

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 2 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592079

研究課題名(和文) 癌の蛍光診断を応用した新たな体内リンパ節と体内深部の転移病巣診断法の開発

研究課題名(英文) Development of diagnostic method of metastatic malignant lesion and body lymph nodes use application of the fluorescence diagnosis of cancer.

研究代表者

北田 正博(KITADA, Masahiro)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60332483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：自家蛍光を利用した、胸腔内微小播腫性病変や早期の悪性胸膜中皮腫に対する光線力学的診断法の研究を行った。自家蛍光とは、細胞が光を吸収した際に起こる光の自然放出である。正常組織では、400-450nmの青色励起光に反応して、520nm程度の緑色の自家蛍光が観察される。悪性病変部位では、粘膜上皮の肥厚、自家蛍光物質の減少などにより、緑色の自家蛍光が減弱し、赤紫系の色調の変化を認める事象を利用した。胸膜面に存在する腫瘍は全例色調の変化が観察可能であった。原発性肺癌では、p1以上の症例で自家蛍光の減弱による色調の変化が観察可能であった。胸膜病変の局在診断は有用であったが、今後精度向上が必要である。

研究成果の概要(英文)：Background: We conducted a study on photodynamic diagnosis (PDD) using autofluorescence in video-assisted thoracic surgery for intrathoracic small malignant lesion. In normal tissues, green autofluorescence of approximately 520 nm is observed in response to 400-450 nm blue excitation rays. However, in cancer lesions, green autofluorescence is reduced and the color spectrum thus shifts to red-violet. This phenomenon is the basis of PDD. Results: The color spectrum shift was observed in all tumors located on the pleural surface. Among patients with primary lung cancer, those with pleural infiltration (p1) scores of 1 or greater showed color spectrum shifts due to reduced autofluorescence. Conclusion: Localization of pleural lesions by autofluorescence imaging was found to be useful. In primary lung cancer cases, differentiation between p10 and p11 lesions appears to be useful for determining therapeutic strategies including surgical procedures.

研究分野：胸部外科

キーワード：肺悪性腫瘍 胸膜悪性腫瘍 光線力学的診断

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺癌の早期再発の要因として、微小な播種性病変の存在が考えられ、本病態を正確に診断する事は、治療戦略を立てる上で非常に重要な事案である。また、治療方針が確立されず、予後不良な悪性胸膜中皮腫の早期診断も注目されている。術前の画像診断や胸腔鏡による目視診断だけでは限界があるのも事実であり、精度が高い診断法が希求されてきた。我々は正常組織が励起光に反応して発する自家蛍光に着目し、光学的診断によって精度向上が可能になるか否かを検討した。現在、自家蛍光を応用した診断法として、気管支鏡や大腸内視鏡で広く施行されているが¹⁻³⁾、胸腔鏡を使用した胸腔内悪性病変に対する診断法の報告例は少ない。我々は、気管支内視鏡における自家蛍光観察システムを応用し、胸腔鏡を使用した、胸腔内悪性病変に対する自家蛍光観察による診断の研究を行った。

(2) 自家蛍光とは、細胞内のミトコンドリアやリソソームなどが光を吸収した際に起こる光の自然放出であり、人体組織における自家蛍光発生源は、nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate(NADPH), flavin-adenine dinucleotide(FAD)の他、collagen、Fibronectin等が報告されている⁴⁾⁵⁾。正常組織では、400～450nmの青色励起光に反応して、520nm程度の緑色の自家蛍光が観察されるが、癌病変部位では、粘膜上皮の肥厚、自家蛍光物質の減少、蛍光吸収物質の増加などにより、緑色の自家蛍光が減弱し、蛍光色調の変化を認める。この蛍光の減弱や波長の変化を画像化して観察するのが自家蛍光観察システムの原理であり、1990年台にはこの原理を利用した自家蛍光気管支鏡が開発され⁶⁾、その後、各分野の診

断で開発応用されてきた⁴⁻⁶⁾。

2. 研究の目的

本研究は、胸腔鏡(硬性鏡)に自家蛍光観察システムを装着した機器により、胸腔内悪性病変に対する診断法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 2012年2月より2013年2月まで、胸腔鏡を使用する呼吸器外科手術症例のうち、同意を頂いた症例に対し、自家蛍光観察システムによる胸腔内の観察を行った。肺癌22例(胸膜播腫症例1例)、転移性肺腫瘍5例、悪性胸膜中皮腫(生検例)2例、良性腫瘍2例の計31例を対象とした。

(2) 手術時、胸腔鏡挿入用ポート(12mm)孔より、自家蛍光観察胸腔鏡を挿入し、胸腔内を観察した。本研究で使用した自家蛍光観察システムは、内視鏡用のカラー蛍光観察システム;PDS-2000(浜松ホトニクス社製)⁷⁾⁸⁾を改良しており、小型CCDカメラを装着し、白色光観察とFilterを介した自家蛍光観察が可能になっている。カラー蛍光カメラにはオリンパスOES(Olympus Endoscopic System)アタッチメントを利用し、手術用ドレープを装着した胸腔鏡と接続した。光源は、420-450nmを中心とする励起光が照射可能なキセノン光源(300W)を使用した。その後、光源を改良、キセノンからLEDに変えて観察を継続した。

(3) 本臨床研究は旭川医科大学倫理委員会で承認済であり、手術前に各症例よりinformed consentを取得した。

4. 研究成果

(1) 病変の描出状況:

白色光では色調の変化が不明瞭、視困難な病変部でも、自家蛍光観察カメラ上、腫瘍部位は、周囲正常組織の緑色自家蛍光と対比して紫~赤紫の色調が描出された。

- ① 胸膜面に存在する転移性肺腫瘍は全例色調の変化が観察可能であった。また、壁側胸膜面では、播種性病変や悪性胸膜中皮腫の場合は観察可能であったが、胸膜線維性病変では色調の変化は認めなかった。(Fig.1-3は矢印が病変を示す、Fig.4は線維性の胸膜変化だが、悪性病変ではないので色調の変化は無かった。)

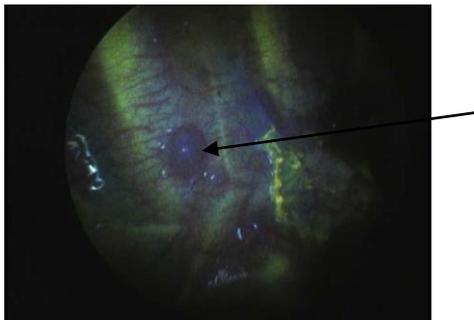


Fig.1 胸膜播種性病変 (転移乳癌)

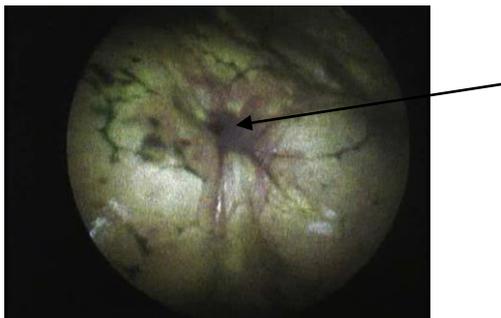


Fig.2 肺癌胸膜浸潤部

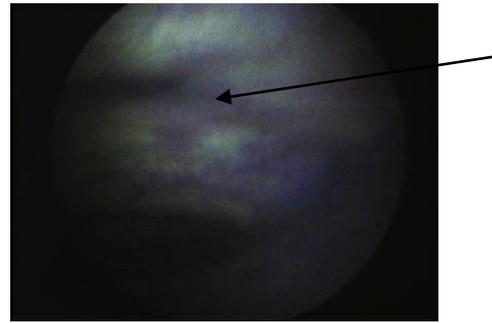


Fig.3 悪性胸膜中皮腫

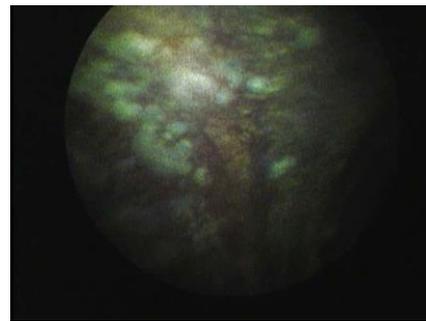


Fig.4 線維性胸膜病変

- ② 肺癌症例のうち、p11以上の症例 (n=4) では、4例とも自家蛍光の減弱による色調の変化が観察可能であった。p10 (n=18) は 2例 (11.1%) で観察可能であったが、2例共、術前、術中診断ではPL1であり、正常組織との境界は不明瞭であった。組織型、悪性度 (Grade) による差は認めなかった。

(3) 研究成果に対する考察と展望

今回施行した胸腔鏡下自家蛍光観察診断の問題点は、診断精度である。問題点は、機器に関する面と病変の違いによる面が考えられる。まず、機器側の問題点であるが、白色観察光に比べて、画像がやや暗調で不鮮明など精度の点が挙げられる。これは、CCDカメラの性能も関与しているが、光源も一つの要因と考えた。本研究は300Wのキセノン光源を用い

て励起光を照射している。励起光はピークが420-450nm 程度の青色光であるが、分光スペクトル解析では400-480nm のばらつきがある。この事が、赤紫の色調よりは病変部位がやや青みがかっているのだと考える。また、観察において光量の少ない事も指摘され、現在LEDを用い、光量の増強と共に、一定の励起光が照射可能な機器を開発中である。また、光学視管に関しては現在、新興光器製作所(SINKO OPTICAL)製を使用しているが、本研究において問題なかった。

病変側の問題点は、診断可能な胸膜浸潤の程度である。胸膜に露出している病変では自家蛍光観察カメラによる色調の変化は高率で確認できたが、肺癌症例における腫瘍本体の描出では胸膜浸潤の程度が問題となる。病理診断のp11以上では自家蛍光の減弱が描出可能であったが、p10症例では自家蛍光減弱の描出は不可能例が多かった。肺癌組織分類における胸膜浸潤 (p1) 因子は重要視され、そのためp10とp11との区別が手術術式も含めた治療方針に重要な意味を持つこと事から、本研究の結果は有用であると考ええる。また、良性悪性の鑑別も問題となる。本研究で観察した悪性病変と線維性肥厚病変や神経原性腫瘍等の良性病変との違いは明確であり、良性病変との鑑別はある程度可能と考える。しかし、IgG4関連疾患の様な炎症性腫瘍では、PET上SUV値が高値である報告もあり⁹⁾、今後、更に検討が必要と考える。

<引用文献>

- 1) Ikeda N, Honda H, Hayashi A, Usuda J, Kato Y, Tsuboi M, et al. **Early detection of bronchial lesions using newly developed videoendoscopy-based autofluorescence bronchoscopy.** Lung Cancer. 2006; 52(1):21-7.
- 2) Cetinkaya E, Veyseller B, Yildirim YS, Aksoy F, Ozgöl MA, et al. **Value of autofluorescence bronchoscopy in patients with laryngeal cancer.** J Laryngol Otol. 2011; 125(2):181-7.
- 3) Wanders LK, East JE, Uitentuis SE, Leeflang MM, Dekker E. **Diagnostic performance of narrowed spectrum endoscopy, autofluorescence imaging, and confocal laser endomicroscopy for optical diagnosis of colonic polyps: a meta-analysis.** Lancet Oncol. 2013; 14(13):1337-47.
- 4) Schomacker KT, Frisoli JK, Compton CC. **Ultraviolet laser-induced fluorescence of colonic tissue: basic biology and diagnostic potential.** Lasers Surg Med. 1992;12:63-78
- 5) Monici M. **Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications.** Biotechnol Annu Rev. 2005; 11: 227-56.
- 6) Lam S, MacAulay C, Hung J, LeRiche J, Profio AE, et al. **Detection of dysplasia and carcinoma in situ with a lung imaging fluorescence endoscope device.** J Thorac Cardiovasc Surg. 1993; 105(6):1035-40.
- 7) Nakanishi K, Ohsaki Y, Kurihara M, Nakao S, Fujita Y, Takeyama K, et al. **Color autofluorescence from cancer lesions: improved detection of central type lung cancer.** Lung Cancer. 200 ; 58(2): 214-9.
- 8) Ohsaki Y, Takeyama K, Nakao S, Tanno S, Toyoshima E et al. **Detection of Photofrin fluorescence from malignant and premalignant lesions in the bronchus using a full-color endoscopic fluorescence**
- 1) Ikeda N, Honda H, Hayashi A, Usuda J, Kato Y, Tsuboi M, et al. **Early detection of bronchial lesions using newly developed videoendoscopy-based autofluorescence**

imaging system: A preliminary report.

Diagnostic Therapeutic Endoscopy. 2001; 7: 187-195

- 9) Kitada M, Matuda Y, Hayashi S, Miyokawa N, Ohsaki Y, et al. **IgG4-related lung disease showing high standardized uptake values on FDG-PET: report of two cases.** J Cardiothorac Surg. 2013 Jun 25; 8: 160.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Kitada M, Ohsaki Y, Matsuda Y, Hayashi S, Ishibashi K. Photodynamic diagnoses of malignant pleural diseases using the autofluorescence imaging system. Ann Thorac Cardiovasc Surg. 2014;20(5):378-82.
- ② Kitada M, Ohsaki Y, Matsuda Y, Hayashi S, Ishibashi K. Photodynamic diagnosis of pleural malignant lesions with a combination of 5-aminolevulinic acid and intrinsic fluorescence observation systems. BMC Cancer. 2015 Mar 25;15:174.
- ③ Masahiro Kitada, Kensuke Yasuda, Kei Ishibashi, Satoshi Hayashi, Yoshinari Matuda, Yoshinobu Ohsaki and Naoyuki Miyokawa. Leiomyoma of the Trachea: a case report **Journal of Cardiothoracic Surgery** 2015, **10**:78
- ④ Kitada M, Yasuda S, Takahashi N, Okazaki S, Ishibashi K, Hayashi S, Ohsaki Y, Miyokawa N. **Non-islet cell**

tumor hypoglycemia caused by

intrathoracic solitary fibrous tumor:

a case report. J Cardiothorac Surg.

2016 Apr 9;11(1):49.

- ⑤ Kitada M, Yasuda S, Nana T, Ishibashi K, Hayashi S, Okazaki S. **Surgical treatment for mediastinal parathyroid adenoma causing primary hyperparathyroidism.** J Cardiothorac Surg. 2016 Apr 7;11(1):44.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 北田正博、アミノレブリン酸 (5-ALA) を用いた胸部悪性疾患に対する光線力学的診断、第 114 回日本外科学会総会、2014 年 4 月 4 日、京都市
- ② 北田正博、アミノレブリン酸 (5-ALA) を用いた胸部悪性疾患に対する光線力学的診断、第 67 回日本胸部外科学会総会、2014 年 10 月 3 日、福岡市
- ③ 北田正博、5ALA と自家蛍光観察システムを併用した肺癌 p1 因子の光学的診断、第 115 回日本外科学会総会、2015 年 4 月 18 日、名古屋市
- ④ 北田正博、Photodynamic diagnosis of pleural malignant lesions with a combination of 5-aminolevulinic acid and autofluorescence Imaging system. 第 68 回日本胸部外科学会総会、2015 年 10 月 18 日、神戸市
- ⑤ 北田正博、胸膜悪性疾患に対する光学的診断と展望、第 36 回日本レーザー医学会総会、2015 年 10 月 25 日、宇都宮市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北田正博 (KITADA Masahiro)、旭川医科大学・医学部・准教授、研究者番号：60332483

(2) 研究分担者

笹嶋 唯博 (SASAJIMA Tadahiro)、旭川医科大学・医学部・名誉教授、研究者番号：20109515

大崎能伸 (OSAKI Yoshinobu)、旭川医科大学・医学部・教授、研究者番号：30191935

林 諭史 (HAYASHI Satoshi)、旭川医科大学・医学部・助教、研究者番号：10363754