

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390311

研究課題名(和文)電界非接触撹拌技術を用いた術中迅速免疫組織染色法の開発

研究課題名(英文)Development of a new rapid immunohistochemical staining method using AC electric field

研究代表者

南谷 佳弘(Minamiya, Yoshihiro)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30239321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：手術中に癌の微小転移巣を免疫組織染色で診断するには免疫染色の時間短縮が必須である。我々は組織切片に電界を与えることにより2時間以上を要する組織染色を12分に短縮させ特許出願した(電界IHC法)。電界IHC法により肺癌患者のリンパ節を染色し、術中にリンパ節微小転移診断が可能であることを明らかにした。また本技術は脳腫瘍の術中悪性度診断にも応用可能であることも明らかにした。本法は肺癌、脳外科のみならず、消化器外科系、婦人科系、小児、耳鼻科系の癌の術中迅速免疫組織染色を用いた診断にも応用可能であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：For the intraoperative diagnosis of lymph-node micro-metastases with immunohistochemical staining, the staining time should be shortened. We invented a new method that allows to reduce the immunohistochemical-staining time by applying an electric field to the tissue sections. We can complete immunohistochemical staining which usually requires 2 hours, within 12 minutes using this method. We demonstrated that this method was useful for the intraoperative detection of lymph node micrometastases of patients with lung cancer. We also demonstrated that this method is useful for the grading of the glioma during surgery. We tried this method to the decision making of the surgery for lung cancer and brain tumor. We also tried this method to the decision making of the surgery of gastroenterological, gynecologic, pediatric cancer and cancer of otorhinolaryngology. And then, we were able to demonstrate the usefulness of this method for the decision making of these surgeries

研究分野：胸部外科学

キーワード：免疫組織染色 癌 手術 術中迅速診断 リンパ節微小転移

### 1. 研究開始当初の背景

最近、乳癌や悪性黒色腫に対してセンチネルリンパ節生検に基づくリンパ節郭清省略が実際の臨床で行われている。また他臓器でも肺、胃、大腸にもセンチネルリンパ節が存在することが明らかになっている。センチネルリンパ節の術中転移診断は時間の制約上ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色が行われているが、HE 染色では微小転移は見逃されることが多い。一方、リンパ節微小転移を見逃さずにセンチネルリンパ節生検に基づくリンパ節郭清省略を安全に行うには免疫組織染色が必要であるが、通常2時間以上を要するため、術中迅速診断には適さない。我々は5年前にフローサイトメトリーを用いて40分で微小転移診断を行う方法を開発して報告した。しかし本法は形態学的な情報が欠如しているため、偽陽性を否定できなかつた。我々は組織切片に電界を印加して、免疫組織染色の時間を格段に短縮する方法(電界免疫組織染色法)を開発し特許出願した。電界免疫組織染色法では通常1時間程度要する抗原抗体反応時間を2分まで短縮可能である。

### 2. 研究の目的

(1)迅速診断用凍結切片に印加する至適電界条件の設定、(2)電界免疫組織染色法の術中センチネルリンパ節微小転移診断への応用の可能性検討、(3)専用の免疫染色装置の開発の3点を申請期間内に検討する。またリンパ節微小転移は2mm~200 $\mu$ mの転移巣と定義されているので、正確に診断するためには200 $\mu$ m毎の連続切片を作成する必要がある。これらの切片をすべて染色するには大量の抗体を必要とするため、経済的な観点から日常臨床には適さない。一方、電界免疫組織染色法で電界印加時間を通常の免疫組織染色法の抗原抗体反応時間程度(1~3時間)まで延長した時、抗体濃度を1/25まで希釈しても染色可能であった。電界免疫組織染色法により抗体を節約して免疫組織染色法のコストを格段に下げることができれば、連続切片の免疫組織染色法による微小転移診断が経済的な観点からも可能になると期待される。また当初の計画に加えて以下の研究も併せて行った。(4)脳腫瘍(glioma)の悪性度診断への応用。(5)ほかの臓器の癌の手術への応用の可能性検討

### 3. 研究の方法

(1)迅速診断用凍結切片に印加する至適電界条件の設定

肺癌の組織を、抗サイトケラチン抗体を用いてサイトケラチンを染色した。そして最も染色高品位に染色される抗体液量、印可電圧、周波数、電極間隙を検討した。

(2)電界免疫組織染色法の術中センチネルリンパ節微小転移診断への応用

肺癌患者34例で術中に得られたセンチネルリンパ節を抗サイトケラチン抗体で電界免疫組織染色法を用いて染色して微小リンパ節転移の有無を検討した。

(3)専用の免疫染色装置の開発

装置の開発は(1)至適電界条件の設定に基づいて秋田県産業技術センターで試作機を作成して、秋田EPSON株式会社と株式会社アクトラスに技術移転して製品化を目指した。製品化に関する研究は各企業がそれぞれ検討した。

(4)脳腫瘍(glioma)の悪性度診断への応用  
Gliomaは当初計画に無かったが、その治療に際して1回目の手術で腫瘍生検を行い、免疫組織染色でKi67を染色、そしてその染色割合で悪性度のGrading(MIB1-index)を行った後に、2回目の手術でそのgradeに従って腫瘍切除の方法を決めている。この治療に迅速免疫組織染色を応用すれば患者の恩恵が大きいことから急遽計画して進めた。具体的には手術時に得られた凍結切片を、本装置を持って染色し、術後に切除後に得られたパラフィン切片をKi67染色してMIB1-indexを測定し、比較検討することにより有用性を検討した。

(5)ほかの臓器の癌の手術への応用

秋田大学医学部附属病院病理部で病理医が必要と判断した抗体を用いて本装置により術中迅速免疫組織染色を行った。そして術後にも免疫組織染色を行って比較検討してその有用性を検討した。

### 4. 研究成果

(1)至適電界条件の設定

検討の結果抗体液の量を200 $\mu$ Lとした時に最も効率よく高品位に染色できた条件は電圧4kV、周波数10Hz、電極間隙4-4.5mmであった。抗体液量とした時に最も効率よく高品位に染色できた条件は400 $\mu$ L、電圧4kV、周波数7-10Hz、電極間隙5-6mmであった。

(2)電界免疫組織染色法の術中センチネルリンパ節微小転移診断への応用

以下の表に研究結果を示す。肺癌患者34例で65個のリンパ節を術中に迅速免疫染色装置を用いて抗サイトケラチン抗体で染色したその結果術後のHE染色とR-IHCの結果は完全に一致して術中診断に応用可能なことが明らかになった。

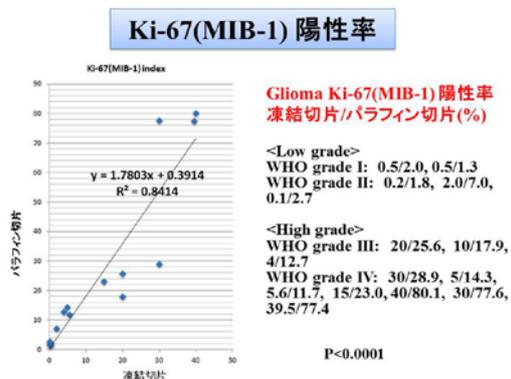
		pN (HE)		
		陰性	陽性	
R-IHC	陰性	3 2	0	3 2
	陽性	0	2	2
		3 2	2	3 4

R-IHC, 電界免疫組織染色法; pN, リンパ節転移

(3)専用の免疫染色装置の開発  
装置は2014年5月に、下図に示すように秋田EPSON株式会社で製造してサクラファインテック株式会社からHisto-Tek R-IHC ラピートとして発売された。



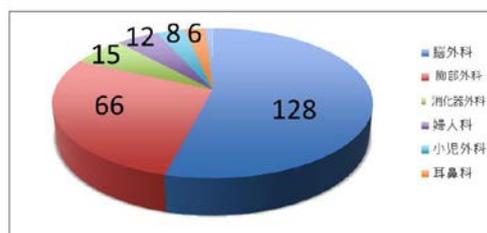
(4)脳腫瘍 (glioma) の悪性度診断への応用  
秋田大学医学部附属病院と北海道大学腫瘍病理学講座で共同研究を行った。結果は数に示すようにラピートを用いてKi67染色に基づくMIB1-indexの値とパラフィン切片を用いたMIB1-indexの値は正の相関を示した。この結果は術中迅速免疫組織染色によるKi67染色に基づくMIB1-indexの値をgliomaのgradingに用いることが可能であることを示す活気的な結果であった。



(5)ほかの臓器の癌の手術への応用の可能性検討

下図は秋田大学医学部附属病院病理部でこの研究期間でラピートを用いて術中迅速免疫組織染色を行った症例数を示す。脳外科での経験が多いが、最近では胸部外科学教室で扱う乳癌、肺癌の数が増加している。ついで多いのが消化器外科である。そのほか婦人科癌、頭頸部癌のセンチネルリンパ節の微小転移診断の検討が増加している本装置を用いた術中迅速免疫組織染色はあらゆる抗体に応用可能であり、今後適応症例や症例数を増やして、その有用性を明らかにしていきたい。

**R-IHC併用術中迅速診断237症例の内訳**



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)

① Tanino M, Sasajima T, Nanjo H, Akesaka S, Kagaya M, Kimura T, Ishida Y, Oda M, Takahashi M, Sugawara T, Yoshioka T, Nishihara H, Akagami Y, Goto A, Minamiya Y, Tanaka S; R-IHC Study Group. Rapid immunohistochemistry based on alternating current electric field for intraoperative diagnosis of brain tumors. Brain Tumor Pathol. 2015;32:12-9. 査読有

② 南條博、吉岡年明、南谷佳弘、赤上陽一。迅速免疫染色。病理と臨床。32巻、2014年、54-58。査読有  
〔雑誌論文〕(計2件)

① 南谷佳弘。超高速免疫組織化学。日本臨床検査自動化学会(招待講演)。2015年4月25日。青森県弘前市

② 南谷佳弘、齋藤元、今井一博、佐藤雄亮、齋藤芳太郎、寺田かおり、中村竜太、赤上陽一。迅速免疫染色装置(R-IHCラピート)の開発とリンパ節微小転移診断。第16回SNNS研究会学術集会(招待講演)。2014年9月19日~9月20日。鹿児島市。

③ 今野隼人、今井一博、齋藤元、工藤智司、齋藤芳太郎、南谷佳弘。呼吸器疾患の

Bio-imaging-PET/CTによる肺癌の診断と治療効果判定のシンポ、肺癌のリンパ節転移診断 N 診断モダリティー オーバービュー. 第55回日本呼吸器学会学術講演会/日本核医学会分科会呼吸器各医学研究会(招待講演) 2014年4月17日-19日. 東京.

[学会発表] (計3件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

①名称: 電界洗浄法

発明者: 赤上陽一、加賀谷昌美、中村竜太、池田洋、南谷佳弘、南條博

権利者: 秋田県、国立大学法人秋田大学

種類: 特許

番号: 特願2014-009634

出願年月日: 2014年1月22日

国内外の別: 国内

②名称: 電界攪拌向けインジケーター付きはっ水リング

発明者: 赤上陽一、加賀谷昌美、中村竜太、池田洋、南谷佳弘、南條博

権利者: 秋田県、国立大学法人秋田大学

種類: 特許

番号: 特願2014-009629

出願年月日: 2014年1月22日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

南谷佳弘 (MINAMIYA Yoshihiro)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 30239321

### (2) 研究分担者

赤上陽一 (AKAGAMI Yoichi)

秋田県産業技術センター・副センター長

研究者番号: 00373217

### (3) 連携研究者

谷野美智枝 (TANINO Mishie)

北海道大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 90360908

### (4) 研究協力者

南條博 (NANJO Hiroshi)

### (5) 研究協力者

中村竜太 (NAKAMURA Ryuta)

### (6) 研究協力者

田中伸哉 (TANAKA Shinya)

### (7) 研究協力者

伊藤智雄 (ITO Tomoo)

### (8) 研究協力者

加賀谷昌美 (KAGAYA Masami)

### (9) 研究協力者

今野隼人 (KONNO Hayato)

### (10) 研究協力者

笹嶋寿夫 (SASAJIMA Toshio)