

第22回総会 総会賞受賞論文

5-Aminolevulinic acid (5-ALA) を投与した腫瘍内代謝物 Protoporphyrin- IX (Pp- IX) の蛍光分析

三好 憲雄, 小笠原利行*, 小川 透*, 佐野 和生*,
金子 貞男**, 福田 優, 久住 治男***

福井医科大学・第一病理学

*歯科口腔外科,

**岩見沢市民総合病院・脳神経外科

***金沢大学・泌尿器科

An Application of Fluorescence Analysis of metabolized
Protoporphyrin-IX (Pp-IX)
in a tumor tissue administrated with 5-aminolevulinic acid (5-ALA).

Norio MIYOSHI, Toshiyuki OGASAWARA*, Toru OGAWA*, Kazuo SANO*,
Sadao KANEKO**, Masaru FUKUDA and Haruo HISAZUMI***

Department of Pathology, *Dentistry and Oral Surgery, Fukui Medical University.

**Department of Neuro Surgery, Iwamizawa Municipal General Hospital and

***Department of Urology, Kanazawa University.

要 旨

著者らは蛍光分光分析を応用して5-アミノレブリン酸 (5-ALA) が生体組織において代謝生成するプロトポルフィリン-IX (Pp-IX) の定量的検出を基礎的, 臨床的に検討した.

動物実験: 担癌マウス (移植扁平上皮癌) に対して5-ALA軟膏を超音波照射併用により経皮投与した. その腫瘍組織内に取り込まれたPp-IXの新鮮凍結切片における蛍光発光スペクトルはミセル溶液に溶解した標準Pp-IXのスペクトルパターンと一致していることが検証され, 標準Pp-IXの蛍光強度と濃度の検量線から腫瘍組織内Pp-IX濃度を算出した. この定量法を種々の5-ALA誘導体について検討したところ, アルキル鎖が長い程, 扁平上皮癌ではPp-IXをより多く生産した. また5-ALA塗布中の超音波照射により経皮吸収が促進され, Pp-IXの取り込み量が増大した.

臨床実験: 脳腫瘍 (Astrocytoma, Glioblastoma) 患者47例に5-ALAを経口投与し, 手術中の

癌組織経口強度を半定量的に肉眼診断 (－, +/－, +, ++, +++) し, また摘出した癌組織内Pp-IX濃度を上記方法により求めた. 算出値は脳腫瘍の悪性度と正の相関 (指数関数的増加) を示し, また脳腫瘍の悪性度と術中の肉眼診断蛍光強度の間にも正の相関を認めた.

以上から本定量法の有用性が示されるとともに, 5-ALAの診断学的有用性が示唆された. 今後, 他領域の腫瘍においても, 術中蛍光観察診断は大変有用と考えられる.

キーワード: 5-アミノレブリン酸 (5-ALA), プロトポルフィリン-IX (Pp-IX), 移植扁平上皮癌 (SCC), 術中蛍光観察診断, 蛍光分光分析

Abstract

We have applied the fluorescence spectral analysis to detection of protoporphyrin-IX (Pp-IX) quantitatively in the transplanted squamous cell carcinoma (SCC) tissue and intraoperative brain astrocytoma (glioblastoma) tissue after administration of 5-aminolevulinic acid (5-ALA). We confirmed the coincidence with emission spectra of Pp-IX incorporated into the tumor tissues (cryo-sections) and the standard Pp-IX in the micellar solution. It has used a calibration curve which the fluorescence intensity of Pp-IX against the known concentration of standard Pp-IX. From the fluorescence detection method, it was found that the longer alkyl-chain length (methyl- and hexyl-) 5-ALA induced much Pp-IX in the SCC tissue, furthermore, an ultrasound treatment enhanced the uptake of Pp-IX during the topical administration of 5-ALA derivatives. In the case of intraoperative observation for the fluorescence intensity of Pp-IX in the brain astrocytoma tissue, this quantitative detection in the cryo-section demonstrated the intraoperative observation for the fluorescence intensities (－, +/－, +, ++, +++) diagnosis was correlated closely with the grades of astrocytoma, which intensity increased exponentially with the grades. In future, the fluorescence diagnosis of Pp-IX in the tumor will be very useful for other clinical diagnosis of tumor using 5-ALA.

Key Words : 5-ALA, Pp-IX, SCC, intraoperative diagnosis, fluorescence spectro analysis

1 はじめに

近年, 5-ALAを用いた癌の診断・治療の応用例が国内でも主に皮膚科, 歯科口腔外科, 脳神経外科領域において報告されている¹⁾. 今までに他の光増感剤に比較して5-ALAの優れた点が多く報告され²⁾, 5-ALA投与により腫瘍組織内で代謝・生成されたPp-IXの集積性を明らかにすることは,

癌の診断・治療に直接関与する重要課題の一つであり, 特に, ヨーロッパでは5-ALA研究の基礎^{3, 7)}と臨床^{8, 12)}の両面で研究が盛んである. 従来, Pp-IX集積の定量法の多くは, 腫瘍組織から抽出したPp-IXの高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に連動した蛍光分析であった. しかし, その抽出過程におけるPp-IXの安定性は明らかで

はなく、抽出操作によるPp-IXの損失や腫瘍境界外からのサンプリングの危険性の問題が残る。今回、5-ALA投与後の腫瘍組織内Pp-IX集積量を蛍光分光光度計を用いて組織化学的に定量化する新しい方法について検討し、脳腫瘍術中蛍光診断の信頼性について臨床的見地から検討したので報告する。

2 方法

2.1 移植実験腫瘍組織の5-ALA取り込み実験と蛍光マクロ観察の方法：

C3Hマウスの背部に扁平上皮癌 (SCC) を移植して一週間から10日目に腫瘍の直径が1 cmになった時点で、5-ALA取り込み実験に用いた。SCC腫瘍のサンプリング4時間前に20%-5-ALA含有親水性軟膏を腫瘍部に塗布し、超音波照射の吸収促進効果により経皮投与した。投与は、20% (1.2M) の5-ALA, Methyl-, Hexyl-誘導体・含有の親水性軟膏をそれぞれSCC腫瘍頂部 (直径7 mm) に塗布し、1時間取り込ませたものと、さらにその間の10分間の超音波 (1 MHz) を水流還流で冷却しながら照射したものの2つの条件下で行った。塗布1時間後SCC腫瘍組織を摘出し、Optimal Cutting Temperature (OCT) コンパウンド (Tissue-Tek社製, No. 4583) に包埋して、 -20°C にて腫瘍実質面を切り出した。組織内Pp-IXの赤色蛍光の励起光源として青紫色半導体レーザー装置 (IHI社製, iLS-LD-400型, $410\pm 5\text{nm}$; 15mW) を使用した。蛍光観測には励起光の波長域をカットするフィルター (東芝社製, $> 430\text{nm}$) を使用した。

2.2 実験腫瘍組織凍結薄切切片の組織観察と蛍光顕微鏡観察の方法：

連続凍結切片固定液により室温で3分間の固定後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色切片および未固定の切像を蛍光顕微鏡 (Olympus; PROVIS-AV80型) により対比観測し、正常皮膚を含めた腫瘍実質内のPp-IX蛍光発光分布を写真に記録した。観測の励起 (フィルター: WBV) 波長域は400~440nmの青紫色で、観測波長域は

475nm以上の長波長域で行った。

2.3 実験腫瘍組織凍結薄切切片の蛍光分析法：

HE組織像との対比により、SCC腫瘍実質を選んで、凍結切片 (-20°C ; $10\mu\text{m}$) の5枚重ね合わせのサンプル ($10\times 5=50\mu\text{m}$) における蛍光強度と標準Pp-IXの検量線 (既知濃度Pp-IXと蛍光強度) との対比により、腫瘍組織単位体積 (g) 当たりのPp-IX集積量 (組織の比重を1として換算: μM オーダー) を算出した。また、蛍光分光光度計 (860型, 日立製作所) の粒子状サンプル測定用セルホルダーとセル (850型のオプション: 図1-1, 1-2) 内に、上記の組織凍結薄切切片 ($10\mu\text{m}$) を5枚重ね合わせて石英プレートでカバーしたもので、組織内蛍光発光スペクトルを測定した。さらに、濃度換算のために、リン酸緩衝溶液とカチオニック性界面活性剤 (10mM cetyl trimethyl bromide=CTAB) 水溶液中の標

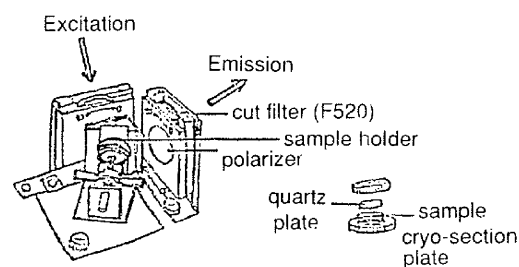
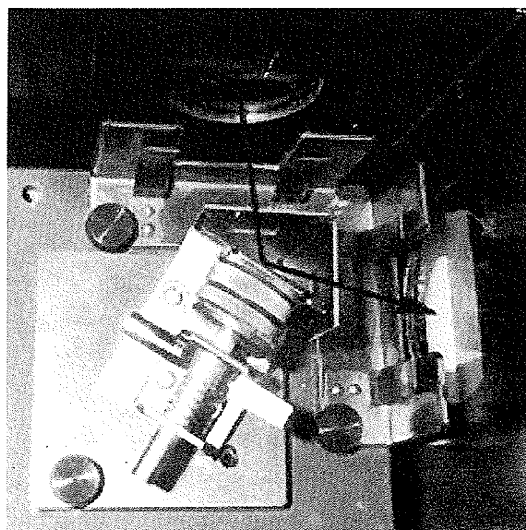


図1-1, 1-2 蛍光分光光度計のサンプルルーム内における粒子状サンプル測定用セルホルダー (1-1) とセル内サンプルの位置関係 (1-2)

準50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pp-IXのスペクトルと比較検討した。また、ヒト悪性黒色腫由来培養 (HMF) 細胞に、100 μM 5-ALAを4時間取り込ませたサンプルの蛍光スペクトルも計測した。

2.4 術中肉眼蛍光診断法:

脳腫瘍 (Astrocytoma又はGlioblastoma) 患者 (47症例) に対し、術前に実験の主旨を十分に説明してインフォームドコンセントを得た上で、5-ALA (10mg/kg, B. W., 5%糖液=20ml) を腫瘍摘出手術5時間前に経口投与した。脳腫瘍組織の術中蛍光マクロ観察には、励起光源として青紫色半導体レーザー装置 (IHI社製, iLS-LD-400型, 410+/-5nm; 15mW) を用い、観測には一枚のカットフィルター (東芝製, >420nm) を通して肉眼診断を行い、蛍光マクロ写真を撮影して記録した。肉眼診断は蛍光強度により (-, +/ -, +, ++, ++++) の五段階に分類して行った。また、この診断を指標にして切除した各摘出物の病理組織学的診断を北海道大学中央検査部に依頼し、得られた診断結果Grade (I~IV) と蛍光強度による肉眼診断との相関性を検討した。

2.5 手術切除組織の薄切切片蛍光分析法:

手術切除サンプルの組織内Pp-IXの蛍光顕微鏡観測は、蛍光顕微鏡写真に記録するとともに、上記の実験腫瘍組織内蛍光分析法と同じ手法で、腫瘍単位体積におけるPp-IX集積量 (μM) を検量線から外挿した。連続切片のHE染色像の病理組織学的診断を上記中央検査部に依頼し、得られた診断結果Grade (I~IV) とPp-IX集積量 (μM) との相関性を検討した。

3 結果

3.1 実験腫瘍組織内蛍光分析結果:

5-ALAの経皮的投与と超音波照射の併用の場合は、図2の蛍光写真のように、青紫色半導体レーザー励起により、移植腫瘍組織中心の実質部に赤色の蛍光が観測された。また、その凍結薄切切片の蛍光顕微鏡写真 (図3) では、確かにSCC腫瘍実質部と毛根部に赤色 (635nm) の強い蛍光が観

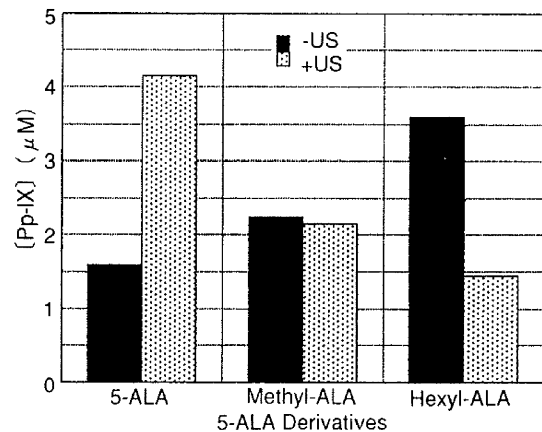


図4 図3のSCC腫瘍実質部の凍結切片 (10×5=50 μm) 内単位体積当たりのPp-IX濃度の5-ALA誘導体依存と超音波照射効果

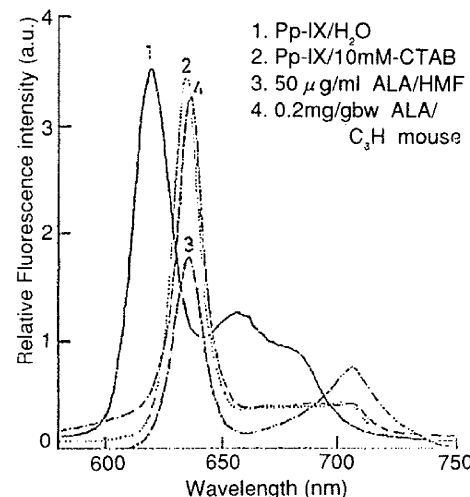


図5 標準Pp-IXと5-ALA体内生成物Pp-IXの発光スペクトル

測できた。これらの形態的腫瘍実質部位の確認のもとで計測した図4のグラフから、腫瘍実質に取り込まれたPp-IX量は、薬剤の極性で疎水性の高いHexyl->Methyl->5-ALAの順に増加していたが、超音波照射を加えた場合、5-ALA単体は他誘導体と異なり約2.5倍に取り込み量が促進された。さらに、検出した腫瘍組織内蛍光 (Curve-4) がPp-IX由来のものであることは、図5のスペクトル計測で、標準Pp-IXの発光スペクトル (Curves-1, 2; 方法2.3) と比較することにより、癌培養 (HMF) 細胞内 (Curve 3; 方法2.3) やSCC組織内 (Curve 4; 方法2.3) のスペクトルが標準Pp-IX

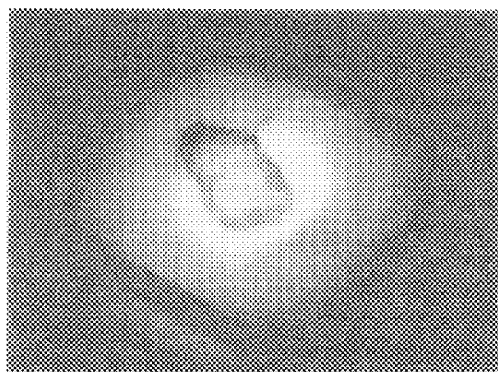


図2 C-Hに代替した扁平上皮癌 (SCC) 組織におけるプロトポルフィリン-IX (Pp-IX) の蛍光組織マクロ写真 (X1)

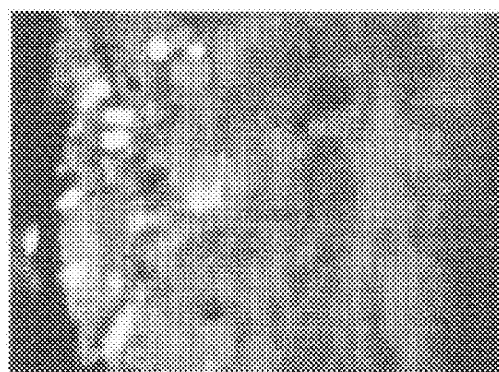


図3 図2の凍結SCC腫瘍組織の凍結切片 (10 μ m) の蛍光顕微鏡写真 (X10)



図6 脳中腫瘍組織マクロ像 (左側: 白色光) と同視野の蛍光顕微鏡像 (右側: 照射の青色光カットのフィルターを使用)

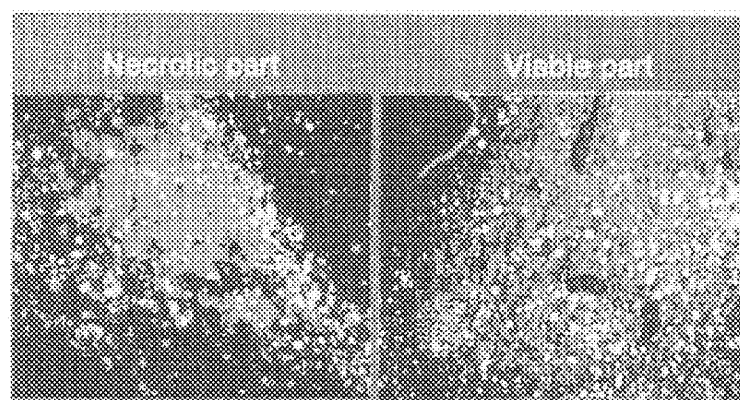


図7 Glioblastoma患部の凍結切片の蛍光顕微鏡像 (左側: 腫瘍壊死部; 右側: 腫瘍実質部; X10)

と一致していることから証明できた。

3.2 術中脳腫瘍切除組織内蛍光分析結果：

脳腫瘍摘出手術中に、図6右図のように、腫瘍境界部が635nmにピークを持つ鮮明な赤色蛍光が観測され、左図のような従来の画像に比較して飛躍的に肉眼的診断が改善できることが明らかとなった。また、摘出腫瘍サンプルの凍結切片の蛍光顕微鏡写真でも、HE組織像（未掲載）との対比検証により確かに腫瘍部と腫瘍組織内壊死部に一致してPp-IX が取り込まれていた（図7）。これら確認の後に図8のグラフから、10mg/kg. B. W. の5-ALA含有5%糖液を経口投与して5時間後の脳腫瘍摘出サンプル内のPp-IX量は、AstrocytomaのGrade (I ~ IV ; IV = Glioblastoma) の上昇と術中肉眼的蛍光観測強度 (—) ~ (+++) の増大に相関して指数関数的 ($y=1.29 \times 10 e^{(0.25)}$; $R^2=0.97$) 増大を示し、肉眼的観測の信頼性が裏付けられた。

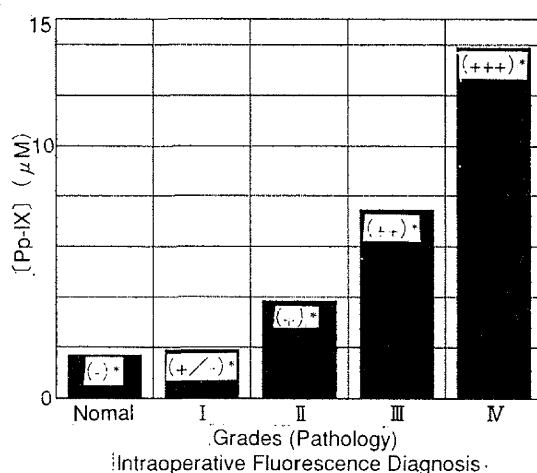


図8 Astrocytoma組織内に取り込まれたPp-IX濃度 (μM) の術中肉眼蛍光診断 [(—), (+/-), (+), (++) , (+++)] と病理診断 grade [N, I, II, III, IV=glioblastoma] との関係

4 考 察

5-ALAの腫瘍親和性は、特に膀胱癌や皮膚癌および脳腫瘍に対する臨床応用例で報告されてきた。しかし、これらの報告はいずれも形態学的な蛍光観察が主であり、概して定量的計測とは切り離されて研究されてきた。今回の報告では、5-

ALAの腫瘍親和性が、脳腫瘍の術中における肉眼的蛍光強度の半定量観察や摘出物凍結切片の定量的蛍光分析から明らかとなり、47症例の検索結果から腫瘍の悪性度の上昇に伴い、蛍光強度が指数関数的に増加することが示され、術中蛍光観測は大変有用な診断法であることが示唆された。このことは肉眼による半定量的な蛍光診断に根拠を与えたが、経験的主観的診断であることは免れず、今後、術中肉眼的蛍光診断にいかに関与性を持たせていくか、さらに検討する必要があると思われる。

腫瘍境界部の蛍光による鮮明化の事実、今後、5-ALAによる肉眼診断が脳神経外科領域以外の他の術中がん診断に応用拡大されていくことを推察させる。また、ページェット病等の癌組織以外の疾患に対する応用も検討されていくことが予想される。

腫瘍組織における5-ALA取り込みのメカニズムは、未だ明確にされていないことから、今後、放射性同位元素でラベルした5-ALA誘導体の腫瘍組織内における挙動を明らかにする必要があると思われる。特に、5-ALAの形のままで腫瘍親和性があるのか、あるいはPp-IXになってから腫瘍親和性が発揮されるのかが意見の別れるところである。また、ミトコンドリアで5-ALAからPp-IXに代謝される酵素系の中で、取り込みに特異性が出るのであれば、腫瘍組織内の代謝系が正常組織と異なる可能性があり、その酵素が腫瘍親和性を制御していることも考えられる。また、腫瘍組織内ではフェトケタラーゼ活性が低いあるいは鉄イオンが少ない可能性も考えられよう。今後、5-ALAの腫瘍特異性のメカニズムを明らかにすることにより、さらに腫瘍選択性を増大させた機能的体内色素前駆体の分子設計および合成開発が可能となるかもしれない。

5 謝 辞

本研究は、科研費（基盤C-2：No. 11672293／1999-2000）と（基盤B-2：No. 11557116／1999-2000）、（基盤B-2：No. 14370793／2002-2005）、経

済産業省戦略的地域産学官共同研究提案書 (2001), 北陸産業活性化センターR&D推進研究助成金 (2002), 岡崎国立共同研究機構, 基礎生物学研究所の共同研究 (2001), および厚生省がん研究助成金 (No. 10-37; がんの診断治療用光学機器の開発; 班長: 田尻久雄; 1998-1999) により行われた。関係各位に心から深謝申し上げます。また, コスモ総合研究所の田中 徹博士には, 動物実験用5-ALAの種々のエステル誘導体の提供に対し, 心よりお礼申し上げます。

参考文献

- 1) 平成13年度岡崎国立共同研究機構, 基礎生物学研究所共同研究報告書の添付書類: 「光生物学から見た光化学的増感反応機構の解釈と応用研究」; T. Tanaka, T. Udagawa, T. Hirano, et al.: "Proceedings of Symposium for Photobiological Bridge between Photochemical Sensitization and Photodynamic Cancer Treatments (5-ALA PDD and 5-ALA PDT)" (Ed. N. Miyoshi), 1-60, 2001. National Institute for Basic Biology.
- 2) O. Peng, T. Warloe, K. Berg, et al.: 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Cancer*, 79: 2282-2308, 1997.
- 3) A. A. Krzemien, D. A. Van Vugt, W. A. Fletcher, et al.: Effectiveness of photodynamic ablation for destruction of endometrial explants in a rat endometriosis model. *Fertil. Steril.*, 78: 169-175, 2002.
- 4) A. Cumow, and S. G. Bown: The role of reperfusion injury in photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid-a study on normal rat colon. *Br. J. Cancer*. 86: 989-992, 2002.
- 5) A. Casas, C. Perotti, M. Saccoliti, et al.: ALA and ALA hexyl ester in free and liposomal formulations for the photosensitisation of tumour organ cultures. *Br. J. Cancer*, 86: 837-842, 2002.
- 6) B. Piot, N. Rousset, P. Lenz, et al.: Enhancement of delta aminolevulinic acid -photodynamic therapy in vivo by decreasing tumor pH with glucose and amiloride. *Laryngoscope*, 111: 2205-2213, 2001.
- 7) K. Lang, K. Bolsen, W. Stahl, et al.: The 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin biosynthesis in benign and malignant cells of the skin. *J. Photochem. Photobiol.*, 65: 29-34, 2001.
- 8) R. M. Szeimies, S. Karrers, S. Radakovic-Fijan, et al.: Photodynamic therapy using topical methyl 5-aminolevulinate compared with cryotherapy for actinic keratosis: A prospective, randomized study. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 47: 258-262, 2002.
- 9) G. Kirdaite, N. Lange, N. Busso, et al.: Protoporphyrin IX photodynamic therapy for synovitis. *Arthritis. Rheum.*, 46: 1371-1378, 2002.
- 10) D. C. Shackley, C. Briggs, C. Whitehurst, et al.: Photodynamic therapy for superficial bladder cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.*, 1: 523-530, 2001.
- 11) S. Karrer, C. Abels, M. B. Wimmershoff, et al.: Successful treatment of cutaneous sarcoidosis using topical photodynamic therapy. *Arch. Dermatol.*, 138: 581-584, 2002.
- 12) D. C. Shackley, C. Briggs, A. Gilhooley, et al.: Photodynamic therapy for superficial bladder cancer under local anaesthetic. *Brit. J. Urol. Int.* (従来のBrit. J. Urol.), 89: 665-670, 2002.