

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08775

研究課題名(和文) 癌の蛍光診断を応用した肺癌胸膜浸潤とリンパ節転移に対する新たな低侵襲診断法の開発

研究課題名(英文) Study of new minimally invasive diagnostic method for pleural invasion and lymph node metastasis of lung cancer using fluorescent diagnosis.

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) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：胸膜悪性病変に対する光感受性物質の5ALA(5-aminolevulinic acid)と自家蛍光を併用した低侵襲な光学的診断開発を行った。経口摂取した5ALAは、ヘムの前駆体であるProtoporphyrin IXに代謝され悪性細胞内に留まり、630nm程度の赤色蛍光を呈する事象を利用した。肺癌胸膜浸潤診断はpI0かpI1以上に対する感度は、肺腺癌に限ると感度93.9%、特異度74.3%であった。蛍光観察可能なpI0の88.9%が術前PL1と診断した症例であった。胸膜近傍で胸膜浸潤を疑う腫瘍性病変に対する高精度な局在診断と胸膜浸潤の有無の診断が可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌術後の早期再発に、術前の画像診断や術中の可視診断では見逃す可能性がある微小な胸膜播種性病変が関与していると考えられ、確実かつ客観的な評価、診断システムの開発が希求されてきた。我々は、正常組織が放つ緑色自家蛍光と悪性腫瘍組織で起きる色調の変化を観察する低侵襲な光学的診断を、独自の観察システムを用い研究してきた。本研究結果により、肺癌の進行度に関与する胸膜浸潤因子の診断に関して、従来の画像診断を補完する事が可能であり、更に、より進行したStage である肺癌胸膜播種性病変の診断に活用可能と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We have developed a minimally invasive optical diagnosis using 5ALA (5-aminolevulinic acid) for pleural malignant lesions, and autofluorescence imaging system. Orally ingested 5ALA was metabolized to Protoporphyrin IX, which is a precursor of heme, and stayed in malignant cells, utilizing the event of exhibiting red fluorescence at about 630 nm. The sensitivity of lung cancer pleural infiltration diagnosis to pI0 or pI1 or higher was 93.9% and specificity 74.3% only for lung adenocarcinoma. It was possible to perform highly accurate localization diagnosis and diagnosis of the presence or absence of pleural infiltration for neoplastic lesions suspected of being pleural infiltration near the pleura.

研究分野：胸部外科

キーワード：光学的診断 自家蛍光 アミノレブリン酸 肺癌 胸膜播種性病変 悪性胸膜中皮腫

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 肺癌術後胸腔内再発の一因と考えられる微小播種性病変 (intrathoracic small dissemination) や小さな転移性肺腫瘍、早期の悪性胸膜中皮腫 (malignant pleural mesothelioma) などの胸膜悪性病変に対する現行の CT, MRI 等による画像診断や、手術時の可視による診断には限界があり、精度の高い評価、診断法が希求されてきた。高精度の胸膜播種診断が不要な肺葉切除を避ける判断となり、肺癌の胸膜浸潤因子の有無診断が縮小手術の可否を含めた適応指標になるものと考え。我々は、自家蛍光 (autofluorescence) に着目し、新たな光線力学的診断法 (Photodynamic diagnosis; PDD) の研究を行ってきた<sup>1)2)</sup>。更なる精度向上のために光感受性物質 (photosensitizer) である 5ALA (アミノレブリン酸) に注目した。体外より摂取した 5ALA は、ヘムの前駆体である Protoporphyrin に代謝され悪性細胞内に留まり、630nm 程度の赤色～ピンク色の発光作用を呈する。現在、脳腫瘍等の脳神経外科領域や膀胱癌等の泌尿器科領域では保険適応となっているが、胸腹部臓器では未だ研究段階である。本研究は低侵襲かつ高精度局在診断法確立を目的に、5ALA と自家蛍光観察システムを用いた胸膜悪性病変の観察、解析を行った。

(2) 自家蛍光観察システムについて: 自家蛍光とは、ミトコンドリアやリソソームなどの生物学的構造が光を吸収した際に起こる光の自然放出である。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) 等が報告されている<sup>3)</sup>。正常組織では、400～450nm 程度の青色励起光 (blue excitation ray) 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や、発生する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、気管支内視鏡分野で応用されている。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。本研究で使用した自家蛍光観察システムには Flovel 社製の蛍光診断用高感度 HbCMOS ハイビジョンカラーカメラを使用、これにアタッチメントを利用して胸腔鏡を装着した。光源は 405nm の励起光を安定供給可能な LED 光源 (SBI ファーマ社製) を使用した。

(3) 5ALA について: 5ALA はポルフィリン合成経路の出発物質であり、生体内の天然アミノ酸である。ミトコンドリアにおいて Glycine と Succinyl CoA から合成される内因性のアミノ酸であり、ヘモグロビンの前駆体である。体外から 5ALA が入ると、正常細胞内ではヘムに速やかに代謝されるが、癌細胞は Porphobilinogen deaminase (PBGD) 酵素活性が高く、ferrochelatase (FECH) 酵素活性が低いため、蛍光物質である Protoporphyrin IX (PpIX) が選択的に蓄積される。そのため、悪性腫瘍部位では 630nm 前後の赤色蛍光を発するという性質を利用した。

## 2. 研究の目的

5ALA を術前に経口投与後、自家蛍光観察システムを用いた悪性病変の観察を行い正常組織が発する自家蛍光との色調の差により、胸膜悪性病変や肺癌胸膜浸潤因子 (pl 因子) に対する高精度診断

法の確立を目的とした。

### 3. 研究の方法

2017年1月より2019年4月までに行った呼吸器外科手術の内、同意を頂いた症例を対象に施行した。内訳は胸膜浸潤が疑われる肺癌82例(腺癌50例、扁平上皮癌22例、線扁平上皮癌3例、大細胞癌4例、小細胞癌2例、多形癌1例)、転移性肺腫瘍32例、悪性胸膜中皮腫7例、胸腔内良性疾患9例の合計131例に対し本手技を施行した。肺癌症例では、pI0: 65例、pI1: 7例、pI2: 9例であった。手術開始3-4時間前に20mg/kgの5ALAを経口投与し、手術開始直後に自家蛍光観察システムを装着した胸腔鏡を用いて、胸腔内の観察を行った。本研究は旭川医科大学倫理委員会の承認を得ており、各症例に対しては手術施行前にinformed consentを取得した。5ALAの一部はSBIファーマ社より提供を受けた。

### 4. 研究成果

5ALA内服により軽度の嘔気を3例に認めた他、光線過敏症を含め重篤な有害事象は認めなかった。

- (1) 胸膜悪性病変の描出状態: 白色光では差が不明瞭である病変も、自家蛍光観察カメラでは周囲正常組織で発生する緑色自家蛍光と対比し、明瞭な赤色蛍光色の腫瘍部位が描出された。また、胸膜に存在する転移性肺腫瘍も同様の描出を示す例が多かった。良性病変全例で色調変化を認めた例は無かった。膵臓癌多発肺転移(Fig.1)、胸膜腫瘤病変葉確認されなかった胸水に対する審査胸腔鏡で発見された早期の悪性胸膜中皮例(Fig.2)を提示する。
- (2) 肺癌胸膜浸潤因子: 術前CT診断との一致度は69.5%であった。本手技の全肺癌症例に対する結果は、pI0かpI1以上(pI1 pI2)症例に対する本法の感度は81.0%、特異度62.5%、陽性的中率52.3%、陰性的中率87.5%であった。しかし、腺癌に限ると感度は93.9%、特異度74.3%、陽性的中率60.8%、陰性的中率96.2%であり、特に腺癌でのpI診断に有用と考えられた( $p=0.00234$ )。陽性的中率が低いのは、pI0でも蛍光観察可能であった例が多かった影響であるが、その88.9%が術前PL1と診断された症例、すなわち病的にpI0であり、腫瘍が胸膜に接していた症例であった。本手技は、末梢肺癌で有効性を示すと考えるので、胸膜に接し、胸膜浸潤がある、または疑う肺腺癌病変に対して浸潤度診断が有効である可能性が示唆された。
- (3) 胸膜播種病変: 原発性肺癌手術例82例中6例に胸膜播種病変を認め、術中病理診断でM1aと診断された。全て、術前画像診断でM0と診断された症例であった。6例中、白色光で病変が可視確認困難で、本手技で観察された赤色蛍光で診断された例が2例あった。Fig3にT2N1M0で紹介され、本法で播種と診断された腺癌症例を示す。M1aと診断された症例は手術中断、術後、各種の薬物療法を施行した



Fig.1

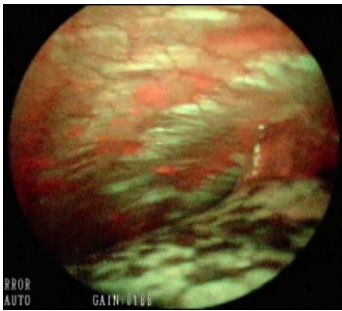


Fig.2



Fig.3

#### (4) 研究成果に対する考察と展望

胸膜悪性病変の診断は、がんの進行度診断やそれに基づく治療戦略を立てる上で、局在診断の他、肺癌早期再発の一因となる微小播種性病変の診断や肺癌胸膜浸潤因子の診断などが重要である。また、治療法が確立されておらず予後不良である悪性胸膜中皮腫の早期局在診断においても同様である。しかし、従来の CT, MRI, PET 等の画像診断や審査胸腔鏡による可視診断だけでは限界があり、より高精度な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、気管支内視鏡の光学的診断が精度向上に寄与するか否かを検討してきた。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領域で広く施行されているが、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<sup>4)</sup>。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てきた<sup>1)</sup>。しかし、自家蛍光のみの局在診断では、鮮明さに欠け

る、境界が不明瞭、血液や反射光の影響を受けるなどの問題点の他、更に精度を高めるには、何より腫瘍自体の色調を上げる目的でアミノレブリン酸(5ALA)を使用した。5ALA を利用した光学的診断(PDD)は、脳腫瘍や膀胱癌、前立腺癌等の泌尿器科領域悪性腫瘍の局在診断への応用の報告があり、胸腔内病変に診断への応用の報告があり、胸腔内病変においても研究が進められてきた。胸腔内悪性病変の診断では、胸膜面に露出している場合は診断が可能であり、肺癌微小播腫や微小転移性腫瘍の発見と局在診断に有効であると考え。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。

肺癌において、組織所見の pI 因子は病期進行度に関わる因子である。肺のリンパ流は気管支や肺動脈に沿った流れの他に、胸膜に沿った流れもある事から、胸膜浸潤因子は予後決定因子の一つであり、特に pI2 症例は胸膜播種が発生している可能性もある。肺癌に対する標準手術は、肺葉切除と縦郭リンパ郭清であるが、2.0cm 小型肺癌に対する積極的縮小手術、いわゆる区域切除術を施行する機会も増加してきた。しかし、胸膜浸潤陽性例は T 因子が上がり、胸膜播種の可能性が高くなることから、胸膜浸潤因子も含めた肺癌局在診断は、区域切除等の縮小手術術式を決定する因子となると考え、その光学的診断についても数少ないが報告されている<sup>5)</sup>。今回の結果では、特に末梢肺癌において、pI1 以上の診断(感度)については良好であったが、pI0 でも光学的診断が陽性になる例も少なくなく、特異度は低い傾向にあった。今後、波長や輝度の解析も含めて検討すべき件と考えられた。

#### < 引用文献 >

- 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) Wanders LK, East JE, Uitentuis SE, et al. **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) KLiman ST, Elicora A, Topcu S, et al. **Value of autofluorescence in video-assisted thoracoscopic surgery in pleural diseases.** Thorac Cardiovasc Surg. 2013; 61(4):350-6.
- 5) Kitada M, Ohsaki Y, Yasuda S, et al. **Photodynamic diagnosis of visceral pleural invasion of lung cancer with a combination of 5-aminolevulinic acid and autofluorescence observation systems.** Photodiagnosis Photodyn Ther. 2017; 20. 10-15

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kitada M, Yasuda S, Abe M, et al	4. 巻 17
2. 論文標題 Solitary fibrous tumor of the trachea: a case report.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gen Thorac Cardiovasc Surg	6. 最初と最後の頁 open access
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11748-019-01274-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北田正博、大崎能伸、安田俊輔、その他
2. 発表標題 光線力学的手法を用いた肺癌胸膜播種病変に対する診断
3. 学会等名 第119回 日本外科学会総会（口演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 北田正博、大崎能伸、安田俊輔、その他
2. 発表標題 5ALA と自家蛍光観察システムを用いた胸部悪性病変の光学的同定診断
3. 学会等名 第42回日本呼吸器内視鏡学会（ワークショップ）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 北田正博、大崎能伸、安田俊輔、その他
2. 発表標題 5ALA と自家蛍光観察システムを併用した胸部悪性病変の光学的診断
3. 学会等名 第29回日本光線力学学会（口演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 北田正博、大崎能伸、安田俊輔、その他
2. 発表標題 Photodynamic diagnosis using 5-Aminolevulinic acid and autofluorescence imaging system of Pleural dissemination of lung cancer
3. 学会等名 第72回日本胸部外科学会（口演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 北田正博、大崎能伸、安田俊輔、その他
2. 発表標題 5ALA と自家蛍光観察システムを併用した胸膜播種性病変に対する光線力学的診断
3. 学会等名 第81回日本臨床外科学会（シンポジウム）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 北田正博、大崎能伸、安田俊輔、その他
2. 発表標題 5ALA と自家蛍光観察システムを併用した胸膜播種性病変に対する光線力学的診断
3. 学会等名 第40回日本レーザー医学会（シンポジウム）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 北田正博
2. 発表標題 5ALA と自家蛍光観察システムを併用した肺癌胸膜浸潤因子に対する光線力学的診断
3. 学会等名 日本外科学会総会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 北田正博
2. 発表標題 アミノレブリン酸（5ALA）と自家蛍光観察システムを併用した胸部悪性病変の光学的診断
3. 学会等名 日本呼吸器内視鏡学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Masahiro kitada
2. 発表標題 Minimal invasive diagnosis of pleural malignant lesions using photodynamic method
3. 学会等名 The Japanese Association for Thoracic Surgery H30.10.5
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 北田正博
2. 発表標題 5ALAと自家蛍光観察システムを用いた胸膜悪性腫瘍に対する光学的診断の研究
3. 学会等名 日本気管食道科学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 北田正博
2. 発表標題 アミノレブリン酸（5ALA）と自家蛍光観察システムを併用した肺癌胸膜播種（M1a）に対する光学的診断
3. 学会等名 日本肺癌学会
4. 発表年 2018年～2019年



1. 発表者名 北田正博
2. 発表標題 アミノレブリン酸（5ALA）と自家蛍光を併用した胸膜悪性病変に対する胸腔鏡下局在診断
3. 学会等名 日本内視鏡外科学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 北田正博
2. 発表標題 悪性腫瘍に対するアミノレブリン酸（5ALA）併用光学的診断法のSNNSへの応用
3. 学会等名 SNNS研究会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 北田正博
2. 発表標題 胸膜悪性腫瘍に対する光学的診断の研究
3. 学会等名 日本レーザー学会研究会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 北田正博
2. 発表標題 5ALA と自家蛍光観察システムを併用した肺癌胸膜浸潤に対する光線力学的診断
3. 学会等名 日本医工学治療学会
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大崎 能伸  (Osaki Yoshinobu)  (30191935)	旭川医科大学・大学病院・客員教授   (10107)	
研究分担者	佐々木 高明  (Sasaki Takaaki)  (70516997)	旭川医科大学・医学部・助教   (10107)	
研究分担者	石橋 佳  (Ishibashi Kei)  (80646076)	旭川医科大学・医学部・客員助教   (10107)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------