

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10276

研究課題名(和文) 口腔癌細胞のポルフィリン代謝異常に着目した新規蛍光診断法の確立と臨床応用への試み

研究課題名(英文) Establishment of a new photodynamic diagnostic method focusing on abnormal porphyrin metabolism in oral cancer cells and trial for clinical application

研究代表者

下間 雅史 (Shimozuma, Masashi)

鶴見大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：50612008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌を早期発見することは予後の向上や治療後のQOLの維持に重要であり、肉眼的に発見困難な微小病変を正確かつ高感度に描出可能な新たな診断装置の開発が望まれている。本研究では、癌細胞内に生じるポルフィリン代謝異常に着目し、アミノ酸の一種である5-アミノレブリン酸(ALA)を応用した口腔癌の新たな光線力学的診断法(ALA-PDD)の確立を目指した。その結果、ALA-PDDによる蛍光診断の結果は病理組織診断結果と一致していた。本蛍光診断法では、切除が必要または推奨される病変、すなわちSCC、CIS、高度異形成および中等度異形成病変と、経過観察可能な軽度異形成病変とを明確に区別することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近い将来、口腔癌患者の増加・高齢化に伴い、口腔癌治療の副作用や術後の機能障害によるQOLの著しい低下が大きな問題となることが予想される。すでにこの問題は起こりつつあり、臨床現場ではいかに患者のQOLを維持出来る治療法を選択するかということに苦慮している。ALA-PDDの潜在的有用性は極めて高く、この診断技術を多くの医療施設に適切に普及させることができれば、口腔癌の早期発見を基盤とした低侵襲治療の実現、国民のQOLの維持・向上、および生命予後の向上を図ることができるとともに、わが国の医療経済の悪化抑制にも資するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Early detection of oral cancer is important for improving prognosis and maintaining quality of life after treatment. It is desired to develop a new diagnostic device capable of accurately and highly sensitively visualizing minute lesions that are difficult to detect by inspection. In this study, we focused on abnormal porphyrin metabolism occurring in cancer cells and aimed to establish a new photodynamic diagnostic method for oral cancer applying 5-aminolevulinic acid (ALA-PDD). As a result, the result of fluorescence diagnosis by ALA-PDD was in agreement with the result of histopathological diagnosis. This photodynamic diagnostic method was able to clearly distinguish between lesions that require or are recommended for resection, namely SCC, CIS, severe dysplasia and moderate dysplasia lesions, and follow-up mild dysplasia lesions.

研究分野：再生医療、口腔外科全般、口腔内科全般

キーワード：蛍光診断 口腔癌 上皮性異形成 5ALA

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えたわが国においては口腔癌患者の増加・高齢化が進行しており、口腔癌治療に伴う副作用や術後の機能障害による QOL の低下をいかに軽減させるかが重要な課題となってきた。このような社会的要請からも、口腔癌をできる限り早期に発見することが重要な課題であるが、口腔に発生する上皮内癌や初期浸潤癌は平坦病変として存在するため肉眼的に認知困難なことが多く、早期発見が困難であり、微小病変を正確かつ高感度に描出可能な新たな診断装置の開発が強く望まれている。

近年、非侵襲的補助的診断法の一つであるヨード生体染色法の有効性が報告され、臨床応用されている。ヨード生体染色法は、ヨード不染帯が病変として描出されるが、1) 上皮性異形成と癌との鑑別が不可能であること、2) ヨードによる粘膜刺激が強いこと、3) ヨード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、さらには4) 角化歯肉が本来ヨード不染性のため角化歯肉病変に適用できないなどの問題点がある。また、VELscope®に代表される蛍光診断機器も近年多用されるようになってきているが、これは 400~460nm の青色光を照射することにより、異常組織を黒色の吸収域として可視化するものであるため、境界部の輪郭がはっきりと描出されなかったり、炎症による変化も黒色の吸収域として描出されたりといった欠点があげられる。一方 ALA-PDD は光線力学的診断法の一つとして、各分野で臨床応用されその有用性が認められているとともに、副作用が最も少ない光感受性薬剤を用いることから、患者への負担も少ない。ALA-PDD は腫瘍組織を視覚的に認識することを可能としながら、非侵襲的であることから、超高齢者や有病者に対しても非常に有用な診断法と考えられる。ALA-PDD はプロトポルフィリン IX (PpIX) の光反応性を利用し、405nm の青紫色光で励起すると 636nm と 705nm の赤色蛍光を発するという特徴をとらえて可視化するという方法である。

癌細胞においてはポルフィリン合成経路に異常があり、中間産物であるプロトポルフィリン IX (PPIX) の蓄積傾向がある。このような癌細胞にポルフィリン合成の出発物質である 5-ALA を取り込ませると、多量の PPIX の細胞内蓄積が起こる。一方、PPIX は 405nm のレーザー光で励起されると 636nm/705nm の赤色蛍光を発することから、癌細胞のみを可視化することが可能であり、現在脳神経外科領域や産婦人科領域で臨床応用が開始されている。この蛍光は強度が比較的強く、また視認しやすいため、癌組織と正常組織の境界が明瞭に描出されるとともに、細胞数が少ないきわめて初期の癌の検知にも有用である可能性が高い。これらの学術的背景から、以下にのべる研究目的を達成するために本研究を計画した。

2. 研究の目的

口腔内はレーザー光の照射が行いやすく、また視診での評価も可能であることから、先に述べた蛍光診断がきわめて有効な領域と考えられる。さらに、代謝を含めた癌細胞内で起こる細胞内物質の化学反応における変調や異常は、細胞異型や組織異型などの形態学的変化に先行することから、口腔癌の早期発見や早期診断という観点、さらには蛍光強度から悪性度や進展度も把握できる可能性という観点からは、ヨード生体染色法や VELscope®に代表される従来の蛍光診断法に比較し、診断上有利と考えられる。このように ALA-PDD は腫瘍組織を視覚的に認識することを可能としながら、非侵襲的であり、かつ従来のヨード生体染色法や蛍光診断法における問題点を改善できる可能性があることから、われわれはこの ALA-PDD による非侵襲的診断法を口腔癌にも応用し、より簡便で確実で、かつ患者負担の少ない方法として臨床応用することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、5-ALA を用いた光線力学的診断を口腔癌にも応用することを目的に、以下の手順で研究を行った。

(1) 小型 PDD 装置の開発および改良

小型蛍光診断装置は、受光レンズ周辺に配置された 8 個の LED より 405nm の青紫光の照射が可能であり、腫瘍組織より発生した 636 nm の赤色蛍光のみを感知できる構造 (特許申請済) とするとともに、検査後に解析可能なデジタル画像として記録できるものとする。われわれは既に 1 台の試作機を作製しているが、本診断装置の安定性・信頼性を確認するため、さらに改良を施した。

(2) 小型蛍光診断装置を用いた ALA-PDD の口腔癌検出能の検討

生検により口腔癌と診断され切除術を予定されている患者のうち、本小型蛍光診断装置を用いた ALA-PDD の実施について十分な説明を行い、十分な理解と自発的同意を得られた患者を対象として本小型蛍光診断装置による ALA-PDD を施行した。診断方法としては、診断前に 5-アミノレブリン酸 (ALA) (光線力学診断用剤 アラグリオ内用剤®: SBI ファーマ) を注射用蒸留水で溶解、1mg/mL 水溶液とし、これに浸漬させたガーゼを病変部を含む口腔粘膜に貼付した後本

装置にて観察を行い、蛍光画像を記録した。次にヨード生体染色を行い同じく画像として記録する。切除範囲についてはヨード生体染色および ALA-PDD の検査結果をもとに総合的に判断し、十分な安全域を設定して切除した。得られた画像と切除標本から赤色蛍光部位と実際の腫瘍組織との関連につき病理組織学的に詳細に検討した。またヨード生体染色との比較検討を行った。なお、本研究は鶴見大学歯学部倫理審査委員会の承認のもと行った。

(3) 小型蛍光診断装置を用いた ALA-PDD の口腔癌スクリーニングとしての有用性についての検討

本装置を用いた ALA-PDD により口腔癌のスクリーニングが可能であるかどうかを検討した。対象は、口腔粘膜病変（口腔癌、口腔癌の疑い、上皮性異形成、白板症、紅板症など）を有し、生検術を予定されている患者のうち、本検査法について説明を行い十分な理解・同意を得られた患者とした。診断は研究項目 2 に準じて行った。生検部位としては原則赤色蛍光部位とし、赤色蛍光を示さない病変においてはヨード不染帯部、肉眼的に癌が疑われる部位、またはその他の病変と思われる部位とした。赤色蛍光部位からの検体に対する病理組織学的診断を踏まえ、本装置を用いた ALA-PDD の腫瘍診断精度につき検討した。

(4) 小型蛍光診断装置にて描出した赤色蛍光部位とヨード不染帯部の組織学的比較検討

研究項目 2 および 3 で得られた白色光画像（通常のカラー病態写真）、蛍光画像、ヨード生体染色画像および病理組織像により、赤色蛍光部位とヨード不染帯での病理組織像を詳細に比較検討し、ALA-PDD とヨード生体染色の診断精度の差違や特性につき検討した。

4. 研究成果

(1) 小型 PDD 装置の開発と改良

現時点においては、405nm 励起光を発する PDD 装置は内視鏡や顕微鏡に付属したものであり、大型かつ高価であることから、限られた専門医療機関にしか設置されていないのが現状である。これまで、われわれは口腔癌早期診断への ALA-PDD の導入を図ることを目的に、操作が簡単で、低コストの小型蛍光診断装置の開発をウシオ電機株式会社と共同で行ってきた。われわれが試作した本装置は、口腔全体に容易に励起光を照射できる形態とし、受光部周辺に配置された 8 個の LED より 405nm の青紫色励起光を照射し、この際腫瘍組織より発せられた 636 nm の赤色蛍光のみを高感度に感知できる構造であり（特許申請済）、また同時に画像として記録することも可能とした。これをさらに改良し、図 1 のようなものとした。

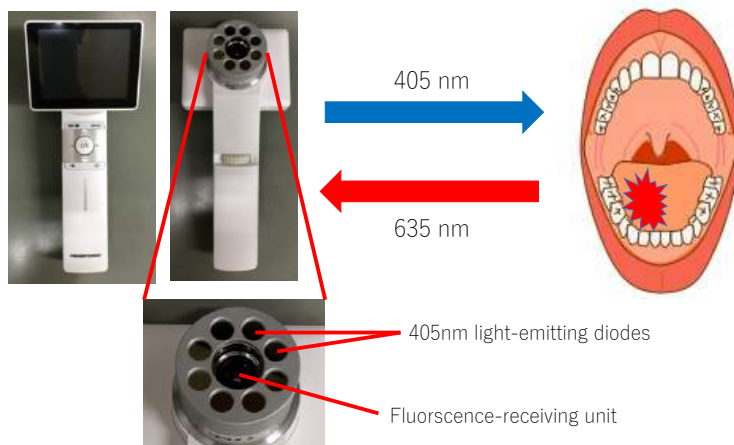


図 1 小型蛍光診断装置

(2) 小型蛍光診断装置を用いた ALA-PDD の口腔癌検出能、口腔癌スクリーニング、ヨード生体染色および病理組織学的所見との比較検討

図 2 に示すような口腔癌が疑われる症例を対象に、患者の同意のもと、ヨード生体染色と ALA-PDD を行った。代表的な本症例は、左側舌縁部の違和感を訴えられた患者で、この症例のように、視診と触診のみでは診断が困難な症例を特に重点的に研究対象とした。その結果、ヨード生体染色により異型上皮の存在が確認され、5-ALA を利用した蛍光診断の結果、ヨード不染域の一部に強い赤色蛍光領域が認められた。

最も赤色蛍光の強い部分の生検を行い、病理組織学的検討を行った。その結果を図 3 に示す。上皮層のほぼ全域にわたって細胞異型や組織

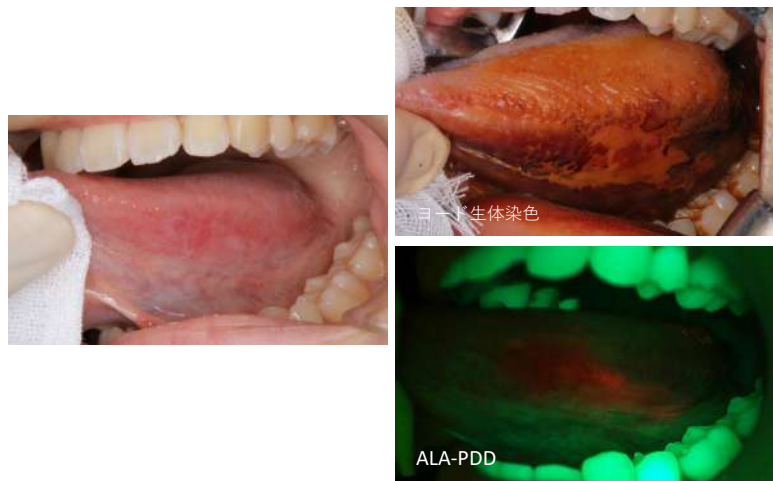


図 2 代表的な症例における臨床病態と同部のヨード生体染色および ALA-PDD の結果

異型が認められ、高度上皮性異形成と診断された。

さらに代表的な症例を示す。いずれの症例においても ALA-PDD による蛍光診断の結果は病理組織診断結果と一致しており、これらの結果から、5-ALA を用いた蛍光診断により、初期浸潤癌、上皮内癌、上皮性異形成病変のいずれもが検出できることが示された (図4、図5)。

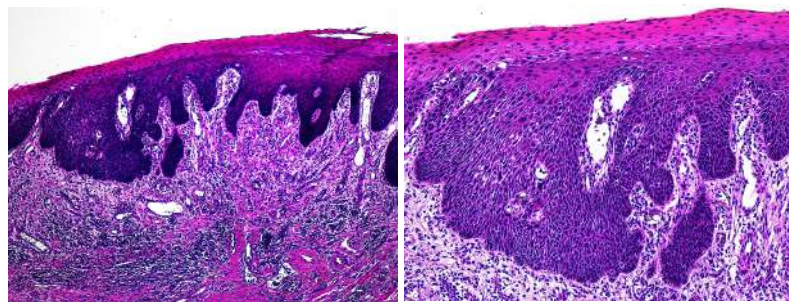


図3 病理組織所見 (図2の症例)

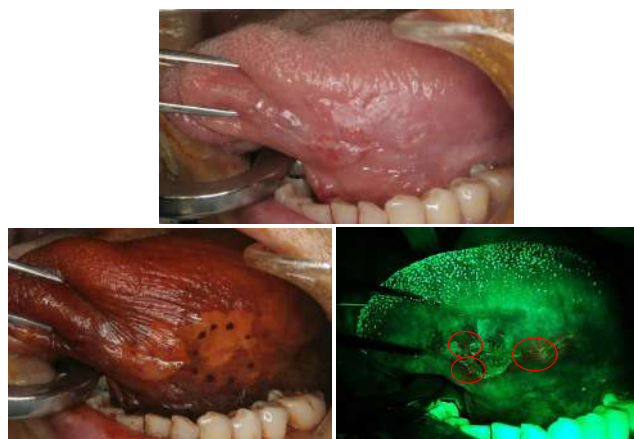


図4 別の症例における臨床病態と同部のヨード生体染色およびALA-PDDの結果

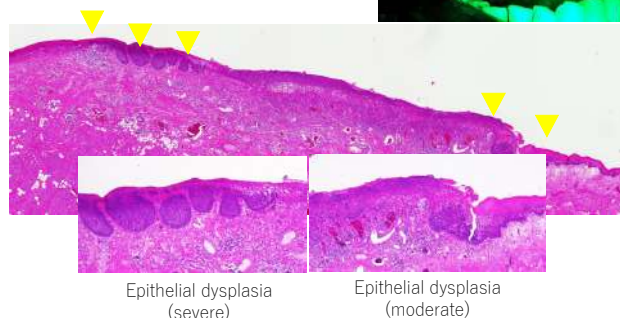


図5 病理組織所見 (図4の症例)

これらの症例のように、研究期間に鶴見大学歯学部附属病院口腔内科を受診し、臨床所見等から明らかに口腔癌と判断できる症例を除いた 48 症例に対して、蛍光診断を行った結果を表 1 に示す。全 48 症例中、赤色蛍光が認められたのは 33 症例で、うち 20 例が扁平上皮癌、3 例が上皮内癌、10 例が上皮性異形成であった。さらにこの内訳は、高度異形成と中等度異形成が各 4 例、軽度異形成が 2 例であった。一方、48 症例中、15 例が赤色蛍光を示さず、このうち 9 例が軽度異形成であった。この結果から、浸潤癌および上皮内癌の診断に関しては、本診断法は感度 100%、特異度 60%となった。一方、2017 年に WHO が新たに行った勧告によれば、上皮性異形成は、低異型度異形成と高異型度異形成の 2 つのカテゴリーに分類され、高異型度異形成に対しては切除することが推奨されている。これに従って、仮に中等度および高度の異形成病変を SCC および CIS と同様に切除すべきと考えるならば、この診断法の要切除病変の診断感度は 100%のまま、特異度は 60%から 88.2%まで改善することとなることも確認できた。ここで再度強調しておきたいことは、この結果が、非常に初期で表面的な病変であるために診断が困難であった症例のみを対象としているという事実である。本蛍光診断法では、切除が必要または推奨される病変、すなわち SCC、CIS、高度異形成および中等度異形成病変と、経過観察可能な軽度異形成病変とを明確に区別することができた。今後、この蛍光診断法が広く普及すれば、これまでになく効率と精度での初期口腔癌および現行の Binary system における高異型度異形成病変の正確な検出が可能となるものと期待している。

Red fluorescence	Histopathological diagnosis					Benign	Total
	OSCC	CIS	OED				
			Severe	Moderate	Mild		
Positive	20	3	4	4	2	0	33
Negative	0	0	0	0	9	6	15
Total	20	3	4	4	11	6	48

Sensitivity : 100% (23/23) Specificity : 60.0% (15/25)

Sensitivity : 100% (31/31) Specificity : 88.2% (15/17)

表1 蛍光診断 (ALA-PDD) の結果と病理組織学的所見

(3) 今後の課題

今後の課題としては、まずわれわれが用いている装置のさらなる改良と本診断法の普及を図っていきたいと考えている。この際には、それぞれの利点・欠点に応じて、従来の ALA を用いない蛍光診断との併用あるいは両立を図ることが重要と考えている。また、今回報告した蛍光診断と同様に、癌細胞 1 個 1 個におけるポルフィリン代謝異常を 5-ALA を用いて可視化する蛍光細胞診断、ALA-cytology を行うことを計画し、研究を開始している。これらの結果により、より

精度の高い新たな細胞診の開発とその自動診断技術の構築を図りたいと考えている。さらには、これまで細胞異型や組織異型という形態学的変化のみに依存してきた上皮性異形成病変の診断基準に、細胞内代謝異常という概念を導入することにより、より高精度で、予後予見性の高い新たな診断基準の確立の可能性についても検討を進めていく予定である。加えて、唾液をサンプルとするさまざまな診断技術、たとえば miRNA やエクソソーム、細胞外小胞などを利用した診断技術との併用による、口腔癌診断精度の向上、そしてこれらの新診断技術の紹介、普及を通じた国際社会への貢献等を目指していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 里村一人
2. 発表標題 初期口腔癌検出のための光線力学的診断法
3. 学会等名 第24回日本歯科医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田島隼人、竹部祐生亮、館原誠晃、今村武浩、戸田（徳山）麗子、堤千明、伊藤由美、里村一人
2. 発表標題 5 - アミノレブリン酸を用いた新たな細胞診の確立
3. 学会等名 第30回日本口腔内科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 館原誠晃
2. 発表標題 アミノレブリン酸を用いた光線力学的診断による上皮性異形成の診断
3. 学会等名 第40回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2022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	徳山 麗子 (Tokuyama Reiko) (20380090)	鶴見大学・歯学部・学内講師 (32710)	

6. 研究組織（つづき）

	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	里村 一人 (Satomura Kazuhito) (80243715)	鶴見大学・歯学部・教授 (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	館原 誠晃 (Tatehata Seiko) (90380089)	鶴見大学・歯学部・講師 (32710)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関