

(BLE))における蛍光励起の程度および従来の白色光源下膀胱鏡 (white light endoscopy (WLE))における肉眼的所見により、既報の通り^{2,3)}、各検体を各々半定量的に評価した。BLE所見は、赤色蛍光励起の程度よりBLE 0 (蛍光励起なし)、BLE 1 (励起軽度)、BLE 2 (励起中等度)、BLE 3 (励起高度)の4段階に大別した。WLE所見は、従来の系統的生検において組織採取を行う程度の異常か否かの観点を中心とした肉眼的悪性度の程度よりWLE 0 (異常所見なし)、WLE 1 (軽度異常)、WLE 2 (中等度異常)、WLE 3 (高度異常)の4段階に大別した。また組織採取の際、青色励起光の照射に伴い蛍光強度が減衰する現象 (photobleaching現象)を避けるため、初回観察時の蛍光強度が軽度の部位 (BLE1)は一期的に生検を行い、以後はBLE2、BLE3、BLE0の順序で二期的に生検を行った。その後は白色光源下および青色光源下で腫瘍を切除した。組織検体はいずれも病理診断を行った。

6) 評価項目

各診断の診断精度は、各半定量的評価のBLE1以上、WLE1以上を陽性として、その部位の生検検体の病理診断との対応での中精度、感度、特異度を求めた。各診断の診断能力は、ROC曲線 (receiver operative characteristic (ROC) curve)を描き曲線下面積 (area under the curve (AUC))を求め、Wilcoxon 検定にて有意差検定を行い比較検討した。さらに肉眼分類別、病歴別における比較や異型度との関連性や本診断法、特に5-ALA膀胱内注入に起因する副作用も評価した。

結 果

1) 全病変における診断結果 (Table 2, Fig. 1)

評価可能な38症例より得られた全301検体 (1症例あたり中央値8 (7-12) 検体)の内、上皮内癌 (carcinoma in situ (CIS)) 24検体 (8.0%) および中等度以上の異形成³⁾

Table 2 診断精度

青色光源下蛍光膀胱鏡 (BLE) 診断	的中精度 (%)	感度 (%)	特異度 (%)
全病変における診断結果	73.8	90.3	62.1
肉眼分類別診断結果			
隆起病変 (68検体)	88.2	96.6	33.3
非隆起病変 (233検体)	69.5	84.6	63.7
乳頭状病変 (51検体)	86.3	97.7	14.3
非乳頭状病変 (250検体)	71.2	86.3	64.1
病歴別診断結果			
初発症例の病変 (185検体)	75.4	88.8	64.2
再発症例の病変 (116検体)	70.8	94.3	59.2
BLE所見で、BLE 1 (蛍光励起軽度) 以上を陽性とした			
白色光源下膀胱鏡 (WLE) 診断	的中精度 (%)	感度 (%)	特異度 (%)
全病変における診断結果	80.4	73.4	85.3
肉眼分類別診断結果			
隆起病変 (68検体)	89.7	100.0	22.2
非隆起病変 (233検体)	77.7	49.2	88.7
乳頭状病変 (51検体)	86.3	100.0	0.0
非乳頭状病変 (250検体)	79.2	58.8	88.8
病歴別診断結果			
初発症例の病変 (185検体)	82.1	75.3	87.7
再発症例の病変 (116検体)	77.4	68.6	81.7

WLE所見で、WLE 1 (軽度異常) 以上を陽性とした

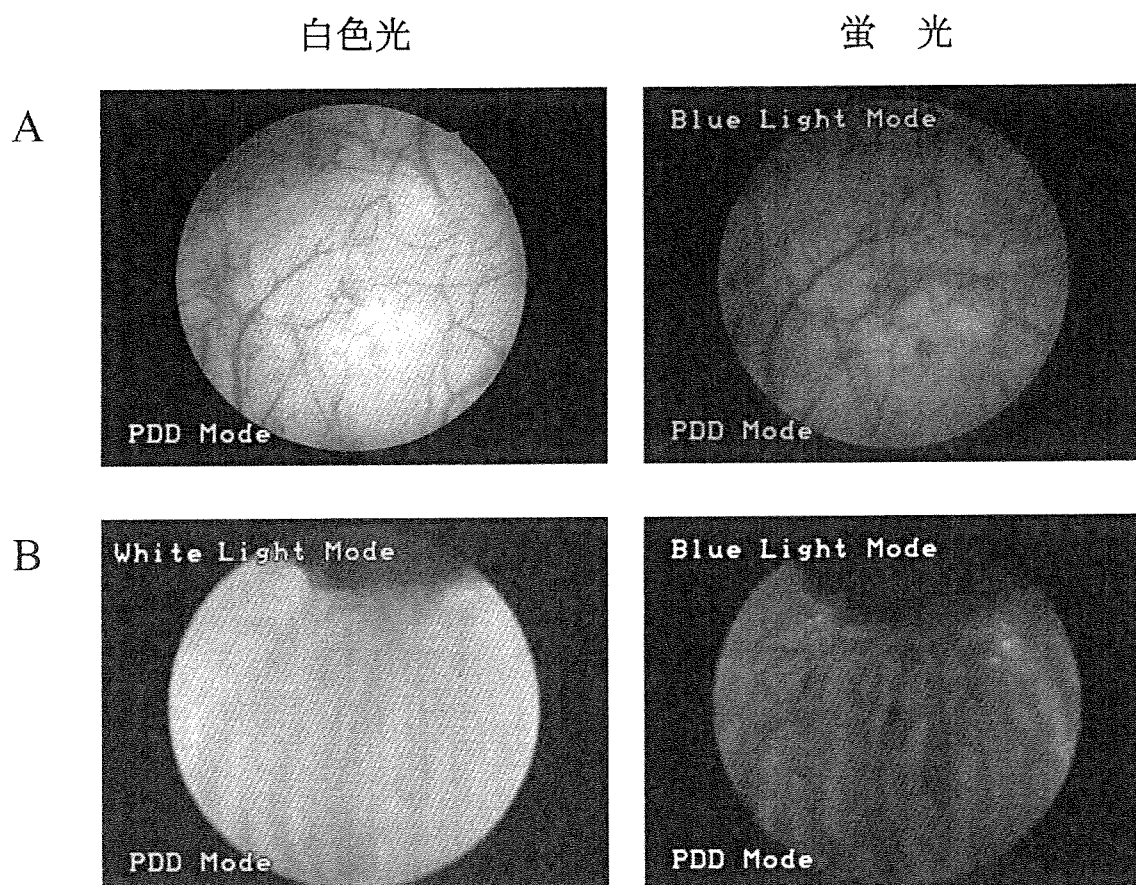


Fig. 1 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) の膀胱内注入による光力学的診断

A, Bは各々従来の白色キセノン光源を用いた膀胱鏡による観察と蛍光光源を用いた蛍光膀胱鏡による観察は同一部位を観察している。

A: 白色光源下の観察で膀胱後壁に比較的視認困難な小腫瘍 (腫瘍径約2mm) を認める。しかし、蛍光光源下の観察で同腫瘍は蛍光励起され、赤色に発光している。この腫瘍はTCC, pTa, G2と病理学的に診断された。

B: 白色光源下の観察で膀胱頸部に異常所見を認めない。しかし、蛍光光源下の観察で同部位は軽度蛍光励起され、赤色に発光している。同部位は移行上皮癌 (上皮内癌), pTis, G3と病理学的に診断された。

33検体 (11.0%) を含む124検体 (検体陽性率41.2%) が病理学的に悪性と診断され、陽性として解析した。全検体の内、青色光源下 (BLE) 所見により軽度以上の蛍光励起を認めた検体 (BLE 1以上) は178検体で、その内112検体 (62.9%) が病理学的に悪性と診断され、その的中精度は73.8%、感度90.3%、特異度62.1%であった。また白色光源下 (WLE) 所見により、軽度以上の異常所見を認めた検体 (WLE 1以上) は117検体で、その内91検体 (77.8%) が病理学的に悪性と診断され、その的中精度は80.4%、感度73.4%、特異度85.3%であった。

2) 肉眼分類別診断結果 (Table 2)

肉眼分類に基づいて、隆起病変部検体 (68検体) と非隆起病変部検体 (233検体) で比較した場合、本診断の的

中精度は隆起病変88.2%、非隆起病変69.5%で、感度96.6%、84.6%、特異度33.3%、63.7%であった。また白色光源下膀胱鏡診断の的中精度は隆起病変89.7%、非隆起病変77.7%で、感度100.0%、49.2%、特異度22.2%、88.7%であった。

また乳頭状病変部検体 (51検体) と非乳頭状部検体 (250検体) で比較した場合、本診断の的中精度は乳頭状病変86.3%、非乳頭状病変71.2%で、感度97.7%、86.3%、特異度14.3%、64.1%であった。また白色光源下膀胱鏡診断の的中精度は乳頭状病変86.3%、非乳頭状病変79.2%で、感度100.0%、58.8%、特異度0.0%、88.8%であった。

3) 病歴別診断結果 (Table 2)

病歴に基づいて、初発症例 (24症例, 185検体)、再発症例 (14症例, 116検体) で比較した。本

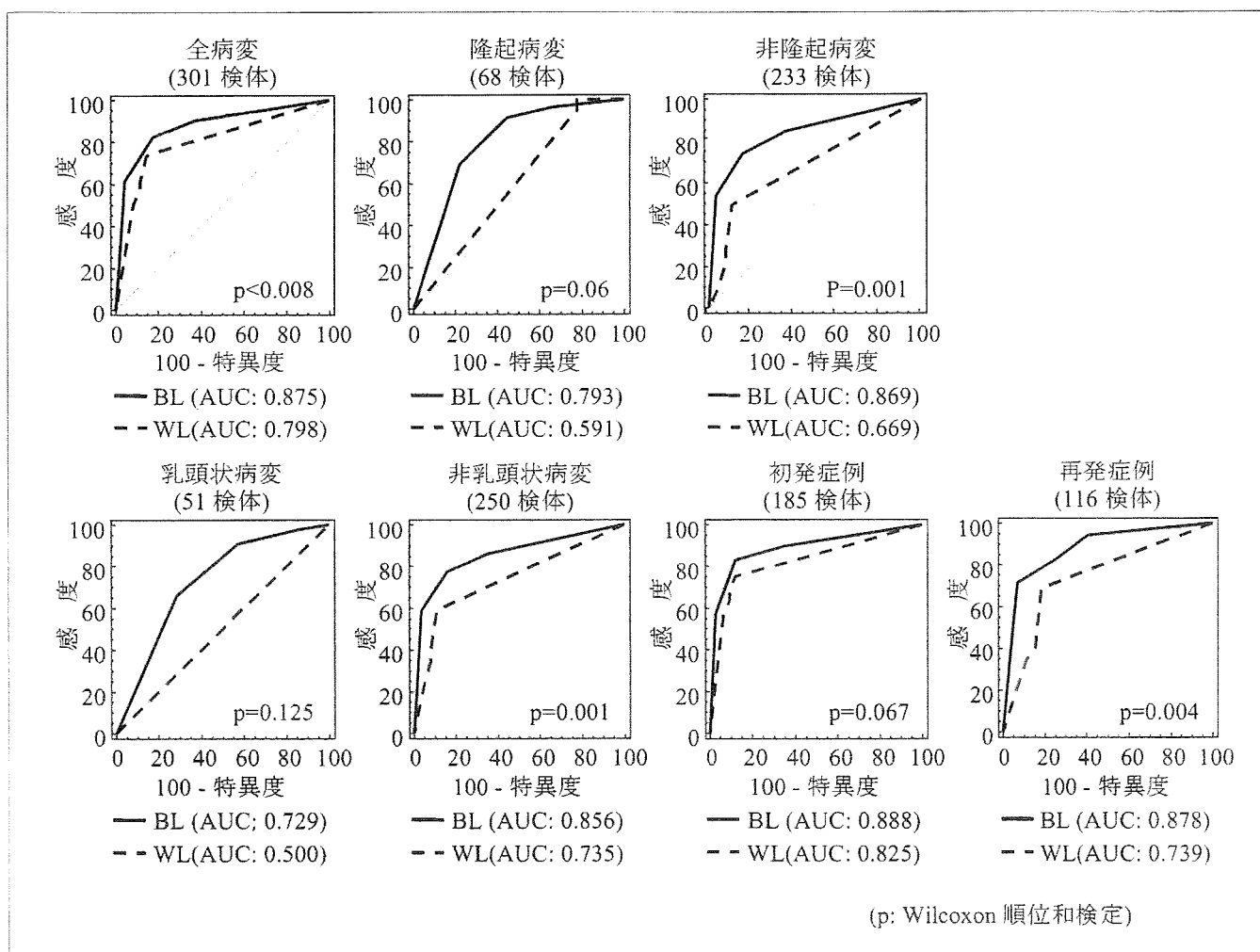


Fig. 2 ROC曲線を用いた診断能力の比較
 光学的診断および白色光源下診断の診断能力を、ROC曲線よりAUCを算出し、評価した。AUCの有意差検定にはWilcoxon 検定を用いた。

BLE: blue light endoscopy (青色光源下蛍光膀胱鏡), WLE: white light endoscopy (白色光源下膀胱鏡), ROC (receiver operative characteristic) 曲線, AUC: area under curve (曲線下面積)

診断の的中精度は初発症例75.4%, 再発症例70.8%で、感度88.8%, 94.3%, 特異度64.2%, 59.2%であった。また白色光源下膀胱鏡診断の的中精度は、初発症例82.1%, 再発症例77.4%で、感度75.3%, 68.6%, 特異度87.7%, 81.7%であった。

4) ROC曲線を用いた診断能力の比較 (Fig. 2)

本診断および白色光源下膀胱鏡診断の診断能力をROC曲線下面積 (AUC) で比較評価した。AUCは全症例 ($p < 0.008$) のみならず、いずれの場合も本診断が白色光源下膀胱鏡診断を上回り、特に非隆起病変 ($p = 0.001$), 非乳頭状病変 ($p = 0.001$), 再発症例 ($p = 0.004$) では有意差を認めた。

5) 病理診断・組織学的異型度別診断結果 (Table 3)

また、病理学的に悪性と診断した124検体の内訳は、移行上皮癌91検体、異形成33検体であった。移行上皮癌の異型度 (Grade (G)) は、G1が18検体、G2が26検体、G3が47検体 (G3-pTis 24検体を含む) で、蛍光強度と有意な相関を認めた ($p < 0.0001$)。

6) 副作用 (Table 4)

本診断法の副作用として、萎縮膀胱などの重篤な局所障害や全身的吸収による光線過敏症や肝障害などの全身性副作用は認めず、下腹部疼痛および尿意切迫などの膀胱刺激症状を認めた。その程度はNCI共通毒性基準 (日本語訳JCOG版) に準じて、Grade1 (軽度の膀胱刺激症状) 症

Table 3 病理診断・組織学的異型度別診断結果

	青色光源下蛍光膀胱鏡 (BLE) 診断				合計
	0	1	2	3	(検体)
正常上皮	111	35	23	8	177
異形成	8	5	6	14	33
TCC G1	0	1	4	13	18
G2	0	2	5	19	26
G3	4	0	4	15	23
G3-pTis	0	2	7	15	24
合計 (検体)	123	45	49	84	301

蛍光強度と移行上皮癌の異型度の相関: $p < 0.0001$ (χ^2 検定)

	白色光源下膀胱鏡 (WLE) 診断				合計
	0	1	2	3	(検体)
正常上皮	151	5	6	15	177
異形成	20	8	1	4	33
TCC G1	4	2	1	11	18
G2	0	2	0	24	26
G3	1	0	1	21	23
G3-pTis	8	4	10	2	24
合計 (検体)	184	21	19	77	301

肉眼的悪性度の程度と移行上皮癌の異型度の相関: $p < 0.0001$ (χ^2 検定)

BLE所見

- BLE 0: 蛍光励起なし
- BLE 1: 蛍光励起軽度
- BLE 2: 蛍光励起中等度
- BLE 3: 蛍光励起高度
- BLE 1, 2, 3を陽性とした

WLE所見

- WLE 0: 異常所見なし
- WLE 1: 軽度異常
- WLE 2: 中等度異常
- WLE 3: 高度異常

Table 4 副作用

全身性副作用	
光線過敏症	0
肝障害	0
その他	0
合計 (症例)	0
局所性副作用	
膀胱刺激症状*	
Grade1 (軽度の膀胱刺激症状認める)	9
Grade2 (中等度の膀胱刺激症状認める)	3
その他	0
合計 (症例)	12

*NCI共通毒性基準 (日本語訳JCOG版)

例が9例, 非ステロイド抗炎症薬を対症的に投与した症例 (Grade2) が3例で, いずれも術後同症状は消失した。

7) 5-ALA 膀胱内暴露時間と蛍光強度の関連性 (Fig. 3)

5-ALA膀胱内暴露時間は原則120-150分とした。しかし, 膀胱刺激症状2症例, 広範な腫瘍に伴う膀胱萎縮3症例, 患者の誤認による排液3症例と, 貯留が60分未満の症例が8症例あり, 手術予定や麻酔時間の都合などの影響もあり, 実

際は20 - 150分 (中央値80分) であった。全症例における5-ALA 膀胱内暴露時間と蛍光強度の関連性をFig. 3の散布図に示し, χ^2 検定にて有意差検定を行った。本診断における蛍光強度 (BLE 0-3) と5-ALA 膀胱内暴露時間とは有意な相関は認めなかった。

考 察

膀胱癌に対する光力学的診断は, 1964年Whitmore WF Jrら⁴⁾の報告が最初である。その後約20年を経て1980年代後半, ヘムの前駆物質で内因性ポルフィリン物質である5-ALAが悪性腫瘍に対する光線力学診断・治療における光感受性物質として報告され, 注目された。5-ALAは細胞質内に取り込まれた後, ミトコンドリアでProtoporphyrin IX (PpIX) に生合成され, 375-445nmの青色光で励起され赤色の蛍光を発光する⁵⁾。また5-ALAは特異的に腫瘍に集積するとされ, その割合は尿路上皮においては17:1といわれる^{5,6)}。その後光力学的診断の基礎的研究や光源装置の開発が進み, 1994年のKriegsmair Mらの膀胱癌に対す

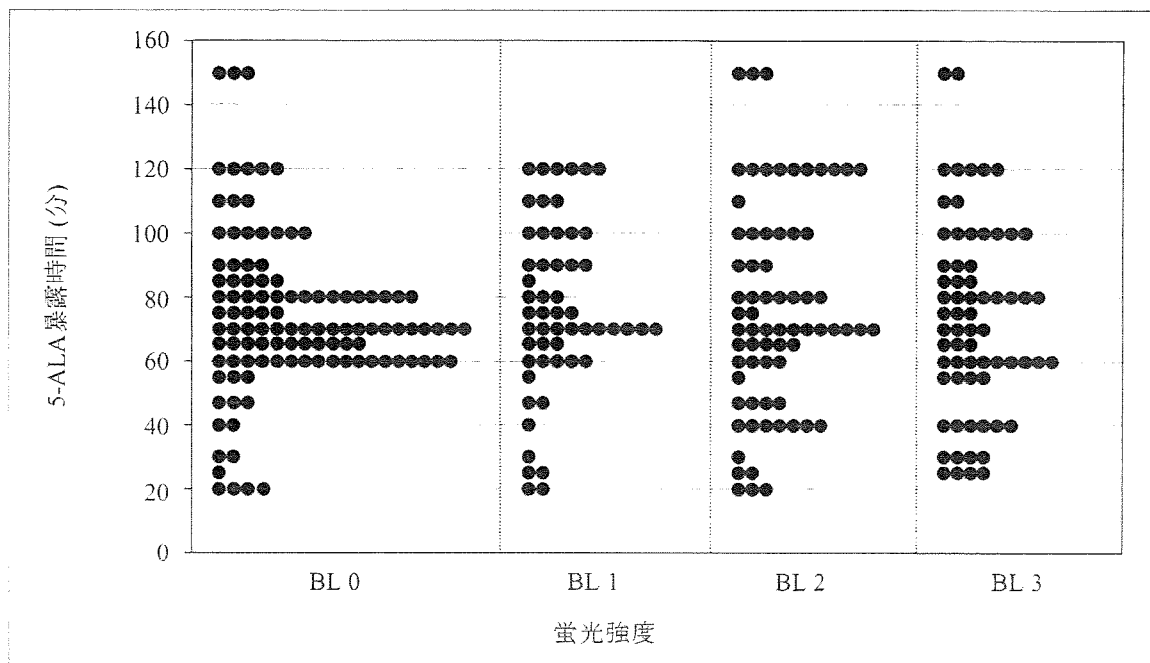


Fig. 3 5-ALA 膀胱内暴露時間と蛍光強度の関連性
 5-ALA膀胱内暴露時間は120-150分を原則としたが、結果は20-150分（中央値80分）であった。
 蛍光強度: BLE 0（蛍光励起なし）、BLE 1（蛍光励起軽度）、BLE 2（蛍光励起中等度）、BLE 3（蛍光励起高度）

る臨床報告⁵⁾を初めとして、欧米を中心に大規模臨床試験が行われ、数多くの臨床報告がみられるようになった。本邦でも光力学的診断は行われるようになったが、泌尿器科領域における現行の光力学的診断としては我々が報告した膀胱癌18症例における初期経験が初めてである²⁾。

光力学的診断の診断精度に関して、前述のKriegmair Mら⁵⁾は、膀胱癌68症例（299生検検体）において、感度100.0%、特異度68.5%であったと初めて報告した。その後彼らは従来の白色光源下診断との比較検討を行い、特異度は光力学的診断66.6%、白色光源下診断68.5%と差は認めなかったが、感度は光力学的診断96.9%、白色光源下診断72.7%と光力学的診断が有意に高く、診断率を20%向上したと報告した⁷⁾。さらに現時点で最多症例での報告を行ったZaak Dら⁸⁾も、膀胱癌713症例1414回の光力学的診断（3834生検検体）における比較検討で、特異度は光力学的診断65.0%、白色光源下診断43.0%と差は認めなかったが、感度は白色光源下診断73.0%と比較して光力学的診断は97.0%と有意に高かったと報告している。我々の結果では、的中精度73.8%、感度90.3%、特異度62.1%とやや特異度が低いものであった。しかし、AUCで表した診断能力は非隆起病変部検体、非乳頭状部検体および全検体いずれ

も、白色光源下診断と比較して有意に高かった。さらに今回、本診断で検出しえたCISの33.3%（8/24検体）や異形成の36.4%（12/33検体）は、従来の白色光源では確認しえない病変であった。前述のZaak Dら⁸⁾も、検出しえたCISの52.8%や異形成の30.3%は、従来の白色光源で確認しえない病変であると報告しており、本診断は特に非隆起病変や非乳頭状病変の診断に有用であるといえる。さらに本光源装置の特性として、瞬時に白色光源と蛍光光源の切り替えが可能であり、実際には白色光源下での肉眼的悪性度の程度と蛍光光源下での蛍光強度という二つの指標を組み合わせ検査することで、さらに診断精度を向上しようと考えた。

次にTURBTや膀胱内注入療法などの前治療の既往を有する再発症例において、前治療の光力学的診断に対する影響も検討した。我々の検討では、初発症例における有意差は認めなかったが、特に再発症例でのAUCで表した診断精度は従来の白色光源での診断と比較して有意に高いものであった。しかし6週間以内のTURBTの既往がある症例⁹⁾やTURBT後Bacille Calmette-Guérin (BCG)などの膀胱内注入療法を行った症例¹⁰⁾では疑陽性率が有意に高いとの報告もあり、やはり前治療の既往を有する再発症例の観察

には厳重な注意が必要であると考えた。

蛍光強度に関して、正常尿路上皮と比較して悪性上皮は蛍光強度が高く、組織学的異型度との相関もあり、さらに5-ALA膀胱内暴露時間に依存して蛍光強度は増強すると報告されている¹¹⁾。本検討でも、異型度が高い検体はその蛍光強度が有意に高かったが、蛍光強度と5-ALA膀胱内暴露時間との間に有意な相関は認めなかった。

また、蛍光検査においてPhotobleaching現象は重要な問題である。腫瘍部で励起された赤色蛍光は励起光照射後約10秒から照射時間に依存して減衰し、70秒以降は励起を示さない周囲正常部との有意差がないとの報告¹²⁾に加え、本検討でも数十秒程度の光照射で蛍光強度が減衰した症例もあった。今回蛍光減衰に関して客観的に評価していないが、時間的な制約を考慮し、計画性を持った手際良い検査の遂行が求められる。

本診断法において、光線過敏症を主とする光毒性反応や肝障害が最も危惧される副作用である。今回38症例中12症例(31.6%)において軽度の膀胱刺激症状を認めたのみで、Grade3以上の重篤な副作用は認めていない。前述したZaak Dら⁸⁾も、1414回の光力学的診断において光線過敏症を認めていない。これら良好な結果は5-ALAの投与方法、つまり膀胱内投与が寄与していると考え、膀胱内投与法は副作用の素因であるProtoporphyrin IX (PpIX)の血漿中の濃度を必要最低限に抑制しようと薬理学的にも証明されており^{13, 14)}、5-ALA膀胱内投与した症例に対して試験的な紫外線暴露を行った実際の検討でも、日光過敏症の発症は認めず、発症防御は不必要であるとの報告もある¹⁵⁾。

本検討では、光力学的診断および従来の白色光源下膀胱鏡診断の有用性を、各々の内視鏡下における肉眼的観察所見を半定量的に各々4段階に大別することで評価し、これまでの多くの報告と相違ない結果を得ることができた。しかし、Zaak Dら¹⁶⁾は、膀胱癌25症例(53生検検体)における検討で、蛍光強度の定量化を試み、疑陽性率を30%にまで減少しえたことを報告しており、今後診断精度および再現性の向上にむけてこのような蛍光強度の定量化も重要であると考えた。

5-ALAの膀胱内注入による蛍光膀胱鏡を用いた光力学的診断は、安全かつ有用な膀胱癌診断法である。今後症例を重ねるとともに、診断特異度の改善、Photobleaching現象の対策、診断の客観性の追求などの問題点、さらに長期

観察の上、膀胱内再発率についても検討する予定である。

文 献

- 1) Lee R, Droller MJ (2000) The natural history of bladder cancer. Implications for therapy. *Urol Clin North Am* 27 : 1-13
- 2) 井上啓史, 辛島 尚, 鎌田雅行, 他 (2006) 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) 膀胱内注入による蛍光膀胱鏡を用いた膀胱癌の光力学的診断. *日本泌尿器科学会雑誌* 97 : 719-729
- 3) 三好憲雄, 小笠原利行, 小川 透, 他 (2002) 5-aminolevulinic acid (5-ALA) を投与した腫瘍内代謝物 protoporphyrin-IX (Pp-IX) の蛍光分析. *日本レーザー医学会誌* 23 : 81-88
- 4) Whitmore WF Jr, Bush IM, Esquivel E (1964) Tetracycline ultraviolet fluorescence in bladder carcinoma. *Cancer* 17 : 1528-1532
- 5) Kriegmair M, Baumgartner R, Knuechel R, et al. (1994) Fluorescence photodetection of neoplastic urothelial lesions following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid. *Urology* 44 : 836-841
- 6) Steinbach P, Weingandt H, Baumgartner R, et al. (1995) Cellular fluorescence of the endogenous photosensitizer protoporphyrin IX following exposure to 5-aminolevulinic acid. *Photochem Photobiol* 62 : 887-895
- 7) Kriegmair M, Baumgartner R, Knuechel R, et al. (1996) Detection of early bladder cancer by 5-aminolevulinic acid induced porphyrin fluorescence. *J Urol* 155 : 105-109
- 8) Zaak D, Hungerhuber E, Schneede P, et al. (2002) Role of 5-aminolevulinic acid in the detection of urothelial premalignant lesions. *Cancer* 95 : 1234-1238
- 9) Filbeck T, Roessler W, Knuechel R, et al. (1999) 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence endoscopy applied at secondary transurethral resection after conventional resection of primary superficial bladder tumors. *Urology* 53 : 77-81
- 10) Grimbergen MC, van Swol CF, Jonges TG, et

- al. (2003) Reduced specificity of 5-ALA induced fluorescence in photodynamic diagnosis of transitional cell carcinoma after previous intravesical therapy. *Eur Urol* 44 : 51-56
- 11) Olivo M, Lau W, Manivasager V, et al. (2003) Fluorescence confocal microscopy and image analysis of bladder cancer using 5-aminolevulinic acid. *Int J Oncol* 22 : 523-528
- 12) Stepp H, Wagner S, Zaak D, et al. (2004) Photo-bleaching. In : Baumgartner R (eds) *Fluorescence diagnosis of bladder tumor using 5-aminolevulinic acid -Fundamentals and Results-*. 1st ed. Verlag Endo-Press TM, Tuttlingen, Germany, pp33
- 13) Rick K, Sroka R, Stepp H, et al. (1997) Pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in skin and blood. *J Photochem Photobiol B* 40 : 313-319
- 14) Popken G, Schultze-Seemann W, Seiler KU, et al. (2000) Intravesical administration of 5-aminolevulinic acid (5-ALA). Safety and pharmacokinetics of 5-ALA and its metabolite protoporphyrin IX. *Eur J Clin Pharmacol* 56 : 241-246
- 15) Filbeck T, Wimmershoff MB, Pichlmeier U, et al. (2000) No generalized skin phototoxicity after intravesical application of 5-aminolevulinic acid for fluorescence diagnosis of superficial bladder cancer. *Urol Int* 64 : 126-128
- 16) Zaak D, Frimberger D, Stepp H, et al. (2001) Quantification of 5-aminolevulinic acid induced fluorescence improves the specificity of bladder cancer detection. *J Urol* 166 : 1665-1668

特集3：連載 “エキスパートが示す内視鏡手術のコツ” ～VI. “TUR-P” “TUR-BT”～

井上啓史 執印太郎

光力学的診断を併用した経尿道的膀胱腫瘍切除術

要旨 光感受性物質である5-アミノレブリン酸 (ALA) の膀胱内注入による光力学的診断 (PDD) は、表在性癌、特に上皮内癌など高異型度の平坦病変の早期検出を向上させ、さらにPDD補助による経尿道的膀胱腫瘍切除術 (TUR-Bt) は、従来のTUR-Btと比較して、腫瘍残存、膀胱内再発を抑制することが示されている。このPDDは欧州では医療承認され、推奨されているが、本邦では医師主導の臨床研究として試行している。また疑陽性率の高さや Photobleaching現象など診断精度に関わる解決すべき課題も残されている。今後この再発や進行に対するPDDおよびPDD補助下TUR-Btの真の効果を前向き無作為化試験により検討すべきである。本稿では表在性癌に対するALAを用いたPDD補助下TUR-Btの現状を概説する。

Transurethral resection of bladder tumor (TUR-Bt) guided by photodynamic diagnosis (PDD)

Abstract Photodynamic diagnosis (PDD) with intravesical application of 5-aminolevulinic acid (ALA) as a photosensitizing agent has been proved to enhance the early detection of non-muscle invasive bladder cancer, particularly of high-grade flat lesions such as carcinoma in situ. Furthermore, it has been shown that transurethral resection of bladder tumor (TUR-Bt)

under PDD guidance reduced the risk of residual tumor and subsequent intravesical recurrence compared to conventional TUR-Bt. It is officially approved and recommended as a diagnostic procedure in Europe, whereas in Japan, it was administered on a clinical trial basis under doctor's initiative. There are many problems concerning accuracy of diagnosis that remains to be solved such as false-positive findings and photobleaching phenomenon. The actual impact of PDD and TUR-Bt under PDD guidance on recurrence and progression must be investigated in prospective randomized trials. This article describes recent facts of TUR-Bt under PDD guidance using ALA for non-muscle invasive bladder cancer.

Key words : 光力学的診断, 経尿道的膀胱腫瘍切除術, 膀胱癌, 5-アミノレブリン酸

背景

膀胱癌において診断時約70%¹⁾を占める表在性癌は、経尿道的膀胱腫瘍切除術 (transurethral resection of bladder tumor (TUR-Bt)) が治療の第一選択とされ、膀胱温存が可能ならばだけでなく、生命予後も極めて良好である。しかし、TUR-Bt術後の膀胱内再発は低異型度のTa症例で50-70%、高異型度のT1症例では80%以上で、浸潤性癌への進展も各々5%、50%と高率である²⁻⁴⁾。TUR-Bt術後の膀胱内再発には、腫瘍残存、多中心性発生、膀胱腔内播種がその要因とされ、さらに微小病変や平坦病変などの手術時

井上啓史・執印太郎：高知大学医学部泌尿器科学教室
〒783-8505 高知県南国市岡豊町小蓮
TEL 088-880-2402, FAX 088-880-2404
E-mail : keiji@kochi-u.ac.jp
Keiji Inoue・Taro Shuin : Department of Urology, Kochi Medical School

に内視鏡的に視認しがたい病変の残存が術直後の再発に大きく関与することが知られている。つまり、表在性膀胱癌の診断および治療成績の向上には、これらの内視鏡的確認が困難な病変の同定が大きな鍵になる。そこで近年、長い年月を経て発展した光力学的技術を用いた診断・治療がその新しい戦略として注目されている。本稿では表在性膀胱癌に対するPDDおよびその現状を概説する。

歴史

20世紀初めより、蛍光物質を用いた悪性腫瘍の診断や治療は試行されていた。現在の光力学的診断 (photodynamic diagnosis (PDD)) や治療 (photodynamic therapy (PDT)) の原型は、1924年ポルフィリンの腫瘍親和性の発見³、1960年ヘマトポルフィリン誘導体hematoporphyrin derivative (HpD, Photofrin I) の開発から始まり⁶、1978年励起光源としてのレーザーの利用によって飛躍的に進歩した⁷。

泌尿器科領域では、1964年Whitmore WF Jr⁸ がTetracyclineとUV lightを用いて初めて膀胱癌に対してPDDを行ったことに始まる。その後、Kelly JFら⁹ が膀胱癌に対してヘマトポルフィリン誘導体hematoporphyrin derivative (HpD, Photofrin I)¹⁰ と水銀アーク灯を用いてPDTを行った。

日本では、1983年Hisazumi Hら¹¹ の表在性膀胱癌9症例(46腫瘍)に対するPDTの報告が最初であり、その後も精力的に治療が試行されたが、ヘマトポルフィリン化合物の全身投与による光線過敏症を主とする光毒性反応などの副作用とレーザー膀胱全面照射による萎縮膀胱の発想などから臨床応用には至らなかった。

しかし近年、5-アミノレブリン酸 (5-aminolevulinic acid (ALA))¹² をはじめとする副作用発現が少ない光感受性物質の研究・開発、さらにLudwig Maximilian大学でBandpass filter system (375-440nm) を備えた白色キセノン光源装置が開発され、同じ光学視管を通じて通常の白色光と赤色蛍光を励起する青色光を瞬時に切り替え、観察が可能となった¹³。この光感受性物質およびPDDシステムの改良・開発を契機としてPDDが再び注目されている。

材料 (光感受性物質・PDDシステム) および方法 (Fig. 1)

ALAは、1987年にMalikら¹² によって悪性腫瘍に対するPDDやPDTにおける光感受性物質として報告された。元来ALAは、生体内ではミトコンドリア内でスクシニールCoAとグリシンからALA合成酵素により合成される天然アミノ酸、内因性ポルフィリン物質であり、クロロフィルやヘモグロビンの共通前駆体である。その後ALA 脱水素酵素により、porphobilinogen (PBG) が作成され、脱アミノ酵素によりuroporphobilinogen IIIが、さらに脱炭酸酵素によってCoproporphyrinogen IIIが生合成される。その後ミトコンドリア内で酸化酵素によってProtoporphyrinogen IXが、さらにProtoporphyrin IX (PpIX) が生合成される。PpIXはphotoactiveであり、青色光 (375~445nm) で励起され赤色蛍光 (590~700nm) を発光する^{14, 15}。その後、PpIXはferrochelataseの触媒としての働きで細胞内鉄が挿入され、ヘム、ビリルビンへと代謝される。外生投与された場合も、細胞質内に速やかに取り込まれた後、内因性の5-ALAと同様にいくつかの前駆体を経て、ミトコンドリア内でProtoporphyrin IX (PpIX) に生合成されるが、正常細胞では、これら過程においてフィードバック機構が働き、PpIX生合成は律速段階である。しかし、腫瘍細胞ではPBG脱アミノ酵素の活性亢進やferrochelataseの活性低下などの酵素の活性異常、また腫瘍細胞内鉄濃度の低下などによってPpIX生合成や蓄積が進むとされている^{16, 17}。したがってALAによるPpIX蛍光は特異的に腫瘍にて発光し^{18, 19}、特に尿路上皮では17:1と腫瘍選択性が高い^{15, 20, 21}。現在我々は、光感受性物質としてMedac GmbH (Wedal, Germany) が製造するLyophilized 5-aminolevulinic acid hydrochloride²を臨床研究用薬剤として使用している。

実際の検査方法としては、まずALAを8.4%重炭酸ナトリウムsodium hydrogen carbonate (NaHCO₃) 50mlで溶解し、pH 7.8~8.0に調節後、膀胱内投与を行う。投与2~3時間後にALA溶液を排出した後、PDDシステムを用いて青色光によって励起した赤色蛍光を内視鏡的に観察する。現在我々はPDDシステムとしてKarl Storz Endoscopy Japan株式会社製の専用ビデオカメラシステム (Endovision TELECAM SL/IPM-PPD System)、光源

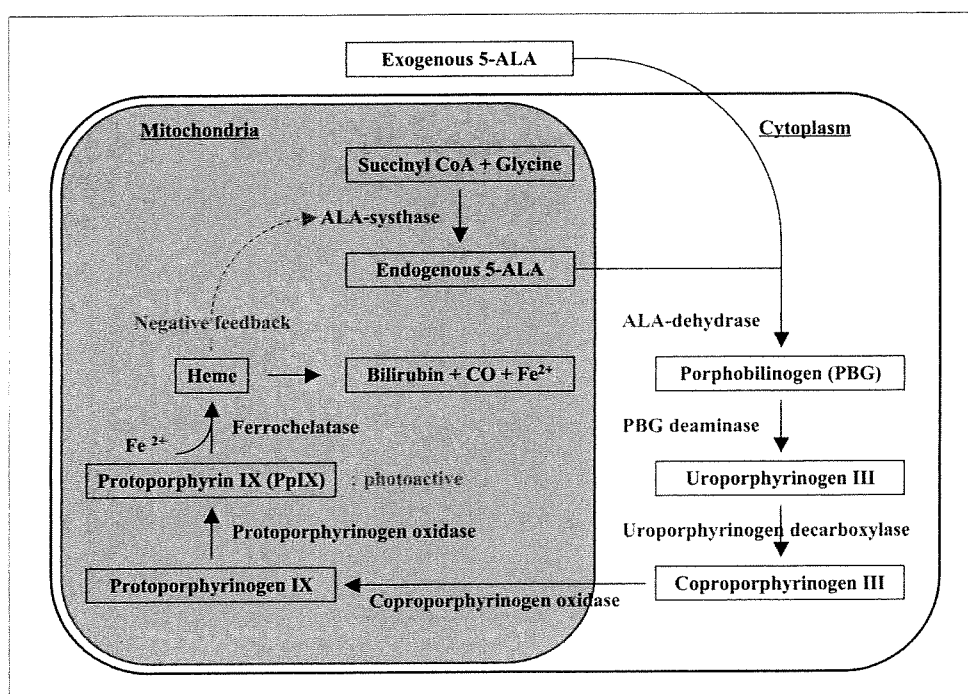


Fig. 1 5-ALA-PpIX合成・代謝過程
 5-アミノレブリン酸 (5-aminolevulinic acid (ALA)) は、細胞質内でいくつかの前駆体を経て、ミトコンドリア内でphotoactiveなプロトポルフィリンIX Protoporphyrin IX (PpIX) に生合成され、その後ヘム、ビリルビンに代謝される。

Table 1 Clinical studies of PDD versus WLE : sensitivity and specificity

Author / year of publication (# References)	No. Pts (samples)	Sensitivity (%)		Specificity (%)	
		PDD	WLE	PDD	WLE
Kriegmair M. et al. 1994 (15)	68 (299)	100.0	-	68.5	-
Kriegmair M. et al. 1996 (22)	104 (433)	96.9	72.7	66.6	68.5
Koenig F. et al. 1999 (23)	55 (130)	87.0	84.0	59.0	-
Riedl CR. et al. 1999 (24)	52 (123)	94.6	76.0	43.0	-
Filbeck T. et al. 1999 (25)	120 (347)	96.0	67.5	35.0	66.4
Filbeck T. et al. 1999 (26)	50 (130)*1	77.8	-	33.0	-
Zaak D. et al. 2001 (27)	605 (2475)	93.4	-	65.3	-
Zaak D. et al. 2002 (28)	713 (3834)	97.0	-	65.0	-
Landry JL. et al. 2003 (29)	50 (50)*2	89.5	-	87.1	-
Grimbergen MC. et al. 2003 (30)	160 (917)*1	97.0	69.0	49.0	78.0
Hungerhuber E. et al. 2007 (31)	875 (4630)	92.0	76.3	41.4	-
Inoue K. et al. 2007 (unpublished)	86 (639)	92.9	79.0	61.7	83.6

*1: post TUR, *2: flat lesion

(D-Light AF System) および光学視管 (PDD telescope 30°) を使用している。この光源は通常の白色光 (white light (WL)) モードおよび蛍光を励起する青色光 (blue light (BL)) モードが即時に選択、切換え可能である。これによって両モードでの同一病巣の観察が容易となり本診断装置の特徴といえる。しかし上記薬剤および光学視管は、本邦では薬事未承認である。

診断精度

泌尿器科領域でのALAを用いたPDDの臨床試験としては、1994年Kriegmair Mら¹⁵⁾の膀胱癌68症例における報告が最初であり、その診断精度は感度100.0%、特異度68.5%であった。さらに彼らは、膀胱癌104症例において、従来の白色光源での診断との比較検討を行い、特異度には有意差を認めなかったが、感度はPDD96.9%、白色光源下診断

Table 2 Clinical studies of PDD : detection rate only due to the positive PDD

Author / year of publication (# References)	No. Pts (samples)	Detection rate only due to the positive PDD (%)		
		All lesions	CIS	Dysplasia
Kriegmair M. et al. 1999 (32)	208 (328)	25.0	—	—
Zaak D. et al. 2001 (27)	605 (2475)	34.2	56.8	38.5
Zaak D. et al. 2002 (28)	713 (3834)	42.1	52.8	30.3
Filbeck T. et al. 2002 (33)	177 (636)	14.9	57.0	44.0
Hungerhuber E. et al. 2007 (31)	875 (4630)	38.3	43.4	30.7
Inoue K. et al. 2007 (unpublished)	86 (639)	28.4	28.8	27.9

72.7%とPDDが有意に高く、診断率を20%向上したと報告した²²。その後欧米を中心に大規模臨床試験が行われ、数多くの臨床報告がみられた²³⁻³¹。Hungerhuber Eら³¹による膀胱癌875症例という最多数症例におけるPDD診断精度の報告を含め、これまでの報告^{15, 22-31}でPDDは感度94.6% (77.8~100%)、特異度59.0% (33.0~87.1%)で、白色光源下診断の感度76.0% (67.5~84.0%)には勝るものの、特異度68.5% (66.4~78.0%)にはやや劣るという結果が示されている (Table 1)。さらにPDDでのみ検出した病変は中央値34.2% (14.9~42.1%)で、上皮内癌 (carcinoma in situ (CIS)) の43.4~57.0%や異形成の30.3~44.0%は、従来の白色光源では確認しえない病変であったと報告されており^{27, 28, 31-33}。PDDは非隆起病変の診断に有用であるといえる (Table 2)。

本邦での泌尿器科領域における現行のPDDとしては、我々が報告した膀胱癌18症例における初期経験が最初であり³⁴。その後症例追加にて、膀胱癌38例³⁵。さらに最新の結果では、膀胱癌86例 (639検体) において、蛍光モードは感度92.9%、特異度61.7%、白色モードは感度79.0%、特異度83.6%で、ROC 曲線・曲線下面積 (AUC) で評価した診断能力も、蛍光モードが有意に検査としての能力が高いという結果であった (p=0.041)。臨床上診断に苦慮する非隆起病変、非乳頭状病変、再発病変などにおいても同様であり、診断精度、診断能力ともにPDDは従来の白色光よりも良好な診断成績であった。また、PDDで検出したCISの28.8%および異形成の27.9%は、従来の白色光源では確認しえない病変であると、これまでの報告と同等の良好な成績を示している。

このように、PDDは従来の白色光源下診断と比較して診断精度は高まったが、偽陽性率の高さが課題の1つと言

える。これには接線効果などの光学的原因やALAの取込みや代謝などの生物学的原因などが考えられるが、未だ結論は出ていない。また、Photobleaching現象 (青色励起光の照射に伴う蛍光強度の減衰) も診断を困難にする要因となり、蛍光検査特有の重要な問題である。Stepp Hら³⁶は、腫瘍部で励起された赤色蛍光は励起光照射後約10秒で減衰が始まり、励起光の照射時間に依存して減衰し、70秒以降は励起されない周囲正常部との有意差がなくなったことを示した。このようにPDDはPhotobleaching現象に伴う時間的な制約があり、診断精度の向上のためには計画性を持った手際良い検査の遂行が求められる。(Fig. 2)

PDD補助下TUR-Bt (Table 3)

PDDは単なる診断に留まらず、外科的切除の補助として腫瘍範囲を同定する役割をも担いうる。従来の白色光源診断下TUR-Bt症例における腫瘍残存率は、術後1~12週目において中央値37% (19.2~53.1%)と高い³⁷⁻⁴²。これに対して、PDDを用いたTUR-Bt (PDD補助下TUR-Bt) 症例における腫瘍残存率は中央値16% (0~32.7%)と有意に低く、その有用性が示されている³⁷⁻⁴²。また膀胱内再発に関して、Daniltchenko DIら¹³は、膀胱癌102症例における無再発生存率を報告しており、PDD補助下TUR-Bt 51例では観察期間中央値42ヵ月で41%、白色光源診断下TUR-Bt 51例では観察期間中央値39ヵ月で25%と有意差を認めたとしている (p=0.02)。さらにFilbeck Tらのグループ^{10, 41, 45}は、膀胱癌191症例において術後長期間での膀胱内再発率に関して、PDD補助下TUR-Bt 88例と白色光源診断下TUR-Bt 103例との比較検討を行っている。その結果、TUR-Bt後の無再発生存率は、PDD補助下では89.6% (観察期間中央値20.5ヵ月)、85.0% (43.0ヵ月)、71.0% (86.0ヵ月)で、白色光源診

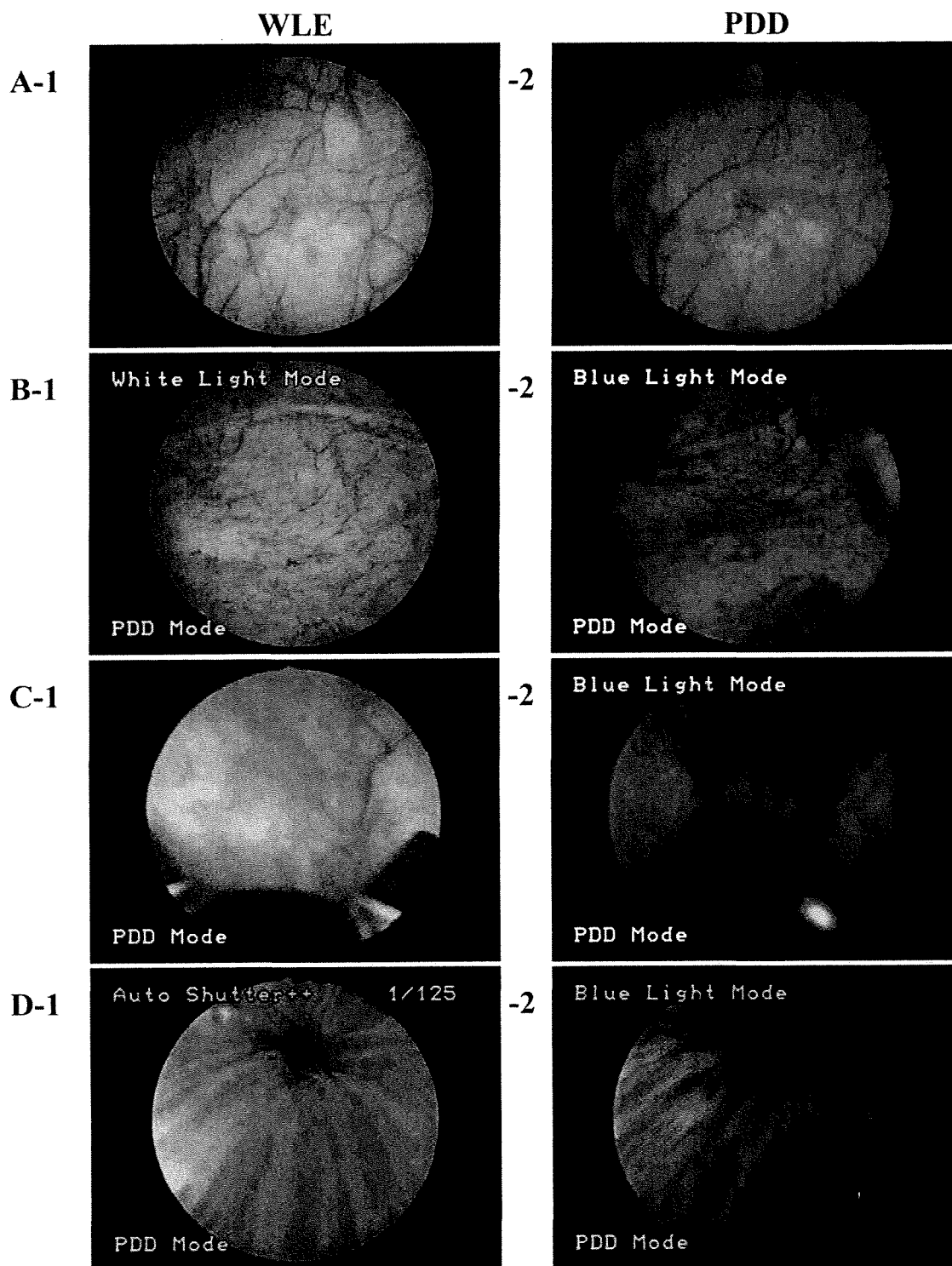


Fig. 2 光学的診断 (PDD) と白色光源下診断 (WLE) の内視鏡所見の比較

A-1: 従来の白色光源下での観察で、微小な乳頭状腫瘍を認める。

-2: 青色光源下での観察で、赤色蛍光の発光によって同腫瘍が明瞭に確認できる。病理診断結果は尿路上皮癌 (UC, G1) であった。

B-1: 膀胱三角部～後壁の粘膜に明らかな不整は認めない。

-2: 赤色蛍光を発光する平坦領域を認める。病理診断結果は中等度異形成 (moderate dysplasia) であった。

C-1: 大きな乳頭状腫瘍を認める。

-2: 大きな乳頭状腫瘍に連続する平坦領域を認める。病理診断結果は上皮内癌 (carcinoma in situ (CIS)) であった。

D-1: 膀胱頸部の粘膜に明らかな不整は認めない。

-2: 赤色蛍光を発光する平坦領域を認める。病理診断結果は悪性所見なしであった (疑陽性)。

Table 3 Clinical studies of TURBT guided by PDD versus WLE : residual tumor rate and recurrence free survival

Author / year of publication (# References)	No. Pts	Residual tumor rate (%)				Recurrence free survival (RFS)			
		PDD	WLE	PDD		WLE			
				RFS rate (%)	Median Follow-up (mos)	RFS rate (%)	Median Follow-up (mos)		
Filbeck T. et al.	1999 (37)	120	0.0	19.2	-	-	-	-	
Riedl CR, et al.	2001 (38)	102	16.0	39.0	-	-	-	-	
Kriegmair M. et al.	2002 (39)	101	32.7	53.1	-	-	-	-	
Filbeck T. et al.	2002 (40)	191	4.5	25.2	89.6	20.5	65.9	21.2	
Filbeck T. et al.	2003 (44)	191	-	-	85.0	43.0	60.7	42.0	
Daniltchenko DI. et al.	2005 (43)	102	-	-	41.0	42.0	25.0	39.0	
Babjuk M. et al.	2005 (41)	109	8.0	37.0	40.0	22.4	28.0	20.7	
Denzinger S. et al.	2007 (45)	191	-	-	71.0	86.0	45.0	83.0	
Alken P. et al.	2007 (42)	604	29.0	29.2	82.0	24.0	81.0	24.0	
Inoue K. et al.	2007 (unpublished)	43	-	-	80.7	33.4	-	-	

断下では65.9% (21.2ヵ月), 60.7% (42.0ヵ月), 45.0% (83.0ヵ月)と有意差を認めている (p=0.0003)^{10, 14, 15}.

我々もALAを用いたPDD補助下TUR-Btを施行しており, その最新の結果では, 表在性癌43症例において, 観察期間中央値 (範囲) 33.4±2.3 (28.8-38.0)ヵ月での膀胱内再発は6例のみであり, 無再発生存率は80.7±7.2%とこれまでの報告と同等の良好な成績を示している.

さらに, Filbeck Tら⁴⁰はCox比例ハザードモデルを用いた解析により, PDD補助下TUR-BtはHazard ratio 0.29 (95%CI 0.15~0.56)と, これ自身が独立した予後改善因子であるとも報告しており, PDD補助下TUR-Btは膀胱内再発を制御しうる可能性があると考えられる.

副作用

PDDにおいて, ALAにより合成されるPPIXは光感受性物質であり, 光線過敏症を主とする光毒性反応や肝障害などの全身性副作用が最も危惧される副作用である. またその合成過程でporphyrinの代謝を介するため, ポルフィリン症患者への投与は禁忌となる. しかしALAの経口による全身投与の場合, 投与24時間後には投与したALAは体外に排泄され^{16, 17}, 皮膚への残存がないため, 従来のポルフィリン誘導体とは異なり, 暗室への隔離を行わなくても光線過敏症の出現は認めず^{18, 19}, 軽度の消化器症状および肝障害を一過性に認めるのみとされる¹⁹. 一方, 膀胱内投与の場合は, 血漿PPIXの最高濃度は膀胱内投与後約30分で, 経口投与の場合と比較して約100分の1と低値であり,

半減期も約45分と短いことより, 薬理的には光毒性反応は起こりえないとされる^{50, 51}. さらに, ALA膀胱内投与した症例に対して試験的な紫外線暴露を行ったFilbeck Tら³²の検討でも光線過敏症の発症は認めず, 発症防御は不必要であると報告されている. 実際, 前述の多数症例での報告³¹や我々の経験^{34, 35}においても, 軽度~中等度の膀胱刺激症状を認めるのみで, 光線過敏症や肝障害などの重篤な全身性副作用は認めていない.

まとめ

表在性膀胱癌におけるALA膀胱内注入によるPDDおよびPDD補助下TUR-Btは, 癌再発に悩む患者にとって大きな福音になると考えられる. ヨーロッパでは, これら無作為臨床試験における良好な成績を受けて, PDDが医療承認され, European Association of Urology (EAU)のガイドラインにおいてもlevel of evidence 2aとして推奨されており⁵², 診断の第一選択になりつつある. しかし, 本邦の現状では, 光感受性物質であるALAおよび現PDDシステムの蛍光フィルターが装着された光学視管は薬事未承認であり, 先進医療に向けた医師主導による臨床研究の域を出ないのが現状である.

今後, この再発や進行に対するPDDおよびPDD補助下TUR-Btの真の有効性を前向き無作為化試験によって検討すべきである.

文 献

- 1) Chopin DK, Gattegno B (2002) Superficial bladder tumors. *Eur Urol* 42 : 533-541
- 2) Althausen AF, Prout GR Jr, Daly JJ (1976) Non-invasive papillary carcinoma of the bladder associated with carcinoma in situ. *J Urol* 116 : 575-580
- 3) Lutzeyer W, Rubben H, Dahm H (1982) Prognostic parameters in superficial bladder cancer : an analysis of 315 cases. *J Urol* 127 : 250-252
- 4) Heney NM, Ahmed S, Flanagan MJ, et al. (1983) Superficial bladder cancer : progression and recurrence. *J Urol* 130 : 1083-1086
- 5) Policard A (1924) Etude sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la limiere de wood. *Biologie Comptes Rendus* 91 : 1423
- 6) Lipson RL, Baldes EJ (1960) The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. *Arch Dermatol* 82 : 508-516
- 7) Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, et al. (1978) Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res* 38 : 2628-2635
- 8) Whitmore WF Jr, Bush IM, Esquivel E (1964) Tetracycline ultraviolet fluorescence in bladder carcinoma. *Cancer* 17 : 1528-1532
- 9) Kelly JF, Snell ME (1976) Hematoporphyrin derivative : a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. *J Urol* 115 : 150-151
- 10) Lipson RL, Baldes EJ (1960) The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. *Arch Dermatol* 82 : 508-516
- 11) Hisazumi H, Misaki T, Miyoshi N (1983) Photoradiation therapy of bladder tumors. *J Urol* 130 : 685-687
- 12) Malik Z, Lugaci H (1987) Destruction of erythroleukaemic cells by photoactivation of endogenous porphyrins. *Br J Cancer* 56 : 589-595
- 13) Kriegmair M, Stepp H, Steinbach P, et al. (1995) Fluorescence cystoscopy following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid : a new procedure with high sensitivity for detection of hardly visible urothelial neoplasias. *Urol Int* 55 : 190-196
- 14) Baumgartner R, Fisslinger H, Jocham D, et al. (1987) A fluorescence imaging device for endoscopic detection of early stage cancer--instrumental and experimental studies. *Photochem Photobiol* 46 : 759-763
- 15) Kriegmair M, Baumgartner R, Knuechel R, et al. (1994) Fluorescence photodetection of neoplastic urothelial lesions following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid. *Urology* 44 : 836-841
- 16) Collaud S, Juzenuine A, Moan J, et al. (2004) On the selectivity of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX formation. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 4 : 301-316
- 17) Peng Q, Warloe T, Berg K, et al. (1997) 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Cancer* 79 : 2282-2308
- 18) Navone NM, Polo CF, Frisardi AL, et al. (1990) Heme biosynthesis in human breast cancer--mimetic "in vitro" studies and some heme enzymic activity levels. *Int J Biochem* 22 : 1407-1411
- 19) Fukuda H, Paredes S, Batlle AM (1992) Tumour-localizing properties of porphyrins. In vivo studies using free and liposome encapsulated aminolevulinic acid. *Comp. Biochem Physiol B* 102 : 433-436
- 20) Steinbach P, Weingandt H, Baumgartner R, et al. (1995) Cellular fluorescence of the endogenous photosensitizer protoporphyrin IX following exposure to 5-aminolevulinic acid. *Photochem Photobiol* 62 : 887-895
- 21) Steinbach P, Kriegmair M, Baumgartner R, et al. (1994) Fluorescence photodetection of neoplastic urothelial lesions following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid. *Urology* 44 : 836-841
- 22) Kriegmair M, Baumgartner R, Knuechel R, et al. (1996) Detection of early bladder cancer by 5-aminolevulinic acid induced porphyrin fluorescence. *J Urol* 155 : 105-109
- 23) Koenig F, McGovern FJ, Larne R, et al. (1999) Diagnosis of bladder carcinoma using protoporphyrin IX

- fluorescence induced by 5-aminolaevulinic acid. *BJU Int* 83 : 129-135
- 24) Riedl CR, Plas E, Pflüger H (1999) Fluorescence detection of bladder tumors with 5-amino-levulinic acid. *J Endourol* 13 : 755-759
 - 25) Filbeck T, Roessler W, Knuechel R, et al. (1999) Clinical results of the transurethral resection and evaluation of superficial bladder carcinomas by means of fluorescence diagnosis after intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid. *J Endourol* 13 : 117-121
 - 26) Filbeck T, Roessler W, Knuechel R, et al. (1999) 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence endoscopy applied at secondary transurethral resection after conventional resection of primary superficial bladder tumors. *Urology* 53 : 77-81
 - 27) Zaak D, Kriegmair M, Stepp H, et al. (2001) Endoscopic detection of transitional cell carcinoma with 5-aminolevulinic acid : results of 1012 fluorescence endoscopies. *Urology* 57 : 690-694
 - 28) Zaak D, Hungerhuber E, Schneede P, et al. (2002) Role of 5-aminolevulinic acid in the detection of urothelial premalignant lesions. *Cancer* 95 : 1234-1238
 - 29) Landry JL, Gelet A, Bouvier R, et al. (2003) Detection of bladder dysplasia using 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin fluorescence. *BJU Int* 91 : 623-626
 - 30) Grimbergen MC, van Swol CF, Jonges TG, et al. (2003) Reduced specificity of 5-ALA induced fluorescence in photodynamic diagnosis of transitional cell carcinoma after previous intravesical therapy. *Eur Urol* 44 : 51-56
 - 31) Hungerhuber E, Stepp H, Kriegmair M, et al. (2007) Seven years' experience with 5-aminolevulinic acid in detection of transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 69 : 260-264
 - 32) Kriegmair M, Zaak D, Stepp H, et al. (1999) Transurethral resection and surveillance of bladder cancer supported by 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence endoscopy. *Eur Urol* 36 : 386-392
 - 33) Filbeck T, Pichlmeier U, Knuechel R, et al. (2002) Do patients profit from 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence diagnosis in transurethral resection of bladder carcinoma? *Urology* 60 : 1025-1028
 - 34) 井上啓史, 辛島 尚, 鎌田雅行, 他 (2006) 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) 膀胱内注入による蛍光膀胱鏡を用いた膀胱癌の光力学的診断. *日本泌尿器科学会雑誌* 97 : 719-729
 - 35) 井上啓史, 濱口卓也, 辛島 尚, 他 (2007) 膀胱癌の光力学的診断. *Japanese Journal of Endourology and ESWL* 20 : 112-120
 - 36) Stepp H, Wagner S, Zaak D, et al. (2004) Photobleaching. In *Fluorescence diagnosis of bladder tumor using 5-aminolevulinic acid -Fundamentals and Results-*, 1st ed., Endo-Press TM, Tuttlingen, Germany. pp33
 - 37) Filbeck T, Roessler W, Knuechel R, et al. (1999) Clinical results of the transurethral resection and evaluation of superficial bladder carcinomas by means of fluorescence diagnosis after intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid. *J Endourol* 13 : 117-121
 - 38) Riedl CR, Daniltchenko D, Koenig F, et al. (2001) Fluorescence endoscopy with 5-aminolevulinic acid reduces early recurrence rate in superficial bladder cancer. *J Urol* 165 : 1121-1123
 - 39) Kriegmair M, Zaak D, Rothenberger KH, et al. (2002) Transurethral resection for bladder cancer using 5-aminolevulinic acid induced fluorescence endoscopy versus white light endoscopy. *J Urol* 168 : 475-478
 - 40) Filbeck T, Pichlmeier U, Knuechel R, et al. (2002) Clinically relevant improvement of recurrence-free survival with 5-aminolevulinic acid induced fluorescence diagnosis in patients with superficial bladder tumors. *J Urol* 168 : 67-71
 - 41) Babjuk M, Soukup V, Petrik R, et al. (2005) Fluorescence cystoscopy in the diagnostics and treatment of superficial urinary bladder tumors. *Cas Lek*

- Cesk 144 : 15-18
- 42) Alken P, Siegsmond M, Gromoll- Bergmann K, et al. (2007) A randomized controlled multicentre trial to compare the effects of transurethral resection of bladder carcinomas under 5-ALA induced fluorescence light to conventional white light. Poster presented at the annual EAU Congress, 21-24, Berlin, Germany.
- 43) Daniltchenko D, Riedl CR, Sachs MD, et al. (2005) Long-term benefit of 5-aminolevulinic acid fluorescence assisted transurethral resection of superficial bladder cancer : 5-year results of a prospective randomized study. *J Urol* 174 : 2129-2133
- 44) Filbeck T, Pichlmeier U, Knuechel R, et al. (2003) Reducing the risk of superficial bladder cancer recurrence with 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence diagnosis. Results of a 5-year study. *Urologe A* 42 : 1366-1373
- 45) Denzinger S, Burger M, Walter B, et al. (2007) Clinically relevant reduction in risk of recurrence of superficial bladder cancer using 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence diagnosis : 8-year results of prospective randomized study. *Urology* 69 : 675-679
- 46) Grant WE, Hopper C, MacRobert AJ, et al. (1993) Photodynamic therapy of oral cancer : photosensitization with systemic aminolevulinic acid. *Lancet* 342 : 147-148
- 47) Webber J, Kessel D, Fromm D (1997) Plasma levels of protoporphyrin IX in humans after oral administration of 5-aminolevulinic acid. *J Photochem Photobiol B* 37 : 151-153
- 48) Kennedy JC, Pottier RH (1992) Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 14 : 275-292
- 49) Webber J, Kessel D, Fromm D (1997) Side effects and photosensitization of human tissues after aminolevulinic acid. *J Surg Res* 68 : 31-37
- 50) Rick K, Sroka R, Stepp H, et al. (1997) Pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in skin and blood. *J Photochem Photobiol B* 40 : 313-319
- 51) Popken G, Schultze-Seemann W, Seiler KU, et al. (2000) Intravesical administration of 5-aminolevulinic acid (5-ALA). Safety and pharmacokinetics of 5-ALA and its metabolite protoporphyrin IX. *Eur J Clin Pharmacol* 56 : 241-246
- 52) Filbeck T, Wimmershoff MB, Pichlmeier U, et al. (2000) No generalized skin phototoxicity after intravesical application of 5-aminolevulinic acid for fluorescence diagnosis of superficial bladder cancer. *Urol Int* 64 : 126-128
- 53) Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou-Redorta J (2008) EAU Guidelines on Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder. *Eur Urol* [Epub ahead of print]

Three-dimensional Cell Culture of Glioma and Morphological Comparison of Four Different Human Cell Lines

YOSHINOBU MANOME¹, SHUICHI MIZUNO², NOBUTAKE AKIYAMA³, KOUKI FUJIOKA¹,
HIDEKI SAITO¹, YOSHIAKI HATABA⁴, TOSHIAKI KOBAYASHI⁵ and MICHICO WATANABE¹

Departments of ¹Molecular Cell Biology, ³Molecular Immunology, Institute of DNA Medicine, Research Center for Medical Sciences, Jikei University School of Medicine, Minato-ku, Tokyo 105-8461, Japan;

⁴Integrated Imaging Research Support, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0093, Japan;

⁵Cancer Screening Technology Division, Research Center for Cancer Prevention and Screening, National Cancer Center, Chuo-ku, Tokyo 105-0045, Japan;

²Department of Orthopedic Surgery, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA 02115, U.S.A.

Abstract. *Background: To explore the intracranial behaviors of glioma, a three-dimensional culture was devised and the morphology of four cell lines was examined. Materials and Methods: Bioabsorbable and degradable gelatin was used as the scaffold and T98G, A172, KNS42, and U118MG representative standard malignant glioma cell lines were cultured three-dimensionally. Results: When grown, the cells demonstrated characteristic conformations. The U118MG cells dispersed with numerous fiber formations. In contrast, the KNS42 and A172 cells aggregated, adhering to each other, resulting in the formation of balloon-like structures. The T98G cells demonstrated an intermediate character. Conclusion: The cell lines showed distinct characteristics in three-dimensional culture. This culture method may have a role in elucidating the fundamental character of cells in the human body.*

Tissues in the human body are derived from certain types of cells and accordingly, the characters of the individual tissues are determined by the constituent cells. This especially may be true in organs such as the central nervous system, because the tissue consists of relatively homologous types of cells, albeit with many functions. Based on this understanding, methods for cell culture have been utilized for biomedical studies and cell biology experiments. However, most of these studies have been conducted using a monolayer or two-dimensionally cultivated

cells. Many researchers nowadays notice that two-dimensional cells on flat and hard plastic dishes or flasks do not represent natural cells in living tissues or organs (1). First of all, monolayer cells do not have steric cell connections, unlike in the human body. Such three-dimensional cell-to-cell connections are important for proliferation, adhesion, migration, invasion and phenotype presentations. In addition, cellular function is regulated by the microenvironment. The environments in monolayer cells are far from those *in vivo*. The extracellular matrix is also known to be important for morphogenesis as it interacts in the cell-to-cell connection and anchoring of cells. However, it differs between cells cultured *in vitro* and *in vivo* (2). From this point of view, three-dimensional cell culture has gained popularity and is now being used in a wide range of cells (3). Representatives of the three-dimensional cell culture method include reconstituted basement membrane (rBM, commercially known as Matrigel) (4-6) and spheroids (7, 8). Many other devices with a collagen scaffold have also been used. However, in spite of the number of studies and the acceptance of three-dimensional cultures as mainstream methods, better systems that simulate the inside of the human body are still required. In this context, we established a three-dimensional cell culture and demonstrated the chondroinduction of human fibroblast cells with demineralized bone powder (9, 10). In that series of studies, when cells were cultured in three dimensions, demineralized bone powder induced an extracellular matrix similar to that deposited around *bona fide* chondrocytes. Kinetic analyses of gene expression during chondroinduction also confirmed the effect (11, 12). We have emphasized that this culture system has the advantage of using bioreactors that can easily control medium perfusion, as well as enable the application of hydrostatic pressure, and/or exposure to low oxygen tension (13-20). Using this device, we also identified messenger RNAs that were regulated by hydrostatic pressure in three-dimensional culture. In the human

Correspondence to: Yoshinobu Manome, MD, Ph.D., Department of Molecular Cell Biology, Institute of DNA Medicine, Research Center for Medical Sciences, Jikei University School of Medicine, 3-25-8 Nishi-shinbashi, Minato-ku, Tokyo, 105-8461, Japan. Tel: +81 334331111 ext. 2360, e-mail: manome@jikei.ac.jp

Key Words: Malignant glioma, cell culture, three-dimension, morphology.

body, hydrostatic fluid pressure constantly oscillates in certain types of tissues or organs, including the central nervous system, that is exposed to intracranial pressure and the vascular system or blood cells exposed to systolic or diastolic blood pressures. Genes of the regulator of G-protein signaling 5 (RGS5) in neuroblastoma cells and chromosome condensation 1-like (CHC1-L) in lymphocytes increased after exposure to hydrostatic pressure (21).

However, during the development of the three-dimensional culture, little was known about the morphology of cultured cells other than chondrocytes. Malignancy is one of the prospective uses for the culture. In this study, human malignant glioma cells were cultivated and their morphologies were observed. The differences between four different cell lines were also compared.

Materials and Methods

Cell lines. The human glioblastoma cell lines, T98G (22), A172 (23) and U118MG (24) were purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). The human glioblastoma KNS42 cell line was provided by Dr. Takeshita, Kyushu-University (25). These cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with 4.5 g/l glucose supplemented with 10% fetal bovine serum. The cells were grown in a normal culture flask until the start of the experiments.

Three-dimensional cell culture. The scaffold material for three-dimensional culture was bioabsorbable and degradable gelatin. The method for the experiments was a modified version of a previously described procedure (9, 10). Dispersed human glioma cells (1×10^4 cells/100 μ l of DMEM) were injected into the scaffold and left to stand for 4-6 hours at 37°C in a 5% CO₂ incubator without additional cell culture medium. After attachment of the cells to the scaffolds, the meshes were transferred into a 10-cm dish, immersed in 10 ml of culture medium and further cultivated for 3 to 20 days.

Morphological evaluations. The cultures with scaffolds were fixed with 10% phosphate buffered-formalin for light microscopy, 1.2% glutaraldehyde for scanning electron microscopy (SEM) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.3, 400 mOsm) or 2% glutaraldehyde for transmission electron microscopy (TEM), and then used as specimens. Paraffin-embedded specimens were sliced at 6- μ m thickness, stained with hematoxylin and eosin, and examined under a light microscope. Freeze fractured- or non-fractured specimens in ethanol were dehydrated by a critical point dryer (Hitach-Hightec, Tokyo, Japan), coated by Au-Pd magnetron sputter and examined at 15 kV under a JSM-5800LV scanning electron microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). Other specimens were examined at 80 kV under a H-7500 transmission electron microscope (Hitachi-Hightec) after ultramicrotomy.

Results

Three-dimensional culture of T98G glioma cells. A cross-section of a three-dimensional culture on day 10 is shown in Figure 1a. The inoculated cells proliferated in the three-dimensional scaffold and were crammed into the

compartment and their fibers also filled in the extracellular spaces. When the cells were crowded in the seeded tracks, they tended to migrate to unoccupied adjoining space and proliferate (Figure 1b). At the beginning of culture, injected or seeded cells adhered to the material and started to grow in the attached spots. After several days, these multiplied cells were detected as groups of cells (Figure 1c) and at this early stage of the culture, they actively grew, rather than producing extracellular matrix. Unattached and dead cells were sloughed away and not observed. When the cellular density increased, the cells produced more extracellular matrix. Simultaneously, the cells started to migrate to neighboring space by anchoring to the scaffold. The T98G cells in three-dimensional culture were vibrant and plicae, microvilli and fibers were clearly observed (Figure 1d). The three-dimensional spatial environment conferred dynamic viability on the cultured cells. The adaptability of the cells to the scaffold was evaluated by TEM. The glioma cells attached to the scaffold with many processes (Figure 1e). Although the cells retained their ability to migrate as well as their mobility on the scaffold surface, cell attachments to the scaffold were abundant. A study at higher magnification revealed that fine matrix fibers intervened between the cell process and the scaffold (Figure 1f). The matrix was produced by the glioma cells and deposited in the extracellular spaces. The cells bonded to the scaffold by means of the extracellular matrix. Similar intervention was also observed on process-to-process connections between the cells (Figure 1g). These connections arose in a complicated and sophisticated manner. Extracellular matrix was used for the connections. Steric connections were observed throughout the culture. The features demonstrated here were rarely detectable in conventional cell culture (data not shown).

Morphology of four representative glioma cell lines. Similar to the T98G cells, human KNS42, A172 and U118MG cell lines have commonly been used in previous studies. When the cells were grown, they presented distinctive appearances. T98G cells grew initially as a group, then migrated into and accumulated in neighboring spaces. A cluster of T98G cells is shown in Figure 2a. The cells aggregated and rolled up, which was the typical appearance of T98G in three-dimensional culture. In contrast, the KNS42 and A172 cells aggregated, adhering to each other, leading to the formation of balloon-like structures (Figure 2b, c). These structures were not formed by the T98G cells. While both the KNS42 and A172 cells conglomerated, the KNS42 cells bound more tightly than the A172 cells. Unlike KNS42, individual cell shapes were maintained in A172 which grew more independently and thus each cell was distinguishable. The U118MG cells presented drastically different characteristics. They dispersed, grew

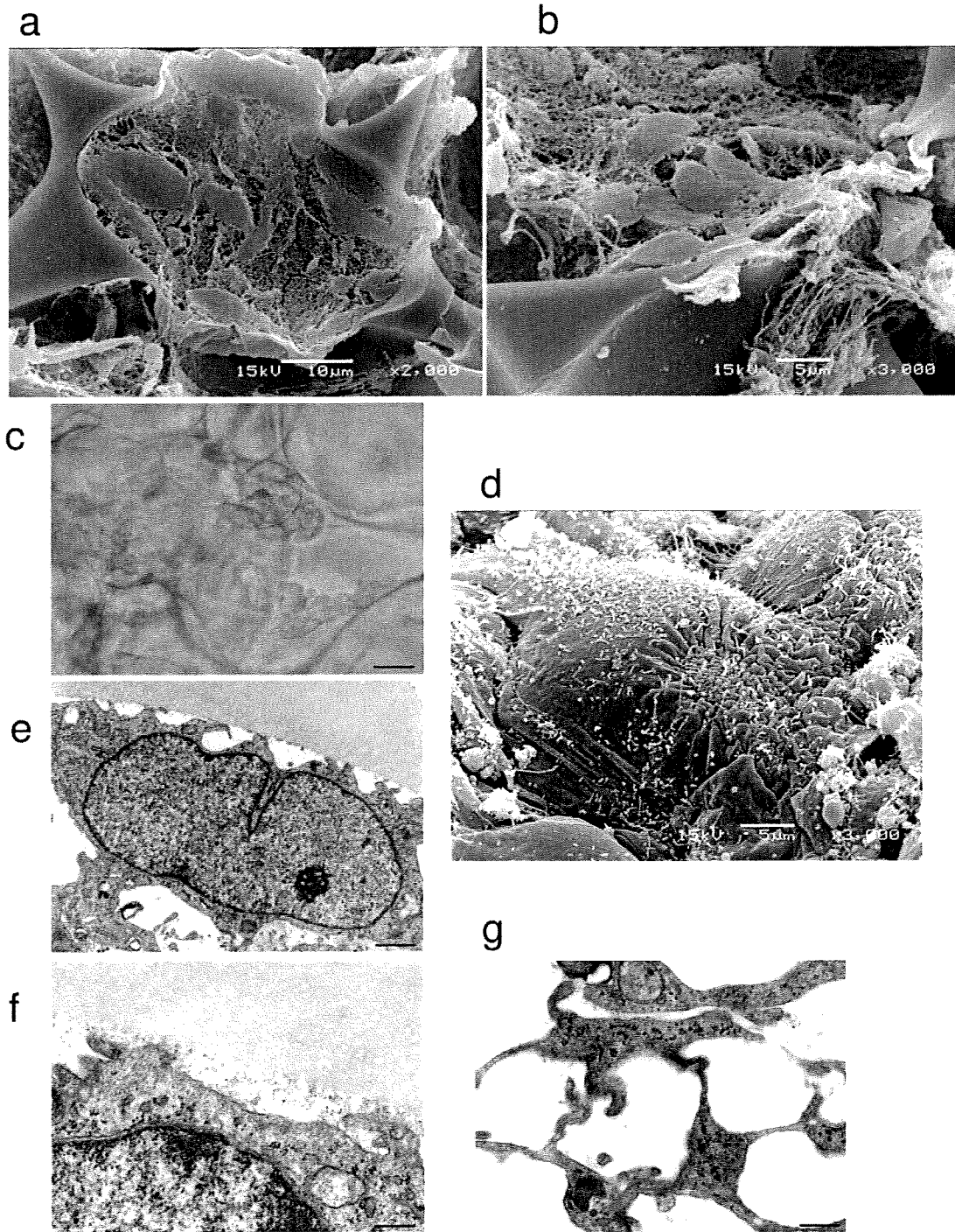


Figure 1. Morphology of three-dimensionally cultured human T98G glioma cells. a: SEM of freeze-fractured cells on day10 of culture, the fractured scaffold presenting a smooth and flat structure. Processes and fibers fill the intracellular space. b: SEM on day 5 of the culture. Most of the glioma cells also fractured. c: Appearance of the glioma by phase-contrast microscopy on day 4 of culture. The cells were tightly attached to the scaffold and starting to proliferate. Magnification, $\times 40$; bar, $40 \mu\text{m}$. d: SEM of the glioma on day 5 of culture. Fine structures of the fibers, plicae, and microvilli on the surface of T98G cells. e: TEM of attachment of a glioma cell to the scaffold on day 8 of culture. More than eight processes projected from the cell body cradling tight adherence. Bar, $1.2 \mu\text{m}$. f: Higher magnification TEM of the attachment revealing extracellular matrix fibers between the cell projections and the scaffold. Bar, 317nm . g: TEM of connection of cell to cell processes on day 8 of culture. Bar, 380nm .

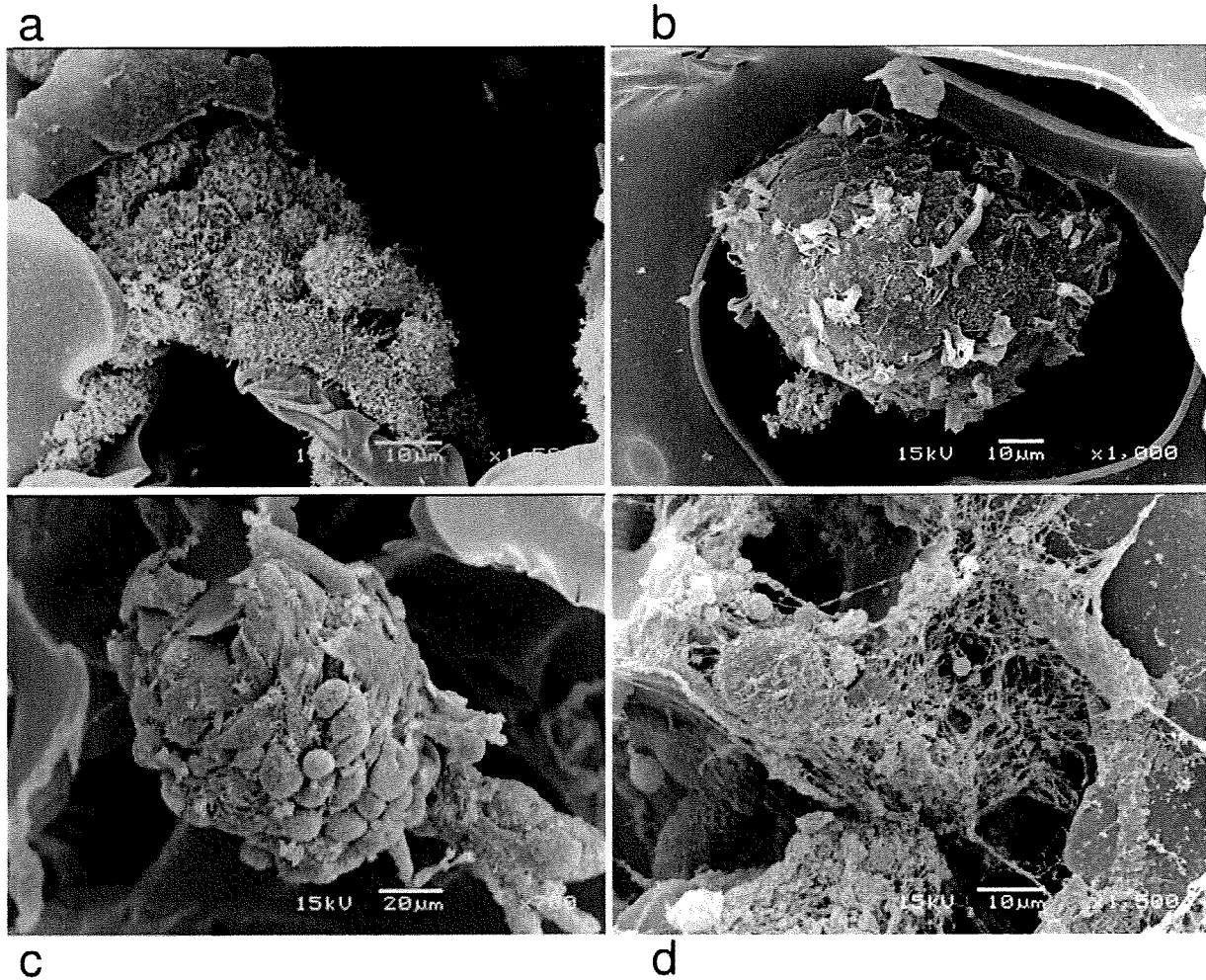


Figure 2. Appearance of three-dimensional cultures of separate glioma cell lines. a: T98G, appearance intermediate between that of KNS42 and U118MG cells. b: KNS42, cell boundary obscure compared to T98G or A172. c: A172, shape of each cell clearly apparent. d: U118MG, strongly attached to the scaffold with numerous fibers.

separately and did not pile up or conglomerate (Figure 2d). The cells attached to the scaffold with numerous fiber formations. These features were observed from the beginning of the cell culture.

Characteristics of three-dimensional culture of KNS42, A172 and U118MG cells. TEM was used to observe the inside of the aggregated KNS cell structure (Figure 3a). Numerous microvilli were observed on the surface of the cells and they also protruded into the extracellular spaces in the inner side of the aggregate. The individual cells possessed their own extracellular spaces, which might be an advantage for maintaining the micro-environment of individual cells. Even after 15 days of culture, the cells still proliferated. Despite the cell numbers and size of the aggregates, very few cells

underwent apoptosis or necrosis (Figure 3b). Although the cells tended to adhere to each other, many attachments to the scaffold were also observed (Figure 3b). TEM also demonstrated tight bonding to the scaffold of the cell (Figure 3c) which was closer than that of the T98G cells. The features of A172 were basically similar to those of KNS42. The cells formed a globoid structure (Figure 3d) and microvilli were found on the surface or intra-structural spaces. However, the overall structure of the A172 complex was different from that of KNS42 since unlike KNS42, the cells protruded beyond the outline of the globoid structure in A172 cells giving a more ragged appearance. In contrast, U118MG cells did not form a complex, grew independently, and even immediately after dividing, the cells dispersed and produced massive fibers (Figure 3e). Long processes