

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593101

研究課題名(和文)免疫細胞化学的検索の口腔がん検診への応用

研究課題名(英文)Application of immunohistochemical study for oral cancer screening

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) 800,000円、(間接経費) 240,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は口腔がん検診に擦過細胞診と免疫染色を組合せ検診者実施者格差の少ない検診方法を模索・確立することを目的とした。擦過細胞診においては液状化細胞診を用いることにより免疫染色施行時のスライドグラスからの細胞の脱落率が低くなるとともに細胞の重積などが少なくなり、より精度の高い検鏡を行うことが可能となった。また、P53染色においては扁平上皮癌および異形成病変の細胞に陽性所見を認めた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to establish a check-up for oral cancer using the smear and immunohistochemical staining. It was suggested that Liquid Based Cytology(LBC) was useful for oral cancer examination. And following results were obtained.

Oral squamous cell carcinoma and oral mucosal dysplasia cells were stained by immunohistochemical staining using anti p53 antibody.

研究分野：歯科臨床検査医学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：口腔がん検診 液状化細胞診 免疫染色

1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔領域に発生する病変は多岐にわたるがその中でも最重要な疾病として口腔癌が挙げられる。我が国における咽頭部分も含めた口腔領域に発生する悪性腫瘍による死亡者数は平成 23 年度において 6,888 名であり(平成 23 年 厚生労働省人口動態調査) **ここ 20 年程でほぼ倍増の状況**である。これは先進諸国、殊に米国における口腔癌死者数の減少とは全く傾向を異にしている。

(2) 一方、**癌対策の重要な柱の一つに癌検診**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、我が国の現状は肺がん、胃がん、大腸がんなどの主要な癌検診においてもその受診率は 30%ほどである。口腔がん検診においてはさらに低率である。その一因として口腔がん検診導入に対して歯科医師間に温度差があることが挙げられる。検診の重要性は認識されているが、検診方法も未だ統一されておらず検診実施者により様々であるのが実態であり。さらに検診実施者による診断技術の格差があることなどが歯科医師側の積極参加への妨げとなっていることも事実である。

2. 研究の目的

(1) 現状の多くの口腔がん検診は各歯科医師会などの単位で実施され、その検診方法は様々であるが近年では擦過細胞診も使用されてきている。**擦過細胞診は検体採取の簡便性、生体への侵襲の度合いの低さ、判定までの迅速性**などから歯科領域においてもその重要性は高まってきている。この擦過細胞診を口腔がん検診に応用することで口腔がんの早期発見につなげる。

(2) 一般に口腔細胞診の目的としては悪性腫瘍かどうかの早期判断が挙げられるが、検鏡者の熟練度の差などにより**真正率にばらつき**が認められる、**口腔領域の病変に熟練した細胞診スクリーナーの人数は極めて少なく検査可能な検体数にかぎりがある**などの問題点があることも事実である。しかしながら前述の擦過細胞診の利点は**口腔悪性腫瘍の早期発見という観点からは極めて高い有用性**をもつと思われる。一方、各種悪性腫瘍や前癌病変の診断のため生検などにより組織採取し、細胞増殖能や遺伝子産物の免疫組織化学的検索がなされている。しかしながら、組織採取時には患者への様々な侵襲が加わることや、術者の熟練度により採取方法や採取部位などが診断用検体として適正か否かに大きな差異がでる。

これらの事より口腔がん検診を広めるには**検体採取の簡便性、生体への侵襲の度合いの低さ、判定までの迅速性**などから近年歯科領域においてもその重要性は高まってきている**擦過細胞診を活用し検診者実施者間の診断格差のない検診方法を構築**することは重要であると考えた。その方法として本研究は口腔がん検診に擦過細胞診と免疫染色を組合せ**検診者実施者格差の少ない検診方法を模索・確立**することを目的とした。

3. 研究の方法

今回、液状化細胞診(Liquid Based Cytology, LBC)の1つであるTACAS™(thinlayer advanced cytology

assay system)法(医学生物学研究所社)を用いた。

方法

スプリット・サンプル法

口腔粘膜病変から、婦人科用剥離子サイトブラシ®プラスを用いて細胞を擦過採取後、まず通法に従い直接塗抹法で標本作製後、95%アルコールで浸漬固定したその後同一のブラシを固定液バイアル(TACAS™ GYN)に、ブラシ先端部分を切り外して浸漬した。1時間の浸漬固定後、バイアルは遠心、上清除去操作を2回繰り返した後に、スライドガラスへ添加し、Papanicolaou染色後に検鏡した。検鏡は、1名の細胞診指導医および1名の細胞検査士により行った。

免疫染色

TACAS™法にて作製した4枚の標本を用いて、Chem Mate Envision法(DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark)により免疫染色を行った。本研究に使用した一次抗体は、細胞骨格の検索を目的として抗Cytokeratin 13抗体(DE-K13, 1:50, Dako Cytomation; CK13)、抗Cytokeratin 17抗体(E3, 1:40, Dako Cytomation; CK17)を、細胞増殖能の検索を目的として抗Ki-67抗体(MIB-1, 1:100, Dako Cytomation; Ki-67)を、癌抑制遺伝子変異の検索を目的として抗p53抗体(DO-7, 1:100, Dako Cytomation; p53)を用いた。標本は親水化処理後、抗原賦活化処理として、Tris-EDTA buffer中でオートクレーブ処理、マイクロウェーブ処理、およびProteinase K処理のいずれかを行った。抗原標本は洗浄後0.3%過酸化水素水にてブロッキングを行った。免疫組織化学染色はDako Cytomationのプロトコールに従った。すべての一次抗体は湿箱中で60

分間反応させ、洗浄後、ポリマー試薬を30分間反応させた。発色はDAB(3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride)LiquidSystem(DAKO)を用いて行い、さらにヘマトキシリンによる対比染色を行った後、通法に従い、脱水、透徹および封入した。

判定

免疫染色の判定は、CK13とCK17は細胞質が茶褐色に反応、Ki-67とp53は核が茶褐色に反応した場合を陽性とした。

4. 研究成果

本研究においては当初、従来の直接塗抹細胞診による検診を目指した。しかしながら、免疫染色時のスライドガラスからの細胞脱落率が高く検鏡時の判断が困難なことから細胞脱落率が低くなる方法を模索した。その結果、液状化細胞診(Liquid Based Cytology, LBC)においては免疫染色時においても細胞脱落率が低下するとともに検体の均一化が図れる結果を得た。

また、免疫染色においては口腔癌症例においてCK13陰性の異型細胞集塊が観察された。またCK17、Ki-67やp53陽性の異型細胞集塊が認められた。

液状化細胞診(Liquid Based Cytology, LBC)は子宮頸部検診の精度管理を目的とした標本作成の標準化を実現する手法として近年急速に普及してきた。LBCはサイトブラシに遺残する細胞や浸漬固定時に剥離する細胞の軽減化、さらに検体の均一化による不適切標本の減少などの利点から、口腔粘膜細胞診の精度管理に非常に有用であると考えられる。さらにLBC法は、1本のサイトブラシで採取した全細胞から細胞判定用のPapanicolaou染色を含めて5~6枚の標本作製が可能である。したがって、従来法と同じ患者侵襲で、複数の特殊染色

や免疫染色を施すことができるために、非常に得られる情報が多い。このことはより精度の高い検診を目指すに当たり大きなメリットとして挙げられる。

以上のことから鑑み口腔がん検診への**LBC 法による免疫細胞染色は検体のリスクをより明瞭に可視化し、検鏡者間の評価のばらつきを是正することが可能となり得ると考えられ口腔がん検診が広く普及する一助となり、ひいては口腔がんの早期発見に繋がるものと考えられた。**しかし、**LBC 法の口腔粘膜疾患への技術殊に免疫細胞学的検索の報告は内外の文献を渉獵しても極く僅少**であり、口腔がん検診で応用展開するにあたり更なる症例検討を積み重ねることが必要であると考ええる。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kayo Kuyama, Takashi
Matsumoto, Miyuki Morikawa, Akira
Fukatsu, Mana
Ichimura, Masanobu Wakami,
Masahiko Fukumoto, Taku Kato,
Hirotugu Yamamoto Open Journal
of Stomatology 2013, 215-222,
Morphometrical findings among
dysplasia of oral, cervical and
bronchial regions

査読有り

〔学会発表〕(計 1 件)

第22回日本有病者歯科医療学会総
会・学術大会

平成25年3月 「公益社団法人 東
京都玉川歯科医師会と口腔がん検診
～10年間の取り組み～」

深津 晶、市村真奈、久山佳代、山本
浩嗣、福本雅彦、浅野紀元

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
福本雅彦 (fukumoto.masahiko)

研究者番号：50175569

(2) 研究分担者
なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者
なし ()

研究者番号：