

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592281
 研究課題名（和文）リンパ管造影CTを用いたセンチネルリンパ節同定法の口腔癌への応用と有用性の検討
 研究課題名（英文）Application to oral cancer of the sentinel lymph node identification method using lymphangiography CT
 研究代表者
 福田 雅幸（FUKUDA MASAYUKI）
 秋田大学・医学部・准教授
 研究者番号：20272049

研究成果の概要：歯肉癌は、センチネルリンパ節の同定が困難であり、舌癌のような軟組織に限局して発生した癌のリンパ路が把握しやすく、センチネルリンパ節の同定も容易であることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：センチネルリンパ節、口腔癌、リンパ管造影CT

1. 研究開始当初の背景

近年、癌治療の成績向上のために、センチネルリンパ節に関する研究が盛んに行われ、乳癌や皮膚癌では、センチネルリンパ節の同定と生検が標準的な治療法となりつつある。最近では、口腔癌においても、センチネルリンパ節に関する報告が多くみられる。

センチネルリンパ節の同定法としては、現在、放射線同位元素標識コロイド法（RI法）と色素法があり、これらを単独あるいは併用して臨床応用されている。しかし、RI法では、1)シンチグラムが二次元画像である、2)センチネルリンパ節が原発巣に近い場合、シンチカメラやガンマプローブでの検出が困難な場合がある、また、色素法では、脂肪の

多い部位では色素で染色されたリンパ管やリンパ節が不明瞭である、などの理由から、センチネルリンパ節の解剖学的位置の同定が困難であることが指摘されている。さらに、リンパ節転移によるリンパ路の変更がある場合や、時間が経過し、放射性コロイドや色素が遠位リンパ節に流入した場合、センチネルリンパ節ではないリンパ節をセンチネルリンパ節と同定する危険性が極めて高いという最大の欠点がある。そこで、これらの欠点を克服するために、申請者らは、乳癌において、リンパ管造影MRIによるセンチネルリンパ節の同定を試みた。しかし、MRIでは、リンパ路を三次元的に描出することが困難であった。一方、乳癌ではリンパ管造影

CT をセンチネルリンパ節の同定に応用した報告がある (Suga K, Yuan Y, Okada M, et al: Breast sentinel lymph node mapping at CT lymphography with iopamidol: preliminary experience. *Radiology*, **230**(2), 543-552, 2004)。リンパ管造影 CT では、造影剤が最初に流入するセンチネルリンパ節とその輸入リンパ管、さらにその後続くリンパ節との連続性や解剖学的リンパ路を三次元的に描出することが可能である。すなわち、リンパ管造影 CT は、時間の経過やリンパ節転移により、造影剤が遠位リンパ節へと流入し、遠位リンパ節が造影された後でも、センチネルリンパ節を同定できるという利点を有する (図 3)。よって、申請者は、本法を口腔癌の治療に導入すれば、センチネルリンパ節を従来法よりも正確に同定できると考えた。口腔癌治療において本法を確立することにより、センチネルリンパ節に転移がなければ、不必要な頸部郭清術を回避でき、口腔癌患者の QOL の向上に大いに寄与できるものと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、リンパ管造影 CT を用いた口腔癌のセンチネルリンパ節の同定法の有用性の評価である。

(1) ウサギ VX2 口腔癌転移モデルにおけるリンパ管造影 CT を用いたセンチネルリンパ節の同定法の有用性の確認

ウサギにおいて、口腔癌の頸部リンパ節転移モデルとして使用されている VX2 癌を用いて、口腔癌転移モデルを作製する。このウサギ VX2 口腔癌転移モデルに対して、リンパ管造影 CT を用いたセンチネルリンパ節の同定を行い、以下について、色素法と比較検討する (表 1)。

- ・同定率：全個体からセンチネルリンパ節を同定できる割合
- ・一致率：各法で同定したセンチネルリンパ節が一致する割合
- ・正診率： $(a+d)/(a+b+c+d)$
- ・感度： $a/(a+c)$
- ・特異度： $d/(b+d)$

表 1

センチネルリンパ節の転移の有無	頸部郭清による頸部リンパ節の転移の有無	
	転移(+)	転移(-)
転移(+)	a	b
転移(-)	c	d

(2) リンパ管造影 CT を用いたセンチネルリンパ節の同定法の臨床応用

T1N0 および T2N0 の口腔癌患者を対象に、リンパ管造影 CT を用いたセンチネルリンパ

節の同定と生検を行う。同定率、正診率、感度、特異度について、色素法と比較検討する。以上より、口腔癌治療におけるリンパ管造影 CT を用いたセンチネルリンパ節の同定法の有用性を評価する。

3. 研究の方法

[動物実験]

(1) ウサギ VX2 口腔癌転移モデルの作製

① 実験動物

実験には、体重 3kg 前後の雄性日本白色家兔を用いる。購入後、秋田大学バイオサイエンス教育・研究センター動物実験部門にて予備飼育し、全身状態および口腔内に異常の認められないものを実験に用いる。

② 実験腫瘍

ウサギに可移植性の扁平上皮癌である VX2 癌を用いる。VX2 癌細胞は、東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センターから入手する。これを、当教室で培養、維持する。

③ 移植方法

VX2 癌細胞の移植は、5%FBS 添加 MEM 培地で、腫瘍細胞数が 5×10^5 個/ml になるように調整し、以下の群に分け、それぞれの部位に 0.1ml (細胞数で 5×10^4 個) を注入する。

- ・舌癌群：舌尖から約 1/3 後方の舌縁部 (図 1)
- ・上顎歯肉癌群：上顎第一前臼歯を抜歯し、治癒後の歯槽頂部
- ・下顎歯肉癌群：下顎第一前臼歯を抜歯し、治癒後の歯槽頂部
- ・頬粘膜癌群：上下顎第一前臼歯相当の咬合線上の頬粘膜

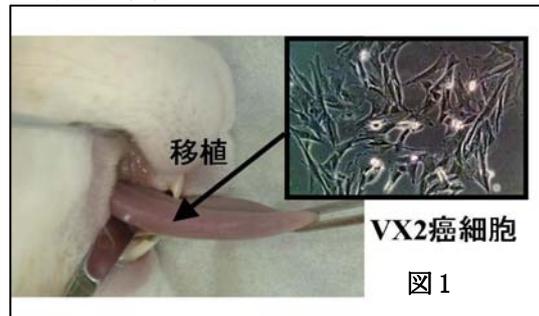


図 1

(2) ウサギ VX2 口腔癌転移モデルにおけるセンチネルリンパ節の同定

① リンパ管造影 CT によるセンチネルリンパ節の同定

各群とも移植後 3、7、14、21 日に、造影 CT 撮影を行う。腫瘍の周囲粘膜下 4 箇所 X 線造影剤 (イオパミドール) を 1ml 注入し、再び CT を撮影し、CT 画像上でセンチネルリンパ節を同定する。

② 色素法によるセンチネルリンパ節の同定と頸部リンパ節の摘出

上記①の翌日以降、全頸部郭清術開始時に、青色色素溶液（インジゴカルミン）2mlを腫瘍周囲の粘膜下に注入する。①で同定したセンチネルリンパ節相当部の頸部皮膚に切開を加え、皮下組織の剥離を行い、青染したリンパ管およびリンパ節を同定する。青染リンパ節が、①で同定したリンパ節と一致するかどうか確認し、センチネルリンパ節を含め、頸部リンパ節をすべて摘出する。

③病理組織学的観察

摘出したリンパ節は、中性緩衝ホルマリン液に固定する。通法に従いパラフィン包埋後、連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色およびサイトケラチン免疫染色を行い、頸部リンパ節への転移の診断を行う。サイトケラチン免疫染色には、一次抗体としてマウス抗ウサギサイトケラチン AE1 抗体および AE3 抗体 (Chemicon International, CA) を用いる。

④リンパ管造影CTによるセンチネルリンパ節の同定と色素法との比較

病理組織学的に腫瘍の転移を確認することにより、同定したリンパ節が真のセンチネルリンパ節なのかどうかを決定する。以上の結果より、各法による同定率、一致率、正診率、感度、特異度について検討し、リンパ管造影 CT を用いたセンチネルリンパ節の同定法が色素法よりも優れていることを評価する。

⑤リンパ管造影CTによるセンチネルリンパ節の同定と生検の口腔癌治療における有用性の確認

上記(1)の③で作製したウサギVX2口腔癌転移モデルのうち、センチネルリンパ節内に病理組織学的に微小転移が確認された時期のモデルに対し、リンパ管造影CTを用いたセンチネルリンパ節の同定と生検を行う。術後21および42日に、全頸部郭清術を行い、後発転移の有無を病理組織学的に診断し、本法を用いたセンチネルリンパ節の同定と生検が、口腔癌の転移治療において有用であることを確認する。

【臨床応用】

(1)対象

秋田大学医学部附属病院を受診した、T1N0 および T2N0 の未治療の口腔癌患者を対象とする。なお、本研究は、秋田大学医学部倫理委員会の承認を受け、インフォームドコンセントが得られた患者に対して施行する。

(2)治療前評価

腫瘍の詳細な評価を行うために、頭頸部の CT および MRI の撮影を行う。また、遠隔転移の評価は、胸腹部造影 CT および PET-CT の撮影を行う。

(3)センチネルリンパ節の同定

①リンパ管造影CTによるセンチネルリンパ節の同定

患者には、CT撮影台上で、仰臥位で手術時と同じ体位をとってもらい、単純CT撮影を行う。その後、腫瘍の周囲粘膜下4箇所イオパミドールを2ml（+2%リドカイン0.5ml）注入し、再びCTを撮影する。CT画像上でセンチネルリンパ節を同定し、皮膚にマーキングする。なお、本検査は、手術の2日前までに行う（図2）。

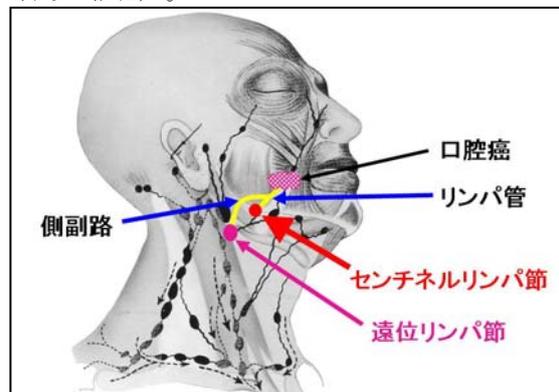


図2 リンパ路の模式図

原発巣からの輸入リンパ管とセンチネルリンパ節との直接的な経路とは別に、遠位リンパ節へ流出していく側副路が形成されることがある。

②色素法によるセンチネルリンパ節の同定と生検

手術開始時に、パテントブルー2mlを腫瘍周囲の粘膜下に注入する。①で同定したセンチネルリンパ節相当部の頸部皮膚に切開を加え、皮下組織の剥離を行い、青染したリンパ管およびリンパ節を同定する。青染リンパ節が、①で同定したリンパ節と一致するかどうか確認し、①②でセンチネルリンパ節と同定したリンパ節を摘出する。

(4)病理組織学的観察

摘出したリンパ節は、術中迅速病理組織検査に提出する。リンパ節は、凍結後、200μm間隔の連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、病理組織学的に転移の有無を診断する。病理組織学的に転移陽性の場合には、全頸部郭清術を適用し、転移陰性の場合には、腫瘍切除のみを行い、経過観察とする。

(5)リンパ管造影CTによるセンチネルリンパ節の同定とRI法および色素法との比較

上記(3)および(4)より、各法における同定率、一致率、正診率、感度、特異度を比較検討する。以上より、リンパ管造影 CT を用いたセンチネルリンパ節の同定法は、色素法よりも優れ、口腔癌の転移治療における有用な診断法となりうる可能性を検討する。

4. 研究成果

[動物実験]

(1) ウサギ VX2 口腔癌転移モデルの作製

入手した VX2 癌細胞の培養、維持を当教室にて行い、まず、舌癌モデルの作製を行った。しかし、個体により移植癌細胞の定着率が異なるためか、増殖や転移の速度が異なり、当初予定した実験を遂行することは極めて困難であった。

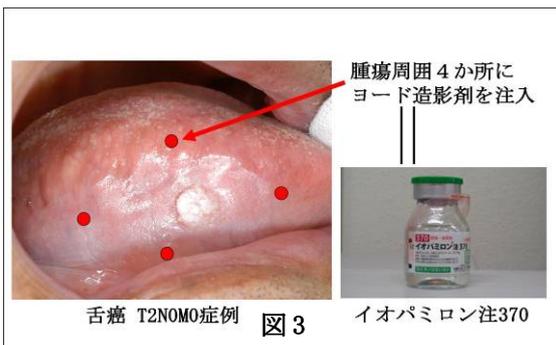
(2) ウサギ VX2 口腔癌転移モデルにおけるセンチネルリンパ節の同定

したがって、動物実験による評価は見送り、すでに倫理委員会で承認を受けた臨床研究を主体に研究を進めることとした。

[臨床応用]

(1) 対象

T1N0 および T2N0 の未治療の口腔癌患者 14 例を対象とした。なお、本研究は、秋田大学医学部倫理委員会の承認を受け、インフォームドコンセントが得られた患者に対して施行した (図 3)。



(2) 治療前評価

腫瘍の詳細な評価を行うために、頭頸部の CT および MRI の撮影を行う。また、遠隔転移の評価は、胸腹部造影 CT の撮影を行う。

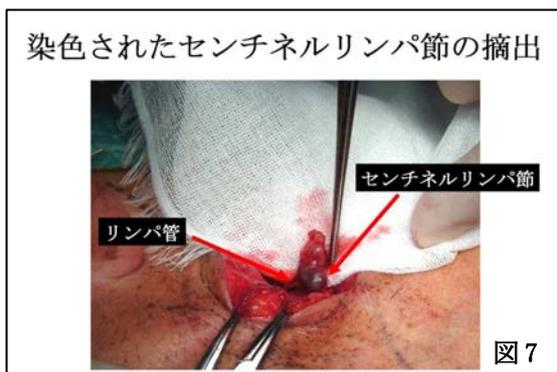
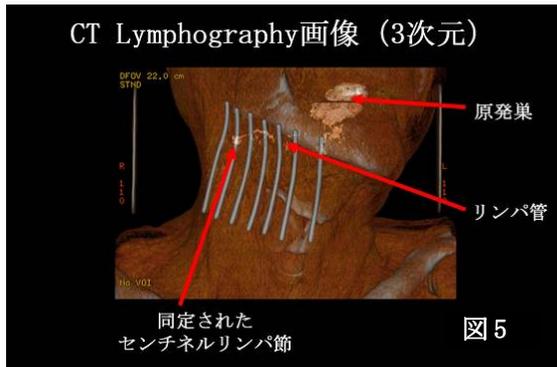
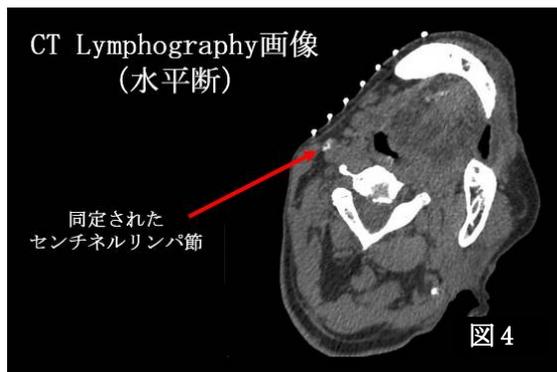
(3) センチネルリンパ節の同定

① リンパ管造影 CT によるセンチネルリンパ節の同定

リンパ管造影 CT によるセンチネルリンパ節の同定を、手術の前日までに行った (図 4~6)。

② 色素法によるセンチネルリンパ節の同定と生検

手術開始時に、パテントブルーを腫瘍周囲の粘膜下に注入し、青染したリンパ管およびリンパ節を同定した。青染リンパ節が、リンパ管造影 CT で同定したリンパ節と一致するかどうかを確認し、リンパ節を摘出した (図 7)。



(4) 病理組織学的観察

摘出したリンパ節は、術中迅速病理組織検査に提出し、病理組織学的に転移の有無を診断した。病理組織学的に転移が陽性の場合には、全頸部郭清術を適用し、転移陰性の場合には、腫瘍切除のみを行い、経過観察とした。

(5) リンパ管造影CTによるセンチネルリンパ節の同定とRI法および色素法との比較

リンパ管造影 CT でセンチネルリンパ節を同定できたのは、14 例中 9 例であった。舌癌 7 例中 1 例に転移陽性が認められたため、頸部郭清を行った。切除標本を検索したところ、センチネルリンパ節以外のリンパ節には転移は認められなかった。他の 2 例は下顎歯肉癌で、転移は陰性であった。

下顎歯肉癌の症例でもセンチネルリンパ節の同定が可能であったが、舌癌のような軟組織に限局して発生した癌のリンパ路が把握しやすく、センチネルリンパ節の同定も比較的容易であることが推察できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① 戸村則昭、大谷隆浩、福田雅幸、頭頸部の診断と治療 update、臨床放射線、53、1401-1410、2008、査読なし

② 福田雅幸、顎口腔疾患に対するオーラルリハビリテーション、みちのく歯学会雑誌、38、7-8、2007、査読有り

③ 中田 憲、福田雅幸、岩波洋一、高野裕史、永井宏和、南條 博、宮本洋二、口腔扁平上皮癌に対する TS-1 と Docetaxel 併用療法の臨床効果に関する検討、癌と化学療法、34 (13)、2237-2240、2007、査読有り

[学会発表] (計 3 件)

① 中田 憲、永井宏和、遊佐和之、佐藤扶美子、伊藤 悠、高野裕史、福田雅幸、宮本洋二、口腔扁平上皮癌に対する S-1 と TXT 併用療法に関する臨床的検討、第 32 回日本頭頸部癌学会、2008

② 高野裕史、永井宏和、中田 憲、伊藤 悠、佐藤扶美子、遊佐和之、古武千昭、福田雅幸、CT Lymphography によりセンチネルリンパ節の同定を行った口腔癌の臨床的検討、第 5 回北東北地区口腔がん勉強会、2008

③ 真宮あさり、中田 憲、立花陽子、吉本正志、岩波洋一、高野裕史、永井宏和、福田雅幸、宮本洋二、口腔扁平上皮癌に対する TS-1 と TXT 併用療法に関する検討、第 61 回日本口腔科学会総会、2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 雅幸 (FUKUDA MASAYUKI)

秋田大学・医学部・准教授

研究者番号：20272049

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

宮本 洋二 (MIYAMOTO YOUJI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・教授

研究者番号：20200214

永井 宏和 (NAGAI HIROKAZU)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・准教授

研究者番号：50282190

高野 裕史 (TAKANO HIROSHI)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：30282172

中田 憲 (NAKATA AKIRA)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：50400510

戸村 則昭 (TOMURA NORIAKI)

秋田大学・医学部・准教授

研究者番号：90143049

石山 公一 (ISHIYAMA KOICHI)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：90344762

佐藤 扶美子 (SATO FUMIKO)

秋田大学・医学部・医員

研究者番号：90455874