

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791647

研究課題名(和文) 二光子励起法を応用したロボット支援前立腺全摘術中ナビゲーションシステムの開発

研究課題名(英文) Development of intraoperative navigation system for robot-assisted radical prostatectomy utilizing two-photon microscope

研究代表者

日向 信之(Hinata, Nobuyuki)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：10598816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：二光子励起蛍光顕微鏡が泌尿器科骨盤内神経温存の術中ナビゲーションとして応用可能であるかにつき基礎的検討を行うことを目的とした。ラットを観察後にsacrificeし、骨盤内組織を採取した。組織の固定後にパラフィン包埋し、H-E染色、マッソントリクローム染色、Tyrosin Hydroxidase抗体およびnNOS抗体を用いた免疫組織化学染色を用いて検討を行い、これら組織所見を二光子励起蛍光顕微鏡にて得られた所見と比較した。神経組織のみを観察するための最適な波長の設定を達成することは困難であったが、本研究より派生した骨盤内解剖学および術中視野の重要性につき報告した(研究発表1、2)。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to analyze a feasibility of utilizing two-photon microscope in the intraoperative navigation system for robot-assisted radical prostatectomy. Male rats were observed and sacrificed, then the tissues were stained using H-E staining, Masson-Trichrome staining, anti-tyrosin Hydroxidase immunostaining, and anti-nNOS immunostaining. Although it was difficult to set suitable wavelength to observe the autonomic nerves in the rat pelvis, we obtained ideas from the present study and reported some observations about neuroanatomy for pelvic organs and intraoperative imaging systems derived from the present study.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：骨盤内神経 機能温存 ロボット支援手術 自律神経 根治的前立腺全摘除術 術中ナビゲーション 前立腺癌

1. 研究開始当初の背景

本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ:泌尿器科骨盤内手術において、3次元視および7自由度を併せ持ち、コンピューター制御された容易な鉗子操作を特徴とした da Vinci system の登場は、術式に大きな変革をもたらしロボット支援腹腔鏡下前立腺全摘除術 (RARP) を中心に急激な普及をみせており、術式の進歩に伴い、泌尿器骨盤外科解剖は進歩を遂げつつある。

応募者のこれまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯:我々はいわゆる neurovascular bundle に対し従来とは異なった解剖学的概念を 2004 年に提唱した。つまり、陰茎海綿体神経のメインルートは骨盤内臓神経の根部付近から分岐し、骨盤神経叢の末梢側をかすめるようにいわゆる NVB の中央部にスプレー状に合流していることを報告した (Takenaka A, et al, J Urol, 2004.)。一方、症例によっては、前立腺腹側や尖部背側においても陰茎海綿体神経がプレート状に存在することを明らかにした (Takenaka A, et al. World J Urol 24, 2006.)。これらの解剖学的理解により、近年では特に RALP を中心に前立腺周囲の神経を plate 状に温存する新しい術式概念が導入されている。また、われわれは、いわゆる NVB 周辺組織を術中電気刺激し、陰茎海綿体圧と尿道括約筋圧を同時にモニターすることで、勃起機能に寄与する神経と尿禁制に寄与する神経の分布を検討した (Takenaka A, et al. J Urol 177, 2007.)。前立腺底部レベルのいわゆる NVB 直上 (A 点) と、その lcm 外側の直腸脂肪織上 (B 点) の 2 点を双極電極を用いて電気刺激したところ、陰茎海綿体圧の上昇は B 点で有意に高い上昇を認めた。一方、個々の症例で検討すると、骨盤内神経のうち陰茎海綿体神経および尿禁制に寄与する神経の走行には個体差が存在することが示唆された。

また、最近、我々は、術中電気刺激部位による海綿体神経分布につき検討し、海綿体神経のうち束状の走行を示す症例が 30%、plate 状の走行を示すものが 70% であり、多様な個体差を認めたことを報告した (Takenaka A et al. Int J Impot Res. 23, 2011.)。

これら解剖学的、生理学的研究により骨盤内自律神経の走行に関する知見は集積されたものの、依然として神経温存を行った場合にも術後の機能障害を完全に防ぐことは困難であり、これは神経走行の個体差がその一因となっている可能性が推察される。また、末梢の自律神経は拡大視野であってもこれを視認にて同定することは困難である。そこで、ロボット支援手術における術中ナビゲーションとして神経線維もしくはガングリオンの可視化が可能となれば、より精度の高い神経温存が可能となる。一方で、蛍光を用いた術中ナビゲーションの応用に関しては、既には検討がなされており、Boyette らは神経トレーサー-VTb-488 を海綿体注入後にラット

海綿体神経を蛍光顕微鏡にて観察することにより、海綿体神経の可視化が可能であったことを報告しているが、神経トレーサー注入による生体への影響を考慮すると、臨床応用についての有用性についてはいまだ疑問視される。そこで、生体への影響のない術中ナビゲーション法の開発が望まれ、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

二光子励起法はエネルギーが低く長波長のレーザーを光源として用い従来の一光子励起法と比較し、組織侵襲性が低く、かつ組織透過性が高いことが特徴であり、二光子励起レーザー走査型顕微鏡は神経細胞・グリア細胞・血管などの形態、細胞内のイオン濃度の変化などの生細胞の動態を捉えることが可能であり、脳神経領域における研究に用いられている。一方、daVinci surgical system は Tile pro と名付けられた術中画像ナビゲーションシステムを備え、術者はコンソールに位置しながら外部入力信号を同一視野において確認することが可能である。これらの技術を応用して、泌尿器骨盤内手術中の神経の局在もしくは走行を視認し、術中ナビゲーションとして応用し得るかにつきラットを用いた基礎的検討を行う。二光子励起蛍光顕微鏡を用いて動物実験にて末梢の自律神経の観察を行い、組織標本との対比を行う。対比により励起波長の妥当性について検討する。

現時点では生体そのものを二光子励起蛍光顕微鏡に載せて観察することは機器の大きさ等の観点より困難であるため、まずは最適な条件下でラット骨盤内臓器を遊離した状態で、神経組織の観察を行うことを目的とする。当初は大腿神経、座骨神経等の太径の体性神経の観察を行い、続いてより末梢の自律神経の観察を行う。

3. 研究の方法

a. ラット骨盤内の二光子励起蛍光顕微鏡での観察

細胞内の蛍光分子を顕微鏡で観察するときには、特定の波長のレーザー光などでその蛍光分子を励起 (原子・分子のエネルギー状態を低い方から高い方へ遷移させること) し、その励起された蛍光分子がもとのエネルギー状態へ戻るときに出す蛍光をとらえる。したがって、どのように蛍光分子を励起させるかということがまず問題となる。原子・分子を励起させるには、エネルギーが遷移する分と同じだけのエネルギーを持つ光子を吸収させる必要がある。二光子励起蛍光顕微鏡の最大の特徴は、一個ではなく、二個の光子を非常に短い時間の間に吸収させて蛍光分子を励起させることである。二光子励起法の長所は、二個の光子を使って蛍光分子を励起させるため、一光子励起の時と比較し、エネルギーが低い、長波長のレーザーを使うことが可能である。ここで、光子の持つエネルギーはその振動数に比例する (光の量子性)

つまり波長の長さには反比例することに注意を要する。長波長のレーザー使用の利点として、以下の2点が挙げられる。エネルギーの低いレーザーを使用できるため、細胞へのダメージが少ない。短波長のレーザーより組織内の深部までレーザーが届くため、比較的深い領域も観察可能である。また、一光子励起の場合は、レーザーの焦点以外でも蛍光分子の励起が起きるが、二光子励起は、二個の光子がほぼ同時に来たときにだけ起こるため、レーザーの焦点面だけで蛍光分子が励起される。したがって、焦点面ではない・観察しない部分の蛍光退色を防ぐことができ、長時間の観察も可能となり、組織の広い範囲で観察することも可能となる。近年、麻酔下のラットより脳を取り出すことなくニューロン活動、特にニューロン内部のカルシウムイオンの動態を観ることに成功しており、二光子励起蛍光顕微鏡を用いることによって、生体内のニューロン活動を観察することが可能となる。個々のシナプスレベルでの活動まで観ることができることから、空間分解能も非常に優れている。また、これまでの研究から、ニューロン内部にあるカルシウムイオンなどの電気的な活動や、スパインの形成などの形態的な変化を観察することも可能である。

骨盤内組織を二光子励起蛍光顕微鏡下に観察するためには、適切な血流を保った状態で骨盤内組織を遊離し観察する必要がある。ラットは観察後に sacrifice し、骨盤内組織を採取するが、これが不可能である場合には sacrifice 後にユーロコリンズ液を血管内にカニューレションし観察を行う。当初は大腿神経、座骨神経等の太径の体性神経の観察を行い、続いてより末梢の自律神経の観察を行う。

b. 組織の採取、観察および免疫組織化学染色

組織を環流しつつ組織は固定、脱脂、脱水の後にパラフィン包埋する。顕微鏡下の観察にて得られた面と平行に切片を作成し、H-E 染色、マッソントリクローム染色を行う。Thyrosin Hydroxidase 抗体および nNOS 抗体を用いた免疫組織化学染色にて交感神経および副交感神経の分布につき検討を行い、これら組織所見を二光子励起蛍光顕微鏡にて得られた所見と比較し、部位の一致につき検討した。

4. 研究成果

ラット骨盤内神経の観察に適切な波長の設定を試みたが、神経組織のみを観察するための最適な波長の設定を達成することは今年度中には不可能であった。しかしながら、組織の固定と上記染色を行った結果、骨盤内組織における弾性線維とヒアルロン酸の分布に着想を得、このことから派生した機能温存前立腺全摘除術を目的とした骨盤内解剖学

の研究成果を報告した(研究発表1)。また、術中視野を改善させる観点に着想を得、ロボット支援前立腺全摘除術における三次元モニターの有用性につき報告した(研究発表2)。

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)

[雑誌論文](計 件)

1. Coexistence of elastic fibers with hyaluronic acid in the human urethral sphincter complex: a histological study. Hinata N, Murakami G, Abe S, Shibata S, Morizane S, Honda M, Isoyama T, Sejima T, Takenaka A.

J Urol. 2013 Oct;190(4):1313-9. doi: 10.1016/j.juro.2013.04.023. Epub 2013 Apr 11.

2. Dry box training with three-dimensional vision for the assistant surgeon in robot-assisted urological surgery.

Hinata N, Iwamoto H, Morizane S, Hikita K, Yao A, Muraoka K, Honda M, Isoyama T, Sejima T, Takenaka A.

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

日向 信之(Nobuyuki Hinata)

研究者番号: 10598816

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
武中 篤 (Atshushi Takenaka)

研究者番号：50368669