シンポジウム

「口腔癌 N0 症例の頸部マネジメント」

口腔癌におけるセンチネルリンパ節生検の現状と課題

合 田 啓 之 中 城 公 一 日 野 聡 史
村 瀬 隆 一 浜 川 知 大 浜 川 裕 之

要旨：頸部リンパ節転移の有無は口腔癌の重要な予後因子である。cN0 症例に対する治療方針としての、予防的頸部郭清術や経過観察についてはいまだ議論の余地があるのが現状である。センチネルリンパ節生検（SNB）は、様々な癌種において臨床応用がなされてきた。口腔癌における SNB の目的は、cN0 症例に対し、頸部郭清術を行うか否かを決定することにある。しかしながら、口腔癌の SNB においては、以下の 4 つの問題点がある。すなわち、RI の使用、shine-through 現象、潜在転移診断法と EBM の不足である。本稿では、口腔癌におけるセンチネルリンパ節生検の現状について解説する。

キーワード：口腔癌、cN0、センチネルリンパ節生検

はじめに

口腔癌における頸部リンパ節転移の有無は最も重要な予後因子のひとつであり、cN0 症例に対しては、経過観察もしくは予防的頸部郭清術のいずれかが選択されており、長年の論点となってきた。経過観察群においては、約 20-30% に後発リンパ節転移が生じ、その予後は不良となることが多い。一方、予防的頸部郭清術群においては、約 80% においては、いわゆる over treatment となる問題がある。2015 年 D'Cruz ら¹⁾による報告により、はじめて cN0 症例に対する予防的頸部郭清術の優位性が示された。

センチネルリンパ節生検（SNB）は、1992 年に Morton ら²⁾によって、悪性黒色腫に対する有用性が示されて以来、乳癌、消化器癌、前立腺癌、頭頸部癌など様々な癌に応用されてきた。現在、悪性黒色腫、乳癌では標準治療に位置付けられている。センチネルリンパ節は、腫瘍から直接リンパ流をうけるリンパ節であり、「領域リンパ節の中で最初に転移がおこるリンパ節」と定義されている。SNB の臨床的意義は、正確な staging に基づく適切な治療法の選択と低侵襲治療の実現にあるが、口腔癌における SNB においては、同定から転移診断における各ステップにおいて様々な問題点があるのが現状である。

本稿では、口腔癌における SNB の現状と課題を示し、今後の展望を記す。

口腔癌における SNB の現状と課題

SNB は、手術前日に ^{99m}Tc-Tin colloid (74MBq, 0.4ml) を原発腫瘍周囲 4 か所に注入し、約 2 時間後にシンチカメラにて頭頸部の撮影を行い、センチネルリンパ節の位置と個数を確認する。術当日には、センチネルリンパ節近傍の皮膚を小切開し、RI ガンマプローブガイド下に、センチネルリンパ節を同定する。同定されたリンパ節は術中迅速病理組織診断および後述する術中迅速遺伝子診断による転移の有無を評価する。

口腔癌における SNB では、次に記す 4 つの課題がある。①トレーサーとしての RI の管理区域外での使用。② shine through の問題。③潜在転移診断法の確立。④ EBM の確立。以下、当科の取り組みを中心に現状と課題を詳細にする（表 1）。

RI の管理区域外での使用

SNB におけるセンチネルリンパ節同定法としては、色素法と RI 法がある。頸部は広頸筋および胸鎖乳突筋に広く覆われている解剖学的理由と、自施設での統計では、センチネルリンパ節は 7% は健側のみ、9% は両側に認められたことより色素法での正確な同定は困難である（表 2）。実際、色素法単独でのセンチネルリンパ節同定率は 70.4% であり、RI 法では 100% であることより RI の使用は必須と考える（表 3）。一方、RI 法では、管理区域外での使用

表 1 口腔癌における SNNS の課題

・ 導入に関する問題：RI の管理区域外での使用
・ 同定法に関する問題：shine through
・ 診断法に関する問題：潜在転移診断法の確立
・ EBM の確立：多施設共同研究，治療成績，他

表 2 センチネルリンパ節同定例

患側のみ	87 症例	(84%)
健側のみ	7 症例	(7%)
両側	10 症例	(9%)

やガンマプローブ，ガンマカメラ等の特殊な機器を必要とすることが短所としてあげられる。RI の管理区域外の使用については臨床研究倫理委員会の承認時に，「放射性同位元素使用室以外の場所で放射性物質を取り扱うため，放射線部や手術室，病理部などの関係部局との打ち合わせた上で実施するものとする」との条件が付いた。そこで，関係部署に説明の上，はじめの 5 症例については，放射線測定ならびに被曝量に関しての測定を行い安全性の検証を行った経緯があり，その過程および結果については新谷ら³⁾が詳しく報告を行ったので参考にされたい。

shine through の問題

RI 法におけるもうひとつの問題が，shine through である。Shine through とは，RI 局注部の高集積の影響で，近傍のいわゆる hot node の集積がマスクされる現象であり，いわゆる偽陰性症例のひとつの原因と考えられる。特に舌癌，口底癌では解剖学的位置関係よりそのリスクは高いと考えられる。これまで，個人遮蔽トレーの作製，SPECT/CT を用いる方法や，原発腫瘍の切除を先行する方法などが考案されてきたが，いずれも一長一短の方法であり，根本的な解決には至っていない。

Shine through はトレーサーに問題があり，理想的なトレーサーとは局注部からの速やかなリンパ管・リンパ節への移行と，リンパ節における滞留という相反する性質が求められる。Lymphoseek (^{99m}Tc-tilmanocept) は，diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA) とマンノースの複数ユニットが 10kDa のデキストランに共有結合した高分子で，その長径は 7 nm である。従来のフチン酸やスズコロイドの 1/100-500 の粒子径であり，局注部位からのクリアランスに優れ，かつ，リンパ組織に移行後，マクロファージおよび樹状細胞表面のマンノース結合受容体 (CD206) に結合し，リンパ組織に集積する性質を持つ。

表 3 センチネルリンパ節の同定方法及び個数および同定率

		平均個数	同定率
色素法 (2%パテントブルー)	14 症例	2.3 個	70.4%
色素法 + RI 法 (^{99m} Tc-スズコロイド)	104 症例	2.0 個	100%

米国では臨床所見上リンパ節転移陰性である口腔扁平上皮癌，乳癌，メラノーマ患者における SNB のトレーサーとして，また，2014 年 10 月には固形癌全体でリンパ節マッピングへの適応が FDA で認可され臨床応用されている。口腔扁平上皮癌においては，83 症例に対するマッピングが実施され，リンパ節検出率は 98% (81/83) とその高い検出感度が報告されている⁴⁾。Lymphoseek[®]は国内未承認薬であるが，将来的には shine through の問題を根本的に解決するトレーサーとなる可能性がある。

潜在転移診断法の確立

潜在転移診断法においては，現在に至るまで様々な工夫を重ねてきた。SNB におけるリンパ節転移診断は，高い診断制度と共に術中診断であるが故の迅速性が要求される。つまり従来の形態学的診断法では限界があり，準連続切片は時間的，マンパワー的な制限が大きく臨床応用には適さない。

そこで，すでに乳癌で応用されていた，術中迅速遺伝子診断法である one-step nucleic acid amplification (OSNA) 法 (Sysmex, Kobe, Japan) の臨床応用を 2006 年より開始した。OSNA 法は，リンパ節から検出対象遺伝子である cytokeratin19 (CK19) mRNA の抽出・精製を行うことなく可溶性試薬中でホモジナイズし，増幅および定量を約 30 分で行うことが可能であり，乳癌および大腸癌では SNB における転移診断において保険適応が認められている。また，本法はキット試薬と専用機器を使用するため，診断の施設格差がなく，短時間で結果が得られるため術中応用が可能となる。しかし，口腔癌を含む頭頸部扁平上皮癌における OSNA 法の診断精度は，感度 (82.4-86.9%)，特異度 (96-99.3%)，正診率 (94.2-96%) と偽陰性の存在の面での問題点が明らかとなった^{5,6)}。この理由としては，すでに OSNA 法が臨床応用されている乳癌等においては，原発腫瘍組織における CK19 の発現はほぼ全症例に認められているのに対して，口腔扁平上皮癌では過去の報告をみてもその発現にはかなりのばらつきがあることがあげられる。われわれの施設においても口腔扁平上皮癌原発組織における CK19 の発現を OSNA 法にて検討したが，その発現量にはかなりのばらつきがあり，偽陰性症例においては低発現であったことも確認できた。つまり，口腔扁平上皮

癌のリンパ節転移分子診断において、CK19 の発現のみでは臨床応用が困難であることが示唆された。

そこで、口腔扁平上皮癌頸部リンパ節転移分子診断に有用となるマーカーの探索を試みた。検体として口腔扁平上皮癌患者由来の転移リンパ節を対象とし、比較対象として非担癌患者由来リンパ節および唾液腺組織を用いた。検体を TissueLyser (Qiagen, Dusseldorf, Germany) 中にてホモジナイズし、Isogen (Nippon Gene, Toyama, Japan) を用いて total RNA を抽出・精製し、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) にて定性・定量解析した。cDNA を合成後、Human Genome Survey Microarray (Applied Biosystems) にてハイブリダイゼーションし、Chemiluminescent Detection kit (Applied Technologies, Santa Clara, CA) にて洗浄・発色後、Applied Biosystems 1700 Microarray Analyzer (Applied Biosystems) にて発現定量を行った。遺伝子発現量の比較は Gene Spring GX 7.3 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) にて解析した。Cut-off 値を非担癌患者由来リンパ節と比較し、3 倍以上の発現亢進とし、発現亢進を認める遺伝子を 33 種類同定した。同定した 33 種類の遺伝子のうち、プライマー設計が可能であった 25 種類の遺伝子について、リアルタイム定量化 RT-PCR 法による発現定量解析を行った。25 種類の遺伝子の内、Annexin A8-like2 (ANXA8) と Desmoglein3 (DSG3) では、検討を行ったすべての転移リンパ節において高発現を認めたが、非担癌患者由来リンパ節においてはそれらの発現は全く検出されなかった。続いて、OSNA 法の原理である RT-LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法におけるプライマーを設計し検討を行った。結果、CK19 と ANXA8 によるダブルマーカーにて転移診断の感度は 100% (53/53) となり、臨床応用への可能性が期待される結果となった⁷⁾。

EBM の確立

口腔癌における SNB については「口腔癌診療ガイドライン」⁸⁾においても補足としての域を出ておらず、その有用性に関する報告が増加してきているものの、質の高いエビデンスは得られていないのが現状である。そこで、これまで当科で SNB を行ってきた 118 症例について検討を行った。SNB にて転移陽性であった症例は 18 症例であり、陰性であった 100 症例中 10 症例に後発リンパ節転移が認められた (sensitivity 64.3%, specificity 100%, accuracy 91.5%, negative predictive value 90%) (表 4)。先述したように、経過観察群においては後発リンパ節転移が 20-30% 程度認められ、予防的頸部郭清術群では 70-80% 程度に過剰な治療となり、後発リンパ節転移が 7-8% 程度認められることと比較すると、SNB 群では、後発リンパ節転移に対する抑制効果が認められた。また、これまで報告されているように予防的頸部郭清に比較すると明らかに低侵襲であること⁹⁾、また、医療経済効果として不必要な頸部郭清術を回避する意味で片側の頸部郭清術に比較して、1 症例あたり 17.2 万円の医療費削減が期待できることが日本各医学会のワーキンググループより報告されている。

当施設の症例解析より後発転移症例の詳細を検討すると、これまで延べてきたトレーサー、shine through、潜

表 4

	Pathological negative	Pathological positive	
SNB negative	90	10	100
SNB positive	0	18	18
	90	28	118

表 5 後発リンパ節転移症例

症例	原発	cT stage	pT stage	SLN	同定法	診断法	転移までの期間	予後
1.	舌	2	2	Level 1., 2.	Dye	病理	7M	無病生存
2.	舌	1	1	Level 1.	Dye + RI	病理	3Y8M	他病死
3.	舌	3	3	—	Dye + RI	病理	3M	無病生存
4.	舌	2	2	Level 1., 3.	Dye + RI	病理	3M	他病死
5.	上顎歯肉	2	4	Level 1.	Dye + RI	病理 + OSNA	7M	原病死
6.	上顎歯肉	2	2	Level 1.	Dye + RI	病理 + OSNA	1Y2M	無病生存
7.	口底	2	1	Level 1.	Dye + RI	病理 + OSNA	4M	原病死
8.	下顎歯肉	2	2	Level 2.	Dye + RI	病理 + OSNA	2Y1M	無病生存
9.	舌	1	1	Level 1.	Dye + RI	病理 + OSNA	6M	原病死
10.	舌	1	1	Level 1.	RI	病理 + OSNA	5M	無病生存

在転移診断に関する問題が原因と考えられた。また、T3以上の症例や顎骨浸潤症例ではリンパ流のトレースが不完全となり、偽陰性症例の原因と考えられ、SNBの適応外と考えられた(表5)。口腔癌におけるSNBに関しては、同定法や転移診断法の標準化が必要であり、更なる研究成果が必要であるが、さらに微小転移の検出時の郭清領域の検討やその妥当性および臨床的意義の解析には多施設共同研究が必須と考えられる。現在、耳鼻咽喉科頭頸部外科医が中心となり、「頭頸部癌センチネルリンパ節生検多施設共同研究(UMIN ID 000006510)」が、厚生労働科学研究費補助研究により進行しており、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比較試験が行われている。本研究にて生存率に対する非劣性、術後機能障害および合併症における優位性が示されれば、口腔癌におけるSNBの妥当性が証明されることとなるであろう。

展 望

口腔癌における頸部リンパ節転移の有無は、重要な予後因子であるが、現状の画像検査の正診率は70-80%程度であり、微小転移を含めた診断は困難な現状がある。cN0症例における潜在転移率は20-30%であるが、頸部郭清術の合併症および低侵襲医療の立場を考慮すると、不必要な頸部郭清術は回避すべきである。口腔癌におけるセンチネルリンパ節のコンセプトが成り立つことはすでに示され、方法論、臨床成績が報告されてきた¹⁰⁻¹²⁾。当科においても2001年よりSNBを導入するとともに、その同定法および診断法に工夫を加え報告してきた^{3,5,7,13-16)}。しかしながら、低侵襲医療の立場からはSNBでさえも70-80%の患者には侵襲的な検査といえる。2005年にRoepmanらは、原発組織での遺伝子発現の解析を行うことで、頸部リンパ節転移の有無を診断する試みを報告した¹⁷⁾。本報告では、リンパ節転移診断における陰性症例の正診率は100%であり、陽性症例の正診率が77%であることを考慮すると、陽性症例のみにSNBを行うことで、更なる低侵襲医療の実現が可能となる。現在、われわれも過去のSNB症例の原発組織の遺伝子解析を進め、診断マーカーの探索を行っており、将来的には同モデルの診断システムを確立したいと考えている。

今後、口腔癌でのSNBの現状における問題点が解決されれば、口腔癌におけるSNBのEBMが確立し、乳癌、悪性黒色腫におけるような標準化がなされることを期待し、今後も研究を続けていきたい。

本論文の要旨は第34回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会(平成28年1月、横浜)のシンポジウム2「口腔癌N0症例の頸部マネジメント」において発表した。

本論文について申告すべき利益相反状態はありません。

文 献

- 1) D'Cruz, A.K., Vaish, R., et al.: Elective versus Therapeutic Neck Dissection in Node-Negative Oral Cancer. *N Engl J Med* 373 : 521-529, 2015.
- 2) Morton, D.L., Wen, D.R., et al.: Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 127 : 392-399, 1992.
- 3) 新谷 悟, 矢野淳也, 他: 核医学的検出法によるセンチネルリンパ節生検実施までの経緯と現状. *日口外誌* 49 : 257-263, 2003.
- 4) Agrawal, A., Civantos FJ, et al.: ^{99m}Tc Tilmanocept Accurately Detects Sentinel Lymph Nodes and Predicts Node Pathology Status in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: Results of a Phase 3 Multi-institutional Trial. *Ann Surg Oncol* 22 : 3708-3715, 2015.
- 5) Goda, H., Nakashiro, K., et al.: One-step nucleic acid amplification for detecting lymph node metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 48 : 958-963, 2012.
- 6) Matsuzuka, T., Takahashi, K., et al.: 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* 19 : 3865-3870, 2012.
- 7) Oka, R., Nakashiro, K., et al.: Annexin A8 is a novel molecular marker for detecting lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 7 : 4882-4889, 2016.
- 8) 科学的根拠に基づく口腔癌診療ガイドライン, 2013年版, 金原出版, 東京, 2013, 109.
- 9) Schiefke, F., Akdemir, M., et al.: Function, postoperative morbidity, and quality of life after cervical sentinel node biopsy and after selective neck dissection. *Head Neck* 31 : 503-512, 2009.
- 10) Koch, W.M., Choti, M.A., et al.: Gamma probe-directed biopsy of the sentinel node in oral squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 124 : 455-459, 1998.
- 11) Stoeckli, S.J., Pfaltz, M., et al.: Histopathological features of occult metastasis detected by sentinel lymph node biopsy in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 112 : 111-115, 2002.
- 12) Ferris, R.L., Xi, L., et al.: Intraoperative qRT-PCR for detection of lymph node metastasis in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 17 : 1858-1866, 2011.
- 13) Hamakawa, H., Onishi, A., et al.: Intraoperative real-time genetic diagnosis for sentinel node navigation surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33 : 670-675, 2004.
- 14) Onishi, A., Nakashiro, K., et al.: Basic and clinical studies on quantitative analysis of lymph node micrometastasis in oral cancer. *Oncol Rep* 11 : 33-39, 2004.
- 15) Hamakawa, H., Fukuzumi, M., et al.: Keratin mRNA for detecting micrometastasis in cervical lymph nodes of oral cancer. *Cancer Lett* 160 : 115-123, 2000.
- 16) Hamakawa, H., Fukuzumi, M., et al.: Genetic diagnosis of micrometastasis based on SCC antigen mRNA in cervical lymph nodes of head and neck cancer. *Clin Exp Metastasis* 17 : 593-599, 1999.
- 17) Roepman, P., Wessels, L.F., et al.: An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Nat Genet* 37 : 182-186, 2005.

Current status and tasks of sentinel node biopsy in oral cancer

Hiroyuki Goda, Koh-ichi Nakashiro, Satoshi Hino,
Ryuichi Murase, Tomohiro Hamakawa and Hiroyuki Hamakawa

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Ehime University Graduate School of Medicine
(Chief: Prof. Hiroyuki Hamakawa)

Abstract

Cervical lymph node metastasis is an important prognostic factor in oral cancer. Whether patients with cN0 status should be treated with elective neck dissection or with therapeutic neck dissection after nodal relapse has been a matter of debate. Sentinel node biopsy (SNB) is a widely accepted procedure in various human malignancies. SNB has received considerable attention for its role in deciding whether to perform neck dissection. However, there are four issues in the current status of SNB in oral cancer: adopting the RI method, shine-through phenomenon, method of diagnosing occult metastasis, and establishment of EBM. This paper outlines the current status of SNB in oral cancer.

Key words : oral cancer, cN0, sentinel node biopsy

Requests for reprints to: Dr. Goda H., Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Ehime University Graduate School of Medicine, Shitsukawa, Toon, Ehime 791-0204, Japan