

原 著

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 —

獨協医科大学 口腔外科学

和久井崇大 博多 裕子 土肥 豊
麻野 和宏 川又 均 今井 裕

要 旨 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、正確な診断が必要となる。そこで、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、また、さらなる診断精度の向上を図るために遺伝子解析による転移診断が応用され、その有用性が報告されている。しかしながら、口腔癌の SLN 生検における遺伝子解析は、従来の病理組織学的診断に比べ精度が高いとする報告がある一方、ほぼ同等とする報告もあり、なお一定の見解が得られていない。本研究では、舌扁平上皮癌に対する SLN 生検における遺伝子解析の有用性について検討を行った。対象は、SLN 生検を施行した舌扁平上皮癌 Stage I, II 症例 28 例で、病理組織学的診断ならびに one-step nucleic acid amplification (OSNA) 法による遺伝子解析を用いて SLN における転移診断を行い、それぞれを比較検討し、さらに治療成績について、SLN 生検導入前の Stage I, II 症例 23 例と比較検討した。

その結果、病理組織学的診断にてリンパ節転移陽性と診断された症例は 28 例中 5 例 (17.9%) で、そのうちの 1 例は、当初病理組織学的診断では転移陰性であったが、遺伝子解析にて転移陽性と診断されたため、亜連続切片にて再度検索を行い、病理学的にも転移陽性と診断されたものであった。OSNA 法による遺伝子解析では 28 例中 6 例 (21.4%) が転移陽性で、病理組織診断との一致率は、27 例 (96.4%) であった。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、有意差はないものの SLN 生検施行群に高い傾向を示した。後発転移は、SLN 生検施行群にはなかったが、SLN 生検未施行群では 23 例中 3 例 (13.0%) に認められ、有意に多かった。

以上の結果より、舌扁平上皮癌においても SLN 生検は有用で、OSNA 法による遺伝子解析は、その診断精度を高めると思われた。

Key Words : センチネルリンパ節生検, 遺伝子解析, 舌扁平上皮癌

緒 言

口腔癌において頸部リンパ節転移の有無は重要な予後因子であり、治療法の選択、特に頸部郭清術の適応を判断するために正確な診断が必要である。現在、頸部リンパ節転移の診断は、触診、computed tomography (CT)、magnetic resonance imaging (MRI)、超音波検査なら

びに 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/CT (FDG- PET/CT) などにより行われているが、未だ正確に診断することは困難である¹⁻³⁾。

近年、この問題を解決する検査法としてセンチネルリンパ節 (Sentinel Lymph node : SLN) 生検によるリンパ節転移診断が応用されている。SLN とは、悪性腫瘍の原発巣からのリンパ流を最初にうけるリンパ節で、最初に転移が生じるリンパ節であるとされている¹⁻³⁾。SLN 生検は、1992 年に Morton ら⁴⁾ が悪性黒色腫においてその有用性を報告して以来、乳癌^{5,6)}、胃癌^{7,8)} などの悪性腫瘍に臨床応用されている。口腔癌においてもいわゆる sentinel node concept が成立していることが認

平成 25 年 12 月 9 日受付, 平成 25 年 12 月 19 日受理
別刷請求先 : 今井 裕

〒 321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880
獨協医科大学 口腔外科学

められており、口腔癌における SLN 生検の有用性が報告されている^{1,2,9~11)}。

SLN における転移の有無を正確に診断することは、適切な治療法の選択において重要である。そのため最大断面における Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色による術中の迅速病理組織診断のみでなく、亜連続切片や Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法を用いた遺伝子診断が応用されている^{1,12)}。

しかしながら、これらの方法による転移検索は結果を得るまでに3時間ほどを要するため、手術中の迅速診断に応用することは困難である^{1,2,13)}。そこで、術中に利用できるリンパ節転移の新しい分子生物学的診断法として one-step nucleic acid amplification (OSNA) 法が開発された^{5,13)}。本法では遺伝子増幅の方法として Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) 法が用いられている^{2,12)}。RT-LAMP 法は、mRNA の抽出および精製を行う必要がなく一定温度で増幅反応を起こすため、時間が大幅に短縮することが可能とされている^{2,5,13)}。OSNA 法を応用した SLN 生検は当初、乳癌を対象として導入され⁵⁾、その後、胃癌⁷⁾、大腸癌¹⁴⁾ などに応用されている。口腔癌における OSNA 法を用いたリンパ節転移診断については、OSNA 法は診断精度が高く有用な検査法であるとの報告^{2,15)} や、従来の病理組織検査と同等な診断が可能であるといった報告¹⁶⁾ がみられるが、その有用性についてはなお検討されるべき点が多い。

今回われわれは、舌扁平上皮癌 Stage I, II 症例における頸部リンパ節転移診断に SLN 生検を施行し、従来の病理組織学的診断に加え OSNA 法を用いた遺伝子解析を併せて行い、その臨床的意義について検討を行なったので報告する。

対 象

2004 年から 2011 年までの 8 年間に獨協医科大学病院口腔外科を受診した舌扁平上皮癌患者 95 例のうち、術前治療未施行で臨床的頸部リンパ節転移を認めず、SLN 生検を施行した Stage I, II 症例 28 例を SLN 生検施行群とし、また、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、それぞれを比較検討した (表 1)。

方 法

1) 画像検査におけるリンパ節転移診断基準

画像検査における転移陽性の診断基準は、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、また、FDG PET-CT にて

表 1 患者背景

		SLN 生検施行群 (n=28)	SLN 生検未施行群 (n=23)
年齢		29~85 歳	28~81 歳
性別	男	19	16
	女	9	7
T Stage	T1	7	10
	T2	21	13
分化度	高分化	20	12
	中分化	3	10
	低分化	5	1
Y-K 分類	1	1	3
	2	4	3
	3	19	14
	4C	1	3
	4D	3	0

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

SLN の同定方法は、手術前日に^{99m}Tc-Tin colloid (74 MBq, 1 ml) を原発腫瘍周囲の 4 箇所に入射し、30 分後と 2 時間後にシンチカメラで頭頸部の撮影を行い、同時にガンマプローブを用いて SLN の数と位置を同定した。また、手術開始時に 2% パテントブルー溶液 1 ml を原発腫瘍周囲に緩徐に入射した後、前日に同定した SLN 相当部に皮膚切開を加え剥離を進め、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。

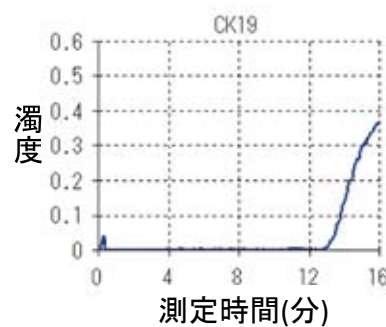
摘出したリンパ節は、リンパ節専用カッター (Sysmex, Japan) を用い分割した。

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

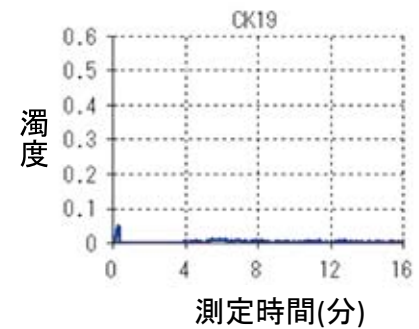
リンパ節の最大断面で H-E 染色による迅速病理組織診断を行った。また、迅速病理組織診断とほぼ同一の組織を用いて、CK19 免疫組織化学染色を行った。免疫組織化学染色は、切片を脱パラフィン後にクエン酸バッファを用いてマイクロウェーブにて 95°C, 10 分間、抗原の賦活化を行った。次いで、正常血清でブロッキングし、一次抗体としてマウス抗ヒト CK19 抗体 (clone RCK108, Dako) を 50 倍希釈し反応させた。その後、PBS 溶液にて洗浄し、二次抗体として ENVISION system (DAKO) を反応させた。検鏡下にて 3,3'-diaminobenzidine による発色を行った。



A



B



C

図 1

A : 遺伝子解析装置 (RD-100i シスメックス社製), B : 陽性症例, C : 陰性症例.

4) 遺伝子解析 (OSNA 法) による SLN 転移診断

分割した SLN のうち, 迅速病理組織診断で用いなかった組織片を組織可溶化液に入れ, 氷上にてホモジナイザー (Microtec nichion, Japan) を用い溶解し, その後 1 分間, 10,000 G にて遠心分離, 中間層を可溶化液で希釈しサンプルとした. このサンプルを遺伝子増幅検出装置 (Sysmex, Japan) にて増幅反応させることにより, CK19 mRNA のコピー数を測定した (図 1). OSNA 法における転移陽性の判定基準は, 乳癌⁵⁾, 大腸癌⁷⁾ における OSNA 法の判定基準に準じ, 250 copies/ μ l をカットオフ値として判定を行った. なお, 2004 年から 2007 年までの症例は, 摘出した SLN の一部を凍結保存した標本にて検索し, 2008 年からの症例は, 術中迅速病理組織診断と同時に遺伝子解析を行った.

5) 後発転移の判定基準

後発転移の判定は梅田ら¹⁸⁾ に準じ, 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を後発転移症例として検討した.

6) 統計解析

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 Logrank 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が陽性であった症例は 28 例中 5

例 (17.9%), 陰性は 23 例 (82.1%) であった. 病理組織学的診断にて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, 重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リンパ節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%) で一致した. 結果が不一致であった症例は 1 例で, 本症例は, 病理組織学的診断では転移陰性と診断されたが, 凍結保存されていた SLN 標本を用いて遺伝子解析を行ったところ, 転移陽性と診断された症例であった (表 2, 3).

2) 免疫組織化学染色の検討

病理組織学的診断, 遺伝子解析ともに陽性と診断され, 免疫染色においても陽性を示した症例は 28 例中 4 例 (14.3%) であった. また, 病理組織診断および遺伝子診断とも陰性で, 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 (表 2).

2. SLN 生検施行群と SLN 生検未施行群の比較検討

1) 生存率の検討

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% であった. SLN 生検施行群は SLN 生

表 2 病理組織学的診断, 遺伝子解析ならびに免疫組織学化学染色の結果

症例	病理組織学的診断	遺伝子解析	免疫染色
2	+	+	+
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	+	-
7	-	-	-
8	+	+	-
9	-	-	-
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-
15	+	+	+
16	-	-	-
17	- → +	+	+
18	-	-	-
19	-	-	-
20	-	-	-
21	+	+	+
22	-	-	-
23	-	-	-
24	-	-	-
25	-	-	-
26	-	-	-
27	-	-	-
28	-	-	-

SLN 生検群における病理組織学的診断, 遺伝子解析および免疫染色による転移診断の結果 (+: 転移陽性, -: 転移陰性)

結果がすべて一致したのは 26 例であった。結果が不一致であった 2 例は, 病理組織学的診断と遺伝子解析は転移陽性で, 免疫染色が転移陰性であった 1 例と, 免疫染色と病理組織学診断が転移陰性, 遺伝子解析が転移陽性の 1 例であった。

検未施行群に比べ, 有意差は見られなかったものの, 生存率が高い傾向を示した (図 2)。

2) 後発転移に関する検討

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%) に後発リンパ節転移を認め, SLN 生検施行群と比べ有意に多かった。なお, このうち 1 例 (4.3%) は不幸な転帰を辿っていた (表 4)。

表 3 病理組織学的診断結果ならびに OSNA 法による結果の比較

		病理組織学的診断		
		陽性	陰性	計
OSNA 法	陽性	5	1	6
	陰性	0	22	22
計		5	23	28

病理組織学的診断と OSNA 法の結果は 28 例中 27 例で一致した。一方, 結果が不一致であった症例が 1 例みられた。本症例は病理組織学的診断では転移陰性であったが, OSNA 法による遺伝子解析の結果が転移陽性であった症例であった。

考 察

口腔扁平上皮癌は頸部リンパ節転移の頻度が高く, 頸部リンパ節転移の有無は予後に密接に関与する重要な因子である^{17,18)}。したがって, 頸部リンパ節転移の正確な診断は重要であり, 診断法として触診や画像診断が用いられている。しかしながら, 口腔癌 N0 症例において, 従来の画像診断方法では検出が困難な転移が存在するとの報告もある¹⁹⁾。特に舌癌においては, 臨床的に N0 と診断された症例のうち, T1 では約 20%, T2 では約 40~50% にリンパ節転移がみられると報告^{20,21)} され, 予防的頸部郭清術はこのような報告を根拠に施行されている。すなわち, 頸部リンパ節転移の正確な診断は, 術式の選択においても重要であり, よりの確な診断を得るための方法の一つとして SLN 生検が行われている。

SLN 生検は, 1992 年に Morton ら⁴⁾ が悪性黒色腫に対してその有用性を報告して以来, 乳癌^{5,6)} を含め, 各領域の悪性腫瘍において臨床応用が進められ, 現在, 乳癌における SLN 生検は, 従来の迅速病理組織診断に代わる検査方法として保険適応が認められている^{2,15)}。口腔癌においても sentinel node concept が成立するとされ^{2,3)}, その臨床応用が期待されている。

SLN 生検ではまず, SLN の同定が行われるが, その方法は色素法と RI 法に大別できる^{1,22,23)}。色素法には, パテントブルーやインドシアニングリーン, インジコカルミンなどが用いられているが^{24,25)}, 皮膚切開を加えないとリンパ節を同定できず, かつ検索は可視範囲に限られる。また, 色素による有害事象として, 色素製剤に起因すると思われるアレルギー反応が挙げられるが²⁶⁾, その発現頻度は 0.5~2% 程度であると報告されている^{26,27)}。一方 RI 法は, 体表よりガンマプローブを用いることによりリンパ節を同定できるという利点を有する。また, 原発巣より染色されたリンパ管を追跡していく色素法とは異なり, SLN のみを同定できるので視野から外れた

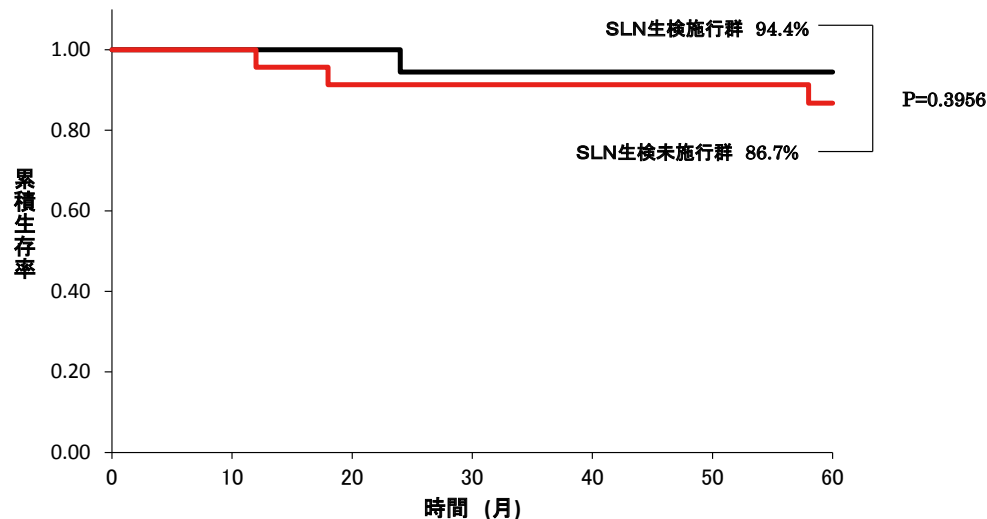


図2 5年累積生存率

SLN生検施行群では94.4%、SLN生検未施行群では86.7%であった。有意差は認めないものの、SLN生検施行群において生存率が高い傾向を示した。

表4 SLN生検施行群とSLN生検未施行群における後発転移の比較

		SLN生検施行群 (n=28)	SLN生検未施行群 (n=23)	P値
後発転移	陽性	0 (0%)	3 (13.0%)	P<0.05
	陰性	28 (100%)	20 (87.0%)	

SLN生検施行群では後発転移がみられなかったが、SLN未施行群では3例にみられ、SLN施行群と比較し有意に多かった。

深部領域でも同定することが可能となる²²⁾。RIを用いる問題点として放射線被曝があげられるが、本法での術者の体幹部の被曝量は大部分の症例で0~2マイクロシーベルトと非常に少なく、自然放射線(6.6マイクロシーベルト/日)、あるいは年間の許容量(術者が放射線診療従事者の場合50,000マイクロシーベルト)と比較して、安全性は確保されているものと考えられている²⁸⁾。頸部領域のリンパ流は複雑であり、SLNが健側にとめられることも少なくないため、上記の点と併せ考えると、同定にはRI法と色素法との併用が適切であると思われる^{2,9)}。

SLNにおける転移診断は、最大断面のみのH-E標本に基づく病理組織診断では微小な転移の正確な把握は困難であることより、亜連続切片による腫瘍細胞の検索や、RT-PCR法による遺伝子診断が報告されている^{1,9,10)}。しかしながら、これらの手法は診断結果を得るまでに時間を要するため、実際の手術における迅速診断への応用は困難であると考えられる^{1,13)}。そのため、術中の迅速

診断に利用できるリンパ節転移診断の新しい診断法としてOSNA法が開発された⁵⁾。本法は、摘出したリンパ節を可溶化試薬にて可溶化し、遠心分離後の上清をサンプルとして用いることにより、摘出したリンパ節からCK19 mRNAを精製することなく、直接遺伝子を増幅することができる。このため術中診断への応用が可能となり^{5,13)}、現在、乳癌のほか、胃癌⁸⁾、大腸癌¹⁴⁾などにおける術中迅速病理診断に応用されている。乳癌におけるOSNA法の有用性について、松浦らは、病理組織学的診断とOSNA法による遺伝子診断結果を比較したところ、98%と高い一致率を示し、OSNA法の診断率は1~2mm間隔で全割し検索した病理組織診断と同等の精度を持つと報告している¹³⁾。口腔癌においても、OSNA法を応用したリンパ節転移診断について報告がなされているが、その有用性については検討されるべき点が多い^{2,15,16)}。

口腔はその解剖学的部位により、舌、歯肉(上顎、下顎)、口腔底、頬粘膜、口蓋に分類されているが、これらを同一の臓器すなわち口腔として検討することには問題があることが指摘されている²⁹⁾。また、リンパ流路の相違を勘案すると、それぞれの部位別に検討されるべきと考えられる。そこで、本研究では口腔癌の中でも頻度が高く、転移の多い舌扁平上皮癌について検討することにした。われわれが渉猟しえた限り、舌扁平上皮癌を対象にした報告はなく、本報告が初めてである。

OSNA法の検査および診断時間に要した時間は、われわれの経験においても、これまでの報告と同様に^{2,15)}、リンパ節を摘出してから30分ほどで遺伝子解析の結果

を得ることが可能であった。

リンパ節転移の有無については、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、SLN 生検の有用性が確認できた。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 OSAN 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。

病理組織学的診断と OSNA 法の結果の一致率は 96.4%であった。合田は診断精度 96.8%と報告しており²⁾、おおむね同様な結果であった。なお、病理組織学的診断で陰性、遺伝子解析で陽性であった症例が1例見られた。診断結果が不一致となる理由として、迷入唾液腺上皮やクロスコンタミネーション、転移の偏在などに起因するものと考えられる^{2,13)}。また、RT-PCR 法による遺伝子解析は、検出感度が高いため組織学的に検出されない微小転移を検出し得た可能性も考えられる^{3,9)}。本症例においては、現在まで臨床的に再発等の所見もなく経過しているが、微小転移については一定の見解が得られていないため、今後の臨床的経過を踏まえ引き続き経過観察が必要であると思われる。

免疫組織化学的検討では、病理組織学的診断ならびに遺伝子解析と不一致であった症例は2例で、その内訳は、病理組織学的診断および遺伝子解析では陽性であったが、免疫染色で陰性であった症例が1例、免疫染色と病理組織学的診断は陰性であったが、遺伝子解析で陽性であった症例が1例であった。遺伝子解析が陽性で、蛋白発現がみられなかった理由として、1) mRNA の発現量が少ないこと、2) 蛋白質は合成されるものの turn over が早く検出できないこと、3) 蛋白質発現を抑制する microRNA の発現に差があること、などが考えられるが、詳細には不明である。また、今回検索した CK19 は上皮細胞に特有の細胞骨格蛋白であるケラチンファミリーの1つであるが、早期舌癌の上皮マーカーとしては適切でないとの報告もあり³⁰⁾、今後さらなる検討が必要であると思われた。

5年累積生存率は、有意差はなかったものの、SLN 生検施行群が良好である傾向がみられ、中嶋らは乳癌における生存率について同様に、有意差はないものの SLN 生検施行群で高い傾向であったことを報告している³¹⁾。

SLN 生検施行群では、転移陽性であれば SLN 生検に引き続き、根治的頸部郭清術を施行することを原則としており、その病理組織学的診断結果により、複数個のリンパ節転移を認めたものや節外浸潤がみられた症例に対しては、後療法として放射線もしくは化学療法の単独あ

るいは二者併用療法を施行している。ただし、今回は後療法を実施する症例はなかった。その結果、SLN 生検施行群における術後経過は全例、頸部リンパ節転移の制御が可能であった。すなわち、転移陰性23例はすべて経過良好で、転移陽性5例では、経過良好2例、他病死2例(クモ膜下出血1例、胆管癌1例)、局所再発非制御が1例であった。一方、SLN 生検未施行群23例の術後経過は、経過良好21例、頸部非制御1例、遠隔転移死1例であった。これら23例中7例に対し、再建目的(栄養血管の剖出)のための便宜的な頸部郭清術を施行した。このうち2例にリンパ節転移が認められ、いわゆるオカルト転移であったが、2例とも制御可能であった。後発リンパ節転移についてみると、SLN 生検施行群には後発リンパ節転移がみられなかったのに対し、SLN 生検未施行群では23例中3例(13.0%)にみられた。このうち2例は追加治療にて制御可能であったが、1例は不幸な転帰を辿った。これらの結果を勘案すると、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、N0 症例における 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 OSNA 法による遺伝子解析を応用した SLN 生検は、短時間で診断が可能であり、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、さらに治療成績の向上に寄与すると考えられた。

文 献

- 1) 中城公一, 新谷悟, 大西詔子, 他: 口腔悪性腫瘍におけるセンチネルリンパ節微小転移の術中診断. 頭頸部腫瘍 **29**: 64-69, 2003.
- 2) 合田啓之: 口腔扁平上皮癌センチネルリンパ節生検における OSNA 法の有用性. 愛媛医学 **28**: 82-89, 2009.
- 3) 長谷川正午, 小村健, 原田浩之, 他: 口腔癌におけるセンチネルリンパ節概念の検証. 頭頸部腫瘍 **31**: 517-522, 2005.
- 4) Morton DL, Wen DR, Wong JH, et al: Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. Arch Surg **127**: 392-399, 1992.
- 5) Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, et al: One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. Clin Cancer Res **13**: 4807-4815, 2007.
- 6) Tamaki Y, Sato N, Homma K, et al: Routine clinical use of the one-Step nucleic acid amplification assay for

- detection of sentinel lymph node metastases in breast cancer patients. *Cancer* **118** : 3477-3483, 2011.
- 7) 木南伸一, 三輪晃一, 石井要, 他 : 早期胃癌に対する Sentinel node navigation を応用した縮小手術. *癌の臨床* **48** : 855-862, 2002.
 - 8) Yaguchi Y, Sugasawa H, Tsujimoto H, et al : One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) for the application of sentinel node concept in gastric cancer. *Ann Surg Oncol* **18** : 2289-2296, 2011.
 - 9) 新谷悟, 中城公一, 三原真理子, 他 : センチネルリンパ節の術中微小転移診断が有用であった上顎歯肉癌の1例. *日本口腔科学会雑誌* **52** : 265-269, 2003.
 - 10) 日野聡史, 新谷悟, 石川徹, 他 : センチネルリンパ節生検によって対側頸部リンパ節転移を発見しえた硬口蓋癌の1例. *愛媛医学* **23** : 192-196, 2004.
 - 11) Santaolalla F, Sanchez JM, Ereno C, et al : Comparative study of patients with and without sentinel lymph node biopsy in oral and oropharyngeal cancer : is SLNB an accurate and useful procedure? *Acta oto-Laryngologica* **129** : 199-204, 2009.
 - 12) 浜川裕之, 福住雅州, 包揚, 他 : 頭頸部腫瘍リンパ節微小転移の遺伝子診断. *頭頸部腫瘍* **25** : 81-86, 1999.
 - 13) 松浦成明, 森誠司, 横山雄起, 他 : 遺伝子発現解析によるリンパ節転移診断. *病理と臨床* **26** : 711-716, 2008.
 - 14) Güller U, Zettl A, Worni M, et al : Molecular investigation of lymph node in colon cancer patients using One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA). *Cancer* **118** : 6039-6045, 2012.
 - 15) Matsuzuka T, Takahashi K, Kawakita D, et al : Intra-operative 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.
 - 16) 松塚崇, 三浦智宏, 横山秀二, 他 : OSNA 法による術中リンパ節転移検出の可能性. *頭頸部外科* **20** : 129-133, 2010.
 - 17) 梅田正博, 大森昭輝, 横尾聡, 他 : 口腔扁平上皮癌の頸部後発転移に関する臨床病理学的研究. *日本口腔外科学会雑誌* **37** : 143-151, 1991.
 - 18) 桐田忠昭, 上海道範昭, 下岡尚史, 他 : 上顎歯肉・硬口蓋粘膜扁平上皮癌の臨床病理学的検討—その病態とリンパ節転移, 予後との関連—. *日本口腔科学会雑誌* **47** : 165-174, 1998.
 - 19) Nieuwenhuis EJC, Colnot DR, Pijpers HJ, et al : Lymphoscintigraphy and ultrasound-guided fine needle aspiration cytology of sentinel lymph node in head and neck cancer patients. *Recent Results Cancer Res* **157** : 206-217, 2000.
 - 20) Haddadin KJ, Souter DS, Oliver RJ, et al : Improved survival for patients with clinically T1/T2, N0 tongue tumors undergoing a prophylactic neck dissection. *Head and Neck* **21** : 517-525, 1999.
 - 21) Keski-Säntti H, Atula T, Törnwall J, et al : Elective neck treatment versus observation in patients with T1/T2 N0 squamous cell carcinoma of oral tongue. *Oral oncology* **42** : 96-101, 2006.
 - 22) 木原圭一, 甲能直幸, 田部哲也, 他 : 口腔癌 N0 症例におけるセンチネルリンパ節の検討. *頭頸部腫瘍* **28** : 108-113, 2002.
 - 23) 寺田聡広, 長谷川泰久 : 口腔癌—舌癌のセンチネルリンパ節同定について—. *癌と化学療法* **31** : 639-643, 2004.
 - 24) 元村和由, 小山博記 : Sentinel node navigation surgery の現状と展開 3. 各種 tracer の特性 b. 色素法. *日本外科学会雑誌* **104** : 755-758, 2003.
 - 25) 渡辺享平, 野村佳代, 大津史子, 他 : センチネルリンパ節生検用色素製剤の市販化に向けた使用調整実態調査. *医療薬学* **35** : 722-728, 2009.
 - 26) Cimmino VM, Brown AC, Szocik JF, et al : Allergic reactions to isosulfan blue during sentinel node biopsy—a common event. *Surgery* **130** : 439-442, 2001.
 - 27) Krag DN, Anderson S, Julian TB, et al : Technical outcomes of sentinel-lymph-node resection and conventional axillary-lymph-node dissection in patients with clinically node-negative breast cancer : results from the NSABP B-32 randomised phase III trial. *Lancet Oncol* **8** : 881-888, 2007.
 - 28) 藤井博史 : これからセンチネル・リンパ節検索を始める人に. *臨床核医学* **33** : 89-93, 2000.
 - 29) 木村幸紀, 柳澤昭夫, 山本智理子, 他 : Stage I・II 舌癌頸部リンパ節後発転移例の予後 節外進展の組織像との関係. *頭頸部腫瘍* **35** : 9-14, 2009.
 - 30) Yamauchi K, Fujioka Y, Kogashiwa Y, et al : Quantitative expression study of four cytokeratin and p63 in squamous cell carcinoma of the tongue : suitability for sentinel node navigation surgery using one-step nucleic acid amplification. *J Clin Pathol* **64** : 875-879, 2011.
 - 31) 中嶋啓雄, 藤原郁也, 阪口晃一, 他 : リンパ節転移陰性 T2 乳癌においてセンチネルリンパ節生検に基づく腋窩リンパ節郭清省略は可能か—腋窩リンパ節郭清群との累積生存率の比較—. *日本外科学系連合学会誌* **33** : 1-7, 2008.

Investigation of Sentinel Lymph Node Biopsy Using Genetic Analysis in Squamous Cell Carcinoma of the Tongue

Takahiro Wakui, Yuko Hakata, Yutaka Doi,
Kazuhiro Asano, Hitoshi Kawamata, Yutaka Imai

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Dokkyo Medical University School of Medicine

Background : Metastasis of cervical lymph node is the most important prognostic factor in oral cancer. In this study, we evaluated the efficacy of one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay for intraoperative diagnosis of sentinel lymph node (SLN) metastasis compared with conventional examination in patients with carcinoma of the tongue. The aim of this study was to investigate availability of the genetic diagnosis in carcinoma of the tongue.

Patients and Methods : We investigated patients with T1 and T2 squamous cell carcinoma of the tongue with a clinical diagnosis of N0 who underwent SLN biopsy (SLN group ; n=28) in comparison with those who did not undergo SLN biopsy (non-SLN group ; n=23). SLN biopsy consisted of not only intraoperative pathological examination, but also genetic analysis using the OSNA method.

Results : Lymph node metastasis was detected in five of 28 patients in the SLN group (17.9%). One discordant case

was observed between pathological examination and OSNA assay. This case was positive metastatic lymph node according OSNA assay, but negative lymph node at pathological examination. Subsequent cervical lymph node metastasis was not seen in the SLN group, it was seen three patients in the non-SLN group (13.0%). Five-year survival rate was higher in the SLN group (94.4%) than the non-SLN group (86.7%), but this difference was not significant.

Conclusion : These results suggest that in early oral cancer, SLN biopsy is highly useful for detecting lymph node metastasis. The high accurate OSNA method can be used in intraoperative diagnosis as a tool for detecting metastasis in the sentinel lymph nodes of tongue carcinoma.

Key words : sentinel lymph node biopsy, genetic diagnosis, squamous cell carcinoma of the tongue