

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09011

研究課題名(和文) 悪性脳腫瘍におけるPDT効果予測ならびに悪性度及び分子生物学的特性予測マップ作成

研究課題名(英文) Predictive map for PDT effect, malignancy and biological characteristics in malignant brain tumor

研究代表者

池田 直廉 (Ikeda, Naokado)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：50434775

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)：悪性脳腫瘍においてナビゲーションガイド下定位的組織採取を応用することにより、既存の多種画像パラメーターと組織所見および5-アミノレブリン酸(5-ALA)による蛍光強度との相関を明らかとすることはできなかった。よって5-ALAを用いた光線力学的治療効果予測マップ作成には至らなかったが、副次的に5-ALAを併用したナビゲーションガイド下定位脳腫瘍生検術における光線力学的診断併用による診断感度、陰性的中率の向上を示すことができたとともに、術中CT併用による本術式の安全性および確実性を示すとともに本術式における実際の標的誤差を初めて明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性脳腫瘍における組織診断に用いられているナビゲーションシステム下定位的脳生検術は手術ではあるが、治療ではなくあくまでも診断手法であることから安全性および確実性がより求められる。本研究成果は5-アミノレブリン酸や術中CTを併用することが本手術手技の安全性および確実性のさらなる向上に寄与することを示し、合併症回避、手術時間短縮をも実現する。さらに本手技を用いた腫瘍生検における実際の誤差を初めて明らかとしたことは、より安全確実な生検標的設定の際に有益な情報を提供するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：With application of navigation-guided stereotactic technique in malignant brain tumors, we demonstrated that conventional multi-image parameters did not correlate with histological findings and fluorescence intensity of 5-aminolevulinic acid (5-ALA). Therefore, we were not able to create a photodynamic therapy efficacy prediction map using 5-ALA. However, we demonstrated that the combined use of 5-ALA mediated photodynamic diagnosis in the navigation-guided stereotactic brain tumor biopsy improved the diagnostic sensitivity and negative predictive value, and the safety and reliability with intraoperative CT. In addition, we demonstrated the safety and reliability of this technique with intraoperative and the real target registration error of the procedure was clarified for the first time.

研究分野：光線力学的診断

キーワード：5-アミノレブリン酸 定位的脳生検術 ナビゲーションシステム 光線力学的診断 光線力学的治療

## 1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫は高浸潤性腫瘍であり標準治療さらには新規治療薬をもってしても極めて予後不良である。造影 MRI で造影される腫瘍本体の範囲を超えて浸潤性に正常細胞間へと進展しているため、造影病変のみを標的とするだけでは十分な治療効果が得られず再発は免れない。つまり浸潤領域に存在する腫瘍細胞をいかに駆逐するかが悪性神経膠腫治療の鍵となる。光線力学的治療(photodynamic therapy; PDT)は腫瘍細胞に選択的に取り込ませた光感受性物質を励起光で励起して活性酸素を生成させ抗腫瘍効果を発揮するため、浸潤腫瘍細胞に対しても効果が期待される。PDT においては励起光の組織深達度および腫瘍における光感受性物質の分布の把握が治療効果を左右する。励起光の深達度には限りがあるため、光感受性物質の分布を正確に把握しその分布に合わせて励起光を照射することができれば最大限の効果を得ることができ悪性神経膠腫のめざましい予後改善に寄与するのではないかと本研究を着想した。

本邦では国内医師主導型治験の結果を受けて、タラポルフィリンソディウム(レザフィリン<sup>®</sup>)が悪性神経膠腫に対する光線力学的治療薬として認可されたが、満足のいく治療効果とは言い難い。その一因は腫瘍摘出腔からの表面照射という照射方法によると予測される。すなわち先述のごとく励起光の深達度には限りがあるため、その範囲でしか効果を発揮しないためである。

一方、本邦で光線力学的診断薬として認可されている 5-aminolevulinic acid (5-ALA)は光感受性物質であるプロトポルフィリン IX (PpIX)の前駆物質で、経口投与されたのち経消化管的に吸収され腫瘍に選択的に取り込まれてポルフィリン代謝により生成された PpIX が蛍光を呈する。光感受性物質そのものを経静脈的投与するタラポルフィリンソディウムとは異なるため全身の光毒性も少ない。PpIX

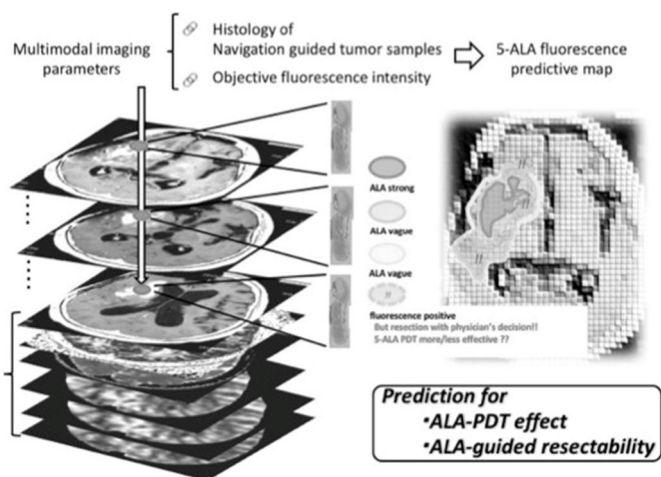


図1; 5-ALA蛍光、PDT効果予測マップ作成概念図

は光感受性物質であるため、5-ALA も PDT に用いられ皮膚がん、消化器がん、呼吸器系がんなどで臨床応用されている。本邦では光線力学的治療薬としては未承認であるが、欧州ではすでに悪性神経膠腫に対しても臨床応用が開始され治療効果が示されている。悪性神経膠腫に対して臨床応用されている 5-ALA を用いた PDT では、タラポルフィリンソディウムの場合と異なり、定位的に励起光源を腫瘍組織に挿入して行われている。本法の利点は挿入ターゲットをいくつも設けることで広範囲に抗腫瘍効果を発揮できる可能性があることである。すなわちターゲットを腫瘍本体周辺領域に複数設定することで正常細胞間浸潤細胞を駆逐する可能性を秘める。

しかし、腫瘍本体周辺領域における 5-ALA による蛍光所見は、比較的均一に強蛍光を呈する腫瘍本体に比して腫瘍本体からの距離に応じて決して均一ではなく、腫瘍細胞密度、悪性度、神経膠腫幹細胞分布、腫瘍血管密度、腫瘍細胞の分布に応じて様々である。欧州で行われている定位的 PDT をもってしてもターゲット設定が的確でなければ期待された十分な治療効果を得られないばかりではなく、有害事象を惹起することになりかねない。よって腫瘍本体および腫瘍周囲組織の客観的蛍光所見を治療前になんらかの方法で予測することは非常に重要で、的確な PDT のターゲット設定につながるが、5-AL 経口投与後 PpIX の分布を術前に予測する有効な方法は存在しない。

## 2. 研究の目的

本研究では既存の多種画像多種パラメーター(既存の MRI 撮像シークエンスにおける信号値や頭部造影 CT の吸収値)と組織所見および 5-ALA による蛍光強度の相関すなわち PDT 効果予測度との相関を見出し、悪性脳腫瘍における 5-ALA による蛍光および定位的 PDT による効果予測マップ(図 1)を作成することを目的とした。

本研究の根幹はナビゲーションガイド下定位的組織採取であることから、5-ALA および術中 CT を併用することの有用性について検証することも副次的な目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 悪性神経膠腫および中枢神経原発悪性リンパ腫に対するナビゲーション誘導による組織サンプリングおよび PpIX による赤色蛍光確認

##### 術前多種画像データによる術前組織採取部設定

悪性脳腫瘍に対して開頭腫瘍摘出術もしくは定位的腫瘍摘出術施行症例を対象とした。悪性脳腫瘍摘手術前画像としてルーチンで撮像している術前画像、MRI（非造影および造影 T1 強調画像、T2 強調画像、FLAIR 画像、拡散テンソルイメージ）、320 列面検出 CT を用いた造影還流画像、可能であれば PET 画像はメチオニンもしくは FDG をトレーサーとした PET 画像を撮像した。各種画像の位置合わせをワークステーション上で行い、MRI 造影 T1 強調画像における造影病変を組織採取標的として、生検鉗子挿入部および安全な到達経路をワークステーション(Synapse Vincent, Fuji Film 社)にて計画して、生検鉗子挿入予定経路を描画した位置情報付き画像データを排出した。

##### 5-ALA 投与後ナビゲーションガイド下定位的組織サンプリングと蛍光評価

術前麻酔導入前 2 時間前に 5-ALA 製剤（アラベル、ノーベルファーマ社）を 20mg/kg 体重を患者に内服してもらい腫瘍摘出術もしくは定位的脳腫瘍生検術を行なった。で排出した画像データを手術用ナビゲーションシステム(Stealth station S7, Medtronic 社)へと転送して予定組織採取経路に沿って組織採取標的、生検経路上の造影腫瘍周辺領域、さらに浅部のより正常に近い脳組織を採取した。摘出標本を採取直後に 5-ALA 蛍光観察システム搭載手術顕微鏡下(OPMI PENTERO; Carl Zeiss 社)で確認して、顕微鏡内臓光源および外部 LED 光源 (Espelaruz; CCS 社) 照射下で蛍光強度を主観的に確認した。客観的蛍光評価として術中蛍光所見をビデオから取得して画像解析ソフトを用いて算出した相対的蛍光値として算出した。

##### 術中 CT 併用ナビゲーションガイド下定位的組織サンプリング

術中 CT 撮像可能な手術室にてナビゲーションガイド下定位的組織サンプリングを行った症例については、生検鉗子挿入直後に頭部 CT を撮像して画像データを院内ワークステーションに排出して、と同様に術前に撮像した多種画像と位置合わせを行った。

#### (2) 定位的採取組織と術前画像における採取計画部位でのパラメータ取得

上記にて作成した位置情報を合わせた生検鉗子挿入予定経路描画画像から実際の生検部位を抽出して関心領域を設定して、その部分での CT 造影還流画像で得た CBV(脳血液量), CBF(脳血流量), MTT(平均通過時間), 拡散テンソルイメージのパラメーターである FA 値および ADC 値を算出した。

#### (3) 定位的採取標本の組織学的評価

定位的に採取した組織の細胞密度、毛細血管密度、細胞増殖能を HE 染色および免疫組織学的に検討した。増殖細胞の算出には Ki67 染色陽性細胞比率を算出し、血管密度の判定には CD34 染色を行ない、陽性範囲を血管域として密度を算出した。

#### (4) 術中 CT 併用ナビゲーションガイド下腫瘍生検の有用性および生検標的誤差の検討

術中 CT を併用した症例における採取組織における 5-ALA による蛍光所見を確認した。生検鉗子挿入直後に施行した術中 CT 画像データと上記(1) で生検標的設定に用いた造影 MRI 画像データをワークステーション上で位置合わせを行い、生検鉗子挿入直後術中 CT 上の実際の生検鉗子内の生検部と術前に計画設定した生検標的との誤差を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 5-ALA による蛍光所見と多種画像パラメータ、組織所見の関連

上記方法で行った定位的標本採取を行った症例のうち開頭腫瘍摘出術を行う症例で定位的標本採取の追加に同意いただくことができた症例が少数で、定位脳腫瘍生検症例がその 98%であったこともあり解析対象腫瘍は中枢神経原発悪性リンパ腫症例が 16 例(59.3%)、悪性神経膠腫 7 例(25.9%) 転移性脳腫瘍 2 例(7.4%)であった。

病理組織診断ごとに画像パラメータおよび組織所見と蛍光所見の関連について検討をおこなった。肉眼的蛍光所見および客観的蛍光値と関連のあるパラメーターは、これまで示されている造影 MRI での造影強度および造影部からの距離との相関は見られたに過ぎず、その他の多種画像各種パラメーターで有意な相関を示すことはなく、それぞれのパラメータを組み合わせで解析を行っても有意な関連を認めなかった。さらに生検標本組織所見については、悪性リンパ腫症例では細胞密度意外に蛍光所見と関連がある組織所見はなかった。悪性神経膠芽腫においてはこれまでに既に報告のある Mib-1 index (Ki67 陽性細胞比率) 以外、PpIX による蛍光所見および相対的蛍光値との関連を示す組織所見はなかった。

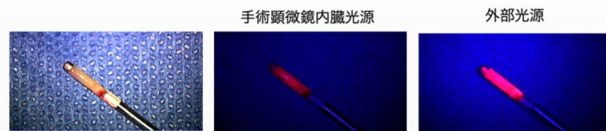
令和元年度からは術中 CT 撮像に対応した生検システム(Navigas biopsy; Medtronic 社)が

利用可能となったため、術中 CT 併用定位の脳腫瘍生検施行症例で術前予定経路と実際の生検鉗子挿入経路の差異を検証すると、生検標的には大きな誤差なく鉗子先端が挿入されていたが、実際の生検鉗子挿入経路は予定生検経路と誤差が生じていることが判明した。術中 CT 非併用症例における予定生検鉗子経路との誤差が本結果に関連している可能性を考慮し、術中 CT 併用例のみで(1)の方法で位置合わせを行い検証したが結果は同様であった。

組織採取対象症例に悪性リンパ腫症例を多く含み、将来的に 5-ALA を用いた光線力学的治療の対象となる悪性神経膠腫症例が、特に術中 CT 併用導入後（生検鉗子挿入経路と予定経路の誤差修正後）少なかったことが蛍光所見および画像パラメータとの相関が得られなかった一因と考えられる。引き続き術中 CT 併用組織採取悪性神経膠腫症例蓄積により検討を継続する予定である。

### (2)5-ALA 併用ナビゲーションガイド定位脳生検における外部光源の有用性の検討

本研究における定位的サンプリング時の 5-ALA による蛍光評価を行うにあたり 37 例で外部 LED 光源を用いたが、LED 外部励起光源を用いることで蛍光所見が判別しやすくなることが確認された(右図)。外部光源を用いることで感度および陰性的中率の上昇を示した(右表)。外部光源の併用は外部光源を用いた蛍光評価は 5-ALA-PDD を併用した定位的脳腫瘍生検術において確実な組織採取確認に極めて有用で、的確、安全なサンプリングを実現するものと考えられた。また、定位的脳腫瘍生検術の手術時間における大半を占める術中迅速組織診断の省略に寄与する可能性もある。



	感度	特異度	陽性的中率	陰性的中率
外部光源なし	38.9%	100%	100%	4.35%
外部光源あり	80.1%	100%	100%	12.5%

### (3)ナビゲーションガイド下定位脳生検における術中 CT の有用性の検討

13 例で術中 CT 併用を行なったが 8 例で生検標本の PpIX による蛍光が全く見えない(none fluorescence)もしくは極めて視認しにくい(faint fluorescence)であった。これらの症例では生検鉗子挿入直後に CT を行うことで目標的傍組織を確実に採取できることが確認できた。最も微小な標的は 0.06cc であったが全例で腫瘍の組織診断が可能であった。さらに予定生検標的点と術中 CT 上の実際の生検鉗子挿入組織採取部との誤差は 2.51mm であり、術中体位により誤差に有意差はなかった。本誤差はナビゲーションガイド定位生検における“本当の誤差”(target registration error)と言い換えてよい。これまでの本術式やナビゲーションシステムの誤差検証はファントムや体表上での誤差を検証したのみであり、target registration error の提示は安全確実な本手術施行に極めて重要である。



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 Izumoto Atsuki, Nishimura Takahiro, Hazama Hisanao, Ikeda Naokado, Kajimoto Yoshinaga, Awazu Kunio	4. 巻 25
2. 論文標題 Singlet oxygen model evaluation of interstitial photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid for malignant brain tumor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Optics	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1117/1.JBO.25.6.063803	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9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 池田直廉 川端信司 片山義英 野々口直助 古瀬元雅 矢木亮吉 塩山高広 梶本宜永 黒岩敏彦
2. 発表標題 悪性脳腫瘍に対する5-アミノレブリン酸を用いた術中蛍光診断における 問題点克服のための工夫
3. 学会等名 第2回蛍光ガイド手術研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田直廉 川端信司 片山義英 古瀬元雅 野々口直助 矢木亮吉 塩山高広 梶本宜永 黒岩敏彦 鱈淵昌彦
2. 発表標題 悪性脳腫瘍に対する5-アミノレブリン酸を用いた 術中蛍光診断における問題点克服のための工夫
3. 学会等名 第15回日本脳神経線力学学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naokado Ikeda, Shinji Kawabata, Yoshihide Katayama, Motomasa Furuse, Ryokichi Yagi, Naosuke Nonoguchi, Ryo Hiramatsu, Toshihiko Kuroiwa and Masahiko Wanibuchi
2. 発表標題 The efficacy of Navigation-system Guided Biopsy with 5-ALA Induced Photodynamic Diagnosis for Malignant Brain Tumors
3. 学会等名 Congress of Neurosurgeons 2019 annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浦原 明宏, 池田 直廉, 川端 信司, 片山 義英, 福村 匡央, 古瀬 元雅, 野々口 直助, 黒岩 敏彦
2. 発表標題 脳腫瘍に対するマルチモダリティ併用ナビゲーション 単独ガイド生検術の有用性
3. 学会等名 第73回脳神経外科学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福村匡央 池田直廉 川端信司 片山義英 古瀬元雅 野々口直助 黒岩敏彦
2. 発表標題 5-ALA光線力学的診断併用ナビゲーションシステム誘導脳針生検の有用性の検討
3. 学会等名 第18回日本術中画像情報学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ikeda Naokado, Kawabata Shinji, Katayama Yoshihide, Fukumura Masao, Furuse Motomasa, Nonoguchi Naosuke, Kuroiwa Toshihiko
2. 発表標題 The Efficacy of pure Navigation-system Guided Biopsy with 5-ALA Induced Photodynamic Diagnosis for Malignant Brain Tumors
3. 学会等名 第56回日本癌治療学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池田直廉 川端信司 矢木亮吉 辻 優一郎 金光拓也 木村誠吾 野々口直助 古瀬元雅 黒岩敏彦 鯉淵昌彦
2. 発表標題 マルチモダリティ支援ナビゲーションシステム 誘導下生検の有用性に関する検討
3. 学会等名 第79回日本脳神経外科学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田直廉 川端信司 片山義英 古瀬元雅 野々口直助 矢木亮吉 塩山高広 梶本宜永 黒岩敏彦 鱈淵昌彦
2. 発表標題 悪性脳腫瘍に対する術中蛍光診断における蛍光観察システムの変遷と問題点の克服
3. 学会等名 日本蛍光ガイド手術研究会第3回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田直廉 古瀬元雅 矢木亮吉 金光拓也 福村匡央 野々口直助 川端信司 鱈淵昌彦
2. 発表標題 脳腫瘍に対する外視鏡による 術中蛍光ガイド下手術の有用性と問題点
3. 学会等名 第16回日本脳神経外科光線力学学会
4. 発表年 2020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	川端 信司 (Kawabata Shinji) (20340549)	大阪医科大学・医学部・准教授  (34401)	
研究分担者	古瀬 元雅 (Furuse Motomasa) (70340560)	大阪医科大学・医学部・准教授  (34401)	
研究分担者	野々口 直助 (Nonoguchi Naosuke) (70388263)	大阪医科大学・医学部・講師  (34401)	

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
---------	---------