

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10062

研究課題名(和文)5-ALAによる新しいセンチネルリンパ節転移・断端診断法の開発

研究課題名(英文)Development of New Diagnostic Method of Sentinel Lymph Nodes Using 5-Aminolevulinic Acid in Breast Cancer Patients.

研究代表者

阪口 晃一 (Sakaguchi, Koichi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00405284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：10例の早期乳がんの手術患者が本研究に登録された。手術前3時間に5-ALAを経口投与した。25個のセンチネルリンパ節に対して蛍光イメージング、術中凍結切片診断、組織病理学的診断、および統計解析を行った。5-ALA投与に伴う明らかな副作用は認めなかった。転移リンパ節におけるPpIXの蛍光強度は、非転移リンパ節よりも大きかった。術中凍結切片診断および組織病理学的診断の両方に対して90%以上の感度を得ることができ、偽陰性率は5%未満であった。この結果は、5-ALAによって誘導されるPpIX蛍光測定が早期乳癌患者のセンチネルリンパ節生検における転移診断に寄与する可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：A total of 10 surgery patients with early breast cancer were enrolled in this study. After 5-ALA was applied orally 3 h prior to surgery, 25 SLNs were subjected to spectral fluorescence imaging, intraoperative frozen section diagnosis, histopathological diagnosis, and statistical analysis was performed. No apparent side effect associated with 5-ALA administration was observed. The spectral fluorescence intensity of PpIX in metastatic SLNs was greater than that in nonmetastatic SLNs. This photodynamic method was able to obtain sensitivity of over 90% and a false negative rate of less than 5% accuracy comparison to both intraoperative frozen section diagnosis and histopathological diagnosis. Our results show the potential of 5-ALA-induced PpIX fluorescence processed by photodynamic technique for detecting metastases in SLNs from patients with breast cancer, suggesting that this rapid and feasible method can be applicable to diagnosis of resected SLN samples in pathology laboratories.

研究分野：乳腺外科

キーワード：早期乳癌 センチネルリンパ節 5-ALA PpIX

### 1. 研究開始当初の背景

近年早期乳癌の発見が増加しており、なかでも社会的役割の重要な年齢層の女性が多く罹患している。このような状況において後遺症が少なく低侵襲な手術が望まれる。特に腋窩リンパ節郭清後にはリンパ浮腫をきたす場合があり、根治不能な症例もしばしば経験する。このような点から乳癌領域においてはより手術侵襲の少ない乳房温存手術（乳房部分切除術）やセンチネルリンパ節生検が現在一般的となっている。切除乳腺の断端検索およびセンチネルリンパ節の転移診断に当たっては術中迅速病理診断が必要となる。この診断は病理医が行うが、実際には病理医の勤務する施設は多くないのが現状である。

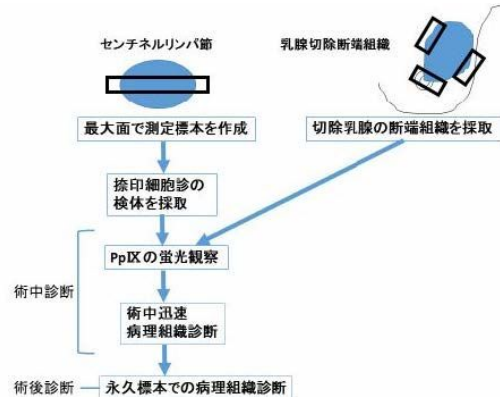
### 2. 研究の目的

リンパ節中のサイトケラチン 19(CK19) mRNA を検出することで転移の有無を診断する OSNA 法 (One-step Nucleic acid Amplification) が開発され、病理医が不在の場合でも術中転移診断が可能となっているが、ここにも解決されない問題を内包している。まず CK19 の発現のない乳癌が全体の 4-5% に存在することがわかっており、その症例においては OSNA 法で偽陰性となる可能性がある。また正確な診断のためにはリンパ節全体を可溶化し検体として使用する必要があるため、リンパ節の病理組織学的検索が行えないこと、まれに機器のトラブルなどがあった場合には診断ができないケースも存在することが挙げられる。本研究では 5-ALA を乳癌手術に応用し、切除乳腺の断端やセンチネルリンパ節への protoporphyrin の集積の有無を、蛍光を術中に観察することにより判定し、これにより断端検索・転移診断を行うことが可能になると考えられる。これが実現すれば病理医が不在の状況でも、OSNA 法より簡便かつ短時間で診断が可能となり、また同検体を用いて事後に病理組織学的検索を行うこともできる。

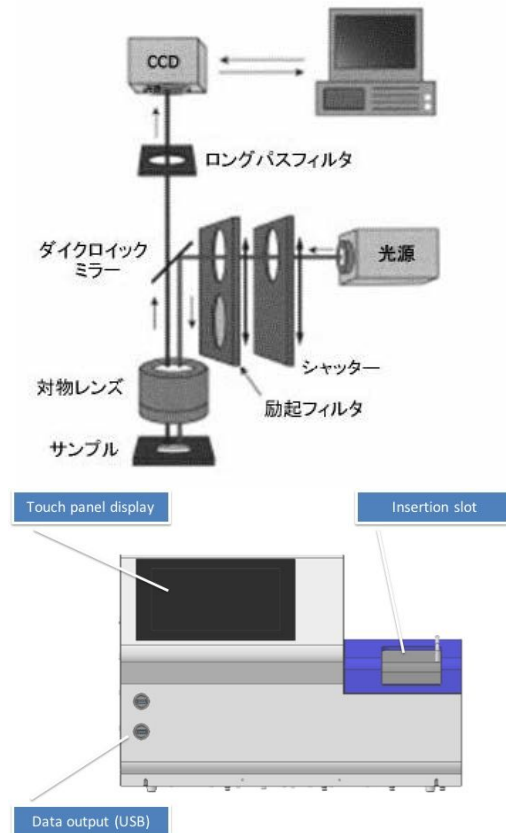
### 3. 研究の方法

術前に腋窩リンパ節転移陰性と診断された乳癌患者に対し、アミノレブリン酸塩酸塩として 20mg/kg を手術時の麻酔導入前 2~4 時間に経口投与する。摘出されたセンチネルリンパ節の最大面で測定標本を作成して、まず捺印細胞診の検体を採取する。これは転移診断を行う検体を担保しておき、万が一以下の操作の過程で標本が使用されて無くなった場合に用いるためである。次に Pp の蛍光観察により術中に転移診断を行う。観察機器としてカラー CCD 搭載の顕微鏡システム（ウシオ電機社製蛍光顕微鏡システム）を使用する（図 2）。続いて同標本を凍結し、これにより術中迅速病理組織診断を行う。術後に永久標本を作製し、病理組織診断を行う。Pp の蛍光観察による転移診断と、凍結切片および永久標本による病理組織診断について、正診

率・偽陽性率・偽陰性率を比較検討する。また乳房部分切除検体について、切除乳腺の断端組織を採取し、術中にウシオ電機社製蛍光顕微鏡システムを使用して Pp 蛍光観察を行い、腫瘍の露出の有無を確認する。



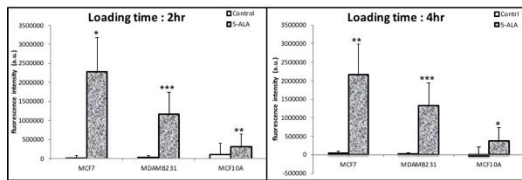
続いてセンチネルリンパ節の場合と同様に同標本を凍結し、これにより術中迅速病理組織診断を行い、さらに術後に永久標本を作製し、病理組織診断を行う。Pp の蛍光観察による断端評価と、凍結切片および永久標本による病理組織診断について、正診率・偽陽性率・偽陰性率を比較検討する。



### 4. 研究成果

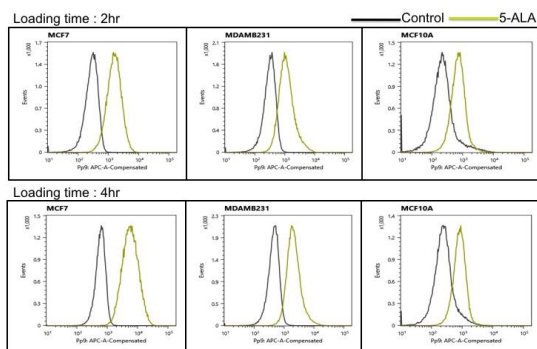
前臨床の研究として In vitro で乳癌細胞株 MCF7, MDA-MB-231 と非癌細胞株 MCF10A を用いて 5-ALA 負荷による Pp 蛍光を確認したところ、癌細胞株と非癌細胞株で蛍光強度の差を認め、臨床応用できる可能性があることを確認した。

Mean fluorescence intensity  
by confocal fluorescence microscope.



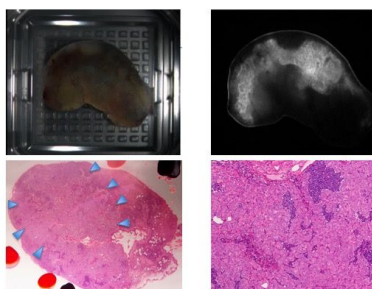
\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, unpaired t test

5-ALA-PpIX histograms of each cell lines by flow cytometry.

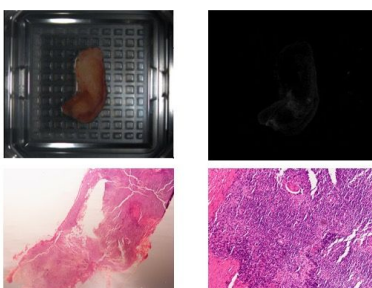


10 例の早期乳がんの手術患者が本研究に登録された。手術前3時間に5-ALAを経口投与した。25個のセンチネルリンパ節に対して蛍光イメージング、術中凍結切片診断、組織病理学的診断、および統計解析を行った。5-ALA投与に伴う明らかな副作用は認めなかった。転移リンパ節におけるPpIXの蛍光強度は、非転移リンパ節よりも大きかった。

### Positive LN

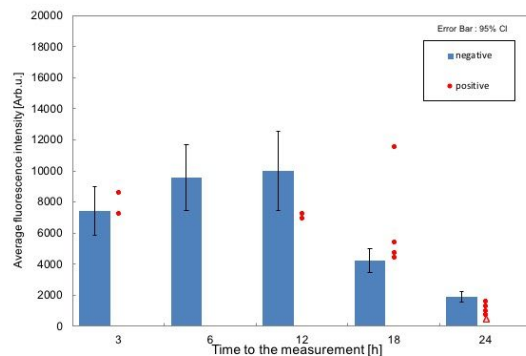


### Negative LN



術中凍結切片診断および組織病理学的診断の両方に対して90%以上の感度を得ることができ、偽陰性率は5%未満であった。この結果は、5-ALAによって誘導されるPpIX蛍光測定が早期乳癌患者のセンチネルリンパ節生検における転移診断に寄与する可能性を示している。

### Fluorescence intensity and measurement time



### 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0件)

〔学会発表〕(計3件)

阪口晃二, 大内佳美, 森田翠, 井口英理佳, 西田真衣子, 大西美重, 莊子万理, 中務克彦, 藤田佳史, 田口哲也 「5-ALAによる乳癌センチネルリンパ節の転移診断法の開発」第116回日本外科学会, SY-10-3, 2016

阪口晃二, 井口英理佳, 西田真衣子, 大西美重, 莊子万理, 森田翠, 大内佳美, 中務克彦, 田口哲也 「5-ALAによる乳癌センチネルリンパ節の転移診断法の開発」第24回日本乳癌学会, DP-1-38-1, 2016

森田翠, 阪口晃二, 田口哲也 「5-ALAによる蛍光診断を用いた新たな腋窩リンパ節転移診断技術の開発」第19回SNNS研究会学術集会, 2017

〔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

阪口 晃一 (SAKAGUCHI, Koichi)  
京都府立医科大学医学研究科 講師  
研究者番号：00405284

(2) 研究分担者

田口 哲也 (TAGUCHI, Tetsuya)  
京都府立医科大学医学研究科 教授  
研究者番号：80243260

原田 義規 (HARADA, Yoshinori)  
京都府立医科大学医学研究科 准教授  
研究者番号：10381956

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )