

20030624

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

エント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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 工藤 進英

平成16(2004)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	-----	14
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

エント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ト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、*in vivo*でヒトの消化管粘膜を観察し、食道においては細胞膜と核を胃においては腺管を明瞭に観察することかてきた。また、LCMによる内視鏡検査時の生検材料の仮想病理像から鑑別診断を行なった場合の正診率について検討した。

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か急増しており、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、完治する可能性か高い。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かあり、多くの時間と労力、コストかかかっている。

(2)研究の目的と期待される成果

エント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か即座に可能になり、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かてきる。したかつて、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、生検をすると多少なから出血かあり、癌の一

部を生検により生体内でかじり取る行為か妥当かとうかの懸念がある。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か可能になれば、検査・診断の低侵襲化と患者にとっての安全性向上か期待できる。

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かされている。エント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かできる。

③診断能力の飛躍的向上

内視鏡検査中にエント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か内視鏡検査中に得られる。したかつて、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かでき、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800億円の費用か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

思われるか念のために生検するものか半分以上含まれているという報告かある。エント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か可能になれば、多くの時間と労力と費用を削減できる可能性かある。

⑤診断の定量化・客観化

LCMを用いた検討により、健常部では核か高輝度、細胞質か低輝度で描出されるのに対して、癌では核か低輝度、細胞質か高輝度で描出される現象か確認されている。この輝度の逆転現象を定量化することかできれば、癌、非癌を客観的に診断できる可能性かある。

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ト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か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染色像か良く対応すること、LCM画像の対比により正常組織と癌組織の判別か典型例では可能であることか明らかになった。

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、さらに診断字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のエントマイクロSCOPE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。平成14年度には、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。

2) 今年度(平成15年度)の研究経過

今年度は、改良したカテーテル型プローブを製作し、前年度よりも高画質なin vivoでの消化管(食道 胃)の細胞レベルの画像を取得した。

また、LCMによる内視鏡検査時の生検材料の仮想病理像から鑑別診断を行なった場合の正診率について検討した。

(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ホランティアの消化管を観察した。

また、全例インフォームトコンセントを得た手術 生検材料を使用した。

C 研究結果

①in vivo観察時の生体の動きの影響を低減するために、プローブ先端に取り付ける透明なソフトキャップを製作して用いた。

②プローブ先端の光学系をレンズからの不要な反射光を受けにくいZ型の光路とし、画像のS/Nを上げた。

以上により、これまでよりも高画質な *in vivo* での消化管の画像、食道においては細胞膜と核を胃においては腺管を明瞭に観察することかできた。

また、LCMによる仮想病理像における特徴的な所見、すなわち、癌においてはスイスチーズ状、またはトーナツ状、非癌においてはハニカム状、また、正常細胞と癌細胞で輝度の逆転現象などをもとに、内視鏡的に胃粘膜生検か施行された癌を含む標本97検体を対象として鑑別診断を行なった。その結果、感度79%、特異度82%の癌/非癌部の鑑別か行えた。

D 考察

カテーテル型プローブのフレームレートの向上とソフトキャンプの使用により、生体の動きの影響か受けにくくなり画像の流れか無くなった。また、光学系の改良によるS/Nの向上によって画質そのものも向上した。一方で、粘液の有無などによって、観察部位によって最適な焦点距離か異なることか分かった。食道においては粘液か無いために焦点距離か短い方か適し、胃においては粘膜か厚く存在するため、焦点距離か長い方か適する事か分かった。

無固定、無染色の切除標本、生検標本から取得した細胞画像から、約8割の感度・特異度で鑑別診断か行えたという結果と、エントマイクロプローブによって *in vivo* での消化管を観察し、

細胞レベルの画像か得られたという結果を合わせて考えると、内視鏡検査において生検を行なわずに診断を行なえる可能性かある。

E 結論

本研究により、生体内で染色を行なわずに細胞の共焦点画像を得られる事か示された。また細胞の共焦点画像によって病態の診断を行なう事か可能である事も示された。一方で、これを臨床で実現するためには、動きのある生体に対して、短時間で容易に画像を得ることかてきるための更なる検討か必要である。

F 健康危険情報

無し

G 研究発表

1 論文発表

- (1) H Inoue et al, "Development of Virtual Histology and Virtual Biopsy Using Laser-scanning Confocal Microscopy", *Scand J Gastroenterol* 2003, Suppl 237, p 37-39, 2003
- (2) M Sakashita, H Inoue et al, "Virtual Histology of Colorectal Lesions Using Laser-Scanning Confocal Microscopy", *Endoscopy* 2003, vol 35, p1-6

(3) 消化器病セミナー,92, p 209-217

「仮想生検, 上部消化管」2003年9月

2 学会発表

(1)第65回日本消化器内視鏡学会総会

「The mechanism of inverted phenomenon on laser reflectance index in esophageal cancer」

2003年5月29日

(2) 第65回日本消化器内視鏡学会総会

「内視鏡の新鮮胃粘膜生検標本における仮想病理 (Virtual Histology) — 共焦点レーザ顕微鏡による癌・非癌の鑑別」2003年5月30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

エント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 「エント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かてきる」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かある。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 4 mm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、食道においては細胞膜と核を胃においては腺管を明瞭に観察することかてきた。

A 研究目的

エント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ト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か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染色像か良く対応すること、LCM画像の対比により正常組織と癌組織の判別か典型例ては可能であることか明らかになった。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画像ても、健常部ては核か高輝度、細胞質か低輝度て描出されるのに対して、癌ては核か

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。

ついで、オリンパスと共同で、外径3-4mmのエント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か明らかになった。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か、生体に使用可能な外径5-2mmの「1.5cm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。平成14年度には、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。しかしながら生体が動く事による像の流れなどの課題も明確になった。

2)今年度(平成15年度)の研究経過

今年度は、改良したカテーテル型プロ

ーブ(図1、図2)を製作し、前年度よりも高画質なin vivoでの消化管(食道・胃)の細胞レベルの画像を取得した(図3、図4)。

(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

改良したカテーテル型プローブ(図1、2)を製作した。本プローブは、前年度よりも観察深度向上(100 μ m以上)、高フレームレート化(20フレーム/秒)、広範囲化(170 μ m \times 90 μ m)が図られた。

in vivo観察時の生体の動きの影響を低減するために、プローブ先端に取り付ける透明なソフトキャップを製作して用いた(図5)。

拍動等に影響を受けるin vivoでの消化管(食道・胃)の細胞レベルの画像を比較的容易に取得できた。(図3、図4)

D 考察

カテーテル型プローブのフレームレートの向上とソフトキャップの使用により、生体の動きの影響が受けにくくなり画像の流れが無くなった。また、光学系の改良によるS/Nの向上によって画質そのものも向上した。一方で、

粘液の有無などによって、観察部位によって最適な焦点距離が異なることが分かった。食道においては粘液が無いために焦点距離が短い方が適し、胃においては粘膜が厚く存在するため、焦点距離が長い方が適する事が分かった。

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、エントマイクロスコ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。

今後は、臨床場面を考慮しニースの高い用途に絞り込んだ詳細スペックの最適化を検討していきたい。

F 健康危険情報

無し

G 研究発表

1 論文発表

(1) H Inoue et al, "Development of Virtual Histology and Virtual Biopsy Using Laser-scanning Confocal Microscopy", Scand J Gastroenterol 2003, Suppl 237, p 37-39, 2003

(2) 消化器病セミナー, 92, p 209-217
「仮想生検, 上部消化管」2003年9月

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

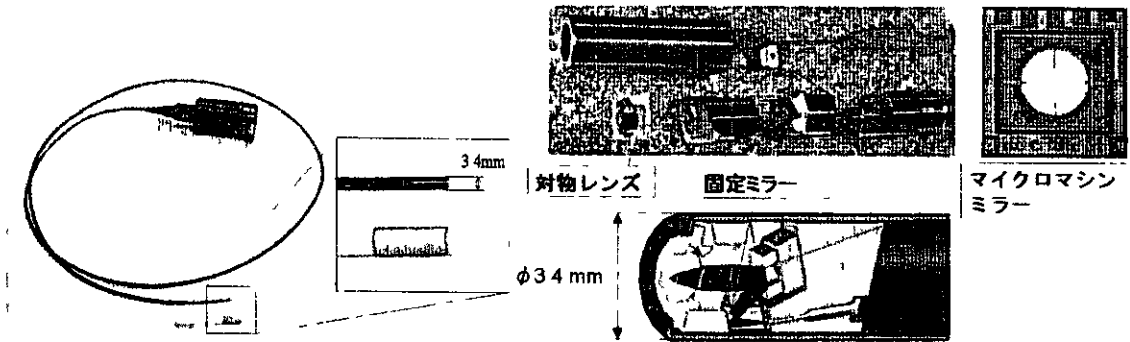


図1 改良したカテーテル型プローブ 図2 改良したカテーテル型プローブの構造

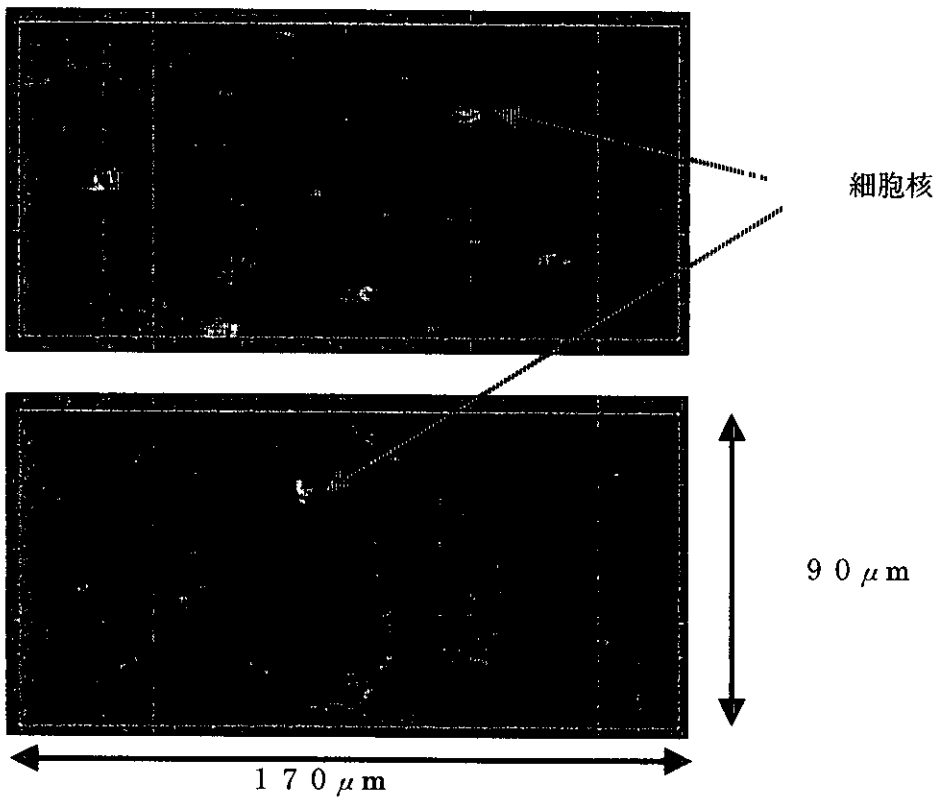


図3 正常ヒトの食道 in vivo 画像 (食道扁平上皮細胞)

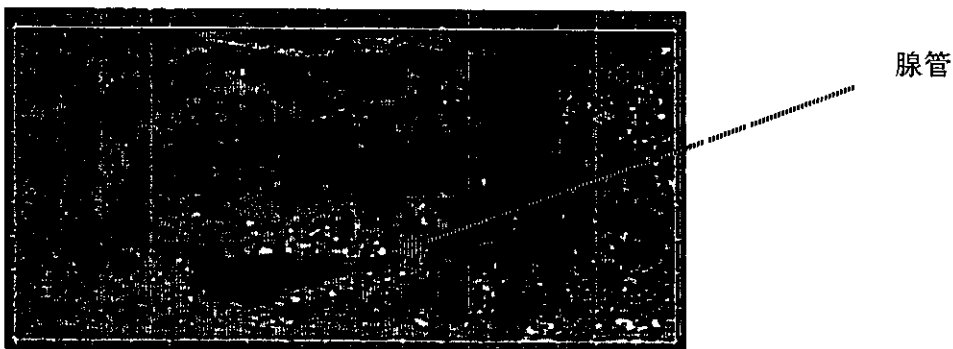


図4 正常ヒトの胃 in vivo 画像 (胃腺管)

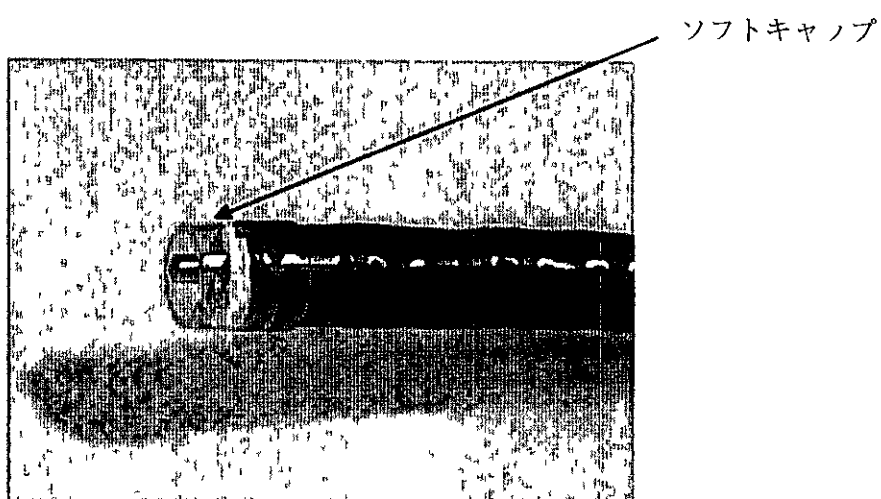


図5 内視鏡先端に取り付けたソフトキャノプ

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

エント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 「エント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かてきる」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かある。レーザー走査型共焦点顕微鏡（以下LCMと略す）による内視鏡検査時の生検材料の仮想病理像から鑑別診断を行なった場合の正診率について検討した。

A 研究目的

エント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ト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か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か典型例では可能であることか明らかになった。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、健常部では核か高輝度、細胞質か低輝度で描出されるのに対して、癌では核か低輝度、細胞質か高輝度と輝度の逆転現象か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かてきれば、癌、非癌を客観的に診断てきる可能性かある。つづいて、オリンパスと共同で、外径

3 4 mmのエント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してきた。平成14年度には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。

(2) 今年度(平成15年度)の研究経過

今年度は、LCMによる内視鏡検査時の生検材料の仮想病理像から鑑別診断を行なった場合の正診率について検討した。

(倫理面への配慮)

本院の倫理規定にのっとり、全例インフォームト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による仮想病理像における特徴的な所見、すなわち、癌においてはスライス状、またはトーナツ状、非癌においてはハニカム状、また、正常細胞と癌細胞で輝度の逆転現象などをもとに、内視鏡的に胃粘膜生検が施行された癌を含む標本97検体を対象として鑑別診断を行なった。その結果、感度79%、特異度82%の癌/非癌部の鑑別が行えた。

D 考察

無固定、無染色の切除標本、生検標本から取得した細胞画像から、約8割の感度・特異度で鑑別診断が行えたという結果と、エントマイクロプローブによってin vivoでの消化管を観察し、細胞レベルの画像が得られたという結果を合わせて考えると、内視鏡検査において生検を行わずに診断を行なえる可能性がある。

E 結論

本研究により、染色を行わずに、細胞の共焦点画像から病態の診断を行なう事が可能である事が示された。

F 健康危険情報

無し

G 研究発表

1 論文発表

M Sakashita, H Inoue et al, "Virtual Histology of Colorectal Lesions Using Laser-Scanning Confocal Microscopy", Endoscopy 2003, vol 35, p1-6

2 学会発表

(1) 第 65 回日本消化器内視鏡学会総会

「 The mechanism of inverted phenomenon on laser reflectance index in esophageal cancer」

2003 年 5 月 29 日

(2) 第 65 回日本消化器内視鏡学会総会

「内視鏡の新鮮胃粘膜生検標本における仮想病理 (Virtual Histology) —共焦点レーザー顕微鏡による癌・非癌の鑑別」2003

年 5 月 30 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

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