ヘマトポルフィリン誘導体とレーザーによる癌診断

Photodynamic Diagnosis of Hematoporphyrin Derivative and Laser

加藤治文 山本英樹 古川欣也 中村治彦
河手典彦 松島 康 林 永信 小中千守
東京医科大学外科第一講座

Harubumi Kato, Hideki Yamamoto, Kinya Furukawa,
Haruhiko Nakamura, Norihiko Kawate, Yasushi Matsushima,
Naganobu Hayashi, Chimori Konaka
Dept. of Surgery I Tokyo Medical College

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) has been recognized as a new expected procedure in treatment of early stage cancer for this decade. We have already treated more than 170 cases of lung cancer with PDT. And also Photodynamic diagnosis for endoscopical occult cancer has been paid attention in the world. We developed excimer dye laser cancer detection and treatment system in cooperation with Hamamatsu Photonics Corporation. The excimer dye laser is puls laser and has a better penetrating ability to the tissue than argon dye laser which is continuous wave. In this system, fluorescence from lung cancer can be observed in 15 cases of 16. And immediately PDT could be performed for these patients, switching two different wave length laser light.

We supposed that there is a possible application for the detection of early stage lung cancer with this system.

1. はじめに

ヘマトポルフィリン誘導体 (hematoporphyrin derivative, HpD) とレーザー光線による光線力学的治療 (Photodynamic therapy, PDT) が癌の治療法の一つとして注目を浴びるようになってすでに十年が経過した。我々はHpDとアルゴン・ダイ・レーザーによるPDTの効果を1980年以来発表し、特に早期癌の根治的治療の可能性を立証した。^{1)・2)} これに対し、米国、カナダでの治療は主として進行癌に対して行われており、局所

病変の改善を目的としたものであった。しかしPDTの本来の目的は、早期癌の根治的治療である。人口構造の高齢化やquality of lifeの向上という観点にたてば、PDTは、将来、外科的治療にとって変わることも予想される。そのためには早期癌としての内視鏡的診断、また局所リンパ節移転の有無の診断、癌の浸潤度の診断が確立されねばならない。これはPDTにとって最も重要な問題である。現在、世界各国でPDTを確立した治療法とするためにレーザー装置や光感受性物質の開発、改良が

図1. エキシマ・ダイ・レーザー癌診断治療装置

なされている。それと同時に光化学反応の原理を応用した光線力学的診断法(Photodynamic diagnosis, PDD)の研究も進んでいる。我々の施設でもエキシマ・ダイ・レーザーを用い癌診断の試みがなされてきた。アルゴン・ダイ・レーザーは連続波(continuous waves, CW)であり組織深達性も限定される。これに代わって、通産省のプロジェクトにより開発されたのが、断続波(puls waves, PW)であるエキシマ・ダイ・レーザー癌診断治療装置である(図1)。このレーザー光は断続波であるため組織深達性に優れ、かつアルゴン・ダイ・レーザーよりも強エネルギーで病巣を壊死に陥らせる効果がある。またエキシマ・ダイ・レーザーは色素を変えることによって二種類以上の波長のレーザー光を得ることができ、一つは癌の局在診断PDD,他は先に癌と診断された病巣への治療、すなわちPDTに用いることができる。今回は、このエキシマ・ダイ・レーザーの装置とこれによるPDDおよびPDTの肺癌症例についての効果を述べる。

2. レーザーの原理と医学応用

1960年, Maimanがルビーを用いて史上初のレーザー発振を行って以来, レーザーは医学のみならず, あらゆる方面に広く応用されてきた。レーザー(Laser)という語は放射の誘導放出による光増幅(Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation)の頭文字からなっており, 全くの人工的な光線が高輝度性, 単色性, 指向性などの多くの特色をもっている。レーザー光線発振の原理は, 不安定な状態にある原子や分子に安定な基底状態との差に等しいエネルギーを与えると, その原子や分子は光を放出して基底状態に戻るが, この際に放出された光は次々に他の原子や分子を励起して発光を促すというもので, この光はさらにレーザー発振管の両端で繰り返し反射されより一層増幅されて位相の整ったいわ

ゆるコヒーレントなレーザー光となるのである。

医学の分野においてもその有用性が認められ, 現在では, 各科で様々な用途に応じたレーザーが利用されるようになってきた。すなわち, 基礎医学応用として遺伝子工学, 細胞計測, 細胞機能測定などがあげられる。臨床応用として診断にはドップラー血流速計, 血液飽和度測定計, 視機能検査, 光線力学的診断などに応用され, 一方治療面ではレーザーメス, 光凝固, 止血, 形成外科や皮膚科的应用, 結石碎石, 骨溶接, 血管吻合, 歯科の治療, 除痛, 創傷治癒促進, 腫瘍焼灼そして光線力学的治療などに应用されている。

また, 利用されるレーザーの種類により次のように大別される。まず第一に組織の焼灼・蒸散を目的とした高出力レーザーで, 代表的なものとして炭酸ガスレーザーやNd-YAGレーザーなどがあり, いずれも100W前後の出力がある。第二に創傷治癒促進や鍼治療に近い効果を目的とした低出力レーザーで, ダイオードレーザーやヘリウム・ネオンレーザーなどがあり, 利用されるエネルギーは数mW-数10mWである。第三に光線力学的診断及び治療を目的としたもので, 診断にはクリプトン・イオンレーザー, アルゴン・レーザー, エキシマ・ダイ・レーザーなどが用いられている。また治療にはアルゴン・ダイレーザー, 金蒸気レーザー, エキシマ・ダイ・レーザーなどが用いられており, 使用されるエネルギーは100mW~1500mWである。

3. 光化学反応の原理

光に感受性を有する物質が, 光を吸収して細胞毒性を発現することは今世紀の初めより指摘されていた。これらの物質のうち, 正常組織に比べ腫瘍組織により強い親和性をもつ光感受性物質, すなわちヘマトポルフィリン誘導体(HpD)が開発されるに至り³⁾, 医学分野への応用が飛躍的に進歩してきた。光感受性物質は, ある波長の光を受け励起状態となるが, エネルギー遷移によって物理化学反応が起きる。一つは蛍光放出であり, 光感受性物質が腫瘍に高い親和性を持っていれば, この蛍光をとらえて腫瘍の局在を診断することが可能となる。一方, 励起状態の光感受性物質からのエネルギーは組織内の酸素を励起して活性酸素を生じさせ, さらに活性酸素は細胞に障害を与えて組織を変性壊死に陥らせる(図2)。特にHpDは細胞内のミトコンドリアに多く集積することが知られており, 電子顕微鏡や位相差顕微鏡で観察すると, 光線力学的初期変化はミトコンドリア, 粗面小胞体に起こりついで遊離リボゾームの減少, クロマチンの凝集が認められる。また腫瘍組織内の血管内皮への集積

図2. HpDの励起と一重項酸素の発生

図3. HpDによる腫瘍からの蛍光

図4. クリプトン・イオン・レーザーによる癌診断装置

とPDT時の内皮細胞の障害も指摘されている。この反応はある程度の濃度の光感受性物質を取り込んだ腫瘍細胞にみられるものであり、腫瘍組織よりも光感受性物質の代謝が早い正常細胞にはほとんど影響を及ぼさない。組織毒性はこの活性酸素により生じるもので、これまで、活性酸素として一重項酸素やsuper oxideなどが考えられていたが、HpDを組織内で励起して得られる活性酸素によりルミノール反応を惹起できることから、この場合の活性酸素は一重項酸素である可能性が示唆されている。⁴⁾

現在、臨床応用されているHpDは、近紫外部(360~410nm)にSoret帯と呼ばれる強い吸収帯を、また可視部(506, 538, 565, 610nm)にQ帯と呼ばれる弱い吸収帯をもっている。腫瘍内に取り込まれたHpDをSoret帯の光で励起すると630nmと690nmに二峰性のピークをもつ特有のスペクトルが観察される。これが癌病巣の局在を診断する根拠となるのである。ポルフィリンは正常の組織内にも存在するため、レーザー照射により光化学反応を起こして蛍光を発する。当初は、この自家蛍光が診断の妨げになると考えられていたが、自家蛍光では690nmにピークがないことから、腫瘍内のHpDから発

せられた蛍光と、自家蛍光の鑑別ができる。⁵⁾

診断のために用いられるレーザー光は、最も励起効率のよい405nmの波長をもつクリプトン・イオン・レーザーやエキシマ・ダイ・レーザーが利用されている。我々の施設でも、腫瘍からの蛍光を観察するために、まずクリプトン・イオン・レーザーが用いられた。図3に腫瘍からの蛍光を示す。腫瘍の局在に一致して微弱な蛍光が観察される。このクリプトン・イオン・レーザーに気管支ファイバースコープと蛍光スペクトル分析器及びオシロスコープを加えたのが図4である。スペクトルパターンによってHpDからの蛍光を同定するためのものである。現在の癌診断装置の原型であるが、クリプトン・イオン・レーザーは診断のみで、治療にはアルゴン・ダイ・レーザーなど別のレーザーが必要であった。そこで二種類の波長を供給できるエキシマ・ダイ・レーザーを用いた。図5にその診断時のテレビモニター図面を示す。同一画面に内視鏡像と蛍光スペクトルを表示することができ、さらにスイッチ操作で波長を変え、ただちに治療も行えるものであった。現在、世界でも光線力学的診断法の研究、開発が盛んで、Mayo ClinicのEdellら⁶⁾は、腫瘍からの蛍光を音声信号に変え診断の助けとし、

British ColumbiaのStephen⁷⁾は、自家蛍光とHpDからの蛍光とを分析し蛍光強度の比で癌の局在を診断している。

治療には、アルゴン・ダイ・レーザー、金蒸気レーザー、エキシマ・ダイ・レーザーが用いられ、励起効率は劣るが組織透過性のよい630nmの波長が利用されている。

4. レーザー装置

クリプトン・イオン・レーザーには、Spectra Physics

図5. エキシマ・ダイ・レーザーによる癌の局在診断(1)

社のモデル164-11が用いられている。波長は406.7～415.4nmで出力は1Wである。

アルゴン・ダイ・レーザーは、Spectra Physics社のモデル171-08とモデル375-03とを組み合わせたもの、Cooper Lasersonic社のモデル770D、及びオーロラ、富士写真光機社のフジノンPDT、Coherent社のものなどがある。色素はローダミンB、DCN、Kiton redなどが使われており、波長は630nm出力は1W～3Wである。金蒸気レーザーは金蒸気をレーザー媒質とするパルスレーザーでパルス幅50ns、パルス頻度1KHz～10KHz、628nmの波長を有し、平均出力4.5Wの時、ピーク出力104Wという高出力が得られる。英国Oxford Laser社のものと、オーストラリアのQuentron社のものがある。エキシマレーザーもパルスレーザーであるが我々はこのレーザーを用いて浜松ホトニクスとともに診断治療装置を共同開発した。

5. エキシマ・ダイ・レーザー癌診断治療装置

エキシマ(Excimer)とはExcited dimerの略で基底状態の原子(分子)と励起状態の原子(分子)が結合し

図6. エキシマ・ダイ・レーザー装置のシェーマ

形成された分子状態をいう。この分子状態は励起状態でしばらくとどまっている安定なものである。システム内の励起状態原子の一つまたは両方が希ガス原子ならば、励起エネルギーの量は非常に大きい。医用に用いられるエキシマレーザーには、Xecl（波長308nm）、KrF（248nm）、ArF（193nm）などのレーザーがあるが、このうち特にXeclレーザーは、他のエキシマレーザーに比べ色素溶媒に吸収されることが少ないので色素レーザーの励起光源として優れ、さらにパルス波であるため尖頭出力が高く癌の診断、治療面での優位性が高い。

現在、我々の施設で用いられている装置は、Xeclをレーザー媒質としたエキシマレーザーによりDPSジオキサン溶液、並びにローダミンBエタノール溶液をレーザー発振させるエキシマ・ダイ・レーザーである。そのシェーマを図6に示す。まず308nmの紫外レーザー光線は色素レーザーへ誘導される。診断時には、ミラーによる光路交換で、DPSジオキサン溶液をパンピングし、波長406.9nm、半値幅11.1nmのレーザー光線を得る。また治療時には、同様にしてローダミンBエタノール溶液をパンピングして波長624.0nm、半値幅12.9nmのレーザー光線を得る。従来、光線力学的診断及び治療を行うには、診断用のクリプトン・イオン・レーザーと、治療用のアルゴン・ダイ・レーザーの二台が必要であった。しかしエキシマ・ダイ・レーザーを開発することにより、二種類の色素レーザーを使って双方の機能を一台に集約することができた。

また、パルスレーザーであることを利用し、内視鏡観察用白色光(Xeランプ)光源をレーザー光の非発振時に合わせチョッパーによって同調させた。これによりHpD励起用レーザー光線と内視鏡観察用白色光が交互に病巣へ照射されることになる。癌の局在及び広がり診断する場合、レーザー光線の照射時には病巣からの光情報を分光器に誘導し、ゲート付きイメージンテンシファイアーで蛍光を増幅する。SIT撮像感で蛍光画像をとらえ、さらにアナライザーで分析して、最終的にテレビモニター上に蛍光波長と蛍光画像が映しだされる。イメージンテンシファイアーへのゲートの開閉はレーザーのパルス周期と同調しているので、レーザー照射による光情報のみを通す。キセノンランプ照射時の内視鏡画像はテレビカメラを通してアナライザーに誘導されテレビモニター上に蛍光画像と同時に映し出される。このときのレーザーエネルギーは1パルス当り 0.03mJ (6.0×10^{13} フォトン)で、HpDの蛍光発光効率を600~750nmの範囲の積分量として1.2%とすると、625~635nmのHpDの蛍光量は分光器の位置で 2.4×10^7 フォトンとなり、

イメージンテンシファイアーの増倍率を1000倍とするとSIT撮像感の光電面で 2.4×10^{10} フォトンとなって十分にテレビモニター上での観察が可能となる。

治療に際しては、1パルス当り4mJ、パルス幅10.9nsecで、30Hzの繰り返しで発振させた。イメージンテンシファイアーの破損を避けるため、高エネルギーの反射光が分析装置に入射しないよう光路ゲートを閉じるようにした。

6. 各種レーザー装置との比較

我々の施設では、これまでに光線力学的治療に連続波であるアルゴン・ダイ・レーザー、断続波である金蒸気レーザーおよびエキシマ・ダイ・レーザーを使用してきた。連続波と断続波とのもっとも大きな違いは、transit photobleaching effect³⁾である。すなわちピーク出力の高いエキシマ・ダイ・レーザーの照射によりHpDの高密度励起状態が過渡的に発生し、その結果、組織透過性が増大する。この効果は金蒸気レーザーでも見られるが、一方アルゴン・ダイ・レーザーでは、時間当りのエネルギーが低く同じような励起状態は発生するものの励起状態からの緩和も次々と起こるためphotobleachingは起こらないと推定される。アルゴン・ダイ・レーザーでは組織深達度が5~8mmであったが、この効果によりエキシマ・ダイ・レーザーや金蒸気レーザーでは10~20mmの深達度が期待できる。レーザー光照射による腫瘍内の温度変化にも特徴がある。エキシマ・ダイ・レーザーは断続波であるためパルス間のわずかな時間に、組織の温度が冷却されるものと考えられる。しかし同じ断続波であっても、金蒸気レーザーの場合、著明な腫瘍内温度上昇がみられる。これは1700Hzとパルス幅が短く、温度に関しては、ほとんど連続波に近い効果を与えるためと考えられる。従って金蒸気レーザーの場合にはhyperthermia効果も期待できるが、照射が長時間にわたれば正常組織への影響も無視できなくなる。また金蒸気レーザーは、発振までに1時間以上要することや、維持費がかかるなどの問題もある。

7. エキシマ・ダイ・レーザーの臨床

現在までに16例の患者に対し、エキシマ・ダイ・レーザーによる光線力学的診断及び治療を行った。その内の2例は、喀痰細胞診によって発見された早期の喉頭癌であった。その結果を表1及び表2に示す。組織学的にすべて扁平上皮癌であり、5例は内視鏡的な診断に難渋すると思われる上皮内癌であった。レーザー照射に先立ち、72~120時間前に2.5mg~3.0mg/kgのHpDまたは

表1 エキシマ・ダイ・レーザーによる診断

DETECTION OF FLUORESCENCE FROM LUNG CANCER LESIONS BY EXCIMER DYE LASER PHOTODYNAMIC PROCEDURE

CASE	HISTOLOGY	STAGE	HPD	EXAMINATION	FLUORESCENCE
1. KA	SQ CA	Ⅲ	3.0mg	72 h	+
2. KY	SQ CA	I	3.0	72	+
3. TK	AD CA	Ⅲ	3.0	96	+
4. KH	SQ CA	I	3.0	120	+
5. SY	SQ CA	CIS	3.0	72	+
6. SF	SQ CA	Ⅲ	3.0	72	+
7. SF	SQ CA	CIS	3.0	72	+
(VOCAL CORD)					
8. BT	SQ CA	I	3.0	72	+
9. NH	SQ CA	I	3.0	72	+
10. KA	SQ CA	CIS	3.0	72	+
11. TS	SQ CA	CIS	3.0	72	+
12. SN	SQ CA	I	3.0	72	+
13. MH	SQ CA	Ⅲ	2.5	72	-
14. KS	SQ CA	Ⅲ	2.0	48	+
15. MK	SQ CA	Ⅲ	2.0	72	+
16. KO	SQ CA	CIS	2.0	72	+
(VOCAL CORD)					

表2 エキシマ・ダイ・レーザーによる治療

THERAPEUTIC RESULTS OF LUNG CANCER
BY EXCIMER DYE LASER PHOTODYNAMIC THERAPY

CASE	HISTOLOGY	STAGE	HPD	TREATMENT	ENERGY	RESULT
1. KY	SQ CA	I	3.0mg	72 h	50 J	SR*
2. TY	SQ CA	IV	3.0	72	115	SR*
3. TK	SQ CA	Ⅲ	3.0	96	100	SR
4. KH	SQ CA	I	3.0	120	140	SR*
5. SY	SQ CA	CIS	3.0	72	100	CR
6. SF	SQ CA	Ⅲ	3.0	72	100	SR*
7. SF	SQ CA	CIS	3.0	72	100	CR
(VOCAL CORD)						
8. BT	SQ CA	I	3.0	72	100	SR
9. NH	SQ CA	I	3.0	72	100	SR
10. KA	SQ CA	CIS	3.0	72	100	CR
11. TS	SQ CA	CIS	3.0	72	100	SR
12. SN	SQ CA	I	3.0	72	270	SR
13. KS	SQ CA	Ⅲ	2.0	48	100	SR
14. MK	SQ CA	Ⅲ	2.0	72	150	SR
15. KO	SQ CA	CIS	2.0	72	100	CR
(VOCAL CORD)						

*OPENING OF OBSTRUCTED BRONCHUS BY TUMOR WAS OBTAINED

図 7. エキシマ・ダイ・レーザーによる癌の局在診断(2)

photofrin II を静脈内投与した。16例中、15例に630nmと690nmに二峰性のピークを有するHpD特有のスペクトルを観察することができた。残りの1例は進行癌で易出血性であり、診断時も腫瘍全体を血液が被っていたため、蛍光が観察できなかったと考えられる。

同時にすべての病巣に対し治療を行った。照射エネルギーは50J～270Jで、いずれの症例にも発赤、腫脹、壊死物質などの反応を見た。結果は、早期癌10例中4例、40%に腫瘍の完全消失(CR)を認め、残りの6例は腫瘍による狭窄が改善するなどの著効(SR)がみられた。上皮内癌だけについて言えば、5例中4例がCRであったが、残りの1例はSRにとどまった。

図7は上皮内癌の症例であるが、59歳の男性で、右B³abの分岐点に限局した病巣である。内視鏡画面上に、病巣に一致したHpDからの蛍光をカラーイメージとしてモニターしている。また、蛍光強度によってもイメージが色分けされるようになっている。このように肉眼的には診断困難な病巣でも、本装置では癌の浸潤域をイメージとして観察できるため、特に表層浸潤型の癌に対しては浸潤範囲の診断率が高い。これは、引き続いて行われるPDT時のレーザー照射野決定にとっても重要な問題である。また癌ばかりでなくdysplasiaの診断も可能であった。図8は56歳の男性で、喉頭に図のような蛍光を見たためbiopsyしたところ、severe dysplasiaであった。

8. おわりに

わが国で世界初の肺癌に対する光線力学的治療が行われて以来、すでに10年が経った。利用されるレーザーも、初期にはアルゴン・ダイ・レーザーのみであったが、より高エネルギーで組織深達性のよい金蒸気レーザーが登場し、現在ではエキシマ・ダイ・レーザーが最も注目されるようになった。一方、腫瘍親和性光感受性物質もへ

図 8. 喉頭のSevere Dysplasiaの局在診断

マトポルフィリン誘導体からその精製物質であるジヘマトポルフィリンエーテル(DHE, photofrin II)に変わってきている。また、組織深達性のよい長波長領域に吸収帯をもつクロリン系物質、クロロフィル系物質、フタロサイアニンなどの開発も進んでいる。より腫瘍親和性の高い光感受性物質や安価なレーザー装置が待ち望まれる。

PDTの適応と限界についても十分に検討されねばならない。中心型早期肺癌に対するPDTの根治的治療の可能性については多くの研究者によって認められている。エキシマ・ダイ・レーザーはアルゴン・ダイ・レーザーより低エネルギーで治療が可能であり、このように熱反応を使わないこともPDTの本来の目的に沿っている。しかしPDDおよびPDTの問題点は、治療前に腫瘍が気管支軟骨輪内にとどまっているかどうかの診断が困難なこと、亜区域枝より末梢への浸潤は内視鏡的に診断が困難なこと、そして解剖学的にレーザー到達不能の部位があること等が挙げられる。この問題点を十分に考慮すれば、今後、光化学反応単独での早期癌の局在診断および治療の可能性が考えられる。

参考文献

- 1) Hayata, Y., Kato, H., Konaka, C. et al: Hematoporphyrin derivative and laser photoradiation in the treatment of lung cancer. Chest, 81: 269, 1982.
- 2) Hayata, Y., Kato, H., Konaka, C. et al: Photoradiation therapy with hematoporphyrin derivative in early and stage I lung cancer. Chest, 86: 169, 1984.
- 3) Lipson, R.L., et al: The Photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative, Arch. Dermatol., 82: 508, 1960.

- 4) 酒井治正：ルミノール反応を利用したヘマトポルフィリン誘導体由来の励起一重項酸素の検出，東京医大雑誌，43：940，1985.
- 5) Kato, H., Cortese, D. A.: Early detection of lung cancer by means of hematoporphyrin derivative fluorescence and laser photoradiation, Clin. Chest Med. 6 : 237, 1985.
- 6) Edell, E. S., Cortese, D. A.: Bronchoscopic localization and treatment of occult lung cancer. Chest 96 : 919, 1989
- 7) Stephen, L.,: Detection of early lung cancer using low dose photofrin II. Chest, 97 : 333, 1990.
- 8) Tanimoto, Y., Udagawa, H., et al: Magnetic field effects on the photolysis of p-benzophenone derivatives in sodium dodecyl sulfate micells. J. Chem. Phys., 87, 3976, 1983.