

生体組織の円偏光分析による 高度病理情報取得を目指した基礎研究*

戸田晋太郎^{*1}・市川修平^{*2}・高島剛志^{*3}・森井英一^{*3}

Basic Research for Acquiring Advanced Pathological Information by Circularly Polarized Light Analysis of Biological Tissue

Shintaro TODA^{*1}, Shuhei ICHIKAWA^{*2},
Tsuyoshi TAKASHIMA^{*3} and Eiichi MORII^{*3}

^{*1}Future Technology Research Laboratory, Research & Development HQ, ULVAC, Inc., 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

^{*2}Graduate School of Engineering, The University of Osaka, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

^{*3}Graduate School of Medicine, The University of Osaka, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Non-invasive diagnosis using Circularly Polarized Light (CPL) is a promising next-generation medical technology. In this work, the visible CPL characteristics of human lung adenocarcinoma were evaluated. White CPL was incident to cultured cell samples (normal and cancerous) and sliced tissue samples (non-metastatic and metastatic cases), and the polarization state of the transmitted light was analyzed by the polarizer rotation method. As a result, the depolarization ratio and its Circular Dichroism (CD) are larger in the cancer cells (or tumor region) than in the normal ones in any samples. In addition, there is the gap of differences in the CD between the normal and tumor region in each non-metastatic and metastatic sliced tissue samples. These findings suggest that polarization parameters may be applicable to distinguishing between normal and cancerous cells (or tumor region) and to evaluating the malignancy of cancer.

1. はじめに

1.1 医療フォトリクス

日本人の死因別死者数の第一位は悪性新生物（癌）である¹⁾。癌の早期発見の重要性は言うまでもないが、病理医の人員不足や診断能力の差、および従来手法では原理的に早期発見が困難な症例の診断方法確立などが社会課題となっている。それらの課題を解決し得る次世代技術として医療フォトリクスが有望である。医療フォトリクスとは、光技術を診断や治療等の医療ニーズに応用する工学のことであり、ラマン分光²⁾や近赤外イメージング³⁾、蛍光イメージング⁴⁾等が先導的である。これら技術の特長として、非侵襲性や高空間分解能、リアルタイム性などがある。しかし、技術の成熟度や医療分野特有の障壁の高さから、その社会実装は非常に限定的である。アルバック未来技術協働研

究所では、大阪大学の医学部・工学部の研究者と共同でこれら社会課題を解決するための取り組みを開始している。

1.2 癌の悪性形質

癌疾患が致命的であるとき、癌組織は増殖過程の遺伝子異常によって発現する悪性形質を具えていることがほとんどである。癌の悪性形質とは、浸潤性（癌細胞が周囲の組織を破壊しながら移動すること）と転移性（リンパ管や血管を経由して他の組織に定着し増殖すること）のことであり、その病理像は極めて多彩である⁵⁾。悪性癌にこれらの性質を付与する特徴は多数報告されており、それらは分子的特徴と形態的特徴に大別される。例えば、癌細胞が浸潤するためには原発巣から遊離する能力（細胞運動性）、すなわち細胞接着を司る蛋白質を不活性化分子を生産する能力を有している必要がある⁶⁾。また、転移するためには標的臓器に対する接着性を有している必要があり、それはセレクチン分子（本来は白血球を捕捉する役割）との親和性で説明される⁷⁾。このような、生体分子の働きや相互作用によって獲得されている特徴を分子的特徴と呼ぶこととする。また、悪性癌の組織形状⁸⁾や細胞表面の微絨毛の密度の違い⁹⁾など、形態的特徴につ

*第85回応用物理学会秋季学術講演会にて関連成果を発表

^{*1} (株)アルバック 開発本部 未来技術研究所
(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1)

^{*2} 大阪大学大学院工学研究科
(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1)

^{*3} 大阪大学大学院医学系研究科
(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1)

いてもいくつか報告がある。悪性度の情報は治療方針や予後判定等にとって重要な意味を有するが、それを非侵襲で獲得することは通常困難であり、判定が容易なほど可視化されたときには治療が不可能な場合も多い。

1.3 生体の偏光分析

光を用いた生体の非侵襲診断手法の一つとして円偏光を用いる方法が提案されている¹⁰⁾。偏光とは、電界ベクトルがある一定の規則で振動している光のことで、特に振動の軌跡が光の進行方向に対して垂直な面内で円である状態を円偏光という。生体中で拡散反射された光は様々な光学的イベント（散乱、屈折、吸収、反射など）を経験する。そして、その情報は光の状態を規定するパラメータ（波長、強度、偏光状態）の変化として保存されているはずである（Fig.1）。特に生体という複雑系の非侵襲分析においては偏光解析が有用であると考えられる。なぜなら、分子のあるいは形態的特徴と相互作用した光の偏光状態は変化するためである。例えば、悪性癌に分子的特徴を与えている酵素、蛋白質、脂質、アミノ酸などの生体分子の多くはカイラリティすなわち円二色性を有している（円偏光の回転方向によって相互作用が異なる）。生体中の生体分子のカイラリティとその作用を調べることは挑戦的な取り組みであるが、薬学分野においては、物質のカイラリティによって薬理が異なることは広くに認識されている¹¹⁾。また、光の散乱によっても偏光状態は変化するが、その散乱特性は形態的特徴の影響を大きく受ける¹²⁾。さらに、光の波長によって生体に対する透過性や散乱確率、侵入深さが異なるので、空間的な情報と関連付けることも可能であると考えられる。したがって、生体中で拡散反射した白色光の偏光状態の変化とその波長依存性を解析すれば癌の悪性度および空間局所的分布を推定可能であると期待される。このよう

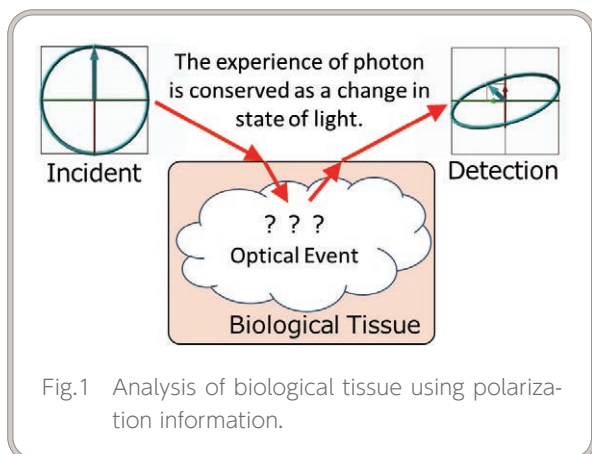


Fig.1 Analysis of biological tissue using polarization information.

に、偏光を用いた医療フォトリクスは次世代の診断技術として有望であると考えられる。しかし、既往研究によって試料や測定・解析手法は全く異なっており^{10, 13)}、結果の現象論的な解釈も不十分である。したがって、偏光の医療応用技術は全く未確立であると言える。また既往研究は癌と正常の判定のみに留まっており、それだけでは既存技術と置換するには至らないと考える。そこで本研究では、実用的な手法で高度病理情報を取得することができる偏光医療フォトリクス技術の開発を目指す。ここで、高度病理情報とは、従来の病理診断手法からは得ることができない生体組織構築や細胞学的特徴およびそれらと疾患性質との相関のことであるとする。本研究では、まずヒト肺を対象として広帯域可視円偏光透過法による測定・解析手法の検討を行った。

2. ヒト肺腺癌の可視円偏光特性

2.1 実験方法

2.1.1 試料

ヒト肺由来正常細胞BEAS-2Bおよび癌細胞A549をそれぞれガラス製シャーレに培養した。また、ヒト肺腺癌で非転移性の症例と転移性の症例の二種の検体を固定化・包埋し4 μm の薄片に切り出した。さらに、ヘマトキシリン-エオジン（Hematoxylin-Eosin, HE）染色を行い、スライドガラスとカバーガラスで封止した。Fig.2は検体薄切試料それぞれの外観である（a：非転移性、b：転移性）。いずれも組織が密な領域が腫瘍であり、それ以外の疎な領域が正常組織である。ま

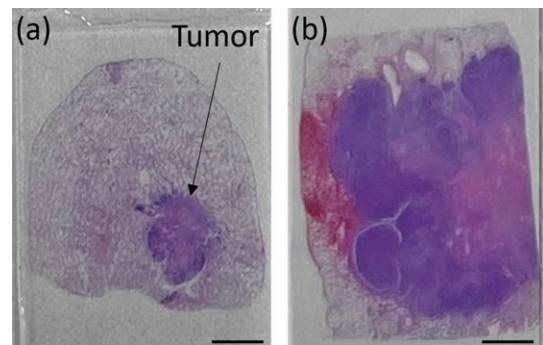
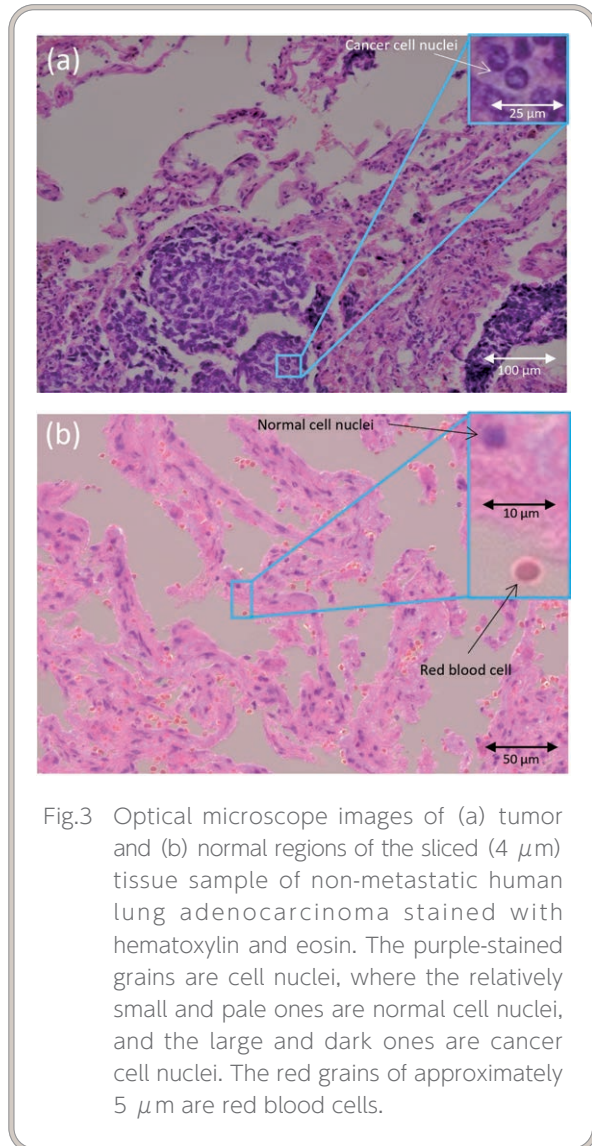


Fig.2 Appearance of the sliced (4 μm) tissue samples of (a) non-metastatic and (b) metastatic human lung adenocarcinoma stained with hematoxylin and eosin (scale bar: 5 mm). The dense (dark purple) and sparse regions are tumor and normal tissues, respectively.

た、非転移性試料の光学顕微鏡像をFig.3に示す（a：腫瘍、b：正常）。紫に染色されているドメインが細胞核であり、そのうち比較的大きく色が濃いものが癌細胞核、小さくて色が薄いものが正常細胞核、5 μm 程度の赤いドメインが赤血球である。

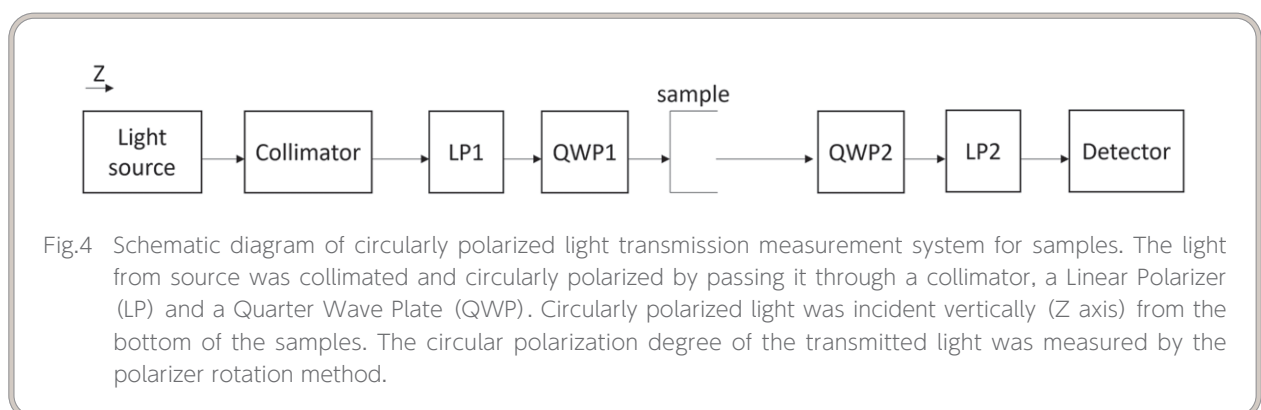
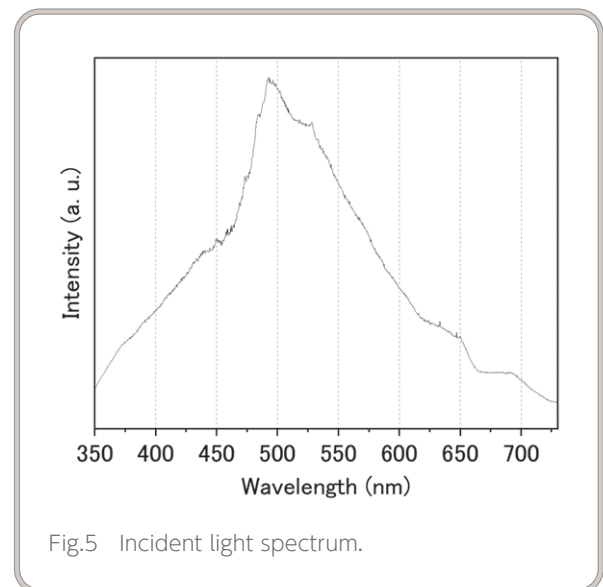


2.1.2 測定・解析方法

培養細胞と検体薄切試料それぞれに対して鉛直に左回り円偏光 (Left-handed Circularly Polarized light, LCP) あるいは右回り円偏光 (Right-handed Circularly Polarized light, RCP) を入射し、透過光の円偏光度 (Circular Polarization degree, CP) を偏光子回転法により測定した。検体薄切試料の測定においては染色外観から腫瘍領域と正常領域を判定し、それぞれの領域に円偏光を入射して測定した。Fig.4に光学系の概略図を、Fig.5に入射光源のスペクトルを示す。このとき、直線偏光子 (Linear Polarizer, LP) を360度回転させ、15度ごとに光強度を測定した。そして、LP回転角に対する光強度のプロファイルを正弦波関数でフィッティングし、各波長における円偏光度の算出に用いた。ここで、CPを

$$CP = |I_L - I_R| / (I_L + I_R) \quad (\text{式 1})$$

と定義する。 I_L と I_R はそれぞれLCPとRCPの光強度である。また、偏光解消率 (Depolarization Ratio, DR) を



$$DR = (CP_{BKG} - CP_{sample}) / CP_{BKG} \quad (\text{式 2})$$

と定義する。 CP_{BKG} と CP_{sample} はそれぞれ試料のホルダーのみ（ガラス製シャーレ+培養液あるいはカバーガラス+スライドガラス）を透過した光のCPと生体試料を透過した光のCPである。DRを用いることで生体試料由来のCPの変化を評価することが可能となる。さらに、DRの円二色性（Circular Dichroism, CD）を

$$CD = DR_L - DR_R \quad (\text{式 3})$$

と定義する。 DR_L と DR_R はそれぞれ入射光がLCPとRCPのときのDRである。これらの偏光パラメータを比較し、それぞれの試料の可視円偏光特性について評価を行った。

2.2 結果・考察

Fig.6に培養細胞試料のDR波長依存性を示す。正常細胞BEAS-2Bよりも癌細胞A549の方が偏光解消率が

大きく、それは波長が長いほど顕著であることが分かる。これは試料に含まれる散乱体（主に細胞核）の大

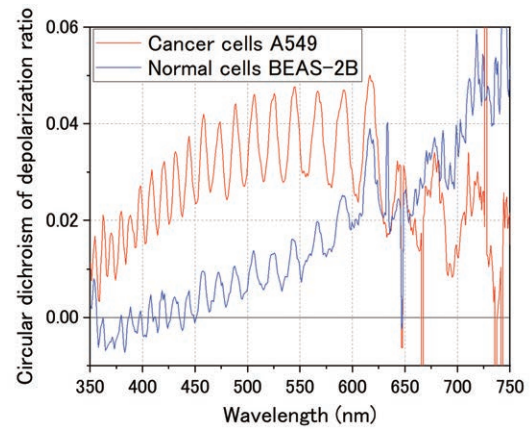


Fig.7 Wavelength dependence in circular dichroism of depolarization ratio of normal and cancerous cultured cells.

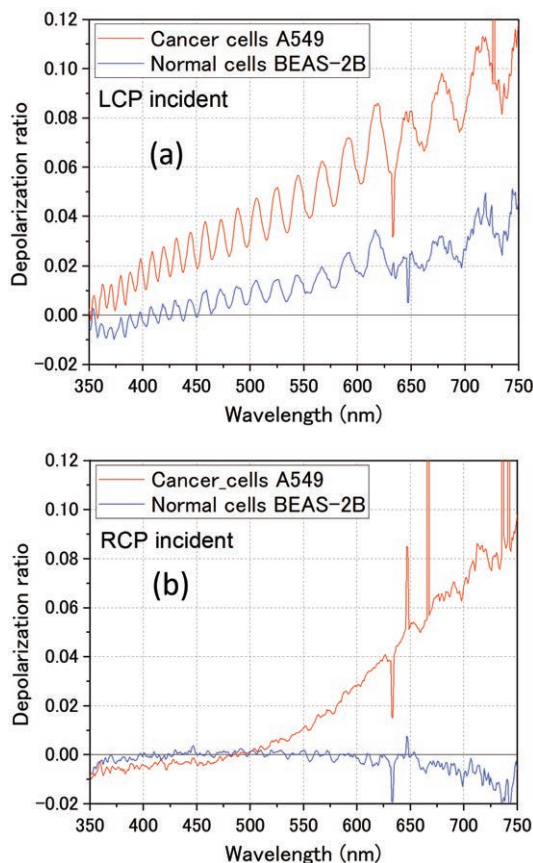


Fig.6 Wavelength dependence in depolarization ratio of normal and cancerous cultured cells measured with (a) LCP and (b) RCP incident.

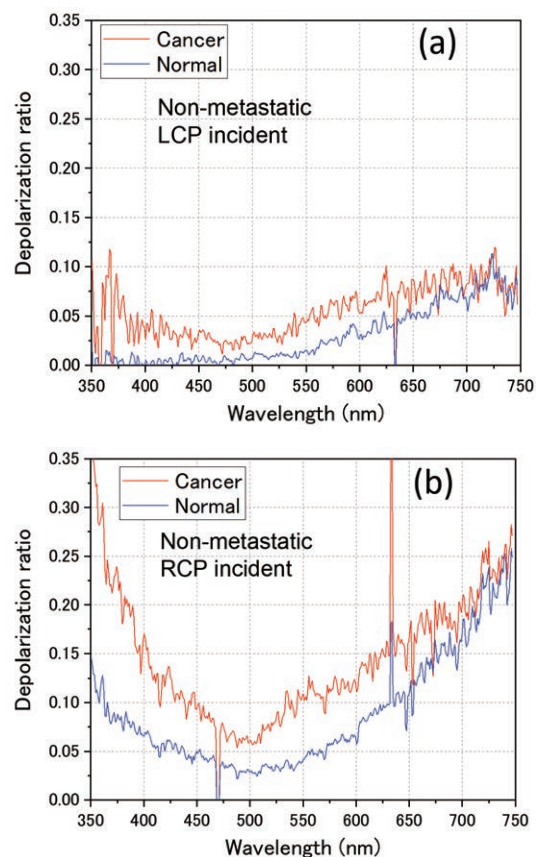


Fig.8 Wavelength dependence in depolarization ratio of non-metastatic sliced tissue sample measured with (a) LCP and (b) RCP incident.

きさの違いによると推察される¹²⁾。一般的に、細胞核のサイズや異形性は正常細胞よりも癌細胞の方が大きく、本実験の培養細胞試料においても同様の傾向にある。また、CDについては波長350-650 nmの範囲では癌細胞の方が大きくなっている (Fig.7)。その原因として生体分子のキラリティの偏りの差などが考えられるが、今後詳細な調査が必要である。

Fig.8, Fig.9はそれぞれ、非転移性症例と転移性症例の検体薄切試料のDR波長依存性である。測定波長域において腫瘍領域の方がDRが大きいことが分かる。また、Fig.10のCDにおいても同様の傾向である。よって、これら偏光パラメータから腫瘍領域と正常領域の判定可能性が示唆された。しかし、一見するとこれらの結果において転移の有無で傾向に差は無いように思われる。そこで、腫瘍領域と正常領域とのCDの差に着目すると、定量性に課題はあるが、転移性の検体試料の方が差が大きい傾向にあった (Fig.11)。

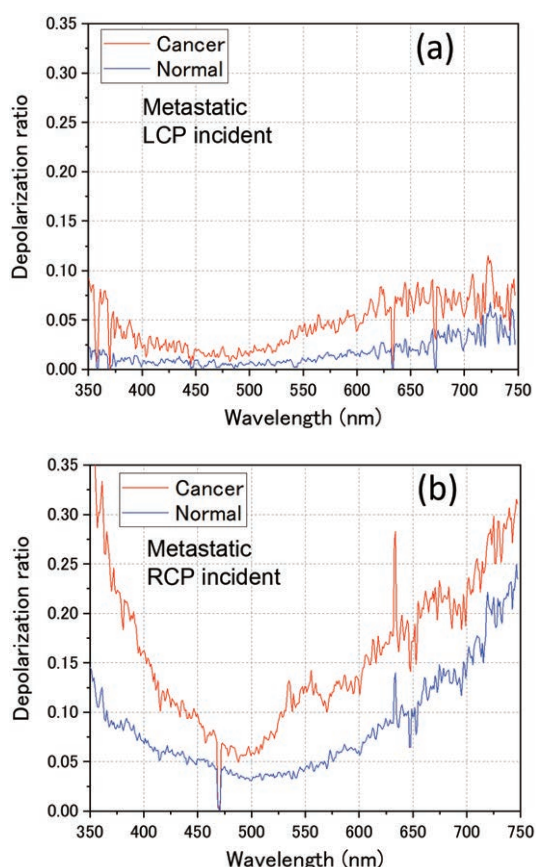


Fig.9 Wavelength dependence in depolarization ratio of metastatic sliced tissue sample measured with (a) LCP and (b) RCP incident.

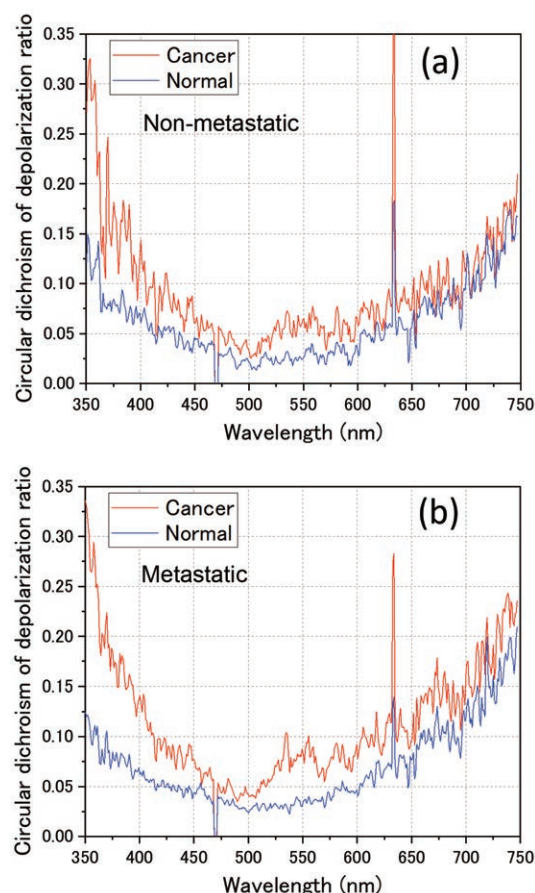


Fig.10 Wavelength dependence in circular dichroism of depolarization ratio of (a) non-metastatic and (b) metastatic sliced tissue samples.

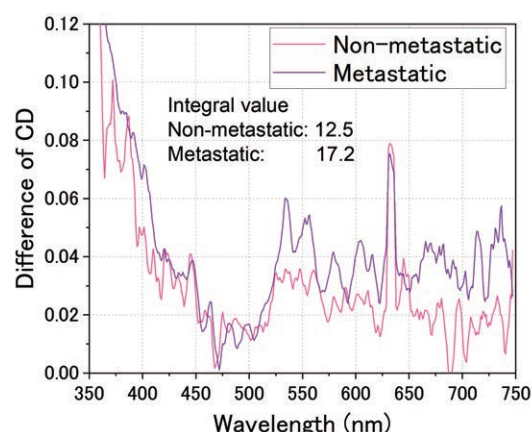


Fig.11 Wavelength dependence in the difference of circular dichroism of depolarization ratio between tumor and normal regions of non-metastatic and metastatic sliced tissue samples.

3. まとめと今後の展望

ヒト肺腺癌の広帯域可視円偏光特性に関して調査を行った。その結果、偏光解消率や円二色性パラメータを正常細胞と癌細胞の判定および癌の悪性度評価へ応用することができる可能性が示唆された。一方、偏光パラメータ変化の素過程の理解等は不十分であり、検証症例も少ないのが現状である。よって本研究では、今後継続して既知症例の検体の円偏光特性を評価解析し、生体の円偏光特性と高度病理情報との相関を体系化していく。しかし、今回用いた透過法による測定においては、生体試料由来の光学的イベントを経験した光の検出光に占める割合は非常に小さいと考えられ、偏光パラメータ変化量の定量的評価の信頼性向上には課題がある。さらに、内視鏡応用等の臨床シチュエーションの場合、透過法は実用的ではない。よって、拡散反射法による測定が有効であると考えられ、既に検証を開始している。また、さらなる取り組みとして、ファントム実験や電磁界シミュレーションを用いて生体試料の円偏光特性を説明可能な物理モデルを構築することによって偏光パラメータ変化のメカニズムを明らかにしていく。最終的には、最適な測定条件（利用波長、偏光度、光強度、検出角度など）と解析パラメータ、およびその解析結果から高度病理情報を推定するアルゴリズムを提案することを目指す。

ところで、ヒト癌の円偏光特性についての調査は工学的にも医学的にも新たな取り組みである。円偏光の応用可能性は医療フォトンクスだけでなく高情報密度通信¹⁴⁾や新原理記憶媒体¹⁵⁾、3Dディスプレイ¹⁶⁾など多岐にわたるが、その社会実装は限定的である。情報通信やコンピューティングの分野が宿命的に抱えている社会課題を革新的に解決する潜在性が唱えられながらも、その技術開発が学術研究の域から脱する気配がないのは2つの要因があると考えられる。一つは実用的な円偏光微細素子が存在しないことである。本稿では扱わないが、アルバック未来技術協働研究所では円偏光微細素子の研究にも同時に取り組んでいる。そしてもう一つは、現代社会では光のスカラー的な自由度（波長と強度）を情報として扱う工学が既に社会基盤となっており、あまりにも多くのシステムがこれに依存しているため、偏光状態の自由度を情報として扱う工学に目先の用途が乏しいことである。用途が乏しければ、つまり社会の要請が無ければデバイス開発は発展せず、実用的なデバイスが無ければ応用技術も発展しない。したがって、既存の技術と組み合わせることが可能で、かつ喫緊の社会的要請に応え得る円偏光応用技術開発の必要性に思い至った。その取り組みの

一つが本研究である。これらの研究が、高付加価値化されたフォトンがあらゆる場面で活躍する未来社会到来のきっかけとなることを願い、結びとする。

文献

- 1) 厚生労働省：“人口動態統計月報年計（2020）”。
- 2) K. Mizushima, Y. Kumamoto, S. Tamura, M. Yamanaka, K. Mochizuki, Menglu Li, S. Egoshi, K. Dodo, Y. Harada, N. I. Smith, M. Sodeoka, H. Tanaka, K. Fujita: *Sci. Adv.* **10**, eadn0110 (2024).
- 3) T. Takamatsu, R. Fukushima, K. Sato, M. Umezawa, H. Yokota, K. Soga, A. Hernandez-Guedes, G. M. Callico, H. Takemura: *Optics Express*, **32**, 16090 (2024).
- 4) Z. Long, J. Gan, X. Wang, X. Jiang, Y. Zou, S. Huang, X. Zhang, Y. Wei: *European Polymer Journal* **222**, 113608 (2025).
- 5) 廣橋説雄：第119回日本医学会シンポジウム記録集, p6, (2001).
- 6) 明渡均, 向井睦子：化学と生物, **36**, 565 (1998).
- 7) M. Kitano, Y. Kizuka, T. Sobajima, M. Nakano, K. Nakajima, R. Misaki, S. Itoyama, Y. Harada, A. Harada, E. Miyoshi, N. Taniguchi: *J. Biol. Chem.*, **296** 100354 (2021).
- 8) Novikov N. M., Zolotaryova S. Y., Gautreau A. M., Denisov E. V.: *Br. J. Cancer*, **124**, 102 (2021).
- 9) 浜田淳一, 任進, 細川真澄男：電子顕微鏡, **31**, 81 (1996).
- 10) N. Nishizawa, Bassam Al-Qadi, T. Kuchimaru: *J. Biophotonics*, **14**, e202000380 (2021).
- 11) 濱島義隆, 山下賢二：化学と教育, **70**, 258 (2022).
- 12) B. Kunnen, C. Macdonald, A. Doronin, S. Jacques, M. Eccles, I. Meglinski: *J. Biophotonics*, **8**, 317 (2015).
- 13) D. Ivanov, V. Dremin, E. Borisova, A. Bykov, T. Novikova, I. Meglinski, R. Ossikovski: *Biomed. Opt. Express*, **12**, 4560 (2021).
- 14) Jacob F. Sherson, Hanna Krauter, Rasmus K. Olsson, Brian Julsgaard, Klemens Hammerer, Ignacio Cirac, Eugene S. Polzik, *Nature* **443**, 557 (2006).
- 15) C. D. Stanciu, F. Hansteen, A. V. Kimel, A. Kirilyuk, A. Tsukamoto, A. Itoh, Th. Rasing: *Phys. Rev. Lett.* **99**, 047601 (2007).
- 16) M. Ahmad, J. Li, H. Ma, J. Liu: *Displays* **85** 102848 (2024).