

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300165

研究課題名(和文) 神経温存手術のための末梢神経可視化技術の創成

研究課題名(英文) Visualization of peripheral nerves for nerve-sparing surgery

研究代表者

高松 哲郎 (Takamatsu, Tetsuro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40154900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：手術において末梢神経を温存することは、器官機能の温存だけでなく、患者のQOLにおいて重要な役割を担う。本研究では、研究代表者らがこれまで行ってきたラマン散乱光を用いた組織観察法を基盤に、末梢神経を非侵襲かつin vivo検出可能なラマン顕微鏡システムの開発を行った。特に、深部組織診断可能な近赤外光に対応したラマン顕微鏡の開発、末梢神経および周辺組織に特徴的なラマンスペクトルの探索と散乱分子骨格の同定、および末梢神経を選択的に検出する解析アルゴリズムの開発を行い、ラマン散乱分光法に基づく末梢神経の分子構造解析および選択的検出が実現可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Detection of peripheral nerve tissues during surgery is required to avoid neural disturbance following surgery as an aspect of realizing better functional outcome. In this study, we developed a Raman microspectroscopic system for label-free and noninvasive detection of peripheral nerves. Firstly, we constructed a Raman microspectroscope with near-infrared excitation light for deep tissue detection. Secondly, we obtained Raman spectra of peripheral nerves including myelinated nerves and unmyelinated nerves, and their adjacent tissues such as fibrous connective tissue, skeletal muscle, tunica media of blood vessel, and adipose tissue, and extracted Raman spectral features for each tissue species. Thirdly, we developed a multivariate spectral analytical method for selective detection of peripheral nerves. Our results provided feasibility of Raman microspectroscopy for molecular analysis of peripheral nerves and for selective detection of peripheral nerves in clinical use.

研究分野：生体医工学

キーワード：バイオイメージング ラマン散乱分光法 末梢神経 術中診断

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は、日本人の死因の第一位であり、死因の約3割を占めている。その治療の柱のひとつとして外科的摘出術が行われているが、その術中に悪性腫瘍周辺の組織に存在する末梢神経が摘出されたり傷ついたりすることによって温存できず、術後に後遺症を残す症例が数多く報告されている。例えば、前立腺全摘術では、術者の眼で鑑別可能な神経血管束を目印として温存手術が行われているが、周囲の細い末梢神経は温存できないことが多く、術後の尿禁制や勃起能の障害が報告されている。そのため、術者自身の目では観察困難な細い末梢神経を可視化する技術が求められている。

従来、細い末梢神経の位置を判断するために、色素を用いた染色技術が改良されてきたが、染色自体がヒトに対して有害であることが多く、術中観察に使用することは困難である。そのため、現在術中に細い末梢神経の位置を判断する技術は存在せず、神経の位置は解剖学的知識、つまり術者の経験に頼らざるを得ない状況がある。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らがこれまで行ってきたラマン散乱光を用いた組織観察法を基盤に、末梢神経を非侵襲かつ *in vivo* 検出可能なラマン顕微鏡システムの開発を行う。特に、末梢神経およびその周囲組織のラマンスペクトルを詳細に検討し、各組織を特徴付けるラマンスペクトルの特定と散乱分子の同定、および末梢神経検出のための解析アルゴリズムの検討を行う。

3. 研究の方法

本研究では、特に下記の3点を行った。

- (1) 近赤外光に対応したラマン散乱顕微鏡の構築
- (2) 神経を特徴付けるラマン散乱スペクトルの特定と散乱分子の同定
- (3) 末梢神経検出アルゴリズムの開発

4. 研究成果

- (1) 近赤外光に対応したラマン散乱顕微鏡の構築

神経組織計測に適したラマン顕微鏡システムを開発するために、近赤外光に対応したラマン顕微鏡の開発を行った。図1に開発したラマン顕微鏡の光学系を示す。現有設備である Raman-11(Nanophoton) を改良し、532 nm 励起および 671 nm 励起でのラマンスペクトル ($500\sim 3500\text{ cm}^{-1}$) が観測可能な光学系を構築した。

光源には、532 nm レーザーおよび 671 nm レーザーを搭載し、ライン型照明が可能な光学系となっている。従来セットアップでは、532 nm 励起に対して $500\sim 3500\text{ cm}^{-1}$ の計測を実現していたものの、671 nm 励起では光学系の透過率の問題で $500\sim 2000\text{ cm}^{-1}$ 程度しか観

測が困難であった。我々は、神経組織の検出を行うためには、 2900 cm^{-1} 付近のラマンスペクトルが重要であると考えている。そこで、光学系の改良により、671 nm で 2900 cm^{-1} 付近(波長では、810 nm ~ 880 nm 程度)のラマンスペクトルの計測に適した分光器および光学系を構築した。

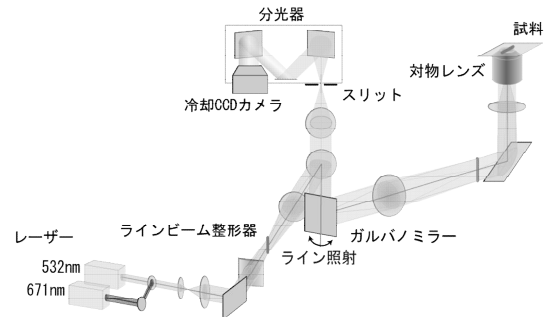


図1 近赤外対応ラマン散乱顕微鏡の模式図

(2) 神経を特徴付けるラマン散乱スペクトルの特定と散乱分子の同定

構築したラマン散乱分光器を用いて、様々な末梢神経のラマンスペクトル、およびその周囲組織のラマンスペクトルを取得した。

末梢神経は、大きく有髄神経、無髄神経の2種類が存在する。有髄神経は、軸索周囲に脂質を多く含むミエリン鞘が存在する。一方、無髄神経はミエリン鞘が存在しない。図2に末梢神経、およびその周囲組織の典型的なラマンスペクトルを示す。ラマンスペクトルの違いは、主に 2850 cm^{-1} 、 2891 cm^{-1} 、 2932 cm^{-1} 付近の強度比の違いとして現れている。 2850 cm^{-1} や 2891 cm^{-1} のラマンバンドは CH_2 伸縮振動という分子振動に帰属され、 CH_2 という分子構造を複数持つ分子を多く含む組織(主に脂質)で強く現れる。一方で、 2932 cm^{-1} は CH_3 伸縮振動に帰属され、主にタンパク質を多く含む組織で強く現れる。即ち、脂質を多く含むミエリン鞘が存在する有髄神経では CH_2 伸縮振動のバンドが強く現れ、ミエリン鞘を持たず脂質の量が相対的に少ない無髄神経では CH_3 伸縮振動のバンドが相対的に強く現れる。

一方、周囲の脂肪組織では有髄神経と同様に強い CH_2 対称伸縮振動のラマンバンドが見られる。これは、脂肪滴として蓄積されている脂質の一種であるトリグリセリドに由来する。有髄神経と比較した場合、脂肪組織の CH_2 伸縮振動のラマンバンドはやや高波数側にシフトしている。この違いは、有髄神経のミエリン鞘(主に Phosphatidylethanolamine や sphingomyelin など)と脂肪組織の脂肪滴(トリグリセリド)に含まれる脂質分子の構造的な違いを反映すると考えられる。また、線維性結合組織は、I型コラーゲンとほぼ一致したスペクトルを示している。このことは、線維性結合組織が主としてI型コラーゲンで構成されていることをラマン分光学的に示す結果である。有髄神経、無髄神経と比較した場合、線維性結合組織の CH_3 伸縮振動のラ

マンバンドが大きく高波数側にシフトしている。さらに、血管中膜、骨格筋組織、および無髄神経を比較した場合、血管や骨格筋のCH₂伸縮振動のラマンバンドが非常に弱い事がわかる。これは、無髄神経中に含まれる脂質（軸索膜やシナプス小胞など）の相対量が血管や骨格筋よりも多いことを示している。さらに、これらの末梢神経、および周囲組織のラマンスペクトルは、波長依存性(532 nmと671 nm)がほぼ存在しないことが明らかとなった。このことから、生体組織への光ダメージを考慮すると、長波長を用いることが有効である可能性が示された。

以上のことから、末梢神経に特徴的なラマンスペクトルが同定された。さらに、散乱分子骨格についても明らかとなった。

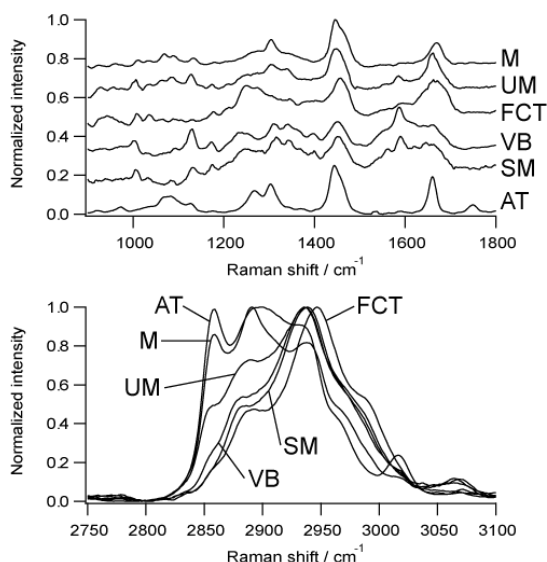


図2 末梢神経およびその周囲組織のラマンスペクトル。MN, 有髄神経(肋間神経); UMN, 無髄神経(迷走神経); FCT, 線維性結合組織; VB, 血管; M, 骨格筋組織; AT, 脂肪組織。

(3) 末梢神経検出アルゴリズムの開発

ラマンスペクトルから末梢神経を選択的に検出するためには、ラマンスペクトルに現れる特徴を効果的に抽出する必要がある。本研究では、多変量解析が効果的であると考えた。

図3に有髄神経、無髄神経、およびそれらの周囲組織を識別した一例を示す。試料はWistarラットの肋間神経(有髄神経)と迷走神経(無髄神経)である。各組織の識別には、多変量解析法の一つである最小二乗解析を適用した。これは、組織から得られるラマンスペクトルを主要構成成分(有髄神経, 無髄神経, 結合組織, 脂肪組織, 骨格筋組織, 血管)のスペクトルの線形和で表せると仮定し、最小二乗法により推定した各比例定数から各組織を識別する方法である。肋間神経および迷走神経ともに、各組織に対する比例定数プロットとHE染色像で確認した組織とがよく

一致していることがわかる。また、ヒト前立腺周囲組織へ応用した例を図3cに示す。例で示している前立腺周囲組織の神経束には、有髄神経と無髄神経が混在している。そのため、比例定数プロットでも、神経束中に有髄神経と無髄神経が混在している様子が見られる。このように、ラマン散乱分光法を用いることで、組織を構成する分子種を元に末梢神経を選択的に検出することが可能であることがわかる。

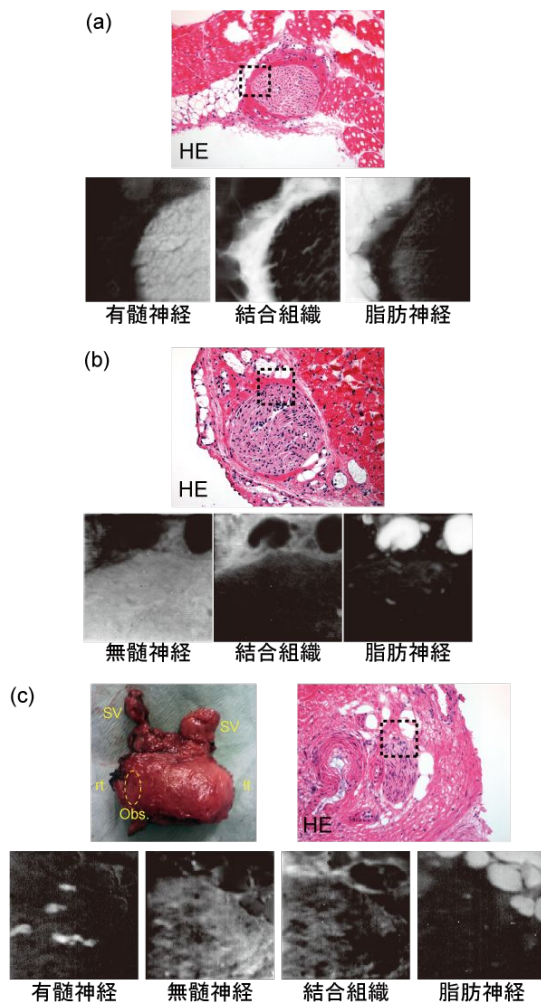


図3 末梢神経および周囲組織のラマンイメージング。(a) Wistarラットの肋間神経, (b) Wistarラットの迷走神経, (c) ヒト前立腺周囲組織。

以上のことから、本研究により以下の点が新たに明らかとなった。

- (1) 有髄・無髄神経の分子構造に基づくラマンスペクトルの違い
- (2) 有髄・無髄神経および周囲組織の特徴的なラマンスペクトルおよび散乱分子
- (3) ラマン散乱分光法に基づく選択的末梢神経検出の有用性

このことから、さらに本研究が発展することで、末梢神経の分子構造に基づいた組織化学へ展開でき、末梢神経の生理学・病理学の発

展に寄与できるものと考えられる。また、臨床応用へ展開することで、これまで末梢神経を検出することが困難で温存できなかった末梢神経も検出・温存できるようになり、特にがん手術における患者 QOL の飛躍的向上に寄与できると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1. N. Nishiki-Muranishi, Y. Harada, T. Minamikawa, Y. Yamaoka, P. Dai, H. Yaku, and T. Takamatsu, "Label-free evaluation of myocardial infarction and its repair by spontaneous Raman spectroscopy", *Analytical Chemistry*, 86 (14), 6903-6910, (2014).
2. 原田 義規, 南川 丈夫, 高松 哲郎, "ラマン分光法による生体情報の可視化", *オプトロニクス*, 33 (389), 70-73 (2014).
3. 南川 丈夫, 原田 義規, 高松 哲郎, "ラマン散乱顕微鏡による分子イメージング", *光アライアンス*, 25 (3), 21-25 (2014).
4. 原田 義規, 南川 丈夫, 高松 哲郎, "光を利用した非標識生体分子イメージング", *G.I. Research*, 22 (1), 44-49 (2014).
5. T. Minamikawa, Y. Harada, N. Koizumi, K. Okihara, K. Kamoi, A. Yanagisawa, and T. Takamatsu, "Label-free detection of peripheral nerve tissues against adjacent tissues by spontaneous Raman microspectroscopy", *Histochemistry and Cell Biology*, 139 (1), 181-93 (2013).
6. T. Minamikawa, Y. Harada, N. Koizumi, and T. Takamatsu, "Raman microspectroscopy for visualization of peripheral nerves", *Proceedings of SPIE*, 8588, 85880P (2013).
7. 南川 丈夫, 原田 義規, 高松 哲郎, "無染色組織イメージング～ラマン散乱分光法を用いて～", *京都府立医科大学雑誌*, 122 (4), 209-217 (2013).

[学会発表](計 27 件)

1. [招待講演] 南川 丈夫, 原田 義規, 高松 哲郎, "医療応用を目指したラマン散乱分光法による生体組織センシング", 日本分光学会赤外ラマン分光部会「第 7 回シンポジウム」, 大阪, 1 月 27 日, (2015).
2. [招待講演] 高松 哲郎, "医療サイドからみた光生体計測" 第 41 回の本光学会冬季講習会「光と生体観察・計測」, 東京, 1 月 22-23 日, (2015)
3. [招待講演] 南川 丈夫, "医療応用を目指したラマン散乱分光法", 量子エレクトロニクス研究会「バイオ・メディカルフォトニクス II」, 長野, 12 月 19-21 日, (2014).
4. [招待講演] 高松 哲郎, "光学顕微鏡の進歩がもたらすもの", 第 55 回日本組織

細胞化学会高松賞受賞記念講演, 長野, 9 月 27-28 日, (2014)

5. [招待講演] 高松 哲郎, "光分子イメージングによる画像ナビゲーション手術", 第 24 回マイクロエレクトロニクスシンポジウム秋季大会依頼講演, 大阪, 9 月 4-5 日, (2014).
6. [招待講演] 高松 哲郎, "ラベルフリーイメージングの医療応用", 第 23 回日本バイオイメージング学会学術集会シンポジウム「脱ラベル化イメージング」, 大阪, 9 月 4-6 日, (2014)
7. [招待講演] 高松 哲郎, "病理学と先端フォトニクス", 病理学会カンファレンス「イメージング技術の進歩と明日の病理学研究・病理診断」, 神戸, 8 月 1-2 日, (2014)
8. [招待講演] 南川 丈夫, 原田 義規, 高松 哲郎, "神経温存手術補助を目指したラマン散乱分光による末梢神経検出法", 最先端光計測とライフサイエンスの近未来-バイオ・ラマン 2017 - [4], 仙台, 5 月 1-2 日, (2014).
9. [招待講演] 南川 丈夫, "ラマン散乱分光法の医学応用 ~分子を捉える新たな無染色イメージング法~", 第 6 回 Translational Research Center (TRC) セミナー, 愛媛, 2 月 18 日, (2014).
10. [招待講演] 南川 丈夫, 原田 義規, 高松 哲郎, "線形・非線形ラマン散乱分光法の医学への応用", 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 3-6 日, (2013).
11. [招待講演] 南川 丈夫, "顕微ラマン散乱分光法の医学・生物学応用", 第 22 回日本バイオイメージング学会学術集会, 東京, 9 月 14-16 日, (2013).
12. [招待講演] 南川 丈夫, "線形・非線形ラマン顕微鏡～医学・生物学の応用を目指して～", 最先端光計測とライフサイエンスの近未来- バイオ・ラマン 2017 - [2], 埼玉, 10 月 25-27 日, (2012).
13. T. Minamikawa, T. Yamamoto, N. Nishiki-Muranishi, Y. Harada, and T. Takamatsu, "Label-free evaluation of myocardial infarction by spontaneous Raman spectroscopy", *SPIE Photonics West, Biomedical Optics (BiOS 2015)*, San Francisco, California, USA, February 7 -12 (2015).
14. T. Minamikawa, Y. Harada, and T. Takamatsu, "In vivo and ex vivo detection of peripheral nerves of rats by using Raman spectroscopy", *Focus on Microscopy 2014 (FOM 2014)*, Sydney, Australia, April 13 - 16 (2014).
15. T. Minamikawa, N. Muranishi, Y. Harada, and T. Takamatsu, "Raman spectroscopic estimation of

- myocardial infarction", SPIE Photonics West, Biomedical Optics (BiOS 2014), San Francisco, California, USA, February 1 - 6 (2014).
16. **T. Minamikawa**, N. Koizumi, **Y. Harada**, and **T. Takamatsu**, "Raman microspectroscopy for peripheral nerve detection", 7th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS-7), Hyogo, Japan, August 25 - 30 (2013).
 17. **T. Minamikawa**, N. Koizumi, **Y. Harada**, and **T. Takamatsu**, "Multivariate analysis of Raman spectra for peripheral nerve detection in human periprostatic tissues", Focus on Microscopy 2013 (FOM 2013), The Netherlands, March 24 - 27 (2013).
 18. **T. Minamikawa**, **Y. Harada**, N. Koizumi, and **T. Takamatsu**, "Raman microspectroscopy for visualization of peripheral nerves", SPIE Photonics West, Biomedical Optics (BiOS 2013), San Francisco, California, USA, February 2 - 7 (2013).
 19. **T. Minamikawa**, **Y. Harada**, N. Koizumi, and **T. Takamatsu**, "Label-free identification of Peripheral Nerves by Raman microscopy", The 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (ICHC 2012), Japan, August 26 - 29 (2012).
 20. **T. Minamikawa**, **Y. Harada**, N. Koizumi, and **T. Takamatsu**, "Label-free spontaneous Raman observation for nerve tissue discrimination", Focus on Microscopy 2012 (FOM 2012), Singapore, April 1 - 4 (2012).

〔図書〕(計 1件)

1. **南川丈夫**, **高松哲郎**, "11. 7. ラマン分光顕微鏡", ライフサイエンス顕微鏡ハンドブック, 山科 正平, 高田邦昭責任編集, 朝倉書店, 分担執筆, (2015年発行予定)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/pcr/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高松 哲郎 (TAKAMATSU, Tetsuro)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：40154900

(2) 研究分担者

原田 義規 (HARADA, Yoshinori)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：10381956

(3) 研究分担者

南川 丈夫 (MINAMIKAWA, Takeo)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：10637193