

<特集「光生体イメージングの進歩と医療」>

## 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) を用いた 消化器癌転移リンパ節の診断

原 田 義 規\*

京都府立医科大学大学院医学研究科細胞分子機能病理学

### Fluorescence Diagnosis of Lymph Node Metastasis of Gastrointestinal Cancers by Using 5-Aminolevulinic Acid (5-ALA)

Yoshinori Harada

*Department of Pathology and Cell Regulation, Kyoto Prefectural University of Medicine  
Graduate School of Medical Science*

#### 抄 録

癌患者の治療法を選択する上でリンパ節転移の有無を正確に診断することは重要である。現在、センチネルリンパ節の術中迅速診断は20~30分要することが多く、より迅速で正確な手法が確立されることが望ましい。生体内在性アミノ酸である5-アミノレブリン酸 (5-ALA) を生体に過剰投与すると、蛍光物質である protoporphyrin IX (PpIX) が、代謝酵素活性の違いにより、癌細胞内に選択的に蓄積する。我々は、マウス直腸癌モデルを用いて5-ALAのリンパ節転移診断能を検討したが、簡便で高い診断能を有していた。また、ヒト胃癌症例においても転移リンパ節に5-ALA由来のPpIX蛍光を認め、転移巣の蛍光検出が可能である。

キーワード：5-アミノレブリン酸, 蛍光診断, リンパ節転移, 光酸化反応.

#### Abstract

Lymph node (LN) metastasis is one of the most important prognostic factors for cancer patients. Accurate and rapid diagnosis of LN metastasis during operations is required for adequate surgical management of cancers. 5-aminolevulinic acid (5-ALA) is a precursor molecule of heme protein, and administration of excessive 5-ALA produces selective accumulation of fluorescent protoporphyrin IX (PpIX) in cancer cells. By making better use of this phenomenon, fluorescence diagnosis of cancer can be achieved. This paper introduces an attempt of fluorescence diagnosis of LN metastasis of gastrointestinal cancers by using 5-ALA. Our results suggested the potential of 5-ALA-induced PpIX fluorescence as a rapid intraoperative diagnostic method of metastasis in excised LNs.

**Key Words:** 5-aminolevulinic acid, Fluorescence diagnosis, Lymph node metastasis.

---

平成25年3月22日受付

\*連絡先 原田義規 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町465番地  
yoharada@koto.kpu-m.ac.jp

## はじめに

我が国は急速な高齢化社会を迎え、癌患者数は増加傾向にあり、新たな癌治療法の開発は喫緊の課題である。なかでも、身体への負担の少ない低侵襲手術は患者ニーズが高く、今後最も発展する分野の一つと考えられる。外科切除で根治が期待できる癌患者に対する低侵襲手術を可能とするためには、術前のみならず術中にも癌転移が疑われる部位を調べ、切除範囲を決定することが望ましい。

胃癌などの消化器癌において、リンパ節への転移は予後因子の1つであり、治療法を選択する上でリンパ節転移の有無を正確に診断することは重要である。例えば、多くの消化器癌ではリンパ節転移の有無により術後補助療法の必要性が決定される。胃癌では、センチネルリンパ節生検で転移が無いと診断できた場合、郭清領域を縮小した手術を選択することで低侵襲手術が可能となる<sup>1)</sup>。

現在、術前のリンパ節転移診断法として computed tomography (CT) や Fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) が用いられる。しかし、CTやFDG-PETの胃癌リンパ節転移の診断精度はそれぞれ69~77%、46~85%程度に留まる<sup>2,5)</sup>。術中、術後のリンパ節転移の診断には病理組織診断が用いられるが、通常1個のリンパ節につき2~3枚作成されたHE染色標本から診断を行う。そのため、小さな転移巣が見逃されることがあり、その感度には限界がある<sup>6,7)</sup>。最近、サイトケラチン19 mRNAを特異的に増幅し、転移の有無を診断する直接遺伝子増幅法(OSNA: One-step Nucleic Acid Amplification)が開発されたが<sup>8)</sup>、採取された検体を可溶化する必要があり、診断の過程で検体は失われる。なお、これらの術中迅速検査は診断までに20~30分要することが多く、より迅速で正確な手法の開発が望ましい。我々は生体分子を光で解析・制御するための技術・機器開発を行っているが、本稿では5-アミノレブリン酸(5-ALA)を用いた消化器癌転移リンパ節診断の試みについて紹介する。

## 5-ALAを用いた蛍光イメージング

最近、蛍光を利用した腫瘍イメージングが臨床現場で行われるようになってきており、5-ALAは脳腫瘍や膀胱癌などの蛍光診断に用いられる<sup>9,10)</sup>。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<sup>11,12)</sup>。また、5-ALAは水溶性で、経口的、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ヘムに速やかに代謝されるが、癌細胞では porphobilinogen deaminase の活性が高く、ferrochelatase の活性が低いため、プロトポルフィリン IX (PpIX) が選択的に蓄積される(図1)<sup>13-16)</sup>。PpIXは蛍光物質であり、これを検出して癌の診断を行うことが可能となる。5-ALAは副作用の少ない物質であるが、ヘム合成過程の代謝障害に基づく疾患であるポルフィリン症の患者には投与すべきではない。

近年、5-ALAは光増感剤としての応用に加えて、免疫調節など種々の作用が注目されており非常に興味深い<sup>17)</sup>が、これについては他著を参考にされたい<sup>12)</sup>。

### 5-ALAを用いた マウス直腸癌リンパ節転移診断

まず、我々はリンパ節転移における5-ALA蛍光診断の可能性を探るため、マウス直腸癌モデルを用いて検討を行った(図2~4)<sup>17)</sup>。直腸壁内に癌細胞を注入後5週間で大動脈周囲リンパ節に転移が認められた。尾静脈より5-ALAを静注後、リンパ節におけるPpIXの蛍光を観察すると(励起光: 385~425 nm, 蛍光: 430 nm以上)、転移巣とPpIXによる蛍光が一致した(図2)。次に、マウス腹腔内で蛍光寿命イメージングを行った。転移巣の蛍光寿命は非転移部より長く、転移巣にPpIXが集積していることが示された。また、転移リンパ節をmacroconfocal imaging systemを用いて観察すると、広視野でありながら高S/N比でz軸方向の観察も可能で、リンパ管内を移動する癌細胞も描出できた。

13匹の直腸癌マウスから切除した47リンパ

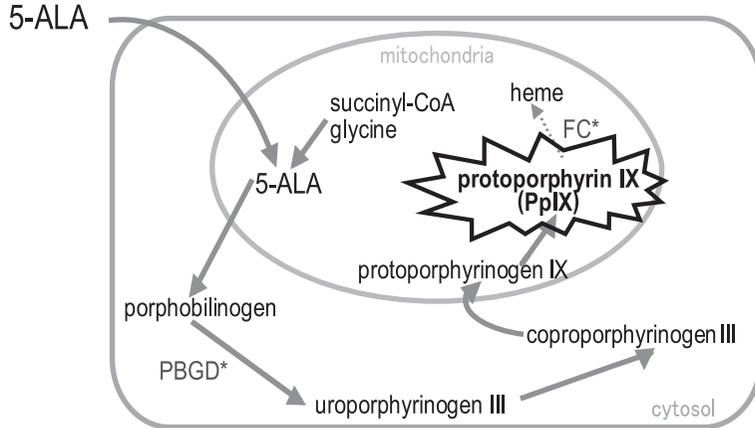


図1 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) の代謝経路. PBGD (porphobilinogen deaminase), Ferrochelatase (FC).

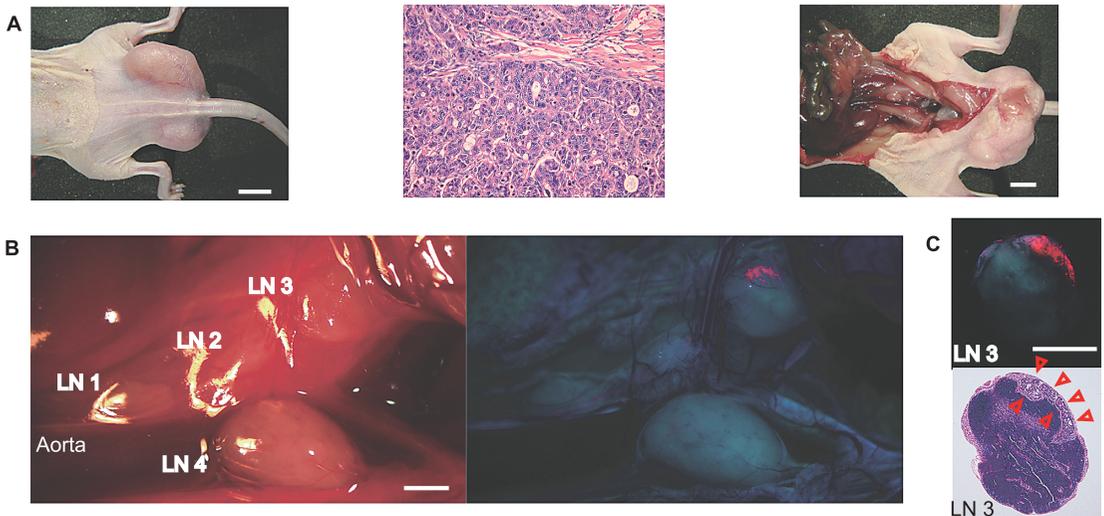


図2 5-ALA を用いたマウス直腸癌リンパ節転移診断. A) BALB/c ノドマウスの直腸壁にヒト大腸癌細胞株 (HT-29 細胞) を注入し, 直腸癌リンパ節転移モデルを作成 (左: 外観, 中央: 直腸原発巣の HE 染色標本, 右: 腹腔の白色光イメージ). B) マウスモデルに 5-ALA (250 mg/kg) を静注後, 開腹し, 大動脈周囲リンパ節を観察 (左: 白色光イメージ, 右: 蛍光イメージ). LN3 に赤い protoporphyrin IX (PpIX) 蛍光が観察された. C) LN3 の蛍光イメージ (upper panel) および HE 染色標本 (lower panel). 転移巣に一致して赤い PpIX 蛍光が観察される. 矢頭: 転移巣. 蛍光イメージ (励起光: 385~425 nm; 蛍光: >430 nm). Scale bar = 1 mm (B, C), 5 mm (A). (文献 17 より許可を得て, 改変・転載)

節を対象とし, その蛍光強度を解析した (図3). 転移リンパ節と非転移リンパ節の蛍光強度比の平均値は, それぞれ  $3.67 \pm 1.38$ ,  $0.99 \pm 0.15$  であり, カットオフ値を 1.7 とすると, リンパ節転移の有無をすべて診断可能であった. さらに,

3 匹のマウスから採取した 9 個のリンパ節の蛍光診断と CEA・CK20 をプライマーとしたリアルタイム RT-PCR による診断結果は一致した (図4). 以上, マウス直腸癌リンパ節転移モデルを用いた検討では, 5-ALA による蛍光診断は

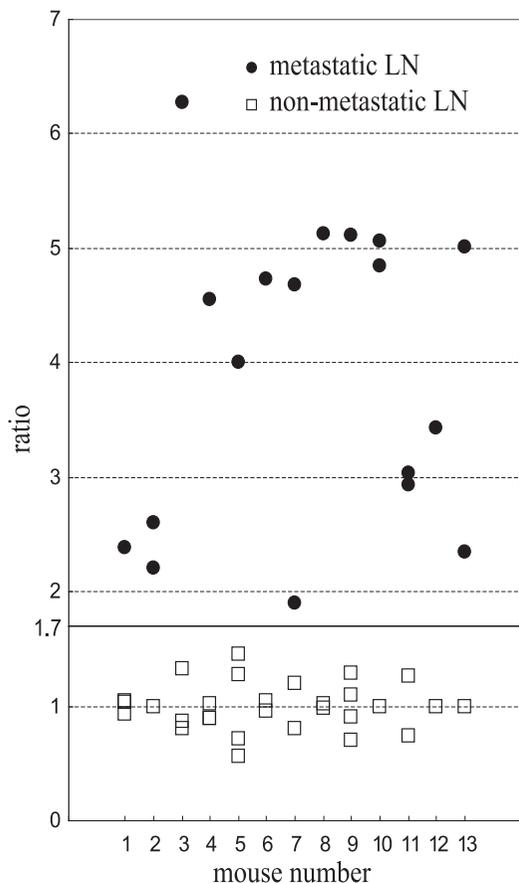


図3 5-ALAを用いたマウス直腸癌リンパ節転移診断。マウスモデルに5-ALA (250 mg/kg)を静注し、6～9時間後に大動脈周囲リンパ節を廓清し、転移リンパ節と非転移リンパ節の蛍光強度比を測定。丸:転移リンパ節、四角:非転移リンパ節(文献17より許可を得て、改変・転載)

転移リンパ節を非常に正確に診断できることが示唆された。

### 5-ALAを用いた ヒト胃癌リンパ節転移診断の試み

次に、我々はヒト胃癌症例で、5-ALAの転移リンパ節診断能の検討を行った。本検討を行うにあたり、あらかじめ京都府立医科大学倫理委員会の承認を得た。対象は、胃切除術を予定されている胃癌患者で、本検査法について説明を行い十分な理解・同意を得た患者とした。手術当日朝に一定量の5-ALAを経口投与し、切除し

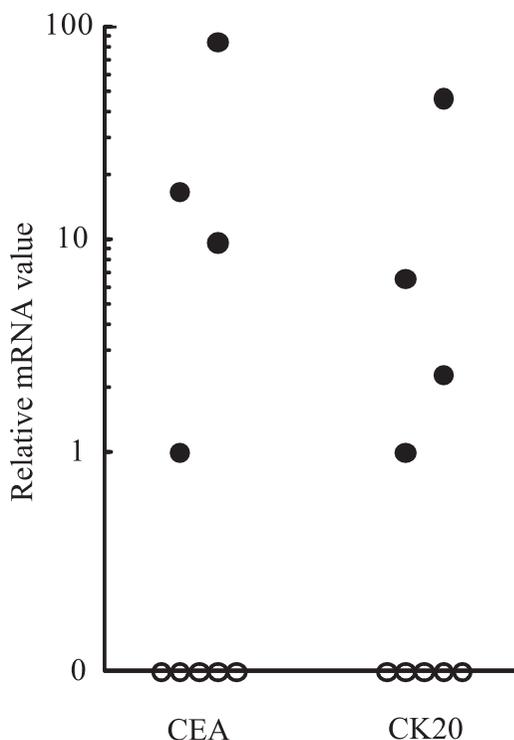


図4 5-ALAを用いたマウス直腸癌リンパ節転移診断。マウス直腸癌リンパ節のCEA mRNAおよびCK20 mRNAのリアルタイムRT-PCRの結果を蛍光診断と比較した。黒丸:PpIX蛍光陽性のリンパ節、白丸:PpIX蛍光陰性のリンパ節(文献17より許可を得て、改変・転載)

たリンパ節の蛍光診断を試みた。観察対象は術前の画像診断で転移が疑われる領域の廓清リンパ節とした。ヘモグロビンは励起光・蛍光を吸収するため、術中操作で出血を来したリンパ節は除外した。リンパ節は半割した断面を、カラーCCDを装備したマクロズーム顕微鏡システム(SZX12, Olympus, Tokyo)(DP71, Olympus)を用いて観察し、PpIXの赤色の蛍光に基づいて転移診断を行った。観察したリンパ節はホルマリン固定後、同一断面のHE染色標本を作製し、組織学的診断と蛍光診断の結果を比較した。

ヒトリンパ節を用いた検討においても、転移リンパ節において5-ALA由来のPpIXの赤い蛍光が確認された(図5)。赤い蛍光を示したリンパ節のうち、小さな丸い蛍光スポットが散発する蛍光パターンを持つリンパ節が観察された

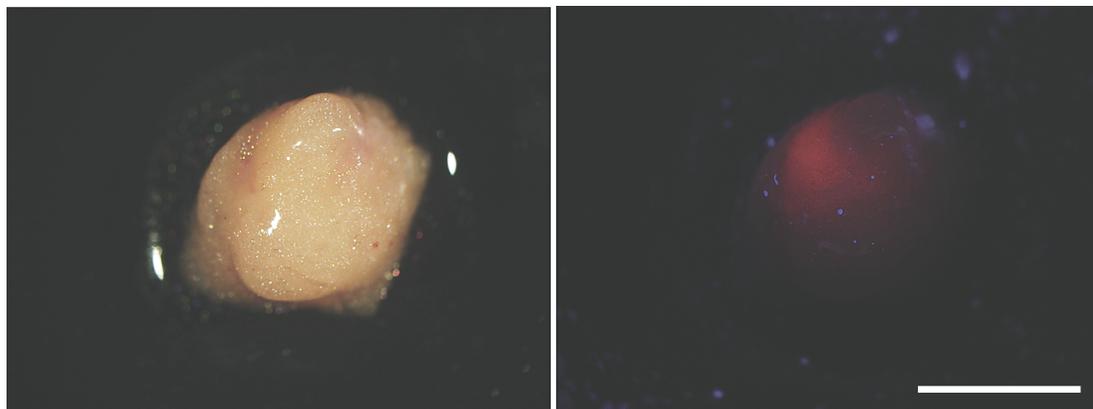


図5 5-ALA を用いたヒト胃癌リンパ節転移イメージング. 左: 白色光, 右: PpIX 蛍光. 蛍光イメージ (励起光: 385 ~425 nm; 蛍光: >430 nm). Scale bar = 3 mm

が, HE 染色標本との比較により, これらはリンパ濾胞に一致することが明らかになった. この特徴的な濾胞性蛍光パターンを考慮に入れて, 3人の外科医が独立して蛍光診断を行うと, その診断能は, 感度0.71, 特異度0.97であった. 非転移リンパ節に比べ, 転移リンパ節の蛍光強度は有意に高かった. また, 5-ALA 投与に伴う有害事象は特に観察されなかった.

以上, 5-ALA はヒト胃癌リンパ節転移診断に有用と考えられたが, 幾つかの課題も明らかとなった. まず, ヒトリンパ節を用いた検討では, マウスモデルを用いた検討と違い, 偽陰性と偽陽性が少なからず見られた. 偽陰性の原因の多くは, 背景の結合組織の自家蛍光が強いためであり, 特に転移巣のサイズが小さなものでその影響を大きく受けていた. いわゆるスキルス型胃癌の場合, 転移巣は原発巣と同様にコラーゲンの顕著な増生を伴っており, コラーゲンの強い自家蛍光のため, 癌細胞由来の PpIX 蛍光はマスクされていた. 偽陰性症例を減らすためには, 自家蛍光の影響を軽減することが必要と考えられた. 偽陽性の主な原因は, 炎症性リンパ節における PpIX の非特異的蓄積と考えられた. PpIX が炎症部位に蓄積する機序については, 細胞内鉄量が関連している可能性があるが, 詳細は不明である<sup>18)</sup>. また, 5-ALA の励起光の波長は比較的短いため脂肪組織内に埋没

するリンパ節をヒトの体内で観察することは難しいことも課題として挙げられた.

### PpIXの光酸化反応を用いた 癌の可視化技術の開発

生体組織中で癌細胞に蓄積した PpIX を高感度かつ特異的に可視化する新しい方法を開発した (特願 2011-143709). PpIX は光を照射することによって photoporphyrin (Ppp) に変化し, 蛍光ピークが 635 nm から 675 nm に変化する<sup>19)</sup>. 一方, 自家蛍光の原因となる他の内在性蛍光色素は光を照射してもこのようなスペクトル変化は来さない<sup>20-22)</sup>. したがって, 光照射前後における蛍光ピークシフトは PpIX に特異的な変化であり, この変化を検出すれば, 組織由来の自家蛍光の影響を受けることなく PpIX を特異的に検出することができる. 具体的には, 光照射前後でリンパ節断面の 635 nm と 675 nm の蛍光分光画像を撮影し, 画像演算を行って変化率を検出することで PpIX の局在を可視化する. これにより自家蛍光の影響を軽減しながら, より正確に転移の有無を診断することが可能となる. このプロセスは 1~2 分で完了するため, 蛍光診断の利点である迅速性も犠牲にならない.

現在, 胃癌・大腸癌の患者を対象として臨床試験を実施しているが, この方法を用いること

で、自家蛍光の影響で検出困難であったリンパ節転移巣を高感度に検出することが可能となっている。本法は術中迅速診断法の1つになり得ると考え、症例を蓄積して検討を進めているところである。

## ま と め

光学技術の進歩により、光を用いた生体イメージングの医療応用は進みつつある。特に、5-ALAを用いた癌イメージングは術中にミクロ的な変化をその場で捉えることのできる技術と位置づけられる。しかし、組織深部の観察は困難、ベッドサイドで使用可能な診断精度の高いイメージング機器の開発が必要など、医療応用

を進めていくためには課題が残されており、今後の研究の発展が期待される。

## 謝 辞

本研究に際して、ご指導頂きました京都府立医科大学大学院医学研究科高松哲郎教授、大辻英吾教授、柳澤昭夫教授に深謝いたします。また、共同研究者である、京都府立医科大学大学院医学研究科村山康利助教、小泉範明氏、米花正智氏、原田憲一氏、南川丈夫氏、中野圭明氏、山岡禎久助教、戴平講師に感謝申し上げます。

本研究は、独立行政法人科学技術振興機構 (JST) の研究助成により遂行された。

オリンパスメディカルシステム株式会社、オリンパス株式会社から研究費を受けている。

## 文 献

- 1) Ichikura T. Sugawara H. Sakamoto N. Yaguchi Y. Tsujimoto H. Ono S. Limited gastrectomy with dissection of sentinel node stations for early gastric cancer with negative sentinel node biopsy. *Ann Surg* 2009; 249: 942-7.
- 2) Yun M. Lim JS. Noh SH. Hyung WJ. Cheong JH. Bong JK. Cho A. Lee JD. Lymph node staging of gastric cancer using (18)F-FDG PET: a comparison study with CT. *J Nucl Med* 2005; 46: 1582-8.
- 3) Kim SK. Kang KW. Lee JS. Kim HK. Chang HJ. Choi JY. Lee JH. Ryu KW. Kim YW. Bae JM. Assessment of lymph node metastases using 18F-FDG PET in patients with advanced gastric cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006; 33: 148-55.
- 4) Mukai K. Ishida Y. Okajima K. Isozaki H. Morimoto T. Nishiyama S. Usefulness of preoperative FDG-PET for detection of gastric cancer. *Gastric Cancer* 2006; 9: 192-6.
- 5) Shimada H. Okazumi S. Koyama M. Murakami K. Japanese Gastric Cancer Association Task Force for Research Promotion: clinical utility of (1)F-fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography in gastric cancer. A systematic review of the literature. *Gastric Cancer* 2011; 14: 13-21.
- 6) Wang X. Heller R. VanVoorhis N. Cruse CW. Glass F. Fenske N. Berman C. Leo-Messina J. Rappaport D. Wells K. et al. Detection of submicroscopic lymph node metastases with polymerase chain reaction in patients with malignant melanoma. *Ann Surg* 1994; 220: 768-74.
- 7) Ghossein RA. Rosai J. Polymerase chain reaction in the detection of micrometastases and circulating tumor cells. *Cancer* 1996; 78: 10-6.
- 8) Yaguchi Y. Sugawara H. Tsujimoto H. Takata H. Nakabayashi K. Ichikura T. Ono S. Hiraki S. Sakamoto N. Horio T. Kumano I. Otomo Y. Mochizuki H. Yamamoto J. Hase K. One-step nucleic acid amplification (OSNA) for the application of sentinel node concept in gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2011; 18: 2289-96.
- 9) Inoue K. Fukuhara H. Shimamoto T. Kamada M. Iiyama T. Miyamura M. Kurabayashi A. Furihata M. Tanimura M. Watanabe H. Shuin T. Comparison between intravesical and oral administration of 5-aminolevulinic acid in the clinical benefit of photodynamic diagnosis for nonmuscle invasive bladder cancer. *Cancer* 2012; 118: 1062-74.
- 10) Tamura Y. Kuroiwa T. Kajimoto Y. Miki Y. Miyatake S. Tsuji M. Endoscopic identification and biopsy sampling of an intraventricular malignant glioma using a 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence imaging system. Technical note. *J Neurosurg* 2007; 106: 507-10.
- 11) Berlin NI. Neuberger A. Scott JJ. The metabolism of delta-aminolaevulinic acid. 2. Normal pathways, studied with the aid of 14C. *Biochem J* 1956; 64: 90-100.
- 12) Ishizuka M. Abe F. Sano Y. Takahashi K. Inoue K.

- Nakajima M. Kohda T. Komatsu N. Ogura S. Tanaka T. Novel development of 5-aminolevulinic acid (ALA) in cancer diagnoses and therapy. *Int Immunopharmacol* 2011; 11: 358-65.
- 13) Dailey HA. Smith A. Differential interaction of porphyrins used in photoradiation therapy with ferrochelatase. *Biochem J* 1984; 223: 441-5.
- 14) Schoenfeld N. Epstein O. Lahav M. Mamet R. Shaklai M. Atsmon A. The heme biosynthetic pathway in lymphocytes of patients with malignant lymphoproliferative disorders. *Cancer Lett* 1988; 43: 43-8.
- 15) Kennedy JC. Pottier RH. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 1992; 14: 275-92.
- 16) Peng Q. Warloe T. Berg K. Moan J. Kongshaug M. Giercksky KE. Nesland JM. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges. *Cancer* 1997; 79: 2282-308.
- 17) Murayama Y. Harada Y. Imaizumi K. Dai P. Nakano K. Okamoto K. Otsuji E. Takamatsu T. Precise detection of lymph node metastases in mouse rectal cancer by using 5-aminolevulinic acid. *Int J Cancer* 2009; 125: 2256-63.
- 18) Berg K. Anholt H. Bech O. Moan J. The influence of iron chelators on the accumulation of protoporphyrin IX in 5-aminolaevulinic acid-treated cells. *Br J Cancer* 1996; 74: 688-97.
- 19) Moan J. Streckyte G. Bagdonas S. Bech O. Berg K. Photobleaching of protoporphyrin IX in cells incubated with 5-aminolevulinic acid. *Int J Cancer* 1997; 70: 90-7.
- 20) Nakano K. Harada Y. Yamaoka Y. Miyawaki K. Imaizumi K. Takaoka H. Nakaoka M. Wakabayashi N. Yoshikawa T. Takamatsu T. Precise Analysis of the Autofluorescence Characteristics of Rat Colon Under UVA and Violet Light Excitation. *Curr Pharm Biotechnol* 2013; 14: 172-179.
- 21) Harada Y. Takamatsu T. [Non-labeling optical imaging of biomolecules in diseased tissues]. *Rinsho Byori* 2012; 60: 119-24.
- 22) Imaizumi K. Harada Y. Wakabayashi N. Yamaoka Y. Konishi H. Dai P. Tanaka H. Takamatsu T. Dual-wavelength excitation of mucosal autofluorescence for precise detection of diminutive colonic adenomas. *Gastrointest Endosc* 2012; 75: 110-7.

## 著者プロフィール



## 原田 義規 Yoshinori Harada

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科細胞分子機能病理学・講師

略 歴：1992年3月 京都府立医科大学医学部 卒業

1992年5月 京都府立医科大学第3内科

1995年4月 京都府立医科大学大学院医学研究科入学

1996年6月 Calgary 大学医学部生化学教室短期留学

1999年3月 京都府立医科大学大学院医学研究科卒業, 博士(医学)号取得

2004年4月 京都府立医科大学助手(細胞分子機能病理学)

2009年6月 京都府立医科大学学内講師(細胞分子機能病理学)

2011年10月～現職

専門分野：実験病理学, バイオイメージング

- 主な業績：1. Harada Y, Takamatsu T. Editorial: Biomedical applications of molecular vibrational imaging. *Curr Pharm Biotechnol* 2013; 14: 131-132.
2. Harada Y, Takamatsu T. Raman molecular imaging of cells and tissues: towards functional diagnostic imaging without labeling. *Curr Pharm Biotechnol* 2013; 14: 133-140.
3. Minamikawa T, Harada Y, Koizumi N, et al. Label-free detection of peripheral nerve tissues against adjacent tissues by spontaneous Raman microspectroscopy. *Histochem Cell Biol* 2013; 139: 181-193.
4. Nakano K, Harada Y, Yamaoka Y, et al. Precise analysis of the autofluorescence characteristics of rat colon under UVA and violet light excitation. *Curr Pharm Biotechnol* 2013; 14: 172-179.
5. Imaizumi K, Harada Y, Wakabayashi N, et al. Dual-wavelength excitation of mucosal autofluorescence for precise detection of diminutive colonic adenomas. *Gastrointestinal Endosc* 2012; 75: 110-117.
6. Harada Y, Dai P, Yamaoka Y, et al. Intracellular dynamics of topoisomerase I inhibitor, CPT-11, by slit-scanning confocal Raman microscopy. *Histochem Cell Biol* 2009; 132: 39-46.
7. Murayama Y, Harada Y, Imaizumi K, et al. Precise detection of lymph node metastases in mouse rectal cancer by using 5-aminolevulinic acid. *Int J Cancer* 2009; 125: 2256-2263.
8. Asazuma-Nakamura Y, Dai P, Harada Y, et al. Cx43 contributes to TGF-beta signaling to regulate differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Exp Cell Res* 2009; 315: 1190-1199.
9. Ogawa M, Harada Y, Yamaoka Y, et al. Label-free biochemical imaging of heart tissue with high-speed spontaneous Raman microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 382: 370-374.
10. 原田義規, 高松哲郎「医療応用をめざした光による in vivo 分子イメージング」*実験医学増刊* 2012; 30: 191-196.