

博士論文（要約）

消化管腫瘍性病変の病理学的評価における  
組織透明化技術の応用

水谷 浩哉

## 論文の内容の要旨

論文題目 消化管腫瘍性病変の病理学的評価における組織透明化技術の応用

氏名 水谷 浩哉

生体組織、生体臓器についての網羅的で緻密な 3 次元構造情報を取得することは、その解剖学的構造を明らかにするのみならず、複雑な細胞同士のネットワークにより構成される組織・臓器単位での生体機能を包括的に解析する上で重要な役割を果たしうるものと考えられている。また正常な生体機能に留まらず、ある疾患における病変の分布や連続性を 3 次元的に解明することにより疾患の病態理解への貢献しうることから、このような生体の 3 次元構造を網羅的に解析することは特に基礎生物学の分野において重要な試みであった。

そのような背景において、組織透明化技術を応用した 3 次元イメージングに注目が集まっている。組織透明化技術の基盤となる機序は、有機溶剤や屈折率を調整した水性試薬等を用いて細胞内外液を蛋白や脂質と同等の屈折率に置換することで組織内の屈折率を均一に近づけ、組織内の光の透過を妨げる一因となっている光の反射・散乱を抑制するものである。また、高屈折率を呈する脂質などを溶出・除去することでさらに肉眼的な透明性を高める方法も報告されている。この組織透明化技術の原理自体は以前より報告されていたものであるが、生物の脳などにおける神経回路配線のマッピング解析であるコネクトミクスへの注目や、光学顕微鏡技術の進歩などに伴って近年盛んに研究が行われ、新たな透明化試薬やプロトコルの開発・改良について様々な報告が見られている。

こういった生体組織を 3 次元かつ包括的に評価する方法は、臨床病理学においても重要性が高く今後期待される技術であるが、今のところこのような 3 次元な形態診断法として確立したものは存在しない。現在の病理学検査においても、採取された組織検体をいくつかの切片に細断し、それぞれの断面における薄切スライドを作成して観察することにより判定する手法が取られている。各断面の 2 次元的な評価がその切片内の病変の性質・広がりなどを代表するものと仮定して診断を行うものであるが、実際には断面と断面の間にある所見については見落とされてしまう可能性がある、という技術的な制約を有している。特に消化管癌の診断・治療における消化管病理学の役割は非常に大きく、例えば内視鏡的に切除された早期癌の根治度は癌の深達度やリンパ管/血管への侵襲の有無などの観点から決定されることから、これらの所見を見落とすことは病変の進行度を過小評価することとなり患者の予後の悪化につながる危険性がある。そのため、消化管粘膜・消化管病変について、全体を包括的・3 次元的に評価することのできる新たな病理学診断における手法の重要性は非常に高いものと考えられる。

我々は前述した組織透明化・3 次元イメージングの手法に着目し、新たな透明化試薬である LUCID (iLUminate Cleared organs to IDentify target molecules) の、消化管粘

膜・消化管腫瘍性病変検体への活用に着目した。組織透明化技術を生体の消化管粘膜に適用した報告は少なく、またヒト消化管粘膜・消化管病変に関しては組織透明化技術を活用した報告は筆者の検索する限りでは認められず、その有効性や組織障害性について十分な検討はされていない。そこで本研究では、LUCIDを用いた組織透明化手法、3次元イメージング手法の、消化管粘膜に対する有効性・組織障害性の検討を目的に、まず動物検体により、本透明化手法の妥当性につき検討を行い、ヒト消化管粘膜での検証を行った。

ブタ消化管粘膜を用いた検討では、LUCIDによる処置により、肉眼的な透光性の亢進が確認された。特にホルマリン固定後に一旦パラフィン包埋・脱パラフィンの工程を経た検体において、高い透明性を示す傾向が見られ、ヒト消化管病理検体への適用性の高さを示した。光学顕微鏡による観察可能深度は食道・胃・大腸の全てにおいて透明化後に有意に延長が得られており、画像処理ソフトを用いた3次元再構築像では食道・胃・大腸において腺管・血管構造の3次元構造を高い分解能で構築することに成功し、これまで困難であった消化管粘膜の包括的・3次元的な形態解析を可能とする点で有用性を示すことが出来た。また透明化処理後の検体に対するHE染色・Ki67免疫染色による病理学評価においては、いずれも組織の形態・染色性は保たれており、変形・変性も最小限と考えられた。本法がブタ消化管組織に対して最低限の組織障害をもって施行可能であることが示され、ヒト消化管組織への適用の妥当性を示すことが出来た。

同様にヒト消化管粘膜検体での検討のため、当院で内視鏡治療ESDによって切除され、病理学的評価ののち保管されている食道・胃・十二指腸・大腸のそれぞれの消化管粘膜検体について、LUCIDによる透明化、3次元撮像を行い、その有効性・組織障害性について検討した。LUCIDによる処理前後の共焦点顕微鏡観察では、透明化後において有意により深部までの蛍光励起・検出が可能であることが確認できた。また3次元再構築像においては、拡大内視鏡観察で認識されるような消化管粘膜表層の血管構造や粘膜構造を3次元的に描出されることに成功し、目的とする部分を抽出し解析することも容易であった。

透明化処理後の検体に対する病理学評価においても、粘膜の微細構造・染色性・抗原性が保たれており明らかな変形変性を認めないことが確認できた。このようにヒト消化管粘膜においても、これまで困難であった消化管粘膜の3次元構造解析が簡便かつ非破壊的に施行可能であることが確認され、本法の有効性・低組織障害性が示された。従来の病理学検査に対する影響が最小限であることは、LUCIDによる形態解析と従来の病理学検査とを相補的に使用することが可能であることを示すものである。組織透明化技術の適用によって従来の消化管病理学検査に生じうる影響について検討した報告はこれまで認められず、今後の臨床応用を見据えるうえで、重要な知見であるものと考えられた。また保管された過去の病理検体からの解析も可能であることから、過去の特定の消化管粘膜や粘膜内病変などについて網羅的・系統的な解析を行うことも可能であり、3次元イメージングによる新たな知見の発見に寄与することが期待される。

組織透明化・3次元イメージング技術の臨床病理学への本格的な応用にあたっては、依然多くの制約を有しており、観察可能深度のさらなる延長、蛍光染色の最適化、撮像する光学顕微鏡の改良・ビッグデータ管理の効率化など解決すべき問題は多々存在するが、実現すれば診断精度の向上や病態解明への貢献などに繋がりうる画期的な技術と考えられる。LUCIDによる透明化技術は、簡便性・安全性・迅速性に優れており、さらに今回ヒト消化管検体においてその有効性と低組織障害性が示されており、臨床検体においても広く活用しうる画期的な技術であることが示唆された。今後のさらなる改良・最適化による適用範囲の拡大や、系統的な解析による新規の知見の解明に寄与することが期待される。