

平成22年 4月 19日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790991
 研究課題名（和文）SCID マウス同所移植モデルを用いた肺癌・悪性胸膜中皮腫蛍光診断の検討
 研究課題名（英文）Fluorescence diagnosis of lung cancer and malignant mesothelioma using orthotopic implantation SCID mice model
 研究代表者
 滝沢 宏光（TAKIZAWA HIROMITSU）
 徳島大学・医学部・歯学部附属病院・講師
 研究者番号：90332816

研究成果の概要（和文）：ヒト肺癌細胞株 A549, Ma44-3, およびヒト悪性胸膜中皮種細胞株 MST0211H を用いた SCID マウス肺癌リンパ節転移モデル, 胸膜悪性腫瘍モデルにおいて, 微小腫瘍病変ができる時期に 5-アミノレブリン酸またはタラポルフィンを投与し数時間後に犠牲死させ, 405nm の励起光を胸腔内に照射し蛍光診断を行ったところ, 肺腫瘍, 転移リンパ節, 胸膜腫瘍に一致した明瞭な赤色蛍光を確認できた. 特に微小な病変の検出については白色光下の観察に勝る感度を示し, 胸腔内悪性腫瘍の検出率向上に寄与する可能性が示唆された.

研究成果の概要（英文）：Human lung cancer cell line A549, Ma44-3 and human malignant mesothelioma cell line MST0211H were injected into left lung or left pleural cavity of severe combined immunodeficiency disease mice. The mice were administered 5-aminolevulinic acid or mono-L-aspartyl chlorine e6 1 to 3 weeks after the implantation. The mice were sacrificed several hours after the administration of these drugs. Their chest walls were opened and illuminated with blue light (405nm). Clear red fluorescence was observed in lung tumors, metastatic lymph nodes, and pleural tumors, even though the tumors were invisible macroscopically under white light. This result suggests possibility of clinical application of fluorescence diagnosis with intrapleural malignant tumors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：呼吸器外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：蛍光診断, 5-アミノレブリン酸, タラポルフィン, SCID マウス, 肺癌, 悪性胸膜中皮腫, リンパ節転移

1. 研究開始当初の背景

非小細胞肺癌の病期診断は手術適応を含

めた治療方針決定のために重要であるが, 各種画像診断を駆使しても, 病期を大きく

左右する胸膜播腫やリンパ節転移の有無を術前に評価することは困難である。これらの因子は術中に評価する必要があるが、微小な胸膜播腫を肉眼で確認することや、リンパ節に関してはいずれのリンパ節を術中組織診断に提出するかの判断は難しい。

近年では小型末梢肺癌に対する積極的縮小手術が話題となっているが、リンパ節転移陰性が縮小手術適応の条件であるため、術中のリンパ節転移診断がより重要となった。

また、2020年頃に罹患患者がピークを迎えると見込まれている悪性胸膜中皮腫については長期生存が期待できる病期I期に診断することが難しいことが問題となっているが、この一因には広範に存在する胸膜肥厚病変の中から組織診断に適切な部位を選択する困難さがあると考えられる。近年、蛍光を応用した診断法が発達してきている。5-アミノレブリン酸およびタラポルフィンと共に腫瘍親和性のある薬剤で、これらの代謝産物は405nmの青色の励起光の照射で、600nm以上の赤色蛍光を発する性質があり、5-アミノレブリン酸は脳外科、口腔外科、泌尿器科領域等において既に悪性腫瘍の浸潤範囲の可視化のために応用されている。肺癌領域ではこれらの薬剤を用いた蛍光診断は臨床応用されていない。これまでの報告としては、胸膜悪性腫瘍の蛍光診断に関する

Thoracoscopic fluorescence diagnosis of pleural malignancies: experimental studies. R L Probst, et al. *Thorax* 2002; 57;1005-1009. Fluorescence Detection of Pleural Malignancies Using 5-Aminolaevulinic Acid. Paul Baas, et al. *Chest* 2006;129;718-724. 等がある。

我々の教室では蛍光診断実験に用いることができる、SCIDマウス同所性移植モデルを作成する手技を確立していた (Anticancer Res 2000; 20; 161-, Ann Thorac Surg 2000; 69; 1691-)。このモデルを用いると、ヒト肺癌細胞株 Ma44-3 は移植後2週間で約3mm大の肺腫瘍を形成し、全例で縦隔リンパ節転移を起こすためリンパ節転移として使用することができる。また培養細胞を左胸腔内に投与することにより胸膜悪性腫瘍モデルを作成することもできる。

2. 研究の目的

光感受性物質を用いた蛍光診断で、肺癌におけるリンパ節転移や胸膜播腫の術中診断の精度、または悪性胸膜中皮腫の早期診断率を向上させることが可能か検討することが本研究の目的である。

SCIDマウス同所性移植モデル(リンパ節転移モデル、胸膜悪性腫瘍モデル)を作成し、5-アミノレブリン酸およびタラポルフィンによる胸腔内腫瘍病変の蛍光診断の有用性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 細胞株

ヒト肺癌細胞株: A549, Ma44-3 およびヒト悪性胸膜中皮腫細胞株: MST0211H を用いる。

(2) In vitro 蛍光観察実験

Semiconfluent となった培養細胞に 0.03-0.05% の 5-ALA を 4-6 時間作用させた後に PBS で洗浄し、蛍光顕微鏡 (EM 378-430, EX 580-) を用いて培養細胞における蛍光の観察を行う。

(3) 移植モデルの作成

6 週齢雄性 SCID マウスをエーテル麻酔下に右側臥位に固定する。左肩甲骨下皮膚に約 1cm の横切開を加え、直下の筋層を肋骨附着部より切離する。肋間より透見できる左肺 (リンパ節転移モデル) または左胸腔内 (胸膜悪性腫瘍モデル) にヒト肺癌細胞懸濁液 (肺腫瘍を形成させる際はマトリジェル使用) 10 μ l (2 \times 10⁶ 個) を 30G 針にて注入し皮膚を縫合する。

(4) 光感受性物質の投与

胸腔内腫瘍病変が形成される時期 (1-3 週) に 100-400mg/kg の 5-アミノレブリン酸を経口投与、または 5mg/kg のタラポルフィンを腹腔内投与する。

(5) 胸腔内蛍光診断

光感受性物質投与から 180-240 分でマウスを犠牲死させ開胸し、白色光下に腫瘍を観察しカウントした後に、VLD-M1 (M&M, CO, LTD) を用いて 405nm の励起光を照射し赤色蛍光を呈する腫瘍を観察しカウントする。

(6) 病理組織学的検討

蛍光診断後に両側肺、胸壁、縦隔組織、横隔膜を摘出し固定した後に HE 染色標本作製し、腫瘍の有無を確認する。

4. 研究成果

(1) In vitro 蛍光観察実験

0.03-0.05%の5-ALAを4-6時間作用させた後、観察において0.03%-4時間の条件にて最も強い蛍光を観察できた。

細胞株により蛍光の強度が異なったが、腫瘍細胞の辺縁に最も強い赤色蛍光を観察できた(図1)

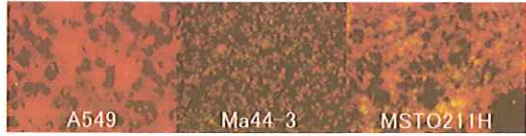


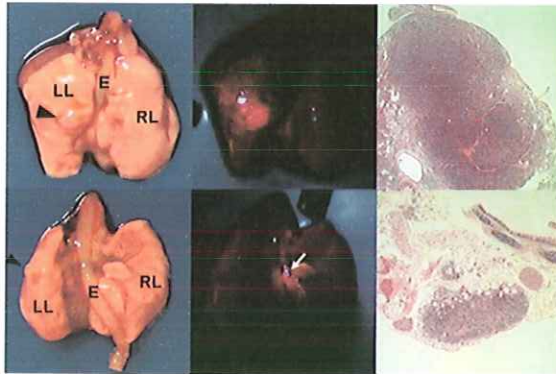
図1

(2) リンパ節転移モデルにおける蛍光診断

Ma44-3を用いたリンパ節転移モデルにおいて、移植から2週間後に100mg/kgの5-アミノレブリン酸を経口投与、または5mg/kgのタラポルフィンを腹腔内投与した後に蛍光診断を行った。5-アミノレブリン酸投与マウス、タラポルフィン投与マウスともに肺腫瘍と縦隔リンパ節転移に赤色蛍光を認め、以下に示すように白色光下では視認が困難な微小な病変に対しても蛍光診断が威力を発揮する可能性が示唆された。

5-アミノレブリン酸投与マウスでは肺腫瘍に一致した明瞭な赤色蛍光を認め(図2-A, B), 同部位は組織学的に肺腫瘍と確認された(図2-C)。

タラポルフィン投与マウスでは白色光下では視認が困難な微小な縦隔リンパ節に一致した明瞭な赤色蛍光を認め(図2-D, E), 同部位は組織学的にリンパ節転移と確認された(図2-F)。



LL: Left lung, RL: Right lung, E: Esophagus,

図2

A	B	C
D	E	F

(3) 胸膜悪性腫瘍モデルにおける蛍光診断

A549, Ma44-3, MSTO211Hを用いた胸膜悪性腫瘍モデルにおいて、移植から1-3週間後に

400mg/kgの5-アミノレブリン酸を経口投与し蛍光診断を行った。細胞株により蛍光の強度が異なったが、肺、胸壁、縦隔、横隔膜のいずれの腫瘍についても赤色蛍光を確認することができた。

A549では、他の細胞株に比較してやや蛍光が弱い傾向にあり、一部の胸壁腫瘍では蛍光が確認できないものもあった。蛍光が確認できた腫瘍においては腫瘍の辺縁に強い蛍光が認められた(図3)。

Ma44-3では、肺、胸壁、縦隔、横隔膜のいずれの腫瘍においても明瞭な赤色蛍光を観察でき、白色光よりも腫瘍の視認性に勝っていた(図4)。

MSTO211Hは、Ma44-3と同様に肺、胸壁、縦隔、横隔膜のいずれの腫瘍においても明瞭な赤色蛍光を観察でき、白色光下で確認できないような微小な病変の検出に優れていた(図5)。

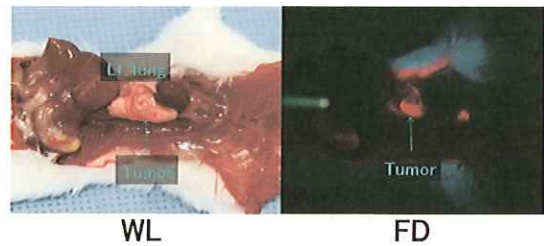


図3

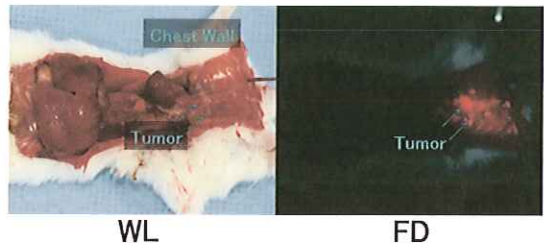


図4

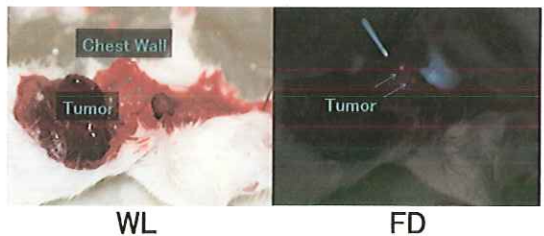


図5

図6は3種の細胞株についてそれぞれ8匹ずつの胸膜悪性腫瘍モデルを作成し、白色光下と蛍光診断での認識できた腫瘍個数をプロットしたグラフである。A549では、一部の胸壁腫瘍で蛍光が確認できないものもあったため蛍光診断での認識腫瘍個数が少ない

傾向であったが、Ma44-3, MST0211Hについては蛍光診断の認識腫瘍個数が勝る結果となった。

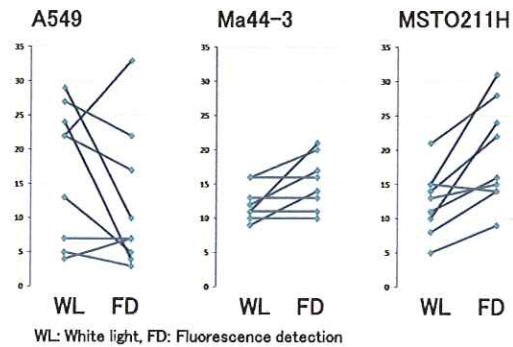


図6

(3) まとめ

SCID マウス同所性移植モデルを用いた実験で、5-アミノレブリン酸およびタラポルフィンによる胸腔内腫瘍病変の蛍光診断は可能であった。白色光下で確認できないような微小な病変についても蛍光診断で検出できた。

5-アミノレブリン酸およびタラポルフィンはすでに臨床で用いられている薬剤であるため、胸腔内腫瘍病変の蛍光診断への臨床応用も容易である。これらの光感受性物質を用いた蛍光診断で、肺癌におけるリンパ節転移や胸膜播種の術中診断の精度、または悪性胸膜中皮腫の早期診断率を向上させる可能性が示唆された。

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)

Hiromitsu Takizawa, Kazuya Kondo, Hiroaki Toba, Koichiro Kenzaki, Shoji Sakiyama, Akira Tangoku. Fluorescence diagnosis of lymph node metastasis of lung cancer in mouse model. *Oncology Reports*, 査読あり, 22, 2009, 17-21

[学会発表] (計0件)

[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

滝沢 宏光 (TAKIZAWA HIROMITSU)
徳島大学・医学部・歯学部附属病院・講師
研究者番号：90332816

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：