

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：32710

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19617

研究課題名(和文) 癌細胞特異的ポルフィリン代謝異常をターゲットとした新規蛍光細胞診の確立

研究課題名(英文) Establishment of new fluorescent cytology targeting cancer cell-specific porphyrin metabolism abnormalities

研究代表者

里村 一人 (Satomura, Kazuhito)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：80243715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌を含めた全ての癌において、その早期発見、低侵襲治療を可能とする安全、簡便、経済的かつ高感度な診断法の開発が望まれる。現在行われている生検による病理組織学的診断には外科的侵襲等の問題が、細胞診には感度および特異度において未だ改善の余地があるという問題点がある。そこで本研究では、癌細胞内のポルフィリン代謝異常に基づき、癌細胞を高感度・高特異度に検出できる5-アミノレブリン酸(5-ALA)を用いた蛍光診断に着目し、この原理を細胞診に応用することにより、その診断精度を向上させ得る可能性を検証することを通して、従来の細胞形態と染色性のみには依らない新たな細胞診の確立を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の細胞診での診断根拠となる癌細胞の形態学的特徴に加え、本研究で確立した新たなALA-Cytologyでは、細胞内代謝異常という機能面の評価を併用できるため、簡便でより正診率の高い新たな細胞診の確立に繋がると考えられる。本法が診断のスタンダードになれば、生検による外科的侵襲を避けられる上、これまでの細胞診の感度および特異度を改善することに直結し、きわめて学術的・社会的意義の高い研究である。

研究成果の概要(英文)：There is an urgent need to develop safe, simple, economical, and highly sensitive diagnostic methods that enable early detection and minimally invasive treatment of all cancers, including oral cancer. Histopathological diagnosis by biopsy, which is currently performed, has problems such as surgical invasion, and cytology still has problems in sensitivity and specificity. Therefore, in this study, we focused on fluorescence diagnosis using 5-aminolevulinic acid (5-ALA), which can detect cancer cells with high sensitivity and specificity based on abnormalities in porphyrin metabolism within cancer cells. By applying this principle to cytology, we aimed to establish a new cytology that does not rely solely on conventional cell morphology and staining.

研究分野：外科系歯学、再生医療

キーワード：蛍光診断 細胞診 口腔癌 口腔白板症 上皮性異形成 5-ALA ALA-Cytology

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌治療後の予後の向上や QOL の維持には、癌の早期発見・早期治療がきわめて重要である。また超高齢社会・人口減少社会を迎えたわが国があらゆる産業分野で引き続き良好な生産性を維持していくためには、治療を受けた癌患者の早期社会復帰の推進が重要であり、このような観点からも癌の早期発見を可能とする安全、簡便、経済的かつ高感度な診断法・検出法の開発が望まれる。現在、癌の診断に用いられている検体検査には組織診断と細胞診断の二つがある。組織診断は癌が疑われる部位の生検により行われるが、外科的侵襲を伴うため、①患者に一定の身体的負担を強いること、②癌の発生部位により生検自体が困難または不可能な場合があるなどの短所がある、一方、細胞診断は擦過・剥離した細胞を用いることから、①視認できる部位であれば原則適応可能、②中空針を用いた穿刺吸引により直接視認できない部位にも適応可能な場合があるなどの特徴がある。また細胞診断は組織生検に比較して患者の身体的負担が少なく、手技も比較的簡便であること、さらに最近細胞診断用の各種キットが開発され診断プロセスの定型化が進んだことから、現在大きく普及しつつある。細胞診断では、Papanicolaou 染色、Giemsa 染色、PAS 染色、Alcian blue 染色などの各種染色を経て、class 分類 (パパニコロウ分類) あるいは各臓器毎の癌取り扱い規約に定義された分類により、良性・悪性の診断がつけられるが、いずれも細胞の形態的特徴と染色態度を基準として診断する方法であり、異常細胞における細胞内代謝変化などの機能面の評価を診断のために利用しようとする試みは未だなされていない。

2. 研究の目的

多くの癌細胞においてはポルフィリン代謝に異常があることから、癌細胞がポルフィリン代謝の発物である 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) を取り込むと、中間代謝産物であるプロトポルフィリン IX (PPIX) の細胞内蓄積が起こる。この PPIX は 405 nm 光で励起されると 636 nm の赤色蛍光を発することから、癌細胞のみを正常細胞から区別して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。これまでにわれわれは、簡便に操作できる小型の蛍光観察装置を開発するとともに、口腔癌に対する 5-ALA を用いた光線力学的診断 (5-ALA-based Photo Dynamic Therapy: ALA-PDD) の可能性につき検討を行ってきた。その結果、上皮内癌 (carcinoma in situ) に対しては感度 91.2%、特異度 91.3%、高度上皮性異形成 (WHO2017) に対しては感度 85.2%、特異度 91.3%での検出に成功した。このことから、本法は簡便かつ安全で、患者負担の少ない新たな口腔癌診断法になり得るという確信を得、学会等で広く報告してきている。ALA-PDD は、これまで広く行われていた組織や細胞の形態学的変化に基づく組織診断や細胞診断と異なり、癌細胞内で起こる細胞内代謝の変調や異常を感知しているものである。細胞異型や組織異型などの形態学的変化には、必ずそれらに先行する細胞内代謝の変化が必要と考えられることから、この細胞内代謝の変化を正確かつ高感度に捉える本診断法は、従来の組織診断や細胞診断に比べ、口腔癌の早期発見や早期診断に大きく貢献するものと考えられる。

そこで本研究では、この ALA-PDD の原理を細胞診にも応用できる点に着目し、5-ALA を用いた新たな細胞診 (ALA-Cytology) を確立できる可能性について検証することを目的とした。ALA-PDD は先に述べたように、癌細胞の微細構造を含む形態学的変化に先行する細胞内代謝系の異常を検知する手法であることから、ALA-Cytology は従来の形態学的診断を補完する形での診断を可能とし、これまでの細胞診の精度を飛躍的に高め得ることが予想され、想定される結果が得られることにより、口腔癌以外の悪性腫瘍への応用拡大、ひいては細胞診の新領域開拓にも繋がると考えられた。

3. 研究の方法

(1) *in vitro*における口腔癌細胞に対する 5-ALA の効果

各種口腔癌細胞および口腔正常細胞を対象に、各種濃度 (0、1、2、5 mM) の 5-ALA で処理し、一定時間 (1、2、3、6、12 時間) 後に蛍光顕微鏡 (405nm 励起) を用いて細胞の赤色蛍光を観察し、腫瘍細胞と正常細胞間での蛍光強度差、また癌細胞の種類による蛍光強度差について検討し、最も蛍光強度差の得られる処理条件の特定を各細胞毎に行った。さらに細胞毎に決定された条件で処理した癌細胞を、従来の細胞診で行われている工程で処理した後、Papanicolaou 染色、Giemsa 染色、PAS 染色、Alcian blue 染色などを行い、5-ALA 処理が各癌細胞の染色態度に及ぼす影響につき検討し、5-ALA 処理が従来の細胞診判定や診断精度に与える影響について検討した。対象とする癌細胞として、口腔癌細胞株では歯肉扁平上皮癌由来 Ca9-22 細胞株、舌扁平上皮癌由来 SAS 細胞株、口底扁平上皮癌由来 HSC-2 細胞株およびヒト正常口腔粘膜上皮細胞株 NOMK とした。

(2) ヒト口腔癌症例における 5-ALA 細胞診 (ALA-cytology) 結果と生検結果の関連について

口腔癌 (あるいは上皮性異形成) を疑う口腔粘膜病変を有する患者を対象として、われわれがすでに臨床応用している ALA-PDD (前述) を施行し、赤色蛍光が認められた部位に対して細胞診を実施し、通法により塗抹標本を作成することとした。この標本に対して、Papanicolaou 染色

実施前に蛍光顕微鏡（405nm 励起）観察を行い、赤色蛍光を有する細胞を記録した後、Papanicolaou 染色を行い細胞学的診断を行った後、再度蛍光顕微鏡（405nm 励起）観察を行った。一方、赤色蛍光が認められた同一部位から生検により組織を採取し、通法により病理組織学的診断を行った。これにより、同一症例において施行された ALA-cytology（Papanicolaou 染色 + 5-ALA による蛍光細胞診断）の診断結果と生検材料から得られた病理組織学的診断結果を比較し、①ALA-cytology 結果と病理組織学的診断結果の一致率、②Papanicolaou 染色による細胞形態や染色態度のみからは診断が困難な症例における正診率の向上等について検討し、より精度の高い新たな細胞診の確立を目指す。以上の検討により、初期口腔癌（および高度上皮性異形成）を対象とし、細胞の形態学的特徴のみに依存せず、細胞内代謝異常という細胞機能を包含する新たな細胞診断、ALA-cytology の確立を目指した。

4. 研究成果

(1) *in vitro*における口腔癌細胞に対する 5-ALA の効果

口腔癌細胞として、SAS、HSC-2、Ca9-22 を、また正常口腔粘膜上皮細胞として NOMK を対象に、それぞれを培養後、0、1、2、5 mM の濃度で 5-ALA 処理し、1、2、3、6、12 時間培養した。それぞれを励起波長 405 nm、蛍光波長 635 nm で蛍光顕微鏡で観察した。その結果、口腔癌細胞では 1 mM 以上の濃度で赤色に蛍光し、正常口腔粘膜上皮細胞では蛍光は認められなかった（代表例として、図 1 に SAS、図 2 に NOMK を示す）。この結果から、5-ALA 濃度は 2 mM で実施することとした。なお、5-ALA 添加後の細胞でも通常細胞診で行われる Papanicolaou 染色等は問題なく実施することができ、染色性においても問題はなかった。

図 1 : SASにおける5-ALA添加後の蛍光顕微鏡像

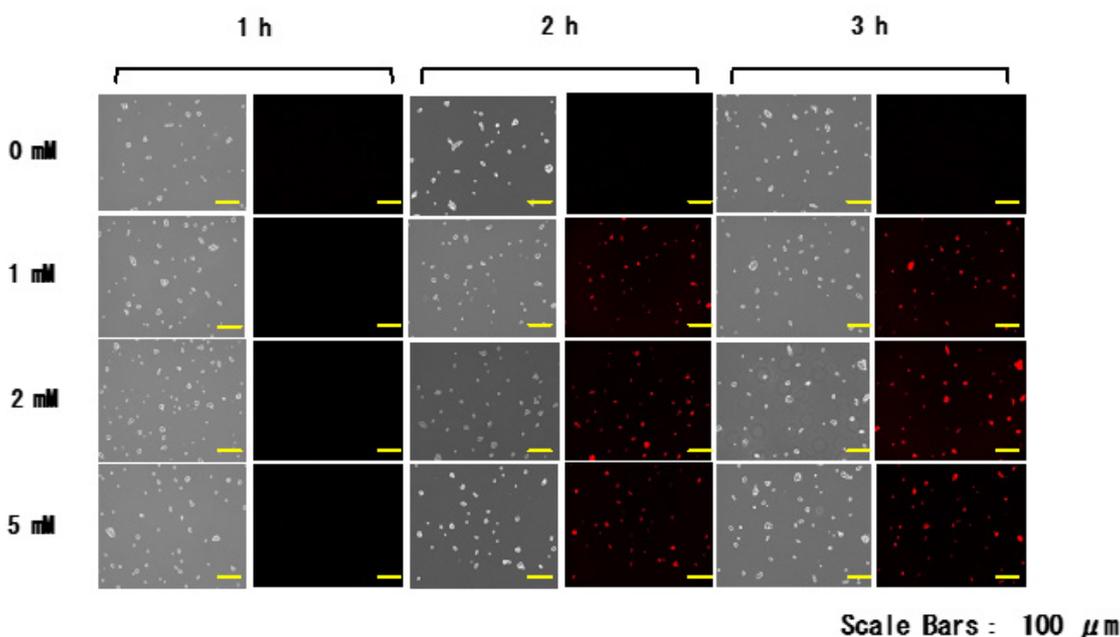
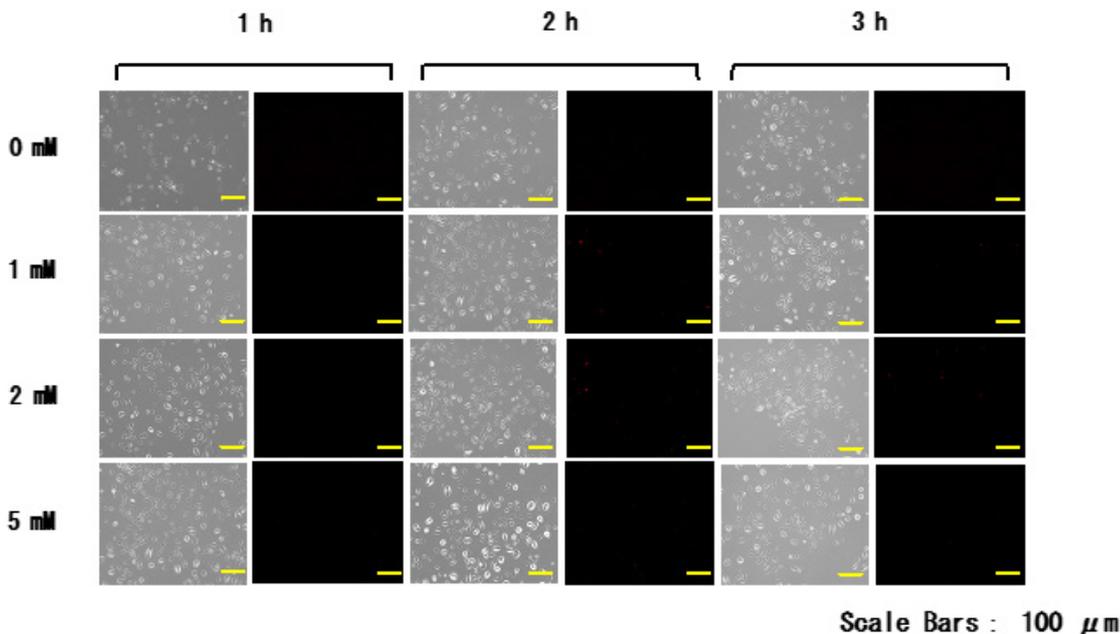


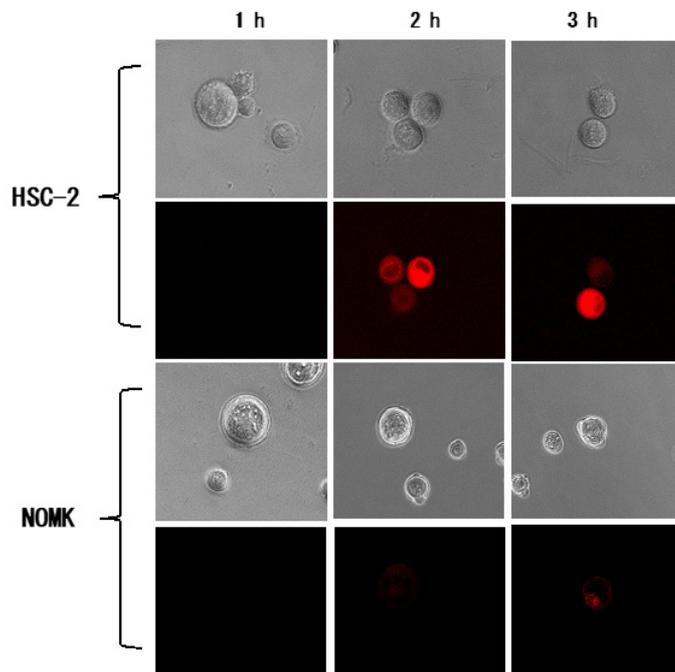
図 2 : NOMKにおける5-ALA添加後の顕微鏡像



(2) *in vitro*における各種口腔癌細胞における 5-ALA 処理後の蛍光および輝度値の比較

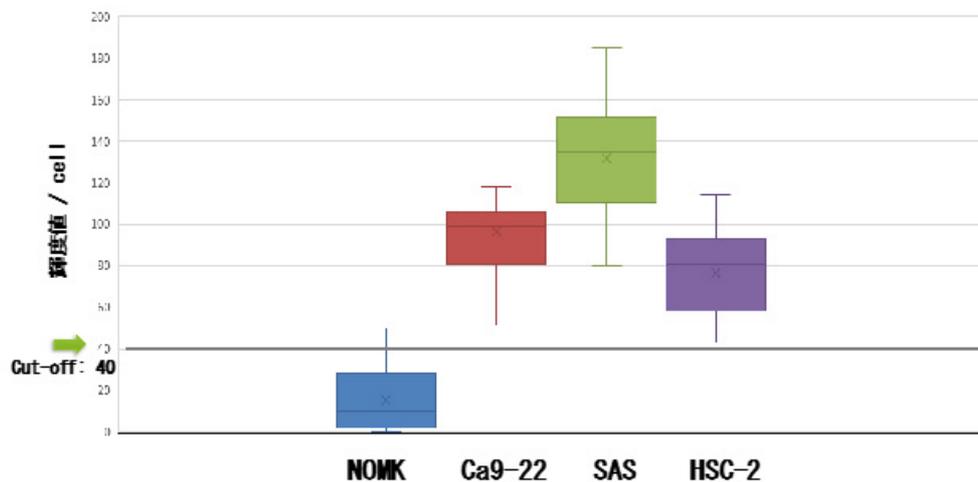
上記と同様の口腔癌細胞および正常口腔粘膜上皮細胞を、浮遊培養用 96well プレートに播種し、(1)の結果をもとに 2 mM の 5-ALA を添加し、1、2、3 時間後に細胞の蛍光を観察した (代表例として HSC-2 および NOMK の結果を図 3 に示す)。

図 3 : HSC2とNOMKのALA 2 mMでの蛍光の比較(強拡大)



ここで得られた蛍光強度を元に、それぞれの口腔癌細胞と正常口腔粘膜細胞との輝度値を算出し、細胞毎の輝度値としてグラフ化したところ、正常細胞と癌細胞の間にカットオフ値を設定することが可能であった (図 4)。

図 4 : 口腔癌細胞株および正常口腔粘膜上皮細胞株の輝度値の比較



これらの結果から、今回の研究で確立した ALA-Cytology は機能面から癌細胞を診断することが可能であり、細胞診の新たな基準となる可能性が示唆された。

(3) ヒト口腔癌症例における 5-ALA 細胞診 (ALA-Cytology) 結果と生検結果の関連

(2) までに得られた *in vitro* の結果をもとに、実際の口腔癌あるいは上皮性異形成病変での ALA-Cytology の可否について検討することとした。図 5 に示すように方法を決定し、臨床研究審査委員会の承認を得た。同意の得られた患者を対象に、ALA-Cytology および従来の細胞診のための擦過を行うとともに、ALA-PDD と生検を実施し、これらの結果の整合性について詳細に検討中である。現時点では未だ少数の症例のみであるが、この確立した方法を用いて、今後は症

例数を増やし、ALA-Cytology の精度を高めるとともに、広く臨床応用できるように研究を進める予定である。

図5：ALA-Cytologyの手順

外来にて病変部を5-ALA処理後

① 採取ブラシを使用して検体を採取



BD SURE PATH™

② 採取ブラシに付着した細胞成分を保存液中に懸濁。



採取ブラシ

③ 採取ブラシの先端を折り、BD SURE PATH™ パイアルの中へ投入。



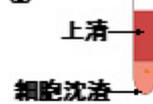
ラボにて

④



分離用試薬に検体を重層
遠心(200xg、2分)

⑤



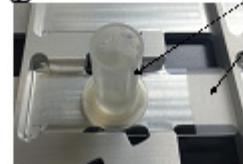
上清を除去
遠心(800xg、10分)

⑥



上清をデカント
細胞沈渣に精製水1mLを加え
ミキサーで撹拌

⑦



セトリングチャンパー
プレコートスライド
セトリングチャンパー内へ分注
10分間静置or遠心(塗抹完了)
洗浄
蛍光観察あるいは通常の染色系列へ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Seiko Tatehara, Toru Sato, Yusuke Takebe, Momoka Fujinaga, Chiaki Tsutsumi-Arai, Yumi Ito and Kazuhito Satomura	4. 巻 12(7)
2. 論文標題 Photodynamic Diagnosis Using 5-Aminolevulinic Acid with a Novel Compact System and Chromaticity Analysis for the Detection of Oral Cancer and High-Risk Potentially Malignant Oral Disorders	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 1532
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics12071532	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 Reiko Tokuyama-Toda, Hirochika Umeki, Shinji Ide, Fumitaka Kobayashi, Shunnosuke Tooyama, Mai Umehara, Susumu Tadokoro, Hiroshi Tomonari, Kazuhito Satomura	4. 巻 11(3)
2. 論文標題 A New Implantation Method for Orthodontic Anchor Screws: Basic Research for Clinical Applications	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 665
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines11030665	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 Tokuyama-Toda R, Terada-Ito C, Muraoka M, Horiuchi T, Amemiya T, Fukuoka A, Hamada Y, Takebe Y, Ogawa T, Fujii S, Kikuta T, Sejima S, Satomura K	4. 巻 12(11)
2. 論文標題 Improving the Detection Sensitivity of a New Rapid Diagnostic Technology for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Using a Trace Amount of Saliva	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 2568
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics12112568	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 Tsutsumi-Arai C, Iwamiya Y, Hoshino R, Terada-Ito C, Sejima S, Akutsu-Suyama K, Shibayama M, Hiroi Z, Tokuyama-Toda R, Iwamiya R, Ijichi K, Chiba T, Satomura K	4. 巻 19(6)
2. 論文標題 Surface Functionalization of Non-Woven Fabrics Using a Novel Silica-Resin Coating Technology: Antiviral Treatment of Non-Woven Fabric Filters in Surgical Masks	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Environ Res Public Health	6. 最初と最後の頁 3639
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijerph19063639	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 Chiaki Tsutsumi-Arai, Yoko Iwamiya, Reiko Hoshino, Chika Terada-Ito, Shunsuke Sejima, Kazuhiro Akutsu-Suyama, Mitsuhiro Shibayama, Zenji Hiroi, Reiko Tokuyama-Toda, Ryugo Iwamiya, Kouhei Ijichi, Toshie Chiba and Kazuhito Satomura	4. 巻 19
2. 論文標題 Surface Functionalization of Non-Woven Fabrics Using a Novel Silica-Resin Coating Technology: Antiviral Treatment of Non-Woven Fabric Filters in Surgical Masks	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Environmental Research and Public Health	6. 最初と最後の頁 3639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijerph19063639	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2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 伊藤由美、戸田 (徳山) 麗子、梅原茉愛、伊地知耕平、遊道俊雄、遠藤美紀、田島隼人、春田 孔、里村一人
2. 発表標題 上皮性異形成病変における上皮下リンパ球浸潤の抗腫瘍免疫学的意義
3. 学会等名 4 学会合同学術大会 (第43回日本歯科薬物療法学会・第33回日本口腔内科学会・第32回日本口腔感染症学会・第36回日本口腔診断学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 里村一人
2. 発表標題 5-ALAを用いた初期口腔癌および高異型度異形成病変検出のための光線力学的診断法
3. 学会等名 第46回日本頭頸部癌学会 (招待講演)
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	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	竹部 祐生亮 (Takebe Yusuke) (50807097)	鶴見大学・歯学部・助教 (32710)	
研究分担者	伊藤 由美 (Ito Yumi) (00176372)	鶴見大学・歯学部附属病院・講師 (32710)	
研究分担者	館原 誠晃 (Tatehara Seiko) (90380089)	鶴見大学・歯学部・准教授 (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