

3. 現行の病理検査とOSNA法を比較し転移診断の一致率を比較しOSNA法の性能を検討する。

(倫理面への配慮)

本研究で得られた情報は匿名化し、名前等の個人情報が公表しない。また、この臨床試験で得られた情報を取りまとめるために、個人を特定できる情報は記載しない。取りまとめられた情報を医学雑誌などに発表する場合も、個人が特定できないように配慮する。

本研究への参加に同意した後でも、既に経過観察を開始している場合でも、自由に同意を撤回でき、研究用の試料や解析の結果は廃棄する。診療記録も、それ以降は、本研究の目的に用いない。

C. 研究結果

頭頸部扁平上皮癌の治療および診断目的で採取した56症例の174リンパ節でOSNA法での解析結果を病理結果と比較した。内訳は病理で転移陽性のリンパ節が33個、転移陰性リンパ節が141個であった。

病理で転移陽性であった33個のリンパ節のうち25個はOSNA法で陽性で8個は陰性であった。病理で転移陰性であった141個のリンパ節のうちOSNA法ですべて陰性であった。

OSNA法で計測に用いるRD100iはCK19 mRNAのカットオフ値が250copy/ μ lに設定されているが、カットオフ値を131copys/ μ lに設定すると、迅速病理で転移陽性であった33リンパ節中28個はOSNA法で陽性であり、迅速病理で転移陰性であった141リンパ節のうち140個がOSNA法で陰性となった。

D. 考察

リンパ節内の癌細胞量をCK19のmRNA量の遺伝子コピー数に換算し、OSNA法ではそれに相当する濁度を検量線から算出

することにより定量的な検査結果が得られる。乳癌においては250copy/ μ l以上を陽性とし、腫瘍細胞の体積が2mm³にあたる5,000copy/ μ l以上を強陽性としている。今回の頭頸部癌を対象としたOSNA法の有用性を検討では、乳癌と比べてCK19mRNAの遺伝子数が少ない傾向がみられたが、カットオフ値を適正に設定することで有用性の高い検査となりえることが確かめられた。

E. 結論

CK19mRNAのコピー数のカットオフ値を131copys/ μ Lに設定すると、迅速病理で転移陽性であった33リンパ節中30個はOSNA法で陽性であり、迅速病理で転移陰性であった141リンパ節のうち140個がOSNA法で陰性となり、OSNA法での解析は従来の病理検査結果は97% (137/141個) で一致していた。

カットオフ値を適正に設定することで本結果から、OSNA法を用いた転移リンパ節の迅速診断は病理診断と同等の精度を持つ可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

① 松塚 崇、鈴木政博、三浦智広、横山秀二、國井美羽、西條 聡、大森孝一：シンポジウムII 口腔癌治療の新展開 センチネルリンパ節生検. 頭頸部外科21, 2012 (印刷中)

② 松塚 崇、三浦智広、鈴木政博 他：シンポジウム センチネルリンパ節生検の概要. 頭頸部癌 37(3) : 355-358, 2011

③ 三浦智広、松塚 崇、大森孝一：ここまで変わった頸部郭清術 頸部郭清術の新しい考え方 センチネルリンパ節生検. JOHNS 27 : 187-190, 2011

2. 学会発表

① 松塚崇, 大森 孝一、長谷川 泰久、谷田部 恭、高橋 克昌、永藤 裕、甲能 直幸： OSNA法による頭頸部扁平上皮癌の頸部リンパ節転移診断－4施設の集

計－. 第13回SNNS研究会学術集会

② 松塚 崇： シンポジウム「口腔癌治療の新展開」センチネルリンパ節生検.
第22日本頭頸部外科学会

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）

分担研究報告書

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

研究分担者 甲能 直幸 杏林大学医学部付属病院耳鼻咽喉科頭頸科学教室 教授

研究要旨

センチネルリンパ節 (SN) 生検を行う際、現在トレーサーにラジオアイソトープ (radioisotope, RI) を使用している。しかしこの手法は被験者および医療従事者の被曝、また RI を使用することによる施設制限というデメリットがあるため改善が必要である。インドシアニングリーン (ICG) には赤外光 (760-780nm) を当てると励起され、波長の異なる近赤外光 (800-850 nm) を発する蛍光特性を持つ。どちらも生体を透過しやすい波長光で、赤外線検出カメラ (Hyper Eye Medical System: HEMS 瑞徳医科工業製) で検出することにより、組織表面下の動態を非侵襲的に観察可能である。この ICG 蛍光特性を利用した SN 同定する手法を動物実験で臨床応用可能であることを以前証明した。今回この結果をもとに、舌癌症例で ICG 蛍光法の有用性について検証した。経皮的に蛍光発光する SN を HEMS で検出でき SN 生検術を施行した。計 3 つの SN 同定でき、RI の集積をそのうちの 2 つで確認できた。ICG 蛍光法を用いた SN 生検術は従来の RI 法での SN 生検術と同様に実行可能な手法であると考えられ、さらに RI 法の欠点を補うことができると考えられた。

A. 研究目的

現在 SN 生検術をする際トレーサーに 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の問題がある。しかし ICG の蛍光法で SN を同定できれば、可視化による診断精度の向上、RI を使用することによる問題の解消、さらに施設制限の解消により医療の均展化に役立つことが期待される。また RI を使用するより ICG の方が低コストのため、医療費の削減にも寄与できると考える。今回この手法を用いて臨床的にリンパ節転移を認めない舌癌症例に RI 法と ICG 蛍光法を同時に用いることで、ICG 蛍光法による SN 生検術の有用性について検証した。

B. 研究方法

臨床的に頸部リンパ節転移を認めない舌癌症例に、トレーサーとして RI (99m Tc

フチン酸) と ICG を用いた SN 生検術を行う。まず、手術前日に腫瘍周囲粘膜下 4 か所に RI を注入する。ICG は 25mg を 5mL の注射用水で溶解し、生検術 10 分前に ICG 1ml を腫瘍 4 か所の粘膜下に注入し約 10 分後に HEMS を使用して、経皮的に蛍光発光する SN を確認し、同時に ヲプローベ (neo2000) を用いて SN 生検術を行う。摘出した SN を RI と ICG の集積を比較検討することで、ICG 蛍光法の有用性を検証する。その後摘出した SN は術中迅速診断を行い、転移陽性ならば頸部郭性術 (ND) を、陰性ならば頸部郭清省略を行う Sentinel navigation surgery (SNNS) を行う。

(倫理面への配慮)

本研究は全てヘルシンキ宣言を遵守して実施する。臨床研究の遂行に当たっては「臨床研究に関する倫理指針」に基づいた研究計画を作成し、杏林大学病院倫

理委員会の承認を得る。試験前に「同位説明文・同意書」に基づき、研究内容などを患者に説明し、その後間を与え文書により自由意思のよる同意を得る。

C. 研究結果

経皮的に J1, 2 領域に蛍光発光する SN が HEMS で検出できた。蛍光発光する SN を生検し J1 に SN を 2 つ、J2 に SN を 1 つ確認した。J1 領域の SN は 2 つとも ICG と RI それぞれ集積していたが、J2 領域の SN は ICG のみ集積していた。J1 領域の SN1 に転移を認め、ND を施行した。(リンパ節領域の定義は INDSG 分類を使用した。)

D. 考察

動物実験では ICG 蛍光法を利用した SN の検出は、2.5cm 以上深い場合、皮膚が厚い場合は検出できなかつた。この症例は脂肪が多く、胸鎖乳突筋が発達した症例であったが、経皮的に蛍光発光する SN 確認することができた。ICG 蛍光法と RI 法を比較すると SN は一致しており、SN 同定率など同等の結果が残せる可能性が示唆された。ICG 蛍光法を用いた SN 生検術は従来の RI 法と同様に有用な手法であることが示せた。

E. 結論

ICG の蛍光特性を利用した SN 生検術は従来法と比べ、経皮的に SN を観察可能、医療従事者、被験者が被曝しないこと、術中にリアルタイムに使用できること、カラーで鮮明に写ることから SN を同定しやすいなど、色素法、RI 法の欠点を補うことができると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

① Yamauchi K, Nagafuji H, Nakamura T, Sato T, Kohno N. Feasibility of ICG fluorescence-guided sentinel node biopsy in animal models using the HyperEye Medical System. *Annals of surgical oncology*. 2011 18(7):2042-7.

② Yamauchi K, Fujioka Y, Kohno N. Sentinel node navigation surgery versus observation as a management strategy for early tongue carcinoma. *Head Neck*. 2012 34(4):568-72.

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 本間 明宏 北海道大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科頭頸部外科
准教授

研究要旨

近年、注目されているシスプラチンの超選択的動注療法を口腔癌の原発巣に対して行い、動注した薬剤がセンチネルリンパ節(SN)に高率に移行しているかどうかを検討した。5例に対して行い、非SNに比べSNに高い濃度のプラチナが検出され、動注した薬剤がSNに移行している可能性が示唆された。頸部リンパ節転移の制御は、治療成績の向上に直結するため、今後、動注化学療法を集学的治療の中に組み入れていきたい。

A. 研究目的

シスプラチンを口腔癌の原発巣に超選択的に動注を行い、その薬剤がセンチネルリンパ節に高率に移行しているかどうかを検討する。

に隣接する非SN8個のプラチナ濃度は平均 $0.506 \pm 0.274 \mu\text{g/g}$ ($0.07 \sim 1.070 \mu\text{g/g}$) と統計学的には有意差を認めた($t\text{-test } p=0.049$)。SN13個のうち7個に病理学的に転移が見られた。

B. 研究方法

口腔癌に対して術前にシスプラチンの超選択的動注療法を行い、手術時に原発巣の切除と頸部郭清術を行う。その際にセンチネルリンパ節生検も行い、リンパ節内のプラチナ組織内濃度を測定し、センチネルリンパ節への薬剤の移行性を検討する。また、超選択的動注療法によるリンパ節への組織学的効果についても検討する。

D. 考察

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、今後、動注化学療法を集学的治療の中に組み入れていきたい。頸部リンパ節転移は、口腔癌の重要な予後因子であり、口腔癌治療成績の向上に役立つものと期待できる。

(倫理面への配慮)

「ヘルシンキ宣言(2008年10月修正)」および「臨床研究に関する倫理指針(平成20年7月31日改正、以下臨床研究倫理指針)」を遵守して実施する。原稿

E. 結論

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、今後、動注化学療法を集学的治療の中に組み入れていきたい。

C. 研究結果

5症例に対して行い、13個のSNのプラチナ濃度は平均 $0.682 \pm 0.246 \mu\text{g/g}$ ($0.350 \sim 1.150 \mu\text{g/g}$)であった。SN

G. 研究発表

1. 論文発表

①Kano S, Homma A, Oridate N, Suzuki F, Hatakeyama H, Mizumachi T, Furusawa J, Sakashita T, Yoshida D, Onimaru R,

Shirato H, Fukuda S : Superselective arterial cisplatin infusion with concomitant radiation therapy for base of tongue cancer. *Oral Oncol* 47:665-70, 2011

② Homma A, Inamura N, Oridate N, Suzuki S, Hatakeyama H, Mizumachi T, Kano S, Sakashita T, Onimaru R, Yasuda K, Shirato H, Fukuda S : Concomitant weekly cisplatin and radiotherapy for head and neck cancer.

Jpn J Clin Oncol 41:980-6, 2011

③ Taki S, Homma A, Suzuki F, Oridate N, Hatakeyama H, Mizumachi T, Kano S, Furusawa J, Sakashita T, Inamura N, Yoshida D, Onimaru R, Shirato H, Fukuda S : Combined Modality Therapy for Locally Advanced Laryngeal Cancer with Superselective Intra-arterial Cisplatin Infusion with Concomitant Radiotherapy.

Int J Clinical Oncol (in press)

④ Homma A : Superselective Arterial Cisplatin Infusion with Concomitant Radiation Therapy for Advanced Nasal and Paranasal Sinus Carcinoma. Recent advances and research updates 12:197-211, 2011

⑤ Sakashita T, Homma A, Oridate N, Hatakeyama H, Kano S, Mizumachi T, Fukuda S : Evaluation of Nodal Response after Intra-arterial

Chemoradiation for Node-Positive Head and Neck Cancer.

Eur Arch Otorhinolaryngol (in press)

2. 学会発表

① Homma A, Sakashita T, Oridate N, Mizumachi T, Kano S, Furusawa J, Inamura N, Taki S, and Fukuda S : Symposium 9. Up to date therapy for sinonasal malignant tumors Superselective intra-arterial chemotherapy with concurrent radiotherapy for sinonasal malignant tumors.

14th International Rhinologic Society, 30th International Symposium Infection and Allergy of the Nose, September 22, 2011 (Tokyo, Japan)

② Homma A, Oridate N, Sakashita T, Yoshida D, Onimaru R, Tsuchiya K, Yasuda K, Suzuki S, Hatakeyama H, Mizumachi T, Kano S, Shirato H, Fukuda S : Symposium 1 Nasopharyngeal cancer and nasal cavity and paranasal sinus. Superselective Intra-arterial Infusion of Cisplatin and Concomitant Radiotehrapy for Paranasal Sinus Cancers. The 11th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery, December 8, 2011 (Kobe, Japan)

分担研究報告書

口腔癌、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

研究分担者 塩谷 彰浩 防衛医科大学校耳鼻咽喉科学講座 教授

研究要旨

口腔癌および咽喉頭癌におけるセンチネルリンパ節（SN）理論に基づくセンチネルリンパ節ナビゲーション手術（SNNS）の実行可能性について検証した。3 割面術中病理診断によるセンチネルリンパ節理論の正診率は 100%であり、SNNS は実行可能であると考えられた。また咽喉頭癌に対する経口的切除法と SNNS の組み合わせも実現性が高いと考えられた。OSNA 法に関しては 4 例中偽陽性 1 例、偽陰性 1 例を生じ、今後多施設共同研究での解析が必要とされる。RI 法を用いた SN 同定にかわる方法としての MRI 造影剤による SN 同定を行い、SPECT/CT と比較すると描出能は劣るものの SN の同定は可能であり、放射線被ばくの問題や設備の問題を解決する方法の一つとして今後のさらなる研究が期待される。

A. 研究目的

分担研究として咽喉頭癌におけるセンチネルリンパ節ナビゲーション手術（SNNS）の実行可能性の検討を行った。咽喉頭癌に対する SNNS 概念が高い精度で成立することは 95%の精度で成立することを既に報告しており、SNNS は郭清側の決定や郭清範囲の最適化に寄与する可能性があることを報告している (Tomifuji, Shiotani et al 2008)。本研究においては近年低侵襲治療として注目される咽喉頭癌の経口的切除術において SNNS の実行可能性を検証し、併せて咽喉頭癌に対する頸部外切開手術例においても SNNS の症例を積み重ね、エビデンスレベルの向上を目指した。

口腔癌における SNNS の実行可能性の検証にも多施設共同研究として参加し、画一化されたプロトコールに基づいた治療を行った。

微小転移の術中診断に関しては one-step nucleic acid amplification (OSNA) 法を用いた迅速診断法の検証にも多施設共同研究として参加してデータの

集積を行った。

現在センチネルリンパ節 SN の同定には RI 法が主に使用されているが、これにかわるものとして磁性体造影剤 (supermagnetic iron oxides: SPIO) やガドリニウム系造影剤による造影 MRI を用いた SN 同定法の検証を動物実験にて行った。

B. 研究方法

前治療なし、臨床的リンパ節転移なしの口腔癌 (late T2-T3)、咽喉頭癌 (声門癌は除く T1-T3) の症例に対して、十分な説明と同意を得たうえでテクネシウムフチン酸による SN の同定を行った。本研究では SNNS 実行可能性の検証であるため通常の予防的頸部郭清は行い、SN 理論の検証を行った。SN は 4 分割し、3 割面に対して術中迅速診断を行い、1 切片は CK19 をターゲットとした OSNA 法による分子生物学的診断を行った。

MRI を用いた SN の同定においてはマウスの舌に SPIO (陰性造影剤) である ferucarbotran とガドリニウム系造影剤

である gadoxetate disodium (Gd)を局注し、MRI での経時的变化を観察し、放射性コロイドによる SPECT/CT によるリンパ節描出能を比較評価した。評価は3人の放射線読影医によって行われ0: poor, 1: fair, 2: good, 3:excellent の評価づけを行った。

(倫理面への配慮)

解析を行う検体については被験者の秘密は保全されることを被験者に説明し、遵守した。本研究で得られた情報は匿名化し、被験者の名前等の個人情報が公表されることが無いように十分注意をした。検体の解析に当たっては防衛医科大学の倫理委員会において研究内容に関する審査を受け承認を得た。動物実験においては当院の倫理委員会にて審査を受けた上で実験を行っている。

C. 研究結果

本研究における症例は6症例（口腔癌4例、下咽頭癌2例）であり、いずれもSN理論に合致する結果であった（正診率100%）。口腔癌、咽喉頭癌の部位による技術的な差異はなく、いずれもSN理論に合致した結果を得ることができた。

下咽頭癌の1例は経口的切除とSNNSを併用した症例で、技術的には問題なく施行することが可能であった。結果的にはリンパ節転移陰性であったが、適切な予防的頸部郭清の範囲決定に寄与したものと思われる。

OSNA法に関しては4例に対して行い、1例に偽陽性、1例に偽陰性がみられた。この結果に関しては症例数が少ないため、本研究全体での解析を行うこととした。

MRIを用いたSNの同定手技に関してはSPIO、GdともにSNの同定が可能であった。SPIO、Gdを用いたMRIリンパ管造影とSPECT/CTの比較は3人の放射線読影医による半定量的評価ではMRIの平均スコアが1.44(SPIO)、1.67(Gd)、SPECT/CTが2.67であり、SPECT/CTのほうが良い

結果であった。なお造影剤の持続時間についてはSPIOは24時間後も造影効果が持続していたが、Gdの造影効果は10分で最大となり60分で消失した。

D. 考察

臨床例においては本研究プロトコールによるSNの同定率、SNの3割面による術中迅速病理診断の正診率は100%であり、非常に良好な結果といえる。

OSNA法では4例中偽陽性1例、偽陰性1例がみられた。偽陰性の1例では解析検体の両割面において転移巣がみられており、allocationの問題ではないと考えられた。偽陰性例が生じることは問題であるが、当施設だけの症例では症例数が少ないため多施設レベルでの解析が必要であると考えている。

MRIを用いたSN同定法の検証においてはSPIOは持続時間に優れ、Gdは画像の質においてすぐれているという結果であった。RI法を用いたSPECT/CTによる描出能には及ばない結果であったが、MRI法はRIの被曝がなく、またRIの設備がない施設においても可能であるという利点があり、一定の有用性が期待される。

E. 結論

口腔癌、咽喉頭癌ともにSNNSは実行可能であり、SN理論に一致した微小リンパ節転移の検出が可能である。咽喉頭癌においても経口的切除法とSNNSの併施が可能であり、より低侵襲な治療、起こりうる微小転移に対する個別化した治療が可能であるといえる。またSNNS普及の障壁となるRI法に代わるものとしてMRI造影の有用性についても基礎的な検討を行い、一定の有用性があることが証明した。

G. 研究発表

1. 論文発表

① Kitamura N, Kosuda S, Araki K, Tomifuji M, Mizokami D, Shiotani A, Shinmoto H, Fujii H, Ichihara K. Comparison of

animal studies between interstitial magnetic resonance lymphography and radiocolloid SPECT/CT lymphoscintigraphy in the head and neck region. Ann Nucl Med. 2012 Jan 12. [Epub ahead of print]

②Yamashita T, Tomifuji M, Araki K, Kurioka T, Shiotani A. Endoscopic transoral

oropharyngectomy using laparoscopic surgical instruments. Head Neck. 2011 Sep;33(9):1315-21.

③Yoshimoto S, Hasegawa Y, Matsuzuka T, Shiotani A, Takahashi K, Kohno N, Yoshida T, Kitano H. Sentinel node biopsy for oral and laryngopharyngeal squamous cell carcinoma: a retrospective study of 177 patients in Japan. Auris Nasus Larynx. 2012 Feb;39(1):65-70.

④Shiotani A, Tomifuji M, Araki K, Yamashita T. Transoral videolaryngoscopic surgery for en bloc resection of supraglottic and hypopharyngeal cancers.

Otolaryngol Head Neck Surg. 2011 Feb;144(2):288-9.

2. 学会発表

①低侵襲と個別化を目指す頸部郭清術
本邦での頭頸部癌センチネルリンパ節生検における臨床の現状. 吉本世一, 長谷川泰久, 松塚崇, 塩谷彰浩, 高橋克昌, 甲能直幸, 吉田知之, 北野博也. 頭頸部癌 37 巻 2 号 Page164(2011.05)

②咽喉頭癌に対する経口的切除術 下咽頭・声門上癌に対する Transoral videolaryngoscopic surgery(TOVS). 富藤雅之, 荒木幸仁, 山下拓, 塩谷彰浩. 頭頸部癌 37 巻 2 号 Page189(2011.05)

③頭頸部癌治療 最近の知見 喉頭・下咽頭癌に対する経口的咽喉頭部分切除術. 塩谷彰浩. 日本外科系連合学会誌 Page455(2011.05)

④当科における喉頭蓋・舌根部癌の経口的切除手術. 宮川義弘, 富藤雅之, 荒木幸仁, 塩谷彰浩. 耳鼻咽喉科展望 54 巻 3 号 Page184(2011.06)

⑤頭頸部センチネルリンパ節抽出における SPECT と MRI の対比. 平成 23 年度厚生労働科学研究費 長谷川斑 第 2 回班会議 2012.2.3 名古屋

⑥当科における頸部郭清術. 防衛医科大学 耳鼻咽喉科学講座. 山下拓, 荒木幸仁, 富藤雅之, 塩谷彰浩 他. 2012.3.29 第 1 回埼玉県頭頸部腫瘍セミナー

分担研究報告書

頭頸部癌におけるセンチネルリンパ節(SN)理論によるlymphatic chemotherapyの確立に関する研究

研究分担者 横山 純吉 順天堂大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸科 准教授

研究要旨

頭頸部癌の最大の予後因子である転移リンパ節の制御にセンチネルリンパ節(SN)理論に基づきリンパ管を利用したlymphatic chemotherapyを頭頸部癌で確立し、侵襲を与えずに、転移リンパ節に持続的に強力な治療効果を発揮する治療法の開発である。舌癌(T3N0M0)の原発巣にCDDPの動注療法を施行し、原発巣に投与した抗癌剤がSN理論によりリンパ管を経由し、SNに移行した。SNと非SNのCDDP濃度はそれぞれ、 $1.2\mu\text{g/g}$ 、 $0.35\mu\text{g/g}$ であり、有意差があった。標準法とされるアイソトープ(RI)の局注とICG(インドシアニングリーン)動注の蛍光法によるSN検出率について比較検討した。両法は感度、特異度等ほぼ同じ結果であったが、SNの内、転移を伴い輸入リンパ管の閉塞例ではRIの局注法では検出できない1症例(偽陰性)があった。ICG動注法では全ての転移を伴うSNを検出できた。ICG蛍光法は取り扱いが簡便で廉価でどの施設でも実施可能で、RI法の欠点であるShine-throughもなく頭頸部領域のlymphatic chemotherapy確立に有用な方法である。

A. 研究目的

舌癌(T3N0M0)の原発巣にCDDPの動注療法を施行し、原発巣に投与した抗癌剤がSN理論によりリンパ管を経由しSNリンパ節に移行するlymphatic chemotherapyを頭頸部癌で確立すること。

B. 研究方法

舌癌(T3N0M0)に腫瘍局所にCDDP50mg/m²を1週毎に2回動注し、1週後に切除した。動注前にCT-アンギオグラフィーにて転移リンパ節に動注されないのを確認した。手術前日にRIを腫瘍周囲に局注し、手術開始前にICG5mgを動注した。術中SNを確定し迅速診断施行した。コントロールとして顎下リンパ節の非SNを2個選択して、SNとCDDP濃度を比較検討した。

(倫理面への配慮)

本学の倫理委員会の承認をうけ、患者に十分インフォームドコンセントし、同意書を得た。

C. 研究結果

SN群と非SN群の平均CDDP濃度はそれぞれ $1.2\mu\text{g/g}$ 、 $0.35\mu\text{g/g}$ であり、有意差があった。7個の転移リンパ節の内RI法では1個検出できない偽陰性例があった。ICG蛍光法は全ての転移リンパ節を検出できていた。検出できなかった転移リンパ節は輸入リンパ管の閉塞例であった。

D. 考察

原発巣に投与した抗癌剤CDDPは、SN理論に基づきリンパ管を経由してリンパ節転移巣に集積した。しかもCDDPはリンパ節内に長期的に滞留し、頭頸部癌でもSN理論によりlymphatic chemotherapyが期待でき、理想的なTargeting Chemotherapyの可能性が期待できる。

また、ICG動注による蛍光法は、RI法の欠点であるリンパ管の閉塞や原発巣の影響を受けて検出できない“Shine-through”が無く、偽陰性がなかった。また、RIは取り扱いの制限があるが、ICG法は廉価

でどの施設でも実施できる利点がある。

E. 結論

舌癌にCDDPの動注を施行すると、SN理論に基づきリンパ管経由でSNに集積し、lymphatic chemotherapyの可能性が高い。ICG蛍光法はSN検出に有用であった。

G. 研究発表

1. 論文発表

① J Yokoyama, et al. A novel approach to translymphatic chemotherapy target-

ing sentinel lymph nodes of patients with oral cancer using intra-arterial chemotherapy - preliminary study. Head & Neck Oncology. 3;42-47, 2011

2. 学会発表

① J Yokoyama. A novel approach to translymphatic chemotherapy targeting sentinel lymph nodes of patients with oral cancer using intra-arterial chemotherapy. 11th Japan-Taiwan joint meeting. Decem 8, 2011. Kobe City

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）

分担研究報告書

頭頸部癌のセンチネルリンパ節検索の基礎的研究

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。これまでに行った検討では、CK19 陽性例は少なく、CK903 や CD44 が有用であり、それらの mRNA をマーカーにする必要があると結論した。今回は、検討症例数を増やすとともに、扁平上皮を広範囲に染色する CK5/6 を新たなマーカーとして加えて、頭頸部領域の扁平上皮癌を検索するための有用なマーカーを明らかにすることを目的とした。その結果、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 CK5/6 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、これまでの検討では CK19 陽性例は少なく、頭頸部の他の領域に比べて口腔癌では発現が著しく弱い結果であった。そして、頭頸部領域の扁平上皮癌を検索するマーカーとしては、CK903 や幹細胞を染色するとされる CD44 が有用であると捉えられた。今回は、検討症例数をさらに増やすとともに、扁平上皮を広範囲に染色する CK5/6 を新たなマーカーとして加えて、頭頸部領域の扁平上皮癌を検索するための有用なマーカーを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

2005 年～2011 年に杏林大学医学部付属病院と関連病院で手術された頭頸部癌 36 例（舌癌 10 例、下咽頭癌 16 例、喉頭癌

10 例）を対象とした。

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、CK5/6、CD44、p63 である。免疫染色の発現の程度を、不染及び軽度陽性（L）、中等度陽性（M）、高度陽性（H）と分けて評価した。

（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) 頭頸部癌全体では、CK903 は H 36 例であり、全例が高度陽性を示した。CK5/6 は H 34 例、M 1 例、L 1 例であり、大部分が高度陽性を示した。それに対して、p63 は H 25 例、M 5 例、L 5 例、CD44 は H 26 例、M 2 例、L 8 例であり、CK19 は H 12 例、M 13 例、L 11 例である。

2) 部位別には、CK903 は全部位で高度陽性を示した。CK5/6 も全部位で高度陽性を示す症例が多く、舌癌 9 例（90%）、下咽頭

癌 15 例(94%)、喉頭癌 10 例(100%)であった。p63 が高度陽性を示す症例は、舌癌 6 例(60%)、下咽頭癌 11 例(69%)、喉頭癌 6 例(60%)である。CD44 が高度陽性を示す症例は、舌癌 9 例(90%)、下咽頭癌 12 例(75%)、喉頭癌 5 例(50%)である。CK19 が高度陽性を示す症例は、舌癌 0 例、下咽頭癌 6 例(38%)、喉頭癌 5 例(50%)である。

D. 考察

CK903 ならびに CK5/6 はほぼ全例で高度陽性を示したが、CK19、CD44、p63 は、高度陽性例がそれぞれ 69%、72%、33%であった。部位別の違いは CK903、CK5/6、p63 では認められなかった。CD44 は高度陽性例が舌癌で多いのに対して、喉頭癌では少ないという違いがみられた。また、CK19 は舌癌では高度陽性例が認められず、下咽頭癌においても高度陽性例が低い結果であった。

頭頸部癌全体の SN 転移を検索するマーカーとしては、CK19 の高度陽性例は全部位で少なく、頭頸部癌の SN 転移を検索するマーカーとしては有用ではない結果である。また、CD44 は今回の結果では喉頭癌で高度陽性症例が少なく、有用なマーカーにはなりえない結果である。これまでの結果では CK903 や CD44 が SN 転移を検索するマーカーの候補にあげられたが、

今回の結果では CK903 や CK5/6 が有用と結論された。

E. 結論

頭頸部癌のマーカーとしては、ほぼ全例に高度陽性を示す CK903 や CK5/6 が有用である。CK19 は陽性率が低く、OSNA 法による SN 転移の検索は適当とはいえない結果である。今後は、CK903 や CK5/6 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、今回の結果を明らかにするためには、多数例を用いたさらなる検討が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担研究報告書

頭頸部領域における間質内MRリンパ造影と放射性コロイドによるSPECT/CT
リンパシンチグラフィ — 動物実験による比較検討

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

マウスを用いた比較試験で、頭頸部センチネルリンパ節描出能に関して、放射性コロイドSPECT/CTリンパシンチグラフィは間質内MRリンパ造影よりも優れた結果が得られた。しかし、頭頸部領域でSPIOもしくはferucarbotranを用いた間質内MRリンパ造影はセンチネルリンパ節生検に用いられる可能性が示された。

A. 研究目的

動物モデルを用いて、放射性コロイドによるSPECT/CTリンパシンチグラフィとSPIOとガドキセト酸ナトリウムによる間質内MRリンパ造影、という2つの手技をセンチネル描出能に関して比較評価すること。

B. 研究方法

8週齢の23~27 gのオスのヌードマウス (B ALB/c Slc-nu/nu)、21匹を用いた。99mTc-フチン酸、0.02 mL, 7.4 MBqを6匹のマウスの舌右縁、粘膜下に投与した。動物用全身SPECT/CTハイブリッドスキャナー、NanoSPECT/CTを用いた。ferucarbotran (レゾビスト®)を粘膜下局注後、30分、80分、110分、24時間にてT2*WIが撮影された。ferucarbotran, 鉄として0.279 mg, 6匹のマウスの舌右縁粘膜下に投与した。gadoxetate disodiumを6匹のマウスの舌右縁粘膜下局注後、10分、20分、30分、40分、50分、60分、70分、80分にて通常のT1WIが撮影された。gadoxetate disodiumの投与量は0.01 mL, 0.363 mgであった。間質内MRリンパ造影とSPECT/CTリンパシンチグラフィのリンパ節描出程度は4段階、すなわち、不良(スコア0)、可(スコア1)、良好(スコア2)、優良(スコア3)に分類され、3名の読影医によって視覚的、主観的に

スコア化された。

(倫理面への配慮)

この研究で行ったすべての処置は実験動物の管理と使用のための当施設ガイドラインに遵守した。

C. 研究結果

T2*WIでの時間信号強度グラフはferucarbotran間質内投与30分で、顎下リンパ節信号強度は投与前に比較して約1/2に低下した(投与前を1.0として、右: 0.43, 左: 0.61)。ferucarbotran投与後24時間までに信号強度は徐々に低下した。右側の顎下リンパ節の信号強度は左側よりも低値であった。gadoxetate disodium間質内投与のT1WIで得られた時間信号強度グラフでは投与後10分で最高値(投与前を1.0として、右側顎下リンパ節 1.43, 左側顎下リンパ節 1.33)が観察され、投与後80分にわたり徐々に低下した。右側顎下リンパ節の信号強度は左側顎下リンパ節のそれよりも高値を示した。Ferucarbotran, gadoxetate disodiumのいずれも、間質内MRリンパ造影では2つのリンパ節(左右顎下リンパ節)のみが描出された(平均描出節数: 2リンパ節)。間質内MRリンパ造影で描出されたリンパ節(左右顎下リンパ節)はSPECT/CTで描出されたリンパ節のうち、最も高い放射能を有したリンパ節に一致した。

3名の読影医によるセンチネルリンパ節描出能に関する間質内MRリンパ造影と、放射性コロイドによるSPECT/CTリンパシンチグラムの段階評価は、SPECT/CTリンパシンチグラムが間質内MRリンパ造影よりも優れた成績であった。3名の読影医による平均スコアは、SPIO ferucarbotran間質内MRリンパ造影 1.44、gadoxetate disodium間質内MRリンパ造影 1.67、SPECT/CTリンパシンチグラム 2.67であった。このように、平均スコアにおいてSPECT/CTリンパシンチグラムと間質内MRリンパ造影において統計学的有意差が認められた (two-factor mixed design with repeated measures on one factor: $p < 0.0002$)。

D. 考察

われわれの検討では、4.7テスラMRI装置で ferucarbotran, gadoxetate disodiumのいずれも、間質内MRリンパ造影で2つのリンパ節 (左右顎下リンパ節) のみが描出された。1.0~3.0テスラMRI装置でも、間質内MRリンパ造影は可能であると思われる^{8), 9)}。すべてのpulse sequenceで、注入側である右側顎下リンパ節は左側と比較して良好に描出され、時間信号強度グラフでも信号強度に左右差がみられたことから、右側顎下リンパ節がセンチネルリンパ節と思われた。舌癌患者での臨床報告でも、顎下リンパ節が高頻度に微小転移をきたすセンチネルリンパ節の一つである。最近、gadolinium-diethylene triamine-pentaacetic acid (Gd-DTPA)の一種で、脂溶性ethyl-oxy-benzyl群であるgadoxetate disodiumが肝細胞特異製剤として用いられている。SPIOと異なり、gadoxetate disodiumはナノ粒子ではない。gadoxetate disodiumは間質内MRリンパ造影として優れた造影剤との報告があり、われわれの研究でも使用した。リンパ節描出のための最適時間はこれまでの報告と一致した。画質に関しては、リンパ節を陽性描画するgadoxetate disodiumの方がferucarbotranよりも優れた結果を示

した。しかし、gadoxetate disodiumはリンパ節からの洗い出しが速いという難点を有している。一般に、造影剤 (鉄製剤) が急速に洗い出される場合、手術時体外から検知する手持ちmagnetmeterを使用するのが困難である一方、間質性MRリンパ造影を繰り返し行うことができる。gadoxetate disodiumとは対照的に、SPIOの細胞内取り込みと保持の程度は、投与量に依存し、緩徐に、連続的に5時間以上かけて集積する。Ultra-small SPIOと比較して、SPIOは大きさと陰イオンの関係から貪食能を有する細胞には取り込まれやすく、より高い集積性を示す。Shine-through現象は間質内MRリンパ造影でも認められた。造影剤を多量に投与したため縞状アーチファクトが注入部位周囲に認められた。マウスあたりの適正投与量を明確にする必要がある。われわれは、原液造影剤を使用したか、生理的食塩水で希釈するなどの対策は縞状アーチファクトを減じる可能性がある。さらに、多量の造影剤が粘膜下に投与されたため、注入部位とその周辺組織は腫脹、ferucarbotranで青褐色変化という副作用が現れた。しかし、注入局所の有害事象は原発巣とともに切除されるために、大きな問題ではないと思われる。

3人の読影医は間質内MRリンパ造影とSPECT/CTリンパシンチグラフィにおけるリンパ節描出そのものと画質を評価したが、SPECT/CTリンパシンチグラフィが間質内MRリンパ造影よりも優れた評点スコアであった。描出された平均リンパ節数は、間質内MRリンパ造影 2.0、SPECT/CTリンパシンチグラフィ 4.0であった。最高カウント数のリンパ節あるいは最初のechelonリンパ節に微小転移が必ずしもおこるとは限らないので、間質内MRリンパ造影は微小リンパ節転移を見逃す可能性がある。腫瘍からのリンパ流が同時に2, 3ルートを経由して発生することがありうるためリンパ管の描出ができれば真のセンチネルリンパ節を確認することは容易である。

E. 結論

放射性コロイドSPECT/CTリンパシンチグラフィは間質内MRリンパ造影よりも優れた結果が得られた。しかし、頭頸部領域でSPIOもしくはferucarbotranを用いた間質内MRリンパ造影はセンチネルリンパ節生検に用いられる可能性が示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

① Naoto Kitamura, Shigeru Kosuda, Koji Araki, Masayuki Tomifuji, Daisuke Mizokami, Akihiko Shiotani, Hiroshi Shinmoto, Hirofumi Fujii, Kiyoshi Ichihara. Comparison of animal studies between interstitial magnetic resonance lymphography and radiocolloid SPECT/CT lymphoscintigraphy in the head and neck region. *An Nucl Med* in press.

2. 学会発表

① 木下 亮、富田浩子、小須田茂、藤井博史、梅田 泉、河野正志. 頭頸部におけるSPIOとガドキセト酸を用いた組織MRIリンパ造影と放射性コロイドを用いたリンパ節描出の比較. 第51回日本核医学会学術総会. 平成23年10月28日, つくば市. (核医学 2011;48:S273) .

② S. Kosuda. Comparison of animal studies between interstitial magnetic resonance lymphography and radiocolloid SPECT/CT lymphoscintigraphy in the head and neck region. 10th Asia Oceania Congress of Nuclear Medicine and Biology. May 16-20, 2011, Tehran, Iran.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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 高橋 克昌 群馬大学耳鼻咽喉科頭頸部外科 講師

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。リンパ節転移の遺伝子マーカーとしてサイトケラチン19(CK19)を標的にしているが、頭頸部の扁平上皮癌では必ずしもCK19の発現は多くない。乳癌で決められた陽性と判定するコピー数のカットオフ値(250 copies/ μ l)を、頭頸部癌では下げなくてはならない(130 copies/ μ l)理由と考えられる。他の遺伝子マーカーについて同じ検査を行い、病理診断に対する感度や特異度を比較検討した。マトリライシン(MMP7)はCK19よりも感度は良いものの、特異度が低かった。現時点ではCK19が転移リンパ節の同定マーカーに最適と思われた。

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。しかし、扁平上皮癌に発現が低いとされるサイトケラチン19(CK19)を標的遺伝子マーカーにしている点が問題視されている。他の癌種と比較して、陽性になるコピー数のカットオフ値を下げなくてはならない(250 \rightarrow 130 copies/ μ l)理由と考えている。CK19以外のマーカーを検索する必要があると思われた。マトリライシン(MMP7)は細胞外マトリックスプロテアーゼと呼ばれる酵素群の一つで、癌細胞自身が分泌し、周囲のコラーゲンを初めとする支持組織を分解することから、局所転移や浸潤に関わっていると推定されている。MMP7を標的遺伝子マーカーにして、CK19との結果を比較検討した。

B. 研究方法

説明と同意を得て手術患者から採取した86個のリンパ節を用い、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、メーカー指定の試薬と消耗品を用いて行った。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 μ 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。

1) CK19を標的としたOSNA法
メーカー指定の反応試薬キットを用い、反応時間は16分で結果を判定した。

2) MMP7を標的としたOSNA法
オリゴプライマーは既報告の配列を参考に自作し、CK19キットと同じ条件になるように反応試薬を作成した。反応時間は32分で結果を判定した。

(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86個のリンパ節のうち、20個が転移陽性で、66個が陰性だった。病理診断と比較して、原法であるCK19を標的としたOSNA法での転移リンパ節検出の感度は80%、特異度は100%、偽陰性率は20%、偽陽性率は0%であった（表1）。対して、MMP7を標的としたOSNA法での転移リンパ節検出の感度は90%、特異度は89%、偽陰性率は10%、偽陽性率は11%であった（表2）。

表1 CK19を標的としたOSNA法

		病理診断	
		陽性	陰性
CK19	陽性	16 80%	0 0%
	陰性	4 20%	66 100%

表2 MMP7を標的としたOSNA法

		病理診断	
		陽性	陰性
MMP7	陽性	18 90%	7 11%
	陰性	2 10%	59 89%

D. 考察

従来法のCK19は特異度が100%、言い換えれば偽陽性が0%であるため、転移陰性を間違えて陽性に判断することはない。MMP7はCK19より感度が良いが（90%と80%）、偽陽性があるため特異度は下がる（89%と100%）。臨床検査という名目からは、過剰医療を避ける意味でCK19のほうが勝っていると思われる。しかもCK19のプライマーはよく設計されていて、短時間で立ち上がり、陽性と陰性がクリアカットに分かれた。MMP7では陽性例の立ち上がりが15分から21分頃と遅く、幅もあった。プライマーの設計や反応温度の見直しが、結果を改善するかもしれないが、よく練られたCK19の設計を覆すまでは至らないと思われる。

MMP7は癌細胞自身、特に癌組織巣の周辺で強く発現されることが分かっており、間質細胞からは検出されない。MMP7が検出されれば、その組織には必ず癌細胞が存在する仮定が成り立てば、転移リンパ節診断には最適なマーカーと予想した。結果、感度はCK19より良好も特異度が低かった。このMMP7でみられた偽陽性7例は、病理学的には検出できない微小転移が存在し、すでに転移

準備状態としてMMP7をmRNAレベルで発現しているとも解釈できるが、推測の域をでない。

E. 結論

MMP7を標的としたOSNA法も良い判定結果だったが、CK19を凌駕する程の結果ではなく、反応時間の短さからは、従来法のCK19に利点があると思われた。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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」を行った。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(RI)を用いたセンチネルリンパ節(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1症例にて評価することができた。

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RI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。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JNDSG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症例を目標症例数を行う。

(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、個人情報の保護、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

1症例を登録できた。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。

D. 考察

臨床的にリンパ節転移を認めない口腔癌症例についてRI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ことができた。

E. 結論

「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」を行い、1症例を登録した。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし