

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590717

研究課題名（和文） アミノレブリン酸負荷による尿中ポルフィリンを利用した胃がんのスクリーニング検査

研究課題名（英文） A screening test using urinal porphyrins for gastric cancer patients.

研究代表者

松井 裕史（MATSUI HIROFUMU）

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：70272200

研究成果の概要（和文）：

胃がんの診断として、光化学反応を利用した方法は、非接触、非侵襲かつ、不可視情報を可視化するという点で有用であると考えられ、研究がすすめられている。当研究代表者らは、アミノレブリン酸を利用した癌固有蛍光を臨床的に捉えるとともに、基礎的研究を行ってきた。我々はがん細胞に有意にプロトポルフィリンIXが蓄積し、がん固有蛍光を発していることを見いだした。ヘムの生合成経路の停滞によって蓄積したプロトポルフィリンIXは、生体内では分解できず、水和物となって尿に排泄される可能性を利用し、担がん患者のスクリーニングが ALA 投与後の尿中ポルフィリン量の測定が可能ではないかと考え、担がん患者の尿中ポルフィリン量を測定した。その結果尿中ウロポルフィリン量は増加していたが、健常者と比較して統計学的有意差は認められなかった。今後症例数を増やした検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：

In Japan, gastric cancer is one of the most popular diseases. Although the relation between gastric cancer and H. pylori has been revealed, many patients have been dying. In photodynamic therapy using aminolevulinic acid, gastric cancer area can be diagnosed with cancer specific porphyrin fluorescence. Because of the difference between cancer patients and health persons in heme biosynthesis. Since these cancer specific porphyrins should be exclude out via urine and/ or feces, urinal porphyrins can be thereby a clue to diagnose cancer patients. To elucidate this possibility, we examine the urine from gastric cancer patients and healthy volunteers. Uroporphyrin I and III in cancer patients' urine showed the tendency to be bigger in comparison with them in healthy volunteers, but no statistically significant difference.

The analysis with larger amount of patients probably shows the importance of this screening.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

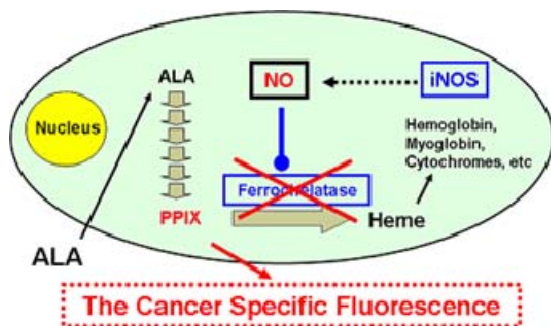
研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：胃がん、アミノレブリン酸、尿ポルフィリン類、がん固有蛍光

1. 研究開始当初の背景

1981年以降、わが国の死因の第一位は悪性新生物であり、死亡者総数の約6割は消化器系のがんである。その中で、胃がんは、50年以上前から死亡率の第1位を占めてきた。現在でも依然高い死亡率を誇っている。胃がんの診断として、光化学反応を利用した方法は、非接触、非侵襲かつ、不可視情報を可視化するという点で、きわめて有用であると考えられており、研究がすすめられている。現在、光化学反応を利用した診断法には、アミノレブリン酸 (ALA) を利用したものと、フォトフリン®を利用したものの二つに大別される。フォトフリン®を利用した例では、オリンパスの開発した蛍光内視鏡が実用化されている。当研究代表者らは、光化学反応による蛍光とがんの関係性を長年研究している。また、筑波大学光学診療部において、光化学療法を臨床に役立てている。ALA を利用した光化学診断法は、1924年 Policard(1) によってその嚆矢を得た。我々は、ALA を利用した光化学療法、光化学診断の研究をすすめ、ALA 蛍光を臨床的に捉えるとともに、基礎的研究を行ってきた。(2) その中で、我々はがん細胞に有意にALAが蓄積する機序を解明した。(3, 4) がん細胞では、細胞内の高NO環境により、鉄のキレート剤であるフェロキレターゼが失活し、ヘムの代謝経路であるプロトポルフィリンIXからヘムを生合成する過程が進まなくなり、プロトポルフィリンIXが蓄積し、がん固有蛍光を発している(図)。



ヘムの生合成経路の停滞によって蓄積したプロトポルフィリンIX以前の物質、ALA、コプロポルフィリン、ウロポルフィリンがどのように処理されるかを考え本研究の着想に至った。胃がんにおいては、スクリーニング法として二重造影法が行われてきたが、手技が煩雑である、偽陽性が多い、術者により得られる結果の差が多いなどの欠点を抱えている。我々は、がん由来細胞にALAを取り込

ませ、その後、ALA が培地中に排泄されていることを確認していた。このとき、ALA のみでなく、コプロポルフィリンやウロポルフィリンなどプロトポルフィリンIXの前駆物質も同様に培地中に排泄されていた。この実験によりがん細胞では、プロトポルフィリンIXの蓄積と、プロトポルフィリンIXの前駆物質の排出が増加することが確かめられた。この結果より、我々は、ALA 負荷によるポルフィリンの排泄が胆がん患者のスクリーニングに応用できる可能性を予見した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ALA 負荷後の尿中ポルフィリン量を測定する手法によって、胃がんにおける新たなスクリーニング法を開発することである。

我々は、光化学療法と胃がん研究の成果がある。また、胃がんには直径数ミリの粘膜内癌から巨大進行癌まで多様なバリエーションに富んでいる。胃がんは治療法や切除法が標準化されていることから、尿中ポルフィリン体と胃がんの関連性を調査追跡し易い。これらの事から担がん患者の中にも胃がんをターゲットとして研究を進めることとした。我々は、光化学反応による不可視情報の可視化による代表的な例として蛍光内視鏡の開発にも寄与してきた。(http://www.olympus.co.jp/jp/) 光化学療法の臨床応用は、日本を中心に進められているものが少なくなく、この分野における日本の役割は先鋭化してきている。この蛍光内視鏡は費用や内視鏡検査の侵襲性からスクリーニングに用いるのは、困難と考えられた。担がん患者のスクリーニングに応用することのできる汎用性の高い研究である。また、ALA のがん特異的蛍光を研究した論文(5, 6)はあるが、プロトポルフィリンIXの前駆物質の排出に関する論文はいまだない。本研究はヘム生合成とALA蓄積のメカニズム解析に関して経験のある我々の独創的な研究課題と考えられた。

3. 研究の方法

筑波大学付属病院において内視鏡的胃がん切除術、胃垂全摘術あるいは胃全摘術を施行される患者のうち、術後の転帰が確認可能であり、かつ本人ならびに家族からその学術的利用について十分な説明の後に了解が得られている患者を対象とし、ALA を投与することによって、患部に特異的に生成されるプロトポルフィリンの尿中代謝物であるコプロポルフィリン、ウロポルフィリンの上昇を

証明することによりがんと関連性を調べることとした。

本研究で施行される臨床上の行為は第3者の学識経験者を含むメンバーで構成される筑波大学医の倫理委員会承認されたものであり、患者にはいつでも自由意志で本研究への協力を拒否できる権利を有していることを継続的に伝えていた。

具体的な尿分析方法としては

- (1)患者に対し、ALA1gを5%グルコース溶液に溶解し、経口投与する。その後24時間蓄尿し、資料とする。
- (2)蓄尿より得た資料のクレアチンをELISA法によるキットを用いて測定する。
- (3)蓄尿より得た資料のALA、ポルフィリン類を高速液体クロマトグラフィーにて分析する。
- (4)3の値をクレアチン量で補正する。
- (5)上部消化管内視鏡にてALA投与により蓄積したプロトポルフィリンIXの蛍光を観察する。そのために、405nmを中心としたバンドパスフィルターを光源に装着し、これを630nmのシャープカットフィルターを装着した高感度カメラで観察する。

4. 研究成果

平成20年度には、胃全摘術を施行された患者4例を含め、総計9例の胃がん患者の同意を得ることができた。

尿中並びに血中ポルフィリン量を測定した結果、5/9例でALA投与によるポルフィリン類高値が認められた。

4例の手術前後の採血採尿可能症例では2例が有意に減少し、2例は変化がなかったが、この2例はいずれもALA投与によって尿中血中ポルフィリンの有意な増加が認められなかった症例だった

21年度は5例の患者にALAを投与したが、1例で畜尿の不備、一例で患者の意志に基づく検討中止があり、3例の患者に検査を施行した。これらの患者の胃を蛍光内視鏡を用いて検討した結果、がん特異的に蛍光が認められることが明らかとなった。また蛍光物質に関してHPLCで分析した。胃がん患者ではいずれも、正常人には認められないウロポルフィリンが24時間後に、コプロポルフィリンが12時間後に有意に高値をとることが明らかになった。ALA服用後4時間後に内視鏡を施行した結果、2/3の症例で、がん固有蛍光を認めたが、一例ではがん領域のみならず胃体部全体に蛍光が認められた。がんの組織型は3例とも高分化腺癌であり、組織型が理由とは考えられなかった。

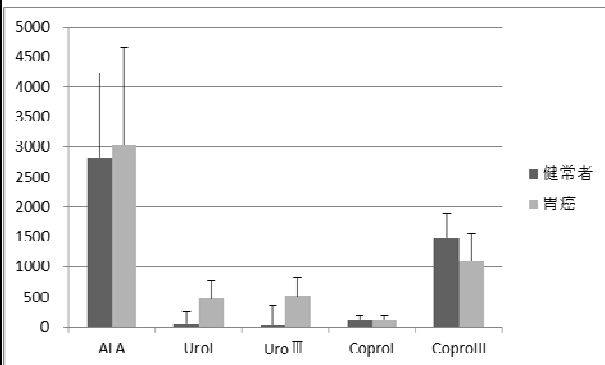
22年度は胃癌症例と胃腺腫症例につき検討を加えた。ALA服用後4時間後に内視鏡を施行した結果、3症例で、固有蛍

光を認めたが、1例では胃体部全体に蛍光が認められた。がんの組織型は3例とも高分化腺癌であった。腺腫症例においては蛍光を認めなかった。尿検体においては、正常ボランティア・腺腫症例には認められないウロポルフィリン、コプロポルフィリンが高値をとる傾向を認めたが、統計学的有意差はなかった。

以上胃がん患者の検討を加えることが可能であった15症例について、健常者8例のデータと比較検討した結果、ウロポルフィリン、ウロポルフィリンIIIで健常者と比較して高値を示す傾向が認められたが、ANOVA法による検討では有意差を認めなかった。

今後症例数を増やすことでウロポルフィリンによる胃がん担がん患者のスクリーニングの可能性が示唆されたが、当初意図したより簡便な形での尿蛍光分光分析法はコプロポルフィリンの値の差がほとんどないことから否定的である。すなわちがん固有蛍光現象に基づく尿ポルフィリンによるスクリーニングの均霑化には、より簡便な検査法が求められる。当初我々は、尿にポルフィリンの至適励起光波長である405nmの光を照射し、赤色蛍光の有無によって担がん状態の可能性を示唆しうるような検査法を意図していた。而してウロポルフィリン量に有意差があっても、ほぼ相同の蛍光特性を有するコプロポルフィリンにマスクされるため、本スクリーニングにはHPLCが必須であることが示唆された。

また3症例で血液生化学的異常を伴わない嘔気嘔吐が認められたことを付記する。



【文献】

1. Policard A. Etude sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de Wood. Comptes-rendus Soc Biol 1924; 91:1423-24
2. Yasushi Murata, Hirofumi Matsui, Akira Nakahara and Hiroshi Muto. Endoscopic Observation for Autofluorescence in

- Indomethacin-Induced Gastric Mucosal Lesions in Rats. Endoscopy 2002 Mar; 34: 208-11
3. Ohgari Y, Nakayasu Y, Kitajima S, Sawamoto M, Mori H, Shimokawa O, Matsui H, Taketani S. Mechanisms involved in delta-aminolevulinic acid (ALA)-induced photosensitivity of tumor cells: relation of ferrochelatase and uptake of ALA to the accumulation of protoporphyrin. Biochem Pharmacol. 2005 Dec 19;71(1-2):42-9. Epub 2005 Nov 10.
 4. Yamamoto F, Ohgari Y, Yamaki N, Kitajima S, Shimokawa O, Matsui H, Taketani S. The role of nitric oxide in delta-aminolevulinic acid (ALA)-induced photosensitivity of cancerous cells. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Feb 16;353(3):541-6. Epub 2006 Dec 22
 5. Kennedy Jc, Pottier RH: Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. J Photochem Photobiol B Biol: 14: 275-292, 1992
 6. Campbell DL, Gudgin-Dickson EF, Forkert PG, Pottier RH, Kenney JC: Detection of Early Stages of Carcinogenesis in Adenomas of Murine Lung by 5-Aminolevulinic Acid-Induced Protoporphyrin IX Fluorescence. Photochem Photobiol 64: 676-682, 1996

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

1. 松井裕史, 金子剛 【やっぱり大切、基本手技】上部消化管〔治療〕 PDT の基本(解説/特集) 消化器内視鏡 22 巻、562-565 頁、2010 年 査読なし
2. 松井裕史、「蛍光内視鏡による胃癌診断」、消化管 Network、第 20 巻 32-33、2009 年 査読有
3. 松井裕史, 金子 剛, 中原 朗, 兵頭一之介:【色素内視鏡を見直す-画像強調観察法との比較】ALA を用いた胃癌の光線力学的診断 臨床消化器内科 24(10):1379-1386, 2009 年 査読なし
4. 松井裕史、宇土潤平、金子剛、下川治、兵頭一之介 アミノレブリン酸投与によるがん固有蛍光と一酸化窒素 日本レーザー医学会誌 29 巻 153-159 頁 査読有 2008

〔学会発表〕(計5件)

1. Matsui H. Gastric Cancer Specific Porphyrin Accumulation. Pacificchem2010.

Honolulu(USA), 2010.12.18

2. 松井裕史:教育講演「がん細胞特異的なへム輸送系の検討」大阪大学核物理研究セミナー、2010.7.4 大阪
3. Matsui H: Plenary Lecture: Gastric cancer specific porphyrin accumulation. LASER TOKYO 2009: 18th International Symposium for LASER Sugery and Medicine Tokyo, 2009.11.8
4. Matsui H. Plenary Lecture: Gastric cancer specific porphyrin accumulation. The 4th Seoul National University Bundang Hospital PDT Colloquium, Seoul(Korea), 2009.7.9
5. 松井裕史:特別講演「胃がんは光る」、群馬大学生体調節研究所特別講演会、2008.11.14 群馬

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

1. 名称:【がん細胞における5-アミノレブリン酸からポルフィリンへの変換促進剤】
2. 発明者:松井裕史、桧山和寛
3. 権利者:筑波大学
4. 種類:特許
5. 番号:2010-095318
6. 出願年月日:2010/04/16
7. 国内外の別:国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

松井 裕史 (MATSUI HIROFUMI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師
研究者番号:70272200

(2)研究分担者

金子 剛 (KANEKO TSUYOSHI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師
研究者番号:90510181