

5-ALA 誘導 PpIX 蛍光計測における術中脳腫瘍同定 精度向上に関する研究

56805 平川 洋輔
指導教員 佐久間 一郎教授

5-Aminolevulinic Acid(5-ALA), a tumor-marker with fluorescence, is used for assisting in tra-operative detection of brain tumor and its boundaries. The observation of fluorescence is subjective, non-quantitative now. In this paper, technique to develop precise measurement system that detects fluorescence of local portion and tumor identification method to judge whether it is tumor portion are described. The device for detection that joined the cylinder with slit to the optical fiber was designed, made for improvement of the spatial resolution of the device that detects local portion, and the evaluation experiment was conducted. Consequently, the spatial resolution of the sensing device has improved. The tumor identification method showed a useful result for the quantitative evaluation of a tumor tissue by analyzing the spectrum data acquired from the tumor sample.

Key words : Aminolevulinic Acid, ProtoporphyrinIX, Fluorescence, Brain Tumor

1. 緒 言

悪性脳腫瘍は浸潤性を持ち、正常組織との境界が不明瞭であり、摘出手術において問題となる。神経組織を過度に切除することは脳機能を損失に繋がる。また、腫瘍の除去率と患者の予後には密接な関係があるため、脳腫瘍の除去手術においては必要十分な領域のみの選択的な治療が理想である。そのため、腫瘍細胞に選択的に集積し、蛍光色素ProtoporphyrinIX(PpIX)の前駆体となる、5-Aminolevulinic Acid(5-ALA)を利用して脳腫瘍を正常組織と識別を行う試みがなされている(参考文献)。現在は主観的、非定量的な蛍光観察を行なう段階であるため、定量性や再現性のある精密な計測システム、腫瘍同定方法が必要となる。これにより、腫瘍の取り残しを防ぎ、同時に過度の侵襲を避ける事を目的とする。

2. 目 的

以上の背景に基づき、本研究は「5-ALA 誘導 PpIX 蛍光計測における術中脳腫瘍同定精度向上」を目的とする。具体的には

1. 光ファイバをセンサとして局所的に蛍光発生部位を計測する光学デバイス
2. 取得した蛍光情報を用いた組織診断情報抽出のための解析方法(腫瘍同定法)の開発、およびその為の技術的な検討を行った。

3. システム構成

全体のシステム概観を Fig.1 に示す。レーザーダイオード 405[nm]を励起光源とし、光ファイバで蛍光を収集し、小型分光光度計で検知する。

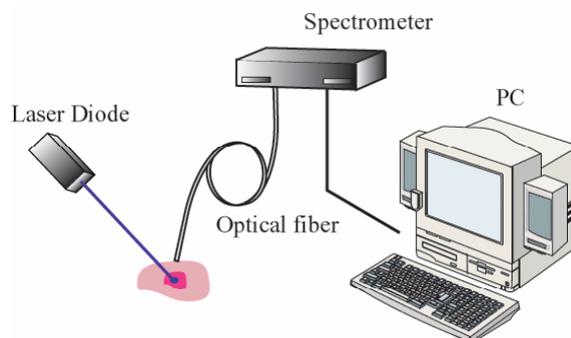


Fig.1 Overview of the fluorescence-pickup system with an optical fiber

3.1. 手持ち型デバイス

(a) 要求仕様

手術で切除可能領域以上の分解能として、2[mm]以上の分解能を有し、蛍光を安定して取得出来る。

(b) 設計概要

蛍光を安定して取得するため位置合わせの簡単な接触式にし、円筒にスリットを入れそこから励起する事によりファイバに入る蛍光を限定した。

3.2. 組織診断情報抽出

(a) 安定したデータ取得

先行研究 1)で製作された摘出脳腫瘍用計測装置の安定性を高めるために、プレパラートを加工し励起面積が一定となるようにした。この装置を用い、波長 405[nm], 15[mW](CW)の青紫色半導体レーザ (φ5[mm], コリメートビーム) による励起光を照射し、光ファイバと小型分光器を用いて蛍光スペクトルを測定した。

(b) 病理診断との相関性

病理診断との相関性を高めため、以前は丸ごと提出していた組織を、蛍光を取得した直径約 3[mm]の組織のみとしたまた、統一性を持たせる為、病理診断は執刀医が HE と MIB の両面から診断した。

4. 手持ち型デバイスの評価

4.1 方法

微動(0.02mm)が可能なメカニカルステージ上に試料を設置し、励起用レーザ(ビーム径φ1以下[mm])と光ファイバを 55° の角度をもって進行方向と 90° の角度で試料上の一点に向けて照射するように配置し、試料表面の境界をまたぐように 0.1[mm]ステップで直線的に走査した。また、XY stage 上に角度を 0~360° 変化させられる回転ステージを設置し、0~40° に 5° 刻みでステージを回転させて計測した。計測のイメージ図を Fig.2 に示す。計測には理想的な状態として白黒シートと、生体の散乱を模したファントムを用いた。Savitzky の方法を用いて 2 次微分を算出し、信号の立ち上がり飽和し始める点の幅をプローブの空間分解能とした。また、安定性の評価の為計器を手で垂直に持ち実験を行った。

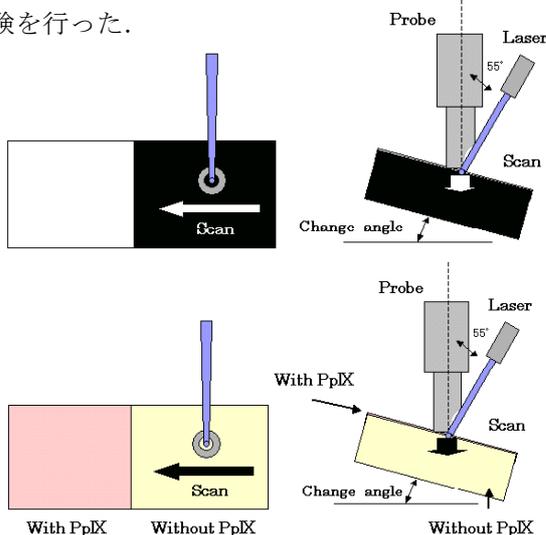


Fig.2 Evaluation experiment method of influence that change in angle gives spatial resolution

4.2 結果

分解能検査の結果を Tabl.1, 安定性テストの結果を Table.2 に示す。

Table.1 The gradient of sample against the horizontal direction and spatial resolution

Monochrome paper	angle[°]	0	5	10	15	20
	resolution[mm]	0.7	0.6	0.6	0.6	0.6
	angle[°]	25	30	35	40	
Phantom	resolution[mm]	0.6	0.6	0.6	0.6	
	angle[°]	0	5	10	15	20
	resolution[mm]	0.8	0.7	0.9	0.8	0.7
	angle[°]	25	30	35	40	
	resolution[mm]	0.7	0.7	0.8	1.1	

Table.2 Signal intensity and standard deviation in the wavelength 465[nm], 531[nm] and 636[nm]

	465nm[a.u.]	531nm[a.u.]	636nm[a.u.]
Dark #1	11303	6784	33466
Dark #2	11448	6790	36971
Lighting #1	11268	6706	35587
Lighting #2	10569	6944	34358
average	11147	6806	35096
stdev	393.09	99.48	1522.3
stdev/average	0.03526	0.01462	0.04339

4.3 考察

理想状態でもファントムでも 2[mm]以下の分解能を持つ事が分り、更に傾斜に対してもそれほど分解能が低下する事なくデータを取得できる事が分った。安定性実験の結果、光にスリットを向けなければ暗室と変わらない安定したデータを取得できる事が分った。

5. 蛍光スペクトル情報からの組織診断

5.1 取得した組織情報の解析方法

脳腫瘍組織から得られた蛍光スペクトルの解析を行い、特徴パラメータを抽出した。このパラメータを用いて多変量解析を行い、腫瘍・非腫瘍の判別の統計的方法論を検討した。全ての基準は病理診断としている。Fig.3 に全体的なアルゴリズムを示す。

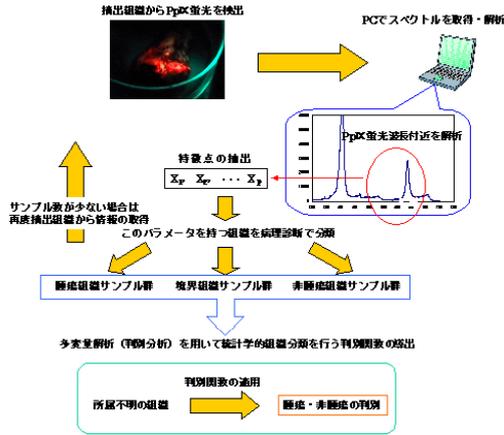


Fig.3 Algorithm to extract feature of 5-ALA-induced fluorescence

5-2 病理診断結果による蛍光情報の郡分け

病理診断結果による群分けの結果を以下に示す。Fig.4 は腫瘍, Fig.5 は境界, Fig.6 は非腫瘍である。全 38 症例中 9 症例のグレード 4 の患者のみを集めて群分けを行った。組織は全部で 72 組織で、腫瘍組織が 22 個、境界組織が 26 個、非腫瘍組織が 24 個である。腫瘍組織で PpIX の集積が高く、非腫瘍組織では低いことが判る。境界組織では腫瘍、非腫瘍両方の特徴が見られる。中にはピーク波長がシフトしている組織も見られる。

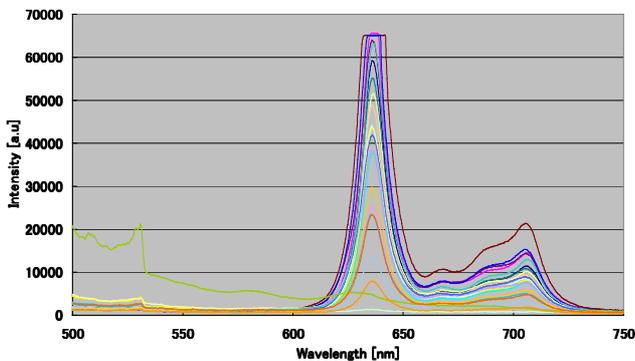


Fig.4 Spectra from tumor tissues

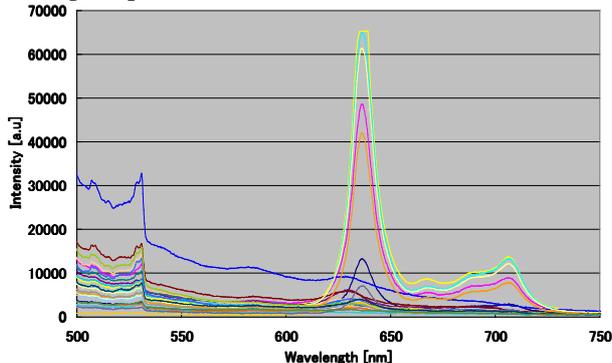


Fig.5 Spectra from margin tissues

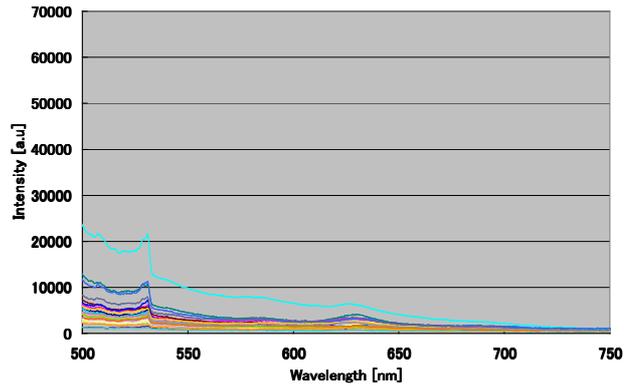


Fig.6 Spectra from non-tumor tissues

5-3 MRI 診断による判別結果

MRI 診断による判別結果と病理診断の比較を Table.3 に示す。

Table.3 Result of MRI

fact	discriminated				total
	tumor	margin	non-tumor		
tumor [%]	20 [90.9]	2 [9.1]	0 [0.0]	22 [100.0]	
margin [%]	18 [69.2]	7 [26.9]	1 [3.85]	26 [100.0]	
non-tumor [%]	6 [25.0]	5 [20.8]	13 [54.2]	24 [100.0]	

Table.3 を見ると、MRI は安全サイドへ判別する傾向がある事がわかる。境界組織の判別が特に悪く、全体の正判別率は正答数 40 ÷ 全体の数 72 で 55.6% となっている。腫瘍を境界と判断、または境界を腫瘍と判断するエラーは安全性の観点からみて問題が無いと考えられるが、非腫瘍を腫瘍や境界と判断するエラーは取りすぎの危険が生じる為十分な検討が必要であろう。

5-3 判別分析による 3 群の判別結果

5 つのパラメータは、 X_1 : 蛍光ピーク強度 [a.u.], X_2 : 蛍光強度ピーク波長 [nm], X_3 : 比: 波長 636 [nm] の強度 ÷ 波長 628 [nm] の強度 (波形の形状を表す), X_4 : 波長 531 [nm] の強度 [a.u.] (組織の反射率を表す), X_5 : 波長 580 [nm] 近辺のピーク強度 [a.u.] (自家蛍光) である。この 5 個のパラメータによる判別の結果を Table.4 に示す。判別分析の結果、正判別率は 81.9% となり、MRI 診断に比べて 26.3% の向上を果たすことが出来た。判別分析の群分けされた結果を見ると、境界組織に対する判別が MRI よりも大きく優れていることがわかる。

Table.4 Result of discrimination using $X_1, X_2,$

X_3 , X_4 and X_5

fact	discriminated			
	tumor	margin	non-tumor	total
tumor [%]	20 [90.9]	2 [9.1]	0 [0.0]	22 [100.0]
margin [%]	5 [19.2]	18 [69.2]	3 [11.5]	26 [100.0]
non-tumor [%]	0 [0.0]	3 [12.5]	21 [87.5]	24 [100.0]

5-3 3群分け時の各パラメータの評価

本研究では変数増減法によって各パラメータの判別に与える影響を評価した。変数増減法とは、独立変数の候補から、予測や判別に有用な順に採用するための方法である。まず、最も有用な独立変数を1個採用する。次の段階では、まだ採用されていない独立変数のうちで最も有用な独立変数を1個採用する。なお、最初のほうで採用された独立変数も、後で採用された変数との関係で不要になる場合があるので、新たな独立変数の採用の前に、すでに採用された変数を取除くかどうかをチェックする。独立変数の採用と除去は偏 F 値による検定で決定される。偏 F 値がある基準値 (F_{in}) より大きければ採用、別の基準 (F_{out}) より小さければ除去される。また、偏 F 値から求められる有意確率 P_{in} , P_{out} によっても同様に変数選択を行うことができる。2) 上限確率 P_{in} , $P_{out}=0.05$, P_{in} , $P_{out}=0.2$ の場合の結果を Table.5 に示す。

Table. 5 Effect of additional parameter in discrimination

turn	$P_{in}, P_{out}=0.05$		$P_{in}, P_{out}=0.2$	
	parameter	P	parameter	P
1	X2	2E-12	X2	2E-10
2	X4	0.0002	X4	0.0001
3	X1	1E-04	X1	0.1399
4	X5	0.0211	X5	0.0194
5	x	x	X3	0.1886

Table.5 より全体の判別において有効な変数は X_2 , X_4 , X_1 , X_5 , X_3 の順である事が分る。PpIXのピーク強度である X_1 が最も有効な判別変数にならなかった理由として、PpIXの蛍光強度の分散が大きいため、群間のマハラノビスの距離(判別効率)が短くなってしまったことが原因と考えられる。

5-5 判別分析による2群の判別結果

取る、取らないの判断から境界群を腫瘍群に入れ、全体を腫瘍群と非腫瘍群の2群に分け判別

分析を行った。MRI 診断結果と判別分析結果 Table.6, 変数増減法による結果 Table. 7 に示す。

Table.6 Result of MRI and discrimination

fact	MRI		
	tumor	non-tumor	total
tumor	47 [97.9]	1[2.1]	48 [100.0]
non-tumor	11 [45.8]	13 [54.2]	24 [100.0]
fact	discriminated		
	tumor	non-tumor	total
tumor	45 [93.8]	3[6.3]	48 [100.0]
non-tumor	3 [12.5]	21 [87.5]	24 [100.0]

Table.7 Result of discrimination using X_1 , X_2 , X_3 , X_4 and X_5

turn	$P_{in}, P_{out}=0.05\sim 0.5$		
	parameter	F	P
1	X2	144.164	1.638E-17
2	X4	20.0221	2.991E-05
3	X5	8.47683	0.0048603

Table.6 より、MRI 診断の正判別率 83.3%、よりも判別分析により 8.4%向上して 91.7%となったことが判る。また、この判別分析は MRI に比べ非腫瘍群の判別に優れていることが判る。また、Table.7 より、実際の判別に影響しているのは X_2 , X_4 , X_5 のみであり二群の判別に最も有意なのは X_2 (ピーク波長である)。

5. 結言

5-ALA 誘導 PpIX 蛍光計測における術中脳腫瘍同定精度向上に関する研究を行った。

- 開発した手持ち型デバイスは要求仕様を十分満たす分解能を有し、安定してデータを取得できるものであった。
- PpIX の特徴変数を用いた判別では、3 群の場合も 2 群の場合も、ピーク波長が最も有意であり、次に有意なのは波長 531[nm] の強度であった。

参考文献

- 吉田大樹: 東京大学大学院新領域創成科学研究科修士論文, (2005).
- <http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/lecture/>