

平成 30 年 6 月 3 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10429

研究課題名(和文) 高周波超音波および光音響特性を利用した軟部肉腫の術中イメージング法の確立

研究課題名(英文) Intra-operative imaging of soft tissue sarcoma with photoacoustic imaging

研究代表者

綿貫 宗則 (Watanuki, Munenori)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：90451575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：軟部肉腫の手術治療は、腫瘍を反応層より外側の健常組織で被包し、一塊として切除する広範切除術を行う。術前画像検査を元に反応層を予測して切除範囲を決めるが、軟部肉腫と健常組織の境界を正確に判断し、適切な切除が行われているかを術中に判断するのは極めて困難である。本研究では、ヒト骨肉腫株MG-63を移植した担癌ヌードマウスを作成し、光音響イメージングによって腫瘍組織のみを描出することに成功した。光音響イメージングによって術中に軟部肉腫と健常組織の境界の描出が可能となることが推定できた。

研究成果の概要(英文)：Surgery of soft tissue sarcoma is wide resection, which means macroscopically and microscopically complete sarcoma resection with reactive layer and normal tissue around it en bloc. Surgical margin is planned on the basis of pre-operative radiological findings. Under operation, it is quite difficult to confirm boundary between tumor and normal tissue and to judge whether tumor is properly resected. We could make photoacoustic imaging of human osteosarcoma xenograft in athymic nude mice. Photoacoustic imaging may enable intra-operative sarcoma imaging.

研究分野：整形外科

キーワード：軟部肉腫 光音響顕微鏡 光音響効果 ヌードマウス 担癌マウス IR780 イメージング装置 MG63

1. 研究開始当初の背景

「軟部肉腫」とは、筋肉、結合組織(腱)、脂肪、血管、リンパ管、関節、神経などの軟部組織から発生した悪性腫瘍である。軟部肉腫の治療は、化学療法と手術療法が組み合わせて行われる。手術療法は根治性の観点から、腫瘍を反応層(腫瘍膜様組織、周囲出血層、浮腫、変性筋組織等による肉眼的変色部)または偽被膜と呼ばれる層より外側の健常組織で被包し、一塊として切除する「広範切除」をめざして行われる。手術で十分な切除縁を得るためには、術前に腫瘍周囲に広がる反応層の外縁を把握することが極めて重要である。術前計画ではMRI検査が主に用いられ、T2強調像やGd造影像で軟部肉腫周辺に見られる信号変化から脂肪内の反応層を予測し切除範囲を決定する。しかし、術中に反応層より外側の脂肪組織で適切な切除が行われているか、肉眼で判断することは極めて困難である。また、反応層への腫瘍細胞の浸潤はごくわずかであることが多く、術中の迅速凍結病理診断でもその判断は困難である。

「三次元高周波超音波顕微鏡装置」は、三次元の超音波受信信号のデータセットの相関解析から生体内器官の構造がどのような力学的な構造によって支持されているかを明らかとすることができ、軟部組織の特性を評価できる可能性を秘めている。また、「光音響顕微鏡装置」は、物質にナノ秒オーダーのレーザー光を照射するときに発生する超音波を検出することをその原理とする。非接触的に高周波超音波振動子を組織上で二次元に走査することで、レーザーにより発生した超音波を検出するので、距離及び方位分解能に優れたイメージングシステムである。三次元高周波超音波顕微鏡装置から得られる三次元組織情報と光音響顕微鏡装置から得られる光音響特性を利用すれば、これまで困難とされていた軟部肉腫反応層による周辺脂肪組織の変化を検知し、術中診断精度の向上に大きく寄与するとの着想に至った、ことを背景とした。

2. 研究の目的

本研究課題では、「光音響効果」を背景として、三次元高周波超音波顕微鏡装置および光音響顕微鏡装置を改良することにより、「光音響顕微鏡を利用した軟部肉腫の非侵襲的なイメージング装置」の開発を念頭に置いた。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍を含む種々の組織を超音波顕微鏡および光音響顕微鏡を用いて観察した結果、光音響信号の強度は光の吸収係数に比例することがわかった。光音響信号の信号強度が最も大きくなる波長は、ヘモグロビンで532nm、脂肪組織で1209nmであった。

手術で摘出した軟部腫瘍周囲の組織に対し、中心周波数8.26MHz、素子面積5mm四方で波長532nm、1209nmのレーザーを照射し、

生じた光音響信号を解析し、腫瘍組織の新生血管および脂肪の差異による境界判定について検討した。

(2) 生体組織の光吸収、錯乱近赤外光蛍光色素腫瘍細胞そのものを描出する方法を検討した。光音響信号は光の吸収係数に比例し、生体内に多量に存在するヘモグロビンおよび水の吸収係数は波長に依存する。この両者の影響を受けにくい近赤外光の色素に対して、希釈系列を作成しそれぞれの光音響顕微鏡での検出精度を比較検討して、候補物質の絞り込みと、それぞれの色素に対する至適観察条件の検討を行った。その結果、光音響顕微鏡での腫瘍組織描出の候補となる物質を2種類の近赤外光色素(IR780、IR783)に絞り込むことができた。この2種の色素について、生体内での観察に適したレーザー波長の探索と、超音波計測系の感度向上のための新しい高速スキャン構造構築を行った。

(3) 色素が生体内にあっても光音響信号を検出できるかどうかの評価を行った。色素を含むアガロースゲルの小片を作成しこれをマウス筋肉内に包埋した筋肉内腫瘍の疑似モデルを作成した。この疑似腫瘍モデルを光源に波長可変レーザーを用いた光音響顕微鏡を使用して光音響イメージングをおこなった。

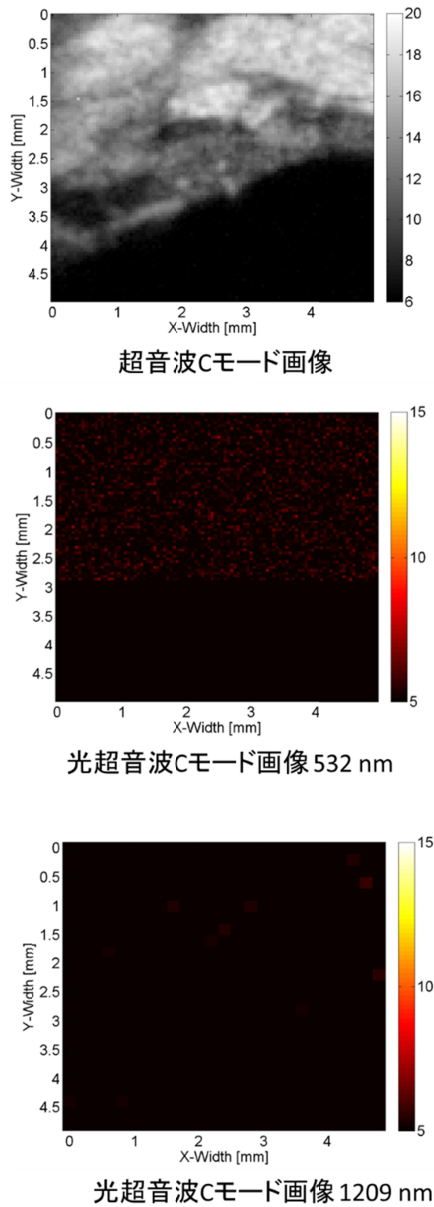
(4) 軟部肉腫の細胞培養はまだ確立されていない。そのため、ヒト骨肉腫株MG63を培養し、肉腫モデルとした。MG63をdishで培養し、90%confluentになったところで、色素を培地に投与し37℃でインキュベートした後、培地をPBSで洗浄し、光音響顕微鏡で培養細胞をイメージングした。光音響信号が最大になる色素の至適濃度およびインキュベートの至適時間を検討した。さらに共焦点レーザー顕微鏡でイメージングを行い、蛍光色素が細胞内に取り込まれていることを確認した。

(5) MG63培養細胞を移植した担癌マウスを作成し、色素を投与し生体内での肉腫組織の可視化モデルを作成した。胸腺摘除ヌードマウスもしくはSCIDマウスにMG63培養株を移植し、8週間程度飼育した。尾静脈へ色素静注後48時間でマウスを還流固定し、腫瘍組織の光音響イメージングを行った。さらに腫瘍組織のヘマトキシリン・エオジン染色標本を作成し、腫瘍組織が正着していることを確認した。

4. 研究成果

(1) 手術で摘出した軟部腫瘍周囲の組織に対し、中心周波数8.26MHz、素子面積5mm四方で波長532nm、1209nmのレーザーを照射したが、光音響信号を捉えることはできなかった(図1)。

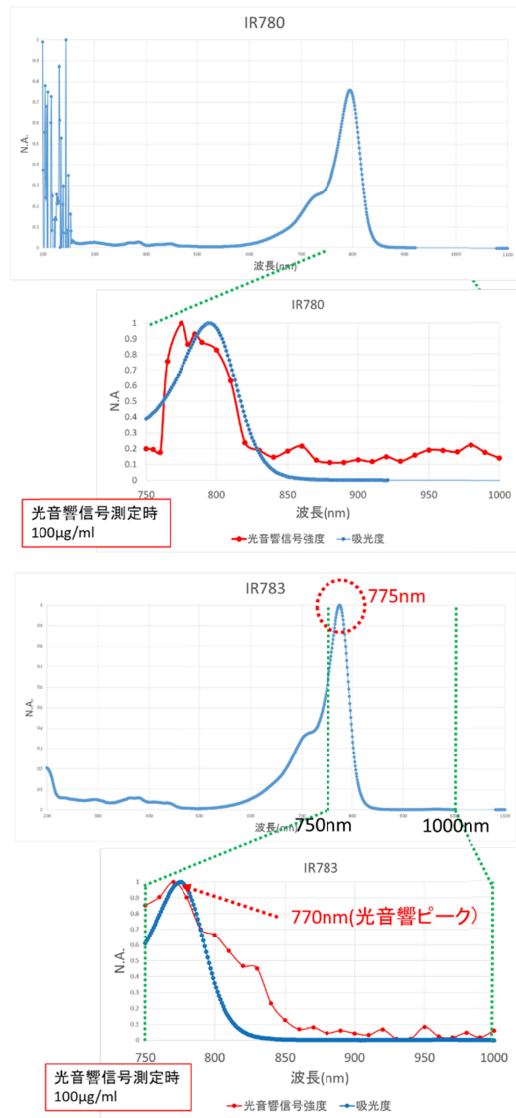
図1 腫瘍組織の超音波画像



当初予定していた組織内の微細な血管構造の描出は切除標本では血液が流出してしまい、観察が非常に困難なことが明らかとなった。腫瘍摘出時に光音響顕微鏡で観察可能な太さの血管内の血流はほぼ流出してしまうことが原因と考えられた。血管の分布から腫瘍の描出を行うことは困難との結論に至った。

(2) 近赤外光蛍光色素 IR780、IR783 の吸光度と光音響のピークを測定した(図2)。波長可変レーザー色素の吸光スペクトルのピークに近い波長およそ770nmを使用することで色素からの光音響信号が十分測定可能であることが確認できた。

図2 吸光度と光音響信号との比較



(3) 筋肉内腫瘍の疑似モデル(図3)で光音響イメージングの描出に成功した(図4)。生体内でも IR780、IR783 の光音響信号をもとに2次元のイメージ画像を構築できることが示唆された。

図3 IR783 ゲルをマウス大腿四頭筋に封入

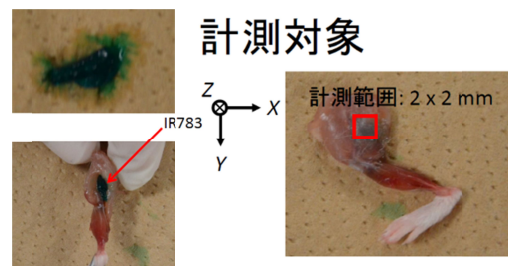
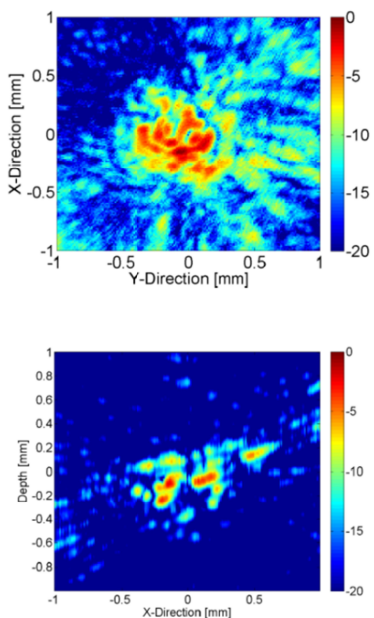
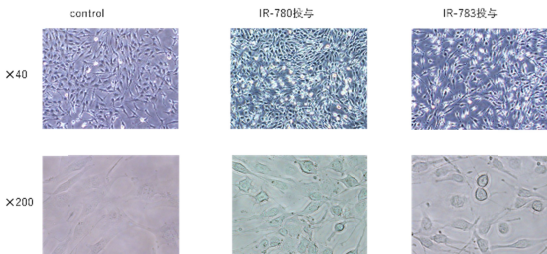


図4 筋肉内腫瘍疑似モデルでの波長 770nm 照射下での光音響信号



(4) IR780 は細胞質に取り込まれ、IR783 は核に取り込まれた(図5)

図5 MG-63 培養細胞への蛍光色素の取り込み



光音響イメージングでは、IR78 を取り込ませた腫瘍細胞の描出に成功した(図6)が、IR783 では描出できなかった(図7)。

図6 IR780 投与した MG-63 培養細胞の光音響イメージング

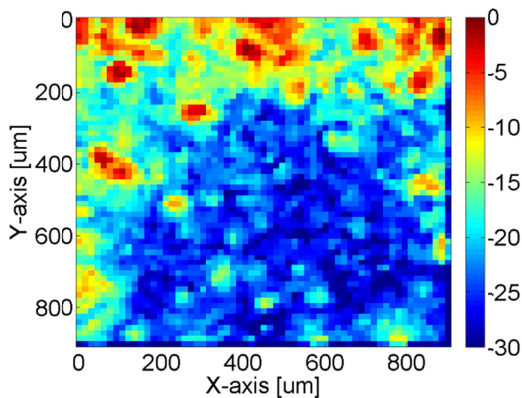
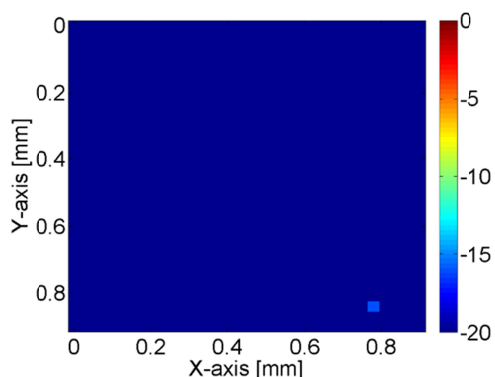


図7 IR780 投与した MG-63 培養細胞の光音響イメージング



その原因として、IR783 は核に取り込まれるため組織に対する IR783 取り込み量が少なく、イメージングを行えるだけの光音響信号を感知できないためだと考えられた。この結果より、IR780 を光音響イメージングの第一候補とした。IR780 投与した MG-63 培養細胞の光音響イメージングと、従来の共焦点レーザー顕微鏡を用いたイメージングとを比較した(図8,9)。両者のイメージングがほぼ一致していることが確認できた。

図8 IR780 投与した MG-63 培養細胞の共焦点レーザー顕微鏡のイメージング

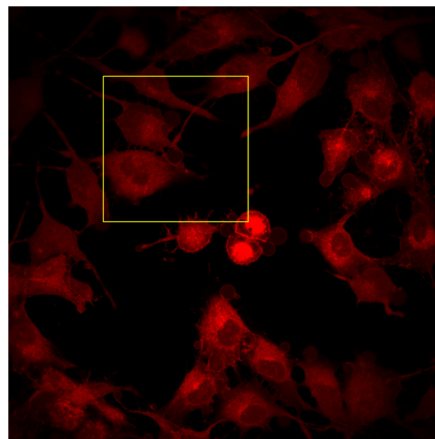
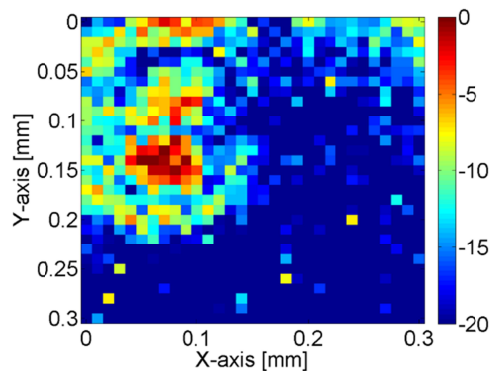


図9 図8での黄線範囲に対し光音響イメージングを行った。



(5) 担癌マウスに移植した腫瘍に光音響信号を有する組織を確認した(図10)。顕微鏡画像では光音響信号を発する組織に腫瘍細胞が存在していたことを確認した(図11)。光音響イメージングによって腫瘍組織と正常組織の境界を描出できる可能性が示唆された。

図10 担癌マウスの腫瘍組織の超音波画像および光音響画像

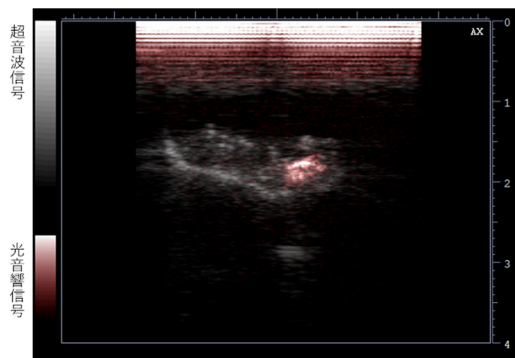
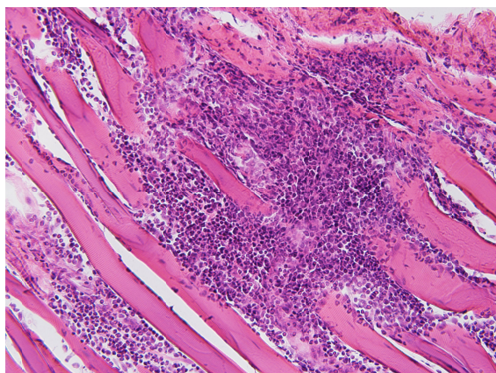


図11 光音響信号を発した組織の顕微鏡標本



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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
とくになし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

綿貫 宗則 (WATANUKI, Munenori)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号: 90451575

(2) 研究分担者

西條 芳文 (SAIJO, Yoshifumi)

東北大学・大学院医工学研究科・教授

研究者番号: 00292277

萩原 嘉廣 (HAGIWARA, Yoshihiro)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 90436139