

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09289

研究課題名（和文）LEDを用いた光音響法による胎児等の血中酸素飽和度測定とその有効性

研究課題名（英文）development of probes for measurement of fetal oxygen saturation in vivo with photoacoustic imaging

研究代表者

瀧内 剛 (Takiuchi, Tsuyoshi)

大阪大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40733358

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、超音波断層法用プローブと近赤外光を発振するLEDおよび光音響法の解析部より構成される機器を開発し、非侵襲的に子宮内胎児・胎盤の酸素飽和度の測定を原理的に可能とした。本研究では、同機器の有効性と安全性を、*in vitro*で評価した後、臨床的な有用性を探索することを目的としていた。本機器の近赤外光LEDから照射された光の細胞毒性を、胎盤、皮膚、神経由来の細胞に本機器の光を照射し評価したが、明らかな障害は認められなかった。臨床応用を目指し、機器のLED出力を強化することなどでより深い深達度が得られる光を照射できるようにさらなる改良を行う必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分娩時の胎児評価方法として、胎児心拍数変化により胎児血の酸素化を推定している。しかし、この方法は、母の帝王切開率を増加させたが、出生児の神経学的予後は改善しなかった。我々は、超音波断層法用プローブと近赤外光を発振するLEDおよび光音響法の解析部より構成される機器を開発し、非侵襲的に子宮内胎児の酸素飽和度の測定を原理的に可能とした。この装置の臨床応用を目指したが、十分な近赤外光の深達度を獲得できなかった。子宮内胎児の血中酸素飽和度を直接測定することは、今後の分娩管理に革新的影響を与え母児の予後改善に寄与すると思われるので、本研究の継続は社会に貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We developed the instrument which consists of ultrasonic tomography probe and near-infrared spectroscopy which theoretically enables to measure fetal and placental oxygen saturation noninvasively in utero. The aim of this study is the evaluation of effectiveness and safety of this instrument *in vitro* and of clinical utility.

We investigated light-induced cell damage by using placenta, skin and neuron derived cultured cells in a variety of conditions and demonstrated no obvious cellular damage through cell proliferation assay, cell death assay, and DNA damage assay. For clinical application during pregnancy, we attempted to improve the instrument to make the penetration depth deeper by increasing LED light output.

研究分野：生殖・周産期

キーワード：胎児well-being 胎児血中酸素飽和濃度 LED 光音響

## 1. 研究開始当初の背景

近年わが国において加速している少子・晩婚化は、今後の社会基盤を脅かす深刻な問題となっている。晩婚化により、妊娠率の低下、また、妊娠・出産に伴う母児の合併症リスクが増加している。脳性まひの原因のうち、分娩時の低酸素脳症に起因するものは、約 10%とされているが、直接的に胎児脳の酸素濃度を測定することは現行では不可能であり、原因の正確な検討は困難である。上記の問題を解決すべく、臨床現場では、胎児心拍数モニタリングを用い、胎児心拍数変化・胎児心電図 ST 波変化により胎児酸素化・胎児酸血症を推定している。しかし上記いずれの方法も、母の帝王切開率を増加させたが、出生児の神経学的予後は改善しなかった。これは、胎児脳の虚血を直接評価する方法が無いという点に、過剰診断が行われていることが一因である。また、帝王切開は、次回妊娠以降の妊娠関連合併症率を上昇させ、母児の周産期予後を悪化させるうえに、非妊娠時の周術期合併症率や不妊症率も上昇させるため、無駄な帝王切開の防止は、女性全体の合併症発生抑制にもつながる。子宮内胎児の血中酸素飽和度の測定は、胎児低酸素症の早期発見により脳障害や後遺症を防ぐことが期待でき、また、分娩後の女性の健康に寄与すると考えられる。よって、子宮内胎児の血中酸素飽和度の直接的な測定方法の開発は、喫緊な研究課題と考えられた。

低侵襲の血中酸素飽和度測定として、近赤外光を用いたパルス酸素飽和濃度測定法により、母体の腹部表面から子宮内胎児の酸素飽和度を測定する方法なども開発されている。しかし、深さ方向の分解能が不足していることもあり、深さ 5mm を超える場合、胎児の血中酸素飽和度測定が物理的、技術的に困難であった。近年、光音響法を使用した画像診断法の有用性が、小動物を用いた実験で報告されている (Nat. Biomed. Eng. 1, 0071 2017) が、臨床現場では未だ検証されていなかった。国内では、浜松医科大学が、近赤外光を用いたパルス酸素飽和濃度測定を目的として、指接着型の胎児パルスオキシメーターを開発していた。この方法では、深さ方向の分解能が不足していることもあり、胎内における胎児脳の血中酸素飽和度を直接測定することが物理的、技術的に困難であった。また、海外では米国のベンチャー企業が、類似の技術で特許を取得していたが(特願 2017-522450 (P2017-522450))、浜松医科大学同様、指接着型の機器であった。

## 2. 研究の目的

我々のグループは、経膈または経腹超音波断層法用プローブと近赤外光を発振する light emitting diode(LED)および光音響法の解析部より構成される機器を開発した。プローブからは超音波を送信せず、プローブ周りに配置する近赤外光 LED から子宮内の胎児へ光を照射する。胎児の脳血管などの光吸収体では、微弱な音響波が発生する。この音響波を受信することで、光吸収体の位置が測定可能であり、解剖学的な情報も取得できる。さらに、血液の分布、複数の異なる波長の光を使うことによって動脈、静脈の区別ができ、酸素飽和状態等を測定可能とする。子宮内胎児・胎盤の任意の深さにおける酸素飽和度を、経膈または経腹から胎児・羊水腔を包んでいる羊膜を破ることなく、音響法により精密測定された例はなかった。この方法では、region of interest (ROI)を自由に設定できるため、測定範囲内の任意の部位の酸素飽和濃度を測定することが理論的に可能となった。よって、胎児脳血流や胎盤などの酸素飽和度を、非侵襲的に直接測定すること、その有効性と安全性評価、また、同機器を用いた臨床的な有用性を探索することを目的とした。

(1)従来の近赤外光のみを利用した酸素飽和度測定では、光の深さ方向の分解能が不足していることもあり、深さ 5 mm を超える場合胎児の血中酸素飽和度測定が物理的、技術的に困難であった点を克服するために、本研究では超音波技術を利用することにより深い深達度を獲得することを目的とした。

(2)一般に使用される光音響測定機器では、光源にレーザー光源を使用している。レーザー光源では、分子振動による発熱が発生し細胞障害も起こりうるが、LED では理論的には熱が発生せず、細胞に対して侵襲性は無いと考えられる。しかし、母児を扱う産婦人科領域の利用では、安全性の証明が特に必要であるため、LED による細胞障害の有無について検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

超音波技術を利用することにより深い深達度を可能とする機器の開発、同時に、本機器の近赤外光 LED から照射された光による細胞障害の有無を、様々な波長の光を用いて検討した。

(1)LED のペアチップをできるだけ高密度に並べて、パワーアップをはかり超音波プローブの両側に取り付けられるように小型化した LED アレイ光源を作成した。アレイ化の方式として、放熱効率の良いアルミ基盤上にチップを 4 列、各列 36 個直列で合計 144(=36×4)個並べて、約 50mm(長さ)×7mm(幅)のアレイ光源とする。LED アレイ光源は、アルミ基盤上に LED チップを並べた構造を取っているために、波長の異なるチップを実装することによって多波長励起への対応を可能としている。例えば、4 列のうち、第 1 列と第 3 列を波長 1、第 2 列と第 4 列を波

長 2 のチップをそれぞれ実装し、波長 1 と波長 2 を交互に発光させて光音響信号を取得することにより、酸素飽和度の検出(波長 1=850nm、波長 2=750nm)や、ICG などの光増感剤とヘモグロビンの峻別(波長 1=820nm、波長 2=940nm)などのリアルタイム多波長解析を可能としている。

( 2 ) 第一生体窓 ( 650-950nm ) の波長領域に入る 940nm、また、第二生体窓 ( 1000-1350nm ) と第三生体窓 ( 1500-1800nm ) の間の 1450nm の近赤外 LED を使用し、無照射、LED、positive control として UVB 照射の 3 群に分けて細胞障害性を評価した。使用した細胞は、胎内環境を模倣するために、胎児の皮膚、神経、胎盤を想定して、マウスケラチノサイト、SH-SY5Y ( ヒト神経芽細胞腫細胞株 )、HTR-SV8 ( 絨毛外栄養膜細胞のモデルとしてヒトトロホプラスト由来細胞株 )、それぞれの細胞増殖 ( 細胞数計測、MTS assay )、細胞死 ( 細胞形態評価、caspase 3、p53、TUNEL 法 )、DNA 障害 ( H2AX ) を評価した。一定の距離から細胞に均一に照射を可能にするためにトレーシングペーパーを置き、インキュベーター内で、短時間照射 ( 20 分 ) および、臨床現場で想定されるよりはるかに長時間の照射 ( 24 時間 ) を行い、その後細胞を回収、上記の検討を行った

#### 4 . 研究成果

( 1 ) LED アレイ光源は、以下に述べる評価性能により、医療用の光音響イメージングシステムの使用に適していることを確認した。

##### 1) 光パルスのピークパワー

典型的な OPO+固体レーザーでは、パルス幅 3.5ns においてピークパワー 860kW であるのに対して、LED アレイ光源では、プローブの幅である 38mm の有効領域においてパルス幅 70ns の条件で 2.15kW のピークパワーを得ている。

##### 2) 光パルス幅と波形の安定性

固体レーザーにおいてパルス幅は 10ns 以下の決められた数値を持ち、可変することは難しい。また、発生する光パルスごとに波形が変動するという特徴を持っている。これに対して、LED アレイ光源では、測定の結果、パルス幅を 30ns ~ 150ns の幅で設定可能で代表的な 30ns、70ns、110ns の光パルス波形が得られた。また長時間の波形変動がなく安定であった。

##### 3) 光出力の安定度

光出力の安定度は、波長の励起光によって得られた画像間の演算を行う多波長光音響イメージングでは極めて重要である。LED アレイ光源を 1 kHz の繰り返しで 70 ns パルス光を連続的に発生させたとき、ピーク値の変動は 0 分 ~ 10 分で -5% 程度であるが、それ以降は、30 分まで -1.2% と安定した。また、10 分間のうち任意の 1 分間の変動は 0.3% 以下であり、高い安定性を持ち画像演算を伴う多波長光音響イメージングに十分使用できる性能があるものを検討した。

( 2 ) 基礎実験として、本機器の近赤外光 LED から照射された光が、細胞障害を発生させるか検討した。無照射、LED ( 940nm、1450nm )、UVB 照射の 3 群に分けて、短時間照射の条件下で、マウスケラチノサイト、SH-SY5Y、HTR-SV8、それぞれの細胞を評価した。いずれも、LED 群では、細胞増殖は抑制されず、細胞死、DNA 障害も誘導されなかった。長時間照射でも同様の方法を用いて細胞障害を評価したが、明らかな細胞障害は見られなかった。よって、近赤外光を用いた同機器の安全性が示唆された。

以上より、近赤外 LED 照射による安全性は示唆されたが、臨床応用可能な深達度には到達していない。LED 出力を強化するなど、より深達度の深い光を照射できるように、更なる機器の改良が必要である。子宮内胎児の血中酸素飽和度を直接測定することは、今後の分娩管理に革新的影響を与え母児の予後改善に寄与すると思われるので、本研究の継続は社会に貢献する可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伴田美佳 瀧内剛 谷口英俊 高橋直子 三宅達也 荒堀仁美 北畠康司 古谷毅一郎 松崎慎哉 味村和哉 遠藤誠之 木村正
2. 発表標題 当院での卵子提供妊娠における周産期予後の検討
3. 学会等名 第55回日本周産期新生児学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 風太、瀧内 剛、伴田 美佳、高橋 直子、神田 昌子、高岡 幸、三宅 達也、木村 正
2. 発表標題 当院で慢性子宮内膜炎検査を実施した胚移植不成功患者24例の検討
3. 学会等名 第27回日本胎盤学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大藤、山田他
2. 発表標題 LEDを用いた光音響イメージングシステムの考案
3. 学会等名 電気・情報関連学会中国支部連合大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	三宅 達也  (miyake tatsuya)  (00814766)	大阪大学・医学系研究科・助教    (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	山田 憲嗣  (yamada kenji)  (70364114)	広島工業大学・工学部・教授    (35403)	
研究分担者	中村 仁美  (nakamura hitomi)  (80467571)	大阪大学・医学系研究科・助教    (14401)	
研究分担者	木村 正  (kimura tadashi)  (90240845)	大阪大学・医学系研究科・教授    (14401)	

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