光感受性物質 Mono-L-aspartyl Chlorin e6 による 実験腫瘍の蛍光画像解析

前田 博史, 猪 吉輝*, 金田 明*, 遊津 隆義*, 南谷 晴之, 會沢 勝夫**

慶應義塾大学院理工生体医工学, 松下産業機器(株)*, 東京医科大学第2生理学**

Fluorescent Image Analysis in a Mouse Tumor Model using Photosensitizer Mono-L-aspartyl Chlorin e6

H.Maeda, Y.Ii, A.Kaneda, T.Yuzu, H.Minamitani, K.Aizawa

Research Center for Biomedical Engineering, Faculty of Science and Technology, Keio University,

*Matsushita Industrial Equipment Co., Ltd., **Department of 2nd Physiology, Tokyo Medical College

Abstract

Mono-L-aspartyl chlorin e6(NPe6) is a photosensitizer that possesses cancer affinity and is excreted from normal tissues quickly. While NPe6 is exploitable for photodynamic therapy(PDT), it may affect the normal tissues where NPe6 is over-remaining. To investigate the concentration of NPe6 in malignant tissues and normal tissues in a mouse tumor model, we've made a fluorescent image analysis system by reconstructing an operating microscope. At 5 hours after administration of NPe6 20mg/kg body weight dose via the tail vein, both malignant and normal tissues are excited at 405nm. The fluorescence of NPe6 is detected through a multilaminate interference filter that can select the fluorescent wavelength at 661nm or 664nm, -- the former is considered to be emitted mainly by free NPe6 and the latter by NPe6 which binds to albumin and the equivalent. The fluorescent intensity is changed into the concentration of NPe6 by a calibration curve. As a result, NPe6 accumulated in the malignant tissues 7 times as much as in the normal one, that gives us much reliability upon PDT.

KEYWORDS: photodynamic therapy(PDT), mono-L-aspartyl chlorin e6(NPe6), fluorescent image analysis system, multilaminate interference filter, mouse

緒言

光感受性物質 mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6、日本石油化学) は腫瘍親和性に優れ、正常組織からの排泄が早い特徴をもつ[1,2]。このためNPe6をレーザー光などで励起することにより活性酸素を産生し、悪性腫瘍の治療

(PDT、Photodynamic therapy) に使用できる。NPe6は励起により蛍光を発するため、腫瘍部位と正常部位の識別が可能となる。しかし正常部位にNPe6が存在すると、励起時に産生する活性酸素により正常組織が障害を受ける可能性がある。したがって生体内での正常部位および

腫瘍部位のNP e6集積状況を把握し、正常組織に NP e6が残留していないことを確認することが求められる。

本研究では NP e6 の蛍光を捉えるための画像解析システムを構築した。さらにこれを用いて担癌マウスの腫瘍部位およびその周辺の正常部位に集積している NP e6 の状態を観測し、蛍光画像の解析を行ったので報告する。

方法および装置

1. 画像解析システム

NP e6の蛍光画像を解析するため画像解析システムを製作した。装置は、手術顕微鏡（OMS-600、TOPCON）を改造した蛍光画像観測部[2]と画像撮像・記録・解析部で構成した（Fig. 1）。蛍光画像観測部では、水銀Xeランプ光源（SUNCURE 202-PS、ASAHI GLASS）を間腔ファイバーに導入し、405nmのバンドパスフィルター透過光をNP e6の励起に用いた。励起光の照射は観測視野面積（16x12mm）より十分広くなるよう直径 40mm に対して行い、視野内における励起光のパワーの均一化を図った。

撮像部と対物レンズの間には、550nm以下の波長をカットするハイパスフィルターを組み込み、撮像部への励起光の入力をほぼ完全に除去した。また同じ位置に角度可変の多層膜干渉フィルターを組み込み、サンプルに集積したNP e6の表面蛍光を捉えた。撮像部には白黒CCDカメラ（Panasonic WV - BP100、最低照度 0.3 Lux）を用い、S-VHS ビデオで記録するとともに、画像A/Dボード（24MxTV、Raster Ops.）を介してパソコン（Macintosh Centris 650）に蛍光画像を取り込み、解析を行った。

2. NP e6とウシ血清アルブミンの相互作用

生体内においてNP e6はアルブミンなどと相互作用する[3]。リン酸緩衝液pH7.4中に牛血清アルブミン（Fraction V、M.W. =68000、岩井化学薬品）またはNP e6を溶解し、両溶液をNP e6とアルブミンのモル比が 2:1 になるよう混合した。NP e6とアルブミンのモル比が2:1 の場合、およびNP e6のみをリン酸緩衝液に溶解した場合のピーク蛍光波長を分光蛍光光度計（日立F-4500）にて測定した。

3. 多層膜干渉フィルター

Fig.1 手術顕微鏡蛍光画像解析システム

多層膜干渉フィルターはバンドパスフィルターで、光の入射角によって透過する波長帯域がシフトする。NP_e6単独およびNP_e6とアルブミンを混在した場合（モル比 2:1）の、NP_e6蛍光波長帯域をカバーする多層膜干渉フィルターを選択し、その波長透過特性を分光光度計（日立U-3200）で調べた。

4. 検量線の作成

本システムを用い、NP_e6:アルブミンのモル比は 2:1 に固定し、多層膜干渉フィルター 0 度、8 度についてそれぞれNP_e6濃度に応じた相対蛍光強度の検量線を作成した。

5. 実験腫瘍の蛍光画像解析

生体内培養で得たMeth-A細胞（腹水腫瘍）を、 1×10^5 個/0.1mlの濃度で生後 3 週令のBALB/cマウス背部皮下に投与後、1 週間目の腫瘍径約10mmの担癌マウスを実験に使用した。この担癌マウスにNP_e6を20mg/kg b.w. 尾静脈投与し、5 時間後、本システムにて腫瘍部位およびその周辺のNP_e6濃度を測定した。

結果および考察

1. NP_e6のピーク蛍光波長

励起波長405nmにてNP_e6単独の溶液とNP_e6とアルブミンがモル比2:1で混在している溶液の蛍光波長を比較した。NP_e6濃度 1.0×10^{-6} Mで蛍光ピーク（単峰性）は前者が657.5nm、後者が660nmで2.5nmシフトした。またNP_e6単独溶液でも 1×10^{-6} Mから 1×10^{-5} Mへと濃度が高くなると、蛍光ピークは4nm長波長側にシフトした（Fig.2）。これらはNP_e6とアルブミン、あるいはNP_e6同士の分子間の相互作用に伴う現象であると考えられる。

Fig.2 NP_e6のピーク蛍光波長

2. 多層膜干渉フィルターの波長透過特性

多層膜干渉フィルターの波長透過特性は角度 0 度で664.0nm、5 度で662.7nm、8 度で661.3nmをピークにもち、半値幅は9.4nmであった（Fig.3）。

Fig.3 多層膜干渉フィルターの波長透過特性

3. 検量線

生体内でのNP_e6濃度であるといわれている 10^{-6} Mオーダーでは角度0度、8度とも相関係数0.9以上の高い相関性が認められた。以上から本システムにて、生体内におけるNP_e6濃度を計測することが可能であるといえる。

4. 実験腫瘍の蛍光画像解析

マウス腫瘍部位周辺の白色光像を示した（写真A）。中央は腫瘍、左上は正常皮膚、右下

は正常な足部である。同部位の干渉フィルタ角8度での蛍光画像をNPc6濃度に応じて階調表示したものを用いた(写真B)。正常部位ではNPc6濃度が $2 \times 10^{-6} \text{M}$ 程度であるのに対し、腫瘍部位では高いところで $1.2 \times 10^{-5} \text{M}$ 以上であった。腫瘍部位は正常部位の6倍以上NPc6が集積していた。干渉フィルタ角0度、すなわち主にアルブミンと相互作用しているNPc6の分布状況を示した(写真C)。正常部位で $1 \times 10^{-6} \text{M}$ に対し、腫瘍部位で $7.5 \times 10^{-6} \text{M}$ 以上のNPc6が入っていた。

写真Bで正常足部に蛍光が僅かに見られるのに対し、写真Cでは見られなかった。このことは次のことを示唆する。NPc6濃度 10^{-6}M オーダーではNPc6単独溶液のピーク蛍光波長が $657.5 \text{nm} \sim 662 \text{nm}$ 、NPc6/アルブミン混合溶液では $660 \text{nm} \sim 664 \text{nm}$ であったことから(Fig.2)、本システムでは干渉フィルター角度0度とき、アルブミンなどと相互作用して単独の場合より波長シフトしたNPc6の蛍光画像を捉えている。干渉フィルタ角8度ときはNPc6単独あるいは、単独の場合に比べ僅かに波長シフトしているNPc6の蛍光も捉えていると考えられる。

写真A

写真B

写真C

結語

マウス腫瘍部位およびその周辺の正常部位の蛍光画像より、腫瘍に集積したNPc6の相対濃度分布が明らかになった。本研究によりPDTを行うときに正常部位に光感受性物質が集積していないことが確認でき、より安全な治療ができる可能性が高まった。

参考文献

1. Aizawa K., et al.: Localization of Mono-L-Aspartyl Chlorin e6(NPc6) in Mouse Tissues. *Photochem. Photobiol.* **46**, 789-793, 1987.
2. 會沢 勝夫: 光感受性物質による病態部位の画像解析. *O plus E*. **160**, 75-82, 1993.
3. 會沢 勝夫ら: Mono-L-Aspartyl Chlorin e6とウシ血清アルブミンとの相互作用. *日本レーザー医学会誌* **10**, 505-507, 1989.