

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890029

研究課題名（和文） 蛍光偏光解消法を用いた消化管病変の診断技術の開発

研究課題名（英文） The Possibility of Cancer Diagnosis with Fluidity Sensitive Fluorescence Measurement

研究代表者

金子 剛 (KANEKO TSUYOSHI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：90510181

研究成果の概要（和文）：近年、癌病変において細胞膜流動性が変化することが報告された。一般に膜流動性を捕捉することは蛍光偏光解消法により可能である。同法は低侵襲な手法で、膜流動性を数値（FP 値）として表すことが可能であるため、例えば、癌化に伴う膜流動性変化という現象を数値にて評価しうる可能性がある。そこで本研究では、同法の有用性を①アゾキシメタン誘発大腸腺腫動物モデルおよび②ヒト胃癌検体を用いて検討した。その結果、①腺腫部位とその周囲の正常粘膜における FP 値に有意な差を認めた。また、②病理学的に高分化腺癌と確認された領域の FP 値は、正常粘膜領域と比較して有意に低値であった。このことは同法により病変部位が数値にて診断可能であることを意味する。同法は内視鏡への応用が可能であり、新しい光学的生検技術の一つとして提案したい。

研究成果の概要（英文）：BACKGROUND AND AIMS: The cellular membrane fluidity changes in response to physiological and pathological stimuli. We showed that the indomethacin treatment increased the fluidity of gastric cellular membrane using a specially designed microscope based system to measure the fluorescence polarization of gastric mucosa-derived RGM-1 cells stained with dodecanoylaminofluorescein (DAF). In the present study, the membrane fluidity of gastric cancer specimens and their surrounding normal mucosa were investigated whether carcinogenesis increased the cellular membrane fluidity. PATIENTS AND METHODS: Gastric cancer specimens from a total of 11 gastric cancer patients that were resected with Endoscopic Submucosal Dissection procedure were investigated. After washed with phosphate buffered saline, the specimens were topically treated with DAF and fluorescence polarization (FP) values on the surface cellular membrane were measured and calculated with an image intensified CCD-mounted fluorescence microscope and an image-processor. Diagnostic accuracy was evaluated and compared with pathological sections stained by H&E stain. RESULTS: The FP values of histologically-confirmed human gastric cancer showed significantly smaller than those of surrounding normal gastric mucosa, indicating that cellular membrane fluidity was decreased in human cancer tissues. CONCLUSION: The present study revealed the cellular membrane fluidity increased during gastric carcinogenesis. The results exhibited the possibility of gastric cancer diagnosis with fluidity measurement.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,210,000	363,000	1,573,000
2009 年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,370,000	711,000	3,081,000

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：蛍光偏光解消法・膜流動性・光学的生検・消化器内視鏡

### 1. 研究開始当初の背景

近年内視鏡の分野では、カプセル内視鏡という新しいタイプの内視鏡が開発された。現在では小腸用カプセル内視鏡はいうまでもなく、大腸用カプセル内視鏡・食道用カプセル内視鏡が次々と実用化されている。よってこれらカプセル型内視鏡が現行型内視鏡に取って代わる日が到来すると考えられている。但し、カプセル内視鏡では、診断の黄金律である生検による病理診断が施行できないことが欠点であり、病理診断に変わりうる手法の進歩が迫られている。

その資質に最も適う技術に光学的診断法が挙げられ、自家蛍光を用いた内視鏡や狭帯域フィルターイメージングなどが実用されている。しかし、これらの手法はいずれも、腫瘍性病変の変化を直接観察するものではなく、粘膜上皮の肥厚や血液量の増大による間接的な情報を捕らえているにすぎず、炎症性病変など血流が増大する病変においては、擬陽性病変として描出される課題が存在する。こうした問題を解決するために、病変を形成する細胞そのものの性質を捕らえる光学的技術が必要である。

そこで本研究者は観察対象である細胞群において、細胞膜そのものに注目した。生体膜は細胞膜や細胞内小器官に共通する、脂質二重層を基礎とする構造であり、脂質二重層を構成する一つ一つの脂質分子の構造が、生体膜の性質を反映する。近年、炎症や前癌病変などにおいて生体膜の流動性が変化することが報告されており、生体膜の物理的性質である流動性の変化を捕えることは、細胞レベルでの病態生理学的変化において重要な観点となる。

この細胞膜流動性の直接的・非破壊的測定方法として、脂質層に蛍光物質をラベルする蛍光ラベル法が提案されており、その中でも今回注目した蛍光偏光解消法は、高感度な測定法として定評がある。この手法は細胞膜、脂質二重膜の基礎研究に広範に使用されており、同法で用いる蛍光色素はフルオレセインを発色団とするため非常に毒性が低く、生態観察に適している。また、測定装置に関しては一対の偏光板と使用する蛍光色素の発色団に選択性のあるフィルターを光路に挿入するという簡単な変更のみで内視鏡への応用が可能である。

このため、本研究者の同法による消化器がんの診断が可能か否かについて検討を行っ

た。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞膜の流動性の差を画像化することによって、癌部と非癌部を鑑別しうる光学システムを構築することである。癌細胞は正常細胞と比較して流動性が高いことが近年報告された。一方我々は、細胞膜流動性は「蛍光偏光解消法」を用いることで光学的に捕捉可能であり、同法を用い脂質過酸化由来の細胞傷害が定量化可能であることを報告した。よって、本研究では蛍光および偏光フィルター、CCD カメラ、画像処理装置を組み合わせた光学系を用いて蛍光偏光解消法システムとし、細胞膜流動性の相違を診断根拠とした、全く新しいコンセプトに基づいた内視鏡診断システムの構築を目指す。

### 3. 研究の方法

平成 20 年度は *in vitro*, *ex vivo* の実験系で顕微鏡像、実体顕微鏡像との対比を行い、至適条件を決定し、実験動物での観察を行う。平成 21 年度は筑波大学医の倫理委員会の承認を得た、消化管がん患者の病変における蛍光偏光解消法の有用性を明らかにする

#### <平成 20 年度・実験動物モデル>

20 年度は蛍光偏光解消法による粘膜細胞膜の流動性の違いによって、ラット大腸腺腫モデルが診断可能か否か検討する。本研究に用いるモデルはアゾキシメタン (AOM) 誘発大腸腺腫モデルである。蛍光偏光解消法により、正常粘膜と異常粘膜との違いを流動性の違いとしてイメージングすることが可能であれば、大腸腺腫などの通常光観察では発見されにくい初期病変の補助診断として同法の有用性が示される。

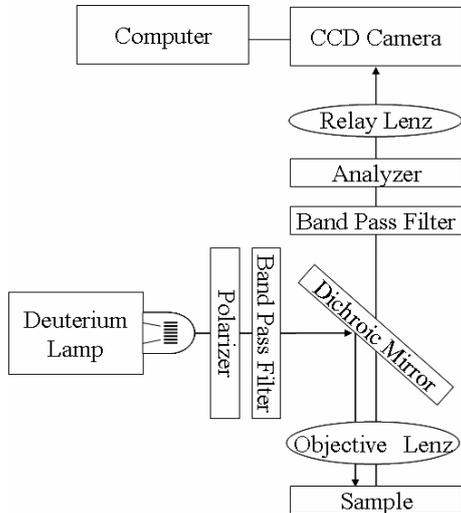
実験動物 4 週齢、体重 150g±10g の雄性ウイスターラットを用いる。

担癌動物モデルの作製 発がん物質として AOM を使用し、飼料摂取 2 週目および 3 週目の計 2 回に腹部皮下注射する。

試薬 流動性指示性蛍光試薬は dodecanoylamino fluorescein (DAF) である。蛍光観察方法 11 週目にエーテル麻酔下にて放血して処理し、大腸を摘出。摘出した大腸は、十分に洗浄して内容物を除去後、筒状のままタンパク分解酵素阻害剤および 100μM DAF 溶液含有の生理食塩水にて 30 分間・37℃にて染色。その後、漿膜側を染色しないよう注意しながら染色液を排出し、結腸ヒダに沿って切開。黒色ゴム板に貼り付け

カバーガラスにて検体を被った後に観察する。

蛍光像は顕微鏡 (BX51, Olympus, Japan)、高感度カメラ (C2400-25, Hamamatsu Photonics, Japan) およびイメージプロセッサー (ARGUS 100, Hamamatsu Photonics, Japan) にて観察 (下図参照)。



蛍光の平行成分との垂直成分は、上述のイメージプロセッサーにて取り込みを行い、ピクセルごとに蛍光偏光解消度を演算する。定常光蛍光偏光解消度 FP は、以下の方程式で算出する。 $FP = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp})$  この方程式中の  $I_{\parallel}$  は平行の成分であり、 $I_{\perp}$  は垂直の成分である。

観察対象は a)AOM 非投与・正常大腸粘膜群 (control 群) b)AOM 投与・正常大腸粘膜群 c)AOM 投与で大腸腺腫群の 3 グループ (各 3 匹) を用いる。各群 1 匹につき 5 個のクリプトにおける平均値を control 群と比較して FP 値を算出する。

統計処理 得られた結果の統計学的有意差は、ANOVA により有意差検定を行い、 $p < 0.01$  を有意差ありとした。

<平成 21 年度・ヒト胃癌検体>

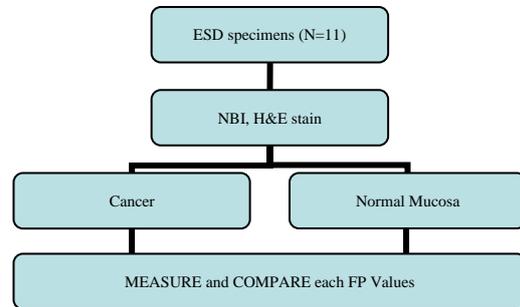
21 年 4 月から 10 月まで筑波大学消化器内科にて胃癌患者に対して施行された内視鏡的粘膜切除術検体 (11 人・11 検体、男女比 9:2、平均年齢 72.3 歳) を用い検討を行う。なお、いずれの検体の術前診断は well differentiated type であり、術後の病

no.	sex	age	type	size (mm)	pathology	UICC
1	M	64	Ⅱa+Ⅱc	4x17	well differentiated type	p Stage1b
2	M	80	Ⅱc	4x10	well differentiated type	p Stage1b
3	F	75	Ⅱc	9x6	well differentiated type	p Stage1b
4	M	70	Ⅱa	10x6	well differentiated type	p Stage1b
5	F	75	Ⅱc	18x8	well differentiated type	p Stage1b
6	M	71	Ⅱa	10x10	well differentiated type	p Stage1b
7	M	67	Ⅱc	12x9	well differentiated type	p Stage1b
8	M	70	Ⅱa+Ⅱc	11x8	well differentiated type	p Stage1b
9	M	75	Ⅱc	9x6	well differentiated type	p Stage1b
10	M	75	Ⅱa	26x23	well differentiated type	p Stage1b
11	M	76	Ⅱc	12x7	well differentiated type	p Stage1b

理的検索にて、pStageIA (UICC) と診

断された。

検体は、下に示すフローチャートのごとく、術中・術後に拡大観察・狭帯域観察を行い、癌部非癌部領域を決定しそのうち 50 ポイントを関心領域とし、蛍光偏光解消法による観察を行った。

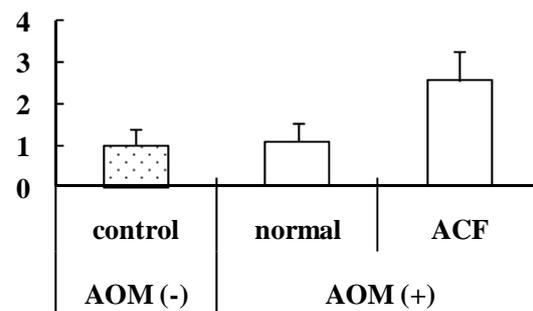


#### 4. 研究成果

<平成 20 年度・実験動物モデル>

蛍光像は上述の顕微鏡、高感度カメラおよびイメージプロセッサーにて観察した。観察対象は a)AOM 非投与・正常大腸粘膜群 (control 群) b)AOM 投与・正常大腸粘膜群 c)AOM 投与で大腸腺腫群の 3 グループ (各 3 匹) を用いた。各群 1 匹につき 5 個のクリプトにおける平均値を control 群と比較して FP 値を算出した。

その結果、下図に示すように AOM 投与群において、大腸腺腫とその周囲の正常粘膜における FP 値に有意な差を認め (1.00±0.45v. s. 2.57±0.69,  $p < 0.01$ )。AOM 投与群の正常粘膜と control 群間に FP 値の有意差は認めなかった。データはすべて平均値±SD (n=15) にて表記。

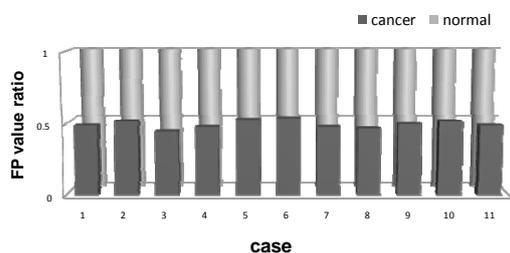


<平成 21 年度・ヒト胃癌検体>

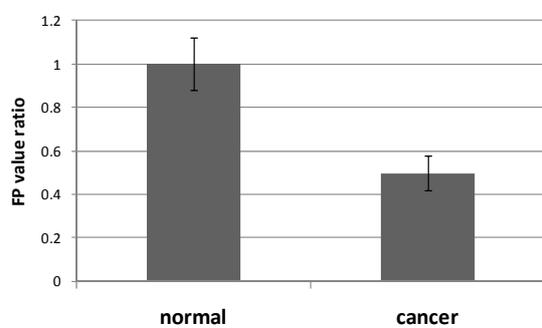
粘膜下剥離術後 (ESD) を施行したヒト胃癌はリン酸緩衝液で洗浄後、流動性感受性蛍光指示薬 (DAF・10microM) で 15 分間染色し、上述の CCD 搭載蛍光顕微鏡と画像プロセッサを用いて流動性を示す FP 値を癌部・非癌部それぞれ 50 ポイント算出した。同時に検病理学的検査を行い、FP 値との比較を行った。なお、FP 値測定中における癌部の判定には狭帯域観察法を併用した。

その結果を下図に示す。HE 染色にて病理組

組織的に癌領域と診断された部位の FP 値は非癌領域のそれと比較すると、すべての症例において前者の FP 値が有意に低値であった (下図)。



また、これらをまとめると、癌部・非癌部における FP 値は  $1.0 \pm 0.12$  v.s.  $0.50 \pm 0.08$ ,  $p < 0.005$  であり、癌部における膜流動性の亢進が示された (下図)。



本研究者及び筑波大学消化器内科・松井研究室では、消化器病変における蛍光観察の臨床への利用応用を進めてきた。本研究者はこれまでの蛍光観察手法に散見される欠点を補う候補として蛍光偏光解消法による消化管病変の診断法を取り上げた。本研究は同法の有用性を上記の2つのモデル、つまりアゾキシメタン誘発大腸腺腫モデルおよびヒト胃癌検体を用いて検討した。この結果、同手法は種々の消化器病変の診断に有用である可能性が示された。

臨床における技術革新が求める基本的方向に非侵襲性がある。消化器病学における瞞目すべき非侵襲性の技術革新として、カプセル内視鏡がある。同法は極めて侵襲が少なく、検査時に苦痛を伴わない検査であり、今後大いなる発展が期待される一方、組織生検が不能であるという欠点を併せ持つ。この欠点を克服すべく、光学的診断の開発が急がれている。

今回用いた蛍光偏光解消法は、生体にとって危険な領域の励起光を用いず、毒性の高い蛍光色素を用いないという非侵襲性に加えて、細胞膜の流動性変化という病態生理を反映した現象を捕捉すること、すなわち広義での病理診断が可能な方法であり、新しい光学

的生検技術として提案したい。

## 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2件)

1. 松井裕史、金子剛、ALAを用いた胃癌の光線力学的診断 臨床消化器内科 24巻,2009,1379-1386 査読無

2. O. Shimokawa, H. Matsui, Y. Nagano, T. Kaneko, T. Neoplastic transformation and induction of  $H^+$ ,  $K^+$ -adenosine triphosphatase by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the gastric epithelial RGM-1 cell line. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 44(1-2):26-30, 2008 査読有

[学会発表] (計3件)

1. 米国消化器病週間 (DDW2009), Kaneko T, The fluorescence assessment of cellular membrane fluidity in human gastric cancer specimens, Chicago USA 2009年6月3日

2. 第27回サイトプロテクション研究会 金子剛ほか、蛍光偏光解消法による NSAIDs 起因性胃粘膜細胞傷害の捕捉、京都 2009年3月27日

3. 米国消化器病週間 (DDW2008), Shimokawa O, Kaneko T, Malignant Transformation of Rat Gastric Epithelial RGM-1 Cell Line Induced By Carcinogen N-methyl-N-nitro-N-Nitroso-guanidine treatment Was Accompanied with the Ectopic Expression of  $H^+$ ,  $K^+$  Adenosine Triphosphatase, San Diego USA 2008年5月21日

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 剛 (KANEKO TSUYOSHI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号: 90510181