

まず、尿管ファイバースコープの開発に関しては、前述のように7~8Frのカテーテルに挿入可能なように挿入部外径は1.5mm程度として、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内部に設け、外周を合成樹脂製チューブで被覆したチューブ型挿入部とする。また、磁気誘導は行わないため、先端部には磁性体は設けないようにする。

さらに、外周チューブの肉厚も微細内視鏡より厚くして、挿入部の強度を向上させる。

前記条件を基に試作機を作製し、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り、共同研究先でもある高知大学医学部にて前記試作機を用いた臨床研究を実施し、有用性を確認する。

次に、微細内視鏡の開発に関しては、前述のように挿入部外径0.8mm以下を条件とし、先端部に磁性体を設けない構造とする。

また、内視鏡画像の改良として、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、昨年度と同様に多成分ガラスを用いながら、ファイバー束の外径を大きくすることで昨年度に対するファイバー本数の増加を検討する。対物レンズに関しては、尿管などの管壁を観察し易いように、昨年度と同じように視野角を90°程度としながら、画像周辺部の光学性能を向上させるために、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のもとで、組み込み可能な本数を検討する。

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、机上検討及び動物実験により、改良の効果を確認する。

(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する。

また、試作機を用いた臨床研究を行う場合には、「臨床研究に関する倫理指針」に基づいて、必要な契約書等を締結したうえで実施する。

C. 研究結果

1) 尿管ファイバースコープ

試作した尿管ファイバースコープの仕様を表1に示す。

表1：尿管用ファイバースコープの仕様

| | |
|------------|-------------|
| 視野角 | 90° (直視) |
| 観察深度 | 1~50 mm |
| 接眼視度調整範囲 | +2~-8 Dptr. |
| 先端硬性部径 | φ1.54 mm |
| 軟性部径 | φ1.5 mm |
| 有効長 (挿入部長) | 700 mm |
| 全長 | 939 mm |

試作した試作機の全体像を図1に、先端部を図2に示す。

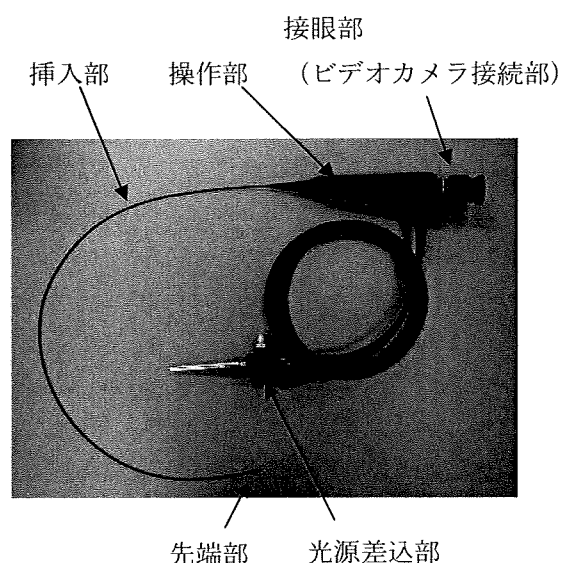


図1：試作尿管ファイバースコープ全体像

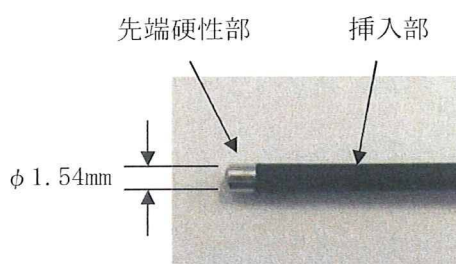


図2：試作尿管ファイバースコープ先端部

試作した尿管ファイバースコープの主な構成要素の検討結果は以下の通りである。

画像伝達用光ファイバー束に関しては、ファイバー束の外径を大きくしたことにより、ファイバー本数を昨年度の試作微細内視鏡に対して約3倍増加させた。

対物レンズに関しては、微細内視鏡に比べてレンズ外径を大きくすることが可能となり、外径0.7mmのレンズを3種類、各1枚組み合わせた対物レンズを試作し、先端硬性部内の画像伝達用光ファイバー束の前方に固定した。

照明用光ファイバーに関しては、前記画像伝達用光ファイバー束の片側を囲むように配置した。

挿入部外周は、昨年度の微細内視鏡に使用した合成樹脂製のチューブの3倍の肉厚を有する合成樹脂製チューブで被覆した。

次に、臨床研究使用前に安全性を確認するために、試作機を用いてブタによる動物実験を実施した。

実験には、臨床研究で実際に使う予定の7～8Frのカテーテルを使用した。

動物実験の結果、前記カテーテルに対して、尿管ファイバースコープ挿入部に挫屈等が生じることなく、問題なく挿抜可能であることが確認できた。さらに、スコープ単独でも尿管に挿入可能であることも確認できた。

また、内視鏡画像に関しては、実際にブタの腎盂内を観察した画像を図3に、比較対象とし

て昨年度の微細内視鏡によるブタの腎盂内の画像を図4に示す。

いずれも照明は昨年度と同様にキセノン光源を用いて行った

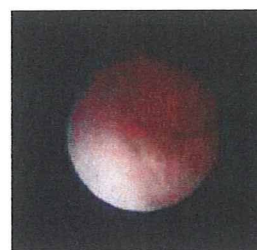


図3：試作尿管ファイバースコープ内視鏡画像（腎盂内）



図4：昨年度試作微細内視鏡画像（腎盂内）

図3及び図4の画像から、試作尿管ファイバースコープの方がより明瞭な画像が得られており、実験に参加された臨床先の先生方からも臨床研究に使用可能との評価をいただいた。

2) 微細内視鏡

試作した微細内視鏡の仕様を表2に示す。

表2：試作微細内視鏡仕様

| | |
|-----------|--------------|
| 視野角 | 87°（直視） |
| 観察深度 | 1～30 mm |
| 接眼視度調整範囲 | +2～-8 Dptr. |
| 先端硬性部径 | 0.79 mm |
| 軟性部径 | 0.74～0.85 mm |
| 有効長（挿入部長） | 1,000 mm |
| 全長 | 1,240 mm |

試作した微細内視鏡の全体像を図5に、先端部を図6に示す。

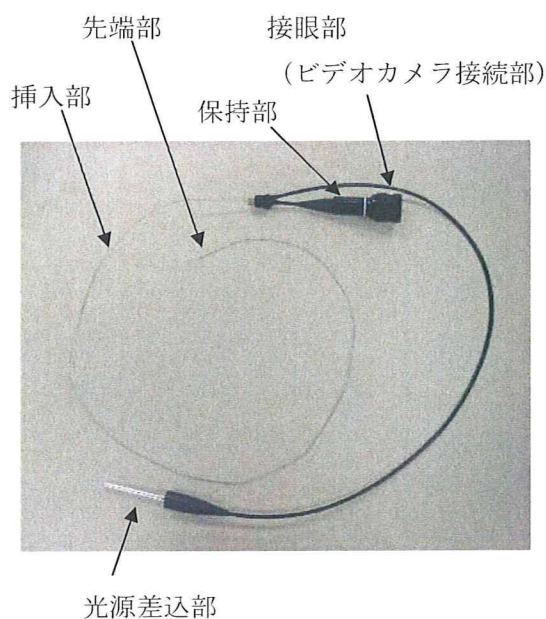


図5：試作微細内視鏡全体像

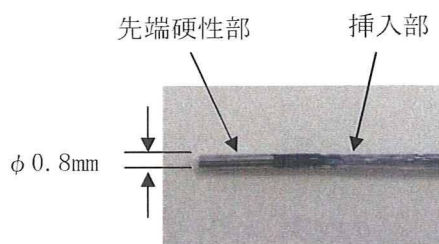


図6：試作微細内視鏡先端部

試作した微細内視鏡の主な構成要素の検討結果は以下の通りである。

対物レンズに関しては、昨年度と同様に視野角 90° 程度を確保しつつ、画像の改良を検討した結果、前記尿管ファイバースコープで良好な画像が得られたことや最前面のレンズ表面が、付着物が拭き取りやすいように平面になっていることから、前記スコープに用いた対物レンズを基に、挿入部外径 0.8mm に対応するため、それぞれの外径を 0.5mm に小径化したレンズを用いた。

画像伝達用光ファイバー束に関しては、ファイバーの素線折れを考慮して昨年度より 10% 程度太いファイバーを用いて組み込み可能な

本数を検討した結果、束径としては、昨年度に比べて 1.6 倍程度太くし、本数としては約 2.3 倍増加させた。また、ファイバー束の保護方法の改良も行い、素線折れも減少させた。

照明用光ファイバー束に関しては、昨年度と同様に画像伝達用光ファイバー束の片側に三日月状に配置するようにした結果、昨年度に比べ本数として約 2.7 倍増加させた。

挿入部外周は、昨年度と同様に合成樹脂製で同肉厚のチューブを被覆した。

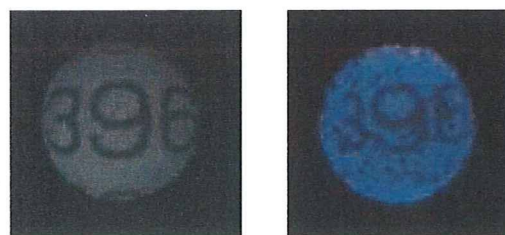
その際に、画像伝達用光ファイバー束の片側に配置するようにした照明用光ファイバー束が設計のような三日月形にならず、部分的に外径 0.8mm を超えるところが発生した。

なお、この点に関しては、試作した微細内視鏡の挿入部が 5Fr カテーテルに挿入可能であることを確認した上で机上検討並びに動物実験に使用した。

挿入部の先端部には外径 0.8mm 、長さ 4mm のパイプ材を用いて先端硬性部を形成し、内部に対物レンズや各ファイバー束の先端部を固定した。

次に、内視鏡画像に関して、机上にて昨年度の試作機と比較検討した。

比較画像を図7に示す。



今年度試作機 昨年度試作機

図7：内視鏡先端面から 3mm の物体画像

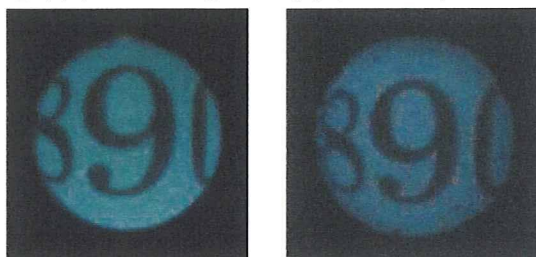
図7から、昨年度の試作機に比べ、今年度の試作機のほうが数字の輪郭が明瞭で、ファイバーの素線折れも少ないことがわかる。

また、前記尿管ファイバースコープに対して

も内視鏡画像を比較した。

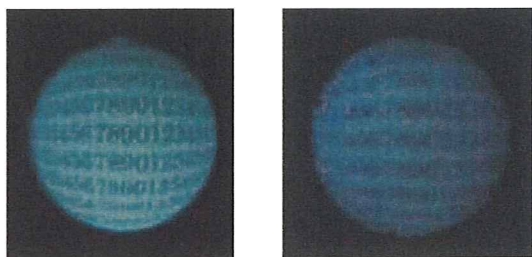
比較画像を図8及び図9に示す。

いずれも 10.5 ポイントの明朝体からなる数字を平面に並べたものを対象物とした。



試作尿管ファイバー スコープ 試作微細内視鏡
スコープ

図8：内視鏡先端面から3mmの物体画像



試作尿管ファイバー スコープ 試作微細内視鏡
スコープ

図9：内視鏡先端面から20mmの物体画像

図8及び図9から、内視鏡先端面から3mmといった近接ではほぼ同等の画像が得られているが、先端面から20mmの遠距離では、特に周辺部のボケに関して微細内視鏡のほうが大きいことが確認できた。

次に、試作微細内視鏡を用いてブタによる動物実験を行った。

まず、先端部に磁性体（ネオジウム磁石）を固定した5Frカテーテル（㈱玉川製作所様にて試作）に試作微細内視鏡を挿入して、カテーテル先端から突出させた状態で、一對の超伝導コイルにより平行磁場を発生させる改良型試作磁気誘導装置（㈱玉川製作所様製）を用いて、ブタの体外にて牽引実験を行った。

実験時の湾曲状態を図10に示す。

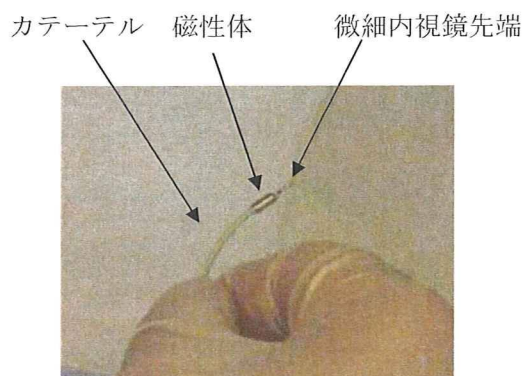


図10：カテーテル先端磁性体牽引実験
（カテーテル湾曲状態）

図10に示すように、試作カテーテルに試作微細内視鏡を挿入して先端を突出させ、先端近傍を指で摘んで保持した状態で磁界発生装置に電流を流すと、カテーテルの先端が湾曲することが目視で確認できた。

さらに、前記試作カテーテル及び試作微細内視鏡をブタの尿管から腎盂内に挿入して内視鏡画像を確認するとともに、磁気による湾曲実験を行った。

試作微細内視鏡によりブタの腎盂内を観察した画像を図11に示す。



図11：試作微細内視鏡画像

内視鏡画像としては、昨年度の画像（図4参照）に比べて内壁が明瞭になっていることが確認できた。

磁気による湾曲実験では、X線透視画像では先端部が誘導されているのが確認できたが、移動量としては、体外実験ほどは動かなかった。

これは、腎内腔が狭く、先端部の移動範囲が

限定された影響が考えられる。

D. 考察

試作尿管ファイバースコープに関しては、動物実験により、カテーテルを介してのスコープの挿入抜去が、挫屈等の不具合もなく可能であったことや、尿管や腎盂内の内視鏡画像に関しても臨床研究を行ううえで十分な画像が得られているとの評価が得られたので、臨床研究に使用して問題ないと考えられる。

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、挿入部内部に配置する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明らかに内視鏡画像が向上した。また、先端レンズ面の付着物の拭き取りも容易になっている。

一方、部分的ではあるが内視鏡挿入部の外径が目標値の0.8mm以下を保つことが出来なかったことに関しては、カテーテル等に無理なく安定して挿入できるようにするためには、目標値を保つ必要があると考えられるため、外皮チューブ被覆時に予め照明用光ファイバー束を所定の位置に配置させるための組立方法の検討が必要と思われる。

また、画像伝達用光ファイバー束の素線折れは、昨年度に比べてかなり減らすことは出来たが、通常内視鏡レベルに対してはまだ不十分であり、今後、ファイバー束の保護方法等の更なる改良が必要と考えられる。

E. 結論

これまで開発を進めてきた微細内視鏡構造の早期臨床応用を目的として、7~8Frのカテーテルに挿入可能なように挿入部外径を

1.5mm程度とした尿管ファイバースコープの開発を行い、臨床研究用の試作機を作製して動物実験により安全性を確認した。

今後は、臨床研究先である高知大学医学部において臨床に使用していただき、本スコープの有用性を確認していただく。

微細内視鏡に関しては、昨年度まで先端部に設けていた磁性体を内視鏡挿入用カテーテルに設けるようにして、これまでの磁性体のスペースを用いて内視鏡画像の改良を検討した。その結果、多成分ガラスからなる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2.3倍にするとともに、昨年度と同程度の視野角を維持しながら、外径0.5mmの試作レンズ3種類各1枚から成る対物レンズを組み込んだ試作機を作製して、机上検討により昨年度に比べて内視鏡画像が向上していることを確認した。また、ブタを用いた動物実験によって、実際に尿管や腎盂の内面画像がより明瞭になったことを確認した。

一方、不具合点として、照明用光ファイバーの配置が安定せず、外皮チューブを被覆した状態で、外径0.8mmを超える部分が生じたため、微細内視鏡を作製する上でさらなる検討が必要である。

今後、ファイバーの素線折れ対策や外周チューブの被覆方法の検討などを行い、磁気誘導可能な微細内視鏡の臨床応用へ向けて更なる改良を進めて行く。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第30回日本レーザー医学会総会

オーガナイズドシンポジウム2

先端的内視鏡技術による光学診断・治療への取り組み S12-3

微細内視鏡の開発

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得

出願中の特許：1件

出願番号 2009-127912 (国立がんセンターとの共同出願)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

以上

厚生労働省科学研究費補助金 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

磁気誘導対象を、微細内視鏡に用いるガイドワイヤ及びカテーテルの先端に装着された永久磁石とし、それらを屈曲誘導することにより間接的に微細内視鏡を誘導する磁気誘導装置の研究開発を行った。磁界発生部について、確実に安全な誘導を実現する、誘導範囲が広い閉磁路構造の新規超電導磁石の開発を行った。また、X線透視装置の併用を実現するために、漏洩磁界の遮蔽技術について継続して開発を行った。そして試作した磁気誘導装置によって動物実験が実施され、その性能を確認した。

A. 研究目的

超早期がんの診断、治療を目的として開発を進めている微細内視鏡の磁気誘導装置は、当初より臨床応用を前提として、磁界発生部を超電導磁石とすることで小型化、軽量化を実現し、さらにX線透視装置の併用を考慮して、透視に影響を及ぼす漏洩磁界を低減するための構造や、遮蔽技術について研究、開発を行い、透視下での磁気誘導の可能性を高めてきた。

一方で、微細内視鏡の先端に装着しうる磁性体の体積が非常に小さいため、磁界発生部には高磁界の発生が要求されるが、安全性や漏洩磁界との兼ね合いで限界があったのに加えて、微細内視鏡の開発進行において、その先端に磁性体を装着すること自体が高性能化の制約となりつつあった。そこで装着、誘導の対象を、微細内視鏡の体内への挿入の際に使用されるガイドワイヤ及びカテーテルとすれば、磁性体の体積の増加が見込め、なおかつ微細内視鏡の高性

能化を妨げない。また、磁性体に永久磁石を用いれば、磁性ステンレスや純鉄と比較して容易に屈曲方向を制御でき、磁界発生部も閉磁路構造にすることができるために漏洩磁界がさらに減少し、安全性が向上する構造とすることができる。

よって今年度は、X線透視下で永久磁石が装着されたガイドワイヤ、カテーテルを誘導することにより、間接的に微細内視鏡を誘導する、安全確実な磁気誘導装置の開発を目的とする。

さらに、超電導コイルの安定性を高めるための開発を目的とする。

B. 研究方法

基礎実験により、永久磁石が先端に装着されたカテーテルを屈曲させ、必要とされる磁界を見積もる。

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、微細内視鏡に合わせて径及び長さが適切なものを選定する。先端に

装着する永久磁石について、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、試作する。

磁界発生部について、永久磁石を広い範囲で効率的に誘導できるとともに、漏洩磁界が少なく、安全性の高い構造を新規に研究、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する。

また、超電導コイルの安定性を高めるため、線材をNb₃Sn（ニオブ3スズ）線としてコイルを試作し、従来のNbTi（ニオブチタン）線のコイルと比較する。

（倫理面への配慮）

動物実験を実施するに当たっては、動物愛護の観点から使用数は最小にとどめるなど配慮をする。

C. 研究結果

1. 基礎実験

先端に磁石が装着されたガイドワイヤやカテーテルについて、どの程度の磁界が必要か見積もるために、常電導磁石を用いて、特に屈曲しづらいと思われるカテーテルについて実験を行った(図1)。その結果、必要とされる磁界は3.5～4 kOe程度と見積もられた。

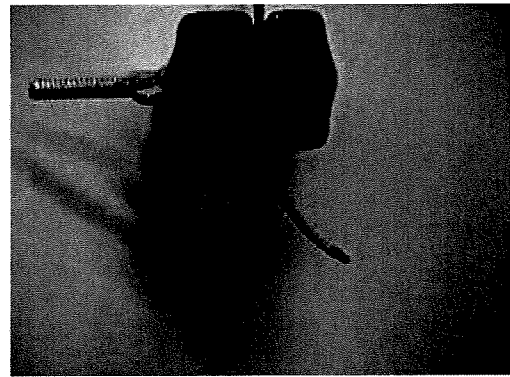


図1 4 kOe での屈曲

2. 磁気誘導ガイドワイヤ及び磁気誘導カテーテルの試作

まず、微細内視鏡に適応するカテーテルの選定を行った。種類は試験的に入手した血管造影用カテーテルが特に問題なく使用できるものであったため、そのまま利用することとした。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、磁界発生部の発生する磁界により減磁しない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た。寸法は外径2.3mm（7Fr程度）×内径1.7mmのものと、体積を増やした外径2.6mm（8Fr程度）×内径1.8mmの2種類を使用した。長さは昨年度微細内視鏡に装着された磁性体と同じ5mmとした。外径2.6mmのものは、外径2.3mmのものに比較して約50%の体積増である。

永久磁石のカテーテルの固定は、カテーテルのもっとも先端に近い部分に、エポキシ系接着剤で角の無いよう成形しながら装着した(図2)。

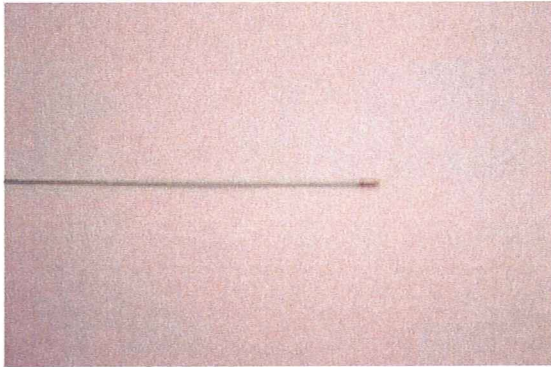


図2 磁気誘導カテーテル

次に選択したカテーテルに適応する、同メーカーの外径0.035インチ及び0.038インチの径の異なるガイドワイヤを2種選択した。

永久磁石は、この外径からパイプ状の加工は困難であるため円柱状とし、外径はガイドワイヤに合わせて0.7mm及び0.8mm、長さはカテーテルと同じ5mmとした。

固定は、肉厚が非常に薄い熱収縮チューブを使用して、永久磁石と熱収縮チューブで外径がガイドワイヤより大きくならないようにしてガイドワイヤ先端に連結した(図3)。

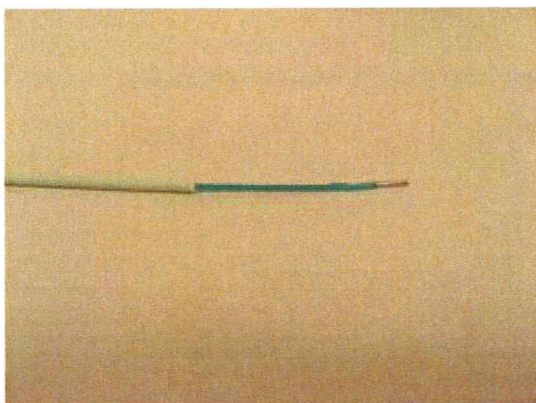


図3 磁気誘導ガイドワイヤ

3. 磁界発生部及び磁気シールドの開発

被誘導物を永久磁石とすることで、対向

する磁界発生部の従来のレイアウト及び構造を変更した。

磁界発生部である2つの超電導電磁石のボアに鉄心を入れる構造は変わらないものの、磁極径を200mmから300mmに拡大するとともに、それぞれ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することで、発生磁界の増大とともに大きな磁気トルクが利用でき、永久磁石が装着されたガイドワイヤやカテーテルを効率よく屈曲誘導することを可能にした(図4)。また、この構造は、漏洩磁界を低減させることができ、さらには強固なヨークに磁界発生部を固定できるので、安全性も高くなるメリットがあった。

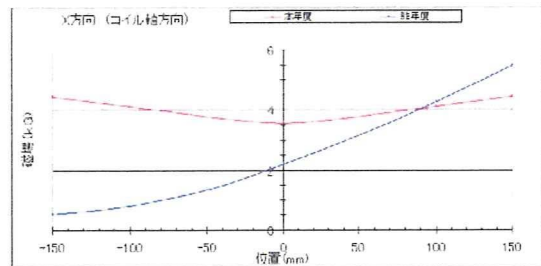


図4 発生磁界の比較

ヨークの形状は、磁極間の直下にあるX線透視装置のX線発生部を避ける必要があるため、鉄心との連結部から二叉に分かれた構造とした(図5)。

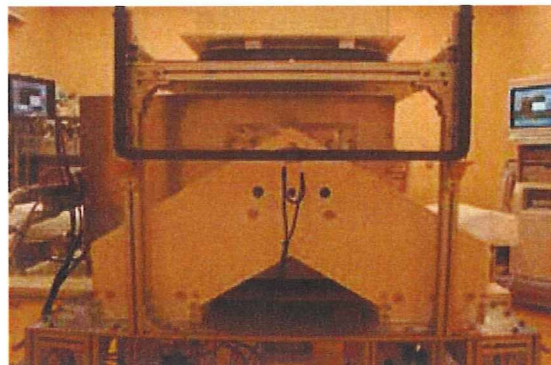


図5 ヨーク形状

磁気シールドについては、昨年度製作の磁気誘導装置の漏洩磁界と、今年度の装置の漏洩磁界の比較から、特に X 線透視装置の撮像部に対し平行な向き (X 線に対し垂直) の磁界成分が多いことがわかった。よって、従来の撮像面に垂直な磁界を打ち消すキャンセルコイルの他に、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 6)。

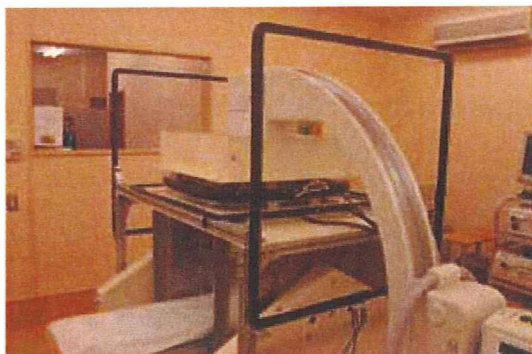


図 6 水平成分打ち消しキャンセルコイル

また、X 線透視装置へ影響の軽減とは別に、安全対策として装置外部への影響を補償するコイルも試験的に試作した。

4. 動物実験の実施

以上の研究開発から試作された超電導磁気誘導装置によって、ブタを用いた動物実験が実施された。

まず、体外で試作した磁気誘導ガイドワイヤと磁気誘導カテーテル、またカテーテルに微細内視鏡を挿入した状態で、それぞれ磁界により屈曲する様子を確認すると同時に、X 線透視装置に対する磁気シールドの効果を確認した。ガイドワイヤ及びカテーテル単体では、比較的低い磁界から十分な屈曲を確認した (図 7、図 8)。また、カテーテルに微細内視鏡を挿入した状態でも、問題なく屈曲した (図 9)。磁気シールドに

ついては、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。(図 9)



図 7 外径 0.7 mm × 長さ 5 mm の磁石を装着した外径 0.035 インチガイドワイヤの、3.5 kOe での屈曲



図 8 外径 2.6 mm × 内径 1.8 mm × 長さ 5 mm の磁石を装着した外径 5 Fr カテーテルの、3.5 kOe での屈曲

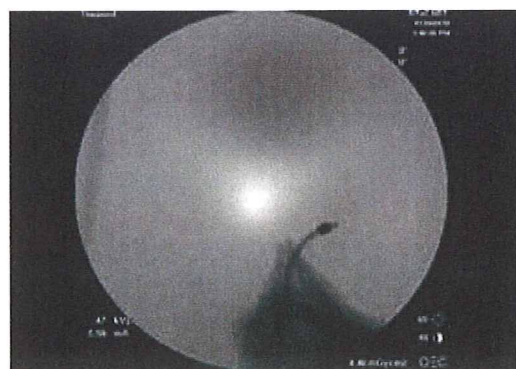


図 9 微細内視鏡を挿入した図 8 のカテーテルの、0.4 kOe での透視画像

次に、ブタの腎盂内にカテーテル及び微細内視鏡を挿入して、誘導の実験を行った。高磁界の領域では透視画像は確認できなかったが、カテーテル先端を外から見える状態にした実験では、屈曲している様子が観察された。

5. カテーテル屈曲のための基礎的電流掃引速度における超電導線Nb₃Snの有効性確認

磁気誘導装置の磁界発生部に超電導電磁石を使用しているため、医療機器として性能の発揮とともにクエンチ（発生磁界の急激な変化による発熱などにより超電導コイルが常電導になり、一旦発生すると以後しばらくは磁界発生ができなくなる。）などに対する安定性が重要な課題である。磁気誘導装置を実際に使用するには、カテーテルやガイドワイヤを10秒程度で屈曲させる必要があり、磁界の変化によるコイルの発熱により内部温度が上昇し、10秒間で最大磁界3.5kOeまで変化させた場合、2A/secの電流掃引にて9K程度まで上昇することが考えられる。NbTi（ニオブチタン）線を用いた超電導コイルでは、臨界温度が9.5Kと低いため、クエンチせずに10秒程度で電流掃引できることが課題であった。線材の基本データ（図11）より、臨界温度が18Kと高いNb₃Sn（ニオブ3スズ）線を用いたコイルは、掃引速度をより速くしても安定して磁界が発生できると予測できるため、その有効性を確認した。

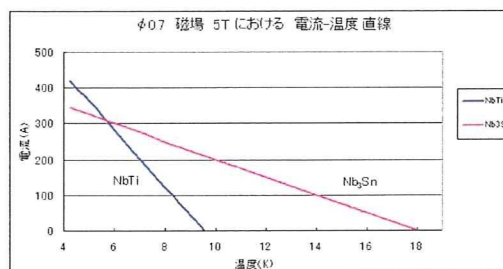


図11 電流-温度直線によるNbTi線とNb₃Sn線の比較

実験はNbTiとNb₃Snの試験用コイルを製作し、超電導電磁石の試作一号機を用いて（図12）、電流掃引温度9Kにおいて外部から3.5kOeの磁界を印加して安定して電流掃引できるか調べた。

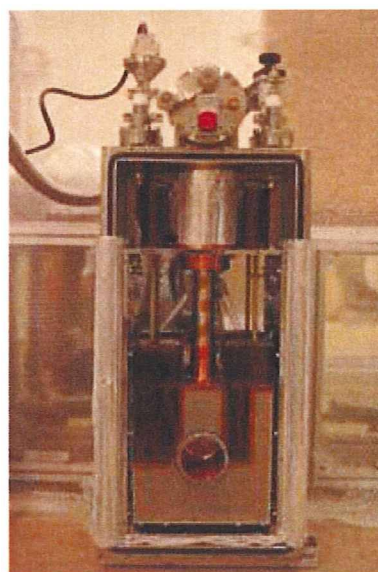


図12 ニオブ3スズ線を用いた試験コイルの設置状況

その結果、NbTiのコイルは1A/sec以上で電流掃引すると途中でクエンチしたのに対し（図13）、Nb₃Snのコイルは4A/secにおいても安定して電流掃引することができ（図14）、Nb₃Snの有効性が確認できた。

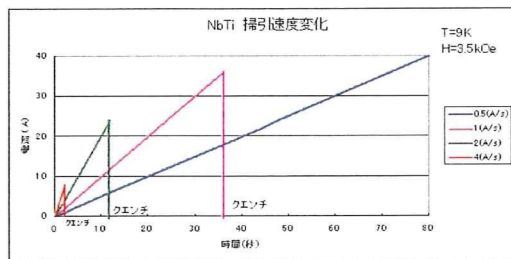


図 1 3 NbTi 線コイルの掃引速度変化
グラフ

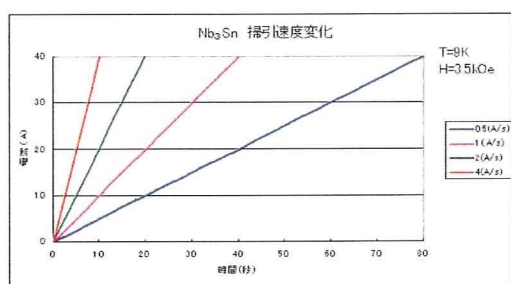


図 1 4 Nb3Sn 線コイルの掃引速度変
化グラフ

D. 考察

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、さら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、臨床応用が可能であると考え。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。

ニオブ3スズのコイル加工は、アニール処理や真空含浸など製作は難易度が高いが、速い電流掃引が可能となり、また小型の冷凍機で冷却可能となるなど利点が大きいと考えられる。

E. 結論

被誘導対象及び磁性体、磁界発生部の改良により、より確実に屈曲誘導が可能となった。また、安全性、安定性も考慮され、開発当初より完成度が高まった。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当なし。
2. 学会発表
該当なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|-----------------------------|-----|---------|------|
| <u>Manome Y</u> , Mizuno S, Akiyama N, Fujioka K, Saito H, Hataba Y, <u>Kobayashi T</u> , Watanabe M. | Three-dimensional cell culture of glioma and morphological comparison of four different human cell lines. | Anticancer Research | 30 | 383-389 | 2010 |
| Akiyama N, Ohno Y, Fukuda T, <u>Manome Y</u> , Saito S. | Enhancing activity of N-glycosylation for constitutive proteins secretions in non-polarized cells. | Biochem Biophys Res Commun. | 381 | 612-618 | 2009 |
| <u>Manome Y</u> , Furuhashi H, Hashimoto A, Funamizu N, Suzuki R, Ishizawa S, Akiyama N, <u>Kobayashi T</u> , Watanabe M. | Application of Therapeutic Insonation to Malignant Glioma Cells and Facilitation by Echo-contrast Microbubbles of Levovist. | Anticancer Research | 29 | 235-242 | 2009 |

Three-dimensional Cell Culture of Glioma and Morphological Comparison of Four Different Human Cell Lines

YOSHINOBU MANOME¹, SHUICHI MIZUNO², NOBUTAKE AKIYAMA³, KOUKI FUJIOKA¹,
HIDEKI SAITO¹, YOSHIAKI HATABA⁴, TOSHIAKI KOBAYASHI⁵ and MICHIKO WATANABE¹

Departments of ¹Molecular Cell Biology, ³Molecular Immunology, Institute of DNA Medicine, Research Center for Medical Sciences, Jikei University School of Medicine, Minato-ku, Tokyo 105-8461, Japan;

⁴Integrated Imaging Research Support, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0093, Japan;

⁵Cancer Screening Technology Division, Research Center for Cancer Prevention and Screening, National Cancer Center, Chuo-ku, Tokyo 105-0045, Japan;

²Department of Orthopedic Surgery, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA 02115, U.S.A.

Abstract. *Background: To explore the intracranial behaviors of glioma, a three-dimensional culture was devised and the morphology of four cell lines was examined. Materials and Methods: Bioabsorbable and degradable gelatin was used as the scaffold and T98G, A172, KNS42, and U118MG representative standard malignant glioma cell lines were cultured three-dimensionally. Results: When grown, the cells demonstrated characteristic conformations. The U118MG cells dispersed with numerous fiber formations. In contrast, the KNS42 and A172 cells aggregated, adhering to each other, resulting in the formation of balloon-like structures. The T98G cells demonstrated an intermediate character. Conclusion: The cell lines showed distinct characteristics in three-dimensional culture. This culture method may have a role in elucidating the fundamental character of cells in the human body.*

Tissues in the human body are derived from certain types of cells and accordingly, the characters of the individual tissues are determined by the constituent cells. This especially may be true in organs such as the central nervous system, because the tissue consists of relatively homologous types of cells, albeit with many functions. Based on this understanding, methods for cell culture have been utilized for biomedical studies and cell biology experiments. However, most of these studies have been conducted using a monolayer or two-dimensionally cultivated

cells. Many researchers nowadays notice that two-dimensional cells on flat and hard plastic dishes or flasks do not represent natural cells in living tissues or organs (1). First of all, monolayer cells do not have steric cell connections, unlike in the human body. Such three-dimensional cell-to-cell connections are important for proliferation, adhesion, migration, invasion and phenotype presentations. In addition, cellular function is regulated by the microenvironment. The environments in monolayer cells are far from those *in vivo*. The extracellular matrix is also known to be important for morphogenesis as it interacts in the cell-to-cell connection and anchoring of cells. However, it differs between cells cultured *in vitro* and *in vivo* (2). From this point of view, three-dimensional cell culture has gained popularity and is now being used in a wide range of cells (3). Representatives of the three-dimensional cell culture method include reconstituted basement membrane (rBM, commercially known as Matrigel) (4-6) and spheroids (7, 8). Many other devices with a collagen scaffold have also been used. However, in spite of the number of studies and the acceptance of three-dimensional cultures as mainstream methods, better systems that simulate the inside of the human body are still required. In this context, we established a three-dimensional cell culture and demonstrated the chondroinduction of human fibroblast cells with demineralized bone powder (9, 10). In that series of studies, when cells were cultured in three dimensions, demineralized bone powder induced an extracellular matrix similar to that deposited around *bona fide* chondrocytes. Kinetic analyses of gene expression during chondroinduction also confirmed the effect (11, 12). We have emphasized that this culture system has the advantage of using bioreactors that can easily control medium perfusion, as well as enable the application of hydrostatic pressure, and/or exposure to low oxygen tension (13-20). Using this device, we also identified messenger RNAs that were regulated by hydrostatic pressure in three-dimensional culture. In the human

Correspondence to: Yoshinobu Manome, MD, Ph.D., Department of Molecular Cell Biology, Institute of DNA Medicine, Research Center for Medical Sciences, Jikei University School of Medicine, 3-25-8 Nishi-shinbashi, Minato-ku, Tokyo, 105-8461, Japan. Tel: +81 334331111 ext. 2360, e-mail: manome@jikei.ac.jp

Key Words: Malignant glioma, cell culture, three-dimension, morphology.

body, hydrostatic fluid pressure constantly oscillates in certain types of tissues or organs, including the central nervous system, that is exposed to intracranial pressure and the vascular system or blood cells exposed to systolic or diastolic blood pressures. Genes of the regulator of G-protein signaling 5 (RGS5) in neuroblastoma cells and chromosome condensation 1-like (CHC1-L) in lymphocytes increased after exposure to hydrostatic pressure (21).

However, during the development of the three-dimensional culture, little was known about the morphology of cultured cells other than chondrocytes. Malignancy is one of the prospective uses for the culture. In this study, human malignant glioma cells were cultivated and their morphologies were observed. The differences between four different cell lines were also compared.

Materials and Methods

Cell lines. The human glioblastoma cell lines, T98G (22), A172 (23) and U118MG (24) were purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). The human glioblastoma KNS42 cell line was provided by Dr. Takeshita, Kyushu-University (25). These cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with 4.5 g/l glucose supplemented with 10% fetal bovine serum. The cells were grown in a normal culture flask until the start of the experiments.

Three-dimensional cell culture. The scaffold material for three-dimensional culture was bioabsorbable and degradable gelatin. The method for the experiments was a modified version of a previously described procedure (9, 10). Dispersed human glioma cells (1×10^4 cells/100 μ l of DMEM) were injected into the scaffold and left to stand for 4-6 hours at 37°C in a 5% CO₂ incubator without additional cell culture medium. After attachment of the cells to the scaffolds, the meshes were transferred into a 10-cm dish, immersed in 10 ml of culture medium and further cultivated for 3 to 20 days.

Morphological evaluations. The cultures with scaffolds were fixed with 10% phosphate buffered-formalin for light microscopy, 1.2% glutaraldehyde for scanning electron microscopy (SEM) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.3, 400 mOsm) or 2% glutaraldehyde for transmission electron microscopy (TEM), and then used as specimens. Paraffin-embedded specimens were sliced at 6- μ m thickness, stained with hematoxylin and eosin, and examined under a light microscope. Freeze fractured- or non-fractured specimens in ethanol were dehydrated by a critical point dryer (Hitach-Hightec, Tokyo, Japan), coated by Au-Pd magnetron sputter and examined at 15 kV under a JSM-5800LV scanning electron microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). Other specimens were examined at 80 kV under a H-7500 transmission electron microscope (Hitachi-Hightec) after ultramicrotomy.

Results

Three-dimensional culture of T98G glioma cells. A cross-section of a three-dimensional culture on day 10 is shown in Figure 1a. The inoculated cells proliferated in the three-dimensional scaffold and were crammed into the

compartment and their fibers also filled in the extracellular spaces. When the cells were crowded in the seeded tracks, they tended to migrate to unoccupied adjoining space and re-proliferate (Figure 1b). At the beginning of culture, injected or seeded cells adhered to the material and started to grow in the attached spots. After several days, these multiplied cells were detected as groups of cells (Figure 1c) and at this early stage of the culture, they actively grew, rather than producing extracellular matrix. Unattached and dead cells were sloughed away and not observed. When the cellular density increased, the cells produced more extracellular matrix. Simultaneously, the cells started to migrate to neighboring space by anchoring to the scaffold. The T98G cells in three-dimensional culture were vibrant and plicae, microvilli and fibers were clearly observed (Figure 1d). The three-dimensional spatial environment conferred dynamic viability on the cultured cells. The adaptability of the cells to the scaffold was evaluated by TEM. The glioma cells attached to the scaffold with many processes (Figure 1e). Although the cells retained their ability to migrate as well as their mobility on the scaffold surface, cell attachments to the scaffold were abundant. A study at higher magnification revealed that fine matrix fibers intervened between the cell process and the scaffold (Figure 1f). The matrix was produced by the glioma cells and deposited in the extracellular spaces. The cells bonded to the scaffold by means of the extracellular matrix. Similar intervention was also observed on process-to-process connections between the cells (Figure 1g). These connections arose in a complicated and sophisticated manner. Extracellular matrix was used for the connections. Steric connections were observed throughout the culture. The features demonstrated here were rarely detectable in conventional cell culture (data not shown).

Morphology of four representative glioma cell lines. Similar to the T98G cells, human KNS42, A172 and U118MG cell lines have commonly been used in previous studies. When the cells were grown, they presented distinctive appearances. T98G cells grew initially as a group, then migrated into and accumulated in neighboring spaces. A cluster of T98G cells is shown in Figure 2a. The cells aggregated and rolled up, which was the typical appearance of T98G in three-dimensional culture. In contrast, the KNS42 and A172 cells aggregated, adhering to each other, leading to the formation of balloon-like structures (Figure 2b, c). These structures were not formed by the T98G cells. While both the KNS42 and A172 cells conglomerated, the KNS42 cells bound more tightly than the A172 cells. Unlike KNS42, individual cell shapes were maintained in A172 which grew more independently and thus each cell was distinguishable. The U118MG cells presented drastically different characteristics. They dispersed, grew

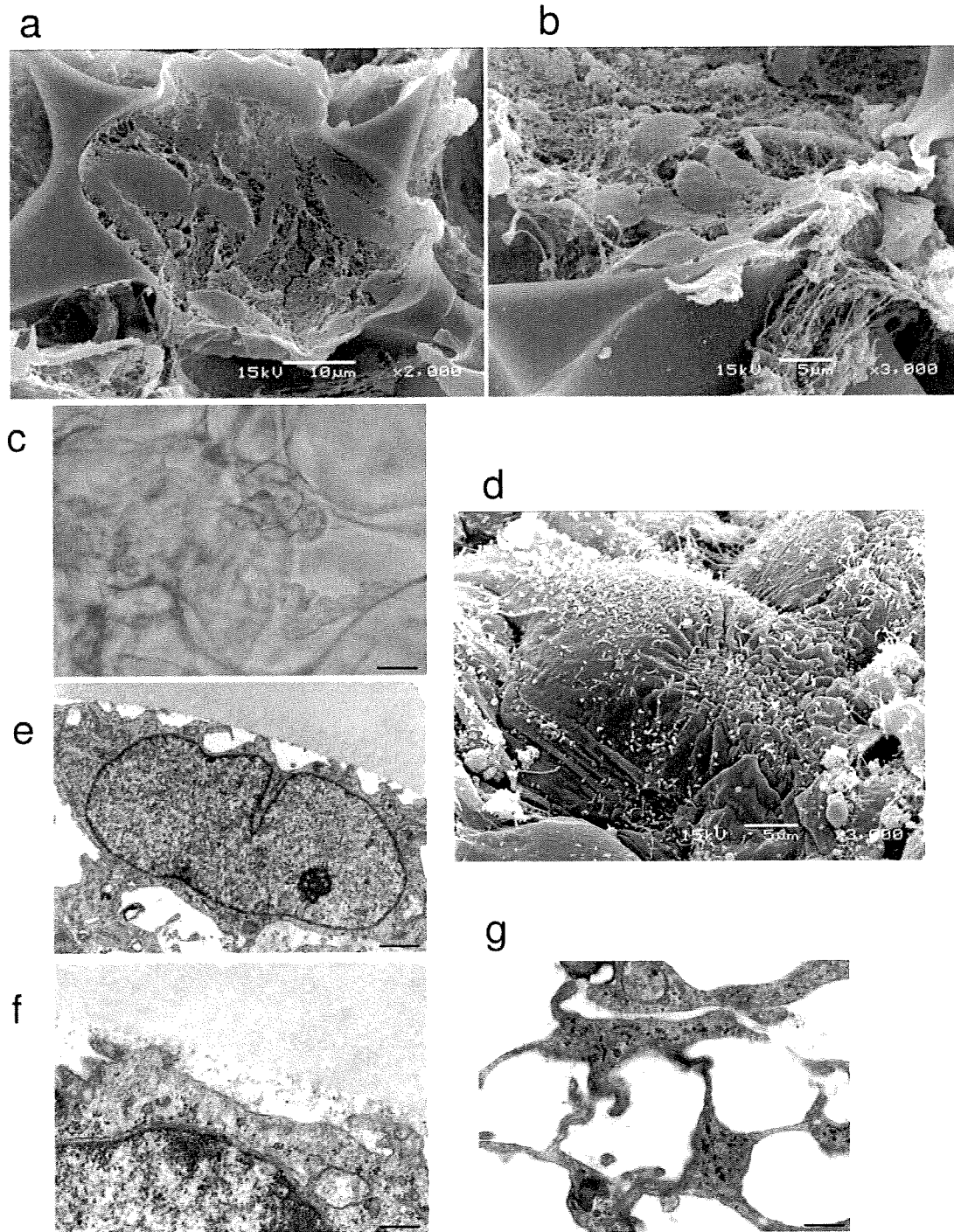


Figure 1. Morphology of three-dimensionally cultured human T98G glioma cells. a: SEM of freeze-fractured cells on day 10 of culture, the fractured scaffold presenting a smooth and flat structure. Processes and fibers fill the intracellular space. b: SEM on day 5 of the culture. Most of the glioma cells also fractured. c: Appearance of the glioma by phase-contrast microscopy on day 4 of culture. The cells were tightly attached to the scaffold and starting to proliferate. Magnification, $\times 40$; bar, $40 \mu\text{m}$. d: SEM of the glioma on day 5 of culture. Fine structures of the fibers, plicae, and microvilli on the surface of T98G cells. e: TEM of attachment of a glioma cell to the scaffold on day 8 of culture. More than eight processes projected from the cell body cradling tight adherence. Bar, $1.2 \mu\text{m}$. f: Higher magnification TEM of the attachment revealing extracellular matrix fibers between the cell projections and the scaffold. Bar, 317nm . g: TEM of connection of cell to cell processes on day 8 of culture. Bar, 380nm .

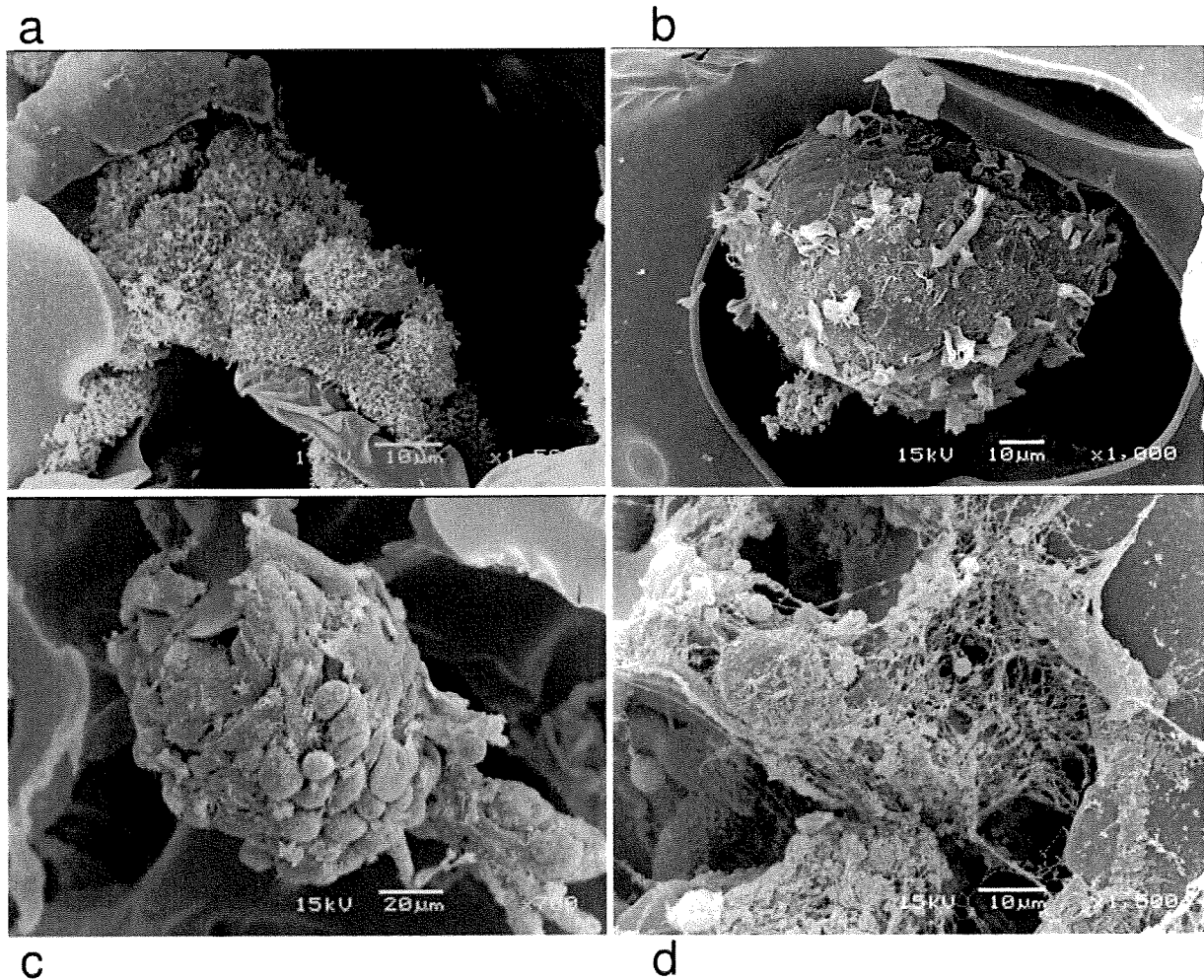


Figure 2. Appearance of three-dimensional cultures of separate glioma cell lines. a: T98G, appearance intermediate between that of KNS42 and U118MG cells. b: KNS42, cell boundary obscure compared to T98G or A172. c: A172, shape of each cell clearly apparent. d: U118MG, strongly attached to the scaffold with numerous fibers.

separately and did not pile up or conglomerate (Figure 2d). The cells attached to the scaffold with numerous fiber formations. These features were observed from the beginning of the cell culture.

Characteristics of three-dimensional culture of KNS42, A172 and U118MG cells. TEM was used to observe the inside of the aggregated KNS cell structure (Figure 3a). Numerous microvilli were observed on the surface of the cells and they also protruded into the extracellular spaces in the inner side of the aggregate. The individual cells processed their own extracellular spaces, which might be an advantage for maintaining the micro-environment of individual cells. Even after 15 days of culture, the cells still proliferated. Despite the cell numbers and size of the aggregates, very few cells

underwent apoptosis or necrosis (Figure 3b). Although the cells tended to adhere to each other, many attachments to the scaffold were also observed (Figure 3b). TEM also demonstrated tight bonding to the scaffold of the cell (Figure 3c) which was closer than that of the T98G cells. The features of A172 were basically similar to those of KNS42. The cells formed a globoid structure (Figure 3d) and microvilli were found on the surface or intra-structural spaces. However, the overall structure of the A172 complex was different from that of KNS42 since unlike KNS42, the cells protruded beyond the outline of the globoid structure in A172 cells giving a more ragged appearance. In contrast, U118MG cells did not form a complex, grew independently, and even immediately after dividing, the cells dispersed and produced massive fibers (Figure 3e). Long processes

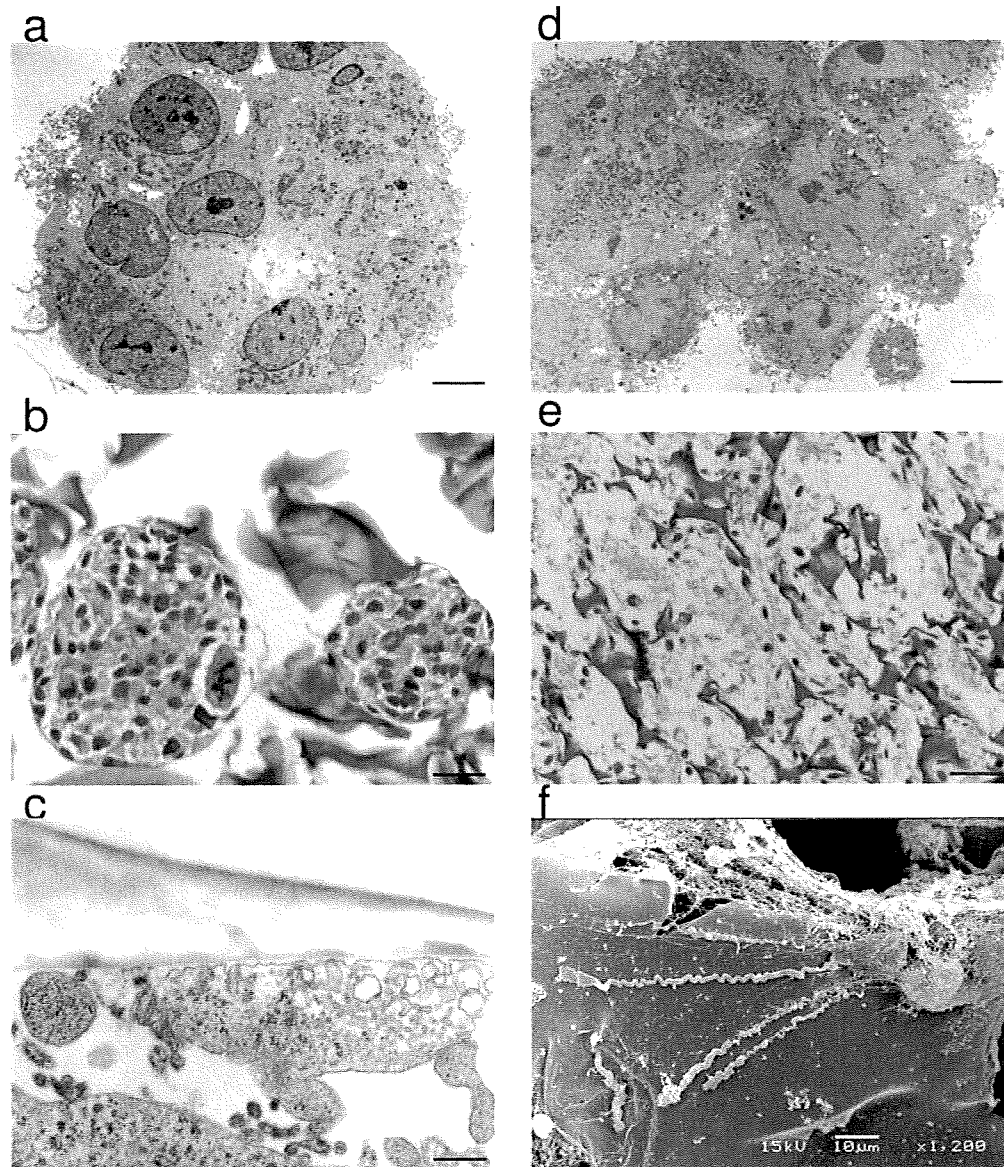


Figure 3. Morphology of three-dimensionally cultured KNS42, A172 and U118MG cells. *a*: TEM image of KNS42 cells. Cells aggregated with numerous microvilli in the extracellular spaces as well as on the outside surface of the structure. Bar, 8 μ m. *b*: Cross-section of KNS42 cells forming a spheroid structure (hematoxylin-eosin staining). Note the presence of attachments to the scaffold. Magnification, $\times 40$; bar, 40 μ m. *c*: TEM image of a KNS42 cell attached to the scaffold with distinct extracellular matrix. Bar, 500 nm. *d*: TEM image of A172 cells with a ragged and lumpy surface and prominent microvilli. Bar, 8 μ m. *e*: Cross-section of U118MG cells (H-E staining) demonstrating an infiltrative pattern and abundant extracellular fibers. Magnification, $\times 10$; bar, 160 μ m. *f*: SEM image of U118MG cells firmly attached to the scaffold by fibers and long processes projecting from the cell body. Microvilli occurred on the tips of the processes.

extended from the cells and attached to the scaffold with further extension of small fibers that also attached to the scaffold (Figure 3f). Many microvilli were seen on the tips of the processes. These features were unique to U118MG. Cellular connection was usually achieved *via* the cell processes.

Discussion

Malignant glioma is one of the intractable diseases of the human body. In spite of recent advances in medical technologies, malignant glioma is refractory to most current therapies and alternative therapies are required. One

advantage for the development of an effective treatment is that malignant glioma cells seldom metastasize to organs other than the central nervous system and long-term survival or even a cure of the disease could be expected by inhibiting local tumor recurrence. Therefore numerous studies have been carried out using glioma cells. Under such circumstances, the development of an experimental model that simulates an intracranial glioma is important (26, 27), because most studies have been performed on cultures with ordinary monolayer cells.

In a recent study, we optimized therapeutic ultrasound against malignant brain tumor, especially glioma, using a three-dimensional cell culture (28). The data obtained were directly applicable to *in vivo* animal studies and we noted the importance of the nature of the culture. In the present study, the tendency of T98G cells to enter a viable G₁-arrested state when crowded (22) was confirmed in an ordinary two-dimensional cell culture (data not shown). In contrast, glioma cells in three-dimensional culture kept on proliferating at least until day 20 under the current experimental conditions. The difference might be attributable to the abundant scaffold spaces of the three-dimension cell culture. The morphology observed in three-dimensional culture was quite different from that of cells in a conventional monolayer culture. Each glioma has different properties for growth and infiltration into brain parenchyma *in vivo* and these abilities may influence the prognosis of host patients. When the different glioma cells were grown in the scaffold, they displayed notably different characteristics. The U118MG cells dispersed, while the KNS42 and A172 cells conglomerated. After the cells were inoculated on to the scaffold, only those that were attached to the scaffold started to divide, and these cells proliferated *ad locum*. Whether the cells dispersed or conglomerated could have been attributable to different migratory or locomotive abilities. While the U118MG cells tended to separate, the KNS42 and A172 cells did not migrate even after division.

The cells used in this study were representative of standard glioma lines widely used experimentally, both *in vitro* and *in vivo*. These cells were much alike in two-dimensional cell culture. However, different characteristics became evident only after three-dimensional cell culture. It is concluded that culture experiments should be planned with consideration to the individuality of each tumor cell type. There may be many different types of three-dimensional culture methods (29-33) other than the one presented here, suitable for the evaluation of expansion or invasion of glioma. While the morphology of the gliomas was demonstrated using the present scaffold method, a better system that replicates the intra-cerebral environment for malignant cells is required. This may also apply to cells other than gliomas. Accordingly, further study is warranted.

References

- 1 Pampaloni F, Reynaud EG and Stelzer EH: The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 839-845, 2007.
- 2 Kleinman HK, Philp D and Hoffman MP: Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Curr Opin Biotechnol* 14: 526-532, 2003.
- 3 Pilkington GJ, Bjerkvig R, De Ridder L and Kaaijk P: *In vitro* and *in vivo* models for the study of brain tumour invasion. *Anticancer Res* 17: 4107-4109, 1997.
- 4 Kleinman HK and Jacob K: Invasion assays. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 12: Unit 12-2, 2001.
- 5 Kleinman HK and Martin GR: Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol* 15: 378-386, 2005.
- 6 Marques MM, Martins MD and Franca CM: Effect of Matrigel on adenoid cystic carcinoma cell line differentiation. *Int J Exp Pathol* 87: 405-410, 2006.
- 7 de Ridder L, Cornelissen M and de Ridder D: Autologous spheroid culture: a screening tool for human brain tumour invasion. *Crit Rev Oncol Hematol* 36: 107-122, 2000.
- 8 Kunz-Schughart LA, Kreutz M and Knuechel R: Multicellular spheroids: a three-dimensional *in vitro* culture system to study tumour biology. *Int J Exp Pathol* 79: 1-23, 1998.
- 9 Mizuno S and Glowacki J: Three-dimensional composite of demineralized bone powder and collagen for *in vitro* analysis of chondroinduction of human dermal fibroblasts. *Biomaterials* 17: 1819-1825, 1996.
- 10 Mizuno S and Glowacki J: Chondroinduction of human dermal fibroblasts by demineralized bone in three-dimensional culture. *Exp Cell Res* 227: 89-97, 1996.
- 11 Allemann F, Mizuno S, Eid K, Yates KE, Zaleske D and Glowacki J: Effects of hyaluronan on engineered articular cartilage extracellular matrix gene expression in 3-dimensional collagen scaffolds. *J Biomed Mater Res* 55: 13-19, 2001.
- 12 Yates KE, Mizuno S and Glowacki J: Early shifts in gene expression during chondroinduction of human dermal fibroblasts. *Exp Cell Res* 265: 203-211, 2001.
- 13 Glowacki J and Mizuno S: Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers* 89: 338-344, 2008.
- 14 Mizuno S and Glowacki J: Low oxygen tension enhances chondroinduction by demineralized bone matrix in human dermal fibroblasts *in vitro*. *Cells Tissues Organs* 180: 151-158, 2005.
- 15 Mueller SM, Mizuno S, Gerstenfeld LC and Glowacki J: Medium perfusion enhances osteogenesis by murine osteosarcoma cells in three-dimensional collagen sponges. *J Bone Miner Res* 14: 2118-2126, 1999.
- 16 Navarro FA, Mizuno S, Huertas JC, Glowacki J and Orgill DP: Perfusion of medium improves growth of human oral neomucosal tissue constructs. *Wound Repair Regen* 9: 507-512, 2001.
- 17 Glowacki J, Mizuno S and Greenberger JS: Perfusion enhances functions of bone marrow stromal cells in three-dimensional culture. *Cell Transplant* 7: 319-326, 1998.
- 18 Mizuno S, Allemann F and Glowacki J: Effects of medium perfusion on matrix production by bovine chondrocytes in three-dimensional collagen sponges. *J Biomed Mater Res* 56: 368-375, 2001.

- 19 Mizuno S, Tateishi T, Ushida T and Glowacki J: Hydrostatic fluid pressure enhances matrix synthesis and accumulation by bovine chondrocytes in three-dimensional culture. *J Cell Physiol* 193: 319-327, 2002.
- 20 Mizuno S: A novel method for assessing effects of hydrostatic fluid pressure on intracellular calcium: a study with bovine articular chondrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 288: C329-337, 2005.
- 21 Manome Y, Saeki N, Yoshinaga H, Watanabe M and Mizuno S: A culture device demonstrates that hydrostatic pressure increases mRNA of RGS5 in neuroblastoma and CHC1-L in lymphocytic cells. *Cells Tissues Organs* 174: 155-161, 2003.
- 22 Stein GH: T98G: an anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G₁ arrest *in vitro*. *J Cell Physiol* 99: 43-54, 1979.
- 23 Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H and Parks WP: *In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51: 1417-1423, 1973.
- 24 Ponten J and Macintyre EH: Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand* 74: 465-486, 1968.
- 25 Takeshita I, Takaki T, Kuramitsu M, Nagasaka S, Machi T, Ogawa H, Egami H, Mannoji H, Fukui M and Kitamura K: Characteristics of an established human glioma cell line. *KNS-42. Neurol Med Chir* 27: 581-587, 1987.
- 26 Corcoran A, De Ridder LI, Del Duca D, Kalala OJ, Lah T, Pilkington GJ and Del Maestro RF: Evolution of the brain tumour spheroid model: transcending current model limitations. *Acta Neurochir* 145: 819-824, 2003.
- 27 Grobden B, De Deyn PP and Slegers H: Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res* 310: 257-270, 2002.
- 28 Manome Y, Furuhashi H, Hashimoto A, Funamizu N, Suzuki R, Ishizawa S, Akiyama N, Kobayashi T and Watanabe M: Application of therapeutic insonation to malignant glioma cells and facilitation by echo-contrast microbubbles of levovist. *Anticancer Res* 29: 235-242, 2009.
- 29 Friedl P and Wolf K: Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3: 362-374, 2003.
- 30 Hegedüs B, Marga F, Jakob K, Sharpe-Timms KL and Forgacs G: The interplay of cell-cell and cell-matrix interactions in the invasive properties of brain tumors. *Biophys J* 91: 2708-2716, 2006.
- 31 Kaufman LJ, Brangwynne CP, Kasza KE, Filippidi E, Gordon VD, Deisboeck TS and Weitz DA: Glioma expansion in collagen I matrices: analyzing collagen concentration-dependent growth and motility patterns. *Biophys J* 89: 635-650, 2005.
- 32 Stein AM, Demuth T, Mobley D, Berens M and Sander LM: A mathematical model of glioblastoma tumor spheroid invasion in a three-dimensional *in vitro* experiment. *Biophys J* 92: 356-365, 2007.
- 33 Werbowetski T, Bjerkvig R and Del Maestro RF: Evidence for a secreted chemorepellent that directs glioma cell invasion. *J Neurobiol* 60: 71-88, 2004.

Received August 25, 2009

Revised January 19, 2010

Accepted January 21, 2010