日消外会誌　20（4）：825～829，1987年

原　著

Eosin yellowとアルゴンレーザー光線を用いた食道癌ならびにリンパ節転移の肉眼診断に関する研究

筑波大学臨床医学系外科（指導：岩崎洋治教授）
渋谷　進　高瀬靖広

CLINICAL AND EXPERIMENTAL STUDIES ON PHOTODYNAMIC DIAGNOSIS BY MEANS OF EOSIN YELLOW ADMINISTRATION AND ARGON LASER PHOTOIRRADIATION FOR ESOPHAGEAL CANCER AND LYMPH NODES

Susumu SHIBUYA and Yasuhiro TAKASE
Department of Surgery, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba
(Director : Prof. Yoji Iwasaki)

光感受性物質としてeosin yellowを用い，アルゴンレーザー光照射により発生する蛍光を観察することによる悪性腫瘍の肉眼診断が，食道癌に応用しうるかを検討した．手術前にeosin yellow 10mg/kgを点滴静注し，レーザー光線を手術標本，特に癌腫，外膜，転移リンパ節および非転移リンパ節，および脂肪組織に照射し，eosin yellowの蛍光を観察した．その結果，手術48時間前に投与した食道癌7症例中，癌腫100%（5/5例）およびほとんどの転移リンパ節94.4%（17/18個）に蛍光がみられ，外膜，非転移リンパ節0%（0/8個），および脂肪組織では蛍光がみられなかった．以上より，eosin yellowを用いた食道癌に対する術中肉眼診断は可能であると思われた．

索引用語：eosin yellow，アルゴンレーザー光線，photodynamic effect，食道癌

I．はじめに

レーザー光線は1960年Maiman[1]によってはじめて発振されて以来，各分野での応用が考えられてきた．そして，医学領域でも，レーザー光線の単色性・高輝度などの特性を利用し，近年腫瘍親和性を有する光感受性物質とレーザー光照射による光化学反応を利用した悪性腫瘍の診断と治療が臨床的に試みられている[2)~6)]．一方，医療機器の進歩によって，癌腫の浸潤状況に対する術前診断が可能となってきた現在においても，手術中に癌腫の浸潤状況を確実に知ることは必ずしも容易ではない．そこで，光化学反応を利用した悪性腫瘍の肉眼診断法（photodynamic diagnosis；PDD）が癌腫の術中診断に応用できれば，腫瘍浸潤範囲の決定，癌腫のリンパ節転移の有無などに有用性があると思われる．現在，光感受性物質としてはhematoporphyrin誘導体が用いられているが，われわれは，かつてEosin-Licht-Behandlung[7]に使用されたeosin yellow（eosin Y）が本診断法の光感受性物質として使用しうるのではないかと考え，今回，eosin Yの悪性腫瘍内停滞性および急性毒性を実験的に検討し，さらに，臨床的に食道癌症例に対して応用しうると思われたので報告したい．

＜1986年7月9日受理＞別刷請求先：渋谷　進
〒305　茨城県新治郡桜村天王台1－1－1　筑波大学臨床医学系外科

II．検討対象および方法

1．基礎的検討

1）Eosin Yの悪性腫瘍内停滞性

ICR系マウス（female，5～8週）の側腹部皮下に移植腫瘍S-180を5×10^6/mouse注入し，移植腫瘍が直径5～7mmに成長した時点で，各マウス腹腔内にeosin Y 10mg/kgを注入し，3時間，6時間，12時間，24時間，48時間後に腫瘍を摘出し資料とした．各時間群の実験動物数は5匹で，eosin Yの腫瘍内濃度測定と蛍

光観察に供した．Eosin Y の腫瘍内濃度測定は蛍光分析法により求めた．Eosin Y は波長270nm～518nm 内に励起波長を持ち，536nm をピークとする蛍光を発する色素である．腫瘍の蛍光観察は光源としてアルゴンレーザー光線（Spectra Physics Model 165, 4 Watts）を用い，腫瘍から15cm の距離で波長514.5nm の光線を出力400mW で照射し，536nm をピークとする光の約50%を通過させるフィルターを通して行った．なお，対照の組織としては検討した時間帯にてレーザー光照射により蛍光のほとんどみられなかった筋組織とした．

2）Eosin Y の急性毒性試験

7 週齢の Wister 系ラットの雄（260～300g），雌（170～200g）各10匹に対し，生理食塩水に溶解した eosin Y をラットに濃度406～875mg/kg（8 段階に濃度分割）を静注し，投与後 3 日間の一般症状を観察した．また，累積死亡数から Lichfield-Wilcoxon 法[8]により LD_{50}値を求めた．

2．臨床的検討

1）対象

対象は1983年10月から1985年12月までに筑波大学附属病院および関連施設にて手術を施行した食道癌症例12例である．対象12例中 1 例は対照例である（表 1）．性別は全例，男性であり，年齢は55～72歳（平均65歳）に分布している．なお，食道癌の組織型は全例，扁平上皮癌であった．

2）方法

Eosin Y の投与量は10mg/kg とし，手術約12時間前（4 例）および48時間前（7 例）に点滴静注した．腫瘍の蛍光観察は光源として出力400mW，波長514.5nm のアルゴンレーザー光線（Spectra Physics Model 165, 4 Watts）を用い，光線を手術標本との距離15cm で癌腫，外膜，転移リンパ節および非転移リンパ節，および脂肪組織に照射し，536nm をピークとする光の約50%を通過させるフィルターを通して行った．Eosin Y の蛍光は肉眼的にみられないものおよびほとんどみられないものを無，明らかにみられるものを有と判定した．

表 1　検討対象

症例	年齢 / 性	投与－手術時間（時間）	肉眼型	深達度
1	68 M	対照	潰瘍型	a_1
2	71 M	12	表在陥凹型（R）	sm
3	65 M	12	潰瘍型	a_1
4	66 M	12	潰瘍型	a_2
5	62 M	12	潰瘍型	a_2
6	62 M	48	潰瘍型	pm
7	55 M	48	潰瘍型	a_2
8	61 M	48	潰瘍型	a_2
9	63 M	48	潰瘍型	a_2
10	69 M	48	潰瘍型	a_2
11*	62 M	48	――	――
12*	72 M	48	――	――

*：試験開腹

III．結　　果

1．基礎的検討

1）Eosin Y の悪性腫瘍内停滞性

悪性腫瘍と筋組織内の eosin Y の濃度比は 3 時間後でもっとも高く14.1であった．そして，6 時間後7.5，12時間後3.5，24時間後2.3，48時間後2.7と減少したが，検討時間内において筋組織内より悪性腫瘍組織内での濃度は高かった（表 2）．なお，統計学的には 3 時間後と 6 時間後に有意差（χ^2検定，$p<0.05$）がみられた．

一方，腫瘍における eosin Y の蛍光は投与 3 時間から24時間後までは強度にみられ，48時間後では軽度に認められた．非投与群の腫瘍にも蛍光が軽度に観察され，非投与群の腫瘍および筋組織に eosin Y が検出されたが，正常の組織成分中にも蛍光分析法によって eosin Y と同様の蛍光パターンを有する成分が含まれているためと思われた．

以上の結果から，eosin Y は検討した時間内（3 ～48時間）において，対照とした筋組織に比べ，悪性腫瘍内停滞性があると思われた．

表 2　Eosin Y の悪性腫瘍内停滞性と蛍光観察の結果

間隔（時間）	Eosin Y ng/g tissue			蛍光の程度
	悪性腫瘍	筋組織	悪性腫瘍 / 筋組織の比	
対照	14.2 ± 5.7	10.1 ± 5.2	1.4	軽度
3	239. ± 133.	16.9 ± 4.8	14.1	高度
6	91.2 ± 49.0	12.2 ± 2.2	7.5	高度
12	29.9 ± 12.0	8.6 ± 4.1	3.5	高度
24	33.7 ± 5.4	14.8 ± 9.0	2.3	高度
48	18.5 ± 10.4 (n=4)	6.9 ± 3.2	2.7	軽度

n＝5

表 3　Eosin Y の急性毒性試験（Wister 系ラット静脈内注入）

Eosin Y dose mg/kg（iv）	Volume injected ml/100g body weight	Mortality	
		Male	Female
406	0.162		0/10
438	0.175		1/10
500	0.200	0/10	1/10
563	0.225	1/10	6/10
594	0.238	9/10	8/10
625	0.250	8/10	9/10
750	0.300	9/10	10/10
875	0.350	10/10	
LD_{50} mg/kg（95% confidence limit）		600(579-621)	580(528-594)

2) Eosin Y の急性毒性試験

最少致死量は雄では562.5mg/kg，雌では437.5mg/kgであり，LD_{50}値は雄では600mg/kg，雌では560mg/kgであった(**表3**)．以上より，eosin Y は極めて低毒性の化合物であると思われた．Eosin Y の中毒症状として自発運動の抑制，立毛運動，流涙および呼吸抑制などがeosin Y 500mg/kgを投与した雄および437.5mg/kg投与した雌にみられ，また，投与量が増加すると，これらの症状はより高率に認められた．死因は呼吸困難によるものと考えられた．生存したラットではこの中毒症状は24時間から48時間後には消失した．したがって，eosin Y の中毒症状は中枢神経の抑制によるものと考えられた．

2. 臨床的検討

手術12時間前にeosin Y を投与した4例全例に癌腫には蛍光が認められ，外膜には蛍光が認められなかった(**表4**)．また，転移リンパ節を有した3例4個全例に蛍光が認められた．しかし，4例中3例に脂肪組織には蛍光が認められ，転移のないリンパ節を有した4例10個中1例3個に蛍光が認められた．一方，手術48時間前に投与した7例中5例では全例に癌腫には蛍光が認められ，外膜には蛍光は認められず，また，脂肪組織には蛍光が認められなかった．転移のないリンパ節について検討した6例において，リンパ節8個すべてに蛍光は認められなかった．転移リンパ節について検討した5例において，リンパ節18個中17個(94.4%)に蛍光が認められたが，5例中1例の転移リンパ節8個中1個に蛍光が認められなかった．この蛍光のみられなかったリンパ節は凍結迅速標本にて癌陰性であったが，永久標本にて癌陽性となったものであり，また蛍光の観察がリンパ節の表面だけにおわっていたものであった．

3. 症例

表4　検討結果

症例	投与－手術時間(時間)	肉眼的蛍光				
		癌腫	外膜	脂肪	転移リンパ節	非転移リンパ節
1	対照	無	無	－	－	－
2	12	有	無	有	－	3/3
3	12	有	無	有	1/1	0/1
4	12	有	無	有	1/1	0/4
5	12	有	無	無	2/2	0/2
6	48	有	無	無	－	0/2
7	48	有	無	無	3/3	0/1
8	48	有	無	無	5/5	0/1
9	48	有	無	無	1/1	0/2
10	48	有	無	無	－	0/1
11	48	－	－	－	7/8	0/1
12	48	－	－	－	1/1	－

図1　手術48時間前にeosin Y を投与した症例9の手術標本である．写真では標本の口側を右側にし癌巣部が外膜側より切開されている．

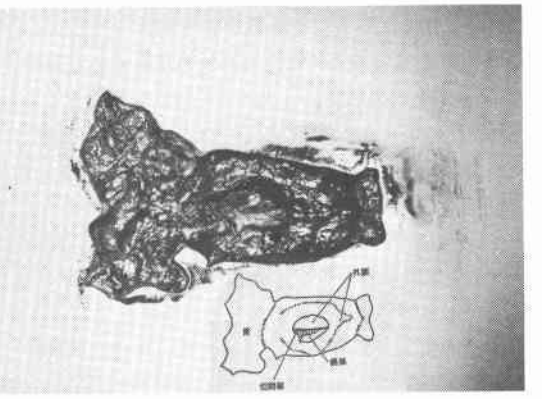
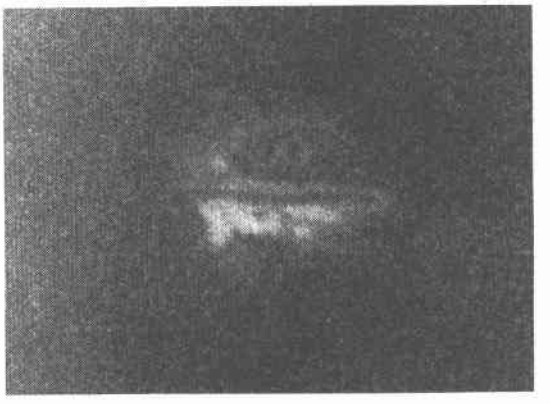


図2　図1の腫瘍切開面の蛍光をみたところである．露出した癌腫には蛍光が認められたが，外膜には蛍光が認められなかった．



手術48時間前にeosin Y 10mg/kgを点滴静注により投与した症例9を呈示する(**表4**)．手術標本の癌巣部を外膜側より切開し癌腫を露出させ(**図1**)，アルゴンレーザー光線を照射した．その結果，露出した癌腫に一致して蛍光が認められたが，外膜では蛍光はみられなかった(**図2**)．

IV. 考　察

Hematoporphyrin は腫瘍に親和性を有することが知られており，hematoporphyrin を光感受性物質とする腫瘍の PDD および photodynamic therapy (PDT) がすでに検討されている．1954年 Rassmussen ら[9]が各種の癌腫とリンパ管組織の診断に高濃度の hematoporphyrin を用いた PDD による肉眼診断法を試み，大腸癌では赤い蛍光がみられ，周囲組織には蛍

光がみられなかったことを報告している．現在も光感受性物質と光線による光化学反応を応用した診断および治療がさかんにおこなわれている[2)~6)]が，これらは1960年Lipsonら[10)]による腫瘍停滞性にすぐれた光感受性物質としてのhematoporphyrin誘導体（HpD）の開発，Doughertyらによるfluorescein[11)]とhematoporphyrin[12)]による光化学治療の基礎的検討に続く，HpDを用いた皮膚および皮下の転移を含む悪性腫瘍に対する治療成績の報告[3)]によって進歩したといえる．また，光化学反応を応用した悪性腫瘍の診断はProfioら[6)]により早期肺癌に試みられた．本邦でも，早田ら[13)]がイヌ実験肺癌に対するHpDを用いたPDDの基礎的検討，肺癌に対する診断[5)]と治療[2)]を報告し，本邦におけるこの領域における研究の一歩がおしすすめられた．そして今日では，早田らの手技は腟癌の治療[4)]にも応用されている．

今回われわれが光感受性物質として用いたeosin Yは，1900年O. Raab[14)]によって始められた光化学反応の研究の中で，Pramecium caudatumを殺す作用のある光感受性物質の1つとして指摘され，緑色の光線との組合わせにてその作用が最大であると報告された色素である．また，eosin Yは殺細胞作用および反酵素作用などから1903年Tappeinerら[7)]によって光感受性物質として注目され，各種皮膚病変を含む皮膚癌に対して塗布および注入された．その結果，皮膚癌については腫瘍周堤の平担化などがみられ，eosin Yを用いた光化学反応による腫瘍の治療が可能であることが示唆された．また，1961年Bellin[15)]は，eosin Yにはin vitroにて，Gardner lymphosarcoma（6C3HED）やsarcoma 180に対する光化学反応がみられ，6C3HED細胞1個について2.34×10^{-16}molesという単位のeosin Yによる光化学反応がおこることを報告している．われわれのマウスを用いた実験的検討では，eosin Yは正常組織に比べ，投与3時間～48時間において悪性腫瘍内に停滞性を有すると思われた．また，eosin Yの最小致死量はラットの雄では562.5mg/kg，雌437.5mg/kg，LD_{50}値は雄では600mg/kg，雌では560mg/kgであり，Lipsonら[10)]により報告されたHpDおよびhematoporphyrinのネズミにおける最小致死量が150mg/kgおよび300mg/kgであることを考慮すると，eosin Yは低毒性の化合物であると思われた．

これらの基礎的検討を参考に，eosin Yを光感受性物質とするPDDを臨床的に食道癌に対して応用した．そして，正常組織の3.5倍の組織内濃度であった12時間前投与よって食道癌症例4例に試みた．その結果，癌巣および転移リンパ節には蛍光が認められ，外膜には蛍光が認められなかったが，脂肪組織および非転移リンパ節にも蛍光が認められ，投与―手術時間が12時間では食道癌の術中視野でのeosin YをPDDは困難であった．そこで，実験的には2.7倍の組織内濃度であった48時間前投与によって，食道癌症例7例に対して再びPDDを試みた．その結果，癌巣では100%（5/5例），転移リンパ節では94.4%（17/18個）に蛍光が認められ，蛍光の認められなかった転移リンパ節1個での偽陰性の原因は，リンパ節内の一部に存在する癌巣に対し，表面のみからの観察におわっていたためであると考えられた．また，外膜（0/5例），脂肪組織（0/5例），および非転移リンパ節（0/8個）には蛍光がみられなかった．そこで，eosin Yの投与―手術時間が48時間の食道癌症例ではアルゴンレーザー光線を組合わせたPDDは可能であると思われた．

V. 結　語

Eosin YとアルゴンレーザーPDDについて基礎的ならびに臨床的に検討を行った．その結果，

1. 基礎的検討

1）マウスによる動物実験から，eosin Yは正常組織に比べ，投与3時間～48時間において悪性腫瘍内に停滞性を有すると思われた．

2）Eosin Yの最少致死量はラットの雄では562.5mg/kg，雌では437.5mg/kg，LD_{50}値は雄では600mg/kg，雌では560mg/kgであり，eosin Yは極めて低毒性の化合物であると思われた．

3）以上の結果から，悪性腫瘍に対するeosin Yとアルゴンレーザー光線を組み合せたPDDは可能であると考えられた．

2. 臨床的検討

基礎的検討結果を参考に，食道癌症例に対してeosin Yを光感受性物質とするPDDを試みた．その結果，eosin Yの投与―手術時間が48時間の症例においては癌巣では100%（5/5例），転移リンパ節では94.4%（17/18個）に蛍光がみとめられ，外膜（0/5例），脂肪組織（0/5例）および非転移リンパ節（0/8個）には蛍光がみられなかった．

以上の結果から，食道癌症例に対し，手術48時間前にeosin Yを投与することにより，術中のアルゴンレーザー光照射によるPDDは可能であると思われた．

稿を終るにあたり，御指導いただいた筑波大学附属病院薬剤部，吉野清高副部長，富士写真工業株式会社営業部3課，和田政雄氏に深謝いたします．

文　献

1) Maiman TH: Stimulated optical radiation in ruby. Nature 187: 493—494, 1960
2) Hayata Y, Kato H, Konaka C et al: Hematoporphyrin derivative and laser photoradiation in the treatment of lung cancer. Chest 81: 269—277, 1982
3) Dougherty TJ, Kaufman JH, Goldfarb A et al: Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. Cancer Res 36: 2628—2635, 1978
4) Soma H, Akiya K, Nutahara S et al: Treatment of vaginal carcinoma with laser photoirradiation following administration of haematoporphyrin derivative. Ann Chir Gynaecol 71: 133—136, 1982
5) Hayata Y, Kato H, Ono Y et al: Fluroescence fiberoptic bronchoscopy in the diagnosis of early stage lung cancer. Recent Results Cancer Res 82: 121—130, 1982
6) Profio AE, Doiron DR: Laser fluorescence bronchoscope for localization of occult lung tumors. Med Phys 6: 523—525, 1979
7) Tappeiner H: Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. Munch Med Wschr 47: 2042—2044, 1903
8) Litchfield JT, Wilcoxon F: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J Pharmacol Exp Ther 96: 99—113, 1948
9) Rassmussen-Taxdal DS, Ward GE, Figge FHJ: Fluorescence of human lymphatic and cancer tissues following high doses of intravenous hematoporphyrin. Cancer 8: 78—81, 1955
10) Lipson RL, Baldes EJ: The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. Arch Dermatol 82: 508—516, 1960
11) Dougherty TJ: Activated dyes as antitumor agents. J Natl Cancer Inst 52: 1333—1336, 1974
12) Dougherty TJ, Grindey GB, Fiel R et al: Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. J Natl Cancer Inst 55: 115—121, 1975
13) 早田義博，加藤治文ほか：ヘマトポルフィリン誘導体及びアルゴン色素レーザー光線照射によるイヌ中心型肺癌での治療実験．医のあゆみ 116: 203—205, 1981
14) Raab O: Ueber die Wirkung fluorescirender Stoffe auf Infusorien. Z Biol 39: 524—546, 1900
15) Bellin JS, Mohos SC, Oster G: Dye-sensitized photoinactivation of tumor cells in vitro. Cancer Res 21: 1365—1371, 1961