

201620037A

厚生労働科学研究費補助金

がん臨床研究事業

---

センチネルリンパ節理論による頭頸部癌  
微小転移の解明と個別的治療法の開発

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 長谷川泰久

平成23（2011）年 5月

I. 総括研究報告	
センチネルリンパ節理論による頭頸部癌微小転移の解明と個別的治療法の開発	
長谷川 泰久	----- 3
(資料1)「分子生物学的手法による頭頸部癌センチネルリンパ節転移診断の臨床的意義の検討」研究計画書、説明文書、同意文書	
(資料2)「インドシアニングリーン蛍光法と放射線同位元素法を用いた口腔咽喉頭癌センチネルリンパ節生検術の実行可能性の検討」研究計画書、説明文書、同意文書	
II. 分担研究報告	
1. 頭頸部がんセンチネルリンパ節生検術についての多施設における実態に関する研究	
吉本 世一	-----65
2. 分子生物学的手法による頭頸部癌リンパ節転移診断の臨床的意義の検討に関する研究	
松塚 崇	-----70
3. 近赤外蛍光カラーイメージングを使用した頭頸部センチネルリンパ節同定への応用に関する研究	
甲能 直幸	-----72
4. センチネルリンパ節理論による頭頸部微小転移の解明と個別的治療法の開発に関する研究	
本間 明宏	-----74
5. 咽喉頭癌におけるセンチネルリンパ節理論による頭頸部微小転移の解明と個別的治療法の開発に関する研究	
塩谷 彰浩	-----77
6. 頭頸部癌における lymphatic chemotherapy (LC) の確立に関する研究	
横山 純吉	-----79
7. 頭頸部癌のセンチネルリンパ節検索の研究	
大倉 康男	-----81
8. センチネルリンパ節理論による頭頸部微小転移の解明と個別的治療法の開発に関する研究	
小須田 茂	-----83
9. OSNA 法による頭頸部癌リンパ節転移判定に関する研究	
古屋 信彦	-----85
10. センチネルリンパ節理論による頭頸部微小転移の解明と個別的治療法の開発に関する研究	
吉田 知之	-----88
11. 分子生物学的手法による頭頸部癌センチネルリンパ節転移診断に関する研究	
永藤 裕	-----90

12. 口腔癌に対するセンチネルリンパ節薬物療法に関する研究 吉崎 智一	-----92
13. センチネルリンパ節理論による頭頸部癌微小転移の解明と個別的治療法の開発 ～磁性体造影剤を用いた MRI による頸部リンパ節転移診断～ 上村 裕和	-----94
14. センチネルリンパ節理論による頭頸部微小転移の解明と個別的治療法の開発の 研究 三浦 弘規	-----96
15. センチネルリンパ節理論による頭頸部微小転移の解明と個別的治療法の開発の 研究 菅澤 正	-----97
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----99
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

## 総括研究報告書

センチネルリンパ節理論による頭頸部癌微小転移の解明と個別的治療法の開発

研究代表者 長谷川 泰久 愛知県がんセンター 頭頸部外科部長

## 研究要旨

頭頸部癌において、センチネルリンパ節(SN)理論によるリンパ節微小転移機構の解明と個別的な低侵襲治療法の開発を目指す。SNの概念に基づく診断法は、転移する最も可能性の高いリンパ節を直接同定し、微小段階で治療することを可能にする。調査研究にて構築されつつあるSN生検術データベースから頭頸部癌SN生検法の実情を詳細に検討し、本邦における標準手技を明らかにした(研究1)。それに基づく前向き試験を多施設共同で計画し、口腔癌ではSN領域郭清術の妥当性を検証する臨床試験の登録を初年度後半より開始した(研究2)。咽喉頭癌では経口的切除例を対象としたSNナビゲーション手術の適応を検討した(研究3)。これまでの研究で術中凍結診断法とSPECT-CTの信頼性が確認されたが、SN生検の結果に基づいて安全な頸部リンパ節転移に対する縮小手術を実用化するためには、より精度の高い画像診断法と術中リンパ節転移検出技術を開発することが必要である。頭頸部癌の術中RT-PCRによる微小転移診断システムがサイトケラチン(CK19)をマーカーとするOSNA法で可能であるかについて、その精度を検証する試験を進めた(研究4)。被爆のないより安全な、さらに空間分解能に優れたSN検出法として、磁性体造影剤を用いたMRI lymphographyとインドシアニングリーン(ICG)蛍光法によるSN生検法の開発の研究をさらに進めた(研究5)。SNは微小転移が存在する可能性のある部位であり、手術療法以外の治療法の標的となり得る。リンパ移行性の高い抗癌剤封入粒子をSNに集積させる薬物療法が新規の転移抑制治療となる可能性がある。この薬剤と投与法の基礎研究を進めるとともに、抗癌剤動注療法において臨床研究を開始し、原発巣に動注したシスプラチンがSNにより多く移行している可能性が示唆された。

SN理論に基づく頭頸部癌微小転移の診断法と治療法の開発は、これまで原発部位と病期により一律に行われてきた治療の改良に留まらず、個別かつ低侵襲な革新的な外科治療法を実現する可能性がある。欧米ではSN生検後の頸部郭清術は一般に二期的に行われているが、調査研究の結果から術中迅速診断法を用いることにより一期的郭清術が可能なが示された。治療の低侵襲化が図れると考える。過剰侵襲のない最適な外科治療と機能障害の軽減さらに術後再発の減少を検証する。そこで調査研究と口腔癌第2相試験の成果を活かし、早期口腔癌を対象に従来からの画一的選択的頸部郭清群とSN生検術ナビゲーション頸部郭清術群の非劣性を確認する第3相試験を計画立案した。また、より安全かつ正確な画像および分子生物学的診断法の研究では、OSNA法とICG蛍光法が頭頸部癌SNナビゲーション手術法の進歩に、飛躍的な展開をもたらすと考えられる。ICGの蛍光特性を利用して頭頸部領域のSNを同定できれば、従来はトレーサーにRIを使用していたため、医療従事者および被験者の被爆、施設の制限、手続きの煩雑さなどが解消され、どの施設でも行うことが可能となり、医療のきんてん化に役立つことが期待される。また低コストのため医療費の削減にも寄与できる。また、SN標的薬物療法の研究ではリンパ節転移に対する新たな薬物療法が確立されると期待される。

分担研究者

吉本 世一

国立がん研究センター中央病院  
頭頸部腫瘍科 医長

松塚 崇

福島県立医科大学  
耳鼻咽喉科・頭頸部外科 講師

甲能 直幸

杏林大学医学部  
耳鼻咽喉科・頭頸部外科 教授

本間 明宏

北海道大学医学部  
耳鼻咽喉科・頭頸部外科 准教授

塩谷 彰浩

防衛医科大学校  
耳鼻咽喉科 教授

横山 純吉

順天堂大学医学部  
耳鼻咽喉科・頭頸部外科 准教授

大倉 康男

杏林大学医学部  
病理学 教授

小須田 茂

防衛医科大学校  
核医学 教授

古屋 信彦

群馬大学医学部  
耳鼻咽喉科・頭頸部外科 教授

吉田 知之

東京医科大学八王子医療センター  
耳鼻咽喉科・頭頸部外科 教授

永藤 裕

杏林大学医学部  
耳鼻咽喉科・頭頸部外科 助教

吉崎 智一

金沢大学医学部  
耳鼻咽喉科・頭頸部外科 教授

上村 裕和

大阪府立成人病センター  
頭頸部外科 副部長

三浦 弘規

国際医療福祉大学三田病院  
頭頸部腫瘍センター 准教授

菅澤 正

埼玉医科大学国際医療センター  
頭頸部腫瘍科 教授

A. 研究目的

1) 頭頸部癌センチネルリンパ節(SN)生  
検術手法のガイドラインの提案

各施設で実行可能性の研究が行われ、SN  
生検法が臨床研究された。手技等のばらつ  
きがあり、標準的手法が確立されていない。  
また、欧州にてガイドラインが示されたが、  
トレーサーの手技を含め本邦に実情に即  
していない。調査研究より得られたデータ  
ベースの解析から、本邦の実情に適した施  
行方法を提案し、手技の標準化を図る。

2) 口腔癌に対するSN生検術の研究

口腔癌についてはSN生検法による頸部  
郭清術の省略に期待が持たれたが、その有  
用性が十分に認識されるに至っていない。  
これまでの研究の限界を打破するため、省  
略も含めた個々の症例の個別的なリンパ  
節郭清範囲の決定への応用について研究  
を行う。同定生検と術中診断の習熟上と技  
術的課題を克服するため、SN領域郭清術の  
考えを計画に取り入れた。これらの考えで  
臨床第2相研究を実行しその考えを検証す  
る。今後さらに非劣性試験への展開を計画  
する。

3) 中下咽頭癌に対するSN生検術の研究

咽頭癌症例で機能温存手術可能例や化  
学放射線治療不応例では外科治療が求め  
られる。実行可能性の研究(Tomifuji M. A  
nn Surg Oncol. 2008)の結果を基に、SN  
生検法により手術の低侵襲化と個別化を  
検討する。

4) 分子生物学的手法によるSN微小転移  
検出とその臨床応用

凍結診断法の研究から、より精度の高  
い診断法が求められた。乳癌で有用とさ  
れたマーカーである CK19 が頭頸部癌で

迅速診断への応用が可能であるかを実臨床に即して検討する。

#### 5) 放射性同位元素を用いない画像診断法の開発

磁性体造影剤を用いたMRI法とICG蛍光法によるSN生検法の開発の研究を行う。被爆のない安全で低侵襲の診断法の研究は意義が高く、特にICG蛍光法は頭頸部癌で独創的である。

#### 6) SN標的治療（薬物療法）の研究

SN標的薬物治療への展開は新たな研究である。動注化学療法によるSNへの薬剤の移行性と臨床的意義の解明の研究は他にない研究である。

### B. 研究方法

#### 1) 頭頸部癌センチネルリンパ節(SN)生検術手法のガイドラインの提案

調査研究計画「頭頸部がんセンチネルリンパ節生検術についての多施設における実態調査」を引き続き実施する。集積した症例データの解析より本邦の実情に即したSN生検術手法のガイドラインを提案する。平成22年度は症例の集積を続けるとともにデータの解析を行う。本研究項目は研究代表者長谷川、研究分担者甲能、吉本が担当する。

#### 2) 口腔癌に対するSN生検術の研究

##### 2-1. 口腔癌に対するセンチネルリンパ節ナビゲーション頸部郭清術の研究-臨床第2相試験-

目的は臨床的にリンパ節転移を認めないlateT2とT3口腔癌症例について放射性トレーサを用いたSN同定および生検を行い、SNナビゲーション領域頸部郭清術の有用性を検証することである。選択的頸部郭清術は従来の画一的な領域の郭清から、より個別化された選択的郭清術へと変わる。主要エンドポイントはセンチネルリンパ節領域のリンパ節転移偽陰性率である。登録

期間年2年で、計56例（SN同定率95%、片側有意水準0.05、パワー0.8）を登録予定数とする。平成22年1月には試験を開始した。平成22年度中に症例登録を完了し、最終症例登録後2年追跡し結果をまとめる。本研究項目は研究代表者長谷川、研究分担者吉田、三浦、菅澤を中心に、研究分担者と協力者を含め全員が担当する。

##### 2-2. 口腔癌に対するSN生検術の有用性の検証

早期口腔癌に対する予防的頸部郭清術群とSN生検術群の非劣性について検証試験の実施計画の立案を平成22年度前半に行う。2-1に続き平成22年度後半開始を目指す。研究代表者長谷川が行う。研究分担者吉田、三浦、菅澤を中心に、研究分担者と協力者を含め全員が担当する。

#### 3) 中下咽頭癌に対するSN生検術の研究

咽喉頭癌のSN生検術の適応を検討し、中下咽頭癌に対するSN生検法の多施設による実行可能性の研究を計画する。SN生検法の妥当性を前向きに検証する。本研究は登録予定症例数20例のうち評価可能となるであろうと想定される18例中におけるSN同定率の95%信頼区間の上限が、90%を下回るか否かにより検証を行う。平成23年度前半の試験開始を目指す。研究代表者長谷川、研究分担者塩谷を中心に、研究分担者と協力者を含め全員が担当する。

#### 4) 分子生物学的手法によるSN微小転移検出とその臨床応用

OSNA(One Step Nucleic Acid Amplification)法とその原法であるLAMP(loop-mediated Isothermal Amplification)法を用いて、頭頸部扁平上皮癌で精度の高い術中微小転移診断法の確立を目指す。頭頸部癌頸部郭清術リンパ節検体を用い、OSNA法でCK19mRNAを増幅し、免疫染色法を含む転移診断と比較検討する。最適なカットオフ値を設定し、臨床応用の可能性を探る。同時にCK19以外のマーカーについて研究する。研究分担者松

塚、古屋、甲能、大倉を中心に、研究分担者と協力者を含めて担当する。

5) 放射性同位元素を用いないセンチネルリンパ節診断法の開発

磁性体造影剤を用いた MRI lymphography と ICG 蛍光法による SN 生検法の開発を行う。口腔癌手術症例に磁性体造影剤を用いた MRI を行い、造影剤の希釈と至適量、さらに撮影至適時間を検証する。ICG 蛍光法は超高感度 CCD と光学フィルターを組み合わせたシステムを用い、臨床応用の前段階として動物実験を行う。体表から深部のリンパ管とリンパ節が同定可能であるかを検証する。研究分担者甲能、永藤、上村、小須田を中心に行う。

6) SN 標的治療（薬物療法）の研究

臨床研究「口腔癌における動注化学療法によるセンチネルリンパ節への薬剤の移行性とその臨床的意義の解明」を行う。効果的な lymphatic chemotherapy の確立に最適な薬剤と Drug Delivery System の基礎的研究を行う。研究分担者吉崎、横山、本間を中心に行う。

（倫理面への配慮）

本研究で行う臨床研究は全てヘルシンキ宣言を遵守して実施する。研究の遂行に当たっては研究計画について倫理委員会の承認を得る。検体採取前に「同意説明文・同意書」に基づき、研究の内容などを患者に説明し、その後患者に十分な時間を与え文書により自由意思による同意を得る。この中で、研究の目的と方法、予測される危険性、本研究に同意されない場合でも不利益を受けないこと、同意後にいつでも撤回できることを、さらにプライバシーの保護と人権擁護について、文書に基づき説明する。症例報告書の作成、取り扱い等において、被験者の機密保護に配慮する。研究成果を発表する際には個人を識別できる情報は一切入れない。

C. 研究結果

1) 頭頸部癌センチネルリンパ節 (SN) 生検術手法のガイドラインの提案

日本国内において、これまでに頭頸部領域における SLN 生検の有用性はすでに示されてきたが一部の施設を除き広く普及するに至っていない。日本における SLN 生検は術前に同定を行い、術中に多割面凍結病理による迅速診断を行い、頸部郭清を行うかすべてを一期的に行っている。今回われわれは、日本国内における SLN 生検の実態を明らかにし、その有用性および問題点を検証した。

対象は7施設で SLN 生検が施行された頭頸部癌 177 例である。喉頭癌および下咽頭癌の SLN 生検は1施設でのみ施行されていた。性別は男性が 124 例で女性が 53 例であった。平均年齢は 63 歳 (21-92 歳) であった。原発部位は 157 例が口腔癌であり亜部位は舌が 125 例、口腔底が 16 例、頬粘膜が 7 例、歯肉が 7 例、口蓋が 2 例であった。口腔以外では喉頭が 16 例、下咽頭が 4 例であった。

術前の SLN の同定はリンパシンチおよび SPECT/CT にて行われた (図 1)。

術中の SLN の同定はガンマカウンターを用いて行われた。また術中病理診断を連続凍結切片にて行った。すべての施設で  $^{99m}\text{Tc}$ -フチン酸がトレーサーとして用いられた。口腔癌症例では腫瘍周囲に直接  $^{99m}\text{Tc}$ -フチン酸を局所注入した。喉頭癌または下咽頭癌症例では内視鏡を併用し、局所注入を行った。トレーサーの放射線量は 35-592 Mbq/ml のものを 0.2-0.8 ml 使用し腫瘍の周囲に 4 か所の粘膜下に局所注入を行った。この操作は7施設いずれでも手術の前日に行われた。

リンパシンチとガンマプローブはすべての施設で用いられたが、SPECT/CT は付加的なものとしそのある施設でのみ用いられた。ガンマプローブは 3 施設で neo2000 (Neoprobe, OH, USA) が用いられ、4 施設で Navigator<sup>TM</sup> GPS (RMD

Instruments, MA, USA)が用いられた。シャインスルー対策は1施設でシールドを用いており、2施設では原発切除を先行させることで行っていた。他の4施設では特別な対策は行っていなかった。凍結切片のスライス幅に関し、3施設では1-2mm間隔の切片で、その他の施設ではリンパ節の最大断面における1スライスの切片で行われていた。術後の病理診断は6施設でHE染色のみで行われており、1施設では免疫染色(サイトケラチン)を併用し行われていた。術後病理のための標本切片は4施設では1-2mmのスライス幅で作成され、他の施設ではリンパ節の最大断面における1スライスで作成されていた。1施設では分子生物学的診断法であるOSNA(One-Step Nucleic Acid Amplification)が用いられていた。非センチネルリンパ節は大部分が最大断面における1スライスのみ作成されHE染色で診断されていた。RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction)法はいずれの施設でも用いられていなかった。

口腔癌におけるリンパシンチ、SPECT/CT、ガンマプローブを用い検出したSLNのそれぞれの個数を図2に示す。リンパシンチでは平均2.6個、中央値2個(0-10個)が検出された。SPECT/CTでは平均2.7個、中央値3個(0-6個)が検出された。最終的に458個のSLNが同定された。SLNの同定率は98.1%であった。1症例あたり平均2.9個、中央値3個(0-10個)であった。口腔癌におけるSLNの同定に関し、リンパシンチ、SPECT/CT、ガンマプローブの間で検出率に有意差は認めなかった。喉頭、下咽頭癌ではSLNの同定率は100%であった。表1に157例の臨床的および病理学的TNM分類を示す。臨床的にリンパ節転移を認めない口腔癌症例は153例で、そのうち病理学的に頸部リンパ節転移を認めた症例は27例であり、臨床病期における偽陰性率は18%であった。ガンマプローブで同定された口腔癌のSLNは458個で喉頭、下咽頭癌は75個であった。病理学的所見が記録

されていなかった13個のSLNは除外された。520個のSLNのうち40個(8%)は病理学的転移を認めた。30人の患者(17%)口腔癌症例445個中33個に転移を認め、喉頭、下咽頭癌症例75個中7個に転移を認めた。40個のSLN転移陽性症例のうち17個はガンマプローブで最も高い測定値を示していた。11例は2番目に、6例は3番目、1例は4番目、1例は5番目に高い値を示していた。3個のSLNでガンマプローブの測定値が記録されていなかった。37個のSLN中13個にガンマプローブで他の陰性のSLNの測定値が高いにもかかわらず病理学的陽性を認めた。いくつかの陽性SLNは陰性よりかなり低い測定値を示した。40個のSLN病理学的転移陽性のうち3個は凍結病理診断がなされずHEのみ診断された。他の37個のSLNのうち25個は2mm以上の大きさの転移を認め、6個は2mm以下の微小転移を認めた。残りの6個は術中凍結診断で転移は判明しなかった。6個の微小転移を認めたSLNの凍結標本における1例は1mm幅のスライスで標本を作成している1施設で、3例は2mm幅のスライスで行っている施設で、2例は多断面迅速凍結病理を行っていない施設で診断された。6個のSLNは凍結診断では陰性であり、術後病理で陽性と診断された。1個は術中捺印細胞診でのみ陽性であった。1個は免疫組織学的検査(サイトケラチン染色)でのみ陽性であった。他の4個はHE染色の多断面で陽性と診断された。60例が多断面迅速凍結病理診断を1施設にて行われた。術中凍結診断は7例、12個のSLNが陽性でいずれにおいても頸部郭清がなされた。術中凍結診断は3例、3個のSLNで永久病理標本の診断と異なった(偽陰性)。多断面迅速凍結病理診断における感度は70%、特異度は100%、正診率は95%であった。術後治療は177例中22例で施行された。19例は術後照射(同時化学放射線療法6例を含む)を、3例は化学療法を受けた。放射線治療は原発部に4例、頸部に5例、



原発部及び頸部に 10 例行われた。  
 頸部再発は 17 例に認めた。患側の郭清野に再発を認めた症例が 3 例(2 例は手術にて救済、1 例は化学放射線治療を受けたが救済されず)であった。患側の郭清野外再発は 6 例(4 例は手術で救済、2 例は切除不能)、3 例は健側における郭清野外の再発例(2 例は手術および術後照射で救済、1 例は化学放射線療法施行も救済できず)であった。4 例は再発部位不明であった(3 例は手術で救済、1 例の死亡は原因不明であった)。その結果、11 例は非担癌生存、1 例は担癌生存、3 例は原病死(原発死)、1

例は他病死、1 例は原因不明の死亡であり頸部制御率は 98%であった。頸部再発は手術が可能であれば制御され得ると考えられた。174 例中、144 例は SLN 陰性であった。このうちの 2 例は非 SLN に転移が認められた。8 例は非郭清例で頸部後発転移を認めた。その結果、偽陰性率は 6.9%であった。口腔癌に関し T1 は 3.0%、T2 は 6%、T3 は 33%であった。偽陰性率において T1 と T3 の間には統計学的有意差を認めた (Fisher's exact test:  $p=0.03$ )。  
 (Yoshimoto S. Auris Nasus Larynx. 2011)

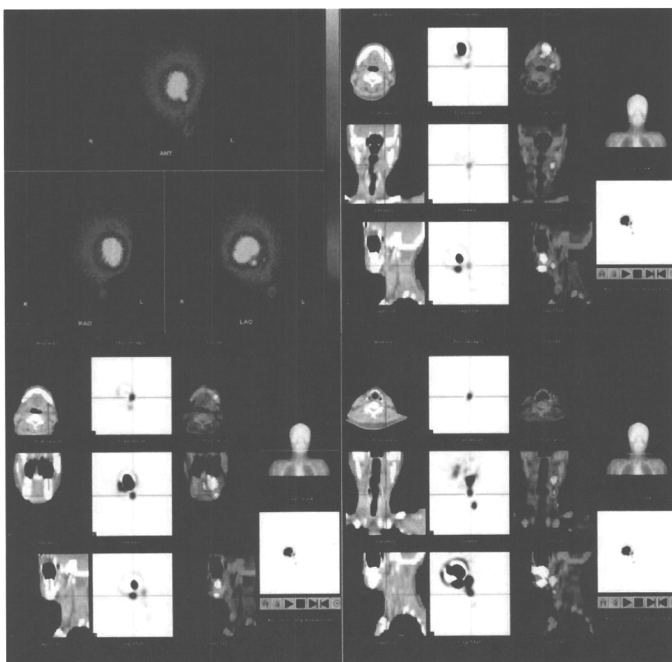


図 1. リンパシンチグラム及び SPECT/CT

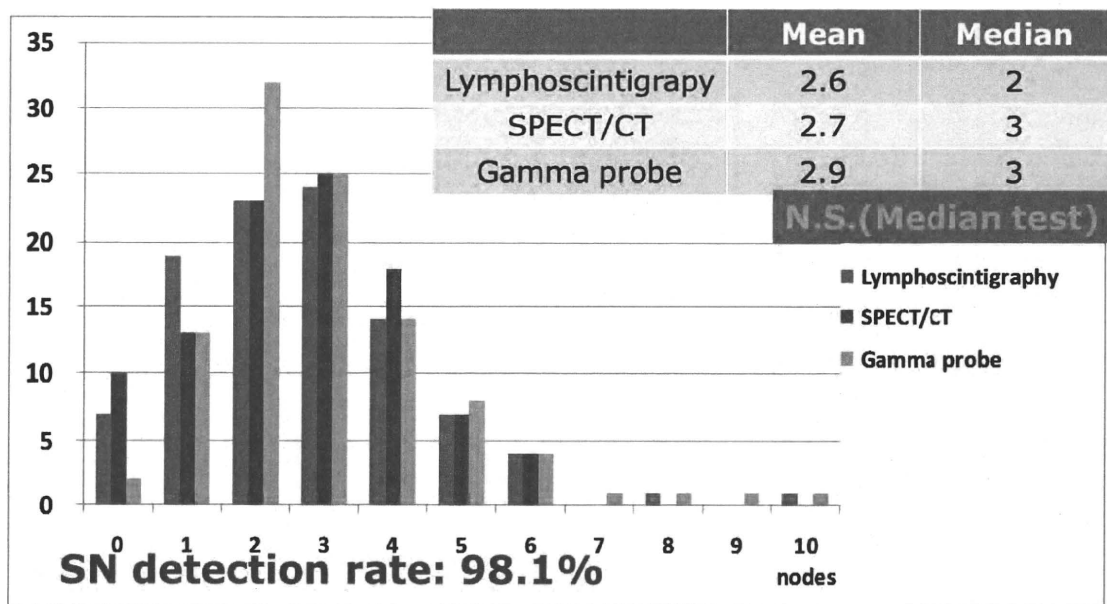


図 2. 口腔癌におけるリンパシンチ、SPECT/CT、ガンマプローブを用い検出した SLN

表 1. 口腔癌 157 例の臨床的および病理学的 TNM 分類

	N0	N1	N2a	N2b	N2c	N3	Total
T1	65	1	0	0	0	0	66
T2	80	2	0	1	0	0	83
T3	6	0	0	0	0	0	6
T4a	2	0	0	0	0	0	2
T4b	0	0	0	0	0	0	0
Total	153	3	0	1	0	0	157

	pN0	pN1	pN2a	pN2b	pN2c	pN3	Total
pT1	68	7	0	2	0	0	77
pT2	53	13	0	6	0	0	72
pT3	3	0	0	1	0	0	4
pT4a	2	1	0	1	0	0	4
pT4b	0	0	0	0	0	0	0
Total	126	21	0	10	0	0	157

2) 口腔癌に対する SN 生検術の研究

2-1. 口腔癌に対するセンチネルリンパ節ナビゲーション頸部郭清術の研究-臨床第 2 相試験-

SNナビゲーション頸部郭清術第 2 相試験を実施した。目的は臨床的にリンパ節転移を認めないlateT2とT3口腔癌症例について放射性トレーサーを用いたSN同定および生検を行い、SNナビゲーション領域頸部郭清術の有用性を検証することである。主要エンドポイントはSN領域のリンパ節転移偽陰性率である。登録期間年2年で、計56例(SN同定率95%、片側有意水準0.05、

パワー0.8)を登録予定数とした。代表施設での倫理委員会の承認を受け、昨年12月より臨床試験の登録を開始した。これまでに倫理委員会の承認を受け、Web登録の手続きを10施設で完了した。平成23年1月までの登録症例は35例で進捗状況は予定症例の63%である(図3)。やや登録が予定より遅れてはいるが重篤な有害事象の報告はない。中間解析では、SN領域リンパ節転移偽陰性率は3%、SN転移偽陰性率は7%で5例以上の偽陰性例はなく試験を継続は可能と判断された。

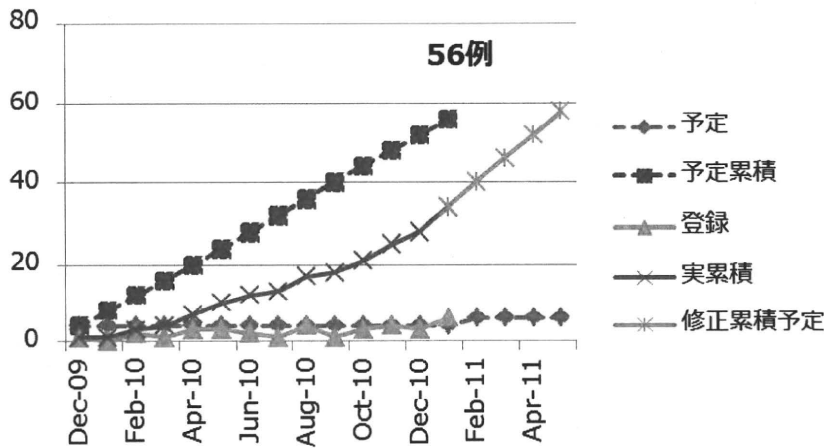


図 3. 症例登録の進捗状況(平成 23 年 1 月)

2-2. 口腔癌に対するSN生検術の有用性の  
検証-臨床第3相試験：

無作為化臨床試験を計画し立案した(図  
4.)。

目的：頭頸部癌において、センチネルリン  
パ節(SN)理論によるリンパ節微小転移機  
構の解明と個別的低侵襲治療法の開発を  
目指す。SNの概念に基づく診断法は、転移  
する最も可能性の高いリンパ節を直接同  
定し、微小段階で治療することを可能にし、  
予後不良な後発転移再発を防ぐことがで  
きる。

臨床的にリンパ節転移を認めない口腔  
癌症例についてラジオアイソトープ (rad  
ioisotope, RI) を用いたSN同定および生  
検を行い、センチネルリンパ節ナビゲー  
ション手術の予防的頸部郭清術に対する生  
存率の非劣性を検証する。

対象：口腔扁平上皮癌

適格基準：

- 1) リンパ節転移を認めない口腔癌lateT1  
～T2症例
- 2) 前治療のない初回手術治療例

- 3) 同意取得時の年齢が18歳以上の症例
- 4) 本人より文書による同意が得られてい  
る症例

実施計画：

本試験は、lateT1-T2N0口腔癌において、  
選択的頸部郭清術群に対するSNナビゲー  
ション頸部郭清術群の非劣性を評価する  
多施設共同無作為化比較試験(第Ⅲ相試験)  
である。

エンドポイント：主要エンドポイントは  
3年全生存率

目標症例数と設定根拠：

主エンドポイントである3年全生存率に  
ついて、SNナビゲーシオン頸部郭清術施  
行群および選択的頸部郭清術施行群はとも  
に85%と想定される。両群の間で臨床上許  
容できる3年生存率の差を12%として、こ  
れを片側 $\alpha=0.05$ と検出力80%の条件下に  
非劣性を証明するのに必要な症例数は一  
群116名となる。10%の不適合症例の可能  
性を考慮し、登録期間3年で予定症例数は2  
56名とした。

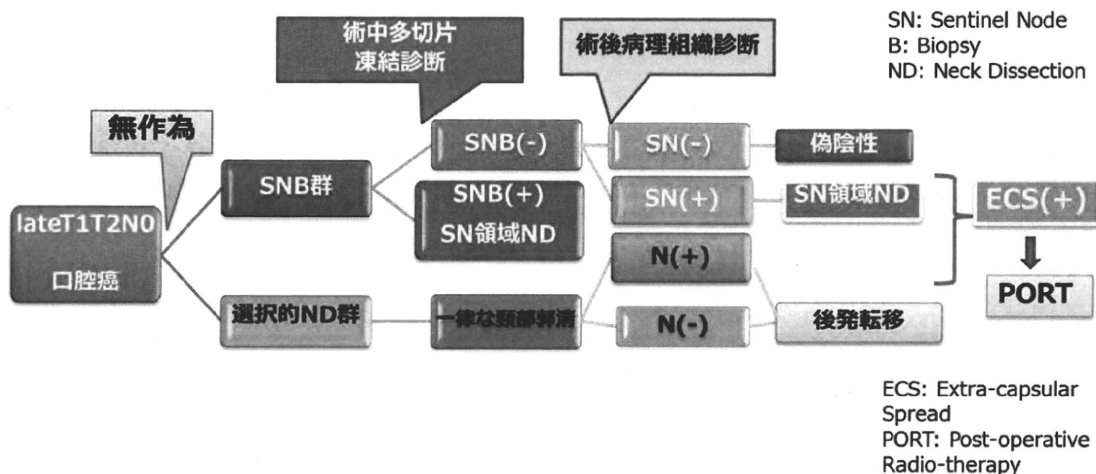


図4. 無作為化比較試験シエーマ

3) 中下咽頭癌に対するSN生検術の研究  
 経口的咽喉頭部分切除術における潜在的リンパ節転移の頻度や頸部郭清の必要性について、SNナビゲーション手術を行う対象を検討した。

前治療なく経口的に一塊切除しえた喉頭癌、下咽頭癌40例を対象とした。深達度が1mmを超える症例においては後発リンパ節転移をきたしうるため、このような症例においては予防的頸部郭清術やSNナビゲーション手術の適応と考えられた。経口的咽喉頭部分切除術においても術前評価で明らかな上皮内癌以外であれば (T1-T3, N0) SNナビゲーション手術の良い適応であると考えられた。(Tomifuji M. Ann Surg Oncol. 2011)

一方、咽喉頭領域で放射性トレーサーを用いることが可能な施設は限定されるため、放射性同位元素を用いないインドシアニンググリーン(ICG)蛍光法によるSN生検法が確立された段階で多施設共同研究を開始することに計画を変更した。

4) 分子生物学的手法によるSN微小転移検出とその臨床応用  
 サイトケラチン(CK)19mRNA をマーカー

としてOSNA法(One Step Nucleic Acid Amplification)を用いた「分子生物学的手法による頭頸部癌センチネルリンパ節転移診断の臨床的意義の検討」(資料1)の臨床試験を4施設で開始した。エンドポイントは病理組織診断転移検出能とOSNA法診断検出能に関する一致率とマーカーであるCK19のカットオフ値の設定である。乳がんでの結果より、頭頸部がんでもOSNA法は、感度95%、特異度93%が期待される。感度、特異度の信頼区間の幅が±10%となる為に必要なリンパ節の数は感度では病理検査陽性リンパ節19個、特異度では病理検査陰性リンパ節25個である。したがって、10%の不適合を考慮して予定リンパ節の数は感度では病理検査陽性リンパ節21個、特異度では病理検査陰性リンパ節28個とした。これまでに148リンパ節でOSNA法を実施した。OSNA法で20個が陽性、128個が陰性と判定された(表2.)。

他のマーカーの検索で、頭頸部癌17例を対象とした免疫組織学的検討では、SN転移を検索するマーカーとしては、CK19よりはCK903やCD44が有用と捉えられた。

表 2. OSNA 検査法と病理組織学的検査法の比較

OSNA	Pathological diagnosis of metastasis			Total
	Macro	Micro	None	
(++)	10	0	0	10
(+)	9	1	0	10
(-)	6	1	121	128
Total	25	2	121	148

5) 放射性同位元素を用いないセンチネルリンパ節診断法の開発

ICG の蛍光特性を利用して頭頸部領域の SLN を同定できるかを基礎的に検証した。ウサギ 6 羽に ICG を注入し 4 羽で経皮的にリンパ節の存在部位が視認できた。豚 8 頭では皮膚、脂肪層が厚く経皮的にはリンパ節の存在部位を同定できなかつた。リンパ節自体は蛍光発光しており脂肪層の中で ICG 集積リンパ節が可視化できた。リンパ節の存在部位を経皮的に視認できる深度は平均 2.5cm 位であり、それ以上の深度があると経皮的なリンパ節存在部位の視認には更なる工夫が必要と考えられた (Yamauchi K, Nagafuji H, Kohno N. Ann Surg Oncol, 2011)。

ICG 蛍光法については基礎研究を進め、口腔咽喉頭癌を対象に実行可能性臨床研究を計画した (資料 2)。RI 法と ICG 法を併用し、集積の一致性を検証する。本研究は登録予定症例数を 20 例とし、評価可能と想定される 18 例中の SN 同定率の 95%信頼区間の上限が、90%を下回るか否かにより検証する。

MRI法の基礎研究で、MRI造影剤SPIO ferucarbotran, ferumoxidesおよびGd含有造影剤であるgadoxetate sodiumいずれを用いてもリンパ節を描出しえた。ferucarbotranが持続的かつ良好に描出され優れた成績が得られた。

Open MRI装置を用いた臨床応用が期待される。SPECT/CTはInterstitial MRIよりも優れたSN描出能を示した。ガンマプローブとの併用により第一選択の検査法であると思われた。

臨床研究では磁性体造影剤でのMRIによる頸部リンパ節転移診断の有用性について、RI法を併用した症例で同一のリンパ節を磁性体造影剤で同定することができた。

6) SN 標的治療 (薬物療法) の研究

SN 理論に基づきリンパ管を利用した lymphatic chemotherapy を確立し、侵襲を与えずに、転移リンパ節に持続的に強力な効果を発揮する治療の実用化を目指した研究である。

「口腔癌における動注化学療法によるセンチネルリンパ節への薬剤の移行性とその臨床的意義の解明」の臨床研究を行った。2 症例に対して行い、SN のプラチナ濃度が非 SN に比して高い傾向が見られた。

薬物送達システム(DDS)の研究としては、キードラッグであるシスプラチンの内包ミセルと ADM をリポゾーム化した Doxil を用い、マウスの転移モデルにて薬剤の体内動態を解析した。リポゾーム化した薬剤の局所投与は血中への移行は軽度で、全身の障害を軽減しながらリンパ管経由で頸部や腋窩や縦隔リンパ節に 1 週後でも高濃度に滞留した。頭頸部癌の予後因子である転移リンパ節を lymphatic chemotherapy により制御できる可能性が示された。

D. 考察

1) 頭頸部癌センチネルリンパ節(SN)生検術手法のガイドラインの提案

SLN生検は日本では乳腺、皮膚メラノーマではすでに広く普及している。しかし頭頸部領域では未だ広く普及しているとは

いえない。臨床的にリンパ節転移を認めない舌癌でも約20-30%の潜在的頸部リンパ節転移がある。3mmスライス幅のCTとUSガイド下細胞診を施行したとしても微小転移を含むすべてのリンパ節転移を術前に診断するのは不可能である。

日本では比較的多くの施設で臨床的N0例に対しwait-and-see policyをとっている。その理由の一つとして日本の医療保険制度下では患者が容易に医療機関を受診でき、外来での慎重な経過観察が可能であることがあげられる。もし頸部リンパ節転移が見つければ、迅速に頸部郭清術を受けることが可能である。しかしそれでも頸部後発転移を認めた場合、生存率は有意に低下してしまう。それに対しては選択的（予防的）頸部郭清術を行うことにより解決され得る。しかしこれにも問題があり、臨床的N0症例の全例に頸部郭清がなされた場合約70%のpN0例が存在するため不必要な手術がなされることになる。さらには選択的頸部郭清術でも顔面神経下顎縁枝の麻痺や、副神経損傷による肩の挙上障害などの合併症の危険性は一定の割合で存在する。wait-and-seeか選択的頸部郭清術を行うのが良いかはいまだ議論の余地がある。頸部後発転移の危険性を術前に予測することが重要である。wait-and-seeは危険性の低い症例には適切であり、選択的頸部郭清術は危険性の高い症例には適切な治療法である。しかし実際には、頸部後発転移の危険性を予測することは容易ではない。腫瘍深達度は広く認められているパラメーターであるがそれも完全なものではない。SLN生検を行うことによりこれらの問題点は解消され得ると考える。

しかしこれが広く普及していない理由の一つとして、手技がやや煩雑になること（二期的手術が必要）があげられる。もし術中診断がより信頼性の高いものであるならばより広い普及が予想される。術中凍結迅速診断の信頼性に対し懐疑的な報告もあるが今回の調査からは多割面凍結標本による術中迅速診断は信頼性の高い診

断法といえる。そのため、われわれはSLN陽性例においては速やかに一次的に頸部郭清を行うことが可能であった。一次的な手技は患者の身体的、心理的負担を軽減することができ、二回の全身麻酔より合併症が減らせ合理的である。

今回の調査で、偽陰性率はこれまでの報告よりやや高い値であった。偽陰性の起こる原因として年齢、T-stage、原発部位、ラーニングカーブなどが報告されている。今回の検討ではT3症例がT1症例に比べ、偽陰性率は有意に高かった。このことからT3症例はSLN生検の必ずしもよい適応とならないことが示唆された。ラーニングカーブの観点からガンマプローブの使用にはやや熟練が必要と思われる。われわれはSPECT/CTとガンマプローブを併用することにより原発巣のShine throughを避け、確実にSLNを摘出することができた。

今回の調査から5症例の非SLN転移例は3例のSLN転移を含むものと、2例の非SLNのみの転移例が認められた。さらなる検討の結果、それらは1例を除き、センチネル流域に存在するのではなくバックアップ郭清領域に存在していたことが示された。SPECT/CTの有用性に統計学的有意差を認めることはできなかったが、SLN生検はSPECT/CTを併用することにより容易で正診率の高い、信頼性の高い診断法となることが示唆された。

## 2) 口腔癌に対するSN生検術の研究

口腔癌の治療において、潜在的リンパ節転移の可能性が高いグループでは予防的頸部郭清術を行い、低いグループでは、後発転移の出現を待つ治療的頸部郭清術を行うのが現状である。前者では多くの実際には転移のない症例に過大な手術が行われ、後者では過少な手術が行われることになる。また予防的頸部郭清術には機能障害の多い根治的郭清術を避け、機能温存を目指した選択的頸部郭清術が行われる。この一律の選択的頸部郭清術も個々の潜在的転移に対応していない。本試験では過不

足のない適切な頸部郭清術を実現する。口腔癌の治療におけるSNナビゲーション領域頸部郭清術の有効性を検証する。

口腔癌に関するSN 診断の報告は症例数が限られ、方法もそれぞれ異なった少数の報告が多い。SN 生検の有用性を検証するため、本試験のような方法論を統一した多数例での多施設共同研究が必須となる。

3) 中下咽頭癌に対するSN生検術の研究  
経口的切除法のNO咽喉頭癌で深達度が1 mmを超える症例で頸部郭清の適応を明らかにした。咽喉頭癌に対する経口法は低侵襲機能温存手術が可能であり、潜在的リンパ節転移にもICG法によるSN生検法を行うことでリンパ節に対する最適かつ低侵襲の新たな治療法が確立できると期待される。

4) 分子生物学的手法によるSN微小転移検出とその臨床応用

OSNA 法はリンパ節転移を迅速に診断できる新しい分子生物学的診断法で、乳癌を対象に開発された。他の領域ではOSNA 法の有用性は確認されていない。頭頸部癌の術中頸部リンパ節転移診断において、OSNA 法が迅速病理診断に比べ精確で簡便にできるかを検証する。扁平上皮の各種マーカーを用いて、更なる病理組織学的検討の必要がある。

5) 放射性同位元素を用いないセンチネルリンパ節診断法の開発

頸部は腔がなく、色素法による頸部全体の同定は困難でRI法が標準である。RIを用いないICG蛍光リンパ節造影法による経皮的頸部SN同定は画期的である。同法による頸部SN同定は国内外で行われていない。よってこの方法は非常に独創的である。また、頭頸部癌で磁性体造影剤を用いたSN同定の試みは殆どない。

6) SN 標的治療（薬物療法）の研究  
SN 標的薬物治療への展開は新たな研究

である。動注化学療法および DDS によるSN への薬剤の移行性と効果について基礎的および臨床的解明が必要である。

E. 結論

1) 頭頸部癌センチネルリンパ節(SN)生検術手法のガイドラインの提案

7施設、177例の頭頸部癌症例に対しSLN生検を行った。ガンマプローブにて533個のSLNを検出した。口腔癌458個、喉頭癌、下咽頭癌75個のSLNの同定率はそれぞれ98.1%、100%であった。533個のSLNのうち520個(病理結果が不明な13個のSLNを除く)を検討した。40個(7.7%)は永久病理診断で陽性であり、37個中5個(12.5%)において術中凍結迅速診断では診断できなかった

多断面迅速凍結病理診断の正診率は95%であった。37個中13個の陽性であったSLNで陰性のSLNよりガンマプローブの測定値が低かった。再発は17例10.7%に認められたが手術により救済できた。頸部の制御率は97.5%であり、偽陰性率は6.9%であった。多断面迅速凍結病理診断による分析は信頼性の高いものといえる。われわれはSLNの術中迅速診断による陽性例には一期的に速やかに頸部郭清術を行うことができた。これにより患者の身体的、心理的負担を二期的に行うことより軽減することができたと考えられる。

これらの結果を基礎データとして、頭頸部癌センチネルリンパ節生検法ガイドラインの作成を今後行う。

2) 口腔癌に対するSN生検術の研究

口腔癌に対するSN生検術の臨床第2相とそれに続く3相試験では過不足のない適切な頸部郭清術を検証する。口腔癌の治療におけるSNナビゲーション領域頸部郭清術の有効性を明らかにする。

3) 中下咽頭癌に対するSN生検術の研究

4) 分子生物学的手法によるSN微小転移

検出とその臨床応用

- 5) 放射性同位元素を用いないセンチネルリンパ節診断法の開発
- 6) SN 標的治療（薬物療法）の研究

より安全かつ正確な画像および分子生物学的診断法の研究では、OSNA法とICG蛍光法が頭頸部癌SNナビゲーション手術法の進歩に、飛躍的な展開をもたらすと考えられる。ICGの蛍光特性を利用して頭頸部領域のSNを同定できれば、従来はトレーサーにRIを使用していたため、医療従事者および被験者の被曝、施設の制限、手続きの煩雑さなどが解消され、どの施設でも行うことが可能となり、医療のきんてん化に役立つことが期待される。低コストのため医療費の削減にも寄与できる。

咽喉頭癌に対する経口的切除法ならば、非 RI法であるICG蛍光法を経口的到達法で行うことがより簡便で低侵襲である。

SN標的薬物療法の研究ではリンパ節転移に対する新たな薬物療法が確立されると期待される。

## F. 健康危険情報

これまでの研究で健康に危険を生じた報告はない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

①Terada A, Hasegawa Y, et al.: Follow-up after intraoperative sentinel node biopsy of N0 neck oral cancer patients. Eur Arch Otorhinola

ryngol. 268:429-435, 2010.

②丹生健一, 長谷川泰久, 他: 頭頸部がんの頸部リンパ節転移に対する標準的手術法の確立に関する研究 頸部郭清術の後遺症調査. 頭頸部癌36:82-88, 2010.

③花井信広, 長谷川泰久: N2-3症例で化学放射線治療後のリンパ節の治療は? 計画的頸部郭清術の立場から. J HONS 26:1699-1702, 2010.

④後藤満雄, 長谷川泰久: 舌扁平上皮癌二次症例における救済手術の予後一次症例との比較より. 日口外誌 56: 561-567, 2010.

⑤花井信広, 長谷川泰久, 他: 中下咽頭癌における計画的頸部郭清術の検討. 頭頸部癌 36:354-358, 2010.

⑥平川仁, 長谷川泰久: 頸部郭清術の新分類法—日本から世界に向けて, JO HNS, 27:161-165, 2011.

### 2. 学会発表

①長谷川泰久: 頭頸部癌に対するセンチネルリンパ節生検術の多施設共同研究, 第12回SNNS研究会学術集会, 2010, 横浜.

②Terada A, Hanai N, Ozawa T, Hirakawa H, Hasegawa Y: Follow up after sentinel lymph node biopsy in early oral cancer patients, The 7th International Sentinel Node Society Meeting, 2010, Yokohama.



資料1 OSNA法研究計画書

臨床研究実施計画書

分子生物学的手法による頭頸部癌センチネルリンパ節転移診断  
の臨床的意義の検討

研究代表者：愛知県がんセンター中央病院 頭頸部外科 長谷川泰久  
愛知県名古屋市千種区鹿子殿1番1号

TEL：052-762-6111

FAX：052-764-2944

E-mail:hasegawa@aichi-cc.jp

研究計画者：頭頸部癌 OSNA 法研究会

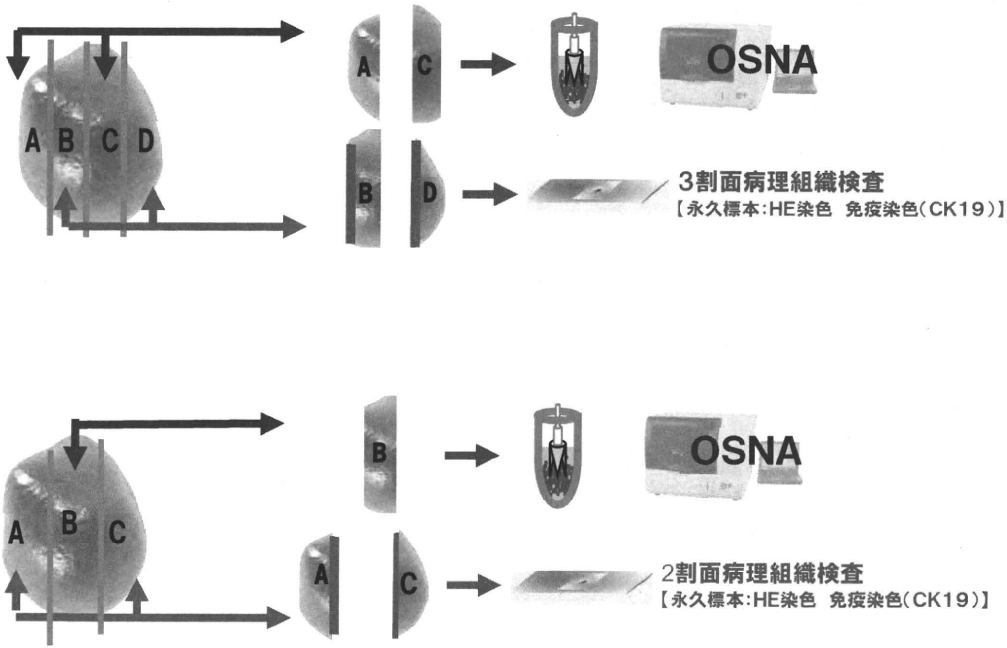
(代表：杏林大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科・頭頸科 甲能直幸)

第1版作成年月日：2009年11月9日

第1.1版作成年月日：2010年11月25日

第1.2版作成年月日：2011年5月17日

研究計画概要

研究名	分子生物学的手法による頭頸部癌リンパ節転移診断の臨床的意義の検討
本研究で用いる分子生物学的手法	OSNA 法 (CK19 mRNA をマーカーとしたリンパ節転移検査法)
OSNA 法の試験用法	<p>試験法の定義：</p> <p>摘出されたリンパ節を、2mm 幅スライスに長軸方向に分割する。</p> <p>4 分割では 2mm 幅スライス A と C または B と D の部分全てを OSNA 法に供し、転移陽性、陰性の判定を実施する。B と D または A と C の残りのリンパ節に関しては、HE、CK19、CKAE1/3 (センチネルリンパ節の場合) 染色用により病理診断を実施する。</p> <p>3 分割では B を OSNA 法に使い、A、C より切り出し標本を作製する。</p> <p>2 分割 (幅 4mm 以下の小リンパ節) では最大滑面で 2 分割し、どちらかを OSNA 法に他片を診断に供する。</p> <p>5 または 6 分割では各々 3、4 分割法に準じて行う。</p>  <p>図 1 OSNA 法の試験法 (乳腺変法)</p>
研究の目的	<p>本臨床研究では頭頸部扁平上皮癌のリンパ節微小転移診断における以下の項目について検討し、将来的にセンチネルリンパ節生検およびリンパ節転移術中迅速転移診断への応用を目的とする。</p> <p>(1) CK19 マーカーの妥当性</p> <p>① 病理組織診断転移検出能と OSNA 法診断検出能に関する一致率</p> <p>② CK19 マーカーのカットオフ値</p> <p>(2) センチネルリンパ節生検における OSNA 法応用の有用性についての検討</p>

<p>研究のデザイン</p>	<p>(1)方法          摘出されたリンパ節について、速やかに乳腺変法により OSNA 法を用いて転移陽性、陰性の判定を行う。残った 2mm スライスを用いて、迅速診断(センチネルリンパ節の場合)もしくは永久標本を作製し、H&amp;E、CK19、CKAE1/3(センチネルリンパ節の場合)染色を行い、病理組織検査に供する。試験法による判定と 1 割面病理組織検査による判定を比較する(※1)。          ※1 試験法によって少なくとも 1 つ以上のリンパ節が転移陽性と判定された症例を「試験法陽性症例」、それ以外を「試験法陰性症例」とする。また、病理組織検査によって少なくとも 1 つ以上のリンパ節が転移陽性と判断された症例を「病理組織検査陽性症例」、それ以外を「病理組織検査陰性症例」とする。</p>
<p>被験者および対象リンパ節の選択基準ならびに除外基準</p>	<p>後述する各施設における未治療頭頸部扁平上皮癌患者のリンパ節生検および頸部郭清術標本より摘出した頸部リンパ節とし、病理組織検査にて転移陽性と診断されたリンパ節 3 個～5 個および、その過程までに摘出された転移陰性リンパ節を対象とする。リンパ節としては、以下の要件を満たすものとする。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>① リンパ節は短径が 4mm 以上で 12mm 以下のものであること。</li> <li>② 内部壊死を伴う明らかな転移を認めないもの。</li> </ul> <p>頸部郭清組織が切除されてから 30 分以内に摘出、周囲組織のトリミング、サイズ測定を終了し液体窒素にて凍結処理が行われたものであること。</p> <p>被験者          &lt;選択基準&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>① 臨床所見によりリンパ節転移陰性 (N0) と診断された者で、リンパ節郭清に適用すると判断された症例(施設の基準に準ずる)</li> <li>② 本研究に参加することについて、同意が得られた者</li> </ul> <p>&lt;除外基準&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>① 術前補助療法を施された者</li> <li>③ 同意の能力を欠く者</li> <li>④ その他、責任(分担)医師により、研究参加が不相当と判断された者</li> </ul>
<p>OSNA 法と使用する試薬・機器等</p>	<p>(1) OSNA 法の原理          OSNA 法は、被検リンパ節の可溶化から遺伝子増幅反応までを 1 段階で行うリンパ節転移検査法である。遺伝子増幅原理として、RT-LAMP 法を利用している。          被検リンパ節をグリシン緩衝液(リノアーク)にて可溶化して採取したリンパ節可溶化液と、6 種類の CK 19 プライマー、4 種類のデオキシヌクレオチド三リン酸、逆転写酵素、DNA 合成酵素及び硫酸マグネシウムとを混合し、65℃の一定温度下で反応させる。リンパ節可溶化液中の CK19 mRNA をもとに、逆転写酵素により cDNA が合成される。この cDNA をもとに DNA 合成酵素により増幅反応が進行する。          DNA 増幅の検出は、反応副産物であるピロリン酸マグネシウム(白色沈殿物質)による濁度が所定の閾値を越えるまでの時間を測定することにより行う。CK19 mRNA 濃度と反応開始から濁度が所定の閾値を越えるまでの時間とは直線関係が成立することから、既知の CK19 mRNA 濃度より検量線を作成し、この検量線をもとに、測定試料中の CK19 mRNA 濃度を算出することができる。この算出された CK19 mRNA 濃度をあらかじめ設定したカットオフ値と比較することにより、リンパ節転移の陽性又は陰性を判定する。</p> <p>(2) 使用する試薬・機器等</p>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>・リノアンプBC (CK19 mRNA 検出試薬) (シスメックス社製)</li> <li>・リノアグ (リンパ節可溶化用グリシン緩衝液) (シスメックス社製)</li> <li>・RD-100i (遺伝子増幅検出装置) (シスメックス社製)</li> </ul>										
リンパ節転移陽性症例・陰性症例の判定基準	<p>(1) 試験法</p> <p>①陽性症例 : 少なくとも1つ以上のリンパ節が、試験法により「陽性」と判定された症例</p> <p>②陰性症例 : 全てのリンパ節が、試験法により「陰性」と判定された症例</p> <p>(2) 病理組織検査 (術迅速組織検査および永久標本確定検査)</p> <p>①陽性症例 : 少なくとも1つ以上のリンパ節が、1 割面病理組織検査により「陽性」と判定された症例</p> <p>②陰性症例 : 全てのリンパ節が、1 割面病理組織検査により「陰性」と判定された症例</p> <p>(1) 試験法</p> <p>① 陽性 : 測定結果が「++」、「+」および「反応阻害 (+i)」の場合</p> <table border="1" data-bbox="460 893 1341 1232"> <tr> <td>++</td> <td>測定サンプル中の CK19 mRNA の測定値 (コピー数) が 5000 copies/μL 以上の場合</td> </tr> <tr> <td>+</td> <td>測定サンプル中の CK19 mRNA の測定値 (コピー数) が 5000 copies/μL より少なく、かつ 250 copies/μL 以上の場合</td> </tr> <tr> <td>反応阻害 (+i)</td> <td>測定サンプル中の CK19 mRNA の測定値 (コピー数) が - または ND、かつ希釈サンプル中の CK19 mRNA の測定値 (コピー数) が 250 copies/μL 以上の場合</td> </tr> </table> <p>②陰性 : 測定結果が「-」または「ND」、かつ「反応阻害」が認められない場合</p> <table border="1" data-bbox="460 1352 1341 1650"> <tr> <td>-</td> <td>測定サンプルおよび希釈サンプル中の CK19 mRNA の測定値 (コピー数) が 250 copies/μL より少なく、かつ測定サンプル中の CK19 mRNA コピー数が測定時間内に検出された場合</td> </tr> <tr> <td>ND</td> <td>測定サンプル中の CK19 mRNA コピー数が測定時間内に検出されず、かつ希釈サンプル中の CK19 mRNA コピー数が 250 copies/μL より少なかった場合</td> </tr> </table> <p>注) OSNA 法では、前処理 (リンパ節可溶化) に供するリンパ節の重量を 1 テストあたり 600mg 以下に規定している。したがって、試験法に供するリンパ節ブロックの重量が 600mg を越える場合は、2 つ以上のブロックに分割し、各ブロックを 600mg 以下にして、それぞれのブロックを前処理・サンプル調製し、遺伝子増幅反応に付す。判定は、分割したリンパ節ブロックそれぞれについての測定結果が、全て「-」または「ND」の場合は陰性、いずれかが「++」「+」、「+i」の場合は陽性とする。なお、いずれかのブロックにおいて「++」と判定された場合は、そのリンパ節の判定は「++」とする。</p>	++	測定サンプル中の CK19 mRNA の測定値 (コピー数) が 5000 copies/μL 以上の場合	+	測定サンプル中の CK19 mRNA の測定値 (コピー数) が 5000 copies/μL より少なく、かつ 250 copies/μL 以上の場合	反応阻害 (+i)	測定サンプル中の CK19 mRNA の測定値 (コピー数) が - または ND、かつ希釈サンプル中の CK19 mRNA の測定値 (コピー数) が 250 copies/μL 以上の場合	-	測定サンプルおよび希釈サンプル中の CK19 mRNA の測定値 (コピー数) が 250 copies/μL より少なく、かつ測定サンプル中の CK19 mRNA コピー数が測定時間内に検出された場合	ND	測定サンプル中の CK19 mRNA コピー数が測定時間内に検出されず、かつ希釈サンプル中の CK19 mRNA コピー数が 250 copies/μL より少なかった場合
++	測定サンプル中の CK19 mRNA の測定値 (コピー数) が 5000 copies/μL 以上の場合										
+	測定サンプル中の CK19 mRNA の測定値 (コピー数) が 5000 copies/μL より少なく、かつ 250 copies/μL 以上の場合										
反応阻害 (+i)	測定サンプル中の CK19 mRNA の測定値 (コピー数) が - または ND、かつ希釈サンプル中の CK19 mRNA の測定値 (コピー数) が 250 copies/μL 以上の場合										
-	測定サンプルおよび希釈サンプル中の CK19 mRNA の測定値 (コピー数) が 250 copies/μL より少なく、かつ測定サンプル中の CK19 mRNA コピー数が測定時間内に検出された場合										
ND	測定サンプル中の CK19 mRNA コピー数が測定時間内に検出されず、かつ希釈サンプル中の CK19 mRNA コピー数が 250 copies/μL より少なかった場合										