

## 蛍光スペクトラムによる不安定粥腫の診断

荒川 宏, 大鈴 文孝

血管内視鏡は血管の内腔をフルカラーで直接観察できる検査方法である。血管表面の壁不整とその色調という情報が得られるが、内膜の下にある粥腫の情報が不十分である。血管内視鏡は数千本の光ファイバーで構成されており、蛍光などの情報を収集するのに適している。血管壁にレーザー照射した後に発光される蛍光は組織により異なるので、スペクトラム解析し、動脈硬化病変の性状診断と、線維性被膜の厚さの推定が可能か検討した。血管構成成分であるコラーゲン、エラスチン、酸化LDLの蛍光スペクトラムを基に蛍光分析することで動脈硬化病変を86%の精度で診断でき、また蛍光スペクトラムから求めたコラーゲンインデックスで線維性被膜の厚さを予測できることがわかった。特に線維性被膜が200 $\mu$ m以下で有効であった( $r=0.65$ ,  $p<0.001$ )。したがって血管内視鏡に蛍光分析を加えることで、線維性被膜の薄い不安定粥腫の診断に役立つと考えられた。

KEY WORDS: vulnerable plaque, laser, fluorescence, spectroscopy, oxidized LDL

Arakawa K, Ohsuzu F: **Auto-fluorescence analysis based on biochemical constituents identifies vulnerable plaque.** J Jpn Coron Assoc 2005; 11: 7-10

### I. 背景

不安定粥腫の病理学的特徴として、線維性被膜が薄い、脂質のコアが大きい、炎症細胞に富んでいるなどが挙げられる<sup>1,5)</sup>。これらに基づく所見を得るために、血管内超音波や光干渉断層法 (optical coherence tomography : OCT)、血管内温度変化測定、血管内視鏡を用いて研究されている。不安定粥腫の早期発見・治療はその後に生じうる急性冠疾患の予防につながる。

血管内視鏡は血管内を観察する装置として、血管内の色調で診断できるという点において優れている。赤色血栓は色調が特異的であり他の病変との区別が容易である。プラークは血管内の隆起性病変として観察されるが、色調は白色から黄色までさまざまであり、同じ黄色でも微妙な違いから不安定粥腫と定義されている。確かに心筋梗塞後に観察される破裂した粥腫 (ulcerated plaque) の多くは黄色調であり、このような黄色調のプラークが急性冠疾患を起こすと思われる。黄色の色調の違いから不安定粥腫の程度を分ける試みがなされているが、しかし病理からみると黄色であっても単なる肥厚した内膜の場合があり、石灰化した病変が黄色を呈していることすらある。色調だけで不安定粥腫であるとの診断にはまだ検討の余地がある。

血管内視鏡は表面の観察だけを行っており、深さ方向の情報が欠落している。血管内視鏡を観察している時にはライトガイドの光が強いため、組織から発せられている弱い蛍光は情報から捨てられている。しかし物質、特にタンパ

ク質に光を当てるとその成分に特有の蛍光を発する<sup>6,11)</sup>。したがって組織の成分の違いにより蛍光が異なる。組織に光を照射した場合、光はある程度の深さにまで到達するので、蛍光は表面の成分だけではなく深さ方向に含まれている成分の総和として表される<sup>12)</sup>。したがって蛍光スペクトラム解析することで深さ方向の情報が得られる可能性がある。今回の目的は蛍光スペクトラムを用いて線維性被膜の薄い粥腫、つまり不安定粥腫の診断に応用可能か否かを検討することである。

### II. 蛍光スペクトラムによる組織診断アルゴリズムの作成

#### 1. 対象

剖検例15例から得られた大腿動脈と冠動脈を用いて、動脈硬化病変から蛍光スペクトラムを計測した。血管壁を長軸方向に開いて内膜を露出させた。血管内膜面に光を照射し、内膜面側から蛍光を計測した。蛍光スペクトラムを測定した後、血管切片は組織学的検討に供した。標本はStary分類<sup>13,14)</sup>に基づいてnormal (n=74), atheroma (Stary IV, V, n=73), preatheroma (Stary III, n=10), ulcerated plaque (Stary VI, n=29)に分けた。染色はHE, elastica-Masson染色を行った。

#### 2. 方法

##### a. 蛍光スペクトラム解析装置

光学台の上にHeCdレーザー (波長325nm, 出力10mW, Omnichrome model 356XMS, Melles Griot) を乗せ、ビームスプリッターを介して600 $\mu$ mのコアを有する石英ファイバーに導光した。ファイバー先端を生理的食塩水中に浸した組織に接触させ、組織からの蛍光は同じファイバーから集光した。ファイバーで集光した蛍光はビームスプリッターを介して分光器 (model 1235, セイコー EG&G) に集

防衛医科大学第一内科 (〒359-8513 埼玉県所沢市並木 3-2) (本論文の要旨は第17回日本冠疾患学会学術集会, 東京で発表した。なお本論文は一部Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002; 22: 1002-1007に掲載された) (2004.9.1 受付, 2004.11.16 受理)

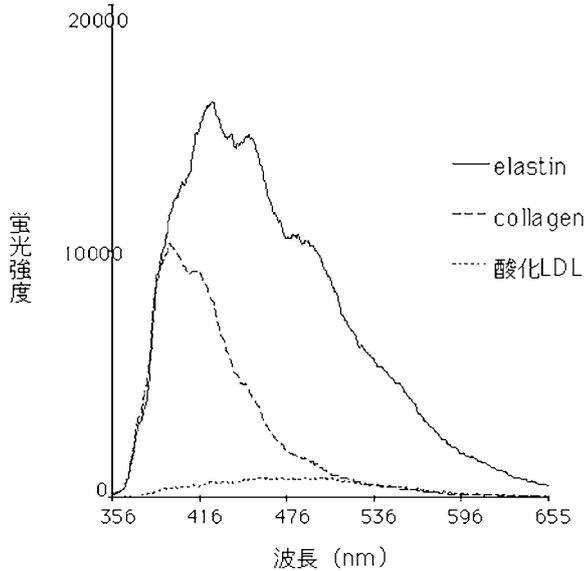


図1 エラスチン, コラーゲン, 酸化LDLの蛍光スペクトラム。縦軸は蛍光強度の絶対値, 横軸は波長を示す。

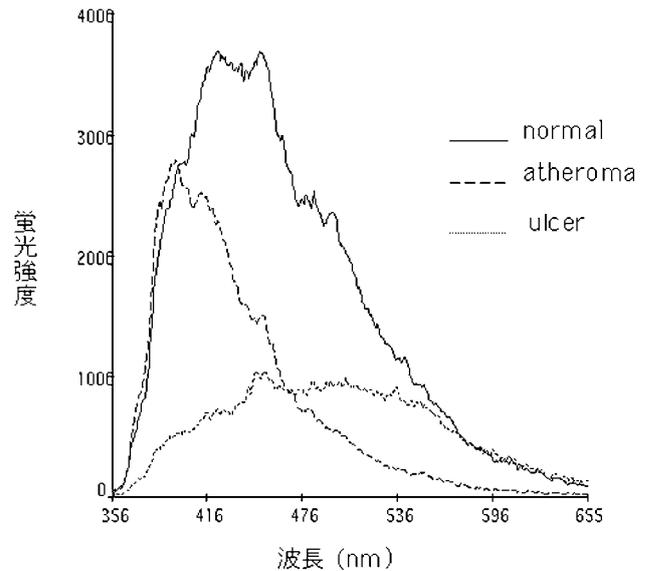


図2 Normal artery (normal), atheroma, ulcerated plaque (ulcer) の蛍光スペクトラム。

められ, 検出器 (OMA III model 1422G, セイコー EG&G) に展開させた。データは解析装置 (OMA III, model 1463, セイコー EG & G) を用いてスペクトラムで表し, パーソナルコンピュータで統計ソフト (SPSS) を用いてスペクトラム解析した。励起に用いた HeCd レーザーの光は分光器に集光する前にフィルターで除外した。スペクトラム解析に用いた波長の範囲は蛍光波長の解析に十分であると判断した 358 ~ 537nm を用いた。

b. スペクトラム解析アルゴリズムの作成

血管組織の成分中, normal artery に多く含まれるエラスチン, 線維性被膜に多く含まれるコラーゲン, リピッドコアに多く含まれる酸化LDLを主成分と仮定し, 各成分の蛍光スペクトラムを記録した。エラスチン, コラーゲンは Sigma Chemical 社のものを使用し, 酸化LDLはLDLを 5 $\mu$ モルの硫酸銅で 3 時間インキュベートしたものをを用いた。血管組織からの蛍光スペクトラムはこの三者のスペクトラムの総和で説明できると考え, 重回帰分析を行った。得られた蛍光スペクトラムを解析するにあたり, 各成分の標準偏回帰係数で各成分の成分比として表した。ただし標準偏回帰係数が負の値を示した時は 0 として計算した。

3. 結果

エラスチン, コラーゲン, 酸化LDLの蛍光スペクトラムを図1に示す。エラスチンは最も蛍光強度が強く, 420と440nmの2つのピークを有する350~700nmにわたる比較的幅広いスペクトラムとして表される。コラーゲンはエラスチンより若干弱いが390nmにピークを有する比較的強い蛍光を発した。一方, 酸化LDLは蛍光強度が弱く, 赤色のほうにシフトした幅広い蛍光スペクトラムとして観察された。各スペクトラムを比較するためにピークの蛍光強度を合わせた後, 解析に用いた。normal artery, atheroma,

ulcerated plaqueの蛍光スペクトラムを図2に示す。normal arteryはエラスチンと, atheromaはコラーゲンと, ulcerated plaqueは酸化LDLの蛍光スペクトラムとよく一致した。図3に病理学的に normal artery, preatheroma, atheroma, ulcerated plaqueと診断した186部位の標準化偏回帰係数をプロットした。normal arteryの標準化偏回帰係数はエラスチン 0.69 $\pm$ 0.30, コラーゲン 0.05 $\pm$ 0.15, 酸化LDL 0.30 $\pm$ 0.28, preatheromaの標準偏回帰係数はエラスチン 0.23 $\pm$ 0.24, コラーゲン 0.30 $\pm$ 0.25, 酸化LDL 0.75 $\pm$ 0.20, atheromaの標準偏回帰係数はエラスチン 0.24 $\pm$ 0.22, コラーゲン 0.78 $\pm$ 0.20, 酸化LDL 0.19 $\pm$ 0.18, ulcerated plaqueの標準偏回帰係数はエラスチン 0.06 $\pm$ 0.13, コラーゲン 0.17 $\pm$ 0.19, 酸化LDL 0.89 $\pm$ 0.14であった。normal arteryはエラスチン, 線維性被膜で被われた atheromaはコラーゲン, ulcerated plaqueは酸化LDLがおもな構成成分であることがスペクトラムから判定できた。

このエラスチン, コラーゲン, 酸化LDLに基づく蛍光スペクトラムからの組織診断は normal artery を 86.5%, preatheromaを60%, atheromaを95.9%, ulcerated plaqueを69%の確率で診断でき, normal artery, atheroma, ulcerated plaqueを93.2%で, preatheromaを含むと86%の正診率で診断できた。

III. 線維性被膜の厚さの推定

1. 対象

リピッドコアを有する動脈硬化病変8個を選んで約8mm角の大きさにし, 内膜面を露出させ凍結標本を作成した。

2. 方法

Cold microtome (Cryostats, OT/FAS/MR, Bright社) を用いて内膜側から10 $\mu$ mごとに中膜側へ薄切した。薄切

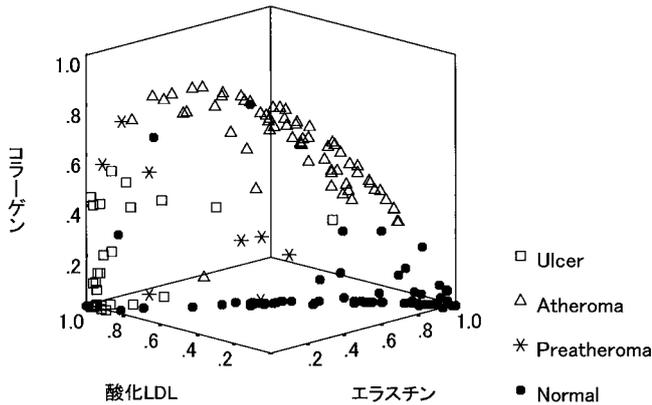


図3 病変別標準化偏回帰係数  
エラスチン, コラーゲン, 酸化 LDL の各標準化偏回帰係数を normal artery (normal), preatheroma, atheroma, ulcerated plaque (ulcer) 別に表した. normal artery は右下方 (エラスチン優位), atheroma は上方に広く分布し (コラーゲン優位), ulcerated plaque は左中央から下方付近に分布している (酸化 LDL 優位).

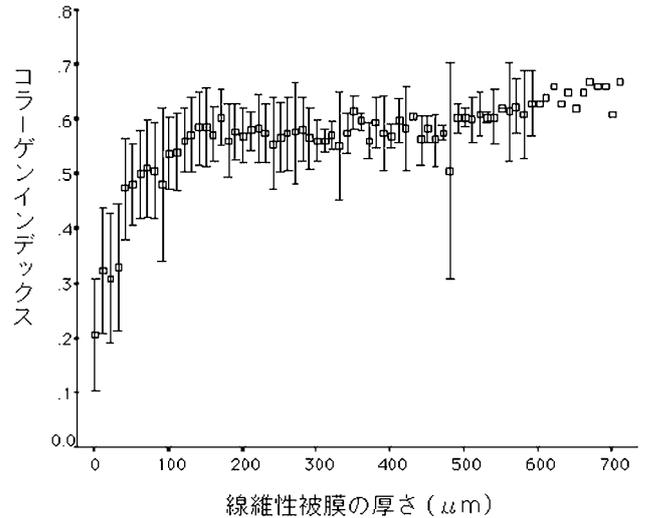


図4 コラーゲンインデックスと線維性被膜厚の関係  
線維性被膜の厚さが200 $\mu$ m以下になるとコラーゲンインデックスが急激に減少する. 表示は mean $\pm$ SEM.

ごとに標本表面から前述の蛍光解析装置を用いて蛍光スペクトラムを測定した. 薄切した標本は病理学的に線維性被膜か, リピッドコアか, 中膜かを判定した. 線維性被膜の厚さは薄切した標本の枚数から求めた. 染色は HE 染色を行い, 必要に応じ oil red O 染色を行った. 蛍光スペクトラムからエラスチン, コラーゲン, 酸化 LDL の各成分の標準偏回帰係数を求めた.

線維性被膜の主成分はコラーゲンであるので, コラーゲンの標準偏回帰係数をすべての標準偏回帰係数の総和で除したものをコラーゲンインデックス (CI) として求め, コラーゲンインデックスと線維性被膜の厚さの関係性を求めた.

### 3. 結果

動脈硬化病変を切除しながら蛍光スペクトラムを測定すると, 線維性被膜の部位ではコラーゲンの標準偏回帰係数が主成分を占めていた. しかし, リピッドコアに近づくに従い酸化 LDL の成分が増加し, 病理学的にリピッドコアに至ると急速にコラーゲンの標準偏回帰係数が減少し, 酸化 LDL の標準偏回帰係数が主成分を占めるようになった. 中膜に近づくに従いエラスチンの標準偏回帰係数成分が増加するが病理学的に中膜に達する前からエラスチンの標準偏回帰係数が増加していた. コラーゲンインデックスと線維性被膜厚との関係を図 4 に示す. コラーゲンインデックスは線維性被膜の厚さが200 $\mu$ m以下になると急激に減少し始めた. logarithmic curve estimation regressionを用いると線維性被膜とコラーゲンインデックスの間に比較的良好な相関が得られた ( $r=0.65$ ,  $p<0.001$ ).

### IV. 考察

今回の研究から, 蛍光スペクトラムから normal artery はエラスチンと, 線維性被膜で覆われた atheroma はコラーゲ

ンと, ulcerated plaque は酸化 LDL のスペクトラムとほぼ一致していることがわかった. そしてこれらの成分のスペクトラムを基に重回帰分析することで normal artery, preatheroma, atheroma, ulcerated plaque (リピッドコア) を診断することができた. さらにコラーゲンインデックスを利用して薄い線維性被膜の厚さを推定できることがわかった.

従来, 蛍光分析を用いた動脈硬化診断では normal artery の蛍光はエラスチンの蛍光と近似し, 動脈硬化病変の蛍光はコラーゲンで代表されるという報告が多くなされていた. 動脈硬化病変の診断のために蛍光スペクトラムを用いて各種の解析が試みられてきた. しかし解析は経験に基づくものが多く<sup>6-11</sup>, 動脈硬化を構成する成分から分析を試みたものは少なかった.

酸化 LDL が動脈硬化形成に重要な役割を果たすことは周知のことである<sup>15, 16</sup>. また動脈硬化病変には乾燥重量で脂質が少なくとも60%以上含まれている. Laifer ら<sup>12</sup>) は脂質の成分を無視しエラスチンとコラーゲンの蛍光スペクトラムだけを用いた成分分析を試み, 動脈硬化病変の診断に有効であると報告した. われわれはリピッドコアの成分は酸化 LDL の蛍光スペクトラムで代表できることを見つけ, エラスチン, コラーゲン, 酸化 LDL の3つのスペクトラムから動脈硬化病変の中でも, preatheroma, atheroma, ulcerated plaque と詳しく診断できることを見いだした. これは酸化 LDL の成分を分析に加えることでさらに精度の高い蛍光診断ができた結果と考えられる.

蛍光スペクトラムを解析することで線維性被膜の厚さが推定できることを, われわれはこの検討の中で新たに見つけた. 血管表面から紫外線を照射した場合, 波長325nmの紫外線は少なくとも50 $\mu$ mから200 $\mu$ m程度は動脈壁の中に

## 文 献

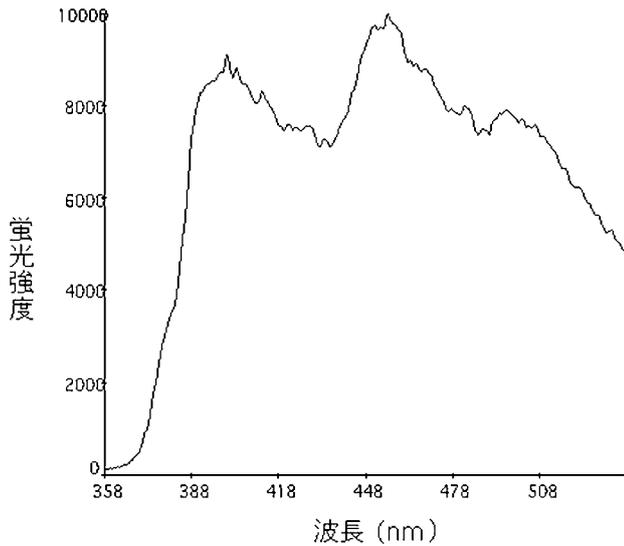


図5 Preatheromaの代表的な蛍光スペクトラムを示す。コラーゲン特有の390nmの蛍光ピークとその後に続く幅の広い酸化LDLの蛍光スペクトラムが見られる。

届く。したがって、この深さ部分での成分の比率を蛍光分析で解析していることになる。線維性被膜が薄くなればコラーゲンの含有量が少なくなり、線維性被膜の下にあるリピッドコアの成分が増してくる。ある程度のリピッドコアがあれば中膜は線維性被膜から十分離れているので325nmの紫外線は中膜まで到達しない。したがって大きなリピッドコアがあれば中膜成分のエラスチンは蛍光スペクトラムにほとんど反映されない。幸いなことに酸化LDLの蛍光よりコラーゲンの蛍光が十分に明るいので、線維性被膜のところではコラーゲンの成分が優位となっている。線維性被膜の厚さが薄くなると酸化LDLの成分が増加すると同時にコラーゲンの成分比率が減少するので、コラーゲン成分の割合と線維性被膜の厚さが直線的に比例してくる。この現象は325nmの紫外線が到達する200 $\mu$ mの範囲で観察される。また当然、線維性被膜が200 $\mu$ m以上厚い場合はコラーゲンインデックスがプラトーに近づき、線維性被膜の厚さとは関連しなくなる結果であった。

図5はpreatheromaの代表的な蛍光スペクトラムを示している。preatheromaは線維性被膜が薄くその下に脂質を含んでいる病変である。興味深いことに線維性被膜が薄いためコラーゲンの含有量が少なくコラーゲン特有の390nmのピークを認めるが、基本的に酸化LDLの蛍光スペクトラムのパターンが得られている。

血管内視鏡は動脈硬化病変を観察するうえで優れたツールではあるが、組織診断には限界がある。それを補ううえで蛍光分析を用いた解析が今後有効であろう。さらに不安定粥腫の特徴として線維性被膜の薄いことに着目し、蛍光スペクトラムを用いた成分分析を行うことで不安定粥腫の診断に役立つと考えられる。

- 1) Davies MJ: A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease. *Circulation* 1990; **82** (3 suppl) I138-46
- 2) Ip JH, Fuster V, Badimon L, Badimon J, Taubman MB, Chesebro JH: Syndromes of accelerated atherosclerosis: Role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *J Am Coll Cardiol* 1990; **15**: 1667-1687
- 3) Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH: The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med* 1992; **326**: 310-318
- 4) Libby P: Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995; **91**: 2844-2850
- 5) Falk E, Shah PK, Fuster V: Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995; **92**: 657-671
- 6) Deckelbaum LI, Stetz ML, O'Brien KM, Cutruzzola FW, Gmitro AF, Laifer LI, Gindi GR: Fluorescence spectroscopy guidance of laser ablation of atherosclerotic plaque. *Lasers Surg Med* 1989; **9**: 205-214
- 7) Cutruzzola FW, Stetz ML, O'Brien KM, Gindi GR, Laifer LI, Garrand TJ, Deckelbaum LI: Change in laser-induced arterial fluorescence during ablation of atherosclerotic plaque. *Lasers Surg Med* 1989; **9**: 109-116
- 8) Gaffney EJ, Clarke RH, Lucas AR, Isner JM: Correlation of fluorescence emission with the plaque content and intimal thickness of atherosclerotic coronary arteries. *Lasers Surg Med* 1989; **9**: 215-228
- 9) Papazoglou T, Papaioannou T, Arakawa K, Fishbein M, Marmarelis VZ, Grundfest WS: Control of excimer laser aided tissue ablation via laser-induced fluorescence monitoring. *Appl Optics* 1990; **29**: 4950-4955
- 10) Bartorelli AL, Leon MB, Almagor Y, Prevosti LG, Swain JA, McIntosh CL, Neville RF, House MD, Bonner RF: In vivo human atherosclerotic plaque recognition by laser-excited fluorescence spectroscopy. *J Am Coll Cardiol* 1991; **17**: 160B-168B
- 11) Bosshart F, Utzinger U, Hess OM, Wyser J, Mueller A, Schneider J, Niederer P, Anliker M, Krayenbuehl HP: Fluorescence spectroscopy for identification of atherosclerotic tissue. *Cardiovasc Res* 1992; **26**: 620-625
- 12) Laifer LI, O'Brien KM, Stetz ML, Gindi GR, Garrand TJ, Deckelbaum LI: Biochemical basis for the difference between normal and atherosclerotic arterial fluorescence. *Circulation* 1989; **80**: 1893-1901
- 13) Stary HC: The histological classification of atherosclerotic lesions in human coronary arteries. *in* Atherosclerosis and Coronary Artery Disease, ed by Fuster V, Ross R, Topol EJ, Lippincott-Raven, Philadelphia/New York, 1996, 463-474
- 14) Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW: A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis. *Circulation* 1995; **92**: 1355-1374
- 15) Steinberg D: Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 1997; **95**: 1062-1071
- 16) Small DM: Progression and regression of atherosclerotic lesions. Insights from lipid physical biochemistry. *Atherosclerosis* 1988; **8**: 103-129