

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09474

研究課題名（和文）組織透明化技術を用いた新たな内視鏡診断技術の確立

研究課題名（英文）A novel diagnostic method using gastrointestinal endoscopy and transparency-increasing technology.

研究代表者

小野 敏嗣 (ONO, Satoshi)

東京大学・医学部附属病院・登録診療員

研究者番号：40611934

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：ブタ消化管を用いた検証では、食道・胃・大腸のいずれの検体においても透明化後に有意に観察可能深度の延長が認め、任意の断面における腺管構造を描出でき、腺管の3次元構造が構築可能であった。また、透明化後の検体に対するHE染色・Ki67免疫染色はいずれも良好な染色性を示した。また明らかな組織の変形・損傷を示唆する所見は認められなかった。ヒト消化管を用いた検討でも同様の結果が示され、LUCIDによる病理検体の包括的な評価および検体に対する非侵襲性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化管腫瘍性病変に対する内視鏡治療検体を透明化して、その腺管構造や血管構造を立体的に評価することにより、最終的には病理学的な診断精度を高めることを目的とし、従来評価できなかった薄切断面以外での脈管侵襲の有無や深部構造を評価する手法を確立し、さらには将来的にはこの手法により得られた知見に基づいた新たな内視鏡機器の開発に繋げることができると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The LUCID technology was effective to evaluate the deeper inside of the specimen obtained from the gastrointestinal tracts of animal models and human. Stacking of vertical images could construct the 3D image of specimen which can be used for evaluation of the structure of vessels and ducts in any slices. It was also revealed that the LUCID technology did not disturb the conventional histopathological assessment including the immunostaining.

研究分野：消化器内科学

キーワード：透明化 病理 消化管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

消化管腫瘍性病変の診断には内視鏡治療などによる切除検体の病理学的評価が不可欠であり、臨床現場においては幅 2mm 程度で分割された検体の断面の HE 染色による二次元での評価が一般的である。しかし、薄切断面以外での評価はなされないために病理学的評価が不十分となってしまう、結果として薄切断面以外に存在した脈管侵襲を見逃され数年後に再発してしまう“治療切除”症例など、患者に不利益をもたらす可能性があるという点が現状での問題点と考えられている。切除検体をより正確に評価するためには切除検体全体の三次元的な評価法が望ましいが、HE 染色による二次元情報を元にコンピューターを用いて擬似的に三次元構造を構築する方法などがあるものの非常に煩雑であり、また病変全体を薄切する必要がある(検体全体を不可逆的に薄切しなければならない)などの問題点があり、実際の臨床現場で使用できる簡便な方法が確立されていない。

2. 研究の目的

共同研究者である東京大学大学院工学系研究科小野寺らは、2,2'-チオジエタノールと、グリセロールおよびグリセロール及び非イオン性有機ヨウ素化合物の少なくとも一方を含む水性溶媒中に組織を浸漬することにより組織を透明化する手法 LUCID (illumination of Cleared organs to Identify target molecules) を開発しており、この手法は全ての組織を短時間に透明化でき、安全で難燃性の試薬のみを使用し、特殊な器具を使用せずに単純浸漬のみで組織を透明化できる新規の組織透明化技術である。この手法を用いて組織を透明化することで組織を薄切することなく深部まで観察することが可能となる。本研究は、消化管腫瘍性病変に対する内視鏡治療検体を透明化して、その腺管構造や血管構造を立体的に評価することにより、最終的には病理学的な診断精度を高めることを目的とし、従来評価できなかった薄切断面以外での脈管侵襲の有無や深部構造を評価する手法を確立し、さらには将来的にはこの手法により得られた知見に基づいた新たな内視鏡機器の開発に繋げることができると考えられる。

3. 研究の方法

3-1. ブタ消化管に対する LUCID の有効性・非侵襲性についての検討

透明化処理により通常の HE 染色・免疫染色が影響を受けないことを動物モデルとしてブタ消化管で評価する。具体的には、動物モデルの消化管(豚食道・胃・大腸)を用いて、DAPI や Tomatolectin などの蛍光標識色素で染色を行い、LUCID により透明化処理を行った上で共焦点顕微鏡・多光子顕微鏡による観察を行う。さらに透明化検体を再びパラフィン固定の上で HE 染色・免疫染色を行い、透明化処理を行わなかった透明化による影響の有無を評価する。

3-2. ヒト消化管に対する LUCID の有効性・非侵襲性についての検討

透明化処理により通常の HE 染色・免疫染色が影響を受けないことをヒト検体で評価する。ヒトの検体を用いてと同様の評価を行い、動物モデルとの差異を評価して、ヒト検体での条件の最適化を図る。

4. 研究成果

4-1. ブタ消化管に対する LUCID の有効性・非侵襲性についての検討

ブタ消化管粘膜の透明化、3次元撮像を行い、その有効性・非侵襲性について検討した。組織の3次元撮像のための蛍光染色には、DAPI による核酸染色、Tomatolectin による血管内皮染色を使用した。透明化された検体の撮像には共焦点レーザー顕微鏡を使用し、焦点面を z 軸方向に少しずつずらしてスキャンし、層として立体的に画像データを集積する Z-stack を獲得した。取得した Z-stack は、画像処理ソフトを用いて3次元的に再構築し検証を行った。

4-1-1. 肉眼的透明性

LUCID により透明化したブタ消化管粘膜は、ホルマリン固定後の消化管粘膜をそのまま透明化した(A)群に対して、一旦パラフィン包埋のちに脱パラフィン化した(B)群の検体においてより透明性が高い傾向が確認できた。これは、ヒト消化管粘膜検体に適用するにあたって好ましい結果であり、以降の検討については脱パラフィンを経た(B)群の検体を用いて行うこととした。

4-1-2. 観察可能深度

LUCID により肉眼的に透明化されたブタ消化管粘膜(B)群のものについて、多光子顕微鏡による観察可能深度を測定した。多光子顕微鏡による撮像において、隣り合う2つの核を分離して認識できる最大深度を観察可能深度とし、測定は透明化の前後に各検体につき任意の5点ずつで施行し、比較検討した。各観察可能深度は、透明化前後で、食道 $118.6 \pm 3.5 \mu\text{m}$ 、 $673.1 \pm 9.0 \mu\text{m}$ 、 $p < 0.05$ 、胃 $150.0 \pm 11.9 \mu\text{m}$ 、 $680.4 \pm 65.4 \mu\text{m}$ 、 $p < 0.05$ 、大腸 $129.1 \pm 4.2 \mu\text{m}$ 、 $611.8 \pm 23.3 \mu\text{m}$ 、 $p < 0.05$ と、いずれの検体においても透明化後に有意に観察可能深度の延長が認められた。

4-1-3. 3次元イメージング

共焦点顕微鏡、および多光子顕微鏡によって撮像した Z-stack 画像を画像処理ソフトを用いて3次元再構築を行なった。共焦点顕微鏡を用いて撮像したブタ胃粘膜の3次元像では、高倍率で高精細な胃の腺管構造とそれを縁取る細胞核が明瞭に描出された。多光子顕微鏡にて撮像し3次元再構築を行なった食道粘膜では、粘膜下層の細い血管の走行やさらに深層の食道腺構造までを描出することが出来た。同様に多光子顕微鏡で撮像し3次元再構築した大腸粘膜でも粘膜

深層までの腺管構造が認識でき、いずれに対しても任意の断面における腺管構造を描出でき、腺管の3次元構造を明らかにした。

4-1-4. 非侵襲性の検討

透明化処理、共焦点顕微鏡による撮像の工程を終えたブタ消化管検体について、その過程における組織への障害・損傷を検討するため、再度パラフィン包埋の上で従来の病理学的評価を追加した。食道・胃・十二指腸のいずれにおいても HE 染色・Ki67 免疫染色の双方に対し良好な染色性を示した。また明らかな組織の変形・損傷を示唆する所見は認められなかった。

4-2. ヒト消化管に対する LUCID の有効性・非侵襲性についての検討

当院にて内視鏡治療 ESD によって切除され、病理学的評価ののち保管されている食道・胃・十二指腸・大腸のそれぞれの消化管粘膜検体について、ブタ消化管粘膜での検討と同様に LUCID による透明化、3次元撮像を行い、その有効性・非侵襲性について検討した。有効性・非侵襲性の検証についても、ブタ消化管粘膜での検証と同様に、透明化前後の共焦点顕微鏡による観察可能深度の比較。透明化後の従来の病理学的評価による組織学的な変形・変性の有無を評価した。病理学的評価には、消化管病理学の日常診療にて使用される頻度の高い、HE 染色、Ki67 免疫染色、p53 免疫染色、E-cadherin 免疫染色を用いた。

4-2-1. 観察可能深度

各検体内の任意の5点における共焦点顕微鏡による観察可能深度は、透明化前後で、食道 $228.3 \pm 14.9 \mu\text{m}$ 、 $1036.7 \pm 62.9 \mu\text{m}$ 、 $p < 0.05$ 、胃 $115.2 \pm 5.5 \mu\text{m}$ 、 $428.7 \pm 15.9 \mu\text{m}$ 、 $p < 0.05$ 、十二指腸 $256.2 \pm 9.5 \mu\text{m}$ 、 $787.0 \pm 18.6 \mu\text{m}$ 、 $p < 0.05$ 、大腸 $113.9 \pm 5.4 \mu\text{m}$ 、 $436.6 \pm 18.5 \mu\text{m}$ 、 $p < 0.05$ であった。ブタ消化管粘膜での結果と同様に透明化による有意な観察可能深度の延長が確認できた。

4-2-2. 3次元イメージング

ブタ消化管粘膜と同様に良好な3次元像を構築することが可能であり、3次元化された画像はソフトウェア上で矢状断・水平断に限らず任意の断面で切って評価することが可能であった。

4-2-3. 非侵襲性の検討

ブタ消化管粘膜の検討と同様に、透明化・3次元撮像を終えたヒト消化管粘膜切片を再度パラフィンブロックの形に戻し、薄切のうえ従来の病理学的評価を行ない、透明化前のものと比較した。HE 染色では食道・胃・大腸のいずれにおいても良好な染色性を示し、微細構造も良好に保持されている。透明化前後で比較しても明らかな変形・変性・組織の破損は指摘できず、形態学的な影響は最小限であるものと考えられた。また消化管病理学にてしばしば用いられる Ki67、p53、E-cadherin 免疫染色においても、陽性細胞の認識は同様に可能であり明らかな染色性の低下や陽性率の低下は認められなかった。

以上のように、LUCID を用いた組織透明化・3次元イメージング技術の、ブタ消化管粘膜における有効性と非侵襲性が確認できた。同様にヒト消化管粘膜検体においてもその有効性・非侵襲性を示されており、消化管の臨床検体について過去に保管されているものも含めて広く適用可能な画期的な技術であることが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mizutani H, Ono S, Ushiku T, Kudo Y, Ikemura M, Kageyama N, Yamamichi N, Fujishiro M, Someya T, Fukayama M, Koike K, Onodera H.	4. 巻 68
2. 論文標題 Transparency-enhancing technology allows three-dimensional assessment of gastrointestinal mucosa: A porcine model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 102-108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.12627	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水谷浩哉、小野敏嗣、牛久哲男他
2. 発表標題 組織透明化技術を応用した消化管粘膜の3Dイメージング
3. 学会等名 JDDW2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水谷浩哉、小野敏嗣、小野寺宏、他
2. 発表標題 胃腫瘍性病変の拡大内視鏡血管所見の病理学的検証における組織透明化技術有効性の検討
3. 学会等名 第14回日本消化管学会総会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野敏嗣、水谷浩哉、伊藤峻他
2. 発表標題 内視鏡生検体の病理評価における組織透明化技術応用の可能性に関する検討
3. 学会等名 JDDW2019
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----