

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成21年 4月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2006～2008
課題番号：18500340
研究課題名（和文）
高速生物フォトン画像計測による迅速がん病理診断
研究課題名（英文）
Pathological Diagnosis of Cancer by Immediate Biophoton Imaging
研究代表者
武田 元博（TAKEDA MOTOHIRO）
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：10333808

研究成果の概要：

がん手術において迅速病理診断は病変の悪性診断のみならず、切除断端における腫瘍の遺残
の判定により正確な切除範囲を決定する上で欠かせない病理検査であり、個々の患者の病期に
合わせた、いわば外科手術の個別化を実現する基本的検査法とすることができる。しかしすべ
ての病院に病理医がいるわけではないため、迅速病理診断ができるわけではなく、現実的に多
くの病院では迅速病理診断を行うことができない。こうした病院では、外注で行うことがあ
るが、手続きが煩雑で手術時間の延長の問題があるため、初回手術の後に病理診断を基に再手術
が行われることも少なくない。我々はこれまで生物フォトン現象の研究過程において、悪性腫瘍
組織が極微弱な光を発することを示してきた。今回、その結果を基に手術組織の生物フォトン
計測からがん悪性度診断を試みている。従来生物フォトン計測は30分以上の計測時間を要す
るため、標本の輸送時間を合わせると迅速病理診断には向かない面があった。我々は高開口度レ
ンズや高感度ディテクタ等、種々の工夫から15分程度で計測可能な方法を開発した。
本年は担癌動物の腫瘍について計測を行い、更に長時間の安定な計測条件を求めた。その結果、
冷却と最適ガス選択により最適な計測を行い得る1時間程度の保存が可能になった。当施設に
おける手術室から計測装置までの移動、設定、計測開始に1時間程度を要することから、ヒト
標本を計測するのに最低限の保存が可能になったと言える。
現在移植腫瘍について更に他の腫瘍について有用性の検討を行っている。なお、乳がんについては
病理診断の臨床試験を行うべく準備中である。本方法は組織形態によらず、組織の生理的機能から
悪性診断を行い得る方法であり、実用化が期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	690,000	4,190,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：生物フォトン、がん、外科学、病理学

1. 研究開始当初の背景

がんの外科手術において、がんを完全に切除しているか否かを確認し、術中の手術方針を最終決定する上で迅速病理診断は欠かせない方法である。しかし標本作製において凍結切片を用いるため、クライオトームによる薄切時に組織の挫滅によって診断が困難となり、ホルマリン固定による永久標本を用いた診断とくい違ふことがある。さらに診断に40-60分もの時間を要し、手術の進行を遅らせる要因にもなっている。また病理診断は根本的に形態的診断であるため、腫瘍のviability等機能的側面は形態から類推することしかできない。したがって直接悪性度診断を迅速かつ腫瘍組織の機能面から診断を行う新しい方法が求められている。

生物フォトン計測は生体が発する極微弱な発光であり、がんにおいては正常組織に比べて発光強度が増すことが培養細胞モデルや担がん動物モデルを用いた実験によって明らかにされてきた。これらの研究から従来の形態的診断と異なり、発光強度によって、がんの悪性度の重要な指標である腫瘍の増殖能力等の機能が計測可能なことを示唆する結果も得られており、手術中の迅速病理診断に応用が期待される。我々は乳がん患者標本を用いた生物フォトン計測を試みてきた。しかし計測装置の高感度化が難しく、1時間以上を計測に要するなど、実用化に問題があった。

我々はこれまで計測光学系の改良により計測時間の短縮に成功した。さらに標本の搬送と計測時の組織のviability維持を課題として研究を進めてきた。

2. 研究の目的

手術標本の迅速なバイオフィトン計測によりがん組織の迅速病理診断による形態診断を補完する組織の機能すなわちviability、増殖性を反映する検査として実施可能なものとするために以下の項目について検討を行う。

- (1) 計測装置の改良により従来の計測時間の半分(30分以内)を目標に光学系の改良を行う。
- (2) 組織の最適な輸送方法および計測時の灌流培養系の条件を検討、最適化する。
- (3) がん組織の発光特性と病理標本を対比し、発光強度の分布と腫瘍、正常組織の分布との対比、腫瘍の病理学的悪性度の比較を行う。

3. 研究の方法

動物モデルとして、担癌マウスの腫瘍について計測を行い、更に長時間の安定な計測条件を求めた。

- (1) 手術標本の生物フォトン画像計測(フォトンカウンティングによる発光強度計測も含む)をがん手術および従来の病理診断と同時にを行い、データの蓄積を行う。
- (2) がん組織の発光特性と病理標本(発光強度の分布と腫瘍、正常組織の分布との対比、腫瘍の病理学的悪性度)、および生命予後、再発率を含めた臨床経過との対比を行い、生物フォトン計測の臨床的意義、有効性を検証する。
- (3) 切除した腫瘍組織のviabilityを長時間保つための計測系を、動物移植腫瘍を用いて確立する。具体的には灌流培養装置の手法を応用して保存する。その際の条件として、温度を室温または氷温、輸送時の気相を5%CO₂/airまたは5%CO₂/O₂と条件を変えて輸送し、データを比較した。培地はRPMI1640+10%FBSを使用した。また、生物フォトン計測装置の改良により生物フォトン計測に要する時間を、最終的には従来の迅速病理診断の半分となることを目標とし、より開口の大きなレンズ等光学系の改良や培養チャンバーの形状について検討を進める。

4. 研究成果

- (1) 生物フォトン計測装置の改良により生物フォトン計測に要する時間を、最終的には従来の迅速病理診断の半分となることを目標として開口値0.5のレンズを用いて集光効率を上げ、撮影時間の短縮を図った。その結果、従来用いた開口値1.0程度のレンズに比べ大きく短縮し、15分から30分程度で撮影可能となった。
- (2) 切除した腫瘍組織のviabilityを長時間保つための輸送法、計測系を確立すべく輸送用チャンバー、温度、気相の改良および灌流培養装置の手法の改良を行った。具体的には計測時の組織灌流において、培地を5%CO₂/airおよび5%CO₂/O₂で飽和させて計測を行った。気相は5%CO₂/airのほうがよりコントラストよく撮影できる傾向にあった。手術室から計測装置までの移動を想定した保存実験では温度を室温または氷温、輸送時の気相を5%CO₂/airまたは5%CO₂/O₂変えて生物フォトン画像を比較した。その結果、氷温、5%CO₂/airでの保存がより有用であった。

(3) がん組織の発光特性と病理標本を対比し、発光強度の分布と腫瘍、正常組織の分布との対比、腫瘍の病理学的悪性度の比較を行ったが、同じ組織像を呈している組織内の発光分布のばらつきがやや大きいことが分かった。したがって生命予後、再発率を含めた臨床経過との対比をする以前に、計測時の組織内の生物フォトン発光のばらつきの解消が必要であるとの結論に達した。以上の経緯により本研究では以下に述べる試料保存と計測条件の改良に主眼を置いて研究を行った。

以上より未だ改善の余地はあるものの、安定した計測を行う準備が整いつつある。当初の予定からは遅れてしまったが、今後臨床データとの対比を行う予定である。

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河合賢朗、石田孝宣、武田元博、多田 寛、大内憲明、外科医に必要ながん化学療法の知識B. がん化学療法の実践 7. 乳癌「乳癌の集学的治療と化学療法」。外科治療、Vol. 98、241-249、2008:増刊。(査読無)
- ②武田元博、権田幸祐、樋口秀男、大内憲明、がん分子イメージングの新展開。癌と化学療法、Vol. 35、No. 8、1277-1280、2008。(査読無)
- ③小林正樹: 生命科学・医学応用のための極微弱発光・蛍光イメージング技術。顕微鏡、43, 3, 202-206, 2008。(査読無)
- ④Kobayashi M, Sasaki K, Enomoto M, Ehara Y. Highly sensitive determination of transient generation of biophotons during hypersensitive response to cucumber mosaic virus in cowpea. J. Exp. Botany, 58, 3, 465-472, 2007。(査読有)
- ⑤菊地大輔、岡村均、小林正樹、超高感度CDによるヒト体表バイオフィトン概日リズムの画像計測。第27回日本レーザー医学会総会、論文番号05-3、日本レーザー医学会誌Vol. 27 No. 3, p. 233-233, 2006。(査読有)
- ⑥van Wijk R, Kobayashi M, van Wijk E. Anatomic characterization of human ultra-weak photon emission with a

movable photomultiplier and CCD imaging. J. Photochem. Photobiol. B: Biol, 83, 69-76, 2006。(査読有)

- ⑦Kobayashi M, Mizumoto T, Shibuya Y, Enomoto M, Takeda M. Fluorescence tomography in turbid media based on acousto-optic modulation imaging. Appl. Phys. Lett. 89, 18, 181102, 2006。(査読有)

[学会発表] (計 5件)

- ①Duc TQ, Nanbu Y, Suzuki T, Takahashi S, Takeda M, Kobayashi M. Fluorescence tomography based-on acousto-optic modulations with phased-array ultrasound transducer. BIOS Part of SPIE Photonic West, January 27, 2009, San Jose, USA.
- ②山内崇弘、渡邊尚哉、小林正樹、超高感度CCDを用いたヒト生物フォトンイメージングによる皮膚酸化ストレス計測の検討。平成19年東北地区若手研究者研究発表会、2007年3月1日、仙台。
- ③菊地大輔、千葉朋子、小林正樹、極微弱発光による化学反応波の動態計測とイメージング。平成19年東北地区若手研究者研究発表会、2007年3月1日、仙台。
- ④菊地大輔、岡村均、小林正樹、超高感度CDによるヒト体表バイオフィトン概日リズムの画像計測。第27回日本レーザー医学会総会、2006年11月2-3日、千葉。
- ⑤今野淳、鈴木聡、武田元博、水野麻弥、小川雄一、川瀬晃道、小林正樹、培養がん細胞AH109からのバイオフィトン検出による細胞代謝活性計測の検討。第45回日本生体医工学会大会、2006年5月15-17日、福岡。

[図書] (計 2件)

- ① 武田元博、権田幸祐、大内憲明。機能性ナノ粒子の医学領域における展開。有機分散系の分散・凝集技術、川口春馬編、シーエムシー出版、pp. 252-261、2008年8月29日
- ② 武田元博、小林芳男、小林正樹、櫻井遊、甘利正和、石田孝宣、鈴木昭彦、大内憲明。機能性ナノ粒子による生体イメージングーがん診療への応用ー。ナノメディシン ナノテクの医療応用、宇理須恒雄編、オーム社、pp. 64-74、2008年2

月 18 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 元博 (TAKEDA MOTOHIRO)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：10333808

(2) 研究分担者

大内 憲明 (OHUCHI NORIAKI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90203710

甘利 正和 (AMARI MASAKAZU)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50400312

(3) 連携研究者

小林 正樹 (KOBAYASHI MASAKI)
東北工業大学・工学部・教授
研究者番号：90332981