

腹腔鏡下温度制御システムを用いた
悪性腫瘍に対する光温熱治療技術の開発

はら だ まなぶ
原 田 学

(消化器病学専攻)

防衛医科大学校

令和4年度

目 次

第 1 章	序論	1 頁
第 2 章	温度制御型腹腔鏡温熱治療システムの開発	
第 1 節	背景と目的	5 頁
第 2 節	材料と方法	6 頁
第 3 節	結果	10 頁
第 3 章	開発した腹腔鏡下温度制御型レーザー光温熱治療 (TC-LTT) システムを用いた腫瘍モデルラットでの治療効果の検証	
第 1 節	背景と目的	12 頁
第 2 節	同所性肝癌モデルラットでの治療効果の検証	
第 1 項	背景と目的	12 頁
第 2 項	材料と方法	13 頁
第 3 項	結果	17 頁
第 3 節	転移性大腸癌モデルラットでの治療効果の検証	
第 1 項	背景と目的	19 頁
第 2 項	材料と方法	19 頁
第 3 項	結果	22 頁

第4章 全体の考察	25頁
第5章 結論	30頁
謝辞	31頁
略語一覧	33頁
引用文献	34頁
図表	41頁

第1章 序論

(1) がん治療としての温熱療法

がん細胞は 42 °C に加温すると細胞質の局所的な膨張、細胞膜の破裂が惹起され、細胞死が誘導される(1, 2)。一方、正常細胞では 42 °C に加温しても細胞の機能は温存される(3)。また、約 50 °C に加温されたがん組織では凝固壊死がしばしば観察されるが(4)、これはがんの組織構造の粗雑さに起因する血管拡張機能不全に由来すると考えられている(5)。このようにがん細胞は正常細胞に比して加温に対して脆弱であるという特徴がある。この現象は古くから知られており、19 世紀には、高熱を伴う丹毒患者の顔面腫瘍が縮小したこと(6)や、細菌抽出物の投与により高熱を誘発されたがん患者の腫瘍が縮小したことなどが報告されている(7)。このような加温を利用したがん治療は温熱療法（ハイパーサーミア）と呼ばれ、1970 年代には、本邦でも高周波誘導加温を原理とする温熱技術が開発され、体内深部の悪性腫瘍に対する温熱療法として現在でも様々な臓器（乳房、肝臓、肺、骨、頭頸部など）の悪性腫瘍に臨床使用されている(4)(8)(9)。

(2) 温熱治療で用いられる加温技術

温熱療法を行うアプローチ法としては、腫瘍に電極プローブを穿刺して加温する方法と非観血的に加温する方法がある。前者は腫瘍病変もしくはその近傍に電極プローブを穿刺して組織内加温する方法であり、腫瘍組織のみを正確に加温することができる利点があるものの、病変の穿刺を伴うために、腫瘍細胞を散布する可能性や穿刺の過程で他臓器や血管損傷などの危険性を孕む。後者は体外などから高周波誘導加温や集束超音波を使用して非観血的に加温する方法で、腫瘍細胞の散布や穿刺に伴う危険性はないが、皮膚、皮下脂肪、筋肉などの

体壁を経由して加温するため、深部の病変への選択的な加温が難しいことや、皮膚の熱傷の問題がある(10) (11)。

病変の選択的な加温には、指向性と集光性に優れ、生体組織を局所的に加温することが可能なレーザーが有用である。1963年に Goldman らによって波長 694 nm のルビーレーザーを用いた腫瘍焼灼治療が世界で初めて行われ(12)、1980 年代に入ると、生体透過性に優れた近赤外光を発振するレーザーによる光温熱治療によって、5mm 程度の厚さの腫瘍も治療できることが証明された(13) (14)。1990 年代に入ると、より効率の良い光温熱治療として、近赤外光に反応して熱を発する光増感剤を用いた研究が行われるようになり(15)、レーザー光温熱療法の関連技術の開発は現在も活発に行われている(16)。

レーザーを用いた光温熱治療においても高周波誘導加温と同様に①標的組織外からの非接触型照射による加温と②標的組織内へ光ファイバープローブを刺入する接触型照射による加温の 2 通りの方式がある。実際に、非接触型加温では気道癌や子宮頸部癌に(17)、接触型加温では乳癌(18)、肝癌(19)、脳脊髄腫瘍(20)に対する治療が報告されている。しかし、この場合においても腫瘍散布や穿刺の偶発症を回避する「非接触性」と病変部位を正確に加温する「病変選択性」が重要であることに変わりはない。

(3) 温熱治療に求められる測温の重要性

温熱治療に際して加温が不十分であった場合、細胞死が誘導される温度に達しない。逆に加温が過剰であれば腫瘍組織のみならず正常組織の損傷を誘発する。したがって、温熱治療は病変温度が適切な温度で推移しているか、モニタリングすることが重要である。

温熱治療での病変部位の測温方法においても、腫瘍内もしくは腫瘍近傍に熱

電対プローブを挿入する方法や画像を用いた非接触的な方法がある(21)。

熱電対プローブを挿入する方法では、腫瘍細胞の散布の可能性に加えて一点のみの計測法であるため腫瘍内の温度分布を知ることは難しい。一方、非接触的な方法としては CT(22)や MRI(23)、超音波(24)を用いた測定法があるが、CT では被爆を伴うこと、MRI ではタイムラグ (4.5 秒) を生じること、超音波では体内気泡による音響効果で温度誤差が生じるなど、それぞれに問題点がある。

(4) 効果的な温熱治療に求められる要件と本研究開発の目的

前述の如く、理想的な温熱治療の要件として次の 3 点が重要であると考えている。

- 腫瘍を選択的に治療できること
- 非接触的に治療が可能なこと
- リアルタイムな測温により適切な加温が可能であること

上記要件を満たす温熱治療技術として、我々の研究グループは非接触型のレーザー光温熱にサーモグラフィによる非接触的な温度モニタリング機構を具備した方法論を採用し、実臨床に応用し得る温熱治療技術の確立を目指して関連技術の開発を進めてきた。我々の研究グループは、サーモグラフィによる温度情報をもとにレーザー出力を変動させることで病変表面温度を一定値に維持することができるシステムを開発し(25)、実験動物の皮下腫瘍に対して体外からの非接触的な加温と温度モニタリングが可能で腫瘍を選択的に治療できる新しいがん治療方法を確立した(25, 26)。

しかしながら、このシステムは体表の病変をターゲットとした治療システムであったため、体内深部の病変には適用できなかった。

そこで本研究では、効果的な温熱治療に求められる 3 つの要件に加え、低侵

襲な手法で治療可能な体内深部の腫瘍病変に対する新たな温熱療法システムを
確立することを目的とした。

第2章 温度制御型腹腔鏡温熱治療システムの開発

第1節 背景と目的

我々の研究グループは以前より、治療対象病変の加温する温度を一定に保ちつつ、非接触で温熱治療ができるシステムの確立を目指して開発研究を進めてきた。そして2017年に、サーモグラフィによる非侵襲でリアルタイムに2次元の温度計測を行いつつ、レーザー出力をフィードバック制御することで治療対象病変表面の温熱温度を誤差 ± 0.1 °Cの範囲で一定に保つことができるレーザー光温熱治療システムの開発に成功した(25)。しかし、サーモグラフィカメラのサイズは一般的に数 cm 大以上であるため、体腔深部の病変を治療する際は、開腹による温度モニタリングを行う必要があり、低侵襲な温熱治療という目的を達成することはできない。

そこで我々の研究グループは、腹腔内の病変に対する低侵襲な温度制御型レーザー光温熱治療の臨床応用を目的として、腹腔鏡スコープに超小型のサーモグラフィセンサを搭載し、腹腔鏡下に操作できる自動温熱制御型システムの開発に着手した。

腹腔鏡下自動温度制御型レーザー光温熱療法には次の4つのメリットがあると考えられる。

- ① 病変への低侵襲的アプローチが可能
- ② 治療標的とする臓器およびその周囲の観察が可能
- ③ レーザー出力を制御することにより、設定した温度で安定した温熱治療が可能
- ④ 腫瘍の散布や穿刺による偶発症を回避することが可能

腹腔鏡下手術では、二酸化炭素で気腹し腹腔内における施術のための広い操

作空間を有する。そのため、腹腔鏡スコープ先端を対象臓器の近傍まで容易に導くことができ、横隔膜下や骨盤腔などにおいては開腹では得ることが難しい良好な視野での観察が可能となる。そのうえ、観察対象に臓器などが介在したとしても鉗子操作などで容易に排することができ、標的外臓器への事故的なレーザー照射の確率を低減し、標的腫瘍への非接触的な持続的治療を安全に行うことができる。

以上のように腹腔鏡下自動温度制御型レーザー光温熱療法は、低侵襲で合併症の少ない治療法として潜在的有用性があり、がん治療の新たな選択肢となり得る可能性がある。

第2節 材料と方法

(1) 温度制御型腹腔鏡レーザー光温熱治療 (TC-LTT) システムの概略

TC-LTT システムは、後述するサーマル腹腔鏡スコープ、近赤外レーザー照射装置 (BWF2 B&W Tek)、マイクロコントローラー (Arduino) から構成される (図 1A)。さらに気腹装置 (PNEUMO SURE, Stryker) と光源装置 (L10000, Stryker) (図 1B) により腹腔鏡下 TC-LTT システムが完成する。

(2) サーマル腹腔鏡スコープの構造・制御

近赤外光照射部位における照射中の腫瘍表面温度を一定に保つために、温度情報をフィードバックしてレーザー照射出力を制御する回路を搭載したサーマル腹腔鏡スコープを製作した。

市販されている腹腔鏡用外径 15 mm トロッカーに挿入が可能となるように、外径 14 mm の円筒状の筒体の先端に超小型赤外線サーモグラフィセンサー (HTPA32 × 32d L2.1, Heimann Sensor, Germany)、硬性鏡 (serial No. 11499,

新興光器, Japan)、光ファイバー鉗子孔を搭載した (図 2)。サーモグラフィセンサで得られた熱画像および CMOS カメラ (EO-1312C, Edmund optics, USA) で得られた明視野画像は、計測・制御用 PC (GPD, MicroPC, Windows10, Japan) のディスプレイ上にそれぞれ出力される (27)。超小型赤外線サーモグラフィセンサは、直径 9.14 mm、最大フレームレート 8.3 fps、空間解像度 32×32 画素で温度範囲 $20 \sim 80$ °C で画素値 $0 \sim 255$ の線型に対応するように設定した。照射対象の温度を一定に保つために、サーモグラフィセンサで取得される熱画像における最高温度情報をもとにレーザー照射出力値を自動調整する機構とした。算出されたレーザー照射出力値はマイクロコントローラーを経由してレーザー照射装置に送られ、レーザー光はファイバースコープ (05533-1, Ceramoptec) を介して照射される (図 3)。

施術者が、対象部位にレーザー照射が行われていることを認識するため、熱画像 (サーモグラフィセンサのディスプレイ) 上では、最も高い温度を呈する画素を緑点として表示させ、そのポイントを中心とする周囲 9×9 画素で形成される正方形の頂点の 4 画素を青点として表示させた。そして、レーザー照射開始と同時に最高温度点の表示が緑色から赤色に切り替わるように設計した (27)。

(3) サーマル腹腔鏡スコープの近接視野限界の検証

今回構築したサーマル腹腔鏡スコープは試作原型器であるために構成が単純になるよう、硬性鏡、サーモグラフィセンサ、レーザー鉗子孔それぞれの長軸が平行となる構造とした (図 4A 上)。そのためスコープ先端を観察対象に近づけていくと (図 4A の距離①→距離③、図 4B→4C)、レーザー照射部位、サーモグラフィセンサの視野、CMOS の視野が一致しなくなることが予想された。腫瘍が CMOS の視野から外れると腫瘍を捕捉できない。また、レーザー照射

部位がサーモグラフィセンサの視野から外れると温度の制御が不可能である。したがって、それぞれの視野が重なっている状態を保てる最短のスコープ先端－観察対象間距離を知る必要があると考え、サーマル腹腔鏡スコープの近接距離限界を以下に示す方法で調査した。

観察対象ファントムとして、45 °Cに設定した 50 × 100 mm のシリコンラバーヒーター (SR100-40-50-100, Three High Co. Ltd., Japan) 上に同サイズで 5 mm 目の方眼紙を密着させたものを作製した。なお方眼紙にはあらかじめ 2 か所の円穴を開けておいた (直径 5 mm と直径 2 mm、離間距離 15 mm) (図 5)。直径 5 mm 穴はレーザー照射による温度上昇部位のファントムとするために設け、直径 2 mm 穴は CMOS 視野とサーモグラフィセンサ視野それぞれの撮像距離を把握するために設けた。スコープ先端から観察対象ファントムまでの距離を変化させ (20, 25, 30, および 35 mm)、ディスプレイに表示される画像を検証した。

(4) TC-LLT システムの温度制御能の検証

開発した TC-LLT システムの温度制御の性能を確認するために、同所性肝癌モデルラット (第 3 章第 2 節 参照) を用い、以下の検証を行った。

① 体外 (大気下) での TC-LLT システムの温度制御能の評価

モデル動物の腹腔内に挿入する前段階として、TC-LLT システムの動物体外での温度制御能を評価した。

ファイバースコープから出力されるレーザー光はファイバーの開口角に呼応する角度をもって円錐状に広がる特性を持つ。また、単位面積あたりの照射エネルギーはファイバー先端と照射対象との距離の 2 乗に反比例する特性を持つ。つまり、ファイバー先端が照射対象から離れるほどに光はより広い範囲を

照射する一方、対象に吸収される単位面積あたりの照射エネルギーは減弱する。したがってレーザー光温熱治療を行う場合、治療部位とファイバー先端の距離を一定に保ち、治療対象に吸収される単位面積あたりの照射強度も一定となるよう維持することが、治療対象の温度維持には望ましいと考えられる。しかし実臨床を想定すると、臓器位置の呼吸性変動や術者の手振れ等により、ファイバー先端と治療対象との距離が変動することが想定される。そこで、ファイバー先端－照射対象間の距離を変化させた際の温度制御（レーザー照射出力の自動調整）が適切に実行されるか否かを調べるために以下の検証を行った。

肝癌モデルラットを全身麻酔下に開腹し、肝腫瘍が形成されている肝左葉を体外に露出させた（第3章第2節 参照）。肝腫瘍の直上にサーマル腹腔鏡スコープを配置し、設定温度（70℃）の条件でレーザー光温熱を行った。腫瘍表面温度が70℃に到達した後、腫瘍からサーマル内視鏡スコープ先端との距離（20～30 mm）を変化させ、その際のサーマル腹腔鏡スコープの温度制御能を検証した。温度測定と比較対象に高解像度赤外線サーモグラフィセンサ（FSV-2000, Apiste Corp., Japan）を用いた（図6）。

② 腹腔内での TC-LLT システムの温度制御能の評価

気腹時の腹腔内は湿度 100 %、温度 36℃の環境となるため、腹腔内でのスコープ使用サーマル腹腔鏡スコープは体外使用時と異なる挙動を示すことが予想される。そこで予備検討として、スコープのラット腹腔内使用下における温度制御能を評価する目的で、以下の検証を行った。

肝癌モデルラットを全身麻酔下に小開腹し、15 mm トロッカー（VersaOne™15mm, COVIDIEN）を挿入後に二酸化炭素（3 mmHg）で気腹させ、サーマル腹腔鏡スコープをラット体内に挿入し、腹腔内での温度制御

下レーザー照射を行い、自動温度制御能を測定・評価した。

第3節 結果

(1) サーマル腹腔鏡スコープの近接視野限界に関する検証

図7に示すようにレーザー照射部位を模した5 mm 穴は、明視野（CMOS 画像）画像上の0～3 時方向に描出され、サーマル腹腔鏡スコープの画像（熱画像）上では左側上方に表示された。ラットの腹腔内のサイズを想定し、ファントムスコープ先端間距離を35 mm から近接させ25 mm に達したところで、熱画像において5 mm 穴の像が欠けた（図7、25 mm の写真）。さらに、25 mm より近接させると最高温度点（緑点）は熱画像範囲外となった（図7、20 mm の写真）。上記の観察より熱画像において最高温度点を確実に熱画像内に捉えられるためには、ファントムスコープ先端間距離を30 ± 5 mm に保つことが必要であることが判明した。

そこで以降の実験では、体内でレーザー照射する際、①熱画像において最高温度点が消失しないようスコープ先端と治療対象の距離を約30 mm に保つように留意すること、②スコープを回転させて、治療対象を明視野像の常に0～3 時方向に描出されるよう留意することとした。

(2) 体外（大気下）での温度制御能（任意の温度維持機能）

図8にサーマル腹腔鏡スコープのサーモグラフィセンサで計測された最高温度の推移、高解像度サーモグラフィカメラで計測された最高温度の推移、そしてレーザー出力（橙色点）の推移を示す。設定温度に到達後のサーマル腹腔鏡スコープのサーモグラフィセンサの温度表示（青色点）は70 °C前後、高解像度サーモグラフィカメラの温度表示（灰色点）は62 °C前後であった。この約

8 °Cの差は、両サーモグラフィの示す温度は概ね同期して推移していたことから、サーマル腹腔鏡のサーモグラフィセンサの温度の初期校正（既知の温度と測定機器の測定値の微調整）が不十分であったことによると推察された。しかし、サーマル腹腔鏡スコープ先端と腫瘍との距離の変動を生じさせる操作を計6回（実験開始から220秒後、270秒後、320秒後にそれぞれ2回ずつ）施行したところ、サーマル腹腔鏡スコープのサーモグラフィセンサの温度表示が上下に変化するものの、上記操作のインターバルの区間では自動温度制御機構により設定温度に維持できることがわかった。

（3）腹腔内での温度制御能（任意の温度維持機能）

設定温度 50 °C、維持時間 300 秒と設定し、温度制御能を検証した。図 9A に示すように、最高温度（青色点）はレーザー照射開始から 22.8 秒で 50 °C に到達し、それ以降レーザー出力の調整が適切に行われ（橙色点）、設定温度（50 °C）に維持されていた。設定温度に到達してからレーザー出力が停止されるまでの間（277.6 秒）における温度分布は 50.2 ± 1.06 °C（平均 ± 標準偏差）であった。（図 9B）。以上から、TC-LTT システムは腹腔内使用においても適切に作動することが確認できた。

第3章 開発した腹腔鏡下温度制御型レーザー光温熱治療（TC-LTT）システムを用いた腫瘍モデルラットでの治療効果の検証

第1節 背景と目的

温熱治療における治療の成否に関わる因子として、加温温度、加温時間等が挙げられるが、それに加えて 43 °C 等価加温時間（温度と加温時間を因子として 43 °C の加温時間に換算した熱線量の推計値）が重要であると報告されている(28)。一方で、43 °C 等価加温時間に基づいた加温条件で治療を行っても病変温度が設定値に達していなかった場合には、治療が不十分となることが報告されている(29)。これまでの我々の研究グループの検討により温熱療法の成否には、加温時間よりも加温設定温度の維持が重要であると考えている(26)。

我々の研究グループが開発した TC-LTT システムは、前述のようにラット腹腔内において治療対象を一定の設定温度で加温・維持できた。そこで、異なる細胞株と異なる腫瘍モデル動物を用いて、TC-LTT システムの温熱治療の有効性を検証した。

第2節 同所性肝癌モデルラットでの治療効果の検証

（1）背景と目的

TC-LTT システムの腹腔内がん病変への治療有用性を検証するため、はじめに同所性肝癌モデルでの検討を行った。その理由は、対象臓器を管腔臓器とした場合には、物理的エネルギーによって穿孔などの臓器損傷が発生しやすい上に腫瘍モデルの作成が難しいことから、実質臓器を用いた方が良いと考えた。腹腔内の実質臓器として肝・腎・脾が挙げられるが、腎・脾は後腹膜下に位置するので、腹腔鏡下観察を行うためには剥離・授動操作が必要となり操作・手

技が煩雑となる。一方、肝は腹腔内臓器であるため、腹腔鏡下観察に要する操作・手技は容易である。加えて肝臓は機能的予備力に優れた臓器であり、80 %の体積切除にも耐えうるとの報告があることから(30)、温熱治療での肝障害に伴う致死的な合併症を引き起こさず、安全に検証できると考えられた。

そこで本実験では対象臓器として肝臓を選択して、同所性肝癌モデルラットの作成を行い、開発した非接触型の TC-LTT システムの有用性を検証した。

(2) 材料と方法

① 同所性肝癌モデルラットの作成

本システムの検証に適した腫瘍モデルの要件として次の3点を考えた。

- (a) 局所（腫瘍移植部位）で増殖すること
- (b) 転移の性質を有さないこと
- (c) 生着率が75 %以上

(a)、(b) の理由としては、これらを満たせば治療効果の評価を局所増殖の観察で簡便に行えるためである。また、(c) の理由は、動物を用いた実験における基準理念である「3R」の原則の一つである Reduction（削減）を満たすためである。本検討では先行論文を参考として生着率75 %以上を目指した(31)。

そこで先行論文を参照に、検証に適したモデル作成のため、以下の2種類のラット肝細胞癌細胞株を用いて同所性肝癌モデルを作成した(31)。

i. 細胞株

McA-Rh7777 (ATCC, CRL-1601, Manassas, VA, USA) は2-フルオレニルフタラム酸を食餌で与え続けて発癌したものを分離して樹立させた細胞株で、N1-S1 (ATCC, CRL-1604, Manassas, VA, USA) は4-ジメチルアミノアゾベ

ンゼンを食餌で与え続けて発癌したものを分離して樹立させた細胞株である (32)。

いずれの細胞の培養には、Dulbecco's Modified Eagle medium 培地に 10 % FBS、ペニシリン (100 U/ mL) (Thermo Fisher scientific KK., Japan)、ストレプトマイシン (100 μ g/ mL) (Thermo Fisher scientific KK.)、アムホテリシン B (0.25 μ g/ mL) (Sigma-Aldrich Inc., Japan) を添加したものを使用し、37 °C、5 %二酸化炭素、95 %空気のインキュベーターで培養した。

ii. 使用動物

8 週齢雌性の BUF/ MnA ラット (NBRP-Rat., Japan) および 8 週齢雄性 Sprague Dawley (SD) ラット (Japan SLC Inc., Japan) を用いた。動物は防衛医科大学校動物実験施設の SPF 区域内にて飼育した。以下のすべての動物実験は防衛医科大学校の動物実験倫理委員会で承認され、実験動物の取り扱いには動物実験ガイドラインに基づいて行った (承認番号 : 19009)。

iii. McA-Rh7777 細胞を使用したモデル

BUF/ MnA ラットに混合麻酔薬 [メデトミジン (0.3 mg/ kg) (Nippon Zenyaku Kogyo Co. Ltd., Japan)、ミダゾラム (4.0 mg/ kg) (Sandz Corp., Japan)、ブトルファノール (5.0 mg/ kg) (Meiji Seika Pharma Co. Ltd., Japan) の 3 種混合麻酔] を腹腔内注射し、小開腹の後、肝左葉を体外に導出させ、リン酸緩衝生理食塩水に懸濁した 20 μ L の McA-Rh7777 (5.0×10^4 cells/ μ L) 細胞浮遊液を肝被膜下に 30 G 針にて注入した。

iv. N1-S1 細胞を使用したモデル

SD ラットに上記同様の麻酔および開腹手技を行い、リン酸緩衝生理食塩水に懸濁した 20 μL の N1-S1 (3.5×10^4 cells/ μL) 細胞浮遊液を肝被膜下に 30 G 針にて注入した。

② 同所性肝癌モデルラットに対する治療効果に関する検討

i. 設定温度と熱エネルギー深達度に関する検討

腹腔鏡下レーザー光温熱治療は原理上、腫瘍表面から近赤外光を照射して加温するため、治療可能な組織の深さ（治療深度）をあらかじめ検証しておく必要がある。そこで予備実験として、同所性肝癌モデルラットを用いて、加温設定温度と治療深度との関係を調べた。

本検討では、加温設定温度として 100 $^{\circ}\text{C}$ での検証を行うために、我々の研究グループが以前報告した温度制御型近赤外光 (TC-NIR) 照射システムを用いた(25)。細胞移植して 2 週間後の同所性肝癌モデルラットに、全身麻酔下に腹部に約 5 cm の切開創を置いて肝腫瘍を露出し、TC-NIR 照射システムを用い、設定温度一定の条件下に 300 秒間（最大出力 3 W/ cm^2 ）、光加温（照射波長 808 nm）を行った。波長 808 nm の近赤外光を用いた理由は、近赤外領域の光温熱では多くの研究がこの波長領域のレーザーを用いて実施されており、結果の比較検証可能な報告が数多く存在するためである(33)。加温設定は 45, 50, 60, 70, 80, 100 $^{\circ}\text{C}$ の 5 通りとした。TC-NIR 照射システムの構成は図 10 に示すように、サーモグラフィカメラ（フレームレート：50 fps、空間解像度：384 \times 288 画素）で測温し、その温度情報を基にマイクロコントローラーを通してレーザー照射（レーザー照射装置 BWF2 B&W Tek）の出力が調整される。

治療介入後 2 日目に犠死させ、肝臓を摘出し 10 %ホルムアルデヒド液で固定した。レーザー照射軸に沿って組織切片を切り出し、病理組織標本（ヘマトキシリン・エオシン染色：HE 染色）を作成して、壊死組織の厚さを測定した。

ii. 腹腔用 TC-LTT システムの設定温度（70 °C）に維持されていることの検証

同所性肝癌モデルラットを全身麻酔下に小開腹し、15 mm トロッカーを挿入後に二酸化炭素（3 mmHg）で気腹させ、サーマル腹腔鏡スコープをラット体内に挿入した。設定温度（70 °C）で肝腫瘍に対してレーザー照射を行い、腹腔内で 70 °Cでの自動温度制御能を検証した。

iii. 腹腔用 TC-LTT システムの抗腫瘍効果に関する検討

腫瘍を移植して 1 週間後の同所性肝癌モデルラット（SD ラット、N1-S1）を用いた。実験動物を無作為に 2 群に分けた（①治療群（n = 6）、②対照群（n = 7））。全身麻酔後に腹部に約 1.5 cm の切開創をおいて、15 mm トロッカーを腹腔内に挿入した。二酸化炭素で気腹（気腹圧 3 mmHg）し、サーマル腹腔鏡スコープを挿入した。治療群に対しては近赤外光照射（808 nm）で 70 °C、300 秒の加温設定で温熱治療を行った。維持加温時間は、ラジオ波焼灼術の研究で用いられた文献(34) を参考にして 300 秒とした。治療 1 週間後に犠死させ、照射肝葉を摘出し 10 %ホルムアルデヒド液で固定し、病理組織標本（HE 染色）を作成した。対照群は肝腫瘍を観察するのみで終了し、治療群と同様に病理組織標本を作成した。

iv. 腫瘍径計測

腫瘍のサイズを治療前および腫瘍摘出時にデジタルノギスで測定し、腫瘍の推定体積 [(縦サイズ) × (横サイズ) × (高さサイズ) × $\pi/6$] を算出した。

v. 統計学的手法

統計分析は Mann-Whitney の U 検定を適応した。統計パッケージは JMP® 14 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いた。p 値が 0.05 未満のときに統計学的に有意と判断した。

(3) 結果

① 同所性肝癌モデルラットの作成

i. BUF/ MnA ラットへの McA-Rh7777 細胞株移植

腫瘍生着率は、移植後 7 日で 14.3 % (2/ 14 匹)、移植後 21 日で 0 % (0/ 4 匹) であった。先行論文で報告されていた生着率 (移植後 21-25 日で生着率 92 % (11/ 12 匹)) とは乖離があった(31)。

ii. SD ラットへの N1S1 細胞株移植

腫瘍生着率は、移植後 7 日で 93.8 % (15/ 16 匹)、移植後 21 日で 77.8 % (7/ 9 匹) であった。先行論文で報告されていた生着率 (移植後 21-25 日で生着率 75 % (12/ 15 匹)) と同等であった(31)。犠死時には移植部位以外の腫瘍の発生を認めなかった。

上記 2 種類の同所移植肝癌モデルを作成した結果、BUF/ MnA ラットに McA-Rh7777 細胞株を移植した場合は、移植 1 週間目の腫瘍生着率が低く、さらに移植 3 週間目では腫瘍が消退することが判明した。SD ラットに N1S1 細胞株を移植した場合は移植 3 週間目でも腫瘍生着率が高いことが判明した。

以上の結果より、以降の検証には SD ラットに N1S1 株を移植して作成する同所性肝癌モデルを用いることにした。

② 同所性肝癌モデルラットへの治療効果に関する検討

i. 設定温度と熱エネルギー深達度

加温設定温度の違いによる治療深度を検討するため、TC-NIR 照射システム（図 10）を用い加温設定温度を変化させ、病理組織標本での壊死組織の深さを測定した。

その結果、設定温度 45 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C、100 °Cでの壊死深達長の中央値（四分位範囲）は、それぞれ 4.1（3.8-6.5）、5.2（3.2-6.5）、6.0（3.9-7.6）、6.4（5.3-6.9）、9.3（7.9-10.2）、および 7.5（5.1-9.0）mm であった（図 11）。同所性肝癌モデルラットへの治療効果に関する検討においては、同所性肝癌モデルにおける腫瘍サイズ（腫瘍移植後 1 週間は）はおおむね 6 mm 以内であり、光温熱中における腫瘍周辺正常肝組織への熱損傷をできるだけ回避することが重要であることから、以降の検討において設定温度は 70 °C が妥当であると思われた。

ii. 腹腔用 TC-LTT システムの設定温度（70 °C）に維持されていることの検証

図 12 に腹腔用 TC-LTT を使用した際の光温熱中の腫瘍表面温度とレーザー出力値の推移を示す。レーザー出力は装置 ON 後 1 秒以内に最大となり、最大出力状態の照射が約 30 秒間続いたのち、腫瘍表面温度は設定した 70 °C に到達した。その後 300 秒間にわたって、腫瘍表面温度が 70 °C に一定になるようレーザー出力の自動制御が行われていたことが確認できた。腫瘍表面温度が 70 °C に達したあとの温度制御中の腫瘍表面温度の分布は、中央値で 69.8 °C（67.8-77.4 °C）であり、温度変動の分布は < 68 °C : 0.2 %、68-72 °C : 93.2 %、> 72 °C : 6.6 %であった

iii. 腹腔用 TC-LTT システムの温熱治療効果

同所性肝癌ラットモデルに対して開発した腹腔用 TC-LTT システムの腹腔内

使用下での治療効果をみた。同所性肝癌モデルラットの腹腔鏡下（AIM1588, Stryker）で観察した腹腔内の光温熱治療前後の写真を図 13 に示す。光温熱治療前に左外側葉に白色結節病変として認識される腫瘍組織が（図 13A）、光温熱治療後に熱変性しているのが確認された（図 13B）。

光温熱治療後の腫瘍体積（犠死時点）を図 14 に示す。腫瘍体積は、治療群では対照群と比較して有意に小さかった（治療群の中央値： $1.0 \times 10^2 \text{ mm}^3$ 、対照群の中央値： $9.4 \times 10^2 \text{ mm}^3$ 、 $P = 0.0043$ ）。病理組織学的には、治療群では腫瘍部全域で壊死変性が見られ、腫瘍境界と接する正常な肝組織も中央値 1.4 mm （ $0.6 - 2.6 \text{ mm}$ ）で熱変性していた（図 15）。

第 3 節 転移性大腸癌モデルラットでの治療効果の検証

（1）背景と目的

第 3 章第 2 節において、実質臓器である同所性肝癌モデルに対して TC-LTT による温度制御下の光温熱治療は有効であることを示した。本検討では管腔臓器由来の癌組織に対しても腹腔内での TC-LTT による温度制御下の光温熱治療が有効であるかを確認するために、以下の実験を計画した。しかし、管腔臓器での同所性モデルへの光温熱治療は、高率に穿孔を起こすことが危惧されたため、本検討では腹膜播種の病態を模したモデルを採用した。

（2）材料と方法

① 転移性大腸癌モデルラットの作成

i. 細胞株

ラット大腸癌細胞株である RCN-9（JCRB 細胞バンク, JCRB0167, Japan）を用いた。培養には Dulbecco's Modified Eagle medium 培地に 10 % FBS、ペ

ニシリン (100 U/ mL)、ストレプトマイシン (100 μ g/ mL)、アムホテリシン B (0.25 μ g/ mL) を添加したものを使用し、37 $^{\circ}$ C、5 %二酸化炭素、95 %空気のインキュベーターで培養した。

ii. 使用動物

8 週齢雄性の F344 ラット (Japan SLC Inc., Japan) を用いた。動物は防衛医科大学校動物実験施設の SPF 区域内にて飼育した。以下のすべての動物実験は防衛医科大学校の動物実験倫理委員会で承認され、実験動物の取り扱いには動物実験ガイドラインに基づいて行われた (承認番号 : 19009)。

本システムの検証に適した腫瘍モデル動物を作製するため、先行論文に基づき、以下の 2 種類の動物モデル作成を行った。

iii. 腹腔内への癌細胞散布によるモデル作成

F344 ラットに混合麻酔薬 [メデトミジン (0.3 mg/ kg)、ミダゾラム (4.0 mg/ kg)、ブトルファノール (5.0 mg/ kg) の 3 種混合麻酔] を腹腔内注射し、小開腹の後、リン酸緩衝生理食塩水に懸濁した 20 μ L の RCN-9 細胞浮遊液 (5.0×10^4 cells/ μ L) を腹腔内に散布した(35)。

iv. 側壁腹膜下への癌細胞注入によるモデル作成

上記同様の麻酔下状態にある F344 ラットの小開腹の後、マトリゲル®に懸濁した 20 μ L の RCN-9 細胞浮遊液 (5.0×10^4 cells/ μ L) を壁側腹膜下に注入した(36)。

② 腹壁転移大腸癌モデルラットへの治療効果に関する検討

i. 腹腔用 TC-LTT システムの温熱治療効果と有害事象の確認

実験動物を無作為に 2 群に分けた (①治療群 (n = 5)、②対照群 (n = 6))。全身麻酔後に腹部に約 1.5 cm の切開創をおいて、15 mm トロッカーを腹腔内に挿入した。サーマル腹腔鏡スコープを挿入し、二酸化炭素で気腹 (気腹圧 3 mmHg) をさせた。治療群に対しては 55℃、300 秒の加温設定で温熱治療を行った。治療介入後 2 週間で犠死させ、照射腹壁を摘出し 10 %ホルムアルデヒド液で固定し、病理組織標本 (HE 染色・TUNEL 染色) を作成した。対照群は観察のみで終了した。

加温設定温度の違いによる有害事象を検討するため、3 通りの設定温度 (75 °C : 1 匹、65 °C : 2 匹、55 °C : 1 匹) で温度制御下の光温熱を行い、肉眼的皮膚熱傷の範囲を照射直後、照射 1 日目、照射 7 日目、照射 14 日で測定した。

ii. 腫瘍径計測

腫瘍のサイズを治療介入時および腫瘍摘出時にデジタルノギスで測定し、腫瘍の推定体積 [(短径サイズ) × (短径サイズ) × (長径サイズ) × 1/2)] を算出した。

iii. 熱傷範囲計測

皮膚に生じた熱傷のサイズを治療介入直後、治療 1 日目、治療 2 日目、治療 7 日目、治療 14 日目にデジタルノギスで測定し、皮膚熱傷部位の推定面積 [(短径サイズ) × (長径サイズ) × π /4)] を算出した。

iv. TUNEL 染色

TUNEL 染色では、アポトーシス細胞に発現が認められるが、壊死組織も染色される(37)。今回は、55 °Cの温熱加療であるため、凝固壊死を来たすと考えられ、壊死組織の評価目的で本染色法を施行した。なお、TUNEL 染色は IHC

WORLD の TUNEL Enzyme Method のプロトコールに基づき行った(38)。

v. 統計学的手法

腫瘍増大率の群間比較は Wilcoxon の符号付順位検定を用いた。統計パッケージは JMP® 14 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いた。p 値が 0.05 未満のとき、統計学的に有意と判断した。生存曲線については Kaplan-Meier 法を用いた。

(3) 結果

① 転移性大腸癌モデルラットの作成

検証に適したモデル作成のため、以下の 2 系統の動物モデルの作成につき検証した。

i. 腹腔内への癌細胞散布によるモデル作成

F344 ラット (8 匹) は腹膜播種により 70 日以内に全例死亡した。生存期間の中央値は 50 日であった (図 16)。最短生存日数は移植から 20 日であり、移植から評価 (犠死) まで 21 日を必要とする本実験では本モデルは不適と判断した。

ii. 側壁腹膜下への癌細胞注入によるモデル作成

F344 ラットへの腫瘍生着率は 84.6 % (11/ 13 匹) であり、腫瘍移植 21 日後に腹膜播種を発症したものは認められなかった。

上記 2 種類のモデル作成の結果、癌細胞の腹腔内散布の場合は生存率が低い上に腫瘍が播種性に増殖し、局所治療である温熱療法の効果を確認するには不向きと判断した。よって以降の検討においては、側壁腹膜下への癌細胞注入によるモデルを適用することにした。

② 大腸癌腹壁転移モデルラットへの温熱治療効果に関する検討

i. 設定温度と皮膚への熱エネルギーの波及

加温設定温度の違いによる有害事象を検討するため、3通りの設定温度（75℃：1匹、65℃：2匹、55℃：1匹）で温度制御下の光温熱を行い、皮膚への肉眼的皮膚熱傷の範囲を照射直後、照射1日目、照射7日目、照射14日で観察した（図17）。

光照射位置における熱による皮膚傷害の領域面積を計測したところ（表1）、設定温度が高いほど、皮膚傷害領域が大きいことがわかった。なお、いずれの設定温度の場合においても照射後7日で痂皮化し、照射後14日で瘢痕化した。なお、治療関連死は認めなかった。

そこで以降の検討においては、設定温度55℃で行うことにした。

ii. 腹腔用 TC-LTT システムの温熱治療効果

図18に光温熱治療中の腫瘍表面温度とレーザー出力値の推移を示す。レーザー出力は装置ON直後1秒以内に最大となり、最大出力状態の照射が約170秒間続いたのち、腫瘍表面温度は設定温度（55℃）に到達した。その後300秒間にわたって、腫瘍表面温度を55℃に維持するレーザー出力の自動制御が行われていたことが確認できた。腫瘍表面温度が55℃に達した後の温度制御中の腫瘍表面温度は、中央値で55.1℃（54.3 - 57.0℃）であった。

図19は大腸癌腹壁転移モデルラットの腹腔鏡下（AIM1588, Stryker）で観察した腹腔内の治療前後の写真である。温熱治療前に腹壁に白色結節病変として認識される腫瘍（図19A）が光温熱治療後に熱変性した（図19B）。

治療の有無による腫瘍サイズの増大（治療介入直前から犠死時）を図20に示す。腫瘍体積変化率（%）は、治療群において有意に小さく（ $p < 0.001$ ）、治療群の中央値は43.0%（対照群の中央値：141.9%）であった。病理組織の結果（後述）を加味して考えると、治療群では腫瘍全域の壊死が起こり、増殖

はほぼ完全に抑制されたことが示唆された。

病理組織（HE 染色、TUNEL 染色）を図 21 に示す。治療群では、腫瘍部全域で壊死変性が見られ（TUNEL 染色陽性）、腫瘍境界と接する正常な筋組織も中央値 3.3 mm（1.5-3.4 mm）の幅で熱変性していた。

第4章 全体の考察

本研究では、腹腔鏡下に適用できる、超小型サーモグラフィセンサを搭載した温度制御型レーザー光温熱治療（TC-LTT）システムを開発し、温度モニタリングによるレーザー出力のフィードバック機構によって、光温熱加温中の標的病巣の精緻な温度制御を実現した。そして、同所性・転移性腫瘍動物モデルに対して非接触的温度治療を行い、癌を縮退させることに成功した。

以前我々の研究グループが開発した温度制御型近赤外光（TC-NIR）照射システムは、温度制御で用いるサーモグラフィカメラの大きさより腹腔内に挿入することができず、肝腫瘍のような体腔内の腫瘍に対する光温熱治療を行うためには、開腹操作により肝臓を体外に露出する必要があった。一方、本研究で開発した TC-LTT では、腹腔内での使用が可能であり、低侵襲に肝腫瘍や腹腔内腫瘍を治療することが可能となった。加えて、腹腔鏡の利点を生かし、開腹下では視認しづらい横隔膜下や骨盤内に位置する腫瘍への加療も容易に行えるものとする。本システムでは、光温熱治療領域の 2 次元の温度分布がリアルタイムな熱画像として表示でき、明視野ではレーザー強度の制御の様子の把握が可能であるので、術者は過不足のない加温が行われているかをリアルタイムに確認することができ、低侵襲で確実な非接触型温度治療となり得ると考えられた。

（1）レーザー光温熱治療中の熱モニタリングの重要性

悪性腫瘍に対する温度治療で高い治療効果は得るには、組織を適切な温度に加温・維持することが重要である。第3章第2節の結果からも、既報と同様に治療温度が低い場合や過度な高温においても治療が不十分となることが示された(39)。

悪性腫瘍に対するレーザー温度治療における温度のモニタリングは熱電対や

MRI、CT を用いた温度測定方法などが報告されている(39)。熱電対は応答時間が早い(約 0.3 秒)、接触型であり組織に熱電対を挿入する必要がある、腫瘍散布や出血のリスクを孕む。一方、CT や MRI での温度測定は非接触的に測定でき 3 次元での温度分布の測定(温度分解能: ± 0.2 °C)ができることは魅力的であるものの、MRI では 4.5 秒のタイムラグがあり、秒単位の温度変化に追従できない(40)。また、MRI は体動による影響でノイズが生じ、体腔内で固定されていない臓器への適応が難しい(39)。また、CT は生体組織に対する電離放射線の問題がある。これに対して、サーモグラフィセンサを用いる TC-LTT システムでは、生体組織に非観血的にアプローチでき、放射線等の影響もない。さらに、温度状況をリアルタイム(応答時間が約 0.12 秒)かつ 2 次元での温度分布が取得できるため、測温の間に病変が過加温の状態になる可能性を術者は危惧する必要は無い。さらに TC-LTT システムは、サーモグラフィセンサによる加熱の制御に加え、明視野画像において他臓器への誤照射を回避でき、光温熱中の組織の色調変化での治療効果をリアルタイムに視認することが可能である。

(2) 非接触的レーザー光温熱法の選択

本システムは、温度測定およびレーザー照射を標的組織に対して非接触に行う形式であるため、腫瘍への機械的接触は全くない。実質臓器へのレーザー温熱治療の場合、一般的にはレーザーファイバーを腫瘍に穿刺して加熱する接触型の照射手段が採られることが多いが、腫瘍に対して温度測定や治療のために穿刺を行う操作は、出血や穿刺に伴う腫瘍散布等のリスクがある(41)。また、穿刺型の一般的な光照射デバイス(例えば The NeuroBlate® System's Optic Laser Probes)では、プローブ先端の過熱を防ぐための冷却システムを搭載する必要があり、デバイス操作の煩雑さが増す上、生体内での破損の危険性を孕む。一方、

本システムでは、プローブ先端が加工されていないファイバーを非接触で用いるため、上記リスクを回避できる。

また、今回の検討では、照射スポットを約 15 mm となるように照射した。これは、腫瘍のサイズが最大でも長径で 10 mm に至らない程度の大きさであったため、腫瘍全体を十分加温できる範囲の照射となった。

(3) 本システムの課題

① 温度測定

TC-LTT システムではサーモグラフィセンサを温度計測に用いているため、温度コントロールの感知範囲は照射部位表面の 2 次元領域に限られ、臓器深部の腫瘍の実測は本法では原理上不可である。言い換えると、光照射面から深さ方向への温度分布や正常組織に囲まれた部位の計測はできないため、組織深部の温度コントロールはできない。ただし、熱伝導シミュレーションや、熱電対などを用いて深部温度を実測しながら、初期設定治療温度と深部温度との相関をみることで、治療可能深度（どの深さまで温熱治療可能になっているか）を推測することは出来るようになると思われる(42) (43)。

② 治療深度

TC-LTT システムは近赤外レーザー光を利用した非接触型照射の温熱療法であるため、近赤外光の組織深達度に依存する限界がある。よって限界値を超える腫瘍には治療効果が不十分となる場合がある（第 3 章第 2 節 参照）。この問題点の解決策として考えられるのは、腫瘍面への多方向からの照射である。光を 1 方向のみからでなく、トロッカーの挿入位置を追加で設けたりすることで、腫瘍に対して複数の方向から照射する方法により治療深度を深くすることが可能か

もしれない。治療効果を減弱させる要因には、腫瘍の大きさに加え、臓器深部に局在する腫瘍においても近赤外光の組織深達度に依存する治療可能な深さの絶対値（限界値）があるからである。治療可能深度は、表面設定温度で約 90 °C 程度のときの深度となるであろう。腫瘍表面温度が 90 °C を超えるようであれば炭化のリスクが高くなり、炭化すると光が表面でほぼ全て吸収されてしまう。ただし、インドシアニンググリーンなどの光増感剤の使用により、治療可能深度の絶対値を大きくしていくことは可能であると考え(44)。

③ レーザー光照射

TC-LTT システムは、硬性鏡を用いているため、トロッカーや腫瘍の位置によっては正面から腫瘍を捉えることができず、効率の良い温熱治療や温度測定が行えない可能性、レーザー光の意図しない他臓器への照射の危険性が高まる可能性がある。トロッカー挿入位置の入念な検討、鉗子操作での対象臓器の授動、ガーゼなどの留置により上記リスクは軽減できると考える。また、視野画像および熱画像での温度上昇領域の観察に基づく照射位置修正により腫瘍をターゲティングし続ける照射は可能であったものの、腫瘍と光ファイバー先端との距離は呼吸性変動と手ぶれにより変化するため照射スポットサイズを一定に保つことは難しく、今後腫瘍のターゲティングを自動化するなど改良の余地がある。

（４）本システムの応用と将来展望

本研究では、サーマル腹腔鏡スコープを硬性鏡の形状で創製し、温度制御型の光温熱治療を腹腔内の同所性肝細胞癌動物モデルおよび大腸癌腹壁転移モデルに対し非接触的に施行できた。TC-LTT システムは腹腔鏡手術と効率的な光温熱治療を兼ね備えており、従来の高周波誘導加熱治療では治療が難しかった体

腔深部にある腓腫瘍や、組織内の血流量の不均衡を有する腎腫瘍等に対しても温熱効果の高い加療が可能と考える(45) (46)。

本システムは硬性鏡による光温熱治療であったが、将来的に軟性鏡や先端可変式硬性鏡に搭載することができれば、さらに効率的な光温熱治療が可能となるだろう。

第5章 結論

- (1) 温度自動制御可能な腹腔鏡下レーザー光温熱治療システムを開発した。
- (2) 開発した治療システムを用いることで、低侵襲に同所性肝癌、転移性大腸癌の温熱治療に成功した。

謝辞

本論文を遂行し書き終えるにあたり、ご指導を頂いた指導教官である上野秀樹博士（防衛医科大学校 外科学講座教授）、辻本広紀博士（防衛医科大学校 病院 医療安全感染対策部教授）に深く感謝いたします。

研究 1 及び研究 2 の遂行にあたり、研究の立案、計画、準備、論文執筆について終始適切な御助言、御指導をいただいた守本祐司博士（防衛医科大学校 生理学講座教授）に深謝いたします。

温度制御型腹腔鏡スコープの製作、プログラムの構築していただいた正宗賢博士（東京女子医科大学 先端工学外科学分野教授）、大谷淳博士（早稲田大学 理工学部総合機械工学科教授）、尾原睦月氏（早稲田大学 理工学部総合機械工学科修士課程卒）に深く感謝いたします。

また、本研究を行うにあたり、防衛医科大学校生理学講座の粥川和歌子氏、武江太郎氏、牛田美穂氏、青木清乃氏、三井由美氏には技術的な支援をいただき深く感謝いたします。

本研究の一部を、以下の学術集会で発表した。

- ・ 17th International Photodynamics World Congress (May, 2019, Boston, USA)
- ・ 第 57 回 日本癌治療学会（2019 年 10 月、福岡）
- ・ 第 27 回 日本消化器関連学会週間（JDDW）（2019 年 11 月、神戸）
- ・ 第 120 回 日本外科学会定期学術集会（2020 年 8 月、横浜）
- ・ 第 75 回 日本消化器外科学会総会（2020 年 12 月、和歌山）
- ・ 第 60 回 日本生体医工学会大会（2021 年 6 月、京都）
- ・ 第 76 回 日本消化器外科学会総会（2021 年 7 月、京都）

- ・ Computer Assisted Radiology and Surgery (CARS) 2022 : 36th
International Congress and Exhibition (June, 2022, Tokyo, Japan)

本研究の一部を、以下の論文として発表した。

原著論文 : Harada M、Morimoto Y、Ohara M、Ohya J、Masamune K、Itazaki Y、Sugihara T、Tsujiimoto H、Kishi K、Ueno H.

Temperature-controlled laser thermal therapy system using a newly developed laparoscopic system equipped with an ultra-compact thermographic camera, Sci Rep. 2022;12(1):18287

本研究の一部は、以下の助成金事業より援助を受けた。

1. 令和2年度 内視鏡医学研究振興財団

超小型サーモセンサーアレイ搭載腹腔鏡カメラシステムの開発

略語一覧

略語	外国語	日本語
FBS	Feral bovine serum	ウシ胎児血清
SPF	Specific pathogen free condition	特定病原体不在
TC-LTT	Temperature-controlled laser thermal therapy	温度制御型レーザー光 温熱治療
TC-NIR	Temperature-controlled near infrared	温度制御型近赤外

引用文献

1. Dewey WC, Hopwood LE, Sapareto SA, Gerweck LE. Cellular Responses to Combinations of Hyperthermia and Radiation. *Radiology*. 1977;123(2):463-74.
2. Fajardo LF, Egbert B, Marmor J, Hahn GM. Effects of hyperthermia in a malignant tumor. *Cancer*. 1980;45(3):613-23.
3. 山田堅一郎, 奥村秀夫, 田村昭蔵. 温度感受性からみた細胞の形態と増殖能. *組織培養研究*. 1985;4(2):65-9.
4. Chu KF, Dupuy DE. Thermal ablation of tumours: biological mechanisms and advances in therapy. *Nature reviews Cancer*. 2014;14(3):199-208.
5. Song CW. Effect of local hyperthermia on blood flow and microenvironment: a review. *Cancer research*. 1984;44(10 Suppl):4721s-30s.
6. Busch W. Über den einfluss Welch heftigere Erysipeln auf organisiente Neubildungen aususuben. *Verhandl naturh Preuss Rein Westphal*. 1866;23:28.
7. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clinical orthopaedics and related research*. 1991(262):3-11.
8. 阿部 光. 私の歩んだハイパーサーミア研究の道と明日への期待. *Thermal Medicine*. 2013;29(4):69-78.
9. Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, Rau B, Gellermann J, Riess H, Felix R, Schlag P. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *The lancet oncology*. 2002;3(8):487-97.

10. Shoji S, Hiraiwa S, Uemura K, Nitta M, Hasegawa M, Kawamura Y, Hashida K, Hasebe T, Tajiri T, Miyajima A. Focal therapy with high-intensity focused ultrasound for the localized prostate cancer for Asian based on the localization with MRI-TRUS fusion image-guided transperineal biopsy and 12-cores transperineal systematic biopsy: prospective analysis of oncological and functional outcomes. *International Journal of Clinical Oncology*. 2020;25(10):1844-53.
11. Ichishima Y, Shindo Y, Iseki Y, Kato K. Heating characteristics of developed rectangular resonant cavity applicator for non-contact hyperthermia treatments. *Thermal Med*. 2019;35(1):1-11.
12. Goldman L, Blaney DJ, Kindel DJ, Jr., Franke EK. Effect of the laser beam on the skin. Preliminary report. *The Journal of investigative dermatology*. 1963;40:121-2.
13. Niko Y, Moritomo H, Sugihara H, Suzuki Y, Kawamata J, Konishi G-i. A novel pyrene-based two-photon active fluorescent dye efficiently excited and emitting in the 'tissue optical window (650–1100 nm)'. *Journal of Materials Chemistry B*. 2015;3(2):184-90.
14. Bown SG. Phototherapy in tumors. *World journal of surgery*. 1983;7(6):700-9.
15. Chen WR, Adams RL, Heaton S, Dickey DT, Bartels KE, Nordquist RE. Chromophore-enhanced laser-tumor tissue photothermal interaction using an 808-nm diode laser. *Cancer letters*. 1995;88(1):15-9.
16. Sun R, Chen H, Sutrisno L, Kawazoe N, Chen G. Nanomaterials and their composite scaffolds for photothermal therapy and tissue engineering

applications. *Science and technology of advanced materials*. 2021;22(1):404-28.

17. 土田 敬. 平成 30 年診療報酬改定におけるレーザー治療. *日本レーザー医学会誌*. 2018;39(1):67-98.

18. van Esser S, Stapper G, van Diest PJ, van den Bosch MAAJ, Klaessens JHGM, Mali WPTM, Borel Rinkes IHM, van Hillegersberg R. Ultrasound-guided laser-induced thermal therapy for small palpable invasive breast carcinomas: a feasibility study. *Annals of surgical oncology*. 2009;16(8):2259-63.

19. Eichler K, Zangos S, Gruber-Rouh T, Vogl TJ, Mack MG. Magnetic resonance-guided laser-induced thermotherapy in patients with oligonodular hepatocellular carcinoma: long-term results over a 15-year period. *Journal of clinical gastroenterology*. 2012;46(9):796-801.

20. McNichols RJ, Kangasniemi M, Gowda A, Bankson J, Price R, Hazle J. Technical developments for cerebral thermal treatment: water-cooled diffusing laser fibre tips and temperature-sensitive MRI using intersecting image planes. *International journal of hyperthermia*. 2004;20(1):45-56.

21. Christensen DA. Thermal dosimetry and temperature measurements. *Cancer research*. 1979;39(6 Pt 2):2325-7.

22. Fallone BG, Moran PR, Podgorsak EB. Noninvasive thermometry with a clinical x-ray CT scanner. *Medical physics*. 1982;9(5):715-21.

23. Stafford RJ, Fuentes D, Elliott AA, Weinberg JS, Ahrar K. Laser-Induced Thermal Therapy for Tumor Ablation. 2010;38(1):79-100.

24. van Dongen KWA, Verweij MD. A feasibility study for non-invasive

thermometry using non-linear ultrasound. *International Journal of Hyperthermia*. 2011;27(6):612-24.

25. Nomura S, Arake M, Morimoto Y, Tsujimoto H, Miyazaki H, Saitoh D, Shinomiya N, Hase K, Yamamoto J, Ueno H. Thermal Sensor Circuit Using Thermography for Temperature-Controlled Laser Hyperthermia. *Journal of Sensors*. 2017;(4):1-7.

26. Nomura S, Morimoto Y, Tsujimoto H, Arake M, Harada M, Saitoh D, Hara I, Ozeki E, Satoh A, Takayama E, Hase K, Kishi Y, Ueno H. Highly reliable, targeted photothermal cancer therapy combined with thermal dosimetry using a near-infrared absorbent. *Scientific reports*. 2020;10(1):9765.

27. Ohara M, Sanpei S, Seo C, Ohya J, Masamune K, Nagahashi H, Morimoto Y, Harada M, editors. Developing Thermal Endoscope for Endoscopic Photothermal Therapy for Peritoneal Dissemination. 2020 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems (IROS); 2020 24 Oct.-24 Jan. 2021.

28. Sapareto SA, Dewey WC. Thermal dose determination in cancer therapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1984;10(6):787-800.

29. Jones E, Thrall D, Dewhirst MW, Vujaskovic Z. Prospective thermal dosimetry: The key to hyperthermia's future. *International Journal of Hyperthermia*. 2006;22(3):247-53.

30. Tamai T. 肝臓シンチグラフィーによる残存肝機能の推定に関する基礎的研究ならびに臨床例についての検討. *岡山医学会雑誌*. 1982;94(3-4):221-34.

31. Guo Y, Klein R, Omary RA, Yang GY, Larson AC. Highly malignant intra-hepatic metastatic hepatocellular carcinoma in rats. *American journal of translational research*. 2010;3(1):114-20.
32. Buijs M, Geschwind JF, Syed LH, Ganapathy-Kanniappan S, Kunjithapatham R, Wijlemans JW, Kook Kwak B, Ota S, Vali M. Spontaneous tumor regression in a syngeneic rat model of liver cancer: implications for survival studies. *Journal of vascular and interventional radiology : JVIR*. 2012;23(12):1685-91.
33. Li X, Lovell JF, Yoon J, Chen X. Clinical development and potential of photothermal and photodynamic therapies for cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2020;17(11):657-74.
34. Wang YC, Chan TC, Sahakian AV. Real-time estimation of lesion depth and control of radiofrequency ablation within ex vivo animal tissues using a neural network. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*. 2018;34(7):1104-13.
35. Yanagi K, Ohshima N. Angiogenic vascular growth in the rat peritoneal disseminated tumor model. *Microvascular research*. 1996;51(1):15-28.
36. Soucy NV, Ihnat MA, Kamat CD, Hess L, Post MJ, Klei LR, Clark C, Barchowsky A. Arsenic Stimulates Angiogenesis and Tumorigenesis In Vivo. *Toxicological Sciences*. 2003;76(2):271-9.
37. Ortiz A. Staining for cell death. *The Lancet*. 2003;361(9370):1748.
38. Apoptosis Detection Using Terminal Transferase and Biotin-16-dUTP

(TUNEL Enzyme Method) [Available from:
http://www.ihcworld.com/_protocols/apoptosis/tunel_enzyme.htm.

39. Saccomandi P, Schena E, Silvestri S. Techniques for temperature monitoring during laser-induced thermotherapy: an overview. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*. 2013;29(7):609-19.

40. McNichols RJ, Gowda A, Kangasniemi M, Bankson JA, Price RE, Hazle JD. MR thermometry-based feedback control of laser interstitial thermal therapy at 980 nm. *Lasers in surgery and medicine*. 2004;34(1):48-55.

41. Ding J, Jing X, Liu J, Wang Y, Wang F, Wang Y, Du Z. Complications of thermal ablation of hepatic tumours: comparison of radiofrequency and microwave ablative techniques. *Clinical radiology*. 2013;68(6):608-15.

42. Nolte T, Vaidya N, Baragona M, Elevelt A, Lavezzo V, Maessen R, Schulz V, Veroy K. Study of flow effects on temperature-controlled radiofrequency ablation using phantom experiments and forward simulations. *Medical physics*. 2021;48(9):4754-68.

43. Yaseen MA, Yu J, Wong MS, Anvari B. Laser-induced heating of dextran-coated mesocapsules containing indocyanine green. *Biotechnology progress*. 2007;23(6):1431-40.

44. Ishizawa T, Fukushima N, Shibahara J, Masuda K, Tamura S, Aoki T, Hasegawa K, Beck Y, Fukayama M, Kokudo N. Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging. *Cancer*.

2009;115(11):2491-504.

45. Sugiyama A, Nishimura T, Shimizu T, Ichinohe K, Teshima T, Kaneko M. Basic Study on 13.56 MHz RF Capacitive Heating System HEH-500C Heating Characteristics and Histological Research on High-temperature Heating. Thermal Medicine(Japanese Journal of Hyperthermic Oncology). 1989;5(4):397-408.

46. 李秀雄, 中嶋和喜, 打林忠雄, 山本肇, 久住治男. 電気分解式水素クリアランス法による腎腫瘍および周囲正常組織局所血流量の検討. 日本ハイパーサーミア学会誌. 1989;5(4):375-9.



図 1 温度制御型腹腔鏡レーザー光温熱治療 (TC-LTT) システム

A : TC-LTT システムの構成要素。サーマル腹腔鏡スコープ (右下)、近赤外レーザー照射装置 (左上)、記録・制御用 PC (右上)、マイクロコントローラー (左下) で構成される。B : 気腹システムと光源。

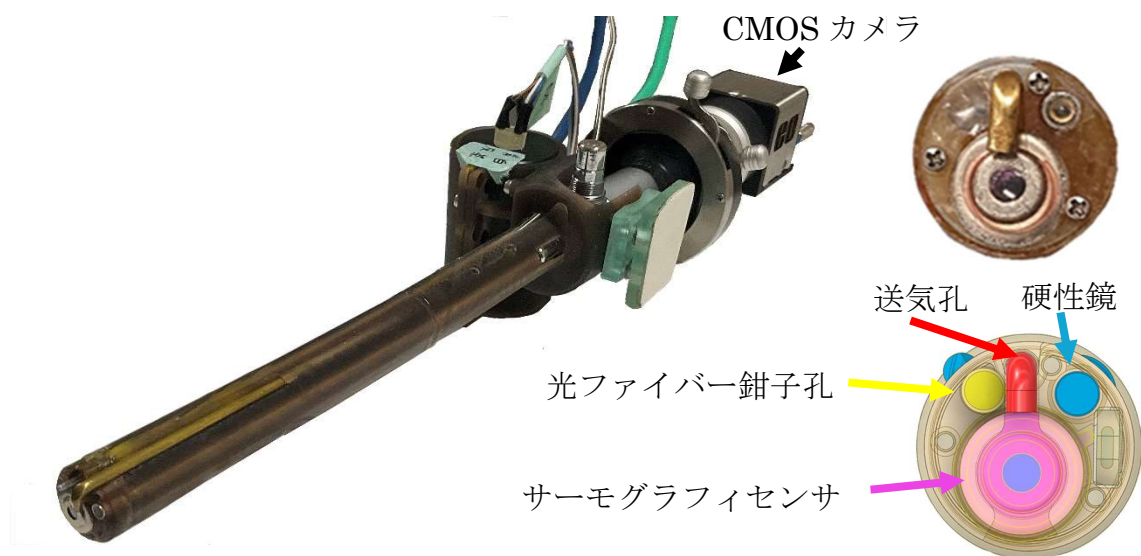


図 2 サーマル腹腔鏡スコープ

サーマル腹腔鏡スコープ（左）とその先端の拡大写真（右上）、先端の模式的拡大図（右下）。先端部は、光ファイバー鉗子孔、硬性鏡、サーモグラフィセンサ、送気孔で構成される。硬性鏡の末端は C マウントになっており、CMOS カメラに装着する。

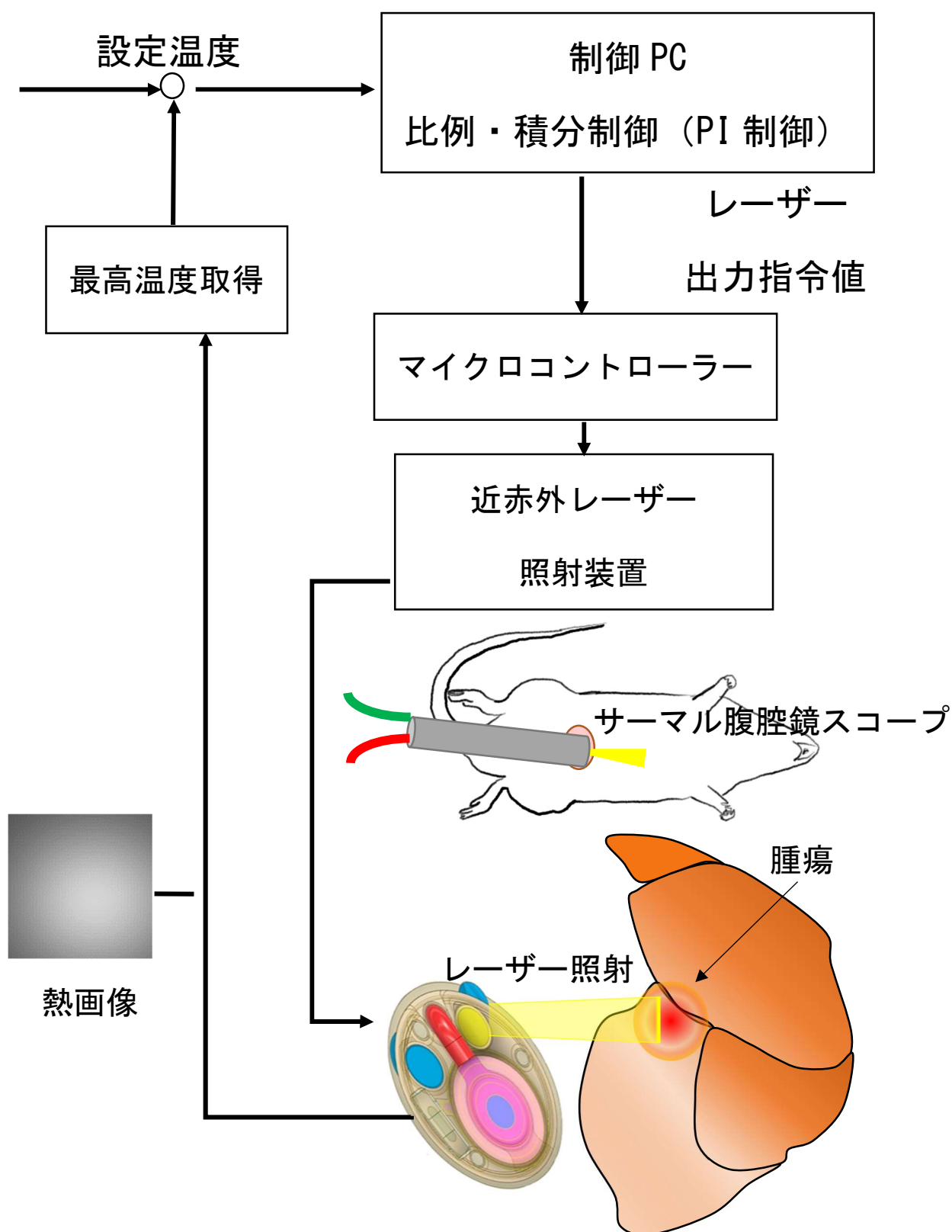


図 3 照射部位の温度制御の原理・方式

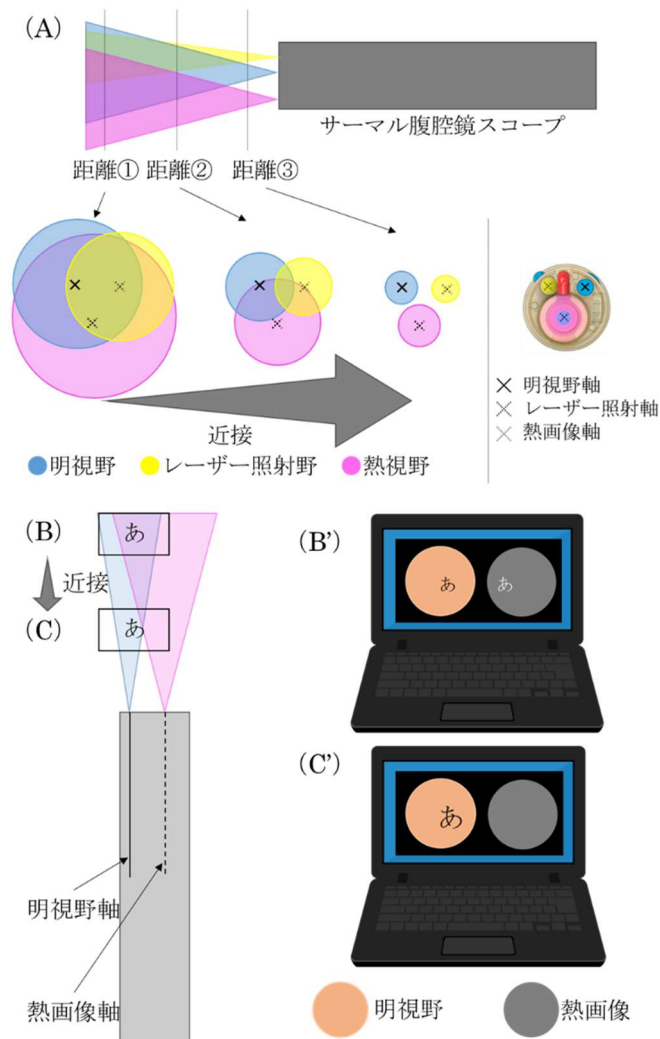


図 4 サーマル腹腔鏡スコープの近接視野限界に関する概念図

(A) 上段：側面からの見通し概略、下段：正面からの見通し概略。スコープ先端を観察対象に近接させると、明視野画像、熱画像、レーザー照射範囲が一致しなくなる。(B) スコープ先端と観察対象間の距離が長ければ、観察対象は明視野画像と熱画像両者の画角内に収まる (B')。(C) スコープ先端と観察対象間の距離が短くなると、観察対象は明視野画像と熱画像両者の画角内に収まらなくなる (C') (どちらか一方の画像のみに描出されるか、両画像ともに描出されない)。

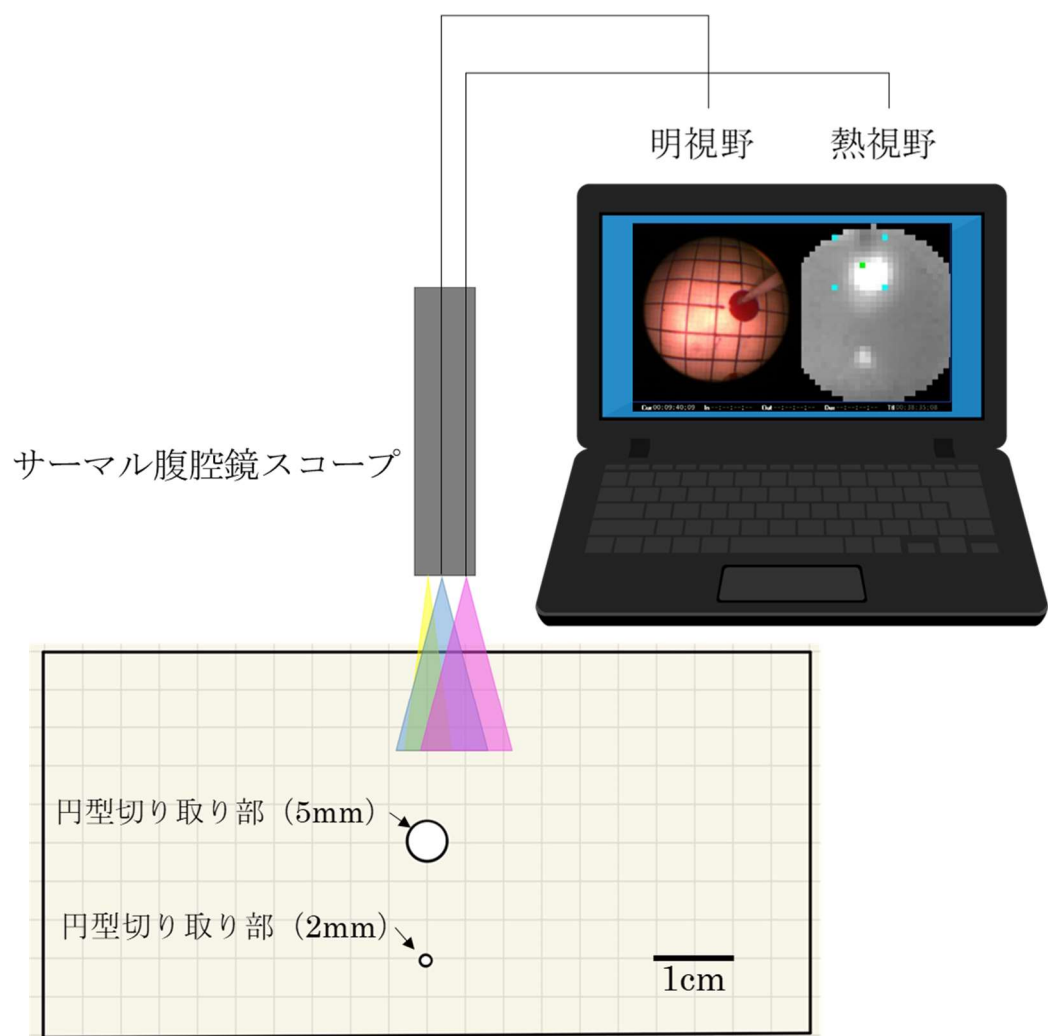


図 5 サーマル腹腔鏡スコープの近接視野限界を知るための実験に関する模式図

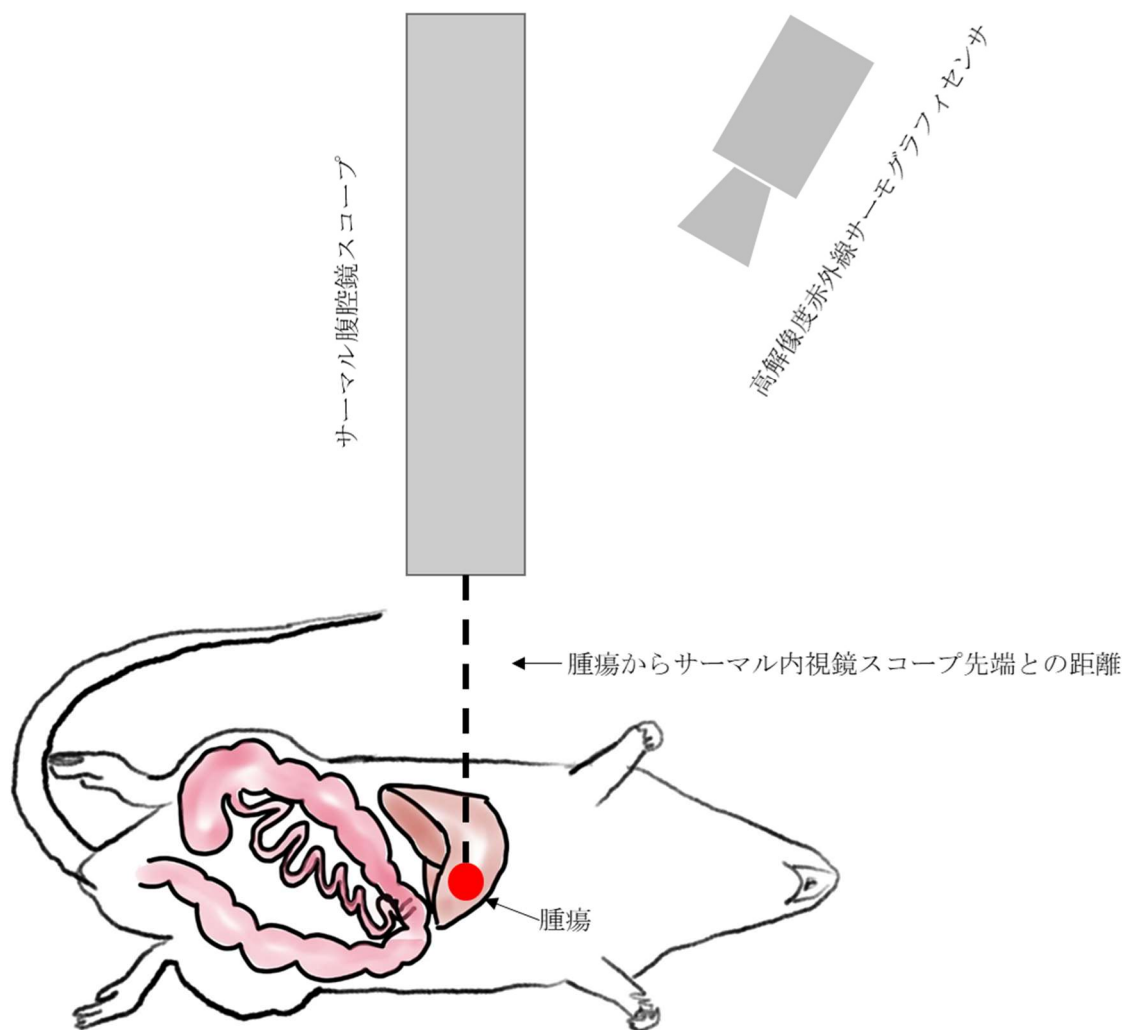
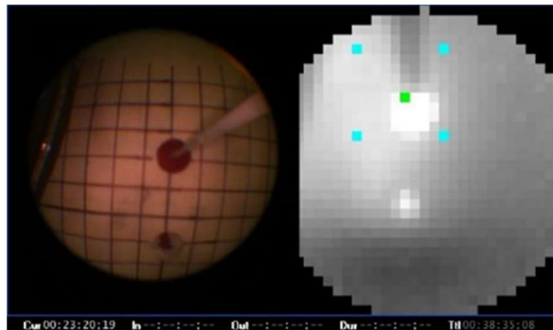
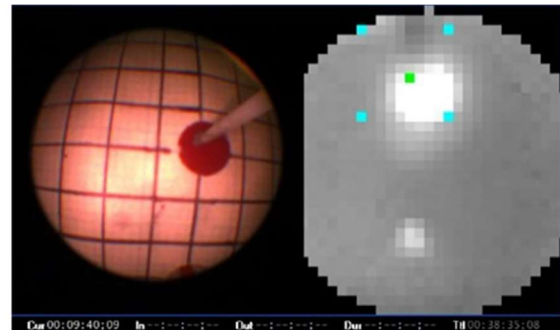


図6 TC-LLT システムの温度制御能の検証

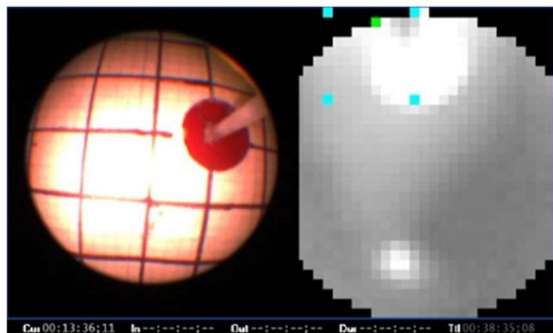
肝癌モデルラットとサーマル腹腔鏡スコープ、高解像度赤外線サーモグラフィセンサの位置関係を示す。ラットと高解像度赤外線サーモグラフィセンサの位置は固定し、サーマル腹腔鏡スコープ先端と腫瘍の距離を 20～30 mm に変化できるようにした。



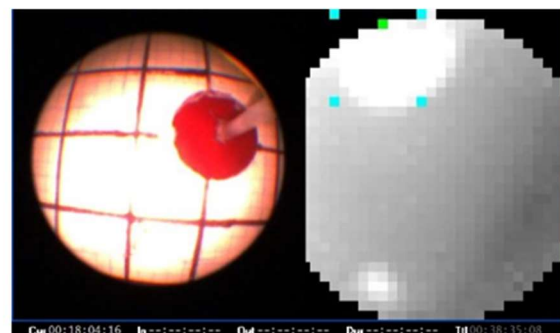
35 mm



30 mm



25 mm



20 mm

図 7 サーマル腹腔鏡スコープの近接距離限界

ディスプレイ上に明視野画像（左側）と熱画像（右側）を示す。レーザーファインバーは明視野画像の 0～3 時方向に確認できる。ファントムスコープ先端間距離を 25 mm より近づけると、熱画像の温度上昇領域が欠けはじめ、20 mm ではそれが視認できなくなる。

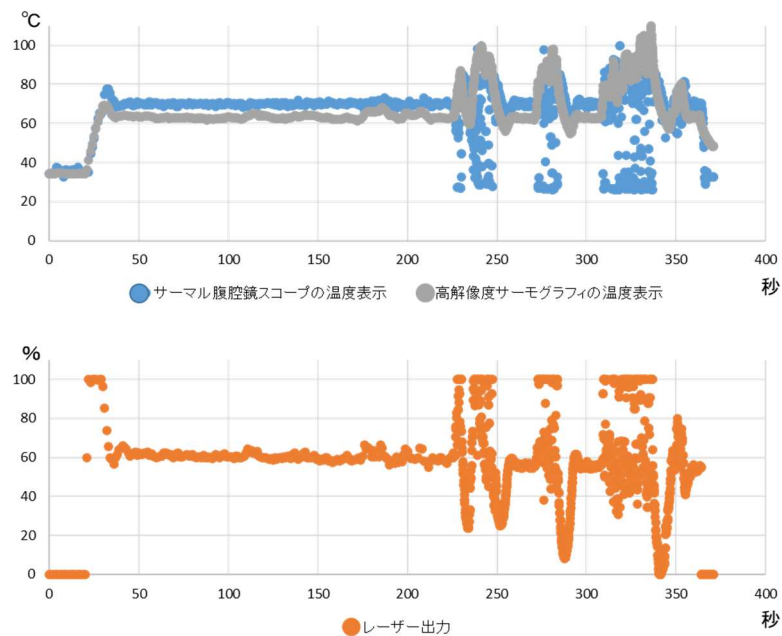


図 8 サーマル腹腔鏡スコープの体外での温度制御能（任意の温度維持機能）

サーマル腹腔鏡スコープのサーモグラフィセンサで計測された最高温度の推移（青色）、高解像度サーモグラフィカメラで計測された最高温度の推移（灰色）、そしてレーザー出力（橙色）の推移を示す。①：レーザー照射開始時、②：レーザー出力制御の開始時、③：サーマル腹腔鏡スコープを照射対象から約 1 秒間遠ざけてから元の位置に戻す動作時。

レーザー照射開始とともにレーザー出力は 100 % となり、腫瘍表面温度は上昇した。設定温度である 70 °C に到達するとそれ以降レーザー出力が 60 % 前後で推移し、70 °C（高解像度サーモグラフィセンサは 62 °C を表示）が維持された。サーマル腹腔鏡スコープを遠ざけると同時に、温度の低下と同時にレーザー出力が最大になった。そして、サーマル内視鏡を元の位置まで近づけると温度表示値が高くなりそれとほぼ同時にレーザー出力が低下した。同様の「遠ざけ」動作を計 6 回行ったが、動作間のインターバルでは 70 °C の温度で加温維持されていた。

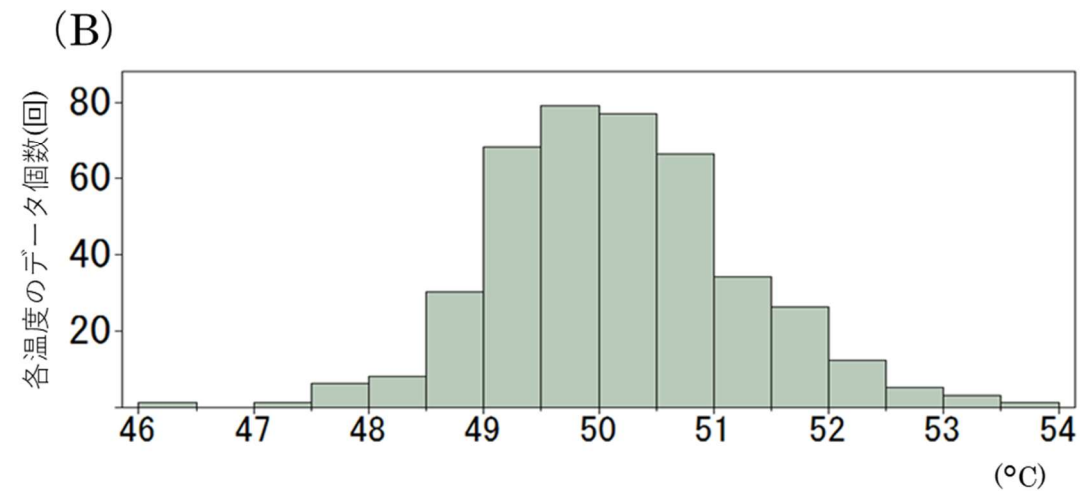
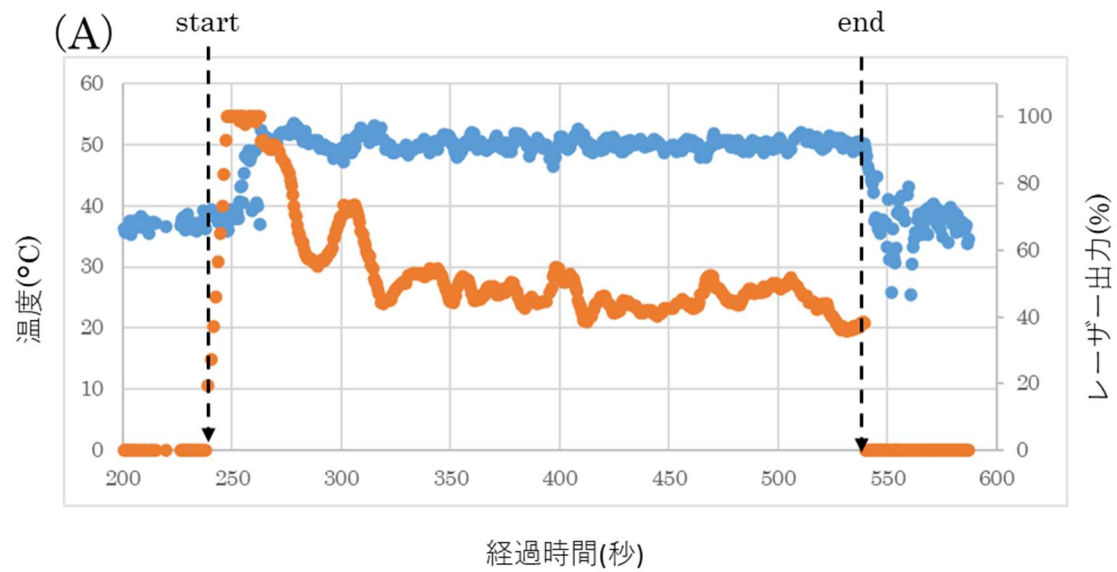
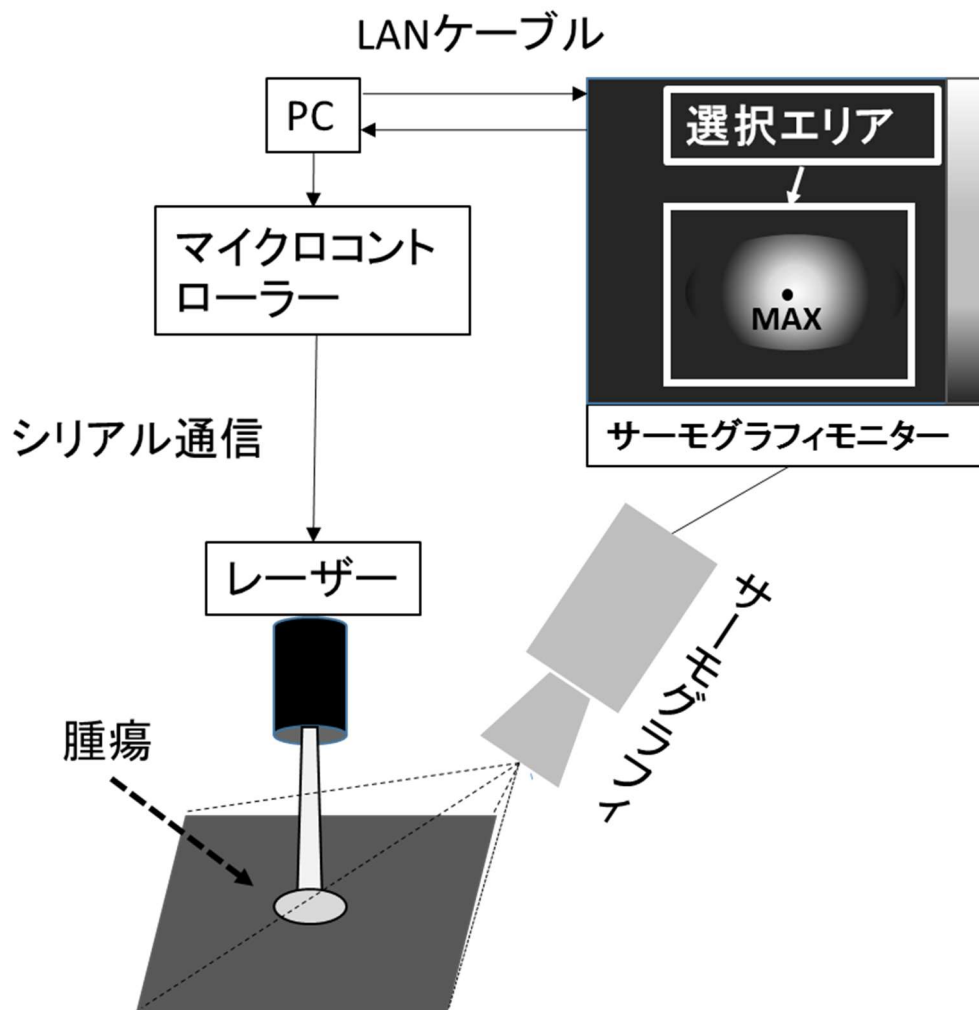


図9 サーマル腹腔鏡スコープの生体内での温度制御能（任意の温度維持機能）

A: 時間経過における腫瘍表面温度とレーザー出力の推移である。縦軸：腫瘍表面温度（°C）およびレーザー出力（%）。レーザー出力 100 %が経過時間 239.2 秒で開始され 22.8 秒経過した後、レーザー出力の自動調整により腫瘍表面温度が 50 °C 付近で維持される。経過時間 539.6 秒でレーザー出力停止すると同時に腫瘍表面温度が低下していくのが観察された。

B: レーザー出力の自動調整開始から出力停止までの間（経過時間 262～539.6 秒）における各温度とその温度データ個数の関係。



(Nomura S. Journal of sensors, 2017 改変)

図 10 温度制御型近赤外光 (TC-NIR) 照射システムの概要

照射範囲を含む温度計測選択領域 (白枠) をサーモグラフィセンサーカメラのモニター上に設定する。検出された選択領域内における最高温度点の温度情報は制御 PC に伝達され、照射対象の温度が一定に保たれるよう、適切な照射出力が計算される。レーザー発生装置に、その変化する出力値情報がマイクロコントローラーを介して伝送され、照射される近赤外光の強度が変化することで、腫瘍表面は一定の温度を保つ (Nomura S. Journal of sensors, 2017 改変)。

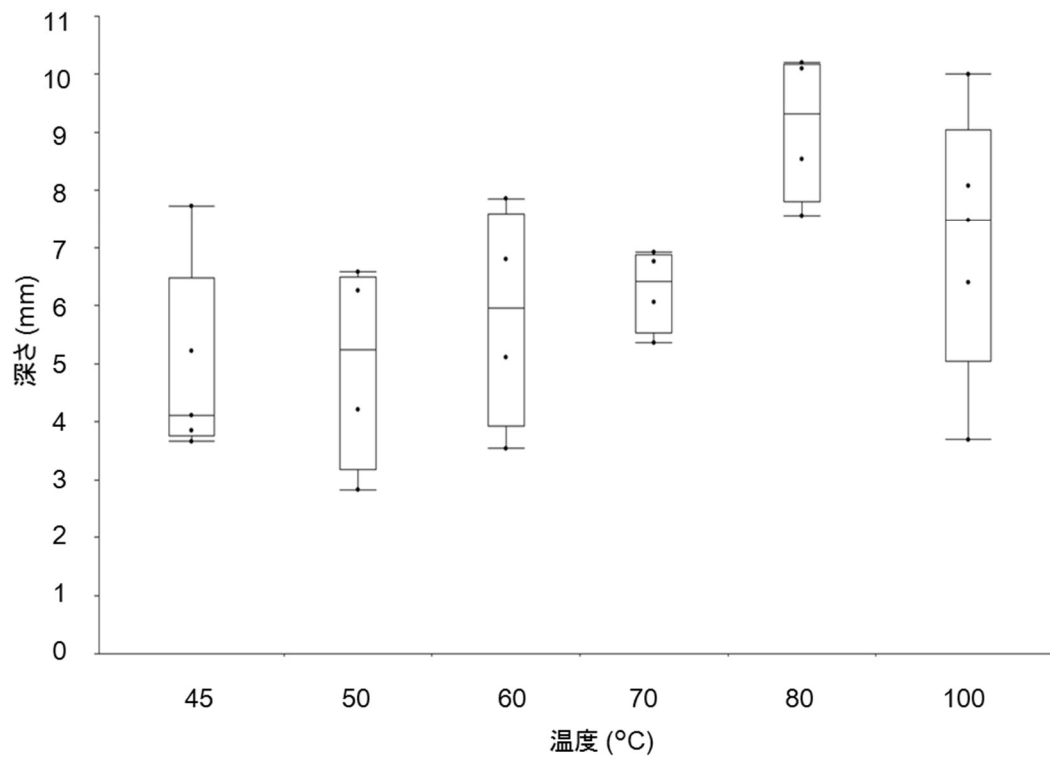


図 11 設定温度と熱エネルギー深達度

設定温度 45 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C、100 °Cでの壊死深達長の中央値（四分位範囲）は、それぞれ 4.1（3.8-6.5）、5.2（3.2-6.5）、6.0（3.9-7.6）、6.4（5.3-6.9）、9.3（7.9-10.2）、および 7.5（5.1-9.0） mm であった。

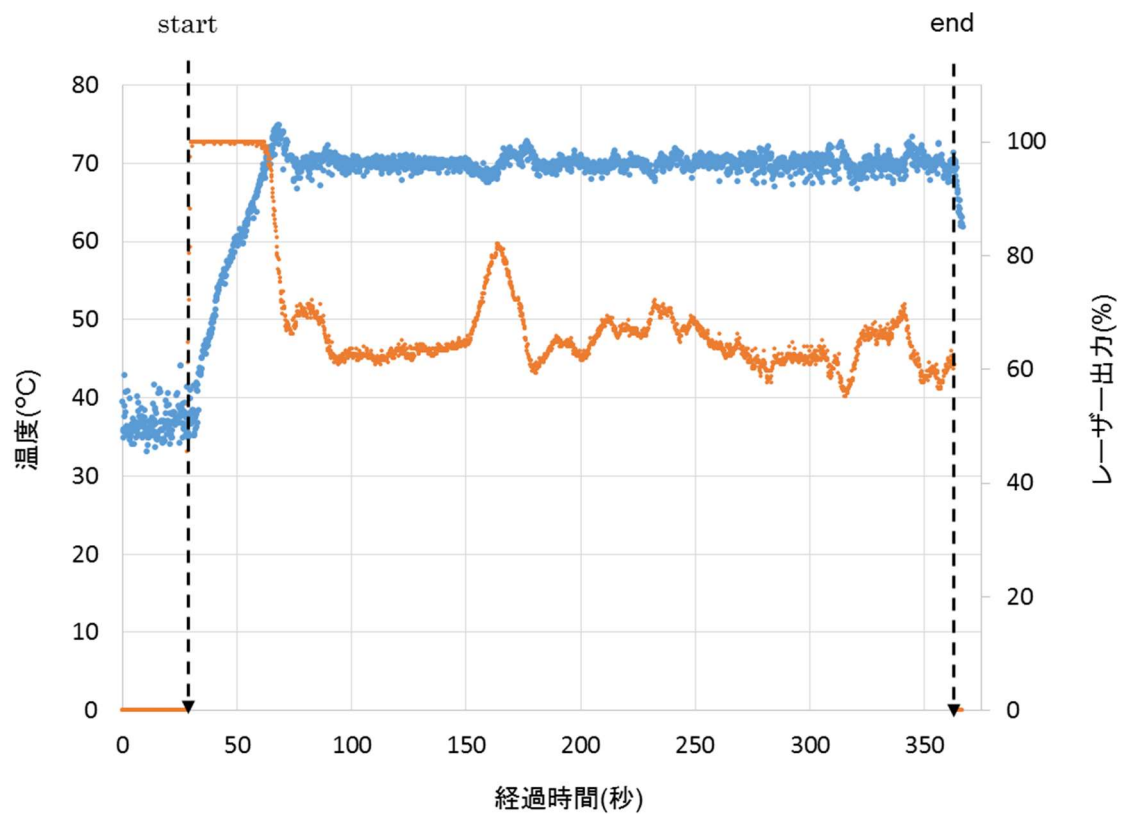


図 12 レーザー光温熱療法中の腫瘍表面の温度（青）とレーザー出力（橙色）の経時変化

レーザー照射開始とともに腫瘍表面の温度が上昇し、設定温度（70 °C）に達すると、腫瘍表面の温度が 70 °C に維持されるようにレーザー出力が自動制御された。

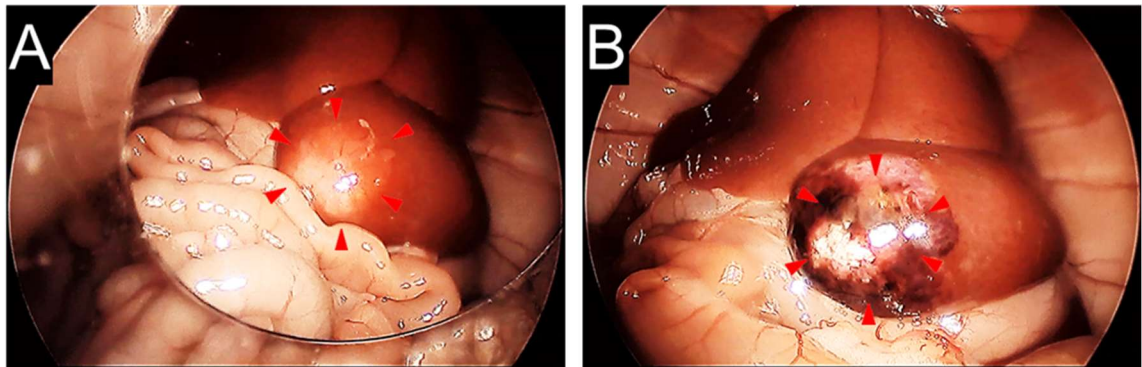


図 13 光温熱治療前後の肝腫瘍を腹腔鏡下で撮影した画像

光温熱治療前に左外側葉に白色結節病変として認識される腫瘍組織が (A)、光温熱治療後、熱変性している (B)。赤矢印で囲んだ領域が肝腫瘍部位である。

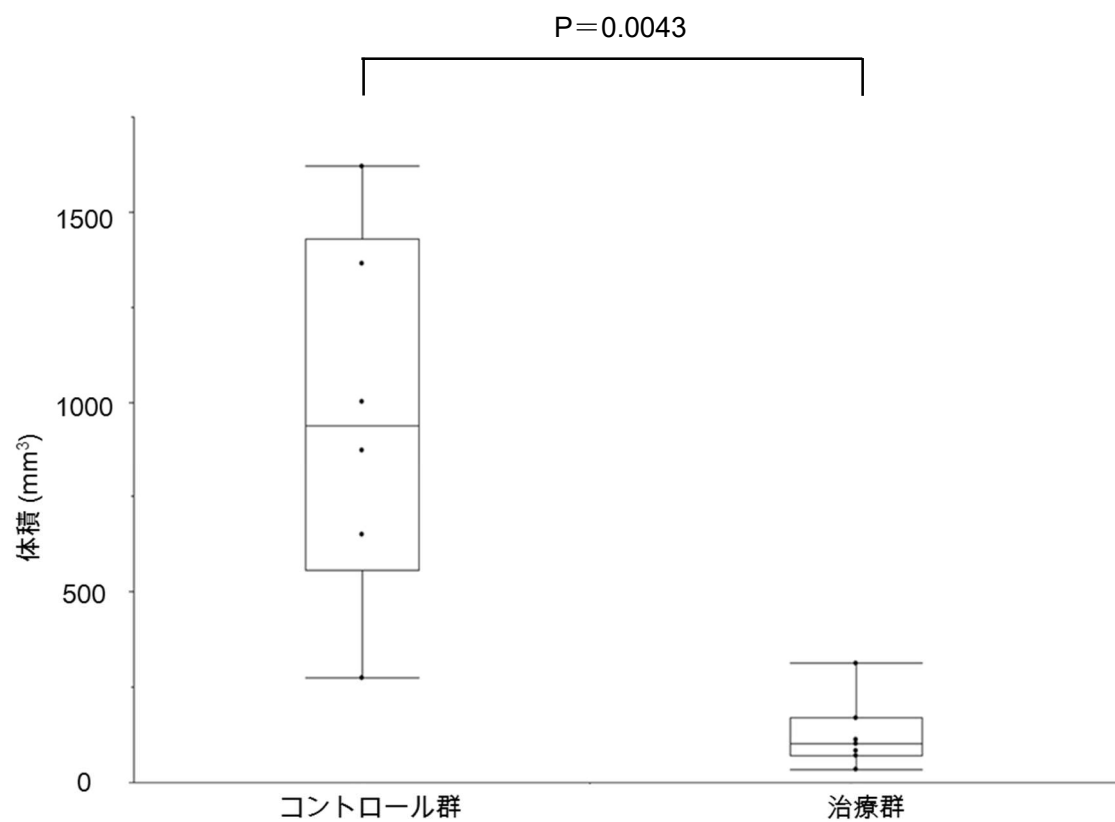


図 14 光温熱治療群と対照群における腫瘍体積

光温熱治療群では、腫瘍体積が有意に小さかった ($P = 0.0043$)。

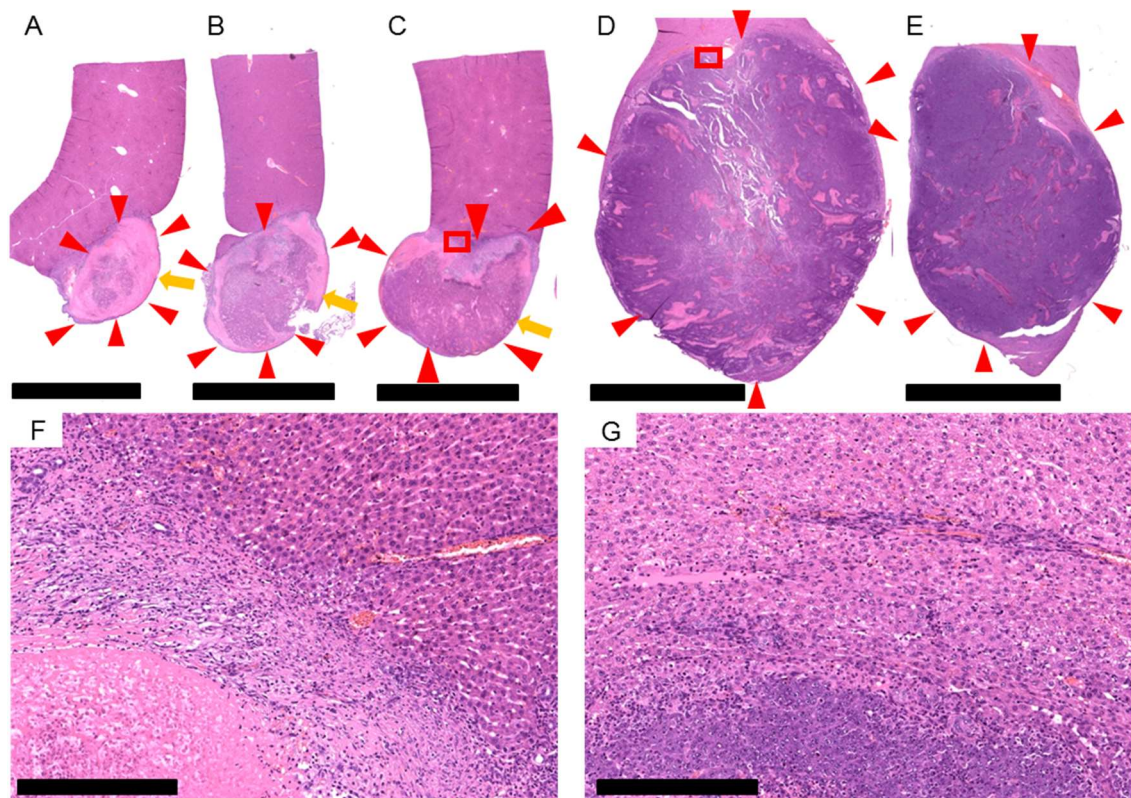


図 15 肝臓組織の断面像

A, B, C : レーザー光で温熱加療した腫瘍のマクロ画像（赤三角）である。各画像は 3 匹の異なる個体から採取した。レーザー照射の方向は橙色矢で示す。
D, E : 対照（未治療）の腫瘍のマクロ画像（赤三角）である。各画像は 2 匹の異なる個体から採取した。F は C の赤枠の拡大写真であり、温熱領域には壊死が見られる。G は D の赤枠の拡大写真である。各組織片は、腫瘍の矢状面上の面積が最大になるように切り出した。H&E, scale bar = 5 mm (A, B, C, D, E)、0.25 mm (F, G)。

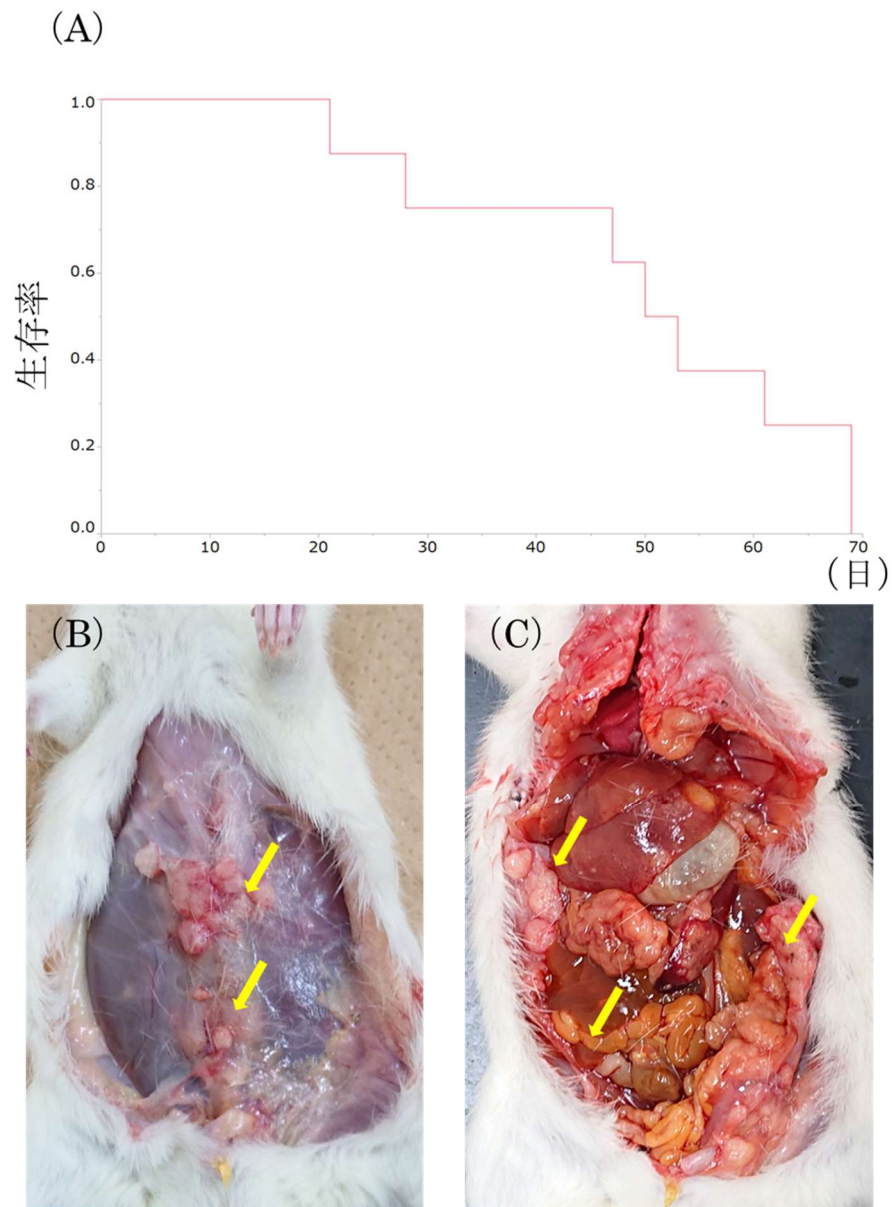


図 16 腹腔内への癌細胞散布によるモデル動物の生存曲線と腹腔内播種の状況

(A) RCN-9 (大腸癌細胞株) を腹腔内に散布した F344 ラット (n=8) の生存曲線。生存期間中央値は 50 日であった。死亡時における腹壁転移腫瘍 (B) および腹腔内転移腫瘍 (C)。黄色矢印で示した箇所が腫瘍である。

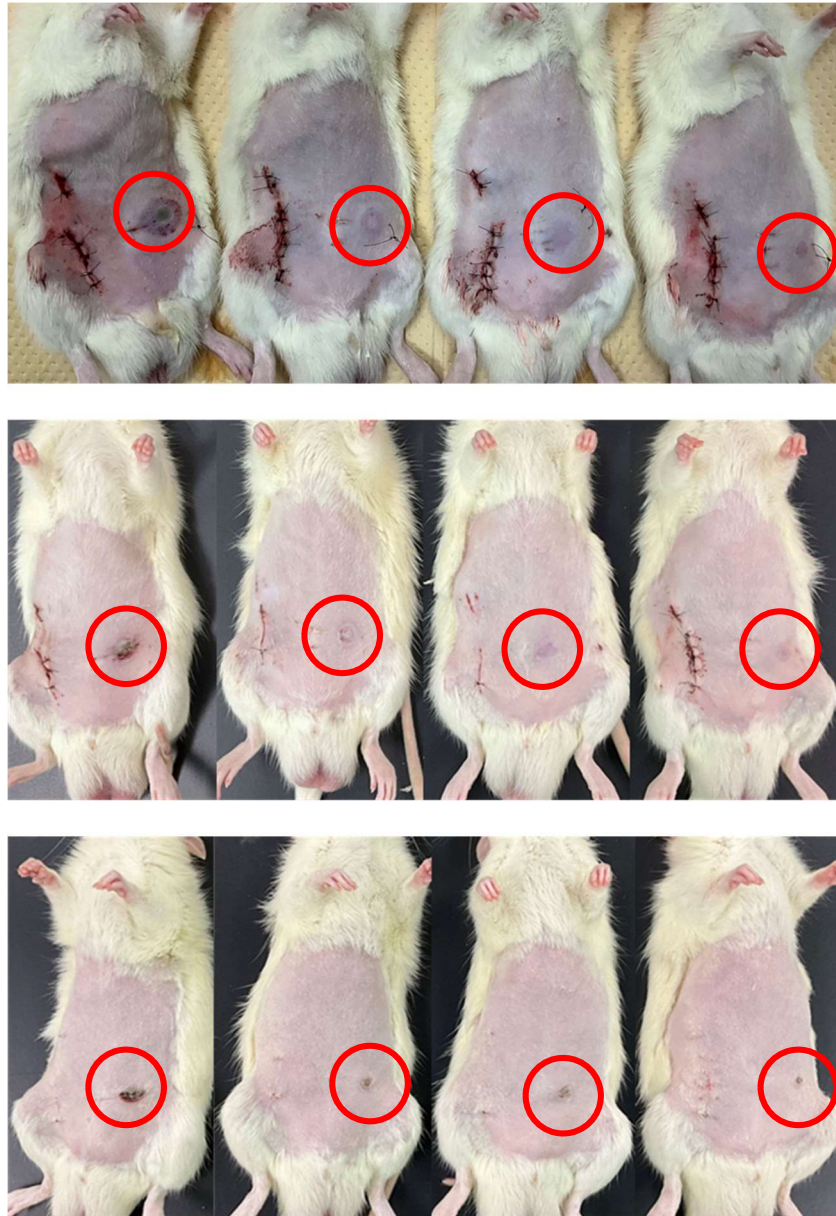


図 17 TC-LTT による光温熱治療後の皮膚所見（上段：光温熱終了直後、中段：光温熱後 1 日、下段：光温熱後 7 日）

加温設定温度は左から 75 °C、65 °C、65 °C、55 °C。設定温度に相関して熱傷害（赤丸）が大きい。75 °C の照射では、照射 1 日目に潰瘍が形成された。照射 7 日目になると癒痕が形成された。

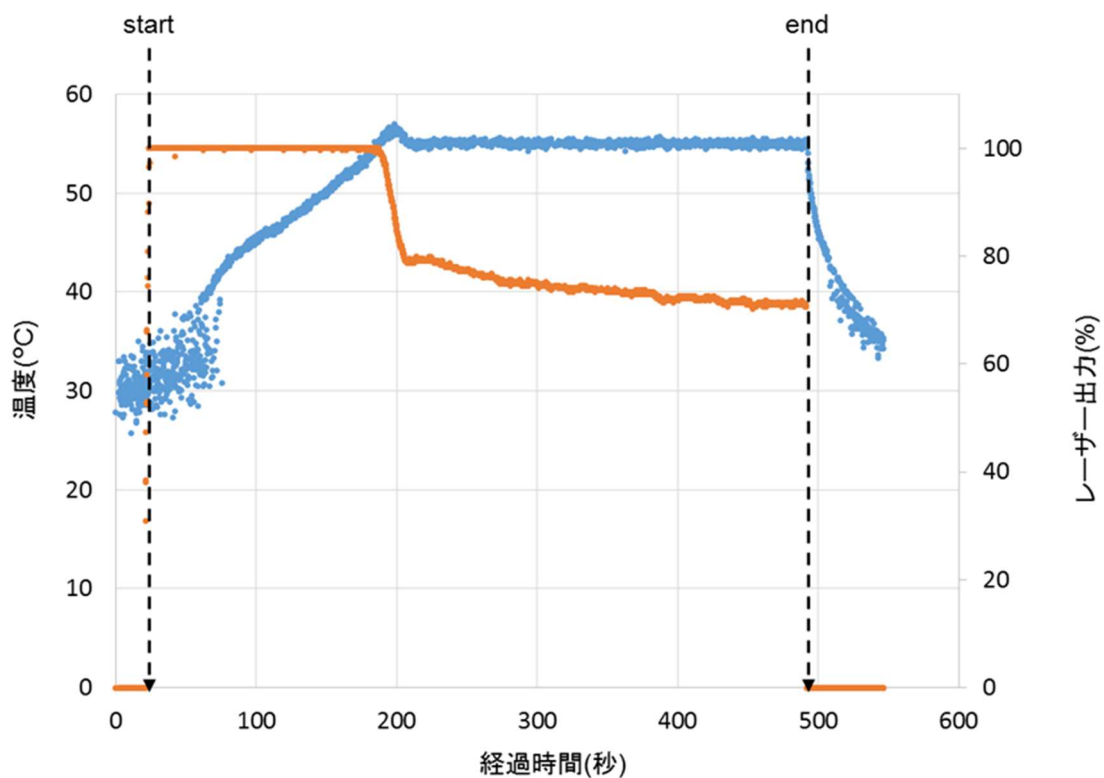


図 18 腹壁転移腫瘍の治療中の温度制御

光温熱療法中の腫瘍表面温度（青色）とレーザー出力（橙色）の推移。レーザー照射開始とともに腫瘍表面温度が上昇し、設定温度（55 °C）に達すると、腫瘍表面温度が 55 °Cに維持されるようにレーザー出力が自動制御された。

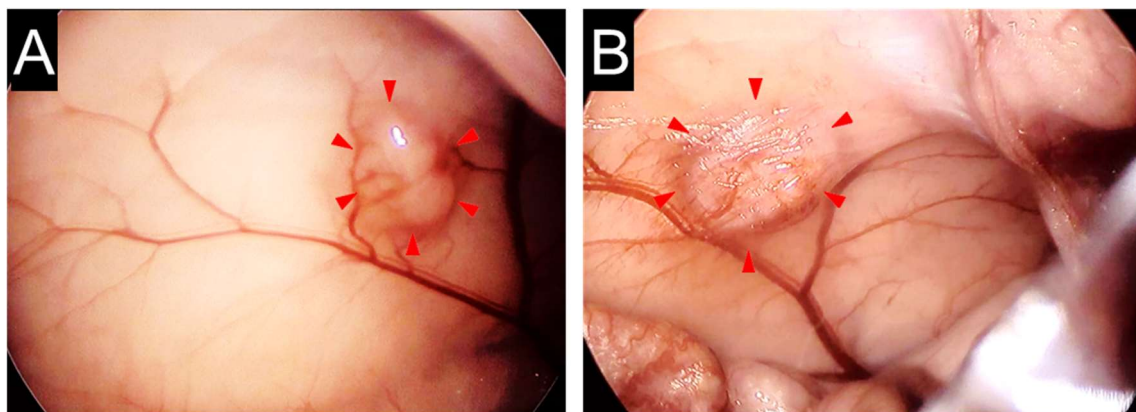


図 19 TC-LTT による光温熱治療前後の腹壁腫瘍

光温熱治療前に腹壁に白色結節病変として認識される腫瘍が (A)、温熱治療後、熱変性した (B)。赤矢印で囲んだ領域が腹壁腫瘍部位である。

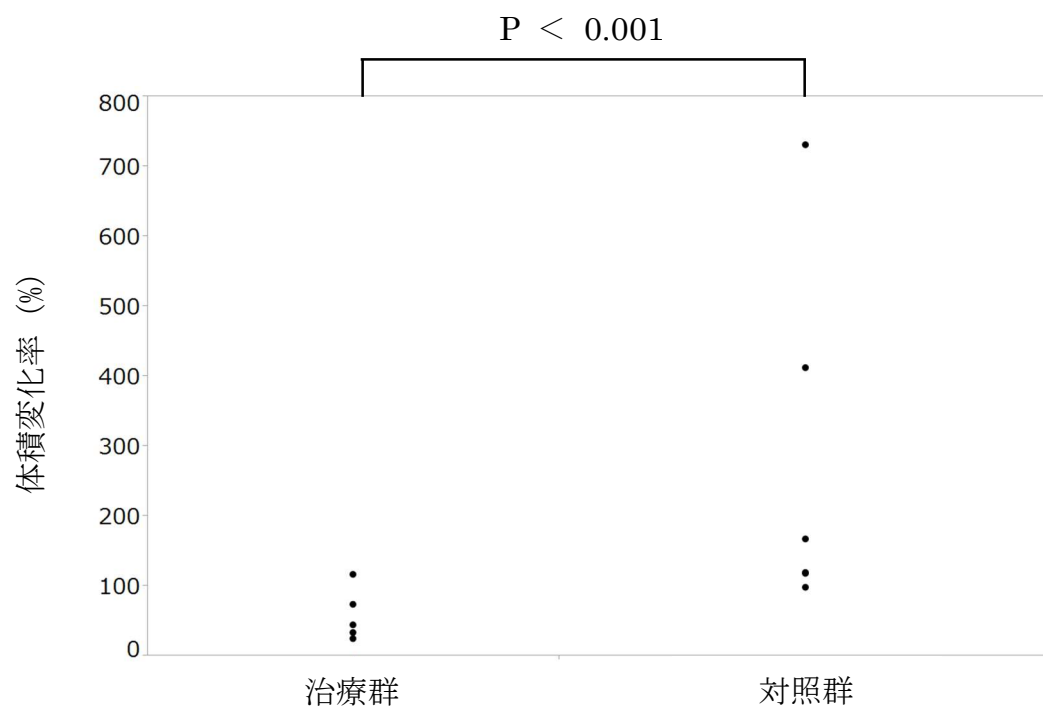


図 20 光温熱治療群と対照群の治療介入直前から犠死時までの腫瘍体積の変化率
治療群では腫瘍増大を有意に抑制できた ($P < 0.001$)。

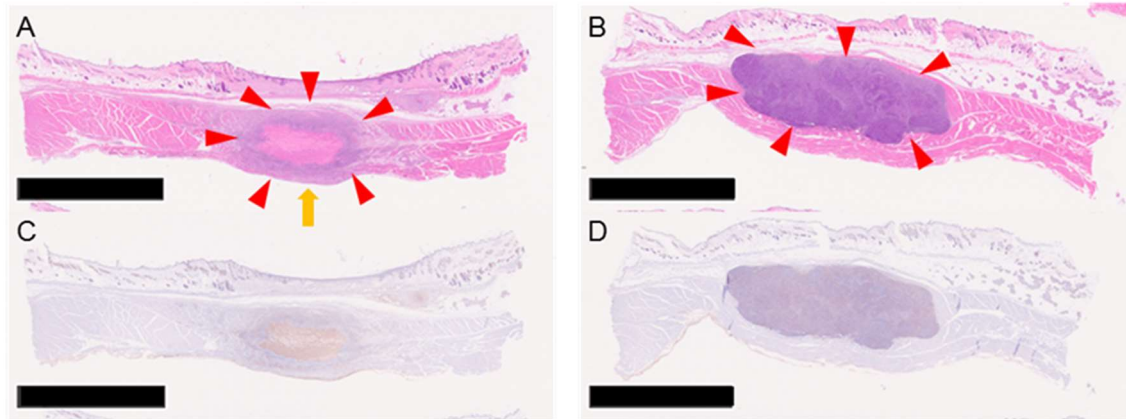


図 21 腹壁腫瘍組織の断面像

A : 光温熱された腫瘍のマクロ画像（赤三角）である。レーザー照射の方向を
 橙色矢印で示す。B : 対照（非治療）の腫瘍のマクロ画像（赤三角）である。C :
 A の TUNEL 染色。熱変性に一致して TUNEL 染色領域を認めた。D : B の
 TUNEL 染色。自然死した腫瘍細胞のみに、TUNEL 陽性細胞が占める領域を少
 数認めた。各組織片は、腫瘍の矢状面上の面積が最大になるように切り出された。
 H&E, scale bar = 5 mm (A, B, C, D)。

加温設定 温度	光温熱直後	光温熱後 1 日目	光温熱後 7 日目	光温熱後 14 日目
75 °C	162.7	170.5	147.7	104.3
65 °C	94.0	76.6	66.4	39.7
65 °C	86.5	80.0	57.5	40.7
55 °C	73.3	47.0	29.7	14.1

表 1 TC-LTT による光温熱治療後の熱波及に伴う皮膚変化を認める領域の面積 (mm²)

加温設定温度が高いほど皮膚変化が大きくなる傾向が見られる。