

学位論文

「Molecular imaging assisted surgery improves survival  
in a murine head and neck cancer model」

(分子イメージング補助下手術は頭頸部がんマウスモデルにおいて  
生存率を改善させる)

指導教授名 岡本 牧人

申請者氏名 宮本 俊輔

## 著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

## 要旨

手術療法は頭頸部がんの主要な治療であり、完全切除の成否は重要な予後因子の一つであるが、切除断端近接もしくは陽性が高率に起こることが問題となっている。この原因として、顕微鏡的な腫瘍進展の有無に関わらず切除範囲は術者の主観的判断により決められることや、頭頸部では解剖学的に根治性と機能温存が両立しにくいことが関わりと考えられる。

分子イメージング (Molecular Imaging; MI) は近年生きた動物体内のターゲットを可視化する検査方法として用いられており、がん手術中に腫瘍進展範囲を検索する手段となりうる。今回我々は、MI を頭頸部がんマウスモデルに対して用いることにより、それが腫瘍切除の精度向上やマウスの生存率改善につながるかどうかについて検討した。

腫瘍の局在を調べるプローブとして緑色蛍光蛋白 (GFP) を発現する SCC VII 細胞を C3H マウスの口腔底に接種して同所性頭頸部がんマウスモデルを作成した。まず通常切除後の残存腫瘍に対する MI の検出精度を調べるため、接種 6 日目に肉眼下手術を行った 20 匹のマウスに対して MI を施行し、組織学検査結果と比較した。次に MI を行うことによる治療成績への効果を検討するため、65 匹のマウスを通常手術群と MI 補助下手術群、コントロール (無手術) 群に無作為に分け、接種 7 日目に手術を行った上で 60 日間観察し生存率を評価した。

MI の腫瘍検出精度の検討では、MI の感度、特異度、陽性的中度、陰性的中度はそれぞれ 86%と 100%、100%、71%であり、残存腫瘍の検出に有用であることが示された。治療効果の検討では、MI 補助下手術群の 60 日生存率は 37%であり、通常手術群、コントロール群のそれぞれ 5%、0%と比べて有意に良好であった (いずれも  $p < 0.001$ )。これは MI 介入により微少な残存腫瘍が検出され、完全切除率が上がることによると考えられた。

今回の結果から、術中に MI を用いることは頭頸部がん患者の手術において腫瘍切除の精度を上げて生存率を改善させうる有望な手段であると考えられた。しかしこの方法を実臨床に応用するためには、蛍光の組織透過性や画像解像度、腫瘍の特異的ラベル法など克服すべき課題があるため、さらなる研究が必要である。

## 目次

1. 序論.....	1
1-1. 頭頸部がん治療における問題点.....	1
1-2. 分子イメージング.....	1
1-3. 本研究の目的.....	2
2. 方法.....	3
2-1. 細胞株.....	3
2-2. <i>In vitro</i> MI.....	3
3-3. 動物モデル.....	3
2-3. <i>In vivo</i> MI.....	4
2-4. 術中 MI の診断精度.....	4
2-5. 生存分析.....	5
2-6. 統計解析.....	5
3. 結果.....	5
3-1. 細胞株における蛍光の比較.....	5
3-3. 術中 MI の診断精度.....	6
3-4. 追加切除標本の組織学的所見.....	6
3-5. 生存分析.....	6
4. 考察.....	6
5. 総括.....	8
6. 今後の課題.....	8
7. 謝辞.....	9
8. 引用文献.....	9
9. 業績目録.....	13
10. 図表.....	18

## 1. 序論

### 1-1. 頭頸部がん治療における問題点

頭頸部がんは鼻腔、副鼻腔、口腔、咽頭、喉頭、唾液腺に生じる悪性新生物の総称である。全世界で起こるがんで6番目に多く、全症例の約6%を占めている<sup>1</sup>。日本ではがん登録が未整備であり実数は明らかでないが、がん登録システムの確立している米国では毎年約5万6千人の新規患者が報告されている<sup>2</sup>。

診断、治療技術の進歩にも関わらず、米国における頭頸部がん患者の生存率は最近30年の間、50~60%でほとんど変わっていない<sup>3</sup>。この期間中に喉頭がんの生存率は悪化しており、またそれと同時に非外科的治療は増加傾向にあることが報告されている<sup>4</sup>。放射線療法の治療技術が向上してきた現在においても手術療法は依然重要な治療の役割を担っている<sup>5,6</sup>。頭頸部がんでは診断時に50%の患者が進行期病変を有するが<sup>7</sup>、その場合手術後の追加治療として放射線療法や化学療法が行われることが多い<sup>5,7</sup>。しかしそうした強力な集学的治療によっても、局所領域再発は30~40%と高率に生じ、その結果3年無病生存率は35~55%と不良である<sup>8</sup>。

手術後切除断端のクリアランスは予後に密接に関わることが知られているが<sup>9</sup>、それにも関わらず腫瘍が断端陽性もしくは近接となる確率はかなり高く、それぞれ3~23%、25~43%と報告されている<sup>10,11</sup>。頭頸部がん患者が初診時から遠隔転移を有することは10%程度とあまり頻度は高くない<sup>7</sup>。しかし進行期がんの術後、特に切除断端のクリアランスが不十分である場合やリンパ節転移に節外浸潤がある場合には、局所領域や遠隔転移を来すことは高頻度となる<sup>7,8</sup>。よって、初回手術時の切除断端クリアランスは予後に重要な意味を持ち、完全切除率を上げることは頭頸部がんの生存率の改善につながると考えられる。

### 1-2. 分子イメージング

近年、蛍光イメージング (fluorescent Imaging: FLI) や生物発光イメージング (bioluminescent Imaging: BLI) といった分子イメージング (Molecular Imaging: MI) が、蛍光蛋白・色素や生物発光基質をそれぞれの光学プローブとして用い、動物体内のターゲットを分子レベルで可視化する方法として急速に発展し、生命科学の幅広い領域で利用されている<sup>12,13</sup>。MIの利点としては、CT、MRI、PETなどの現在実臨床で診断に使用されているイメージング方法と比べ、機器が安価でポータブル、放射線被曝がなく低侵襲、撮像時間が短時間でほぼリアルタイムであることなどが上げられる<sup>14</sup>。

FLIはBLIよりも有利な点を多く有する。FLIの主な利点は、撮像前にターゲットを可視化するための動物への発光基質注射が不要なことである<sup>15</sup>。生物発光は基質への酵素の触媒作用により生じるため、BLIの光強度は酵素の反応時間や量、温度などにより変動しやすい<sup>16</sup>。また光強度は基質注射後ピークに達するまでに10~15分程度の時間を要する<sup>17</sup>。それに対して蛍光は励起光が必要ではあるが、光強度は比較的高く安定しており、検査前の手間を必要としない。さらに、生物発光の標準的な発光基質であるルシフェリンは毒性を有することが報告されている<sup>18</sup>。これらの点により、FLIはより臨床応用に関してより見込があると

考えられる。FLI の欠点としては、主に皮膚や体毛から発生する自家蛍光や組織による光の吸収、錯乱が挙げられる<sup>12</sup>。蛍光蛋白を研究に用いることにより、我々は生体内におけるがん細胞の移動や浸潤、転移、血管新生などの重要な性質をリアルタイムに見ることができるようになったのだが、生体のイメージングは自家蛍光による高いバックグラウンドノイズや、組織透過時の励起光強度減衰のため、可視光領域では微弱な蛍光は検出されにくいという問題がある<sup>13, 19</sup>。しかし、手術時の検査であれば皮膚が開創されてターゲットまでの障害物が減少するため、これらの問題は相対的に小さくなると考えられる。生体への FLI は通常 macroscopic な画像検査であり、比較的広範囲の検索が可能である。他方で蛍光を利用する MI としては、共焦点顕微鏡 (confocal microscopy) や光干渉断層法 (optical coherence tomography) などの microscopic な特徴を持った方法が発展してきており、これらの方法は細胞や細胞より微少なレベルの構造物を捉えられる程の高い解像度を有している<sup>14, 20</sup>。しかしながら、これらにより広範囲を網羅的に検索することは困難であり、頭頸部がん手術では原発巣局所および領域リンパ節の比較的広い視野を調べる必要があるため、本研究における腫瘍検索目的の MI としては、macroscopic な FLI を使用した。

### 1-3. 本研究の目的

このように、MI はがん手術におけるリアルタイムな術中検査法として将来応用しうる有望な方法である。そのゴールは、従来の手術方法では切除断端クリアランスに問題を生じていたような症例においても腫瘍の広がりを適切に捉えることにより、腫瘍切除の精度を向上させることである。

MI は既になん手術において臨床応用されている分野があり、主なものとしては乳がん、皮膚がん、胃がん、大腸がん、中咽頭がんや悪性黒色腫におけるセンチネルリンパ節マッピングがある<sup>21-23</sup>。しかし、原発腫瘍の切除目的での術中 MI 応用というのは未だ限られている。報告は脳腫瘍、肝臓がんでなされているのみであり、またそれらでは切除後の生存率についての検討はされていない<sup>24, 25</sup>。一方、実験レベルで腫瘍切除に MI を用いた報告は数多くされている<sup>26-29</sup>。しかしながら、治療介入のアウトカムとして生存率を検討している報告は異所性マウスモデルを使用した 1 編のみであった<sup>30</sup>。これらの報告では、ターゲットとなる腫瘍細胞におけるバイオマーカーの選択や標識方法が全て異なるため、手術アウトカムにも全て相違がある。これらの方法で腫瘍細胞を完全に標識することは困難であるため、MI 補助下手術により腫瘍可視化することで、生存率においてどの程度大きな恩恵が得られるのかということについて説明するデータは今のところない。

それ故、本研究で我々は安定的に蛍光シグナルを発する細胞株を用いて頭頸部がん同所性動物モデルを作成した。このモデルにおいてはほぼ全ての腫瘍細胞が継続的に MI で捉えられ、イメージングソフトにより光強度の定量が可能である。我々は、術中 MI による腫瘍可視化が完全切除率の精度を向上させることにより、頭頸部がん手術の治療アウトカムを改善させようと仮定した。これを証明するため、我々は MI を動物モデルにおける腫瘍切除術中に応用し、検査精度と生存率についての検討を行った。

## 2. 方法

### 2-1. 細胞株

SCC VII は C3H マウスより自然発生したマウス由来扁平上皮がん細胞株である<sup>31</sup>。緑色蛍光蛋白 (Green Fluorescent Protein: GFP) は動物生体内においてがん細胞を可視化するために広く利用されているため<sup>15</sup>、安定して蛍光を発現する細胞株を樹立するためのプローブとして選択した。TdTomato は赤色蛍光蛋白うちの 1 つであるが、赤色波長領域では自家蛍光による干渉が減少するため、もう一つのプローブ候補とした。

GFP 遺伝子はレンチウイルスベクター (GFP lentiviral particles (GenTarget、サンディエゴ、米国)) を用いて製品説明書に従って細胞へ形質導入し、これを SCC VII-GFP とした。TdTomato 遺伝子は以下のようにレトロウイルスを用いて形質導入し、SCC VII-tdTomato とした。要約すると、まず FuGENE HD トランスフェクション培地 (Roche、インディアナ州、米国) の中で、pBabe-Blast-tdTomato プラスミドを Phoenix Eco と Phoenix Amphi のレトロウイルスパッケージング細胞株 (ATCC、バージニア州、米国) に加えた。72 時間培養後、その上清を SCC VII に加えて形質導入した。SCC VII-GFP と SCC VII-tdTomato は、10%ウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich、セントルイス、米国) と 1%ペニシリン・ストレプトマイシン (Invitrogen、ニューヨーク州、米国) を加えた RPMI-1640 培地 (Lonza、メリーランド州、米国) 中で、37℃、5% CO<sub>2</sub> の条件で培養した。培養中の細胞の蛍光および明視野画像は、Nikon ECLIPSE TS100 顕微鏡 (Nikon、東京) に Nikon Coolpix 4500 デジタルカメラを装着して撮影した。

### 2-2. *In vitro* MI

SCC VII-GFP と SCC VII-tdTomato の光強度は、Kodak In-Vivo Imaging System FX Pro (Carestream、ニューヨーク州、米国) を用いた MI により比較した。96 ウェル培養皿の 3 ウェルに、それぞれの細胞株を 1 ウェルあたり 10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup> 個蒔いた。この培養皿の蛍光画像は露出時間 5 秒で撮像され、その際に SCC VII-GFP に対しては 480 nm と 535 nm、SCC VII-tdTomato に対しては 550 nm と 600 nm の波長を透過させる励起、吸収フィルタをそれぞれ使用した。蛍光画像はそれぞれ緑色と赤色に加工し、同視野のグレースケール画像に重ね合わせた。蛍光シグナルの強度を計測するため、同じサイズの関心領域 (Region of Interest: ROI) をそれぞれのウェル上に設定し、ROI 内のシグナル量を付属のソフトウェアを使って定量化した。

### 3-3. 動物モデル

SCC VII と C3H マウスを用いた頭頸部がん動物モデルは、1997 年に最初に報告された<sup>32</sup>。この同所性モデルでは SCC VII が C3H マウス由来のため免疫原性が弱く、腫瘍接種直後から局所領域での高い攻撃性を示す<sup>33</sup>。そのため、本マウスモデルはヒトの局所進行期頭頸部がんをよく模倣すると考えられる。我々は動物生体内の腫瘍細胞を可視化するため、SCC

VII-GFP を用いた頭頸部がんマウスモデルを作成した。簡単に述べると、生後 6~8 週の雌 C3H/HeJ マウス (Jackson Laboratory、メイン州、米国) の口腔底に、100  $\mu$  L のリン酸緩衝液 (カルシウムイオン、マグネシウムイオン無含有) あたり  $5 \times 10^5$  個の SCC VII-GFP を含んだ細胞懸濁液を経皮的に 28G 針を用いて接種した。全ての動物への処置は、ペンシルベニア大学医学部の動物実験委員会 (Institutional Animal Care and Use Committee: IACUC) のガイドラインに従って行った。

### 2-3. *In vivo* MI

頭頸部がんマウスモデルは腫瘍切除の後に開創されたままで MI システムのチャンバー内の撮影台上に置いた。それぞれのマウスに対して、420、430、440、450、460、470、480 nm の計 7 枚の励起フィルタおよび 535 nm の吸収フィルタを用いて、露出時間 2 秒で多重スペクトル蛍光画像を撮像した。その多重スペクトル画像は付属ソフトウェアによって処理することにより、バックグラウンドの蛍光が最小化された。処理画像は同視野のグレースケール画像に重ね合わせて、術野内での腫瘍の局在が明らかになるようにした。同サイズの ROI を全てのマウスに設定することにより、術野内のシグナル量を定量化した。

### 2-4. 術中 MI の診断精度

この実験では、20 匹のマウスを使用した (図 1a)。2,2,2-トリブromoエタノール (Sigma-Aldrich) を 0.4~0.5 mg/g の容量で腹腔内注射し、全身麻酔をした上で腫瘍直上に I 字皮膚切開して、通常的肉眼的腫瘍切除を行った。全ての手術は一人の頭頸部外科医により腫瘍接種後 6 日目に施行されたが、その時点での腫瘍径は 7 mm 程度であった。マウスの頭頸部領域は狭小であり頸動静脈や気管など様々な重要臓器を含むことに加えて、マウスの大きな唾液腺組織と腫瘍との境界部は視認困難ではあったが、切除安全域は 1、2 mm を意図して腫瘍切除を行った。1 匹は手術中の出血が原因で死亡したため、検討から除かれた。

通常手術直後に術野を MI により検索し、視覚的に明らかな残存蛍光シグナルを画像上認めたものは即時に残存腫瘍陽性と診断することとした。この即時診断が妥当であるかどうか評価するため、腫瘍切除直後のマウスを全てネガティブコントロールマウスと並べて撮像し、それぞれの開創部に設定した ROI 内シグナル量の相対値を計算した。開創部は 4-0 ナイロン糸にて縫合閉鎖した。

真の腫瘍残存有無を診断するために、がん診断のゴールドスタンダードであるヘマトキシリン・エオジン染色による組織学的検査が筋、唾液腺、頸静脈周囲軟部組織を含めた口腔底組織に対して 0.5 mm 間隔で施行された。ここで、切除直後の時点では残存腫瘍は極小な病変が含まれる可能性があり、また口腔底組織全体に対して真の連続切片を作成することは困難であるため、組織学的検査によってもその存在を否定することは不可能である。そこで、短期間で新たな SCC VII が生じることはほぼ考えられず、その間に生じたものは残存腫瘍と見なせることから、我々は潜在的残存腫瘍に対する組織学的検査での偽陰性を防ぐために切除後観察期間をおくこととした。観察期間は明白な腫脹が生じるまで、もしくは生じないの



であれば腫瘍細胞接種から 28 日間として、組織採取を行った。これらの MI と組織学的検査の結果から、診断精度として感度、特異度、陽性的中度、陰性的中度が算出された。

## 2-5. 生存分析

この実験では、65 匹のマウスを使用した（図 1b）。腫瘍接種後 7 日目に全てのマウスは無作為に以下の 2 群に分けられた。55 匹のマウスに対しては 2 人の頭頸部外科医により前述 2-4 と同様の通常手術が行われ、10 匹のマウスは無治療群とした。その時点で腫瘍径は 9 mm 程度であった。5 匹は手術中の出血や麻酔薬の副作用で死亡したために検討から除かれ、残りの 50 匹が無作為に以下の 2 群に分けられた。30 匹は MI を行って MI 補助下手術群とし、20 匹はそれ以上の切除を行わない通常手術群とした。さらに MI 補助下切除群の中でのサブグループとして、検出された蛍光シグナルがなくなるまで追加切除を受けた群をシグナル陽性群、初回手術後から蛍光が検出されなかった群をシグナル陰性群とした。追加切除された組織は真の腫瘍残存有無を調べるため組織学的に検索され、それらの標本写真は Nikon ECLIPSE 80i 顕微鏡により撮られた。

術創は縫合閉鎖した上で全てのマウスを腫瘍接種後 60 日目まで観察し、生存分析を行った。切除部癒着化により再発したかどうかの判断は困難であり主観が入りやすいと考えられたため、本研究では腫瘍特異的生存による評価を行った。ただし IACUC ガイドラインに従って、腫瘍径が 20 mm に達するか、悪液質を示した時点でマウスを腫瘍死とみなして安楽死させた。

## 2-6. 統計解析

ROI 中のシグナル量の比較には Mann-Whitney の U 検定を用いた。マウスの生存曲線は Kaplan-Meier 法により描かれ、治療群間の生存率の差は logrank 検定、ハザード比 (Hazard Ratio : HR) は比例ハザードモデルにより評価された。統計解析は PASW ver. 18 (IBM、ニューヨーク州、米国) により行い、有意水準は 5%とした。

## 3. 結果

### 3-1. 細胞株における蛍光の比較

動物実験に使用する細胞株を選ぶため、蛍光顕微鏡によりいずれも蛍光発現率がほぼ 100%であることを確認した上で、*in vitro* での SCC VII-GFP と SCC VII-tdTomato の蛍光シグナル量を MI にて比較した。その結果、シグナル量はおおよそ細胞数に比例し、また SCC VII-GFP は SCC VII-tdTomato の 25~90 倍明るかった（表 1）。よって、動物実験において使用する細胞株は SCC VII-GFP とした。

### 3-2. MI による残存シグナル評価

頭頸部がんマウスモデルにおける口腔底部の腫瘍は、MI により十分に可視化された（図 2a、2b）。腫瘍切除後のマウス 19 匹をそれぞれネガティブコントロールマウスとともに MI にて撮像して比較したところ（図 2c）、即時診断では 12 匹が腫瘍残存陽性、7 匹が陰性と判

断された。陽性マウスでの相対的シグナル量は理論的に 1 より大きくなる筈であり、実際の算出値は多量の腫瘍残存があったマウスがいたためばらつきが大きかった（平均±標準偏差、以下同 26.9±50.0）ものの、最低値は 2.01 であった。一方、陰性マウスでの相対値は 1.02 ±0.47（95%信頼区間（Confidence Interval : CI）0.56-1.46）であり、これらの間には有意差を認めた（ $p < 0.001$ ）。この結果から、MI で残存シグナル有無を即時診断することはシグナル定量の結果と相関しており、妥当であると考えられた。

### 3-3. 術中 MI の診断精度

術中 MI の診断精度を評価するため、前述 3-2 のマウス 19 匹における切除後観察期間を経た口腔底組織は組織学的検査に供された（表 2）。感度、特異度はそれぞれ 86%と 100%、陽性的中率と陰性的中率はそれぞれ 100%と 71%であった。よって、術中 MI は肉眼的に見逃された切除後残存腫瘍を検索するのに有効であると考えられた。

### 3-4. 追加切除標本の組織学的所見

生存分析において MI で残存シグナルがあり追加切除されたマウスは 18 匹で 22 標本あり、組織学的検査にて 19 標本で残存腫瘍を認めた（86.4%）。ほとんどの標本で唾液腺浸潤（図 3a）や筋浸潤（図 3b）を認め、2 標本ではリンパ節転移を認めた（図 3c）。これらの所見は腫瘍接種のわずか 7 日後であり、SCC VII の攻撃性を反映していた。標本中には 1mm 未満の顕微鏡的病変も認めた（図 3d）。

### 3-5. 生存分析

腫瘍接種後 60 日間の生存率は、MI 補助下手術群、通常手術群、無治療群でそれぞれ 37%、5%、0%であり（図 4a）、MI 補助下手術群では他の 2 群と比較して有意に良好であった（対通常手術群：HR 0.25、95% CI 0.13-0.49、 $p < 0.001$  対無治療群：HR 0.20、95% CI 0.09-0.43、 $p < 0.001$ ）。

MI 補助下手術群のサブグループの生存分析では（図 4b）、シグナル陽性群の生存率は 33%でありシグナル陰性群の生存率 42%との間に有意差を認めなかった（HR 1.12、95% CI 0.47-3.04、 $p = 0.70$ ）。さらに通常手術群と比較すると、シグナル陽性群（HR 0.28、95% CI 0.13-0.60、 $p < 0.001$ ）とシグナル陰性群の生存率（HR 0.51、95% CI 0.32-0.80、 $p = 0.001$ ）はともに有意に良好であった。これらからは、残存腫瘍があっても MI 補助下での追加切除によりかなりの生存率改善が期待できることが示唆された。

## 4. 考察

頭頸部がんにおいて切除断端クリアランスは重要な予後因子であるが<sup>9</sup>、外科医は通常手術の際に視触診といった主観的感觉に頼りながら腫瘍の位置を把握し、切除範囲を決定する<sup>34</sup>。主観に頼る従来型手術は、顕微鏡的腫瘍やスキップ病変、微少リンパ節転移があった場合に見落としやすい。たとえ顕微鏡下手術でも、組織学的検査なしに微少病変を周囲組織と見分

けることは困難である。

凍結切片による術中迅速病理診断はがん手術において頻用されるが、標本の質が通常のホルマリン固定による永久組織学的検査標本と比べて低いため診断精度が下がる<sup>35, 36</sup>。またもし微少なスキップ病変やリンパ節転移が切除断端や郭清範囲よりも外の術野側に残った場合は、術中迅速病理診断を施行するために採取した組織にたまたま含まれない限り検出することはほぼ不可能である。さらに、たとえ採取組織に含まれたとしても、術中迅速病理診断では切片を作成する間隔が密ではないため微少病変は見逃されうる。このように、術中迅速病理診断には問題点があるが、MI は切除範囲内外をリアルタイムに検索でき、微少病変も可視化できる利点を有する。我々はこれらを組み合わせることのがん手術の精度が向上すると考える。永久組織学的検査標本においても完全な連続切片ではなく、通常は最小でも 1～数 mm 間隔での切片であるため<sup>37, 38</sup>、それ以下の微少病変は見逃される可能性がある。

従って術者は、潜在的腫瘍が実際にあるかないかに関わらずそれを切除する目的で、広く切除安全域をとったり、予防的リンパ節郭清を行ったりする。しかしながら頭頸部がん手術においては頸動脈や脳神経、頭蓋骨などの重要臓器と腫瘍との近接により、切除範囲が制限されることが多い<sup>7</sup>。舌、咽喉頭など頭頸部臓器の過度の切除もまた発声や嚥下機能の障害を来す。これらの制限はおそらく切除断端陽性が高率に生じること、ひいては予後不良であることに関連する。

術中 MI は腫瘍の進展範囲を肉眼よりも正確に捉えることでこれらの制限を軽減しうる。本研究の同所性マウスモデルにおける腫瘍検出の感度と特異度は良好であり、それぞれ 86%、100%であった異種移植マウスモデルにおける他家の報告と同様であった<sup>28</sup>。また本研究では以前の報告と同様に、1 mm 未満の顕微鏡的腫瘍が検出可能であった<sup>34</sup>。これらの結果は、MI が腫瘍検索において十分な精度を有していることを示した。MI 補助下手術群が肉眼での通常手術群よりも有意に良好な生存率を示したことは、前者で完全切除率がより高いことを示唆した。前者の 60 日生存率は 37%に過ぎないが、この局所進行がんモデルに対して不十分な切除安全域のみで手術単独治療を行ったことを考慮すると、顕著な改善効果であったと考える。また MI 補助下手術群のサブグループの解析では、残存腫瘍の有無いずれの場合でも生存率は同等であり、肉眼下手術よりも有意に良好であることが示された。注目すべきは、シグナル陽性群でもし追加切除がなされない場合は、全例が腫瘍死した筈であり、これは MI の切除断端クリアランスを適正にしてサルベージする効果の高さを示していると考ええる。

このように術中 MI 診断は現在の手術の問題点を改善する可能性を持った方法であり、特に不規則な周囲組織浸潤やスキップ病変、領域リンパ節転移を来すような進行期病変に対しては大きな効果が見込まれる。進行期病変に初回治療として手術が行われる場合、通常は頸部郭清が併せて施行される<sup>7</sup>。郭清範囲は現在、原発巣の部位と進行期により判断されており<sup>39, 40</sup>、切除の範囲によっては原発巣と同様に様々な機能的、審美的合併症を生じる<sup>41</sup>。MI は腫瘍の浸潤や転移状況により切除、郭清範囲を個別に決定して過剰な合併症を回避することに応用できる可能性がある。さらに進行期病変では術後に放射線や化学放射線療法が行われることが多い<sup>7</sup>。MI 補助により手術治療効果が向上することで、術後の治療量や期間を減少

して治療毒性を軽減させることも期待される。

しかしながら、この方法を実臨床に応用するためには様々な課題が存在する。第一に、CT、MRI など従来の画像診断方法と比べて、MI では深部病変の観察が困難であることや画像解像度が低いことである<sup>14</sup>。近赤外波長領域では組織による自家蛍光や光の吸収、錯乱が著明に小さくなるため、この問題点は Cy5.5、インドシアニンググリーン (ICG)、量子ドットなどの近赤外蛍光プローブを用いることで軽減されうる<sup>42, 43</sup>。近赤外蛍光蛋白・色素の人体への使用認可が MI を臨床応用する上での重要なステップであるが、現在のところ米国食品医薬品局に認可されているのは ICG のみである<sup>22, 42</sup>。また、CCD カメラの感度改善によっても画像の問題点は軽減される。

第二に、ターゲットを標識するためには腫瘍細胞の標的分子に特異的なプローブ製剤が必要であるが、現在がんの標的分子に特異的な製剤は少数である<sup>14</sup>。頭頸部がんにおける標的分子の候補としては、上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor : EGFR) や血管内皮細胞増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor : VEGF)、VEGF 受容体 (VEGFR)、Hsp47 などがある<sup>44-46</sup>。動物実験レベルでは、頭頸部がん細胞の標識を抗 EGFR 抗体と Cy5.5 の結合体により行ったものや<sup>47</sup>、膜透過性ペプチド (Cell Penetrating Peptide : CPP) と Cy5 の結合体により行った報告があるが<sup>30</sup>、臨床応用のためには毒性、特異性も含めて適切な標識方法を検討する必要がある。

## 5. 総括

MI の診断精度は高く、術中がん診断の信頼性を向上させる検査になりうると考えられる。よって MI 補助手術は治療効果を上げて頭頸部がん患者の生存率を改善させるのに将来有望な方法である。しかし、蛍光の組織透過性や画像解像度、腫瘍の標識方法など克服すべき課題があるため、さらなる研究が必要である。

## 6. 今後の課題

ヒト体内で腫瘍細胞を特異的に蛍光標識しそれをイメージングするためにはまだ課題が多いのが実情であるが、前述のようにがんそのものでなくセンチネルリンパ節を可視化して生検する目的では蛍光イメージングは多領域のがんで臨床応用されており、乳がんと悪性黒色腫については既に我が国で保険適応となっている。頭頸部がん領域での報告はまだ少ないが、従来の RI を用いたセンチネルリンパ節生検法と比較すると低侵襲で簡便、安価に施行できる利点がある。そのため我々も頭頸部がんに対しての応用研究を進めている。

また現在は分子標的薬の発展からも分かるように分子生物学分野の研究の進歩が目覚ましい。分子標的薬ではがんを特異的に標的としても、そのみでは抗腫瘍効果が不十分なものもみられる。しかしその技術は蛍光標識に応用できると考えられ、手術の治療効果向上につながることを期待される。

## 7. 謝辞

本研究は、著者が米国ペンシルベニア大学医学部耳鼻咽喉科頭頸部外科へ客員研究員として留学中に行ったものである。研究を進めるにあたりご指導を頂いた同科 **Gene and Molecular Therapy laboratory** の研究責任者である **Daqing Li** 准教授（現教授）と同科主任教授である **Bert W. O'Malley Jr.** 教授に感謝致します。また、研究に多大な協力をいただいた研究室のメンバー、特に現防衛医科大学耳鼻咽喉科講師の山下拓先生と荒木幸仁先生には研究実施だけでなく精神的にもいろいろと支えていただき、感謝の念に堪えません。

そして、米国留学へ背中を押して下さり、私に大きな経験を得る機会を与えて下さった本学耳鼻咽喉科学教室の岡本牧人教授と中山明仁診療准教授には深謝致します。また、留学中に私が不在な分の業務を担っていただいた教室員の先生方に感謝の意を表します。本当にありがとうございました。

## 8. 参考文献

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2005;55:74-108.
2. American Cancer Society. Learn About Cancer, 2010.  
<http://www.cancer.org/Cancer/index> [Updated October 7, 2010].
3. Altekruse SF, Kosary CL, Krapcho M, Neyman N. SEER Cancer Statistics Review 1975-2007, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2007/index.html](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/index.html) National Cancer Institute [Updated October 8, 2010].
4. Hoffman HT, Porter K, Karnell LH, Cooper JS, Weber RS, Langer CJ, et al. Laryngeal cancer in the United States: changes in demographics, patterns of care, and survival. *The Laryngoscope* 2006;116:1-13.
5. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Guidelines, 2011.  
[http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/f\\_guidelines.asp](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp). [Updated March 30, 2011].
6. Gourin CG, Johnson JT. A contemporary review of indications for primary surgical care of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *The Laryngoscope* 2009;119:2124-34.
7. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet* 2008;371:1695-709.
8. Marur S, Forastiere AA. Head and Neck Cancer: Changing Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings* 2008;83:489-501.
9. Haque R, Contreras R, McNicoll MP, Eckberg EC, Petitti DB. Surgical margins and survival after head and neck cancer surgery. *BMC Ear, Nose, and Throat Disorders* 2006;6:2.

10. McMahon J, O'Brien CJ, Pathak I, Hamill R, McNeil E, Hammersley N, et al. Influence of condition of surgical margins on local recurrence and disease-specific survival in oral and oropharyngeal cancer. *The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* 2003;41:224-31.
11. Woolgar JA, Triantafyllou A. A histopathological appraisal of surgical margins in oral and oropharyngeal cancer resection specimens. *Oral Oncology* 2005;41:1034-43.
12. Choy G, Choyke P, Libutti SK. Current advances in molecular imaging: noninvasive in vivo bioluminescent and fluorescent optical imaging in cancer research. *Molecular Imaging: Official Journal of the Society for Molecular Imaging* 2003;2:303-12.
13. Yang M, Baranov E, Jiang P, Sun FX, Li XM, Li L, et al. Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97:1206-11.
14. Weissleder R, Pittet MJ. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* 2008;452:580-9.
15. Hoffman RM. The multiple uses of fluorescent proteins to visualize cancer in vivo. *Nature Reviews. Cancer* 2005;5:796-806.
16. Koo V, Hamilton PW, Williamson K. Non-invasive in vivo imaging in small animal research. *Cellular Oncology: The Official Journal of the International Society for Cellular Oncology* 2006;28:127-39.
17. Klerk CPW, Overmeer RM, Niers TMH, Versteeg HH, Richel DJ, Buckle T, et al. Validity of bioluminescence measurements for noninvasive in vivo imaging of tumor load in small animals. *BioTechniques* 2007;43:7-13, 30.
18. Contag CH, Spilman SD, Contag PR, Oshiro M, Eames B, Dennerly P, et al. Visualizing gene expression in living mammals using a bioluminescent reporter. *Photochemistry and Photobiology* 1997;66:523-31.
19. Mansfield JR, Gossage KW, Hoyt CC, Levenson RM. Autofluorescence removal, multiplexing, and automated analysis methods for in-vivo fluorescence imaging. *Journal of Biomedical Optics* 2005;10:41207.
20. Pierce MC, Javier DJ, Richards-Kortum R. Optical contrast agents and imaging systems for detection and diagnosis of cancer. *Int J Cancer* 2008;123:1979-90.
21. Bredell MG. Sentinel lymph node mapping by indocyanin green fluorescence imaging in oropharyngeal cancer - preliminary experience. *Head & Neck Oncology* 2010;2:31.
22. Te Velde EA, Veerman T, Subramaniam V, Ruers T. The use of fluorescent dyes and probes in surgical oncology. *European Journal of Surgical Oncology: The Journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical*

- Oncology 2010;36:6-15.
23. Uhara H, Takata M, Saida T. Sentinel lymph node biopsy in Japan. *International Journal of Clinical Oncology / Japan Society of Clinical Oncology* 2009;14:490-6.
  24. Gotoh K, Yamada T, Ishikawa O, Takahashi H, Eguchi H, Yano M, et al. A novel image-guided surgery of hepatocellular carcinoma by indocyanine green fluorescence imaging navigation. *Journal of Surgical Oncology* 2009;100:75-9.
  25. Widhalm G, Wolfsberger S, Minchev G, Woehrer A, Krssak M, Czech T, et al. 5-Aminolevulinic acid is a promising marker for detection of anaplastic foci in diffusely infiltrating gliomas with nonsignificant contrast enhancement. *Cancer* 2010;116:1545-52.
  26. Gleysteen JP, Newman JR, Chhieng D, Frost A, Zinn KR, Rosenthal EL. Fluorescent labeled anti-EGFR antibody for identification of regional and distant metastasis in a preclinical xenograft model. *Head & Neck* 2008;30:782-9.
  27. Keramidas M, Josserand V, Righini CA, Wenk C, Faure C, Coll JL. Intraoperative near-infrared image-guided surgery for peritoneal carcinomatosis in a preclinical experimental model. *The British Journal of Surgery* 2010;97:737-43.
  28. Kulbersh BD, Duncan RD, Magnuson JS, Skipper JB, Zinn K, Rosenthal EL. Sensitivity and specificity of fluorescent immunoguided neoplasm detection in head and neck cancer xenografts. *Archives of Otolaryngology--Head & Neck Surgery* 2007;133:511-5.
  29. Mieog JSD, Hutteman M, van der Vorst JR, Kuppen PJK, Que I, Dijkstra J, et al. Image-guided tumor resection using real-time near-infrared fluorescence in a syngeneic rat model of primary breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2011;128:679-89.
  30. Nguyen QT, Olson ES, Aguilera TA, Jiang T, Scadeng M, Ellies LG, et al. Surgery with molecular fluorescence imaging using activatable cell-penetrating peptides decreases residual cancer and improves survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:4317-22.
  31. Olive PL, Chaplin DJ, Durand RE. Pharmacokinetics, binding and distribution of Hoechst 33342 in spheroids and murine tumours. *British Journal of Cancer* 1985;52:739-46.
  32. O'Malley BW, Cope KA, Johnson CS, Schwartz MR. A new immunocompetent murine model for oral cancer. *Archives of Otolaryngology--Head & Neck Surgery* 1997;123:20-4.
  33. Khurana D, Martin EA, Kasperbauer JL, O'Malley BW, Salomao DR, Chen L, et al. Characterization of a spontaneously arising murine squamous cell carcinoma (SCC VII) as a prerequisite for head and neck cancer immunotherapy. *Head & Neck*

- 2001;23:899-906.
34. Rosenthal EL, Kulbersh BD, Duncan RD, Zhang W, Magnuson JS, Carroll WR, et al. In vivo detection of head and neck cancer orthotopic xenografts by immunofluorescence. *The Laryngoscope* 2006;116:1636-41.
  35. Grabau DA, Rank F, Friis E. Intraoperative frozen section examination of axillary sentinel lymph nodes in breast cancer. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, Et Immunologica Scandinavica* 2005;113:7-12.
  36. Weiser MR, Montgomery LL, Susnik B, Tan LK, Borgen PI, Cody HS. Is routine intraoperative frozen-section examination of sentinel lymph nodes in breast cancer worthwhile? *Annals of Surgical Oncology* 2000;7:651-5.
  37. Davids V, Kidson SH, Hanekom GS. Melanoma patient staging: histopathological versus molecular evaluation of the sentinel node. *Melanoma Research* 2003;13:313-24.
  38. Hatta N, Takata M, Takehara K, Ohara K. Polymerase chain reaction and immunohistochemistry frequently detect occult melanoma cells in regional lymph nodes of melanoma patients. *Journal of Clinical Pathology* 1998;51:597-601.
  39. Gil Z, Fliss DM. Contemporary management of head and neck cancers. *The Israel Medical Association Journal* 2009;11:296-300.
  40. Robbins KT, Clayman G, Levine PA, Medina J, Sessions R, Shaha A, et al. Neck dissection classification update: revisions proposed by the American Head and Neck Society and the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. *Archives of Otolaryngology--Head & Neck Surgery* 2002;128:751-8.
  41. Ferlito A, Rinaldo A, Robbins KT, Silver CE. Neck dissection: past, present and future? *The Journal of Laryngology and Otology* 2006;120:87-92.
  42. Luker GD, Luker KE. Optical imaging: current applications and future directions. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 2008;49:1-4.
  43. Shu X, Royant A, Lin MZ, Aguilera TA, Lev-Ram V, Steinbach PA, et al. Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome. *Science (New York, N.Y.)* 2009;324:804-7.
  44. Chai RL, Grandis JR. Advances in molecular diagnostics and therapeutics in head and neck cancer. *Current Treatment Options in Oncology* 2006;7:3-11.
  45. Li D, Guang W, Abuzeid WM, Roy S, Gao G-P, Sauk JJ, et al. Novel adenoviral gene delivery system targeted against head and neck cancer. *The Laryngoscope* 2008;118:650-8.
  46. Seiwert TY, Cohen EEW. Targeting angiogenesis in head and neck cancer. *Seminars in Oncology* 2008;35:274-85.



47. Rosenthal EL, Kulbersh BD, King T, Chaudhuri TR, Zinn KR. Use of fluorescent labeled anti-epidermal growth factor receptor antibody to image head and neck squamous cell carcinoma xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics* 2007;6:1230-8.

## 9. 業績目録

### (I) 原 著

1. Suzuki Y, Yoshida T, Wang G, Aoki T, Katayama T, Miyamoto S, Miyazaki K, Iwabuchi K, Danbara M, Nakayama M, Horie R, Nakamine H, Sato Y, Nakamura N, Niitsu N. Incidence and Clinical Significance of Aberrant T-Cell Marker Expression on Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cells. *Acta Haematol.* 130(4):230-7, 2013.
2. Nakayama M, Okamoto M, Hayakawa K, Ishiyama H, Kotani S, Miyamoto S, Seino Y, Okamoto T, Soda I, Sekiguchi A. Clinical outcome of supracricoid laryngectomy with cricohyoidoepiglottopexy: radiation failure versus previously untreated patients. *Auris Nasus Larynx*, 40(2):207-10, 2013.
3. Nakayama M, Watanabe A, Matsuki T, Tamura E, Seino Y, Okabe S, Okamoto T, Miyamoto S, Okamoto M. Buccal fat augmentation for insufficient neoglottal closure after supracricoid laryngectomy with cricohyoidoepiglottopexy. *Auris Nasus Larynx*. 40(5):500-5, 2013.
4. Nakayama M, Katada C, Mikami T, Okamoto M, Koizumi W, Tanabe S, Miyamoto S, Okamoto T, Seino Y, Kano K. A clinical study of transoral pharyngectomies to treat superficial hypopharyngeal cancers. *Jpn J Clin Oncol.* 43(8):782-7, 2013.
5. Tuttle S, Hertan L, Daurio N, Porter S, Kaushick C, Li D, Myamoto S, Lin A, O'Malley BW, Koumenis C. The chemopreventive and clinically used agent curcumin sensitizes HPV (-) but not HPV (+) HNSCC to ionizing radiation, in vitro and in a mouse orthotopic model. *Cancer Biol Ther*, 13(7):575-84, 2012.
6. Nakayama M, Sato YI, Iwabuchi K, Tetuo M, Okamoto M, Seino Y, Okamoto T, Miyamoto S. Laminin-5 immunohistochemical mapping for analysis of local extension in hypopharyngeal cancer: A preliminary report. *Auris nasus larynx*, 39(3):301-4, 2012.
7. Miyamoto S, Sperry S, Yamashita T, Reddy NP, O'Malley BW, Jr., Li D. Molecular imaging assisted surgery improves survival in a murine head and neck cancer model. *Int J Cancer*, 131(5):1235-42, 2012.
8. Suzuki Y, Yoshida T, Wang G, Togano T, Miyamoto S, Miyazaki K, Iwabuchi K, Nakayama M, Horie R, Niitsu N, Sato Y, Nakamura N. Association of CD20 levels with clinicopathological parameters and its prognostic significance for patients with DLBCL. *Ann Hematol*, 91(7):997-1005, 2012.
9. Masaki T, Katada C, Nakayama M, Takeda M, Miyamoto S, Seino Y, Matsuba H,

- Okamoto T, Koizumi W, Tanabe S, Horiguchi S, Okamoto M, Muto M. Usefulness and pitfall of Narrow band imaging combined with magnifying endoscopy for detecting an unknown head and neck primary site with cervical lymph node metastasis. *Auris nasus larynx*, 39(5):502-6, 2012.
10. Reddy NP, Miyamoto S, Araki K, Liu T, Feldman M, O'Malley BW, Jr., Li D. A novel orthotopic mouse model of head and neck cancer with molecular imaging. *Laryngoscope*, 121(6):1202-7, 2011.
  11. 松木崇、宮本俊輔、永井浩巳、岡本牧人. 咽喉頭浮腫を合併したムンプス 4 例の検討. *耳鼻咽喉科臨床*, 104(6):441-6, 2011.
  12. Xu L, Heldrich J, Wang H, Yamashita T, Miyamoto S, Li A, Uboh CE, You Y, Bigelow D, Ruckenstein M, O'Malley B, Li D. A controlled and sustained local gentamicin delivery system for inner ear applications. *Otol Neurotol*, 31(7):1115-21, 2010.
  13. 清野由輩、中山明仁、林政一、竹田昌彦、宮本俊輔、松葉宏起、岡本牧人. 精神神経系既往症を有する頭頸部進行癌症例の治療. *頭頸部癌*, 36(1):119-24, 2010.
  14. Nakayama M, Holsinger C, Okamoto M, Seino Y, Miyamoto S, Takeda M, Yokobori S, Masaki T, Hayashi S. Clinicopathological analyses of fifty supracricoid laryngectomized specimens: evidence base supporting minimal margins. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 71(6):305-11, 2009.
  15. 中山明仁、清野由輩、林政一、宮本俊輔、竹田昌彦、正来隆、横堀学、岡本牧人. Supracricoid laryngectomy 50 症例の臨床的検討. *日本耳鼻咽喉科学会会報*, 112(7):540-9, 2009.
  16. Nakayama M, Okamoto M, Miyamoto S, Takeda M, Yokobori S, Masaki T, Seino Y. : Supracricoid laryngectomy with cricothyroidopiglotto-pexy or cricothyroid-pexy: Experience on 32 patients. *Auris Nasus Larynx*, 35:77-82, 2008.
  17. 中山明仁、清野由輩、林政一、宮本俊輔、竹田昌彦、岡本牧人、菅信一、秦博文、埴宏典. 頭頸部悪性腫瘍における Multidetector-row CT の有用性. *北里医学*, 38:43-7, 2008.
  18. 横堀学、中山明仁、鈴木立俊、竹田昌彦、宮本俊輔、岡本牧人 : 喉頭垂全摘手術(CHEP) の術前後における輪状軟骨・舌骨の位置に関する検討. *日本気管食道科学会会報*, 58:25-9, 2007.
  19. 浜田幸宏、内藤久志、宮本俊輔、竹田昌彦、鈴木立俊、中山明仁、岡本牧人、矢後和夫 : 頭頸部腫瘍患者の MRSA 感染症. *耳鼻咽喉科臨床*, 100:303-7, 2007.
  20. 中山明仁、清野由輩、長田真由美、宮本俊輔、竹田昌彦、岡本牧人 : 喉頭垂全摘術 SCL-CHEP パス導入の効果と課題. *頭頸部癌*, 33:332-5, 2007.
  21. Nakayama M, Hirose H, Okamoto M, Miyamoto S, Yokobori S, Takeda M, Seino Y, Kawashima E. : Electromyography of the cricoarytenoid unit during supracricoid

- laryngectomy with a cricohyoidoepiglottopexy procedure. J. Laryngol. Otol., 121:87-91, 2007.
22. 竹田昌彦、堅田親利、中山明仁、宮本俊輔、岡本牧人：Narrow Band Imaging(NBI)内視鏡アシスト下に経口腔法切除した中咽頭癌の2症例. 頭頸部癌, 33:470-5, 2007.
  23. 中山明仁、岡本牧人、竹田昌彦、宮本俊輔、清野由輩、酒井直彦：口腔・咽頭癌診療の最前線 下咽頭癌の機能温存手術 術式の選択と予後. 日本口腔・咽頭科学会誌, 18:269-275, 2006.
  24. 中山明仁、岡本牧人、竹田昌彦、宮本俊輔、清野由輩：喉頭癌 626 例の臨床統計. 耳鼻咽喉科臨床, 99:299-304, 2006.
  25. 中山明仁、牧敦子、竹田昌彦、宮本俊輔、岡本牧人：T3、T4 声門癌における喉頭亜全摘術 SCL-CHEP の役割. 耳鼻と臨床, 52:186-9, 2006.
  26. 中山明仁、大橋健太郎、清野由輩、宮本俊輔、竹田昌彦、横堀学、岡本牧人：喉頭温存手術の現状と将来展望 喉頭亜全摘術 SCL-CHEP の適応と限界. 頭頸部癌, 32:311-4, 2006.
  27. 竹田昌彦、中山明仁、宮本俊輔、岡本牧人：経口腔法による側壁型中咽頭癌の手術治療 Transoral Lateral Oropharyngectomy について. 頭頸部癌, 32:468-73, 2006.
  28. 清野由輩、中山明仁、鈴木立俊、橋本晋一郎、横堀学、竹田昌彦、宮本俊輔、長田真由美、八尾和雄、岡本牧人：喉頭亜全摘術 SCL-CHEP, SCL-CHP におけるクリニカルパス導入の試み. 頭頸部癌, 31:611-8, 2005.
  29. 中山明仁、栗原里佳、宮本俊輔、竹田昌彦、横堀学、鈴木立俊、八尾和雄、岡本牧人、新部譲、北野雅史、早川和重、小林伸行、酒井直彦：理想的なチーム医療を行うために北里大学病院におけるチーム医療の実践と展望. 頭頸部癌, 30:385-90, 2004.
  30. 宮本俊輔、佐野肇、小野雄一、新田光邦、岡本牧人：難聴患者におけるミトコンドリア遺伝子変異の検討. Audiology Japan, 46:595-600, 2003.

## (II) 総説・講座

1. 中山明仁、堅田親利、清野由輩、宮本俊輔、竹田昌彦、正来隆、岡本牧人. 【中・下咽頭の表在癌 新しい疾患概念】 治療 中咽頭表在癌の内視鏡治療の実践と展望. JOHNS, 25(2):239-42, 2009.
2. 中山明仁、林政一、清野由輩、宮本俊輔、竹田昌彦、正来隆、横堀学、岡本牧人. 局所進行喉頭癌に対する音声保存治療 局所進行喉頭癌に対する喉頭亜全摘出術 SCL-CHEP の切除限界. 日本気管食道科学会会報, 60(2):86-9, 2009.
3. 堅田親利、正来隆、中山明仁、竹田昌彦、宮本俊輔、松葉宏起、田辺聡、小泉和三郎、西元寺克禮、岡本牧人. 【中・下咽頭の表在癌 新しい疾患概念】 表在癌診断に向けた内視鏡の進歩 オリンパス NBI. JOHNS, 25(2):171-8, 2009.
4. 新部譲、中山明仁、宮本俊輔、岡本牧人、早川和重. 喉頭がん(T2,T3)治療法の選択 切除・再建か放射線・化学療法か T2N0 声門癌に対する化学放射線療法の意義. 頭頸部

癌, 10:34(3):352-4, 2008

5. 中山明仁, 林政一, 清野由輩, 宮本俊輔, 竹田昌彦, 横堀学, 岡本牧人喉頭亜全摘術 supracricoid laryngectomy with cricothyroidoepiglottopexy (SCL-CHEP)による音声・嚥下機能の温存. 北里医学, 37(2):135-8, 2007.
6. 宮本俊輔, 中山明仁, 岡本牧人: 傍神経節腫 頸動脈小体腫瘍. JOHNS, 22:1601-5, 2006.

#### (III) 症例・臨床治験・その他

1. Nakayama M, Okamoto M, Seino Y, Miyamoto S, Matsuki T, Ogawa A. Delayed wound infection after supracricoid partial laryngectomy following failure of high dose radiation. Eur Arch Otorhinolaryngol, 268(2):273-9, 2011.
2. Nakayama M, Seino Y, Okamoto M, Mikami T, Okamoto T, Miyamoto S. Clinical significance of positive Delphian node in supracricoid laryngectomy with cricothyroidoepiglottopexy. Jpn J Clin Oncol, 41(8):987-91, 2011.
3. 松木崇、宮本俊輔、岡本牧人. 肩甲舌骨筋症候群例. 耳鼻咽喉科臨床, 104(2):151-5, 2011.
4. Nakayama M, Okamoto M, Seino Y, Miyamoto S, Hayashi S, Masaki T, Yokobori S, Takeda M. Inverted epiglottitis: a postoperative complication of supracricoid laryngectomy with cricothyroidoepiglottopexy. Auris nasus larynx, 37(5):609-14, 2010.
5. Masaki T, Katada C, Nakayama M, Takeda M, Miyamoto S, Seino Y, Koizumi W, Tanabe S, Horiguchi S, Okamoto M. Narrow band imaging in the diagnosis of intra-epithelial and invasive laryngeal squamous cell carcinoma: a preliminary report of two cases. Auris nasus larynx, 36(6):712-6, 2009.
6. Seino Y, Nakayama M, Okamoto M, Yokobori S, Takeda M, Miyamoto S. Laryngeal chondritis induced by C3-4 osteophyte following supracricoid laryngectomy with cricothyroidoepiglottopexy: report of two cases. J Laryngol Otol, 122(7):745-9, 2008.
7. 清野由輩、中山明仁、竹田昌彦、橋本大門、宮本俊輔、八尾和雄、岡本牧人: 口蓋扁桃転移により判明した肝細胞癌例. 耳鼻咽喉科臨床, 99:1035-9, 2006.

#### (IV) 学会発表

##### 〈シンポジウム〉

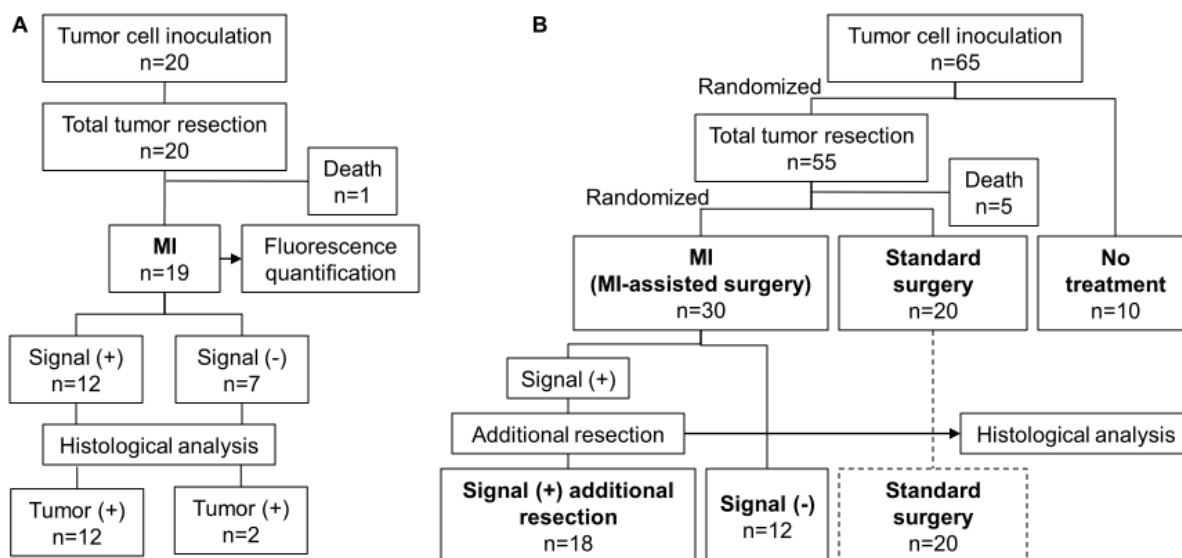
1. Miyamoto S, Sperry S, Yamashita T, Reddy NP, O'Malley BW, Nakayama M, Okamoto M, Li D : The effectiveness of molecular imaging assisted surgery in murine head and neck cancer model. 20th IFOS World Congress, 2013. 6, Seoul.

##### 〈一般講演〉

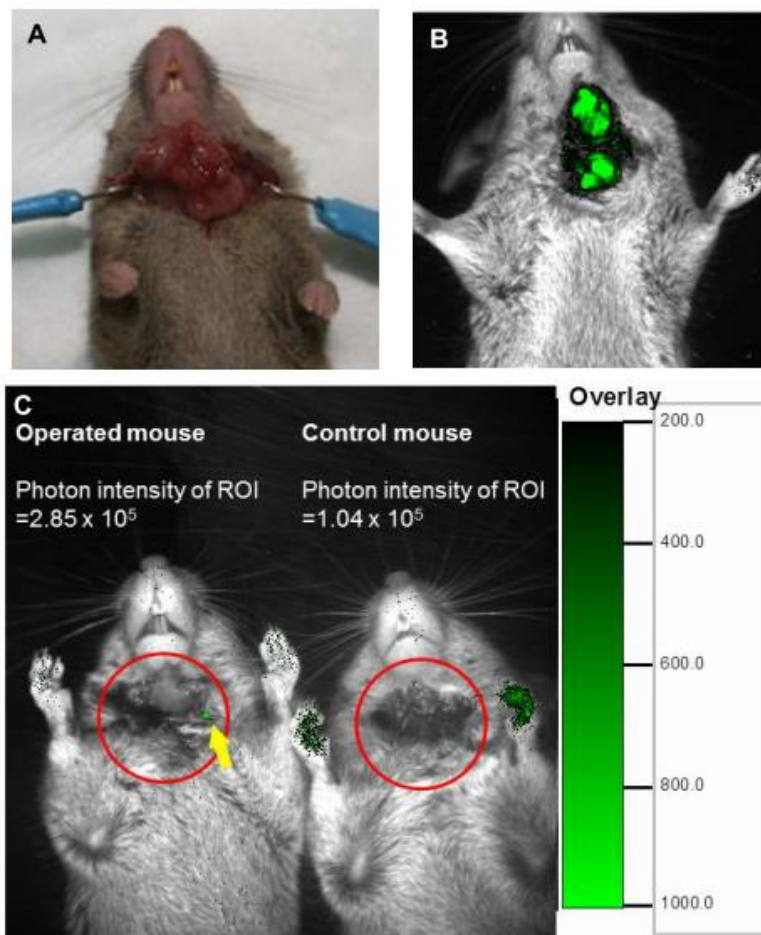
1. Araki K, Reddy N, Miyamoto S, Jiang X, Xu L, Liu T, Wang H, O'Malley BW, Li D: Molecular Imaging for Head and Neck Cancer in Mouse Models. AAO-HNSF 113th

- Annual Meeting & OTO EXPO, 2009, San Diego. (Otolaryngol Head Neck Surg, 141(3)suppl 1:55, 2009.)
2. Miyamoto S, Yamashita T, O'Malley BW, Li D: Molecular Imaging-Assisted Surgery for Head and Neck Cancer. AAO-HNSF 114th Annual Meeting & OTO EXPO, 2010, Boston. (Otolaryngol Head Neck Surg, 143(2)suppl 2:67, 2010.)
  3. Miyamoto S, Yamashita T, O'Malley BW, Jr., Li D. Molecular imaging assisted surgery in an animal model with head and neck cancer. AACR 102nd Annual Meeting, 2011, Orlando, USA.
  4. 宮本俊輔, 中山明仁, 清野由輩, 岡本旅人, 岡本牧人, Li Daqing : 頭頸部癌手術における蛍光イメージングによる腫瘍可視化の有用性. 第 113 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 2012.5.10, 新潟. (日本耳鼻咽喉科学会会報, 115(4):435, 2012.)
  5. 宮本俊輔 : マウスモデルを用いた頭頸部癌手術における蛍光イメージングの有効性に関する研究. 第 7 回頭頸部癌基礎研究会, 2013.6.12, 東京.

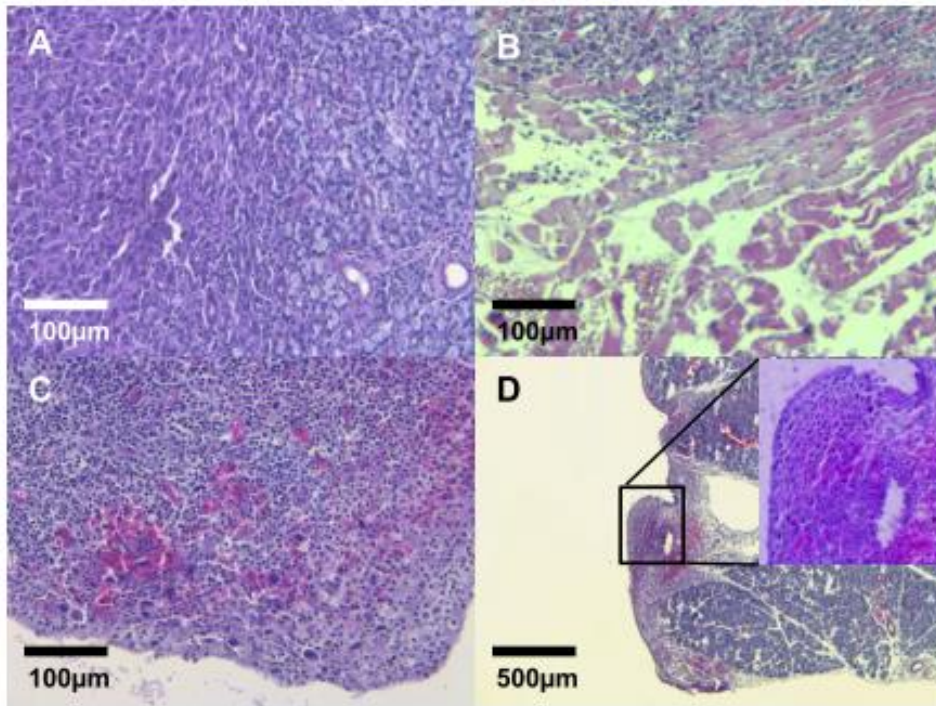
## 10. 図表



**図 1.** 実験デザインのフローチャートを示す。術中分子イメージング（Molecular Imaging : MI）の診断精度についての実験（A）では、20 匹の頭頸部がんマウスモデルに肉眼下腫瘍切除を施行した後の手術創部を MI で検索し、残存蛍光シグナル有無を評価した。その結果と組織学的検査結果を比較した。MI 補助下手術の生存への寄与についての実験（B）では、65 匹の頭頸部がんマウスモデルを無作為に MI 補助下手術群、肉眼下通常手術群、無治療群の 3 群に分けて、腫瘍接種後 60 日間の腫瘍特異的生存率を評価した。また、MI 補助下手術群をさらに初回手術後のシグナル残存があり追加切除したものをシグナル陽性群、なかったものをシグナル陰性群に分けて、それらと通常手術群との生存率を比較評価した。



**図 2.** GFP を安定発現する SCC VII 細胞株 (SCC VII-GFP) を用いて作成した頭頸部がんモデルマウスにおける皮膚切開後の代表的な明視野画像 (A) および蛍光画像 (B) を示す。また、腫瘍の肉眼下切除後にマウスモデルをコントロールマウスとともに **MI** により検索した代表的画像 (C) を示す。切除後マウスでは残存蛍光シグナルが検出された (黄色矢印)。蛍光シグナルを定量して相対値を算出するため、それぞれのマウスの開放創部に関心領域 (Region of Interest : ROI) が設定された (赤色円)。



**図 3.** MI 補助下で残存蛍光シグナルを認め、追加切除した組織に対する組織学的検査結果の代表的画像を示す。腫瘍細胞は、主に唾液腺 (A) と筋 (B) への浸潤していたが、リンパ節転移 (C) も認めた。1 mm 未満の顕微鏡的腫瘍も検出された (D)。



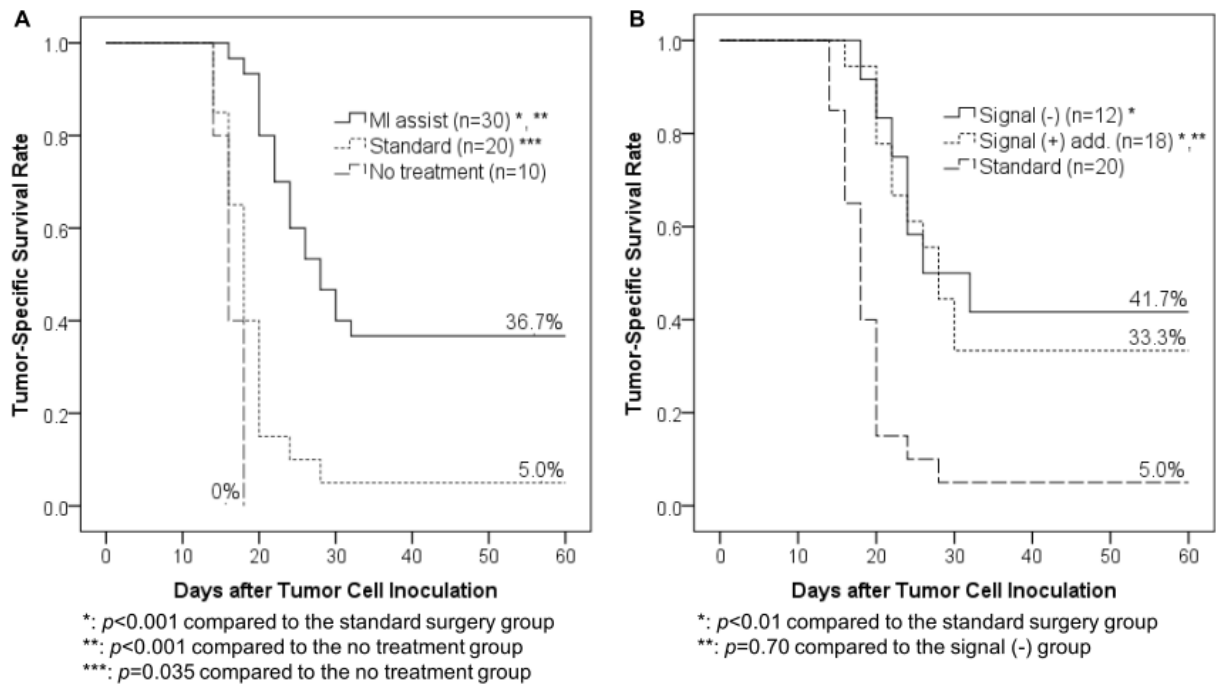


図 4. 頭頸部がんマウスモデルにおける MI 補助下手術の有効性をみるため、Kaplan-Meier 法により腫瘍特異的生存率が評価された。(A) MI 補助下手術群は肉眼下通常手術群、無治療群と比較して、有意に良好な生存率を示した。(B) MI 補助下手術群をさらに初回手術後のシグナル残存があり追加切除したものをシグナル陽性群、なかったものをシグナル陰性群の 2 群に分けたが、シグナル陽性群の生存率はシグナル陰性群と同等であり、さらに通常切除群よりも有意に良好であった。

**表 1.** Fluorescence photon intensity of cultured cells

Number of cells	10 <sup>6</sup> /well	10 <sup>5</sup> /well	10 <sup>4</sup> /well
SCC VII-GFP	1.16 × 10 <sup>9</sup>	1.14 × 10 <sup>8</sup>	2.80 × 10 <sup>7</sup>
SCC VII-tdTomato	4.64 × 10 <sup>7</sup>	4.39 × 10 <sup>6</sup>	3.04 × 10 <sup>5</sup>
Ratio of SCC VII-GFP to SCC VII-tdTomato	24.9	25.9	92.1

SCC VII-GFP の蛍光強度は SCC VII-tdTomato よりも著明に大きかった。

**表 2.** Diagnostic accuracy of intraoperative MI

n=19		Histological analysis		
		Positive	Negative	
MI	Positive	12	0	PPV=100%
	Negative	2	5	NPV=71.4%
		Sensitivity=85.7%	Specificity=100%	

MI: molecular imaging, PPV: positive predictive value, NPV: negative predictive value

MI と組織学的検査の診断結果が比較され、MI は肉眼下切除で見逃された残存腫瘍の検出において高精度な検査であることが示された。