

20020766

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 工藤 進英

平成15(2003)年 3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	-----	18
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	--

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

（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内視鏡チャンネルに挿通可能なエンドマイクロスコープ実験機（φ3.4カテーテル型プローブ）を用いて、初めてin vivoでヒトの消化管粘膜を観察できた。一方で、課題もわかってきた。この課題を最終年度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」ことの実現に近づけたい。

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取る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。生検しないで組織病理学的な診断が可能になれば、検査・診断の低侵襲化と患者にとっての安全性向上が期待できる。

②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、患者にとってより安心な医療技術の提供ができる。

③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、診断能力の向上に寄与する。

④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。これらの医療行為に対して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、多くの時間と労力と費用を削減できる可能性がある。

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。

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。平成13年度は、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。

(2)今年度(平成14年度)の研究経過

仮想生検の研究として、外径3.4mmで、生体適合性のあるチューブを外装とした、消化管に挿入可能な

カテーテル型プローブを実現し、in vivoでの消化管(食道・胃・大腸)の細胞レベルの画像を取得した。

仮想病理の研究として、LCM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・無染色で、細胞画像を取得して、病態による画像的特徴の抽出を試みた。また、輝度の逆転現象についても定量的に評価した。

(倫理面への配慮)

カテーテル型プローブの使用にあたり、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、共同研究者であるオリンパスのボランティアの消化管を観察した。

また、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

仮想生検を実現させるための研究では、内視鏡チャンネルに挿通可能な生体適合性のチューブを外装とした外径3.4mmのカテーテル型のプローブを用いてヒトの食道、胃、大腸をin vivoで観察した。食道においては核と細胞膜、胃においては腺管を観察することができた。一方で、この消化管粘膜観察の結果、生体内で画像を安定的に得るには画像のフレームレートを上げる必要があることがわかった。

仮想病理の研究では、LCMを使用し、内視鏡検査時の生検材料において仮想病理像とHE染色による病理組織像を

比較検討し、癌においてはスイスチーズ状、またはドーナツ状、非癌においてはハニカム状、という特徴的な所見を認めた。さらに、正常細胞と癌細胞で輝度の逆転現象について反射輝度を定量的に評価し、反射輝度比の差が統計的に有意であることが示された。

D. 考察

仮想生検の研究では、 ϕ 3.4 mm カテーテル型プローブで、胃では腺管を観察することができたが、食道では安定して画像を得る事ができなかった。これは、観察倍率が非常に高い上に、拍動の影響で観察対象が動くため、今回のカテーテル型プローブのフレームレートでは画像が流れてしまうためである。従ってフレームレートを上げる必要がある。

仮想病理の研究では、正常、良性腫瘍、線種、癌によってLCM画像の特徴の違いが認められるが、これは、病態による細胞密度、細胞の大きさ、N/C比の変化によるものである。また、正常細胞と癌細胞で輝度の逆転現象は、実際に細胞からの光の反射率変化によっていることが分かった。今後は、輝度逆転現象の更なる解析を進めるとともに、これらの画像的特徴による正診率を数を増して確認していくことが、仮想生検実現のために必要である。

E. 結論

内視鏡チャンネルに挿通可能な外径3.4 mmのカテーテル型プローブでヒトの消化管のin vivoでの細胞レベルの観察をすることができた。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。

また、仮想病理像により、正常、良性腫瘍、線種、癌を、ハニカム状、スイスチーズ状といった特徴、核と細胞質の反射輝度比、等によって鑑別できる可能性を示した。最終年度はプローブの性能向上、仮想病理像を用いた正診率の検討を行い、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」ことの実現に近づけたい。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

(1)「共焦点レーザー顕微鏡を用いた組織診断について—仮想病理と仮想生検へ向けて」臨床消化器内科 Vol.17 No.10 2002

(2)「拡大内視鏡による食道癌の病期診断」消化器内視鏡 第14巻 第5号 (2002年5月)

(3) 「胃癌の内視鏡的粘膜切除術」
外科治療 Vol.87 No.1(2002:7)

2. 学会発表

(1) 第 63 回日本消化器内視鏡学会総会
「大腸における仮想病理 - レーザ
ー共焦点顕微鏡による検討」
2002 年 4 月 19 日

(2) 第 64 回日本消化器内視鏡学会総会
「早期大腸癌の仮想病理に向けて -
レーザー共焦点顕微鏡による検討」
2002 年 10 月 26 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

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る、生体に使用可能な外径3.4mmのカテーテル型プローブを用いてヒトの消化管粘膜を観察したところ、食道において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最終年度に解決をはかっていたい。

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に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。平成13年度に、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」を用いてヒトの口腔粘膜を観察した。

(2) 今年度(平成14年度)の研究経過

外径3.4mmで、生体適合性のあるチューブを外装とした、消化管に挿入可能なカテーテル型プローブ(別紙の図1参照)を実現し、in vivoでの消化管(食道・胃・大腸)の細胞レベルの画像を取得した。

(倫理面への配慮)

カテーテル型プローブの使用にあたり、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、共同研究者であるオリンパスのボランティアの消化管を観察した。

C. 研究結果

内視鏡チャンネルに挿通可能な生体適合性のチューブを外装とした外径3.4mmのカテーテル型のプローブを用いてヒトの食道、胃、大腸をin vivoで観察した。食道においては核と細胞膜、胃においては腺管を観察することができた(別紙の図2参照)。得られた画像は、生検標本をLCMで観察した画像と同じであった。一方で、この消化管粘膜観察の結果、生体内で画像を安定的に得るには画像のフレームレートを上げる必要があることがわかった。

D. 考察

φ3.4mmカテーテル型プローブでは、ヒトの消化管粘膜の細胞像をin vivoで観察することができた。胃では腺管を観察することができたが、食道では安定的に画像を得る事ができなかった。これは、観察倍率が非常に高い上に、拍動の影響で観察対象が動くため、今回のカテーテル型プローブのフレームレートでは画像が流れてしまうためである。従ってフレームレートを上げる必要がある。

これらの課題を最終年度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

内視鏡チャンネルに挿通可能な外径3.4mmのカテーテル型プローブでヒトの消化管のin vivoでの細胞レベルの観察をすることができた。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。最終年度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

(1)「共焦点レーザー顕微鏡を用いた組織診断について—仮想病理と仮想生検へ向けて」臨床消化器内科 Vol.17 No.10 2002

(2)「拡大内視鏡による食道癌の病期診断」消化器内視鏡 第14巻 第5号 (2002年5月)

(3)「胃癌の内視鏡的粘膜切除術」外科治療 Vol.87 No.1(2002:7)

(4)Dynamism of tumor vasculature in the early phase of cancer progression:outcomes from oesophageal cancer research
THE LANCET Oncology October 2002 Vol3 Issue10

2. 学会発表

(1)第63回日本消化器内視鏡学会総会「共焦点レーザー顕微鏡による仮想病理・仮想生検への検討」

2002年4月18日

(2)第64回日本消化器内視鏡学会総会「早期大腸癌の仮想病理に向けて—レーザー共焦点顕微鏡による検討」

2002年10月26日

H. 知的財産権の出願登録状況

1. 特許取得

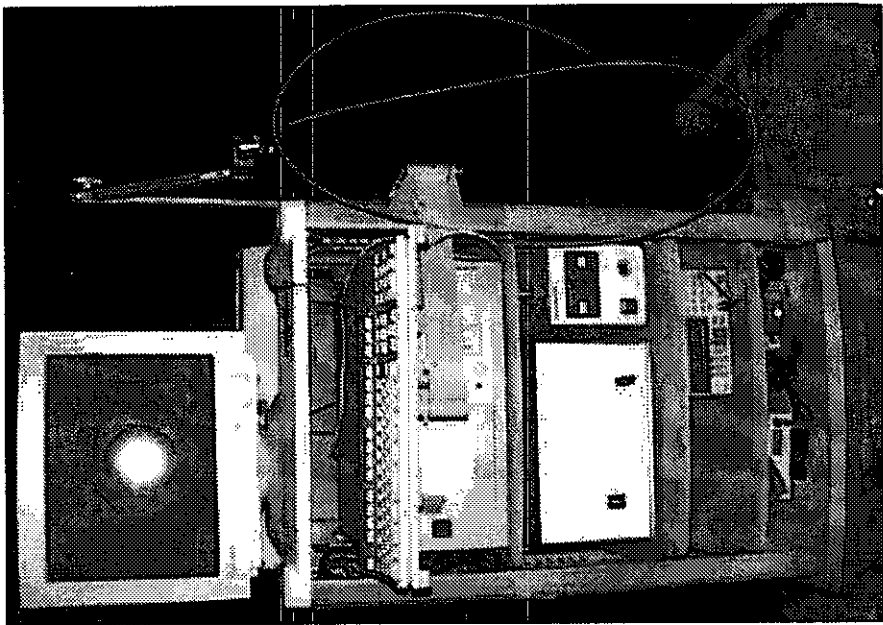
無し

2. 実用新案登録

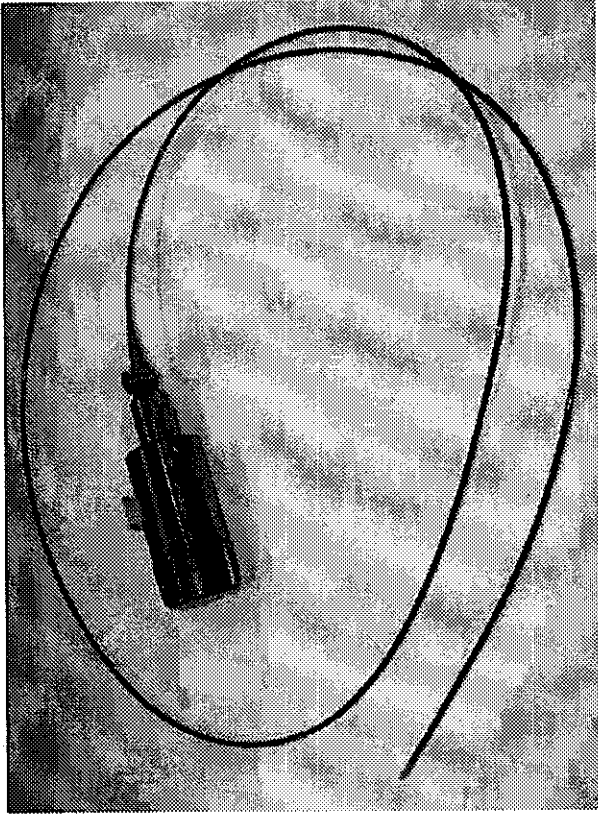
無し

3. その他

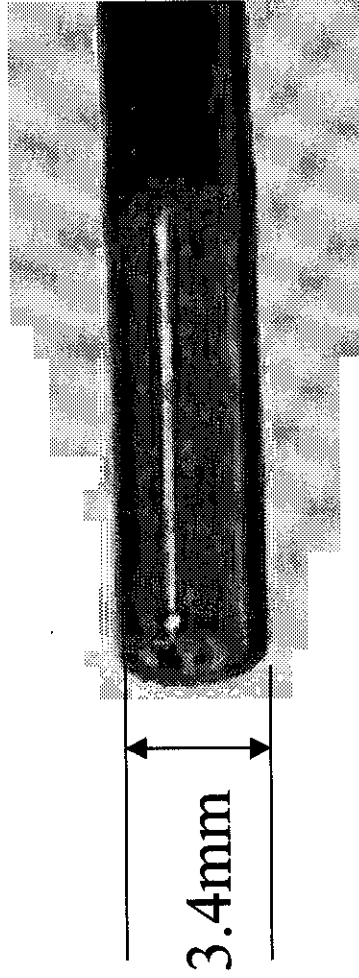
無し



観測装置外観

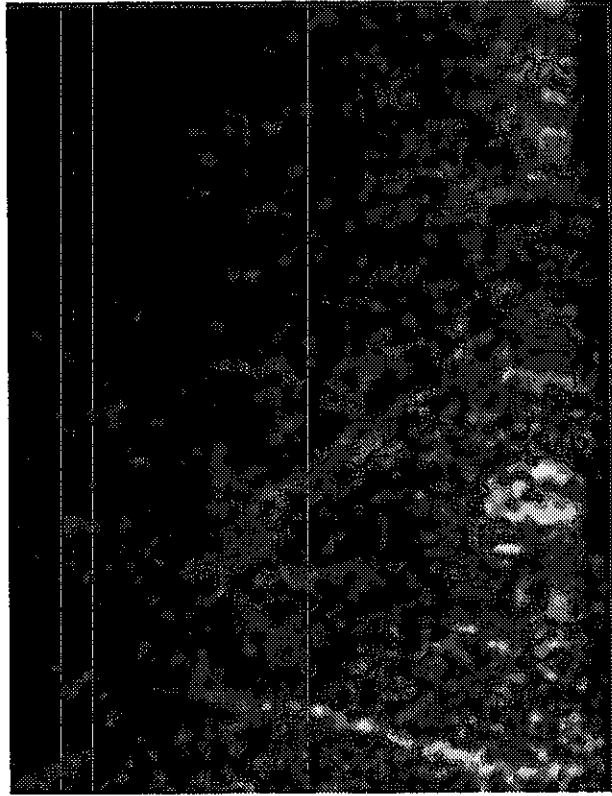


プローブ外観



プローブ先端

図1 エンドマイクロコープ カテーテル型プローブ



ヒト正常食道粘膜(細胞核、細胞膜)



ヒト正常胃粘膜(腺管)

図2 カテーテル型プローブによるヒト画像(in vivo)

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

（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、内視鏡検査時の生検材料に対して、仮想病理像とHE染色による病理組織像を比較検討し、正常、良性腫瘍、線種、癌をハニカム状、スイスチーズ状といった特徴によって鑑別できる可能性を示した。

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に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。平成13年度には同様の方法で、合計37例全例で細胞画像を観察できた。

(2) 今年度(平成14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・無染色で、細胞画像を取得して、病態による画像的特徴の抽出を試みた。また、輝度の逆転現象についても定量的に評価した。

(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、内視鏡検査時の生検材料合計84例において仮想病理像とHE染色による病理組織像を比較検討し、癌においてはスイスチーズ状、またはドーナツ状、非癌においてはハニカム状、という特徴的な所見を認めた(別紙の図4、図5参照)。癌の特徴所見は、食道、胃、大腸で類似していた。非癌におけるハニカム状の所見は、食道、胃で共通して認められた。さらに、正常細胞と癌細胞で輝度の逆転現象について反射輝度を定量的に評価し、反射輝度比の差が統計的に有意であることが示された(別紙の図6参照)。

D. 考察

正常、良性腫瘍、線種、癌によってLCM画像の特徴の違いが認められるが、これは、病態によって細胞密度、細胞の大きさ、N/C比の変化によって起こっている。また、正常細胞と癌細胞で輝度の逆転現象は、実際に細胞からの光の反射率変化によることが分かった。今後は、輝度逆転現象の更なる解析を進めるとともに、これらの画像的特徴による正診率を数を増して確認していくことが、仮想生検実現のために必要である。

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、内視鏡検査時の生検材料に対して仮想病理像とHE染色による病理組織像を比較検討することにより、正常、良性腫瘍、線種、癌をハニカム状、スイスチーズ状といった特徴によって鑑別できる可能性を示した。

さらに、正常細胞と癌細胞で輝度の逆転現象について反射輝度を定量的に評価し、核と細胞質の反射輝度比を取ることで正常と癌の区別が可能なが示された。これらを用いた正診率の検討を最終年度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

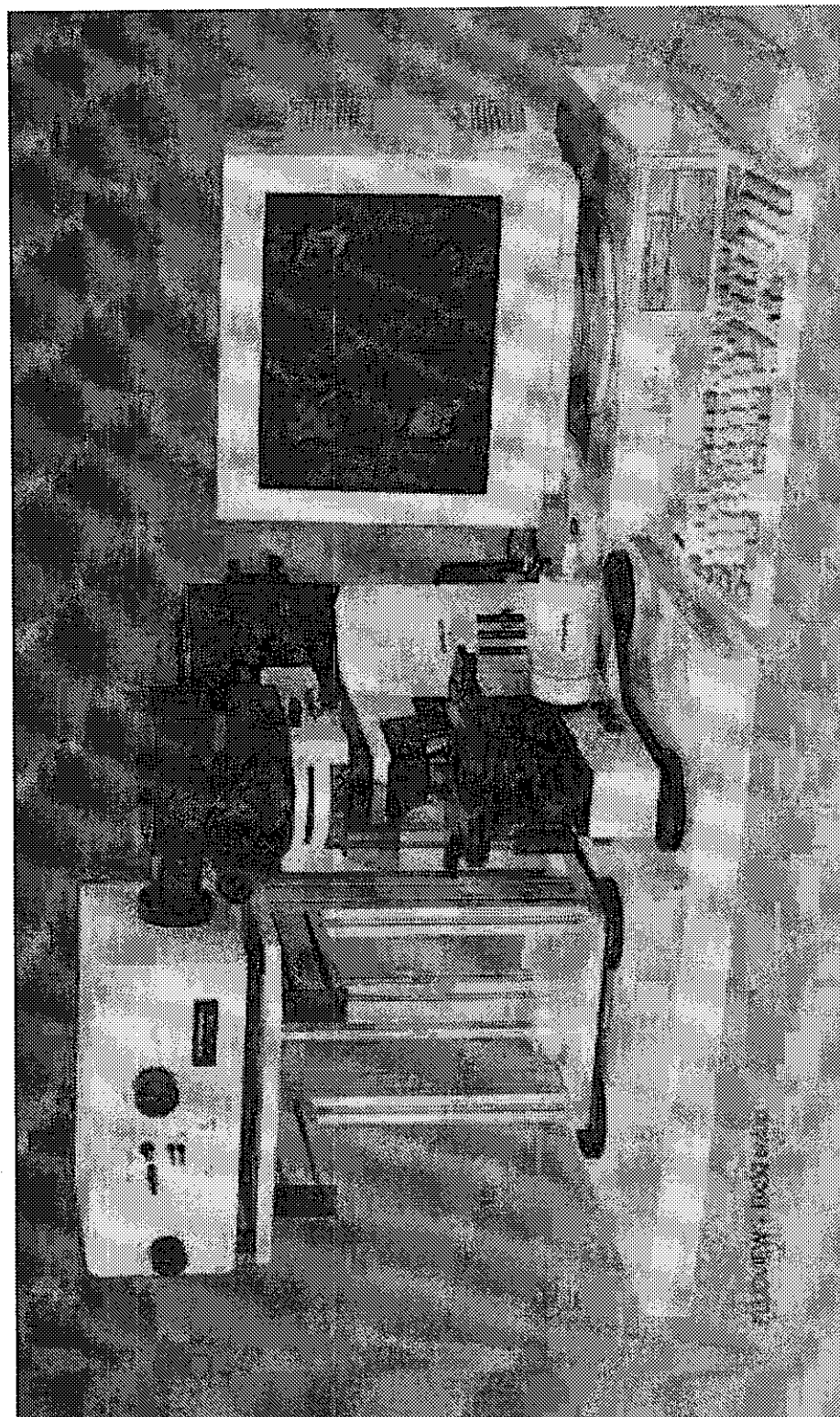
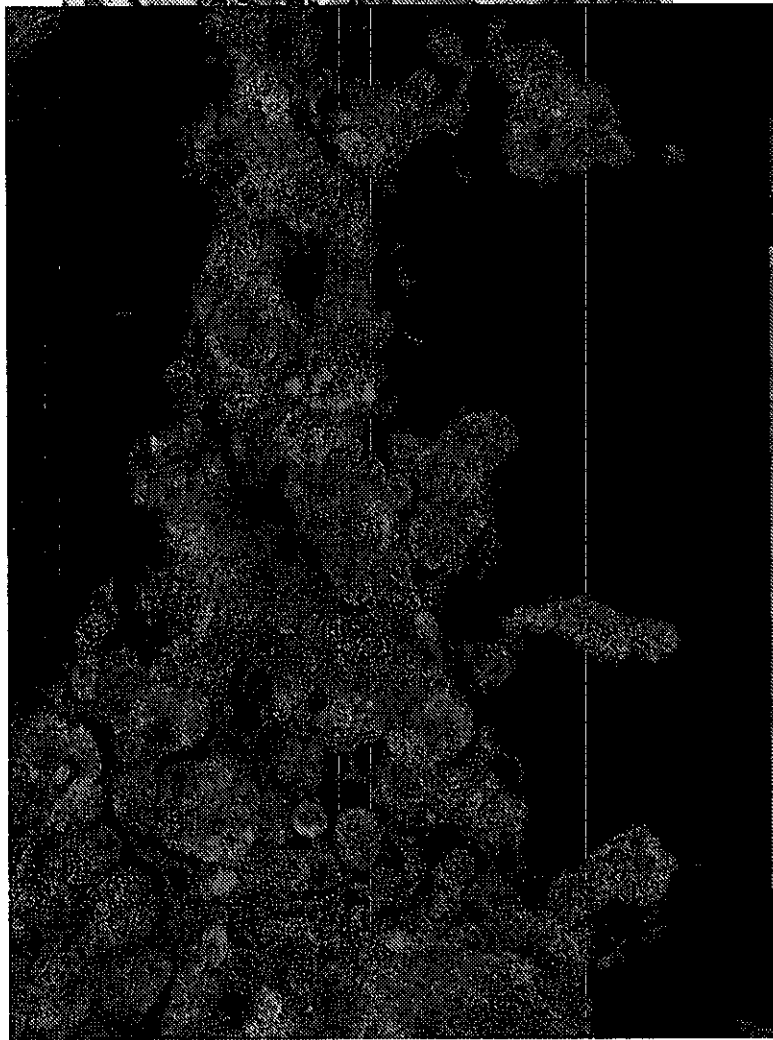


图3：レーザー走査型共焦点顕微鏡（LCM）



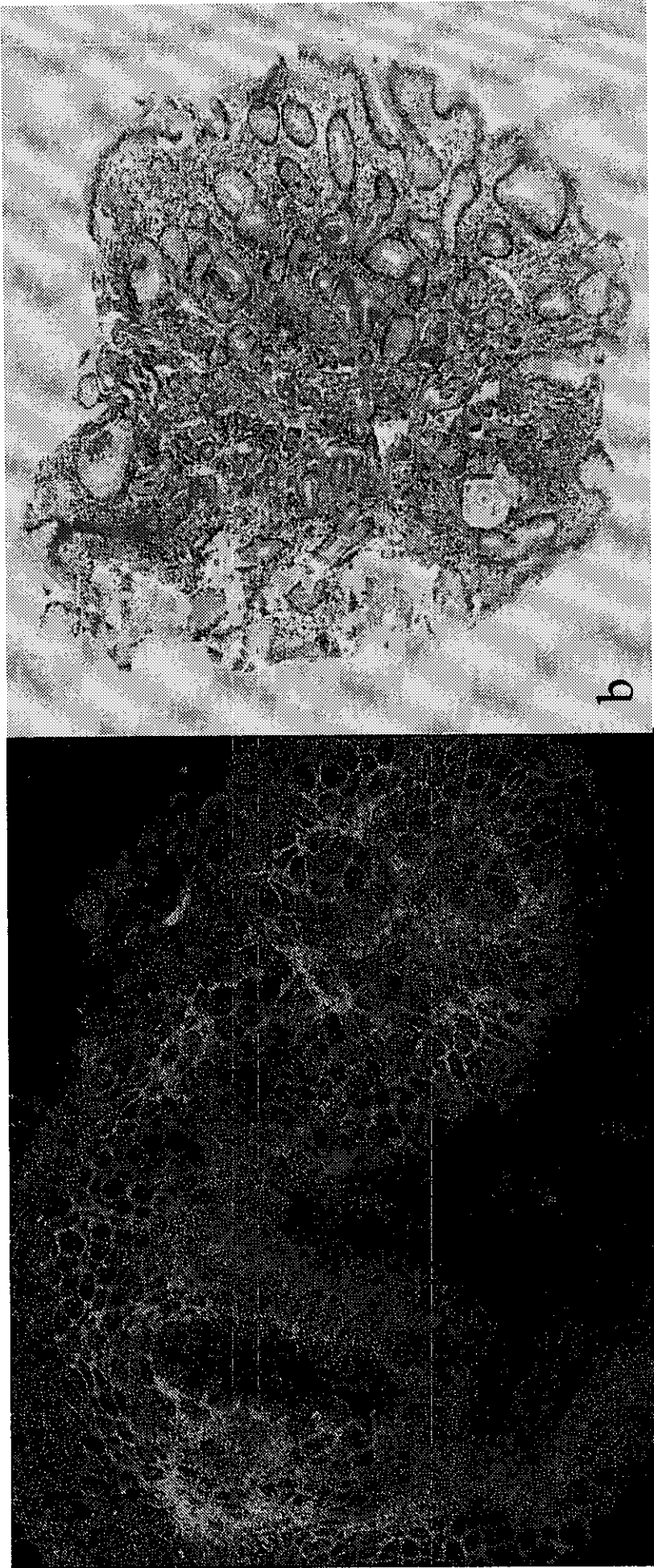
a. 仮想病理像



b. HE染色像

c. 仮想病理像は、スライスチーズの断面に類似する。

図4 癌の所見

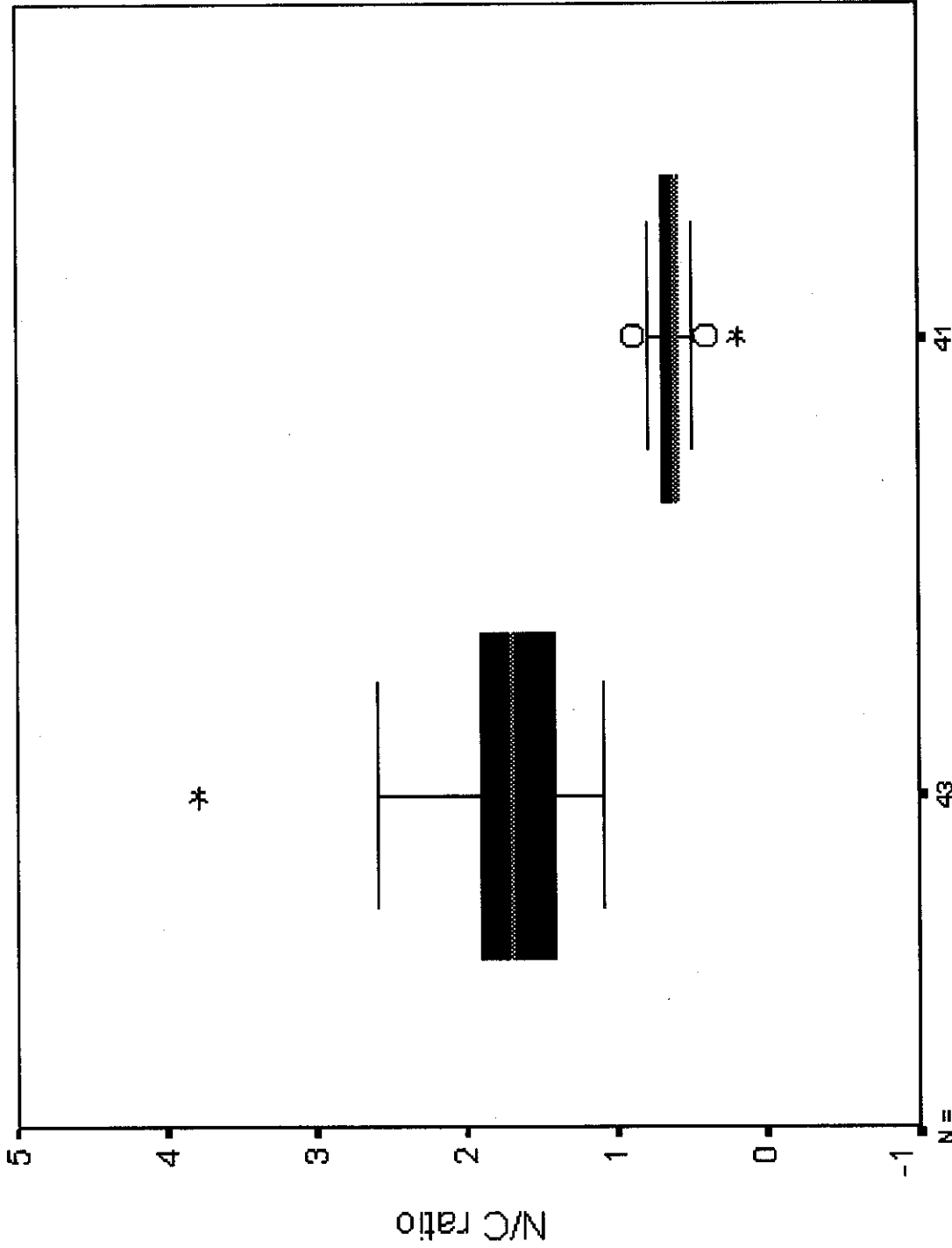


a . 胃底腺ポリープの仮想病理像。細胞膜が境界明瞭に描出され、ハニカム状である。

b . HE染色像

図5 非癌の所見

細胞核(Nucleus)と細胞質(Cytoplasm)の反射輝度の比



正常食道細胞 食道癌細胞

図6 細胞核と細胞質の輝度の逆転現象

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