

平成 30 年 5 月 3 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10251

研究課題名(和文) 光線力学的手法を応用した胸部悪性病変とリンパ節転移に対する新たな診断法の開発

研究課題名(英文) Development of new diagnostic method for chest malignant lesions and lymph node metastasis using photodynamic method

研究代表者

北田 正博 (Kitada, Nasahiro)

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)：光感受性物質のアミノレブリン酸を併用した胸腔内悪性病変に対する局在診断法の開発を行った。アミノレブリン酸は代謝され悪性細胞で赤色蛍光を呈する。自家蛍光観察システムを用い、正常組織の緑色自家蛍光との色調差で局在診断を行った。胸膜面に存在している悪性病変では、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、明瞭な境界線を示したピンク色の腫瘍部位が描出された。原発性肺癌症例で赤色光が確認可能であったのは、p11-p13症例は100%の描出、p10症例は27.7%であり、全例PL1症例であった。今後、精度の高い悪性病変の局在診断により、光線力学治療にも応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have developed a new diagnostic method using the photosensitizer 5-aminolevulinic acid (5ALA) for diagnosing intrathoracic malignant lesions. When ingested exogenously, 5ALA is metabolized to a heme precursor, protoporphyrin IX, which stays in malignant cells and emits red to pink luminescence of about 630 nm. Malignant lesions on the pleural surface emitted pink autofluorescence in contrast to the green autofluorescence of the surrounding normal tissues observed by an autofluorescence imaging system. When 28 patients with primary lung cancer were examined according to the degree of pleural infiltration (pI), red fluorescence was confirmed in 100% with p11-p13 and 27.7% with p10. The latter 5 patients had been diagnosed with PL1 preoperatively or intraoperatively. This system achieved accurate localization of malignant lesions, suggesting that it may also be applicable to photodynamic therapy.

研究分野：胸部外科学

キーワード：胸部悪性腫瘍 肺癌 胸膜腫瘍 光線力学的診断 アミノレブリン酸

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) や早期の悪性胸膜中皮腫 (malignant pleural mesothelioma) に対し、CT、MRI、PET 等の画像診断や、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いる。我々は、自家蛍光 (autofluorescence) に着目し、自家蛍光観察システムを使用した新たな光線力学的診断法 (Photodynamic diagnosis; **PDD**) の研究を行ったが、病変の描出や、正常と悪性病変の境界が不鮮明であり、更なる精度向上を目指してきた¹⁾²⁾。そこで、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 (photogenesis) を呈する。現在、脳腫瘍等の脳神経外科領域、膀胱癌、前立腺癌等の泌尿器科領域でその研究がなされている。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、精度の高い局在診断法の研究を行った。

(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。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は、従来から使用している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)³⁾ を改良し、小型 CCD カメラを装着、白色光観察、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て胸腔鏡を装着した。また、420nm をピークの中心とした励起光を照射可能な LED 光源を使用した。

(3) 5ALA について：5ALA は 5 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) 活性が高く、ferrochelatase (FECH) の活性が低いいため、蛍光物質である Protoporphyrin IX (PpIX) が選択的に蓄積される。そのため、630nm 前後の赤色～ピンク色の蛍光を発する。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。

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

対象は、2015年7月より2016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。肺癌28例、転移性肺腫瘍12例、悪性胸膜中脾腫2例の合計42例に対して本手技を施行した。肺癌症例では、p10: 18例、p11: 3例、p12: 3例、p13: 4例であった。手術開始3-4時間前に15~20/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、12mmポート孔より胸腔内の観察を行った。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、405nmを中心とする励起光が照射可能なLEDを使用した。

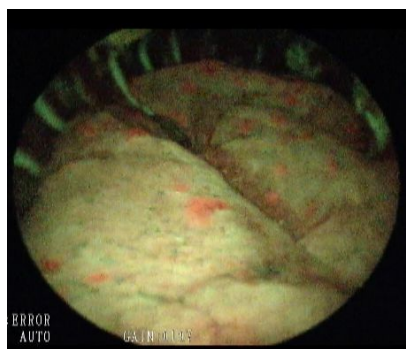
4. 研究成果

(1) 病変の描出状況：

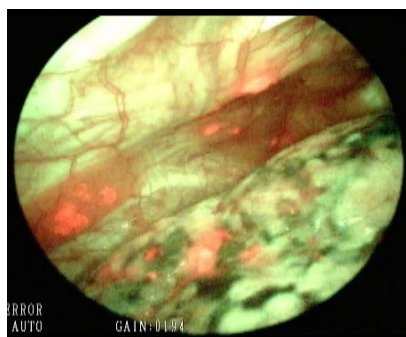
5ALA内服による有害事象発生例は認めなかった。描出状態：白色光では差が不明瞭である病変も、自家蛍光観察カメラでは周囲正常組織で発生する緑色自家蛍光と対比し、明瞭な境界線を示したピンク色の腫瘍部位が描出された。また、転移性肺腫瘍でも同様の描出を示す例が多かった。明確な腫瘍の境界線が描出された子宮癌の胸膜再発例（Fig.1）、膀胱癌肺転移（Fig.2）を提示する。また、術前T2N0の診断で手術開始するも、本システムにより蛍光赤色を呈した播種性病変が発見された例も提示する（Fig.3）。



(Fig.1)



(Fig.2)

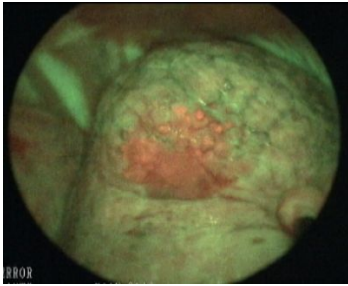


(Fig.3)

(2)肺癌胸膜浸潤に対する赤色光描出状況：
肺癌症例で赤色光が確認可能であったのは15/28(53.5%)であった。胸膜浸潤別で見るとp11~p13症例は10/10(100%)例の描出であった。p10症例は5/18(27.7%)例であったが、5例共、術前、術中診断でPL1の症例であった。腫瘍の悪性度（Grade）との関連性はなかった。この結果、胸膜に接し、胸膜浸潤がある、または疑う腫瘍性病変であれば、病変の局在診断が可能であった。浸潤度による蛍光認識病変を提示する（Fig.4,5,6,）



(Fig.4 pl0)



(Fig.5 pl1)



(Fig.6 pl2)

(3)研究成果に対する考察と展望

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、未だ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研究を進めているが、病変の描出や、正常と悪性病変の境界線等が不鮮明であり、更なる精度向上を目指してきた。

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、更に研究が進められている。本研究では、胸腔内悪性病変の診断では、胸膜面に露出して

いる場合に診断が可能であり、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える。肺癌において、組織所見の pl 因子は病期進行度に関わる因子である。本手技では、pl1 ~ pl3 では確実に局在診断が可能であったが、胸膜浸潤が全くない例 (pl0) では描出困難であった。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り、自家蛍光観察システムを用いた光学的診断よりも精度の向上が得られた。また、良悪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⁴⁾、今後、更に検討が必要な領域である。

本研究では、5ALA を利用した胸腔内悪性疾患の診断について報告したが、今後、診断だけでなく治療領域 (Photo Dynamic Therapy: PDT) への応用が必要と考える。温熱療法との併用で、5ALA 使用後の腫瘍組織の Protoporphyrin IX の蓄積により、顕著に HT の腫瘍成長の抑制作用を強化したという報告⁵⁾や、ALA-PDT は癌細胞の EGFR 表現と浸潤度を低下させることができた等の報告⁶⁾もある。現在、PDT に関しては、フォトフリン (Porfimer Sodium)、レザフィリン (Talaporfin Sodium) という2つの腫瘍親和性光感受性物質の使用が認められている。PDT の原理は、光感受性物質がレーザー光をあけると活性化し、細胞の回復段階で活性酸素を出す事により、悪性細胞を攻撃する事である。現在までは、腫瘍親和性光感受性物質は正常組織よりも悪性腫瘍に集積する特徴があるため、広範囲にレーザーを照射し、悪性腫瘍の部位だけを治療する手技であった。しかし、5ALA を利用した選択的な局在診断が、より

選択的なレーザー照射が可能とし、治療精度を向上する可能性がある。更に、治療法が未だ確立されていない胸膜悪性中皮腫に対する低侵襲な光学的治療の可能性もあり、研究を進めている。

<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) Ohsaki Y, Takeyama K, Nakao S, Tanno S, Toyoshima E, et al. **Detection of Photofirin fluorescence from malignant and premalignant lesions in the bronchus using a full-color endoscopic fluorescence imaging system: A preliminary report.** Diagnostic Therapeutic Endoscopy. 2001; 7: 187-195
- 4) 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; 8: 160.
- 5) Takahashi K, Hasegawa T, Ishii T, Suzuki A, Nakajima M, et al. **Antitumor effect of combination of hyperthermotherapy and 5-aminolevulinic acid (ALA).** Anticancer Res. 2013; 33(7):2861-6.
- 6) Tsai T, Ji HT, Chiang PC, Chou RH, Chang WS, et al. **ALA-PDT results in phenotypic changes and decreased cellular invasion in**

surviving cancer cells. Lasers Surg Med. 2009; 41(4):305-15.

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5件)

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; 25;15:174.

Kitada M, Ohsaki Y, Yasuda S, Abe M, Takahashi N, Okazaki S, Ishibashi K, Hayashi S. **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 22.

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 ; 9;11(1):49.

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; 7;11(1):44.

Ohsaki Y, Sasaki T, Endo S, Kitada M, Okumura S, Hirai N, Kazebayashi Y, Toyoshima E, Yamamoto Y, Takeyama K, Nakajima S, Sakata I. **Observation of Zn-photoporphyrin red Autofluorescence in human bronchial cancer using color-fluorescence endoscopy.**
BMC Cancer. 2017; 17(1): 289

〔学会発表〕(計5件)

北田正博、5ALA と自家蛍光観察システムを併用した肺癌 pI 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

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

北田正博、Development of photodynamic diagnosis of pleural malignant lesions with a combination of 5-aminolevulinic acid and autofluorescence Imaging system. 日本胸部外科学会 2016年9月29日

北田正博、大崎能伸：5ALA と自家蛍光観察システムを併用した胸膜悪性病変に対する光学的診断。日本外科学会総会 2017年4月28日

北田正博、大崎能伸：アミノレブリン酸(5ALA)を用いた胸部悪性病変の光学的診断と低侵襲治療への展望。日本胸部外科学会 2017年9月26日

〔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〕
なし

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

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

佐々木 高明 (SASAKI, Takaaki)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：70516997