

# 博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

高林一浩より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号乙第 2695 号

学位申請者 : 高 林 一 浩  
                  たか ばやし かず ひろ  
                  高 林 一 浩

学位審査論文 : Diagnostic potential of near-infrared Raman spectroscopy  
for colon cancer

(ラマン分光法による大腸癌診断の可能性)

著 者 : Kazuhiro Takabayashi, Yoshihisa Saida, Toshiyuki Enomoto, Shinya Kusachi,  
Masahiro Ando, Hiro-o Hamaguchi

公 表 誌 : Toho Journal of Medicine 1 (3) : 35-40, 2015

論文内容の要旨 :

【諸言】ラマン分光法は、前処理なしに詳細な分子構造情報を得ることができることから、近年様々な医用応用を目指した研究が進んでいる。特に、近赤外励起ラマン分光法は、生体組織からの蛍光の妨害を回避することで高いS/Nのラマンスペクトルを得ることができ、有用な手法の一つと考えられる。本手法を臨床診断に応用した場合、ラマンスペクトルから得られる分子構造情報を数値化することで、迅速かつ客観的な診断につながるものと期待される。本研究では、大腸癌の診断へ向けた応用を考え、手術で摘出された生検体を近赤外ラマン分光測定し、正常・癌部位でのスペクトルの差異をとらえることを試みた。

【方法】ラマン分光測定には、1064 nm 励起ファイバープローブ型ラマン分光装置を用いた。ファイバー型の装置を用いることで、試料上で容易に測定位置を選び、ラマンスペクトルを得ることができる。サンプル位置での励起光強度は 40 mW であり、1つのスペクトルを得るのに1分の露光時間を要した。

測定試料には、大腸癌摘出手術で得られた生検体を用いた。血液の影響を回避するため、検体表面に付着した血液をふき取った上で、その他の処理をせず、摘出後2時間以内に測定を終えた。測定の際は、検体の中で癌部位、正常部位それぞれにおいてランダムに測定点を選び、ラマンスペクトルを取得した。正常部位の測定では、癌部位から1 cm 以上十分に離れ、明らかに正常と思われる位置から測定点を選んだ。55 検体に対しラマン測定を行い、癌部位 181 点、正常部位 157 点からのラマンスペクトルを得た。また、得られた測定結果は、病理診断の結果を考慮して解析を行った。

【結果・考察】 今回の 55 検体からの測定で得られた正常部位、癌部位それぞれの平均ラマンスペクトルでは、正常部位のスペクトルでは、癌部位に比べて全体的にベースラインの上昇が見られる。これは、試料からの自家蛍光によるものと考えられ、蛍光強度の違いによっても正常・癌部位の区別が得られる可能性もある。一方、ラマンバンドの比較では、正常・癌部位どちらかのみに現れるなどの顕著なマーカーバンドの存在は見られなかった。

続いて、それぞれのラマンスペクトルの差異を検出するため、正常部位のスペクトルから癌部位のスペクトルを差し引き差スペクトルを得た。タンパク質のフェニルアラニン残基に帰属される  $1003\text{ cm}^{-1}$  のバンド強度で規格化した後に差スペクトルを得た。得られたスペクトルには、 $1300$ ,  $1447$ ,  $1657\text{ cm}^{-1}$  に顕著なラマンバンドが見られ、これらは脂質に帰属されるものと考えられる。本結果は、正常部位と癌部位でタンパク質・脂質の存在量比が異なることを示唆するものである。すなわち、癌部位では、正常部位に比べて、相対的に(タンパク質量)/(脂質量)の値が大きくなることが分かる。

そこで、タンパク質のみに帰属される  $1003\text{ cm}^{-1}$  のバンド、及びタンパク質・脂質両方に帰属される  $1447\text{ cm}^{-1}$  のバンドに着目し、それぞれのバンド強度比 ( $1003\text{ cm}^{-1}$  バンド強度)/( $1447\text{ cm}^{-1}$  バンド強度)を、今回得られた全てのスペクトルにおいて算出した。この値の度数分布をとった図から、強度比の値の分布が、正常部位、癌部位の間で違いが見られることが確認された。

同様に、脂質の C=C 伸縮振動、及びタンパク質のアミド I モードに帰属される  $1657\text{ cm}^{-1}$  のバンドにも着目し、バンド強度比 ( $1657\text{ cm}^{-1}$  バンド強度)/( $1447\text{ cm}^{-1}$  バンド強度)を算出すると、こちらもその分布に有意な差が見られた。これら 2 種類のバンド強度比を用いることにより 2 次元プロットが得られる。2 つの指標を用いることで、よりはっきりと正常・癌部位の区別が可能となり、今回の測定結果では感度 91 %、特異度 91 % という結果が得られた。

【結果】 以上のように、 $1064\text{ nm}$  励起近赤外ラマン分光法を用いることによって、大腸癌摘出生検体のラマンスペクトルを容易に得ることができた。本手技が内視鏡下に応用可能となり、迅速にラマンスペクトルが得られれば、分子生物学的構造に基づいた診断や治療方針の検討が可能となると期待される。

# 1. 学位審査の要旨および担当者

|               |     |           |
|---------------|-----|-----------|
| 学位番号乙第 2695 号 | 氏 名 | 高 林 一 浩   |
| 学位審査担当者       | 主 査 | 金 子 弘 真   |
|               | 副 査 | 前 谷 容     |
|               | 副 査 | 船 橋 公 彦   |
|               | 副 査 | 五 十 嵐 良 典 |
|               | 副 査 | 岡 住 慎 一   |

## 学位審査論文の審査結果の要旨 :

ラマン分光法はレーザー光を照射したときに物質から生じる散乱光を計測しスペクトル表示するものである。分子の指紋とも呼ばれ組織の分子構造いわば組織の“成り立ち”の違いによって異なったパターンを示すことが知られている。そして、前処置なしに非侵襲的に詳細な分子構造を得ることができることから近年様々な医療応用を目指した研究が進んでいる。とくに臨床診断に応用した場合、ラマンスペクトルから得られる分子構造情報を数値化することで、迅速かつ客観的な診断につながるものと期待され、筆者らは大腸癌診断への応用をめざし手術標本を用いて正常部分と癌部のスペクトル差異をとらえることを試みた。

実験方法：ラマン分光測定には、1064 nm 励起ファイバースコープ型ラマン分光装置を用いた。ファイバー型の装置を用いることで、試料上で容易に測定位置を選び、ラマンスペクトルを得ることができる。サンプル位置での励起光強度は 40 mW であり、1つのスペクトルを得るのに1分の露光時間を要した。

測定試料には、大腸癌摘出手術で得られた生検体を用いた。血液の影響を回避するため、検体表面に付着した血液をふき取った上で、その他の処理をせず、摘出後2時間以内に測定を終えた。測定の際は、検体の中で癌部位、正常部位それぞれにおいてランダムに測定点を選び、ラマンスペクトルを取得した。正常部位の測定では、癌部位から 1 cm 以上十分に離し、明らかに正常と思われる位置から測定点を選んだ。

対象：院内倫理委員会承認（承認番号：22-67）後、2013年6月～2013年11月までに当科にて手術を施行した初発大腸癌患者のうち、事前に説明し同意が得られた 55 名。年齢中央値：77 歳。男性：女性比 = 35:20。組織型：高分化型腺癌 18 例、中分化型腺癌 31 例、低分化型腺癌 2 例、粘液癌 4 例。Stage I：10 例、II：25 例、IIIa：11 例、IIIb：7 例、IV：2 例

結果：ラマンバンドの比較では、正常・癌部位どちらかのみに見えるなどの顕著なマーカーバンドの存在は見られなかった。続いて、それぞれのラマンスペクトルの差異を検出するため、正常部位のスペクトルから癌部位のスペクトルを差し引き、その差スペクトルを得た。タンパク質のフェニルアラニン残基に帰属される  $1003\text{ cm}^{-1}$  のバンド強度で規格化した後に差スペクトルを得た結果を示す (Fig2)。

得られたスペクトルには、 $\sim 1300, 1447, 1657\text{ cm}^{-1}$  に顕著なラマンバンドが見られ、これらは脂質に帰属されるものと考えられる。本結果は、正常部位と癌部位でタンパク質・脂質の存在量が異なることを示唆するものである。すなわち、癌部位では、正常部位に比べて、相対的に(タンパク質量)/(脂質量)の値が大きくなることが分かる。

正常部位、癌部位すべてのスペクトルにおいて算出した自家蛍光強度の度数分布を示したものである。正常部位では自家蛍光強度が強い値を示す頻度が大きくなっており、蛍光強度の違いによって正常・癌部位の区別が得られる可能性がある (Fig3)。

タンパク質のみに帰属される  $1003\text{ cm}^{-1}$  バンド、およびタンパク質、脂質両方に帰属される  $1447\text{ cm}^{-1}$  のバンドに着目しそれぞれのバンド強度比を今回得られたすべてのスペクトルにおいて算出し度数分布をとった結果である。強度比の分布が正常部位、癌部位で違いが認められる。(Fig4)

脂質の C=C 伸縮運動、及びタンパク質のアミド I モードに帰属される  $1657\text{ cm}^{-1}$  のバンドにも着目し、バンド強度比を算出するとこちらもその分布に有意な差がみられた。(Fig5)

これら2種類のバンド強度比を用いるとこのような2次元プロットが得られる。ROC 曲線をもとにカットオフ値を決定し、このように直線を引いて正常、癌を区別すると感度 91%、特異度 91%という結果が得られた。(Fig6) 以上から、赤外ラマン分光法を用いることにより大腸癌の術前内視鏡診断の精度が向上する可能性がある。臨床応用により、的確な手術適応が判断できるようになれば患者 QOL の向上につながるものと考えられる。

特に治療法が大きくかわる SM 癌の深達度診断への応用ができるかが大きな課題であると考えられる。その他にも術中の断端チェック、リンパ節転移や腹膜播種の診断に応用を拡大できるか。診断精度があがれば内視鏡に組み込むことにより不必要な生検やポリペックを回避でき、的確な手術適応の判断につながる可能性があると考えている。

2月22日の公開審査会では、学位審査担当者から様々な質問があった。技術的な問題として、本研究は画像としてあるいは視覚としてとらえることができるのか。レーザーの当て方による違いが発生しないのか。理論的には癌深達度有効性、特に SM 癌の診断。分化度や腫瘍サイズによる違い。本文の波形のピーク値の判断にバイアスはないか。拡大内視鏡との違いと今後の展望など、極めて活発な質疑応答がなされたが、申請者は的確に答えた。審査会では学位に値するものと判断した。