

平成25年度

共焦点顕微鏡による悪性脳腫瘍の術中診断・治療システムの開発

金沢大学  
中田 光俊

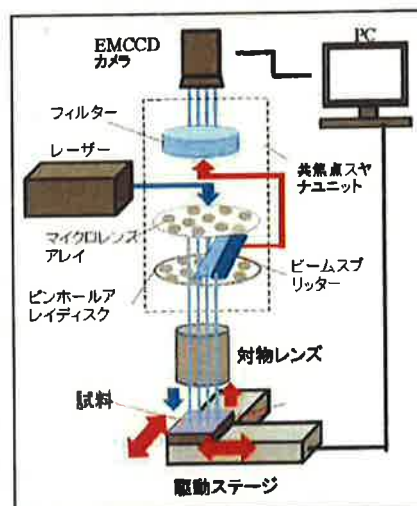
# 共焦点顕微鏡による悪性脳腫瘍の 術中診断・治療システムの開発

## ■実施機関／研究者

金沢大学	医薬保健研究域医学系	教授 中田光俊
金沢大学	理工研究域機械工学系	教授 米山 猛
金沢大学	医薬保健研究域医学系	准教授 林 裕
金沢大学	理工研究域機械工学系	准教授 渡辺 哲陽
金沢大学	理工研究域機械工学系	講師 香川 博之

## 1. 研究概要

脳原発の腫瘍である膠芽腫は、根治不能な悪性腫瘍の一つである。外科手術において脳腫瘍と正常脳の境界の見極めは難しく、広汎に摘出すれば正常脳を損傷し、言語障害や運動障害などの後遺症を来す危険性がある。一方、腫瘍部分を取り残すと、早期に再発をきたし生存期間は大幅に短縮する。そのため客観的な術中診断法と新たな治療法の開発が急務である。本研究の目的は、アミノレブリン酸 (5-ALA) 内服による蛍光ガイド下脳腫瘍摘出手術において、術野にて細胞レベルで腫瘍の蛍光強度判別を行ない、腫瘍領域を明示するとともに、特定された腫瘍部に光線力学療法を適用して細胞レベルで腫瘍を死滅させて、悪性脳腫瘍の治療効率を飛躍的に向上させるシステムを構築することにある。



## 2. 研究の実施内容及び成果

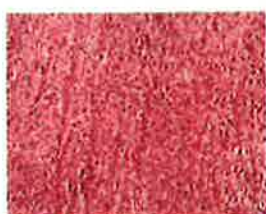
- ① 観察時に使用するフィルターを変えて透過波長を変えることで、腫瘍組織に見られる蛍光が 5-ALA の代謝産物である Protoporphyrin IX (Pp IX) によるものであるか確認した。

Filter 1 : 透過波長 618nm~675.5nm

Filter 2 : 短波長側のフィルター. 透過波長 580.5nm ~653.5nm

Filter 3 : 狭い範囲の波長を観察するためのフィルター. 透過波長 632nm~640nm

### ・病理所見：腫瘍 の観察結果



H&E 染色



Filter 1



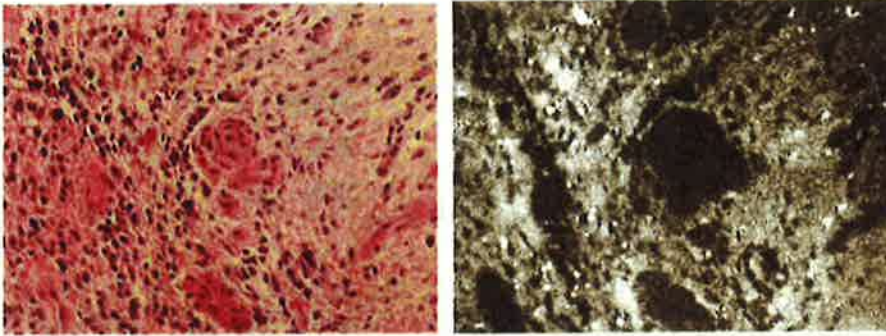
Filter 2



Filter 3

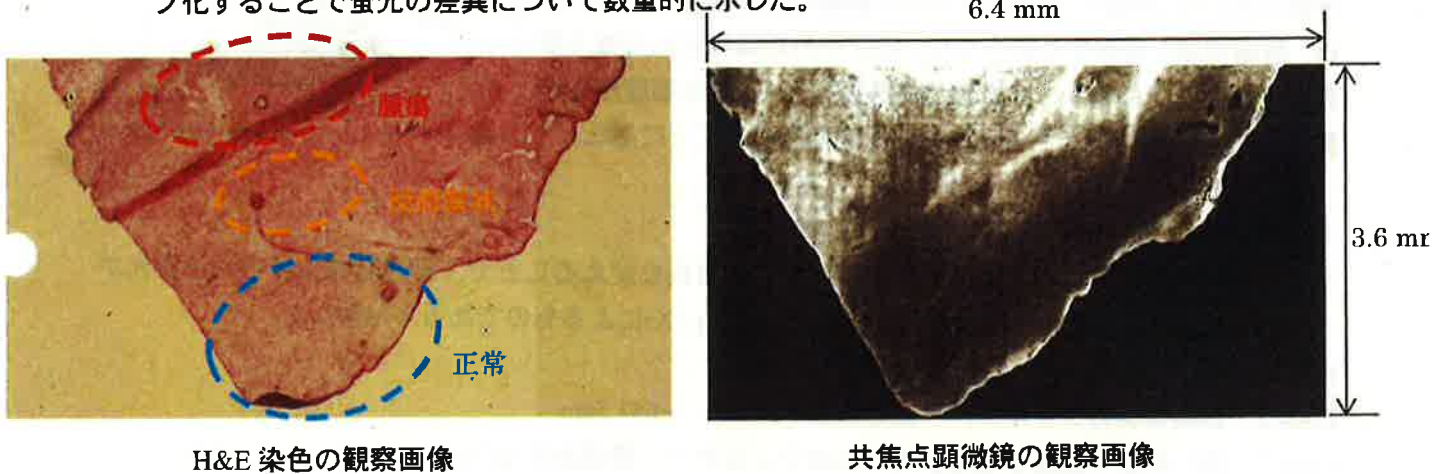
結果：腫瘍組織において3種類のフィルターによる輝点の局在は一致したことから共焦点顕微鏡において観察される輝点はPpIXであると考えられた。

- ② 腫瘍組織を共焦点顕微鏡で観察した後、その試料にH&E染色を施し、両者を比較することで、蛍光局在を明らかにした。



結果：膠芽腫組織において細胞密度の高い領域は特に高い蛍光強度を示した。蛍光は腫瘍細胞の細胞質で検出され核には認めなかった。血管は蛍光を示さなかった。増殖腫瘍細胞は必ずしも蛍光を示さず、増殖腫瘍細胞が多い領域は細胞密度が高くなるため蛍光強度が相対的に高くなった。

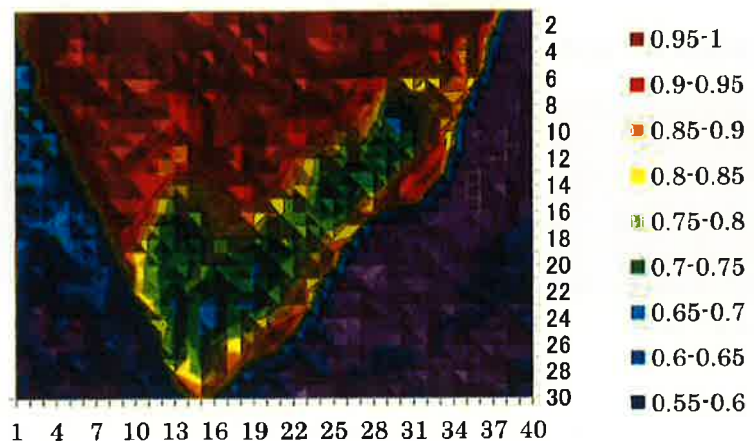
- ③ H&E染色によって腫瘍組織から正常組織への段階的な変化が確認された試料を共焦点顕微鏡で観察した。共焦点顕微鏡の観察画像1枚ごとのR値（darkよりも明るい確率）を求めマップ化することで蛍光の差異について数量的に示した。



H&E染色の観察画像

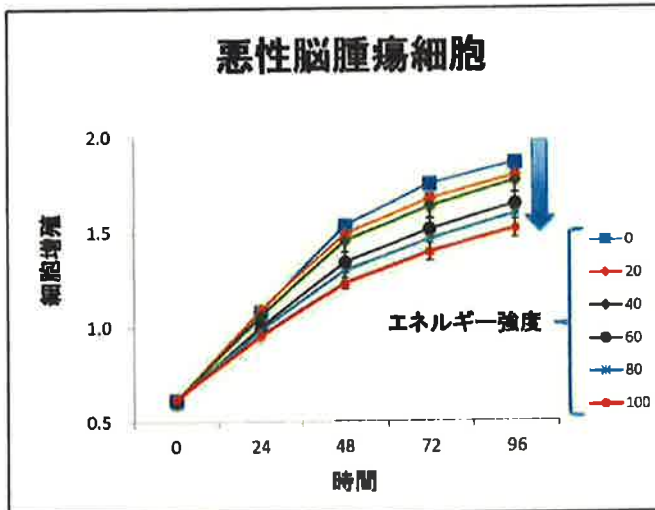
共焦点顕微鏡の観察画像

共焦点顕微鏡の観察データから得られたR値のマップ図



結果：H&E 染色で腫瘍、浸潤、正常組織が確認された部分と同一箇所を共焦点顕微鏡で観察したところ、共焦点顕微鏡の画像では正常組織から腫瘍領域に向かうにつれて蛍光強度が段々強くなっていった。また R 値のマップ図を作成することで明るさの違いを数量的に示すことができた。

④ 5-ALA 処理後の膠芽腫細胞株に対してレーザー照射を行い、光線力学療法の効果を確認した。



結果：膠芽腫細胞はレーザー光照射により照射量依存性に増殖が抑えられることを確認した。

以上のことから、術中蛍光診断の基礎原理が明らかとなり、また光線力学療法の可能性が見いだせた。

3. 現状における課題、問題点  
課題は下記の2点に集約される。

① 手術中に実際に使用できるシステムにする。

現在のシステムでは実験の域を出ていない。システムをコンパクト化し、術者が片手で操作できるプローブの作成が望まれる。また数値化した明るさの違いについて腫瘍か浸潤領域か正常かのカットオフ値の設定が重要と思われる。

② 光線力学療法を行う際の適切なエネルギー量の設定

特殊な波長のレーザー光を照射すると腫瘍細胞の増殖は阻害され、光線力学療法が可能であることが示せたが、正常脳細胞にダメージを与えず腫瘍細胞のみに効果を示すエネルギー量を決定せねばならない。

#### 4. 今後の目標と展開

上記の問題点をクリアすべく下記の課題に取り組む。

- ① 蛍光診断と光線力学療法を同時に行える小型プローブの開発
- ② 蛍光強度の定量評価による腫瘍判別のカットオフ値の統計学的解析
- ③ 5-ALA による光線力学療法の正常脳細胞に対する影響の検討
- ④ 動物実験と前臨床試験

上記を達成し膠芽腫細胞株を脳内に移植したラットを使用した動物実験により蛍光診断の確実性と光線力学療法の安全性・抗腫瘍効果を確認する。その後学内の倫理委員会の承認を得て臨床現場で活用する。