

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26820065

研究課題名(和文)内視鏡治療への応用を目的とした凍結加温手術と熱的障害に関する研究

研究課題名(英文)The study of the combination treatment of cryosurgery and hyperthermia treatment and the heat induced disorder for living tissue

研究代表者

高橋 大志 (TAKAHASHI, Daishi)

北里大学・北里大学保健衛生専門学院・講師

研究者番号：20549943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、悪性腫瘍に対する新たな低侵襲療法として凍結加温手術を提案し、凍結加温手術を実施可能な凍結加温手術装置を作製すること及び凍結加温手術の組織破壊性を明らかにすることを目的とした。凍結加温手術装置は、手術用プローブと冷媒循環装置、温調機能を有する電源を用いて作製され、性能評価実験において、手術用プローブ温度は -40 から45 の温度範囲で自動的に制御された。また、動物実験後の標本観察では、染色標本に壊死が観察され、凍結加温手術を実施できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the combination treatment system of cryosurgery and hyperthermia treatment was fabricated and evaluated. The therapeutic apparatus consists of the surgical probe using Peltier device, the coolant circulation system and the power with the temperature control function for Peltier device. In the evaluation of the system performances, the temperature cycles that cryosurgery and hyperthermia treatment were alternately repeated three times could be achieved. The combination treatment was operated on the living liver tissue of mouse for confirming the tissue destruction effect. The injuries such as the disappearances of the cell nuclei, the cell dropout and the decrease of the stainability were observed in the HE stained tissue sections under the optical microscope. The results suggest the feasibility of the combination treatment of cryosurgery and hyperthermia treatment and the application potentiality to the endoscope by the downsizing of the system.

研究分野：医用生体工学

キーワード：凍結手術 温熱療法 凍結加温手術 手術装置 ペルチェ素子 併用療法

1. 研究開始当初の背景

本邦において、消化器疾患は主要な疾患の一つであり、中でも胃癌や肝癌、大腸癌といった悪性腫瘍が死因の大きな割合を占めている。近年では、内視鏡用の各種の外科的な手術用デバイスが開発され、内視鏡下による低侵襲治療も多く実施されるようになってきている。しかし、消化管は複数の薄膜が積層された層状構造をしており、内視鏡による粘膜層までの搔術や焼灼術には、熟練した技術が要求される。そのため、医師には技術を向上させるための多くの臨床的時間が必要であると共、技術習熟度の違いが治療効果に対して直接的に影響してしまう可能性が考えられるなど課題も多く存在する。

他方、悪性腫瘍に対する低侵襲療法の研究では、内視鏡用の各種デバイス開発だけではなく、多くの手術法や治療法そのものが研究されてきた。このうち、外科領域では熱を治療に直接応用する凍結手術や温熱療法が注目を集めている。凍結手術は腫瘍組織を -20 以下となるように冷凍し細胞や組織を破壊する治療法であり、他方の温熱療法は腫瘍組織を 43 程度以上まで加温し破壊する治療法である。

しかし、これらの治療法には課題や欠点があり、凍結手術では不十分凍結による悪性腫瘍の増悪や遠隔転移の危険性増大等が指摘されているにもかかわらず、冷凍源に液体窒素やアルゴンガスを用いているために、凍結や融解速度の制御が難しく、また最低到達温度も冷凍源や冷凍時間に依存するなど、温度制御性が乏しい装置構造となっている。一方の温熱療法では、細胞分裂周期による温熱感受性の変動や熱ショック蛋白の発現による耐熱性の獲得など、治療効果が十分に発揮できない生体的な課題がある。さらに、腫瘍組織の縮小・退縮や遠隔転移に対しては、腫瘍辺縁部の細胞を破壊することが重要と考えられるが、この2つの治療法では、基本的に腫瘍中心に熱源(手術用プローブ)を配置することになるため、熱源から遠方に存在する腫瘍辺縁領域の細胞を熱による直接的な影響だけで効率良く破壊することは、生体熱伝導現象から困難であると考えられる。以上より、凍結手術や温熱療法は低侵襲療法ではあるものの、多くの課題もあることから、低侵襲性を確保した上で組織破壊性も向上させた新たな治療法が強く望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、凍結手術や温熱療法の低侵襲性を確保した上で、さらに組織破壊効果の向上も見込まれる新規な治療法として凍結加温手術を提案する。凍結加温手術は、凍結手術と温熱療法を併用する手術法で、組織冷凍によって直接的に細胞を傷害し、さらに微小循環系障害による血流による放熱能力の低下による温熱効果の向上、及び細胞内小器官の破壊に伴うタンパク質の発現不能による耐熱性の獲得障害によって温熱影響を増大

させることができ、両手術法に比べ組織破壊性が大幅に向上すると予測される。これまでの研究において、凍結加温手術装置を試作し、その装置を用いて凍結加温手術を動物実験に供した結果、凍結手術や温熱療法単体と比較して組織破壊効果が向上した結果が得られている。しかし、これまでに開発した装置は凍結加温手術の実行可能性を確認するための試験機であったことから、実際の外科処置は想定していなかったために装置サイズが大きく、操作性がない構造であった。そこで本研究では、低侵襲手術が可能となる内視鏡手術への応用を視野に入れ、新たな機構による装置の小型化とその手術装置による凍結加温手術の組織破壊性を調べることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 凍結加温手術装置の作製

冷媒循環型の凍結加温手術装置

凍結加温手術装置は、手術用プローブ、冷媒チャンバ、冷媒循環用ポンプ及び温調機能付きの電源から構成される(図1)。手術用プローブには、電力供給によって発熱面及び吸熱面が生じるペルチェ素子(FPH1-3104NC、Z-max)を取り付けた。ペルチェ素子は、電流の向きを反転させることで発熱面と吸熱面が入れ替わる特徴があり、凍結手術時には吸熱面を対象物側、温熱療法時には発熱面を対象物側となるように電流の向きを制御することで、凍結手術と温熱療法が連続的に実施可能となる。手術用プローブの作製では、塩化ビニルパイプの端面に機械加工した上蓋を取付け、他端には市販ヒートシンクとペルチェ素子を固定した下蓋を取り付けて手術用プローブとした。ペルチェ素子への電力供給は、プログラマブル温調機能付きの正負両極性電源(TDU-5000A(R/G)、フェローテック)によって設定値に合わせ自動的に制御される。冷媒チャンバの作製では、チャンバ内の冷媒を冷却する目的で、スターリングクーラ(SC-UD08、ツインバード工業、以下SC)の先端冷却部に、2本の冷媒循環用パイプを接続したアルミニウムボックスを熱伝導性接着剤で固定し、このボックスを発泡断熱材で覆った。最後に、

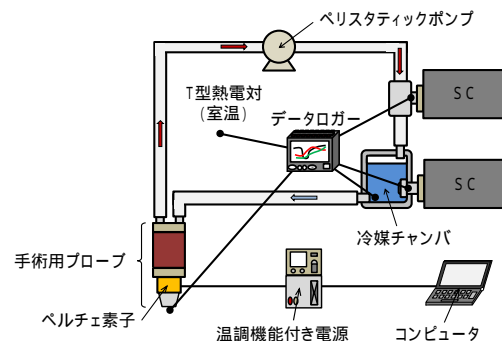


図1 凍結加温手術装置の構成

手術用プローブと冷媒チャンバをフレキシブルチューブで接続し、冷媒をペリスタティックポンプでペルチェ素子まで循環させることで凍結加温手術装置とした。

凍結加温手術装置の改良

3(1) で作製した凍結加温手術装置の冷媒循環回路内に、もう1台のSCを追加設置し、さらに冷媒循環回路にも断熱材を装着した。また、冷媒循環用のペリスタティックポンプをギアポンプに変更した。

(2)凍結加温手術装置の性能評価実験

作製した凍結加温手術装置における凍結加温手術の実行可能性を調査するため、以下の試験を実施した。

最低到達温度の測定実験

3(1)で作製した凍結加温手術装置における手術用プローブの最低到達温度を調べる目的で、無負荷条件にて実験を行った。測温実験では、冷媒として液体エタノール(800ml)を使用し、-60以下まで予冷した後、流量を約150ml/minとして循環させた。ペルチェ素子への電力供給は3.3Aで一定とした。実験中は、T型熱電対(ET-3、CHINO)とデータロガー(GL-220、GRAPHTEC)を用いて、手術用プローブ先端、SCの先端冷却部、冷媒チャンバの送液パイプ部における循環エタノール温度及び室温を30秒間隔で計測した(図1)。

温度サイクル実験

3(1)で作製した凍結加温手術装置の手術用プローブの温度推移において、冷却から加温までの連続的な温度サイクルの実行能力を調べるための実験を、無負荷条件で行った。温度サイクル実験では、電源専用の温度サイクル用ソフトウェアを用いて、22(30秒) - 40(120秒) 38(120秒) 45(120秒)を1サイクルとして、これを3回繰り返すように設定した。ペルチェ素子への電力供給は、冷媒を送液した1分後から開始し、冷却時には最大で3.3A、加温時には最大で-2.5Aとした。温度測定部位は3(2)と同様にし、10秒間隔で温度を計測した。

(3)動物に対する凍結加温手術の実施

作製した凍結加温手術装置を用いて、実験動物に対して凍結加温手術を実施した(北里大学保健衛生専門学院動物実験委員会、承認番号1506)。実験動物及び対象部位は、マウス(ICR、雄、10週齢、コントロール含め7匹)の生体肝組織とし、凍結加温手術条件は1サイクル法及び3サイクル法で実施した。実際の手術では、麻酔下でマウスを開腹し生体肝組織にプローブを押し付ける圧抵法を用いた。凍結加温手術条件の設定では、1サイクル法では25(120秒) - 50(180秒) 25(300秒)とし、-50(180秒)が終了した後に肝組織にプローブを圧抵した(n=3)。また、3サイクル法では、25(120秒) - 50(180秒) - 40(180秒)

60(60秒) - 40(180秒) 60(60秒) - 40(180秒) 60(60秒) 25(120秒)とし、-50(180秒)が終了した時点で肝組織にプローブを圧抵した(n=1)。なお、手術時には赤外線カメラによる手術部位の撮影も試みた。

1サイクル法における凍結加温手術の24時間後に肝組織を摘出した後に病理学的手法によって薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った後に光学顕微鏡下で組織の様相を観察した。

4. 研究成果

(1)凍結加温手術装置の作製

3(1)凍結加温手術装置の作製に従って作製し、手術用プローブ、冷媒チャンバ、冷媒循環用のペリスタティックポンプ、温調機能付き電源によって構成されている(図2)。

(2)凍結加温手術装置の性能評価実験結果

最低到達温度の測定結果

作製した凍結加温手術装置の性能を評価する目的で、手術用プローブの最低到達温度を測定した。実験中の温度測定結果において、冷媒循環を開始した時間を0秒としてプロットしたものを図3に示す。手術用プローブの先端温度は、冷媒循環を開始した後に低下し、ペルチェ素子に電力供給を開始した後は、さらに急速な温度低下が観察され、最低到達温度は -51.6 ± 5.4 となった(n=5)。その後は時間と共に温度が上昇し、実験終了時の30分後には-36で、最低到達温度との差は15.6であった。温度推移が安定したと考えられる20分時から30分時における温度の上昇速度は、0.33/分であった。また、冷媒温度とSCの先端冷却部温度は、冷媒循環を開始した後から上昇し、実験終了時点でそれぞれ-19及び-30まで上昇したことが観察された。20分時から30分時における冷媒の温度上昇速度は0.68/分であった。

次に、改良型の凍結加温手術装置における最低到達温度の調査では、改良前の装置と同様に、手術用プローブの先端温度は冷媒循環の開始と共に低下し、ペルチェ素子への電力供給によってさらに急速に温度が低下し、その後の最低到達温度は-68.6を記録した。その後も温度上昇は継

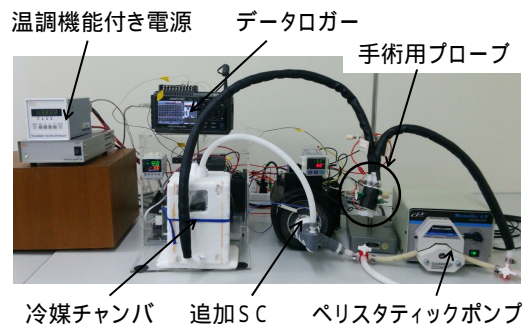


図2 凍結加温手術装置の写真

続したが、実験終了時においても -59 と、最低到達温度との差は 9.6 であった。20 分時から 30 分時にかけての温度上昇速度は、改良前の速度 (0.33 /分) のおよそ半分程度となる 0.16 /分であったことが確認された。また、冷媒及び SC の温度推移では、改良前と同様に冷媒循環の開始と共に温度上昇は観測され、実験終了時である 30 分後には、冷媒温度は -39 、SC 温度も -57 であった。冷媒における 20 分時から 30 分時での温度上昇速度は 0.22 /分であり、改良前の温度上昇速度 (0.68 /分) のおよそ 1/3 倍と、改良前と比較して緩やかになったことが確認された。これらの結果は、本手術装置によって凍結手術を実行できる可能性を示唆するものであった。

温度サイクル実験における温度推移

温度サイクル実験における手術用プローブの温度推移を図 4 に示す。手術用プローブ温度は、-60 以下の冷媒が循環し始めた際に一時的に低下したが、その後は設定サイクル条件に従ってプローブ温度が冷凍から加温条件まで連続的に変化することが観測された。条件設定に対する手術用プローブの設定時間内における平均温度は、1 サイクル目の -40 、38 、45 に対しては、それぞれ -39.8 ± 0.6 、 38.4 ± 0.4 、 44.8 ± 1.0 であり、2 サイクル目の -40 、38 、45 に対しては、それぞれ -40.0 ± 1.3 、 38.3 ± 0.5 、 45.0 ± 0.5 、

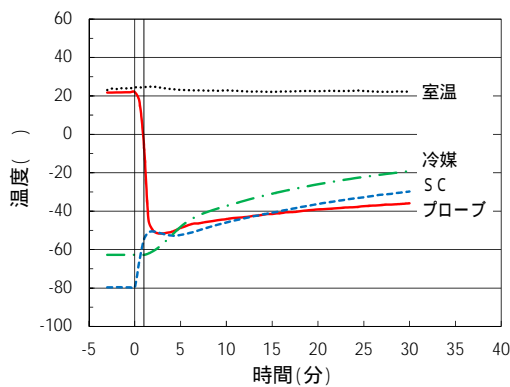


図 3 手術装置各部の温度推移

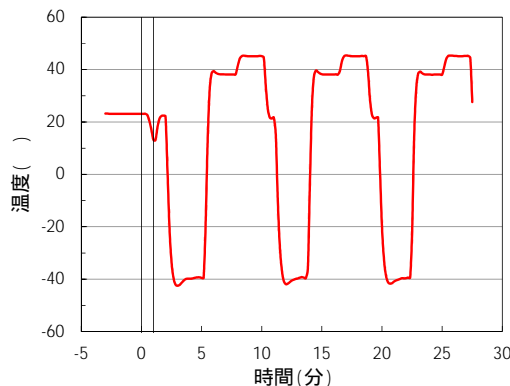


図 4 温度サイクル試験時の温度推移

3 サイクル目の -40 、38 、45 に対しては、それぞれ -40.2 ± 0.9 、 38.3 ± 0.3 、 45.0 ± 0.4 であった。これらの結果は、本研究で作製した凍結加温手術装置が凍結手術並びに温熱療法に要求される温度帯である -20 以下から 43 以上を達成できる性能を有することを示しており、また凍結手術と温熱療法を連続的に複数回併用実施できることも明らかとなった。以上の結果を踏まえ、本手術装置を用いた凍結加温手術を実験動物に対して実施した。

(3) 実験動物に対する凍結加温手術の実施

温度測定結果

実験動物に対する凍結加温手術中の温度変化を図 5 に示す。これまでの評価実験と同様に、手術用プローブを -50 まで冷却した後、マウスの生体肝組織に圧抵した結果、手術用プローブが圧抵されているマウス肝組織の表面温度が急速に低下した。しかし、5 付近から温度の低下速度が緩やかになり、さらにおよそ -3 以下に到達した後はわずかな温度低下となり、肝表面の最低温度は -5.0 であった。その後は手術用プローブの温度上昇と共に肝表面温度も上昇し、60 (180 秒) の設定温度に対して手術用プローブ温度が 59.0 ± 0.3 であり、その加温時間内における肝組織の表面温度は 50.6 ± 0.6 であった。また、3 サイクル法での凍結加温手術では、1 サイクル目の凍結時及び加温時の最低・最高温度は、それぞれ 3.8 、49.3 であり、2 サイクル目の最低・最高温度は、それぞれ -21.8 、46.9 、3 サイクル目の最低・最高温度は、それぞれ -20.4 、47.2 であることが観察された。1 サイクル法及び 3 サイクル法における 1

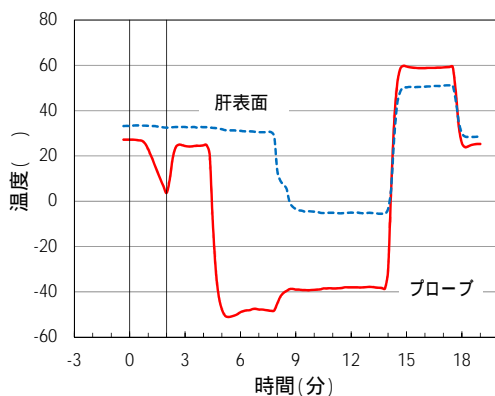
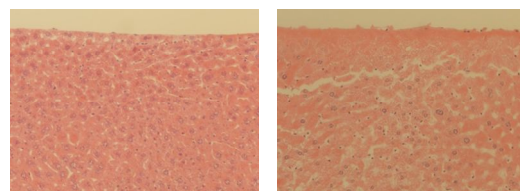


図 5 動物実験における温度推移



a. コントロール

b. 手術群

図 6 HE 染色後の組織の様相

サイクル目の凍結時の最低到達温度が、凍結手術に要求される - 20 に到達していなかったが、3 サイクル法の 2 サイクル目以降では - 20 を下回った結果であった。凍結手術の研究において、細胞や組織破壊性の面から冷凍と融解を繰り返す反復法（サイクル法）が有効とされており、臨床においてもサイクル法が実施されている。本実験において 1 サイクル目の組織冷凍では、十分な温度低下が得られず、2 サイクル目以降では急激に温度が低下するといった現象が観察されたことから、細胞破壊に有効である反復法と合致する結果であったと考えられる。2 回目以降の凍結で温度が低下する理由としては、1 回目の凍結や加温による微小循環系障害による放熱能力の低下などが考えられたため、近赤外線カメラで手術部位を撮影したが、血流の動態が詳細に把握できなかったため、その点については今後の検討課題とした。

凍結加温手術後の組織の様相

病理学的手法によって作製した肝組織の HE 染色標本の観察結果を図 6 に示す。コントロール群では正常な状態が観察された。一方の凍結加温手術群では、核の濃縮や消失、細胞の脱落、染色性の低下、うっ血等が観察され、細胞が破壊され壊死している様子が確認され、この結果は本研究で作製した凍結加温手術装置に組織破壊性があることを示している。

最後に、本研究のまとめとして、作製した凍結加温手術装置は、1：電力供給のみで凍結加温手術が実行可能であること、2：冷凍・加温条件を事前に設定しておくことで自動的に、かつ精密に温度制御が可能であること、3：凍結加温手術を実施した肝組織には細胞の壊死が観察されたことから、組織破壊効果を有していることが明らかとなり、凍結加温手術装置を実現できる可能性が示唆された。本研究では、冷媒にエタノールを使用し、フレキシブルチューブで冷媒チャンバと手術用プローブを接続している構造であることから手術用プローブを手で持つことも可能であり、試作機と比べて操作性は向上したと考えられる。さらに、本研究で使用したチューブをより細いものへと置換することや手術用プローブ先端の吸熱能力の向上を含めた再設計によって、内視鏡に対応できるダウンサイジングに向けても十分な可能性が存在すると考えられる。しかしながら、凍結時や加温時における冷却・加温速度や手術中における冷媒の温度上昇に対する更なる対策や改良も必要であることが判明した。しかしながら、本手術装置の内視鏡への応用展開が可能となれば、新たな低侵襲療法の発展が期待されるだろう。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

高橋大志、田口洋介、相田武則、冷媒冷却の性能向上を目的とした凍結加温手術装置の改良、北里大学保健衛生専門学院紀要、査読有、第 21 巻、2016、27-35

高橋大志、田口洋介、相田武則、エタノール冷媒を用いた凍結加温手術装置の基礎的検討、北里大学保健衛生専門学院紀要、査読有、第 20 巻、2015、19-25

〔学会発表〕(計 6 件)

高橋大志、田口洋介、相田武則、凍結加温手術装置における温度サイクル性能の評価、第 55 回日本生体医工学会大会、2016 年 4 月 27 日、富山国際会議場・富山市民プラザ(富山県富山市)

高橋大志、田口洋介、相田武則、凍結加温手術装置の改良による冷媒への温度影響、第 24 回魚沼シンポジア 2015 年 12 月 5 日、北里大学保健衛生専門学院(新潟県南魚沼市)

TAKAHASHI D, TAGUCHI Y and AIDA T, Fabrication of the combination treatment system of cryosurgery and hyperthermia treatment using Peltier device with ethanol circulation as a coolant, The 8th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (AP Biomech 2015), Sep 19, 2016, Hokkaido University, (Sapporo, Japan)

高橋大志、田口洋介、相田武則、冷媒循環型の凍結加温手術装置の作製、第 54 回日本生体医工学会大会、2015 年 5 月 8 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

高橋大志、田口洋介、相田武則、冷媒循環型の凍結加温手術装置の試作、第 23 回魚沼シンポジア、2014 年 11 月 15 日、北里大学保健衛生専門学院(新潟県南魚沼市)

高橋大志、田口洋介、外山竹弥、ハンドピース型凍結加温手術装置の作製と性能評価、第 53 回日本生体医工学会大会、2014 年 6 月 24 日、仙台国際会議場(宮城県仙台市)

6．研究組織

(1) 研究代表者

高橋 大志 (TAKASHASHI, Daishi)

北里大学・北里大学保健衛生専門学院・臨床工学専攻科・講師

研究者番号：20549943