

論文審査の結果の要旨

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 lumine 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)

審査委員：(主査) 教授 平塚 浩一

(副査) 教授 小宮 正道

教授 福本 雅彦

本研究は、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を目指し、行ったものである。

本邦の口腔領域に発生する悪性腫瘍の約90%は扁平上皮癌である。一般的に悪性腫瘍の治療は外科的切除、化学療法および放射線療法が選択される。口腔領域の悪性腫瘍もこれに準ずる。そのため、進行した口腔がんでは治療後に重大な機能障害や審美的な問題を引き起こす可能性がある。これらにより患者のQOLは著しく損なわれる。それ故、口腔領域の悪性腫瘍の早期発見、早期治療は極めて重要である。

口腔がんの早期発見の基本は、視診・触診・問診・画像診断であるが、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少なくない。この医療者間の差異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。しかし、口腔領域の特殊性も相俟って口腔擦過細胞の評価もまた、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く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可視化できる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が認めなかった。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た。

第1章では、安全かつ精度の高い口腔がん診断方法の確立を目的に、培養ヒト口腔扁平上皮癌(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を施行し、励起光を照射することで得られる経時的な蛍光強度を蛍光プレートリーダーで測定することにより各細胞株の蛍光強度の挙動を数値化し、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、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、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。がん細胞において、PpIX からヘムの合成を行っている Ferrochelatase 活性が正常細胞に比べ低下していることに着目し、Ferrochelatase 活性を阻害する Deferoxamine (DFO) を併用することで細胞内の PpIX 濃度を上昇させ、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、5-ALA と DFO の組合せにより PpIX の蓄積を増加させ、加えて、蛍光プレートリーダーを用いた高感度での蛍光強度の測定方法は、少ない細胞数であってもチェアースайдにおける口腔がんの早期発見の一助となる可能性が示唆された。

これらの研究は、口腔がん早期発見のスクリーニング検査における解明の新たな知見を得たものであり、今後の歯科医学ならびに臨床検査医学の発展に大きく寄与し、意義のあるものと思われる。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和 3 年 11 月 18 日