

AMCoR

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

北海道医報 (2017.4) 1183:18-24.

光を使った新しい医療の開発

大崎 能伸


光を使った新しい医療の開発

旭川医科大学病院呼吸器センター
教授 大崎 能伸



大崎教授

今日は、内視鏡を使った蛍光診断についてお話しさせていただきます。表題に共同研究者の名前が書いてあるが、研究に携わった全員は書ききれないので、書けるだけ書いたということでご承知いただき

 旭川医科大学

光を使った新しい医療の開発

旭川医科大学 呼吸器センター
大崎能伸、北田正博、山本泰司、豊嶋恵理、
佐々木高明、林 諭史、奥村俊介、風林佳大、
平井理子、石橋 佳、竹山周良、阪田 功、市川 晶
森山メモリアル病院
中島 進

北海道医学大会 2016年10月1日

図 1

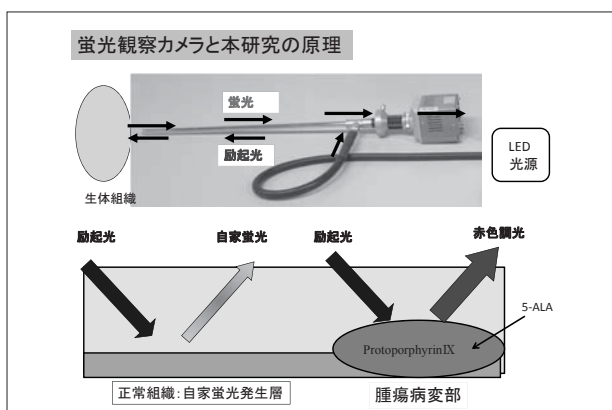


図 2

たい(図1)。

本研究での機械の概要であるが、人の体に青い光や紫外線などの励起光を当てると人の体は蛍光を発生する。この蛍光を見るためには励起光を完全にブロックして観察することが必要であり、自家蛍光が出ない臓器は何も見えず、真っ暗に見えるという仕組みになっている(図2)。

自家蛍光の出る組織を見るためにカメラの感度を上げると、いろいろな色の蛍光が見えてくる。この生体から発生する蛍光を応用するものが自家蛍光診断である。このシステムではもうひとつの使い方ができて、がんに取り込まれるような蛍光診断薬を使ったときに、蛍光診断薬の色が観察されることによってがんの部位がわかる光線力学的診断にも使える。

励起光を完全にカットすると、人の体は蛍光を発生するのでその色が見える。何も蛍光がないときは真っ暗という原理によって生体からの蛍光を見る機械をつくらうということで始めた研究である。

この図は第1号機のブロック図である(図3)。微弱な蛍光を見るためには非常に大掛かりな画像診断システムが必要であり、その仕組みを組み込んだのが第1号機である。ここにCCDが入っているが、内視鏡装置にカメラを取り付けて、カメラボックス内で緑、青のRGBフィルターを回してカラーの情報を撮る。

CCDの前にイメージインテンシファイヤーという、光を電気に変えて、これを加速して光の強さを強める装置を入れて、CCDで見るシステムが必要である。

このシステムを組んだ第1号機が写真のもので、これくらい大きなボックスでなければ先ほどのシステムが入らなかった。私たちの研究はここからスタートしている。このカメラボックスのカメラに内視鏡を接続して蛍光を観察するところから始まった。

写真の右手に持っているのがこのあとに作った機械である(図4)。第1号機には先ほどお見せしたRGBフィルターを回してカラーを撮るといった高感度のCCDが入っているが、新しいカメラはカラー

CCDに変えて、電気的あるいは回路的な工夫によって感度を上げた。

現在はもうひとつあとの新しい機械を使って研究をしている。今は更にその先の機械を設計しているところである。

さて、このカメラの使い方であるが、写真は光学視管と呼ばれる胸腔鏡にカメラをつけた場合を示している(図5)。このほかに内視鏡装置の気管支鏡でも使え、消化管内視鏡にも接続することができ、いろいろな臓器の中に入れていくと生体から出てくる蛍光をこのカメラを通してカラーで見えるところがこの装置のポイントである。

先ほど説明したように、本機では405nmの励起光を当てると、その励起光をこのフィルターでカットする。蛍光をカラーで観察するためには、100%カットするような仕組みが必要である。

この写真が今、私たちが使っている新しいCCDのカメラである。以前のもより少し大きくなっている。このカメラはEM-CCDという感度の高いCCDをさらに改造して感度を上げたもので、4Kのディスプレイに映像を出せるようにハイビジョン化したものを使っている。

この写真はシステムを手術中に使っているところで、術者の手が見えるが、手元に胸腔鏡があり、カ

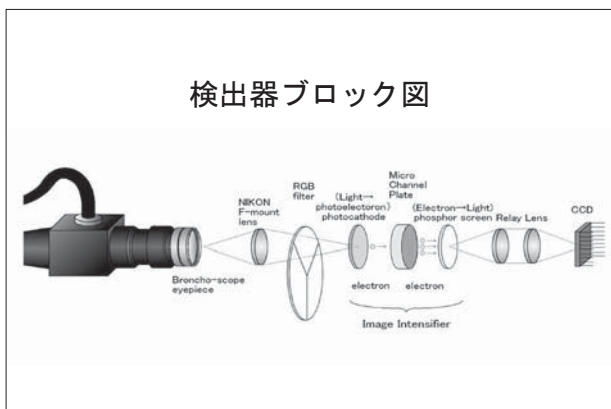


図3



図4

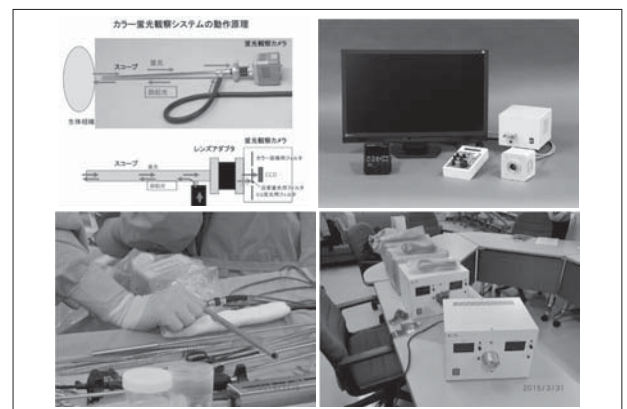


図5

メラは胸腔鏡に接続している。このカメラは滅菌することができないので、ドレープで包んで使っている。

現在使えるシステムは4台あり、旭川医科大学で2台使っている。1台が内科で使い、1台が外科である。ほかは、1台は岡山労災病院に行っていて、もう1台は旭川医療センターにある。こちらにあるのは405nmの励起光を発生する光源装置であるが、これらをセットで使うシステムである。

この写真はアミノレブリン酸という蛍光診断薬を患者さんに投薬して私たちのカメラで見ているところである（図6）。従来同じようなシステムが使われていた。それに比べて私たちのシステムはどこが違うのかという質問をしばしばいただく。私たちのカメラで見ると、ご覧のようにこれは肺の表面であるが、肺の表面からはコラーゲンを主体とする蛍光物質から蛍光が出てくる。この蛍光はカラーで見ると緑色の蛍光に見えるので、私たちのカメラで見ると正常な臓器からは緑の蛍光が観察される。この部位は病変部であるが、病変部にアミノレブリン酸から生成するプロトポルフィリンIXが取り込まれているところである。このように、ポルフィリン誘導体などの蛍光診断薬から出る緑ではない蛍光が、そのままカラーで見えるのが従来のシステムと異なるところである。

この写真は従来のあるシステムによる蛍光診断であるが、従来のシステムで蛍光診断薬を見ると、このようにピンク色に見える。これは膀胱鏡で見ている膀胱の写真であるが、背景にある正常な組織の緑の蛍光が観察できない。そのために励起光である青の光を少しもらして、この光を反射光として正常組織も観察する仕掛けが必要になってくる。

私たちのカメラで見ると、正常組織から出てくる蛍光が観察され、赤を含めたいろいろな色の変化が観察されるので、さまざまな蛍光診断薬が使い、診断精度が高まることが予想される。

この写真は私たちのカメラで見た自家蛍光診断の例である（図7）。この症例はハマルトーマの症例である。悪性度の低い腫瘍であるが、普通の白色光

のカメラで見るとこのように見える。これで見ている像は、白色光の中のいろいろなスペクトルの光が反射されてきてカラーで見える。これが、私たちが内視鏡を使って見る人の体の色である。

これを蛍光に切り替えると、青の励起光を当てて青の励起光が完全にカットされているので、蛍光がなければ真っ暗であるのが、青の励起光によって正常組織から出てくる緑の蛍光、そして、ハマルトーマ、腫瘍から出てくる赤の蛍光が観察されている。

従来、蛍光診断装置で見た人の腫瘍は、蛍光は発生しないとされていた。以前の蛍光診断のためのシステムは、いままで世界で3システムつくられたが、それらのシステムでは、がんの部分は緑の蛍光が落ちるだけで、腫瘍は真っ黒に見えると言われていた。しかし、感度を高めたカラーカメラで見ると、腫瘍も黒いだけではなくて、このように赤の蛍光を出すことがわかる。そして、このあたりの色も観察していただけたらと思うが、気管支壁などの正常部位でも単に緑一色の蛍光を出すのではなくて、この部位にある蛍光物質に応じたいろいろな色が観察されていることがわかりいただけと思う。

次の例は悪性腫瘍である（図8）。こちら側の気管支が悪性腫瘍で閉塞している症例で、この写真は自家蛍光の観察で見ている。ちょっと色がピンクっぽくって白色光で見る正常の色のように見えるが、これはカラーの調整が悪いためにピンクっぽく見え

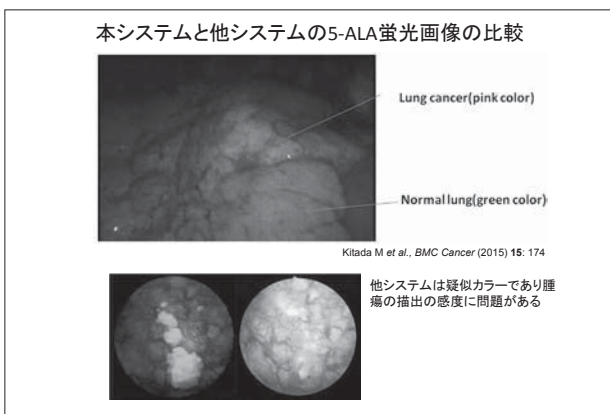


図6

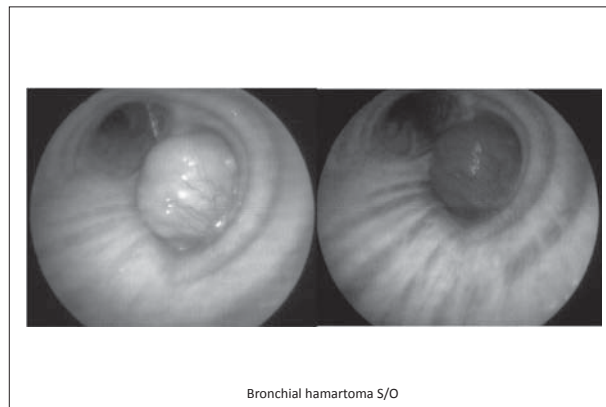


図7

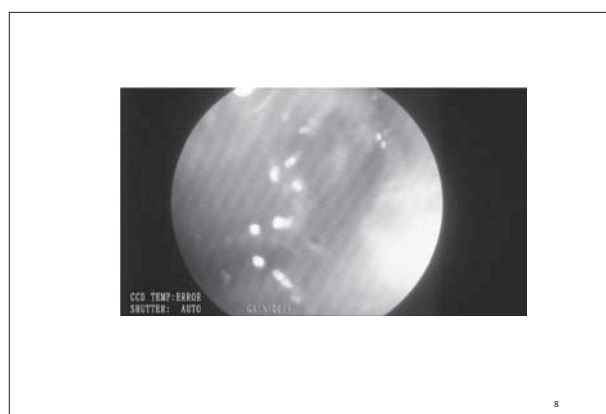


図8

ているところである。しかし、同部位がだんだん黄緑色に見えてくる。

この色は腫瘍が出している自家蛍光の赤い蛍光である。さらに、周辺に出血しているようなところからも蛍光が見え、気管支の表面からは緑の蛍光が見えるというように、いろいろな色の蛍光が見えることが私たちの研究で明らかになってきている。

次は同じ症例であるが、光線力学療法をこの患者さんに行った時のものである。光線力学療法は、ポルフィリン誘導体をがんの部分に取り込ませて、レーザーを照射する治療であるが、そのときの蛍光画像である。

この例では、先ほどの自家蛍光画像と違い、蛍光診断薬を患者さんに投薬した状況と同じである。この例ではレザフィリンというポルフィリン誘導体を使っているが、感度を調整してゆくと、がん病巣に取り込まれたレザフィリンからの非常に強い赤の蛍光が観察され、がんの浸潤がないところはこのように綺麗な緑色の自家蛍光が出ているのが観察された。

このように、私たちのシステムを使うと、蛍光診断薬を使わない正常の体から出てくる蛍光がいろいろな色で見え、また、がんの病巣からは赤の自家蛍光が観察される。さらに、蛍光診断薬を使うと蛍光診断薬の強い赤色蛍光が観察されることがわかった(図9)。

この研究を進めていくうちに、心配なことが出てきた。感度をどんどん上げていくと、いろいろなものが見えてくる。説明してきたように、蛍光診断薬を用いなくても組織や腫瘍から発生する赤色蛍光が観察される場合があることがわかった。それらの蛍光波長は618nm前後である(図10)。このことについては、もう少し詳しく説明する。

これらの生体から発生する赤色蛍光の蛍光源は生体ポルフィリンと考えられているが、生体ポルフィリンの中のどれが蛍光を出しているのかは、いまだに明らかになっていなかった。

そして、体の外から入れる蛍光診断薬としてのポ

高感度化で懸念されること

- 蛍光診断薬を用いなくても、正常組織や腫瘍から赤色蛍光が観察される
- それらの蛍光波長は618nm前後である
- 蛍光源は生体ポルフィリンである
- ポルフィリン誘導体は635、645nmなどの蛍光を発生する
- 高感度化するとカメラの特性上区別できない

図9

ルフィリン誘導体は、これよりも長い波長、635nmとか645nmなどの赤外線に近くなっていく波長であるが、長い波長の赤色の蛍光を発生すると言われて

いる。カメラの感度を上げていくと、この618nmと635nm、645nmの赤の色の区別ができなくなるのではないかとということがわかってきた。最近、これを解決する研究を進めている。

その一端であるが、これは自家蛍光の波長を見たグラフである。こちらは正常部分から出てくる波長。ここは400nm、ここは600nmで、真ん中は500nmくらいで、557nmくらいが正常の部位から出てくる緑の蛍光である。このピークがそうであるが、正常部位からは550nm程度の非常に強い緑色蛍光を発生することがわかった。

がんの部分にカメラを振っていくと緑の蛍光が落ちてくる。その中に新しい波形が出てくる。これはだいたい620nmくらいであるが、正常の550nmに対して、がんの部位からは620nmの赤色蛍光が観察されることがわかった。

次に、これをもう少し詳しく見るために、各症例の蛍光を、スペクトルメーターを使って解析した(図11)。

5例の正常部分から出てくる蛍光は、緑色の蛍光が541.4nm、プラスマイナスゼロで、非常に均一な541.4nmの緑の蛍光が出ていることがわかった。

大部分の正常部位では赤の蛍光は観察されない

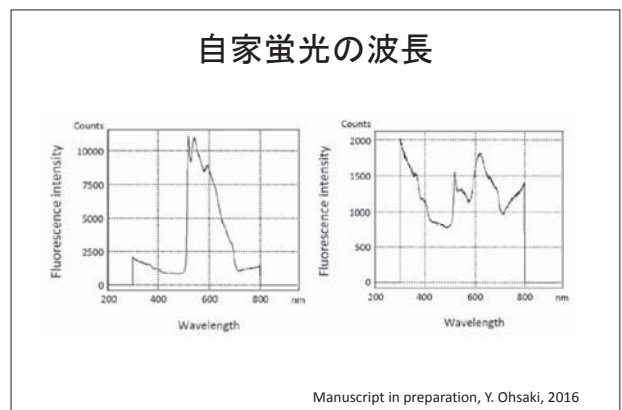


図10

Table 1. Wavelength of green and red autofluorescence from bronchial lesions in eight patients (average ± SD).

Pathological diagnosis	Green autofluorescence (nm)	Red autofluorescence (nm)
Normal n=5	541.4 ± 0.00	617.3 ± 0.03
Inflammation n=13	541.7 ± 0.49	617.4 ± 0.82
Mild dysplasia n=7	542.0 ± 0.67	619.0 ± 2.04
Malignant* n=4	541.0 ± 0.00	617.1 ± 0.38

*Including three squamous cell carcinoma and one severe dysplasia.

図11

が、このときはカメラを入れて少しでも赤いところをすべて生検して組織を見るという研究をした。その結果、波長は617.3nmプラスマイナス0.03ということで、非常に均一な617nmの赤色の蛍光が出ていることがわかった。

生検組織の所見が炎症であった症例が13例あり、541nmの緑色と、617nmの赤色蛍光、マイルドディスプラージアの症例が7例あり、542nmの緑色と619nmの赤色蛍光が観察された。

悪性病変では、3例の扁平上皮がんと、1例のシビアディスプラージアの4例で検討しているが、どちらも541nmの緑色と617nmの赤色の蛍光が観察された。

先ほど申し上げたように、正常部分は緑の蛍光が出て、がんのところは緑の蛍光が脱落するというのが、いままでの報告であったが、私たちの機械で見ると617nm付近の赤の蛍光が腫瘍の部位から発生していることが判明したわけである。

次の疑問は617nmの蛍光の光源は何かということである。それを調べるために共同研究者に依頼してポルフィリン誘導体を合成していただいた(図12)。プロトポルフィリン、フォトプロトポルフィリン、そして、ここに亜鉛をつけたジンクプロトポルフィリンとジンクフォトプロトポルフィリンである。合成したのはこの4つであるが、この4つのポルフィリン誘導体の蛍光波長を検討した。

なぜ亜鉛ポルフィリンを選んだのかというと、人の体には蛍光を出す3種類のポルフィリンがある。ひとつがウロポルフィリン、もうひとつがコプロポルフィリン、もうひとつが亜鉛ポルフィリンである。その中でジンクポルフィリンが基礎研究で蛍光発生していたことから、ジンクプロトポルフィリンに着目した。

このジンクフォトプロトプロフィリンとフォトプロトプロフィリンであるが、フォトプロトプロフィリンであると664nm、亜鉛をつけたフォトプロトポルフィリンは625.5nmの赤の蛍光を出すということがわかった(図13)。

このほかの合成したポルフィリン誘導体からは

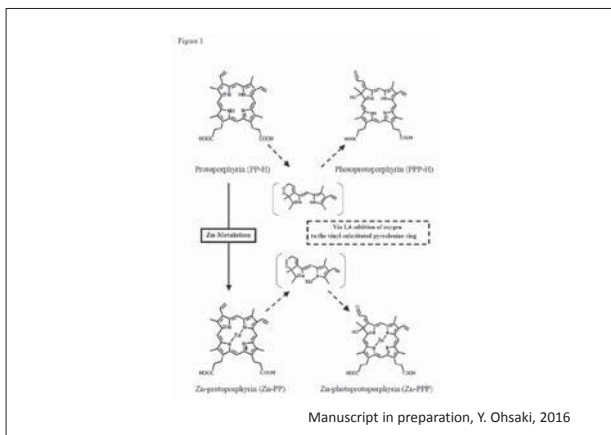


図12

625nm付近の蛍光は出なかった。この結果から私たちが蛍光カメラで観察している赤の蛍光の発生源は亜鉛フォトプロトポルフィリンから出ているのであろうと結論している。

人体には亜鉛フォトプロトポルフィリンは少ないが、亜鉛プロトポルフィリンは多く存在する。この亜鉛プロトポルフィリンは、青色の光を当てるとフォトプロトポルフィリンに変化することがわかっている。すなわち、私たちのカメラで見て青色の光を当てると、がん病巣にたまっている亜鉛プロトポルフィリンが亜鉛フォトプロトポルフィリンに変化して625nmの赤色蛍光として観察されると結論した。ちなみに、グラフの中の587.5nmの蛍光は、アルブミンから出ている蛍光である。

このスライドは上記のまとめを示している(図14)。がん病巣では緑色蛍光の減弱と赤色蛍光が観察されることが私たちのカメラを使った検討で明らかになった。正常部の緑色蛍光は541nmで、病変部の赤色蛍光は617nmである。従来はプロトポルフィリンIXが蛍光源とされていたが、プロトポルフィリンIXは、635nmの赤色蛍光を出している。これは私たちの観察した赤色蛍光よりも長い波長で、波長が合わないのはおかしいということから始めた。私たちの検討では人の体に含まれるウロポルフィリン、コプロポルフィリン、亜鉛ポルフィリンから亜鉛ポルフィリンに着目し、おそらくこれががん病巣の赤色の蛍光

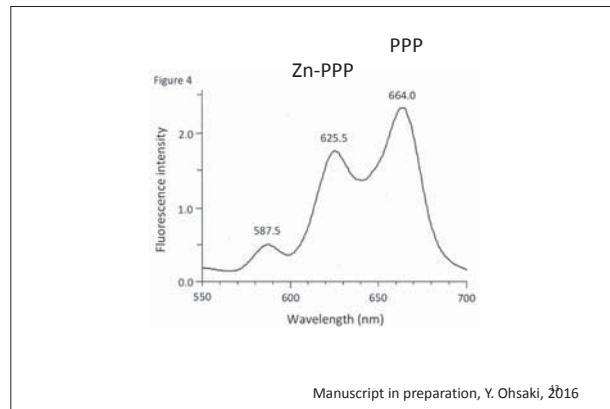


図13

自家蛍光による癌診断

- 癌病巣では緑色蛍光の減弱と赤色蛍光が観察される
- 緑色蛍光は541nm赤色蛍光は617nm
- 従来はプロトポルフィリンIXが蛍光源とされていた
- ウロポルフィリン、コプロポルフィリン、亜鉛ポルフィリンがふくまれ、プロトポルフィリンIXは少ない
- 赤色蛍光はZn-PPPから
- 蛍光診断薬では自家蛍光をカットする必要がある

図14

源になっていると結論した。

したがって、617nmと、蛍光診断薬を使う635nmとか645nmは、CCDカメラではどちらの波長も同じ赤にしか見えない。蛍光診断薬を使った診断を開発する際には、617nmの赤色自家蛍光をカットする必要があると考え、特許を出願したところである。

次に、この蛍光カメラを使った臨床研究を紹介させていただく(図15)。私たちの外科のグループでは、5アミノレブリン酸を用いた胸腔内悪性腫瘍に対する光学的診断の研究を続けている。「5-ALA」と略させていただくが、5-ALAは細胞の中に入ると代謝を受けて最終的にはヘモグロビンになるのが正常な経路である(図16)。ところが、がん細胞の中にはPBGDというプロトポルフィリンIXの前駆物質を作る酵素の活性が高まっていることと、プロトポルフィリンIXに鉄をつけてヘムを作るケラターゼの活性が低いことがわかっている。この結果、アミノレブリン酸を患者さんに投薬すると、がん病巣にプロトポルフィリンIXとして集積することが以前から知られている。このプロトポルフィリンIXは非常に強い赤の蛍光を出すので、がんの患者さんにアミノレブリン酸を飲んでいただいて、私たちのカメラで見るとプロトポルフィリンIXが集積するがん病巣が直接観察できるというのが原理である。

この症例では、ここにがんがあつて胸膜から少し出ている(図17)。この患者さんにアミノレブリン

酸を飲んでもらい蛍光観察システムで見ると正常部から緑の蛍光が出て、プロトポルフィリンIXの非常に強い赤色蛍光が同時に見えることがわかった。

これは同じ症例のビデオ画像であるが、肉眼的に病巣が露出していそうであるが、同部が非常に強い赤の蛍光を出す病巣として観察される(図18)。

私たちの外科グループでは、腫瘍からの自家赤色蛍光がどのような病変で見られるか検討した(図19)。その結果、原発性肺がん15例のうち7例に外側から見て赤色蛍光が観察された。その7例のうち5例がP1、P2、これは後ほど説明するが、胸膜に浸潤がある例が5例である。胸膜播種があつた症例が2例である。すなわち、原発性肺がんの7例のうち、赤色蛍光が観察された内訳は5例が胸膜浸潤

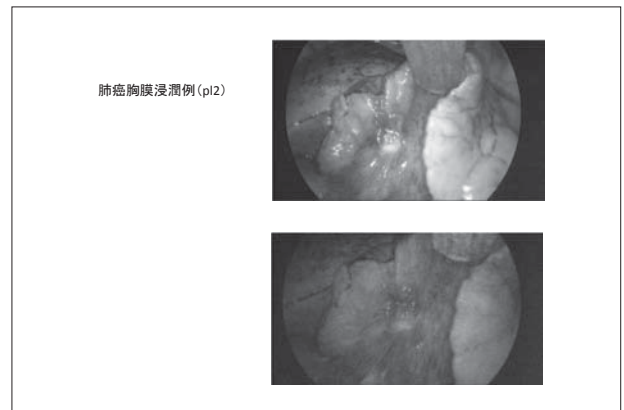


図17

**5-ALAを用いた胸腔内悪性病変に対する
光学的診断**

旭川医科大学 呼吸器センター

北田正博、大崎能伸

Kitada, M. Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 20:378-382,2014.
Kitada, M. BMC Cancer, 15:174,2015.

図15

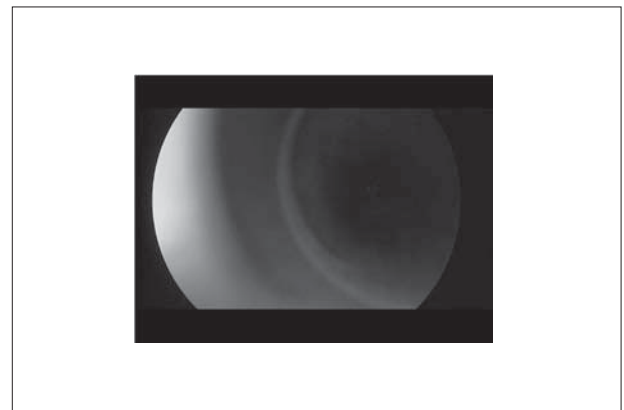


図18

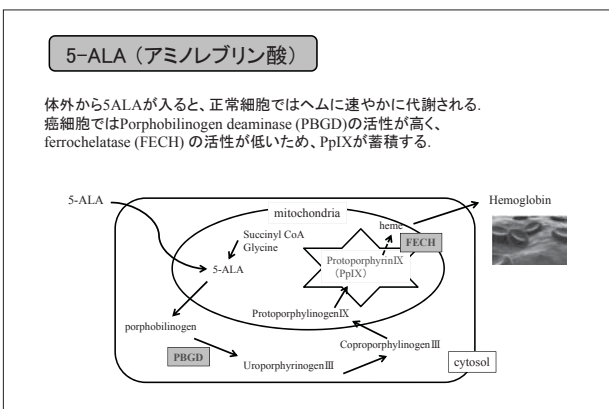


図16

【結果】 診断可能例(赤色光発現例)

- ・ 原発性肺がん15例の内 7例
 - P1~P2因子: 5例
 - 胸膜播種例: 2例
 - 非描出例は、P0例であつた。
- ・ 転移性肺腫瘍6例(腎癌1例、大腸癌2例、乳癌2例、子宮癌1例)の内5例
 - 非描出の1例は、胸膜からの距離があつた
- ・ 胸膜腫瘍2例の2例
 - 生検例であるが、2例ともに明確な画像が得られた。

図19

ありで、2例が胸膜播種ありであった。赤色蛍光が観察されなかったP 0症例というのは、胸膜に浸潤がなかった例である。

転移性の肺腫瘍6例の観察では、6例のうち5例で赤の蛍光が見えて、見えなかった1例は胸膜から距離があった例である。

胸膜腫瘍は中皮腫であるが、2例あって、2例とも赤色蛍光が観察された。

次に5-ALAを用いた蛍光診断の検討を行った(図20)。肺がんの胸膜浸潤は0、1、2、3と分類されている。1から進行すると予後が悪くなることが報告されている。私たちのシステムで見ると、蛍光診断薬を使ったときにP 1、P 2、P 3が、赤色蛍光が観察されることが示されている。胸膜浸潤の

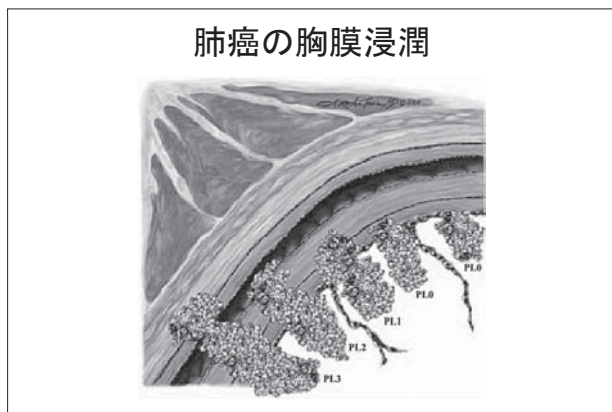


図20

胸膜浸潤の蛍光診断

		pleural invasion				
red fluorescence	実測値	pl0	pl1	pl2	pl3	total
	-		13	0	0	0
+		5	3	3	4	15
total		18	3	3	4	28

		pl0	pl1	pl2	pl3
理論値	-	8.357143	1.392857	1.392857	1.857143
	+	9.642857	1.607143	1.607143	2.142857

p value 0.003703

Manuscript in preparation, M. Kitada, 2016

図21

胸膜浸潤の蛍光診断正診率

		pleural invasion		
red fluorescence		pl0	pl1-3	total
	-		13	0
+		5	10	15
total		18	10	28

sensitivity	1
specificity	0.722222
positive predictive value	0.666667
negative predictive value	1

Manuscript in preparation, M. Kitada, 2016

図22

検討では、28例の症例で行った。13例がP 0で赤色蛍光が見えなかった。5例がP 0で赤色蛍光が観察された。ここがP 0で18例ということである。

P 1から進むと、図で説明したように、胸膜の中にがんが入っている。この場合は赤色蛍光が観察できなかった症例が1例もなく、全て赤色蛍光陽性に見えたということである。統計解析で検定すると、Pが0.003ということで、大きな有意差があった(図21)。

陽性診断率、陰性診断率を検討すると、センシティブリティが1、スペシフィシティが0.7、ポジティブプロステクティブバリューが0.6でネガティブが1ということで、蛍光が見えなければ胸膜浸潤はないという結論であった(図22)。

私たちのグループではこのような検討しているが、このような研究をする原動力のひとつがパルスオキシメーターの開発に携わった先生にご指導いただいていることがある。

この写真は、日本はもとより、世界で初めて使われた指尖型のパルスオキシメーターの第1号機である(図23)。現在は型も小さくなって外来にコロコロ転がっていると思うが、この装置は北海道で開発されていて、旭川医科大学の9階病棟の外科で初めて臨床応用された。青柳卓男さんと私の師匠の中島進先生が開発した。

みなさまご存知のように、この特許は外国に行ってしまうと、外国経由でまた日本に入ってきた。そ



図23

- 医療機器開発での関門**
- 薬機法
 - 医療機器製造販売業者、3種類
 - 機器開発が早い分野
 - 企業の経営面からの検討
 - 売れるか売れないか
 - 国内で販売されないと海外にだせない
 - 輸入品があふれる
 - 臨床試験
 - 症例の多い疾患のみ対象になる
 - 死の谷に飲まれてしまう

図24

の後、爆発的に普及した。医療機械には開発の関門がいろいろあって、後ほどPMDAの理事長が説明して下さるかもしれないが、薬機法という法律がある（図24）。この法律は患者さんの生命を守るために必要なものであるが、医療機器を開発するときには大変なハードルになる。

私たちの開発している機械は非常にいいものであると思っているが、それだけでは販売できない。製造販売業者と組まないと製造できない。しかも販売業者がこの薬機法で医療機器を製造する資格を持っていることが必要である。日本の画像技術の進歩は早く、機械を作っている間に新しい部品が出てくる。こういう環境でパルスオキシメーターのように普及する機械をつくっていくためには、企業の経営面から売れるか売れないかが要件になってしまう。国内で販売したものでなければ海外に出せないこともあるので、まず日本で開発して販売することが必要である。

このような高いハードルがあるために、日本の医療機械は輸入品ばかりになってしまい、国産品を愛用する者にとっては非常にフラストレーションがたまる状況が続いてしまう。いい機械を作ろうと研究しても開発の死の谷に飲まれてしまうという危険がいつもある。

このような医療機器開発の状況を全国の研究者に集まっていただいて、先ほど秋田教授からもご紹介があったが、10月21日と22日、旭川グランドホテルでレーザー医療を対象とした日本レーザー医学会総会を開催させていただく（図25）。PMDAの方にもたくさん参加していただいて、率直な意見交換をして、先ほど申し上げたようなハードルを下げたうえで日本の医療に貢献するような医療機器を出していく機会になることを願っている。



図25