

論文の内容の要旨

氏名：大森 寛子

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Development of photodynamic diagnosis and objective screening methods for oral squamous cell carcinoma using 5-aminolevulinic acid and a luminescence plate reader

(5-アミノレブリン酸と蛍光プレートリー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的スクリーニング法の構築)

チェアサイドにおける口腔がんの早期発見の基本は、問診、視診および触診である。しかし、これらはいずれも医療者の経験や主観に頼るところが大きく診断評価は医療者間で差異を生ずることが多い。これを補完する補助的診断方法の一つとして擦過細胞診が使用されているが、口腔領域の特殊性も相俟って口腔擦過細胞の評価も細胞スクリーナーの経験などにより差異が認められ、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。これらのことにより、口腔がんの早期発見には医療者間の格差が発生することが少ない数値化された診断方法を構築することは極めて重要であるといえる。

近年、医科領域では腫瘍における術中診断および病変領域の把握のため、光線力学を応用した光線力学的診断 (Photodynamic diagnosis: PDD) が注目されている。PDDは細胞に 5-aminolevulinic acid (5-ALA) を取り込ませ、正常細胞と腫瘍細胞の 5-ALA 代謝速度の違いにより、後者にプロトポルフィリンIX (PpIX)を蓄積させる。そこへ励起光 (405 nm 帯)を照射することで蛍光 (630 nm 帯)を検知し、病変部を把握する原理である。そこで口腔がんの早期発見方法として PDD を適用し蛍光強度を数値化することで診断者の主観を排除し、客観的評価が可能になり得る点に着目した。蛍光プレートリーダーを用い数値化された口腔がん診断基準に関する報告は国内外の文献を渉猟した限りでは見当たらなかった。本研究では、培養ヒト口腔扁平上皮癌 (OSCC) 由来細胞株を用いた蛍光プレートリーダーによる PDD の基礎的知見を得ることを目的とし、2つの実験を構成した。

第1章では OSCC 由来細胞株 (HSC-2, HSC-3, HSC-4, Sa3) および正常ヒト口腔ケラチノサイト (HOK) に対して 5-ALA を使用した PDD を蛍光プレートリーダーで測定し、細胞株の違いや細胞数の違いによる経時的な蛍光強度の挙動を測定した。

その結果、細胞数の違いによる 5-ALA を作用させた (+)群 / 5-ALA 作用させない (-)群の蛍光強度比は、代謝時間 240 分において $1 \times 10^6 > 1 \times 10^5 > 1 \times 10^4$ cells の順に細胞数依存的に増加した。 1×10^4 と 1×10^5 cells における蛍光強度比から 5-ALA の有無にかかわらず蛍光強度に有意な差は認めなかった。そのため、顕著な (有意な) 蛍光強度比を示した 1×10^6 cells に焦点を絞り、細胞株の違いによる蛍光強度の挙動変化について検討した。各細胞株間の蛍光強度の挙動は、5-ALA (+)群において HSC-2, HSC-3 および HSC-4 では作用 40 分後、Sa3 では作用 60 分後、さらに HOK では作用 100 分後にそれぞれの 5-ALA (-)群の蛍光強度との間に有意な増加があり、かつ OSCC 細胞株間での増強レベルは HSC-2 > HSC-4 > HSC-3 > Sa3 の順となった。この蛍光強度の差については OSCC 細胞株の分化度や採取部位などによるものと推察されるが、いずれの OSCC 細胞株においても代謝 40 分後に HOK の蛍光強度と比較し、有意な増加を示したことから PDD は口腔がんの早期発見に使用可能であることが示唆された。しかしながら、蛍光強度の有意な増加を示した細胞数は 1×10^6 cells 必要であり、臨床的にこの細胞数を口腔内から擦過することは困難であると考えられることからより少ない細胞数で PDD を行う必要があった。

第2章では、口腔がん早期発見における PDD 有効性に言及した第1章の研究結果について改善を要した、より少ない細胞数で有意な蛍光強度差を検知することを目的とした。つまり、少ない細胞数で細胞内 PpIX 蓄積を誘導させるため、5-ALA 代謝経路の中の PpIX からヘムに変換される際に必要な Ferrochelatase 活性を阻害する Deferoxamine (DFO)を併用する PDD を行い、得られる蛍光強度を検討した。

その結果、5-ALA に DFO を添加することで HOK と OSCC 細胞株間の各細胞数を比較したところ、すべての OSCC 細胞株 5×10^5 cells において、蛍光強度は代謝 120 分後に HOK の蛍光強度より有意に増加した。このことは DFO を添加することで 5-ALA 単独と比較し、半数の細胞数で PDD が可能であることを示唆した。

以上の結果から、本研究に基づく口腔がん早期発見に対する PDD の基礎的知見は、OSCC 細胞株に対してその蛍光強度の違いから数時間でかつ客観的に評価することが可能であり、チェアサイドにおける蛍光プレートリーダーを用いたスクリーニングおよび診断基準の策定の一助となると考えられる。