

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461047

研究課題名(和文) エンドサイトスコープシステム (GIF-Y0002) を用いた食道病変の観察

研究課題名(英文) *In vivo* observation using the endocytoscopy system (GIF-Y0002) for the esophageal lesions

研究代表者

熊谷 洋一 (Kumagai, Youichi)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80611087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：超拡大内視鏡であるEndocytoscopeは生体染色することで生体内でリアルタイムに細胞レベルの診断をすることができる。これにより、生検組織診断を減少させ医療経済に貢献する。研究期間に核異型が診断できる至適倍率を設定し、この論文を根拠に最新GIF-Y0074(光学倍率500倍、ハイビジョン)が開発され市販可能なレベルに到達している。食道癌のほかに食道炎について論文報告し、本年最新GIF-Y0074の使用経験も報告した。オリンパス社はこの最新型エンドサイトの製品化を決定した。また、食道癌発癌早期の微細血管構造の変化は、血管新生の観点から重要であり、各種免疫染色から全貌が解明されつつある。

研究成果の概要(英文)：the Endocytoscopy system (ECS) is the novel ultra-high magnifying endoscope that can allow *in vivo* cell observation. ECS can reduce the need of conventional histological diagnosis using biopsy histology. In terms of medical economics, ECS will cut costs by allowing histological examination to be omitted. In this study period, we determined the adequate magnifying power of ECS for recognition of nuclear abnormality. Referring our results, Olympus developed a latest prototype ECS (GIF-Y0074) that can magnify up to 500 times with high vision view. This ECS achieves a level that makes its commercial release justifiable. We reported the experience of using this latest type ECS. In addition, we reported the endocytoscopic features of esophagitis for differential diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). Further, we have made effort to clarify the mechanism of the morphological change of the microvasculature in superficial ESCC using immunohistochemical staining.

研究分野：消化器内視鏡

キーワード：エンドサイトスコープシステム 食道癌 食道炎 血管新生 超拡大内視鏡 リンパ管新生

## 1. 研究開始当初の背景

(1) Endocytoscopy system(以下ECS)とは生体内に挿入可能な超拡大内視鏡である。2003年に試作機1号をオリンパス社が開発し、研究開始当初第3世代ECS(GIF-Y0002)が開発されていた。第1世代、第2世代ECSを用い正常食道、食道癌のECS像の特徴を明らかにし、食道癌を効率的に細胞レベルで診断するためのType分類、フローチャートを作成した(2009年)。第3世代ECSは細径化され格段に操作性が向上し汎用スコープとして使用可能なため、これを用い良性病変も含めた食道病変の観察を開始していたが、380倍と倍率が低いために核異型が認識できず誤診する症例が存在した。

(2) 80倍程度の低倍率でのECS観察では表面の微細血管構造が鮮明に描出され、その変化は食道癌の深達度と相関している。この血管形態の変化はまさに食道癌の発癌初期の血管新生そのものを観察するものである。我々はこの点に注目し、組織像と血管新生因子との相関を文献的に考察し食道癌発育における多段階血管新生の概念を提唱してきた。しかし、前癌病変、炎症、また癌においても表在癌深達度亜分類別に血管形態と血管新生因子の相関を網羅的にプロファイリングした研究は存在しなかった。

## 2. 研究の目的

本研究はECSを用い以下の3点を明らかにするために行った。

(1) ECSで得られる病変表層の細胞形態をゴールドスタンダードである生検組織診断と比較することでECS診断の正診率を算出する。

(2) 食道癌の観察で得られた画像で核異型を認識できる至適倍率の決定を行う。

(3) 弱拡大で病変表層の微細血管形態が観察できる。食道では組織の種類や癌の壁進達度によって特徴的な血管形態を示すことが知られているがこの血管形態と血管新生因子との関連を明らかにし、食道癌発癌初期の多段階血管新生の概念を証明する。

## 3. 研究の方法

研究目的あげた3点につき以下の研究で計画を進めた。

(1) GIF-Y0002はスクリーニング内視鏡でも使用可能である。非癌病変を含めた様々な食道病変の表層の細胞形態を観察し内視鏡医はtype分類を行い、病理医はECS画像から良悪性の判断を行う。最終的に生検組織診断と対比することで内視鏡で得られる病理学と生検組織診断の整合性を検討する。

(2) 弱拡大で表層の血管形態も記録し、同時に得られる生検組織から各種血管新生因子を免疫染色することで組織型、癌深達度における血管新生因子の発現状況を検索する。3) CD105、CD31を用い上皮内、粘膜固有層内のMicro vessel densityを測定することで炎症、前癌病変、各深達度における食道癌の新生血管の誘導の状況を検索する。CD68、IL-17などを染色し炎症細胞の血管新生におよぼす働きを検索する。最終的に我々の提唱する多段階血管新生を証明する。

## 4. 研究成果

### (1) 至適倍率の模索

研究開始前の380倍の超拡大内視鏡GIF-Y0002を用いた検討において、良性病変を含めた各種食道病変の正診率は、通常内視鏡観察所見をblindにした病理医の判定ではsensitivity: 94.9%, specificity: 50.0%であり食道炎、LGINの約2/3を悪性と判定していた。

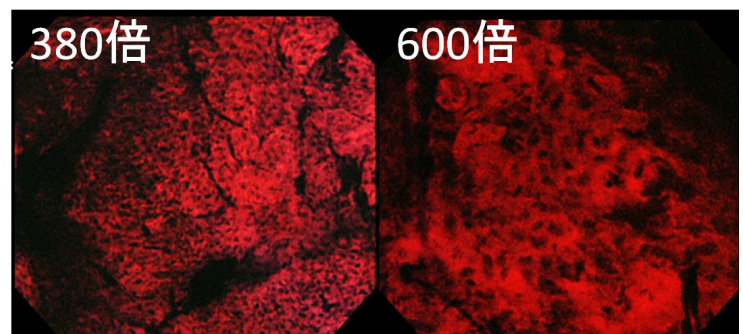


図1: 食道癌のECS像、380倍では核密度の情報のみであるが、600倍まで倍率を上げると核異型の診断が容易である。

そこで、内視鏡本体(光源)に内蔵されているデジタルズーム機能(1.6、1.8倍)を使用し600倍以上に倍率を上げて観察を行った(図1)。食道癌19例、食道炎17例(GERD:7例、放射線性食道炎:5例)、正常、グリコーゲ

ン顆粒、平滑筋腫各1例を対象とした。食道癌では18/19(感度94.7%)で悪性と判定し、良性病変の16/21(特異度76.2%)をECS画像より良性と診断し、病理医の正診率は向上した。また、今回核密度の上昇はあるものの核異型が弱いものを病理医はborder lineとしたが、これを正診したと判断すると特異度は90.4%に向上した。食道扁平上皮病変においては、生検診断省略も現実的なものとなってきている。また病理医も600倍での画像をもって核異型を認識できる至適倍率であるとの印象であった。

以上の知見をKumagai Y, et al. Endocytoscopic observation of various esophageal lesions at x600: can nuclear abnormality be recognized? Dis Esophagus 28:269-275 に報告し、学会報告を行った。

この論文をもとにオリンパスメディカルシステムズ社は光学500倍、ハイビジョン観察が可能なGIF-Y0074を開発した。この超拡大内視鏡は本年度オリンパス社から市販の予定となっている。この最新ECSの使用経験を本年Endoscopy誌に掲載している。(Kumagai Y et al. A newly developed continuous zoom-focus endocytoscope. Endoscopy. 2017)

## (2) 食道炎の観察

次いで食道癌と鑑別を要する胃・食道逆流症(GERD)のECS観察を行った。GIF-Y0002を用いて600倍でのECS観察をおこなったGERD30例(Grade M: 8例, A: 7例, B: 3例, C: 7例, D: 5例)を対象とした。粘膜傷害部近傍の扁平上皮にはしばしば乳頭血管の周囲を扁平上皮細胞が「木の節」状に取り囲む“onion slice appearance”をGrade A~D22例中7例(31.8%)に認めた。また、組織学的に再生上皮と診断された症例は核密度の上昇と核異型が観察され扁平上皮癌との鑑別を要することが判明した。このような判断に迷う症例には生検診断が必要であると報告した。また、カンジタ食道炎では超拡大観察すると白苔部でカンジタの菌糸が確認され、好酸球性食道炎では粘膜表層に浸潤する好酸球が描出された。

この内容はKumagai Y et al. Endocytoscopic observation of various type esophagitis. Esophagus13: 200-207. 2016 に報告した。

## (3) 食道扁平上皮病変以外のECS観察

十二指腸腺腫、腺癌や食道でもBarrett食道の検討も行った。それぞれ病理組織像と一致する特徴的なECS像が観察され論文掲載、学会報告を行っている。

Kumagai Y et al. Endocytoscopic observation of duodenal polyps associated with familial adenomatous polyposis: Report of four cases. Dig Endosc. 2015;27:778.

ECSは内視鏡診断の新たな幕を開けることになると考える。細胞レベルでの悪性診断はこれまで病理医が担ってきたが、内視鏡医でも行える時代が到来する。教育システム、診断システムの構築が今後の課題である。

## (4) 血管新生からの微細血管構造の変化へのアプローチ。血管新生因子、抑制因子のプロファイリングと多段階血管新生のメカニズムの解明

前述のとおり、食道は正常食道粘膜、食道癌の各深達度で特徴的な血管形態をしめすことが知られている(図2)。

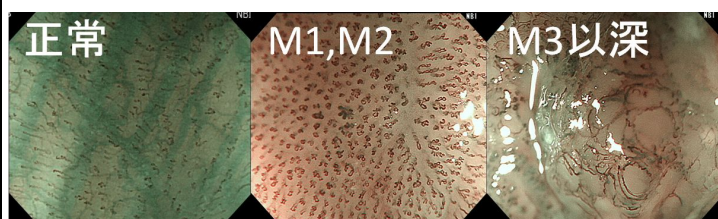


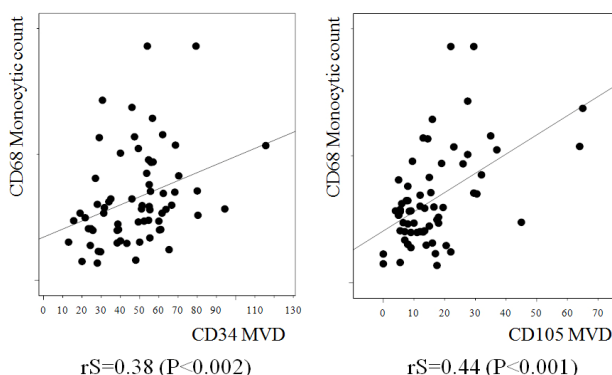
図2: 低倍率での正常食道粘膜、各深達度における血管形態の変化

この血管形態の変化は文献検索から当初癌細胞から分泌される血管新生因子が各深達度で変化することで説明可能であると考えていた。すなわち、M1, M2 癌の乳頭血管構造が保たれた形態はCox2などの炎症性の血管新生因子で誘導されるものと考えられた(文献1)。またVEGFなどの強力な血管新生因子は粘膜下層癌で分泌されるとの報告があり(文献2)、M3以深癌で観察されるいわゆる腫瘍血管の形態をしめす血管はVEGFなどで誘導されるのであろうと推測していた。しかし、Cox2, iNOSを免疫染色してみると、M1, M2 癌よりむしろM3以深癌で強発現していた。(Kumagai Y et al. Coexpression of COX-2 and iNOS in angiogenesis of superficial esophageal squamous cell carcinoma. Int Surg 2015;100:733-43.)さらに、VEGFやThymidine Phosphorylase(TP)といった強力な血管新生因子はM1, M2 癌から強発現しており、また癌

細胞からのVEGF, TPIは血管密度と相関しないことが判明した ( TPIに関しては論文投稿中、VEGFに関しては執筆中 )

CD34、CD105 抗体で血管を免疫染色してみるとCD105 陽性の腫瘍血管は炎症細胞浸潤部で高頻度に観察され、炎症細胞が血管を誘導していることが示唆され、以前報告した。このうちマクロファージに着目しマクロファージと血管密度について検討したところ有意な相関関係にあった ( Kumagai Y et al. Tumor-associated macrophages and angiogenesis in early-stage esophageal squamous cell carcinoma. Esophagus 13: 245-253, 2016 ) ( 図 3 )。

図3: CD68陽性マクロファージ数とCD34,CD105血管密度の相関



よって、発癌早期で認められる血管は癌細胞からの血管新生因子よりはむしろ腫瘍関連マクロファージからの血管新生因子により誘導されていることが判明した。TP抗体による免疫染色では癌間質のTP陽性細胞が血管密度と相関していた ( 論文投稿中 )。

しかし、癌が浸潤するにつれて血管密度が増加することはわかったが、血管形態の変化の理由が未解明である。この疑問を解明するために現在癌細胞から分泌される血管新生因子、血管新生抑制因子を網羅的に免疫染色し、プロファイリングを作成することで癌の発育伸展に伴う腫瘍構造の変化から血管形態変化の理由の解明に着手している。(免疫染色終了・検討中)

#### <引用文献>

1. Shamma A, Yamamoto H, Doki Y, Okami J, Kondo M, Fujiwara Y et al. Up-regulation of cyclooxygenase-2 in squamous carcinogenesis of the esophagus. Clin Cancer Res. 2000

Apr;6(4):1229-38.

2. Ogata Y, Harada Y, Fujii T, Yamana H, Fujita H, Shirouzu K. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in esophageal cancer. Kurume Med J. 1996;43:157-63.

#### 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 9件)

1. Kumagai Y, Takubo K, Kawada K, Higashi M, Ishiguro T, Sobajima J, Fukuchi M, Ishibashi KI, Mochiki E, Aida J, Kawano T, Ishida H. A newly developed continuous zoom-focus endocytoscope. Endoscopy. 査読有り、49巻、2017、176-180. doi: 10.1055/s-0042-119267
2. 熊谷 洋一, 川田 研郎, 田久保 海誉, 石田 秀行. 超拡大内視鏡(Endocytoscopy system)による食道病変の診断. 日本消化器内視鏡学会雑誌 査読なし、59巻、2017、207-218  
doi:org/10.11280/gee.59.207
3. Kumagai Y, Sobajima J, Higashi M, Ishiguro T, Fukuchi M, Ishibashi K, Mochiki E, Yakabi K, Kawano T, Tamaru J, Ishida H. Tumor-associated macrophages and angiogenesis in early-stage esophageal squamous cell carcinoma. Esophagus 査読有り、13巻、2016、245-253 doi: 10.1007/s10388-015-0520-6
4. Kumagai Y, Takubo K, Kawada K, Higashi M, Ishiguro T, Sobajima J, Fukuchi M, Ishibashi K, Mochiki E, Aida J, Kawano T, Ishida H. Endoscopic observation of various type esophagitis. Esophagus 査読有り、13巻、2016、200-207 doi: 10.1007/s10388-015-0517-1
5. 熊谷洋一、川田研郎、伊藤徹哉、田久保海誉 . トピックス：食道表在癌の診断 Endocytoscopyによる診断 . 消化器内視鏡 査読なし、28巻、2016、388-393
6. 熊谷洋一、天野邦彦、川田研郎、福地稔、石橋敬一郎、持木彫人、河野辰幸、石田秀行、相田順子、田久保海誉 .

- Endocytoscopy systemを用いた胃・食道逆流症の観察．潰瘍 査読なし、43巻、2016、24-28
7. Kumagai Y, Kawada K, Higashi M, Ishiguro T, Sobajima J, Fukuchi M, Ishibashi K, Baba H, Mochiki E, Aida J, Kawano T, Ishida H, Takubo K. Endocytoscopic observation of various esophageal lesions at x600: can nuclear abnormality be recognized? Dis Esophagus 査読有り 28巻、2015、269-275 doi: 10.1111/dote.12183.
  8. Kumagai Y, Sobajima J, Higashi M, Ishiguro T, Fukuchi M, Ishibashi K, Mochiki E, Yakabi K, Kawano T, Tamaru J, Ishida H. Coexpression of COX-2 and iNOS in angiogenesis of superficial esophageal squamous cell carcinoma. Int Surg 査読有り、100巻、2015、733-43. doi: 10.9738/INTSURG-D-14-00234.1.
  9. Kumagai Y, Watanabe Y, Ishida H. Endocytoscopic observation of duodenal polyps associated with familial adenomatous polyposis: Report of four cases. Dig Endosc. 査読有り、27巻、2015、778. doi: 10.1111/den.12516.

〔学会発表〕(計 19件)

1. 熊谷洋一, 石田秀行, 川田研郎, 田久保海誉. Endocytoscopy systemによる食道病変の診断．第103回日本消化器内視鏡学会関東支部例会，東京，2016.12.17.18(レクチャー) 12/17(土)
2. 天野邦彦, 熊谷洋一, 傍島潤, 石畝亨, 東守洋, 石田秀行. 食道癌発癌早期におけるリンパ管新生とVEGF-C, Dとの関係．第68回日本気管食道科学会，東京，2016.11.17-19(口演) 11/17(木)
3. 傍島潤, 熊谷洋一, 石畝亨, 東守洋, 石田秀行. 腫瘍関連マクロファージ(TAM)と食道癌発癌早期の血管新生の関連．第68回日本気管食道科学会，東京，2016.11.17-19(口演) 11/17(木)
4. 熊谷洋一, 田久保海誉, 川田研郎, 傍島潤, 石畝亨, 河野辰幸, 持木彫人, 石田秀行.

エンドサイトスコピーシステムを用いた食道病変の観察．

- 第68回日本気管食道科学会，東京，2016.11.17-19(パネルディスカッション) 11/17(木)
5. 熊谷洋一, 傍島潤, 石畝亨, 石田秀行. 腫瘍関連マクロファージ(TAM)が食道癌発癌早期の血管新生におよぼす役割．第24回日本消化器関連学会週間(消化器外科学会)，神戸，2016.11.3-6(デジタルポスターセッション) 11/5(土)
  6. Sobajima J, Kumagai Y, Higashi M, Ishiguro T, Ishida H. Tumor-associated macrophages and angiogenesis in early-stage esophageal squamous cell carcinoma. 40<sup>th</sup> World Congress of the International College of Surgeons(第40回国際外科学会世界総会) Kyoto, 2016, 10.23-26(oral) 10/25(tue)
  7. Kumagai Y. Endocytoscopic observation of esophagitis 15th WORLD CONGRESS International Society for Diseases of the Esophagus, Singapore, 2016. 9.19-21(Featured Abstracts) 9/19
  8. 熊谷洋一, 川田研郎, 石畝亨, 石田秀行, 河野辰幸, 田久保海誉. Endocytoscopy systemを用いた胃・食道逆流症の観察．第70回日本食道学会学術集会，東京，2016.7.4-6(ワークショップ) 7/5(火)
  9. 熊谷洋一, 川田研郎, 田久保海誉, 石畝亨, 傍島潤, 河野辰幸, 石田秀行. エンドサイトスコピーシステムによる上部消化管粘膜の細胞観察．第91回日本消化器内視鏡学会総会，東京，2016.5.12-14(プレナリーセッション) 5/14(土)
  10. 熊谷洋一, 川田研郎, 田久保海誉. エンドサイトスコピーシステムを用いた食道病変の生検診断省略の可能性．第91回日本消化器内視鏡学会総会，東京，2016.5.12-14(パネルディスカッション) 5/12(木)
  11. 傍島潤, 熊谷洋一, 石畝亨, 河野辰幸, 石田秀行. 食道癌発癌早期における腫瘍関連マクロファージ(TAM)と血管新生 第116回日本外科学会定期学術集会，大阪，2016, 4.14-16(ポスターセッション) 4/16(土)
  12. 熊谷洋一, 川田研郎, 田久保海誉, 石畝亨, 傍島潤, 河野辰幸, 石田秀行. エンドサイトスコピーシステム(

- GIF-Y0002)による食道病変の観察  
第116回日本外科学会定期学術集会,大阪,2016,4.14-16(一般演題)4/16(土)
13. 熊谷洋一,田久保海誉,川田研郎,傍島潤,石畝亨,河野辰幸,石田秀行.食道におけるエンドサイトスコピーシステムの到達点と将来展望.  
第77回日本臨床外科学会総会,2015,福岡,11,26-28(特別演題)11/27(金)
14. 熊谷洋一,傍島潤,石畝亨,河野辰幸,石田秀行.食道癌発癌早期におけるCOX-2,iNOSと血管新生.  
第67回日本気管食道科学会総会ならびに学術集会,2015.11.19-20(示説)11/20(金)
15. 熊谷洋一,川田研郎,石畝亨,河野辰幸,石田秀行,傍島潤,田久保海誉.エンドサイトスコピーシステム(ECS)の到達点と将来展望.  
第90回日本消化器内視鏡学会総会,東京,2015.10.8-11(示説)10/9(金)
16. Kumagai Y, Ishiguro T, Ishida H, Sobajima J.  
Coexpression of cox-2 and inos in angiogenesis of superficial esophageal squamous cell carcinoma.  
Organization 46<sup>th</sup> World Congress of Surgery WCS 2015, Bangkok, (Thailand) 2015.8.23-27(Oral)8/24(月)
17. Kumagai Y, Sobajima J, Mochiki E, Ishida H, Kawada K, Takubo K.  
Current status of the newly developed endocytoscope "GIF-Y0002" with reference to its diagnostic performance for common esophageal lesions.  
Organization 46<sup>th</sup> World Congress of Surgery WCS 2015, Bangkok, (Thailand) 2015.8.23-27(Oral)8/24(月)
18. 熊谷洋一,川田研郎,石田秀行,河野辰幸,田久保海誉  
エンドサイトスコピーシステム(ECS)で観察する食道炎の特徴  
第43回日本潰瘍学会,2015,沖縄,6,19-20(スポンサーシンポ)6/19
19. 熊谷洋一,傍島潤,石畝亨,石田秀行.当科における表在食道癌に対する新規拡大内視鏡分類の検証と研究の現状.  
第11回日本消化管学会総会学術集会,東京,2015.2.13-15(ワークショップ)2/14(土)

[図書](計0件)

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

熊谷洋一(KUMAGAI, Yoichi)  
埼玉医科大学・医学部・准教授  
研究者番号:80611087

### (2)研究分担者 なし

### (3)連携研究者

川田研郎(KAWADA, Kenro)  
東京医科歯科大学・医学部付属病院・講師  
研究者番号:20311219

田久保海誉(TAKUBO, Kaiyo)  
東京都健康長寿医療センター・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長  
研究者番号:00154956

河野辰幸(KAWANO, Tatsuyuki)  
東京医科歯科大学・医歯(薬)総合研究科・教授  
研究者番号:00186115

石田秀行(ISHIDA, Hideyuki)  
埼玉医科大学・医学部・教授  
研究者番号:00262197

石畝亨(ISHIGURO, Toru)  
埼玉医科大学・医学部・講師  
研究者番号:10383241

傍島潤(SOBAJIMA, Jun)  
埼玉医科大学・医学部・助教  
研究者番号:40406517

東守洋(HIGASHI, Morihiro)  
埼玉医科大学・医学部・准教授  
研究者番号:00323395

### (4)研究協力者 なし