

学位請求論文の内容の要旨

領 域	医療生命科学	分 野	生体機能科学
氏 名	吉岡 治彦		
(論文題目) 非がん細胞とがん細胞の鑑別における紫外・可視顕微分光法の有用性			
主 査	渡邊 純		
副 査	千葉 正司		
副 査	木田 和幸		
副 査	中村 敏也		
<p><b>I.はじめに</b>  がん細胞判定は、細胞、組織学的な形態特徴により組織型や悪性度を判定するため、形態学的な特徴が乏しい高分化腺癌や低悪性度の腫瘍は、がん細胞判定に苦慮することが多い。鑑識の科学捜査技法として、紫外線カメラで肉眼で見えない潜在指紋（皮膚汗腺や皮脂腺由来の汗や脂分）を検出することにヒントを得て、弘前大学大学院保健学研究科では、2005年より紫外線顕微鏡（Ultraviolet- microscopic spectroscopy: UV-MS）の研究に取り組み始め、近年、可視光スペクトル解析（Visible microscopic spectroscopy: Vis- MS）も同時に行える紫外・可視顕微分光法（UV-Vis MS）を開発した。そこで、本研究では、UV-Vis MS法が、非がん細胞とがん細胞の客観的な判定手法として有用か否かを検討した。</p> <p><b>II.研究目的</b>  液状化検体細胞診（Liquid -based cytology: LBC）標本の無染色がん細胞を材料としたUV-MS法や、LBC標本のPapanicolaou染色がん細胞を材料としたVis-MS法が、非がんとがんの判定に有用かを検証する。さらに、組織標本において、子宮内膜類内膜腺癌高分化型(G1), 低分化型(G3)の無染色標本をUV-MS法で解析し、同一細胞をH-E染色後、核領域色彩をVis-MS法で追加解析することで、がん細胞の核色彩変化に影響を及ぼすUV吸収波長を調べ、G1とG3の判定に有用かを検証する。</p> <p><b>III.研究方法</b>  <u>Chapter 1：LBC・無染色細胞診のUV-MS</u>  材料としてLBC処理した無染色の6種類の培養細胞株：非がん由来細胞（NHDF, COS-7）、がん細胞（A549, MCF-7, LS-180, Kato-III）を石英ガラスに塗抹した検体を用いた。UV-MS法で紫外線波長260 nm, 280 nm, 300 nm, 320 nm, 340 nmの透過率値を抽出し、判別分析によりUV-MS法が非がんとがん細胞の判別に有用かを検討した。  <u>Chapter 2：LBC・Papanicolaou染色細胞診のVis-MS</u>  材料としてLBC処理したChapter 1と同種の細胞を普通スライドガラスに塗抹しPapanicolaou染色した検体を用いた。Vis-MS法で530 nm（エオジン）, 580 nm（ヘマ</p>			

【細則様式第 1 - 2 号続き】

トキシリン), 630 nm (ライトグリーン) の透過率値、及び530 nm/580 nm透過率比、630 nm/580 nm透過率比を抽出し、2項ロジスティック回帰分析により両者の判別に有用かを検討した。

**Chapter 3 : 子宮内膜類内膜腺癌G1, G3の組織切片によるUV-Vis MS**

材料として子宮内膜類内膜腺癌G1, G3の組織標本を用いた。無染色UV-MS法解析で260 nm, 280 nm, 300 nm, 320 nmを、H-E染色後、核色彩のVis-MS法解析で520 nm, 540 nm, 560 nmの波長を抽出し、正準相関分析によりG1とG3の判定に有用かを検討した。

**IV.結果**

**Chapter 1 : LBC・無染色細胞診のUV-MS (Table 1)**

がん細胞は、非がん細胞に比べ、紫外線各波長透過率は低く (p<0.01)、がん細胞は紫外線を吸収する物質が多く含まれることが明らかになった。さらに判別の中率は**96.3%** (Z=0.61×300 nm透過率-44.02)であり、LBC標本の無染色がん細胞を材料としたUV-MS法で高い確率で非がんとがんとを判別できた。

**Table 1 Comparison of the transmittance measured using the UV-MS between non cancer and cancer cells**

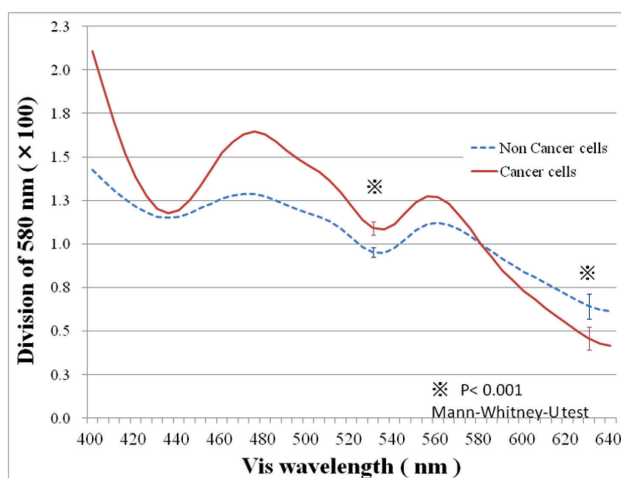
Wavelength (nm)	Transmittance (mean ± SD)%		P-value
	Non-cancer cells (n=100)	Cancer cells (n=200)	
260	69.0 ± 7.9	49.4 ± 6.6	} < 0.01※
280	71.8 ± 6.8	53.1 ± 6.1	
300	79.7 ± 5.0	64.1 ± 5.0	
320	83.7 ± 4.3	70.7 ± 4.7	
340	87.1 ± 3.8	75.5 ± 4.5	

※ Mann Whitney -U test

**Chapter 2 : LBC・Papanicolaou染色細胞診のVis-MS**

580 nm 透過率値は、がん細胞 (27.4 ± 6.7%)は非がん細胞 (51.5 ± 9.3%) に比べ、有意 (p<0.001)に低かった (紫色が濃い)。

530 nm/580 nm 透過率比は、がん細胞は (109.1 ± 6.5%) は非がん細胞 (95.2 ± 4.2%) に比べて、有意 (p<0.001)に高く (赤色調が薄い)、630 nm/580 nm 透過率比は、がん細胞 (45.7 ± 7.7%) は非がん細胞 (64.2 ± 8.6%) に比べ、有意 (p<0.001)に低かった (青緑調が濃い) (Fig.1)。



**Fig. 1 Comparison of the division of 580 nm values between non cancer and cancer cells**

2 項ロジスティック回帰分析の結果、多重共線性のない変数で、変数増減法から 580 nm 透過率値(p<0.001)と、630 nm /580 nm 透過率比(p<0.001)が選択され、以下の 2 項ロジスティック回帰式が得られた (R2 乗値:0.92, 尤度比検定:p<0.001、判別的中率 : 98.0%)。

$$p(x) = \frac{1}{1 + \exp(-41.19 + 0.73x_1 + 0.33x_2)} \quad x_1 = [580 \text{ nm}] \quad x_2 = [630/580 \text{ \%}]$$

オッズ比は、580 nm 値 : 0.48(95%信頼区間 0.34~0.67)、630 nm/580 nm 比 : 0.72(95%信頼区間 0.34~0.67)であった。残差検定はスチューデント化残差が 2 を超えたものは 0.3%であり、この回帰式は有意に適合していた。以上の結果から、LBC 標本の Papanicolaou 染色したがん細胞を材料とした Vis-MS 法は、高い確率で非がん とがんを判別できた。

### Chapter 3 : 子宮内膜類内膜腺癌G1, G3の組織切片によるUV-Vis MS

UV-MSにおいて G3はG1に比べて、紫外線各波長透過率は低かった (p<0.01) (G3は多くの紫外線吸収物質をもつ)。

Vis-MSにおいて G3はG1に比べて、540 nm(紫)、520 nm (赤紫)、560 nm (青紫)の順に透過率が低かった (各色みが濃い)。

正準相関分析の結果 (Fig. 2)、正準相関係数 (核色彩と紫外線各波長との関係が最大になる係数) において、G3 (rc=0.574, p<0.01) はG1 (rc=0.899, p<0.01) に比べて低く、この時のG3の重み係数 (標準化した変数値で紫外線と可視光線が最も強い相関関係にある時の、それぞれの下位にある変数が係った度合い) は、同程度 (2.055~5.476) であった。よって、G3は、特定の核色彩は、特定の紫外線吸収物質の変化によっているのではないということが明らかになった。

### V. まとめ

UV-Vis MS法は、培養細胞株におけるLBC標本の無染色細胞診 (判別的中率 96.3%)、Papanicolaou染色細胞診(判別的中率 98.0%) のがん判定に有用であった。組織標本における検討から、G3ほど核色彩の変化には、特定の紫外線物質が係らないことが明らかになり、悪性度評価に有用であることが分かった。これらの基礎的研究を基盤に 今後はより多くの臨床材料を用いた検討を行い、がん細胞判定のみならず、がん細胞の悪性度評価、予後評価の有用性について検証する予定である。

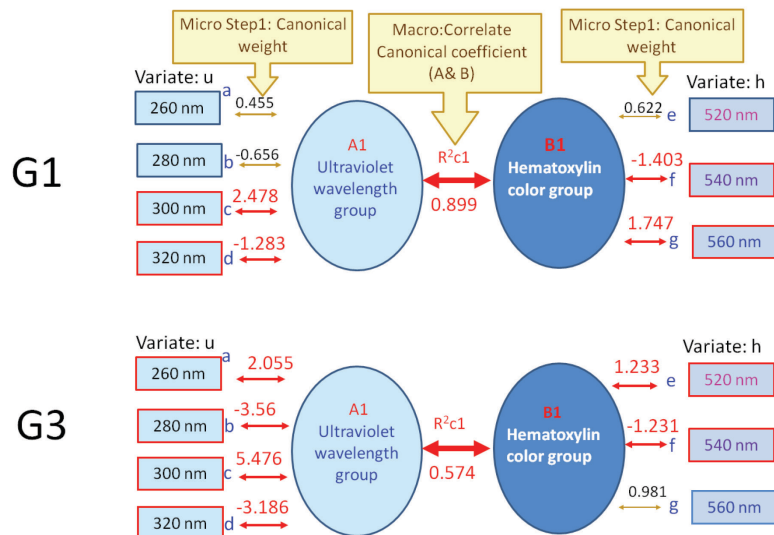


Fig. 2 Graphical presentaion of comparison of the standardized canonical coefficients of the first canonical variables ( G1 and G3)