

機関番号：31201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659283

研究課題名(和文) 7T超高磁場MRIを応用した消化器癌切除標本の3D実体顕微鏡の開発

研究課題名(英文) Development of high resolution imaging for tumor boundary delineation using 7-tesla magnetic resonance imaging enhanced by high iron diamine immersion

研究代表者

前沢 千早 (Maesawa, Chihaya)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：10326647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌モデルラットにおいて、7-tesla超高磁場MRIを用いた粘膜ムチン強調撮像法を開発し、腫瘍-正常境界部の判定が容易になるか検討した。高鉄ジアミン染色液(HID)の浸透染色液は粘膜杯細胞に特異的に反応し、粘膜強調画像を得る事ができた。DMH誘発ラット発癌モデルでは、肉眼的には把握不可能であった正常-腫瘍境界部の判定が容易になった。本研究で開発された、HID浸透染色によるMRI-粘膜ムチン強調撮像法はラット大腸癌発癌モデルでの粘膜内伸展の画像化を可能にし、正常-腫瘍境界部の客観的診断法と有用であった。本法は大腸のEMR/ESD材料における新たな腫瘍範囲評価法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We developed a method for ex vivo imaging using 7-tesla high-resolution magnetic resonance imaging (MRI) combined with high-iron diamine (HID) immersion. All MR images were acquired with a 7-tesla scanner by spoiled gradient recalled acquisition using the steady state (SPGR) gradient-echo sequence. Colorectal specimens obtained from normal rats and model rats with colon cancer induced by dimethylhydrazine (DMH) were enhanced by immersion in colloidal iron or HID as contrast agents for goblet cell mucin, and subsequently examined by 7-tesla MRI. Although colloidal iron immersion failed to yield well contrasted images of the colonic epithelium, the HID immersion method clearly delineated the tumor boundary. Contrast ratios differed significantly between cancerous tissue and normal epithelium ( $P < 0.01$ ). Our established ex vivo 7-tesla MRI method combined with HID immersion is a unique approach for delineating the tumor boundary in ESD/EMR specimens.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：MRI 病理 高鉄ジアミン染色 EMR ESD

## 1. 研究開始当初の背景

消化器癌治療法の進歩はめざましく、特に腹腔鏡手術や内視鏡を使ったESD (Endoscopic Submucosal Dissection)による低侵襲治療は、患者にやさしいがん治療として普及している。ESDを初めとする消化器癌材料の病理診断に於いて、切除標本における腫瘍断端および深達度の評価は最も重要な臨床情報の一つである。これらの標本における正確な断端、深達度評価には、病理医が複数のブロックを作製し、詳細な腫瘍範囲のマッピングを行い決定している。しかし、病理切片による腫瘍範囲の評価は平面像(2D)の積算であり、必ずしも腫瘍の全体像を評価しているとは言い難い。加えて、複数のブロック/切片を作製し、鏡検する労力と時間には限界もあり、新たな評価法の開発が期待される。

一方、治癒切除可能な進行・再発結腸・直腸癌の分子標的治療薬として、抗VEGF抗体(アバスタチン)が効果をあげている。アバスタチンの組織学的治療効果判定には、HE切片を用いた腫瘍細胞量の2D的な評価が一般的である。しかし、抗体の直接標的である新生血管の状態と、3D画像による腫瘍全体量の評価の方がより適切な判定法といえる。

近年、MRIの空間分解能は超高磁化により、径50-100 $\mu\text{m}$ 程度の脳血管の撮像が可能となっている。さらに、組織内の特定の元素を指標とした撮像法も開発されており、病変部の立体構築ばかりでなく臓器の機能/病態評価にも応用されている。超高磁場MRIによる胃・大腸腫瘍の三次元構築の画像化が可能であれば、臨床に有益な情報をもたらす。

我々は、世界有数の超高磁場MRI施設を有し、7T-MRIによって極めて高い空間分解能を示す消化管画像を撮像できた。加えて常磁性体である酸化鉄(III)と消化管の酸性ムチンが結合する事を応用して、正常粘膜と腫瘍部粘膜の境界影出ができる可能性がある事に気づいた。

本邦におけるMRIの普及率は世界有数で、多様な疾病の*in vivo* imagingに貢献してきた。しかし、摘出標本を撮像して、治療指針に役立てようとする試みは実用化されていない。また、病理学に従事する我々は、従来の慣習にとらわれMRIを実体顕微鏡のように使おうとする発想には至らなかった。加えて植物をはじめとした様々の生物では、MRIによる品種鑑定や成分分析にまで応用されているにも係わらず、切除標本での検討を試みた論文はない。さらに、7T超高磁場MRIは、従来の3T画像の解像度を遙かに凌駕し、20-50 $\mu\text{m}$ の血管

の影出が可能であり、今回使用する酸化鉄(III)は、コロイド鉄染色として病理学で古くから慣れ親しんでいた試薬である。

以上のような観点から、超高磁場MRI粘膜ムチン強調撮像法を開発することにした。

## 2. 研究の目的

大腸癌モデルラットにおいて、7-tesla 超高磁場MRIを用いた粘膜ムチン強調撮像法を開発し、腫瘍-正常境界部の判定が容易になるか検討した。

## 3. 研究の方法

ジメチルヒドラジン誘発ラット発癌モデル(n=20)を作成した(1,2-dimethylhydrazine, DMH, 20 mg/kg, 皮下注/毎週1回)。22週後に愛護的に屠殺し、全結腸・直腸を摘出した。結腸粘膜の杯細胞内に含有されるスルフォムチンを指標に浸透造影画像を撮像する目的で、古典的なコロイド鉄および高鉄ジアミン染色液(HID)を用いた。通常の病理組織染色で用いる溶液をworking solution(WS)とし、実験に応じた濃度に希釈した。摘出標本は、腸内容物の除去後、10%緩衝フォルマリン液で1時間固定後、1% Triton-X100処理を行った。室温で、実験に応じた濃度・反応時間で浸透染色し、超音波洗浄機で洗浄後撮像を行った。撮像には、岩手医科大学医歯薬総合研究所、超高磁場先端MRI研究センターの7-tesla MRI (Discovery MR950 Ver. 21, GE Medical Systems)、2.7-cm-diameter loop coil (IWTM-7HSN-003, Takashima Seisakusho Co.)を用いて撮像した。関心領域の画像データの分析には、フリーソフトウェアのzioTerm 2009 (Ziosoft)を用いた。撮像後の標本はフォルマリン液で再固定後、全割し組織学的検索を行った。癌組織と正常上皮粘膜のシグナルの比較には、Student's t-testを用いた。

## 4. 研究成果

### (1) コロイド鉄染色による撮像

コロイド鉄による浸透染色は腸間膜側の表面組織と非特異的な反応を起こし、撮像に適さなかった。

## (2) 高鉄ジアミン染色液(HID)染色による撮像

粘膜杯細胞に特異的に反応し、粘膜強調画像を得る事ができた(WSの500倍希釈液/反応時間1時間)。HID浸透強調画像では、粘膜上皮欠損モデルで正確にその境界部を撮出できた。DMH誘発ラット発癌モデルでは、腫瘍の粘膜内伸展を正確に評価可能であり、肉眼的には把握不可能であった正常-腫瘍境界部の決定が容易になった。腫瘍部は正常粘膜上皮部に比較して有意に強いシグナル強度を示した( $p < 0.01$ )。腫瘍内のシグナル強度は腫瘍毎のheterogeneityが強く、筋層のシグナル強度との区別が難しい場合もあった。正常粘膜内でシグナルの減弱した部位で、前癌病変と考えられているmucin-depleted fociが認められた。

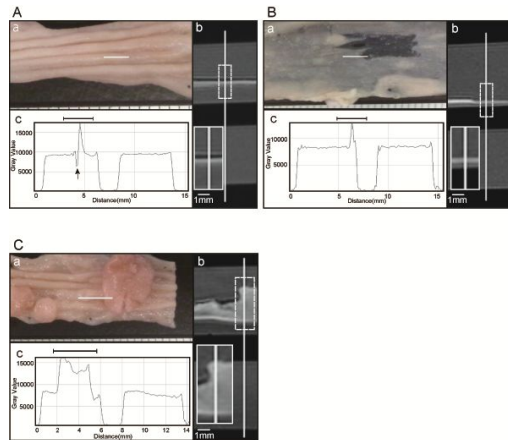


Figure 2.

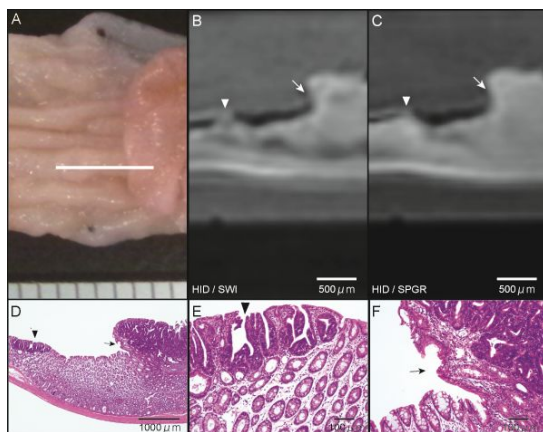


Figure 5.

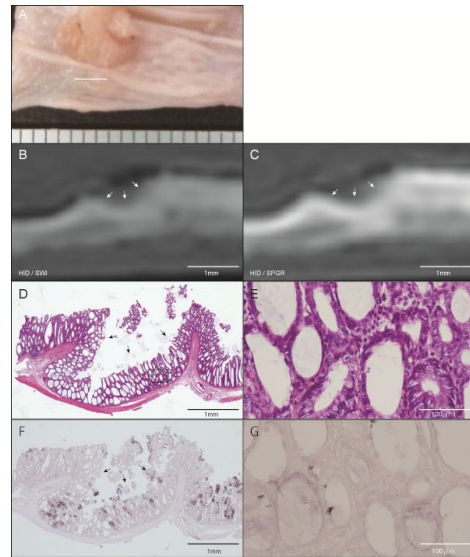


Figure 6.

以上より、本研究で開発された、HID浸透染色によるMRI-粘膜ムチン強調撮像法はラット大腸癌発癌モデルでの粘膜内伸展の画像化を可能にし、正常-腫瘍境界部の客観的診断法と有用であった。本法は大腸のEMR/ESD材料における新たな腫瘍範囲評価法となる可能性が示唆された。

## 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5件)

1. Miura S, Maesawa C, Shibazaki M, Yasuhira S, Kasai S, Tsunoda K, Maeda F, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T. Immunohistochemistry for histone h3 lysine 9 methyltransferase and demethylase proteins in human melanomas. *Am J Dermatopathol*. 2014 Mar;36(3):211-6. doi: 10.1097/DAD.0b013e3182964e02. P
2. Oikawa H, Maesawa C, Tatemichi Y, Nishinari Y, Nishiya M, Mizugai H, Ikeda A, Oikawa K, Takikawa Y, Masuda T. A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) mediates epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II on hepatic stellate cells. *Life Sci*. 2014 Mar 3;97(2):137-44. doi: 10.1016/j.lfs.2013.12.028.
3. Miura S, Shibazaki M, Kasai S, Yasuhira S, Watanabe A, Inoue T, Kageshita Y, Tsunoda K, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T, Maesawa C. A somatic mutation

- of the KEAP1 gene in malignant melanoma is involved in aberrant NRF2 activation and an increase in intrinsic drug resistance. J Invest Dermatol. 2014 Feb;134(2):553-6. doi: 10.1038/jid.2013.343. Epub 2013 Aug 12.
4. Watanabe A, Yasuhira S, Inoue T, Kasai S, Shibasaki M, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T, Maesawa C. BCL2 and BCLxL are key determinants of resistance to antitubulin chemotherapeutics in melanoma cells. Exp Dermatol. 2013 Aug;22(8):518-23. doi: 10.1111/exd.12185.
5. Kanno K, Kanno S, Nitta H, Uesugi N, Sugai T, Masuda T, Wakabayashi G, Maesawa C. Overexpression of histone deacetylase 6 contributes to accelerated migration and invasion activity of hepatocellular carcinoma cells. Oncol Rep. 2012 Sep;28(3):867-73. doi: 10.3892/or.2012.1898.

〔学会発表〕(計0件)

〔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〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者  
前沢千早(岩手医科大学・医学部・教授)

研究者番号：10326647

(2)研究分担者  
佐々木真理(岩手医科大学・医学部・教授)

研究者番号：80205864

千葉俊美(岩手医科大学・医学部・准教授)

研究者番号：40254784

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：