大腸組織を用いた蛍光顕微鏡による自家蛍光物質の基礎的検討

出石邦彦¹⁾、田尻久雄、藤井隆広、阿部誠司、竜崇正¹⁾、吉田茂昭

国立がんセンター東病院内科、¹⁾ 外科

Autofluorescent appearance of normal and cancerous tissues in human colon by fluorescence microscopy

Kunihiko Izuishi, Hisao Tajiri, Takahiro Fujii, Seiji Abe, Munemasa Ryu, and Shigeaki Yoshida

Department of Internal Medicine, ¹⁾Department of Surgery, National Cancer Center Hospital East

Abstract

There is increasing interest in the endoscopic study of tissue laser-induced autofluorescence in the detection of malignancy. Flavins, NADH, and collagen have been regarded as a major source of fluorescence in colonic tissue. However, the basis of the different autofluorescence between normal and cancerous tissues is unknown. Human colonic tissues were obtained from resected specimens. To study the existence of fluorescence, frozen sections of normal and cancerous tissues were observed by fluorescence microscopy under 400-440 nm excitation. The strong autofluorescence was seen from the submucosal layer corresponding with the collagen. Tissue fluorescence did not decrease in a reductant or acid solution. These results indicate that flavins and NADH do not affect tissue fluorescence. In cancerous tissue, decrease of autofluorescence arose from the collagen in the submucosal layer, which was substituted by cancer cells, was recognized

緒言

近年、癌の早期発見、早期診断の重要性が指摘されるなか、様々な方法、工夫が報告されており、蛍光内視鏡もそのひとつの有力な手段として注目されてきている。蛍光内視鏡は正常部と病変部の自家蛍光の差を利用した内視鏡装置であり、現在まで、気管支や大腸に対する癌診断への応用が報告されている^{1, 2)}。この蛍光

内視鏡における病変部の自家蛍光の差として現在、フラビン、NADH、コラーゲンがその有力な蛍光物質とされているが^{3, 4, 5)}、その原理、機序はいまだ明らかにされていない。今回、我々はヒト大腸組織を用いて蛍光内視鏡(Ex 437、Em 520)で見られる自家蛍光の差を明らかにする目的で基礎的検討を行った。

対象および方法

正常部、癌部のヒト大腸切除組織を用いた。切除組織をすぐに凍結標本に作成し、蛍光顕微鏡観察に使用するとともに、HE染色による組織像の検討を行った。蛍光顕微鏡（EDF2, Nikon, Co., Tokyo Japan）に励起フィルタ（EX400-440）、ダイクロイックミラー（DM455）、吸収フィルタ（BA520）を用いることで、蛍光内視鏡で用いられている励起波長437nmに合わせて励起は400-440nmで行い、500nm以上の波長による蛍光組織像を観察した。

蛍光物質であるフラビンは還元剤によりすぐに蛍光を失う特性があり⁶⁾、NADHは酸性緩衝液存在下で蛍光を失う特性がある⁷⁾。このことを利用して、還元剤存在下（buffered saline with sodium ditionate, pH 7.4）および酸性緩衝液存在下（citrate buffer, pH 3.0）で自家蛍光を観察した。

結果

正常組織において自家蛍光は粘膜下層、固有筋層の順に強く認められたが、粘膜にはほとんど認められなかった。この粘膜下層の緑色の蛍光物質は線維状のものでコラーゲンに一致するものであった（図1）。

還元剤存在下において組織の自家蛍光には全く変化が認められなかった。酸性緩衝液存在下では、コラーゲン繊維が溶解してわずかに広がっていたが粘膜の蛍光には変化が認められなかった。

癌部においては自家蛍光はほとんど認められなかった。癌の深部浸潤部において粘膜下層のコラーゲンは、癌組織に置換されることにより自家蛍光は著明に減少していた（図2、3）。

考察

Kapadiaら⁸⁾はヒト大腸において正常部と癌部の自家蛍光の差異を用いて、癌、腺腫性病変をほぼ100%検出できたと報告している。また喉頭⁹⁾、気管支¹⁰⁾などでも同様の報告がされている。これらの報告によれば、正常組織では緑色にピークを持ち、長波長側になるに従い減衰する蛍光スペクトル波形が得られるのに対し、癌部では短波長側を中心とした全スペクトル領域の減衰が起こり、スペクトル波形は全体的に平坦な形状を示すとされている。

図1 正常組織における自家蛍光像（X100）

図2 癌部のHE像（X100）

図3 癌部における自家蛍光像（X100）

このスペクトル波形の差を利用し、関連する光学機器の開発、改良にともない構築されたのが、蛍光内視鏡装置である。すなわち、一定の波長の光を組織に照射した後、一定の波長のみを検出して、自家蛍光を画像化することで、従来の内視鏡では診断が困難な病変を蛍光色の違いとして表示する装置である。この装置では緑と赤の自家蛍光を検出し、正常部と癌部が識別

されるようになっており、正常部は緑色で表されるのに対し、病変部は暗赤色で示される。本邦においても気管支内視鏡用蛍光観察装置

(Xillix LIFE-Lung System、Xillix technology Corp. Canada and Olympus optical Co., Japan) により臨床応用が始められている¹¹⁾。Lamら¹⁾は、このような蛍光内視鏡を用い気管支において、通常光による気管支鏡と比べ異型上皮および上皮内癌はほぼ同等のspecificityで検出でき、そのsensitivityは通常光による気管支鏡が48%であるのに対し蛍光内視鏡では72%であると報告している。

このような癌部と正常部との自家蛍光の差をもたらす原因について、今日まで様々な検討がなされてきた。生体組織における緑色の自家蛍光物質としてコラーゲン、フラビン、NADH、赤色の自家蛍光物質としてポルフィリンなどが関与していると報告されているが^{3, 4, 5)}、いまだ統一した見解は得られていない。しかしながら、我々の検討においては正常部、癌部ともに赤色の蛍光は全く観察されず、ポルフィリンの関与は考えられなかった。また自家蛍光は還元剤、酸性緩衝液存在下で変化を受けなかったことよりフラビン、NADHではなく、粘膜下層のコラーゲン由来であることが強く示唆された。

光の透過性についてみると、緑領域の光は赤領域の光に比べ1 cmあたり1/100から1/1000ほどしかなく¹¹⁾、粘膜下層から出た自家蛍光は容易に粘膜層で減弱するものと考えられる。そのため癌細胞に置換され厚くなった粘膜において、この粘膜下層からの自家蛍光は正常部の自家蛍光に比べかなり弱くなっているものと思われる。また浸潤癌では、コラーゲンを豊富に含有する粘膜下層への癌細胞への置換が、コラーゲンからの自家蛍光を減らし蛍光減弱の要因となっているものと推測された。

結論

大腸組織における自家蛍光は、主に粘膜下層からのコラーゲンによるものであり、粘膜下層を被う粘膜の厚みが病変部における蛍光減弱のメカニズムであると思われる。また、癌浸潤部では、コラーゲンを豊富に含有する粘膜下層への癌細胞への置換が、蛍光減弱の要因と推測された。

本研究は厚生省がん研究助成金 (8-39) によって行われた。

文献

- 1) Lam S, MacAulay C, Hung J, Leriche J, Profio AE, Palcic B. Detection of dysplasia and carcinoma in situ with a lung imaging fluorescence endoscope device. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 105: 1035-1040.
- 2) DuVall A, Kost J, Scheider D, Lilge L, Cirocco M, Hassaram S, Kandel G, Kortan P, Haber G, Mang T, DaCosta R, Wilson B, Marcon N. Laser induced fluorescence (LIF) endoscopy (E): A pilot study of a real-time (RT) autofluorescence imaging system for early detection of dysplasia and carcinoma in the gastrointestinal (GI) tract. *Endoscopy* 1996; 28: S45.
- 3) Schomacker KT, Frisoli JK, Compton CC, Flotte TJ, Richter JM, Deutsch TF, Nishioka NS. Ultraviolet laser-induced fluorescence of colonic polyps. *Gastroenterology* 1992; 102: 1155-1160.
- 4) Bohorfoush AG. Tissue spectroscopy for gastrointestinal diseases. *Endoscopy* 1996; 28: 372-380.
- 5) Richards-Kortum R, Rava RP, Petras RE, Fitzmaurice M, Sivak M, Feld MS. Spectroscopic diagnosis of colonic dysplasia. *Photochem Photobiol* 1991; 53: 777-786.
- 6) Bessey OA, Lowry OH, Love RH. The fluorometric measurement of the nucleotides of riboflavin and their concentration in tissues. *J Biol Chem* 1949; 180: 755-769.
- 7) Lowry OH, Passonneau JV, Rock MK. The stability of pyridine nucleotides. *J Biol Chem* 1961; 230: 2756-2759.
- 8) Kapadia CR, Cutruzzola FW, O'Brian KM, Stetz ML, Enriquez R, Deckelbaum LI. Laser-induced fluorescence spectroscopy on human colonic mucosa. *Gastroenterology* 1990; 99: 150-157.
- 9) Qu J, MacAulay C, Lam S, Palcic B. Laser-induced fluorescence spectroscopy at endoscopy. *Proc SPIE* 1994; 2133: 162-169.

- 10) Cothren RM, Sivak MV, Dam JV, Petras RE, Fitzmaurice M, Crawford JM, Wu J, Brennan JF, Rava RP, Manoharan R, Feld MS. Detection of dysplasia at colonoscopy using laser-induced fluorescence: a blinded study. *Gastrointest Endosc* 1996; 44: 168-176.
- 11) 金子守 自家蛍光の内視鏡的応用 平成9年電気学会全国大会論文集 1997; S9-37-39