

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小林 寿光

平成21（2009）年4月10日

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小林 寿光

平成21（2009）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 …10
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 …11
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 …16
佐野 浩
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 …22
玉川克紀

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……27

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ……28

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

研究代表者 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医療技術を、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を受けて、より臨床使用を想定した実験系を構築して開発を行った。今年度の機器装置は昨年度の機器装置が抱えていた、誘導用磁力、磁気遮蔽装置の性能、内視鏡画像などの懸案が改良された。動物実験において検証を行ったが、尿路系における診断・治療に高い臨床的な意義が見出されたため、今後は尿管微細内視鏡機器装置及びその診断・治療技術の開発を積極的に行っていく。

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
佐野浩・HOYA株式会社 PENTAX ライフケア事業部先端技術担当部長
玉川克紀・株式会社玉川製作所代表取締役

A. 研究目的

診断機器の進歩や普及によって、微小な病変が多く発見されるようになった。これらはがんであれば適切な治療を行うことで治癒が期待できる、これまで以上に早期のがんである可能性がある。しかし画像診断で確定診断は難しく、生検を行おうとしても通常の方法では微小であるために病変への到達が難しい。CTガイド下に経皮的針穿刺生検を行えば、希とはいえ重篤な合併症が発生する可能性があり、播種や転移の

可能性も否定し得ない。手術的に生検を行えば、診断手技としては侵襲が過剰である。また確定診断が得られても、これまでの標準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がある。

これらの病変ががんである場合でも通常のものよりは早期であり、その診断・治療に伴う侵襲は、標準的ながんに対して行われるものより低く抑える必要がある。また病変が良性であれば、侵襲的な診断手技は本来行うべきではない。

血管や気管支、尿管などの管腔を介した病変へのアプローチは、基本的に組織を損傷しないために低侵襲であるが、微小な病変への到達は、微細な末梢分枝の選択が難しいために容易ではない。またその到達のための技術は、基本的にを行う医師のそれに

依存しているが、医師の技術に大きく依存する医療技術は標準化が阻害され、無理をすれば安全性を犠牲にしかねない。

そこで血管や気管支、尿管などの管腔等を介して、低侵襲で効果的、正確で安全な診断・治療を行う、微細内視鏡機器装置を、微細化のために磁気誘導も導入して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も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。

なお実質的な腫瘍も、例えば嚢胞や壊死などの領域を持つ、また治療後に空隙を確保するなどして、同様の診断・治療が可能である。術後の病変部にドレーナージューブなどが挿入されていれば、それを介した診断、治療も可能となる。このような実質腫瘍に対する診断・治療にも配慮して開発を行う。

なお今年度は、昨年度の動物実験によって確認された、種々の問題に対する解決を行うことで、前述の目的の達成に向かうことを目的とする。

B. 研究方法

一般に内視鏡はその内視機能によって目標に到達して診断・治療を行うが、カテーテルなどでは内腔の確認ができないために、X線透視下に誘導及び診断・治療を行う。本研究において開発する微細内視鏡は、カテーテルなどにも挿入可能であり、カテーテルを内視鏡化することも想定している。

そこで、その誘導及び診断・治療も、X線透視を内視機能に併用するとして、操作性及び効果を相乗的に向上するものとする。

X線透視下に誘導する場合の問題は、磁気がX線透視装置の光電子増倍管に干渉するために、画像の確認ができないことで、当初から確認されていた懸案である。これを解決して画像を確認するためには、誘導用の強力な磁界内にある光電子増倍管周囲を広範に覆い、その内部の磁界を地磁気レベルにまで低減する必要があるが、このような磁気遮蔽はこれまで開発が難しいと考えられていた。

そのため本研究計画では、磁気誘導装置を臨床的に使用する場合には、将来普及するであろう光電子増倍管を持たないフラットパネルX線透視装置を使用することを前提に、研究開発では必要に応じて対象物を透明化することで、通常光にX線と同等の効果を持たせて画像を確認することを想定していた。

しかしフラットパネルX線透視装置の臨床の場での普及にはまだまだ時間が必要であると考えられ、また実験で対象動物を透明にすることは難しく、更にフラットパネルX線透視装置を導入した動物実験施設もないため、研究の促進のためには何等かの対策を行うことが望ましかった。

そこで昨年度、磁気を強力にシールドすることができる磁気遮蔽装置の開発を積極的に行った結果、各種技術を複合することで開発の目処が立ち、この結果を受けてX線透視を前提としたより臨床的な開発に研究全体を進めた(変更申請済)。更にX線透視を前提とすることで、誘導用超小型超伝導電磁石を含めた誘導システム全体を、大

幅に小型でかつ簡易なものとする事ができ、この事で臨床導入がより現実的な開発とすることができた。

以上の開発及び製作を行った結果、昨年度に動物実験系を構築して動作検証を行った。実験系は磁気誘導と微細内視鏡の特徴が良く出る領域で、これまで内視鏡診断・治療が難しかった尿路系として、末梢から腎盂に至る間を誘導して診断・治療するものとした。誘導用電磁石は小型超伝導電磁石として、鉄芯を入れた構造とした。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した。磁気遮蔽装置は、種々の予備実験を行い仕様を最終決定して製作した。微細内視鏡は、挿入部先端の磁性体径0.8mmで種々製作した。

以上の機器装置を使用した動物実験において、磁気遮蔽装置を使用することで、X線透視画像のゆがみはあったが、磁気存在下で対象を確認することができた。しかし磁気遮蔽装置が有効なのは超伝導電磁石へのコイル電流が20Aまでであり、腎盂内で有効な屈曲を得るために必要な30Aの電流を流した場合には、磁気遮蔽装置の遮蔽能力の限界を超えるために画像の確認はできなかった。

X線透視下に尿管内を進めた微細内視鏡画像所見は、同時に記録されたビデオ画像で後に詳細を確認することができた。尿管内では、その管腔及び内部の浮遊物などの確認ができた。また腎盂内に固定したメチレンブルーで染色した3次元腫瘍塊を、青色の領域として確認することができた。微細内視鏡の照明光を使用しなくても、特殊高感度カメラ(EM-CCDカメラ)を使用することで、外部から漏れ込む光のみで内腔の

確認ができた。

以上の実験を通して、種々の問題が確認された。微細内視鏡に関しては、細径化の結果として画像ファイバー数が不足するために、通常の内視鏡に比較して画質が劣ると共に、広範な領域が観察できない、つまり視野角が不足していた。また耐久性にも問題があり、操作中の画像ファイバーの折損が目立った。ところで画像の確認は、通常のCCDカメラの他に、特殊高感度カメラを使用していたが、後者は白黒画像であるために診断能に限界があった。

そこでまず観察光学系の性能向上として、先端部外径0.8mm、挿入部外径0.5mm以下とし、画像伝達用光ファイバーの材料に多成分ガラスを用いることを前提に、これまで限界と考えられていたファイバーの素線径を更に細くし、また画像伝達用ファイバー束の外径を大きくすることで、画像伝達用光ファイバーの本数増加を行う。視野角に関しては、これまでの微細内視鏡の前面の対物レンズの前に装着する、微細凹レンズを新たに開発製作して、併せて90度程度まで広げる。

画像ファイバーの折損は、製作時と使用時に発生していたが、その構造上現時点では根本的な対応が難しい。そこで細心の注意を払い、複数の微細内視鏡を製作することで対策する。

特殊高感度カメラを本研究で開発またカラー化するのには、特に開発費用面で難しい。そこで液晶カラーフィルターを介在させることでカラー化する。

ところで誘導力向上のための微細内視鏡側からのアプローチとして、微細内視鏡先端に設ける被誘導体として昨年度まで使用

した磁性ステンレスの代わりに、これまで微細加工の経験がない純鉄を用いた部材を新たに製作してその効果を確認する。

昨年度の動作検証では、超伝導磁気誘導装置は微細内視鏡の屈曲に十分な磁気吸引力を発生することはできたが、周囲の磁性体の磁気吸引による飛び込み事故が発生する可能性があり、実際には十分な磁力を発生させることができなかった。

そこで超伝導電磁石に関しては、高磁力化と漏洩磁束の低減の両立を図る構造として、鉄心に加えてヨーク（継鉄）を有する構造を開発、試作する。ヨークを鉄心に接合することにより、磁束が鉄心及びヨークに集中し、高磁力化と漏洩磁界の低減が期待できる。

昨年度の実験にて磁気遮蔽装置は確かに磁力発生中でもX線透視画像を確認できるなど、一定の効果があることは確認されたが、腎盂内に微細内視鏡を挿入するために必要な急峻な屈曲を得る磁場に対しては、十分な遮蔽能力を持っていなかった。

このような強い磁界内で画像をX線透視で確認するためには、光電子増倍管周囲を広く地磁気レベルまで低下させる必要があり、種々の開発及びその適正化が必要である。しかし磁気遮蔽装置開発環境ではX線透視装置を利用することができないためにその評価が難しい。そこで同様の現象を呈するCRTモニタを擬似的にX線透視装置の撮像部の位置に設置して、影響及び対策の効果を確認していく。この実験系を利用して、アクティブシールドを強化して強い磁力への対策を行う。

昨年度に対象とした三次元腫瘍細胞塊は、T24細胞とタイプII組織吸収性ゼラチン

をデバイスに用いて三次元化を図ったが、対象が単にメチレンブルーで染色されているだけであるため、微細内視鏡の診断能は明確に評価できなかった。

そこで今年度は、脳腫瘍(KNS脳腫瘍細胞株)と膀胱癌(T-24膀胱腫瘍細胞株)を用いて3Dマトリクス培養を行う際に、内部で腫瘍細胞塊が散在する島状の分布をするように三次元腫瘍塊を作製する。また色素だけではなく、GFPを組み込んだ腫瘍細胞による3次元腫瘍塊も作製し、その蛍光を確認することで微細内視鏡の診断能を、将来の医療技術開発をも想定して確認する。

C. 研究結果

微細内視鏡の画像用光ファイバーの本数に関しては、素線径を昨年度より約10%細くし、ファイバー束の外径を1.6倍にしたことで、3倍程度に増加することができたが、同時に製作時にファイバー折れが多く発生する不具合も生じた。また昨年度装置の照射光量には余裕があったことから、照明用光ファイバーの本数を約半分にすることで、外径の増大を抑えた(図1)。

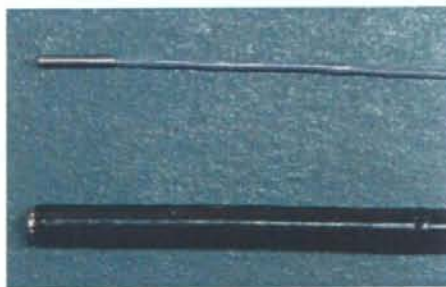


図1 微細内視鏡(上段、先端部磁性体外径0.8mm)と市販最細径内視鏡(下段、先端部外径2.4mm)



図2 広視野角化用凹レンズ（白枠内）

広視野角化に関しては、外径 0.35mm の凹レンズを試作し（図2）、微細内視鏡先端のセルフロックレンズの前側に貼り合わせた。この結果、机上で視野角が約 90° 程度になっていることが確認できた。一方、対象物が少し離れると画像のボケが発生し易い傾向も見られた。

内視鏡先端に設ける被磁気誘導体に関して、磁性ステンレスと純鉄の磁化特性を確認した結果、磁性ステンレスに比べて純鉄のほうが、1.3 倍程度値が大きいことがわかった。

超電導電磁石のヨークは、背面ヨークと、上側ヨーク及び下側ヨークの3ピース構造とした。この構造がもたらす強度と熱の問題について最適化を図り、新規設計の超電導コイルと共に超電導電磁石の試作を行った。発生磁界については、磁極表面で昨年度に比して2倍以上となり、磁気吸引力に関与する磁気勾配も増大した（図3）。

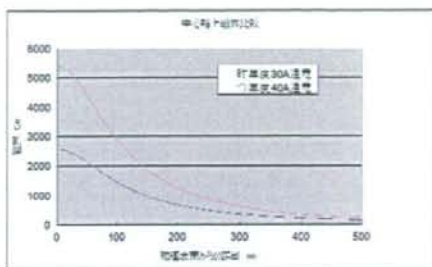


図3 超電導電磁石の性能

磁気遮蔽装置の性能向上のために、CRTモニターを擬似的検出器として用いて磁界の影響と遮蔽の効果、キャンセルコイルの効果について検証した。この実験から透視装置の撮像部には2段にしたキャンセルコイルを設置し、アクティブシールド効果を向上することとした。

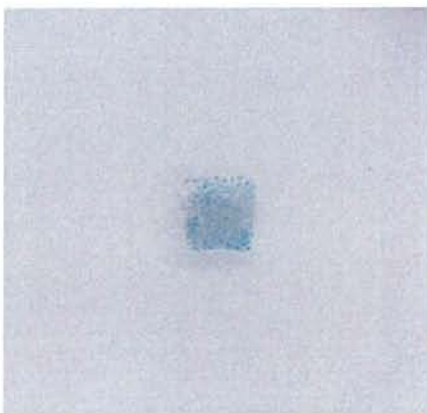


図4 KNS 脳腫瘍細胞株を使用した三次元腫瘍細胞塊（アルシアンブルー染色）

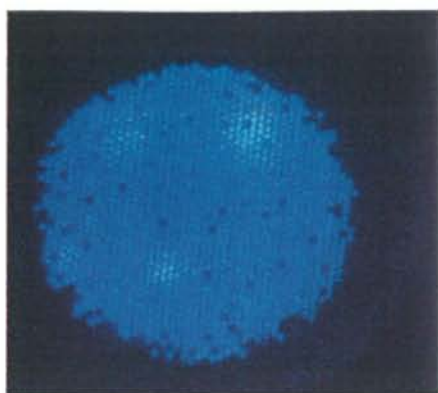


図5 外部照射光による生体外のGFP導入脳腫瘍細胞株の微細内視鏡画像

三次元腫瘍塊は、目的に合わせ適切に作製された(図4)。生体外で外部照明光を用いることで、微細内視鏡を介してGFPの発光を、カラー化した特殊高感度カメラを使用して確認することができた(図5)。しかし微細内視鏡の照明光では光量が足りず、蛍光を確認することはできなかった。

動物実験系(ブタ)を構築して(図6)、開発された機器装置の検証を行うと共に、臨床医学的評価を行った。



図6 動物実験系

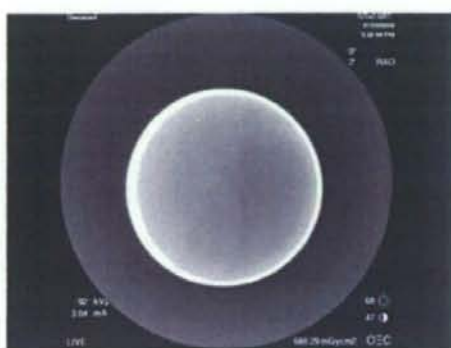


図7 X線透視画像(40A 通電、キャンセル無)



図8 X線透視画像(40A 通電、キャンセル有)

自由空間で微細内視鏡は、磁気誘導装置により十分に屈曲することが確認された。またX線透視画像は、十分な屈曲が可能な磁気コイルへの40Aの通電状態では確認できないが(図7)、アクティブシールドによってキャンセルを行うと、微細内視鏡が確認できた(図8)。しかし画像は拡大されて視野が狭くなり、また回転してゆがむことが確認された(図9)。

尿管内に挿入したカテーテルを介して微細内視鏡を挿入したが、内腔の浮遊物や尿管壁、対象の腎盂内の確認ができた(図1

0)。病変等がない正常の内腔であるために、病変の診断能力を確認することはできなかったが、何等の病的変化があれば確認できることが期待できる画質であった。

腎盂内に三次元腫瘍塊を固定して、外部光源を用いてカラー化 EM-CCD カメラで微画像を確認した。その結果、島状に存在する腫瘍細胞塊の GFP からの蛍光を確認することができた (図 11)。



図 9 屈曲した微細内視鏡 (30A、遮蔽有)



図 10 微細内視鏡の画像 (尿管内)



図 11 脳腫瘍 (GFP) のカラー化 EM-CCD カメラ画像 (外部光源使用)

D. 考察

今回の機器装置の開発では、当初の目的をほぼ達成することができた。微細内視鏡の画質は画像ファイバーの増加と共に確実に向上し、昨年度のものに比較して画素のざらつきも少なく、対象を明確に確認できるようになった。また広視野角化を図ることで、対象領域を広く観察できるのみならず、特に尿管内のように長軸に長い管腔において、正面視のみならず側方視が可能となり、臨床実使用における診断能の向上が期待された。その一方で、正面視を行った場合には相対的に画素が減少するために、更なる高画素化も必要であると考えられた。

製作時に画像ファイバーの折損が発生することは、今回も避けることができなかった。これは先端に磁気誘導用金属キャップを装備する構造上、回避することは難しい。しかし今回の動物実験にて、操作中の折損は目立たなかった。よって具体的な臨床的な用途を決定できれば、必要ない構造や要件を積極的に省略することで、ニーズを十分満たす微細内視鏡を開発していくことができると考えられる。

今回の磁気誘導装置は昨年度の装置に比較して、約2倍の磁力を発揮できると共に、相対的に漏洩磁場も低減されている。その結果、誘導に必要な磁力を安全に発生することができた。また微細内視鏡の先端を十分屈曲することのできる磁力でも、改良された磁気遮蔽装置を使用することでX線透視画像の確認ができた。以上のことから、今年度の機器装置は昨年度のそれに比較して、十分な性能向上が図られたと考えられる。

今回対象としてGFPを組み込んだ三次元腫瘍塊を使用した。このような形で病変が明確に確認できる技術が実際に臨床的に応用できれば理想的である。しかし残念ながら、このような理想的な診断薬を臨床的に利用する方法は現時点ではない。診断技術の問題に関しては、対象とする領域や疾患と併せて検討し、今後積極的に目的に合わせて構築していく必要がある。

今回誘導路として対象にした尿路系は、長いために誘導の意義が明確になると共に、血管や気管支のように分枝していないために、機器装置への要求も比較的単純である。その一方でこのような領域における内視鏡検査はこれまで希であり、特にここに発生する移行上皮癌の特質を考えた場合、微細内視鏡による診断・治療に十分な臨床的意義があると考えられる。

今回の実験による微細内視鏡機器装置の性能及び臨床的意義の確認により、尿管微細内視鏡診断・治療は臨床的に高い意義が期待できると考えられた。更に今回の微細内視鏡の画質でも十分臨床的な意義が期待できると考えられたために、今後の開発は尿管微細内視鏡の開発を中心として行って

いくこととした。

診断・治療技術の開発に関しては、この領域での内視鏡診断・治療概念がこれまでにないために、他領域の内視鏡診断・治療の技術も導入して、臨床的な微細内視鏡のデータを集積することとも併せて行っていく。

E. 結論

今年度開発した磁気誘導微細内視鏡機器装置は、昨年度の懸案の多くを解決することができた。現時点においてまだ解決すべき問題は多いが、今回の動物実験によって確認された尿路における高い臨床的意義を考慮し、今後尿管微細内視鏡機器装置の開発に注力すると共に、その診断・治療技術の開発も行っていく予定である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

・井上啓史、執印太郎、光力学的診断を併用した経尿道膀胱腫瘍切除術、Japanese Journal of Endourology and ESWL. 21(3):323-331, 2008.

2. 学会発表

・井上啓史、執印太郎、他、膀胱癌に対する光力学診断補助下経尿道的膀胱腫瘍切除術、第22回Endourology・ESWL学会総会(2008年11月)

・井上啓史、執印太郎、他、膀胱癌に対する光力学診断補助下経尿道的膀胱腫瘍切除術、第29回日本レーザー医学会(2008年11月)

・Y Manome, T. Kobayashi, M. Watanabe.

Morphologic characterization of human glioma cells in three-dimensional cell culture 9th Asia-Pacific Microscopy Conference (APMC9) Nov. 4, 2008, ICC, Jeju, Korea

・Manome Y, Watanabe M. Three-dimensional cell culture of human glioma cells and morphological differences. Eighth International Conference of Anticancer Research. Oct 18, 2008, Kos, Greece.

・ Manome Y, Hataba Y, Watanabe M. Morphology of human glioma cell lines in three-dimensional cell culture Cell Biology Summer Meeting 2008 Molecular Meta-strategy ― 分子レベルの診断・治療をめざす網羅的戦略 ― 平成 20 年 7 月 5 日、千葉

・ 渡辺美智子、小林寿光、馬目佳信 遺伝的変異と超微細構造との関連 日本顕微鏡学会第 64 回学術講演会 平成 20 年 5 月 22 日 京都

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
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由で直径0.8mmの視野が改良された微細内視鏡を使い、腎盂尿管の内景と蛍光を発生する腫瘍細胞塊の観察を検討した。また、超伝導コイルで内視鏡先端を動かすことが可能かを検討した。その結果、腎盂尿管内が大径内視鏡と同等かそれ以上に画像観察がなされた。蛍光発生腫瘍塊の観察も可能であった。画像の精度は著しく改善していた。X線透視の視野は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次元的な誘導も困難であった。今後、これらの点でのさらなる改良が必要である。

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。従来の大径は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由で直径0.8mmの視野が改良された微細内視鏡を使い、腎盂尿管の内景と蛍光を発生する腫瘍細胞塊の観察を目的に実験的に検討した。超伝導コイルで内視鏡先端を動かす3次元的な先端誘導も検討した。

B. 研究方法

実験用豚を用い尿管経由で微細内視鏡で腎盂尿管の内景と蛍光を発生する腫瘍細胞塊の観察を、目を主眼として超伝導コイルで内視鏡先端の誘導を検討する。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由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し、腎盂尿管の内景観察を試みる。
2. 蛍光を発生する腫瘍細胞塊を、培養器上で微細内視鏡で観察後、腫瘍を腎盂に固定し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。
3. 超伝導コイルで内視鏡先端誘導を検討する。

(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

昨年の結果を受け、微細内視鏡開発の第2段階として実験用豚を用いて視野改良された直径0.8mmの微細内視鏡を膀胱内より尿管口経由で挿入し尿管と腎盂を観察し、蛍光発生腫瘍細胞塊を壁に固定し形態観察を試みた。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、昨年の結果に比べて尿管と腎盂の内景は明らかに優れた精度で観察され画像精度の著しい向上が認められた。蛍光発生する腫瘍細胞塊は培養容器上でも暗視野で形態観察が可能であった。暗視野での蛍光発生腫瘍細胞塊を腎盂の壁に固定しての形態観察は細胞のviabilityの問題もあるが、部分的に観察された。超伝導コイルによる内視鏡先端の磁場誘導は依然やや困難であった。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。

本研究での今回改善された点には、①正常光源による視野と画像所見②暗視野画像所見であった。今後改善が望まれるのは①微細内視鏡の強度、②超伝導コイルによる内視鏡先端の誘導性、

③X線透視による内視鏡位置確認の改善などがある。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由で微細内視鏡で腎盂内の蛍光発生腫瘍細胞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。本研究で昨年より改善された点は上記にも記載したとおり①正常光源による視野と画像所見②暗視野の画像所見であった。今後の改善点は③X線透視による内視鏡位置確認などがある。我々の立場からは新規技術を立ち上げるために、これらの点を改善するための補助用ガイド用カテーテル類やガイドワイヤ等を出来るだけ有用なものにと改良する事が挙げられる。

E. 結論

0.8mmの微細内視鏡を用いた実験用豚において尿管経由で腎盂内の腫瘍塊の観察が行えた。今回、正常光源下と暗視野での画像所見が著しく改善され臨床上の使用はほぼ可能と考えられた。内視鏡の強度と内視鏡誘導の際の技術的な改善が今後の検討課題である。その結果で医療機器として利用可能である。

G. 研究発表

1. 論文発表
井上啓史、執印太郎、光力学的診断を併用した経尿道膀胱腫瘍切除術、Japanese Journal of Endourology and ESWL. 21(3):323-331, 2008.
2. 学会発表
井上啓史、執印太郎、他、膀胱癌に対する光力学診断補助下経尿道的膀胱腫瘍切除術、第22回Endourology・ESWL学会総会（2008年11月）
井上啓史、執印太郎、他、膀胱癌に対する光力学診断補助下経尿道的膀胱腫瘍切除術、第29回日本レーザー医学会（2008年11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 総合医科学研究センター
DNA医学研究所 分子細胞生物学研究部 教授

研究要旨
外部から物理エネルギー投与により脳腫瘍を破壊し、その治療効果を微細内視鏡で追跡・観察する新規診断・治療システムの確立のための研究を進めている。この研究のために脳腫瘍を三次元培養することによって臨床の脳腫瘍のモデルとなる実験系を提唱し、通常の培養細胞と遺伝子発現のパターンが異なることを示した。また、細胞増殖や浸潤に関係すると思われる低分子Gタンパク質Rhoに注目し、エフェクターであるRhoキナーゼ/ROCKのアイソフォームを低下させた細胞を樹立し性質を調べた。これらの細胞を使用することにより今後、微細内視鏡で追跡すべき脳腫瘍のモデルを確立した。

A. 研究目的

脳腫瘍はCTやMRIなどの発達や普及、ドックなどの浸透によって超早期に発見することが可能な腫瘍である。脳には様々な種類の細胞が存在するため発生する母地より色々な組織型の脳腫瘍が発生し、全体の半数以上を良性の腫瘍群が占めるが、脳腫瘍全体で見ると約4分の1以上を占める神経膠腫、すなわちグリオーマが発生の頻度も高く、予後不良で悪性のものの代表例となっている。この腫瘍は手術に加え放射線療法、免疫療法などを行っても生命予後に関しては依然厳しいものがあり、近年優れた化学療法剤が利用されているがその効果は限られている。このように治療が困難なグリオーマだが、腫瘍の頭蓋外への転移は稀であり、腫瘍死のほとんどが局所再発であることから、現在、有効な局所療

法の開発が脳腫瘍制圧の大きな鍵となっておりこの分野の研究が大きく着目されている。すなわち局所での腫瘍の増大を予防できれば患者の長期生存、場合によっては完全な治癒が期待できる。このため、本「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」事業でも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、超音波や光線などの物理的な外力を用いて腫瘍細胞を破壊し、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している。中枢神経系は重要な臓器であり新たな技術機器開発を行う際に安全性の確認が最優先される。微細内視鏡は脳内の状況を視覚的にリアルタイムで確認す

ることができるため先端治療技術の効果や副作用を確認するのに最適な道具である。本年度は内視鏡で確認しなくてはならない脳腫瘍の浸潤や発育を検討するためこれまでに確立した脳腫瘍培養法や実験株の性質を検討した。

B. 研究方法

1. 脳腫瘍三次元培養モデルの遺伝子・タンパクリン酸化の検討

ヒトグリオーマ細胞を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。このモデルは脳腫瘍細胞に対する超音波照射の影響を調べるために開発された。すなわち生体内での脳腫瘍は三次元的に増殖・浸潤するのに、腫瘍細胞を用いた通常の培養ではディッシュやフラスコの底面を用いるため平面的な増殖しかおこさない。このような条件は生理的な環境を反映しておらず、治療条件を培養実験で得たとしても必ずしも動物や生体で効果を挙げるとは限らない。また二次元の培養では超音波照射によって細胞が容易にフラスコ底面から剥げ落ちてしまう。これまでに三次元的構造を有するゼラチンマトリクスメッシュにヒトグリオーマ T98G 細胞を接着・増殖させることにより、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。本年度、三次元培養の腫瘍細胞がどの程度通常の培養と異なっているのか調べるため、発現が変化する遺伝子の同定を行った。三次元ゼラチンマトリクス中で T98G 細胞を増殖させ、10 日目に細胞を回収し、RNA とタンパクを回収した。通常の二次元培養の細胞からも同様にサンプルを回収し、RNA は逆転写酵素で cDNA を合

成させ浸潤や増殖に関連すると思われる遺伝子についてサーマルサイクラーを用いて増幅を行った。リン酸化タンパクについては直接タンパクを SDS-ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動を行いウエスタンブロット法で比較した。

2. ROCK1 および ROCK2 強制発現低下ラット脳腫瘍細胞株の性質の解明

脳内で浸潤や増殖様式に影響を与える細胞接着に低分子Gタンパク質Rhoがある。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。脳腫瘍の増殖や浸潤にこれらの分子がどのように関与しているか調べるため、昨年度までに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RT2ラットグリオーマ細胞株を樹立した。本年度はこの細胞の持つ性質を検討した。トリプシン処理したRT2細胞からCHAPS溶出液でタンパクを抽出・定量してSDS-ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動を行いウエスタンブロット法でROCK1, ROCK2の発現をそれぞれ検出した。細胞増殖能は細胞数測定により算出した。1×10⁴個の細胞を培養用ディッシュにプレートし、24時間ごとに全細胞数を計測することにより細胞倍化時間(doubling time)を決定した。細胞周期はフローサイトメトリーにて解析した。単離した細胞をメタノール固定後、染色体をヨウ化プロビジウム(PI)で染色しフローサイ

トメーターで蛍光量と細胞数を測定した。倫理面に関して動物実験については東京慈恵会医科大学動物実験委員会において承認を受けて行った。また本研究はヒトを対象とした研究ではなく人体への安全性や個人情報等の保護の対象とはならなかった。

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ている。形態変化について細胞膜からの情報が重要であると考え TGF- β /SMAD 系、マトリクスメタロプロテナーゼ系等の遺伝子発現に注目した。RT-PCR 法でこれらの遺伝子の発現を調べたところ最終的に発現の相違を認めたのは TGF- β 、ALK5、ALK1、Smad 2、Smad 4、MMP-2、p38MAPK の 7 つであった。このうち ALK5、Smad 2、Smad 4 の 3 つの遺伝子では発現は大きく異なっており三次元培養では発現はかなり抑制されていた。これに対して TGF- β 、ALK5、MMP-2、p38MAPK では発現の差は前者ほど著明ではなかった。これらはいずれも三次元培養で発現が低下しており今後どのような遺伝子が三次元培養で発現増強するのか興味を持たれた。一方、インスリンや各種成長因子で PI3K の活性化が起こると Akt がリン酸化を受けて NO 産生や細胞の増殖、グリコーゲンの合成や細胞の成長・生き残りなどに影響を及ぼす。RT-PCR 法で Akt の転写にほとんど差を認めなかったようにウエスタンブロット法でも通常の培養、三次元培養、共に Akt のタンパク量そのものの変化

は認められなかった。しかしリン酸化について p-Akt に特異的な抗体で調べると通常の培養で Akt はほとんどリン酸化を受けていないことが分かったが三次元培養では Akt のリン酸化が強く確認された。この結果から三次元培養では細胞の増殖能などに差があることが示唆された。

2. 次に、ROCK1、ROCK2 の発現を各々抑制した細胞で細胞内の ROCK 量を調べると、それぞれ導入した siRNA に対するタンパクの発現が低下していることが確認された。対照となる ROCK に無関係な配列を導入した細胞ではいずれも ROCK の低下は認められたかった。この結果から樹立した細胞株で恒常的に各遺伝子の発現低下が起きていることが示された。また ROCK1、2 共に発現を強制低下させた株は増殖せず、両者の遺伝子を共に恒常的に抑制する細胞は生存することができなかった。ROCK の存在は脳腫瘍細胞にとって大きな関わりを持っているようである。ROCK の低下が細胞増殖能に影響を及ぼすかどうか確認するため、倍化時間 (ダブルリングタイム) を測定したところ、野生株、対照株、各 ROCK1、2 低下株ではそれぞれ 8.7 時間、8.2 時間、9.0 時間、9.4 時間であった。哺乳類遺伝子発現ベクターを導入するとわずかに細胞増殖能が上昇し、ROCK1、ROCK2 の発現の低下により細胞増殖が抑制される傾向は認められたものの実際に観察するとこの差はわずかなもので増殖能に差は認められなかった。またこれらの細胞は全てラットの皮下や脳内に生着させることができた。細胞周期の解析では対照の siRNA 導入細胞では野生型と細胞周期に変化はほとんど見られなかったが ROCK1 発現を低下させた細胞では G0 期の細胞の割合が減

少し、G2/M期の細胞が増加していた。一方、ROCK2発現を低下させた細胞ではG2/M期の細胞の割合が減少した。

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。磁気誘導などの工夫で外径を極めて細くすることができるため、脳などの閉鎖空間もカテーテル等空隙があれば、中の空間を利用して外から直接腫瘍など脳の内部を観察することができる。この際、実際に手術などの後、残存している腫瘍組織の観察が可能なのかなど検討すべき課題が多い。しかしモデルが確立し、本年度の結果から三次元培養、ROCK1とROCK2の分子の発現操作したラット脳腫瘍ともにその性格が判明してきたため、今後どのような面に注目して成果を求めれば良いかという点が明らかになってきた。脳腫瘍への物理的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エネルギーを追加投与できるため、安全かつ効果が高い治療法の開発が可能となる。グリオーマにも様々な病態があり、今回の細胞が脳深部への浸潤様式の異なるモデルとして利用できることになれば、様々な臨床経過の脳腫瘍に対する技術開発を行うことができる。三次元培養と併用することで治療面でも最適化が図られるので今後の動物実験も進むことが予想される。次年度以降、微細内視鏡との組み合わせで治療効果の可視化に挑戦する。

E. 結論

三次元でヒトグリオーマ細胞を培養することにより従来の培養を用いた細胞モデルの問題点が明らかとなった。TGF- β /SMAD 系信号伝達分子、マトリクスメタロプロテナーゼ系等の遺伝子発現や、増殖に関するシグナルのうち Akt のリン酸化が異なるなど通常の培養脳腫瘍との差が示された。またラット脳腫瘍細胞で ROCK1 および ROCK2 の発現を抑制したところ増殖能にはあまり変化を来さないがそれぞれ細胞周期の割合の異なった細胞株が確立された。

F. 研究発表 [学会発表]

Y Manome, T. Kobayashi, M. Watanabe. Morphologic characterization of human glioma cells in three-dimensional cell culture. 9th Asia-Pacific Microscopy Conference (APMC9) Nov. 4, 2008, ICC, Jeju, Korea

Manome Y, Watanabe M. Three-dimensional cell culture of human glioma cells and morphological differences. Eighth International Conference of Anticancer Research. Oct 18, 2008, Kos, Greece.

Manome Y, Hataba Y, Watanabe M. Morphology of human glioma cell lines in three-dimensional cell culture Cell Biology Summer Meeting 2008 Molecular Meta-strategy -- 分子レベルの診断・治療をめざす網羅的戦略 -- 平成 20 年 7 月 5 日、千葉

渡辺美智子、小林寿光、馬目佳信 遺伝的変異と超微細構造との関連 日本顕微鏡学会第 64 回学術講演会 平成 20 年 5 月 22 日 京都

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]
知的財産権の出願は行っていない。

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

研究分担者 佐野 浩

HOYA株式会社 PENTAXライフケア事業部 医用機器SBU

開発統括部 先端技術担当部長

研究要旨

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、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た場合の内視鏡画像の改良として、照明用光ファイバーを内蔵し、挿入部径を0.8mm以下に保った状態で、画像伝達用光ファイバー本数を昨年度の約3倍に増やすことができた。また、これまで対物レンズとしてセルフオックレンズを用いた場合、視野角が50~60°程度であったのに対して、本年度試作した凹レンズを前記レンズの前面に貼り合わせることで視野角を90°程度まで広げることができた。実際にブタによる動物実験を行った結果、ブタの尿管壁や腎盂内壁の色の変化が観察可能であった。次に、挿入先端部に外径0.8mm、長さ5mmで、純鉄からなる被誘導体を設けた微細内視鏡を試作して、超伝導コイルからなる改良型試作磁気誘導装置により、照明用光ファイバーを内蔵した状態で内視鏡先端部が容易に湾曲することを確認した。

さらに、液晶カラーフィルターを取り付けた高感度CCDカメラと試作微細内視鏡を接続し、立体培養した脳腫瘍細胞にGFPを発現させ、青色の励起光を前記細胞に照射しながら、モニター上で観察した結果、前記細胞が緑色に発光することを内視鏡画像により確認することができた。

A. 研究目的

平成18年度まで実施した萌芽の先端医療技術推進研究事業において、細径カテーテルなどに挿入可能で、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。

その結果を受けて、昨年度では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、試作機を作製してその性能を確認した。

研究2年目の本年度では、照明用光ファイバーを内部に設けたうえで、挿入部の外径を従来

程度に抑えながら、観察光学系の向上を進めるとともに、内視鏡先端に設けた被誘導体の改良検討を行い、磁気誘導装置によりさらに誘導し易くする。

さらに、立体培養した細胞を用いて、微細内視鏡を介して細胞の観察を行うことで、診断・治療に関する新たな可能性の検討も行う。

B. 研究方法

まず、観察光学系の向上として、画像伝達用光ファイバーの本数増加を検討する。

挿入部外径はこれまで通り、細径カテーテルに挿入することや磁気誘導考慮して、先端部外

径0.8mm、挿入部外径0.5mm以下とする。また、画像伝達用光ファイバーの材料には挿入部の柔軟性を考慮して、昨年同様に多成分ガラスを用いることを前提条件として、ファイバー本数を増加させる手段として、ファイバーの素線径をさらに細くすること、また、照明用光ファイバーを減らし、その分、画像伝達用光ファイバー束の外径を大きくすることを検討する。

次に、尿管などの管壁を観察し易いように、昨年度の試作微細内視鏡では 50° ～ 60° 程度であった視野角を 90° 程度まで広げることを検討する。

具体的には、これまで用いているセルフオックレンズの前面に、視野角を広げるための凹レンズを設けることを検討する。

照明用光ファイバー束に関しては、多成分ガラスからなるファイバーを用いて、前記挿入部外径の制約条件を保ちつつ、可能な限りの本数を組み込むようにする。

さらに、微細内視鏡先端に設ける被誘導体に関しては、磁気誘導装置により牽引され易くするために、昨年度まで使用した磁性ステンレスの代わりに純鉄を用いた部材を製作してその効果を確認する。

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。

また立体培養した細胞の蛍光画像を観察する手段として、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や蛍光自体が弱い光であ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昨年度と同様に高感度CCDカメラを接続して、モニター上で内視鏡画像を確認する。さらに、本年度では蛍光画像が観察し易いように高感度CCDカメラの前面に液晶カラーフィルターを接続して、カラー画像が観察可

能なようにする。

(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プタは必要最小限に留めるようにした。

C. 研究結果

まず、画像伝達用光ファイバーの本数に関しては、素線径を昨年度より約10%細くし、ファイバー束の外径を1.6倍にしたことで、本数的には3倍程度にすることができた。

本年度と昨年度の観察画像を図1及び図2に示す。



図1：本年度試作機 図2：昨年度試作機

一方、ファイバー束作製にファイバー折れが多く発生するといった不具合点も生じた。

また、照明用光ファイバーの本数は、同じ素線径のファイバーを使用した結果、昨年度の半分程度になった。

しかも本数が減ったことで照明用光ファイバー束としての強度も低下したため、組立時にファイバーも折れ易くなり、実際に照明可能な本数はさらに少なくなってしまった。

次に、広視野角化に関しては、組立易さを考慮して、1個の凹レンズを従来のセルフオックレンズの前側に貼り合わせることにした。

試作した凹レンズを図3に示す。

実際に試作レンズを組み込み、机上で視野角を測定した結果、約 90° 程度になっていることが確認できた。(図1参照)

一方、対象物が少し離れると画像のボケが発