

肉眼所見

- 非自己免疫性慢性膵炎では白色の線維化を伴う病変として認められる。線維化はびまん性で膵組織を置換するパターンや小葉周囲にみられる場合などがある。出血、壊死、偽嚢胞、膵石などを伴う。腫瘍類似病変として切除される症例においても、白色の線維化や黄色調の脂肪壊死、小さな嚢胞や石灰化などがみられることが多い(図1)。
- 自己免疫性膵炎は例外を除き、壊死、膿瘍、膵石を認めない。膵癌と同様に線維化がみられ、組織全体が置換されていることが多いが、部分的に膵小葉が線維化に囲まれて残存してみられることもある(図2)。

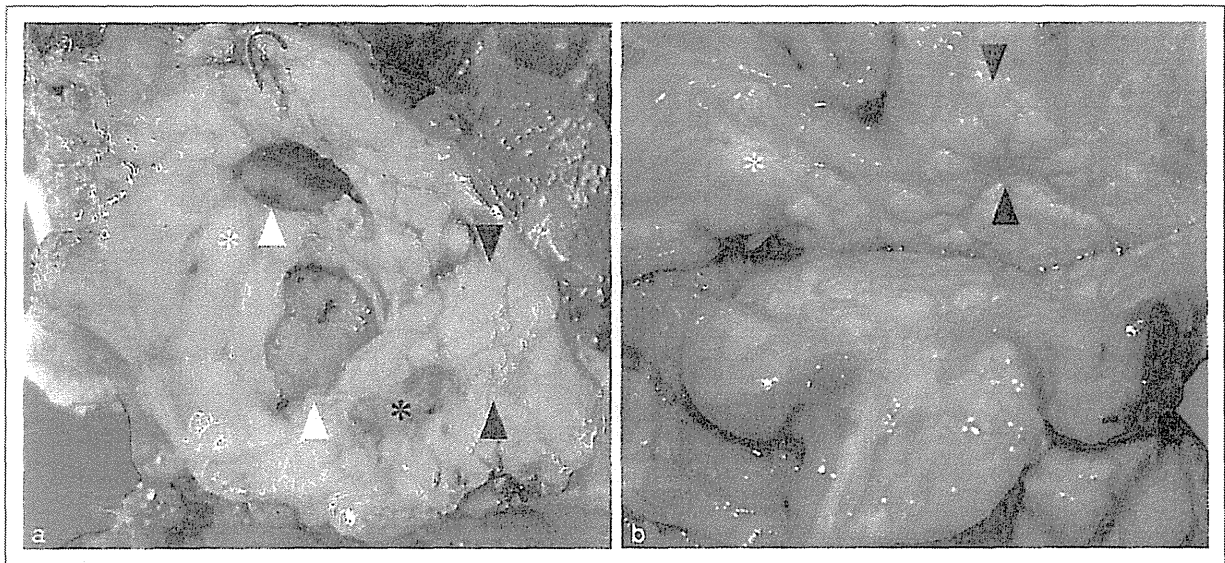


図1 非自己免疫性慢性膵炎の肉眼像

a: 肉眼像において多彩である。線維化は、びまん性線維化[\* (白)], や小葉周囲性にみられることが多い(▶)。そのほか肉芽組織[\* (黒)]や嚢胞形成がみられる(▷)。

b: びまん性線維化[\* (白)]および小葉周囲性線維化(▶)。

膵

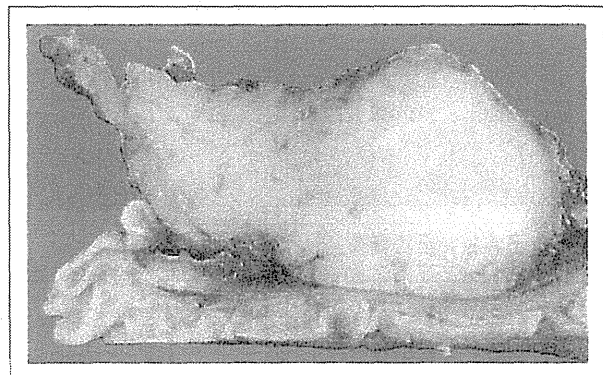


図2 自己免疫性膵炎の肉眼像

切除症例においては境界の比較的明瞭な場合が多い。線維化はびまん性にみられるが、辺縁部には小葉の残存がみられる。

## 組織学的所見

- 非自己免疫性慢性膵炎 図3 では出血、壊死、偽嚢胞、膵石を認めることが多い。肉眼的に膵石が認められない場合でも、拡張した膵管内に小さな蛋白栓をしばしば多数認める。膵管は拡張、蛇行し、上皮が脱落している部分も多い。線維化巣は細胞が疎で基質に富む。炎症細胞浸潤は比較的乏しく、膵管周囲、壊死部、石灰化の周囲などに局在する。ヘモジデリン貪食組織球もしばしばみられる。糖尿病を合併した症例では Langerhans 島の硝子化もみられることがある。
- 1型自己免疫性膵炎では非自己免疫性慢性膵炎と比較すると炎症細胞浸潤を伴っており、間質細胞は密である 図4a。炎症細胞はリンパ球、形質細胞が主体であり膵管周囲に線維化を伴ってみられる 図4b。線維化は storiform fibrosis が基本であり、膵周囲にも線維化が及ぶことがある 図4c、d。また、血管周囲や神経周囲にも炎症細胞浸潤がしばしばみられる 図4e、f。出血、壊死、偽嚢胞、膵石は基本的には認めない。
- 2型自己免疫性膵炎においては壊死や嚢胞、石灰化を認めない点は1型と類似しているが、以下の相違がある。まず、好中球浸潤が目立ち、上皮内への浸潤もみられ、上皮の脱落を伴う。この所見は granulocytic epithelial lesion (GEL) と

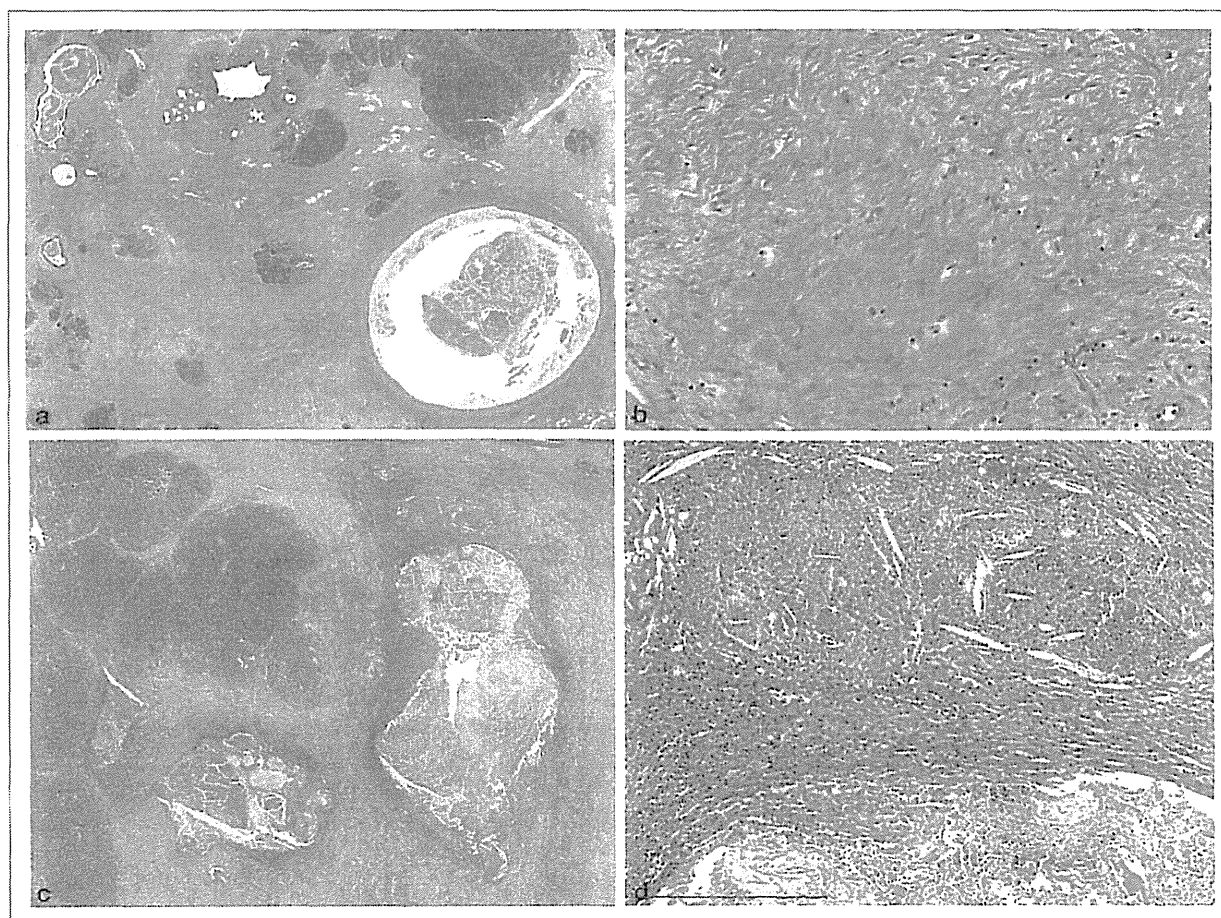


図3) 非自己免疫性慢性膵炎

- a: 弱拡大において基質に富む線維化がみられ、拡張した膵管が蛋白栓を含有してみられる。  
 b: 線維化巣は基質に富み、細胞成分は少ない。  
 c: 膵管内に蛋白栓と膵管上皮の脱落がみられる。  
 d: 上皮の脱落した膵管周囲には壊死やコレステリン間隙がみられる。

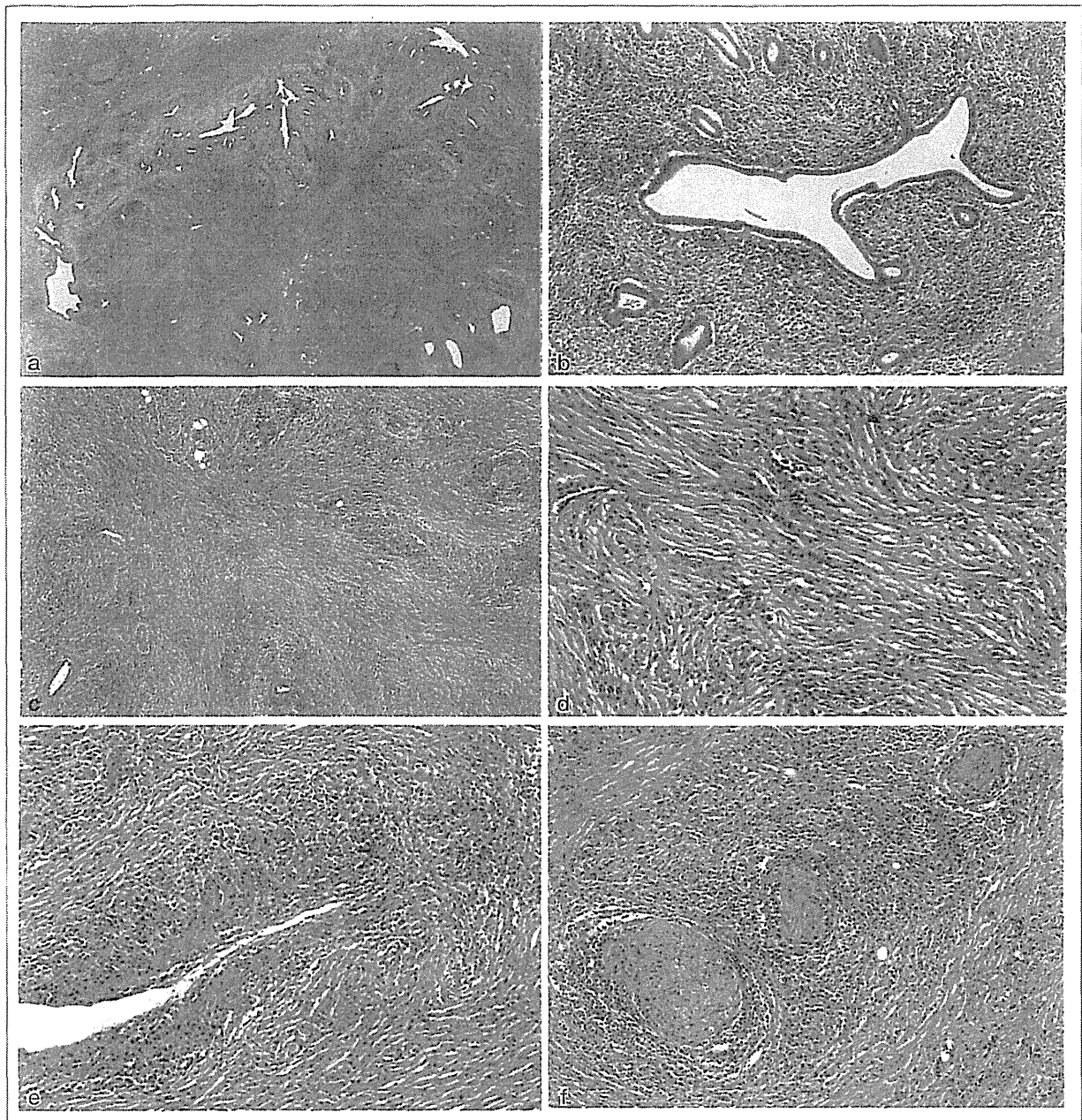


図4 1型自己免疫性膵炎

- a: 弱拡大において炎症細胞浸潤を伴う線維化がみられる。全体として細胞成分に富む。
- b: 膵管周囲に線維化を伴う炎症細胞浸潤がみられる。
- c, d: 間質の線維化はリンパ球などの炎症細胞浸潤を含み、細胞密度が高く、花むしろ状の配列を呈する。
- e, f: 静脈周囲や神経周囲にもリンパ球、形質細胞浸潤がみられる。

呼ばれる 図5。線維化は周囲脂肪組織には及ばず、程度も軽度であることが多い。血管周囲の炎症も乏しい。組織内の IgG4 陽性細胞数も少ない傾向がある。1型と2型の鑑別には組織学的検索が重要と考えられる。

### 免疫組織化学

- 自己免疫性膵炎では IgG4 陽性リンパ球がびまん性にみられる。強拡大1視野10以上が判定の目安となる。癌に随伴する炎症でも IgG4 陽性細胞浸潤がみられることがあるが、血管周囲などに限局しており、浸潤細胞数も少ない。

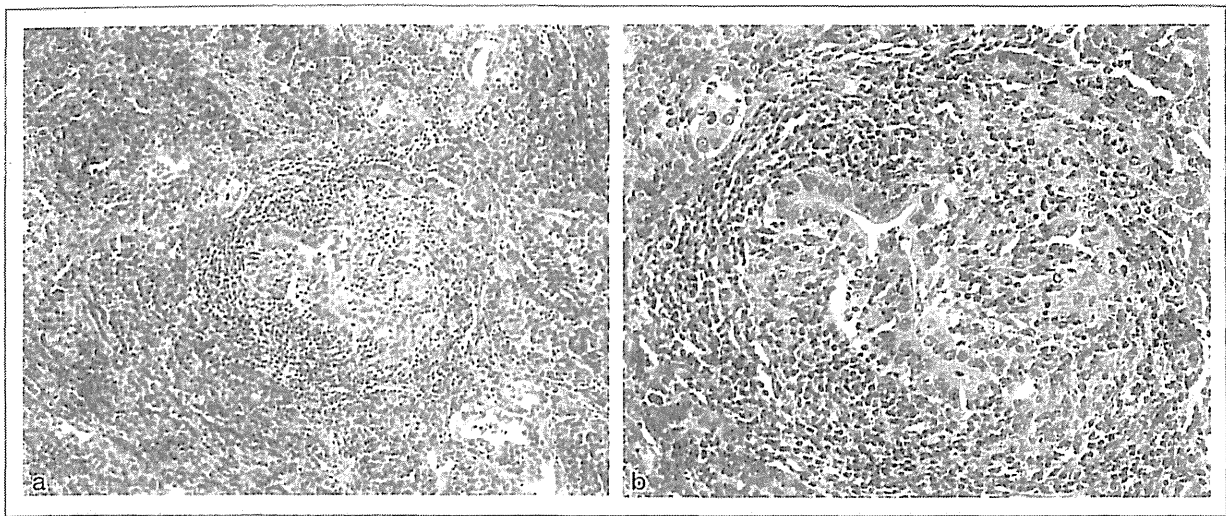
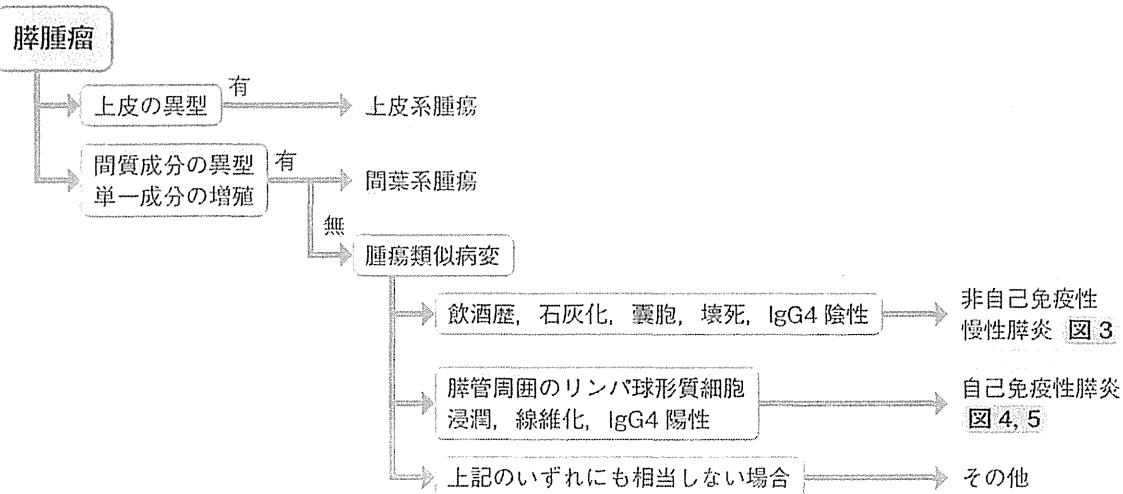


図5 2型自己免疫性膵炎におけるGEL  
膵管上皮内に好中球を含む炎症細胞浸潤がみられ、上皮の脱落を伴っている (a:弱拡大, b:強拡大).

## 鑑別診断

腫瘍類似病変



### 診断のポイント

- ・ 膵腫瘍を臨床的に疑って切除や生検が施行される症例のなかには非腫瘍性、腫瘍類似病変が存在することを念頭に置く。
- ・ まれではあるが膵原発、間葉系腫瘍も存在することを念頭に置く。
- ・ 腫瘍類似病変の多くは自己免疫性膵炎と非自己免疫性慢性膵炎であり、わが国における自己免疫性膵炎のほとんどが1型自己免疫性膵炎である。
- ・ 自己免疫性と非自己免疫性の鑑別には石灰化、嚢胞、壊死などの肉眼所見、リンパ球形質細胞浸潤などの組織学的所見のほか、IgG4陽性形質細胞の確認が有用である。一方、2型自己免疫性膵炎などIgG4陽性形質細胞が少ない自己免疫性膵炎も存在するので注意が必要である (あくまでも診断補助マーカーである)。

- まれではあるが腭原発の間葉系腫瘍が存在する。そのうち特に充実性で紡錘形細胞からなる腫瘍は腫瘍類似病変との鑑別に挙がる。

▶ 神経鞘腫 (schwannoma)

- 腭原発 schwannoma の頻度は低い。
- 紡錘形細胞が palisading pattern を呈してみられる場合には神経系マーカーの免疫染色が必須である。一部の症例では囊胞性変化などの二次的変化を生じることもある。

▶ 炎症性筋線維芽細胞性腫瘍 (inflammatory myofibroblastic tumor) および悪性線維性組織球腫 (malignant fibrous histiocytoma)

- いずれもまれな疾患であるが、線維芽細胞に異型や核分裂像がみられる場合は鑑別に挙げるべきである。
- p53 免疫染色は腫瘍性の判定に有用と報告されている。

(小嶋基寛)

## 膵・胆道癌診療の新時代へ—診断と治療の新たな展開—

## 何故、牛蒡子か？

池田 公史<sup>1)</sup>・江角 浩安<sup>2)</sup>

要約：膵癌が極めて予後不良である原因の一つは、乏血管性により抗癌剤が到達しにくく、低酸素と低栄養のため抗癌剤が効果を発揮しにくいことである。この栄養飢餓耐性を獲得した癌細胞に有効な薬剤として、アルクチゲニンを同定した。アルクチゲニンの抗腫瘍性を膵癌細胞株およびゼノグラフトで再確認し、毒性試験にて毒性がないことを確認した。アルクチゲニンを多く含む牛蒡子エキス剤を製剤化（GBS-01）し、ゲムシタピン不応膵癌患者を対象として、GBS-01の第Ⅰ相試験を施行した。GBS-01と関連のある有害事象はほとんど無く、ゲムシタピンとS-1併用療法に不応の患者1名に部分奏効が得られた。現在、ゲムシタピンとフツ化ピリミジン系抗癌剤に不応の膵癌患者を対象として、多施設共同第Ⅱ相試験が進行中である。GBS-01は、栄養飢餓状態で有効性を発揮するという独創的なコンセプトを持つ抗癌剤であり、今後もさらなる開発を進めていく予定である。

Key words：牛蒡子，アルクチゲニン，栄養飢餓耐性，ミトコンドリア複合体Ⅰ

## はじめに

進行膵癌に対する化学療法は、ゲムシタピン+エルロチニブ療法、FOLFIRINOX療法やゲムシタピン+ナブパクリタキセル療法の延命効果が示され、近年、急速に進歩している。しかし、これらの治療法でも効果が得られなかったり、耐性を示したりと、その治療効果はまだ十分ではなく、膵癌患者の予後は不良である。その理由として、大部分の膵癌では、血管造影、造影CT、MRIなどによって乏血管性が認められ、血流が少ないために酸素が十分供給されない低酸素環境下となり、それによって抗癌剤の抗腫瘍効果が減弱する可能性が指摘されている。牛蒡子の主成分であるアルクチゲニンは、これらの低酸素・低栄養状態の癌細胞に対して選択的な抗腫瘍効果を示すことが判明し、膵癌に対して有効性が期待できると考え、臨床研究を進めている。本稿では、膵癌に対する牛蒡子のこれまでの開発の経緯について、解説する。

## Ⅰ. 何故、牛蒡子か？

膵癌の一つの大きな特徴は、乏血管性である。一般に、腫瘍が増殖進展する時には盛んな増殖を支えるため腫瘍血管の増生が必要とされている。肝癌や腎癌はその典型であり、盛んな腫瘍血管増生が癌化の目印である。細胞が分裂するためには細胞の構成成分であるDNA、RNAはもとより、タンパク質、脂質、糖タンパクなどすべてが2倍になる必要があり、これらを合成するための莫大なエネルギーがATPの形で必要である。そこで、膵癌のように乏血管性、血流不足の状態では、如何にして可能なのか？という疑問が生じた<sup>1)</sup>。一般に、癌が乏血管性、血流不足の状態になると、下記のような状態が生じてくる。

①膵癌に限らず多くの固形癌は強い低酸素状態にあり、低酸素と悪性度が相関する。

②固形癌組織のメタボローム解析をすると、グルコース濃度が多くの場合極めて低い<sup>2)</sup>。

③膵癌細胞株などは栄養欠乏に耐性を示す<sup>3)</sup>。

④グルコース依存性の癌細胞でも低酸素にすると、耐性を誘導できる<sup>4)</sup>。

⑤既存の抗癌剤は低酸素・低栄養条件では効果が失われる<sup>5)</sup>。

Why is Goboushi ?

Masafumi Ikeda et al

1) 独立行政法人国立がん研究センター東病院肝胆膵内科 (〒277-8577 千葉県柏市柏の葉 6-5-1)

2) 学校法人東京理科大学生命医科学研究所

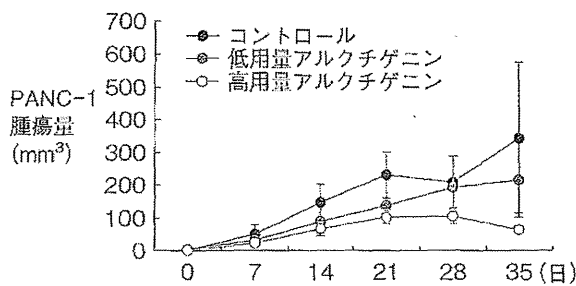


図1 ゼノグラフトでのアルクチゲニンの抗腫瘍性

これらのことから、低酸素・低栄養状態で抗腫瘍性を示す抗癌剤の開発が必要と考え、癌細胞の示す栄養飢餓耐性を解除する化合物をスクリーニングした。各種の化合物ライブラリーや放線菌の培養濾液などをスクリーニングし、現在までに20種類以上の候補を見出している。その中で、約500種類の伝統薬の阻抽出液の活性を調べた時に、最も活性の高かったのが牛蒡子であった。富山医科薬科大学（当時）和漢薬研究所 Suresh Awale 博士、門田重雄教授との共同研究で牛蒡子の活性本体がリグナンの一種アルクチゲニンであることを突き止めた<sup>6)</sup>。アルクチゲニンはベトリ皿の中では血清の存在で活性が低下するが、アルクチゲニンの IC50 が 1 μM 程度であり、活性が低下しても十分に効果が期待できると考えた。動物でも、数種類のヒト膀胱癌細胞株のゼノグラフトで抗腫瘍性を示した（図1）。アルクチゲニンは、グルコースなど栄養が十分に存在すれば毒性を示さなかったため、生体では低毒性と予想した。実際、マウスで4週間の毒性試験を行ったが、抗腫瘍性を示す投与量の100倍まではさしたる影響を認めなかった。

## II. アルクチゲニンはどの様に抗腫瘍効果を示すか？

アルクチゲニンは、培養細胞ではグルコース欠乏時に選択毒性を強く示す（図2）。細胞をグルコース欠乏培地に置くと極めて速やかに PI3K/AKT 系の活性化が起こる。この活性化は、グルコース代謝の中間産物の減少により引き金を引かれる NOX4 による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の産生により引き起こされることが分かっている。当初、アルクチゲニンの存在下では PI3K/AKT の活性化が強く抑制されるので、PI3K/AKT 系による生存シグナルの抑制が細胞死のメカニズムではないかと考えていた。その後、アルクチゲニンはミトコンドリアの複合体 I を阻害すること、グルコース欠乏下では強く活性酸素を産生することが明らかになった<sup>7)</sup>。グル

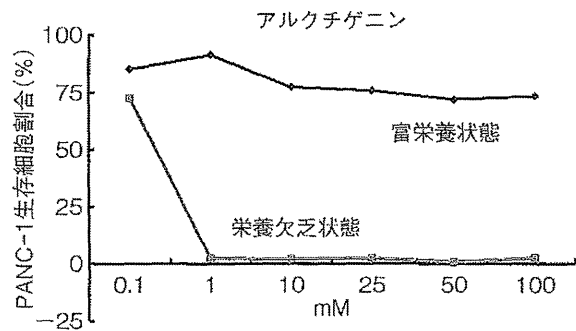


図2 アルクチゲニンの抗腫瘍性

コース欠乏条件ではミトコンドリアへの依存性が高くなると予想され、ミトコンドリア複合体 I の阻害によるエネルギー枯渇が細胞死の原因と考えられた。しかし、活性酸素の発生を抑えることにより細胞死は強く抑制されたため、細胞死の直接の原因は強い活性酸素の発生と考えている。

乏血管性の悪性腫瘍はどこでも低酸素・低グルコース状態であろうか？ たとえ乏血管性の腫瘍の典型である膀胱癌でも血流の盛んな腫瘍血管の周りと毛管から距離のある、あるいは血流の極めて悪い部分とは入り交じっており、腫瘍の微小環境は多彩 (heterogenous) である。アルクチゲニンは、この多彩な組織の中で、灌流の悪い部分に、より強い効果を示すと考えられる。アルクチゲニンとよく似た作用を示すキガマイシン D で治療すると microvessel density は却って高くなり抗 VEGF 抗体による normalization のような効果が観察されている<sup>8)</sup>。

抗癌剤や各種の治療に抵抗性を示す“癌幹細胞”は、低酸素・低栄養ニッチに存在するという考えがある。実際、われわれの用いているヒト膀胱癌細胞株でもこの様な条件にすると CD44, CD24, CD133 などの幹細胞マーカーの発現が増加する。アルクチゲニンは、実は癌幹細胞フラクションにより強い効果を示すのではないかと考え、*in vitro* およびゼノグラフトモデルで検討した結果、予想通り癌幹細胞マーカー陽性細胞の強い減少をみる事ができた。その作用メカニズムから考えてもアルクチゲニンは単剤で用いるよりも、抗 VEGF 抗体と同じように抗癌剤との併用に強い効果が期待される。実際、MIAPACA2 などを用いたゼノグラフトではイリノテカンとの併用で有意に腫瘍の消失が認められている。

## III. GBS-01 とは？

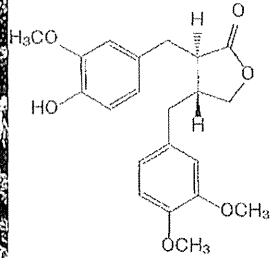
このように、アルクチゲニンが膀胱癌に対して抗腫瘍



Arctium lappa (牛蒡子)



牛蒡子  
GoBouShi



Arctigenin

→GBS-01

図 3 アルクチゲニン

性を示すことが明らかになり、肺癌患者を対象として、アルクチゲニンの臨床試験を行うこととなった。しかし、アルクチゲニンを精製して、薬剤化することはすぐには困難であるため、アルクチゲニンを多く含む牛蒡子を用いることとなった。牛蒡子は第十六改正日本薬局方に収載されている生薬であり、*Arctium lappa* Linne の果実である。牛蒡子を含有する漢方製剤は、一般用医薬品、医療用医薬品として製造販売され、広く国内の臨床現場で使用されている。また、臨床研究において牛蒡子エキス量として 4.0 g/日までの忍容性が確認されており、特記すべき毒性所見が認められていない。この牛蒡子の抽出液を減圧濃縮し、噴霧乾燥ののち賦形剤を加えて顆粒とした牛蒡子エキス製剤が GBS-01 (GoBouShi) である (図 3)。

#### IV. GBS-01 の臨床試験

まずは、GBS-01 の安全性を確認する目的で、第 I 相臨床試験を計画した<sup>9)</sup>。主要評価項目は GBS-01 の投与量規制毒性とし、投与量規制毒性を含めて有害事象を検討し、第 II 相臨床試験での推奨用量を決定することとした。副次的に有効性も評価した。対象は、病理組織学的に診断された進行肺癌で、ゲムシタビン不応の進行肺癌患者とした。

GBS-01 は、レベルを 3 段階に設定し、各レベル 3 名の用量漸増試験を行った。レベル 1: 2 包 (牛蒡子エキスとして 1.0 g)/回、レベル 2: 5 包 (牛蒡子エキスとして 2.5 g)/回、レベル 3: 8 包 (牛蒡子エキスとして 4.0 g)/回とし、GBS-01 を 1 日 1 回連日経口投与することとした。投与量規制毒性は GBS-01 投与後 28 日

までの Grade 4 の血液毒性、Grade 3 以上の非血液毒性とした。有害事象は CTC AE ver 4.0、抗腫瘍効果は RECIST1.1 にて判定した。

レベル 1: 3 名、レベル 2: 3 名、レベル 3: 9 名、計 15 名が登録された。レベル 3 で投与量規制毒性の評価不能であった 3 名を除く 6 名において、投与量規制毒性の発現は認めなかった。主な Grade 3 以上の有害事象については、 $\gamma$ GTP 上昇 (46.7%)、高血糖 (33.3%)、ビリルビン増加 (20.0%)、AST 増加 (6.7%)、ALT 増加 (6.7%)、ALP 増加 (6.7%) が認められた (表 1) が、いずれも原病に起因すると考えられた。また、有効性に関しては、15 名中 1 名 [ゲムシタビン+S-1 療法施行後、増悪を認めた症例に部分奏効 (PR) (5 ヶ月継続)]、4 名において安定 (SD) が認められた。無増悪生存期間の中央値は 1.05 ヶ月、全生存期間は 5.68 ヶ月であった。

栄養飢餓耐性を標的とした GBS-01 は第 I 相試験の結果、レベル 3 (牛蒡子エキスとして 4.0 g) の忍容性が確認され、推奨用量は牛蒡子エキスとして 4.0 g と判断された。また、第 I 相試験で PR 例も認められており、有効性も示唆された。今後、第 II 相試験に進み、有効性と安全性を確認する意義は十分であると考えている。

このように、ゲムシタビン不応の進行肺癌患者に対して、GBS-01 の忍容性は良好で、腫瘍縮小効果も確認されたため、現在、ゲムシタビンならびにフッ化ピリミジン系抗癌剤に不応の進行肺癌患者に対して GBS-01 の多施設共同の第 II 相試験を行っている (UMIN000010111)。主要評価項目は、8 週の病勢制御割合とし、副次評価項目は、有害事象、奏効割合、無



表 1 GBS-01 の主な有害事象

CTC-AE4.0	Level 1 (n=3)			Level 2 (n=3)			Level 3 (n=9)		
	G1-2	G3	G4	G1-2	G3	G4	G1-2	G3	G4
好中球数減少	0	0	0	1	0	0	1	0	0
貧血	2	0	0	3	0	0	3	0	0
血小板減少	0	0	0	0	0	0	1	0	0
下痢	0	0	0	0	0	0	4	0	0
嘔気	0	0	—	1	0	—	5	0	—
嘔吐	0	0	0	1	0	0	3	0	0
食欲不振	1	0	0	1	0	0	6	1	0
倦怠感	1	0	0	1	0	0	2	2	0
ビリルビン上昇	0	0	0	0	0	0	2	1	0
AST 上昇	2	0	0	1	0	0	7	1	0
γGTP 上昇	1	1	0	1	0	0	3	5	0
高血糖	2	1	0	1	2	0	7	2	0

増悪生存期間, 全生存期間, 薬物動態学的パラメータとして行い, 現在までに第Ⅱ相試験の計39名の患者の登録も終了し, 近日中に結果が明らかになる予定である。

### おわりに

アルクチゲニンを多く含む牛蒡子エキス製剤である GBS-01 は低酸素, 低栄養条件下で抗腫瘍活性を呈する薬剤として, 開発された。最近の研究で, アルクチゲニンはミトコンドリア複合体 I を阻害することが判明した。また, 癌幹細胞様細胞に対する効果も確認され, アルクチゲニンによる抗腫瘍活性の機序も徐々に明らかにされている。そして, GBS-01 の臨床試験でも良好な腫瘍縮小効果が得られた症例も認めており, 進行肺癌に対する GBS-01 の有効性が期待されている。

### 参考文献

- 1) 江角浩安: がん細胞の代謝を標的とした薬剤開発. 腫瘍内科 13: 458-463, 2014.
- 2) Hirayama A, Kami K, Sugimoto M, et al.: Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Res* 69: 4918-4925, 2009.

- 3) Izuishi K, Kato K, Ogura T, et al.: Remarkable tolerance of tumor cells to nutrient deprivation: possible new biochemical target for cancer therapy. *Cancer Res* 60: 6201-6207, 2000.
- 4) Esumi H, Izuishi K, Kato K, et al.: Hypoxia and nitric oxide treatment confer tolerance to glucose starvation in a 5' -AMP-activated protein kinase-dependent manner. *J Biol Chem* 277: 32791-32798, 2002.
- 5) Onozuka H, Tsuchihara K, Esumi H: Hypoglycemic/hypoxic condition in vitro mimicking the tumor microenvironment markedly reduced the efficacy of anticancer drugs. *Cancer Sci* 102: 975-982, 2011.
- 6) Awale S, Lu J, Kalauni SK, et al.: Identification of arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation. *Cancer Res* 66: 1751-1757, 2006.
- 7) Owada S, Shimoda Y, Tsuchihara K, et al.: Critical role of H2O2 generated by NOX4 during cellular response under glucose deprivation. *PLoS One* 8: e56628, 2013.
- 8) Jain RK: Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers. *J Clin Oncol* 31: 2943-2948, 2013.
- 9) Ikeda M, Sato A, Mochizuki N, et al.: A phase I trial of GBS-01 for advanced pancreatic cancer refractory to gemcitabine. *J Clin Oncol* 31: suppl; abstr 2559 2013.

\* \* \*

## III 分子イメージングの臨床への展開

## 2. がんの分子イメージングの現状と展望

藤井 博史 独立行政法人 国立がん研究センター東病院臨床開発センター機能診断開発分野

## がん治療の発展と画像検査の役割の変化

がんの根治には、がん細胞を体内から完全に排除することが必要であり、治療の開始前にがんの進展範囲の評価、すなわち病期診断（ステージング）を正確に行うことが重要である。多くのがんの病期診断にはTNM分類が用いられ、原発巣の進展範囲（T因子）、所属リンパ節への転移の有無（N因子）および遠隔転移の有無（M因子）が評価されているが、これには従来よりX線CT検査、MRI検査などの画像検査が重要な役割を果たしてきた。

さらに、今日ではがんを根治させるだけでなく、治療後の患者の生活の質（quality of life: QOL）の担保も求められるようになってきている。そのためには、できるだけ小さい侵襲で高い治療効果の得られる治療法を選択することが大事であり、がんの形態学的な特徴だけでなく、がんの性状も評価することが必要になっている。最近の分子生物学的手法を駆使した研究から、がんの本態が、遺伝情報の変異が原因で無秩序な増殖を行うようになった細胞集塊であることが明らかになったため、がんの遺伝子情報や遺伝子変異に関連して生じる代謝変化などを可視化することによって、がんの性状を評価する手法が研究されるようになってきている。このような生体内の分子動態を引き起こす生化学現象などを可視化する画像診断技術は“分子イメージング”と称され、さまざまな画像診断モダリティ

に関して新技術の開発が精力的に進められている<sup>1)</sup>。こうした新規技術を臨床応用することにより、がん治療の最適化、低侵襲化が進むものと考えられる。

## がんの診断精度を向上させるための分子イメージング

最近の多列X線CT装置や高磁場MRI装置の開発は、診断画像の画質を改善させたが、同時に放射線科医が読影しなければならぬ画像量も著しく増加させてしまった。もし、がん病巣を選択的に周囲の健常組織とは異なる信号で描画することができれば、がん病巣の診断効率の改善につながる。ブドウ糖の類似化合物である<sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose (FDG)を用いたPET検査は、組織の糖代謝活性の評価が可能で、周囲の健常組織よりも糖代謝活性が亢進することが多いがん病巣を高いコントラストで描画するため、がん病巣の診断精度の向上に貢献している(図1)。<sup>18</sup>F-FDG-PET検査は、糖代謝活性を反映する分子プローブを用いた画像診断検査であり、現時点において最も重要な“臨床分子イメージング検査”と言える。

## 外科治療の低侵襲化のための分子イメージング

がんの進展範囲が確認できれば、それに基づいて至適な治療法を選択することになるが、がん病巣を物理的に摘除する外科治療は最も根治性の高い治療法で

ある。しかし、がんの外科的切除に伴う病巣周囲の健常組織の損傷は、治療後の患者のQOLの低下につながるおそれがあるため、切除範囲を最低限にとどめることが重要である。

術中にがん病巣の境界を明瞭に描出することができれば、過不足のないがん病巣の摘出が可能となる。外科的治療では、もともと体深部に位置する病巣を近距離から視覚で確認しながら治療を進めるため、吸収や散乱により体表からの観察に利用することが難しい光イメージング技術を活用することができる。光イメージングは時間分解能に優れ、リアルタイムで信号変化を観察することが可能であるため、光イメージング技術を併用することで、手術時間に影響を与えることなく精度の高い手術を施すことが可能となる。イメージングプローブの安全



図1 <sup>18</sup>F-FDG-PET画像  
70歳代、男性。悪性リンパ腫  
(stage III)。

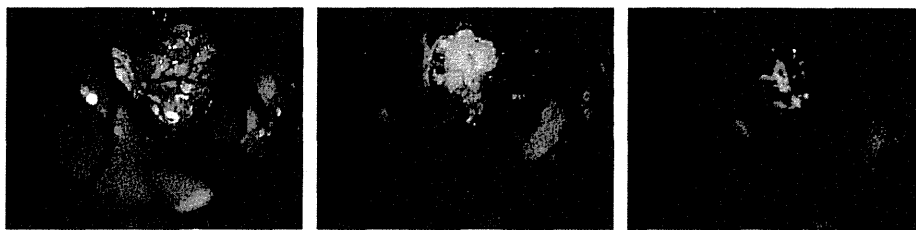


図2 ICGによる大腸がん肝転移病巣  
辺縁の術中イメージング  
◀: 転移病巣, ▶: 正常肝臓  
(参考文献2)より引用転載)

性が担保されれば、臨床応用は比較的容易である。具体的な例として以下のようなのがある。

肝腫瘍の病変切除時に、肝機能検査薬であるindocyanine green (ICG)を投与すると、がん病巣の周囲の肝組織にICGが停滞し、がん病巣との間に良好なコントラストを呈する。ICGは生体からの自家蛍光の乏しい近赤外線光領域でも蛍光を発することから、術中に近赤外線光領域の波長を観察することにより、より明瞭にがん病巣の境界を判断することができる<sup>2)</sup>(図2)。また、5-aminolevulinic acid (ALA)はアミノ酸の1つで、生体内では赤色の蛍光を発するprotoporphyrin IXに代謝される。膠芽腫病巣には正常脳組織よりも多くprotoporphyrin IXが停滞するため、術前に5-ALAを服用させておくと膠芽腫病巣と正常脳組織との間にコントラストが生じ、両者の境界の判断に役立つ<sup>3)</sup>(図3)。

所属リンパ節の郭清も手術侵襲に大きく影響する。多くのがんでは、所属リンパ節の転移状態が重要な予後因子となっており、所属リンパ節の転移状態の評価のため所属リンパ節の郭清が実施されることが多いが、これによりリンパ浮腫などの後遺症に悩まされることがある。このため、最小限の侵襲で所属リンパ節の転移状態を評価する技術が期待されている。これまでの研究から、多くのがんで所属リンパ節への転移が、原発巣からのリンパ流を直接受けるリンパ節であるセンチネルリンパ節(SN)にリンパ節転移が初発することが明らかとなった(SN concept)。この概念が成立するがんに対しては、まず、SNを生検し、



a: 白色光での観察 b: レーザー光による暗視野での観察 c: 摘出後

図3 5-ALAによる膠芽腫の術中イメージング

(画像ご提供: 国立がん研究センター中央病院脳脊髄腫瘍科・成田喜孝先生)

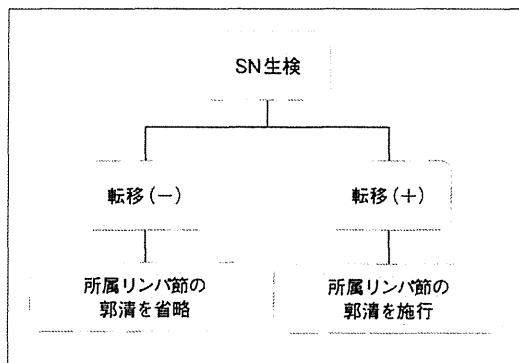


図4 sentinel node navigation surgeryの概要

その転移状態を評価することにより、そのほかの所属リンパ節の転移状態を予測することができ、ひいてはその郭清を省略することも可能となるsentinel node navigation surgery (SNNS)を実施することができる(図4)。SNNSの成功には、SNの確実な同定が重要である。リンパ移行性を示すイメージングプローブを原発巣周囲に投与し、その動態を観察することによりSNを同定することができる。現在、わが国では、乳がんと悪性黒色腫のSN検索に対して、2種類の青色色素および2種類の放射性薬剤が保険適用となっているが(図5)、頭頸部がんや胃がんに対しても保険適用をめざした臨床研究が進められている。このほかの泌尿器科がんや婦人科がん、肺がんに対しても、SN conceptが成立すると報告が認められる。米国では、リンパ節内のマクロファージに発現するマンノース受容体に親和性を示す<sup>99m</sup>Tc標識tilmanoceptが承認されるなど、SN検索を目的とする分子プローブの開発も進められているが、SN生検の目的はその転移状態を知ることであるため、分子イメージング研究のテーマとしては、SN内の小転移病巣の可視化の方が興味

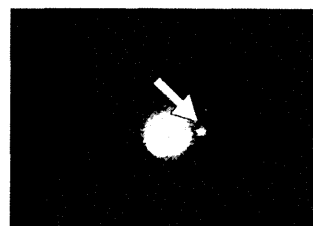


図5 <sup>99m</sup>Tc標識フチン酸リンパシンチグラフィによる悪性黒色腫のSN検索  
原発巣は下腹部の正中よりやや右寄りに位置したが、SN(♂)は左鼠径部に見つかった。  
(画像ご提供: 帝京大学皮膚科・小林孝志先生)

深い。

2000年代の初めに、超常磁性体酸化鉄(USPIO)造影MRIにより、リンパ節内の小転移病巣を陰性に描画させる方法が考案され、注目を集めたが<sup>4)</sup>(図6)、USPIOの安全性の問題やリンパ節内のマクロファージの分布が非転移領域においても均等ではないことによる偽陽性所見が少なからず認められることなどから、実用化には至っていない。今後の研究の進展により、SN内の免疫状態の可視化などにより予後の増悪に関係する転移病巣が描画できるようになれば、臨床的有用性は高いと考えている。

## 放射線治療の最適化のための分子イメージング

手術によるがん病巣の摘除によってQOLを損なう危険性が高ければ、放射線治療や化学療法などの非外科的治療を施すことも賢明な選択である。最近の放射線治療技術の進歩は目覚ましく、強度変調放射線治療(IMRT)や粒子線治療などが導入され、がん病巣に高い選択性で線量を集中させる治療計画が可能となっている。がん病巣の放射線

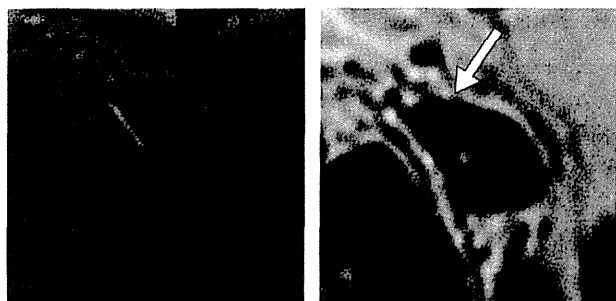


図6 USPIO造影MRIによる前立腺がんのリンパ節内転移病巣の描出  
正常リンパ節組織 (b) の信号が低下して、相対的に転移病巣が高信号に描出される。  
(画像ご提供: Massachusetts 総合病院放射線科・Harisinghani 先生)

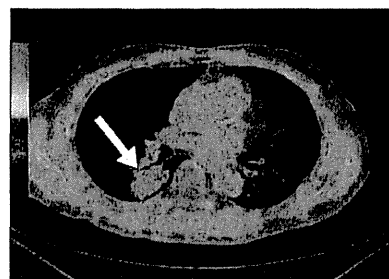


図7  $^{18}\text{F}$ -FAZA-PETによる肺がん低酸素イメージング  
60歳代、男性。右肺がん (⇒)。

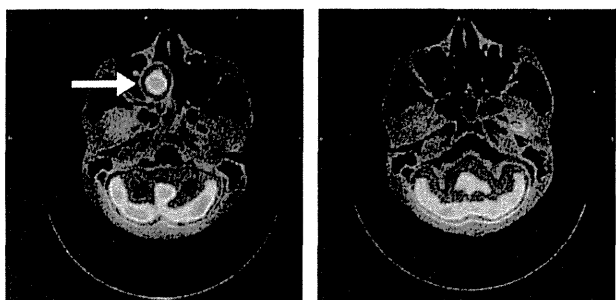


図8  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT検査による治療効果判定  
50歳代、男性。右鼻腔がん (a⇒)。aは治療前。bは陽子線治療後。軟部組織の残存を認めるが、FDG集積は消失し、がん病巣は制御された。

治療感受性を治療前に評価できれば、放射線治療のさらなる最適化が期待できる。放射線生物学的研究から、がん病巣内の低酸素領域は放射線治療に対する感受性が不良であることが示されており、治療前にがん病巣内の低酸素領域の分布を把握できると放射線治療計画の最適化に役立つ<sup>5)</sup>。がん病巣内の酸素分圧はプローブの刺入により測定することができるが、侵襲的であり、がん病巣全体の評価が困難である。このため、低酸素細胞内が過還元状態であることを利用して、低酸素細胞内に停滞するPETプローブが複数開発されており、その臨床的有用性に関する検討が進められている。

$^{18}\text{F}$ -fluoromisonidazole (FMISO)-PET検査が最初に始められた低酸素PET検査であるが、常酸素組織からの洗い出しが遅く、低酸素領域を高いコントラストで描画するためには撮像までに長時間を要するという問題点があった。最近、 $^{18}\text{F}$ -fluoroazomycin arabinoside (FAZA) や  $^{62}\text{Cu}$  あるいは  $^{64}\text{Cu}$  標識 copper-diacetyl-bis [N<sub>4</sub>-methylthiosemicarbazone (ATSM)] などの常酸素組織からの洗い出しが良好なPETプロ-

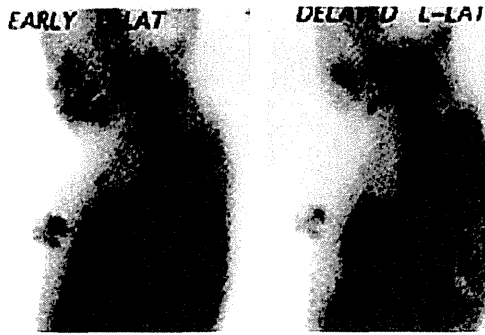
ブが開発され、臨床試験が行われている(図7)。これらのPET検査が実地診療に導入されれば、放射線治療の最適化が進むものと考えられる。

陽子線などの高エネルギー放射線でがん治療を行うと、放射線が照射された組織が放射化してポジトロン放出核種を生じるため、照射直後にPET撮像を行うと実際の照射野を確認することができ<sup>6)</sup>。この方法は、放射線治療の精度を検証する上で有用な方法と考えられる。また、放射線治療のような非外科的治療を行った場合、治療が奏効してもがん病巣が存在した部位に軟部組織が残存する場合がある。これは、がん病巣の中に線維成分などの腫瘍細胞以外の成分が含まれていることや、治療に伴う反応性細胞の浸潤などが原因である。このような軟部組織の残存は、形態学的な評価基準で判断すると治療効果判定を誤ってしまう危険性がある。 $^{18}\text{F}$ -FDG-PET検査で病巣のブドウ糖代謝活性を評価することで、より正確に治療効果を判定できる場合もあり(図8)、PERCISTなどの $^{18}\text{F}$ -FDG-PET検査の所見に基づいた治療効果判定基準も提案されている<sup>7)</sup>。

## 化学療法の個別化のための分子イメージング

抗がん剤を用いた化学療法もがんの主要な治療法であるが、抗がん剤はすべてのがんに奏効するわけではない。抗がん剤が奏効しない場合、患者は副作用にさいなまれるだけに終わるので、治療開始前に抗がん剤の感受性を評価することは非常に重要である。これまで、手術あるいは生検により得られた検体を用いた抗がん剤感受性試験が研究されてきたが、がん病巣の不均一性を考えた場合、*in vivo* イメージング検査でがん病巣全体を評価の方が合理的と考えられる。しかし、抗がん剤の耐性機序は複数存在し、画像検査による抗がん剤感受性の評価は容易ではない。アントラサイクリン系抗がん剤など一部の抗がん剤は、がん細胞の細胞膜に発現するP糖タンパク質により細胞内から汲み出され、耐性を示す。このような抗がん剤の耐性を同様にP糖タンパク質により細胞内に汲み出される $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -methoxyisobutylisonitrile (MIBI) の洗い出しにより予測することが試みられている<sup>8)</sup>(図9)。

最近では、がんに比較的特異的な、代謝を阻害することにより抗がん作用を発揮する分子標的薬の開発が進められている。代表的な分子標的薬には、がん細胞表面に発現する抗原や各種の受容体に親和性を示す抗体を利用した製剤(薬剤名がmabで終わる)や、がん細胞でしばしば活性が亢進する tyrosine kinase (TK) を阻害する製剤(薬剤名がnibで終わる)などがある。抗体製剤については、放射性核種で標識した抗体を投与してがん病巣での発現を確認し、感受性予測に役立てようとする研究が進められている<sup>9)</sup>(図10)。一般的に抗体の血中半減期は長いので、放射性核種で



a: 早期像

b: 後期像

図9  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBIによる乳がんのアントラサイクリン系抗がん剤に対する感受性の評価

後期像 (b) では、早期像 (a) に比べて  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI の集積が减弱している。このような症例のアントラサイクリン系抗がん剤に対する感受性は低い。

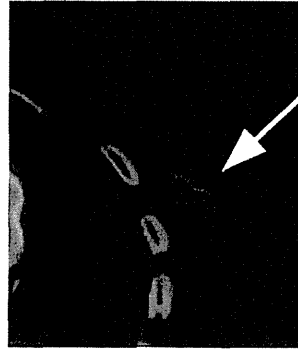


図10  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-trastuzumab による乳がん病巣のイメージング  
左乳がんのHER2陽性病巣(⇐)に集積が認められた。  
(画像ご提供: 国立がん研究センター中央病院放射線診断科・栗原宏明先生)

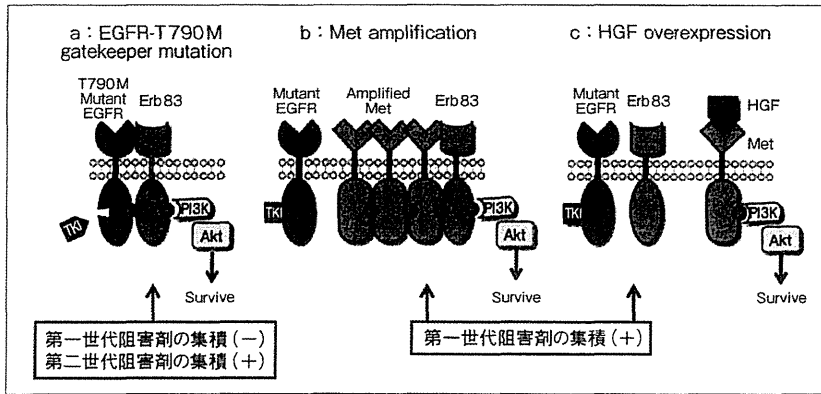


図11 EGFR-TK 阻害剤のR1標識製剤による耐性機序の評価

耐性が生じた場合に、第一世代EGFR-TK阻害剤標識体を投与して集積が確認できた場合は、MET増幅やHGF過剰発現といった耐性機序が考えられる (b, c)。第一世代EGFR-TK阻害剤標識体の集積が確認できなかった場合で、第二世代EGFR-TK阻害剤標識体が集積した場合には、T790M変異が考えられる (a)。(参考文献11)より引用改変)

標識抗体を投与して、標的組織に結合しない抗体が血中から洗い出され、良好な病変-血液比が得られるまでに長時間を要するため、長半減期核種での標識が必要である。この問題を克服するため、最近では、抗体の抗原親和性を示す部分を取り出して標識したminibody製剤なども研究されている<sup>10)</sup>。

TK阻害剤も数多く開発されている。第一世代の上皮成長因子受容体(EGFR)-TK阻害剤(gefitinibなど)は、EGFR遺伝子変異を伴った非小細胞肺癌に著効することが報告されているが、数年のうちには耐性を獲得する。これには、T790M変異のような第一世代のEGFR-TK阻害剤が結合できなくなることによるものと、がん遺伝子であるMETの増幅や肝細胞増殖因子(HGF)過剰発現のように第一世代のEGFR-TK阻害剤が結合しても阻害作用が発揮されないことによるものがある<sup>11)</sup>。前者

の耐性に対しては、より強い親和性を示す第二世代EGFR-TK阻害剤が期待できる。このため、第一世代EGFR-TK阻害剤と第二世代EGFR-TK阻害剤の両者の放射性核種標識体を作成し、がん病巣への親和性を確認すると、理論的には耐性機序を鑑別することが可能となる(図11)。このような診断技術の臨床応用が期待されている。

化学療法の治療効果の判定には、放射線治療と同様に $^{18}\text{F}$ -FDG-PET検査が有用であるが、現状では、悪性リンパ腫を除いて保険適用とされていない。

◎

がん治療の低侵襲化が進み、がん病巣の形態学的な特徴だけでなく、がん病巣の性状を評価する画像検査への期待が高まっている。これには分子イメージング技術を積極的に臨床応用していくことが有用であると考えられる。すでに、 $^{18}\text{F}$ -FDG-PET検査が保険診療として実

施され、がんの診断精度の向上やがん治療の最適化に大きく貢献しているが、今後は光イメージング技術の活用による低侵襲外科治療や、各種の核医学検査の応用による放射線治療や化学療法への感受性評価技術の実用化が期待される。

●参考文献

- 1) Weissleder, R., Mahmood, U.: Molecular imaging. *Radiology*, **219**・2, 316 ~ 333, 2001.
- 2) van der Vorst, J.R., Schaafsma, B.E., Hutteman, M., et al.: Near-infrared fluorescence-guided resection of colorectal liver metastases. *Cancer*, **119**・18, 3411 ~ 3418, 2013.
- 3) 成田善孝: 5-アミノレブリン酸(5-ALA)による術中蛍光診断 update. *Annual Review 神経* 2013, 鈴木則宏・他編, 東京, 中外医学社, 156 ~ 162, 2013.
- 4) Harisinghani, M.G., Barentsz, J., Hahn, P.F., et al.: Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. *N. Engl. J. Med.*, **348**・25, 2491 ~ 2499, 2003.
- 5) Padhani, A.R., Krohn, K.A., Lewis, J.S., et al.: Imaging oxygenation of human tumours. *Eur. Radiol.*, **17**・4, 861 ~ 872, 2007.
- 6) Nishio, T., Miyatake, A., Ogino, T., et al.: The development and clinical use of a beam ON-LINE PET system mounted on a rotating gantry port in proton therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **76**・1, 277 ~ 286, 2010.
- 7) Wahl, R.L., Jacene, H., Kasamon, Y., et al.: From RECIST to PERCIST: Evolving Considerations for PET response criteria in solid tumors. *J. Nucl. Med.*, **50** (Suppl. 1), 122S ~ 150S, 2009.
- 8) Fujii, H., Nakamura, K., Kubo, A., et al.: Preoperative evaluation of the chemosensitivity of breast cancer by means of double phase  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintimammography. *Ann. Nucl. Med.*, **12**・6, 307 ~ 312, 1998.
- 9) Tamura, K., Kurihara, H., Yonemori, K., et al.:  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-trastuzumab PET imaging in patients with HER2-positive breast cancer. *J. Nucl. Med.*, **54**・11, 1869 ~ 1875, 2013.
- 10) Knowles, S.M., Zettlitz, K.A., Tavaré, R., et al.: Quantitative immunoPET of prostate cancer xenografts with  $^{89}\text{Zr}$ - and  $^{124}\text{I}$ -labeled anti-PSCA A11 minibody. *J. Nucl. Med.*, **55**・3, 452 ~ 459, 2014.
- 11) Yano, S., Takeuchi, S., Nakagawa, T., et al.: Ligand-triggered resistance to molecular targeted drugs in lung cancer; Roles of hepatocyte growth factor and epidermal growth factor receptor ligands. *Cancer Sci.*, **103**・7, 1189 ~ 1194, 2012.

## ニトロイミダゾール類とは異なる集積機序をもつ $^{99m}\text{Tc}$ 標識低酸素イメージングプローブの開発

梅田 泉、木村 禎亮、藤井 博史

国立がん研究センター東病院 臨床開発センター機能診断開発分野

### はじめに

固形腫瘍の病巣内では、異常な脈管構造構築により生じた血流低下による酸素供給と酸素消費の不均衡によって慢性的な低酸素領域が存在し、特異的な微小環境が構築されている<sup>1</sup>。低酸素環境下では低酸素誘導因子 (hypoxia inducible factor-1; HIF-1) が活性化し、それによって誘導される諸因子ががんの増殖分化、転移浸潤を助長する。従って悪性度の高い領域といえる。また、X線など放射線の生物作用 (殺細胞効果) は酸素の存在に大きく依存することから、低酸素環境にあるがん細胞は放射線治療抵抗性を示す。さらにこれらは化学療法に対しても抵抗性を示すことが報告されている。このように、がん病巣内の低酸素環境はがんの悪性度や治療抵抗性の指標となることから、その可視化はがん治療の最適化にとって必須であり、がん画像診断の重要な課題である<sup>2</sup>。

これまで核医学領域では、低酸素イメージングプローブとして  $^{18}\text{F}$ -fluoromisoimidazole ( $^{18}\text{F}$ -FMISO)、 $^{18}\text{F}$ -fluoroazomycin arabinoside ( $^{18}\text{F}$ -

FAZA)、 $^{18}\text{F}$ -flortanidazole ( $^{18}\text{F}$ -HX4)、 $^{60/62/64}\text{Cu}$ -diacetyl-bis (N4-methylsemicarbazone) ( $^{60/62/64}\text{Cu}$ -ATSM) などが開発されてきた (図 1A)<sup>3,4</sup>。これらはいずれも PET プローブであり、また前三者はニトロイミダゾール骨格を土台としている。低酸素環境は電子が過剰で過還元状態にある。ニトロイミダゾール化合物は高い還元電位を有し (= 電子不足)、低酸素環境下で特異的に生体還元代謝を受けて、最終的に細胞内の求核高分子 (タンパク質や核酸) と結合すると考えられている (図 1B)。上述のイメージングプローブは臨床研究でも用いられているが、現時点では画像診断薬として認可されているものはない。PET プローブは半減期が短く、基本的にはサイクロトロンを有する施設でしか使用できないため、汎用性の点に問題がある。そこで本研究では、より汎用性の高い SPECT 低酸素プローブの開発を目指し、 $^{99m}\text{Tc}$  標識でかつニトロイミダゾールとは異なる機序で低酸素領域に留まる化合物を設計・合成し、低酸素プローブとしての有用性を評価した。

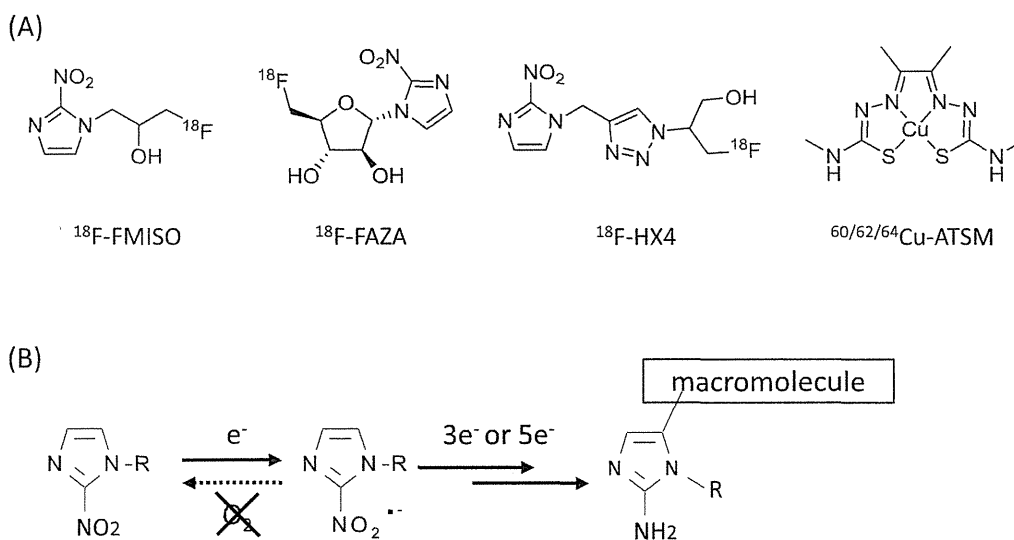


図 1 従来の核医学低酸素イメージング剤

(A) 代表的な低酸素イメージング剤

(B) ニトロイミダゾール化合物の低酸素領域集積機序 (推定)

## 新規プローブの分子設計

プローブの設計にあたり、1) 核医学核種として最も汎用性の高い<sup>99m</sup>Tcを用いること、2) 低酸素環境下で特異的に構造を大きく変化させ、細胞内に留まる機構を持たせることの2点を基本概念とし、第2項達成のため、4-nitrobenzyl esterの利用を企画した。低酸素環境のような電子過剰状態で、4-nitrobenzyl esterは還元を受け、最終的に脱離基が脱離する(図2A)。この脱離基に<sup>99m</sup>Tcを結合し、低酸素環境下で特異的に細胞内に集積させることを試みた(図2B)。この化合物は脂溶性であり、細胞内に移行すると考えられる。常酸素濃度の細胞では、化合物に変化は起こらず、経時的に細胞から洗い出される。一方、低酸素細胞に取り込まれた場合、低酸素下の過還元状態において、4-nitrobenzyl基が還元・脱離し、その結果、水溶性の<sup>99m</sup>Tc標識化合物に変化すると予想される。構造によっては電荷も有するようになる。それらの生成物は細胞膜を透過できず、従って低酸素細胞に留まることを期待した。

## 低酸素イメージングプローブとしての評価

この分子設計に基づき、10種類余の候補化合物を

合成した。それぞれの化合物を<sup>99m</sup>Tcで標識し、その標識率と製剤安定性を検討した後に、マウス乳癌FM-3A細胞あるいはEMT6細胞を用いて常酸素・低酸素環境下での細胞取込の相違を調べた。さらに担がん動物モデルを用いて、候補化合物の腫瘍集積性および体内動態を検討し、SPECT/CTイメージングも実施した。低酸素環境特異性に関しては、凍結組織切片を作成し、オートラジオグラフィと免疫染色による検討を実施した。

最初の候補化合物としてSD32を合成した。構造を図3Aに示す。細胞取込実験において、低酸素条件下の細胞へのSD32の取込は正常状態の細胞より有意に高いことが認められた(図3B)。それぞれの細胞の融解液をHPLCで分析した結果、正常細胞ではSD32は最初の構造を保っていたが、低酸素細胞では脱ベンジル体に変換していることが明らかとなった(図3C)。従って本プローブは、図2に示した設計概念どおりに機能していることが証明された<sup>5</sup>。しかしながら、これらのプローブを担がん動物に投与すると、血中から速やかに消失し、腫瘍にはほとんど到達しなかった。

この結果は、*in vivo*イメージングのためには、もうひとつの因子として血中滞留性を高める必要性を示

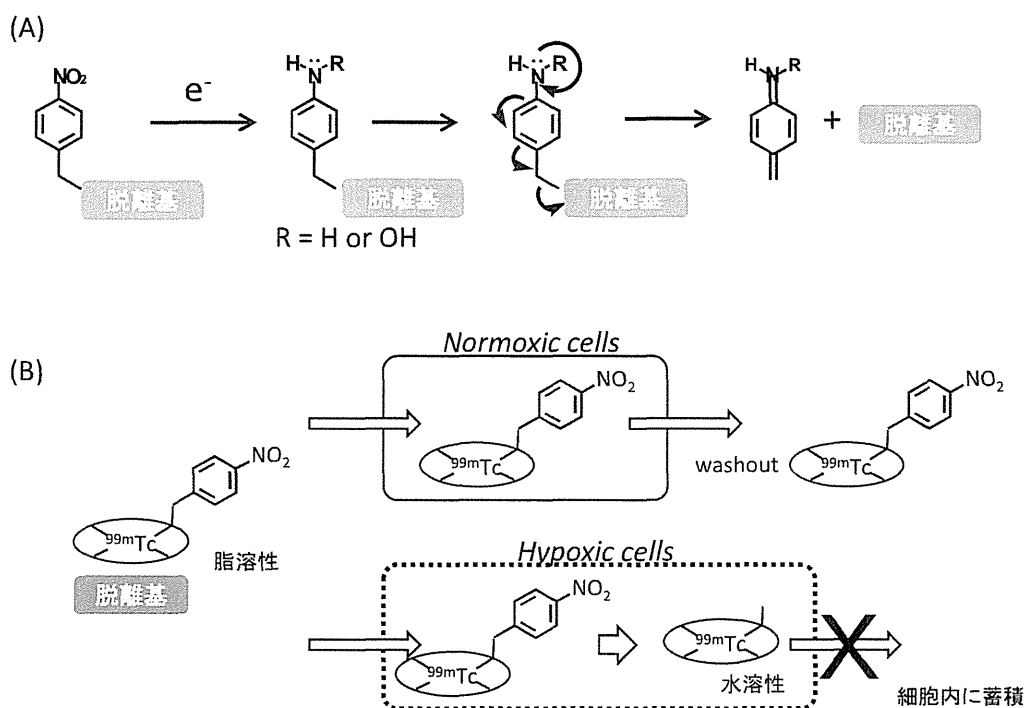


図2 新規プローブの分子設計  
(A) ニトロベンジルエステルの還元と脱離  
(B) 新規プローブの低酸素集積機構

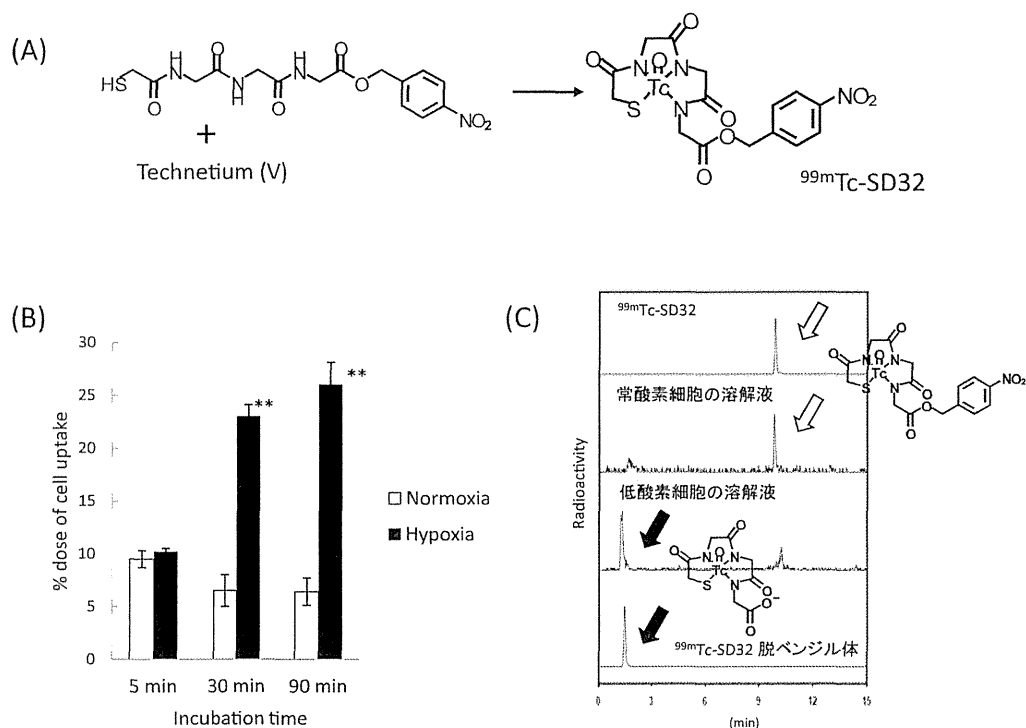


図3 新規低酸素プローブ  $^{99m}\text{Tc-SD32}$

(A) 構造

(B) 低酸素細胞への選択的集積 \*\*、 $P < 0.01$

(C) SD32 およびその代謝物の HPLC 解析

唆している。そこで、リガンド部分の構造に変更を加え、試行錯誤でプローブの体内動態の改良に努めた。緒検討の結果、投与3時間後で、腫瘍集積率が投与量の約1-2%/g、腫瘍/血液比2-3、腫瘍/筋肉比15-20程度の良好な成績を示すプローブを得ることが出来た(特許出願中)。このプローブを用いて *in vivo* SPECT イメージングを行った結果、腫瘍が明瞭に描画された。さらに腫瘍を摘出してオートラジオグラフィと低酸素マーカーであるピモニダゾール免疫染色を行った結果、両者の分布はよく一致した。従って本プローブの集積は低酸素環境に依存したものであると認められた。これらの結果より、本研究で新規に開発した  $^{99m}\text{Tc}$  標識プローブは、新しい腫瘍低酸素 SPECT プローブとして期待できる。

### まとめと今後の展望

本研究では、従来の低酸素イメージングプローブとは異なる集積機序を持ち、かつ汎用性の高い  $^{99m}\text{Tc}$  標識低酸素プローブの開発を目指し、有望な成績を得ることができた。今後はがん治療への寄与に力点を置いて検討を進める予定である。近年、放射線治療は強度

変調放射線治療 (IMRT) やペンシルビーム陽子線治療のように極めて位置精度の高い照射が可能となっている。本プローブにより、腫瘍内低酸素環境の有無のみでなく、腫瘍内低酸素部位の局在までも描画できれば、理想的な画像ガイド下治療となりうる。我々は腫瘍内不均一性の描画に関しても検討を進めている<sup>6</sup>。また、化学療法においても、最近低酸素環境を標的とした治療薬の開発が進められており、すでに臨床試験も開始されている。これらの治療薬が有効な患者の選別や、効果予測、効果判定においても、本プローブの有効性が大いに期待される。個々の患者の腫瘍の特性の把握は個別化治療の第一歩となる。がん治療の最適化への貢献を目指し、さらなる研究の発展を目指したい。

### 謝辞

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金、厚生労働省科学研究費補助金およびがん研究振興財団がん研究助成金の助成により実施した。



#### 参考文献

1. Tatum JL, et. al., Hypoxia: importance in tumor biology, noninvasive measurement by imaging, and value of its measurement in the management of cancer therapy. *Int J Radiat Biol.* 2006 Oct; 82 (10) : 699-757.
2. Padhani AR, et al., Imaging oxygenation of human tumors. *Eur Radiol.* 2007 17 : 861-874.
3. Lopci E, et. al., PET radiopharmaceuticals for imaging of tumor hypoxia: a review of the evidence. *Am J Nucl Med Mol Imaging.* 2014 Jun 7; 4 (4) : 365-84. eCollection 2014
4. Carlin S, Zhang H, Reese M, Ramos NN, Chen Q, Ricketts SA. A comparison of the imaging characteristics and microregional distribution of 4 hypoxia PET tracers. *J Nucl Med.* 2014 Mar; 55 (3) : 515-21. doi:10.2967/jnumed.113.126615. Epub 2014 Feb 3.
5. Kimura S, Umeda IO, Moriyama N, Fujii H: Synthesis and evaluation of a novel <sup>99m</sup>Tc-labeled bioreductive probe for tumor hypoxia imaging. *Bioorg Med Chem Lett,* 21 (24) : 7359-7362, 2011.
6. Umeda IO, Tani K, Tsuda K, Kobayashi M, Ogata M, Kimura S, Yoshimoto M, Kojima S, Moribe K, Yamamoto K, Moriyama N, Fujii H: High resolution SPECT imaging for visualization of intratumoral heterogeneity using a SPECT/CT scanner dedicated for small animal imaging. *Ann Nucl Med,* 26 (1) : 67-76, 2012.

## パラフィンブロックの長期保存と採取試料の固定までの時間が与える Ki-67 免疫染色, DNA と RNA への影響

佐藤 正明<sup>1</sup>      小嶋 基寛<sup>1</sup>      永妻 晶子<sup>1</sup>  
中村 優香<sup>1</sup>      福田 幸子<sup>1</sup>      斉藤 典男<sup>2</sup>  
落合 淳志<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>国立がん研究センター東病院臨床開発センター臨床腫瘍病理分野, <sup>2</sup>同 大腸外科)

要旨: 近年既往のパラフィン包埋組織 (FFPE) が再発時の治療方針決定に利用されるようになり, 初発の組織が採取された後に再発するまでは年単位の時間が経過することも多い一方, FFPE の長期保存が与える経時的な質の劣化に関する報告は少ない。今回, 各年代の FFPE と組織採取から固定までの時間における Ki-67 と DNA, RNA を比較検討した。結果, 長期保存 FFPE の核酸は PCR 増幅成功率の低下がみられるため, 3 年以内の新しい検体を用い, 固定までの時間は組織学的な変化が観察される 6 時間以内が望ましいと考えられた。

キーワード: fixation, immunohistochemistry, DNA, RNA, formalin-fixed and paraffin-embedded

### はじめに

すべての臨床検査は, 解析前段階, 解析段階, 解析後段階の過程を経て臨床情報として報告される。固定や包埋は解析前段階に該当し, その後の結果に重要な影響を及ぼす段階である。近年, ホルマリン固定, パラフィン包埋 (FFPE) された原発腫瘍組織が, 年単位の時間を経過し再発した際の治療方針決定の目的で免疫染色や遺伝子解析等に広く利用されるようになってきている。一方, 固定液の種類, pH, 固定時間等, 解析前段階の違いにより, これらの検査結果は影響をうけるため固定条件の標準化が必要である<sup>1-3)</sup>。近年, 臓器やタンパク, 核酸ごとに固定条件のプロトコールが推奨されている<sup>4-6)</sup>。この検査ごとの標準化の流れは重要である一方, 検査の種類と推奨プロトコールが増えるほど, 多数かつ多種類の臓器を一括して扱うことを基本とする一般的な病理検査室の負担は大きい。我々は, 全国の一般的な病理検査室で広く利用できる固定液と固定時間のプロトコール作成を目的に, 解析前段階の検討を行ってきており, 均一な解析結果を提

出するために中性緩衝ホルマリンの使用と 1 週間以内の固定が重要であると報告してきた<sup>7)</sup>。一方で, 解析前段階に影響を与える因子はこの他にも多数考えられる。一般的に, 組織劣化を考慮すると組織採取から固定までの時間と FFPE 作製から解析までの検体保存期間は短いほうが現実を反映した結果がえられると考えられるが, 臨床的に影響がある劣化はどの程度で出現するかの検討は少ない。今回, 我々は組織採取から固定までと FFPE 作製から解析までの検体保存期間が Ki-67 陽性率と PCR, Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) の増幅成功率に与える影響に関して検討し, 当院における手術検体抽出から固定までの時間の現状を示した。

### 材料および方法

#### ・組織採取から固定までの時間に関する検討

組織採取から固定までの時間が病理組織標 5 本, Ki-67 (clone 30-9, ベンタナ) 免疫染色と DNA, RNA に与える影響を検討する目的で大腸癌の臨床診断で 2013 年に国立がん研究センター東病院で切除された 3 症例の腫瘍から 5 cm 以上離れた正常粘膜組織を採取した。採取された組織は 2.0×1.0 cm 大, 4 片に切り分け, 固定するまで大塚生食注 100 mL で室温放置した。1 時間, 3 時間, 6 時間, 24 時間放置した後に 10% 中性緩衝ホルマリンで 24~48 時間固定した。その後, これらの固定された組織から FFPE を作製, 室温保管 (遮光なし, 薄切後は表面をパラフィンコーティング)

Effect of Long-term storage of formalin-fixed and paraffin-embedded block, and effect of time before tissue fixation to histology, Ki-67, DNA and RNA analyses

Masaaki Sato<sup>1</sup>, Motohiro Kojima<sup>1</sup>, Akiko Nagatsuma<sup>1</sup>, Yuka Nakamura<sup>1</sup>, Sachiko Fukuda<sup>1</sup>, Norio Saito<sup>2</sup>, and Atsushi Ochiai<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Pathology, Research Center for Innovative Oncology and

<sup>2</sup>Colorectal and Pelvic Surgery Division, National Cancer Center Hospital East

後, Ki-67免疫染色, DNA, RNA の抽出を行った。

・ **FFPE** 作製から解析までの検体保存期間に関する検討

国立がん研究センター東病院で保存されている2004年, 2007年, 2008年, 2009年, 2010年, 2013年の1~3月に切除された胃癌, 大腸癌症例各6例を抽出した。各症例に含まれる正常組織を含むFFPE (10%ホルマリン固定) を用いてKi-67免疫染色, DNA, RNA の抽出を行った。上記実験は2013年3月から2014年1月に施行した。

・ 免疫組織化学, **DNA, RNA** の抽出, **PCR** 増幅, **DNA** サイズ測定の方法

免疫染色は大腸正常粘膜組織4µmの切片を用いて, Ki-67 (30-9) で染色した。Ki-67 (30-9) 染色は推奨の染色プロトコルを用いてベンチマークウルトラ (ベンタナ) で行った。染色されたスライドはバーチャルスライドスキャナ (NanoZoomer, 浜松ホトニクス) で取り込み, デジタル化した。Ki-67陽性率はhot spot法を用いて×40倍 (0.1mm<sup>2</sup>) 3視野で求めた。

DNAとRNAは, それぞれ10µmの切片を5枚使用し, QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (キアゲン) とRNeasy FFPE Kit (キアゲン) を用いて抽出した。

PCR酵素は, PrimeSTAR Max DNA Polymerase (タカラバイオ) を使用した。PCR条件は, DNA 1µL, プライマー0.4µM, 10µL反応系, 98°C 10秒, 55°C 5

秒, 72°C 5秒, 35サイクルで増幅を行った。RT-PCRは, PrimeScript RT reagent Kit (Perfect RealTime, タカラバイオ) を使用し, random 6 mers を用いて, 37°C 15分, 85°C 5秒, 1サイクルで, total RNA から逆転写反応を行ってcDNAを調整した。増幅の成功は電気泳動により確認し成功率を算出した。使用したプライマーの配列は表1に示す<sup>8,9)</sup>。

DNAのサイズ分布を比較するために, 2100バイオアナライザー (アジレント・テクノロジー) を用いて, Agilent High Sensitivity DNA キットで測定した。

なお, 本検討はあらかじめ倫理委員会の承認を得て行い, 国立がん研究センターの包括同意書に同意が得られた患者を対象として施行した (倫理審査委員会承認研究課題番号021-080)。

結果

・ **FFPE** 作製から解析までの検体保存期間に関する検討

DNAとcDNAのPCR成功率は, FFPEの保存期間が長くなるにつれて低下する傾向がみられた。大腸と胃のDNAは, 2013年と比較して2010年は同等に高いPCR成功率であったが, 2009年から低下がみられた。2008年以前では, 142bpと307bpで低いPCR成功率となり, 500bpのPCRでは増幅されなかった (図1a, b)。大腸の142bpのcDNAのPCR成功率は,

表1: プライマー情報

プライマー	配列	増幅産物 (bp)
DNA		
ACTB 142-F	5'-CCTGTGTTATCTTGGAGGTCCCCTGAAG-3'	142 bp
ACTB 142-R	5'-ACCGTĀGAGTGGTCACTCAATGAAG-3'	
ACTB 307-F*	5'-CTTGAGGAGGTGGGAAGGGACTATTTGG-3'	307 bp
ACTB 307-R*	5'-CCCCTACCCCAACTTGACTTTGATTCCTCA-3'	
GAPDH 500-F*	5'-GAAAAGGACATTTCCACCGCAAAATGGC-3'	500 bp
GAPDH 500-R*	5'-GGTCAGAAATTAAGTGGACAGGGCAAGC-3'	
cDNA		
ATP5F1-F	5'-GAAGCAGGCTTCCATCCAACA-3'	142 bp (1)
ATP5F1-R	5'-TCGTTCCCGGTAAGTAAGTCACTTCCAA-3'	
GAPDH 142-F	5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'	142 bp (2)
GAPDH 142-R	5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3'	
TBP 161-F*	5'-GGGCACCACTCCACTGTAT-3'	161 bp
TBP 161-R*	5'-CACGAAGTGCAATGGTCTTT-3'	
TBP 252-F*	5'-GGGAGCTGTGATGTGAAGTTT-3'	252 bp
TBP 252-R*	5'-TGAGAGCCATTACGTCTCT-3'	

ACTB, β-actin; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; TBP, TATA-binding protein; ATP5F1, ATP synthase, H<sup>+</sup> transporting, mitochondrial Fo complex, subunit B1.

\*: 文献より

2013年と比較して2008年までは高めに推移したが、2007年と2004年で低下する傾向を示した。2010年以前で161bpはほとんど増幅されず、252bpではまったく増幅されなかった(図1c)。胃のcDNAのPCR成功率は、ばらつきはあるが、2013年と比較して2010年ですでに低下しており、252bpでは増幅されなかった(図1d)。同様にDNAサイズの分布の検討において、2013年の大腸癌の検体では10,380bp近傍から蛍光が減弱したのに対して、2009年の検体では300bp付近にピークが出現し、2004年では200bp付

近にピークが出現しており、徐々に分解されていることが示された(図1e, f, g)。2004年の胃のDNAのサイズは150bp付近にピークがみられ、胃のDNAが大腸よりより分解されていることを示した(図1g, h)。

Ki-67(30-9)陽性率は、2004年から2013年において、明らかな差はみられなかった。

・組織採取から固定までの時間に関する検討  
通常の組織観察において、固定までの時間が1時間と3時間では標本に影響がみられなかったが、6時間では粘膜の表層上皮で剥脱がみられた。24時間で、

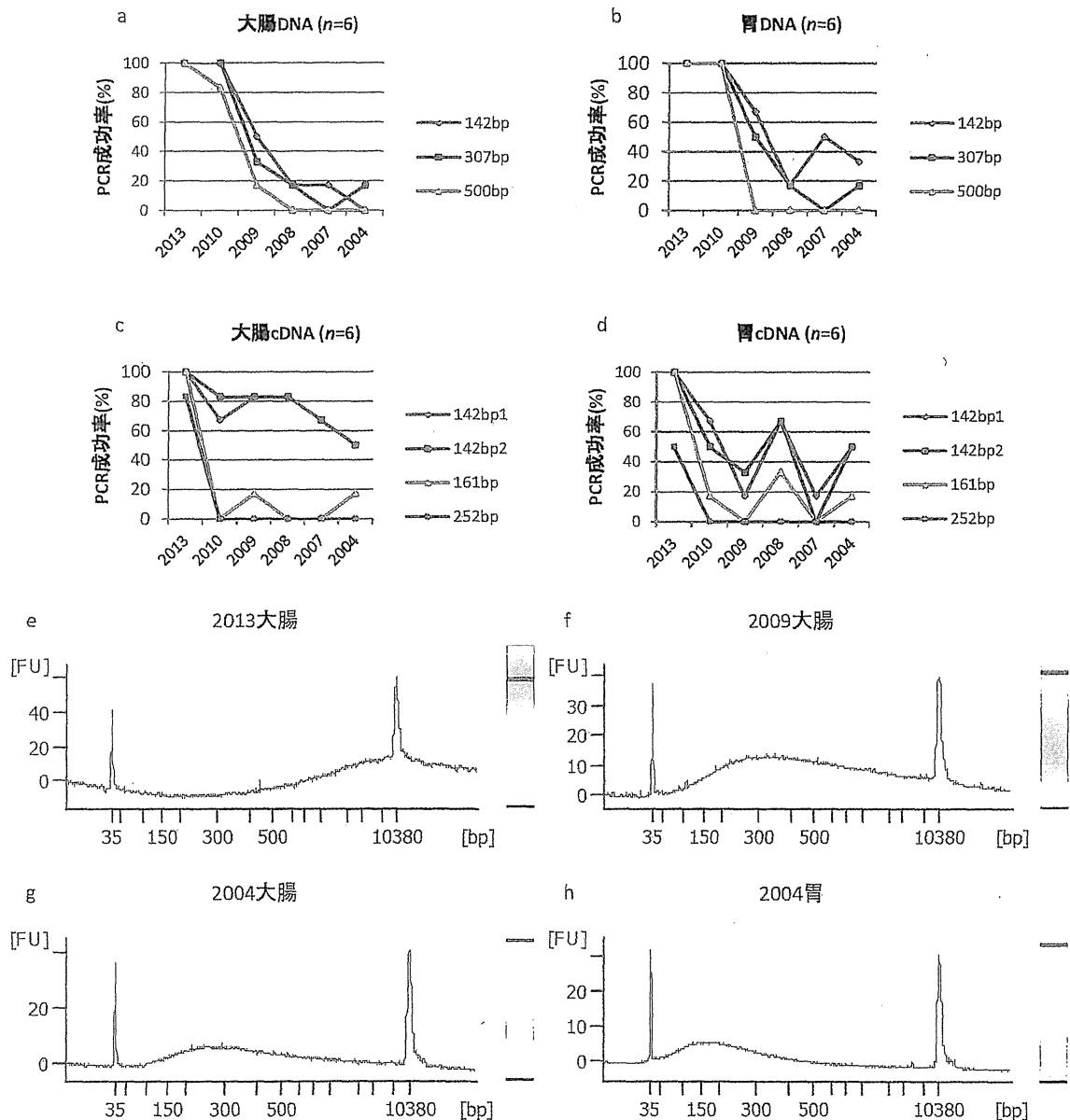


図1: パラフィンブロックにおける長期保存の核酸への影響。a, b: 2013~2004年に作製したパラフィンブロックから抽出したDNAのPCR成功率。c, d: 2013~2004年に作製したパラフィンブロックから抽出したRNA由来cDNAのPCR成功率。e~h: 2013, 2009, 2004年のパラフィンブロックから抽出したDNAのサイズ分布。