

令和元年6月11日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06660

研究課題名（和文）眼内悪性リンパ腫のラマン散乱光解析による新規診断法開発

研究課題名（英文）Novel diagnostic approach of Intraocular lymphoma using Raman spectroscopy

研究代表者

岩崎 優子（IWASAKI, Yuko）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・プロジェクト助教

研究者番号：10801516

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：1細胞レベルのラマン散乱光解析による、悪性リンパ腫とリンパ球の鑑別能を評価した。悪性リンパ腫とB細胞を感度平均94.2%（92.3%～95.1%）、特異度平均95.5%（92.3%～96.1%）で鑑別し、悪性リンパ腫と活性化T細胞を感度平均93.8%（91.6%～95.3%）、特異度平均73.7%（69.0%～76.9%）で鑑別した。1細胞レベルで測定したラマン散乱光による悪性リンパ腫とリンパ球の鑑別能は良好であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラマン散乱光解析は1細胞レベルの測定で悪性リンパ腫と正常リンパ球を鑑別できることが、初めて示された。このことから、将来、眼内に浸潤した細胞を眼内にあるままで撮影できるようになれば、悪性リンパ腫の診断に有用であることが期待される。本研究により、ラマン散乱光解析の新しい臨床応用方法が提案された。

研究成果の概要（英文）：We evaluated how effective Raman spectrum analysis at single cell resolution is for distinguishing malignant lymphoma from lymphocyte. The analysis distinguished malignant lymphoma cell from B lymphocyte with mean sensitivity of 94.2% (92.3%～95.1%) and mean specificity of 95.5% (92.3%～96.1%). Furthermore, the analysis distinguished lymphoma cell from activated T lymphocyte with mean sensitivity of 93.8% (91.6%～95.3%) and mean specificity of 73.7% (69.0%～76.9%). Raman spectroscopy at a single cell resolution was effective to diagnose malignant lymphoma cell from lymphocyte.

研究分野：眼科

キーワード：悪性リンパ腫 炎症 ラマン散乱光

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

眼内悪性リンパ腫は高率(56-85%)に中枢神経悪性リンパ腫を併発し、5年生存率は30%~60%と生命予後不良な疾患である。患者の生命予後のためには中枢神経病変を併発する前に眼内悪性リンパ腫を診断することが望ましい。眼内リンパ腫では、リンパ腫細胞の眼内浸潤により硝子体混濁をきたす。混濁硝子体を手術生検で採取するが、感染症惹起などのリスクがあるため、生検の適応判断は臨床経過を観察しながら数か月かけて行われる。また、眼内サンプルが微小であることも診断を難しくしており、診断のゴールドスタンダードである細胞診の診断率はおよそ30%と低い(Kase S et al. Diagn Pathol. 2016., Chan CC et al. Oncologist. 2011.)。このため、臨床の現場ではリンパ腫を積極的に示唆する非侵襲的な検査の開発が望まれている。従来、混濁した硝子体を眼内にあるまま撮影して評価する手法は存在しない。新規イメージング技術を眼内撮影に用いようと考えるとき、重要なことは症例ごとの所見の多様性に影響されずに診断に貢献できると期待できる技術を採用することである。眼内悪性リンパ腫患者では、随伴する炎症や虚血の程度は症例により多様である。これらの所見に関わらず、悪性細胞そのものの性質により診断できる画像技術が眼内撮影に応用されることが望ましい。ラマン散乱光解析は、悪性リンパ腫の診断に有用であると報告されるイメージング技術である(Donfack P et al. J Biophotonics. 2013, Lloyd GR et al. Analyst. 2013)。これらの報告ではリンパ節を解析対象としているため、腫瘍浸潤に伴う虚血性変化や炎症による間質の変化が診断に寄与した可能性がある。このため我々は、ラマン散乱光解析が腫瘍細胞を1細胞レベルで測定しても診断に有用であるかを解析し、今後臨床応用した際の有用性を判断することとした。

### 2. 研究の目的

ラマン散乱光解析により、正常リンパ球と悪性リンパ腫細胞を1細胞レベルで観察した際の鑑別能を検討する。また、当院における過去の貴重なサンプルの解析を行うため、細胞の固定処理によっても鑑別が可能であるか検討する。以上により、将来実際のヒト眼内における浮遊成分を非侵襲的に解析することの診断への有用性を評価する。

### 3. 研究の方法

- (1.) 眼内悪性リンパ腫に多くみられる病型であるびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫のセルラインを培養した：RIKEN BioResource Centerにより提供されているセルライン(KML1)を購入した。RPMI1640-10%FBSを用い、48時間毎に継代し、凍結ストックを作成した。生細胞の観察においては、測定2日前に解凍し、1日前に継代したものをを用いた。購入したKML1は、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫の形態を示していた。
- (2.) 10%中性バッファーホルマリン(10%NBF)固定した悪性リンパ腫セルラインを用い、細胞の観察に適切な測定機器を選択した。外部の利用が可能な東京近郊のラマン散乱光顕微鏡として、電気通信大学、早稲田大学、および、ナノフォトン社東京ショールームでのデモ使用を行った。水浸レンズを用いた観察が、高倍率の対物レンズを用いた観察には有用であることがわかり、その条件を満たす施設として茨城県つくば市の国立研究開発法人物質・材料研究機構(NIMS)のラマン顕微鏡を使用することとした。
- (3.) 固定した悪性リンパ腫セルラインを用い、細胞の撮影条件を設定した。十分なS/N比が得られる最小のレーザー強度として、523nmレーザーを4.5mW、9秒照射した。PBSに入れた細胞を観察し、細胞の中心のXY位置にて2μm刻みのZ stack撮影を行った(図1a,b)。主成分分析で溶媒中、細胞中、dish由来のスペクトラムが分離されることを確認し、以後の撮影条件および細胞由来のスペクトラムの選択方法を規定した。また、溶媒由来のスペクトラムはそれぞれの細胞の近傍にて、同一のZ stack設定にて観察した。
- (4.) 生細胞、固定細胞、パラフィン包埋細胞のラマン散乱光の比較：生細胞は上記と同様、PBSに懸濁して観察した。固定細胞は10%NBFで室温にオーバーナイト固定を行い、PBSに懸濁した。包埋試料は、固定の後さらに脱水、パラフィン包埋し薄切片、脱パラフィンしたものにPBSを加えた。
- (5.) 正常ヒトの血球の分離：正常ボランティア由来の末梢血単核球から磁気ビーズを用いてB細胞をネガティブ分離した。
- (6.) 悪性リンパ腫と末梢血B細胞の観察：生細胞を「ライブ輸送デバイスおよび定温輸送Box」(サンプラテック)を用い90分かけて運搬し、3で設定した条件で測定を行った。同様の実験を、日にちを変えて3名のボランティア由来B細胞を用いて行い、リンパ腫とB細胞の測定データを3セット得た。

(7.) 得られたラマン散乱光の解析：まず溶媒のデータの処理として、a) 実測値そのまま、b) 細胞由来のスペクトラムから対応する Z 位置の溶媒由来のスペクトラムを引く、c) 細胞由来のスペクトラムから溶媒由来の 3 つのスペクトラムの平均値を引く、の 3 つを試みた。また、基線補正法としては、d) なし、e) 移動平均法、f) mod-poly 法、g) i-mod-poly 法の 4 つを試みた。以上の組み合わせとなる 12 通りのデータ処理を行ったのち、ベクターノーマライズ法で強度補正を行った。主成分分析・二次判別分析を行い、以下の鑑別能評価方法を検討した。評価方法 1 「1 つのデータセット内での鑑別」：同日に測定したリンパ腫由来、B 細胞由来の多数のスペクトラムのうち、ランダムに 50% を選択しトレーニングセット、残りの 50% をテストセットとして鑑別能を評価した。ランダムな選択を 100 回繰り返した。評価方法 2 「異なるデータセット間での鑑別」：3 つのデータセットのうち、あるものをトレーニングセット、別のものをテストセットとし、組み合わせた 6 通りについて鑑別能を評価した。鑑別能に寄与した波数を考察するため、1 つのデータセットに含まれるリンパ腫と B 細胞スペクトラムについて ANOVA で F value を算出した。上述の 12 通りのデータ処理方法から、評価方法 1、2 双方において比較的安定した鑑別能を示し、かつ ANOVA の F value が保たれる処理方法を選択した。

(8.) 正常ヒトの T 細胞の観察：正常ボランティア由来の末梢血から磁気ビーズを用いて T 細胞をネガティブ分離し、RPMI1640-10%FBS-IL2-抗 CD3 抗体-抗 CD28 抗体を用いて増殖刺激を与え 1 週間培養した。6 同様に運搬、観察し、7 と同様に解析し、鑑別能を評価した。

#### 4. 研究成果

図 1 に測定環境の図と KML1 細胞由来のスペクトラムのひとつを代表例として挙げる。スペクトラムの測定及びデータ処理条件を細胞の中心部での Z stack 撮影 (図 1a) から得たスペクトラム (図 1c-1) から、溶媒中で測定されたスペクトラム (図 1b) を引き (図 1c-2)、i-mod-poly 法で基線補正を行った (図 1c-3) のち、ベクターノーマライズ法で強度補正を行った (図 1d)。

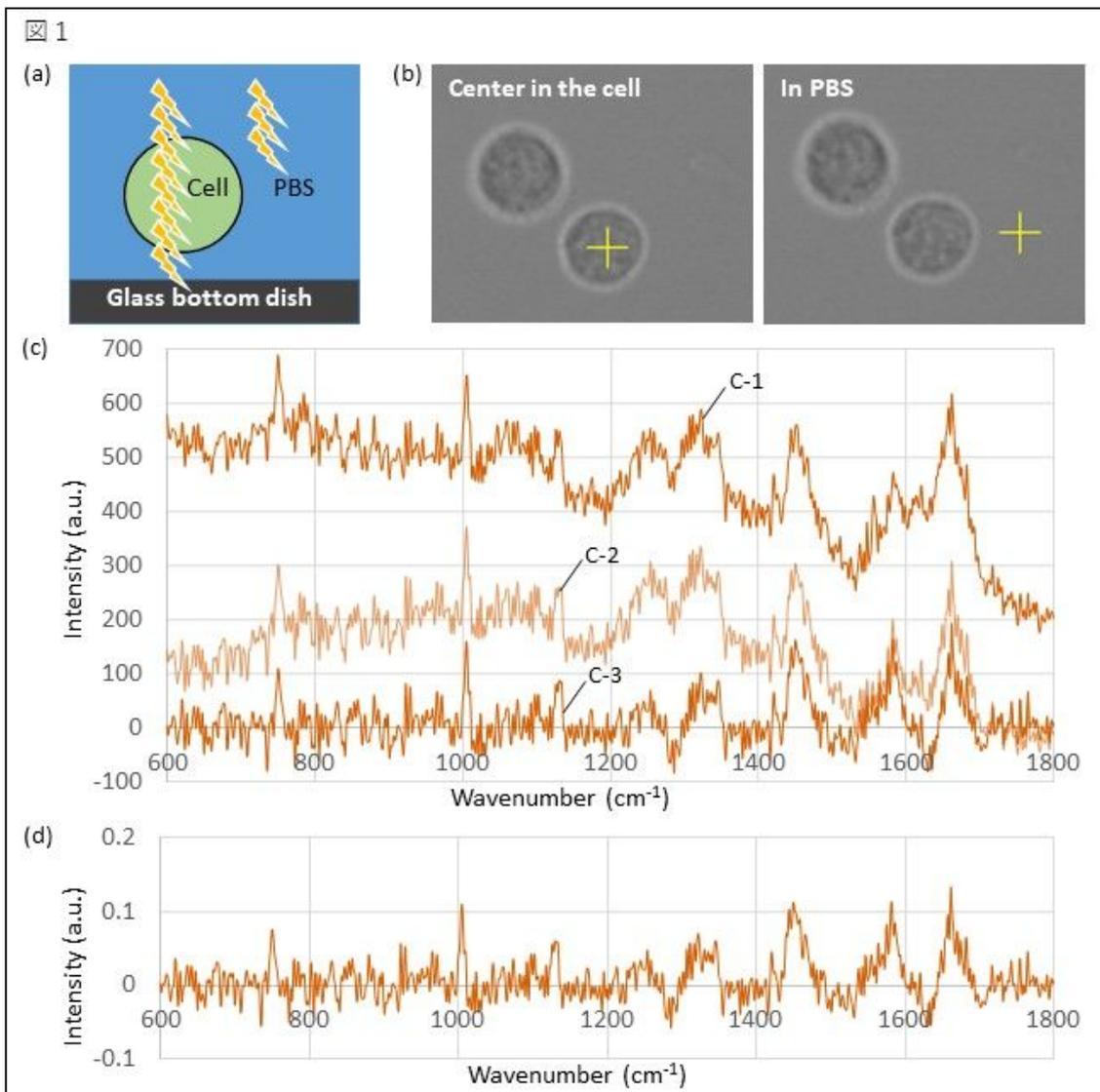
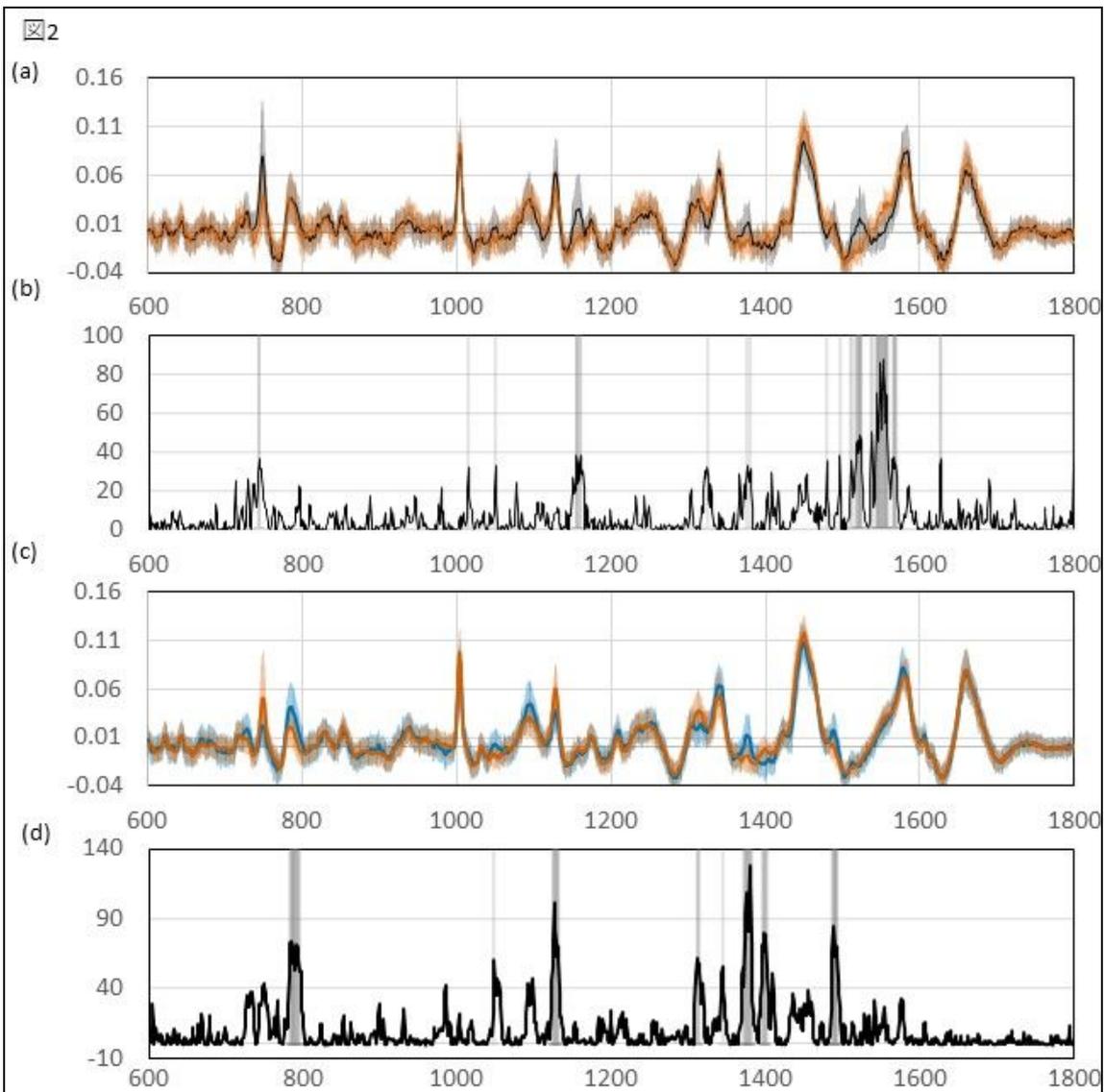


表. データ数

B細胞vs悪性リンパ腫			
	①由来	②由来	③由来
細胞数	12 vs 8	12 vs 8	15 vs 8
スペクトラム数	52 vs 54	50 vs 53	70 vs 54
T細胞vs悪性リンパ腫			
	①由来	②由来	③由来
細胞数	32 vs 25	31 vs 24	37 vs 32
スペクトラム数	133 vs 167	130 vs 157	150 vs 220

正常ボランティア3人( 、 、 )由来の正常B細胞とリンパ腫セルラインの測定データ3セット、活性化T細胞とリンパ腫セルラインの測定データ3セットは、表の通りの細胞数、スペクトラム数からなるデータセットとなった。なお、生細胞、固定細胞、パラフィン包埋細胞はそれぞれ全く異なるスペクトラムを示したため、本研究においては生細胞由来のスペクトラムのみを解析対象とした。

図 2a に、正常ボランティア 由来の B 細胞由来の 52 スペクトラムとリンパ腫細胞由来の 54 スペクトラムの平均および標準偏差を示した。また、図 2b にはそれらの ANOVA 解析の F value を示し、F value が高い波数を棒グラフで表示した。図 2a にてシグナル強度に差がある波数の多くで F value が高く、鑑別に寄与しうる波数を示すと考えられた。同様に、T 細胞においても正常ボランティア 由来の 133 スペクトラムとリンパ腫由来の 167 スペクトラムの平均と標準偏差を図 2c に、F value を図 2d に示した。活性化 T 細胞とリンパ腫の比較においても、シグナル強度が異なる波数の多くで F value が高かった。F value が高くみられた波数は B 細胞と活性化 T 細胞で異なり、異なる波数が鑑別に貢献したと考えられた。



B 細胞とリンパ腫細胞の鑑別能は、同日に測定されたデータを用いてランダムな選択を 100 回繰り返した評価方法 1 によると、 由来の B 細胞を用いたデータセットでは平均感度 95.1%、 由来の B 細胞を用いたデータセットでは平均感度 95.2%、 由来の B 細胞を用いたデータセットでは平均感度 92.3%となり、3つのデータセットの平均感度は 94.2%であった。また、特異度は 由来の B 細胞を用いたデータセットでは 100 回の平均が 96.1%、 由来の B 細胞を用いたデータセットでは 93.6%、 由来の B 細胞を用いたデータセットでは 92.3%であり、3つのデータセットの平均特異度は 95.5%であった。異なるデータセット間での鑑別を行った評価方法 2 では、6 通りのトレーニングデータとテストデータの組み合わせから得られた鑑別能は、感度平均 85.1% (74.1~94.4%)、特異度平均 95.2% (90.4~100%)であった。次に、正常ボランティア 3人( 、 、 )由来の活性化 T 細胞とリンパ腫鑑別能を同様に評価した。同日に測定されたデータを

用いてランダムな選択を 100 回繰り返した評価方法 1 によると、由来の活性化 T 細胞を用いたデータセットでは平均感度は 95.3%、  
では 91.6%、  
では 94.4%であり、3 つのデータセットの平均は 93.8%であった。特異度は、  
では 69.0%、  
では 76.9%、  
では 75.1%で、3 つのデータセットの平均特異度は 73.7%であった。異なるデータセット間での鑑別を行った評価方法 2 では、6 通りのトレーニングデータとテストデータの組み合わせから得られた鑑別能は、感度平均 89.5% (80.0~95.5%)、特異度平均 72.5% (57.7~84.2%) であった。特異度はやや下がるものの感度は高く、リンパ腫はリンパ腫と判定できていた。このことから、ラマン散乱光解析は 1 細胞レベルの測定で悪性リンパ腫と正常リンパ球を鑑別でき、将来眼内を撮影できるようになれば生検の判定など診断に有用であることが示された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

岩崎優子、高瀬博、大野京子 ラマン散乱光解析による悪性リンパ腫と B 細胞の鑑別 第 123 回日本眼科学会総会 2019 年

岩崎優子、川岸将彦、高瀬博、大野京子 ラマン散乱光解析による悪性リンパ腫細胞と正常リンパ球の鑑別能 2019 年度日本分光学会年次講演会 2019 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：川岸将彦  
ローマ字氏名：KAWAGISHI, Masahiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。