

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25280103

研究課題名(和文) 乳がんセンチネルナビゲーション手術支援のための術中迅速画像診断技術の開発

研究課題名(英文) Development of intraoperative rapid diagnostic imaging technology for support of breast cancer sentinel navigation surgery

研究代表者

野坂 大喜 (Nozaka, Hiroyuki)

弘前大学・保健学研究科・講師

研究者番号：80302040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,000,000円

研究成果の概要(和文)：肉眼的発見が困難な微少転移乳がん症例を対象とした新たな術中迅速画像診断技術を確立するため、高精度検出技術と医用画像処理技術を研究し、術中迅速病理診断用イメージスキャンニング技術の開発を行った。研究の結果、蛍光イメージング以上の高感度測定技術として新たに化学発光による免疫組織化学染色技術と同染色標本の測光に対応したイメージスキャンニング技術を確立した。また臨床評価において同システムは微小がんの検出において極めて有用性が高いことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Breast cancer has a high mortality rate in Japan. It is difficult to detect micro metastasis of breast cancer to lymph node, therefore intraoperative rapid diagnostic imaging technology is required for extraction of reliable cancer tissue. In this research, we studied high sensitivity breast cancer detection technology and medical image processing technology, and developed image scanning technology for intraoperative rapid pathology diagnosis. As a result of research, we developed new immunohistochemical staining technology with chemiluminescence and image scanning technology for chemiluminescence detection in pathology. We evaluated sensitivity and accuracy of our system in clinical trials, and it was more sensitive than fluorescence observation. Our technology is useful for detection of microinvasive breast cancer, and it was suggested this technology can be applied to the detection of micro metastatic cancer.

研究分野：医療情報学

キーワード：乳がん 化学発光 迅速病理診断 センチネルリンパ節 免疫組織化学 バーチャルスライド

1. 研究開始当初の背景

我が国においては、がん死亡者の増加に対応すべく「がん対策基本法」が成立し、同法律に基づく「がん診療連携拠点病院」が各中核地域に設置され、がん診療・診断技術向上を目的とした、拠点病院間での医療連携システムや、高精度ながん診断支援システムの研究開発が重点的に求められている状況にある。

がん診断研究においては、早期診断のための各種腫瘍マーカーの開発や遠隔診断支援システムの開発は行われてきたものの、外科執刀医が術中に外科的切除範囲を決定するための迅速診断技術や、がん細胞の微少浸潤・微少転移の有無を発見する術中迅速検査技術など緊急性の高い迅速検査技術が臨床実用化に至った例は少ない。厚生労働省の調査では、治療効果や5年生存率において「がん診療連携拠点病院」間で大きな格差があることがデータで示されており、外科的がん治療においては術中迅速検査の選択肢が少ないために医師の経験に依存することも一因であると考えられ、外科手術時の切除範囲決定に有用な情報を提供する迅速検査システムの開発は、再発患者を減少させ、さらに患者QOLの向上を図る上で喫緊の課題となっている。

病理組織学的術中迅速診断は、乳がんセンチネルナビゲーション手術(SNNS)の実施範囲が明確に決定されるだけでなく、予後推定や術後補助療法である内分泌療法・化学療法・分子標的治療等の治療方針にも影響を与え、適切なSNNSの実施は病理学的完全奏効(pCR)率向上の大きな要因であることも関連学会において報告されている。一方で、近年の臨床的研究により病理組織学的な術中迅速診断では肉眼的に検出出来ない微少転移がんの存在が問題となっている。術後の通常病理組織診断において免疫組織学的手法での検査を行った結果、偽陰性率は5~10%に達していることが明らかとされている。そのため再発防止のために微少転移乳がんを術中に迅速かつ高感度に検出可能な検査技術開発が求められているが、摘出検体からのサンプリング方法など技術的検討が未確立であること、また検査に要する時間的・コスト的制約により、臨床現場で日常検査として利用可能な検査技術としては普及に至っていない状況にあり、5年生存率の向上を図る上で高精度な術中迅速病理細胞診断イメージング技術の開発が重要課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では肉眼的発見が困難な微少転移乳がん症例を対象として、有機液晶波長可変フィルター技術の臨床応用による高精度蛍光測光検出技術と解析用画像処理技術を研究し、迅速病理診断用イメージングシステムを開発する。また、細胞診断学的検査技術として形態認識画像処理技術とバイ

オマーカー検出とのハイブリッド化により高精度・高感度な転移乳がん細胞の検出技術を開発する。

両技術を融合させることにより、高感度・高精度な『乳がんセンチネルナビゲーション手術支援のための術中迅速病理画像診断技術』を確立するのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1)有機液晶波長可変フィルター技術を用いた病理組織診断用蛍光マルチカラーイメージング技術と画像診断用医用画像処理技術の研究

従来型蛍光顕微鏡では多波長での蛍光観察において同時多波長測定に制限があることから、本研究テーマでは、有機液晶波長可変フィルターを用い、高感度かつS/N比の高い多波長医用蛍光画像の撮像技術を研究するとともに、バーチャルスライド化技術(スライド全体を高倍率で撮影したデジタル標本)と蛍光画像検出技術を加えた高速マルチカラー蛍光イメージングシステムを開発した。

(2)病理組織診断用化学発光イメージング技術と画像診断用医用画像処理技術の研究

蛍光観察技術は病理組織標本上の微量のタンパク質検出に有用であることから、共焦点レーザー顕微鏡による細胞の微細構造観察が診断等に利用されている。しかし本研究が目的とするリンパ節への乳がん細胞の転移においては、乳がん細胞のリンパ節内での位置情報に加え、1~10個レベルの早期微少浸潤を極めて高感度に検出することが望まれる。そこで本研究テーマでは、より高感度な検出技術として蛍光以上の感度が得られる検出系として化学発光技術を病理組織診断技術へ応用化を図るとともに、前述の病理組織診断用蛍光マルチカラーイメージング技術を応用化させ、化学発光イメージング技術を研究し、病理診断用化学発光イメージングシステムを開発した。

(3)蛍光マルチカラーイメージング技術と化学発光イメージング技術を用いた転移乳がん細胞高感度検出技術の研究

蛍光マルチカラーイメージング技術と化学発光イメージング技術を用いた転移乳がん細胞高感度検出技術の有用性評価を行うため、①培養細胞を対象とした蛍光染色および化学発光染色によるがん細胞検出評価、②病理組織標本を対象とした蛍光染色および化学発光染色によるがん細胞検出評価を実施した。

①培養細胞による評価

非上皮系細胞と乳がん細胞を10%FBS加RPMI1640細胞培養液にて培養を行い、得られた細胞はサイトスピナーを用いてスライドガラスに塗布した。エタノール系固定液を用いて細胞を固定し、サイトケラチンカクテル

抗体(CK1-8、CK10、CK 14-16、CK 18/19)を用いた免疫組織化学染色を行い、Qdot (Invitrogen 社)を用いた蛍光染色とアルカリフォスファターゼ標識抗体を検出するCDP-STARによる化学発光染色を行った。

②病理組織標本による評価

病理組織標本は外科的に切除された乳腺腫瘍 20 例であり、同患者の原発部位とリンパ節郭清の両組織を分析対象とした。10%緩衝ホルマリン固定後、パラフィン包埋し、薄切切片(4 μm)を作製後に HE 染色を行った。一般的な検出方法と比較するため、サイトケラチンカクテル抗体(CK1-8、CK10、CK 14-16、CK 18/19)と DAB を用いた免疫組織化学染色を行った。またカウンター染色としてヘマトキシリンによる核染色を行った。蛍光マルチカラーイメージング技術での解析にはサイトケラチンカクテル抗体(CK1-8、CK10、CK 14-16、CK 18/19)と Qdot (Invitrogen 社)を用いた蛍光免疫組織化学染色を行った。またカウンター染色として DAPI による核染色を行った。一方、化学発光イメージング技術の解析にはサイトケラチンカクテル抗体(CK1-8、CK10、CK 14-16、CK 18/19)を用い、ペルオキシダーゼ標識抗体を検出する化学発光試薬であるイムノスターとアルカリフォスファターゼ標識抗体を検出するCDP-STAR による化学発光免疫組織化学染色を行った。カウンター染色にはヘマトキシリン染色による核染色を行った。

HE 染色と免疫組織化学染色はバーチャルスライドシステムによる撮影を行った後、画像処理ソフトウェアにて画像解析を行い、転移乳がん細胞を計測した。一方、蛍光免疫組織化学染色と化学発光免疫組織化学染色については、それぞれ蛍光イメージスキャンニングシステムと病理診断用化学発光スキャンニングシステムによる計測を行い、4 法について比較検討を行った。

(4) 転移乳がん細胞高感度検出技術を用いた他臓器がん診断技術への応用化

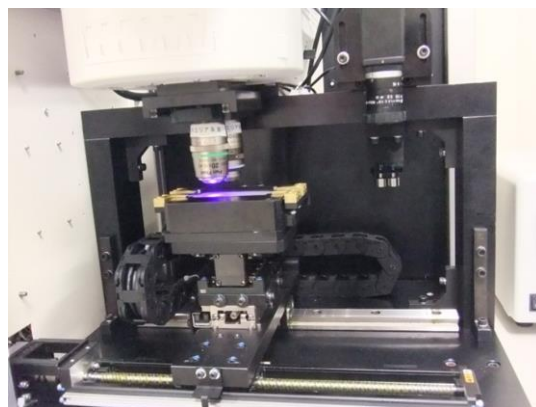
前述の化学発光免疫組織化学染色法と病理診断用化学発光スキャンニングシステムによる計測技術の応用可能性について検討を行うため、消化器系癌組織を用いて化学発光免疫組織化学染色を行い、臨床応用化可能性について検討を行った。

4. 研究成果

(1) 有機液晶波長可変フィルター技術を用いた病理組織診断用蛍光マルチカラーイメージング技術と画像診断用医用画像処理技術の研究

ハードウェアはバーチャルスライドシステム (CLARO 社)をスライド搬送系の基盤として用い、蛍光観察のために以下の光学部品を組み込み、制御ソフトウェアを開発した。以下に本システムの外観図を示す。

- ・蛍光顕微鏡 3 眼鏡筒 DIGITAL IMAGING HEAD
- ・蛍光対応高感度カメラ
 - ①Retiga-2000RV CCD digital camera (Qimaging 社)、
 - ②HV-F22 CCD digital camera (日立国際電気社)
- ・蛍光顕微鏡用光源 X-cite (EXFO 社)
- ・蛍光観察用液晶フィルター
- ・蛍光観察用光学フィルターキューブ



(2) 病理組織診断用化学発光イメージング技術と画像診断用医用画像処理技術の研究

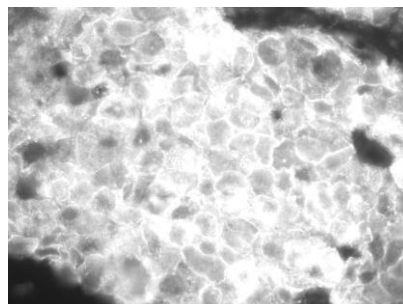
ハードウェアは、バーチャルスライドシステム (CLARO 社)をスライド搬送系の基盤として用い、化学発光計測のために光電子増倍管をシステムに組み込み、制御ソフトウェアを開発した。システム構成は以下の通りである。

- ・マイクロPMTモジュール(浜松ホトニクス社)
- ・マイクロPMTフォトンカウンティングヘッド(浜松ホトニクス社)
- ・フォトンカウンティングユニット(浜松ホトニクス社)
- ・光センサモジュール(浜松ホトニクス社)

(3) 蛍光マルチカラーイメージング技術と化学発光イメージング技術を用いた転移乳がん細胞高感度検出技術の研究

①培養細胞による評価

蛍光免疫組織化学染色標本について、液晶フィルターユニットを用いた蛍光イメージングにおいては十分な蛍光強度が得られた。また陰性コントロールとなる非上皮系培養細胞と蛍光染色画像を比較した場合、撮像画像はS/N比が高く低ノイズであり、良好な感度で乳がん細胞を検出可能であるとの結果を得た。



化学発光免疫組織化学イメージングにおいては乳がん細胞量に比例してフォトンの検出量が増加する傾向が認められ、本技術においても非上皮系培養細胞と蛍光染色画像を比較した場合、S/N 比が高く低ノイズであり、良好な感度で乳がん細胞を検出可能であるとの結果を得た。

②病理組織標本による評価

HE標本およびDABを用いた免疫組織化学標本において検出可能であった転移性乳がんにおいてはその全てにおいて蛍光免疫組織化学イメージングによる検出が可能であった。また同様に化学発光免疫組織化学イメージングによる検出も可能であった。

一方、HE標本およびDABを用いた免疫組織化学標本において検出されなかった標本であり、かつ遺伝子学的に転移の可能性ありと判定された症例においては、蛍光免疫組織化学イメージングによる検出感度を化学発光免疫組織化学イメージングが上回り、化学発光免疫組織化学イメージングが高感度に微小浸潤転移乳がんの発見に有用であることが示唆された。一方、S/N比については、遺伝子学的にサイトケラチンの検出がなされなかった標本において化学発光ではバックグラウンドノイズが認められたことから、化学発光技術についてはバックグラウンドノイズの低減について染色技術としての検討が必要であると考えられた。

(4) 転移乳がん細胞高感度検出技術を用いた他臓器がん診断技術への応用化

化学発光免疫組織化学染色法と病理診断用化学発光スキャンニングシステムによる計測技術の応用可能性について検討を行うため、大腸癌 20 症例について化学発光免疫組織化学染色を行い、臨床応用化可能性について検討を行った。免疫組織化学染色には抗体として EGFR、HER2、HER3、HER4 抗体を使用し、ペルオキシダーゼ標識抗体を検出する化学発光試薬であるイムノスターとアルカリフォスファターゼ標識抗体を検出する CDP-STAR による化学発光免疫組織化学染色を行った。カウンター染色にはヘモトキシリン染色による核染色を行った。

その結果、前述の乳がんでの検討と同様に、化学発光免疫組織化学イメージングが高感度に陽性細胞を検出でき、かつ化学発光量は陽性細胞数と相関性があることが判明し、他臓器腫瘍の検出系としても応用化可能性があることが明らかとなった。

以上のことから、化学発光免疫組織化学イメージング技術は転移乳がん細胞の検出において、従来法に比較して高感度に検出可能であり、その有用性も高いことから、今後臨床応用化に向けて実用化研究を進めることで、新たな術中迅速診断技術として期待できるものと考えられる。

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 1 件)

- ① Hiroyuki Nozaka, Tomisato Miura, Zhongxi Zheng, Multi-layer virtual slide scanning system with multi-focus image fusion for cytopathology and image diagnosis, IEICE TRANSACTIONS on Information and Systems, E96-D (4): p856-863, 2013 年、査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① Hiroyuki Nozaka, Development of variable wavelength band-pass filter with liquid crystal for microscope - Application to virtual slide imaging system in histopathology -, MEDLAB ASIA PACIFIC, 2017 年 4 月 1 日、Singapore
- ② Hiroyuki Nozaka, Miku Togashi, Sayaka Kurosawa, Ai Igarashi, Yayoi Takahashi, Makoto Eiduka, Noriyuki Uesugi, Kazuyuki Ishida, Tamotsu Sugai, Co-expression of HER family relates to progression and lymph node metastases in human colorectal cancer, 2017 United States & Canadian Academy of Pathology Annual Meeting, 2017 年 3 月 8 日、San Antonio (USA)
- ③ Hiroyuki Nozaka, Miku Togashi, Sayaka Kurosawa, Ai Igarashi, Noriyuki Yamada, Yayoi Takahashi, Kazuyuki Ishida, Tamotsu Sugai, Clinico-pathological analysis of HER family expression in human colorectal cancer. - Co-expression of HER family is clinico-pathological biomarker which relates to progression in human colorectal cancer -, The 32nd World Congress of Biomedical Laboratory Science (IFBLS2016), 2016 年 9 月 1 日、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
- ④ Hiroyuki Nozaka, Tomisato Miura, Zhongxi Zheng, Development of new fluorescence virtual slide system equipped with the liquid crystal filter unit, 2016 United States & Canadian Academy of Pathology Annual Meeting, 2016 年 3 月 9 日、Seattle (USA)
- ⑤ 野坂 大喜、三浦 富智、石田 和之、上杉 憲幸、菅井 有、液晶波長可変フィルタによる蛍光顕微鏡システムの開発と評価、第 105 回日本病理学会総会日本病理学会総会、2015 年 5 月 4 日、仙台国際センター (宮城県仙台市)
- ⑥ Hiroyuki Nozaka, Tomisato Miura, Zhongxi Zheng, Development of fluorescence microscope system with variable

wavelength band-pass filter、Digital
Pathology Congress 2015: Asia、2015年
9月21日、Kuala Lumpur (Malaysia)

〔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〕

<http://www.mt.hirosaki-u.ac.jp/hp1/kaken.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野坂 大喜 (NOZAKA、Hiroyuki)
弘前大学・大学院保健学研究科・講師
研究者番号：80302040

(2) 連携研究者

菅井 有 (SUGAI、Tamotsu)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：20187628