原著

ORIGINAL ARTICLE

膀胱癌に対するアミノレブリン酸光線力学診断における
診断深度拡張に向けた励起光波長の検討滝島 裕貴¹, 井原 大祐¹, 西村 隆宏¹, 間 久直¹, 栗津 邦男^{1,2,3}¹大阪大学 大学院工学研究科²大阪大学 大学院生命機能研究科³大阪大学 国際医工情報センター

(2020 年 6 月 25 日受付, 2020 年 9 月 14 日掲載決定, 2020 年 11 月 27 日 J-STAGE 早期公開)

Investigation of the Excitation Wavelength for Extension of Diagnostic Depth
in 5-aminolevulinic Acid-based Photodynamic Diagnosis of Bladder CancerHiroki Takishima¹, Daisuke Ihara¹, Takahiro Nishimura¹, Hisanao Hazama¹, Kunio Awazu^{1,2,3}¹Graduate School of Engineering, Osaka University²Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University³Global Center for Medical Engineering and Informatics, Osaka University

(Received June 25, 2020, Accepted September 14, 2020, Advance Publication released online November 27, 2020)

要 旨

膀胱癌に対するアミノレブリン酸光線力学診断 (5-aminolevulinic acid-based photodynamic diagnosis: ALA-PDD) における診断深度の励起光波長の選択による拡張を検証した。膀胱組織中の光減衰とプロトポルフィリン IX の光吸収特性に基づく理論計算で、腫瘍の深さが 0.9 mm 以深では波長 505 nm の緑色光励起で蛍光強度が最も高くなった。摘出ブタ膀胱組織を用いた実験で、現行 ALA-PDD システムで用いられている波長 405 nm と波長 505 nm で励起した場合を比較した結果、腫瘍の深さが 0.8 mm 以深で励起光波長 505 nm の蛍光強度が高くなり、緑色光励起による診断深度の拡張を実証した。

キーワード：光線力学診断, プロトポルフィリン IX, 膀胱癌, 励起光波長, 蛍光

Abstract

Extension of diagnostic depth in 5-aminolevulinic acid-based photodynamic diagnosis (ALA-PDD) for bladder cancer was investigated by selecting the wavelength of the excitation light. Numerical calculation based on the light attenuation in bladder tissue and the absorption coefficient of PpIX showed that the fluorescence intensity with the green excitation light of 505 nm wavelength was highest for a tumor located at a depth of 0.9 mm or deeper. The diagnostic depth in an extracted porcine bladder tissue using an excitation wavelength of 505 nm was compared with that using the blue-violet excitation light of 405 nm wavelength that is currently used in PDD. The fluorescence intensity at the excitation wavelength of 505 nm was higher for a tumor located at a depth of 0.8 mm or deeper. These results indicate that an extension of the diagnostic depth is achieved with the excitation wavelength of 505 nm.

Key words: photodynamic diagnosis, protoporphyrin IX, bladder cancer, excitation wavelength, fluorescence

1. 背景

膀胱癌は筋層への浸潤の有無により大別される¹⁾。筋層非浸潤性膀胱癌は、全体の約7割を占め、主な治療法として経尿道的膀胱腫瘍切除術 (Transurethral resection of bladder tumor: TURBT) が選択される²⁾。TURBTは、膀胱鏡下にて電気メスを用いて腫瘍を切除するため、膀胱温存が可能である³⁾。一方、筋層浸潤性膀胱癌に対しては、膀胱の全摘出と尿路変更術が選択される^{4,5)}。膀胱癌は、このように筋層浸潤の有無により大きく治療方針が異なるため、膀胱癌の正確な深達度診断が重要である。

膀胱癌診断では、多くの場合、膀胱鏡検査により白色光照明下にて腫瘍形態を確認するため、小径や平坦型の腫瘍の見落としが課題となる⁶⁾。筋層非浸潤性膀胱癌の診断には系統的な生検が行われるが、正常粘膜に対しても行うため、不必要な生検による組織採取も多く効率的ではない^{7,8)}。また、膀胱壁深部に浸潤する筋層浸潤性膀胱癌の診断には、TURBT時に切除切片に筋層を含む必要があるが、術中にリアルタイムに筋層浸潤を可視化できる光技術は未整備である⁹⁾。そのため、切除前に膀胱癌の深部方向への深達度を可視化できれば根治切除可能かどうかを術中に判断することができる。また特にT1/high grade膀胱癌に対しては、可視化された腫瘍の深部組織までTURBTで確実に筋層組織を採取できれば、2nd TURBTを回避することが可能となる^{9,10)}。このように膀胱壁深部に浸潤する癌の可視化により、術前に切除範囲の判断が可能となり、TURBTにおける筋層浸潤の見落としを抑制し正確な診断を下すことが可能となる。

腫瘍病変の検出感度向上において、5-アミノレブリン酸 (5-aminolevulinic acid: ALA) を用いた光線力学診断 (photodynamic diagnosis: PDD) が有効である¹¹⁾。ALA-PDDは、プロトポルフィリンIX (protoporphyrin IX: PpIX) の前駆体であるALAを投与することでPpIXが腫瘍細胞内に特異的に蓄積することを利用する。腫瘍細胞内に蓄積するPpIXの蛍光観察により、高精度に癌診断やリンパ節同定が可能になる。膀胱鏡検査においてはTURBTとの併用により、白色光観察診断と比較して、ALA-PDDによる感度が48.7%改善することが示されている³⁾。また、白色光観察診断で視認困難であった上皮内癌等の診断精度の向上が実証されている。正確かつ低侵襲な病変切除が可能となり、膀胱癌に対する治療成績の向上が報告されている^{3,8,12)}。2019年に改訂された膀胱癌診療ガイドラインでは膀胱癌に対する診断方法としてALA-PDDが推奨されるなど²⁾、膀胱癌に対するALA-PDDの普及が進められている。

現行のALA-PDD診断システムでは、PpIXの吸収係数が最大となる波長405 nm付近の青紫色励起光が採用されている。しかし、青紫色光は膀胱組織内でヘモグロビンにより強く吸収される¹³⁾。また、膀胱組織内ではレイリー散乱およびミー散乱の影響が支配的となる。そのため、波長405 nm付近はPpIXの吸収波長帯の中でも散乱の影響が大きい。したがって、膀胱組織による吸収・散乱により、青紫色励起光は強く減衰される。現行の青紫色励起光による膀胱癌のALA-PDDでは、ALA塩酸塩顆粒剤 (アラグリオ®顆粒剤分包1.5 g, 中外製薬) の適正使用ガイドにおいて、「青色励起光は膀胱壁表面から

1 mm以内にしか透過できない」とされている¹⁴⁾。これは、膀胱筋層の厚さが3 mmであることから、ALA-PDDにおいても筋層浸潤性膀胱癌等の膀胱壁深部の癌を見落とす可能性が高いことを意味する¹⁵⁾。膀胱壁深部の癌の効率的な診断に向け、ALA-PDDのさらなる診断深度の拡張が求められる。

PDDにおける診断深度の拡張に向けたアプローチとして、対象患部における光侵達深さと光感受性薬剤の光吸収特性それぞれの波長依存性から、腫瘍位置に対する光感受性薬剤の励起効率を比較して決定する手法が提案されている^{16,17)}。例えば、悪性脳腫瘍に対するALA-PDDでは、波長405 nmと比較して波長633 nmの励起光の有効性が臨床研究により示されている¹⁸⁾。ただし、波長633 nmの励起光は、蛍光測定にマルチチャンネル分光器を用いることを想定している。ALA-PDDにおいてはPpIXの蛍光波長帯 (蛍光ピーク波長: 635 nm) と重なるため、内視鏡下のような小型な実装を求められる場合不向きである。内視鏡下ALA-PDDを想定した検討では、PpIXの蛍光波長帯未満 (<600 nm) の波長を候補に検討する必要がある。例えばこれまでに、粘膜内胃癌に対する内視鏡下ALA-PDDを想定した検討では、励起光波長405 nmと比較して励起光波長505 nmによる診断深度拡張における有効性が示されている¹⁹⁾。膀胱癌を対象に診断深度の拡張を行うには、膀胱組織の光学特性値による診断深度と励起光波長の関係性を評価する必要がある。

2. 目的

本論文の目的は、膀胱壁深部の癌診断の実現に向け、励起光波長の選択によるALA-PDDの診断深度の拡張を検証し、その有効性を示すことである。診断深度の拡張による膀胱壁深部に分布する癌検出の実現は、膀胱癌診断における偽陰性の減少に貢献する。膀胱癌の見落としを減らすことにより、TURBTにおける膀胱癌の残存が減少し、再発症例の削減につながる。本論文では、励起光の膀胱組織内における光侵達深さの波長依存性に着目する。ヒト膀胱と機能や構造が類似したブタ膀胱を代替サンプルとして仮定する^{15,20)}。励起光の減衰とPpIXの光吸収特性に基づいた検出蛍光強度の数値モデルを構築する。これにより、膀胱壁表面からの腫瘍位置深さに対する、励起光波長ごとの検出蛍光強度を算出する。算出した検出蛍光強度を比較し、深部を最も効率よく励起可能な波長を決定する。ブタ膀胱組織を用いたex vivo実験により、決定した励起光波長による蛍光像と、現行のALA-PDDにおける励起光波長405 nmによる蛍光像を比較し、検出可能な腫瘍位置の深さが拡大することを実証する。これにより、膀胱壁深部の癌診断に向けた、ALA-PDD内視鏡システムの設計指針を与えることを目的とする。

3. 対象と方法

3.1 数値モデルによる励起光波長に対する診断深度の評価

3.1.1 膀胱組織数値モデル

膀胱組織は層状の構造とし、粘膜、筋層の2層モデルを仮定した。各層の厚さは、ブタ膀胱のヘマトキシリン・

エオシン (Hematoxylin Eosin: HE) 染色膀胱片の解析結果から、膀胱壁表面から 0~0.5 mm を粘膜, 0.5 mm 以深を筋層と設定した。各層に光学特性値を割り当て、膀胱組織内の光伝搬計算に用いた。膀胱壁表面から PpIX が蓄積した腫瘍までの深さ (以下、腫瘍深さと呼ぶ) を変えて、検出蛍光強度を評価した。

3.1.2 膀胱鏡下 ALA-PDD における検出蛍光強度の定式化

Fig.1 に膀胱組織内における励起光および蛍光の減衰、励起光を吸収し蛍光を発する過程を示す。膀胱組織内で粘膜表面に照射された励起光は、吸収と散乱により指数関数的に減衰すると近似できる。照射された励起光の強度が減衰により $1/e$ となる深さ (光侵入深さ) δ [mm] は、吸収係数 μ_a [mm⁻¹], 散乱係数 μ_s [mm⁻¹], 異方性因子 g を用いて、

$$\delta = \frac{1}{\sqrt{3\mu_a\{\mu_a + \mu_s(1-g)\}}} \quad (1)$$

と表現できる²¹⁾。これは、膀胱組織中では散乱が支配的であり ($\mu_a \ll 3\mu_s(1-g)$)、また、ALA-PDD の励起光が観察領域において一様に分布すると近似できるためである。膀胱組織の g は 0.9 とした²²⁾。

粘膜表面から深さ z [mm] の励起光強度 $I(\lambda, z)$ は、粘膜表面の励起光強度 I_{suf} 、励起光の光侵入深さ $\delta_{\text{ex}}(\lambda)$ [mm⁻¹] を用いて、

$$I(\lambda, z) = I_{\text{suf}} \exp\left(-\frac{z}{\delta_{\text{ex}}(\lambda)}\right) \quad (2)$$

となる²³⁾。PDD における励起光強度では、蛍光分子の励起飽和などの非線形現象は無視できると考えられるため、蛍光強度と励起光強度は比例関係となり、蛍光強度 $F(\lambda, z)$ は、

$$F(\lambda, z) = I(\lambda, z) A \phi \varepsilon(\lambda) L C \quad (3)$$

と表現できる。このとき、 A は集光面積、 ϕ は蛍光量子収率、 $\varepsilon(\lambda)$ は PpIX のモル吸光係数、 L は腫瘍組織の厚さ、 C は PpIX の濃度を表す。蛍光も励起光と同様に生体組織内で指数関数的に減衰すると近似できるため、内視鏡下で検出可能な粘膜表面における蛍光強度 $F_{\text{suf}}(\lambda, z)$ は、

$$F_{\text{suf}}(\lambda, z) = F(\lambda, z) \exp\left(-\frac{z}{\delta_f}\right) \quad (4)$$

と表せ、式 (2), (3), (4) より、

$$F_{\text{suf}}(\lambda, z) = A \phi \varepsilon(\lambda) L C I_{\text{suf}} \exp\left(-\frac{z}{\delta_{\text{ex}}(\lambda)}\right) \exp\left(-\frac{z}{\delta_f}\right) \quad (5)$$

となる^{19,24)}。 δ_f は蛍光波長の光侵入深さを表す。粘膜表面に PpIX が存在する場合の蛍光強度 $F_{\text{max}}(\lambda)$ により規格化した規格化表面蛍光強度 Γ は、

$$\Gamma = \frac{F_{\text{suf}}(\lambda, z)}{F_{\text{max}}(\lambda)} \quad (6)$$

となる。規格化により、励起光波長、腫瘍深さに依存しないパラメータは相殺され、励起光波長の差異による検出蛍光強度を比較できる。励起光波長の Γ を比較し、膀胱癌 ALA-PDD に用いる励起光波長の検討を行った。本研究では ALA-PDD において励起光を遮断する必要があるため、励起光波長 400~600 nm において、各腫瘍深さにおける Γ が最大となる波長を評価した。

3.1.3 膀胱壁組織の光学特性値

規格化表面蛍光強度の算出に必要な μ_a と μ_s は、ヘモグロビンをはじめとする生体組織内部の影響を考慮するため、実測した光学特性値を用いた。粘膜表面から 0~0.5 mm を粘膜、1.0~1.5 mm を筋層としてクライオトーム (CM1850, Leica, Germany) を用いてブタ膀胱組織を分離した。双積分球光学系により測定した拡散反射率 R_d および総透過率 T_t から、inverse Monte Carlo 法により μ_a と μ_s を算出した^{25,26)}。実測した μ_a と μ_s を用いて、式 (1) から光侵入深さを算出した。

3.2 ex vivo 実験による励起光波長に対する診断深度の評価

3.2.1 蛍光観察に用いる光学系の構築

Fig.2 に蛍光観察に用いた実験光学系を示す。光源には現行 ALA-PDD で用いられている励起光波長である 405 nm を中心波長とする LED (M405L3, Thorlabs, USA) と数理モデル評価により決定した 505 nm を中心波長とする LED (M505L3, Thorlabs) を用いた。各励起光は、ダイクロイックミラー (Cut-on 450 nm: #69-898, Edmund

Fig.1 Schematic diagram of fluorescence observation process.

Fig.2 Optical setup. L1: Condenser lens ($f = 16$ mm: ACL25416U-A, Thorlabs), L2: Achromatic doublets ($f = 35$ mm: AC254-035-A, Thorlabs), L3: TV lens (MLM3X-MP, computar, Japan), DM1: Dichroic mirror (Cut-on 450 nm: #69-898, Edmund optics), DM2: Dichroic mirror (Cut-on 567 nm: DMLP567R, Thorlabs), F1: Short-pass filter (Cut-off 550 nm: FESH0550, Thorlabs), F2: Long-pass filter (Cut-in 600 nm: FELH0600, Thorlabs), A: Aperture diaphragm, CCD camera (CoolSNAP MYO, photometrics, USA).

optics, Cut-on 567 nm: DMLP567R, Thorlabs) を用いて合波した後、ケーラー照明光学系を経て、一様な光強度分布となるようにサンプルへ照射した。サンプルの蛍光像を、ショートパスフィルター (Cut-off 550 nm: FESH0550, Thorlabs) およびロングパスフィルター (Cut-in 600 nm: FELH0600, Thorlabs) により励起光を除去して、冷却 CCD (CoolSNAP MYO, photometrics, USA) に結像させて取得した。サンプルを可動式のステージ上に設置して、サンプル表面に結像面がくるように調節して蛍光像を取得した。

3.2.2 蛍光観察に用いるサンプルの調整

PpIX が蓄積した腫瘍組織を模擬するために、PpIX ペレットを作製した。まず、PpIX (P8293-1G, SIGMA-Aldrich, USA) をジメチルスルホキシド (D4540-100ML, SIGMA-Aldrich) に溶解した PpIX 溶液とエポキシ樹脂 (87136, TAMIYA, Japan) を混合した。PpIX の終濃度は、これまでの膀胱における腫瘍細胞への PpIX 蓄積量の報告例²⁷⁾を参考に、 $10 \mu\text{M}$ とした。次に、混合した溶液を厚さ 0.5 mm のシート状になるようスライドガラス上に成形し、溶液を暗室で 3 日間保管して硬化させた。直径 2.5 mm のパンチキット (3376, POLARIS, Japan) を用いて型抜きを行い、PpIX ペレットとした。

ブタ膀胱組織は約 1 cm 四方になるようにメスで成形した。膀胱壁表面における観察では、ブタ膀胱粘膜表面に PpIX ペレットを置き、励起光を照射して蛍光観察を行った。膀胱粘膜表面下に置かれた PpIX ペレットの蛍光観察では、クライオトームにより膀胱サンプル片を薄切し、切断面に PpIX ペレットを置き、薄切した膀胱片を被せることにより、膀胱組織中の癌を模擬した。

3.2.3 蛍光観察手法

励起光のパワー密度を、パワーセンサー (12A-V1-ROHS, Ophir Optonics, Israel) を用いて、それぞれ 8.0 mW/cm^2 に調整した。励起光を切り替えて照射し、各波長での PpIX ペレットの蛍光像を取得 (露光時間: 0.1 s) した。蛍光像取得後、形状確認のため室内照明下で同撮影系にて明視野像を取得した。画像処理ソフトウェアである ImageJ により直径 1 mm の円内における平均画素値を測定し、バックグラウンドを引いた値を蛍光強度 F とした。蛍光強度 F に

$$f(F) = \frac{\log(F)}{\log(65535)} \quad (7)$$

を適用し、対数表示とした。膀胱壁表面に PpIX ペレットを配置した蛍光観察では、PpIX を含まないペレットにおける平均画素値をバックグラウンドとし、膀胱表面下に配置した PpIX ペレットの蛍光観察では、膀胱サンプルのみにおける平均画素値をバックグラウンドとした。取得画像には、PpIX ペレットのサイズを 2.5 mm として算出して、スケールバーを表示した。蛍光観察に用いた膀胱サンプル片をクライオトームにより $50 \mu\text{m}$ に薄切し、HE 染色を行った。光学顕微鏡により、膀胱壁表面から PpIX ペレットまでの深さを求めた。

4. 結果

4.1 数理モデルによる ALA-PDD 励起光波長の検討

ブタ膀胱粘膜および筋層の吸収スペクトルおよび散乱スペクトル、光侵入深さを Fig.3 に示す。粘膜、筋層どちらの吸収スペクトルでも、波長 420 nm 付近および波長 550 nm 付近にヘモグロビンの吸収ピークが検出された¹³⁾。また、散乱スペクトルでは波長が大きくなるにつれて値が小さくなった。PpIX の吸収ピーク波長 ($405, 505, 541, 575, 630$ nm) のうち、波長 405 nm における光侵入深さが最小となった¹⁹⁾。

式 (6) から、各波長における腫瘍深さに対する規格化表面蛍光強度を Fig.4 に示す。腫瘍深さ 0.8 mm までは現行の膀胱癌 ALA-PDD で用いられている励起光波長 405 nm 付近の規格化表面蛍光強度が最高となった。一方、腫瘍深さ 0.9 mm 以上は励起光波長 505 nm の規格化表面蛍光強度が最高となった。これは、腫瘍深さが大きくなるにつれ、波長 405 nm と 505 nm における PpIX 吸収係数の差と比較して、膀胱組織による光減衰が大きくなったことが理由である。

4.2 ex vivo 実験による観察深度に対する励起光波長評価

Fig.5 に室内照明光および波長 405 nm と 505 nm 励起による蛍光像を示す。Fig.5(b), (c) は膀胱壁表面とした場合の蛍光像である。対数蛍光強度は波長 405 nm 励起において 7.4×10^{-1} arb. units, 波長 505 nm 励起において 5.8×10^{-1} arb. units であった。膀胱壁表面においては波長 405 nm 励起による対数蛍光強度が波長 505 nm 励起による対数蛍光強度の 1.3 倍であった。膀胱壁表面においては現行の ALA-PDD で用いられている励起波長 405 nm の蛍光強度が高い。Fig.5(b) に示した蛍光像の膀胱組織における蛍光強度が、膀胱壁表面下に PpIX ペレットを配置

Fig.3 (a) Absorption and (b) scattering coefficients porcine bladder of mucosa. (c) Absorption and (d) scattering coefficients of porcine bladder muscularis. Penetration depths porcine bladder (e) mucosa and (f) muscularis. Each error bars in (a-d) indicate the standard deviation. Each error bars in (e, f) indicate the ranges between the maximum and minimum penetration depth calculated by using the pairs of the maximum absorption and scattering coefficients and the minimum absorption and scattering coefficients of the standard deviations.

した蛍光観察における PpIX ペレット部分の蛍光強度と同等であった。

Fig.4(e), (f)は腫瘍深さ 0.8 ± 0.1 mm, Fig.4(h), (i)は腫瘍深さ 0.9 ± 0.1 mm, Fig.4(k), (l)は腫瘍深さ 1.9 ± 0.1 mm の地点に PpIX ペレットを配置し、波長 405 および 505 nm の励起光を照射した蛍光像を示す。それぞれの対数蛍光強度は (e) 5.2×10^{-1} , (f) 5.4×10^{-1} , (h) 4.5×10^{-1} , (i) 5.1×10^{-1} , (k) N.A., (l) 3.3×10^{-1} arb. units であった。数理モデルを用いた検討と同様に、腫瘍深さが大きくなるにつれて、波長 405 nm 励起時と比べ波長 505 nm 励起時における蛍光強度が高くなった。

5. 考察

5.1 数理モデルによる ALA-PDD 励起光波長の検討

ブタ膀胱において、PpIX の吸収ピーク波長のうち、波長 405 nm における光侵入深さが最小となった。ヘモグ

ロビンによる吸収および粘膜による散乱が原因といえる。したがって、励起光波長 405 nm を用いた場合、膀胱壁深部の癌を効率的に励起することは困難といえる。

励起光波長 505 nm による診断深度拡張が、数理モデルを用いた評価から示された。現行の励起光波長 405 nm は膀胱壁表面から 1 mm 以内にしか透過できない¹⁴⁾。そのため、励起光波長 505 nm による診断深度拡張は、筋層浸潤性膀胱癌等の膀胱壁深部の癌見落としの抑制につながる事を本結果は示している。

5.2 ex vivo 実験による観察深度に対する励起光波長評価

Fig.5(b)に示した蛍光像の膀胱組織における蛍光強度が、膀胱壁表面下に PpIX ペレットを配置した蛍光観察における PpIX ペレット部分の蛍光強度と同等であった。膀胱壁表面下に PpIX ペレットを配置した蛍光観察では、膀胱組織で蛍光は検出されなかったため、膀胱壁表面に

Fig.4 (a) Relations between cancer depth, excitation wavelength, and fluorescence intensity. (b) Cross sections at cancer depth of 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mm. (c) Excitation wavelength showing maximum fluorescence intensity at each cancer depth.

配置した PpIX ペレットの蛍光により膀胱組織全体が照らされ、蛍光強度が高くなったと考えられる。

腫瘍深さ 0.8 mm, 0.9 mm において波長 505 nm 励起時の蛍光強度が波長 405 nm 励起時の蛍光強度よりも高かった。腫瘍深さ 1.9 mm においては、波長 505 nm 励起時には蛍光が検出された一方、波長 405 nm 励起時には蛍光が検出されなかった。したがって、腫瘍深さ 0.8 mm 以深の癌検出には励起光波長 505 nm が有効であると示唆された。

5.3 ヒト膀胱組織における励起光波長に対する検出蛍光強度の推定

本研究では、ヒト膀胱の代替サンプルとして機能や構造が類似したブタ膀胱を用いた^{15,20)}。光学特性値をもと

にヒト膀胱における励起光波長と検出蛍光強度の関係を評価した。Fig.6 に本研究で測定したブタ膀胱の粘膜、筋層における光学特性値とこれまでに報告されているヒト膀胱における各層の光学特性値²²⁾を示す。文献値では波長 405 nm に対応する値がないため、他の波長における値からの推定になるが、吸収係数は共に同等の値と予想できる¹³⁾。散乱係数は、レイリー散乱およびミー散乱の影響により、どちらの組織でも波長が長くなるにつれて値が小さくなった。ただし、ヒト膀胱とブタ膀胱では、ブタ膀胱で波長 405 nm と波長 505 nm の散乱係数の比が大きくなると予想される。これは、ブタ膀胱の方が各波長間の光侵達深さが大きく異なることを意味する。そのため、ヒト膀胱において波長 505 nm 励起が有効になる腫瘍深さは、ブタ膀胱による評価で求めた 0.9 mm より大きい領域となることが推察される。

生体内におけるヒトの膀胱組織は血流が多く、切除したブタ膀胱組織では血流がないため、光学特性値に影響を及ぼすことが考えられる。in vivo 実験と ex vivo 実験の光学特性値を比較すると、ヘモグロビンの量が増えるため、in vivo 実験における吸収係数が ex vivo 実験における吸収係数より波長 405 nm 付近において 30%大きく、波長 505 nm 付近においては 20%大きいことが報告されている²⁸⁾。したがって、波長 405 nm の励起光は波長 505 nm の励起光と比較してより強く減衰されるため、蛍光強度が小さくなる。そのため生体内の血流を考慮すると、波長 505 nm 励起が有効になる腫瘍深さは切除したサンプルを用いた評価で求めた 0.9 mm より小さい領域となることが推察される。

5.4 数値モデルと ex vivo 実験による規格化蛍光強度の比較

Fig.7 に腫瘍深さ 0 mm とした場合の蛍光強度で規格化した、数値モデルを用いた評価と ex vivo 実験による蛍光観察で得られた蛍光強度を示す。膀胱壁表面に PpIX ペレットを配置した場合、数値モデルを用いた評価および ex vivo 実験どちらにおいても波長 405 nm の励起光照射時における蛍光強度が高くなった。したがって、膀胱壁表面においては現行の励起光波長 405 nm が有効であると示された。膀胱壁表面下に PpIX ペレットを配置した蛍光観察において、腫瘍深さが深くなるにつれて、波長 405 nm の励起光照射時に比べ波長 505 nm の励起光照射時における蛍光強度が高くなった。膀胱壁深部においては PpIX の吸収係数の違いに伴う影響と比べ、膀胱組織による励起光の減衰に伴う影響が大きく、波長 405 nm の励起光照射時は励起光が強く減衰されたため、蛍光強度が低くなった。したがって、膀胱壁深部においては励起光波長 505 nm が有効であると示された。

5.5 数値モデルと ex vivo 実験の膀胱壁表面における相対蛍光強度の比較

数値モデルを用いて算出した相対蛍光強度と ex vivo 実験により求めた相対蛍光強度を比較した。腫瘍深さを 0 mm とした場合、数値モデルを用いた評価では波長 405 nm 励起時と波長 505 nm 励起時の相対蛍光強度が 11.2 であり、ex vivo 実験による評価では 5.9 であった。

Fig.5 Images of PpIX pellets at the surface of mucosa (a) with white light, (b) with an excitation wavelength 405 nm, (c) with an excitation wavelength 505 nm. Images at depth: $d = 0.8 \pm 0.1$ mm from mucosal surface (d) with white light, (e) with an excitation wavelength 405 nm, (f) with an excitation wavelength 505 nm. Images at $d = 0.9 \pm 0.1$ mm from mucosal surface (g) with white light, (h) with an excitation wavelength 405 nm, (i) with an excitation wavelength 505 nm. Images at $d = 1.9 \pm 0.1$ mm from mucosal surface (j) with white light, (k) with an excitation wavelength 405 nm, (l) with an excitation wavelength 505 nm.

ex vivo 実験は波長バンド幅のある LED 光源を用いたため、差が生じたと考えられる。そこで、数理モデルにおいて LED の発光スペクトルに合わせて蛍光強度を算出した。ショートパスフィルタによる減衰を考慮して、396 ~ 548 nm で LED の発光スペクトルと PpIX の吸収スペクトルが重なる部分を 1 nm ごとに積分した¹⁹⁾。*ex vivo* 実験では 2 つの励起光波長で照射するパワー密度を統一したため、発光スペクトルをもとにそれぞれの LED において積分し、規格化した。LED の発光スペクトルを考慮した計算の結果、相対蛍光強度が 6.5 となった。LED の発光スペクトルを考慮した計算により、*ex vivo* 実験における値との差が縮まることが示された。

膀胱壁表面からの深さに対する蛍光強度の減衰率が、*ex vivo* 実験と比較して数理モデルを用いた場合に大きくなった。原因として、数理モデル構築に向けた光学特性値測定時の誤差が考えられる。光学特性値測定時の組織への圧迫によるヘモグロビン密度の増加に伴い、吸収係数および散乱係数は増加する²⁹⁾。また、生体から組織を採取してから時間経過に伴い組織の水分が蒸発するため、ヘモグロビンの密度が増加し、吸収係数および散乱係数は増加する³⁰⁾。本研究においては、ブタ膀胱の層構造を基に組織の厚さを 0.5 mm に統一してスライドガラスに挟んだため、組織を圧迫したと考えられる。また、生体から組織を採取後、冷凍保存したのちに光学特性値を測定したため、蒸発により吸収係数および散乱係数が増加したと考えられる。したがって、数理モデルにおける減衰率が大きくなり、*ex vivo* 実験における減衰率と差が生じたと考えられる。

Fig.6 (a) Absorption and (b) scattering coefficients of porcine bladder and human bladder. Error bars at porcine bladder's data indicate the standard deviation obtained from bladder at three different locations. Error bars at human bladder's data indicate the standard error of the mean. Data of porcine bladder are measured in this paper. Data of human bladder are taken from Ref. 22, Table 1.

Fig.7 Relations between normalized fluorescence intensity and cancer depth at numerical calculation and *ex vivo* evaluation. Error bars in numerical calculation indicate the ranges between the maximum and minimum normalized fluorescence intensity calculated by using the pairs of the maximum absorption and scattering coefficients and the minimum absorption and scattering coefficients of the standard deviations shown in Fig.3. Error bars in *ex vivo* evaluation indicate the standard deviation about depth measurement obtained from bladder at different locations.

6. 結論

本研究は膀胱組織内の光減衰およびPpIXの光吸収特性を考慮して励起光波長の検討を行うことにより、膀胱癌におけるALA-PDDの診断深度拡張による膀胱壁深部の癌診断を目的とした。数値モデルを用いた計算および*ex vivo*実験により、膀胱壁深部のALA-PDDで励起光波長505 nmが有効であることを実証した。したがって、励起光波長505 nmを用いることで膀胱壁深部の癌診断が可能であると示唆された。今後は、膀胱癌のALA-PDDにおける励起光波長505 nmの臨床応用に向け、生体内における有効性の評価が必要であると考えられる。また、膀胱癌の深達度診断に向けて、励起光波長の違いによる蛍光強度比等を利用した膀胱癌の深さ推定が必要であると考えられる。

謝辞

本研究の遂行にあたり、医学的な見地からご指導頂きました、高知大学医学部泌尿器科学講座の井上啓史教授、福原秀雄助教に深く感謝申し上げます。また、英文校正をしていただいた、大阪大学大学院工学研究科のSochi Ogbonna氏に深く感謝申し上げます。本研究はJSPS科研費JP19K22966, JP19K12822の助成を受けたものです。

利益相反の開示

開示すべき利益相反なし。

引用文献

- 1) Chopin DK, Gattegno B. Superficial bladder tumors. *Eur Urol.* 2001; 40: 533-541.
- 2) 日本泌尿器科学会. 膀胱癌診療ガイドライン 2019年版. 医学図書出版株式会社; 2019.
- 3) 福原 秀雄, 井上 啓史. Photodynamic diagnosis for bladder cancer. *日レ医誌.* 2019; 40: 83-86.

- 4) 野口 純男, 高瀬 和紀, 窪田 吉信, 上村 博司, 斎藤 和男, 増田 光伸, 矢尾 正祐, 穂坂 正彦. 局所浸潤膀胱癌に対する膀胱全摘除術施行症例の予後規定因子の解析. *日本泌尿器科学会雑誌.* 1998; 89: 816-822.
- 5) 石岡 淳一郎, 影山 幸雄, 一柳 暢孝, 齊藤 吉宏, 野津 聡, 西田 一典, 福田 博志, 東 四雄. 浸潤性膀胱癌でのturbtと化学放射線療法による膀胱温存療法. *日本泌尿器科学会雑誌.* 2007; 98: 752-756.
- 6) Kausch I, Sommerauer M, Montorsi F, Stenzl A, Jacqmin D, Jichlinski P, Jocham D, Ziegler A, Vonthein R. Photodynamic diagnosis in non-muscle-invasive bladder cancer: A systematic review and cumulative analysis of prospective studies. *Eur Urol.* 2010; 57: 595-606.
- 7) 三宅 牧人, 桑田 真臣, 穴井 智, 辰巳 佳弘, 井上 剛志, 千原 良友, 平尾 佳彦, 藤本 清秀. 5-アミノレブリン酸を使用した蛍光膀胱鏡補助下 経尿道的腫瘍切除術の診断・治療成績. *Japanese J Endourol.* 2014; 27: 373-381.
- 8) 藤本 清秀, 松村 善昭, 三宅 牧人, 千原 良友, 近藤 秀明, 穴井 智, 井上 剛志, 平尾 佳彦. 膀胱癌における5-aminolevulinic acidを用いた蛍光膀胱鏡下経尿道的 腫瘍切除術および尿中剥離細胞に対する光学的診断. *日レ医誌.* 2010; 30: 399-404.
- 9) Ueno Y, Takeuchi M, Tamada T, Sofue K, Takahashi S, Kamishima Y, Hinata N, Harada K, Fujisawa M, Murakami T. Diagnostic accuracy and interobserver agreement for the vesical imaging-reporting and data system for muscle-invasive bladder cancer: A multireader validation study. *Eur Urol.* 2019; 76: 54-56.
- 10) Divrik RT, Ahin AF, Yildirim Ü, Altok M, Zorlu F. Impact of routine second transurethral resection on the long-term outcome of patients with newly diagnosed pT1 urothelial carcinoma with respect to recurrence, progression rate, and disease-specific survival: A prospective randomised clinical trial. *Eur Urol.* 2010; 58: 185-190.
- 11) 田中 徹, 石塚 昌宏, 小倉 俊一郎, 井上 克司. 5-アミノレブリン酸を用いたPDD, PDTの現状と将来. *Japanese J Endourol.* 2011; 24: 29-34.
- 12) 井上 啓史, 久野 貴平, 福原 秀雄, 濱口 卓也, 深田 聡, 幸島 尚, 鎌田 雅行, 執行 太朗, 阪倉 直樹, 笠原 高太郎, 渡邊 裕修, 香西 哲夫, 安田 雅春, 片岡 真一, 谷村 正信, 倉林 睦, 降幡 睦夫. 光力学診断補助下経尿道的膀胱腫瘍切除術の臨床経験. *日本泌尿器科学会雑誌.* 2009; 100: 661-670.
- 13) Faber DJ, Mik EG, Aalders MCG, van Leeuwen TG. Light absorption of (oxy-)hemoglobin assessed by spectroscopic optical coherence tomography. *Opt Lett.* 2003; 28: 1436-1438.
- 14) 藤本 清秀, 井上 啓史. 適正使用ガイド 光線力学診断用剤 処方箋医薬品アラグリオ顆粒剤分包1.5 g アミノレブリン酸塩酸塩顆粒剤. 中外製薬; 2017. 6 p.
- 15) Narumi Y, Kadota T, Inoue E, Kuriyama K, Horinouchi T, Kasai K, Maeda H, Kuroda M, Kotake T, Ishiguro S, Kuroda C. Bladder wall morphology: In vitro MR imaging-histopathologic correlation. *Radiology.* 1993; 187: 151-155.
- 16) Jermyn M, Kolste K, Pichette J, Sheehy G, Angulo-Rodriguez L, Paulsen KD, Roberts DW, Wilson BC, Petrecca K, Leblond F. Macroscopic-imaging technique for subsurface quantification of near-infrared markers during surgery. *J Biomed Opt.* 2015; 20: 036014.
- 17) Kolste KK, Kanick SC, Valdés PA, Jermyn M, Wilson BC,

Roberts DW, Paulsen KD, Leblond F. Macroscopic optical imaging technique for wide-field estimation of fluorescence depth in optically turbid media for application in brain tumor surgical guidance. *J Biomed Opt.* 2015; 20: 026002.

- 18) Roberts DW, Olson JD, Evans LT, Kolste KK, Kanick SC, Fan X, Bravo JJ, Wilson BC, Leblond F, Marois M, Paulsen KD. Red-light excitation of protoporphyrin IX fluorescence for subsurface tumor detection. *J Neurosurg.* 2018; 128: 1690-1697.
- 19) Ihara D, Hazama H, Nishimura T, Morita Y, Awazu K. Fluorescence detection of deep intramucosal cancer excited by green light for photodynamic diagnosis using protoporphyrin IX induced by 5-aminolevulinic acid: An ex vivo study. *J Biomed Opt.* 2020; 25: 1.
- 20) Wang Z, Lee CSD, Waltzer WC, Liu J, Xie H, Yuan Z, Pan Y. In vivo bladder imaging with microelectromechanical-systems-based endoscopic spectral domain optical coherence tomography. *J Biomed Opt.* 2007; 12: 034009.
- 21) Gardner CM, Jacques SL, Welch AJ. Fluorescence spectroscopy of tissue: Recovery of intrinsic fluorescence from measured fluorescence. *Appl Opt.* 1996; 35: 1780-1792.
- 22) Van Staveren HJ, Keijzer M, Keesmaat T, Jansen H, Kirkel WJ, Beek JF, Star WM. Integrating sphere effect in whole-bladder-wall photodynamic therapy: III. Fluence multiplication, optical penetration and light distribution with an eccentric source for human bladder optical properties. *Phys Med Biol.* 1996; 41: 579-590.
- 23) 石原 美弥. レーザー生体相互作用とその治療と診断への応用. *光学.* 2012; 41: 548-555.
- 24) Walker DA. A fluorescence technique for measurement of concentration in mixing liquids. *J Phys E.* 1987; 20: 217-224.
- 25) 本多 典広, 石井 克典, 南條 卓也, 栗津 邦男. 双積分球光学系と逆モンテカルロ法を用いた組織の可視・近赤外域光学特性値算出システムの開発とその評価. *日レ医誌.* 2012; 32: 421-428.
- 26) Shimojo Y, Nishimura T, Hazama H, Ozawa T, Awazu K. Measurement of absorption and reduced scattering coefficients in Asian human epidermis, dermis, and subcutaneous fat tissues in the 400- to 1100-nm wavelength range for optical penetration depth and energy deposition analysis. *J Biomed Opt.* 2020; 25: 1.
- 27) Hagiya Y, Fukuhara H, Matsumoto K, Endo Y, Nakajima M, Tanaka T, Okura I, Kurabayashi A, Furihata M, Inoue K, Shuin T, Ogura S. Expression levels of PEPT1 and ABCG2 play key roles in 5-aminolevulinic acid (ALA)-induced tumor-specific protoporphyrin IX (PpIX) accumulation in bladder cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013; 10: 288-295.
- 28) Salomatina E, Yaroslavsky AN. Evaluation of the in vivo and ex vivo optical properties in a mouse ear model. *Phys Med Biol.* 2008; 53: 2797-2807.
- 29) Chan EK, Sorg B, Protsenko D, O'Neil M, Motamedi M, Welch AJ. Effects of compression on soft tissue optical properties. *IEEE J Sel Top Quantum Electron.* 1996; 2: 943-950.
- 30) Cilesiz I, Welch AJ. Light dosimetry: Effects of dehydration and thermal damage on the optical properties of the human aorta: Errata. *Appl Opt.* 1993; 32: 477-487.

著者紹介

滝島 裕貴 (Hiroki Takishima)

2020 年 4 月, 大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻入学。

井原 大佑 (Daisuke Ihara)

2019 年 4 月 大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻入学

西村 隆宏 (Takahiro Nishimura)

2013 年 3 月, 大阪大学大学院情報科学研究科情報数理学専攻博士後期課程修了 (博士 (情報科学)). 2013 年 4 月, 日本学術振興会特別研究員 (大阪大学大学院医学系研究科). 2014 年 7 月, 大阪大学大学院情報科学研究科特任助教. 2018 年 6 月, 大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻助教. 専門は情報光学, 生体光学. 日本レーザー医学会, 日本光学会, 応用物理学会, 各会員.

間 久直 (Hisanao Hazama)

2001 年 3 月, 東京理科大学大学院理工学研究科電気工学専攻博士後期課程修了 (博士 (工学)). 2001 年 4 月, 川崎重工株式会社技術研究所. 2006 年 6 月, 大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻, 特任研究員. 2009 年 6 月, 同研究科附属高度人材育成センター助教. 2014 年 4 月, 同研究科環境・エネルギー工学専攻講師. 2015 年 4 月, 同専攻准教授. 日本レーザー医学会 (評議員, 安全教育委員会委員), 日本レーザー歯学会 (編集委員会査読委員), 日本レーザー治療学会 (評議員), 日本光線力学学会, 応用物理学会, 電気学会, レーザー学会, 日本質量分析学会, The American Society for Mass Spectrometry, 各会員.

栗津 邦男 (Kunio Awazu)

1984 年 3 月, 神戸大学大学院工学研究科修士課程修了. 1984 年 4 月, 住友電気工業株式会社研究開発本部研究員. 1993 年 6 月, テキサス州立大学 MD アンダーソン癌研究所客員研究員. 1995 年 9 月, 自由電子レーザー研究所 (通産省系プロジェクト研究所) 主任研究員, 1999 年 10 月, 超分子工学研究部部長. 1996 年 4 月, 博士 (工学) 神戸大学, 1997 年 3 月, 博士 (医学) 順天堂大学. 2000 年 5

月, 大阪大学大学院工学研究科教授となり現在に至る.
2007 年 4 月, 大阪大学国際医工情報センター教授兼任.
2011 年 10 月, 大阪大学大学院生命機能研究科教授兼任.
九州大学大学院客員教授, 光産業創成大学院大学客員教授,
千歳科学技術大学客員教授. 専門は, 医用工学, 生体組織光学,
レーザー医療機器のレギュラトリーサイエンス. 日本レーザー医学会 (副理事長), 日本レーザー歯学会 (理事), 日本光線力学学会 (幹事), 日本レーザー治療学会 (理事), 日本レーザー獣医学研究会 (副会長) レーザー学会 (諮問員), 日本生体医工学会, SPIE 等.