

氏 名 わく い たか ひろ
和久井 崇 大

学 位 の 種 類 博士（医学）

学 位 記 番 号 甲第643号

学位授与の日付 平成26年3月5日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項
(口腔外科学)

学 位 論 文 題 目 舌扁平上皮癌におけるセンチネルリンパ節生検に関する研究
－OSNA法による遺伝子解析の有用性について－

論 文 審 査 委 員 (主査) 教授 春 名 眞 一
(副査) 教授 深 澤 一 雄
教授 窪 田 敬 一

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

癌においてリンパ節転移は重要な予後因子であることより、正確なリンパ節転移診断を行う方法としてセンチネルリンパ節（sentinel lymph node：SLN）生検が導入され、さらに診断精度の向上を図るために遺伝子解析が応用され、その有用性が報告されている。しかしながら、口腔癌ではSLN生検における遺伝子解析を用いた転移診断については、なお一定の見解が得られていない。

【目 的】

舌扁平上皮癌においても、SLN生検におけるone step nucleic acid amplification（OSNA）法を用いた遺伝子解析による転移診断が、有用であることを明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】

1. 対象

2004年から2011年までにSLN生検を施行した舌扁平上皮癌Stage I、II症例28例をSLN生検施行群とし、SLN生検導入前のStage I、II症例23例をSLN生検未施行群として比較検討した。

2. 方法

1) 画像検査におけるリンパ節転移診断基準

CT、MRIにてリンパ節の内部壊死が認められるもの、リンパ節の短径が10mm以上のもの、FDG PET-CTにてFDGの異常集積を認め、かつ Standardized Uptake Value（SUV）max値が4.0

以上のものを転移陽性とした。

2) SLN生検

手術前日に^{99m}Tc-Tin colloid (74 MBq, 1 ml) を原発腫瘍周囲に注入し、シンチカメラで撮影を行い、SLNを同定した。また、手術開始時に2%パテントブルー溶液1mlを原発腫瘍周囲に注入後、皮膚切開を加え青染されたリンパ節を確認し、ガンマプローブを用いてSLNであることを同定し摘出した。

3) 病理組織学的診断および免疫組織化学染色によるSLN転移診断

摘出したリンパ節を分割し、最大断面でH-E染色による迅速病理組織診断およびCK19免疫染色を行った。免疫染色は、一次抗体としてマウス抗ヒトCK19抗体 (clone RCK108, Dako) を50倍希釈し反応させた後、二次抗体としてENVISION system (DAKO) を反応させた。

4) OSNA法によるSLN転移診断

分割したSLNのうち、組織片を組織可溶化液に入れ、溶解し遠心分離、中間層を可溶化液で希釈しサンプルとした。これを遺伝子増幅検出装置 (Sysmex, Japan) にて増幅反応させ、CK19mRNAのコピー数を測定した。転移陽性の判定基準は、250copies/ μ lをカットオフ値として判定を行った。

なお、後発転移の判定基準は、原発巣は制御されているにもかかわらず、術後6か月以上経過して頸部リンパ節転移をきたしたものとした。統計学的検討は χ^2 検定を用いて行い、生存率はKaplan-Meier法にて算出し、各群間の生存率比較はLog rank testにて行った。

【結 果】

1. SLN生検施行群における検討

1) 病理組織学的診断とOSNA法による遺伝子解析の検討

病理組織学的に転移陽性であった症例は28例中5例 (17.9%)、転移陰性は23例 (82.1%) であった。転移陽性と診断した5例のうち1例は、当初、迅速病理組織検査にて転移陰性であったが、遺伝子解析で転移陽性と診断されたため、亜連続切片を作成し再度検討を行なったところ、病理組織学的診断でも転移陽性と診断された症例であった。また、OSNA法による遺伝子解析の結果は28例中6例 (21.4%) で転移陽性、22例 (78.6%) で転移陰性であった。病理組織学的診断と遺伝子解析の結果は28例中27例 (96.4%) で一致し、1例が不一致であった。

2) 免疫組織化学染色の検討

病理組織学的診断、遺伝子解析ともに転移陽性で、免疫染色においても転移陽性を示した症例は28例中4例 (14.3%)、病理組織診断および遺伝子解析とも転移陰性で、免疫染色も転移陰性であった症例は28例中22例 (78.6%) であった。一方、結果が不一致であったのは2例 (7.1%) で、病理組織学的診断と遺伝子解析では転移陽性であったが免疫染色が転移陰性であった症例が1例、病理組織学的診断と免疫染色が転移陰性であったが遺伝子解析が転移陽性の症例が1例であった。

2. SLN生検施行群とSLN生検未施行群の比較検討

5年累積生存率は、SLN生検施行群94.4%、SLN生検未施行群86.7%で、有意差は見られなかったものの、SLN生検施行群の生存率が高い傾向を示した。後発転移は、SLN生検施行群では後発転移は見られなかったが、SLN生検未施行群では23例中3例（13.0%）に認め、SLN生検施行群と比べ有意に多く、かつそのうち1例は不幸な転機を辿った。

【考 察】

SLN生検を施行することにより、従来の画像診断では検索し得なかったリンパ節転移を検出することができ、また、リンパ節転移陽性と診断した5例のうち1例は、病理組織学的検査では検出できなかったリンパ節転移をOSNA法によって診断することができた症例で、OSNA法による遺伝子解析は診断精度を高めるものと思われた。

SLN生検施行群28例では全例、頸部リンパ節転移の制御が可能であった。一方、SLN生検未施行群23例では、頸部再発非制御が1例みられた。SLN生検未施行群においてもSLN生検が施行されていれば、適切な治療法が選択可能であったことが推測され、SLN生検は予後改善に寄与することが考えられた。

【結 論】

舌扁平上皮癌における遺伝子解析を応用したSLN生検は、従来の病理組織学的診断と比較し診断精度が高く有用な診断法であり、治療成績の向上に寄与すると考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

癌においてリンパ節転移は重要な予後因子であることより、正確なリンパ節転移診断を行うことが重要である。近年、センチネルリンパ節（sentinel lymph node：SLN）の概念が報告され、その臨床応用すなわちSLN生検は、正確なリンパ節診断に有用であることが述べられている。しかしながら、転移の有無を同定する従来の方法はなお、問題が残されている。本研究では、舌扁平上皮癌のSLN生検において、新たに開発された遺伝子診断法であるone-step nucleic acid amplification（OSNA）法が転移診断に有用であるかを検討している。対象は、舌扁平上皮癌Stage I、II症例28例で、SLN生検を施行し、SLNの転移診断を最大断面における病理組織検査ならびにOSNA法による遺伝子解析によりリンパ節転移を同定し、従来の病理診断との診断精度について比較検討するとともに、治療成績についてSLN生検未施行群23例と併せて検討している。その結果、SLN生検によって、1）SLN生検を施行した28例中、従来の画像診断では検出できなかったリンパ節転移を5例検出できた。2）病理検査では診断できなかったリンパ節転移を、OSNA法によって検出得た。3）SLN生検未施行群と比較し、5年累積生存率は、有意差はないものの施行群に良好な傾向を示した。4）後発リンパ節転移は、SLN生検施行群では認めず全例頸部制御が可能であったのに対し、未施行群では3例に認められ、うち1例は制御が不能であった。5）診断精度は、SLN生検施行群は96.4%、未施行群では87.0%であった。以上の結果より、舌扁平上皮癌におけるOSNA法を応用したSLN生検は、短時間で亜連続切片と

同等な結果を得ることが可能で、従来の最大断面のみによる病理組織学的診断と比較し、診断精度が高く有用な診断法であり、かつ治療成績の向上に寄与する可能性がある」と結論づけている。

【研究方法の妥当性】

舌扁平上皮癌（Stage I、II）症例を対象に、通法に従いSLNを同定し、病理組織学的診断およびOSNA法による遺伝子解析を行い、さらに免疫組織化学染色を用いリンパ節転移の診断精度について適切に検討を行っている。研究目的を明確に設定し、それに即した検討が行われており、本研究方法は妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

申請論文では、舌扁平上皮癌SLN生検におけるOSNA法の有用性について検討を行っている。頭頸部癌を対象に、病理組織学的診断との比較検討を行った報告はあるものの、舌癌のみを対象に、かつ予後との関連についての報告は見られない。この点において本研究は新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文では、臨床的に頸部リンパ節転移を認めない舌癌に対しSLN生検を施行し、OSNA法によるSLNの転移診断が有用であるか、そして治療成績についてSLN生検未施行群と比較検討を行っている。その結果、舌扁平上皮癌のSLN生検においてOSNA法は、従来の病理組織学的診断と比較し診断精度が高く有用な診断法であり、治療成績の向上に寄与する可能性がある」と結論づけている。本結論は論理的に矛盾するものでなく、耳鼻咽喉科学、外科学、病理学など関連領域における知見を踏まえても妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

申請論文では、舌癌N0症例における正確なリンパ節転移の診断法を確立し、オカルト転移症例をよりの確に診断することにより、不必要な手術の回避および治療成績の向上を目的とし、OSNA法を応用したSLN生検の有用性を明らかにしようと試みている。その結果、OSNA法を応用したSLN生検は転移診断の精度が高い検査法で、治療成績の向上に寄与する可能性があることを明らかにしており大変意義深い研究として評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、口腔外科学や病理学の理論を学び実践した上で、作業仮説を立て実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し貴重な知見を得ていることより、研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士（医学）の学位授与に相応しいと判定した。

（主論文公表誌）

Dokkyo Journal of Medical Sciences

41 : 129-136, 2014