

200500225 A

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

がんの超早期診断・治療システムに関する研究

平成17年度 総括研究報告書

主任研究者 今野 弘之

平成18 (2006) 年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
がんの超早期診断・治療システムに関する研究	----- 1
今野 弘之	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 4

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

総括（研究報告書）

がんの超早期診断・治療システムに関する研究

主任研究者 今野 弘之（浜松医科大学外科学第二講座 教授）

研究要旨：本研究はラマン分光スペクトルを用い、従来の組織癌診断に変わる臨床応用可能な光線力学的診断法の確立することを目的としている。1）内視鏡下での癌非癌の判定（Endoscopic Raman Diagnostic System）や2）手術中の癌の浸潤やリンパ節転移を判定（Intra-operative Raman Diagnostic System）の2つを行うための基礎的研究として、内視鏡下生検組織や手術検体を用いてラマン分光スペクトルの解析による癌の診断と機器の改良を行った。まず動物移植ヒト腫瘍を用い、胃癌に特有のラマンスペクトルが得られることを明らかにした。1）Endoscopic Raman Diagnostic System（Endoscopic-RDS）：倫理委員会の承認を得て上部消化管内視鏡検査時に採取した胃癌組織を用いた検討をラマン分光の主成分解析（PCA: Principle Component Analysis）による胃癌の正診率は約70%、新たにcalibration setでの最小二乗分析で特異性76%、感受性66%、正診率71%という結果を得た。2）Intra-operative Raman Diagnostic System（Intra-operative RDS）：倫理委員会の承認を得て、胃癌の切除標本を用いて正常部及び癌部のラマンスペクトルを連続的に解析し癌部の判別が可能であった。今後さらに正診率を上げ機器の改良により臨床応用は可能である。

A. 研究目的

従来の組織癌診断に代わる診断装置は種々開発されているが、感度特異性いずれも十分な精度に達していない。そこで本研究は全く新しい方法を用いて臨床応用可能な光線力学的診断法（Photo Dynamic Diagnosis: PDD）の確立を目指すことを目的としている。

本研究ではラマン散乱法、特に近赤外励起ラマン分光法により得られるスペクトルから、極微弱光計測技術や波形解析技術等を駆使して、癌組織と正常組織の明確な識別を行う簡便性迅速性低侵襲性において優れた診断技術であり、更に組織型、分化度、進行度の情報が得られる可能性がある。また薬剤を用いた診断法でないため、その毒性や副作用による制約を受けない。本法は非常に強いバックグラウンド自家蛍光による妨害の回避が最大の開発要素であり、これまでの研究では、励起波長が800nm付近を用いているため、バックグラウンド蛍光の妨害を防ぎきれず、ごく限られた臓器の測定に限定されていた。しかし我々は励起光として1000nm付近の近赤外光を用い、弱くなるラマン散乱光を近赤外用光検出器の高感度化、及び光学系の高効率化により解決した。消化器癌へのラマン分光の具体的な臨床応用は内視鏡での使用や手術時の迅速診断など広範囲に及び実時間で診断が可能となることから、患者負担の大幅軽減とともに、医療経済的にも大いにメリットがある。

Raman Diagnostic System を具体化するために以

下の2つの臨床応用を目的とした。

(1) Endoscopic RDS: 内視鏡検査中に生検診断の結果を待たずその場でreal timeに癌非癌の診断ができ、癌の組織型の診断もできる可能性がある。臨床応用a)内視鏡的粘膜切除術施行前の切除範囲を決めるための正確な迅速診断や、断端検索、b)内視鏡施行時に形態的にわかりにくい微小癌の検索、

(2) Intra-operative RDS: 従来は病理医による診断を待たなければ診断し得なかったリンパ節転移の有無、切除断端の癌の有無が手術中にその場で迅速な診断が可能となり、正確な治療方針が速やかに決定される。臨床応用a)主癌巣の浸潤範囲同定や転移巣の同定、b)切除断端の癌遺残検索、c)リンパ節転移の有無。

本研究はラマン分光解析による癌診断の臨床応用としてEndoscopic RDSとIntra-operative RDSを目指して、基礎的研究をおこない、ラマン分光と癌組織成分、構造との関連、及び測定機器の開発の達成可能性をさぐった。

B. 研究方法

(1) ノードウス移植ヒト癌株を用いたラマン分光解析。ヒト胃癌株、ヒト大腸癌株を用いて癌組織と非癌組織の近赤外線ラマン分光解析を行った。同時にラマン分光機器の改良を行い、条件を設定した。

(2) Endoscopic RDS: 臨床で胃癌患者に対して内視鏡検査を施行するときに、癌部及び非癌部の生検組織を提供して頂き、その癌部と非癌部のラマン分

光解析を行った。分光解析結果から、癌非癌の違いを評価し、癌診断の正誤率を評価した。

(3) Intra-operative RDS : 手術で得られた胃切除標本より非癌部から癌部にかけて連続的に組織を提供して頂き、ラマンスペクトル解析を行った。またリンパ節においても転移リンパ節、非転移リンパ節の一部提供して頂きのラマンスペクトルの解析を行った。癌部非癌部や転移非転移におけるラマンスペクトルの特徴を検討した。

(4) ラマン分光測定機器を浜松ホトニクスにて改良を重ね正診率の向上を測定時間の短縮をはかった。(倫理面での配慮)

内視鏡下生検組織や摘出手術検体を用いての研究のいずれにおいても本学の倫理委員会を得た。また、検体提供者には十分なインフォームドコンセントを得た。本学倫理委員会で承認された1)研究の目的 2)研究の方法 3)研究の危険性(予期される研究の危険性とその副作用、医学的な対処法) 4)研究に協力することを拒否しても、そのために治療内容が異なったり、何らかの不利益を被ることがないこと。5)得られた検査結果により、本人の人権が損なわれたり、治療の上で不利益を被ることがないこと。6)得られた検査結果は、守秘され、個人のプライバシーを侵害する可能性がないこと。7) 研究に協力することに同意した後も、いつでも自由に辞退できること。これらを口頭及び書面にて説明の上、すべての検体提供者の同意を得ている。また研究対象者の情報はすべて記号化され第三者によって管理されプライバシーは保護され研究結果は守秘されている。

C. 研究結果

(1) 動物実験腫瘍組織やパラフィン包埋永久標本を用いてラマンスペクトル分光解析を行い、処理薬剤の影響が無く、且つ臨床応用しやすい無処理組織へと改善を行い癌と非癌部においてラマン分光スペクトルに特徴があることがわかった。

(2) Endoscopic RDS : 本学倫理委員会の承認を得て内視鏡下に採取された無処理癌組織片を用いてラマン分光スペクトルの検討を行った。最初に主成分分析(PCA)を用いた検討を行った。すなわちラマンスペクトルを成分波形に分け、特徴的な主成分についての数式展開を行う解析方法であるが、同一検体での腫瘍部、正常部の比較において、癌、非癌を示す特徴的な波形が現れ、両者の識別可能な事が確認された。32症例の検体の解析では約70%の未知検体の癌正診率が得られた。さらにより再現性の高い解析方法の確立のために、20例に対し、新たにcalibration setを正常グループ、癌グループで作成した後、判別解析により、測定試料の分類を行った。PCAによらない最小二乗分析において全検体の特異性76%、感受性66%、正診率71%という良好な結果が

得られた。

(3) Intra-operative RDS : 本学倫理委員会の承認を得て、手術により摘出した胃癌切除全検体を組織学的に評価し、組織学的結果とRDSによる解析結果との整合性の検討を開始した。癌部及び非癌部における特有のラマンスペクトラムが得られる可能性が示唆されたが、血液の付着や壊死部の存在など種々の影響が懸念されるため、更なる測定法や検体処理法の改善を行いつつ癌特有ラマンスペクトルの解析を進めている。

(4) 光検出器の予備検討 : 本検討では、極めて微弱なラマン散乱光を測定するために最も重要な光検出器について、以下の研究項目を設定し実施した。(1)光電面材料の決定; 励起光として、近赤外光、1064nmを用いた場合、必要なラマン散乱は 1000cm^{-1} から 1800cm^{-1} の範囲であり、これは波長としては、約1190nmから約1320nmとなる。そのため、実際に採用すべき光電面材料としては、InP/InGaAsPが適切であることがわかった。(2)光電面ユニフォミティーの改善; 光電面ユニフォミティー、及び感度の改善には、光電面の表面の清浄化がポイントとなる。光電面清浄化方法には熱加熱方式と光加熱方式があり、光電面位置の温度分布計測を実施し検討したところ、光加熱方式が、熱加熱方式より優れていることがわかった。(3)光学系の予備検討(評価用ラマンプローブヘッドの作製); 極めて微弱なラマン散乱光をできるだけ効率良く取得・検出するための光学系について検討した。ラマン信号の質、強度の検討を行うことが評価用ラマンプローブヘッド作製の目的であり、プローブヘッド内部の各光学素子は微調整が可能なホルダーにて固定されており、また各光学素子は、光量のロスを減らすために近赤外領域の反射防止コーティングを施した。本プローブヘッドを基本として、小型化の可能性が広がった。

D. 考察

Endoscopic RDS : 内視鏡生検組織でのラマン分光解析の結果では現在特異性76%、感受性66%、正診率71%である。もっと症例を増やし、少なくとも100例で再検討を行いたい。また、胃癌の組織型の違いや背景粘膜などの臨床病理学的な違いとラマンスペクトルを比較検討し癌診断に最も有効な組織型や臨床病理学的因子を検討することで、ラマンスペクトルでの癌診断の有効性を評価できると思われる。臨床応用可能な正診率を得るためには更に測定法や機器の改良が必要である。

Intra-operative RDS : 現時点では症例数が少ないためはっきりした正診率を評価するに至っていない。更に症例を増やし、まず癌診断の感度、特異性、正診率いずれも80%以上を目標としたい。

機器開発 : 近赤外用光検出器の高感度化、光学系の

高効率化を行いさらに診断精度を向上させる必要がある。光電面材料や集光光学系の改良を行い現在1回200秒近くかかる測定時間を30秒程度まで短縮する機器を開発が急務である。これによりさらに小型化し精度の高い内視鏡応用や術中プローブへの応用に近づくことができる。

E. 結論

ラマン分光スペクトル診断は従来の組織癌診断に変わる臨床応用可能な光線力学的診断法の可能性を秘めている。内視鏡下での癌非癌の判定 (Endoscopic Raman Diagnostic System) や手術中の癌の浸潤やリンパ節転移を判定 (Intra-operative Raman Diagnostic System) するための基礎的研究として本研究はそのデータを示すことができた。今後正診率の向上と機器の改良により臨床応用は可能である。

F. 健康危険情報 特に認めない。

G. 研究発表

1) 国内

口頭発表

・岡崎茂俊, ラマン分光による胃癌診断への試み, 2005, 第3回医用分光研究会. (浜松)

2) 国外

口頭発表

・Hiroyuki Konno, Gastric cancer diagnosis by Raman spectroscopy, 2005, American Association for Cancer Research 96th Annual Meeting. (Anahaim, USA)

・Hiroyuki Konno, Optical biopsy with Raman spectroscopy, 2005, 6th International Gastric Cancer Congress. (Yokohama, Japan)

H. 知的所有権の出願・取得状況

・特許

「試料分析装置及びそれを用いた試料分析方法」、平成17年4月18日出願、出願番号 特願2005-120138、伊藤利昭、平松光夫

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
なし					