

78. 円偏光散乱を用いた生体内がん評価技術の開発

西沢 望

北里大学 理学部 物理学科 生物物理学講座

Key words : 円偏光, 多重散乱, がん検出, 光診断

緒言

偏光を生体組織に照射すると内部の様々な構成物によって次々に散乱され偏光は徐々に解消していく。その結果として外部に出射した散乱光の偏光状態は、散乱体である構成物の大きさや密度、分布などの情報を有する [1]。このとき、偏光解消の強度が大きすぎれば完全な無偏光となり内部情報は失われ、逆に強度が弱すぎればその差異を検出することは困難となる。照射光の波長と散乱体のサイズがほぼ同等か数倍程度の領域で起こる散乱 (Mie 散乱) の領域では、この偏光解消の強度は波長と散乱体の径の比に依存する [2] ため、観察対象の散乱体に対して適切な波長を選択することで対象以外の散乱要因からの影響を受けずに目的の情報のみを抽出することができる。また、前方散乱が支配的な Mie 散乱の領域では、直線偏光は散乱による偏光面の回転に起因した偏光解消が非常に強いいため比較的容易に偏光が失われてしまう。一方、円偏光では偏光面の回転の影響を受けず、散乱による光の進行方向の変化の影響のみ受けるため適切に光学配置を選択すれば、散乱体の情報を保持したまま検出することが可能である [3, 4]。実際、2015 年に I. Meglinski らのグループは波長 639 nm の円偏光を切除したヒトの肺組織に照射し、その散乱光の偏光状態が正常組織とがん組織では大きく異なることを報告した [5]。この実験では数~10 μm 程度の細胞核が主な散乱体となり、がん化による細胞核肥大を散乱光の偏光度の差異として検出している。また、彼らは同手法をイメージングに発展させ乳管がんの同定にも成功している。これらは新たな生体観察・評価技術を提示するとともに円偏光の新たな活用法として重要な報告である。しかしながら、円偏光散乱法を用いたがん検出の実用化には、2 つの課題がある。第 1 の課題は、単一の小型光源の実現が難しいという装置上の制約と光ファイバーを介して偏光状態を維持したまま伝搬させることが難しいことから生じる空間的な制約である。このような制約のためがん検出応用に関しては体外での観察、検出に限定されてしまう。第 2 の課題は、がんの識別という用途のみであるならば NBI (Narrow Band Imaging) など他技術を凌ぐ利点は乏しいという点である。現在の NBI などの高分解能な内視鏡イメージング技術では、染色による観察などとの併用により非常に高い精度で表面のがんのみならずがん病変を検出することができる。組織表面のがんの発見という点において平面分解能が低い円偏光散乱法は利点に乏しい。

しかしながら我々はこれらの課題に対して以下のようなアプローチにより実用的な新技術になりうると考えている。第 1 の課題に関しては、研究代表者のグループでは長年スピントロニクスを基盤とした円偏光発光ダイオードの開発を進めており、磁性体を電極とした発光ダイオードである Spin-LED において室温で 100%偏極した円偏光の発光を実証している [6]。さらに、偏光極性 (右回り、左回り) の電気的な変調や円偏光の検出などの素子開発なども報告している。これらの素子はスピントロニクス素子と呼ばれ、上記の生体応用を含む多くの円偏光応用の基盤となる素子と考えられる [7]。スピントロニクス素子は半導体ベースであるため集積化、小型化が容易であり空間的な制約を受けない。次に第 2 の課題に関しては、円偏光散乱法は散乱領域が数 mm 程度となり平面分解能が低い、これは言い換えれば一定領域内のがん細胞の有無を評価できるということになる。既存の内視鏡イメージング技術では内部構造の情報を得ることは困難であるが、円偏光散乱法は波長を適切に選ぶことで深さ 3~5 mm 程度までの情報を得ることができ、また円偏光の入射角や散乱光の検出角を変化させることで散乱領域の深さを変調することができ、散乱領域内に含まれるがん組織の割合に応じて散乱光の偏光度は変化する。すなわち本手法はがん組織に対して深さ分解能を有する [8]。初期の消化器系がんは、表層である粘膜層 (1~1.5 mm) にとどまる限りは内視鏡的処置で切除できるが、進行

が進むと外科的治療などが施される。がんの進行が粘膜層に以浅なのか以深なのかを内視鏡でその場観察できれば診断における時間軽減、患者負担の軽減につながると考えられる。一方で、散乱領域内に含まれるがん組織の割合に応じて散乱光の偏光度は変化するのであれば、表面に露出していない未分化のがんの検出が可能である可能性がある。すなわちスキルス胃がんのような瀰漫性がんの検出が可能であると考えられる。

本研究では、以上に述べたとおり①がん深達度の定量的計測と②瀰漫性がんの検出という2つの課題に対してシミュレーションによる計算的手法と生体組織に対する実験的手法という2つのアプローチで検証を進めた。

方 法

1. 計算的手法 (シミュレーション)

本研究では、meridian plane MC algorithm と呼ばれる偏光に対応した光散乱モンテカルロ法を基に独自に改良したアルゴリズムを用いて多重散乱による強度、偏光状態、散乱経路を計算した。はじめに一つの粒子に円偏光を照射した際の散乱光の強度、偏光状態の散乱角依存性を計算し、それを多重散乱のアルゴリズムに導入することで組織に対する円偏光照射と散乱光検出を再現した。光学配置は図1(左)に示すように生体組織にほぼ垂直に右回り円偏光を照射し、内部で散乱した後に照射点から離れた領域から出射した散乱光の偏光状態を計算により求めた。正常組織中およびがん組織中の細胞核(散乱体)の大きさをそれぞれ $5.9\mu\text{m}$ 、 $11.0\mu\text{m}$ とした。これらは実験で使用した生体試料の実測値の平均値である。はじめに、 300nm から $1,800\text{nm}$ までの波長の光を照射し、健常組織とがん組織での円偏光度差および散乱光強度を比較した。その結果、 600nm と 950nm 付近の光が円偏光度差および散乱光強度が大きいことが示された。また、これらの波長では健常組織とがん組織に対する円偏光度の大小関係が逆となっており比較検討に非常に適していると考えられる。よって、以降の検証ではこれら2つの波長を用いた。①がん深達度計測に対しては、表面から厚さ t の領域をがん組織、それ以下の領域を健常組織とした2層構造の生体組織に対して計算を行った。②瀰漫性がん検出に対しては、健常組織中のがん細胞の割合を r として計算を行った。

2. 実験的手法

白色のハロゲンランプを分光した後に $\lambda/2$ 波長板と $\lambda/4$ 波長板を介して生成した右回り円偏光を生体試料に垂直に照射した。散乱光は鉛直軸に対して $30^\circ \sim 50^\circ$ の方向でレンズにより集光し偏光計 (PAX1000、Thorlabs) を用いて円偏光度 (Degree Of Circular Polarization : DOCP) を計測した。生体試料は水平ステージ上に設置する必要があるため、照射系および検出系は鉛直に回転ステージを立てて鉛直面内で角度を自在に変調できる構造を構築した。

がん深達度計測に関しては2層構造の生体試料を人工的に作製して用いた。正常組織はヌードマウスの大腿部から採取した筋組織から作製した。加えて、腫瘍組織は、ヒト膵臓がん細胞株 SUIT-2 をヌードマウスの皮下に移植して作製した皮下腫瘍から作製した。クライオスタットを使って、凍結した皮下腫瘍から 0.25mm の厚さの組織片を作製し、正常組織の上に目的の厚さになるように重ねた。腫瘍組織の厚さ t は 0.5mm および 1.0mm である。瀰漫性がん検出には、スキルス胃がんのモデルマウスから採取した胃検体を切り開いて用いた [9]。

また、より系統的な実験を行うために溶媒中にポリスチレンビーズを拡散させた生体模型を用いることを計画していたが、ビーズの沈殿や凝集を 방지し一定間隔で分散させることに試行錯誤を要し研究期間中に水準以上の模型を作製することができなかった。しかしながら層構造による作製を繰り返す手法を取り入れた結果、分散体を形成できたため今後は実験用に厚さを調節した模型の作製に取り組み、実験に導入する予定である。

結果および考察

1. がん深達度の定量的計測

1) 計算的手法 (シミュレーション) [10]

表面から厚さ t の領域をがん組織、それ以下の領域を健常組織とした2層構造の生体組織を想定し、その生体組織に対して円偏光を照射した際の散乱光の偏光度をモンテカルロシミュレーションにより計算した。図1にモデル(左)と結果(右)をそれぞれ示す。2層構造のモデルに対して角度 1° のほぼ垂直に右回り円偏光(DOC=+1)を照射し、照射点から1 mm離れた幅1 mm部分から射出した散乱光の偏光度を計算した。結果において横軸はがん層の厚さ、縦軸はDOCP値、カラーは散乱光の検出角(φ)である。また、 t の増加に対して増加傾向にあるものが波長600 nm、減少傾向にあるものが950 nmに対する結果である。いずれの波長においても $t=0.7$ mm程度までは線形に変化し、そこから $t=1.5$ mm程度までは変化は少ないが検出角に応じて変化量に差異が見られる。すなわち、2つの波長に対し検出角依存性を測定、比較することで $t=1.5$ mm程度までのがん層の厚さを見積もることができることがわかる。また、組織表面の反射や湾曲などの要因を排除するために2つの波長での偏光度の差分を取ると、検出角依存性が消失する一方、 $t=0.7$ mm程度において符号が反転する。緒言で述べたように粘膜層(1~1.5 mm)に対してがんの深達が以浅か深かを判断する上では十分な範囲をカバーする上、2波長の差分の符号による判断も可能であることが示された。

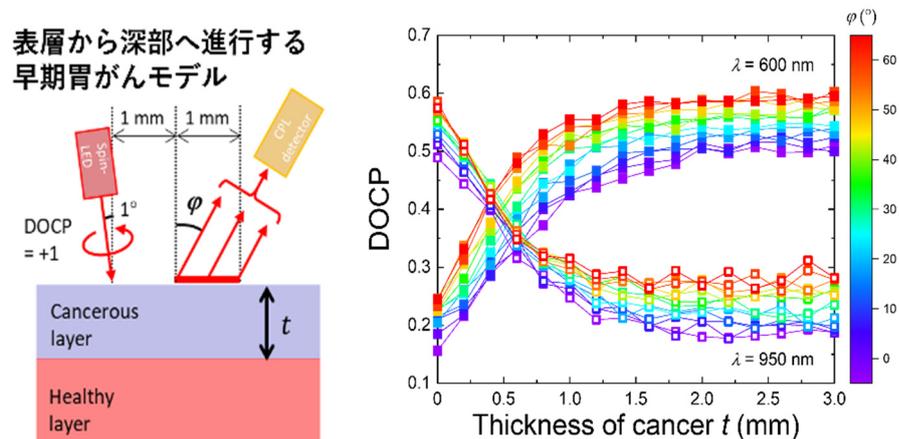


図1. 早期胃がんの深達度計測に対するシミュレーションモデル(左)と計算結果(右)

2) 実験的手法

シミュレーションで示された深達度計測機能について実験的に実証を試みた。シミュレーションと同様にほぼ垂直に右回り円偏光(DOC=+1)を照射し、その散乱光を計測した。結果を図2に示す。左に上面写真および検出角 $\varphi=30^\circ$ における測定値のカラーマップを示す。2層構造になっている試料のほぼ全域でほぼ同一の偏光度が得られおり、試料の辺縁部の湾曲の影響は見られなかった。前項のシミュレーション結果と比較したグラフを図2の右に示す。緑のプロット(右軸)が実験結果である。いずれの波長においても計算と増加および減少の傾向が一致した結果が得られた。一方で、DOCPの絶対値においては大きく負側に偏っており大きな乖離が見られた。これは表面反射した光の円偏光度(DOC=-1)が同時に検出されているためと考えられる。シミュレーションではこの表面反射光を除去するために検出点を照射点から離している。実験においても今後は空間的に表面反射光が検出に寄与しない工夫が必要であると考えられる。また、検出角依存性として $\varphi=40^\circ$ 、 50° においても実験を行ったが、系統的な結果は得られなかった。現時点では角度を変化させた際に検出器側の焦点が照射点から大きく外れてしまった可能性が考えられ、対策を検討する必要がある。

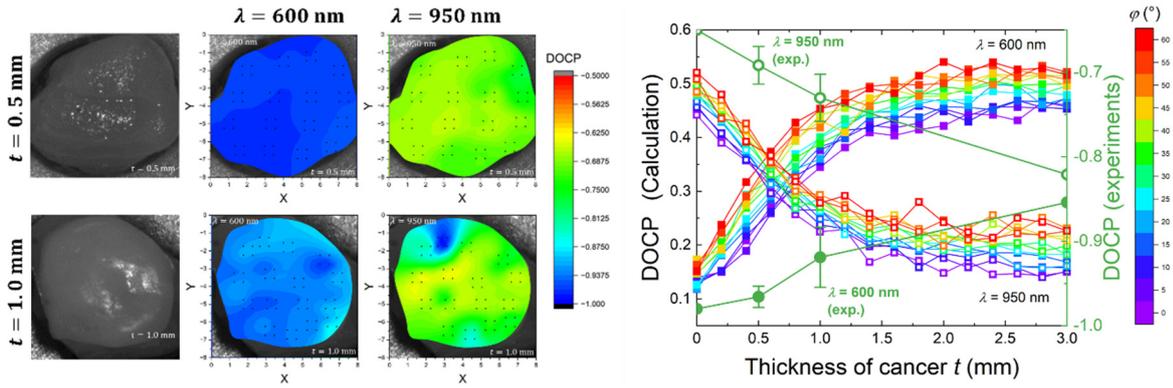


図2. 早期胃がんの深達度計測における実験結果

左図) 生体試料の上面写真および検出角 30° における測定値のカラーマップ。

$t=0.5$ mm (上段) $t=1.0$ mm (下段) に対して波長 600 nm (左)、950 nm (右) を照射した際の結果。

右図) シミュレーションとの比較。緑プロットが実験結果 (右軸)。

2. 瀰漫性がんの検出

1) 計算的手法 (シミュレーション)

組織中の細胞核のうち、がん化により肥大化した細胞核の割合を r_s とすることで図3 (左) に示す簡易的な瀰漫性がんの生体組織モデルに対してモンテカルロシミュレーションによる計算を行った。光学配置は前項と同様である。結果を図3 (右) に示す。横軸は全細胞に対するがん細胞数の比 r_s 、縦軸は DOCP 値、カラーは散乱光の検出角 (φ) である。また、 r_s の増加に対して増加傾向にあるものが波長 600 nm、減少傾向にあるものが 950 nm に対する結果である。それぞれの波長においてほぼ線形に変化していることがわかる。また、全体にわたって組織の変化に対する検出角 (φ) 依存性が見られない点が深達度計測の計算と大きく異なる点である。検出側の偏光度分解能にも大きく依存するが、0.1 (10%) の差が見られると仮定すれば、計算結果から全体の 20% のがん化を検出可能であると考えられる。さらに2つの波長の差分を計測することにより精度は向上することが予想される。初期がんの検出という点でこの分解能が十分であるかは現時点では不明である。そのため、がん細胞数の比 r_s と実際に検出が可能か否かを実験的に検証する必要がある。

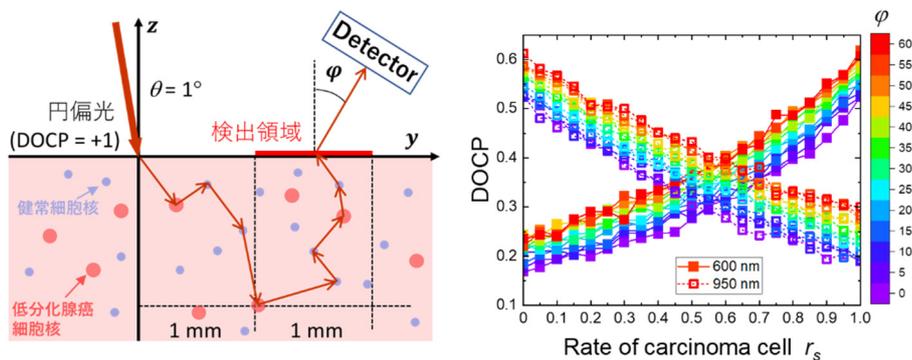


図3. 瀰漫性がんの検出に対するシミュレーションモデル (左) と計算結果 (右)

2) 実験的手法

計算により検出可能性が示されたとして、スキルス胃がんのモデルマウスから採取した胃検体を用いた実験による実証を試みた。検体は東京医科歯科大学の島田周博士、田中真二教授のご協力によりご提供いただいた。スキルス胃がんが発生していると考えられる点を含めて広い範囲に対して円偏光散乱計測を行った。測定範囲において局所的に散乱光

の円偏光度が著しく逸脱する点が見られており、この点ががん発生箇所と考えられる。より詳細な面分析、線分析測定の後、該当箇所の断面組織観察との対比を行う予定である。実験に時間を要する理由として深達度計測の生体試料と比べて切開した胃検体は凹凸が大きく測定ごとに照射と検出の両方の焦点を適宜調整する必要があるためである。照射点の調整に関しては自動で高さ調整ができるシステムを構築しており測定時間の短縮が見込まれる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、自治医科大学分子病態治療研究センターの口丸高弘准教授、東京医科歯科大学の島田周博士、田中真二教授である。

文 献

- 1) Bickel W. S., Davidson J. F., Huffman D. R., Application of polarization effects in light scattering: A new biophysical tool. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1976 Feb 73(2):486-490. PMID: PMC335934, DOI: 10.1073/pnas.73.2.486.
- 2) Bohren C. F., Huffman D. R., *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*, Wiley, New York, NY 1983, PMID: 18235596.
- 3) Bicout D., Brosseau C., Marthinez A. S., Schmitt J. M., Depolarization of multiply scattered waves by spherical diffusers: Influence of the size parameter, *Phys. Rev. E* 49(2): 1767-1770. PMID: 9961398, DOI: 10.1103/physreve.49.1767.
- 4) MacKintosh F. C., Zhu J. X., Pine D. J., Weitz D. A. Polarization memory of multiply scattered light, *Phys. Rev. B* 40(13): 9342-9345, PMID: 9991437, DOI: 10.1103/physrevb.40.9342.
- 5) Kunnen B., Macdonald C., Doronin A., Jacques S., Eccles M., Meglinski I., Application of circularly polarized light for non-invasive diagnosis of cancerous tissues and turbid tissue-like scattering media, *J. Biophotonics*, 2015 8:317-323, PMID: 25328034, DOI: 10.1002/jbio.201400104.
- 6) Nishizawa N., Nishibayashi K., Munekata H., Pure circular polarization electroluminescence at room temperature with spin-polarized light-emitting diodes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2017 114(8) 1783-1788, PMID: 28174272, DOI: 10.1073/pnas.1609839114.
- 7) Nishizawa N., Munekata H., *Lateral-Type Spin-Photonics Devices: Development and Applications*, *Micromachines*, 2021, 12(6):644, PMID: 34072992, DOI: 10.3390/mi12060644.
- 8) Nishizawa N., Hamada A., Takahashi K., Kuchimaru T., Munekata H., Monte Carlo simulation of scattered circularly polarized light in biological tissues for detection technique of abnormal tissues using spin-polarized light emitting diodes, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 2020, 59:SEEG03, DOI: 10.35848/1347-4065/ab69db.
- 9) Shimada S., Mimata A., Sekine M., Mogushi K., Akiyama Y., Fukamachi H., Jonkers J., Tanaka H., Eishi Y., Yuasa Y., Synergistic tumour suppressor activity of E-cadherin and p53 in a conditional mouse model for metastatic diffuse-type gastric cancer, *Gut*. 2012, 61(3):344-353, PMID: 21865403 DOI: 10.1136/gutjnl-2011-300050.
- 10) Nishizawa N., Kuchimaru T., Depth estimation of tumor invasion in early gastric cancer using scattering of circularly polarized light: Monte Carlo Simulation study, *J. Biophotonics*, 2022, 15(10):202200062, PMID: 35666013 DOI: 10.1002/jbio.202200062.