

令和 元 年 5 月 30 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19958

研究課題名（和文）ラマン分光法を用いた直腸癌術中組織診断法の革新

研究課題名（英文）Development of diagnostic apparatus using Raman spectroscopy for colorectal cancer.

研究代表者

佐藤 純人（Sato, Sumito）

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：80769315

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000 円

研究成果の概要（和文）：分子組成を解析するラマン分光法が、大腸癌診断において、新しい診断技術となり得るか検証した。1064nm励起光を搭載したハンドヘルド型ラマン分光器で、安定したラマンスペクトルの検出を可能にし、照射試料への安全性を確認した。得られたスペクトルは、主成分分析で判別分析され、感度87.5% 特異度82.6% 精度 85.1%で正常と癌組織とを判別した。早期癌と進行癌の深達度診断も可能とした。スペクトルの分析範囲を指紋領域を中心に縮小し分析することで解析時間を短縮した。腸管と鑑別するために腸管周囲の腸間膜組織のスペクトルを集積した。本研究では、今後臨床応用に必要な多くの結果が蓄積された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、悪性腫瘍手術において、術中の良悪性の診断には病理診断が用いられている。診断までには時間がかかり、組織を摘出する侵襲やコストがかかる。本研究で用いたハンドヘルド型の小型ラマン分光器を、本研究の研究成果から悪性組織を迅速かつ正確に診断ができる新しい診断法として発展させることができれば、手術の精度向上などを目的とした新しい医療機器の開発に繋がると考える。直腸癌手術はいまだ局所再発や術後合併症が多くみられ、本研究でのラマン分光法を用いた新しい技術は、今後、これらの問題の改善に貢献できることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Raman spectroscopy measures the specific spectrum which represents the molecular structure of the irradiated target. Our aim is to evaluate whether Raman spectroscopy can be used as a medical diagnostic application for colorectal cancer. Samples were measured with an excitation wavelength of 1064 nm and confirmed the safety for the irradiated samples. The specific Raman spectra for cancer and normal tissue were obtained, discrimination analysis with principal components showed that sensitivity, specificity, and accuracy of the diagnosis were 87.5%, 82.6%, and 85.1%, respectively. In addition, it distinguished early cancer and advanced cancer. Raman spectrometer can efficiently discriminate using the narrowed spectral range in fingerprint regions. Raman spectra for mesentery was also collected. Raman spectroscopy performed using a handheld device has potential to become a clinically powerful tool diagnosing colorectal cancer.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 ラマン分光法

## 1. 研究開始当初の背景

（１）ラマン分光法は、試料に励起光を照射した際に生じる散乱光を用いた分光法で、得られたラマンスペクトルは、試料の分子組成を解析することができる。この分光法は、迅速で信頼性が高く、無機化合物や有機物の構造分析に用いられてきた。

（２）直腸癌の手術成績は、前治療併用でも約 10%に癌の遺残による局所再発が、自律神経を温存した症例においても約 60%の術後排尿障害と約 70%の勃起障害が報告されていた。ラマン分光法は、迅速で信頼性が高く、生体試料にも応用され、胃癌や肺癌で正常組織と癌組織とを鑑別する技術として報告されていたが、ラマン分光法を直腸癌診断や治療に応用した報告例はほとんどなかった。

（３）従来の 785nm 励起光を用いたラマン分光法では、生体試料の蛍光バックグラウンドの影響が強く、生体試料に用いた場合、良好なデータが得られない。近年、1064nm 励起光を用いることで解析能が向上し、より詳細な試料の分析が可能になった。しかし、これらの解析は簡便で低侵襲である一方、1064nm 励起光のスペクトル検出器はまだ少なく、励起光装置を含めその分析デバイスは、大変高価で大掛かりであった。本研究で用いたラマン分光器（Progeny 株式会社リガク製）は、蛍光バックグラウンドの影響を回避できる 1064nm 励起光と、高い分解能を有するスペクトル検出器を搭載したハンドヘルド型ラマン分光器であった。

## 2. 研究の目的

1064nm 励起光と高分解能スペクトル検出器を搭載した最新のハンドヘルド型ラマン分光器を、直腸正常組織、直腸癌組織、直腸周囲組織の分析に応用することで、癌組織と正常組織との識別を可能とし、将来的には手術に必要な組織を識別する客観的指標をリアルタイムに提示、それにより手術手技向上と術後合併症の改善につながる、次世代の手術支援デバイスの開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

（１）大腸癌手術において、手術標本より正常組織と癌組織を採取し、ラマン分光器を用いてラマンスペクトルを解析する。このラマンスペクトルを用いて正常組織と、癌組織の判別を行う。また、さらに直腸周囲組織を採取し、ラマン分光器を用いてラマンスペクトルを収集し、大腸組織との判別に用いる。

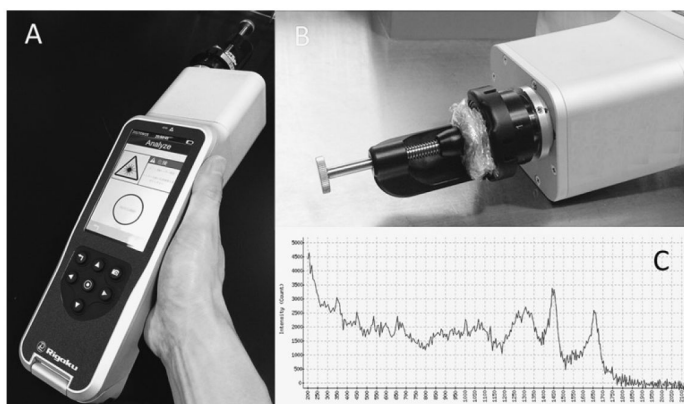
（２）蓄積されたラマンスペクトルをデータベースや分析方法を基にして、それぞれの組織の標準スペクトルを作成し、手術中に、ラマン分光器を用いることで組織の同定が可能か、手術支援デバイスとしての可能性を評価する。

## 4. 研究成果

本研究では、試料の分子組成を解析することができるラマン分光法が、これまで報告のない大腸癌診断において、迅速性、客観性、簡便性に優れた低侵襲な診断技術となり得る可能性について検証した。

### （１）ラマンスペクトル採取のための条件設定

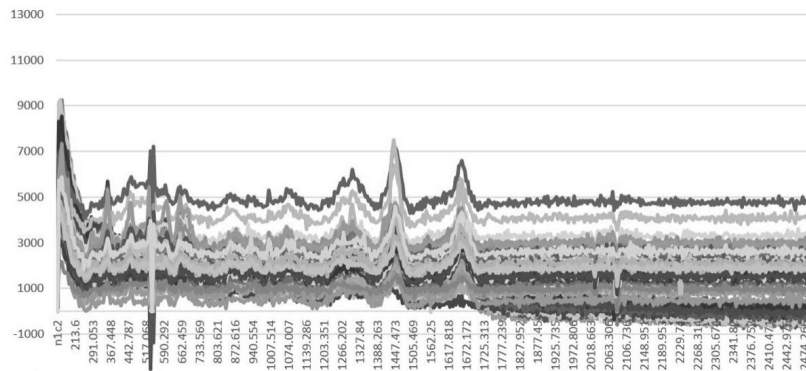
手術検体から作成した生体試料を用いて実験を開始した。1064nm の近赤外励起光を搭載したハンドヘルド型ラマン分光器を用いて生体組織から適切なラマンスペクトルを検出するために、レーザーの焦点距離、出力、照射時間、照射回数などを検証し、さらに生体試料の保存条件、照射環境、検出環境を変えることで、ラマンスペクトルを検出可能とした。



All-in-one Raman spectroscopy was performed using (A) a handheld Progeny<sup>TM</sup> spectrometer (Rigaku Raman Technologies Inc., Tokyo, Japan). (B) The tissue sample is placed in the holder attached to the front of the device and scanned. (C) A recorded Raman spectra.

## ( 2 ) ラマンスペクトルの再現性と安全性の確認

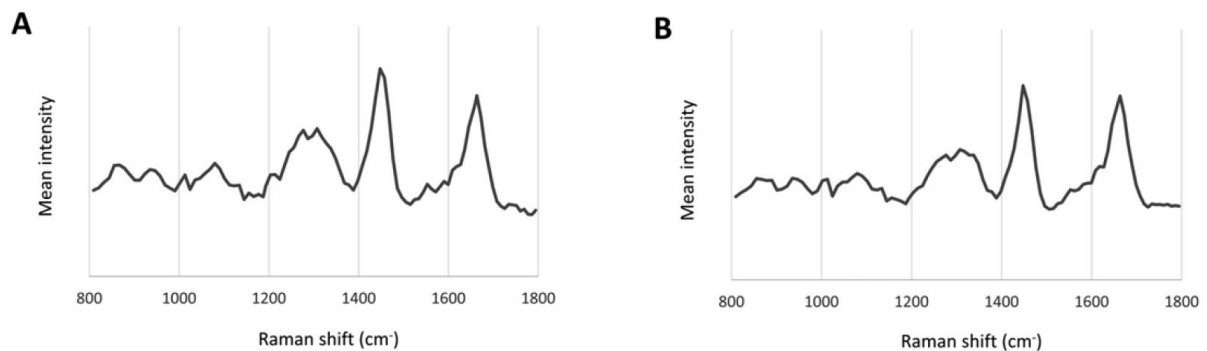
生体試料からのスペクトルの採取は、計 94 回繰り返し施行された。得られたラマンスペクトルの測定結果を蓄積し、ラマンスペクトルの形状を比較解析することで、その再現性を確認し信頼性を証明した( 下図 )。また同実験中に、レーザーを照射することによる生体試料への影響についても検証した。レーザーの照射部位の組織の温度上昇や、変色、損傷を認めず測定の安全性を確認した。



All Raman spectra obtained from 94 measuring points

## ( 3 ) スペクトル強度の相違を用いた正常組織と癌組織を判別診断

1064nm の近赤外励起光を用いたラマン分光法にて、正常腸管組織と大腸癌組織を測定した。得られたスペクトルについて、スペクトル強度の平均を算出し波形の相違を検証した。KruskalWallis 法を用いて正常組織と癌組織それぞれのスペクトル強度を比較した結果、 $1261\text{ cm}^{-1}$  と  $1427\text{ cm}^{-1}$  のスペクトル強度に統計学的有意差をもって相違を認め、 $1276\text{ cm}^{-1}$  と  $1442\text{ cm}^{-1}$  においても統計学的に相違傾向を認めた。これら 4 点の相違が、正常組織と癌組織との判別に応用できるかについて、ROC 曲線(Receiver Operatorating Characteristic curve、受信者動作特性曲線)と、ROC 曲線下面積(AUC: area under the curve)を用いて判別分析を施行した。その結果、これら 4 点のスペクトルの相違を用いて良悪性を判別することはできなかった。



Mean intensity of Raman spectra from (A) normal colon tissues and (B) colorectal cancer tissues

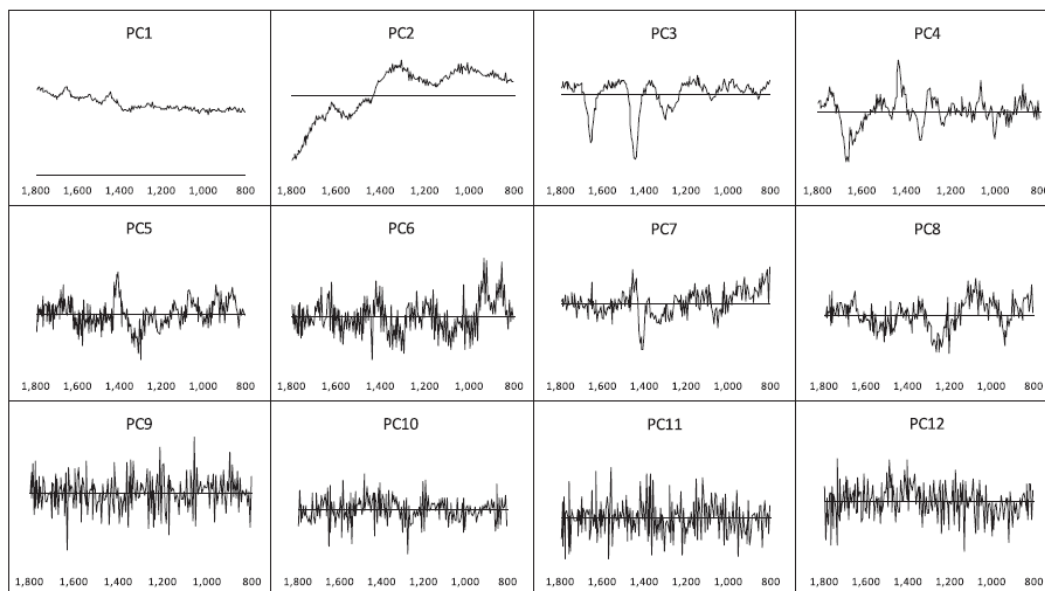
Raman shift	P value	AUC	95% CI	Sensitivity	Specificity
$1261\text{ cm}^{-1}$	$P < 0.05$	0.593	0.501-0.678	49.3%	64.2%
$1427\text{ cm}^{-1}$	$P < 0.05$	0.589	0.495-0.674	44.0%	60.5%
$1276\text{ cm}^{-1}$	$P = 0.143$	0.567	0.476-0.655	37.3%	65.4%
$1442\text{ cm}^{-1}$	$P = 0.132$	0.570	0.478-0.656	40.0%	61.7%

AUC: The area under the ROC curve, 95% CI: 95% confidence interval.

Characteristic Raman spectrum shift and discrimination analysis using ROC curve and AUC.

#### (4) 主成分分析を用いた正常組織と癌組織を判別診断

ラマンスペクトルを用いて正常組織と癌組織を判別する方法として、本研究では主成分分析を採用した。得られたスペクトルから、そのスペクトルを構成する主成分を分析し抽出し、その主成分の中で、判別分析に応用が可能である 12 種類の主成分を解析する主成分分析を施行した。



The 12 principal components obtained from analysis of the Raman spectra

さらにその 12 種類の主成分を用いて、それぞれの試料から得られたラマンスペクトルが良性か悪性かを診断する判別分析を施行し、感度 87.5% 特異度 82.6% 精度 85.1% で正常組織と癌組織とを判別可能であった。さらに早期癌と進行癌との鑑別も可能とした。

		Pathological diagnosis	
		(n = 94)	
Raman classification	Cancer	42	8
	Normal	6	38
	Total	48	46

Sensitivity 87.5%, Specificity 82.6%, Accuracy 85.1%

Discrimination analysis of cancer and normal tissue of the colon

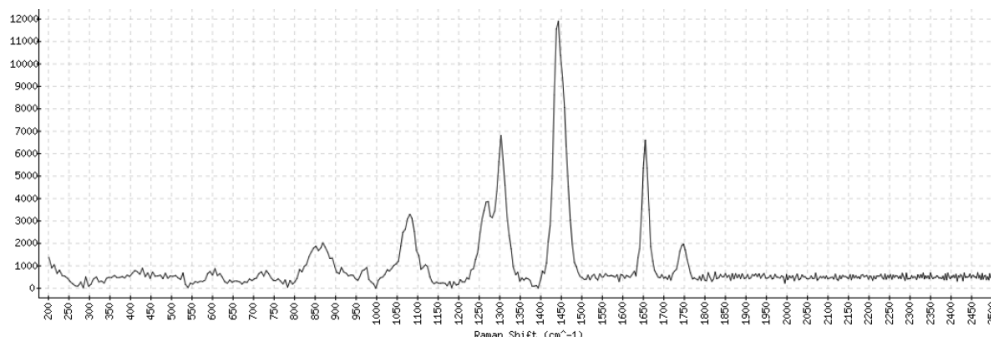
		Pathological diagnosis	
		(n = 48)	
Raman classification	Advanced cancer	36	1
	Early cancer	6	5
	Total	42	6

Sensitivity 85.7%, Specificity 83.3%, Accuracy 85.4%

Discrimination analysis of advanced and early cancer of the colon

### ( 5 ) 腸管周囲組織のスペクトルの解析

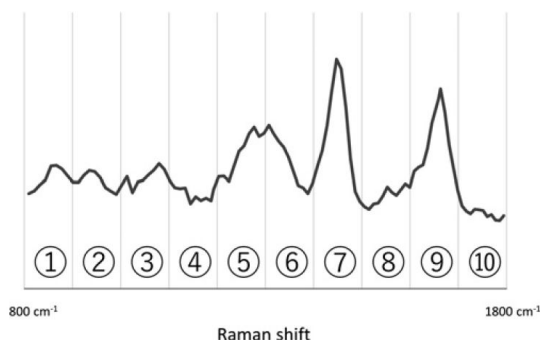
腸管周囲に多く存在している腸間膜脂肪組織についても解析し、腸管と鑑別するためのスペクトルを集積した。



Raman Spectra obtained from the mesentery tissue

### ( 6 ) スペクトル解析時間短縮への試み

得られたラマンスペクトルは  $800\text{ cm}^{-1}$  から  $1800\text{ cm}^{-1}$  と幅広い解析範囲が必要だったため、分析まで時間がかかっていた。将来、臨床応用するためにも、分析時間の短縮が必要であり、われわれは、この分析範囲を分割して、解析範囲を縮小させることができないかを検討した。168 スペクトルの測定結果を分析し、 $800\text{ cm}^{-1}$  から  $1800\text{ cm}^{-1}$  の領域を  $100\text{ cm}^{-1}$  ずつ 10 分割し、それぞれのスペクトルに対して主成分分析を施行した。 $100\text{ cm}^{-1}$  それぞれ単独の分割領域では、良悪性の判別は困難であった。さらに、10 分割した領域を、5 領域もしくは 3 領域を組み合わせ、主成分分析を施行することで、判別診断の可否を検討した。結果として  $900\text{ cm}^{-1}$  から  $1000\text{ cm}^{-1}$ 、 $1000\text{ cm}^{-1}$  から  $1100\text{ cm}^{-1}$ 、 $1300\text{ cm}^{-1}$  から  $1400\text{ cm}^{-1}$  の 3 領域のスペクトルを組み合わせ主成分分析を施行することで、良悪性を良好に判別することができ、さらに、判別までの分析時間を約 50%短縮することができた。



The Raman spectra ranging from  $800\text{ cm}^{-1}$  to  $1800\text{ cm}^{-1}$  are divided into 10 regions of  $100\text{ cm}^{-1}$  each.

Region	Accuracy	Combined regions	Accuracy
① $800\text{ cm}^{-1} \sim 900\text{ cm}^{-1}$	70.3%	① ~ ⑩	84.1%
② $900\text{ cm}^{-1} \sim 1000\text{ cm}^{-1}$	71.2%	① ~ ⑤	78.1%
③ $1000\text{ cm}^{-1} \sim 1100\text{ cm}^{-1}$	74.2%	⑥ ~ ⑩	76.5%
④ $1100\text{ cm}^{-1} \sim 1200\text{ cm}^{-1}$	63.8%	① ~ ③	75.4%
⑤ $1200\text{ cm}^{-1} \sim 1300\text{ cm}^{-1}$	70.6%	④ ~ ⑦	80.1%
⑥ $1300\text{ cm}^{-1} \sim 1400\text{ cm}^{-1}$	78.2%	⑧ ~ ⑩	71.3%
⑦ $1400\text{ cm}^{-1} \sim 1500\text{ cm}^{-1}$	65.6%	② ③ ⑥	83.4%
⑧ $1500\text{ cm}^{-1} \sim 1600\text{ cm}^{-1}$	67.1%		
⑨ $1600\text{ cm}^{-1} \sim 1700\text{ cm}^{-1}$	69.7%		
⑩ $1700\text{ cm}^{-1} \sim 1800\text{ cm}^{-1}$	70.2%		

Results of the Discriminant Analysis per Region and Combinations of Regions

本研究は臨床応用を目指して進められ、そのために必要なさまざまな結果が蓄積された。これら結果は有用であったが、臨床で使用するまでは至らなかった。今後は研究を継続することでこれらの技術を発展させていきたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Sumito Sato, Ryuichi Sekine, Hirotada Kagoshima, Keisuke Kazama, Aya Kato, Manabu Shiozawa, Jun-ichi Tanaka、All-in-one Raman spectroscopy approach to diagnosis of colorectal cancer: analysis of spectra in the fingerprint region、J Anus Rectum Colon 査読あり 3(2) 2019 pp 84-90

Ryuichi Sekine, Sumito Sato, Jun-ichi Tanaka, Hirotada Kagoshima, Takeshi Aoki, Masahiko Murakami、Potential application of Raman spectroscopy for real-time diagnosis and classification of colorectal cancer、Showa Univ J Med Sci 査読あり 30(3) 2018 pp 381-389

〔学会発表〕(計3件)

Sumito Sato, Ryuichi Sekine, Manabu Shiozawa, Jun-ichi Tanaka、Development of diagnostic apparatus using Raman spectroscopy for colorectal cancer、The 34th Congress of the Pan-pacific Surgical Association、2018

関根隆一 佐藤純人 青木武士 田中淳一、ハンドヘルド型ラマン分光器を用いた新たな大腸癌診断機器の可能性、第73回日本消化器外科学会総会、2018

佐藤純人 関根隆一 加藤貴史 田中淳一、近赤外励起のラマン分光法を用いた新しい大腸癌診断装置開発の試み、JDDW2017、2017

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等：なし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。