

口腔扁平上皮癌における所属リンパ節に関する病理組織学的検討

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

伏見 習

(指導：小宮 正道 教授)

目次

参考論文	・ ・ ・ ・ ・ 1
概要	・ ・ ・ ・ ・ 2
第 1 章	
緒言	・ ・ ・ ・ ・ 4
対象および方法	・ ・ ・ ・ ・ 5
結果	・ ・ ・ ・ ・ 7
考察	・ ・ ・ ・ ・ 9
結論	・ ・ ・ ・ ・ 13
第 2 章	
緒言	・ ・ ・ ・ ・ 18
対象および方法	・ ・ ・ ・ ・ 19
結果	・ ・ ・ ・ ・ 22
考察	・ ・ ・ ・ ・ 24
結論	・ ・ ・ ・ ・ 26
総括	・ ・ ・ ・ ・ 31
参考文献	・ ・ ・ ・ ・ 32

参考論文

本論文は、主となる参考論文「Immunohistochemical Study of Lymphatic Vessels in Cervical Lymph Nodes of Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma」International Journal of Oral-Medical Sciences 掲載予定、および副となる参考論文「口腔扁平上皮癌における所属リンパ節腫大に関する病理組織学的検討」日大口腔科学：Vol.45(3), 110-118, 2019 をまとめたものである。

概要

口腔扁平上皮癌(Oral squamous cell carcinoma : 以下 OSCC)は, リンパ行性転移が多く, 特に所属リンパ節である頸部リンパ節に認められる. 頸部郭清術にて切除したリンパ節は, 口腔癌取り扱い規約に基づき, 領域, 転移数, 大きさ, 被膜外浸潤, 隣接血管浸潤の有無が, 病理組織学的所見として記述される. しかし, リンパ節の組織構築の変化に関する評価は行われていない. 口腔扁平上皮癌患者における所属リンパ節を詳細に検索し, 特徴的な所見を得ることは, 癌細胞のリンパ節への転移の予測につながると考える.

そこで, 第1章では OSCC における所属リンパ節での病理組織学のおよび統計学的検討を行った. 2006年11月から2018年4月の期間に日本大学松戸歯学部附属病院口腔外科にて原発巣切除術および頸部郭清術を行った OSCC 症例11例(転移群5例, 非転移群6例)を対象とした. 頸部郭清術を行った全リンパ節を, 癌細胞の浸潤が認められた M(+)(+)群, 癌細胞の浸潤が認められなかった M(+)(-)群, 非転移群の M(-)(-)群の3群に分類した. ヘマトキシリン・エオジン重染色後, スライド標本上にてリンパ節の短径・長径の測定を行い, さらに病理組織学的検索を施した.

リンパ節の短径は, M(+)(+)群と M(-)(-)群間, M(+)(-)群と M(-)(-)群間に統計学的有意差を認めた. 短長径比は, M(+)(+)群と M(+)(-)群間で統計学的有意差を認めた. 非転移リンパ節の病理組織学的検索では M(+)(-)群と M(-)(-)群間で, lymphocyte predominance, germinal center predominance, sinus histiocytosis, lymphocyte depletion, granulomatous reaction の5つの観察項目の出現頻度に統計学的有意差を認めた.

短長径比は転移の目安として用いられるものの, 部位によって大きさが異なるため参考程度であると考えられる. 一方, リンパ節の短径の計測と転移群の非転移リンパ節で認められた病理組織像は, 術後の予後予測因子として

有用であることが示唆された。

第 2 章では、第 1 章で得られた病理組織学的所見の予後予測因子に加え、免疫組織化学染色による所見の評価として、所属リンパ節におけるリンパ管の検索を行った。対象症例およびリンパ節の分類は第 1 章と同様とした。免疫組織化学染色(D2-40 抗体)を施した後、ImageJ ソフトウェア(NIH, Bethesda, MD)を使用して、リンパ管占有率とリンパ管面積、リンパ管形態、およびリンパ管数を定量化した。

リンパ管占有率とリンパ管数に M(-)(-)群と M(+)(+)群間、M(-)(-)群と M(+)(-)群間で有意差を認めた。リンパ管面積、リンパ管形態には M(-)(-)群と M(+)(+)群間、M(-)(-)群と M(+)(-)群間での有意差を認めなかった。以上の結果から OSCC 患者の所属リンパ節では、M(+)(-)群はリンパ管数が増えることでリンパ管の占有率の増加が起きていることが示唆され、より多くの癌細胞がリンパ節への流入・定着することでリンパ節転移が引き起こされていることが推察された。頸部郭清術にて切除した OSCC 患者の所属リンパ節を免疫組織化学染色にてリンパ管の検索を行うことで、転移群と非転移群のリンパ節でのリンパ管占有率の差を認めたことから、術後の予後予測因子として活用できる可能性が示唆された。

本研究に基づく、OSCC 患者の頸部郭清術により摘出した所属リンパ節の病理組織学的所見、免疫組織化学的所見の詳細な検索は、予後予測因子として活用されることで OSCC 患者の術後経過予測や追加治療の検討など診断精度の向上につながると考える。

第1章 口腔扁平上皮癌における所属リンパ節腫大に関する病理組織学的検討

緒言

日本人における顎口腔領域の悪性腫瘍の罹患率は、全身の悪性腫瘍のうち約1%である。頭頸部領域における口腔癌の割合は約40%を占め、病理組織学的に90%以上が扁平上皮癌であり、部位別にみると舌癌が最も多いと報告されている¹⁻⁴⁾。腫瘍の進行状態を評価する臨床的な因子は、原発巣の大きさ、頸部リンパ節転移、遠隔転移であり、Union for International Cancer Control (以下UICC)のTNM分類や口腔癌取り扱い規約⁵⁾が治療方針の決定に用いられている。

口腔扁平上皮癌(Oral squamous cell carcinoma: 以下OSCC)はリンパ行性に、特に所属リンパ節である頸部リンパ節に転移することが多い。頸部郭清術にて切除したリンパ節は、口腔癌取り扱い規約⁵⁾に基づき、領域、転移数、大きさ、被膜外浸潤、隣接血管浸潤の有無が、病理組織学的所見として記述される。しかし、組織構築の変化に関する評価は行われていない。他領域における悪性腫瘍のリンパ節の研究は、子宮頸がん、乳がん、肺がん、胃がん、喉頭がんなどで行われている⁶⁻¹⁰⁾。特にGiorgioらによる肺癌の所属リンパ節の研究では、リンパ節の細胞性免疫反応が予後良好を反映するとの報告¹¹⁾がされており、予後との関連が示唆されている。しかし、口腔癌の所属リンパ節についての報告は少ないのが現状である^{12, 13)}。

OSCC患者における所属リンパ節を詳細に検索し、特徴的な所見を得ることは、癌細胞のリンパ節への転移の予後予測に繋がると考える。そこで担癌患者のリンパ行性転移に関連するリンパ節の病理組織学的所見の抽出を目的として、郭清したリンパ節について詳細な検索を行った。

対象および方法

1) 対象症例

2006年11月から2018年4月の期間に日本大学松戸歯学部附属病院口腔外科にて原発巣切除術および頸部郭清術を行った OSCC 症例 37 例のうち，術前化学療法・放射線療法が行われた症例を除外した 11 例を対象とした．頸部リンパ節転移が認められた 5 例を転移群(M(+))，頸部リンパ節転移が認められなかった 6 例を非転移群(M(-))とした．本研究は日本大学松戸歯学部倫理委員会 (EC-18-16-15-034-2 号) の承認を得て実施した．

2) 対象症例の詳細

臨床所見として年齢，性別，原発部位，pathological TNM(pTNM)分類，予後，原発巣の病理組織学的所見として，リンパ管侵襲，切除断端，組織学的悪性度，浸潤様式 (YK 分類¹⁴⁾) について検討した．TNM 分類は，UICC 第 8 版に準拠した．

3) 頸部リンパ節の分類方法

頸部郭清術を行った全リンパ節を 3 群に分類した(Fig.1)．転移群(M(+))のリンパ節は，癌細胞の浸潤が認められたリンパ節を M(+)(+)群(n=19)，癌細胞の浸潤が認められなかったリンパ節を M(+)(-)群(n=111)とした．非転移群(M(-))のリンパ節を M(-)(-)群(n=220)とした．病理組織診断は 2 人の口腔病理専門医が行った．

4) 頸部リンパ節の病理組織学的検索

手術材料は，10%中性緩衝ホルマリン水溶液にて固定後，最大断面になるように切り出し，パラフィン包埋を行い 4 μ m の薄切切片を作製，通法に従いヘマトキシリン・エオジン(以下：HE)重染色を行い，病理組織学的検索に供した．リンパ節の HE 重染色標本における病理組織学的観察項目として，IOACHIM'S Lymph Node Pathology¹⁵⁾に基づき，lymphocyte predominance，

germinal center predominance , sinus histiocytosis , lymphocyte depletion , granulomatous reaction の 5 項目の有無について検索した. リンパ節の病理組織像(HE 重染色)を Fig.2 a-e に示す. lymphocyte predominance は, 傍皮質領域においてリンパ球数の増加が認められ, リンパ濾胞の消失と傍皮質の拡大が生じていた(Fig.2-a). germinal center predominance は, 胚中心の過形成が認められ, 髄索も拡大していた(Fig.2-b). sinus histiocytosis は, リンパ洞は膨張しており, 被膜下のマクロファージなどの洞組織球の過形成が認められた(Fig.2-c). lymphocyte depletion は, 線維芽細胞増生に伴うリンパ球の減少が観察された(Fig.2-d). granulomatous reaction は, 流入領域リンパ節に肉芽腫の形成が認められた(Fig.2-e). さらに 5 項目の出現頻度は, M(+)(-)群と M(-)(-)群で比較検討を行った.

5) 頸部リンパ節の形態計測

リンパ節の大きさの検討として, HE 重染色後, スライド標本上にてリンパ節の短径・長径の測定を行った. M(+)(+)群, M(+)(-)群, M(-)(-)群の短径および短長径比を比較した.

6) 統計処理

リンパ節の大きさの検討は, 転移群と非転移群の 2 群を比較するために, Mann-Whitney の U 検定を行った. 病理組織学的検索では, M(+)(-)群と M(-)(-)群の 2 群を比較するために, カイ 2 乗検定, Fisher の正確確率検定を行った. 有意水準は 5%とした.統計処理には統計ソフトウェアの SPSS Statistics 20.0 (IBM, 東京) を用いた.

結果

本研究の対象症例の一覧を Table.1 に示す. 対象は, 転移群 5 例, 非転移群 6 例であった. 性別は, 転移群では男性 1 例, 女性 4 例, 非転移群では男性 2 例, 女性 4 例であった. 年齢は, 転移群では 72~82 歳(平均年齢 \pm SD ; 76.0 \pm 4.00 歳)であった. 非転移群では 62~86 歳(70.3 \pm 9.05 歳)であった. 原発部位は, 転移群では舌 2 例, 下顎歯肉 2 例, 上顎歯肉 1 例, 非転移群では舌 2 例, 下顎歯肉 2 例, 上顎歯肉 1 例, 頬粘膜 1 例であった. pTNM は, 転移群では T1 が 1 例, T2 が 2 例, T3 が 1 例, T4 が 1 例, N1 が 2 例, N2b が 3 例, 非転移群では T1 が 2 例, T2 が 3 例, T4 が 1 例であった. 予後については, 転移群では後発頸部転移症例が 1 例, 術後 5 年経過症例が 2 例, 術後 5 年未満症例が 2 例, 非転移群では術後 5 年経過症例が 2 例, 術後 5 年未満症例が 4 例であった. リンパ管侵襲は, 転移群, 非転移群ともに全例で認められなかった. 切除断端は, 転移群, 非転移群ともに全例で陰性であった. YK 分類は, 転移群では全例で YK-3 であった. 非転移群では, YK-2 が 1 例, YK-3 が 3 例, YK-4C が 2 例であった. 組織学的悪性度は, 転移群は全例で Grade 1 であった. 非転移群では Grade 1 が 4 例, Grade 2 が 2 例であった.

リンパ節の大きさについての結果を Fig.2, 3 に示す. M(+)(+)群の短径の最小値 3.50mm・最大値 16.30mm (平均値 \pm SD ; 6.14 \pm 3.11mm), 長径の最小値 3.62mm・最大値 17.40mm (9.33 \pm 3.40mm), 短長径比は 0.68 であった. M(+)(-)群の短径の最小値 0.54mm・最大値 6.11mm (2.22 \pm 1.23mm), 長径の最小値 1.48mm・最大値 17.92mm (4.40 \pm 2.79mm), 短長径比は 0.54 であった. M(-)(-)群の短径の最小値 0.74mm・最大値 8.11mm (3.26 \pm 1.83mm), 長径の最小値 1.14mm・最大値 19.92mm (5.97 \pm 3.75mm), 短長径比は 0.59 であった.

M(+)(-)群と M(-)(-)群における病理組織学的に観察した 5 項目の出現頻度と統計解析の結果を Table.2 に示す. lymphocyte predominance は, M(+)(-)群

に 75.68%, M(-)(-)群に 30.45%, germinal center predominance は, M(+)(-)群に 9.01%, M(-)(-)群に 23.64%, sinus histiocytosis は, M(+)(-)群に 85.59%, M(-)(-)群に 35.45%, lymphocyte depletion は, M(+)(-)群に 14.41%, M(-)(-)群に 2.73%, granulomatous reaction は, M(+)(-)群に 34.23%, M(-)(-)群に 1.82%認められた.

考察

原発巣の病理組織学的所見として、リンパ管侵襲、病理組織学的悪性度、YK 分類の検索を行った。

リンパ管侵襲は、リンパ節転移との予後因子となりうることを示唆する¹⁶⁾と報告されている。本研究では、リンパ管侵襲は転移群、非転移群ともに認められなかったため、予後との関連性の検索は至らなかった。病理組織学的悪性度は、一般的に低分化型が転移を生じやすく、また予後も悪いとされている¹⁷⁾。しかし、病理組織学的悪性度とリンパ節転移における明らかな相関はないという報告もある¹⁸⁾。本研究では、転移群では全例が Grade 1、非転移群では Grade 1 が 4 例、Grade 2 が 2 例であり、相関が認められなかった。YK 分類は腫瘍宿主境界部の腫瘍胞巣形態に注目したもので、リンパ節転移と比較的相関し、特に YK-4D にリンパ節転移が多いと報告されている¹⁴⁾。本研究では、転移群では全例で YK-3、非転移群では YK-2 が 1 例、YK-3 が 3 例、YK-4C が 2 例とリンパ節転移との相関関係は認めることができなかった。

次に、頸部リンパ節の大きさの検討を行った。

癌細胞は原発腫瘍巣からリンパ流を介し、被膜下や辺縁洞で腫瘍組織が増殖し、徐々に大きくなっていく¹⁹⁾ことから、転移リンパ節は非転移リンパ節に比べて大きくなる。本研究において、M(+)(+)群である転移リンパ節に腫大傾向が認められ、短径については M(-)(-)群との間に統計学的有意差がみられた。肺癌の縦隔リンパ節における転移、非転移リンパ節の大きさの研究において、非転移リンパ節径と転移リンパ節径間には短径に有意差が認められると報告されている²⁰⁾。リンパ節の短径の計測はリンパ節転移を予測する因子として有用と考える。

また、正常リンパ節の短径：長径の比率は 1：2 の楕円形であるが、転移性

腫瘍細胞の増殖に伴い球体に近づくことから短長径比は 1 に近くなると報告²¹⁾されている。本研究においても、M(+)(+)群の短長径比は 0.68 と、非転移リンパ節に比べて短長径比が 1 に近接していた。M(+)(-)群は 0.54 と正常リンパ節の短長径比である 0.5 に近い値であった。M(-)(-)群は 0.59 と、M(+)(-)群の 0.54 と比べやや大きい値であったが統計学的有意差は認められなかった。M(+)(+)群と M(-)(-)群間にも統計学的有意差は認められなかった。頸部リンパ節の部位によってはもともとの短長径比が 1 に近いリンパ節も存在する²²⁾ため、口腔癌での短長径比は参考程度であり領域ごとの比較などの追加検討が必要であると考ええる。

加えて、今回の大きさの測定として、スライド標本上での測定となっており、正確な大きさとはいい難い。より正確な大きさの測定として、摘出時、ホルマリン固定時、パラフィン包埋時など経時的な大きさの変化も考慮していく必要があると考ええる。

リンパ節は、被膜に包まれたそら豆状の器官である。リンパ液中の異物や抗原を捕捉するろ過装置ならびに免疫応答の場として機能している。口腔扁平上皮癌はリンパ行性転移が多く、所属リンパ節である頸部リンパ節では免疫応答が活発に行われている²³⁾。悪性腫瘍に対するリンパ節の反応を評価するため、本研究では IOACHIM'S Lymph Node Pathology¹⁵⁾を参考に、非転移リンパ節を 5 つの観察項目に分けて検索を行った。

lymphocyte predominance は、リンパ球が増加し傍皮質の拡大が認められる。germinal center predominance は、胚中心の過形成が認められる。これらの所見は、リンパ節での免疫応答の反応を示す²⁴⁾。本研究では、M(-)(-)群と M(+)(-)群ともにこれらの所見を有するリンパ節が散見された。

sinus histiocytosis は転移群の非転移リンパ節に多く認められた。癌細胞は輸入リンパ管より辺縁洞に浸潤し、着床および増殖を開始する²⁵⁾。リンパ洞

には、リンパ球、形質細胞、マクロファージが分布しており、リンパ液がリンパ洞に流れる間に異物粒子の 99%以上はマクロファージ及び細網細胞に貪食される²³⁾。本研究の結果から、転移群の非転移リンパ節でも非転移群と比べてリンパ洞でのリンパ球およびマクロファージの活性が多くなると考えられた。

lymphocyte depletion は、リンパ球が減少しており、リンパ球の大きさも縮小傾向である。線維芽細胞や無構造物質によりリンパ球の分離が行われている。これらの変化は消耗したリンパ節の状態を反映しており、予後不良に関連するという報告がされている⁷⁾。本研究の結果では、**lymphocyte depletion** は転移群の非転移リンパ節でやや高値であったが、原因に関する過去の文献は認められず、検討の必要性が残された。

悪性腫瘍における **granulomatous reaction** は、非乾酪性の類上皮肉芽腫の形成を生じており、癌患者の 4.4%に認められる²⁶⁾。全身疾患であるサルコイドーシスと区別し、サルコイド様反応と呼ばれる。悪性腫瘍によるサルコイド様反応とサルコイドーシスを組織学的に区別することは困難である²⁷⁻²⁹⁾。本研究では対象症例の既往歴にサルコイドーシスの所見を有する患者はいなかったため、悪性腫瘍による所属リンパ節のサルコイド様反応と判断した。また、サルコイド様反応の病因についての十分な解明はされていない³⁰⁾。

Brincker は腫瘍細胞に由来する可溶性の抗原因子がリンパ行性に所属リンパ節に流れ、肉芽腫を形成するという仮説を立てているが、抗原因子は不明である²⁷⁾。M(+)(-)群と M(-)(-)群との間に **granulomatous reaction** における統計学的有意差を認めたことから、腫瘍細胞由来の因子が M(+)(-)群のリンパ節に多いことが示唆された。

本研究では、リンパ管侵襲、病理組織学的悪性度、YK 分類でのリンパ節転移との相関関係は認められなかった。これは、対象症例が転移群 5 例、非転

移群 6 例と少ないことが要因のひとつと考えられる。リンパ節の病理組織学的検索では、転移群 5 例の非転移リンパ節 111 個と、非転移群 6 例のリンパ節 220 個の病理組織学的検討を行い、転移群の非転移リンパ節と非転移群リンパ節における観察項目 5 項目で統計学的有意差を認めた。このことから、非転移リンパ節の病理組織学的検索を行い特徴的な所見を見出すことは、予後判定因子の一つとして活用できることが示唆され、臨床的意義が大きいと考えられた。

結語

本研究では，頸部リンパ節転移の有無によって，非転移リンパ節においても lymphocyte predominance, germinal center predominance, sinus histiocytosis, lymphocyte depletion, granulomatous reaction の5つの病理組織学的所見が異なることが示唆された．今後，所属リンパ節における特異的な反応を検索として免疫染色を行い，非転移リンパ節のリンパ節の所見が異なることを見出すことができれば，所属リンパ節の病理組織学的所見が術後の予後予測因子の一つとして活用することが期待できると考えた．

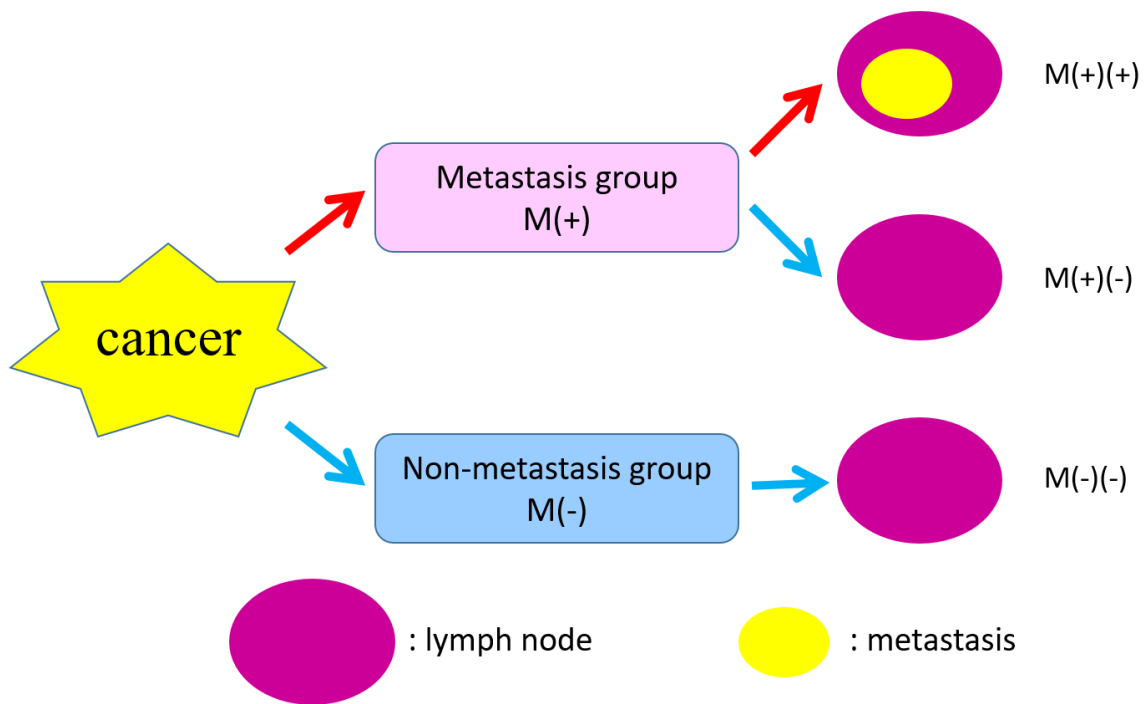


Fig.1 Classification of lymph nodes

The lymph nodes of the metastasis group were classified as M(+)(+) with cancer cell invasion and M(+)(-) without cancer cell invasion. The lymph nodes of the Non-metastasis group were classified as M(-)(-).

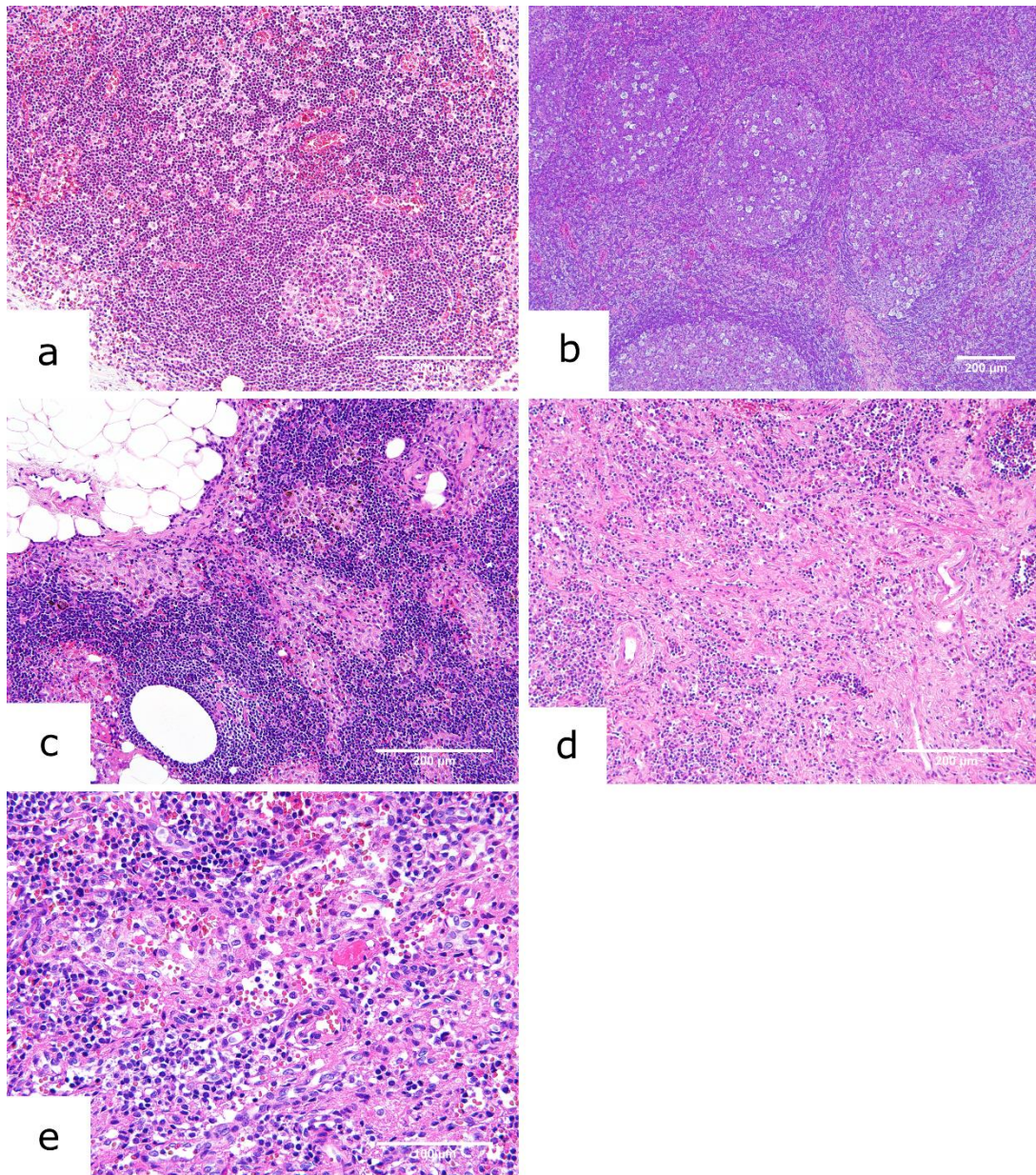


Fig.2 Pathological observation items in cervical lymph nodes

a) lymphocyte predominance; Lymph nodes are enlarged particularly because of the increased number of lymphocytes in the paracortical areas.

b) germinal center predominance; The increase in volume is caused by hyperplasia of follicles, particularly the germinal centers.

c) sinus histiocytosis; The lymph node is enlarged by markedly distended sinuses and hyperplasia of the sinus histiocytes.

d) lymphocyte depletion; Lymph node is of normal or diminished size, and the lymphocytic population is depleted.

e) granulomatous reaction; Due to unknown causes, clusters of epithelioid histiocytes sometimes resembling non-necrotizing granulomas may be seen in draining lymph nodes.

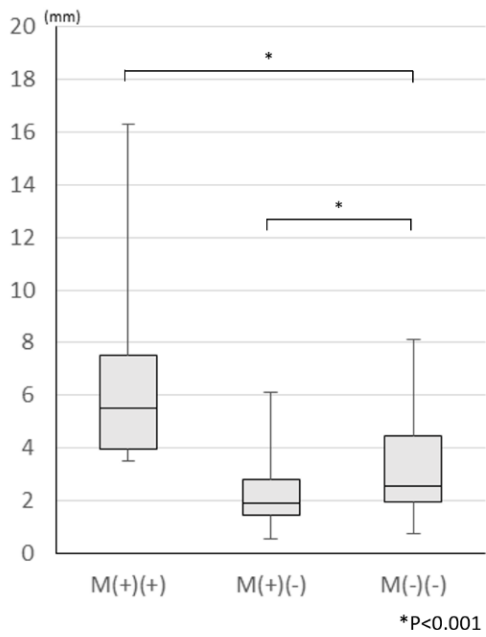


Fig.3 Minor diameter of lymph nodes

The short diameter of the lymph node was significantly different between M(+)(+) and M(-)(-), and between M(+)(-) and M(-)(-).

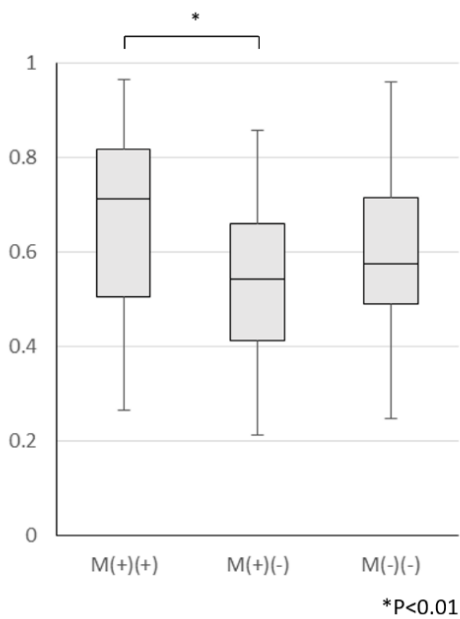


Fig.4 Ratio of minor to major diameter of lymph nodes

The ratio of minor to major diameters was significantly different between M(+)(+) and M(+)(-).

Table 1 Details of the target case

		metastasis group				non-metastasis group		
clinical findings								
sex	male	1				2		
	female	4				4		
age		72-82				62-86		
	average	76.0 ± 4.00				70.3 ± 9.05		
primary site	tongue	2				2		
	lower gingiva	2				2		
	upper gingiva	1				1		
	buccal mucosa	0				1		
pTNM	T	1(1)	2(2)	3(1)	4(1)	1(2)	2(3)	4(1)
	N	1(2)				2b(3)		
	M	0(5)				0(6)		
convalescence	local recurrence	0				0		
	cervical recurrence	0				0		
	metastasis to late departure neck	1				0		
	more than 5 years after surgery	2				2		
	within 5 years after surgery	2				4		
pathological findings of primsry lesion								
lymphatic invasion	+	0				0		
	-	5				6		
margin	+	0				0		
	-	5				6		
grade	1	5				4		
	2	0				2		
	3	0				0		
mode of invasion	1	0				0		
	2	0				1		
	3	5				3		
	4C	0				2		
	4D	0				0		

Table 2 Ratio of pathological observation items in cervical lymph nodes

	M(+)(-)		M(-)(-)		P value
	n	%	n	%	
lymphocyte predominance	84/111	75.68	67/220	30.45	P<0.001
germinal center predominance	10/111	9.01	52/220	23.64	P=0.00128
sinus histiocytosis	95/111	85.59	78/220	35.45	P<0.001
lymphocyte depletion	16/111	14.41	6/220	2.73	P<0.001
granulomatous reaction	38/111	34.23	4/220	1.82	P<0.001

第2章 口腔扁平上皮癌の所属リンパ節におけるリンパ管に関する免疫組織化学的研究

緒言

リンパ行性転移である口腔扁平上皮癌(Oral squamous cell carcinoma:以下OSCC)の所属リンパ節は、口腔癌取り扱い規約⁵⁾に基づき、領域、転移数、大きさ、被膜外浸潤の有無が病理組織学的所見として記述される。しかし、免疫組織化学染色による所見の評価は行われていない。近年、リンパ行性転移の研究として、リンパ管内皮細胞に特異的な抗体であるD2-40抗体に関する知見が増えている^{31,32)}。いくつかの研究では、多種にわたる固形がんのリンパ管占有率は、初期診断時のリンパ節転移の状態と関連していることが報告されており³²⁻³⁵⁾、リンパ管が頸部リンパ節転移に重要な役割を果たすことが示唆されている³⁶⁾。原発巣でのリンパ管の研究は散見される^{37,38)}が、所属リンパ節に注目したリンパ管の研究は少ない。

リンパ節における免疫組織化学染色による所見の評価を行うことは、口腔癌のリンパ行性転移のメカニズムの解明の一端となり、癌細胞のリンパ行性転移の予測へと繋がると考える。そこで、第2章ではOSCC患者の所属リンパ節でのリンパ管の詳細な病理組織学的検討を行った。

対象および方法

1) 対象症例

2006年11月から2018年4月の期間に日本大学松戸歯学部附属病院口腔外科にて原発巣切除術および頸部郭清術を行った口腔扁平上皮癌症例37例のうち、術前化学療法・放射線療法が行われた症例を除外した11例を対象とした。頸部リンパ節転移が認められた5例を転移群、頸部リンパ節転移が認められなかった6例を非転移群とした。本研究は日本大学松戸歯学部倫理委員会(EC-18-16-15-034-2号)の承認を得て実施した。

2) 頸部リンパ節の分類

頸部リンパ節の分類を Fig.1 に示す。切除されたリンパ節を3群に分類した。転移群は、癌細胞の浸潤が認められたリンパ節の M(+)(+)群(n=19)と、癌細胞の浸潤が認められなかったリンパ節の M(+)(-)群(n=92)に分け、非転移群のリンパ節は M(-)(-)群(n=214)とした。使用したリンパ節は患側リンパ節とした。

3) 免疫組織化学染色

手術材料は10%ホルマリン水溶液にて固定後、通法に従ってパラフィン包埋を行い4 μ mの薄切切片を作製し、免疫組織化学的検索に供した。免疫組織化学的染色は、一次抗体には、monoclonal mouse anti-human Podoplanin antigen (Clone D2-40, IgG1, dilution 1:50; Dako Cytomation, Glostrup, Denmark)を用いた。0.5% H_2O_2 メタノールで内因性ペルオキシダーゼのブロッキングを10分間行った。Dako REALTM EnVisionTM/HRP, Rabbit/Mouse (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark)を二次抗体として使用した。発色基質としてDAB+ Liquid (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark)を用い、Mayerのヘマトキシリンで対比染色を行った。陰性コントロールは、一次抗体の省略を行うことで得られた。陽性コントロールには、リンパ管腫症例を用いた。

4) 計測方法

免疫組織化学染色を施した後、光学顕微鏡(4倍)で観察した。リンパ節皮質および被膜におけるリンパ管の数が多い領域(hot spot)を40倍で3か所撮影した。撮影範囲は $11520\mu\text{m}^2$ とした。陽性所見および hot spot の確認は、1人の口腔病理専門医と1人の口腔外科医が行った。被膜直下のリンパ球が占める範囲を皮質領域と定義した。リンパ節の表面を覆う結合組織であるリンパ節被膜から、周囲の脂肪組織と被膜下組織を除いた領域を被膜領域と定義した。

M(+)(+)群の被膜の計測では、腫瘍細胞に近接した被膜(M(+)(+)a)と最も離れている被膜(M(+)(+)n)に分類し、計測を行った。

画像ソフト ImageJ(NIH, Bethesda, MD)を用いて、リンパ管占有率：リンパ節皮質および被膜内に対するリンパ管面積の占有率(lymphatic vascular density:以下 LVD), リンパ管面積(lymphatic vascular area:以下 LVA), リンパ管形態(lymphatic vascular morphology:以下 LVM), リンパ管数(lymphatic vascular counts:以下 LVC)について数量化した。

LVD は、リンパ節皮質と被膜内における D2-40 陽性リンパ管領域占有率とした。LVA は、リンパ節皮質と被膜における D2-40 陽性リンパ管内腔面積とした。LVM は、リンパ節皮質と被膜内における D2-40 陽性リンパ管の短径とした。LVC は、リンパ節皮質と被膜内における D2-40 陽性リンパ管の数を計測した。

リンパ節皮質におけるリンパ管の検討では、撮影した画像をリンパ節皮質領域と D2-40 陽性リンパ管内腔領域に分け、二値化した。二値化像を Fig.5 に示す。リンパ管内腔領域を黒色、リンパ節皮質領域または被膜領域を灰色、被膜外領域および被膜下領域を白色とした。

リンパ節被膜内におけるリンパ管の検討では、リンパ節被膜下領域および

被膜外領域を各画像から切り取り，これらの画像を手動追跡によって D2-40 陽性リンパ管内腔領域と被膜領域に分け二値化した．

次に，二値化像から LVD および LVA を算出した．LVD は以下の式から算出した．

リンパ節皮質リンパ管： $(\text{D2-40 陽性リンパ管内腔領域} / \text{D2-40 陽性リンパ管内腔領域およびリンパ節皮質領域}) \times 100$

被膜内リンパ管： $(\text{D2-40 陽性リンパ管内腔領域} / \text{D2-40 陽性リンパ管内腔領域および被膜領域}) \times 100$

それぞれの中央値を各群で比較した．

5) 統計処理

転移群と非転移群の 2 群の比較には Mann-Whitney の U 検定，M(+)(+)群と M(+)(-)群の比較および M(+)(+)a 群と M(+)(+)n 群の比較には，Wilcoxon の符号付き順位検定を行った．有意水準は 5%とした．統計処理には統計ソフトウェアの SPSS Statistics 20.0(IBM, 東京)を用いた．

結果

対象症例を Table.3 に示す. 対象は, 転移群 5 例, 非転移群 6 例であった. 性別は, 転移群では男性 1 例, 女性 4 例, 非転移群では男性 2 例, 女性 4 例であった. 年齢は, 転移群では 72~82 歳で平均 \pm (SD)は 76.0 \pm 4.00 歳であった. 非転移群では 62~86 歳で平均は 70.3 \pm 9.05 歳であった. 原発部位は, 転移群では舌 2 例, 下顎歯肉 2 例, 上顎歯肉 1 例, 非転移群では舌 2 例, 下顎歯肉 2 例, 上顎歯肉 1 例, 頬粘膜 1 例であった.

D2-40 抗体の免疫組織化学染色の結果を Fig.6 に示す. 所属リンパ節の皮質および被膜内に, D2-40 抗体陽性リンパ管を認めた.

皮質における LVD, LVA, LVM, LVC の結果を Fig.7 に示す.

皮質における LVD(中央値[第一四分位数-第三四分位数])は, M(-)(-)群は 1.46 [1.19-1.77] %, M(+)(-)群は 5.54 [4.82-6.71] %, 転移(+)(+)群は 7.09[6.61-7.29] %であり, M(-)(-)群と M(+)(-)群, M(-)(-)群と M(+)(+)群で有意差が認められた. M(+)(-)群と M(+)(+)群での有意差は認められなかった.

皮質における LVA は, M(-)(-)群は 215 [177-222] μm^2 , M(+)(-)群は 176 [144-180] μm^2 , M(+)(+)群は 206 [194-334] μm^2 であり, M(-)(-)群と M(+)(-)群, M(-)(-)群と M(+)(+)群, M(+)(-)群と M(+)(+)群で有意差を認めなかった.

皮質における LVM は, M(-)(-)群は 13 [13-16] μm , M(+)(-)群は 12 [10-12] μm , M(+)(+)群は 13 [12-16] μm であり, M(-)(-)群と M(+)(-)群, M(-)(-)群と M(+)(+)群, M(+)(-)群と M(+)(+)群に有意差は認めなかった.

皮質における LVC は, M(-)(-)群は 5.0 [4-6] 個, M(+)(-)群は 10.5 [8-11] 個, M(+)(+)群は 11.5 [10.5-13.3] 個であり, M(-)(-)群と M(+)(-)群, M(-)(-)群と M(+)(+)群に有意差を認めた. M(+)(-)群と M(+)(+)群での有意差は認められなかった.

被膜における LVD, LVA, LVM, LVC の結果を Fig.7 に示す.

被膜における LVD は, M(-)(-)群は 3.48 [2.05-4.36] %, M(+)(-)群は 7.30 [5.47-8.90] %, M(+)(+)群は 8.42 [4.75-15.37] % であり, M(-)(-)群と M(+)(-)群, M(-)(-)群と M(+)(+)群で有意差が認められた. M(+)(-)群と M(+)(+)群での有意差は認められなかった.

被膜における LVA は, M(-)(-)群は 237 [208.5-326] μm^2 , M(+)(-)群は 207 [175-313] μm^2 , M(+)(+)群は 143.5 [118.9-304.8] μm^2 であり, M(-)(-)群と M(+)(-)群, M(-)(-)群と M(+)(+)群, M(+)(-)群と M(+)(+)群での有意差は認められなかった.

被膜における LVM は, M(-)(-)群は 11 [10-15] μm , M(+)(-)群は 12 [12-17] μm , M(+)(+)群は 10.5 [8.63-14.3] μm であり, M(-)(-)群と M(+)(-)群, M(-)(-)群と M(+)(+)群, M(+)(-)群と M(+)(+)群に有意差は認めなかった.

被膜における LVC は, M(-)(-)群は 2.5 [1-3] 個, M(+)(-)群は 7 [5-8] 個, M(+)(+)群は 7.7 [7-13.1] 個であり, M(-)(-)群と M(+)(-)群, M(-)(-)群と M(+)(+)群に有意差を認めた. M(+)(-)群と M(+)(+)群での有意差は認められなかった.

皮質および被膜における LVD, LVC では, M(-)(-)群と M(+)(-)の間と M(-)(-)群と M(+)(+)群の間に有意差を認めた.

M(+)(+)a 群と M(+)(+)n 群の比較結果を Fig.8 に示す.

LVD は M(+)(+)a 群で 8.52 [3.04-19.2] %, M(+)(+)n 群で 8.32 [7.34-9.82] % であり, 有意差は認めなかった. LVA は M(+)(+)a 群で 139.5 [50.0-143.0] μm^2 , M(+)(+)n 群で 331.5 [144.0-440.5] μm^2 であり, 有意差を認めた. LVM は M(+)(+)a 群で 10.0 [6.0-11.0] μm , M(+)(+)n 群で 14.5 [9.0-15.0] μm であり, 有意差を認めた. LVC は M(+)(+)a 群で 14.5 [8.3-15.0] 個, M(+)(+)n 群で 7 [4.6-7.1] 個であり, 有意差を認めた.

考察

悪性腫瘍の主な転移経路は、血行性転移とリンパ行性転移である。血行性転移については形態学的及び分子生物学的知見が比較的多く報告されており、原発巣における血管侵入にはじまり、血流を介して遠隔組織への定着と増殖のプロセスに関して一定の知見が得られている。一方、リンパ行性転移については、標準化された抗体がなかったため、血行性転移のような一定の知見は得られてこなかった。近年、リンパ管内皮に特異的なマーカーが取扱い規約⁵⁾のリンパ管侵襲の検索に使用されており、原発巣におけるリンパ行性転移の研究にも使用されている^{31,32)}。モノクローナル抗体 D2-40 は 38kDa の O 結合型膜貫通シアロ糖タンパク質であり、リンパ管の内皮細胞に特異的に発現する。原発巣でのリンパ管の研究は散見される^{37,38)}が、所属リンパ節に注目したリンパ管の研究は少ない。脈管の分布と疾患の関係性について、血管やリンパ管密度及びその面積を病理組織標本上で測定されており、それぞれの疾患との関連が報告されている^{39,40)}。したがって、本研究では、OSCC 患者の頸部郭清術にて切除したリンパ節のリンパ管の存在および分布を評価した。

M(-)(-)群と M(+)(+)群では、皮質と被膜内ともに、LVD に有意差を認めた。M(+)(+)群のリンパ節は、悪性腫瘍細胞に侵されたリンパ節である。扁平上皮癌における原発腫瘍胞巣内でのリンパ管の占有率の増加とリンパ節転移との相関が報告されている^{38,41,42)}。特に井上らは、リンパ節への非転移症例と比べて転移症例での原発腫瘍胞巣内での LVD が有意に高いことを報告している⁴¹⁾。M(-)(-)群と M(+)(+)群で LVD に有意差を認めることから、原発腫瘍胞巣内のリンパ管占有率が増加し、所属リンパ節においてもリンパ管占有率が増加することで、より多くの癌細胞がリンパ節へ流入・定着して所属リンパ節転移が起きていると考えられる。

また、M(-)(-)群と M(+)(-)群においても、皮質と被膜内ともに、LVD に有意差を認めた。M(+)(-)群のリンパ節は、転移群の癌細胞の浸潤のないリンパ節である。このことから、転移群においては、癌細胞の浸潤のないリンパ節であってもリンパ管の占有率の増加がおきていることが示唆された。

転移群の転移リンパ節内において、M(+)(+)a 群と M(+)(+)n 群間での D2-40 陽性リンパ管の比較検討を行った。LVD に有意差を認めないことから、腫瘍細胞の近接の有無によるリンパ管の占有率は変わらないことが考えられる。しかし、LVA、LVM は近接しない被膜で有意差が認められ、LVC は近接する被膜で有意差が認められた。このことから、所属リンパ節における被膜部でのリンパ管数の増加により腫瘍細胞が流入し定着・増殖することでリンパ節転移が起き、そこから対側の被膜ではリンパ管の形態変化や拡張が起きることと他のリンパ節への転移へ繋がると推察された。

リンパ管占有率の増加のパターンには、リンパ管数の増加、リンパ管の面積の増加、あるいはその両方の 3 パターンが挙げられる。本研究では、M(-)(-)群と M(+)(-)群、M(-)(-)群と M(+)(+)群において LVC での有意差を認め、LVA と LVM での有意差は認められなかった。このことから、転移群の所属リンパ節におけるリンパ管の占有率の増加は、リンパ管の形態変化や拡張による面積の増加よりもリンパ管数の増加によるものであることが示唆された。

結語

頸部郭清術にて切除した OSCC 患者の所属リンパ節の免疫組織化学染色を行いリンパ管について検索し、M(+)(-)群でのリンパ管占有率の増加とリンパ管数の増加に統計学的有意差を認めた。このことから、頸部郭清術にて切除した OSCC 患者の所属リンパ節を免疫組織化学染色にて検索を行うことで、リンパ管占有率の変化による病理組織学的所見が術後の予後判定因子のひとつとなりうることが示唆された。今後、OSCC 患者の所属リンパ節の病理組織学的所見と予後の関連性の検索を行うことで臨床応用を目指したい。

cortex

capsule

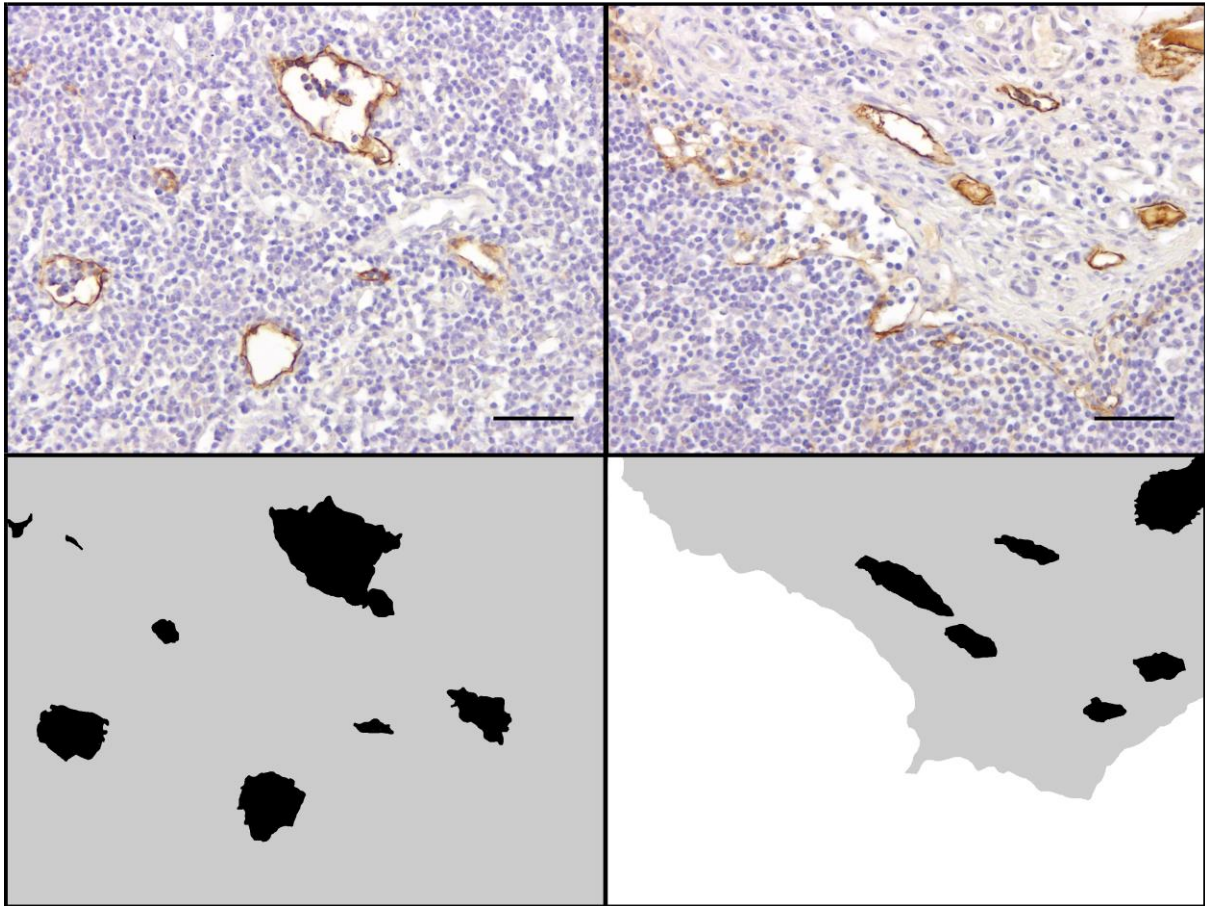


Fig.5 Binarized image of lymphatic vessels in lymph node

These images were then divided into D2-40-positive lymphatic vascular lumen regions and capsule regions, and they were binarized by manual tracing. Scale bar indicates 50 μ m.

cortex: Black: Lymphatic vessel Gray: cortex area

capsule: Black: Lymphatic vessel Gray: capsule area White: subcapsular tissue

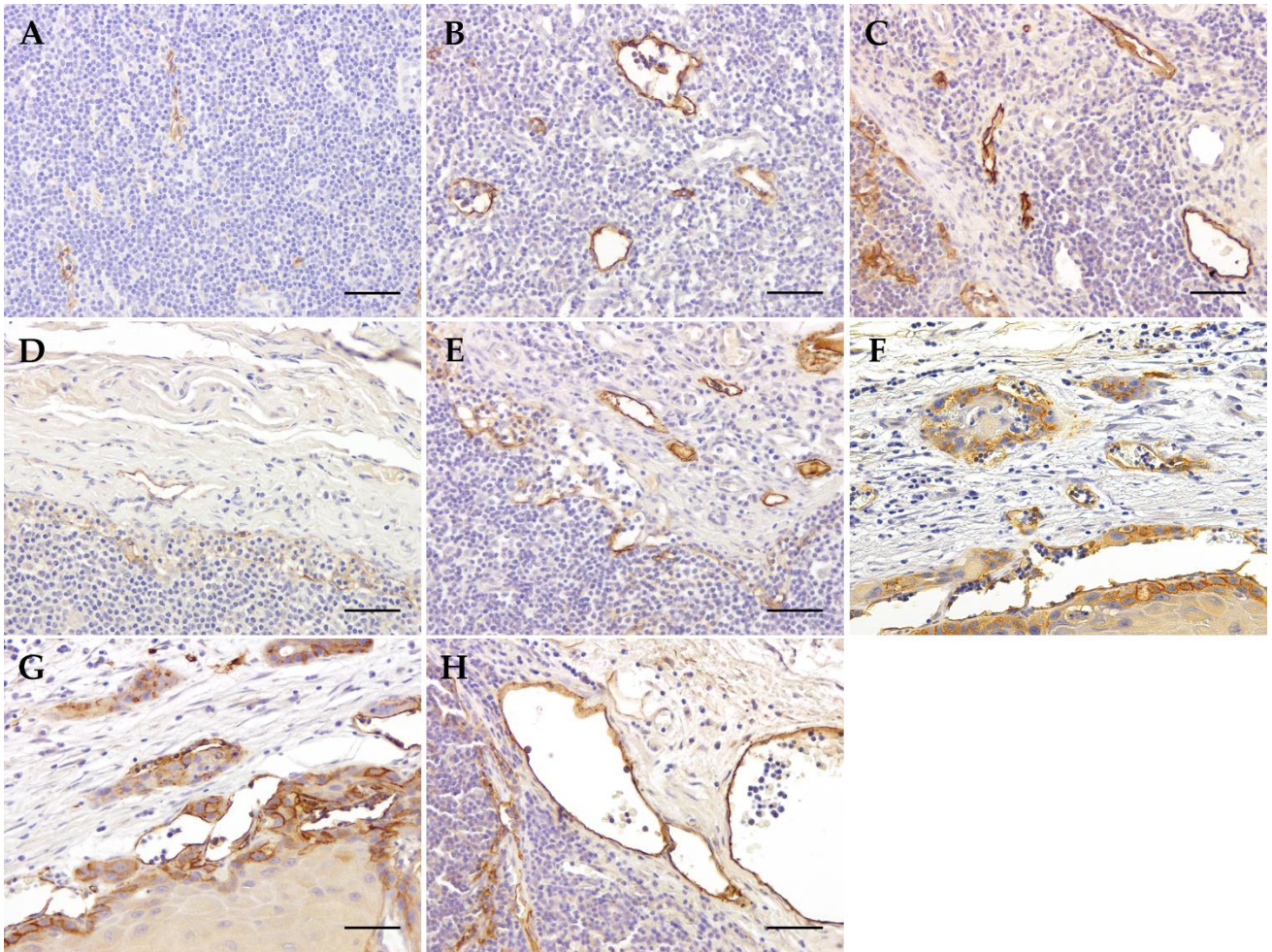
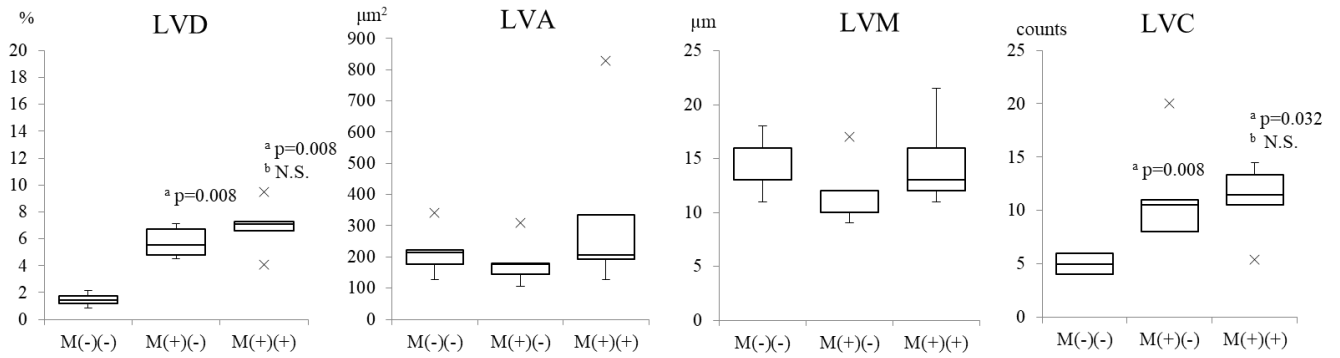


Fig.6 Lymphatic vessels in lymph node (D2-40)

D2-40-positive lymphatic vessels are stained brown. (A) to (C) are cortex regions. (D) to (H) are capsule regions. (A) and (D) are the M(-)(-) group, (B) and (E) are the M(+)(-) group, and (C) and (F) are the M(+)(+) group. (G) is the M(+)(+)a group adjacent to the tumor cells. (H) is the M(+)(+)n group not adjacent to the tumor cells. Scale bar indicates 50 μ m.

cortex



capsule

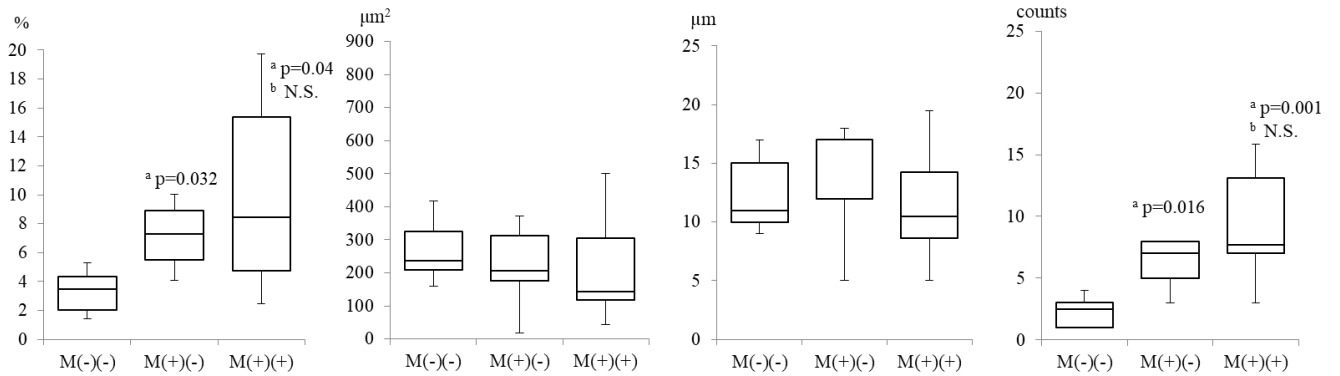


Fig.7 Comparison of LVD, LVA, LVM and LVC in cortex and capsule

The Mann-Whitney U test was used to compare the metastasis and non-metastasis groups. The Wilcoxon signed-rank test was used to compare the M(+)(-) and M(+)(+) groups. a; vs M(-)(-) b; vs M(+)(-) x; Outlier

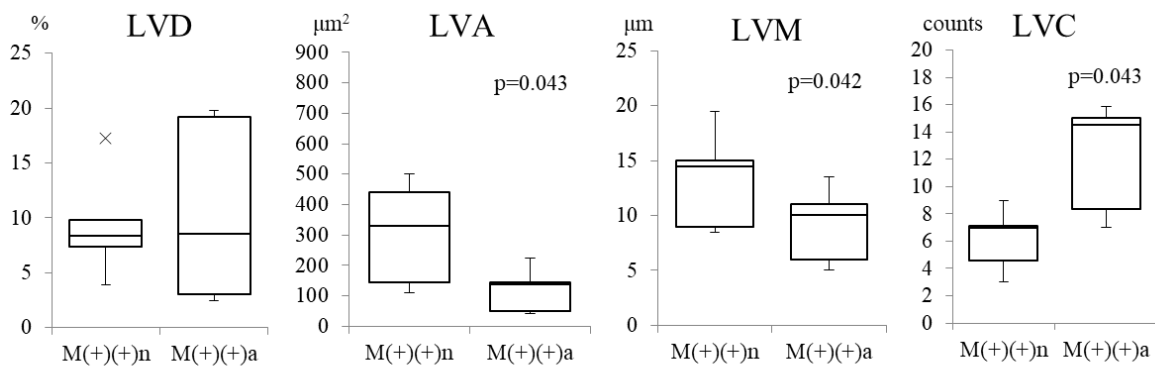


Fig.8 Comparison of LVD, LVA, LVM and LVC between capsule adjacent to tumor and not adjacent to tumor

The Wilcoxon signed-rank test was used to compare the M(+)(+)n and M(+)(-)a groups. x; Outlier

Table.3 Details of the target case

		metastasis group	non-metastasis group
sex	male	1	2
	female	4	4
age		72-82	62-86
	average	76.0 ± 4.00	70.3 ± 9.05
primary site	tongue	2	2
	lower gingiva	2	2
	upper gingiva	1	1
	buccal mucosa	0	1

総括

口腔扁平上皮癌におけるリンパ節転移の有無は、患者の予後に影響する重要な因子である。口腔扁平上皮癌患者の予後の予測が可能となれば、診断精度の向上につながると考える。そこで本研究では、口腔扁平上皮癌患者の頸部郭清術にて切除したリンパ節の詳細な検索を行った。第1章では、所属リンパ節の大きさの計測と病理組織学的所見の検索を行い、転移群と非転移群の比較検討を行った。第2章では、免疫組織化学的所見の抽出を目的とし、リンパ管の形態計量学的検討を行い、転移群と非転移群の比較検討を行った。

リンパ節の短径は、M(-)(-)群と M(+)(-)群である非転移リンパ節と比較して M(+)(+)群である転移リンパ節が腫大していた。

リンパ節の病理組織像の検索では、M(+)(-)群と M(-)(-)群で、病理組織学的検索5項目である lymphocyte predominance, germinal center predominance, sinus histiocytosis, lymphocyte depletion, granulomatous reaction の出現頻度に有意差が認められた。

リンパ節におけるリンパ管の検索では、M(+)(-)群のリンパ管占有率が増加し、リンパ管数の増加が認められた。転移群では、原発腫瘍胞巣内でのリンパ管占有率の増加により、より多くの癌細胞がリンパ節へ流入・定着することでリンパ節転移が引き起こされ、またリンパ節内のリンパ管占有率の増加により、他のリンパ節への転移へ繋がっていくと推察された。

本研究によって得られた、口腔扁平上皮癌患者の頸部郭清術により摘出した所属リンパ節の病理組織学的所見、免疫組織化学的所見の詳細な検索は、予後予測因子の一つとして活用できると考えられる。

参考文献

- 1) Hori M, Matsuda T, Shibata A, et al.: Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2009: a study of 32 population-based cancer registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) project, *Jpn J Clin Oncol*, 45: 884-891, 2015.
- 2) 日本口腔腫瘍学会 口腔癌治療ガイドライン改訂委員会, 日本口腔外科学会 口腔癌診療ガイドライン策定委員会 合同委員会編: 科学的根拠に基づく口腔癌診療ガイドライン, 2013 年版, 11-13, 金原出版株式会社, 東京, 2012.
- 3) 有吉靖則, 島原政司, 小村健, 他: 2002 年度(社)日本口腔外科学会指定研究機関を受診した顎口腔領域の悪性腫瘍に関する疫学的研究, *日口外誌*, 52: 401-410, 2006.
- 4) Yamamoto N, Sato K, Yamauchi T: A 5-year activity report from the oral cancer center, Tokyo Dental College, *Bull Tokyo Dent Coll*. 54:265-273, 2013.
- 5) Japan Society for Oral Oncology, General rules for clinical and pathological studies on oral cancer, 2nd Ed, 12-17, JSOO, Tokyo, 2019.
- 6) Silverberg SG, Chitale AR, Hind AD: Sinus histiocytosis and mammary carcinoma study of 366 radical mastectomies and an historical review, *Cancer* 26:1177-1185, 1970.
- 7) Tsakraklides V, Anastassiades OT, Kersey JH: Prognostic significance of regional lymph node histology in uterine cervical cancer, *Cancer* 31:860-868, 1973.
- 8) Kaufmann M, Wirth K, Scheurer J: Immunomorphological lymph node changes in patients with operable bronchogenic squamous cell carcinoma, *Cancer* 39 : 2371-2377, 1977.
- 9) Bennett SH, Futrell JW, Roth JA: Prognostic significance of histologic host response in cancer of the larynx or hypopharynx, *Cancer* 28:1255-1265, 1971.

- 10) Black MM, Freeman C, Mork T: Prognostic significance of microscopic structure of gastric carcinomas and their regional lymph nodes, *Cancer* 27:703-711, 1971.
- 11) Di Giorgio A, Mingazzini P, Sammartino P: Host defense and survival in patients with lung carcinoma, *Cancer* 89:2038-2045, 2000.
- 12) Okura M, Kagamiuchi H, Tominaga G: Morphological changes of regional lymph node in squamous cell carcinoma of the oral cavity, *Oral Pathol Med* 34:214-219, 2005.
- 13) Yadav ST, Madhu Shankari GS, Chatura K: Immunomorphological assessment of regional lymph nodes for predicting metastases in oral squamous cell carcinoma, *Indian J Dent Res* 23:121-122, 2012.
- 14) Yamamoto E, Miyakawa A, Kohama G: Mode of invasion and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity, *Head Neck Surg*, 6: 938-947, 1894.
- 15) Harry LL, L.Jeffrey M: IOACHIM'S Lymph Node Pathology 4th EDITION, Lippincott Williams&Wilkins, America, 2008.
- 16) Okada Y: Relationships of cervical lymph node metastasis to histopathological malignancy grade, tumor angiogenesis, and lymphatic invasion in tongue cancer, *Odontology* 98, 153-159, 2010.
- 17) 津山泰彦, 中塚貴志, 森良之, 他: 舌扁平上皮癌における頸部リンパ節転移に関する臨床病理組織学的検討, *埼玉医科大学雑誌*, 29: 161-165, 2002.
- 18) 志水賢一郎, 牧野邦彦, 天津睦郎, 他: 舌癌における頸部リンパ節転移予測因子に関する病理組織学的研究, *口咽科*, 13: 269-279, 2001.
- 19) 古本啓一, 岡野友宏, 小林馨ら編: 歯科放射線学 第4版, 277-283, 医歯薬出版株式会社, 東京, 2007.

- 20) 藤本公則: 縦隔リンパ節転移診断における基礎的研究—非小細胞肺癌患者の摘出リンパ節の非転移,転移リンパ節径の比較—, 肺癌, 33: 533-542, 1993.
- 21) Steinkamp HJ, Cornehl M, Hosten N, et al.: Cervical lymphadenopathy: ratio of long- to short-axis diameter as a predictor of malignancy, Br J Radiol, 68:266-270, 1995.
- 22) 林孝文, 新国農, 斎藤美紀子, 他: 口腔扁平上皮癌頸部リンパ節転移の画像診断, Niigata Dent. 37: 173-187, 2002.
- 23) 磯川桂太郎, 中村雅典, 柳澤考彰, 他: 組織学・口腔組織学 第4版, 141-144, わかば出版株式会社, 東京, 2014.
- 24) Raj L SM, Boaz K, Natarajan S: Prognostic Significance of Lymph Node Pattern in Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC), J Clin Diagn Res, 8(1):232-235, 2014.
- 25) 黒川英雄, 村田朋之, 山下善弘, 他: 口腔扁平上皮癌における頸部リンパ節転移の臨床病理組織学的検討, 日本口腔科学会雑誌, 47: 9-15, 1998.
- 26) Brincker H: Sarcoid reactions in malignant tumours, Cancer Treat Rev, 13:147-156, 1986.
- 27) Anderson R, James DG, Peters PM, et al.: Local sarcoid-tissue reactions, Lancet, 1:1211-1213, 1962.
- 28) 千葉保之, 細田裕: サルコイドーシスの概念と歴史, 最新医学 27: 1252-1258, 1972.
- 29) 坂上慎二, 尾島裕和, 秋田弘俊 他: 自己免疫疾患の検索中に発見された肺腺癌にサルコイド反応を伴った1症例, 日呼吸会誌, 37: 204-208, 1999.
- 30) Kuś E, Gabryś J, Czyżewski D: False positive result of 18F-FDG PET in patient with lung cancer due to sarcoid-like reaction in regional lymph nodes, Pneumonol Alergol Pol, 82:548-554, 2014.
- 31) Zhang Z, Helman JI, Li LJ: Lymphangiogenesis, lymphatic endothelial Cells and

lymphatic metastasis in head and neck cancer – A review of mechanisms, *Int J Oral Sci*, 2: 5-14, 2010.

32) Van der Auwera I, Cao Y, Tille JC, et al.: First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. *Br J Cancer*, 95: 1611-1625, 2006.

33) Bono P, Wasenius VM, Heikkilä P, et al.: High LYVE-1-positive lymphatic vessel numbers are associated with poor outcome in breast cancer, *Clin Cancer Res*, 10: 7144-7149, 2004.

34) Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, et al.: Lymph vessel density correlates with nodal status, VEGF-C expression, and prognosis in breast cancer, *Breast Cancer Res. Treat*, 91: 125-132, 2005.

35) Tomita N, Matsumoto T, Hayashi T, et al.: Lymphatic invasion according to D2-40 immunostaining is a strong predictor of nodal metastasis in superficial squamous cell carcinoma of the esophagus: Algorithm for risk of nodal metastasis based on lymphatic invasion, *Pathol Int*, 58: 282-287, 2008.

36) Zhao D, Pan J, Li XQ, et al.: Intratumoral lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma and its clinicopathological significance, *J Oral Pathol Med*, 37: 616-625, 2008.

37) Seppala M, Pohjola K, Laranne J, et al.: High relative density of lymphatic vessels predicts poor survival in tongue squamous cell carcinoma, *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 273:4515-4524, 2016.

38) Agarwal D, Pardhe N, Bajpai M, et al.: Characterization, localization and patterning of lymphatics and blood vessels in oral squamous cell carcinoma: A comparative study using D2-40 and CD-34 IHC marker, *J Clin Diagn Res*, 8: 86-89, 2014.

- 39) Inomata T, Utsunomiya T, Suemitsu M: A histopathological and immunohistochemical study of vascular localization on schwannoma in the oro-maxillofacial region, *Int J of Oral-Med Sciences*, 9: 159-166, 2011.
- 40) Suemitsu M: A Pathomorphological Study of fractal analysis in parenchymal-stromal border on keratocystic odontogenic tumor – with special reference to proliferative activity and vascular distribution – , *Int J Oral-Med Sci*, 10: 372-383 2012.
- 41) Inoue M, Roan CH, Abe T, et al.: Localization and characterization of lymphatic vessels in oral and cervical squamous cell carcinoma, *Exp Ther med*, 2: 793-797, 2011.
- 42) Watanabe S, Kato M, Kotani I, et al.: Lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor expression in squamous cell carcinomas of lip and oral cavity: A clinicopathological analysis with immunohistochemistry using antibodies to D2-40, VEGF-C and VEGF-D, *Yonago Acta Med*, 56: 29-37,2013.