

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500526

研究課題名(和文) NADH 蛍光観察による新たな大腸腫瘍検出法の開発

研究課題名(英文) Development of new autofluorescence imaging method for detection of bowel tumors

研究代表者

原田 義規 (Harada, Yoshinori)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：10381956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円、(間接経費) 1,230,000 円

研究成果の概要(和文)：消化管粘膜には nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) や flavin adenine dinucleotide などの自家蛍光物質が存在し、これらを利用することにより早期の腫瘍性病変を非侵襲的に検出できる可能性がある。本課題において、我々は、主に粘膜の蛍光変化を管腔側より測定可能な新たな自家蛍光イメージング法の開発・改良を行った。本法は大腸腫瘍性病変の非標識検出に有用と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Nicotinamide adenine dinucleotide and (NADH) and flavin adenine dinucleotide are considered to be main autofluorescence substances included in the gastrointestinal mucosae. There is a possibility that small neoplastic lesions can be detected by observing the mucosal autofluorescence. In this study, we developed and improved an NADH autofluorescence imaging method which was optimized for detection of bowel tumors. This method was useful for label-free detection of small-sized bowel tumors.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学生体材料学

キーワード：バイオイメージング

## 1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織はその発生初期から微小循環動態上の欠陥等により恒常的に低酸素状態にあるといわれている。また、生体内在性蛍光物質である nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) は細胞の代謝状態に関連して蛍光強度が変化し、細胞が低酸素状態に陥ると NADH による蛍光強度は上昇することが知られている。大腸腫瘍の発生源である大腸粘膜は NADH を豊富に含むとされている。

以上より、大腸粘膜の腫瘍化を NADH 蛍光強度の違いとして捉えられる可能性があると考えた。ただし、生体内において NADH 蛍光を正確に測定するためには、血液の影響を軽減・除去する必要がある。血液中のヘモグロビンは NADH の励起光・蛍光を強く吸収するからである。NADH からの蛍光を正確に測定することにより、腫瘍の血管密度や形状の影響の少ない腫瘍イメージングが可能となる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、大腸腫瘍の生体内在性蛍光特性を検討し、NADH 蛍光観察による腫瘍イメージング法を開発・改良することである。

## 3. 研究の方法

正常大腸組織・大腸腫瘍において生体内在性蛍光の局在・スペクトルを検討し、データの取得を行う。粘膜面および切断面について光学的観察装置下で検討する。観察を終えた検体について、HE 染色等を施し、組織診断を行い比較検討する。

## 4. 研究成果

生体には数種類の自家蛍光物質が内在しており、これらを利用することにより腫瘍を検出できる可能性がある。本研究においては正常大腸組織・大腸腫瘍の自家蛍光特性を検討し、NADH 蛍光に着目した非標識な腫瘍イメージングの開発・改良を行った。

まず、生体内在性蛍光物質の蛍光スペクトルの例を示すが(図1、2)、NADH 蛍光は410 nm 励起より370 nm 励起で観察しやすいことがわかる。

大腸正常組織における自家蛍光の局在・スペクトルを検討した。生体組織は種々の自家蛍光物質が様々な濃度で多層構造を示しながら存在するため、切断面および粘膜面についてそれぞれ観察・検討した。切断面における検討では、UVA 光～紫色光励起でその蛍光強度を測定すると、粘膜層も蛍光を発してお

り、粘膜内の腺管上皮細胞に含まれるNADH (あるいはFAD) が比較的強い蛍光を持っていると考えられた。また、粘膜層の腺管上皮細胞の自家蛍光を大腸内腔面から観察するには、UVA 励起が適していると考えられた。

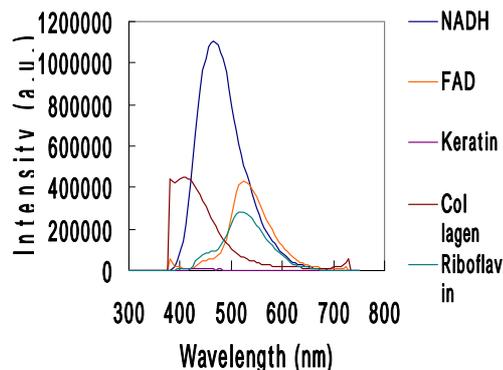


図1 生体内在性蛍光物質の蛍光スペクトル (370 nm 励起)

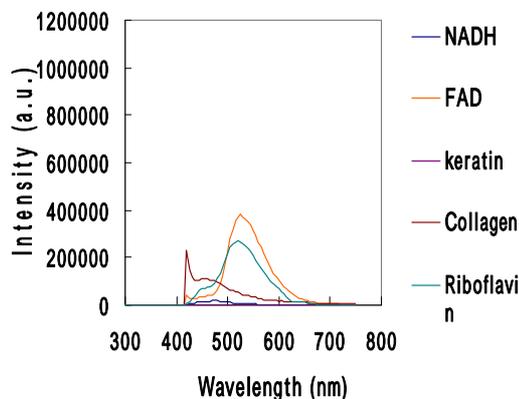


図2 生体内在性蛍光物質の蛍光スペクトル (410 nm 励起)

正常大腸組織および大腸腫瘍検体における自家蛍光の分光画像を取得し、正常部と病変部における自家蛍光の差異を検討した。

まず、正常大腸組織の管腔面において、 $365 \pm 10 \text{ nm}$  で励起し、400 nm 以上のカラー蛍光画像 (CNU) と  $405 \pm 20 \text{ nm}$  で励起し、430 nm 以上のカラー蛍光画像 (CNV) を取得し、青の成分のみを抽出後、それぞれを除算した例を示す(図3)。除算後の画像では、NADH を含む粘膜腺管上皮が比較的強調されて表現されており、同法は粘膜を観察するのに適していると考えられた。

また、同様の方法を大腸腫瘍で検討した例を示す(図4)。

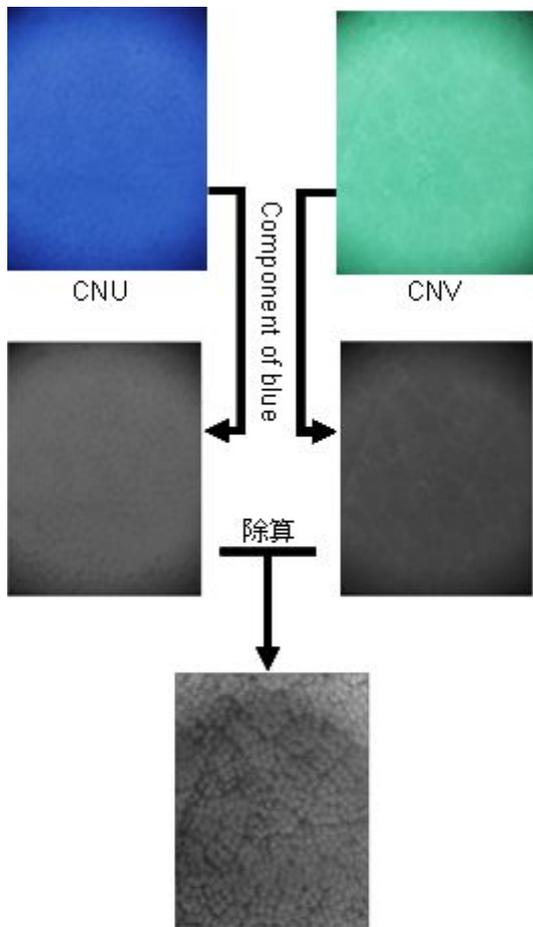


図3 正常大腸粘膜蛍光画像。CNU (Ex:365 ±10nm Em:400nm<)およびCNV (Ex:405 ±20nm Em:430nm<)の蛍光像をカラーCCDで撮影した。撮像した画像の青成分を抽出後、画像間演算(除算)を行った。除算後の画像では、腺管上皮が強調して表現されている。

CNU蛍光画像の青成分を抽出した画像は、主に、NADH蛍光イメージを反映すると考えられ、それを除算したレシオ画像では大腸腫瘍が強調されていた。また、レシオ画像は概ね腫瘍の血管密度や形状の影響の少ないイメージング法であると判断された。

組織内の様々な機能分子を可視化する分子イメージング技術は、生体機能を診断する上で重要である。しかし、多くの分子イメージング技術は目的分子を蛍光タンパクなどのプローブで標識しなければならず、ヒトへ応用するためには困難を伴う。一方、生体内在性蛍光を利用する本法は、生体組織内分子を非標識で可視化でき、ヒトへの応用も比較的容易である。本研究は将来的には内視鏡によるヒト生体内NADH分子イメージング技術の開発につながる可能性が示唆された。

現在臨床において使用されている自家蛍光内視鏡は生体内コラーゲンの蛍光を観察することで腫瘍を間接的に可視化しているが、本法は粘膜から発生する腫瘍細胞を粘膜の自家蛍光で直接観察するため、より小さな腫瘍を描出できる可能性があると考えられた。

また、本法は腫瘍のみならず、虚血による低酸素環境を可視化できる可能性も考えられ、将来的に虚血心筋や虚血脳のイメージングなどにも応用できる可能性が示唆された。

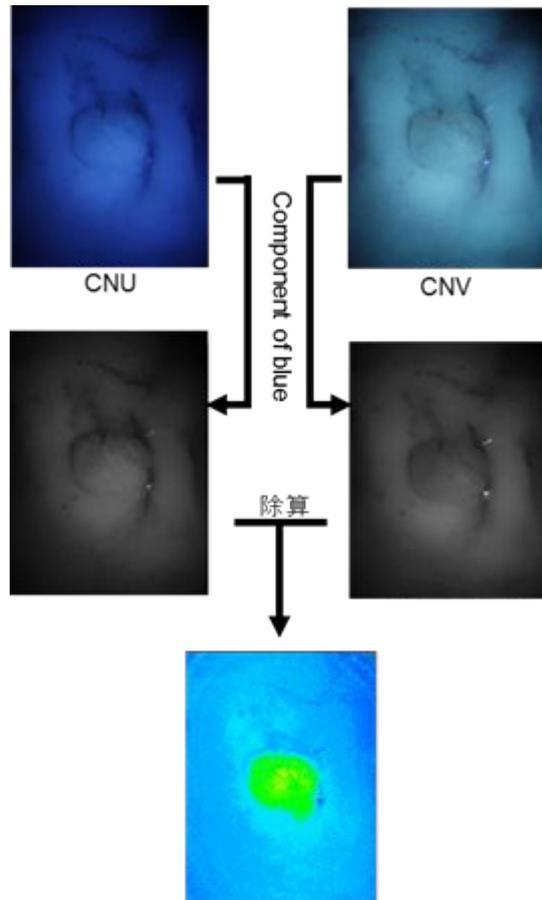


図4 大腸腫瘍蛍光画像。CNUおよびCNVの蛍光像をカラーCCDで撮影した。撮像した画像の青成分を抽出後、画像間演算(除算)を行い、擬似カラー表示した画像を示す。除算後の画像では、大腸腫瘍が強調して表現されている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

原田義規、南川丈夫、高松哲郎、光を利用した非標識生体分子イメージング、先端医学社、G. I. Research Journal of Gastrointestinal Research, 2014、50-56

原田義規、高松哲郎、内視鏡応用を目指した新たな自家蛍光イメージング技術の開発、細胞，ニュー・サイエンス社、2014、161-164

〔学会発表〕(計 5件)

原田義規、高松哲郎、分子イメージングの臨床応用、第1回3次元MSイメージング解析研究会2011年12月3日(大阪)

Harada Y, Imaizumi K, Yamaoka Y, Nakano K, Dai P, Tanaka H, Takamatsu T. A dual-wavelength excitation method to visualize colonic neoplasms. Focus on Microscopy 2012、2012年4月1日~4月4日、Singapore

原田義規、高松哲郎、光による非侵襲的生体計測とin situ診断への応用 第35回日本分子生物学会年会ワークショップ、2012年12月11日~12月14日、福岡

原田義規、高松哲郎、先進バイオイメージングとがん診断、第72回日本癌学会シンポジウム「がん研究におけるイメージング技術の新展開」、2013年10月3日~10月5日、横浜

Harada Y, Takamatsu T. Label-free Microscopy and its Applications. SUPERIMAGING 2013. International Symposium on Super-Resolution Imaging 2013、2013年12月2日、Hamamatsu

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/pcr/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

原田 義規 (HARADA Yoshinori)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院) 講師

研究者番号：10381956