

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11889

研究課題名(和文)5-ALAを用いた口腔癌の蛍光診断および術中蛍光ナビゲーションシステムの開発

研究課題名(英文)Development of photodynamic diagnosis and intra-operative navigation system for oral cancer using 5-ALA

研究代表者

佐藤 徹 (Sato, Toru)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：30170765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：体外から細胞内に吸収されたALAはPpIXに変換され、青紫色励起光で赤色蛍光を発する。癌細胞ではPpIXが細胞内に蓄積することを応用し、口腔表在癌を疑う患者の病変部にALA含浸ガーゼを貼付後、小型診断装置にて赤色蛍光を観測し色度分析した。病変中の赤色成分の平均値を代表値としてROC曲線で解析したところ、中等度上皮性異形成以上の病変を感度、特異度とも極めて良好に検出可能であった。一部の症例で、ALAの細胞内取込みに関与するPEPT1およびPpの細胞外排出に関与するDynaminとABCG2について免疫組織学的染色を行ったが、これらの反応については健常部と異形成や癌部との差がみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALAを用いた光線力学的診断は脳腫瘍や膀胱癌などで既に応用されているが、赤色蛍光を色度で数値化した本研究により、癌化傾向の高い中等度から高度の上皮性異形成も含めた口腔表在癌に対して極めて高い感度と特異度で診断できることが分かった。また、ALAは基本的に有害性がなく局所貼付でも内服や静脈内注射と同様に応用できることがわかったので、今回開発した手軽に持ち運べる小型診断装置と相まって、炎症性病変や反応性病変と区別しにくい口腔表在癌やその前駆病変のスクリーニング検査として優れた方法となりえる。また今後病変の蛍光画像を大量集積することで、その蛍光パターンからAI診断も可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Absorbed extracellular 5-aminolevulinic acid (ALA) is metabolized to protoporphyrin (Pp) which exhibits red fluorescence excited by bluish purple light. Utilizing the property that cancer cells intracellularly accumulate Pp, ALA was topically applied to the patients who was clinically suspected superficial oral cancer, then observed red fluorescence using newly developed mobile detection device. X (red) element of chromaticity in the digital images obtained from the device were measured. ROC curve drawn by the mean value of X element in each lesion could discriminate moderate dysplasia and more from mild dysplasia or non-dysplasia with high sensitivity and high specificity.

Some of the cases were examined immunohistochemically using antibodies against PEPT1 which transport ALA into the cytoplasm, Dynamin and ABCG2 which play roles of transportation of Pp. However, the difference between dysplastic epithelium and surrounding normal epithelium was not found.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔表在癌 光線力学的診断 5-アミノレブリン酸 プロトポルフィリンIX 色度 PEPT1 ABCG2 Dynamin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔粘膜の初期癌病変は表在性の平坦な病変として出現し、炎症性病変や反応性変化との鑑別が困難な場合が多く早期発見が遅れる場合がある。最近、副作用が少ない光感受性薬剤である 5-アミノレブリン酸(5ALA)を用いた非侵襲的な光線力学的診断(PDD)が脳腫瘍^{1,2)}や膀胱癌^{3,4)}などで応用され、その有用性が示されている。生体外から投与された ALA は光反応性のあるプロトポルフィリン IX(PpIX)に変換され、405nm の青紫色励起光にて 636nm と 705nm の赤色蛍光を発する。PpIX は正常細胞では素早く代謝されるが、癌細胞では Pp が細胞内に蓄積することから、この赤色蛍光で腫瘍性病変を同定することができる(図1)。

この原理を口腔表在癌やその前駆病変の診断に応用されつつあるが⁵⁾、蛍光の数値化による客観的な判断基準や、Pp 蓄積の機序については未だ明確にはなっていない。

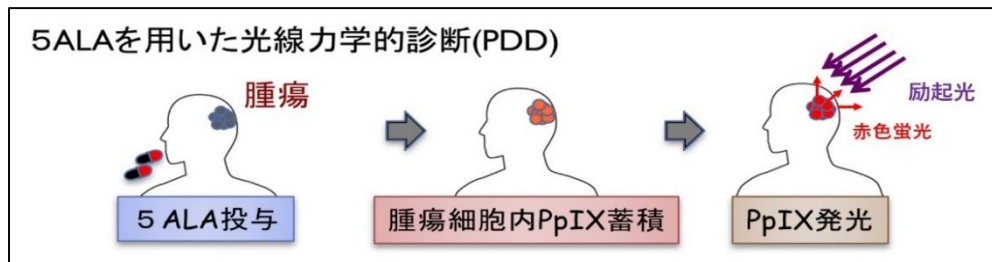


図1: 5ALA による PDD の概略

2. 研究の目的

口腔粘膜の非侵襲的補助診断法の一つであるヨード生体染色は、上皮性異形成がヨード不染域として描出されるが、(1)ヨードによる粘膜刺激が強いこと、(2)アレルギー患者や甲状腺疾患患者には使用不可能であること、(3)角化を示す咀嚼粘膜や特殊粘膜である舌背は元来ヨード不染性のために適用できないこと、などの問題点がある。一方、5ALA は基本的に為害のない物質であり、前記の原理を応用し、口腔粘膜の表在癌やその前駆病変を疑う患者に対し、5ALA を局所貼付して当講座とウシオ電機株式会社で開発した小型蛍光診断装置を用いて、どのような病理組織診断において赤色蛍光を発するのかを検討する。更にその原理として細胞内に取り込まれた 5ALA から Pp に代謝され、細胞外に排出されるどの段階の異常により Pp が蓄積するのも検討する。

3. 研究の方法

(1) 小型蛍光診断装置

操作が簡単な小型蛍光診断装置の開発をウシオ電機株式会社とともに行った。本装置はハンディタイプになっており、レンズの周囲から波長 405 nm の青紫色光が照射され、病変からの波長 635 nm の赤色蛍光のみを感知する構造となっている。さらにこれをデジタル画像として装置内に記録蓄積できることが特徴である(図2)。

(2) 対象と方法

口腔粘膜の表在癌やその前駆病変を疑う患者 40 名(表1)に対し、十分な説明を行い文書での同意を得た後に 1% 5ALA 含浸ガーゼを局所に 1 時間貼付し、前記の小型蛍光診断装置により暗所で赤色蛍光を観察した。得られたデジタル画像を Eye-Scale one software (I-System, Tokyo) にて病変部及び正常部の色度 X(赤色成分)と Y(緑色成分)を測定した。病変部についてはその大きさによって 20~60 か所を測定し、その平均値を病変の代表値とした。切除標本の病理組織診断で、扁平上皮癌、上皮内癌、高度上皮性異形成、中等度上皮性異形成、軽度上皮性異形成、その他及び病変断端の正常粘膜の 6 グループに分類し、データを SPSS ver.25 を用いて ROC 曲線解析を行い、どのグループ間で色度に優位な差があるかを検討した。更に、一部の症例

について 5ALA の細胞外からの取込に關与する peptidetransporter1 (PEPT1)、 Pp を取り込んだ小胞の exocytosis を司ると考えられている Dynamin、 Pp を細胞外に排出する transporter である ABCG2 について免疫組織学的染色による検討を行った。



図 2：ウシオ電機株式会社と共同開発による小型蛍光診断装置

患者	40
男性	18
女性	22
年齢	30 ~ 85 (平均: 66.3)
部位	
舌	21
口腔底	6
歯肉	10
頬粘膜	3

表 1：検索症例

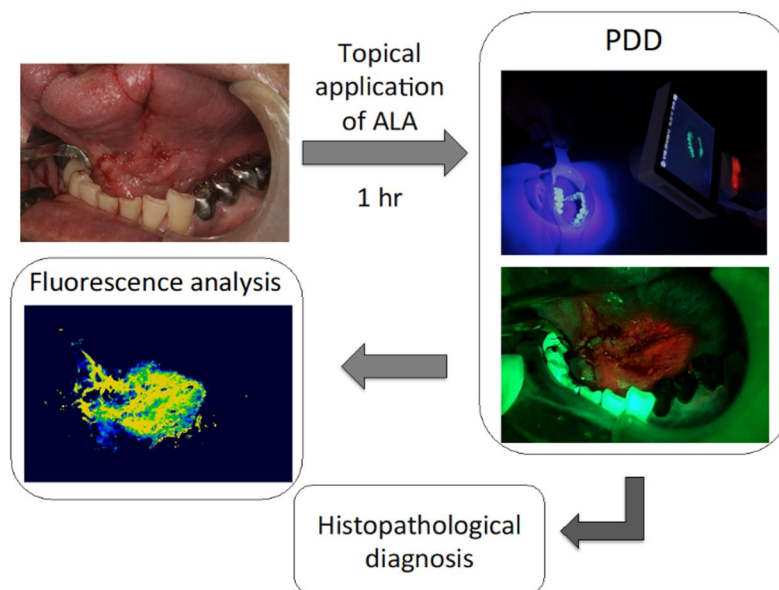


図 3：色度測定の流れ

4. 研究成果

(1) 蛍光診断

扁平上皮癌では全例で明瞭な赤色蛍光を認めた。上皮性異形成では多くの症例で赤色蛍光を認めたが(図 4) 軽度上皮性異形成の場合には弱い赤色蛍光を認めるものから殆ど認識できないものまで様々であった。上皮生異形成を示さない上皮過形成や切除病変辺縁の正常部分では殆ど蛍光を認識できなかった。

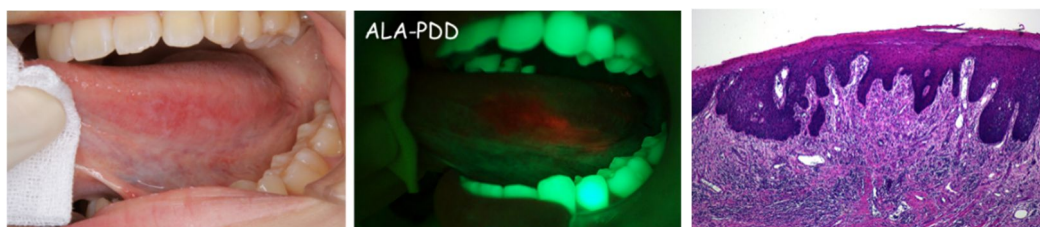


図 4：30 歳女性 高度上皮性異形成（左から口腔内所見、PDD 画像、病理組織所見）

上記所見の客観性を得る目的で撮像したデジタル画像の病変相当部分及び正常部分を、その大きさによって 20~60 箇所で色度分析し、X 成分（赤の強さ）と Y 成分（緑の強さ）を測定した。X 及び Y の平均値、更に X/Y 値を各病変及び正常部の代表値として数値の分布状態を調べたところ、X、Y、X/Y いずれの値においても中等度上皮性異形成と軽度上皮性異形成を境に差がみられ、正常部分に対しての中等度以上の上皮性異形成では明かな有意差を認めた（図 5）。

この結果をもとに、扁平上皮癌を含む中等度以上の上皮性異形成のグループと、軽度上皮性異形成と上皮性異形成のないグループに分けて ROC 曲線での解析を行ったところ、X、Y、X/Y のカットオフ値をそれぞれ 0.46、0.45、0.99 に設定すると、感度 96.6~98.3%、特異度 96.6% で判別可能であった。

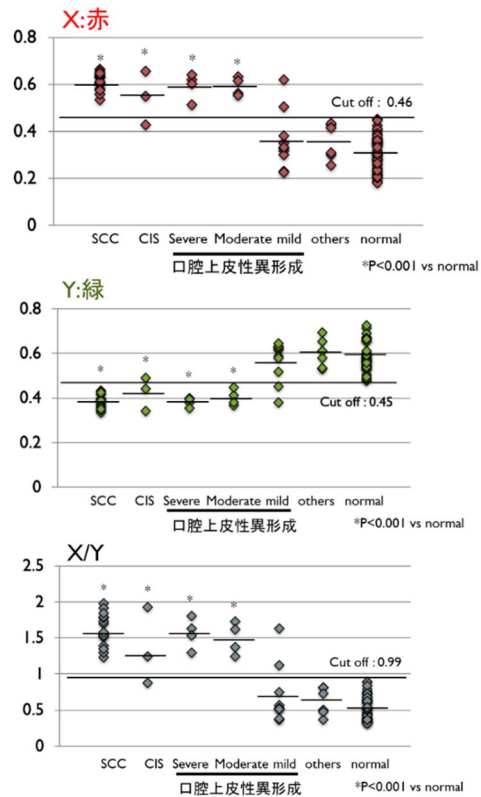


図 5：病理診断と色度の関係

(2) 免疫組織化学

5ALA の細胞内代謝の概略を図 6 に示す。癌細胞の Pp の細胞内蓄積は PEPT1 の過剰発現による 5ALA 取込亢進、ミトコンドリア内での Pp から Heme への変換酵素である FECH 活性の低下、Pp の細胞外への transporter である ABCG2 の抑制、Pp を取り込んだ小胞の exocytosis に係わる Dyamin などの影響が想定されるが、それらのうちの 1 つだけが関わっているわけではなく、癌腫によっても違いがあると想定されている^{6,7)}。一部の症例で行った PEPT1、Dynamnin、ABCG2 の免疫組織化学においては、正常部、上皮性異型生部、癌部それぞれの部位において、Pp の蓄積の要因を示唆する積極的な所見は得られなかった(図 7)。

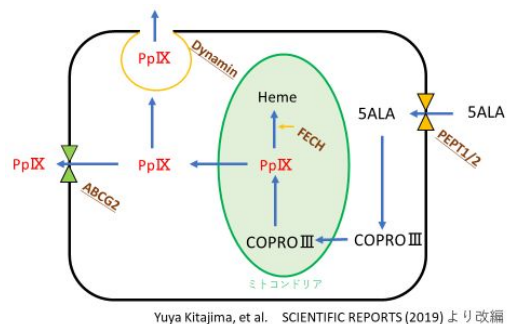
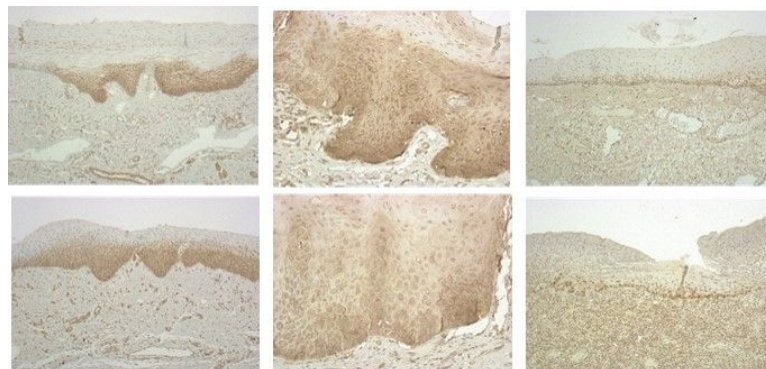


図 6：5ALA の細胞内代謝経路

図 7：PEPT1、Dynamnin、ABCG2 の免疫組織染色
上段；正常部
下段；上皮性異形成部



PEPT1

Dynamnin

ABCG2

<参考文献>

- 1) Norico Kawai et al. ABCG2 expression is related to Low 5-ALA photodynamic diagnosis (PDD) efficacy and cancer stem cell phenotype, and suppression of ABCG2 Improves the efficacy of PDD. PLoS One May 13;13(5):e0216503, 2019.
- 2) Kaneko S et al. Fluorescence-guided resection of Malignant glioma with 5-ALA. Int J Biomed Imaging 2016:6135293, 2016.
- 3) Kutwin P. et al. Photodynamic diagnosis and narrow-band imaging in the management of bladder cancer: A review. Photodynamic Laser Surg 35(9):459-464, 2017.
- 4) 藤本清秀 他 膀胱癌における5-aminolevulinic acidを用いた蛍光膀胱鏡下経尿道的腫瘍切除術および尿中剥離細胞に対する光学的診断 JJSLSM 30(4):399-404, 2010.
- 5) Leunig A. et al. Detection of squamous cell carcinoma of the oral cavity by imaging 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin fluorescence. Laryngoscope 110:78-83, 2000.
- 6) Yang X. et al. Aminolevulinic acid-based tumor detection and therapy: Molecular mechanism and strategies for enhancement. Int J Mol Sci 16:25865-25880, 2015.
- 7) Kitajima Y. et al. Mechanistic study of Pp accumulation using the JFCR39 cell panel revealed a role for Dynamin 2-mediated exocytosis. SCIENTIFIC REPORTS 9:8666, 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 里村一人、館原誠晃、佐藤 徹、藤永桃歌	4. 巻 71
2. 論文標題 初期口腔癌早期診断のための蛍光診断法の確立	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本歯科医師会雑誌	6. 最初と最後の頁 19-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 館原誠晃、佐藤 徹、藤永桃歌、寺田知加、井出信次、竹部祐生亮、堤 千明、杉本龍太郎、伊藤由美、里村一人
2. 発表標題 口腔癌に対する5-アミノレブリン酸を用いた光線力学的診断の有用性
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 里村一人
2. 発表標題 蛍光診断について
3. 学会等名 口腔がん低侵襲診断治療研究会（仮称）発足集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 館原誠晃、佐藤 徹、藤永桃歌、寺田知加、井出信次、竹部祐生亮、堤 千明、瀧居博史、伊藤由美、里村一人
2. 発表標題 早期口腔癌に対する5-アミノレブリン酸を用いた光線力学的診断の有用性
3. 学会等名 第74回日本口腔科学会学術大会（インターネット学術集会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 K. Satomura, S. Tatehara, T. Sato, M. Fujinaga
2. 発表標題 Development of novel fluorescence diagnostic method for the detection of early oral cancer
3. 学会等名 Indo-Japanese Multidisciplinary Symposium on Oral Oncology & Maxillofacial Trauma (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 徹
2. 発表標題 シンポジウム4：口腔表在癌の病理 口腔表在癌－口腔外科医の立場から－
3. 学会等名 第38回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 館原誠晃
2. 発表標題 シンポジウム口腔がん検査の最前線 「アミノレブリン酸を用いた光線力学的診断」
3. 学会等名 日本歯科人間ドック学会 第20回記念学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	館原 誠晃 (Tatehara Seiko) (90380089)	鶴見大学・歯学部・講師 (32710)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	横田 利夫 (Yokota Toshio) (60737956)	鶴見大学・歯学部・非常勤講師 (32710)	
研究分担者	井出 信次 (Ide shinji) (00611998)	鶴見大学・歯学部・助教 (32710)	
研究分担者	寺田 知加 (Terada Chika) (40460216)	鶴見大学・歯学部・助教 (32710)	
研究分担者	里村 一人 (Kazuhito Satomura) (80243715)	鶴見大学・歯学部・教授 (32710)	