

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20251

研究課題名(和文) 真珠腫の術中蛍光診断の開発に関する研究

研究課題名(英文) The detection of cholesteatoma residue by using immunofluorescent method during surgery

研究代表者

高木 大樹 (Takagi, Daiki)

愛媛大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10448376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：真珠腫摘出手術では遺残・再発のリスクが常に付きまとうため、手術中に真珠腫上皮をgalectin-7抗体で蛍光免疫染色し、レーザー顕微鏡を用いて同定する手法を開発することが本研究の目的である。蛍光試薬を開発するにあたり抗体精製を試みたが、開発に要する費用の面などから難渋している。そのため抗体を用いない染色方法として蛍光顕微鏡の励起波長を変更するなど検討した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop how to visualize the residual cholesteatomas at the time of operation by using immunofluorescent method with laser microscope. We tried antibody purification to develop a fluorescent reagent, but it is difficult from the aspect of cost required for development. Therefore, as a staining method without using antibodies, we studied changing the excitation wavelength of the fluorescence microscope.

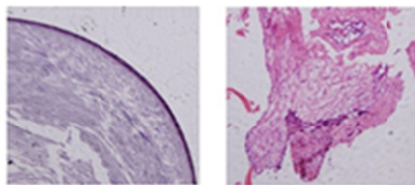
研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：真珠腫性中耳炎 術中診断 galectin-7

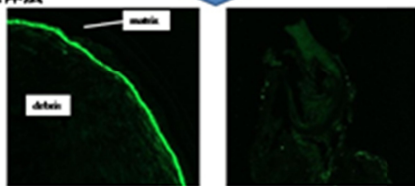
## 1. 研究開始当初の背景

真珠腫の治療原則は上皮である母膜を含めた全摘手術であるが、母膜を完全に摘出することは時に困難で、わずかに残存した母膜から再発をきたすことがある。これは主に遺残の確認が術者の主観的評価に委ねられているため、真珠腫の再発を根絶するには遺残母膜の客観的で確実な同定法の開発が欠かせない。申請者らは術中に真珠腫母膜の染色ができれば、完全な真珠腫除去が可能になると考え研究を進めてきた。採取したヒト真珠腫のプロテオーム解析を行ったところ、レクチンファミリーの一つである galectin-7 が全ての真珠腫上皮から検出できること、この物質は免疫染色によって母膜で強く発現することを発見した。そこで galectin-7 をターゲットとする免疫蛍光染色法と、脳外科で臨床使用されている手術用レーザー蛍光顕微鏡を組み合わせれば、術中に遺残母膜の同定が可能になるのではないかと着想した。検討を行ったところ、本法は真珠腫母膜の検出手段として特異性が高く感度も良好なことから、十分に実用的な検査法になりうると考えられた。そこで臨床展開を始めるには、ヒト中耳に投与可能な新たな galectin-7 抗体試薬の作製が欠かせない。また、新規作製する染色試薬の染色性や安全性確認が不可欠であると考え、本研究を計画した。

### H/E 染色



### 免疫蛍光抗体法



真珠腫

中耳粘膜

## 2. 研究の目的

本研究ではまず、本学プロテオサイエンスセンターおよび先端医療創生センターのバイオイメージング部門と共同で galectin-7 の抗体生成を行う。その後、臨床使用を前提としているため、一次抗体に蛍光標識を結合させ、ワンステップでの蛍光染色が可能な抗体試薬を精製する。この抗体試薬の完成後、真珠腫の染色性だけでなく、モルモットを用いた実験で ABR 測定や組織学的検査により耳毒

性を評価し、安全確実に実施できる真珠腫上皮の免疫染色法の確立を目指す。

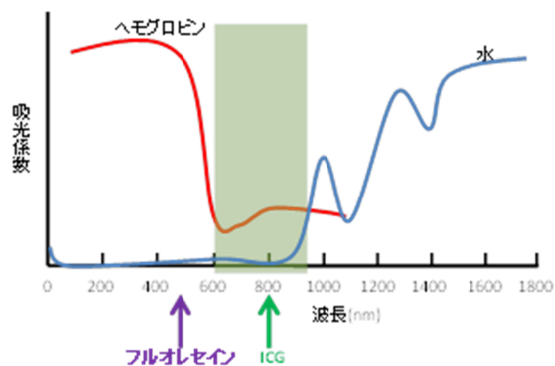
## 3. 研究の方法

### (1) Galectin-7 モノクローナル抗体の生成と抗体試薬の精製

ファージディスプレイでのモノクローナル抗体生成を行う。この作業は本学プロテオサイエンスセンターおよび先端医療創生センターのバイオイメージング部門と共同で行う。マウス由来のハイブリドーマを使用する作製方法とは異なり、臨床使用での安全性、反応性が担保される。ファージディスプレイでの抗体生成は、完全なクローンでの追加抗体作製が可能で、本学の無細胞タンパク質合成技術と合わせ、将来的に大量の抗体を安定供給することが可能な手法である。galectin-7 の抗体生成後は、生成された一次抗体に直接蛍光標識を結合させ、ワンステップで蛍光染色が可能な抗体試薬を精製する。

### (2) Galectin-7 抗体試薬の蛍光染色性試験

手術にて採取した真珠腫標本は、可能な限り短時間で研究室に移動し新鮮標本として染色試験を行う。学内の倫理委員会の承認後、症例ごとに研究への同意を取得予定である。真珠腫標本をシャーレ上に置き、上記手法で作製した抗体試薬を加えて真珠腫に存在する galectin-7 を標識する。蛍光染色性試験では、1) 抗体試薬の至適濃度、2) 抗体試薬の染色時間を検討し、3) 抗体試薬の正常中耳粘膜や肉芽の染色性を可能な範囲で検討する。観察には現有備品である蛍光実体顕微鏡(オリンパス)を用いる。その際顕微鏡のオプションとして複数の蛍光波長が選択できるようになっているため、出血下や骨面などが露出する術野での至適波長を同時に検索する。



予想される術野での至適蛍光波長

(3) Galectin-7 抗体試薬の安全性試験  
 実験動物にはモルモット(体重 150~200g)を用いる。ABR を測定した後、A 群: 精製した抗体試薬、B 群: PBS (コントロール)のいずれかを、注射器を用いて経外耳道的に鼓室内に投与する。試薬濃度や反応時間は前項での研究結果の最適値を採用する。1 週後に ABR を測定し、ABR 閾値の変化から内耳障害の程度を評価する。なお、ABR 測定時の刺激音には 8 kHz、16 kHz、32 kHz のトーンバーストを用い、300 回の加算を行う。閾値付近では 5dB ステップで刺激音圧を変化させて聴力閾値を求める。ABR 測定後は深麻酔下に中耳および内耳を摘出して組織学的検討を行う。中耳は HE 染色にて粘膜の変性や病的变化を観察する。内耳は surface preparation 法でコルチ器を採取して、切片を作製、Rhodamine-phalloidin および Hoechst33342 による二重染色を行って、有毛細胞の骨格や核を染色する。これを蛍光顕微鏡下に観察し、基底回転、第 2 回転、頂回転における内外有毛細胞の生細胞と死細胞の数を求めて脱落率を算出する。なお、安全性試験で中耳あるいは内耳に障害が生じていれば、抗体試薬の濃度、反応時間を再検討する。

#### 4. 研究成果

当初予定していた抗体精製は、開発費用の面などから難渋している。そのため、実際に手術で用いる蛍光顕微鏡を用いて真珠腫を観察し、波長を変化させるなどして識別が可能か検討を行った。以下にその一部を図示する。

(通常光)



(青色励起光: 波長は 568nm)



上図の 2 枚は同一視野の真珠腫塊を、波長を変化して撮影したものである。非標識下でも淡く蛍光を発する部分が確認できる。しかし発光している部位が本当に真珠腫母膜なのか、あるいは発光していない部分は遺残しても再発にならないのか、そもそも発光のメカニズムは、など数々の疑問も残るため、臨床応用には至っていない。

一方で本学プロテオサイエンスセンターでは無細胞タンパク質合成技術をコアにした新しい創薬を行っており、現在試みている抗体以外での蛍光診断方法も模索している。目標とする蛋白質と特異的に結合できるようなアプタマーが開発できれば、比較的短期間で合成が可能となるため、抗体精製での問題点も解決可能になる可能性がある。今後もサイエンスセンターと共同研究を行う予定である。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

1. 100th Anniversary of the ENT Department, 2017, Myringoplasty simulation using a finite element method.

Daiki Takagi, Hidayat, Shingo Okamoto, Naohito Hato.

[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

高木 大樹 ( Takagi, Daiki )  
愛媛大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：10448376

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし