

令和元年6月11日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10534

研究課題名(和文) 生体蛍光染色剤とレーザー内視顕微鏡によるリアルタイム光学的組織診断法の開発

研究課題名(英文) Real-time histopathology by optical biopsy using laser endomicroscopy with topical fluorescence

研究代表者

田中 光司 (Tanaka, Koji)

三重大学・医学系研究科・客員准教授

研究者番号：10345986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：二光子レーザー顕微鏡を用い、早期癌切除標本における可食性色素(curcumin)の生体蛍光染色作用を検討した。消化管正常粘膜は細胞及び組織レベルで光学的組織診断可能であった。消化器癌は細胞異型及び構造異型診断可能であった。共焦点レーザー内視顕微鏡を用い、curcuminを塗布した早期癌切除標本を観察した。二光子レーザー顕微鏡による観察と同程度の光学的組織画像を得ることができた。レーザー顕微鏡画像(光学的病理組織所見)は病変表面からの横断面像(断層像)であるのに対し、従来の病理組織所見は病変の縦断面像である。しかし、癌診断における細胞異型及び構造異型の判定には問題無いと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内視鏡下光学病理組織診断法が確立すれば、消化器疾患の内視鏡診断において悪性疾患を疑う病変部位は、表層から数百マイクロメートル深部までの横断面像を自動スキャンで観察し、光学的組織画像で明らかな細胞及び構造異型がなければ不必要な生検を回避でき、患者に対しては出血リスクを軽減できる。また、内視鏡終了時に光学病理組織診断名を患者に説明でき、最終病理組織診断を待つ患者不安を軽減できる。

研究成果の概要(英文)：We imaged Ex vivo, fresh, and unfixed resected specimens of gastrointestinal (GI) malignancies including esophageal, gastric, and colorectal cancer using two photon laser scanning microscopy (TPLSM) with topical administration of an exogenous fluorescent probe curcumin). Subcellular, cellular, and structural morphology of either normal or cancerous tissues were clearly visualized. We imaged the resected specimens of GI malignancies by confocal laser endomicroscopy (CLE) with topical administration of curcumin. The images of CLE were comparable to those of TPLSM. Either images were high contrast, high resolution and high quality. Optical histopathology using TPLSM or CLE were imaged cross-sectionally from the mucosal tissue surface up to the deeper part of the specimens. Optical histopathological images can provide cancer diagnosis based on cellular atypia and structural atypia.

研究分野：消化器外科

キーワード：可食性色素 内視顕微鏡 共焦点レーザー顕微鏡 二光子レーザー顕微鏡

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### < 消化器病診断と内視鏡機器の進歩 >

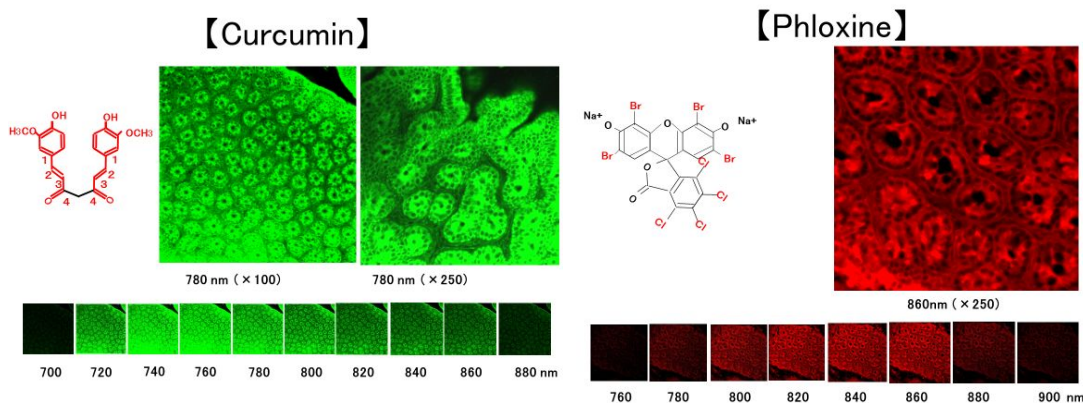
消化器内視鏡診断学の進歩は目覚ましく、拡大内視鏡や Narrow Band Imaging (NBI) は粘膜表層の腺管構造や血管構造の微細な変化を描出することで、病変部位の間接的な質的診断を可能としてきた。すなわち、消化管表層の構造変化 (正常構造からの逸脱の度合い) をパターン分類することで病変深部の病理組織像を推測する (この意味で間接的な質的診断) 内視鏡診断学を確立してきた。しかし、治療法の選択と決定には生検組織を用いた病理組織所見が最終診断として必要であり、とくに悪性疾患が疑われる場合には必須である。したがって、今後の内視鏡診断学を支える医療機器として、内視鏡観察下でリアルタイムに病理組織診断が可能な医療機器の開発が一つの方向性として挙げられる。

#### < 共焦点レーザー内視顕微鏡の臨床応用とその問題点 >

次世代内視鏡として注目されるレーザー内視顕微鏡は、一般的な内視鏡機能に加え、病変部位の顕微鏡画像が得られる。すなわち共焦点レーザー顕微鏡機能が付加された内視鏡では、病変部表層から数百マイクロメートル深部までの細胞レベルの光学的組織像 (横断面画像) が観察可能である。レーザー励起光によるヒト組織の自家蛍光のみでは高解像度の画像が得られないため、フルオレセインを生体蛍光染色剤として静脈内投与し細胞・組織を蛍光させている。日本では保険適応はないものの、欧米では規制当局の承認を受けた内視鏡機器としてすでに用いられている。しかし、フルオレセインの静脈内投与は稀にアレルギー反応が出現することやフルオレセインのヒト組織に対する蛍光作用が、共焦点レーザー内視顕微鏡画像に基づいた病理組織診断 (いわゆる光学的生検、optical biopsy) には不十分であることなど、生体蛍光染色剤としてのフルオレセインの使用には限界がある。

#### < 可食性色素化合物を含む生体蛍光染色剤 >

リアルタイム光学的病理組織診断を可能とするためには、1. フルオレセインより高い蛍光作用を持ち、2. 生体反応が少ない投与方法で高解像度画像が得られるような特性をもった生体蛍光染色剤を見出す必要があると考えた。人体への毒性及び安全性を考慮し新規合成化合物よりはむしろ人体への安全性が担保されている可食性色素の生体蛍光染色剤としての可能性を探索した (三重大学 神経再生医学/細胞情報学 溝口 明)。また、二光子レーザー顕微鏡を用いた前臨床研究の経験から、内視鏡に搭載されるレーザー顕微鏡が現在市販の共焦点レーザー顕微鏡から二光子レーザー顕微鏡へ移行していく可能性も考慮し (細胞・組織への光損傷が40分の1以下、深部観察距離は10倍以上) 二光子レーザー顕微鏡を用いた可食性色素による組織蛍光作用をマウス・ヒト組織で評価した。その結果、日本およびアメリカ食品医薬品局 (FDA) 認可済み可食性色素 1200 種類のスクリーニングで、生体蛍光染色剤として有望な可食性色素を約7種類見出した。また、正常細胞に比べ腫瘍細胞での蛍光が強いものを数種類認め (PCT/JP2014/059351、PCT/JP2017/018755)。



### 2. 研究の目的

可食性色素化合物を含む生体蛍光染色剤 (PCT/JP2014/059351、W02014157703 A1、特許出願人: 三重大学) を用いたレーザー内視顕微鏡により、消化管病変部を表層から数百マイクロメートル深部まで細胞レベルの光学的組織画像による観察を行う。可食性色素を用いたレーザー内視顕微鏡画像による光学的病理組織診断と、従来のヘマトキシリン・エオジン染色による病理組織診断との関連性を評価し、内視鏡下のリアルタイム光学的組織診断法の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

- 共焦点および二光子レーザー顕微鏡による可食性色素の至適条件設定 (早期癌摘出標本)
- 市販の共焦点レーザー内視顕微鏡による可食性色素の至適条件設定 (早期癌摘出標本)
- 可食性色素を用いたレーザー顕微鏡および内視顕微鏡画像による光学病理組織診断の妥当性の評価 (早期癌摘出標本)
- 可食性色素を用いた共焦点レーザー内視顕微鏡による消化器疾患に対するタイム光学病理診

断の妥当性を評価す（医師主導型臨床研究）。

#### 4. 研究成果

二光子レーザー顕微鏡を用い、早期癌切除標本における可食性色素（curcumin）の生体蛍光染色作用を検討した。

正常食道粘膜：非角化型重層扁平上皮が整然と並んで配置している。扁平上皮細胞では細胞質は核より染色性が低下していた。

食道癌：癌細胞は個々の細胞の大きさが不均一（大小不同）で、核は大きく、細胞内の位置が不均一（極性の乱れ）であった（細胞異型）。扁平上皮が整然と並んで配置している構造を逸脱した細胞分布であった（構造異型）。癌細胞では核の方が細胞質より染色性が低下していた。

正常胃粘膜：単層円柱上皮、粘液細胞から成る。深部観察では粘膜固有層の中に単層円柱上皮が管状に陥凹し胃小窩を形成しているのが観察可能であった。円柱上皮細胞では核は細胞質より染色性が低下していた。

胃癌：癌細胞は個々の細胞の大きさが不均一（大小不同）で、核は大きく、細胞内の位置が不均一（極性の乱れ）であった（細胞異型）。扁平上皮が整然と並んで配置している構造を逸脱した細胞分布であった（構造異型）。癌細胞でも核の方が細胞質より染色性が低下していた。

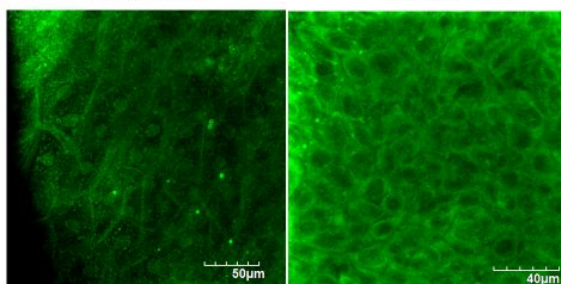
正常大腸粘膜：単層円柱上皮（吸収上皮細胞、杯細胞）から成る。深部観察では粘膜固有層の中に単層円柱上皮が管状に陥凹し陰窩を形成しているのが観察可能であった。陰窩は深部で内腔が広く杯細胞が多くなっていた。円柱上皮細胞では核は細胞質より染色性が低下していた。

大腸癌：癌細胞は個々の細胞の大きさが不均一（大小不同）で、核は大きく、細胞内の位置が不均一（極性の乱れ）であった（細胞異型）。扁平上皮が整然と並んで配置している構造を逸脱した細胞分布であった（構造異型）。癌細胞でも核の方が細胞質より染色性が低下していた。

#### 【Curcumin-食道】

正常食道粘膜

食道癌

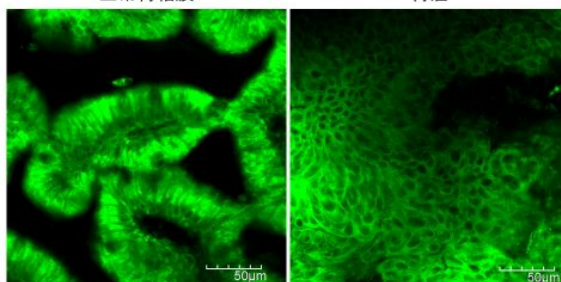


Imaged by two-photon laser scanning microscopy (TPLSM)

#### 【Curcumin-胃】

正常胃粘膜

胃癌

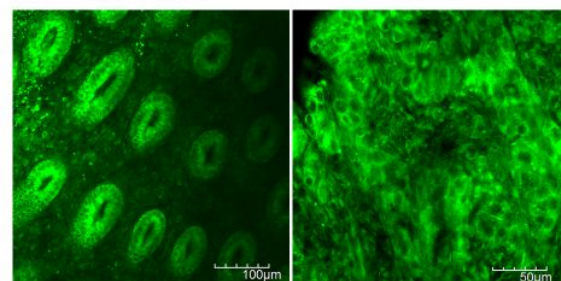


Imaged by two-photon laser scanning microscopy (TPLSM)

#### 【Curcumin-大腸】

正常大腸粘膜

大腸癌



Imaged by two-photon laser scanning microscopy (TPLSM)

市販の共焦点レーザー内視顕微鏡を用い、可食性色素を塗布した早期癌切除標本を表層から深部まで観察した。

胃癌切除標本に可食性色素 (curcumin) を散布し数分後、市販の共焦点レーザー内視顕微鏡を用いて観察したところ、二光子レーザー顕微鏡を用いた観察と同程度の光学的組織画像を得ることができた。しかし、癌診断に関する因子 (癌診断: 細胞異型及び構造異型による癌診断能、臓器特異性: 背景臓器の差による癌診断能; 食道癌、胃癌、大腸癌など) 細胞レベルの高倍率、高解像度画像に関する因子 (レーザー顕微鏡: 共焦点及び二光子レーザー顕微鏡, レーザーパワー, 励起波長, 観察深度など、可食性色素: 濃度、反応時間、蛍光強度、蛍光深度、複数可食性色素: 癌診断に有用な組み合わせ) などの条件設定を検証するには至らなかった。

可食性色素を用いた早期癌切除標本のレーザー顕微鏡画像とレーザー内視顕微鏡画像による光学的病理組織診断と従来の病理組織所見とを比較検討した。光学的病理組織所見と従来の病理組織所見では観察方向が異なる。すなわち、光学的病理組織所見は病変表面からの横断面像 (断層像) であるのに対し、従来の病理組織所見は病変の縦断像 (病変粘膜表面が上方、深部の漿膜面が下方) である。しかし、癌診断における細胞異型及び構造異型の判定には問題無いと考えられた。

医師主導型臨床研究で、可食性色素を用いた共焦点レーザー内視顕微鏡による消化器疾患に対するタイム光学病理診断の妥当性を評価するため、三重大学医学系研究倫理審査委員会 (研究課題 3089 共焦点顕微内視鏡および色素散布による消化器病変に対する生体内組織診断) や可食性色素 (curcumin) のヒト消化管内への投与に関する準備を進めていたが、検証するには至らなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Tanaka K, Araki T, Toiyama Y, Okita Y, Mohri Y, Kusunoki M: Incidence and Risk Factors : Kusunoki M (eds), Colitis-Associated Cancer, Springer Japan, P23-39, 2016. 査読有

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 内田 恵一

ローマ字氏名: (Uchida, Keiichi)

所属研究機関名: 三重大学

部局名：医学部附属病院  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：30293781

研究分担者氏名：小林 美奈子  
ローマ字氏名：(Kobayashi, Minako)  
所属研究機関名：三重大学  
部局名：医学系研究科  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：30359765

研究分担者氏名：井上 幹大  
ローマ字氏名：(Inoue, Mikihiro)  
所属研究機関名：三重大学  
部局名：医学系研究科  
職名：講師  
研究者番号（8桁）：30422835

研究分担者氏名：大竹 耕平  
ローマ字氏名：(Otake, Kohei)  
所属研究機関名：三重大学  
部局名：医学系研究科  
職名：リサーチアソシエイト  
研究者番号（8桁）：40378344

研究分担者氏名：楠 正人  
ローマ字氏名：(Kusunoki, Masato)  
所属研究機関名：三重大学  
部局名：医学系研究科  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：50192026

研究分担者氏名：溝口 明  
ローマ字氏名：(Mizoguchi, Akira)  
所属研究機関名：三重大学  
部局名：医学系研究科  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：90181916

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。