

平成29年度  
戦略的基盤技術高度化・連携支援事業  
戦略的基盤技術高度化支援事業

「低侵襲に子宮内膜症の悪性化を評価できる光学経膣プローブの開発」

研究開発成果等報告書

平成30年5月

担当局 東北経済産業局  
補助事業者 公益財団法人いわて産業振興センター

## 目 次

第1章 研究開発の概要	
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	1
1-2 研究体制	2
1-3 成果概要	4
1-4 当該研究開発の連絡窓口	4
第2章 本論	
【1】チョコレート嚢胞液中のヘム鉄を観測可能なスペクトル解析技術の開発	5
【2】チョコレート嚢胞液中のヘム鉄を観測可能な経腔プローブの設計開発	7
【3】組織学的安全性の確認	9
【4】臨床試験に適するためのプローブ試作品の設計と製作	10
【5】症例研究の拡充と子宮内膜症の悪性化と嚢胞内鉄濃度変動による発癌機序の 解明	11
最終章 全体総括	
3-1 研究開発成果まとめ	13
3-2 研究開発後の展開について	13

## 第1章 研究開発の概要

### 1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

#### 【研究開発の背景】

子宮内膜症は、200万人以上の女性が罹患する疾患であり、月経痛、不妊症、そして卵巣癌の合併と、女性のQOLを最も低下させる疾患である。子宮内膜症性卵巣嚢胞（別名「チョコレート嚢胞」と呼ばれる良性卵巣嚢腫）は、子宮内膜症の一種であり、子宮内膜症が卵巣内で発症し、その子宮内膜症からの出血のために血液が溜まって嚢胞が形成されたものをいう。この子宮内膜症性卵巣嚢胞の一部は、悪性化することで卵巣癌になることが知られており、超音波診断装置や核磁気共鳴映像法（MRI）による嚢胞の形態的評価によって、癌化の可能性が判断されている。しかし、これらの診断方法では実際に癌化しているか否かは判断することができず、組織の病理学的検査等によって初めて明らかにされる。従って、子宮内膜症性卵巣嚢胞を有している多くの患者は癌化していないものの、将来癌化する可能性を考慮して、子宮内膜症性卵巣嚢胞を摘出する外科的な処置を受ける患者も多く、より低侵襲、且つ精度の高い診断方法の実用化が囑望されている。

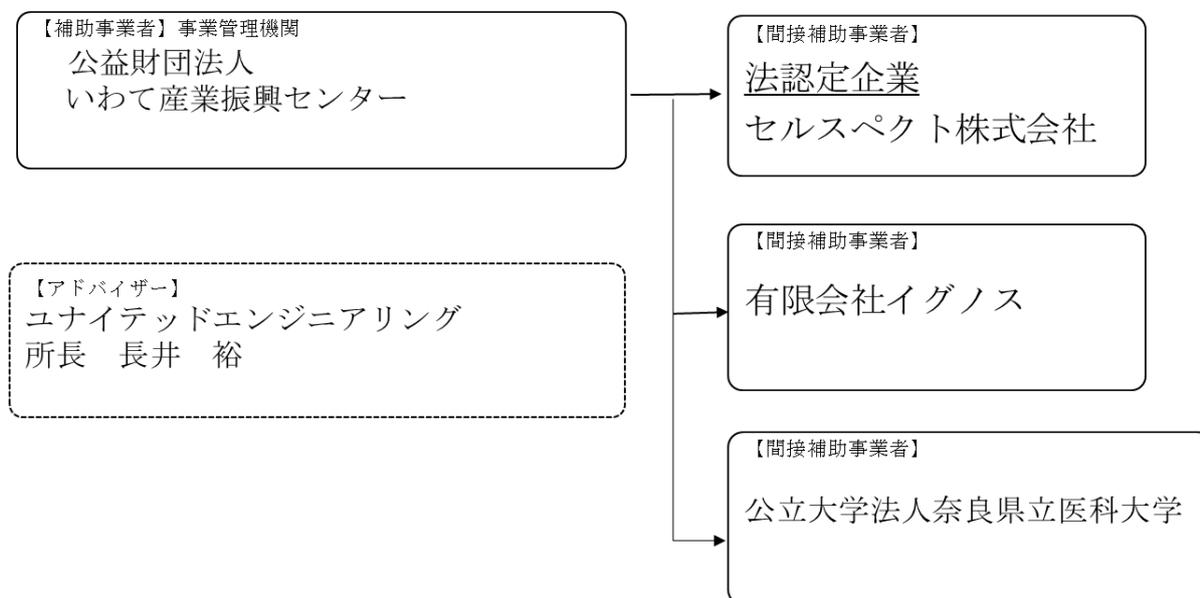
#### 【研究目的及び目標】

本研究開発では、低侵襲に子宮内膜症の悪性化を評価できる光学経膣プローブを開発する。以前、チョコレート嚢胞液中における鉄、及びヘム鉄が、子宮内膜症の悪性化を鑑別可能なバイオマーカーであること、更にこれらバイオマーカーの濃度が光学的検出により評価可能であることを明らかにしている。しかしながら、以前行った研究開発では、チョコレート嚢胞の表面肉厚の影響により、測定値に誤差が生じ、実用化に至ることができなかつた。本研究開発においては、この問題を解決するため、近赤外光による反射光スペクトルを解析することで、チョコレート嚢胞の肉厚の影響を受けずに、ヘム鉄濃度を測定できる方法を開発する。この方法を応用し、本研究開発においては、嚢胞液中のヘム鉄をバイオマーカーとして用いた子宮内膜症の悪性化度（癌、非癌）を診断する方法、及びこれを実施するための低侵襲な光学的センサーを実装させた経膣エコープローブを試作開発し、実用化させる。

## 【実施内容】

### 1-2 研究体制

#### 実施体制



#### 研究員

セルスペクト株式会社		
氏名	部署・役職	備考
北條 渉	最高技術責任者 (CTO)	P L
江面 知彦	研究開発部長	
長野 典浩	戦略企画室長	
近藤 真一	研究開発部 シニアマネージャー	
大槻 透	研究開発部 マネージャー	
林 秀洋	研究開発部 チームリーダー	
酒井 博則	研究開発部 チームリーダー	
土井 和彦	研究開発部 フェロー	
高橋 智美	研究開発部 フェロー	
郭 亭坊	研究開発部 フェロー	
赤坂 弘	経営企画部 マネージャー	

有限会社イグノス

氏名	部署・役職	備考
大和田 功	代表取締役	S L
寒川 陽美	取締役	
似田貝 正紹	研究員	
大森 久美子	研究員	
伊藤 大	研究員	
大森 健資	研究員	

公立大学法人奈良県立医科大学		
氏名	部署・役職	備考
小林 浩	医学部医学科産婦人科学 教授	
川口 龍二	医学部医学科産婦人科学 講師	
棚瀬 康仁	医学部医学科産婦人科学 助教	
山田 有紀	医学部医学科産婦人科学 助教	
小川 憲二	医学部医学科産婦人科学 助教	

公益財団法人いわて産業振興センター		
氏名	部署・役職	備考
田澤 潤	ものづくり振興部 チームリーダー	
小笠原 勇司	ものづくり振興部 研究開発支援員	
村上 あずさ	ものづくり振興部 短時間勤務職員	

アドバイザー		
氏名	部署・役職	備考
長井 裕	ユナイテッドエンジニアリング所長 超音波プローブ技術アドバイザー	

### 1-3 成果概要

テーマ名	計画および目標	実施結果
【サブテーマ1】 チョコレート嚢胞 液中のヘム鉄を観測可能なスペクトル解析技術の開発	模擬嚢胞の肉厚に影響されずヘム鉄濃度を算出可能なスペクトル処理法原理の確立、試験データ数を増やして精度・再現性についての検証	模擬チョコレート嚢胞内のヘム鉄濃度測定法を開発し、相関係数 $r=0.89$ を達成した。多変量解析を採用することにより、さらに高い精度で、かつより一般的に使用出来るヘム鉄濃度測定法の開発に成功
【サブテーマ2】 チョコレート嚢胞 液中のヘム鉄を観測可能な経膣プローブの設計開発	経膣プローブへイメージセンサーを実装し、これを用いたヘム鉄濃度測定法の確立	臨床試験用試作品へ発展させるべく、赤外イメージセンサーの最適化や波長取得の最適化や、疑似検体・臨床検体の測定例を拡充し、測定精度・再現性を向上させた
【サブテーマ3】 組織学的安全性の確認	照射光源の波長・照度による発熱等の組織破壊に対する影響を確認する	サブテーマ【1】、サブテーマ【2】で使用した光学条件で肉へ光を照射し温度変化を測定したが、全体温度も中心温度も影響は認められなかった。また、熱によるタンパク質変性、凝固、水分蒸発なども起こらなかった
【サブテーマ4】 臨床試験に適するためのプローブ試作品の設計と製作	臨床試験用経膣プローブへのイメージセンサーの実装、ヘム鉄濃度測定法の確立、疑似カラー画像によるヘム鉄濃度表示の開発	サブテーマ【2】での試作品を発展させ、さらに装置構成、プローブ形状等を最適化し、試作品の製造を行った。また、ユーザビリティの向上のため画像処理演算処理等プログラムの開発を行った
【サブテーマ5】 症例研究の拡充と子宮内膜症の悪性化と嚢胞内鉄濃度変動による発癌機序の解明	鉄による酸化・抗酸化バランスの生化学的検討及び培養細胞、臨床的検討	子宮内膜症と卵巣嚢胞の嚢胞内容液の酸化ストレスおよび抗酸化能を評価したところ、前者が酸化ストレス優位であり、後者が抗酸化が優位であった。さらに酸化ストレスと抗酸化ストレスのバランスを評価し、発癌機序を示唆する結果を得た

### 1-4 当該研究開発の連絡窓口

所属：セルスペクト株式会社 研究開発部

氏名：北條 渉

TEL：019-681-6710

FAX：019-903-0418

E-mail：whoujou@ak-j.com

## 第2章 本論

### 【サブテーマ 1】 チョコレート嚢胞液中のヘム鉄を観測可能なスペクトル解析技術の開発

#### 【1-1】 分光器を備えた原理試作機による、ヘム鉄濃度測定法の開発

模擬嚢胞の肉厚に影響されず、ヘム鉄濃度を算出可能なスペクトル処理法の原理を確立するため、光学試験台及びファイバー光源、ミニ分光器をセットアップした(図 1)。模擬嚢胞液の前面に設置した豚肉へ照射用光ファイバーを接触させ、ファイバー光源の光を照射し、受光用の光ファイバーを模擬嚢胞液後方の豚肉に接触させ、透過してきた光をミニ分光器へ導入した。ミニ分光器で観測した近赤外光のスペクトルは、リファレンス光のスペクトルと比較することで吸光度を算出し、解析した。解析の結果、相関係数  $R=0.89$  を達成したヘム鉄の測定手法が開発できた(図 2)。本スペクトル解析法は、本研究開発の成果として特許出願準備中である。

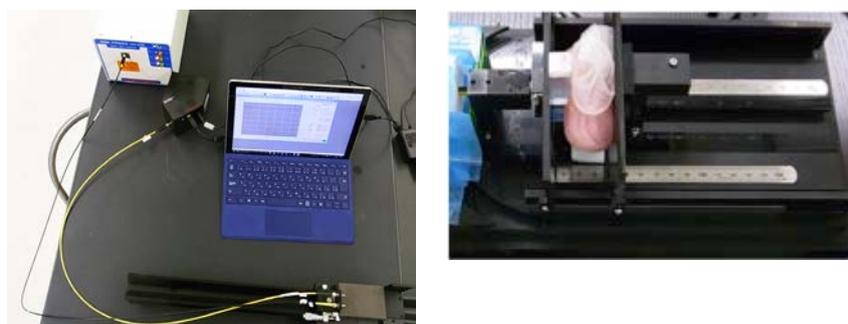


図 1 光学試験台全体および試験台

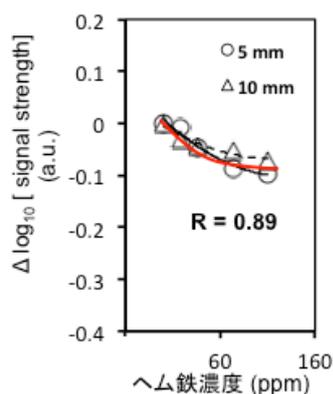


図 2 ヘム鉄濃度とスペクトル処理後のシグナル値の相関性

さらに、多変量解析による多数の波長を用いた重回帰式を構築し、ヘモグロビン標準液に適用したところ相関係数  $r=0.93$  を得た(図 3)。また、子宮内膜症性卵巣嚢胞の臨床検体に適用したところ相関係数は  $r=0.92$  を得ることができ(図 4)、臨床検体に対しても精度良く低侵襲に測定可能な測定

法を構築することができた。

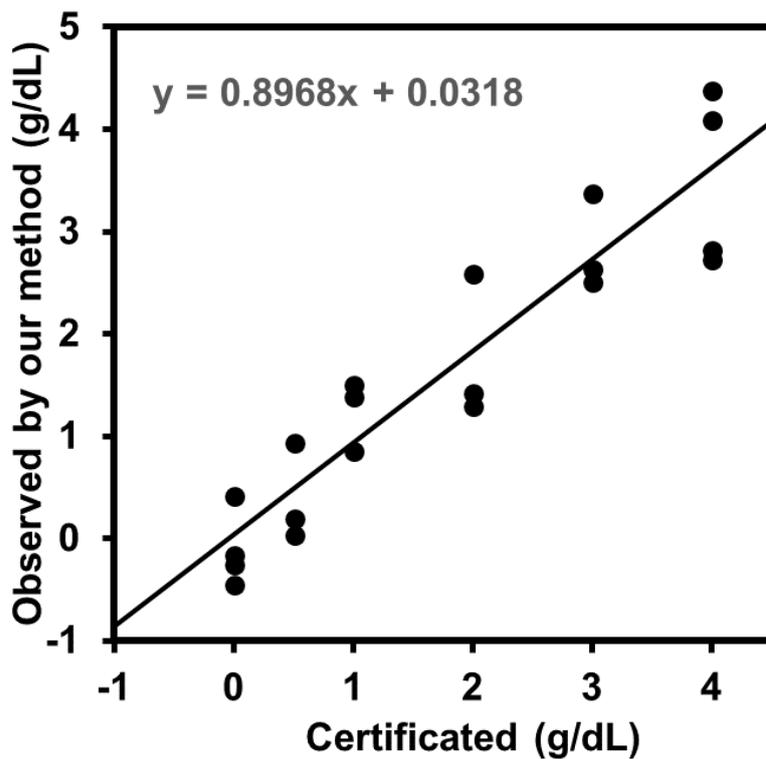


図3 既知濃度のヘモグロビンに対する相関

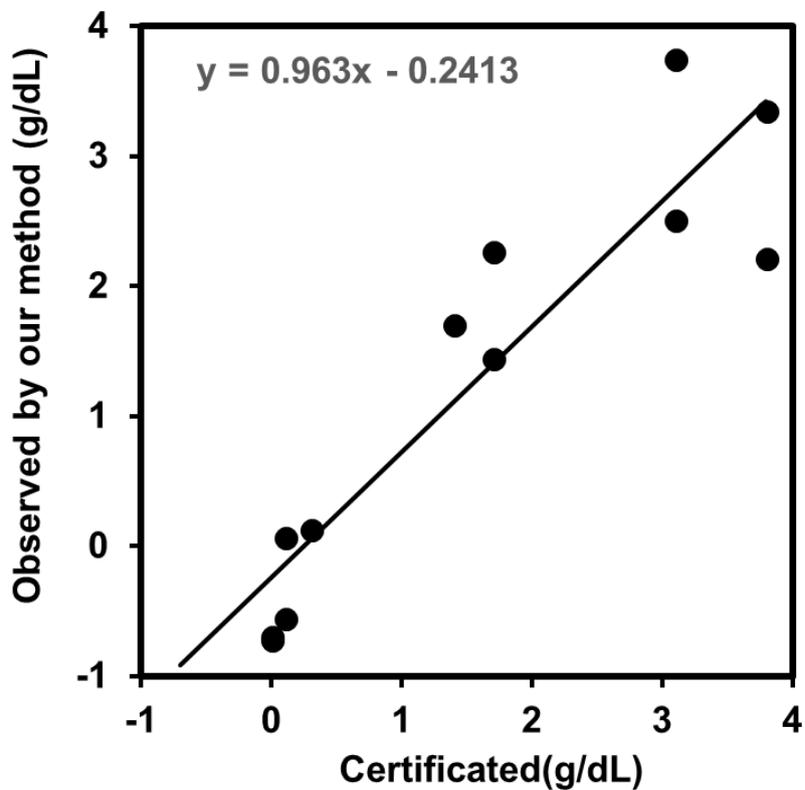


図4 臨床検体での既知濃度のヘモグロビンに対する相関

## 【サブテーマ 2】 チョコレート嚢胞液中のヘム鉄を観測可能な経膣プローブの設計開発

### 【2-1】 近赤外スペクトルを取得するための分光器の経膣プローブへの実装

### 【2-2】 近赤外イメージセンサー用光照射部の設計開発

### 【2-3】 受光部の設計開発

### 【2-4】 生体安全性が確保された観測部(レンズ、照射部)の設計

### 【2-5】 近赤外イメージセンサーによるヘム鉄濃度の擬似カラーイメージング法の開発

臨床試験用の試作プローブを開発する前段階として、体外試験用の経膣プローブを試作し、臨床試験用プローブ開発のための課題抽出・解決を行う必要があった。これには、既存の経膣プローブを用いて、光学系の実装方法やユーザビリティの向上、プローブの形態・素材など安全性を高めるための検討を行った。また、これらの結果を基に光ファイバーを内蔵可能なプローブを試作し、プローブを用いて光強度を測定したところ、濃度依存性を確認できるものとなり(図 5)、臨床試作に反映させた。

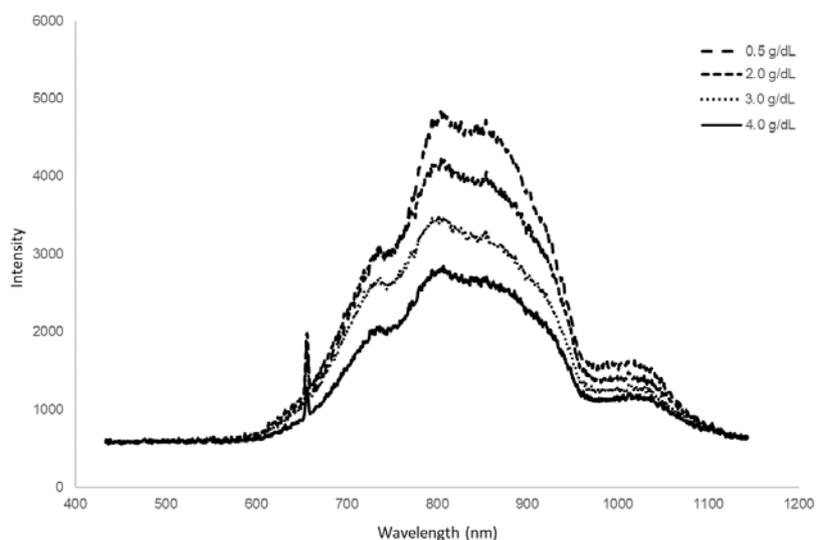
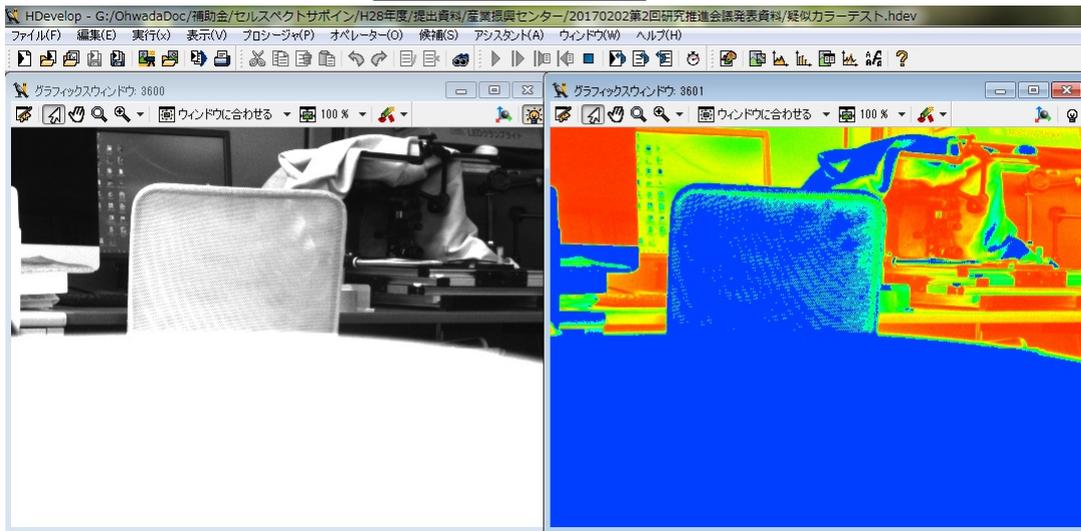
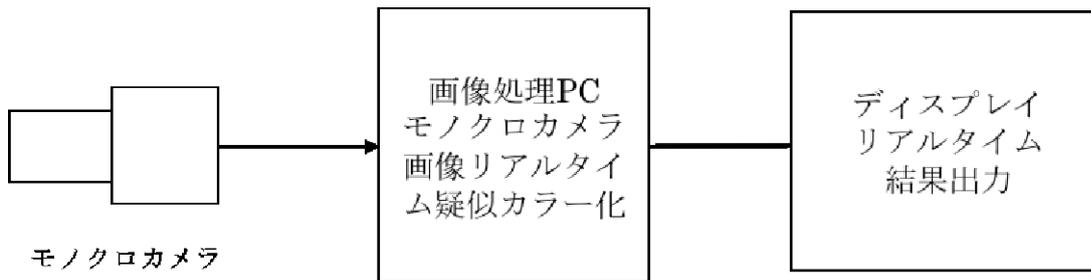


図 5 プローブで測定された光強度

さらに、これらで得た各波長のデータから、PC による出力信号の画像化ソフトウェアプログラムや (モノクロ 8bit グレースケール→擬似カラー256 調変換) (図 6)、VisualApplets を使用した FPGA による出力信号の画像化プロジェクトを作成し (モノクロ 8bit グレースケール→擬似カラー256 調変換) (図 7)、ヘム鉄濃度を擬似カラーイメージングするプログラムを開発した。この上、現場での操作性や表示性能を向上するため、ユーザーインターフェースの最適化を行った。



(入力画像)



(出力画像)

図 6 ソフトウェアプログラムによる出力信号変換実施例(入力はモノクロカメラ)

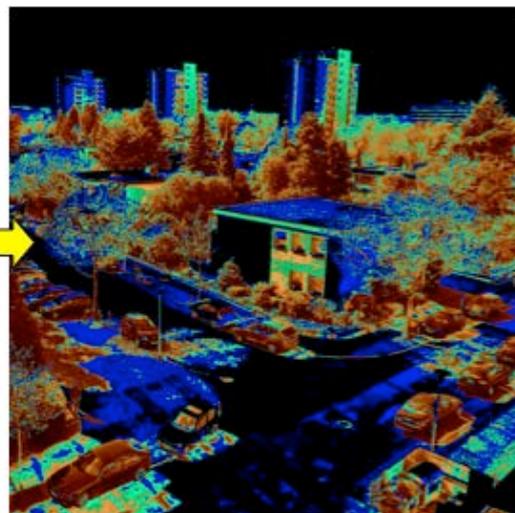
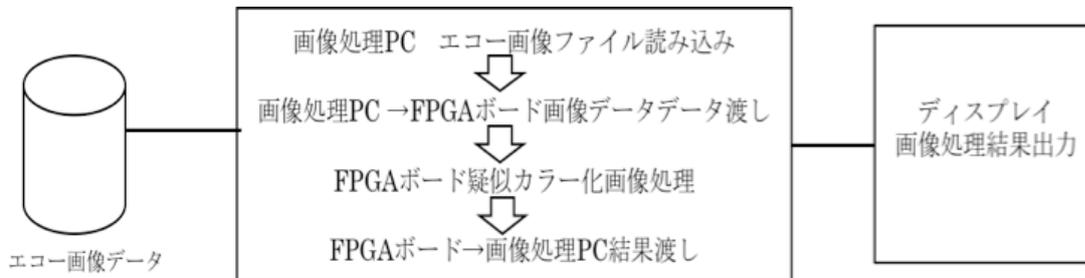


図7 VisualApplets 使用して FPGA による出力信号変換実施例(入力静止画モノクロデータ)

【サブテーマ3】組織学的安全性の確認

【3-1】サーモグラフィーによる中心温度変化の計測

【3-2】組織学的変化の確認

豚肉に対して、サブテーマ【1】、サブテーマ【2】で使用された光学条件による光を照射し、サーモグラフィーによる全体温度変化(図8)と、中心温度変化を計測した(図9、10)。照射から10分間温度変化を測定したが、温度変化はおおよそ $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 以内であり、光源の照射による温度変化は認められなかった。また、熱によるタンパク質変性、凝固、水分蒸発なども起こらなかった。

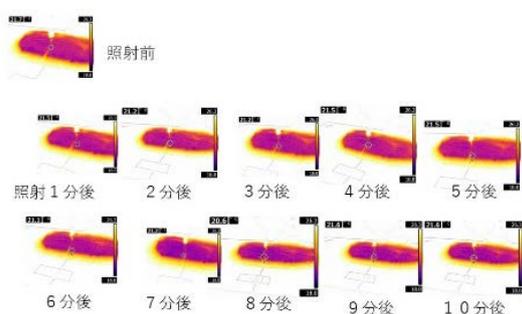


図8 サーモグラフィーによる温度変化計測

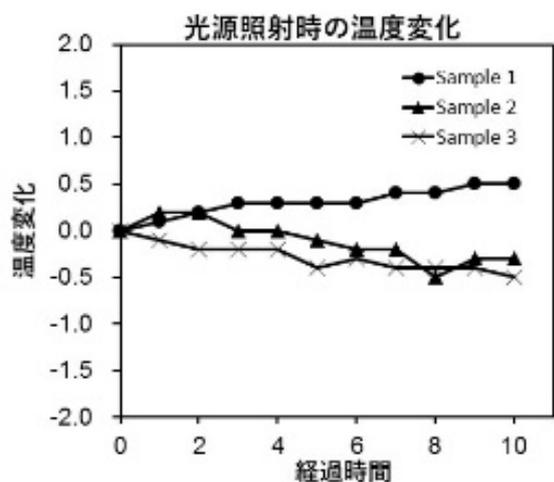


図9 光源照射時のサンプルの温度変化

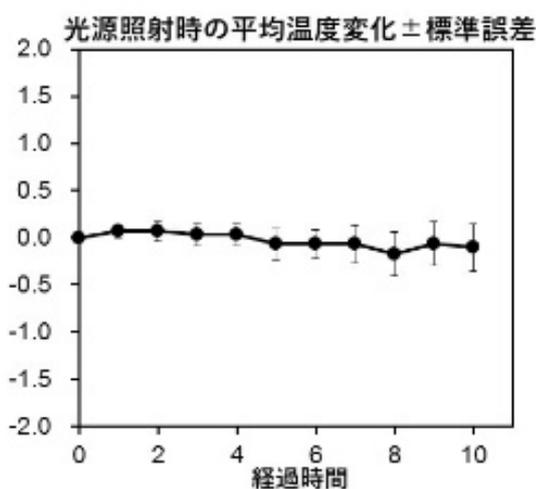


図10 光源照射時の平均温度変化±標準誤差

#### 【サブテーマ 4】 臨床試験に適するためのプローブ試作品の設計と製作

##### 【4-1】 近赤外スペクトル取得用分光器の超音波プローブへの実装

##### 【4-2】 近赤外イメージングセンサーの超音波プローブへの実装

##### 【4-3】 プローブ用画像処理プログラムの開発

サブテーマ 2 で得られた結果を基に、分光器もしくはイメージセンサーとエコーのドッキングプローブを開発し、分光学的な測定を行った(図 11)。エコープローブによる画像取得時にはゼリーを用いるため、ゼリーを用いた条件で模擬嚢胞液について分光学的な測定をしたところ、模擬嚢胞の濃度に依存したスペクトルを得ることができた(図 12)。また、この測定条件で超音波画像も同時に取得可能なことを確認した。この成果より、超音波で嚢胞を探してから低侵襲に嚢胞中のバイオマーカー濃度を観測可能な超音波プローブを実現することができた。

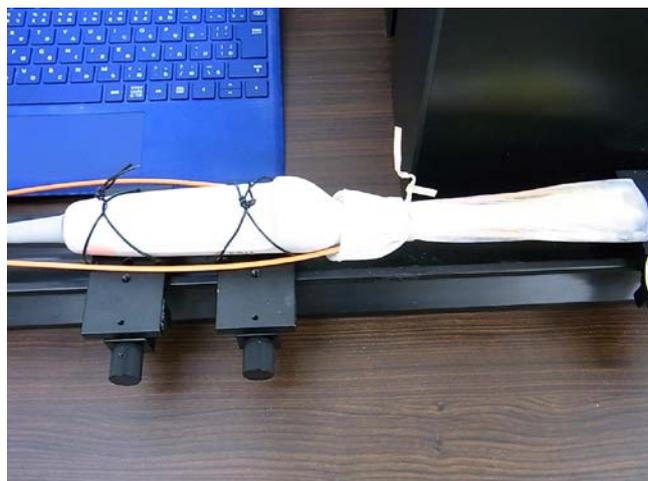


図 11 光ファイバー固定ガイドを装着したプローブ。  
プローブカバーを装着し、光学試験台上に固定している。

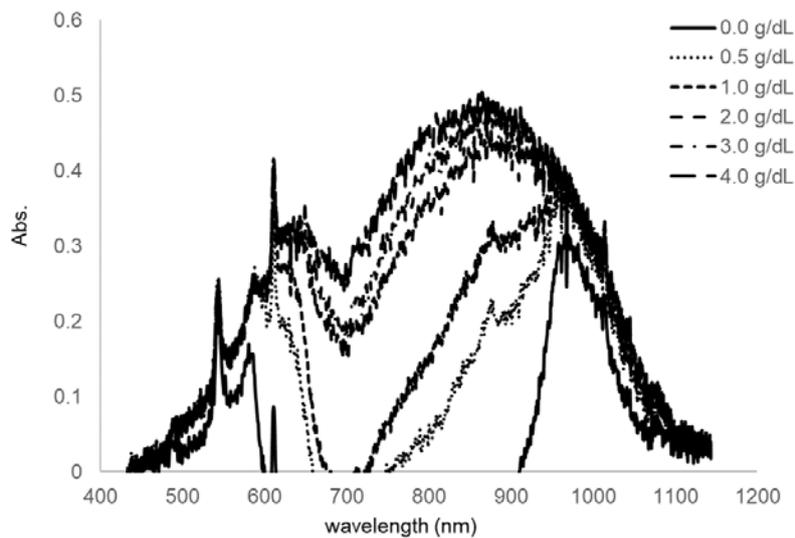


図 12 超音波プローブに実装された近赤外スペクトル取得プローブでの測定結果

その上で、実際の臨床試験で医師が使い易いユーザーインターフェースが必要となるため、表示・解析システムのユーザビリティ改善や操作性向上のためのプログラムを開発した(図 13、14)。さらに、今後の実装に向けて、各種画像処理演算処理を FPGA ボードで実行できるハードウェア処理用アルゴリズムの開発や、治験を想定したデータベースプログラム開発を行った(図 15)。

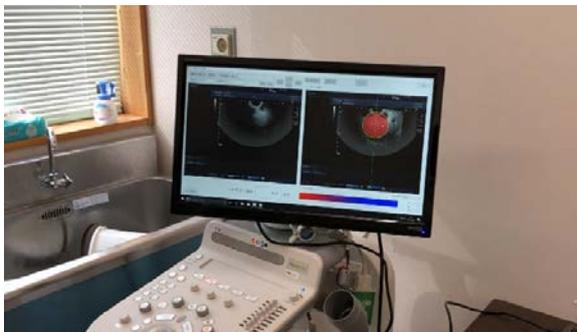


図 13 エコー装置実機稼働

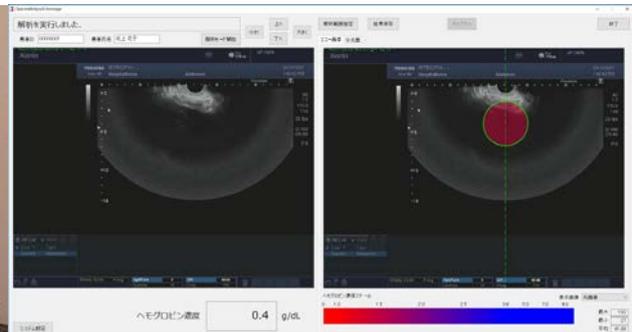


図 14 プログラム実行画面

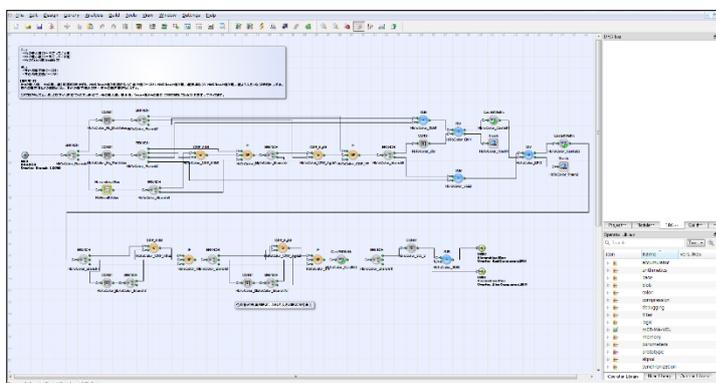


図 15 FPGA 用アルゴリズム生成画面

【サブテーマ 5】 症例研究の拡充と子宮内膜症の悪性化と嚢胞内鉄濃度変動による発癌機序の解明

【5-1】 発癌機序仮説の検証

臨床検体中の遊離鉄、ヘム由来鉄、総鉄、抗酸化物質としてのヘモグロビンの化学種について解析を行った。検体中の遊離鉄、総鉄、及びヘム由来鉄は内膜症性嚢胞で高く、卵巣癌(EAOC)において低かった。これまでの研究において、内膜症性嚢胞嚢胞液においては酸化されたヘモグロビンであるメヘモグロビンの割合が高く、EAOC の嚢胞液ではオキシヘモグロビンの割合が高いことが報告されている。この結果は、子宮内膜症性卵巣嚢胞由来検体では、非がんと卵巣がんとで傾向が異なり、卵巣がんの方は全体的に濃度が低い事を示した。結果をより確実なものとするために、今後も測定を継続してデータの積み増しを行う。

また、腫瘍内容液の酸化ストレスマーカーと抗酸化マーカーを測定したところ、増殖しやすいように癌細胞が環境を変化させていることが推察される結果が得られた。これらの結果と発がんとの関連を継続して検討して行く。

## 最終章 全体総括

### 3-1 研究開発成果まとめ

- ①模擬チョコレート嚢胞内のヘム鉄濃度測定法を開発し、相関係数  $r=0.89$  を達成した。多変量解析を採用することにより、さらに高い精度で、かつより一般的に使用出来るヘム鉄濃度測定法を開発することが出来た。
- ②臨床試験用試作品へ発展させるべく、赤外イメージセンサーの最適化や波長取得の最適化を行い、疑似検体・臨床検体の測定例を拡充し、測定精度・再現性を向上させることが出来た。
- ③サーモグラフィー及び組織学的検討により、豚肉への光源照射試験において、光源照射による温度変化・組織学的変化が生じないことが確認できた。通常の経膈超音波診断は1分以内であるが、その10倍の時間を照射しても、まったく温度上昇は認められなかったため、第1相臨床試験へ進むことが可能であると判断した。
- ④サブテーマ【2】での試作品を発展させ、さらに装置構成、プローブ形状等を最適化し、試作品の製造を行った。また、画像処理演算処理等プログラムの開発を行い、ユーザビリティを向上出来た。
- ⑤子宮内膜症が悪性化する段階で、酸化ストレスから抗酸化ストレス環境に変化していることが確認できた。酸化ストレスの代表である鉄濃度測定が、悪性化の指標になることを生化学的に証明できた。

### 3-2 研究開発後の展開について

子宮内膜症の悪性化の診断は、経膣エコープローブ、造影 MRI 法により実施されているが、いずれも形態学的所見しか得られないため、侵襲的な病理学的検査により確定診断される。また、病理学的な検査方法では、高頻度に検査することが困難であるため、その経過を観察していくには経膣エコープローブ法に依存している。本研究開発品は経膣エコープローブの利便性、低侵襲性に加えて、悪性化に対して高い感度、特異度、的中率を与えるものであり、子宮内膜症性腫瘍の定期的な治療管理、及び悪性化を早期に診断することが可能になる。

現在、グローバルにおける医療診断機器の機能における需要は、個別化（癌）、低侵襲化、であり、また、そのターゲット分野として、婦人科・産婦人科が重要視されている。本研究開発品はこのニーズを満たすものとしてその市場の成熟が確実視されている。また、海外デストリビューションは卵巣癌の診断法、Prognostic diagnostics（経過予知診断）のツールの拡充を目指しており、本製品の日本での上市後、本技術をこれらのニーズに特化させた仕様におけるグローバルな流通が可能と考えている。本バイオマーカーの特許は PCT 出願により優先権が確保されており、また、パリルートにおける出願もなされており、当事国のほとんどに権利を行使する予定である。なお、本特許は、2017 年 1 月に、日本において特許査定されている（特許第 6078687 号）。