

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18300178
 研究課題名（和文） 臓器内部血流の in situ 可視化にて胎児手術成績向上を目指した
 特殊内視鏡の開発
 研究課題名（英文） Fluorescence endoscope for visualization of the placental vascular
 network
 研究代表者
 千葉 敏雄 (CHIBA TOSHIO)
 国立成育医療センター（研究所）・臨床研究開発部・部長
 研究者番号：20171944

研究成果の概要：本研究では、臓器内部の血流、特に子宮内胎児手術の代表的な症例である、双胎間輸血症候群（TTTS）の胎盤吻合血管レーザー凝固術において、吻合血管の血流を可視化する蛍光内視鏡システムを開発した。本蛍光内視鏡にて妊娠ウサギの胎盤血流観察を行った結果、通常内視鏡より細かな血管像を確認することが可能であった。将来、この手法を用いることで双胎間の吻合血管の焼き残しなく、より適切な血管焼灼が可能となり、胎児予後の更なる改善が期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2007年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2008年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：検査・診断システム、内視鏡

1. 研究開始当初の背景

胎児外科治療とは、妊娠子宮を切開し胎児を直視下におき、あるいは子宮内に留置した内視鏡を用いて、胎盤・胎児異常を外科的に是正する出生前の治療であり、最近その進歩には著しいものがある。特に胎盤血流異常に

起因する双胎間輸血症候群 Twin-twin transfusion syndrome (TTTS) を対象とした内視鏡的胎盤吻合血管レーザー焼灼術は、日本国内でも実施されるようになってきた。この治療法は責任病変である胎盤吻合血管を正確に焼灼する必要性があるが、現在使用されて

いる通常の内視鏡では、この血管を描出するには必ずしも十分でない。そこで、胎盤表面のみでなく胎盤内部の血管走行をも術中リアルタイムに可視化することが、現行手技の飛躍的向上のために不可欠と考えられ、我々は蛍光色素を用いた臓器内部血流可視化技術を応用し子宮内蛍光内視鏡を開発する。

2. 研究の目的

本研究では、臓器内部構造と血流ダイナミクスの実タイム可視化のための特殊内視鏡開発を行う。特に胎盤機能異常の診断と胎児手術への応用を目的として、胎盤内部の血流動態を *in situ* に可視化する子宮内蛍光内視鏡を開発する。

3. 研究の方法

蛍光色素を用いた臓器内部血流可視化技術を応用し、蛍光波長を透過するレンズ系を有する特殊内視鏡と、高感度蛍光観察カメラを開発する。また、動物実験にて一般内視鏡下手術への適用を確認するとともに、胎盤観察の評価を行う。

(1) 妊娠動物の母体または胎仔に蛍光色素を投与し、蛍光分布を観察することで胎盤内部血管走行ジオメトリや血流のダイナミクスを特定する方法を研究する。(2) 蛍光観察のために、近赤外波長を透過可能な特殊レンズ構成を有する細径内視鏡と(3) 蛍光観察用カメラの小型化、及び一層微弱な蛍光を観察しうるように感度・精度の技術的向上を図る。また、蛍光画像と通常内視鏡画像の切り替えユニットを開発する。(4) 妊娠動物の胎盤やその他の臓器内における蛍光血行分布を観察し、その実用性を評価する。具体的な研究計画を以下に述べる。

(1) 動物胎盤の蛍光観察

蛍光造影技術は、眼底検査では適用されて

いるが、胎盤を観察した例はない。そこで、平成17年に三輪らによって開発された蛍光観察カメラを用いて、胎盤の内部血管走行ジオメトリや血流のダイナミクスを観察する。

(2) 特殊内視鏡の開発

既存の内視鏡はレンズとフィルター構成の問題から、観察対象となる蛍光波長をロスなく透過することはできない。さらに、光が内視鏡内の複数のレンズを透過する間に減衰してしまい、既存の蛍光観察カメラではとらえることができない。そこで、蛍光の減衰を最小限に抑える内視鏡レンズ構成を研究する。

(3) 超高感度蛍光観察カメラの開発

前述したように、内視鏡のレンズを経由することで観察対象の蛍光は非常に微弱になる。微弱蛍光を観察可能な超高感度蛍光観察カメラを開発する。この技術開発において、感度のみを向上させると蛍光全体がぼやけてしまい、その輪郭を確認することが困難になる。つまり、感度のコントラストを最適化する技術開発が必須である。また、胎盤観察において、母体に蛍光を投与した場合、胎盤は蛍光で光るが、観察対象である、胎児の血管は光らない。そのため、明るい背景から暗く観察され極細血管を正確に摘出するための高度な画像処理技術も開発する必要がある。特に実際の胎児手術では、母体側に蛍光色素を投与する手技が現実的であり、早期臨床応用には不可欠な技術である。

(4) 開発した内視鏡での *in vivo* 実験

開発された特殊内視鏡を用いて胎盤の観察を行う。通常内視鏡を用いた場合の観察精度と比較し、その実用性を確認する。また、実

際の胎児外科手術を視野に置いて、内視鏡的胎盤血管レーザ焼灼術を動物に対して行う。胎盤表面や胎盤深部の血管走行を確認しながらのターゲット確認や、焼灼後の血流確認において、蛍光観察がもたらしうる結果とその意義を確認する。また、母体側からの蛍光色素注入による、胎盤血管部分の黒抜け画像観察、及び画像の時系列変化観察も並行して行い、臨床における実用性の評価を進める。

4. 研究成果

(1) 動物胎盤の蛍光観察

今回、胎盤血管を描出する目的で使用する蛍光色素としては、臨床上で既に使用され安全性も確認されている、インドシアニングリーン(indocyanine green; ICG)を用いることにした。ICGは、もともと肝機能、循環機能の診断、治療予後判定に使用されてきた検査用試薬である。ICGは生体内に投与されると血液中のたんぱく成分と結合し血中を循環し、その後速やかに肝臓に取り込まれる。腸肝循環や腎代謝の影響も無く、肝臓より遊離形で胆汁中に高率かつ速やかに排泄されるため安全な薬剤として臨床に広く使用されている。一方で、ICGが生体内たんぱく成分と結合している間、外部から赤外光を照射することで励起発光することから、近年、乳癌や消化器癌のリンパ節転移等の画像的診断補助機器としての報告もみられている。

ICGを用いた蛍光観察方法と、(2)と(3)で述べる蛍光内視鏡システムを用いて動物胎盤の蛍光観察を行った。胎盤の血管の描出(in vitroにおける)には、妊娠サル(カニクイザル)の児出生後に娩出された胎盤を使用した。前処置として胎盤血管は臍帯血管を通じて生理食塩水で洗浄しておき、胎盤血管内に残存する血液を除去しておいた。この胎盤を羊水で満たした水槽内に留置し、臍帯血管か

らアルブミンに溶解したICG溶液を投与した。Fig.1は妊娠サルの羊水中でとらえた胎盤血管画像で、Fig.1(a)が可視光画像、Fig.1(b)が近赤外蛍光画像である。臍帯からICG溶液投与後、ICGは速やかに胎盤全体にわたり広がりをみせ、可視光画像よりもはるかに詳細な血管像、さらには表面上観察困難な深部血管まで、細部にわたり観察することが可能である。このように、詳細な血管描出、深部血管の描出、さらには混濁羊水環境においても、このICG蛍光内視鏡技術を使用することで、胎盤血管描出が可能となり、この技術の利点をうかがいしることができる。

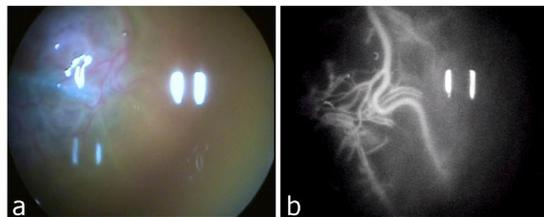


Fig.1.Placental vascular networks in turbid amniotic fluid.

a. Visible image. b. Fluorescence image

(2) 特殊内視鏡の開発

本研究の主目的は上述したICG蛍光画像化法を子宮内の胎児治療に応用することにあるため、装置の形態としては硬性内視鏡が望まれる。初年度には、外径10mmの硬性鏡をベースとして特殊内視鏡の試作を行い、2年度目には、外径5mmの細径内視鏡の試作を行った。通常の内視鏡では、内視鏡内の複数のレンズに特殊なコーティングが施されているため、蛍光観察のための近赤外線はこのレンズで反射する。また、光が内視鏡内のリレーレンズ系を透過する間に減衰してしまい、既存の蛍光観察カメラではとらえることができない。そこで、ICG蛍光観察に適した特殊レンズ系の開発を行い、通常観察(可視領域)と蛍光観察(近赤外領域)ともに可視

化することができた。

光源には硬性鏡用として使用されているキセノン白色光源を採用した。この光源装置に、目的とする波長の ICG 蛍光画像が描出しやすいような光学フィルターを備えた。

(3) 超高感度蛍光観察カメラの開発

生体内に投与された ICG の画像を描出する蛍光観察カメラとしては、蛍光励起光を観察する赤外観察カメラシステム PDE (photo dynamic eye, 浜松ホトニクス) を採用した。

ICG 蛍光硬性鏡用画像検出部として求められる主たる仕様は、①カラー画像撮像機能、②蛍光画像撮像機能、③小型の3要素である。そこで、可視～近赤外領域(400nm~950nm)の広い波長範囲に感度を有する CCD カメラを採用した。また CCD カメラ1台でカラーと蛍光の2つの撮影機能を持たせるために、カメラ内部の CCD チップ直前に可視光透過フィルターと近赤外蛍光のみ透過できる High Pass Filter の2枚を設け、小型ソレノイドにて2枚のフィルターを電氣的に切り替える方式を採用した。これによりカメラ外部からカラーモードと蛍光モードを簡単に切り替えることが可能となった。また、カメラシステムのサイズ・重量とも通常の硬性鏡と同等であり、臨床応用にも充分使用可能と思われる。

2年度目には、外径 5mm の細径硬性鏡を採用しているが、内視鏡外径が細くなると検出される光量は減るため、高感度の検出器を用いることが重要となる。そこで、高感度 EM-CCD カメラの適用可能性について試作機を用いて検討を行った。試作した EM-CCD カメラはコントローラ部とカメラヘッド部から構成されており、カメラヘッド部は内視鏡に接続しても充分片手で取り扱えるよう、小型・軽量である。Fig. 2 に開発した蛍光内視鏡システムを示す。

本機にも、カラーモードと蛍光モードがワンタッチで切り替えられる機構を搭載した。ICG の蛍光を発するファントムを用いて従来の CCD と EM-CCD の感度比較を行った結果、従来 CCD ではわずかにしか観察できない蛍光画像が EM-CCD では明瞭に観察できる様子が確認できた。

さらに、胎児外科手術を念頭にいったときに注意すべきことは、ICG 溶液を妊娠母体に投与しているため、ICG 自体は胎盤の絨毛間腔という腔隙に満たされる。そのため、絨毛間腔が ICG の励起発光により白色像として描出され背面照射光として働き、胎盤上の血管は、黒色に抜けた像として観察される。(ポジティブ画像) (Fig. 3(a)). この撮像システムには、画像信号のポジとネガを反転する機能を搭載することで、Fig. 3(b)のようなネガティブ表示画像が得られ、場合によっては術者の感覚により適するものといえる。



Fig.2 ICG Fluorescence Endoscope system

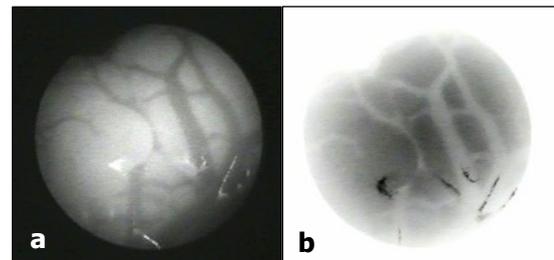


Fig.3 Conversion of fluorescence vascular image. a. Positive. b. Negative

(4) 開発した内視鏡での in vivo 実験

臨床における実用性を評価するために、妊娠母体側からの蛍光色素注入による胎盤血管部分の蛍光画像観察、及び画像の時系列変化観察を並行して行った。

胎児治療という母体・胎児の両者を対象とする本手術の場合、臍帯は胎児の付属物として子宮内に存在するため、臍帯血管路を確保し ICG を注入するという事は、その手技自体にリスクが伴う。そこで実臨床に応用されるためには、臍帯に ICG 溶液を投与することなく、妊娠母体に ICG 溶液を投与し、胎盤上の血管を把握することが必要となる。そこで妊娠ウサギを用いた in vivo の検証を行った。対象は妊娠日齢 28~30 日 (full term 32~34 日) の妊娠ウサギを用いた。全身麻酔後に開腹し子宮に切開を加え胎盤を露出し、ICG 溶液を耳静脈から投与後、内視鏡下での胎盤表面の観察を行った。ICG 溶液の投与は 1.0mg/kg の単回静脈投与とした。Fig. 4 は胎盤血管観察を経時的に示したものである。母体の静脈から ICG 溶液を投与すると、投与後およそ 30 秒で胎盤の絨毛間腔に ICG の蛍光が斑状に出現し (Fig. 4(b))、投与後 60 秒が経過すると、胎盤血管が陰影として現われる (Fig. 4(c))。発光の程度は ICG 投与後 90~120 秒でピークとなり、その後減衰を始める。単回の ICG 静脈投与で、ICG 発光による血管描出が確認できる持続時間はおよそ 15 分である。その後観察を続け ICG 投与後 20 分経過すると胎盤上の血管と絨毛間腔の境界が不明瞭になり、胎盤の血管を細部に渡って観察することが困難となる (Fig. 4(f))。血管の輝度値をグレースケールとして数値に換算し、経時的に評価したものの 1 例を Fig. 5 に示す。このグラフにおいてもその減衰具合は、90~120 秒でピークに達し、持続時間がおよそ 15 分であることがわかる。

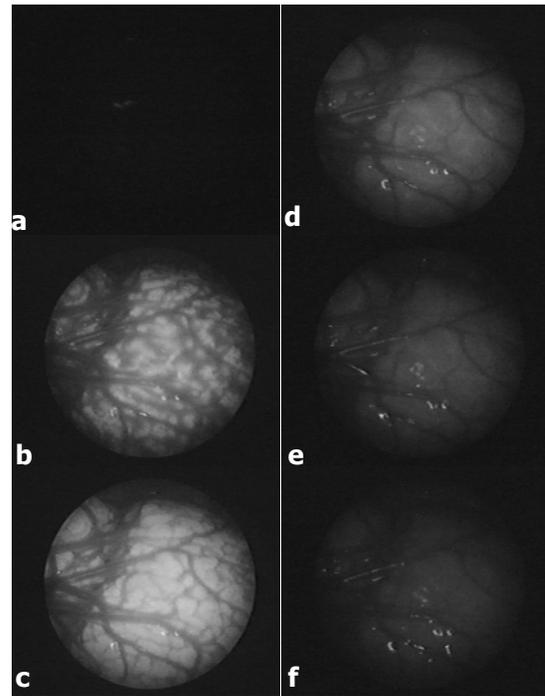


Fig.4 Fluorescence image of the rabbit placenta: Time series. a.5sec. b.30sec. c.60sec. d.10min. e.15min. f.20min

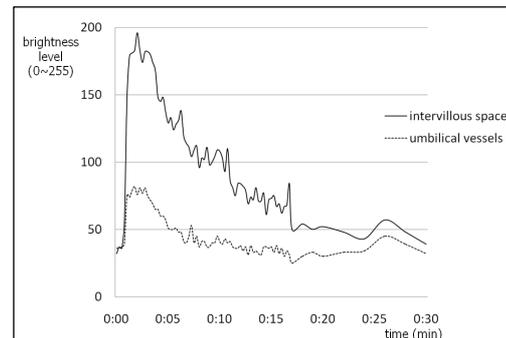


Fig.5. Time series luminance change of the placental vascular networks

また描出可能な最小の血管径は径 0.2mm の微細な血管まで観察が可能であった (Fig. 6).

さらに、ICG の妊娠中の投与に関する安全性はまだ確立されていないことから、臍帯への ICG 移行について評価を行った。その結果、妊娠ウサギ母体は、ヒト成人の測定で得られるような ICG の肝代謝、血漿消失のパターンを呈していた。一方、臍帯側すなわち胎仔側では ICG は検出されず、その移行はほぼ生じないと考えられた。

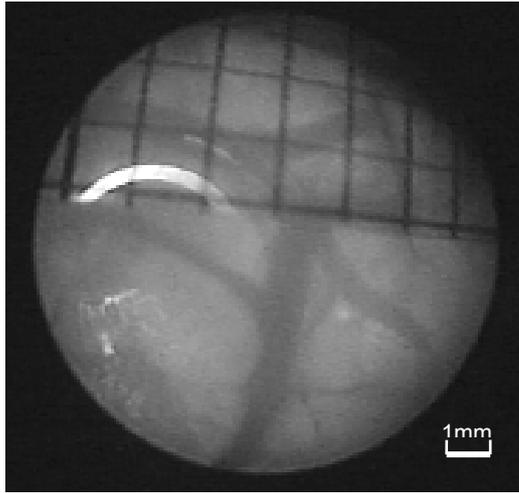


Fig.6 Fluorescence endoscope could visualize even a small vessel of 0.2mm in diameter

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

・ 千葉敏雄・草野満夫・原田香奈子・渡邊慎介・絵野沢伸・福与恒雄・前田英樹・三輪光春・鹿山貴弘・山海直:新しい硬性蛍光内視鏡とその胎児手術への応用, 第19回日本内視鏡外科学会雑誌, Vol. 11 No. 7, 368, 2006

・ Kanako Harada, Mitsuharu Miwa, Tsuneo Fukuyo, Shinsuke Watanabe, Shin Enosawa, Toshio Chiba: ICG fluorescence endoscope for visualization of the placental vascular network, Minimally Invasive therapy and Allied Technologies, 18(1), 1-5(5), 2009

〔学会発表〕(計3件)

・ Kanako Harada, Mitsuharu Miwa, Tsuneo Fukuyo, Toshio Chiba, Mitsuo Kusano, Shin Enosawa, Shinsuke Watanabe, Hideki Maeda, Takahiro Shikayama, Tadashi Sankai: New fluorescence endoscope for visualization of the placental vascular network – a feasibility study, IFMSS2007, 2007年5月1日, Aruba, USA

・石山昭彦, 原田香奈子, 三輪光春, 福与恒雄, 山下紘正, 中山智里, 宮本義孝, 千葉敏雄, 草野満夫, 絵野沢伸, 渡辺慎介, 前田英樹, 鹿山貴弘, 山海直: TTTS 治療におけ

る胎盤血管観察のための蛍光内視鏡, 胎児治療学会, 2007年10月19日, 大阪

・ Akihiko Ishiyama, Hiromasa Yamashita, Kanako Harada, Mitsuharu Miwa, Tsuneo Fukuyo, Toshio Chiba, Mitsuo Kusano, Shin Enosawa, Shinsuke Watanabe, Hideki Maeda, Takahiro Shikayama, Tadashi Sankai: New fluorescence endoscope can visualize the detailed placental vascular network

–a feasibility study-, SMIT2007, 2007年11月20日, 仙台

〔図書〕(計2件)

石山昭彦, 千葉敏雄: ICG 蛍光 Navigation surgery のすべて

・胎児手術への応用, 鏡視下手術との融合による新たな低侵襲性手術の展開 (pp.376-381)

・胎児内視鏡と胎盤血管造影, 脈管造影 – 胎児内視鏡と胎盤血管造影 (pp.277-286), 株式会社インターメディカ, 2008

6. 研究組織

(1)研究代表者

千葉 敏雄 (CHIBA TOSHIO)

国立成育医療センター (研究所)・臨床研究開発部・部長

研究者番号: 20171944

(2)研究分担者(2006~2007)

絵野沢 伸 (ENOSAWA SHIN)

国立成育医療センター (研究所)・実験外科研究室・室長

研究者番号: 40232962

三輪 光春 (MIWA MITSU HARU)

浜松ホトニクス株式会社・中央研究所 第7研究室・主任部員

研究者番号: 90393983

(3)連携研究者(2008)

絵野沢 伸 (ENOSAWA SHIN)

国立成育医療センター (研究所)・実験外科研究室・室長

研究者番号: 40232962

三輪 光春 (MIWA MITSU HARU)

浜松ホトニクス株式会社・中央研究所 第7研究室・主任部員

研究者番号: 90393983