

術後5か月目に下咽頭癌の出現を認めたため治療を行ったところ、その後さらに顎下部に頸部再発を認めた。放射線治療を行い現在は落ち着いている。この症例を除いては、舌癌の再発もなく全例無病生存中である。

D. 考察

結果として、2例目、3例目、4例目、5例目、9例目、10例目に転移陽性のSNが確認されたことになる。その転移巣のサイズの内訳は、3mm大が1例、1mm大が1例、0.5mm大が1例、ITCが3例であった。3mm大のものと1mm大とITCの1例は2mm切片による凍結切片で術中診断がなされていたが、0.5mm大とITCの残りの2例は術中の2mm切片での迅速診断では判明せず、術後のHEで判明していた。以上より、非常に微小な転移を凍結切片による迅速診断のみで全て同定するのは困難であると思われたが、全体を通じて10例中6例が3mm以下のリンパ節転移を診断されていて、これらは通常の検索では転移陽性と判断される確率は非常に低く、SNを精査する重要性を実証する形となった。今後の症例の蓄積を待って、その有用性については更なる検証がされることになるであろう。

E. 結論

舌癌に対するSN生検において、施行した10例全例でSNが同定され、6例のSNの2mm切片での病理検査で、微小な転移を診断することができた。SN以外のリンパ節にのみ転移を認めた症例は存在せず、SN理論が舌癌でも成立すると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

①Yoshimoto S, Asai M, Maki D, Nomura T:

Intraoperative Image Diagnosis Using CT for Head and Neck Cancer. July, 1-5, 2013, 20th World Congress of the International Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (IFOS), Seoul, Korea

②Yoshimoto S:

Results of Open Surgery for Hypopharyngeal Cancer with Laryngeal Preservation. Oct. 4, 2013, UAE Cancer Congress, Dubai, UAE

③吉本世一

選択的頸部郭清術（口腔がん）．平成25年
12月8日 頸部郭清講習会 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

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

「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

研究分担者 松塚 崇 福島県立医科大学耳鼻咽喉科学講座 講師

研究要旨

One step nucleic acid amplification (OSNA) 法は、分子生物学的に転移リンパ節を迅速に検出する方法として、乳癌ではすでにセンチネルリンパ節の術中転移診断に用いられている。頭頸部扁平上皮癌においても、リンパ節転移を検出する方法として、OSNA 法の有用性が報告されている。OSNA 法は、CK19mRNA の発現量を定量的に検出する。CK19 はヒト癌において広く発現する代表的な上皮系のマーカー (marker) であり非転移リンパ節では発現しないとされている。大部分の乳癌では CK19 を発現しているが、発現しない場合もあることが報告され、この問題は頭頸部癌でも同様に生じる可能性がある。

この研究では、頭頸部扁平上皮癌の原発巣における CK19 蛋白の発現を免疫染色を用いて検査し、OSNA 法が頭頸部扁平上皮癌におけるセンチネルリンパ節の術中転移診断に有用となる症例の選択を試みた。

原発巣のCK19免疫染色陽性率は全症例の半数以下の43%であった。原発巣のCK19免疫染色陽性例におけるリンパ節のH. E. 染色に対するOSNA分析の感度、特異度は86%、100%であった。一方、原発巣のCK19免疫染色陰性例におけるOSNA分析の感度、特異度は50%、97%であり、原発巣のCK19免疫染色陽性例ではCK19免疫染色陰性例より精度が良好であった。原発巣でCK19免疫染色が陽性であることが、OSNA分析による転移リンパ節を検出するための条件と考えられた。

A. 研究目的

CK19mRNA を用いた OSNA 法はリンパ節転移の新しい診断法として、乳癌において有用性が報告されている。頭頸部扁平上皮癌においても、研究段階であるが、リンパ節転移を検出する方法として、OSNA 法の有用性が報告されている。

大部分の乳癌では CK19 を発現しているが、発現しない場合もあることが報告され、この問題は頭頸部癌でも同様に生じる可能性がある。

この研究では、頭頸部扁平上皮癌の原発巣における CK19 蛋白の発現を免疫染色を用いて検査し、OSNA 法が頭頸部扁平上皮癌におけるセンチネルリンパ節の術中転移診断に有用となる症例の選択を試みた。

B. 研究方法

対象は 2009 年から 2011 年の間に福島医科大学で 21 例の頭頸部扁平上皮癌患者から手術中に摘出された原発巣と計 54 個の頸部リンパ節とした。

対象となったすべての頸部リンパ節は、術前

評価では、臨床的に転移陰性の腫大していないリンパ節であり、主に頸部郭清の際に外科的に摘出した標本から無作為に 1 症例あたり 2～3 個を抽出した。

手術時に、リンパ節は 4 分割し、2 分割は迅速病理及び免疫染色用の検体とし、別の 2 分割は OSNA 用の検体とした。

CK19 抗体の免疫染色では、原発巣内とリンパ節内に染色を認める腫瘍細胞がある場合を CK19 抗体陽性とし、OSNA 法では CK19mRNA のコピー数のカットオフ値は 131 copies/ μ l とした。

本研究は福島県立医科大学倫理委員会の承認を得ており、本人の承諾が得られた場合に実施した。

(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

原発巣の CK19 免疫染色陽性率は全症例の半数以下の 43%であった。原発巣の CK19 免疫染色陽性例におけるリンパ節の H.E. 染色に対する OSNA 分析の感度、特異度は 86%、100%であり、Fisher の直接法で、 $p<0.0001$ と有意な結果であった。一方、原発巣の CK19 免疫染色陰性例における OSNA 分析の感度、特異度は 50%、97%であった。

D. 考察

原発巣のCK19免疫染色陽性率は全症例の半数以下の43%であった。舌癌において原発巣のCK19免疫染色陽性率が47%との報告もあり、CK19が、頭頸部扁平上皮癌において、常に高頻度に発現する上皮標識ではないことが判明した。原発巣のCK19免疫染色陽性例ではCK19免疫染色陰性例より精度が良好であり、原発巣でCK19免疫染色が陽性であることが、OSNA分析による転移リンパ節を検出するための条件と考えられた。

E. 結論

頭頸部扁平上皮癌の原発巣における CK19 蛋白の発現は半数以下で高いとは言えないが、原発巣の CK19 免疫染色が陽性の場合には、センチネルリンパ節生検における OSNA 分析は病理組織学的検査と同等のポテンシャルを持つ可能性があることが判明した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① 松塚 崇、西條 聡、松井隆道、野本幸男、鈴木政博、佐藤 聡、大森孝一： 局所進行舌癌に対する超選択的動注化学療法併用の手術治療。耳鼻と臨床 59 巻補冊 1 号 S77-84, 2013.

2. 学会発表

- ① 松塚 崇：シンポジウム I 診療領域・臓器別 SNNSの現状と新たな展開（頭頸部・食

道・胃）頭頸部癌におけるSNNSの現状と新たな展開。第15回Sentinel Node Navigation Surgery研究会，2013年10月，釧路市

- ② 鈴木政博 松塚崇 横山秀二 岡野渉 西條聡 大森孝一：下咽頭進行がんにおける化学放射線治療後の頸部郭清術の必要性。頭頸部癌学会，2013年6月，東京都

- ③ Takashi Matsuzuka, Masahiro Suzuki, Tomohiro Miura, Wataru Okano, Satoshi Saijo, Takamichi Matsui, Yasuhiro Tada, Koichi Omori: Sentinel Node Biopsy Provides a Useful Way of Deciding on Neck Dissection in Early Stage Tongue Cancer. The Triological Society 116th Annual Meeting. 2013年4月，Orlando

- ④ Masahiro Suzuki, Takashi Matsuzuka, Koichi Omori: One-Step Nucleic Acid Amplification - a molecular method for the detection of cervical lymph node metastases in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma patients. IFOS. 2013年6月，SEOUL

- ⑤ Masahiro Suzuki, Takashi Matsuzuka, Koichi Omori: Molecular Detection for Cervical Metastases in Head and Neck Carcinoma Using One-Step Nucleic Acid Amplification Assay. The Triological Society 116th Annual Meeting. 2013年4月，Orlando

G. 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

ICG 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、トレーサーは放射性同位元素を使用している。しかし、この手法は被験者および医療従事者の被曝、また放射性同位元素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事を以前証明した。今回この結果をもとに、舌癌症例 3 例と中咽頭癌、下咽頭癌各 1 例で ICG 蛍光法の有用性について検討した。経皮的に発光する SN を視認できた。ICG 蛍光法を用いた SN 生検術は従来の放射性薬剤を使用した SN 生検術同様に頭頸部領域でも有用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

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放射線同位元素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、手続きの煩雑などが解消され、さらに放射性同位元素を使用するより ICG の方が低コストのため、医療費の削減にも寄与できる。また経皮的に SN を視認できれば、SN 生検術の精度をさらに向上させることが可能である。

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 ICG 蛍光法を用いた SN 同定法の有用性について検討した。

B. 研究方法

トレーサーには放射性薬剤 ^{99m}Tc フチン酸と ICG を用いる。まず、術前 1 日前に腫瘍周囲粘膜内 4 か所にフチン酸を 27G 針で注入する。ICG は 25 mg を 10 mL の注射用水で溶解し、生検術 10 分前に、ICG 2 ml 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 ^{99m}Tc フチン酸と 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清術(ND)を、陰性ならば頸部郭清省略を行う Sentinel navigation surgery(SNNS)を行う。中・下咽頭癌に対しては、可能な場合にのみ RI 法の併用を行い、不可能な場合には ICG 法単独で行う。

(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同意を得る。

C. 研究結果

下咽頭以外の4例でRI法とICG法を併用し、下咽頭症例ではICG法を単独で行った。舌癌の1例を除く4例で経皮的に発光するSNの様子がHEMSを通して視認できた。SNに転移巣を認めた舌癌症例では頸部郭清を施行した。RIとICGの併用例においては、RI法よりもICG蛍光法において多数のリンパ節が同定される傾向にあった。

D. 考察

ICG蛍光法におけるSNは2次リンパ節である可能性が考えられた。今後2次リンパ節にもICGが流れているかどうか更に症例を増やして検討する必要があると考えられた。また、深部のリンパ節はICG法では視認しづらい現象も認められ、今後の検討課題と考えられた。

ICG蛍光法を用いたSN生検術は従来の放射性薬剤を使用したSN生検術同様に頭頸部領域でも有用な手法であることが示唆された。

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、経皮的にセンチネルリンパ節を観察可能、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

論文発表

- 1) 小柏 靖直, 甲能 直幸. 頭頸部癌治療の現状と展望. 杏林医学会雑誌 44 巻 2 号 Page97-101,2013
- 2) Sato D, Kogashiwa Y, Tsukahara K, Yamauchi K, Kohno N. Phase I study of nedaplatin prior to s-1 in patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. Chemotherapy. 2013. Epub 2014 Jan 28

- 3) Yamauchi K, Kogashiwa Y, Nakamura T, Moro Y, Nagafuji H, Kohno N. Diagnostic evaluation of sentinel lymph node biopsy in early head and neck squamous cell carcinoma: A Meta-Analysis. Head Neck. 2013 [Epub ahead of print]
- 4) Ikeda T, Kobayashi R, Kogashiwa Y, Matsuda T, Kohno N. Epstein-barr virus diversity in immunocompetent healthy persons: reassessment of the distribution of genetic variants. J Med Virol. 86(2):301-5, 2013.
- 5) Yoshimoto S, Nakashima T, Fujii T, Matsuura K, Otsuki N, Asakage T, Fujimoto Y, Hanai N, Homma A, Monden N, Okami K, Sugawara M, Hasegawa Y, Nibu KI, Kamata SE, Kishimoto S, Kohno N, Fukuda S, Hisa Y. Japanese Board Certification System for head and neck surgeons. Auris Nasus Larynx. 2014 [Epub ahead of print] .

学会発表

- 1) 小柏靖直、佐藤大、茂呂順久、松本吉史、渡邊格、中村健大、甲能直幸. ICG 蛍光法を用いたセンチネルリンパ節生検においてトレーサーの2次リンパ節流入を抑制する方法に関する研究. 第15回SNNS研究会 学術集会
- 2) Yasunao Kogashiwa, Dai Sato, Naoyuki Kohno. Sentinel Node Navigation Surgery Using Indocyanin Green (ICG) Fluorescence Imaging for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. 20th IFOS World Congress, 2013 年 6 月

分担研究報告書

「N0口腔癌における選択的頸部郭清術とセンチネルリンパ節ナビゲーション手術の無作為化比較試験」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

早期口腔癌に対する「N0 口腔癌における選択的頸部郭清術とセンチネルリンパ節ナビゲーション手術の無作為化比較試験」、早期咽喉頭癌に対する「咽喉頭癌に対する経口的切除術とインドシアニングリーン蛍光法センチネルリンパ節生検術による低侵襲手術の研究」の2つの臨床試験を行い、早期頭頸部癌において、センチネルリンパ節理論によるリンパ節微小転移の解明と新たな診断治療法の開発により、個別的で低侵襲かつ機能温存の治療法を確立する。

A. 研究目的

早期口腔癌に対する「N0口腔癌における選択的頸部郭清術とセンチネルリンパ節ナビゲーション手術の無作為化比較試験」（UMIN000006510）（以下、「口腔癌センチネルリンパ節（SN）ナビゲーション手術（NS）無作為化比較試験」）を主研究として、早期咽喉頭癌に対する「咽喉頭癌に対する経口的切除術とインドシアニングリーン蛍光法センチネルリンパ節生検術による低侵襲手術の研究」（UMIN000009331）（以下、「咽喉頭癌インドシアニンググリーン（ICG）法SN生検術試験」）の2つの臨床試験を行い、早期頭頸部癌において、センチネルリンパ節理論によるリンパ節微小転移の解明と新たな診断治療法の開発により、個別的で低侵襲かつ機能温存の治療法を確立する。

B. 研究方法

1) 口腔癌 SNNS 無作為化比較試験：

臨床的にリンパ節転移を認めないlateT2-T3口腔癌症例について、ラジオアイソトープ(RI)を用いたSN生検法に基づくナビゲーション手術の頸部郭清術が一律の選択的頸部郭清術に対して生存率は非劣性であるか、術後機能障害と合併症において優位性、すなわち低侵襲性を有することを検証する。

2) 咽喉頭癌ICG法SN生検術試験：

早期咽喉頭癌に対して、経口的切除法に非RIのSN生検法-ICG蛍光法を行い、その有用性を検証する。

（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。

C. 研究結果

平成25年3月現在、当院では、1)は4例に対して行い、現在経過観察中である。2)は院内の倫理委員会で承認され、今後、現在まで2例に対して行った。

D. 考察

成果は個別的で低侵襲かつ機能温存の治療法確立から、医療費削減、きんてん化、安全、医療機器産業振興に波及するものと期待される。

E. 結論

1)および2)の両試験の結果は、今後の早期の口腔および咽喉頭癌の個別的で低侵襲かつ機能温存の治療法を確立に寄与するものと期待され、本研究推進に協力していく決意である。

G. 研究発表

1. 論文発表

①Sakashita T, **Homma A**, Oridate N, Suzuki S, Hatakeyama H, Kano S, Mizumachi T, Onimaru R, Tsuchiya K, Yasuda K, Shirato H, Fukuda S. Regional control after concomitant chemoradiotherapy without planned neck dissection in node-positive head and neck squamous cell carcinomas. *Auris Nasus Larynx* 40: 211-215, 2013

②Sakashita T, **Homma A**, Hatakeyama H, Kano S,

Mizumachi T, Furusawa J, Yoshida D, Fujima N, Onimaru R, Tsuchiya K, Yasuda K, Shirato H, Fukuda S. The incidence of late neck recurrence in N0 maxillary sinus squamous cell carcinomas after superselective intra-arterial chemoradiotherapy without prophylactic neck irradiation. *Eur Arch Otorhinolaryngol* (in press)

Kawabata K, Monden N, Hasegawa Y, Onitsuka T, Fujimoto Y, Iwae S, Okami K, Matsuzuka T, Yoshino K, Nibu K, Kato T, Nishino H, Asakage T, Ota I, Kitamura M, Kubota A, Ueda T, Ikebuchi K, Watanabe A, Fujii M. Lymph node metastasis in T4 maxillary sinus squamous cell carcinoma: Incidence and treatment outcome. *Ann Surg Oncol* (in press)

③ **Homma A**, Hayashi R, Matsuura K, Kato K,

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

研究要旨

RI 法を用いたセンチネルリンパ節（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、動物実験においては SPECT/CT と比較すると描出能は劣るものの SN の同定は可能であることを報告した。MRI 造影剤による SN 同定はヒト臨床応用も行い、RI 法による検出との比較を行い、SN 同定に有用である可能性を示唆した。また ICG 法に関する基礎的な動物実験を行い、フチン酸コロイドと ICG の混合によるセンチネルリンパ節検出時間延長、二次リンパ節描出を抑制する可能性について検討した。ICG 法は咽喉頭領域のように RI の術前注入が困難な症例にも術中投与できる利点があり、今後咽喉頭領域における臨床応用が期待される。

A. 研究目的

1. 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。また臨床応用として舌癌症例において SPECT/CT と SPIO、ガドキシト酸による間質内 MR リンパ造影を SN 描出に関して比較する。
2. ヒト舌癌症例においては第 2 相試験の予後解析、第 3 相試験（ランダム化比較試験）の登録を行った。咽喉頭癌に対してはラジオアイソトープの術前日注入が多施設では困難であるため、これに替わる方法として ICG 法によるセンチネルリンパ節同定法の症例登録を行っている。また第 2 相研究の一環として SN におけるリンパ管新生とリンパ節転移に関する研究（於：金沢大学）に多施設共同としての症例登録を行った。
3. ICG 法は放射線被曝もなく SN 同定が可能な方法であるが、リンパ流での移行が速く、すぐに下位リンパ節まで描出されてしまい、SN 同定時間が限られるという問題点がある。この問題点を克服する目的で、フチン酸コロイドと ICG の混合による SN 検出能の変化についての検討を行った。
4. ICG 蛍光法によるセンチネルリンパ節生検術については中下咽頭、喉頭癌において臨床症例において開始し、その有用性を検証する。

B. 研究方法

1. 8 週齢、6 匹のヌードマウスに Tc-99m フチン酸、7.4 MBq を粘膜下投与後 30 分で SPECT/CT

を撮影した。Ferucarbotran、gadoxetate を同様な方法で局注し、4.7 テスラ MRI 装置で経時的に撮影した。関心領域を SN に設定し、時間信号強度グラフを作成した。MR リンパ造影と SPECT/CT の SN 描出は 3 名の読影医が 4 段階視覚評価した。舌癌 T1, 2N0M0 患者 3 名に腫瘍周囲に Tc-99m フチン酸または Ferucarbotran を局注し、SPECT/CT, MRI を撮影した。

2. ヒト舌癌症例の第 2 相試験、第 3 相試験を愛知県がんセンターにおけるプロトコルに準拠して症例の登録を行った。SN におけるリンパ管新生とリンパ節転移に関する研究では院内の倫理委員会承認を得た後に多施設共同での解析に登録した。咽喉頭癌における ICG 法は今後症例を行う予定である。

3. フチン酸コロイドと ICG を比率を変えて混合し、マウス舌に投与した。SN 検出能や 2 次リンパ節検出率などを経時的に観察した。

4. ヒト臨床例ではリンパ節転移陰性の咽喉頭癌経口的切除症例において腫瘍切除前に辺縁に ICG 投与を行い、赤外線プローブを用いてセンチネルリンパ節の同定を行った。

（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. SN 描出平均スコアは ferucarbotran 1.44、gadoxetate 1.67、SPECT/CT 2.67 で SPECT/CT が MR リンパ造影よりも優れた成績であった。舌癌患者の検討では SPECT/CT、MRI いずれも良好な SN が描出された。gradient echo 法の一つである fast field echo 法の T1 および T2*WI で SN は低信号領域として明瞭に描出された。注射 10 分後の FFE-T1WI で同定された SN は術前リンパシンチと術中ガンマプローブによって同定された SN と 3 例とも完全に一致した。描出した SN は、すべて鉄染色陽性であった。
2. 第 2 相試験として 3 例、第 3 相試験として 2 例の症例登録を行った。症例のデータは Web にて登録され解析が行われる予定である。リンパ管新生とリンパ節転移に関する研究では症例の登録を行い、中央での解析が行われる予定である。
3. ICG 単独では SN (1 次リンパ節) は注入直後から描出され、30-60 分で 2 次リンパ節へと拡散し、24 時間後にはほとんど検出できなかった。フチン酸コロイドと混合した ICG では 30-60 分で SN が描出されはじめ、ピークは 6-12 時間、24 時間後にも SN が検出可能であった。2 次リンパ節は検出されず、真の SN 検出能に優れ、臨床応用も期待できる手法であることが確認できた。

D. 考察

1. 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。
2. 実臨床における SN 同定の手技については安定しているが、症例の登録については予定数を下回っている。ランダム化に対する同意が得られない症例もあるが、十分な説明の上で今後も症例登録を継続する予定である。
3. ICG 法の問題点である拡散が早いという点に関してフチン酸コロイドとの混合コロイド化による解決の可能性があると考えられた。Pilot study の段階であり、今後多数例での検討が必要である。
4. 中咽頭癌 1 例において ICG によるセンチネルリンパ節の同定を行った。皮膚切開前では赤外線プローブによる同定は困難であったが皮膚切開を行うとセンチネルリンパ節の同定が可能であった。皮膚切開の部位によってセンチネルリ

ンパ節同定の精度が左右される恐れがあり、注意を要すると考えられた。

E. 結論

マウス比較試験で、頭頸部の SN 描出能に関して SPECT/CT は MR リンパ造影より優れた結果が得られた。舌癌患者では ferucarbotran MR リンパ造影は SLNB に用いられる可能性が示された。これまで RI 法による SN 同定が主流であったが、今後多くの施設で行われるには規制の多い RI 法以外での SN 同定法も開発していく必要がある。MRI-SPIO 法や ICG 法による SN 同定法の確立についても今後、動物実験から臨床応用が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Araki K, Muzokami D, Tomifuji M, Yamashita T, Ohnuki K, Umeda I, Fujii H, Kosuda S, Shiotani A. Novel Indocyanine Green-Phytate Colloid Technique for Sentinel Node Detection in Head and Neck: Mouse Study. *Otolaryngology- Head and Neck Surgery*. (in press)
- ② Tomifuji M, Araki K, Yamashita T, Shiotani A. Transoral videolaryngoscopic surgery for oropharyngeal, hypopharyngeal, and supraglottic cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2014;271(3):589-597.
- ③ Mizokami D, Kosuda S, Tomifuji M, Araki K, Yamashita T, Shinmoto H, Shiotani A. Superparamagnetic iron oxide-enhanced interstitial magnetic resonance lymphography to detect a sentinel lymph node in tongue cancer patients. *Acta Otolaryngol*. 2013;133(4):418-23.
- ④ 山下 拓, 富藤雅之, 荒木幸仁, 塩谷彰浩. Transoral Videolaryngoscopic Surgery (TOVS) による舌根病変へのアプローチ 頭頸部外科 23, 323-330. 2013
- ⑤ 当科における中咽頭扁平上皮癌の臨床統計および p16 発現に関する検討. 田中 雄也, 山下 拓, 富藤 雅之, 荒木 幸仁, 塩谷 彰浩: 頭頸部外科 23 巻 2 号 Page199-204, 2013
- ⑥ 【のどの異常感】 咽喉頭・頭頸部領域の腫瘍性疾患とのどの異常感(悪性腫瘍を含む): 荒木 幸仁, 塩谷 彰浩: ENTONI160 号 Page23-31, 2013
- ⑦ 中咽頭癌に対する経口的切除術 Transoral Videolaryngoscopic Surgery (TOVS): 山下 拓, 富藤 雅之, 荒木 幸仁, 塩谷 彰浩: 頭頸部癌

39 卷 1 号 Page37-43, 2013

- ⑧ 【下咽頭癌はここまで治る】 初回治療でここまで治る 適応と成績 経口的下咽頭部分切除術：塩谷 彰浩，富藤 雅之，荒木 幸仁，山下 拓：JHNS29 卷 6 号 Page977-981, 2013
- ⑨ 【急患・急変対応マニュアル-そのとき必要な処置と処方】 術中・術後の急変への対応法 術中編 経口的腫瘍摘出時の咽頭穿孔：荒木 幸仁，山下 拓，富藤 雅之，塩谷 彰浩：耳鼻咽喉科・頭頸部外科 85 卷 5 号 Page316-321, 2013

2. 学会発表

・ Araki K, Mizokami D, Tomifuji M, Yamashita T, Kosuda S, and Shiotani A: Feasibility Animal Study of Novel ICG Sentinel Node Detection Technique in Head and Neck Region. 2013 AAO-HNSF Annual Meeting & OTO EXPO in Vancouver, Canada, 2013.9

・ S. Kosuda, K. Araki, D. Mizokami, M. Tomifuji, T. Yamashita, A. Shiotani: Feasibility of novel ICG-radiocolloid sentinel node detection technique in head and neck region using animal model. EANM'13 - Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine (October 19 - 23, 2013 in Lyon/France)

・ 荒木幸仁、溝上大輔、富藤雅之、山下拓、藤井博史、小須田茂、塩谷彰浩：頭頸部癌における ICG 法によるセンチネルリンパ節生検の工夫ー ICG-コロイド化法の基礎的検討。第 15 回 SNNS 研究会学術集会（釧路 2013.9.20-21）

・ 当科における中・下咽頭、声門上表在癌の肉眼分類に関する検討：田中 雄也，富藤 雅之，鈴木 洋，荒木 幸仁，山下 拓，塩谷 彰浩：第 13 回頭頸部表在癌研究会(2013.06)

・ 頭頸部表在癌における導管内進展、腺組織進展の検討：鈴木 洋，富藤 雅之，田中 雄也，荒木 幸仁，山下 拓，塩谷 彰浩：第 13 回頭頸部表在癌研究会(2013.06)

・ 頭頸部領域でのセンチネルリンパ節検出のための ICG-コロイド法 動物実験による検討：木下 亮，小須田 茂，荒木 幸仁，溝上 大輔，富藤 雅之，山下 拓，塩谷 彰浩，藤井 博史，梅田 泉：核医学 50 卷 3 号 PageS248(2013.09)

・ 下咽頭輪状後部に認めた陥凹型表在癌の 1

例：宮川 義弘，富藤 雅之，松野 直樹，前田 真由香，塩谷 彰浩：第 14 回頭頸部表在癌研究会(2013.11)

・ 頭頸部表在癌の診断と治療 頭頸部表在癌に対する Transoral videolaryngoscopic surgery (TOVS)：富藤 雅之，塩谷 彰浩：頭頸部癌 39 卷 2 号 Page116(2013.05)

・ 気管食道科領域におけるセンチネルリンパ節生検の現状と展望 咽喉頭領域のセンチネルリンパ節研究：山下 拓，富藤 雅之，荒木 幸仁，溝上 大輔，塩谷 彰浩：日本気管食道科学会会報 64 卷 2 号 Page81(2013.04)

・ 咽喉頭がんに対する経口的咽喉頭部分切除術：富藤 雅之：埼玉頭頸部癌手術懇話会(2013.9)

・ 咽喉頭悪性腫瘍に対する経口的咽喉頭部分切除術(Transoral videolaryngoscopic surgery: TOVS)：富藤 雅之、山下 拓、荒木幸仁、鈴木洋、塩谷 彰浩：第 15 回耳鼻咽喉科手術支援システム・ナビ研究会（2013.10）

・ 舌癌術後、後発ルビエールリンパ節転移に対するナビゲーション下、経口的ルビエールリンパ節摘出術を施行した 1 例：鈴木 洋、富藤 雅之、田中 雄也、山下 拓、荒木 幸仁、塩谷 彰浩：第 15 回耳鼻咽喉科手術支援システム・ナビ研究会（2013.10）

・ 山下拓，荒木幸仁，富藤雅之，塩谷彰浩. Transoral Videolaryngoscopic Surgery(TOVS) による舌根病変へのアプローチ法と治療成績. 頭頸部外科 2013.1.25.

・ 田中雄也，山下拓，荒木幸仁，富藤雅之，塩谷彰浩. 当科における中咽頭癌の臨床統計および p16 発現に関する検討. 頭頸部外科 2013.1.25.

・ 山下 拓，荒木幸仁，富藤雅之，塩谷彰浩. 頭頸部領域からみた重複癌の現状と治療戦略. 日本気管食道科学会学術講演会 シンポジウム 3. 2013.11.01.

・ 山下 拓. 頭頸部癌化学放射線療法による口内炎に対する漢方治療. 埼玉 KAMPO 緩和ケア講演会 教育講演 2013.11.22.

分担研究報告書

頭頸部癌におけるセンチネルリンパ節理論による 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)理論に基づくリンパ管を利用した lymphatic chemotherapy を頭頸部癌で確立し、低侵襲的に転移リンパ節制御法の開発である。このリンパ管と SN を可視化するのに ICG(インドシアニンググリーン)近赤外線法が口腔癌や咽頭癌で従来の放射線同位元素 (RI 法) に比べて有効であることを報告してきた。今回 ICG 蛍光法をガイドにしたナビゲーション手術の有用性を検討した。

目的) ICG投与後ICGガイド下ナビゲーション手術の最適時期の決定と有効性の検討。方法) ICG投与後 NIR fluorescence imaging visibilityによりスコア化し、ICG近赤外線法をガイドにしたルビエールリンパ節や副咽頭間隙悪性腫瘍の蛍光法によるSN検出時期決定と有効性について検討した。結果) 最適なSNの検出時期は30分から120分であった。SNは粘膜上より検出でき、安全に低侵襲に実施できた。結論) 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、副咽頭間隙のリンパ節をICG蛍光法をガイドにしたナビゲーション手術は安全で低侵襲であり有用な方法である。

A. 研究目的

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)理論に基づくリンパ管を利用した転移リンパ節制御法を開発するため、リンパ管と SN を可視化するのに ICG(インドシアニンググリーン)近赤外線法が口腔癌や咽頭癌で従来の放射線同位元素 (RI 法) に比べて有効であることを報告してきた。今回 ICG 蛍光法をガイドにしたナビゲーション手術の有用性を検討するため、ICG 投与後の最適な手術時期の決定と本法の有効性の検討した。

B. 研究方法

口腔・咽頭癌 9 例に ICG 投与後 NIR fluorescence imaging visibility によりスコア化し、ICG 近赤外線法をガイドにしたルビエールリンパ節や副咽頭間隙悪性腫瘍の蛍光法による最適な SN 検出時期決定と本術式の安全性と低侵襲性と検出率より有効性について検討した。

(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、同意書を得て実施した。

C. 研究結果

NIR fluorescence imaging visibilityスコアより最適なSNの検出時期は30分から120分であった。SNは粘膜上より検出でき、SNに最短距離で到達できた。頸動脈や嚥下に関与する下位脳神経(舌咽神経、迷走神経等)を避けながら安全に低侵襲に実施できた。また、全ての転移リンパ節を検出することができ、検出率は100%であった。

D. 考察

ルビエールリンパ節等の副咽頭間隙部に転移した

場合、予後が不良であるだけでなく QOL 不良である。通常頸部操作による摘出術を施行時、頸動脈出血や下位脳神経の損傷による嚥下障害等の重大な合併症が多い。

本術式は経口腔的にリンパ管や SN を可視化し、明視下に腫瘍を摘出可能で、頸動脈や下位脳神経を触知しないで摘出可能であり、安全で低侵襲に実施することが可能であった。

ICG 蛍光法は、RI と異なり取り扱いの制限がなく手術室で投与可能である。しかも 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

ICG蛍光法をガイドにした最適なナビゲーション手術時期はICG投与後30分から120分であった。ルビエールリンパ節等の副咽頭間隙部に転移リンパ節の検出率は100%であった。ICG蛍光法取り扱いが簡便で廉価でどの施設でも実施可能で、ICG蛍光法をガイドにしたナビゲーション手術は安全で低侵襲であり有用な方法である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. J Yokoyama, et al A novel procedure for reconstruction utilizing superficial femoral vein grafts following en bloc resection of carotid artery and head and neck malignant tumors. Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery, doi: 10.1093/icvts/ivu112.
2. K Ito, K Shimoji, Y Miyata, K Kamiya, R Minamimoto, K Kubota, M Okasaki, M Morooka, J Yokoyama. Prognostic value of post-treatment 18F-FDG PET/CT for advanced head and neck cancer after combined

- intra-arterial chemotherapy and radiotherapy. Chin J Cancer Res 2014 Feb;26(1):30-7
3. J Yokoyama, et al. Impact of removing mastoid process for advanced parotid cancer on facial nerve identification, preservation and reconstruction. Head & Face Medicine 2014, 10:6 doi:10.1186/1746-160X-10-6.
 4. M Fujimaki, Y Fukumura, K Mitani, A Kurisaki, J Yokoyama, et al. Histological subtypes and characteristic structures of HPV-associated oropharyngeal carcinoma; study with Japanese cases. Diagnostic Pathology 2013, 8:211 doi:10.1186/1746-1596-8-211.
 5. J Yokoyama, et al. Impact of Indocyanine Green Fluorescent Image-Guided Surgery for Parapharyngeal Space Tumors. J Cranio-Maxillofacial Surgery 2013, DOI . 10.1016/j.jcms.2013.12.001
 6. Yokoyama J, et al. Significant improvement in superselective intra-arterial chemotherapy for advanced paranasal sinus cancer by using Indocyanine green fluorescence. Eur Arch Otorhinolaryngol. doi 10.1007/s00405-013-2846-9
 7. Yokoyama J, et al. Minimally invasive procedure for reconstruction through grafting free fat placed in sternocleidomastoid muscle flap following total parotidectomy with parapharyngeal space dissection. Head Neck Oncol. 2013 Apr 01;5(4):42.
 8. Yokoyama J, et al A feasibility study of NIR Fluorescent Image-Guided Surgery in head and neck cancer based on the assessment of Optimum Surgical Time as revealed through Dynamic Imaging. OncoTargets and Therapy 2013;6 :1-6
 9. Ohba S, Yokoyama J, et al. A Novel application of a polyglycolic acid sheet in treating oral and oropharyngeal cancer. Head Neck Oncol. 2013 Jan 04;5(1):3.
2. 学会発表
 横山純吉 他. 頭頸部癌における近赤外蛍光イメージングを用いた Navigation surgery の有用性の検討.第 50 回 頭頸部癌学会 2013.6 月 7 日 東京都
- H. 知的財産権の出願・登録状況
 (予定を含む。)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

研究要旨

乳癌のセンチネル・リンパ節(SN)転移検索にCK19 を用いたOne Step ucleic Acid Amplication (OSNA)法が用いられているが、頭頸部扁平上皮癌ではCK19の発現率は低く、CK903 やCK5/6 などの別のマーカーが有用とされる。

こうした検索は原発巣でされているものが多く、原発巣とリンパ節転移巣でのマーカー物質の発現の差異についての検討はあまりされていない。

また、頭頸部癌の手術は、放射線治療、化学療法後に行われることがあり、マーカー物質の発現にたいする治療による修飾も考慮する必要がある。

今回は、サイトケラチンなどのマーカー物質の原発巣、リンパ節転移病変での発現の検討を行った。

A. 研究目的

乳癌のセンチネル・リンパ節(SN)転移検索にCK19 を用いたOne Step ucleic Acid Amplication (OSNA)法が用いられているが、頭頸部扁平上皮癌ではCK19の発現率は低く、CK903 やCK5/6 などの別のマーカーが有用とされる。

こうした検索は原発巣でされているものが多く、原発巣とリンパ節転移巣でのマーカー物質の発現の差異についての検討はあまりされていない。

また、頭頸部癌の手術は、放射線治療、化学療法後に行われることがあり、治療のマーカー物質の発現に対する影響も検討する必要がある。

原発巣に加えて、リンパ節転移巣についての検討を行うことを目的とした。

B. 研究方法

杏林医科大学病院で手術された頭頸部癌手術症例の原発巣、リンパ節転移巣について、CK19, CK903, CK5/6, CD44, p63 について免疫染色で検討した。

（倫理面への配慮）

手術材料は、診断、研究に用いられていることが同意されており、病理番号のみを用いた連結可能な匿名化がされており、患者の個

人情報は完全に保護された状態で行われる。

C. 研究結果

杏林大学で、2000 年から 2013 年まで手術された頭頸部扁平上皮癌のうち、リンパ節転移のある症例が 68 例（咽頭 26 例、口腔 12 例、喉頭 10 例、舌 20 例）あった。16 症例が放射線療法、化学療法が行われた後の症例であった。

染色結果などについて現在解析中である。

D. 考察

原発巣のみならずリンパ節転移巣についての検討は、有用な結果をもたらすと思われる。

E. 結論

頭頸部扁平上皮癌のマーカー物質について、原発巣に加えてリンパ節転移巣についての検討を行っている。

G. 研究発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

なし。

分担研究報告書

「N0口腔癌における選択的頸部郭清術とセンチネルリンパ節ナビゲーション手術の
無作為化比較試験」研究班

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

頭頸部領域のセンチネルリンパ節描出能に関して、放射性コロイドと ICG を混合し、マウス舌辺縁部に混合液を注入して SPECT/CT リンパシンチグラフィと近赤外線蛍光画像を同時に施行してセンチネルリンパ節を同定することができた。この新しい方法は ICG のリンパ管内移行速度を抑制するため、術中のセンチネルリンパ節同定を容易にする。

A. 研究目的

動物モデルを用いて、放射性コロイドであるTc-99m phytateとインドシアニングリーン色素（ICG）を混合し、混合液をマウスの舌辺縁部に局注することによって、センチネルリンパ節を明瞭に描出可能なSPECT/CTと近赤外線蛍光画像の3種類の画像が得られることが可能かどうか評価することである。

B. 研究方法

8週齢の23～27 gのオスのヌードマウス（BALB/c S1c-nu/nu）、21匹を用いた。^{99m}Tc-フチン酸とICGの混合比（ICG：6.4 mM, 640 μM, 64 μM）を3種類作成し、マウスの舌右縁粘膜下に投与した。近赤外線蛍光イメージングカメラで、投与10分後から経時的に48時間後まで撮影した。動物用SPECT/CT装置を用い、投与5時間後SPECT/CTのデータ採取を行った。

（倫理面への配慮）

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

ICG 64 μg 群が最も良好な signal/back-ground 比を示した。ICG 64 μg と^{99m}Tc-フチン酸との混合液群では、second echelon の描出を認めず、投与24 時間後までセンチネルリンパ節の描出が得られた。投与1 時間後に撮影した近赤外線蛍光イメージで描出されたセンチネルリンパ節とSPECT/CT で得られたそれとは一致した。

E. 結論

ICGと^{99m}Tc-フチン酸混合液投与によるセンチネルリンパシンチグラフィはICGのリンパ流の速度を遅

らせ、second echelonの描出を抑えるため、センチネルリンパ節の正確な同定と術中の検出時間に余裕をあたえる。今後はSPECT/CTと近赤外線蛍光画像の3種類の融合画像が可能と思われる。今後の臨床研究が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

Araki K, Mizokami D, Tomifuji M, Yamashita T, Ohnuki K, Umeda IO, Fujii H, Kosuda S, Shiotani A. Novel indocyanine green-phytate colloid technique for sentinel node detection in head and neck: mouse study. Otolaryngology- Head and Neck Surgery 2014; in press.

2. 学会発表

Kosuda S, et al. Feasibility of novel ICG-Radiocolloid sentinel node detection technique in head and neck region using animal model. EANM'13, Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine. October 21, 2013, Lyon France, Eur J Nucl Med Mol Imaging 2013;40:S354.

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

分担研究報告書

口腔がんのリンパ節転移予測分子の探索に関する研究
-細胞代謝関連分子についての検討-

研究分担者 近松 一郎 群馬大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 教授

研究要旨

口腔扁平上皮癌を対象に、細胞代謝のうちアミノ酸代謝関連分子としてLAT1、細胞内代謝を担うオートファジーの関連分子であるLC3、Beclin-1、p62/SQSTM1についてその発現を免疫組織化学法にて評価し、リンパ管浸潤やリンパ節転移を含む病理組織学的因子、臨床因子との相関を検討した。LAT1の発現は、口腔扁平上皮癌におけるリンパ管浸潤、リンパ節転移の両者とも有意な相関を認めた。更には、病期、Ki-67 index、予後の低下とも関連を認めた。一方、オートファジー関連分子のLC3の発現がリンパ管浸潤と相関していた。このように、細胞代謝に関与する分子の発現評価がリンパ節転移の予測に有用な可能性が示唆された。

A. 研究目的

口腔がんの最も大きな予後規定因子は所属リンパ節転移である。これまでに潜在的リンパ節転移の有無については腫瘍の厚さ、サイズ、局在、血管浸潤などが危険因子として報告されている。リンパ節への転移はセンチネルリンパ節から始まるとされ、それを早期かつ確実に同定するためにセンチネルリンパ節生検の臨床研究が行われている。当科でもその有用性を検証する臨床試験が現在進行中であり、適応基準のある症例に対して、センチネルリンパ節生検を行っている。

加えて、昨年我々は画像診断の一つであるFDG-PETにおけるSUVmax値が、がんの生物学的悪性度やリンパ節転移を含めた臨床因子と関係を有するか検討し、潜在的リンパ節転移の危険因子としての可能性について調べた。その結果、SUVmax値とアミノ酸トランスポーター（L-amino acid transporter 1: LAT1）、Ki-67の発現との間に有意な相関を認めた。またT-stage、病期、リンパ管浸潤、血管浸潤との間にも有意な相関を認め、リンパ節転移を有する症例はSUVmax値が高い傾向を認め、SUVmax値のイメージングバイオマーカーとしての可能性が示唆された。

本年は、さらに口腔がんにおけるリンパ節転移危険因子として細胞代謝のうちアミノ酸代謝と細胞内の主要分解システムで、その代謝回転を担うオートファジーに着目して、その関連分子について検討した。

昨年検討したLAT1はアミノ酸分子の取り込みにかかわる分子で、これまでに様々な癌腫でがんの悪性度や臨床因子との関係が報告されているが、口腔がん

についての報告はほとんどない。

一方、オートファジーは、タンパク質、細胞内小器官などがオートファゴソーム内に捕捉され、リソソームと融合して分解されるというプロセスで、飢餓、低酸素など細胞ストレス下のエネルギー調達プロセスであり、正常な恒常性に必要である一方、発癌や癌の発育浸潤過程に寄与していると考えられているが、その役割についてはいまだ不明な点も多いとされている。

B. 研究方法

当科で手術治療を施行した口腔扁平上皮癌患者の手術検体を対象にした。アミノ酸トランスポーターのLAT1及びオートファジー関連分子として、LC3、Beclin-1、p62/SQSTM1の3分子の発現について検討した。

各分子の発現は免疫組織化学法によって評価した。これらの分子の発現とリンパ管浸潤及びリンパ節転移について検討した。また、他にも臨床因子としてT-stageや病期、再発、予後について、病理組織学的因子として分化度、血管浸潤、細胞増殖能（Ki-67 index）との関連についても検討を加えた。

（倫理面への配慮）

群馬大学医学部臨床研究倫理審査委員会の承認を得て行なった。

C. 研究結果

現在までのところ、口腔扁平上皮癌におけるLAT1の発現は61%（85例中52例）で強発現を認めた。一方、オートファジー関連分子については、LC3 37%（74例中27例）、Beclin-1 37%（74例中27例）、p62/SQSTM1 32%（74例中24例）の発現頻度であった。

LAT1の発現は、リンパ節転移及び腫瘍のリンパ管浸潤のみならず、病期やKi-67 indexとの間にも有意な相関を認めた。更にLAT1が強発現している症例では有意に全生存期間、無増悪生存期間の低下を認めた。

一方、LC3、Beclin-1、p62/SQSTM1の発現はリンパ節転移の有無と相関を認めなかったが、LC3の発現とリンパ管浸潤との間には有意な相関を認めた。Beclin-1については、発現している腫瘍でリンパ管浸潤の傾向を認めるも有意な相関には至らなかった。またp62/SQSTM1については、リンパ管浸潤との有意な相関は認めなかった。興味深いことに、腫瘍辺縁におけるLC3発現が、病期、T因子、Ki-67 indexなどと有意な相関を認めた。

D. 考察

口腔がんのリンパ節転移、特に臨床的N0症例におけるリンパ節転移の有無を確実に評価することは治療戦略を考えるうえで重要な項目である。現在、センチネルリンパ節生検は、その評価ができる手法の一つである。

これまでに、がん細胞の生物学的特性を評価する分子が多数同定されてきており、実際に臨床現場に応用されるものも出てきている。今回、我々は細胞代謝という面に着目して、4つの分子について検討した。LAT1は中性アミノ酸のトランスポーターとして、がん細胞の生存や転移に重要な役割を果たしている分子であり、予想通りにLAT1高発現のがんでは高悪性度の生物学的特性を有していることが確認できた。一方、オートファジーとがん細胞の関係は非常に複雑で、がん細胞増殖を促進するという報告と抑制するという報告があり、その役割についてはまだ不明な点もある。また、がん細胞の治療抵抗性との関連も示唆されており、今後新たな治療戦略として注目すべき存在である。今回の我々の検討では、いわゆる臨床的な悪性度とLC3分子の発現

は関連を認めており、がん細胞の増殖浸潤能が亢進する方向に寄与していることが示唆された。

今回は細胞代謝に関与する分子の発現とリンパ管浸潤やリンパ節転移との関連を検討したが、LAT1やLC3のような分子の発現を複数評価し、その組み合わせによって口腔がん細胞

の生物学的特性を評価することによりリンパ節転移を予測することが可能となるかもしれない。

E. 結論

口腔扁平上皮癌におけるリンパ節転移予測分子の探索として、細胞代謝のうちアミノ酸代謝及び細胞内代謝を担うオートファジー関連分子の発現とリンパ管浸潤、リンパ節転移との関連を検討した。LAT1の発現はリンパ管浸潤及びリンパ節転移と、LC3分子の発現はリンパ管浸潤と有意な相関を認め、これらの分子の発現の評価はリンパ節転移の予測に有用な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

横堀有紀，豊田実，坂倉浩一，解良恭一，近松一朗．口腔扁平上皮癌におけるFDG-PET max SUV値のimaging biomarkerとしての可能性について．

第37回頭頸部癌学会平成25年6月13日～14日東京．

頭頸部癌39巻2号208頁2013年

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

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

造影超音波と ICG 蛍光法を併用したセンチネルリンパ節生検に関する動物実験

研究分担者 小柏靖直 杏林大学医学部耳鼻咽喉科学教室 学内講師

研究要旨

舌癌においては RI 法を用いたセンチネルリンパ節生検がゴールドスタンダードとなっているが、放射性同位元素を手術室内で使用できない制約から、全身麻酔がかかっているとトレーサーの正確な注入が困難な咽喉頭癌には使用できない。これに対して ICG 蛍光法は手術室で使用可能なメリットはあるものの、深部の観察や 2 次リンパ節への流入する問題を克服する必要がある。今回、ICG 蛍光法に造影超音波を併用による頭頸部のセンチネルリンパ節生検の実行可能性についてウサギを使用した実験で検討を行ったところ、造影超音波はコントラストが明瞭でかつ ICG の様に時間経過に伴って下流のリンパ節に流入する可能性が極めて低いことがわかった。今後、咽喉頭領域への臨床応用に向けて十分将来性のある方法と考えられた。

A. 研究目的

舌癌におけるセンチネルリンパ節生検では RI 法がゴールドスタンダードとなっており、症例の蓄積により多くの evidence が積み重ねられつつある。しかし放射性同位元素は手術室で使用することができないため、全身麻酔がかかっているとトレーサーを正確に注射することが困難である。このため、咽喉頭癌に対するセンチネルリンパ節生検をどのようにおこなっていくかが今後の検討課題である。ICG 蛍光法はこの問題に対処可能な有力な方法と考えられ、現在検討が進められているところであるが、皮膚からの深さが 2.5cm を超える深部の評価が困難となる点と、ICG の粒子径が小さいことに起因する、2 次リンパ節への流入という点が問題点として挙げられる。これ

らの問題を解決するために、超音波造影剤ソナゾイドを ICG 蛍光法に併用した方法を考案し、動物実験においてその有用性を検討した。

B. 研究方法

ウサギ 8 羽を用いた。舌、中咽頭、下咽頭に、ソナゾイドと ICG の混合液をトレーサーとして使用した。注射 20 分後にトレーサーの集積したリンパ節を Hyper Eye Medical System (HEMS; ミズホ株式会社) 及び造影剤対応超音波診断装置 HIVISION Ascendus (日立アロカメディカル株式会社) を用いて観察した。

本実験は杏林大学医学部の動物実験規定を遵守し、実験動物に苦痛を与えないよう配慮した。また、動物実験委員会の承認を

受けて行った。

C. 研究結果

ICG 注射後、2 分～5 分でリンパ節の蛍光発光が始まり、10 分後には 2 個～3 個のリンパ節への ICG の集積が認められた。20 分経過時には 2 個～5 個のリンパ節で集積を認めた。一方ソナゾイドは注射 20 分後の集積リンパ節の個数が 1 個か 2 個、注射後 2 時間を経過しても造影の輝度は低下せず、明瞭なコントラストが維持された。また集積リンパ節の個数も注射 20 分後と同じ結果であった。表 1 に、トレーサー注射後 20 分での ICG 蛍光法と造影超音波による集積リンパ節の個数を示す。

D. 考察

ICG 蛍光法は放射性同位元素を使用せず手術室でも使用可能な利点があるが、比較的速やかにセンチネルリンパ節の下流のリンパ節に流れてしまう点、深部の観察に難がある点が指摘されているが、造影超音波ではこれらの欠点を克服できる可能性が示唆された。しかし、超音波のみで生検をするよりも術野全体の視覚的な情報が得られる ICG 法を併用することで、お互いの短所を補完することができるものと考えられ、今後のさらなる検討が期待される。

E. 結論

ICG 法と造影超音波の併用法は、咽喉頭癌のセンチネルリンパ節生検に有用である可能性が示唆された。

表 1

同定されたリンパ節数

Injection site		ICG 蛍光法	造影超音波
1	Tongue	2	2
2	Tongue	4	2
3	Tongue	3	1
4	Tongue	4	1
5	Hypopharynx	4	1
6	hypopharynx	5	1
7	oropharynx	4	2
8	oropharynx	4	1

G. 研究発表

論文発表

- 1) 小柏 靖直, 甲能 直幸. 頭頸部癌治療の現状と展望. 杏林医学会雑誌 44 巻 2 号 Page97-101,2013
- 2) Sato D, Kogashiwa Y, Tsukahara K, Yamauchi K, Kohno N. Phase I study of nedaplatin prior to s-1 in patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. Chemotherapy. 2013. Epub 2014 Jan 28
- 3) Yamauchi K, Kogashiwa Y, Nakamura T, Moro Y, Nagafuji H, Kohno N. Diagnostic evaluation of sentinel lymph node biopsy in early head and neck squamous cell carcinoma: A Meta-Analysis. Head Neck. 2013 [Epub ahead of print]
- 4) Ikeda T, Kobayashi R, Kogashiwa Y, Matsuda T, Kohno N. Epstein-barr virus diversity in immunocompetent healthy

persons: reassessment of the distribution of genetic variants. J Med Virol. ;86(2):301-5, 2013.

学会発表

- 1) 小柏靖直、佐藤大、茂呂順久、松本吉史、渡邊格、中村健大、甲能直幸. ICG 蛍光法を用いたセンチネルリンパ節生検においてトレーサーの 2 次リンパ節流入を抑制する方法に関する研究. 第 15 回 SNNS 研究会学術集会
- 2) Yasunao Kogashiwa, Dai Sato, Naoyuki Kohno. Sentinel Node Navigation Surgery Using Indocyanin Green (ICG) Fluorescence Imaging for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. 20th IFOS World Congress, 2013 年 6 月

分担研究報告書

センチネルリンパ節におけるリンパ管新生に関する研究

研究分担者 吉崎 智一 金沢大学附属病院耳鼻咽喉科頭頸部外科 教授

研究要旨

仮説「口腔癌ではリンパ節転移が起こる前にリンパ管新生が起こる」について、摘出済みセンチネルリンパ節を免疫染色して検証を行った。転移陽性症例の転移陰性リンパ節でリンパ管新生が亢進していたことは、仮説を支持する結果であった。

A. 研究目的

「仮説1：口腔癌リンパ節では転移が起こる前にリンパ管新生が始まる。」、「仮説2：センチネルリンパ節内のリンパ管新生の度を調べれば、ある程度、転移再発を予測できる。」、を検証すること。

B. 研究方法

44症例165個の摘出済みセンチネルリンパ節についてD2-40抗体で免疫染色を行い、リンパ管を同定する。センチネルリンパ節内のリンパ管数とリンパ管面積を算出し、リンパ管新生と転移の有無、頸部再発の有無との関連を調べる。

（倫理面への配慮）

金沢大学医学倫理審査委員会での承認を得た。さらに、各参加施設でも同様の承認を得た。

C. 研究結果

165個のセンチネルリンパ節の内、転移陽性であったものは17症例24個であった。転移を有するリンパ節では有意にリンパ管新生が亢進していた。転移陰性リンパ節でもリンパ節転移を来していた症例ではリンパ管新生が亢進していた。頸部再発の有無とリンパ管新生では有意な相関を認めなかった。

D. 考察

転移陰性リンパ節でも、転移を来していた症例ではすでにリンパ管新生が亢進していたことは、リンパ節転移前に既にリンパ管新生が亢進することを支持する結果であった。頸部再発とリンパ管新生については、さらに患者予後の経過観察を要する。

E. 結論

リンパ節転移を来す前段階として、リンパ節ではリンパ管新生が亢進する。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし