

令和元年5月10日現在

機関番号：10107
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2017～2018
 課題番号：17K16621
 研究課題名(和文) 新しい言語機能マッピング法と蛍光分光解析手法の併用による脳腫瘍摘出術の展望

研究課題名(英文) The prospects of the brain tumor resection including awake surgery by the combination of new language function mapping method and fluorescence spectrometric analysis technique

研究代表者
 田村 有希恵 (TAMURA, YUKIE)
 旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：30723879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍細胞は正常組織に浸潤していくため腫瘍と判別できないが、5-ALAを術前に経口投与することで、その代謝産物(Pp)が腫瘍細胞に蓄積し、励起光により蛍光を呈することで同定可能とされている。しかしながら、Ppの腫瘍特異的な蓄積のメカニズムについては明らかにされていない。本研究では、この蛍光強度を術中顕微鏡に搭載した分光器を介して術中リアルタイムに蛍光強度を定量できるシステム”Spectrum Insight”を開発した。さらに組織内の物質分析、特にPpの定量を行い、蛍光強度とPp蓄積量、病理組織学的悪性度との関連性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍細胞と正常組織は肉眼的に判別は難しいが、5-ALAの術前投与により、その代謝産物(Pp)が腫瘍細胞に特異的に蓄積し、励起光により蛍光を呈することで腫瘍細胞の同定が可能とされている。また、蛍光強度と腫瘍細胞密度との相関関係もいわれているが、その蓄積のメカニズムについては、いまだ明らかにされていない。本研究では、この蛍光強度を術中リアルタイムに定量化を可能としたシステム”Spectrum Insight”を開発した。さらに腫瘍組織内のPpの定量も行い、蛍光強度との関連性を示せた。本研究結果が、Pp蓄積メカニズムの解明につながると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We cannot distinguish the neoplastic cell from normal cell because of a tumor permeating the normal organization. But if 5-ALA are administered orally before surgery, A metabolism product(Pp) accumulates to the neoplastic cell and it is told to be identifiable in a thing with the fluorescence by excitation light. However, it is not found about the mechanism of the accumulation that is a tumor-specific of Pp. In this study, I developed the system "Spectrum Insight", which could assay intensity of fluorescence in real time during the surgery by the spectroscopy which put on a microscope. Furthermore, I assay an interstitial material particularly the Pp, and I showed intensity of fluorescence and the stockpile of the Pp, the association with the histopathological malignancy.

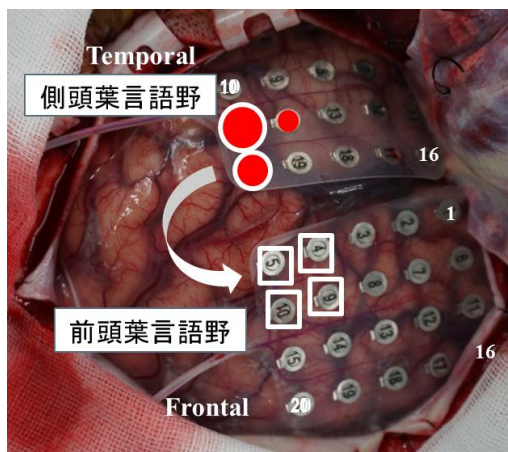
研究分野：脳神経外科(悪性神経膠腫)

キーワード：定量 蛍光強度 プロトポルフィリン 5アミノレブリン酸 分光器

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫の摘出術における目的は、ヒト言語機能ネットワークを術中リアルタイムにモニタリングし、機能を温存し、かつ最大限に腫瘍を摘出することである。言語機能マッピングの方法として過去10年を遡ると、functional magnetic resonance imaging (fMRI)や、拡散テンソル画像(diffusion tensor image:DTI) tractographyによる術前機能画像が主体であった。しかしこれら画像の信頼性は80-86%程度(Kamada K, 2009, Kunii N, 2011)であり、新たな機能モニタリングが必要であった。現在の gold standard である脳皮質電気刺激(ECS)は、言語関連機能を抑制する機能同定法である。しかし、この方法は失語患者では不可能であり、かつECSにより痙攣のリスクを伴う。我々は80-140Hzの高周波律動(high gamma activity; HGA)リアルタイム表示(World Neurosurg, 2014)と言語野電気刺激皮質-皮質誘発電位(CCEP)を融合した"Passive mapping"を提唱した(Tamura 2016)。特筆すべきはHGAおよびCCEPはBispectral index 70-85(浅麻酔)の状態でも検出可能であり、患者の協力が全く必要ないことである。



本法の発展は手術時間短縮、患者および術者への負担を大幅に軽減するものである。いずれの計測も2分程度で終了するため、本申請では我々の提唱した"Passive mapping"をさらに改良し、文字認知、物品名称、さらには記憶を含めた高次脳機能マッピングへと応用を考えていく。

一方、神経膠腫は周囲脳組織に浸潤発育するため、腫瘍組織と正常脳組織を顕微鏡下であっても識別が困難なことが多い。近年、生体に投与された5ALAは特異的に悪性神経膠腫に取り込まれ、腫瘍組織内代謝されたprotoporphyrin IX (PpIX)は、405nmの励起光により635nmの蛍光を発色する。臨床ではこの蛍光を指標とし腫瘍境界部の同定に用いているが、蛍光強度の定性的評価で蛍光強度と腫瘍組織学的悪性度と相関に関する報告がある

(Cancer 118:1619-27, 2011)。我々はこの蛍光を定量化するため、顕微鏡に小型分光器搭載し、三菱製光ファイバーから誘導した視野内光を分光し、リアルタイムでコンピュータで定量化した。この定量には光源強度、フレームレート、作業距離、焦点など顕微鏡コンピュータからの情報を元に、蛍光強度を補正するソフトウェアをInfocom社と作成した。申請者の検討ではPpIXピーク値の蛍光強度は、5~7以上であれば高悪性度腫瘍の存在が疑われることがわかってきた。

本システムは申請者が" Spectrum Insight" 商標登録するとともに、現在国内特許、および国際協力条約加盟国(PCT)出願中である。本申請では新たなマッピング法の開発と蛍光診断法の確立を目指す。

2. 研究の目的

以前の我々の検討では、前頭葉-側頭葉言語野では言語関連HGAダイナミクスが異なっていた(Ogawa 2014)。このため各言語領域において、適切な課題(言語音、文字読み、物品名称、文章読み、記銘)を行う必要がある。しかし、それぞれの課題別、脳領域別に焦点を絞った周波数、潜時を含む解析が必要である。その一方で臨床応用のためには、全計測が15分程度で終了する課題を組み立てる。また、言語音課題以外では発声を伴う covert、または発声をしない思考のみの overt 課題を行い、運動関連反応を除いたHGA反応の比較をする。さらにHGAのみならず、 α 、 β 、 γ 、HGA帯域などの異なる周波数成分にRGBの三原色を付すことで、各周波数成分のダイナミクス、および最も活動が重なっている電極にRGBがすべてが重畳してwhite out(白色)する表示方法で明瞭に活動部位を指摘できることが期待できる。一方、CCEPは双方向性の誘発反応であるため、リアルタイム周波数マッピングでは経時的にその所見が変化してしまう重要言語野を安定、かつ確実に捉えることができる。リアルタイム-マルチ周波数マッピングとCCEPの融合は迅速、かつ複雑な情報を一度に提供することができる。

"Spectrum Insight"により定量化した蛍光強度と摘出病理、および組織内のPpIXおよび周辺の酵素活性、遺伝子解析と比較することにより、蛍光強度から摘出領域を決定することができる。蛍光強度と摘出領域のPpIX、酵素濃度、遺伝子との比較によりROCカーブを描くことにより、蛍光強度の感度と特異度を明らかにする。我々のpreliminaryな結果では蛍光強度PpIXの濃度との間に相関が認められていた。このためさらなる検討にはPpIXとその代謝に関与している数十にもおよぶ酵素、遺伝子の定量、および各因子間の相関解析、主成分分析などを行い生物学的な特性を明らかにする。一方、5ALA投与による蛍光は良性腫瘍である髄膜腫でも認められる。これは悪性腫瘍特有のPpIXからへムに代謝するフェロケラターゼ(FECH)の活性が低下しているという仮説のみでは説明がつかない。良性腫瘍においても酵素、遺伝子の解析も行い、腫瘍蛍光との相関を明らかにする。

3. 研究の方法

言語野近傍に神経膠腫を有し、覚醒下手術が必要な患者において前述した”Passive language mapping”法を行った。これは患者協力が不要であり、軽度の麻酔状態で側頭葉に音刺激 HGA、側頭葉電気刺激で前頭葉 CCEP を認める。これに加え文字読み、図形名称、記銘、それぞれ発語・黙読課題を行い、純粋に言語関連反応の抽出を目指した。また、5ALA 投与により発する腫瘍蛍光は腫瘍と正常組織の鑑別に極めて有用である。この現象には PpIX が関与しているが、未だ腫瘍蛍光と PpIX、およびその周辺代謝物質、酵素活性、遺伝子との関係が不明である。組織内物質分析することで腫瘍蛍光の機序と意味を検討した。

言語野近傍の神経膠腫が疑われる患者を全対象とした。当施設は覚醒下手術認定施設である。脳腫瘍は年間平均約 90 症例(うち覚醒下手術 10 例程度)であったが、研究期間中の対象は 6 症例と少ない結果であった。すべての患者で術前に言語・記憶関連テスト、および fMRI による言語関連機能の画像化と Wada テストにて優位半球を同定した。電位計測は g-HI amp(Guger technology, Austria)、CCEP 刺激は Neuromaster MEE-1232(Nihon Koden, Japan)を用いた。

ECoG 記録では通常電極直径 3mm、電極間 10mm を用いるが、現在当施設倫理委員会で承認されている高密度電極(豊橋技術大学 河野剛司氏)も用いた。従来よりも 5 倍以上の高密度電極であり、かつ脳表への密着もよいバリレン薄膜型電極も試用した。また、診断・治療の効率化のために Guger 氏と、リアルタイム HGA マッピングと刺激装置一体システムを構築した。本装置は市販の刺激装置と同等の刺激強度を有し、かつ過電流に対して安全装置を設けている電極・計測/刺激システムの充実とともに、患者の言語関連機能を捉えることが重要と考えられ、そのためには上述した言語機能抽出のための複数の課題を行う必要があった。

音刺激は標準的な抑揚のある日本人が 20 語で構成された昔話を 15 秒間録音した音声ファイルを用い、参考音刺激として 1KHz の純音を用いた。この計測は fMRI、脳波などで類似検査は行えるが、より広いダイナミックレンジの周波数、高い時間分解能があるために硬膜下電極を留置した患者から得ることができる貴重な機会であり、言語特異性の反応を同定しようとした。さらに CCEP を行い、CCEP の刺激強度、刺激頻度、加算回数など指摘な条件設定を統一化し、不関電極は対側耳朶となっているが、我々の検討では非機能野の硬膜下腔に硬膜側をむけた電極でも十分な信号強度で得られることを確認した。

また、術前と比較し術後の CCEP 波が陰転化していた患者では、術後の言語障害が増悪しており、術中の CCEP モニタリングが術後の症状転帰を反映するものと考えられた。

5-ALA についてであるが、術前の麻酔導入 2 時間前に 5-ALA 20mg/kg を水で溶解し経口投与した。励起光下、あるいは自然光下でも蛍光退色が観察されるため、手術室はできる限り遮光し、全例同じ環境下で行った。腫瘍が疑われる部位にキセノンランプ光源装置(電気入力:600W)を用いて励起光(405nm)を照射し、蛍光は手術顕微鏡(M525 OH4, Leica, Switzerland)に設置した分光器(Hamamatsu Photonics, Japan)を通して観察した。光源の強さ、作業距離、倍率は顕微鏡コンピュータの RS232 ポートから取り込み、検出蛍光強度を自動補正している。すでに PpIX を用いたファントム実験で補正式を作成している。分光解析ソフト”Spectrum Insight”を用いて蛍光強度を計測し、635nm の PpIX の特異ピーク値を算出し、蛍光の定量化を行った(図 1)。

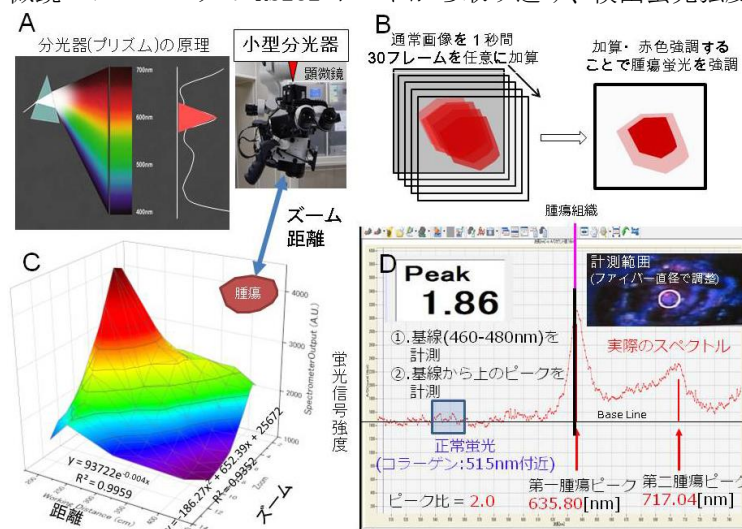
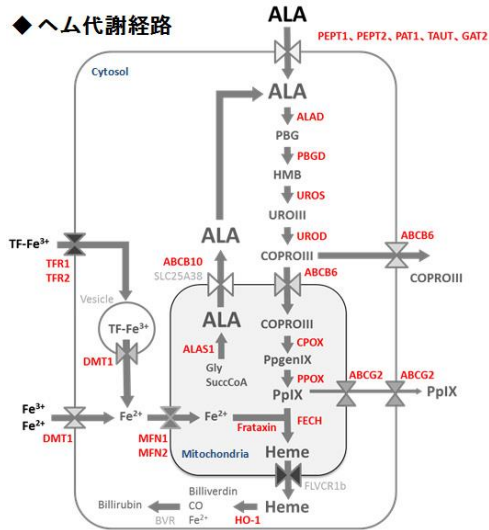


図 1 Spectrum Insight による蛍光強度の定量化

現在までで約 70 サンプルで蛍光定量化と病理組織の比較の結果、Peak 値が 5~7 以上の場合、有意に高悪性度の glioma であった。蛍光強度と MIB-1 index の相関が指摘できた。PpIX の分子量は 562.6、MRI 造影剤は 560-750 を考慮すると、PpIX の分子量は小さく腫瘍細胞外に露出している可能性がある。そのため、蛍光を認めた部位が腫瘍辺縁である場合は、MIB-1 腫瘍細胞存在のみならず、PpIX からへムを合成する FECH 活性の低下のため、PpIX が蓄積されると考えられている。当施設と研究協力者である SBI ファーマで、まず図 2 に示す PpIX の定量化を試みた。

◆ヘム代謝経路



蛍光強度の定量化だけではなく、蛍光強度と PpIX 蓄積の関連性、病理組織学的悪性度との関連性についても評価することで、今後の腫瘍摘出における摘出範囲の決定に大きく貢献するものと考えられた。すべての患者において年齢、性別、優位半球、腫瘍部位、術前後の症状、病理組織について記録し、生命予後は Karnofsky Performance Status (KPS)、Overall Survival (OS) を用いて経過観察し評価するが、研究期間内で予後について判断するにはまだ今後検討が必要であった。

4. 研究成果

腫瘍細胞は正常組織に浸潤していくため腫瘍と判別できない。5-ALA を術前に経口投与することで、その代謝産物 (PpIX) が腫瘍細胞に蓄積し、励起光により 630nm の蛍光を呈することで同定可能とされている。また、蛍光強度と腫瘍細胞密度、細胞増殖能との相関関係も指摘されている。しかしながら、PpIX の腫瘍特異的な蓄積のメカニズムについては代謝酵素活性の低下など様々な報告がされているが、いまだ明らかにされていない。本研究では、この蛍光強度を術中顕微鏡に搭載した分光器を介して術中リアルタイムに蛍光強度を定量できるシステム”Spectrum Insight”を開発した。さらに組織内の物質分析、特に PpIX の定量を行い、蛍光強度と PpIX 蓄積量、病理組織学的悪性度との関連性を示した。本研究結果が、PpIX 蓄積メカニズム解明の一助になると考えられた。

我々が提案した Passive language mapping であるが、患者数が少なく、また術前からの失語症の程度や麻酔深度、患者の心理的要因の影響もあり、刺激内容を含めマッピング方法論を検討することはできなかった。対象が患者であり、症例数をコントロールすることは困難であるが、今後長期にわたり検討し、患者協力の不要なマッピング法として改めて提案、確立する必要があると考えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ① 田村有希恵 第 22 回北海道脳腫瘍懇話会 2018 5ALA 蛍光定量化による術中組織モニタリングへの展望
- ② 田村有希恵 第 4 回脳神経外科 BMI 懇話会 2018 覚醒下手術における新たな脳機能マッピング法”Passive language mapping”の展望

〔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：
 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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。