

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670605

研究課題名(和文)迅速免疫組織染色装置を用いた肺腫瘍の術中自動病理診断法の開発

研究課題名(英文) Intraoperative computer-aided pathological diagnosis of lung cancer using the device for ultrarapid immunohistochemical staining method developed in our institute.

研究代表者

南谷 佳弘 (Minamiya, Yoshihiro)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30239321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：外科治療には術中迅速病理診断が必須である。しかし本邦の病理専門医不足深刻である。本研究の最終目標は病理専門医不要の自動迅速病理診断の確立である。我々は20分以内に免疫組織染色を終える装置を開発した。この装置を用いて術中に免疫組織染色を行い、術中迅速診断の自動化を検討している。自動化のためには免疫組織染色を客観的に評価する指標が必要である。陽性コントロールには2種類ある。一つは形態コントロールで、もう一つは濃度コントロールである。濃度コントロールは高分子マイクロハイドロゲルに目的タンパク質を含有させて、その含有量を変えることにより作成できた。形態コントロールは培養細胞を用いて作成するができた。

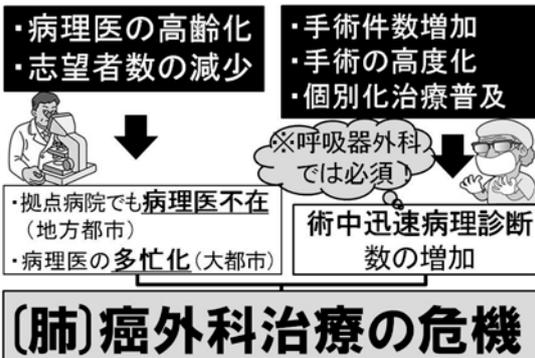
研究成果の概要(英文)：Intraoperative pathological diagnosis is required for the surgical treatment of cancer patients. However, a shortage of pathologists is serious in Japan. The aim of this study is the establishment of the intraoperative computer-aided pathological diagnosis. We have developed a equipment to complete immunohistochemical staining within 20 minutes. We tried to develop the intraoperative computer-aided pathological diagnosis after staining the sample using this equipment. The index of the objective evaluation is required for the intraoperative computer-aided pathological diagnosis. There are two types of positive control. One is in the morphological control, is another the concentration control. The index of the target protein concentration was made of polymer of the microhydrogel containing the target protein. The morphological index was made of the cultured cells.

研究分野：外科学

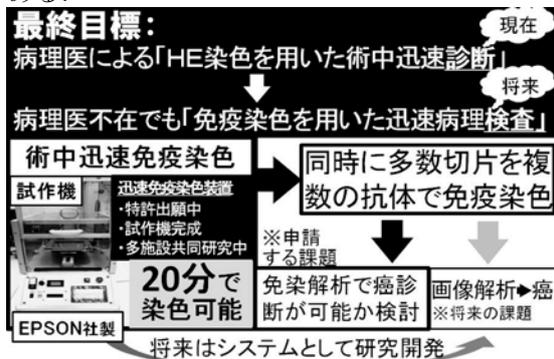
キーワード：術中迅速病理診断 免疫組織染色 自動診断

1. 研究開始当初の背景

最近、肺癌罹患数の増加とともに肺癌手術件数が増加している。画像診断の進歩とともに早期の肺癌が発見される機会が増加して区域切除など進行度に応じた個別化治療が普及してきており、リンパ節転移診断を含めた術中病期診断は重要である。一方、肺癌は気管支鏡によって術前診断がつかない症例が多い。また原発性肺癌か転移性肺腫瘍か診断に苦慮する症例も多い。そのため肺癌外科治療には術中迅速病理診断が必須であり、その件数は増加してきている。本邦の病理専門医は米国の1/4以下で2,118人(日本病理学会HPより)と少ない上に、病理を志す学生の減少や現役病理専門医の高齢化のため、病理専門医不足はさらに深刻化することが懸念されている。地方都市では病理専門医不在のがん拠点病院が問題になっており、都市部の中核病院でも病理専門医の多忙化は深刻である。以上より術中迅速病理診断を多用する肺癌外科治療は危機的状況にあると言わざるを得ない。



現在まで我々は免疫組織染色を20分で行う迅速免疫染色装置を開発して特許出願し、試作機を完成させた。現在、全国7大学の病理部と多施設共同研究で装置の性能評価を行っている。本研究の最終目標は病理専門医不在でも結果が出る「迅速病理検査」の確立である。



2. 研究の目的

今回申請した研究期間で「我々の開発した迅速免疫染色装置を用いて術中に多数切片を複数抗体で免疫染色し、結果を解析して肺癌

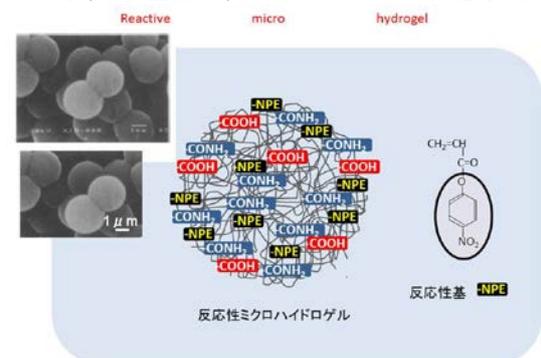
の診断が出来るか、HE染色を用いた病理専門医による「術中迅速病理診断」と同等の結果が得られるか、を検討することを計画した。当初前述のことを計画して研究を進めたが、研究を進めるうちに将来の自動を見据えた場合には免疫組織染色で陽性・陰性であることを客観的に評価するための指標が必要であると判断した。陽性コントロールには2種類ある。一つは染まるべきものが正しく染まっているかを見る形態コントロールで、もう一つは染色濃度を見る濃度コントロールである。濃度コントロールは高分子ゲル・反応性マイクロハイドロゲルにより作成することとした。そして濃度コントロールに関しては下図のようにパソコン画面上でマウスによってポイントした部位のタンパク濃度を測定できるレベルを目標とした。また形態コントロールは培養細胞を用いて作成することにした。



3. 研究の方法

(1) 濃度コントロール

染色強度の定量的指標となり得る陽性コントロールとして今回使用する高分子ゲルは、4種類のモノマー(Acrylamide, Methacrylic acid, Nitrophenyl acrylate, Methylene-bis-Acrylamide)の重合体であり、タンパク質と結合する基をもつマイクロオーダーの親水性網目構造体である。-NPAで示す反応性基に、目的タンパクが結合する。



①高分子ゲルの作成

研究協力者川口春馬氏の指導のもと、高分子ゲルの作成を行なった。



4種類のモノマーをアルコールで溶解し、開始剤を加えて60℃、200rpmで6時間攪拌する。フラスコ内の空気は、窒素に置換する。攪拌が終了したのち、遠心分離し、アルコールを水に置き換えて高分子ゲルが完成する。作成した高分子ゲルに免疫染色を行ない、ゲル粒子の大きさ、染色性の評価を行なった。

(2) 形態コントロール

コントロールを含んだ細胞ブロックの作成
肺癌の培養細胞 H358 を固定液 (50mM Dimethyl suberimidate dihydrochloride) で固定後 6%ゼラチンに浮遊させて固化させた (細胞ブロック)。このゼラチン内にサイトケラチン 19 を含有した反応性マイクロハイドロゲルで作成した陽性コントロールと非含有反応性マイクロハイドロゲルの陰性コントロールを同時浮遊させた。コントロールを含んだ細胞ブロック (以下検体) を以下の手順で免疫染色を行った。検体を O.C.T コンパウンド (Sakura Finetek Japan CO., Ltd., Japan) に包埋して -80℃ の冷アセトンで Histo-Tek Pino (Sakura Finetek Japan) を用いて凍結した。この検体をクリオスタット (CM1900 Leica, Wetzlar, Germany) で 5μm の厚さに薄切片、スライドガラス上に貼り付けた。得られた切片を 2 分間アセトンで固定した。リン酸緩衝液で 3 度洗浄後 (各 5 秒)、抗サイトケラチン抗体カクテル (AE1/AE3; Progen Biotechnik GmbH, Heiderberg) 1:200 倍濃度 (5μg/ml) を添加して 1 時間反応させた。その後、リン酸緩衝液で 3 度洗浄後、30 分間二次抗体 (EnVision + System/HRP Mouse (DAB+) Dako) と反応させた。そしてリン酸緩衝液で 3 度洗浄して DAB (3,3'-diaminobenzidine substrate) で発色させた。核をヘマトキシリン液で染色して、カバーガラスをかけた後に顕微鏡で観察した。

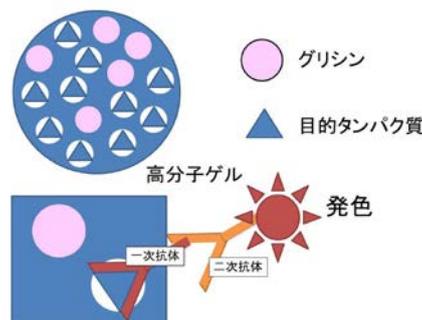
4. 研究成果

(1) 濃度コントロール

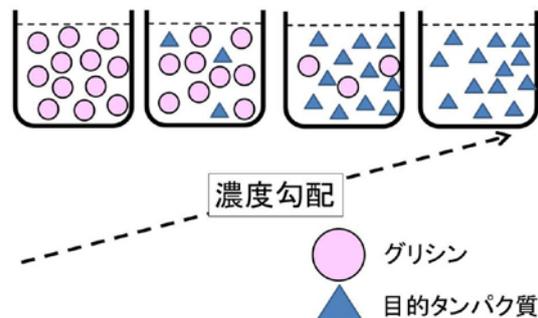
① 高分子ゲルの作成

川口氏の指導のもと予定通り高分子ゲルを作成することができた。しかしエタノールを

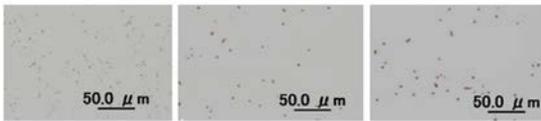
溶媒に用いると粒子径の小さいものが生成された。実際は顕微鏡下で比較するのに適した大きさとなる必要があるため、高分子ゲルの粒子径の拡大が必要であると考えた。そこで、溶媒を、エタノールのみから、エタノールとメタノールを配合したものへと変更することで、粒子の巨大化に成功した。高分子ゲルは、前述の通り、タンパク質と結合する基を有する。そのため高分子ゲルにタンパク質を結合させ、そのタンパク質に特異的な抗体を反応させる免疫染色により、病理組織と同様に DAB 発色 (鏡検像では茶褐色の染まり) する。しかし今回、作成した高分子ゲルが、タンパクと結合していないものでも染色性を示した。そこで、高分子ゲルの非特異的な反応が起こらないように、濃度勾配を作成する際にグリシンなどを用いたブロッキングを行っている。この操作を行わないと、アミノ酸が結合していない空の反応性基に抗体が結合してしまうため、非特異的な false-positive 様反応が起きる。また、ブロッキングする物質によっては、ゲル自体が凝集してしまい、画像解析に適さない形状に変化してしまうため、protein block、BSA などと比較検討した結果、グリシンによるブロッキングが現在のところ最も適していた。



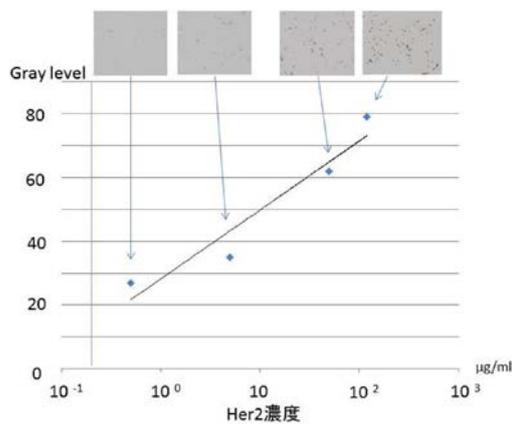
ブロッキングにより非特異的染色を抑制したうえで、高分子ゲルに濃度の異なるタンパク質を結合させることで、染色性に勾配ができるかを CK19 で検討した。



そして下図のようにサイトケラチン濃度に応じた染色強度得ることに成功した。

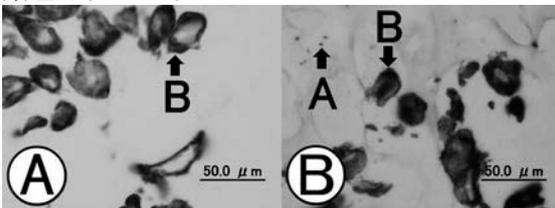


次に定量化を試みるために検量線を作成した（目的タンパク質を Her2 とした例）. 濃度とパソコン上の Gray level でプロットしたところ検量線を下図のように引くことができた. これを用いて組織内の目的タンパク質の濃度をパソコン上で測定可能となった.



(2) 形態コントロール

様々な方法で保存性等を試したが、最終的には研究方法で示す方法で満足が行く結果が得られた. 下図に実験結果を示す. ④は陰性コントロールと肺癌細胞 H358 の組織を抗サイトケラチン抗体カクテル AE1/AE3 で染色したものである. ⑤は陽性コントロールと肺癌細胞 H358 の組織を抗サイトケラチン抗体カクテル AE1/AE3 で染色したものである. ④では肺癌細胞 H358 (B) は染色されているが、陰性コントロールは染色されておらず、写真には写っていない. 一方、⑤では肺癌細胞 H358 (B) と陽性コントロール (A) がともに染色されている.



以上から形態コントロールとして培養細胞を用いることが可能と判断した.

5. 主な発表論文等

特許出願のため、公表は控えている.

- [雑誌論文] (計0件)
- [学会発表] (計0件)
- [図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 細胞内生体分子の検出に用いる標準資料及び細胞内生体分子の検出方法
 発明者: 寺田かおり、南谷佳弘、川口春馬、赤上陽一、中村竜太
 権利者: 国立大学法人秋田大学、川口春馬、秋田県
 種類: 特許
 番号: 特願 2015-019566
 出願年月日: 2015年02月03日
 国内外の別: 国内

名称: 培養細胞を用いた標準資料及びその製造方法
 発明者: 南谷佳弘、赤上陽一、中村竜太
 権利者: 国立大学法人秋田大学、秋田県
 種類: 特許
 番号: 特願 2015-021675
 出願年月日: 2015年02月05日
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南谷 佳弘 (MINAMIYA, Yoshihiro)
 秋田大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号: 30239321

(2) 研究分担者

赤上 陽一 (AKAGAMI, Yoichi)
 秋田県産業技術センター・副所長
 研究者番号: 373217

(2) 研究分担者

南條 博 (NANJO, Hiroshi)
 秋田大学・医学部・准教授
 研究者番号: 70250892

(3) 研究協力者

川口 春馬 (KAWAGUCHI, Haruma)

(4) 研究協力者

寺田 かおり (TERATA, Kaori)

(5) 研究協力者

中村 竜太 (NAKAMURA, Ryuta)