

厚生科学研究費補助金

高度先端医療研究事業：治療機器等開発研究分野

エンドマイクロスコープを用いた癌の新しい診断についての研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 工藤 進英

平成14(2002)年 4月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- エンドマイクロスコープを用いた癌の新しい診断についての研究 ..... 1  
工藤進英

### II. 分担研究報告

1. エンドマイクロスコープを用いた癌の新しい診断についての研究 ..... 6  
井上晴洋
2. エンドマイクロスコープと病理画像の比較評価の研究 ..... 11  
塩川章

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 16

- IV. 研究成果の刊行物・別刷 ..... —

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

（総括・分担）研究報告書

エンドマイクロスコープを用いた癌の新しい診断についての研究

（主任又は分担）研究者 工藤 進英 昭和大学横浜市北部病院  
消化器センター長・教授

研究要旨：レーザー走査型共焦点顕微鏡（以下LCMと略す）をマイクロマシン技術を用いて超小型化し、カテーテルプローブの先端に搭載したエンドマイクロスコープ実験機（15cmプローブプロトタイプ）を用いて、ヒトの口腔粘膜を観察したところ、細胞膜と核が明瞭に観察できた。一方で、課題もわかってきた。この課題を次年度以降の研究により解決し、最終目標である「エンドマイクロスコープを用いて内視鏡検査中に生検することなく組織病理学的な診断を即座に可能にし、内視鏡検査中に治療方針を決定し引き続いて内視鏡を用いた治療を行うことができる」ことの実現に近づきたい。

分担研究者：

井上晴洋 昭和大学横浜市北部病院 消化器センター 助教授  
塩川章 昭和大学横浜市北部病院 病理科 助教授

A. 研究目的

(1)研究の必要性

急速な高齢化に伴い悪性新生物の罹患率が急増しており、総患者数は日本で約136万人(平成8年)と推定され、平成10年の死亡者数は約28万4千人、全死因の約30%を占めている。癌は早期発見、早期治療さえすれば、完治する可能性が高い。今日、癌の早期診断・治療において、低侵襲な内視

鏡検査は重要な役割を果たしている。しかし、内視鏡検査の後に病理検査による確定診断を行うためには、内視鏡検査時に組織を生検し、これを顕微鏡下で詳細に観察する必要がある、多くの時間と労力、コストがかかっている。

(2)研究の目的と期待される成果

エンドマイクロスコープを用いた方法では、内視鏡検査中に生検することなく組織病理学的な診断が即座に可能になり、内視鏡検査中に治療方針を決定し、引き続いて内視鏡を用いた治療を行うことができる。したがって、以下の具体的な効果が期待できる。

①医療費の削減と検査・診断の迅速化  
内視鏡下生検法は1年で推計約360万件(平成10年)実施され、病理組織顕

微鏡検査は1年で推計約750万件(平成10年)実施されている。これらの件数に保健点数を乗じて加算すると1年間に約800億円の費用が発生していると推測される。一方、消化管の診断においては良性と思われるが念のために生検するものが半分以上含まれているという報告がある。エンドマイクロスコープにより、生検及び生検組織標本の作成をしないで組織病理学的な診断が可能になれば、非常に多くの時間と労力と費用を削減できる可能性がある。

②検査・診断の低侵襲化と安全性向上  
消化管の内視鏡検査において、生検をすると多少ながら出血があり、癌の一部を生検により生体内でかじりとるという行為が妥当かどうかの懸念がある。また、生検した後に、生検部から大量出血をした例も報告されている。エンドマイクロスコープにより生検しないで組織病理学的な診断が可能になれば、検査・診断の低侵襲化と安全性向上が期待できる。

③内視鏡的粘膜切除術(以下EMRと略す)時の病変の遺残防止

消化管のEMR後に遺残再発をきたしたという報告がされている。エンドマイクロスコープにより、EMR前の病変部の同定や、EMR後に病変の取り残しを確認することにより、病変の遺残を防止できる。

④診断能力の飛躍的向上

内視鏡検査中にエンドマイクロスコー

プを用いれば、従来の内視鏡検査では得られなかった細胞レベルの画像が内視鏡検査中に同時に得られる。したがって、内視鏡検査中に内視鏡画像と病理検査画像の両方の画像を見ることにより内視鏡診断と病理診断の2つの側面から総合的に診断することができ、診断能力の向上や検査の効率化に寄与する。たとえば、病理医からの指示により適切な部位から適切な数の細胞画像を得ることが可能となり診断能力の向上と、検査の効率化が期待される。

⑤診断の定量化・客観化

LCMを用いた検討により、健常部では核が高輝度、細胞質が低輝度で描出されるのに対して、癌では核が低輝度、細胞質が高輝度で描出される現象が確認されている。この輝度の逆転現象を定量化することができれば、癌、非癌を客観的に診断できる可能性がある。エンドマイクロスコープの画像処理技術の開発により、実現が可能となる。

B. 研究方法

(1) 前年度までの研究状況

内視鏡の処置用チャンネルを挿通可能なエンドマイクロスコープの開発に先立ち、まず、基礎的な検討として、無固定無染色の新鮮な粘膜標本に対してLCMを用いた検討をオリンパスと共同で開始した。そして、平成9年11月にLCMで新鮮な食道粘膜及び胃粘膜で無固定無染色の細胞を画像化することに成功した。その後、人の食道、

胃、大腸の新鮮標本において細胞膜と核が観察可能であること、食道、胃、大腸全てにおいて正常、癌共LCM画像とHE染色像が良く対応すること、LCM画像の対比により正常組織と癌組織の判別が典型例では可能であることが明らかになった。この結果に対して日本および欧米の病理医から十分診断可能であるとのコメントを頂いた。なお、さらに診断学として興味深いのは、食道、胃、大腸のいずれのLCM画像でも、健常部では核が高輝度、細胞質が低輝度で描出されるのに対して、癌では核が低輝度、細胞質が高輝度と輝度の逆転現象が見られたことである。この輝度の逆転現象を定量化することができれば、癌、非癌を客観的に診断できる可能性がある。

つづいて、オリンパスと共同で、外径3.4mmのエンドマイクロスコープ机上実験プローブ(以下プローブ)を開発した。このプローブを用いて、ホルマリン固定・無染色の食道正常粘膜標本において、平成12年1月に細胞膜と核を画像化することに成功した。この研究により、人の食道のホルマリン固定・無染色標本において細胞膜と核の観察が可能であること、LCM画像とHE染色画像と対応する画像が得られることが明らかになった。

(2)今年度(平成13年度)の研究経過

今年度は、細胞レベルの画像を、無固定無染色の標本から獲得する(仮想病

理と称す)ことと、同様の組織像を、生検鉗子孔を通したプローブで獲得する(仮想生検と称す)ことを実現するための研究を実施してきた。仮想生検を実現させるための研究では、まず、生検鉗子孔には挿通できないが、生体で使用可能な外径5.2mmの「15cmプローブプロトタイプ」を用いて、ヒトの口腔粘膜を観察した。

(倫理面への配慮)

仮想病理の研究においては、本院の倫理規定にのっとり、全例インフォームドコンセントを得た、手術・生検材料を使用した。

仮想生検の研究においては、15cmプローブプロトタイプの使用にあたり、機器の安全性を十分に確認した後、本院の倫理規定にのっとり、分担研究者本人の口腔粘膜を観察した。

### C. 研究結果

仮想病理の研究では、LCMを使用して合計37例全例において細胞画像の撮像に成功した。食道では85%で細胞核を確認することが可能であった。胃・大腸では細胞の腺管状の配列やピットパターンを確認することはできたが、細胞核の確認はしばしば困難(23%)であった。典型例では核と細胞質で輝度の逆転現象が生じた。癌の場合は、92%で輝度が逆転した。ただし、健常部でも細胞質が高輝度に出る場合が42%発生した。

仮想生検を実現させるための研究で

は、まず、生検鉗子孔には挿通できないが、生体に使用可能な外径5.2 mmの15 cmプローブプロトタイプをオリンパスで作製した。これを用いてヒトの口腔粘膜を観察したところ、細胞膜と核を明瞭に観察することができた。一方で、この口腔粘膜観察の結果、画像を安定的に撮るにはプローブの固定方法を工夫する必要があることがわかった。また、プローブを内視鏡の鉗子チャンネルに挿通するためには、プローブをフレキシブルにすることと外径を細径化し、かつ生体内に使用可能にする必要がある。

#### D. 考察

仮想病理の研究では、LCMを使用して合計37例全例において細胞画像の撮像に成功した。典型例では核と細胞質で輝度の逆転現象が生じた。

仮想生検の研究では、15 cmプローブプロトタイプでは、ヒトの口腔粘膜の細胞膜と核を明瞭に観察することができた。

一方で、仮想病理の研究、仮想生検の研究とも課題も明らかになった。これらの課題を次年度以降の研究で解決していけば、最終目標である「内視鏡検査中に生検することなく組織病理学的な診断が即座に可能になり、内視鏡検査中に治療方針を決定し、引き続いて内視鏡を用いた治療を行う」ことの実現が近づくとと思われる。

#### E. 結論

生体に使用可能な外径5.2 mmの15 cmプローブプロトタイプでヒトの口腔粘膜の細胞膜と核を明瞭に観察することができた。この結果から、エンドマイクロスコープにより、生体消化管粘膜の細胞膜や核を観察できる可能性を示すことができた。これによりエンドマイクロスコープを用いた方法では、内視鏡検査中に治療方針を決定し、引き続いて内視鏡を用いた治療を行うことができる可能性を示唆できた。一方で、課題も明らかになった。次年度以降の研究で課題を解決していきたい。

#### F. 健康危険情報

無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

無し

##### 2. 学会発表

(1)第9回日本消化器病週間、IT技術と消化器診断、マイクロコスモ技術による仮想生検に向けて、2001年10月18日

(2)フランス内視鏡学会、Virtual biopsy and virtual histology、2001年11月10日

#### H. 知的財産権の出願登録状況

##### 1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

その他

無し

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

（総括・分担）研究報告書

エンドマイクロスコープを用いた癌の新しい診断についての研究

（主任又は分担）研究者 井上 晴洋 昭和大学横浜市北部病院  
消化器センター 助教授

研究要旨：「エンドマイクロスコープを用いて内視鏡検査中に生検することなく組織病理学的な診断を即座に可能にし、内視鏡検査中に治療方針を決定し引き続いて内視鏡を用いた治療を行うことができる」ためには、仮想病理（細胞レベルの画像を無固定無染色の新鮮生標本から獲得する）と仮想生検（同様の組織像を生検鉗子孔を通したプローブで獲得する）の研究を推進する必要がある。仮想生検を実現する研究として、生検鉗子孔には挿通できないが、生体に使用可能な外径5.2mmの「15cmプローブプロトタイプ」を用いてヒトの口腔粘膜を観察したところ、細胞膜と核を明瞭に観察することができた。一方で課題も明らかになったので、仮想生検実現に向け次年度以降に解決をはかっていきたい。

A. 研究目的

エンドマイクロスコープを用いた新しい癌の診断についての研究のうち、仮想生検の研究を分担した。

仮想生検とは、「生体から組織を物理的に採取することなく、内視鏡的に直接に細胞や核を観察する」ことである。

B. 研究方法

（1）前年度までの研究状況

内視鏡の処置用チャンネルを挿通可能なエンドマイクロスコープの開発に先立ち、まず、基礎的な検討として、無固定無染色の新鮮な粘膜標本に対してLCMを用いた検討をオリンパスと共

同で開始した。そして、平成9年11月にLCMで新鮮な食道粘膜及び胃粘膜で無固定無染色の細胞を画像化することに成功した。その後、人の食道、胃、大腸の新鮮標本において細胞膜と核が観察可能であること、食道、胃、大腸全てにおいて正常、癌共LCM画像とHE染色像が良く対応すること、LCM画像の対比により正常組織と癌組織の判別が典型例では可能であることが明らかになった。この結果に対して日本および欧米の病理医から十分診断可能であるとのコメントを頂いた。なお、さらに診断学として興味深いのは、食道、胃、大腸のいずれのLCM



画像でも、健常部では核が高輝度、細胞質が低輝度で描出されるのに対して、癌では核が低輝度、細胞質が高輝度と輝度の逆転現象が見られたことである。この輝度の逆転現象を定量化することができれば、癌、非癌を客観的に診断できる可能性がある。

つづいて、オリンパスと共同で、外径3.4mmのエンドマイクロスコープ机上実験プローブ(以下プローブ)を開発した。このプローブを用いて、ホルマリン固定・無染色の食道正常粘膜標本において、平成12年1月に細胞膜と核を画像化することに成功した。この研究により、人の食道のホルマリン固定・無染色標本において細胞膜と核の観察が可能であること、LCM画像とHE染色画像と対応する画像が得られることが明らかになった。

(2)今年度(平成13年度)の研究経過

仮想生検を実現させるための研究として、生検鉗子孔には挿通できないが、生体に使用可能な外径5.2mmの「15cmプローブプロトタイプ」(別紙の図1参照)を用いてヒトの口腔粘膜を観察した。

(倫理面への配慮)

15cmプローブプロトタイプの使用にあたり、機器の安全性を十分に確認した後、本院の倫理規定にのっとり、分担研究者本人の口腔粘膜を観察した。

### C. 研究結果

生体に使用可能な外径5.2mmの「15cmプローブプロトタイプ」を用いてヒトの口腔粘膜を観察したところ、細胞膜と核を明瞭に観察することができた(別紙の図2参照)。一方で、この口腔粘膜観察の結果、画像を安定的に得るにはプローブの固定方法を工夫する必要があることがわかった。また、プローブを内視鏡の鉗子チャンネルに挿通するためには、プローブをフレキシブルにすることと外径を細径化し、かつ生体内に使用可能にする必要がある。

### D. 考察

15cmプローブプロトタイプでは、ヒトの口腔粘膜の細胞膜と核を明瞭に観察することができた。一方で、課題も明らかになった。これらの課題を次年度以降の研究で解決していけば、仮想生検を実現することに近づくとと思われる。

### E. 結論

生体に使用可能な外径5.2mmの15cmプローブプロトタイプでヒトの口腔粘膜の細胞膜と核を明瞭に観察することができた。この結果から、エンドマイクロスコープにより仮想生検を実現できる可能性を示すことができた。一方で課題も明らかになった。次年度以降の研究で課題を解決していきたい。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

(1)第9回日本消化器病週間、IT技術と  
消化器診断、マイクロコスモ技術に  
よる仮想生検に向けて、2001年10  
月18日

(2)フランス内視鏡学会、Virtual biopsy  
and virtual histology、2001年11月  
10日

H. 知的財産権の出願登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

長さ 15cm、外形 5.2mm  
405nm の青色半導体レーザー  
深達度 50 $\mu$ m  
撮像速度 4.7枚/秒

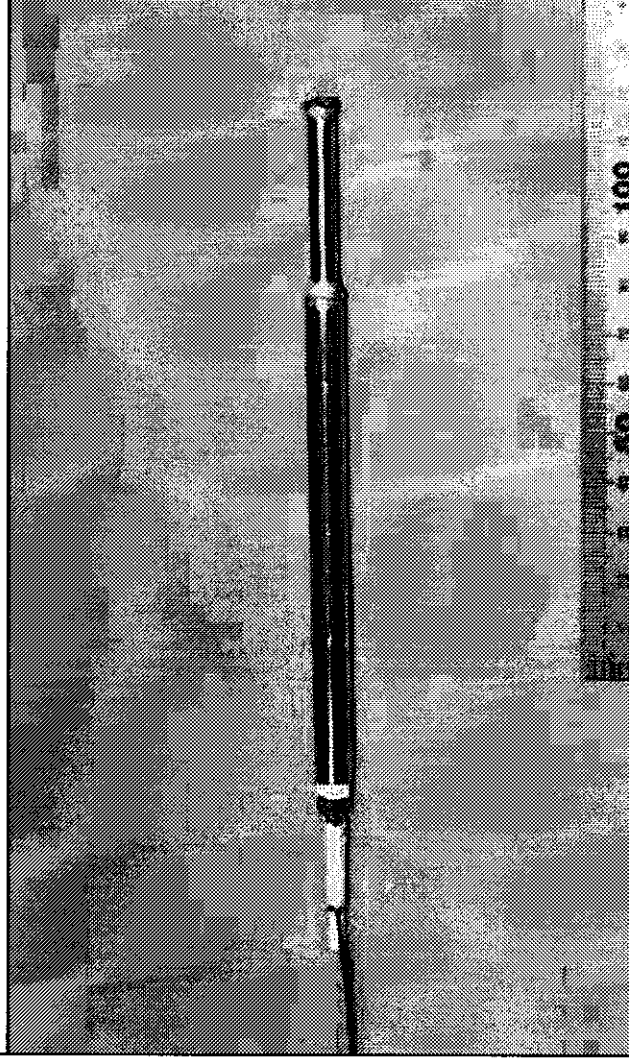


図1 15cmプローブ、プロトタイプの作成



**図2: エントマイクロスコプによる人の口腔粘膜画像**

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

（総括・分担）研究報告書

エンドマイクロスコープと病理画像の比較評価の研究

（主任又は分担）研究者 塩川 章 昭和大学横浜市北部病院

病理科 助教授

研究要旨：「エンドマイクロスコープを用いて内視鏡検査中に生検することなく組織病理学的な診断を即座に可能にし、内視鏡検査中に治療方針を決定し引き続いて内視鏡を用いた治療を行うことができる」ためには、仮想病理（細胞レベルの画像を無固定無染色の新鮮生標本から獲得する）と仮想生検（同様の組織像を生検鉗子孔を通したプローブで獲得する）の研究を推進する必要がある。仮想病理の研究を実施した結果、レーザー走査型共焦点顕微鏡（以下LCMと略す）を使用して、合計37例全例で細胞画像を観察できた。典型例では核と細胞質で輝度の逆転現象が生じたが、その機序に関してはまだ解明できていない。次年度以降に引き続き研究していきたい。

A. 研究目的

エンドマイクロスコープを用いた新しい癌の診断についての研究のうち、仮想病理の研究を担当した。

仮想病理とは、「細胞レベルの画像を、無固定無染色の標本から獲得する」ことである。

B. 研究方法

（1）前年度までの研究状況

内視鏡の処置用チャンネルを挿通可能なエンドマイクロスコープの開発に先立ち、まず、基礎的な検討として、無固定無染色の新鮮な粘膜標本に対してLCMを用いた検討をオリンパスと共同で開始した。そして、平成9年11月にLCMで新鮮な食道粘膜及び胃粘

膜で無固定無染色の細胞を画像化することに成功した。その後、人の食道、胃、大腸の新鮮標本において細胞膜と核が観察可能であること、食道、胃、大腸全てにおいて正常、癌共LCM画像とHE染色像が良く対応すること、LCM画像の対比により正常組織と癌組織の判別が典型例では可能であることが明らかになった。この結果に対して日本および欧米の病理医から十分診断可能であるとのコメントを頂いた。なお、さらに診断学として興味深いのは、食道、胃、大腸のいずれのLCM画像でも、健常部では核が高輝度、細胞質が低輝度で描出されるのに対して、癌では核が低輝度、細胞質が高輝度と輝度の逆転現象が見られたことで

ある。この輝度の逆転現象を定量化することができれば、癌、非癌を客観的に診断できる可能性がある。

つづいて、オリンパスと共同で、外径3.4mmのエンドマイクロスコープ机上実験プローブ(以下プローブ)を開発した。このプローブを用いて、ホルマリン固定・無染色の食道正常粘膜標本において、平成12年1月に細胞膜と核を画像化することに成功した。この研究により、人の食道のホルマリン固定・無染色標本において細胞膜と核の観察が可能であること、LCM画像とHE染色画像と対応する画像が得られることが明らかになった。

(2)今年度(平成13年度)の研究経過

仮想病理の研究として、LCM(別紙の図3参照)を用いて、ヒトの食道、胃、大腸の切除標本と生検標本から、無薄切り・無固定・無染色で、細胞画像を取得して、細胞と核の描出を試みた。そして、輝度の逆転現象についても観察した。

(倫理面への配慮)

本院の倫理規定にのっとり、全例インフォームドコンセントを得た手術・生検材料を使用した。

#### C. 研究結果

LCMを使用して合計37例全例において細胞画像の撮像に成功した。食道では85%で細胞核を確認することが

可能であった。胃・大腸では細胞の腺管状の配列やピットパターンを確認することはできたが、細胞核の確認はしばしば困難(23%)であった。典型例では核と細胞質で輝度の逆転現象が生じた。癌の場合は、92%で輝度が逆転した。ただし、健常部でも細胞質が高輝度に出る場合が42%発生した。(別紙の図4参照)

#### D. 考察

現状、食道では高率で細胞核の撮像が可能だが、胃・大腸では細胞核の撮像が困難なことがある。組織構造の違いが影響している可能性があるため、今後数を増して確認する。そして、より良い画像を得るための条件について研究していくことが、仮想生検実現のために必要である。

輝度の逆転現象に関しては、詳細は不明であるが癌化により何らかの蛋白質が出ている可能性もある。次年度以降の研究課題である。

#### E. 結論

エンドマイクロスコープを用いて内視鏡検査中に生検することなく組織病理学的な診断を即座に可能にし、内視鏡検査中に治療方針を決定し引き続いて内視鏡を用いた治療を行うことができるためには、仮想病理と仮想生検の研究を推進する必要がある。

仮想病理の研究を実施した結果、LCMを使用して、合計37例全例で細胞

画像を観察できた。典型例では核と細胞質で輝度の逆転現象が生じたが、その機序に関してはまだ解明できていない。次年度以降に引き続き研究していきたい。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

無し

H. 知的財産権の出願登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

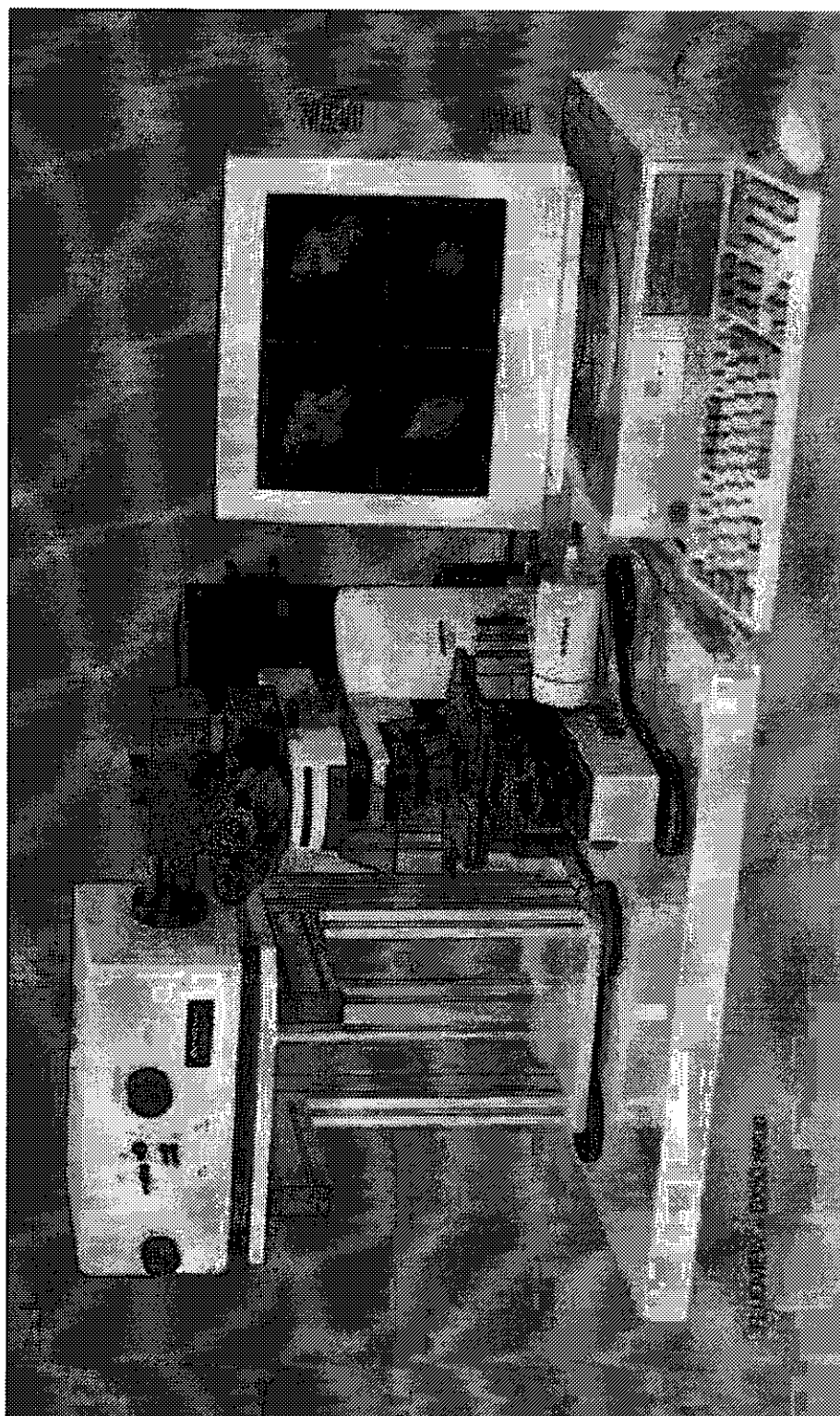
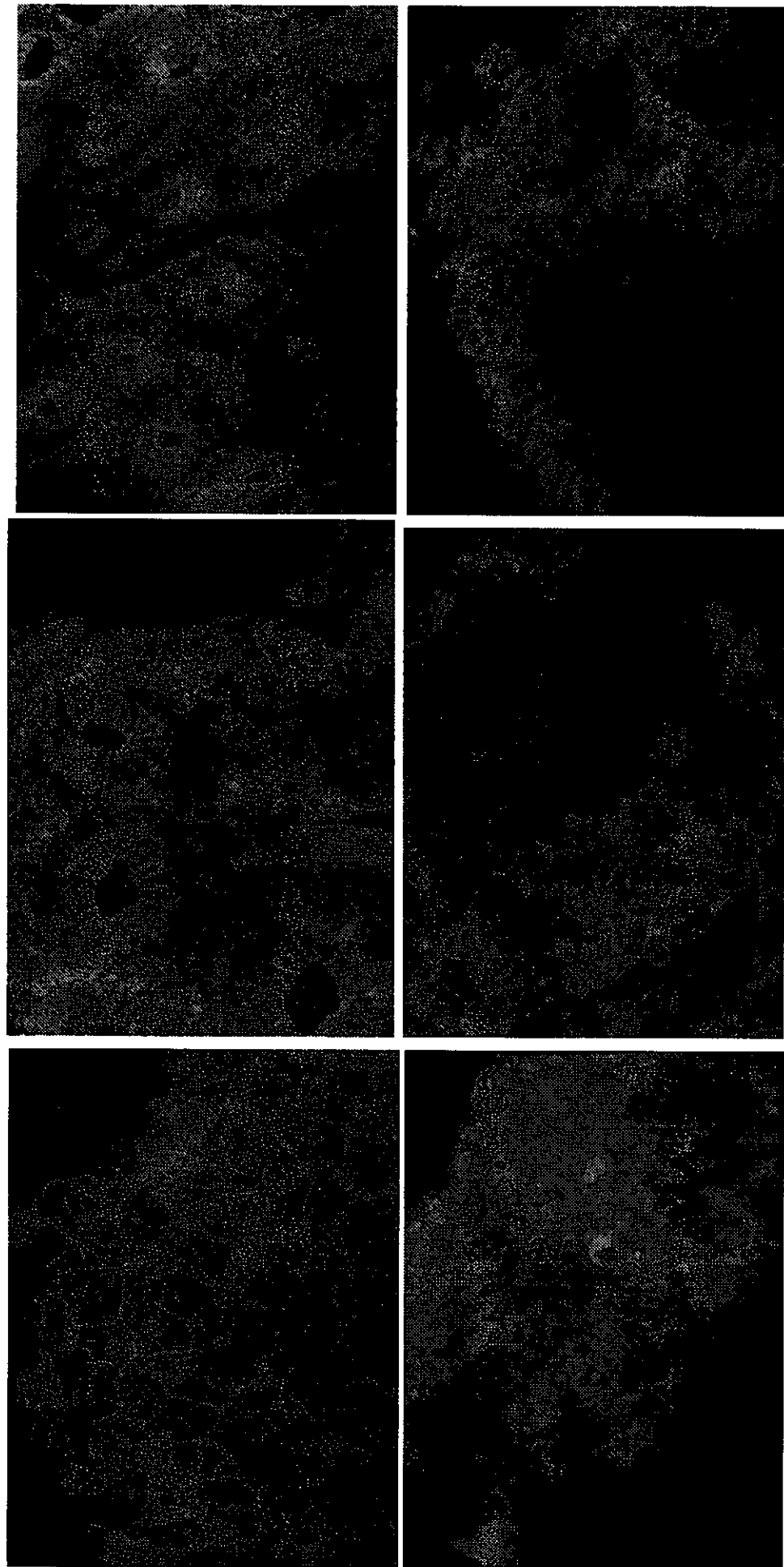


図3：レーザー走査型共焦点顕微鏡（LCM）





食道

胃

大腸

(いずれも上段が正常、下段が癌である。)  
※癌と非癌で、輝度の逆転現象がおこる

図4 LCM画像

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年