

平成 30 年 9 月 15 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461048

研究課題名(和文) Photodynamic diagnosis (PDD) of the detection of colitis-associated tumor by AFE (Autofluorescent endoscopy) using oral 5-ALA (5-aminolevulinic acid) during UC (ulcerative colitis) surveillance

研究課題名(英文) Photodynamic diagnosis (PDD) of the detection of colitis-associated tumor by AFE (Autofluorescent endoscopy) using oral 5-ALA (5-aminolevulinic acid) during UC (ulcerative colitis) surveillance

研究代表者

加藤 智弘 (Kato, Tomohiro)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：40185856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：潰瘍性大腸炎の合併症のうちcolitis-associated cancer and dysplasia (CC/D)は予後に大きく関与する。内視鏡による早期発見が重要であるが、未だに確立された方法はない。すでに動物モデルで腫瘍親和性物質である5-aminolevulinic acid (5-ALA)を利用し腫瘍検出に有用であったことを報告した。そこで本研究では、この5-ALAを使用した蛍光内視鏡(AFE)を行うことによるCC/D発見の有用性について検討したところ、5-ALAを利用したAFE観察がCC/D検出に有用であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Early diagnosis of colitis-associated cancer and dysplasia (CC/D) through surveillance endoscopy is critical in patients with ulcerative colitis (UC). The objective of this study was to investigate the fluorescence signal localization pattern in autofluorescence endoscopy (AFE) following 5-aminolevulinic acid (5-ALA) administration in tumorous lesions diagnosed histopathologically as CC/D, and to evaluate the sensitivity and specificity of detection of tumorous lesions by white light endoscopy (WLE) observation with and without AFE observation. In conclusion, AFE using 5-ALA can detect CC/D lesions in patients with long-standing UC, including some lesions that are not detected with WLE. The results indicated that lesions that could not be detected with WLE could be detected with AFE. In addition, distinctive fluorescence patterns in lesions could allow qualitative diagnosis of the CC/D lesions.

研究分野：消化器内科学

キーワード：ulcerative colitis colitic cancer photodynamic diagnosis 5-aminolevulinic acid 蛍光内視鏡

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis : UC) は原因不明の疾患であり、主に大腸に慢性の炎症を起こす難治性疾患である。しかしながら、近年の生物学製剤を初めとする新たに開発された薬剤により、長期にわたる良好な経過を期待することができる様になった。そのため、UC の長期経過例における慢性の合併症が問題となっている。そのうち、経年的に、発生リスクが高くなる大腸炎関連腫瘍

(colitis-associated cancer or dysplasia : CC/D) が予後に大きく関与する重要な問題となっている。通常の大腸癌と異なり、前癌病変である dysplasia の存在があり、大腸炎関連大腸癌の診断とともに dysplasia を含めた診断も重要とされる。この CC/D の検出を向上させることを目的とした様々な内視鏡画像化技術がこれまでに比較検討されてきた。しかしながら、2014 年に SCENE で報告された最新のガイドラインでも国際的にコンセンサスが得られている手技は、High definition の White light endoscopy (WLE)、及び chromoendoscopy (CE) による内視鏡検査のみとされる。しかし、一方では、Image-enhanced endoscopy (IEE) の一つである NBI (Narrow-band imaging) の有用性や、magnified endoscopy を利用した腺管構造の観察、いわゆる pit-pattern を観察する方法も報告されてきた。しかしながら、手技の煩雑性や習熟性の問題があること、慢性の炎症を背景とした腫瘍であること、従来から行われてきた random biopsy による検出率と比較して、いずれも明らかな advantage を見いだせず、実際の臨床現場で行われているとは言い難い。

Autofluorescence endoscopy (AFE) は IEE の一つであるが、健常組織が持つ自家蛍光が腫瘍組織においては失われることに着目し、その差異を強調してもモニターに描出するし、癌の存在を評価する方法である。WLE では発見しづらい、表面型の大腸腫瘍性病変の検出に有効であるとされる。UC 患者においては、炎症のある粘膜において Autofluorescence が失われることから、粘膜の炎症の評価に利用されてきた。しかしながら、AFE が CC/D の検出に有効であったとする報告はあるものの、粘膜の炎症の状態に大きく影響を受けるために、CC/D の検出は難しく臨床では利用されていない。AFE における陽性所見の多くが、炎症を持つ粘膜が真の腫瘍に類似した画像表示されてしまう、つまり偽陽性像が問題となる。

近年、泌尿器科や脳神経外科の領域では、腫瘍切除の範囲診断として、腫瘍親和性物質を用いた光線力学的診断 (Photodynamic diagnosis : PDD) が臨床で利用されている。UC での CC/D 検出に関しても、PDD の一つである腫瘍親和性物質の 5-Aminolevulinic Acid (5-ALA) を用いた蛍光内視鏡の検討がこれまで報告されている。5-ALA 自体は励起しても fluorescence signal を発しないが、腫瘍細胞内

で 5-ALA が protoporphyrin IX (PpIX) に代謝され蓄積されることで、腫瘍組織内に集積した PpIX の蛍光を観察することで検出可能となる。しかしながら、UC surveillance に 5-ALA を用いた PDD の検討はこれまで極めて限られており、臨床的な有用性や意義に関しては明確ではない。

以前に我々は大腸炎マウスモデルからの腫瘍発生モデルを利用して、5-ALA を投与後の、腫瘍性病変での蛍光シグナルの評価について報告した。病理組織学的に診断される腫瘍の部位に一致して、PpIX の集積と蛍光シグナルが観察されること、さらに癌でない dysplasia と診断される腫瘍の辺縁で、より強い特徴的な蛍光シグナルを認め、有用であることを報告した。

前述の通り、ヒトでの 5-ALA を利用した PDD は限られた報告があるものの、その有用性は様々で一定していない。そこで我々は、UC の長期経過症例に対して、5-ALA を利用した PDD を行い、CC/D 検出の可能性について、その蛍光信号パターンも含めて検討した。

2. 研究の目的

現在、WLE/CE が最もエビデンスのある surveillance であることから、WLE/CE の診断を基本として、WLE / CE では検出できない腫瘍、また検出された病変に対する質的診断の向上の可能性を目的に本研究を計画した。

本研究では、surveillance を行っている UC において、5-ALA を経口投与した後に、従来の WLE/CE で観察、次いで AFE による観察を追加で行い、CC/D 病変の検出能の向上、質的診断の向上の点について検討を行った。なお、動物モデルにおいて、特徴的な蛍光シグナルパターンを示したことから、本研究においてもその蛍光パターンにも着目した。

3. 研究の方法

Patients

研究登録前に全ての患者から書面にてインフォームドコンセントを得た。当院で加療中の 8 年以上の罹患期間で全大腸炎もしくは左側大腸炎型の UC 患者が対象とした。寛解期 UC の定義は Lichtiger index が 5 点未満とした。除外基準は 18 歳未満、凝固機能異常、ポルフィリン症、インフォームドコンセントに同意できない患者とした。5-ALA は一過性の肝酵素上昇を来しうるので、すべての患者で検査開始前と検査後 24 時間で肝酵素の測定を行った。本研究は当院の治験審査委員会 (Institutional Review Board) で承認され UMIN 登録 (UMIN 000021402) を行った。

Endoscopy

すべての患者が 12 時間の絶食の後に、5-ALA (20mg/body weight kg) を内服した。5-ALA 内服 1 時間後より、polyethylene glycol (PEG) による通常の大腸前処置を行った。排便が clean となり、5-ALA 投与により生理的に蛍光を示

す部位（扁桃・乳頭など）での蛍光を確認した後に、内視鏡検査を行った。内視鏡検査には AFE 機能を備えた CF-FH260AZI (Olympus Medical Systems, Tokyo, Japan) を使用した。なお、WLB 観察では CE の併用を含めた。AFE は、白色光が励起光と緑色光に分光され大腸粘膜に照射される。粘膜から励起され発せられた自家蛍光と緑色反射光の画像が、順次、プロセッサで疑似カラー画像に合成処理後に表示される。本研究に先立って、AFE で使用される励起光を用いて PpIX サンプルでの観察では、強い赤色蛍光が発せられることを肉眼的に確認した。しかし、PpIX からの蛍光は肉眼では赤色光であるが、日常臨床で使用される AFE システムではプロセッサ内の処理により、AFE を介したモニターでは強い緑色蛍光として表示された。つまり、5-ALA を用いた AFE 観察では、UC 患者での CC/D は強い緑色光として画像表示されると推定したが、実際には生検サンプルに PpIX に特有な波長を有することをチェックすることで確認した。

実際の操作では、まず WLE により Total colonoscopy を行った後に、盲腸～上行結腸、横行結腸、下行結腸、S 状結腸、直腸の 5 つの segment に区分けして検討した。各 segment で、最初に WLE observation、続いて AFE observation を行い、いずれか一方で疑わしい病変があれば、生検を行い病理組織学的検索を行った。

Histopathological diagnosis

病理診断は消化管病理の専門医 2 名で行われたが、診断が一致しない場合には discussion により決定した。病理組織診断は Vienna criteria に基づいて分類された。本研究では Non-invasive low grade neoplasia (adenoma/dysplasia)、non-invasive high grade neoplasia (high grade adenoma/dysplasia, non-invasive carcinoma and suspicion of invasive carcinoma)、invasive neoplasia (intramucosal carcinoma, submucosal carcinoma or beyond) を neoplasia と定義した。Indefinite for neoplasia/dysplasia なる場合には neoplasia として扱わないこととした。また、散在性腺腫と CC/D の鑑別困難症例では、病変を含めて周囲組織の p-53 免疫染色を追加して判断した。内視鏡的治療や全大腸切除術で検体が得られた場合は、この検体を用いて HGIN や腺癌の最終診断を行った。

Statistical analysis

本研究の目的は、白色光観察に 5-ALA を用いた AFE を併用することの有用性、並びに AFE 施行時の PpIX の蛍光パターンの検討である。このため、白色光観察にて同定された病変を全病変とし、その病変のなかで 5-ALA を用いた AFE 時の蛍光パターンと蛍光の有無を検討した。

この研究において CC/D の見落としがないこ

とを以下のように確認した。全大腸切除症例では切除検体を肉眼的に観察し、非手術例においては少なくとも 1 年後に経過観察の内視鏡検査を行い CC/D の見落としがないことを確認した。

4-1. 研究成果

以下、5-ALA を使用した AFE 観察を単に「AFE 観察」と略す。

Patient characteristics

11 名の患者に対して合計 13 回の内視鏡検査を施行した。男性 8 名、女性 3 名、年齢の分布は内視鏡検査施行時で 41-81 歳だった。UC 罹患期間は 8-27 年で平均罹患期間は 12 年だった。7 名が全大腸炎で、それ以外は左側大腸炎型だった。内視鏡施行時の 11 名の患者の治療内容は、5 名が 5-ASA、3 名が 5-ASA と AZA、2 名が 5-ASA と PSL、1 名のみが無治療で経過観察されていた。本研究への登録前に、全 UC 患者が臨床的寛解 (clinical activity index (CAI) である Lichtiger index が 5 点未満) であることを確認した。しかし、内視鏡検査施行時に全症例のうち 1 名のみが活動期であった (CAI が 6 点)。その他の全患者は CAI が 0-1 点で臨床的寛解であった。

Detection of CC/D with WLE and AFE using oral 5-ALA administration

WLE と AFE 観察で合計 68 病変が検出され、生検が行われた。うち 63 病変は WLE で検出された。WLE 観察のみでは 63 病変のうち 11 病変 (17%) が腫瘍性変化であったが、CE を併用すると、CC/D の 12 病変のうち 11 病変が検出可能であった。一方、別の 5 病変は WLE では不明であったが、AFE で検出された。AFE 観察で検出された 12 病変のうち、7 病変は WLE 観察でも指摘可能であった。従って、WLE と AFE による CC/D 検出能の感度は 36% で、特異度は 94% であった。陽性的中率は 57%、陰性的中率は 87% であった。

5-ALA の副作用は発生しなかった。

AFE fluorescence patterns and histopathological findings of tumorous lesions

AFE で強い緑色の蛍光シグナルを示した 12 病変のうち、5 病変は組織学的に CC/D であった。内訳は、High-grade dysplasia (HGD) 1 病変、Low-grade dysplasia (LGD) 1 病変、Low-grade tubular adenoma 2 病変、Adenocarcinoma 1 病変であった。また、蛍光パターンは 3 種類あった。

辺縁に強い蛍光を示す隆起性病変；WLE/CE 観察では数 mm 程度の隆起性病変であったが、病変の辺縁に強い緑色の蛍光を示した。生検組織では p53 陽性の LGD であった

(Figure 1a,b)。

Figure 1a

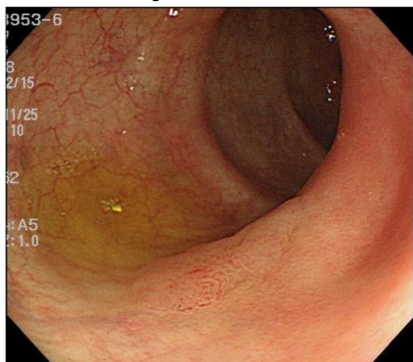
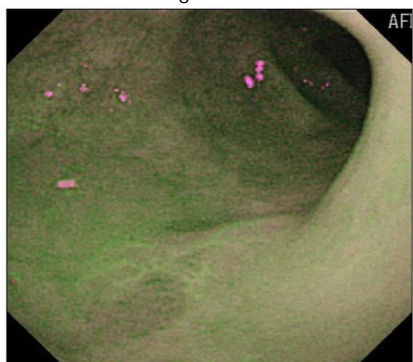


Figure 1b



全体に強い蛍光を有する隆起性病変；15 mm 大の隆起性病変で，NBI 併用拡大内視鏡では不規則な微小血管を示す分葉状の病変であったが，全体に，しかし不均一な強い緑色の蛍光信号を示した．生検からの病理組織では adenocarcinomas であった (Figure 2a, b)．

Figure 2a

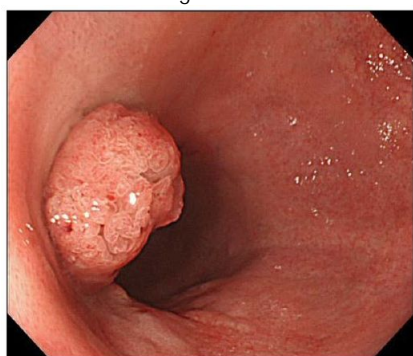
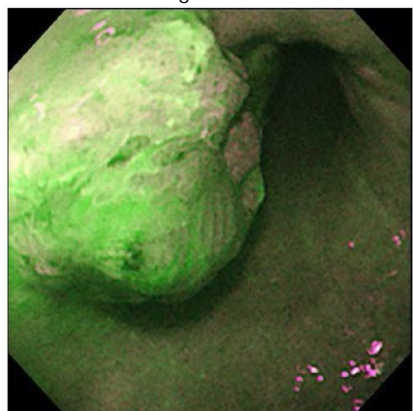


Figure 2b

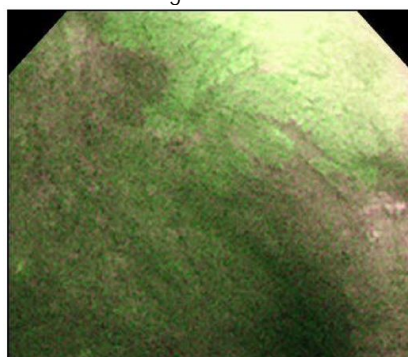


WLE/CE では検出出来ない，強い蛍光信号を示す病変；WLE/CE 観察では指摘できなかったが，AFI 観察で強い緑色の蛍光信号を有する漁期を認めた．生検検査では，p53 陽性の HGD であった (Figure 3a, b) ．

Figure 3a



Figure 3b



4 - 2 . 研究成果

現在，CC/D の検出で最も信頼性が高く，基本となる内視鏡観察である，白色光観察と色素内視鏡による内視鏡観察に加えて，5-ALA による蛍光内視鏡を行うことで，CC/D の質的診断の診断能が上がる可能性がある．

白色光内視鏡・色素内視鏡による観察では検出が極めて困難な形態を示す CC/D の検出が，5-ALA を用いた蛍光内視鏡で拾い上げることができる可能性が示された．

5-ALA は内服可能であり，蛍光内視鏡はボタン一つで（通常光からの）切替が可能な検査手技であり，本法は非常に簡便に行えることから，潰瘍性大腸炎の長期経過における重要な合併症である CC/D の検出に非常に有意義な検査手段であることが示された．今後，多施設での前向き検討による，さらに客観的な評価が行われることが期待される．

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)

岩崎 哲良, 加藤 智弘, 他．潰瘍性大腸炎関連腫瘍の検出に対する、腫瘍親和性物質を用いた光線力学的診断． Prog Dig Endosc

〔学会発表〕(計3件)

加藤智弘,筒井佳苗,西村尚,澤田亮一,岩崎哲良,井出大資,菰池信彦,猿田雅之,松岡美佳,有廣誠二,田尻久雄.「潰瘍性大腸炎の長期経過例における腫瘍性病変の検出に対するALAを用いた蛍光内視鏡の有用性の検討」第98回日本化器内視鏡学会関東地方会.平成26年12月.東京.

Tetsuyoshi Iwasaki, Tomohiro Kato, Nobuhiko Komoike, Ryouichi Sawada, Daisuke Ide, Jimi Mitobe, Makoto Mitsunaga, Masayuki Saruta, Mika Matsuoka, Seiji Arihiro, Hisao Tajiri. Visualization of endoscopically undetectable dysplasia in patients with ulcerative colitis following sensitization with oral 5-aminolevulinic acid. Digestive Disease Week (DDW). Washington DC, 2015.

小川まい子,加藤智弘,宮崎亮佑,野口正朗,伊藤公博,筒井佳苗,澤田亮一,中尾裕,三戸部慈実,光永真人,松岡美佳,猿田雅之.「潰瘍性大腸炎関連腫瘍の検出に対する腫瘍親和性物質を用いた光線力学的診断」.第34回日本大腸検査学会総会(東京).平成28年10月.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 智弘 (Kato, Tomohiro)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：40185856