

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18060

研究課題名(和文) 生体自家蛍光の機序解明と術中イメージングシステム開発へ向けた基礎研究

研究課題名(英文) The investigation into the mechanism of tissue auto-fluorescence and development of new surgical technique

研究代表者

新田 吉陽 (Shinden, Yoshiaki)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・助教

研究者番号：20725733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：当研究では、(1)人体組織、臓器、種々の癌組織の自家蛍光の測定、(2)新規自家蛍光の原因物質の発見とその生物学的意義の探索、(3)自家蛍光を利用した新しいイメージング法と手術方法の確立を目的とした。今回の研究で特に副甲状腺の自家蛍光に注目した。副甲状腺の自家蛍光は近年発見されたが、その原因物質は不明であり、一方で手術中に副甲状腺を発見するのに有用である。まず副甲状腺の自家蛍光物質を同定するために、蛍光強度の異なる副甲状腺間でタンパク質解析を行うことで、複数の原因物質を絞り込むことに成功した。引き続き細胞株を用いた遺伝子発現実験により、原因物質を確定することを企図している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を基盤として、新しい手術手技を考案すること患者にとって手術の安全性が向上し、医療従事者にとっては手術の難易度が低下することが期待される。また、新たな医療機器を開発することで科学技術の向上にも寄与する可能性がある。新たな自家蛍光物質が同定されることで、他の臓器でも同様の手法が使用できれば、副甲状腺に限らない、より多くの疾患の治療に貢献できる可能性もある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we planned 1; measurement of autofluorescence in human tissues, organs, and various cancer tissues, 2; discovery of the causative agent of new autofluorescence and exploration of its biological significance, 3; building new imaging methods using autofluorescence and establish new surgical methods. particularly, we studied the autofluorescence of the parathyroid glands. Although autofluorescence of the parathyroid gland has been discovered in recent years, its causative agent is unknown, while it is useful for detecting the parathyroid gland during surgery. First, in order to identify autofluorescent substances in the parathyroid glands, we succeeded to find several candidate causative substances by performing protein analysis between parathyroid glands with different fluorescence intensities. We continue to attempt to determine the causative agent by gene expression experiments using cell lines.

研究分野：内分泌外科

キーワード：自家蛍光 副甲状腺 手術手技

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 外科手術における蛍光法の意義

蛍光法により肉眼では捉えられない生体の生物学的情報(臓器の区別、がん組織と正常組織の区別など)を可視化することは、外科手術の精度向上に加え、患者の生存率も寄与しうる有用な技術である。

### (2) 蛍光法の外科手術への応用

現在、蛍光法そのものは外科手術でも広く用いられているが、そのほとんどの蛍光法は生体への薬物投与を必要とする方法である。一方で生体には元来、自家蛍光を有する組織が存在するが、それを外科手術において積極的に活用する技術はほとんど存在していなかった。

### (3) 自家蛍光による生体組織の識別

2011年に米国のグループによって副甲状腺組織が近赤外領域に自家蛍光を有することが見出された(Paras et al. *J Biomed Opt.* 2011)。我々は、副甲状腺組織の自家蛍光が ICG の蛍光スペクトルと類似している点に注目し、既存の蛍光検出装置(Photo Dynamic Eye neo、以下 PDE-neo、浜松ホトニクス社製)を用いて、副甲状腺の自家蛍光を検出し、簡便かつ高い実用性のある術中の副甲状腺同定法を示した(Shinden et al. *World J Surg.* 2017より)。これまでは外科医の経験に頼ってきた生体組織の識別を客観的な手法で可能とし、外科手術の精度向上に寄与しうる成果であった。一方、その副甲状腺の自家蛍光を生み出している原因物質はまだ特定されておらず、生体組織が有する自家蛍光については科学的には未知の部分が多いのも現状である。生体物質、特に外科手術において重要となる組織や臓器ごとの吸収スペクトルと蛍光スペクトルは、医学において非常に重要な生態情報であるにも関わらず、非常に限られている。この基礎的な生態情報を収集することで、未知の自家蛍光物質を見だし、加えて既知の蛍光物質の組織ごとの分布の差異を同定すれば、新たな組織識別方法が見出しうる。

## 2. 研究の目的

- (1) 人体組織、臓器、種々の癌組織の自家蛍光の網羅的測定
- (2) 新規自家蛍光の原因物質の発見とその生物学的意義の探索
- (3) 自家蛍光を利用した新しいイメージング法と手術方法の確立

## 3. 研究の方法

### (1) 人体組織、臓器、種々の癌組織の自家蛍光の網羅的測定

分光蛍光光度計を用いて、可視光～赤外領域における上記組織(摘出切片)の吸収スペクトルと蛍光スペクトルを測定する。生体組織(in vivo 測定)では励起用 LED ライト、CCD カメラ、光学フィルターを用いて、手術野での自家蛍光測定を行う。

(2) (1)において得られたスペクトルデータを解析し、既知の蛍光物質の濃度分布の同定と新規蛍光スペクトルの探索を行う。新規蛍光スペクトルが得られた際には、同種の組織を採取し、その自家蛍光の強弱で分類、マイクロアレイなどで蛍光活性物質の同定を行う。腫瘍組織において新規蛍光活性物質が見られた場合は、細胞株実験でその生物学的意義の探索も行う。我々のこれまでの知見から、組織の自家蛍光の強度は同一組織においても均一ではなく、それは原因物質の多寡に依存していると考えられる。蛍光強度の異なる同一組織片を採取し、蛍光強度に応じた cDNA ライブラリを作成する。ライブラリを蛍光の強弱で分類して DNA マイクロアレイを行い、候補となる核酸や蛋白質を同定する。それらを精製あるいは siRNA で抑制し蛍光顕微鏡で観察することで自家蛍光の原因物質を同定する。腫瘍組織において自家蛍光を生み出す物質が見いだされた際には、臨床学的解析、細胞株実験を行い、その生物学的意義を探索する(図)。

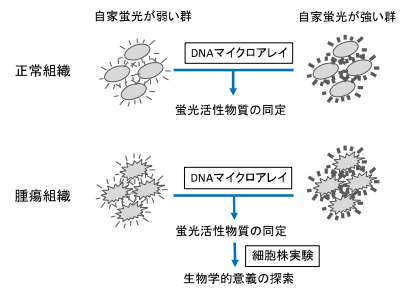


図2: 蛍光活性物質とその生物学的意義の探索

(3)既に手術中の組織同定法として有用性が示されている、副甲状腺組織の自家蛍光検出を対象として、現行の機器を改良し、より高感度な測定機器を開発する。具体的な改良点として、励起ライトの光度増強、フィルターによる余剰な光の遮断、蛍光検出カメラのフィルターの可変化を実現し汎用性を高める、画像処理による術中視認性の向上、内視鏡機器への応用を想定している。さらに目的(1)、(2)で得られた自家蛍光データを元にして、現在行われている外科手術において有用な新たな組織識別方法を探索する。術中の生体内の癌細胞の可視化による存在診断や、もともと肉眼では困難な組織識別、あるいは癒着などにより識別困難となった組織の区別を容易とすることを想定している。

#### 4. 研究成果

当研究では、(1)人体組織、臓器、種々の癌組織の自家蛍光の測定、(2)新規自家蛍光の原因物質の発見とその生物学的意義の探索、(3)自家蛍光を利用した新しいイメージング法と手術方法の確立を目的とした。今回の研究で特に副甲状腺の自家蛍光に注目した。副甲状腺の自家蛍光は近年発見されたが、その原因物質は不明であり、一方で手術中に副甲状腺を発見するのに有用である。まず副甲状腺の自家蛍光物質を同定するために、蛍光強度の異なる副甲状腺間でタンパク質解析を行うことで、複数の原因物質を絞り込むことに成功した。引き続き細胞株を用いた遺伝子発現実験により、原因物質を確定することを企図している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshiaki Shinden, Kosei Maemura, Motoyuki Hashiguchi, Yota Kawasaki, Hiroshi Kurahara, Yuko Mataka, Satoshi Ino, Masahiko Sakoda and Shoji Natsugoe	4. 巻 20(1)
2. 論文標題 Preoperative Changes in Body Weight in Patients with an Insulinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JOP. J Pancreas	6. 最初と最後の頁 44-47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Munetsugu Hirata, Yoshiaki Shinden, Ayako Nagata, Yuki Nomoto, Hazuki Saho, Akihiro Nakajo2, Takaaki Arigami, Hiroshi Kurahara, Kosei Maemura, Shoji Natsugoe, Yuko Kijima	4. 巻 20(6)
2. 論文標題 Clinical Features of Breast Cancer Patients with Human T-Cell Lymphotropic Virus Type-1 Infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Asian Pacific Journal of Cancer Prevention	6. 最初と最後の頁 1909-1912
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.31557/APJCP.2019.20.6.1909	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0件

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------