

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18211

研究課題名（和文）生体多光子励起イメージング技術を利用した胸部腫瘍の新規低侵襲診断装置の開発

研究課題名（英文）Development of novel minimally invasive diagnostic device for thoracic tumor using intravital multiphoton excitation imaging technology

研究代表者

谷口 聖治（Taniguchi, Seiji）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50836252

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：癌腫の診断は主に病理検査によって行われるが、侵襲的で診断までに時間を要する。本研究では、新たな低侵襲的癌診断技術を開発することを目的とし、多光子励起イメージング技術を用いて臨床検体の肺組織の観察を行った。肺胸膜面からの観察では、胸膜線維とその直下の肺組織構造、並びに肺胸膜に浸潤する癌細胞の観察に成功した。また癌組織の切離面からの観察では、実際の組織病理学的画像と同様の特徴を描出できた。この結果から、多光子励起イメージング技術を用いることで、非侵襲的に胸膜浸潤の診断や肺癌の組織亜型まで評価できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌腫における従来の病理組織診断法は、侵襲的であり、また診断までに時間を要する。本研究は、多光子励起イメージング技術を用いた新たな低侵襲的癌診断技術を開発することを目的とした。当技術を用いることで癌・非癌部の境界を認識できたり、胸膜浸潤や組織亜型まで診断できるようになれば、この技術を手術時の胸腔鏡カメラに導入することでより侵襲の低い術式へと術中に変更することが可能となり、その結果患者の術後呼吸機能の温存につながる。

研究成果の概要（英文）：Although the carcinoma has been mainly diagnosed by pathological examination, it is invasive and takes a long time to diagnose. In this study, we observed the clinical lung tissue using multiphoton excitation imaging technology, for the purpose of development of the novel minimally invasive diagnostic device for cancer. Approached from lung pleural surface, we could observe the pleural fiber, subpleural lung structure, and pleural-infiltrating cancer cells. And approached from cutting surface of cancer tissues, we could visualize the same characteristics as the actual histopathological image. From these results, it was suggested that the diagnosis of pleural infiltration of cancer cells and histological subtypes of lung cancer can be evaluated non-invasively using this multiphoton excitation imaging technology.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：生体イメージング 多光子励起顕微鏡 肺癌 胸膜浸潤

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺癌は、他の癌腫と比べて組織型並びに組織亜型が多く、治療戦略や予後に影響する。例えば肺胞上皮置換性増殖型優位の肺腺癌は、部分切除でも完全治癒が見込める可能性が高いが、これらを術中に診断する技術は未だ開発されていない。従来の組織診断法としては、一般的に組織を侵襲的に採取した後、固定・薄切・染色といった処理工程に数日を要する。また、術中の凍結標本を用いた組織診断ではこれらの工程は必要でないが、組織亜型まで詳細に観察することは困難である。

近年、最新型の光学顕微鏡を用いた多光子励起イメージング技術は技術革新が著しく、生きた細胞の動態や機能を詳細かつリアルタイムで解析することが可能となっている。当該連携研究室である大阪大学大学院医学系研究科・免疫細胞生物学教室では、この多光子励起イメージング技術を用いることで、従来のガラス標本による顕微鏡画像と同様に大腸組織の特徴を詳細に描出できることを明らかにした。また、大腸腺管構造の基底膜における第二高調波発生シグナルが正常組織と癌組織で異なることを見出し、これらを定量化することで、癌部と非癌部を分類できることを明らかにした(Matsui et al., Sci Rep 2017)。一方で、ヒトの胸部組織においてこれらのイメージング技術を用いた解析の報告は未だない。

### 2. 研究の目的

本研究では、上述した多光子励起イメージング技術を用いて、非常に多彩な組織型ならびに亜型をもつ肺癌の解析を行い、新たな低侵襲的診断技術の開発を目的とする。癌・非癌部の境界部分の認識することが可能となれば、この技術を手術時の胸腔鏡カメラに導入することで、より侵襲の低い術式へと術中に変更することが可能となり、その結果患者の術後呼吸機能の温存につながる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 臨床肺検体を用いた生体多光子励起イメージング系の確立

大阪大学医学部附属病院呼吸器外科の手術で摘出された肺組織のうち、癌部と非癌部の一部を、ホルマリン固定前に大阪大学大学院医学系研究科・免疫細胞生物学教室に送付し、多光子励起顕微鏡で観察を行い、最適な観察系を検討した。

#### (2) 肺胸膜面・切離面からの観察、および従来の病理組織画像との整合性の評価

確立した観察系を用いて、肺胸膜面、そして肺に割を入れて作成した切離面からの観察を行った。またイメージング終了後、従来の病理組織標本を作製し HE 染色を行い、病理組織画像と多光子励起顕微鏡のイメージング像との対比を行った。

なお、本研究は、大阪大学医学部附属病院倫理審査委員会で研究実施を承認されており、研究対象者に文書及び口頭による十分な説明を行い、研究対象者の自由意志による同意を文書で取得している。また、観察に用いた肺組織は、病理診断に影響を与えない部位を採取している。

### 4. 研究成果

#### (1) 臨床肺検体を用いた生体多光子励起イメージング系の確立

肺は肺胞構造を形成しており内部に多くの空気を含んでいるため、他の実質臓器と比べ顕微鏡による観察に不向きである。これを克服するため、15ml のシリンジ内に生理食塩水を満たし中に肺組織を入れ、シリンジの内筒を用いて陰圧をかけ肺実質内を生理食塩水で満たした後に観察を行った。そうすることで、肺は虚脱することなく肺胞構造は保たれたまま観察することができた。また励起に用いる近赤外線波長についても検討を重ねた結果、750 nm から 800 nm 付近の近赤外線が、最も観察に有用な自家蛍光シグナルを検出することがわかった。上述したイメージングの手順を用いることで、ヒト組織の胸膜の膠原線維を非線形光学現象により可視化できる観察系を確立することができた(図1)。

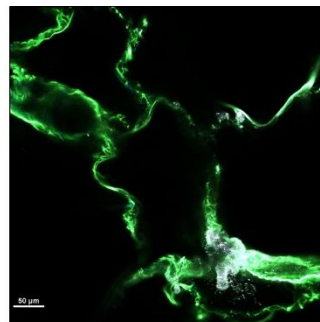


図1：多光子励起顕微鏡で観察した正常肺組織

## (2) 肺胸膜面・切離面からの観察、および従来の病理組織画像との整合性の評価

この観察系を用いて、胸膜直下に存在する癌部を肺胸膜面から観察したところ、肺胸膜の網目状の膠原線維内に腫瘍細胞の浸潤を観察することができた(図2)。胸膜浸潤診断は病期とそれに基づく術式決定を左右する因子であるにも関わらず、術後の病理診断で初めて診断される。今後、本技術を胸腔鏡カメラに導入することができれば、術中に胸膜浸潤の有無を知ることができ、このジレンマを克服しえる有用な観察技術であると考えられた。

次に、腫瘍組織をメスで切離し、上述の観察系を用いてその切離面から観察を行った後、病理組織標本を作製した。多光子励起顕微鏡によるイメージング画像と、従来の病理組織診断法に基づいた病理組織画像とを比較したところ、同様の組織学的特徴を描出することができた(図3)。このイメージング技術を用いることで、術中に組織亜型まで診断することが可能となり、より侵襲の低い術式へと変更できるようになる。一方で、正確な画像を描出するには適切なフィルター・レーザー強度・励起波長の選択等が必要であり、これらの問題を解決するため今後更なる症例の蓄積を加え、様々な組織型における顕微鏡画像と組織診断時の画像との整合性、ならびに顕微鏡画像による組織診断の可能性を検証する必要がある、今後の課題と考えられた。

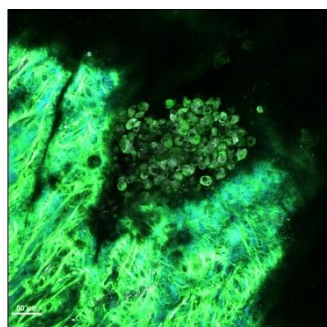


図2：胸膜浸潤部（肺胸膜面からの観察）

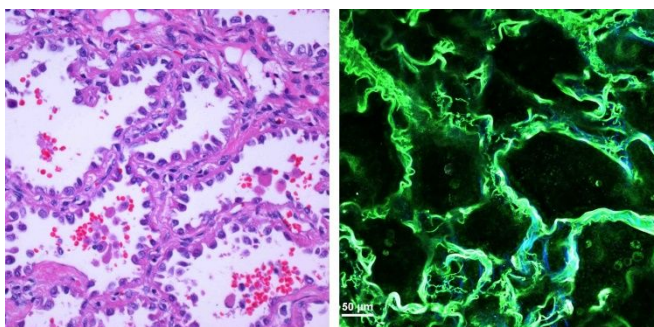


図3（左）：肺胞上皮置換性増殖型の肺腺癌のHE画像  
（右）：多光子励起顕微鏡で観察した肺組織（同症例）

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------