レーザー光励起による消化管癌の蛍光

スペクトル分析

Emission spectrum analysis of GI tract
cancer

米川元樹 西坂 剛

Motoki YONEKAWA , Tsuyoshi NISHISAKA

東京農工大学保健管理センター

Little work has been done in the fluorescence spectroscopy in GI tract cancer. We studied the emission spectrum analysis of GI tract cancer without any administration of probing reagents.

Resected fresh specimens illuminated by Argon laser showed red, orange and yellow fluorescences.

Fluorescence spectra were classified into 4 types (A-D). Type A, which showed 2 peaks located at 560nm and 600nm, was most frequently obtained from benign region and malignant region. Type B, which showed 3 peaks located at 560nm, 600nm and 660nm, was observed from the ulcer bed. Type C spectra, which showed clear peak at 630nm, was obtained from the marginal wall and the ulcer bed of cancer, and was characteristic of cancer. This spectrum was observed from not only human cancer but also animal tumor such as MH-134 in mice. Emission spectrum and excitation spectrum of 630nm emission strongly suggested that the red emission might be originated from the native porphyrin accumulated in malignant tumor. Type D spectra was characteristic of xanthoma.

1. はじめに

従来、腫瘍組織の蛍光を癌診断へ応用しようとする試みは、金子¹⁾や勝²⁾によって行なわれていたものの、蛍光強度が弱く一般的ではなかった。しかし、近年レーザー光という、より強力な励起光源の出現により、再び腫瘍組織の蛍光に関する研究が行なわれるようになった。特に本邦では福富³⁾らが未分化な陥凹型早期胃癌に強い黄色蛍光が認められることを発表して以来、癌の蛍光分析が急速に発展してきている。我々は、生体の蛍光分析は物理学領域と同様、単なる色彩表現ではなくスペクトル分析が必要であるとの認識に基づき、腫瘍の蛍光分析を行なっている。今回、消化管癌のスペクトル分析を基に、スペクトルの腫瘍特異性について検討したので報告する。

2 対象

胃および大腸の新鮮摘出標本 38 病変を対象とした。その内訳は早期胃癌 7 病変、進行胃癌 11 病変、胃潰瘍 6 病変、早期大腸癌 2 病変、進行大腸癌 10 病変である (Table 1)。

3. 方法

まず、Argon laser (Cooper Medical, Model 770-10) を標本に照射し、VO-55 (東芝フィルター) もしくは KV-550 (Schott) の Barrier Filter を用いて全体の蛍光像の観察、撮影を行なった (Fig.1)。

次いでスペクトル分析を行った。すなわち、励起波長 476.5nm の Argon laser (Spectra Physics, Model 165-00) 光を分光器を通して放電光を除いたのち、直径約 2mm のスポット

STOMACH			
early cancer	IIa	tub ₁	1
	IIa + IIc	tub ₁	1
	IIc	tub ₂	3
advanced cancer		por	2
	Borr. II	tub ₁	2
	Borr. III	por	5
		sig	3
	Borr. IV	por	1
benign lesion	open ulcer		2
	ulcer scar		4
	xanthoma		2

total			26

LARGE INTESTINE			
early cancer	polypoid lesion	mod. dys.	1
		sev. dys.	1
advanced cancer	Borr. II	pap-tub	5
		tub	2
		mod. dif.	1
	Borr. III	pap-tub	2

total			12

Table 1 Materials

Ar⁺ LASER
 FILM : ASA 400
 FILTER : VO 55
 LENS : f 105mm
 Cooper Medical
 Model 770 10

Fig. 1 Photography

Fig. 2 System of spectral analysis

で標本の目的部位を照射し、Optical Spectrum Analyser (以下 OSA、B&M, WP-4) を用いて蛍光スペクトル分析を行った (Fig.2)。

また、正常胃粘膜、早期胃癌 (IIo)、大腸癌について励起スペクトル分析を行った。これは Argon laser の発振波長を変化させて、各励起波長毎に蛍光スペクトルを測定し、その蛍光スペクトルのピークの強度から励起スペクトルを分析するものである。

4 成績

A 蛍光スペクトルの分類

対象とした 38 病変、正常胃・大腸粘膜などの蛍光スペクトルは次の 4 型に分類された。

a 型: 560nm, 600nm に 2 峰性のピークを有するもの (肉眼的には黄色を呈する)。

b 型: a 型に 660nm のピークの加わっ

Fig. 3 Classification of fluorescence spectra

Fig. 4 Relative intensity of "Type a" spectra

たもの

c 型: a 型に 630nm のピークが加わったもので、時には 680nm, 700nm のピークもみられることがある (肉眼的には橙から赤色)

d 型: 550nm のピーク単独のものなどに分類された (Fig.3)。

a 型は癌部、非癌部を問わず、検索部位の大多数において認められるものである。しかし、その強度は部位によ

って著しく異なり、粘膜下層、粘膜筋板、潰瘍底の滲出液などでは非常に強く、ポリープや IIa. などの隆起性病変や潰瘍瘢痕などでは、正常粘膜より弱い (Fig.4)。

b型は潰瘍底の蛍光強度の弱い部位から得られることが多く、腫瘍との関係はみられない。

c型は胃癌 1 例、大腸癌 8 例にみられ、特に大腸癌では高頻度に得られる。この型は正常部では全く認められず、癌病巣にのみ存在している。630nm のピークが強い部位では肉眼上蛍光は橙色を呈し、680nm のピークが混在する場合には赤色を呈する。またこの c型の腫瘍内局在は、周堤に存在するもの、潰瘍底の附着物に強く認められるもの、また周堤にも潰瘍底にも存在するものなど、症例によって異なり、一様ではない。

d型は xanthoma に特徴的なものである。

B 症例

蛍光スペクトルが特徴的であった 3 症例について、スペクトルを示す。

症例 1 胃癌、BorrmannIV型、印環細胞癌

Argon laser 照射による肉眼観察では、太くなった粘膜襞は蛍光が弱く、癌性びらん部では強い黄色蛍光を示す部位と、弱い部位とがある。蛍光スペクトル分析では、癌性びらん部や粘膜襞のスペクトルピークはいずれも 560 nm と 600nm にあり、a型に属する。しかし、その強度は部位によって著しく異なる (Fig.5)。

症例 2. 結腸癌、Borrmann II型、高分化型腺癌

Fig. 5 Fluorescence spectra of Case 1

Fig. 6 Fluorescence spectra of Case 2

肉眼蛍光像では腫瘍の潰瘍底に強い黄色蛍光、周堤に橙色の蛍光がみられた。蛍光スペクトル分析では、Fig.6 に示すように、潰瘍底は 560nm, 600nm の 2 峰性の a 型スペクトルを示したのに対し、周堤部では 630nm に鋭いピーク、700nm に小さなピークを有する c 型スペクトルが得られた。この 630 nm のピークの強度は、Fig.6 の 4 の部位では高いが、3 の部位では a 型スペクトルに 630nm のピークがわずかに加わった程度であり、同じ周堤でも部位によって強度は異なる。これらのスペクトル形状の異なる周堤各部位の病理

Fig. 7 Fluorescence spectra of Case 3

組織像には全く差はみられなかった (Fig.6)。

症例3 結腸癌、Borrmann II型、高分化型腺癌

術前約3時間前に内視鏡的蛍光観察を行った。当施設において、出射角を拡大することを目的として工夫した Round Shaped Single Quartz Fiber を用いて、Argon laser を 10W の出力で病巣部に照射し、約 20 分間にわたって病変の蛍光観察を行った。隆起する周堤部に赤色蛍光、潰瘍底一部に黄色蛍光が観察された。標本のスペクトル分析では、潰瘍部や周堤部に約 680nm のピークがみられ、630nm のピークは低く、確認できない部位もあった。断面の蛍光スペクトルをみると、表面とは異なり、680nm のピークは顕著ではなく、630nm のピークを主体とした典型的c型スペクトルが得られた (Fig.7)。

C 励起スペクトル分析

正常胃粘膜と早期胃癌 (IIc) の蛍光スペクトルはいずれも a型に属し、最も長波長側の 600nm のピークについて励起スペクトルを分析した。Fig8 に示すように、いずれも 465.8nm に

Fig. 8 Excitation spectra

最大励起波長があり、励起波長が長波長側に移行するに従って励起効率は下り、一般的に用いられている 514.5nm は最も低い。一方、蛍光スペクトルでc型を示した大腸癌の場合には、630nm のピークについて励起スペクトルを分析した。胃粘膜の場合とは異なり、励起波長 501.7nm の時が最も励起効率が高く、それより短波長では励起効率は低い (Fig.8)。

5. 考察

近年、レーザー光のもつ単色性を利用して生体の蛍光情報を得ようとする試みが盛んに行なわれるようになり、特に癌診断の分野において期待されている。

一般に臨床分野では、蛍光は黄色蛍光、赤色蛍光として色調で表現されることが多い。これは臨床医学では病変の性状を把握する基礎は、あくまでも肉眼所見であるという認識に基づいているためと考えられる。しかし、蛍光

は形や色という形態を表わすものではなく、励起波長に対する分子の発光という、むしろ機能と結びついた情報である。従って、単なる色調表現のみでは、そこに含まれる詳細な情報を無駄にすることになりかねない。以上の観点から、我々は物理学領域におけるレーザー分光学の手法を取り入れ、生体の蛍光観察を行っている。

一般に生体の蛍光観察には Argon laser が用いられることが多い。しかし、これは生体の蛍光を得るために励起波長を検討した結果、選択されたわけではなく、臨床医学への応用の際に要求される安全性、安定性、耐久性などの点から比較的使い易く、普及していることに起因している。従って必ずしも至適励起波長であるとは限らず、得られた蛍光はあくまでも Argon laser の励起波長に対応したものであることを常に念頭におく必要がある。

我々が蛍光スペクトル分析に用いている励起波長は 476.5nm である。それは、最も高頻度に行われる蛍光スペクトルのピークが 560nm と 600nm にあり、488nm 以上の波長で励起すると、560nm のピークは Barrier Filter で削られて、正確なピークとはならないからである。

励起波長が理にかなっているか否かを見きわめるためには励起スペクトルを分析する必要がある。本研究から明らかのように、いわゆる 2 峰性のピークを有する a 型の蛍光スペクトルでは 465.8nm が最も励起効率が高いのに対し、c 型の 630nm のピークの励起スペクトルでは 501.7nm が最も良好である。従って、本来励起波長は、得ようとする蛍光によって選択すべきもので

ある。また、各発振波長の出力も選択の基準の一つとなる。

Fig.2 に示したごとく、Argon laser 光は 1 度分光器を通してから標本に照射している。これは、Argon laser 光には必ず放電光が混在しており、分光器を通して放電光を除去しないと、蛍光スペクトルに放電光のスペクトルが混入するからである。

蛍光スペクトル分析に用いた OSA システムは 150^本/mm の回折格子を使用した場合、約 32msec で 300nm

Fig. 9 Fluorescence spectra of colon cancer, MH-134 and MH-134 with HpD

の範囲の掃引が可能で、生体の蛍光分析には有用である。

蛍光スペクトル分類の a 型は大部分の病変から得られ、粘膜筋板、粘膜下層、潰瘍底などでは強度が強く、隆起性病変や潰瘍瘢痕では弱い。一般に黄色蛍光と呼ばれているものは a 型であり、癌病変のみならず正常粘膜や良性疾患でも同じスペクトルが得られ、癌に特異的なものではない。

一方、o 型は非癌部からは全く検出されず、全て癌病巣内から得られるもので、特に大腸癌では高頻度に認められる。この 630nm に主ピークを有する蛍光スペクトルは Fig9 に示すように、C3H 系マウス移植腫瘍 (MH134) において得られた蛍光スペクトルと一致しており、その形状から腫瘍に集積しているポルフィリンの蛍光であると推測される。生体内に存在するポルフィリンとしては protoporphyrin, coproporphyrin, uroporphyrin があり、これらの生体内ポルフィリンが腫瘍に自然に集積することは古くから知られている。⁴⁾⁵⁾ この蛍光スペクトルについては現在、大腸癌では高頻度に得られるが、胃癌ではほとんど検出されないこと、同一腫瘍内においても不均一に存在することなどが、問題点としてあげられる。この様な蛍光の不均一性に関しては2つの理由が考えられる。第1にはポルフィリン集積度が腫瘍内で異なるため、蛍光が不均一となること、第2にはポルフィリンはある種の金属を除いて、一般的に金属と錯体を形成すると発光しにくくなる性質があり、蛍光のみられない部位では、金属などが quencher になっている可能性があることなどが考えられる。

また、症例3に示されるごとく、Argon laser照射数時間後において、630nmよりも680nmに主ピークを有する蛍光スペクトルが得られたことは興味深い。断面では通常のC型を呈していることから、Argon laser照射により、腫瘍表面のポルフィリンが何らかの化学変化をきたしたことが推測されるが、今後の検討を待たねば断定できない。

この腫瘍に自然に集積しているポルフィリンに関しては、腫瘍内の存在部位、ポルフィリンの種類同定、光化学反応を起す可能性など、解明すべき問題が多数存在している。

今後はさらに、各蛍光スペクトルの時間分解、寿命測定なども検討する予定である。

6. 結論

胃および大腸の新鮮摘出標本のArgon laser励起蛍光スペクトル分析を行い、次の結論を得た。

- 1) 蛍光スペクトルは4型に分類される。
- 2) 560nmと600nmの2峰性のピークを有する蛍光スペクトルは、癌部、非癌部を問わず高頻度に得られ、腫瘍に特異的ではない。
- 3) 630nmにピークを有する蛍光スペクトルは腫瘍に特異的で、特に大腸癌では高頻度に得られる。しかし、その蛍光強度は腫瘍内で均一ではなく、また、スペクトルの形状が変化して680nmに主ピークのみられる場合もある。

文 献

- 1) 金子栄蔵：胃癌の早期診断に関する臨床的ならびに実験的研究 一紫外線撮影を中心として一. Gastroenterological Endoscopy, 5: 266~285, 1963

- 2) 勝 健一：蛍光内視鏡の基礎的研究、
第3報、胃癌。Progress of Digestive
Endoscopy, 9: 89~92, 1976
- 3) 福富久之・他：レーザー励起による
胃癌粘膜の蛍光に関する研究。日本レー
ザー医学会誌, 1 (1) : 365~369, 1980
- 4) Figge F.H.J: The Relationship of
Pyrrol Compounds to Carcinogenesis.
In A.A.A.S. Research Conference on
Cancer, 1944. Am. Assoc. Adv. So. :
117~128, 1945
- 5) Rubino G.F.—Rasetti L.: Porphyrin
Metabolism in Human Neoplastic
Tissues. Panminerva Med. 8: 290~292,
1966