

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03013

研究課題名(和文) 消化器系悪性腫瘍検出のための高感度自家蛍光イメージング技術の開発

研究課題名(英文) Unstained tumor detection in digestive organs based on auto fluorescence spectroscopy

研究代表者

有本 英伸 (Arimoto, Hidenobu)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・エレクトロニクス・製造領域・主任研究員

研究者番号：50344198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：消化器系の悪性腫瘍を高いコントラストで判別する光学的イメージング技術に関する基礎研究を行った。手術によって切除された実際の腫瘍試料に対して、組織中の代謝レベルの指標となりうる補酵素NADHおよびFADの自家蛍光スペクトルを計測した。血中ヘモグロビンの光吸収を適切に補正することで酸素消費レベルを推定し、腫瘍部と正常部を正確に判別することに成功した。加えて、組織の深さ方向を走査して代謝指標を算出し、腫瘍の存在する深さ分布を推定する原理を開発した。また、補酵素の自家蛍光寿命を計測し、さらに精度の高い腫瘍判別を実現する可能性を見いだした。

研究成果の概要(英文)：We have studied the technique for unstained tumor detection imaging based on the autofluorescence spectra of coenzymes NADH and FAD. First, we measured the autofluorescence spectra of the coenzymes and calculated REDOX index which represents the metabolism in organs. The normalized REDOX index has been found to be highly correlated with the presence of the tumor. Next, we measured the REDOX index along the depth direction of the tumor organs. The results showed the possibility of estimating the presence of the tumor to the depth direction. Finally, we have measured fluorescence lifetime for more precise tumor detection. The lifetime was plotted using Feather plotting method. From there results, it was suggested that appropriate combination of these techniques will leads to high precision of the tumor detection technique.

研究分野：医用生体光学

キーワード：生体イメージング 蛍光スペクトル解析 癌検出 蛍光寿命 イメージセンサー

1. 研究開始当初の背景

食道、胃、大腸などの消化器系組織の悪性腫瘍診断には内視鏡を用いるのが今日では一般的である。熟練した専門医でも3ミリ以下の小さな悪性腫瘍を発見することは容易ではないが、悪性腫瘍は可能な限り早期に発見、処置を行うことが重要である。悪性腫瘍部位と正常部位の違いを光学的性質から判別し、差異が明瞭になるような表示ができれば、悪性腫瘍の早期発見への可能性が高まると考えられる。

申請者らは分光イメージングによる生体機能可視化技術、高性能 CMOS イメージセンサー開発、および内視鏡による消化器系悪性腫瘍の臨床研究をそれぞれ専門として成果をあげてきたメンバーで構成されている。申請者らはこれらの専門性を集結し、「補酵素の3次元的分布計測」、「空間的スペクトル圧縮技術による補酵素濃度推定」、および「超高感度イメージセンサー設計・開発技術」を統合することで、消化器系悪性腫瘍の判別イメージング技術の開発を目指す。

2. 研究の目的

内視鏡を用いた診断や手術において胃癌や大腸癌などの消化器系悪性腫瘍を選択的に描出できるイメージング技術の確立を目指す。これは、正常部位と比較して悪性腫瘍部位において濃度が変化することが知られている自家蛍光性補酵素の濃度分布を可視化することで実現する。組織内部の現象を理解するために、補酵素の3次元的分布を光学的計測により明らかにする。補酵素の濃度推定や不要因子を除去する解析技術を確立し、独自開発の超高感度イメージセンサーで腫瘍組織サンプルの自家蛍光スペクトルを測定、正常部位と悪性腫瘍部位を正確に判別・描出するイメージング技術を開発する。

3. 研究の方法

本研究は以下の3つの研究要素で構成され、それぞれ次のような手段で研究を進める。

[1] 主要組織計測と自家蛍光データ解析法の確立

腫瘍組織内部における NADH、FAD の3次元的分布を明らかにするとともに、2次元的分光スペクトル分布を推定する空間的スペクトル圧縮技術を構築、さらに NADH と FAD の濃度分布を決定する自家蛍光スペクトル解析技術を確立する。実施項目は

- ・腫瘍サンプル計測実験
- ・NADH と FAD の濃度推定法確立
- ・血中酸素飽和度推定

とし、自家蛍光スペクトル計測および、必要に応じて蛍光寿命計測を行う。

[2] 超高感度 CMOS イメージセンサーの開発と作製

反射・自家蛍光スペクトル画像のビデオレ

ート計測に適した、超高感度(最大ゲイン 64 ~ 128 倍)・高フレームレート(90 枚毎秒)・小面積(有効撮像領域 3mm 角)のハイビジョン CMOS イメージセンサーを開発する。実施項目は

- ・CMOS イメージセンサーアーキテクチャとプロトタイプ的设计・試作
- ・超高感度・高ダイナミックレンジの実現である。

[3] 悪性腫瘍判別イメージング装置の構築と腫瘍サンプル計測

超高感度イメージセンサーを用いた悪性腫瘍判別イメージング装置(自家蛍光スペクトルイメージング装置)を作製し、2次元的に正常部位と悪性腫瘍部位を判別し、選択的に悪性腫瘍部位を描出させる技術を開発することを目標とする。実施項目は

- ・装置作製
- ・腫瘍サンプル計測実験
- ・分光スペクトル推定法構築とする。

4. 研究成果

本研究の成果を4項目に分け、それぞれの内容を以下に記す。計測実験はすべて広島大学病院にて実施した。計測実験で使用したサンプルは消化器系がんの手術において内視鏡で切除した組織であり、これを切除直後に計測した。組織には悪性腫瘍部と正常部が含まれ、それぞれの部位は専門医によってあらかじめ位置が示され、その情報を参照して計測位置を決定した。

補酵素 NADH は低酸素下では減少し、一方で FAD は低酸素下において増加することが知られている。また、波長 365nm の光を照射した場合はほぼ NADH のみが自家蛍光を発生し、一方波長 405nm の光では NADH と FAD の両者が自家蛍光を発生する。したがって、 $[365\text{nm 励起の自家蛍光強度}] / [405\text{nm 励起の自家蛍光強度}]$ という量を指標にすると(これを REDOX インデックスと呼ぶことにする)低酸素状態を数値化することが可能である。悪性腫瘍組織においては細胞分裂が活発なため、正常組織に比べて低酸素状態となることから、REDOX インデックスの大きさが悪性腫瘍存在の可能性と相関を持つと考えられる。以下では、REDOX インデックスは悪性腫瘍であることの可能性を意味する。

[1] 腫瘍部および正常部における自家蛍光スペクトル計測と解析

悪性腫瘍部と正常部を補酵素 NADH および FAD の自家蛍光スペクトルから判別する際に、粘膜組織上層に存在する血中ヘモグロビンで吸収される光量を補正することで精度の高い判別が可能になると考えた。そのため、自家蛍光を励起する光源(波長 375、405、および 450nm の半導体レーザー)とヘモグロビ

ン濃度を推定するための白色光源（LED）、小型分光器からなる光学システムを大学病院に設置して腫瘍サンプルの計測を行った。図1に使用した光学系の概念図を示す。本来は光源からの照明軸と光検出の軸を一致させた同軸配置が理想的だが、蛍光励起や光検出の効率の観点から非同軸配置とした。3種類のレーザーと白色LED光源を順次切り替えながら計測を行った。サンプルは全部で8個、腫瘍部と正常部それぞれで複数点の計測を行った（一部小さなサンプルは腫瘍部と正常部それぞれ1点のみのも含む）。

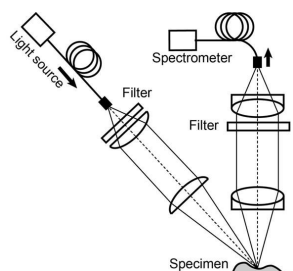


図1：自家蛍光スペクトル計測用光学系

図2(a)は計測した蛍光スペクトルの例である。波長550-580nm付近に下に窪んだスペクトル形状があるが、これが血中ヘモグロビンによる光吸収である。血中ヘモグロビンは粘膜組織の上層部に存在するため、照明光（入射光）と自家蛍光（射出光）の両者に対して吸収の影響を及ぼす。この影響を可能な限り除去するために、粘膜組織構造を模した単純なレイヤー構造をモデルとして補正理論を構築、実験データに適用した。血中ヘモグロビンによる吸収を補正した結果が図2(b)である。波長550-580nm付近に見られた吸収の窪みがほぼ消失している。この補正後のスペクトルが実際に補酵素NADH、FADから射出した自家蛍光のスペクトルであると考えられる。

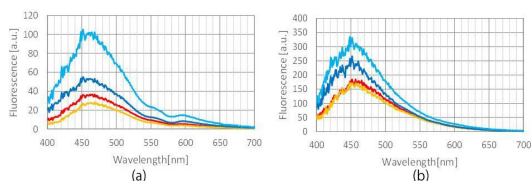


図2：(a)ヘモグロビン吸収補正前および(b)補正後の自家蛍光スペクトル

この補正スペクトルから算出した、前述の REDOX インデックスを図3(a)に示す。それぞれの棒グラフは計測点に対応する。サンプルの名称は「サンプル番号 - 計測点番号 (N=正常 / T=腫瘍)」を意味する。REDOX インデックスのばらつきを規格化し、1より大きいか小さいかによって腫瘍部と正常部を表すようにした。グラフから、実際に腫瘍である点の REDOX インデックスは1よりも大きな値を持ち、一方で正常部の REDOX インデックスは1以下である場合がほとんどであることがわかる。一部これに反する測定点があるが、

術後の時間経過などの条件が悪かったことなどが要因として推定される。

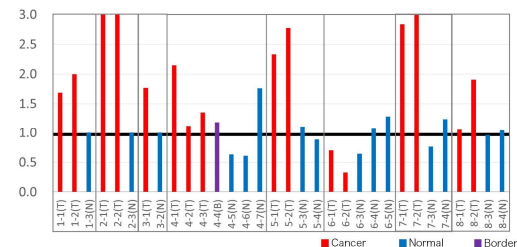


図3：腫瘍サンプル上における REDOX インデックス

[2] 腫瘍部における深さ方向に沿ったスペクトル計測と解析

消化器系悪性腫瘍分析において、腫瘍の存在する深さは病状の性質や治療方針と強く関連する重要な情報である。したがって、粘膜組織の深さ方向に沿った自家蛍光スペクトル計測が可能な光学系を設計、構築し、手術によって切除された組織の計測を行った。

光学系は共焦点型と呼ばれる、計測試料の深さ方向に関して非常に短い焦点深度を持つシステムを採用した。通常、共焦点光学系は特定の深さからの反射光強度を検出、2次元的に走査することでイメージングを行う目的で使用されるが、本研究では自家蛍光を励起する光を照射するとともに、検出した光を分光して自家蛍光スペクトルを計測できる構成とした。分光原理はグレーティングを使った分散型であり、本研究において独自チューニングを施した超高感度 CMOS イメージセンサーによって分光後の光を検出した。自家蛍光励起には365、405nmの光源を使用し、前項と同じ手順で REDOX インデックスを求める。粘膜組織の深さ方向については、10マイクロメートルステップで20点、表面から200マイクロメートルの深さまで計測し、REDOX インデックスの分布を調べた。

図4(a)-(e)は5つの腫瘍サンプルにおける深さ方向の REDOX インデックス分布である。前項と同様に、REDOX インデックスの大きさは酸素消費を伴う代謝の活発さに関連すると考えられるので、腫瘍の存在する深さでは高い REDOX インデックスが観察されると期待できる。図4(a)は表面から深さ100マイクロメートルにおいて高い REDOX インデックスを示しており、比較的浅い部位での腫瘍である可能性が窺える。図4(b)および(c)は、全体的に深くなるにつれて REDOX インデックスが下がる(b)傾向、上がる(c)傾向が見られ、腫瘍の存在する深さについて明確な指標となりにくい。図4(d)および(e)はそれぞれ、深さ100-150マイクロメートル、0-100マイクロメートルにおいて高い REDOX インデックスが得られた。これら、高い REDOX インデックスが現れている深さに腫瘍が存在する可能性が考えられるが、検証には生体組織採取検査を行う必要があり、現時点ではこれ以上の明確な推定は困難である。しかしながら、共

焦点分光光学系を採用し REDOX インデックスの深さ方向分布を調べることで、腫瘍の存在する深さがある程度推定できる可能性が示唆された。

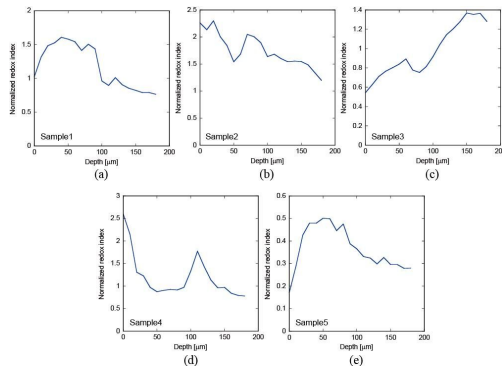


図 4：深さ方向に沿った REDOX インデックス分布

[3] 自家蛍光寿命計測のための時間分解蛍光計測

図 3 で示したように、NADH および FAD の自家蛍光スペクトル分析から悪性腫瘍部と正常部をある程度の正確さで判別できることがわかったが、さらに精度を上げるために、これらの補酵素の蛍光寿命を計測し、組織内部に存在する物質の判別を試みる。自家蛍光物質は励起光が照射されると即座にそのエネルギーの一部を吸収し、蛍光を発する。蛍光はある程度の時間持続しながら強度が減少するが、この緩和時間（蛍光寿命）は蛍光物質によって様々である。したがって、蛍光寿命を計測することで粘膜組織内部に存在する物質の解析に有益な情報が得られる。本研究では、時間の関数として計測した蛍光強度分布をフーリエ変換し、その実部と虚部を複素平面上にプロットすることで成分情報を可視化するフェーザープロットを試みた。

フェーザープロットでは、物質の蛍光寿命は複素平面上の位相角として表される。物質が単一の場合は第 1 象限の半円弧上にプロットされ、物質が二つの場合はそれぞれを単独にプロットした 2 点を結ぶ線分上のどこかにプロットされる。図 5(a)-(c) にフェーザープロットの 3 例を示す。

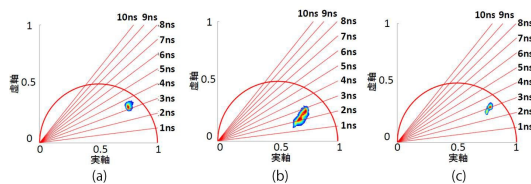


図 5：蛍光寿命のフェーザープロット

図 5(a) はあらかじめ病変部であるとわかっている点で計測した蛍光寿命をプロットしたものであり、(b) と (c) は病変部と正常部の境界あたりで計測した蛍光寿命をプロットしたものである。図 5(a) の病変部ではフェーザープロットが一か所に集中しているのに対して、(b) および (c) の境界部におけるフ

ェーザープロットはふたつのピークに分離した分布が得られている。現時点においてこれらのプロットが起因する蛍光物質の種類やその濃度については推定方法を検討しているところであり、医療関係者による医学的知見等を踏まえて引き続きその物理的解釈を行う予定である。

[4] 自家蛍光スペクトル解析に基づいた腫瘍判別イメージングおよび研究総括

本研究一連の流れの最終的な到達点は、悪性腫瘍を明瞭なコントラストで可視化、超早期発見に資することである。前項までは測定試料上の点における REDOX インデックスを主な指標として判別の精度を検討してきたが、この項では 2 次元的に判別イメージングを行った実験結果を報告する。判別のための指標には REDOX インデックスのみを用いた。原理的には共焦点光学系を用いた深さ方向のセクションング（特定の深さでスライスしたような情報を取得すること）や蛍光寿命を含めて判別イメージングを実施することも可能と思われるが、本助成研究期間ではそれぞれの要素技術の開発およびパフォーマンスの評価までが目的であるので、最終的な技術統合は次のステージで検討する。

蛍光励起波長および REDOX インデックスの算出は前項までの実験条件と同一である。自家蛍光強度は非常に微弱であるため、独自チューニングを施した超高感度 CMOS イメージセンサーによって画像を取得した。画像全体が REDOX インデックスの分布をあらわすように画像間演算を行った 3 例を図 6(a)-(c) に示す。上段は切除された組織をカラーカメラで撮影したものであり、下段が REDOX インデックス分布、すなわち判別イメージングの結果である。実際には多数の試料を測定しているが、結果が特徴的な 3 例を掲載する。図 6(a) は試料中央付近が病変部であるが、REDOX インデックス分布結果は病変部の周辺部で高い値を示しており、期待する結果と逆の傾向になっている。図 6(b) は試料中央にポリープ状の凸部があり、そこが病変部である。この例では REDOX インデックスは病変部で高い値を示しており、正しい判別イメージング結果が得られている。図 6(c) も他の 2 例と同様に中央付近が病変部であるが、全体的に REDOX インデックス分布は顕著な変化を見せておらず、病変部と正常部の判別が難しい。

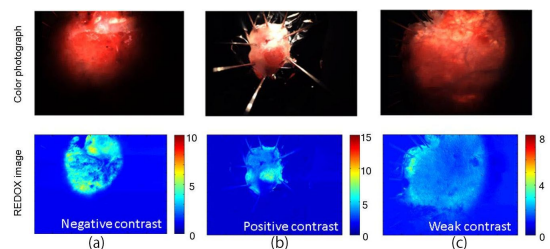


図 6：REDOX インデックスを 2 次元的にマッピングした悪性腫瘍判別イメージ

光散乱と吸収に関する理論的解析を行った結果、粘膜下層の比較的浅い部分にコラーゲンが存在する場合はコラーゲンの自家蛍光を励起してしまい、標的である NADH や FAD の自家蛍光と重畳することで REDOX インデックス分布が代謝状態と比較して反転したりコントラストの低下を引き起こす可能性がわかった。これを避けて悪性腫瘍判別イメージングの精度を向上させるためには、前項で報告した蛍光寿命の解析結果を統合した判別指標を導入することが有効であると推測しており、引き続き蛍光寿命解析の手法確立を図るとともに、技術的統合へ向けた議論を重ねているところである。

まとめとして、3 年間の本助成研究を遂行した結果、補酵素の自家蛍光スペクトル解析による悪性腫瘍判別、深さ方向に関する計測と病変部分分布の推定、および 2 次元的判別イメージングはいずれも目標通りの成果を収めたと言える。前述の通り、コラーゲン等の不要要素を計測結果から排除するアルゴリズムを導入するなどして、さらなる判別精度向上を目指し、将来の実用化に向けた研究の展開を今後進める予定である。

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)

M. Ozaki, K. Kagawa, H. Arimoto, Y. Kominami, Y. Sanomura, S. Yoshida, M-W, Seo, S. Kawahito, and S. Tanaka, "Spectral study of metabolism-based autofluorescence and white-light reflectance for endoscopic tumor imaging," 2015 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), Milan, 2015, pp. 5879-5883. doi: 10.1109/EMBC.2015.7319729

H. Arimoto, A. Iwata, K. Kagawa, Y. Sanomura, S. Yoshida, S. Kawahito, and S. Tanaka, "Spectroscopic analysis of autofluorescence distribution in digestive organ for unstained metabolism-based tumor detection," Proc. SPIE 10068, Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues XV, 100681L (16 February 2017); doi: 10.1117/12.2250776

[学会発表](計 5 件)

M. Ozaki, K. Kagawa, H. Arimoto, Y. Kominami, Y. Sanomura, S. Yoshida, M-W, Seo, S. Kawahito, and S. Tanaka, "Spectral study of metabolism-based autofluorescence and white-light

reflectance for endoscopic tumor imaging," 2015 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), Milan, August 2015.

岩田 淳、尾崎 聖史、香川 景一郎、有本 英伸、小南 陽子、佐野村 洋次、三重野 寛、吉田 成人、徐 珉雄、川人 祥二、田中 信治、コラーゲン発光の自家蛍光酸化還元指標への影響の検討”、第 16 回情報フォトンクス研究グループ研究会、2015 年 9 月

A. Iwata, K. Kagawa, H. Arimoto, Y. Sanomura, S. Yoshida, M-W. Seo, S. Kawahito, S. Tanaka, "Preliminary Study on an Effect of Collagen to Autofluorescence-based Tumor Detection," International Symposium on Biomedical Engineering, Tokyo, Nov. 2016.

有本 英伸、岩田 淳、香川 景一郎、川人 祥二、佐野村 洋次、田中 信治、吉田 成人、"自家蛍光スペクトル計測に基づいた消化器系悪性腫瘍判別イメージング技術"、電気学会 光・量子デバイス研究会、東京、2016 年 9 月。

H. Arimoto, A. Iwata, K. Kagawa, Y. Sanomura, S. Yoshida, S. Kawahito, and S. Tanaka, "Spectroscopic analysis of autofluorescence distribution in digestive organ for unstained metabolism-based tumor detection," Proc. SPIE 10068, Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues XV, San Francisco, February 2017.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有本 英伸 (ARIMOTO, Hidenobu)
産業技術総合研究所・電子光技術研究部門・主任研究員
研究者番号：50344198

(2) 研究分担者

香川 景一郎 (KAGAWA, Keiichiro)
静岡大学・電子工学研究所・准教授
研究者番号：30335484

田中 信治 (TANAKA, Shinji)
広島大学・大学病院・教授
研究者番号：00260670