

# 厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業:ナノメディシン研究

超早期がんの低侵襲で効果的、正確で安全な  
診断・治療用微細内視鏡機器装置及び  
その医療技術の開発に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小林 寿光

平成20(2008)年4月10日

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 超早期がんの低侵襲で効果的、正確で安全な診断・  
治療用微細内視鏡機器装置及びその医療技術の開発に関する研究 …… 1  
小林寿光

### II. 分担研究報告

1. 超早期がんの低侵襲で効果的、正確で安全な診断・  
治療用微細内視鏡機器装置及びその医療技術の開発に関する研究 … 9  
執印太郎
2. 超早期がんの低侵襲で効果的、正確で安全な診断・  
治療用微細内視鏡機器装置及びその医療技術の開発に関する研究 …10  
馬目佳信
3. 超早期がんの低侵襲で効果的、正確で安全な診断・  
治療用微細内視鏡機器装置及びその医療技術の開発に関する研究 …14  
大原健一
4. 超早期がんの低侵襲で効果的、正確で安全な診断・  
治療用微細内視鏡機器装置及びその医療技術の開発に関する研究 …18  
玉川克紀

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……23

### IV. 研究成果の刊行物・別刷 ……25

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業：ナノメディシン研究）

総括研究報告書

超早期がんの低侵襲で効果的、正確で安全な診断・治療用微細内視鏡機器装置及び

その医療技術の開発に関する研究

主任研究者 小林 寿光 国立がんセンター 室長

研究要旨

超早期で微小ながんに、血管や気管支、尿管などを介して到達し、診断・治療を行う微細内視鏡システムと技術を、磁気誘導を導入して開発する。X線透視装置の光電子増倍管への磁気干渉を低減する磁気遮蔽装置の開発に目処がついたため、開発全体をより臨床応用を前提としたものへと変更した。誘導経路を経路の長い尿路系として、3次元腫瘍モデルを作製して腎盂内（ブタ）に固定し、尿管内に挿入したカテーテル内に外径0.8mmの微細内視鏡を進め、X線透視下に腎盂までの誘導を試みた。磁気遮蔽装置は有効でX線透視下の誘導が可能であったが、腎盂内での急峻な屈曲に必要な高磁界領域では限界があった。微細内視鏡によって尿管内や3次元腫瘍塊の観察が可能であり、今後の開発を促進する臨床的な意義が明示された。今回種々の懸案が確認されたが、今後これらを改善し、実際の診断・治療技術となるよう開発を進めていく。

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  
執印太郎・高知大学医学部教授  
馬目佳信・東京慈恵会医科大学教授  
大原健一・ペンタックス株式会社医用機器  
管理担当  
玉川克紀・株式会社玉川製作所代表取締役

的な治療が行われた場合には、特に超早期のがんでは過剰侵襲の可能性もある。

これらの病変は、がんであっても通常のがんよりは早期であり、その診断・治療に伴う侵襲は、標準的な病変のそれに比較して低く抑える必要がある。また病変が良性であれば、本来侵襲的な診断はあるべきではない。更に良性疾患を診断のために手術することによる患者への負担を考えれば、病変を発見する本来の意義を否定することになる。

血管や気管支、尿管を介した経腔的な病変へのアプローチは、基本的には組織を損傷しないために低侵襲であると考えられる。しかし微小な病変への到達は、特に末梢分枝の選択が難しく、これまでの病変においても一定の限界があった。また、種々の診断・治療手技、機器装置が開発されても、

A. 研究目的

診断機器の進歩や普及によって発見が増加した微小な病変は、がんであればこれまで以上に早期のがんである可能性がある。しかし画像のみで悪性と良性の鑑別は難しく、確定診断を得ようとしても微小であるために到達することが難しい。例えばCTをガイドにして経皮的に針穿刺を行えば、少ないとはいえ合併症は時に重篤であり、播種や転移の可能性は否定し得ない。また手術的に診断を行えばその侵襲は大きい。更に、がんとの診断の後にこれまでの標準

基本的に施行するのは医師であり、医師の技術に大きく依存する医療は普及を阻害すると共に、無理をすれば安全性を犠牲にしかねなかった。

ところで実質手的な腫瘍も、例えば嚢胞や壊死で空隙をもつ、また初回治療後に空隙を確保すれば、同様の診断・治療が可能である。また病変内にドレナージチューブなどが挿入されていれば、それを介した治療も可能となる。これらの場合にも、目的の方向に微細内視鏡の先端を向けることは、適切な診断・治療には必要である。

そこで血管や気管支、尿管などの解剖学的な空隙等を介して、低侵襲で効果的、正確で安全な診断・治療を行う、微細内視鏡を開発することを目的とする。微細化のレベルはカテーテルなどに挿入できるものとして、これまでのカテーテル検査を始めとして体内に挿入された一チューブを介した検査を、内視鏡検査とすることにも配慮する。また新規の概念であるために、実際の診断・治療技術を開発して提示することも目的とする。

## B. 研究方法

市販されている微細内視鏡の太さは 3mm を少し切る程度であり、カテーテルの  $\phi 1\text{mm}$  以下の内腔に挿入するためには、何等かの概念の変更が必要である。そこで内視鏡の先端の屈曲機構を省略し、内視鏡先端に磁性体のキャップを装着することで磁気誘導を行い、先端屈曲力の代替とする。なお磁気吸引を行う磁気発生装置は、小型で高磁力が低電力で発生できる、小型超伝導電磁石を開発して使用する。なおネオジウム磁石等の永久磁石では磁力が弱いと共に、必

要に応じて磁力の調整を行うことができないために使用しない。

微細内視鏡内の処置チャンネルに関して、 $\phi 1\text{mm}$  を切る内視鏡内に設置したとしても、対象物の粘稠性や固形成分があることを考えれば、殆ど機能しないと考えられる。そこで微細内視鏡を挿入するカテーテルの内壁と微細内視鏡の外壁との間隙を、必要に応じて処置チャンネルとして使用する。この場合、同じ口径差を使用しても、内視鏡内のチャンネルの断面積よりカテーテルとの間隙を利用した方が大きくなる。また、円滑な挿入抜去を行うために太めのカテーテルを使用すれば、より大きな間隙が期待される。

実際に開発を行い、また誘導を行うには、何等かの方法で誘導経路や目標、微細内視鏡を確認する必要がある。臨床的にはX線透視を使用するが、X線透視装置の光電子増倍管への磁気干渉で画像の確認ができなくなる。この現象は、光電子増倍管を使用しないフラットパネルX線透視装置を使用すれば解決する。

しかしフラットパネルX線透視装置の開発や購入をこの研究で行うことは難しく、また動物実験施設で高価なフラットパネルX線透視装置が利用可能なところはない。そこで誘導経路を光学的に透明にすることで、通常の光学ビデオ系を使用して誘導を確認することを考えていた。

このような問題に対して、これまで開発不可能と考えられていた光電子増倍管への磁気干渉を大幅に低減する、磁気遮蔽装置の開発に目処がついた。そこで大幅に臨床使用を念頭に置いたものへと研究を変更することとした（変更申請済）。

磁気誘導装置を使用して誘導するには、例えば患者周囲を回転する装置に磁気誘導装置を固定して、目的の方向に微細内視鏡を吸引する方法がある。3次元的に誘導を行うためには、この周回装置は小型超伝導電磁石の移動空間も含め、かなりの大型化をする。これに対して通常のX線透視を前提とすれば、そのX線透視の軸に直交する2次元平面での誘導で十分と考えられる。そこで、これまでの単極小型超伝導電磁石を移動した誘導から、小型超伝導電磁石を2機使用した2次元平面での誘導を行うこととした。

対象経路は、誘導経路が長く意義が確認しやすい尿路系として、尿管を介して腎盂内で目的の診断・治療行為を行うとして実験系を構築することとした。なお、将来治療技術の開発を行うことに配慮して、立体的な腫瘍塊の作製も行うこととした。

以上の結果、初期の開発項目は、微細内視鏡に磁気誘導装置と磁気遮蔽装置、それに3次元腫瘍細胞塊の作製と、臨床技術開発となった。

磁気誘導装置と磁気遮蔽装置に関しては、磁界発生部である超伝導電磁石の仕様をまず決定し、磁界発生部と被誘導物、X線透視装置の位置関係を決定し、装置の構成を決定する。

X線透視装置の漏れ磁場の影響を確認するため、実際にX線透視装置に磁界発生コイルを接近させながら撮像してその画像を取得し、許容磁界強度を確定する。

次に、決定された超伝導電磁石の仕様を基に、縮小スケールモデルの常伝導電磁石を製作し、磁界の強度、分布を実測することで、実際の超伝導電磁石の磁界分布を推

測する。更に微細内視鏡モデルを用いて操作性の確認を行う。

また、様々な形状の磁気シールドを試作し、上記の常伝導電磁石に設置してその効果を実測により確認する。

微細内視鏡は、体外からの磁気誘導装置により誘導可能なように、磁性ステンレスからなる磁性体を先端部に設ける。画像伝達用光ファイバー束に関しては、画質と柔軟性の確保のために、多成分ガラスを用いることとする。今年度はまずカテーテルへの挿入性と誘導性に配慮して、多成分ガラス等からなるファイバーを用いた照明用光ファイバー束を、前記画像伝達用ファイバー束と共に使用し、内視鏡挿入部外径を0.8mm以下にした内視鏡の検討を行う。

3次元腫瘍細胞は、T24細胞を用いて作製を行った。立体3次元培養はタイプII組織吸収性ゼラチンをデバイスに用いて行った。動物実験時の視認性に配慮して、デバイス上の腫瘍細胞(図1)をグルタルアルデヒドで固定後に、メチレンブルーで染色を行い(図2)、実験用3次元腫瘍塊とした。

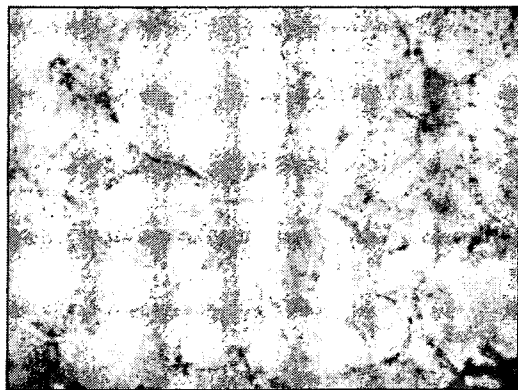


図1 3次元培養後、固定・染色を行ったゼラチンデバイス上の腫瘍細胞

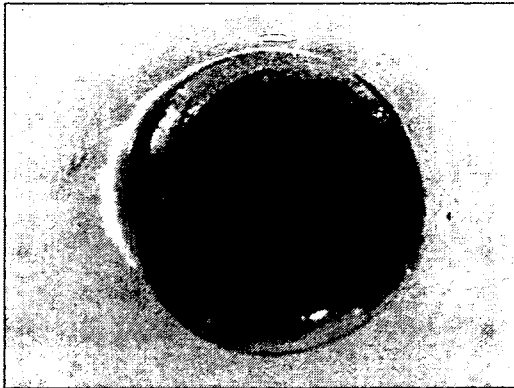


図2 固定染色後、アガロースに封入したT24腫瘍細胞

実験方法は、実験用ブタを用い尿管経由で微細内視鏡で腎盂内の染色された腫瘍塊の観察を主眼とし、超伝導コイルで内視鏡先端を誘導し内腔観察を検討する。その手順は、開いた膀胱内で微細な尿管口を発見し、尿管口経由でガイドワイヤを挿入し、それを利用してガイド用カテーテルを腎盂まで誘導する。微細内視鏡の誘導はカテーテル内を腎盂まで行い、その際に腎盂内の位置についてX線透視にて観察する。青色に染色した癌細胞腫瘍塊を、腎盂を開いて腎盂内に固定し、微細内視鏡を用いこの腫瘍塊を確認する。

診断・治療技術の開発のための要素技術開発として、生体内での脳腫瘍の動向を近似するシステムを実験室内で構築するため、三次元構造ゼラチンマトリクスにヒトグリオーマ細胞を生育させた。次に脳内浸潤に影響を与える細胞接着因子として低分子Gタンパク質 Rho に着目し、エフェクターである ROCK1、ROCK2 に対する siRNA をデザインし、各タンパク発現が低下するグリオーマノックダウン細胞株の作製を試みた。

また超音波の音響エネルギーを集中させることにより、脳腫瘍を縮小させる方法を検討した。安全で低侵襲な治療法を確立するため、HIFU などの医療器械よりも更に低い強度の超音波を用いることとし、口径 40mm と 60mm のトランスデューサーで超音波の分布域を調べた。

これらの疾患としての脳腫瘍と、対象臓器としての尿路系の設定は矛盾するが、高精度な治療を必要とする脳腫瘍の特徴と、誘導が高意義となる尿路系の特徴を両立することで、限られた領域の一つの疾患に適用される医療技術開発ではなく、広範な疾患に応用可能な基礎技術開発とすることにも配慮する。

### C. 研究結果

誘導用超伝導電磁石の磁界発生部は、漏れ磁界の低減と低い通電電流で離れた場所に効率よく磁界を発生させるため、鉄芯を入れた構造とした（図3）。

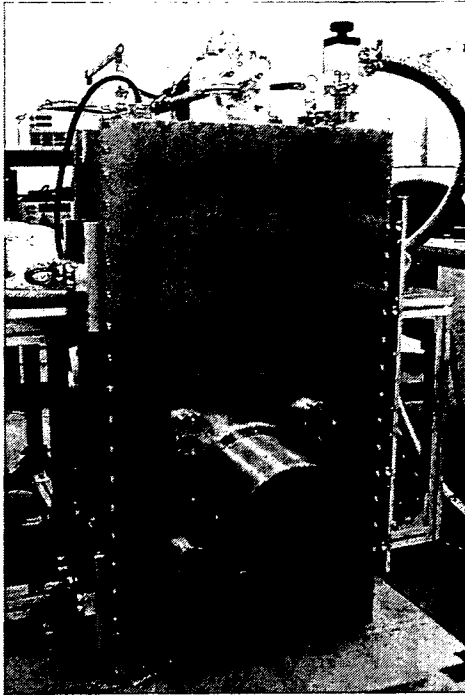


図3 小型超伝導電磁石装置の外観(縦置)

X線透視装置はX線発生部と撮像部を鉛直に配して位置を固定することとした。そこで動物実験施設のX線透視装置を用いて、撮像面に近接させたソレノイドコイルから磁界を発生させて、透視画像に対する影響を確認した。その結果、撮像面表面で垂直な磁場成分を $20e$ 以下にする必要性を確認した。これを基準に縮小スケールモデルの常伝導型電磁石を製作し、磁場測定および微細内視鏡モデルの屈曲実験を行い操作性を確認すると共に、様々な形状の磁気シールドを製作してその効果を実測した。その結果、Z方向の磁界を0にすることが可能であることが示唆された。

以上の実験結果から、磁気誘導装置の仕様を最終決定し、製作を行った(図4)。

#### 実験系

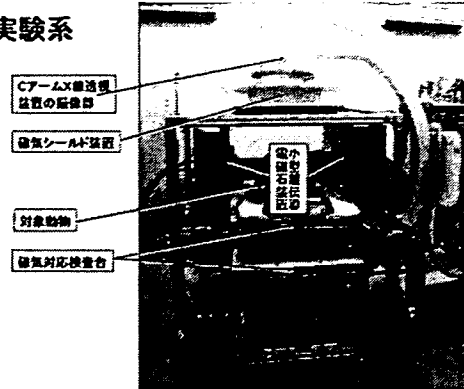


図4 微細内視鏡誘導実験系

微細内視鏡は、挿入部先端に外径 $0.8$  mm、長さ $4$  mmの磁性ステンレスを設けた2種類の実験用微細内視鏡を試作した。タイプ1として、画像伝達用ファイバー束を合成樹脂で被覆した外径 $0.3$  mmで、有効長 $1$  mの挿入部を有する微細内視鏡を試作した。

また、タイプ2として、タイプ1の片側に照明用光ファイバー束を配置して、外周を合成樹脂で被覆した外径 $0.6 \sim 0.8$  mmで、有効長 $99$  cmの微細内視鏡を試作した(図5)。

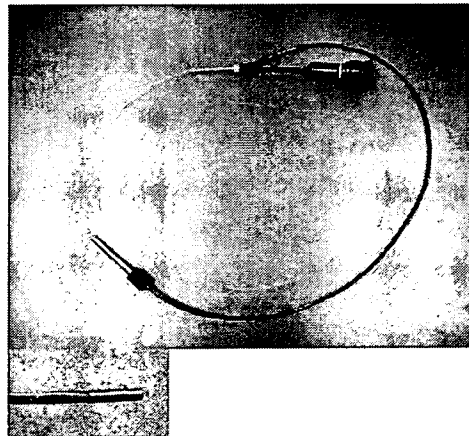


図5 微細内視鏡(全体と先端、照明ファイバー有)

磁気誘導装置を作動させてX線透視を行った場合には、画像の確認はできなかった(図6)。対象動物(ブタ)の体表に誘導用カテーテルとメジャーを置き、磁気遮蔽装置を作動させてX線透視を行った場合は、遮蔽装置を適切に調整することで、画像のゆがみはあったが対象を確認することができた(図7)。

実際に微細内視鏡をX線透視下に進めたが、尿管内の所見は同時に記録されたビデオ画像上確認することができた。腎盂への挿入及び対象の確認は、今回の腎盂の大きさから急峻な屈曲を要した(図8)。この急峻な屈曲を可能とする磁力では磁気遮蔽装置の性能は十分ではなかったが、対象とした3次元腫瘍塊をブルーの領域として確認することができ、屈曲誘導が可能であることが示された。

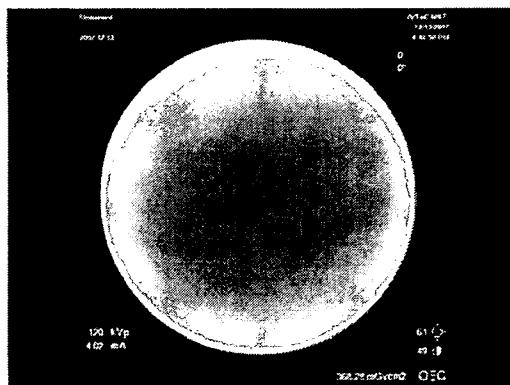


図6 X線透視像(磁気遮蔽無)

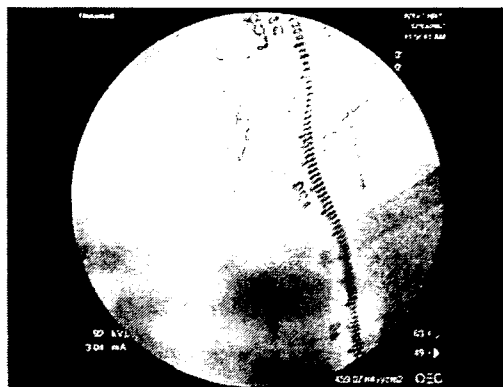


図7 X線透視(磁気遮蔽有)

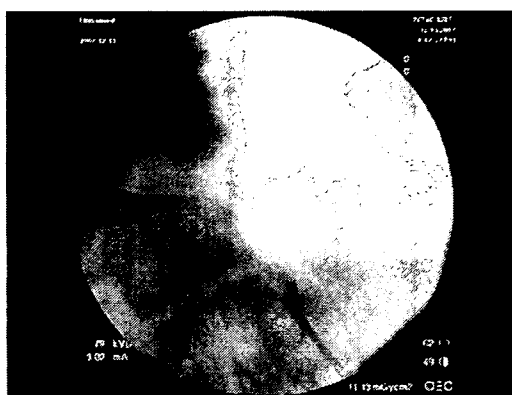


図8 X線透視(微細内視鏡とカテーテル)

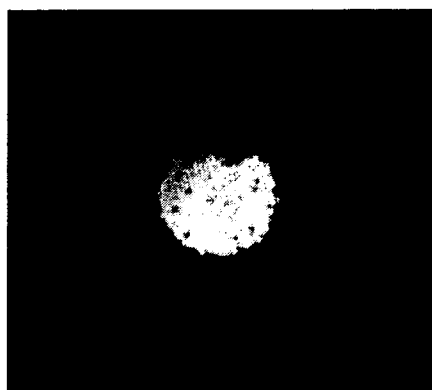


図9 微細内視鏡画像

要素技術開発として、三次元培養したヒトグリオーマ細胞の組織を光学および電子顕微鏡で評価したところ、グリオーマ細胞



は産生する細胞外基質を介してゼラチンマトリクスと三次元的に接着し、腫瘍細胞同士はグリア線維を介して接着していた。また ROCK1、ROCK2 に対する siRNA を発現するベクターを構築してヒトグリオーマ細胞に導入し安定株を得た。ウエスタンブロット法でこれらの細胞で ROCK1 および ROCK2 のタンパク発現の低下を確認した。

また口径 40mm と 60mm のトランスデューサーで 500kHz 及び 200kHz の振動数のビームパターンを検討した。500kHz で比較すると 60mm の方が水平面 (X-Y 断面) においてビームの分布が狭く、垂直面 (Y-Z 断面) においても焦点はトランスデューサーから 55-65mm、約 10mm 以内に分布していた。一方、40mm 口径では焦点分布が 30mm 程度に分散した。この傾向は 200kHz で更に顕著で、特に Y-Z 断面では 60mm 口径のトランスデューサーの焦点が 30mm 以内に収束されたのに対し、40mm 口径のものでは 35mm-100mm 以上に拡散してしまい、40mm のものは事実上使用不能なことが示された。500kHz 及び 200kHz の振動数の比較ではいずれの口径でも 500kHz の振動数の方が超音波の分布域が狭かった。

#### D. 考察

今回の実験から、磁気遮蔽装置を用いることで X 線透視が可能であることが示された。確かにアクティブシールドを用いれば、任意の点の磁気勾配をゼロにすることはできるが、光電子増倍管全体で適切なバランスをとることはなかなか難しい。いずれにしても磁気誘導を行うにおいて、通常の X 線透視装置を使用できることは大きな進歩と考えられる。その一方で、十分磁気誘導

を行える高い磁力では磁気遮蔽装置の効果は十分ではなく、何等かの方法で遮蔽性能を向上することが今後の開発の一つである。

非誘導物に装備できる磁性体は、外径と長さが 1cm の純鉄だとして 6g 余りであり、磁石によって自重を持ち上げることができる。しかしそれぞれ 1mm であるとするればその重量は 1000 分の 1 であり、発生する磁力も 1000 分の 1 である。更に微細内視鏡では内部に内視鏡構造を収容するために磁性体は中空のパイプとなっているため、高い磁界内においても発生する磁気吸引力は非常に小さい。

このような状況で、今回は必要な誘導力を得ることができ、また装置自体は更に強い磁力を発生することができた。しかしこの誘導力はそのまま外部から磁性体を吸引する力であり、現状の装置では周囲からの強磁性体の飛び込みの危険がある。よって有効な誘導を可能とするためには、適切な磁性体飛び込み防止機構の開発が必要である。

今回の微細内視鏡は、まず基本装置を作るとして行ったため、画素数の点で劣るものであった。微細化した場合には対象領域が狭くなるために、通常の内視鏡よりは少ない画素で目的を達成可能かとも考えられるが、広範な領域の確認には画素の増大が必要であると考えられる。現在の装置ではまだ外径に余裕があり、来年度以降の開発では画素数の増大にも配慮していく。

今回の微細内視鏡は耐久性が低く、そのためファイバーが損傷して画素欠落が目立った。耐久性を上げれば屈曲が難しくなり、今後の開発における大きな懸案である。

今回は将来の診断・治療を考え、無構造

の3次元培養腫瘍モデルを使用した、内部に微細な構造が無いために、微細内視鏡の内視鏡としての性能の確認ができなかった。今後、診断・治療の開発とは別に、画質確認用モデルの構築が必要であると考えられた。

現時点ではまだ多くの問題を抱える微細内視鏡であるが、X線透視が利用可能となったこと、またこれまで観察がなかなか難しかった尿管内の観察も可能であったこともあり、今後更に臨床的なシステムとするために開発を継続する。

#### E. 結論

磁気遮蔽装置を開発することで、X線透視画像の確認が可能となった。X線透視下で尿管内で微細内視鏡を進め、対象とした腎盂内の3次元培養腫瘍塊を確認することができた。現状では種々の懸案があるが、今後徐々に解決していく。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ・Nomori H, Kobayashi T, et al. Sentinel node navigation segmentectomy for clinical stage IA non-small cell lung cancer. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 2007; 133: 780-785.
- ・井上啓史, 執印太郎, 他. 膀胱癌の光力学的診断. Japanese Journal of Endourology and ESWL, 20 巻, 112-120, 2007.
- ・井上啓史, 執印太郎, 他. 蛍光スペクトラム解析に基づく膀胱癌診断の試みー光線力学技術の膀胱癌治療への応用ー. Japanese Journal of Endourology and ESWL, 20 巻, 50-55 2007.

#### 2. 学会発表

- ・濱口卓也, 執印太郎, 他. 膀胱癌に対する光力学的診断(PDD)部位別診断精度の検討. 第45回日本癌治療学会 (2007年10月)
- ・井上啓史, 執印太郎, 他. 尿路上皮癌における5-アミノレブリン酸に基づくプロトポルフィリン IX 生合成とその制御. 第45回日本癌学会総会 (2007年10月)
- ・馬目佳信 分子操作 第46回日本生体医工学会大会専門別研究会16「ナノメディスン研究会」平成19年4月27日 仙台
- ・渡辺美智子, 馬目佳信 3次元培養法によるヒトグリオーマ細胞の形態と特性の変化 Cell Biology Summer Meeting 2007 治療と診断法の融合~Theranostics~ 平成19年7月28日 伊東

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 (出願)  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

超早期がんの低侵襲で効果的、正確で安全な診断・  
治療用微細内視鏡機器装置及びその医療技術の開発に関する研究

分担研究者 執印太郎 高知大学医学部教授

研究要旨：実験用豚を用い尿管経路で直径が0.6mmの微細内視鏡を使い、腎盂内の蛍光物質を取込んだ腫瘍塊を観察することを試みた。また、超伝導コイルで内視鏡先端を動かし3次元的な視野観察が可能かを検討した。その結果、腎盂内の青色に染色された腫瘍塊の観察は可能であったが、画像の観察精度は低く、X線透視も磁場の影響を受け困難であった。また、超伝導コイルによる内視鏡先端の3次元的な誘導による腎盂視野観察も困難であった。今後、これらの点での改良が必要である。

A. 研究目的

泌尿器科領域では直径が3-6mmの腎盂尿管鏡を経尿道に尿管口より挿入し内視鏡診断を行っているが広径のため操作が難しい。観察が困難であり生検や診断も容易ではない。

今回、実験用豚を用いて尿管経路の微細内視鏡で腎盂内の染色された腫瘍塊の観察を目的とし、超伝導コイルで内視鏡先端を動かし3次元的な視野観察を検討した。

B. 研究方法

実験用豚を用い尿管経路で微細内視鏡で腎盂内の染色された腫瘍塊の観察を主眼とし超伝導コイルで内視鏡先端を誘導し視野観察を検討する。これについては下記の手順で行う。

1. 実験用豚を用い開腹し、膀胱を開き、尿管口を発見後尿管口経路でガイドワイヤを挿入しそれに利用してガイド用カテーテルを腎盂まで誘導する。

2. 直径0.6mmの微細内視鏡を用い腎盂内の観察を行う。腎盂内の位置についてX線透視にて観察する。

3. 青色に染色した癌細胞腫瘍塊を、腎盂を開いて腎盂内に固定する。微細内視鏡を用いこの腫瘍塊の形態を観察する。

4. 超伝導コイルで内視鏡先端を動かし3次元的な視野の観察を試みる。

我々は腎盂内の内視鏡誘導の技術的な指導と補助を行う。

（倫理面への配慮）

動物実験委員会で認可済みである。

C. 研究結果

本研究では上記の微細内視鏡開発の第1段階として実験用豚を用いて直径0.6mm以下の微細内視鏡を経膀胱的に尿管口より挿入誘導し尿管と腎盂を観察し光感受性物質を取り込んだ培養腫瘍細胞の微量細胞塊を同定し形態を観察することを試みた。微細内視鏡を腎盂内に導入する方法としてガイドワイヤを尿管口より通過させ、それを通してガイド用広径カテーテルを膀胱内より尿管経路で腎盂に挿入し微細内視鏡を腎盂内に誘導し腎盂内部を観察し腎盂内で蛍光に変わる手段として、まず青色に染色した細胞塊を観察した。さらに超伝導による磁気で内視鏡先端の移動を試みた。その結果、青色に染色した細胞塊の観察は行えた。超伝導コイルによる内視鏡先端の磁場誘導は困難であった。また、内視鏡のX線透視は超伝導に影響され困難であった。

本研究の改善点には、①微細内視鏡の強度、②視野の改善、③超伝導コイルによる内視鏡先端の容易な誘導、④X線透視による内視鏡位置確認の改善などの幾つかがある。これらを徐々に改良することで医療用として優れた内視鏡への発展性が見込まれる。

D. 考察

本研究では初期の操作手順通りに実験用豚を用い尿管経路で微細内視鏡で腎盂内の染色された腫瘍塊の観察を目的とし、超伝導コイルで内視鏡先端を誘導し3次元的な視野観察を検討した。本研究の改善点は上記にも記載したとおり①微細内視鏡の強度の改善、②内視鏡的な視野の改善、③X線透視による内視鏡位置確認の改善などがある。我々の立場からは新規技術を立ち上げるために、これらの点を補助するための有用なカテーテル類やガイドワイヤ等補助的な機材を出来るだけ有用なものに選択する事が挙げられる。

E. 結論

0.6mmの微細内視鏡を用いた実験用豚において尿管経路で腎盂内の腫瘍塊の観察が行えた。今後、視野と操作性の改善が必要である。また、内視鏡誘導の際の技術的な改善も今後の検討課題である。その結果で医療機器として発展性が見込まれる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 井上啓史, 執印太郎, 他. 膀胱癌の光力学的診断. Japanese Journal of Endourology and ESWL, 20巻, 112-120, 2007.

2. 井上啓史, 執印太郎, 他. 蛍光スペクトラム解析に基づく膀胱癌診断の試みー光線力学技術の膀胱癌治療への応用ー. Japanese Journal of Endourology and ESWL, 20巻, 50-55 2007.

2. 学会発表

1. 濱口卓也, 執印太郎, 他. 膀胱癌に対する光力学的診断(PDD)部位別診断精度の検討. 第45回日本癌治療学会 (2007年10月)

2. 井上啓史, 執印太郎, 他. 尿路上皮癌における5-アミノレブリン酸に基づくプロトポルフィリンIX生合成とその制御. 第45回日本癌学会総会 (2007年10月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）  
分担研究報告書

超早期がんの低侵襲で効果的、正確で安全な診断・治療用微細内視鏡機器装置  
及びその医療技術の開発に関する研究

分担研究者 馬目佳信 東京慈恵会医科大学 教授

研究要旨

超音波照射により脳腫瘍を障害し治療効果を微細内視鏡で観察する新規診断・治療システムの確立のための予備研究を行った。初年度である本年は脳腫瘍三次元モデルにおいて浸潤能が異なると思われる新たな細胞株を作製し、治療用超音波のトランスデューサーの振動数と口径について検討した。

A. 研究目的

脳腫瘍はCTやMRIなど従来の技術で超早期に発見することが可能な悪性腫瘍である。中でも全体の4分の1以上を占めるグリオーマは予後が悪く、手術療法に加え放射線療法、化学療法、免疫療法などの補助療法を行っても治癒することは難しく、早急に何らかの効果的な治療法を確立する必要があり、従来の治療法を凌駕する新たな診断・治療技術の開発が望まれている。

一方、グリオーマは頭蓋外への転移は稀であり、この点で他の悪性腫瘍と大きく性質が異なっている。患者の死亡のほとんどが局所での再発によるものであり、これは局所での再発を制御することさえできれば患者の長期生存が期待できることを意味する。すなわち現在、新たに有効な局所療法の開発が必要であり、その効果が期待できる腫瘍と考えられている。このため「超早期がんの低侵襲で効果的、正確で安全な診断・治療用微細内視鏡機器装置及びその医療技術の開発に関する研究」事業を進

めるに当たってこの疾患を対象とした。

本研究では脳腫瘍を正確で安全かつ効果的に治療するため、超音波を用いて腫瘍細胞をキャビテーションによって破壊しながら、微細内視鏡により診断および効果の確認を行なっていく新しいシステムの構築を目指す。中枢神経系はクリティカルな臓器であり新たな技術機器開発を行う際に「安全であること」が最優先の課題となる。このため、本年度、効果に加えて安全性を評価するための脳腫瘍三次元培養モデルの確立を行った。またシステム作製のための基礎となる治療用超音波発振装置用トランスデューサーの条件検討を行った。

B. 研究方法

1. 脳腫瘍三次元培養モデルの構築

ヒトグリオーマ細胞をプラスチックディッシュによる通常の培養ではなく、三次元的に培養することによって生体内の脳腫瘍を近似するシステムを構築することができる。

我々はこれまでに I 型コラーゲンを用いる方法と組織吸収性ゼラチンを用いる方法の開発をしてきたが、本年度、三次元的構造を有するゼラチンマトリックスのメッシュにヒトグリオーマ T98G 細胞を生育させることにより、より生体内に近い性質を持つ脳腫瘍のモデルを作製した。

また脳内で浸潤や増殖様式に影響を与える細胞接着を考慮して、低分子 G タンパク質 Rho に着目した。Rho のエフェクターである Rho キナーゼ/ROCK はミオシン軽鎖のリン酸化やアクチン重合促進を介して細胞収縮や肥大、細胞形態や接着性に影響を及ぼすことが知られている。ROCK のアイソフォームは ROCK1 と ROCK2 の 2 種類があり、接着性などシグナル伝達の際に異なった役割を担っていると考えられている。各々の役割に関してはまだ詳細は明らかにされていないが両者とも異なったシグナルで脳腫瘍の浸潤様式に関与していると考えられている。これら脳腫瘍の Rho キナーゼ/ROCK のモデュレーションを行うため ROCK1, ROCK2 に対する siRNA をデザインし、これらの分子の発現が抑制されたモデルの作製を計画した。siRNA はいくつかの領域をターゲットとしたが、最終的には最も効率的に作用するキナーゼ活性部位に対するものを選択・使用した。siRNA をショートヘアピン構造として細胞内で発現させることとし、レトロウイルスベクター (ROCK2) および真核生物発現用ベクター (ROCK1) を用いてヒトグリオーマ T98G 細胞に導入して、その後 10 日間抗生剤による選択を行った。安定発現株を得ることによって各タンパク量の発現の低下したグリオーマノックダウン細胞株を作製した。

## 2. 治療用超音波照射用トランスデューサー開発のための基礎検討

超音波は外部から体深部にメカニカルフォースを直接与えることができる優れた道具である。これまでも悪性腫瘍に対し超音波の音響エネルギーを集中させて腫瘍を小さくさせる技術が開発されているが、本研究でもマイクロバブルなどの超音波増感剤と併用して音響化学療法の開発を予定している。この際、利用する超音波照射法の特徴は副作用が少なく効果が高い方法を選択する必要がある。前立腺や子宮などの悪性腫瘍の治療として HIFU などの超音波医療器械がすでに販売されているが、中枢神経系をターゲットとするため本研究ではさらに低い強度の超音波で安全で低侵襲かつ効果的な治療法を目指す必要がある。このため本年度、治療装置作製のための基礎となる口径 40mm と 60mm のトランスデューサーについて出力されるビームの分布や収束性を調査した。

## C. 研究結果

1. 三次元培養したヒトグリオーマ細胞組織を光学顕微鏡および電子顕微鏡で評価すると、通常の培養では観察できない三次元的な形態で腫瘍細胞同士が突起を延ばして連絡する像が確認された。マトリックスの組織吸収性ゼラチン基質とは細胞外基質を介して接着しており、また腫瘍細胞同士はグリア線維を介して接着していた。

このグリオーマ細胞にレトロウイルスベクター (ROCK2) および真核生物発現用ベクター (ROCK1) を用いて siRNA を導入し、ベクターが組み込まれたクローンを選択培地で

カルチャーしたところ、siRNAの安定発現株が得られた。これらの細胞をウエスタンブロット法で解析したところ、それぞれ対象となるROCKのアイソフォームの発現が低下していた。

2. トランスデューサーの特性を調べた。本年度、振動数 500kHz 及び 200kHz の発振で口径 40mm と 60mm のトランスデューサーを比較した。500kHz でビームパターンを検討したところ、口径が 60mm のものは 40 mm のものより水平面 (X-Y 断面) において、ビームの分布が狭い範囲に収束していた。垂直面 (Y-Z 断面) においても 60mm のものでは焦点がトランスデューサーから 55-65mm の場、すなわち約 10mm 以内の狭い範囲に分布していることが分かった。これに対し 40mm 口径のものでは焦点分布が 30mm 程度に分散しており、60mm 口径のトランスデューサーの方がフォーカシング性能に優れていることが判明した。

この傾向は 200kHz の振動数でさらに顕著であり、X-Y 断面においても Y-Z 断面に於いても 40mm 口径に比べて 60mm 口径トランスデューサーのほうがビームの分布が狭かった。特に Y-Z 断面では 60mm 口径のトランスデューサーの焦点が 30mm 以内に収まっていたのに対し、40mm 口径のものでは 35mm-100mm 以上に広がってしまい焦点が絞れず、40mm の口径のものは事実上使用が不能なことが示された。

500kHz 及び 200kHz の振動数比較についてはいずれのトランスデューサー口径でも 500kHz の振動数の方が超音波の焦点分布域が狭く、フォーカシングに関して 500kHz の方が優れていることも明らかとなった。

#### D. 考察

微細内視鏡の特性はリアルタイムに病変を直接観察できる点である。脳腫瘍への超音波による音響エネルギーによる治療との組み合わせは、治療の過程でどの部位に残存腫瘍が存在するのかを常に確認しながら超音波を追加照射できるため安全かつ効果が高い治療法の開発が可能となる。またグリオーマにも様々な病態があり、脳深部への浸潤性や様式の異なるモデルの作成が大切であると思われる。従来のグリオーマ細胞株に加えて ROCK1, ROCK2 の発現の低下した株を作成できたため、様々な臨床経過の脳腫瘍に対する技術開発が可能となろう。三次元培養と併用することで治療の最適化が図られるので今後の動物実験での個体数の軽減につながり、経済面からも動物愛護の観点からも意義が高いと考えられた。また今回、超音波照射用トランスデューサーの条件が決定できた。本年度の成果は来年度以降の技術開発に直接使用することができ、この成果によって *in vitro* での実験で照射時間や強度の最適化を行うことが可能となった。

#### E. 結論

脳腫瘍三次元モデルにおいて浸潤能が異なると思われる新たな細胞株を作製した。これらの細胞では低分子G蛋白Rhoの信号伝達の下流に位置するROCK1またはROCK2の発現が低下していた。また機器開発における超音波トランスデューサーは振動数500kHz、口径は60mmの方が望ましいとの結論を得た。

#### F. 研究発表 [学会発表]

馬目佳信 分子操作 第 46 回日本生体医  
工学会大会専門別研究会 16「ナノメディシ  
ン研究会」 平成 19 年 4 月 27 日 仙台  
渡辺美智子、馬目佳信 3次元培養法によ  
るヒトグリオーマ細胞の形態と特性の変化  
Cell Biology Summer Meeting 2007 治療と  
診断法の融合～Theranostics～ 平成 19  
年 7 月 28 日 伊東

G. 知的財産権の出願・登録状況〔特許取  
得、実用新案登録、その他〕

本年度はモデル確立およびトランスデュー  
サー開発用基礎データの収集であり知的財  
産権の出願や取得は行っていない。

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業：ナノメディシン研究）

分担研究報告書

超早期がんの低侵襲で効率的、正確で安全な診断・治療用微細内視鏡機器装置  
及びその医療技術の開発に関する研究

分担研究者 大原健一

ペンタックス株式会社 医療機器管理担当

研究要旨

平成18年度まで分担研究として開発を進めてきた、先端に磁性体を設けて体外からの磁気誘導装置によって牽引され、細径カテーテルに挿入可能な微細内視鏡の開発を継続して行った。

本年度では、内視鏡挿入先端部に外径0.8mmの磁性体を固定し、昨年度と同様に内視鏡挿入部に柔軟性を持たせることを目的に、多成分ガラスを材料に使用した画像伝達用光ファイバー束を用いながら、挿入部径を0.8mm以下で可能な限り細径化することを検討し、画像伝達用光ファイバー束のみを内部に設け、外周を合成樹脂で保護した挿入部径0.3mmの実験用微細内視鏡を試作した。また、ブタを用いた動物実験を実施し、超伝導コイルからなる改良型試作磁気誘導装置により、従来に比べてより誘導され易くなったことをX線透視装置を用いて確認した。また、挿入部径0.8mm以下を保ちながら、画像伝達用光ファイバー束と共に、対象物を照明するための照明用光ファイバー束を内部に設け、外周を合成樹脂で保護した実験用微細内視鏡を試作し、ブタを用いた動物実験により、青色に着色した仮想病変の識別が可能であることを確認した。

さらに、前記実験用微細内視鏡の照明光量を考慮して、高感度CCDカメラを微細内視鏡に接続した実験により、微量な光が照射される条件下で、モニター上で文字が判別できることを確認した。

A. 研究目的

微細な気管支、血管、消化器などの管腔内を自由に動き、高度な診断と治療を操作技術に依存せず、容易にかつ高精度に実施可能にするために、細径カテーテルなどに挿入可能で、外部から非接触で高度な制御が可能であると期待できる磁気により誘導可能な視認機器を開発することは、癌をはじめとした病変の早期発見と正確な早期診断が可能となり、低侵襲の治療が標準化され、医療の低侵襲化、効率化、医療費の削減に寄与する。

このような考えに基づき、昨年度まで萌芽的先端医療技術推進研究事業において上記視認機器として先端に磁気誘導用として磁性体を

設けた微細内視鏡の開発を進めてきた。

研究初年度の本年度では、微細内視鏡の開発を継続して行い、体外に設けた磁気誘導装置によって誘導し易くするために更なる細径化を検討すると共に、対象物を視認し易くするための照明用光ファイバーを内部に設けた微細内視鏡の開発を行い、性能の向上を進めていく。

B. 研究方法

まず、昨年度と同様に、体外からの磁気誘導装置により誘導可能なように、磁性ステンレスからなる磁性体を微細内視鏡の先端部に設ける。磁性体の外径は、細径カテーテルに挿入することを想定して外径0.8mmとする。



次に、画像伝達用光ファイバー束に関しては、昨年同様に多成分ガラスを用いることとし、挿入部の柔軟性の向上を目指して、前年度の外径0.5mmよりも更に細径化することを検討する。

さらに、照明用光ファイバー束に関しては、多成分ガラスや合成樹脂からなるファイバー等を用いて、前記画像伝達用ファイバー束を使用しつつ、内視鏡挿入部外径を0.8mm以下に保つことを条件に、内蔵可能なファイバー本数に関する検討や両端の固定方法を含めた組み立て方法の検討を行う。

また、実験用微細内視鏡には対物レンズ及び接眼レンズを組み込んで、内視鏡画像が確認できるようにすると共に、照明用光ファイバー束を内蔵した微細内視鏡では、光源装置に接続可能な差込部を設けるようにする。

そして、これらの検討結果をもとに実験用微細内視鏡を試作し、机上並びに動物実験により、その有用性を確認する。

さらに、微細内視鏡の外径の制約から照明用光ファイバー束を通しての光量がかかなり少なくなることが予想されるため、前記実験用微細内視鏡の接眼部に高感度CCDカメラを接続して、モニター上で内視鏡画像を確認しながらその有用性も確認する。

#### (倫理面の配慮)

動物愛護の観点から、動物実験を行う場合に使用するミニブタは必要最小限に留めるようにした。

#### C. 研究結果

試作した実験用微細内視鏡を図1及び図2に示す。

また、それぞれの仕様を表1に示す。

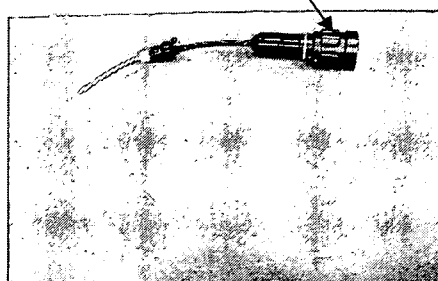
図1の実験用微細内視鏡は、画像伝達用ファイバー束の周りを合成樹脂からなるチューブで被覆して挿入部とした。

但し、細径化のためファイバー本数としては4百数十本程度となった。

表1：実験用微細内視鏡仕様（単位：mm）

No.	1 (図1)	2 (図2)
先端部径	0.8	0.8
挿入部径	0.3	0.6~0.8
有効長	1000	990
照明用光ファイバー	なし	あり

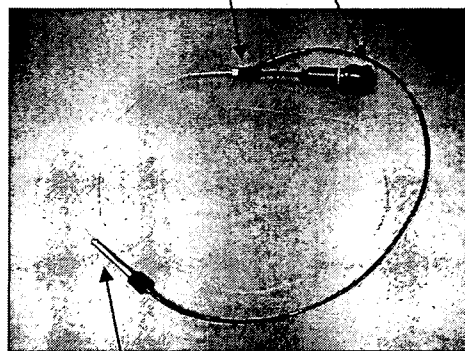
接眼部 (CCDカメラ接続部)



先端部 (拡大)

図1：実験用微細内視鏡  
(画像伝達用ファイバー束のみ内蔵)

分岐部 接眼部 (CCD  
カメラ接続部)



光源差込部

先端部 (拡大)

図2：実験用微細内視鏡  
(画像伝達用光ファイバー束及び照明用光  
ファイバー束を内蔵)

図2の微細内視鏡は、図1で用いた画像伝達用光ファイバー束の片側に照明用光ファイバー束を配置して、その外周を合成樹脂からなるチューブを被覆して内視鏡挿入部を形成した。

また、途中に分岐部を設けて、照明用光ファイバー束を分岐させて、端部を光源差込部に固定するようにした。

内視鏡の先端部は、両方とも外径0.8mm、長さ4mmの磁性ステンレスからなる磁性体を固定し、その内部には対物レンズを設けるようにした。

また、図2で示した実験用微細内視鏡では、照明用光ファイバー束の一端も磁性体内に配置して、光源装置からの照明光が内視鏡先端から照射可能にした。

前記試作実験用微細内視鏡を使用し、ブタを用いて以下のような動物実験を行った。

#### 1. 微細内視鏡先端部湾曲動作実験

はじめに、ブタの尿管に細径カテーテルを挿入して、その中に、試作した実験用微細内視鏡(図1に示す)を挿入し、内視鏡の先端を腎盂内に突出させた状態にした。

使用した細径カテーテルの仕様は、外径：5Fr、内径：1.1mm、全長：96cm。

次に、超伝導コイルを用いた改良型試作磁気誘導装置(榊玉川製作所様製)を用いて、内視鏡先端部に設けた磁性体を体外から磁氣的に誘導させる実験を行った。

その結果、X線透視装置によって前年度よりも内視鏡先端部が誘導され易くなったことが確認できた。

#### 2. 病変部確認実験

はじめに、腎盂内に青色に着色した仮想病変を取り付けた。

次に、尿管に1と同じ細径カテーテルを挿入して、その中に、試作した実験用微細内視鏡(図

2に示す)を挿入し、通常のCCDカメラを用いてモニターにて内視鏡画像を観察した。

照明用としてキセノン光源を用いた。

その結果、病変の輪郭まではわからなかったが、青色によって病変部の所在を確認することが可能であった。

#### 3. 高感度CCDカメラによる内視鏡画像確認

使用した高感度CCDカメラと実験用微細内視鏡と接続するアダプターを図3に示す。



高感度CCDカメラ アダプター

図3：高感度CCDカメラ及びアダプター

試作した実験用微細内視鏡を、上記アダプターを介して上記高感度CCDカメラに接続し、ブタの体内及び微量の光が取り込める状態に設定した暗箱の中での内視鏡画像をモニターにて確認した。

その結果、ブタの体内では、実験用微細内視鏡の画像伝達用光ファイバーの折れが実験中に増加した影響もあり、観察像が不明瞭な状態であった。

一方、暗箱の中の文字はカメラの感度をあげることによって確認可能であった。

#### D. 考察

動物実験等の結果から、今回試作した実験用微細内視鏡の外径は0.3mmと、昨年度の試作機に比べて外径が0.2mm細くなっており、そのため、内視鏡挿入部の柔軟性が増したことや、先端部に設けた磁性ステンレスの大きさを前年度に比べて大きくしたことなどから、昨年度

と挿入部位は異なるが、昨年度より微細内視鏡の先端部が磁気誘導装置によって誘導され易くなったと考えられる。

一方、細径化のため、画像伝達用光ファイバーの本数を減らしたことから解像力が低下したうえに、挿入部作製中や微細内視鏡の細径カテーテルへの挿入抜去を何度も繰り返していくうちにファイバー折れが増加したため、内視鏡画像では何を見ているか判別できない状態になってしまった。

このことは、視認装置としての基本的な性能が低下したことになるため、今後改善しなければならぬ重要な点と思われる。

対策として、画像伝達用光ファイバー束の作製方法等を見直して、挿入部作製中のファイバーの素線折れを減らすようにすることや細径カテーテルへの挿入抜去を何度も繰り返していくと、内視鏡挿入部の腰もなくなるとともに、ファイバー折れも増加するため、外皮チューブなどによる保護方法の再検討も必要と思われる。

さらに、高感度CCDカメラを用いることにより、微量の光で暗箱の中の文字が判別できたことから、照明用光ファイバーの本数をもっと減らすことも可能と考えられる。これにより、照明用光ファイバーを画像伝達用光ファイバーに置き換えることによりファイバー本数を増やして、解像力の改善も進められると期待できる。

#### E. 結論

多成分ガラスからなる画像伝達用光ファイバー束に合成樹脂からなる外皮チューブを被覆して形成した外径0.3mmの内視鏡挿入部を有する実験用微細内視鏡を試作して、ブタを用いた動物実験を行った。その結果、体外に設けた改良型試作磁気誘導装置によって、前年度より内視鏡先端が誘導され易くなったことをX

線透視装置によって確認した。

一方、細径化により画素数が減少したこと、挿入部作製中や実験中にファイバーの折れが増加したことなどにより、内視鏡画像の劣化が進んだことから、今後その対策を中心に検討を進めていく。

また、前記実験用微細内視鏡挿入部に照明用光ファイバーを内蔵した外径0.8mmの実験用微細内視鏡を試作し、ブタを用いた動物実験を行った。その結果、ブタの体内に取り付けた仮想病変部を通常のCCDカメラを用いた内視鏡画像から、色による判別が可能であることを確認した。

さらに、高感度CCDカメラを接続して、微量光でも文字の判別が可能であることを確認した。

このことから、前記のように高感度CCDカメラを用いることで、照明用光ファイバーの本数を減らすことも可能になると考えられるため、今後画像伝達用光ファイバーの本数を増やすことによる解像力向上の検討も進めていく。

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的所有権の取得状況

なし

以上

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業：ナノメディシン研究）

分担研究報告書

超早期がんの低侵襲で効果的、正確で安全な診断・治療用微細内視鏡機器装置

及びその医療技術の開発に関する研究

分担研究者 玉川 克紀 株式会社玉川製作所 代表取締役

研究要旨

管腔を介して病変部の診断、治療を行う微細内視鏡を磁気で誘導するための超電導磁気誘導装置の開発を行った。今年度開発試作した超電導磁気誘導装置は、誘導に不可欠な X 線透視装置との併用を可能とするための対策を講じた。磁界発生部である超電導電磁石は、漏れ磁界の低減と離れたところに効率よく磁界を作用させるために、鉄芯の入った構造とした。この超電導磁気誘導装置を用いて動物実験を実施し、X 線透視下での誘導が基本的に可能であることを確認した。

A. 研究目的

対象の深部あるいは細部の超早期がんを診断・治療する微細内視鏡を、超電導電磁石によって誘導する磁気誘導装置は、ブタを用いた動物実験により生体内での微細内視鏡の動作が確認される段階まで進行した。

今後臨床への応用を考慮した場合、誘導装置として不可欠の要素であり、研究当初からの目標でもあった、X 線透視装置の併用による X 線透視下での誘導が可能な磁気誘導装置の開発が必要となった。

X 線透視装置は、磁界発生部からの漏れ磁界により大きく影響を受け、撮像が困難になることが以前の実験で示されている。また、撮像に影響が出るばかりでなく、機器の損傷を招く恐れもあり、漏れ磁界対策としての磁気シールドの必要性が重要視さ

れた。

そこで、動物実験施設において動物実験の実施が可能である（施設の設備や大きさ、重量などを考慮して）ことを前提として、超電導電磁石の仕様と磁気誘導装置のレイアウト、構成を決定し、それに対応する最適な磁気シールドの形状や大きさなどを実験によって決定し、最終的に試作機を製作、動物実験によって操作性と安全性が損なわれず X 線透視装置が併用できることを実証することを目的とした。

B. 研究方法

1. 磁界発生部の仕様、装置のレイアウト、構成の決定

磁界発生部である超電導電磁石の仕様と、磁界発生部と被誘導物、X 線透視装置の位