

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591024

研究課題名(和文) 蛍光を用いた光学的生検方法の開発

研究課題名(英文) An Optical Cancer Diagnosis with Fluorescence Polarization.

研究代表者

金子 剛 (KANEKO, TSUYOSHI)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：90510181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞は正常細胞と比較して細胞膜流動性が高いことが報告されており、この性質が癌固有性質として注目されている。膜流動性を非侵襲的に測定可能な手法として蛍光偏光解消法がある。同法により得られるFP値は客観的な絶対数として表されるため、癌固有性質の客観的評価法として期待される。大腸癌手術検体を用いた本検討では、非癌部と比較し癌部において明らかなFP値の低下を認めた。また免疫組織学的検討では、癌部において資質過酸化量が増加していた。これにより癌部の細胞膜流動性上昇がもたらされる可能性が示された。蛍光偏光解消法は内視鏡装置にも応用可能な光学的手法であり、癌固有性質の客観的な診断方法として期待される。

研究成果の概要(英文)：Background: Fluorescence polarization (FP) is an optical method to measure cellular membrane fluidity. We showed that high reactive oxygen species involved cellular lipid peroxidation to increase its membrane fluidity in cancer cells. We thus investigated that the relation among tumor differentiation, lipid peroxidation and membrane fluidity in colon cancer. METHODS: Fourteen specimens of colon cancer were investigated. FP values of each sample were measured with a specially designed system. We compared each FP value of the specimens with the result of pathological examinations to evaluate the relation membrane fluidity and tumor differentiation. RESULTS: FP value of normal area was significantly higher than that of adenoma and adenocarcinoma area. Amount of lipid peroxidation estimated by 8OH-dG stain, membrane fluidity were significantly increased in than those of cancerous area than those of normal area. CONCLUSION: The FP analysis was demonstrated to be clue to an optical biopsy.

研究分野：消化器内科

キーワード：光学的生検 細胞膜流動性 蛍光偏光解消法 大腸癌

1. 研究開始当初の背景

- (1) 光を用いた生体観察技術は、低侵襲性と鋭敏さから医学生物学領域で幅広く用いられている。この技術の一つである内視鏡は、患者に侵襲を加えることなく各種消化管疾病を観察し、診断・治療することが可能であり、現代の消化器病学に必須の機器である。近年、より鋭敏かつ客観的な内視鏡診断を目的として、不可視領域の可視化技術に注目が寄せられている。現在までに狭帯域内視鏡、自家蛍光内視鏡、赤外内視鏡などが実用化されているが、これらの手法は癌化に伴う間接情報の差別化にとどまっている。
- (2) 癌細胞は正常細胞と比較して細胞膜流動性が高いことが報告されており、癌固有の性質として細胞膜流動性の相違に注目が集まっている。同性質を内視鏡装置にも応用可能な光学的手法があれば、癌固有性質の客観的な診断方法として期待される。
- (3) 蛍光偏光解消法は細胞膜流動性を非接触・非破壊的に可能な光学手法であり、同法は癌・非癌を細胞膜流動性という癌固有の性質から客観的診断ができる可能性がある。

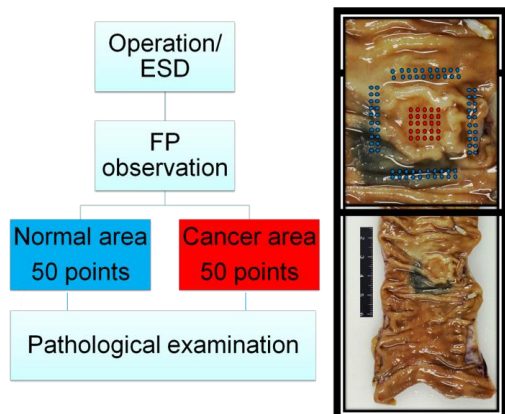
2. 研究の目的

- (1) 本研究の目的は細胞膜流動性の相違を画像化し、癌部・非癌部を鑑別しうる光学的生検システムを構築し、蛍光偏光解消値という客観的数値による癌の領域診断を行うという試みである。

- ① ヒト手術標本を対象に検討を行い、癌部・非癌部の流動性の相違を数値にて明らかにする。
- ② 腺腫および癌の分化度による流動性の相違を明らかにする。

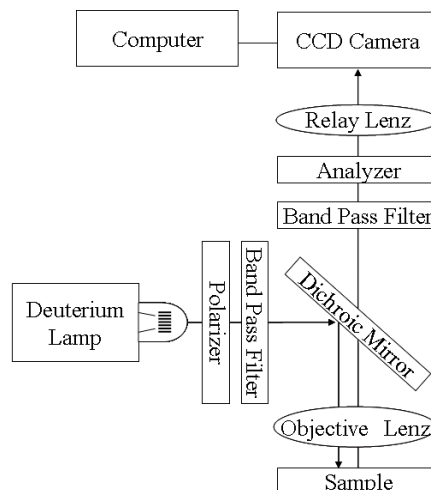
3. 研究の方法

- (1) 筑波大学附属病院において大腸切除術を施行される癌患者のうち、内視鏡手術・外科手術標本を対象に、蛍光偏光解消法による粘膜細胞膜流動性の相違によって、癌部・非癌部の診断可能か否か検討する。



①方法

- 切除標本を生理食塩水にて洗浄する。
- フルオレセインを発色団とする蛍光色素(ドデカノアミノフルオレセイン・100 μM)にて15分染色する。
- 485nm を中心としたバンドパスフィルターを光源に装着し、切除標本に照射する。標本から発する蛍光(ピーク 500nm)、これを 630nm のシャープカットフィルターと1組の偏光版を装着した高感度カメラで観察する(下図)。



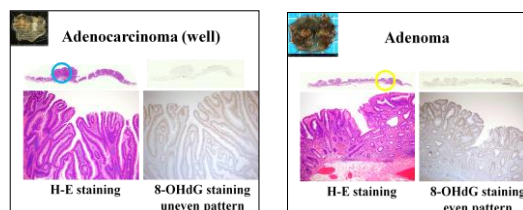
- 膜流動性変化に関連すると考えられる抗酸化酵素群の発現と癌の分化度について病理組織学的に検討する。

4. 研究成果

(1) 蛍光偏光解消法による検討結果

HE 染色にて正常と判断された領域の蛍光偏光解消値は 0.3 ± 0.12 であり、同様に腺腫および高分化腺癌と診断された領域の FP 値は各々 0.14 ± 0.03 、 0.16 ± 0.11 であった。腫瘍性変化により FP 値の低下傾向を認めた。ヒト大腸癌組織では細胞膜流動性が正常組織に比較して上昇している可能性が示された。

- (2) 病理組織学的・免疫組織学的検討結果
癌性度診断と膜流動性の関係を調べるために、流動性に変化を与える可能性がある脂質過酸化量を 8-OHdG による免疫組織学的に検討した。その結果病変領域の 8-OHdG 染色性は、腺腫 > 高分化腺癌の順で強く染色された。この結果は癌の分化度による FP 値の相違の一端を支持している可能性を示した。



<引用文献>

- ① Kaneko T, Matsui H, Shimokawa O, Nakahara A, Hyodo I. Cellular membrane fluidity measurement by fluorescence polarization in indomethacin-induced gastric cellular injury in vitro. *J Gastroenterol*. 2007 42: 939-46.
5. 主な発表論文等
[雑誌論文] (計 6 件)
- ① 金子剛, 松井裕史, 下川治, 間宮孝, 溝上裕士, 兵頭一之介高齢者に対する消化器領域の光線力学療法日本レーザー医学会誌 35(4): 468-474, 2015
- ② Tamura M, Matsui H, Tomita T, Sadakata H, Indo HP, Majima HJ, Kaneko T, Hyodo I. Mitochondrial reactive oxygen species accelerate gastric cancer cell invasion. *J Clin Biochem Nutr*. 2014 Jan;54(1):12-7. doi: 10.3164/jcfn.13-36. Epub 2013 2
- ③ Tamura M, Matsui H, Kaneko T, Hyodo I. Alcohol is an oxidative stressor for gastric epithelial cells: detection of superoxide in living cells. *J Clin Biochem Nutr*. 2013 Sep;53(2):75-80. doi: 10.3164/jcfn.13-32. Epub 2013 Aug 31.
- ④ Suzuki H, Kaneko T, Mizokami Y, Narasaka T, Endo S, Matsui H, Yanaka A, Hirayama A, Hyodo I. Therapeutic efficacy of the Qing Dai in patients with intractable ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2013 May 7;19(17):2718-22. doi: 10.3748/wjg.v19.i17.2718.
- ⑤ Tamura M, Matsui H, Nagano YN, Kaneko T, Indo HP, Majima HJ, Hyodo I. Salt is an oxidative stressor for gastric epithelial cells. *J Physiol Pharmacol*. 2013 Feb;64(1):89-94.
- ⑥ Nagano Y, Matsui H, Shimokawa O, Hirayama A, Nakamura Y, Tamura M, Rai K, Kaneko T, Hyodo I. Bisphosphonate-induced gastrointestinal mucosal injury is mediated by mitochondrial superoxide production and lipid peroxidation. *J Clin Biochem Nutr*. 2012 Nov;51(3):196-203
- [学会発表] (計 6 件)
- ① Kaneko T, Matsui H, Hyodo I: Measuring iron concentration in the gut lavage fluid is helpful for detecting colon cancer. 第 22 回 JDDW, 2014. 10. 25, ポートピアホテル, 神戸
- ② 富田勉, 金子剛, 松井裕史: 全身+局所投与によってアスピリン起因性小腸傷害が惹起される 第 100 回日本消化器病

学会総会, 2014. 4. 24, 東京国際フォーラム, 東京

- ③ 金子剛, 松井裕史, 溝上裕士: 医療過疎地域における読影ネットワークの運用とその効果 第 100 回日本消化器病学会総会, 2014. 4. 24, 東京国際フォーラム, 東京
- ④ Kaneko T, Matsui H, Hyodo I: A new screening method for colon cancer by measuring iron concentration in the gut lavage fluid. *Digestive Disease Week 2013*, May 19, 2013. Orange County Convention Center, Orlando FL, USA
- ⑤ 金子剛, 松井裕史, 溝上裕士: NSAIDs 起因性小腸傷害を活性酸素産生の観点から可視化する 第 99 回日本消化器病学会総会, 2013. 3. 22, 山城観光ホテル, 鹿児島
- ⑥ Kaneko T, Matsui H, Hyodo I: An Optical Cancer Diagnosis with Fluorescence Polarization. *Digestive Disease Week 2012*, May 19, 2012, San Diego Convention Center, San Diego CA, USA
- [図書] (計 2 件)
- ① 金子剛, 松井裕史, 頼冠甫, 間宮孝, 溝上裕士, 消化器癌に対する光線力学療法 (Photodynamic Therapy: PDT) 日本消化器内視鏡学会雑誌 2013; 55(3): 494-501
- ② 富田勉, 田村磨聖, 金子剛, 長野由美子, 松井裕史: がんは動く G. I. Research 21(4): 392-393, 2013
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 2 件)
- 名称: 大腸がん検出方法及び大腸がん検出キット
- 発明者: 金子剛, 福田淳二, 松井裕史, 鈴木英雄, 鈴木博章, 木村翔平
- 権利者: 金子剛, 福田淳二, 松井裕史
- 種類: 特願
- 番号: 2013-2956
- 出願年月日: 2013 年 1 月 10 日
- 国内外の別: 国内
- 名称: 大腸がん検出内視鏡
- 発明者: 金子剛, 福田淳二, 松井裕史, 鈴木英雄, 鈴木博章, 木村翔平
- 権利者: 金子剛, 福田淳二, 松井裕史
- 種類: 特願
- 番号: 2013-2957
- 出願年月日: 2013 年 1 月 10 日
- 国内外の別: 国内
- [その他]
- ホームページ
<http://www.md.tsukuba.ac.jp/clinical-med/matsui-GI/>
6. 研究組織
(1) 研究代表者

金子 剛 (KANEKO, TSUYOSHI)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：90510181

(2) 研究分担者

松井 裕史 (MATSUI, HIROFUMI)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：70272200