総説

REVIEW ARTICLE

腫瘍内増感剤の蛍光計測による臨床指針査定への応用

三好 憲雄¹, 金子 貞男², 北井 隆平³, 堤 孝太郎⁴,
 櫻井 良憲⁵, 朝山-小坂 祥子⁶, 井上 啓史⁷, 岡田 茂俊⁸

¹福井大学 医学部 腫瘍病理学 (現: 京都工芸繊維大学分子化学系, 静岡大学大学院総合科学技術研究科, 浜松医科大学先端医学教育研究センター医学分光応用寄附講座, 筑波大学大学院臨床研究系消化器内科)

²柏葉脳神経外科病院 脳神経外科学

³福井大学 医学系部門医学領域感覚運動医学講座脳脊髄神経外科

⁴株式会社 YHTC 研究開発部門

⁵京都大学 複合原子力科学研究所基礎工学研究部門

⁶日本医科大学 医学部皮膚科学教室

⁷高知大学 医学部泌尿器科学講座

⁸浜松医科大先端医学教育研究センター 医学分光応用寄附研究室

(2019年10月9日受付, 2020年2月4日掲載決定, 2020年5月16日J-STAGE 早期公開)

Application for Clinical Guideline Assessment by Fluorescent Measurements of Sensitizer Molecule in Tumor

Norio Miyoshi¹, Sadao Kaneko², Ryuhei Kitai³, Koutarou Tsutsumi⁴,
 Yoshinori Sakurai⁵, Sachiko Asayama-Kosaka⁶, Keiji Inoue⁷, Shigetoshi Okada⁸

¹Department of Tumor Pathology, Faculty of Medicine, University of Fukui (New ones: System of Molecular Chemistry, Kyoto Institute of Technology; Graduate School of General Science and Technology, Shizuoka University; Department of Donated Fund Laboratory for Medical Applied Spectroscopy, Faculty of Medicine, Hamamatsu Medical University; Algae Biomass Energy System R & D Center, Tsukuba University)

²Department of Neurosurgery, Kashiwaba Neurosurgery Hospital

³Department of Spinal Neuro Surgery, Medical Department of Sensorimotor Medicine, Medical Area of Graduate School, University of Fukui

⁴Division of Research and Development, YHTC Ltd., Co.

⁵Division of Basic Research of Engineering, Institute for Integrated Radiation and Nuclear Science, Kyoto University

⁶Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Nihon Medical University

⁷Department of Urology, Faculty of Medicine, Kochi University

⁸Department of Donated Fund Laboratory for Medical Applied Spectroscopy, Faculty of Medicine, Hamamatsu Medical University

(Received October 9, 2019, Accepted February 4, 2020, Advance Publication released online May 16, 2020)

要 旨

本研究は脳腫瘍の術中蛍光診断 (Photodynamic diagnosis: PDD) にて切除組織および凍結切片の症例標本を使用し、蛍光分光高度計による定量的蛍光計測を行い、その蛍光強度から濃度換算した蛍光代謝物の濃度と外科病理生検

結果を悪性グレードに分けて、それらの相関性を検討した。その結果、計測した濃度は Astrocytoma grades の変化につれ指数関数的に増大した。また 5-ALA 経口投与後のその体内蛍光代謝物が予測できる分子量=質量の分析を顕微鏡レベルで脳腫瘍モデル動物を使用して行い、蛍光画像と予測質量での画像のほぼ一致したことより、腫瘍内に蓄積した蛍光代謝物がヘム前駆体 Pp-IX であることを明らかにできた。自然蛍光の影響を除いた蛍光強度比 (I_{635nm}/I_{500nm}) も同様に癌悪性度 (grades) の亢進と共に増大化し、上記濃度変化よりも鋭敏に対応した。さらには、本濃度が PDT レーザー照射量の Dose 計算には腫瘍内 Pp-IX 濃度が重要な指標になることを新たに計算式で提示でき、今後の PDT 指針に導入することを検討した。

キーワード：術中蛍光診断、脳腫瘍標本、外科病理生検、定量的蛍光分析、Pp-IX 濃度外挿法、スペクトル強度比、PDT-Dose 計算式

Abstract

Quantitative data of the fluorescence intensity accumulated in clinical malignant brain tumor tissues (astrocytoma) were obtained from a good number of photodynamic diagnosis (PDD)-operated samples in this study. From where, it has been resulted that the concentration/intensity increases exponentially with the increase in the grades of the astrocytoma. It was found that the ratio values (I_{635nm}/I_{500nm}) of the fluorescence intensity against the green autofluorescence one follows the similar exponential increment for the more sensitive cancer grades with the changes on fluorescence intensity. Finally, it reflected that the ratio values could be very much helpful to estimate the Pp-IX concentration from the obtained calibration curve, as a follow through it could be a very important tool to estimate the dose of photodynamic therapy (PDT) and thereby the treatment efficiency of cancer, especially for the cases where different fluorescence concentration is estimated due to different cancer grades in a single tissue. Thus, this technique can be added as a measure of new dose calculation similar to that of the boron neutron capture therapy (BNCT), which is a new presentation for the clinical laser PDT guideline. It was also elucidated that the fluoresced metabolized material was a precursor of Hem namely, protoporphyrin-IX (Pp-IX), because the measurement by a mass spectroscopic analysis and then the comparison of the microscopic image of the mass spectroscopy with the fluorescent one matched completely through overlapping of both images.

Key words: PDD (photodynamic diagnosis of fluorescence), Malignant brain resected sample, Surgical biopsy, Quantitative fluorescent analysis, Estimation method of Pp-IX concentration, Relative values on the spectra, A new dose formula of PDT

1. 緒言

近年 5-Aminolevulinic Acid (5-ALA) の経口投与による自然摂理の体内ヘム・ポルフィリン合成経路¹⁾を活用した、腫瘍切除の外科と併用した術中蛍光診断 (Photodynamic Diagnosis: PDD) 切除術²⁻¹⁴⁾が、悪性脳腫瘍および悪性膀胱癌に対して臨床指針の確立を経て、臨床に応用されるに至っている。また一方で皮膚科領域においては患部への塗布によるニキビ³⁾やページェット病および腫瘍⁴⁾等皮膚疾患には光線力学治療 (Photodynamic therapy: PDT) も行われている。蛍光診断薬 5-ALA の供給の確立と医薬品としての認証への道のりは元より、5-ALA 研究への道のりも長い経緯が存在する。

悪性脳腫瘍組織内では 5-ALA が体内のどこで代謝を受けてどの段階のものが存在しているのであろうか？の問いの答えは未だ明らかではない¹⁰⁾が、ヘム合成経路で生じる種々のポルフィリン誘導体 (Uroporphyrin-III: Up-III, Coproporphyrin-III: Cp-III, and Protoporphyrin-IX: Pp-IX) の蛍光を診ているはずである。まずは、その腫瘍組織内からの蛍光検出されるものはどの段階の誘導体なのか？の素朴な疑問が残る。また、脳腫瘍の場合は血流脳関門 (Blood-brain barrier: BBB) を通過する段階では、5-ALA そのままの状態なのか？あるいはポルフィリン誘導体の状態であるのか？も未だ明らかにはされていない。今回紹介の質量顕微鏡画像計測の結果、腫瘍からの蛍光ポルフィリンが Pp-IX 分子量 ($652.26; m/z = 652 + H =$

653.3) のイメージングと蛍光部位画像との類似性から、Pp-IX であることを実証化した。

5-ALA を経口投与 3~4 時間後には悪性脳腫瘍部に取込まれた光増感剤の赤色蛍光を頼りに腫瘍ボーダーを判別しながら外科用メスにて蛍光性組織のサンプリングを行った。この蛍光強度をよく観測すると、強度にバラツキが存在することが分かる。この強度は取りも直さず Pp-IX 濃度に依存している。どうしてこのような濃度依存が生じているのかを検証することにした。周囲の黄緑色 (500 nm = G) の自然蛍光に肉眼観測では影響をうけるのでそれを避けるために、ポルフィリン特有の赤色 (635 nm = R) 蛍光強度比 (R/G) 率、すなわち異なる比率の腫瘍部位で生検した結果、蛍光強度の変化は悪性脳腫瘍 (星細胞腫: Astrocytoma) 組織内悪性度 (Grades) に対して、指数関数的 ($0.88347 \times e^{(0.69398 \times \text{Stage})}$) に増加依存していることを示した。一方、既知の Pp-IX 濃度変化に対する蛍光強度 (If: 635 nm) の検量線から、逆に 78 症例の臨床切除組織内蛍光強度計測と同じ凍結連続切片の HE 染色診断結果から、Pp-IX 濃度を外挿する検量線を作成した。上記で得られた検量線から求めた蛍光強度比 (R/G) から Pp-IX 濃度換算を行い、腫瘍悪性度 (Astrocytoma-I, -II, -III, and -IV = 多型性膠芽腫: Glioblastoma) の変化に連れて、その比率は取り込まれた Pp-IX 濃度に対して指数関数的に増大化していることが結論できた。また、得られた蛍光強度比 (R/G) は上記検

量線での単なる蛍光強度よりもより感度が良く、(R/G) 比率が 1.0 以上は Astrocytoma-II 以上となり、切除対象となる貴重な指標が、腫瘍表面からの開発した分光計測より得られた。

それゆえに、より簡便的な腫瘍組織表面からの (R/G) 比率計測でも濃度外挿した値を PC に送り込めば、直ちにレーザーパワー制御システムにより、目的とする Dose の照射が時間制御とともに PDT¹⁵⁻²²⁾ が精度よく行われるものと期待する。しかもその PDT 照射は、蛍光強度の視野を診断用励起波長 (405 nm) と治療用照射波長 (635, 665 nm) のパルス化のタイミングを取りながら、蛍光診断と同時に、腫瘍境界部 (例えば Astrocytoma-II) をも確実に悪性度対応の PDT 照射ができる^{23,24)} 可能性を提案する。

2. 目的

基礎研究領域の立場からより良い診療行為に還元されるべく、悪性脳腫瘍における 5-ALA (5-Aminolevulinic acid) 経口投与による PDD の外科病理学的情報との関連性を例に、脳外科を含む他科への的確な PDD 臨床指針に導入できるように定量的蛍光分析を脳腫瘍の凍結切除標本で行なう。また、PDD の際に観測する蛍光発光本体の特定だけは脳腫瘍モデル組織を使用し、臨床サンプルが使えない全国共同利用施設の質量顕微鏡にて明らかにする。さらにヘムの前駆体代謝物 Pp-IX の腫瘍内 Pp-IX 濃度を既知の Pp-IX 濃度と水溶液中 Pp-IX 蛍光強度の検量線 (検量線作成には既知濃度の標準 Pp-IX を使用することから水溶液を使用するのが一般的である) から外挿し、組織内自然蛍光に対する Pp-IX 蛍光強度比と悪性度及び外挿 Pp-IX 濃度との関連式を求めることで、弱蛍光強度比の良性神経膠腫 (Astrocytoma-II) への PDT 照射量 (Dose) がどの程度増大化が必要なのか? を、この Dose 計算には照射強度と照射時間以外に光増感剤濃度が必須である見地 (BNCT の物理学的 Dose 計算式に準ずる根拠) に立って、具体的に検証する。以上、主に 3 点を明らかにする。

3. 対象と方法

3.1 質量分析顕微画像システムによるイメージング計測: (Fig.1)

他には実験脳腫瘍 (C6 Glial tumor cell: 福大・脳外科・北井氏より提供の継代細胞を増殖させ、 2×10^6 cells/50 μ l をシリンジにて脳移植後 3 週間後) のウィスターラット脳腫瘍組織に、5-ALA を直接局所注入したもので、質量分析顕微画像計測に、凍結連続切片で HE 染色像と蛍光顕微像と共に、浜松医科大学質量分析イメージング共用センターにて、MALD-IT-TOF 型顕微質量分析装置 (iMScope β 機)・島津製作所製) を使用して計測した¹³⁾。

3.2 検量線を作成するための種々のサンプル溶液の蛍光計測: (Fig.2)

実際の腫瘍内蛍光スペクトルと類似 (Biomimetic) の溶液系を見つけるために、Fig.2 の右のスペクトルのように計測した。生体系スペクトル 3 と 4 とに近い 2 のスペクトルは、10 mM カチオン性界面活性 (Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide = CTAB) 水溶液であった。恐らくは Pp-IX 分子のカチオンと界面活性剤のアモニウムの陰性イオンとの静電的結合により、水溶液の蛍光ピーク位置より長波長側にレッドシフトしているものと推測され、生体内ではこのようなイオン結合で安定化しているものと考えられる。従って 10 mM-CTAB 水溶液で既知濃度変化に対する蛍光強度変化の検量線を作成した (Fig.4 内のスペクトル右上のグラフ)。

3.3 凍結切片の蛍光強度計測方法: (Fig.3, 4)

臨床外科切除時の悪性脳腫瘍凍結標本を共同著者から提供頂いたものを主に計測対象とした。その症例組織一つ一つに対し、連続凍結切片 (10 μ m) を作成し蛍光分光光度計 (850 型、日立製作所製) で分光学的計測とまた、残り連続切片は必ず HE 染色を施し病理診断で病期 (Astrocytoma) を明らかにして、病期と蛍光強度や術中計測した自然蛍光の比率 (R/G) との相関性を検討した。

厚み 10 μ m の凍結切片 5 枚を蛍光強度の計測は、Fig.3 の左写真で示すように、粉体試料の蛍光を計測する附属

Fig.1 Mass imaging of Pp-IX in C6 glial tumor model tissue (Upper central), Sample image (Upper left), Red fluorescence image (Upper right), HE stained image (Under right), and Mass spectra (Under left) of Pp-IX, respectively.

Fig.2 Fluorescence spectra analysis of Pp-IX in tumor SCC tissue of C3H/He mouse (Curve 4), a human melanoma (HMF) cultivated cell suspension (Curve 3), 10 mM cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) aqueous solution (Curve 2) and pure water solution (Curve 1).

Fig.3 Fluorescence sample holder (Left: photograph) for HpO (Hematoporphyrin Oligomer) and Pp-IX incorporated in frozen-section of cancer tissues (Right: illustration)

Fig.4 Accumulation of Pp-IX concentrations (Bar graph included within the standard deviation of $\pm 13\%$ against each stage) in the astrocytoma brain tissues of clinical human 78 cases, the emission spectra in a CTAB aqueous solution and a tissue, and a calibration curve (Upper illustration). (-), (+/-), (+), (++) and (+++): Fluorescence intensity observed by one operator through a microscope with his naked eyes.

ホルダーを使用した。右下に示す挿絵のように凍結切片を石英円窓板で挟んだホルダーに入れて蛍光発光スペクトル (Fig.3) と蛍光ピーク強度を記録した。ただ、光増感剤の濃度を外挿するための検量線を作成するためには、Fig.4 右図のように腫瘍内光増感剤の蛍光発光スペクトルと類似したスペクトル特にスペクトルピークの一致したバイオミメティック溶液系を探して、既知の Pp-IX 濃度変化による蛍光強度関係すなわち検量線を上記 (2) のように水溶液中で作成する必要があった。その結果の検量線は Fig.4 のスペクトル右上のグラフで提示した。

4. 結果

4.1 質量分析顕微画像システムによるイメージング計測結果：(Fig.1)

Fig.1 の質量分析顕微画像上段中央の (Mass Image: $m/z = 563.32 = \text{Pp-IX} + \text{H}$) とその右横の蛍光発光像とが、皮膚以外の腫瘍内ではほぼ一致していることから、Pp-IX (分子量 = 562.26) の存在が確定した。また、C6 腫瘍生組織への 1 mM の 5-ALA 直接局所注入によっても蛍光ラベルが可能であることが判明したことは、今後特に脳外科、泌尿器科や皮膚科の PDD 臨床で、可視化腫瘍ペインティングマーキングの可能性を示唆するものとして、この結果の意義は大きい。

4.2 凍結切片の蛍光強度計測結果：(Figs.2, 3, 4)

Fig.2 の右側の発光スペクトル 4 に対する励起スペクトルを左側に示している。すなわち蛍光発光第二のピーク 707 nm で固定して、励起波長を変化させながら蛍光発光収率を観測した励起スペクトルを見ると、右側縦軸で表す蛍光強度変化で表現される。いわゆる 405 nm の Soret 帯と他 4 つのピーク (Q-band) と新たに 665 nm が出現していることも明らかにできた。これら蛍光スペクトル情報を元に、既知の濃度と蛍光強度の検量線の作成を行った。その検量線は Fig.4 のグラフ左上のスペクトル右上のグラフ ($[\text{Pp-IX}] = [\text{If}] / 0.0057$) の様に、既知 Pp-IX 濃度と蛍光強度は比例関係を得た。さらに定量的計測結果の見積もりからは正常と悪性腫瘍との濃度的コントラ

ストは最大で約 8.5 倍であった。体内ヘムポルフィリン合成反応で、2 分子の 5-ALA が 1 つのピロール環を形成し、そのピロール環 4 分子で 1 つのポルフィリン環 (Pp-IX) を Grade-IV (GBM) で形成した生合成の反応収率は、今回の投与 5-ALA 濃度から当腫瘍内 Pp-IX 濃度計算より、効率の高い (85.8%) ことが明らかになった。以上、これら腫瘍内光増感剤の蛍光情報の定性的術中外科的蛍光診断から光学的レーザー分光計測技術を慎重に駆使して、より詳細な定量的蛍光計測による臨床指針への応用期待が臨床例をもって示す結果となった。

4.3 悪性脳腫瘍の蛍光スペクトル診断法：(Figs.5, 6, 7)

Fig.5 で示すような脳腫瘍の蛍光スペクトル診断レーザーシステムで、計測を行った結果、Figs.6, 7 で示すような蛍光イメージとそれぞれの計測ポイントで、スペクトルが得られた。蛍光スペクトル診断システムは M&M 社 (株) の PDD 研究用紫色半導体レーザーを使用した。また、悪性脳腫瘍 78 症例の内切除 1 症例 (No. 43) 組織で行った。Fig.6 の左上の写真から白色光下ではポイント 1 番では正常組織と区別ができないているが、紫色光で励起すると右下の蛍光像の如く、明らかな蛍光を呈している。これらの計測ポイントにおける生検と蛍光スペクトルから自然蛍光 G (500 nm) に対する赤色蛍光ピーク R (635 nm) 強度比 (R/G) を Fig.7 でポイント毎に提示する。(1) Astrocytoma III, R/G = 6.5 であった。続いて (2) Astrocytoma IV (glioblastoma), R/G = 30.9 ; (3) Necrosis, R/G = 0.6 ; (4) Astrocytoma II, R/G = 1.3 であった。

Figs.4 と 7 のデーターで得られた外科病理診断結果と蛍光情報の定量的蛍光分析結果との相関を Fig.8 のグラフに表すことができる。つまり Fig.4 の棒グラフからも示唆されるように、各悪性脳腫瘍組織片に取り込まれた Pp-IX の濃度 (左側の片対数表示) は各悪性度変化に対して、指数関数的

$$y(\text{Pp-IX}) = 0.88 \times E(0.69 \times [\text{Grades}])$$

に増加していることが分かる (Fig.8 赤色カーブ)。

Fig.5 PDD laser system excited at 405 nm of diode laser and guided the fluorescence into the spectroscopic analyzer (Made by M & M Co. in Tokyo).

Fig.6 Clinical resected astrocytoma tissue and the Pp-IX fluorescent image excited by a diode blue laser with labeled numbers (1, 2, 3, 4), respectively.

Fig.7 The fluorescent emission spectra at each point with labels (1, 2, 3, and 4), respectively on clinical astrocytoma tissue and with the pathological findings, respectively.

Fig.8 The relations of Log values of Pp-IX concentration (μM) and Log values of ratio of Red/Blue of the fluorescence at each measurement points against the malignancy of astrocytoma.

Fig.9 The linear relationship of Log Ratio of Rand G values dependent on the Pp-IX concentration from Fig.8.

また、蛍光発光ポイントで計測したスペクトルの蛍光強度比 (R/G: 右側片対数表示) でも Pp-IX 濃度と同様な指数関数的

$$y(\text{Pp-IX}) = 0.12 \times E(1.34 \times [\text{Grades}])$$

増加 (カーブフィッティング率 (R) は 0.99 を示していることが判明し、検量線を使用した Pp-IX 濃度外挿をなくとも、蛍光強度比率から直接腫瘍病期を逆に想定できることが分かった。この蛍光比計測の実験は一回ずつであることから、今後の追加実験が必要と思われる。しかしながら腫瘍組織表面からの蛍光計測にも関わらず Pp-IX 濃度変化に対する指数関数的傾きの比率が約二倍であることから、本蛍光比 (R/G) の方が、Astrocytoma malignancy の悪性度変化を鋭敏に反映しているものと結論付けられた。

Fig.8 で得られた関係式からさらに発展解釈すると、蛍光発光スペクトルの蛍光強度比 (R/G) の値から逆に Pp-IX 濃度をも換算できることが、Fig.9 で示すことができた。その得られた関係式は、

$$y(\text{R/G}) = 0.39 \times E(0.33 \times [\text{Pp-IX}])$$

であり、計測した蛍光比率から容易に Pp-IX の値が予測できる。

5. 考察

蛍光計測の定量的最終段階で導き出したグラフ Figs.8 と 9 からは、臨床指針にとって重要なポイントを指摘できた。それは蛍光強度が弱い領域の Astrocytoma-II では蛍光強度比 (R/G) が 1~3 の領域であり、Pp-IX 濃度は 4.5~10 μM の取り込み量であり、蛍光強度が強い領域の 1/3~1/4 の濃度しか存在しないことが推測できる。

また、どうしても切除できない蛍光発光部位への PDT 追加が必要な際には、同じ腫瘍内ではあるが蛍光強度が弱い領域を PDT 照射根治するには、蛍光強度の強い領域と同じ照射 Dose では足りず、低蛍光強度域の腫瘍内取り込み濃度が 1/3~1/4 と低いために、3~4 倍の照射時間

や照射強度が必要ではないかと予測できた。

今までレーザー照射強度 (W/cm²) と照射した時間 (sec) の積・照射量 (J/cm²) で、PDT 効果の臨床指針の判断材料としてきたが、実は上記で求めた腫瘍内光増感剤濃度が本 PDT の Dose 計算には重要なパラメーターとして、その臨床治療効果の判断に欠くことのできない重要なパラメーターの一つである根拠を関係式と共に以下に考察する²⁵⁾。それはホウ素中性子捕捉療法 (BNCT = Boron Neutron Capture Therapy) における以下の Dose 計算式①と比較しながら検討すると、同じ次元 [J/Kg] に統一することで光増感剤濃度が必要であることが明らかである。

BNCT と PDT の Dose 計算式の比較:

腫瘍体積と質量は比例すると仮定すると以下①と②の様に BNCT と PDT の Dose 計算式に類似性を見出すことが出来る。

①BNCT:

$$\begin{aligned} \text{Gy} = \text{J/kg} &= (\text{Neutron Fluence} [\text{cm}^{-2}] \times \\ &(\text{Reaction Cross-section: 反応断面積 for } ^{10}\text{B(n,}\alpha\text{)}^7\text{Li} [\text{cm}^2] \times \\ &(\text{Number of } ^{10}\text{B per mass: 数密度} [\text{kg}^{-1}]) \times \\ &(\text{Q-value for B(n,}\alpha\text{)}^7\text{Li} [\text{J}]) \times \\ &(\text{Unit Conversion Factor: 吸収線量換算係数}) \end{aligned}$$

②PDT:

$$\begin{aligned} \text{J/kg} &= (\text{Photon Energy Fluence} [\text{J/cm}^2] \times \\ &(\text{Reaction Cross-section for PDT} [\text{cm}^{-2}]) \times \\ &(\text{Number of Photosensitizer Molecules per mass:} \\ &\text{光増感剤濃度} [\text{kg}^{-1}] = [\mu\text{mol/L}]) \times \\ &(\text{Energy Efficiency: 効率}) \times \\ &(\text{Unit Conversion Factor}) \end{aligned}$$

もちろん純溶媒系における光化学の反応効率計算からも濃度の必要性の根拠があり、従来の [J/cm²] 計算だけの Dose の見積もりでは不十分なので、今後の PDT-Dose 計算における臨床指針に、今回求めた腫瘍内光増感剤濃度の導入を提案する。

6. 結論

これまで、定性的 PDD 蛍光像から外科的腫瘍境界病変部を提供し活用されつつあるが、蛍光の計測技術の更なる進展と共に、外科病理学的対応の定量的蛍光強度相関性の今回の解析結果や考察を、これからの実際の PDD 臨床指針に少しなりとも参考情報として提案することが出来た。さらには PDD 切除後の残存部 PDT-照射 Dose 計算において今回得られた腫瘍内濃度のパラメーターをレーザー強度、照射時間と共に是非とも追加する必要があることも提案した。

また、5-ALA-PDD で観測の蛍光発光物質を腫瘍モデルではあるが臨床と同じ条件実験で Pp-IX であることを質量分析顕微鏡像により直接証明できた。

謝辞

本研究は、以下の研究協力者により執り行われ、また、以下の公的競争的助成金により成り立っている成果であることを改めて感謝申し上げます。

福永幸裕（ポスト Doctor／三好研）、伊藤慎治（ポスト Doctor／三好研）、田中 徹（SBI-Pharma）、井上克司（IHI）、金子貞男（柏葉脳神経外科病院）。

コスモ石油（株）総合研究所・SBI-ALApromo（平成 17～20 年）、澁谷工業（株）からの研究助成（平成 23 年特許申請）。

科研費 文部省、文部科学省 [基盤研究 C-2：平成 11～12 年度：11672293；B-2：平成 20～22 年度：20390165、平成 14～17 年度：14370793；挑戦的萌芽研究：平成 26 年度：26640090]、特定領域研究（平成 17～18 年度 [光機能界面の学理と技術]）、厚生省科研費（平成 10～11 年度がん研究）、厚生労働省科研費（平成 20～21 年度・医療機器開発研究事業ナノメディシン研究）、福井県工業技術センター（平成 14 年度戦略的地域産学官共同研究：医療福祉関連領域・医療福祉健康）、若狭湾エネルギー研究センター（平成 19～21 年度・公募型）、JST 先端計測分析技術・機器開発事業（平成 21～24 年度）、JST 産学共同シーズイノベーション化事業・顕在化ステージ（平成 18～19 年度）、経済産業省・ものづくり中小企業製品開発等支援補助金（平成 21～22 年度・実証等支援事業）、日瑞 Stiftelsen 研究基金（平成 15～令和元年度）。

利益相反

謝辞に記載の民間企業（SBI-ALApromo 社からの委託助成研究、澁谷工業株式会社の特許申請）と参考文献 13) の株式会社 YHTC との特許申請に関係している。

これらの助成は 5-ALA 薬剤の提供や半導体レーザーの開発に活用された。

引用文献

- 1) Peng Q, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Nesland JM. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. *Photochem Photobiol.* 1997; 65: 235-252.
- 2) Kaneko S. A current overview: photodynamic diagnosis and photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid in neurosurgery. *The Journal of Japan Society for Laser Medicine.* 2008; 29: 135-146.
- 3) Kosaka S, Miyoshi N, Akilov OE, Hasan T, Kawana S. Targeting of sebaceous glands by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: An in vivo study. *Lasers Surg Med.* 2011; 43: 376-381.
- 4) 松本 義也, 秋田 洋一, 河野 千晴, 中瀬 古 裕乃, 渡辺 大輔, 玉田 康彦. 皮膚腫瘍に対する光線力学的療法. *日レ医誌.* 2008; 29: 160-163.
- 5) Matsumoto N, Saito H, Miyoshi N, Nakanishi K, Fukuda M. Combination effect of hyperthermia and photodynamic therapy on carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1989; 116: 824-829.
- 6) 三好 憲雄, 小笠原 利行, 小川 透, 佐野 和生, 金子 貞男, 福田 優, 久住 治男. 5-Aminolevulinic acid (%-ALA) を投与した腫瘍内代謝物 protoporphyrin-IX (Pp-IX) の蛍光分析. *日レ医誌.* 2002; 2: 81-88.
- 7) Miyoshi N, Ogasawara T, Nakano K, Tachihara R, Kaneko S, Sano K, Fukuda M, Hisazumi H. In light of recent developments: Application of fluorescence spectral analysis in tumor diagnosis. *Appl Spectr Rev.* 2004; 39: 437-455.
- 8) Miyoshi N, Ogasawara T, Nakano K, Tachihara R, Kaneko S, Sano K, Fukuda M, Hisazumi H. An application of fluorescence analysis in tumor tissues. In *"Recent Progress on Clinical and Basic Research of ALA"* (eds.) Miyoshi N, Kaneko S, published from Kashiwaba Neurosurgical Hospital; 2005. p. 11-16.
- 9) Utsuki S, Miyoshi N, Oka H, Misajima Y, Shimizu S, Suzuki S, Fujii K. Fluorescence guided resection of metastatic brain tumors using a 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin-IX: pathological study. *Brain Tumor Pathol.* 2007; 24: 53-55.
- 10) 梶本 宣永, 黒岩 敏彦. 5-ALA 光線力学診断の問題点：蛍光輝度定量化は可能か、ポルフィリン蓄積機序は解明されたか. *日レ医誌.* 2011; 32: 143-148.
- 11) 三好 憲雄. 利用拡大をめざした 5-ALA を用いたがんの PDD-PDT 研究. *日レ医誌.* 2008; 29: 134.
- 12) Miyoshi N, Fukunaga Y, Kaneko S, Hisazumi H. PD and PDT with porphyrin precursors (5-ALA) in Japan. *日レ医誌.* 2009; 29: 164-168.
- 13) Miyoshi N, Kundu SK, Mandal V, Fukunaga Y, Sano K, Setou M, Kaneko S. Determination of porphyrins involved in photodynamic diagnosis by mass-spectrum microscopy. *ALA-Porphyrin Science.* 2017; 6: 9-16.
- 14) 三好 憲雄, 伊藤 慎治, 福永 幸裕, 木下 英荘. 第 12 章 利用拡大を目指した 5-ALA を用いたがんの PDD・PDT. 栗津邦男 (監修). 次世代光医療—レーザー技術の臨床への橋渡し—. シーエムシー出版; 2010. p.135-137.
- 15) Hisazumi H, Miyoshi N, Misaki T. Photoradiation therapy of bladder tumors. *J Urol.* 1983; 130: 685-687.
- 16) Miyoshi N, Hisazumi H, Nakajima K, Ueki O. The similarity between the fluorescence spectra of hematoporphyrin derivative incorporated by rat bladder cancer tissue and trimethyl ammonium bromide micelles. *Photobiochem & Photobiophys.* 1984; 8: 115-121.
- 17) Hisazumi H, Miyoshi N, Ueki O, Nishino A, Nakajima K. Cellular uptake of hematoporphyrin derivative in KK-47 bladder cells. *Urol Res.* 1984; 12: 143-146.
- 18) Miyoshi N, Hisazumi H, Ueki O, Nakajima K. Cellular binding of hematoporphyrin derivative in human bladder cancer cell line: KK-47. *Photochem & Photobiol.* 1984; 39:

359-364.

- 19) Hisazumi H, Miyoshi N, Misaki T. Whole bladder wall photoradiation therapy for carcinoma in situ of the bladder: A preliminary report. *J Urol*. 1984; 131: 884-887.
- 20) Hisazumi H, Miyoshi N, Misaki T. A trial manufacture of amotor-driven laser light scattering optic for whole bladder wall irradiation. In: Doiron DR, Gomer CJ. (eds.) "Porphyrin Localization and Treatment of Tumors. Progress in Clinical and Biological Research". 1984; 170: 239-247.
- 21) Misaki T, Hisazumi H, Miyoshi N. Photoradiation therapy of bladder tumors. In: Doiron DR, Gomer CJ (eds.) "Porphyrin Localization and Treatment of Tumors. Progress in Clinical and Biological Research". 1984; 170: 785-794.
- 22) Naito K, Hisazumi H, Uchibayashi T, Amano T, Hirata A, Komatsu K, Ishida K, Miyoshi N. Integral laser photodynamic treatment of refractory multifocal bladder tumors. *J Urol*. 1991; 146: 1541-1545.
- 23) 三好 憲雄, 堤 孝太郎, 久米 恭. 「光線力学診断・治療用の多波長レーザー装置」. 申請者: 福井大学. 特願番号: 2011-132209. 平成 23 年 5 月 6 日
- 24) 金子 貞男. 「ALA 光線力学診断 (ALA-PDD) ガイドによる腫瘍摘出術」新 NS NOW No. 4 脳・脊髄腫瘍摘出のための引き出し—腫瘍摘出のコツとビットフォール. メジカルビュー社; 2015. p. 84-95.
- 25) Miyoshi N, Kaneko S. Chapter-6 "The need for a parameter of sensitizer's concentration in cancer tissue to estimate PDT effects." printed in *Photodynamic Therapy (PDT)* (ed.) By Flora Fitzgerald published from Nova Science Publishers; 2018. p. 185-195.