

学 位 論 文 題 名

A study of analytical methods for the purpose of quantification and imaging of substance in vivo

（生体深部成分の定量・イメージングを目的とした分析手法に関する研究）

学位論文内容の要旨

(1) 概要

本研究は、世界的に急速に進展する高齢化により、治療から予防に転換する社会システムの変化に対し、その必要条件である生体成分の非侵襲計測方法のインテグレーションプロセスのフレームワーク化を検討した上で、具体的な生体物質においてそのプロセスを確認した。具体的には、米国で第一の失明原因である加齢黄斑変性症に着目し、その予防に重要である一方で、これまで実現していなかったヒト眼底上のルテインとゼアキサンチンの非侵襲計測・イメージングを研究を行った。研究では、ルテイン、ゼアキサンチンの存在する視細胞をヒトのアイバンクアイから単離し、光学的アプローチを比較検討した。さらに、波長可変レーザーによる吸収・蛍光計測を行い、視細胞上の光学特性を確認したことに加え、共焦点レーザーシステムを構築してイメージングに成功した。また、HPLC との定量結果を比較することで、ルテイン、ゼアキサンチンの混合比率と定量可能性を検証し、視細胞上のルテイン、ゼアキサンチン混合比率の計測の可能性について確認した。

(2) 背景

加齢黄斑変性症 (AMD) は、眼底中央にあたる黄斑の網膜視細胞が障害される疾患であり、50 歳以上の高齢者に生じる。AMD は米国で失明原因の第一位であることから、近年治療に向けた研究が進められてきた。AMD の根本要因は、網膜および網膜上皮細胞に対する主に青色光による光酸化ストレスによる炎症であると考えられている。網膜中心窩にはカロテノイドを含む黄斑色素があり、青色光の吸収効果や抗酸化作用によって網膜上皮細胞下の炎症を防止する。この黄斑色素のカロテノイドが、ルテイン、ゼアキサンチンによって構成されている。AMD 発症者と健常者を比較すると、優位に AMD 発症者のカロテノイド色素密度が低い。このことから、カロテノイドの黄斑色素密度と、AMD の発生に強い相関があると考えられている。そのため、黄斑色素密度の非侵襲計測は、AMD の将来の発症リスクの把握を可能にすることから期待されているものの、現時点では実現していない。AMD の根本的な治療技術が確立されていない現状では、黄斑色素の分布や濃度を可視化するニーズは、臨床の現場からも極めて高い。

(3) 現在の技術と課題

現時点で、眼底を非侵襲計測する方法として、光トポグラフィー、オプティカルコヒーレンストモグラフィー (OCT)、眼底造影検査、眼底自発蛍光法などがある。ただし、これらは AMD 発症後の病変構造を可視化するためのものであって、病変が発生以前のルテイン・ゼアキサンチンの成分密度を計測するものではない。黄斑色素密度を直接計測する方法には、吸収分光、蛍光分光、共鳴ラマン分光、CARS 分光分等による方法がある。そのうち蛍光計測は、網膜上皮細胞上のリポフスチンの自発蛍光を測定しているものであり、網膜視神経細胞に存在するルテイン・ゼアキサンチンを直接する方法は確立されていない。その理由として以下が挙げられる。リポフスチンの自発蛍光の励起に利用される 488nm の光が、ルテイン・ゼアキサンチンなどのカロテノイドの吸収帯と重

なっており、さらに、リポフスチンの吸収および自発蛍光量は、ルテイン・ゼアキサンチンよりも多いため、直接眼底に光を照射する方法では、リポフスチンの吸収、蛍光によって妨げられ計測することができない。なお、リポフスチンの分布する網膜上皮細胞は、眼の表面に対しては、ルテイン、ゼアキサンチンの存在する網膜神経細胞よりも下層にあることを利用して、現在では、リポフスチンの自発蛍光量からこれらの密度を間接的に類推する方法がとられている。しかしながら、リポフスチンは、その量や分布に個人差が大きく、加齢によって増加する物質であり網膜上皮細胞上において密度も一定ではない。それに加え、吸収、蛍光の波長領域も重複し、かつその量がカロテノイドに対して大きいため、正確なルテイン・ゼアキサンチンは類推できない。

また、最近の研究ではルテインとゼアキサンチンの網膜細胞上での密度分布が異なることが分かっており、機能面でも異なることが分かっているため、直接計測による分離分析が求められる。

(4) 検討アプローチ

このような背景を踏まえて、本研究では事例研究により一般化したフレームワークを用いて、上部層、対象層、下部層と論点を整理した上で抽出し、それぞれに対して、光学的(光学原理の適用の選択)、工学的(計測系の設計と制御)、情報学的(多変量解析方法のスペクトル分析への展開)な方法を検証し、ルテイン、ゼアキサンチンの生体内での非侵襲計測に向けた検討を行った。具体的には、波長可変レーザーを用いた蛍光分光法を用いて、ルテイン・ゼアキサンチンの分離・定量計測をスペクトルと多変量解析により実施した。さらに共焦点レーザー系と組み合わせることで深さ方向の構造と成分の計測と補正を行い下部層のリポフスチンの影響を受けないことを狙った計測システムを構築した。

(5) 実験結果

視神経細胞を単離した試料を用いて、視神経細胞の吸収と蛍光の特性を確認し、極大吸収波長と、蛍光量の極大波長が確認できた。また、ルテインとゼアキサンチンの混合溶液から類推した存在比を、HPLCでの計測結果と比較したところ、関連性を確認した(存在比、ルテイン:ゼアキサンチン=4.06:5.94、スペクトルからの類推比率 3.78:6.22)。さらに、共焦点レーザー系を用いて、眼底の構造を計測した結果を用いて、蛍光測定的位置を制御する方法により、眼底のルテイン、ゼアキサンチンのイメージングが可能であることを確認した

(6) 結論と議論

今回の研究では、加齢黄斑変性症を取り上げることで、生体深部の成分計測にアプローチするためのインテグレーションプロセスの有効性を確認した。また、その検討の結論として、波長可変レーザーと共焦点レーザー系を統合することにより、生体内構造の計測結果を入力値として生体成分計測のシステムを制御することの有用性を確認できた。

今後は、加齢黄斑変性症の予防診断システムとして社会に上梓する上で必須となる測定波長の絞り込みなどを情報科学の知見を取り入れることで分析を進め、サンプルを増やすことにより早期の実現を目指す。また、今回のインテグレーションモデルを、血糖値の非破壊計測などに適用することで、モデルや手法の検証とブラッシュアップ行う。

学位論文審査の要旨

主査	教授	鈴木	恵二
副査	教授	栗原	正仁
副査	特任教授	古川	正志
副査	教授	小野	哲雄
副査	准教授	川村	秀憲

学位論文題名

A study of analytical methods for the purpose of quantification and imaging of substance in vivo

(生体深部成分の定量・イメージングを目的とした分析手法に関する研究)

本論文は、生体の深部成分の計測する方法のフレームワークを提示した上で、その具体的事例として波長可変レーザーを用いた光学的方法と吸収スペクトルを用いた回帰分析方法を用い、加齢黄斑変性症に因果関係があるとされているヒト眼底のカロテノイドの非侵襲成分計測とイメージング技術を提案している。それによりフレームワークの有効性と他の計測への応用可能性を明らかにしている。

第1章、第2章では、生体深部の非侵襲計測が必要とされる社会的背景と、本研究の成果が目指す技術的な課題を明らかにすることに加え、生体深部の非侵襲計測の検討アプローチを一般化した枠組みを挙げ、本研究が立脚するフレームワークを提示している。

第3章では、第2章で一般化したフレームワークの具体的検討事例として加齢黄斑変性症の予防に向けて臨床現場からの技術開発が期待されているヒト眼底のカロテノイド計測を取り上げ、成分計測のアプローチとそれに基づく計測結果を示している。具体的には、上部層、対象層、下部層と論点を整理した上で抽出し、それぞれに対して、光学原理の適用の選択に関わる光学的方法、計測系の設計と制御に関わる工学的的方法、および多変量解析方法のスペクトル分析への展開に関わる情報学的方法を検証し、ルテイン、ゼアキサンチンの生体内での非侵襲計測に向けた検討を行っている。具体的には、波長可変レーザーを用いて吸収分光法、蛍光分光法、ラマン分光法、CARS 分光法をそれぞれの特性に基づいて検証し、定量手法として蛍光分光法が適していることを示した。また、得られたスペクトルからルテインとゼアキサンチンの分離・定量計測を Lambert-beer 則を基にした回帰分析により計算しその存在比を示すことで、アプローチの有効性を確認している。

第4章では、測定対象構造の下層部のノイズの排除を目的として共焦点レーザー系を組み合わせることで深さ方向の構造と成分の計測、および補正を行い下部層のリボフスチンの影響を受けない計測システムを提案し、ヒト眼底のルテイン、ゼアキサンチンのイメージングが可能であることを明らかにしている。

第5章では、第2章で提示した検討のアプローチの有効性を、ヒト眼底のルテイン、ゼアキサンチンの非侵襲計測、およびイメージングを具体例として検証することで、生体深部の成分計測にアプローチするためのインテグレーションプロセスとしてその有効性を確認した。また、その検討の結論として、波長可変レーザーと共焦点レーザー系を統合することにより、生体内構造の計測結果を

入力値として生体成分計測のシステムを制御するシステムを提案している。また今後の展望として、計測スペクトルの波長の絞り込みなどに多変量解析手法を応用することで、加齢黄斑変性症の予防診断システムとして社会に上梓することを具体的目標として挙げている。それに加え、今回の非侵襲計測のインテグレーションモデルを、血糖値の他の生体の非侵襲計測などに適用することで、モデルや手法の検証とブラッシュアップをおこなう可能性を提示している。

上記を要するに、本論文は、生体深部の非侵襲計測に向けたインテグレーションに関して新知見を得ており、生体の非侵襲成分計測および複雑系工学の発展に貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士(情報科学)の学位を授与される資格があるものと認める。