

- 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
 - ・ 石澤将、宇都宮一典、横田太持、谷口幹太、五條淳、渡辺美智子、馬目佳信、田島尚子 培養メサンギウム細胞の TGF- β 発現機序における Rho キナーゼの関与 平成 19 年 10 月 11 日、12 日、第 124 回成医会総会 東京
 - ・ 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
 - ・ 石澤将、宇都宮一典、渡辺美智子、馬目佳信、田嶋尚子 培養メサンギウム細胞の TGF- β 発現機序における Rho キナーゼの関与 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
 - ・ Funamizu N., Suzuki R., Watanabe M., Manome Y. A difference of sensitivities of pancreatic cancer cells to gemcitabine after transduction of deoxycytidine kinase (dCK) gene by retroviral vector. The 13th annual meeting 2007. Japan Society of Gene Therapy June 30, 2007. Nagoya, Japan.
 - ・ 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
 - ・ 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、出願
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をし、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

泌尿器科領域では径が3-6mmの腎盂尿管鏡を経尿道的に尿管内に挿入し診断するが大径のため操作が難しく観察困難であり診断も容易ではない。そのため実験用豚を用いて尿管経由の0.6-0.8mm径微細内視鏡で腎盂尿管内景と病変や腫瘍の観察を目的とし、同時に超伝導コイルで内視鏡先端を動かし3次元的な視野観察の可能性を検討した。

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、ホヤペンタックス社の協力で作製した0.6-0.8mm微細内視鏡で腎盂尿管の観察を行った。微細内視鏡先端を可動させるという目的での微細内視鏡先端に磁石をつけて超伝導磁場誘導による先端誘導や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。同時に染色模擬腫瘍や蛍光発生腫瘍の観察を試みた。
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. 最終的には尿管カテーテル先端誘導で視野改良した微細内視鏡によるブタ腎盂尿管内の観察は容易に行えた。染色模擬腫瘍や蛍光発生腫瘍の観察も行えた。超伝導磁場誘導による内視鏡先端に磁石をつけての先端誘導は不可能であるが、磁場強化した結果で尿管カテーテル先端の可動による微細内視鏡の間接的動可は容易に行えた。また、腎盂を解放した状態で目視下に磁場誘導による内視鏡先端可動の観察は可能であった。磁場の影響が強いため、X線透視の視野が歪み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り、今後、この点について改善を必要とした。

2. ホヤペンタックス社の協力下に作製の径約1.5mmの細径内視鏡により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。細径内視鏡のブタ腎盂尿管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、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て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

本研究は、ブタ実験で直接尿管鏡を磁場誘導で動かすことができるとの考えから、尿管鏡を誘導する尿管カテーテルを磁場誘導して可動するという考えに発展させて、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。同時に微細内視鏡も良好な視野が得られ模擬腫瘍や蛍光発生腫瘍の観察が行えた。さらにホヤペンタックス社協力で作製された外径約1.5mmの細径内視鏡はヒト対象の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。本研究は、今後の応用的な発展が期待される。

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えた。
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
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.

3. 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

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)
3. 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)
4. 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

微細内視鏡は通常では見ることのできない細い間隙からでも人間の組織や器官を直接観察することができる便利な道具であり、この技術開発を進めることは悪性腫瘍の領域でも新しい医療への発展につながる。本研究では微細内視鏡の微細であるという特性を活かし悪性腫瘍を早期に診断し安全に治療するための応用研究を行った。対象疾患を脳腫瘍（グリオーマ）と膀胱癌に絞り、脳腫瘍に対しては病変に超音波増感剤であるマイクロバブルの投与と外部から音響エネルギーの照射によって頭蓋内の腫瘍を破壊するシステム開発し、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との組み合わせを検討した。初年度、超音波照射で脳腫瘍を障害・破壊し、その効果を微細内視鏡で観察する診断治療システムの開発を念頭に置き、脳腫瘍3次元モデルにおいて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に注目して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作製、また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。次年度、樹立した脳腫瘍の生物学的性質の検討と3次元モデルでの遺伝子発現の解析、および治療用超音波による腫瘍細胞の内視鏡的観察、蛍光プローブでの観察と追跡を行い、最終年度、マイクロバブルを用いた音響化学療法ROCK2を変調させた脳腫瘍に対しての効果、および膀胱癌を対象とした磁気誘導型DDSの可能性について調査した。これらの結果から微細内視鏡では装置に加えて周辺治療技術の開発を進めることで悪性腫瘍の診断治療に大きな進歩をもたらすことが予想された。

A. 研究目的

内視鏡は生体内で発生するイベント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。その利便性や簡易性、汎用性から臨床の場面でも消化管を初めとした管腔などの臓器に対して幅広く使用されているが、一方、直視下に観察するという事は常にレンズを病

変部に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ような生体組織や、管腔が非常に細いような臓器については観察が難しい。これを克服するための1つの手段として内視鏡の微細化がある。微細内視鏡は生体内で直接観察することにメリットのあると思われる例えば脳のような組織や、これまでのサイズや材質の

ものでは挿入することが難しかったような尿管、腎盂などの泌尿器病変の診断や治療に応用できる。開発中の微細内視鏡とその特性を活かした応用技術を開発することを本研究で目指した。

微細内視鏡の技術を反映できる1つのモデルは脳腫瘍、特にグリオーマである。脳腫瘍はCTやMRIなどの発達や普及、脳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する。全体の半数以上を様々な良性の腫瘍群が占めるが、原発性脳腫瘍全体で見ると約4分の1以上で最も多いのがグリオーマである。この腫瘍は浸潤性に進行し予後は不良であり、治療成績はグレードの低い比較的良性のものでも5年生存率が50%、悪性のもものでは5年生存率は8%程度と治癒させることが困難である。現在、手術療法や放射線療法、免疫療法などが進歩してもまだ満足できる成績が残せておらず、近年優れた化学療法剤としてテモゾロミドが開発されたがその効果も限定的である。このようにグリオーマは予後が不良な腫瘍だが、頭蓋外への転移は稀であり、この点で他の悪性腫瘍と性質が大きく異なる。患者の死亡のほとんどが局所での腫瘍の再発によるもので、逆説的に言えば局所での再発さえ制御することができれば患者の長期生存、場合によっては完全に治癒させることが期待でき、有効な局所療法が開発がグリオーマ制圧の大きな鍵と考えられている。

本研究では脳腫瘍、特にグリオーマを正確で安全かつ効果的に治療するため、超音波などの物理的な外力を用いて破壊し、微

細内視鏡により診断および効果の確認を行う新しい局所療法のシステムの構築を目指した。中枢神経系はクリティカルな臓器であり技術開発を行う際に安全性の確保が最優先の課題となる。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グリオーマへの治療の安全性を確認するのに最適な道具である。脳神経外科の領域ではオンマイヤーリザーバーの設置や定位脳手術、ナビゲーターの使用が日常行われている。術後、腫瘍部にカテーテルを置くことも多く、注射針程度の針穴から挿入できる大きさの内視鏡であれば腫瘍腔内に挿入が可能である。

一旦局所療法が確立すれば、技術は他の領域の癌へ応用できる。次に有用と考えられるモデルとして泌尿器系の癌がある。膀胱や尿管などの癌は表面の移行上皮から発生するため内視鏡での発見が容易である。内視鏡技術と局所療法の組み合わせで、手術による摘出よりずっと非侵襲的な治療となる。手術に対するリスクのある患者や老人等に対しても治療を行うことができるようになれば意義が高いと思われる。

また、微細内視鏡の周辺技術の一つに内視鏡自体を誘導するための磁気誘導システムがある。これは内視鏡自体やカテーテル、ガイドワイヤーの先端に小磁石を設置し、外部から強力な超電導電磁石で内視鏡を誘導するシステムがある。磁力は生体内の奥深くまで到達し、反応する金属などを自由に動かしたり目的の領域に集中させたりすることができる。本研究での誘導式の強度磁気発生装置の利用が可能であることから磁気により病変にドラッグを誘導する磁気

誘導DDS（ドラッグデリバリーシステム）についての検討も行った。

B. 研究方法

1. 脳腫瘍三次元培養モデルの作製

ヒトグリオーマ細胞を通常のフラスコやディッシュによる培養ではなく立体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作ることができる。これまでにI型コラーゲンや組織適合性ゼラチンを利用し、三次元マトリクスの中にグリオーマ細胞を生育させることで実験に役立つ脳腫瘍のモデルを作成を行ってきた。脳腫瘍ではゼラチンマトリクスによるメッシュを用いた方法が安定した再現性の良いモデルとなることが判ったため今回基質としてゼラチンを用いて実験を行った。5mm角の三次元メッシュ内に $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^5$ を100 μ lに懸濁した脳腫瘍細胞をシリンジで接種、細胞培養器の中で4時間培養、細胞がメッシュに接着した後、メッシュを底面コーティングしていない10cmディッシュに移して10mlの細胞培養用培地を加え、1～20日間培養してモデルを作成した。

2. 三次元培養での遺伝子発現、タンパクリン酸化の差異の検出

三次元培養モデルを用いて今回多くの実験を行った。生体内の腫瘍は立体的に増殖・浸潤するのに対し、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2次元の観察しかできない。このような平面的条件は生理環境を反映しておらず、培養実験で得られた治療条件は必ずしも動物や生体での効果を保証しないことが知られている。また二次元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

てしまうため条件の検討を行うことができなかった。実際に三次元培養での腫瘍細胞の挙動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試みた。三次元マトリクス中でT98G細胞を増殖させ、10日目に細胞を回収し、RNAとタンパクを精製した。対照に通常の培養細胞を用いた。サンプル回収後、RNAから逆転写酵素でcDNAを合成、浸潤や増殖に関連する遺伝子についてサーマルサイクラーで増幅した。解析はTGF- β /SMAD系、マトリクスメタロプロテナーゼ系のシグナル、およびEGF, EGFR, PDGF, PDGFRなど増殖因子について行い、リン酸化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、ウエスタンブロットを行って細胞内シグナルのリン酸化を抗体で比較した。

3. 脳腫瘍へのROCKアイソフォームに対するショートヘアピンRNAの導入

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とが知られている。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が存在し、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。このようにRhoのエフェクターであるRhoキナーゼ/ROCKは脳腫瘍、特にグリオーマにおいても細胞の増殖や浸潤に大きな役割を持つがその詳細は明らかにされていない。また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が、各々の役割に関してもまだ明らかにされていない。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可能性がある。そこでこれら脳腫瘍のROCK1, ROCK2に対するsiRNAをデザインし、これらの分子の発現がそれぞれ抑制された細胞株の樹立を行った。siRNAはいくつかの部位をターゲットとしたものを作成して効果を比較した。siRNAはショートヘアピン構造(sh)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)を用いてラットグリオーマRT2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の常時発現低下したグリオーマ細胞株を得た。

4. 変調させたROCKを有するRT2細胞の性質の解明

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の発現をそれぞれ比較した。ま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を決定した。細胞周期はフローサイトメトリーにて解析、単離した細胞をメタノール固定後、染色体をヨウ化プロピジウム(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。またこれらのデータから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マイクロバブルを用いた音響化学療法による治療成績を調べた。

5. 微細内視鏡検出用脳腫瘍細胞および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細胞の可視化技術の開発が進みつつある。微細内視鏡の画像においても通常の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例えば蛍光等で可視化された腫瘍組織を識別することができる。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内視鏡で識別することも可能となろう。微細内視鏡での観察を行うためヒト悪性グリオーマT98G細胞およびヒトT24膀胱癌細胞にエンハンス型蛍光緑色タンパク(EGFP)を導入した。蛍光マーカーとしてpEGFP-C1プラスミド(クローンテック社)を用い、8×10⁶個の腫瘍細胞にpEGFP-C1 2μgを加え200V, 975μFで電気穿孔(Gene Pulser II, バイオラド社)、その後、10cm dishにて細胞を培養、48時間後に培地に硫酸ジェネチシン添加(最終濃度1mg/ml)してさらに14日間選択培養して得られたコロニーを解析しGFPを最大発現しているクローンを得て増殖させた。これらの細胞を微細内視鏡で観察するため三次元培養を行った。膀胱癌細胞では基質上にほぼ一層の腫瘍の成

長が観察されるのみで脳腫瘍のような三次元構造は形成しなかったため、ポリエステル繊維メッシュ上に増殖させて膀胱癌モデルシートを作成した。また一部はモデルとなる細胞を0.5% グルタルアルデヒドで固定、生食で洗浄後、0.05%メチレンブルー15分染色、その後、生食で過剰なメチレンブルーを洗流し青色細胞として画像確認のために使用した。

6. 磁気誘導による抗癌剤デリバリーシステムの開発

今回の研究で微細内視鏡やカテーテル先端等を生体内で観察したい方向に磁気誘導するシステムを開発した。この方法は内視鏡のみならずドラッグデリバリーにも利用できる可能性があったためデリバリーシステムを作成して効果を調べた。鉄粒子などの磁性体は加工が容易であり表面に抗癌剤などを結合させることができる。これまでに磁気誘導によるドラッグデリバリーシステムはいくつか発表されているが我々の超電導磁石は強力な磁束を発生させることができるためより効果的なデリバリーを狙うことができると考えた。通常、磁気誘導システムではキャリアとなる磁性体の粒子径が小さいと磁気によって誘導が利きにくくなることが知られている。すなわちキャリアのサイズを小さくすれば磁力への反応性が低下する。さらに本研究ではシース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へ内視鏡を挿入することができる。磁気誘導によるドラッグデリバリーを直接観察することができるため磁性体粒子に抗癌剤アドリアマイシンが結合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。

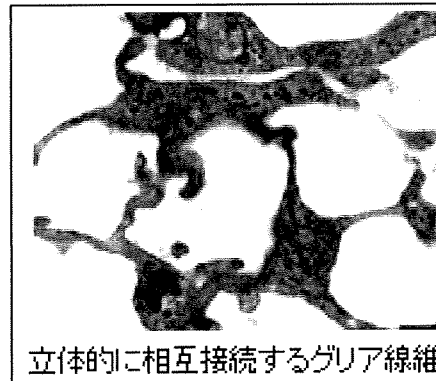
(倫理面への配慮)

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っていない。

C. 研究結果

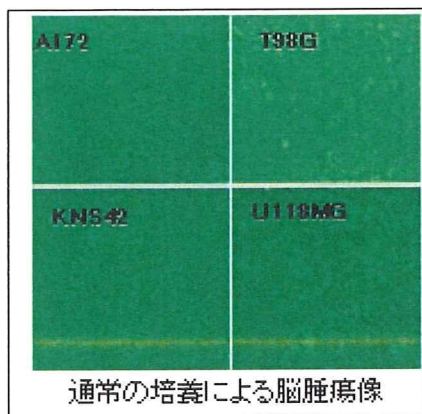
1. 脳腫瘍三次元培養モデル

ゼラチンメッシュをスキュフォードとして用いることにより三次元培養で脳腫瘍のモデルを作成することができた。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立体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。

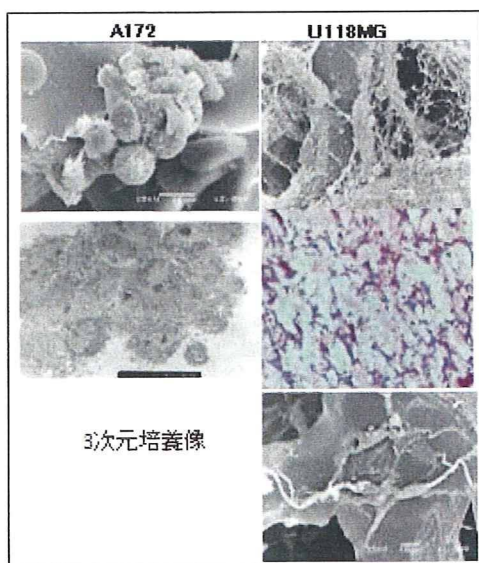


組織適合性ゼラチンとは細胞外基質を介して接着しており、また腫瘍細胞同士はグリア線維を介して接着していた。いずれも接着は強固でこの様子を透過型電子顕微鏡などで観察した。次に脳腫瘍の株間で差異があるかどうかについて検討したところ、用いる腫瘍細胞によって明らかに形態の異なる像が得られた。脳腫瘍の実験で通常用いられているT98G, A172, KNS42, U118MG細胞について解析したが、A172とKNS42は細胞分裂しても基質上の移動が少なく遠方への

進展が見られないため細胞同士が接着して巨大な塊を形成した。一方U118MG細胞は分裂後細胞同士が分散したため巨大な細胞塊

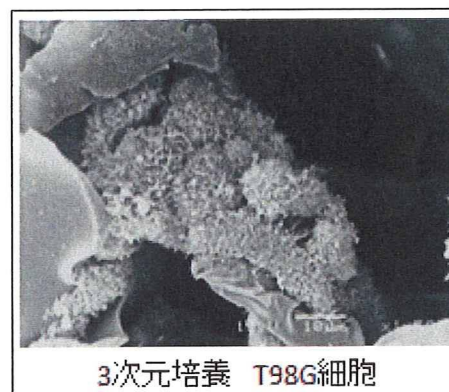
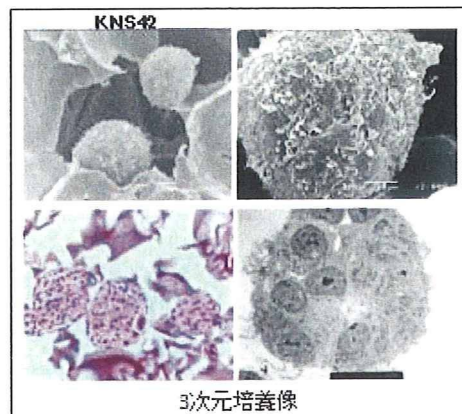


を形成することはなかった。



また細胞外基質やファイバーの形成は著明であった。T98G細胞はこれらの中間型であった。またA172とKNS42は両者とも細胞同士が接着して増殖したが、この二者の間には差が歴然とありA172細胞の方がより1つ1つの細胞が独立して増殖する傾向が強かった。これは基質との接着性の良、不良とは関係なく、いずれの細胞もスキャフォードとは密着していることが電子顕微鏡で観察されており、各細胞で増殖性や様式の差が

あることが示された。



2. 三次元培養での遺伝子発現、タンパクリン酸化の差異

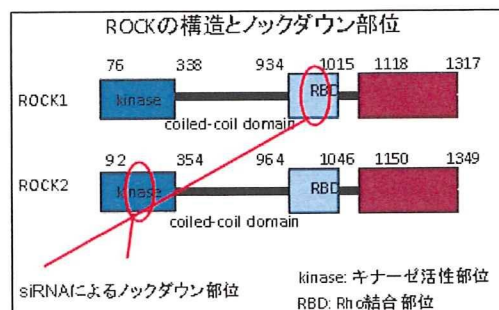
形態変化が起きる時、細胞膜からの情報が重要であると考えTGF- β /SMAD系、マトリクスメタロプロテナーゼ系等の遺伝子発現に注目した。RT-PCR法でこれらの遺伝子の発現を調べたところ最終的に発現の相違を認めたのはTGF- β 、ALK5、ALK1、Smad 2、Smad 4、MMP-2、p38MAPKの7つであった。このうちALK5、Smad 2、Smad 4の3つの遺伝子では発現は大きく異なっており三次元培養で発現はかなり抑制されていた。これに対してTGF- β 、ALK1、MMP-2、p38MAPKでは発現の差は前者ほど著明ではなかった。これらはいずれも三次元培養で発現が低下してお

り各シグナルの関与する信号がどのような変化を起こすのかについての網羅的解析の必要性が示唆されている。また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の転写自体にはほとんど差を認めなかったようにウェスタンブロットでも三次元培養で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調べると三次元培養ではAktのリン酸化が強く確認された。また増殖シグナルでも3次元培養ではU118MGなど分散して増殖する細胞ではPDGFAの発現がA172, KNS42など集塊形成するものに対して10倍以上発現が高くなっていることが判った。

3. 各ROCKアイソフォームのショートヘアピンRNA導入

ROCK1, ROCK2に対する siRNA を作製して調べたところ、ROCK1についてはRho結合部位をターゲットにしたものが、ROCK2についてはキナーゼ活性部位をターゲットにしたものが最も活性が強かった。

それぞれのsiRNAをショートヘアピン型で



発現する遺伝子導入用発現ベクターに組み込みラット脳腫瘍細胞に導入して選択培地で培養して得られたコロニーを解析したと

ころ、それぞれ安定株が得られていた。

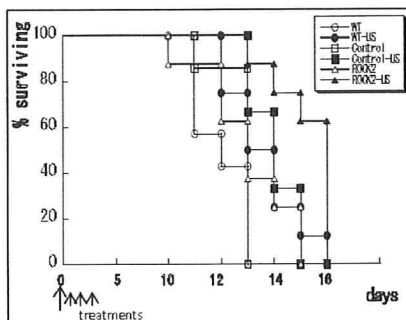
4. ROCKアイソフォームの低下した脳腫瘍細胞の性質

以上のROCK1, ROCK2 の安定導入株のタンパク発現をウェスタンブロット法確認したところ、それぞれ対応する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の低下は認められなかった。この結果から樹立した細胞



株では安定した各遺伝子の発現低下が恒常的に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。このことからROCKの存在は脳腫瘍細胞の増殖にとって大きな関わりがあるようである。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。対照的に、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。ROCK2は特に細胞の浸潤能などに関与していることなどが他の研究からも示唆されているためマイクロバブルを用いた音響化学療法への影響を調べたところ、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を抑制すると野生型とは $p=0.0297$ で、対照株とは $p=0.0446$ で生存の延長が認められた。

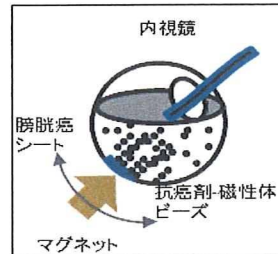


5. 微細内視鏡検出用脳腫瘍細胞および膀胱癌細胞の蛍光標識

脳腫瘍細胞、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を得ることができた。これらの細胞は三次元培養やポリエステルシートでの培養が可能でありこれらのメッシュ、シートはいずれも微細内視鏡での画質確認のために用いることができた。

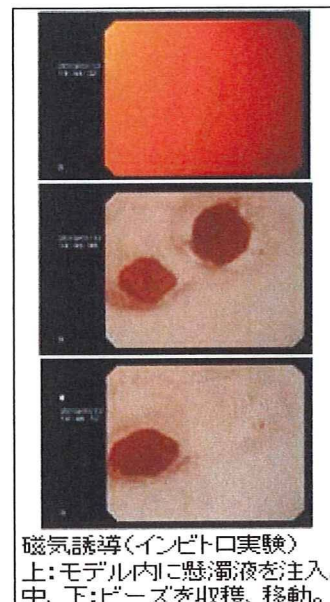
6. 磁気誘導による抗癌剤デリバリーシステム

磁気誘導のための磁性体ビーズは直径が75 μm のものと15 μm のものを用いた。磁性体に関しては直径を小さくすればする程、マグ



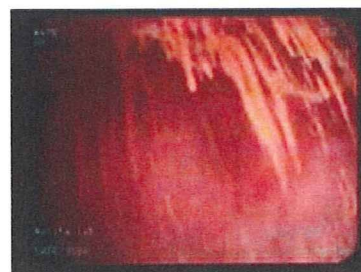
ネットによる誘導が難しくなる。他分担研究による超電導を用いた強力な磁気発

生装置により微細磁性体ビーズの誘導が可能かどうか調べるため磁性体ビーズに抗悪性腫瘍薬のアドリアマイシンを結合させた



ものを用いた。直径の大きいビーズでは非電流型の通常のマグネットでもインビトロでビーズをターゲットに誘導することが可

能であった。また磁石の移動により任意の



膀胱内磁気ビーズの磁束による連鎖形成

場所に磁性体ビーズを動かすことができ、この様子は内視鏡で

観察することもできた。しかし大型動物の膀胱内で開発された磁気発生装置によりビーズの誘導を試みたが磁性体ビーズの誘導はできなかった。粒径の小さな粒子は磁力で誘導が効かず、直径の大きなものでも磁束によって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

内視鏡が他の診断機器より優る点はリアルタイムに病変を直視下に観察できることである。微細内視鏡の開発により外径が極めて細いスコープが使用できるようになったため従来の内視鏡では見るのが難しかった脳内の病変などについても針穴程度の大きさの挿入口さえあれば観察することができる。また従来の内視鏡で操作できる病変に対しても径が細い分、同じ空隙で治療用の鉗子などを操作する場合、スペースのゆとりから安全性の高い方法を選択することが可能である。ところで微細内視鏡に関してはできる限り視野角を広くするような開発を重ねても、微細であるという宿命のため広い腔内を観察する場合には何らかの工夫がないと時間と手間がかかり有用性を損ねてしまう可能性がある。本研究では微細内視鏡が最も活躍できる対象として脳腫瘍、特にグリオーマや泌尿器癌に対して腫瘍3次元モデル、ROCKのモデュレーションによる増殖性の異なる腫瘍細胞株の作製および超音波治療との組み合わせ実験、腫瘍蛍光標識、磁気誘導抗癌剤デリバリーシステムなどバリエーションのある実験を行ってきたが、これらは微細内視鏡本体の開発に関連

する要素の工夫のため、組み合わせによって様々な状況で対応して使用できるシステムの確立を目指したからである。特に微細内視鏡の開発では単に内視鏡を作製する技術を確認するだけではなく周辺技術が必要となる。さらにハードとなる細さやファイバーの本数、解像度、レンズ視野角や磁気誘導システム、ファイバーの硬度、照明システム等だけではなく、ソフトの対象となる疾患や検出法、治療システムなど微細内視鏡技術が活きる技術の開発も重要である。グリオーマは脳腫瘍の中でも新たな治療技術の開発が求められており本研究からマイクロバブルを用いた超音波とのコンビネーションが有効であろう。特に内視鏡でリアルタイムに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照射して治療を進めていく手法は、安全かつ効果が高いと思われる。また、浸潤性の強いグリオーマに対しても、ROCK2分子のsiRNAによる核酸医療と超音波の組み合わせが有用であることが判り、実際に臨床で適応する場合、蛍光等でラベルすることで核酸の投与部位も内視鏡で確認することができるようになれば動物実験で示される以上に優れた効果が期待される。一方、腫瘍細胞そのものを観察するという点では内視鏡では顕微鏡のように個々の細胞を確認することはできなかった。しかし蛍光標識によって微細内視鏡でも組織として集塊は観察することができたため今後イメージングの方法が進んで生体内でシグナルを発生することができるようになれば本研究で示したようにCCDや波長フィルターを用いることで悪性腫瘍の早期診断にも役立つ。最後に膀胱癌については従来から内

視鏡治療が行われている。膀胱癌が内視鏡治療に向いている点は管腔の移行上皮表面に発生する癌であり、内視鏡を用いれば直視下に病変の治療ができる点である。また直接腫瘍に熱エネルギーや抗癌剤などを暴露させることができる。光線力学療法について今回は検討しなかったが微細内視鏡では通常の内視鏡のように光エネルギーもファイバー経由で送ることができるため当然のオプションとして利用できると考えられる。

E. 結論

微細内視鏡の開発とともに本研究ではグリオーマと膀胱癌を中心に微細内視鏡の応用技術を確認した。微細内視鏡では通常観察することができない体内の部位を直視下で「見る」こと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。微細内視鏡技術を実用化するにあたり必要な技術は内視鏡による腫瘍領域の同定や治療デバイスのデリバリーである。微細内視鏡では微細な空間を調べる目的では絶大な効果を生むが、広い腔内を全部見ようとすると膨大な時間がかかりこのような臓器の単純な観察目的のためだけであれば従来の内視鏡を超える点は少ないかもしれない。しかし分子イメージングで腫瘍組織の可視化ができればこれも微細である点が活かされる。同じルートから複数の内視鏡を用いて別々の方向を同時に診断・記録するなどの手法、また位相を変えて立体的な画像が得られるような応用もある。CCDで得られた光をRGB分光化によって腫瘍病変部位が確認されたことはエキスパート診断システムにもつながる。いずれにせよ微細内視鏡が完成

し、そのスペックが明らかになったことで今後の応用範囲の拡大が期待される。

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

Kouki Fujioka, Masaki Hiruoka, Keisuke Sato, Noriyoshi Manabe, Ryosuke Miyasaka, Sanshiro Hanada, Akiyoshi Hoshino, Richard D Tilley, Yoshinobu Manome, Kenji Hirakuri, Kenji Yamamoto. Luminous passive-oxidized silicon quantum dots as biological staining labels and their cytotoxicity effects at high

concentration. Nanotechnology 19 (2008) 415102 (7pp).

[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 東京ファッションタウン (TFT) ビル 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 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 15th 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 Tilly, 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

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

石澤将、宇都宮一典、横田太持、谷口幹太、五條淳、渡辺美智子、馬目佳信、田島尚子 培養メサンギウム細胞のTGF- β 発現機序におけるRhoキナーゼの関与 平成19年10月11日、12日、第124回成医学会総会 東京

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

石澤将、宇都宮一典、渡辺美智子、馬目佳信、田嶋尚子 培養メサンギウム細胞の TGF- β 発現機序における Rho キナーゼの関与
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

Funamizu N., Suzuki R., Watanabe M., Manome Y. A difference of sensitivities of pancreatic cancer cells to gemcitabine after transduction of deoxycytidine kinase (dCK) gene by retroviral vector. The 13th annual meeting 2007. Japan Society of Gene Therapy June 30, 2007. Nagoya, Japan.

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

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）

総合分担研究報告書

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

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。

研究1年目では、先端部に外径0.8mmの磁性ステンレスからなる磁性体を取り付け、挿入部に柔軟性を持たせるため多成分ガラスから成る画像伝達用光ファイバー束を用いて、挿入部径0.8mm以下で可能な限り細径化することを検討した。その結果、照明用光ファイバーなしで外径0.3mmの微細内視鏡を試作し、ブタによる動物実験を行って、超伝導コイルを用いた試作磁気誘導装置により、前年に比べて誘導され易くなったことをX線透視下で確認した。また、照明用光ファイバーを内蔵して外径0.6~0.8mmにした試作機も作製し、ブタの腎盂内に設けた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、高感度CCDカメラを用いた実験を行い、微量の光で文字の判別が可能であることを確認した。

研究2年目では、挿入部径0.8mm以下を保ちながら内視鏡画像の改良検討を行い、画像伝達用光ファイバー束の外径を大きくし、ファイバー径を約10%細くして、ファイバーの本数を前年度の約3倍に増やした。また、対物レンズとして用いたセルフロックレンズの前面に試作凹レンズを設けて、視野角を50~60°から90°程度まで広げた。また、動物実験によりブタの尿管壁や腎盂内壁の色の変化が観察でき、内視鏡画像が改善したことを確認した。次に、磁性体として純鉄を用い、照明用光ファイバーを内蔵した試作機で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接続した高感度CCDカメラを用いて、GFPを発現させた脳腫瘍細胞が緑色に発光することを内視鏡画像により確認した。

研究3年目では、微細内視鏡の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、臨床研究の準備を完了した。また、微細内視鏡に関しては、先端部に設けていた磁性体を挿入用カテーテル先端に設けるようにし、挿入部外径を0.8mm程度として光学系の改良を検討した。その結果、画像伝達用光ファイバー束のファイバー本数を前年の約2.3倍に増加させ、対物レンズに関しては前年と同程度の視野角を保ちながら、外径0.5mmのレンズを3枚組み合わせて光学性能を向上させた。また、動物実験によりブタの尿管内面や腎盂内面が前年に比べてより鮮明に観察できることを確認した。さらに、先端部に磁性体を設けたカテーテルに試作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

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、平成18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た。

本研究では、前記微細内視鏡の開発を継続して行う。

研究1年目では、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、性能向上を進める。

研究2年目では、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磁性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。

研究3年目では、微細内視鏡の早期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尿管ファイバースコープの開発を行う。また、微細内視鏡の開発に関しては、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、これまでと同程度の外径を保ちなが

ら磁性体によって占有されていた部分を用いて内視鏡画像の改良検討を行い、性能向上を進める。

B. 研究方法

微細内視鏡の外径は、細径カテーテルや針等への挿入を想定して0.8mm以下とする。

研究1年目では、内視鏡先端部に設け、体外からの磁気誘導装置により牽引される磁性体として、洗浄性を考慮して磁性ステンレスを用いる。磁性体の外径は0.8mmとする。

画像伝達用光ファイバー束に関しては、挿入部の柔軟性を考慮して多成分ガラスを用いることとし、柔軟性の向上を目指して、照明用光ファイバーなしで外径0.5mmよりも更なる細径化を検討する。

また、挿入部外径を0.8mm以下に保つことを条件に多成分ガラスや合成樹脂からなる照明用光ファイバーを用いて、内蔵可能なファイバー本数の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。

研究2年目では、観察光学系の向上として、まず多成分ガラスを用いた画像伝達用光ファイバーの本数増加を検討する。

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。加えて、尿管などの管壁を観察し易いように、セルフオックレンズの前面に凹レンズを設けて視野角を広げることも検討する。

次に、微細内視鏡先端に設ける磁性体として磁性ステンレスの代わりに純鉄を用いた場合の効果を確認する。

さらに、立体培養した細胞の蛍光画像を観察する手段として、照明用光ファイバーによる光量が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、液晶カラーフ

フィルターを接続してカラー画像が観察可能なようにした高感度CCDカメラを微細内視鏡の接眼部に接続して、モニター上で蛍光画像を確認する。

研究3年目では、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を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。

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、磁性体のスペースを利用して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、複数の光学レンズを組み合わせた光学系を検討する。

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。

各年において、検討結果をもとに実験用微細内視鏡を試作し、机上検討及びブタを用いた動物実験により、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) 研究1年目

試作した微細内視鏡を図1及び図2に、それぞれの仕様を表1に示す。

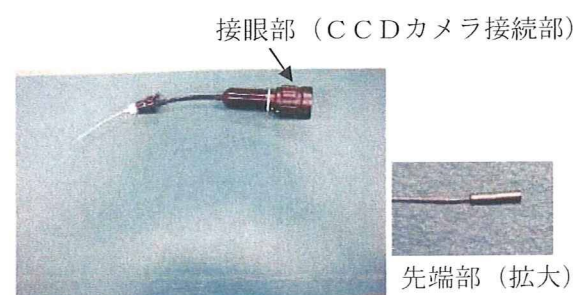


図1：実験用微細内視鏡
(照明用光ファイバーなし)

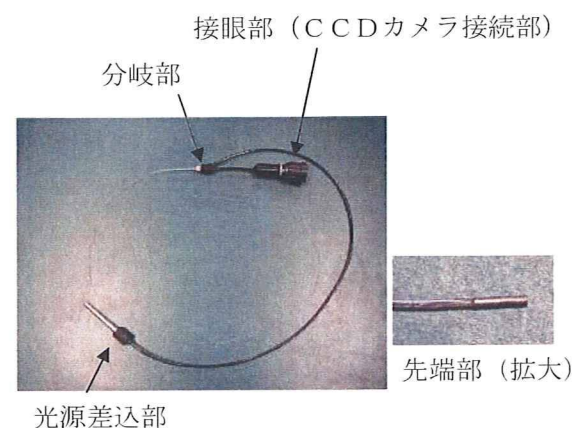


図2：実験用微細内視鏡
(照明用光ファイバー内蔵)

表1：1年目試作微細内視鏡仕様(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

No.1の試作機は、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。また、ファイバー本数としては480本程度となった。

No. 2の試作機は、No. 1に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挿入部にした。

先端部には、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、その内部にはセルフロックレンズからなる対物レンズを設けた。

前記試作機を用いて、動物実験を行った。

はじめにNo.1の試作機を5Frのカテーテルに挿入し、ブタの腎盂内に先端部を突出させた状態で、超伝導コイルを用いた改良型試作磁気誘導装置（関玉川製作所製）を用いて、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平成18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。

次に、青色に着色した仮想病変を腎盂内に取り付け、No.2の試作機を前記カテーテルに挿入して内視鏡用CCDカメラを用いて観察した。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の所在が確認できた。

さらに、図3に示す高感度CCDカメラを用いた実験を行った。

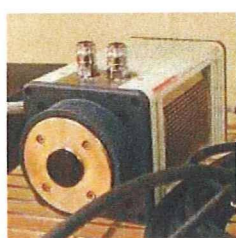


図3：高感度CCDカメラ
(浜松ホトニクス社製)

試作機を上記高感度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、ブタの体内観察では、画像伝達用光ファイバーの折れが実験中に増加したため、

観察像が不明瞭になり、高感度CCDカメラの効果は確認できなかった。

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。

2) 研究2年目

照明用光ファイバーの本数を1年目の半分し、画像伝達用光ファイバー束の外径を1.6倍にして、ファイバー素線径を10%程度小さくすることで、1年目の約3倍の本数にした。

研究1年目と2年目の内視鏡画像を図4及び5に示す。

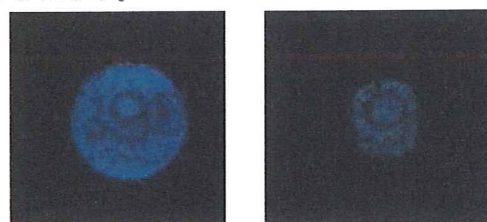
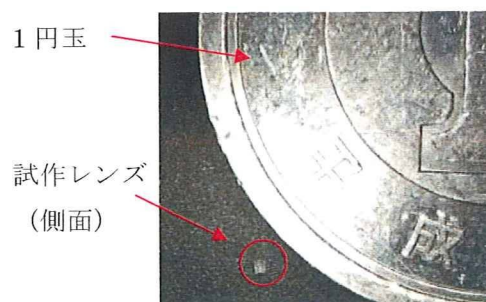


図4：2年目試作機 図5：1年目試作機

ファイバー束作製時や組立時に素線折れが発生して、1年目より細かい黒点が多い画像になってしまった。

次に、広視野角化として試作した凹レンズを図6に示す。



レンズの外径は0.35mm

図6：試作凹レンズ（側面方向）

上記試作レンズをセルフロックレンズの前に固定して机の上にて視野角を測定した結果、50~60° から90°程度に広がったことを確認した。

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。

さらに、磁性体として純鉄を用いることを検討し、はじめに磁化特性を磁性ステンレスと比較した。

その結果を図7に示す。

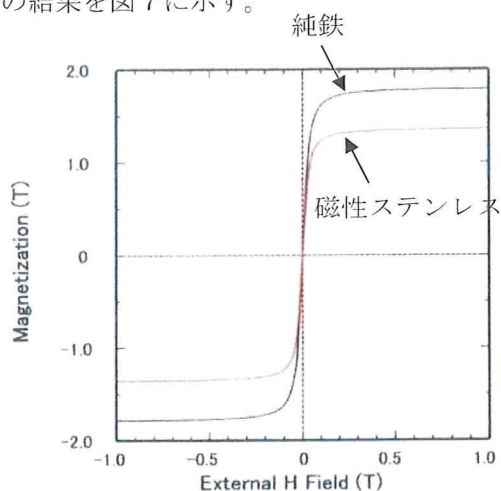


図7：磁化特性測定結果

測定値から、従来の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。

以上の検討結果を基に試作した微細内視鏡を図8に、先端部を図9に示す。

また、主な仕様を表2に示す。

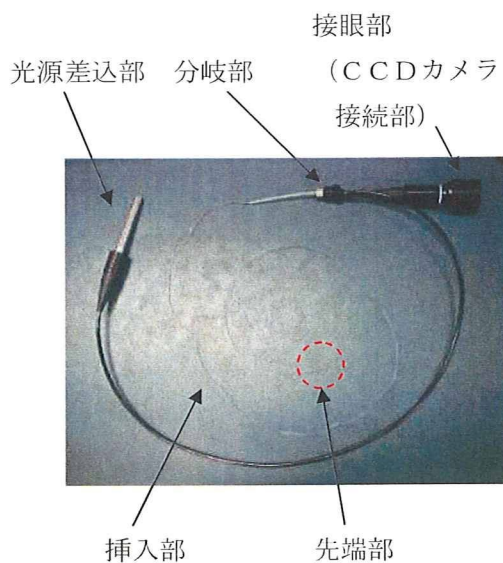


図8：2年目試作微細内視鏡

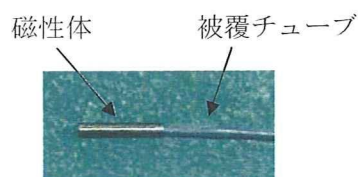


図9：2年目試作微細内視鏡先端部
使用した磁性体は、純鉄製、外径 0.8mm、長さ 5mmで、前年より 1mm 長くした。

表2：2年目試作微細内視鏡仕様

視野角	90°
先端部径	φ 0.8mm
挿入部径	φ 0.54~0.62 mm
有効長	1000 mm
照明用光ファイバー	20 本

挿入部は昨年度と同様に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、その外周に合成樹脂からなるチューブを被覆した。

前記試作機を使用してブタを用いた動物実験を行った。

はじめに、ブタの尿管に細径カテーテルを挿入して、その中に試作機を挿入し、カテーテルの先端から内視鏡先端をわずかに突出した状態で尿管壁を内視鏡モニターで観察しながら、細径カテーテルと共に腎盂内に挿入させた。

内視鏡画像は、内視鏡ビデオカメラ PVK-1070Z を用いてモニターにて観察し、照明にはキセノン光源を用いた。

動物実験による内視鏡画像を図10に示す。



図10：内視鏡画像（腎盂内）