

## 26) 腹膜切除+HIPEC時の術中止血法-3

### ガーゼによる圧迫止血法

#### 肝表面からの出血

肝へのscalloping(圧排性浸潤)(図-7)を肝被膜とともに切除する時肝実質や肝表面の血管から出血することがある。特にS6肝下面やS7横隔膜ドーム下には肝表面近くに太い血管がある(図-7)。針糸などで止血するが、4L以上の出血がおこると出血傾向が出現し、止血困難なことがある。このような時はガーゼ(滅菌オペックスC吸収ガーゼ、30x30、スズラン株式会社、名古屋 図-8)で圧迫止血する(図-9)。出血部位にガーゼを4-10枚重ね置いて手掌で数分間強く圧迫し、出血がないことを確認後、閉腹する。デュープルドレイン(直径10mm)を近傍に留置する。術後3-7日後に全身麻酔下にガーゼを摘出する。肝表面とガーゼが強固に接着していることが多く、無理に剥がすと再出血する恐れがある。肝表面とガーゼの境界に注射器で低分子デキストラン液を注入し少しずつはがすと良い。ガーゼが感染していることがあるので(図-9,10)培養を行い、生理食塩水で十分洗浄する。肝表面に止血糊を塗付してドレインを挿入し閉腹する(図-11)。

図-7: 高度のscallopingを示す腹膜偽粘液腫症例。矢印で示す血管(右)からの出血に注意しなければならない。

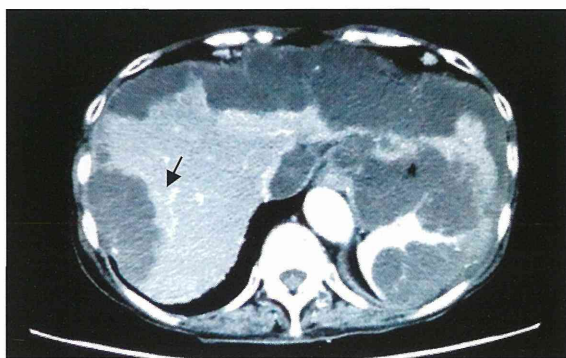


図-8: ガーゼ圧迫に用いる滅菌オペックスC吸収ガーゼ。

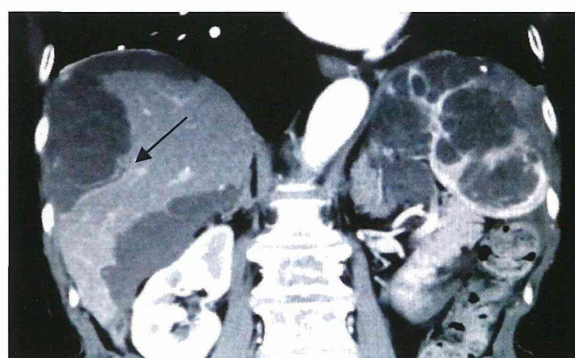


図-9: ガーゼ圧迫後のCT像。ガーゼ内にガス像がある。

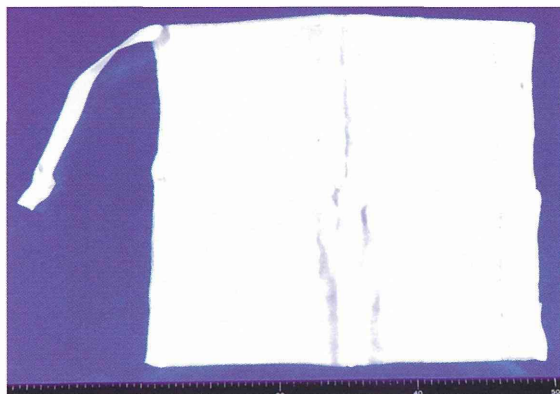


図-10: 11日目にガーゼを摘出した。ガーゼは感染している。

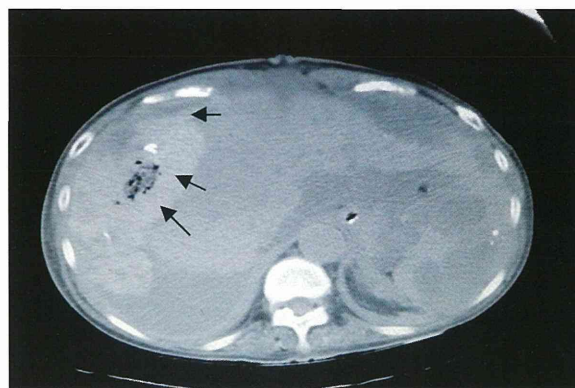
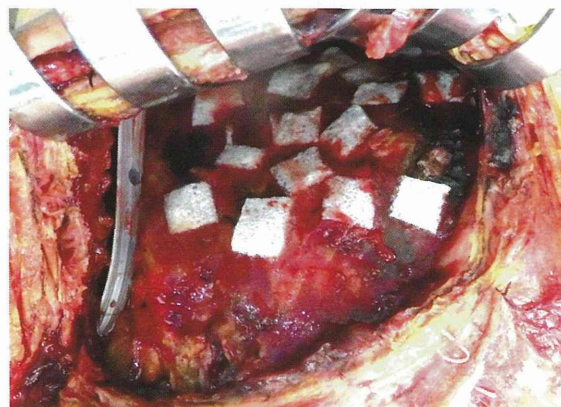
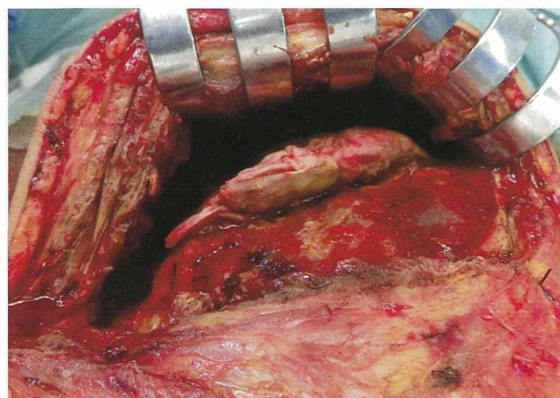


図-11: 摘出後の肝表面に止血糊を塗付。。



## 26) 腹膜切除+HIPEC時の術中止血法-4

### 仙骨前面からの出血の対策

#### 仙骨からの出血

仙骨前面の静脈叢からの出血は止血が困難なことがある。電気メスでの止血が困難な理由は、仙骨前面には十分な量の蛋白成分がないことが原因である。そこで、腹直筋から筋肉を5mm角摘出し(図-12)、仙骨出血部に置き、ボールチップ型電気メス100Wで腹直筋蛋白を凝固変性させ止血する(図-13,14,15,16)。さまざまな止血方法でも止血できないときは、ガーゼ圧迫もやむをえないことがある。ガーゼ摘出は1-7日後に行なう。

図-12. 腹直筋の採取。

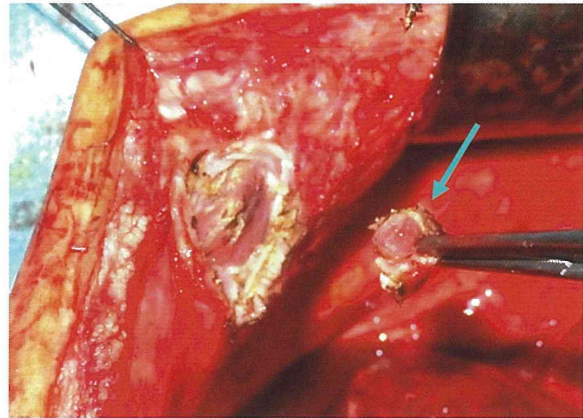
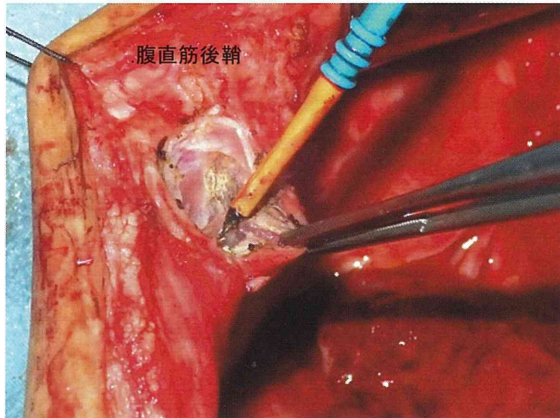


図-13: 摘出した腹直筋。大きさは5x5mm。

図-14: 摘出した腹直筋を出血している仙骨前面に置く。

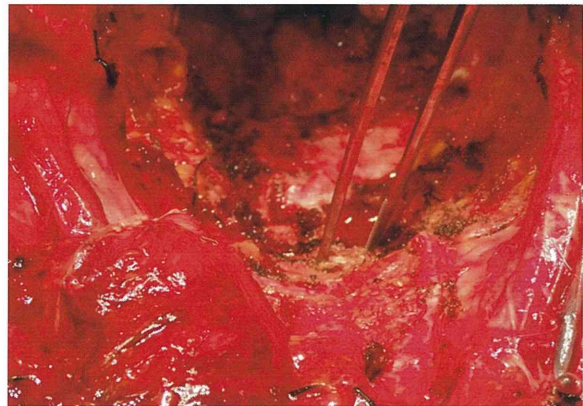
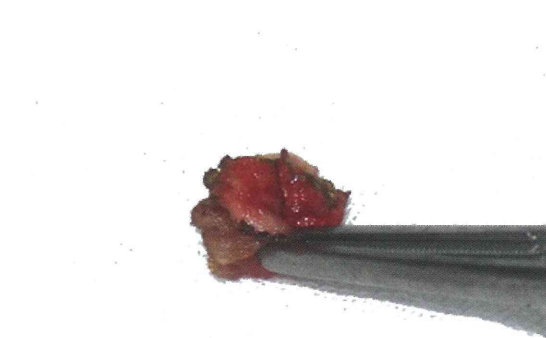
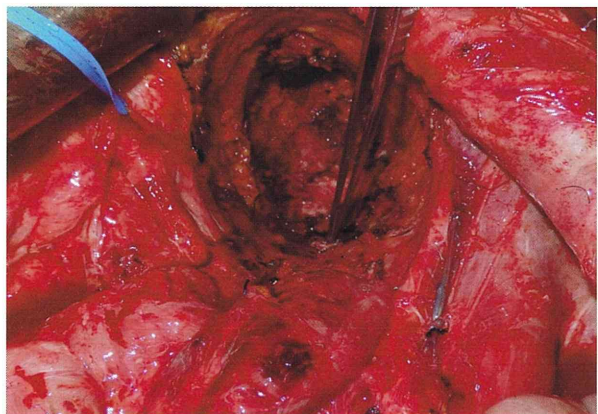
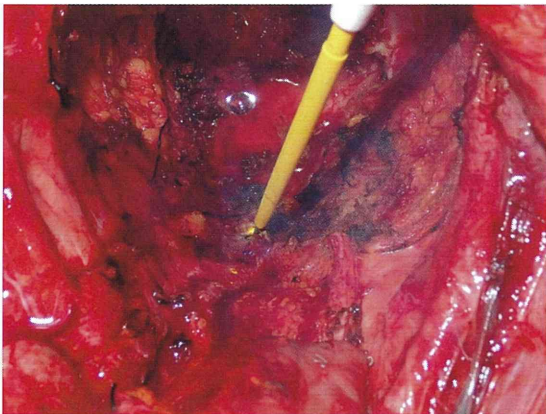


図-15: 摘出した腹直筋に通電し腹直筋断片を熱変性させる。炭化すると止血力が落ちるので、低分子デキストラン液を筋肉断片に垂らしながら通電する。

図-16: 止血が完了したところ。



## 27) 腹膜切除+HIPECの術前・術後の管理・クリニカルパス

NPO腹膜播種治療支援機構 米村豊、岸和田徳洲会病院腹膜播種センター 竹下和良

### CRS+HIPEC術前術後のクリニカルパス。

|                        | 入院<br>手術前日   | 手術前     | 手術                                | 手術後                                      | 術後1日                                     | 2日  |
|------------------------|--------------|---------|-----------------------------------|--|--|---|
| 食事                     | 早から経食、夕まで飲水可 | 経飲食     | CVカテーテル挿入<br>腹膜切除<br>HIPEC        | 経飲食                                      | 経飲食                                      | 経飲食                                       |
| 下剤                     | 夕方:ニフレック     |         |                                   |  |  |   |
| 点滴<br>輸血<br>昇圧剤<br>利尿剤 | ラクテックx2      | ラクテックx2 | ラクテックx2<br><br>輸血<br>FFP<br>ドーパミン | ラクテック<br>200ml/6時間<br>輸血<br>FFP<br>ドーパミン | ラクテック<br>200ml/6時間<br>輸血<br>FFP<br>ドーパミン | フルカリク2号x2<br>ラクテック<br>100ml/6時間<br>イントラx1 |
| 胃管                     |              |         | 挿管後挿入                             | ○  | 抜去                                       |   |
| 抗生物質                   |              |         | CEZ1gx2                           | CEZ1gx2                                  | CEZ1gx2                                  | CEZ1gx2                                   |
| 疼痛管理                   |              |         | IAPブロック<br>RSブロック                 | フェンタニル<br>1ml/6時間                        | フェンタニル<br>1ml/6時間                        | ロピオン                                      |
| レスビレータ                 |              |         |                                   | ○  | 抜管                                       |   |
| 腹腔ドレイン                 |              |         | デュブルドレイン                          | ○  | ○  | ○   |
| 胸腔ドレイン                 |              |         | 16G胸腔ドレイン                         | ○  | ○  | ○   |
| 消化管透視                  |              |         |                                   |  |  |   |
| 胸部写真                   |              |         | ○                                 |  | ○  |   |
| 腹部写真                   |              |         | ○                                 |  | ○  |   |
| リハビリテーション              |              |         |                                   |  | 開始                                       | ○   |

|                        | 3日                                       | 4日  | 5日                                 | 6日        | 7日        | 8日        |
|------------------------|--|---|------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| 食事                     | ガム・氷・水                                   | ガム・氷・水  | 流動食                                | 5分粥       | 5分粥       | 全粥        |
| 下剤                     |  |   |                                    |           |           |           |
| 点滴<br>輸血<br>昇圧剤<br>利尿剤 | フルカリク2号x2<br>ラクテック<br>100ml/時間<br>イントラx1 | フルカリク2号x2<br>ラクテック<br>100ml/時間<br>イントラx1<br>ラシックス1A | フルカリク2号x2<br><br>イントラx1<br>ラシックス1A | フルカリク2号x2 | フルカリク2号x1 | フルカリク2号x1 |
| 胃管                     |  |   |                                    |           |           |           |
| 抗生物質                   | CEZ 1gx4                                 | CEZ 1gx4  | CEZ 1gx4                           | CEZ 1gx4  | CEZ 1gx4  |           |
| 疼痛管理                   | ロピオン                                     | ロピオン  | ロピオン                               |           |           |           |
| レスビレータ                 |  |   |                                    |           |           |           |
| 腹腔ドレイン                 | 短切                                       | 16Gサファイード   | ○                                  | ○         | 抜去        |           |
| 胸腔ドレイン                 | ○  | 抜去  |                                    |           |           |           |
| 消化管透視                  |  |   |                                    |           | 食道透視      |           |
| 胸部写真                   | ○  |   | ○                                  |           |           |           |
| 腹部写真                   | ○  |   | ○                                  |           |           |           |
| リハビリテーション              | ○  | ○   | ○                                  | ○         | ○         | ○         |

|            |   |
|------------|---|
| 術後0-3日間の輸液 | 尿量が6時間500ml以下であれば適宜ラクテックやラシックスを投与する   |
| TAPブロック    | Transversus abdominis plane block, 腹横筋膜に0.25%ボプスカイン 合計100ml                       |
| RSブロック     | Rectus Sheath block, 腹直筋鞘ブロック   |
| 胸腔ドレイン     | 横隔膜下腹膜切除したとき挿入。100ml/日以下で抜去   |
| 消化管透視      | 胃全摘の場合のみ第7日目に行なう  |
| 腹腔ドレイン     | デュブルドレイン 10mm、バッグとつないで閉鎖ドレインとする<br>左右横隔膜下・骨盤腔・左横隔膜下ドレインは臍漏の恐れのあるときは食事開始後3日間まで留置する |
| 抗生物質       | WBC,CRP・排液の培養を参考に考える  |
| CT         | 適宜撮る  |
| ガム         | ガムはNGを抜いたあと1日6個噛ませる。  |

### 腹腔鏡下HIPECの術前術後のクリニカルパス。

|           | 入院<br>手術前日 | 手術前     | 手術                       | 手術後               | 術後1日              | 2日               | 3日      | 4日  |
|-----------|------------|---------|--------------------------|-------------------|-------------------|------------------|---------|-----|
| 食事        | から経食、夕まで飲水 | 絶飲食     | 腹腔鏡下<br>HIPEC 43度C, 40分) | 絶飲食               | 絶飲食               | 朝から水・ガム・昼から流動    | 5分粥・普通食 | 普通食 |
| 下剤        | 夕方:ニフレック   |         |                          |                   |                   |                  |         |     |
| 点滴        | ラクテックx2    | ラクテックx2 | ラクテックx2                  | ラクテック<br>150ml/時間 | ラクテック<br>150ml/時間 | ラクテック<br>60ml/時間 |         |     |
| 抗がん剤      |            |         | ○                        |                   |                   |                  |         |     |
| 胃管        |            |         | 挿管後挿入                    | ○                 | 抜去                |                  |         |     |
| 抗生物質      |            |         | CEZ 1gx2                 | CEZ 1gx1          | CEZ 1gx3          | CEZ 1gx3         |         |     |
| 疼痛管理      |            |         |                          | ロピオン              | ロピオン              | ロピオン             |         |     |
| レスビレータ    |            |         | ○                        | 抜管                |                   |                  |         |     |
| 胸部写真      |            |         | ○                        |                   | ○                 |                  |         |     |
| 腹部写真      |            |         | ○                        |                   | ○                 |                  |         |     |
| リハビリテーション |            |         |                          |                   | 開始                | ○                | ○       |     |

## 28) アミノレブリン酸蛍光ガイド手術-1

NPO腹膜播種治療支援機構 米村豊、金沢大学がん研究所 遠藤良夫、東京工業大学 小倉俊一郎

腹膜播種を有する患者を包括的治療で治癒させるための最も大きな因子は腫瘍の完全切除である。完全切除しても胃癌で65%・大腸癌で58%、腹膜偽粘液腫で31%、卵巣癌で42%が再発する(表-1)。また、各々の疾患で再発例の67%,52%,53%,32%は腹膜再発である(表-1)。この事実はいかに肉眼的に完全な切除をしても、肉眼で確認できない播種が腹膜切除後も遺残したことを示している。腹腔内は解剖学的に非常に複雑な構造をしているため、サイズが小さい腹膜播種は手術中に見逃されることが多い。

最近、動物実験による腹膜播種の発見に光線力学的診断photodynamic diagnosis (PDD) が有効であるとする報告がある(1)。5-aminolevulinic acid (ALA) は有用なPDDの薬品として注目を集めている(図-1)。

ALAは体内のミトコンドリア内でglycineとsuccinyl CoAからALA synthaseによりつくられるアミノ酸で、ヘムやチトクロームCなどのエネルギー産生に関与するたんぱく質の原料となる(図-2)。ヘム・プロトポルフィリン9がミトコンドリア内で減少するとこの合成経路はフィードバック機構で活性化される。

大量のALAを経口投与すると、ALAは細胞膜上のトランスポーターを介して細胞内に取り込まれる。ALAは律速酵素であるALA dehydrataseによりporphyrinogenに変換された後 Hydroxymethylbilane・Uroporphyrinogen III・Coproporphyrinogen IIIに転換する。この過程は細胞質内で行なわれる(図-2)。Coproporphyrinogen IIIはミトコンドリア膜にあるトランスポーター ABCB6でミトコンドリア内に移送される。Coproporphyrinogen IIIはミトコンドリア内で ProtoporphyrinogenからProtoporphyrin IX(プロトポルフィリンIX・Pp IX)に代謝される。Protoporphyrin IXは最終的に律速酵素であるフェロケラターゼ(Ferrochelatase: FeC)によりヘムに転換される(2)(図-2)。

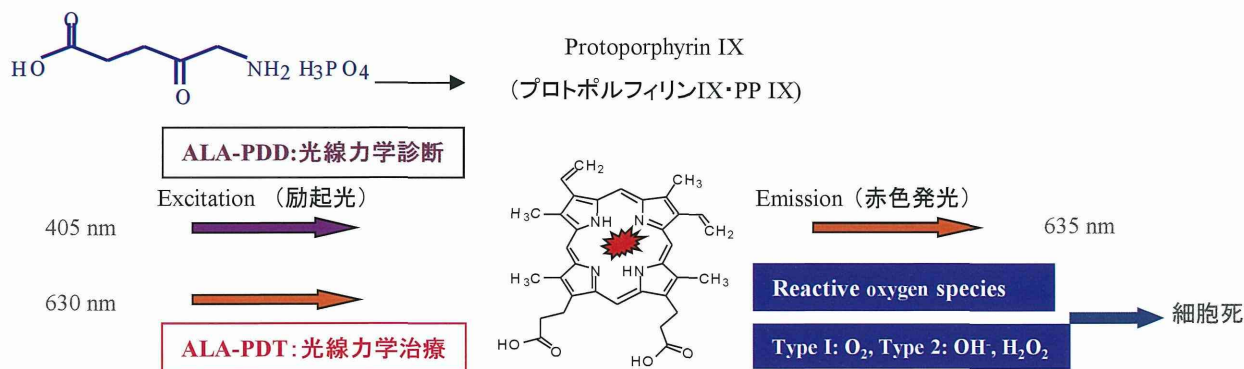
ヘムはヘモグロビン(Hb), myoglobin, cytochrome C, P450, catalase, NO synthetaseやperoxidaseなどの生命維持に不可欠な分子の補因子cofactorである。

波長405nmの紫色の光でProtoporphyrin IXを励起すると、635nmの赤色に発光する(3)。癌細胞内のProtoporphyrin IXを紫色の光で励起し、赤色に発光すれば癌の診断になる。これを利用したのが光線力学診断(ALA-Photodynamic detection: ALA-PDD)である。また、630nmの光をPpIXに照射すると活性酸素やフリーラジカルが産生され、ミトコンドリアが破壊されることから細胞を死滅させる。これを利用したのが光線力学治療(PDT)である(図-1)。

表-1 腹膜播種完全切除後の再発形式

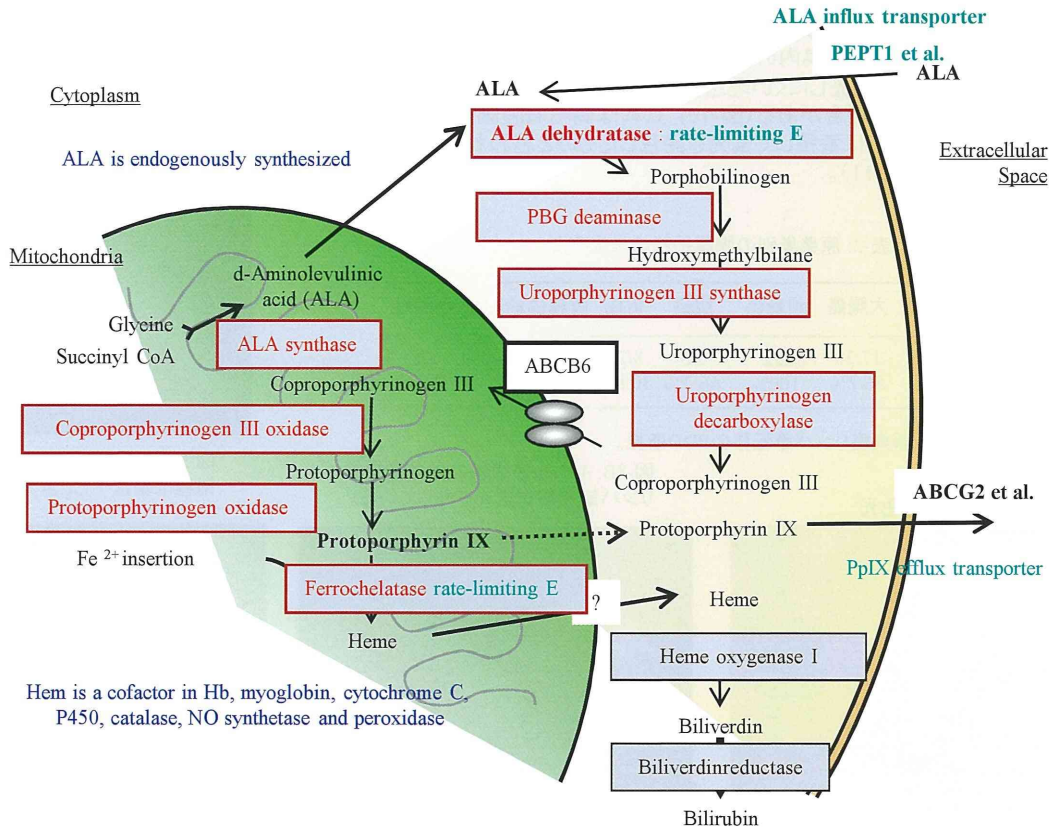
|                | 腹膜           | 肝          | リンパ節         | 骨          | 脳(髄膜腔)         | 肝門部        | 皮膚         | 食道断端       | 肺          | 胸膜           | 腹壁         | 他病死          | 再発重複         | 計             |
|----------------|--------------|------------|--------------|------------|----------------|------------|------------|------------|------------|--------------|------------|--------------|--------------|---------------|
| 胃癌<br>(N=234)  | 102<br>67%   | 7<br>4.60% | 8<br>5.20%   | 9<br>5.90% | 2 (1)<br>1.30% | 4<br>2.60% | 1<br>0.60% | 1<br>0.60% | 2<br>1.20% | 3<br>1.80%   | 2<br>1.20% | 13<br>8.50%  | 10<br>6.50%  | 153<br>65%    |
| 大腸癌<br>(N=100) | 52<br>52%    | 39<br>39%  | 6<br>6%      | 3<br>3%    | 2<br>2%        | 0<br>0%    | 0<br>0%    | 0<br>0%    | 18<br>18%  | 2<br>2%      | 5<br>5%    | 4<br>4%      | 23<br>39.70% | 58<br>58%     |
| PMP<br>(N=353) | 58<br>53.20% | 2<br>1.80% | 2<br>1.80%   | 2<br>1.80% | 0<br>0         | 5<br>4.60% | 1<br>0.90% | 0<br>0     | 1<br>0.90% | 15<br>13.80% | 4<br>3.60% | 15<br>13.80% | 4<br>3.60%   | 109<br>30.90% |
| 卵巣癌<br>(N=133) | 18<br>32.10% | 4<br>7.60% | 12<br>21.40% | 0<br>0     | 1<br>1.80%     | 1<br>1.80% | 0<br>0     | 0<br>0     | 1<br>1.80% | 4<br>7.60%   | 0<br>0     | 0<br>0       | 11<br>19.60% | 56<br>42%     |

図-1 5-アミノレブリン酸リン酸塩 ALA・H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH・H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, M.W. 131.13



## 28) アミノレブリン酸蛍光ガイド手術-2

図-2: 5アミノレブリン酸からプロトポルフィリン9・ヘムの体内合成経路。



### ALA 蛍光ガイド腹膜切除(ALA fluorescence-guided peritonectomy)

開腹2時間前に5ALAを50mlの水やオレンジジュースで経口投与する。全身麻酔下に開腹し、200mlの生食水で腹腔内洗浄細胞診を行なう。その後生理食塩水10Lで腹腔内洗浄療法: Extensive intraoperative peritoneal lavage (EIPL)(第12章、39ページ)を行い腹腔内に遊離している癌細胞を取り除く。室内照明を消し、xenon lamp で紫色405 nmの光を腹膜表面に照射し、PpIXを励起する。赤色の蛍光を発する腫瘍を腹膜とともに切除する。また、腹膜切除後に取り残した腫瘍を発見するために再度 xenon lamp で紫色405 nmの光を腹膜表面に照射し、取り残しがないか調べる。

図-4は卵巣癌の播種である。図-5は微少な転移が多数見られた例であり、白色光下では発見困難な微少な転移も見つけることができる場合がある(図-6)。副作用では嘔気・嘔吐が各1例にみられたのみで、皮膚症状などは認められなかった。

図-3: ALA 蛍光ガイド腹膜切除(ALA fluorescence-guided peritonectomy)

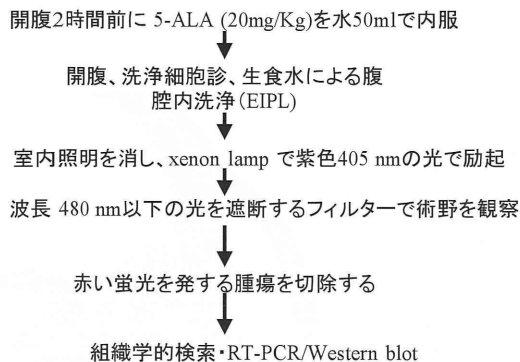


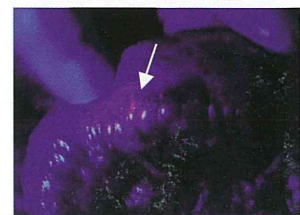
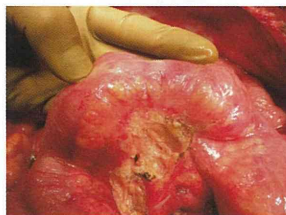
図-4: 卵巣癌の播種。



図-5: 最小0.5mmまで発見できる。



図-6: 白色光下(左)では発見できない微少な転移(右、大きさ0.5mm)。



## 28) アミノレブリン酸蛍光ガイド手術-3

### 癌による蛍光発色の差異

原発巣別の腹膜播種の蛍光発色の差を見たのが表-2である。最も発光率が高かったのが卵巣癌で、86.7%であった。図-7は卵巣癌の発色例で、きわめて強い蛍光が見られる。卵巣癌ではリンパ節転移の診断にも有効である(図-8)。腹膜中皮腫・大腸癌・胆嚢癌・膵癌も発光率が高いが、胃癌・小腸癌は30.8%・33.3%と低かった。胃癌が低かった理由は全例術前化学療法が行われたため、播種巣内の癌細胞の数が減少したためと推察している(図-9)。腹膜偽粘液腫は最も発光率が低かった。腹膜偽粘液腫が発光しにくい理由は腹膜播種の中の癌細胞の占める割合が低いためと思われる。腹膜偽粘液腫では粘液が蛍光を発する場合がある(図-10)。これは偽粘液腫細胞に取り込まれたALAがPpIXに代謝されたあと、細胞外に排出されPpIXが粘液内に蓄積して蛍光を発色したものと思われる。卵巣転移も蛍光を発することがあり、卵巣の温存に役立つ可能性がある(図-11)。

表-2: 原発巣別の腹膜播種の蛍光発色。

| 卵巣癌   | 腹膜中皮腫 | 大腸癌   | 胆嚢癌  | 膵癌    | 胃癌    | 腹膜偽粘液腫 | 小腸癌   |
|-------|-------|-------|------|-------|-------|--------|-------|
| 13/15 | 5/7   | 17/30 | 2/2  | 2/3   | 8/26  | 8/47   | 2/6   |
| 86.7% | 71.4% | 56.7% | 100% | 66.7% | 30.8% | 13.8%  | 33.3% |

図-8: 卵巣癌リンパ節転移のPDD所見。

図-7: 卵巣癌のPDD所見。

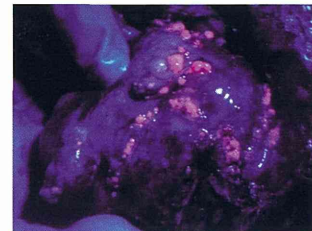


図-9: 胃癌化学療法後のPDD所見。播種は癒痕下し、蛍光を発しない。

図-8B: 405nmの紫色の光で励起後リンパ節転移が蛍光を発している。

図-8A: 白色光

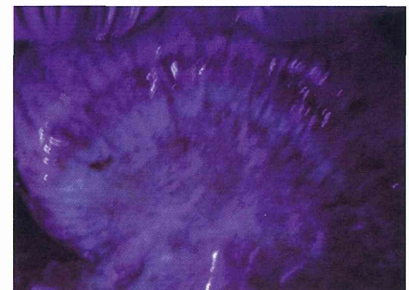
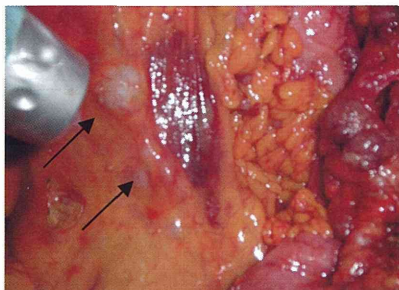


図-10 腹膜偽粘液腫のPDD所見

図-10A: 白色光(横隔膜転移)

図-10B: 405nmの紫色の光 (横隔膜転移)

図-10C: 腸間膜転移

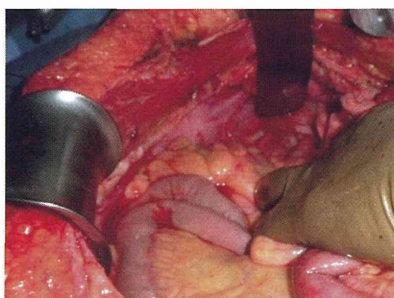
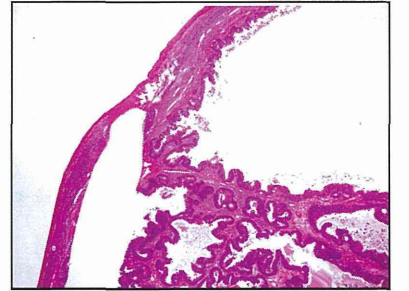
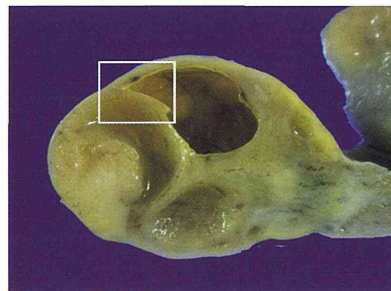


図-11 大腸癌卵巣転移のPDD所見

図-11A: 卵巣転移の蛍光

図-11B: 卵巣の剖面

図-11C: 組織像



## 28) アミノレブリン酸蛍光ガイド手術-4

### ALA経口投与後癌細胞にPpIXが蓄積する理由

PDDを臨床に最初に導入したのが脳腫瘍の領域である。KondoらはALAを投与した脳腫瘍患者のgliomaと正常周辺脳組織のPpIX含量を測定した。励起光で発光したglioma組織のPpIX含量は発光しなかった正常組織より6-10倍を示したとしている(6,7)。ALA 20mg/Kg経口投与後2時間の正常腹膜組織と腹膜播種のPpIX含量は $0.0039 \pm 0.0023$  ng/mg-protein,  $0.0121 \pm 0.0216$  nm/mg-proteinで腹膜播種で有意にPpIX含量が高かった。さらに、ALA投与後赤色の蛍光を発色した腹膜播種のPpIX含量は $0.0158 \pm 0.00252$  nm/mg-proteinで、蛍光を発色しなかった例のPpIX含量 $0.00365 \pm 0.00214$  nm/mg-proteinより有意に高値を示した(図-12)。このようにALA投与後の蛍光発色とPpIXの癌組織内含量には有意な関連が見られた。

5)ALAを摂取したあと癌細胞にPpIXが蓄積する理由にはさまざまな見解がある。

1)癌細胞ではPpIXをHemeに変換する酵素(フェロケラターゼ活性, FeC)の量が低いためPpIXが腫瘍内に蓄積する。

2)過剰なALA投与後ポルフィリン/ヘム代謝経路にnegative feedbackがかかるためPpIXが蓄積する。

3)ALAは癌細胞と親和性があるため、などと考えられてきた。

KanekoらはglioblastomaのFeC活性は周辺正常脳腫瘍のFeC活性より有意に低値を示したとしている(6)。また、FeC活性とミトコンドリア内PpIX量は逆相関し、脳腫瘍組織内のヘム量は正常脳組織より有意に低いとしている(6)。正常脳組織にはBlood Brain Barrier (BBB)が働いているため、経口投与したALAが脳組織内には少ない可能性がある(6)。

一方、腹膜播種を起こしやすい胃癌細胞の細胞内PpIX・FeC活性を示したのが図-13,14である。図-13は1mMのALAを含む培養液で4時間処理したあとの胃癌細胞内PpIX量を示す。細胞内PpIX量はMKN45が最も高く、NKPSが最も低かった。また、640nmの光による光線力学治療効果はPpIX細胞内含量が高いほど細胞致死効果が高かった(図-15)。

ポルフィリン・ヘム代謝経路の8酵素をNorthern Blotで調べたが、酵素のmRNA発現はすべての胃癌細胞株で認められ、発現量に差はなかった(図-14)。このことから、胃癌ではPpIXの細胞内蓄積の理由としてFeCは関連がないと考えられた。

図-12: 5ALA 20mg/Kg経口投与後2時間後の腹膜播種と正常組織のPpIX含量および蛍光発色陽性例と陰性例のPpIX含量。

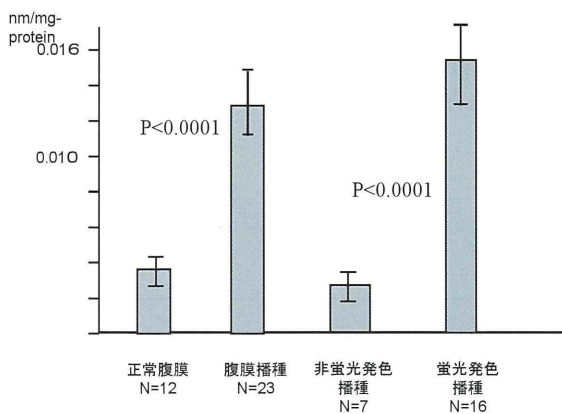


図-13: 1mMのALAを含む培養液で4時間処理したあとの胃癌細胞内PpIX量。

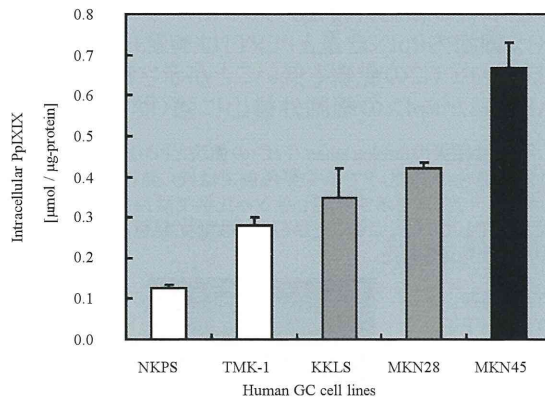


図-14: 胃癌培養細胞株のヘム・ポルフィリン代謝経路の酵素発現(Northern blot法)。

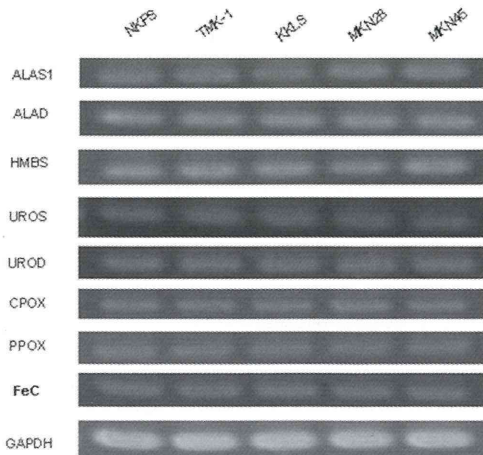
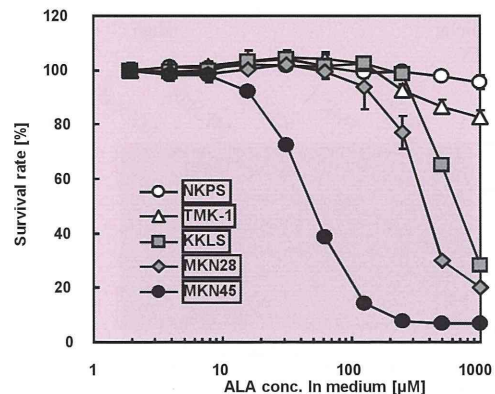


図-15: 胃癌培養細胞株の光線力学治療効果。640nmの光線治療(1080mJ/m<sup>2</sup>/5分間のLED照射)によりPpIX含量に依存して細胞は死滅する(KKLS,MKN28,MKN45)。しかし、NKPS/TMK-1はALA濃度が上がっても耐性を示す。この原因はp53遺伝子の変異が関連する。P53遺伝子野生型(KKLS,MKN28,MKN45)はPDT感受性が高く、変異型(TMK-1,NKPS)は耐性を示す。縦軸: 生存細胞量をMTT法で測定、横軸: 細胞内ALA含量。



## 28) アミノレブリン酸蛍光ガイド手術-5

図-16は腹膜播種のFeCとPDDにおける蛍光発色の関連を示したものである。4例の蛍光を発した播種巣(図のP)のFeC量は2例で多いが、2例では低かった。一方、蛍光を発しなかった5例(図のN)では1例でFeCの発現が見られたが、4例ではFeCの発現は低下していた。このようにFeCの発現と蛍光発色は関連が見られなかった。最近我々のグループはALAの細胞内移行に細胞膜に存在するtransporter・peptide transporter PEPT1 (ALA influx transporter: 図-2のA) が関与することを明らかにした。また、PpIXの細胞外排出にATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2 (porphyrin efflux transporter: 図-2のB) が深く関わっていることを見出した(5,8)。**ALA細胞内移送・PpIX細胞外排出に関わる分子の発現(Detection of PEPT1 and ABCG2 expression levels)** 組織からTotal RNA を抽出 cDNAをRTで合成した。その後、PEPT1, ABCG2,  $\beta$ -actin の特異プライマー(センス・アンチセンス)でpolymerase chain reaction (PCR)を行なった(Thermal Cycler Dice Mini (TaKaRa Bio, Otsu, Japan)。型のごとく2.5% agarose gel electrophoresisを行い特異バンドを紫外線下でethidium bromide で検出した。

### Immunoblot analyses、免疫染色

Immunoblot analyses は ヒトFeC/PEPT1 polyclonal antibody (H-235:1:200 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), BXP-21 specific to human ABCG2- monoclonal antibody (1:200 dilution; Convince Research Products, Emeryville, CA), rabbit muscle GAPDH monoclonal antibody (1:1000 dilution; American Research Products, Belmont, MA) を用いた[5]。2次抗体にはanti-mouse IgG HRP-conjugated antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) とanti-rabbit IgG HRP conjugates (Santa Cruz Biotechnology, 1:3000 dilutions)を用いた。免疫染色は各々の抗体を200倍希釈し、酵素抗体法で染色した(図-20~25)

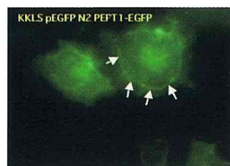
### 結果

#### 胃癌培養細胞株

胃癌培養細胞株を1mMのALAを含む培養液で4時間処理したあとのALAの細胞内移送トランスポーターであるPEPTとPpIXの細胞外排出トランスポーターABCG2 mRNA・蛋白発現と細胞内PpIX発現の関連を示した(図-17,18)。細胞内PpIX含量とPEPT1は有意に相関したがPEPT2との関連はなかった。一方、PpIXの細胞内含量が低いほどABCG2の発現も低いことが示された。このことから胃癌細胞培養株ではPEPT1が5-ALAの細胞内移行に、ABCG2がPpIXの細胞外排出に強く関わっている可能性が示された。

図-16: 腹膜播種巣のferokeratase (FeC)の発現とPDDにおける赤色蛍光発色の関連。Pで示す発色例ではFeC発現は2例に見られた。一方、Nで示す発色しなかった例ではFeCは4例で発現が低下していた。このことからFeCは蛍光発色との関連が少ないと考えられた。

PEPT1の局在。  
PEPT1遺伝子を過剰発現させた胃癌細胞KKLSの細胞膜上に局在する。



FeC  
 $\beta$ -Actin

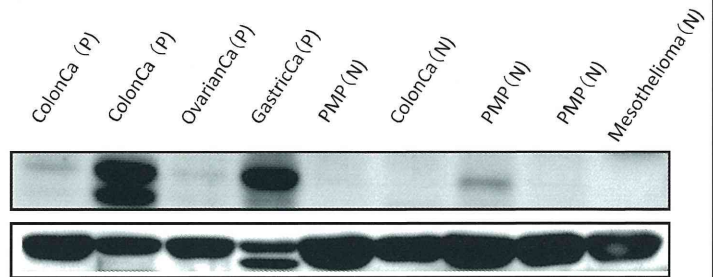


図-17: 胃癌培養細胞株のALA/PpIX膜移送トランスポーターのmRNA発現と蛍光発光度・PpIX細胞内含量(RT-PCR)。

発光しやすい細胞株ほどPpIX発現が多い。

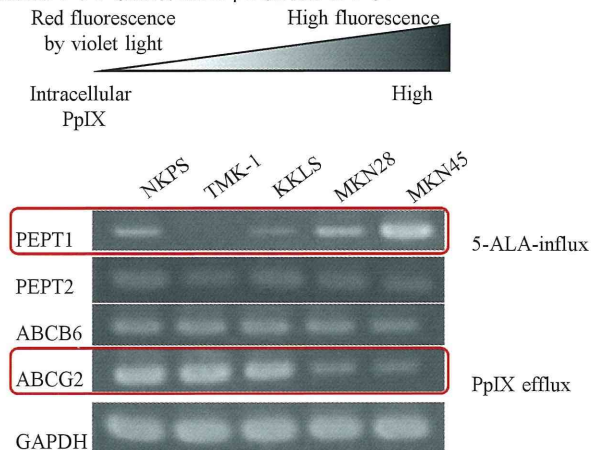
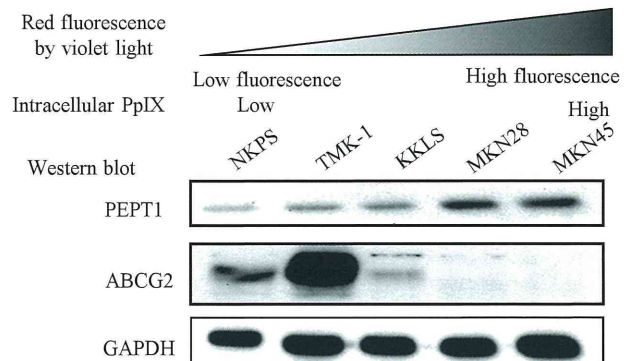


図-18: 胃癌培養細胞株のALA/PpIX膜移送トランスポーター蛋白の発現と蛍光発光度・PpIX細胞内含量(Western blot)。発光しやすい細胞ほど細胞内PpIX量が多い。





## 28) アミノレブリン酸蛍光ガイド手術-6

### 腹膜播種・正常組織のPEPT1, ABCG2 mRNAの発現(RT-PCR法) Characterization of porphyrin biosynthesis pathway-related genes PEPT1 and ABCG2 expression levels in ALA-PDD positive specimens of patients with peritoneal metastasis

図-19に腹膜播種巣と正常腹膜のPEPT1, ABCG2 mRNAの発現をRT-PCRで検査した7例の結果を示す。正常腹膜ではPEPT1の発現はなく、発光もみられなかった。一方、ABCG2 mRNAは正常腹膜で14例中12例(86.7%)に発現していた。表-3に腹膜播種巣のPEPT1発現(RT-PCR)とPDD発光陽性率の関係を示す。PEPT1 mRNA発現例は有意にPDD発光陽性例が多かった。PEPT1 mRNA発現23例中PDD発光陽性例は12(52.2%)例であったが、PEPT1陰性例41例ではPDD発光例は11例(23.6%)で有意差を認めた(P<0.001)。

一方、ABCG2 mRNA発現23例中PDD発光陽性例は12(52.2%)例であったが、ABCG2陰性例31例ではPDD発光例は4例(12.9%)で有意差を認めた(P<0.001)。また、PEPT1 mRNAとABCG2 mRNA発現には有意な関連があった(表-5)。PEPT1 mRNA陽性13例中ABCG2 mRNA陽性は12例(92.3%)であった。PEPT1 mRNA陰性41例中ABCG2 mRNA陰性は37例(90.2%)で有意差を認めた。

#### PEPT1 mRNA・ABCG2 mRNA発現と癌組織内PpIX

PEPT1 mRNA陽性9例の腹膜播種組織内PpIX含量は $0.0200 \pm 0.0333$ nm/mgであったが、PEPT1 mRNA陰性(N=6)では $0.0023 \pm 0.0019$ nm/mgで、PEPT1 mRNA陽性例で有意に高かった(P<0.0001)。ABCG2 mRNA陽性・陰性例の腹膜播種組織内PpIX含量は $0.0692 \pm 0.0085$ ,  $0.0180 \pm 0.0380$ nm/mgと、陽性例で有意に高かった(P=0.00078)。図-20は癌細胞と小腸絨毛上皮細胞のPEPT1局在を示す。PEPT1は細胞膜上に発現している。

以上より、405nmの励起光照射後のPDD初光陽性例は腹膜播種組織内PpIX含量が有意に高かった。今回のRT-PCRの成績ではPDD発光陽性とPEPT1遺伝子およびABCG2遺伝子発現の相関が見られた。一方、FeCの発現とPDD蛍光には相関がなかった。PEPT1 (ALA influx transporter)遺伝子とABCG2 (porphyrin efflux transporter)遺伝子の発現が見られる例では腹膜播種組織内PpIXの蓄積が起こる結果、癌組織が蛍光を発することが明らかになった。PEPT1によりALAが細胞内に取り込まれ、FeCの発現と関係なく細胞内にPpIXが蓄積する。ABCG2発現とPEPT1の発現は有意に相関する。ABCG2発現例はPEPT1を同時に発現しているため、細胞内PpIX含量が上がる。ABCG2発現がある例ではPpIXが癌細胞の外に排出されるが、癌細胞周辺の間質にPpIXが蓄積する結果強い蛍光を発すると考えられた。

正常腹膜組織はPEPT1は発現していないため組織内PpIXは低かった。また、正常腹膜組織はABCG2を発現しているため、合成されたPpIXを細胞外・腹腔内に排出するため生食水による十分な洗浄後はPDDによる発光がみられないと考えられた。

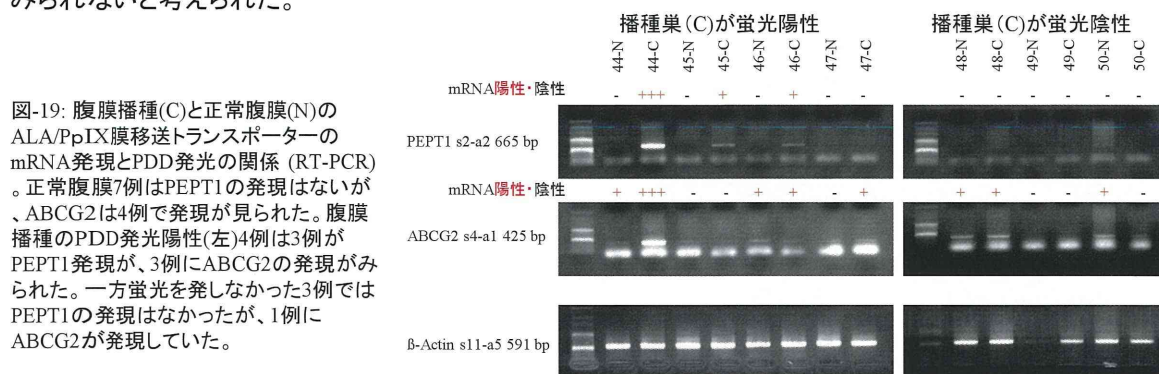


図-19: 腹膜播種(C)と正常腹膜(N)のALA/PpIX膜移送トランスポーターのmRNA発現とPDD発光の関係(RT-PCR)。正常腹膜7例はPEPT1の発現はないが、ABCG2は4例で発現が見られた。腹膜播種のPDD発光陽性(左)4例は3例がPEPT1発現が、3例にABCG2の発現がみられた。一方発光を发しなかった3例ではPEPT1の発現はなかったが、1例にABCG2が発現していた。

表-3: PDD発光とPEPT1 mRNA発現(P<0.0001)

| PEPT1 mRNA | PDD発光陰性 | PDD発光陽性 | 計  |
|------------|---------|---------|----|
| 陰性         | 30      | 11      | 41 |
| 陽性         | 1       | 12      | 13 |
| 計          | 31      | 23      | 54 |

表-4: PDD発光とABCG2 mRNA発現(P=0.002)

| ABCG2 mRNA | PDD発光陰性 | PDD発光陽性 | 計  |
|------------|---------|---------|----|
| 陰性         | 27      | 11      | 38 |
| 陽性         | 4       | 12      | 16 |
| 計          | 31      | 23      | 54 |

表-5: PEPT1 mRNAとABCG2 mRNAの発現(P<0.0001)

| PEPT1 mRNA | ABCG2 陰性 | ABCG2 陽性 | 計  |
|------------|----------|----------|----|
| 陰性         | 37       | 4        | 41 |
| 陽性         | 1        | 12       | 13 |
| 計          | 38       | 16       | 54 |

表-6: PEPT1 mRNA/ABCG2 mRNAの発現と腹膜播種組織内PpIX含量。

| Transporter mRNA | PpIX腹膜播種組織内含量             |                           | P<0.0001 |
|------------------|---------------------------|---------------------------|----------|
|                  | mRNA陰性                    | mRNA陽性                    |          |
| PEPT1 mRNA       | $0.0023 \pm 0.0019$ nm/mg | $0.0200 \pm 0.0333$ nm/mg |          |
| ABCG2 mRNA       | $0.0180 \pm 0.0380$ nm/mg | $0.0692 \pm 0.0085$ nm/mg |          |

## 28) アミノレブリン酸蛍光ガイド手術-7

### 卵巣癌患者におけるALA PDDの診断能

ALAを投与した20例の卵巣癌腹膜播種のPDD発光を調べた。赤色発光は19例に見られた。158個の生検の病理診断と蛍光発生の関連を調べた。白色光下で播種と判断し採取した40個はすべて癌巣であったが、正常組織と判定した40個中5個に組織学的に癌を認めた。赤色蛍光を発生し、癌と判定した38例はすべて組織学的に癌であった。一方、赤色発光を認めなかった40個中3個の組織学的に癌をみとめた。ALA蛍光ガイド手術の偽陰性は7.5%であった(表-7)。

このように卵巣癌では腹腔内の微少な病変の発見に5-ALAによるPDDは極めて有用な方法であると考えられた(4,5,6,7,8)。

### PEPT1/ABCG2/Fecの癌細胞での発現

図-20・23,25は大腸癌・腹膜中皮腫細胞のPEPT1の局在を示す。細胞質や細胞膜に活性がみられる。正常な組織では小腸の絨毛上皮の刷子縁に発現している(図-20A)。ABCG2の免疫染色でも小腸の絨毛上皮の刷子縁・癌細胞の細胞質や細胞膜に活性が認められる(図-21,24,26)。Fec活性は細胞質に認められる(図-22,27)。

PEPT1の免疫組織陽性例は有意にPDD発光陽性例に多かった(表-8)。また、ABCG2免疫組織陽性例は有意に高いPDD発光陽性反応を示した(表-9)。このようにPEPT1・ABCG2免疫染色がPDD陽性率と良く相関することから、ALA PDDの適応を決定するのにPEPT1/ABCG2免疫染色が有用であると思われる。

表-7: 白色光とALA蛍光ガイド手術による肉眼的診断と病理学的診断

|        | 病理学的診断 |       |         |
|--------|--------|-------|---------|
|        | 癌細胞陽性  | 癌細胞陰性 |         |
| 白色光    |        |       |         |
| 腫瘍     | 40     | 0     | P<0.001 |
| 正常     | 5      | 35    |         |
| PDD    |        |       |         |
| 赤色蛍光陽性 | 38     | 0     | P<0.001 |
| 赤色蛍光陰性 | 3      | 37    |         |

図-20A: 小腸絨毛上皮のPEPT1局在

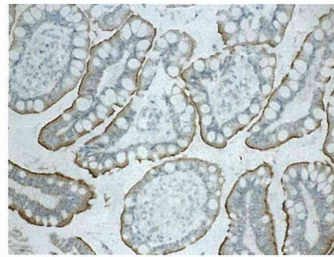


図-20B: 大腸癌細胞のPEPT1局在

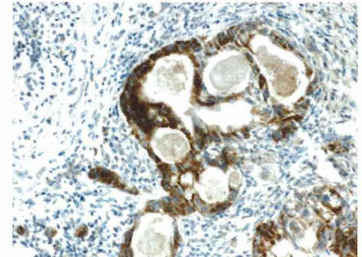


図-21: 大腸癌のABCG2の発現

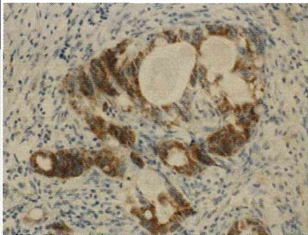


図-22: 大腸癌のFecCの発現

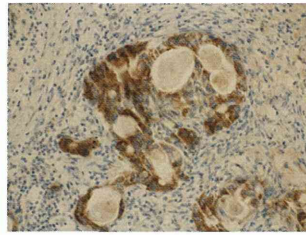


図-23: 大腸癌のPEPT1の発現

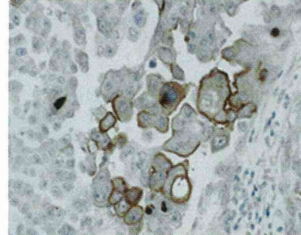


図-24: 大腸癌のABCG2の発現

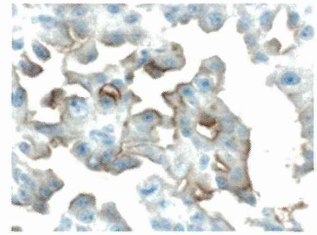


図-25: 腹膜中皮腫のPEPT1の発現

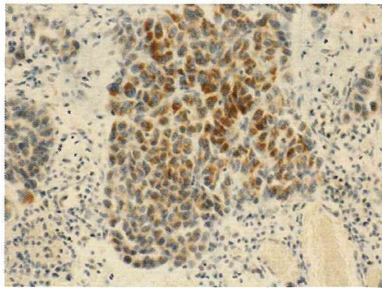


図-26: 腹膜中皮腫のABCG2の発現

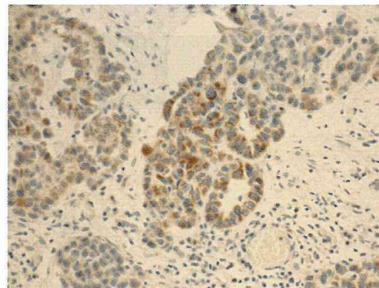


図-27 腹膜中皮腫のFecCの発現

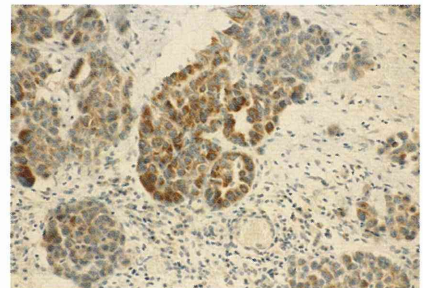


表-8: PEPT1免疫染色とPDD発光との関連

P=0.0019

| PEPT1 Expression | PDD negative | PDD positive | total |
|------------------|--------------|--------------|-------|
| negative         | 22           | 10           | 32    |
| positive         | 14           | 29           | 43    |
| total            | 36           | 39           | 75    |

表-9: ABCG2免疫染色とPDD発光との関連

P=0.0038

| ABCG2 mRNA Expression | PDD negative | PDD positive | total |
|-----------------------|--------------|--------------|-------|
| negative              | 15           | 5            | 20    |
| positive              | 21           | 34           | 55    |
| total                 | 36           | 39           | 75    |