

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：33929

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12738

研究課題名(和文) ラマン分光法を応用した膀胱上皮内癌(CIS)診断技術の開発

研究課題名(英文) Raman study for development of a diagnostic method of carcinoma in situ of the bladder

研究代表者

松吉 ひろ子 (Matsuyoshi, Hiroko)

東海学園大学・健康栄養学部・准教授

研究者番号：10448772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：N-Butyl-N-butan-4-ol-nitrosamine (BBN) の経口投与により、膀胱上皮内非浸潤癌を誘発したモデルとBBN不含飲水を経口投与した対照モデルラット膀胱組織を10%中性緩衝ホルマリン液で固定、パラフィンに包埋・脱パラフィン処理した後、ラマンスペクトルを測定し、解析した。膀胱上皮内癌モデルではAmide IIIのピークである1230 cm⁻¹でラマン強度が減少し1300 cm⁻¹付近で増強する結果になった。主成分分析により、膀胱癌上皮と対照上皮は弁別できることが明らかになった。以上より、ラマン分光は、膀胱上皮非浸潤癌の診断に有効な技術となりうると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、技術的制約から、無標識、非侵襲で生体膀胱の状態を判断する方法について論じられることはまれであったが、ラマン分光の応用により無侵襲で生きたままの組織情報の取得が期待でき、有用性の高い新しい診断法が確立できる可能性がある。今研究では、ラマン分光法で膀胱上皮内癌モデルラットと対照ラットの膀胱組織の弁別が可能であることを示すことで、これまで白色光内視鏡観察では診断できなかった検出の難しい膀胱上皮内癌の高精度診断技術の確立に近づいたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：A model rat of carcinoma in situ (CIS) of the bladder was made by peroral administration of N-Butyl-N-butan-4-ol-nitrosamine (BBN) and Raman spectra of the bladder epithelium of model and control rats without BBN were measured and analyzed. In the BBN-induced CIS of the bladder model, Raman intensity decreased at 1230 cm⁻¹, the peak of amide III, and enhanced around 1300 cm⁻¹, so principal component analysis revealed that bladder model and control epithelium can be discriminated. The Raman technique therefore has a possibility as a detection system of differentiation between normal and carcinoma in situ model and then, might be useful for diagnosis of CIS of the bladder.

研究分野：神経科学

キーワード：Raman分光 膀胱上皮内癌

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膀胱上皮内癌 (carcinoma in situ : CIS) は、筋層非浸潤型癌に分類されるが、明らかに悪性と判断される異型度の高い腫瘍細胞が増殖する平坦状病変であり、肉眼的に認識し難い、高リスク群に含まれる癌である。筋層非浸潤癌に対しては、経尿道的膀胱腫瘍切除術 (TURBT) が行われるが単独治療後の膀胱内再発率は 30~70%と高く、白色光膀胱鏡では確認が困難な微小病変や CIS の存在が原因と考えられ、早期発見が課題である。光学的診断や狭帯域光観察技術の登場によりその診断能は向上したものの、まだ、充分ではなく、蛍光色素などを使用することのない非侵襲的で、かつ高精度で CIS だけを検出する技術の開発が待たれる。

2. 研究の目的

ラマン分光分析は、励起光とラマン散乱光の振動数の差が分子振動の励起エネルギーに相当することを利用して測定対象の分子組成を知ることができる技術であり、試料の前処理を必要とせず、そのままの状態でも分子情報を非侵襲的に得ることができる。近年、レーザー光源や光学素子、検出技術の発展により組織や細胞などの生体試料から質の高いラマンスペクトルを再現性良く得ることが可能となっており、このラマン分光分析法を応用して、診断の難しい膀胱上皮内癌を非侵襲的に検出でき、加えて経時的に治療効果を判定できる技術を確立したい。

3. 研究の方法

(1) モデル動物作成

5週齢の雄 Fischer344 ラットに 0.05% 濃度で N-Butyl-N-butan-4-ol-nitrosamine (BBN) を混合した飲料水を 15 週間与えることで癌発生を誘導し、更に 10 週間飼育を続け、膀胱上皮内癌 (CIS) モデル動物を作成した。セボフルラン麻酔下にてモデル動物から膀胱を摘出し、中性緩衝ホルマリン液で浸漬固定した。対照には、BBN を含まない飲料を与えて同様の操作で作成した動物の組織を使用した。

(2) 組織切片作製

10%中性緩衝ホルマリン液で浸漬固定した膀胱組織をパラフィン包埋して実験に用いた。パラフィン包埋膀胱組織をマイクロトームで 10 μm 厚に薄切して、スライドガラスに貼付し、免疫組織化学実験に供した。ラマン分光測定に用いる試料は同じく薄切した膀胱組織を石英スライドに貼付し作成した。

(3) ヘマトキシリン・エオジン染色

スライドガラスに貼付したパラフィン包埋組織切片を脱パラフィン処理しヘマトキシリン・エオジン染色して作成したモデルラットの膀胱組織を光学顕微鏡で観察した。

(4) ラマン測定

石英スライドに貼付したパラフィン包埋膀胱組織切片を脱パラフィン処理し、顕微ラマン装置 (InVia™ confocal Raman microscope : Renishaw Inc., UK) を用いて、膀胱上皮からラマンスペクトルを得た。励起光源には 532nm レーザーを使用し、露光時間 60 秒の条件で、3 回の積算を行った。

(5) データ解析

得られたスペクトルのベースラインを多項式近似により補正し、1440 cm^{-1} ~ 1470 cm^{-1} 範囲の面積強度でスペクトル強度の規格化を行い、計算ソフト The Unscrambler を用いて主成分分析を行った。

4. 研究成果

(1) BBN 誘発膀胱癌モデルラットの作成

N-Butyl-N-butan-4-ol-nitrosamine (BBN) 含有水の飲水瓶での経口投与により、膀胱癌の発症を誘発した。ヘマトキシリン・エオジン染色した組織の光学顕微鏡による組織学的観察により、膀胱上皮に局限した癌組織が認められた (図 1)。これまで、BBN による乳頭状非浸潤癌誘発では、マウスに比べてラットでの乳頭状非浸潤癌誘発率が低いといわれていたが、今実験では、ラットの膀胱乳頭状非浸潤癌組織及び乳頭状非浸潤癌部を認める膀胱組織を得ることができた (図 1)。

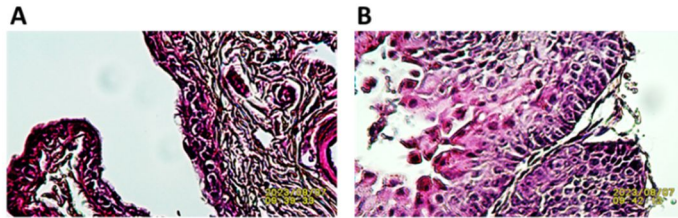


図1 BBN誘発膀胱癌モデルラット膀胱組織
 ヘマトキシリン・エオジン染色を施したモデルラット膀胱光学顕微鏡図。ラットでも膀胱上皮内癌が認められた。
 A 対照ラット膀胱 B 膀胱癌モデルラット膀胱

(2) ラット膀胱上皮のラマンスペクトル

BBN 誘発膀胱癌モデルラット膀胱上皮乳頭状増殖部ならびに対照ラット膀胱上皮のベースライン補正、1440 cm^{-1} ~ 1470 cm^{-1} の範囲の面積強度による規格化後のスペクトルを示す(図2)。BBNにより誘導された膀胱上皮内癌モデルでは1230 cm^{-1} でラマン強度が減少し1300 cm^{-1} 付近で増強した。1230 cm^{-1} は Amide のピークと一致しており、この変化が判別に大きな影響を与えており、今後、癌の診断法を確立する上で重要な変化であると考えられる。

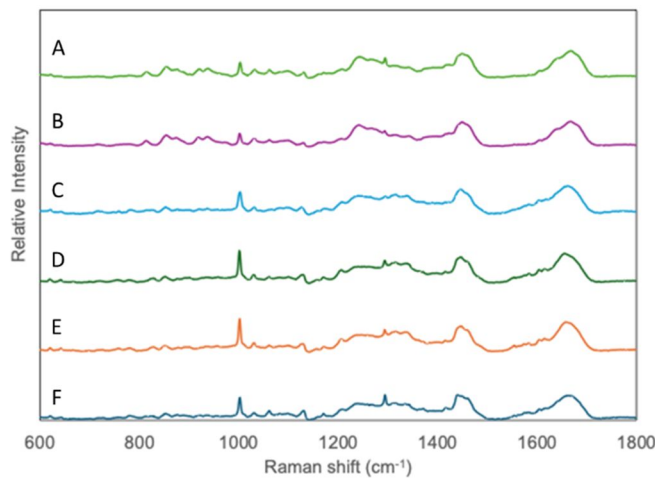
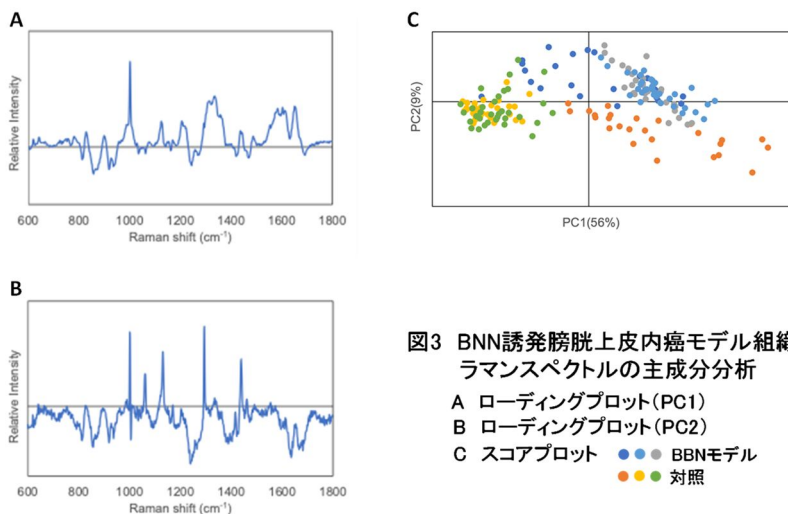


図2 BBN誘発膀胱上皮内癌モデルラット膀胱上皮のラマンスペクトル
 A BBNラット1 B BBNラット2 C BBNラット3
 D 対照ラット1 E 対照ラット2 F 対照ラット3

(3) BBN 誘発乳頭状非浸潤膀胱上皮癌モデルラット膀胱上皮と対照膀胱上皮との判別
 各組織から得られたラマンスペクトルを用いて主成分分析手法で解析した(図3)。



**図3 BBN誘発膀胱上皮内癌モデル組織
 ラマンスペクトルの主成分分析**
 A ローディングプロット(PC1)
 B ローディングプロット(PC2)
 C スコアプロット ●●● BBNモデル
 ●●● 対照

主成分分析ではローディングプロット 2 で膀胱上皮内癌と対照上皮との弁別が可能であった (図 3、4)。

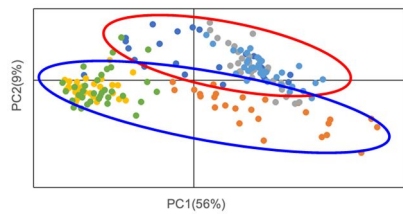


図4 BNN誘発膀胱上皮内癌モデル組織ラマン
スペクトル主成分分析のスコアプロット

今解析で、判別に大きな影響を与えたローディングプロット 2 では 1100 cm^{-1} ならびに 1300 cm^{-1} 付近にピークが認められる。このスペクトルパターンは血液のラマンスペクトルの特徴と類似し、癌組織の正常組織からの弁別には血液成分が大きな影響を与えている可能性が示唆された。血管浸潤、血管新生の亢進は多くの癌組織の特徴であるが、膀胱上皮内癌でも同様の変化が起こっており、その変化がラマンスペクトル変化に影響を与えているのかもしれない。膀胱炎組織の正常組織との弁別には、血液成分以外の影響が示唆されており(未発表データ)ここから、炎症と判別できる可能性が高い。故に、ラマン分光の応用は、蛍光色素の投与や観血的処置等の必要のない非侵襲的な膀胱癌の診断方法の確立に寄与する可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	佐藤 英俊 (Sato Hidetoshi) (10300873)	関西学院大学・生命環境学部・教授 (34504)	
研究分担者	三宅 牧人 (Miyake Makito) (80601400)	奈良県立医科大学・医学部・准教授 (24601)	

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