

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700471

研究課題名（和文）

光線力学治療の高度化に向けた腫瘍組織の光学特性値の算出およびデータベース化

研究課題名（英文）

Determination and Database Construction of Tumor Tissue Optical Properties for Advanced Photodynamic Therapy

研究代表者

石井 克典 (ISHII KATSUNORI)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：20512073

研究成果の概要（和文）：がんの低侵襲な治療法の一つである光線力学療法（PDT）の治療計画において、生体組織内の光の侵達度や照射線量分布を定量的に把握することは、治療成績を向上させるために重要である。生体組織内の光の侵達度は、生体組織の光学特性である吸収係数 $[\text{mm}^{-1}]$ 、換算散乱係数 $[\text{mm}^{-1}]$ 等により理解できる。一般的に、レーザー照射により生体組織の光学特性は変化する。そこで、我々は、PDT 前後の腫瘍組織の光学特性を算出することを目的として基礎的検討を行った。PDT をマウス皮下腫瘍モデルに対して行い、双積分球光学系と Inverse Monte Carlo 法を用いて波長 350～1000 nm における腫瘍組織の光学特性を算出した。

研究成果の概要（英文）：In photodynamic therapy (PDT), which is one of the less-invasive tumor treatment method, the accurate knowledge about the optical properties (absorption coefficient μ_a $[\text{mm}^{-1}]$, reduced scattering coefficient μ_s' $[\text{mm}^{-1}]$, etc.) of the target tissue is important for the understanding and prediction of propagation and distribution of light in tissues, since the PDT efficacy depends on the photon propagation through irradiated tissues. The objective of this study was to determine the optical properties of the tissues before and after PDT. The optical properties of the mouse tumor tissue treated by PDT were calculated with a double integrating sphere measurement system combined with an inverse Monte Carlo method in the wavelength range from 350 nm to 1000 nm.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：(分科) 人間医工学 (細目) 医用生体工学、生体材料学

キーワード：生体光学、レーザー医学、光線力学療法、光学特性、積分球、逆モンテカルロ法

1. 研究開始当初の背景

がんのレーザーを用いた低侵襲治療法の一つである光線力学療法（photodynamic

therapy: PDT) は、腫瘍親和性のある光感受性物質とレーザー光との光化学作用により生じる一重項酸素の殺細胞効果を利用した

治療法である。現在 PDT は、悪性腫瘍、皮膚病や加齢性黄斑変性症の治療等に用いられており、動脈硬化等の心血管病変の治療に対しても研究が進められている。

PDT の治療効果向上のためには、量子効率の良い光感受性物質の開発、光感受性物質の腫瘍選択的な集積性の増強、病変への選択的・効果的な照射法の確立、皮膚光線過敏症等の副作用の低減が重要である。また、より高度な PDT の為には定量的な治療計画が必要である。PDT の治療計画において、腫瘍組織内の光の侵達度や組織内の照射線量分布に関する情報は、PDT の治療成績を向上させるために必要である。生体組織内の光の伝搬は、生体組織の吸収係数 (absorption coefficient: μ_a [mm^{-1}]) や換算散乱係数 (reduced scattering coefficient: μ_s' [mm^{-1}]) 等で表現される光学特性に依存するため、光の侵達度や生体組織内の照射線量分布は、対象とする組織の光学特性により定量的に理解できる。

現在、様々な PDT の光感受性物質が開発されている現状、可視～近赤外域における広帯域波長の腫瘍組織の光学特性を求めることが必要である。また、一般的に、レーザー治療により生体組織の構造は変化するため、生体組織の光学特性は変化する。したがって、PDT の治療効果を向上させるためには、腫瘍組織の光学特性及び PDT による腫瘍組織の光学特性の変化を算出し、治療計画に反映させることで可能となる。

2. 研究の目的

より高度な PDT を実現するために、PDT による腫瘍組織内への光の侵達度の変化を定量的に把握することを目的とした。可視～近赤外の波長域 (350～1000 nm) において、PDT 中及び PDT 前後の腫瘍組織の光学特性値を算出し、PDT 前後の腫瘍組織への光の侵達度を比較した。また、光学特性値の変化と組織学的な変化の関係性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍細胞および動物実験モデル

マウス肺癌細胞株 Lewis lung carcinoma (LLC) を、10%胎児牛血清 (FCS, Bio West Inc.)、ペニシリン 100 units/mL とストレプトマイシン 0.1 mg/mL (ナカライテスク株式会社) を加えた細胞培養液 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich Inc.) を用いて 5%CO₂、37℃の条件下にて培養した。LLC 1×10^6 個を C57BL/6 マウス (6 週齢) の背部に皮下移植し、1 週間飼育後、平均長径がおよそ 11.5 mm に形成された腫瘍に対し PDT を施した。全ての動物実験は大阪大学動物実験規程に準じて行った。

(2) 光感受性物質

Talaporfin Sodium (レザフィリン®、明治製菓株式会社) を 1 mg/ml となるよう生理食塩水で溶解し調整し、マウス尾静脈より 5 mg/kg body weight で投与した。

(3) レーザー照射システム

照射用光源には、Talaporfin Sodium の吸収極大波長と一致する波長 664 nm で連続発振する半導体レーザー (UM1000 Dental_665, JENOPTIK unique-mode GmbH) を使用した。石英ファイバーの先端にコリメートレンズを接続してレーザー光を擬似平行化し、アパーチャを用いて照射部位においてビーム径が 12.5 mm になるよう固定した。パワーメーターを用いて照射パワー密度を 100 mW/cm² に設定した。マウスを小動物実験固定具に固定しマウス腫瘍組織の上部よりレーザーを照射した。PDT のレーザー照射条件は、2 グループに分けた。グループ 1 は、PDT 中の腫瘍組織の光学特性を算出するために、レーザー照射エネルギー密度を 60 J/cm² に設定し 10 min レーザー照射を施行した。グループ 2 は、PDT 実施 7 日後の腫瘍組織の光学特性を算出するために、レーザー照射エネルギー密度を 100 J/cm² に設定し 16 min 40 sec レーザー照射を施行した。

(4) 測定サンプルの作成方法と計測

PDT 後、直ちに深麻酔下にて全ての動物を安楽死させ、手術用メスを用いて腫瘍組織サンプルを採取した。腫瘍組織摘出後、手術用ナイフとハサミを用いて腫瘍組織の周辺の皮膚やかさぶた等を除去した。腫瘍組織をスライドガラスに挟み、スライドガラス間を 2 mm のスペーサーを用いて調整し、腫瘍摘出後 30 min 以内に拡散反射率 (Diffuse reflectance: R_d) 及び透過率 (Transmittance: T_t) を測定した。各サンプル内の 2～5 箇所内の平均値を算出した。マウスの匹数をデータ数 1 とした。

(5) 双積分球光学系と逆 Monte Carlo 法を用いた光学特性算出システム

双積分球を基本とした分光分析装置と逆 Monte Carlo 法を用いて構築した光学特性算出システムを用いて、波長 350～1000 nm における腫瘍組織の光学特性を算出した。

① 構築した双積分球光学系

光源は、ハロゲンランプと重水素ランプを用いた広帯域白色光源 (波長帯域 230～2000 nm) (DH-2000BAL, Ocean Optics) のハロゲンランプを高強度のバルブ (波長帯域 360～2000 nm) (HL-2000-HP, Ocean Optics) に換装したものを使用した。本光学系において、光源からの出射光はレンズを用いて擬似平行化しアパーチャを用いてビーム径 3 mm

に絞り、測定サンプルに照射される。測定サンプルの R_d 及び T_t は、球の内部表面に $BaSO_4$ を塗布した内径 38.1 mm、入射ポート径 8.0 mm、サンプルポート径 9.8 mm の積分球 (FOIS-1, Ocean Optics) と、波長分解能 0.41~0.48 nm の分光器 (HR-4000; 200-1100 nm, Ocean Optics) を用いて、波長 350~1000 nm において測定した。測定した分光器の波長分解能は 0.41~0.48 nm である。積分球光学系を暗室内に設置し、外部光によるノイズを低減した。

② Inverse Monte Carlo 法を用いた光学特性の算出

本研究では、L.V. Wang らにより作成された Monte Carlo シミュレーションを用い、逆 Monte Carlo 法を開発した。逆 Monte Carlo 法を用いた光学特性算出のアルゴリズムは次の手順に従う。1) 組織の光学特性値 μ_a 及び散乱係数 (scattering coefficient: μ_s [mm^{-1}]) を推定する。2) Monte Carlo シミュレーションを用いて、推定した測定サンプルの光学特性値から R_d と T_t の計算値を算出する。3) R_d と T_t のそれぞれにおいて計算値と実測値の誤差を算出する。4) 3) で算出した誤差が R_d と T_t ともに 0.5 % 以下になった場合、1) で推定した μ_a , μ_s を測定サンプルの光学特性値とする。また、0.5 % よりも大きい場合、1) に戻り、 μ_a , μ_s を推定しなおす。最終的に、誤差が 0.5% 以下になるまで上述の 1)~4) の手順を繰り返す。また、光の散乱の異方性を表現する異方性因子 g は 0.9 一定とし、 μ_s を算出した。以上の計算過程を波長 350~1000 nm において行い、 μ_a 及び μ_s のスペクトルを得た。

(6) 組織学的評価

採取した腫瘍サンプルを 8%ホルマリン固定液を使用して浸潤固定後、HE 染色による病理像にて組織学的検討を行った。

(7) 統計学的処理

データは、平均値±標準偏差 (standard deviation: S.D.) で表示し、Student's t-test により統計学的解析を行い、 $p < 0.05$ で統計学的に有意と判定した。

4. 研究成果

(1) PDT 中の腫瘍組織の光学特性

PDT 中は μ_a 及び μ_s のスペクトルに有意な変化は認められなかった。

(2) PDT 後の腫瘍組織の光学特性

PDT 実施 1、2、7 日後の腫瘍組織の μ_a 及び μ_s のスペクトルをそれぞれ、図 1(a)、図 1(b) に示す。図 1(a) より、波長帯域 350~700 nm において μ_a の増加が観測された。吸収ピーク波長 552 nm において PDT 前の μ_a は

0.60 mm^{-1} であり、PDT 実施 7 日後は、1.09 mm^{-1} と増加していた。図 1(b) より、PDT 後、全波長域において μ_s の増加が観測された。Talaporphin Sodium の吸収極大波長 664 nm において、 μ_s は、PDT 前 0.64 mm^{-1} であり、PDT 実施 7 日後は、1.24 mm^{-1} と増加した。

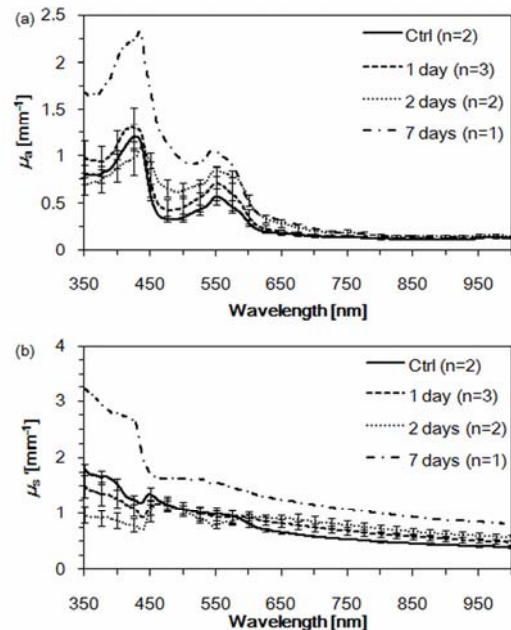


図 1 PDT 実施 1、2、7 日後の腫瘍組織の μ_a 及び μ_s スペクトル

(3) 腫瘍の組織学的評価

図 2 に腫瘍組織の HE 染色像を示す。図 2(a)、(c) に PDT 前の腫瘍組織の組織切片像を、図 2(b)、(d) に PDT 実施 7 日後の像をそれぞれ示す。PDT 実施 7 日後、癌細胞がある程度死滅し、空隙が線維組織に置き換わっている様子が確認された。

PDT 実施 7 日後、波長 664 nm における μ_s の増加と腫瘍組織内の線維組織の存在が認められた。コラーゲン原線維やエラスチンの

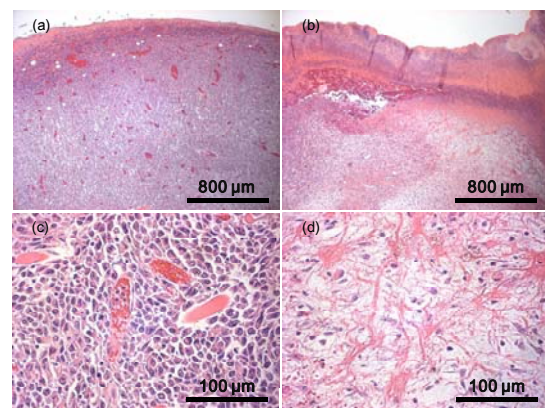


図 2 PDT 実施後の腫瘍組織の HE 染色像 (a)(c) PDT 実施前、(b)(d) PDT 実施 7 日後

サイズは 60~100 nm であり、それらが束になると線維の太さは 1~8 μm 程度になる。この大きさの散乱体は、可視~近赤外光を散乱する。また、個々の線維が結合し集積することで、光の散乱体としての大きさが増加し、光の散乱断面積は高くなると考えられる。皮下のコラーゲン線維の直径の大きさと、散乱の強さの関係を調べ、コラーゲン線維の直径の増加による散乱体の断面積の増加が、光の散乱強度を強くするという報告がある。以上の事から、PDT 実施 7 日後の μ_s の増加は、PDT により腫瘍細胞が死滅した後、腫瘍細胞の空隙に線維組織が置き換わることにより、組織内の光の散乱断面積が高くなり、その結果、腫瘍組織の μ_s が増加したと考えられた。

(4) 腫瘍組織への光の侵達度

PDT 後、腫瘍組織の光学特性が変化するという知見が得られた。腫瘍組織への光の侵達度（表面からの光の強度が $1/e$ になる深さ）は、PDT の治療効果に関する重要な知見となる。腫瘍組織の光学特性と下式を用いて治療波長 664 nm における腫瘍組織への光の侵達度を算出した。PDT 中、光の侵達度は変化しないことが示唆された。図 3 に PDT 実施 1、2、7 日後の腫瘍組織の波長 600~850 nm における光侵達深さを示す。PDT 実施後、経過日数に伴い光侵達深さが全波長域で減少していることが分かった。PDT 実施 7 日後の光の侵達度は、PDT 前に比べおよそ 44% 減少することが見積もられた。

PDT において、進行胃癌や進行直腸癌に対して繰り返し PDT を行い良好な治療成績が

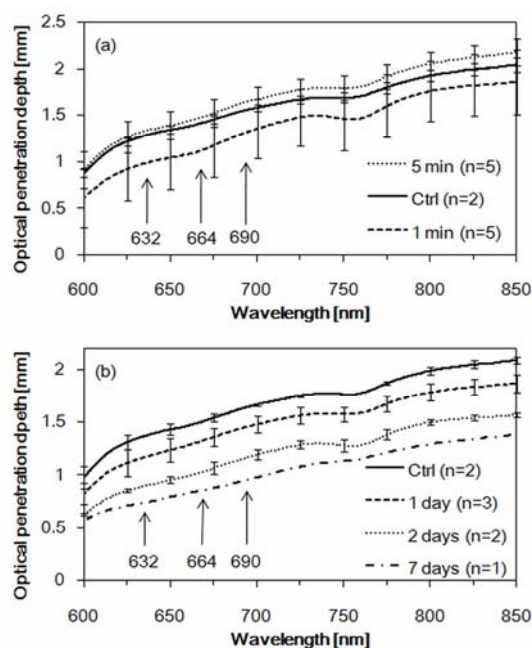


図 3 PDT 実施 1、2、7 日後の腫瘍組織の波長 600~850 nm における光侵達深さ

得られたという症例報告がされている。今後、追加のレーザー照射による PDT が重要になってくると考えられる。本研究結果より、PDT 後の追加のレーザー照射による PDT の際、光の侵達度の減少を考慮したレーザー照射条件の調整が必要であると考えられる。すなわち、PDT 後の腫瘍組織の光学特性は、PDT の再照射における照射線量分布に関する重要な知見となると考えられる。今後、PDT の再照射における光の侵達度の変化をより詳細に検討するために、PDT 後、治療が完了するまでの期間における腫瘍組織の光学特性を算出し、光学特性の変化を観察すること、また、PDT 後の腫瘍組織の光学特性の変化に寄与する弾性線維の増性や空砲化変性などの組織切片像の詳細な観察を行い、光学特性の変化と腫瘍組織の構造的な変化との詳細な関連を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① 本多典広, 石井克典, 南條卓也, 粟津邦男: 双積分球光学系と逆モンテカルロ法を用いた組織の可視・近赤外域光学特性値算出システムの開発とその評価, 日本レーザー医学会誌, 32 (4): 421-428 (2012.2) 査読有
- ② 南條卓也, 石井克典, 本多典広, 粟津邦男: 生体組織の散乱係数誤算出における Mie 散乱及び Rayleigh 散乱を用いた補正, 日本レーザー医学会誌, 32 (4): 429-436 (2012.2) 査読有
- ③ N. Honda, K. Ishii, T. Terada, T. Nanjo, K. Awazu: Determination of the mouse tumor tissue optical properties during and after photodynamic therapy using Inverse Monte Carlo method and double integrating sphere between 350 nm and 1000 nm, Journal of Biomedical Optics, 16(5): 058003 (2011.4) 査読有
- ④ 本多典広, 寺田隆哉, 南條卓也, 石井克典, 粟津邦男: Inverse Monte Carlo 法による光線力学療法前後の腫瘍組織の光学特性の算出, 日本レーザー医学会誌, 31 (2): 115-121 (2010.7) 査読有

[学会発表] (計 15 件)

- ① N. Honda, K. Ishii, K. Awazu: Optical properties measurement of the laser-ablated tissues for the combined laser ablation with photodynamic therapy. Photonics West BIOS 2012 (2012.1.21-26, The Moscone Center, San Francisco, CA, USA)
- ② K. Ishii, N. Honda, K. Awazu: Optical

- properties of biological tissues and laser-treated tissues for advanced laser medicine. 日本光学会年次学術講演会 Optics & Photonics Japan 2011 (2011.11.28-30, 大阪大学コンベンションセンター, 大阪府吹田市)
- ③ 南條卓也, 本多典広, 寺田隆哉, 石井克典, 栗津邦男: 生体組織の散乱係数誤算出における Mie 及び Rayleigh 散乱を用いた補正. 日本光学会年次学術講演会 Optics & Photonics Japan 2011 (2011.11.28-30, 大阪大学コンベンションセンター, 大阪府吹田市)
- ④ 本多典広, 南條卓也, 石井克典, 栗津邦男: 光線力学治療前後の腫瘍組織における吸収係数および換算散乱係数の変化. 第 32 回日本レーザー医学会総会 (2011.11.24-25, パシフィコ横浜 ANNEX ホール, 神奈川県横浜市)
- ⑤ 本多典広, 石井克典, 栗津邦男: 波長 664 nm における光線力学的療法の再治療の際の腫瘍組織の光学特性に基づいた光ドジメトリー. 第 21 回日本光線力学学会学術講演会 (2011.7.2-3, 大阪大学银杏会館, 大阪府吹田市)
- ⑥ T. Terada, T. Nanjo, N. Honda, K. Ishii, K. Awazu: Error analysis of tissue optical properties determined by double-integrating sphere system and inverse Monte Carlo method. Photonics West BiOS 2011 (2011.1.22-27, The Moscone Center, San Francisco, CA, USA)
- ⑦ N. Honda, T. Terada, T. Nanjo, K. Ishii, K. Awazu: Determination of the optical properties of the tissues treated by photodynamic therapy using Inverse Monte Carlo method between 350 nm and 1000 nm. The 2nd Asia Japan-Korea-China PDT Symposium (2010.6.11, AOSSA, Fukui, Japan)
- ⑧ K. Ishii, N. Honda, T. Nanjo, T. Terada, K. Awazu: Optical Properties of Soft Tissues in the VIS and NIR Wavelength Range and their Changes by Laser Treatments. The 7th Asia-Pacific Laser Symposium (APLS 2010) (2010.5.11-15, Seopwipo KAL Hotel, Jeju Island, Korea)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 克典 (ISHII KATSUNORI)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号: 20512073