

論文の内容の要旨

1 申請者

防衛医科大学校 田地 一欽

2 論文題目

前立腺癌における *in vivo* 血中循環腫瘍細胞 (CTC) 検出に向けた光音響顕微鏡技術の開発

3 論文の内容の要旨 (博士：2,000 字程度：スペース込み 2191 字)

【背景および目的】

高齢化が進む本邦において、前立腺癌の罹患率は増加の一途を辿っている。多くの限局性前立腺癌は手術や放射線治療などの局所療法によりコントロールが可能で良好な予後が期待できる。一方、有転移癌では、新規のホルモン治療や抗癌剤治療などが目覚ましい進歩を遂げているものの、現時点では治癒は困難であり、その予後を改善するためには、転移を早期に予測し早期に治療介入することが重要である。

本研究では、血液中を循環する前立腺癌の循環腫瘍細胞(Circulating Tumor Cell; CTC)を検出する、前立腺癌の早期診断の新規手法とすることを目的とし、光音響技術(パルス光で光吸収体を励起し、発生した超音波を観測する画像化技術)を応用したマイクロレベルの観察手法である、光音響顕微鏡(Photoacoustic Microscope; PAM)の技術開発を行った。

これまでの報告で PAM の励起光に用いられてきた光源はその多くが単一波長レーザーや複数の単一波長レーザーの組み合わせであるが、本研究では循環腫瘍細胞を修飾する光吸収体の選択肢を広げるため、広帯域レーザー光である SC(supercontinuum) 光から、目的波長の光を抽出し、反射型光学素子で集光する反射型 PAM を新規開発し、それによる *in vivo* CTC 検出の可能性を追求した。*in vivo* CTC 検出に必要な性能として、細胞レベルの観察が可能であること、血管を描出し、血液と光音響造影剤で修飾した CTC を弁別できること、*in vivo* 観察を実現できる構造であること、CTC が観察範囲内に存在している間に観察を完了できることを想定し、段階的に性能の実証を行った。

【方法】

まず、透過型 PAM(対物レンズから励起光をサンプルに照射し、サンプルを透過してきた光音響波を観測する)を構築した。これは、構造が単純で、構成要素の配置に関する制限が少ないという利点がある。

これを用いて、ウサギ洗浄赤血球(細胞レベル)の観察、ヌードマウス耳の毛細血管の観察(血管を描出できるか)、近赤外色素で標識した前立腺癌細胞株 PC3 (以下、染色前立腺癌細胞)をヌードマウス大腿部に皮下注射して作成した皮下腫瘍のマルチカラー観察(光吸収体の弁別が可能か)を行った。

次に、反射型 PAM の構築を行った。これは超音波センサを透過型 PAM と逆の

対物レンズ側に配置し、観察対象物の表面側から励起、観測を行うことで、観察対象物の厚みによる制約を受けず、*in vivo* 観察に適用しやすいという利点がある。透過型 PAM では自動ステージで観察対象物を走査していたのに対し、反射型 PAM ではガルバノミラーシステムによる光学焦点走査を追加し、撮像速度の高速化を実現した。

反射型 PAM を用い、ウサギ洗浄赤血球と染色前立腺癌細胞との混合物のマルチカラー観察(細胞レベルで光吸収体を弁別できるか)、ヌードマウス耳の *in vivo* 連続観察(血管内を細胞レベルで画像化できる速度があるか)を行った。

最後に、染色前立腺癌細胞を模擬 CTC としてヌードマウス尾静脈の末梢から注射し、尾静脈の中枢側を反射型 PAM で連続観察し、模擬 CTC の検出が可能であるか検討した。

【結果】

透過型 PAM を用いた実験では、PAM を用いることで、細胞レベルの観察が可能であること(ウサギ洗浄赤血球の観察)、組織中の毛細血管の描出が可能であること(ヌードマウスの毛細血管の観察)、血液と光音響造影剤で修飾した腫瘍細胞を弁別できること(染色前立腺癌細胞の皮下腫瘍のマルチカラー観察)をそれぞれ実証した。

反射型 PAM を用いた実験では、これを用いて赤血球と光音響造影剤で修飾した腫瘍細胞を弁別できること(ウサギ洗浄赤血球と染色前立腺癌細胞との混合物のマルチカラー観察)、高速撮像により、毛細血管内部の血球を画像化し、その流れを描出できること(ヌードマウス耳の毛細血管の連続観察)をそれぞれ実証した。

最後に反射型 PAM を用いた模擬 CTC 検出を行った。模擬 CTC の投与開始直後は背景ノイズを超える信号は検出されなかったが、投与開始 30 秒後から、模擬 CTC 由来の光音響信号が断続的に検出され、各画像における平均信号強度が上昇し、模擬 CTC 由来の信号を検出できる能力を実証した。

【考察】

SC 光を励起光とし、反射型光学素子で集光する PAM を新規開発した。これを用いて生体の吸光係数が低い波長領域の光に吸収ピークを持つ光音響造影剤で標識した CTC を検出できる可能性を示した。SC 光を用いることにより、励起光の波長に合わず適用できなかった光吸収体を光音響造影剤の候補にできる。

今後の課題として、今回用いた模擬 CTC は細胞膜を非特異的に染色する色素を用いて体外で染色したものであるため、実際に *in vivo* CTC 検出を実現するためには、いかにして体内で癌細胞を光吸収体で修飾するか、という課題を解決する必要がある。今後は創薬等の面から、目的とする腫瘍細胞を特異的に染色できる光音響造影剤に関する研究を進める必要がある。

【結論】

細胞レベルの空間分解能で *in vivo* 観察可能な光音響顕微鏡を開発し、マウス尾静脈中を流れる血中循環腫瘍細胞 (CTC) を模擬した染色前立腺癌細胞を検出することに成功した。

4 キーワード（5 個程度）

前立腺癌 循環腫瘍細胞 光音響顕微鏡 CTC(Circulating Tumor Cell)
PAM(Photoacoustic Microscope)