

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

『呼吸器疾患』先端医療シリーズ10・呼吸器疾患(書籍)(2001):99～104.

超感度内視鏡システムの開発と応用

大崎能伸、竹山周良、中島進

6. 超高感度内視鏡システムの開発と応用

6.1 はじめに

エキシマダイレーザーを用いた悪性腫瘍の光化学療法 (photodynamic therapy, PDT) では、ヘマトポルフィリン誘導体 (hematoporphyrin derivatives) のフォトフリン (Photofrin, Axcan Pharma, カナダ/日本ワイスレダリー) が増感剤として用いられる¹⁾。ヘマトポルフィリン誘導体は波長が405nm程度の光を照射すると630nmの蛍光を発生する。悪性腫瘍患者に投与すると、ヘマトポルフィリン誘導体は正常組織よりも癌組織に選択的に集積する²⁾。正常組織のなかでは肝臓、脾臓、腎臓に比較的高濃度集積するとされる³⁾。このヘマトポルフィリン誘導体の特徴を利用して、癌病巣を選択的に破壊する治療法がPDTである。同時にヘマトポルフィリン誘導体が癌病巣に集積する性質を利用した癌の局在診断 (光化学診断、photodynamic diagnosis, PDD) の開発が試みられてきた。腫瘍に集積したヘマトポルフィリンによる蛍光は、肺癌⁴⁾、膀胱癌⁵⁾などを含めた多くの腫瘍で観察されている⁶⁾。

今までに試みられていた癌病巣の蛍光の検出は、ヘマトポルフィリン誘導体による蛍光の波長を選択し、その強度を蛍光フォトメーターなどを用いて測定する方法が主であった。この測定方法では正常組織からのバックグラウンド蛍光のために測定精度に難点があった。

ヘマトポルフィリン誘導体は励起光を照射すると630nmの赤色蛍光を発生する⁸⁾。それに対し、正常組織は500nm前後の緑色の蛍光を発生する⁹⁾。正常組織の蛍光は、コラーゲン、nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADP)、flavin-adenine dinucleotide (FAD) などが主な発生源とされる (表3.6.1)^{10,11)}。異なった波長の蛍光を同時に観察できる装置の開発は、癌の治療の際に切除範囲を決定したり放射線治療の範囲を決定したりするための局在診断に大きく貢献すると考えられる。

ここでは、現在私たちが開発しているリアルタイムにカラー蛍光観察ができる超高感度内視鏡システムの開発経過とその応用について報告したい¹²⁾。超高感度内視鏡システムの性能の向上は満足できるものであり、市販機の開発も視野に入ってきている。この装置の開発は、ATX-S10¹³⁾などの次世代のヘマトポルフィ

リン誘導体を用いた日帰りの癌の局在診断と光化学療法の展開を主な目的としている。

6.2 装置の概要

超高感度内視鏡システム (仮称フルオロダイナミックカメラ、fluorodynamic camera) はカラーICCDカメラを備えたカメラボックスとコントロールユニットから構成される。カラーICCDは浜松ホトニクス製で、ハワイのすばる天文台で用いられている超高感度装置の民生転用の第一号機である。カメラボックスにはオリンパス製の内視鏡コネクターが装備されており、オリンパス製のOlympus Endoscopy System (OES) 内視鏡システムのほとんどの内視鏡を接続することができる。カメラボックスは、RGBフレームメモリー、image average system、scan converter、カメラコントロールユニットを装備したRGBコントロールユニットに接続される (図3.6.1,2)。

200Wの水銀-キセノンランプ光源装置から発生させた平均波長405nmの励起光は、ファイバースコープのライトガイドに導入され内視鏡のライトチャンネルから照射される (図3.6.3)。白色光で観察する時は、300Wのキセノンランプを光源に使い、蛍光観察と白色光観察は切り替えスイッチによって選択する。どちらの場合も同じカラーICCDカメラから入力される。出力装置はカラーモニター、マッキントッシュコンピュータ、ビデオレコーダーである。

ヘマトポルフィリン誘導体は現時点ではフォトフリンしか臨床使用できないため、フォトフリンを使用し

表3.6.1 正常組織での蛍光の発生源と蛍光波長

	励起波長 (nm)	蛍光波長 (nm)
Collagen	440	500-510
Fibronectin	440	500-510
FAD*	440	520-530
Porphyrin	440	630
Vitamin	440	500
NADH**	400	440-450
Albumin	400	440-450
Globulin	400	430-450

*FAD; flavin-adenine dinucleotide,

**NADH; nicotinamide-adenine dinucleotide.

ている。2.5mg/mlの注射用溶液を48時間前に2.0 mg/kgの量で静脈内に注射する。動物実験や基礎的検討ではATX-S10も用いた。

6.3 超高感度内視鏡システムの性能

ここでは開発に伴って挙がった問題点と、それに対する主な改良点を概説する。現在の性能は満足できるものとなってきたが、今の装置で得られている画像を提示したい。

初期の装置では、200Wの水銀-キセノンランプ光源装置からの励起光をファイバーを用いて気管支鏡の生検チャンネルから導入した。この装置では満足できる蛍光画像は得られなかった。その理由は、生検チャンネルを通して内視鏡の先端から出たファイバーの固定が悪いため光軸が安定しなかったことと、ファイバーの径が細いため十分な光量が照射されなかったことなどが考えられた。そのため、内視鏡のライトガイドを直接水銀-キセノンランプ光源装置に接続し、内視鏡先端のライトガイドのレンズを通して照射するように改良した。この変更は非常に効果的で、蛍光画像の質の改善に大きく貢献した。

超高感度内視鏡システムは、450から630nmの波長の蛍光を高感度に検出すると同時に、白色光を用いたカラー観察を一台のICCDカメラで行えることが大きな特徴である。このために、励起光である平均405nmの照射光をカットする必要がある、特殊なフィルター

の開発が必要であった。平均405nmの照射光で照射中に白色光の条件で観察すると図3.6.4のようなイメージが得られる。超高感度内視鏡システムの開発で、いままでもっとも困難であった点は、観察に適したフィルターの開発であった。

超高感度内視鏡システムで観察した最初の症例を提示する。症例は51歳の男性で、膵臓原発のislet cell tumorの左主気管支転移の症例である。1999年にこの転移のために左無気肺となり、高度の呼吸困難を訴えた。手術適応はなく、気道の確保のためにYAGレーザー治療を試みたが効果がなかったために、PDTを試みて気道の再開が得られた。1年後に左主気管支の後壁側から約1cmのポリープ状の転移性腫瘍が再発したために、再度PDTを行うことにした。PDT時に超高感度内視鏡システムによって観察した。PDT施行48時間前に2.0 mg/kgのフォトリンを静脈注射した。超高感度内視鏡システムに気管支ファイバースコープを装着し、白色光で観察した後に200Wの水銀-キセノンランプに切り替えた。左主気管支後壁のポリープ状の転移性腫瘍はフォトリンによる630nmの蛍光により赤色に観察された。ポリープ状腫瘍の茎部から気管支後壁にかけては、正常粘膜からと思われる緑色の蛍光が観察されたが、蛍光強度は弱かった(図3.6.5)。赤色蛍光部と緑色蛍光部の境界は比較的明確であった。

蛍光の検出感度が不十分と思われたために、フィ

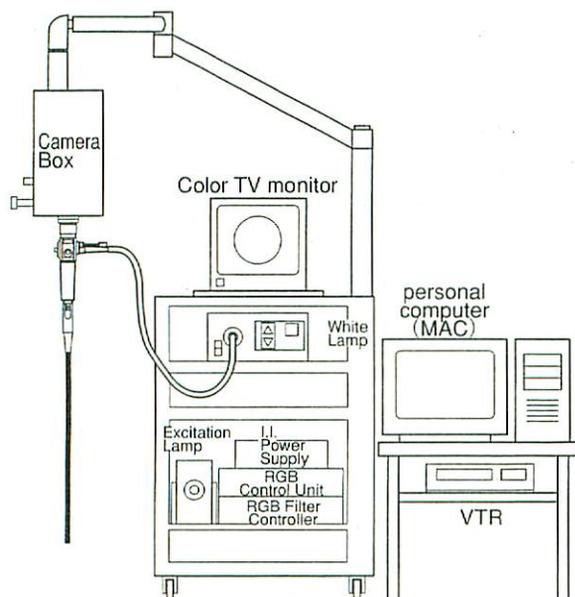


図 3.6.1 超高感度内視鏡システムのブロックダイアグラム

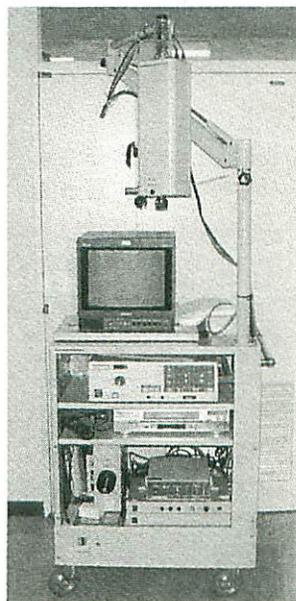


図 3.6.2 超高感度内視鏡システムの外観

ターに改良を加えた。図3.6.6は最新の機器の条件により健常部で観察された緑色の自家蛍光を示す。写真に見られるように極めて明るい黄緑色の自家蛍光が観察された。

次に、最近経験された気管支に浸潤した扁平上皮癌の症例を提示する。症例は56歳男性。2年前に肺扁平上皮癌の診断により右上葉切除術をうけた。その後、再発により放射線治療をうけた。気管支鏡検査により切除部の再発と、反対側の左B6入口部に新たな病巣が出現したために、PDTの適応とした。気管支鏡所見では、気管分岐部から右主気管支にそって、右上葉入口部まで隆起性病変を認めた。左気管支ではB6入口周辺の粘膜の不整像が観察された。PDTは前の症例と

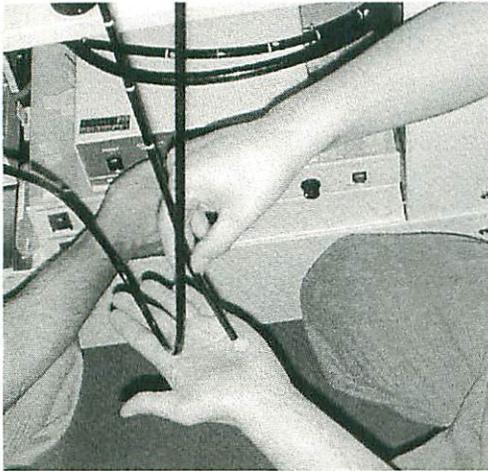


図3.6.3 気管支ファイバースコープの先端より励起光が照射されている。(口絵18参照)

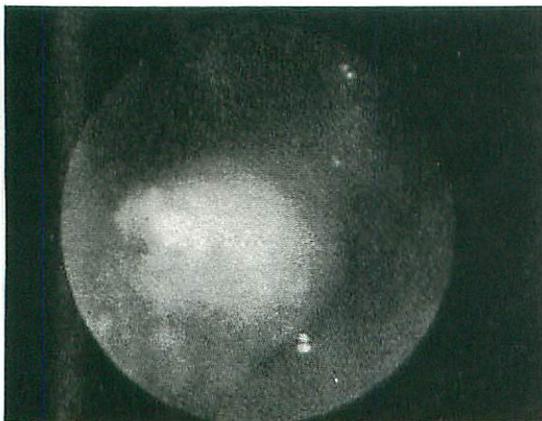


図3.6.4 励起光を照射したときのフルカラー画像(口絵19参照)胃粘膜が青色に観察されている。

同様に施行したが、右の病変には行わなかった。超高感度内視鏡システムに気管支ファイバースコープを装着し、白色光で観察した後に励起光源に切り替えた。図3.6.7は左B6入口周辺部の気管支鏡所見を示す。粘膜面の不整像と肥厚がみられる。図3.6.8は同部位の蛍光内視鏡所見を示す。B6入口部の下壁側に緑色の自家蛍光が観察され、上壁から下葉気管支入口部に全周性にフォトフリンの赤色蛍光が観察された。赤色蛍光と緑色蛍光の境界は明瞭であった。図3.6.9は右主気管支の病変部の白色光の所見、図3.6.10は同部位の蛍光内視鏡所見を示すが、気管分岐部から連なった隆起性病変では赤色蛍光のみが観察された。

私たちの超高感度内視鏡システムは、次世代のヘマトポルフィリン誘導体を用いた蛍光診断を計画して開発している。基礎的検討で、蛍光強度の弱いフォトフリンでの赤色蛍光を検出し得たことから、フォトフリンを静脈注射したPDTの臨床例でも検討することを計画に加えた。図3.6.11はラットの足底にATX-S10を投与して、超高感度内視鏡システムで観察した結果を示す。ATX-S10ではフォトフリンよりもはるかに強い赤色蛍光が観察された。

6.4 実用化へ向けての問題点と今後の展開

私たちが開発している超高感度内視鏡システムでは、気管支からの緑色自家蛍光とフォトフリンによる赤色蛍光をリアルタイムに観察することができる。赤色蛍光を発生している部分が、悪性腫瘍の浸潤などの病変部であるかどうかは今後の検討を待たねばならない。しかし、超高感度内視鏡システムによる自家蛍光

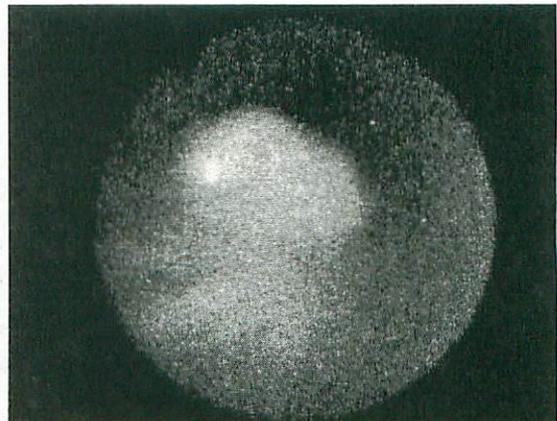


図3.6.5 左主気管支後壁から隆起する転移性 islet cell tumor の蛍光気管支鏡画像(口絵20参照)腫瘍は赤色に蛍光した。茎部には弱い緑色の自家蛍光が観察される。

の観察では、病変がないと考えられる部位では赤色蛍光は全く観察されなかった。また、ヘマトポルフィリン誘導体を投与した時の臓器あるいは腫瘍内の分布を考えると、偽陽性病変が強い赤色蛍光を発生することは極めて考えにくい。したがって、赤色蛍光を発生する部位は悪性変化を示す可能性が高いと考えられる。

私たちの超高感度内視鏡システムは、次世代ヘマトポルフィリン誘導体 ATX-S10 を使用した悪性腫瘍の蛍光診断の臨床導入を目的として開発を始めた。ATX-S10 は水溶性のヘマトポルフィリン誘導体¹⁴⁾ 前臨床研究段階にあり、臨床第2相試験が計画されているが、現時点では臨床的には使用することはできない。ATX-S10 の特徴は強い蛍光を発生すること、腫瘍破壊作用が強力であること、代謝が極めて早いこと、安全性が高いことなどである。とくに体外への排せつは迅速でフォトフリンが14日以上体内に滞留するのに対して、ATX-S10 は24時間でほとんどが排せつされる。

蛍光強度はフォトフリンの約20倍である。しかし、超高感度内視鏡システムの感度は高く、フォトフリンにおいても臨床例で630nmの赤色蛍光を観察できた。ATX-S10 のように蛍光強度が強く、血中半減期が短い新規ヘマトポルフィリン誘導体^{14,15)} が開発されれば、超高感度内視鏡システムによる癌の蛍光診断は飛躍的に発展すると考えられる。

内視鏡に接続して自家蛍光を観察する装置として Xillix 社の light-induced fluorescence endoscopy system (LIFE system) や旭光学の SAFE system¹⁶⁾ がある。どちらのシステムも技術的な内容は完全には明らかにされていないが、光源から励起光を照射して500nm付近の蛍光をとりだして増幅することは共通のようである。したがって、観察される蛍光は緑色に見えるが、本質的には白黒画像と理解できる。私たちのシステムの大きな特徴は、励起光の波長はフィルターによって減弱されるが、リアルタイムにフルカラー蛍

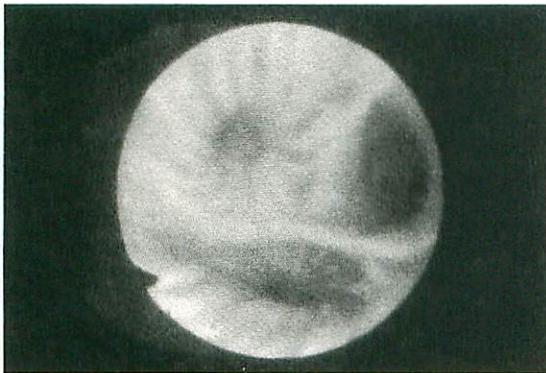


図 3.6.6 最新の設定による健常気管支粘膜からの緑色自家蛍光 (口絵 21 参照)
気管支壁の粘膜ヒダがよく観察されている。

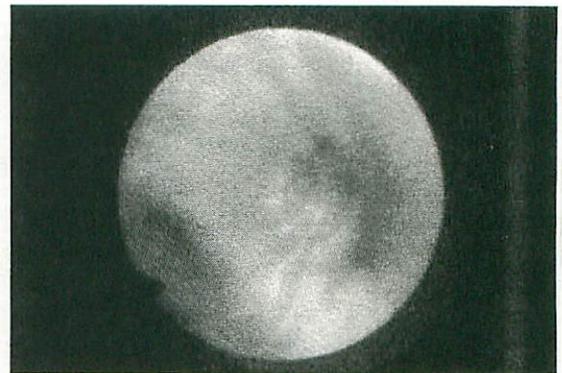


図 3.6.8 左 B6 入口周辺部の蛍光内視鏡所見 (口絵 23 参照)
B6 入口部の下壁側に緑色の自家蛍光が観察され、上壁から下葉気管支入口部に全周性にフォトフリンの赤色蛍光が観察された。赤色蛍光と緑色蛍光の境界は明瞭であった。



図 3.6.7 気管支扁平上皮癌症例の白色光による気管支鏡所見 (口絵 22 参照)
左 B6 入口周辺部の粘膜面の不整像と肥厚がみられる。

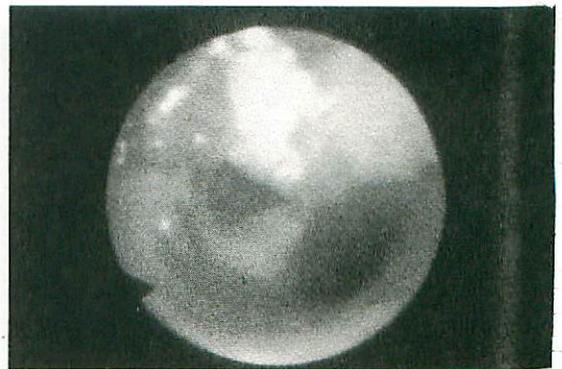


図 3.6.9 右主気管支の病変部の白色光気管支鏡所見 (口絵 24 参照)
気管分岐部前壁から右上葉入口痕にかけて隆起性病変を認める。

光観察ができることである。このシステムによって初めてヘマトポルフィリン誘導体の赤色蛍光と緑色の自家蛍光が同時に観察できた。また、外径 2.8mm の細径気管支鏡 BF-XP40 を用いて高次分岐気管支まで観察したが、末梢まで自家蛍光が観察された。超高感度内視鏡システムは気管支鏡以外の内視鏡にも装着できる。胃ファイバースコープを用いた検討では、胃癌病巣を描出することができた。

最新の設定で超高感度内視鏡システムは満足できる性能を示した。画像解析の能力については、技術的な難関はほとんど解決されたと考えている。現在は、操作性の向上を目指して改良を加えている。

6.5 まとめ

私たちが開発した超高感度内視鏡システムを用いて、気管支壁の緑色の自家蛍光と集積したフォトフリンによる病変部の赤色蛍光を観察した。病変部の赤色

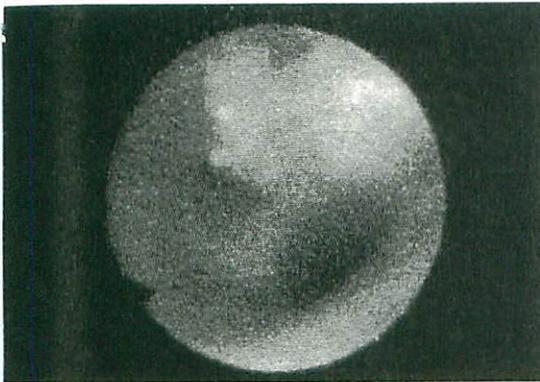


図 3.6.10 蛍光内視鏡所見 (口絵 25 参照)

気管分岐部から連なった隆起性病変では赤色蛍光のみが観察された。手前には緑色蛍光が観察される。



図 3.6.11 ラットの足底に ATX-S10 を投与した超高感度内視鏡画像 (口絵 26 参照)

ATX-S10 ではフォトフリンよりも強い赤色蛍光が観察された。指の末梢に緑色の自家蛍光が観察されている。

蛍光と健常部の緑色蛍光の境界は明瞭であった。また、フォトフリンを注射しないで観察した場合は腫瘍病巣部の緑色の自家蛍光は減弱していた。超高感度内視鏡システムは癌の局在診断と浸潤範囲の決定に極めて有用であると考えられる。体内動態の良好な次世代のヘマトポルフィリン誘導体の開発により、日帰り外来での癌の蛍光診断とそれに引き続き光化学療法を行う可能性が期待される。

文献

- 1) Dougherty TJ: A brief history of clinical photodynamic therapy development at Roswell Park Cancer Institute. *J. Clin. Laser Med* **14**: 219-221, 1996
- 2) Nakajima S, Hayashi H, Omote Y, Yamazaki Y, Hirata S, Maeda T, Kubo Y, Takemura T, Kakiuchi Y, Shindo Y, et al: The tumour-localizing properties of porphyrin derivatives. *J. Photoch. Photobiol. B* **7**: 189-198, 1990
- 3) Gomer CJ, Dougherty TJ: Detection of 3H-and 14C hematoporphyrin derivative distribution in malignant and normal tissue. *Cancer Res* **39**: 146-151, 1979
- 4) Bellnier DA, Ho YK, Pandey RK, Missert JR, Dougherty TJ: Distribution and elimination of Photofrin® II in mice, *Photochem. Photobiol* **50**: 221-228, 1989
- 5) Hayata Y, Kato H, Ono J, Matsushima Y, Hayashi N, Saito T, Kawate N: Fluorescence fiberoptic bronchoscopy in the diagnosis of early stage lung cancer. *Recent Results Cancer Res* **82**: 121-130, 1982
- 6) Benson RC, Farrow GM, Kinsey JH, Cortese DA, Zincke H, Utz DC: Detection and localization of in situ carcinoma of the bladder with hematoporphyrin derivative. *Mayo Clin. Proc* **57**: 548-555, 1982
- 7) Lipson RC, Baldes EJ, Olsen AM: The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J. Natl. Cancer Inst* **26**: 1-11, 1961
- 8) Eales L: Clinical chemistry of the porphyrins, in Dolphin D (ed): *The porphyrins*. Academic Press, New York, pp 810, 1978
- 9) Schomacker KT, Frisoli JK, Compton CC, Flotte TJ, Richter JM, Deutsch TF, Nishioka NS: Ultraviolet laser-induced fluorescence of colonic polyps. *Gastroenterology* **102**: 1155-1160, 1992

- 10) Lakowicz JR: Principles of fluorescence spectroscopy: Plenum Press, New York, pp 14-18, 1983
- 11) Schomacker KT, Frisoli JK, Compton CC, Flotte TJ, Richter JM, Nishioka NS, Deutsch TF: Ultraviolet laser-induced fluorescence of colonic tissue: basic biology and diagnostic potential. *Laser Surg. Med* **12**: 63-78, 1992
- 12) Ohsaki Y, Nishigaki Y, Nakanishi K, Toyoshima E, Takeyama K, Yamamoto Y, Matsumoto K, Saito H, Osanai S, Kikuchi K, Nakajima S: Development of High Sensitive Fluorodynamic Camera to Detect Cancer Lesion using Fiber-Optic Endoscope submitting
- 13) Nakajima S, Sakata I, Hirano T, Takemura T: Therapeutic effect of interstitial photodynamic therapy using ATX-S10 (Na) and a diode laser on radio-resistant SCCVII tumors of C3H/He mice. *Anti-Cancer Drug* **9**: 539-543, 1998
- 14) Tatman D, Liddell PA, Moore TA, Gust D, Moore AL: Carotenohematoporphyrins as tumor-imaging dyes. Synthesis and in vitro photophysical characterization. *Photochem. Photobiol* **68**: 459-466, 1998
- 15) Mori M, Sakata I, Hirano T, Obana A, Nakajima S, Hikida M, Kumagai T: Photodynamic therapy for experimental tumors using ATX-S10 (Na), a hydrophilic chlorin photosensitizer, and diode laser *Jpn. J. Cancer Res* **91**: 753-759, 2000
- 16) George PJ: Fluorescence bronchoscopy for the early detection of lung cancer. *Thorax* **54**: 180-183, 1999

(大崎能伸、竹山周良、中島 進)