

図 7. CK19mRNA コピー値と病理診断の比較

表 5. コピー値と感度特異度

Copies / μ l	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	LR+	LR-
100	82.9	66.4-93.4	98.6	95.0-99.8	59.2	0.2
131	82.9	66.4-93.4	99.3	96.2-100.0	118.5	0.2
300	77.1	59.9-89.6	100.0	97.5-100.0	Not estimated	0.2

D. 考察

転移陽性率を縦軸、偽陽性率を横軸にして、ROC 曲線を求めた。AUC は 0.92 であった。一般的には、AUC の値に基づいて予測能・診断能を判断するが、OSNA 法による診断能は良好と判定された。ま

た、乳癌、胃癌、大腸癌の OSNA 法のカットオフ値は 250 コピー/ul であるが、これらは腺癌系であり、扁平上皮癌である頭頸部癌では 131 コピー/ul でほぼ同様の診断精度が得られた。

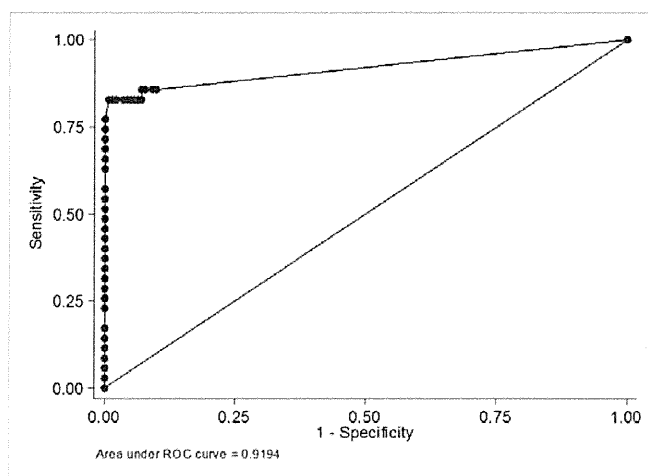


図 8. OSNA 法の ROC 曲線

表 6. 診断精度の他癌との比較

Cancer site	Cutoff (copies/ μ l)	Sensitivity	95%CI	Specificity	95%CI
Head and neck	131	82.9	66.4-93.4	99.3	96.2-100.0
Breast					
Tamaki et al.	250	95.0	75.1-99.9	97.1	91.8-99.4
Schem et al.	250	98.1	93.3-99.8	89.0	84.3-92.7
Visser et al.	250	95.3	86.9-99.0	94.7	91.3-97.0
Stomach	250	88.9	75.9-96.3	96.6	91.5-99.0
Colorectal	250	95.2	88.1-98.7	97.7	95.3-99.1

E. 結論

従来の病理組織学的検査に匹敵する分子生物学的リンパ節転移の診断法として、OSNA 法と免疫組織学的病理診断法を比較検討した。131 コピー/ul のカットオフ値にした場合、感度 83%、特異度 99%の結果が得られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

①松塚 崇、鈴木政博、三浦智広 他： 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. 頭頸部外科 22, 2012 (in press)

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.

④松塚 崇、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(2):129-133, 2010.

⑤松塚 崇、三浦智広、横山秀二 他: 頸部リンパ節手術—舌癌N0症例について—センチネルリンパ節生検と頸部郭清術. 耳鼻と臨床55(補1):S55-S62, 2009.

⑥松塚 崇、大森孝一: 舌癌T1-2N0症例の頸部リンパ節に対する治療方針は? センチネルリンパ節生検にて決定する立場から. JOHNS 25:1511-1514, 2009.

⑦Matsuzuka T, Takahashi K, Kawakita D, Kohno N, Nagafuji H, Yamauchi K, Suzuki M, Miura T, Furuya N, Yatabe Y, Matsuo K, Omori K, Hasegawa Y: Intraoperative molecular assessment for lymph node metastasis in head and neck squamous cell carcinoma using one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay. Ann Surg Oncol. in press, 2012.

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, 2011, 東京.

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, 2012, 福島.

③松塚 崇、長谷川泰久、三浦智広、永藤 裕、山内宏一、唐帆健浩、甲能直幸、大森孝一: 分子生物学的手法を用いた転移リンパ節の迅速診断. 第111回日本耳鼻咽喉科学会, 2010, 仙台.

④松塚 崇、三浦智広、横山秀二、野本幸男、國井美羽、西條 聡、大森孝一: OSNA法を用いた頭頸部癌のリンパ節転移の迅速診断. 第12回SNNS研究会学術集会, 2010, 横浜.

⑤松塚 崇、三浦智広、國井美羽、西條聡、大森孝一: OSNA法による頭頸部癌の頸部リンパ節転移診断. 第21回日本頭頸部外科学会, 2011, 宇都宮.

⑥松塚 崇、三浦智広、鈴木政博、他: OSNA法は術中のリンパ節転移を検出できるか. 第20回日本頭頸部外科学会, 2010, 東京.

研究 4) 非 RI 画像診断法の開発

臨床試験 (UMIN000006509) : インドシアニングリーン (ICG) 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

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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報告した (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。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した。

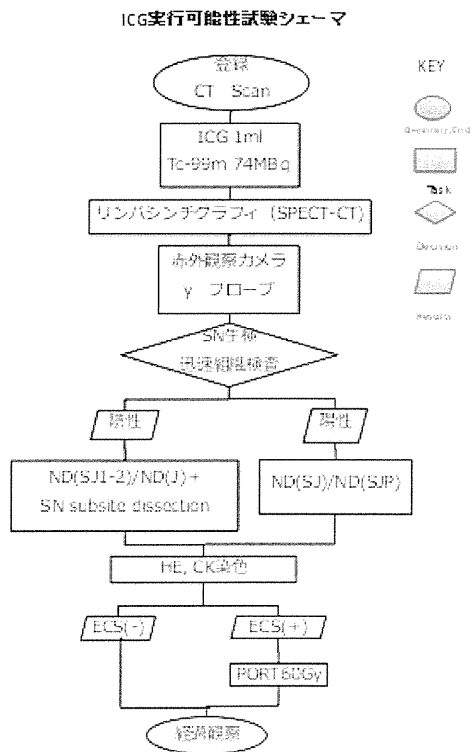


図 9. ICG 実行可能性試験シエーマ

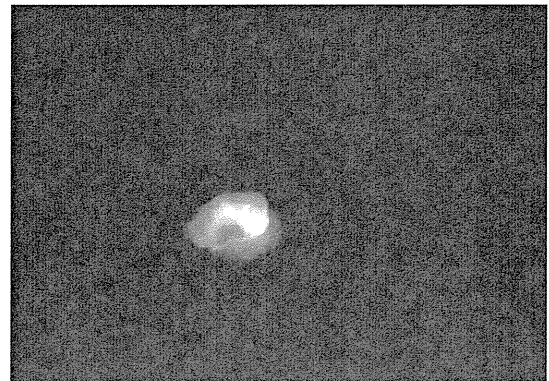


図 10. ICG 蛍光法

C. 研究結果

目標症例数は20例で、これまで16例

登録し、内15例、94%でRI法のセンチネルリンパ節をICG法で同定できた。

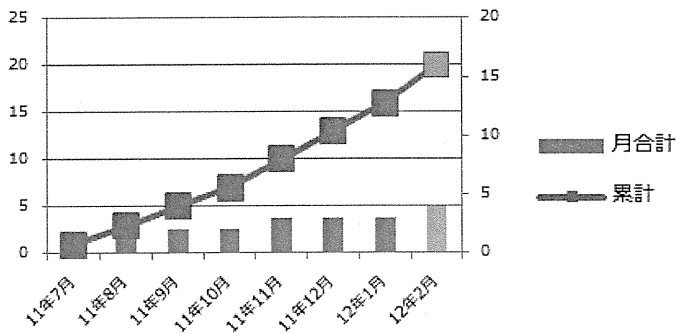


図 11. 症例登録の進捗状況

D. 考察

SN生検術には一般にトレーサーにRIを使用するため、不足する放射線診断医への対応、施設の制限、手続きの煩雑さなどが生じる。一方、非RI法では放射線防護設備器機と要員のない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、早期咽喉頭癌の診断が内視鏡特殊強観察の技術により可能となってきたが、治療法の確立は十分でない。特に潜在的リンパ節転移に対する低侵襲治療の開発は行われていない。咽喉頭癌にRI法を行う場合、内視鏡下注入が必要で制限があ

る。経口的切除法に非RIのSN生検法を併用する治療法は、最適かつ低侵襲な治療ができると期待される。

E. 結論

SN同定のために非RI法であるICG蛍光法の有用性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

(2) 分担研究

研究3) 咽喉頭癌に対する研究

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

研究要旨

経口的咽喉頭部分切除術とセンチネルリンパ節ナビゲーション手術の組み合わせが潜在的リンパ節転移も含めた咽喉頭癌の包括的な低侵襲手術となると期待される。早期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の適応としては明らかな上皮内癌を除いたT1-T3, N0症例が最も有用であると考えられる。次に、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

1. 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)。まず、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はまだ十分なデータがないため、過去に経口的咽喉頭部分切除術を施行した症例とリンパ節転移の有無について解析を行い、SNNS を加える至適条件を検討した。

2. 次に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。

3. 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。

4. 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多施設共同研究として参加してデータの集積を行った。

5. 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

1. 前治療の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。臨床的リンパ節転移陰性例については経過観察の方針として 1 年以上の観察期間が得られた症例を転移陰性例とした。後発頸部リンパ節転移に対しては頸部郭清を施行し、潜在的転移陽性例とした。原発巣の病理学的データ（水平方向径、厚さ、深達度、静脈侵襲、リンパ管侵襲、分化度）と頸部リンパ節転移の相関について単変量および多変量解析を行った。

2. 3. 4. 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。

5. 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 での経時的変化を観察し、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校の倫理委

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

1. 単変量解析の結果では基底膜からの深達度、静脈侵襲に有意差をみとめ、多変量解析では基底膜からの深達度へのみ有意差を認めた。深達度が 1mm を超える症例においては後発転移がみられた。また深達度が 0.5mm 以下の症例においてリンパ節転移陽性例は少なく、0.5-1mm の症例においては後発転移はないものの、初診時に既にリンパ節転移陽性の症例もあるため慎重な経過観察が必要である。

2. 3. 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と思われる。

4. 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、班研究全体での解析を行うこととした。

5. MRI を用いた SN の同定手技に関しては SPIO, Gd とともに 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

咽喉頭癌においては深達度が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SNNS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（具体的にはT1-T3, N0）SNNSの良い適応であると考えられた。

口腔癌、咽喉頭癌における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

咽喉頭癌においても原発巣を経口的に切除する低侵襲手術が可能となってきたおり、患者のQOL(Quality of Life)、術後合併症発生率の低下といったメリットがあるが、今後は頸部リンパ節転移に関してもSNNSを組み合わせることに必要最低限にして十分な治療が出来ることを期待される。現在のところ咽喉

頭癌に関してはT1-T3, N0症例がSNNSの良い適応であるといえる。

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

①Yamashita T, Tomifuji M, Araki K, Kurioka T, Shiotani A. Endoscopic transoral oropharyngectomy using laparoscopic surgical instruments. *Head Neck*. 33(9):1315-21 2011.

②Shiotani A, Tomifuji M, Araki K, Yamashita T. Transoral videolaryngoscopic surgery for en bloc resection of supraglottic and hypopharyngeal cancers. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 144(2):288-9, 2011.

③Tomifuji M, Imanishi Y, Araki K, Yamashita T, Yamamoto S, Kameyama K, Shiotani A. Tumor depth as a predictor of lymph node metastasis of supraglottic and hypopharyngeal cancers. *Ann Surg Oncol*. 18(2):490-6, 2011.

④山下拓、富藤雅之、齋藤康一郎、甲能直幸、塩谷彰浩：がん治療におけるセンチネルリンパ節の基礎的・臨床的知見 頭頸部がんに対するセンチネルリンパ節研究. *リンパ学* 32(1): 28-32, 2009.

2. 学会発表

①富藤雅之、荒木幸仁、山下拓、塩谷彰浩：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).
第 35 回日本頭頸部癌学会, 2011, 名古屋.

②塩谷彰浩: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. 第 36 回日本外科系連合学会誌, 2011, 東京.

③宮川義弘, 富藤雅之, 荒木幸仁, 塩谷彰浩:当科における喉頭蓋・舌根部癌の経口的切除手術. 第 7 回 頭頸部表在癌研究会, 2011. 東京.

④山下 拓, 荒木幸仁, 富藤雅之, 塩谷彰浩 他:当科における頸部郭清術. 第 1 回埼玉県頭頸部腫瘍セミナー, 2012.

⑤栗岡隆臣, 富藤雅之, 荒木幸仁, 塩谷彰浩 他: 喉頭癌、下咽頭癌に対する SNNS (Sentinel Node Navigation Surgery) . 第 12 回 SNNS 研究会学術集会, 2010, 横浜.

⑥塩谷彰浩、富藤雅之、荒木幸仁: 喉

頭癌・下咽頭癌に対する Sentinel Node Navigation Surgery. 第 62 回日本気管食道科学会シンポジウム, 2010, 別府.

⑦Araki K, Tomifuji M, Shiotani A et al:Sentinell Node Concept in Clinically N0 Laryngeal and Hypopharyngeal Cancer. The 7th international sentinel node society meeting, 2010, Yokohama.

⑧Kitamura N, Araki K, Kosuda S, Tomifuji M, Shiotani A, Shigematsu N, Fujii H: Interstitial MR Lymphography in the Head and Neck Region Using Superparamagnetic Iron Oxides and Gadoxetate Sodium -Preliminary Animal Study. The 7th international sentinel node society meeting, 2010, Yokohama.

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

① 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。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

1) 平成 21 年度は口腔癌 (舌癌) 症例を対象として検討した。平成 22 年度は、2005 年～2010 年に杏林大学医学部附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。平成 23 年度は、2005 年～2011 年に杏林大学医学部附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。

2) 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、平成 21 年度は CK19、CK903、p63 を用い、平成 22 年度は幹細胞のマーカーとされる CD44 を加えた。さらに、平成 23 年度は CK5/6 を加えて検討した。また、平成 23 年度は、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) 平成 21 年度 ; 口腔癌では 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。

2) 平成 22 年度 : 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。

3) 平成 23 年度 : 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。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。

CK903、CD44では、病変部とLN転移部での染色性の違いが頻度は少ない結果であった。

頭頸部癌全体のSN転移を検索するマーカーとしては、CK903やCK5/6が有用と結論された。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。

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。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

② 分子標的手法による頭頸部癌頸部リンパ節転移診断に関する研究

研究分担者 永藤 裕 杏林大学医学部耳鼻咽喉科頭頸科学教室 助教

研究要旨

分子生物学的手法を用いた OSNA (One-Step Nucleic Acid Amplification) 法では遺伝子診断が 30 分以内で可能であり、手術中にリンパ節転移を判定することができる迅速性を有している。既に乳癌で保健医療は可能となっているが、今回頭頸部癌症例を対象に分子標的手法での解析結果と従来の病理検査結果とを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。頭頸部扁平上皮癌の 24 リンパ節について従来の病理検査結果と比較検討を行った。感度 75% 特異度 100% 偽陰性 4.1% 一致率 95.8% であった。OSNA 法による転移リンパ節の迅速診断は病理組織学的検査と比較し十分な検出率を持つと考えられた。

また現在 OSNA 法では CK19 の mRNA がマーカー遺伝子として用いられるが、頭頸部扁平上皮癌において更に特異性の高いマーカーを検索し、今後 OSNA 法での診断精度を向上させるために、舌扁平上皮癌原発巣において 4 サイトケラチン (CK19, CK903, CK8/18, AE1/AE3) と p63 による免疫組織学的検討を行った。CK19, CK8/18 は有意差を持ってその他のものより弱く発現しており、p63 は全てのケースで強く発現されていた。頭頸部扁平上皮癌において p63 は CK19, CK903, CK8/18 より特異性の高いマーカーであると考えられた。

A. 研究目的

頭頸部癌領域における癌リンパ節転移検出を現行法 (病理組織学的検査) と分子標的手法との比較検討を行い、分子標的手法による癌リンパ節転移検出の有用性を検討し、将来的にセンチネルリンパ節 (SN) 転移術中迅速転移診断への応用を目的とする。また現在 OSNA 法では CK19 の mRNA がマーカー遺伝子として用いられるが、頭頸部扁平上皮癌において更に特異性の高いマーカーを検索し、OSNA 法での診断精度の更なる向上を目的とした。

B. 研究方法

摘出されたリンパ節を最大断面含む 2 mm 幅スライスとそれ以外の部分に長軸方向に分割する。分割されたリンパ節の半分を OSNA 法に、残りを H&E 染色、パンサイトケラチン染色を行い病理組織学的検査で微小転移を含む癌リンパ節転移を検出する。これらを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

有用性を検証する。また舌扁平上皮癌 17 例を対象に、CK19, CK903, CK8/18, AE1/AE3, p63 の 5 種類の抗体を用いて原発巣の免疫染色学的検討を行った。対象症例は 2002 年から 2009 年までに手術加療した 17 症例で、術前に化学療法や放射線治療をしていない症例のみとした。免疫染色の評価は Allred Score に準じ、intensity と proportion を併せて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究で行う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。また手術材料は診断、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

24 リンパ節について従来の病理検査結果と比較検討を行った。カットオフ値を250 copy/ul とした場合、感度 75% 特異度 100% 偽陰性 4.1% 一致率 95.8%であった。またサイトケラチン染色での微小転移検索は全てのリンパ節で認めなかった。

17 症例における CK19, CK903, p63, CK8/18, AE1/AE3 のそれぞれの平均 Proportion score, Intensity score, Total score はそれぞれ 1/1/3, 5/2/7, 5/3/8, 0/0/0/, 5/3/8 であった。

AE1/AE3 と p63 は全てのケースで強く発現されており、CK903 はそれらと比較するとやや弱く発現していた。CK19, CK8/18 は有意差を持ってその他のものより弱く発現していることがわかった。

D. 考察

分子標的手法を用いたリンパ節転移検出方法は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%ありこの症例に関しては今後さらなる検討が必要と考えられた。また乳癌において 250copy/ul 以上を陽性としているが、その陽性基準を当てはめると感度が十分とは言えず、感度を改善させるために頭頸部扁平上皮癌においてさらに特異性のある新たなマーカーの検討が必要と考えられた。

そこで頭頸部扁平上皮癌における新たな特異性のあるマーカーの検討したところ、p63 は CK19, CK903, CK8/18 より全例で強く発現しており、頭頸部癌の SN 転移を検索するマーカーとしてはCK19よりP63が有用と考えられた。

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有用性を検討した。OSNA 法での転移リンパ節検出法は従来法と同等の結果を得ることが可能であると考えられた。また頭頸部扁平上皮癌における新たな特異性のあるマーカーの検討したところ、舌癌 17 症例の検討では、CK19 より P63 が妥当なマーカーであると思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

① Yamauchi K, Fujioka Y, Kogashiwa Y, Kohno N: Quantitative expression study of four cytokeratins and p63 in squamous cell carcinoma of the tongue: suitability for sentinel node navigation surgery using one-step nucleic acid amplification. J Clin Pathol, 64(10): 875-9, 2011.

2. 学会発表

① 永藤裕、山内宏一、唐帆健浩、甲能直幸、松塚崇、大森孝一、長谷川泰久：耳鼻咽喉科頭頸科領域における OSNA 法臨床研究の展開。第 11 回 S N N S 研究会学術集会, 2009, 東京。

② 山内宏一、永藤 裕、唐帆健浩、甲能直幸、藤岡保範、金井好克：頭頸部癌における微小転移診断と治療戦略 第 11 回 S N N S 研究会学術集会, 2009, 東京。

③ 小倉 慶雄、山内 宏一、永藤 裕、藤岡 保範、小柏 靖直、甲能 直幸：舌癌の免疫染色学的検討 -OSNA 法における最適遺伝子。第 13 回 S N N S 研究会学術集会, 2011, 東京。

③ 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。既存の凍結切片による迅速病理診断と同等の感度、特異度を持つ反面、1) 核酸精製の手間を省くことが偽陰性を増している、2) 頭頸部癌に発現の少ないサイトケラチン19 (CK19) を標的にしている点が問題とされている。1) について、mRNA の精製課程の有無が転移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検討した。元のプロトコールに15分の手順を加えるのみで、OSNA法の感度が69%から92%に、偽陰性が21%から8%に改善した。偽陰性の原因は、頭頸部癌の転移リンパ節は中心部壊死を伴い、核酸増幅反応阻害物質が多く含まれるためと考察した。2) について、CK19以外の標的マーカーを検討した。CK19よりも感度が良かったのはマトリライシン (MMP7) であったが、特異度が低く偽陽性の取り扱いに苦慮した。感度、特異度、反応時間の短さから総合的に判断すると、もっともバランスが良いのは従来のCK19であった。

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。既存の凍結切片による迅速病理診断検査と同等の感度、特異度を持つ反面、高い偽陰性率が問題である。偽陰性になる原因として mRNA の精製課程を省くためと推測され、精製の有無が転移の判定に及ぼす影響を調べた。またサイトケラチン19 (CK19) 以外のプライマーを設計し、検査感度の検討をした。

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、CK19 mRNA 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。

I. mRNA 精製過程を加えた OSNA 法

① 通常の OSNA 法

溶解液 (リノアグ) 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。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 μ l を RNA pure Kit (TaKaRa 製) を用い、プロトコールどおりに精製した。特殊なメンブレンに結合した RNA は、最後に溶解液に溶かして抽出した。精製した RNA は 100 μ l のリノアグに溶解し、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 10 μ 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 末端の poly A に結合する塩基配列がナノサイズの磁性ビーズに付着している。磁石にて mRNA のみをスピッツの側面に固定したまま、洗浄を行い、余分なタンパクや DNA から分離精製した。mRNA は 100 μ l のリノアグに溶解し、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/ μ 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。

II. 新しい標的遺伝子の検討

① 候補標的遺伝子に対するプライマー設計

頭頸部癌の転移リンパ節で発現が増強している遺伝子を過去の論文から選び出し、プライマーを設計した。OSNA 法の原法である LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法プライマー設計ソフト(栄研化学 <http://primerexplorer.jp/>) を用いて、OSNA 法の反応温度 65 度に最適なプライマーを選択した。

② プライマーの比較検討

扁平上皮癌抗原 1 と 2 (SCC-1 and 2)、尋常性天疱瘡抗原 (pva)、マトリライシン

(MMP7) について 65 度で反応するプライマーを作成し、LAMP 法試薬を用いて通常の OSNA 法を行い、CK19 における結果と比較した。

(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)。個人情報の取り扱い、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

I. mRNA 精製過程を加えた OSNA 法

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%、偽陰性率は 8%、偽陽性率は 0% であった(表 1)。

II. 新しい標的遺伝子の検討

SCC 1 and 2、pva の各遺伝子を標的にした際は、病理診断と比較して十分な転移の有無を判定する結果にはならなかった。対して MMP7 では原法に匹敵する判定結果が得られた

(図 1 と 2)。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。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)。

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、転移陰性例を間違えて転移ありと判断する過剰治療が極めて稀であり、臨床検査として安全に施行できると思われる。しかし、感度が 69% に留まることは、換言すると見落とし例（偽陰性）があると言える。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。特に頭頸部癌の転移リンパ節は中心部壊死を伴い、サンプルには変性したタンパク質が混入しやすい。実際、10 倍希釈系列では増幅反応が生じず（偽陰性）、100 倍系列で初めて増幅される現象を多く経験する。これは、十分な希釈によって阻害物質の濃度が下がり、酵素による核酸増幅が始まると解釈される。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。

MMP7 は癌細胞自身、特に癌組織巢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 より良好だが、特異度が低い点が問題であった。MMP7 を標的とした際に検出された偽陽性 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。

OSNA 法原法である CK19 プライマーはよく設計されていて、短時間で立ち上がり、陽性と陰性と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、反応時間に幅があった。プライマーの設計や反応温度の見直しは、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。

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。

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。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

表 1 OSNA原法とRNA精製ステップを加えた感度の比較

	感度	特異度	偽陽性	偽陰性	一致率
OSNA法	69%	100%	0%	31%	94%
	9/13	51/51	0/51	4/13	60/64
RNA精製	92%	100%	0%	8%	98%
	12/13	51/51	0/51	1/13	63/64

表 2 CK19とMMP7を標的にしたOSNA法の感度の比較

	感度	特異度	偽陽性	偽陰性	一致率
CK19	80%	100%	0%	20%	95%
	16/20	66/66	0/66	4/20	82/86
MMP7	90%	89%	11%	10%	90%
	18/20	59/66	7/66	2/20	77/86

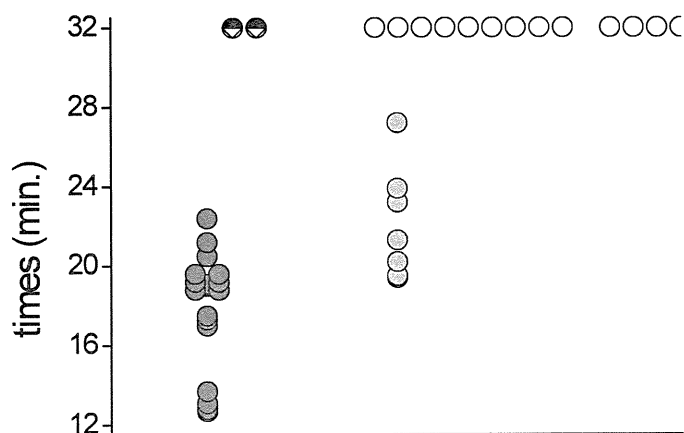


図 1 CK19を標的としたOSNA法の反応時間のプロット
 黒丸；病理で陽性かつOSNA法でも陽性、半白黒丸；病理で陽性もOSNA法では陰性（偽陰性）、白丸；病理で陰性かつOSNA法でも陰性。

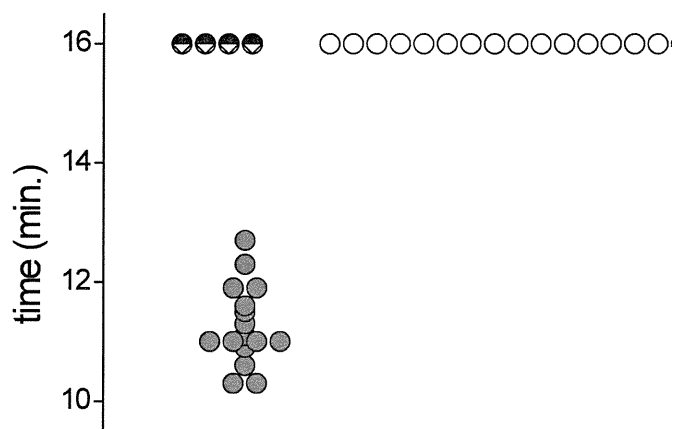


図2 MMP7を標的としたOSNA法の反応時間のプロット
 黒丸；病理で陽性かつOSNA法でも陽性、半白黒丸；病理で陽性もOSNA法では陰性（偽陰性）、灰色丸；病理で陰性もOSNA法では陽性（偽陽性）、白丸；病理で陰性かつOSNA法でも陰性。

研究5) 非RI画像診断法の開発

① 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 杏林大学医学部附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(800-850nm)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 瑞穂医科工業製)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か検討した。ウサギにおいて全例経皮的にSN同定可能、豚においては皮膚、脂肪層が厚いため経皮的にリンパ節の存在部位を同定できなかった。しかしリンパ節自体は蛍光発光しており脂肪の中でICG集積リンパ節の可視化が可能であり、臨床応用可能であることを証明した。この結果をもとに舌癌症例でRI(99m Tc フチン酸)とICGを同時に用い、集積するSNを比較検討することでICG蛍光法によるSN生検術の有用性について検証した。ICG蛍光法ではSN3つ同定可能でそのうちの2つはRIも集積を認め、さらにそのSN1つに転移巣を認めた。ICG蛍光法を用いたSN生検術は頭頸部領域でも十分に実用可能な手法と思われる、RI法の欠点を補うことができる手法と考えられた。

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。

ICG蛍光法の実行可能性を立証するため動物実験を行い、更に臨床でも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

ウサギ、豚の舌、喉頭または咽頭にそ

れぞれICG(1ml:5mg)とインジゴカルミン3mlの混合液をそれぞれ注入し、10分後経皮的にHEMSを用いてSNが同定できるか観察した。その後頸部皮膚を翻転し、リンパ節を摘出しICGと色素法の結果が一致するかを確認した。薬剤の注入部位はウサギ4羽とも舌側縁に4側、ブタ2頭は舌側縁に4側、下咽頭(梨状陥凹)、喉頭(声門上、左声帯)にそれぞれ2頭ずつ注入した。

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γ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討する。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、その後患者に十分な時間を与え文書により自由意思の同意を得る。

厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針に従い動物愛護の観点に配慮しつつ、科学的観点に基づく適正な動物実験を行う。動物実験を適性に行うための実験動物の取り扱いに関しては、実験動物の飼育及び保管ならびに苦痛の軽減に関する基準の規定を踏まえて行う。また本実験は杏林大学実験規定等に適合し、杏林大学医学部動物実験委員会の承認を得る。

C. 研究結果

ウサギ4羽の検討ではHEMSでSNの存在部位を全例経皮的に検出できた。4側SN生検を行ったところ、全てにおいてSNを同定できた。HEMSでは5個同定でき、そのうち4個が色素法でも同定できた。豚6頭にも同様な実験を行ったところ、皮膚、脂肪層が厚く経皮的にはSNの存在部位を同定できなかった。しかしリンパ節自体は蛍光発光しており脂肪の中でICG集積リンパ節の可視化が可能であった。

舌癌でのICG蛍光法を利用したSN生検術では、経皮的にJ1,2領域に発光するSNがHEMSで検出できた。γプローベではJ1領域に集積を認めた。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SNに転移巣を認め、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

経皮的にウサギはSNの同定が可能であったが、ブタでは不可能であった。原因は皮膚、皮下組織の厚みが影響したと考えられた。色素法で同定できなかったSNをICG蛍光法で同定できた事より、色素法よりICG蛍光法の方がSNの同定率がよい可能性を示せた。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ぐらいであり、それ以上の深度があるとリンパ節の存在部位を経皮的には視認できないと考えられた。

舌癌症例では経皮的に蛍光発光するSNをHEMSで検出可能で、ICG蛍光法を用いたSN生検術は頭頸部領域でも十分に実行可能な手法と思われた。しかしJ2に認めたSNはRIの集積がなく、2次リンパ節を検出した可能性があると思われた。今後この点については検討する必要があると思われた。

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可能と考えられた。今後リアルタイムに使用できることより、咽頭癌におけるSN生検術への応用が期待されると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamauchi K, Nagafuji H, Nakamura T, Sato T, Kohno N: Feasibility of ICG