

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26242054

研究課題名（和文）共焦点顕微鏡を用いた脳腫瘍の微細蛍光現象の解明と浸潤領域の判別

研究課題名（英文）Observation of micro fluorescence and discrimination of infiltrating brain tumor region using confocal microscope

研究代表者

米山 猛（Yoneyama, Takeshi）

金沢大学・機械工学系・教授

研究者番号：30175020

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 34,500,000円

研究成果の概要（和文）：蛍光ガイド下脳腫瘍摘出手術において、腫瘍領域においては、共焦点顕微鏡による観察画像から得られる蛍光強度のヒストグラムおよび平均蛍光強度から、正常脳と腫瘍部との判別が可能であることを示した。

一方、判別が難しい浸潤領域においては、共焦点顕微鏡で観察した画像に2値化処理をして、蛍光輝点の大きさや数の分布を作成すると、この分布が境界領域の腫瘍や浸潤領域と正常脳とで大きく異なることが見出された。蛍光輝点の分析により浸潤領域の判別が行なえる可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：In photodynamic diagnosis on brain tumor, the fluorescence intensity distribution and average intensity in the tumor observed by confocal microscope are different from those in the normal region. Tumor region is distinguished by the fluorescence intensity distribution.

On the other hand, in the infiltrating region which is difficult to distinguish by fluorescence intensity, the bright spot size and number are different from those in the normal region. Possibility to distinguish infiltration region by the analysis on bright spot size and number observed by confocal microscope has been found.

研究分野：機械工学

キーワード：脳腫瘍 光線力学診断 共焦点顕微鏡 蛍光

### 1. 研究開始当初の背景

脳は人間としての知的、精神的・高次機能を担う極めて重要な臓器であり他の臓器と異なり外科的手術で摘出できる範囲が限られている。ひとたび重要部位に及んだ腫瘍は外科的に取り除くことができないために難治である。脳原発の腫瘍である悪性神経膠腫は、外科的手術において腫瘍と正常脳の境界の見極めが難しく、広汎に摘出すれば正常脳を損傷し、言語や運動障害等後遺症を来す危険性がある。一方、腫瘍部分を取り残すと、生存率は大幅に低下する。腫瘍摘出手術後の放射線療法や化学療法は残存腫瘍の再発予防に必須であるが、平均生存期間は1年しかないのが現状である。そのため客観的な術中腫瘍診断法の開発が急務である。

5-ALA (5-Aminolevulinic Acid) は赤血球の酸素運搬に関わるヘムの前駆体として生物に内在する化合物である。これを経口内服した場合、悪性脳腫瘍細胞に特異的に取り込まれ代謝される。代謝産物のプロトポルフィリン IX (PP IX) は、波長 405nm の光を照射すると、波長 635nm の赤色蛍光を発することから腫瘍摘出術に応用され、悪性神経膠腫摘出率を格段に向上させた (Stummer W, *Lancet Oncol* 7: 392-401, 2006)。しかし前述のように、腫瘍部と正常部を正確に区別して摘出することは依然として難しい。

筆者らは、蛍光ガイド下腫瘍摘出術において摘出した脳腫瘍およびその周辺部について、共焦点顕微鏡を用いて高倍率で観察を行い、0.1mm 四方領域ごとに顕微鏡観察画面内の蛍光強度分布を分析して、蛍光強度や腫瘍細胞割合を求める評価を行ってきた。

### 2. 研究の目的

本研究は、正常脳との境界の判別が難しい浸潤性脳腫瘍について、術中に共焦点顕微鏡を用いて、細胞レベルで判別し、腫瘍摘出率 100% を目指すものである。蛍光ガイド下脳腫瘍摘出術において、腫瘍領域における蛍光の微細現象を共焦点顕微鏡により明らかにするとともに、浸潤領域における蛍光の特徴を分析して、浸潤領域の判別方法を確立する。これによって悪性脳腫瘍領域を精密に判別する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 共焦点顕微鏡観察システム

共焦点顕微鏡を用いて、脳腫瘍領域を観察するシステムを図1に示す。波長 405nm のレーザー光を照射し、透過波長 610~680nm の赤色光のみをフィルタを通して EMCCD カメラで撮影する。164 $\mu$ m $\times$ 125 $\mu$ m ごとに画像を採取し、CCD カメラの1画素 (0.25 $\mu$ m $\times$ 0.25 $\mu$ m) ごとの蛍光強度を検出する。さらにステージを XY 方向に走査して、例えば 6.4mm $\times$ 3.7mm の領域の蛍光強度マップを作成することができる。

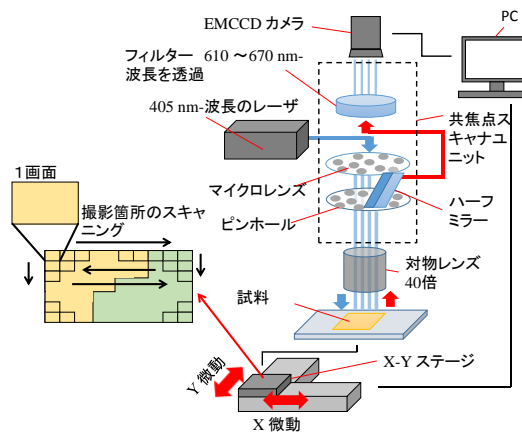


図1 共焦点顕微鏡観察システム

#### (2) 観察試料

脳腫瘍摘出手術で採取した赤色蛍光部や境界部、非赤色部の試料から厚さ 10 $\mu$ m にスライスした観察サンプルを作成し、共焦点顕微鏡で観察する。一方、同じ部位から、H&E 染色を行なう試料も作成し、通常の光学顕微鏡で観察して、腫瘍か否かについての病理的所見を得る。

#### (3) 蛍光強度分析

共焦点顕微鏡を用いた画像から各画素の蛍光強度が得られるので、蛍光強度とその蛍光強度を持つ画素数についてヒストグラムを作成する。何もサンプルを置かない場合の画像（ダーク）も取得する。各サンプルの蛍光強度分布と平均蛍光強度を比較するとともに、蛍光強度がダークの蛍光強度を上回る確率 R 値を求めて比較する。

#### (4) 蛍光輝点の分析

境界部（浸潤領域）においては、画面における蛍光強度を 2 値化して、白と黒に分け、輝点の大きさと数を求めて、ヒストグラムとして表示する。

### 4. 研究成果

#### (1) 共焦点顕微鏡画像と H&E 画像との比較

腫瘍領域の共焦点顕微鏡画像と H&E 画像との比較例を図2に示す。(a)は 3.2mm $\times$ 3.6mm 領域の蛍光画像であり、(b)は同じ領域の H&E 画像である。このうち、H&E 画像で細胞の密度が高い腫瘍部 (1) を (c) に、比較的細胞密度の低い (2) を (d) に示す。どちらの共焦点顕微鏡画像も全体として雲のように蛍光が生じていることが特徴である。

一方、境界領域における共焦点顕微鏡画像と H&E 画像との比較例を図3に示す。ここでは H&E 画像から、腫瘍領域 (3)、浸潤領域 (4)、正常領域 (5) が見られる。それぞれにおいて共焦点顕微鏡画像と H&E 画像を比較したのが (c)、(d)、(e) である。この画像において気がつくことは、正常領域と浸潤領域とで輝点の様子が大きく異なることである。

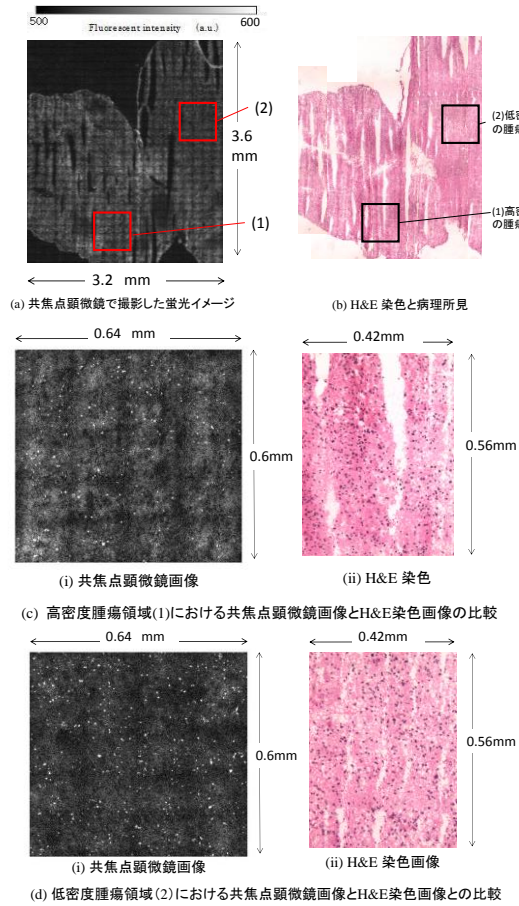


図2 腫瘍領域における共焦点顕微鏡画像と H&E 画像の比較

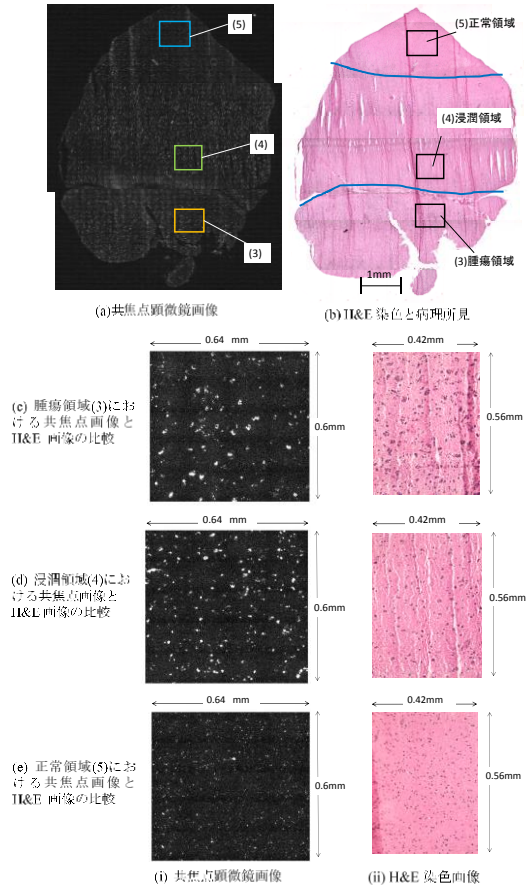


図3 境界領域における共焦点画像と H&E 画像の比較

## (2) 蛍光強度の分析結果

上記の(1)～(5)の領域における蛍光強度分布の比較を図4(a)に、平均強度の比較を図4(b)に、R値の比較を図4(c)に示す。腫瘍領域の(1)、(2)の蛍光強度分布や平均蛍光強度、R値は、ダークの値や正常領域の値よりも大きくことになっており、蛍光強度分布や平均強度、R値などを用いて、腫瘍領域を判別することができる。

一方、浸潤領域においては、蛍光強度分布、平均蛍光強度、R値のどれを用いて比較しても、正常領域と浸潤領域との差が小さい。

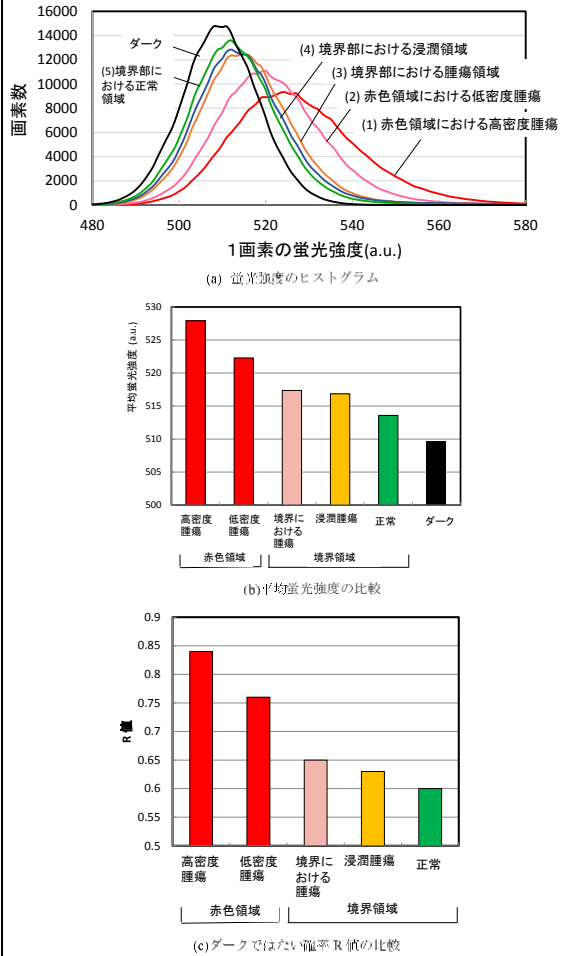


図4 蛍光強度分布、平均蛍光強度、R値の比較

## (3) 蛍光輝点の分析結果

そこで、蛍光強度の分析において差の小さかった浸潤領域における蛍光輝点を比較した。その分析例を図5に示す。

図5は、(3)、(4)、(5)の領域における輝点の大きさとサイズのヒストグラムを(a)～(c)で示し、輝点の平均サイズと輝点の数の比較を(d)に示したものである。

これを見ると、境界領域における腫瘍領域や浸潤領域の輝点ヒストグラムは清涼領域のそれと大きく異なることがわかる。腫瘍領域や浸潤領域における輝点の平均サイズは正常領域と大きく異なり、輝点の数も大きくことになっている。このことから、浸潤領域においては、輝点の大きさと数を分析すること

により、腫瘍判別を行なう可能性がある。

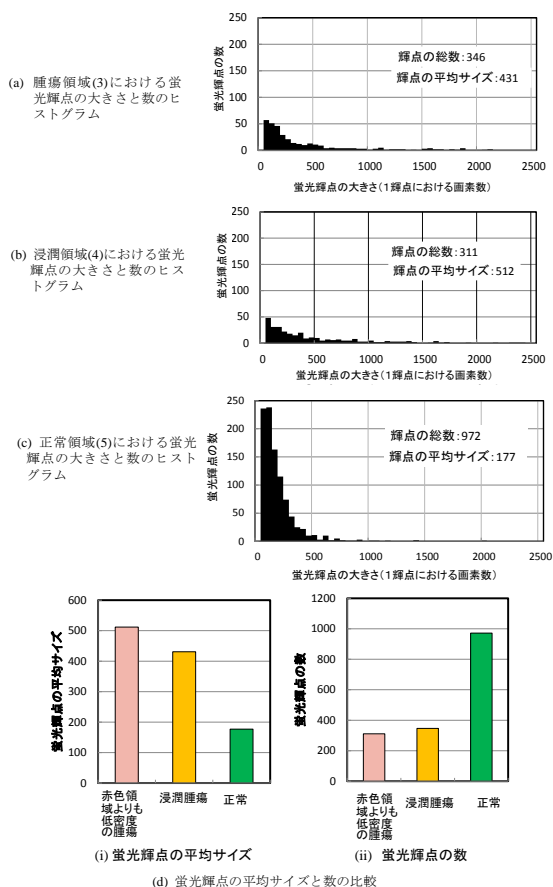


図5 境界領域における蛍光輝点の分析

以上のように、蛍光の強い腫瘍領域においては、蛍光強度分布や平均蛍光強度、R値を用いて、判別を行なうことが可能である。また蛍光強度では判別がむずかしい浸潤領域においては、蛍光輝点の大きさと数を分析することにより、腫瘍の判別を行うことができる可能性を見出した。蛍光輝点の分析による腫瘍判別については、今後さらに様々な腫瘍例について調べて明らかにしていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- ① T. Yoneyama, H. Kagawa, T. Watanabe, Y. Hayashi, M. Nakada, Fluorescence intensity and bright spot analysis using a confocal microscope for photodynamic diagnosis of brain tumors, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 査読有, 17(2017), 13-21

〔学会発表〕(計2件)

- ① 米山猛, 伊藤雄介, 宮下勝吉, 渡辺哲陽, 中田光俊, 5-ALA 蛍光ガイド下手術における蛍光輝点の分析, 第12回日本脳神経外科光線力学学会, 2017年6月26日, はまぎんホール ヴィアマレー (神奈川

県横浜市)

- ② 中田光俊, 伊藤雄介, 片平拓磨, 滝沢真, 宮下勝吉, 渡辺哲陽, 米山猛, 5-ALA 蛍光ガイド下手術における蛍光微細局在の解析, 第11回日本脳神経外科光線力学学会, 2015年7月11日, 京王プラザホテル (東京都).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

米山 猛 (Yoneyama Takeshi)  
 金沢大学・機械工学系・教授  
 研究者番号: 30175020

### (2) 研究分担者

中田 光俊 (Nakada Mitsutoshi)  
 金沢大学・医学系・教授  
 研究者番号: 20334774

### (3) 研究分担者

渡辺 哲陽 (Watanabe Tetsuyou)  
 金沢大学・機械工学系・准教授  
 研究者番号: 80363125

### (4) 研究分担者

香川 博之 (Kagawa Hiroyuki)  
 金沢大学・機械工学系・講師  
 研究者番号: 40251938

### (5) 研究分担者

林 裕 (Hayashi Yutaka)  
 金沢大学・医学系・協力研究員  
 研究者番号: 90262568