

論文の内容の要旨

氏名：浅賀 勝寛

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：The Effectiveness of a Portable Fluorescence Spectrophotometer for Early Detection of Oral Cancer
(ポータブル蛍光分光光度計を用いた早期口腔がん発見の有効性)

口腔・咽頭領域のがんは、日本では年間約 8,000 人が死亡しており、その数は過去 30 年間で約 2 倍に増加している。超高齢社会となった日本では、今後も増え続けることが予想される。進行した口腔がんの予後は、咀嚼・嚥下などの機能面だけでなく、顔貌などの審美面でも患者の QOL に大きな影響を与えるため、早期発見が非常に重要であると考えられる。従来、口腔がんは直接目で見ることで発見しやすい部位ではあるが、口腔がんが進行していれば一般歯科臨床医でも比較的容易に発見・診断できるものの、口腔潜在的悪性疾患を含む口腔粘膜疾患は、早期の口腔がんと同様に臨床像が酷似しているために早期診断が困難であるのが現状である。口腔がんの発見には主に視診と触診が有効であり、その他にも様々な検査が行われてきたが、これらの方法は歯科医師の臨床経験に依存するため、経験に依存しない客観的なスクリーニング方法の確立が、口腔がんの早期発見において非常に重要である。そしてさらに、口腔がんの早期発見において医療従事者間の格差が生じにくい客観的な診断方法の確立が非常に重要である。

近年、口腔がん診断において口腔蛍光観察装置や蛍光を用いた光線力学的診断 (PDD) などの客観的診断法が大きな注目を集めている。しかしこれらの診断法も得られた蛍光度合から術者および検鏡者の主観的な要素をすべて除くことは困難であり、半定量的な補助的診断法といえる。一方、本講座では PDD を応用した培養ヒト口腔扁平上皮癌 (OSCC) 由来細胞株とヒト正常口腔粘膜細胞株 (HOK) の判別を 5-アミノレブリン酸塩酸塩 (5-ALA) および ferrochelatase 活性を阻害する deferoxamine (DFO) を併用し、細胞内で代謝されるプロトポルフィリン IX (PPIX) の蛍光強度を蛍光プレートリーダーで定量化することで、口腔内から安全に擦過できうる細胞数で客観的な診断が可能であることを報告した。蛍光プレートリーダーを用いた方法は集団検診などの多数検体には有効であると考えられるが、一般歯科診療所には装置を設置するスペースも限りがあることが予想される。そのため、限られたスペースの診療施設に設置可能な検査装置で、簡便・迅速・客観的に評価できる PDD 法が確立できればさらに口腔がんの早期発見が期待できる。

本研究では、上記を鑑み一般歯科診療所においても設置可能なポータブル蛍光分光光度計 (FC-1) を使用することにより、チェアサイドで簡便かつ客観的に口腔がんの早期発見が有効かつ効率的に PDD によって鑑別可能であるか実証することを目的に 3 つの実験を行った。

- 1) 短時間 (2, 4, 6 時間) の PDD を行うことで OSCC 細胞株 (HSC-2, HSC-3) と HOK を鑑別可能か検討するため、5-ALA と DFO を Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) に加えた PDD 群と DMEM 単独である Control 群を HOK, HSC-2 および HSC-3 に遮光室温下 (RT) で作用させ、Control/RT 群および PDD/RT 群を比較、さらに細胞株間で比較した。
- 2) 細胞に対する 5-ALA と DFO の作用条件、特に温度環境の条件変化より PDD により HOK, HSC-2 および HSC-3 から得られる蛍光強度値について検討するため、細胞株に対して PDD 群に対して RT 条件下および 37°C 条件 (37°C) 下で作用し PDD/RT 群と PDD/37°C 群で得られた蛍光強度値を比較した。
- 3) 従来の検鏡が必要な PDD と比較し、FC-1 を用いた PDD の利点を PPIX に焦点を絞り検討するため、PPIX の吸収スペクトル (400-630 nm) を利用し、Control/RT, Control/37°C, PDD/RT および PDD/37°C 群における作用 24 時間後の細胞上清に対して 405 nm LED (106 J/cm²) を照射することで生じる一重項酸素 (¹O₂) を、電子的スピン共鳴を用いた spin-trapping 法で検知し、それぞれを細胞株間で比較した。

その結果、以下の知見を得た。

- 1) HOK では作用開始 2 時間後に PDD/RT 群が Control/RT と比較し有意な蛍光強度の有意な低下を示したものの、4 時間後には上昇を示し、6 時間後には有意差を認めなかった。一方、HSC-2 および HSC-3 で

は作用開始2時間後から PDD/RT 群が有意な増加を示した。また、HOK と OSCC 細胞 (HSC-2 および HSC-3)の細胞株間を比較したところ、作用開始2時間後から HOK と OSCC 細胞株間で有意な蛍光強度の増加を認めた。

- 2) HOK においては作用 2, 4 および 6 時間いずれにおいても有意差を認めなかった。一方、OSCC 細胞株では、作用開始2時間以降、PDD/37°C 群に有意な上昇が認められた。
- 3) 細胞上清中から得られた $^1\text{O}_2$ シグナルは、Control/RT < Control/37°C < PDD/RT < PDD/37°C 群の順で増加した。また、PDD/37°C 群では HOK と比較し HSC-3 において $^1\text{O}_2$ シグナルが有意に増加した。

以上の結果より、PDD 開始2時間後で HOK と OSCC 細胞株をポータブル蛍光分光光度計により、蛍光強度値によって鑑別できる可能性が確認された。さらに RT よりも 37°C 条件下で反応を実施することで、さらに蛍光強度値の有意な差が確認できることから、本ポータブル蛍光分光光度計を用いた PDD 法のガイドライン作成の一助となる可能性がある。また、従来の検鏡を必要とする従来型 PDD 法は、細胞内 PPIX を標的とした蛍光診断方法であるため、細胞内に PPIX を蓄積させる対策や検鏡時間制限など煩雑した熟練な手技が必要になる。一方、ポータブル蛍光分光光度計を用いた PDD 法は、細胞内 PPIX だけでなく、細胞上清、すなわち細胞外 PPIX も含めた蛍光強度値を計測することが可能であるため、操作が簡便であることに加え感受性が高く、一般歯科診療所においても応用できる手法であることが示唆されることから、将来的に口腔がん早期発見の臨床検査法の一つの手段となる可能性が考えられる。