

## E. 結論

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ある。

## G. 研究発表

1. 論文発表  
論文化予定
2. 学会発表  
未発表

分担研究報告書

頭頸部癌のセンチネルリンパ節検索の研究

研究分担者 大倉 康男 杏林大学医学部病理学教室教授

研究要旨

乳癌のセンチネルリンパ節（SN）転移の検索に OSNA（one step nucleic acid amplification）法が用いられているが、頭頸部領域の扁平上皮癌の SN 転移については検討中である。昨年度に行った口腔癌の検討では、CK19 陽性例は少なく、CK903 や p63 の mRNA をマーカーにする必要があると結論した。今回は、頭頸部領域の扁平上皮癌について、幹細胞マーカーとされる CD44 を加えて部位別の比較検討を行った。さらにリンパ節転移例は原発巣との比較検討をした。その結果、頭頸部癌のマーカー発現は病変部と LN 転移部での発現の違いは少なかったが、部位別に違いがみられた。原発巣の部位を考慮した OSNA 法の検討が必要であり、また頭頸部癌の 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。

A. 研究目的

OSNA（one step nucleic acid amplification）法による乳癌のセンチネルリンパ節（SN）転移の検索では CK19 の mRNA がマーカー遺伝子として用いられるが、頭頸部領域の扁平上皮癌の SN 転移については検討中である。CK19 は表皮の幹細胞を染色するマーカーであり、扁平上皮癌においても OSNA 法が有用な可能性がある。しかし、昨年度に行った口腔癌の検討では CK19 陽性例は少なく、CK903 や p63 の mRNA をマーカーにする必要があると結論した。今回は、頭頸部領域の扁平上皮癌について、幹細胞マーカーとされる CD44 を加えて頭頸部癌の部位別の検討を行った。さらにリンパ節（LN）転移例は原発巣との比較検討をした。

B. 研究方法

2005 年～2010 年に杏林大学医学部付属病院で手術された頭頸部癌 17 例（舌癌 6 例、下咽頭癌 5 例、喉頭癌 6 例）を対象とした。LN 転移例は 7 例（各 2 例、2 例、3 例）である。症例数が少ないことから、術直前に

化学療法を施行した症例や術前治療後の再発切除症例を加えている。

切除検体のホルマリン固定パラフィン切片を作製し、HE 染色および免疫組織化学的検索を行った。免疫染色に用いた一次抗体は、CK19、CK903、CD44、p63 である。

（倫理面への配慮）

手術材料は診断、研究に用いられることが同意されており、病理番号のみを用いて連結可能な匿名化を行い、患者の個人情報 は完全に保護された状態で使用した。

C. 研究結果

1) 術前治療の有無による染色性の違いは認められなかった。

2) 病変部では、CK903 は全例、CD44 は 14 例(82%)、CK19 と p63 は 12 例 (71%)が陽性であった。なお、CD44 は組織変性が目立つ組織で陰性を示した 2 例を除くと 93%が陽性であった。

3) 部位別には、CK903 は全部位で陽性を示した。CK19 は下咽頭癌では全例、喉頭癌では 5 例(83%)が陽性であったが、舌癌で

は 2 例 (33%) が陽性であった。p63 は舌癌と喉頭癌では 5 例 (83%) が陽性であったが、下咽頭癌では 2 例 (40%) が陽性であった。CD44 は舌癌と下咽頭癌では全例陽性を示し、喉頭癌では 3 例 (50%) が陽性であった。

4) LN 転移部では、CD44 は全例、CK903 は 6 例 (86%)、p63 は 5 例 (71%) が陽性であったが、CK19 は 3 例 (43%) が陽性であった。部位別には、CK903 は喉頭癌 1 例が陰性、p63 は下咽頭癌と喉頭癌で 1 例ずつ陰性、CK19 は舌癌と喉頭癌で 2 例ずつ陰性であった。

5) LN 転移部で陰性あるいは著明に減弱した症例は、CK19 と CK903 で 1 例ずつであった。p63 では 2 例が陰性であり、同一症例の異なる LN で染色性が異なるもの (一方が陽性で、他方が陰性) が 2 例認められた。

#### D. 考察

CK903 は病変部の全例が陽性であったが、CK19、CD44、p63 は陰性例が 20~30% で認められた。CK19 は舌癌で陰性例が多く、他部位との染色性の違いがみられた。LN 転移部では CD44 は全例、CK903 は 86% が陽性であるのに対して、CK19 は陽性が 43% であった。

また、病変部と LN 転移部での染色性の違いが頻度は少ないものの認められた。

部位によっては CK19 が有用であるが、頭頸部癌全体の SN 転移を検索するマーカーとしては CK19 よりは CK903 や CD44 が候補にあげられ、それらの mRNA がマーカー遺伝子となりうるかを検討する必要がある。また、原発巣によるマーカーの選択も考慮する必要もある。今回の検討は少数例であり、多数例を用いた検討が必要である。

#### E. 結論

頭頸部癌のマーカー発現は病変部と LN 転移部での発現の違いは少なかったが、部位別に違いがみられた。その結果からは、原発巣の部位を考慮した OSNA 法の検討が必要である。また、頭頸部癌の 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。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

分担研究報告書

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

研究分担者 小須田 茂 防衛医科大学校 放射線医学講座教授

研究要旨

動物モデルにおいて、超常磁性酸化鉄、superparamagnetic iron oxide (SPIO)とガドキセト酸ナトリウムを用いた頭頸部間質性MRリンパ造影によって、頭頸部領域のセンチネルリンパ節が検出されるかどうかを評価すること、および放射性コロイドによるSPECTとMRIによるセンチネルリンパ節描出能を対比することを目的とした。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よりも優れたセンチネルリンパ節描出能を示した。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。

A. 研究目的

動物モデルにおいて、超常磁性酸化鉄、superparamagnetic iron oxide (SPIO)とガドキセト酸ナトリウムを用いた頭頸部間質性MRリンパ造影によって、頭頸部領域のセンチネルリンパ節が検出されるかどうかを評価すること、および放射性コロイドによるSPECTとMRIによるセンチネルリンパ節描出能を対比することを目的とした。

B. 研究方法

BALB/c Slc-nu/nuマウスを用いた。3種類のMRI用造影剤、ferucarbotran (リゾビスト), ferumoxides (フェリデックス), gadoxetate sodium (EOB・プリモビスト)、それぞれを舌右縁の皮下に0.01 mLを局注した。局注後10-30分から24時間まで繰り返しMRI画像を採取した。撮影終了後、リンパ節組織を摘出し、その標本を対象に、T2\*強調画像とT1強調像 (SSFSE: single-shot fast spin-echo) を採取した。<sup>99m</sup>Tc-phytateを7.4 MBq, 0.02mLをヌードマウス舌 右側粘膜下に注入し、30分後にin vivo動物用全身SPECT/CT複

合型イメージングシステム NanoSPECT/CTを用いて30分間撮影した。用いた装置はCT: tube voltage 45kV, tube current 177 microA, ヘリカルスキャン SPECT: 1.4 mm径の9-hole multi-pinhole collimators, 3 detectorsである。

C. 研究結果

ferucarbotranとferumoxidesを投与後30分から24時間、左右の顎下リンパ節がT2\*強調画像で低信号として描出された。一方、gadoxetate sodium投与では10分から80分まで、経時的に信号は低下したものの左右の顎下リンパ節がT1強調画像で高信号として描出された。摘出標本の撮影では、ferucarbotran、ferumoxides投与ではT2\*強調画像で低信号として描出され、gadoxetate sodium投与ではT1強調画像で高信号として描出された。<sup>99m</sup>Tc-phytate投与SPECT/CTはshine-throughの問題点はあるものの、Interstitial MRIよりもSNを良好に描出できた。

D. 考察

今回のSPIOでは粒子径60~200nmの

ferucarbotranが投与24時間後まで持続的かつ良好に描出され優れた成績が得られた。ferucarbotranは生体内で粒子径が変化することが考えられる。鉄剤であるためマクロファージにより多く貪食され長時間リンパ節内に保持される可能性がある。ferumoxidesを用いても遜色のない結果であったが、翌日のMRI検査には不適と思われた。gadoxetate sodiumではリンパ節はT1強調画像で高信号として描出される利点があるものの、30分前後で信号が低下し、リンパ節の検出が困難となる。放射性コロイド製剤と比較して描出能がやや劣るのはSPI0の粒子径とその化学的性状の相違によるものと思われた。以上から、open型MRIを用いてferucarbotranによるセンチネルリンパ節ナビゲーション手術への臨床応用の可能性が示唆された。

#### E. 結論

MRI造影剤SPI0 ferucarbotran, ferum oxidesおよびGd含有造影剤であるgadoxe

tate 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。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

① Kitamura N, Kosuda S, et al.: Interstitial MR lymphography in the head and neck region using superparamagnetic iron oxides and gadoxetate sodium - preliminary animal study. The 7<sup>th</sup> International Sentinel Node Society Meeting, Yokohama, November 19, 2010.

分担研究報告書

OSNA 法による頭頸部癌リンパ節転移判定に関する研究

研究分担者 古屋 信彦 群馬大学医学部耳鼻咽喉科頭頸部外科教授

研究要旨

リンパ節可溶化から遺伝子増幅までを一工程で行う OSNA 法 (One-Step Nucleic acid Amplification assay) は、術中に短時間で転移リンパ節を同定できると期待される。既存の検査と同等の感度、特異度を持つ反面、30%になる偽陰性率が問題と思われる。偽陰性になる原因として mRNA の精製課程が省かれているためと推測され、精製の有無が転移の判定に及ぼす影響を調べた。メンブレン法とビーズ法の異なる精製方法を試み、時間的制約を受けない手技を確立した。15 分の手間を加えるのみで、OSNA 法の感度が 69%から 92%に、偽陰性が 21%から 8%に改善した。

A. 研究目的

リンパ節可溶化から遺伝子増幅までを自動で行う装置を利用する OSNA 法 (One-Step Nucleic acid Amplification assay) は、術中に短時間で転移リンパ節を同定できると期待される。既存の検査と同等の感度、特異度を持つ反面、20%近くになる偽陰性率が問題と思われる。偽陰性になる原因として mRNA の精製課程が省かれているためと推測され、精製の有無が転移の判定に及ぼす影響を調べた。

B. 研究方法

説明と同意を得て手術患者から採取したリンパ節 64 個を用い、半分を臨床病理診断に、残り半分を研究用途に使用した。OSNA 法はシスメックス社製 GD-100i を用い、サイトケラチン 19mRNA を標的遺伝子とするメーカー指定の試薬と消耗品を用いて行った。

1) 通常の OSNA 法

溶解液（リノアーク）中でホモゲナイズした後、遠心分離を行い、中間層を 500  $\mu$ l 取り出した後に、10 倍希釈、100 倍希釈の 2 系列を作成して、そのまま

精製せずに核酸増幅反応を行った。反応時間は 16 分で結果を判定した。

2) メンブレン法で total RNA を精製してから行う OSNA 法

上記 1) の残りの中間層 100  $\mu$ l を RNA pure Kit (TaKaRa 製) を用い、プロトコールどおりに精製した。精製した mRNA は 100  $\mu$ l のリノアークに溶解し、OSNA 法に適応した。精製には 30 分強費やすため、総検査時間は 1 時間弱に及んだ。

3) ビーズ法で mRNA を精製してから行う OSNA 法

上記 1) の残りの中間層 5-10  $\mu$ l を Dyna beads mini RNA Kit (Invitrogen 製) を用い、プロトコールどおりに精製した。mRNA は 100  $\mu$ l のリノアークに溶解し、OSNA 法に適応した。精製には 15 分弱しかかからず、総検査時間は 30 分強になった。

結果は、乳癌でエビデンスのある 250 コピー/ $\mu$ l 以上を陽性と判定した。

OSNA 法での結果を永久病理診断（パラフィン包埋切片 HE 染色、パンサイトケラチンの免疫染色）と比較し、感度、特異度、偽

陰性、偽陽性率を計算した。

偽陰性（病理診断では転移陽性も OSNA 法では陰性）のリンパ節については、細胞に定常的に発現する b-actin に対するプライマーを作成し、同一検体で反応を行い、mRNA が取れているか確認した。

（倫理面への配慮）

研究内容は群馬大学臨床試験審査委員会で承認されている（承認番号 652）。個人情報取り扱い、インフォームドコンセント、生命倫理委員会での申請の詳細については、平成 16 年 12 月施行通知、「臨床研究に関する倫理指針（厚生労働省告示第 459 号）」に則って行われた。また、医学研究として患者に不利益がないよう、ヘルシンキ宣言（日本名「ヒトを対象とする医学研究の倫理的原則」）に則って研究が行われた。

### C. 研究結果

永久病理診断では 64 個のリンパ節のうち、13 個が転移陽性で、51 個が陰性だった。病理診断と比較して、OSNA 原法での転移リンパ節検出の感度は 69%、特異度は 100%、偽陰性率は 31%、偽陽性率は 0%であった。RNA 精製のステップを加えた 2 つの方法ともに、感度は 92%、特異度は 100%、偽陽性率は 8%、偽陽性率は 0%であった。OSNA 原法の検体は精製過程を省略しているため、余分なタンパクや脂質など核酸増幅反応を抑制する物質が含まれていると推測された。

		病理診断	
		陽性	陰性
O S N A	陽性	9 69%	0 0%
	陰性		

	陰性	4 31%	33 100%
--	----	----------	------------

表 1 OSNA 原法での結果

		病理診断	
		陽性	陰性
O S N A	陽性	12 92%	0 0%
	陰性	1 8%	51 100%

表 2 RNA 精製を加えた OSNA での結果

### D. 考察

総じて OSNA 法による転移リンパ節の迅速診断は、臨床検査として十分な検出率を持つと思われる。特に特異度が 100%であり、転移陰性例を間違って転移ありと判断して過剰な治療を行うことが極めて稀であると思われ、臨床検査として安全に施行できるとと思われる。しかし、感度が 69%に留まることは、つまり見落とし症例（偽陰性）があることである。先行して保険診療として認められている乳癌での OSNA 法でも、感度は同程度の 72%に留まっていることを鑑みると、臨床検査としては許容範囲なのかもしれないが、癌の転移診断という重要な判定を下す検査としては、更なる感度の上昇を期待したい。今回、OSNA 法に 2 種類の RNA 精製ステップを加えることで感度を上げることに成功した。OSNA 法の利点は、16 分の反応時間で迅速に結果がでることであり、精製に時間がかかってはいけない。その点、ビーズ法は 15 分の追加時間のみで、

OSNA 法の利点を損なわない方法と思われた。

#### E. 結論

OSNA 法原法での感度は 69%にとどまるが、RNA 精製のステップを加えることで 92%にまで感度が上昇した。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし



分担研究報告書

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に関する  
研究

研究分担者 吉田 知之 東京医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科教授

研究要旨

口腔咽頭癌T1—2N0に対するSNのシンチグラム描出能は83%であった。同定可能であった5例のSNは1～5個（平均2.3個）であった。このセンチネルリンパ節を摘出し転移がみられないものには頸部リンパ節郭清を省略し後発転移の有無を検討した。その結果全例に2年間の観察にて後発転移は認めなかった。

A. 研究目的

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のため、口腔咽頭癌の後発転移を検討した。これらの中には臨床的N0症例の2～3割に潜在性の転移が存在するとされている。この為、Sentinel node navigation surgery (SNNS)が施行可能ならば、正確な頸部郭清術の適応が決定可能となると期待される。

B. 研究方法

口腔咽頭癌T1—2N0に対してセンチネルリンパ節を同定し摘出標本にて転移がみられないものには頸部リンパ節郭清を省略し後発転移の有無を検討した。

（倫理面への配慮）

当大学倫理委員会の許可を得て行った。この検討は被験者にとっても頸部郭清を回避可能であるメリットは多いと考えられる。

C. 研究結果

口腔咽頭癌T1—2N0に対するSNのシンチグラムにて同定可能であった5例のSNは平均2.3個であった。同定したセ

ンチネルリンパ節を摘出し転移がみられないものには頸部リンパ節郭清を省略し後発転移の有無を2年間経過観察を行った結果いずれにも後発転移はみられなかった。

D. 考察

少数のパイロットスタディではあるがセンチネルリンパ節に転移がみられないもので頸部リンパ節郭清を省略し2年以上経過観察し得た5症例には、いずれにも後発転移はみられなかった。このことからセンチネルリンパ節理論が成立する可能性が示唆される検討と思われる。しかし症例を重ねると擬陽性、偽陰性がみられるとの報告も多い。多施設による症例の蓄積が望まれる。

E. 結論

口腔咽頭癌T1—2N0においてはセンチネルリンパ節に転移がみられないものには頸部リンパ節郭清を省略できる可能性が示唆された。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に寄与するデータと考えられるとともに頭頸部腫瘍におけるSN理論の確立と更なる診断精度の改善により

頸部リンパ節転移診断の精度向上が期待できる。

G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

分担研究報告書

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に関する研究

研究分担者 永藤 裕 杏林大学医学部付属病院耳鼻咽喉科頭頸科 助教

研究要旨

センチネルリンパ節生検術を行うにあたり微小転移を正確にかつ迅速に診断することは重要なことである。しかし従来の迅速病理検査では微小転移を正確かつ迅速に診断できないのが現状である。栄研化学が考案した Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP 法) を応用した遺伝子抽出から増幅、検出までを約 20 分で終える One Step Nucleic acid Amplification (OSNA 法) は、遺伝子診断に要する時間がリンパ節摘出より 30 分以内となっており、乳癌のセンチネルリンパ節微小転移診断に既に臨床診断に適用されている。本臨床研究では頭頸部扁平上皮癌のリンパ節転移診断において CK19 マーカーの妥当性、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、CK19 マーカーのカットオフ値、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。

本研究で用いる OSNA 法の特徴は、リンパ節全体を検索して転移陽性、陰性の判定を行うため、リンパ節の一部分（剖面）しか転移を検索、観察できないという現行の病理組織検査の欠点が解消される。さらに、OSNA 法は専用の遺伝子増幅検出装置（RD-100: シスメックス社製）を用いて簡便な操作でリンパ節転移検査を行うことができる。現行のリンパ節転移検査では病理医の熟練度や主観にも左右されるが、OSNA 法を導入することにより、簡便かつ客観的にリンパ節転移検査を行うことができ、リンパ節転移検査の均てん化に貢献できると期待されている。

A. 研究目的

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いて現行法（病理組織顕微鏡検査）と分子標的手法との比較検討を行い、CK19 マーカーの妥当性、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、CK19 マーカーのカットオフ値、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。

B. 研究方法

対象リンパ節は、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、リンパ節は短径が 4mm 以上で 12mm 以下のもの、内部壊死を伴う明らかな転移を認めないもの要件を満たすものとする。

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。4 分割されたリンパ節をそれぞれ A, B, C, D とすると 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 染色により病理診断を実施する。3 分割では B を OSNA 法に使い、A、C より切り出し標本作製する。2 分割（幅 4mm 以下の小リンパ節）では最大剖面で 2

分割し、どちらかを OSNA 法に他片を診断に供する。

本研究で用いる OSNA 法は、被検リンパ節をグリシン緩衝液（リノアーク：シスメックス社製）にて可溶化して採取したリンパ節可溶化液と、6 種類の CK19 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°C 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。

### C. 研究結果

未治療頭頸部癌患者 8 症例 24 リンパ節について分子標的手法と従来の病理組織学的検査の比較検討を行った。症例の内訳は口腔癌 4 例、中咽頭癌 1 例、喉頭癌 2 例、下咽頭癌 1 例である。従来の病理組織学的検査では転移陽性リンパ節が 4 個、陰性が 20 個認められた。今回の転移陽性リンパ節はいずれも微小転移は認められず、すべてマクロ転移であった。

OSNA 法ではカットオフ値を測定サンプル中の CK19 mRNA の測定値（コピー数）250 copies/ $\mu$ L とした場合、転移陽性が 3 個、陰性が 21 個であった。感度 75% (3/4) 特

異度 100% (20/20) 偽陰性 4.2% (1/24) 一致率 95.8% であった。

### D. 考察

感度は 75%、特異度は 100% であり、CK19 をマーカーとして使用した分子標的手法を用いた癌リンパ節転移検出方法は、頭頸部扁平上皮癌において十分に臨床応用できる可能性が示唆された。しかし偽陰性は 4.1% あるため今後偽陰性症例のさらなる検討が必要と考えられた。CK19 を頭頸部扁平上皮癌リンパ節転移のマーカーとして使用することについては、特異度が 100% であり現時点では妥当であることが考えられた。今後カットオフ値の再検討、さらに分子標的手法の感度を上昇させる方法を検討する必要があると考えられた。

### E. 結論

今回頭頸部癌リンパ節転移を分子標的手法での解析結果と、従来の病理検査結果と比較検討することにより、分子標的手法による癌リンパ節転移検出の臨床的有用性を検討した。将来的に CK19 をマーカーとした OSNA 法が、頭頸部扁平上皮癌センチネルリンパ節転移術中迅速転移診断へ臨床応用が可能であることが示唆された。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

① Kohn N, Yamauchi K, Nagafuji H: Sentinel lymph node (SLN) Navigation surgery for node-negative head and neck squamous cell carcinoma (H&NSCC) patients, The 7th International Sentinel Node Society Meeting, 2010, Yokohama.

分担研究報告書

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

研究分担者 吉崎 智一 金沢大学医学部耳鼻咽喉科頭頸部外科 教授

研究要旨

頭頸部癌のリンパ節転移は重要な予後因子であり、その制御は治療成績の向上を期待できる。ナノテクノロジーのシンポに伴い、頭頸部癌治療のキードラッグであるシスプラチンを内包したシスプラチン内包ミセルが開発され従来と同等以上の抗腫瘍効果と有害事象の軽減が期待される。マウスの舌癌、頸部リンパ節転移モデルを用いて、それらの解析し、薬剤の体内動態を調べるのが本研究の目的である。さらにセンチネルリンパ節理論に基づき、ミセルのリンパ移行性、抗腫瘍効果、有害事象について検討する。

A. 研究目的

頭頸部癌の局所制御率向上に化学療法への期待は大きく、キードラッグであるシスプラチンの役割は依然として大きい。第二世代抗癌剤としてのミセル化シスプラチンは抗腫瘍効果の向上、有害事象の軽減するとの報告が主に胃癌など消化器癌で報告がある。本研究では頭頸部癌での治療応用に関して、センチネルリンパ節と絡めて薬剤動態（リンパ移行性など）、抗腫瘍効果、有害事象についてマウスモデルにおいて検討する。

B. 研究方法

ミセル化ナノ粒子（高分子ミセル）技術を用いて、薬剤をブロックコポリマーで封入したものが開発された（Cancer Res 2003）。ミセル化したシスプラチン

（NC-6004）、および従来のシスプラチンを用いて、舌癌の頸部リンパ節転移を起こしたマウスに投与することで、その抗腫瘍効果と薬剤副作用を従来のシスプラチンと比較検討する。

C. 研究結果

頭頸部癌細胞株である OSC-19, OSC-20,

HSC-2, HSC-3 細胞にそれぞれ 2 剤を添加し細胞増殖を測定したが細胞増殖抑制効果には有意差は認めなかった。さらに OSC-19 細胞において薬剤投与後のアポトーシスの指標である Caspase-3 活性を測定したが、シスプラチン投与群、ミセル化シスプラチン投与群とも Caspase-3 活性は亢進しアポトーシスの誘導を認めた。

D. 考察

in vitro においてシスプラチン、ミセル化シスプラチンとも細胞増殖抑制、アポトーシス抑制といった効果が確認できた。現在はヌードマウスの頸部リンパ節転移モデルに対してそれぞれ投与した際の抗腫瘍効果（腫瘍縮小率）、薬剤副作用（血液毒性、腎機能障害、末梢神経障害）などを検討し、NC-6004 の有用性を検証する予定である。ミセル化シスプラチンに特徴的な血中安定性と Drug Delivery System (DDS) に基づく癌組織に選択的に集積する効果を考慮すると、従来のシスプラチンよりより高濃度の薬剤投与が可能になるばかりでなく、シスプラチン動注化学療法において STS の中和が不要となる。これは動注療法に局所制御のみな

らず、全身投与と同等の転移巣制御といった効果も期待でき治療の幅が広がる。

#### E. 結論 今後の展開

ミセル化シスプラチンの *in vitro* での抗腫瘍効果を確認し、今後はマウスモデルにおいて上記に述べたように研究中である。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

分担研究報告書

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  
～磁性体造影剤を用いた MRI による頸部リンパ節転移診断～

研究分担者 上村 裕和 大阪府立成人病センター頭頸部外科 副部長

研究要旨

磁性体造影剤を用いた MRI 画像により口腔癌のリンパ節転移の評価を行い、センチネルリンパ節の同定や転移評価に利用可能か検討した。頭頸部 MRI で磁性体造影剤（リゾビスト）による造影効果が確認された症例でテクネシウムフチン酸による評価と一致する結果が得られた。磁性体造影剤を用いたセンチネルリンパ節の同定の可能性が示唆された。

A. 研究目的

磁性体造影剤を用いた MRI 画像により口腔癌のリンパ節転移の評価を行い、センチネルリンパ節の同定や転移評価に利用可能か検討することを目的とする。

B. 研究方法

磁性体造影剤（リゾビスト）を口腔癌手術症例の原発腫瘍周辺粘膜下に分割注射した後に頭頸部 MRI を施行した。注射後短時間での撮像を行った。本検査施行後には頸部郭清術と原発巣摘出を行い、磁性体造影剤の実際にリンパ節内に取り込まれたかを鉄染色で確認を行った。

頭頸部 MRI で磁性体造影剤（リゾビスト）による造影効果が確認された 1 症例ではテクネシウムフチン酸による評価と照合した。

C. 研究結果

500 倍および 50 倍希釈した磁性体造影剤は腫瘍周囲への注入後短時間（15 分、1 時間）では確認出来なかった。しかし、鉄染色を行ったところ頸部リンパ節に取り込まれていることは確認された。

この結果を受けて、リゾビスト注を原液で 0.016mL/kg（鉄として 0.45mg/kg=8 $\mu$

mol/kg）を注射したところ、注射後約 30 分での頭頸部 MRI で頸部リンパ節の造影効果が確認された。リゾビストにより検出されたセンチネルリンパ節と考えた。同一の症例でテクネシウムフチン酸を用いてセンチネルリンパ節の評価を行ったところ、リゾビストで造影効果が得られたリンパ節との一致を認めた。

（倫理面への配慮）

1. 研究の対象とする個人の人権の擁護  
本研究を実施するにあたってはヘルシンキ宣言を遵守し、次の点に十分配慮する。本試験への参加は本人の自由意志によってのみ決定される。参加しない場合にも、その後の診療で不利益を被ることが無く、当院での最善の診療を受けられる事を保証する。知り得た個人情報および本研究で得られた情報を漏洩しない。被験者の同定や照会は、登録時に発行される登録番号、被験者イニシャル、生年月、被験者識別コードを用いて行われる。又、結果の公表に際しても個人が同定される事がないように配慮される。
2. 被験者に理解を求め、同意を得る方法及び同意を得るに際しての説明内容  
口頭及び開示文書により被験者に同意を求め、口頭及び同意書にて同意を得る。

### 3. 研究によって生じる個人の不利益と医学上の利益または貢献度の予測

試験を続ける事の利益: 従来から行われている頸部郭清範囲の検証に役立つ情報が得られる。

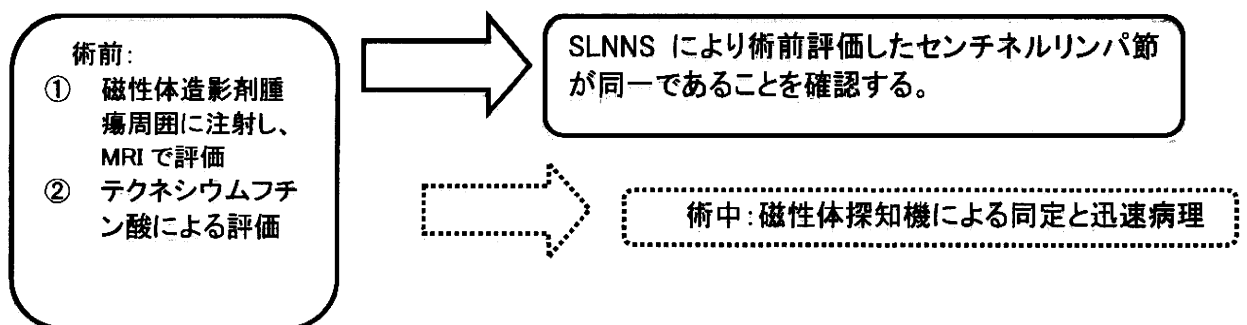
試験を続ける事の不利益: 磁性体造影剤を用いることによる合併症発生の危険性がある。

#### D. 考察

1. リゾビストによる造影効果が得られるリンパ節とテクネシウムフチン酸の一致がどの程度得られるかに関して症例数を重ね検討する必要がある。
2. その他の描出方法（拡散強調画像）との比較、あるいは複合応用を考え

たい。拡散強調画像が微小な転移を指摘しえる報告（転移部位や病巣によってはその他の検査よりも優れる）のあること、一度の検査でより多くの情報を得ること、一般的な造影MRIを行わなかった場合に不利益を回避することなどから一部方法の変更を検討している。

3. 頭頸部癌での磁性体探知機の臨床応用を考えている。本機器を使用すればアイソトープを用いたセンチネルリンパ節同定法の代替法となる可能性がある（現時点では薬事法上の問題が解決するまで臨床応用不可能な状態）。



#### E. 結論

頭頸部MRIで磁性体造影剤（リゾビスト）による造影効果が確認された症例でテクネシウムフチン酸による評価と一致する結果が得られた。磁性体造影剤を用いたセンチネルリンパ節の同定の可能性が示唆された。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし



分担研究報告書

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

研究分担者 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

研究要旨

頭頸部癌のセンチネルリンパ節（SN）については、2001年に頭頸部微小転移研究会（代表世話人：長谷川泰久）が設立され、5回の検討会が行われた。今回の研究では、臨床的にリンパ節転移を認めない口腔癌症例についてアイソトープを用いたSN同定および生検を行い、SNナビゲーション頸部郭清術の有用性を評価する。具体的にはT2-3口腔癌を対象にセンチネルリンパ節生検術を行う。その結果に従い、原則的頸部郭清範囲に加え、SNを認めた亜区域の郭清を行う。これらの経過などのデータを規定のフォーマットに記入し、連結可能匿名化したうえで、CD-Rにダウンロードし、調査研究責任者に郵送する。調査研究責任者は各施設からのデータを一括化し、口腔癌SN生検術についての臨床基礎データの質・量ともに信頼度の高いデータベースの構築を図る。

A. 研究目的

臨床的にリンパ節転移を認めない口腔癌についてアイソトープを用いた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頸部郭清術の有用性を評価する。主要エンドポイントはSNナビゲーション領域郭清術におけるSN領域のリンパ節転移偽陰性率とする。

B. 研究方法

LateT2-3N0 舌癌に対してSNナビゲーション頸部郭清術の安全性と有用性を評価する第II相試験。SNを認めるJND SGリンパ節分類亜区域を一括切除する。その領域の偽陰性率で妥当性を評価。各々症例は2年間追跡を行う。分担された各施設でそれぞれに登録を行い全体で56症例を目標症例数に行う。

（倫理面への配慮）

ヘルシンキ宣言および臨床研究に関する倫理指針の厳守、被験者へ文章および同

意書を作成、個人情報保護、施設のプロトコル倫理審査委員会の承認を得る。

C. 研究結果

4例の症例に登録できた。偽陰性率、予後などは今後経過観察とともに評価を加える予定である。

D. 考察

今後症例数を増やして行う予定。

E. 結論

今後症例数を増やして行う予定。

G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

分担研究報告書

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治療法の開発に関する研究

研究分担者 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

研究要旨

埼玉医科大学国際医療センターにて、口腔がんに対する SN 生検を施行する体制を構築し、倫理委員会承認後、1 症例に SN 生検を施行した。6 個の SN が同定できたが術中確認できたのは 3 個であり、それらは前日の SPECT で確認可能であった。残り 3 個は標本組織中からの確認であり、shine through 対策が重要であると思われた。

A. 研究目的

当院においても、乳がんや悪性黒色腫治療にセンチネルリンパ節 (SN) 生検は積極的に臨床応用されている。頭頸部癌、特に口腔がんはリンパ節転移の頻度が高く、その制御が予後を左右する。本研究は頭頸部癌特に口腔がんにおいて、乳がんと同様 Sentinel node navigation surgery が成立するかどうか検証することが目的である。

B. 研究方法

口腔がん lateT2, T3N0 症例に対して、センチネルリンパ節マッピングを行った後、頸部郭清術を施行し、SNL を検証する。

手術前日 99mTC 標識フチン酸を注入、SPECT 撮影を行う。当日、センチネルリンパ節生検後、頸部郭清を施行し、摘出標本組織においても SN の取り残しが無いか確認した。

SN の同定率、転移頻度、再発率など検討する。

(倫理面への配慮)

院内、倫理委員会の承認(10-039)、文書による患者の了承を得て施行している。

C. 研究結果

IRB 承認が遅れたため、症例集積開始が 11 月であり、SN 生検は 1 例にのみ施行されたのみであった。

SPECT で 3 個同定され、それらは術中ガンマプローブにて確認摘出されている。摘出標本からさらに 3 個 SN が確認された。2mm スライスで迅速、HE, CK 免疫染色いずれでも転移を認めなかった。

D. 考察

術中確認された SN のカウントはいずれも 100 以上であったが、標本中の SN は 60 以下であり、Shine through の影響が想定され、今後、SN 同定率の向上のため、遮蔽などの対策を要すると思われた。SPECT では 100 以上の高カウントの SN のみ、確認可能であった。

2010 年内に当施設に於いて、口腔がんが原発巣切除のみ施行した症例は 19 例に達しており、大半が本研究の対象であることから、口腔がんにおいて、SN リンパ節生検が成立する意義は大きい。

E. 結論

当院に於いて口腔がん N0 症例に対して SN 生検を施行する体制を構築した。1 例に SN 生検を施行し、6 個の SN が確認

された。SNを確実に同定するため、shine through 対策が必要と思われた。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

別添5  
雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Yoshimoto S,</u> <u>Hasegawa Y,</u> <u>Matsuzuka T,</u> <u>Shiotani A,</u> <u>Takahashi K,</u> <u>Kohno N,</u> <u>Yoshida T,</u> Kitano H.	Sentinel node biopsy for oral and laryngopharyngeal squamous cell carcinoma: a retrospective study of 177 patients in Japan	Auris Nasus Larynx		Epub ahead of print	2011
<u>Terada A,</u> <u>Hasegawa Y,</u> Yatabe Y, et al.	Follow-up after intraoperative sentinel node biopsy of N0 neck oral cancer patients	Eur Arch Otorhinolaryngol	268	429-435	2010
平川仁, <u>長谷川泰久</u>	頸部郭清術の新分類法－日本から世界に向けて	JOHNS	27	161-165	2011
花井信広, <u>長谷川泰久</u>	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－	JHONS	26	1699-1702	2010
後藤満雄, <u>長谷川泰久</u>	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－	日本口腔外科学会雑誌	56	561-567	2010
花井信広, <u>長谷川泰久,</u> 寺田聡広, 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
<u>Yamauchi K,</u> <u>Nagafuji H,</u> <u>Nakamura T,</u> Sato T, <u>Kohno N</u>	Feasibility of ICG Fluorescence-Guided Sentinel Node Biopsy in animal Models using the HyperEye Medical System	Ann Surg Oncol		e-pub ahead of print	2011
<u>松塚崇,</u> 三浦智広, 横山秀二, 他	OSNA 法による術中リンパ節転移検出の可能性	頭頸部外科	20	129-133	2010
Tomifuji M, Araki K, Yamashita T, <u>Shioani A</u> et al.	Tumor depth as a predictor of lymph node metastasis of supraglottic and hypopharyngeal cancers.	Ann Surg Oncol	18	490-496	2011