

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08781

研究課題名（和文）光バイオプシー技術を用いたヒルシュスプルング病の術中リアルタイム診断法の開発

研究課題名（英文）Development of an intraoperative diagnosis for Hirschsprung's disease using optical biopsy technology

研究代表者

小川 雄大（Ogawa, Katsuhiko）

大分大学・医学部・病院特任助教

研究者番号：40733621

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：確実かつ客観的に無神経節腸管の切除範囲を決定するために、手術室に搬入可能な小型ラマン分光システムを開発し、ヒルシュスプルング病3症例について、無神経節腸管の粘膜上皮のラマンスペクトル測定を行った。スペクトルデータに対して、ニューラルネットワークおよび決定木アルゴリズムを適用し、病変部の判別成績の評価を行った。また、二光子蛍光顕微鏡を用いて無神経節腸管の粘膜上皮の形態学的・組織学的な解析を行った。結果として、3症例ともに、ラマン分光法と機械学習の組み合わせによって、90%以上の精度をもって同一患者における病変部と正常部の判別に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒルシュスプルング病（H病）は、腸管壁内神経叢の先天性欠如が原因となる小児の代表的な消化管機能異常疾患である。無神経節腸管の切除が必要であるが、術中迅速病理診断をもってしても100%ではなく、無神経節腸管の残存が引き起こす腸炎や排便障害による再手術が問題となる。近年、物質に光を照射した際の分子の振動情報により分子構造を解析するラマン分光法が生体内でのリアルタイムモニタリングとして応用されており、術中迅速病理診断に代わる新たな診断方法として注目されている。本研究はH病手術において、ラマン分光法を用いた無神経節腸管範囲を非侵襲的かつリアルタイムに同定する新たな術中診断法の開発に寄与する。

研究成果の概要（英文）：In order to reliably and objectively determine the extent of the ganglion-free intestine, we developed a compact Raman spectroscopy system that can be carried into the operating room, and measured Raman spectra of the mucosal epithelium of the ganglion-free intestine in three cases of Hirschsprung's disease. Neural networks and decision tree algorithms were applied to the spectral data to evaluate the discrimination performance of the lesions. Morphological and histological analysis of the mucosal epithelium of the ganglion-free intestine was also performed using two-photon fluorescence microscopy. As a result, in all three cases, the combination of Raman spectroscopy and machine learning successfully discriminated lesions from normal areas in the same patient with an accuracy of more than 90%.

研究分野：小児外科

キーワード：ヒルシュスプルング病 ラマン分光法 畳み込みニューラルネットワーク

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒルシュスプルング病(H病)は、腸管壁内神経叢の先天性欠如が原因となり、腸管の蠕動障害が起こる小児の代表的な消化管機能異常疾患である。肛門から連続する無神経節腸管の切除が根治術として施行されるが、切除腸管範囲の決定には無神経節腸管の領域を正確に判定する必要があり、術中迅速病理診断が用いられている。しかし、術中迅速病理診断は経験豊富な病理医の目をもってしても100%ではなく、無神経節腸管の残存が引き起こす腸炎や排便障害による再手術が問題となる。

近年、物質に光を照射した際の分子の振動情報により分子構造を解析するラマン分光法が生体内でのリアルタイムモニタリングとして応用されており、悪性腫瘍において術中迅速病理診断に代わる新たな診断方法として注目されている。

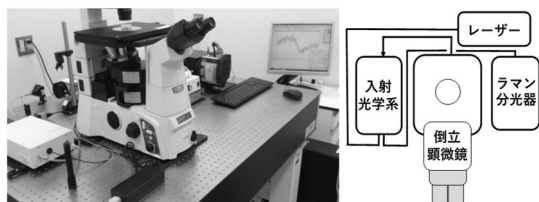
2. 研究の目的

本研究はH病手術において、ラマン分光法を用いた光ファイブスコープによって無神経節腸管範囲を非侵襲的かつリアルタイムに同定し、無神経節腸管の残存"0"を目指す新たな術中診断法の開発を目的とする多施設共同研究である。

3. 研究の方法

過去にH病根治術で採取されたホルマリン固定標本を用いて、ラマン分光法による腸管壁内神経叢同定を行う。研究代表者によりホルマリン固定標本でのラマン分光法による神経叢の同定手技は確立されているため、永久標本による病理学的な裏付けを得ることにより、ラマン分光法によるH病腸管における神経叢の同定手技を確立する。同時に手術生標本での測定も行い、H病の腸管におけるラマンスペクトルデータの蓄積も行う。

また、H病神経叢の同定手技およびファイバー型ラマンスペクトル測定デバイスを用いて、大型動物実験(ブタ)にて検証を行い、腹腔鏡手術下でのラマン分光法による腸管壁内神経叢同定を行う。すでに開発に着手している臨床応用のためのAIナビゲーション手術デバイスを用いて、将来的には術中に神経叢の有無を判別し、「AIが神経叢なしと判断した部分の腸管を切除する」といった技術の実用化を目指す。



高感度顕微鏡タイプ (バリデーション用)



小型卓上デバイス
(内視鏡・腹腔鏡への搭載)

4. 研究成果

H病根治術で採取されたホルマリン固定標本を用いて、ラマン分光法による腸管壁内神経叢同定を行った。結果として、無神経節腸管と正常腸管の粘膜から得られたラマンスペクトルデータをAIに学習させることにより無神経節腸管と正常腸管を100%判別させることに成功した。

さらに臨床実用化に向けた装置の性能評価および診断精度の検証を行った。手術室に小型ラマン分光器(近赤外光レーザー搭載、60倍対物レンズにて標本に光照射、同じ対物レンズにてラマン散乱光を観測)を持ち運び、切除直後の標本の正常直腸粘膜、漿膜のラマンスペクトルを網羅的に計測した。また、計測されたラマンスペクトルデータに対して、ノイズ除去処理後、主成分分析および線形判別分析を適用した。結果は正常直腸粘膜においては自家蛍光発生による背景光が極めて強く、粘膜組織に特徴的なラマンピークを検出できなかった。漿膜では付着している脂肪組織のラマンスペクトルが顕著に観測された。

その後、ヒルシュスプルング病3症例について、無神経節腸管の粘膜上皮のラマンスペクトル測定を行った。スペクトルデータに対して、ニューラルネットワークおよび決定木アルゴリズムを適用し、病変部の判別成績の評価を行った。また、二光子蛍光顕微鏡を用いて無神経節腸管の粘膜上皮の形態学的・組織学的な解析を行った。結果として、3症例ともに、ラマン分光法と機械学習の組み合わせによって、90%以上の精度をもって同一患者における病変部と正常部の判別

に成功した。また、二光子顕微鏡による画像解析の結果、粘膜上皮におけるコラーゲンが占める割合と、赤血球の凝集が増加傾向にあることが明らかとなり、ラマン分光法による無神経節腸管の特徴抽出の結果と矛盾しない所見を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oshima Y, Ogawa K, Fumuro H, Katagiri T, Inomata M	4. 巻 1283903
2. 論文標題 Intraoperative tissue identification for gastrointestinal disorder by Raman spectroscopy and machine learning	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Proceedings of SPIE (The International Society for Optical Engineering), Photonics West, Biomedical Vibrational Spectroscopy 2024: Advances in Research and Industry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1117/12.3005335	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katsuhiko Ogawa, Yusuke Oshima, Tsuyoshi Etoh, Yushi Kaisyakuji, Manabu Tojigamori, Yasuharu Ohno, Norio Shiraishi, Masafumi Inomata	4. 巻 56
2. 論文標題 Label-free detection of human enteric nerve system using Raman spectroscopy: A pilot study for diagnosis of Hirschsprung disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Surgery	6. 最初と最後の頁 1150-1156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpedsurg.2021.03.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 K. Ogawa*1, Y. Oshima2, Y. Matsumoto2, K. Tamura2, S. Onishi3, T. Etoh1, S. Ieiri3, M. Inomata1
2. 発表標題 A NEW OPTICAL BIOPSY TECHNIQUE FOR DETECTION OF AGANGLIONOSIS IN HIRSHSPRUNG DISEASE BY USING RAMAN SPECTROSCOPY COMBINED WITH DEEP LEARNING
3. 学会等名 International surgical week 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川 雄大、大嶋 佑介、皆尺寺 悠史、上田 貴威、當寺ヶ盛 学、白下 英史、衛藤 剛、白石 憲男、猪股 雅史
2. 発表標題 ラマン分光法を用いたヒルシュスプルング病における腸管壁内神経叢の術中同定法の開発
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本 悠希、小川 雄大、衛藤 剛、猪股 雅史、片桐 崇史、大嶋 佑介
2. 発表標題 術中に無神経節腸管を同定するためのラマン分光システムの開発
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第42回年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本悠希, 小川 雄大, 衛藤 剛, 猪股雅史, 田村海, 竹中峻, 片桐崇史, 大嶋佑介
2. 発表標題 術中病理診断を目的としたヒト腸管の共焦点顕微ラマン測定法の検討
3. 学会等名 光・量子デバイス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川 雄大、大嶋 佑介、松本 悠希、松本 紘明、皆尺寺 悠史、大西 峻、白下 英史、衛藤 剛、家入 里志、猪股 雅史
2. 発表標題 ラマン分光法を用いたヒルシュスプルング病診断の臨床応用への取り組み
3. 学会等名 第60回日本小児外科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Oshima Y, Ogawa K, Fumuro H, Katagiri T, Inomata H
2. 発表標題 Intraoperative tissue identification for gastrointestinal disorder by Raman spectroscopy and machine learning
3. 学会等名 SPIE Photonics West 2024
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 大嶋佑介, 小川雄大, 衛藤剛, 大西峻, 家入里志, 駄阿勉, 猪股雅史
2. 発表標題 光イメージング技術を用いたヒルシユスブルグ病における無神経節腸管の形態学的解析・病理学的解析
3. 学会等名 第13回癌・炎症と抗酸化研究会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	猪股 雅史 (Inomata Masafumi) (60315330)	大分大学・医学部・教授 (17501)	
研究分担者	衛藤 剛 (Etoh Tsuyoshi) (00404369)	大分大学・医学部・教授 (17501)	
研究分担者	家入 里志 (IEIRI Satoshi) (00363359)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	
研究分担者	大嶋 佑介 (Oshima Yusuke) (10586639)	富山大学・学術研究部工学系・准教授 (13201)	
研究分担者	大西 峻 (Ohnishi Takashi) (10614638)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・特任助教 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------