

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19250

研究課題名(和文) 癌発生におけるジェネティック・エピジェネティック制御機構の解明と臨床検査法の確立

研究課題名(英文) Elucidation of genetic and epigenetic control mechanisms in cancer development and establishment of clinical examination methods

研究代表者

中村 那々美 (Nakamura, Nanami)

鶴見大学・歯学部・臨床助手

研究者番号：40824909

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)：従来、上皮性異形成を検出するためヨード染色法(IOM)が用いられているが、IOMはヨードの粘膜刺激性、ヨードアレルギー患者への適用外、角化粘膜には適用できないという弱点がある。そこで、蛍光観察装置のIllumiScanおよびVELscopeを用い、蛍光観察法(AVM)の客観的指標として、健常粘膜とFVL部の輝度比からカットオフ値を設定し、病理組織学的診断をゴールドスタンダードとして舌上皮性異形成の検出精度を求め、その臨床応用の可能性についてヨード染色法と比較検証した。

客観的AVMは、IOMよりも正診率が高く、舌上皮性異形成の補助検出法として臨床応用できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔がんは口腔顎顔面領域に発生するため、発見が遅延した場合、外科的な手術が施されたとしても、術後、社会生活に不可欠な摂食嚥下機能、構音機能ならびに審美的機能に著しい低下をきたす。そのため、口腔がんにおいて早期発見早期治療が重要となる。

従来、口腔がんおよび上皮性異形成の検出のためにヨード染色法(IOM)が用いられてきたが、IOMにはヨードによる粘膜刺激があり、角化粘膜には適応できないという弱点があり、近年、非接触・非侵襲の蛍光観察法が用いられてきている。しかしながら、現在、蛍光観察装置はさまざまな機器が開発、臨床応用されているが、それらの客観的評価法は未だ確立されておらず、精度も様々である。

研究成果の概要(英文)：Conventionally, an iodine-staining method (IOM) has been used to detect the oral epithelial dysplasia. However, IOM has several weak points: iodine is irritative to the mucosa, it is contraindicated in patients with allergy to iodine, and it cannot be used in keratinized mucosa. Therefore, using the fluorescence visualization devices, such as IllumiScan and VELscope, set the cutoff value from the luminance ratio between the healthy tissue and FVL for an objective index of fluorescence visualization method (AVM). To obtain the detection accuracy of epithelial dysplasia of the tongue, we used histopathological diagnosis as the gold standard and examined its clinical application potential in comparison with the iodine-staining method.

Objective AVM has a higher accuracy rate than IOM, and it was indicated the possibility of clinical application as an auxiliary detection method for epithelial dysplasia of the tongue.

研究分野：口腔外科

キーワード：蛍光観察法 VELscope IllumiScan 上皮性異形成 口腔がん

## 1. 研究開始当初の背景

口腔がんは年々増加傾向にあり、その中でも扁平上皮がんが最も多く、その半数以上は舌癌である。口腔がんは直視直達が可能である臓器であるものの、口腔顎顔面領域に発生するため、発見が遅れた進行性の口腔がんの場合、外科的な手術が施されたとしても、術後の社会生活に不可欠な摂食嚥下機能、構音機能ならびに審美的機能に著しい低下をきたす。そのため、口腔がんにおいて早期発見早期治療が重要となる。

また、口腔上皮性異形成は口腔扁平上皮がんの周囲にしばしば認められ、3-33%の割合でがん化することが報告されている。よって、切除術を施行する際は、上皮性異形成の範囲を適切に検出し切除することが重要である。口腔上皮がんならびに口腔上皮性異形成の領域を検出するために、従来ヨード染色法が用いられてきた。しかしながら、ヨード染色法にはヨードそのものによる粘膜刺激があること、さらにヨード染色の機序のために歯肉や硬口蓋などの角化粘膜には適応できないという弱点がある。近年、それらの欠点を解決するために蛍光観察法が用いられてきている。蛍光観察装置で発生した青色光(400-460nm)を健常粘膜に照射すると、粘膜内の自家蛍光物質により緑色光が発せられるが、上皮性異形成を伴う粘膜には自家蛍光物質がないため、蛍光の消失(FVL)が生じ、黒色領域として検出される(図1)。現在、蛍光観察装置はVELscope®はじめ、さまざまな機器が開発、臨床応用されているが、それらの評価法は未だ確立されていない。

## 2. 研究の目的

以前、VELscope®における舌上皮性異形成の検出精度を判定量値の輝度比を用いて算出し、従来の上皮性異形成の検出法であるヨード染色法と比較し、その臨床的有用性について報告した。そこで、今回は蛍光観察装置の一つである IllumiScan®の舌上皮性異形成における検出精度を半定量値の輝度比を用いて、VELscope®およびヨード染色法と比較し、IllumiScan®の臨床的有用性について検討した。

## 3. 研究の方法

舌扁平上皮癌あるいは舌白板症が疑われた患者 81 症例(男性 38 例、女性 43 例、平均年齢 60.6 歳)、100 検体を対象とした。蛍光観察法(AVM)はVELscope® (LED Dental 社製)ならびに IllumiScan® (松風社製)を用いて上皮性異形成の検出を主観的ならびに客観的に行った。主観的蛍光観察法では肉眼的に FVL の有無を判定した。客観的蛍光観察法では、先ず画像処理ソフト(VELscope®では Image J®、IllumiScan®では付属のデジタル画像ソフト)を用いて画像上で病変部の輝度と健常部の輝度の比(健常部輝度/病変部輝度: Lesion-to-Normal tissue uptake Ratio:LNR)を算出した。次に、病理組織学的診断結果と LNR 値を EZR 統計ソフトにて ROC(Receiver Operating Characteristic)曲線を作成し、上皮性異形成の存在が示唆される LNR の cut-off 値を決定したうえで、LNR が cut-off 値以上であれば FVL(+)、未満であれば FVL(-)と定義した。ヨード染色法(IOM)では肉眼的にヨード不染域の有無を判定した。検査は主観的蛍光観察法、ヨード染色法、生検の順に実施し(図2)、客観的蛍光観察法では PC 上で LNR を算出し、FVL の有無を判定した。これらの判定結果から、病理組織学的診断をゴールドスタンダードとして、各々の検査法の検出精度を算定した。また、各検査法と病理組織学的診断との一致度については、係数にて評価した。統計解析には EZR 統計ソフトを用いた。また、免疫組織化学染色は E-cadherin、Ki67、OCT4、sox2、WNT5A を施行し、EZR 統計ソフトを用いて陽性となった茶色成分を抽出し、それらの輝度を測定した。

## 4. 研究成果

病理組織学的診断は扁平上皮癌(SCC)が 40 検体、上皮性異形成あり(OED)が 44 検体、上皮性異形成なし(OEH)が 16 検体で、上皮性異形成(+)群は 84 検体、上皮性異形成(-)群は 16 検体であった。IllumiScan®とVELscope®における cut-off 値はそれぞれ 1.42 と 1.62 であった。IllumiScan®とVELscope®の ROC 曲線下面積(area under the curve)はどちらも Moderate accuracy で、IllumiScan®; AUC=0.898 95%信頼区間(CI)0.815-0.981、VELscope®; AUC=0.881 95%CI 0.771-0.992 であった(図3)。AVM において設定したそれぞれの Cut-off 値を用いて FVL の上皮性異形成を判定したところ、IllumiScan®では 80 検体が FVL (+)、20 検体が FVL(-)であった。VELscope®では 77 検体が FVL (+)、23 検体が FVL(-)であった。IOM では 93 検体が不染域(+)、7 検体が不染域(-)と判定した。

病理組織学的診断における上皮性異形成(+)群 84 検体の LNR は、IllumiScan®は平均 2.00 (中央値 1.85 range 1.10-4.29)、VELscope®は平均 2.66 (中央値 2.44 range 1.08-6.96)であった。一方、上皮性異形成(-)群 16 検体では、IllumiScan®は平均 1.29 (中央値 1.26 range 0.95-1.93)、VELscope®は平均 1.52 (中央値 1.33 range 1.12-3.09)であった。LNR は、IllumiScan®とVELscope®共に上皮性異形成(+)群が上皮性異形成(-)群と比較して有意に高かった (IllumiScan®, VELscope®; P < 0.001、Mann-Whitney U 検定)(図4)。AVM によ

る舌上皮性異形成の主観的検出精度は、IllumiScan®は感度 96.4%、特異度 37.5%、陽性的中率 89.0%、陰性的中率 66.7%、正診率 87.0%、陽性尤度比 1.54、陰性尤度比 0.10 であった。VELscope®は、感度 96.4%、特異度 31.3%、陽性的中率 88.0%、陰性的中率 62.5%、正診率 86.0%、陽性尤度比 1.40、陰性尤度比 0.11 であった。LNR を用いた AVM による舌上皮性異形成の検出精度は、IllumiScan®は、感度 91.7%、特異度 81.3%、陽性適中率 96.3%、陰性適中率 65.0%、正診率 90.0%、陽性尤度比 4.89、陰性尤度比 0.14 であった。VELscope®は、感度 89.3%、特異度 87.5%、陽性適中率 97.4%、陰性適中率 60.9%、正診率 89.0%、陽性尤度比 7.14、陰性尤度比 0.12 であった。IOM における舌上皮性異形成の検出精度は、感度 96.4%、特異度 25.0%、陽性適中率 87.1%、陰性適中率 57.1%、正診率 85.0%、陽性尤度比 1.29、陰性尤度比 0.14 であった。また、検査結果と病理組織学的診断結果との一致度である 係数 (kappa value) は、AVM(IllumiScan®)における主観的評価法では 0.412 (95%信頼区間 (95% Confidence intervals: 95% CI 0.114-0.710)で、一致度の判定は moderate であった。AVM(VELscope®)における主観的評価法では 0.347 (95%信頼区間 (95% Confidence intervals: 95% CI 0.030-0.664)で、一致度の判定は fair であった。LNR を用いた評価法では IllumiScan®は 0.662 (95% CI 0.463-0.861)で、一致度の判定は substantial となった。VELscope®は 0.652 (95% CI 0.459-0.846)で、一致度の判定は substantial となった。一方、IOM は、係数が 0.277 (95% CI -0.060-0.615)で、一致度の判定は fair であった。

免疫組織化学染色にて、E-cadherin の輝度は SCC 193.8、OED 208.8、OEH 223.8 であり、上皮異形成(+)群と上皮性異形成(-)群間および SCC と OEH の間に有意差を認めた。Ki67 の輝度は SCC 221.1、OED 225.0、OEH 231.8 であり、それぞれに有意差は認めなかった。OCT4 の輝度は SCC 201.7、OED 207.7、OEH 222.2 であり、上皮異形成(+)群と上皮性異形成(-)群間、SCC と OEH 間、OED と OEH 間にそれぞれ有意差を認めた。sox2 の輝度は SCC 206.4、OED 224.4、OEH 227.6 であり、上皮異形成(+)群と上皮性異形成(-)群間、SCC と OEH 間および SCC と OEH 間にそれぞれ有意差を認めた。WNT5A の輝度は SCC 208.7、OED 203.8、OEH 211.4 であり、それぞれに有意差は認めなかった(図 5)。

本研究における IOM の舌上皮性異形成の検出精度は、感度 96.4%、特異度 25.0%、正診率 85.0%で、係数は 0.277 で、一致度の判定基準は fair であったが、95%CI が 0 を跨いでいたため、この係数は有意ではなかった。IOM では悪性および上皮性異形成のみならず、上皮の角化が亢進しているだけの病変でもヨード不染域として検出されるため、特異度が低くなったと考えられた。一方、FVL の有無を客観的に評価する目的で、判定量的指標として LNR を用いた客観的 AVM の舌上皮性異形成の検出精度は、IllumiScan®は、感度 91.7%、特異度 81.3%、正診率 90.0%、係数は 0.662 (95% CI 0.463-0.861)で、一致度の判定は substantial であった。VELscope®は、感度 89.3%、特異度 87.5%正診率 89.0%、係数は 0.652 (95% CI 0.459-0.846)で、一致度の判定は substantial であった。これらのことから、LNR を用いた AVM は、上皮性異形成の有無に対する確定診断能が非常に高く、上皮性異形成の除外診断能も高いものと考えられた。

客観的蛍光観察法は、ヨード染色法と比較して舌上皮性異形成の補助検出法として臨床応用できる可能性が示唆された。また、舌上皮性異形成の検出能において、IllumiScan®は VELscope®とほぼ同等であったことから、IllumiScan®はカメラが内蔵されたハンディタイプのため、利便性が高く、臨床応用しやすいと考えられた。

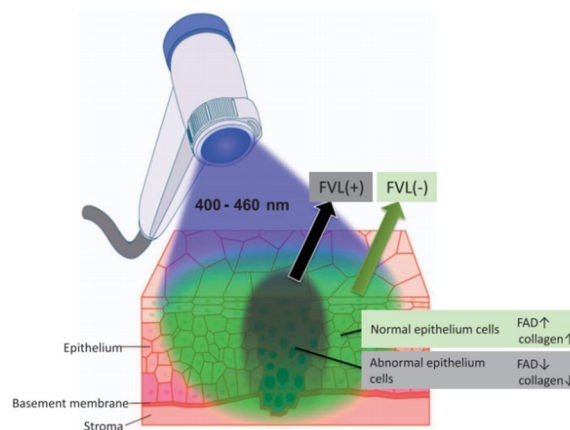


図 1 蛍光観察法のメカニズム(下記参考文献より引用)

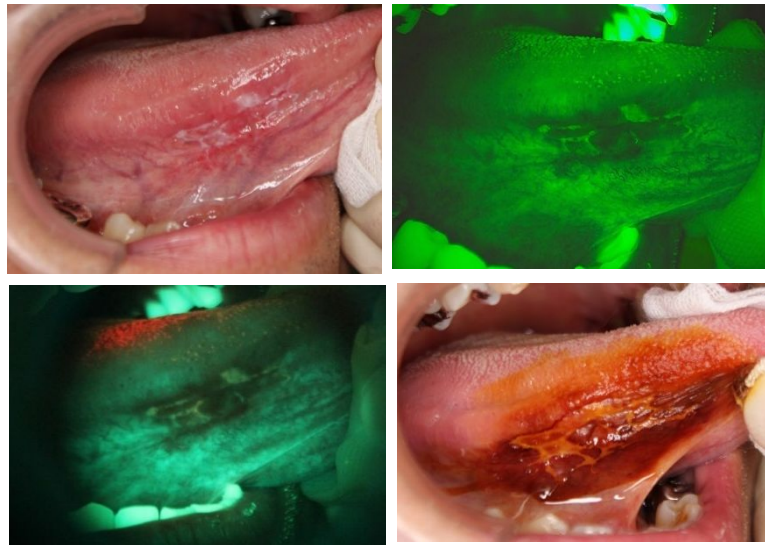


図2 代表症例( 肉眼像 AVM 像;IllumiScan® AVM 像;VELscope® IOM 像)

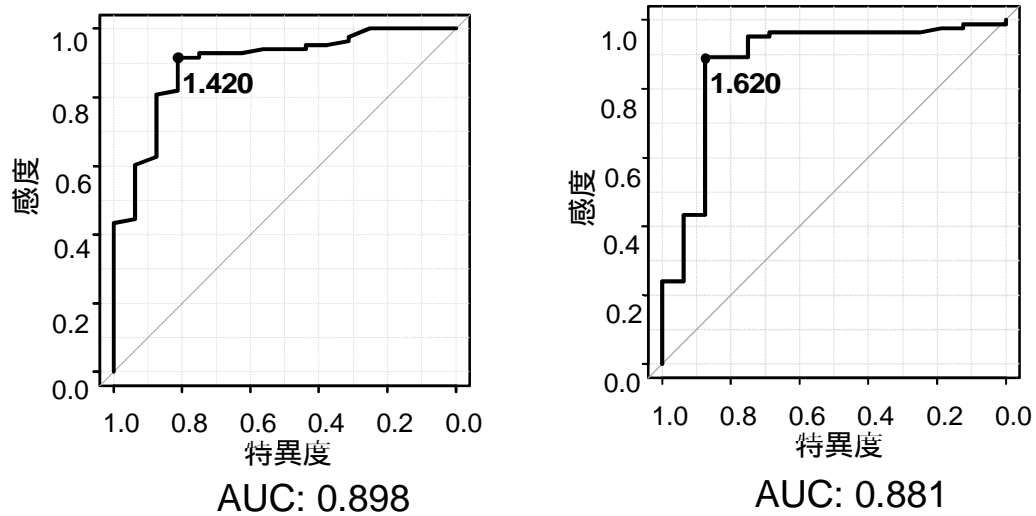


図3 客観的 AVM の輝度比・カットオフ値と ROC 曲線

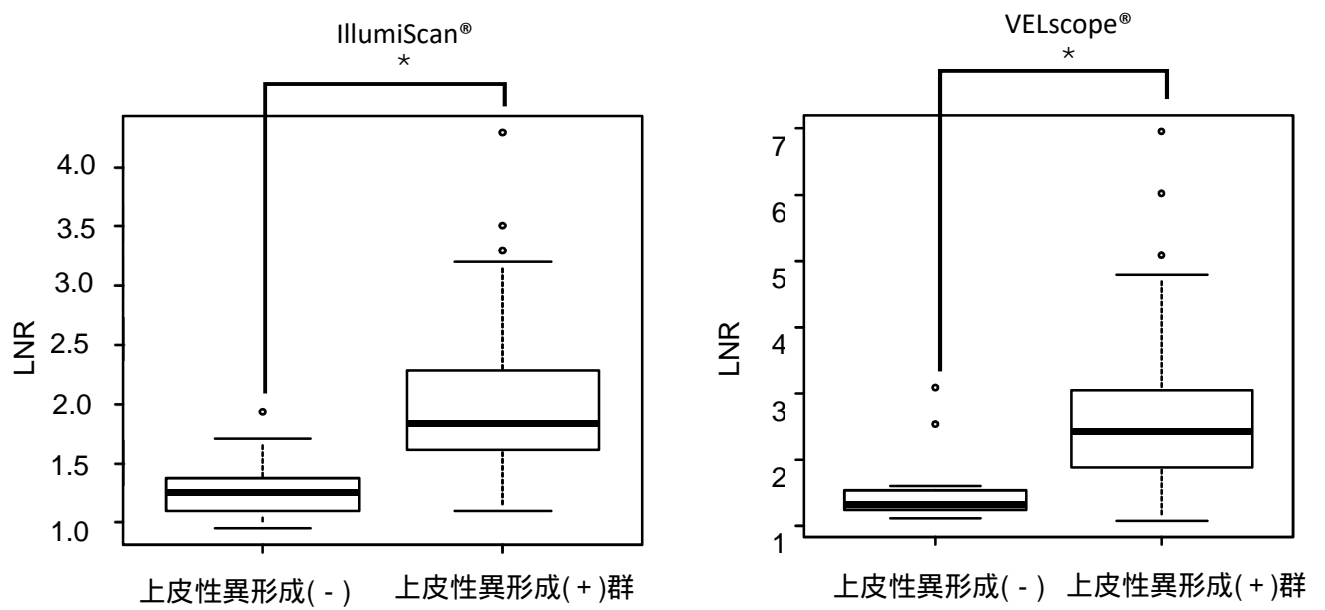


図4 病理組織学的診断結果における LNR の比較

\*P < 0.01



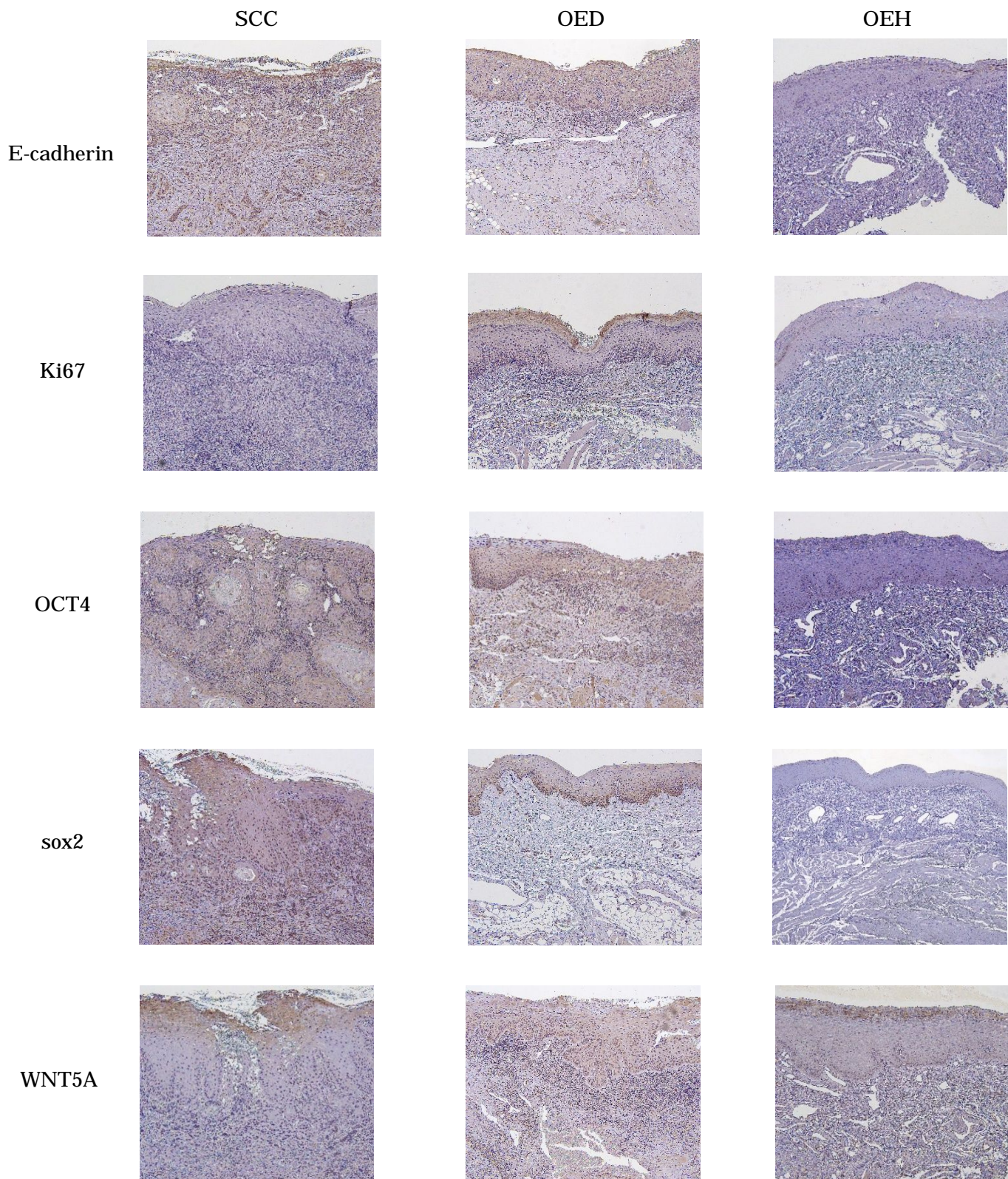


图5 免疫組織化学染色結果

《参考文献》 Yamamoto N, Kawaguchi K, Fujihara H, Hasebe M, Kishi Y, Yasukawa M, Kumagai K, Hamada Y. Detection accuracy for epithelial dysplasia using an objective autofluorescence visualization method based on the luminance ratio. *Int J Oral Sci.* 2017 Nov 10;9(11):e2. doi: 10.1038/ijos.2017.37.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------