

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16981

研究課題名（和文）消化管腫瘍性病変の病理学的評価における組織透明化技術の応用

研究課題名（英文）Efficacy and Feasibility of Tissue-clearing Technique in the Human Gastrointestinal Tissues Using LUCID

研究代表者

水谷 浩哉（Mizutani, Hiroya）

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：60864303

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトの食道・胃・十二指腸・大腸粘膜のいずれにおいてもLUCIDによる透明化処理によって共焦点顕微鏡による観察可能深度が有意に延長することが確認された。また、ヒト病理検体を使用するにあたっては組織に対する変性や損傷のないことが重要と考えられるが、透明化前後でのHE染色および各種免疫染色（Ki67, p53, E-cadherin）においても、明らかな染色性の低下や形態破壊は認められず、良好な診断可能性が保持されているものと考えられた。このように従来の病理学的評価と相補的に併用することが可能である点はLUCIDの持つ重要な有用性であり、今後のさらなる改良や臨床応用への発展が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織透明化技術は主に生物学の分野で研究開発されているが、ヒト検体での報告は依然として限られており消化管検体での有効性を示す報告は認められない。今回我々はLUCIDで透明化されたヒト消化管粘膜について、ブタ消化管粘膜と同様に、光学顕微鏡による撮像・3次元再構築を行なうことで、粘膜内の腺管や血管の3次元構造を獲得することに成功しており、さらにLUCIDによる処理が臨床上の病理学的評価に及ぼす影響は最小限と考えられることを示した。これはLUCIDが従来の病理学的評価と相補的に併用することが可能であることを示唆しており、実臨床への応用にあたり非常に重要な知見であるものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：It was confirmed that LUCID transparency treatment significantly extended the depth of observation by confocal microscopy in human esophageal, gastric, duodenal, and colonic mucosa. In addition, although it is important for human pathological specimens to be free of tissue degeneration and damage, no obvious decrease in staining or destruction of morphology was observed in HE staining and various immunostaining (Ki67, p53, E-cadherin) before and after transparency, suggesting that good diagnostic potential is maintained. Thus, it was considered that good diagnostic potential was maintained. The fact that LUCID can be used in combination with conventional pathological evaluation in a complementary manner is an important usefulness of LUCID, and further improvement and development for clinical application are expected in the future.

研究分野：消化器内科

キーワード：組織透明化技術 消化管 3次元構造 LUCID

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

組織透明化技術は主に基礎生物学の分野において開発研究されている生体組織を光学的に透明にすることにより三次元イメージングを可能とする技術である。生体組織、生体臓器についての網羅的で緻密な三次元構造情報を取得することは、その解剖学的構造を明らかにするのみならず、複雑な細胞同士のネットワークにより構成される組織・臓器単位での生体機能を包括的に解析する上で重要な役割を果たしうるものと考えられる。しかしながら依然ヒト検体における透明化の報告は限られており、特にヒト消化管粘膜・消化管病変に対して組織透明化技術を活用した報告は筆者の検索する限りでは認められない。ヒト検体に対する組織透明化技術の応用が可能となれば、病変全体を包括的・網羅的な 3 次元での消化管病理診断を可能とする新たな手法となるものと期待される。

	BABB 2007 Dott et al.	3DISCO 2012 Erturk et al.	SeeDB 2013 Ke et al.	CLARITY 2013 Chung et al.	CUBIC 2014 Etsuo A et al.	LUCID -
毒性試薬	使用	使用	不使用	不使用	不使用	不使用
特殊器材	不要	不要	不要	要	不要	不要
透明化の所要時間	3日	3日	3日	1-2週間	2週間	5-7日 **
組織変形	収縮	収縮	なし	なし	なし	なし
撮影方法	LSFM	LSFM/CLSM/MPFM	MPFM	CLSM	LSFM/MPFM	CLSM/MPFM
組織	マウス脳	-	マウス脳	マウス/ヒト脳	マウス脳	-
透明度	高い	高い	高い	非常に高い	非常に高い	高い

* LSFM: Light sheet fluorescence microscopy ライトシート顕微鏡
CLSM: Confocal laser scanning microscopy 共焦点顕微鏡
MPFM: Multi-photon fluorescence microscopy 多光子顕微鏡

** 染色・洗浄期間(3日間)を含む

2. 研究の目的

我々は以前に新規の透明化試薬である LUCID を用いた組織透明化技術について、ブタ消化管粘膜における有効性を報告した。LUCID は毒性を有さない水溶性試薬のみを使用した透明化手法であり、特殊な機材や処理を要さない簡便な手法であり、先のブタ消化管検体における検証において組織変形や変性も最小限であった。これらは LUCID による透明化処理が実臨床におけるヒト消化管病理検体への適用可能性を示唆するものであり、LUCID protocol の有する簡便性・迅速性・透明化組織の可逆性などの特徴は、従来の病理学的検査と相補的に併用しうるものと考えられ、他の透明化手法と比較しても、より臨床利用に適したものである可能性が期待される。そこで LUCID を用いたヒト消化管病理検体の透明化・3 次元イメージングに着目し、その有効性と妥当性について検討する。

3. 研究の方法

(1)ヒト消化管検体における透明化技術の有効性を評価するため、ESD 治療にて切除された消化管粘膜検体(食道・胃・十二指腸・大腸)を任意に選択し、LUCID による処理ののち光学的に透明化されていることを確認するため共焦点顕微鏡による観察可能深度を測定した。これを LUCID による処理を施行しない検体における観察可能深度と比較し有効性について検討した。
(2)また同様にヒト消化管検体における妥当性を検証するため、食道・胃・大腸の各検体について、透明化処理、撮像の工程による組織への障害や従来の病理学的検査への影響の有無を評価した。透明化・撮像を終えた検体を不透明な状態に復したうえで、再度パラフィン包埋・薄切を行ない、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色および各種免疫染色を行ない、透明化処理前の染色性と比較した。

4. 研究成果

(1)食道・胃・十二指腸・大腸の各検体内の任意の 5 点における共焦点顕微鏡による観察可能深度は、透明化を行なわないもので行なったものでそれぞれ、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

観察可能深度(μm)

	LUCID(-)	LUCID(+)
Esophagus	228	1036
Stomach	115	428
Duodenum	256	787
Large intestine	113	436

あり透明化による有意な観察可能深度の延長が確認できた。

(2)透明化・3次元撮像後の薄切検体による病理学的評価において、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た。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透明化前後での明らかな染色性の低下は認められず、良好な診断可能性が保持されているものと考えられた。

以上から、LUCIDによる処理後の共焦点顕微鏡観察では、より深部までの蛍光励起・検出が可能であり、ヒト消化管粘膜においてもLUCIDによる透明化処理が光学顕微鏡によるスキャンニングに有効に働くことが確認された。また透明化処理後の検体に対する病理学評価においては、食道・胃・大腸のいずれにおいても粘膜の微細構造・染色性保たれていることが確認でき、ブタ検体と同様に、ヒト消化管粘膜においてもLUCIDによる透明化処理やその後のレーザー光を用いた光学顕微鏡による3次元撮像のプロセスは、組織の形態や細胞内外の構造・染色性を大きく損なうことはなく、臨床上の病理学的評価に及ぼす影響は最小限であるものと考えられた。

組織透明化・3次元イメージング技術のヒト検体への応用にあたっては、透明化プロトコルのみならず、撮像技術・データ解析等の点で依然いくつかの制約を有しているが、一方でこれまでにない形での形態解析を可能とし臨床応用や病態解明などに繋がりうる画期的な技術であり、今後のさらなる改良・最適化による適用範囲の拡大や、系統的な解析による新規の知見の解明に寄与することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

本研究の内容については現在医学ジャーナルへの投稿準備中である。

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
---------	---------