

腫瘍モデルマウスを用いた超音響画像の有用性検証

研究分担者	堀口 明男	防衛医科大学校	泌尿器科学講座	講師
研究分担者	津田 均	防衛医科大学校	病態病理学講座	教授
研究分担者	辻田 和宏	富士フイルム株式会社	R&D 統括本部	
		メディカルシステム開発センター		主任研究員
研究協力者	櫛引 俊宏	防衛医科大学校	医用工学講座	准教授

要旨

本研究事業では超音響画像化技術を臨床応用する対象疾患として前立腺癌を挙げている。前立腺癌組織に対する超音響画像の有用性を検証するための1つの手段として、ヒト前立腺癌腫瘍モデルマウスを対象に計測し、可能性を検討した。ヒト前立腺癌モデルマウスでは、癌組織特異的に集積することが知られている蛍光イメージング試薬(MMPSense™750)の集積が認められ、さらに病理画像から多くの血管組織の走行も観察でき、超音響画像取得のために適した動物モデルであった。泌尿器科領域での腫瘍モデルマウスとして、ヒト前立腺癌モデルマウスに加えてヒト腎癌モデルマウスを作成した。これらを対象に超音響画像を取得した。またコントロールのために正常マウスを取得し、比較検討した。腫瘍内に血管が豊富なヒト腎癌モデルマウスは、腫瘍内に超音響信号が認められ、ヒト前立腺癌モデルマウスとは異なる像であり、正常マウスとも異なる超音響画像であった。

A. 研究目的

人口の高齢化、食生活の欧米化に伴い、前立腺癌患者が増加しており、我が国においても深刻な社会問題となりつつある。前立腺特異抗原(PSA)が前立腺癌のスクリーニング法として定着したことにより、臨床症状を伴わない早期癌の割合が高くなっている。早期前立腺癌の増加に伴い、前立腺癌根治手術(根治的前立腺全摘術)の件数も著しい増加傾向にある。

本研究事業では、超音響画像化技術の臨床応用の対象疾患として前立腺癌を挙げている。超音響画像化技術を用いて腫瘍辺縁や腫瘍内腔の画像特性を取得し、正常組織を比較対象として、超音響画像と超音波画像を取得することを目標としている。また、腫瘍組織の病理標本組織像と超音響画像とを比較し、選択性(抽出精度)、感度(画像化範囲)、解像度を指標とした超音響画像診断の適用疾患を絞り込むことを目的としている。

そこで、これらの目的を達成するために、ヌードマウスにヒト前立腺癌細胞株を移植した皮下腫瘍

モデルマウスを作製し、その形成腫瘍の確認を行った。

マトリックス分解酵素(Matrix Metalloproteinase : MMP)は細胞外基質を分解する酵素である。多くの種類の癌細胞が MMP を強く発現しており、その活性が癌の増殖、浸潤、転移能などと関係している。MMPSense™750 は、MMP-2, -3, -7, -9, -12 や-13 が発現している組織で分解され、近赤外領域の蛍光を生じる酵素活性型蛍光 *in vivo* イメージング試薬である。本研究では MMPSense™750 を用いて腫瘍組織の確認を行い、病理画像とともに作製した腫瘍組織の評価を行った。

さらに、これらの目的を達成するために、ヌードマウスにヒト前立腺癌細胞株とヒト腎癌細胞株を移植した皮下腫瘍モデルマウスを作製し、皮下腫瘍モデルマウスを対象に、超音響画像の取得を行い、可能性を検証した。

B. 研究方法

本実験は防衛医科大学校動物倫理委員会から承認されている研究課題「マウスの皮下腫瘍に対する光-超音波法による分子イメージング」に準じて実施した。

今回は、プロト機でリニアプローブを使用し、通常の超音波検査に加えて、光音響モードを実施した。波長 756 nm を励起光の波長として選択し、血管構造を主に観察した。

以下、腫瘍モデルマウスの作成について記載した。

- ・ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 の培養
ヒト前立腺癌細胞株である PC-3 は、10 % Fetal Calf Serum (FCS) と ペニシリン (100 units/mL) ・ ストレプトマイシン硫酸塩 (100 µg/mL) を含む Minimal Essential Medium (MEM) を用いて、37 °C ・ 5 % CO₂ 条件下で培養を行った。
- ・ヒト前立腺癌腫瘍モデルマウスの作製
PC-3 細胞の浮遊液 100 µL (2×10⁶ cells) を、体重 20-25 g の BALB/c ノードマウスの左腹側部皮下に投与し、2 cm 程度の大きさになったタイミングでマウスを光音響画像観察に供した(図 1)。

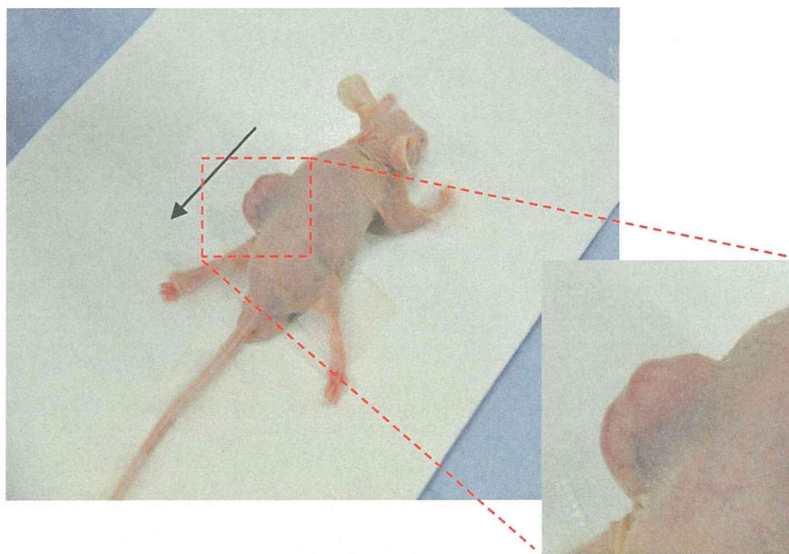


図 1 ヒト前立腺癌腫瘍モデルマウス

- ・ヒト腎癌細胞株 Caki-1 の培養
ヒト腎癌細胞株である Caki-1 は、10 % Fetal Calf Serum (FCS) と ペニシリン (100 units/mL) ・ ストレプトマイシン硫酸塩 (100 µg/mL) を含む Minimal Essential Medium (MEM) を用いて、37°C ・ 5 % CO₂ 条件下で培養を行った。
- ・ヒト腎癌細胞株腫瘍モデルマウスの作製
Caki-1 細胞の浮遊液 100 µL (2×10⁶ cells) を、体重 20-25 g の BALB/c ノードマウスの左腹側部皮下に投与し、4 cm 程度の大きさになったタイミングでマウスを光音響画像観察に供した(図 2)。

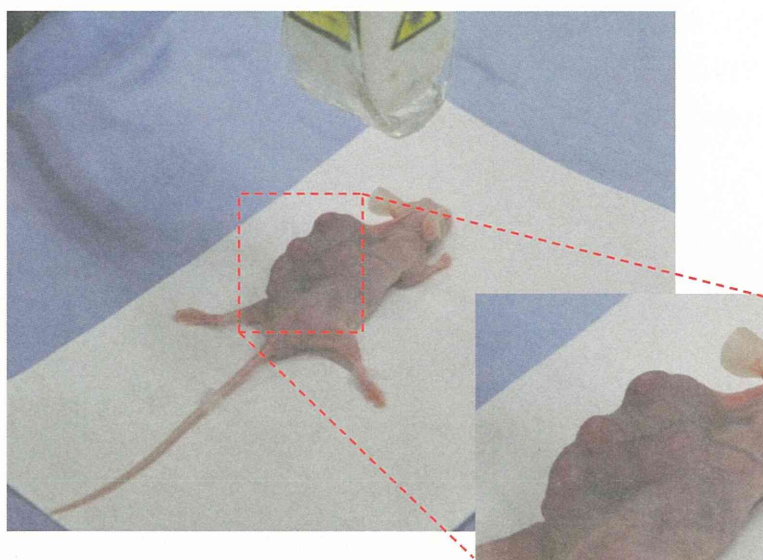


図2 ヒト腎癌細胞株腫瘍モデルマウス

・正常マウス

今回はヌードマウスではないので、計測部位の体毛を除毛クリームにより、除去した。

・*in vivo* 蛍光イメージング

観察は、ヒト前立腺癌マウスに MMPsense™750 を 100 μ L (2 nmol) 静脈内投与し、6 時間後にイソフルラン麻酔下で生体観察システム・オリンパス OV110 を用いて観察した。励起波長は 750 nm, 検出蛍光波長は 775 nm とし、皮膚を切開して腫瘍組織を露出させた状態で観察を行った。

・病理学的観察

同様の手法で別に作製したヒト前立腺癌マウスから腫瘍組織を含む周辺組織を摘出し、ホルマリン水溶液で固定後、常法に従いヘマトキシリン-エオジン(HE)染色を行った。

C. 研究結果

図 3 に皮膚を切開して露出させた腫瘍組織の明視野画像および MMPsense™750 を用いた腫瘍組織の蛍光画像を示した。作製した腫瘍組織は直径約 2 mm の半円球状であり、腫瘍組織特異的に MMPsense™750 に由来する蛍光を検出することができた。



図3 ヒト前立腺癌細胞を皮下移植後の腫瘍部位画像(左)および MMPsense™750 を静脈内投与後の蛍光画像(右)

図4に腫瘍組織及びその周辺組織を摘出後のHE染色結果を示す。皮下組織と腫瘍組織の間には、摘出時に肉眼で観察可能な血管が走行していたほ

か、腫瘍組織周辺には多くの血管が新生されていることが観察できた。

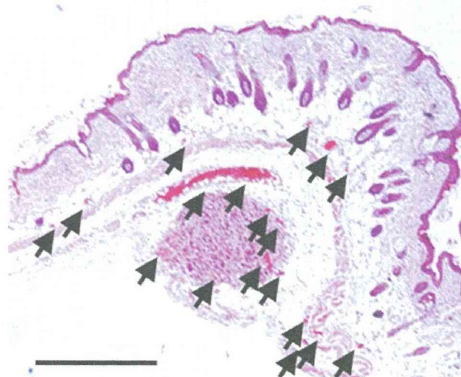


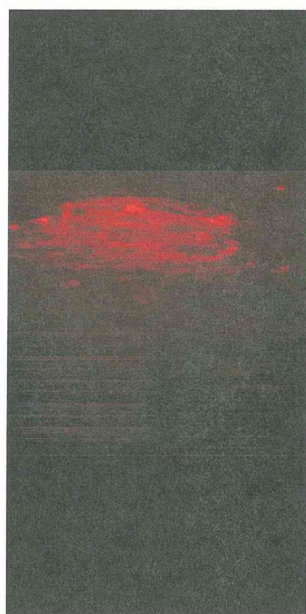
図4 ヒト前立腺癌細胞を皮下移植後のHE染色画像。矢印は血管組織を示している。Bar=500 μ m

マウスを対象にした光音響画像を下記の通り順に示す。

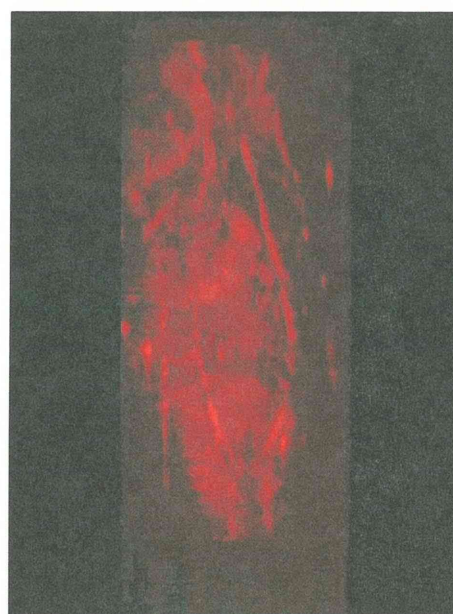
図5(a)(b)に正常マウスの腹側からの光音響画像を示す。(b)は投影画像である。投影画像はプローブを画像を再構成して得られた。背側からの血管3次元構造が観察できた。

図5, 図6ではマウス皮膚上を走査して得られた像は血管構造を反映しており、走査法及び、画像再

走査した後に、画像を再構成して得られた。腹側からの血管3次元構造が観察できた。図6(a)(b)に正常マウスの背側からの光音響画像を示す。(b)は投影画像である。投影画像はプローブを走査した後に、構成が目的通りに出来ていることが確認できる。また、本光音響画像は、ヘモグロビンの局在を示しているため、血管構造以外の臓器からの光音響信号が観察できていることが確認できる。



(a)



(b)

図5 正常マウスの腹側からの光音響画像
(a)断層像, (b)投影像

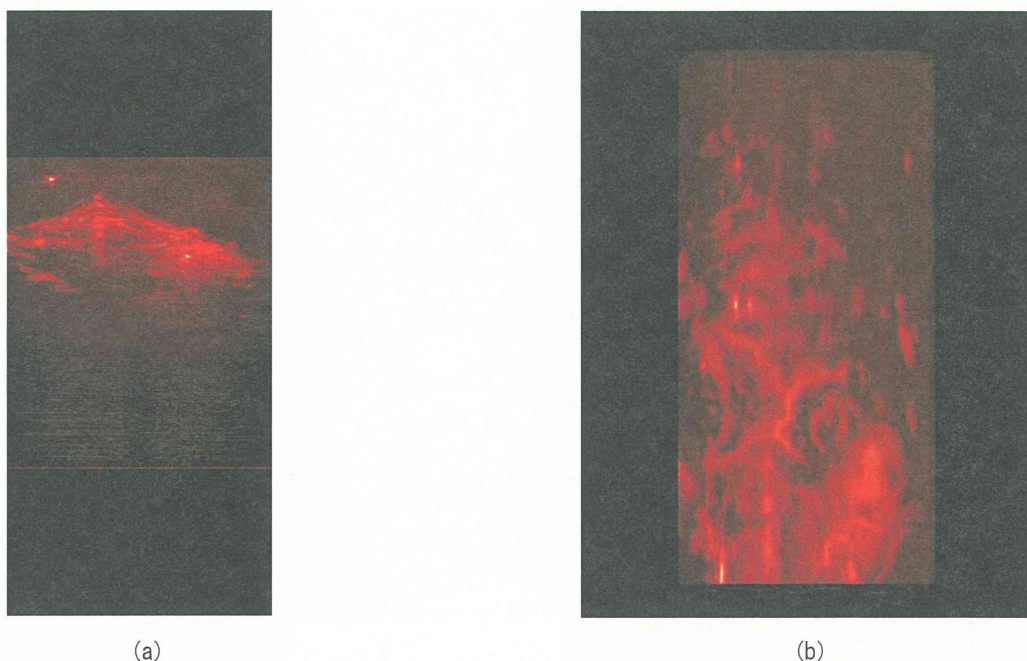


図6 正常マウス背側からの光音響画像
(a)断層像, (b)投影像

図7(a)(b)にヒト前立腺癌モデルマウスの背側(腫瘍)からの光音響画像を示す。(b)は光音響像(赤)と超音波画像(白)の重畳画像である。

死後ホルマリン固定した腫瘍を切り出した断面像を示す。画像内にとろどころ赤く見えるのが腫瘍血管である。

図8にヒト腎癌細胞株腫瘍モデルマウスの犠牲

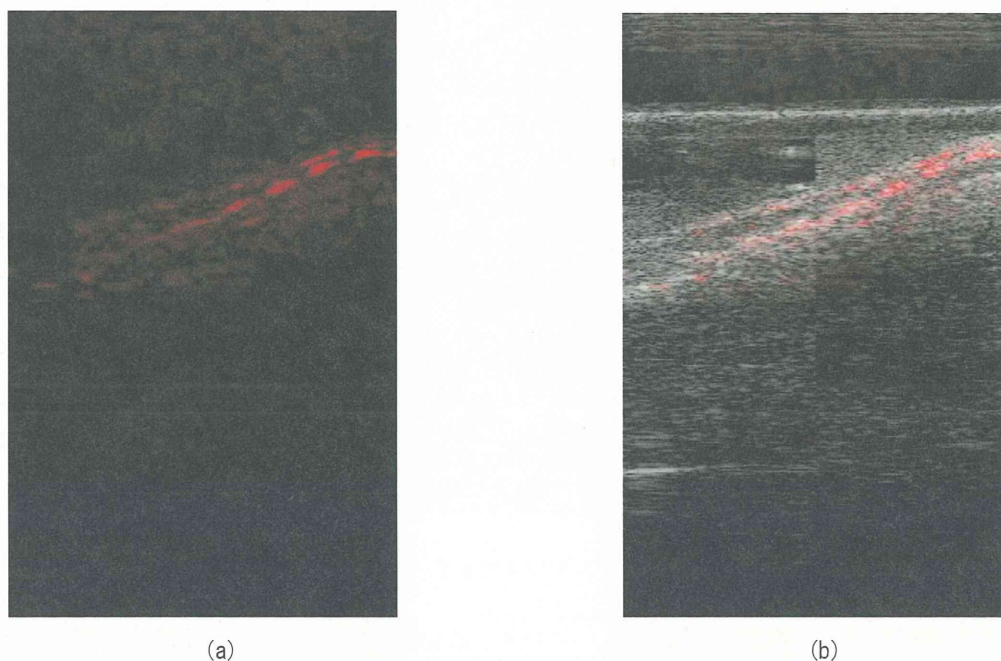


図7(a) ヒト前立腺癌モデルマウスの背側(腫瘍)からの光音響画像
(a)光音響画像, (b)光音響像(赤)と超音波画像(白)の重畳画像



図8 ヒト腎臓癌モデルの断面像

図9にヒト腎臓癌モデルマウスの背側(腫瘍)からの光音響画像を示す。光音響像(赤)と超音波画像(白)の重畳画像である。腎臓癌特有の hyper

vascularityにより腫瘍内の信号が観察でき、これは断面像と一致していることが確認できる。腫瘍血管が観察出来ている事がわかる。

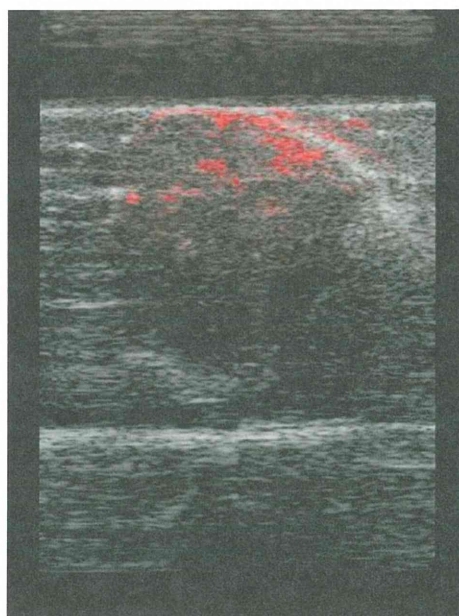


図9 ヒト腎臓癌モデルマウスの背側(腫瘍)からの光音響画像

D. 考察

ヌードマウスにヒト前立腺癌細胞株を移植した皮下腫瘍モデルを作製し、MMPSense™750を用いた腫瘍組織特異的な蛍光イメージングにより、

その腫瘍形成の確認を行うことができた。しかしながら、皮膚を切開し腫瘍組織を露出させない限り、蛍光イメージング画像を得ることは困難であった。ヌードマウス皮膚組織は厚さ1 mmにも満たないが、その皮膚組織でさえも蛍光イメージン

グ画像取得時には障壁となっている。このことから、本研究事業である光音響画像化技術を用いて、皮膚を切開することなく非侵襲的に腫瘍組織をイメージングすることができれば、従来の蛍光イメージングでは補えなかった深部組織のイメージング技術として有用である。

さらに、HE染色画像から腫瘍組織周辺に多くの新生血管の存在を確認できた。本研究事業における光音響画像化技術は血液中のヘモグロビンを光吸収体としてイメージングすることを主眼としているため、正常組織と比較して多くの新生血管が存在する腫瘍組織の光音響画像を取得できると考えられる。

これらのことから、選択性(抽出精度)、感度(画像化範囲)、解像度を指標とした光音響画像取得対象として本腫瘍モデルを利用できることが確認された。

正常マウスを対象にした場合に取得できた光音響画像では腹側からも背側からも主要な血管が描出できた。また、ヘモグロビンの分布ということで臓器からの信号も確認できている。

腫瘍モデルマウスについては、その血管構造に応じた画像が取得できたが、ヒト前立腺癌出の診断を想定した腫瘍辺縁や腫瘍内腔の画像特性の詳細解析には至らなかった。病理画像との比較が必要である。一方で腎臓癌特有の hyper vascularity により腫瘍内の信号が観察でき、これは断面像と一致していることが確認できた。

E. 結論

マウスを対象にしてもプロト機で光音響画像が取得できることを確認した。現在の設定(仕様)では、ヘモグロビンの局在を光音響画像で観察するため、血管構造以外の臓器からの信号が確認された。また、ヒト腎臓癌モデルマウスでは腫瘍血管が観察できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 榎引俊宏, 平沢壮, 大川晋平, 石原美弥. “3次元培養細胞観察のための光音響イメージング顕微鏡の創製”. 日本レーザー医学会誌, 33(3), p.318, 2012.11.

2. 学会発表

国際学会

- 2) Kushibiki T, Hirasawa T, Fujita M, Ishihara M. “Development and integration of photoacoustic imaging technology”. Conference on Laser Surgery and Medicine 2012, Proceedings of Conference on Laser Surgery and Medicine 2012, p.78-79, 2012.04.

国内学会

- 3) 榎引俊宏, 平沢壮, 大川晋平, 石原美弥. “3次元培養細胞観察のための光音響イメージング顕微鏡の創製”. 第33回日本レーザー医学会, 日本レーザー医学会誌, 33(3), p.318, 2012.11.
- 4) 榎引俊宏, 平沢壮, 大川晋平, 石原美弥. “光音響技術を用いた in vivo および in vitro 分子イメージングによる生体機能解析”. 第5回医実隊・医大研究交流会, 2012.05.

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

I. 参考文献

なし

脈管疾患における光音響技術の有用性の検証

研究協力者	綾織 誠人	防衛医科大学校	内科学講座	助教
研究分担者	池脇 克則	防衛医科大学校	内科学講座	教授
研究分担者	辻田 和宏	富士フイルム株式会社	R&D 統括本部	
		メディカルシステム開発センター		主任研究員

要旨

本研究事業では光音響画像化技術を臨床応用する対象疾患として脈管疾患を挙げている。そこでプロト機の性能評価としてウサギを用いた動物実験を実施し、主要血管から微細な血管まで描出できることを確認した。さらに、健常人の下腿皮下静脈、頸部血管、鼠径部血管を光音響で観察したところ、①脈管特異的な信号を認めた。②脈管の遠位壁に比して近位壁に信号を強く認めたが、側壁や内腔は無信号であった。③動静脈間で信号の差はなかった。④2 cm 以深では信号の減衰を認めた。

三次元画像を含めた光音響によるヒト脈管の描出に成功した。今後の検討を積み重ねることにより診断モダリティとしての有用性を探索していきたい。

A. 研究目的

わが国では、食生活が欧米化され、高齢化に伴い血管疾患が増加している。血管疾患には、動脈と静脈性疾患に大別され、前者は動脈硬化性疾患としてわが国の死因の約 3 割を占めるに至っている。脂質異常症、高血圧、糖尿病、喫煙などの動脈硬化危険因子の存在により、頸動脈の動脈硬化性プラークが発症・進展し、このプラークの破綻により虚血性脳卒中が発症する。虚血性脳卒中はわが国の死亡原因の上位に位置し、かつ寝たきりの最大の原因であり、その予防は喫緊の課題である。重要である。一方、静脈性疾患として、下肢静脈瘤、静脈血栓症などが代表的な疾患として挙げられる。下肢静脈瘤は、日本人の約 9 %の人に、中でも出産経験のある成人女性の 2 人に 1 人に発症するといわれ、患者数は 1000 万人以上と推定されている。静脈血栓症では、深部静脈に発症した場合、エコノミークラス症候群とよばれ致死的な肺塞栓症を合併する危険がある。先の東日本大震災の被災者の 3 人に 1 人が発症したとの報告がある。このように、血管疾患の発症頻度は増加しているが、画像診断技術としては、超音波検査を筆頭に CT, MRI などに限局されているのが現状であ

り、MRI, CT 共に装置が大型であるが故に、可搬性や即時性が低くならざるをえない。またより詳細な情報を得ることができる造影 CT は、造影剤使用により腎機能が低下するため腎不全例では実施できない。超音波診断装置は可搬性や即時性が高く、ドップラー信号を見ることで脈間の画像化が可能である。しかしながらドップラー信号は血流量に依存するため、遅い流速の血管や細い血管描出は得意ではない。

光音響画像化技術は、光と超音波の長所を融合した放射線被曝のない新しい画像診断ツールとして着目されている。造影剤の使用なく血管網の画像化が可能で、小型化が可能で可搬性や即時性に優れており、血流速に依存しないため、細い血管からも信号が得られる特徴がある。防衛医科大学校と富士フイルムで独自に開発している光音響画像撮像システムでは、プローブ表面から約 30 mm の深部で約 100 μm 径の血管の画像化が可能となっており、動物を対象とした実験では超音波画像、ドップラー画像よりも微細な血管網を 3 次元で描出可能となっている。また、既に倫理委員会で承認されている前立腺癌の診断で外科的切除された前立腺組織を対象とした場合には、前立腺周囲の血管構造が明瞭に観察可能であること

が判明している。同じく倫理委員会の承認を経て、浅頭動脈、後頭動脈を対象として本法と3D-CTAの比較検討を行っている。

本研究では、体表からのアプローチで微細な血管網を観察する光音響画像の有用性を検証するために、脈管疾患を対象として血管走行や血管内血栓を確認観察することを目的とする。すなわち、これらの疾患の画像診断への臨床応用を目指した第一段階として、現行の超音波画像と比較することを目的とする。さらに健常人における予備的検討を行い、脈管の画像化を目指すべく基礎データの蓄積を推進する。

B. 研究方法

【B-1】光音響画像取得

光音響画像化技術は、光と超音波の長所を融合した放射線被曝のない新しい画像診断ツールとして着目されており、造影剤の使用なく微細な血管網の画像化が可能な手法である。光音響画像化装置は、一般的に画像診断で用いられている超音波診断装置とそのプローブにレーザー装置及び、レーザー光を導光する光ファイバーから構成される(図1参照)。生体への安全性について、レーザーについては、JIS C 6802：レーザー製品の安全基準にて規定されている。種々の条件下(波長、露光時間、動作モード、点光源、測定開口と距離など)で安全性の目安を与えるMPE(Maximum Permissible Exposure：最大許容露光量)を十分に下回る条件にて実施する。超音波については、JIS T 0601にて規定されており、十分な安全性が確保されている状況である。今回は、リニアプローブを使用する。

通常超音波画像検査で使用しているリニアプローブに安全な条件のレーザーを対象(生体)に照射するための導光手段を付加した光音響プローブを使用することにより、超音波画像に重畳した光音

響画像が得られる。よって、通常の超音波検査に加えて、光音響モードを実施することにより、静脈疾患の診断を目的とした血管構造の観察を行う。血管構造の観察には、ヘモグロビンが光の吸収体となり、本研究では波長756nmを励起光の波長として選択した。超音波画像のみで診断した場合と比較して、血管走行や血管内血栓の確認観察を行う。

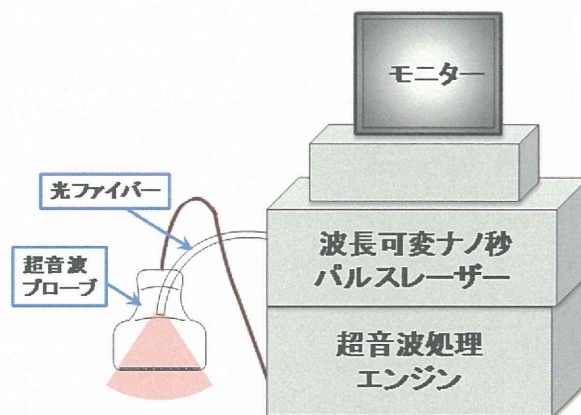


図1 プロト機の構成

【B-2】ウサギによるプロト機の性能評価

プロト機の性能評価として、ウサギソケイ部を対象に測定した。その様子を図2に示す。当初は、筋肉注射のみであったが、データを安定してとるために、人工呼吸器を使用して実験した。具体的には、気管を横切開し、気管チューブを約4cm挿入固定。気管に結紮した。人工呼吸器に接続し、1回換気量22ml、呼吸回数40回/分とした。計測中は保温マットで保温を行い、体温を36～37℃に維持した。

なお、本実験は防衛医科大学校動物倫理委員会から承認されている研究課題「光—超音波イメージング法の開発」に準じて実施した。



図2 人工呼吸器コントロール下のウサギ

【B-3】臨床研究

平成24年11月2日に、防衛医科大学校倫理委員会により、「脈疾患における光音響技術の有用性の検証」として臨床研究が承認された。健常人ボランティアを含めて超音波検査を実施する外来及び入院患者で同意が得られた場合に実施することとした。いずれも、超音波画像を取得した後に、光音響モードとして、超音波画像と重畳して光音響画像を表示するような設定で実施した。健常人における測定部位は①前腕②鼠径部③下腿④頸部とした。

C. 結果

【C-1】ウサギによるプロト機の性能評価

ウサギソケイ部の測定結果を図3に示す。ウサギソケイ部から大腿部の毛を剃った後に頭側から尾側へ走査して取得した。プローブの走査は超音波探触子と励起光源であるパルスレーザー導光が一体化された光音響プローブを自動ステージに接続し、ステージ走査しながら断層画像を取得した。取得した画像を再構成して3次元画像、および投影画像とした。

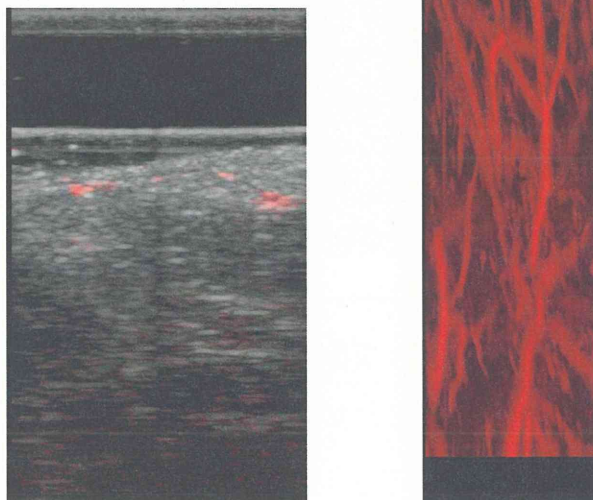


図3 ウサギソケイ部の光音響像(赤)と超音波画像(白)の重畳画像(左)、プローブ走査後の光音響像の投影画像(右)

【C-2】臨床研究

8例(延べ12例)の健常人で検討を行った。①下腿、②鼠径部、③頸部を観察し、以下の所見が得られた。

① 下腿皮下静脈

図4のように、下腿内側の皮下に走行する大伏

在静脈を観察した。大伏在静脈は、下肢静脈瘤を形成したり、冠動脈大動脈バイパス術の血管グラフトとして使用されたりするなど、臨床的に重要な血管である。皮下を走行するため、駆血により容易にうっ血し、採血や静脈路確保の対象となる。



図4 下腿静脈の観察

図5に光音響画像と超音波画像を重ね合わせたものを示す。皮膚に沿って強い信号を認める以外、大伏在静脈の近位壁に強く、遠位壁に弱く信号を認める。大伏在静脈側壁の信号を認めなかった。

それ以外の信号の解剖学的構造物との関連は示唆できなかった。他の対象でも、上記のような所見は同様に認められた。

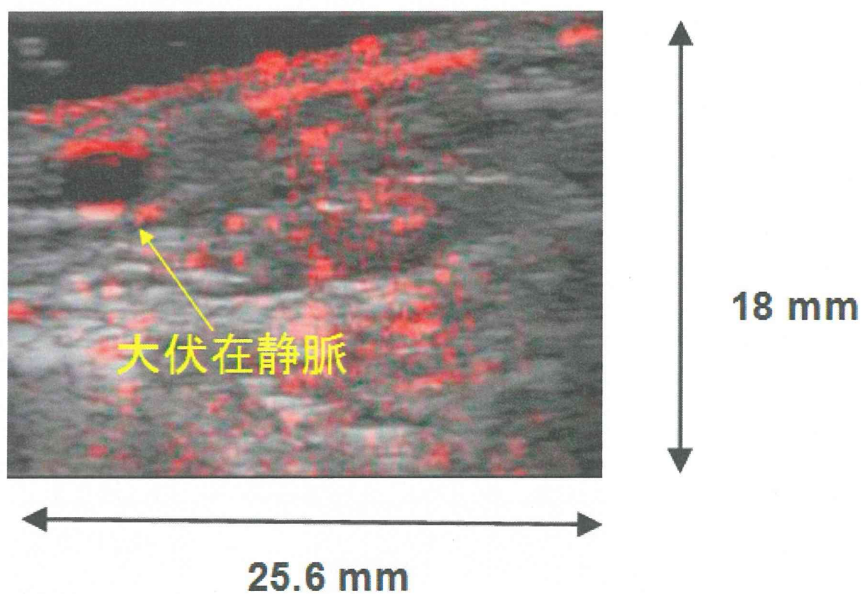


図5 大伏在静脈の観察

② 鼠径部の血管

鼠径部に存在する大腿静脈はDVTの好発部位であり、この部の血栓には下大静脈フィルターを挿入し肺動脈塞栓の予防を行う場合があり、大腿静脈の血栓性状の評価は臨床的に重要である。図5に代表的な画像例を示す。総大腿動静脈は、皮下の大伏在静脈とは異なり、皮膚から約2cmと比較

的深部に存在する。①と同様に、皮膚に強い信号を認めるが、大伏在静脈で認められた近位壁の信号集積を認めなかった。また、図6では、総大腿静脈内腔にモザイク状に信号を認めるが、他の対象では認めないことも多く、アーチファクトの可能性が高いと考えられた。

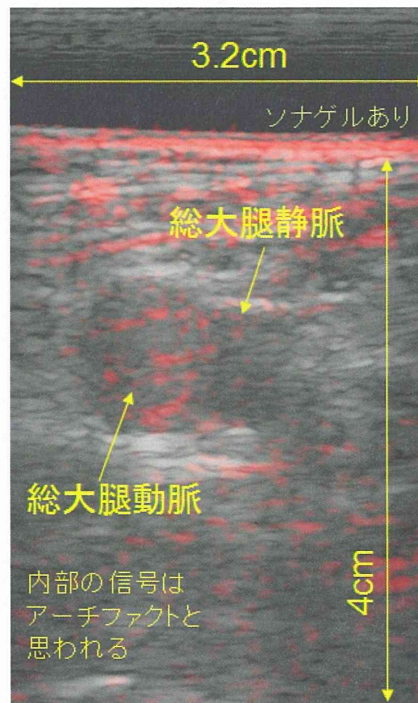


図6 総大腿動静脈の観察

③ 頸部血管

頸部の脈管は外側に内頸静脈、内側に総頸動脈が存在し、内頸静脈がより浅い位置に存在する。図7に代表的な画像を示す。内頸静脈の近位壁に

沿って強い信号が認められたのに対し、総頸動脈にはほとんど信号がなかった。信号強度にいくらか差があるものの、他の対象でも同様の傾向が見られた。

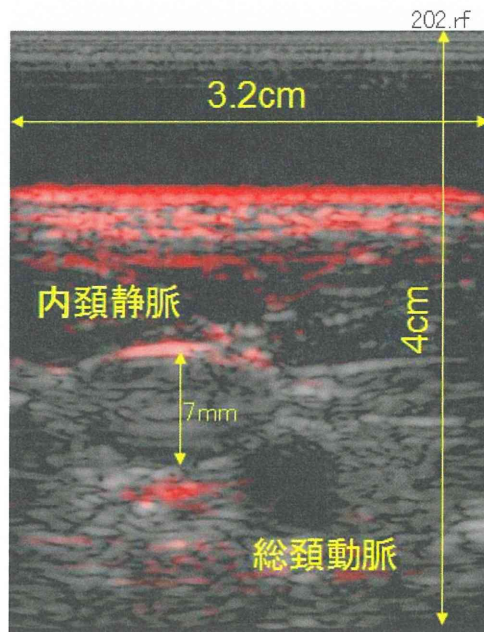


図7 頸部血管の観察

④ 皮下静脈の三次元構築

以上のように、光音響の信号は皮膚の浅いところに認めやすいことが確認されたため、前腕の皮膚をスキャンし、取り込んだ動画から三次元構造

の構築を試みた。

前腕の皮下静脈も、下肢と同様に血管遠位壁に比して、近位壁に強い信号を認めた。このスキャン画像から図8のような三次元画像が構築できた。



図8 皮下静脈の三次元構築

D. 考察

ウサギ実験では光音響像と超音波画像の重畳画像において、位置ずれなく重畳できていることが確認できた。また、主要血管から微細な血管まで描出できることを確認した。比較のため、超音波ドプラー像を取得したが、検出血管数が光音響画像の方が多かった。

臨床研究においてはステージを使った走査は出来ないため、下肢のエコーではルーチンで実施している血管走行を確認しながら検査することになる。この場合、超音波画像モードと光音響画像が切り替えられると、医師が見慣れている超音波画像で確認できる。光音響画像診断技術が普及する前の導入時には必須であることが分かった。現在までの結果で、血管性状に加えて血管の深さには個人差があるので、今後はさらに症例数を重ねて行く。

今回臨床的に重要な血管である頸動脈と大腿静脈を中心に、健常人での基礎検討を行った。その結果、光音響画像により可視化できる脈管は皮下2cm以内であることが分かった。動脈と静脈間では明らかな差を認めることはなかったが、近位壁は遠位壁に比較してより強い信号を認めた。静脈血栓の質的診断には血管内腔の描出が必要とされるが、今回の検討では信号を認めない場合が多かった。このことは近位壁の高信号と関連しているかもしれない。

E. 結論

健常人の下腿皮下静脈、頸部血管、鼠径部血管の光音響による観察を行った。脈管近位壁に信号が強く認められ、三次元画像を含めた光音響による脈管の描出に成功した。2 cm 以深の構造物描出には困難を伴うかもしれないが、条件検討を行うことにより血管内腔の構造物を描出できる可能性があると考えられる。今後、さらなる健常人にお

ける基礎検討を積み重ねるとともに、脈管疾患患者における検討を進めることにより、診断モダリティとしての有用性を探索していきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okawa S, Hirasawa T, Kushibiki T, Ishihara M. “Reconstruction of the optical properties of inhomogeneous medium from photoacoustic signal with l_p sparsity regularization”. Proceedings of SPIE, 8581, p.858131-1-858135-6, 2013.03.
- 2) Hirasawa T, Fujita M, Okawa S, Kushibiki T, Ishihara M. “Improvement in quantifying optical absorption coefficients based on continuous wavelet-transform by correcting distortions in temporal photoacoustic waveforms”. Proceedings of SPIE, 8581, p.85814J-1-85814J-7, 2013.03.
- 3) 石原美弥. “レーザー生体相互作用とその治療と診断への応用”. 光学, 41(11), p.548-555, 2012.11.
- 4) 石原美弥. “光音響画像の現状”. 電気学会論文誌C(電子・情報・システム部門誌), 132(8), p.1287-1290, 2012.08.
- 5) 平沢壮, 榎引俊宏, 藤田真敬, 石原美弥. “連続ウェーブレット変換を用いた光音響信号解析による光吸収係数同定法の開発”. 第 51 回日本生体医工学会論文集, 2012.05.

2. 学会発表

国際学会

- 6) Kushibiki T, Hirasawa T, Fujita

M, Ishihara M. “Development and integration of photoacoustic imaging technology”. Conference on Laser Surgery and Medicine 2012, Proceedings of Conference on Laser Surgery and Medicine 2012, p.78-79, 2012.04.

国内学会

- 7) 石原美弥. “Development of photoacoustic technique towards deeply penetrating in vivo imaging and its clinical application”. 第 35 回日本分子生物学会年会, 第 35 回日本分子生物学会年会 プログラム, p.88, 2012.12.
 - 8) 大川晋平, 平沢壮, 榎引俊宏, 石原美弥. “光音響信号源分布画像化の逆問題解法によるアプローチ”. 電気学会 光・量子デバイス研究会, 電気学会研究会資料, OQD-12-030, p.27-31, 2012.09.
 - 9) 石原美弥. “【シンポジウム】「バイオイメーシングが医療を変える」光音響原理に基づく組織の分子イメージング”. 第 48 回日本小児循環器学会総会・学術集会, 日本小児循環器学会雑誌, 28(Supplement), p.s98, 2012.06.
 - 10) 平沢壮, 榎引俊宏, 藤田真敬, 石原美弥. “連続ウェーブレット変換を用いた光音響信号解析による光吸収係数同定法の開発”. 第 51 回日本生体医工学会, 生体医工学, 50(特別), p.212, 2012.05.
3. その他
- 11) 石原美弥. “5.バイオメディカルフォトニクス
の治療技術応用に関する技術動向 5.1 光音響
技術の応用 5.1.1 光音響画像の高分解能化の
ための画像再構成”. 電気学会技術報告, 1250,
p.46-49, 2012.06.
 - 12) 藤田真敬, 平沢壮, 石原美弥. “次世代の画像診
断装置としての光音響画像化技術開発と医師
の期待”. O Plus E (optics +electronics), 34(2),
p.151-154, 2012.01.

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

I. 参考文献

なし

血管外科領域の臨床価値探索に関する考察

研究協力者	藤田 真敬	航空自衛隊	航空医学実験隊	第2部長
研究分担者	池脇 克則	防衛医科大学校	内科学講座	教授
研究協力者	北垣 学	自衛隊横須賀病院	診療部	医局長兼内科長

要旨

光音響画像の生体応用について過去の動物実験の現状と応用の可能性を探った。主に血管外科領域の臨床価値について考察を行った。微細な血管やリンパ管の立体画像の構築取得が報告されている。現状のドップラー血流画像計より、光音響画像の方が、分解能が高く、かつ血液の流れが無くてもその存在範囲を描出可能である。

下肢静脈瘤などの手術においては分岐血管の確実な結紮処理が再発の予防に重要とされるが、あらかじめ分岐血管の3D画像の取得が可能となれば、分岐の処理の効率化が期待できる。手術を行う術者の視野の範囲外から分岐する血管の立体的位置関係の把握は、手術中の不意の出血を予防可能となり、あらゆる血管手術の安全性を高めることになる。

癒着の多い再手術において血管の位置を術中に観察できれば、癒着剥離における出血の軽減も可能となる。

既存の超音波検査では難しい急性血腫、陳旧性血腫、注入液の鑑別も光音響画像の取得により確実に行うことが可能となる。下肢静脈瘤の血管内レーザー治療において、レーザーで焼却する静脈周辺に麻酔液を注入する手順(低濃度大量局所浸潤麻酔(Tumescent local anesthesia: TLA 麻酔))では現状の超音波画像モニターでは、薬液注入後から血管と薬液注入部の判別が難しくなり、安全な施行には熟練を要するが、光音響画像の取得が成されれば、判別は容易になる。各種超音波ガイド下穿刺においても血腫などの合併症が減少する。既存の超音波画像との組み合わせを行うことで、血管のモニター精度が大きく向上し、新しい外科手技の導入に際し医療安全の観点からも大きく貢献できることが期待される。

A. 光音響画像装置の医学応用

超音波画像は、音の反射を画像化する。光画像は、光の散乱や吸収を画像化する。光音響画像は、光の吸収体で発生した超音波を画像化する。いわば、体の深部を切開いていけば見ることができる色のコントラストを、体表から見ることができる。動脈血と静脈血の色の違い、血腫、貯留液などの色の違いから質的な診断が可能になる。皮膚の下では毛細血管、静脈、動脈により血液が循環している。色が着いていないため観察することはむづかしいが、リンパ液の循環も存在する。血管内には血液が流れていて、周辺組織とは異なる色合いをしている。光音響画像の最大の特徴は深部(また

は体表から数センチメートル)にある血液や体液の色を体の外から検出し、画像化できる。

最近の研究では、未だに動物実験や装置開発にかざられているものの、血管、リンパ管などの立体画像化の報告がなされている[1-10]。(表1)光音響の技術は生体計測にも応用されつつある。血液の酸素飽和度の計測[11]、血液中のグルコース濃度(血糖値)の計測[12]、が実用化されつつある。画像分解能は数百マイクロン。超音波画像やCT画像の分解能に相当する。この高分解能と画像の鮮明なコントラストから血管内径の計測も可能である[13]。(表2)注目する物質の濃度による血液の微細色調変化をとらえることで、本研究以外にも非侵襲的モニターが将来商品化される可能性がある。

表1 血管, リンパ管などの立体画像化における光音響画像の応用

著者	年	雑誌	臓器, 動物種
Jansen	2011	Opt Lett	ヒト 冠状動脈プラーク
Mallidi	2011	Trends Biotechnol	総説
Zhang	2011	Mol Imaging Biol	リンパ管
Hu	2010	Opt Lett	マウス 眼底血管
Kim	2010	J Biomed Opt	ラット リンパ管
Wang	2010	IEEE Trans Biomed Eng	マウス 血管, リンパ管の統合画像
Hu	2010	J Biomed Opt	マウス 微小血管網画像
Li	2010	J Biomed Opt	マウス 脳血管像
Song	2008	Med Phys	ラット 胸腔構造
Kolkman	2006	Lasers Surg Med	ヒト 静脈弁

表2 生体情報計測における光音響画像の応用

著者	年	雑誌	臓器, 動物種
Wang	2011	Opt Lett	マウス
Sieg	2005	Diabetes Technol Ther	ヒト
Kolkman	2004	Phys Med Biol	ウサギ

表3 各種診断における光音響画像の応用

著者	年	雑誌	臓器, 動物種
Hu	2011	J Biomed Opt	ラット 骨肉腫
Holotta	2011	J Biomed Opt.	マウス 心筋梗塞
Kruger	2010	Med Phys	ヒト 乳房血管
Wang	2010	Biomed Opt Express	イヌ 前立腺癌
Yang	2009	Opt Lett	ラット 内視鏡
Sun	2009	J Biomed Opt	ヒト 指関節腔
Hong	2008	Clin Cosmet Investig Dermatol	マウス 皮膚がん
Sato	2005	J Trauma	ラット 熱傷深度
Viator	2003	Appl Opt	ヒト 母斑深度

各種腫瘍の診断や予後診断には血管形態, 血管新生や血管浸潤の観察が必須である[14, 15]が, 現状では毛細血管を高分解能で特異的に描出可能な技術が無い場合, 摘出後の病理検査でしか分からなかった情報を摘出前に得ることが可能になる。この可能性から各種腫瘍の診断[16 - 22]や, 心筋梗塞[23], 熱傷の深度診断[24]に応用する研究が進んでいる。(表 3)

B. 光音響画像装置の位置付け

表 4 に現状で利用可能な医療用画像装置の比較を行った。CTはごく軽度の被曝という弊害はあるものの, 全身の臓器構造や広範囲の観察が可能のため, 内科医は幅広い範囲の診断が可能となり, 外科医は正確な手術計画を練ることができる。画像合成による 3D 画像は正確な処置や手術の計画に威力を発揮している。

表4 各種生体画像装置の比較

装置	普及度	被曝	汎用性	分解能	深部 診断	広範囲 画像	血流 診断	立体 画像	検査 時間
MRI	○	◎	△	○	◎	○	◎	○	△
CT	○	△	△	◎	○	◎	◎	◎	△
超音波	◎	◎	◎	◎	△	△	△	△	○
超音波 ドップラー	○	◎	○	○	△	△	○	△	○
光音響	△	◎	○	◎	△	△	○	○	○
X線	◎	△	◎	△	○	○	△	△	○

MRIはCTと比べると検査時間が長くなるが、被曝せず、全身の臓器構造が観察できる。骨にかこまれた脳幹部の病気の診断はCTでは画像上の雑音(アーチファクト)に邪魔されて困難な場合が多いが、MRIによる脳幹部の病気の診断能力はCTを遙かにしのぐ。

超音波検査では検査範囲に制限があるものの、臓器の形態に生じる異常を痛み無くリアルタイムに表示できる。また画像の輝度によりある程度の質的な診断が可能である。超音波ドップラー法の追加により、血流という動きについて正常異常の診断も可能になった。

レントゲン画像は最も汎用性、利便性に優れているが、立体的な画像表示を行うことができず、撮影方向を変えた複数の写真から立体構造を想像するしか無い。

光音響画像装置は、簡便に造影剤を使うことなく血管の画像化が可能という特徴から、かつて無い医療応用の可能性が指摘されている。診断が難しい、さまざまな腫瘍の無侵襲診断が各種画像検査所見の組合せにより議論される場合が多い。これらの治療前診断の議論の中では常に腫瘍と血管との関係が考察されている。CT, MRI, 超音波検査に加えて、血管の分布情報が得られる光音響画像検査が普及すれば、診断効率の向上が期待できる。

**C. 心臓血管外科, 関連内科診断分野への
応用の可能性と期待**

光音響画像が血液中のヘモグロビンの色調を微細に検出し、画像のコントラストに鋭敏に反映する特性は、心臓血管外科, 関連内科診断分野への応用が期待できるものと考えている。現状のドップラー血流画像は血液の流れを検出できるが、光音響画像はより分解能が高く、かつ血液の流れが存在しない場合でも血液の存在範囲を描出できる。

下肢静脈瘤などの手術においては分岐血管の確実な結紮処理が再発の予防に重要とされる[25]が、あらかじめ分岐血管の3D画像が取得できれば、分岐の処理の効率化が期待できる。手術を行う術者の視野の範囲外から分岐する血管の立体的位置関係の把握は、手術中の不意の出血を予防可能となり、あらゆる血管手術の安全性を高めることになるであろう。

癒着の多い再手術において血管の位置を術中に観察できれば、癒着剥離における出血の軽減にもつなげることが可能となる。高齢化に伴う再手術症例の増加に対応する有効な手段となり得る。

これまでの超音波検査では難しかった急性血腫, 陳旧性血腫, 注入液の鑑別も光音響画像の取得でより確実となる。

下肢静脈瘤の血管内レーザー治療が普及しつつ

あり、需要も高まるものと思われるが、レーザーで焼却する静脈周辺に麻酔液を注入する手順(低濃度大量局所浸潤麻酔(Tumescent local anesthesia: TLA 麻酔))がある[26]。血管の熱焼却時の疼痛の予防と周辺組織の保護のために血管周囲に大量の麻酔液を注入するものである。この手順において現状の超音波画像によるモニターでは、薬液の注入後から血管と薬液注入部の判別が難しくなり、熟練を要するものと思われるが、光音響画像の取得が成されれば、判別は容易になる。

同様に各種エコーガイド下穿刺において上記の難点が解消され、血腫などの合併症の頻度が減少するであろう。血管のモニター精度が大きく向上することから、新しい外科手技の導入に際し医療安全の観点からも大きな貢献が期待される。

現状の画像構築時間で検査診断に十分応用可能と思われるが、手術中や血管穿刺のモニターへの応用にはリアルタイムの画像構築が求められる。これらの技術開発に大きく期待したい。

D. まとめ

新規技術である光音響画像の主として血管外科領域への応用範囲を考察した。

- 1) 下肢静脈瘤の手術において分岐血管の立体画像取得により高い処理効率が期待できる。
- 2) 血管手術において血管の立体的位置関係の把握により手術の安全性を高めることが可能となる。
- 3) 癒着の多い再手術において癒着剥離における出血の軽減が可能となる。
- 4) 急性血腫、陳旧性血腫、注入液の鑑別がより確実に施行できる。
- 5) 各種エコーガイド下穿刺において血腫などの合併症が減少する。

光音響画像の医療分野への導入により以上の効果が期待され、血管のモニター精度が大きく向上することから、新しい外科手技の導入が相次ぐ昨

今、医療安全の観点からも大きな貢献が期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 藤田真敬, 平沢壮, 石原美弥, “次世代の画像診断装置としての光音響画像化技術開発と医師の期待”. O Plus E (optics +electronics), 34(2), p.151-154, 2012.02.
- 2) Hirasawa T, Ishihara M, Tsujita K, Hirota K, Irisawa K, Kitagaki M, Fujita M, Kikuchi M. “Continuous wavelet-transform analysis of photo-acoustic signal waveform to determine optical absorption coefficient”, Proceedings of SPIE 8223, p.822333-1-822333-7, 2012.01.
- 3) 平沢壮, 石原美弥, 藤田真敬, 北垣学, 大谷直樹, 菊地眞. “光音響画像化技術の要素技術開発とシステム化:動物モデルによる性能検証”. Optics and Photonics Japan 2011, p.P65-1-P65-2, 2011.11.
- 4) 平沢壮, 石原美弥, 藤田真敬, 北垣学, 大谷直樹, 堀口明男, 菊地眞, “光音響技術を利用した選択的イメージングの動物モデルによる検証”. 日本レーザー医学会誌, 32(3), p.334, 2011.10.
- 5) 平沢壮, 石原美弥, 辻田和宏, 入澤覚, 北垣学, 藤田真敬, 菊地眞. “深部組織の高分解能画像化に向けた光音響画像診断法の開発と評価”. 第50回日本生体医工学会(CD-ROM), 2011.04.

2. 学会発表

国際学会

- 6) Hirasawa T, Ishihara M, Tsujita K, Hirota K, Irisawa K, Kitagaki M, Fujita M, Kikuchi M. “Continuous

wavelet-transform analysis of photo-acoustic signal waveform to determine optical absorption coefficient”. SPIE Photonics West Biomedical Optics, BiOS 2012, SPIE Photonics West BiOS Technical Summaries, p. 268, 2012.01.

国内学会

- 7) 平沢壮, 石原美弥, 藤田真敬, 北垣学, 大谷直樹, 堀口明男, 菊地眞. “光音響技術を利用した選択的イメージングの動物モデルによる検証”. 第 32 回日本レーザー医学会総会, 日本レーザー医学会誌, 32(3), p.334, 2011.11.
- 8) 平沢壮, 石原美弥, 藤田真敬, 北垣学, 大谷直樹, 菊地眞. “光音響画像化技術の要素技術開発とシステム化:動物モデルによる性能検証”. Optics and Photonics Japan 2011, Optics & Photonics Japan 2011, p.P65-1-P65-2, 2011.11.
- 9) 平沢壮, 石原美弥, 辻田和宏, 入澤覚, 北垣学, 藤田真敬, 菊地眞. “深部組織の高分解能画像化に向けた光音響画像診断法の開発と評価”. 第 50 回日本生体医工学学会大会, 生体医工学, 49(特別), p.311, 2011.04-2011.05.

F. 参考文献

1. K. Jansen, A.F. van der Steen, H.M. van Beusekom, J.W. Oosterhuis, G. van Soest :Intravascular photoacoustic imaging of human coronary atherosclerosis, Opt Lett., 36(5),pp. 597~599(2011)
2. S. Mallidi, G.P. Luke, S. Emelianov : Photoacoustic imaging in cancer detection, diagnosis, and treatment guidance,Trends Biotechnol., 29(5),pp. 213~221(2011)
3. F. Zhang, G. Niu,G. Lu, X. Chen: Preclinical lymphatic imaging,Mol Imaging Biol., 13(4),pp. 599~612(2011)
4. S. Hu, B. Rao, K. Maslov, L.V. Wang: Label-free photoacoustic ophthalmic angiography,Opt Lett. ,35(1), pp.1 ~ 3(2010)
5. C. Kim, T.N. Erpelding,K. Maslov,L. Jankovic,W.J. Akers,L. Song, S.Achilefu, J.A. Margenthaler,M.D. Pashley, L.V. Wang: Handheld array-based photoacoustic probe for guiding needle biopsy of sentinel lymph nodes,J Biomed Opt. 15(4), p.046010(2010)
6. Y. Wang, K. Maslov, C. Kim,S. Hu, L.V. Wang: Integrated photoacoustic and fluorescence confocal microscopy, IEEE Trans Biomed Eng., 57(10), 2576 ~ 2578(2010)
7. S. Hu, L.V. Wang: Photoacoustic imaging and characterization of the microvasculature,J Biomed Opt. ,15(1),p. 011101 (2010)
8. C Li,A Aguirre,J Gamelin,A Maurudis,Q Zhu, LV Wang: Real-time photoacoustic tomography of cortical hemodynamics in small animals ,J Biomed Opt., 15(1),p. 010509(2010)
9. K.H. Song, L.V. Wang: Noninvasive photoacoustic imaging of the thoracic cavity and the kidney in small and large animals,Med Phys., 35(10),pp. 4524~4529 (2008)
10. R.G. Kolkman, N. Bosschaart,B. Kok, T.G. van Leeuwen, W. Steenbergen: Photoacoustic imaging of valves in superficial veins,Lasers Surg Med., 38(8),pp. 740~744 (2006)
11. Y. Wang, S. Hu, K. Maslov,Y. Zhang,Y.