

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号： 21601  
 研究種目： 基盤研究 (C)  
 研究期間： 2009 ~ 2011  
 課題番号： 21592200  
 研究課題名 (和文) 遺伝子学的手法を用いたセンチネルリンパ節転移の術中迅速診断法の開発  
 研究課題名 (英文)  
 Intraoperative diagnostic system for the metastasis of sentinel lymph node  
 using the genetic technique  
 研究代表者  
 松塚 崇 (TAKASHI MATSUZUKA)  
 福島県立医科大学・医学部耳鼻咽喉科学講座・講師  
 研究者番号： 80336461

## 研究成果の概要 (和文)：

リンパ節転移の診断は標本の割面で診断されている。術中にリンパ節全体の情報を診断できる方法が求められる。OSNA 法は分子生物学的に 30 分で自動的・定量的に診断できる方法である。今回の研究では、頭頸部癌の頸部リンパ節転移の判定に、OSNA 法を迅速病理検査結果と比較した。

頭頸部扁平上皮癌 22 症例の頸部リンパ節で OSNA 法と迅速病理診断の結果が有意差に一致し、OSNA 法は頭頸部癌においてもリンパ節転移の術中診断が迅速病理検査と同等の可能性を示すことができた。

## 研究成果の概要 (英文)：

One-step nucleic acid amplification (OSNA) is a new automated rapid system to detect lymph node metastasis using the genetic technique. The purpose of this study was to develop the OSNA method to identify lymph node metastasis in head and neck cancer.

Analysis of 22 cases of head neck squamous cell carcinoma was performed with OSNA method and with routine histological examination. The OSNA and histological results were identical. According to this study, OSNA method has the potential to diagnose cervical node metastasis in head and neck cancer.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
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： 外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード： センチネルリンパ節

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 現在の癌治療において治療方針はプロトコル化が推進されている一方で、個々の症例における治療効果を治療前に判定し患者個々のQOLを高めることを目的とした治療法が注目されている。

センチネルリンパ節とは癌病巣から癌細胞がリンパ管に入り最初に流れ込んで転移を来すリンパ節とされる。腫瘍周囲にリンパ管に流れ込む薬剤（トレーサ）を注入し、最初に流れ込むリンパ節、すなわちセンチネルリンパ節を同定し、ここに転移した癌細胞が無ければ、他のリンパ節に転移はないと判断する検査である。

(2) これまで、リンパ節転移を来していない症例にリンパ節郭清が行われ、QOLの低下を来す問題があった。センチネルリンパ節診断により、個々の症例のリンパ節転移の有無を診断し、転移陰性例へのリンパ節郭清を省略できる可能性が高い。1990年前半に悪性黒色腫、乳癌に対してセンチネルリンパ節同定が行われるようになり、近年、同定率の改善とともに対象臓器を広げて臨床応用されている。特に乳癌では、すでに一つの診断方法として定着し、QOLの向上に寄与している。われわれは学内倫理委員会の承認のもと、口腔・咽頭癌、食道・胃癌症例に対し臨床応用を行っている。

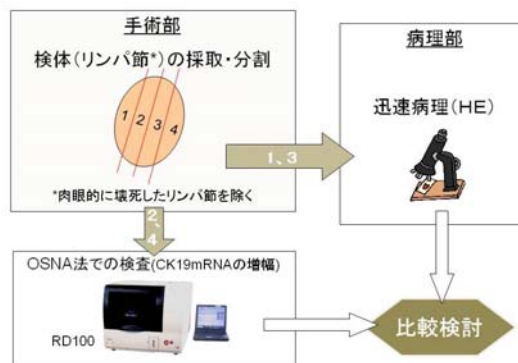
## 2. 研究の目的

(1) センチネルリンパ節生検は、近年乳癌をはじめとする癌において、その有用性に関する研究が進められている。本大学でも乳癌以外に頭頸部癌、消化器癌、皮膚癌において臨床応用の研究が進んでおり、実用化の期待が大きい。

(2) OSNA法 (One Step Nucleic Acid Amplification) は遺伝子学的手法を用いてリンパ節転移を精度よく診断する方法で、予め切除組織を処理（ホモジナイズ、遠心分離またはろ過、希釈）して調製されたサンプル液をセットし、サンプル中に存在する標的遺伝子(CK19mRNA)をLAMP法（栄研化学）で増幅させ、増幅に伴い発生するピロリン酸マグネシウムの濁りを測定する。測定開始から反応検出までを約30分という短時間で処理することが可能であり、従来の迅速病理診断、凍結標本を病理医が目視して診断していた方法に代わる可能性を秘めた診断法である。乳癌の領域ではOSNA法に関するエビデンスが集積している。一方、その他の領域にはその有用性は確認されていない。本研究は本学でセンチネルリンパ節生検の研究を行っている各分野における有用性を検討し臨床上的エビデンスを集積し、臨床での有用性を拡大することにあり、術中のリンパ節転移

が従来法に比べて簡便に診断できるようにするのが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法



(1) 本研究の内容は学内倫理委員会（福島県立医科大学倫理委員会、平成20年）で承認を得た。

(2) 本学附属病院の当該腫瘍患者を対象に、治療および診断目的で採取したリンパ節を直ちに4分割し現行法として、得られた3割面から永久標本（HE染色）を作製し、鏡検による診断を行った。

(4) OSNA法として、4分割のうち隣接しない2分割分の検体を用いた。切除組織を処理（溶媒中でホモジナイズし検体を分離・希釈）し、調製された検体液を遺伝子増幅検出装置GD-100iにセットした。GD-100iにてサンプル中に存在する標的遺伝子(CK19mRNA)をLAMP法で増幅させ、増幅に伴い発生するピロリン酸マグネシウムの濁度を測定し、予め準備された検量線を用いてCK19mRNAを定量した。

(5) 実施した研究結果を集計し、各症例のOSNA法の診断結果と現行の病理組織検査の診断結果を比較した。

## 4. 研究成果

頭頸部扁平上皮癌の手術で採取した頸部リンパ節のうち、22症例、55個のリンパ節のうち、迅速病理では8個が転移あり、1個が微小転移、46個が転移なしであった。OSNA法ではリンパ節3個が強陽性、4個が陽性、48個が陰性であった。

OSNA	迅速病理			計
	マクロ転移	ミクロ転移	転移なし	
++	2	0	0	2
+	4	0	1	5
-	1	1	42	44
計	7	1	43	51

OSNA	迅速病理			計
	マクロ転移	ミクロ転移	転移なし	
++	2	0	0	2
+	4	0	1	5
-	1	1	42	44
計	7	1	43	51

Fisherの直接法  $p < 0.0001$

偽陽性: 1リンパ節(1例)  
偽陰性: 2リンパ節(1例)

## 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6件)

- 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、査読有、頭頸部外科、21巻、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、査読有、頭頸部癌、27巻、2011、355-358
- 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、査読なし、JOHNS、27巻、2011、187-190
- ④ 松塚 崇、三浦智広、横山秀二、鈴木政博、他、OSNA 法による術中リンパ節転移検出の可能性、査読有、頭頸部外科、20巻、129-133
- ⑤ 松塚 崇、三浦智広、横山秀二、鈴木政博、他、センチネルリンパ節生検と頸部郭清術、査読有、耳鼻と臨床 55(補 1)、2009、S55-S62
- 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、査読なし、JOHNS、25巻、1511-1514

[学会発表] (計12件)

- ① 松塚 崇、三浦智広、横山秀二、鈴木政博、國井美羽、大森孝一、口腔・中咽頭癌におけるセンチネルリンパ節生検、第110回日本耳鼻咽喉科学会総会、2009年5月14-16日、東京都
- ② 松塚 崇、三浦智広、横山秀二 他、早期舌癌の治療におけるセンチネルリンパ節生検の役割、第11回 Sentinel Node Navigation Surgery 研究会学術集会、2009年11月28日、東京都
- ③ Takashi Matsuzuka, Tomohiro Miura, Syuji Yokoyama, Masahiro Suzuki, Miha Kunii, Wataru Okano, Koichi Omori, Outcome of sentinel node biopsy for early stage carcinoma of the tongue, 10th Taiwan-Japan Otolaryngology Head and Neck Conference、2009年12月4-5日、Yilan(Taiwan)
- ④ 松塚 崇、三浦智広、鈴木政博、國井美羽、岡野 渉、大森孝一、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年2月28日、東京都
- ⑤ 松塚 崇、三浦智広、大森孝一、永藤 裕、山内宏一、唐帆健浩、甲能直幸、長谷川泰久、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総会・学術講演会、2010年5月20-22日、仙台市
- ⑥ 松塚 崇、三浦智広、鹿野 真人、横山 秀二、鈴木 政博、國井 美羽、岡野 渉、大森 孝一、口腔癌における潜在転移 センチネルリンパ節生検と腫瘍の厚みについて、第34回日本頭頸部癌学会、2010年6月9-11日、東京都
- ⑦ Takashi Matsuzuka, Tomohiro Miura, Masahiro Suzuki, Shuji Yokoyama, Miha Kunii, Koichi Omori, Sentinel Node Biopsy Provides a Decision for Neck Dissection in Early Stage of Tongue Cancer., 4th World Congress of International Federation of Head and Neck Oncologic Societies, 2010年6月16-18日、Seoul
- ⑧ 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 Sentinel Node Navigation Surgery 研究会学術集会、2010年11月17日、横浜市
- ⑨ Takashi Matsuzuka, Tomohiro Miura, Syuji Yokoyama, Masahiro Suzuki, Yukio Nomoto, Miha Kunii, Satoshi Saijoh Koichi Omori, Sentinel node biopsy provides as part of the decision for neck dissection in early stage of tongue cancer, INSN2010 The 7th International Sentinel Node Society Meeting、2010年11月18-20日、Yokohama
- ⑩ 松塚 崇、シンポジウム低侵襲と個別化を目指す頸部郭清術 センチネルリンパ節生検の概要、第35回頭頸部癌学会、2011年6月9日、名古屋市
- ⑪ 松塚 崇、大森孝一、長谷川泰久、他、OSNA 法による頭頸部扁平上皮癌の頸部リンパ節転移診断、第13回 Sentinel Node Navigation Surgery 研究会学術集会、2011年12月3日、東京都
- ⑫ 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回日本頭頸部外科学会、2012年1月27日、福島市

〔図書〕（計1件）

- ① 松塚 崇：センチネルリンパ節の EBM と  
は. EBM 耳鼻咽喉科頭頸部外科の治療（池  
田勝久他編），p495-498, 中外医学社, 2010

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松塚 崇 (MATSUZUKA TAKASHI)  
福島県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：80336461

### (2) 研究分担者

木暮道彦 (KOGURE MICHHIKO)  
福島県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：90264548  
三浦智広 (MIURA TOMOHIRO)  
福島県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00423806  
鈴木政博 (SUZUKI MASAHIRO)  
福島県立医科大学・医学部・助手  
研究者番号：90513268

### (3) 連携研究者

なし