

## 14-17 がんの診断治療用光学機器の開発に関する研究

主任研究者 静岡県立静岡がんセンター 小野 裕之

### 研究成果の要旨

拡大内視鏡を用い生体の粘膜上皮下の毛細血管をはじめとする消化管粘膜の微小血管像を観察する技術を確立した。自家蛍光内視鏡診断システムを、電子内視鏡に搭載することにより画質と操作性が飛躍的に向上し、消化管癌の質的・範囲診断に有用であることを臨床的に証明した。通常の卓上型共焦点顕微鏡と同等の機能を有するユニットを内視鏡の先端に組み込んだ共焦点内視鏡システムの開発により、生体内で病理組織学的レベルと同じ画像を得ることを可能にした。同時に内視鏡チャンネルを通過可能な細径プローブ型の共焦点レーザー顕微鏡を使用した仮想生検 (Virtual biopsy) 技術を開発し、より臨床応用に近づいた。内視鏡的粘膜切除術を安全かつ容易に行うために従来の IT ナイフの改良型を作成し、市販への量産化を進めている一方、絶縁体の付属なしに常に低い電気密度を保ち、従来までの針状メスと同様の操作性がありながら、穿孔を来さないかつ低出力で切開・凝固が可能であるバイポーラー針メスを開発し、市販化に成功した。

### 研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
小野 裕之	静岡県立静岡がんセンター 部長	内視鏡的治療における新しい器具の開発
田尻 久雄	東京慈恵会医科大学 教授	内視鏡画像解析による消化管がんの診断
伊東 進	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部臓器病態治療医学 教授	赤外線蛍光内視鏡を用いた診断システムの確立
竜田 正晴*1	大阪府立成人病センター 副院長	蛍光を利用した消化管がんの新しい診断法の開発と応用について
上堂 文也*2	大阪府立成人病センター内科 医長	内視鏡による非可視光画像処理を利用したがん診断法の開発
萩原 達雄	順天堂大学 消化器内科 助教授	エンドマイクロスコープによる仮想生研の研究
井上 晴洋	昭和大学横浜市北部病院 消化器センター 助教授	
林 琢也 *3	自衛隊中央病院研究検査部 研究検査課 課長	光硬化性キトサン溶液の粘膜下注入を用いた内視鏡的粘膜切除術の開発及び高酸素負荷条件下の光戦力的療法の開発
	*4 自衛隊中央病院 第4内科 部長	
八尾 建史 *5	福岡大学筑紫病院 消化器科 講師	新しい消化器内視鏡診断体系の確立：
宗 祐人 *6	福岡大学筑紫病院 消化器科 併任講師	早期癌の微小血管構築像
土井 俊彦	国立がんセンター東病院 病棟部 5A病棟医長	内視鏡的粘膜切除に関する新たな診断・治療デバイスの開発

- \*1：平成14年4月1日～平成16年3月31日
- \*2：平成16年4月1日～平成18年3月31日
- \*3：平成14年4月1日～平成17年3月31日
- \*4：平成17年4月1日～平成18年3月31日
- \*5：平成14年4月1日～平成17年3月23日
- \*6：平成17年3月24日～平成18年3月31日

## 研究報告

### 1 研究目的

本研究の目的は、消化管におけるがんの診断および治療に関する光学機器の開発である。診断は、電子内視鏡およびその画像処理技術の向上により飛躍的に進歩してきたが、肉眼的に認識されない早期段階のがんや病変範囲を切除前に正確に同定することが困難な症例も少なからず存在する。オプトエレクトロニクス技術の進歩にもとづき、組織の腫瘍性変化を組織採取せずに画像として実時間に把握できる新たな機能内視鏡の研究開発が望まれている。一方、これらの診断技術の進歩により、早期消化管癌の頻度が増加し、内視鏡の粘膜切除術等の内視鏡治療の占める割合は著明に増大している。癌患者に対して低侵襲かつ良好な quality of life (QOL) を提供することが可能であることから、その適応も拡大しつつあるが、切除の原則である一括切除が可能な施設は一部に限られている。本研究では、新たな診断手法を開発し、消化管癌の早期発見および質的診断の向上を目指す。また、内視鏡治療機器の開発を行い、より普遍的な治療方法の開発と普及を目指すことにより早期消化管癌の治療成績の向上に寄与することを目的とする。

### 2 研究成果

研究成果は、以下のとおりである。

#### 1) 拡大内視鏡に関する研究

食道癌、胃癌、大腸癌の内視鏡診断において色調変化は重要な診断指標である。しかしながら色調は従来から不整な発赤など主観的表記法で表現され記録されてきた。これを客観的に診断すべく、拡大内視鏡を用い生体の粘膜上皮下の毛細血管をはじめとする消化管粘膜の微小血管像を観察する技術を確立し粘膜表層の癌の微小所見の確立を目指した。早期胃癌を対象として拡大内視鏡を用い、粘膜表層の微小血管の密度と構築が内視鏡の色調の成り立ちであることを、生体ではじめて観察し世界に先駆けて報告した。

#### 2) 自家蛍光内視鏡診断システムに関する研究

生体組織はコラーゲンや NADH などの内因性蛍光物質を含むため、青色の励起光を照射すると微弱な自家蛍光を発生する。これを内視鏡下に高感度撮像素子により感知し、疑似カラー表示して画像化するのが自家蛍光内視鏡装置で、本装置を用いると各種病態により変化する生体組織の蛍光特性の違いを内視鏡画像上の色調差としてとらえることが可能である。

LIFE-GI (オリンパス-Xillix 社) を用いて、蛍光内視鏡の機器改良と臨床応用の可能性について検討を行い、LIFE-GI による蛍光観察が大腸腫瘍の拾い上げと腫瘍・非腫瘍との鑑別診断に有用であることを報告した。しかし、LIFE-GI はファイバー・スコープを用いた装置であるため、白色光観察での画質は通常電子内視鏡に比べて明らかに劣り、また、高感度 CCD を内蔵した重いカメラ部をスコープに外付けしているため、挿入時の操作性や観察時の画質などの点で臨床的に汎用するには大きな問題があった。そこで、オリンパス社と共同で自家蛍光電子内視鏡装置 (AFI) を開発した。これは、汎用機である EVIS-CF240AI の先端に白色光用と蛍光用のふたつの小型 CCD を搭載し、それらを手元のボタンひとつで切り替えることができる。外観や操作性と白色光観察での画質は通常電子内視鏡と全く同等であるため、現在通常行われている大腸内視鏡検査に加えて蛍光観察が行え、自家蛍光画像についてもファイバースコープによる自家蛍光画像に比べ優れた解像度の画像が得られた。AFI の蛍光画像は、励起光 (395-475nm) を照射した際に生じる 490-625nm の帯域の自家蛍光画像に加えて、透過性に優れた 600-620nm の赤色光の反射光画像と、ヘモグロビンに強く吸収される 540-560nm の緑色光の反射光とを面順次方式で合成して疑似カラー表示させていることが特徴である。これにより遠距離での形態描出能が改善し、従来機では鑑別が困難であった腫瘍による蛍光の減弱と血液によるそれとを色調により区別することが可能となった。

#### 3) 赤外蛍光内視鏡診断と生体への応用

外付け CCD 型の従来機に代え、先端 CCD を搭載し、NBI (narrow band imaging) および拡大観察機能を備えた新型赤外線蛍光電子内視鏡 (新機種) の開発に成功した。これを用いて、早期胃癌症例を観察した。新型赤外蛍光電子内視鏡 (XGIF-Q240IRFZ) は、オリンパス社製 EVIS LUCERA ビデオシステムセンター (XCV-260HP・IRF) および光源装置 (XCLV-260HP・IRF) と組み合わせることで通常光観察、赤外蛍光観察、NBI (narrow band imaging) 観察および拡大観察を切り替えながら行なうことが可能

である。外付け CCD 型の従来機に対して、新機種は 10.8mm のスコープ先端に赤外蛍光用と通常観察用の 2 つの CCD を備えており、格段に汎用性が増すとともに、540nm-560nm の反射光を利用し赤外蛍光観察中にも胃内でのオリエンテーションをつけることが可能となった。また、疑似カラー表示にて赤外蛍光部分はリアルタイムに緑色のシグナルとして認識されるようになった。

#### 4) 焦点内視鏡システムおよび接触型拡大内視鏡を使用した仮想病理・仮想生検

近年、大腸の腫瘍性疾患はますます増加してきている状況下において、大腸内視鏡検査は大腸癌を含む全ての大腸疾患の診断・治療に非常に重要な役割を持ってきており、腫瘍性疾患においては特に有用である。拡大内視鏡検査は 80~100 倍程度の拡大率で、腫瘍の表面構造を観察するが、その拡大率のために大腸の腺開口部の観察にとどまるものの、現在の診断学においては有効な手段である。しかし、この方法では腫瘍の細胞や細胞からなる構造、すなわち顕微鏡学的レベルでの直接の観察は不可能であり、その集合体である腺開口部の構造物を観察して病変を推定しているに過ぎない。共焦点内視鏡システム(以下、共焦点内視鏡)は、レーザー光と光学技術を使用し生体組織を細胞レベルで視覚化された、すなわち通常の卓上型共焦点顕微鏡と同等の機能を有するユニットを内視鏡の先端に組み込み、生体内で病理組織学的レベルと同じ画像を得ることができる画像撮影装置である。本研究では、共焦点内視鏡を使用して、通常の検査に引き続いて、正常の大腸粘膜及び大腸粘膜病変を観察し、通常観察像から細胞レベルまでの連続した検討を行い、臨床面での程度の利用が可能かを明らかにすることを目的とした。共焦点内視鏡の観察前に蛍光色素を静脈注射(10% fluorescein sodium 溶液)し、fluorescein を静注数分後より共焦点内視鏡による観察を開始した。共焦点内視鏡によって得られる画像と実際の病理組織像との整合性を比較し、fluorescein の局在を明らかとし得られた共焦点内視鏡画像の構成を理解する目的で、1) 健常部での通常内視鏡像と共焦点内視鏡との比較、2) 健常部での fluorescein の局在を免疫組織学的に検討した。対象は 43 症例、平均年齢 63 歳、男女比=31:12。観察は、1) 通常内視鏡による観察、2) 共焦点内視鏡による観察、3) 生検検査(病理組織学的検討・免疫組織学的検討の追加)、とした。

通常観察・拡大内視鏡は Olympus Medical System 社製 CF-Q260AZI、共焦点内視鏡は Optiscan and Pentax 社製

を用いた。免疫組織化学的な検討には、一次抗体を mouse monoclonal Ab to fluorescein (clone 6A4; abcam 社, Cambridge, UK) を用い、ABC 法、DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による発色による光学顕微鏡レベルで検討した。

薬剤関係を含めて、特に問題となるような偶発症・合併症は認められなかった。健常部において、共焦点内視鏡画像は表面から 250 μm の深部まで、すなわち大腸腺管の 1/2 程度(粘膜固有層の 1/2 付近まで)の深部まで連続的に横断像が得られた。共焦点内視鏡により得られた画像は、腺管部とその周囲の間質の構成により 3 つに分類されると理解された。すなわち、腺管開口部・大腸小区などが認識できる表層、腺管開口部が back to back で規則正しく配列し間質がほとんど認められない中間層、腺管より間質の占める割合が増える深層の 3 つである。各々の層では相当する病理組織学像と整合する特徴が得られた。特に、中間部では腺管の細胞質が比較的高信号として検出されるが、深層では逆に間質が高信号として腺管部は低信号として検出され、病理組織像では得られない局所での血行動態が加わった興味深い画像が得られた。共焦点内視鏡による観察は、virtual biopsy としての architectural structure の評価としてだけでなく、physiological function の評価にも利用可能と考えられ、炎症性腸疾患などの炎症後の再生粘膜の評価、腫瘍部での本来有する機能の腫瘍化による変化、など多岐にわたる目的に応用できる可能性があり、将来、有望な検査方法の一つとなる可能性があると考えられた。

また、内視鏡の生検チャンネルプローブタイプのレーザー共焦点顕微鏡の開発を行った。オリンパス社と共同で、外径 3.4mm のプローブを試作、生体内での正常食道の LCM の像を獲得することに成功した。この手法を「Endomicroscopy (内視顕微鏡)」と名付けた。また、光学レンズ系のみによる接触型拡大内視鏡を全く新たに開発し、この Endo-Cytoscopy system (Prototype, Olympus) によって、生体内で、生きた健常細胞および生きた癌細胞の観察に成功した。本システムは、外径 3.4mm のカテーテル型の超拡大内視鏡を用いる。500 倍あるいは 1000 倍を越える倍率での観察が可能で、画質、画像獲得の再現性の高さでは極めて優れており、とくに 100 倍の画像は、Gold standard である細胞診の画像に匹敵する。500 倍はピットパターンなどの構造異型を観察するのに適しており、一方、1000 倍は細胞 1 つ 1 つの観察が可能で細胞異型をみることも可能である。したがって、目的に応じた使いわけが可能で

ある。また同じ倍率であっても、焦点深度を変更した検討もおこなっており、表層の観察とやや深層の細胞の観察の検討をおこなっている。このような工夫により、仮想生検に一步一步近づきつつあると考えている

#### 4) 内視鏡治療機器・材料の開発

早期胃癌に対する内視鏡的粘膜切除術(EMR)において、病変を一括切除するために、近年粘膜を切開し、粘膜下層を剥離する切開剥離法が開発された。本研究班にて研究された IT(Insulation-tipped)ナイフに始まる粘膜切開剥離法は、ガイドライン適応外の病変に対しても一括完全切除を可能とし根治切除治療を可能にしている。しかし、ITナイフの市販後、多施設が導入したにもかかわらず、従来から指摘されていた手技の困難さ、偶発症の高さによって継続使用されない場合も多い。ITナイフの問題点は、構造的に電氣的に不安定な要素をもつことである。ナイフ金属部と切開部との接触面積の状態が内視鏡操作によって一定しないため電気密度が安定しない。そのため、切開能が安定せず、不用意に深切りや焦げるといった現象が起こってしまう。しかし、他のデバイス(フックナイフ、フレックスナイフ)に比し、凝固能(止血効果)は、本来は優れているデバイスであるとも考えられた。特に、ナイフ部での安定した粘膜層への接触が必要であると考えられた。そこで、市販されている IT ナイフの絶縁セラミックボール部分とブレードの接続部に新たに放射状に 3 本の補助ブレードを接続した改良型 IT ナイフを試作し、ブタ切除胃を用いて切開能を検討した結果、切開能が高く、かつ穿孔も見られなかったため、現在院内の審査を経て臨床応用中である。2006 年中に市販予定となった。モノポーラーデバイスにおいては、構造は単純であるが、局所電流は胃壁を貫通してしまうため、必然的に穿孔ならびに深く切り込んでしまうことがおこりやすい。また、対極版との距離も遠いため電氣的な不安定さが起こりやすく高出力での使用を余儀なくさせられ、組織に与える障害も多いデメリットがある。これらに対してバイポーラー処置具は拡散電極および能動電極の両極を処置具に設け、近接した電極間で通電を行うため、低出力で切除部位にのみ高周波電流を流すことになり、モノポーラー処置具に比べ安全性の高いシステムとして評価されている。バイポーラーデバイスについては、対極板が存在せず切開・凝固局所のみ電流密度分布になるため、局所電流は胃壁を貫通することがなく穿孔や深く切り込んでしまうことも少ない。しかも、電流密度はきわめて高くなることから低出力での使用が可能となる。しかしながら、いくつかのバイポーラーデバ

イスが内視鏡処置具として製品化にはいたっているものの、処置具としての安定性・操作性からモノポーラーデバイスから移行しなかったのも現実である。本研究班にて、バイポーラー針状メス(B-knife)の開発に成功した。B-knife は、bipolar の特性上、低出力で安定した切開・凝固能を持つ。針先端は、絶縁体の付属なしに常に低い電気密度を保ち先端絶縁体がなくても穿孔は起こりえない機構であり、従来までの針状メスと同様の操作性があり、また低出力で切開・凝固が可能である。新たな切開、止血器具として有用と考えられ、市販化されて、臨床応用中である。

さらに腫瘍親和性光感受性物質を注入し、腫瘍にレーザー光を照射して生じる活性酸素により腫瘍を選択的に死滅させる方法である光線力学的療法(PDT)は、粘膜下層へ浸潤した癌に対して有効であり、EMR と組み合わせることで、局所制御能を上昇させる方法として期待されている。しかし面順次式電子スコープでは観察不能であるため、ファイバースコープで施行されている現状に対して、特殊フィルターを開発し、電子スコープでの病変観察するための試作器を完成させた。

EMR 時の粘膜下局注液は、通常生理食塩水が用いられているが、切開剥離法の問題点である出血と穿孔の危険性を減少させる局注液が求められている。抗菌、免疫附活、創傷治癒促進等の活性の知られている蟹殻から抽出される複合糖質であるキトサンを原料に可溶性と光硬化性を合わせ持つ光硬化性キトサンゲル剤を調製した。このゲル化素材は 10 秒程度の 300 - 350 nm の UV 照射で不溶性の、軟ゴム状に硬化する。マウスやラット創傷治癒モデルで抗菌、創傷治癒促進活性を持った有効な閉塞性創傷ドレッシング材となることが確認された。内視鏡的粘膜切除(EMR)時に穿孔出血などの合併症なく効果的に行なうために、内視鏡に付けた紫外線照射用光ファイバーを用いてゲル化させ、出血等を伴わないより安全な EMR を施行する方法を考案した。

#### 3 倫理面への配慮

倫理面への配慮については、薬剤の特性に関する研究および光学機器の開発研究は、in vitro あるいは動物実験にて行った。実験は各研究機関の動物委員会の規定に従った。臨床的検討においては患者への説明と同意を得て実施した。得られた検討結果は、患者本人が特定できないようにプライバシーの保護に特に配慮した。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Ono H. Endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer. Chin J Dig Dis. 2005;6(3):119-21.
2. Yao K., Sou S., et al. Novel Zoom Endoscopy Technique for Visualizing the Microvascular Architecture in Gastric Mucosa. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 3(7):S23-S26, 2005
3. Nakaniwa N, Ogihara T Newly developed autofluorescence imaging videoscope system for the detection of colonic neoplasms, Digestive Endoscopy, 17, 235-240, 2005
4. Uedo N, Iishi H, A novel videoendoscopy system using autofluorescence and reflectance imaging for diagnosis of esophago-gastric cancers. Gastrointest Endosc, 62:521-8. 2005
5. Ito-S., et al. Principle and clinical usefulness of the infrared fluorescence endoscopy. J Med Invest, 53:1-8, 2006
6. Inoue H, Kudo S, Technology Insight: novel endoscopic imaging techniques towards the *in vivo* observation of living cancer cells in the gastrointestinal tract. Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology 2005; 2: 31-37.
7. Tajiri, H., Future perspectives of gastrointestinal endoscopy and joint academic-industrial research following technological innovation in medical and biological engineering, Dig Endosc, 17:S97-S104, 2005
8. Hayashi T. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Sci. 2005 Mar;96(3):176-82. 2005

日本語論文

1. ○小野裕之他 早期胃癌に対するESD切除成績と切除困難例の特徴胃と腸41巻1号 Page37-44、2006
2. 八尾建史、宗 祐人、他. 早期胃癌診断の現況と将来—内視鏡の立場から 拡大内視鏡と切開・剥離法は早期胃癌診断をどう変えたか? 胃と腸 40(1):49-64、2005.
3. 炭山和毅、田尻久雄ほか、切開・剥離法(ESD)に必要な胃癌術前診断—新しい診断法 : narrow band imaging (NBI)、胃と腸、40:809-816、2005.
4. 荻原達雄 自家蛍光観察. 消化器内視鏡 17: 744-749