

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19308

研究課題名(和文) ヒト食道組織内アセトアルデヒド測定 - 食道組織内還流装置による新たな試み -

研究課題名(英文) The measurement of acetaldehyde in human esophageal tissue by using a novel recirculating device

研究代表者

八田 和久 (Hatta, Waku)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：30706932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：食道組織内還流装置の試作品を完成させ、生体ブタに対して内視鏡下に還流針を留置して食道組織内アセトアルデヒド濃度測定を行った。しかし、内視鏡と同装置のチューブが干渉することにより安定した食道内の還流針留置が困難であることからアセトアルデヒド濃度測定ができず、この問題に対して現在改良を行っている。

一方、食道・胃組織内アセトアルデヒド濃度測定に関しては、内視鏡生検組織によるアセトアルデヒド濃度の測定が可能であることが判明し、今後行う試験の基礎となるデータが得られた。

研究成果の概要(英文)：We developed a prototype of a recirculating device for measuring acetaldehyde in esophageal tissue, and then we measured the in vivo acetaldehyde concentration rate of esophageal tissue by using living porcine model. However, we could not measure this rate because it is difficult to keep a recirculating needle into the esophageal epithelium due to interference between the tube of this device and endoscope which was used for entering the recirculating needle into the esophageal epithelium.

However, we revealed that it is possible to measure acetaldehyde concentration rate of esophageal and gastric tissue by endoscopic biopsy, and acquired the preliminary data for the future trial.

研究分野：Gastroenterology

キーワード：acetaldehyde

1. 研究開始当初の背景

食道扁平上皮癌の発生において、飲酒は主要な危険因子であり、2009年にWHOの国際がん研究機関(IARC)より「飲酒と関連したアセトアルデヒド」は発癌物質と認定されている。アルコール飲料を摂取すると、エタノールは口腔内細菌やアルコール脱水素酵素などによりアセトアルデヒドに酸化され、アルコール飲料そのものに含まれているアセトアルデヒドとあわせて容易に唾液内に溶出、唾液の嚥下とともに食道にアセトアルデヒドが直接暴露される。アセトアルデヒドは、DNAや蛋白質と結合して付加体を作り、DNA修復を阻害し、発癌を誘発すると考えられている(Int J Clin Oncol 2010; 15: 135-44)(図1)

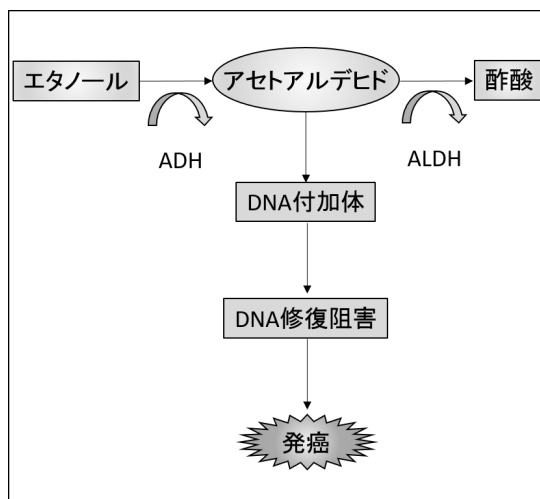


図1. エタノールの代謝と発癌への役割

このため、アセトアルデヒドを無害な酢酸に分解するアセトアルデヒド脱水素酵素の存在が重要であるが、アセトアルデヒド脱水素酵素2には遺伝子多型があり、アセトアルデヒド脱水素酵素2 活性型、アセトアルデヒド脱水素酵素2 不活性型、アセトアルデヒド脱水素酵素2 欠損型の3つに分けられる。日本人では50%弱がアセトアルデヒド脱水素酵素2 不活性型である。アセトアルデヒド脱水素酵素2 不活性型の飲酒者では、アセトアルデヒド脱水素酵素2 活性型の飲酒者に比し、アセトアルデヒド-DNA付加体や遺伝子障害性の指標である姉妹染色分体交換や小核形成がより高頻度で発生され、食道扁平上皮癌発生のリスクが高い、と報告されている(Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1996; 5: 99-102)。

これまで、アルコール摂取後のヒト体内でのアセトアルデヒド濃度に関しては、血液中、唾液中、胃液中での測定がなされ、アセトアルデヒド脱水素酵素2 不活性型では、活性型に比べ、各々の濃度が高いことが示されてい

るが、アセトアルデヒドの食道での発癌作用を直接証明するには、食道組織中にて同様の遺伝子多型によるアセトアルデヒド濃度の違いを示すことが重要である。さらに、他の多くの臓器とは異なり、食道組織中にはアセトアルデヒド脱水素酵素2 遺伝子が発現していないことから、アセトアルデヒド脱水素酵素2 遺伝子多型ごとの食道組織中アセトアルデヒド濃度の違いが、どこに由来するのか

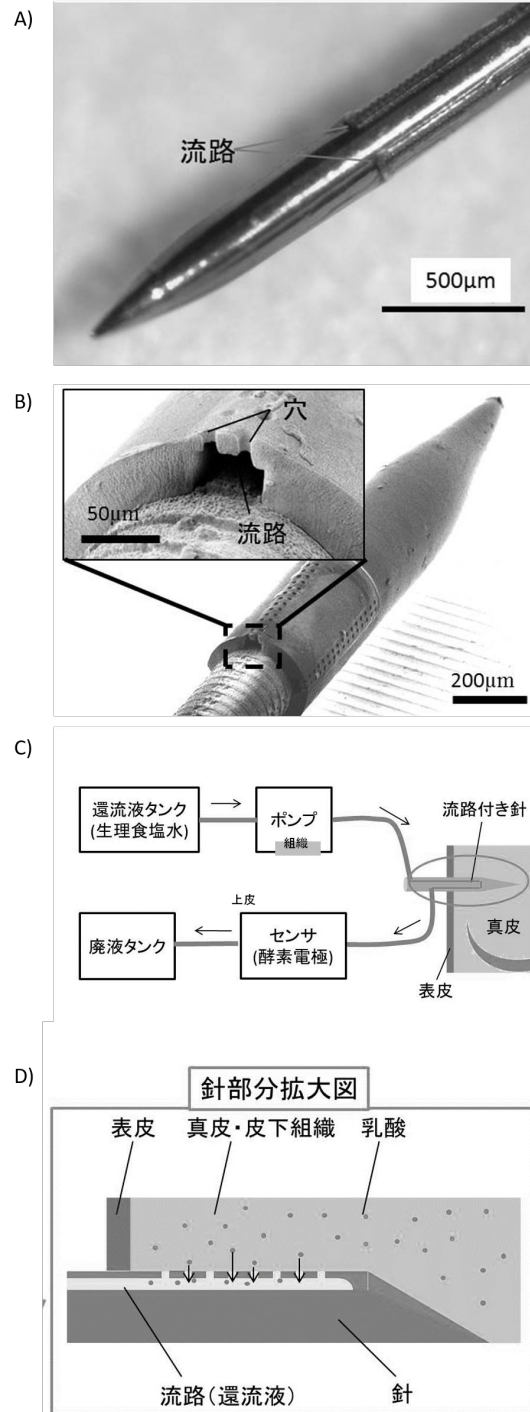


図2. 微小還流針と還流装置

- A) 微小還流針
- B) 微小還流針の流路構造
- C) 還流装置の模式図
- D) 針部分拡大図

(血液、唾液)が不明である。しかし、アセトアルデヒドは、その沸点の低さ(21度)などから、生体内組織中での測定は困難であるとされており、食道組織中アセトアルデヒド濃度測定に関連する検証はこれまでには困難であった。

東北大学大学院医工学研究科・生体機械システム医工学講座・ナノデバイス医工学研究分野では、皮下生体成分測定のために、外径0.2mmの針の上に表面に無数の穴のあいた流路を作製した微小還流針を開発した(図2)。これを目的組織に留置することで、微小還流、浸透圧勾配により測定物質を採取して濃度測定を行う仕組みとなっている。実際に、微小還流針をラット皮膚に留置し、還流装置を用いた微小還流により、組織中乳酸・グルコース濃度の経時的なモニタリングに成功した(35th Annual International Conference of the IEEE EMBS, Osaka, Japan, 3-7 July, 2013, pp.4478-81)。この微小還流針を応用することで、これまでには測定できなかった食道組織内のアセトアルデヒドを測定できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

生体内で食道組織内アセトアルデヒドを採取し、アセトアルデヒド濃度の経時的モニタリングすることが可能な微小還流針を用いた還流装置を新規開発し、体外に集められた還流液の濃度を測定することでヒト食道組織中アセトアルデヒド濃度を測定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

東北大学大学院医工学研究科・生体機械システム医工学・ナノデバイス医工学研究分野と共同で開発を進めている食道組織内微小還流装置のプロトタイプを完成させた。そのデザインとしては、ヒト食道に合わせたデザインの微小還流針、および、それに接続する細チューブ(沸点の低いアセトアルデヒドが管内で揮発することを防ぐためステンレスチューブとする)からなる還流装置とした。プロトタイプ完成後には、まず第一に、ブタ食道切除標本にアセトアルデヒドを浸し、食道組織内微小還流装置を用いてのアセトアルデヒド濃度測定実験を行った。続いて、東北大学大学院医学系研究科消化器病態学分野にて、装置評価のための生体ブタを用いた実験を行った。その際の評価項目としては、内視鏡を用いた食道組織内への安定した留置の可否、食道組織中アセトアルデヒド採取の可否、安全性とした。また、アセトアルデヒド濃度を効果的・正確に測定するために、

アセトアルデヒドの専門家である東北大学大学院工学系研究科・応用生命化学分野に依頼して、食道組織内還流液中のアセトアルデヒド濃度を測定した。その際の必要還流液量は、100 $\mu$ Lとした。採取した還流液は6M次亜塩素酸50 $\mu$ Lを添加し、-80で保存し、後日、東北大学大学院工学系研究科・応用生命化学分野においてガスクロマトグラフィー法にてアセトアルデヒド濃度の測定を行った。

また、生検検体を用いての食道・胃組織内のアセトアルデヒド濃度測定についても行った。微小還流装置の場合と同様に、まず第一にはブタ食道切除標本を用いてアセトアルデヒド濃度の測定を行い、その後に生体ブタを用いて食道組織中アセトアルデヒド濃度測定実験を行った。尚、採取した生検検体は0.6Mの次亜塩素酸300 $\mu$ Lが入ったエッペンに入れて固定し、エッペンを氷で冷却しながら検体をホモジナイザーで粉碎した。その後、粉碎された生検検体をガラスバイアルに入れ密閉し、4の冷蔵庫で保管した。こちらについても、後日、東北大学大学院工学系研究科・応用生命化学分野においてガスクロマトグラフィー法にてアセトアルデヒド濃度を測定した。

## 4. 研究成果

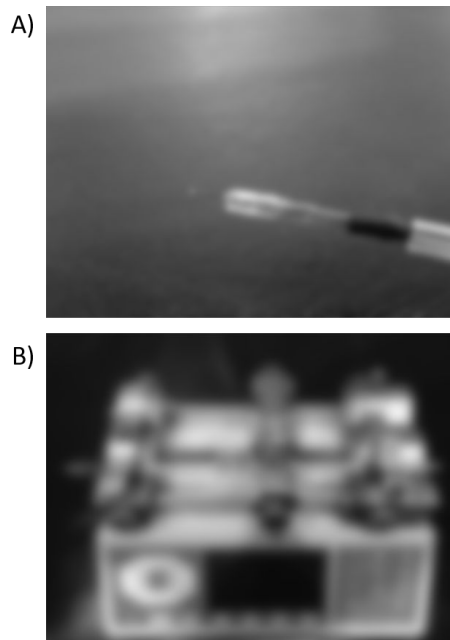


図3. 食道組織内微小還流装置プロトタイプ

- A) 微小還流針
- B) 還流装置

平成27年度は、食道組織内アセトアルデヒド測定に向けて、微小還流針を用いた食道組織内還流装置の完成と食道組織内還流シ

ステム構築を目標とした。まず、安全に食道組織内に微小還流針を留置するため、東北大学大学院医工学研究科と議論を行い、食道組織内還流装置本体からの流入路、流出路のステンレスチューブは外枠チューブで被覆されるように設計し、また、微小還流針を収納可能な構造とした。その後、食道モデルなどを用いて強度実験を行い、不具合の修正に努め、試作品を完成させた(図3)。

続いて、ブタ食道切除標本にアセトアルデヒドを浸し、本微小還流装置を用いてのアセトアルデヒド濃度測定を行った。この実験を行った目的としては、アセトアルデヒドは沸点が21℃と低く、揮発しやすいため、微小還流装置を用いての食道組織内アセトアルデヒド濃度測定が可能かを判定するためである。その結果、高濃度アセトアルデヒドの場合には、微小還流装置を用いての食道組織内アセトアルデヒド濃度測定が可能であり、本装置にてアセトアルデヒド濃度測定が可能であることが判明した。しかし、100 $\mu$ Mと低濃度のアセトアルデヒドに浸した場合には、本装置を用いてのアセトアルデヒド濃度測定が検出感度以下との判定になった。

平成28年度は、平成27年度に完成させた食道組織内還流装置の試作品を用いて、生体ブタにおける食道組織内アセトアルデヒド濃度測定実験を行った。具体的な方法としては、飲酒後の生体ブタに対して、全身麻酔下に微小還流装置のチューブを経口で挿入した上で内視鏡を挿入し、内視鏡観察下に目的部位までチューブを移動させ、把持鉗子を用いて還流針を留置、測定を行った。また、還流針留置部近傍より食道生検を行い、生検組織内アセトアルデヒド濃度の測定もあわせて行った。結果として、食道組織内還流装置による食道組織内アセトアルデヒド濃度の測定は困難であった。理由としては、内視鏡と微小還流装置チューブが干渉するため、安定的な留置が困難であることが挙げられた。現在、内視鏡と干渉しないチューブ、そして最終的には内視鏡鉗子口より挿入できる細径の微小還流装置チューブ作製に向けて検討中である。

一方、飲酒後の生体ブタ食道生検組織よりアセトアルデヒド濃度が測定されたことから、ヒトにおいても食道生検組織からアセトアルデヒド濃度の測定が可能と考えられた。このため、東北大学病院倫理委員会にて承認を得た上で、アセトアルデヒド脱水素酵素2活性型、不全型の健常成人において食道・胃生検組織からアセトアルデヒド濃度の測定を行った。その結果、ヒト食道・胃生検組織からもアセトアルデヒド濃度の測定が可能であることが判明し、今後行う試験の基礎となるデータが得られた。

以上をまとめると、食道組織内微小還流装置プロトタイプを作成し、生体ブタを用いて食道組織内アセトアルデヒド測定を行ったが、最も大きな問題として内視鏡との干渉が

挙げられた。干渉を軽減させるための改良を今後行っていき、食道組織内微小還流装置の臨床応用に向けて更なる検討を行っていく予定である。さらに、ヒト食道・胃組織検体におけるアセトアルデヒド濃度の測定が可能であることもわかった。これにより、今後はアセトアルデヒド脱水素酵素2活性型、不全型の健常成人における食道・胃組織内アセトアルデヒド濃度の差異など様々な検討を行うことが可能と思われる。このように、本研究では食道・胃組織内アセトアルデヒド濃度測定の可能性について明らかにすることができた。

## 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)

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

八田 和久 (Hatta, Waku)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：30706932