

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15760

研究課題名(和文)近赤外スペクトル情報をフルに活用する臓器障害モニタリングシステムの開発

研究課題名(英文)Development of a monitoring system to estimate in vivo tissue injury using chemometric analysis of near infrared spectra

研究代表者

小池 薫 (Koike, Kaoru)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：10267164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：近赤外スペクトル法は、非破壊、非接触で、瞬時に測定できる電磁波計測法で、救急・集中治療領域では、リアルタイム計測ツールとして大きな魅力を有する。ラットに小腸虚血(3時間)ならびに小腸虚血・再灌流(3時間/1時間)を行い、超小型近赤外分光計を用いて小腸のin vivo近赤外計測を行った。得られた近赤外スペクトル全帯域をケモメトリクスを用いて解析すると、虚血と再灌流による小腸の組織障害の時間変化が良好に捉えられた。

研究成果の概要(英文)：Near infrared (NIR) spectroscopy is a noninvasive, contactless and real-time analytical technology that may yield a variety of promising bedside monitoring systems in the field of emergency and critical care medicine. After intestinal ischemia (3h) or intestinal ischemia/reperfusion (3h/1h) was conducted in rats by superior mesenteric artery occlusion, NIR spectra of the intestine were obtained in vivo using ultra-compact NIR spectrometer. When the full range of NIR spectra observed were analyzed by chemometric technique, the temporal change of intestinal tissue injury was clearly estimated.

研究分野：救急医学

キーワード：近赤外スペクトル 臓器障害 リアルタイム モニタリング 小腸 虚血 再灌流

## 1. 研究開始当初の背景

近赤外分光法は、近赤外光(750~2500nm)を照射して、物質の定性・定量を行う方法である。近赤外信号は膨大な情報を含んでいるが、医療現場での利用は、経皮的動脈血酸素飽和度(SpO<sub>2</sub>)や脳局所酸素飽和度(rSO<sub>2</sub>)測定など、ヘモグロビン由来の信号(700~900nm)に限られている。

我々は、広波長域(1000~2350nm)の計測が行える近赤外組成イメージングシステムを用いて、ラット小腸虚血・再灌流実験による小腸障害を調べた。その結果、再構成画像の形態描出能は良好であったが、障害の程度を明瞭に示す画像コントラストは得られなかった。

近年、我々は、近赤外スペクトル全帯域に含まれる信号情報をフルに活用し、測定対象の特性を、迅速に、精度よく評価するデータ解析法を考案した(特開2014-20831、特開2015-114157)。そこで、近赤外組成イメージングシステムの再構成画像の関心領域から近赤外スペクトルを取得し、本法を用いて解析したところ、虚血前と再灌流後のスペクトルに明らかな違いがあることが確認できた。

最近では、超小型携帯式の近赤外分光計(MicroNIR™、Viavi Solutions社製)も開発され、我々の予備的検討では、小腸から得られる近赤外スペクトルのリアルタイム表示が可能であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ラットで小腸虚血ならびに小腸虚血・再灌流動物モデルを作成し、小腸・肝を対象として、近赤外組成イメージングシステムとMicroNIR™で近赤外データを取得し、我々独自の手法で組織障害評価モデルを構築すれば、利便性に優れた精度の高い近赤外組織障害評価法となるか検討することであった。そして、「臨床現場で無侵襲に近赤外データを取得し、組織障害の程度を、高精度、瞬時に表示できる解析技術」を開発し、医療機器としての仕様を検討することを本研究の最終目標とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物実験

#### 小腸虚血群(4匹)

体重280~330gの雄性Sprague-Dawleyラットを3~5%イソフルラン麻酔下を開腹し、クリップを用いて上腸間膜動脈の血行遮断を行った。虚血後はイソフルラン麻酔を継続した。

#### 小腸虚血・再灌流群(4匹)

体重280~330gの雄性Sprague-Dawleyラットを3~5%イソフルラン麻酔下を開腹し、クリップを用いて上腸間膜動脈の血行遮断を行い、3時間後にクリップをはずし、血流を再開した。再灌流後はイソフルラン麻酔を

継続した。

### (2) 近赤外スペクトルデータの取得と解析 近赤外スペクトルデータの取得

近赤外スペクトルデータの取得には、超小型近赤外分光計(MicroNIR™、Viavi Solutions社製)を使用した。小腸虚血群では各個体毎に、虚血前、15分後、30分後、1時間後、1時間30分後、2時間後、2時間30分後、3時間後に、非侵襲的にリアルタイム計測を行った。小腸3時間虚血・再灌流群では、虚血3時間後、15分後、30分後、45分後、1時間後に、計測を行った。スペクトルデータの取得に際しては、麻酔下のラットから一時的に腸管を露出し、腸管表面からプローブを数ミリ離して計測した。

#### MicroNIR™のデータ取得条件

MicroNIR™のデータ取得条件は、装置付属のマニュアルに従い、以下のように設定した。

センサー:128 pixel InGaAs フォトダイオード アレイ

波長:950~1650nm、6.2nm 間隔で同時取得

ピクセルサイズ/ピッチ:30 μm x 250 μm/50 μm

ダイナミックレンジ(max):1000:01:00、拡散反射モード、タングステン光源

上記条件下、Black & White補正後、PC上の専用のソフトウェアを使って計測を行った。1回の計測で100回(1スキャンは11.61ms)の積算を行って1データとし、1秒間隔で連続10回のデータを取得した。

#### 近赤外スペクトルデータの解析

取得したすべてのデータは、USBインターフェイスによりPC上の多変量解析用ソフトウェアUnscrambler-X® ver10.3(CAMO社)に数値データとして転送した。続いてベースライン補正、正規化処理を行った。

まず、小腸虚血群および小腸虚血・再灌流群におけるスペクトルパターンの経時的変化を肉眼的に観察し、それぞれに特徴的なピークが認められるか検討した。次に、Partial least squares discriminant analysis(PLS-DA)を用いた解析を行い、各群内に共通する特徴が認められるか、各群間の異なる特徴を識別できるか、詳細に検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 虚血小腸から得られた近赤外スペクトルの観察

ラット1、2、3、4のスペクトルを虚血前、虚血2時間、虚血3時間で色分けして、一括表示した(図1)。

次にラット1、2、3、4から得られたスペクトルを、虚血前、虚血2時間、虚血3時間毎に分けて表示した(図2,3,4)。

図1 虚血小腸からえられた近赤外スペクトル

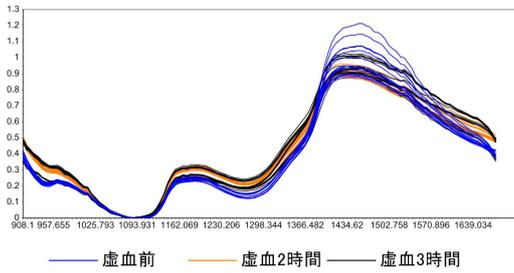


図2 虚血小腸からえられた近赤外スペクトル

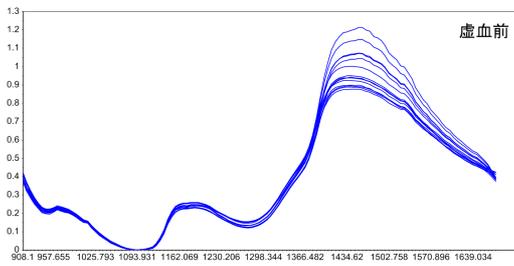


図3 虚血小腸からえられた近赤外スペクトル

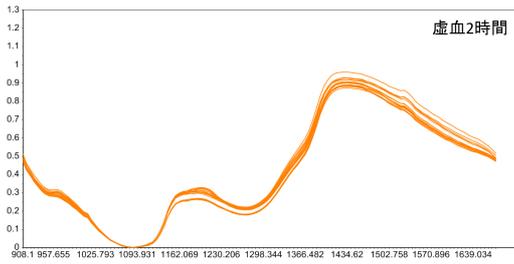
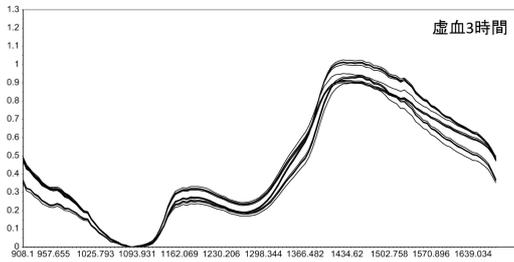


図4 虚血小腸からえられた近赤外スペクトル



スペクトルを目視にて概観したが、虚血前、虚血2時間、虚血3時間を識別するのに役立つ波形の特徴は見出せなかった。

(2) 虚血時間に伴うスペクトルからの特徴抽出

ラット1から虚血前、虚血15分、30分、1時間、1時間30分、2時間、2時間30分、3時間後に得られたスペクトルデータに対して、PLS-DAを行った結果を示す(図5)。ラット2、3、4についても同様の解析を行った(図6,7,8)。

図5 虚血小腸(rat 1)

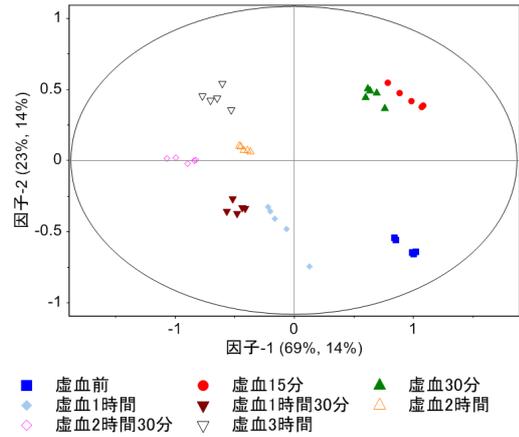


図6 虚血小腸(rat 2)

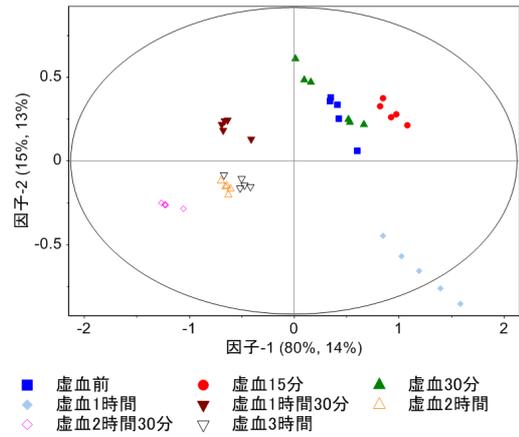


図7 虚血小腸(rat 3)

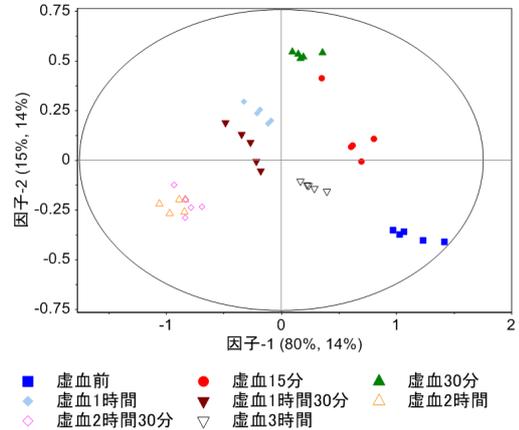
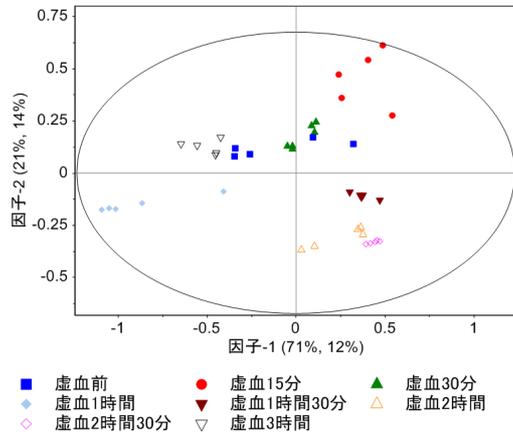


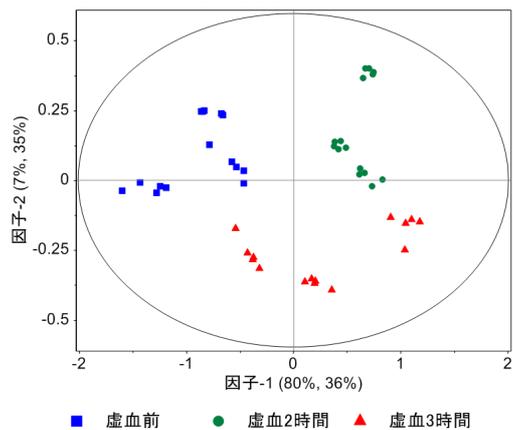
図 8 虚血小腸(rat 4)



ラット 1、2、3、4 では、虚血時間に伴うスコア値の変化を追跡することができた。

スコアプロット上、他のラットと異なる挙動を示したラット 4 を除き、ラット 1、2、3 の虚血前、虚血 2 時間、3 時間に得られたデータを用いて PLS-DA を行った結果を示す(図 9)。

図 9 虚血小腸(rat 1,2,3)



虚血時間毎に各プロットはクラスター化し、各群間の分離は良好であった。

### (3) 再灌流小腸から得られた近赤外スペクトルの観察

ラット 5、6、7、8 のスペクトルを虚血 3 時間(再灌流前)、再灌流 30 分、再灌流 1 時間で色分けして、一括表示した(図 10)。

次にラット 1、2、3、4 から得られたスペクトルを、虚血 3 時間(再灌流前)、再灌流 30 分、再灌流 1 時間毎に分けて表示した(図 11, 12, 13)。

図 10 再灌流小腸からえられた近赤外スペクトル

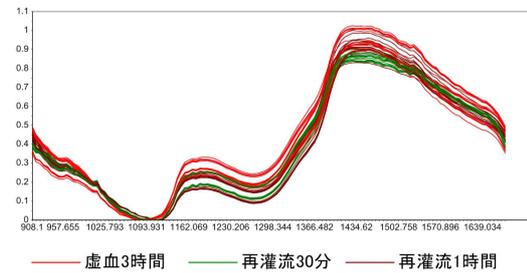


図 11 再灌流小腸からえられた近赤外スペクトル

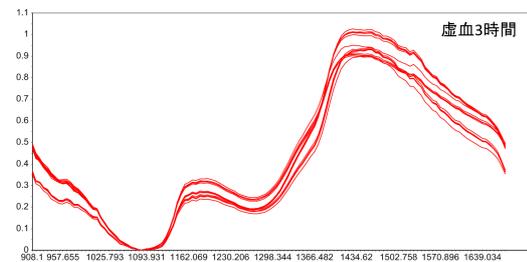


図 12 再灌流小腸からえられた近赤外スペクトル

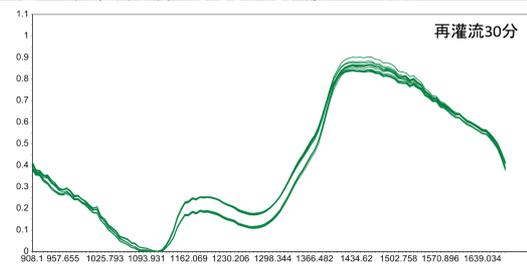
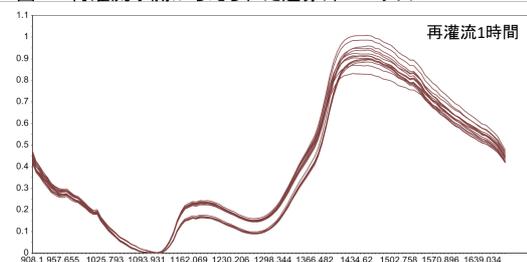


図 13 再灌流小腸からえられた近赤外スペクトル



スペクトルを目視にて概観したが、虚血 3 時間(再灌流前)、再灌流 30 分、再灌流 1 時間を識別するのに役立つ波形の特徴は見出せなかった。

(4) 再灌流時間に伴うスペクトルからの特徴抽出

ラット 5 から虚血 3 時間 (再灌流前)、再灌流 15 分、再灌流 30 分、再灌流 45 分、再灌流 1 時間後に得られたスペクトルデータに対して、PLS-DA を行った結果を示す (図 14)。ラット 6、7、8 についても同様の解析を行った (図 15, 16, 17)。

図 14 再灌流小腸 (rat 5)

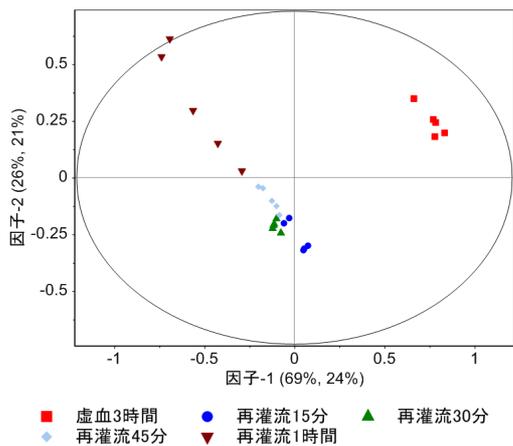


図 15 再灌流小腸 (rat 6)

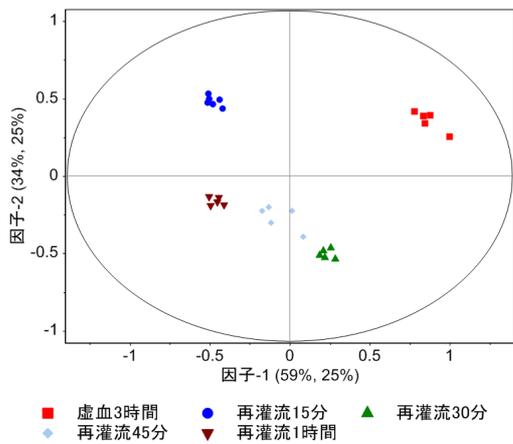


図 16 再灌流小腸 (rat 7)

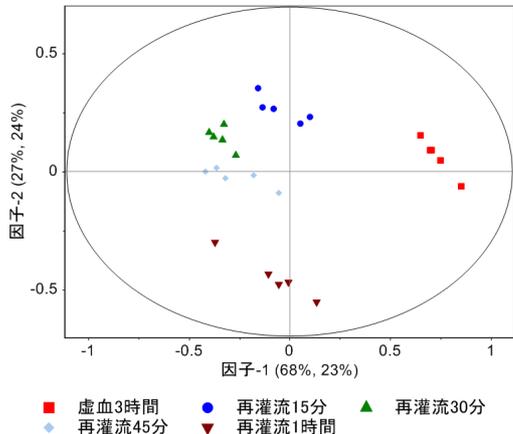
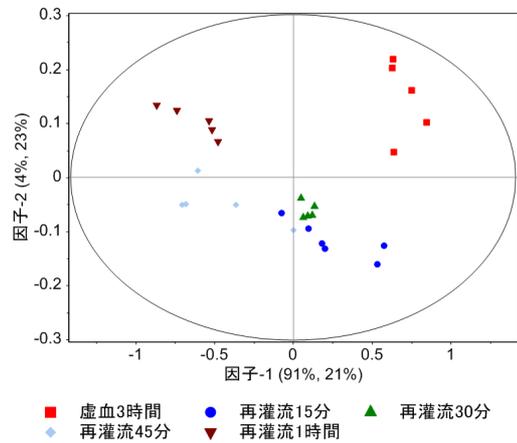


図 17 再灌流小腸 (rat 8)



ラット 5、6、7、8 では、再灌流時間に伴うスコア値の変化を追跡することができた。

(5) まとめ

本研究の目的は、ラットで小腸虚血ならびに小腸虚血・再灌流動物モデルを作成し、小腸・肝を対象として、近赤外組成イメージングシステムと MicroNIR™ で近赤外データを取得し、我々独自の手法で組織障害評価モデルを構築することであった。

「MicroNIR™ による近赤外データの取得」に関しては、上記のとおり、MicroNIR™ を用いて小腸虚血ならびに小腸虚血・再灌流ラットの腸を非侵襲的にリアルタイムに近赤外データを取得することができた。まず、虚血小腸から得られた近赤外スペクトルを観察し、虚血時間による変化を見出せるか検討したところ、目視では違いを確認することはできなかった。次に、虚血小腸から得られたデータを数値化して PLS-DA を行ったところ、本法は虚血時間に伴って刻々と変化する小腸の組織障害を数値評価できる可能性が示された。

同様に、再灌流小腸から得られた近赤外スペクトルを観察し、再灌流時間による変化を見出せるか検討したが、目視での確認はできなかった。しかし、再灌流小腸から得られたデータを数値化して PLS-DA を行ったところ、本法は再灌流時間に伴う小腸の組織障害を経時的に数値評価可能であることが示唆された。

得られた結果を詳細に検討すると、ラットは個体毎に、虚血時間や再灌流時間が同じでも組織障害の程度は異なることが示唆された。本研究における小腸虚血の作成方法は、上腸間膜動脈の血流遮断であったが、上部小腸ならびに下部小腸からの側副血行路からの血流量には個体差が大きいため、上腸間膜動脈領域の血行遮断が小腸虚血をもたらす程度には個体差があることが理由と考えられる。

一方、ケモメトリクスを用いた近赤外スペクトル解析をこの実験系に適用させること

に時間を要したため、1年の短い研究期間では、近赤外組成イメージングシステムとMicroNIR™で得られた近赤外データを融合することや、肝臓から得られたスペクトルを解析することに関しては、着手することができなかった。しかし、本法は個体毎の虚血障害や再灌流障害の客観的評価に役立つことが判明した。

今後、実験データを蓄積して評価法のブラッシュアップを図るとともに、小腸虚血モデルならびに小腸虚血・再灌流動物モデルにおける他臓器障害の検出に関する検討を進め、「臨床現場で無侵襲に近赤外データを取得し、組織障害の程度を、高精度、瞬時に表示できる解析技術」の開発をめざす予定である。

5．主な発表論文等  
特になし

6．研究組織

(1)研究代表者

小池 薫 (KOIKE Kaoru)  
京都大学・医学研究科・教授  
研究者番号：10267164

(2)研究分担者

平川 慶子 (HIRAKAWA Keiko)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30165162

(3)研究分担者

金涌 佳雅 (KANAWAKU Yoshimasa)  
日本医科大学・医学部・講師  
研究者番号：80465343

(4) 研究分担者

佐藤 格夫 (SATO Norio)  
京都大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：30409205