



Porphyrin-like fluorescence in oral cancer : in vivo fluorescence spectral characterization of lesion by use of a near -uv excited autofluorescence diagnosis system and separation of fluorescent extracts by capillary electrophoresis

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 稲熊, 昌広 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1102

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 249号	学位授与年月日	平成10年 3月26日
氏 名	稲 熊 昌 広		
論文題目	Porphyrin-like fluorescence in oral cancer : in vivo fluorescence spectral characterization of lesion by use of a near-uv excited autofluorescence diagnosis system and separation of fluorescent extracts by capillary electrophoresis (口腔癌のポルフィリン様蛍光：近紫外線励起固有蛍光診断システムを用いた in vivo での病変部の蛍光スペクトルの特性化とキャピラリー電気泳動による蛍光抽出物の分離)		

博士(医学) 稲熊昌広

論文題目

Porphyrin-like fluorescence in oral cancer: in vivo fluorescence spectral characterization of lesion by use of a near-uv excited autofluorescence diagnosis system and separation of fluorescent extracts by capillary electrophoresis

(口腔癌のポルフィリン様蛍光: 近紫外線励起固有蛍光診断システムを用いた in vivo での病変部の蛍光スペクトルの特性化とキャピラリー電気泳動による蛍光抽出物の分離)

論文内容の要旨

〔はじめに〕

Pollicard (1924) は実験的につくったラット肉腫の潰瘍部に紫外線照射下で強く明るい赤色蛍光を認めている。ヒト皮膚の潰瘍性扁平上皮癌 (SCC)、緑色腫、乳房の腺癌、肝臓の腺癌でも紫外線照射下で赤色蛍光が認められ、それはポルフィリンの存在に帰されていた。口腔領域では Harris (1987) らがカルチノーゲンで誘導したハムスターの口腔粘膜部の腫瘍とヒト口腔癌にも赤色固有蛍光が観察できると報告している。

このため、口腔癌の赤色固有蛍光を検索するために浜松ホトニクス KK と共同で開発した近紫外線励起固有蛍光診断システム (以下、光診断装置) を用い、癌病巣に対して in vivo で蛍光スペクトル分析を行った。次に、口腔癌の赤色蛍光物質を検索するため、キャピラリー電気泳動 (CE) を用いて分離を行った。

〔材料ならびに方法〕

(I) 病変部の蛍光スペクトル分析 (光診断)

装置は光診断装置を使用した。システムはキセノンフラッシュランプ、干渉フィルター、ダイクロイックミラー、光ファイバー、カットフィルター、分光器、イメージ・インテンシファイアー、SIT カメラ、コンピューターより構成される。キセノンフラッシュランプを光源とした。光ファイバーの先端を組織の表面から垂直に 5 mm 離して測定した。励起波長 410 nm、測定波長範囲 605–700 nm、スポットサイズ 12.6 mm、繰り返し周波数 7.5 Hz、パルス幅 1.0×10^{-3} sec、平均出力 0.23 mW、エネルギー密度 0.24 mJ/cm² とした。癌と臨床診断された病変部の蛍光スペクトル分析を行ったのち、その部分の生検を行い、各症例のスペクトル特性を病理組織診断と比較した。

(II) 口腔癌の蛍光物質の抽出、蛍光スペクトルおよび CE 分析

光診断装置を用いて病変部の蛍光スペクトル分析を行ったのち、組織を採取しメタノール/クロロホルム (2/1) でホモジナイズして蛍光物質を抽出する。抽出液の一部をとり、蛍光スペクトル測定を行う。残りの抽出液は濃縮し CE により蛍光物質の分離を行う。癌の試料は症例 1 (67 歳男、T4N1M0、上顎高分化型 SCC)、症例 2 (73 歳男、T4N2M0、下顎、舌、口底の浸潤 SCC)、症例 3 (92 歳男、T3N0M0、上顎高分化型 SCC) の未処置試料を用い、対照の試料は全身疾患のない、正常歯肉粘膜と舌粘膜を用いた。抽出液の蛍光スペクトル測定は分光蛍光光度計を用い、励起波長 400 nm、蛍光波長範囲 420–750 nm とした。CE は蛍光検出器 (励起波長 400 nm、蛍光波長 630 nm)、チャートレコーダー、高電圧直流電源から構成されるシステムで行った。70 cm × 内径 50 μ m の溶解シリカ素管を分離に用いた。泳動液は 15% methanol / 100 mM SDS–20 mM CAPS (pH 11) を用い、ミセル電気泳動を行った。標準物質のプロト

ポルフィリン (PP) と亜鉛プロトポルフィリン (ZnPP) の混合溶液を生体サンプル分析の前後に導入し、分離した蛍光物質と比較した。PP と ZnPP を標準物質に用いた理由は血中、組織中に PP、ZnPP が極少量含まれるためである。

〔結果〕

(I) 分析の結果、630nm の大きなバンドと665–690nm にかけての小さなバンドまたは肩型のバンドの2つのバンドをもつ蛍光スペクトルを症例の大多数に認め、これらを「ポルフィリン様スペクトル」あるいは「二峰性のスペクトル」と呼んだ。臨床的に癌と疑われる症例について1993年6月～96年3月に計78例を検索し、内訳は癌新鮮例61例、再発例17例、組織型ではSCC73例、腺様嚢胞癌 (ACC) 2例、verrucous carcinoma 2例、粘表皮癌 1例であった。光診断装置を用いて検索した口腔癌78例のうち、ACCの2例と SCC 再発の14例を含む66例 (全症例の85%) にポルフィリン様の蛍光スペクトルを認めた。このスペクトルを認めなかった (偽陰性) 12例のうち、光の深達性が悪かった深在性の4例と粘表皮癌の1例を除く7例について、病理組織学的に悪性度、異形度、間質との関係につき検討した。浸潤形態は山本・小浜の分類により、また組織学的悪性度については、腫瘍-宿主関係を含めて、Willen の分類に準じて検討したが相関性は認められなかった。

(II) 抽出液の蛍光スペクトル測定の結果は、3例ともほぼ630nm にバンドを持っており、蛍光強度の強い症例2ではさらに671.0nm にバンドを持っていた。正常組織では630–690nm にバンドはなかった。CE での分離の結果、症例1では移動時間10.4分、11.0分にピークがあり、ZnPP や PP とは異なっていた、少なくとも2種類以上のポルフィリン様蛍光物質を認めた。症例2では20.6分、26.0分、29.4分に3つのピークがあり、3種類のポルフィリン様蛍光物質が認められた。3つのピークは、標準試料の ZnPP と PP のいずれとも移動時間は異なっていた。症例3では20.8分にピークがあり、PP と時間は一致していた。正常組織ではピークはなかった。3例の口腔SCCのCE分析では、2例のSCCではPPとZnPP以外のポルフィリンが含まれ、もう1例のSCCではPPと同じ移動時間を持つ物質を含んでいた。

〔考察〕

化学療法や放射線療法後の病変ではポルフィリン様蛍光スペクトルは認めず、蛍光物質の検索には未処置の試料を必要とした。また、収集できる未処置の試料は、約3～5mm角と非常に小片である上、試料内に含有される蛍光物質は非常に微量であり、口腔癌のポルフィリン様蛍光物質に対する高感度で有用な分析手法が必要とされた。ミクロHPLCを用いて分離を行ったが一回あたりのサンプル注入量も多く上手くいかなかった。そのため CE を用いた。ヒト口腔癌は通常、化学療法や放射線療法後に切除される。小さな癌は通常切除により治療されるが、分析に十分な未処置の試料は採取できない。未処置の試料は生検時に大きな癌から取られたが、そのような患者の来科は非常に少なかった。

癌の赤色蛍光の原因は、腫瘍そのものの産生物であるという説や細菌活動の産生物であるという説がある。正常粘膜で覆われ潰瘍形成のない腫瘍 (症例1) から vivid な癌組織を露出させ、光診断装置を用いたところポルフィリン様蛍光スペクトルが認められ、このことはこの蛍光の原因が腫瘍そのものにあることを示唆している。口腔癌の大多数にポルフィリン様蛍光スペクトルがみられ、蛍光物質は癌の種類でさまざまであることから、口腔癌とポルフィリン代謝との関連が示唆される。口腔癌におけるヘム合成の代謝欠損が、病変部におけるポルフィリンの蓄積を引き起こしている可能性も考えられる。

〔結論〕

ACC と SCC 再発例を含む78例の口腔癌が光診断装置で検索された。励起波長410nm の紫外線で照射されると、口腔癌の85%がポルフィリン様スペクトルを示したが、口腔正常粘膜では示さなかった。ポルフィリン様蛍光物質は口腔癌から抽出され、蛍光検出のCEシステムで分離された。CEのデータは明らかに蛍光物質は癌の種類でさまざまであることを示している。

論文審査の結果の要旨

1924年 Policard の報告以来、悪性腫瘍は固有蛍光を有することが知られている。申請者は口腔癌が自然に発する赤色蛍光を浜松ホトニクス KK と共同で開発した近紫外線励起固有蛍光診断装置（以下、光診断装置）で検索した。また口腔癌の赤色蛍光物質の性質を探索するためキャピラリー電気泳動（CE）を用いて分析した。

光診断装置はキセノンフラッシュランプを光源とし、ファイバー先端を組織表面から垂直に5mm離して測定した。励起波長410nm、測定波長範囲605-700nm、スポットサイズ12.6mm、繰り返し周波数7.5Hz、パルス幅 1.0×10^{-3} sec、平均出力0.23mW、エネルギー密度0.24mJ/cm²の条件下に測定を行った。

対象は臨床的口腔癌と診断された78例について、光診断装置により蛍光の有無を検索し、検索後全例病理検索を行い診断の正確性を検討した。検索した結果全例癌であったが、そのうち66例（85%）に蛍光を検出し得た。口腔癌の内訳は、再発癌17例を含み、組織型では扁平上皮癌73例、腺様嚢胞癌2例、verrucous carcinoma 2例、粘表皮癌1例である。なお化学療法、放射線療法中のものは蛍光が観察出来なかった。

病変部の蛍光スペクトル分析（光診断）の結果、630nm の大きなバンドと665-690nm にかけての小さなバンドまたは肩型のバンドの2つのバンドをもつ蛍光スペクトルを症例の大多数に認めた。これを「ポルフィリン様スペクトル」あるいは「二峰性のスペクトル」と名付けた。微弱蛍光あるいは単峰性のものなど二峰性を示さなかった12例（偽陰性）のうち深在性のもの4例と粘表皮癌の1例を除く7例について、病変部の蛍光スペクトル分析終了後、判定部位の生検を行って、スペクトル特性と病理組織診断、浸潤形態、悪性度などとの関係について比較検討したが特徴的所見は得られていない。

CE は70cm×内径50μm の溶融シリカ素管を分離に用い、励起波長400nm、蛍光波長630nm にて測定した。標準物質としてプロトポルフィリン（PP）と亜鉛プロトポルフィリン（ZnPP）の混合溶液を生体サンプル分析の前後に導入し測定した。3例においてCEを行ったところ、1例はPPのピークと一致したが、他の2例ではPP、ZnPP の標準試料とは異なる移動時間を示した。この2種の物質は、尿中に排泄されるような極性の高いポルフィリンの代謝生成物とは異なっており、親油性のポルフィリン或いは親油性基と結合したポルフィリン様物質と考えられる。ポルフィリン様蛍光物質として検出されるものはポルフィリンの代謝物質の種々のものを含んでいるものとも考えられた。

本法が癌の screening に役立つにはなお症例を加え、偽陽性、偽陰性蛍光部位の病理所見なども検討が必要であるが、サージカルマージンの決定や、癌の早期発見、癌の再発部位を正しく示すため生検診断の精度上昇に役立つなどの利点もあると考えている。

本研究に関して次のような質疑、試問を行った。

1) 紫外、可視吸収スペクトルと蛍光の関係について

- 2) PDTの光増感剤注入を行えば感度を上げられるのではないか
- 3) 生体の蛍光物質で加齢に伴い出現する物質について
- 4) 本検査のreproducibilityについて
- 5) 組織型別判定能力、或いは予後判定の可能性について
- 6) 出血がある場合、蛍光検出に影響があるか
- 7) 培養株のcell lineにより蛍光物質が異なるのか
- 8) 白斑への応用について
- 9) 再発症例で認められる二峰性spectrumの説明
- 10) 赤色蛍光の一般的な要因物質について
- 11) Screening法に利用するための問題点について
- 12) キャピラリー電気泳動におけるポルフィリン代謝生成物の分布について
- 13) 赤色蛍光物質の存在組織と診断深度、領域の関係について
- 14) 蛍光物質の安定性、検出量について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 馬 場 正 三

副査 教授 平 光 忠 久 副査 教授 藤 瀬 裕