

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560206

研究課題名(和文)非線形ラマン散乱分光法による新たな腫瘍診断法の開発

研究課題名(英文)Detection of malignant tumor by using nonlinear Raman spectroscopy

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：5-ALA (aminolevulinic acid) の代謝産物であるPpIX (protoporphyrin IX) は腫瘍特異的に蓄積し蛍光を発する。ヒトへ応用可能な腫瘍検出用プローブとして有用であるものの、背景組織の自家蛍光の影響や蛍光灯など白色光による退色が問題となっている。そこで、本研究では非線形ラマン散乱分光法をPpIX検出に応用する新たな選択的腫瘍検出法の開発を行った。その結果、分子振動情報を検出するに十分な非線形ラマン散乱分光システムの開発に成功し、またPpIXや5-ALAに特徴的なラマンスペクトルが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：5-ALA (aminolevulinic acid) is now becoming a useful probe for the detection of malignant tumor in patient. Exogenous administration of 5-ALA results in selective accumulation of a fluorescent metabolite, called protoporphyrin IX (PpIX), in cancer cells. However, the fluorescence detection of PpIX is sometimes perturbed by autofluorescence from the surrounding tissues and by the photobleaching of PpIX. In this study, we address these limitations of conventional scheme of PpIX detection by applying nonlinear Raman spectroscopy. We developed a nonlinear Raman spectroscopy system using white light continuum for simultaneous detection of nonlinear Raman spectrum. We also analyzed Raman spectroscopical signatures of 5-ALA and PpIX appeared in Raman spectra. Our findings provided a proof-of-principle demonstration of malignant tumor detection using 5-ALA based on molecular vibrational information.

研究分野：生体医工学

キーワード：5-ALA PpIX 非線形ラマン散乱分光法 腫瘍

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行われる外科的摘出術の際、腫瘍を残すこと無く摘出することが望ましいが、術中に腫瘍の拡がりや正確に判断することは困難であり、微小な浸潤・転移巣は見逃されることが多々ある。

近年、ヒトに投与可能な 5-ALA (aminolevulinic acid)を用いその代謝物である PpIX が腫瘍特異的に蓄積するのを検出する手法が、悪性腫瘍検出法として注目を集めている。研究代表者らは、PpIX (protoporphyrin IX)による腫瘍診断法が消化器癌のリンパ節転移巣へ応用可能であることを世界で初めて報告し(業績文献: Int J Cancer 2009;125:2256), 消化器癌診断の臨床試験 (UMIN000005080)を現在行っている。

しかし、従来法では PpIX を検出するためには 405 nm の短い波長の光を用いる必要があるため、深達度が浅く、組織の浅い情報しか得られない。また、PpIX の蛍光は他の生体物質(コラーゲンやフラビン類)と重なるため、強いバックグラウンドノイズがあり、腫瘍診断能に制限が伴った。さらに、円滑に手術を行うため、常に白色光(蛍光灯)をつける必要があり、この白色光の影響で PpIX の蛍光が退色してしまう懸念もあった。

2. 研究の目的

本研究では、非線形ラマン散乱分光法を PpIX 検出に応用することで、長波長励起、組織からの自家蛍光フリー、退色フリーの検出を実現し、従来の検出法に対して高深達度・高精度に腫瘍を検出する手法の開発を行う。

3. 研究の方法

- 本研究では、特に下記の2点を行った。
- (1) 非線形ラマン散乱分光システムの構築
 - (2) 5-ALA および PpIX のラマン分光特性の評価

4. 研究成果

(1) 非線形ラマン散乱分光システムの構築
PpIX 検出に適した非線形ラマン散乱分光システムを開発するために、広帯域光を用いた非線形ラマン散乱分光システムを開発した。図1および図2に開発した非線形ラマン散乱分光システムを示す。本研究では、開発したシステムで高感度な観測が可能であったコヒーレント反ストークスラマン散乱光(CARS光)を採用し、非線形ラマンスペクトルを取得した。

励起光源には、1台のフェムト秒 Ti:S レーザーを用いた。レーザーを2つに分割し、一方を励起光1、他方を励起光2とした。スペクトル分解能を高めるため、励起光2

はバンドパスフィルターを用いて狭帯域化した。励起光1は、フォトニック結晶ファイバーにより広帯域化し、光学フィルタ1により長波長側のみを透過させた(図3)。空間的に重ねあわせた励起光1および励起光2は、倒立型光学顕微鏡へ介して試料へ照射した。非線形ラマン散乱の計測のため、励起光1および励起光2を光学フィルタ2でカットし、非線形ラマン信号のみを透過させた。透過した非線形ラマン信号は分光器により各波長に分光し、CCD検出器で検出した。

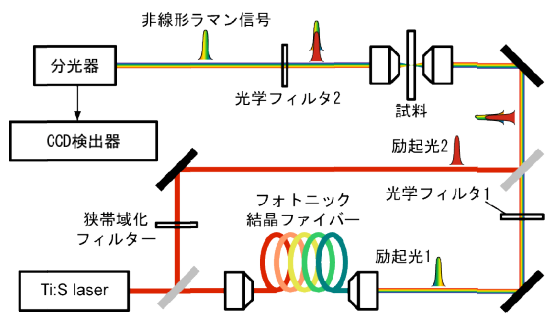


図1 非線形ラマン散乱分光システム

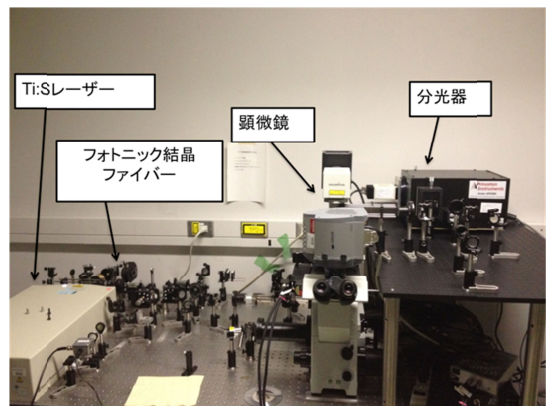


図2 光学系全体図

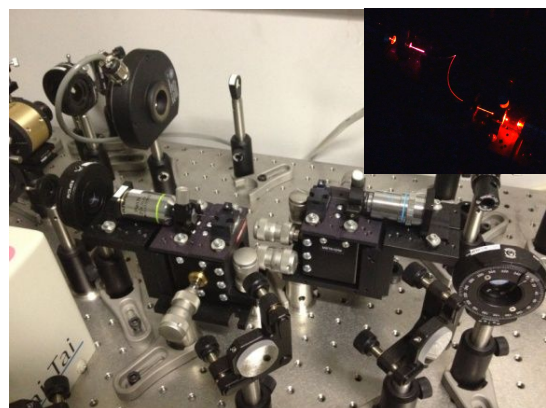


図3 フォトニック結晶ファイバー

次に、開発した非線形ラマン散乱分光システムの基礎特性を評価した。非線形ラマン散乱分光はフォトニック結晶ファイバーを透過するためパルス幅が広がる。しかし、効率的に非線形光学効果を誘起するためにはパ

ルス幅は狭い(尖頭値が高い)方が良い。また、非線形ラマンスペクトルを取得するに十分な波長幅も求められる。そこで、本システムにおけるフォトニック結晶ファイバー後のパルス形状およびスペクトルの評価を行った(図4)。励起光は強度 300 mW, パルス幅 100 fs, 中心波長 780 nm に設定した。その結果, フォトニック結晶ファイバー後は, パルス幅 940 fs, 波長帯域は 1000 nm 以上に広がっていることが明らかとなった。励起光 2 を 780 nm とした場合, 3000 cm^{-1} 付近の分子振動を観測するためには, 1000 nm 以上波長を広げる必要がある。本システムでは, 1000 nm を十分カバーする波長帯域を, 1 ps 以下のパルス幅で実現可能であることが明らかとなった。

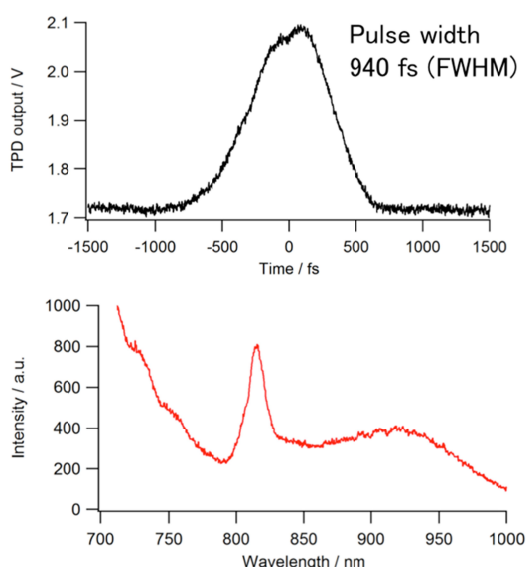


図4 フォトニック結晶ファイバー後のパルス形状(上)とスペクトル(下)。

次に開発した非線形ラマン散乱分光システムを用いて, エタノールの非線形ラマンスペクトルの取得を試みた(図5)。その結果, 非線形ラマンスペクトルは, 共鳴項と非共鳴項の光干渉のため, 分散型のスペクトルを呈した(図5 赤線)。そこで, 共鳴項および非共鳴項をフィッティングし, 共鳴項のみを抽出した(図5 黒線)。その結果, 自発ラマン散乱スペクトル(図5 黒点線)と同様のスペクトルを取得することに成功した。また, その際の波数分解能は 55 cm^{-1} 程度であった。

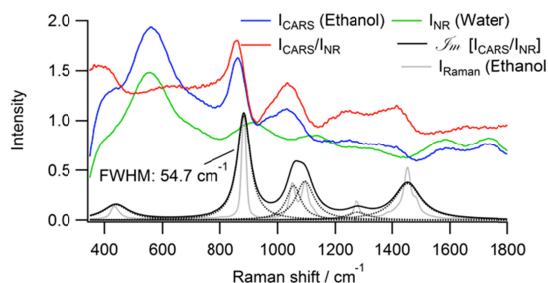


図5 非線形ラマンスペクトル。

以上のことから, 振動分光情報を取得するに十分な非線形ラマン散乱分光システムが開発できたと考える。

(2) 5-ALA および PPIX のラマン分光特性の評価

5-ALA および PPIX のラマン分光特性の評価を行った。まず, 5-ALA の基本ラマンスペクトルの取得を行った(図6)。粉末状のラマンスペクトルでは, 急峻なピークが複数確認された。溶液にするとこれらのピークが鈍化した。これは, 溶液により分子の自由度が増えたため, スペクトル幅が広帯域化のためであると考えられる。

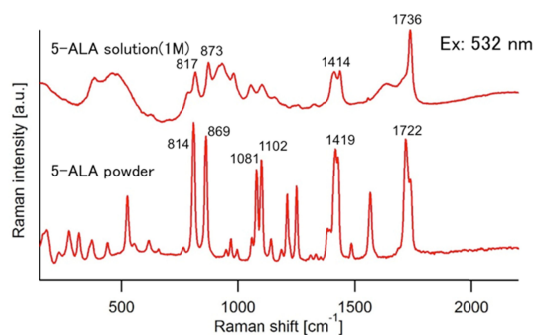


図6 5-ALA のラマン分光特性

次に, PPIX のラマン分光特性を評価した(図7)。粉末のスペクトルでは, 特徴的なラマンバンドが 738, 1333, 1587 cm^{-1} に見られた。これらのラマンスペクトルは 5-ALA と大きく異なった。これは, 選択的な PPIX 検出ができることを示唆する。溶液中でも 738 cm^{-1} に粉末と同様のスペクトルが見られた。ただし, PPIX の非常に強い自家蛍光のため, 高波数領域のラマンスペクトルを確認するには至らなかった。

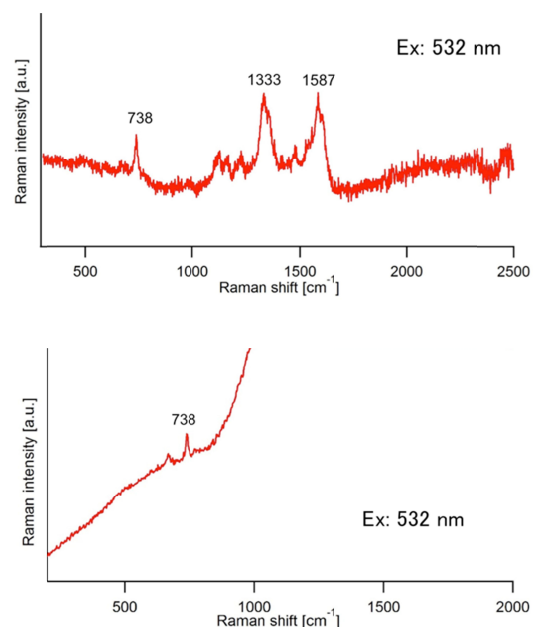


図7 PPIX のラマン分光特性。(上) 粉末。(下) 10 mM 溶液。

最後に、細胞に 5-ALA を細胞に取り込んだ際のラマンスペクトル変化の取得を試みた (図 8)。より詳細な変化を観測するため、多変量解析によるスペクトル解析を行った (図 9)。多変量解析には、部分最小二乗法を用いた。計算された第一主成分を詳細に解析した所、PPIX の特徴である 738, 1333, 1587 cm^{-1} 付近の特徴が顕在化された (図 9 上)。第一主成分スコアの時間変化をプロットした所、5-ALA の投与後の時間経過に伴って増加した (図 9 下)。これは、5-ALA が細胞内に取り込まれ、時間経過とともに PPIX へ代謝されている様子を示していると考えられる。

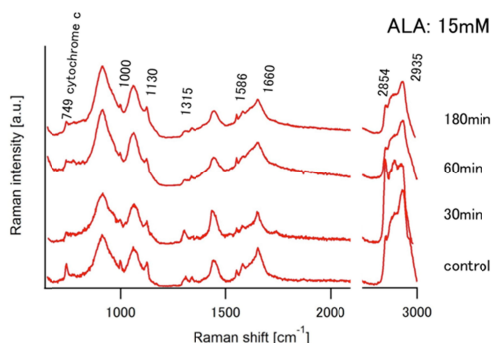


図 8 5-ALA を細胞内に取り込んだ際のラマンスペクトル変化。

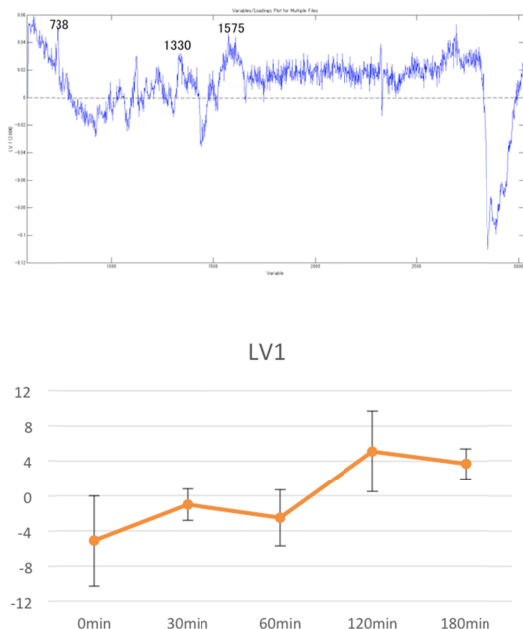


図 9 部分最小二乗法を援用したスペクトル解析。(上) 第一主成分。(下) 第一主成分スコアの時間挙動。

以上のことから、5-ALA のラマン散乱分光学的特徴が明らかとなった。また、非線形ラマン散乱分光システムを援用することで、より高感度な PPIX 検出が可能になると考えられる。今後は、本研究で開発した非線形ラマン散乱分光システムにより、より詳細な 5-ALA および PPIX の分子挙動解析、および臨

床応用による自家蛍光フリー、退色フリーながん検出へ展開させていく予定である。

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 2 件)

1. K. Harada, Y. Harada, M. Beika, N. Koizumi, K. Inoue, Y. Murayama, Y. Kuriu, M. Nakanishi, T. Minamikawa, Y. Yamaoka, P. Dai, A. Yanagisawa, E. Otsuji, and T. Takamatsu, "Detection of Lymph Node Metastases in Human Colorectal Cancer by Using 5-Aminolevulinic Acid-Induced Protoporphyrin IX Fluorescence with Spectral Unmixing", International Journal of Molecular Sciences, 14 (11), 23140-23152 (2013).
2. 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).

〔学会発表〕(計 1 件)

1. T. Minamikawa, N. Koizumi, Y. Harada, E. Otsuji, and T. Takamatsu, "Photooxidation-assisted-photodynamic diagnosis of lymph node metastasis using 5-aminolevulinic acid", SPIE Photonics West, Biomedical Optics (BiOS 2014), San Francisco, California, USA, February 1 - 6 (2014).

〔図書〕(計 1 件)

1. T. Minamikawa, Y. Harada, and T. Takamatsu, "Section III. Chapter 29. Photodynamic detection of lymph node metastases gastrointestinal cancer by using 5-aminolevulinic acid", in Concepts and Applications of Fluorescence Imaging for Surgeons, F. Dip and T. Ishizawa (eds.), Springer Science and Business Media, co-author, (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

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