

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10256

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌における擦過細胞および5-ALAを用いた光線力学的診断法の確立

研究課題名(英文) Development of a Photodynamic Diagnosis Method for Oral Squamous Cell Carcinoma Using 5-ALA

研究代表者

福本 雅彦 (FUKUMOTO, Masahiko)

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：50175569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト口腔癌由来扁平上皮癌細胞株とヒト正常口腔粘膜細胞株(NHOK)に対して蛍光プレートリーダーを用いて蛍光強度を経時的に測定した結果、扁平上皮癌細胞株が正常細胞株に比較して有意に蛍光強度が強かった。またより少ない細胞量で強い蛍光強度を得るためにdeferoxamine mesylate (DFO)の添加を試みた。その結果、より少ない細胞量で有意な差を得ることができた。この研究から得られた結果により、歯科診療所のチェアサイドで5-ALAを生体へ投与することなく生体為害性を完全に排除した状況で口腔癌診断を確実に実施できる可能性が現実化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔がんの早期発見には医療者間の診断能力格差が発生することが少ない診断方法を構築することは極めて重要である。擦過細胞診は病変が直視直達できるという口腔領域の特性や患者側への侵襲が低いということから有用なツールである。本研究は口腔がんに対して擦過細胞診と光線力学的診断(以下PDD)を組合せ新たな診断方法を確立することを目的とした。本研究から得られた結果により、歯科診療所のチェアサイドにおいて5-ALAを生体へ投与することなく生体為害性を完全に排除した状況で口腔癌診断を確実に実施できる可能性が現実化した。

研究成果の概要(英文)：A fluorescent plate reader was used to measure the fluorescence intensity of a human oral cancer-derived squamous cell carcinoma cell line and a human normal oral mucosa cell line (NHOK) over time. Fluorescence intensity was significantly stronger at In addition, addition of deferoxamine mesylate (DFO) was tried to obtain strong fluorescence intensity with a smaller amount of cells. As a result, a significant difference could be obtained with a smaller amount of cells. The results obtained from this study have realized the possibility of reliably performing oral cancer diagnosis in a chairside setting of a dental clinic without administering 5-ALA to the living body and completely eliminating biohazards.

研究分野：歯科臨床検査医学

キーワード：口腔がん 光線力学的診断 擦過細胞診

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国の口腔癌死者数はここ 20 年程でほぼ倍増の状況である。一方、癌対策の重要な柱の一つに早期発見がある。米国における口腔癌死者の低下には癌検診が大きく寄与している事実もある。早期発見された悪性腫瘍の治療成績は良好であることは周知の事柄である。しかしながら、我が国の口腔癌死者数の増加傾向を鑑みると早期発見が為されているとは言い難い。その一因として医療者間により診断技術の差があることが挙げられる。このことより口腔がんの早期発見には医療者間の診断能力格差が発生することが少ない診断方法を構築することは極めて重要である。

### 2. 研究の目的

現状において口腔領域の細胞診の普及率はそれほど高いとはいえない。それゆえ、口腔領域専門に携わるスクリーナーの数が少ない。かつ、口腔の病変は他領域の病変と比較して異なる点多々あり口腔専門以外のスクリーナーの細胞診断は大きなリスクを伴う。また口腔領域を専門的に観察しているスクリーナーでも、その判断は主観に頼るところが大きいため、個人の熟練度により組織診との間の一致率は大きなばらつきが生じている。この問題点の解消のため擦過細胞に光線力学的検索を加え診断の補完とする事を考えた。PDD は光感受性物質を体内に投与後、腫瘍に特異的に取り込まれた同物質に対して励起光を照射して発生する蛍光波長を検知することにより腫瘍を診断する方法である。5-aminolevulinic acid (以下、5-ALA) は元々体内に微量存在しているが、一定量を体外から投与することにより腫瘍に取り込まれ、腫瘍細胞内に 5-ALA 代謝産物である protoporphyrin (以下、Pp) が蓄積される。Pp は蛍光を有し、励起光の照射により Pp から蛍光が発せられる。この蛍光検出を利用した PDD が腫瘍の存在診断に有効である。光線力学的診断は泌尿器科、消化器科、脳外科領域で実施されている。これらの領域は病変部が直視・直達することができない部位であり内視鏡などを使用し視野や器具操作が制限された状況で行われる。また事前に 5-ALA の経口投与を行うことから光毒性や生体為害性はほとんどない物質であるが体内に投与されることによる何らかの生体為害性を示す可能性はゼロとは言えない。

本研究においては、その多くの場合に病変が表面に露出し術者が直視・直達でき病変部細胞を容易に擦過採取できる環境である口腔領域のアドバンテージを生かしサイトブラシを使用し生体への侵襲性が低い方法で細胞採取し 5-ALA の生体への投与なしで体外のチェアサイドで診断することにより生体為害性は完全に排除される。細胞診の利点を生かしながら、弱点であるスクリーナーの熟練度や人的資源の少なさをカバーできること、更には高次病院から遠隔な診療所を含め各歯科診療所において安全性が高く、チェアサイドかつ短時間で信頼性の高い口腔癌診断が可能となることが本研究の最大の目的である。

### 3. 研究の方法

ヒト口腔癌由来扁平上皮癌細胞株である HSC-2、HSC-3、HSC-4 および対照群としてヒト正常口腔粘膜細胞株 (NHOK) を細胞バンクより購入し実験に供する。細胞株は直径 10 cm のディッシュ上で非動化済 10% ウシ胎児血清および 2% ペニシリン添加 Doubeccos Modified Eagles Medium (DMEM) を用いて 5% CO<sub>2</sub> 下 37 °C で培養する。80% コンフルエンスを目途に継代を行う。つまり培養細胞を PBS にて 2 度洗浄後、Trypsin EDTA を 2 分間作用しディッシュより剥離し遠心分離 (1000rpm × 5min) を行い細胞回収する。回収した細胞に対して 5-ALA (100

μg、300 μg、500 μg) の各濃度に deferoxamine mesylate ( DFO ) 添加 DMEM を 50ml 遠心管中 1 ~ 3 時間、暗所 5%CO<sub>2</sub> 下 37 °C で作用させる。作用させた各細胞株を蛍光用 96well プレートに  $1 \times 10^3 \sim 5$ /well

となるようそれぞれ播種し 5-ALA を作用後に細胞により代謝され生じるプロトポルフィリン ( PpI ) に対して蛍光プレートリーダーを用いて 400 ~ 440nm の励起波長により蛍光する 630nm 波長帯の蛍光強度を経時的に測定する。この実験を行うことにより蛍光強度を得るための 5-ALA の最適濃度、作用時間の知見を得るとともに蛍光強度を得るための必要最低細胞数さらには NHOK と比較することによる癌細胞のスクリーニングする際の臨床判断値を設定することが可能となる。

#### 4 . 研究成果

口腔がんの早期発見には医療者間の診断能力格差が発生することが少ない診断方法を構築することは極めて重要である。擦過細胞診は病変が直視直達できるという口腔領域の特性や患者側への侵襲が低いということから有用なツールである。本研究は口腔がんに対して擦過細胞診と光線力学的診断 ( 以下 PDD ) を組合せ新たな診断方法を確立することを目的とした。

本研究から得られた結果により、歯科診療所のチェアサイドにおいて 5-ALA を生体へ投与することなく生体為害性を完全に排除した状況で口腔癌診断を確実に実施できる可能性が現実化した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Chiaki Komine, Masahiko Fukumoto, Hiroko Omori, Yuki Ogura, Yoshimi Konishi-Takahashi, Katsuhiko Asaka, Yoshinori Ono, Mana Fuchigami, Osamu Tsuzukibashi, Akira Fukatsu	4. 巻 14
2. 論文標題 Establishment of an objective screening method for oral malignant tumors using a photodynamic technique involving a fluorescence plate reader	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本口腔検査学会雑誌	6. 最初と最後の頁 17～26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15041/jsedep.14.17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Asaka Katsuhiko, Fukatsu Akira, Komine Chiaki	4. 巻 12
2. 論文標題 The Effectiveness of a Portable Fluorescence Spectrophotometer for Early Detection of Oral Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Open Journal of Stomatology	6. 最初と最後の頁 30～31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4236/ojst.2022.121003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Omori Hiroko, Komine Chiaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of a Photodynamic Diagnosis Method for Oral Squamous Cell Carcinoma Using 5-Aminolevulinic Acid and a Luminescence Plate Reader	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Open Journal of Stomatology	6. 最初と最後の頁 325～340
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4236/ojst.2021.119029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大森寛子
2. 発表標題 蛍光王レトリダーを用いた口腔扁平上皮癌の光線力学的診断法と客観スクリーニング法の構築
3. 学会等名 日本口腔検査学会第15回学術大会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------