レーザー分光による“がん”の基礎研究

Laser Spectroscopy of Cancer

黒田 寛人

Hiroto KURODA, ph.D.

東京大学物性研究所

It is well recognized that laser spectroscopy plays important roles in the research of cancer. Little work has been done in the laser spectroscopy in malignant tumor, especially in vivo. We observed the characteristic spontaneous emission and excitation spectra obtained without any injection of probing reagents.

This emission was observed in human gastric and colon cancer and will be a good indicator for the cancer detection.

I はじめに

近年、レーザーによる“がん”の診断と治療の研究が開始され臨床にも用いられる様になっている。しかしながら、それらの基礎となる生体組織の光物性や“がん”の物性等の基礎的問題に関しては未解決の問題が多く、根本に立ち帰って解明する事が今後の発展のために必要と思われる。

“がん”の本質は大変に複雑で、基礎的な検討ですら、多くの困難な問題に直面させられるが、やはり多くの境界分野の交流による基礎からの総合的研究の積み上げが必要であると思われる。

ここでは、現在のレーザーによるがん研究の大きな問題になっていると思われる、(1)レーザー励起蛍光によるがん診断と、(2)ヘマトポルフィリン誘導体による一重項酸素生成に関する我々の研究結果について述べる。

II-2 “がん組織”の光物性

がん組織のレーザー励起による発光スペクトルの測定等のレーザー分光実験を *carcinosarcoma 256* を移植した rat や担ガン移植マウス等について行った。

Fig 1 に Ne レーザー励起色素レーザー (パルス幅 3 ns、ピーク出力 10 kw 波長可変) による実験系のブロックダイアグラムを示す。色素レーザー光をサンプルに照射しサンプルからの発光をレンズで分光器に集光し分光した後フォトマンチプライヤーで電気信号に変えボックスカー積分器で積分した後レーコーダーで書かせている。

Fig. 1

rat carcinosarcoma 256 による生体 in-vivo の発光スペクトルの様子を Fig 2 a, b, c に示す。HP、HPD 等の色素は全く付加されていない。

Fig 2 (a) は正常組織、(b) はザルコーマ部の発光を示す。ザルコーマ部に 630 nm の強い発光が出現している事、励起波長 (514.0 nm と 511.0 nm) によりスペクトル強度が変化していることがわかる。

(c) は 503.4 nm 励起による 630 nm のピークの出現を示す。これにより励起スペクトルを測定し、630 nm 発光の準位を推定する事ができ重要な情報である。この発光のライフタイムは約 10 ns 程度であり、 $^1\text{S}_0$ の蛍光である。

Fig. 2

Fig 3 に色素レーザーにより測定したこの 630 nm 発光に対する励起スペクトルの様子を示す。実線は HpD-アルコールの吸収スペクトルであり、励起スペクトルは Hp、HpD 等の吸収スペクトルとはほぼ良好な一致を示す。Hp、HpD 等の蛍光寿命も測定では 1S_0 ではほぼ 7~10 ns 程度でありこれらの事実からこの 630 nm の発光は自然にザルコーマ部に存在するポルフィリン類の発光によると考えられる。

Fig. 3

Ⅱ-3 担がんマウスによる基礎実験

近年生体組織からの蛍光分析によるがん診断の研究が盛んであるが検体としてヒトの摘出臓器を用いたものが多く、その多様性のため基礎的な比較実験が充分なされているとはいえない。そのため検体として個体再現性の高い純系マウスを用いて、個体差、がん種による差、経時変化などをスペクトル形状の違いによって分析した。

実験は、健康な C₃H 系マウス及びこれに癌種 MH134 を移植した担癌マウスの正常部位及び癌

部位に波長 500 nm 付近の窒素レーザー励起色素レーザー光又はアルゴンレーザー光を照射し組織からの蛍光を分光系口導きスペクトル分析を行なった。主な結果：1) 正常部位からは波長約 680 nm にピークをもつ半値全巾約 30 nm の蛍光が観測される。2) 癌部位からは波長約 630 nm の位置にピークをもつ半値全巾約 20 nm の蛍光が観測される。3) 癌を母体から切除しない状態では癌部からの蛍光は変化しないが、母体から切離すと時間の経過とともに 630 nm の蛍光成分は減少し、680 nm の位置に蛍光が現われてくる。4) 切除した癌部位を液体窒素中で凍結して解凍した直後ではスペクトルに変化はない。5) 同一種の腹水型癌細胞浮遊液について吸収及び発光スペクトルを調べたが固型癌のような明確なピークは見られなかった。6) BALB/C マウスに Meth A を移植した場合、ベースラインはヒト及びラットの場合に似てくるが、癌部位と正常部位の発光の波長は C₃H:MH134 の場合と変わらない。

Fig 4 に Ar laser 励起による発光スペクトル測定のプロックダイアグラムを示す。発光スペクトルは分光器と SIT (Silicon Intensifier Analyser) の組合せでリアルタイムにディスプレイ表示されプロッターで処理される。

Fig. 4

表 1 に実験を行ったガン種と純系マウスの組合せを示す。

マウス系統	癌種	部位
C3H	MH-134	肝臓
C3H	X5563	プラズマ細胞腫
C3H	KK-102	乳癌
BALB/C	Meth-A	肉腫
C57BL	EL-4	白血病

表 1

ガンに特有で、かつ一般性を有する実験をするためにガン種やマウス系、固形ガン、腹水ガン等の種々の組合せを考慮している。その結果ガン種、マウス系、ガンの形態をとわず630nmの発光が研査された。

Fig 5にMH134の場合のスペクトルの部位依存性を示す。

Fig. 5

Ⅲ ヘマトポルフィリン誘導体 (HpD) による一重項酸素 O_2 生成

Ⅲ-1 概 論

ここでは、がん治療に重要と考えられるHpDおよび O_2 生成減衰の動的過程について述べる。HpDおよび O_2 のエネルギー図をFig 6に示す。HpDは光を吸収して一重項(S_1)にたまりそこから630nmを中心とする発光を生ずる。一部は三重項(T_1)にエネルギー移動し又その一部が同じくエネルギー移動し 1S_0 が生ずると考えられる。

Fig. 6

O_2 を高濃度に生成するためには、一重項一三重項移動は n^2 に比例するのでHpDを高濃度にするとともに酸素分圧を高めればよいと考えられる。

Ⅱ-2 ピコ秒～マイクロ秒の動的過程

実験はHpDの630nmの発光と O_2 からの発光と考えられる1.27 μ mの時間的変化を測定した。

1) HpDアルコール溶液に時間幅 ~ 2.5 sec、波長532nmの光を照射し630nmの発光を、時間分解能1 nsec 以下の測定系を使用して行観測したところ、減衰時間として約10 nsec を得た。(Fig 7) (Fig 8) 又ピコ秒ストリークカメラを使用することにより立上り時間30 psec 以下が得た。(Fig 9)

このような方法で得た値を表2に示す。

2) HpDから 1O_2 へのエネルギー移動を調べるために、 1O_2 からと思われる1.27 μ m の発光を観測した。Cel4に溶かしたHpDにCW Ar LASERを照射しGe 光検出器とLock-in Amp を用いて1.27 μ m の発光の励起光からの移送シフトを測定することによりエネルギー移動の特性時間を求め0.875 msec の値を得た。(Fig 10) 又、

Fig. 7

Fig. 8

Fig. 9

Result of Life-time Measurement

	Emission at 630nm		Emission at 680nm	
	τ_1	τ_2	τ_1	τ_2
HPD in Saline	7.5 ns	26.0 ns	8.0 ns	19.5 ns
in Saline + Serum	7.0	29.0	4.5	19.5
"	5.5	26.5		
Hp in Saline	7.5	long	8.0	32.0
in Saline Serum	6.0	30.5		
Pp in Saline	9.0	26.0		
in Saline + Serum	4.75	19.0		

表 2

Fig. 10

1.27 μm の発光が $^1\text{O}_2$ に起因することは酸素分圧を変えると発光量が変化することにより確認された。(Fig 11) 3) MH134 マウスの癌部を 30 psec, 532nm の光で励起そこからの発光 (630nm) をストリークカメラで測定したところ、立上り時間として 300 psec を得た。

以上の事実から次のような結論が得られた。1) HpD から $^1\text{O}_2$ へのエネルギー移動の確率が生体の in vivo (MH.134), in vitroではじめて測定された。2) HpD の一重項の life time が 10 nsec 程度なので $^1\text{O}_2$ を増大させるためには HpD を高濃度にして一重項から三重項への transfer rate を高める必要がある。

以上のように HpD $^1\text{O}_2$ について今後の癌治療に重要と思われる新しい知見を得ることができた。

1.27 μm Emission from $^1\text{O}_2$ of HPD in CCl_4

Fig. 11

IV おわりに

癌のレーザー励起蛍光は極めて重要な情報を有すると考えられるが、解明すべき問題も多い。時間分解スペクトルのみならず励起波長、パルス幅、

出力を変化させる事により選択的化学反应を誘起し癌治療に応用できる可能性も有する。今後の基礎的研究が必要である。

本研究は東大物性研（黒田）、東京農工大（西坂）北大医（米川、葛西）、山口大医（竹本）、呉羽化学（大平）、町田製作所（町田）、平塚胃腸病院（平塚）、癌研・病理（加藤）等による共同研究である。