

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007 ～ 2009
 課題番号：19790469
 研究課題名（和文） 超拡大内視鏡を用いた内視鏡的組織診断法の確立と自動診断への応用
 研究課題名（英文） Establishment of in-vivo histological diagnosis by using endo-cytoscopy system toward automatic diagnosis of gastrointestinal neoplasia
 研究代表者 藤城 光弘 (FUJISHIRO MITSUHIRO)
 東京大学・医学部附属病院・准教授
 研究者番号：70396745

研究成果の概要（和文）：光学顕微鏡と同様の原理で観察可能な超拡大内視鏡による最適観察条件の検討から、最適な染色液は、食道（重層扁平上皮）では 1%メチレンブルー60秒染色が、胃、大腸（円柱上皮）では 0.2%トルイジンブルー60秒染色であるとの結論を得た。この結果を生体ビーグル犬に適用したところ、食道、大腸では安定して良好画像が得られたが、胃では各種蛋白分解酵素を前処置に用いるも厚い粘液層の影響で観察条件が安定せず、以後は食道を中心に検討を行った。ヒトにおいても切除臓器と生体観察の超拡大内視鏡所見が相同であることを確認した後、水平断における H&E 染色の病理所見と超拡大内視鏡所見が極めて類似しており、従来からの病理診断が超拡大内視鏡診断に応用可能であることを明らかにした。正常部では、均一な小型核を有する扁平上皮細胞が規則正しく配列している一方、癌部では、不均一の大型核を有する癌細胞が密に増殖して観察されるため、超拡大内視鏡画像の核密度をコンピューター解析することで、正常部と癌部を自動診断できる可能性があることを示唆する新見も得た。

研究成果の概要（英文）：The investigation to determine an appropriate staining regimen for endocytoscopy revealed that the optimum conditions for endocytoscopic observation were obtained after staining with 1% methylene blue in the esophagus and with 0.25% toluidine blue in the stomach and the colon, after 60 seconds of exposure to the dye. When the conditions were applied to the living beagles, reliable observations in the stomach were not obtained in the stomach due to thick mucous layer on the surface epithelia. Focusing on the esophageal observations, in-vivo endocytoscopic images were quite similar with the horizontal histology of fixed specimens with H&E staining. We obtained a novel finding that computer-assisted analysis of nuclear density between malignant and normal epithelia can lead to automatic diagnosis by using the endocytoscopy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,200,000	0	1,200,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,200,000	600,000	3,800,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：超拡大内視鏡、内視鏡的組織診断、内視鏡的自動診断、仮想生検、消化管腫瘍

1. 研究開始当初の背景

消化管腫瘍の内視鏡的診断は、今日、色素内視鏡、高解像度内視鏡、拡大内視鏡、超音波内視鏡など、観察技術や内視鏡機器の開発・改良により、早期癌の発見のみならず、その正確な範囲診断、深達度診断までが行えるようになった。しかし、癌の診断は、依然、内視鏡下生検による病理組織学的診断に委ねられているのが現状である。そのため、臨床的に強く癌が疑われても生検が施行され、診断が下るまでの物理的な時間やサンプリングエラーの問題から癌治療の開始が遅延したり、生検で引き起こされる腫瘍の形態変化や瘢痕形成が引き続く癌治療にマイナスに働くことなど、生検依存診断の弊害も指摘されている。より安全で確実な内視鏡的治療を遂行するに当たり、内視鏡的治療に必要な機器の開発・改良は非常に重要な要素を占めるが、それ以上に、内視鏡下生検がその妨げになっている。これを回避するため、内視鏡下生検を行わずに内視鏡的治療に至ることもあるが、術前説明に十分な情報を提供できなかつたり、不確実な術前診断のもとでの治療を行うこととなる。内視鏡下生検を行うことなく、同様の病理組織学的診断が内視鏡下でそれもリアルタイムに行うことができれば、これらの問題点は完全に解決される。古くから生体内で直接細胞を観察するという試みは行われているが、現時点でも実用化には至っていない。

2. 研究の目的

2003年、大植、熊谷、井上の共同提案でOlympus社との協力の下、開発された超拡大内視鏡(Endocytoscope)を用いた内視鏡的病理診断の確立を行い、最終的にはリアルタイムの自動診断までの応用について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

ブタ切除臓器および生体ビーグル犬を用いた実験系で、正常臓器の超拡大内視鏡(Endocytoscope)観察を行い、生体(in vivo)観察するに当たり、最適な前処置法と最適な染色条件の選定を行った。本検討で得られた結果を元に、ヒト臓器(内視鏡的切除材料)から、正常と癌の超拡大内視鏡像の特徴を明

らかにし、その違いから、正常と癌の内視鏡的組織診断が可能かどうか、また、通常のH&E染色病理プレパラートとの比較を行い、その異同を検討した。最後に、超拡大内視鏡像を用いて、コンピューターを用いた画像解析を行い、自動診断の可能についての検証を行った。

4. 研究成果

ブタ切除臓器の検討から、最適な染色液は、食道(重層扁平上皮)では1%メチレンブルー60秒染色、胃、大腸(円柱上皮)では0.2%トリジンブルー60秒染色であるとの結論を得た。切除臓器での検討を生体ビーグル犬に適用したところ、食道、大腸では安定した良好画像が得られたが、胃では各種蛋白分解酵素を前処置に用いるも厚い粘液層の影響で観察条件が安定せず、胃における更なる検討は断念し、以後は食道を中心に検討を行った。ヒトにおいても切除臓器と生体観察の超拡大内視鏡所見が相同であることを確認した後、水平断におけるH&E染色の病理所見と超拡大内視鏡所見が極めて類似しており、従来からの病理診断が超拡大内視鏡診断に応用可能であることを明らかにした。正常部では、均一な小型核を有する扁平上皮細胞が規則正しく配列している一方、癌部では、不均一の大型核を有する癌細胞が密に増殖して観察された。超拡大内視鏡像中心部の $4 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$ 領域の検討で、合計核面積(領域内に存在する核すべてが占める面積)は、正常部で、平均 $0.10 \times 10^{-2} \pm 0.03 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$ (range $0.05 \times 10^{-2} \sim 0.18 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$)、癌部で、平均 $0.40 \times 10^{-2} \pm 0.06 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$ (range $0.33 \times 10^{-2} \sim 0.55 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$) で有意差を認めた($P < 0.001$)。核占有率(領域内の核が占める面積の割合)は、正常部で、平均 $6.4 \pm 1.9\%$ (range 3.1~11.3%)、癌部で、平均 $25.3 \pm 3.8\%$ (range 20.5~34.5%) であり、有意差を認めた($P < 0.001$)。以上より、超拡大内視鏡画像の核密度をコンピューター解析することで、正常部と癌部を自動診断できる可能性があることを見出した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- ① Fujishiro M, Kodashima S, Takubo K, Kakushima N, Omata M: Detailed comparison between endo-cytoscopy and horizontal histology of an esophageal intraepithelial squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 21:181-185, 査読有 2008
- ② 小田島慎也、藤城光弘、小俣政男: エンドサイトスコープを用いた自動診断の可能性 *臨床消化器内科* vol.23 No.5 657-661, 査読無 2008
- ③ Kodashima S, Fujishiro M, Takubo K, Kammori M, Nomura S, Kakushima N, Muraki Y, Goto O, Ono S, Kaminishi M, Omata M: Ex vivo pilot study using computed analysis of endo-cytoscopic images to differentiate normal and malignant squamous cell epithelia in the esophagus. *Dig Liver Dis* 39:762-766, 査読有 2007
- ④ Muto M, Fujishiro M, Sato Y, Kaise M, Niwa Y, Kato M, Takubo K: Multicenter study design of the *ex vivo* evaluation of endocytoscopy in esophagela squamous cell carcinoma. *Dig Endosc* 19: S153-155, 査読有 2007
- ⑤ Fujishiro M, Kodashima S, Takubo K, Kakushima N, Omata M: Comparison among endo-cytoscopy, cytology and histology of an esophageal intraepithelial carcinoma. *Dig Endosc* 19: S156-159, 査読有 2007
- ⑥ Takubo K, Aida J, Sawabe M, Kurosumi M, Arima M, Fujishiro M, Arai T: Early squamous cell carcinoma of the oesophagus: the Japanese viewpoint. *Histopathology* 51:733-742, 査読有 2007
- ⑦ Fujishiro M, Takubo K, Sato Y, Kaise M, Niwa Y, Kato M, Muto M: Potential and present limitation of endo-cytoscopy in diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma: a multi-center *ex vivo* pilot study. *Gastrointest Endosc* 66:551-555, 査読有 2007

〔学会発表〕(計 2 件)

- ① 小田島慎也、藤城光弘、小俣政男: Endo-Cytoscopy System を用いた食道扁平上皮癌の診断 第 62 回日本食道学会、2008 年 6 月 21 日、東京
- ② 小田島慎也、藤城光弘、田久保海誉、角嶋直美、村木洋介、建石綾子、神森眞、野村幸世、川邊隆夫、上西紀夫、小俣政男: Endo-Cytoscopy System を用いた食道病変の画像解析—正常粘膜と扁平上皮の比較— 第 73 回日本消化器内視鏡学会総会、2007 年 5 月 9 日、東京

〔図書〕(計 1 件)

- ① Fujishiro M: Current perspective on endocytoscopic diagnosis in the esophagus based on the multicenter study at the

endoscopy forum Japan. In: Niwa H, Tajiri H, Nakajima M, Yasuda K (Eds): *New challenge in gastrointestinal endoscopy*. Springer-Verlag Tokyo, pp95-100, 2008

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.h.u-tokyo.ac.jp/patient/depts/kogaku.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤城 光弘 (FUJISHIRO MITSUHIRO)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 70396745

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし