



Title	外耳道癌における聴覚機能温存治療と臨床病理学的解析に基づく予後規定因子の探求
Author(s)	森田, 真也
Description	配架番号 : 1692
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	乙第7011号
Issue Date	2017-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r7011
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65956
Type	doctoral thesis
File Information	Shinya_Morita.pdf



学 位 論 文

外耳道癌における聴覚機能温存治療と
臨床病理学的解析に基づく予後規定因子の探求

(The research for the preservation of hearing
function after treatment and the prognostic factor
based on the clinicopathological analysis for
external auditory canal cancer)

2017 年 3 月

北 海 道 大 学

森田 真也

Shinya Morita

学 位 論 文

外耳道癌における聴覚機能温存治療と
臨床病理学的解析に基づく予後規定因子の探求

(The research for the preservation of hearing
function after treatment and the prognostic factor
based on the clinicopathological analysis for
external auditory canal cancer)

2017 年 3 月

北 海 道 大 学

森田 真也

Shinya Morita

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
1. 本論文全体の緒言	3 頁
2. 略語表	11 頁
3. 第一章 外耳道癌における予後規定因子の検索	
3-1. 本章に関連した緒言	13 頁
3-2. 実験方法	14 頁
3-3. 実験結果	17 頁
3-4. 考察	24 頁
4. 第二章 早期外耳道癌に対する聴覚機能温存手術に関する検討	
4-1. 本章に関連した緒言	27 頁
4-2. 実験方法	28 頁
4-3. 実験結果	31 頁
4-4. 考察	39 頁
5. 第三章 外耳道癌組織における免疫組織化学的手法に基づく発現分子解析	
5-1. 本章に関連した緒言	42 頁
5-2. 実験方法	44 頁
5-3. 実験結果	47 頁

5-4. 考察	54 頁
6. 総括および結論	57 頁
7. 謝辞	59 頁
8. 引用文献	60 頁

1. 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

原著論文

1. **Shinya Morita**, Yuji Nakamaru, Akihiro Homma, Tomohiro Sakashita, Masayori Masuya, Satoshi Fukuda. Hearing preservation after lateral temporal bone resection for early-stage external auditory canal carcinoma. *Audiol Neurotol*. 2014;19(6):351-7.
2. **Shinya Morita**, Yuji Nakamaru, Akihiro Homma, Tomohiro Sakashita, Hiromitsu Hatakeyama, Masayori Masuya, Satoshi Fukuda. Comparison of hearing outcomes after treatment for early-stage external auditory canal cancer. *Head Neck*. 2016;38 Suppl 1:E1110-6.
3. **Shinya Morita**, Akihiro Homma, Yuji Nakamaru, Tomohiro Sakashita, Hiromitsu Hatakeyama, Satoshi Kano, Atsushi Fukuda, Satoshi Fukuda. The Outcomes of Surgery and Chemoradiotherapy for Temporal Bone Cancer. *Otol Neurotol*. 2016;37(8):1174-82.
4. **Shinya Morita**, Yuji Nakamaru, Akihiro Homma, Shinichiro Yasukawa, Hiromitsu Hatakeyama, Tomohiro Sakashita, Satoshi Kano, Atsushi Fukuda, Satoshi Fukuda. Expression of p53, p16, cyclin D1, epidermal growth factor receptor and Notch1 in patients with temporal bone squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol*. 2016 Aug 3:Epub ahead of print.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

国際学会

1. **Shinya Morita**, Yuji Nakamaru, Akihiro Homma, Tomohiro Sakashita, Hiromitsu Hatakeyama, Masayori Masuya, Satoshi Fukuda.
Comparison of hearing outcomes after treatment for early stage external auditory canal cancer. 3rd Congress of European ORL-HNS, Prague, Czech Republic. June 7-11, 2015.
2. **Shinya Morita**, Akihiro Homma, Yuji Nakamaru, Tomohiro Sakashita, Takatsugu Mizumachi, Atsushi Fukuda, Satoshi Fukuda. Management for temporal bone cancer: A single institution experience. 10th International Conference on Cholesteatoma and Ear Surgery, Edinburgh, UK. June 5-8, 2016.

国内学会

1. **森田真也**、中丸裕爾、榊谷将偉、福田諭. 早期外耳道癌に対して外側側頭骨切除術に一期的鼓室形成術を施行した4症例. 第22回 日本耳科学会総会・学術講演会、名古屋市. 2012年10月4-6日.
2. **森田真也**、中丸裕爾、榊谷将偉、福田諭. 早期外耳道癌症例における治療前後の聴力に関する検討. 第115回 日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会、福岡市. 2014年5月14-17日.
3. **森田真也**、中丸裕爾、榊谷将偉、福田諭. 早期外耳道癌症例における治療前後の聴力に関する検討. 第26回 日本頭蓋底外科学会総会・学術講演会、千葉市. 2014年6月19-20日.
4. **森田真也**、中丸裕爾、榊谷将偉、福田諭. 早期外耳道癌症例における治療前後の聴力に関する検討. 第24回 日本耳科学会総会・学術講演会、新潟市. 2014年10月15-18日.

1. 本論文全体の緒言

1-1. 外耳道癌

外耳道癌は 100 万人に 1 人の発生頻度で、頭頸部癌全体の約 0.2% を占める希少疾患である^{1,2}。外耳炎などの慢性炎症および耳かきなどによる機械的刺激が発生要因になり、他の頭頸部癌とは異なり飲酒・喫煙の影響は少ないと考えられている³。組織型については、他の頭頸部癌と同様に扁平上皮癌が大多数を占め、その他に腺様嚢胞癌、腺癌、基底細胞癌、小細胞癌などがある³。治療成績を比較検討する上で標準的な病期分類が確立していることが必要だが、American Joint Committee on Cancer (AJCC) においては規定がなく、複数の分類方法が提唱されている（表 1、表 2）^{2,4-6}。

T 分類	所見
1	外耳道内に限局し、骨・軟部組織への進展を伴わない腫瘍
2	骨部外耳道の部分浸潤、または限局した軟部組織浸潤 (<0.5 cm) を伴う腫瘍
3	骨部外耳道に全層浸潤および限局した軟部組織浸潤 (<0.5 cm) を伴う腫瘍、または中耳や乳突蜂巣に浸潤した腫瘍
4	蝸牛、錐体尖、中耳内側壁、頸動脈管、頸静脈孔、硬膜に進展する腫瘍、または顎関節や茎状突起などの軟部組織浸潤 (>0.5 cm) を伴う腫瘍、または顔面神経麻痺を伴う腫瘍

表 1. Pittsburgh 大学の提唱する外耳道癌における T 分類^{2,4}

T 分類	所見
1	外耳道または中耳腔内に限局し、顔面神経麻痺や骨破壊を伴わない腫瘍
2	側頭骨内に進展し、顔面神経麻痺や骨破壊を伴う腫瘍
3	側頭骨外（硬膜、頭蓋底、耳下腺、顎関節など）に進展する腫瘍
X	原発腫瘍の評価が不可能

表 2. Stell らの提唱する外耳道・中耳癌における T 分類⁵

これらの病期分類方法はいずれも原発巣の進行度を表す T 分類のみであり、N 分類および M 分類については AJCC による頭頸部癌の分類方法を参考にしているのが現状で（表 3）⁷、世界的に統一されたものはない。

N 分類	所見
0	所属リンパ節転移なし
1	同側の単発性リンパ節転移で最大径 3 cm 以下
2a	同側の単発性リンパ節転移で最大径 3 cm をこえるが 6 cm 以下
2b	同側の多発性リンパ節転移で最大径 6 cm 以下
2c	両側あるいは対側のリンパ節転移で最大径 6 cm 以下
3	最大径 6 cm をこえるリンパ節転移
M 分類	
0	遠隔転移なし
1	遠隔転移あり

表 3. AJCC 第 7 版による頭頸部癌における N 分類、M 分類⁷

治療法に関しては、現時点では手術を中心とした治療が標準的と考えられており、腫瘍の進展範囲が重要な予後規定因子と推測されている²。

1-2. 外耳道と側頭骨の解剖

外耳道は軟骨部と骨部に分けられ、骨部外耳道は大部分を占める側頭骨の鼓室部と上方の鱗部および後方の乳突部によって構成されている。図1に示すように⁸、側頭骨内には聴覚機能を担う中耳および内耳、第VII-XII脳神経、内頸動脈、S状静脈洞などの重要な神経系や脈管系が存在し、非常に複雑な解剖学的構造になっている。また、側頭骨の前方は耳下腺および顎関節、上方・後方は頭蓋底（硬膜、脳実質）、下方は頸静脈球および頸動脈管が隣接する。

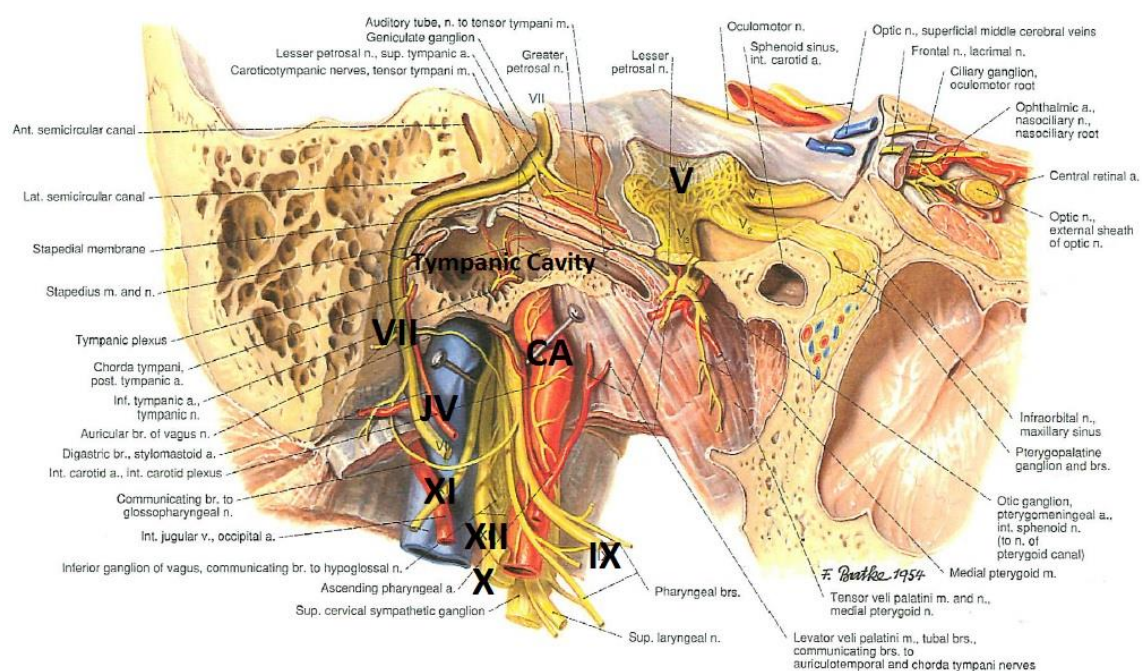


図1. 側頭骨の解剖（Pernkopf Anatomy から引用⁸）

V：三叉神経、VII：顔面神経、IX：舌咽神経、X：迷走神経、XI：副神経、XII：舌下神経、CA：carotid artery（頸動脈）、JV：jugular vein（頸静脈）

1-3. 聴覚機能と聴力検査

外耳道は一端が鼓膜で閉鎖された管状構造であり、2500-4000 Hz 付近で共鳴による音圧増強作用を持ち、増幅の程度は約 10 dB である。外耳道から入った音波は中耳に到達し、耳小骨連鎖の特異な形状から槌子のような作用関係によって音圧が増幅される。また、音の振動エネルギーが面積の広い鼓膜から狭いアブミ骨底板に集約されることでも音圧が増幅される。中耳による音圧増強作用の程度は約 25-30 dB である。外耳および中耳で増幅された音響の機械的エネルギーは蝸牛に到達すると、コルチ器に存在する有毛細胞の興奮によって電気エネルギーに転換され、聴覚中枢へと情報伝達される。

純音聴力検査の目的は、聴力障害の程度と病変の存在部位を評価することである。気導聴力閾値は、ヘッドフォンを用いて外耳道口から純音を呈示して測定する。骨導聴力閾値は、耳介後方の乳突部に振動体（端子）を接触させて、外耳・中耳を経由せずに直接内耳に純音を呈示して測定する。気導聴力閾値と骨導聴力閾値の差から、障害部位が外耳・中耳に起因する伝音難聴なのか、内耳・後迷路に起因する感音難聴なのかを鑑別できる（図 2）。

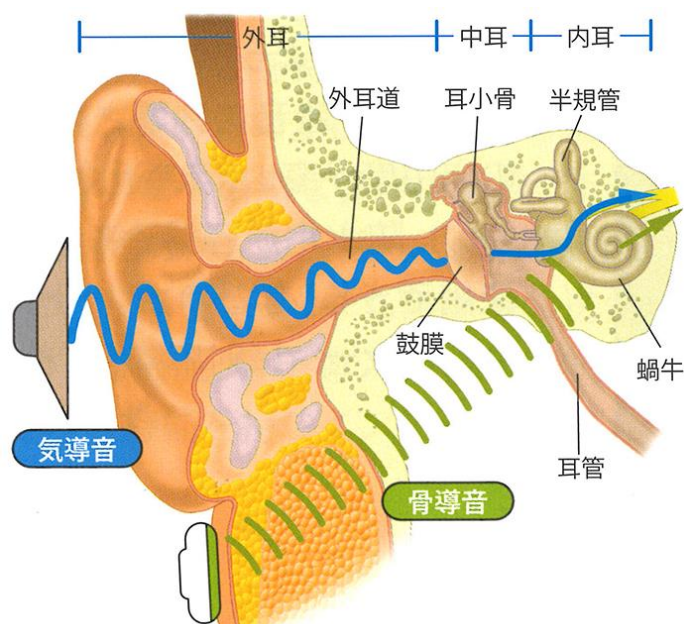


図 2. 気導聴力と骨導聴力 (<http://www.temco-j.co.jp/whatis/>から改編して引用)

1-4. 外耳道癌の進展形式に応じた切除範囲と限界

図3に示すように²⁾、外耳道内の皮膚に発生した腫瘍は、①耳下腺および顎関節、②耳介周囲の皮膚・皮下組織、③鼓膜を經由して中耳腔、④乳突蜂巣を經由して顔面神経や頭蓋底（硬膜、脳実質、S状静脈洞）、⑤前鼓室および耳管、⑥内耳および内耳道、⑦側頭下窩、⑧頸動脈・頸静脈および下位脳神経などに浸潤していく。術式は腫瘍の進展範囲に応じて、外耳道部分切除術、外側側頭骨切除術、側頭骨垂全摘出術、側頭骨全摘出術などが選択される。

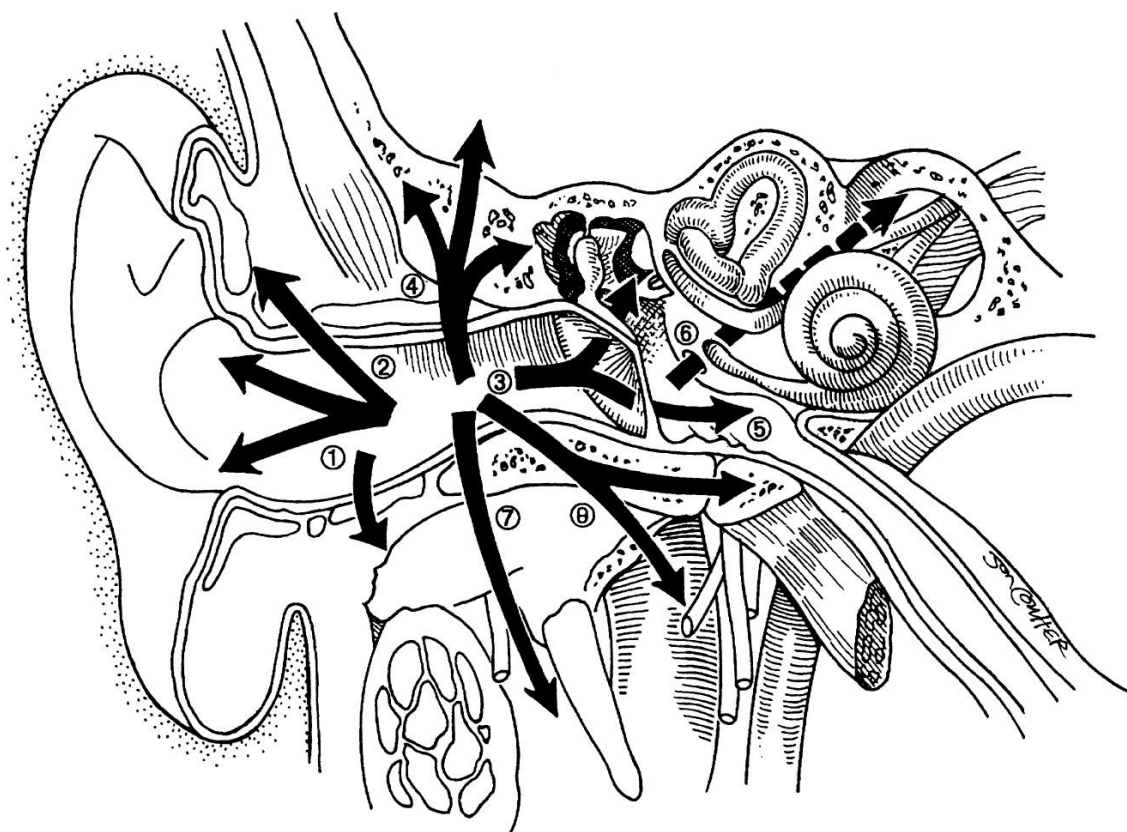


図3. 外耳道癌の進展経路（Moody らの論文から引用²⁾）

①耳下腺および顎関節、②耳介周囲の皮膚・皮下組織、③鼓膜を經由して中耳腔、④乳突蜂巣を經由して顔面神経や頭蓋底（硬膜、脳実質、S状静脈洞）、⑤前鼓室および耳管、⑥内耳および内耳道、⑦側頭下窩、⑧頸動脈・頸静脈および下位脳神経などに浸潤

術式ごとの切除範囲は図 4 に示すように⁹⁾、外耳道部分切除術については、鼓膜外側までの軟骨部および骨部外耳道の一部を摘出する。外側側頭骨切除術は、鼓膜内側の中耳腔まで開放して軟骨部および骨部外耳道を全周性に摘出する。側頭骨亜全摘出術は、この切除範囲に内耳を含め、中頭蓋窩および後頭蓋窩を開放する。側頭骨全摘出術は、さらに錐体尖まで拡大して摘出する方法である。十分な安全域を確保して腫瘍を一塊に切除することが肝要であるが、側頭骨の複雑な解剖学的構造から切除範囲に関しては議論がある。

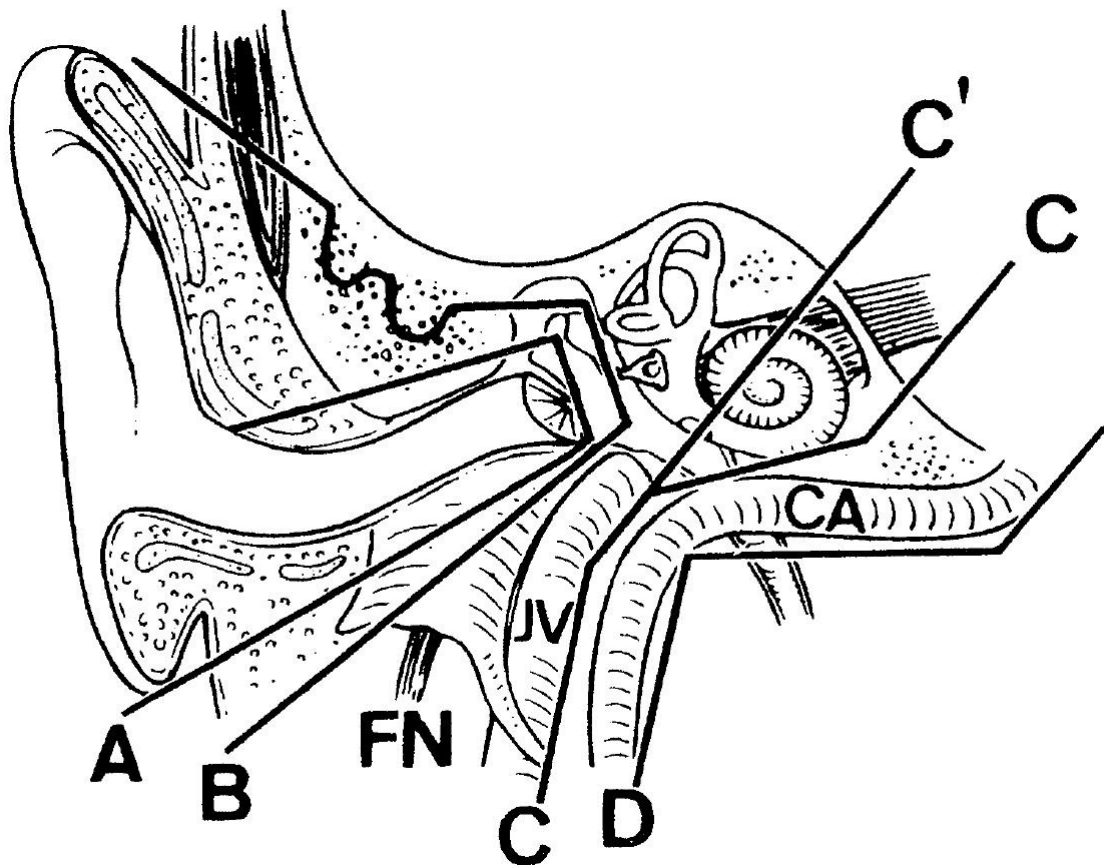


図 4. 術式ごとの切除範囲（丹生らの論文から引用⁹⁾）

A : 外耳道部分切除術、B : 外側側頭骨切除術、C : 側頭骨亜全摘出術、D : 側頭骨全摘出術、FN : facial nerve（顔面神経）、JV : jugular vein（頸静脈）、CA : carotid artery（頸動脈）

外耳道内に限局する早期例に対しては、腫瘍の完全切除によって予後良好と報告されているものの、根治性が優先されるため聴覚機能温存を考慮されることは少ない^{10,11}。また、進行例に対しては、重要構造物の損傷から致死的な周術期合併症を高率に引き起こすため切除範囲の十分な安全域を確保することは容易ではなく、依然として予後不良な疾患である^{12,13}。中・後頭蓋窩の脳実質、海面静脈洞、内頸動脈などの重要構造物に浸潤している場合は、切除不能進行例とされる¹³。

外耳道癌のリンパ節転移に関しては、まず外耳道前壁の **Santorini** 切痕を経由して耳下腺内リンパ節に転移し、さらに同側の頸部リンパ節へ転移が拡大する²。耳下腺内リンパ節および頸部リンパ節転移陽性例では、耳下腺切除に加えて同側の頸部郭清術が施行される。頸部リンパ節転移の頻度は低いと考えられており、頸部リンパ節転移陰性例では、予防的頸部郭清術および予防照射については施行されないことが多い^{14,15}。

1-5. 外耳道癌に対する化学放射線療法と分子標的治療の現状

外耳道癌に対しては、従来から手術を中心とした治療が行われており、放射線治療（radiotherapy：RT）や化学療法との比較検討の報告は少ない^{2,3,12,13}。切除不能進行例、手術拒否の進行例に対しては、他の頭頸部癌と同様に化学放射線療法（chemoradiotherapy：CRT）が行われることが多いが、標準治療といえる具体的なプロトコールは確立されていない¹³。

多くの他領域の癌において、様々な遺伝子変異および発現分子異常が認められている¹⁶。これらは、腫瘍増殖・浸潤、病期の進行、再発増加、放射線治療や化学療法に対する低感受性など予後規定因子として関与し、それぞれの発現分子をターゲットにした分子標的薬の治療効果も確認されている¹⁷⁻¹⁹。しかし、希少疾患である外耳道癌における分子生物学的解析は世界的にも報告がなく、ある特定の遺伝子変異および発現分子異常を同定できれば新しい予後規定因子として臨床上有用であり、これらに対する標的治療の確立によって外耳道癌患

者の予後改善につながることも期待される。

1-6. 本論文の目的

本論文では先ず、第一章において外耳道癌における予後規定因子について明らかにし、第二章において予後良好と推測される早期外耳道癌に対する聴覚機能温存手術について検討し論ずる。さらに第三章においては、外耳道癌組織標本を用いて特定の遺伝子変異および発現分子異常を免疫組織化学的手法により解析することで新たな予後規定因子となりえるのか検討する。

1-7. 本論文で明らかになったこと

外耳道癌においては、原発巣の進行度分類法の一つである Pittsburgh 分類が独立した予後規定因子として示された。早期例に関しては腫瘍の根治性だけでなく聴覚機能温存も求められ、外側側頭骨切除術の際に分層植皮を用いて外耳形成および鼓室形成を加える方法は有用性が高いと考えられた。また、免疫組織化学的検討を行った結果、EGFR および Notch1 発現が予後規定因子となりえる可能性が示唆された。

2. 略語表

本文中、ならびに図中で使用した略語は以下の通りである。

AJCC	American Joint Committee on Cancer
CA	carotid artery
CRT	chemoradiotherapy
dB	decibel
EGFR	epidermal growth factor receptor
FN	facial nerve
GBI	Glasgow Benefit Inventory
hr	hour
Hz	hertz
JV	jugular vein
PS	performance status
QOL	quality of life
RADPLAT	radiotherapy and concomitant intraarterial cisplatin
RT	radiotherapy

第一章

外耳道癌における予後規定因子の検索

3-1. 本章に関連した緒言

外耳道癌は希少疾患のため evidence level の高い臨床的研究は少なく、治療方針の選択や予後規定因子などに関して世界的に統一された見解が得られていない状況である²⁰。治療成績の比較検討を困難にする要因として、AJCC などによる世界標準的な病期分類が規定されていなかったことが挙げられる。1985 年に Stell らが臨床症状および画像所見に基づいた外耳・中耳癌の病期分類を提唱したが、骨浸潤や軟部組織浸潤の状態を詳細に評価してなかった⁵。しかし、1990 年に Pittsburgh 大学が原発巣の進展範囲を細分化した病期分類を提唱し⁴、2000 年に改訂して以降は²、同一の病期分類を用いての報告が多く見られる。T1-2 症例では 5 年生存率 80-100%と予後良好であるのに対し、側頭骨内の重要構造物に浸潤する T4 症例においては 5 年生存率 40%以下と予後不良である^{2,3}。

治療法に関しては手術を中心とした報告が多く、病理学的な断端所見が重要視されている^{6,21,22}。外耳道内に限局する早期例においては、腫瘍の完全切除による根治が期待できる。一方で、進行例においては、側頭骨の解剖学的構造から切除範囲の十分な安全域を確保することは容易ではなく、拡大手術によって致死的な周術期合併症が高率に発生することも問題となる²³⁻²⁶。CRT については標準治療といえる具体的なプロトコールは確立されていないが、切除不能進行例、手術拒否の進行例に対する治療の選択肢として施行されている^{27,28}。

本章では、Pittsburgh 分類に基づき²、外耳道癌に対する各治療法の成績を評価し、有用な予後規定因子を検索することを目的とした。

3-2. 実験方法

(1) 対象

1997 年 4 月から 2015 年 3 月までの期間に、北海道大学病院耳鼻咽喉科において、根治を目的に手術・RT・CRT を施行した外耳道扁平上皮癌患者を対象として retrospective に検討した。Pittsburgh 分類に従い²、原発腫瘍を T 分類²、AJCC 第 7 版による頭頸部癌の病期分類に従い⁷、頸部リンパ節転移を N 分類、遠隔転移を M 分類として病期を決定した。各治療法および病期における生存率を解析し、年齢、性別、病悩期間、喫煙習慣、飲酒習慣、外耳道炎の既往、中耳手術歴、T 分類、N 分類、組織学的分化度、病理学的切除断端の臨床病理学的因子を加えて、予後規定因子を検索した。

(2) 治療方法

治療法は、耳鼻咽喉科、放射線治療科、腫瘍内科の医師で構成される Cancer Board にて個々の症例ごとに検討し、患者・家族と話し合って最終的に決定された。

基本的な治療方針は、T1-2 症例に対しては、外側側頭骨切除術を第一選択とした。切除後の外耳道については、側頭筋弁・骨膜弁などの局所弁および分層植皮にて形成した。病理学的に切除断端陽性の場合、術後 RT を追加した。また、高齢・重篤な合併症・performance status (PS) 不良で手術が適応されない場合や患者の希望に応じて RT 単独での治療も選択された。

T3-4 症例に対しては、外側側頭骨切除術または側頭骨亜全摘出術を行い、全例において術後 CRT を施行した。切除による欠損部は、側頭筋弁・骨膜弁などの局所弁にて充填・被覆した。耳下腺内への直接浸潤例では、耳下腺合併切除を行った。また、耳下腺内リンパ節および頸部リンパ節転移陽性例においては、耳下腺切除に加えて同側の頸部郭清術を施行した。中・後頭蓋窩の脳実質、海面静脈洞、内頸動脈などの重要構造物に浸潤している場合は、切除不能進行

例として CRT が選択された。

(3) 化学放射線療法 (CRT)

RT は 3 次元原体照射にて、根治照射として総量 60-70 Gy を 6-7 週間かけて施行された。化学療法のプロトコールは、病期、年齢、合併症の有無、PS、治療開始の時期、患者の希望などにより、3 剤併用化学療法 (TPF 療法)、シスプラチン週 1 回投与 (weekly CDDP 療法)、超選択的動注療法 (RADPLAT; radiotherapy and concomitant intraarterial cisplatin) から選択された。

TPF 療法については、Shiga らの文献に従って²⁸、第 1 日にドセタキセル 50 mg/m²、第 4 日にシスプラチン 60 mg/m²を経静脈的に投与し、第 1-5 日に 5-FU 600 mg/m²を持続点滴投与した。休薬期間を 3 週間として、合計 2-3 回の投与を行った。

weekly CDDP 療法については、Homma らの文献に従って²⁹、週 1 回経静脈的にシスプラチン 40 mg/m²投与した。4 週目は予定休止として、合計 6 回の投与を行った。

RADPLAT については、Homma らの文献に従って³⁰、腫瘍の栄養血管にマイクロカテーテルをセルディンガー法により超選択的に挿入し、週 1 回経動脈的にシスプラチン 100-120 mg/m²を投与した。シスプラチン動注開始と同時に経静脈的にチオ硫酸ナトリウム 24 g/body を 100 ml/hr の滴下速度で投与してシスプラチンの中和を行った。放射線照射期間中に、合計 6 回の投与を行った。

RT および CRT による有害事象に関しては、Common Terminology Criteria for Adverse Events version 4.0 を用いて判定した³¹。

(4) 統計学的手法

統計解析ソフトウェア JMP version 10.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて統計解析を行った。2 群間の差の比較には Mann-Whitney U

検定、3 群間以上の差の比較には Kruskal-Wallis 検定を用いた。粗生存率は Kaplan-Meier 法により算出し、差の比較は log rank 検定により行った。単変量・多変量解析には Cox 比例ハザードモデルを用いた。 p 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意であると判定した。

(5) 倫理面への配慮

尚、本研究は、北海道大学病院高度先進医療支援センターにおける自主臨床研究審査委員会の審査を受け承認された「早期外耳道癌に対して外側側頭骨切除術に一期的鼓室形成術を施行した症例の検討(自主臨床研究番号 012-0150)」、「早期外耳道癌症例に対する治療前後の聴力に関する検討(自主臨床研究番号 013-0316)」、「外耳道扁平上皮癌における遺伝子変異および発現解析(自主臨床研究番号 015-0149)」の一環として、「ヘルシンキ宣言」および「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」(平成 26 年文部科学省・厚生労働省告示第 3 号)を遵守して実施された。

3-3. 実験結果

(1) 対象症例の臨床的特徴

対象とした外耳道扁平上皮癌は 66 例（男性 35 例、女性 31 例）であり、年齢 29-88 歳（中央値 65 歳）、追跡観察期間 6-120 カ月（中央値 37.5 カ月）、病悩期間 1-27 カ月（中央値 5 カ月）、習慣的な喫煙歴のあったものは 34 例（51.5%）、習慣的な飲酒歴のあったものは 30 例（45.5%）、外耳道炎の既往のあったものは 34 例（51.5%）、中耳手術歴のあったものは 9 例（13.6%）であった。組織学的分化度に関しては、高分化型 47 例（71.2%）、中等度分化型 14 例（21.2%）、低分化型 5 例（7.6%）であった。病期分類に関しては、T 分類について T1 : 24 例（36.7%）、T2 : 14 例（21.1%）、T3 : 14 例（21.1%）、T4 : 14 例（21.1%）であり、N 分類について N0 : 54 例（81.8%）、N1 : 8 例（12.1%）、N2a : 2 例（3.0%）、N2b : 2 例（3.0%）であった（表 4）。

T 分類	N 分類				総数
	0	1	2a	2b	
1	24				24
2	13	1			14
3	8	3	2	1	14
4	9	4		1	14
総数	54	8	2	2	66

表 4. 対象 66 例の病期分類

病期分類による治療別内訳を表 5 に示す。

T 分類	治療方法				総数
	手術単独	手術 + (C)RT	RT 単独	CRT	
1	13		11		24
2	4	5	5		14
3		8	2	4	14
4		4	2	8	14
総数	17	17	20	12	66

表 5. 病期分類別の治療法の内訳

外側側頭骨切除術を 31 例に対して行い、内訳は T1 : 13 例、T2 : 9 例、T3 : 7 例、T4 : 2 例であった。側頭骨垂全摘出術を 3 例に対して行い、内訳は T3 : 1 例、T4 : 2 例であった。手術治療された T2 症例のうち 5 例では、病理学的に切除断端陽性であったため術後 RT（そのうち 3 例は weekly CDDP 療法併用）を施行した。手術治療された T3 および T4 症例については、全例において術後 RT を施行（そのうち 1 例は TPF 療法併用）した。手術治療が選択されなかった T3-4 症例の 16 例においては、4 例で RT 単独、12 例で CRT（そのうち 4 例は TPF 療法併用、6 例は weekly CDDP 療法併用、2 例は RADPLAT）を施行した。

(2) 病期分類と生存率との関連

外耳道扁平上皮癌における病期分類に応じた生存曲線について図 5a,b に示す。

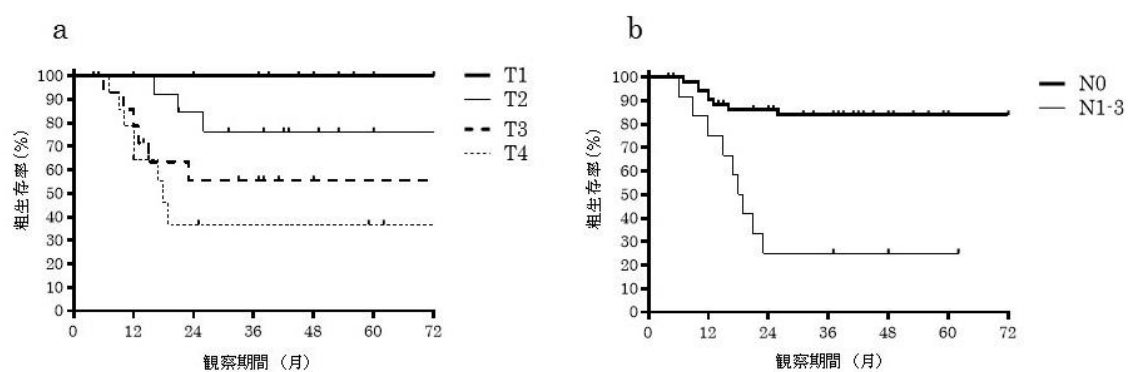


図 5. 病期分類による生存曲線

a) T 分類別の粗生存率、b) N 分類別の粗生存率

T 分類別の 5 年粗生存率は、T1 : 100%、T2 : 76.2%、T3 : 55.6%、T4 : 36.7% であった。N 分類別の 5 年粗生存率は、N0 : 83.8%、N1-3 : 25.0% であった。T 分類および N 分類ともに、病期の進行に伴って有意に予後不良であった ($p<0.001$ 、 $p<0.001$)。

(3) 治療方法と生存率との関連

外耳道扁平上皮癌に対する治療方法による生存曲線を図 6a,b に示す。

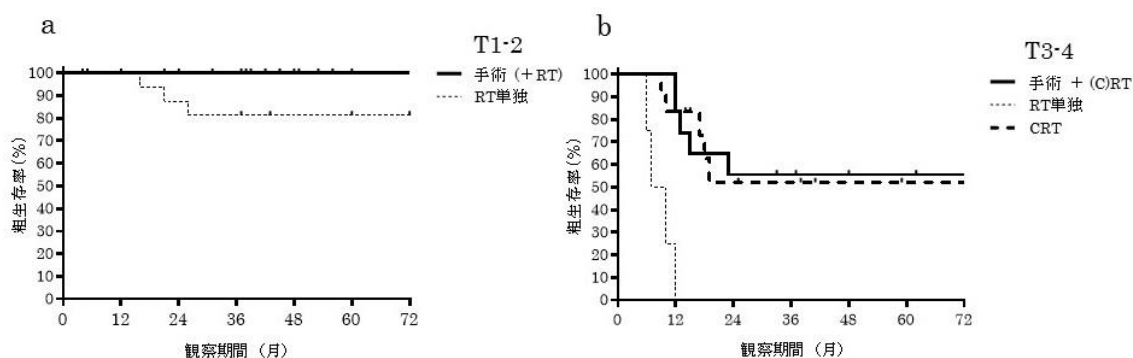


図 6. 治療方法による生存曲線

a) T1-2 に対する治療法別の粗生存率、b) T3-4 に対する治療法別の粗生存率

T1-2 症例においては、手術治療群の 5 年粗生存率は 100%であり、RT 単独群は 81.3%であった。手術治療の方が予後良好である傾向が認められたものの、統計学的な有意差は得られなかった ($p=0.063$)。RT 単独群のうち T1 は 11 例全例生存しているものの、T2 の 5 例中 3 例においては局所再発にて原病死した。再発までの期間は、10-16 カ月 (中央値 13 カ月) であった。

T3-4 症例においては、手術+RT 群の 5 年粗生存率は 55.6%であり、CRT 群は 52.1%であった。これらの 2 群間における 5 年粗生存率について、統計学的な有意差は得られなかった ($p=0.93$)。再発までの期間は、手術+RT 群においては 2-46 カ月 (中央値 5 カ月)、CRT 群においては 3-11 カ月 (中央値 5 カ月) であった。

(4) 予後規定因子の検索

各臨床病理学的因子による 5 年粗生存率および Cox 比例ハザードモデルによる単変量解析結果について表 6 に示す。

	総数	5年粗生存率 (%)	ハザード比	95%信頼区間	p 値
全体	66	72.0			
年齢					
60歳未満	32	72.8			
60歳以上	34	71.5	1.00	0.39-2.61	0.99
性別					
女性	31	76.6			
男性	35	69.6	1.12	0.43-2.92	0.82
病悩期間					
6ヵ月未満	35	71.9			
6ヵ月以上	31	72.0	1.00	0.38-2.58	0.99
喫煙習慣					
なし	32	71.9			
あり	34	73.0	0.90	0.35-2.34	0.83
飲酒習慣					
なし	36	74.1			
あり	30	69.7	1.09	0.42-2.83	0.86
外耳道炎の既往					
なし	32	67.5			
あり	34	76.3	0.65	0.25-1.68	0.37
中耳手術歴					
なし	57	73.3			
あり	9	63.5	1.50	0.38-6.73	0.52
T 分類					
T1-2	38	91.0			
T3-4	28	46.7	8.64	3.11-22.8	<0.001
N 分類					
N0	54	83.8			
N1-3	12	25.0	6.20	5.05-70.6	<0.001
組織学的分化度					
高分化型	47	75.5			
中-低分化型	29	62.3	1.39	0.50-4.10	0.51
手術治療					
なし	32	60.7			
あり	34	83.2	0.37	0.14-1.00	0.052
放射線治療					
なし	17	100			
あり	49	63.5	4.08	1.41-11.8	0.010
化学療法					
なし	51	74.7			
あり	15	60.7	1.59	0.53-5.52	0.37
病理学的切除断端					
陰性	18	100			
陽性	16	65.0	9.82	1.66-58.1	0.012

表 6. 臨床病理学的因子による 5 年粗生存率・Cox 比例ハザードモデルによる単変量解析

単変量解析から有意差が得られた因子は、T 分類、N 分類、放射線治療の有無であった ($p<0.001$ 、 $p<0.001$ 、 $p=0.010$)。手術治療を施行した症例においては、病理学的切除断端が予後と有意に関連していた ($p=0.012$)。一方、年齢、性別、病悩期間、喫煙習慣、飲酒習慣、外耳道炎の既往、中耳手術歴、組織学的分化度、手術、化学療法などの因子における 5 年粗生存率に関しては、それぞれ有意差を認めなかった ($p=0.99$ 、 $p=0.82$ 、 $p=0.99$ 、 $p=0.83$ 、 $p=0.86$ 、 $p=0.37$ 、 $p=0.52$ 、 $p=0.51$ 、 $p=0.052$ 、 $p=0.37$)。

これらの検討因子について Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析を行ったところ、T 分類のみが独立した予後規定因子として示された (ハザード比 5.66、95%信頼区間 1.51-27.0、 $p=0.015$)。

(5) 有害事象

RT および CRT による有害事象を表 7 に示す。

有害事象	治療方法		
	手術 + (CRT)	RT 単独	CRT
皮膚炎			
Grade 1-2	17 (100%)	20 (100%)	11 (91.7%)
Grade 3	0 (0%)	0 (0%)	1 (8.3%)
粘膜炎			
Grade 1-2	5 (29.4%)	6 (30.0%)	5 (41.7%)
Grade 3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
貧血			
Grade 1-2	4 (23.5%)	1 (5.0%)	9 (75.0%)
Grade 3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
白血球減少			
Grade 1-2	4 (23.5%)	1 (5.0%)	6 (50.0%)
Grade 3	0 (0%)	0 (0%)	2 (16.7%)
好中球減少			
Grade 1-2	4 (23.5%)	1 (5.0%)	6 (50.0%)
Grade 3	0 (0%)	0 (0%)	2 (16.7%)
血小板減少			
Grade 1-2	0 (0%)	0 (0%)	2 (16.7%)
Grade 3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
肝機能障害			
Grade 1-2	1 (5.9%)	0 (0%)	1 (8.3%)
Grade 3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
低 Na 血症			
Grade 1-2	2 (11.8%)	0 (0%)	3 (25.0%)
Grade 3	0 (0%)	0 (0%)	2 (16.7%)
高 K 血症			
Grade 1-2	0 (0%)	0 (0%)	2 (16.7%)
Grade 3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
嘔気・嘔吐			
Grade 1-2	2 (11.8%)	0 (0%)	4 (33.3%)
Grade 3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

表 7. RT および CRT による有害事象

CRT 群においては、手術+(C)RT 群および RT 単独群と比較して有害事象の発生頻度が多い傾向が認められたものの、そのほとんどが Grade1-2 であった。Grade3 の有害事象として、皮膚炎 1 例、白血球減少 2 例、好中球減少 2 例、低 Na 血症 2 例に認められたが、全例治療完遂できた。骨壊死、脳壊死、脳浮腫、脳膿瘍、髄膜炎などの重篤な晩期障害は認めていない。

手術合併症に関して表 8 に示す。

合併症	治療方法	
	手術単独	手術 + (C)RT
早期		
創傷治癒遅延	0 (0%)	5 (29.4%)
めまい	1 (5.9%)	3 (17.6%)
分層植皮壊死	0 (0%)	2 (11.8%)
顔面神経麻痺	0 (0%)	1 (5.9%)
晩期		
難聴	7 (41.1%)	12 (70.6%)
局所弁壊死	0 (0%)	2 (11.8%)
骨露出	0 (0%)	2 (11.8%)

表 8. 手術合併症

手術+(C)RT 群においては、手術単独群と比較して合併症の発生頻度が多い傾向が認められた。術後 RT にて分層植皮壊死および局所弁壊死による骨露出を 2 例において認めたが、軟膏処置などの保存的治療で改善した。術後癒痕形成による外耳道狭窄および難聴を 19 例において認め、術後 RT にて発生頻度が多くなる傾向であった。大血管からの出血、脳壊死、脳浮腫、脳膿瘍、髄膜炎などの致死的な合併症は認めていない。

3-4. 考察

本研究における外耳道癌の5年粗生存率は、T1にて100%、T2にて76.2%、T3にて55.6%、T4にて36.7%であり、多変量解析によってT分類が独立した予後規定因子として示された。希少疾患のため単一施設での解析困難で、AJCCなどによる世界標準的な病期分類が規定されていなかったことを考慮すると、2000年に改訂されたPittsburgh病期分類²の有用性を確認できた意義は大きい。早期診断の重要性は他の悪性疾患と同様であるが、外耳道癌に特異的な臨床症状はなく、耳漏・耳痛・難聴などを呈して外耳炎や中耳炎として漫然と治療されることも多いため、日常診療において難治性の外耳炎に対しては必ず念頭に置くべき疾患である^{3,12,20}。

早期外耳道癌に対する治療法に関しては、T1症例において外側側頭骨切除術またはRT単独、T2症例において外側側頭骨切除術および術後RTの有用性が報告されている^{3,20,32-34}。本研究においてもこの結果は同様であり、腫瘍の完全切除によって極めて高い生存率が期待できるが、病理学的切除断端が手術治療における予後規定因子と示唆された。T1-2症例に対する外耳道部分切除術の報告も散見されるが、外側側頭骨切除術は切除範囲の十分な安全域を確保可能で、切除断端陽性となる可能性が低い根治性の高い手術と考えられる^{34,35}。RTに関しては、T2症例において局所再発を3例に認めたものの、T1症例に限ると11例全例生存しており、手術治療と同様に有用性が示された。第二章では、予後良好な早期外耳道癌に対する聴覚機能温存を考慮に入れた治療法に関して検討したい。

一方、外耳道癌進行例に対する治療法に関しては、世界的に統一された見解は得られていない^{3,20,27,28}。側頭骨全摘出術などの拡大手術にても、解剖学的構造から切除断端陽性となる可能性が高いため根治性が低い上に、周術期死亡率が18.7%と高率に発生する²³⁻²⁶。Prasadらも、進行例に対する手術治療の限界を報告している²³。本研究においては、T3-4症例に対する手術治療とCRTの5年粗生存率は、それぞれ55.6%、52.1%と同等であった。CRTを施行した

群には切除不能進行例が含まれていることを考慮すると、特に側頭骨外に浸潤する T4 症例に対する CRT の予後改善に関しては期待できる。Takenaka らの meta-analysis にても、手術治療と CRT の 5 年粗生存率は、それぞれ 53.5%、43.6%と報告しており²⁷、本研究と同様に CRT について一定の有用性を示唆する。CRT のプロトコールに関する具体的な比較検討はなく、未だに標準治療として確立されたものはないが^{27,28}、近年では TPF 療法の同時併用による CRT の有効性を示す報告が散見される^{28,36}。本研究においても、TPF 療法の同時併用による CRT を行った 4 例中 3 例で無病生存しており有用性が示唆される。一方、weekly CDDP 療法に関しては、認容性が高いものの、6 例中 3 例は局所再発しており根治性がやや低いと考えられる²⁹。また、外耳道癌では腫瘍の栄養血管が複数存在して単純ではない場合が多く、RADPLAT の良い適応とはならないと考えている³⁰。

CRT の有害事象として、Grade3 の皮膚炎、白血球減少、好中球減少、低 Na 血症を認めたが、治療完遂に際して支障なく、重篤な晩期障害は認めていない。他の頭頸部癌では重篤な粘膜炎が治療完遂の支障となるが、特に TPF 療法の同時併用による CRT で頻度が高いと報告されている³⁷。外耳道癌においては放射線照射野に口腔・咽頭粘膜が広範囲に含まれないため、進行例に対する治療法として同プロトコールは認容性が高い。

上述のように、外耳道癌進行例に対しては CRT の有用性を示すことができたが、依然として予後不良である。様々な癌腫において発現分子解析が進み、腫瘍増殖・浸潤、病期の進行、再発増加、放射線治療や化学療法に対する低感受性など予後規定因子として関与し、それぞれの発現分子をターゲットにした分子標的薬の治療効果も確認されている¹⁶⁻¹⁹。しかし、外耳道癌においては希少疾患であるために発現分子解析の報告がなく、生存率向上のため新たな予後規定因子、バイオマーカー、治療ターゲットの検索が望まれる。外耳道癌組織標本を用いた発現分子異常の解析については、第三章で検討したい。

第二章

早期外耳道癌に対する聴覚機能温存手術に関する検討

4-1. 本章に関連した緒言

前章で述べたように、外耳道癌においては、**T** 分類が独立した予後規定因子であることが確認できた。**T1** 症例に対しては外側側頭骨切除術または **RT** 単独にて極めて高い生存率が期待でき、**T2** 症例に対しても外側側頭骨切除術にて切除範囲の十分な安全域を確保可能なため、早期外耳道癌の根治性は高い^{3,20,32-34}。そのため、他の頭頸部癌と同様に生存期間中における機能・形態の温存は、考慮すべき重要な課題と判断できる。しかし、外側側頭骨切除術においては、切除範囲に中耳が含まれ、外耳道皮膚の広範な欠損のため上皮化遅延および瘢痕形成に伴う外耳道狭窄が出現する^{10,34}。腫瘍切除によって高い根治性は期待できるものの、難聴の出現は不可避であるため適切な外耳および中耳伝音系の再建法が必要となる^{10,38,39}。また、**RT** の合併症に関しては、外耳道狭窄による伝音難聴に加えて、照射野に内耳が含まれることに起因する感音難聴が報告されている⁴⁰。現在までのところ、外耳道癌に対する治療については生存率にのみ主眼が置かれ、聴覚機能温存も考慮した検討の報告はない。

本章では、早期外耳道癌に対する手術および **RT** による治療前後の聴覚機能を評価し、機能温存の観点から有用と思われる治療法に関して検討することを目的とした。

4-2. 実験方法

(1) 対象

1997 年 4 月から 2015 年 3 月までの期間に、北海道大学病院耳鼻咽喉科において、手術および RT にて治療を施行した早期外耳道扁平上皮癌患者の治療前後の聴覚機能に関して retrospective に検討した。Pittsburgh 分類に従い²、原発腫瘍を T 分類、AJCC 第 7 版による頭頸部癌の病期分類に従い⁷、頸部リンパ節転移を N 分類、遠隔転移を M 分類として病期を決定した。病期 T1N0M0 および T2N0M0 の早期例を対象とし、治療前後で適切な聴力検査が施行されていない症例や姑息的治療を施行した症例については除外した。

T1・2 症例に対しては、外側側頭骨切除術を第一選択として、Hirsh らの文献に従った方法で施行した⁴¹。切除境界ラインについては、内側はキヌタ・アブミ関節、後方は乳突腔、前方は顎関節包、上方は頬骨弓基部、下方は鼓骨、外側は耳甲介軟骨として一塊に切除した。切除後の機能再建として、耳介軟骨を加工してアブミ骨頭の上に乗せ、筋膜を用いて鼓膜形成することで、中耳伝音系を再建した。また、外耳道形成は、側頭筋弁・骨膜弁などの局所弁によって削開した骨部分を被覆する方法（非植皮群、図 7a）と、これらの局所弁を移植床として大腿から採取した皮膚を円筒状に縫合し分層植皮する方法（植皮群、図 7b）のいずれかで施行した。

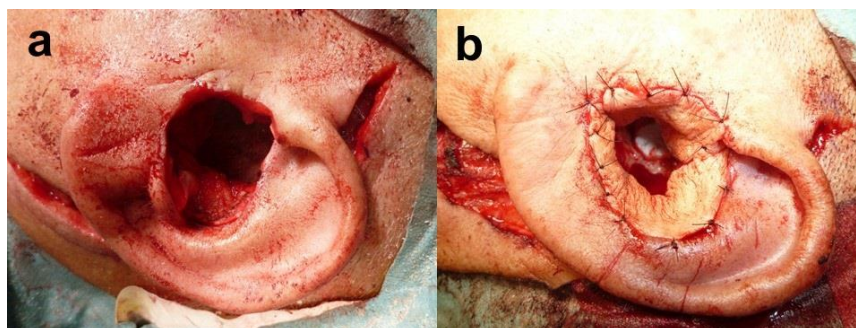


図 7. 外耳道形成方法

a) 非植皮群の外耳道、b) 植皮群の外耳道

病理学的に断端陽性の場合、術後 RT を追加（手術 + RT 群）した。また、高齢・重篤な合併症・PS 不良で手術が適応されない場合や患者の希望に応じて RT 単独での治療も選択（RT 群）された。RT は 3 次元原体照射にて、総量 60-70 Gy を 6-7 週間かけて根治照射した。T1-2 症例に対する治療方法を上記の 4 群に分類し、治療前および治療後 1 年の純音聴力検査を用いて、聴覚機能評価を行った。

(2) 純音聴力検査

純音聴力検査については、オーディオメーター (AA-78, RION, Tokyo, Japan) を用いて、外部の音が完全に遮断された聴力検査室にて言語聴覚士が施行した。気導聴力閾値に関しては 125、250、500、1000、2000、4000、8000 Hz を、骨導聴力閾値に関しては 250、500、1000、2000、4000 Hz を非検耳にバイドノイズで遮蔽しながら測定した。聴力検査は、治療開始前および治療終了後 1、3、6、12 ヶ月に施行した。平均気導聴力閾値および平均骨導聴力閾値については、American Academy of Otolaryngology Head and Neck Surgery Committee on Hearing and Equilibrium Guidelines に従い⁴²、500、1000、2000、4000 Hz における各聴力閾値の算術平均値で求められた。気骨導差については、平均気導聴力閾値と平均骨導聴力閾値の差で算出した。

(3) quality of life (QOL) 質問紙

治療終了後の主観的な健康度、社会生活機能、身体的機能などを評価するため、Glasgow Benefit Inventory (GBI) 質問紙を用いた⁴³。GBI スコアは、-100 から+100 までの範囲で算出され、正の値を示した場合には、治療により QOL 向上したと解釈される。逆に負の値を示した場合には、治療により QOL 低下したと解釈される。

(4) 統計学的手法

統計解析ソフトウェア GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)を用いて統計解析を行った。2 群間の差の比較には Mann-Whitney U 検定、3 群間以上の差の比較には Kruskal-Wallis 検定を用いた。 p 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意であると判定した。

(5) 倫理面への配慮

尚、本研究は、北海道大学病院高度先進医療支援センターにおける自主臨床研究審査委員会の審査を受け承認された「早期外耳道癌に対して外側側頭骨切除術に一期的鼓室形成術を施行した症例の検討(自主臨床研究番号 012-0150)」、「早期外耳道癌症例に対する治療前後の聴力に関する検討(自主臨床研究番号 013-0316)」の一環として、「ヘルシンキ宣言」および「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」(平成 26 年文部科学省・厚生労働省告示第 3 号)を遵守して実施された。

4-3. 実験結果

(1) 対象症例の臨床的特徴

対象とした外耳道扁平上皮癌 35 例（女性 16 例、男性 19 例）を表 9 に示す。

	植皮群	非植皮群	RT 群	手術 + RT 群	<i>p</i> 値
総数	10	7	13	5	
年齢（歳）					0.82
範囲	46-77	39-86	47-88	52-82	
中央値	65.5	65	65	77	
性別					0.17
女性	6	5	4	1	
男性	4	2	9	4	
病期					0.052
T1N0M0	8	5	11	1	
T2N0M0	2	2	2	4	
追跡観察期間（月）					0.18
範囲	18-100	28-79	16-84	26-96	
中央値	30.5	41	60	36	
局所再発	0	0	2	0	0.32

表 9. 対象 35 例の臨床的特徴

年齢 39-86 歳（中央値 65 歳）、追跡観察期間 16-100 ヲ月（中央値 45 ヲ月）であった。病期分類に関しては、T1N0M0 25 例（71.4%）、T2N0M0 10 例（28.6%）であった。植皮群 10 例、非植皮群 7 例、RT 群 13 例、手術+RT 群 5 例からなり、4 群間での年齢、性別、病期、追跡観察期間に関する有意差は認めなかった。

T1 症例においては、4 群とも局所再発や原病死を認めなかった。T2 症例においては、RT 群の 2 例で局所再発を認め、それぞれ治療後 16 ヶ月、26 ヶ月の時点で原病死した。

(2) 治療前後の聴力閾値に関する比較

各群における治療前後の平均気導聴力閾値、平均骨導聴力閾値、気骨導差を図 8a-d に示す。

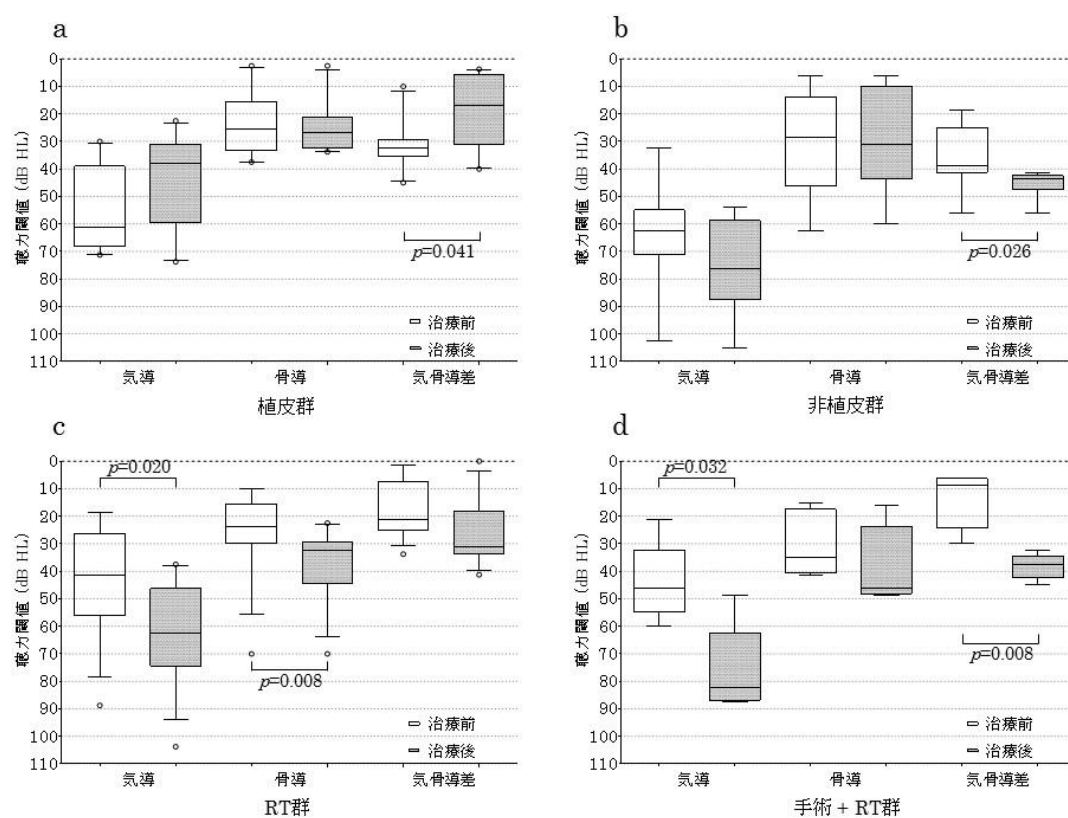


図 8. 治療前後の聴力閾値

a) 植皮群、b) 非植皮群、c) RT 群、d) 手術+RT 群

治療開始前での平均気導聴力閾値、平均骨導聴力閾値、気骨導差については各群間で有意差を認めなかった。

植皮群では、気骨導差が治療前の 31.5 dB HL（中央値 32.5、95%信頼区間 25.1-38.0）から治療後の 19.0 dB HL（中央値 16.9、95%信頼区間 9.2-28.8）に有意な改善を示した（ $p=0.041$ ）。

非植皮群では、気骨導差が治療前の 35.0 dB HL（中央値 38.8、95%信頼区間 23.1-46.9）から治療後の 45.7 dB HL（中央値 43.8、95%信頼区間 41.1-50.4）に有意な増悪を示した（ $p=0.026$ ）。

RT 群では、平均気導聴力閾値が治療前の 42.5 dB HL（中央値 41.3、95%信頼区間 30.1-54.6）から治療後の 62.4 dB HL（中央値 62.5、95%信頼区間 51.0-73.8）に有意な増悪を示した（ $p=0.020$ ）。また、平均骨導聴力閾値も治療前の 25.3 dB HL（中央値 23.8、95%信頼区間 16.0-34.6）から治療後の 37.0 dB HL（中央値 32.5、95%信頼区間 28.9-45.2）に有意な増悪を示した（ $p=0.008$ ）。

手術+RT 群では、平均気導聴力閾値が治療前の 44.3 dB HL（中央値 46.3、95%信頼区間 26.5-62.0）から治療後の 76.3 dB HL（中央値 82.5、95%信頼区間 56.4-96.1）に有意な増悪を示した（ $p=0.032$ ）。また、気骨導差も治療前の 14.0 dB HL（中央値 8.8、95%信頼区間 1.2-26.8）から治療後の 38.3 dB HL（中央値 37.5、95%信頼区間 32.5-44.0）に有意な増悪を示した（ $p=0.008$ ）。

(3) 治療方法に応じた聴覚機能の利得

各群における平均気導聴力閾値、平均骨導聴力閾値、気骨導差の利得に関して図 9a-c に示す。

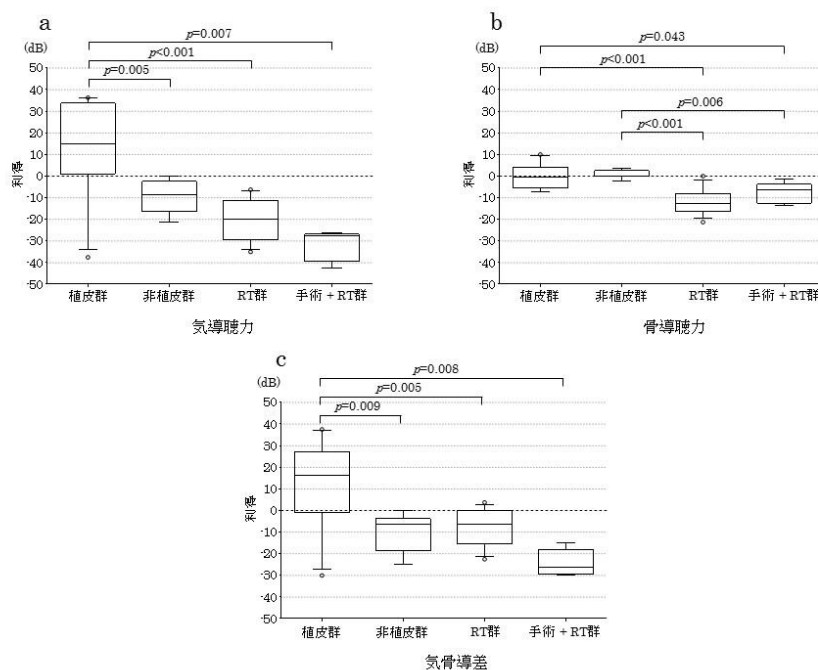


図 9. 治療方法による聴覚機能の利得

a) 気導聴力、b) 骨導聴力、c) 気骨導差

植皮群のみで平均気導聴力閾値および気骨導差に関して正の利得値が得られ、他の 3 群では負の利得値（聴力損失）を示した。その値においては、非植皮群に対して $p=0.005$ 、 $p=0.009$ 、RT 群に対して $p<0.001$ 、 $p=0.005$ 、手術+RT 群に対して $p=0.007$ 、 $p=0.008$ とそれぞれ有意差を示した。平均骨導聴力閾値に関しては、RT 群および手術+RT 群において負の利得値（聴力損失）を示し、その値においては、植皮群に対して $p<0.001$ 、 $p=0.043$ 、非植皮群に対して $p<0.001$ 、 $p=0.006$ とそれぞれ有意差を示した。

(4) 放射線照射前後の骨導聴力閾値の比較

RT 群における治療前後の周波数別骨導聴力閾値に関して図 10 に示す。

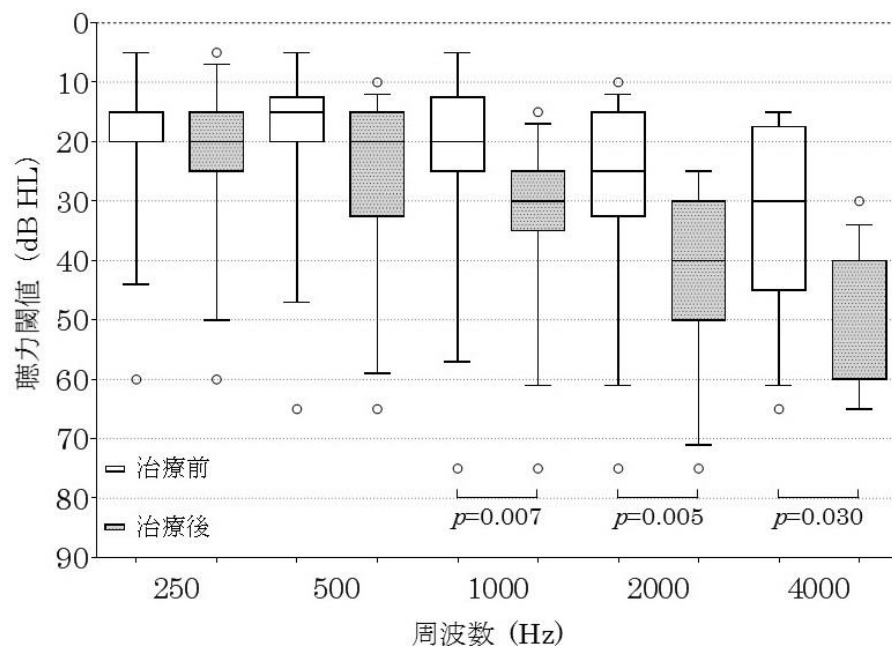


図 10. 放射線照射前後の周波数別骨導聴力閾値

1000 Hz においては、治療前の 22.7 dB HL（中央値 20.0、95%信頼区間 12.0-33.4）から治療後の 33.1 dB HL（中央値 30.0、95%信頼区間 24.4-41.8）に有意な増悪を示した（ $p=0.007$ ）。2000 Hz においては、治療前の 27.3 dB HL（中央値 25.0、95%信頼区間 17.2-37.5）から治療後の 42.7 dB HL（中央値 40.0、95%信頼区間 33.6-51.8）に有意な増悪を示した（ $p=0.005$ ）。4000 Hz においては、治療前の 32.7 dB HL（中央値 30.0、95%信頼区間 22.9-42.5）から治療後の 46.9 dB HL（中央値 40.0、95%信頼区間 39.9-54.0）に有意な増悪を示した（ $p=0.030$ ）。

一方で、植皮群および非植皮群においては、全ての周波数帯で骨導聴力閾値についての有意な変化は認めず、治療後も増悪なく保たれていた。

(5) 治療後の QOL

各群における治療後の GBI スコア (QOL 質問紙) に関して図 11a-d に示す。

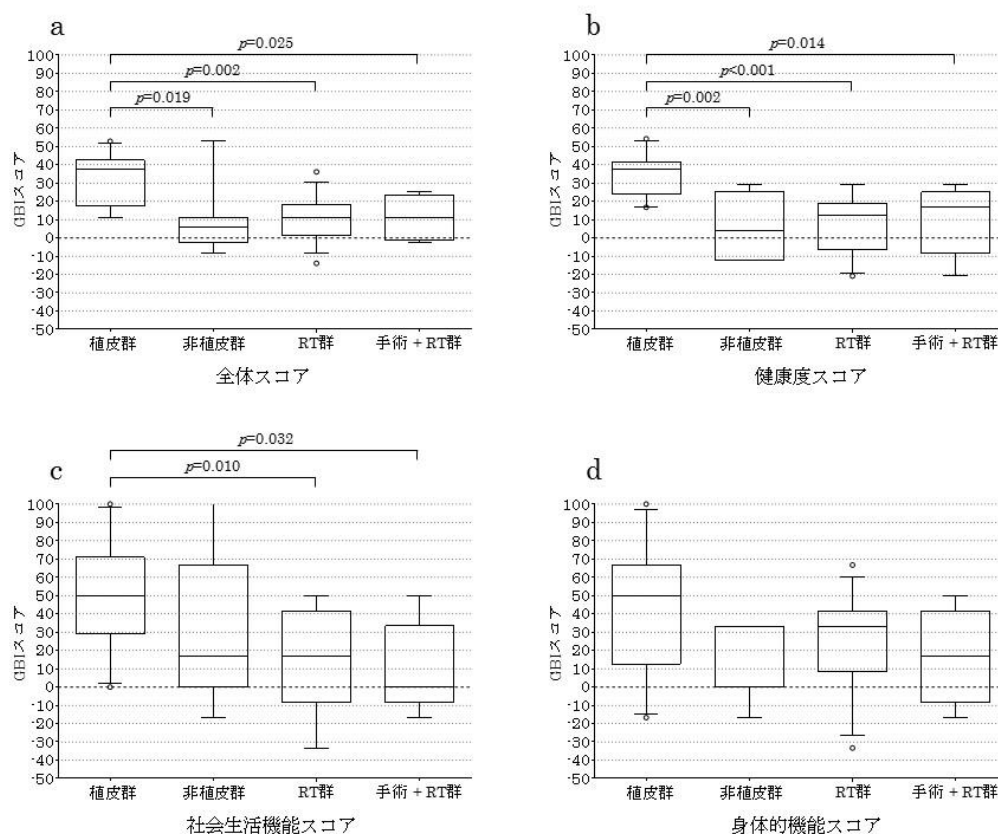


図 11. 治療方法による GBI スコア (QOL 質問紙)

a) 全体スコア、b) 健康度スコア、c) 社会生活機能スコア、d) 身体的機能スコア

植皮群においては、全体スコアが+33.3 (中央値+37.5、95%信頼区間+23.0 - +43.6)、健康度スコアが+34.6 (中央値+37.5、95%信頼区間+26.3 - +42.9)、社会生活機能スコアが+50.0 (中央値+50.0、95%信頼区間+28.2 - +71.8)、身体的機能スコアが+41.7 (中央値+50.0、95%信頼区間+15.2 - +68.2) であった。他の 3 群との比較において、非植皮群に対して全体・健康度スコア ($p=0.019$ 、

$p=0.002$) が、RT 群に対して全体・健康度・社会生活機能スコア ($p=0.002$ 、 $p<0.001$ 、 $p=0.010$) が、手術+RT 群に対して全体・健康度・社会生活機能スコア ($p=0.025$ 、 $p=0.014$ 、 $p=0.032$) がそれぞれ有意に高値を示した。

(6) 合併症

各治療方法による合併症に関して表 10 に示す。

合併症	植皮群	非植皮群	RT 群	手術 + RT 群	p 値
外耳道狭窄・閉塞	0 (0%)	7 (100%)	6 (46.2%)	5 (100%)	<0.001
感染性肉芽	1 (12.5%)	2 (28.6%)	4 (30.8%)	3 (60.0%)	0.26
鼓膜肥厚	1 (12.5%)	0 (0%)	4 (30.8%)	0 (0%)	0.18
鼓膜穿孔	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	—
局所弁壊死	0 (0%)	0 (0%)	—	1 (20.0%)	0.18
分層植皮壊死	0 (0%)	—	—	1 (20.0%)	0.33
骨露出	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (20.0%)	0.11
骨壊死	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	—
脳幹障害	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	—
脳膿瘍	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	—
髄膜炎	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	—
顔面神経麻痺	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	—

表 10. 各治療方法による合併症

植皮群においては、外耳道狭窄および閉塞を認めず、その外耳道形態は治療終了後 12 ヶ月以上維持されていた（図 12a）。一方、非植皮群においては 7 例（100%）、RT 群においては 6 例（46.2%）、手術+RT 群においては 5 例（100%）に外耳道狭窄を認め、治療終了後 10 ヶ月以内に完全閉塞した（図 12b）。

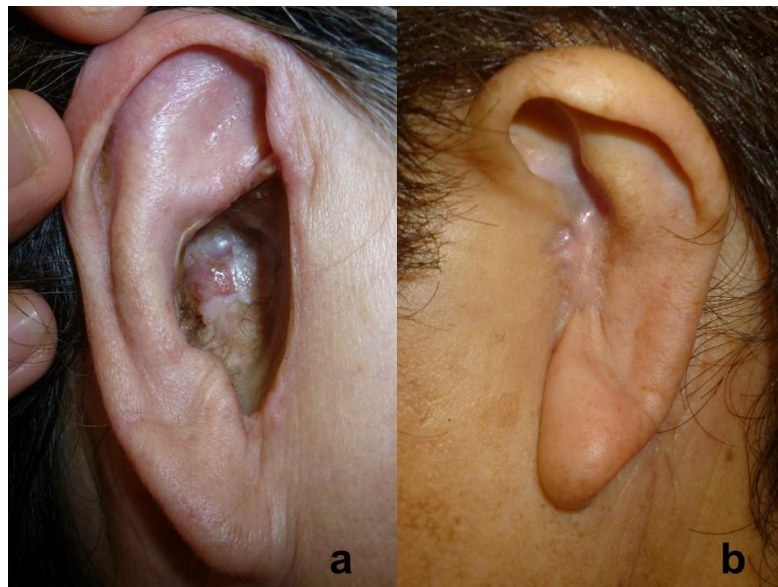


図 12. 治療終了後 12 ヶ月時点での外耳道形態

a) 植皮群、b) 非植皮群

外耳道狭窄および閉塞の発生率については、植皮群が他の 3 群と比較して有意に低値を示した（ $p<0.001$ ）。術後 RT にて分層植皮壊死および局所 flap 壊死による骨露出を 1 例において認めたが、軟膏処置などの保存的治療で改善した。4 群全てにおいて、骨壊死、脳幹障害、脳壊死、脳膿瘍、髄膜炎、顔面神経麻痺などの重篤な合併症は認めていない。

4-4. 考察

本研究において、植皮群のみが平均気導聴力閾値および気骨導差に関して改善を認め、その利得値は他の3群と比較してそれぞれ有意差を示した。外側側頭骨切除術によって軟骨部から骨部外耳道は鼓膜を含めて全周性に切除されるため、骨露出した欠損部位は広範囲となる。創傷治癒遅延や瘢痕形成による外耳道狭窄および閉塞を防止するため、局所皮弁や遊離皮弁、植皮などの方法を用いた外耳道形成が報告されているが、その有用性に関して比較検討されていない^{10,34,38,39}。従来から報告されていた外耳道形成は、側頭筋弁・骨膜弁などの局所弁によって骨露出部位を被覆する方法であった¹⁰。しかし、局所弁のみでは外耳道内の上皮化が不十分であり、瘢痕形成による外耳道閉塞に伴い術後の聴力は増悪した。そのため、これらの局所弁を移植床として分層植皮を追加する方法に改良することで、分層植皮の生着および外耳道内の上皮化を促進させ、瘢痕形成による外耳道狭窄を防止できた¹⁰。分層植皮による外耳道形成は、局所皮弁や遊離皮弁と比較すると、皮膚の厚みが欠損した外耳道の径に適しており、技術的にも容易に施行できることや手術的侵襲が大きいことから有用性が高いと考えられる^{10,34,38,39}。

一方、RTによって平均気導聴力閾値の有意な増悪が認められた。照射野に外耳および中耳が含まれるため、外耳道狭窄、皮膚炎や炎症性肉芽に伴う遷延性耳漏、耳小骨壊死、鼓膜肥厚、鼓膜穿孔などに起因する伝音難聴が報告されている⁴⁰。本研究においても同様であり、外耳道狭窄を46.2%、感染性肉芽に伴う遷延性耳漏を30.8%、鼓膜肥厚を30.8%に認め、外耳および中耳伝音系障害の発生頻度は多い。また、外側側頭骨切除術に際して分層植皮を用いて外耳道形成しても、術後RTによって分層植皮の生着および外耳道内の上皮化が阻害され、最終的には炎症性肉芽や瘢痕形成などで外耳道狭窄および閉塞を来した¹⁰。外耳道は皮膚の他、軟骨および骨組織で構成されるため、腫瘍が外耳道内に限局する早期例に対する外側側頭骨切除術では、軟骨部および骨部の術中

迅速病理診断による切除断端評価ができないことも多い。切除標本を脱灰した後に病理組織診断で術後 RT の適応を決定するため、術中に術後 RT の必要性を予見して外耳道形成を施行するかどうかを判断することは困難である¹¹。

また、本研究においては、RT によって骨導聴力閾値の有意な増悪が認められた。特に、1000 Hz 以上の中高音域が主要な障害部位であった。照射野には外耳・中耳に加えて内耳が含まれるため、内耳障害も起こしうる⁴⁰。放射線による感音難聴は照射線量依存性で、高音域においては 40 Gy 程度、低音域においては 60 Gy 程度で発生し、照射後 1 年程度かけて徐々に進行すると報告されている⁴⁴⁻⁴⁹。この低音域と高音域の放射線耐性の相違に関しては、基底回転と頂回転の外有毛細胞の数的要因や伸縮運動性の差異などに起因する^{50,51}。中高音域を中心とした感音難聴の進行は、子音の語音弁別能や補聴器装用効果の低下を誘因して日常生活に支障をきたす¹¹。また、外耳道狭窄をきたした症例においては、従来型の気導補聴器を装用不可能で良聴耳による聴取を強いられるため、音源定位性や雑音下での聴取能も低下する¹¹。GBI スコアに関して、STSG 群は他の 3 群と比較して有意に高値を示した。外側側頭骨切除術の際に分層植皮を用いて外耳形成および鼓室形成を加える方法は、審美的にはやや劣るものの、聴覚機能は温存され、外耳道形態から将来的にも気導補聴器を装用可能であるため、QOL の観点からも有用な治療法と考えられる。

第三章

外耳道癌組織における免疫組織化学的手法に基づく

発現分子解析

5-1. 本章に関連した緒言

前章までに述べたように、外耳道癌においては T 分類が独立した予後規定因子であることが確認できた。外耳道内に限局する T1-2 症例に対しては、切除範囲の十分な安全域を確保できるため、単なる生存期間を最大限に延長することだけではなく、聴覚機能温存を考慮することが可能である^{10,11}。進行例についても、手術を中心とした治療法が重要な根治療法の一つと考えられており、その切除断端における病理組織学的な癌細胞残存の有無が重要な予後規定因子と報告されている^{6,21,22}。一方、通常の病理組織学的検査では探索されないような遺伝子もしくは蛋白発現異常に関する研究については、外耳道癌において現状では報告されていない。

また第一章で述べたように、外耳道癌進行例に対する CRT で一定の有用性は示せるものの、5 年粗生存率は 52.1%と依然として予後不良で、新たな予後規定因子や治療ターゲットの検索が望まれる^{27,28}。近年、頭頸部扁平上皮癌において分子生物学的解析が進み、p53、EGFR、p16、cyclinD1、NOTCH、PI3K などの遺伝子変異および発現分子異常が報告されている¹⁶。これらは、腫瘍増殖・浸潤、病期の進行、再発増加、放射線治療や化学療法に対する低感受性など予後規定因子として関与し、それぞれの発現分子をターゲットにした分子標的薬の治療効果も確認されている¹⁷⁻¹⁹。外耳道癌は希少疾患であるために発現分子解析の報告がなく、現状では頭頸部扁平上皮癌と組織学的に類似するものとして扱われる。しかし、外耳道癌は外耳道内の皮膚に発生し、外耳炎などの慢性炎症および耳かきなどによる機械的刺激が要因になっているとされ、また、飲酒・喫煙などの影響が少ないことから³、口腔・咽頭・喉頭・鼻副鼻腔などの粘膜に発生する他の頭頸部扁平上皮癌とは異なる遺伝子変異および発現分子異常を示す可能性も予測される。外耳道癌において、ある特定の遺伝子変異や、細胞・蛋白発現異常が新しい予後規定因子となる可能性を持っており、これらに対する標的治療が確立した場合には外耳道癌患者の生存率向上につながる

break through となることが期待される。

本章では、外耳道癌組織標本を用いて特定の遺伝子変異および発現分子異常を免疫組織化学的手法により解析することで、新しい予後規定因子となりえる発現分子の同定と治療標的分子としての可能性を模索することを目的とした。

5-2. 実験方法

(1) 対象

1997 年 4 月から 2015 年 3 月までの期間に、北海道大学病院耳鼻咽喉科において、手術・RT・CRT を施行した外耳道扁平上皮癌患者を対象とした。パラフィン包埋にて保管されている手術および生検組織標本を用いて免疫染色を施行し、臨床病理学的所見および生存率との関連を解析した。免疫組織化学的解析を施行するにあたって、十分な組織量が保管されていないものは除外した。予後規定因子として検討した項目は、p53、p16、cyclin D1、EGFR、Notch1 発現の有無や組織学的分化度、年齢、性別、喫煙習慣、飲酒習慣、T 分類、N 分類など計 12 因子とした。

(2) 免疫染色

ホルマリン固定後パラフィン包埋された組織標本を 4 μ m 厚に切離したのち、キシレンとエタノール類を通して再水和化し脱パラフィン処理を行った。0.01 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 中で 15 分間、750 W マイクロウェーブを用いて抗原賦活した。0.1% 過酸化水素水を加えて内因性過酸化水素活性を不活化し、10% ヤギ正常血清と 30 分間反応させてブロッキングした。一次抗体として p53 (DO-7; Roche Diagnostics Ltd., Tokyo, Japan)、p16^{INK4a} (E6H4; Roche Diagnostics Ltd., Tokyo, Japan)、cyclin D1 (EP12; Dako, Glostrup, Denmark)、EGFR (M7298; Dako, Glostrup, Denmark)、Notch1 (#3608; Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA) モノクローナル抗体を用い、4 $^{\circ}$ C で 12 時間反応させた。二次抗体としてヒストファイン SAB-PO(M) キット (Nichirei, Tokyo, Japan) を用い、ストレプトアビジン-ビオチン複合体と反応させて発色させた。また、ヘマトキシリンで対比染色を行った。

(3) 免疫組織化学的判定

p53、p16、cyclin D1 発現の有無に関する免疫組織化学的評価判定基準は、過去の文献に従って、染色強度および染色占有率を用いてスコア化することで陽性・陰性を判定した⁵²⁻⁵⁵。染色強度については、全く染色していない場合をスコア 0（陰性）、400 倍拡大視でなければ陽性と判断できない場合をスコア 1（弱陽性）、40 倍拡大視で容易に陰性と判断できる場合をスコア 3（強陽性）、弱陽性と強陽性の中間をスコア 2（中等度陽性）とした。染色占有率については、1 視野における染色細胞の割合に応じて、1%未満をスコア 0、1%以上 10%未満をスコア 1、10%以上 50%未満をスコア 2、50%以上 90%未満をスコア 3、90%以上をスコア 4 とした。p53 および p16 に関しては、染色強度および染色占有率スコアを合算して、3 以上を陽性と判定した^{52,54}。cyclin D1 に関しては、染色強度および染色占有率スコアの積が 3 以上の場合を陽性と判定した⁵³。

EGFR 発現の有無に関する免疫組織化学的評価判定基準は、過去の文献に従って、「細胞膜に陽性染色なし、あるいは細胞膜の陽性染色がある腫瘍細胞が一切片上に 10%未満」をスコア 0、「細胞膜に弱い染色性がある腫瘍細胞が一切片上に 10%以上」をスコア 1、「細胞膜に中等度の染色性がある腫瘍細胞が一切片上に 10%以上」をスコア 2、「細胞質に強い染色性がある腫瘍細胞が一切片上に 10%以上」をスコア 3 と、4 段階に評価した⁵³。スコア 2 以上の場合を EGFR 発現陽性と判定した⁵³。

Notch1 発現の有無に関する免疫組織化学的評価判定基準は、過去の文献に従って、染色強度および染色占有率を用いてスコア化することで陽性・陰性を判定した⁵⁵。染色強度については、全く染色していない場合をスコア 0、淡黄色に染色された場合をスコア 1、黄色に染色された場合をスコア 2、茶色に染色された場合をスコア 3 とした。染色占有率については、1 視野における染色細胞の割合に応じて、5%未満をスコア 0、5%以上 25%未満をスコア 1、25%以上 50%未満をスコア 2、50%以上 75%未満をスコア 3、75%以上をスコア 4 とした。染色強度および染色占有率スコアの積が 6 以上の場合を陽性と判定した⁵⁵。

以上の判定については、2名の医師が盲検法により行った。スコアが3以上差のある組織標本に関しては、再判定を行った。

(4) 統計学的手法

統計解析ソフトウェア JMP version 10.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いて統計解析を行った。2群間の差の比較には Mann-Whitney U 検定、3群間以上の差の比較には Kruskal-Wallis 検定を用いた。粗生存率は Kaplan-Meier 法により算出し、差の比較は log rank 検定により行った。単変量・多変量解析には Cox 比例ハザードモデルを用いた。 p 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意であると判定した。

(5) 倫理面への配慮

尚、本研究は、北海道大学病院高度先進医療支援センターにおける自主臨床研究審査委員会の審査を受け承認された「外耳道扁平上皮癌における遺伝子変異および発現解析（自主臨床研究番号 015-0149）」の一環として、「ヘルシンキ宣言」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」（平成 26 年文部科学省・厚生労働省告示第 3 号）および「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」（厚生科学審議会答申）を遵守して実施された。試料の保存にあたっては、連結可能匿名化を行い、結果と個人情報とが直接結びつかないように配慮した。

5-3. 実験結果

(1) 対象症例の臨床病理学的因子

対象とした外耳道扁平上皮癌 30 例(女性 15 例、男性 15 例)を表 11 に示す。

項目		患者数
合計		30
性別	女性	15 (50.0%)
	男性	15 (50.0%)
年齢 (歳)	範囲 (中央値)	39-86 (67.5)
追跡観察期間 (月)	範囲 (中央値)	9-112 (36)
喫煙習慣	なし	13 (43.3%)
	あり	17 (56.7%)
飲酒習慣	なし	15 (50.0%)
	あり	15 (50.0%)
T 分類	T1	10 (33.3%)
	T2	7 (23.3%)
	T3	5 (16.7%)
	T4	8 (26.7%)
N 分類	N0	21 (70.0%)
	N1-3	9 (30.0%)
組織学的分化度	高分化型	21 (70.0%)
	中等度分化型	8 (26.7%)
	低分化型	1 (3.3%)
治療	手術単独	14 (46.7%)
	手術+RT	11 (36.7%)
	CRT	5 (16.7%)

表 11. 対象 30 例の臨床病理学的因子

年齢 39-86 歳(中央値 67.5 歳)、追跡観察期間 9-112 ヶ月(中央値 36 ヶ月)、習慣的な喫煙歴のあったものは 17 例 (56.7%)、習慣的な飲酒歴のあったものは 15 例 (50.0%) であった。病期分類に関しては、T 分類について T1 : 10 例 (33.3%)、T2 : 7 例 (23.3%)、T3 : 5 例 (16.7%)、T4 : 8 例 (26.7%) であり、N 分類について N1 以上 9 例 (30.0%) であった。組織学的分化度に関しては、高分化型 21 例(70.0%)、中等度分化型 8 例(26.7%)、低分化型 1 例(3.3%) であった。治療別内訳は、手術治療を T1 症例に対して 10 例、T2 症例に対して 7 例、T3 症例に対して 5 例、T4 症例に対して 4 例施行した。T2 症例のうち 2 例については、術後病理学的所見において断端陽性であったため術後 RT を施行した。T3 および T4 症例については、全例において術後 RT を施行した。切除不能 T4 症例の 4 例については、CRT を施行した。放射線の総線量は 60-70 Gy であり、中央値 66Gy であった。

(2) 免疫組織化学的解析の判定結果

腫瘍組織の免疫組織化学的解析により、21 例(70.0%)に p53 陽性、8 例(26.7%)に p16 陽性、18 例 (60.0%) に cyclin D1 陽性、16 例 (53.3%) に EGFR 陽性、4 例 (13.3%) に Notch1 陽性を認めた (図 13a-e)。

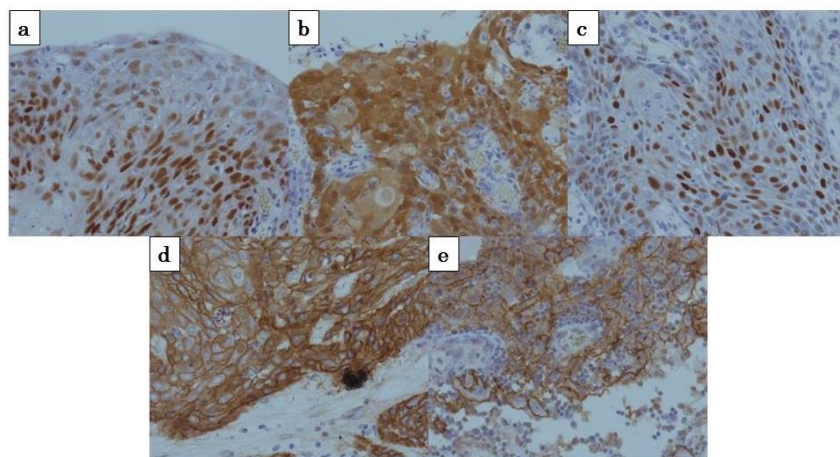


図 13. 免疫染色による陽性例

a) p53、b) p16、c) cyclin D1、d) EGFR、e) Notch1

対照的に、正常な外耳道皮膚組織の免疫組織学的解析において、陽性を示すものは認めなかった（表 12）。

	外耳道癌組織	正常外耳道皮膚組織
p53		
陽性	21 (70.0%)	0 (0%)
陰性	9 (30.0%)	30 (100%)
p16		
陽性	8 (26.7%)	0 (0%)
陰性	22 (73.3%)	30 (100%)
cyclin D1		
陽性	18 (60.0%)	0 (0%)
陰性	12 (40.0%)	30 (100%)
EGFR		
陽性	16 (53.3%)	0 (0%)
陰性	14 (46.7%)	30 (100%)
Notch1		
陽性	4 (13.3%)	0 (0%)
陰性	26 (86.7%)	30 (100%)

表 12. 免疫組織化学的解析結果

(3) 免疫組織化学的解析と臨床病理学的因子との関連

免疫染色による p53、p16、cyclin D1、EGFR、Notch1 陽性と臨床病理学的因子との関連性についての解析結果を表 13 に示す。

因子	総数	p53 陽性	p16 陽性	cyclin D1 陽性	EGFR 陽性	Notch1 陽性
年齢						
60 歳未満	6	3 (50.0%)	1 (16.7%)	3 (50.0%)	2 (33.3%)	1 (16.7%)
60 歳以上	24	18 (75.0%)	7 (29.2%)	15 (62.5%)	14 (58.3%)	3 (4.2%)
<i>p</i> 値		0.33	0.66	0.66	0.38	> 0.99
性別						
女性	15	8 (53.3%)	5 (33.3%)	9 (60.0%)	8 (53.3%)	2 (13.3%)
男性	15	13 (86.7%)	3 (20.0%)	9 (60.0%)	8 (53.3%)	2 (13.3%)
<i>p</i> 値		0.11	0.68	> 0.99	> 0.99	> 0.99
喫煙習慣						
なし	13	8 (61.5%)	5 (38.5%)	8 (61.5%)	9 (69.2%)	3 (23.1%)
あり	17	13 (76.5%)	3 (17.6%)	10 (58.8%)	7 (41.2%)	1 (5.9%)
<i>p</i> 値		0.44	0.24	> 0.99	0.16	0.29
飲酒習慣						
なし	15	11 (73.3%)	5 (33.3%)	9 (60.0%)	11 (73.3%)	2 (13.3%)
あり	15	10 (66.7%)	3 (20.0%)	9 (60.0%)	5 (33.3%)	2 (13.3%)
<i>p</i> 値		> 0.99	0.68	> 0.99	0.066	> 0.99
T 分類						
T1-2	17	9 (52.9%)	5 (29.4%)	10 (58.8%)	5 (29.4%)	1 (5.9%)
T3-4	13	12 (92.3%)	3 (23.1%)	8 (61.5%)	11 (84.6%)	3 (23.1%)
<i>p</i> 値		0.042	> 0.99	> 0.99	0.004	0.29
N 分類						
N0	21	13 (61.9%)	6 (28.6%)	13 (61.9%)	8 (38.1%)	2 (9.5%)
N1-3	9	8 (88.9%)	2 (22.2%)	5 (55.6%)	8 (88.9%)	2 (22.2%)
<i>p</i> 値		0.21	> 0.99	> 0.99	0.017	0.56
組織学的分化度						
高分化型	21	15 (71.4%)	7 (33.3%)	13 (61.9%)	10 (47.6%)	3 (14.3%)
中・低分化型	9	6 (66.7%)	1 (11.1%)	5 (55.6%)	6 (66.7%)	1 (11.1%)
<i>p</i> 値		> 0.99	0.37	> 0.99	0.44	> 0.99

表 13. 免疫組織化学的解析と臨床病理学的因子との関連

腫瘍組織における p53 陽性については、有意に T 分類と相関を示した ($p=0.042$)。また、腫瘍組織における EGFR 陽性については、有意に T および N 分類と相関を示した ($p=0.004$, $p=0.017$)。一方、腫瘍組織における p16、cyclin D1、Notch1 陽性については、年齢、性別、喫煙習慣、飲酒習慣、T 分類、N 分類、組織学的分化度などの因子と相関を示さなかった。

(4) 免疫組織化学的解析と生存率との関連

腫瘍組織における各免疫組織化学的解析と生存曲線について図 14 に示す。

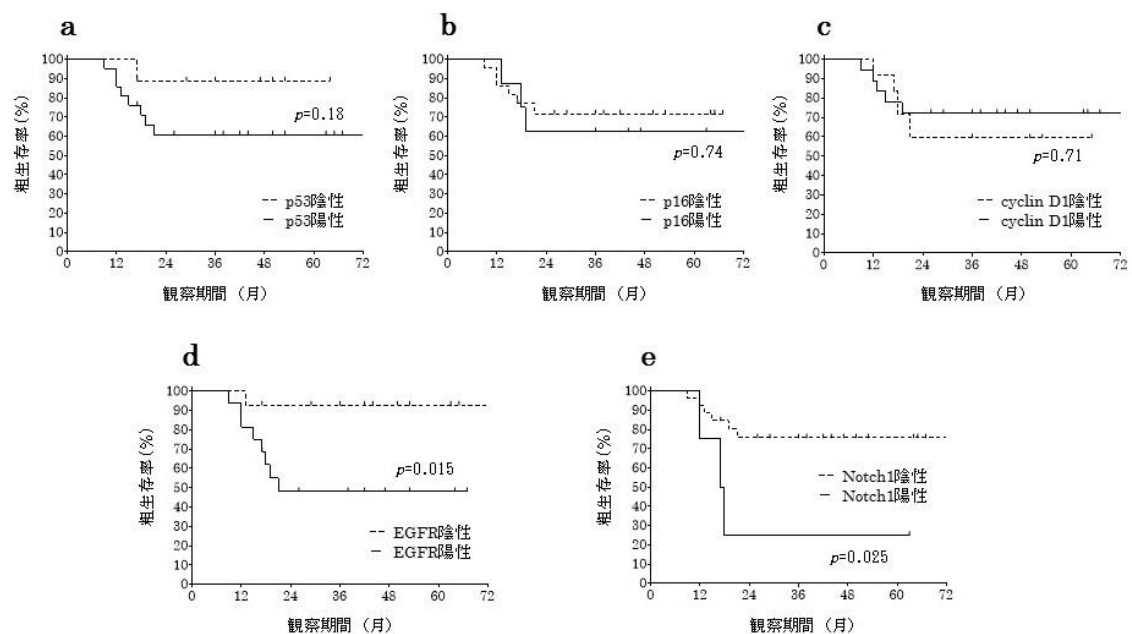


図 14. 腫瘍組織における免疫組織化学的解析と生存曲線

a) p53、b) p16、c) cyclin D1、d) EGFR、e) Notch1

腫瘍組織における EGFR 陽性群の 5 年粗生存率は 48.1%であり、EGFR 陰性群の 92.9%と比較して有意に予後不良であった ($p=0.015$)。また、腫瘍組織における Notch1 陽性群の 5 年粗生存率は 25.0%であり、Notch1 陰性群の

75.7%と比較して有意に予後不良であった ($p=0.025$)。一方、腫瘍組織における p53、p16、cyclin D1 陽性群・陰性群の 5 年粗生存率に関しては、それぞれ有意差を認めなかった ($p=0.18$ 、 $p=0.74$ 、 $p=0.71$)。

(5) 臨床病理学的因子と生存率との関連

T 分類および N 分類と生存曲線について図 15 に示す。

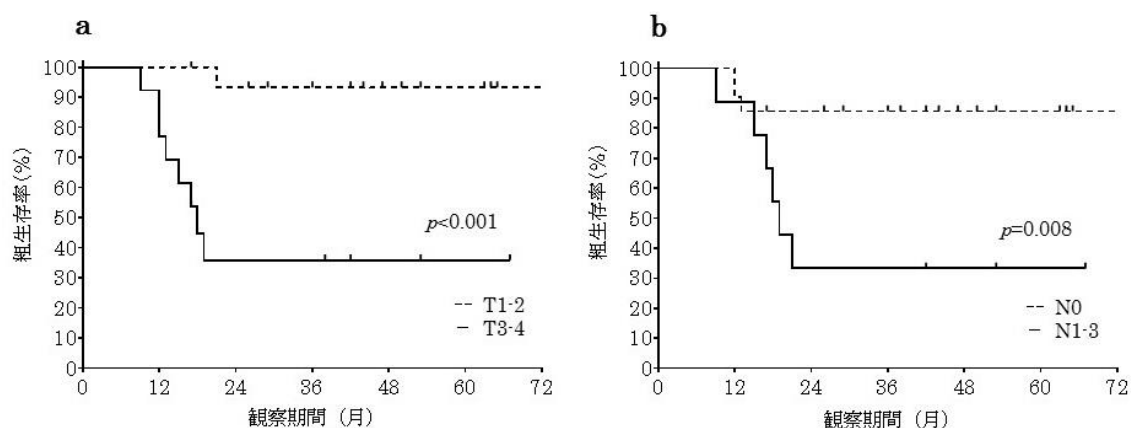


図 15. a) T 分類と生存曲線、b) N 分類と生存曲線

T3-4 群の 5 年粗生存率は 35.9%であり、T1-2 群の 93.3%と比較して有意に予後不良であった ($p < 0.001$)。また、N1-3 群の 5 年粗生存率は 33.3%であり、N0 群の 85.7%と比較して有意に予後不良であった ($p=0.008$)。一方、年齢、性別、喫煙習慣、飲酒習慣、組織学的分化度などの各臨床病理学的因子における 5 年粗生存率に関しては、それぞれ有意差を認めなかった ($p=0.78$ 、 $p=0.071$ 、 $p=0.42$ 、 $p=0.76$ 、 $p=0.73$)。

(6) 新しい予後規定因子の検索

粗生存率における単変量解析から有意差が得られた因子は、腫瘍組織における EGFR および Notch1 陽性、T 分類、N 分類であった (表 14)。これらの検

討因子について Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析を行ったが、独立した予後規定因子を抽出できなかった。

因子	単変量解析		
	ハザード比	95%信頼区間	p 値
年齢			
60 歳未満			
60 歳以上	0.80	0.15-4.22	0.78
性別			
女性			
男性	3.83	0.91-12.5	0.071
喫煙習慣			
なし			
あり	1.58	0.42-5.79	0.42
飲酒習慣			
なし			
あり	0.81	0.22-3.00	0.76
T 分類			
T1-2			
T3-4	15.7	3.20-50.7	<0.001
N 分類			
N0			
N1-3	5.25	1.68-31.3	0.008
組織学的分化度			
高分化型			
中・低分化型	1.28	0.30-5.53	0.73
p53			
陰性			
陽性	3.73	0.64-10.7	0.18
p16			
陰性			
陽性	1.26	0.30-5.42	0.74
cyclin D1			
陰性			
陽性	0.78	0.20-2.94	0.71
EGFR			
陰性			
陽性	5.11	1.37-19.1	0.015
Notch1			
陰性			
陽性	4.22	1.39-96.9	0.025

表 14. Cox 比例ハザードモデルによる単変量解析

5-4. 考察

本研究において、外耳道癌組織の免疫染色による EGFR 陽性については、T 分類、N 分類、生存率と有意に相関を示した。EGFR はチロシンキナーゼ活性のある膜貫通型糖タンパク質で、細胞膜上にある受容体に上皮成長因子が結合すると、受容体の二量体化とチロシン自己リン酸化により活性化され、細胞内に増殖シグナルを伝達する⁵⁶。正常組織においては細胞の分化・発達・増殖・維持の調整に重要な関与を示すが、EGFR の遺伝子変異によって発癌、癌の増殖・浸潤、血管新生、転移などを誘導する⁵⁶。頭頸部癌以外にも多くの上皮系、間葉系、神経系の癌種において、EGFR の過剰発現は腫瘍増殖、浸潤、転移に関与し、有用な予後規定因子の可能性も報告されており、放射線治療や化学療法に対して耐性を示すとされる^{22,56-58}。第一章で述べたように、外耳道癌進行例においては解剖学的構造から切除不能となることも多く、CRT が重要な位置づけとなるものの依然として予後不良である^{27,28}。そのため、他の癌種と同様に EGFR をターゲットにした分子標的薬による個別化医療に関しては検討の余地があり、外耳道癌の生存率向上に対して重要な治療法の一つとなることが期待される^{17,58-60}。

Notch シグナル経路は細胞間情報伝達を担う主要なシグナル伝達系の一つで、隣接する細胞間の受容体とリガンドが相互作用することによりそれぞれの状態を伝達する⁶¹。Notch の受容体は一回膜貫通型受容体で、細胞表面におけるリガンドとの結合および物理的な作用による構造変化が発生し、タンパク質切断酵素の作用により活性化される。活性化された Notch の細胞内ドメインは細胞質に遊離して核へと移行し、標的遺伝子上流において転写因子やコアクチベーターと相互作用することによりその転写を促進させる⁶²。こうした Notch シグナル経路は、発生における形態形成および臓器形成に関与する他、細胞の恒常性維持や分化における制御を担う⁶²。そのため、Notch シグナル経路を構成する分子の変異は、遺伝性脳小血管病、アラジール症候群、大動脈弁疾患、急性白血病、悪性疾患といったさまざまな疾患の原因となることが報告されてい

る⁶³。頭頸部癌扁平上皮癌においても腫瘍増殖、浸潤、転移に関与し、予後規定因子の可能性も示唆される⁶⁴。本研究において、外耳道癌組織の免疫染色による Notch1 陽性については、生存率と有意に相関を示した。しかし、腫瘍組織における Notch1 陽性率は 13.3%と低く、正常組織における Notch1 陽性例を認めなかったものの有意差を得られなかった。そのため、Notch のリガンド結合部位をターゲットにした分子標的薬の開発による次世代の個別化医療を期待するとともに^{18,19}、より多くの外耳道癌組織検体を用いた分子生物学的解析が必要である。

本研究において、外耳道癌組織の免疫染色による p53 陽性については、T 分類と有意に相関を示した。様々なヒト癌細胞で変異が検出されている癌抑制遺伝子の p53 は、DNA 損傷刺激を受けた細胞で活性化され、bax 蛋白を介して異常細胞のアポトーシスを誘導する他、細胞分裂周期を制御して損傷した DNA の修復に関与する⁶⁵。p53 遺伝子の変異により半減期の長い変異型 p53 が過剰発現し、p53 依存性アポトーシス機構を不活化させるため腫瘍増殖を誘導する⁶⁵。50%以上の癌種において変異型 p53 は腫瘍増殖・浸潤に関与すると報告されており^{65,66}、外耳道癌においても同様のことが示唆された。免疫組織化学的手法のほか DNA シークエンス法、LigAmp 解析、RT-PCR 法などの分子生物学的手法による解析にて、変異型 p53 は予後規定因子となりえる可能性が報告されているが⁶⁷、一方で、その有用性については否定的な報告も散見されるため一定した見解は得られていない⁶⁸。本研究においても、外耳道癌組織の免疫染色による p53 陽性については、生命予後との有意な関連性を認めなかった。本研究の結果と頭頸部扁平上皮癌における過去の報告から総合して考察すると、p53 と生命予後や局所再発との関連性は否定できないものの、少なくとも免疫組織学的手法による解析を施行した場合においては、予後規定因子としての有用性は認められないと結論付けられる。

外耳道癌における分子生物学的な検討の報告は世界的になく、本研究の意義は高いものと考えられる。本研究で用いた免疫染色は、蛋白発現解析において

広く施行されている手法で、一般的なホルマリン固定パラフィン包埋で保管された切除標本を対象に解析できるため、長期間の追跡調査が終了して予後が判明した症例の生存解析が可能である⁶⁹。また、DNA シーケンス法、RT-PCR 法、免疫ブロット法などと比較して手技が簡便で費用も安価で、実臨床においても導入が容易であるなど有用性が高い。一方で、抗原賦活の方法や抗体の種類によって染色性が異なること、評価基準が一定ではないことなど短所も存在する⁶⁹。希少疾患である外耳道癌に関しては、症例集積が困難であり、多くの症例で検討する場合には、長期間の患者を対象にせざるを得ないため、ホルマリン固定パラフィン包埋で保管された切除標本を対象に免疫組織化学的解析をすることが妥当である。

6. 総括および結論

①研究から得られた知見

- 外耳道癌においては、原発巣の進行度分類法の一つである Pittsburgh 分類が独立した予後規定因子として示された。
- 早期外耳道癌に対する治療法として、外側側頭骨切除術の際に分層植皮を用いて外耳形成および鼓室形成を加える方法は、腫瘍の根治性だけではなく聴覚機能温存の観点から有用性が高いと考えられた。
- 腫瘍組織における免疫組織化学的手法により、EGFR および Notch1 発現が予後規定因子となりえる可能性が示された。

②新しい知見の意義

- 希少疾患のため現在まで不明確であった外耳道癌の予後規定因子を同定でき、Pittsburgh 分類による進行度に応じた治療選択を行うことが可能になると期待される。
- 外耳道癌における聴覚機能温存を考慮に入れた治療法の比較検討は世界的になく、他の頭頸部癌と同様に、早期例においては癌の根治性と機能温存の両面を治療目標にする必要がある。
- 外耳道癌における分子生物学的な検討の報告は世界的になく、新たな予後規定因子および標的分子として EGFR および Notch1 が候補に挙げられたことの意義は高い。これらをターゲットにした分子標的薬による個別化医

療に関しては検討の余地があり、外耳道癌の生存率向上に対して重要な治療法の一つとなる可能性がある。

③今後の研究展開と課題

- 早期外耳道癌における腫瘍切除後の外耳形成の方法として、分層植皮を用いる方法の他に、全層植皮、局所皮弁、遊離皮弁なども含めて比較検討する必要がある。
- EGFR および Notch1 をターゲットとした分子標的治療薬の開発により、予後不良な進行例に対して選択的に投与されることで生存率向上に寄与するか臨床的検討の必要性がある。
- 癌に関連する遺伝子および蛋白発現において、EGFR および Notch1 の他に局所再発・生命予後と関連性を示す因子がないか、これらの下流シグナル経路を制御する因子がないか追加して探索する必要性がある。
- 外耳道癌は希少疾患であるため、組織標本の重要性は極めて高いものと考えられる。将来的な分子生物学的研究の準備として、バイオバンクシステムによる癌組織保管が求められる。ホルマリン固定標本や新鮮凍結標本よりも PAX 固定標本を用いることで、癌組織からの DNA およびタンパク質抽出の精度を高めるようにする必要性がある。

7. 謝辞

博士學位論文を終えるにあたり、本研究に関しての議論、国内・国外での発表の機会を与えて下さいますと共に、終始ご指導賜りました北海道大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学分野の福田諭教授ならびに本間明宏准教授、中丸裕爾講師に深謝いたします。併せて、本研究の遂行にあたり様々な助言と励ましを頂きました耳鼻咽喉科・頭頸部外科分野の皆様に心よりお礼申し上げます。

最後になりましたが、多忙な日々の中、研究の機会を与えてくれ、生活を支えてくれた家族に感謝し、筆を置きたいと思います。

2016 年 12 月

森田 真也

8. 引用文献

1. Barrs, DM. Temporal bone carcinoma. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 34, 1197-1218 (2001).
2. Moody, S.A., Hirsch, B.E. & Myers, E.N. Squamous cell carcinoma of the external auditory canal: an evaluation of a staging system. *Am. J. Otol.* 21, 582-588 (2000).
3. Yin, M., et al. Analysis of 95 cases of squamous cell carcinoma of the external and middle ear. *Auris Nasus Larynx* 33, 251-257 (2006).
4. Arriaga, M., et al. Staging proposal for external auditory meatus carcinoma based on preoperative clinical examination and computed tomography findings. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 99, 714-721 (1990).
5. Stell, P.M. & McCormick, M.S. Carcinoma of the external auditory meatus and middle ear. *J. Laryngol. Otol.* 99, 847-850 (1985).
6. Austin, J.R., Stewart, K.L. & Fawzi, N. Squamous cell carcinoma of the external auditory canal: therapeutic prognosis based on a proposed staging system. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 120, 1228-1232 (1994).
7. American Joint Committee on Cancer. AJCC Cancer Staging Manual, 7th ed. Springer Verlag, New York, N.K, 2010, pp.22-26.
8. Monsen, H. Pernkopf Anatomy, 3rd ed. In: Werner, P., editor. Volume I: Head and Neck. Urban & Schwarzenberg, Munich, 1989, pp.125.

9. 丹生健一. 側頭骨亜全摘の実際. 耳鼻咽喉科展望 46, 464-471 (2003).
10. Morita, S., et al. Hearing preservation after lateral temporal bone resection for early-stage external auditory canal carcinoma. *Audiol. Neurotol.* 19, 351-357 (2014).
11. Morita, S., et al. Comparison of hearing outcomes after treatment for early stage external auditory canal cancer. *Head Neck* 38 Suppl 1, E1110-1116 (2016).
12. Zhang, B., et al. Squamous cell carcinoma of temporal bone: reported on 33 patients. *Head Neck* 21, 461-466 (1999).
13. Nakagawa, T., et al. Squamous cell carcinoma of the external auditory canal and middle ear: an operation combined with preoperative chemoradiotherapy and a free surgical margin. *Otol. Neurotol.* 27, 242-248 (2006).
14. Moffat, D.A., Wagstaff, S.A. & Hardy, D.G. The outcome of radical surgery and postoperative radiotherapy for squamous carcinoma of the temporal bone. *Laryngoscope* 115, 341-347 (2005).
15. Zanoletti, E. & Danesi, G. The problem of nodal disease in squamous cell carcinoma of the temporal bone. *Acta Otolaryngol.* 130, 913-916 (2010).
16. Mountzios, G., Rampias, T. & Psyrri, A. The mutational spectrum of squamous-cell carcinoma of the head and neck: targetable genetic events and clinical impact. *Ann. Oncol.* 25, 1889-1900 (2014).

17. Cohen, E.E.W. Role of epidermal growth factor receptor pathway-targeted therapy in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *J. Clin. Oncol.* 24, 2659-2665 (2006).
18. Aste-Amezaga, M., et al. Characterization of Notch1 antibodies that inhibit signaling of both normal and mutated Notch1 receptors. *PLoS One* 5, e9094 (2010).
19. Wu, Y., et al. Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature* 464, 1052-1057 (2010).
20. Morita, S., et al. The outcomes of surgery and chemoradiotherapy for temporal bone cancer. *Otol. Neurotol.* 37, 1174-1182 (2016).
21. Ito, M., Hatano, M. & Yoshizaki, T. Prognostic factors for squamous cell carcinoma of the temporal bone: extensive bone involvement or extensive soft tissue involvement? *Acta Oto-Laryngologica* 129, 1313-1319 (2009).
22. Nyrop, M. & Grøntved, A. Cancer of the external auditory canal. *Arch Otolaryngol. Head Neck Surg.* 128, 834-837 (2002).
23. Prasad, S. & Janecka, I.P. Efficacy of surgical treatment for squamous cell carcinoma of the temporal bone: a literature review. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 110, 270-280 (1994).
24. Martinez-Devesa, P., Barnes, M.L. & Milford, C.A. Malignant tumors of the ear and temporal bone: a study of 27 patients and review of their

- management. *Skull Base* 18, 1-8 (2008).
- 25.Lobo, D., Llorente, J.L. & Suarez, C. Squamous cell carcinoma of the external auditory canal. *Skull Base* 18, 167-172 (2008).
- 26.Leong, S.C., Youssef, A. & Lesser, T.H. Squamous cell carcinoma of the temporal bone: outcomes of radical surgery and postoperative radiotherapy. *Laryngoscope* 123, 2442-2448 (2013).
- 27.Takenaka, Y., et al. Chemoradiation therapy for squamous cell carcinoma of the external auditory canal: A meta-analysis. *Head Neck* 37, 1073-1080 (2015).
- 28.Shiga, K., et al. Concomitant chemoradiotherapy as a standard treatment for squamous cell carcinoma of the temporal bone. *Skull Base* 21, 153-158 (2011).
- 29.Homma, A., et al. Concomitant weekly cisplatin and radiotherapy for head and neck cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 41, 980-986 (2011).
- 30.Homma, A., et al. Rapid superselective high-dose cisplatin infusion with concomitant radiotherapy for advanced head and neck cancer. *Head Neck* 27, 65-71 (2005).
- 31.National Institutes of Health National Cancer Institute. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 4.0. (2009)
- Available at:
- http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickRefer

ence_8.5x11.pdf.

32. Pfreundner, L., et al. Carcinoma of the external auditory canal and middle ear. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 44, 777-788 (1999).
33. Prabhu, R., et al. Squamous cell carcinoma of the external auditory canal: long-term clinical outcomes using surgery and external-beam radiotherapy. *Am. J. Clin. Oncol.* 32, 401-404 (2009).
34. Zhang, T., et al. Evidenced-based surgical management of T1 or T2 temporal bone malignancies. *Laryngoscope* 123, 244-248 (2013).
35. Kunst, H., Lavieille, J.P. & Marres, H. Squamous cell carcinoma of the temporal bone: results and management. *Otol. Neurotol.* 29, 549-552 (2008).
36. Shinomiya, H., et al. Concomitant chemoradiotherapy for advanced squamous cell carcinoma of the temporal bone. *Head Neck* 38 Suppl 1, E949-953 (2016).
37. Posner, M.R., et al.; TAX 324 Study Group. Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.* 357, 1705-1715 (2007).
38. Iida, T., et al. Reconstruction of the external auditory canal using a super-thin superficial circumflex iliac perforator flap after tumour resection. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 66, 430-433 (2013).
39. Gal, T.J., et al. Reconstruction after temporal bone resection.

- Laryngoscope* 108, 476-481 (1998).
40. Jereczek-Fossa, B.A., Zarowski, A., Milani, F. & Orecchia, R. Radiotherapy-induced ear toxicity. *Cancer Treat. Rev.* 29, 417-430 (2003).
41. Hirsch, B.E. & Chang, C.Y.J. Carcinoma of the temporal bone. In: Myers, E.N., editor. *Operative Otolaryngol Head Neck Surgery*. Saunders, Philadelphia, W.B., 1997, pp.1434-1458.
42. American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery Foundation, Inc. Committee on Hearing and Equilibrium guidelines for the evaluation of results of treatment of conductive hearing loss. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 113, 186-187 (1995).
43. Robinson, K., Gatehouse, S. & Browning, G.G. Measuring patient benefit from otorhinolaryngological surgery and therapy. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 105, 415-422 (1996).
44. Kretschmar, C.S., et al. Ototoxicity of preradiation cisplatin for children with central nervous system tumors. *J. Clin. Oncol.* 8, 1191-1198 (1990).
45. Ho, W.K., et al. Long-term sensorineural hearing deficit following radiotherapy in patients suffering from nasopharyngeal carcinoma: a prospective study. *Head Neck* 21, 547-553 (1999).
46. Low, W.K. & Fong, K.W. Hearing disability before and after radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. *J. Laryngol. Otol.* 110, 121-123 (1996).

47. Wang, L.F., et al. A long-term study on hearing status in patients with nasopharyngeal carcinoma after radiotherapy. *Otol. Neurotol.* 25, 168-173 (2004).
48. Bhandare, N., et al. Ototoxicity after radiotherapy for head and neck tumors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 67, 469-479 (2007).
49. Herrmann, F., Dörr, W., Müller, R. & Herrmann, T. A prospective study on radiation-induced changes in hearing function. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 65, 1338-1344 (2006).
50. Ludman, H. Applied anatomy of the internal ear. In: Mawson's Diseases of the Ear, 5th edition. London: Edward Arnold; 1988, pp17-73.
51. Tokimoto, T. & Kanagawa, K. Effects of x-ray irradiation on hearing in guinea pigs. *Acta Otolaryngol.* 100:266-272 (1985).
52. Lee, H.J., et al. Positive expression of NANOG, mutant p53, and CD44 is directly associated with clinicopathological features and poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. *BMC Oral Health* 15, 153 (2015).
53. Sato-Kuwabara, Y., et al. Comparative analysis of basaloid and conventional squamous cell carcinomas of the esophagus: prognostic relevance of clinicopathological features and protein expression. *Tumour Biol.* 37, 6691-6699 (2016).
54. Sakashita, T., et al. Prognostic value of cyclin D1 expression in tumor-free surgical margins in head and neck squamous cell carcinomas.

- Acta Otolaryngol.* 133, 984-991 (2013).
55. Chu, D., et al. Notch1 expression, which is related to p65 status, is an independent predictor of prognosis in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 17, 5686-5694 (2011).
56. Herbst, R.S. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 59, 21-26 (2004).
57. Sweeny, L., et al. EGFR expression in advanced head and neck cutaneous squamous cell carcinoma. *Head Neck* 34, 681-686 (2012).
58. Ciardiello, F. & Tortora, G. Epidermal growth factor receptor (EGFR) as a target in cancer therapy: understanding the role of receptor expression and other molecular determinants that could influence the response to anti-EGFR drugs. *Eur. J. Cancer* 39, 1348-1354 (2003).
59. Grandis, J.R. & Tweardy, D.J. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res.* 53, 3579-3584 (1993).
60. Thomas, S.M. & Grandis, J.R. Pharmacokinetic and pharmacodynamics properties of EGFR inhibitors under clinical investigation. *Cancer treat. Rev.* 30, 255-268 (2004).
61. Artavanis-Tsakonas, S. & Muskavitch, M.A. Notch: the past, the present, and the future. *Curr. Top. Dev. Biol.* 92, 1-29 (2010).

62. Kopan, R. & Ilagan, M.X. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137, 216-233 (2009).
63. Louvi, A. & Artavanis-Tsakonas, S. Notch and disease: a growing field. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 473-480 (2012).
64. Inamura, N., et al. Notch1 regulates invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma by inducing EMT through c-Myc. *Auris Nasus Larynx* in press (2016).
65. Levine, A.J., Momand, J. & Finlay, C.A. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 351, 453-456 (1991).
66. Marchetti, P., et al. Prognostic value of p53 molecular status in high-risk primary breast cancer. *Ann. Oncol.* 14, 704-708 (2003).
67. Karpathiou, G., et al. p16 and p53 expression status in head and neck squamous cell carcinoma: a correlation with histological, histoprognostic and clinical parameters. *Pathology* 48, 341-348 (2016).
68. Zambetti, G.P. The p53 mutation “gradient effect” and its clinical implications. *J. Cell. Physiol.* 213, 370-373 (2007).
69. Valgardsdottir, R., et al. Genomic instability and poor prognosis associated with abnormal TP53 in breast carcinomas. Molecular and immunohistochemical analysis. *APMIS* 105, 121-130 (1997).