

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：84503

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15727

研究課題名(和文) 顕微内視鏡による頭頸部腫瘍の新しい光学生検法の開発

研究課題名(英文) Optical Biopsy in Head and Neck tumors using micro-endoscope

研究代表者

船曳 和雄 (Funabiki, Kazuo)

公益財団法人先端医療振興財団・その他部局等・研究員(上席・主任研究員クラス)

研究者番号：00301234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は細胞レベルの解像度をもつ顕微内視鏡システムを作成し、頭頸部腫瘍、特に扁平上皮癌の迅速診断における有用性について検討した。対象は神戸市立中央市民病院頭頸部外科にて手術した扁平上皮癌例で、摘出標本を手術室内に設置したシステムで迅速評価する形で行った。扁平上皮癌組織では高率に青色(473nm)レーザー励起に対する緑領域(500-550nm)の自家蛍光の低下を認めた。さらにアクリフラビン滴下による迅速蛍光染色では、正常粘膜領域と扁平上皮癌領域とで核の均一性、分布等に明確な差が認められる例が多く、頭頸部外科領域に於ける顕微内視鏡のリアルタイム光学生検による組織学的評価の有用性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：We designed a fiber-bundle based confocal micro-endoscope which can be used for real time optical biopsy (Goto et al, PNAS 2015) and evaluated its usefulness in head and neck tumor cases, especially, squamous cell carcinomas. Dissected specimen were first evaluated about its auto-fluorescence spectral profile with 473nm or 561nm laser excitation, and then fluorescence labeled by drop application of 0.03-0.1ug/ml acriflavine to visualize the nuclei and underwent optical observation by the micro-endoscope. Auto-fluorescence spectral analysis revealed that the auto-fluorescence (500-550nm) of cancer tissue against 473nm excitation was lower than that of corresponding normal tissue. Although, some training seems required for judgement, there existed a clear difference between tumor tissue and normal pharyngeal mucosa in the uniformity of nuclear size and shape, indicating its promising efficacy in the real-time histological evaluation of head and neck tumors.

研究分野：脳計測科学

キーワード：光学生検 顕微内視鏡 in vivo Optical biopsy

1. 研究開始当初の背景

細胞レベルの解像度を持つ顕微内視鏡を用いた即時的な組織診断、いわゆる光学生検 (Optical biopsy) は、迅速な診断や即時的な腫瘍組織の広がりや評価できる利点から欧米を中心に消化器内科、呼吸器内科領域で広まり (Jabbour et al., *Annals Biomedical Engineering*, 2012)、頭頸部外科領域でも報告が散見される (Abbaci et al., *Oral Oncology*, 2014 など)。これら報告のほとんどが市販品の顕微内視鏡システムを使用したもので、その代表的な物として仏国 MaunaKea 社が販売する CellVizio システムがある。このシステムは 488nm あるいは 660nm のレーザー光を励起光として Proflavine などの蛍光色素の全身投与、あるいは局所噴霧により組織を蛍光ラベルして観察している。2014年に研究目的では2色の蛍光をモニターできるシステムが4000万程度で発売されたが、臨床に使用可能なものは単色の蛍光染色にしか対応しない。そのため、得られる組織学的な情報に限界があり、それによる診断にはトレーニングが要ると言われている (*United European Gastroenterol J.*, 2015)。価格も2500万程度と高額であり、多くの施設で容易には導入できないのが現状と思われる。

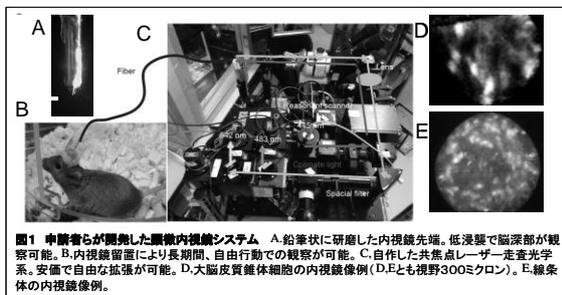


図1 申請者が開発した顕微内視鏡システム。A.鉛筆状に研磨した内視鏡先端、低浸襲で脳深部を観察可能。B.内視鏡留置により長時間、自由行動での観察が可能。C.自作した共焦点レーザー走査光学系。安価で自由な拡張が可能。D.大脳皮質錐体細胞の内視鏡像例 (D,Eとも視野300ミクロン)。F.線条体の内視鏡像例。

一方、申請者らはこれまで脳研究のために小動物の脳に刺入して細胞レベルの蛍光組織像を得ることのできる顕微内視鏡システムを開発し (船曳, *Equilibrium Res*, 2011, 2015)、それを大脳基底核の神経回路の解析 (Goto et al, *PNAS*, 2015, Yamaguchi et al, *PNAS*, 2015) や、扁桃体回路の解析 (Isosaka et al., *Cell*, 2015) などに応用してきた (図1参照)。このシステムは CellVizio とほぼ同等の光学性能をもち、自作しているため安価 (市販品の5分の1以下) だけでなく、任意の波長のレーザーと組み合わせることで複数の蛍光波長を同時に検出することができる。このため、これまで報告されている光学生検法 (蛍光色素の局所散布による単色蛍光像観察) のみならず、全く新しい計測法を試みる事が可能である。

2. 研究の目的

本研究では、頭頸部腫瘍症例の摘出標本に対して、申請者らが開発してきた顕微内視鏡により様々な方法 (自家蛍光、多色蛍光染色、特異的抗体染色) を使って手術室でリアルタイムに光学生検を行う。そして、その結果と臨床病理組織学的な結果とを照合することで、臨床で、最も効率的かつ合理的な光学生検の方法の確立と、それに適した顕微内視鏡

システムの開発を行う。

3. 研究の方法

頭頸部腫瘍例の摘出標本を対象とし、摘出直後に手術室で自家蛍光、各種蛍光色素、さらに特異的抗体染色を行い、リアルタイムで顕微内視鏡により組織像を得る。さらに通常の病理診断プロセスを経て得られる最終病理結果との対比を経て、臨床的に最も効率的な光学生検法の確立とシステムの開発を行う。また同時に理化学研究所にて腫瘍モデル動物を用いた検討も行い、顕微内視鏡による組織光学生検法の確立を目指す。

4. 研究成果

顕微内視鏡は、市販の光ファイバー束を部材として使用し、一端を平面に、反対側を竹槍状に研磨し、平面側を試作した共焦点レーザー走査光学系で走査する形で竹槍状先端部周辺の組織像を可視化した。対象は神戸市立医療センター中央市民病院頭頸部外科にて手術した扁平上皮癌症例で、手術により摘出された標本を手術室内に設置したシステムで迅速に評価する形で行った。扁平上皮癌組織では高率に青色 (473nm) レーザー励起に対する緑領域 (500-550nm) の自家蛍光の低下を認めた。また、アクリフラビン滴下による迅速蛍光染色では、正常粘膜領域と扁平上皮癌領域とで核の均一性、分布等に明確な差が認められる例が多く、頭頸部外科領域に於ける顕微内視鏡のリアルタイム光学生検による組織学的評価の有用性を示唆する結果であった。

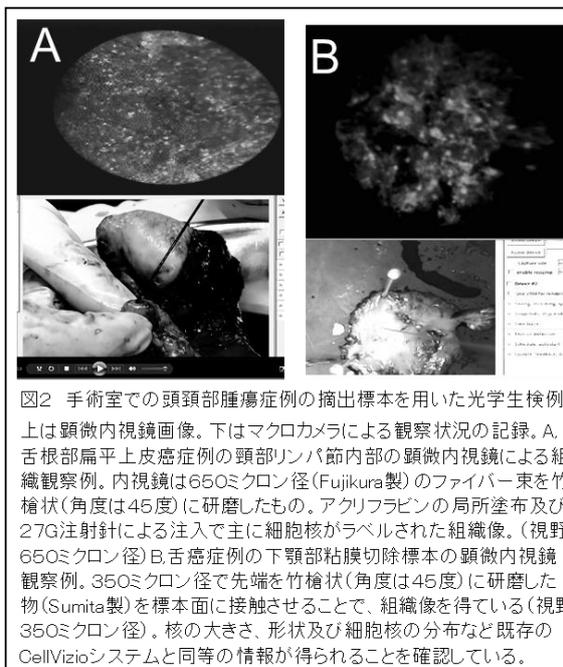


図2 手術室での頭頸部腫瘍症例の摘出標本を用いた光学生検例。上は顕微内視鏡画像。下はマクロカメラによる観察状況の記録。A.舌根部扁平上皮癌症例の頸部リンパ節内部の顕微内視鏡による組織観察例。内視鏡は650ミクロン径 (Fujikura製) のファイバー束を竹槍状 (角度は45度) に研磨したもの。アクリフラビンの局所塗布及び、27G注射針による注入で主に細胞核がラベルされた組織像。(視野650ミクロン径) B.舌癌症例の下顎部粘膜切除標本の顕微内視鏡観察例。350ミクロン径で先端を竹槍状 (角度は45度) に研磨した物 (Sumita製) を標本面に接触させることで、組織像を得ている (視野350ミクロン径)。核の大きさ、形状及び細胞核の分布など既存の CellVizio システムと同等の情報得られることを確認している。

同時に我々は、理化学研究所 CLST にて腫瘍モデル動物を用いた検討も行った。具体的には、細胞周期をリアルタイムで可視化する Fucci (Fluorescent ubiquitination-based

cell cycle indicator、理研 BSI 宮脇研より分与)を導入した線維肉腫 HT1080-Fucci5 細胞株を担癌したヌードマウスに、同システムを応用し、がん組織構造と細胞周期の関係性及び、抗がん剤に対する応答を経日的に連続観察した。担癌されたがん組織は、表面部と内部で分裂細胞の分布が異なり、表面部では増殖期 (G2/M) の細胞が多く、中心部付近では休止期 (G1) の細胞と増殖期の細胞が混在していることが明らかになった。そして、細胞分裂を阻害する抗がん剤ドキシソルビシンを静脈投与すると、がん組織中央部だけではなく、表層部の細胞もほぼすべて休止期に変化した。さらに抗がん剤の投与を中止すると、再び増殖期の細胞が出現し、がん組織の肥大化が観察された。この結果から、本システムは微小環境と組織構造を細胞レベルの解像度で長期的に連続撮影することができ、抗がん剤を評価する上で有用なツールになりうることを示された。(図 3 参照)

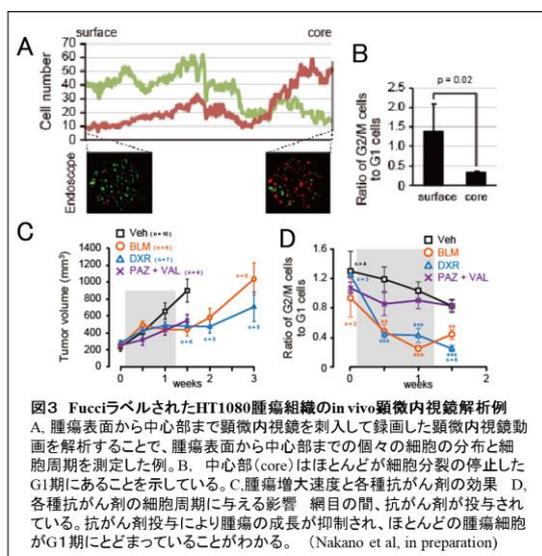


図3 FucciラベルされたHT1080腫瘍組織のin vivo顕微内視鏡解析例
A. 腫瘍表面から中心部まで顕微内視鏡を刺入して録画した顕微内視鏡動画を解析することで、腫瘍表面から中心部までの個々の細胞の分布と細胞周期を測定した例。B. 中心部 (core) はほとんどが細胞分裂の停止したG1期にあることを示している。C. 腫瘍増大速度と各種抗がん剤の効果。D. 各種抗がん剤の細胞周期に与える影響。網目の間、抗がん剤が投与されている。抗がん剤投与により腫瘍の成長が抑制され、ほとんどの腫瘍細胞がG1期にとどまっていることがわかる。(Nakano et al, in preparation)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1, Contribution of action potentials to the extracellular field potential in the nucleus laminaris of barn owl. Kuokkanen PT, Ashida G, Kraemer A, McColgan T, Funabiki K, Wagner H, Köppl C, Carr CE, Kempter R. *J Neurophysiol.* 2018 Apr 1;119(4):1422-1436.

2, An attempt to measure the diametric relationship between slow and quick phases of nystagmus. Kanazawa Y, Funabiki K, Taura A, Imai T, Torii H, Ogita H, Okano T, Ito J, Omori K. *Acta Otolaryngol.* 2018 Jan 21:1-6.

3, In vivo calcium imaging from dentate

granule cells with wide-field fluorescence microscopy. Hayashi Y, Yawata S, Funabiki K, Hikida T.

PLoS One. 2017 Jul 12;12(7):e0180452.

4, Micro-endoscopic system for functional assessment of neural circuits in deep brain regions: Simultaneous optical and electrical recordings of auditory responses in mouse's inferior colliculus. Yashiro H, Nakahara I, Funabiki K, Riquimaroux H. *Neurosci Res.* 2017 Jun;119:61-69.

5, Contribution of action potentials to the extracellular field potential in the nucleus laminaris of barn owl. Kuokkanen PT, Ashida G, Kraemer A, McColgan T, Funabiki K, Wagner H, Köppl C, Carr CE, Kempter R. *J Neurophysiol.* 2018 Apr 1;119(4):1422-1436.

6, Regenerative therapy for vestibular disorders using human induced pluripotent stem cells (iPSCs): neural differentiation of human iPSC-derived neural stem cells after in vitro transplantation into mouse vestibular epithelia. Taura A, Nakashima N, Ohnishi H, Nakagawa T, Funabiki K, Ito J, Omori K. *Acta Otolaryngol.* 2016 Oct; 136(10):999-1005.

7, ファイバー型顕微内視鏡とそれを用いた自由行動下の記録法について 藤飯慎也 船曳和雄 *日本レーザー医学会誌* 37(4): 459-464 2017

[学会発表] (計 7 件)

1, がん微小環境を長期間連続観察できる in vivo 顕微内視鏡システムの開発 中野 真行、後藤 俊志、阪上 (沢野) 朝子、安藤 亮子、宮脇 敦史、渡辺 恭良、片岡 洋祐、船曳 和雄 日本分子生物学会年会 2016年12月1日 パシフィコ横浜

2, Optical Biopsy in Head and Neck Cancers using Fiber-bundle based Micro-endoscope. Shogo Shinohara, Kazuo Funabiki, Masayuki Nakano, Toshiyuki Goto, Yosky Kataoka, Shinji Takebayashi, Koji Saida, Kazuki Hayashi, Ryosuke Yamamoto, Tetsuhiko Michida, Hiroyuki Harada, Keizo Fujiwara, Yukihiro Imai, Yasushi Naito 5th Congress of ORL-HNS Oncology, Indonesia, 2017年3月22日

3, VOG による衝動性眼球運動評価: 必要なビデオレートとスプライン補完の有用性の検討 船曳和雄 桐村晋 吉川英基 第 75 回

日本めまい平衡医学会総会・学術講演会
2016年10月28日大阪

4, ファイバーバンドル型頭微内視鏡による
自由行動下の脳内キナーゼ計測
船曳和雄 第39回日本神経科学会大会 シ
ンポジウム 「ファイバーフォトメトリを用
いた行動中動物の脳深部神経活動記録」
2016年7月22日 パシフィコ横浜

5, 微小重力環境における前庭有毛細胞につ
いての検討 田浦晶子, 中川隆之, 船曳和
雄, 辻純, 伊藤壽一, 大森孝一 第75回日
本めまい平衡医学会総会・学術講演会 2016
年10月28日 大阪

6, オリジナルのWindowsソフトを用いた自
覚的視性垂直位(SVV)の計測 扇田秀章,
金沢佑治, 鳥居紘子, 田浦晶子, 船曳和雄,
伊藤壽一, 大森孝一 第75回日本めまい平
衡医学会総会・学術講演会 2016年10月28
日 大阪

7, 頭微内視鏡による頭頸部腫瘍の光学生検
船曳和雄, 篠原尚吾, 中野真行, 後藤俊志,
片岡洋祐, 竹林慎治, 齋田浩二, 林一樹, 山
本亮介, 道田哲彦, 原田博之, 藤原敬三, 今
井幸弘, 内藤泰 日本頭頸部癌学会 201
7年6月8日 京都

〔図書〕1件

1, 脳内キナーゼイメージング
船曳和雄 脳内環境辞典 メディカルドゥ
P78-79 2016

〔産業財産権〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船曳和雄 (FUNABIKI, Kazuo)
公益財団法人先端医療振興財団
先端医療センター研究所 上席研究員
研究者番号:

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

内藤泰 (NAITO, Yasushi)
公益財団法人先端医療振興財団
その他の部局、研究員
研究者番号: 70217628

篠原尚吾 (SHINOHARA, Shogo)
公益財団法人先端医療振興財団
その他の部局、研究員
研究者番号: 80263078

(4) 研究協力者

中野真行 (NAKANO, Michiyuki)
片岡洋祐 (KATAOKA, Yosky)