

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591485

研究課題名（和文） 内視鏡下リンパ節転移診断確立のための基礎研究

研究課題名（英文） Fluorescence diagnosis of metastatic lymph nodes using 5-ALA in a mouse model of colon cancer

研究代表者

坂井 義治（SAKAI YOSHIHARU）

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：60273455

研究成果の概要（和文）：我々が提案する Lymph node navigation surgery は、術中にリンパ節転移を診断しながら手術操作を進めるというものであり、リンパ節転移の術中評価法として腫瘍の蛍光診断に着目した。ヘム合成の前駆物質であるアミノレブリン酸（5-ALA）は、その代謝産物プロトポルフィリン IX（PPIX）が腫瘍細胞特異的に蓄積し、励起光により赤色の蛍光を呈する。マウス大腸癌リンパ節転移モデルにおいて、5-ALA を用いた蛍光観察により転移リンパ節の同定が可能かどうかを検討したところ、5-ALA を経口投与した場合はリンパ節転移の同定は困難であったが、腹腔内投与した場合は転移リンパ節の同定が可能であった。以上の結果は5-ALA を用いた蛍光診断が実際の腹腔鏡手術に応用できる可能性を示している。

研究成果の概要（英文）：Fluorescence diagnosis using 5-aminolevulinic acid (5-ALA) is a promising technique for evaluating various malignancies. In this study, we investigated the usefulness of fluorescence diagnosis using 5-ALA for the detection of lymph node metastasis in a mouse model of colon cancer. An orthotopic colon cancer model was prepared by inoculating the cecal wall of nude mice with human colon cancer cell lines. After 3 wk, 40 mg/kg of 5-ALA was administered intraperitoneally (IP) or orally (PO). Fluorescence diagnosis with a D-Light System (Karl Storz) was then performed. In the IP group, PPIX fluorescence was detected in metastatic lymph nodes as well as in other malignant lesions, including primary tumors and abdominal implantations, while non-metastatic nodes were fluorescence-negative. In contrast, no obvious fluorescence was detected in cancerous tissues in the PO group. This technique may facilitate the intraoperative diagnosis of lymph node metastases from colon cancer in a clinical setting.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：消化器外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：内視鏡手術、大腸癌、リンパ節転移

### 1. 研究開始当初の背景

(1) リンパ節転移は大腸癌における予後決定に最も強く影響する因子の1つである。CT、MRI、PET といった検査機器の進歩にも関わらず、術前にリンパ節転移を正確に判断するのは難しく、術中に切除したリンパ節の一部を迅速病理検査に提出して判断しているのが現状である。しかしながら迅速病理検査は少なくとも30分以上の時間を要すること、未固定標本を使用することによる診断の正確性に限界があること、などの問題点がある。

(2) リンパ節郭清は欧米では従来は進行度(Stage)の決定に役立つと言われてきたが、近年はリンパ節郭清がStageの決定に役立つばかりでなく、患者の予後そのものに関与するということが前向き臨床試験の結果から乳癌、胃癌などで明らかとなってきた。従って患者の進行度に適した過不足のないリンパ節郭清を行うには、術中に転移リンパ節を正確に診断する手法の樹立が必要である。

(3) ヘム合成の前駆物質であるアミノレブリン酸(5-Aminolevulinic acid; 5-ALA)は、その代謝産物であるプロトポルフィリン IX(Protoporphyrin IX; PPIX)が腫瘍細胞特異的に蓄積し、青紫色の励起光により赤色の蛍光を呈する性質を持つ。5-ALAをもちいた腫瘍細胞の同定は、脳腫瘍、膀胱癌などの領域ではすでに臨床応用されている。

### 2. 研究の目的

我々が提案するLymph node navigation surgeryは、術中にリンパ節転移を診断しながら手術操作を進めるというものである。以上の背景を踏まえ、大腸癌におけるリンパ節転移の術中評価法として5-ALAをもちいた腫瘍の蛍光診断の可能性について検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) GFP発現安定細胞株の樹立

高転移能をもつといわれるヒト大腸癌細胞株HCA7、HCT116、HT29に、GFP(Green Fluorescent Protein)を組み込んだレトロ

ウイルスを感染させる。そのあとにGFPを高発現している集団をFACS(Fluorescence activated cell sorting)でsortingし、GFPを安定して発現する細胞株を樹立する。

#### (2) リンパ節転移モデルの樹立

5~8週齢のヌードマウスの虫垂壁に、樹立したGFP標識ヒト大腸癌細胞株をそれぞれ $1 \times 10^6$ 個接種し、腸間膜リンパ節への転移が生じるか、接種後1週間、2週間、3週間と経時的に検討する。

#### (3) 使用機器

5-ALAをもちいた蛍光診断に関しては、膀胱腫瘍の同定のためすでに市販されているKarl Storz社製のD-light Systemを開腹後の腹腔内リンパ節の検定に使用する。この機器は、通常内視鏡の光源および検出器にPPIXの蛍光波長を特異的に検出できるフィルターを組み込んだものである。なお、実際にリンパ節に腫瘍細胞が存在しているかどうかは、リンパ節を摘出後に透過型蛍光顕微鏡を使用してGFP発現の有無を確認するとともに、パラフィン切片を作成しH.E.染色でも確認する。

#### (4) 5-ALAの投与方法

脳腫瘍や膀胱癌で臨床的に使用されている投与量を参考として、40mg/kgの5-ALAをヌードマウスに①経口投与、および②腹腔内投与の2通りで検討する。また5-ALA投与して①3時間後、②6時間後、③12時間後、の3点でD-light Systemを用いて蛍光観察し、最適条件を決定する。

### 4. 研究成果

(1) GFPを組み込んだレトロウイルスをヒト大腸癌細胞株HCA7、HCT116、HT29らに感染させたところ、30~50%の細胞がGFPを発現するようになった。さらにFACSでGFP強度でsortingしたところ、ほぼ100%の細胞がGFPを高発現する細胞株が樹立できた。なお、これらの細胞株は細胞培養では少なくとも3ヶ月以上にわたって強度をおとすことなくGFPを安定的に発現しつづけることを確認

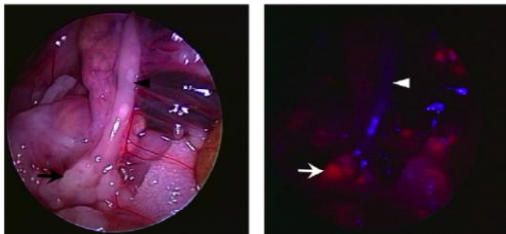
した。

(2) ノードマウスの虫垂壁にそれぞれの細胞株  $1 \times 10^6$  個を 30  $\mu$ l の PBS に溶かして接種して経時的に観察したところ、1 週間経過時点では原発巣は同定できるものの、リンパ節転移ははっきりしなかった。しかしながら、3 週間経過時点ではいずれの細胞株においても 70~80% と高率に腸間膜リンパ節への転移がおこなっていることが確認された。さらに一部のマウスでは腹膜播種、肝転移もおこなっているのが確認された。

(3) マウスの開腹後に Karl Storz 社製の D-light System を使用して検討したところ、全ての盲腸原発巣において非常に高い赤色蛍光が検出された。さらに、腸間膜リンパ節に関しては、赤色蛍光が検出されるものと、検出されないものの 2 群に分かれる結果であった (図 1)。それらの腸間膜リンパ節を摘出して透過型蛍光顕微鏡で GFP 発現を検討したところ、D-light System での赤色蛍光の結果とほぼ一致して GFP 蛍光が確認された。さらにパラフィンブロックでの H. E. 染色においても、GFP 蛍光と一致して腫瘍細胞が認められ、病理学的にもリンパ節転移であることが確認された (図 2)。

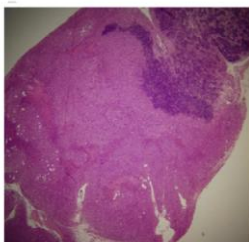
(図 1)

赤色蛍光のあるリンパ節(矢印)とないリンパ節(矢頭)

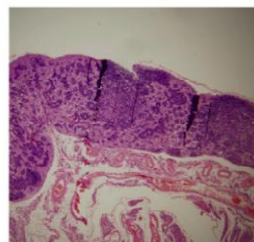


(図 2)

リンパ節転移  
陽性



リンパ節転移  
陰性



(4) 5-ALA の投与方法に関しては、経口投与群 (PO 群 : n=13 匹) では、原発巣や腹壁転移など一部の癌組織に淡い蛍光を認める場合もあった。一方、腹腔内投与群 (IP 群 : n=10 匹) では、腸間膜内に赤色蛍光を認めたリンパ節は全例転移陽性が確認された (10/10)。5-ALA の投与後の観察に関しては、投与 3 時間、6 時間、12 時間のいずれにおいても D-light System で腸間膜リンパ節転移は赤色蛍光として検出可能であった。ただ蛍光強度に関しては、投与後 3 時間の方が 6 時間よりも強い傾向にあり、12 時間はかなり弱くなることが確認された (表 1)。

(表 1)

Route of administration	IP		PO	
	3 h	6 h	3 h	6 h
No. of animals	4	6	3	10
PPIX fluorescence in mesenteric nodules, no.				
Positive	4	6	0	0
Negative	0	0	3	10

以上の結果から、5-ALA をもちいた蛍光診断能については、腹腔内投与で、かつ投与 3 時間での観察が最適条件であると考えられた。今後は実際の臨床に 5-ALA を用いた蛍光観察によるリアルタイムのリンパ節転移診断が応用可能かどうか、ヒト臨床検体等を用いてさらに詳細な検討をしていく予定である

## 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 1 件)

Kato S, Kawamura J, Kawada K, Hasegawa S, Sakai Y. "Fluorescence diagnosis of metastatic lymph nodes using 5-aminolevulinic acid (5-ALA) in a mouse

model of colon cancer.” J Surg Res. 2012  
Aug;176(2):430-6.  
DOI: 10.1016/j.jss.2011.10.031.

〔学会発表〕(計1件)

加藤滋、川村純一郎、河田健二、他 “In vivo  
fluorescence diagnosis of metastatic  
lymph nodes using 5-aminolevulinic  
acid(5-ALA) in colon cancer”  
European Society for Surgical Research.  
2011.5.26. Aachen

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂井 義治 (SAKAI YOSHIHARU)  
京都大学・医学研究科・教授  
研究者番号：60273455

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし