

# 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事業）

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小林 寿光

平成22（2010）年5月31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	11
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	12
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	18
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	25
玉川克紀	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	31
IV. 研究成果の刊行物・別刷	32

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 国立がん研究センター 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。昨年度の成果を受け、今年度は問題点の解決として微細内視鏡の画質及び耐久性向上と、成果をより生かすために早期臨床応用という目標を設定した。これを基に、磁気誘導ガイドワイヤと磁気誘導カテーテルの併用を前提とした微細内視鏡と、尿管～腎盂系の内視鏡の、2種類の内視鏡を開発し、それに伴う機器装置及び将来の診断・治療を目的とした基礎技術の開発を行った。それぞれ基礎検証から動物実験による検証を行い、適切な効果が確認された。尿管内視鏡に関しては既存の内視鏡構造を基礎として開発を行ったが、高い臨床意義が期待された。その結果を受けて、臨床試験計画を作成し、倫理審査委員会の承認を得て、臨床試験を開始したが、現時点で良好な結果を得ている。今後もこれらの成果を基に、開発を継続していく予定である。

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。これらは悪性腫瘍であればこれまで以上に早期である可能性があり、適切な治療を行うことで治癒が期待できる。しかし画像診断のみ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もある。

これらの病変が超早期の悪性腫瘍である場合には、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。

この点で、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、基本的に組織損傷はあっても僅かであり、低侵襲である。しかしこれまで以上に微小な病変への到達はこれまで以上に難しい。またこの技術は医師に大きく依存しているために標準化が難しく、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。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も内視鏡検査化することにも配慮する。また新規の概念であるために、診断・治療技術を開発することも目的とする。

昨年度の開発で確認された問題点は（図1）、まず微細内視鏡の画質に関して、画像ファイバーの折損が、機器製作時や使用時に発生しやすいことである。また、臨床応用を考えた場合には耐久性に問題があり、硬くした場合には先端の屈曲ができないことである。磁気誘導装置は、微細内視鏡を十分屈曲させるには高い磁力を発生する必要があるが、その場合の安全性の確保や、X線透視装置のイメージインテンシファイアへの磁気干渉が発生してしまうことが問題であった。また、臨床の現場に導入する場合の磁気誘導装置システム全体の大きさ、重さ、更に危険物の磁気吸引は、大きな懸案と考えられた。

その一方で、これまで難しかった尿管～腎盂内の確認が可能であり、たとえ昨年度

の微細内視鏡の画質であっても、臨床的に十分な意義が期待された。

#### 昨年度までの結果のまとめと今後の方針

磁気誘導可能な磁力下でも磁気遮蔽装置を使用すれば画像の確認が可能  
高磁場下では画像が拡大、回転し、画質が劣化する  
誘導に必要な磁力の発生は可能であった  
周囲の強磁性体飛び込み防止用遮蔽を使用すれば安全になる  
微細内視鏡の画質は昨年度より向上した  
広視野角化で相対的にはそれほど分解能の改善が目立たない  
配光の改善が必要である  
レンズの汚れを防止する方法を開発する必要がある  
微細内視鏡の画素数が十分ではない  
画像ファイバーの破損が発生する  
微細内視鏡構造を大幅に変更する必要がある  
適切な対象物であれば診断能が期待される  
実際の診断法の開発が必要である  
同時に治療技術の開発が必要である  
これまで難しかった尿管内の確認が可能であった  
現状の画質であっても臨床的に大きな意義があると考えられる

図1 昨年度の結果のまとめ

本年度は、このような問題に対して対策を行い、また臨床的意義に関しては更に高めていく。また、開発された成果の早期臨床応用に関しても配慮する。また、この概念や技術を使用して可能な、診断・治療技術に関する開発も行う。

#### B. 研究方法

微細内視鏡の画像ファイバーの折損は、先端に磁気誘導用の強磁性体を装着する際に発生すると共に、その構造自体の脆弱性から操作中にも発生していた。しかし、磁気誘導に適した構造や材質と、耐久性や強靱性の両立は非常に難しい問題であった。

ところで移行上皮癌が多発また播種する症例のことを考えれば、この領域の内視鏡検査は重要であるが、これまで容易に施行できるものはなかった。よって、今回の尿管～腎盂の微細内視鏡検査の臨床的意義は、非常に大きいと考えられ、内視鏡検査を開発する必要があると考えられた。

尿管～腎盂を対象とした場合の内視鏡の

太さは、必ずしも 0.8mm 以下にする必要はなく、これより太くても問題はない。また、カテーテル内に挿入して誘導を行うとすれば、先端の磁気誘導がなくても腎盂に至る尿管内の観察は可能である。よってこの方針を基にして、尿管～腎盂系に対する新たな尿管内視鏡を開発する。

磁気誘導に関しては、微細内視鏡を直接誘導するのではなく、カテーテルやガイドワイヤを誘導するのであれば、装着できる強磁性体の種類や形状の自由度は上がる。そこで、これらを使用して誘導を行う、画質や耐久性の問題に対策を施した微細内視鏡を開発する。

以上の方針の下に今年度は、早期臨床導入と尿管～腎盂系での新たな内視鏡検査を開発するための新たな尿管内視鏡開発と、磁気誘導デバイス併用する微細内視鏡開発の、二つを行うこととした。また磁気誘導デバイスは、磁気誘導カテーテル及び磁気誘導ガイドワイヤを使用するものとして、誘導力の向上のために磁石を被誘導体として用いるものとした。

内視鏡の開発に関して、まず尿管内視鏡では、挿入部外径 1.5mm 程度で先端部に磁性体を設けない構造とし、内部には微細内視鏡と同じように、多成分ガラスを用いた画像伝達用光ファイバー束と照明用光ファイバーを設け、外周を微細内視鏡より厚い合成樹脂製チューブで被覆する。

磁気誘導と共に使用する微細内視鏡の開発では、挿入部外径 0.8mm 以下で先端部に磁性体を設けない構造とする。内視鏡画像の改良として、ファイバー束の外径を大きくしてファイバー本数の増加を検討する。対物レンズは、視野角を 90° 程度とし、性

能向上のため複数の光学レンズの組み込みを検討する。照明用光ファイバーは、前記挿入部に組み込み可能な本数を検討する。

これらの検討結果をもとに試作機を作製し、机上検討を行った。

磁気誘導ガイドワイヤ及び磁気誘導カテーテルについては、微細内視鏡に合わせて径及び長さが適切なものを選定した。先端に装着する永久磁石は、種類及び形状、寸法、ガイドワイヤ、カテーテルへの固定方法を検討し、試作した。

磁界発生部について、永久磁石を効率的に誘導できると共に、漏洩磁界が少なく、安全性の高い構造を研究、開発する。また、磁気シールドについて、漏洩磁界に合わせた適切な構造、形状を研究し、試作する。以上の研究開発を基に磁気誘導装置を試作し、動物実験の実施によってその性能を確認した。

動物実験（ブタ）では基本的に、全身麻酔下に膀胱を開き、尿管口よりガイドワイヤを挿入後、尿管カテーテルを挿入して、内視鏡をカテーテル内に挿入し腎盂～尿管の観察を行った。磁気を使用する場合には、カテーテル先端に磁石を装着したものをを用いて、微細内視鏡の先端可動を試みた。尿管内視鏡では、破断などを含めた安全性に関しても結果を確認した。

その結果を受け、臨床試験計画を作成し、倫理審査委員会の承認の後に、経尿道的に膀胱内に尿管カテーテル経由で細径内視鏡をヒト腎盂尿管に挿入して、ヒト腎盂～尿管の観察を臨床研究として行った。

また磁気誘導の結果を踏まえ、局所においてより強力な磁場が必要と考えられた。また、超伝導に至るまでの時間を含む安定

性を高めることが必要と考えられた。そこで、線材を転移温度の高いニオブ3スズ線としてコイルを試作し、従来のニオブチタン線のコイルと比較した。

近年腫瘍の可視化技術が進んでおり、通常蛍光顕微鏡等でしか観察することができない蛍光プローブを使用した脳腫瘍の観察も、内視鏡で行うことが可能であった。この結果を踏まえて、本年度は、浸潤や増殖に関係すると思われる、ROCKのシグナルを低下させた脳腫瘍細胞株での、音響化学療法と膀胱癌を想定した、抗癌剤のデリバリーシステムを検討した。脳腫瘍三次元培養モデルの遺伝子の発現を、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）で解析し、ROCK2強制発現低下ラット脳腫瘍細胞株の性質は、ラットを用いてマイクロバブル存在下で超音波局所治療の効果を比較した。抗癌剤システムはアドリアマイシン結合磁性体ビーズを作成して、磁気誘導によるデリバリーを内視鏡的に観察した。

### C. 研究結果

試作尿管鏡は、画像伝達用光ファイバー束のファイバー本数を昨年度の微細内視鏡に比較して約3倍にし、外径0.7mmの試作レンズ3種類各1枚組み合わせた対物レンズを画像伝達用光ファイバー束の前方に固定し、照明用光ファイバーを画像伝達用光ファイバー束の片側を囲むように配置し、微細内視鏡の3倍の肉厚を有する合成樹脂製チューブで被覆した（図2）。

試作微細内視鏡は、前記尿管鏡に用いた対物レンズの外径を0.5mmに小径化し、画像伝達用光ファイバー束の本数を昨年度より約2.3倍増加させ、照明用光ファイバ

一束も本数を約2.7倍にして、外周を昨年度と同肉厚の合成樹脂製チューブで被覆した（図2）。また、観察範囲の拡大も図っている（図3）。

内視鏡画像に関して、上記試作機を用いて机上にて昨年度の試作機と比較した結果、昨年度に比べ、文字の輪郭が明瞭で、ファイバー折れも少ないことを確認した（図4、5）。

### 平成21年度試作内視鏡

#### ・ FUR-K4P及び微細内視鏡の先端



図2 尿管内視鏡と微細内視鏡

#### 画像伝達用光学系の比較2

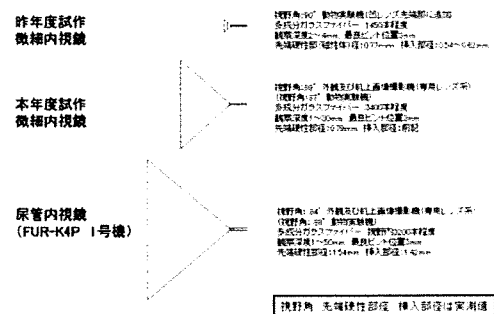


図3 試作内視鏡の観察範囲

画像伝達用光学系の比較(画像)1

・本年度試作微細内視鏡と昨年度試作微細内視鏡との比較

内視鏡先端面から	3mm	5mm
<b>本年度微細内視鏡試作機</b> ・専用設計による広視野角化 ・画素:6.5μm ×4400画		
<b>昨年度微細内視鏡試作機</b> ・モノフォーカス型による広視野角化 ・画素:6.5μm ×450画		

図4 微細内視鏡の画像比較

平成21年度試作内視鏡

・尿管ファイバースコープFUR-K4P動物(ブタ)実験結果I  
 ・腎盂内通常観察  
 ・7Fr&8Frカテーテル内挿入

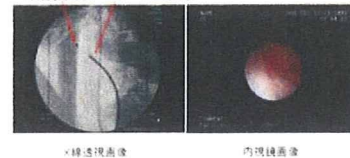


図6 尿管内視鏡の画像

画像伝達用光学系の比較(画像)2

・FUR-K4Pと本年度試作微細内視鏡との比較

先端面から	1mm	3mm	5mm	20mm	30mm
尿管内視鏡 FUR-K4P					
試作 微細内視鏡					

図5 尿管内視鏡と微細内視鏡の画像

上記試作機を用いた動物実験の結果、問題なくカテーテルに挿抜でき、単独でも尿管に挿入できた。尿管カテーテル誘導下ではブタ腎盂～尿管の観察は容易に行え、内視鏡画像は微細内視鏡より明瞭で、良好な視野も認められた(図6)。

また、破断に繋がり得るような、臨床的にはあり得ないような操作を行っても、破断することはなく、画像ファイバーのごく一部は折損するが、内腔確認が十分可能な画像を維持できることも確認された。

この細径内視鏡の結果を受けて、細径内視鏡の使用に関して学内倫理委員会の承認を得て、ヒト腎盂尿管内景の観察を臨床試験として開始した。これまでの4例の腎盂尿管に異常所見を示す患者で尿管～腎盂の観察を行った結果では、腎盂尿管粘膜の損傷が少なく非侵襲的に従来型の大径尿管鏡と同様かそれ以上の視野観察が行えた。

磁気誘導に関しては、まず微細内視鏡に適応するカテーテルの選定を行った。外径は、本研究の目的からできるだけ細径のものとし、5Frを選択した。先端に装着する永久磁石は、保磁力の大きなネオジウム磁石とし、形状はパイプ状の肉厚の薄いものとして外径が極力小さくなるようにし、エポキシ系接着剤で角の無いよう成形しながら接着した(図7)。

### 磁気誘導カテーテル

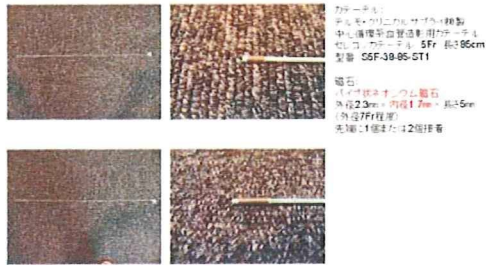


図7 磁気誘導カテーテル

次に選択したカテーテルに適応する、径の異なるガイドワイヤを2種選択した。永久磁石は円柱状とし、肉厚が非常に薄い熱収縮チューブを使用してガイドワイヤ先端に連結した(図8)。

### 磁気誘導ガイドワイヤ

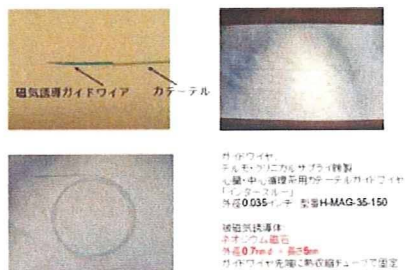


図8 磁気誘導ガイドワイヤ

超伝導磁気誘導装置の磁界発生部はレイアウトを変更し対向する鉄心の反対側を鉄製のヨークで連結して磁路を形成した。磁気シールドは、水平の磁界成分を打ち消すキャンセルコイルを付加した(図9)。

### 新規超伝導磁気誘導装置



図9 超伝導磁気誘導装置

ブタを用いた動物実験が実施され、比較的低い磁界から十分な屈曲を確認した。透視画像は磁界の増加に伴って像の拡大や歪みが発生し、十分に打ち消すことはできなかったが、その効果は確認できた。

磁気誘導による微細内視鏡手技に関して、尿管～腎盂内壁が明瞭となり、視野も良かった(図10)。また、先端部に磁性体を固定した5Frカテーテルに試作微細内視鏡を挿入した状態で、改良型試作磁気誘導装置により牽引可能であることを確認した。しかしながら、漏洩磁場の影響が強いため、X線透視の視野がゆがんで、透視下にカテーテル先端の動きを観察する事は困難であった。

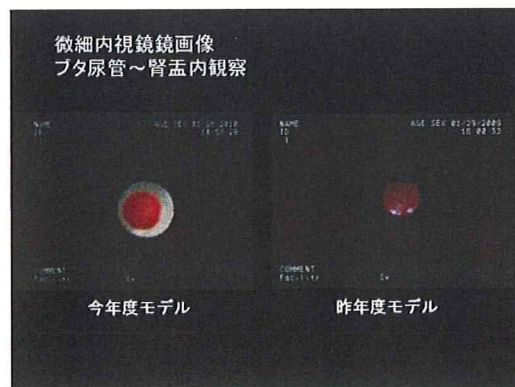




図 1 0 微細内視鏡画像

磁気誘導に使用する超伝導コイルの磁力や安定性を高める手段として、転移温度の高い NbTi と Nb<sub>3</sub>Sn の試験用コイルを使用した超伝導電磁石の試作一号機を用いて (図 1 1)、電流掃引温度 9 K において外部から 3.5 kOe の磁界を印加して安定して電流掃引できるか調べた。

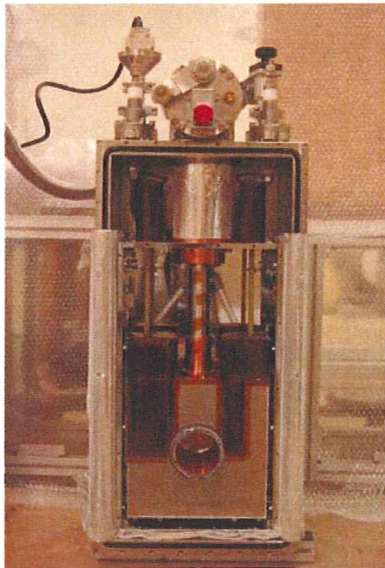


図 1 1 ニオブ 3 スズ線を使用した超伝導電磁石装置

その結果、NbTi のコイルは 1 A / s e c 以上で電流掃引すると途中でクエンチしたのに対し (図 1 2)、Nb<sub>3</sub>Sn のコイルは 4 A / s e c においても安定して電流掃引することができ (図 1 3)、Nb<sub>3</sub>Sn の有効性が確認できた。

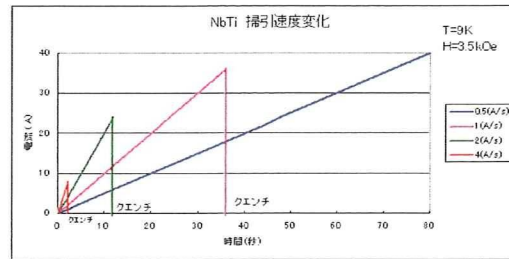


図 1 2 NbTi 線コイルの掃引速度変のグラフ

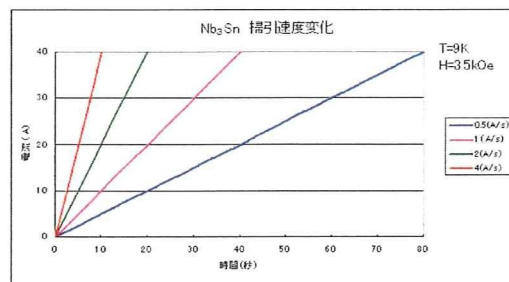


図 1 3 Nb<sub>3</sub>Sn 線コイルの掃引速度変化グラフ

診断・治療用基礎実験に関して、3 次元培養の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、腫瘍によって形態が大きく異なっていた。この時、細胞同士や細胞と細胞外マトリックスとの接着性に差が認められたため、細胞増殖に関するシグナル分子を解析したところ、細胞増殖因子で発現の差異が見つかり、特に増殖と共に遊走をおこす腫瘍株では PDGFA (血小板増殖因子 A) が局所に留まる株より 10 倍以上発現が高いことなどが判った。次に ROCK2 発現を低下させると細胞周期における G2/M 期の細胞の割合が減少した。この細胞でマイクロバブルを用いた音響化学療法による治療効果を調べたところ、野生型と対照細胞に治療効果の差は認められなかったが、ROCK2 の抑制で、野生型とは

p=0.0297、対照株とは p=0.0446 で生存日数に差が認められた。また、磁力によるアドリアマイシン結合磁性体ビーズの腫瘍への誘導を膀胱癌を想定して行ったが、インビトロの結果と異なり生体内では磁束に沿ってビーズが連鎖を起し期待された効果が得られていないことが内視鏡的に観察された (図14)。

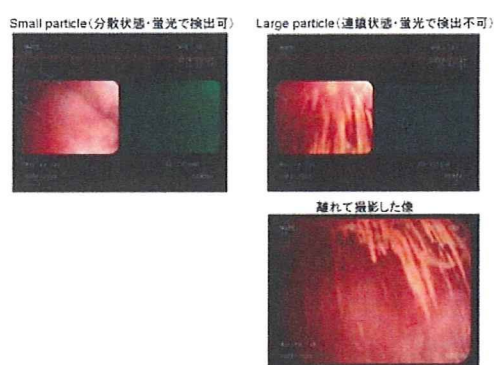


図14 磁性体ビーズの誘導実験

#### D. 考察

動物実験により、カテーテルへのスコープの挿抜が、挫屈等の不具合もなく可能であった。また尿管や腎盂内の内視鏡画像に関しても、臨床研究を行う上で十分な画像であるとの評価が得られた。更に、基本構造はこれまでの内視鏡のそれと同様であるので、臨床研究に使用して問題ないと考えられた。

現在臨床試験を行っているこの内視鏡は、ヒトを対象とした臨床検討では細経なため粘膜の挫滅が少なく、異常を示す腎盂～尿管粘膜の観察が有利である点で、有効な診断機器と考えられる。今後、検討する症例を追加して仕様や方法の改善点を追求して行く。

磁気誘導微細内視鏡に関しては、昨年度まで内視鏡先端部に設けていた磁性体を無くした結果、挿入部内部に組み込む対物レンズ外径や画像伝達用光ファイバー束の外径を大きくすることが可能になったことで、対物レンズの性能改良や画素数を増加させることが可能となり、試作機を用いた机上検討や動物実験の結果から、昨年度の試作機に比べて内視鏡画像が向上したと考えられる。

誘導の対象を微細内視鏡からガイドワイヤやカテーテルとしたことで、磁性体の体積を増加させることができ、更に被誘導体に永久磁石を用いたことで、確実に安定した屈曲誘導を実現できた。永久磁石の材質やコーティングなど生体適合性の課題が解決されれば、機能面では適切であり、臨床応用が期待されると考えられる。磁気シールドについては、不均一な漏洩磁界を、X線透視装置に対し一様に減衰させることは、装置の大きさや重量の点で難しく、X線透視装置のどの部分でどの程度の減衰が必要かをもう少し研究する必要がある。また、将来は磁気の影響を受けないフラットパネルX線透視装置の使用も期待される。

安定性を高めた超電導コイルの試作については、その性能を十分確認できた。単純な磁力の向上のみならず、超伝導に至るまで数日間を要していたこれまでの準備も、かなり短縮できると期待される。

脳腫瘍の治療では、治療用超音波と微細内視鏡の組み合わせだけではなく、細胞内シグナルの核酸モデュレーションが有効であった。本研究で低分子量GTP結合蛋白Rhoの下流のROCK2を低下させることが、治療効果の増大につながることを示したが、細

胞増殖因子である PDGFA が遊走しながら増殖する脳腫瘍株で過剰に発現していることから、将来の干渉 RNA 技術を用いたこれらの分子の変調も核酸医療の対象となっていくことが示唆された。

動物の膀胱ではマイクロビーズを用いた磁気誘導装置による抗癌剤の誘導はできなかったが、蛍光磁気ビーズの利用によりドラッグデリバリーの様子を内視鏡の CCD を応用して捉えることの可能性が示された。

本研究の計画研究期間は今年度が最終年度となるが、微細内視鏡の開発を磁気誘導と併せ、更に早期臨床適用に関しても臨床試験を開始するなど、順調に行うことができた。今後はこの成果を生かし、同様の領域における開発として継続していく方針である。

#### 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。また臨床応用に関しても、これまで容易に施行できる内視鏡検査がなかった、尿管～腎盂を対象とした内視鏡を開発し、臨床試験によって良好な結果を得ることができた。以上の結果、当初想定した研究に関して、適切な結果を得ることができ、今後の発展に繋がる成果も得られたと考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

・ Manome Y, Kobayashi T, et al.

Three-dimensional cell culture of glioma and morphological comparison of four different human cell lines. Anticancer Research, 30:383-390, 2010.

・ Akiyama N, Ohno Y, Fukuda T, Manome Y, Saito S. Enhancing activity of N-glycosylation for constitutive proteins secretions in non-polarized cells. Biochem Biophys Res Commun. 381:612-618, 2009

・ Manome Y, Kobayashi T, et al. Application of Therapeutic Insonation to Malignant Glioma Cells and Facilitation by Echo-contrast Microbubbles of Levovist. Anticancer Research 29: 235-242, 2009

##### 2. 学会発表

・ 馬目佳信 脳腫瘍治療における超音波分子生物学的技術 特別企画[基礎技術研究会共催セッション] 日本超音波医学会関東甲信越地方第 21 回学術集会 2009 年 11 月 7 日 東京有明

・ 稲葉宣晴、石澤将、木村真規、柴崎敏昭、馬目佳信 グリオーマ細胞の増殖に対する ROCK アイソフォームの関与 第 126 回成医会総会 2009 年 10 月 1 日-2 日 東京

・ Manome Y. Kobayashi T. et al. Three-dimension cell culture and comparison of morphology of four different glioma cell lines, 15th Congress of the European Cancer Organization, 21, Sept, 2009. ICC Berlin, Berlin, Germany.

・ Inaba N, Ishizawa S, Kimura M, Watanabe

M, Shibasaki T., Manome Y. Different roles of ROCK isoform in malignant glioma cells The 15<sup>th</sup> Annual Meeting 2009, Japan Society of Gene Therapy 10, July, 2009 Osaka

- ・ 藤岡宏樹、星野昭義、真鍋法義、花田三郎、昼岡正樹、佐藤慶介、Richard D Tilley、平栗健二、山本健二、馬目佳信 蛍光ナノ粒子 QD を使った医療応用 Cell Biology Summer Meeting 2009 平成 21 年 7 月 12 日、つくば市
- ・ 馬目佳信、小林寿光、幡場良明、渡辺美智子 三次元培養脳腫瘍細胞の形態学的変化 日本顕微鏡学会第 65 回学術講演会 平成 21 年 5 月 29 日 仙台
- ・ 小林寿光、執印太郎、馬目佳信、佐野浩、玉川克紀. 微細内視鏡の開発 第 30 回日本レーザー医学会総会(2009 年 12 月)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

小林寿光、玉川克紀、他. 長尺状挿入物の磁気式誘導装置. 特願 2009-127912 号、2009 年 5 月.

##### 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、正確な安全な診断・治療用微細内視鏡機器装置及び  
その臨床技術の開発に関する研究

研究分担者 執印 太郎 高知大学医学部教授

研究要旨：麻酔下ブタ腎盂尿管で磁場強化後の超磁場誘導下で尿管カテーテルを可動する発案で尿管鏡先端部が可動する事が出来た。さらにヒト対象の臨床検討で外径約1.5mm細径内視鏡は粘膜の挫滅が少なく腎盂尿管粘膜の観察が有利な点で有効な診断機器と結論された。

#### A. 研究目的

1. 微細内視鏡をブタ腎盂尿管内で、超伝導磁場誘導下に先端を可動させて内景を観察する事を目的として研究を遂行した。
2. 外径約1.5mmの細径内視鏡により全身麻酔下にブタ腎盂尿管内を非侵襲的に観察し、次にヒト腎盂尿管内を非侵襲的に病変を観察する事を目的として臨床研究を遂行した。

#### B. 研究方法

1. 全身麻酔下にブタ膀胱を開き、尿管口よりガイドワイヤを挿入後、尿管カテーテルを挿入して、視野改良した微細内視鏡をカテーテル内に挿入し腎盂尿管の観察を行った。微細内視鏡先端を稼働させるという目的での微細内視鏡先端に磁石をつけて可動することは困難と判断して、超伝導磁場も前年度装置より強力にして磁場誘導によるカテーテル先端に磁石をつけて可動することで微細内視鏡の先端可動を試みた。
2. ホヤペンタックス社の協力のもとに外径約1.5mmの細径内視鏡を作製して上記と同様の方法で麻酔下のブタで腎盂尿管の観察を行った。その後、学内倫理委員会の承諾のもとに経尿道的に膀胱内に尿管カテーテル経由で細径内視鏡をヒト腎盂尿管に挿入してヒト腎盂尿管の観察を臨床研究として行った。

（倫理面への配慮）

ヒトへの臨床研究に対しては、学内倫理委員会での承認を得ている。

#### C. 研究結果

1. 尿管カテーテル誘導下で視野を改良した微細内視鏡によるブタ腎盂尿管の観察は容易に行え、良好な視野観察が行えた。また、磁場も前年度の装置より強力にしたため超伝導磁場誘導による尿管カテーテル先端の可動は昨年度に比べて容易に行えた。これは腎盂を解放した状態で目視下に観察する事は可能であった。しかしながら、磁場漏れによる磁場の影響が強いため、X線透視の視野がゆがんで、透視下にカテーテル先端の動きを観察する事は困難であった。この点に改善を必要とする。
2. ホヤペンタックス社の協力のもとに作製した外径約1.5mmの細径内視鏡によって尿管カテーテル

誘導下でブタ腎盂尿管の観察は容易に行え、良好な視野が認められた。この細径内視鏡の観察結果を受けて、細径内視鏡の使用に関して学内倫理委員会の承認を得てヒト腎盂尿管内景の観察を臨床試験として行った結果、現在、4例の腎盂尿管に異常所見を示す患者さんで尿管腎盂の観察を行った結果では腎盂尿管粘膜の損傷が少なく非侵襲的に従来型の大径尿管鏡と同様かそれ以上の視野観察が行えた。

#### D. 考察

1. 本研究は直接尿管鏡を磁場誘導で可動するという考えから発展して、ブタの実験で尿管鏡を誘導する尿管カテーテルを磁場で誘導して可動するという考えに方向性を発展させて、磁場を強力にして誘導による尿管鏡先端の可動が行えた。また、同時に微細内視鏡も良好な視野が得られ、今後の応用研究の発展が期待された。

2. ホヤペンタックス社の協力のもとに作製された外径約1.5mmの細径内視鏡はヒトを対象とした臨床検討では細径なため粘膜の挫滅が少なく、異常を示す腎盂尿管粘膜の観察が有利である点で有効な診断機器と結論された。今後、検討する症例を追加して仕様や方法の改善点を追求して行く。

#### E. 結論

1. 磁場を強力にして磁場誘導して尿管カテーテルを可動する考えで、ブタ腎盂尿管で尿管鏡先端が可動した。
2. 外径約1.5mmの細径内視鏡はヒトを対象の検討では粘膜の挫滅が少なく、腎盂尿管粘膜の観察が有利な点で有効な診断機器と結論された。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### 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

微細内視鏡により悪性腫瘍を早期診断、治療する方法の開発を行っているが対象疾患を脳腫瘍（グリオーマ）と膀胱癌をモデルとして研究を進めている。脳腫瘍モデルではこれまでに開発された音響エネルギーを投与し頭蓋内の腫瘍を安全に破壊するシステムを発展させるためROCK2分子を変調させた脳腫瘍で超音波による治療成績を測定、膀胱癌に対しては磁気誘導による抗癌剤デリバリーシステムの実験を行った。いずれも微細内視鏡による腫瘍の可視化技術との組み合わせで用いるためのものであるが今回の基本技術の確立によって臨床応用が可能となった。

A. 研究目的

内視鏡は生体内で発生する出来事をリアルタイムで直視下に観察できるという他の診断装置にはない大きな特徴を持つ。しかし欠点も多く、直視下に観察することはレンズを病変部に直接向けなければならないという制約が生ずるため内視鏡の挿入できない生体内の組織については観察が難しい。これを克服するための方法として内視鏡の微細化がある。微細化は生体内でも直接観察することにメリットのある例えば脳のような組織やこれまでの外径のものでは到達し難かった膀胱からの尿管、腎盂などの泌尿器病変の診断や治療に期待ができる。このように微細内視鏡は従来の内視鏡に革命をもたらすものであるが一方、微細であるが故に観察できる範囲を大きくしな

いと可視化範囲が限られてしまうため視野角の拡大や病変を手早く見つける技術と組み合わせる必要がある。近年腫瘍の可視化技術が進んでおり、通常蛍光顕微鏡等では観察することができない蛍光プローブを使用した脳腫瘍の観察を昨年度微細内視鏡で行った。本年度はこれまでの結果を踏まえて、浸潤や増殖に関係すると思われるROCKのシグナルを低下させた脳腫瘍細胞株での音響化学療法と、膀胱癌を想定した抗癌剤のデリバリーシステムを検討した。

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

脳腫瘍局所治療システムの開発において通常の培養細胞を用いる方法では微細内視鏡

の特性を活用することができないため、3次元的に細胞を培養して生体内の脳腫瘍を近似するシステムを条件検討に用いている。組織適合性ゼラチン3次元メッシュの中で腫瘍細胞を培養することによって通常のフラスコやディッシュでは認められない特徴ある形態を腫瘍細胞がとることや基質との接着において細胞ごとに動態が異なることが判明している。そこで三次元培養の脳腫瘍細胞がどの程度通常の培養と異なっているのか前年度に続いて細胞増殖に関して発現してくる遺伝子を調査した。細胞からRNAを抽出、RT-PCR法で増幅し、TGF- $\beta$ /SMAD系、マトリクスメタロプロテナーゼ系のシグナルに加えて本年度EGF, EGFR, PDGF, PDGFRなどの増殖因子についても解析を行った。またシグナルタンパクのリン酸化について抗リン酸化抗体を用いてウエスタンブロット法で調べた。

## 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

細胞の増殖は外部からの刺激により細胞膜に存在するG共役タンパク質レセプターやRTK（レセプターチロシンキナーゼ）等を介してシグナルを伝達し、転写因子をリン酸化して働きかけることによって起こる。またこのシグナル伝達は細胞の遊走、接着、収縮、遺伝子発現にも関与している。このシグナル伝達の経路中に低分子量GTP結合蛋白質の一つであるRhoがある。RhoはGTPを結合した活性化型とGDPを結合した不活性化型の間を往復して細胞内の分子スイッチとして働いている。Rhoの下流に細胞内セリン・スレオニンリン酸化酵素であるRhoキナーゼ/ROCKが存在する。ROCKはアクチンストレスファイバーや細胞質分裂、細胞の収縮

に関与するとされていて、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。本研究では脳腫瘍細胞でROCKのアイソフォーム（ROCK1、ROCK2）の発現を抑制したRT2ラットグリオーマ細胞株を樹立した。これらのうちでROCK2は特に腫瘍の浸潤に関連すると思われたので動物モデルを作成し音響化学療法による治療効果を調べた。

## 3. 膀胱癌細胞の蛍光標識

悪性腫瘍の診断では分子マーカーをもちいた腫瘍部の可視化技術の開発が進みつつある。昨年度、微細内視鏡の画像において通常のRGBで撮影した画像にG（グリーン）のフィルターを通すことによって緑色蛍光タンパクの導入された3次元脳腫瘍細胞を識別することが可能であった。高解像度のCCDと組み合わせることにより将来、分子マーキングされた腫瘍組織をさらに可視化することが可能になると思われたため、泌尿器系でも内視鏡での正常組織と腫瘍細胞との識別を試みた。高知大学医学部泌尿器科学教室より分与されたヒトT24膀胱癌細胞にエンハンス型蛍光緑色タンパク（EGFP）遺伝子を導入し安定発現する株を作成、内視鏡で観察することとした。膀胱癌細胞は移行上皮であり3次元培養を行っても基質上に沿ってほぼ一層の細胞の成長が観察されるのみで脳腫瘍のような立体構造は形成しない。そこで平面的なメッシュシートに膀胱癌細胞を移し膀胱癌組織シートモデルを作成して青色LED光源を照射、微細内視鏡で観察した。

## 4. 磁気誘導による抗癌剤デリバリーシステムの開発

本事業では微細内視鏡先端を生体内で任意の方向に磁気誘導するシステムを開発したが、この誘導システムは微細内視鏡のみならず様々なドラッグデリバリーにも応用性が高い。いくつかの磁性体は薬剤との加工が容易なため、抗癌剤等も磁性体と適切に結合させれば磁気誘導装置を用いて腫瘍へ到達させることができるかもしれない。この可能性について調査した。磁気誘導によるドラッグデリバリーシステム(DDS)については既にいくつかの方法が報告されているがいずれも欠点はキャリアーとなる磁性体の粒子径が小さいと磁気によって誘導が難しくなることである。すなわちキャリアーのサイズを小さくすればするほど磁束への反応性が低下する。本研究班では非常に強力な磁気発生システムを開発できたため細かなキャリアーについて利用が可能であると考えた。さらに、シースが強化された微細内視鏡を用いれば磁気誘導なしでも膀胱のような組織の観察は可能であり磁気によるデリバリー効果を上げることができる。そこで大小の磁性体粒子に抗悪性腫瘍薬であるアドリアマイシンをコーティングした素材を作成して磁気誘導の可能性について検討した。

### C. 研究結果

1. 3次元培養の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、腫瘍によって形態の異なる像が得られた。脳腫瘍の実験で通常用いられているT98G, A172, KNS42, U118MG細胞についても解析したがこれらの細胞間では培養後の形態は従来の培養法で認められる違い以上の大きな隔たりがあることが分かっ

た(Anticancer Research. 30:383-390, 2010参照)。細胞同士、細胞と細胞外マトリックスとの接着性にも差が認められたため、これらの接着性がどの分子によるものか発現する細胞接着や細胞増殖のシグナル分子の解析を行ったところEGF, EGFR, PDGF, PDGFRなどの増殖因子について3次元培養で発現が異なることが分かり、特に、成長とともに分散しながら増殖する傾向のあるU118MG細胞ではPDGFAの発現が集塊を形成するものに対して10倍以上発現が高くなることが判明した。

### 2. ROCK発現低下脳腫瘍細胞の音響化学療法

ROCK1, ROCK2の発現の抑制を狙った細胞はsiRNAを導入した細胞で対応する分子のタンパク発現が低下していた。ROCK1, 2共に発現を強制低下させた株は致死となって樹立することができず、両者のアイソフォームを同時に抑制することはできなかった。ROCKの細胞増殖能に及ぼす影響については倍化時間ではほとんど差を認めず増殖そのものへ直接影響を及ぼしている可能性については否定された。しかし細胞周期を調べてみると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、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ていた。ROCK2は特に細胞の浸潤能などに関与していることなどが示唆されているためこれまで開発したマイクロバブルを用いた音響化学療法による治療効果を調べたところ、野生型と対照細胞にマイクロバブルと超音波との併用での差は認められなかったがROCK2の抑制で野生型とは $p=0.0297$ 、対照株とは $p=0.0446$ の確立で生存の日数に差が認めら



れた。

3. 膀胱癌にEGFPを導入すると励起光の照射によりin vitroで強い緑色のシグナルが得られた。膀胱癌細胞は移行上皮であり脳腫瘍細胞と異なって3次元的に培養ができなかったため細胞シートとして観察する必要がある。細胞シートで立体的に腫瘍細胞の存在を確認できるかどうかを落射型外部光源で調べたところ、励起光を遮断するフィルターの使用で緑色のシグナルを観察することはできたものの、コントラストがつきにくく診断用の画像としてまでは捉えることはできなかった。

4. 磁気誘導のための磁性体ビーズは粒度7.5 $\mu\text{m}$ と15 $\mu\text{m}$ のものを用いた。磁性体ビーズにアドリアマイシンを結合させて内視鏡での観察を行ったところ粒子径の大きいものはin vitroで腫瘍シートにビーズを集積させることが可能で、さらに誘導によって粒子を任意の場所に移動させることができた。しかし超電導磁石を用いた動物実験では小粒子ビーズは誘導を行うことができず、一方、径が大きくても磁束による磁性体の連鎖が発生し、事実上、誘導は困難であった。磁気誘導システムでは磁界の強さと磁性体粒子径の関係が大切であることがあらためて示された。

#### D. 考察

本年度、対象となる疾患を脳腫瘍と膀胱癌に定め、診断は直視下観察と可視化マーカーの検出、治療は、脳腫瘍に対しては細胞内Gタンパクシグナル分子のモデュレーションと音響化学療法の組み合わせ、膀胱癌に対しては磁気誘導による抗癌剤デリバリーと役割決めて微細内視鏡技術が活きるよ

うな具体的な方法の検討を行った。微細内視鏡技術が最も役に立つと思われる疾患には脳腫瘍、特にグリオーマが挙げられる。これは従来の内視鏡ではどうしても見ることのできなかった領域も微細化によってカテーテル等から腫瘍部位までレンズを進めることができるようになったからである。治療に関しても内視鏡との併用で安全性が高まると期待される音響化学療法を中心にこれまでにマイクロバブルと超音波のコンビネーションでの有効性を示してきた。本年度はグリオーマに対してROCK2分子のsiRNAによるモデュレーションと超音波の効果を調べた。今回の結果からROCK2の抑制がマイクロバブルと超音波の組み合わせで治療に有用なことが示唆された。実際にこの方法をヒトで適応する場合、残存腫瘍や再発の部位と音響エネルギーの照射位置の関係も内視鏡で確認することができるため、動物実験以上に優れた効果を生むことが期待される。一方、腫瘍そのものの観察という点では内視鏡では顕微鏡のように個々の細胞までは通常のカメラで確認することはできなかった。しかし昨年度、蛍光標識による可視化で微細内視鏡でもEM-CCDの利用によって組織塊としては観察することができたため、今後分子イメージング技術が進み生体内での蛍光イメージングが可能となれば、専用開発されたCCDを用いることによって腫瘍組織を診断することができるようになる。最後に磁気誘導によるドラッグデリバリーについてはこれまでに開発した強力な磁気誘導装置により小粒径のビーズを誘導することがin vitroで可能であった。生体内で使用するためには磁力やビーズ径の最適化などまだまだ課題が多いと思われる

たが将来的には有望な価値があると考えられる。

#### E. 結論

微細内視鏡の開発ではファイバーやレンズなど内視鏡自体の開発に加え誘導システムやCCDカメラなど様々な要素の開発が必要となる。本研究部ではこの研究で病変を脳腫瘍と膀胱癌をモデルに微細内視鏡の応用技術について研究を行った。微細内視鏡では通常アクセスすることができない部位まで直視下で観察ができるため早期悪性腫瘍の診断と治療に効果を発揮すると期待されるが組み合わせの技術との兼ね合いが大切である。このような中で音響化学療法や抗癌剤磁気誘導デリバリーシステムに関してはいずれも将来微細内視鏡とともに実用化が可能な技術であると考えられた。

#### F. 研究発表

[論文発表]

Manome Y, Mizuno S, Akiyama N, Fujioka K, Saito H, Hataba Y, Kobayashi T, Watanabe M. Three-dimensional cell culture of glioma and morphological comparison of four different human cell lines. *Anticancer Research*. 30:383-390, 2010.

Akiyama N, Ohno Y, Fukuda T, Manome Y, Saito S. Enhancing activity of N-glycosylation for constitutive proteins secretions in non-polarized cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 381:612-618, 2009.

Manome Y, Furuhashi H, Hashimoto A, Funamizu N, Suzuki R, Ishizawa S, Akiyama N, Kobayashi T, Watanabe M.

Application of Therapeutic Insonation to Malignant Glioma Cells and Facilitation by Echo-contrast Microbubbles of Levovist. *Anticancer Research* 29: 235-242, 2009

[学会発表]

馬目佳信 脳腫瘍治療における超音波分子生物学的技術 特別企画[基礎技術研究会共催セッション] 日本超音波医学会関東甲信越地方第21回学術集会 2009年11月7日 東京有明

稲葉宣晴、石澤将、木村真規、柴崎敏昭、馬目佳信 グリオーマ細胞の増殖に対するROCKアイソフォームの関与 第126回成医学会総会 2009年10月1日-2日 東京

Manome Y, Kobayashi T, Mizuno S. Three-dimension cell culture and comparison of morphology of four different glioma cell lines, 15th Congress of the European Cancer Organisation, 21, Sept, 2009. ICC Berlin, Berlin, Germany.

Inaba N, Ishizawa S, Kimura M, Watanabe M, Shibasaki T., Manome Y. Different roles of ROCK isoform in malignant glioma cells The 15<sup>th</sup> Annual Meeting 2009, Japan Society of Gene Therapy 10, July, 2009 Osaka

藤岡宏樹、星野昭義、真鍋法義、花田三四郎、昼岡正樹、佐藤慶介、Richard D Tillee、平栗健二、山本健二、馬目佳信 蛍光ナノ粒子QDを使った医療応用 Cell Biology Summer Meeting 2009 平成21年7月12日、つくば市

馬目佳信、小林寿光、幡場良明、渡辺美智子 三次元培養脳腫瘍細胞の形態学的変化

日本顕微鏡学会第 65 回学術講演会 平成  
21 年 5 月 29 日 仙台

G. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得や実用新案登録等を行っていない。

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

ナノメディシン研究最終年度の本年度では、微細内視鏡の構造を基にした早期臨床応用機として、挿入部外径 1.5mm、有効長 700mm の尿管ファイバースコープの開発を行い、臨床研究機を作製して動物実験により安全性を確認した後、臨床研究実施施設である高知大学医学部に送付して、前記スコープを用いた臨床研究の準備を完了した。

また、微細内視鏡に関しては、昨年度まで内視鏡先端部に設けていた磁気誘導用の磁性体を内視鏡挿入用の 5Fr カテーテル先端に設けるようにし、前記カテーテルに挿入するために昨年度と同様に挿入部外径を 0.8mm 程度として、内部に組み込む光学系の改良を検討した結果、多成分ガラスを使用した画像伝達用光ファイバー束のファイバー本数を昨年度の約 2.3 倍に増加させ、対物レンズに関しては昨年度と同程度の視野角を保ちながら、外径 0.5mm のレンズを 3 枚組み合わせることで光学性能を向上させたことにより、昨年度に比べてブタの尿管内面や腎盂内面のより鮮明な観察が可能になった。

さらに、先端部に磁性体を設けた 5Fr カテーテルに前記微細内視鏡を挿入した状態で、平行磁場からなる超伝導磁気誘導装置により、カテーテル先端部が容易に湾曲することを確認した。

### A. 研究目的

ナノメディシン研究最終年度の本年度では、これまで開発を進めてきた微細内視鏡の早期の臨床応用を目的として、7~8Fr 程度のカテーテルに挿入可能な外径を有する尿管ファイバースコープの開発を行う。

次に、微細内視鏡の開発に関しては、昨年度まで先端部に磁性体を設けて磁気誘導装置によって牽引することにより、先端部の湾曲を行ってきたが、挿入するカテーテルや針の太さを考慮するとこれまでのように微細内視鏡の挿入部外径を 0.8mm 以下にすることが必要であり、外径の制約上磁性体を大きくすることには限界があった。

また、磁性体を設けることで微細内視鏡内部

に組み込む対物レンズ、画像伝達用光ファイバー束、照明用光ファイバー束などが制約され、内視鏡画像の改良にも限界があった。

さらに、小さい体積の磁性体を牽引するためには磁気誘導装置の磁力を大きくする必要があり、それを支えるために装置が大きくなってしまふことなどの弊害も伴うようになった。

そこで、磁性体を内視鏡が挿入されるカテーテルの先端に設けるようにすることで、磁性体の大きさをより大きくして牽引し易くすると共に、内視鏡に関しては、これまで磁性体によって占有されていた部分を用いることによって内視鏡画像の改良を検討する。

### B. 研究方法