

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

分担研究報告書

電子工学的技術を応用した治療技術の開発及び評価に関する研究

分担研究者 小林 寿光 国立がんセンターがん予防・検診研究センター 室長

研究要旨

治療技術や機器装置を支援開発することで、これまでに開発された、また開発中の技術や機器装置を、新たな総合治療システムとして構築できるよう研究する。その中心を医師の技術と侵襲に限界のある局所治療として、具体的には微細内視鏡を使用した低侵襲で正確な治療技術の開発支援とする。対象疾患は局所治療が有効で予後が悪いと共に、開発された治療技術が他疾患の特に超早期かつ微小ながんにも応用できることを期待して、脳の再発神経膠芽腫とした。微細内視鏡治療機器装置の支援となる技術として、今年度は3次元脳腫瘍モデルの構築を進めた。また超音波とマイクロバブルの併用では、腫瘍移植モデルを使用して抗腫瘍効果を確認した。また薬剤含有シートを作製して、その効果を確認した。今後、これらの要素開発を進め、統合して新たな総合治療システムを構築していく。

A. 研究目的

医療手技の開発において医師の関与は必須であり、医療手技を行うために使用される各種医療機器の開発においても同様である。一般にこれら要素技術の開発では、開発者と臨床における使用者の間には距離があり、医療に応用可能と推定できても、実際に医療に利用されない多くの要素技術開発が埋もれている可能性がある。

そこでがん医療のために利用可能なこれまでに行われた、また行われている技術開発を基に、実際に臨床応用の可能な医療技術とするために必要な構想を構築し、要素技術を纏めると共に、その隙間を埋めるため、また統合するために必要な概念や技術、支援機器装置の開発を行っていくことが必要である。これには研究開発の垣根を越えると共に、必

要に応じて垣根を越えてそれぞれの研究開発にフィードバックを加えることも必要である。

ところで一般的にがん治療の局所治療として標準的である外科手術も、その成果が医師の技術に依存することと、外科手技であるために必然的に侵襲が大きいことが問題である。特に昨今の病変の超早期発見に基づく微小がんの治療では、低侵襲で効果的、正確で安全な局所治療技術の開発が重要な課題であると考えられる。

外科療法は本来の病変に対する切除などの処置と、そこに至るまでの経路の手術的作製から構成されるが、治療を考えた場合には後者は本来必要のないものである。これを省略して、本来の外科切除を低侵襲かつ正確にすることができれば、より良い手術的治療の

開発が期待できる。

そこでこれまで微細内視鏡を使用した局所治療概念を基に、実際に治療技術とするために必要な、治療効果評価用3次元脳腫瘍モデルの構築や、局所で実際に治療を担う薬剤や技術の開発を行う。これらを開発により、低侵襲で正確な治療技術の完成を支援することを目標とする。

B. 研究方法

治療効果を基礎的に検証するためには腫瘍モデルが必要であるが、今回腫瘍として選択している脳腫瘍の3次元モデルの構築は、単純に腫瘍細胞を培養しても立体的な脳腫瘍とはならないことが問題である。そこで scaffold を使用して腫瘍細胞を培養し、3次元化を図る。この基質には2種が考えられ、1つ(タイプIデバイス)は中性化I型乾燥コラーゲンで、もう1つ(タイプIIデバイス)は組織吸収性ゼラチンである。

前者は親水性で細胞の接着は容易であるが、コラーゲンを使用しているので高価であり、また作製に手間がかかる。後者は細胞の増殖性はよいが、培養初期の接着性はタイプIに劣る。

今年度は昨年度に引き続き、超音波による音響局所療法の評価をタイプIIデバイスで行ったため、タイプIIデバイスでのモデル構築を中心に行った。

局所への超音波照射は薬剤の浸透促進等に期待されるが、単独でも殺細胞効果を発揮できると期待される。また正常細胞への影響の確認、評価も重要である。そこで昨年度に引き続き、今年度も実験、検討を行う。

特に今年度はこれまでの実験で確認された、ガラクトース・パルミチンサン混合液

(30mg/ml)、超音波強度 2.61W/cm² の連続波 20 秒照射の条件で、RT2 脳腫瘍細胞の皮下移植モデルを用いて治療効果を評価した。なお照射は、腫瘍細胞の皮下移植 4 日後、腫瘍が結節を形成したのを確認した後に、連日治療を 3 回行った。同様に定位脳手術装置を使用して、RT2 脳腫瘍細胞を右大脳尾状核に接種後、翌日より同様に治療を 3 回行った。

また局所治療法として、化学療法剤を含有した除法性ポリマーシートを使用した除法剤を開発した。これは、PLGA (poly-L-lactic-co-glycolic acid) とドキシソルピシンを、50:50(モル比)でポリメライズして作製した。その後このシートの特性、効果等を確認した。

(倫理面への配慮)

臨床試験を行う場合には臨床試験計画を作成し、倫理審査委員会の許諾をもって行う。動物実験を行う場合にも実験施設の倫理規定に基づいて行い、実験計画を吟味して精度の高い実験を行うことで必要最小限の実験にとどめ、動物の生命を尊重し、かつ科学的な実験を心がける。

C. 研究結果

KNS42 細胞をタイプIIデバイスで培養すると細胞同士が接着・増殖し、スフェロイドを形成する。図1は培養3日目の走査型電子顕微鏡像だが、4個以上の腫瘍細胞が塊状に集合して増殖していることが判る。この細胞は scaffold との接着が不良という訳ではなく、ここでは提示されていないが透過型電子顕微鏡などでゼラチンマトリックスとも密に接着する。しかし細胞同士の接着がより tight なため三次元培養でこのような形をとりながら増殖するものと思われた。

一方図2のように、U118MG細胞は塊状に増殖する像はほとんど認められず、数多くのフィラメントで細胞同士は接触するものの、細胞自体は離れて個別に scaffold と接着することが判った。この差が何から由来するのかについてはまだ不明だが、三次元培養では各腫瘍の性格がより際立って観察された。

超音波の局所照射による治療に関して、RT2 脳腫瘍細胞の皮下移植モデルを使用した実験では(図3)、超音波単独でも腫瘍の増殖抑制が確認された。また *in vitro* のデータと同様、レボピストの併用により効果がさらに増強されることが示された。なお超音波、レボピスト両方で治療したラットに関しては6匹のうち2匹では腫瘍は完全に消失し、治療後6ヶ月を経過した後も再発なくラットは生存していた。

頭蓋内接種モデルの実験で、対照群、レボピスト単独投与群で全てのラットは15日以内に死亡したが、超音波照射群では生存日数が延長し、レボピスト併用群でさらに有意な生存の延長が認められた。

ドキソルビシン含有シートは柔らかく弾性に富み、 1cm^2 に 1mg のドキソルビシンを含有する。シートはドキソルビシンの結晶と思われる小さな粒子を含む構造をとっていることが分かる(図5はシート表面の走査型顕微鏡像)。

このシートの特性を調べるため、ドキソルビシンの吸光度を測定した(図6)。右上の図がドキソルビシン吸光度曲線の結果であり、 232nm および 480nm の波長のところでピークが認められた。 232nm よりも 480nm の方が定量性に優れていたため最終的にドキソルビシンの定量は 480nm で行うこととし、次にリン酸緩衝液中へポリマーシートから放

出されたドキソルビシンの量を測定した。左図が作成したシートからの放出曲線で、右下が同様のシートにドキソルビシンが3倍多く含まれているシートからのものである。右下の図のように薬剤の量を多くすると放出は急激に始まってピークに達してしまうため左図のような徐放性が保たれないことが判明した。また皮下に埋め込まれたシートは、80日程度で殆ど分解されることが確認された。

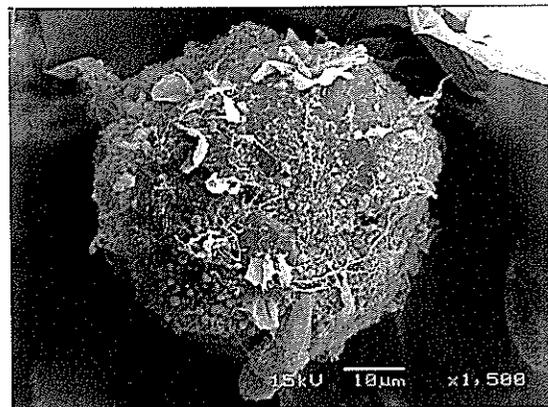


図1 KNS42細胞のスフェロイド形成

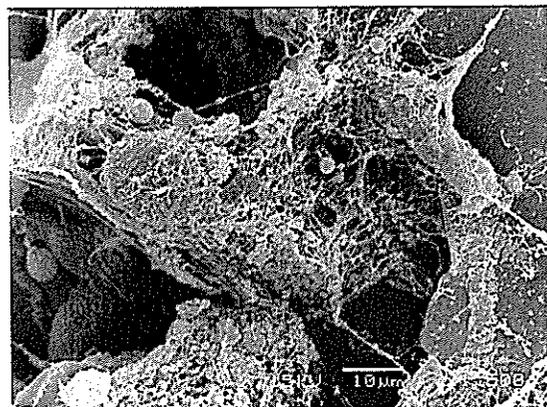


図2 U118MG細胞の増殖

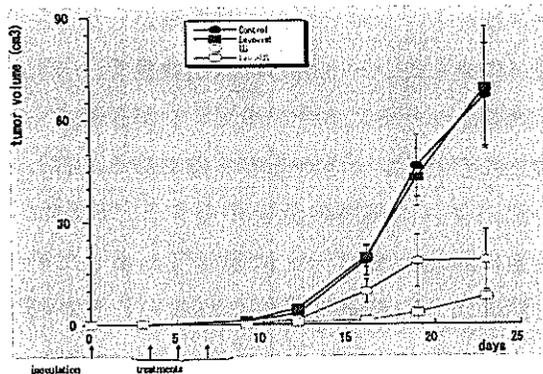


図3 超音波の治療効果(皮下)

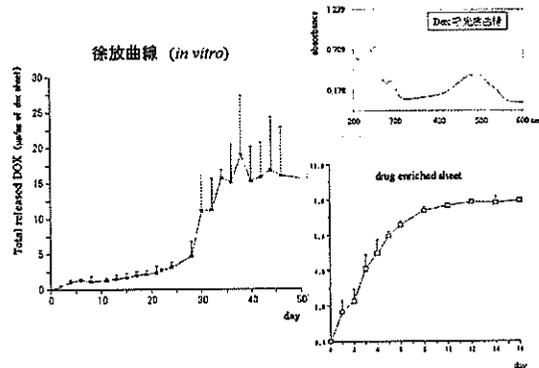


図6 ドキソルビシン徐放曲線

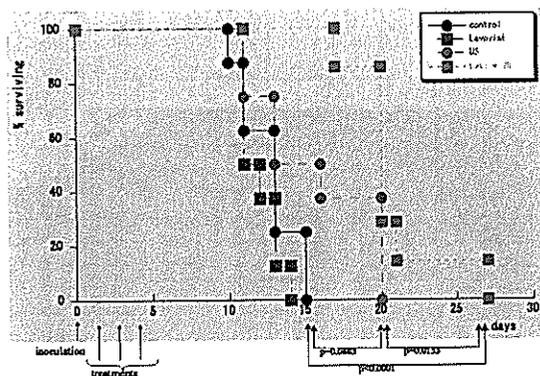


図4 超音波の治療効果(脳)

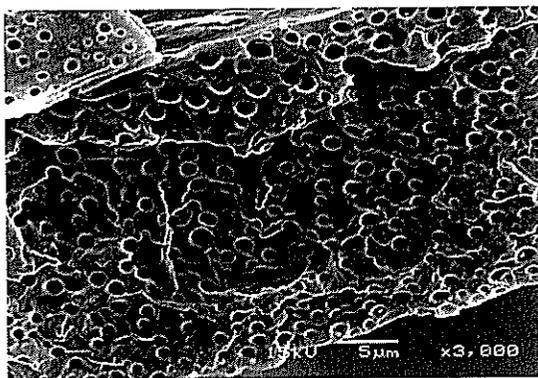


図5 ドキソルビシン含有シート

D. 考察

3次元脳腫瘍モデルは種々の問題から、さらなる大型化は難しい。しかし概念を変えて実験系を構築することで、同等の効果確認が可能であると考えられる。またこれまでの実験の結果、治療効果が確認できるサイズまでの3次元化が図られた。

これまでに確認されたように、治療用超音波照射の正常細胞に対する影響は重要な問題であり、照射対象臓器との問題を含めて適正化が必要であると考えられる。また今後、治療用より低出力超音波による、投与薬剤と合わせた治療補助等に関する研究も考えていく。

抗腫瘍薬剤含有シートは微細内視鏡や鉗子で局所に植え込めば、単なる薬剤の局所投与と異なり局所で長期にわたって薬理作用を発揮すると共に、吸収されることで回収するなどの必要がない。現在まだ開始したばかりであるが、今後各種薬剤を試みるなど、発展的かつ積極的に開発していく予定である。

E. 結論

3次元脳腫瘍モデルの構築において、基本となるモデルを構築し、その形態を確認した。

また脳腫瘍細胞に対する超音波とマイクロバブルの抗腫瘍効果を確認した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. Manome, Y., Kobayashi, T., et al.,
Local delivery of doxorubicin for
malignant glioma by a biodegradable
PLGA polymer sheet. Anticancer Res.,
26: 3317-3326, 2006.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

厚生労働科学研究費補助金(第3次対がん総合戦略研究事業)
(分担)研究報告書

Precision-guided surgery (PGS:精密誘導手術) を誘導する技術の開発

(分担)研究者 伊関 洋
東京女子医科大学 先端生命医科学研究所

研究要旨 Quality of Therapy (QOT)を極限まで高め、術前の精緻なプランニングに基づき、術中情報を(リアルタイムに)反映しながら実行する正確・安全な手術を誘導する技術開発を目的とし、今年度はナビゲーションシステムと手術戦略デスクを中心に研究開発を行った。具体的には1)術中拡散強調画像ナビゲーションシステムの評価、2)化学的ナビゲーションの信頼性評価、3)術中情報統合・提示・管理に関する研究開発、4)新しいカメラを用いたナビゲーションシステムの基礎検討を行った。

A. 研究目的

2000年3月に本学に開設したインテリジェント手術室(OpenMRI手術室)では現在までの200例を越す臨床経験と、それに伴って来た術中情報可視化・統合技術により、悪性脳腫瘍手術において平均摘出率及び全摘率の向上という顕著な臨床的知見を得ることが出来た。また、精緻な腫瘍情報の可視化の成功に伴い、その情報に見合う精緻な手術手技の確立が新たに必要不可欠となった。

精緻な医療情報を元に精緻な治療を行う精密誘導手術(Precision-guided Surgery)を脳腫瘍摘出手術において実現する新たな手術システムを開発するに当たり、我々は以下の点に着目した。

1) 術中拡散強調画像ナビゲーションシステムの開発

fMRI・術中皮質電極刺激による機能領域の同定のみならず、そこから大脳・体幹へつながる神経線維のネットワークの可視化が必要である。

2) 化学的ナビゲーションの発光強度・探査システムの改良

5-アミノレブリン酸(5ALA)などを用いての光線力学的腫瘍同定法を発展し、精緻なナビゲーションを行うシステムが不可欠である。

3) 術中情報統合・表示・管理に関する研究開発

手術情報の共有に基づく手術の円滑な進行、手術室内の人員の最適配置、チーム医療サポート体制の確立を支援する情報統合管理システムの開発が必要である。

4) 新しいマーカ・カメラを用いたナビゲーションシステム

現在のナビゲーションシステムに存在する、

認識領域の狭さ、死角、精度の問題を解決することが必要である。

本事業においてはこれらの要素技術検討を通じ、新たな脳腫瘍摘出手術システム開発に必要な技術基盤の確立を目指している。昨年度の研究では、1)術中MRIによる拡散強調画像を利用した椎体路ナビゲーションの改良と評価、2)5ALA腫瘍蛍光計測の腫瘍細胞同定能評価、3)手術パスのWebベース術中提示・管理・分析システムの基礎構築、4)ナビゲーションシステム用位置計測装置の見直しと3DCADを用いた設置シミュレーションシステムの試作を行った。本年度はこれらの要素技術試作・検討をベースに、要素技術基盤確立に向けた更なる技術向上を目指した。

B. 研究方法

目的にあげた4要素に対し、本年度は具体的に以下の方法で研究を行った。

1) 術中拡散強調画像ナビゲーションシステムの評価

錐体路に近接する脳腫瘍摘出術では、運動機能を如何に保護するかが重要な問題である。運動機能の局在を確認するためには、脳表から電気刺激し四肢で筋電図を計測する運動誘発電位(MEP)等が行われる。しかし、この方法は運動神経線維が保存されているかどうかの指標になるが、手術操作している場所から神経線維までの距離や位置関係に関しての情報を与えない。一方、術前にMRIにより神経線維束を描出する拡散テンソル画像は手術計画に有用であるが、術中に参照するには手術操作に伴うブレインシフトのため限界がある。本研究では、脳腫瘍摘出術において運動神経線維の意図し

ない損傷を防ぐため、錐体路を含む神経線維束を術中に画像化しブレインシフトに対応した正確な位置情報を示すことをめざした。

本年度の研究では、これまでに得られた拡散強調画像ナビゲーションの結果を元に、信頼性の評価を行った。

頭部固定フレーム一体型DWI撮像コイル支錐体路近傍に脳腫瘍を有する患者で、2004年2月～2005年11月に摘出術が適用になった28人の患者（男性11人、女性17人、18～68歳、 39.1 ± 12.3 歳）を対象として、術中拡散強調画像誘導手術を行った。患者から書面によるインフォームドコンセントを得た。手術は、0.3T垂直磁場方式MRI（AIRIS® II, 日立メディコ）を設置した手術室で行った。固定具とMR受信コイルには、ガラス繊維強化樹脂製の頭部固定具と一体化した受信コイルを瑞穂医科工業と共同開発し、使用した。MR撮影は、開頭後の腫瘍摘出前と摘出後（及びさらに摘出を行った場合はその後）に行った。錐体路描出のため、拡散強調イメージングを行った（DW-EPIシーケンス、 $b:700 \text{ mm}^2/\text{s}^2$, MPG方向:A-P, 脈波同期、冠状断面）（ $n = 50$ 回）。また、解剖学的な情報を得るため、T1強調イメージングを併せて行なった（横断面、10症例では冠状断面を追加）。得られたMR画像上に、位置計測装置で計測した術具の位置を表示し、手術ナビゲーションを行った（ $n = 24$ 症例、拡散強調画像ナビゲーション導入前の4症例は除く）。手術操作が錐体路近傍まで達した場合は、皮質下電気刺激を行い、運動誘発電位を測定した。本手法の有用性を評価するため、以下の評価を行った。（1）錐体路描出の可否。

（2）拡散強調画像の歪みを評価するため、解剖学的な位置の距離を測定し、同じ冠状断面のT1強調画像の場合と比較した（ $n = 10$ 症例）。

（3）錐体路の描出能を評価するため、コントラスト比を測定した（（1）の症例の摘出前後 $n = 17$ 回の撮影、但し撮影条件を変更した3回は除く）。（4）術中に生じる錐体路のシフトを評価するため、腫瘍摘出前後の画像で錐体路の位置を計測し、シフト量を算出した（摘出前後共に撮影を行った $n = 17$ 症例）。（5）拡散強調画像に描出された神経束の妥当性を評価するため、皮質下電気刺激を行った位置と画像上の神経束の距離を算出しマッピングの結果と照合した（ $n = 6$ 症例）。

2) 化学的ナビゲーションの発光強度・探索システムの信頼性評価

5-ALAを用いた腫瘍の蛍光同定法は、蛍光に

より腫瘍細胞領域を肉眼で直感的に観察可能である。しかし一方で励起光や他の波長の光を排除し蛍光のみを観察するためのフィルタの使用において、フィルタ取り付け作業の煩雑化、フィルタによる視野の色合い変化の問題がある。また、肉眼によるセンシングは蛍光の光量が十分でないとき腫瘍細胞同定の感受性・分解能が低い結果となる（実際は腫瘍細胞が存在し蛍光を発しているが肉眼では確認できない）。また、蛍光波長に近い外乱光が存在すると計測の信頼性が損なわれてしまう。

そこで本研究事業では、効率的な紫外線励起と正確な蛍光測定による精緻な腫瘍同定を実現するために、635nmの蛍光励起光をスペクトログラムで確認する計測系を構築し、摘出標本およびInvivo実験により腫瘍からの蛍光の波長及び強度をスペクトログラムで評価する系を開発した。今年度は本システムを用いた5ALA術中蛍光診断法の信頼性評価を継続して行った。

3) 術中情報統合・提示・管理に関する研究開発
術中MRIによる解剖学的画像情報、PET、5-ALA、術中拡散強調画像を統合表示し、術者に正確に機能領域・正常組織・腫瘍領域を提示するための術中画像統合・表示技術についての研究開発を行ってきた。今年度はそのプロトタイプとしてリモート戦略拠点より、手術室内機器（MRI、PC、ナビゲーションシステムなど）の情報のモニタリングと操作を可能にするリモート手術支援システムを昨年度試作した。

本年度は、手術室内に設置した18台のCCDカメラより得られた術中撮影動画の情報圧縮率の変化から、手術工程の時間フェーズの推測が可能であるかどうか検討を行い、手術操作の系統的作業分類との統合の可能性を検討した。

4) 新しいカメラを用いたナビゲーションシステム

狭く限られた術空間において適切な位置に機器を配置し円滑に手術を遂行することは、精密誘導技術の確立と安全性の担保において非常に重要である。手術機器が執刀医に適した配置ならば、手術のパフォーマンスを高水準に高めることが容易になる。逆に不便な配置ならば、機器のパフォーマンスを十分に生かすことができないことはもちろん、常に機器に対する配慮を必要とされるため執刀医自身のパフォーマンスをも低下させることが考えられる。しかしながら、現在手術中にどこの位置にどの機器

を配置すればよいかについては術者の経験によるところが大きく、配置最適化の手法についての検討はされていない。

我々は手術機器の最適位置を定量的に求めるために3D-CADを用いて手術現場における器具の配置をシミュレートする方法を研究している。本年度はナビゲーションシステムにおける光学式位置計測カメラの最適配置検討を通じた、ナビゲーションシステム構築について研究を行った。

手術ナビゲーション運用におけるひとつの大きな問題は、位置計測装置の配置が不適切なために、本装置の位置計測可能範囲と計測対象の運動空間(ここでは術具の移動範囲)が一致せず計測脱落を起こしたり、位置計測方向が不適切なために術具角度によって計測脱落が頻発したりするという、測定系の問題である。この問題を解決するためには、

1. 手術空間を確実に捉え、かつ術者や機器の干渉の少ない場所に測定装置を設置する
2. 機器・人員の配置といった周辺環境に応じ測定装置の設置位置・角度を定量的に提示する

ことが必要である。

今年度本研究では、3次元CADソフトを使用し、ナビゲーションのカメラ配置と頭部の術野、術者・医療スタッフ間の関係をシミュレーションし、最適配置位置と遮蔽エリアなどを計測した。

3D-CADを用いて東京女子医科大学インテリジェント手術室(術中MRI導入手術室)を仮想空間上にモデリングし、自由な利き・スタッフの配置と、Polarisの計測範囲を視覚的な表現を可能にした(図1)。

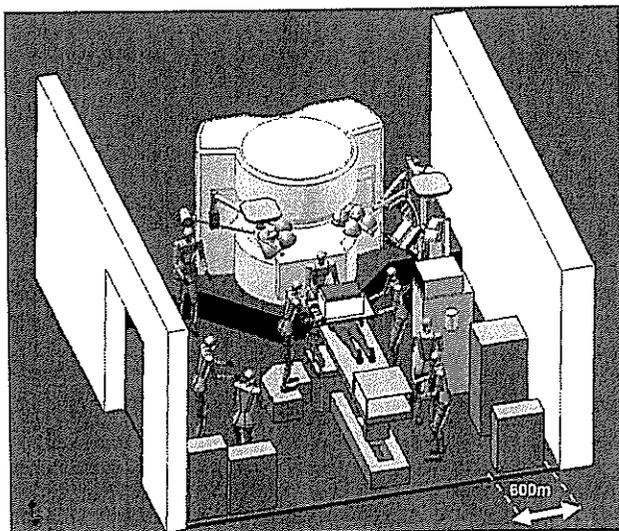


Fig. 1 OpenMRI手術室内機器・人員の3Dデジタルデータ化

この仮想手術室上において、Polarisの最適な配置法として、術具マーカの認識率を最高に

する配置法を定義した。本来の手術においては、マーカ認識の指向性や術者・手術用機材による遮蔽等の影響を考慮する必要があるが、今回はシミュレーションの簡略化のためPolarisの計測範囲が術具のマーカ部駆動範囲をすべてカバーしている場合を規定し、遮蔽に関しては手術用顕微鏡のみを考慮した。(図2)

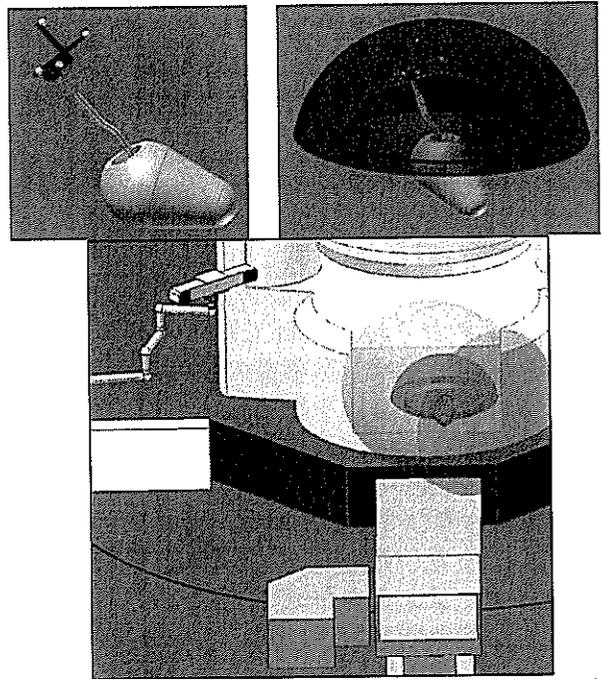


Fig. 2 計測範囲ベースのPolaris最適配置法。左上：患者頭部モデルとマーカつき術具モデル、右上：術具マーカの駆動軌跡のモデル化、下：最適配置状態。Polarisの計測範囲(黄色モデル)内に術具マーカ駆動軌跡(緑モデル)が収まっている。

この仮想手術室上でのPolaris最適配置(術具認識率を最高にする配置)シミュレーション結果を、現実の手術室環境へ反映させるための方法として、以下の方法をとった。

- (ア) Polarisを搭載したナビゲーションシステム本体の手術室座標系での位置と、Polaris固定アームの各関節角度を測定・設定可能とすることで、手術室座標系とPolaris座標系を統合する。
- (イ) 手術開始後(ナビゲーション起動前)にPolarisを用いて顕微鏡位置・患者開頭部位位置を測定し、1.を元に手術室座標系での顕微鏡・患者開頭部位を決定する。
- (ウ) シミュレータにナビゲーションシステム位置、Polaris固定アーム各関節角度、顕微鏡位置、患者開頭部位位置を入力し、Polaris最適配置シミュレーションにより最適なPolaris位置を実現するアーム各関節角度を求める。
- (エ) 実際のナビゲーションシステムのアーム角度をシミュレーション結果により調整

する。

以上のシミュレーションにより術具認識率がどの程度向上するかについて、ファントムを用いて認識率調査を行った。

(倫理面への配慮)

本例ではネットワークを介した患者情報のやり取りを行うに際し、ファイアウォールを備え院外との情報伝達を遮断した院内ネットワークを用いた。また、P2P通信ソフトウェアベースにセキュリティに十分に配慮した。また治療について患者に説明しインフォームドコンセントを得ている。この研究での個人情報厳重な管理を行い、研究結果発表の場合に特定個人が認識されないよう配慮を行う。更にこの悪性脳腫瘍に対する5ALAを用いた光線力学的診断・治療の臨床研究は本学倫理委員会の承認を得ており(2000年10月5日、248号)、承認要綱に沿った対象となる患者さんから効果と危険性も含めた十分なインフォームドコンセントを得た上で書面による承諾をいただいた。

C. 研究結果

1) 術中拡散強調画像ナビゲーションシステムの評価

拡散強調画像により26症例(93%; 47回, 94%)で錐体路を術中に描出することができた。2症例(7%; 3回, 6%)ではモーションアーチファクトのため描出できなかった。拡散強調画像の歪み(T1強調画像に対する位置ずれ)は、最大1.2mmだった。この画像を手術ナビゲーションへ適用することにより、術者は錐体路と術具の位置関係を確認しながら手術を行うことができた。錐体路のコントラスト比は、 $29.5 \pm 7.9\%$ (平均 \pm SD)だった。但し、周囲の腫瘍や浮腫の影響で神経束の描出能が低下する場合があった。腫瘍摘出前後で生じた錐体路のシフトは、最大最小が $-8 \sim 8.7\text{mm}$ 、平均 \pm SDが $+1.9 \pm 4.8\text{mm}$ (絶対値 4.4mm)だった。但し、シフト量の符号は患側の脳表に向かう方向を正とした。皮質下電気刺激を行った結果、運動誘発電位を検出した4症例では、刺激位置と錐体路の距離は $0 \sim 4.7\text{mm}$ 、平均 2.2mm だった。運動誘発電位を検出できなかった2症例では、両者の距離は 5mm と 18.7mm だった。

2) 化学的ナビゲーションの発光強度・探査システムの信頼性評価

基礎実験としてファントムおよび典型症例

組織ではともに自然蛍光灯下での発光強度減衰率は4.4%であった。測定装置の誤差として、測定焦点距離から $-3 \sim +5\text{mm}$ の範囲で最適測定強度に対し5%程度の誤差であることを確認した。対象に対する照射角度の違いでは40度の角度の相違において分解能 0.2mm 程度の誤差であった。これら実験をもとにコントロールを用いて蛍光波長域および強度の定量測定が可能であった14例のglioma症例(grade IV-4例、grade III-7例、grade II-3例)を用いて、波長帯、波長強度、病理組織、MRI像の検索を行った。初発grade IVでは 635nm をピークとするPpIXに特徴的な2峰性の蛍光が観察され安定した術中蛍光診断が可能であった。観察に用いられた13サンプルでの正診率は蛍光強度 1300a.u を閾値として強度が強い場合には92.3%、弱い場合には50.0%であった。またGrade II IIIでは強度 1300a.u 以上の組織が腫瘍である確率78.3%、強度 1300a.u 以下の組織が非腫瘍である確率46.2%である。また、これらサンプルで組織内に血液の混入が多いサンプルを除外した場合には84.0%、75.0%に改善した。

3) 術中情報統合・提示・管理に関する研究開発

映像圧縮率と手術パスとの連携を考え、マクロの手術作業フェーズである映像圧縮による手術の流れと、ミクロでの手術操作パスとの統合研究に着手した。

東京女子医科大学インテリジェント手術室での脳腫瘍摘出術において室内を撮影した動画のMpeg圧縮率の時系列的変化を図に示す。フェーズ解析として、室内のレイアウト・セットアップ変更や開・閉頭といった大きなフェーズについては現在でも十分把握が可能である。また、尿バッグの交換など看護師の動きの大きい作業についても一部自動解析が可能であるが、外乱とフェーズとの的確な分類については今後の更なる検討が必要であることがわかった。

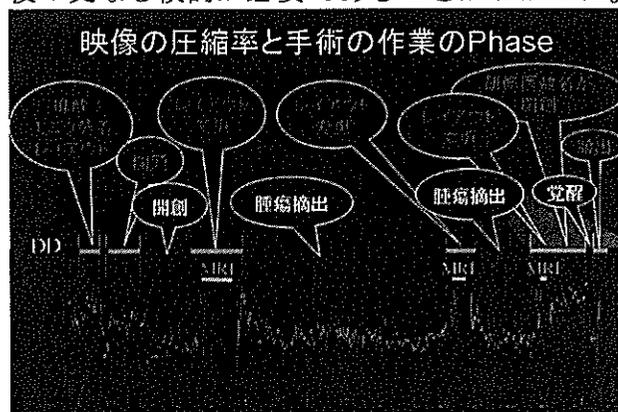


Fig. 3 映像圧縮率と手術作業フェーズの関係

4) 新しいカメラを用いたナビゲーションシステム

Polarisの最適配置シミュレーションを行う前に、現状の臨床でのPolaris認識率の調査を行った。

東京女子医科大学インテリジェント手術室での脳腫瘍摘出術3例において、

- 1) ナビゲーションシステムが性状稼動状態にあり、かつ
- 2) 術者がマーカつき術具を用いて処置を行っている

という条件を満たしている期間のPolaris認識率を測定した。ここでPolaris認識率とは

$$\frac{\text{(術具座標を正確に出力できた回数)}}{\text{(Polarisが測定を行った回数)}}$$

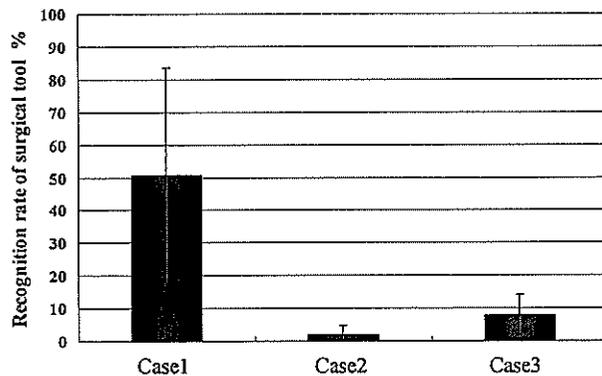
である。

結果を表に示す。どの症例でも認識率は低く、またかなりのばらつきがある。人気率の低下には、

- ① Polarisの計測範囲が術具の駆動範囲の全てを満たしていないこと
- ② 顕微鏡や執刀医における計測に関する障害
- ③ 術者の体、及び手によるPolarisの計測視野の遮蔽
- ④ 術具の姿勢の影響（反射球がPolarisで計測できない状態である）
- ⑤ 術具の反射球の劣化や手術室内における外乱の影響

など、様々なものが考えられるが、Polarisが最適に配置されていないことが一因を担っている可能性がある。

Table.1 脳腫瘍手術におけるPolaris認識率



次にインテリジェント手術室にて、患者頭部を模したファントムを用いて、シミュレーションによるPolarisの最適配置効果について検証

した。

頭部ファントムを手術ベッド上に配置し、光学式マーカを取り付けたバイポラでファントム上の5点を各1分間指し示した。この作業を3回行い、その間のPolaris認識率を求めた。この計測を、Polarisの位置姿勢を目視で設定した場合(n=4)とシミュレーション結果を元に設定した場合(n=4)の両方で行った。顕微鏡についてはファントム上の開頭部を捕らえるように配置したが、それ以外の器械台やドレープ、スタッフ等の機材・人員は配置しなかった。

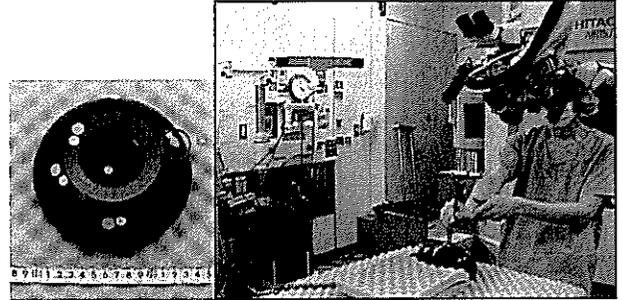
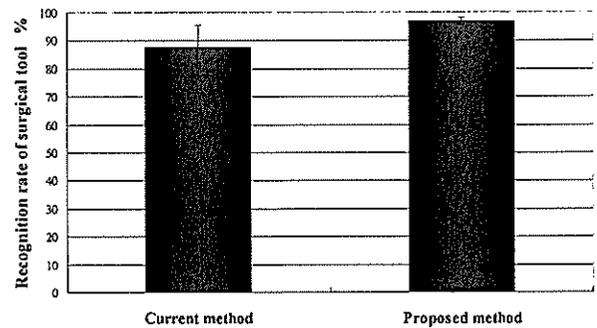


Fig.4 術具認識率計測実験。左は頭部ファントム。

結果を表に示す。目視で設定した場合の認識率87.9%(SD 7.5)に対しシミュレーション利用時は97.0%(SD 1.3)と、平均認識率およびばらつきが向上した。

Table.2 シミュレーション結果非適用例と適用例でのPolaris認識率。左：非適用(目視で設置)、右：適用例。n=4



D. 考察

術中拡散強調画像は、アーチファクトが生じた症例と描出能が低下した症例を除き、診断に十分な錐体路のコントラストが得られた。モーションアーチファクトの原因は脈波の変動と思われる、同期計測の精度向上が課題である。描出能が低下した症例では、腫瘍や浮腫の影響で拡散異方性が低下したことが原因と考えられる。拡散強調画像は、歪みが小さいので手術ナビゲーションに利用できた。術中の錐体路のシフトは、画像上平均4.4mm(絶対値)と無視できない大きさであり、術中撮影の有用性を示している。皮質下刺激の結果、術中拡散強調画像

上に描出された神経束の近傍(5mm未満)を電気刺激したときにいずれも運動誘発電位を認めており、この神経束は錐体路であると考えられる。

手術場という特殊環境における機器・人員の最適配置の検討は、安全で効率のよい高品位の手術を行ううえで非常に重要である。先端技術を駆使した手術においても高い安全性・信頼性を得る上で、本研究の重要性は高い。

今年度の研究では、最適配置による機能向上が顕著に現れる光学式位置計測装置を対象に、本仮説を実証する試みを行った。今回はファントムを用いたが、実際の臨床では今回用いた「Polaris計測範囲がマーカ駆動領域をカバーする位置」という配置方法のみではカバーできない問題が生じる。特にマーカの指向性と術者・機材による遮蔽の影響は大きいことが考えられるので、シミュレーション条件をさらに検討する必要がある。

E. 結論

術中に手術を評価・支援するためには、どこを手術しているか、術野はどのような状態であるのかを知るナビゲーションシステムや、術中の判断をリアルタイムに支援するシステムが必須である。術中診断技術の発達により、診断即治療のリアルタイム性を追求する診断と治療の融合技術の発達と共に、術中にリアルタイムの治療決断をサポートするシステムの構築が重要である。本研究で開発したシステムは、術前情報を元に構築した精緻な手術計画のもと、決断のために必要な医療情報をリアルタイムに更新し、治療行為の結果を即座に術者にフィードバックし、手術計画(目標とする治療結果・効果)を術中にリアルタイムに更新することで、時事刻々の変化に対応した、最適な解決法を提示することを可能とした。すなわち、重要な機能領域を可視化することで手術侵襲の影響を極力排除し、腫瘍と正常組織を的確に区別することで必要最小限な侵襲で腫瘍の全摘出に貢献できる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yoshiyuki Fujita, Yoshihiro Muragaki, Kyojiro Nambu, Tomokatsu Horii, Hiroshi Iseki, Three-way Bipolar Forceps: a Novel Bipolar

Coagulator System for Nerve Stimulation and Detection of Nerve Potentials, *Neurologia medico-chirurgica*, 46(4):169-175, 2006

村垣善浩、丸山隆志、中村亮一、伊関洋、久保長生、高倉公朋、堀智勝、情報誘導によるグリオーマ手術、*脳神経外科ジャーナル*、15(5):384-395、2006

村垣善浩、伊関洋、中村亮一、高倉公朋、丸山隆志、堀智勝、MRIガイド下治療の最新動向 ここまで来たオープンMRIを用いた精密誘導手術とインテリジェントオペ室、*INNERVISION*、21(9):55-58、2006

2. 学会発表

小澤紀彦、村垣善浩、鈴木浩一、中村亮一、伊関洋、2重の安全域で錐体路を保護する術中拡散強調画像誘導手術、第15回日本コンピュータ外科学会大会、東京、10月27-29日、2006、*論文集*p167-168、2006

野口雅史、青木英祐、小林英津子、大森 繁、村垣善浩、伊関洋、佐久間一郎、中村勝重、5-ALA 誘導PpIX 蛍光計測による手持ち型局所的脳腫瘍同定システム、第15回日本コンピュータ外科学会大会、東京、10月27-29日、2006、*論文集*p219-220、2006

青木英祐、野口雅史、洪 在成、小林英津子、中村亮一、丸山隆志、村垣善浩、伊関洋、佐久間一郎、脳神経外科手術における異種環境統合プラットフォームの開発と評価～第2報オクルージョン問題の回避、第15回日本コンピュータ外科学会大会、東京、10月27-29日、2006、*論文集*p223-224、2006

原 美紀子、鈴木浩一、植松美幸、安藤隼人、中村亮一、伊関洋、上杉 繁、梅津光生、複数台の光学式三次元位置計測装置を用いた手術ナビゲーションシステムの開発、第15回日本コンピュータ外科学会大会、東京、10月27-29日、2006、*論文集*p225-226、2006

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

陽子線治療における新技術の開発研究

分担研究者 国立がんセンター東病院臨床開発センター粒子線医学開発部長 荻野 尚

研究要旨 陽子線照射によって患者体内での原子核破碎反応より生成されるポジトロン放出核から放出される消滅 γ 線を測定し、リアルタイムで照射位置精度を確認するために、陽子線のビームライン上に設置した高位置分解能を持つPET装置（beam on-line PET system (BOLPs)）を開発した。

A. 研究目的

治療用の陽子線を患者へ照射した際に、照射陽子線と患者体内にある原子核との核反応によってポジトロン放出核が生成される。それを利用して、ポジトロン放出核からの消滅 γ 線をPET装置で計測することによって、ポジトロン放出核の位置・activityを算出し、腫瘍への確に放射線が照射されたかどうかを確認可能となる。本研究はリアルタイムに腫瘍の位置を確認できる陽子線ビームのライン上に（ビームオンライン）PETカメラを設置し、上記を達成できるシステムを構築することが目的である。

B. 研究方法

治療中の患者への陽子線照射後に診断用PET-CT室へ移動して、PET-CT装置により照射部位ごとに生成されたポジトロン放出核を検出し画像化（ビームオフラインPET画像）を実施し、人体構成要素に応じたactivityの違いを検証した。また、治療室に簡易型PETカメラを設置し、ウサギへ陽子線照射を行い、飛程の違いなど治療計画との一致性の検証を行った。実際の治療装置に設置する実機の製作を行った。

（倫理面への配慮）

ビームオフラインPET画像の取得にあたっては、患者より同意を得た上で実施した。得られた画像からは患者個人情報を削除した。

C. 研究結果

患者を用いたビームオフラインPETでは人体構成要素により生成される核種が異なることが判った。例えば骨ではK-39が多く生成される。また、半減期の短いO-15が最も多く生成されるが、オフラインPETでは照射後約10

分から撮像する為にこの核種はほとんど反映されないことがわかった。ウサギを用いた実験においては治療計画が適格に再現されていた。また、2007年1月にビームオンラインPET実機を回転ガントリー照射室に組み込んだ。

D. 考察

治療室内で患者のどこに陽子線が本当は照射されているかを確認するシステムとその場で最適な照射法に瞬時に適応出来る照射システムの構築があって、患者へ高品質で高精度の陽子線治療を実現できるようになる。Dose volume adapted proton therapy (DAPT)の流れとしては、治療室内で患者が寝台に寝た状態のまま、コンビームCTによる3次元の患者位置決め及びそのCT画像を利用して治療計画装置による高速かつ高精度の線量分布計算・最適照射条件の決定、Spot scanning照射法やMulti patch照射法などによる最適照射の実施、処方予定の線量の僅かな投与線量でのビームオンラインPETシステムによる線量ならびに位置ナビゲーション治療の実施、的確に腫瘍への照射が可能な状態になっていることを確認後、処方線量を投与する陽子線照射を実施することを計画している。

E. 結論

陽子線のビームライン上に設置した高位置分解能を持つPET装置（beam on-line PET system (BOLPs)）を開発した。測定されるポジトロン放出核の生成位置・量を患者体内で実際に陽子線が照射された位置・線量を数値化しリアルタイムで画像表示することで腫瘍に的確に照射されているかを確認しながら陽子線治療を実施することができ

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kohno R, Nishio T, Miyagishi T, Hirano E, Hotta K, Kawashima M, Ogino T. Experimental evaluation of a MOSFET dosimeter for proton dose measurements.

Phys Med Biol 2006;51:6077-6086.

2. Nishio T, Ogino T, Nomura K, Uchida H. Dose-volume delivery guided proton therapy using beam on-line PET system.

Med Phys 2006;33:4190-4197.

3. Nihei K, Ogino T, Ishikura S, Nishimura H. High-dose proton beam therapy for stage I non-small cell lung cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys

2006;65:107-111.

4. Nishio T, Kataoka S, Tachibana M, Matasumura K, Uzawa N, Saito H, Sasano T, Yamaguchi M, Ogino T. Development of simple control system for uniform proton dose distribution in a dual-ring double scattering method. Phys Med Biol 2006;

51:1249-1260.

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

高精度陽子線治療のためのビームオンラインPET装置用画像表示装置及び解析装置

照射室内ビームオンラインPETカメラ位置可動機構を備えた陽子線治療支援装置 (出願中)

高位置分解能ビームオンラインPET装置による腫瘍位置及び照射位置確認システム (出願中)

2. 実用新案登録

3. その他

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

3次元体表座標を基準にした高精度放射線治療装置の開発

分担研究者 近藤達也

国立国際医療センター病院長

研究要旨

放射線治療では正確な治療を施行するために体位の再現はもっとも重要である。本研究では、患者体表座標をレーザースキャンし、患者体表座標の3次元絶対座標を算出し、その基準座標とのずれを定量的に表示するシステムを開発した。当初レーザースキャンからずれの表示までに2.5秒を要したが、本年度ハードおよびソフトの改善によりそれを1秒程度に短縮できた。また、CT画像から体表座標を抽出し、それをレーザースキャンで抽出された体表座標とマッチングさせることにより体表座標と体内解剖の融合が可能となった。またファントム実験により、装置の設置位置などで多少の差がでるものの2mm以下の体表座標のずれが定量的に把握可能であることが示された。今後さらにボランティアおよび臨床での試用を行い放射線治療時の正確な体位再現における有用性を検討する。

A. 研究目的

放射線治療においては正確な体位再現が高精度放射線治療の必要条件である。この研究においては、無用な放射線被曝を伴わずに体位再現を確認する方法としてレーザースキャンによる3次元座標採取を行い、体表座標と基準体表座標（具体的には放射線治療計画時の体表座標）のずれを定量的に表示するシステムを開発する。更に、治療計画時のCT画像から体表座標を抽出して、レーザースキャンから得られた体表座標とのマッチングを行い体表座標と体内解剖の相関も描出するシステムを開発する。

B. 研究方法

体表座標の採取方法としてレーザースキャンを採用することは平成16年度の当研究班で報告したが、この方法の利点は計算速度が速いことであり、人体に応用する場合最も重要なことである。本年度においてはこのスキャンのハードウェアおよびソフトウェアの改善を行い計算時間の更なる短縮化を目指した。更に、定量的評価を行うためにファントム実験とボランティアによる実験を行う。また、患者に対して試用し、精度の評価を行う。

(倫理面への配慮)

患者への臨床試用に当たってはすでに国立国際医療センター倫理委員会の承認を得ており、書式によるインフォームドコンセントを得て実施する。

C. 研究結果

システム全体としては、レーザースキャンによる体表面計測装置とその結果を基準体表座標と比較してずれを算出する位置決め支援装置からなる。平成17年度においてはレーザースキャン開始から体表座標ずれの表示までが2.5秒程度要したが、高出力レーザー（経産省での人体に適用可能承認済範囲）に切り替えること、ソフトウェアの改善、体表面計測装置と位置決め支援装置間の通信速度の上昇などにより、レーザースキャン開始からずれ表示までを1秒程度に抑えることが可能となった。また、レーザースキャン本体の重量を6kgから5kgにまでおとすことにも成功した。更に、CT画像から3次元体表座標を抽出し、そのCTと同時に施行されたレーザースキャンで獲得された3次元体表座標とマッチングさせ体表と体内解剖の融合を行うソフトも開発した。また校正用のファントムを開発し、それを1度スキャンすることにより自動的にアイソセンターと、アイソセンターを通る水平面と鉛直面が設定され、体表座標がその平面を基準として表示されるようにした。また、体表の呼吸運動をリアルタイムで採取する機能も設定している。ファントムを用いた実験では、体表面計測装置の設置角度にもよるが体表座標のxyz方向の2mm以下のずれを定量的に感知できることが示された。現在ボランティアを用いた実験を施行中であり、今年度中には臨床試用に移る予定である。その際には、患者体位再現が従来法と比較してより高精度で可能であるかを検証

するとともに、体位再現に要する時間が短縮されるかを検討する。

D. 考察

現状の高精度放射線治療、特にImage-Guided Radiation Therapyでは、治療寝台上で撮影したCTやX線像をもちい腫瘍座標の再現性のみが追求されている。それらの方法では、無用な放射線被曝を伴うとともに、体位全体の再現は顧慮されていないのが実態である。本方法では、体表座標を非放射線的に獲得することにより、体表座標の基準座標よりのずれを検出し、体位全体の再現性の向上を目指すものである。処理時間も1秒以内まで短縮し、臨床的にも応用可能な段階まできていると思われる。この装置の導入によりいままでは診療放射線技師の「かん」に頼っていた患者体位の設定により客観的かつ定量的な基準を与えることができ、放射線治療の精度向上および体位再現に要する時間の短縮化が期待できる。しかしながら、体位再現は放射線治療の必要条件ではあるが絶対条件ではない。体各部で体位再現のみで腫瘍位置の再現も可能な腫瘍と可能でない腫瘍が考えられ、それらを抽出選択し、当システムの適応を考えていくのが今後の開発に必要であろう。

E. 結論

放射線治療に応用可能な体表面計測装置および位置決め支援装置を開発し、システム化した。この装置の導入により放射線被曝なく患者体位の高精度な再現が可能となると思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hara R, Itami J, Kondo T, et al. Clinical outcomes of single-fraction stereotactic radiation therapy of lung tumors. *Cancer* 2006;106:1347-52.

Isobe K, Uno T, Tamaru J, Kawakami H, Ueno N, Wakita H, Okada J, Itami J, et al. Extranodal natural killer/T-cell lymphoma, nasal type: the significance of radiotherapeutic parameters. *Cancer*. 2006;106:609-15.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合研究事業）
「がん治療のための新技術の開発研究」班（H16-3次がん-026）

分担研究報告書

「同種血液・免疫細胞を用いた悪性腫瘍に対する革新的治療法の開発」

分担研究者 田野崎 隆二 国立がんセンター中央病院医長 厚生労働技官

研究要旨

悪性リンパ腫に対する同種造血幹細胞移植は、治療関連毒性が多いために未だ確立していない。けれども、減量した前処置を用いた同種造血幹細胞移植（以下「ミニ移植」）の導入により、安全に移植片対リンパ腫(GVL)効果を誘導することが期待できる。同種移植を施行した難治性悪性リンパ腫計127例（うちミニ移植は95例）をレトロスペクティブに解析し、通常の移植では非再発死亡率が高いもののミニ移植ではより安全性が高いことが示された。また有効性は病型により差があり、自家移植無効と考えられる難治性末梢型Tリンパ腫や形質転化したろほう性リンパ腫でも50%以上の3年全生存が得られた。一方、アグレッシブ・リンパ腫に対して「自家末梢造血幹細胞移植+ミニ移植療法」の第I相臨床試験を行い、安全性と実現可能性が確認され、有効性も期待できた。また、同種免疫により誘導される抗腫瘍効果を増強する目的で、移植後に抗腫瘍効果を担うエフェクター細胞を体外で分離・増幅し、再度体内に戻す「細胞治療」の臨床応用に関する検討を行った。ヒトに対して使用可能なNKT細胞製造に関連して、現段階では、培養に適切な培地とバッグ材質の選定がほぼ終了し、臨床試験実施の準備が整いつつある。

A. 研究目的

悪性リンパ腫に対する同種造血幹細胞移植は、治療関連毒性が多いために未だ確立していない。けれども、減量した前処置を用いた同種造血幹細胞移植（以下「ミニ移植」）の導入により、治療抵抗性の悪性リンパ腫にも安全に同種免疫効果を利用した治療を行うことが期待できる。悪性リンパ腫に対して、安全で有効な同種移植技術を開発・確立することを目的とした。

また、同種免疫により誘導される抗腫瘍効果を増強する目的で、移植後に抗腫瘍効果を担うエフェクター細胞を体外で分離・増幅し、再度体内に戻す「細胞治療」の臨床応用に関する検討を行った。

B. 研究方法

第1に、1999年1月から2005年12月までに当院で同種移植を施行した悪性リンパ腫計127例（うち95例がミニ移植）を対象に、安全性および有効性に関してレトロスペクティブに検討した。

第2に、化学療法に感受性があるものの通常の自家移植では治癒が困難と考えられる治療抵抗性のアグレッシブ・リンパ腫に対し、「自家末梢造血幹細胞移植+ミニ移植療法（前方視臨床試験）」の第I相試験を施行し、その安全性と実現可能性について検討した。なお、以上の治療および研究は、院内の倫理委員会により承認された臨床研究に基づいて行なわれた。

細胞治療の臨床応用に関しては、ヒトに応用可能な培養液と大量培養用のバッグの選定作業を行った。

なお、移植および研究に際しては全例において同意説明と文書による同意書を得て施行した。

C. 研究結果

アグレッシブ・リンパ腫に対する通常の同種造血幹細胞移植は非再発死亡率が高く、これに対してミニ移植はより安全性が高いことが示唆された。濾胞性リンパ腫に対しては、形質転化した経緯があっても、その病変が放射線照射などでコントロールされていれば、

高い有効性が得られることが示唆された (図 1)。末梢型 T 細胞リンパ腫は治療抵抗例であってもミニ移植のみで病勢がコントロールされた例が多く、再発後も免疫抑制剤減量で再寛解になる症例もあり、移植片対リンパ腫 (GVL) 効果が観察された (図 2)。以上は、悪性リンパ腫に対する同種移植に関する単施設での検討としては世界的にもこれまでほとんど報告が無く、また、固形腫瘍のひとつとも考えられる悪性リンパ腫に対する GVL 効果が示唆された点は、他の固形腫瘍に対する免疫療法に対しても示唆に富む成果と考えられる。

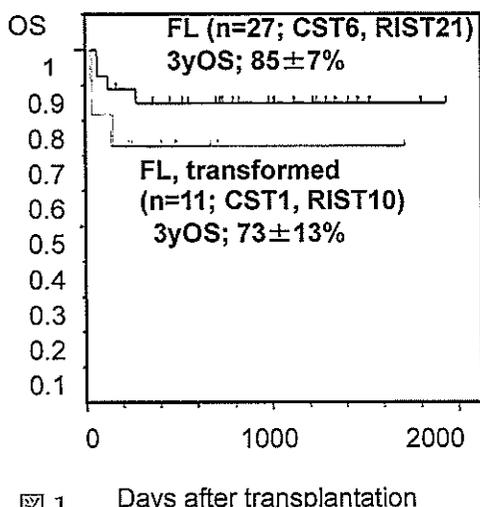


図 1 Days after transplantation

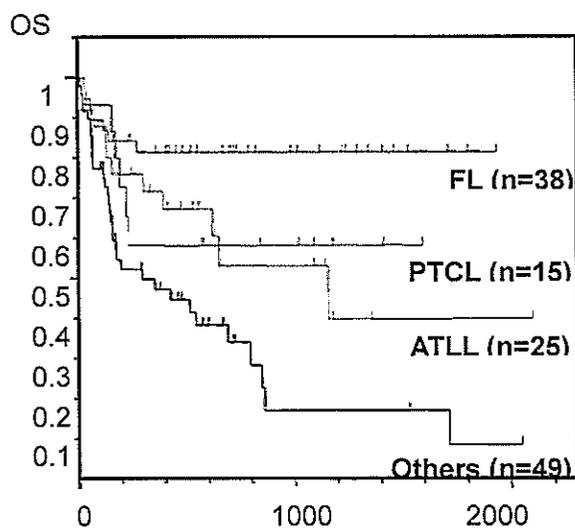


図 2 Davs after transolantation

次に、「自家末梢血幹細胞移植+ミニ移植療法」第 I 相試験には 7 例が登録され、自家移植からミニ移植まで中央値 42 (40~55) 日の期間内で施行できた。生着

は速やかで、移植後早期再発により 1 例が 97 日目に死亡したが、治療関連死亡はなかった。治療完遂 7 例中 5 例で再発したものの、免疫抑制剤の急速減量などにより再度寛解に至る例もあり、4 例が中央値 383 日 (292~749) で無病生存中である。

細胞治療の臨床応用のための研究の一例としては、ヒトに対して使用可能な NKT 細胞製造のための培地とバッグの検討を行った。現段階では、培養に適切な培地とバッグ材質の選定がほぼ終了し、臨床試験実施の準備が整いつつある。

D. 考察

悪性リンパ腫では、ミニ移植を導入することにより安全に同種移植が施行でき、病型により差があるものの多くの症例で GVL 効果が認められた。移植適応の慎重な選択や、自家末梢血幹細胞移植を組み合わせることにより、自家移植で治療を期待できない悪性リンパ腫に対して、ミニ移植は有効性の高い治療手段となる可能性が示唆された。

細胞治療に関しては基礎的な検討と平行して臨床応用のための検討も進める必要がある。

E. 結論

難治性悪性リンパ腫に対して、ミニ移植を用いることにより、多くの症例で安全に GVL 効果を誘導することができた。更なる治療の工夫が必要である。

F. 健康危険情報

時に重篤な合併症を伴う治療であるために十分な経験と技術が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kim SW, Tanimoto ET, Hirabayashi N, Goto S, Kami M, Yoshioka S, Uchida T, Kishi K, Tanaka Y, Kohno A, Kasai M, Higuchi M, Kasai M, Mori S, Fukuda T, Izutsu K, Sao H, Ishikawa T, Ichinohe T, Takeuchi K, Tajima K, Tanosaki R, Harada M, Taniguchi S, Tobinai K, Hotta T, Takaue Y. Myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for non-Hodgkin lymphoma: a nationwide survey in Japan. *Blood* 108: 382-389, 2006.

2) Morita Y, Heike Y, Kawakami M, Miura O, Nakatsuka S, Ebisawa M, Mori S, Tanosaki R, Fukuda T, Kim SW, Tobinai K, Takaue Y. Monitoring of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Cancer* 119:1360-1367, 2006.

2. 学会発表

1) 田野崎隆二、他. 難治性悪性リンパ腫に対する「自己+血縁骨髄非破壊的移植 (RIST、ミニ移植)」療法の第 I 相試験. 第 28 回日本造血細胞移植学会、東京、2006 年

2) Tanosaki R, et al. A retrospective single institute analysis of 127 lymphoma patients who underwent allogeneic stem cell transplantation: impact on peripheral T-cell lymphoma (PTCL) including ATLL. 48th ASH meeting, USA, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特に無し。

NKT細胞を利用した新しい免疫療法の開発

分担研究者 五十嵐 美德 国立がんセンター研究所・化学療法部・主任研究官

研究要旨

NKT細胞を利用した新しい細胞療法の開発を目的とし、NKT細胞の効率的な増殖培養法の確立について検討した。特に、臨床応用可能な培養液並びに培養バッグの開発、NKT細胞の増殖効率を規定する因子の同定、がん患者におけるNKT細胞の増殖効率低下のメカニズムについて解析した。NKT細胞増殖効率のよい、培養液並びに培養バッグを開発した。NKT細胞の産生するIL-4及びIFN- γ の産生のバランスによって増殖効率が規定されることが明らかとなった。がん患者におけるNKT細胞の増殖効率の低下のメカニズムとして、CD14陽性細胞におけるCD1d分子の発現低下及びNKT細胞自身の増殖能の低下が原因として考えられた。IL-4の添加およびCD1dを強発現した人工的抗原提示細胞等を用いることに、NKT細胞の増殖効率が改善され、NKT細胞療法の臨床応用が可能になると考えられる。

A. 研究目的

本研究では、NKT増殖効率が良く且臨床使用可能な培養液並びに培養バッグを開発することを目的とした。また、NKT細胞増殖効率が個体間で大きな差があること、さらにはがん患者で低い傾向（数倍～数千倍）があることから、NKT細胞の増殖効率を規定する因子の同定及びがん患者におけるNKT細胞の増殖効率低下のメカニズムを明らかにすることも、本研究の目的とした。

B. 研究方法

1) 新規を含む15種類の培養液、並びに18種類の培養バッグの素材間で、NKT細胞の増殖効率を検討した。

2) がん患者でのNKT細胞の増殖率低下のメカニズム

健常人あるいはがん患者の末梢血単核球細胞を α -GalCer(50ng/ml)とIL-2(100IU/ml)存在下で12日間、培養し、抗TCR-V α 24および抗TCR-V β 11モノクローナル抗体を用いて、NKT細胞を同定し、増殖率を算定した。FITC標識CD14モノクローナル抗体、抗FITC-マイクロビーズおよびMACSシステムを用いて末梢血単核球細胞からCD14陽性細胞を除去して培養あるいは、CD14陽性細胞を精製し、末梢血単核球細胞と共培養し、その後のNKT細胞の増殖効率を解析した。また抗CD1d抗体を用いてCD14陽性細胞上のCD1dの発現についてフローサイトメーターを用いて解析した。

3) 純系マウス系を用いたNKT細胞の増殖効率を規

定する因子の同定

各種純系マウス(8-12週齢)の脾細胞を α -GalCer(50ng/ml)とIL-2(100IU/ml)の存在下で4日間、培養し、CD1d/ α -GalCerテトラマーを用いてNKT細胞を同定し、増殖率を算定した。また培養上清中のIL-4およびIFN- γ の産生量をELISA法により測定した。また、IL-4あるいはIFN- γ に対するモノクローナル抗体を加えたサイトカインの中和試験あるいは外因性にIL-4やIFN- γ を添加し、NKT細胞の増殖率およびサイトカイン産生能の変化について解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は国立がんセンター動物実験倫理委員会規定に基づき、実施した。健常人ボランティア、患者ボランティアを用いて行なう非臨床研究・前臨床研究、並びに患者に培養細胞を投与する臨床研究を行なうに際しては、ヘルシンキ宣言並びに米国ベルモントレポート等国际的倫理原則、臨床研究に関する倫理指針に沿い、研究計画書を作成し各施設の倫理審査委員会の承認を得た上で行なった。

C. 研究結果

1) 既存の培地・培養バッグと比較し、高い増殖・活性化効率を示す培養液並びに培養バッグを開発した。

2) がん患者におけるNKT細胞の増殖効率低下のメカニズム

がん患者の末梢血中のNKT細胞の体外での増殖効率は著しく低下していた。その原因として、CD14陽性細胞でのCD1d分子の発現の低下が認められた。さらに、がん患者由来の末梢血単核球細胞を健康人由来のCD14陽性細胞と共培養しても、NKT細胞の増殖効率は部分的にのみしか、回復しなかった。

3) 純系マウス系を用いたNKT細胞の増殖効率を規定する因子の同定

マウスにおいても、NKT細胞の増殖効率は系統間にかんがりの差が存在した。特に、NKT細胞が殆ど増殖しない系統(C3H/Heマウス)が存在した。NKT細胞の増殖効率はNKT細胞の産生する代表的なTh1サイトカイン(IFN- γ)およびTh2サイトカイン(IL-4)を解析した結果、培養上清中のIL-4の産生量と増殖率が相関する傾向にあった。NKT細胞が増殖するマウスの系統において、培養時に抗IL-4中和抗体の添加により、NKT細胞の増殖効率の低下が認められた。増殖しないマウス系統において、外因性のIL-4を加えることにより増殖率の改善が認められた。つまり、IL-4がNKT細胞の増殖を促進する因子の一つであることが明らかとなった。さらに、培養初期のIFN- γ およびIL-4の産生を測定した結果、IFN- γ /IL-4比率とNKT細胞の増殖率が逆相関する傾向にあった。つまり、IL-4はNKT細胞の増殖を促進し、IFN- γ は逆に抑制し、両者のバランスによってNKT細胞の増殖効率が規定されることが明らかとなった。

D. 考察

NKT細胞の増殖技術の現状に立脚し、効率が良く且臨床使用可能な培養液・培養バッグが開発できたことは、現存する治療抵抗性の患者さんに新たな免疫治療を提供できることにつながると期待される。

NKT細胞の体外での増殖効率を規定する因子としてNKT細胞の産生するIL-4であることを明らかとした。さらに、NKT細胞の増殖はNKT細胞自身が産生し、免疫応答に重要なIFN- γ (Th1サイトカイン)による抑制とIL-4(Th2サイトカイン)による促進により増殖が制御される、意義のある成果を得ることができた。これらの成果はIL-4の添加とIFN- γ の阻害によってNKT細胞の増殖効率を改善し、細胞療法に必要な細胞数の確保が可能になると期待される。しかし、Th2優位な状態で増殖させたNKT細胞が今後、抗腫瘍活性があるのかについて検討する必要がある。

がん患者において、NKT細胞の増殖効率が低下するメカニズムを明らかとし、新しい増殖培養法を確立する必要がある。増殖効率の低下がCD14陽性細胞におけるCD1dの発現低下およびNKT細胞自身の増殖能の低下によることから、CD1dを強発現した人工的な抗原提示細胞を用いることや、IL-4を添加することによって、がん患者においても、NKT細胞の体外での増殖効率が改善することが期待される。

E. 結論

マウスを用いた解析から、NKT細胞の増殖効率はIL-4の産生量に相関する傾向であった。IL-4の添加によって増殖効率の改善が認められた。さらに、NKT細胞の増殖効率はIL-4による増殖の促進に加えて、IFN- γ /IL-4の産生比率とNKT細胞の増殖率が逆相関する傾向にあった。つまり、IL-4はNKT細胞の増殖を促進し、IFN- γ は逆に抑制し、両者のバランスによってNKT細胞の増殖効率が規定されることが明らかとなった。

がん患者においてNKT細胞の増殖の著しい低下が認められた。これらのメカニズムはCD14陽性細胞

におけるCD1dの発現の低下とNKT細胞自身の増殖の低下による。

IL-4の添加およびCD1dを強発現した人工的な抗原提示細胞を用いることにより増殖効率が向上し、細胞療法に必要な細胞数を確保でき、臨床応用が可能になることが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takeshita F, Kodama M, Yamamoto H, Ikarashi Y, Ueda S, Teratani T, Yamamoto Y, Tamatani T, Kanegasaki S, Ochiya T and Quinn G. Streptozocin-induced partial beta cell depletion in nude mice without hyperglycaemia induces pancreatic morphogenesis in transplanted embryonic stem cells. *Diabetologia* 2006; 49: 2948-2958.
2. Kuwatani M, Ikarashi Y, Iizuka A, Kawakami C, Quinn G, Heike Y, Yoshida M, Asaka M, Takaue Y and Wakasugi, H. Modulation of acute graft-versus-host disease and chimerism after adoptive transfer of in vitro-expanded invariant V α 14 natural killer T cells. *Immunol Lett.* 2006; 106: 82-90.
3. Imataki O, Heike Y, Ishida T, Takaue Y, Ikarashi Y, Yoshida M, Wakasugi H and Kakizoe T. Efficient ex vivo expansion of V α 24⁺ NKT cells derived from G-CSF-mobilized blood cells. *J Immunother.* 2006; 29: 320-327.
4. Ohashi M, Kobayashi A, Hara H, Kushida M, Miura Y, Yoshida K, Ikarashi Y, Mandai M, Kitajima M, Yoshida T and Aoki K. Allogeneic major histocompatibility complex gene transfer enhances antitumor activity of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation without exacerbating graft-versus-host disease. *Clin Cancer Res* 2006; 12:2208-2215.

2. 学会発表

1. 五十嵐美徳、飯塚明、吉田光二、平家勇司、高上洋一、若杉尋。α-galactosylceramideを用いて体外で増殖・活性化させたNKT細胞およびNK細胞におけるNK細胞活性化レセプターNKG2Dの発現修飾 第65回日本癌学会学術総会 (横浜)
2. 今滝修、平家勇司、小田慶一郎、五十嵐美徳、白川一男、石田秀行、高上洋一、若杉尋。がん患者末梢血由来V α 24陽性NKT細胞の増殖効率 第65回日本癌学会学術総会 (横浜)
3. 松井祐樹、吉田光二、五十嵐美徳、臼井健朗、長田裕之、若杉尋。TaxolおよびVindesin耐性H69細胞株に対する分裂阻害剤Pironetinの抗