

多光子レーザー顕微鏡とクルクミン生体染色を用いた新規生体蛍光観察手法による ヒルシュスプルング病における非侵襲的腸管神経叢のリアルタイム観察 ～三重大学発！世界初！ 組織を透視して無傷で観察～

- マウスの腸管で、腸管神経叢を3Dスキャンで可視化
- ヒトの切除腸管で腸管神経叢を腸を傷つけることなく可視化

【概要】

多光子レーザー顕微鏡は生体深部観察に優れる一方、蛍光組織の観察に限られていた。これを克服する新規生体蛍光観察手法(CVS-IFOM)は、ヒト組織のような非蛍光組織にクルクミンを散布することで生体染色を行い、生体深部の非侵襲的な組織観察が可能となった。三重大学発かつ世界初の新技术であり、術中のリアルタイム組織診断などの臨床応用が期待される。

【研究内容】

腸管の蠕動運動を司る腸管の神経が先天性に欠損しているヒルシュスプルング病の腸管において、CVS-IFOMの新技术を用いて、腸管の神経ネットワークを傷つけることなく観察することが可能となった(世界初)。

【今後の展望】

このCVS-IFOMのシステムを術中に用いることができれば、腸管の最適な切除ラインを術中にリアルタイム観察して同定するといった応用が可能となり、臨床において多大な貢献ができる可能性がある。

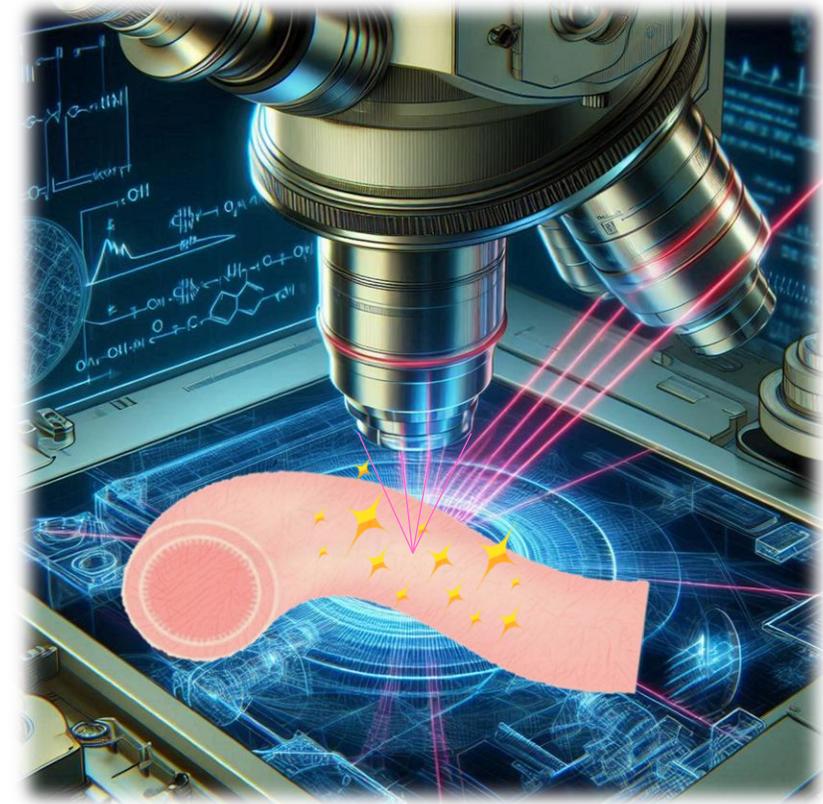
【用語解説】

多光子レーザー顕微鏡:

生体深部の長時間観察に優れた顕微鏡だが、蛍光発色する組織しか観察できない

CVS-IFOM(新規生体蛍光観察手法):

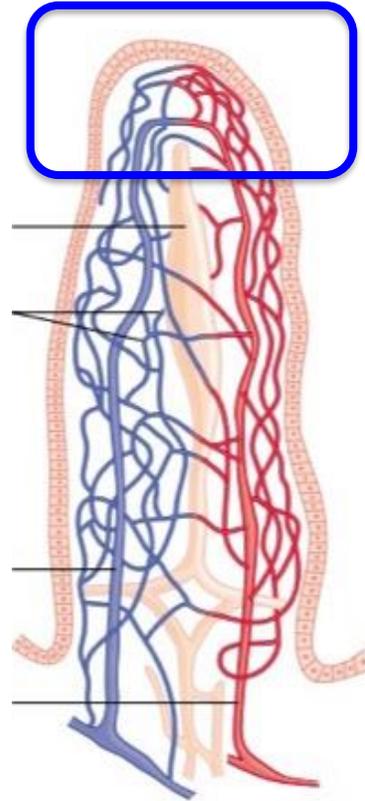
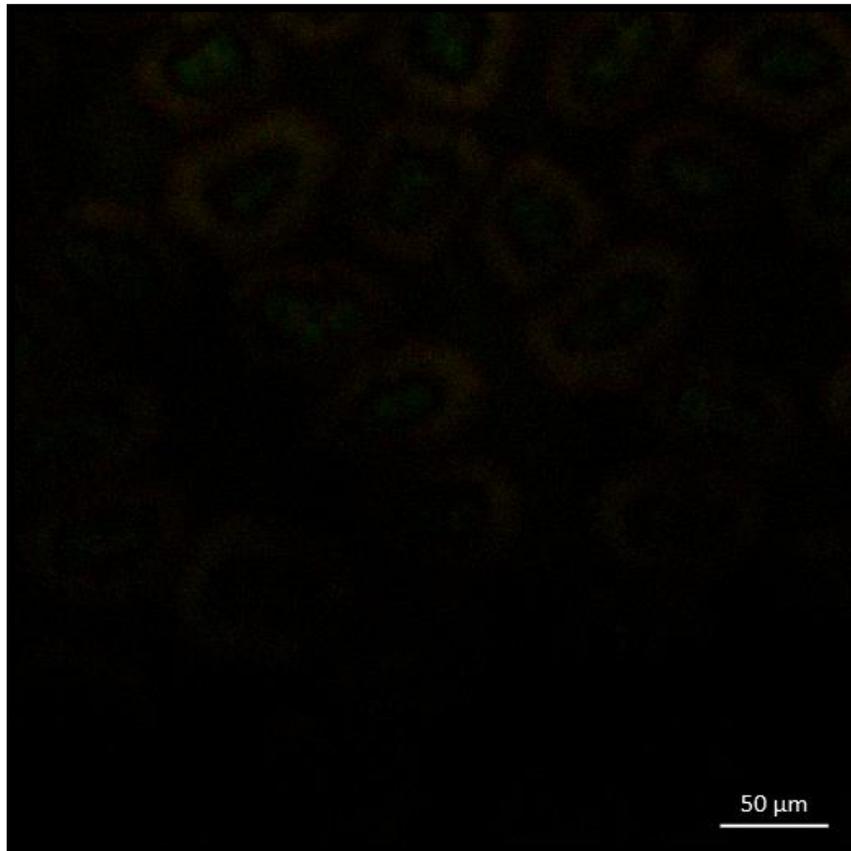
多光子レーザー顕微鏡とクルクミンによる生体染色を合わせた生体深部観察法で三重大学発の新技术



**多光子レーザー顕微鏡＋クルクミン
新規生体蛍光観察手法
(CVS-IFOM)**

多光子レーザー顕微鏡(MPLSM)とは

マウスの小腸における絨毛の3Dスキャン

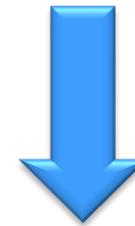


50 μm

Koike Y, Li B, Ganji N, et al. *Nature Communications*. 2020; 11: 4950

生体深部のイメージを長時間観察可能

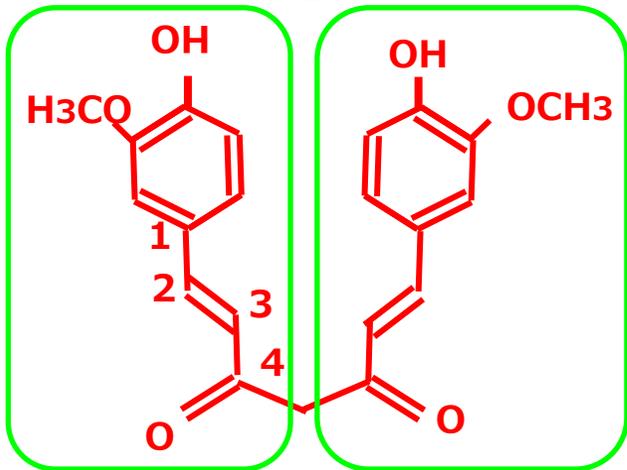
多光子レーザー顕微鏡の欠点



蛍光発色する組織しか観察できない

多光子レーザー顕微鏡と 新たな生体蛍光染色法との組み合わせ

三重大学
溝口明教授が
発見！



クルクミン

発見したこと！

天然の食用色素であるクルクミンを局所散布することで、
蛍光発色のない組織においても、生体内部の組織観察が
可能となる

- ・AMED (平成30年度 革新的医療技術創出拠点プロジェクト採択)
- ・AMED (令和3年度「難治性疾患実用化研究事業」採択)
- ・PCT/JP2018/43636 ・PCT/JP2017/006962 ・PCT/JP2017/018755



クルクミンによる生体組織染色法
+
二光子レーザー顕微鏡による生体観察法

ウコンの力

Curcumin vital staining - intravital fluorescent observation method
CVS-IFOM⇒新規生体蛍光観察手法の確立

倫理審査承認済(H2019-019)

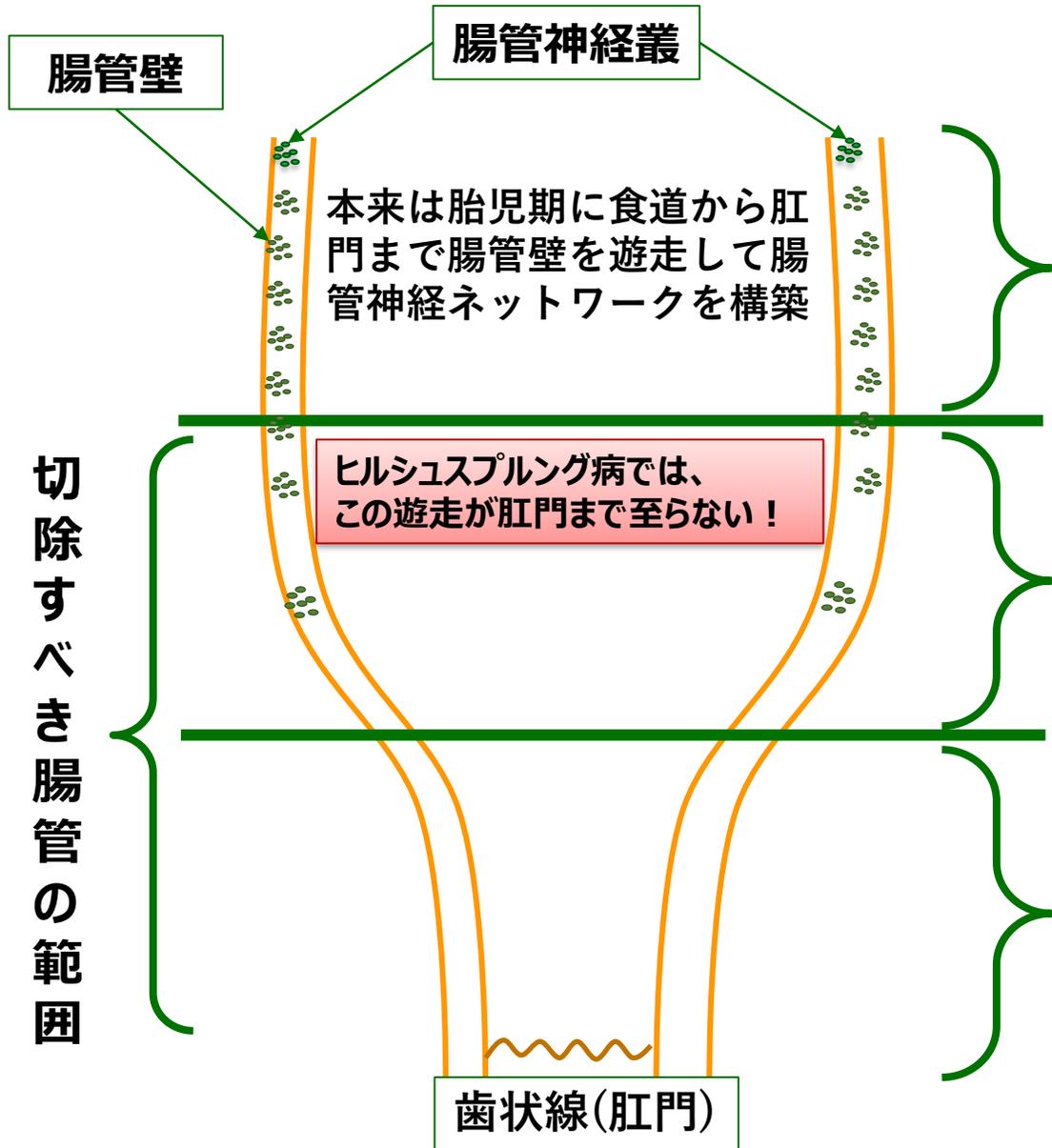
ヒルシュスプルング病とは？

腸管神経叢の先天的な欠損により蠕動不全をきたす疾患

- ◆ 出生直後から著明な腹部膨満
- ◆ 自力排便がみられない
- ◆ 重度の便秘により致死的な腸炎を発症する
- ◆ 手術で腸管の神経が先天的に欠損している腸の範囲を切除する必要がある



ヒルシュスプルング病の新規生体蛍光染色法による 腸管神経叢の術中迅速解析を目指して



有神経腸管

蠕動あり

腸管神経が存在するこのレベルで吻合したい

移行帯

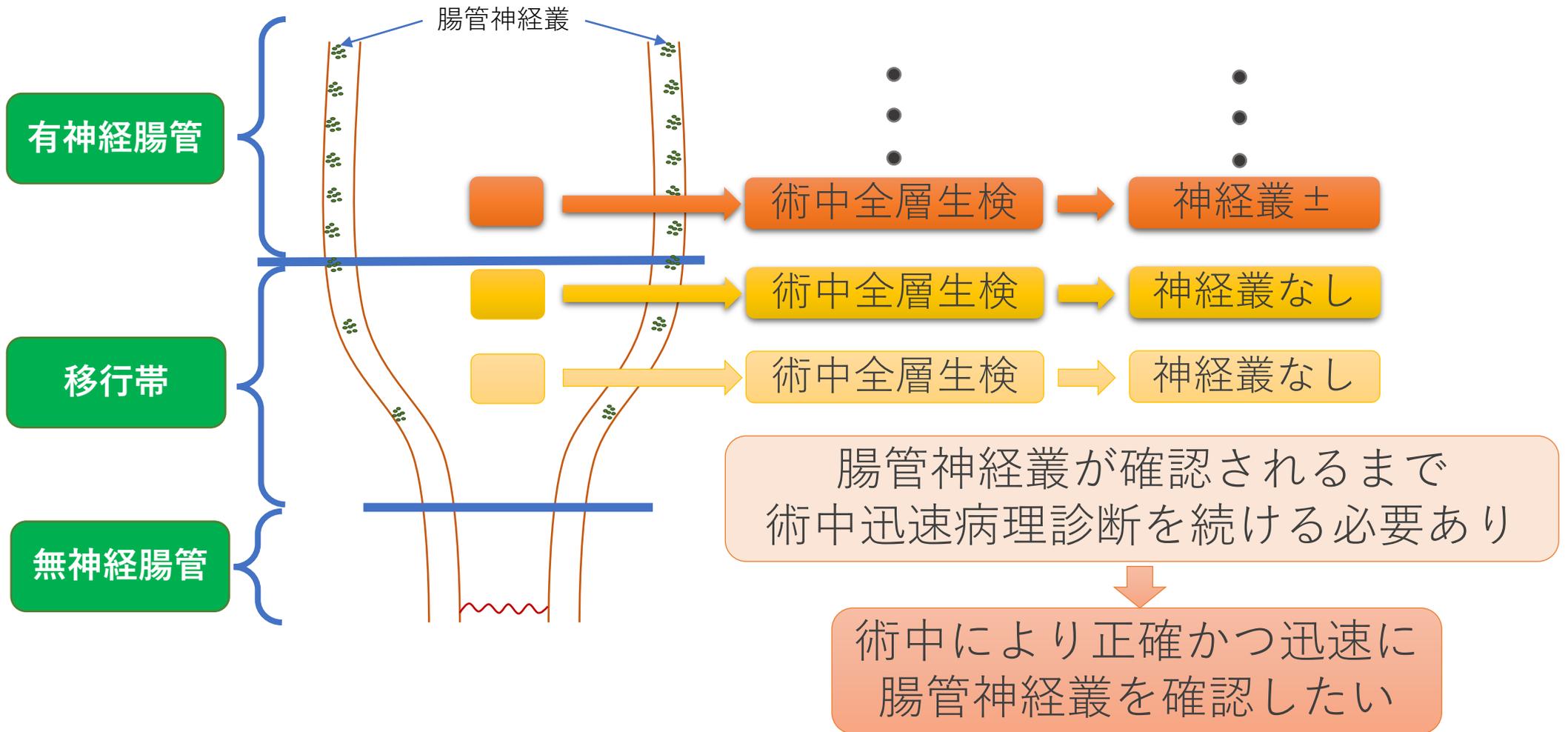
蠕動不全

ここで吻合すると術後重症腸炎発症リスクup

無神経腸管

蠕動なし

ヒルシュスプルング病の手術時の病理組織診断

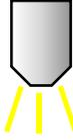


将来的に新規生体蛍光観察手法である
CVS-IFOMを術中に応用できないだろうか？

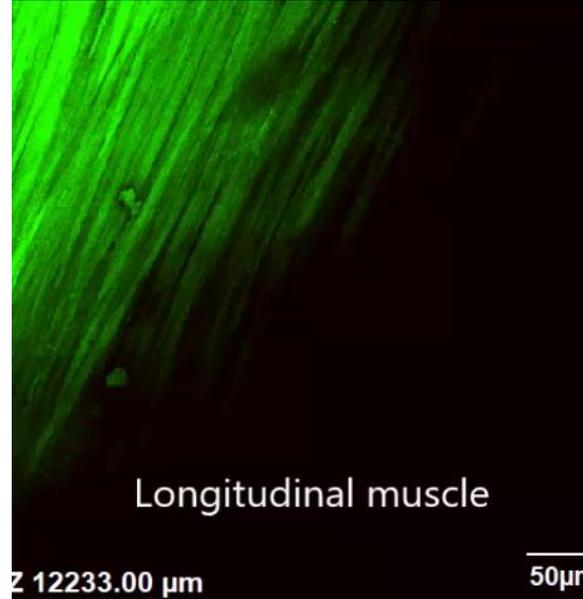
CVS-IFOMによる腸管神経の非侵襲的観察 (マウスによる予備実験)

緑色発光マウス

多光子レーザー顕微鏡



観察可能



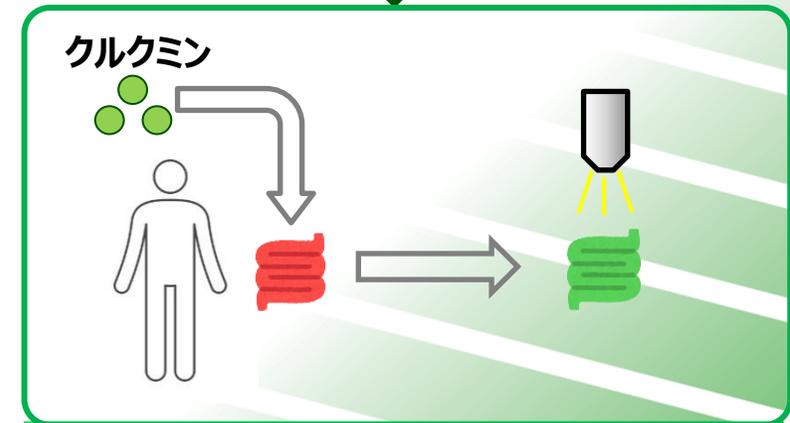
Longitudinal muscle

Z 12233.00 µm

50µm

全身が元々緑色に蛍光発色するマウス
(例：GFPマウス)

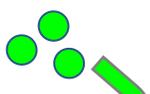
➤ どちらのマウスでも、腸管の神経に関して3Dスキャンが可能であった
⇒ **非侵襲的に顕微鏡レベルの画像が取得可能**



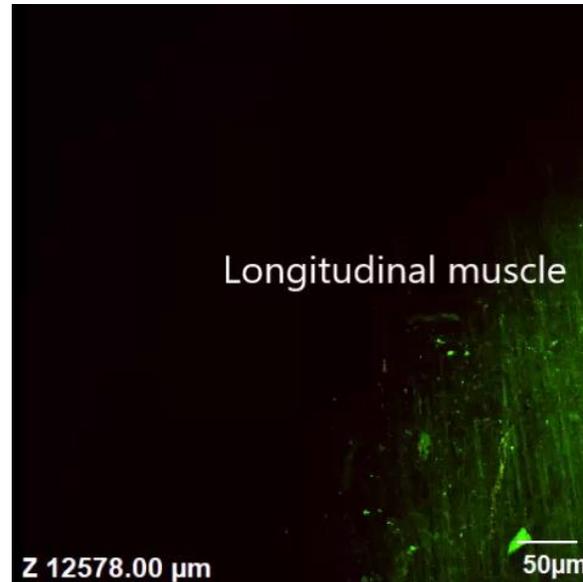
人の腸でも神経は見える？

腸にクルクミンを散布した普通のマウス

クルクミン



観察可能？



Longitudinal muscle

Z 12578.00 µm

50µm

蛍光発色のない普通のマウス
(例：C57BL6マウス)

対象と方法

ヒルシュスプルング病

(腸管神経叢の先天的な欠損により蠕動不全をきたす疾患)

患者

- ◆ 生後3ヶ月未満のヒルシュ 3名
- ◆ 切除検体: S状結腸～直腸
- ◆ 観察タイミング: 切除直後

方法

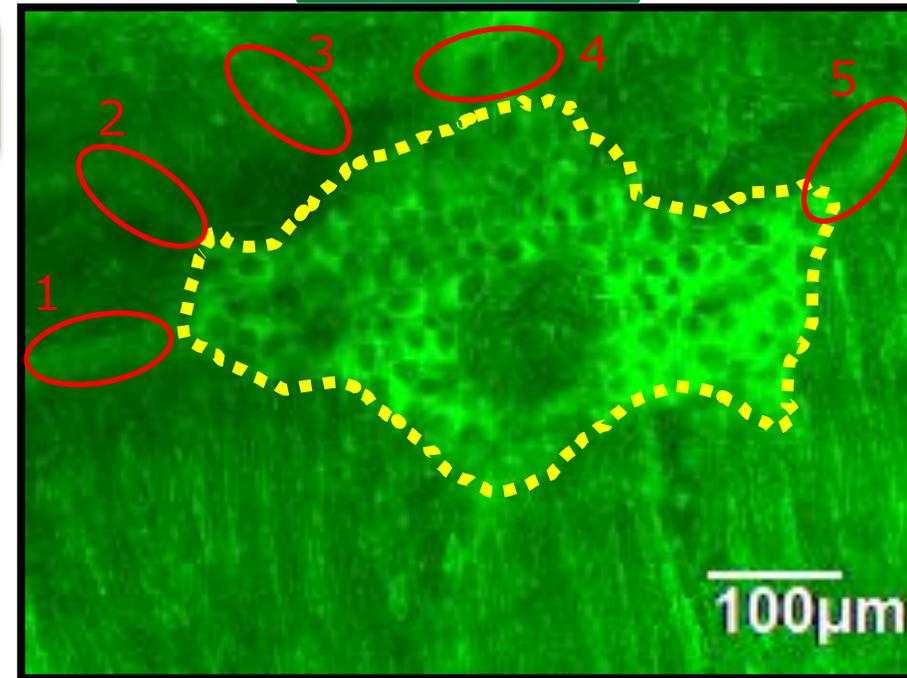
切除検体にクルクミンを散布



⌚ 5分

CVS-IFOMによる
生体スキャン開始

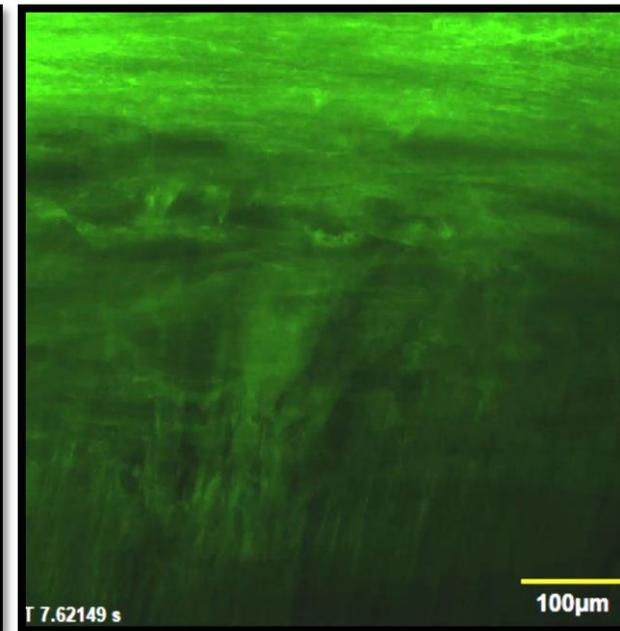
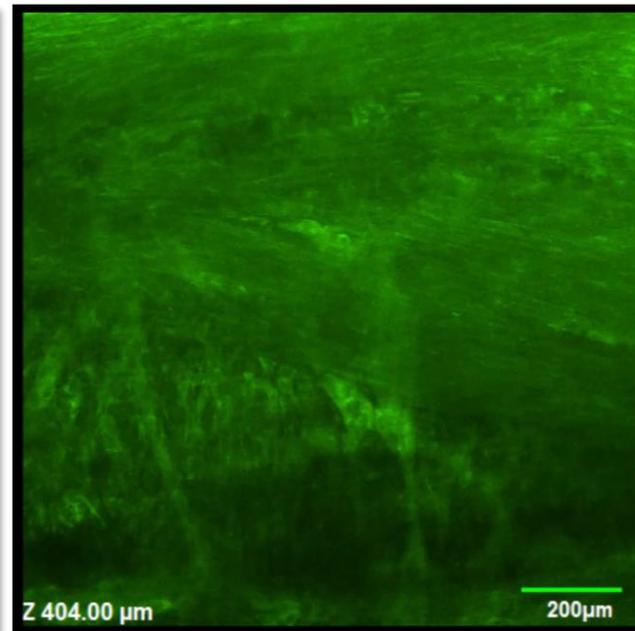
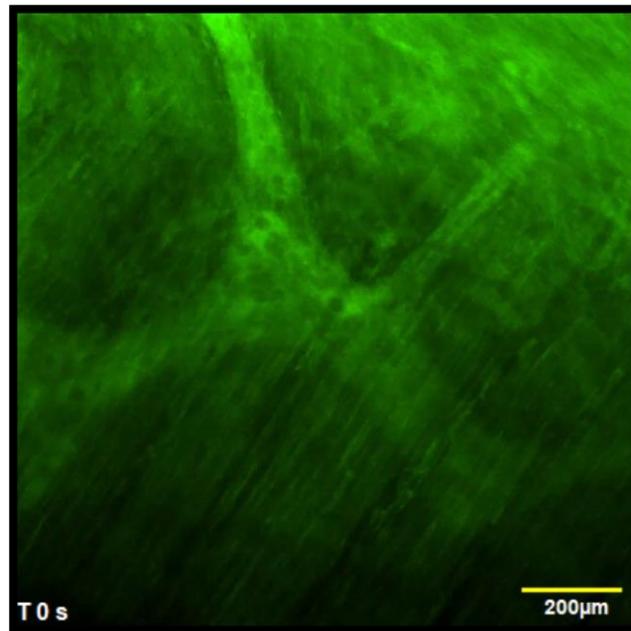
評価項目



- 神経束の数 / 単位神経叢
- アウエルバッハ神経叢のサイズ

アウエルバツハ神経叢のスキヤン

移行帯(Caliber change area)における腸管神経叢の変化

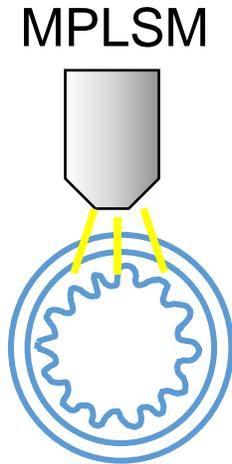


口側断端 6時方向

中間部 6時方向

肛門側断端 6時方向

移行帯における腸管神経叢の変化を
容易に把握することができる



漿膜面からの観察
⇒腸管を傷つけずに
顕微鏡レベルの観察
が可能となった
(世界初)

今後の展望

クルクミンと多光子レーザー顕微鏡による新規生体蛍光観察手法

5分で観察開始

腹腔内臓器におけるMicroscopic levelの変化を
生体内で迅速に観察開始可能

- 将来的にこの顕微鏡を内視鏡や腹腔鏡の先端に接続することができれば、新規生体観察手法を用いて、臨床現場へ多くの応用が期待できる。
- 現在、内視鏡トローサイズで手術室へ持ち込み可能な軟性タイプの多光子レーザー顕微鏡を開発中。
- 術中での臨床試験に向けて、引き続き研究進行中。