HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	膵癌腹膜播種病変における光線力学診断に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	齋藤, 崇宏
Description	配架番号：2818
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15689号
Issue Date	2023-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91344
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	SAITO_Takahiro_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　齋藤　崇宏

学 位 論 文 題 名

膵癌腹膜播種病変における光線力学診断に関する研究

(Studies for photodynamic diagnosis of peritoneal dissemination in pancreatic cancer)

【背景と目的】

膵癌は消化器癌の中で悪性度が高い癌腫とされており、我が国の統計においても癌による死因の１位を占める。膵癌の根治治療は唯一手術とされているが、癌発見時に腹膜播種など切除不能の状況で発見されることが多い。一方で、抗癌剤治療を含めた集学的治療も進歩しており、当初切除不能と診断された症例に対しても化学療法施行後に切除可能と判断されれば外科手術を付加する conversion surgery の取り組みも一部で行われるようになってきており、術前術中の診断能の向上が求められている。病期診断の評価として審査腹腔鏡検査が膵癌ガイドラインでも提案されており、腹膜播種や微小管転移検索目的に広く行われるようになってきている。しかし、肉眼観察に頼っているため偽陰性の症例も報告されている。

腹膜播種における診断率向上の方法として、5 アミノレブリン酸（5-aminolevulinic acid: 5-ALA）を用いた術中の光線力学的診断（Photodinamic Diagnosis: PDD）が期待されている。5-ALA は脳腫瘍や膀胱癌などの蛍光診断に用いられている。5-ALA はミトコンドリアにおいてグリシンとサクシニル CoA から合成される内因性のアミノ酸である。体外から 5-ALA を投与すると、正常細胞では蛍光を認めないヘムに速やかに代謝されるが、癌細胞内ではワークスブルグ効果が働くため 3 価鉄を 2 価鉄へ還元できずプロトポルフィリン IX（Protoporphyrin IX: PpIX）が選択的に蓄積される。この PpIX は蛍光物質であり、405nm で励起を行うと 635nm の発光を示すため、これを検出して癌診断を行うことが可能となる。

消化器悪性腫瘍における 5-ALA の応用は、大腸悪性腫瘍や胃悪性腫瘍を対象としたリンパ節転移や腹膜播種を診断する先行研究があり、診断率が向上することが分かって来た。しかしながら、感度が低い報告や偽陰性率が高い報告があり、臨床応用には至っていない。その原因として蛍光の判定が肉眼（目視）による主観的かつ定性的なものであると考えられる。この評価方法では術者の感じ方や観察力の個人差により偏りが生じる。このような原因から微弱な蛍光が認識できていない可能性がある。そこで、これらの問題点を解決すべく微弱な蛍光を認識するために蛍光スペクトルを検出する腹腔鏡診断用近赤外線蛍光画像システムを開発した。蛍光をスペクトルに分離して蛍光ピークの値を計測する方法であり、人間の視覚よりも高い感度で蛍光を認識することができると考える。本システムを用いることにより先行研究の欠点である微小転移の検出ができる可能性があり、PDD がより定量的な検査になっていくと考え今回の研究を立案した。

【材料と方法】

5-ALA の代謝産物である PpIX に対する検出能を確認するために、PpIX を 6uM/L から 0.1uM/L まで段階希釈を行った。希釈液に対して 405nm の励起を行い、肉眼による蛍光（Fluorescence image: FL）診断とスペクトルによる（Spectrograph :SP）診断を行い PpIX の検出能を比較した。

膵癌細胞株に対する検出能を確認するために、ヒト膵癌細胞株 Mia-Paca2、Panc-1、PK-1、KLM-1 を使用し PDD を行った。それぞれの細胞は 1mmol/L の 5-ALA 溶液を 30 分間投与し、リン酸緩衝生理食塩水

（PBS）で洗浄後に、1.5x10^6 /ml に調節した。その後、405nm の励起光を照射し、SP 診断を行った。

マウスモデルにおける検証を行うために、腹膜播種モデルマウスに 5-AL を投与し腹腔鏡下に PDD を行い、病理組織学的診断と比較検討を行った。観察方法は順に白色観察（White light image: WL）診断、FL 及び SP 診断を行った。

実臨床における検証を行うため、2017 年 4 月から 2019 年 3 月に北海道大学病院消化器外科 II において手術を予定した 8 症例患者に対して PDD を行った。その内、手術中に膵癌腹膜播種を疑った 4 症例で検討を行った。麻酔導入 2-4 時間前に 5-ALA（20mg/kg）を経口内服してもらった。手術は通常通りの方法で行い、切除検体を取り出した後、体外で F　L と SP 診断を行い病理組織学的診断と比較を行った。

【結果】

PPIX に対する SP 診断では FL 診断に比べ SP 診断ではより低濃度である 0.5μM/L の濃度まで 635nm と 700nm 前後をピークとした 2 相性の PpIX のスペクトルグラフが観察可能であった。

膵癌細胞株に対する SP 診断では複数の膵癌細胞株において 635nm と 700nm 前後をピークとした 2 相性の PpIX のスペクトルグラフが観察可能であった。

膵癌播種マウスモデルにおける検証では、WL 診断では播種病変の検出率は 62%であり、FL 診断では検出率は 78%であった。病理組織学的評価で転移を認めた腹膜と認めなかった腹膜の 2 郡に分け、SP 強度を比較すると有意差を持って転移陽性腹膜の SP 強度が高かった。SP 強度のカットオフラインを設定するために ROC 解析を行った後、カットオフラインであった 4000 a.u.以上かつ 635nm と 700nm 前後をピークとした 2 相性のスペクトルグラフを認めた場合を転移とした場合、SP 診断の検出率は 90%であった。

手術中に腹膜播種を疑い生検を施行した 4 症例、24 病変に対して FL と SP 観察による検査を行った。FL 観察での検出率は 36%であった。病理組織学的評価で転移を認め病変と認めなかった病変の 2 郡に分け、SP 強度を比較したが、有意差を認めなかった。FL 観察では肉眼上で蛍光を判断できないが、SP 観察では PPIX の 2 相性のスペクトルグラフを観察でき、病理組織学的診断で転移陽性の病変を 2 例認めたが、偽陽性症例も増加した。

【考察】

In vitro において腹腔鏡診断用近赤外線蛍光画像システムは肉眼的に観察が難しい微弱な PpIX のスペクトルグラフが観察可能であり有用であった。In vivo の播種モデルに対して腹腔鏡診断用近赤外線蛍光画像システムを用いることで、肉眼では観察困難な播種病変の微弱な蛍光を腹腔鏡下に検索できることが示せた。実臨床においてはブリーチングによると考えられる偽陰性病変や、免疫反応や抗癌剤治療によって生まれる繊維組織などに PPIX が集積することで偽陽性症例も認めているが、実臨床においても同様に微弱な蛍光を捕らえることができる症例があることから、今後、腹腔鏡診断用近赤外線蛍光画像システムを応用することでこれまで見逃されていた微小転移を検出できる可能性が示唆された。

【結論】

本研究では膵癌の腹腔内播種診断において腹腔鏡診断用近赤外線蛍光画像システムを用いることで微小転移の検出ができる可能性が示唆された。