

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19917

研究課題名（和文）眼炎症疾患診断を可能とする in vivo シングルセルイメージング技術の開発

研究課題名（英文）Development of in vivo single cell imaging technology for diagnosis of ocular inflammatory diseases

研究代表者

中村 大輔（Nakamura, Daisuke）

九州大学・システム情報科学研究所・准教授

研究者番号：40444864

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000 円

研究成果の概要（和文）：眼炎症疾患の新たな診断情報を与える革新的な非侵襲眼内診断技術を開発するために、眼内の炎症細胞や腫瘍細胞がもつ固有の微弱な自発蛍光をリアルタイムかつシングルセルレベルに識別可能なイメージングの技術基盤を築くことを目指した。結果、正常細胞に比べて腫瘍細胞が特徴的な自発蛍光を示すことを明らかにし、特定条件の励起レーザー光を用いることで自発蛍光を非侵襲かつ高効率に取得できる手法を見出した。眼科検査において最も多用される眼科機器である細隙灯顕微鏡に超高感度分光イメージングと自発蛍光高効率検出技術を組み合わせた手法を提案するとともに、眼炎症性疾患の診断補助となる非侵襲眼科検査機器開発の可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の細隙灯顕微鏡では眼内浮遊細胞観察が可能だが形態的特徴しか得られない。これに対し、本技術は特殊レーザー光を用いて細胞固有の微弱な自発蛍光を計測することで眼内の腫瘍細胞や炎症細胞の識別を可能とする。非侵襲かつ迅速診断が可能となり、患者に優しく安全な手法となる可能性がある。これにより専門医でも診断が困難で時間を要する眼内悪性リンパ腫の早期スクリーニングや眼炎症性疾患診断の補助となる識別機器の実用化が期待できる。さらに、硝子体生検に伴う医療従事者と患者の負荷低減、患者の合併症リスクといった問題点解決にも大きく貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To develop an innovative noninvasive intraocular diagnostic technique that provides new diagnostic information for ocular inflammatory diseases, we aimed to establish a technological basis for imaging that can identify the intrinsic autofluorescence of inflammatory and tumor cells in the eye in real time and at the single cell level. As a result, we found that tumor cells exhibit characteristic autofluorescence compared to normal cells and developed a method to acquire autofluorescence noninvasively and efficiently by using excitation laser light under specific conditions. We proposed a method that combines ultra-sensitive spectroscopic imaging and high-efficiency detection of autofluorescence with slit-lamp microscopy, which is the most widely used ophthalmic instrument in ophthalmology, and identified the possibility of developing a noninvasive ophthalmic examination device that can assist in the diagnosis of ocular inflammatory diseases.

研究分野：レーザー工学

キーワード：眼炎症性疾患 自発蛍光 非侵襲診断

1. 研究開始当初の背景

眼炎症性疾患とは何らかの原因で眼内の組織に炎症を起こす疾患である。その多くは、虹彩、毛様体、脈絡膜からなるぶどう膜に生じ、ぶどう膜炎と呼ばれる。世界におけるぶどう膜炎の年間新規発症患者数は10万人あたり17~52人といわれており、炎症を引き起こす原因が多様(自己免疫疾患、感染症、悪性腫瘍、その他)であるため確定診断が困難であり、現在の医療でも分類不能が1/3程度存在する。中でも、高齢化に伴い悪性疾患の頻度が増加しており、70歳以上の初診患者においてはサルコイドーシスに次いで疾患頻度2位となっている。眼内悪性腫瘍とはいわゆる眼内に発生するガンであるが、29ヵ月以内に65-80%が脳病変を発症し、呼吸や循環停止、意識障害など致命的な状態に陥ることから、5年生存率61.1%の生命に関わる疾患である。したがって、悪性疾患においては特に早急な診断と適切な治療が求められるが、初診では他の原因による症状と非常に類似しており、診断に時間を要するケースが多い。よって、適切な治療を早く進めるために眼内悪性腫瘍の迅速かつ非侵襲的な鑑別診断方法の確立が求められている。生体内の細胞の動きや機能をリアルタイムかつ高解像に観察する手法に関して、intravital microscopyの研究分野が進展している。その観察原理は細胞の物性や分子配列に対する固有の光応答に基づいており、具体的には近赤外短パルスレーザーを用いた多光子励起蛍光、ラマン散乱、高調波(Second harmonic generation: SHG, Third harmonic generation: THG)発生などが挙げられる。一方、眼においては角膜、水晶体、硝子体など可視光帯において透明な組織から構成されているため他の部位に比べて光計測との相性が良い。実際、眼内悪性リンパ腫の自発蛍光やラマン散乱による細胞識別の報告がある。本研究では、眼内に浮遊する個々の細胞が固有の自発蛍光を示すことに注目し、非侵襲的な眼内浮遊細胞識別技術の確立を目指すこととした。

2. 研究の目的

本研究では、眼科医でも原因特定が困難な眼炎症疾患の新たな診断情報を与える革新的な非侵襲眼内診断技術の開発を目指し、眼内の炎症細胞や腫瘍細胞がもつ固有の微弱な自発蛍光をリアルタイムかつシングルセルレベルに識別可能なイメージングの技術基盤を築くことを目的とした。具体的には(1)フローサイトメトリーを利用した採取組織細胞の蛍光データベース構築、(2)ヒト眼内の炎症細胞や腫瘍細胞をリアルタイムかつシングルセルレベルで識別する超高感度in vivo非侵襲イメージングシステムの開発と検証の事項を実施した。以上を通じて、大きな侵襲と多くの時間を要する眼内診断の現状を打破するための、その場診断可能な眼検査機器の開発に挑戦した。

3. 研究の方法

悪性リンパ腫(B細胞リンパ腫)セルライン(721.221, OCI-Ly10, CA46)、および正常細胞として末梢血単核球(Peripheral Blood Mononuclear Cells: PBMC)を準備し、リン酸緩衝生理食塩水(Phosphate-buffered saline: PBS)に入れて細胞浮遊液を準備し、蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーにて自発蛍光を計測した。また、ガラス製キュベット内の浮遊細胞の自発蛍光をスペクトロメーターにて計測する光学系を構築し、悪性リンパ腫と正常細胞の蛍光スペクトルを計測した。次に、細隙灯顕微鏡に高感度カメラを搭載した自発蛍光イメージングシステムを構築し、浮遊細胞の自発蛍光計測を試みた。

4. 研究成果

蛍光顕微鏡を用いた自発蛍光計測の実験結果を図1に示す。このとき、励起光は470/40 nm(中心波長470 nm, バンド幅40 nm, 以降同様の表記)、受光フィルターは525/50 nmであった。実験に用いた悪性リンパ腫細胞において、正常細胞に比べて個々の細胞から強い自発蛍光を確認した。

次に、フローサイトメーターを用いて悪性リンパ腫細胞(OCI-Ly10, CA46)およびPBMC(刺激なし、刺激後)の自発蛍光を計

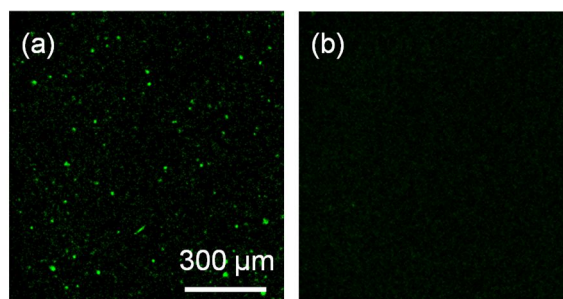


図1 (a)B細胞リンパ腫セルラインと(b)PBMCの蛍光顕微鏡像。

測した。まず、各細胞を 2%牛血清入り PBS に入れて細胞濃度 $1.67 \times 10^6 \text{ cm}^{-3}$ の細胞浮遊液を準備した。その後、装置に設置し、異なる 3 波長 (488, 561, 633 nm) のレーザー光にて励起した際の複数波長の受光フィルターを介して得られた各細胞の自発蛍光を計測し、PBMC (刺激なし) の蛍光強度を基準として相対強度を比較した。その結果、いずれの励起波長においても腫瘍細胞から正常細胞よりも 5~8 倍の高い自発蛍光が得られることを確認した。また、B 細胞リンパ腫の種類によっても自発蛍光強度が異なることがわかった。したがって、蛍光顕微鏡の結果と合わせて自発蛍光強度にしきい値を設けることで眼内リンパ腫細胞と正常細胞を識別できる可能性が示された。

次に、眼内に浮遊する細胞を *in vivo* 計測することを想定した実験を試みた。細胞サンプルは前述と同じ悪性リンパ腫セルライン 2 種 (OCI-Ly10, CA46) と PBMC を入手し、0.5%牛血清入り PBS に入れ細胞浮遊液を準備した。1 cm^2 石英キュベットに入れた細胞浮遊液 ($1 \times 10^5 \text{ cm}^{-3}$) に対してレーザー光を照射し、細胞からの自発蛍光をレンズで集光してスペクトロメーターにて計測した。細胞からの自発蛍光を計測する前に、細胞を含まない PBS (牛血清濃度 0, 0.5, 1.0, 2.0%) を計測し、PBS の自発蛍光および水のラマンスペクトルを分離した。OCI-Ly10, CA46, PBMC の自発蛍光スペクトルにおいて、いずれも 540 nm 付近にピークをもつ 500~900 nm 帯のブロードな蛍光を確認した。また、OCI-Ly10 については正常細胞に比べ、高い蛍光強度を示すことが確認された。一方、CA46 については 700 nm 帯において正常細胞よりも高い輝度値であった。以上のことから自発蛍光によって細胞識別の可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横山空羅, 東畠三洋, 八幡信代, 園田康平, 中村大輔
2. 発表標題 レーザー励起眼内悪性リンパ腫細胞からの自発蛍光計測
3. 学会等名 電気・情報関係学会九州支部連合大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村大輔
2. 発表標題 眼内悪性リンパ腫の早期確定診断を目的とした眼内浮遊細胞の非侵襲的体外識別機器の開発
3. 学会等名 第10回TR推進合同フォーラム・ライフサイエンス技術交流会
4. 発表年 2023年

〔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
研究分担者	園田 康平 (Sonoda Kohei) (10294943)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	八幡 信代 (Yawata Nobuyo) (90315812)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	

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
---------	---------