

氏 名	鱒 淵 誉 宏
(ふりがな)	(ますぶち たかひろ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙 第 号
学位審査年月日	平成26年1月29日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題名	Experimental Study to Understand Nonspecific Protoporphyrin IX Fluorescence in Brain Tissues Near Tumors After 5-Aminolevulinic Acid Administration (5-アミノレブリン酸投与後の腫瘍周囲脳における プロトポルフィリン IX の由来に関する検討)
論文審査委員	(主) 教授 内 山 和 久 教授 矢 野 貴 人 教授 鳴 海 善 文

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

#### 《緒 言》

悪性神経膠腫での切除率は予後決定因子であるが、術中に腫瘍と正常脳の境界を識別することは困難である。これを補助するため、5-Aminolevulinic Acid(5-ALA)を用いた術中蛍光診断を行っている。5-ALA は腫瘍細胞に取り込まれ、Protoporphyrin IX(PpIX)に代謝され、励起光により赤色蛍光を発する。この蛍光は腫瘍特異性が高いと報告されてきたが、腫瘍周囲の浮腫領域でも蛍光がみられることがある。この腫瘍周囲での PpIX によると思われる赤色蛍光に関し、3つの仮説を立てた。1) 腫瘍細胞内で代謝された PpIX が浮腫液により周辺に拡散する。2) 破綻している血液脳関門を 5-ALA が通過し周囲に拡散し、周囲のグリア細胞や炎症細胞が 5-ALA を PpIX に変換する。3) 他臓器で産生された PpIX が脳へ到達し、腫瘍や周囲の破綻した血液脳関門を通過する。これらの仮説を検証した。

## 《方 法》

### 仮説 1)

Rat glioma cell line C6、human glioma cell line U87 delta と U251、human malignant meningioma cell line IOMM-Lee の細胞を各 1000 個用意し、培養を開始した。24 時間後に 0、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0mM 濃度の 5-ALA を添加した。さらに培養継続後、培地から分離した細胞と培養液の蛍光強度を測定した。前者は細胞内 PpIX、後者は細胞外 PpIX と定義し、予め作成した検量線により蛍光強度を PpIX 濃度に変換した。

### 仮説 2)

血液脳関門を破綻させた脳において、5-ALA 投与後の PpIX 蛍光を評価した。6 匹のラットに、頸動脈から mannitol を動注し血液脳関門を破綻させた後、5-ALA を腹腔内投与した。コントロール群の 3 匹のラットに、mannitol の動注をせずに 5-ALA を腹腔内投与した。各群 4 時間後に脳を摘出し、励起光による PpIX 蛍光を観察した。次に、直接、脳内に 5-ALA を注入し PpIX 蛍光を評価した。7 匹のラットに、convection enhanced delivery(CED)手技を用い右基底核に注入した。内 3 匹は 5-ALA 溶液、3 匹は negative control として溶媒のみ、1 匹は positive control として PpIX 溶液を注入した。各群 4 時間後に脳を摘出し、励起光による PpIX 蛍光を観察した。

### 仮説 3)

血液脳関門を破綻させた脳における、PpIX 投与後の PpIX 蛍光を評価した。3 匹のラットに、頸動脈から mannitol を動注し血液脳関門を破綻させた後、PpIX を腹腔内投与した。4 時間後に脳を摘出し、励起光による PpIX 蛍光を観察した。

## 《結 果》

### 仮説 1)

C6 と U87 delta では、細胞内外 PpIX 濃度とも用量依存的に増加し、細胞外 PpIX 濃度は細胞内 PpIX 濃度に比べ高値であった。一方、U251 と IOMM-Lee では、細胞内外 PpIX 濃度ともかなり低値であった。

## 仮説 2)

血液脳関門の破綻後に 5-ALA を投与した脳では、広範な領域で PpIX 蛍光が確認できた。一方、血液脳関門を破綻させていない脳では PpIX 蛍光は確認できなかった。CED 手技により 5-ALA や PpIX を注入した脳では PpIX 蛍光が観察された。一方、5-ALA や PpIX を注入していない脳では、PpIX 蛍光は観察されなかった。

## 仮説 3)

血液脳関門の破綻後、PpIX を腹腔内投与した脳では、PpIX 蛍光は観察されなかった。

## 《考 察》

神経腫瘍での 5-ALA を用いた蛍光ガイド下手術が確立されている理由は、腫瘍特異性と安全性である。そのため、蛍光物質である 5-ALA 由来の PpIX の細胞内外の動態は重要である。しかし、腫瘍周囲、放射線壊死や変性疾患でも、5-ALA 由来の PpIX 蛍光が観察されることがある。この理由を解明するため、腫瘍周囲の PpIX の由来について、3 つの仮説を立て検証した。仮説 1)の結果から、PpIX の細胞内外の移動が示唆された。文献上、細胞内と表面での porphyrin の transporter の存在も指摘されている。仮説 2)の結果から、腫瘍以外の細胞でも、5-ALA を PpIX に変換される可能性が示唆された。仮説 3)の結果から、他臓器で産生された PpIX が脳内での蛍光に関与する可能性は低いことが示唆された。

## 《結 論》

5-ALA 投与後に腫瘍周囲で PpIX 蛍光が観察されることがあり、手術時に注意が必要となる。その動態は腫瘍細胞内で生成された PpIX が細胞外液に排出され、浮腫液により周囲脳内に移動することと、血液脳関門の破綻により 5-ALA が周囲のグリア細胞や炎症細胞などに到達し、PpIX に変換されることによることが考えられる。

## 論文審査結果の要旨

悪性神経膠腫の予後決定因子として切除率は重要で、切除率向上のための補助として、5-Aminolevulinic Acid(5-ALA)を用いた術中蛍光診断が普及している。これは、5-ALA由来の Protoporphyrin IX(PpIX)蛍光の腫瘍特異性が高いと報告されてきたことによるが、実際の手術では腫瘍周囲の浮腫領域でも PpIX 蛍光がみられることがある。術中蛍光診断の向上は、切除率の向上や予後の改善につながるため、蛍光物質である 5-ALA やその代謝産物である PpIX の薬物動態の把握は重要である。

申請者は、腫瘍周囲での PpIX 蛍光に関し、以下の 3 つの仮説を立て、検証した。1) 腫瘍細胞内で代謝された PpIX が浮腫液により周辺に拡散する。2) 破綻している血液脳関門を 5-ALA が通過し周辺に拡散し、周囲のグリア細胞や炎症細胞が 5-ALA を PpIX に変換する。3) 他臓器で産生された PpIX が脳へ到達し、腫瘍や周囲の破綻した血液脳関門を通過する。その結果、1)細胞内 PpIX が細胞外へ移動すること、2)腫瘍以外の細胞でも、5-ALA を PpIX に変換される可能性があること、そして 3)他臓器で産生された PpIX が脳内での蛍光に関与する可能性は低いことが示唆された。つまり、腫瘍周囲の PpIX 蛍光は、腫瘍細胞内で生成された PpIX が細胞外液に排出され、浮腫液により周囲脳内に移動することによると考えられ、同時に血液脳関門の破綻により 5-ALA が周囲のグリア細胞や炎症細胞などに到達し、PpIX に変換されることによることも考えられる。

神経膠腫における術中蛍光診断では、PpIX の動態把握が重要であり、本研究は PpIX の動態解明のために重要な役割を果たすと考えられる。

以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Photomedicine and Laser Surgery 31(9): 428-433, 2013