

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591944

研究課題名(和文) 5-ALA投与後蛍光観察による胃癌手術中の新しいリンパ節転移診断法の開発

研究課題名(英文) Fluorescence diagnosis of metastatic lymph nodes in gastric cancer patients using 5-ALA.

研究代表者

中西 正芳 (Nakanishi, Masayoshi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20516190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：5-アミノレブリン酸(5-ALA)はヘム合成の前駆体物質であり、内因性のアミノ酸である。癌細胞に投与すると蛍光物質であるプロトポルフィリンIX(PpIX)に代謝され蓄積する。この性質を用いて胃癌細胞株に5-ALAを投与するとPpIXの蛍光が観察された。また、EGFPを導入した細胞株を用いたマウスモデルに5-ALAを投与するとEGFPの蛍光を認めた部位にPpIXの蛍光が観察された。胃癌患者14名に5-ALAを内服してもらい、切除標本を用いたリンパ節の蛍光観察を行い、病理組織診断と比較すると、正診率は92.4%であり、ROC曲線では0.832と高い診断能を有することが分かった。

研究成果の概要(英文)：5-aminolevulinic acid (5-ALA) is a natural amino acid and can be converted into a photosensitizer, protoporphyrin IX (PpIX), via the heme biosynthetic pathway. Gastric cancer cell lines with 5-ALA were positive for PpIX fluorescence. After injection of 5-ALA to mouse model via the tail vein, PpIX fluorescence could be detected on metastatic lymph nodes by stereomicroscopic imaging. A total of 144 lymph nodes obtained from 14 gastric cancer patients were examined. The patients were administered 5-ALA orally before surgery. The diagnostic results were compared to those of the routine H&E stain examination. Observed PpIX fluorescence of was identical to the metastatic lymph nodes, with 92.4 % accuracy. The area under the curve was calculated as 0.832 throughout Receiver operating characteristic (ROC) analysis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：胃癌 リンパ節転移 蛍光診断 5-ALA

1. 研究開始当初の背景

生体に投与された 5-aminolevulinic acid(5-ALA)は細胞内で代謝されて蛍光発色する protoporphyrin IX (PpIX)に変換される。正常組織では PpIX は速やかに代謝されてヘム合成されるが、癌組織内では porphobilinogen deaminase の活性の上昇と ferrochelatase の活性の減弱のために代謝されず、PpIX のまま残存する。5-ALA 投与による PpIX の蛍光発色の応用は泌尿器科領域の膀胱癌の診断や脳神経外科領域のグリオーマの診断に臨床応用されている。

胃癌に対するリンパ節郭清は全国規模の臨床試験である JCOG9501 で大動脈周囲リンパ節郭清の意義が否定されたことから

2 群リンパ節郭清が標準的治療とされ、全例に画一的なリンパ節郭清が行われている。しかし症例によっては大動脈周囲を追加郭清することにより予後の期待できる場合があることも否定できず、逆に領域リンパ節の中でも症例によって郭清を一部省略できる可能性もある。術中に個々の症例によってリアルタイムに正確なリンパ節転移診断が可能となれば、郭清が必要な領域を個別に決定し、必要十分なリンパ節郭清を伴うオーダーメイドの合理的手術が可能となる。これにより過大な侵襲を回避し、予後の延長や臓器の温存につながることを期待できるため、そのメリットは計り知れない。

我々は従来から大腸癌患者の術前に 5-ALA を投与して転移リンパ節に取り込ませた後、大腸切除術後のリンパ節を蛍光観察することで病理診断に臨床応用できることを報告してきた。

我々の行った *in vitro* の予備実験では、癌細胞に取り込まれた 5-ALA は細胞内で PpIX に代謝され、蛍光観察された (excitation, 440nm, emission, 575-675nm)。また、ヒト大腸癌をヌード

マウスに皮下移植した大腸がんモデルによる *in vivo* の予備実験でも、5-ALA の投与によって微小な腫瘍の蛍光発色を確認できた。

胃癌患者の術前に 5-ALA を投与し、癌細胞だけに存在する PpIX の蛍光を検出することができれば、胃癌のリンパ節転移の有無をリアルタイムに正確に診断できるため、胃癌の根治性を向上しつつ、患者に対する不必要な侵襲を避けることができる。本研究では 5-ALA 投与による PpIX の蛍光観察が、胃癌手術において至適リンパ節郭清範囲の決定に応用できることを証明する。

2. 研究の目的

胃癌の術後生存率が改善された現在でも、胃癌手術におけるリンパ節の郭清範囲については全例に画一的なリンパ節郭清が行われている。手術中にリアルタイムに正確なリンパ節転移診断が可能となれば、症例毎の至適リンパ節郭清が可能となり、過大な侵襲の回避や臓器の温存、予後の延長など大きなメリットがあるものと予想される。我々は生体に 5-ALA を投与すると癌組織中で代謝物質である PpIX が蛍光を発するため、リンパ節転移の診断に有用であることを報告してきた。本研究では胃癌術前患者に 5-ALA を投与後、手術中にリンパ節内の蛍光発色を検出することで術中にリンパ節転移診断を行い、合理的なリンパ節郭清を行い得ることを証明する。

3. 研究の方法

(1) 胃癌細胞株の蛍光観察

まずヒト胃癌細胞株 MKN45 を 5-ALA で処理後に蛍光観察を行う。ヌードマウスの背部皮下に MKN45 を移植してヒト胃癌移植ヌードマウスを作成し、5-ALA を又

ードマウスの尾静脈から静注して、腫瘍の蛍光発色を実体蛍光顕微鏡で検討する。5-ALAの投与量を変更して至適投与量と、投与から観察までの時間を決定する。

(2) 転移リンパ節モデルでの蛍光診断の有用性について

EGFP でラベルした MKN-45 細胞を用いた胃癌リンパ節転移モデルを作製し、5-ALA を尾静脈より投与し、4 時間後に観察し転移リンパ節が診断可能かを検討する。

(3) 胃癌患者での 5-ALA を用いた蛍光リンパ節転移診断の有用性についての検討

本学倫理審査委員会の承認後、文書で同意を得た 14 人の進行胃癌患者に術前 20mg/kg の 5-ALA を内服してもらい、切除標本に対する蛍光リンパ節転移診断が有用であるかを病理組織診断の結果と比較することで検討する。

4. 研究成果

(1) 胃癌細胞株の蛍光観察

ヒト胃癌細胞株である MKN-45 を 5-ALA で処理すると、処理後 1 時間以降で PpIX の蛍光が観察された。

(2) 転移リンパ節モデルでの蛍光診断の有用性について

EGFP でラベルした MKN-45 細胞の転移モデルに 5-ALA を投与すると、転移リンパ節に EGFP の蛍光が観察され、同部位に一致して PpIX の蛍光を確認することができた。

(3) 胃癌患者での 5-ALA を用いた蛍光リンパ節転移診断の有用性についての検討

全 14 人中 144 リンパ節を対象とし、蛍光画像による $R / (R+G+B)$ 日で診断し、

病理組織検査と比較した。その結果正診率は 92.4%であり、ROC 曲線では 0.832 と高い診断能を有することが分かった。いずれの症例でも明らかな副作用は認められなかった。

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 2 件)

Harada K, Nakanishi M, Otsuji E(他 11 名): Detection of lymph node metastases in human colorectal cancer by using 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence with spectral unmixing 査読あり Int J Mol Sci. 2013 Nov 21;14(11):23140-52. doi: 10.3390/ijms141123140.

Koizumi N, Otsuji E(他 12 名): Detection of metastatic lymph nodes using 5-aminolevulinic acid in patients with gastric cancer 査読あり Ann Surg Oncol. 2013 Oct;20(11):3541-8. doi: 10.1245/s10434-013-3017-3. Epub 2013 Jul 12.

[学会発表](計 5 件)

小泉範明、中西正芳ほか：5-アミノレブリン酸(5-ALA)を用いた胃癌リンパ節転移の光線力学的診断.第 49 回日本癌治療学会学術集会 2011 年 10 月 27 日、28 日、29 日 名古屋

小泉範明、中西正芳ほか：5-アミノレブリン酸(5-ALA)を用いた胃癌リンパ節転移診断の検討.第 111 回日本外科学会定期学術集会 2011 年 5 月 26 日、27 日、28 日

小泉範明、中西正芳ほか：新たな胃癌リンパ節転移の迅速診断法としての 5-ALA の

有用性 .第 50 回日本癌治療学会学術集会
2012 年 10 月 25 日、26 日、27 日 横浜
小泉範明、中西正芳ほか：より高感度な
検出法による 5-ALA を用いた胃癌リンパ
節の蛍光診断 .第 113 回日本外科学会定
期学術集会 2013 年 4 月 11 日、12 日、
13 日 福岡
泉範明、中西正芳ほか：蛍光を用いた正
確な消化器癌のリンパ節転移迅速診断法
の開発 .第 68 回日本消化器外科学会総会
2013 年 7 月 17 日、18 日、19 日 宮崎

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中西 正芳 (NAKANISHI MASAYOSHI)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号 : 20516190

(2)研究分担者

大辻 英吾 (OTSUJI EI GO)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号 : 20244600