

ความชุกของไวรัสฮิวแมนพาพิวโลมาในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิด สแควมัสเซลล์
ที่ไม่ใช่ มะเร็งหลังโพรงจมูก ในผู้ป่วยอายุไม่เกิน 45 ปีที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

นายธีรภัทร อังตระกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

PREVALENCE OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN NON-NASOPHARYNGEAL HEAD
AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA IN PATIENTS AGED NOT OVER
45 YEARS AT THE KING CHULALONGKORN MEMORIAL HOSPITAL

Mr. Teerapat Ungtrakul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medicine

Department of Medicine

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ความชุกของไวรัสฮิวแมนพาพิวโลมาในมะเร็งศีรษะและ
ลำคอชนิด สแควมัสเซลล์ที่ไม่ใช่ มะเร็งหลังโพรงจมูก ใน
ผู้ป่วยอายุไม่เกิน 45 ปีที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

โดย

นายธีรภัทร อึ้งตระกูล

สาขาวิชา

อายุรศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมบูรณ์ คีลาวัฒน์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ โสภณ นภทร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ธนินทร์ อัสววิเชียรจินดา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมบูรณ์ คีลาวัฒน์)

..... กรรมการ

(อาจารย์ นายแพทย์ จักรพันธ์ ชัยพรหมประสิทธิ์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ธิดิยา ลีริสิงห์)

ธีรภัทร อึ้งตระกูล : ความชุกของไวรัสฮิวแมนพาพิวโลมา ในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งหลังโพรงจมูก ในผู้ป่วยอายุไม่เกิน 45 ปีที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ (PREVALENCE OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN NON-NASOPHARYNGEAL HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA IN PATIENTS AGED NOT OVER 45 YEARS AT THE KING CHULALONGKORN MEMORIAL HOSPITAL) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ.นพ.วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ.นพ.สมบุญ คีลาวัฒน์, 80 หน้า.

ที่มา มะเร็งศีรษะและลำคอที่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวีมีอุบัติการณ์เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยอายุน้อย อย่างไรก็ตาม ความชุกของไวรัสเอชพีวีในประชากรกลุ่มดังกล่าวยังไม่ได้มีการศึกษาที่ชัดเจน

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความชุกของไวรัสเอชพีวีในผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอที่ไม่ใช่มะเร็งหลังโพรงจมูก ในผู้ป่วยกลุ่มอายุน้อยและหาความสัมพันธ์ของสถานะไวรัสเอชพีวีกับพยากรณ์และการดำเนินโรค

ประชากรและวิธีการ ผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งหลังโพรงจมูก และอายุไม่เกิน 45 ปีที่ได้รับการรักษาที่รพ.จุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ระหว่างปีพ.ศ. 2543-2553 โดยตรวจหาดีเอ็นเอของไวรัสเอชพีวีด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ในชิ้นเนื้อพาราฟินของผู้ป่วยจำนวน 71 ราย และเปรียบเทียบผลการตรวจกับการดำเนินโรค

ผลการวิจัย พบผลบวกต่อดีเอ็นเอไวรัสเอชพีวีจำนวน 28 ราย คิดเป็นร้อยละ 39.4 โดยเมื่อแบ่งตามตำแหน่งรอยโรค พบผลบวกร้อยละ 32 ในมะเร็งช่องปาก, ร้อยละ 47 ในมะเร็งคอหอยส่วนช่องปากและร้อยละ 43 ในมะเร็งคอหอยส่วนล่างและมะเร็งกล่องเสียง ทั้งนี้ ไม่พบความแตกต่างของลักษณะพื้นฐานทางคลินิก และการรักษาเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ให้ผลบวกและผลลบต่อดีเอ็นเอไวรัสเอชพีวี นอกจากนี้ พบว่าระยะของก้อนมะเร็ง (ระยะที่ 3 หรือ 4) และการกระจายไปต่อมน้ำเหลือง มีผลต่อการพยากรณ์โรคที่แย่ กว่า โดยที่ไม่พบความสัมพันธ์ของไวรัสเอชพีวีกับพยากรณ์โรค

สรุปผลการวิจัย พบความชุกของไวรัสเอชพีวีในกลุ่มผู้ป่วยอายุน้อยใกล้เคียงกับการศึกษาอื่นๆ อย่างไรก็ตาม ผลดังกล่าวไม่มีความสัมพันธ์กับพยากรณ์โรค

ภาควิชา อายุรศาสตร์..... ลายมือชื่อนิสิต.....
 สาขาวิชา..... อายุรศาสตร์..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา.... 2554..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5374638330: MAJOR MEDICINE (ONCOLOGY)

KEYWORDS: HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV)/HEAD AND NECK CANCER

TEERAPAT UNGTRAKUL: PREVALENCE OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN NON-NASOPHARYNGEAL HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA IN PATIENTS AGED NOT OVER 45 YEARS AT THE KING CHULALONGKORN MEMORIAL HOSPITAL. ADVISOR: ASST.PROF.VIROTE SRIURANPONG, M.D., CO-ADVISOR: ASSOC.PROF.SOMBOON KELAWAT, M.D., 80 PP.

Background: HPV-associated HNSCC has been commonly described to associate with younger patients. However the true prevalence of HPV in this specific population remains unclear.

Objectives: The aim of this study is to determine the prevalence of HPV in HNSCC reference to young patients and find an association between HPV status and clinical outcome.

Patients and methods: We collected archival 71 paraffin-embedded tumor tissue samples from HNSCC patients diagnosed and treated at The King Chulalongkorn Memorial Hospital between 2000 and 2010. The major inclusion criterion was the age at diagnosis less than 45 year-old. The HPV status was determined by HPV polymerase chain reaction (PCR). The clinicopathological correlations with HPV status were analyzed.

Results: Twenty-eight (39.4%) of the 71 HNSCC samples exhibited HPV DNA by PCR. Among cancer sites, 8 of 25 (32%) of oral cavity, 8 of 17 (47%) of oropharynx and 12 of 28 (43%) of hypopharynx and larynx displayed HPV DNA in tumor tissue. There was no major difference in demographic data, tumor characteristic and treatment modalities between HPV DNA-negative and HPV DNA-positive samples. Survival analyses indicated that T3/4 and nodal metastasis were predictors for poorer survival. Surprisingly, the presence of HPV DNA was not a significant predictor for the survival (p=0.53).

Conclusion: Though HPV genome was found moderately in our young HNSCC patients, HPV DNA is not a predictor for a survival in this subset of HNSCC.

Department..... Medicine..... Student’s signature.....
 Field of Study:... Medicine..... Advisor’s signature.....
 Academic Year:... 2011..... Co-advisor’s signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนร่วมทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงสมความมุ่งหมาย

ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย
2. อาจารย์แพทย์หญิงชนิดา วินะยานุวัตติคุณ ให้คำปรึกษาการทำวิจัย
3. คุณชวลิต แซ่ลือ พนักงานวิจัย ช่วยประสานงานและติดตามเวชระเบียน

และขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยมะเร็งวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ทุกท่าน

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. รองศาสตราจารย์นายแพทย์สมบูรณ์ คีลาวัฒน์ ช่วยตรวจผลทางพยาธิวิทยา
2. คุณจุฑามาศ วงภูมิ ช่วยติดตามชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา

รวมทั้ง แพทย์หญิงนันท์ธิดา ภัทรประยูร, บิดา, มารดา และครอบครัว

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2 คำถามการวิจัย.....	4
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
1.4 สมมติฐาน.....	4
1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	5
1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น.....	5
1.7 คำสำคัญ.....	5
1.8 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย.....	6

บทที่ 1 บทนำ (ต่อ)	หน้า
1.9 รูปแบบการวิจัย.....	6
1.10 ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม.....	6
1.11 ข้อจำกัดของการวิจัย.....	7
1.12 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	7
1.13 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข.....	7
บทที่ 2 มะเร็งศีรษะและลำคอในผู้ป่วยอายุน้อย.....	8
บทที่ 3 ไวรัสฮิวแมน พาพิวโลมาหรือไวรัสเอชพีวี.....	14
บทที่ 4 การตรวจทางอณูพันธุศาสตร์.....	29
บทที่ 5 วัสดุและวิธีการ.....	36
บทที่ 6 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	40
บทที่ 7 อภิปรายผลการวิจัย.....	56
บทที่ 8 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	64
รายการอ้างอิง.....	66
ภาคผนวก.....	71
ภาคผนวก ก.....	72
ภาคผนวก ข.....	79

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....80

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1	แสดงการเปรียบเทียบพยากรณ์โรคมะเร็งศีรษะและลำคอ ระหว่าง กลุ่มผู้ป่วยอายุมาก และอายุน้อย.....	13
ตารางที่ 3.1	รายงานความชุกไวรัสเอชพีวีในมะเร็งศีรษะและลำคอ.....	18
ตารางที่ 3.2	รายงานความชุกไวรัสเอชพีวีในมะเร็งคอหอยส่วนช่องปาก.....	19
ตารางที่ 3.3	แสดงการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลของมะเร็งศีรษะและลำคอ ที่สัมพันธ์และไม่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวี.....	21
ตารางที่ 3.4	แสดงการเปรียบเทียบลักษณะทางคลินิกระหว่างมะเร็งศีรษะและลำคอที่สัมพันธ์ กับไวรัสเอชพีวีและไม่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวี.....	22
ตารางที่ 3.5	แสดงความความไวและความจำเพาะต่อการตรวจสถานะไวรัสเอชพีวี ด้วยวิธีต่างๆ.....	26
ตารางที่ 4.1	แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย.....	35
ตารางที่ 6.1	แสดงข้อมูลพื้นฐานทั่วไปของผู้ป่วยทั้งหมด.....	43
ตารางที่ 6.2	แสดงลักษณะพื้นฐานเปรียบเทียบกลุ่มที่ให้ผลบวกและผลลบต่อการตรวจ ไวรัสเอชพีวี.....	47
ตารางที่ 6.3	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ กับอัตราการรอดชีวิตโดยรวม.....	51
ตารางที่ 6.4	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ กับอัตราการรอดชีวิต แยกตามสถานะ ไวรัสเอชพีวี.....	52

ตารางที่ 6.5	เปรียบเทียบค่ามัธยฐานการรอดชีวิต ระหว่างกลุ่มต่างๆ.....	55
ตารางที่ 7.1	เปรียบเทียบความชุกของไวรัสเอชพีวีในมะเร็งศีรษะและลำคอในผู้ป่วย อายุน้อย.....	58
ตารางที่ 7.2	แสดงเปรียบเทียบความชุกของไวรัสเอชพีวีในมะเร็งศีรษะและลำคอใน ประเทศไทย.....	60
ตารางที่ 7.3	แสดงเปรียบเทียบพยาธิกรณ์โรคของมะเร็งศีรษะและลำคอที่สัมพันธ์กับ ไวรัสเอชพีวี.....	62

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1.1	กรอบแนวคิดการวิจัย.....	5
ภาพที่ 3.1	แสดงโครงสร้างของฮิวแมน พาพิวโลมาไวรัส.....	14
ภาพที่ 3.2	แสดงกลไกการเกิดมะเร็งจาก ไวรัสเอชพีวี.....	16
ภาพที่ 3.3	แสดงสัดส่วนของมะเร็งคอหอยส่วนช่องปาก (A) และมะเร็งศีรษะและลำคอ (B) ที่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวี ในภูมิภาคอเมริกาเหนือและยุโรป.....	17
ภาพที่ 3.4	แสดงความยาวคู่เบสของไพรเมอร์ชนิดต่างๆ ต่อส่วน L1 consensus.....	23
ภาพที่ 3.5	แสดงการย้อมติดสีในนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งโดยวิธี In Situ Hybridization...	25
ภาพที่ 4.1	แสดงกระบวนการของ Nested-PCR.....	31
ภาพที่ 4.2	เครื่องเทอร์โมไซเคิล รุ่น My Cycler thermal cycler.....	34
ภาพที่ 6.1	แสดงการรวบรวมชิ้นเนื้อมะเร็งศีรษะและลำคอในผู้ป่วยอายุน้อยเพื่อทำการตรวจไวรัสเอชพีวี.....	41
ภาพที่ 6.2	แสดงกราฟการรอดชีวิตรวมของผู้ป่วยทั้งหมด.....	45
ภาพที่ 6.3	แสดงกราฟการรอดชีวิตเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ให้ผลบวกและผลลบต่อไวรัสเอชพีวี.....	50
ภาพที่ 6.4	แสดงกราฟการรอดชีวิตเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ให้ผลบวกและผลลบต่อไวรัสเอชพีวีในผู้ป่วยมะเร็งคอหอยส่วนช่องปาก.....	53

ภาพที่ 6.5	แสดงกราฟการรอดชีวิตเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ให้ผลบวกและผลลบต่อ ไวรัสเอชพีวีในผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอที่ไม่ใช่มะเร็งคอหอยส่วน- ช่องปาก.....	54
------------	---	----

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rationale)

มะเร็งศีรษะและลำคอ ที่ไม่ใช่มะเร็งหลังโพรงจมูกพบได้ร้อยละ 3 ของอุบัติการณ์มะเร็งในประเทศไทย โดยพบผู้ป่วยรายใหม่มากกว่า 8000 ราย ระหว่างปี พ.ศ. 2544-2546 โดยพบอุบัติการณ์เพิ่มขึ้นในช่วงอายุ 50-60 ปีขึ้นไป (1)

ผู้ป่วยส่วนใหญ่มักมาพบแพทย์ในระยะโรคลุกลาม ทำให้ได้ผลการรักษาไม่ดี นอกจากนี้ ความแตกต่างของการตอบสนองต่อการรักษามะเร็งศีรษะและลำคอในแต่ละอวัยวะ และการขาดปัจจัยพยากรณ์โรค ทำให้ผลการรักษาในมะเร็งกลุ่มดังกล่าวมักพบอัตราการกลับเป็นซ้ำอยู่ในเกณฑ์สูง และมากกว่าครึ่งของผู้ป่วยเสียชีวิตในระยะเวลา 5 ปี

ปัจจัยทางพฤติกรรมสุขภาพ เช่น การสูบบุหรี่, การเคี้ยวหมาก, การดื่มแอลกอฮอล์, การขาดการดูแลสุขภาพปากและฟัน ถือเป็นปัจจัยสำคัญของการเกิดมะเร็งศีรษะและลำคอที่ไม่ใช่มะเร็งหลังโพรงจมูก อย่างไรก็ตาม จากข้อมูลการศึกษาในปัจจุบัน พบว่าไวรัสเอชพีวี พาพิโลมา (ไวรัสเอชพีวี) เป็นอีกสาเหตุหนึ่งของการเกิดมะเร็งศีรษะและลำคอที่ไม่ใช่มะเร็งหลังโพรงจมูก โดยเฉพาะในผู้ป่วยเพศชายอายุน้อยที่มีประวัติโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ เปลี่ยนคู่นอนบ่อย โดยไม่มีประวัติการสูบบุหรี่หรือดื่มสุรามาก่อน (2)

ในปัจจุบัน ไวรัสเอชพีวี พบมากกว่า 120 สายพันธุ์ โดยพบว่ามียังน้อย 15 สายพันธุ์ที่สามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์เป็นเซลล์มะเร็งได้ สำหรับในมะเร็งศีรษะและลำคอที่ไม่ใช่มะเร็งหลังโพรงจมูก พบว่า กว่าร้อยละ 90 มักเกิดจากการติดเชื้อไวรัสเอชพีวีเพียงสายพันธุ์เดียว มากกว่าการติดเชื้อร่วมหลายสายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ 16 เป็นสายพันธุ์ที่พบได้บ่อยที่สุด รองลงมาคือสายพันธุ์ 18 และสายพันธุ์ 33 ตามลำดับ นอกจากนี้ จากรายงานพบว่าความชุกของการติดเชื้อไวรัสเอชพีวี ในมะเร็งศีรษะและลำคอที่ไม่ใช่มะเร็งหลังโพรงจมูก ยังมีความแตกต่างในแต่ละอวัยวะที่ก่อโรค, ลักษณะประชากรในแต่ละภูมิภาค โดยพบความชุกของไวรัสเอชพีวีเฉลี่ยประมาณร้อยละ 25.9 โดยพบมากในมะเร็งช่องคอ

(Oropharyngeal cancer) ร้อยละ 35.6 รองลงเป็นมะเร็งช่องปาก (Oral cavity cancer) มะเร็งกล่องเสียง (Laryngeal cancer) ร้อยละ 23.5 และร้อยละ 24 ตามลำดับ ในขณะที่อุบัติการณ์ในแต่ละภูมิภาค พบอุบัติการณ์ตั้งแต่ร้อยละ 3-80 (3)

ไวรัสเอชพีวี เป็นดีเอ็นเอไวรัสที่สามารถจับกับเซลล์ผิวหนังชนิดสแควมัส (Squamous epithelium) โดยเมื่อมีการติดเชื้อเกิดขึ้น ไวรัสจะสร้างโปรตีนก่อมะเร็ง (Viral oncoprotein) E6/E7 ซึ่งมีผลให้เกิดการยับยั้งยีน p53 และยีน retinoblastoma (pRb) ซึ่งมีบทบาทต่อวงจรของเซลล์ปกติ ทำให้เกิดการกลายพันธุ์เป็นมะเร็ง โดยพบว่า การกลายพันธุ์ดังกล่าว จะมีการสร้างโปรตีน p16 ที่มากกว่าปกติ (4) ทั้งนี้ การตรวจหาสถานะการติดเชื้อไวรัสเอชพีวีในมะเร็งศีรษะและลำคอที่ไม่ใช่มะเร็งหลังโพรงจมูก ยังไม่มีวิธีมาตรฐานที่ชัดเจน โดยสามารถตรวจได้หลายวิธี เช่น การตรวจการติดเชื้อไวรัสเอชพีวีโดยตรง โดยวิธีเทคนิคปฏิกิริยาพอลิเมอเรส เช่น type-specific PCR, real-time PCR viral loads, การตรวจ type-specific in situ hybridization หรือการตรวจโปรตีนผลิตผลจากไวรัส เช่น การย้อมโปรตีน p16 อิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ เป็นต้น ทั้งนี้ พบความแตกต่างในการวินิจฉัยสถานะไวรัสเอชพีวีในแต่ละวิธีเพียงแค่อ้อยละ 7(5)

จากการศึกษา พบว่า มะเร็งศีรษะและลำคอที่ไม่ใช่มะเร็งหลังโพรงจมูกที่ตรวจพบไวรัสเอชพีวี เป็นกลุ่มที่มีพยากรณ์โรคที่ดีกว่ากลุ่มที่ไม่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวี โดยจะตอบสนองต่อรังสีรักษาและเคมีบำบัดได้ดีกว่าและมีอัตราการรอดชีวิตนานกว่า (6) โดยเชื่อว่าไวรัสเอชพีวีทำให้เกิดการทำลายยีน p53 ซึ่งเมื่อได้รับการรักษา ทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิส (Apoptosis) ต่างจากกลุ่มที่ตรวจไม่พบไวรัสเอชพีวี ที่มักพบการกลายพันธุ์ของยีน p53 ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการไม่ตอบสนองต่อการรักษาดังกล่าว

Ang และคณะ (7) ศึกษาพบว่าผู้ป่วยมะเร็งช่องปากที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสเอชพีวีชนิดก่อมะเร็ง มีพยากรณ์โรคที่ดีกว่า มีอัตราการรอดชีวิตที่ 3 ปีมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ร้อยละ 82.4 เทียบกับร้อยละ 57.1) นอกจากนี้ยังพบว่า มะเร็งช่องปากที่ตรวจพบไวรัสเอชพีวี ยังมีการตอบสนองที่ดีต่อการให้เคมีบำบัดและรังสีรักษาอีกด้วย สอดคล้องกับการศึกษาแบบ meta-analysis ของ Deyyani และคณะ (6) ที่พบว่าในกลุ่มที่

ตรวจพบไวรัสเอชพีวี มีอัตราการรอดชีวิตที่ดีกว่า (HR 0.42; $p < 0.0001$) และมีการตอบสนองต่อรังสีรักษา/เคมีบำบัดที่ดีกว่า 2-4 เท่า (8) ทั้งนี้ เนื่องจากความแตกต่างของการตอบสนองต่อการรักษา การที่สามารถแบ่งกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอที่ไม่ใช่มะเร็งหลังโพรงจมูก โดยอาศัยสถานะของไวรัสเอชพีวีจะทำให้การรักษาสามารถวางแผนการรักษาเฉพาะบุคคล การรักษาโดยเก็บอวัยวะ (Organ preservation) โดยมีผลข้างเคียงจากการรักษาน้อยที่สุด

แม้ว่า มะเร็งศีรษะและลำคอที่ไม่ใช่มะเร็งหลังโพรงจมูกที่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวีจะพบได้บ่อยในกลุ่มผู้ป่วยอายุน้อย อย่างไรก็ตาม ในกลุ่มผู้ป่วยดังกล่าว รายงานความชุกของไวรัสเอชพีวีมีค่อนข้างจำกัดและมีความแตกต่างกันค่อนข้างมากตั้งแต่ร้อยละ 8-30 (9-11) นอกจากนี้ การศึกษาของ Badaracco (12) และ Sisk (13) ซึ่งทำการเปรียบเทียบความชุกไวรัสเอชพีวีในกลุ่มอายุน้อยเปรียบเทียบกับกลุ่มอายุมาก จะพบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างทั้งสองกลุ่ม หากแต่มีข้อจำกัด โดยจำนวนผู้ป่วยที่ศึกษามีปริมาณไม่มาก และเป็นการตรวจในชิ้นเนื้อสด

สำหรับ การศึกษาสถานะไวรัสเอชพีวีในผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอในประเทศไทย มีเพียง 1 รายงานโดย Khovidhunkit และคณะ (14) พบความชุกของไวรัสเอชพีวีเพียงแค่อ้อยู่ที่ 1.54 ซึ่งแตกต่างจากข้อมูลการศึกษาในต่างประเทศ อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาดังกล่าว ไม่ได้มีการเลือกกลุ่มอายุผู้ป่วยและศึกษาเฉพาะมะเร็งช่องปากเท่านั้นทางผู้วิจัย จึงต้องการศึกษาเพิ่มเติมในผู้ป่วยอายุน้อย เพื่อหาความชุกและความสัมพันธ์ของไวรัสเอชพีวีต่อการเกิดมะเร็งศีรษะและลำคอที่ไม่ใช่มะเร็งหลังโพรงจมูกในประชากรดังกล่าว

2. คำถามของการวิจัย (Research question)

คำถามหลัก (Primary research question)

ความชุกของไวรัสเอชพีวีในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสเซลล์ ที่ไม่ใช่มะเร็งหลังโพรงจมูก โดยการตรวจด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ในผู้ป่วยที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์อายุไม่เกิน 45 ปีเป็นเท่าใด

คำถามรอง (Secondary research question)

ลักษณะทางคลินิก ,ผลการตรวจทางพยาธิวิทยา ,การตอบสนองต่อการรักษาและพยากรณ์โรคของ มะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสเซลล์ ที่ไม่ใช่มะเร็งหลังโพรงจมูกที่ตรวจพบไวรัสเอชพีวี แตกต่างจาก ชนิดที่ตรวจไม่พบไวรัสเอชพีวี หรือไม่ อย่างไร

3. วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objective)

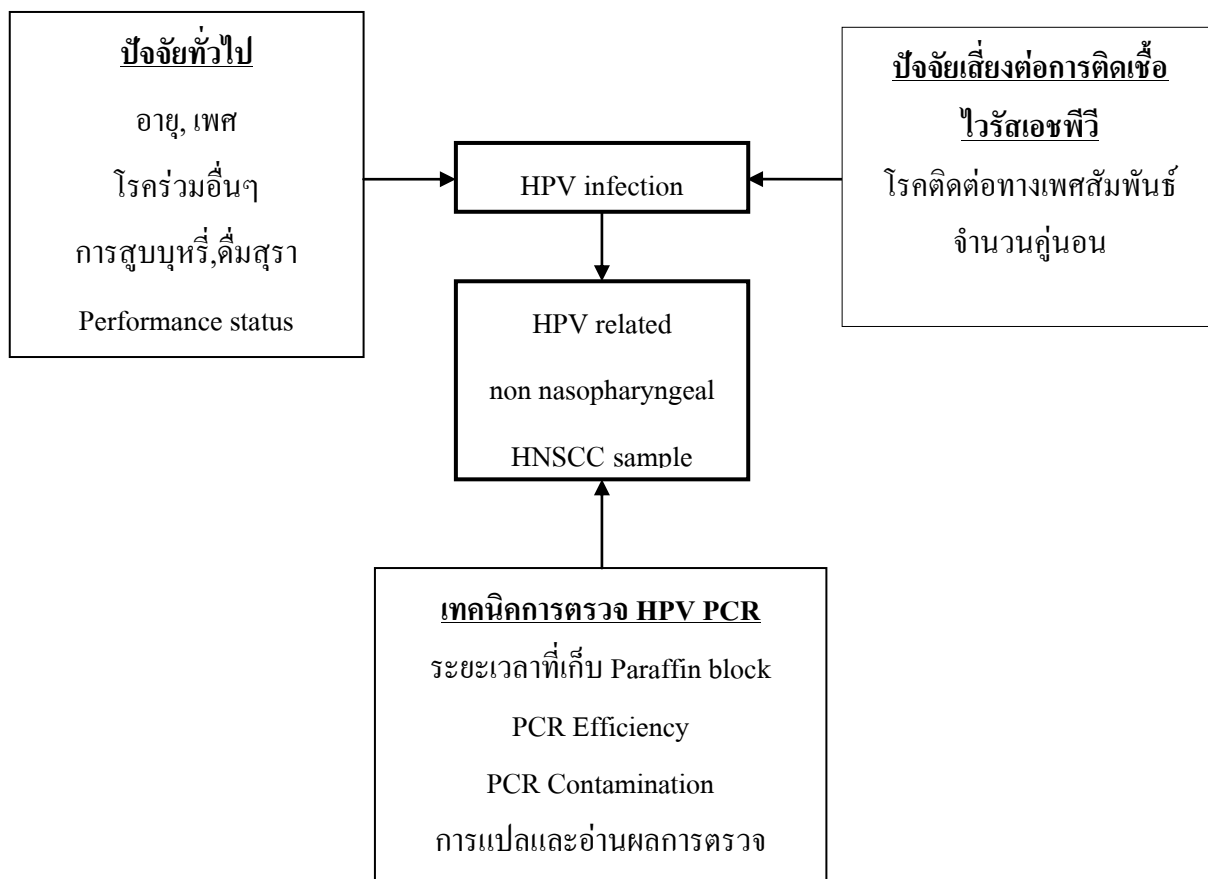
1. ทราบความชุกของไวรัสเอชพีวี ในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งหลังโพรงจมูก
2. ทราบลักษณะทางคลินิก การตอบสนองต่อการรักษาและพยากรณ์โรค ของมะเร็งศีรษะและลำคอชนิด สแควมัสเซลล์ ที่ไม่ใช่มะเร็งหลังโพรงจมูกที่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวี

4. สมมติฐาน (Hypothesis)

H0: ความชุกของไวรัสเอชพีวีในผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ ที่ไม่ใช่มะเร็งหลังโพรงจมูก ในผู้ป่วยที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ อายุไม่เกิน 45 ปี เท่ากับร้อยละ 25

H1: ความชุกของไวรัสเอชพีวีในผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ ที่ไม่ใช่มะเร็งหลังโพรงจมูก ในผู้ป่วยที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ อายุไม่เกิน 45 ปี ไม่เท่ากับร้อยละ 25

5. กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual Framework)



ภาพที่ 1.1 กรอบแนวความคิดการวิจัย

6. ข้อตกลงเบื้องต้น ไม่มี

7. คำสำคัญ (Key words)

Human Papillomavirus (HPV)

Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC)

8. การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย (Operational definitions)

- มะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสเซลล์ (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma) หมายถึง พบเซลล์มะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์จากการตรวจทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อมะเร็งปฐมภูมิของมะเร็งศีรษะและลำคอ หรือชิ้นเนื้อจากตำแหน่งแพร่กระจายของมะเร็งศีรษะและลำคอก็ได้
- ระยะเวลาการรอดชีวิต (Overall survival) หมายถึง ระยะเวลาตั้งแต่วันที่วินิจฉัยโดยมีผลทาง พยาธิวิทยา จนถึงวันที่ผู้ป่วยเสียชีวิตหรือวันสุดท้ายที่มาตรวจติดตามการรักษา (Last follow-up date)

9. รูปแบบการวิจัย (Research Design)

เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา ณ จุดเวลาใดเวลาหนึ่ง (Cross-sectional Descriptive study)

10. ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม (Ethical Consideration)

1) **หลักความเคารพในบุคคล (respect of person)** โดยการขอความยินยอมเข้าร่วมในงานวิจัย แต่การวิจัยนี้เป็นการศึกษาจากเวชระเบียน และไม่มีการติดต่อเพื่อเก็บข้อมูลโดยตรงจากผู้ป่วย อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยจึงต้องการขอยกเว้นการขอความยินยอมจากผู้ป่วย โดยจะขออนุญาตจากผู้อำนวยการโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เพื่อใช้เวชระเบียนและตัวอย่างชิ้นเนื้อจากผู้ป่วย

2) **หลักการให้ประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/Non-maleficence)** ผู้ป่วยจะไม่รับประโยชน์ใดๆ โดยอาจเกิดความเสี่ยงต่อตัวผู้ป่วยเพียงเล็กน้อย คือ ความลับของผู้ป่วยอาจถูกเปิดเผย แต่ผู้วิจัยจะเก็บรักษาความลับของผู้ป่วยโดยในแบบบันทึกข้อมูลจะไม่มีตัวระบุ (identifier) ที่จะระบุถึงตัวผู้ป่วย

3) **หลักความยุติธรรม (Justice)** โดยผู้วิจัยมีเกณฑ์การคัดเข้าและคัดออกที่ชัดเจน

11. ข้อจำกัดของการวิจัย (Limitation)

1) การตรวจสอบสถานะไวรัสเอชพีวีด้วยวิธีเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส: ขึ้นเนื้อพาราฟิน ที่ทำการเก็บไว้นาน อาจให้ผลลบลงจากการตรวจได้เนื่องจากการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอของไวรัสเอชพีวี

2) ข้อมูลเป็นการทบทวนเวชระเบียนย้อนหลัง ผู้ป่วยบางส่วนขาดการติดต่อ ทำให้ขาดรายละเอียดการตอบสนองต่อการรักษา การรอดชีวิต ทำให้ไม่สามารถสรุปผลพยากรณ์โรคได้,

12. ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected benefits and application)

1) ทราบความชุกและชนิดของไวรัสเอชพีวีในมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสเซลล์ ที่ไม่ใช่มะเร็งหลังโพรงจมูกในผู้ป่วยอายุน้อย

2) ทราบถึงพยากรณ์โรค การตอบสนองต่อการรักษาในผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าว ซึ่งอาจสามารถนำมาใช้ในการกำหนดการศึกษาวิจัยและวางแผนการรักษาในอนาคต

13. อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and strategies to solve the problems)

1) เทคนิคการตรวจสอบสถานะไวรัสเอชพีวี ทั้งการตรวจด้วยวิธีเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส อาจเกิดผลบวกหรือผลลบลงได้ จากกระบวนการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งแก้ไขโดยการกำหนดวิธีการตรวจสอบให้เป็นมาตรฐาน, มีกลุ่มควบคุมทั้งผลบวกและผลลบ, ดำเนินการตรวจโดยใช้เจ้าหน้าที่เทคนิคเพียงท่านเดียวในการทดสอบ และกำหนดมาตรฐานในการแปลผลการตรวจ

2) การติดตามเวชระเบียนของผู้ป่วย อาจพบผู้ป่วยบางส่วนที่ขาดการติดต่อ ทำให้ไม่ทราบพยากรณ์โรคที่ชัดเจน แก้ไขโดยการติดตามข้อมูลทางโทรศัพท์ หรือจดหมายติดตาม และในรายที่ไม่สามารถติดตามได้ ไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ข้อมูลในส่วนพยากรณ์โรค

บทที่ 2

มะเร็งศีรษะและลำคอในผู้ป่วยกลุ่มอายุน้อย

(Head and Neck Carcinoma in the Young Patient)

ความชุก พบได้ร้อยละ 1-8 ของมะเร็งศีรษะและลำคอทั้งหมด แตกต่างตามแต่ละภูมิภาค และเกณฑ์ที่ใช้วินิจฉัย (ร้อยละ 6.7 หากใช้เกณฑ์อายุน้อยกว่า 45 ปี และร้อยละ 0.4-3.6 หากใช้เกณฑ์อายุน้อยกว่า 40 ปี)(15) จากหลักฐานปัจจุบันพบว่า อุบัติการณ์เพิ่มมากขึ้นในช่วงหลัง Shiboski และคณะ(16) รายงานเปรียบเทียบอุบัติการณ์ระหว่างปีค.ศ.1973-2001 พบว่าอุบัติการณ์เพิ่มมากขึ้นประมาณร้อยละ 1-4 โดยเฉพาะมะเร็งช่องปาก และมะเร็ง คอหอย เช่นเดียวกับ Schantz และ Yu(17) พบอุบัติการณ์เพิ่มขึ้นกว่าร้อยละ 60 ในมะเร็งช่องปาก ระหว่างปีค.ศ.1973-1997

เพศ พบอุบัติการณ์ได้บ่อยในเพศชาย หากแต่เมื่อเทียบกับกลุ่มอายุอื่น สัดส่วนของผู้ป่วยหญิงมีสัดส่วนที่มากกว่า โดยเฉพาะในกลุ่มที่ไม่มีประวัติการสูบบุหรี่, ดื่มสุราหรือการเคี้ยวหมาก

Funk และคณะ (18) ได้จัดกลุ่มมะเร็งศีรษะและลำคอในผู้ป่วยกลุ่มอายุน้อย เป็น 3 กลุ่ม คือ

- 1) กลุ่มที่ 1 คือผู้ป่วยหญิงอายุน้อยกว่า 35 ปี ไม่มีประวัติความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งและมาด้วยโรคในระยะลุกลาม
- 2) กลุ่มที่ 2 คือผู้ป่วยชายอายุน้อยกว่า 40 ปี มีประวัติความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งเช่นเดียวกับมะเร็งศีรษะและลำคอที่พบในอายุมาก
- 3) กลุ่มที่ 3 คือผู้ป่วยชาย มีประวัติความเสี่ยงมะเร็งเล็กน้อย และมาด้วยโรคในระยะเริ่มต้น

เชื้อชาติ มักพบผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอในผู้ป่วยกลุ่มอายุน้อยที่มีเชื้อชาติ African American มากกว่าผู้ป่วยผิวขาว และมักจะมาในช่วงอายุที่น้อยกว่า อย่างไรก็ตาม ยังมีความแตกต่างกันในแต่ละงานวิจัย ส่วนหนึ่งเชื่อว่าผู้ป่วยเชื้อชาติ African American มีพฤติกรรมการสูบบุหรี่และดื่มสุรามากกว่าผู้ป่วยผิวขาว

ตำแหน่งเกิดมะเร็ง พบการเกิดมะเร็งช่องปาก (Oral cavity) และมะเร็งคอหอยส่วนปาก (Oropharynx) ได้บ่อย โดยที่มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นในช่วงหลายปีหลัง ส่วนหนึ่งเชื่อว่า อาจมีความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อไวรัสเอชพีวีกับการก่อมะเร็งคอหอยส่วนปาก ทั้งนี้ ในส่วนของมะเร็งช่องปาก ยังมีข้อถกเถียงถึงความสัมพันธ์ดังกล่าว

นอกจากนี้ ยังพบอุบัติการณ์ของมะเร็งของต่อม (Adenocarcinoma) และมะเร็งหลอดเลือดชนิด Kaposi ในช่องปากได้บ่อยกว่า ในขณะที่ พบอุบัติการณ์ของมะเร็งกล่องเสียงและมะเร็งหลังโพรงจมูกได้น้อยกว่า เมื่อเทียบกับผู้ป่วยกลุ่มอายุมาก

ระยะของโรค จากข้อมูลของ SEER พบว่าผู้ป่วยกลุ่มอายุน้อยมักมาในระยะเริ่มต้น (Early stage) และมีการลุกลามไปต่อมน้ำเหลืองข้างเคียงมากกว่าผู้ป่วยกลุ่มอายุมาก

ลักษณะทางพยาธิวิทยา พบลักษณะทางพยาธิชนิด High grade ได้บ่อยกว่า อย่างไรก็ตาม การพบลักษณะพยาธิวิทยาดังกล่าว ไม่สัมพันธ์กับการกลับเป็นซ้ำของโรค

สาเหตุและปัจจัยเสี่ยง (19)

การสูบบุหรี่และดื่มสุรา ถึงแม้ว่าหลายการศึกษาในมะเร็งศีรษะและลำคอในผู้ป่วยกลุ่มอายุน้อย จะพบอัตราการสูบบุหรี่และดื่มสุราน้อยกว่ากลุ่มผู้ป่วยอายุมาก การศึกษาของ Llewellyn และคณะ (20) พบการสูบบุหรี่ ในผู้ป่วย กลุ่มนี้ ตั้งแต่ร้อยละ 38-100 ซึ่งความสัมพันธ์กับการก่อโรคมะเร็งจากงานวิจัยดังกล่าวยังไม่แน่ชัด โดยการ พบว่าการเกิดโรคมะเร็งจะเพิ่มมากขึ้น หากการสูบบุหรี่หรือดื่มสุรานานมากกว่า 21 ปี

กัญชา พบหลักฐานความเกี่ยวเนื่องกับการเกิดมะเร็ง โดยเฉพาะในกลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสเอชพีวีร่วมด้วย

อาหาร การรับประทานผักและผลไม้มากกว่า 3 ส่วนต่อวัน ช่วยลดอัตราการเกิดมะเร็งช่องปาก ทั้งนี้ ข้อมูลดังกล่าวยังมีข้อจำกัด โดยเฉพาะในผู้ป่วยกลุ่มอายุน้อย

ภาวะสุขภาพปากและฟัน การขาดการดูแลสุขภาพปากและฟัน เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง

ไวรัส ไวรัส Herpes simplex, ไวรัส Epstein-Barr และไวรัสเอชพีวี พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิด มะเร็งศีรษะและลำคอในกลุ่มผู้ป่วยอายุน้อย โดยเฉพาะไวรัสเอชพีวีชนิด 16 ใดๆก็ตาม ยังไม่พบ หลักฐานที่ชัดเจนว่าอุบัติการณ์ดังกล่าว แตกต่างจากผู้ป่วยกลุ่มอายุมากหรือไม่

Sisk และคณะ (13) ทำการศึกษาเปรียบเทียบอุบัติการณ์ไวรัสเอชพีวีในมะเร็งศีรษะและลำคอจาก กลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยอายุน้อย (น้อยกว่า 50ปี) และผู้ป่วยอายุมาก (อายุมากกว่า 50ปี) พบว่าอุบัติการณ์ในทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน (ร้อยละ 50 และร้อยละ 44 ตามลำดับ) เช่นเดียวกับ Koch และคณะ(21) ที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างไวรัสเอชพีวีกับอายุของผู้ป่วย

อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาของ Gillison และคณะ (22) พบว่า ในผู้ป่วยที่ตรวจพบไวรัสเอชพีวี จะมีสัดส่วนของผู้ป่วยกลุ่มอายุน้อยมากกว่ากลุ่มที่ตรวจไม่พบไวรัสเอชพีวี (ร้อยละ 33 เทียบกับร้อยละ 17) โดยเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งคอหอยส่วนช่องปากและมะเร็งทอนซิล

ส่วนความสัมพันธ์กับพยากรณ์โรคในผู้ป่วยกลุ่มนี้ ยังเป็นที่ถกเถียงกัน เนื่องจากข้อมูลค่อนข้างจำกัด

พันธุกรรม Llewellyn และคณะ(23) พบว่าผู้ป่วยในกลุ่มนี้ จะมีประวัติครอบครัวที่ป่วยเป็นมะเร็งกว่าร้อยละ 59-75 นอกจากนี้ ยังมีกลุ่มอาการทางพันธุกรรม เช่น Fanconi anemia ซึ่งเป็นกลุ่มอาการทางพันธุกรรมที่มีการถ่ายทอดผ่านทางยีนด้อย โดยมีความผิดปกติของการซ่อมแซมดีเอ็นเอ ผู้ที่เป็นพาหะของโรคดังกล่าว จะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งศีรษะและลำคอในช่วงอายุน้อย และมีอายุเฉลี่ยขณะวินิจฉัยประมาณ 31 ปี อุบัติการณ์จะเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 14 หลังอายุ 40 ปีขึ้นไป โดยพบการเกิดมะเร็งในช่องปากได้บ่อย และอัตราการรอดชีวิตที่ 2 ปีประมาณร้อยละ

การกำหนดระยะของโรคก่อนการรักษา

การกำหนดระยะโรค

ไม่แตกต่างจากการดูแลผู้ป่วยในกลุ่มอายุมาก ทั้งนี้ในรายที่ไม่มีปัจจัยเสี่ยง ควรซักประวัติครอบครัว, ประวัติภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Immunodeficiency) รวมถึงการตรวจหาไวรัสเอชพีวี, การตรวจทางพันธุกรรม เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การตรวจดังกล่าวยังไม่ถือเป็นมาตรฐานในการดูแลผู้ป่วย

การรักษา

การฉายรังสีและเคมีบำบัด ในปัจจุบัน ยังไม่มีแนวทางการให้รังสีรักษาหรือเคมีบำบัดเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยนี้ เนื่องจากเป็นกลุ่มผู้ป่วยจำนวนน้อย ทั้งนี้ สิ่งที่น่ากังวล คือ ผลข้างเคียงจากการรักษา เนื่องจากผู้ป่วยมักจะมีชีวิตยืนยาว ผลข้างเคียงต่างๆ จึงเป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงได้ยาก โดยเฉพาะจากการฉายรังสี อาทิ การเกิดพังผืดในปอด, ปัญหาด้านการกลืน หรือมะเร็งบางชนิด เช่น มะเร็งไทรอยด์, มะเร็งของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Sarcoma) เป็นต้น

การผ่าตัด เช่นเดียวกับการฉายรังสีและเคมีบำบัด การผ่าตัดถือตามมาตรฐานที่ใช้ในกลุ่มผู้ป่วยอายุมาก

ผลการรักษาและพยากรณ์โรค

ยังมีข้อถกเถียงเกี่ยวกับพยากรณ์โรคในผู้ป่วยกลุ่มนี้ เนื่องจากส่วนใหญ่ของงานวิจัยเป็นการศึกษาย้อนหลัง, มีจำนวนผู้ป่วยในแต่ละงานวิจัยจำนวนไม่มากและไม่ได้เปรียบเทียบกับผู้ป่วยกลุ่มอายุมากแบบมีข้อกำหนดในรูปแบบเดียวกัน (Matched control) ซึ่งส่วนใหญ่ของการศึกษาไม่พบความแตกต่างของพยากรณ์โรกระหว่างทั้ง 2 กลุ่ม อย่างไรก็ตาม บางการศึกษา พบว่า ผู้ป่วยกลุ่มอายุน้อย มีพยากรณ์โรคที่ดีกว่า ดังตารางที่ 2.1

รูปแบบการกลับเป็นซ้ำของโรค ในบางการศึกษา พบว่าในผู้ป่วยกลุ่มนี้ มีอัตราการกลับเป็นซ้ำได้บ่อยกว่า โดยเฉพาะการกลับเป็นซ้ำเฉพาะที่

การเกิดมะเร็งอื่นร่วมด้วย (Second primary tumor)

Verschuur และคณะ (24) พบการเกิดมะเร็งอื่นร่วมด้วยในผู้ป่วยกลุ่มนี้ น้อยกว่ากลุ่มผู้ป่วยอายุมาก (ร้อยละ 8 เทียบกับร้อยละ 18) ทั้งนี้ ส่วนหนึ่งของผู้ป่วยกลุ่มอายุมาก มีอัตราการสูบบุหรี่มากกว่า ซึ่งอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเกิด Second primary tumor

ผู้วิจัย (ปีค.ศ.ที่ตีพิมพ์)	จำนวนผู้ป่วย	เกณฑ์อายุน้อย (ปี)	ตำแหน่งรอยโรค	อัตราการรอดชีวิต/อัตราการปลอดโรคที่ 5 ปี (ร้อยละ)	พยากรณ์โรคเมื่อเทียบกับกลุ่มอายุมาก
Friedlander (1998)	36	<40	ลิ้น	62	เหมือนกัน
Verschuur (1999)	185	<40	ทุกตำแหน่ง	72	เหมือนกัน
Pitman (2000)	122	<40	ลิ้น	53.3	เหมือนกัน
Lacy (2000)	40	<40	ทุกตำแหน่ง	65	ดีกว่า
Axon (2000)	24	<45	คอหอยส่วนล่าง	13	เหมือนกัน
Davidson (2001)	n.a.	<40	ลิ้น	n.a.	ดีกว่า
Annertz (2002)	276	<40	ลิ้น	66	ดีกว่า
Funk (2002)	1039	<35	ช่องปาก	57	ดีกว่า
Veness (2003)	22	<40	ลิ้น	62	เหมือนกัน
Manuel (2003)	n.a.	<45	ลิ้น	78	เหมือนกัน
Hyam (2003)	15	<40	ลิ้น	n.a.	ดีกว่า
Gilroy (2005)	30	<40	คอหอยส่วนช่องปาก และกล่องเสียง	75	เหมือนกัน

n.a.: not available

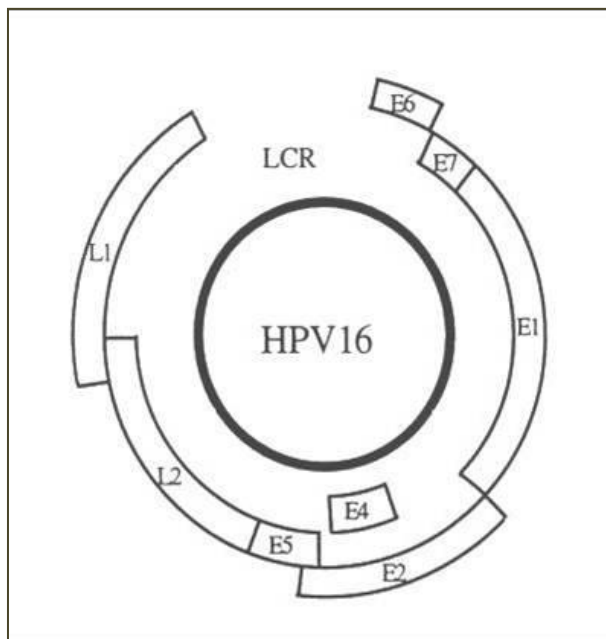
ตารางที่ 2.1 แสดงการเปรียบเทียบพยากรณ์โรคมะเร็งศีรษะและลำคอ ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยอายุมากและอายุน้อย(25)

บทที่ 3

ไวรัสอิวแมน พาพิวโลมาหรือไวรัสเอชพีวี (Human Papillomavirus; HPV)

ไวรัสอิวแมน พาพิวโลมาหรือไวรัสเอชพีวี (Human Papillomavirus; HPV) เป็นไวรัสชนิดดีเอ็นเอสายคู่ ที่มีการเรียงตัวในรูปแบบวงกลม (circular, double-stranded DNA virus) โดยมีขนาดประมาณ 8000 คู่เบส ประกอบด้วยโปรตีนส่วนสำคัญ 3 ส่วนคือ (26)

- 1) โปรตีนส่วนควบคุม (Regulatory protein) กำหนดด้วยยีน E1 และ E2 ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างอาร์เอ็นเอ (Transcription) และการแบ่งตัว (Replication)
- 2) โปรตีนกระตุ้นการเกิดมะเร็ง (Oncoprotein) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในกระบวนการเกิดโรคมะเร็ง กำหนดด้วยยีน E5, E6 และ E7
- 3) โปรตีนหุ้มล้อมรอบเพื่อป้องกันกรคนิวคลีอิก (Capsid protein) กำหนดด้วยยีน L1 และ L2



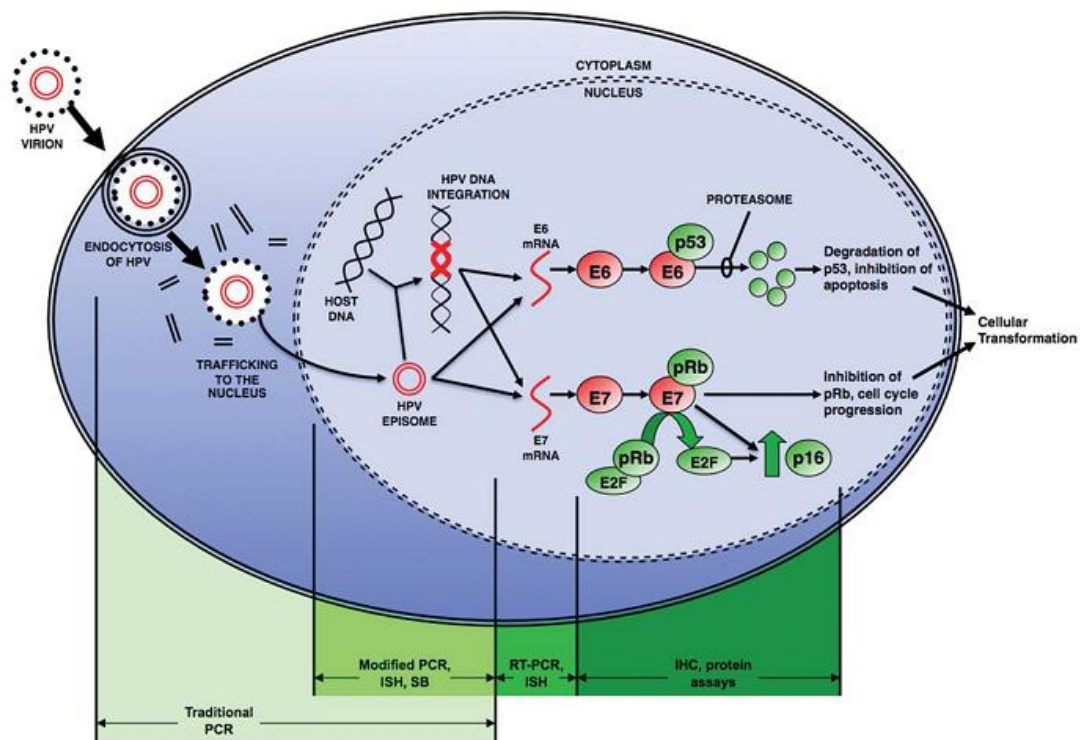
ภาพที่ 3.1 แสดงโครงสร้างของอิวแมน พาพิวโลมาไวรัส

ในปัจจุบัน มีการค้นพบไวรัสเอชพีวีมากกว่า สายพันธุ์ โดยพบความคล้ายคลึงกันของ 100 ลำดับยีนในแต่ละสายพันธุ์กว่าร้อยละ 71-89 ไวรัสเอชพีวีแต่ละสายพันธุ์จะมีความแตกต่างในส่วน ของความสามารถในการก่อมะเร็ง และอวัยวะที่ก่อโรค (Tissue tropism) โดยไวรัสเอชพีวี ชนิดอัลฟาก่อให้เกิดโรคในส่วนของเยื่อเมือก (Mucosa) และอวัยวะสืบพันธุ์ (Genital) ในขณะที่ ไวรัสเอชพีวีชนิดเบต้าก่อให้เกิดโรคในส่วนผิวหนัง

ความสัมพันธ์ระหว่างไวรัสเอชพีวีและการเกิดมะเร็ง

วงจรชีวิตของไวรัสเอชพีวีค่อนข้างซับซ้อน โดยพบว่าเมื่อเกิดการติดเชื้อ ยีนของไวรัสจะ เชื่อมประสานกับยีนของเซลล์ปกติ (Host genome) เกิดการสลายตัวของโปรตีน E2 ก่อให้เกิดการ สร้างโปรตีนกระตุ้นการเกิดมะเร็ง E6 และ E7 มากกว่าปกติ ทั้งนี้บทบาทที่สำคัญของโปรตีน E6 คือจะไปรบกวนกระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิส (Apoptosis) โดยไปยับยั้งยีนยับยั้ง การเกิดมะเร็ง (Tumor suppressor gene) p53 นอกจากนี้โปรตีน E6 ยังกระตุ้นเอนไซม์ telomerase ทำให้เซลล์สูญเสียการควบคุมการแบ่งตัวตามวัฏจักรของเซลล์ปกติ

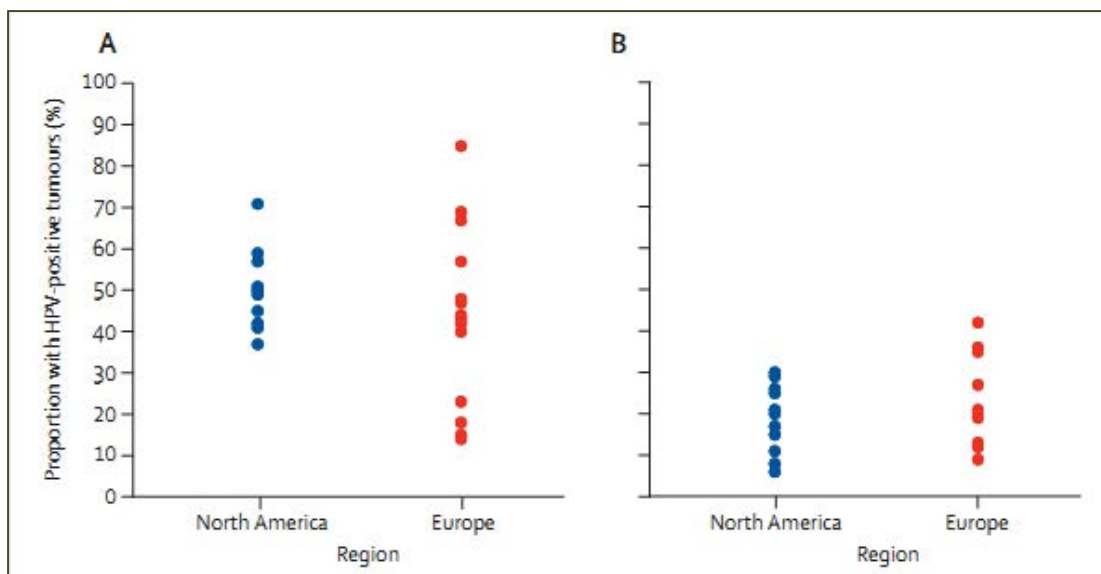
โปรตีน E7 เป็นโปรตีนอีกหนึ่งชนิดที่มีความสำคัญในการก่อโรคมะเร็ง โดยจะไปรบกวน ยีนยับยั้งการเกิดมะเร็งเรตินอบลาสโตมา ส่งผลให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ (pRB ;Retinoblastoma) ผิดปกติ จนเกิดมะเร็งในที่สุด



ภาพที่ 3.2 แสดงกลไกการเกิดมะเร็งจากไวรัสเอชพีวี(27)

มะเร็งศีรษะและลำคอที่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวี (HPV associated head and neck cancer)

ความชุก พบมากกว่าร้อยละ 40-80 ในมะเร็งคอหอยส่วนปากในสหรัฐอเมริกา ในขณะที่ประเทศในยุโรป พบร้อยละ 20-90 ทั้งนี้แตกต่างกันตามอัตราการสูบบุหรี่(5) ดังรูป 3.3



ภาพที่ 3.3 แสดงสัดส่วนของมะเร็งคอหอยส่วนช่องปาก (A) และมะเร็งศีรษะและลำคอ (B) ที่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวี ในภูมิภาคอเมริกาเหนือและยุโรป

จากข้อมูลของ SEER พบว่าในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา (28) อุบัติการณ์ของมะเร็งคอหอยส่วนปากในกลุ่มผู้ป่วยอายุน้อย ที่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวีมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้การติดเชื้อไวรัสเอชพีวี สามารถพบได้ทั้งผู้ป่วยที่สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่ โดยมากกว่าร้อยละ 10-30 ของผู้ป่วยกลุ่มนี้จะมีประวัติการ สูบบุหรี่หรือดื่มสุราเป็นประจำ

เนื่องจากไวรัสเอชพีวี สามารถติดต่อทางเพศสัมพันธ์ได้ หลายการศึกษา พบว่า ผู้ป่วยที่มีคู่นอนหลายคน จะเพิ่มความเสี่ยงต่อมะเร็งในกลุ่มนี้ (29)

ทั้งนี้ ความชุกยังแตกต่างกันตามวิธีการตรวจสถานะไวรัสเอชพีวี, ประชากร, ชนิดของชิ้นเนื้อ และตำแหน่งของรอยโรค ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 รายงานความชุกไวรัสเอชพีวีในมะเร็งศีรษะและลำคอ

ผู้วิจัย (ปีค.ศ.ที่ตีพิมพ์)	จำนวนผู้ป่วย	ร้อยละของผู้ป่วยที่ตรวจพบผลบวกต่อไวรัสเอชพีวี	วิธีการตรวจ
Begum (2005)	176	22	HPV 16 ISH
Braakhuis (2004)	143	17	PCR L1, HPV16 E7
Fakhry (2008)	96	40	PCR, HPV 16 ISH
Gillison (2000)	253	25	PCR L1, HPV 16/18 E7
Jung (2010)	231	13	PCR
McKaig (1998)	873	16	ISH
McKaig (1998)	1205	35	PCR
Paz (1997)	156	16	PCR L1, PCR E1
Singhi (2010)	256	69	HPV 16 ISH
Van Houten (2001)	34	24	PCR L1, HPV 16 E6
Wietst (2002)	88	32	HPV 16 PCR

PCR: Polymerase Chain Reaction, ISH: In Situ Hybridization

จากตารางดังกล่าว จะเห็นความแตกต่างของความชุกของไวรัสเอชพีวีตั้งแต่ร้อยละ 3-69 นอกจากนี้ ยังมีงานวิจัย meta-analysis ของ Termine และคณะ(30) ซึ่งรวบรวมการตรวจด้วยวิธี PCR และ ISH พบความชุกไวรัสร้อยละ 34.5 ใกล้เคียงกับงานวิจัย meta-analysis ของ Kreimer และคณะ (3) ที่ใช้การตรวจด้วยวิธี PCR ที่พบความชุกประมาณร้อยละ 26 ทั้งนี้ ไม่พบว่าชนิดของชิ้นเนื้อที่นำมาตรวจ ไม่ว่าจะเป็นชิ้นเนื้อพาราฟิน หรือชิ้นเนื้อแช่แข็ง มีผลกระทบต่อผลการตรวจ

สำหรับประเทศไทย การศึกษาของ Khovidhunkit และคณะ (14) พบความชุกไวรัสเอชพีวี ในมะเร็งช่องปาก โดยการตรวจด้วยวิธี PCR ต่อส่วน L1 (MY09/11) เพียงแค่ร้อยละ 1.54 (ผู้ป่วยที่มีผลบวกต่อไวรัสเอชพีวีจำนวน 1 ราย ต่อจำนวนผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอจำนวน 32 ราย, อายุเฉลี่ย 60 ปี) ซึ่งแตกต่างค่อนข้างมากเมื่อเทียบกับการศึกษาในต่างประเทศ

ความชุกของไวรัสเอชพีวี จะพบมากในบริเวณคอหอยส่วนช่องปาก เมื่อเทียบกับอวัยวะส่วนอื่น โดยพบได้ตั้งแต่ร้อยละ 14 ถึงร้อยละ 72 โดยงานวิจัย meta-analysis ของ Termine พบความชุกร้อยละ 38 ส่วน meta-analysis ของ Kreimer พบประมาณร้อยละ 35.6

ตารางที่ 3.2 รายงานความชุกไวรัสเอชพีวีในมะเร็งคอหอยส่วนช่องปาก

ผู้วิจัย (ตีพิมพ์ปีค.ศ.)	จำนวนผู้ป่วย	ร้อยละของผู้ป่วยที่ตรวจพบผลบวกต่อไวรัสเอชพีวี	วิธีการตรวจ
Ernster (2007)	72	69	HPV 16/18 PCR
D'Souza (2010)	119	71	HPV 16 ISH
D'Souza (2007)	100	72	HPV 16 ISH
Klussmann (2003)	34 (ทอนซิล)	53	Nested PCR
Lindel (2001)	99	14	PCR L1
Mellin (2000)	60	43	PCR L1
Sedaghat (2009)	49	53	HPV 16 ISH

ไวรัสเอชพีวีสายพันธุ์ที่ 16 เป็นสายพันธุ์ที่พบบ่อยที่สุดในมะเร็งศีรษะและลำคอ โดยพบได้ร้อยละ 78.6-100 ในมะเร็งคอหอยส่วนช่องปาก ในขณะที่มะเร็งช่องปาก และมะเร็งกล่องเสียง พบได้ร้อยละ 32 และร้อยละ 31 ตามลำดับ Kreimer และคณะ พบว่ากว่าร้อยละ 99 ของมะเร็งศีรษะและลำคอที่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวี จะตรวจพบไวรัสสายพันธุ์ที่ 16, 18, 31 และ 33 โดยสามารถตรวจพบการติดเชื้อไวรัสเอชพีวีมากกว่า 1 สายพันธุ์ได้

เนื่องจาก ไวรัสเอชพีวีสามารถตรวจพบได้ทุกระยะของการเกิดมะเร็งศีรษะและลำคอ ในบางการศึกษาสามารถพบอุบัติการณ์ดังกล่าวในผู้ป่วยระยะก่อนเป็นมะเร็ง (Premalignant) ได้กว่าร้อยละ 20 เช่นเดียวกับกับอุบัติการณ์ในคนปกติ สามารถตรวจพบไวรัสเอชพีวี จากการตัดชิ้นเนื้อต่อมทอนซิลได้ร้อยละ 3 รวมถึงการตรวจจากเซลล์ที่ได้จากการบ้วนปากที่ร้อยละ 12.2 (31) อย่างไรก็ตาม การศึกษาความสำคัญของการตรวจพบดังกล่าว ยังอยู่ในระหว่างการพัฒนางานวิจัย

การตรวจพบไวรัสเอชพีวี ในเนื้อเยื่อมะเร็งที่กระจาย เช่น ต่อมน้ำเหลือง จะสามารถช่วยบอกแหล่งที่มาของอวัยวะที่เป็นต้นกำเนิดของมะเร็งได้ โดยเฉพาะมะเร็งคอหอยส่วนปาก ซึ่งพบในงานวิจัย กว่าร้อยละ 78 ของต่อมน้ำเหลืองที่ตรวจพบไวรัสเอชพีวี มาจากมะเร็งคอหอยส่วนปาก (32)

การเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลในมะเร็งศีรษะและลำคอที่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวี

พบการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลหลายรูปแบบ เช่น พบการขาดหายของยีน 16q, การกลายพันธุ์ของยีนแบบ loss of heterozygosity (LOH) บริเวณยีน 3p และ 17p เป็นต้น ซึ่งมีความแตกต่างเมื่อเทียบกับมะเร็งศีรษะและลำคอที่ไม่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวี

ลายพันธุ์ของยีนยับยั้งมะเร็งจากการศึกษา พบว่าการ p53 พบอุบัติการณ์น้อยกว่าในมะเร็งศีรษะและลำคอที่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวี เนื่องจากการทำลายยีนดังกล่าว โดยโปรตีน E6 เช่นเดียวกับกับการขาดหายของโปรตีนเรตินโนบลาสโตมา จากการทำลายโดยโปรตีน E7 ทั้งนี้ผลของการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ทำให้สามารถตรวจพบการแสดงออกมากขึ้นของโปรตีน p16 ซึ่งอยู่ในกระบวนการควบคุมวัฏจักรของเซลล์ ซึ่งการศึกษาภายหลัง พบว่าการแสดงออกของโปรตีน p16 โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ มีความสอดคล้องกับการตรวจไวรัสเอชพีวีโดยตรงด้วยวิธีการเพิ่ม

จำนวนดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และมีความสัมพันธ์กับพยากรณ์โรค (33) นอกจากนี้ ยังพบการเพิ่มระดับของโปรตีน β -catenin ในนิวเคลียส

อาจกล่าวได้ว่า ในกลุ่มมะเร็งศีรษะและลำคอที่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวี เมื่อนำมาตรวจทางระดับโมเลกุลโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ จะพบการแสดงออกของโปรตีน p16 และโปรตีน β -catenin ในขณะที่ ไม่พบการแสดงออกของโปรตีน p53

ตารางที่ 3.3 แสดงการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลของมะเร็งศีรษะและลำคอที่สัมพันธ์และไม่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวี

การเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุล	มะเร็งศีรษะและลำคอที่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวี	มะเร็งศีรษะและลำคอที่ไม่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวี
p53	ปกติ (Wild type)	กลายพันธุ์ (Mutant type)
pRb	ลดลง	เพิ่มขึ้น
P16	เพิ่มขึ้น	ลดลง
Cyclin D	ลดลง	เพิ่มขึ้น
EGFR	ลดลง	เพิ่มขึ้น
Survivin	ลดลง	เพิ่มขึ้น

ลักษณะทางพยาธิวิทยา มักพบลักษณะพยาธิวิทยาแบบ Non-keratinisation และ basaloid โดยพบบ่อยในตำแหน่ง tonsillar crypt และไม่พบลักษณะ dysplasia ของเยื่อเมือกมาก่อน อาจพบเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte และการเจริญเติบโตแบบ lobular ได้

อาการแสดง ผู้ป่วยส่วนใหญ่มักมาในระยะที่ก่อนมีขนาดเล็ก (Early T stage) แต่มีการลุกลามไปต่อมน้ำเหลืองได้บ่อย ลักษณะของต่อมน้ำเหลืองมักพบได้หลายกลุ่มและมีลักษณะ cystic โดยเฉพาะมะเร็งคอหอยช่วงปาก มักมาในระยะที่ 3 หรือ 4

ตารางที่ 3.4 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะทางคลินิกระหว่างมะเร็งศีรษะและลำคอที่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวีและไม่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวี

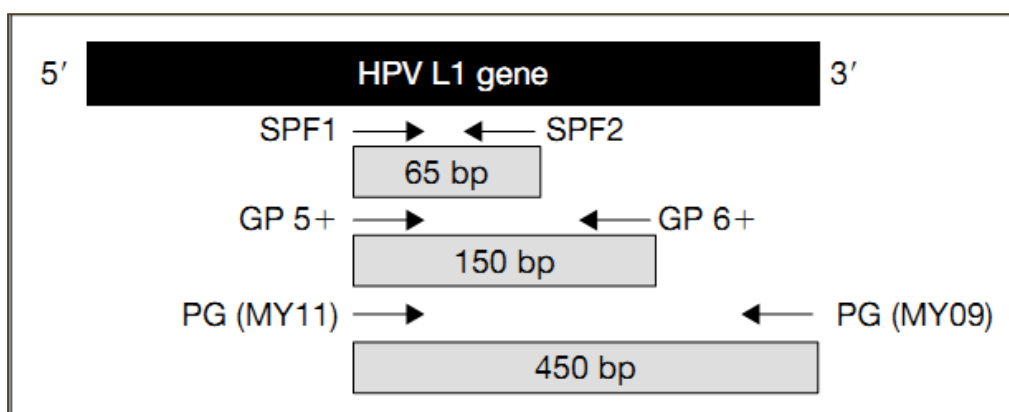
	มะเร็งศีรษะและลำคอที่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวี	มะเร็งศีรษะและลำคอที่ไม่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวี
ตำแหน่งรอยโรค	ต่อมทอนซิลและมะเร็งโคนลิ้น	เป็นได้ทุกตำแหน่ง
ลักษณะทางพยาธิวิทยา	Non-keratinised	Keratinised
อายุ	อายุน้อย	อายุมาก
สัดส่วนเพศชาย:เพศหญิง	3:1	3:1
ระยะของโรค	Tx, T1-2	ไม่แน่นอน
ปัจจัยเสี่ยง	พฤติกรรมเสี่ยงทางเพศสัมพันธ์	การสูบบุหรี่, การดื่มสุรา
อุบัติการณ์	พบมากขึ้น	พบน้อยลง
แนวโน้มน้ำอัตรการอยู่รอด	ดีขึ้น	เหมือนเดิม

การตรวจสถานะไวรัสเอชพีวี

ในปัจจุบัน ยังไม่มีวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจสถานะไวรัสเอชพีวีทำให้ยังมีความหลากหลายในการตรวจ ทั้งนี้ ขึ้นกับชนิดของชิ้นเนื้อ (ชิ้นเนื้อพาราฟิน, ชิ้นเนื้อแช่แข็ง หรือชิ้นเนื้อสด) และระดับความลึกของการตรวจ (โปรตีน, ดีเอ็นเอ หรือเอมอาร์เอ็นเอ)

วิธีที่สามารถใช้ตรวจสอบสถานะภาพไวรัสเอชพีวี เช่น การตรวจด้วยวิธี PCR, Real time PCR, DNA in-situ hybridization, Immunohistochemistry หรือการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสเอชพีวี เป็นต้น

1) การตรวจด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) สามารถตรวจได้ทั้งคัดกรองหรือตรวจสายพันธุ์ของไวรัสเอชพีวี สำหรับการตรวจคัดกรอง สามารถใช้ไพรเมอร์ (Primer) ที่มีความจำเพาะต่อส่วน L1 ของไวรัสเอชพีวี เช่น GP5/6 (สามารถตรวจไวรัสเอชพีวีได้มากกว่า 27 สายพันธุ์รวมถึงสายพันธุ์ที่ 6, 11,16,18,31 และ 33), GP5+/6+, MY09/11 (สามารถตรวจไวรัสเอชพีวีได้กว่า 30 สายพันธุ์รวมถึงสายพันธุ์ที่ 6, 11,16,18,31 และ 33) ทั้งนี้ แต่ละไพรเมอร์จะมีความแตกต่างในจำนวนคู่เบส ดังรูป 3.4



ภาพที่ 3.4 แสดงความยาวคู่เบสของไพรเมอร์ชนิดต่างๆ ต่อส่วน L1 consensus (bp:base pair)(34)

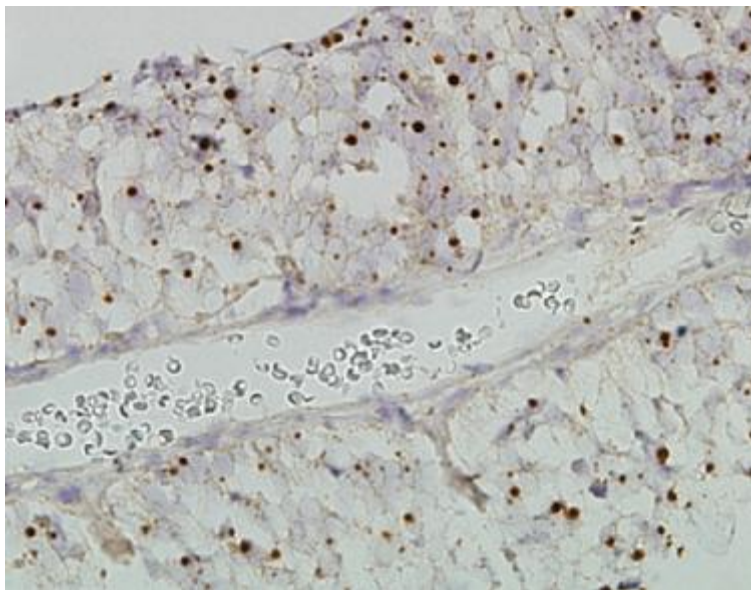
จำนวนคู่เบสของไพรเมอร์ จะมีผลสำคัญต่อการตรวจดีเอ็นเอ โดยเฉพาะในชั้นเนื้อพาราฟิน เนื่องจากในชั้นเนื้อดังกล่าว พบการแตกหักของดีเอ็นเอได้บ่อย การใช้ไพรเมอร์ที่มีคู่เบสน้อย จะทำให้สามารถตรวจสอบสถานะไวรัสเอชพีวีได้ดีกว่า อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดของการตรวจ PCR โดยใช้ primer ต่อส่วน L1 คือ การพบผลบวกลวง จากการที่ไวรัสมีการสลายส่วน L1 ภายหลังจากประสานดีเอ็นเอกับยีนของเซลล์ปกติ (พบได้ร้อยละ 7)

นอกจากการตรวจด้วยวิธี PCR ตามปกติแล้ว ยังมีการตรวจด้วยวิธี Nested-PCR (กล่าวในบทการตรวจทางอณูพันธุศาสตร์) ซึ่งสามารถเพิ่มความไวต่อการตรวจดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตาม อาจพบผลบวกคลวงได้, หรือการตรวจด้วยวิธี Real-time PCR ที่สามารถวัดปริมาณไวรัสในเนื้อเยื่อตัวอย่างได้ และพบปนเปื้อนในการตรวจได้น้อยกว่า

หลังจากการตรวจคัดกรองสถานะไวรัสเอชพีวี เราสามารถตรวจสอบสายพันธุ์ของไวรัสดังกล่าวได้หลายวิธี เช่น Restriction fragment length polymorphisms (RFLP), dot blot, reverse dot blot หรือ DNA enzyme immunoassay เป็นต้น

การตรวจเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ของยีน E6 และ E7 เป็นอีกการตรวจหนึ่งที่พบว่ามีความไวและจำเพาะที่ดีกว่าการตรวจดีเอ็นเอ โดยพบว่าผู้ป่วยมะเร็งที่ตรวจพบดีเอ็นเอของไวรัสเอชพีวี แต่ไม่พบเอ็มอาร์เอ็นเอของยีน E6 และ E7 มีพยาธิสภาพและการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลไม่ต่างกับผู้ป่วย มะเร็งที่ตรวจไม่พบดีเอ็นเอของไวรัสเอชพีวี อย่างไรก็ตาม การตรวจดังกล่าวมีข้อจำกัดที่สามารถตรวจได้ในชิ้นเนื้อสดหรือชิ้นเนื้อแช่แข็งเท่านั้น

2) *In Situ Hybridization (ISH)* เป็นการตรวจดีเอ็นเอส่วนที่สนใจ โดยใช้สาร Chromogen หรือ Fluorophore การตรวจดังกล่าวสามารถตรวจคัดกรองไวรัสเอชพีวีหรือตรวจเฉพาะสายพันธุ์ได้โดยเฉพาะชิ้นเนื้อพาราฟิน โดยการตรวจดังกล่าวจะพบการติดสีในส่วนของนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งแบบ dot-like ดังรูป 3.5



ภาพที่ 3.5 แสดงการย้อมติดสีในนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งโดยวิธี In Situ Hybridization(5)

3) *Hybrid capture (Quigen Valencia, CA)* การตรวจดังกล่าว ทำได้โดยการสลายสายคู่ดีเอ็นเอเป็นสายเดี่ยว เพื่อจับกับ probe อาร์เอ็นเอที่มีสารเรืองแสง สามารถตรวจไวรัสเอชพีวีได้ 13 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ 16, 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 และ 68) ซึ่งสายพันธุ์ที่มีความสามารถก่อโรคมะเร็ง

4) *อิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (IHC)* เป็นการตรวจหาแอนติเจนซึ่งเป็นโปรตีนบนผิวเซลล์ โดยอาศัยหลักการของการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยเฉพาะโปรตีน p16 ซึ่งจะพบการแสดงออกมากขึ้น เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสเอชพีวี

เปรียบเทียบการตรวจสถานะไวรัสเอชพีวีด้วยวิธีต่างๆ

การตรวจด้วยวิธี PCR มีประโยชน์ในด้านความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอของไวรัส เมื่อเทียบกับการตรวจด้วยวิธีอื่น สามารถตรวจพบดีเอ็นเอได้แม้มีปริมาณไวรัสแค่ 1 ยีนต่อเซลล์ ในขณะที่การตรวจด้วยวิธี ISH หรือ IHC สามารถทำได้ง่ายกว่า, ราคาถูก และสะดวกกว่า

Smets และคณะ (33) ได้ทำการศึกษา มะเร็งช่องปากและมะเร็งคอหอยส่วนช่องปาก โดยการตรวจชิ้นเนื้อพาราฟินและซีรัมของผู้ป่วย จำนวน 48 ราย การตรวจชิ้นเนื้อด้วยวิธีอิมมูโนฮิส

โตเคมิสตรี้ ของโปรตีน p16, การตรวจ PCR โดยใช้ GP5+/6+ primer ,การตรวจด้วยวิธี enzyme immunoassay เพื่อบอกสายพันธุ์ของไวรัสเอชพีวี, การตรวจ Real-time PCR ต่อเอมอาร์เอ็นเอของไวรัสเอชพีวีสายพันธุ์ 16 ส่วน E6 และ E7, การตรวจแอนติบอดีในเซรัมต่อโปรตีน E6, E7 ของไวรัสเอชพีวีสายพันธุ์ 16 พบความสัมพันธ์ของการตรวจ ดังตาราง 3.5

ตารางที่ 3.5 แสดงความไวและความจำเพาะต่อการตรวจสถานะไวรัสเอชพีวี ด้วยวิธีต่างๆ

เทคนิคการตรวจ	ความไว (ร้อยละ)	ความจำเพาะ(ร้อยละ)
p16 IHC	100	79
PCR for L1	100	89
Real-time PCR for E6	100	100
Real-time PCR for HPV16	92	97
Serum antibody	91	30

ในการศึกษานี้ ใช้การตรวจ Real-time PCR ต่อ mRNA ส่วน E6 และ E7 เป็นการตรวจมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบ โดยผู้วิจัยได้แนะนำให้ทำการคัดกรองสถานะไวรัสเอชพีวีด้วยการตรวจ IHC ต่อโปรตีนp16 ก่อน ในรายที่ให้ผลบวก จึงทำการตรวจต่อด้วยวิธี GP5+/6+ PCR จะได้ความไวและความจำเพาะถึงร้อยละ 100

เช่นเดียวกับการศึกษาของ Singhi และคณะ (35) ซึ่งพบความสัมพันธ์ของการตรวจด้วยวิธี ISH และ การตรวจด้วยวิธี IHC ต่อโปรตีน p16

อย่างไรก็ตาม หากเปรียบเทียบการตรวจด้วยวิธีต่างๆ ในทางคลินิก พบว่าการตรวจด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อส่วน L1 ของไวรัสเอชพีวีในชิ้นเนื้อพาราฟิน สามารถทำได้ง่ายกว่าการตรวจวัด mRNA, สามารถตรวจคัดกรองสายพันธุ์ไวรัสเอชพีวีได้หลายสายพันธุ์ รวมถึงมีความจำเพาะกว่าการตรวจวัดโปรตีน p16 อิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้

การรักษาและพยากรณ์โรคผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอที่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวี

จากข้อมูลย้อนหลัง พบว่าผู้ป่วยกลุ่มนี้ โดยเฉพาะมะเร็งคอหอยส่วนปาก พบอัตราการตอบสนองต่อรังสีรักษาและเคมีบำบัดที่ดีกว่า และมีอัตราการรอดชีวิตที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวี ส่วนหนึ่ง เชื่อว่าการตอบสนองดังกล่าวเกิดจาก unmutated p53 และโปรตีน E6, E7 ที่กระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ต่อรังสีและเคมีบำบัดได้ดี นอกจากนี้ ผู้ป่วยในกลุ่มดังกล่าวไม่มีประวัติสูบบุหรี่หรือดื่มสุรา ทำให้โอกาสสัมผัสสารก่อมะเร็ง (Field cancerization) ในส่วนอื่นน้อยกว่า

ยาแบบวิเคราะห์ที่ไปด้านหน้าระยะที่การศึกษาระยะ 2 ของ Eastern Cooperative National Cancer Institute (ECOG) (36) ทำการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งคอหอยส่วนช่องปากและมะเร็งกล่องเสียง ระยะที่ 3 หรือ 4 พบว่า กลุ่มที่ได้ผลบวกต่อไวรัสเอชพีวีโดยการตรวจ ISH มีการตอบสนองต่อรังสีเคมีบำบัดที่ดีกว่า (ร้อยละ 87 เทียบกับร้อยละ 57, $p=0.007$), อัตราการกลับเป็นซ้ำที่ 2 ปีที่ดีกว่า (ร้อยละ 86 เทียบกับร้อยละ 57, $p=0.02$) และอัตราการรอดชีวิตที่ 2 ปีดีกว่า (ร้อยละ 95 เทียบกับร้อยละ 62, $p=0.005$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ให้ผลลบต่อการตรวจไวรัสเอชพีวี ทั้งนี้ ผลดังกล่าวก็สอดคล้องไปในแนวทาง เดียวกันเมื่อทำการวิเคราะห์ในกลุ่มมะเร็งคอหอยส่วนช่องปาก

การศึกษาต่อมาในระยะที่ 3 แบบวิเคราะห์ย้อนหลังของ Ang และคณะ (7) พบว่า ผลการรักษาคล้ายคลึงกับผลการรักษาของ ECOG โดยกลุ่มที่ตรวจพบผลบวกต่อไวรัสเอชพีวี มีอัตราการรอดชีวิตและอัตราการกลับเป็นซ้ำที่ 2 ปีดีกว่ากลุ่มที่ให้ผลลบต่อไวรัสเอชพีวี ในงานศึกษานี้ ยังพบว่าการสูบบุหรี่ มีผลต่อพยากรณ์โรคของกลุ่มที่ให้ผลบวกต่อไวรัสเอชพีวี

นอกจากนี้ Rischin และคณะ (37) ได้ศึกษาวิเคราะห์ย้อนหลังระยะที่ 3 ในผู้ป่วยมะเร็งคอหอย ส่วนช่องปากที่ได้รับการรักษาด้วยรังสีเคมีบำบัด ผู้ป่วยที่ตรวจพบผลบวกต่อไวรัสเอชพีวี และผลบวก ต่อโปรตีน p16 ด้วยวิธี อิมมูโนฮิสโตเคมีสตรีย มีอัตราการรอดชีวิตที่ 2 ปีที่ดีที่สุดเมื่อเทียบกับ กลุ่มที่ให้ผลบวกต่อไวรัสเอชพีวี แต่ให้ผลลบต่อโปรตีน p16 และกลุ่มที่ให้ผลลบต่อไวรัสเอชพีวี (ร้อยละ 95, ร้อยละ 88 และร้อยละ 77 ตามลำดับ, $p=0.003$)

จากการศึกษาดังกล่าว ได้มีการศึกษา meta-analysis โดย Dayyani และคณะ(6) พบว่า กลุ่มที่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวี มีการตอบสนองต่อรังสีเคมีบำบัดที่ดีกว่า (OR 2.87, $p=0.01$) และอัตราการรอดชีวิตที่ดีกว่า (HR 0.42, $p<0.0001$)

แม้ว่า ในกลุ่มที่ให้ผลบวกต่อไวรัสเอชพีวี จะมีพยากรณ์โรคที่ดีกว่า แต่ด้วยข้อจำกัดของข้อมูลที่มีในปัจจุบัน ยังไม่มีแนวทางการรักษาที่เฉพาะสำหรับกลุ่มดังกล่าว

บทที่ 4

การตรวจทางอณูพันธุศาสตร์

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain reaction, PCR) เป็นกระบวนการที่ใช้เพื่อเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยๆ เพื่อใช้ในการทดลองต่างๆ ได้

ปัจจัยสำคัญของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ได้แก่

- ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ที่ต้องการเพิ่มปริมาณ
- ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primer) ที่มีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบ
- เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase)
- คีอ็อกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ คือ dATP, dTTP, dGTP และ dCTP
- โคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ได้แก่ Mg^{2+} หรือ Mn^{2+}

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ประกอบด้วยขั้นตอน 3 ขั้นตอนหลัก ซึ่งจะซ้ำๆ เป็นวัฏจักรจนกว่าจะได้ดีเอ็นเอปริมาณมากขึ้นเพียงพอ ประกอบด้วย (38)

1) การสูญเสียสภาพธรรมชาติของดีเอ็นเอ (Denaturation)

เป็นการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงเพียงพอที่จะทำให้ดีเอ็นเอตั้งต้น เกิดสูญเสียสภาพธรรมชาติ โดยมีการแยกสายพอลินิวคลีโอไทด์สองสายที่พันกันเป็นเกลียวแยกออกจากกัน ส่วนใหญ่ใช้อุณหภูมิประมาณ 90 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจแตกต่างกันตามองค์ประกอบของเบส

2) การเข้าคู่ของสายดีเอ็นเอตั้งต้นกับดีเอ็นเอที่เป็นไพรเมอร์ (Annealing)

ไพรเมอร์ (Primer) คือดีเอ็นเอสายเดี่ยวสั้นๆ ประมาณ 20-22 เบส มีลำดับเบสจากสายปลาย 5' ไปยังสาย 3' กับสายดีเอ็นเอต้นแบบ การทำ PCR ชุดหนึ่งจะใช้ดีเอ็นเอไพรเมอร์ 2 ชุด ชุดที่มีลำดับเบสเหมือนกับดีเอ็นเอแม่แบบจากปลายสาย 5' ไป 3' เรียกว่า forward primer ส่วนดีเอ็นเอไพรเมอร์อีกชุดที่มีทิศทางสวนกลับ เรียกว่า reverse primer เมื่อดีเอ็นเอมีการแยกเป็นสายเดี่ยวแล้ว

การปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมจะทำให้เกิดการเข้าคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบทั้งสองสาย โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิประมาณ 52-58 องศาเซลเซียส

3) การต่อสายยาวของดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (Extension)

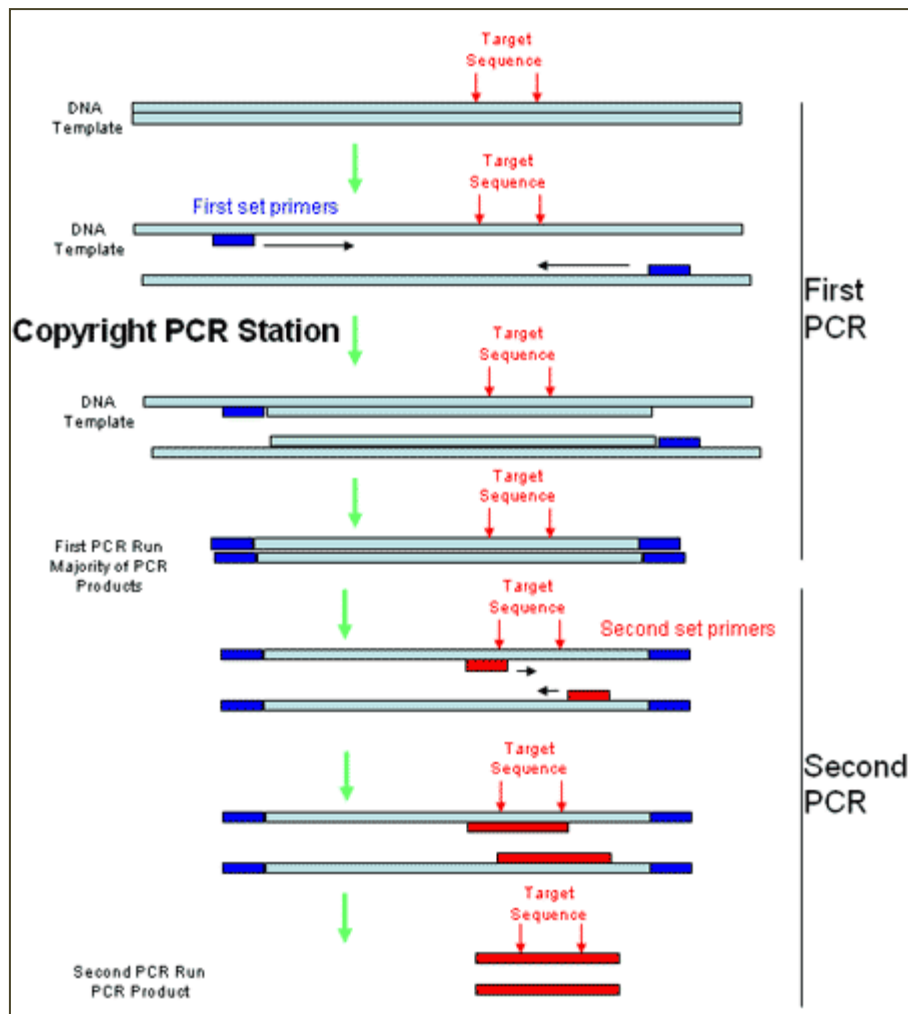
หลังจากดีเอ็นเอไพรเมอร์เข้าคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบแล้ว เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) จะทำการเลือกนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟตที่มีเบสคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบ ทำให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ที่ยาวขึ้นและมีเบสคู่สมกับสายดีเอ็นเอเดิมได้ ใช้อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส

ทั้งนี้ กระบวนการ PCR จะดำเนินเป็นวัฏจักรอย่างเป็นวงจร แต่ละวัฏจักรจะได้ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเท่าตัว โดยทั่วไปนิยมประมาณ 25 ถึง 30 วัฏจักร

การตรวจด้วยวิธี Nested-Polymerase Chain Reaction (Nested-PCR)

เป็นการทำ PCR โดยใช้ดีเอ็นเอไพรเมอร์ 2 คู่ คู่แรกเป็นการทำ PCR ในวงกว้างเพื่อจำกัดพื้นที่ให้แคบลง จากนั้นใช้ดีเอ็นเอไพรเมอร์คู่ที่สองซึ่งจะอยู่ในบริเวณที่แคบลง ทำให้สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้มีความแม่นยำ ถูกต้อง และชัดเจนมากขึ้น

ข้อเสียของการทำ Nested-PCR คือจะต้องเปิดหลอดทดลองเพื่อเอาผลผลิตจาก PCR ครั้งแรกมาเป็นต้นแบบของการทำ Nested-PCR ซึ่งอาจเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจากดีเอ็นเออื่นๆ ได้



ภาพที่ 4.1 แสดงกระบวนการของ Nested-PCR

การวิเคราะห์ผลผลิตจาก PCR

สามารถทำได้หลายวิธี วิธีที่ง่ายและนิยมมากที่สุดคือ agarose gel electrophoresis หรือ polyacrylamide gel electrophoresis จากนั้นย้อมสีด้วยสารเรืองแสง ethidium bromide ซึ่งมีคุณสมบัติที่สามารถแทรกตัวเข้าไปอยู่ในดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถมองเห็นแถบของดีเอ็นเอในเจลได้ โดยการส่องด้วยแสง UV หรือย้อมสี silver ก็ได้

การตรวจด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในงานวิจัยนี้ ประกอบด้วย

1) ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นเนื้อพาราฟิน

1. เตรียมชิ้นเนื้อพาราฟินในสไลด์ โดยทำการตัดจากบล็อก เฉพาะส่วนที่พบเซลล์มะเร็ง
2. ใช้ใบมีดขูดพาราฟินส่วนเกินในสไลด์ เพื่อแยกเฉพาะชิ้นเนื้อที่จะทำการตรวจ
3. ตัดชิ้นเนื้อพาราฟินที่ได้ออกมาเป็นส่วน อย่างน้อย 8 ส่วน โดยมีความหนาต่อชิ้น 5-10 ไมครอน
4. ใส่ชิ้นเนื้อที่ตัดลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 ซีซี และเติมสารละลาย xylene 1 ซีซี, ปิดฝาและเขย่าอย่างน้อย 10 วินาที
5. ทำการปั่นโดยใช้เครื่อง centrifuge ในขนาดความแรงสูงสุด เป็นเวลา 2 นาที ที่ อุณหภูมิ ห้อง (15-25 องศาเซลเซียส)
6. ทำการดูดเฉพาะสารละลายส่วนบน (supernatant) ทิ้งโดยใช้ pipette
7. เติม ethanol (96-100%) 1 ซีซีลงในตะกอนส่วนที่เหลือ (pellet) ทำการเขย่าจนเข้ากันดี (ethanol จะทำการแยก xylene ส่วนที่ยังตกค้างออกจากตะกอนที่ต้องการตรวจ)
8. ทำการปั่นอีกครั้งโดยใช้เครื่อง centrifuge ในขนาดความแรงสูงสุด เป็นเวลา 2 นาที ที่ อุณหภูมิห้อง
9. ทำการดูดเฉพาะสารละลายส่วนบน (supernatant) ทิ้งโดยใช้ pipette หลังจากนั้นเปิด ฝาทิ้งไว้ และทำการ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาทีหรือจนกว่าสารละลาย ethanol จะระเหยออกหมด
10. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ ATL ปริมาณ 180 ไมโครลิตร และสารละลาย proteinase K 20 ไมโครลิตรลงในตะกอนส่วนที่เหลือ
11. Incubate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งตะกอนส่วนที่เหลือละลายหมด
12. Incubate ต่อที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
13. ทำการปั่นอีกครั้งโดยใช้เครื่อง centrifuge
14. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AL ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ทำการเขย่า หลังจากนั้นเติม สารละลาย ethanol (96-100%) 200 ไมโครลิตร ทำการเขย่าอีกครั้ง

15. ทำการปั่นอีกครั้งโดยใช้เครื่อง centrifuge
 16. เติมนสารละลายทั้งหมด (lysate) ใส่ใน QIAamp MinElute column, ปิดฝาและทำการปั่นโดยใช้เครื่อง centrifuge ในขนาดความแรง 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
 17. เติมนสารละลายบัฟเฟอร์ AW1 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร, ปิดฝาและทำการปั่นโดยใช้เครื่อง centrifuge ในขนาดความแรง 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
 18. เติมนสารละลายบัฟเฟอร์ AW2 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร, ปิดฝาและทำการปั่นโดยใช้เครื่อง centrifuge ในขนาดความแรง 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
 19. ทำการปั่นโดยใช้เครื่อง centrifuge ในขนาดความแรง 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที
 20. เติมนสารละลายบัฟเฟอร์ ATE ปริมาณ 20-100 ไมโครลิตร ปิดฝาและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที
 21. ทำการปั่นโดยใช้เครื่อง centrifuge ในขนาดความแรง 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
- 2) ขั้นตอนการตรวจ
1. เตรียมสารประกอบ Master mix (อัตราส่วนต่อดีเอ็นเอ 1 ตัวอย่าง) ประกอบด้วย

- 10X buffer	2 μ l
- 50 mM MgCl ₂	0.6 μ l
- 20 mM dNTP mixture	0.4 μ l
- Primer (GP5/6)	
20 μ M GP 5/6 Forward	0.2 μ l
20 μ M GP 5/6 Reverse	0.2 μ l
- Taq DNA polymerase	0.2 μ l
- DNA	100 ng/ μ l
- dH ₂ O	

2. ดำเนินการตรวจปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยนำหลอดที่มี ส่วนประกอบของ Master mix ผสมเข้ากับดีเอ็นเอตัวอย่าง และนำเข้าเครื่องเทอร์โมไซเคิล (รูปที่ 4.2) ซึ่งกำหนดค่าต่างๆ ดังนี้

Denaturation	94 °C	ใช้เวลา 10 นาที	} จำนวน 40 รอบ
	94 °C	ใช้เวลา 20 วินาที	
Annealing	56 °C	ใช้เวลา 20 วินาที	
Extension	72 °C	ใช้เวลา 20 วินาที	
Forward	4 °C		



ภาพที่ 4.2 เครื่องเทอร์โมไซเคิล รุ่น My Cycler thermal cycler

ทั้งนี้ ในงานวิจัย ผู้ศึกษาได้ใช้ไพรเมอร์ GP5+/6+ (39)ซึ่งมีความยาวคู่เบส ประมาณ 150 คู่เบส ซึ่งสามารถตรวจได้ง่ายในชั้นเนื้อพาราฟิน ไพรเมอร์ดังกล่าว มีความจำเพาะต่อส่วน L1 ของไวรัสเอชพีวี ซึ่งครอบคลุมสายพันธุ์ของไวรัสมากกว่า 37 สายพันธุ์ เช่น สายพันธุ์ที่ 6, 11, 16, 18, 31 และ 33 เป็นต้น โดยมีลำดับดีเอ็นเอ ดังตาราง ที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

Primer	Sequence (5' -> 3')
GP 5+/6+ For	TTT-GTT-ACT-GTG-GTA-GAT-ACY-AC
GP 5+/6+ Rev	GAA-AAA-TAA-ACT-GTA-AAT-CAT-ATT-C
GAPDH 2924f	TGA-GGC-TCC-CAC-CTT-TCT-CAT-C
GAPDH3081r(ivs)	TGA-GGC-CCT-GCA-GCG-TAC-TC

Y = C or T

ตัวควบคุมบวก คือ เซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ตรวจพบไวรัสเอชพีวี, ตัวควบคุมลบ คือน้ำเปล่า

โดยมี GAPDH เป็นตัวออกคุณภาพของดีเอ็นเอ (internal control of RNA)

ในการทดลองเบื้องต้น พบผลลบต่อตัวควบคุมบวก (เซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ตรวจพบไวรัสเอชพีวี) โดยการตรวจเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์มาตรฐาน (Conventional PCR) ซึ่งอาจเป็นได้จากดีเอ็นเอไวรัสในชั้นเนื้อพาราฟินมีปริมาณน้อยและมีการแตกหัก ทางผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนวิธี การตรวจ โดยการใช้เทคนิค Nested-PCR หลังเปลี่ยนวิธีการตรวจ สามารถให้ผลตรงตามตัวควบคุมทั้งบวกและลบ จึงดำเนินการตรวจชิ้นเนื้อพาราฟินของผู้ป่วยทั้งหมด

3. การตรวจเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส โดยวิธี Nested-PCR ขั้นตอนการทำเหมือนการทำเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สดังได้กล่าวข้างต้น ยกเว้นดีเอ็นเอจะต้องเป็นดีเอ็นเอที่ได้มาจากการตรวจเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สรอบแรกจำนวน 0.5 μ l ทั้งนี้ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของดีเอ็นเอระหว่างตัวอย่าง อันจะทำให้เกิดผลบวกหลงได้ ผู้วิจัยมีการแยกตัวอย่าง, ทำการตรวจในห้องปฏิบัติการเฉพาะ และมีตัวควบคุมลบทุกครั้งดำเนินการตรวจ

- 3) การวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอจากเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส

โดยใช้ 8% Acrylamide gel electrophoresis การอ่านผล แสดงในภาคผนวก ข

บทที่ 5

วัตถุประสงค์และวิธีการ

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง (Population and sample)

ประชากรเป้าหมาย (Target population) หมายถึง ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสเซลล์ ที่ไม่ใช่มะเร็งหลังโพรงจมูก ทุกอายุ เมื่ออายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 45 ปี

ประชากรที่ใช้ในการศึกษา (Study population) หมายถึง ประชากรเป้าหมายทุกคน ที่ได้เข้ารับการรักษาแบบผู้ป่วยใน หรือผู้ป่วยนอก รพ.จุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ระหว่างเดือนมกราคม พ.ศ.2543 ถึงธันวาคม พ.ศ.2553

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยเข้าการศึกษา (Inclusion criteria)

1. ผู้ป่วยต้องมีผลการตรวจทางพยาธิยืนยัน ว่าเป็นมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสเซลล์
2. ผู้ป่วยทุกระยะของโรค
3. ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยในช่วงอายุ 15-45 ปี ทั้งหญิงและชาย

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่เคยได้รับการวินิจฉัยมะเร็งศีรษะและลำคอก่อนปี พ.ศ.2543
2. ผู้ป่วยที่ไม่สามารถติดตาม ขึ้นเนื้อพาราฟิน เพื่อส่งตรวจสถานะไวรัสเอชพีวี

การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size determination)

ใช้วิธีคำนวณขนาดตัวอย่างโดยสูตรหาขนาดตัวอย่างสำหรับการประมาณค่าสัดส่วนหรือร้อยละของกลุ่ม

$$n = Z_{\infty/2}^2 P (1-P) / d^2$$

เมื่อ n = จำนวนตัวอย่างในผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ ที่ไม่ใช่มะเร็งหลังโพรงจมูก
 Z = ค่าที่ได้จากตารางการแจกแจงปกติมาตรฐาน (Standard normal distribution)
 ถ้าใช้ระดับความเชื่อมั่น 95% ชนิด 2 ทาง ($Z_{\infty/2} = Z_{0.05/2} = 1.96$ (two tail))
 P = ค่าสัดส่วนที่ประมาณไว้
 d = ค่าความคลาดเคลื่อนที่จะยอมรับได้ (acceptable error between 2 group) = 10%
 จากการทบทวนวรรณกรรม ข้อมูลจากการศึกษาพบว่าความชุกของไวรัสเอชพีวีในมะเร็งศีรษะและลำคอ คือ ร้อยละ 25 (0.25) ตามรายงานของ Kreimer และคณะ (3)

$$n = (1.96)^2(0.25)(0.75) / (0.10)^2$$

เมื่อกำหนดค่า $\alpha=0.05$, Power ที่ 95% จะได้ค่า $n = 72$ ราย

วิธีการศึกษา

1. การเข้าถึงเวชระเบียนและชิ้นเนื้อผู้ป่วย เนื่องจากในการวิจัยนี้ ผู้วิจัยไม่มีการติดต่อกับผู้ป่วยโดยตรง ผู้วิจัยจึงต้องการขอยกเว้นการขอความยินยอมจากผู้ป่วย โดยจะขออนุญาตจากผู้อำนวยการโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เพื่อใช้เวชระเบียนและตัวอย่างชิ้นเนื้อของผู้ป่วย
2. ติดตามประวัติผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสแควมัสเซลล์ ที่ไม่ใช่มะเร็งหลังโพรงจมูก ในระบบทะเบียนประวัติ ICD10 รหัส C00.0-C14.8, C32.0-C32.9
3. ตรวจสอบชิ้นเนื้อพาราฟิน ในผู้ป่วยทุกรายในข้อ 1
4. ผู้ป่วยทุกรายที่สามารถตรวจสอบชิ้นเนื้อพาราฟินได้ จะทำการบันทึกในแบบบันทึกข้อมูล (เอกสารภาคผนวก)

5. ชิ้นเนื้อที่ได้ส่งตรวจหาสถานะไวรัสเอชพีวี โดยวิธีเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยทำการตรวจที่ห้องปฏิบัติการวิจัยห้อง 713 บริเวณชั้น 7 อาคารแพทยพัฒน์
6. การแปลผลการตรวจวิธีเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส
 - ถ้าการตรวจหา DNA ไม่มีแถบ GAPDH DNA ร่วมด้วยถือว่า DNA มีคุณภาพไม่สมบูรณ์พอในการตรวจไวรัสเอชพีวี
 - ถ้าการตรวจหา DNA มีแถบ GAPDH DNA ร่วมด้วยถือว่า DNA มีคุณภาพสมบูรณ์พอในการตรวจไวรัสเอชพีวี
 - 6.1 Positive: ผลการติดแถบของ GAPDH เป็นผลบวก และการย้อมดีเอ็นเอ ติดแถบของไวรัสเอชพีวี
 - 6.2 Negative: ผลการติดแถบของ GAPDH เป็นผลบวก และการย้อมดีเอ็นเอ ไม่ติดแถบของไวรัสเอชพีวี
7. นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์

วิธีเก็บรวบรวมข้อมูล (Data collection)

ข้อมูลทั้งหมด ผลการตรวจสถานะไวรัสเอชพีวี ผลทางพยาธิวิทยา จะได้รับการบันทึกลงในแบบบันทึกข้อมูลดังกล่าวโดยผู้วิจัยเป็นผู้เก็บและบันทึกข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

1. ลักษณะทางคลินิกและพยาธิวิทยา, อัตราความชุกของสถานะไวรัสเอชพีวี นำเสนอในรูปแบบค่าเฉลี่ย, สัดส่วน, ร้อยละและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานและแผนภูมิ
2. คำนวณความแตกต่างของตัวแปร ใช้วิธี Chi-square test
3. แสดงอัตราการรอดชีวิต โดยวิธี Kaplan-Meier curve
4. วิเคราะห์ความแตกต่างของอัตราการรอดชีวิตระหว่างกลุ่มที่ให้ผลบวกและผลลบต่อการตรวจไวรัสเอชพีวี โดยวิธี Log rank test
5. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรทางคลินิกกับอัตราการรอดชีวิต โดยวิธี Cox Proportional Hazard

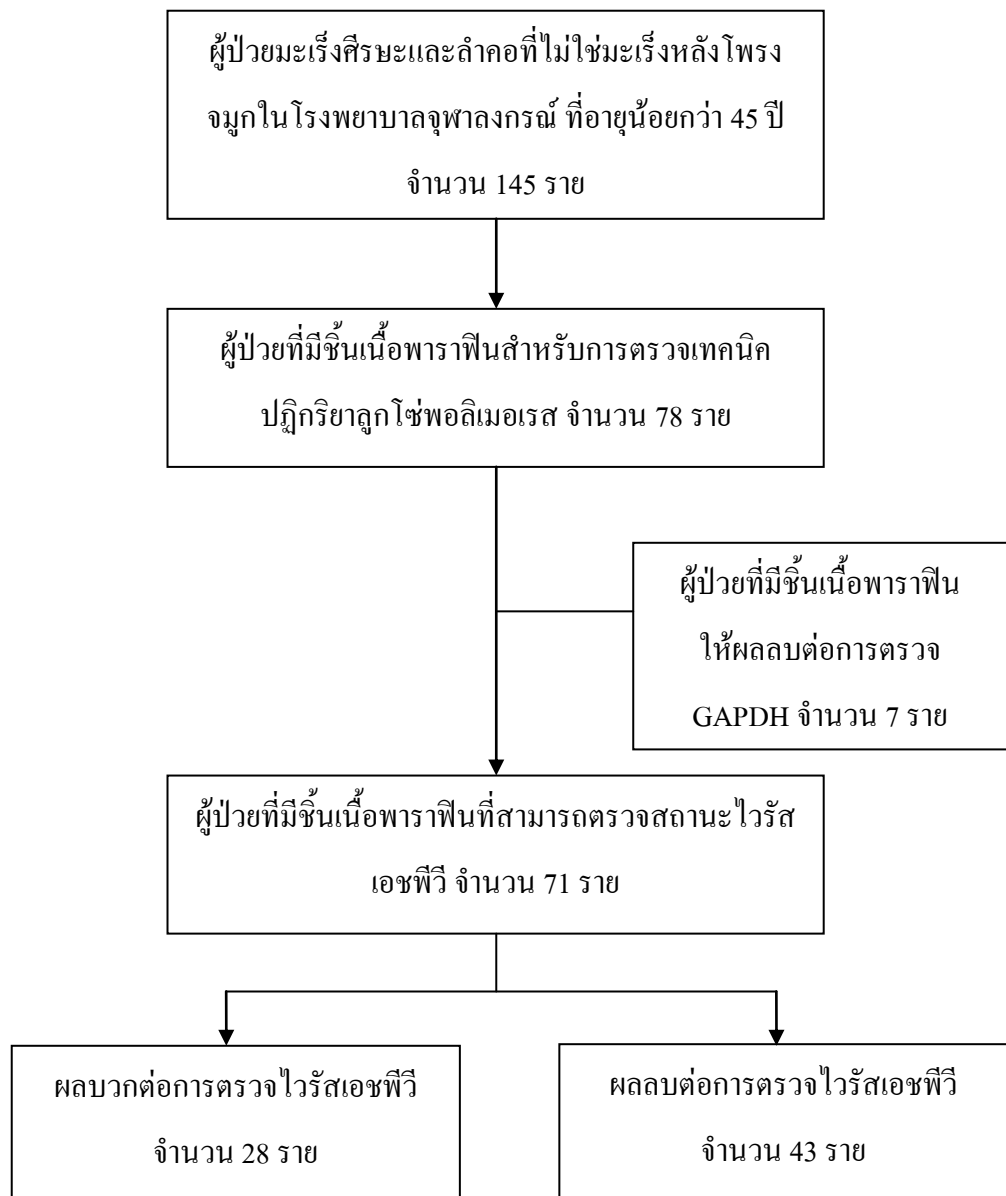
6. คำนวณค่าทางสถิติทั้งหมดโดยโปรแกรม SPSS statistical software package version 16.0
(Statistical Package for Social Science, SPSS Inc., Chicago, IL)
7. ที่ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จะถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $p < 0.05$

บทที่ 6

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษานี้ เป็นการศึกษาเชิงบรรยาย ณ ช่วงเวลาหนึ่ง (Cross-sectional descriptive study) เพื่อศึกษาความชุกของไวรัสเอชพีวีในผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ ที่ไม่ใช้มะเร็งหลังโพรงจมูก ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่อายุไม่เกิน 45 ปี รวมถึงศึกษาความสัมพันธ์ของการตรวจพบสถานะไวรัสเอชพีวีกับพยากรณ์และการดำเนินโรค

จากการเก็บข้อมูลย้อนหลัง ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2543 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ.2553 มีจำนวนผู้ป่วย 145 ราย โดยสามารถค้นหาชิ้นเนื้อพาราฟิน เพื่อนำมาตรวจสถานะไวรัสเอชพีวีได้ทั้งสิ้น 78 ราย ทั้งนี้ใน 7 ราย ตรวจพบผลลบต่อยีน Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ซึ่งเป็นตัวควบคุมเปรียบเทียบ เหลือผู้ป่วยจำนวน 71 รายที่ชิ้นเนื้อมีโอกาสที่ สามารถนำมาวิเคราะห์สถานะของไวรัสเอชพีวีได้ ตามรูปที่ 6.1



ภาพที่ 6.1 แสดงการรวบรวมชิ้นเนื้อมะเร็งศีรษะและลำคอในผู้ป่วยอายุน้อยเพื่อทำการตรวจไวรัสเอชพีวี

ส่วนที่ 1 ข้อมูลพื้นฐานทั่วไป (Baseline Demographics)

ผู้ป่วยทั้งหมด 71 ราย เป็นเพศชาย 59 ราย คิดเป็นร้อยละ 83 อายุที่เริ่มวินิจฉัยเฉลี่ย 40 ปี โดยมีอายุที่เริ่มวินิจฉัยน้อยสุด 20 ปี ผู้ป่วย 3 รายมีประวัติเป็นมะเร็งชนิดอื่นก่อนการวินิจฉัยมะเร็งศีรษะและลำคอ (1 รายเป็นมะเร็งหลังโพรงจมูก, 1 รายเป็นมะเร็งไทรอยด์ และ 1 รายเป็นมะเร็งต่อมไทรอยด์) โดยกว่า ร้อยละ 50 ของผู้ป่วยมีประวัติการสูบบุหรี่หรือดื่มสุรา

วิธีการวินิจฉัยทั้งหมด ได้ขึ้นเนื่องจากตำแหน่งรอยโรคโดยตรง โดยพบในตำแหน่งช่องปากมากที่สุด รองลงมาเป็นคอหอยส่วนช่องปาก, ก่อเสียงและคอหอยส่วนล่างตามลำดับ (ร้อยละ 35, ร้อยละ 24, ร้อยละ 23 และร้อยละ 17) ทั้งนี้ กว่าร้อยละ 70 ของลักษณะทางพยาธิวิทยาเป็นชนิด well to moderately differentiated

ระยะของโรค ร้อยละ 83 ของผู้ป่วย มาตรวจในระยะที่ 3 หรือ 4 โดยพบว่า ร้อยละ 64 มีระยะของก้อนอยู่ในระยะที่ 3 หรือ 4 (T3 หรือ T4) และมีการกระจายไปต่อมไทรอยด์ข้างเคียงกว่า ร้อยละ 58 (N1 หรือ N2 หรือ N3)

ในด้านการรักษา ผู้ป่วยส่วนใหญ่ได้รับการรักษามากกว่า 1 วิธี โดยส่วนใหญ่เป็นการรักษาด้วยรังสีเคมีบำบัด หรือการผ่าตัด ตามด้วยรังสีเคมีบำบัด สำหรับสูตรเคมีบำบัดที่มีการใช้มากที่สุดคือ แพลตินัม (Cisplatin หรือ Carboplatin)

ตารางที่ 6.1 แสดงข้อมูลพื้นฐานทั่วไปของผู้ป่วยทั้งหมด

Characteristics	n =71 (%)
Gender	
Male	59 (83)
Female	12 (17)
Median age (year)(IQR)	40 (36-43)
History of previous cancer	
No	66 (93)
Yes	3 (4)
Unknown	2 (3)
Co morbidities	
No	58 (82)
Yes	11 (15)
Unknown	2 (3)
Tobacco habit	
Ever	42 (59)
Never	16 (23)
Unknown	13 (18)
Alcohol drinking habit	
Ever	37 (52)
Never	19 (27)
Unknown	15 (21)
Anatomical site	
Oral cavity	25 (35)
Oropharynx	17 (24)
Hypopharynx	12 (17)
Larynx	16 (23)
Other	1 (1)

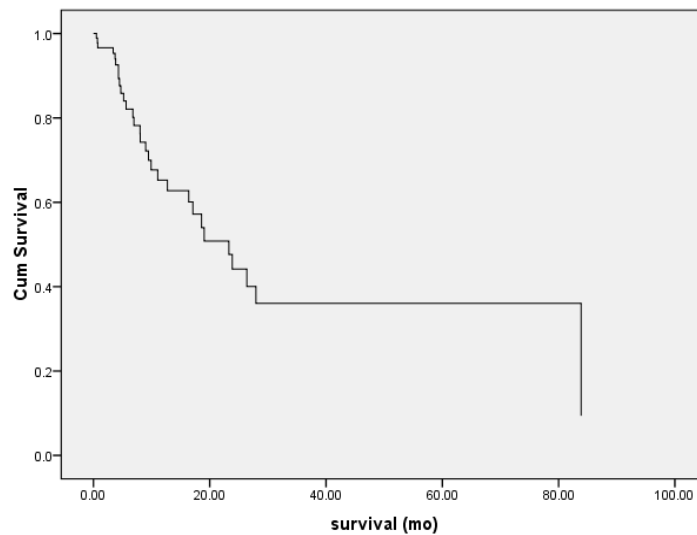
ตารางที่ 6.1 (ต่อ) แสดงข้อมูลพื้นฐานทั่วไปของผู้ป่วยทั้งหมด

Characteristics	n=71 (%)
Tumor grade	
Well/moderate differentiated	50 (70)
Poor/undifferentiated	8 (11)
Unknown	13 (19)
T stage	
T1/T2	23 (32)
T3/T4	45 (64)
Unknown	3 (4)
N stage	
N0	27 (38)
N1/N2/N3	41 (58)
Unknown	3 (4)
TNM	
I/II	9 (13)
III/IV	59 (83)
Unknown	3 (4)
Treatment modality	
No treatment	6 (8)
Surgery alone	7 (10)
Surgery followed by RT	11 (15)
Surgery followed by CRT	12 (17)
Curative RT alone	4 (6)
Palliative RT	6 (8)
Definitive CRT	16 (23)
Induction chemotherapy followed by CRT	3 (4)
Unknown	6 (9)

ตารางที่ 6.1 (ต่อ) แสดงข้อมูลพื้นฐานทั่วไปของผู้ป่วยทั้งหมด

Characteristics	n=71 (%)
HPV status	
Positive	28 (39)
Negative	43 (61)

เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลถึงเดือนธันวาคม พ.ศ.2554 พบผู้ป่วยเสียชีวิตทั้งหมด 37 รายคิดเป็น ร้อยละ 52 ทั้งนี้ มีผู้ป่วยจำนวน 5 ราย (ร้อยละ 7) ที่ไม่สามารถติดตามข้อมูลการดำเนินโรคได้ สำหรับค่ามัธยฐานของการรอดชีวิตโดยประมาณ (Estimated median overall survival) 19 เดือน และ อัตราการรอดชีวิตที่ 2 ปี (2- year overall survival) ร้อยละ 38 ดังรูป 6.2



ภาพที่ 6.2 แสดงกราฟการรอดชีวิตรวมของผู้ป่วยทั้งหมด

ส่วนที่ 2 ข้อมูลพื้นฐานทั่วไปเปรียบเทียบตามสถานะไวรัสเอชพีวี

จากการศึกษา พบผลบวกต่อการตรวจไวรัสเอชพีวีในผู้ป่วย 28 ราย คิดเป็นร้อยละ 39 โดยเมื่อแบ่งตามความซุกของไวรัสเอชพีวีในแต่ละตำแหน่งรอยโรค พบผลบวกต่อไวรัสเอชพีวีร้อยละ 47 ในมะเร็งคอหอยส่วนช่องปาก, ร้อยละ 44 ในมะเร็งกล่องเสียงและมะเร็งคอหอยส่วนล่าง และร้อยละ 32 ในมะเร็งช่องปาก

ทั้งนี้ ไม่พบความแตกต่างของลักษณะพื้นฐานระหว่างกลุ่มที่ให้ผลบวกและผลลบต่อการตรวจไวรัสเอชพีวี แต่พบว่าในกลุ่มที่ให้ผลลบต่อไวรัสเอชพีวี มีแนวโน้มสูบบุหรี่และดื่มสุรามากกว่า รวมถึงพบมะเร็งในตำแหน่งช่องปากมากกว่า ดังตารางที่ 6.2

ตารางที่ 6.2 แสดงลักษณะพื้นฐานเปรียบเทียบกลุ่มที่ให้ผลบวกและผลลบต่อการตรวจไวรัสเอชพีวี

Characteristics	HPV DNA negative n (%)	HPV DNA positive n (%)	p-value
Gender			
Male	36 (84)	23 (82)	0.8
Female	7 (16)	5 (18)	
Median age (year)(IQR)	41 (39-43)	40 (34-43)	0.5
History of previous cancer			
No	40 (93)	26 (93)	0.5
Yes	1 (2)	2 (7)	
Unknown	2 (5)	-	
Co morbidities			
No	35 (81)	23 (82)	0.7
Yes	6 (14)	5 (18)	
Unknown	2 (5)	-	
Tobacco habit			
Ever	27 (63)	15 (54)	0.7
Never	9 (21)	7 (25)	
Unknown	7 (16)	6 (21)	
Alcohol drinking habit			
Ever	24 (56)	13 (46)	0.4
Never	12 (28)	7 (25)	
Unknown	7 (16)	8 (29)	

ตารางที่ 6.2 (ต่อ) แสดงลักษณะพื้นฐานเปรียบเทียบกลุ่มที่ให้ผลบวกและผลลบต่อการตรวจไวรัส
เอชพีวี

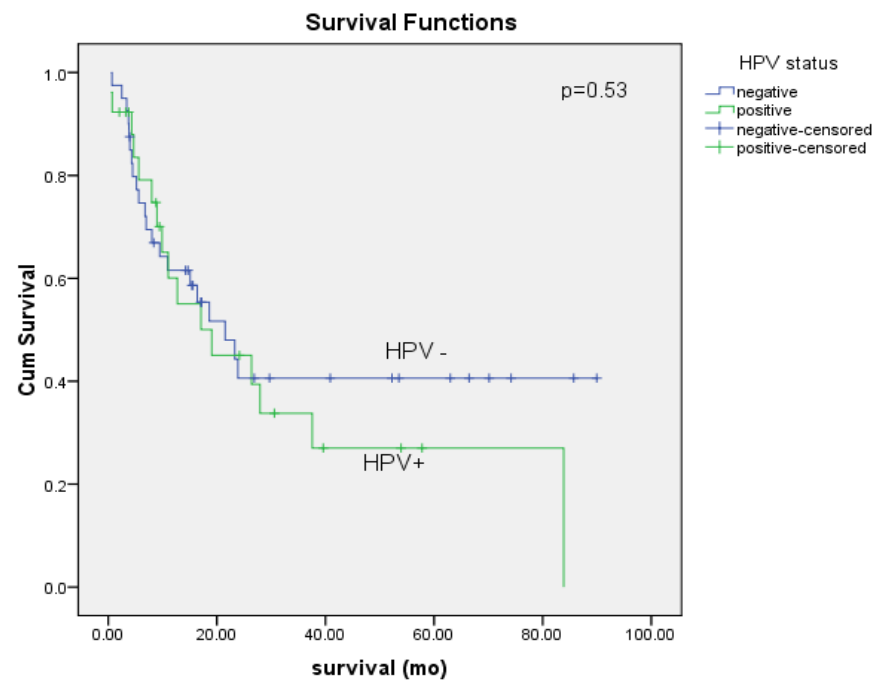
Characteristics	HPV DNA negative	HPV DNA positive	p-value
	n (%)	n (%)	
Anatomical site			0.8
Oral cavity	17 (40)	8 (29)	
Oropharynx	9 (21)	8 (29)	
Hypopharynx	7 (16)	5 (17)	
Larynx	9 (21)	7 (25)	
Other	1 (2)	-	
Tumor grade			0.9
Well/moderate differentiated	30 (70)	20 (71)	
Poor/undifferentiated	5 (12)	3 (11)	
Unknown	8 (18)	5 (18)	
T stage			0.2
T1/T2	16 (37)	7 (25)	
T3/T4	25 (58)	20 (71)	
Unknown	2 (5)	1 (4)	
N stage			0.5
N0	15 (35)	12 (43)	
N1/N2/N3	26 (60)	15 (54)	
Unknown	2 (5)	1 (3)	
TNM			0.2
I/II	7 (16)	2 (7)	
III/IV	34 (79)	25 (89)	
Unknown	2 (5)	1 (4)	

ตารางที่ 6.2 (ต่อ) แสดงลักษณะพื้นฐานเปรียบเทียบกลุ่มที่ให้ผลบวกและผลลบต่อการตรวจไวรัสเอชพีวี

Characteristics	HPV DNA negative	HPV DNA positive	p-value
	n (%)	n (%)	
Treatment modality			
No treatment	3 (7)	3 (11)	0.4
Surgery alone	7 (16)	-	
Surgery followed by RT	5 (12)	6 (21)	
Surgery followed by CRT	7 (16)	5 (18)	
Curative RT alone	3 (7)	1 (4)	
Palliative RT	3 (7)	3 (10)	
Definitive CRT	9 (20)	7 (25)	
Induction chemotherapy followed by CRT	2 (4)	1 (4)	
Unknown	4 (9)	2 (7)	

ส่วนที่ 3 การดำเนินโรค แบ่งตามสถานะไวรัสเอชพีวี

ไม่พบความแตกต่างของค่ามัธยฐานของการรอดชีวิตทั้งหมดโดยประมาณ เมื่อแบ่งตามสถานะไวรัสเอชพีวี โดยในกลุ่มที่ให้ผลบวกต่อไวรัสเอชพีวี มีค่ามัธยฐานของการรอดชีวิต 19.05 เดือน, อัตราการรอดชีวิตที่ 2 ปีร้อยละ 35 ในขณะที่กลุ่มที่ให้ผลลบต่อไวรัสเอชพีวี มีค่ามัธยฐานของการรอดชีวิต 21.52 เดือน, อัตราการรอดชีวิตที่ 2 ปีร้อยละ 41 (HR 1.22, 95%CI 0.64-2.35, p=0.53) ตามรูป 6.3



ภาพที่ 6.3 แสดงกราฟการรอดชีวิตเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ให้ผลบวกและผลลบต่อไวรัสเอชพีวี

ส่วนที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยเสี่ยงต่ออัตราการรอดชีวิต

เมื่อพิจารณาถึงปัจจัยเสี่ยงอื่นๆ ต่อการรอดชีวิตโดยการตรวจ Multivariate analysis พบว่า ระยะของก้อนในระยะที่ 3 หรือ 4 (OR 3.73) และการกระจายไปต่อมน้ำเหลือง (OR 4.0) มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตที่แย่กว่า ตามตาราง 6.3

ตารางที่ 6.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ กับอัตราการรอดชีวิตโดยรวม

Variables	n	OR	95% CI		P value
			Lower	Upper	
Gender					
Female	11	Reference			
Male	55	0.72	0.20	2.52	0.60
Smoking					
Never	14	Reference			
Ever	40	1.22	0.54	2.72	0.62
Alcohol drinking					
Never	18	Reference			
Ever	34	1.84	0.28	11.8	0.52
T parameter					
T1/T2	17	Reference			
T3/T4	37	3.73	1.40	9.93	0.008*
N parameter					
N0	23	Reference			
N1/N2/N3	31	4.00	1.79	8.91	0.001*
TNM					
I/II	7	Reference			
III/IV	47	1.29	0.12	13.13	0.825

*p<0.05

ทั้งนี้ ผลสอดคล้องไปในแนวทางเดียวกันในกลุ่มที่ให้ผลบวกต่อการตรวจไวรัสเอชพีวี (OR 10.72 เมื่อระยะของก้อนที่ 3 หรือ 4, OR 4.27 เมื่อมีการกระจายไปต่อมน้ำเหลือง) ในขณะที่กลุ่มที่ให้ผลลบต่อไวรัสเอชพีวี พบว่า การกระจายไปต่อมน้ำเหลือง (OR 5.1) เป็นปัจจัยเดียวที่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิต ดังตาราง 6.4

ตารางที่ 6.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ กับอัตราการรอดชีวิต แยกตามสถานะไวรัสเอชพีวี

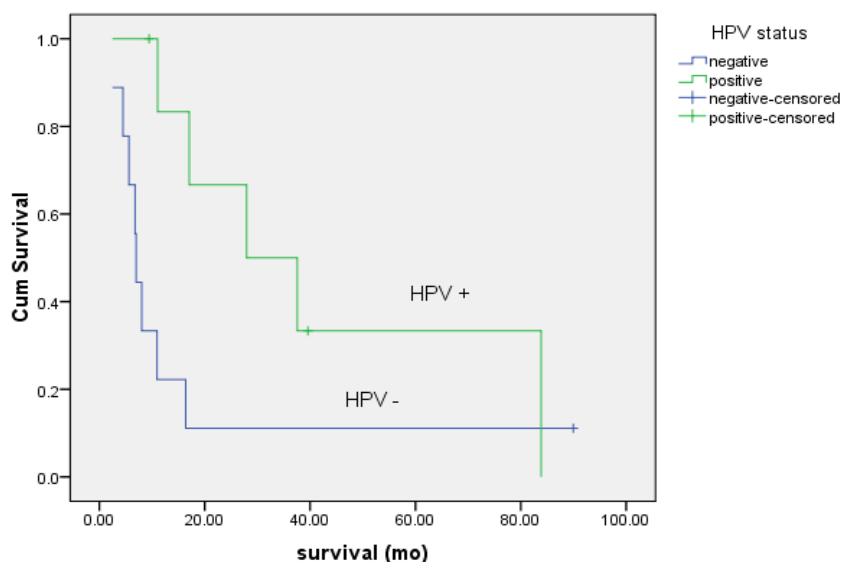
Variables	Survival in HPV-positive group					Survival in HPV-negative group				
	n	OR	95% CI		P value	n	OR	95% CI		P value
			Lower	Upper				Lower	Upper	
Tparameter										
T1/T2	5	Reference				12	Reference			
T3/T4	19	10.72	1.20	95.38	0.03*	18	2.15	0.57	8.05	0.25
Nparameter										
N0	11	Reference				12	Reference			
N1/N2/N3	13	4.27	1.28	14.28	0.02*	18	5.10	1.08	24.02	0.039*
TNM										
I/II	2	Reference				5	Reference			
III/IV	22	NA	-	-	-	25	0.68	0.04	10.60	0.70

*p<0.05

ส่วนที่ 5 การวิเคราะห์เฉพาะกลุ่มมะเร็งคอหอยส่วนช่องปาก

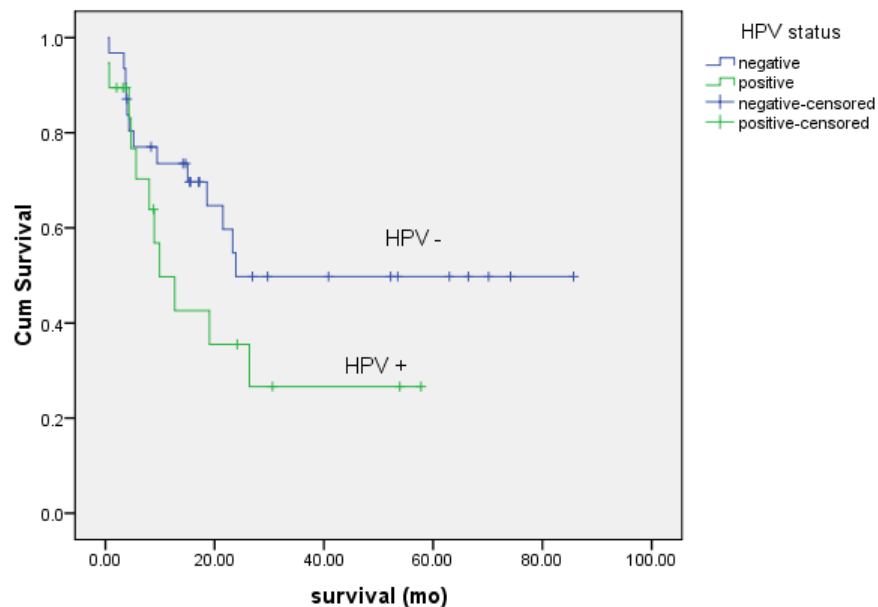
เมื่อทำการศึกษาเฉพาะกลุ่มมะเร็งคอหอยส่วนช่องปาก มีจำนวนผู้ป่วยจำนวน 17 รายคิดเป็นร้อยละ 24 ของมะเร็งศีรษะและลำคอทั้งหมด โดยพบว่ากว่าร้อยละ 94 ของผู้ป่วยเป็นเพศชาย และมากกว่าร้อยละ 80 มาในระยะโรคที่ 3 หรือ 4 (ระยะก่อนที่ 3 หรือ 4 ร้อยละ 52 และ มีการกระจายไปต่อมน้ำเหลืองร้อยละ 70)

พบความชุกของไวรัสเอชพีวีจำนวน 8 ราย คิดเป็นร้อยละ 47 ของมะเร็งคอหอยส่วนช่องปากทั้งหมดโดยเมื่อทำการวิเคราะห์มัชฌิมของการรอดชีวิตในกลุ่มที่ให้ผลบวกต่อไวรัสเอชพีวีประมาณ 27.9 เดือน ในขณะที่กลุ่มที่ให้ผลลบต่อไวรัสเอชพีวีประมาณ 6.9 เดือน ทั้งนี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.05$) ดังรูป 6.4 แต่มีแนวโน้มว่า กลุ่มที่ให้ผลบวกต่อไวรัสเอชพีวี จะมีค่ามัชฌิมของการรอดชีวิตที่ดีกว่า



ภาพที่ 6.4 แสดงกราฟการรอดชีวิตเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ให้ผลบวกและผลลบต่อไวรัสเอชพีวี ในผู้ป่วยมะเร็งคอหอยส่วนช่องปาก

เมื่อทำการเปรียบเทียบกับมะเร็งศีรษะและลำคอ ที่ไม่ใช่มะเร็งคอหอยส่วนช่องปาก พบว่าไม่มีความแตกต่างของลักษณะพื้นฐานทั้งสองกลุ่ม โดยพบความชุกของไวรัสเอชพีวีในมะเร็งศีรษะและลำคอ ที่ไม่ใช่มะเร็งคอหอยส่วนช่องปาก จำนวน 20 รายใน 54 ราย คิดเป็นร้อยละ 37 ทั้งนี้ ค่ามัชฌิมของการรอดชีวิตในกลุ่มที่ให้ผลบวกต่อไวรัสเอชพีวีประมาณ 9.9 เดือน ในขณะที่กลุ่มที่ให้ผลลบต่อไวรัสเอชพีวีประมาณ 23.88 เดือน และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ($p=0.16$) ดังรูป 6.5 และตารางเปรียบเทียบที่ 6.5 เช่นเดียวกับมะเร็งช่องปาก



ภาพที่ 6.5 แสดงกราฟการรอดชีวิตเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ให้ผลบวกและผลลบต่อไวรัสเอชพีวี ในผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอที่ไม่ใช่มะเร็งคอหอยส่วนช่องปาก

ตารางที่ 6.5 เปรียบเทียบค่ามัธยผลการรอดชีวิต ระหว่างกลุ่มต่างๆ

ตำแหน่งรอยโรค	ค่ามัธยผลการรอดชีวิต (เดือน)
ทุกตำแหน่ง (n=71) ผลบวกต่อไวรัสเอชพีวี ผลลบต่อไวรัสเอชพีวี	19.05 21.52
มะเร็งคอหอยส่วนช่องปาก (n=17) ผลบวกต่อไวรัสเอชพีวี ผลลบต่อไวรัสเอชพีวี	27.9 6.9
มะเร็งศีรษะและลำคอ ที่ไม่ใช่มะเร็งคอหอยส่วนช่องปาก (n=54) ผลบวกต่อไวรัสเอชพีวี ผลลบต่อไวรัสเอชพีวี	9.9 23.88

บทที่ 7

อภิปรายผลการวิจัย

แม้ว่าในปัจจุบัน จะพบสัดส่วนของผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอในกลุ่มอายุน้อย ที่ไม่มีประวัติสูบบุหรี่หรือดื่มสุรา เพิ่มมากขึ้น ซึ่งส่วนหนึ่งเชื่อว่าอาจเป็นผลจากการติดเชื้อไวรัสเอชพีวี อย่างไรก็ตาม การศึกษาความชุกของไวรัสเอชพีวีในกลุ่มเฉพาะนี้ ไม่ได้มีการศึกษาที่ชัดเจน รวมถึงความสำคัญของสถานะไวรัสเอชพีวีกับการพยากรณ์และการดำเนินโรค

การทราบความชุกของไวรัสเอชพีวีในประชากรกลุ่มนี้ อาจช่วยในการวางแผนการป้องกัน โดยเฉพาะการใช้วัคซีนป้องกันไวรัสเอชพีวี, การวางแผนการรักษาเฉพาะรายเพื่อลดผลข้างเคียงจากการรักษา เนื่องจากผู้ป่วยในกลุ่มนี้มีช่วงเวลาการดำเนินชีวิตที่นานกว่า

ลักษณะพื้นฐานของผู้ป่วย

แม้ว่า จากหลายการศึกษา จะรายงานลักษณะของผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอที่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวี ว่ามีอายุเฉลี่ยน้อยกว่า, ไม่สูบบุหรี่หรือดื่มสุรา, พบลักษณะทางพยาธิวิทยาแบบ basaloid, ตำแหน่งรอยโรคพบบริเวณคอหอยส่วนช่องปากและมีระยะของโรคในระยะที่ 3 หรือ 4 ได้บ่อยกว่าเมื่อเทียบกับประชากรกลุ่มที่ไม่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวี อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาของผู้วิจัย พบว่า ไม่พบความแตกต่างของลักษณะดังกล่าวในผู้ป่วยกลุ่มอายุน้อย เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ให้ผลบวกและผลลบต่อการตรวจไวรัสเอชพีวี ซึ่งข้อมูลดังกล่าวในปัจจุบัน ยังไม่มีการศึกษาจำนวนมากพอที่จะเปรียบเทียบลักษณะดังกล่าวได้ ปัจจัยหนึ่งที่น่าจะทำให้ลักษณะทางคลินิกทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกันมาก อาจเป็นเพราะปัจจัยเสี่ยงอื่นๆ เช่น การสูบบุหรี่หรือดื่มสุรา ซึ่งในการศึกษานี้ พบได้มากกว่าร้อยละ 50 ซึ่งจากการศึกษาของ Ang และคณะ (7) พบว่า การสูบบุหรี่อาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางชีวโมเลกุลของไวรัสเอชพีวี

เปรียบเทียบความชุกของไวรัสเอชพีวีในมะเร็งศีรษะและลำคอในผู้ป่วยอายุน้อย

เนื่องจาก ข้อมูลความชุกของไวรัสเอชพีวีในผู้ป่วยอายุน้อย ไม่ได้มีการศึกษาเฉพาะกลุ่มโดยตรง ส่วนใหญ่ของการศึกษาจะรวมเข้าไปกับผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอในกลุ่มอายุมาก ซึ่งมักจะรายงานเป็นความชุกของไวรัสเอชพีวีเฉลี่ยรวมทั้งสองกลุ่มประชากร (ประมาณร้อยละ 25) ทั้งนี้การศึกษาของ Badaracco (12) และ Sisk (13) ซึ่งทำการเปรียบเทียบความชุกไวรัสเอชพีวีในกลุ่มอายุน้อยเปรียบเทียบกับกลุ่มอายุมาก พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างทั้งสองกลุ่ม

อย่างไรก็ตาม การศึกษาของ van Monsjou และคณะ (11) ได้ทำการศึกษาผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอที่วินิจฉัยเมื่ออายุน้อยกว่า 40 ปี จำนวน 45 ราย พบความชุกของไวรัสเอชพีวีเฉลี่ยร้อยละ 31 เช่นเดียวกับการศึกษาของ El-Mofty และคณะ (10) ที่พบความชุกร้อยละ 36 ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของผู้วิจัย (พบความชุกร้อยละ 39) ดังตาราง 7.1

เมื่อทำการเปรียบเทียบความชุกของไวรัสเอชพีวีในแต่ละตำแหน่งของรอยโรค พบว่า กว่าร้อยละ 86 ในการศึกษาของ van Monsjou และร้อยละ 83 ในการศึกษาของ El-Mofty ที่ให้ผลบวกต่อการตรวจไวรัสเอชพีวี พบรอยโรคในส่วนมะเร็งคอหอยส่วนช่องปาก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของผู้วิจัย มะเร็งคอหอยส่วนช่องปากพบความชุกได้บ่อยกว่ามะเร็งในส่วนอื่นๆ (ร้อยละ 47) ซึ่งอาจเป็นได้จากการที่มะเร็งคอหอย ส่วนช่องปาก มีสภาพเป็นร่องหว้า (crypt) ทำให้ที่มีพื้นที่สัมผัสกับไวรัสได้มากกว่าส่วนอื่น รวมถึงข้อมูลบางงานวิจัยที่พบว่า อาจเป็นบริเวณที่มีความไวต่อการเกิดมะเร็งจากไวรัสสูงกว่าส่วนอื่น

ในทางตรงข้าม ในส่วนของมะเร็งช่องปาก การศึกษาของผู้วิจัย พบความชุกไวรัสเอชพีวีร้อยละ 32 ซึ่งแตกต่างจากข้อมูลความชุกไวรัสเอชพีวีเมื่อเทียบกับการศึกษาของ van Monsjou (ร้อยละ 5) และ El-Mofty (ร้อยละ 0) ทั้งนี้ ข้อมูลความชุกในมะเร็งช่องปาก ยังเป็นที่ถกเถียงกัน เนื่องจากความแตกต่างในแต่ละการศึกษา ตั้งแต่ร้อยละ 0-35 ความแตกต่างที่เกิดขึ้นอาจเป็นได้จำนวนประชากรที่ศึกษามีจำนวนน้อยและความแตกต่างทางเชื้อชาติ (40)

ตารางที่ 7.1 เปรียบเทียบความชุกของไวรัสเอชพีวีในมะเร็งศีรษะและลำคอในผู้ป่วยอายุน้อย

	Nagpal(41)	Chang(42)	Smith(43)	Sisk(13)	Kabeya(44)
จำนวนผู้ป่วย	110	103	193	32	32
เกณฑ์อายุน้อย (ปี)	<50	<40	<55	<50	<45
จำนวนผู้ป่วยอายุน้อย	66	29	58	14	11
ตำแหน่งรอยโรค	Oral SCCA	Oral SCCA	Oral SCCA	Oral SCCA	Oral tongue
ชนิดชิ้นเนื้อ	FF	PE	PE	FF	FF
PCR ไพร์เมอร์	MY09/11	MY09/11 & GP5+/6+	MY09/11, TS-primer	E1/L1	L1
จำนวนผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต่อไวรัสเอชพีวี (ร้อยละ)	24/66 (36)	13/29 (44)	21/58 (36)	7/14 (50)	0/11 (0)

FF: Fresh frozen tissue PE: Paraffin embedded tissue SCCA: Squamous cell carcinoma

ตารางที่ 7.1 (ต่อ) เปรียบเทียบความชุกของไวรัสเอชพีวีในมะเร็งศีรษะและลำคอในผู้ป่วยอายุน้อย

	van Monsjou(11)	Harris(9)	El-mofty(10)	Current study
จำนวนผู้ป่วย	45	25	33	71
เกณฑ์อายุน้อย (ปี)	<50	<40	<40	<45
จำนวนผู้ป่วยอายุน้อย	45	25	33	71
ตำแหน่งรอยโรค	HNSCC	Oral tongue	HNSCC	HNSCC
ชนิดชิ้นเนื้อ	PE	PE	PE	PE
PCR ไพร์เมอร์	NS	TS-primer	SPF10	Nested GP5+/6+
จำนวนผู้ป่วยที่ให้ผล บวกต่อไวรัสเอชพีวี (ร้อยละ)	14/45 (31)	2/25 (8)	12/33 (36)	28/71 (39)

FF: Fresh frozen tissue PE: Paraffin embedded tissue SCCA: Squamous cell carcinoma

เปรียบเทียบความชุกของไวรัสเอชพีวีในประเทศไทย

จากข้อมูลการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่มีการศึกษาความชุกของไวรัสเอชพีวีในมะเร็งศีรษะและลำคอ พบว่ายังมีความแตกต่างกันอย่างมาก ดังตาราง 7.2

ตารางที่ 7.2 แสดงเปรียบเทียบความชุกของไวรัสเอชพีวีในมะเร็งศีรษะและลำคอในประเทศไทย

	Khovidhunkit(14)	Petcharapirach(45)	Current study
จำนวนผู้ป่วย	65	33	71
ตำแหน่งรอยโรค	มะเร็งช่องปากและระยะก่อนเป็นมะเร็งช่องปาก	มะเร็งคอหอยส่วนช่องปาก	ทุกตำแหน่ง ยกเว้นโพรงจมูก
อายุเฉลี่ย (ปี)	64.8	n.a.	40
วิธีการตรวจ	MY09/11 PCR	p16 IHC	GP5+/6+ PCR
ร้อยละของผลบวกต่อไวรัสเอชพีวี	1.54	48.5	39

n.a.: not available

ส่วนหนึ่ง อาจเป็นเพราะความแตกต่างในวิธีการตรวจ รวมถึงตำแหน่งรอยโรค ปัจจัยเสี่ยงอื่นๆ และอายุของผู้ป่วย ทั้งนี้ เมื่อพิจารณาการศึกษาของ Khovidhunkit และคณะ (14) พบความชุกเพียงแค่ร้อยละ 1.5 ซึ่งประชากรที่นำมาศึกษา ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยสูงอายุ มีประวัติสูบบุหรี่และดื่มสุรา รวมถึงเป็นมะเร็งส่วนช่องปาก ซึ่งการศึกษาที่คล้ายกันที่ตรวจสถานะไวรัสเอชพีวี ในกลุ่มมะเร็งช่องปาก พบความชุกได้ค่อนข้างน้อย เมื่อเทียบกับมะเร็งคอหอยส่วนช่องปาก

Petcharapirach และคณะ (45) ได้ทำการศึกษาการตรวจสถานะไวรัสเอชพีวี โดยการใช้ p16 IHC พบความชุกถึงร้อยละ 48 ทั้งนี้ ในงานวิจัยดังกล่าว ใช้เกณฑ์การตัดสินมากกว่าร้อยละ 0 ถือเป็นเกณฑ์บวก การใช้เกณฑ์ดังกล่าว อาจเกิดผลบวกสูงได้ เนื่องจากการพบผลบวกต่อ p16 อาจไม่ได้สัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสเอชพีวี ทั้งนี้ เกณฑ์ที่เชื่อว่าสัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวี จะต้องมีการตัดสินของโปรตีน p16 ที่สม่ำเสมอทั้งนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม กว่าร้อยละ 70 ขึ้นไป (46)

สำหรับ ในงานศึกษาของผู้วิจัย พบความชุกของไวรัสเอชพีวี ใกล้เคียงกับการศึกษาใน งานวิจัยอื่นๆ โดยพบความชุกเฉลี่ยมากที่สุดในกลุ่มมะเร็งคอหอยส่วนช่องปาก

การพยากรณ์และดำเนินโรค

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตที่ 2 ปี กับการศึกษาอื่นๆ ดังตาราง 7.3 พบว่า ใน การศึกษาของผู้วิจัย มีอัตราการรอดชีวิตที่ 2 ปีน้อยกว่าการศึกษาอื่นๆ และไม่พบความแตกต่าง ของการดำเนินโรคของกลุ่มที่ให้ผลบวกหรือผลลบต่อการตรวจไวรัสเอชพีวี ทั้งนี้ อาจเป็นได้ว่า ความแตกต่างของการดำเนินโรคไม่ได้สัมพันธ์กับสถานะของไวรัสเอชพีวีเพียงอย่างเดียว ยังขึ้นกับ ปัจจัยอื่นๆ เช่น ตำแหน่งรอยโรค, ขนาดและเทคนิคของรังสีรักษา, ขนาดและชนิดของเคมีบำบัด, ความสม่ำเสมอของการตรวจติดตามการรักษา รวมถึงปัจจัยในด้านตัวผู้ป่วย เช่น โรคร่วม หรือการ สูบบุหรี่ เป็นต้น ซึ่งในงานศึกษาของผู้วิจัย มีข้อจำกัดเนื่องจากการศึกษาย้อนหลัง ทำให้ข้อมูล บางอย่างไม่สามารถเก็บได้อย่างครบถ้วน

นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาเฉพาะกลุ่มมะเร็งคอหอยส่วนปาก พบว่ากลุ่มที่ให้ผลบวกต่อไวรัส เอชพีวี มีแนวโน้มการดำเนินโรคที่ต่ำกว่า (ค่ามัธยผลการรอดชีวิต 27.9 เดือน) แตกต่างจากกลุ่มที่ ไม่ใช่มะเร็งคอหอยส่วนปาก ที่พบว่า กลุ่มที่ให้ผลบวกต่อไวรัสเอชพีวี กลับมีแนวโน้มการดำเนิน โรคที่แย่กว่า (ค่ามัธยผลการรอดชีวิต 9.9 เดือน) อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างดังกล่าว ไม่มีนัยสำคัญ ทางสถิติ และจำนวนผู้ป่วยในแต่ละกลุ่มมีจำนวนน้อย แนวโน้มดังกล่าว สอดคล้องไปกับการศึกษา อื่นๆ ดังตาราง 7.3 ที่พบว่าสถานะของไวรัสเอชพีวี อาจมีผลต่อพยากรณ์และการดำเนินโรคเฉพาะ กลุ่มมะเร็งคอหอยส่วนปาก

ตารางที่ 7.3 แสดงเปรียบเทียบพยากรณ์โรคของมะเร็งศีรษะและลำคอที่สัมพันธ์กับไวรัสเอชพีวี

	Fakhry(36)	Ang(7)	Rischin(37)	Current study
จำนวนผู้ป่วย	96	323	185	71
ค่ามัชฌิมอายุ (เดือน)	56	53.5	58	40
กลุ่มผลบวกต่อ ไวรัสเอชพีวี	60	57	54	41
กลุ่มผลลบต่อ ไวรัสเอชพีวี				
ตำแหน่งรอยโรค	มะเร็งคอหอย ส่วนช่องปาก และมะเร็งกล่อง เสียง ระยะที่ 3 หรือ 4	มะเร็งคอหอย ส่วนช่องปาก ระยะที่ 3 หรือ 4	มะเร็งคอหอย ส่วนช่องปาก ระยะที่ 3 หรือ 4	ทุกตำแหน่ง ทุกระยะของโรค
วิธีการตรวจ HPV	PCR	PCR	p16	PCR
ชนิดชิ้นเนื้อ	ชิ้นเนื้อพาราฟิน	ชิ้นเนื้อพาราฟิน	ชิ้นเนื้อพาราฟิน	ชิ้นเนื้อพาราฟิน
อัตราการรอด ชีวิตที่ 2 ปี (ร้อยละ)	95	87.5	91	35 (All sites)
กลุ่มผลบวกต่อ ไวรัสเอชพีวี	62	67.2	54	51 (Oropharynx)
กลุ่มผลลบต่อ ไวรัสเอชพีวี				41 (All sites)
Hazard Ratio (กลุ่มผลลบต่อ ไวรัสเอชพีวีเป็น กลุ่มอ้างอิง)	0.36	0.42	0.36	1.2
				11 (Oropharynx)

การวิเคราะห์พยากรณ์โรคและการดำเนินโรคในการศึกษาส่วนใหญ่ จะรวมกลุ่มผู้ป่วยอายุมากไปด้วยกัน ดังนั้น ด้วยข้อจำกัดของงานศึกษาระยะไวรัสเอชพีวีในผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอในกลุ่มผู้ป่วยอายุน้อย การศึกษาของผู้วิจัย ถือเป็นการศึกษาแรกที่แสดงให้เห็นถึงผลดังกล่าวต่อพยากรณ์โรค ทั้งนี้ อาจเป็นได้ว่า สถานะของไวรัสเอชพีวี ไม่ได้มีผลต่อพยากรณ์โรคในทุกกลุ่มอายุ

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ความชุกของไวรัสเอชพีวีโดยการตรวจวิธีเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคออายุน้อย ในประชากรไทย พบได้ใกล้เคียงกับรายงานอื่นๆ ในต่างประเทศ แต่ความสำคัญในการพยากรณ์การดำเนินโรค มีความแตกต่างจากการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยอายุมาก ทั้งนี้ ผลของไวรัสเอชพีวี อาจมีผลเฉพาะบางตำแหน่งของรอยโรค เช่น มะเร็งคอหอยส่วนช่องปาก

บทที่ 8

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้ เป็นการศึกษาเชิงบรรยาย ณ ช่วงเวลาหนึ่ง (Cross-sectional descriptive study) โดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความชุกของไวรัสเอชพีวีในผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ ที่ไม่ใช่ มะเร็งหลังโพรงจมูก ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่อายุไม่เกิน 45 ปี รวมถึงศึกษาความสัมพันธ์ของ การตรวจพบสถานะไวรัสเอชพีวีกับพยากรณ์และการดำเนินโรค

การตรวจสถานะไวรัสเอชพีวีในปัจจุบัน ยังไม่มีวิธีมาตรฐาน และการตรวจส่วนใหญ่ ทำ ในชิ้นเนื้อสดหรือชิ้นเนื้อแช่แข็ง ซึ่งไม่เหมาะสมในการตรวจทางคลินิก ผู้วิจัยได้ใช้การตรวจด้วย วิธีเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสแบบ Nested-PCR ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ในชิ้นเนื้อ พาราฟิน ที่มีข้อจำกัดในด้านดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อย โดยที่ยังสามารถคงประสิทธิภาพในการตรวจ ได้ ทั้งนี้ ในงานศึกษาของผู้วิจัย มีตัวควบคุมทั้งตัวควบคุมลบ และตัวควบคุมบวก (ชิ้นเนื้อมะเร็ง ปากมดลูกที่ให้ผลบวกกับไวรัสเอชพีวี) รวมทั้งมีการกำหนดสถานะและเทคนิคการทดลองที่ ควบคุมการปนเปื้อน จึงเชื่อได้ว่า ข้อมูลที่ได้มีคุณภาพ และสามารถนำไปใช้ในการวิจัย ต่อไปได้

ข้อมูลความชุกของไวรัสเอชพีวีที่ได้จากการตรวจ พบว่าได้ร้อยละ 39 ซึ่งใกล้เคียงกับ การศึกษาอื่นๆ ก่อนหน้า โดยไม่พบความแตกต่างของลักษณะพื้นฐานเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม ที่ให้ผลบวกหรือผลลบ ต่อไวรัสเอชพีวี

ในด้านการพยากรณ์โรค พบว่าข้อมูลส่วนใหญ่จากการศึกษาที่ผ่านมา ไวรัสเอชพีวีจะมีความสัมพันธ์กับพยากรณ์โรคที่ดี โดยเฉพาะมะเร็งคอหอยส่วนช่องปาก ในขณะที่มะเร็งศีรษะและ ลำคอส่วนอื่นๆ ยังมีข้อขัดแย้งกันพอสมควร ทั้งนี้ในการศึกษาของผู้วิจัย ได้ศึกษาเฉพาะกลุ่มผู้ป่วย อายุุน้อย ซึ่งส่วนใหญ่เป็นมะเร็งช่องปาก อีกทั้งผู้ป่วยโดยรวมมีอัตราการรอดชีวิตที่แย่ ทำให้ไม่เห็น ความแตกต่างของการบอกพยากรณ์โรค โดยใช้สถานะของไวรัสเอชพีวี แต่เมื่อพิจารณาเฉพาะกลุ่ม มะเร็งคอหอยส่วนปาก พบว่าสอดคล้องกันกับการศึกษาอื่นๆ

ทั้งนี้ ในการศึกษาของผู้วิจัย มีข้อจำกัดของการศึกษา คือ การตรวจด้วยเทคนิคปฏิกิริยา ลูกโซ่ พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ต่อ L1 ซึ่งจะครอบคลุมทั้งสายพันธุ์เสี่ยงสูงและเสี่ยงต่ำต่อการ เกิดมะเร็ง โดยไม่ได้ระบุสายพันธุ์ของไวรัสเอชพีวี การตรวจดังกล่าวอาจมีผลกระทบในการ วิเคราะห์พยากรณ์โรคและความสัมพันธ์ของการตรวจด้วยวิธีเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสได้

นอกจากนี้ การพบดีเอ็นเอของไวรัสเอชพีวีในชิ้นเนื้อ อาจไม่สามารถบอกได้ว่าการตรวจ พบนั้นเป็นสาเหตุของการเกิดโรคหรือไม่ ซึ่งข้อมูลการศึกษาก่อนหน้า จะเห็นได้ว่า การพบอาร์เอ็น เอของไวรัส มีความเชื่อถือได้มากกว่า

ข้อเสนอแนะ

1. การตรวจสายพันธุ์ของไวรัสเอชพีวี การตรวจดังกล่าวจะทำให้ทราบความชุกของไวรัส ชนิดสายพันธุ์ที่มีความเสี่ยงสูงที่สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็ง
2. เพิ่มจำนวนกลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษา โดยเฉพาะกลุ่มมะเร็งคอหอยส่วนปาก ซึ่งเป็นกลุ่มที่ ไวรัสเอชพีวีอาจใช้บอกพยากรณ์โรคได้
3. การศึกษาติดตามไปข้างหน้า ซึ่งจะทำได้เก็บข้อมูลทั้งลักษณะทางคลินิก ข้อมูล การดำเนินโรคที่ครบถ้วน
4. การตรวจชิ้นเนื้อเพิ่มเติม โดยเฉพาะการตรวจ mRNA ในเนื้อเยื่อพาราฟิน จะทำให้สามารถ บอกความสัมพันธ์ในกลุ่มประชากรนี้ ได้ดีขึ้น

รายการอ้างอิง

1. Khuhaprema T, Srivatanakul P, Attasara P, Sriplung H, Wiangnon S, Sumitsawan Y. Cancer in Thailand 2001-2003: Ministry of public health; 2009.
2. Fakhry C, Gillison ML. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. **J Clin Oncol**;24(17)(Jun 2006):2606-11.
3. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**;14(2)(Feb 2005):467-75.
4. Haddad RI, Shin DM. Recent advances in head and neck cancer. **N Engl J Med**;359(11)(Sep 2008):1143-54.
5. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. **Lancet Oncol**;11(8)(Aug 2010):781-9.
6. Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho CH, Lippman SM, Tsao AS. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). **Head Neck Oncol**;2 (2010):15.
7. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. **N Engl J Med**; 363(1)(Jul 2010):24-35.
8. Goon PK, Stanley MA, Ebmeyer J, Steinstrasser L, Upile T, Jerjes W, Bernal-Sprekelsen M, Gorner M, Sudhoff HH. HPV & head and neck cancer: a descriptive update. **Head Neck Oncol**;1 (2009):36.
9. Harris SL, Thorne LB, Seaman WT, Neil Hayes D, Couch ME, Kimple RJ. Association of p16(INK4a) overexpression with improved outcomes in young patients with squamous cell cancers of the oral tongue. **Head Neck**;(Dec 2010).
10. El-Mofty SK, Lu DW. Prevalence of human papillomavirus type 16 DNA in squamous cell carcinoma of the palatine tonsil, and not the oral cavity, in young patients: a distinct clinicopathologic and molecular disease entity. **Am J Surg Pathol**;27(11)(Nov 2003):1463-70.

11. van Monsjou HS, van Velthuysen ML, van den Brekel MW, Jordanova ES, Melief CJ, Balm AJ. Human papillomavirus status in young patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Int J Cancer**(May 2011).
12. Badaracco G, Venuti A, Morello R, Muller A, Marcante ML. Human papillomavirus in head and neck carcinomas: prevalence, physical status and relationship with clinical/pathological parameters. **Anticancer Res**;20(2B)(Mar-Apr 2000):1301-5.
13. Sisk EA, Bradford CR, Jacob A, Yian CH, Staton KM, Tang G, Harris MO, Carey TE, Lancaster WD, Gregoire L. Human papillomavirus infection in "young" versus "old" patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. **Head Neck**;22(7)(Oct 2000):649-57.
14. Khovidhunkit SO, Buajeeb W, Sanguansin S, Poomsawat S, Weerapradist W. Detection of human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma, leukoplakia and lichen planus in Thai patients. **Asian Pac J Cancer Prev**;9(4)(Oct-Dec 2008):771-5.
15. Toner M, O'Regan EM. Head and neck squamous cell carcinoma in the young: a spectrum or a distinct group? Part 1. **Head Neck Pathol**;3(3)(Sep 2009):246-8.
16. Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RCK. Tongue and tonsil carcinoma. **Cancer**; 103(9) (2005):1843-9.
17. Schantz SP, Yu GP. Head and neck cancer incidence trends in young Americans, 1973-1997, with a special analysis for tongue cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**;128(3)(Mar 2002):268-74.
18. Funk GF, Karnell LH, Robinson RA, Zhen WK, Trask DK, Hoffman HT. Presentation, treatment, and outcome of oral cavity cancer: a National Cancer Data Base report. **Head Neck**;24(2)(Feb 2002):165-80.
19. Langerman A. Head and Neck Carcinoma in the Young Patient 2009.
20. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England. **J Oral Pathol Med**;33(9)(Oct 2004):525-32.
21. Koch WM, Lango M, Sewell D, Zahurak M, Sidransky D. Head and neck cancer in nonsmokers: a distinct clinical and molecular entity. **Laryngoscope**;109(10)(Oct 1999):1544-51.

22. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, Viscidi R. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. **J Natl Cancer Inst**;100(6)(Mar 2008):407-20.
23. Llewellyn CD, Linklater K, Bell J, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients aged 45 years and under: a descriptive analysis of 116 cases diagnosed in the South East of England from 1990 to 1997. **Oral Oncol**;39(2)(Feb 2003):106-14.
24. Verschuur HP, Irish JC, O'Sullivan B, Goh C, Gullane PJ, Pintilie M. A matched control study of treatment outcome in young patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. **Laryngoscope**;109(2 Pt 1)(Feb 1999):249-58.
25. Goldstein DP, Irish JC. Head and neck squamous cell carcinoma in the young patient. **Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg**;13(4)(Aug 2005):207-11.
26. Snow AN, Laudadio J. Human papillomavirus detection in head and neck squamous cell carcinomas. **Adv Anat Pathol**;17(6)(Nov 2010):394-403.
27. Allen CT, Lewis JS, Jr., El-Mofty SK, Haughey BH, Nussenbaum B. Human papillomavirus and oropharynx cancer: biology, detection and clinical implications. **Laryngoscope**;120(9) (Sep 2010):1756-72.
28. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, Jiang B, Goodman MT, Sibug-Saber M, Cozen W, Liu L, Lynch CF, Wentzensen N, Jordan RC, Altekruze S, Anderson WF, Rosenberg PS, Gillison ML. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. **J Clin Oncol**;29(32)(Nov 2011) : 4294-301.
29. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. **N Engl J Med**; 356(19)(May 2007):1944-56.
30. Termine N, Panzarella V, Falaschini S, Russo A, Matranga D, Lo Muzio L, Campisi G. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). **Ann Oncol**;19(10)(Oct 2008):1681-90.
31. McKaig RG, Baric RS, Olshan AF. Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. **Head Neck**;20(3)(May 1998):250-65.

32. Jannapureddy S, Cohen C, Lau S, Beitler JJ, Siddiqui MT. Assessing for primary oropharyngeal or nasopharyngeal squamous cell carcinoma from fine needle aspiration of cervical lymph node metastases. **Diagn Cytopathol**;38(11)(Nov 2010):795-800.
33. Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, Haesevoets A, Snijders PJ, Pawlita M, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. **Int J Cancer**; 121(11)(Dec 2007):2465-72.
34. Suzanne MG, Sepehr T. Methods for HPV Detection: Polymerase Chain Reaction Assays. JM, editor 2006.
35. Singhi AD, Westra WH. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. **Cancer**;116(9)(May 2010):2166-73.
36. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. **J Natl Cancer Inst**;100(4)(Feb 2008):261-9.
37. Rischin D, Young RJ, Fisher R, Fox SB, Le QT, Peters LJ, Solomon B, Choi J, O'Sullivan B, Kenny LM, McArthur GA. Prognostic significance of p16INK4A and human papillomavirus in patients with oropharyngeal cancer treated on TROG 02.02 phase III trial. **J Clin Oncol**; 28(27)(Sep 2010):4142-8.
38. รัตนาพรชัย ต. อนุพันธุศาสตร์เบื้องต้น มหัศจรรย์ของดีเอ็นเอ. 1 ed: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2009.
39. Remmerbach TW, Brinckmann UG, Hemprich A, Chekol M, Kuhndel K, Liebert UG. PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. **J Clin Virol**;30(4)(Aug 2004):302-8.
40. Machado J, Reis PP, Zhang T, Simpson C, Xu W, Perez-Ordóñez B, Goldstein DP, Brown DH, Gilbert RW, Gullane PJ, Irish JC, Kamel-Reid S. Low prevalence of human papillomavirus in oral cavity carcinomas. **Head Neck Oncol**;2 (2010):6.

41. Nagpal JK, Patnaik S, Das BR. Prevalence of high-risk human papilloma virus types and its association with P53 codon 72 polymorphism in tobacco addicted oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients of Eastern India. ***Int J Cancer***;97(5)(Feb 2002):649-53.
42. Chang JY, Lin MC, Chiang CP. High-risk human papillomaviruses may have an important role in non-oral habits-associated oral squamous cell carcinomas in Taiwan. ***Am J Clin Pathol***;120(6)(Dec 2003):909-16.
43. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klussmann JP, Lee JH, Wang D, Haugen TH, Turek LP. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. ***Int J Cancer***;108(5)(Feb 2004):766-72.
44. Kabeya M, Furuta R, Kawabata K, Takahashi S, Ishikawa Y. Prevalence of human papillomavirus in mobile tongue cancer with particular reference to young patients. ***Cancer Sci***;103(2)(Feb 2012):161-8.
45. Petcharapirach C, Ativitavas T, Larbcharoensub N, Cheewaruangroj W, Udomsubpayakul U, Sirisinha T, Sirachainan E, Panvichian R, Ratanatharathorn V. Incidence of HPV-associated p16 positive in oropharyngeal cancer; Clinical presentations and treatment outcomes-Ramathibodi hospital experience: มะเร็งวิทยาสมาคมแห่งประเทศไทย; 2011.
46. Begum S, Gillison ML, Ansari-Lari MA, Shah K, Westra WH. Detection of human papillomavirus in cervical lymph nodes: a highly effective strategy for localizing site of tumor origin. ***Clin Cancer Res***;9(17)(Dec 2003):6469-75.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

แบบบันทึกการเก็บข้อมูล (Case record form)

**Prevalence of Human Papillomavirus in Non- Nasopharyngeal Head and Neck Squamous
Cell Carcinoma in Patients aged not over 45 years at King Chulalongkorn Memorial
Hospital**

Patient Code ___

Part A: Demographic characteristics at the first visit

Date of birth (dd/mm/yyyy) __/__/_____

Gender Male FemalePerformance status (ECOG) 0 1 2 3 4

Body weight _____. Height _____.

History of previous associated cancer Yes NoIf yes specify: lung esophagus bladder other site of HNSCC other_____Co-morbidities STDs HIV Heart burn/Gastric refluxes other..... NoneSmoking status Never Former/Current Not available

If Former/Current specify: Cigarette Other.....

..... Pack/day foryrs

quit.....d.....m.....yr

Alcohol drinking Yes No

Part B: Diagnosis of HNSCC

Date of first diagnosis HNSCC (1st pathology date) Date (dd/mm/yyyy) _ _ / _ _ / _ _ _ _

Histology of primary site Histology of metastasis site (LN, other)

Primary site:

Oral cavity Lips Buccal mucosa Anterior tongue Floor of the mouth

Hard palate Upper and lower gingiva

Oropharynx Tonsillar area Tongue base Soft palate

Posterior pharyngeal wall

Hypopharynx Pyriform sinuses Posterior surface of the larynx (postcricoid area)

Inferior, posterior, and lateral pharyngeal walls

Larynx Supraglottis Glottis Subglottis

Grade: well diff moderate diff poorly diff undiff not available

Perineural/lymphovascular invasion Yes No

T stage __ N stage __ M stage __

If M1: specify site of metastasis

Bone Lung Liver Brain Bone other.....

AJCC stage ____

Part C: HNSCC treatment

1) Surgery Yes No if no, skip to 2) Radiation

First surgery Date (dd/mm/yyyy) __/__/____

-Primary tumor resection

Final surgical Margin Positive Close Negative

Extracapsular invasion Yes No

-Neck dissection Yes No if yes, specify...

Radical Modified Selective

Bilateral Unilateral

2) Radiation Yes No if no, skip to 3) chemotherapy

Curative radiation Adjuvant radiation

Adjuvant chemoradiation Concurrent chemoradiation

Radiation technique 2D 3D IMRT

Total dose given ____ cGy/ Gy/ rads

3) Chemotherapy Yes No if no, skip to Part D

Adjuvant chemoradiation First date of treatment (dd/mm/yyyy) __/__/____

- Cisplatin Carboplatin Other specify.....
- Concurrent chemoradiation First date of treatment (dd/mm/yyyy) _/_/_/_____
- Cisplatin Carboplatin 5FU Paclitaxel Hydroxyurea
- Cetuximab Other specify.....
- Induction chemotherapy First date of treatment (dd/mm/yyyy) _/_/_/_____
- Doxorubicin/cisplatin/5FU
- Other specify.....
- Metastasis chemotherapy
- Line of systemic chemotherapy 1st 2nd 3rd 4th
- Cisplatin Carboplatin 5FU Doxorubicin Paclitaxel Methotrexate
- Ifosfamide Bleomycin Cetuximab Other, specify.....
- First date of treatment (dd/mm/yyyy) _/_/_/_____
- Date of maximum response (dd/mm/yyyy) _/_/_/_____
- Maximum response CR PR SD PD Not available
- Date of progression (dd/mm/yyyy) _/_/_/_____ / No progression
- Reason for stopping treatment PD Complete Intolerant; specify
- Other.....

Part D: Recurrence/Progressive disease Yes No if no, skip to Part E

Fist recurrence Second recurrence Third recurrence

Date of recurrence/progressive disease (dd/mm/yyyy) _ _ / _ _ / _ _ _ _

Locoregional recurrence Distant metastasis Second primary cancer

1) Surgery Yes No if no, skip to 2) Radiation

Second surgery Date (dd/mm/yyyy) _ _ / _ _ / _ _ _ _

2) Radiation Yes No if no, skip to 3) Chemotherapy

Curative radiation Adjuvant radiation

Adjuvant chemoradiation Concurrent chemoradiation

Radiation technique 2D 3D IMRT

Total dose given ___ cGy/ Gy/ rads

3) Chemotherapy Yes No if no, skip to Part D

Adjuvant chemoradiation First date of treatment (dd/mm/yyyy) _ _ / _ _ / _ _ _ _

Cisplatin Carboplatin Other specify.....

Concurrent chemoradiation First date of treatment (dd/mm/yyyy) _ _ / _ _ / _ _ _ _

Cisplatin Carboplatin 5FU Paclitaxel Hydroxyurea

Cetuximab Other specify.....

Induction chemotherapy First date of treatment (dd/mm/yyyy) _ _ / _ _ / _ _ _ _

Doxorubicin/cisplatin/5FU

Other specify.....

Metastasis chemotherapy

Line of systemic chemotherapy 1st 2nd 3rd 4th

Cisplatin Carboplatin 5FU Doxorubicin Paclitaxel

Methotrexate

Ifosfamide Bleomycin Cetuximab Other, specify.....

First date of treatment (dd/mm/yyyy) _/_/_/____

Date of maximum response (dd/mm/yyyy) _/_/_/____

Maximum response CR PR SD PD Not available

Date of progression (dd/mm/yyyy) _/_/_/____ / No progression

Reason for stopping treatment PD Complete Intolerant; specify

Other.....

Part E: Last visit

Date of assessed (dd/mm/yyyy) _ _ / _ _ / _ _ _ _ _

Status Death Cause of death 1) from HNSCC 2) Others..... Alive with disease Alive without disease Lost to follow up Other, specify

Date of completion of this CRF (dd/mm/yyyy) _ _ / _ _ / _ _ _ _ _

Part F: Laboratory testing for HPV status

Baseline hemoglobin _ . _ g/dl

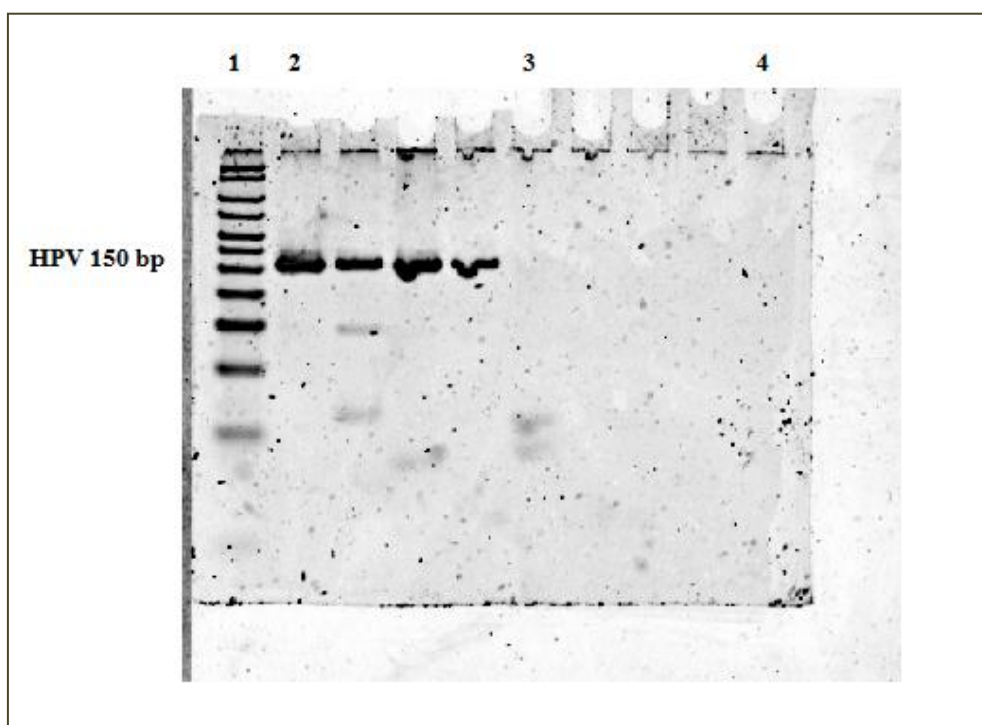
Baseline albumin _ . _ g/dl

Primary HNSCC site HPV status Positive Negative

ภาคผนวก ข

รูปแสดงผลการตรวจเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูโซฟอติเมอเรส โดยการใช้ 8% Acrylamide gel

การอ่านผล จะดูจากแถบดีเอ็นเอ ซึ่งจะเคลื่อนที่ไปในเจลตามคุณสมบัติของประจุและน้ำหนักโมเลกุล โดยเปรียบเทียบกับตัวควบคุมบวกและตัวควบคุมลบ



แถวที่ 1 คือ ตัวควบคุมบวก (เซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีการติดเชื้อไวรัสเอชพีวี)

แถวที่ 2 คือ ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อไวรัสเอชพีวี

แถวที่ 3 คือ ตัวอย่างที่ให้ผลลบต่อไวรัสเอชพีวี

แถวที่ 4 คือ ตัวควบคุมลบ (น้ำเปล่า)

การแปลผล คือ กลุ่มที่ให้แถบดีเอ็นเอ ถือว่าเป็นผลบวก ในขณะที่ กลุ่มที่ไม่ให้แถบดีเอ็นเอ ถือว่าเป็นผลลบ

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นายธีรภัทร อึ้งตระกูล

วันเดือนปีเกิด 18 มีนาคม พ.ศ. 2523 จังหวัดร้อยเอ็ด

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

นิติคณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2539-2545
แพทย์เพิ่มพูนทักษะ โรงพยาบาลศูนย์การแพทย์สมเด็จพระเทพฯ	2545-2548
แพทย์ประจำบ้านอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์	2548-2550
อายุรแพทย์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์	2550-ปัจจุบัน

ปริญญาและประกาศนียบัตร

แพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 1) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วุฒิปัตรแพทย์ผู้เชี่ยวชาญสาขาอายุรศาสตร์

ECFMG Certification # 0-661-125-5

สมาชิกสมาคมวิชาชีพ

สมาชิกราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย

สมาชิกแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย

สมาชิกแพทยสภา