

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 676 号	氏名	小川雄大
審査委員会委員	主査氏名	谷川雅人 (査)	
	副査氏名	藤木 稔 (査)	
	副査氏名	沖本忠義 (査)	
論文題目 Label-free detection of human enteric nerve system using Raman spectroscopy: A pilot study for diagnosis of Hirschsprung disease ラマン分光分析による腸管壁内神経叢の同定： ヒルシュスプルング病術中診断への応用に関する研究			
論文掲載雑誌名 Journal of Pediatric Surgery			
論文要旨 緒言：ヒルシュスプルング病(HSCR)は、腸管壁内神経叢(ENS)の先天的欠如が原因となり、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り、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。本研究では、ラマン分光法を用いて非侵襲的にヒトENSを同定する技術確立し、HSCR診断への応用について検討した。 方法：マイクロスライサーを用いた100 μ mの腸管壁各層の切片を作成し、粘膜、粘膜下層、筋層および漿膜に分離してレーザーラマン顕微鏡を用いて各組織のラマンスペクトルの計測を行い、スペクトル平均化および主成分分析(PCA)によって、神経節細胞およびその周囲の筋層との判別分析を行った。 結果：ラマン分光分析により、腸管壁内構造の各層に特徴的なラマンスペクトルを検出することができた。粘膜は細胞が密に存在することから核酸を表すスペクトルが検出され、粘膜下層では結合組織、脂肪および粘膜筋板の筋繊維のスペクトルが検出され、腸管壁内構造の各層に特徴的なラマンスペクトルを検出することができた。PCAによって隣接する筋繊維との判別も可能であった。 考察：HSCRの無神経節腸管は外来神経繊維の増生が特徴的である。つまり、ENSにある神経節細胞を同定することが出来れば、正常腸管と無神経節腸管の判別が可能であると考えられる。本研究において、筋層間にある神経節細胞を同定できたことにより、ラマン分光法が非侵襲的にヒトENSを同定可能であることが証明された。 結論：本研究によって、ラマン分光法を用いることにより、腸管壁内構造の各層のスペクトル判別を行うことができ、さらにはアウエルバッハ神経叢の同定にも成功した。この低侵襲手技により、術中無神経叢領域を同定することでHSCR診断への臨床応用が可能になることが示唆された。 本研究は、ラマン分光法を用いてヒトの検体の腸管壁内神経叢の同定に関する初めて報告されたものである。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。			

最終試験
の結果の要旨
学力の確認

審査区分 ①・論	第676号	氏名	小川雄大
審査委員会委員	主査氏名	谷川雅人	②
	副査氏名	藤木 穂	③
	副査氏名	津本 忠義	④
<p>学位申請者は本論文の公开发表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ラマン分光法の医療への応用がよく行われるようになった時期について。 2. 何故ラマン分光法の医療への応用が急に発展したのか。 3. 整体分子の中でどのような成分が自家蛍光を用いた2光子で励起されているのか。 4. アウエルバッハ神経叢についてその反射弓を交感・副交感神経支配等を含め解剖学的・生理学的に概説せよ。 5. ラマン分光法の先行研究はいずれも神経繊維を対象としたものである一方、本研究の対象は神経節である。これらの整合性について説明せよ。 6. ヒルシュスプルング病の診断時期、診断時の症状、手術適応について説明せよ。 7. マイクロスライサーを使って検体を作成しているが、腸管内腔と並行に切片を作らないとそれぞれの層の検討ができないのではないかと。水平断面を保つ工夫などあるか。 8. 主成分解析における第一主成分の構成について。 9. ラマンスペクトルで変化の大きい1300cm⁻¹に対応する分子の構造について。 10. ラマン分光法の到達可能な理論上の深さを概説せよ。 11. アウエルバッハ神経叢先天的欠如によるヒルシュスプルング病にて観察された神経繊維が外来性を示唆する本研究結果の解釈を述べよ。 12. 臨床応用に関して、術中迅速で行うために生検組織を使うのであれば、現在のラマン分光での5μmという測定深度は不十分ではないか。不十分であれば今後の対応法は。 13. 内視鏡や腹腔鏡に組み入れるには、ラマン分光法のみでは検査範囲が狭く、見逃す可能性が高いため二光子顕微鏡との組み合わせなどが必要ではないか。 <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること

学 位 論 文 要 旨

氏名 小川 雄大

論 文 題 目

Label-free detection of human enteric nerve system using Raman spectroscopy:

A pilot study for diagnosis of Hirschsprung disease

ラマン分光分析による腸管壁内神経叢の同定：ヒルシュスプルング病術中診断への応用に関する研究

要 旨

【緒言】ヒルシュスプルング病(HSCR)は、腸管壁内神経叢(ENS)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り、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。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が、正確な切除ライン決定には不十分な場合があり、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っている。この課題に関して、術中に腸管壁内神経を可視化もしくは非侵襲的に同定することができれば、切除ライン決定に大きな役割を果たすことが期待される。近年、外科領域において可視・近赤外光を利用した生体の非・低侵襲診断技術の開発が盛んに行われているが、蛍光造影剤や光感受性物質の投与が必要となるため臨床応用の範囲が限定されている。そこで、本研究では無染色で癌細胞や神経組織の同定が可能であるラマン分光法に着目した。これまでラマン分光法においては、末梢神経の同定は可能である報告がされているが、ヒトの検体を用いた腸管壁内神経叢の同定に関する報告はない。本研究は、ラマン分光法を用いて非侵襲的にヒトENSを同定する技術を確立することを目的とし、HSCR診断への応用についても検討した。

【方法】まず、直腸癌手術の切除標本のうち正常腸管のラマン分光分析を行った。マイクロスライサーを用いた100 μ mの腸管壁各層の切片を作成し、粘膜、粘膜下層、筋層および漿膜に分離してレーザーラマン顕微鏡を用いて各組織のラマンスペクトルの計測を行った。測定された各組織のラマンスペクトルの平均化処理を行い組織間の比較を行った。次に、マイクロスライサー切片における壁内神経叢（アウエルバッハ神経叢）の位置を同定するため、二光子顕微鏡を用いて神経節細胞を可視化し、アウエルバッハ神経叢ラマンスペクトルの同定を試みた。スペクトル平均化および主成分分析(PCA)によって、神経節細胞およびその周囲の筋層との判別分析を行った。さらに、HSCR手術検体のパラフィン包埋切片を用いて、筋層と筋層間のラマンスペクトルを測定した。

【結果】ラマン分光分析により、腸管壁内構造の各層に特徴的なラマンスペクトルを検出することができた。粘膜は細胞が密に存在することから核酸を表すスペクトルが検出され、粘膜下層では結合組織、脂肪および粘膜筋板の筋繊維のスペクトルが検出された。筋層は蛋白質特有のスペクトルが検出され、漿膜は結合組織特有のスペクトルが強く検出された。アウエルバッハ神経叢のスペクトルは神経節細胞の密度の関係から粘膜と類似のスペクトルを示したが、PCAによって隣接する筋繊維との判別も可能であった。また、HSCR手術検体における筋層間のラマンスペクトルはコラーゲンに関連したピークを持ったスペクトルが検出され、アウエルバッハ神経叢を表すスペクトルは検出されなかった。

【考察】HSCRの無神経節腸管は外来神経繊維の増生が特徴的である。つまり、ENSにある神経節細胞を同定することが出来れば、正常腸管と無神経節腸管の判別が可能であると考えられる。本研究において、筋層間にある神経節細胞を同定できたことにより、ラマン分光法が非侵襲的にヒトENSを同定可能であることが証明された。今後の課題として、HSCRの手術検体におけるラマンスペクトルデータの蓄積と術中診断に応用可能なデバイスの開発を行う必要がある。

【結論】ラマン分光法を用いることにより、腸管壁内構造の各層のスペクトル判別を行うことができ、さらにはアウエルバッハ神経叢の同定にも成功した。この低侵襲手技により、術中無神経叢領域を同定することでHSCR診断への臨床応用が可能になることが示唆された。