

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	腫瘍制御科学領域 消化器外科学教育研究分野 氏名 横山 拓史
(論文題目) Imaging hamster model of bile duct cancer <i>in vivo</i> using fluorescent L-glucose derivatives (蛍光 L-グルコース誘導体を用いた胆管癌モデルハムスターの生体内イメージング)	
<p>(内容の要旨)</p> <p>胆管癌は胆管狭窄を来たすまで症状が顕在化せず早期発見が困難な疾患である。長期予後を得るためには外科的な完全切除が唯一の方法であるが、表層進展する特徴により従来の画像検査による正確な進展範囲の診断は困難であり、外科的切除においても切除範囲の決定は術中迅速病理診断に依存している。早期発見や外科的切除範囲の決定が困難であることから、現状では予後不良な疾患と言える。胆管癌の予後向上には、早期発見が可能となる新たな診断技術の出現と、術前、術中の正確な進展度範囲診断が必須といえる。</p> <p>自然界に存在しない L-グルコースを NBD で標識した 2-NBDLG が本学統合機能生理学教室で開発され(Yamamoto 他 Tetrahedron Lett. 2008; Yamada 他 2015 日米欧特許登録)、悪性度の高い細胞に特異的に取り込まれることが報告されている (Sasaki 他 Human Cel. 2015)。さらに、2-NBDLG と蛍光色の異なる赤色の大型蛍光基 Texas Red を L-グルコースに結合することで細胞膜不透過性とした誘導体 2-TRLG を 2-NBDLG と混合して用いることで、癌細胞を精度よく検出できることが培養細胞や癌患者から得られた生きた癌細胞で示されている。2-TRLG は炎症や外的要因によって損傷を受けた細胞に取り込まれる特徴を有し、特異的に細胞内に取り込まれる 2-NBDLG を、細胞壁の損傷によって細胞内に浸入した 2-NBDLG と区別可能としている。しかし、生体内でのがん細胞検出における 2-NBDLG や 2-TRLG の有効性は十分明らかになっていない。</p> <p>近年開発が進められている probe-based confocal laser endomicroscopy(pCLE) は、観察臓器表面の異常所見をより詳細に評価可能であり、静脈投与した蛍光剤フルオレセインを利用した胆管表面の蛍光観察の報告もある (Wang 他 United European Gastroenterol J. 2015、Caillol 他 United European Gastroenterol J. 2013)。しかし、フルオレセインは細胞内に入らないため、がん細胞集団をシルエットとしてしか認識できない短所がある。癌細胞を特異的に識別できる可能性をもつ 2-NBDLG を胆管内腔に局所投与し、pCLE で観察することにより、蛍光標識された高悪性度の胆管細胞が同定されれば、胆管癌の早期発見につながる可能性が考えられる。また、術中に 2-NBDLG で蛍光標識された高悪性度の細胞を pCLE で観察することで切除範囲決定の一助となる可能性が考えられる。そこで、胆管癌モデルハムスターを作成し、2-NBDLG を投与した胆管内腔を pCLE で観察することでその有用性の有無について検討した。</p> <p>胆嚢十二指腸吻合、胆管遠位端の結紮を施したメスのシリアン系ハムスターに発癌物質である N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine(BOP)を 9 週にわたり皮下投与することで数ヶ月後およそ 20%に内視鏡で観察可能な部位に胆管癌を誘発した (Tajima ら</p>	

Jpn J Cancer Res. 1994)。予備実験として行った 13 例のハムスターのうち 2 例に明らかな adenocarcinoma が発生し、発癌率は Tajima らの報告に近似していることを確認した。本実験として胆管癌誘発を行い、蛍光イメージングならびに観察部位を確認可能な病理標本作製に成功した 14 例のハムスター中、3 例において病理学的に adenocarcinoma(invasive adenocarcinoma もしくは carcinoma in situ)が確認された。これら 14 例のハムスターをウレタンならびにペントバルビタールの腹腔内投与による麻酔下で開腹手術を行い、胆嚢十二指腸吻合の離断と癒着剥離術により胆管を同定した後、胆管内腔に 2-NBDLG・2-TRLG 混合液を還流した。イメージング前に胆管腹側壁を縦切開し、切離端を左右に展開することで胆管内腔を露出した。胆管内腔を pCLE で観察して得られたイメージング画像と、イメージング後に摘出された胆管の HE 染色による病理組織学的所見を比較検討した。正常ハムスター 10 例においても同様の方法でイメージング画像を得てコントロールとした。病理学的に明らかな adenocarcinoma と診断される部位では bright spot & dark clumps により特徴付けられる蛍光パターンを認めた。病理学的に異形度が低く hyperplasia もしくは mild dysplasia と診断された例、ならびに non-neoplastic lesion、コントロールに用いた正常ハムスターの蛍光イメージング画像はほぼ一様に暗く、蛍光所見は認めなかった。両者の中間にあたる dysplasia と診断された部位には、不均一な蛍光パターンを認め、正常ハムスターや hyperplasia と分類された例との識別が可能であった。

2-NBDLG および 2-TRLG の混合液を局所投与することで、悪性度の高い胆管内腔領域を pCLE を併用することで可視化できる可能性が、胆管癌モデルハムスターを用いた実験により示唆された。今回の研究に用いた pCLE は単色光のみ検出可能なタイプで、2-NBDLG の蛍光を 2-TRLG の蛍光と識別できないが、現在開発中の二波長型内視鏡を用いることで、将来炎症や外的要因による細胞損傷により浸入した 2-NBDLG との識別も可能になると期待される。

本手法は、病理組織学的に明らかな悪性所見を認めないものの異型度が高く、前癌病変と考えられる病変の同定においても有効である可能性が考えられ、胆管癌の水平進展の範囲診断においても、新たなデバイスとなる可能性が示唆された。安全性に関する GLP 試験の結果も順調とされており、ヒトにおける胆管癌スクリーニングや術前・術中の癌進展度範囲診断に応用できれば、胆管癌の早期発見と根治切除率の向上、さらには予後の改善への貢献も期待される。今後臨床応用に向けてヒトの生体に対する適用方法などを検討する必要がある、特に pCLE の probe の形態や 2-NBDLG・2-TRLG の投与方法、評価基準についてもさらなる研究が必要である。