

平成22年5月31日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790949

研究課題名（和文） 近赤外（1064nm）励起ラマン分光法による消化器癌診断

研究課題名（英文） The diagnosis of digestive carcinoma using Raman spectroscopy with near infrared (1064-nm) excitation.

研究代表者

川端 俊貴（KAWABATA TOSHIKI）

浜松医科大学・医学部・リサーチアシスタント

研究者番号：90402289

研究成果の概要（和文）：本研究はラマン分光法を用いて癌組織と正常組織との判別を行う診断技術の確立を目的としたものである。ラマン分光装置を用いて、胃癌切除検体の癌部と正常部を直接測定し、得られたラマンスペクトルを用いて胃癌を判別した。胃癌と正常胃粘膜は、正診率72%で判別可能であった。癌が既知であれば、分化型と未分化型は正診率98%で、粘膜内癌と粘膜下層浸潤癌は正診率98%で判別可能であり、内視鏡治療における有用な情報を提供できる可能性が示唆できた。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is an establishment of diagnostic systems which discriminate cancer from normal tissue using Raman spectroscopy. We obtained Raman spectra from gastric carcinoma points and normal mucosal points of stomach samples by surgical resection. We can discriminate the spectra of carcinoma points from those of normal points by the 72% accuracy rate. And if the measured points have been diagnosed to be carcinoma points, we can discriminate the differentiated carcinoma and the undifferentiated carcinoma by the 98% accuracy rate, and the carcinoma in situ and the submucosal invasive carcinoma by the 98% accuracy rate. We can show that Raman spectroscopy may provide useful information for endoscopic therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：近赤外ラマン分光法，消化器癌，胃癌診断，optical biopsy

## 1. 研究開始当初の背景

現在の日本において、悪性新生物の死因順位は1位であり、増加の一途を辿っている。

胃癌に対しては上部消化管内視鏡検査が普及しており、その結果胃癌の早期診断・治療が可能となってきた。しかし一般に癌の診断に

は組織学的な確定診断が必要不可欠である。これには時間を要し直ちに治療を開始できないこともある。内視鏡検査に用いられる光学的診断技術を用いた癌診断としては現在、拡大内視鏡、高解像度内視鏡、狭帯域光観察 (Narrow Band Imaging = NBI)、蛍光観察 (Auto Fluorescence Imaging = AFI)、赤外光観察 (Infra Red Imaging = IRI) などの検討が進んでおり、良好な成績が報告されている。しかしこれらは、組織 (消化管粘膜) の形態を視覚化し、これを認識することで診断を可能としている技術であり、精度の上昇はあるものの、主観から完全に脱することは困難で、最終診断は生検による病理組織学的診断に委ねられる。本法はラマン分光法を用いて、癌組織と正常組織との明確な識別を行う診断技術であり、癌組織の検出のみならず、組織型、分化度、深達度などの情報も得られる可能性を秘めている。さらに客観性・簡便性・低侵襲性・迅速性などにおいて優れた特性を有しており、これにより癌治療においては、迅速で至適な治療方針が可能になると考える。

1993年に初めてラマン分光法による癌診断が報告され、肺癌、乳癌 (Cancer Res 2006) などで、有用性が認められている。簡便性や低侵襲性などから、その臨床応用が期待されている。ラマン散乱光は非常に微弱であり、生体から強く発する蛍光などに容易に妨害される。これを克服する方法として、近赤外のような長波長の光にて励起する方法が挙げられるが、ラマン散乱光の検出において、通常の出検器では励起波長の長波長側検出の限界は 830nm 程度であり、ヒト組織に対しては蛍光による妨害を回避するために必要な励起波長としては不十分である。浜松ホトニクス製ラマン分光測定装置は、長波長側 1400nm まで感度波長領域がある高感度近赤外マルチチャンネル検出器を内蔵しており、近赤外 (1064nm) 励起によるラマン散乱光取得が可能である。この装置によりほぼ完全に蛍光の妨害が回避でき、精度の高い (S/N 比の高い) スペクトルを得られる。今回この装置を用いてラマンスペクトルを取得し、ラマン分光法による消化器癌診断の可能性を調査した。

## 2. 研究の目的

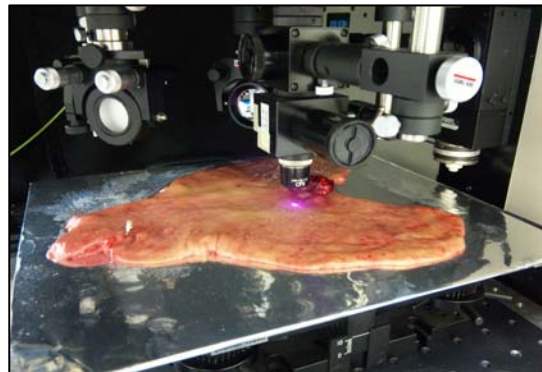
本研究は光学技術を用いることで、従来の癌診断法とは全く異なる光学的診断方法の確立を目的としている。

我々はこれまで、近赤外励起ラマン分光法による胃癌診断の可能性を研究を継続してきた。内視鏡生検による癌組織と正常組織から、近赤外 (1064nm) 励起ラマン分光法を用いて得られたラマンスペクトルに対し、主成分分析を用いた判別分析を行ったところ、感度 66%、特異度 73%、正診率 70% ので、癌と正常を判別できた。

(1) 以上を元に、検査法、解析法の改良により、ラマン分光法による一般的な胃癌の正診率を上昇させる事を目的とする。また、生検検体と切除検体のラマンスペクトルおよびそれらの病理組織を詳細に対比する事でスペクトルのもつ胃癌組織の情報を推定し、さらに胃癌に特異的な物質やその構造の同定を行う。  
(2) ラマン分光測定機器の改善を図る。ラマン分光測定における、短時間で安定したラマンスペクトルを取得するラマン分光測定装置を確立する。測定試料の形状を考慮し、励起条件 (励起光強度、集光径)、および散乱光の集光条件の最適化を行う。

## 3. 研究の方法

切除検体を直接測定し、得られるラマンスペクトルを収集解析した。術前に、本研究に関する説明と本研究に対する同意を得た。胃癌の診断にて、当科で開腹胃切除術を施行した症例を対象にし、切除された検体は、前処置を施さずに新鮮な検体をラマン分光測定に使用した。切除検体を測定するにあたり調整・最適化された近赤外 (1064nm) 励起ラマン分光測定装置 (浜松ホトニクス製) を使用して、粘膜面より癌部および非癌部を直接測定し、ラマンスペクトルを取得した。これにより、内視鏡検査を擬似した。(下図)



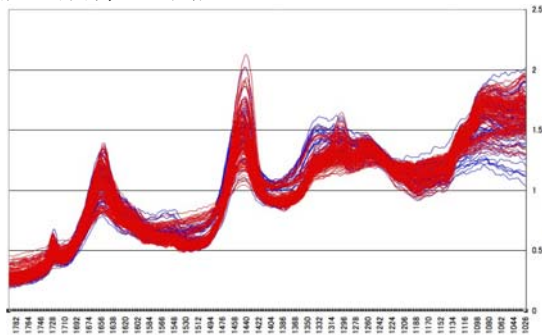
測定点には朱にて印をつけ、通常病理組織学的検査へ提出し、測定点が癌の領域であるか正常粘膜かを決定した。得られたラマンスペクトルを、indene および白色光による補正を施し、測定点固有のラマンスペクトルをして解析に使用した。

スペクトルの解析には、主成分分析を用いて、対象群間の判別分析を施行した。

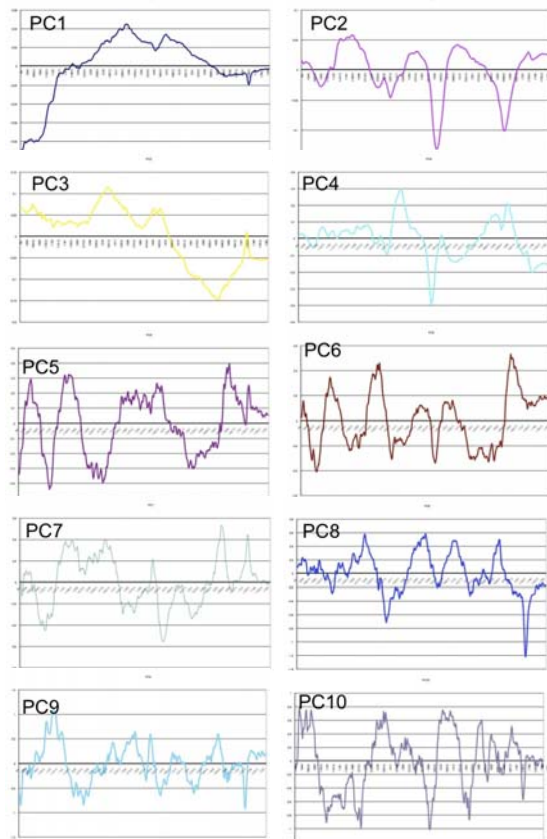
## 4. 研究成果

ラマンスペクトル測定点と病理検査との比較が可能であった胃癌 10 症例、12 病変に対して解析を行った。年齢 52 歳 - 79 歳、男性 5 例、女性 5 例。肉眼型は 0 型 6 病変、1 型 2 病変、2 型 3 病変、3 型 1 病変であった。進行度は早期癌 7 病変、進行癌 5 病変。分化度は分化型 6 病変、未分化型 6 病変であった。全測定点は 213 点で、うち癌測定点は 81 点、

正常粘膜測定点は 132 点であった。  
全ラマンスペクトルを下に示す。  
癌：青線，正常粘膜：赤



全スペクトルは、似た形状を呈し、特徴的なピークを示している。癌スペクトルと正常スペクトルの形状は若干相違し、これらを判別できる可能性がある。全スペクトルを主成分分析を用いて解析した。以下に主成分 PC1～PC10 を示す。



各主成分は特徴的なピークをもち、測定された検体の特徴を抽出出来ていると考えた。各成分およびそのピークの意味は未知であり、今後探求すべきである。

測定されたラマンスペクトルはすべて、上記の主成分と各々の PCscore( $t_n$ )の積の和となり、 $t_n$ は各スペクトルに固有の数値である。

Raman spectrum

$$= (t_1 \times PC_1) + (t_2 \times PC_2) + (t_3 \times PC_3) + \dots + E(\text{noise})$$

ここで、 $t_n$ ( $n=1-10$ )を用いて、ある 2 群間のスペクトルの判別分析を行ったところ、以下の結果を得られた。

すべての癌測定点と正常粘膜測定点は、  
{感度 72%，特異度 73%，正診率 72%}  
で両者を判別できた。

この結果は、これまでに我々が発表した生検検体を用いた結果とほぼ同程度であったが、胃切除検体を直接測定することで、若干の正診率の向上がみられた。

臨床で必要とされる深達度診断や、組織診断の可能性を追求し、さらに詳細な検討を行った。すなわち、

\* 早期癌測定点 と 正常粘膜測定点  
{感度 76%，特異度 73%，正診率 74%}

\* 進行癌測定点 と 正常粘膜測定点  
{感度 71%，特異度 92%，正診率 88%}

であり、進行癌の方が早期癌より正診率が高かった。

\* 分化型癌測定点 と 正常粘膜測定点  
{感度 73%，特異度 91%，正診率 87%}

\* 未分化型癌測定点 と 正常粘膜測定点  
{感度 88%，特異度 73%，正診率 76%}

上記のごとく、分化型は特異度良く (91%)、未分化型は感度良く (88%) 正常粘膜と判別可能であった。

癌が既知の場合、

\* 分化型癌測定点 と 未分化型癌測定点  
{感度 95%，特異度 100%，正診率 98%}

\* 早期癌測定点 と 進行癌測定点  
{感度 98%，特異度 84%，正診率 93%}

\* 粘膜内癌測定点 と 粘膜下層浸潤癌  
{感度 97%，特異度 100%，正診率 98%}

上記のような結果を得られた。

今回の研究で、1064nm の近赤外励起ラマン分光法は、内視鏡検査における深達度診断や組織学的診断など、詳細に胃癌を診断できる可能性を持つことが示唆できた。

現在胃癌では、分化型管状腺癌の粘膜内癌に対しては、内視鏡的粘膜剥離術が適応になり、深達度によっては、胃切除におけるリンパ節郭清の程度も変わってくる。このように胃癌における深達度診断は治療内容に直結するものであり、良悪性の診断の次に必要なものと考えられる。現在の内視鏡検査において癌の深達度診断は、超音波内視鏡にて行われるが、その診断率も施設により様々である。さらに、これまでの経験則に基づいた腫瘍の所見から深達度の診断がなされていることも多い。このように現在の深達度診断は、客観性に乏しく、これに変わる診断技術が求められる。この現状の中で、今回の結果のように、内視鏡検査を擬似した切除検体の直接

測定によるラマン分光法は、正診率よく深達度を判別できた。この技術が臨床に応用できれば、胃癌に対する治療決定に最も有用であると考えられる。

#### 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)

[学会発表] (計 10 件)

①川端俊貴, 近赤外(1064nm)励起ラマン分光法による胃癌診断, 日本外科学会, 2010年4月8日, 名古屋

②川端俊貴, 近赤外励起ラマン分光法による胃癌診断(胃切除検体を用いて), 日本消化器外科学会, 2009年7月16日, 大阪

③川端俊貴, 近赤外(1064nm)励起ラマン分光法を用いた胃癌診断, 日本癌病態治療研究会, 2009年6月18日, 福島

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

川端 俊貴 (KAWABATA TOSHIKI)

浜松医科大学, 医学部, リサーチアシスタント

研究者番号: 90402289

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: