

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19300166
 研究課題名（和文）NADH・FAD 自家蛍光観察による術中心筋代謝機能イメージングシステムの開発
 研究課題名（英文）Development of a intraoperative monitoring system for myocardial metabolism using autofluorescence of NADH and FAD

研究代表者
 小笠原 康夫（OGASAWARA YASUO）
 川崎医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：10152365

研究成果の概要（和文）：

心臓手術において心臓表面の酸素分圧の変化を観察することは重要である。心筋細胞内の FAD と NADH は自家蛍光特性を有する。酸素分圧の増加により、FAD 濃度は増加するが、NADH 濃度は減少する。我々は心筋代謝機能の評価のために FAD/NADH の比率を可視化した。2 波長励起光源と蛍光観察システムを用いて実験動物の心臓表面の観測を行い、システムの有効性を確認した。

研究成果の概要（英文）：

It is highly important to observe changes in oxygen concentration on the myocardial surface during a cardiac surgery. Both flavin adenine dinucleotide (FAD) and reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) in myocardial cells emit auto-fluorescence. An increase in oxygen tension causes enhanced FAD level as well as attenuated NADH level. We thus measured both FAD and NADH fluorescences using a newly developed fluorescence imaging system with a dual-wavelength excitation source and obtained the ratio of FAD/NADH to evaluate a change in the myocardial metabolism. The myocardial surface of experimental animals was observed by the system. We confirmed the applicability of the system to evaluation of the cardiac metabolism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：NADH, FAD, 蛍光, 心筋代謝, 二波長励起

1. 研究開始当初の背景

これまでの心筋エネルギー代謝の評価方

法には、心筋生検による高エネルギーリン酸の測定や NMR による計測等が行われてきた

が、どの評価方法も時間的かつ空間的制約があり、開心術中の臨床応用は困難であった。一方、心筋細胞内ミトコンドリアは酸素の供給を受け、NADH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide) を NAD⁺ に変換する過程で ATP を産生し、酸素不足の状態では、NADH は NAD⁺ に変換されず、心筋細胞内に蓄積する。NADH は紫外線に対して蛍光特性を有しており、自家蛍光として観測することが可能である。この NADH 蛍光輝度を測定し、虚血心筋でのエネルギー代謝を明らかにしようとする試みは、Chance (1976, Circ Res) に始まり、Ince ら (1993, Am J Physiology) がビデオシステムを導入し、検討している。また、研究グループも NADH 蛍光観測システムを開発し、摘出心による晶質液灌流モデルで心筋代謝評価を行い心筋虚血が時間的空間的に不均一におこり、数 100micron 程度のサイズで虚血に陥りやすい領域と陥りにくい領域が混在することを明らかにし、またこれらの虚血による心筋代謝変化は NO による冠循環調節が関与しており、加齢や高血圧はこれらの調節機構に影響を与えることを報告した (J Cardiac Surg. 2002)。しかしながら、NADH 蛍光自体の観測は容易ではあるが、湾曲した心臓表面への一様な励起や蛍光強度の校正が煩雑なこと、またヘモグロビンでの蛍光吸収のために血液還流下での評価に問題があったため、臨床での心筋代謝イメージングには至っていない現状にある。

2. 研究の目的

ミトコンドリアにおけるエネルギー代謝のサイクルの中で、NADH を NAD⁺ に変換する過程で ATP を産生するとともに FADH₂ を FAD (flavin adenine dinucleotide) に変換する過程でも ATP を産生し、FAD を心筋内に蓄積することが知られている。すなわち酸素消費とともに NADH は減少するが FAD は蓄積していくため拮抗的な変化を示すことが知られている。本研究では、NADH 蛍光イメージングと FAD 蛍光イメージングを併せて実施して、両者の拮抗的反応を利用した実用性ある心筋代謝機能イメージングの開発を行い、術中での代謝機能評価システムの開発をめざす。それにより、新生児、小児の心臓手術時に心筋代謝機能評価を行い治療効果の確認、治療法の評価を行い、ひいては小児治療における手術-手技選択指針の策定に寄与することを目標とする。

3. 研究の方法

3-1 可視化計測の概要

本研究では心筋代謝機能を可視化する手段として生体細胞中でのエネルギー産生の

過程で必要とされる酸化還元酵素 (Oxidoreductase) の蛍光を用いる。酸化還元酵素は、生体の細胞の活動を維持する酸化還元反応を触媒する酵素で生体内には様々な酸化還元酵素が存在しているが、本研究では酸化型の FAD および還元型の NADH の 2 種類の酸化還元型酵素の補酵素を利用する。

FAD は励起光として 435nm に吸収極大をもち、蛍光の中心波長は 595nm である。FAD は細胞中の酸素濃度が高い時に多く生成される。生体組織に酸素が十分供給されているときにその蛍光強度は高く、酸素が多い部位ほど明るい蛍光像が撮影される。NADH は FAD と同様に酸化還元反応の際の電子媒体の一つである。梗塞時や運動時など酸素が不足した状態で濃度が増加する。NAD は酸化還元反応で水素を受け取り NADH に還元されると、吸収波長が 340nm 付近で極大となり 535nm 付近蛍光を発する。

NADH の蛍光像のみの観察では、酸化還元状態の変化による NADH の変化と、被写体の移動などによる映像強度の変化が判別不能である。特に心臓の動的観察では心臓拍動によって心臓表面は常に移動・変形しているため、励起光のあたる角度やレンズの合焦点との位置などの撮影状態が変化し定量的な観察を難しくする。一方、本研究における 2 波長同時観測では NADH と同位置に存在する FAD も同じ撮影条件の変化の影響を受けるため、外乱があってもその比は酸化還元状態を安定して示す。そのため FAD と NADH の蛍光像を撮影し、その点での比を求めると、酸化還元状態の分布や時間変化を安定して評価することが可能となる。

3-2 多波長蛍光観察システム

本システムの信号系統図を図 1 に示す。FAD および NADH の蛍光は微弱光の撮影に有利な EM-CCD カメラを使用した。映像信号は画像処理用 PC に送られるとともに、同期信号発生部に入力されフレーム同期信号が取り出される。フレーム同期信号は励起光制御部に入力され、撮像タイミングに同期させ FAD 用励起光 (460nm) と NADH 用励起光 (360nm) を交互に点灯させる。

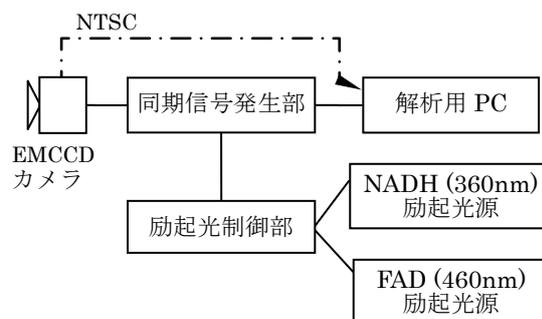


図1 システム構成

撮影では 30fps で 2 波長画像が交互に撮影され、NADH と FAD の映像はそれぞれ 15fps となる。FAD と NADH の映像相互の強度比を演算することで酸化還元反応の状態を 15Hz で画像情報化する。本システムを臨床に用いる場合に、正常なヒトの心拍数は 60~90 拍/分 = 1~1.5 拍/秒であり、15fps は 10~15 サンプル/拍となり十分な時間分解能を有している。

3-3 励起光源

本システム西要する FAD, NADH の 2 つの励起用光源には制御特性に優れた LED を使用した。2 つの励起光による蛍光映像強度の比により酸化還元状態を評価するため、両蛍光映像の撮像条件をそろえるために、LED を同心円状に配置し、FAD および NADH 用の励起光の照射条件が同一になるようにした。

また、撮像対象に対する光源の相対的な位置に違いによる影の相違は蛍光強度比解析の誤差の要因となるため、多数の LED をカメラの撮影レンズを中心に円形に配列することで影の発生を防止し、照明に起因する映像解析誤差を抑制した。

本研究に使用している励起 LED 光源の一例を図 2 に示す。点灯しているのは FAD 蛍光像撮影時の励起光 LED である。NADH 蛍光像撮影時には図中の点灯している LED は消灯し、暗部に配置された LED が紫外線を発光する。



図 2 励起用 LED 光源

生体組織の蛍光像が同様に得られるように紫外線 LED と青色 LED の数と点灯電流を設定した。その結果、図 2 に示す光源ユニットでは紫外線との青色 LED の数の比を 4 : 1 とし、本装置では紫外線 LED 800 個、青色 LED 200 個の計 1000 個の LED を使用している。LED 点灯用の電源電圧を 48V とし、使用電力はそれぞれ紫外線 LED 72W, 青色 LED 18W とした。光量調整のため、通電電流は規格値の + 20% まで増加できる設定とした。

3-4 撮像部

使用した EM-CCD (日立国際電気製 K P-D E 500) は撮像素子に入射した光を電荷に変換し、CCD が電荷を読みだし部に転送するまでに電氣的に電子数を増倍することで感度を向上させている。そのため、EM-CCD カメラに内蔵されている電子増倍機能を使うことで通常のカメラよりも低照度での撮像が可能で高感度特性を有している。また、従来から使用されているイメージ・インテンシファイアに比べ残像がなく、取り扱いが簡単であるという利点がある。さらに本実験においては、低照度での撮像感度がより高い白黒撮像モードに設定して使用した。カメラの特性を以下に示す。撮影時にはレンズ前面に蛍光の透過波長帯域をもつバンドパスフィルタを取り付け、計測に不要な波長の光を遮断し撮影した。

3-5 解析アルゴリズム

映像は 1 台のカメラにより撮影し、FAD と NADH の映像を交互に連続で撮影する。NTSC 信号には交互に切り替わる一連の映像として出力される。この連続した映像を FAD と NADH の蛍光像に分離して処理するための映像解析フローを図 3 に示す。

撮影された映像の画像ピクセルの強度は PC 内部で 1 フレームごとに数値に変換された後に、偶数フレームと奇数フレームで識別され FAD 映像と NADH 映像に分けられる。FAD/NADH の蛍光強度比を計算するために、演算に適した数値範囲になるように数値補正を行う。

4. 研究成果

(1) 本研究においては臨床計測を目指した基礎実験として、システムの基本機能を検証するため実験動物 (ラット) を用いて実験した。ラットは麻酔開胸して、呼吸器を装着した。撮像対象のラットの心臓位置に合わせ励起光源、カメラ等の撮影システムをセットした。励起光源先端部分から被写体までのワーキングディスタンスは約 30cm で、心臓の可動範囲等も考慮し撮影範囲の 50% 程度に心臓

の像が写るよう画角を調整して撮像した。

実験では呼吸器によりラットの呼吸を確保して観察した。生理的に安定な状態(コントロール) 30秒以上の後に呼吸器停止60秒間とその後の再呼吸時に蛍光観察を行った。ラットの状態を監視しながら上記の手順を数回繰り返して映像データを取得した。

(2) 図4 (a) に得られた FAD 蛍光映像、図4 (b) に NADH 蛍光映像の元画像を示す。中央部に心臓が表示されている。FAD 画像では酸素濃度が高いほど明るくなるため、明部が酸素が多い状態であり、同様に NADH 蛍光画像は NADH が多いほど明るいことから、図4 (a) とは反対に明部が酸素濃度が低い状況である。両画像は 1/30 秒の時間差で連続した画像であり、ほぼ同一画面の異なる蛍光波長像を撮影できていることがわかった。

両画像を比較すると、FAD 画像と比べ、NADH 画像はコントラストが低いが、心臓中心部の明部に差が見られ、酸化還元反応の指標である FAD と NADH の濃度分布に差があること窺われた。

(3) FAD/NADH の比の解析画像

図5に酸化還元状態を示す FAD/NADH の比の映像の一例を示す。これは前出の図4 (a) および(b)を演算して得られた画像である。図中の明部は FAD が多く酸素が多い部位、暗部は NADH が多く酸素が少ない部位を表している。

図中の H の点線で囲まれた部分が露出した心筋である。心筋の表面には明暗の分布がみられ、経時的には脈状に明部が表れる。F に示す部位では FAD が多く存在し細胞中に酸素が多い。また、N に示す心室付近に大きく暗部が見られ、NADH が多く細胞中の酸素濃度が低い部位である。

(4) 1台のカメラで FAD と NADH の蛍光像を撮影し、その演算処理データから酸化還元状態に関する可視化情報を表示することができた。FAD や NADH の単一の蛍光画像では判明できなかったが、二つの蛍光画像の画像ピクセルの強度の比をとることにより酸化還元状態を評価することができた。FAD または NADH 単独の蛍光画像から酸化・還元状態を評価する場合よりも、FAD/NADH 両方の蛍光画像を撮影し演算処理してその結果を画像として提示することにより、生体組織の酸化還元状態を実時間で適切に画像として示せるのがわかった。拍動する組織の状態の定量的な評価画像を得るなど、臨床応用で求められる機能を本システムが実現できることが窺われた。

[参考文献]

- 1) 福廣吉晃、小笠原康夫、望月精一、石原和明、心筋虚血時のラット心における NADH 蛍光の in vivo イメージング、電子情報通信学会技術研究報告(ME とバイオサイバネティクス)、査読有り、Vol. 106、No. 370、pp. 21-24、2006
- 2) 長谷川克也、川崎朋実、小林清和、筒井雅夫、可変波長フィルタを利用した固体推進薬燃焼表面の解析技術の開発:2007年火薬学会秋期公演要旨集、pp39-40
- 3) Tatsuya Kajita, Takashi Matsumoto, Yasuo Ogasawara, Seiichi Mochizuki, Hiroshi Nakamoto, Hiroyuki Tachibana,

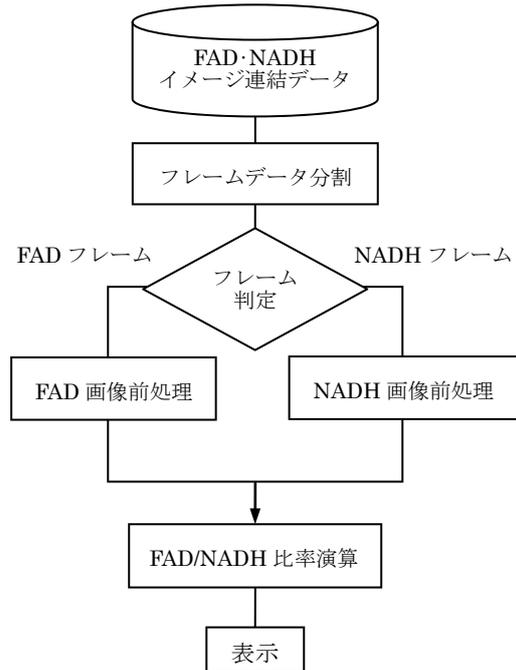


図3 画像解析手順

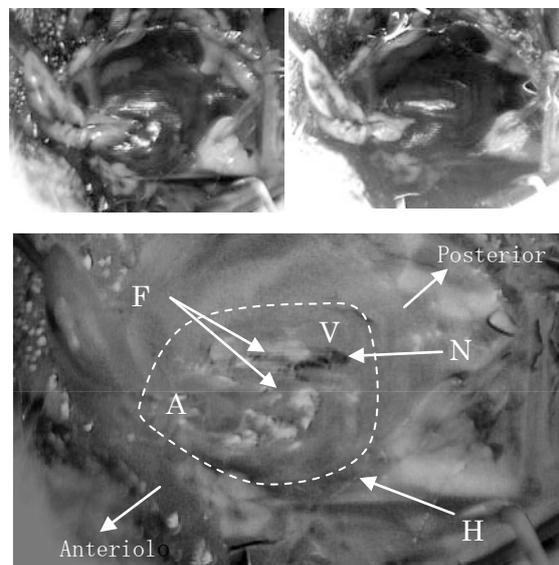


図5 FAD/NADH イメージ

H: Heart, A: Atrium, V: Ventricle
F: FAD rich area, N: NADH rich area

Fumihiko Kajiya: Heterogeneity of Microcirculatory Flow and Mitochondrial Redox State in Isolated Rat Hearts during Dysoxia. :Heart Vessels, Supplement 13(2000) p.37

- 4) Michal Mokry, Peter Gal, Boris Vidinsky, Jarosiav Kusnir, Katarina Dubayoba, Stefan Mozes, Jan Sbo, In Vivo Monitoring the Changes of Interstitial pH and FAD /NADH ratio by Fluorescence Spectroscopy in Healing Skin Wounds. : Photochemistry and Photobiology. 2006.82 pp.793-797

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計2件)

- ① 長谷川克也、小笠原康夫、LED 励起光を利用した心筋細胞の酸化還元状態観察. LED 総合フォーラム、2010/04/17、徳島市
- ② Hasegawa Katsuya, Ogasawara Yasuo: Dynamic monitoring of mitochondrial redox state in heart by the ratio of FAD/NADH fluorescence intensity. World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, 2009/09/10, Munich, Germany, 査読有り

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：生体代謝機能評価用多波長蛍光撮影装置及び生体代謝機能評価用多波長蛍光
発明者：長谷川克也、小笠原康夫
権利者：宇宙航空研究開発機構
種類：特許
番号：特願 2009-203551
出願年月日：2009年9月3日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

小笠原 康夫 (OGASAWARA YASUO)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10152365

(2)研究分担者

矢田 豊隆 (YADA TOYOTAKA)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：00210279
仲本 博 (NAKAMOTO HIROSHI)
川崎医科大学・医学部・助教
研究者番号：10299183
岡林 均 (OKABAYASHI HITOSHI)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：10204009

福廣 吉晃 (FUKUHIRO YOSHIAKI)
岩手医科大学・医学部・助教
研究者番号：20228927

(3)研究協力者

長谷川 克也 (HASEGAWA KATSUYA)
宇宙航空研究開発機構・宇宙科学研究本部
技術開発部・開発員
研究者番号：なし