

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：2017～2020

課題番号：17K10883

研究課題名(和文)悪性神経膠腫蛍光ガイド下手術での定量化に関する研究

研究課題名(英文)Study of quantification by fluorescence guided surgery with malignant glioma

研究代表者

安栄 良悟 (ANEI, RYOGO)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：80301985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：FECH活性とPp 含有量との間には相関性が認められなかった。これは、従来の仮説に疑問を呈するとともにFECH活性化は悪性神経膠腫の悪性度(grade)の指標にはなり難いことが示唆された。Ppの含有量と5-ALA蛍光強度との間には全脳腫瘍検体の34例では $y=1.2332x + 18.626$, $R^2=0.5134$ 、悪性神経膠腫のうちの膠芽腫の20例では $y=0.9664x + 29.006$, $R^2=0.467$ と正の相関が認められた。これにより我々の開発したリアルタイム蛍光強度定量法は組織内のPpの含有量を反映していることがわかった。定量値3～7の間に腫瘍と正常境界があることが示唆された

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性神経膠腫は脳浸潤性腫瘍のため肉眼的には境界不明である。一般的に蛍光反応=悪性腫瘍という概念が通っているが、腫瘍辺縁部でも蛍光反応を示すことが既にわかっている。本研究は、悪性神経膠腫の術中蛍光反応をリアルタイムに客観的に定量し、その病理組織およびPp蓄積経路に關与する酵素を測定することである。これにより蛍光強度に応じた腫瘍と非腫瘍の境界を術中リアルタイムで診断することが可能になり、摘出率の向上ならびに過剰切除による術後障害の回避に有用である。

研究成果の概要(英文)：No correlation was found between FECH activity and PpIX content. This questioned the conventional hypothesis and suggested that FECH activation is unlikely to be an indicator of the grade of malignant glioma. Between the PpIX content and 5-ALA fluorescence intensity, $y = 1.2332x + 18.626$, $R^2 = 0.5134$ in 34 cases of whole brain tumor specimens, and $y = 0.9664$ in 20 cases of glioblastoma among malignant gliomas. A positive correlation was observed with $x + 29.006$ and $R^2 = 0.467$. From this, it was found that the real-time fluorescence intensity quantification method developed by us reflects the content of PpIX in the tissue. It was suggested that there was a normal boundary with the tumor between the quantitative values 3-7.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：glioblastoma fluorescence quantification

1. 研究開始当初の背景

5-ALA を用いた蛍光ガイド下手術は、悪性神経膠腫の摘出率向上に有用であることが 1988 年ドイツ (Stummer et al. Neurosurgery) で報告され、2013 年に日本でも正式認可されている。アミノレブリン酸(5-ALA)は細胞内に取り込まれ、ミトコンドリア内でプロトポルフィリンIX (PpIX) に変化しその後ヘムに変換される。悪性腫瘍では 5-ALA から PpIX へ変換する酵素が上昇し、ヘム合成にかかわる酵素 (フェロケラターゼ) が低下しているため PpIX の蓄積が生じるといわれている。しかし国内第Ⅲ相試験においても感受性 72.2%、特異度 65.2% であり必ずしも悪性腫瘍への特異性が高い訳ではない。ゆえに我々が赤色光を通して見ている対象は明確ではない。かつ 5ALA による蛍光状態の判断は術者の主観的判断に依存している。そこで蛍光状態を定量し、病理組織との対比、合成及びヘム生成への pathway 酵素を測定することにより、腫瘍と非腫瘍との境界ラインに相当する蛍光強度を検出することにより、術中悪性神経膠腫の境界ラインを正確に診断し、切除範囲の決定に貢献することが出来る。

2. 研究の目的

悪性神経膠腫に対する術中の 5-ALA 蛍光診断は、これまで術者の肉眼的な主観により strong, vague というように判定されていた。これをもとに感受性、特異性や陽性診断率、陰性診断率などを報告されてきたが、主観的判断のため決して高くはない。悪性神経膠腫は脳浸潤性腫瘍のため肉眼的には境界不明である。腫瘍は可能な限り最大摘出を行った方が生命予後はよくなるため可及的に摘出する必要がある。反対に、脳機能領域や神経線維にまで摘出が及ぶと術後に運動障害や言語障害を来し生命予後を縮めてしまう。また、一般的に蛍光反応＝悪性腫瘍という概念が通っているが、腫瘍辺縁部でも蛍光反応を示すことが既にわかっている。本研究は、悪性神経膠腫の術中蛍光反応をリアルタイムに客観的に定量し、その病理組織および PpIX 蓄積経路に関与する酵素を測定することである。これにより蛍光強度に応じた腫瘍と非腫瘍の境界を術中リアルタイムで診断することが可能になり、摘出率の向上ならびに過剰切除による術後障害の回避に有用である。現在の膠芽腫 (悪性神経膠腫 WHO gradeⅣ) の標準中央生存期間は 14 か月 (当施設では 20 か月)、標準二年生存率は 26% (当施設では 40%) である。しかし、この研究ならびに技術の開発により、極めて予後不良である悪性神経膠腫の患者の予後を更に改善し、脳腫瘍学会の目指す二年生存率 50% の目標に大きく貢献できるものと考えられる。

3. 研究の方法

悪性神経膠腫患者に同意を得て術前アミノレブリン酸塩基酸 (5ALA) を投与し、手術中にマイクロ顕微鏡下にて 400nm 青色光線で励起する。蛍光反応が認められた部分 (腫瘍及び周辺) の蛍光強度を分光器で測定し同部組織を採取する。採取した組織を二つに分け、一方は当院病理部へ提出。一方は液体窒素にて凍結標本とし SBI ファーマ株式会社へ送付する。病理部では病理組織診断、p53 染色、MIB1 測定を行う。送付されたサンプルは SBI ファーマ株式会社 神戸研究所にてポルフィリン分析、遺伝子発現解析、フェロケラターゼ活性測定を行う。蛍光強度、組織、活性酵素について相関分析を行い、腫瘍と非腫瘍の蛍光強度による境界ラインを算出する。

4. 研究成果

まず FECH 活性と PpIX 含有量との間には相関性が認められなかった。これは、従来の仮説に疑問を呈するとともに FECH 活性化は悪性神経膠腫の悪性度 (grade) の指標にはなり難いことが示唆された (ALA-Porphyrin Science, Vol. 7 No.1 2018, 13-23:共著)。これに対し PpIX の含有量と 5-ALA 蛍光強度との間には全脳腫瘍検体の 34 例では $y=1.2332x + 18.626$, $R^2=0.5134$ 、悪性神経膠腫のうちの膠芽腫の 20 例では $y=0.9664x + 29.006$, $R^2=0.467$ と正の相関が認められた。これにより我々の開発したリアルタイム蛍光強度定量法は組織内の PpIX の含有量を反映していることがわかった (Clinical Neurology and Neurosurgery 181 (2019) 89-97:共著, CI 研究 40 (1) : 17-22, 2018 : 自著にて報告) (図 1)。この結果をもとに 5-ALA 蛍光強度と病理との関係を解析した。採取した部分で病理的な変化がみられ徐々に蛍光強度の低下をしめす 9 症例 24 検体での検討では定量値 3~7 の間に腫瘍と正常境界があることが示唆された (図 2)。

図1
リアルタイム定量化システムの開発

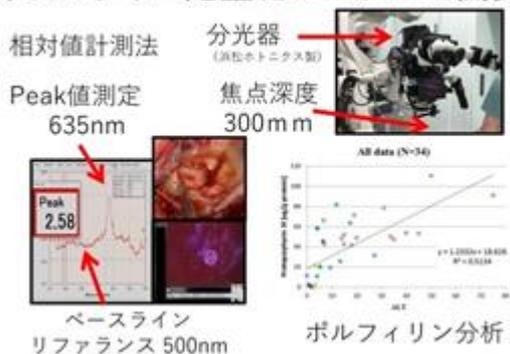
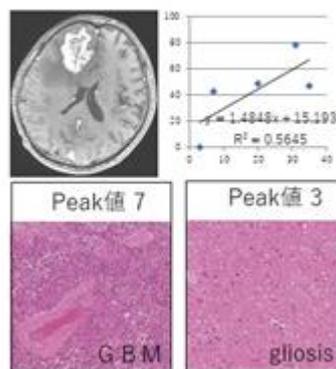


図2
Peak値3~7前後に腫瘍境界



しかし、課題①「一例あたりのサンプル数が少ない」ことと、課題②4 症例 14 検体で「脳室へ切除を進めていく症例では上衣組織の蛍光反応による偽陽性がある」ことが課題であることがわかった（2018 年 CI 学会 シンポジウムにて筆頭演者として発表）。そこで、これらの課題に対し新たに高 DNA 量測定装置フローサイトメトリー（Celltac PEAK: 日本光電）を導入（購入決定・発注済）し術中迅速に malignancy index (MI) を測定することにより克服を試みる予定である。術中採取した 2 mm 角程度の組織を専用スピッツに入れ 10 分程度で細胞核 DNA 量解析を行うことが可能である。測定は malignant index (MI) として算出されて MI level 0~IV として評価される。MI は高 DNA 量細胞比率を表しており値が大きいほど分裂能が高く MIB 1 labeling index が高いことを示し、これは病理学的悪性度と相関していることが報告されている。これまで我々の行ってきた病理学的検索は永久標本による術後の評価であり、採取サンプル数も 3~5 個が限界であった。迅速病理でも 3~5 個が限界であるが、このフローサイトメトリーでは数回の採取が可能であり、我々の開発したシステムを併用することでリアルタイムに 5-ALA 蛍光強度と MI を測定することが可能となる。これにより課題①の解決につながられる。課題②に対して、ナビゲーションシステムを用いて腫瘍組織切除方向性を確かめながら 5-ALA 蛍光強度と MI を測定する。脳室方向へ向かう場合上衣組織の蛍光反応によりむしろ深部に向かうほど蛍光強度が上昇する偽陽性が生じた。既に我々はフローサイトメトリーを用い蛍光反応を示す脳室上衣を採取、MI が level 0 であり病理学的にも腫瘍細胞が存在せず偽陽性であることを確認している。偽陽性に対し、サンプル採取を脳室方向と脳実質方向の二方向に分けて行い解析することで課題②の解決を図る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kyousuke Kamada, Ryogo Anei, Ken Kodama, Yuya Kitajima, Masahiro Ishizuka, Satoru Hiroshima, Hiroshi Ogawa, Yukie Tamura, Fumiya Takeuchi	4. 巻 181
2. 論文標題 Real-time quantification of tumor-related fluorescence during neurosurgery: a preliminary report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Neurology and Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 9-97
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 安栄良悟、田村有希恵、小川博司、広島覚、竹内文也、石塚昌宏、児玉建、鎌田恭輔	4. 巻 40(1)
2. 論文標題 5-ALA蛍光ガイド下手術における術中リアルタイム定量化の意義	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 CI研究	6. 最初と最後の頁 17-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kyousuke Kamada, Ryogo Anei, Ken Kodama, Yuya Kitajima, Masahiro Ishizuka, Satoru Hiroshima, Hiroshi Ogawa, Yukie Tamura, Fumiya Takeuchi	4. 巻 181
2. 論文標題 Real-time quantification of tumor-related fluorescence during neurosurgery: a preliminary report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Neurology and Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 9-97
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 安栄良悟
2. 発表標題 悪性神経膠腫に対する術中5ALA蛍光定量化の意義と限界
3. 学会等名 第40回日本レーザー医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Anei R
2. 発表標題 Significance and limitations of intraoperative 5ALA fluorescence quantification for malignant glioma
3. 学会等名 7th International ALA and Porphyrin Symposium (IAPS7) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安栄良悟
2. 発表標題 5ALA蛍光強度定量化による術中リアルタイム組織モニタリングへの展望
3. 学会等名 第41回 日本脳神経CI学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安栄良悟
2. 発表標題 顕微鏡下リアルタイム5ALA蛍光定量化による リアルタイム組織モニタリングへの展望
3. 学会等名 第27回脳神経外科手術と機器学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安栄良悟
2. 発表標題 神経膠腫に対するmaximal safe resectionの検討
3. 学会等名 第22回日本脳腫瘍の外科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安栄良悟
2. 発表標題 神経膠腫手術におけるtotal management
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第76回学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安栄良悟
2. 発表標題 5ALA蛍光強度定量化による術中リアルタイム組織モニタリングへの展望
3. 学会等名 第41回日本脳神経CI学会
4. 発表年 2017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	田村 有希恵 (TAMURA YUKIE) (30723879)	旭川医科大学・医学部・助教 (10107)	
研究 分担者	鎌田 恭輔 (KAMADA KYOUSUKE) (80372374)	旭川医科大学・医学部・教授 (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
---------	---------