Incorporation of a photosensitizer in tumor tissue and photochemical treatment of the tissue by photoirradiation of a laser

O三好憲雄、金朝暉*、石黒和守*、上田恵一*、熊切正信*、福田優 (福井医科大学、第一病理学; *同大、皮膚科)
Noiro Miyoshi, Zhao-phi*, Kazumori Ishiguro*, Keiichi Ueda*, Masanobu Kumakiri*, Masaru Fukuda

(Department of Pathology and *Dermatology, Fukui Medical University)

1.はじめに

1960年にレーザーが発明されて以来、急速に技術的開発が進み主にいたる光工業分野で拡大応用されて来ている。今回腫瘍親和性の光親和性の光感応物質とレーザー光照射による初期癌組織の検出のため、厚生省がん研究班が発足し研究が継続されている。国内で開発合成された次世代の新光感応物質を投与したヒト癌由来培養細胞や実験腫瘍動物モデルを使用してレーザーによる診断の最近の成果を報告したい。

2.実験方法と実験結果

(1) 光感応物質としては5-Aminolevulinic acid (5-ALA) 塩酸塩を使用した。使用直前にサンプル溶液を作成した。(2) ヒト悪性黒色腫由来培養細胞(HMF)やマクロファージの培養細胞(RAW264.7)の培地に光感応物質を加えた。扁平上皮癌(SCC)を背部の皮下に移植継代したC3Hマウスに光感応物質を腹腔内投与後、経時的にサンプリングして腫瘍組織内の蛍光発光スペクトルや励起スペクトルの計測(日立製作所製、蛍光分光光度計850型)や蛍光顕微鏡観測(オリンパス社、落射型蛍光顕微鏡AH2型)を行ない、分光学的検討を行なった。また肉眼的Pp-IXの赤色蛍光の観測のため、開発された青紫色半導体レーザー(407nm, 5mW)を使用して、移植したSCC組織からの蛍光観察を行なった。

その結果、(1)培養細胞内でのPp-IX蛍光顕微鏡観測：HMFの培養細胞内ではプロトポルフィリン-IX(Pp-IX)の蛍光強度は5-ALAを培養液に加えてから、細胞外の遊離5-ALAや培養液中のPp-IX分子を洗浄後、比較的ゆっくり増加傾向にあり、投与後約6時間から10時間目に飽和強度に達した。しかし、それに比べてマクロファージのRAW264.7細胞は早い時期より比較的高濃度に取り込まれ、巨大細胞内の蛍光強度も安定化していることが観測できた。また、特にHMF細胞内の局在は細胞質に多く取り込まれPp-IX特有の赤色蛍光が細胞質から観測され、細胞核内では黒く抜けていることが観測された。(2) 実験腫瘍組織内でのPp-IX蛍光顕微鏡観測はSCC腫瘍実質にPp-IXの蛍光が局在しているのが観測されるが、観測用励起光により蛍光退色も早く、実質内のマクロファージにより安定した赤色蛍光が観測された。また、その蛍光発光スペクトルは市販されたPp-IXの蛍光パターンと比較した結果、図1のように長波長シフト以外は同じスペクトルパターンを示していることからC3Hマウス体内で5-ALAは体内代謝を受けて確かに蛍光性Pp-IXに移行し腫瘍組織内特にそのマクロファージにより安定に取り込まれていることが判明した。さらに青紫色半導体レーザー光(407nm, 5mW)励起により腫瘍からのより鮮明な蛍光像が観測できたことから、今後、表在性癌あるいは術中または内視鏡でのレーザー光励起観察が有意義な癌診断の補助的診断になる可能性が示された。

Fig.1.

○近江雅人、大西康仁、國澤直美、余田浩次、春名正光（大阪大学医学部保健学科）

Masato Ohmi, Yasuhito Ohnishi, Naomi Kunizawa, Koji Yoden and Masamitsu Haruna
(School of Allied Health Sciences, Faculty of Medicine, Osaka University)

1. はじめに

高分解能光CTの有力な手段として低コヒーレンス光干渉法が注目されており、網膜下組織の検出・可視化[1]等が試みられている。ここで、対象とする生体組織の屈折率を n 、厚さを t とすると、反射/透過直進光の位相は $n \times t$ で決まる。すなわち、光CTにおいて正確な幾何学的構造を得るには、生体組織の n と t の分離測定が必須である。また、これまでの生体光計測の研究分野で、各種生体組織の屈折率の測定データはほとんど無く、屈折率のデータを蓄積することが急務である。我々は、低コヒーレンス光干渉による生体組織の n 、 t 同時測定法[2-4]に関して検討を進めており、今回、精度1%以下で軟・硬組織の屈折率が測定できることを実証したので報告する。

2. 実験の方法および実験結果

測定系は中心波長850nmのスーパーミネッセントダイオード（SLD）を光源とする低コヒーレンス光干渉系と精度1 μ mの微動ステージから構成される。参照光ミラーに合わせて測定サンプルを光の伝搬軸に沿って走査して、サンプルの前面と後面の集光状態を得るためのステージの移動距離 Δz 、およびこれに対応する光路差 ΔL を測定し、これら二つの測定量から n と t を算出する。

軟組織としては鶏のささみ肉を用いた。この場合、生体サンプルをガラス板で挟み込んでガラスと鶏肉の境界面を捕らえてin vitroで屈折率を測定した。厚さ1mm以下であれば、容易に直進光成分を検出でき、 $n=1.441$ を得た。一方、骨、歯牙などの硬組織では、光散乱が大きく、サンプルを厚さ ~ 0.3 mmの薄片に研磨してその屈折率を測定した。ヒト歯牙組織の測定結果を図1に示す。象牙質の屈折率 $n=1.546$ 、エナメル質では $n=1.652$ が得られ、本手法でヒト歯牙硬組織の屈折率を明確に分離測定することができた。このような薄片研磨した生体サンプルの屈折率測定においては、直進光成分抽出のS/N比と測定精度は厚さ t に対してトレードオフの関係にあるが、厚さ $t \sim 0.1$ mmでも精度1%を確保できる。この他に、多層構造をもつカニの殻の屈折率測定を行い、本手法を用いて各層の屈折率と厚さを決定することができた。

3. まとめ

以上、低コヒーレンス光干渉をベースとする生体組織の屈折率と厚さ同時測定法について検討し、精度1%以下で軟・硬組織の屈折率が測定できることを実証した。将来は、各種生体組織の屈折率変化を測定することで組織内の病変部を特定し、実際の生体光診断へ適応する予定である。文献：[1]D. Huang et al, Science 254, p. 1178 (1991). [2]M. Ohmi et al, Opt. Review 4, p.507 (1997). [3]近江他, 平10春応物講演予稿, [4]春名, 日本光学会OPTICS JAPAN'93, 19aC01(1998).

図1 ヒト歯牙組織の検出信号パターン

○貞藤忠彦、中川貴聖、橋新裕一、近畿大学理工学部

○T. Sadatou, K. Nakagawa, Y. Hashishin, Science and Engineering Kinki University

最近、種々のパルスレーザーの医療応用が活発になってきた。パルスレーザーを生体組織に照射すると、レーザーアブレーションが観られると共に衝撃音を生じる。これまでに、この衝撃音の周波数特性に関する詳細な報告はない。そこで、本研究は衝撃音の周波数特性を騒音計（中心周波数20Hz $\sim$ 16kHz）で解析した。使用するパルスレーザーは波長248nmのKrFエキシマレーザーと10.6 μ mのCO₂レーザーである。生体試料にはゼラチン、ヒトの抜去歯（エナメル質）と鶏の骨（皮質骨）を用いた。

KrFエキシマレーザーの場合の結果を第1図に示す。レーザーの照射条件は照射エネルギー10mJ/pulse、照射エネルギー密度20.4J/cm²・pulse、繰り返し周波数2ppsである。試料のサイズは照射面8 $\times$ 8mm、厚さ2mmであり、騒音計はレーザー照射方向に対して角度45°の方向、距離3cmの位置に配置した。衝撃音の測定時間は各中心周波数につき15秒（照射パルス数30パルス）であり、図の縦軸は各パルスの音圧レベルの平均である。

図のように、最も高い平均音圧レベルを示す周波数は歯、骨の場合8kHzであり、ゼラチンの場合は10kHzであった。中心周波数8kHzにおける平均音圧レベルは歯、骨そしてゼラチンの順に高い。紫外可視分光光度計でKrFエキシマレーザーの波長248nmに対する各試料の吸収係数を調べた結果、鶏の骨：6.95cm⁻¹、ゼラチン：6.78cm⁻¹、歯：1.12cm⁻¹の順で吸収が大きい。この結果は音圧レベルの場合と異なる。音圧レベルの違いは試料の含水率による影響であると考えられる。そこで、含水率の異なるゼラチンのKrFレーザー衝撃音の周波数特性を調べた。レーザー照射エネルギー40mJ/pulseの場合、ゼラチン重量濃度5%、20%、40%に対する中心周波数8kHzの平均音圧レベルはそれぞれ62、65、67dBであった。これより、重量濃度が濃いゼラチンほど音圧レベルの高いことが明らかになった。現在、CO₂レーザーにおいても同様の実験を行っており、詳細は大会にて報告する。

第1図 KrFレーザー照射生体組織の衝撃音周波数特性

Development of temperature monitoring technique for cornea during ArF excimer laser ablation by autofluorescence measurement

○中野 博徳*, 石原 美弥**, 荒井 恒憲**, 佐藤 俊一**, 菊池 眞**, 小原 實*, *慶應義塾大学, **防衛医科大学校

Hironori NAKANO*, Miya ISHIHARA**, Tunenori ARAI**, Shuniti SATO**, Makoto KIKUCHI**
Minoru OBARA*, *KEIO UNIV., **National Defense Medical College

【緒言】ArFエキシマレーザによる角膜蒸散を利用したレーザ角膜形成術（PRK）は、蒸散深さ $1\mu\text{m}$ 以下の精密蒸散が可能であることなどから革新的なレーザ手術である。しかし、術前の計画と実際の矯正量にばらつきがあるなどの問題点がある。これはレーザの照射条件の最適化が行われていないためである。高い安全性および確実性を確保するために、レーザの照射条件の最適化のための実時間モニタリングの開発が必要とされている。我々は、ArFエキシマレーザ角膜蒸散機構は熱的影響を支配的に受けると考えることから、蒸散中の角膜の温度が蒸散量および蒸散品質に深い相関があると考え、自家蛍光計測による実時間温度モニタリングを検討している。温度測定法としては、レーザ照射時間に近い時間分解能（現在まで $1\mu\text{s}$ の時間分解能を持つ測定法が報告されている）や、無侵襲非接触であること、実用可能な測定法であることが必要である。自家蛍光計測はこれらを満たしている。本発表では、自家蛍光計測による実時間温度モニタリングの開発に関する基礎的検討として、ArFエキシマレーザ照射中に発生する角膜の自家蛍光強度の時間変化を計測し、温度モニタリングとしての可能性を実験的に検討した。

【方法】ArFエキシマレーザ（発振波長 193 nm 、パルス幅 13 ns ）を照射フルエンスは $88.3\sim 313\text{ mJ/cm}^2$ 、繰り返し周波数 10 Hz で用いた。X-Yスリットを用いて $1.5\times 1.0\text{ cm}$ の方形にビームを整形した。その後、焦点距離 4 cm の平凸レンズを用いて照射面積を $2.2\times 10^{-2}\sim 7.8\times 10^{-2}\text{ cm}^2$ とした。試料は屠殺後24時間以内に摘出した豚角膜から上皮をとった角膜実質を用いた（以下試料）。波長 193 nm 光励起の試料の自家蛍光をアバランシェフォトダイオード（周波数帯域 $1\sim 1000\text{ MHz}$ 、感度波長域 $400\sim 1000\text{ nm}$ 、以下APD）を用いて検出し、デジタルオシロスコープ（周波数帯域 $0\sim 1\text{ GHz}$ ）で自家蛍光強度の時間変化を観測した。散乱光をカットするためにバンドパスフィルター（透過中心 450 nm 、半値全幅 70 nm ）をAPDの前に用いた。またArFエキシマレーザと自家蛍光の時間波形を比較するため、パイプライン光電管（立ち上がり時間 55 ps ）を用いてX-Yスリットの散乱光を検出し、デジタルオシロスコープで観測した。

【結果および考察】典型的な蛍光波形はレーザ照射後 20 ns 後に発生し、 35 ns 後にピークを持ち、 48 ns 後に消滅した。蛍光波形の時定数（ $1/e$ decay time、以下life time）はフルエンスの増加とともに減少（ $10.3\sim 6.5\text{ ns}$ ）した。フルエンスの増加とともに照射領域に蓄積するエネルギーが増加し熱エネルギーも増加するので、照射領域の温度が上昇する。照射領域の温度上昇により分子の振動エネルギーが増加し、振動緩和による蛍光発光以外に励起分子のエネルギーが損失する確率（無輻射遷移確率）が増加するので蛍光波形のlife timeは減少する。よって、我々の計測結果と一致する傾向が確かめられた。

【結語】以上から照射フルエンスの増加にともなう自家蛍光波形のlife timeの減少は、角膜の温度上昇を反映していると考えられる。よって、自家蛍光波形のlife timeで実時間温度計測が可能であることが示された。

29pIV10 3 μ m, 2 μ mカスケード発振ファイバレーザ (Ho doped fluorozirconate fiber laser) の家兎生体軟組織への照射

Irradiation of a holmium doped fluorozirconate fiber laser with cascade oscillation at 3 μ m and 2 μ m on soft tissues of rabbit.

荒井 恒憲* (会), 石原 美弥* (賛・会・非), 佐藤 俊一** (賛・会・非), 菊地 真* (賛・会・非), 住吉 哲実*** (会), 関田 仁志 (会)

所 属: * 防衛医科大学校 医用電子工学講座, Department of Medical Engineering

** 防衛医科大学校防衛医学研究センター情報システム研究部門, Division of Biomedical Engineering

*** NEC 光・超高周波デバイス研究所 光コンポーネント研究部, Opto-Electronics Component Res. Lab. NEC Corporation.

(はじめに) 一般にレーザ治療器は波長可変性が無いため、生体作用を大きく変化することができない。1~3 μ mの波長域では生体吸収係数が3桁以上変化する為、種々の作用を発現できるが、実用化されているNd:YAG, Ho:YAG, Er:YAGレーザの治療器はいずれも単一波長であり、生体作用を可変する為には複数の装置を混載した手術装置を構成する必要がある。

我々は3 μ m帯, 2 μ m帯の2波長帯にエネルギー帯を有するホルミウムイオンをドープしたファイバレーザを開発して高効率2波長CW発振を実現し、同レーザを用いた可変機能レーザ手術装置の開発を目指している。今回、同レーザビームを生体軟組織に照射し、波長可変による治療機能変化の基礎的な知見を得たので報告する。

(方法) Ho doped fluorozirconate fiber laserは1.15 μ mファイバランレーザで励起し、出力は3 μ m帯, 2 μ m帯の出力比1:1にて約2Wである。装置の詳細は同大会の別発表を参照されたい。

照射装置は波長比を制御するためのフィルター、および集光光学系からなる。光ビームは鉛直に生体組織に照射できるようにした。集光レンズの焦点距離は50~70mmである。照射試料は一軸自動ステージ上に載せ、速度一定にて直線切開を得られるようにした。

試料として用いたのは、ペントバルビタール麻酔下の日本白色種家兎(雄、体重:2kg)の剃毛した腹部皮膚、および肝臓であり、血流があるin situの状態と、摘出した新鮮標本に対してin vitroでの照射を行った。照射はすべて非接触照射とし、ビームを固定しての穿孔と移動しての線状切開の二通りで行った。

(結果) 3 μ m帯の出力を1Wに固定し、2 μ m帯の出力を0~1Wの間で5段階変化させ皮膚に対して線状切開を行った所見では、2 μ m帯光のブレンドにより切開層面両側に0.5~1.0mmの凝固層が形成されその中央が3 μ m帯光により切開されていった。凝固層厚みはブレンド比で制御可能であった。2 μ m帯光のブレンドモードでは創面(皮膚全層切開)からの出血および滲出液は観察されなかった。創面は鋭利であり、2 μ m帯光のブレンドにより炭化物が減少する傾向があった。

(考察) レーザ手術装置における生体作用可変性を獲得する為、CO₂レーザとNd:YAGレーザの同時照射装置、Nd:YAGレーザ基本波と二重倍波の切り替えが行える装置などが実用化している。一方、本レーザは同一の装置でカスケード発振により常に、3 μ m帯, 2 μ m帯レーザが同時発振しており、装置の小型化、機能の迅速な可変性が期待できる。また、3 μ m帯, 2 μ m帯の波長の組み合わせは従来の装置には無く、赤外波長域での吸収係数極大である3 μ m帯切開機能を中心に創の止血機能を適宜追加できる特徴的な組み合わせであるといえる。さらに、実用化している3 μ m帯および2 μ m帯レーザ手術装置がパルス幅200 μ s程度のパルスレーザであり、照射面での急激な水蒸気(穿孔照射の場合は気泡)の発生により滑らかな切開創が得られないのに対して、連続レーザであり術者が制御しやすい精密な切開機能を提供できる。

(おわりに) 本装置を用いた切開散熱実験によって3 μ m帯光の切開能主体とし、2 μ m帯光ブレンドによる創面止血能向上、創面炭化物減少の効果が明らかになった。本装置は小型であり、形成外科等の精密切開を必要とする外科用途に適しているものと考えられる。

29pIV11 エキシマレーザパワー伝送用水素ドープ紫外ファイバ

Hydrogen doped UV fiber for excimer laser power delivery

○中川貴聖, 貞藤忠彦, 橋新裕一(近畿大学理工学部), 速水弘之(三菱電線工業)

○K.Nakagawa, T.Sadatou, Y.Hashishin (School of Science and Engineering Kinki University), H.Hayami (Mitsubishi Cable Industries LTD)

エキシマレーザのパワー伝送路として、コアに OH 基をドープした高純度石英ガラスファイバ(以下、紫外ファイバと呼ぶ)を検討している。紫外ファイバの現状の問題点は、レーザ伝送によってバルク中に欠陥が誘起されるため、高伝送率で安定なレーザ伝送ができないこと、入射端面がレーザ損傷を受けるため、高ピークパワー伝送が困難なことである。今回はレーザ誘起欠陥の生成を抑制し、伝送率向上を図る目的で、紫外ファイバの水素処理効果を検討した。

一般に、紫外ファイバは伝送開始初期に高い伝送率を示すが、伝送パルス数の増加に伴い伝送率は減少し、ある伝送パルス数を越えると低い値で一定になる。この伝送率減少の原因は主に、E' センターと呼ばれる常磁性欠陥がレーザ伝送によって誘起されるためである。この欠陥は紫外ファイバを室温で放置すると約 40 時間で消滅し、周囲温度を高くするともっと早く消滅することが判った。しかし、周囲温度が 200℃を越えると、ファイバの被覆が溶解する恐れがあるため限界がある。そこで、欠陥の生成を抑制する方法として、紫外ファイバに水素をドープしたファイバの有効性を調べた。

伝送パルス数に対する伝送率を調べた。紫外ファイバにはコア径 180 μ m、クラッド径 200 μ m のステップインデックス型を用いた。波長 248nm の KrF エキシマレーザの入射エネルギー 0.089J/pulse、入射エネルギー密度 0.5J/cm²・pulse、繰り返し周波数 4pps、伝送時間 30 分、伝送パルス数 7,200 パルスとし、伝送パルス数に対する伝送率特性を第1図に示した。図のごとく、伝送初期の伝送率は水素処理、水素未処理ファイバとも約 90%/m であるが、伝送パルス数が増加すると伝送率は減少する。水素処理ファイバの場合、伝送率は 1,200 パルス以降になると約 10%低下し、約 80%/m となる。一方、水素未処理ファイバの場合、伝送率は伝送パルス数が増加すると減少し続け、7,200 パルスでは約 60%/m になる。水素処理ファイバは水素未処理ファイバより伝送率は高く、伝送パルス数に対して安定している。水素ドープにより、レーザの誘起欠陥の生成を抑制し、伝送率を向上することができた。しかし、水素処理ファイバは時間と共に水素が抜け出て、効果が弱くなると考えられている。現在、水素処理ファイバの温度依存性について調べており、詳細は大会で発表する。

第1図 KrF レーザの紫外ファイバ伝送率