



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the role of cyclin D1 for predicting local recurrence and the drug distribution after superselective intra-arterial chemotherapy in head and neck cancer
Author(s)	坂下, 智博
Description	配架番号 : 1679
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	乙第6904号
Issue Date	2014-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r6904
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56273
Type	doctoral thesis
File Information	Tomohiro_Sakashita.pdf



学 位 論 文

Studies on the role of cyclin D1 for predicting local recurrence and
the drug distribution after superselective intra-arterial
chemotherapy in head and neck cancer

(頭頸部癌における局所再発予測因子としてのサイクリン D1 の
役割および超選択的動注療法の薬剤分布に関する研究)

2014 年 3 月

北 海 道 大 学

坂 下 智 博

Tomohiro Sakashita

目次

1. 発表論文目録および学会発表目録	1 頁
2. 本論文全体の緒言	4 頁
3. 略語表	5 頁
4. 第一章	
4-1. 本章に関連した緒言	6 頁
4-2. 実験方法	7 頁
4-3. 実験結果	11 頁
4-2. 考察	16 頁
5. 第二章	
5-1. 本章に関連した緒言	18 頁
5-2. 実験方法	20 頁
5-3. 実験結果	23 頁
5-4. 考察	28 頁
6. 総括および結論	30 頁
7. 謝辞	32 頁
8. 引用文献	33 頁

1. 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Sakashita T, Homma A, Oridate N, Suzuki S, Hatakeyama H, Kano S, Mizumachi T, Yoshida D, Fujima N, Fukuda S. : Platinum concentration in sentinel lymph nodes after preoperative intra-arterial cisplatin chemotherapy targeting primary tongue cancer. *Acta Otolaryngol* 132:1121-1125 (2012年)
2. Sakashita T, Homma A, Oridate N, Hatakeyama H, Kano S, Mizumachi T, Fukuda S. : Evaluation of nodal response after intra-arterial chemoradiation for node-positive head and neck cancer.
Eur Arch Otorhinolaryngol 269:1671-1676 (2012 年)
3. Sakashita T, Homma A, Suzuki S, Hatakeyama H, Kano S, Mizumachi T, Oridate N, Fukuda S. : Prognostic value of cyclin D1 expression in tumor-free surgical margins in head and neck squamous cell carcinomas.
Acta Otolaryngol 133:984-991 (2013 年)
4. Sakashita T, Homma A, Oridate N, Suzuki S, Hatakeyama H, Kano S, Mizumachi T, Onimaru R, Tsuchiya K, Yasuda K, Shirato H, Fukuda S. : Regional control after concomitant chemoradiotherapy without planned neck dissection in node-positive head and neck squamous cell carcinomas. *Auris Nasus Larynx* 40:211-215 (2013 年)
5. Mizumachi T, Kano S, Sakashita T, Hatakeyama H, Suzuki S, Homma A, Oridate N, Fukuda S. : Improved survival of Japanese patients with human papillomavirus-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma.
Int J Clin Oncol 18:824-828 (2013年)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 坂下智博（発表者）、本間明宏、折館伸彦、鈴木清護、畠山博充、水町貴諭、加納里志、古沢 純、福田 諭、吉田大介、鬼丸力也、安田耕一、白土博樹：放射線動注化学療法の頸部転移に対する有効性、第 37 回北海道頭頸部腫瘍研究会、札幌、平成 23 年 3 月 5 日
2. Sakashita T（発表者）, Oridate N, Homma A, Suzuki S, Hatakeyama H, Kano S, Mizumachi T, Fukuda S. : Cyclin D1 is an immunohistochemical predicting indicator for local recurrence in head and neck squamous cell carcinomas. ”The 14th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology- Head and Neck Surgery. Kyoto, Japan. 2012.4.12
3. Sakashita T（発表者）, Homma A, Oridate N, Suzuki S, Hatakeyama H, Kano S, Mizumachi T, Yoshida D, Fujima F, Fukuda S. : Distribution of platinum in sentinel lymph nodes after preoperative intra-arterial cisplatin chemotherapy targeting primary tongue cancer. 5th International Symposium on Sentinel Node Biopsy in Head and Neck Cancer. Amsterdam, The Netherlands. 2012.5.24
4. 坂下智博（発表者）、折館伸彦、本間明宏、鈴木清護、畠山博充、加納里志、水町貴諭、福田 諭：頭頸部扁平上皮癌根治切除症例の切除断端における免疫組織学的予後因子の検討、第 36 回日本頭頸部癌学会、島根、平成 24 年 6 月 7 日
5. 坂下智博（発表者）、折館伸彦、本間明宏、鈴木清護、畠山博充、加納里志、水町貴諭、福田 諭：頭頸部扁平上皮癌根治切除症例の腫瘍組織と切除断端組織における cyclinD1 発現の検討、第 23 回日本頭頸部外科学会総会、鹿

児島、平成 25 年 1 月 28 日

2.本論文全体の緒言

頭頸部癌は癌全体の 5%を占め全世界では年間 50 万人以上が罹患するといわれており、本邦においては 2 万人以上が罹患しその数は年々増加傾向にある¹⁻²。頭頸部癌の発生の多くは喫煙曝露や飲酒などによる環境的要因が関与しているが、Human Papilloma Virus(HPV)・Epstein Barr Virus(EBV)などウイルス感染の関与も報告されている。ここ 20 年間、頭頸部癌治療において手術技術の向上・放射線化学療法 of 技術的向上は進んだが生存率向上に結びついたという明確なデータは示されていないのが現状である。近年、HPV 関連発生の頭頸部癌の場合は放射線化学療法に対する治療反応が高く予後良好であることが明らかとされてきたが、HPV ステータスに応じて治療強度を決定した方がリスクアンドベネフィットの観点からも有益であるというコンセプトが打ち出されつつある³⁻⁶。これと同様にある特定の遺伝子発現異常や、細胞・蛋白発現異常が予後規定因子となる可能性も秘めており、これら原因遺伝子に対する標的治療が確立した場合には頭頸部癌患者の予後改善につながる Break through となると期待される。

根治的手術治療によって原発巣切除を行い切除断端に顕微鏡的に癌が無いことを確認できた場合にも、正常と思われる粘膜に癌発現に関連する遺伝子発現異常・蛋白発現異常を起こしている可能性があり、局所再発の危険性がある。また、深部浸潤を認める原発巣の場合には潜在的な頸部リンパ節転移を起こす可能性が高いとの報告もあり⁷、確実に原発巣を切除できた後に転移頸部リンパ節が顕在化することがある。本論文では先ず、第一章において手術治療の際に問題となる術後局所再発に関連する予後予測因子について、手術切除断端における特定の遺伝子発現異常・蛋白発現異常を免疫組織学的手法により明らかにし、さらに第二章では術後局所再発の高リスク群に対する補助治療として期待される超選択的動注療法による原発巣・潜在的頸部リンパ節転移巣への薬剤移行性について検討し論ずる。

3. 略語表

AJCC: American Joint Committee on Cancer

CDK: Cyclin-dependent-kinase

CI: Confidence interval

EBV: Epstein-Barr Virus

HPV: Human Papilloma Virus

HR: Hazard ratio

IRB: Institutional review board

LC: Local control rate

NSN: Non-sentinel lymph node

OS: Overall survival rate

RI: Radio isotope

RT-PCR: Real time-polymerase chain reaction

SD: Standard deviation

SN: Sentinel lymph node

第一章 手術切除断端における免疫組織学的予後予測因子の検索

4.1. 本章に関連した緒言

頭頸部扁平上皮癌において手術治療は放射線治療と並んで重要な根治治療のひとつである。手術切除断端粘膜において通常の顕微鏡検査によって腫瘍細胞を認めなかった場合にも 10-30%に局所再発がみられると報告されている^{8,9}。このように、通常の病理組織学的検査では探索されないような遺伝子発現もしくは細胞・蛋白発現異常が癌の発生に関与されていると考えられており、段階的な遺伝子異常、蛋白発現異常を経て癌発生に至る **multistep process** という概念からも近年、この分野の研究が進められつつある¹⁰。

癌遺伝子である **cyclin D1** は細胞分裂周期 G1 期において重要な調節能を有しており、この遺伝子異常により発癌に関与すると報告されている。癌抑制遺伝子である **p53** の変異・過剰発現は頭頸部癌の 40-60%に認めると報告されており発癌との強い関与が示唆されているもののひとつである^{11,12}。

このように、腫瘍組織におけるこれら癌発現に関連した遺伝子発現と予後予測については既に一定の研究成果が挙げられているが、腫瘍組織そのものではなく手術切除断端粘膜における遺伝子発現、細胞・蛋白発現と生命予後・局所再発との関連について調査した研究はまだ充分になされていない。

本研究では「腫瘍組織」に加えて、「手術切除断端粘膜」において **cyclin D1**、**p53** の発現異常を免疫組織学的に確認し生命予後・局所再発との関連について比較し、「腫瘍組織」と「手術切除断端粘膜」のどちらが生命予後・局所再発の予測に有用か、また **cyclin D1** と **p53** のいずれの発現異常がより有用な予後予測因子となり得るかについて検討した。

4.2.実験方法

4.2.1.対象

1995 年から 2007 年まで北海道大学病院において手術治療を受け、手術切除断端に顕微鏡的に腫瘍細胞を認めなかった頭頸部扁平上皮癌を有する患者 162 症例を対象とした。このうち根治治療として行った放射線治療の後に再発を認め救済手術を受けた 46 例については除外しており、残った 116 例を適格症例とした。

116 例のうち、口腔癌が 43 例(37.1%)、中咽頭癌が 11 例(9.5%)、下咽頭癌が 39 例(33.6%)、喉頭癌が 23 例(19.8%)であった。習慣的な喫煙のあったものは 101 例(87.1%)、習慣的な飲酒を有するものは 95 例(81.9%)といずれも大半を占める結果であった。American Joint Committee on Cancer(AJCC)の提唱する TNM 分類(第 6 版、2002 年)に従い原発腫瘍の T 分類、転移リンパ節から N 分類に分類したところ T1 20 例(17.2%)、T2 45 例(38.8%)、T3 34 例(29.3%)、T4a 17 例(14.7%)であり T4b 症例は認めなかった。N 分類別では、N0 64 例(55.2%)、N1 19 例(16.4%)、N2a 5 例(4.3%)、N2b 24 例(20.7%)、N2c 4 例(3.4%)であり N3 症例は認めなかった。57 例(49.1%)に追加治療を行ったが、内訳は 39 例に術前放射線治療(単独若しくは化学療法との併用)を行い、18 例は術後放射線治療を行った。追加治療として行った放射線治療の線量は 20Gy から 50Gy であり平均 44Gy、中央値 40Gy であった。(表 1)

尚、本研究について北海道大学自主臨床研究審査委員会(Institutional review board; IRB)の審査を受け承認されている(自主臨床研究番号 011-0344 及び 012-0074)。

表 1 対象 116 例の臨床的特徴

項目		患者数
合計		116
性別	男性	101 (87.1%)
	女性	15 (12.9%)
年齢（歳）	中央値	61
	範囲（平均）	29-86 (Ave. 61.7)
追跡観察期間（月）	中央値	69.6
	範囲（平均）	12-164.4 (Ave. 77.9)
原発部位	口腔	43 (37.1%)
	中咽頭	11 (9.5%)
	下咽頭	39 (33.6%)
	喉頭	23 (19.8%)
喫煙習慣	なし	15 (12.9%)
	あり	101 (87.1%)
飲酒週間	なし	21 (18.1%)
	あり	95 (81.9%)
T 分類	T1-2	65 (56.0%)
	T3-4	51 (44.0%)
N 分類	N0	64 (55.2%)
	N1-2	52 (44.8%)
腫瘍分化度	高分化	56 (48.3%)
	中低分化	60 (51.7%)
追加治療	なし	59 (50.9%)
	あり	57 (49.1%)

4.2.2.組織採取および免疫染色

手術にて原発腫瘍を切除した後に、手術切除断端粘膜を 2-3 箇所、深部断端組織を 1 箇所採取し免疫組織学的に精査を行った。腫瘍組織、切除断端組織それぞれの標本はパラフィンにて包埋し 4 μ m 厚に切離したのち、キシレンとエタノール類を通して再水和化し脱パラフィン処理を行った。内因性過酸化水素活性を不活化するため 0.1%過酸化水素水を加え、cyclin D1 モノクローナル抗体 (NCL-L-CYCLIN D1-GM; Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, UK) と p53 モノクローナル抗体 (NCL-p53-DO7; Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, UK) を用いて免疫染色を行った。1 次抗体の希釈割合は、cyclin D1 モノクローナル抗体の場合は 1:100、p53 モノクローナル抗体の場合は 1:200 とした。

4.2.3.免疫組織学的判定

発現強度の判定は過去の報告を元に強拡大 ($\times 200$) 1 視野において 10%以上の染色細胞を認めた場合に p53 免疫組織学的陽性^{13,14}、cyclin D1 の場合も同様に 10%以上の染色細胞を認めた場合に cyclin D1 免疫組織学的陽性と判定した¹⁵。以上の判定については、筆頭著者を含む 3 名 (N.O., S.S.) により行った。

免疫染色により cyclin D1 陽性・陰性のものを図 1、p53 陽性・陰性のものを図 2 に示す。

図 1 cyclin D1 陽性 (左) と陰性 (右) ($\times 200$)

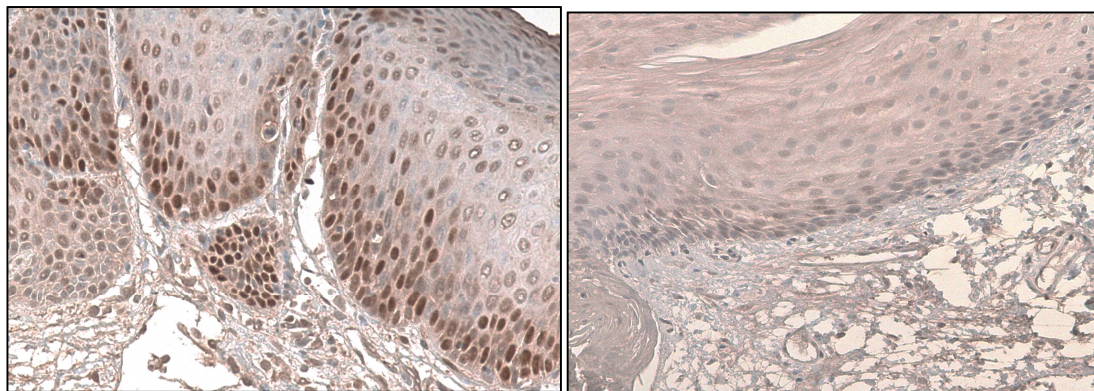
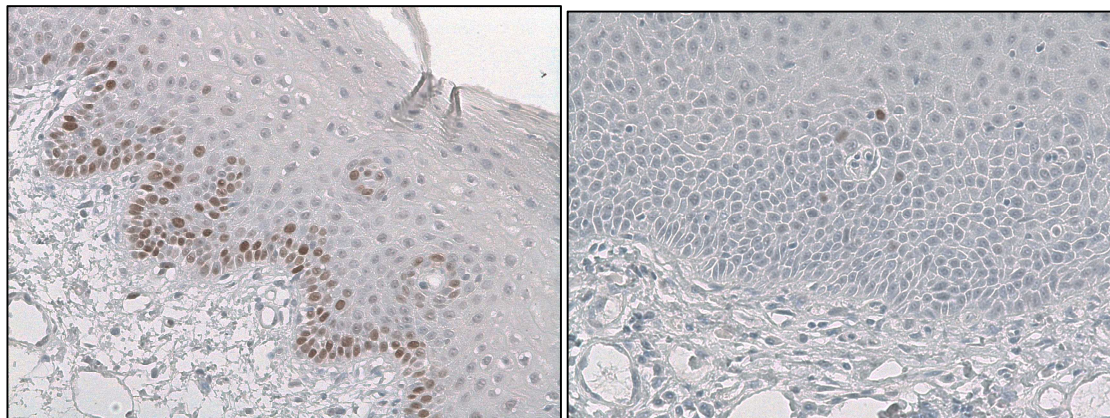


図2 p53 陽性（左）と陰性（右）（×200）



4.2.4 統計学的手法

局所制御率、粗生存率は Kaplan-Meier 法により算出し、2 群の比較は log-rank 法により行った。また独立した生存予後増悪因子・局所再発のリスク要因の判定には比例ハザード法を用いた多変量解析にて行った。統計学的有意差については p 値 0.05 未満のものを有意差有りとした。統計解析については統計解析ソフトウェア JMP 9.0.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA)を用いた。

4.3 実験結果

4.3.1 免疫組織学的陽性・陰性の判定結果

腫瘍組織の免疫組織学的解析により、63 例(54%)に p53 陽性、76 例(66%)に cyclin D1 陽性を認めた。切除断端の免疫組織学的解析により、34 例(29%)に p53 陽性、54 例(47%)に cyclin D1 陽性を認めた。

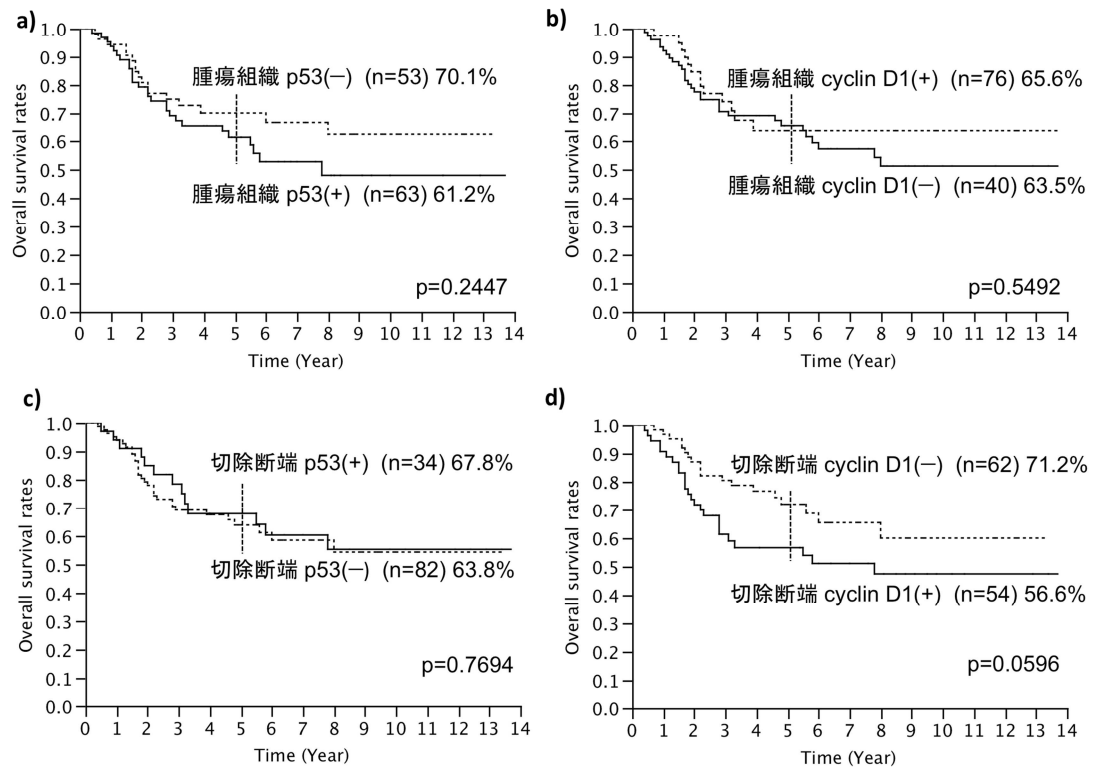
4.3.2 免疫組織学的解析と生存率

生存者の追跡期間は 12 ヶ月から 164.4 ヶ月であり中央値 69.6 ヶ月であった。116 例中、34 例は原疾患による死亡、10 例は他病死、残りの 72 例は生存しているが内 1 例は遠隔転移を有するものの担癌生存している。

腫瘍組織における p53 陽性群・陰性群の 5 年粗生存率は、61.2%、70.1%であり有意差を認めなかった($p=0.2447$)。腫瘍組織における cyclin D1 陽性群・陰性群の 5 年粗生存率は 65.6%、63.5%であり有意差を認めなかった($p=0.5492$)。切除断端における p53 陽性群・陰性群の 5 年粗生存率は 67.8%、63.8%であり有意差を認めなかった($p=0.7694$)。切除断端における cyclin D1 陽性群・陰性群の 5 年粗生存率は 56.6%、72.0%であったが、有意差を認めなかった($p=0.0596$)。腫瘍組織・切除断端における各免疫組織学的解析と生存曲線について次頁の図 3 に示す。

他の臨床的因子により生存率を比較した場合に有意差を認めたのは原発腫瘍の部位(口腔癌 73.6% vs 咽頭癌・喉頭癌 59.8%)、T 分類(T1-2 74.5% vs T3-4 53.3%)、N 分類(N0 74.3% vs N1-2 53.8%)、組織学的分化度(高分化 77.0% vs 中低分化 54.4%)、追加治療の有無(有り 51.1% vs 無し 78.7%)であった(表 2 参照)。

図 3 腫瘍組織・切除断端における免疫組織学的解析と生存曲線



4.3.3 免疫組織学的解析と局所制御率

局所再発は 15 例(13%)に認めた。切除断端における cyclin D1 陽性群・陰性群の局所制御率は 77%、91%であり有意差を認めた($p=0.0139$)。腫瘍組織における cyclin D1 陽性群・陰性群では局所制御率に差を認めず、p53 については腫瘍組織・切除断端のいずれの標本で比較しても局所制御率に差を認めなかった。腫瘍組織・切除断端における各免疫組織学的解析と局所制御曲線について次頁の図 4 に示す。

各臨床的因子と 5 年生存率・局所制御率との関連性については表 2 にまとめて示す。

図 4 腫瘍組織・切除断端における免疫組織学的解析と局所制御率

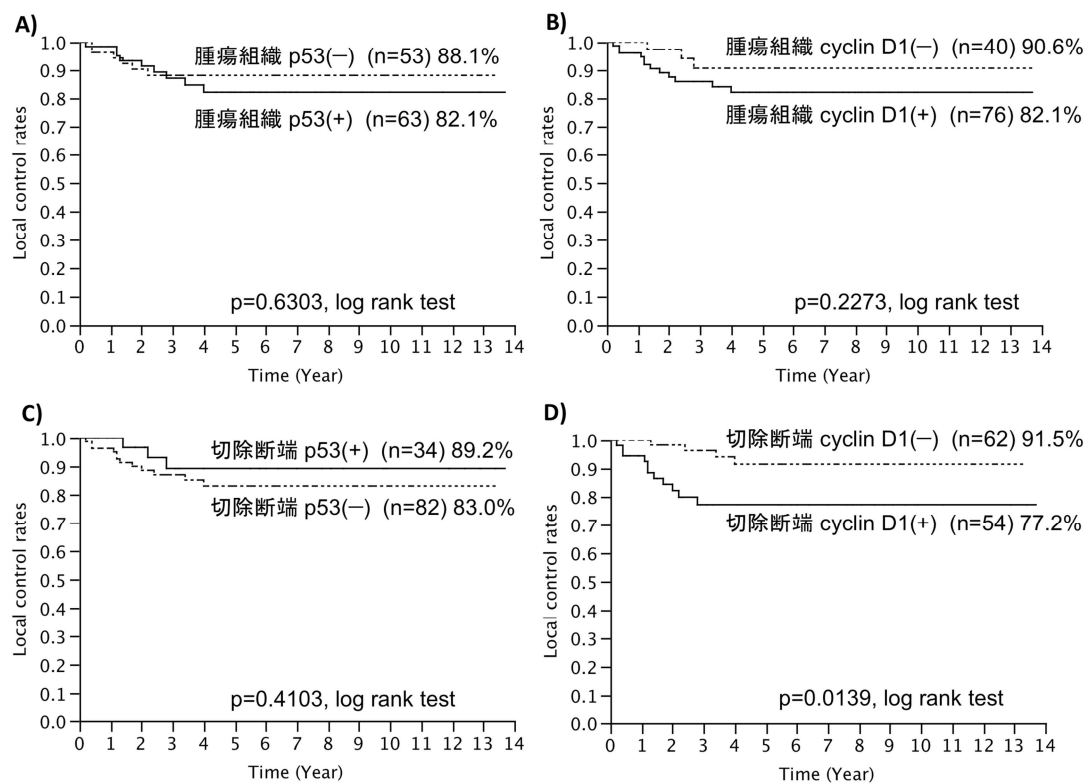


表 2 各臨床的因子および 5 年粗生存率(OS)・局所制御率(LC)

項目			粗生存率(OS)		局所制御率(LC)	
			5-year OS (%)	p	5-year LC (%)	p
年齢	<60	54	66.5		85.2	
	>60	62	64.4	0.3125	84.7	0.8996
性別	男性	101	63.3		82.7	
	女性	15	79.0	0.3572	100.0	0.1260
原発部位	口腔	43	73.6		88.5	
	咽頭癌・喉頭癌	73	59.8	0.0373	82.9	0.2599
喫煙習慣	なし	15	53.0		71.3	
	あり	101	66.8	0.7481	86.3	0.3989
飲酒習慣	なし	21	80.7		94.7	
	あり	95	62.1	0.1947	82.6	0.2030
T 分類	T1-2	65	74.5		87.3	
	T3-4	51	53.3	0.0191	82.0	0.2748
N 分類	N0	64	74.3		87.0	
	N1-2	52	53.8	0.0138	82.5	0.3158
腫瘍分化度	高分化	56	77.0		89.8	
	中低分化	60	54.4	0.0135	80.1	0.1006
追加治療	なし	59	78.7		88.0	
	あり	57	51.1	0.0062	81.7	0.2172
腫瘍組織 p53-	陰性	53	70.1		88.1	
	陽性	63	61.2	0.2447	82.1	0.6303
腫瘍組織 cyclin D1-	陰性	40	63.5		90.6	
	陽性	76	65.6	0.5492	82.1	0.2273
切除断端 p53-	陰性	82	63.8		83.0	
	陽性	34	67.8	0.7694	89.2	0.4103
切除断端 cyclin D1-	陰性	62	72.0		91.5	
	陽性	54	56.6	0.0596	77.2	0.0139

4.3.4 多変量解析による独立した予後規定因子の同定

前頁表 2 において、粗生存率・局所制御率における単変量解析から有意差の得られた原発部位・T 分類・N 分類・組織学的分化度・追加治療の有無・切除断端における cyclin D1 の発現を検討因子に加えて比例ハザード法による多変量解析を行った場合、切除断端における cyclin D1 陽性群の局所再発リスク比が最も高く 4.58(95% confidence interval 1.14-21.69, $p=0.0304$)であった。(表 3 参照)

表 3 比例ハザード法による多変量解析

Variable (score)	n	粗生存率		局所制御率	
		HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
原発部位					
口腔 (0)	43				
その他 (1)	73	0.81 (0.29-2.25)	0.6978	0.36 (0.06-2.36)	0.2921
T 分類					
T1-2 (0)	65				
T3-4 (1)	51	1.64 (0.81-3.44)	0.1721	1.65 (0.49-6.31)	0.4219
N 分類					
N0 (0)	64				
N1-2 (1)	52	1.49 (0.75-3.02)	0.2516	0.99 (0.31-3.30)	0.9865
腫瘍分化度					
高分化 (0)	56				
中低分化 (1)	60	2.00 (1.05-3.94)	0.0350	2.39 (0.77-8.37)	0.1335
追加治療					
なし (0)	59				
あり (1)	57	1.51 (0.72-3.36)	0.2817	1.34 (0.39-5.04)	0.6491
切除断端 cyclin D1-					
陰性 (0)	62				
陽性 (1)	54	1.15 (0.55-2.48)	0.7124	4.58 (1.14-21.69)	0.0304

4.4. 考察

本研究は、手術治療を行い通常の病理検査では切除断端組織に癌細胞を認めなかった症例を対象にしているが、諸家の報告と同様に 13%に局所再発を認めた。これら局所再発は、手術治療時の迅速病理検査では正常と判断されるような粘膜から癌化した可能性も考えられ、手術切除断端粘膜における分子生物学的アプローチによる前癌病変の探索は近年試みられつつある^{16,17}。段階的に癌化していく過程で、通常の顕微鏡検査では探索されない遺伝的異常、蛋白・細胞発現異常を発見できれば、それら高リスク群に対して有効な補助治療を行うことが可能で生存率向上に寄与すると考えられる。

今回我々が用いた免疫組織学的手法による検索は RT-PCR 法・免疫ブロッティング法などに比べ最も簡便かつ安価であり実臨床においても導入が容易であり有用性が高いと考えられる。手術症例に対しては腫瘍組織そのものよりも、患者体内に残る組織に最も近い切除断端組織を用いた検索がより局所再発の予後予測に有用ではないかと予想していたが、本研究により得られた結果はこの考えを支持するものであった。

癌抑制遺伝子のひとつである p53 は、DNA が傷害を受けた際に活性化され bax 蛋白を介して異常細胞の apoptosis を誘導する他、細胞分裂周期を arrest し傷害を受けた DNA の修復に関与すると言われている。p53 遺伝子の変異により変異型 p53 は過剰発現するため DNA シークエンス法・LigAmp 解析・RT-PCR 法などの分子生物学的手法による探索が可能で予後予測因子となり得ると報告されているが¹⁶⁻¹⁹、その有用性についてはまだ一定した見解は得られていない。放射線化学療法を行った頭頸部癌の予後予測因子として原発腫瘍組織を免疫組織学的に解析した場合に p53 は予後予測因子としての有用性が明ら

かではなかったと報告されている²⁰。本研究においても、手術切除断端粘膜における p53 発現性と生命予後・局所再発の関係を検討したが有意な関連性を見いだせなかった。本研究の結果と過去の報告から総合して考えると、p53 と生命予後・局所再発との関連性は否定できないが、少なくともその探索手法としての免疫組織学的手法による探索をした場合の有用性は認められないと結論付けられる。

cyclin D1 は cyclin-dependent-kinases(CDKs)と複合体を形成することで、細胞分裂周期 G1 期に作用して癌細胞の増殖を促進させる以外にも、癌抑制遺伝子である Rb の機能に対して抑制的に働くことで癌細胞の増殖を促進させると考えられる^{21,22}。腫瘍組織において cyclin D1 が高発現しているものは有意に予後が増悪することが知られているが^{15,23}、手術切除断端組織における発現性の研究についてはいままでもなされていない。本研究の結果からは、手術切除断端における cyclin D1 高発現群は有意に局所制御率が低下し、多変量解析によっても独立した予後予測因子であることが明らかとなった。今後、cyclin D1 を標的とした分子標的治療・遺伝子標的治療が確立されれば手術後の有用な補助療法が可能であり、頭頸部癌克服のための重要な一手となることが期待される。また、現在腫瘍の栄養血管に経動脈的に抗癌剤を投与する方法（超選択的動注療法）が確立しているが、経動脈的にこれら cyclin D1 標的治療薬がデリバリーできれば治療の必要な部位に高濃度の薬剤を投与することが出来るため効率の良い補助治療が可能と考えている。次章では経動脈投与した薬剤の原発腫瘍・所属リンパ節への移行性について検討し、局所再発の高リスク群に対する補助療法としての超選択的動注療法の有用性について検討したい。

第二章 術後局所再発高リスク群に対する補助療法としての超選択的動注療法と薬剤移行性

5.1 本章に関連した緒言

本邦を中心に 1950 年代より原発腫瘍に対する局所治療として経動脈的な抗癌剤治療が試みられている^{24,25}。これら抗癌剤動注治療の応用は従来の手術治療では根治が得られ難い症例に対しても有効性が指摘されており、1992 年に米国の Robbins らが、より選択的にカテーテルを留置し経動脈的に抗癌剤投与を行い（超選択的動注療法）放射線治療を同時併用で行う方法を報告して以来、広く用いられている²⁶。超選択的動注療法は、通常の経静脈投与に比べてより効率的に原発腫瘍への抗癌剤のデリバリーが可能であり、局所再発高リスク群に対しての補助治療として有用となる可能性を秘めている。また、深部浸潤が 5mm 以上であるものについては、局所再発の高リスク群であるだけでなく潜在的頸部リンパ節転移を有する危険性が有意に高く⁴、特に口腔癌の場合治療開始時に頸部リンパ節転移を認めなかった症例でも 20-40%に後発頸部リンパ節転移をみるとの報告もなされており原発腫瘍のみならず潜在的頸部リンパ節転移巣に対する予防的治療の必要性についても議論がなされている²⁷⁻³¹。

また、センチネルリンパ節という概念が存在するが、これは「見張りリンパ節」の意で原発癌から所属リンパ節に転移を起こす際に、リンパ流の経路から最初に転移を起こすリンパ節のことを言う。既に乳癌、皮膚悪性黒色腫に対してはその有用性が確立されているが、近年頭頸部癌の分野においてもその概念が成立すると報告されており潜在的転移リンパ節の検索に関する臨床応用が進められている³²⁻³⁴。

本章においては、センチネルリンパ節生検の技術を応用して、原発腫瘍を標的とした超選択的動注療法を行った後に原発腫瘍と潜在的転移リンパ節への薬

剤移行性を確認することで、超選択的動注療法における局所再発高リスク群に対する補助療法としての有用性について検討し論ずる。

5.2 実験方法

5.2.1 対象

2010 年から 2011 年に北海道大学病院耳鼻咽喉科で治療した口腔癌 T1N0 および T2N0 の 5 症例。尚、本研究について北海道大学自主臨床研究審査委員会 (IRB) の審査を受け承認されている (自主臨床研究番号 009-0158)。

5.2.2 プラチナ抗癌剤の経動脈的投与

手術 2 週間前に、患側舌動脈にマイクロカテーテルをセルディンガー法により挿入しシスプラチン $100\text{mg}/\text{m}^2$ を投与した。投与速度は $0.3\text{ml}/\text{sec}$ から、 $0.6\text{ml}/\text{sec}$ であり中央値 $0.4\text{ ml}/\text{sec}$ 。チオ硫酸ナトリウム $24\text{g}/\text{body}$ を、シスプラチン動注開始と同時に経静脈的に $100\text{ ml}/\text{hr}$ の滴下速度で投与して中和を行った。本動注法及び、シスプラチン投与量は本間らの報告に従った³⁵。

5.2.3 放射線薬剤の調整及び投与

ラジオアイソトープ (radioisotope, RI) の調製、投与は指定された管理区域内で手術前日に行った。放射性医薬品には $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -phytate (フチン酸) : テクネフチン酸キット (52AM448) を用い、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ との標識には $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ ジェネレータもしくは $^{99\text{m}}\text{Tc}$ パーテクネート (過テクネチウム酸ナトリウム) 注射液を用いた。

フチン酸キットに $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 注射液 4mL を加え、よく振り混ぜて $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -phytate を作成し、うち 74 MBq (2 mCi) $= 1\text{ mL}$ を腫瘍周囲粘膜内 4 か所 (1 か所あたり 0.25 mL) に 27G 針で分注した。

5.2.4 リンパシンチグラフィの撮像

撮影は投与後 1 時間に、シンチカメラで前面、左右斜位像（顔面を横に向けてシンチカメラのガントリーを 10 から 15 度傾斜）、左右側面像の 5 方向を撮影した。Shine through の影響を防ぐため、適宜、鉛製円盤等を用いて遮蔽を行い撮影した。患者の背側にアクリル製の面線源容器（ ^{99m}Tc 37 MBq の溶液を満たす）を用いて撮影し患者の輪郭が描出されようにし、撮影時間は 1 コマ 5 分とした。

5.2.5 センチネルリンパ節の同定と摘出・頸部郭清範囲

手術当日に、原発巣切除（舌部分切除）を先行して行い、ガンマプローブ C-Trak collimated gamma probe (model CW3000; Carewise Medical Corp., Morgan Hill, CA, US)を用いてセンチネルリンパ節を同定した。RI が集積しバックグラウンドの 10 倍以上のカウント数(cpm)を示すリンパ節で、カウント数の高い順に最大 5 個までをセンチネルリンパ節とした。センチネルリンパ節の存在した部位は level 分類に従った³⁶。センチネルリンパ節に対して後述する凍結迅速検査を行い転移の有無により頸部郭清範囲を決定した。センチネルリンパ節に転移を認めなかった場合には、顎下部・上中頸部の郭清を行い、転移を認めた場合にはさらに下頸部を含めた拡大領域の郭清を行った。センチネルリンパ節に隣接する非センチネルリンパ節を摘出しプラチナ濃度測定を行った。また、症例 3 から 5 に関してはセンチネルリンパ節に隣接する筋組織を一部採取し比較対象とした。

5.2.6 プラチナ濃度測定

採取組織（原発腫瘍組織、センチネルリンパ節、非センチネルリンパ節、筋組織）を 2mm 片に切り取り濃硝酸 80℃に 5 時間温浸し消化処理した。pH7 から 8 のジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムでキレート化し、クロロホルム抽出したものを濃縮し原子吸光用試料とした。原子吸光計 Zeeman atomic absorption spectrometer (model: 170-70; Hitachi , Tokyo, Japan)を用いてプラチナ濃度を測定した³⁷⁾。

5.2.7 リンパ節の病理組織学的検討

採取されたセンチネルリンパ節は摘出後直ちにリンパ節専用カッター（ティシューカッター：シスメックス社製）を用いて 2mm 幅のブロックを作成し、切り出し面の凍結迅速検査を行った。センチネルリンパ節および非センチネルリンパ節についてはホルマリン固定を行い代表 1 割面の切り出しを行った。パラフィン包埋後、センチネルリンパ節は 2mm 幅のブロックで各切り出し面の 4 μ m の薄切標本を 2 枚作製し、HE 染色とサイトケラチン(CK)免疫染色を行った。非センチネルリンパ節については代表 1 割面で癌の転移の有無を HE 染色で検索した。免疫染色は抗サイトケラチン抗体 AE1/3 (Signet Laboratories, MA, USA)を一次抗体とし酵素抗体間接法(Streotavidin-biotin 法)にて行った。

抗癌剤投与による腫瘍組織の変性・壊死の所見は下里らの提唱する基準により分類した³⁸⁾。

5.2.6 統計学的処理

センチネルリンパ節・非センチネルリンパ節のプラチナ濃度の比較は、混合効果モデルを適応させて行った。転移センチネルリンパ節・非転移センチネルリンパ節のプラチナ濃度比較には unpaired-*t* 検定を用いた。

5.3. 実験結果

5.3.1 治療経過及び有害事象発生について

対象の全 5 例に対して超選択的動注化学療法を行い、手術において原発巣の切除およびセンチネルリンパ節の摘出、隣接する非センチネルリンパ節の摘出が可能であった。シスプラチンの投与量の 80 mg/m² から 100 mg/m² であり、中央値 100mg/m² であった。センチネルリンパ節の個数は 1 個から 4 個で中央値 3 個であった。臨床的特徴について表 4 に示す。

症例 5 は 81 歳と高齢であることからシスプラチン投与量を 80%に減量して行った。超選択的動注化学療法後および手術施行後の有害事象発生はいずれの症例においても認めなかった。症例 2 においては、複数のセンチネルリンパ節に転移が確認されたため、術後放射線治療(60Gy/30fr)と同時併用でシスプラチン 40mg/m² 経静脈投与を 1 週おきに行った。

表 4 対象 5 症例の臨床的特徴とセンチネルリンパ節個数

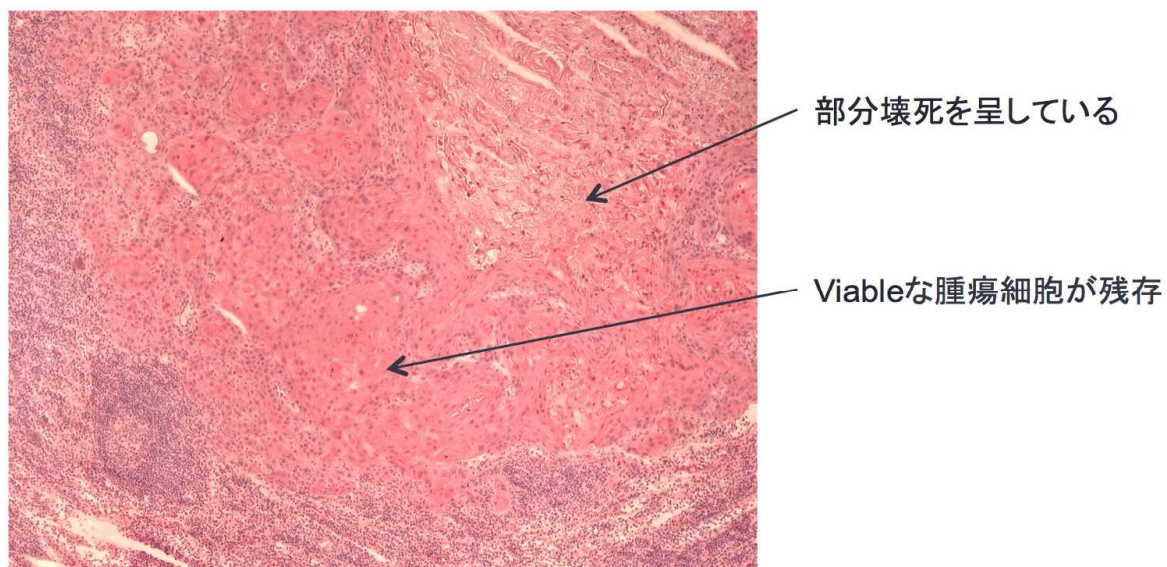
症例	年齢	性別	原発部位	TN 分類	腫瘍径 (mm)	浸潤深度	シスプラチン 動注投与量	センチネルリン パ節の数
1	61	M	舌	T1N0	12×12	8mm	100mg/m ²	3
2	35	M	舌	T2N0	20×10	10mm	100mg/m ²	4
3	62	F	舌	T2N0	22×15	9mm	100mg/m ²	4
4	59	M	舌	T2N0	28×14	9mm	100mg/m ²	1
5	81	F	舌	T2N0	22×15	10mm	80mg/m ²	1

5.3.2. センチネルリンパ節生検と病理組織学的結果

計 13 個のセンチネルリンパ節が術前のシンチグラフィで確認され、術中もガンマプローブの使用により摘出が可能であった。また、これらセンチネルリンパ節に隣接する非センチネルリンパ節を 8 個採取した。今回確認されたセンチネルリンパ節はいずれも患側であり、健側には認めなかった。術後病理結果から 13 個のセンチネルリンパ節のうち 7 個に転移を認めた。8 個の非センチネルリンパ節には転移を認めなかった。

7 個転移センチネルリンパ節のうち、3 個に病理組織学的に変性（腫瘍細胞の膨張・細胞融解・部分壊死）を認めたが、いずれも **viable** な腫瘍細胞の残存を認め、腫瘍構造は保たれていた。残り 4 例については、腫瘍蜂巣が極めて小さかったため、これら変性変化を確認するのは困難であった。症例 5 の転移センチネルリンパ節にみられた部分壊死像を図 5 に示す。

図 5 症例 5 における転移センチネルリンパ節にみられた部分壊死像（×100）



5.3.3 プラチナ濃度測定

センチネルリンパ節、非センチネルリンパ節、原発腫瘍組織のプラチナ濃度測定を行った結果を表 5 に示す。

原発腫瘍組織のプラチナ濃度は平均値 $1.978 \pm 0.807 \mu\text{g/g}$ 、リンパ節のプラチナ濃度は平均値 $0.615 \pm 0.265 \mu\text{g/g}$ であり有意に原発腫瘍組織において高値であった。 $(p < 0.001)$

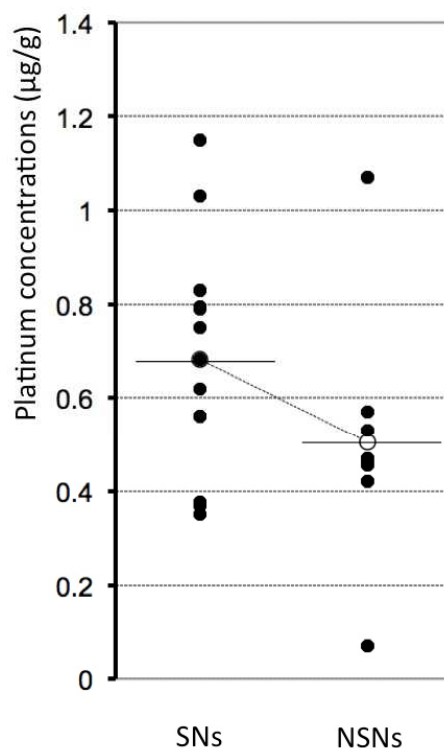
表 5 プラチナ濃度測定結果

症例	センチネルリンパ節			非センチネルリンパ節			原発腫瘍
	部位	プラチナ濃度	転移	部位	プラチナ濃度	転移	プラチナ濃度
		(μg/g)			(μg/g)		
1	Ib	0.682	－	Ib	0.422	－	2.650
		0.376	＋				
	IIa	0.794	－	IIa	0.455	－	
2	Ib	0.350	＋	Ib	0.070	－	1.030
		0.370	－				
		0.620	＋				
		0.560	＋				
3	Ib	0.830	－	Ib	0.470	－	1.180
		1.150	－				
		0.790	－				
		0.560	－				
4	IIa	1.030	＋	IIa	1.070	－	2.370
5	IIa	0.750	＋	IIa	0.460	－	2.660
mean ± SD		0.682±0.246		0.506±0.274			1.978±0.807

センチネルリンパ節のプラチナ濃度は平均値 $0.682 \pm 0.246 \mu\text{g/g}$ 、非センチネルリンパ節のプラチナ濃度は平均値 $0.506 \pm 0.274 \mu\text{g/g}$ であり、有意にセンチネルリンパ節において高値であった。 $(p=0.049)$ 、図 6 参照)

病理検査により転移を認めたセンチネルリンパ節 7 個の平均プラチナ濃度は $0.645 \pm 0.245 \mu\text{g/g}$ 、転移無しセンチネルリンパ節 6 個の平均プラチナ濃度は $0.724 \pm 0.263 \mu\text{g/g}$ であり有意差を認めなかった。 $(p=0.293)$

図 6 センチネルリンパ節(SN)と非センチネルリンパ節(NSN)のプラチナ濃度のデータプロット



また、コントロールとして症例 3 から 5 においてはリンパ節と隣接する筋組織（顎二腹筋後腹の一部）を採取し、同様にプラチナ濃度を測定したが、症例 3 においては $0.37 \mu\text{g/g}$ 、症例 4 および 5 においては測定感度値以下であった。

5.3.4 臨床経過

全 5 症例とも原発腫瘍、頸部リンパ節とも再発を認めず生存されている。観察期間は 22 ヶ月から 34 ヶ月であり中央値は 24 ヶ月であった。

5.4. 考察

本研究により超選択的動注療法により投与された薬剤がどのように原発腫瘍・リンパ節に分布するか明らかにされた。原発腫瘍への栄養血管に選択的に薬剤投与しているため原発腫瘍組織において最も高濃度に分布していたのは当然のことと言える。また、リンパ節組織からも原発腫瘍の4分の1から3分の1程度の投与薬剤濃度が検出される結果であった。センチネルリンパ節においては隣接した非センチネルリンパ節よりも有意に高濃度に分布していたことが明らかとなった。これは、投与した薬剤が一度原発腫瘍に取り込まれた後にリンパ流に乗って経リンパ管的にリンパ節に及んだ可能性を示唆する。また、近接する筋組織にはほとんど投与薬剤が検出されなかったことから、原発腫瘍に取り込まれた後に全身に拡散する投与薬剤の濃度は極めて小さくなることが予想されるが、リンパ節に対しては先に述べたリンパ流に乗って移行することが期待できるためセンチネルリンパ節にみられる潜在的頸部リンパ節転移に対しての治療効果も期待できると考えられた。

シスプラチンの頸部リンパ節転移に対する効果は、すでに報告されており初診時に頸部リンパ節転移を有する症例に対してシスプラチンの経静脈投与と放射線治療を組み合わせで行った際に頸部制御率96.3%と、頸部リンパ節転移に対する高い治療効果が明らかにされている³⁹。尚、本研究と同様に原発腫瘍を標的に超選択的動注療法を放射線治療と同時併用で行った際にも、頸部制御率は81.1-91%と報告されており経静脈投与と匹敵する治療効果を有することが報告されている⁴⁰⁻⁴²。

本研究においては、7個中3個の潜在的転移リンパ節において下里分類Grade 1（部分的な壊死・変性を認めるが、癌の構造は保たれているもの）の変性を認めており、この変性変化は抗癌剤による治療効果の早期反応である可能性が

あると報告されている^{38,43}。

以上の結果から、原発腫瘍を標的に選択的動注療法を行った際にも抗がん剤はリンパ流に乗り経リンパ管的に潜在的転移リンパ節に移行する可能性が示唆された。局所進行癌に対して超選択的動注療法によりシスプラチンを投与することで原発腫瘍に対して高い治療効果を有するだけに留まらず潜在的転移リンパ節に対する治療効果も期待できることが明らかになった。

超選択的動注療法の応用により、原発腫瘍と潜在的転移リンパ節という予後を左右する重要な領域に効果的に抗がん薬剤をデリバリーすることが可能であり、本治療法の応用は、第一章で明らかにされた術後局所再発における高リスク群に対する有効な補助療法となり得ると考えられた。

3. 総括および結論

①本研究から得られた知見

- 手術切除断端における免疫組織学的 cyclin D1 陽性は局所再発のリスク因子であり予後予測因子として有用である。
- 切除断端において腫瘍細胞を認めなかった症例を対象とした場合、腫瘍組織よりも手術切除断端における免疫組織学的検討の方が、より有用性が高い。
- 超選択的動注療法によって投与された抗癌剤は非センチネルリンパ節よりもセンチネルリンパ節の方が有意に高濃度に分布していることが判明した。

②新しい知見の意義

- いままで明らかされていなかった根治切除後の予後増悪因子が明らかになり、この増悪因子を有する症例に選択的に補助療法を行うことが可能となると期待される。
- 超選択的動注療法によって投与された薬剤はリンパ行性に移行すると考えられ原発腫瘍のみならず潜在的転移リンパ節に対する治療効果も期待できると考えられた。

③今後の研究の展開

- cyclin D1 遺伝子を標的とした遺伝子標的治療薬の開発。同治療薬が局所再発の高リスク群と考えられる手術切除断端 cyclin D1 高発現例に対して、選択的に投与されることにより生命予後の改善が期待できるものと考えられた。

- 原発腫瘍を標的にインドシアニンググリーンなどの蛍光色素を選択的に動脈注射し、リンパ行性に所属リンパ節に蛍光色素剤が移行するところを、赤外線カメラを用いて可視化・画像化することで、本研究結果の裏付けが可能であると考えられた。

④今後の課題

- 癌発現に関連する遺伝子・蛋白発現において **cyclin D1** の他に局所再発・生命予後とより強く関連した因子が無いか、追加して探索する必要性がある。
- 補助療法を行う場合の最適な投与経路（経静脈的・経動脈的・局所注入等）および投与薬剤については、その局所制御・生命予後での比較のみならず有害事象発生についても考慮して比較検討する必要性がある。

謝辞

博士学位論文を終えるに当たり、本研究の機会を与えて下さいますと共に、終始ご指導賜りました北海道大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科学分野の福田諭教授ならびに本間明宏准教授に深謝いたします。併せて、本研究の遂行にあたり様々な助言と励ましを頂きました耳鼻咽喉科・頭頸部外科分野の皆様にも心よりお礼申し上げます。

引用文献

1. Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 83, 18-29 (1999).
2. 津熊秀明, 井岡亜希子, 大島明, 味木和喜子. わが国におけるがん罹患動向と頭頸部がん. 頭頸部癌. 32, 292-299 (2006).
3. Mizumachi T, *et al.* Improved survival of Japanese patients with human papillomavirus-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol* 18, 824-828 (2013)
4. Allen CT, *et al.* Human papillomavirus and oropharynx cancer: biology, detection and clinical implications. *Laryngoscope* 120, 1756-1772 (2010).
5. Hoffmann M, *et al.* p16(INK4a) overexpression predicts translational active human papillomavirus infection in tonsillar cancer. *Int J Cancer* 127, 1595-1602 (2010).
6. Fischer CA, *et al.* Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality? *Int J Cancer* 126, 1256-1262 (2010).
7. Kane SV, Gupta M, Kakade AC, D' Cruz A. Depth of invasion is the most significant histological predictor of subclinical cervical lymph node metastasis in early squamous carcinomas of the oral cavity. *Eur J Surg Oncol* 32, 795-803 (2006).
8. Loree TR, Strong EW. Significance of positive margins in oral cavity squamous carcinoma. *Am J Surg* 160, 410-414 (1990).
9. Leemans CR, *et al.* Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor. *Cancer* 73, 187-190 (1994).

10. Ha PK, *et al.* Molecular techniques and genetic alterations in head and neck cancer. ***Oral Oncol*** 45, 335-339 (2009).
11. Sakai E, Tsuchida N. Most human squamous cell carcinomas in the oral cavity contain mutated p53 tumor-suppressor genes. ***Oncogene*** 7, 927-933 (1992).
12. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. ***Cancer Res*** 54, 4855-4878 (1994).
13. Shin DM, *et al.* Biochemopreventive therapy for patients with premalignant lesions of the head and neck and p53 gene expression. ***J Natl Cancer Inst*** 92, 69-73 (2000).
14. Shin DM, *et al.* p53 expressions: predicting recurrence and second primary tumors in head and neck squamous cell carcinoma. ***J Natl Cancer Inst*** 88, 519-529 (1996).
15. Bova RJ, *et al.* Cyclin D1 and p16INK4A expression predict reduced survival in carcinoma of the anterior tongue. ***Clin Cancer Res*** 5, 2810-2819 (1999).
16. Brennan JA, *et al.* Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. ***N Engl J Med*** 332, 429-435 (1995).
17. Huang X, *et al.* p53 mutations in deep tissues are more strongly associated with recurrence than mutation-positive mucosal margins. ***Clin Cancer Res*** 13, 6099-6106 (2007).
18. van Houten VM, *et al.* Mutated p53 as a molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer. ***J Pathol*** 198, 476-486 (2002).
19. Poeta ML, *et al.* The Ligamp TP53 Assay for Detection of Minimal Residual Disease in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Surgical Margins. ***Clin Cancer Res*** 15, 7658-7665 (2009).

20. Oridate N, *et al.* p53 expression in concurrent chemoradiotherapy with docetaxel for head and neck squamous cell carcinoma.
Auris Nasus Larynx 36, 57-63 (2009).
21. Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited.
Cancer Res 60, 3689-3695 (2000).
22. Bartkova J, Lukas J, Strauss M, Bartek J. Cyclin D1 oncoprotein aberrantly accumulates in malignancies of diverse histogenesis.
Oncogene 10, 775-778 (1995).
23. Higuchi E, *et al.* Prognostic significance of cyclin D1 and p16 in patients with intermediate-risk head and neck squamous cell carcinoma treated with docetaxel and concurrent radiotherapy.
Head Neck 29, 940-947 (2007).
24. Sato Y, *et al.* Combined surgery, radiotherapy, and regional chemotherapy in carcinoma of the paranasal sinuses.
Cancer 25, 571-579 (1970).
25. Sakai S, Fuchihata H, Hamasaki Y. Treatment policy for maxillary sinus carcinoma. *Acta Otolaryngol* 82, 172-181 (1976).
26. Robbins KT, *et al.* Efficacy of targeted supradose cisplatin and concomitant radiation therapy for advanced head and neck cancer: the Memphis experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 38, 263-271 (1997).
27. Hosai AS, Carrau RL, Johnson JT, Myers EN. Selective neck dissection in the management of the clinically node-negative neck.
Laryngoscope 110, 2037-2040 (2000).
28. van den Brekel MW, *et al.* The incidence of micrometastases in neck dissection specimens obtained from elective neck dissections.
Laryngoscope 106, 987-991 (1996).
29. Shah JP, Andersen PE. The impact of patterns of nodal metastasis on modifications of neck dissection. *Ann Surg Oncol* 1, 521-532 (1994).

30. Vigili MG, *et al.* Lymphoscintigraphy and radioguided sentinel node biopsy in oral cavity squamous cell carcinoma: same day protocol.
Eur Arch Otorhinolaryngol 264, 163-167 (2007).
31. Ross GL, *et al.* Sentinel node biopsy in head and neck cancer: preliminary results of a multicenter trial.
Ann Surg Oncol 11, 690-696 (2004).
32. Civantos FJ, Moffat FL, Goodwin WJ. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for 106 head and neck lesions: contrasts between oral cavity and cutaneous malignancy. *Laryngoscope* 112, 1-15 (2006).
33. Jefferson GD, Sollaccio D, Gomez-Fernandez CR, Civantos F Jr. Evaluation of immunohistochemical fine sectioning for sentinel lymph node biopsy in oral squamous cell carcinoma.
Otolaryngol Head Neck Surg 144, 216-219 (2011).
34. Yoshimoto S, *et al.* Sentinel node biopsy for oral and laryngopharyngeal squamous cell carcinoma: A retrospective study of 177 patients in Japan. *Auris Nasus Larynx* 39, 65-70 (2012).
35. Homma A, *et al.* Superselective high-dose cisplatin infusion with concomitant radiotherapy in patients with advanced cancer of the nasal cavity and paranasal sinuses: a single institution experience.
Cancer 115, 4705-4714 (2009).
36. Robbins KT, *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.
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 128, 751-758 (2002).
37. 入江 毅, 橋本 豊, 入江 朱美. イヌ及びラットにおけるシスプラチンの吸収・排泄・分布. 医薬品研究. 14, 384-410 (1983).
38. Shimosato Y, Oboshi S, Baba K. Histological Evaluation of Effects of Radiotherapy and Chemotherapy for carcinomas.

- Jpn. J. Clin. Oncol* 1, 19-35 (1971).
39. Sakashita T, *et al.* Regional control after concomitant chemoradiotherapy without planned neck dissection in node-positive head and neck squamous cell carcinomas.
Auris Nasus Larynx 40, 211-215 (2013).
40. Robbins KT, *et al.* Efficacy of targeted chemoradiation and planned selective neck dissection to control bulky nodal disease in advanced head and neck cancer.
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 125, 670-675 (1999).
41. Sakashita T, *et al.* Evaluation of nodal response after intra-arterial chemoradiation for node-positive head and neck cancer.
Eur Arch Otorhinolaryngol 269, 1671-1676 (2012).
42. Robbins KT, Doweck I, Samant S, Vieira F. Effectiveness of superselective and selective neck dissection for advanced nodal metastases after chemoradiation.
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 131, 965-969 (2005).
43. Ikushima I, *et al.* Superselective arterial infusion chemotherapy for squamous cell carcinomas of the oral cavity: histopathologic effects on metastatic neck lymph nodes.
Eur Arch Otorhinolaryngol 264, 269-75 (2007).