

令和元年6月11日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16478

研究課題名（和文）STIC法を用いた造影頸動脈超音波検査によるプラーク内新生血管の観察

研究課題名（英文）Contrast-enhanced ultrasonography using the spatio-temporal image correlation (STIC) method for the evaluation of intraplaque neovascularization in carotid artery plaque

研究代表者

大浦 一雅 (Oura, Kazumasa)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：20611015

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：spatio-temporal image correlation (STIC) 法と呼ばれる超音波技術を応用し、3次元的にプラーク内へ流入する造影剤を観察し、gray scale medianを用い定量化した。2D造影超音波検査は、time intensity curveを用いて定量化し、結果を頸動脈内膜剥離術によって得られた病理標本の新生血管数および面積と比較し、どちらがよりプラーク内新生血管を反映するか検討した。両者ともに新生血管の数とは相関を認めなかった。新生血管占有面積は両者ともに相関を認めたが、明らかな有意差は認めず、STICを用いた造影超音波検査の優位性は証明できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

STIC法による頸動脈プラーク新生血管の評価法を確立することにより、従来の2D造影超音波検査よりも正確にプラーク内の新生血管を観察可能となり、より正確な脳梗塞発症リスクの評価が可能になると考えたが、今回の研究ではSTIC法の優位性は証明できなかった。

研究成果の概要（英文）：The presence of intraplaque neovascularization has been identified as a factor in unstable carotid plaque. Contrast-enhanced ultrasonography (US) has been used to evaluate such neovascularization. The spatio-temporal image correlation (STIC) method is an approach developed for displaying fetal cardiac images on multiplanar displays. We have examined contrast media flowing within plaque three-dimensionally using the STIC method and assessed with gray-scale median. We evaluated whether the STIC method was superior to conventional contrast-enhanced US with time intensity curve in evaluating neovascularization, using a pathological specimen provided from carotid endarterectomy. Both of the STIC method and conventional contrast-enhanced US correlated with the area of neovascularization in the plaque. However, there were no significant difference between STIC method and conventional contrast-enhanced US.

研究分野：脳神経超音波

キーワード：造影超音波検査 超音波造影剤 STIC

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頸動脈プラークによる内頸動脈狭窄は、アテローム血栓性脳梗塞の原因として重要であり、その性状を判定することは脳梗塞の発症予防や治療法の決定に重要である。

近年、脳梗塞の原因となる不安定プラークの要因として、プラーク内の新生血管が脆弱であるためにプラーク内出血が起こりやすいことが関与しているとの報告がみられ、プラーク内新生血管の評価が重要となっている。しかしながらプラーク内新生血管は微小な血管であり、従来の超音波検査法では描出不能である。

超音波検査を施行する際に超音波造影剤を用い、造影剤のプラーク内への流入がプラーク内の新生血管を表しているという報告があるが、少数例の報告のみであり、また2次元的な超音波での観察のみであるため検者の技量によって結果が左右されること、1断面のみの評価となりプラーク全体を評価することが困難であるという問題がある。(図1)

頸動脈プラークが立体的構造物であるという観点から、我々はこれまでに頸動脈プラークに対する新しい治療評価方法として3D超音波検査によるプラーク体積の測定を実施し、従来の評価方法と比較してより鋭敏にプラークの形態変化を検出することが可能であることを示した(図2)。この技術を応用し、超音波造影剤を用いた3D超音波検査を施行することによってプラーク全体の新生血管を立体的に観察が可能になると考えた。

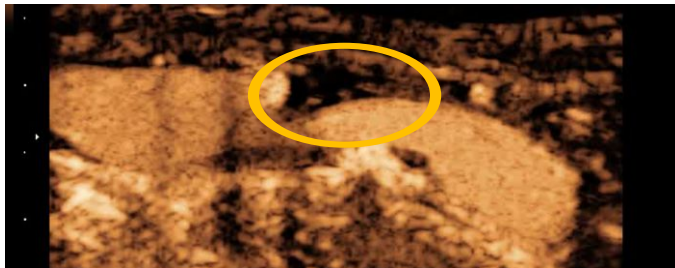


図1：造影超音波検査

低輝度プラークの内部に造影剤の流入を認める。

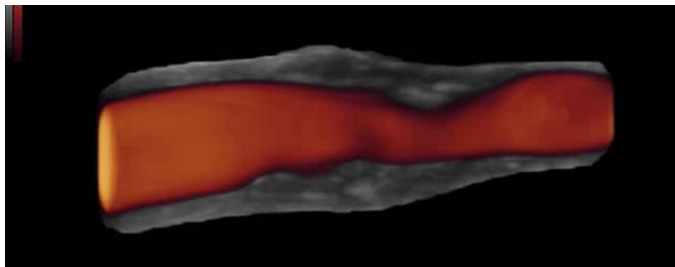


図2：プラークの3D画像

プラークと内部の血流を立体的に描出することが可能である。

2. 研究の目的

頸動脈プラークによる内頸動脈狭窄に対して頸動脈内膜剥離術を施行予定の患者に対し、超音波造影剤であるペルフルブタンを用いた従来の造影超音波検査およびSTIC法による造影超音波検査を施行し、プラーク内への造影剤の流入を観察する。それらの結果を手術によって得られた病理標本中の新生血管が占める面積の割合と比較することによって、従来の造影超音波検査とSTIC法による造影超音波検査のどちらがより正確にプラーク内の新生血管を反映するかを明らかにする。

また、造影効果と血液検査データ等の比較を行い造影効果に影響を与える因子について検討する。さらに術後の塞栓性合併症と超音波所見についての関係を検討し、塞栓性合併症の予測能について明らかにする。内頸動脈狭窄を有し頸動脈内膜剥離術の適応とならなかった患者について、新生血管の経時的変化および脳梗塞の発症について検討した。

3. 研究の方法

(1) 造影超音波検査：

頸動脈超音波検査装置には本教室で所有するVOLUSON E8 EXPERT (GEヘルスケア・ジャパン) および2Dプローブ(3-8MHz)、3D/4Dプローブ(4-14MHz)を使用する。まず、頸動脈内膜剥離術の術前患者に対してペルフルブタンを用いた造影超音波検査を行う。初めに2Dプローブを用いた通常の超音波検査を行い最大狭窄部を同定し、その後従来の造影超音波検査を行う。その後、胎児先天性心疾患の診断のために開発されたSpatio-Temporal Image Correlation (STIC) と呼ばれる技術を応用し、経時的および立体的な造影剤のプラーク内への流入を観察する。STICは7.5-15秒間のスキャンを行うことにより3次元超音波情報を収集し、心臓の周期的な動きから心周期を読み取り、同一の心時相ごとに3次元情報を構築する方法である。出来上がった3次元画像を連続的に動かすことにより3D情報を含む動画としての超音波画像が得られる。また、volume data であるので後から任意の断面での観察を行うことが容易である。これを血管に応用し、血管の拍動から心拍数を計測し1心拍分の3D動画として再構築することが可能である(図3)。従来のメカニカル4Dスキャンでは、画質の低下やスキャン範囲の移動に伴うプローブの振れなどの問題があったが、STIC法を用いることにより高画質なvolume dataを得ることが可能である。

造影効果の評価にはエコー装置本体に搭載されたソフトウェアを使用し time-intensity curve (TIC)を作成し、血管内腔の輝度とプラーク内の輝度の比を計測し定量的な評価を行った。(図4、図5)。造影剤投与前後の血管内腔およびプラークの intensity (dB)を計測し、その peakでの intensityから baselineの intensityを引いたものを enhanced intensity (EI)と定義し、血管内腔 (EIL)およびプラーク (EIP)を計測し、EILに対するEIPの割合 (EIP/EIL)を算出した。STIC法を用いた造影超音波検査では水平断・矢状断・冠状断での観察が可能であるため、それぞれの断面において造影効果の評価を gray scale median (GSM)を用い定量化を行い、従来法との相関、病理標本との相関について検討を行った。スキャンによって得られた volume dataを水平断で再構成し、最大狭窄部を基準に前後2.5mmを0.5mm間隔で11スライスに分割した画像を作成し、JPEG画像として保存した(図6)。それをPhotoshop CC 2016を使用し gray scale化し、深部の無エコー域のGSM値を0、外膜のGSM値を195に変換し、それぞれの断面においてプラーク全体および血管内腔全体に関心領域を作成し、造影前のプラークのGSM値と造影後のプラークのGSM値の差(GSMP)および造影前の血管内腔のGSM値と造影後の血管内腔のGSM値の差(GSML)を最大狭窄部とその前後2.5mmの3断面で計測し、その中央値を算出し、GSMLに対するGSMPの割合(GSMP/GSML)を算出した(図7)。

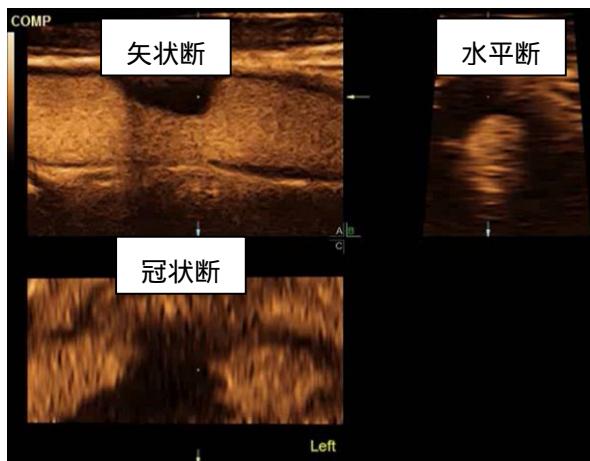


図3：STIC法を用いた造影超音波画像。造影剤の流入する様子を、図に示したような直行3断面で経時的に観察することが可能である。また、ボリュームデータであるので観察する断面は自由に移動することが可能である。

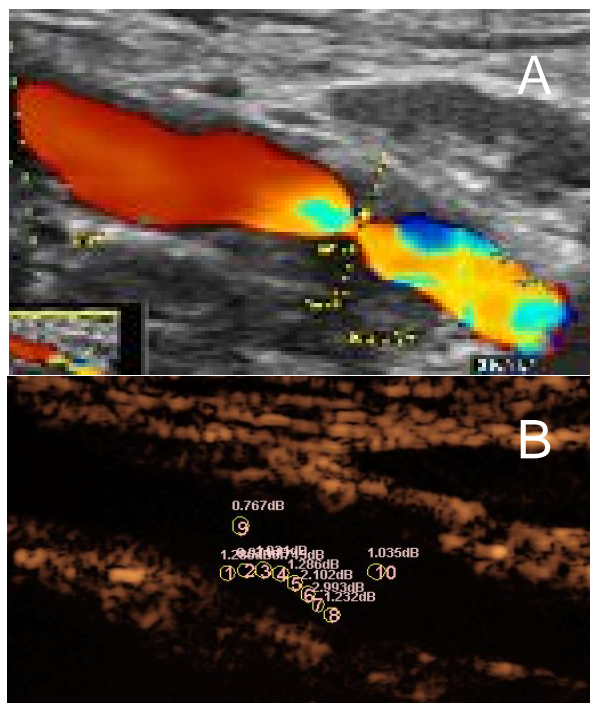


図4：頸動脈超音波画像
A:最大狭窄部のカラードプラー画像。
B:造影剤流入前。1~8の丸で囲んだ部分はプラーク内の関心領域、9、10の丸は血管内腔の関心領域を示す。
C:造影剤流入後。プラーク全体に造影効果を認める。

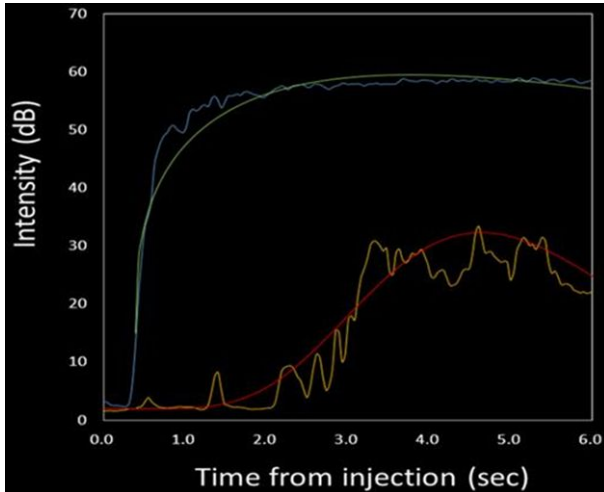


図 5 : TIC 画像

横軸は時間、縦軸は intensity を示す。青線は血管内腔の intensity の変化、黄線はプラーク内の intensity の変化を表す。

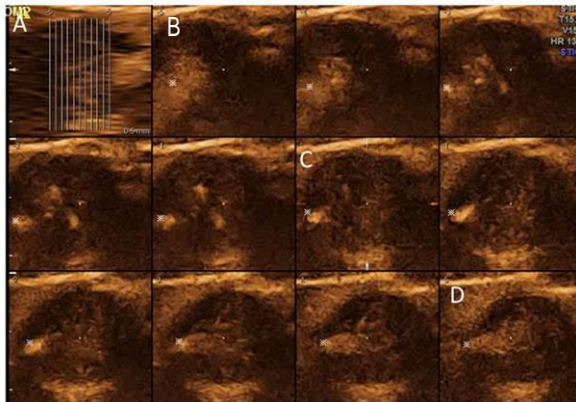


図 6 : 水平断の再構成画像

- A : 矢状断画像
- B : 最大狭窄部から 2.5mm 中枢側
- C : 最大狭窄部
- D : 最大狭窄部から 2.5mm 末梢側

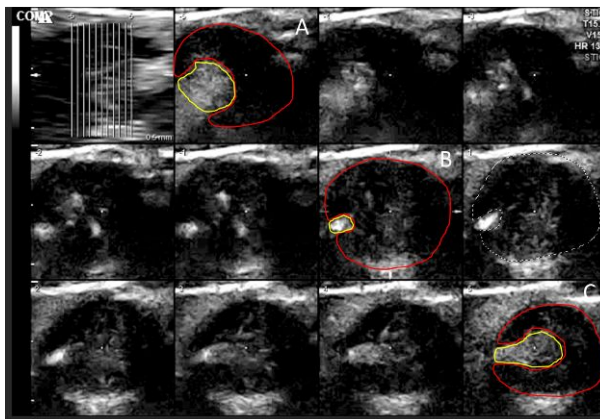


図 7 : gray scale median 画像

- A : 最大狭窄部から 2.5mm 中枢側
 - B : 最大狭窄部
 - C : 最大狭窄部から 2.5mm 末梢側
- 赤線で囲んだ部分がプラーク、黄線で囲んだ部分は血管内腔を示す。用手的にトレースし GSM 値を測定した。

(2) 病理学的評価：

摘出した手術検体を 10% ホルマリン緩衝液にて固定し、脱灰後パラフィン包埋し 7 μ m にて薄切、免疫染色を行った。スライス幅は 2.5mm 間隔とした。脱パラフィン後水洗し、ブロッキング液にて 2~3 時間 ブロッキングを行い、抗 CD 34 抗体 (抗ヒト CD34 Class Mouse モノクローナル Clone QbEnd-10、Dako) を 1000 倍希釈し室温にて 20 時間反応させ、リン酸緩衝液で洗浄し二次抗体 (Phosphatase Labeled Goat anti Mouse IgG(H+L)、フナコシ) を 500 倍希釈し室温にて 2 時間反応させた。二次抗体反応後、リン酸緩衝液に続き 50mM Tris-HCl (pH7.5) にて洗浄し、発色基質を添加して 30 分発色した。水洗後にヘマトキシリンにて核染色を行い、水洗、色出し後、水溶性封入剤にて封入し作成した。顕微鏡は Olympus BX51(Olympus、Tokyo、Japan) を使用し、造影超音波検査に合わせて最大狭窄部位と前後 2.5mm の合計 3 スライスを観察した。はじめに 40 倍 (接眼レンズ \times 10、対物レンズ \times 4) で新生血管を最も多く認める部分の画像を保存した。CD34 抗体により染色された内皮細胞が円形に認められ、内腔が確認できる

ものを新生血管とし、1mm²中の新生血管の数を2名の神経内科医が造影超音波検査の結果を得ずに肉眼的にそれぞれ2回計測し、3スライスの合計値を算出し、その平均値を解析に使用した。

次に10倍(接眼レンズ×10、対物レンズ×1)にてプラーク全体像を描出し、JPEG画像として保存した。Photoshop CC 2016を用い、1スライスにおけるプラークの断面積(px)および新生血管の面積(px)を計測し、プラークの断面積中の新生血管が占有する面積の割合を計測し、3スライスでの平均値を算出した(図8)。

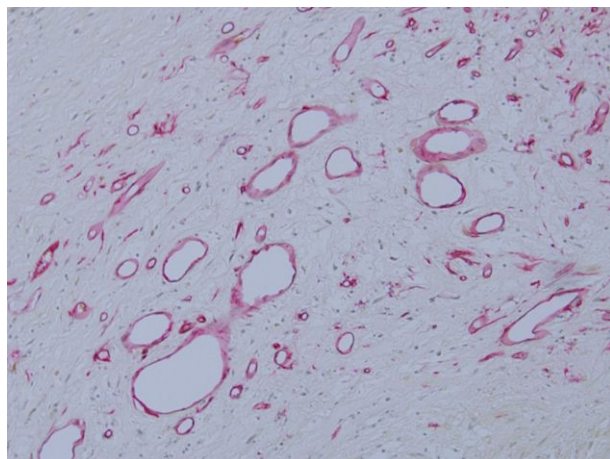


図8：CD34染色 ×200
血管内皮細胞が赤く染色され、多数の新生血管を認める。

(3) 統計解析

EIP/EIL、GSMP/GSMLとプラーク内新生血管の数および専有面積の相関については、Spearman's rank correlation testを使用した。相関の有意差の検定は相関係数の95%信頼区間を用いて行った。病理標本での新生血管の数の計測について、検者内信頼性および検者間信頼性の検討は級内相関係数を用いて行った。

4. 研究成果

(1) STIC法を用いた頸動脈プラーク内新生血管観察について

期間中に適格基準を満たした患者は57名で、病理標本の評価が不能であった17名、石灰化によりプラークの観察が困難であった6名、体動により観察困難であった4名を除外し、最終的に30名(男性29名)について解析を行った。病理標本での新生血管の数の計測について、検者内信頼性(級内相関係数 $r=0.990$)および検者間信頼性(級内相関係数 $r=0.994$)ともに良好であった。

全症例での新生血管の数は 83 ± 58 個(平均±標準偏差)、新生血管占有面積は $8.0 \pm 6.3\%$ (平均±標準偏差)であった。プラーク内新生血管の数とEIP/EIL($r=0.302$, $p=0.161$)、矢状断でのGSMP/GSML($r=0.048$, $p=0.828$)、水平断でのGSMP/GSML($r=0.144$, $p=0.513$)はいずれも有意な相関を認めなかったが、プラーク内新生血管占有面積との間にはEIP/EILで相関[$r=0.381$, $p=0.038$, 95%信頼区間(0.022-0.651)]を認め、GSMP/GSMLでは矢状断で[$r=0.480$, $p=0.007$, 95%信頼区間(0.144-0.716)]、水平断で[$r=0.465$, $p=0.01$, 95%信頼区間(0.125-0.706)]ではいずれもEIP/EILと同等の相関を認めた。

本研究の結果からは従来の2D造影超音波検査法と比較してSTIC法を用いた造影超音波検査の優位性は証明できなかった。本研究法の問題点として、病理評価の方法、STIC法の技術的な限界、造影効果の定量化の方法がある。病理評価については新生血管の計測は肉眼的に新生血管の密集している1視野で行っており、プラーク全体の新生血管の数を正確に反映していない可能性がある。また、面積の計測についても新生血管1本1本の面積を計測することは困難であり、プラーク全体に占める新生血管の面積で代用している。今後病理の評価方法をさらに検討し、より正確にプラーク内新生血管の数および面積を計測する必要がある。

SITC法の問題点としては、リアルタイムでの造影剤の流入を確認できないことがある。STIC法は造影剤が流れている一定の時間内においてプラークをvolume dataとして保存し、その後心周期に合わせて3次元画像を合成し1心拍の動画像を再構成している。そのためSTIC法によって確認できる造影剤の流入画像は再構成した画像であり、実際の造影剤流入と一致していない可能性がある。造影効果の定量化については、2D造影超音波検査法とSTIC法を用いた造影超音波検査のそれぞれで定量化の方法が異なるため、今後評価方法について両者ともに統一する必要がある。

また、本研究では病理標本の3スライスとSTIC法を用いた造影超音波画像の3断面で検討を行ったが、STIC法の利点としては複数の断面から画像を評価できることであり、今後さらに多くの病理スライスおよび超音波画像の断面で部位を一致させて評価を行うことで、より正確にプラーク全体の新生血管を評価できるか検討する必要がある。

(2)造影超音波検査による頸動脈内膜剥離術前のリスク評価
術前の造影超音波検査の結果と頸動脈内膜剥離術中の経頭蓋ドプラ (trans cranial doppler:TCD) で検出される microembolic signals (MES)の関係について検討を行い、造影効果の強さがMESの有無と関連すること、GSMを用いた評価法と比較しMESの予測能が優れていることを報告した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5件)

Oura Kazumasa, Kato Tadayoshi, Ohba Hideki, Terayama Yasuo, Evaluation of Intraplaque Neovascularization Using Superb Microvascular Imaging and Contrast-Enhanced Ultrasonography, Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases, 2018, 査読あり

大浦一雅、大庭英樹、寺山靖夫、頸動脈超音波検査の最新技術と今後の課題、臨床検査、2巻、144-149、2018、査読なし

加藤正義、大浦一雅、大庭英樹、小林正和、小笠原邦昭、人見次郎、寺山靖夫、spatio-temporal image correlation (STIC)法を用いた造影頸動脈超音波検査によるプラーク内新生血管の評価、岩手医学雑誌、69巻、255 - 264、2017、査読あり

Oikawa K, Kato T, Oura K, Narumi S, Sasaki M, Fujiwara S, Kobayashi M, Matsumoto Y, Nomura J, Yoshida K, Terayama Y, Ogasawara K, Preoperative cervical carotid artery contrast-enhanced ultrasound findings are associated with development of microembolic signals on transcranial Doppler during carotid exposure in endarterectomy, Atherosclerosis, 260, 87-93, 2017, 査読あり

Shimada Yasuyoshi, Oikawa Kohki, Fujiwara Shunrou, Ogasawara Yasushi, Sato Yuiko, Narumi Shinsuke, Kato Tadayoshi, Oura Kazumasa, Terayama Yasuo, Sasaki Makoto, Fujimoto Kentaro, Yoshida Jun, Ogasawara Kuniaki, Comparison of Three-Dimensional T1-Weighted Magnetic Resonance and Contrast-Enhanced Ultrasound Plaque Images for Severe Stenosis of the Cervical Carotid Artery, Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases, 2017, 査読あり

〔学会発表〕(計 3件)

小野寺奈緒、大浦一雅、加藤正義、大庭英樹、田代敦、寺山靖夫、諏訪部章、超音波検査による頸動脈プラーク内微細血流評価、日本超音波医学会学術集会、2018年6月10日、神戸国際会議場(兵庫)

寺山靖夫、大浦一雅、超音波検査によるプラーク体積測定およびプラーク性状診断、日本脳卒中学会総会、2018年3月15日、福岡国際会議場(福岡)

及川公樹、島田奏良、藤原俊朗、小笠原靖、佐藤由衣子、鳴海新介、加藤正義、大浦一雅、寺山靖夫、佐々木真理、藤本健太郎、吉田純、小笠原邦昭、頸動脈プラーク評価における造影超音波検査とMRプラークイメージングの検証、日本脳卒中学会総会、2018年3月15日、福岡国際会議場(福岡)

〔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〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。