

機関番号：24303
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21700469
 研究課題名（和文） 上皮細胞内分子を標的とする大腸腫瘍蛍光寿命イメージング診断法の開発
 研究課題名（英文） Diagnostic technique for the detection of colon adenoma using fluorescence lifetime imaging targeting epithelial intracellular molecules
 研究代表者
 山岡 禎久（YAMAOKA YOSHIHISA）
 京都府立医科大学・医学研究科・助教
 研究者番号：80405274

研究成果の概要（和文）：上皮細胞内分子の微小環境に依存する蛍光寿命により大腸腫瘍検出が可能ではないかという仮説を検証するために、ヒト大腸腫瘍 EMR（内視鏡的粘膜切除術）検体に対して、自家蛍光寿命イメージングを行った。その結果、生体内蛍光物質である FAD（フラビンアデニンジヌクレオチド）の吸収、蛍光波長帯域において、大腸腫瘍部と正常部で違いが存在することを明らかにした。蛍光寿命の違いは主に粘膜上皮細胞内分子からの蛍光に起因し、細胞、分子レベルでの腫瘍検出が可能となる。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated autofluorescence lifetime imaging of human colon specimens obtained by endoscopic mucosal resection (EMR). As a result, we found that there is a difference of fluorescence lifetime using the excitation and fluorescence wavelengths of FAD (flavin adenine dinucleotide) between normal and adenoma regions. This difference is mainly caused by fluorescence from mucosal epithelial intracellular molecules. Autofluorescence lifetime imaging would be a promising and practical method having potential for the detection of colon adenoma targeting intracellular environments.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：バイオイメージング、精密光計測

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学、生体材料学

キーワード：蛍光寿命、腫瘍診断、内視鏡、自家蛍光、大腸上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

現代日本において、大腸はがん罹患数が2番目に多い部位であり、早期に大腸癌を発見することは非常に有効な対策である。そのため様々な計測法の開発が行なわれているが、なかでも内視鏡技術の発展、特に CCD カメラの発展は腫瘍の早期検出能力を向上させ

た。しかしながら、内視鏡検査は白色像を見ることにより、その形態変化から判断することから、形態変化の少ない表在型微小腫瘍(数 mm 以下)の検出は非常に困難である。また、腫瘍検出向上のために、Narrow Band Imaging (NBI) や自家蛍光内視鏡 (AFI) に代表される特殊光による内視鏡技術も発達

している[1]。これらの技術は粘膜表面の微細模様や大腸粘膜上皮の厚さ情報を強調して見せるものであるが、白色像による診断と同様に、形態の変化が小さいと診断は非常に困難になる。

そのような状況下で、自家蛍光寿命を用いた大腸腫瘍検出の提案がなされた[2]。この方法は、腫瘍部と非腫瘍部の自家蛍光寿命の違いにより診断するものであるが、報告は組織構造を考慮していないポイント測定による検討[2]であった。また他の報告においても、凍結組織切片による検討[3]であったり、大腸のような円柱上皮細胞を持たない臓器（脳、皮膚、乳房）を用いた検討[4-6]であったり、組織ではなく細胞を用いた検討[7,8]であったり、実際の大腸腫瘍検出の臨床応用からはかけ離れたものであった。さらに、このような腫瘍と非腫瘍部の自家蛍光寿命に関する報告は、臓器、測定条件、解析法等の違いもあり、普遍的な結果は得られていない。また、どのような測定をすれば、腫瘍部と非腫瘍部が自家蛍光寿命により区別できるのか明確になっていないのが現状である。

- [1] 「特殊光による内視鏡アトラス」、日本メディカルセンター、東京：2006.
- [2] *Gastrointest. Endosc.* 48: 390-394, 1998.
- [3] *J. Biomed. Opt.* 10: 051403, 2005.
- [4] *PNAS* 104: 19494-19499, 2007.
- [5] *Neurosurgery* 58: 759-767, 2006.
- [6] *J. Pathol.* 199: 309-317, 2003.
- [7] *Cancer Res.* 65: 8766-8773, 2005.
- [8] *J. Photochem. Photobiol. B* 31: 101-112, 1995.

2. 研究の目的

上皮細胞内分子の微小環境に依存する蛍光寿命により大腸腫瘍検出が可能ではないかという仮説を、蛍光寿命イメージングシステムを構築し、検証をすることにある。様々な励起波長、検出波長、寿命解析を用いることにより、間質ではなく上皮細胞のみの情報を選択的に抽出でき、細胞、分子レベルでの腫瘍検出が可能となる。

3. 研究の方法

- (1) **EMR**（内視鏡的粘膜切除術）により生体外へ取り出したヒト大腸組織を用い、組織表面から蛍光寿命イメージングを行った。生体外に取り出すことによる組織変化を最小限に抑えるために、**EMR** 後、すぐさま 4℃ に冷却し、*in vivo* に近い状態で測定を行った。測定後に大腸腫瘍の **HE** 染色切片を作成し、病理診断を行った。

図 1 に今回の測定に用いた蛍光寿命イメージングシステムを示す。波長可

変フェムト秒パルスレーザーからの基本波を 2 倍波に波長変換し、励起光として用いた。励起光は共焦点レーザー走査顕微鏡に導光され、大腸組織から発生する蛍光光子をアバランシェフォトダイオードでフォトンカウンティングする。スタート信号に対する蛍光光子が観測されるまでの時間を計測し、横軸に各光子の検出時間、縦軸に観測された光子数としてヒストグラム（蛍光減衰波形）を作成する。アバランシェフォトダイオードの前の光学フィルターを変えることにより、蛍光波長を選択することが出来る。今回特に、生体内自家蛍光物質として知られている **NADH**（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド）と **FAD**（フラビンアデニンジヌクレオチド）に合わせて励起波長、蛍光波長を調整し、蛍光寿命測定を行った。

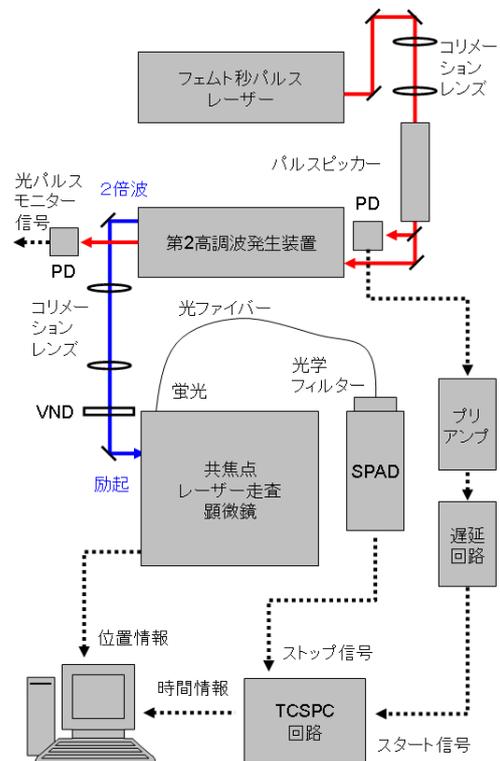


図 1 蛍光寿命イメージングシステム。PD: フォトダイオード、VND: 可変 ND フィルター、SPAD: 単一光子アバランシェダイオード、TCSPC 回路: 時間相関単一光子計数回路。

- (2) **NADH** と **FAD** 分子を狙って蛍光寿命イメージングを行ったが、実際の生体においては様々な自家蛍光物質が関与している可能性がある。ヒト大腸組織における自家蛍光の起因を明確にす

るために、ラットの大腸組織を用いて、組織細胞化学的考察を行った。ラット大腸組織の核染色を行い、共焦点レーザー走査顕微鏡によって3次的に自家蛍光と核の位置関係を明らかにした。大腸表面を傷つけないように慎重に切り開き、粘液の影響を少なくするために、酢酸水溶液を用いて粘液を取り除いた。核染色はDraq5 (Cell Signaling Technology)を用いた。

4. 研究成果

(1) 通常の蛍光寿命イメージングでは、各ピクセルで得られた蛍光減衰波形に対して蛍光寿命を計算するために、装置応答関数を用いたデコンボリューションを行う必要がある。正確な蛍光寿命を測定するためには、多くの光子数を必要とするが、測定が長時間になり、診断に用いるための実用性に乏しいという問題点が存在した。しかしながら、今回使用したアバランシェフォトダイオードの装置応答は、特にFADの波長帯域で非常に速いため、近似的に励起パルスの試料への入射時間(蛍光の立ち上がり)と光子(蛍光)発生時間の平均時間差を蛍光寿命とする方法を提案した(理論的には装置応答関数が瞬時の場合の蛍光寿命と一致する)。この擬似的な蛍光寿命を用いて、腫瘍部と正常部の比較を行った。この方法は、装置応答関数もデコンボリューションも必要としないため簡便で高速である。擬似蛍光寿命を用いた結果、光子数が少なくても、デコンボリューションによる方法に比べて得られる蛍光寿命が安定しており、蛍光寿命を用いた診断に有用であることがわかった。

(2) NADH と FAD の吸収蛍光に対応する波長帯域(NADHは励起380 nm、蛍光 460 ± 20 nm、FADは励起440 nm、蛍光 520 ± 40 nm)を用いて擬似蛍光寿命イメージングを行った。蛍光強度に関しては、NADH と FAD の波長帯域を用いた場合、蛍光強度分布に違いが存在することがわかった(図2)。蛍光寿命に関しては、NADHの波長帯域を用いた場合、腫瘍部と正常部における蛍光寿命に顕著な違いは見られなかった。一方、FADの波長帯域を使用した場合、ヒト大腸腫瘍部と正常部の蛍光寿命に違いが現れた(図3)。その結果から得られる蛍光寿命をピクセルごとに計算し、蛍光寿命に対してヒストグラムを作成すると、図4のようにな

った。このように、腫瘍部と正常部で蛍光寿命に違いが存在し、腫瘍部と正常部を判別できることが明らかとなった。

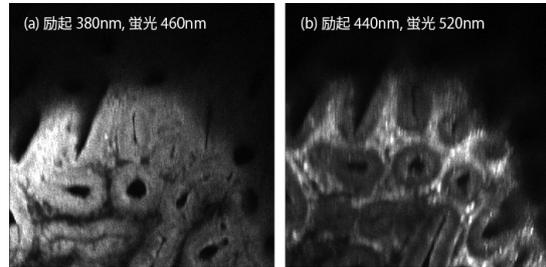


図2 大腸腫瘍部における(a)励起380 nm、蛍光460 nm、(b)励起440 nm、蛍光520 nmの波長帯域を用いた蛍光イメージング。

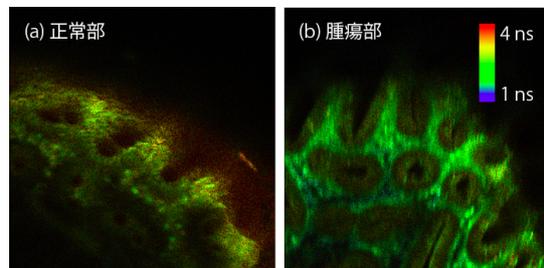


図3 (a)大腸正常部と(b)腫瘍部における擬似蛍光寿命イメージング(励起440 nm、蛍光520 nm)。

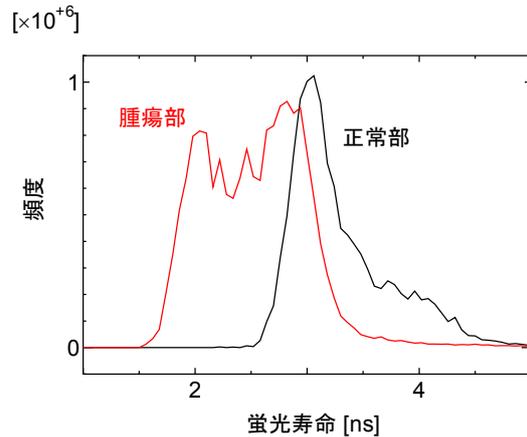


図4 大腸正常部(黒)と腫瘍部(赤)における擬似蛍光寿命の違い。

(3) 自家蛍光の起源を明らかにするために、ラット大腸組織において自家蛍光と核の位置関係を測定した。図5は励起440 nm、蛍光520 nmで計測を行った自家蛍光(緑)と核(赤)の深さ方向依存性(10 μ m ステップ)を示して

いる。この図を見てわかるように、核よりも表層に近い部分において自家蛍光が点状に強く観察されることがわかった。大腸の粘膜上皮は細胞一層で構成されており、核は粘膜固有層側にあるため、自家蛍光として光っているものは細胞内にある物質であることが明らかとなった。

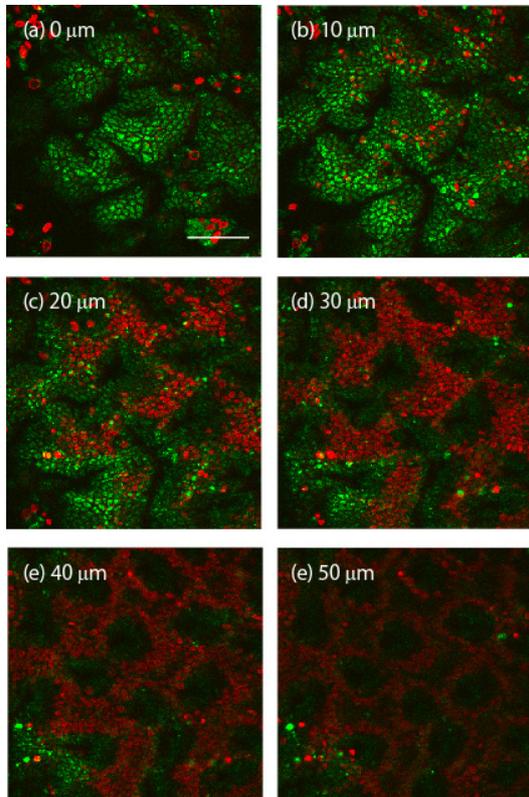


図5 ラット大腸組織における自家蛍光(緑)と核(赤)の組織深さ依存性。スケールバーは50 μm。

- (4) (1)~(3)の成果は、励起440 nm、蛍光520 nmを用いた擬似蛍光寿命イメージングによってヒト大腸腫瘍を検出できることを示唆する。大腸正常部と腫瘍部の蛍光寿命の違いは粘膜上皮細胞内物質に起因し、微小環境を指標とした診断が可能である。

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3件)

- ① Nakano K, Harada Y, Yamaoka Y, Miyawaki K, Imaizumi K, Takaoka H, Nakaoka M, Wakabayashi N, Yoshikawa T, Takamatsu T, Precise analysis of the autofluorescence characteristics of rat colon under UVA

and violet light excitation, Current Pharmaceutical Biotechnology, 査読有, 2011, in press.

- ② Yamaoka Y, Nambu M, Takamatsu T, Fine depth resolution of two-photon absorption-induced photoacoustic microscopy using low-frequency bandpass filtering, Optics express, 査読有, 2011, in press.
- ③ Yamaoka Y, Nambu M, Takamatsu T, Frequency-selective multiphoton-excitation-induced photoacoustic microscopy (MEPAM) to visualize the cross sections of dense objects, Proceedings of SPIE, 査読無、vol. 7564, 2010, 75642O-1-9.

[学会発表] (計5件)

- ① 原田義規, 宮脇喜一郎, 今泉克一, 中野圭明, 山岡禎久, 高松哲郎, Autofluorescence imaging to detect azoxymethane-induced colon tumors in rats, 第49回日本生体医工学会大会, 2010年4月27日, 大阪国際交流センター(大阪)。
- ② 山岡禎久, 南部美佳, 高松哲郎, Ultrasound frequency filtering in multiphoton excitation-induced photoacoustic microscopy, 第49回日本生体医工学会大会, 2010年4月27日, 大阪国際交流センター(大阪)。
- ③ 山岡禎久, 南部美佳, 高松哲郎, 光学分解能を有する多光子励起光音響イメージングシステムの開発, 第51回日本組織細胞化学会総会, 2010年9月4日, 秋葉原コンベンションホール(東京)。
- ④ Yamaoka Y, Nambu M, Takamatsu T, Multiphoton excitation-induced photoacoustic microscopy in living tissues, Second Japanese-French Workshop together with First American-French meeting on Nanobiophotonics, 2009年10月26-29日, Marseille, France.
- ⑤ Yamaoka Y, Nambu M, Takamatsu T, Frequency-selective multiphoton-excitation-induced photoacoustic microscopy (MEPAM) to visualize the cross sections of dense objects, SPIE Photonics West 2010, 2010年1月23-28日, San Francisco, USA.

[図書] (計1件)

- ① Harada Y, Wakabayashi N, Imaizumi K, Miyawaki K, Nakano K, Yamaoka Y, Yanagisawa A, Yoshikawa T,

Takamatsu T, InTech - Open Access
Publisher, Chapter “Highly
fluorescent macrophages in colonic
mucosa under autofluorescence
imaging endoscopy: brief case report”
in Endoscopy edited by Prof. Oliviu
Pascu, 2011, 5.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：光音響断層撮影装置

発明者：山岡禎久、高松哲郎

権利者：山岡禎久、高松哲郎

種類：特許

番号：特願 2009-196237

出願年月日：2009 年 8 月 27 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山岡 禎久 (YAMAOKA YOSHIHISA)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：80405274