



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15689
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91355
Type	doctoral thesis
File Information	SAITO_Takahiro.pdf



学 位 論 文

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)

2023 年 12 月

北 海 道 大 学

齋 藤 崇 宏

学 位 論 文

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)

2023 年 12 月

北 海 道 大 学

齋 藤 崇 宏

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
方法	9 頁
結果	13 頁
考察	21 頁
結論	24 頁
謝辞	26 頁
利益相反	27 頁
引用文献	28 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文として受理された。

1. Takahiro Saito, Yuma Ebihara, Liming Li, Tomoya Shirosaki, Hiroaki Iijim, Kimitaka Tanaka, Yoshitsugu Nakanishi, Toshimichi Asano, Takehiro Noji, Yo Kurashima, Soichi Murakami, Toru Nakamura, Takahiro Tsuchikawa, Keisuke Okamura, Toshiaki Shichinohe, Satoshi Hirano. “A novel laparoscopic near-infrared fluorescence spectrum system for photodynamic diagnosis of peritoneal dissemination in pancreatic cancer”, Photodiagnosis Photodyn Ther, 33, 102157, 2021

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 齋藤崇宏, 海老原裕磨, 川村武史, 宮坂 大介, 中西喜嗣, 浅野賢道, 野路武寛, 倉島 庸, 村上壮一, 中村 透, 土川貴裕, 岡村圭祐, 七戸俊明, 李 黎明, 平野 聡
消化器悪性腫瘍に対する蛍光スペクトル測定を用いた術中光線力学診断法
(Intraoperative Photodynamic diagnosis; iPDD)の確立
第 30 回 内視鏡外科学会総会, 2017 年 12 月 7-9 日・京都

要旨

【背景と目的】

膵癌は消化器癌の中で悪性度が高い癌種とされており、極めて予後不良な疾患である。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、腹膜播種や肝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 (Photodynamic 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へムに速やかに代謝されるが、癌細胞内では Warburg 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 で励起される。励起状態にある PpIX は基底状態に戻る際に赤色蛍光(第一蛍光ピーク波長 635nm、第二蛍光ピーク波長 705nm)を発するため、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いる。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。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 6 μ M/L から 0.1 μ M/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、1.5 $\times 10^6$ 細胞/ml に調整した。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-ALA 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 FL 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 0.5 μ M/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 群に分け、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 群に分け、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、偽陽性病変も増加した。

【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線維組織などに 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。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

5-ALA	5-Aminolevulinic Acid
5-ALALD	5-aminolevulinic acid dehydratase
COPROTOIII	Coproporphyrinogen III
CPOX	Coproporphyrinogen oxidase
CT	computed tomography
FDG-PET	Fluorodeoxyglucose positron emission tomography
FECH	ferochelatase
FL	Fluorescence image
PBG	Porphyvinogen
PBG-D	porphobilinogen deaminase
PDD	Photodynamic diagnosis
PpIX	Protoporphyrin IX
PROTOIX	Protoporphyrinogen
PROX	protoporphyrinogen oxidase
SP	Spectrograph
URO-D	Uroporphyrinogen decarboxylase
URO III	Uroporphyrinogen III
WL	White light image

緒言

膵臓癌（以下、膵癌）は消化器癌の中で、最も悪性度が高い癌種の1つであり、本邦の膵癌登録によると、5年生存率は膵癌全体で9.0-11.7%、切除可能例でも20%程度となっており極めて予後不良な疾患である（Egawa et al., 2007）上に、膵癌患者数は2010年に比べ2030年には倍増することが予想されている（Rahib et al., 2014）。現在、膵癌の根治治療は唯一手術とされているが、原発巣切除後の早期（5-6ヶ月）での腹膜や肝転移再発を多く経験する（Zheng et al., 2017）。一方で、ゲムシタビンとテガフル、ギメラシル、オテラシルカリウム合剤を用いた術前化学療法の導入（Unno et al., 2019）や、イリノテカン、オキサリプラチン、レボホリナートカルシウム併用療法（Neoptolemos et al., 2017）やゲムシタビン+ナブパクリタキセル（Conroy et al., 2017）などの術後補助化学療法により、膵癌の予後も改善の兆しがみられている。また、当初切除不能と診断された局所進行癌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など（Asano et al., 2014）、適切に診断をすることの重要性が増している。

腹膜播種は、腹部に発生した悪性腫瘍が漿膜に露出した後、腹腔という閉鎖腔内に癌細胞が散布される形で多数の転移巣を形成するという特殊な病態で、進行すると癌性腹水や管腔臓器の狭窄をきたす癌性腹膜炎の状況に陥る予後不良の病態である。原発は胃、膵臓、大腸などの消化器癌と婦人科生殖器癌が多い。膵癌においても生存期間中央値が7週間と報告され予後不良因子である（Takahara et al., 2016）。腹膜播種患者は治療中に腹水貯留が早期におき、腹水制御が不良のため治療の継続が困難になることが多い。近年、腹水を制御するためにパクリタキセルの腹腔内投与を併用する新規治療法の開発によって、腹膜播種を伴う胃癌患者の1年生存率が16%から78%と格段に伸びた（Ishigami et al., 2010）。膵癌領域でも同様の治療が始められており（Satoi et al., 2017）、腹膜播種診断の重要性は増している。現在、腹膜播種診断法として computed tomography (CT) や Fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) が用いられる。しかし、CT や FDG-PET の腹膜播種診断率は80%台に留まる（Kayaalp et al. 2002, Chen et al. 2005）。そこで、術中腹腔鏡検査を用いて腹腔内転移病変を検索するステージ診断（staging laparoscopy）が行われるようになったが十分な診断率とは言えない。

癌の診断を補助する方法として光線力学的診断（Photodynamic Diagnosis: PDD）がある。腫瘍親和性を有する光感受性物質を投与し、腫瘍部位に選択に蓄積された後、特定波長の光を照射した時に発する蛍光を観察することで診断を行う。5-アミノレブリン酸（aminolevulinic acid:5-ALA）、インドシアニングリーン、フルオレセイン、タ

ラポルフィンナトリウムなどが実臨床で使用されている。この診断薬のうち 5-ALA は脳腫瘍や膀胱癌などの蛍光診断に広く用いられている。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。また、5-ALA は水溶性で、経口的または局所的に投与可能である。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へムに速やかに代謝されるが、癌細胞内では Warburg 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 (PpIX) が選択的に蓄積される (Koizumi et al., 2016)。また、porphobilinogen deaminase (PBG-D) の活性が高く、ferochelatase (FECH) の活性が低いため、PpIX が蓄積する。この PpIX は蛍光物質であり、405nm で励起される。励起状態にある PpIX は基底状態に戻る際に赤色蛍光 (第一蛍光ピーク波長 635nm、第二蛍光ピーク波長 705nm) を発するため、これを検出して癌診断を行うことが可能となる (図 1)。

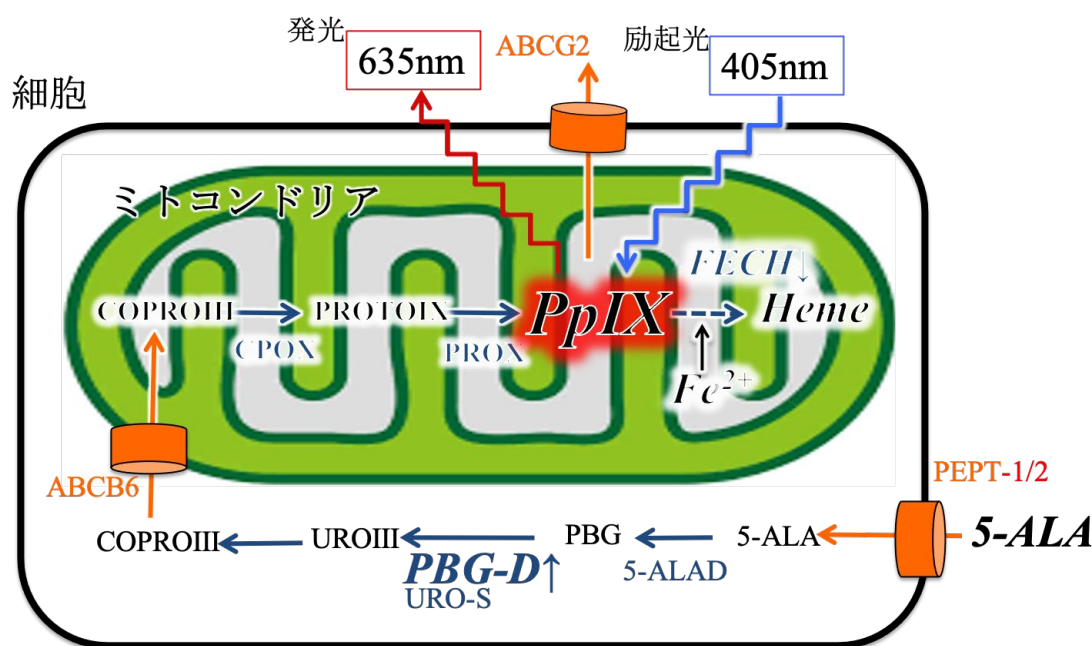


図 1. 5-ALA の代謝図

青：酵素、黄：トランスポーター

PpIX: Protoporphyrin IX。405nm で励起される。励起状態にある PpIX は基底状態に戻る際に赤色蛍光 (第一蛍光ピーク波長 635nm、第二蛍光ピーク波長 705nm) を発する。

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、5-ALA の内服後に PDD を併用することで診断率が向上することが分かって来た (Koizumi et al., 2016; Harada et al., 2013; Almerie et al., 2015)。しかしながら、感度が低い報告や偽陰性率が高く、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。また、視力の生理現象としての暗順応にも影響も受ける。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。微弱な PpIX の蛍光を客観的に捉える研究として膀胱癌領域の細胞診において蛍光スペクトラムを計測することが有用であったと報告されている（Nakai et al., 2015）。

膀胱癌の微細な腹膜播種を検索するために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（laparoscopic spectrophotometry）を開発した（Ebihara et al., 2012）。スペクトル解析は主観的評価による曖昧さを排除する 1 手法である。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。また、今後癌に対する手術療法は患者の高齢化や複数の併存症を持つ患者増加が予想される。低侵襲性を保ったまま微細病変を検出できれば、不要な手術を減らすことが可能になり、それぞれの患者に適した治療を早期に開始できるようになる。

方法

laparoscopic spectrophotometry について

北海道大学消化器外科Ⅱと千年科学技術大学の共同開発した蛍光スペクトラムと強度をリアルタイムに計測できる腹腔鏡システムである。蛍光スペクトルはオプティカルファイバー（東京特殊電線）から蛍光を取得し、405nm を中心にカットするノッチフィルターを通し、分光器で蛍光スペクトルを検出した（図2）。また、腹腔鏡手術の実臨床で使われる通常の15mm ポートから挿入可能である。



図 2. laparoscopic spectrophotometry

1) PpIX 検出能の検証

5-ALA の代謝産物である PpIX（Frontier Scientific 社）を 6 μ M/L から 0.1 μ M/L まで Dimethyl Sulfoxide（Wako）を用いて段階希釈を行った。希釈液を Macro cell（Hellma Analytics）に入れ、405nm の励起光を照射し、肉眼による蛍光画像の観察（FL 診断）とスペクトルによる観察（SP 診断）を行い PpIX の検出能を比較した。SP 診断による発光の有無は 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時に発光検出とした。励起光は Storz の腹腔鏡システムを（300w xenon light with band pass filter）を用いて 2cm の距離より行った。FL 診断は Storz の腹腔鏡システムを用い、SP は laparoscopic spectrophotometry を用いて、2cm の距離から行った（図 3）。

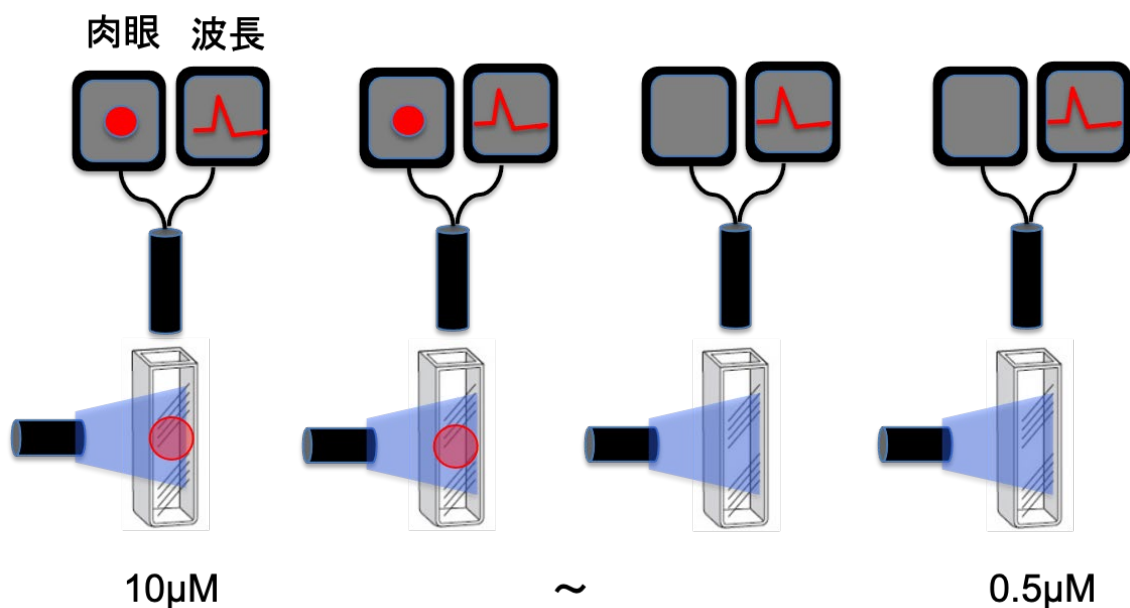


図 3 PpIX 検出能の検証

2) 膵癌細胞株における検証

本研究に使用した細胞株は、ヒト膵癌細胞株として RIKEN Bio Resource センターより購入した Mia-PaCa2、Panc-1、PK-1、KLM-1 を使用した。細胞培地は Mia-PaCa2 と Panc-1 に対しては D-MEM (Wako) を、PK-1、KLM-1 に対しては RPMI-1640 (Wako) を使用した。いずれもウシ胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS, Cell Culture Bioscience, Tokyo, Japan) と Penicillin/Streptomycin (Life Technologies, Tokyo, Japan) を添加し、それぞれ終濃度 10%, 1% とした。いずれの細胞株も 5% CO₂ 下で 37 度の温度のもとインキュベーター内で培養を行った。

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、 1.5×10^6 細胞/ml に調整した。調整液を Macro cell (Hellma Analytics) に入れ、その後、405nm の励起光を照射し、SP 診断を行った。励起光は Violet Laser Diode -EX (SBI Pharmaceuticals Co., Ltd, Japan) を用いて 2cm の距離より行い、SP 診断は laparoscopic spectrophotometer を用いて、2cm の距離から行った (Tsuruki et al., 2016)。

3) 腭癌播種マウスモデルにおける検証

PK-1 (5×10^6 細胞) を $50 \mu\text{l}$ の Hanks Balanced Buffer Solution (HBBS, Life technologies, Tokyo, Japan) に溶解し 1ml シリンジに入れた。6 週令のメスの Balb/c-nu/nu (日本クレア, Tokyo, Japan) を、十分な麻酔下におき、右上腹部を切開し、PK-1 を注入した。その後、マウス用サージカルクリップで閉腹した。

予備実験として GFP を導入した PK-1 を使用し、同様の手順で播種病変を作った。その後、1 週間毎に IVIS Spectrum imaging system (Caliper Life-Sciences, Hopkinton, MA) を用いて麻酔下で観察し (図 4)、播種病変の広がり確認を行い、PDD を行う至適時期を 3 週間とした。

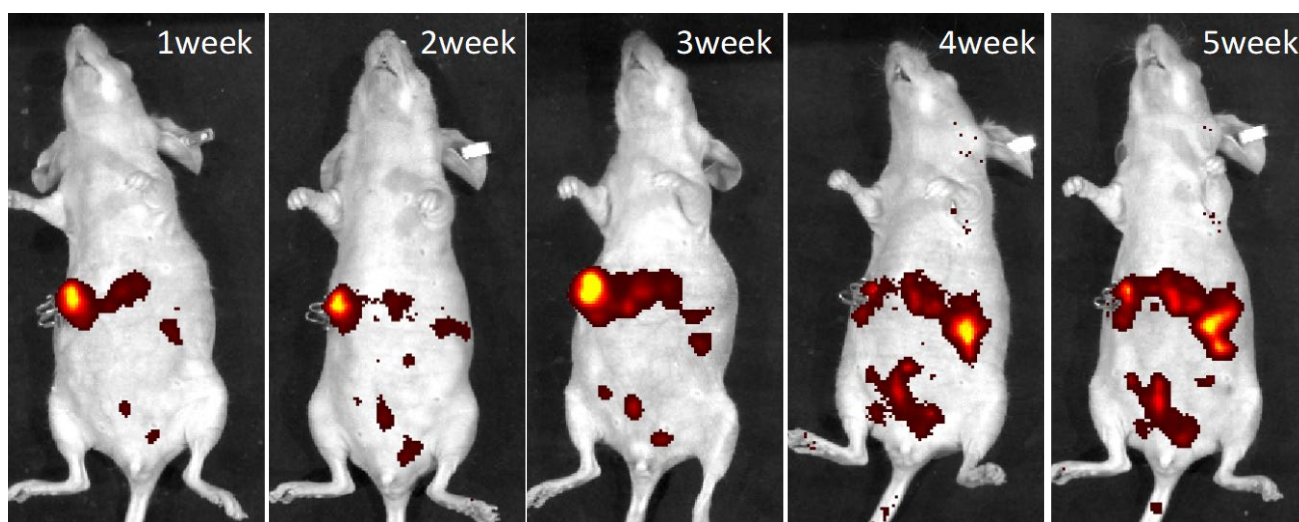


図 4. PK-1 (GFP 導入) の広がり

上記の方法で 3 週前に作製した腹膜播種マウスモデル 15 匹に 5-ALA (200mg/kg) を腹腔内投与し、2 時間後に十分な麻酔下で安楽死させた。その後、脊椎を挟んだ両側背部より小開腹し、同創部より骨盤内臓全摘術を施行し、同創部より 5mm と 15mm ポート (covidien) を挿入した。注射器で気腹を行った後に、Storz の 5mmHD カメラ (1920x1080p) と laparoscopic spectrophotometry を用いて腹腔内を観察した (図 5)。それぞれのマウス腹膜を前後左右に分けた 4 箇所、合計 60 箇所を観察部位とした。観察方法は順に白色観察 (WL 診断)、FL 及び SP 診断を行った。WL 及び FL 診断で転移の有無の判断は 2 人の外科医で行った。その後、観察腹膜をホルマリン固定し、H.E 染色を行った上で、腹膜播種病変の有無について病理組織学的検討を行った。また、SP 強度と病理組織学的評価を統計学的に比較検討した。強度は 635nm での値を統計に使用した。2 変数間の検定は Wilcoxon 検定を使用した、SP の強度のカットオフ値の設定にはロジスティック回帰分析を使用した。統計解析の際はいずれも $p < 0.05$ を有意水準とし信頼区間 95% とした。統計解析には JMP 12.2.0 for

MAC (SAS institute. Inc., Cary, NC, USA) を使用した。励起光は Storz の腹腔鏡システムを (300w xenon light with band pass filter) を用いて 2cm の距離から行った。WL 及び FL は Storz の腹腔鏡システムを用い、SP 診断は laparoscopic spectrophotometry を用いて、2cm の距離から行った。

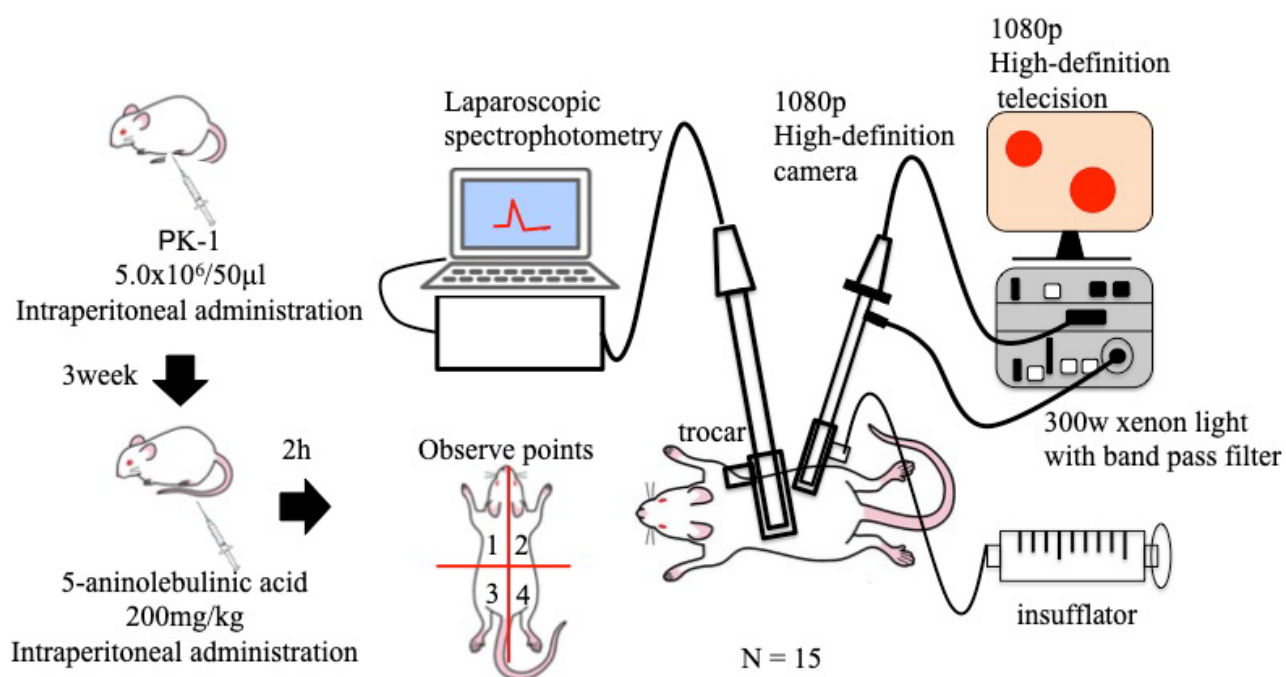


図 5. 腹膜播種マウスモデルの観察

腹膜播種マウスモデルに 5-ALA (200mg/kg) を投与し、2 時間後に腹腔鏡下に観察した。観察方法は WL、FL、SP 診断の順で行った。観察部位は前後左右の 4 箇所とした。

4) 臨床における検証

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 症例を対象とした。その内、手術中に脾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) を経口投与する。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 FL と SP 診断を行った。励起光は SBI ファーマーの VLD-EX を用いて行い。SP は laparoscopic spectrophotometry を用いて、2cm の距離から行った。検査後通常通りの病理診断を行い、比較検討した。すべての患者症例は十分なインフォームドコンセントの上、同意を得ており、また、本研究は北海道大学病院において自主臨床研究の承認を得て行った (自 016-0362)。

結果

1) PpIX 検出能の検証

FL 診断では $6\mu\text{M/L}$ (A) から $1\mu\text{M/L}$ (D) までの濃度まで赤色発光が視認可能であったが、 $0.5\mu\text{M/L}$ (E) から $0.1\mu\text{M/L}$ (F) は視認ができなかった (図 6 上段)。一方、SP による観察ではより低濃度である $0.5\mu\text{M/L}$ (E) 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 (図 6 下段)。

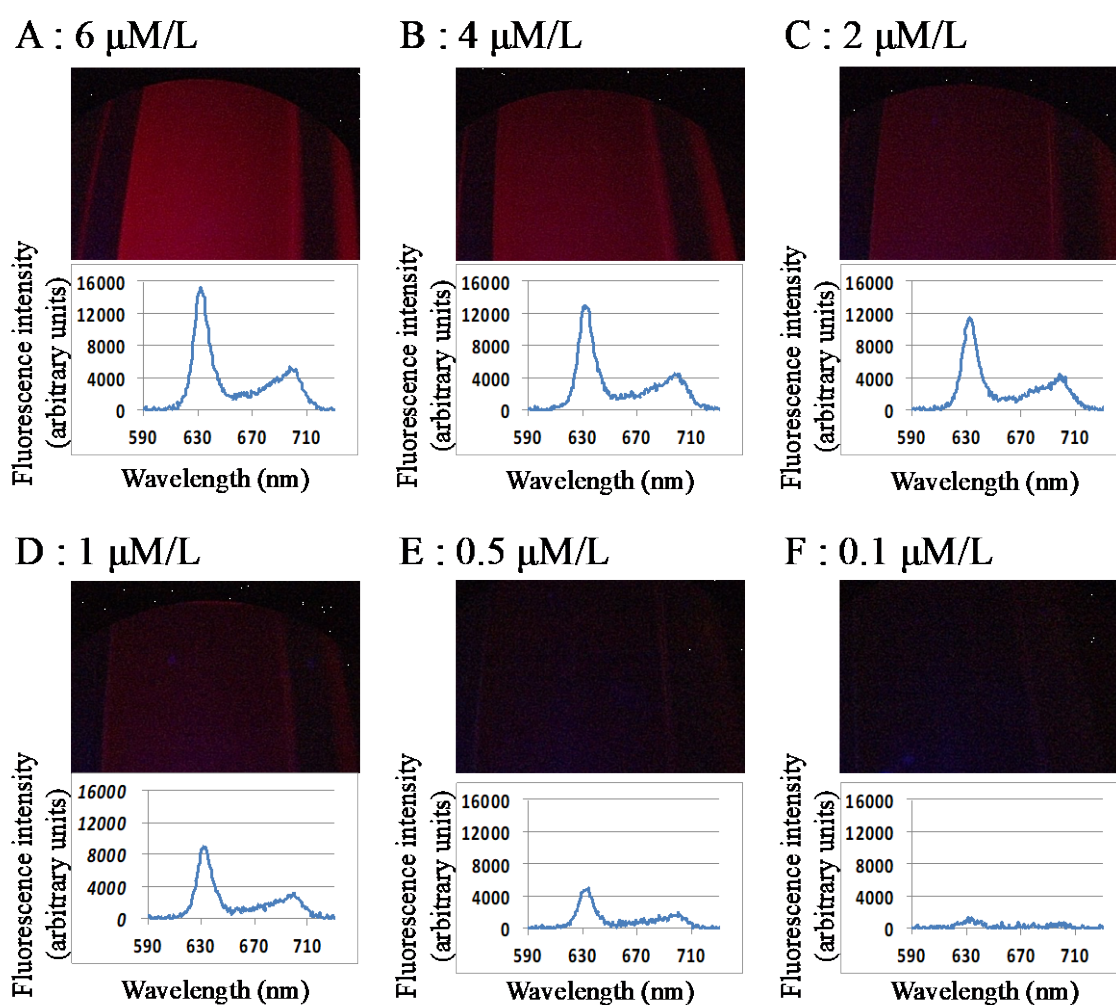


図 6. 段階希釈した PpIX の観察

上段:FL、下段:SP

2) 膵癌細胞株における検証

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 (図 7)。また、細胞株に対して段階希釈をすると SP の強度は細胞濃度に比例することがわかった (図 8)。

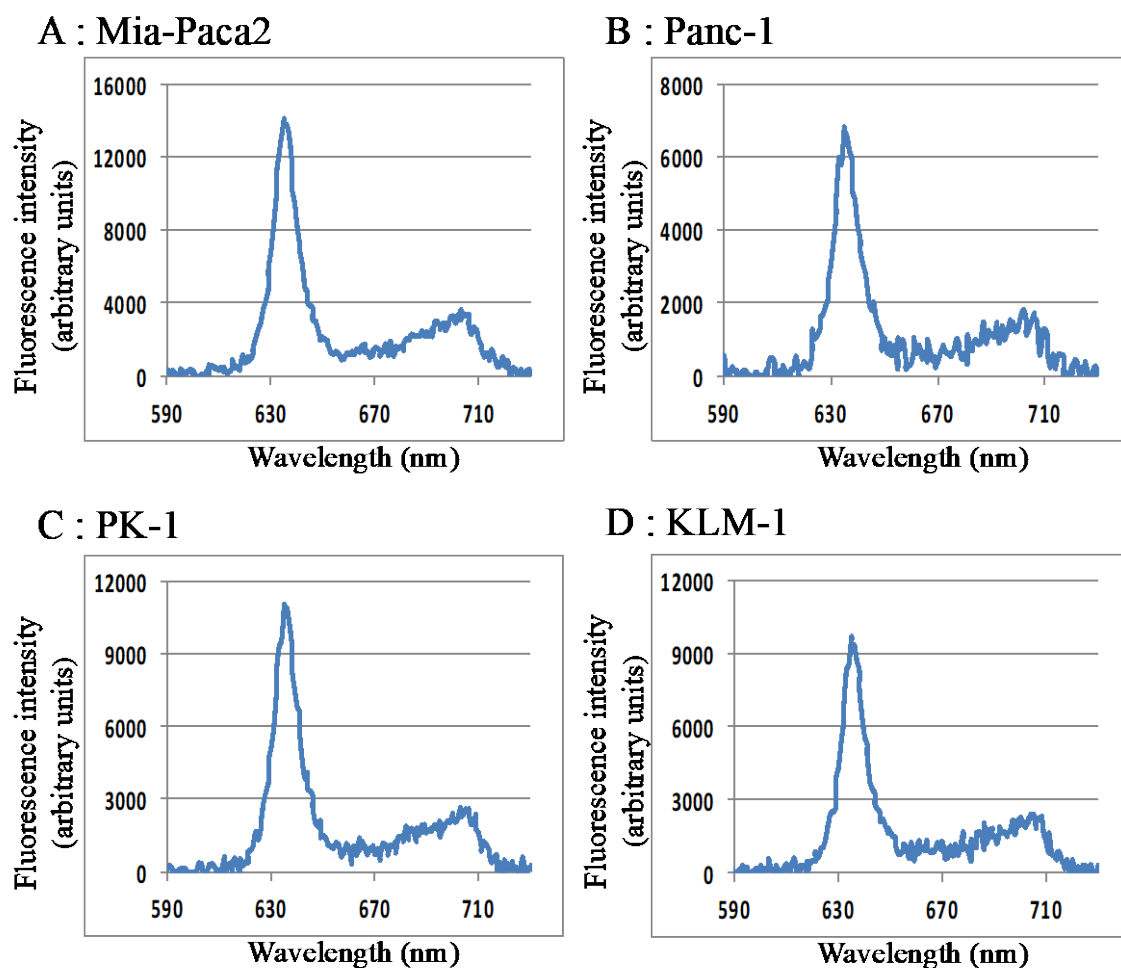


図 7. 膵癌細胞株に対する SP

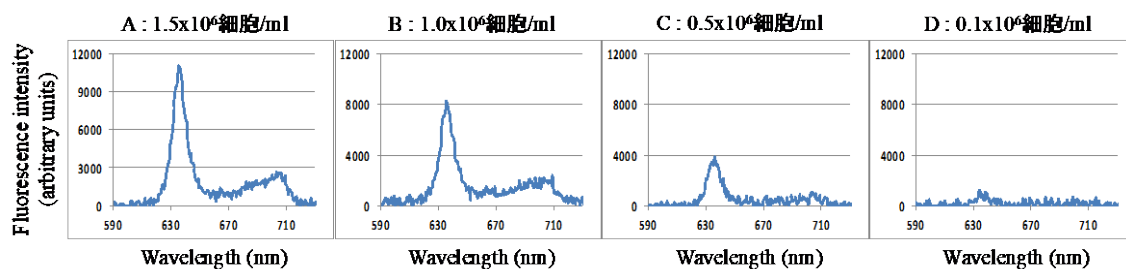


図 8. 段階希釈した PK-1 の観察 (SP 診断)

3) 腭癌播種マウスモデルにおける検証

病理組織学的検討で 60 腹膜の内 50 腹膜に播種病変を認めた（図 9）。WL 診断では 31 腹膜に転移を疑い、検出率は 62%であった。FL 診断では 39 腹膜に転移を疑い、検出率は 78%であり、転移陰性と判断した 21 腹膜の内 11 腹膜には、腹膜播種を認めた（表 1）。

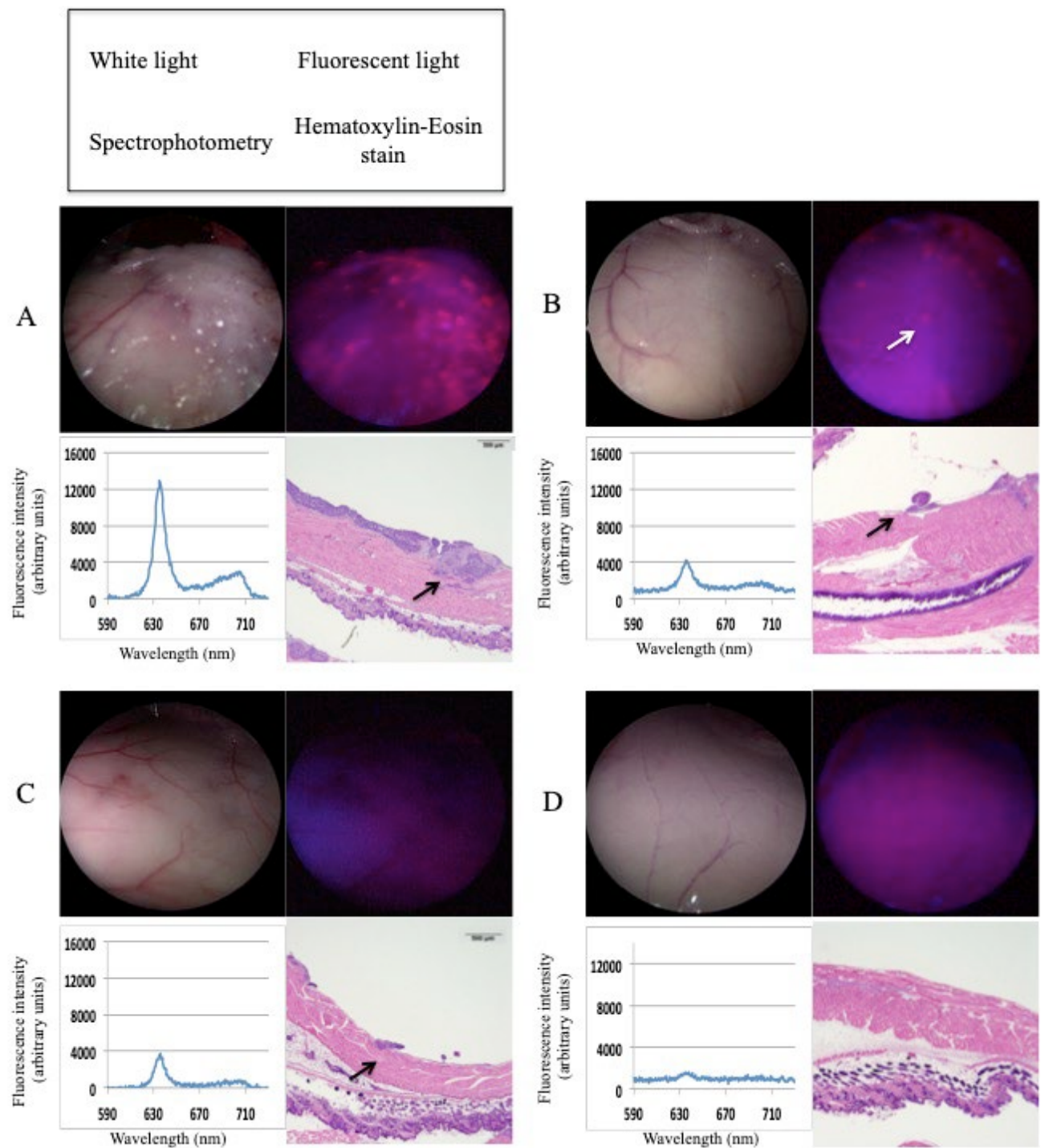


図 9. 膵癌播種マウスモデルにおける代表的腹膜画像

病理組織学的評価では A、B と C に転移を認め、D には転移を認めない。A は全ての観察方法で転移を疑うことができる。B では WL 診断では病変の指摘が難しいが、FL 診断で病変の指摘が可能である。C は FL 診断では病変の指摘が難しいが、SP 診断で 2 相性のスペクトルグラフが確認可能である。

表 1. WL と FL 診断による腹膜播種結節の検出

A) White light image diagnosis

	Cancer	Non-cancer	Total
Negative	19	10	29
Positive	31	0	31
Total	50	10	60

B) Fluorescence image diagnosis

	Cancer	Non-cancer	Total
Negative	11	10	21
Positive	39	0	39
Total	50	10	60

全ての 60 腹膜を病理組織学的評価で転移を認めた 50 腹膜と認めなかった 10 腹膜の 2 群に分け、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 ($P<0.0001$)。FL 診断で転移陰性と判断した 21 腹膜を病理組織学的評価で転移を認めた 11 腹膜と認めなかった 10 腹膜の 2 群に分け、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 ($P<0.010$) (図 10)。

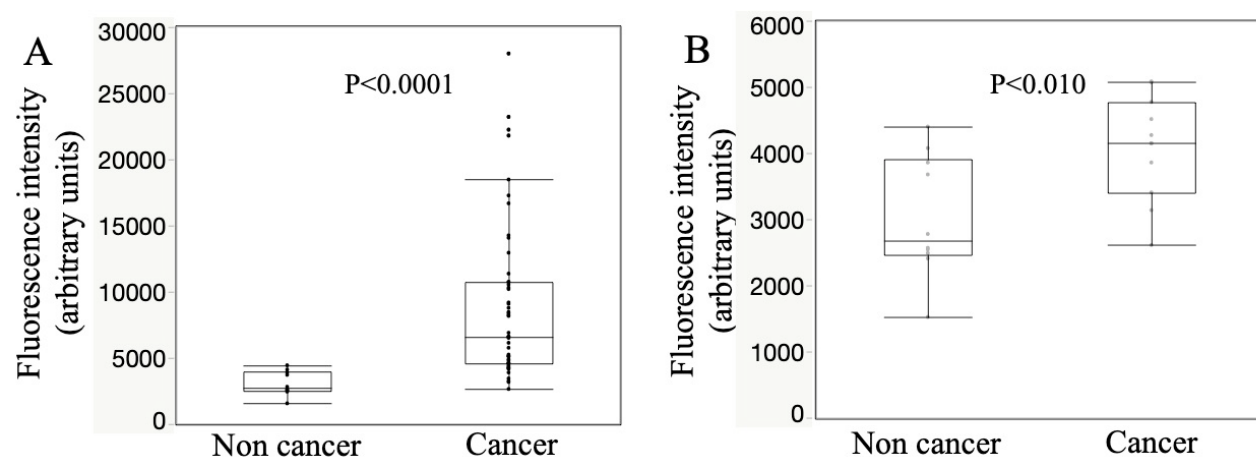


図 10. SP 強度の 2 群間比較

A:全腹膜を病理組織学的転移陽性と陰性の 2 群に分け比較。

B:FL 診断で転移陰性と判断した 21 腹膜を病理組織学的転移陽性と陰性の 2 群に分け比較。

SP 強度 ROC 曲線におけるカットオフ値は 4000a.u.であり、AUC は 0.831 であった。SP 強度の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、検出率は 90%であった。しかしながら、SP 診断では偽陽性となる 2 腹膜結節も認めた（表 2）。

表 2. SP 診断による腹膜播種結節の検出

c) Fluorescence spectgraphic diagnosis			
	Cancer	Non-cancer	Total
Intensity < 4000 a.u.	5	8	13
Intensity $\geq$ 4000 a.u.	45	2	47
Total	50	10	60

4) 臨床における検証

手術中に外科医が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。病理組織学的検査では 11 病変に悪性所見を認めた（図 11）。FL 観察での検出率は 36%であった（表 3）。全ての 24 病変を病理組織学的評価で転移を認めた 11 病変と認めなかった 13 病変の 2 群に分け、SP 強度を比較した。転移を認めた群と認めなかった群の SP 強度の中央値はそれぞれ 4442a.u（482-16740）と 1528a.u.（24-9556）であり、有意差を認めなかった（ $P=0.125$ ）（図 12）。SP の強度が 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 観察での検出率は 63%であった（表 3）。しかしながら、偽陽性病変も 1 例増加した（図 13）。

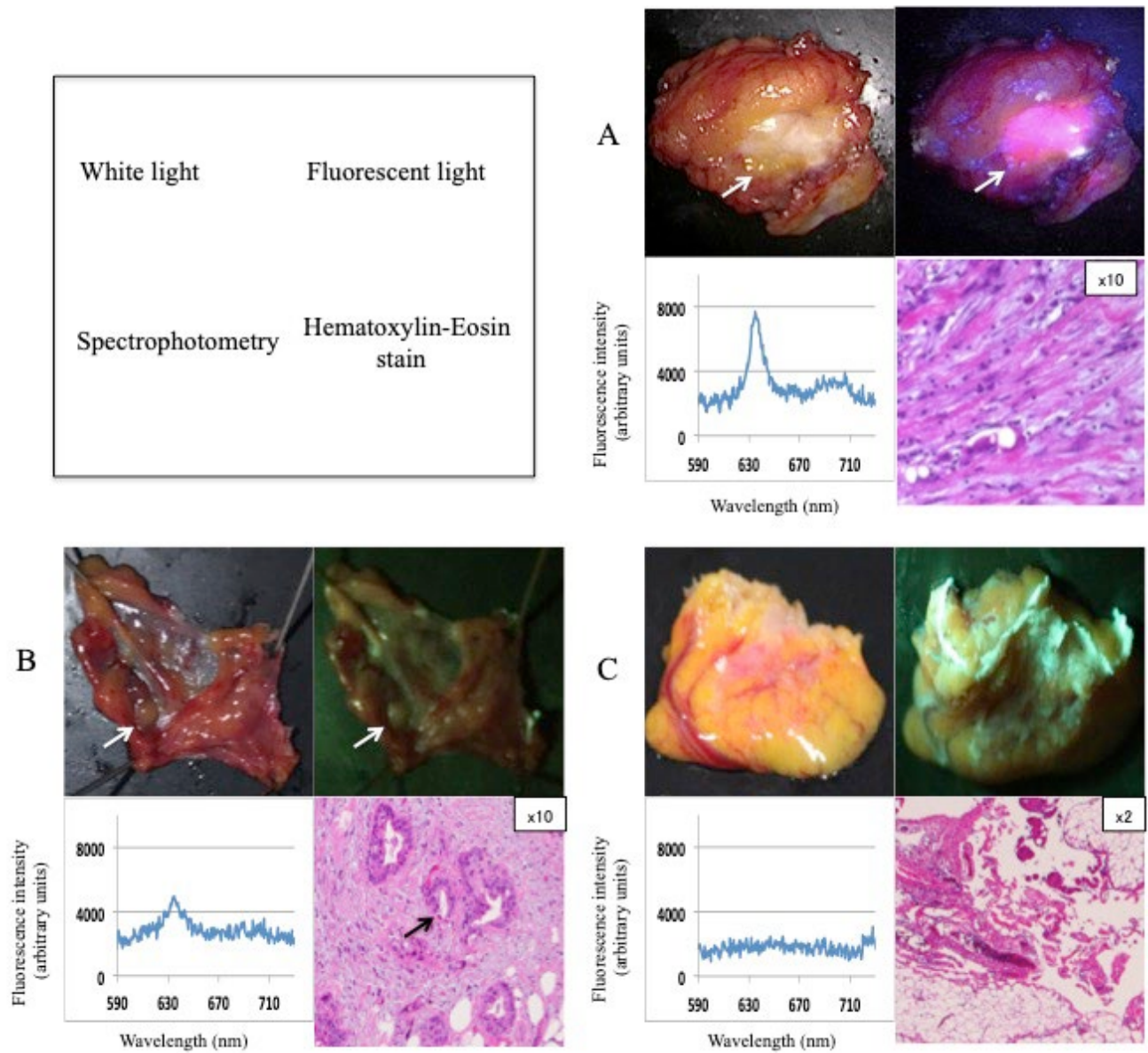


図 11. 臨床における代表的播種疑い画像

病理組織学的評価では A と B に転移を認める。C には転移を認めない。A は全ての観察方法で転移を疑うことができる。B は FL 観察では病変の指摘が難しいが、SP 観察で 2 相性のスペクトルグラフが確認可能である。

表 3. 手術検体に対する体外での観察

	Cancer	Non-cancer
Fluorescence image diagnosis		
Negative / Positive	7 / 4	12 / 1
Spectrophotometry diagnosis		
Negative / Positive	4 / 7	11 / 2
Total	11	13

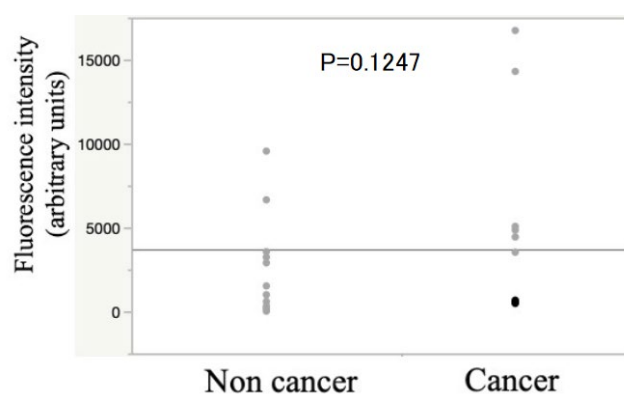


図 12. SP 強度の 2 群間比較

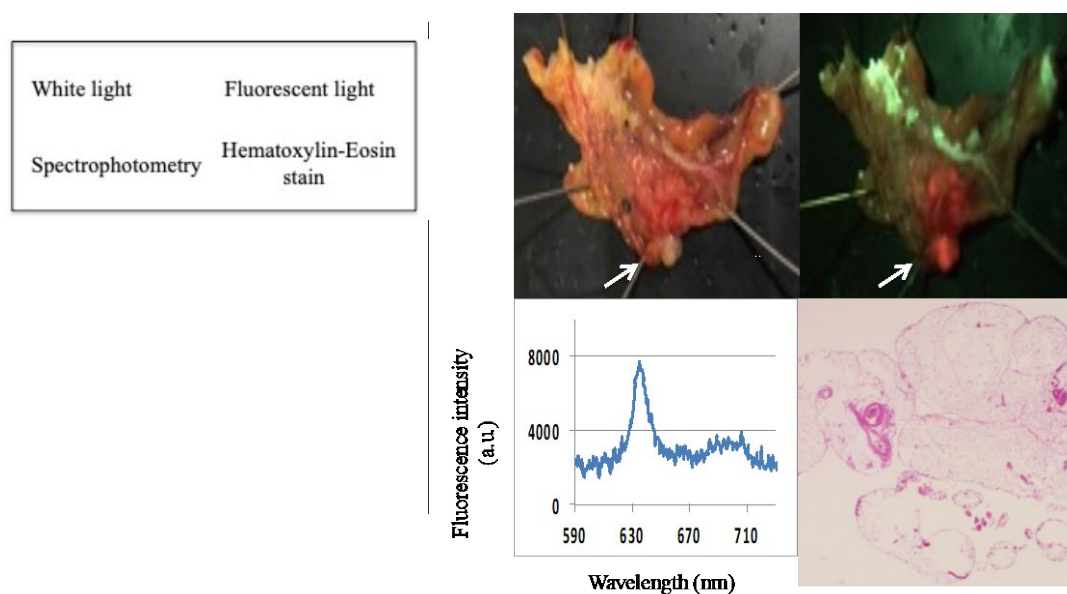


図 13. 臨床における代表的な偽陽性症例画像

FL 及び SP 診断ともに陽性であるが、病理組織学的評価では陰性である。

考察

膵癌領域での 5-ALA を用いた PDD の報告は少ないが、有用性を示した報告はある。様々な癌種の腹膜播種患者に対して 5-ALA-PDD を腹腔鏡下に行い、WL 観察では 19 病変を発見に留まったが、FL 観察を用いることでさらに 26 病変を発見しており、12 名の膵癌患者が含まれていたとの報告がある (Otth et al., 20015)。消化器領域では胃癌の領域において多く 5-ALA の臨床的有用性が報告されている。Murayama (Murayama et al., 2012) や Kishi (Kishi et al., 2012) らはそれぞれ腹膜播種患者に対して、Koizumi (Koizumi et al., 2013)) らはリンパ節転移患者に対して 5-ALA-PDD を行い、FL 診断を併用することで診断率の向上を認めたことを報告している。しかしながら、発光の陽陰性の判断が肉眼 (目視) による主観的かつ定性的なものであり、微細病変の偽陰性の問題が残る。胃癌播種モデルマウスの全腹膜 726 病変を全て検索した Kishi らの報告では FL 診断の感度は 72% (WL では 39%) となっており (Kishi et al., 2012))、実臨床でも微弱な病変や蛍光が認識できていない可能性が高い。微細な発光に対する診断として、Nakai (Nakai et al., 2015) らが膀胱癌患者の尿細胞診に対する PDD の時に、spectrophotometry が有用であったと報告している。細胞診のレベルでは肉眼的に発光は確認困難であり、微細な発光に対してスペクトルグラフを利用することは有用と考える。そこで、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 (laparoscopic spectrophotometry) を開発した。本システムは腹腔鏡下に蛍光スペクトルを測定することができ、5-ALA の微弱な蛍光も検出可能となる。また、腹腔鏡下に行うことで、低侵襲性を保ったまま、リアルタイムに観測ができる。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と考える。

実際にシステムの検出能を評価するために、5-ALA の代謝産物である PpIX を段階希釈した後に、405nm の励起光を照射し、肉眼による FL と SP を行い検出能につき比較検討した。検証 2) では肉眼的に赤色観察が難しい $0.5 \mu\text{M/L}$ 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り (図 6)、微弱な発光に対してスペクトルグラフを利用することは有用と考えられた。膵癌細胞株における検証 3) では、複数の膵癌細胞 (Mia-Paca2、Panc-1、PK-1、KLM-1) が 5-ALA を PpIX に代謝しており、その蛍光を laparoscopic spectrophotometry で観察可能であった (図 7)。また、PK-1 を段階希釈し同様に観察すると細胞密度と波長の強度は比例しており (図 8)、微細な転移を発見するためには微弱な発光を検出することができる spectrophotometry を利用することは有用と考える。

膵癌腹膜播種モデルマウスにおける検討では、WL 診断による感度が 62%であることに比べ FL 診断では 78%と、感度の上昇を認めた（表 1）。この感度は他癌種ではあるが、Kishi が行った胃癌の腹膜播種モデルマウスにおける検討と同程度であった（FL 診断 72%）（Kishi et al., 2012）。しかしながら、FL 診断でも 20%以上の微細病変が見落とされている。全腹膜に対して SP 診断を行った後に、病理組織学的転移陽性と陰性の 2 群に分け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（ $P<0.0001$ ）（図 10A）。また、FL で転移陰性と判断した腹膜を病理組織学的転移陽性と陰性の 2 群に分け強度を比較すると、有意差を持って転移陽性腹膜の SP 強度が高かった（ $P<0.010$ ）（図 10B）。このことから、肉眼的に蛍光判断が難しい病変でもスペクトルグラフを用いることで、客観的に陽陰性の判断ができると考えられた。実際に 635nm の強度に対して ROC 解析を行った後、カットオフラインであった SP 強度 4000 a.u.以上を転移とした場合、検出率は 90%と感度の上昇を認めた。一方、特異度は低下してしまった（表 2）。実臨床において 5-ALA 内服後の膵癌患者に対して手術を行い、術中に腹膜播種を疑い摘出した標本に対して FL と SP 観察を行ったが、転移陽性腹膜と陰性腹膜にわたる 2 群間の SP 強度に関しては有意差を認めなかった（ $P=0.125$ ）（表 12）。これは摘出標本を体外で検査するといった研究であることや、開腹操作が長いことなどから標本のブリーチングが進んだことによって蛍光が弱くなってしまった可能性が考えられる。しかし症例は少ないが、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症例を 2 例認めた。このことから、腹腔内で本システムを用いることで FL が困難な微弱な播種病変の蛍光を検索できる可能性が示唆された。また、抗癌剤治療後の症例において、5-ALA の偽陽性病変を認めた（表 13）。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ており、PpIX が集積していることがわかるが、病理組織診断では悪性所見は認めず、線維化組織のみであった。同様の現象は他癌種でも報告されている（Kishi et al., 2016）。実臨床においては免疫反応を含めた炎症部分や抗癌剤治療によって生まれる腹膜の線維組織などに PpIX が集積し蛍光を示したと考えられる。このように感度の高い SP は偽陽性病変を拾い上げすぎてしまう可能性がある。このように感度の高い SP は偽陽性病変を拾い上げすぎてしまう可能性がある。しかし、病理迅速診断ができる術中腹膜播種検索においては転移を疑うことが重要であると考ええる。

本システムのように蛍光スペクトルを測定することで、肉眼では判断が難しい 5-ALA の蛍光も検出可能となり、PDD による感度が上昇すると考える。しかしながら、実臨床で定量的な検査として用いるには課題が未だ残る。一つ目に術野の状態が変化することがある。術野表面は出血などによる汚れや、周囲組織の自家蛍光によって状況が変わる。また、PpIX の蛍光は時間と共に漸減してしまう。膵癌手術の時間は

長く、今回の検証でも SP 検査までの時間が手術開始から 4 時間以上経過している症例があり、ブリーチングが進んだ結果 SP の強度が弱くなってしまい有意差がつきづらかったと考える。また、広い腹腔内を短時間で検査するために、一回に測定できる範囲を広げる工夫が必要になると考える。二つ目に観察物との距離、光軸に対する角度をどのように保つかという問題がある。光の強度は距離の 2 乗に反比例するため、実臨床で 5-ALA-PDD を定量的に行うには、リアルタイムに観察物との距離を測り補正するようなシステムの追加が必要と考える。三つ目に蛍光強度の単位の問題がある。蛍光ピークの値を計測する場合、得られる値は無次元であり、その単位は任意単位 (arbitrary unit) として表記される。マウスのような実験的な条件では、測定条件を一定にできるため任意単位でも比較できるとされている。しかし、実臨床の腹腔内においては測定条件を完全に一定に保つことは困難である。そのため自家蛍光や反射励起光をリファレンスとして相対値にする方法が取り入れられる。しかし、本研究のように弱い光を検査していく場合、どの部位を正常と判断してリファレンスとするかについては今後研究が必要である。

今後、5-ALA 内服後の膀胱癌患者の術中診断をする際に腹腔鏡診断用近赤外線蛍光画像システムを併用することができれば、これまで見落とされていた微細な腹膜播種を検索できる可能性が示唆される。低侵襲性を保ち術中診断能が上昇することは不要な手術を減らすことが可能になり、それぞれの患者に適した治療を早期に開始できるようになると考える。今回の研究の臨床研究では人体の体外での検査で終わっており、同様のシステムを実際に体内で使用する研究を行う必要がある。体腔内で安全に使用でき、診断能が上昇することが証明できれば、実臨床に用いることができる可能性があることが期待される。また、同様に播種病変が多い胃癌や大腸癌の進行患者への応用や、カットフィルターを変更することで他の蛍光診断薬への応用も期待される。

結論

① 本研究から得られた新知見

- ・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観察では検出困難な低濃度の PPIX 検出が可能であった。
- ・複数の膵癌細胞株に対して 5-ALA を用いた PDD を行い、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腹腔鏡下に PDD の感度が上昇することがわかった。
- ・膵癌患者の播種検体に対して体外にて PDD を行い、肉眼では観察が難しい腹膜播種の蛍光を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確認できた。

② 新知見の意義

本研究ではマウスモデルに対して播種診断をする際に腹腔鏡診断用近赤外線蛍光画像システムを併用することで肉眼観察が難しい微細な腹膜播種を検索することができることが確認できた。今後、5-ALA 内服後の膵癌患者の術中診断をする際に腹腔鏡診断用近赤外線蛍光画像システムを併用することができれば、これまで見落とされていた微細な腹膜播種を検索できる可能性が示唆される。低侵襲性を保ち術中診断能が上昇するは不要な手術を減らすことが可能になり、それぞれの患者に適した治療を早期に開始できるようになると考える。

③ 本研究で得られた新知見からどのような研究が展開されうるか

今回の研究の臨床研究では人体の体外での検査で終わっており、同様のシステムを実際に体内で使用する研究を行う必要がある。体腔内で安全に使用でき、診断能が上昇することが証明できれば、実臨床に用いることができることが期待される。

同様に播種病変が多い胃癌や大腸癌の進行患者において術中進行度診断をする際に 5-ALA と腔鏡診断用近赤外線蛍光画像システムを併用を行うことで、術中診断能が上昇する可能性がある。また、今回のシステムを用いる方法はカットフィルターを変更することで他の蛍光診断薬の蛍光をより正確に拾い上げることも可能と考えられるため、他の診断薬を用いた腹腔・胸腔内蛍光検査が発明された際には応用ができると考える。

④ 今後の課題

今後の膵癌の実臨床では術前化学療法を受けた患者が前提となるため、抗癌剤治療によって生まれる腹膜の線維組織などの自家蛍光を拾い上げ過ぎてしまい偽陽性患者が増える可能性がある。また、実臨床において定量的な検査にするには検査条件を一定に保つシステムの開発が必要と考える。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂いた、北海道大学医学研究院 消化器外科学教室Ⅱ 平野聡 教授に深く感謝致します。

また、本研究において直接ご指導頂いた北海道大学医学研究院 消化器外科学教室Ⅱ 海老原裕磨 助教に心から感謝申し上げます。

また、本研究において温かいご協力を賜りました北海道大学医学研究院 脳神経外科教室 小林浩之 講師、同じく 山口 秀 助教、千歳科学技術大学 バイオ・マテリアル科 李黎明 教授、ならびに北海道大学病院 臨床研究開発センター生物統計部門 生物統計室 飯島弘章 様に深く感謝いたします。

最後に、本研究を支えてくださった、消化器外科学教室Ⅱ、分子診断病理学教室、ならびに病理診断科・病理部の全ての皆様に心より御礼を申し上げます。

利益相反

本研究の一部は公益財団法人光科学技術研究振興財団研究助成第 1094 号の助成を受けたものである。

引用文献

Almerie MQ, Gossedge G, Wright KE, and Jayne DG (2015) Photodynamic diagnosis for detection of peritoneal carcinomatosis. *J Surg Res* 195, 175-187.

Asano T, Hirano S, Nakamura T, Okamura K, Tsuchikawa T, Noji T, Nakanishi Y, Tanaka K, and Shichinohe T (2018) Survival benefit of conversion surgery for patients with initially unresectable pancreatic cancer who responded favorably to nonsurgical treatment. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 25, 342-350.

Chen J, Cheong JH, Yun MJ, Kim J, Lim JS, Hyung WJ, and Noh SH (2005) Improvement in preoperative staging of gastric adenocarcinoma with positron emission tomography. *Cancer* 103, 2383-2390.

Conroy T, Hammel P, Hebbar M, Abdelghani MB, Wei AC, Raoul JL, Chone L, Francois E, Artru P, Biagi JJ, et al (2018) FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* 379, 2395-2406.

Egawa S, Toma H, Ohigashi H, Okusaka T, Nakao A, Hatori T, Maguchi H, Yanagisawa H, and Tanaka M (2007) A digest of the pancreatic cancer registry report 2007. *Suizo* 23, 105-123.

Harada K, Harada Y, Beika M, Koizumi N, Inoue k, Murayama Y, Kuriu Y, Nakanishi M, Minamikawa T, Yamaoka Y, Dai P, Yanagisawa A, Otsuji E, and Takamatsu T (2013) Detection of lymph node metastases in human colorectal cancer by using 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence with spectral unmixing. *Int J Mol Sci* 14, 23140-23152.

Ishigami H, Kitayama J, Kaisaki S, Hidemura A, Kato M, Otani K, Kamei T, Soma D, Miyato H, Yamashita H, et al (2010) Pphase II study of weekly intravenous and intraperitoneal paclitaxel combined with S-1 for advanced gastric cancer with peritoneal metastasis. *Ann Oncol* 21, 67-70.

Kayaalp C, Arda K, Orug T, and Ozcay N (2002) Value of computed tomography in addition to ultrasound for preoperative staging of gastric cancer. *Eur J Surg Oncol* 28, 540-543.

Kishi K, Fujiwara Y, Yano M, Inoue M, Miyashiro I, Motoori M, Shingai T, Gotoh K, Takahashi H, Noura S, et al (2012) Staging laparoscopy using ALA-mediated photodynamic diagnosis improves the detection of peritoneal metastases in advanced gastric cancer. *J Surg Oncol* 106, 294–298.

Kishi K, Fujiwara Y, Yano M, Motoori M, Sugimura K, Ohue M, Noura S, Marubashi S, Takahashi H, and Sakon M (2014) Diagnostic laparoscopy with 5-aminolevulinic-acid-mediated photodynamic diagnosis enhances the detection of peritoneal micrometastases in advanced gastric cancer. *Oncology* 87, 257-265.

Kishi K, Fujiwara Y, Yano M, Motoori M, Sugimura K, Takahashi H, Ohue M, and Sakon M (2016) Usefulness of diagnostic laparoscopy with 5-aminolevulinic acid (ALA)-mediated photodynamic diagnosis for the detection of peritoneal micrometastasis in advanced gastric cancer after chemotherapy. *Surg Today* 46, 1427-1434.

Koizumi N, Harada Y, Murayama Y, Harada K, Beika M, Yamaoka Y, Dai P, Komatsu S, Kubota T, Ichikawa D, et al (2013) Detection of metastatic lymph nodes using 5-aminolevulinic acid in patients with gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 20, 3541-3548.

Koizumi N, Harada Y, Minamikawa T, Tanaka H, Otsuji E, and Takamatsu T (2016) Recent advances in photodynamic diagnosis of gastric cancer using 5-aminolevulinic acid. *World J Gastroenterol* 22, 1289-1296.

Li L, Ebihara Y, Shirogane R, and Saito M (2012) Near infrared fluorescence imaging and spectrum of indocyanine green for laparoscopy diagnosis in gastric cancer. *Chin Opt Lett* 10, S21003-S321005.

Murayama Y, Ichikawa D, Koizumi N, Komatsu S, Shiozaki A, Kuriu Y, Ikoma H, Kubota T, Nakanishi M, Harada Y, et al (2012) Staging fluorescence laparoscopy for gastric cancer by using 5-aminolevulinic acid. *Anticancer Res* 32, 5421-5427.

Nakai Y, Anai S, Onishi S, Masaomi K, Tatsumi Y, Miyake M, Chihara Y, Tanaka N, Hirao Y, and Fujimoto K (2015) Protoporphyrin IX induced by 5-aminolevulinic acid in bladder cancer cells in voided urine can be extracorporeally quantified using a spectrophotometer. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 12, 282-288.

Neoptolemos JP, Palmer DH, Ghaneh P, Psarelli EE, Valle JW, Halloran CM, Faluyi O, O'Reilly DA, Cunningham D, Wadsley J, et al (2017) Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet* 389, 1011-1024.

Orth K, Russ D, Steiner R, and Beger HG (2000) Fluorescence detection of small gastrointestinal tumours: principles, technique, first clinical experience. *Langenbecks Arch Surg* 385, 488-494.

Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, and Matrisian LM (2014) Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res* 74, 2913-2921.

Satoi S, Fujii T, Yanagimoto H, Motoi F, Kurata M, Takahara N, Yamada S, Yamamoto T, Mizuma M, Honda G, et al (2017) Multicenter phase II study of intravenous and intraperitoneal paclitaxel with S-1 for pancreatic ductal adenocarcinoma patients with peritoneal metastasis. *Ann Surg* 265, 397-401.

Takahara N, Isayama H, Nakai Y, Sasaki T, Saito K, Hamada T, Mizuno S, Miyabayashi K, Mohri D, Kogure H, et al (2015) Pancreatic Cancer With Malignant Ascites Clinical Features and Outcomes. *Pancreas* 44, 380-385.

Unno M, Motoi F, Matsuyama Y, Matsuyama Y, Satoi S, Matsumoto I, Aosasa S, Shirakawa H, Wada K, Fujii T, Yoshitomi H, et al (2019) Randomized phase II/III trial of neoadjuvant chemotherapy with gemcitabine and S-1 versus upfront surgery for resectable pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 37, 189.

Zheng B, Ohuchida K, Yan Z, Okumura T, Ohtsuka T, and Nakamura M (2017) Primary recurrence in the lung is related to favorable prognosis in patients with pancreatic cancer and postoperative recurrence. *World J Surg* 41, 2858-2866.