

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11519

研究課題名(和文) ヒルシュスプルング病の低侵襲かつ迅速な診断法の開発

研究課題名(英文) A minimally invasive and rapid diagnostic method for Hirschsprung's disease

研究代表者

熊谷 秀規 (Hideki, Kumagai)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：60364353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：臨床で高周波の超音波を用いてヒルシュスプルング病の診断をすることを目指した。研究では音響特性データを取得して課題と有用性を明らかにし、診断デバイスの開発につなげることを目標とした。しかし、超音波顕微鏡によるex vivoの観察では、パラフィン包埋切片と異なり、大腸の組織構造や神経節細胞の同定が容易でなかった。インピーダンスデータをもとに3D画像を構築などを試みたが、細胞核の同定も困難であった。本研究ではこうした音響データを得たのちに、それを応用してデバイスの開発につなげることを企図していたが、前者の段階で課題をクリアできなかったためデバイスの開発研究へ進むことが出来なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒルシュスプルング病の確定診断には大腸の生検が必要だが、侵襲的であり合併症のリスクが伴う。本研究では、超音波の減衰情報によって神経節細胞の有無を検査中に観察し、低侵襲かつ迅速な診断を目指した。しかしながら、十分な研究成果が得られなかった。一方、心筋生検や腎生検、皮膚生検など、他臓器においては威力を発揮することがなお期待できると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The goal was to diagnose Hirschsprung's disease using high-frequency ultrasound in clinical practice. The study aimed to obtain acoustic characterization data to clarify the issues and usefulness and to develop a diagnostic device. However, unlike paraffin-embedded sections, ex vivo observation using ultrasound microscopy did not facilitate the identification of tissue structures and ganglion cells in the colon. We attempted to construct 3D images based on impedance data, but the identification of cell nuclei was also difficult. In this study, we planned to apply the acoustic data to the development of a device after obtaining such data, but we could not proceed to the development of the device because we could not clear the problem at the former stage.

研究分野：小児消化器病学

キーワード：超音波顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

我々は、超音波診断装置の臨床応用や、小児の消化器病理について研究している。小児の消化器難病のひとつにヒルシュスプルング病がある。消化管の蠕動の役割を果たすために必要な神経細胞が、肛門から連続して欠如するために、罹患範囲の消化管の蠕動運動がおこらず腸閉塞をきたす疾患である。診断には病理組織所見が必須であり、直腸粘膜生検のアセチルコリンエステラーゼ染色や、手術または剖検により得られた消化管の全層標本で肛門から連続して腸管壁内神経節細胞の欠如を認めることで診断する。しかし、生検は出血や消化管穿孔などのリスクを伴い、とくに新生児や幼児ではその侵襲性は問題である。

我々の研究テーマのひとつに、超音波を用いた組織レベルの画像の取得があり、細径ファイバーを用いた高周波帯超音波伝送についての研究を行ってきた。(Irie・Kumagai, et al. J Med Ultrasonics, 2011.日本超音波医学会論文賞・第25回菊池賞)。その結果、石英を用いることで、これまで困難とされてきた細径のファイバーに100 MHz領域の超音波を伝搬させることに成功した。加えて、細径ファイバーの先端を凹面状に加工することにも成功したことによって、ファイバーを伝播した超音波を集束できるようになった。これにより方位分解能を細胞レベルにまで高めることが可能となったことから、臨床の場で臓器の組織構造の情報を直接取得するリアルタイムの「バーチャル生検」を目指した(伊東ら。リアルタイム腎生検の実現に向けて。2015年日本腎臓学会学術総会・優秀演題賞。熊谷ら。超音波顕微鏡の臨床応用の可能性。2016年日本小児栄養消化器肝臓学会)。

近年、超音波顕微鏡自体は市販されたが、臓器や組織の音響特性は未知な部分が多い。整形外科領域等で基礎的な実験報告があるが、消化管に関する報告はない。また、超音波顕微鏡の臨床応用はなされておらず課題である。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトの大腸標本や実験動物を用い、大腸の超音波組織像を得て光学顕微鏡像と比較検討した。また、インピーダンス値や音速といった客観的な音響特性データを取得し、診断における課題と有用性を明らかにすることを目的とした。そのうえで、デバイスの開発を目標とした。すなわち、石英ファイバーを通した高周波帯の超音波を、肛門を通して探触子を直腸粘膜にあて、神経節細胞の有無を直接観察するもので、ヒルシュスプルング病の低侵襲かつ迅速な診断を目指した。

3. 研究の方法

計測・解析の対象は動物やヒトの大腸組織である。まず、ヒト大腸の切片をスライドグラスに固定した標本から解析を開始し、つぎに、摘出したラットの生の大腸へと移行した。

(1) 高周波帯超音波顕微鏡を用いた実験

超音波顕微鏡システム AMS-40SI (本多電子株式会社)を用いた。本装置はメカニカル走査方式を採用し、送受信探触子(周波数帯域 5-400 MHz)、コンピュータ、モニターで構成される。

ヒトの摘出大腸標本における高周波帯超音波画像の取得

ヒルシュスプルング病などで切除され、ホルマリン固定パラフィン包埋された大腸組織を用いた。包埋パラフィンブロックから10 μ m厚さに連続切片を作製し、連続切片でヘマトキシリン&エオジン染色、ヘマトキシリン染色、および未染色の標本プレパラートを作成した。染色したものは光学顕微鏡で観察し、一方、未染色プレパラートは脱パラフィン処置を行い、ただちに超音波顕微鏡で観察した。最後に、それぞれの画像を比較検討した。

ラットから摘出した生の標本における高周波帯超音波画像の取得

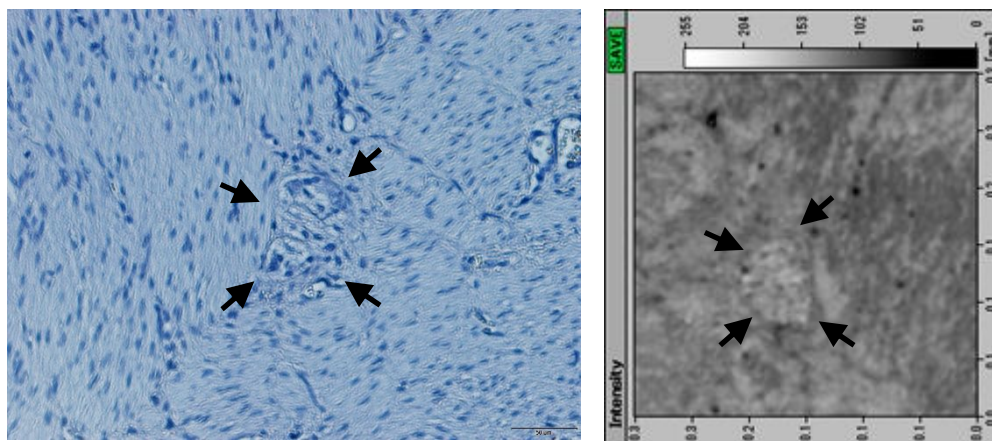
実験用ラットを安楽死させたのち大腸を摘出した。摘出大腸をスライサーで400 μ m厚に切り出し、超音波顕微鏡のステージに固定して *ex vivo* で音響インピーダンス値やエコー減衰、エコー輝度、細胞や核の様子を解析した。

(2) 石英ファイバーを通した高周波帯超音波による実験

画像取得システムは、超音波送受信機パルスー/レシーバー、送受信探触子(周波数帯域 95-278 MHz)、オシロスコープ、画像構築装置、モニター、伝送用ファイバーとしてフォーカス型テーパ形状石英ファイバーで準備した。トランスデューサーを最適な位置に移動させ、先端を凹面加工した細径石英ファイバー内に超音波を伝播させ、組織切片で集束させ組織の超音波画像(Cモード)を取得し、組織学的評価を前述の如く解析する方針とした。また、高周波帯超音波の伝送のチャレンジとして、ファイバーの長さや凹面の径、凹面度数(カーブの強さ)の調整加工、そして画像処理ソフトの調整を行うこととした。

4. 研究成果

ヒト小児のヒルシュスプルング病の大腸組織を用いて、超音波顕微鏡像を光学顕微鏡と比較した。その結果、intensity に基づいた超音波画像所見は、大腸の粘膜層や筋層といった組織構造が、光学像とほぼ同様に描出された。さらに、320 MHz 帯の高周波プローブを用いた観察では、ヒルシュスプルング病を診断する際のポイントとなる神経節細胞を、正常大腸部分において同定し得た。(下図)。



光学顕微鏡像（ヘマトキシリン染色；左）と超音波顕微鏡像（右）。矢印は筋間神経叢を指す。

次に、*ex vivo* で腸管の組織構造や神経節細胞の超音波顕微鏡による同定を行った。しかし、パラフィン包埋切片を用いた観察と異なり、神経節細胞を同定することは容易ではなかった。超音波顕微鏡のセッティングの見直しや、組織切片作成方法の工夫、さらには、滴下試薬を用いた神経節細胞同定に取り組んだが奏功しなかった。

そこで、インピーダンスデータをもとに時間周波数分析を応用した 3D 画像を構築することで、診断手法に検討した。本手法は、皮膚の構造を 3D 化して観察する方法として開発が進んでいる。しかし、皮膚と腸壁とでは超音波ビームの減衰や多重反射の状況が異なるのでそのまま応用することはできない。また、細胞核の同定も培養細胞では可能なものの実組織では難しく、解像度を上げるには超音波周波数を上げる必要があるが、それは超音波ビームの深達度に関わる問題である。医工学分野の専門家にも指導を仰いだが、研究期間内に画像描出を実現化し得なかった。このように、超音波顕微鏡による *ex vivo* の観察では、パラフィン包埋切片と異なり、大腸の組織構造や神経節細胞の同定が困難であり、インピーダンスデータをもとに 3D 画像の構築を試みたが細胞核の同定も難しかった。

デバイスの開発に係る石英ファイバーを通した高周波帯超音波画像の取得については、超音波伝搬の観点から、ファイバーは石英ではなくサファイア製への変更を計画した。また、細径ファイバーを直接磨くよりも、レンズを別に用意した方がファイバーの破損の際などに対応しやすいと考え、仕様の変更を行いメーカーと調整を行った。一方、本研究では音響データを得たのちに、それを応用してデバイスの開発につなげる流れであった。しかしながら、前者の段階で課題をクリアできなかったため、デバイスの開発研究へ進むことが実質上、出来なかった。

本研究では、超音波の減衰情報によって神経節細胞の有無を検査中に観察し、ヒルシュスプルング病の低侵襲かつ迅速な診断を目指したが、十分な研究成果が得られなかった。一方、本手法の応用は、腎生検や皮膚生検など他臓器においては威力を発揮することが、なお期待できると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

関連研究の雑誌論文: Kumagai H, et al. Use of Ultrasound Microscopy for Ex Vivo Analysis of Acoustic Impedance in Mouse Liver with Steatohepatitis. Acoustics 2021, 3, 3–10. <https://dx.doi.org/10.3390/acoustics3010002>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------