

口腔微生物相與口腔鱗狀細胞癌術後併發症及長期預後的因果推論

Causal Inference of Oral Microbiota on Postoperative Complications and Long-term Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma

中文摘要 (500 個中文字且 1,000 個字元內，包含空白、數字及符號)

口腔鱗狀細胞癌 (OSCC) 是全球第六大常見癌症，也是台灣第四高發癌症類型，具有高復發率與高致死率。復發是影響預後的關鍵因素，而術後短期併發症如吸入性肺炎、血管阻塞、傷口感染及譫妄，對患者的康復進程與生活品質影響顯著，同時顯著增加醫療成本與死亡風險。近年來，口腔微生物相被認為在 OSCC 的發生與發展中扮演重要角色，但針對其與術後併發症及長期預後的關聯性研究相對稀少。現有文獻多為橫斷式設計，無法明確推斷因果關係，且在控制干擾因子與處理競爭風險（如死亡）導致的資料偏誤方面存在不足。本研究將利用林口長庚醫院 203 名 OSCC 患者的長期臨床數據及口腔微生物相資料庫，結合生物多樣性分析、功能路徑分析與因果推論模型，系統探討口腔微生物相在短期併發症（如吸入性肺炎、血管阻塞、傷口感染及譫妄）及長期預後（如復發率與五年存活率）中的作用。本研究旨在：(1) 分析口腔微生物相與術後併發症的因果關係；(2) 探討口腔微生物相與長期預後的因果關係。透過整合本土大規模數據與先進因果推論方法，本研究將填補 OSCC 術後併發症及預後研究的空白，促進對其預後機制的深入理解，為術後管理與個人化醫療策略的改進提供科學依據，並推動微生物相在癌症治療中的應用。

英文摘要 (500 個英文字且 4,000 個字元內，包含空白、數字及符號)

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the sixth most common cancer globally and ranks as the fourth most prevalent cancer among men in Taiwan. It is characterized by high recurrence rates and significant mortality, with a five-year overall survival rate of only 41.7%. Recurrence is a critical factor influencing prognosis, while perioperative complications, such as aspiration pneumonia, vessel compromise, wound infection, and delirium, significantly impact patients' recovery and quality of life. These complications also contribute to increased healthcare costs and higher mortality risks. Recent studies have highlighted the importance of the oral microbiome in the development and progression of OSCC, yet its association with perioperative complications and long-term outcomes

remains underexplored. Existing research is often limited by cross-sectional designs, which fail to establish causal relationships, insufficient adjustment for confounding factors, and the inability to address bias arising from competing risks such as death. This study utilizes a comprehensive dataset from 203 OSCC patients at Chang Gung Memorial Hospital, combining long-term clinical data with oral microbiome profiles. By integrating biodiversity analysis, functional pathway analysis, and causal inference models, we aim to systematically investigate the role of the oral microbiome in both short-term complications, such as aspiration pneumonia, vessel compromise, wound infection, and delirium, and long-term outcomes, including recurrence rates and five-year survival. The objectives of this study are to analyze the causal relationship between the oral microbiome and postoperative complications and to explore the microbiome's influence on long-term prognostic outcomes. This research leverages a robust local dataset and advanced causal inference methodologies to fill critical gaps in understanding OSCC prognosis. The findings are expected to enhance knowledge of OSCC prognostic mechanisms, provide essential insights for improving postoperative management and personalized medical strategies, and promote the application of microbiome-based approaches in cancer care.

關鍵詞中文 (200 個中文字內，包含空白、數字及符號)

口腔鱗狀細胞癌、口腔微生物相、術後併發症、吸入性肺炎、傷口感染、譫妄、血管阻塞、復發率、五年存活率、因果推論

關鍵詞英文 (50 個英文字且 400 個字元內，包含空白、數字及符號)

Oral squamous cell carcinoma, oral microbiome, perioperative complications, aspiration pneumonia, wound infection, delirium, vessel compromise, recurrence, five-year survival, causal inference

計畫概述

請概述執行本計畫之目的及可能產生對社會、經濟、學術發展等面向的預期影響性

本研究將利用林口長庚醫院 203 名 OSCC 患者的長期臨床數據及口腔微生物相資料庫分析口腔微生物相與術後併發症與長期預後的因果關係。研究結果預期對學術、臨床及社會層面產生多重影響：(1)本研究將填補口腔癌症學領域的研究空白，進一步擴展微生物組學在癌症治療中的應用範疇；(2)研究成果將提供預防術後併發症與改善癌症長期存活率的具體建議，為臨床診療指引提供實證基礎；(3)透過強調因果推論及路徑分析，本計畫將促進統計學與臨床研究的跨領域融合，為方法學創新提供範例；(4)在社會層面，本研究可望改善台灣口腔癌患者的預後，減少併發症帶來的經濟負擔，提升整體生活品質，並進一步促進癌症治療的個人化進程。

(一)研究計畫之背景

口腔鱗狀細胞癌術後併發症與長期預後

口腔鱗狀細胞癌（Oral Squamous Cell Carcinoma, OSCC）是全球第六大常見癌症[1]，也是最常見的口腔癌症類型，占口腔癌所有病例的約 90% [2]。在台灣，口腔鱗狀細胞癌是男性中排名第四好發的癌症類型[3]。根據國際癌症研究機構（International Agency for Research on Cancer, IARC）資料，全球每年新增口腔鱗狀細胞癌病例超過 30 萬例[4]，台灣每年新增的口腔癌約 4000 餘例左右。口腔癌的高復發率與高致死率對全球公共衛生構成重大挑戰；隨著癌症分期的提升，患者的存活率顯著降低，從第 I 期的 72.7% 降至第 IV 期的 11.8% [3]。即便經過外科手術、放射線治療和化學治療等多重治療策略，口腔鱗狀細胞癌患者的五年總生存率仍僅約 41.7% [5]。在所有影響五年存活率的危險因子中，局部復發被視為最關鍵的因素；口腔鱗狀細胞癌患者原發性腫瘤在接受根治性手術後，復發率介於 7% 至 47.4% 之間 [6-12]。這些復發多數發生在治療後的前兩年，高達 76% 的復發病例集中於此期間，其中 24% 的復發發生在治療後的前 12 個月 [13]。特別是早期復發（定義為 18 個月內）與較差的生存預後密切相關 [14]，進一步表明當前治療和預防策略尚有非常大的改進空間。

除了預防口腔鱗狀細胞癌患者在復發以及延長其長期存活率的挑戰以外，術後併發症（perioperative complications）也是口腔鱗狀細胞癌術後照護面臨的重要問題，對患者康復進程和生活品質產生直接影響。四種最常見術後併發症包括：(1)吸入性肺炎（Aspiration Pneumonia）：這是一種由手術或住院期間相關的呼吸道感染引發的常見併發症，對患者的生命安全構成了嚴重威脅；過去研究指出，吸入性肺炎的發生率可高達 30.6% [15]，會顯著增加加護病房（Intensive care unit, ICU）停留時間和再入院率 [16]，也有研究顯示頭頸部重建術後出現肺部併發症的患者，其術後死亡率高達 12.8% [17]；(2)血管阻塞（Vessel Compromise）：會導致皮瓣供血不足，可能需要再次手術；(3)傷口感染（Wound Infection）：會顯著延遲傷口癒合，增加患者的 ICU 住院天數和再入院率；嚴重感染甚至可能導致顯微皮瓣重建失敗或局部復發的風險，不僅對患者身體造成額外負擔，也大幅提升醫療成本；(4)譫妄（Delirium）：是一種突發的認知功能與意識狀態的改變，在住院患者中常見的問題，顯著延長住院時間並與不良預後相關。譫妄每年為醫療系統帶來高達 329 億美元的負擔 [18]，且被認為有內科共病相關的問題，會有較高的死亡率 [19]。這四種併發症在臨床上有時互相影響，例如血管阻塞造成再次手術，或是局部血液循環不良，因而增加傷口癒合的機會。而傷口感染或吸入性肺炎增加了加護病房的住院時間，因而造成譫妄增加。這四個常見的術後併發症往往導致更長的住院時間、更高的醫療成本以及更高的死亡率，對患者健康和醫療系統造成負面影響 [20]。儘管這些併發症的影響極大，與之相關的風險因子及潛在機制，仍未有研究深入探討，這強調了系統性分析口腔微生物相在這些併發症中的作用的的重要性，如下節所述。

口腔微生物相在口腔鱗狀細胞癌預後指標中的潛在角色

口腔微生物相（oral microbiome）是指居住在口腔中的多樣化細菌群落，是人體微生態系統的重要組成部分 [21, 22]。與傳統的醫用微生物學「只研究單一菌屬或菌種與疾病的相關」不同，拜近年來生物資訊的進展，如今的技術已經能夠測量樣本全體微生物各種菌屬（甚至菌種）

組成比例，因此「微生物相」研究(或稱微生物體學研究)就是指這種研究全體微生物的組成分布、功能路徑、甚至生物多樣性如何影響疾病與健康的研究。其中常被研究的人體微生物相包含腸道微生物相(gut microbiome)、口腔微生物相、以及皮膚微生物相；而與口腔鱗狀細胞癌相關的微生物相區域，自然以口腔微生物相為危險因子研究之首選。越來越多的證據顯示，口腔微生物相在口腔鱗狀細胞癌的發展中扮演著重要角色[23-25]：Ahn 等學者(2012)的研究顯示，口腔微生物相在生物多樣性的失衡可能通過慢性炎症促進癌症的發展，且發現特定病原菌 *Porphyromonas gingivalis* 與癌症風險有顯著相關[26]；Pushalkar 等學者發現，口腔鱗狀細胞癌患者的微生物多樣性顯著降低[27]，並指出微生物群落的改變可能是癌症進展的重要標誌。台灣本土的研究中，Yang 等學者使用林口長庚醫院口腔鱗狀細胞癌患者的資料(為本研究即將使用之資料庫)不但有觀察到同樣的現象，更進一步將患者分成不同癌症分期，不但發現其微生物相多樣性在末期患者較低，且微生物組成存在顯著差異，其中 *Prevotella* 和 *Capnocytophaga* 等細菌與晚期癌症分期相關[28]。

雖然已經有上述許多證據顯示口腔微生物相是造成口腔鱗狀細胞癌發生的可能成因之一，對於口腔微生物相與長期預後的關係目前只有一篇本土研究[29]：在分析 54 名口腔鱗狀細胞癌患者的口腔菌相與復發狀態後，發現復發患者的口腔微生物相與非復發患者顯著不同。研究顯示，*Granulicatella*、*Porphyromonas* 和 *Campylobacter* 等菌群在復發患者中更為豐富，並與氨基酸、碳水化合物和脂質代謝相關的功能路徑改變密切相關，強調了口腔微生物相在口腔鱗狀細胞癌復發及預後中的潛在作用；但在生物多樣性方面，只有其中一種指標有統計顯著意義，這可能是因為樣本數不足所致；同時在復發的定義上並沒有包含時間，這在高死亡率的族群(例如本研究的主要對象——口腔鱗狀細胞癌患者)會有因為死亡競爭風險導致的選擇性偏差，這個偏差是有方向性的，主要會低估危險因子對復發的效應[30, 31]。雖然口腔鱗狀細胞癌的一些術後併發症——吸入性肺炎以及局部感染——會受到口腔微生物的影響是一件很直觀的事情，但關於口腔鱗狀細胞癌患者的口腔微生物與四種術後併發症的關聯性目前完全沒有任何研究。

除了上一篇的口腔癌的預後指標(在往後的全文，「術後併發症」或「長期預後」這兩者合稱「預後指標」)有進行口腔微生物相研究以外，過去的研究都使用傳統微生物學的方法——單純比較單一微生物與這些預後的關聯性，而不是研究整體的微生物相[32-36]；這些文獻指出，舌苔微生物與吸入性肺炎相關性強，例如 *Prevotella* 和 *Veillonella* 等菌群在長期住院患者中與肺炎的發生率升高相關[32]。然而，目前尚無針對口腔鱗狀細胞癌患者口腔微生物相與術後吸入性肺炎的系統研究。同樣地，關於口腔微生物相與術後譫妄的關聯文獻更為稀少，僅有間接研究顯示術前口腔健康與術後譫妄風險相關，而對微生物相的直接影響缺乏證據。

目前臨床治療上，術後病人因為口腔傷口，會使用殺菌漱口水進行沖洗，但術前口腔準備並未有標準化的措施。如果由研究口腔微生物相與預後指標之關係，我們甚至能制定手術前的口腔準備標準，以期能改善口腔癌患者之整體預後。

現有研究的不足與挑戰

承上所述，先前研究證據雖然暗示了口腔微生物是口腔鱗狀細胞癌的術後併發症與長期預後的形成的重要潛在危險因子，但仍有以下三個重要的空白需要填補：

1. **缺乏關於口腔微生物相對於口腔鱗狀細胞癌完整預後指標的影響的資料庫與研究：**如上段所言，過去的研究著重在口腔微生物相對於口腔鱗狀細胞癌發生的研究，然而口腔鱗狀細胞癌諸多術後併發症與長期預後極少研究。
2. **缺乏因果推論：**當今針對口腔微生物相與口腔癌發生的研究多為橫斷式研究（cross-sectional study, 即口腔微生物相與口腔鱗狀細胞癌診斷為同一時間）：在時序性方面無法明確推斷因果關係；即便在特定的假設能夠令時序性成立（例如假設口腔微生物相與發病前之微生物相相同），該研究未對患者的年齡、性別及癌症分期等干擾因子進行充分調整，使其因果關係仍不明確。因此這樣只有統計相關、沒有因果相關的結果無法對於這些預後指標的病理形成機轉，以及臨床治療與預防有指引的效果。
3. **未校正復發事件被死亡事件競爭的偏差：**在過去的復發研究中，並沒有考慮到復發的時間，因此有些在還沒有復發就過世的患者並沒有辦法被觀察到；如此一來，在統計方法學稱作「選擇性偏差」或是「復發事件被死亡事件競爭（competing）」，這樣會造成的危險因子(在這篇研究指的是微生物相的不同)效應的低估；這樣低估的偏誤在過去研究中並未被校正處理。

儘管已有研究初步揭示口腔微生物相可能與術後併發症、復發與存活相關，但樣本量小、未控制干擾因子及缺乏因果推論分析的局限性，限制了這些研究的解釋力與應用價值。為全面理解口腔微生物相在口腔鱗狀細胞癌術後併發症及復發中的作用，並進一步探討其與臨床結局的因果關係，有必要進行基於大樣本的系統研究，結合功能性代謝分析和因果推論方法與建模，以填補現有文獻的空白，並為未來臨床治療與預防提供理論基礎。

研究目標

我們預計提出以下三個大研究目標(因果圖如下節圖 1 所示)：

目標 1: 探討口腔微生物相與術後併發症之間的因果關係

- 目標 1.1：(口腔鱗狀細胞癌)診斷時不同的口腔微生物相是否增加術後吸入性肺炎的風險。
- 目標 1.2：診斷時不同的口腔微生物相是否增加術後血管阻塞的風險。
- 目標 1.3：診斷時不同的口腔微生物相是否增加術後傷口感染的風險。
- 目標 1.4：診斷時不同的口腔微生物相是否增加術後譫妄的風險

目標 2. 探討口腔微生物相與口腔鱗狀細胞癌長期預後之間的因果關係

- 目標 2.1：診斷時不同的口腔微生物相是否增加復發率。
- 目標 2.2：診斷時不同的口腔微生物相是否降低五年存活率。

目標 3. 路徑分析：探討口腔微生物相與預後指標之間的直接因果關係

(將在「(二)研究方法、進行步驟及執行進度-執行細節-(3.2)路徑分析」詳述之)

- 目標 3.1：研究目標 1.4.之因果關係是否獨立於 ICU 住院時間與前三者術後併發症。
- 目標 3.2：研究目標 2.2.之因果關係是否獨立於術後併發症以及復發事件。

根據上述的研究目標以及過去文獻支持，我們預計這些目標將會驗證(或否證)以下的研究假說：

目標 1: 探討口腔微生物相與術後併發症之間的因果關係

假說 1.1：診斷時口腔微生物相多樣性較低、特定菌群(這點屬於探索性研究，以下相似的假說亦如是)的豐度較高(或較低)、以及特定功能路徑的菌群(這點屬於探索性研究，以下相似的假說亦如是)較高(或較低)會增加術後吸入性肺炎的風險。

假說 1.2：診斷時口腔微生物相多樣性較低、特定菌群的豐度較高(或較低)、以及特定功能路徑的菌群較高(或較低)會顯著增加術後血管阻塞的風險。

假說 1.3：診斷時口腔微生物相多樣性較低、特定菌群的豐度較高(或較低)、以及特定功能路徑的菌群較高(或較低)會導致術後傷口感染風險升高。

假說 1.4：診斷時口腔微生物相多樣性較低、特定菌群的豐度較高(或較低)、以及特定功能路徑的菌群較高(或較低)會導致譫妄的發生風險。

目標 2: 探討口腔微生物相與口腔鱗狀細胞癌長期預後之間的因果關係

假說 2.1：診斷時口腔微生物相多樣性較低、特定菌群的豐度較高(或較低)、以及特定功能路徑的菌群較高(或較低)會導致復發風險。

假說 2.2：診斷時口腔微生物相多樣性較低、特定菌群的豐度較高(或較低)、以及特定功能路徑的菌群較高(或較低)會導致五年存活率降低。

目標 3: 路徑分析：探討口腔微生物相與預後指標之間的直接因果關係

假說 3.1：口腔微生物相對譫妄的影響(目標 1.4 要驗證之假說)在校正 ICU 住院時間及其他術後併發症後，仍具有顯著的直接因果關係(可能解釋機制為口-腦軸線，不過本研究的數據無法得知，需要其他的證據佐證)。

假說 3.2：口腔微生物相對五年存活率的影響在控制術後併發症與復發事件的影響後，仍具有顯著的直接因果關係(可能解釋機制為透過院外社區型肺炎感染，常見的原因為非院內之吸入性肺炎，不過本研究的數據無法得知，需要其他的證據(例如死因資料)佐證)。

研究創新性

本研究相較於過去相關文獻有以下三點創新：

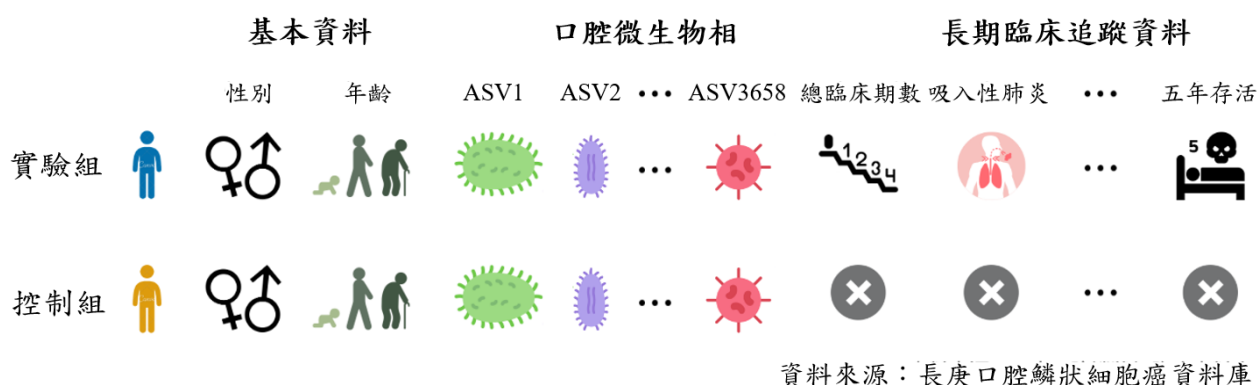
1. **研究設計方面—本土研究樣本數據的豐富性：**本研究預計以林口長庚醫院耳鼻喉科之口腔鱗狀細胞癌患者之口腔微生物相資料庫為基本，整合長期臨床數據，涵蓋術後併發症與長期預後的全方位記錄。如此不但是台灣本土最大的口腔鱗狀細胞癌患者之口腔微生物相數據，擴大的研究樣本量能彌補以往樣本數不足導致的統計效能低問題。
2. **資料分析方面—應用質性因果推論與因果模型：**由於本研究使用長期追蹤方法，得以滿足因果推論的時序性；同時，因為全面地蒐集各種術後併發症以及長期預後，我們更能夠完整地描繪出這些併發症與預後之間可能的因果關係。也因此，除了質性因果推論以外，我們也預計使用因果模型進行分析，包括(1)在分析微生物相與臨床預後之關係時控制干擾因子，盡可能地獲得其因果關係而非僅為統計上的相關；並且(2)在（目標3）也使用路徑分析方法，排除掉在臨床較無意義的路徑，得以知道我們有興趣的因果路徑；(3)在（目標2.1）我們將克服資料因死亡競爭（competing）造成的偏誤，精確解析微生物相與復發之因果關係。本項創新之處能夠讓研究結果不僅有預測的功能，更能對於臨床的治療與預防有指標意義。
3. **跨領域研究：**本研究結合了臨床醫師、因果推論與統計學家、以及微生物相學家三大領域之跨域合作，主持人與共同主持人之背景與本計畫之關聯性將於「(二)研究方法、進行步驟及執行進度-主持人及研究團隊簡述與計畫可行性陳述」詳細介紹。

（二）研究方法、進行步驟及執行進度

總體規劃

在本計畫中我們打算使用長庚口腔鱗狀細胞癌資料庫全面性的研究口腔微生物相和這些預後的因果關係；在目標1中，我們計劃探索上述四項術後併發症；在目標2中，我們計劃探索口腔微生物相與復發以及存活的影响；在目標3中，我們使用路徑分析來探討目標1.4以及目標2.2的因果效應是否獨立於已知的中介因子。詳細目標如前段所述，其因果圖如圖1所示。

(a)



(b)

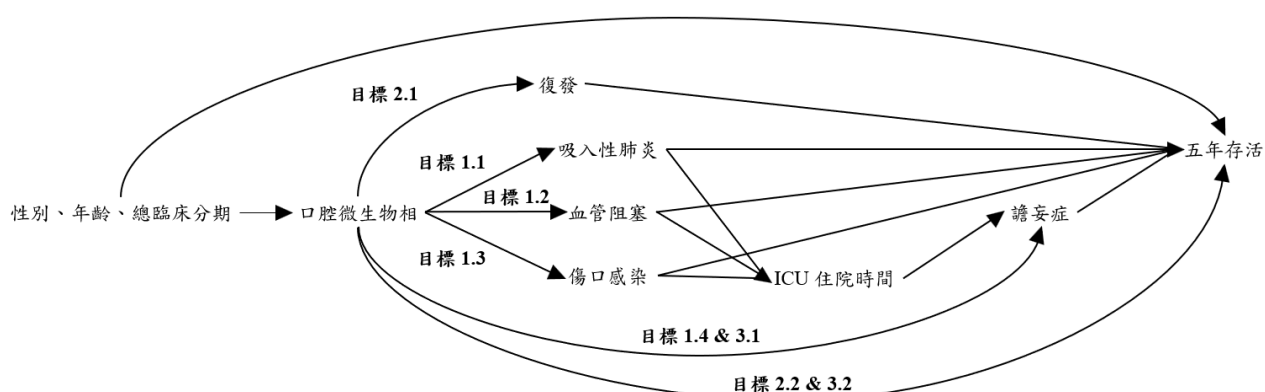


圖 1. 口腔微生物相與長期臨床追蹤資料之研究計畫：(a)資料庫示意圖；(b)因果關係圖以及相對應的研究目標。

執行細節

以下我們主要分成幾個階段論述介紹：首先，我們介紹本研究(1)資料收集過程，以及 (2)口腔微生物數據的蒐集與資料前處理的方法，這點是原資料收集者業已處理完成，僅在此簡單回顧；接著介紹在研究設計以及統計建模前需要的(3)「因果推論」與「路徑分析」的概念：如同研究創新性一章所言，我們不僅想要知道口腔微生物相對於這些預後的影響，更希望能夠推論他們之間的因果關係，因此才能夠對於臨床的治療與預防有指標意義。而這些概念將會指引分析建模的選擇上；最後我們將介紹(4)數據分析的部分，其中又包含了生物多樣性分析、相對豐度分析、以及功能分析這三部分。雖然這些分析都是微生物相正式的分析，但本研究預期推論其因果性以及有興趣的因果路徑，因此也特別著重介紹如何校正干擾因子以及中介因子。

(1) 長庚口腔鱗狀細胞癌患者的口腔微生物相長期臨床追蹤資料介紹

本計畫的分析皆基於 Yang 等人在 2014 至 2015 年開始建立的口腔鱗狀細胞癌患者口腔微生物相資料庫[28]。這是一個包含完整術後併發症與長期預後的臨床資料庫，除了由唾液樣本得到的口腔微生物相資料(將於下節介紹)以外，還涵蓋以下臨床變項：

1. **在 ICU 時術後併發症 (ICU 相關) 狀態：**包括吸入性肺炎 (有吸入性肺炎則標註為 1、無則標註為 0、以下省略此一介紹)、傷口感染、血管阻塞、ICU 停留時間、謔妄。
2. **長期預後狀態：**包括復發狀態、復發時間、死亡狀態、死亡時間。
3. **診斷時及術後的臨床數據：**包括年齡、性別、腫瘤個數、腫瘤部位、腫瘤臨床分期、淋巴臨床分期、總臨床分期、病理分期、體能狀態、抽菸、嚼檳榔、喝酒、是否有做顯微手術、高血壓、糖尿病、冠狀動脈心臟病、總住院時長、使用安眠藥

(2) 口腔微生物相數據的蒐集簡述

本研究所使用的口腔微生物相資料來自先前已收集完成的資料集，關於更詳細的數據收集與測序過程，可參考 Yang et al. 的研究[28]。以下簡要說明基本的數據收集方法：在這項研究中，共納入 248 名口腔癌患者，取自於 IRB 案號:201305685A3 之 2014 年 2 月至 2015 年 5 月這期間診斷口腔癌患者之唾液檢體。口腔唾液檢體之 DNA 的提取使用 QIAamp DNA Microbiome Kit 完成，並通過高靈敏度的 Qubit 雙鏈 DNA 分析法檢測 DNA 濃度與純度。DNA 擴增目標區域為 16S rRNA V3-V4 區段，通過 PCR 建構每個樣本的擴增子文庫，並在基因特異性序列上附加 Illumina 適配器的延伸核苷酸序列。初步擴增的產物經純化、加索引標籤後再次純化，並使用 HT DNA 高靈敏 LabChip 試劑盒驗證 PCR 產物的質量。最終，高通量測序由 MiSeq 系統完成，確保數據的完整性與高精度。接著我們使用 QIIME2 v2023.2 這個平台進行序列資料的後續處理。首先，利用 Cutadapt v4.2 移除接頭序列和引子，接著使用 Vsearch v2.22.1 合併雙端讀取序列，設置最低重疊長度為 5 個鹼基，並過濾 Phred 品質分數低於 20 的序列。隨後，使用 Deblur v1.1.1 進行序列去噪，並將序列長度修剪至 427 個鹼基 (bp)，並計算其豐度。最後，透過基於 scikit-learn 的貝氏分類器進行物種分類，該分類器以 Silva v138 NR99 據庫中全長序列的 V3-V4 區域進行訓練，用於後續分析。功能路徑則是使用 PICRUST2 2.5.2 依據標誌基因序列預測功能豐度。

(3) 因果推論與路徑分析

(3.1) 因果推論

不同於過去僅聚焦於微生物相相關性分析的研究，我們希望在現有資料科學的基礎上，盡可能地接近因果推論。本研究的因果推論將基於 Hill Criteria 的因果判準中的三項核心原則[37]：

- (1) **時序性：**因果事件應按時間先後發生；
 - (2) **干擾因子排除：**控制潛在的共同原因；
 - (3) **統計無法解釋：**統計方法檢驗假說排除偶然性。
- 在時序性方面，口腔微生物相的測量明顯發生在預後事件之前，理由如下：在本研究中，微生物相數據來自口腔鱗狀細胞癌患者於診斷時 (2014-2015 年) 的樣本，而術後併發症的結局則來自 2015-2024 年的追蹤資料。因此，本研究符合因果關係中時序性的基本要求。在干擾因子排除方面，首先根據 Hernán 與 Robins

(2021) 的定義干擾因子是「因果路徑中的共同原因」，因此當我們探討口腔微生物相與術後併發症與長期預後的因果關係，以下數個干擾因子需要控制：(1)基礎人口學特徵：如年齡和性別；(2)癌症相關因子：Yang et al. (2017) 指出癌症分期與微生物相有顯著相關[28]；且臨床普遍認知分期是存活與病情最重要的影響指標。除了上述三個變量為當然干擾因子以外，我們也會使用統計分析，將與微生物相以及預後指標同時有顯著相關的基礎變量 (baseline covariates) 當作干擾因子。在校正干擾方面，我們將採用模型校正法，將這些干擾因子納入回歸模型進行調整，在建模方面則分別在統計分析的章節中詳細說明模型。

(3.2)路徑分析 (目標 3)

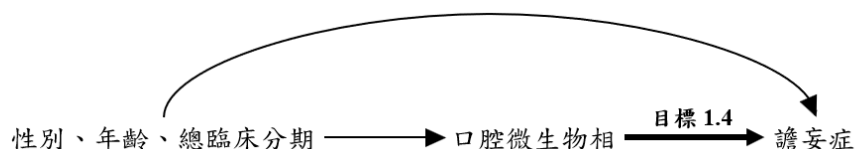
路徑分析(有時稱作「中介分析」；請特別注意與微生物相分析的「(4.3)功能路徑豐度差異分析」是不同的分析方法)是最常見的統計方法之一，用於研究不同變量的因果關係分解成不同路徑，以量化變數之間的影响機制和強度；透過繪製路徑圖，可以清楚表示變數間的影响結構。路徑分析廣泛應用於社會科學、生物醫學和心理學等領域，幫助探索複雜系統中的機制與相互作用。在目標 3 中，當我們想要探討口腔微生物相與預後指標之間的直接因果關係，驗證「口腔微生物相對謾妄的影響，在排除 ICU 住院時間及其他術後併發症後，仍具有顯著的直接因果關係」以及「口腔微生物相對五年存活率的影響在控制術後併發症與復發事件的影響後，仍具有顯著的直接因果關係」這兩個假說，就必須使用路徑分析來處理。以下我們用前者的假說為例，來示範如何使用路徑分析來驗證這個假說。

在目標 3.1 中，我們除了想要研究口腔微生物相是否最造成術後謾妄風險的增加以外，也想探索此因果效應是否獨立於 ICU 住院時間；由於謾妄的主要已知危險因子是較長的 ICU 住院時間，而口腔鱗狀細胞癌的術後併發症（如吸入性肺炎、傷口感染及血管阻塞）會延長 ICU 住院時間。同時，口腔微生物相可能增加這些術後併發症的風險（這是目標 1.1–1.3 探索的重點），進而間接影響謾妄的發生。這一假設的路徑結構如圖 2 所示。因此在分析中，我們需要調整 ICU 住院時間以及三種術後併發症（吸入性肺炎、傷口感染、血管阻塞）對謾妄的間接影響，確保研究的重點放在口腔微生物相是否通過獨立路徑直接影響謾妄風險。因此在目標 3 中，我們將三種術後併發症和 ICU 住院時間這四個變項如同干擾因子一樣，在模型中進行校正，以估計「『微生物相』對『謾妄風險』，且與增加 ICU 住院時間無關的效應」。在中介效性分析的文獻中，此效應又稱為「『微生物相』對『謾妄風險』的直接效應」[38]。

(3.3)校正競爭風險 (目標 2.1)

我們根據特定時間區間內的復發狀況，將受試者分為兩組，並以一年、兩年及三年作為時間區隔，進行人口統計特徵的差異比較。原先亦考慮了半年與五年作為分析的時間點。然而，由於半年內發生復發的患者比例過低，難以進行具統計效力的比較，故不予採用。而五年的時間區隔未經復發而死亡的個案比例較高，因此亦未納入分析範疇。本篇研究中欲比較之特徵可分為三類，一為基本資訊及病史，包含：年齡、性別及是否有糖尿病；二為臨床狀況，包含在：總臨床分期、是否傷口感染及術後是否引發吸入性肺炎；三為臨床結果，包含：五年後存活狀態及是否於特定時間區間內死亡。連續型變數採用 Kruskal-Wallis 檢定 (Kruskal-Wallis Test)；類別型變數採用卡方檢定 (Chi-square Test)，並將結果以表格呈現。

(a)



(b)

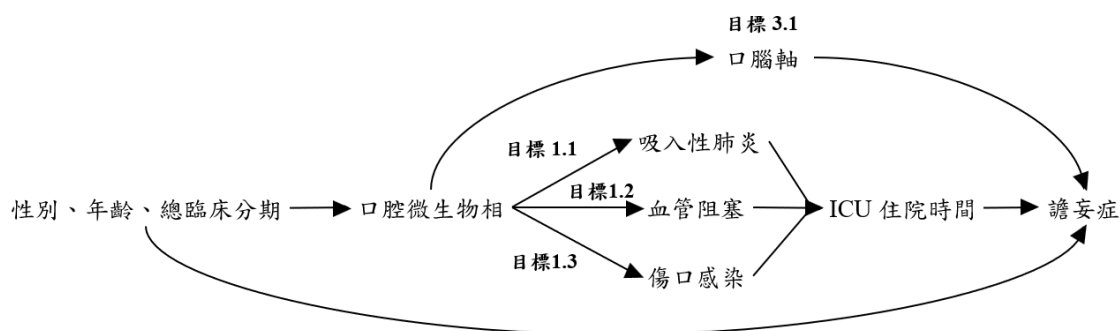


圖 2. 因果關係圖：(a)口腔微生物相對譫妄症的因果關係；(b)三種術後併發症（吸入性肺炎、血管阻塞、傷口感染）及 ICU 住院時間對譫妄症的因果關係。

(4) 資料分析與建模

我們從三個面向分析口腔微生物相與預後指標之間的關係（以目標 1.1 的結果變量「吸入性肺炎」為例，目標 1.2 至 目標 1.4 的結局分別為「傷口感染」、「血管阻塞」和「譫妄」，目標 2.1 和目標 2.2 的結局則為「復發」與「五年存活率」），包括：(1) Alpha 與 Beta 多樣性分析，(2) 相對豐度差異分析，以及 (3) 功能路徑豐度差異分析。Alpha 與 Beta 多樣性分析主要探討口腔微生物相的生物多樣性如何影響吸入性肺炎的發生率。生物多樣性通常被認為與健康狀況密切相關，較低的多樣性可能反映較差的健康狀態，因此我們假設「較低的生物多樣性會增加吸入性肺炎的風險」。Alpha 多樣性評估微生物群內的多樣性，Beta 多樣性則衡量不同樣本間的群落組成差異，提供更全面的微生物群結構變化信息。相對豐度差異分析則聚焦於各菌屬的相對豐度是否與吸入性肺炎的風險相關，通過檢測菌屬豐度差異並使用模型校正干擾因子與中介因子，確保結果的準確性，幫助識別特定菌屬對結局風險的潛在影響。功能路徑豐度差異分析則進一步探討微生物群落的功能性變化與吸入性肺炎之間的關聯，通過分析代謝功能路徑揭示可能的生物學機制，例如代謝、免疫或炎症的相關變化。通過這三種方法的結合，我們期望全面解析口腔微生物相在不同結局中的作用機制，為臨床預測與干預策略提供科學基礎。這三個面向的分析如下詳述：

(4.1) Alpha 多樣性及 Beta 多樣性

為了探討是否復發與口腔微生物之間的關聯性，本研究首先分析了 Alpha 多樣性。Alpha 多樣性反映了單一環境中的微生物豐富度 (Richness) 和均勻度 (Evenness)。本文選用了四種常見的 Alpha 多樣性指標：Observed（單純計算微生物物種數）、Chao1[39]、Shannon[40] 和

Simpson[41]。Observed 和 Chao1 主要關注豐富度，數值越大代表 Alpha 多樣性越高；Shannon 和 Simpson 則同時考慮豐富度與均勻度，範圍在 0 至 1 之間，數值越大亦代表 Alpha 多樣性越高。這些指標是使用 R 套件 phyloseq 計算得出，接著使用 ANOVA 檢定來比較有無復發的兩組人群之間的差異。為了校正潛在的干擾因子，本研究在 ANOVA 檢定中加入干擾因子（以及在目標 3 加入中介因子，將在後章節敘述）作為控制變數，確保比較結果能夠排除這些潛在影響因素的干擾。最終，通過箱型圖來展示校正後兩組人群之間的差異。

第二步分析的是 Beta 多樣性，用來衡量不同環境間物種組成的差異，即比較兩組樣本間口腔微生物組成的相似程度。Beta 多樣性通常通過計算距離矩陣來進行分析，然後使用無母數方法中的 PERMANOVA 檢定來比較群體之間的相似程度。本研究使用了兩種距離計算方法：一種基於系統發育樹的距離，如加權和非加權的 UniFrac 距離[42]，這些距離可使用 R 套件 phyloseq [43]計算；另一種是不基於系統發育樹的距離，如坎貝拉距離[44]，該距離可使用 R 套件 vegan[45] 計算。計算距離後，我們使用 PERMANOVA 檢定來檢查有無復發的兩組人在口腔微生物組成上的差異，同時將干擾因子也加入到 PERMANOVA 模型中，確保分析結果更加準確。在 Beta 多樣性的呈現上，常使用微生物生態學中的一種降維方法，稱為主座標分析（Principal Coordinate Analysis, PCoA）。這種分析透過對多維數據進行特徵值和特徵向量排序，找出最重要的元素和結構。PCoA 基於不同的距離測量進行，並選取前兩個主要維度繪製散佈圖，便於觀察結果。

(4.2)相對豐度差異分析

我們針對有無復發的兩組人進行口腔微生物豐度差異分析，以找出在豐度上有顯著差異的微生物，藉此確定口腔微生物。在分析前，為了消除樣本差異和測序過程的影響，我們先對絕對豐度表進行正規化處理。本研究採用了總和比例化（Total-sum scaling）方法，將絕對豐度表轉換為相對豐度表，然後使用 R 套件 glmmTMB 1.1.9-9000 中的 glmmTMB 函數來檢查兩組人之間的豐度差異，該函數使用帶有零膨脹的負二項分佈廣義線性模型（GLM）去進行計算，干擾因子也被納入 GLM 模型中，從而確保模型結果更加準確且能排除外部干擾的影響。最後，利用火山圖呈現檢定結果，圖中橫軸為 $\log_2$ （變化倍數），縱軸為 $-\log_{10}$ （p-value）。為解決某些菌屬相對豐度為 0 的問題，我們在計算變化倍數時，對所有相對豐度加上了一個極小值，該極小值定為所有不為 0 的相對豐度中之最小值除上 100。

(4.3)功能路徑豐度差異分析

我們使用 White's 無母數 t 檢定（White's non-parametric t-test）[46]，這是一種去除常態分佈假設的檢定方法，設定為雙尾檢定，並重複 1000 次。檢定結果的 p-value 經過 Storey FDR 校正後稱為 q-value，以 0.05 為顯著水準。q-value 小於 0.05 表示兩組在該功能路徑的相對豐度有顯著差異。本分析使用 STAMP（Statistical Analysis of Metagenomic Profiles）[47]進行並繪製圖表。

(5)實際操作與初步結果

本研究主要的分析方法有兩大類型：(1)因果分析：針對目標 1 與目標 2；(2)路徑分析：針對目標 3。因果分析著重在控制干擾因子，我們在此先簡單使用一定要校正的三個變項——年齡、

性別、以及臨床期數—做為控制干擾因子的示範、並且只使用目標 1.4 為例，跑出微生物項指標與譫妄症之因果關係作為範例；路徑分析主要著重在同時控制干擾因子以及中介因子，以獲得直接效應，我們在此在干擾因子控制上使用目標 3.1 為例，也是直接採用年齡、性別、以及臨床期數三個變項，以及加上有興趣的中介因子—三項術後併發症以及 ICU 時間—跑出微生物項指標與譫妄症之直接效應作為範例。然而干擾因子與中介因子必須要經過分析比對，以及在校正建模上必須還要考慮劑量效果曲線(dose-response curve)、與主效應是否有交互作用(interaction)、以及模型的配適度分析(Goodness-of-fit)；路徑分析除了上述的問題以外，使用模型法控制中介因子在方法學上如果有存在交互作用時，有更為精緻的因果模型(如「因果中介分析」)，因此本研究結果只是做為研究步驟以及預期結果的範例以及可行性的展現，並不能當作最終的結論。

(5.1)因果分析：目標 1 與目標 2 (以 1.4 為例)

以目標 1.4 為例，為探討不同的口腔微生物相是否增加術後譫妄的風險，將採用上述提到的建模方法進行分析。在 alpha 多樣性分析中，使用 ANOVA 檢定比較有無譫妄症兩組之間的微生物豐富度及均勻度是否不同。例如，以 Observed 指標(可以代換成其他三個 alpha 多樣性指標)為例，我們將檢定兩組間的 Observed 是否存在顯著差異，其模型如下：

$$\text{Observed 指標} \sim \text{譫妄症} + \text{年齡} + \text{性別} + \text{總臨床期數}$$

在 beta 多樣性分析中，透過計算距離矩陣並利用 PERMANOVA 檢定，比較兩組樣本的微生物組成的相似程度。例如，以坎貝拉距離(可代換成另外兩個 beta 多樣性指標)為例，檢定組間距離是否有顯著差異，其模型如下：

$$\text{坎貝拉距離} \sim \text{譫妄症} + \text{年齡} + \text{性別} + \text{總臨床期數}$$

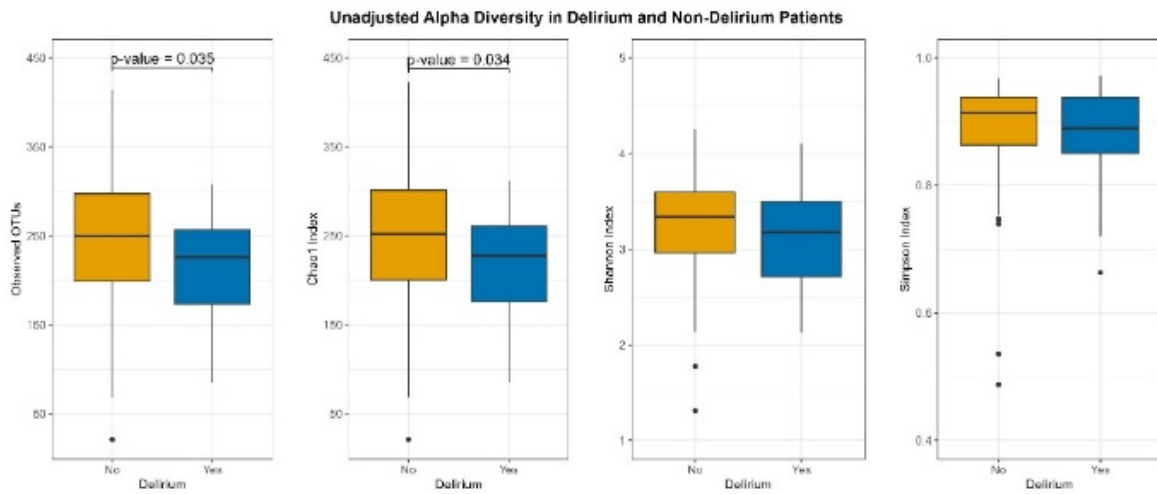
在相對豐度差異分析中，由於是零膨脹且非常態分佈，因此我們使用加入零膨脹的負二項分佈廣義線性模型，找出相對豐度不同的微生物。例如，以 *Streptococcus* (可以代換成其他的菌種)為例，檢定其相對豐度是否具有顯著差異，其模型如下：

$$\text{Streptococcus} \sim \text{譫妄症} + \text{年齡} + \text{性別} + \text{總臨床期數}$$

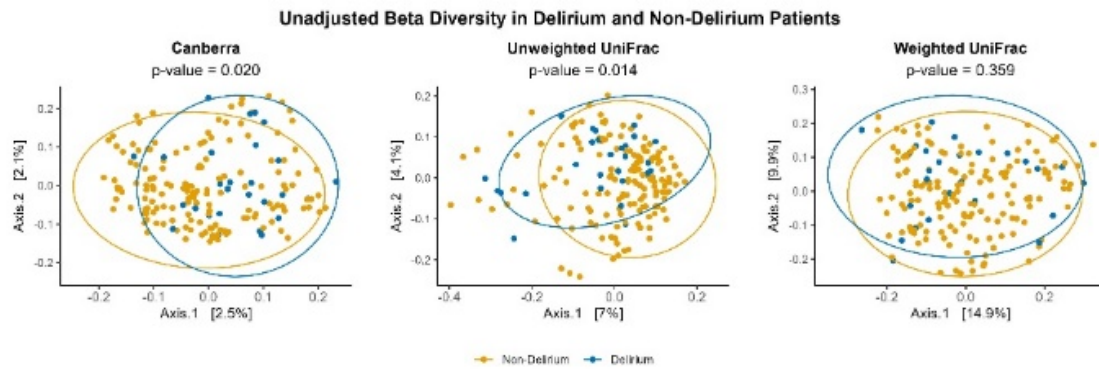
在功能路徑豐度差異分析中，透過 White's 無母數 t 檢定，找出相對豐度不同的代謝途徑。例如，以 Glycerophospholipid metabolism 為例，檢定其相對豐度是否具有顯著差異，其模型如下：

Glycerophospholipid metabolism ~ 譫妄症

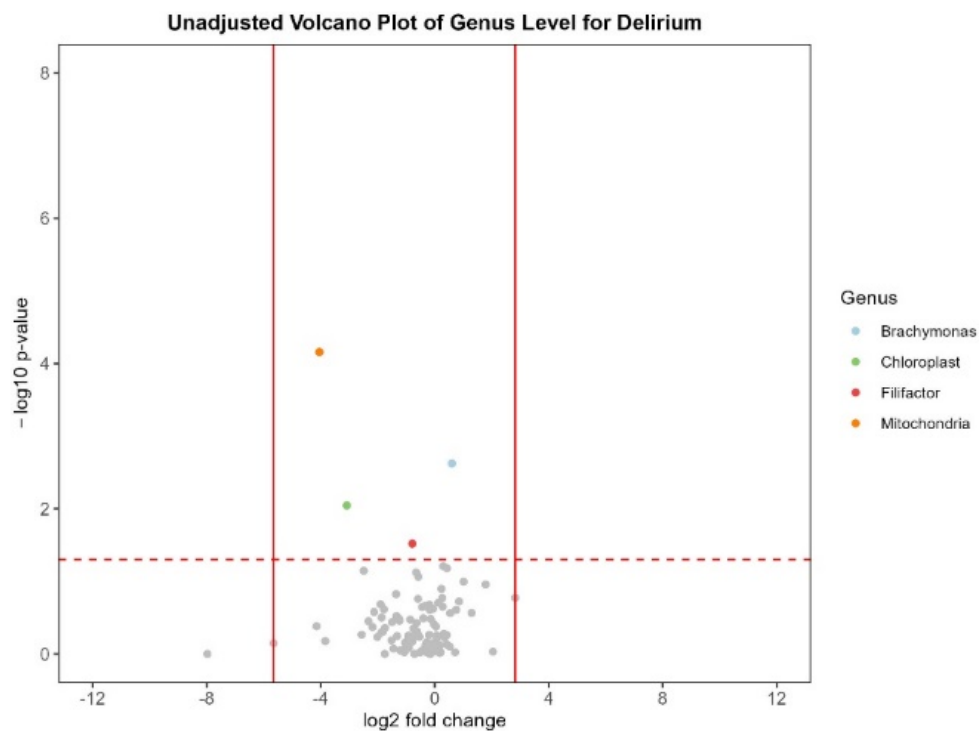
(a)



(b)



(c)



(d)

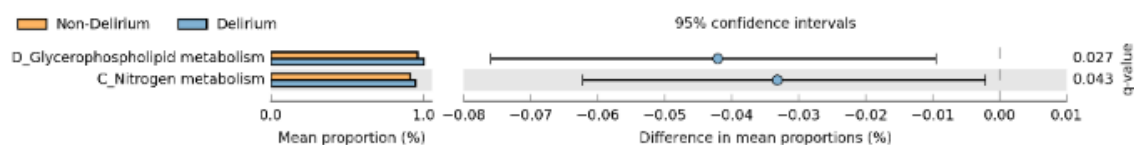


圖 3. 目標 1.4 初步結果：(a) alpha 多樣性；(b) beta 多樣性；(c) 相對豐度差異分析；(d) 功能路徑豐度差異分析。

初步結果

(再次強調，在干擾因子的選擇以及建模上有非常多需要調整的部分，在此僅為研究步驟之示範以及可行性之展現)

目標 1.4 初步結果如圖 3 所示，在 alpha 多樣性分析上，顯示無譫妄症組的 alpha 多樣性皆較高，但僅在 Observed 及 Chao1 指標上顯著，在 Shannon 及 Simpson 指標上則無顯著差異。在 beta 多樣性分析上，兩組患者的「坎培拉距離 beta 多樣性」及「未加權 UniFrac 距離 beta 多樣性」皆具有顯著差異。在相對豐度差異分析，針對 105 個菌屬，有 4 個菌屬具有顯著差異，其中僅有 *Brachymonas* 在有譫妄症組中顯著較高；其餘 3 個菌屬則在無譫妄症組中顯著較高，分別為 *Mitochondria*、*Chloroplast* 及 *Filifactor*。最後，在功能路徑豐度差異分析中，針對 97 條代謝途徑，僅有 Glycerophospholipid metabolism 在兩組患者之間具有顯著差異，且在無譫妄症組中顯著較高。

因此研究結果大部分對於「假說 1.4：(1)診斷時口腔微生物相多樣性較低、(2)特定菌群的豐度較高(或較低)、以及(3)特定功能路徑的菌群較高(或較低)會導致譫妄的發生風險」的證據顯示為：(1)診斷時口腔微生物相多樣性較低增加譫妄的發生風險；(2)「*Brachymonas*」的豐度較高，以及「*Mitochondria*、*Chloroplast* 及 *Filifactor*」的豐度較低會增加譫妄的發生風險；(3) 具有「Glycerophospholipid metabolism」功能路徑的菌群會增加譫妄的發生風險。

(5.2)路徑分析：目標 3 (以目標 3.1 為例)：模型校正「干擾因子」以及「中介因子」為重點

假設前章最終分析結果確認「診斷時口腔微生物相的差異會導致譫妄的發生風險」為真，我們在目標 3.1 就是要探討這個因果關係是否獨立於 ICU 住院時間與三大術後併發症。因此在路徑分析中，我們針對這四個變數進行控制，並同時校正干擾因子，以確保結果的準確性，其因果關係如圖 4 所示。其中，性別、年齡及總臨床期數為干擾因子，吸入性肺炎、血管阻塞、傷口感染及 ICU 住院時間則為中介因子，並同樣採用上述提到的建模方法來分析。在 alpha 多樣性中，以 Observed 指標為例，我們將檢定兩組間的 Observed 是否具有顯著差異，其模型如下：

Observed 指標 ~ 譫妄症 + 性別 + 年齡 + 總臨床期數 + 吸入性肺炎 + 血管阻塞 + 傷口感染 + ICU 住院時間

在 beta 多樣性中，以坎貝拉距離為例，檢定組間距離是否具有顯著差異，其模型如下：

坎貝拉距離 ~ 譫妄症 + 性別 + 年齡 + 總臨床期數 + 吸入性肺炎 + 血管阻塞 + 傷口感染
+ ICU 住院時間

在相對豐度差異分析中，以 *Streptococcus* 為例，檢定相對豐度是否有顯著差異，其模型如下：

Streptococcus ~ 譫妄症 + 性別 + 年齡 + 總臨床期數 + 吸入性肺炎 + 血管阻塞 + 傷口感染
+ ICU 住院時間

在功能路徑豐度差異分析中，由於該方法無法同時校正多個干擾因子，因此，我們參考過去的研究背景，選擇對譫妄症影響最大的變數進行分層分析，這邊將以 ICU 住院時間是否大於 7 天作為分層依據[48]。以 Glycerophospholipid metabolism 為例，檢定是否具有顯著差異，分別對 ICU 住院時間大於 7 天與小於等於 7 天的子樣本建模，其模型如下：

Glycerophospholipid metabolism ~ 譫妄症

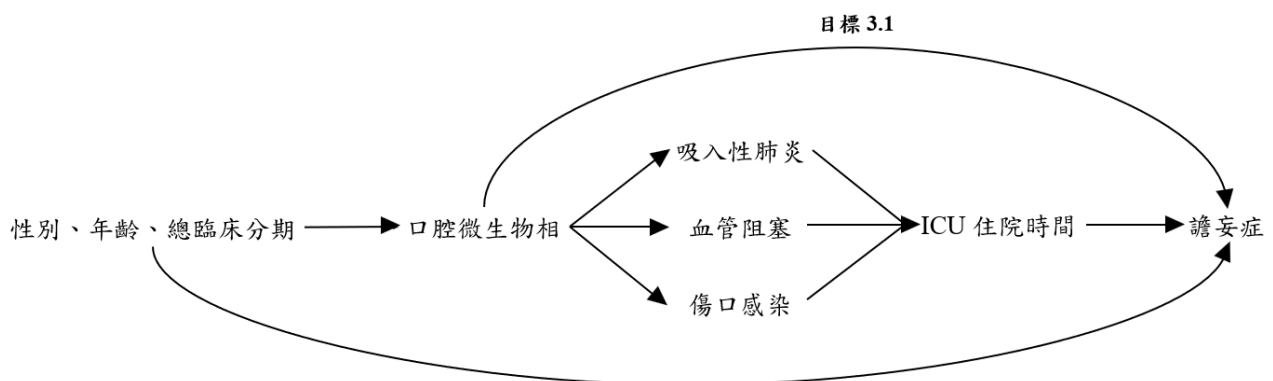


圖 4. 目標 3.1 之因果關係圖

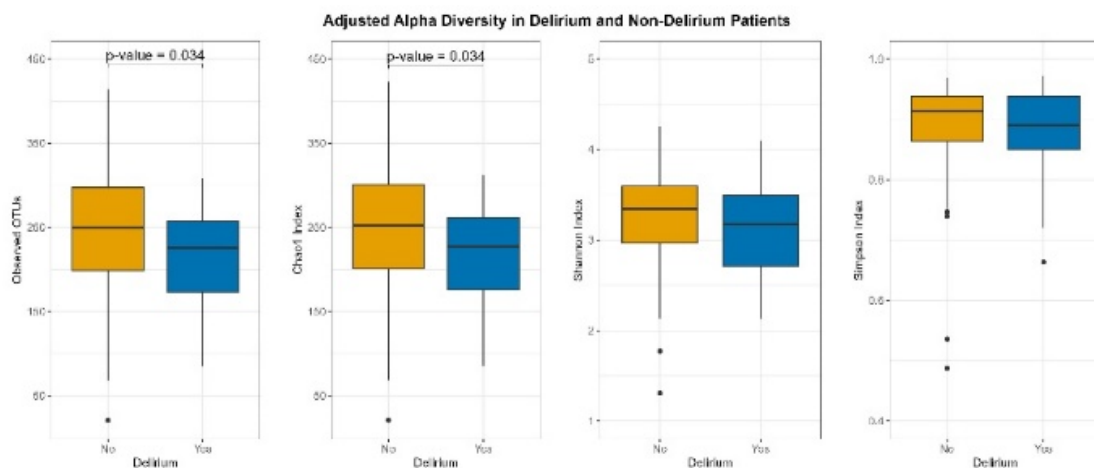
初步結果

目標 3.1 初步結果如圖 5 所示，在 alpha 多樣性分析上，顯示無譫妄症組的 alpha 多樣性皆較高，在 Observed 及 Chao1 指標上達統計顯著水準。在 beta 多樣性分析上，基於坎培拉及未加權 UniFrac 距離的分析，兩組患者的 beta 多樣性皆具有顯著差異。在相對豐度差異分析，針對 105 個菌屬，有 13 個菌屬具有顯著差異，其中 7 個菌屬在有譫妄症組中顯著較高，分別為 *Haemophilus*、*Kingella*、*Neisseria*、*Brachymonas*、*Eikenella*、*Halomonas* 以及 *Actinomyces*；其餘 6 個菌屬則在無譫妄症組中顯著較高，分別為 *Bacteroides*、*Parascardovia*、*Absconditabacteriales*_(SR1)、*Bergeyella*、*Slackia*、*Dialister*。最後，在功能路徑豐度差異分析中，針對 97 條代謝功能途徑，ICU 住院時間小於等於 7 天的患者，有 3 條途徑具有顯著差異，且皆在無譫妄症組中顯著較高，分別為 Ethylbenzene degradation、Chloroalkane and

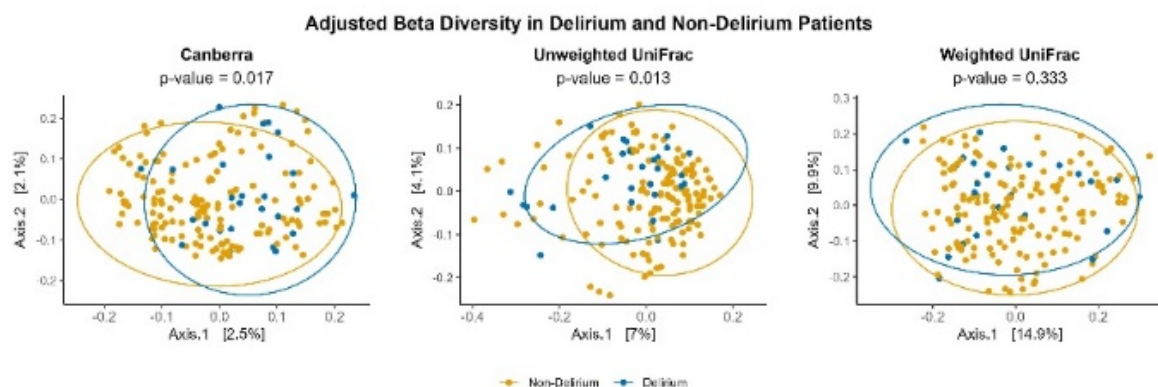
chloroalkene degradation 及 beta-Alanine metabolism。針對 ICU 住院時間大於 7 天的患者，有 4 條途徑具有顯著差異，其中 3 條途徑在有譫妄症組中顯著較高，分別為 Glycerophospholipid metabolism、Glycine, serine and threonine metabolism 及 Fatty acid degradation，而 Chloroalkane and chloroalkene degradation 則在無譫妄症組中顯著較高。

因此研究結果大部分對於「假說 3.1：口腔微生物相對譫妄的影響在校正 ICU 住院時間及其他術後併發症後，仍具有顯著的直接因果關係」的證據顯示為：(1) 診斷時口腔微生物相多樣性較低會透過與 ICU 住院天數、以及術後併發症無關的機制，增加譫妄的發生風險；(2) 以下 7 個菌屬「*Haemophilus*、*Kingella*、*Neisseria*、*Brachymonas*、*Eikenella*、*Halomonas* 以及 *Actinomyces*」的豐度較高，以及以下 6 個菌屬「*Bacteroides*、*Parascardovia*、*Absconditabacteriales_(SR1)*、*Bergeyella*、*Slackia*、以及 *Dialister*」的豐度較低會透過與 ICU 住院天數、以及術後併發症無關的機制，增加譫妄的發生風險；(3) 具有「Ethylbenzene degradation、Chloroalkane and chloroalkene degradation 及 beta-Alanine metabolism」功能路徑的菌群會透過與 ICU 住院天數、以及術後併發症無關的機制，降低譫妄的發生風險。

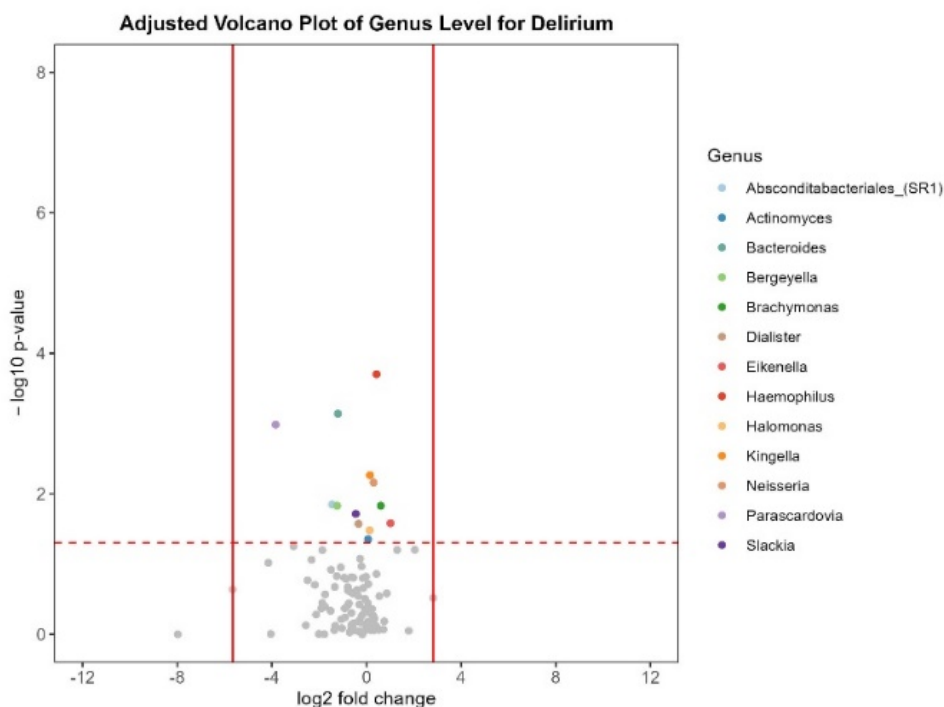
(a)



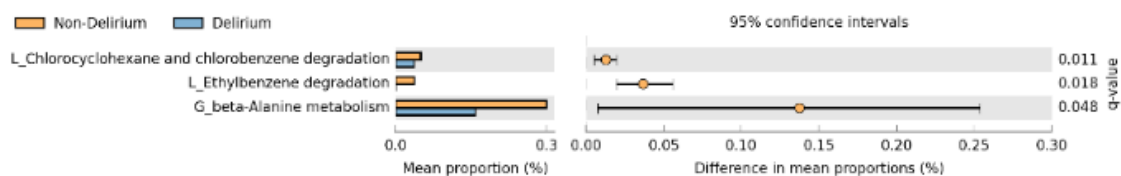
(b)



(c)



(d)



(e)

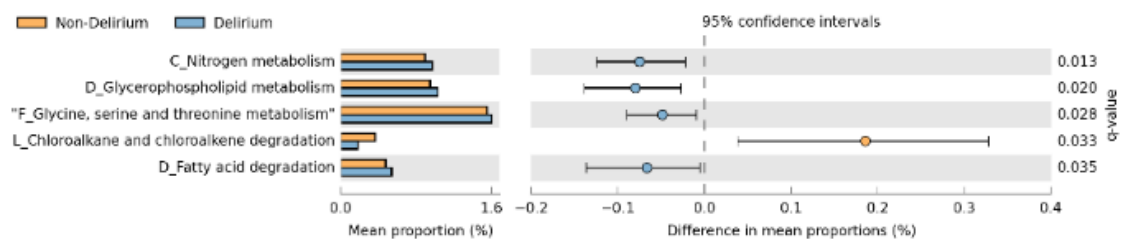


圖 5. 目標 3.1 初步結果：(a) alpha 多樣性；(b) beta 多樣性；(c)相對豐度差異分析；(d)功能路徑豐度差異分析(ICU 住院時間 ≤ 7 天)；(e)功能路徑豐度差異分析(ICU 住院時間 > 7 天)。

(三) 預期完成之工作項目及成果

三年預期研究進度如下所述：

1. 預計完成工作項目

第一年 (2025.8 - 2026.7)

● 目標 1.1.

- 目標 1.2.
- 目標 1.3.
- 目標 1.4.

第二年 (2026.8 - 2027.7)

- 目標 2.1.
- 目標 2.2

第三年 (2027.8 - 2028.7)

- 目標 3.1
- 目標 3.2.

以上工作均包含以下六項流程

- 文獻回顧與整理
- 資料清理：包含遺失值的處理與插補、極端值的處理等
- 數據分析，包含干擾因子的判定、模型選擇與配適度檢驗等
- 討論臨床結果；比較與過去文獻之差異
- 論文撰寫
- 投稿國際期刊

2. 對於參與之工作人員，預期可獲之訓練

本計畫預計聘請統計學門相關研究人員，包括全職助理、以及統計所及數據科學所的碩士生(兼任研究助理)若干名。研究過程中，團隊成員將逐步熟練掌握多種計算機語言，包括 Python、R 和 Bash，同時接受有關口腔癌研究與微生物群分析的專業訓練，涵蓋 16S rRNA 數據及全基因組宏基因組學數據分析。透過與醫療及統計領域專家的緊密合作，增強跨領域協作能力，同時深化對口腔鱗狀細胞癌預後研究的理解與應用能力。

參與本計畫的工作人員將獲得豐富且極具挑戰性的專業訓練，具體包括：

(1) 研究助理

- 碩士級研究助理將在本計畫中接受全面而深入的研究訓練，涵蓋方法論構思、理論推導至應用推廣的完整研究流程。助理將學習並參與理論模型的構建與驗證，培養使用高階統計工具進行分析及解決問題的實務能力，並提升數學推導與研究思維的嚴謹性。
- 獲得跨學科合作的寶貴經驗，參與與不同領域專家的協作，並在過程中協助指導博士生，進一步發展教學與指導技能，為未來在學術或產業領域中擔任領導角色做好準備。
- 在資料分析方面，助理將深入參與臨床數據的清理、建模與解釋過程，學習如何以科學論證支持研究假設，並增強其數據處理與科學溝通的能力。整體而言，研究助理將在理論與應用的雙重訓練中成長，從而為其未來的學術或職業生涯奠定堅實的基礎。

(2) 碩士生

- 將接受電腦模擬程式設計與運行的專業訓練，熟悉統計軟體的實作與應用。

- 在資料分析中，培養基礎的數據處理、探索性分析與建模能力，為未來學術或產業領域奠定實務基礎。

3. 預期完成之研究成果

經過三年的深入研究，我們預計將累積足夠完整且系統化的數據，撰寫 10 篇的研究論文，投稿至國際頂尖期刊，如 Journal of Experimental Orthopaedics、Gut Microbes、Microbiome、Frontiers in Cellular and Infection Microbiology、Frontiers in Microbiology、International Microbiology 等。此外，本研究預計每年參加一至二場國際學術會議，例如美國微生物學會（American Society of Microbiology）、國際人類微生物組聯盟(International Human Microbiome Consortium Conference)、歐洲臨床微生物學與傳染病學會(European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases)、國際微生態學會(International Symposium on Microbial Ecology)、國際微生物研究聯盟(Global Microbiome Summit)，發表我們的研究成果，與國際學界進行學術交流，推動研究進展。

4. 學術研究、國家發展及其他應用方面預期之貢獻

本計畫在學術上將通過因果推論模型及路徑分析，揭示口腔微生物相在術後併發症與長期預後中的角色，為癌症預後發生機制以及預防提供新方向。在國家發展層面，計畫將強化台灣在微生物組學及腫瘤醫學領域的國際地位，並提供本土化臨床數據支撐，促進精準醫療政策的制定。應用層面則包含改善 OSCC 術後管理與患者預後，並推動微生物組技術在癌症治療中的應用，最終降低併發症風險與醫療資源耗損，增進整體社會福祉。

(四)參考文獻

1. Giovannacci, I., et al., Non-invasive visual tools for diagnosis of oral cancer and dysplasia: A systematic review. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*, 2016. **21**(3): p. e305.
2. Feller, L. and J. Lemmer, *Oral squamous cell carcinoma: epidemiology, clinical presentation and treatment*. *Journal of cancer therapy*, 2012. **3**(4): p. 263-268.
3. Chen, Y., et al., *Primary oral squamous cell carcinoma: an analysis of 703 cases in southern Taiwan*. *Oral oncology*, 1999. **35**(2): p. 173-179.
4. International Agency for Research on Cancer, W., *GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012*. 2012.
5. Tajmiriahi, N., et al., *Evaluation of metastasis and 5-year survival in oral squamous cell carcinoma patients in Isfahan (2001-2015)*. *Dent Res J (Isfahan)*, 2019. **16**(2): p. 117-121.
6. Joosten, M.H.M.A., R. de Bree, and E.M. Van Cann, *Management of the clinically node negative neck in squamous cell carcinoma of the maxilla*. *Oral Oncology*, 2017. **66**: p. 87-92.
7. Haque, S., et al., *High-risk pathological features at the time of salvage surgery predict poor survival after definitive therapy in patients with head and neck squamous cell carcinoma*. *Oral Oncology*, 2019. **88**: p. 9-15.
8. González-García, R., et al., *Local recurrences and second primary tumors from squamous cell carcinoma of the oral cavity: A retrospective analytic study of 500 patients*. *Head & Neck*, 2009. **31**(9): p. 1168-1180.
9. Mücke, T., et al., *Recurrence interval affects survival after local relapse of oral cancer*. *Oral Oncology*, 2009. **45**(8): p. 687-691.
10. Safi, A.-F., et al., *Analysis of clinicopathological risk factors for locoregional recurrence of oral squamous cell carcinoma – Retrospective analysis of 517 patients*. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 2017. **45**(10): p. 1749-1753.
11. Shinn, J.R., et al., *Cumulative incidence of neck recurrence with increasing depth of invasion*. *Oral Oncology*, 2018. **87**: p. 36-42.
12. Yanamoto, S., et al., *Clinicopathological risk factors for local recurrence in oral squamous cell carcinoma*. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2012. **41**(10): p. 1195-1200.
13. Blatt, S., et al., *Tumor Recurrence and Follow-Up Intervals in Oral Squamous Cell Carcinoma*. *J Clin Med*, 2022. **11**(23).
14. Wang, Y., et al., *Temporal and spatial patterns of recurrence in oral squamous cell carcinoma, a single-center retrospective cohort study in China*. *BMC Oral Health*, 2023. **23**(1): p. 679.
15. Yeung, J.K., et al., *Delayed mobilization after microsurgical reconstruction: an independent risk factor for pneumonia*. *The Laryngoscope*, 2013. **123**(12): p. 2996-3000.
16. Sabaté, S., V. Mazo, and J. Canet, *Predicting postoperative pulmonary complications: implications for outcomes and costs*. *Current Opinion in Anesthesiology*, 2014. **27**(2): p. 201-209.
17. Petrar, S., et al., *Pulmonary complications after major head and neck surgery: a retrospective cohort study*. *The Laryngoscope*, 2012. **122**(5): p. 1057-1061.
18. Gou, R.Y., et al., *One-year medicare costs associated with delirium in older patients undergoing*

- major elective surgery. JAMA surgery, 2021. **156**(5): p. 462-470.
19. Ely, E.W., et al., *Delirium as a predictor of mortality in mechanically ventilated patients in the intensive care unit*. Jama, 2004. **291**(14): p. 1753-1762.
 20. Stephenson, C., et al. *Management of common postoperative complications*. in *Mayo Clinic Proceedings*. 2020. Elsevier.
 21. Dewhirst, F.E., et al., *The human oral microbiome*. Journal of bacteriology, 2010. **192**(19): p. 5002-5017.
 22. Wade, W.G., *The oral microbiome in health and disease*. Pharmacological research, 2013. **69**(1): p. 137-143.
 23. Al-Hebshi, N.N., et al., *Inflammatory bacteriome featuring Fusobacterium nucleatum and Pseudomonas aeruginosa identified in association with oral squamous cell carcinoma*. Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 1834.
 24. Nagy, K., et al., *The microflora associated with human oral carcinomas*. Oral oncology, 1998. **34**(4): p. 304-308.
 25. Bolz, J., et al., *Bacterial colonization of microbial biofilms in oral squamous cell carcinoma*. Clinical oral investigations, 2014. **18**: p. 409-414.
 26. Ahn, J., S. Segers, and R.B. Hayes, *Periodontal disease, Porphyromonas g ingivalis serum antibody levels and orodigestive cancer mortality*. Carcinogenesis, 2012. **33**(5): p. 1055-1058.
 27. Pushalkar, S., et al., *Microbial diversity in saliva of oral squamous cell carcinoma*. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2011. **61**(3): p. 269-277.
 28. Yang, C.-Y., et al., *Oral microbiota community dynamics associated with oral squamous cell carcinoma staging*. Frontiers in microbiology, 2018. **9**: p. 862.
 29. Lyu, W.-N., et al., *An Oral Microbial Biomarker for Early Detection of Recurrence of Oral Squamous Cell Carcinoma*. ACS Infectious Diseases, 2023. **9**(9): p. 1783-1792.
 30. Hernán, M.A., *The Hazards of Hazard Ratios*. Epidemiology, 2010. **21**(1): p. 13-15.
 31. Young, J.G., et al., *A causal framework for classical statistical estimands in failure-time settings with competing events*. Statistics in Medicine, 2020. **39**(8): p. 1199-1236.
 32. Takeshita, T., et al., *Microfloral characterization of the tongue coating and associated risk for pneumonia-related health problems in institutionalized older adults*. J Am Geriatr Soc, 2010. **58**(6): p. 1050-7.
 33. Kageyama, S., et al., *Relationships of Variations in the Tongue Microbiota and Pneumonia Mortality in Nursing Home Residents*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2018. **73**(8): p. 1097-1102.
 34. Sumi, Y., et al., *Colonization of dental plaque by respiratory pathogens in dependent elderly*. Archives of gerontology and geriatrics, 2007. **44**(2): p. 119-124.
 35. Terpenning, M.S., et al., *Aspiration pneumonia: dental and oral risk factors in an older veteran population*. Journal of the American Geriatrics Society, 2001. **49**(5): p. 557-563.
 36. Mohamed, N., et al., *Analysis of salivary mycobiome in a cohort of oral squamous cell carcinoma patients from Sudan identifies higher salivary carriage of malassezia as an independent and favorable predictor of overall survival*. Frontiers in cellular and infection microbiology, 2021. **11**: p. 673465.

37. Hill, A.B., *The environment and disease: association or causation?* 1965, Sage Publications.
38. Malan-Müller, S., et al., *Probing the oral-brain connection: oral microbiome patterns in a large community cohort with anxiety, depression, and trauma symptoms, and periodontal outcomes.* Translational Psychiatry, 2024. **14**(1): p. 419.
39. Chao, A., *Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population.* Scandinavian Journal of Statistics, 1984. **11**(4): p. 265-270.
40. Shannon, C.E., *A mathematical theory of communication.* The Bell System Technical Journal, 1948. **27**(3): p. 379-423.
41. Simpson, E.H., *Measurement of Diversity.* Nature, 1949. **163**(4148): p. 688-688.
42. Lozupone, C. and R. Knight, *UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities.* Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(12): p. 8228-35.
43. McMurdie, P.J. and S. Holmes, *phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data.* PLOS ONE, 2013. **8**(4): p. e61217.
44. Lance, G.N. and W.T. Williams, *A General Theory of Classificatory Sorting Strategies: 1. Hierarchical Systems.* The Computer Journal, 1967. **9**(4): p. 373-380.
45. Oksanen, J., et al., *Vegan: Community Ecology Package.* R Package Version 2.2-1, 2015. **2**: p. 1-2.
46. White, J.R., N. Nagarajan, and M. Pop, *Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples.* PLoS Comput Biol, 2009. **5**(4): p. e1000352.
47. Parks, D.H., et al., *STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles.* Bioinformatics, 2014. **30**(21): p. 3123-4.
48. Ely, E., et al., *The impact of delirium in the intensive care unit on hospital length of stay.* Intensive care medicine, 2001. **27**: p. 1892-1900.