

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350555

研究課題名(和文) 発癌による新生血管ネットワーク形成に関する3次元血管血流情報解析とその制御

研究課題名(英文) Elucidation of formation process of new blood vessels network caused by carcinogenesis

研究代表者

石田 弘樹 (Ishida, Hiroki)

岡山理科大学・理学部・准教授

研究者番号：50413761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、血流速の情報を元に細血管を3次元画像化できる血流血管イメージング装置の開発を行った。この装置を用いて発癌により形成された新生血管のネットワークを鮮明な画像として可視化することに成功した。また、癌腫瘍の成長に伴う血管走行の変化や血流速の変化を調べることで癌腫瘍の急激な成長を助けるようなかたちで血管ネットワークが形成されることを確認することができた。また、既存のレーザードップラー血流計では、皮下の末梢血管などの極浅い位置にある血流しか測定できなかったが、本装置では、より深い位置まで計測が可能なり、実験用マウスの乳癌も計測できるようになった。

研究成果の概要(英文)：In this research, we developed a three dimensional (3D) imaging device of thin blood vessels which can convert into 3D image based on blood flow velocity. Using this device, we succeeded in visualizing the network of new blood vessels caused by carcinogenesis. It was confirmed that a vascular network was formed to help cancer tumor growth by investigating changes in blood vessel running and blood flow velocity accompanying the growth of cancer tumor. Existing laser Doppler flowmeter could only measure blood flow at extremely shallow position such as subcutaneous peripheral blood vessels. In this device, possible to measure more deeper position, and breast cancer of experimental mice can be measured.

研究分野：血流計測

キーワード：癌 新生血管 血流計測

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 癌細胞は、血管内皮細胞増殖因子を生み出し血管内皮細胞の遊走と増殖を促進させる。血管内皮細胞は伸張していき癌組織の中に網目状の血管ネットワークを形成し、癌に酸素や栄養を供給する。腫瘍内の微小血管密度が高いほど、つまりネットワークが高密度であるほど、腫瘍の予後が悪いと言われている。従って血管ネットワークの形成を遅らせる方向に制御することは治療に有効であると考えられており、医学的観点から研究が行われている。しかし、血管ネットワークを血流速など動的な情報を元に鮮明で定量的な画像として取得した例は無い。このような画像は癌の成長メカニズムを探究するうえで重要である。

(2) レーザー光を利用した血流計としては、レーザードップラー血流計やレーザースペックル血流計がある。これらの血流計は、超音波を利用した血流計に比べ空間分解能が高く、細血管まで画像化(イメージング)できる能力を有する。しかし、レーザー光は、皮膚にあたると散乱されてしまう。結果的に光のコヒーレント性は、大きく劣化してしまうため、これまでは、皮下の末梢血管などの極浅い位置にある血流しか測定できなかった。これでは、皮膚や網膜などの限られた部分しか適応できないため、応用上の大きな制約があった。

### 2. 研究の目的

(1) 皮膚から深い位置にある細血管(少なくとも数ミリの深さ)をイメージングできる血管血流イメージング装置の開発を行う。開発された装置の有効性及び性能は、実験用マウスを用いた *in-vivo* 計測により検証する。

(2) 発癌により、いち早く血管新生が起こる。この腫瘍塊を包み込むように伸張する血管ネットワークの形成過程を鮮明で定量的な画像で記録した例はない。本研究で開発する血管血流イメージング装置を用いて発癌により形成された血管ネットワークを鮮明なイメージング画像として記録する。さらに、血管ネットワークの形成過程と癌腫瘍の成長の関係を明らかにするため、血管ネットワークの経日変化を調べ、癌細胞が引き起こすと考えられる血流の制御について考察する。

### 3. 研究の方法

(1) 近赤外波長の半導体レーザーを用いた血管血流イメージング装置の開発を行った。特に皮膚から深部にある血管でも計測を可能にするため光学系(ハードウェア)と信号処理(ソフトウェア)の両面から改善を行った。

(2) (1)において開発された血管血流イメージング装置を用いて実験用マウスによる *in-vivo* 計測を行った。特にこれまで計測が困難であった乳癌の腫瘍付近の細血管のイメージングを行った。さらに、乳癌が成長していく過程でおこる血管ネットワークの形成過程を時系列で記録し、生体で血流の制御がどのように行われているのか考察した。

### 4. 研究成果

図1に血管血流イメージング装置の光学系の概形を示す。一本のレーザービームをブームスプリッターとミラーにより二本の平行なビームに分ける。次に二本のビームをロッドレンズとシリンドリカルレンズにより厚さ0.1mmの薄いシート光に変換させた後、交差させる。この交差領域(測定領域)が空中にある場合は、計測領域内に鮮明な干渉縞が現れる。なお、この干渉縞の間隔は数 $\mu\text{m}$ であり非常に微細である。実際に干渉縞を拡大写真が図2(a)である。これまで、この計測領域が生体内にある場合には、皮膚組織などにより光が散乱され干渉縞が形成されないため、血流計測は難しいと考えられてきた。しかし、本装置では、スリットを設けるなど改良により生体内でもレーザー光のコヒーレント性が完全に失われることなく、図2(b)に示すような干渉模様を形成することができた。この模様を血液中の赤血球が通過すると赤血球の速度に比例したビート周波数をもつ散乱光が発生する。この散乱光を検出し、高速フーリエ変換などの信号処理を用いて血流速の情報を得ることができた。

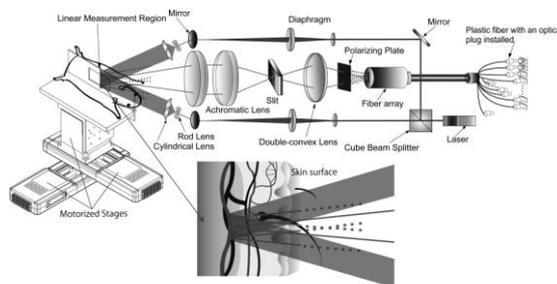


図1. 血管血流イメージング装置の光学系の概形

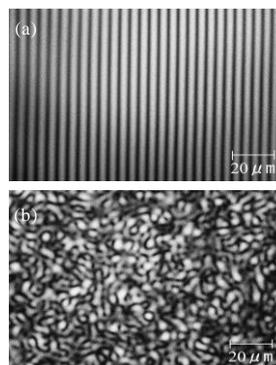


図2. 計測領域の拡大写真, (a)空中, (b)マウスの腹部の皮膚表面から0.8 mmの深さ

実験用マウスに乳癌細胞を移植して経時変化を記録した写真を図3に示す。目視では、移植後6日目までなら変化を確認することはできなかったが、6日目において直径4 mm程度の楕円形の腫瘍を確認した。

写真の破線で囲まれた2次元(x-y面)の領域を皮膚表面から深さ(z方向)1 mmにおいてx-y面をスキャンした場合のイメージング画像を血流速のコンターグラフとして図4(a)-(d)に示す。なお、脈拍と血流速には関連性があるため、脈拍が240-250回/分の範囲にあることを確認し、計測を行った。移植から3日後に血流に大きな変化が見られた。血管内の血流速は\*マークを付けた位置で移植前に比べ1.5倍程度に増加した。また、血管#1および#2では、血管径が大きくなっていることが明確である。移植6日後においては、さらに血流速が増し血管径が大きくなっている。また、腫瘍魂内部の血流速も速くなっていることが確認できる。本システムの空間分解能の限界から腫瘍魂内部の新生血管の走行までは可視化することはできないが腫瘍魂内部に無数の新生血管が生成された結果だと考えられる。

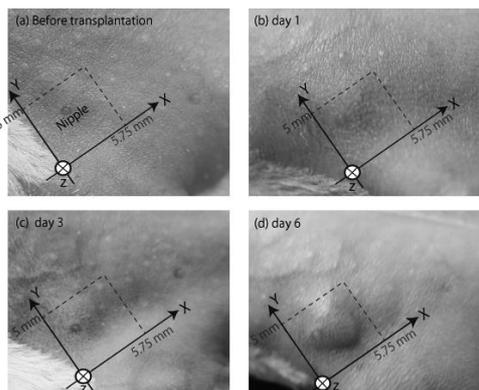


図3. マウスの乳癌の経時変化の写真による記録、(a)移植前、(b)1日後、(c)3日後、(d)6日後

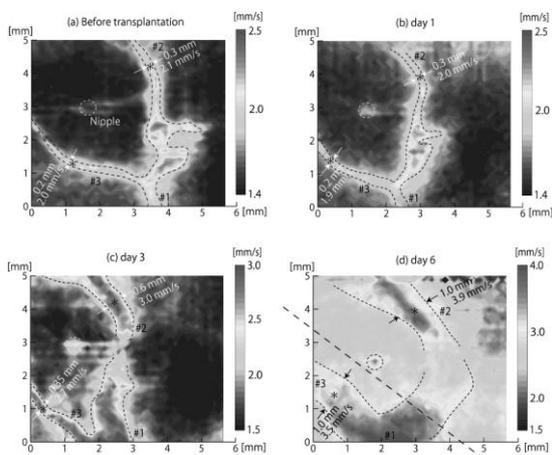


図4. 乳癌の経時変化の血管血流イメージングによる記録、(a)移植前、(b)1日後、(c)3日後、(d)6日後

次に身体の深部から腫瘍魂へと伸びる血管の様子を知るため図4(d)中に引いた斜めの破線に沿って深さ方向の計測を試みた。図5(a)は測定した深さ方向の血管の走行を赤外線撮影した写真である。写真の破線で囲まれた領域をスキャンしたときに得られた血管血流イメージングを図5(b)に示す。図5(a)の写真からは、縦横方向に伸びる複数本の血管が確認できるが、実際に血液が流れている血管は、2本(血管#4と#8)のみであった。血管#8は、腫瘍に向かって流れ込み腫瘍魂で拡散しているように見える。血管#4は、上部で複数本(#5-#6)の血管に分岐しているが、血液が流れているのは、#6の血管のみであった。血管#6は、図4(d)に見られる血管#1と同一の血管であり、血管#1からの血液もまた腫瘍魂に拡散しているように見える。つまり、癌腫瘍を上下から挟み込むようにして血液が腫瘍内部に拡散していると言える。また、腫瘍に向かって流れ込む血管のみ血流が促進され、その他の血管の血流は殆ど失われており、単に血流が増加するだけではないこともわかった。

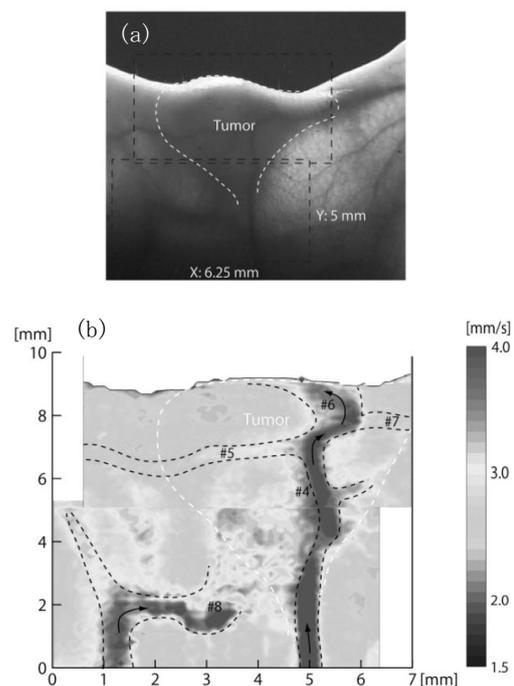


図5. 移植6日後における腫瘍付近の血管血流イメージング、(a)写真、(b)イメージング画像

この結果を考察すれば、癌腫瘍が周囲の血流をコントロールして腫瘍内に優先的に血液を送っていると解釈することもできる。医学分野では、癌細胞が血管新生を促進させる因子を生み出すことは既に良く知られているが、癌細胞移植から短時間で起こる血管血流の変化を鮮明な画像と

して捉えた例は無く。学術的にも価値のある結果であると考えられる。また、今回の動物実験からも皮膚から3 mm程度の深さまでは十分に計測できることが確認できた。

将来、本装置を用いて癌腫瘍に血液を送っている血管を特定し、その血管の血流のみをレーザーなどで局所的に遮断することができれば、癌の成長を遅らせることが可能であるかもしれない。今後、本研究をさらに発展させていきたい。最後に本研究課題の成果を以下にまとめる。

(1) これまでレーザーを用いた血流計は、皮下の極浅い部分にある末梢血管程度しか測定できなかった。本研究では、二つレーザー光を交差させたときに形成される干渉縞が生体内においてもある程度保持されることに着目し、生体内で形成される干渉模様を利用した血流計測に成功した。実験動物を使ったin-vivo計測において皮膚から3 mmの深さまでは計測可能であることを確認した。本計測手法および本装置は、レーザードップラー血流計とレーザースペックル血流計を融合させた測定方法として学術的な価値があると判断され、研究成果は、学術雑誌Journal of Applied Physicsに掲載された。

(2) 皮下から深い位置にある実験用マウスの乳癌の周囲に形成された新生血管をイメージングすることに初めて成功した。さらに、乳癌の成長に伴う血管ネットワークの形成過程を時系列的に計測することで癌腫瘍の急速な成長を助けるように血管ネットワークが形成され、この血管ネットワークを使って癌腫瘍に血液が送られていることを鮮明なイメージング画像で確認することができた。本研究成果は、学術雑誌Applied Physics Lettersに掲載された。

なお、本動物実験は、富山大学動物実験委員会の承認を得ており、動物実験指針に従って適切に実施された。また、実験は麻酔下で行い、動物への苦痛軽減に努めた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6件)

- ① T. Kyoden, N. Shoji, S. Akiguchi, H. Ishida, T. Andoh, Y. Takada, N. Momose, T. Homae, and T. Hachiga,  
In vivo visualization method by absolute blood flow velocity based on speckle and fringe pattern using two-beam multipoint laser Doppler velocimetry,  
Journal of Applied Physics, 査読有、120, 2016, 084701(1)-(8)  
DOI:

<http://dx.doi.org/10.1063/1.4961611>  
1

- ② S. Akiguchi, H. Ishida, Y. Takada, T. Teranishi, T. Andoh and T. Hachiga,  
Examining the relationship between blood flow velocity and movement of erythrocytes in a capillary using laser Doppler velocimetry,  
IEEJ Transactions on Electrical and Electronic Engineering, 査読有、11, 2016, 451-456  
DOI: 10.1002/tee.22262
- ③ T. Kyoden, S. Abe, H. Ishida, S. Akiguchi, T. Andoh, Y. Takada, T. Teranishi and T. Hachiga,  
High-resolution LDV monitoring system for measuring velocity distribution in blood vessel,  
Optics Communications, 査読有、353, 2015, 122-132  
DOI:  
<https://doi.org/10.1016/j.optcom.2015.04.075>
- ④ H. Ishida, T. Andoh, S. Akiguchi, T. Kyoden and T. Hachiga,  
Observation of tumor micro vessels that are controlled by blood flow in breast cancer,  
Applied Physics Letters, 査読有、106, 2015, 173703(1)-(5)  
DOI:  
<http://dx.doi.org/10.1063/1.4919103>
- ⑤ T. Kyoden, Y. Yasue, H. Ishida, S. Akiguchi, T. Andoh, Y. Takada, T. Teranishi and T. Hachiga,  
Multi-channel laser Doppler velocimetry using a two-dimensional optical fiber array for obtaining instantaneous velocity distribution characteristics,  
Japanese Journal of Applied Physics, 査読有、54, 2015, 012501(1)-(6)  
DOI: 10.7567/JJAP.54.012501
- ⑥ H. Ishida, Y. Yasue, T. Hachiga, T. Andoh, S. Akiguchi, Y. Kuraishi and T. Shimizu,  
Power spectrum and blood flow velocity images obtained by dual-beam backscatter laser Doppler velocimetry, Optical Review, 査読有、21, 2014, 461-467  
DOI: 10.1007/s10043-014-0071-4

[学会発表] (計 7件)

- ① 莊司成熙、秋口俊輔、経田僚昭、石田弘樹、安東嗣修、百生登、八賀正司、  
多点同時面計測 LDV による脈動流速変動場  
のその場観察システム、  
第 76 回応用物理学学会秋季学術講演会、  
14p-2N-13, 2015 (名古屋国際会議場)
- ② 経田僚昭、莊司成熙、石田弘樹、安東嗣修、  
秋口俊輔、百生登、八賀正司、  
多点同時面計測 LDV によるメラノーマ内  
微小血管の可視化、  
第 76 回応用物理学学会秋季学術講演会、  
14p-2N-14, 2015 (名古屋国際会議場)
- ③ T. Kyoden, H. Ishida, N. Shoji, T. Andoh,  
S. Akiguchi and T. Hachiga,  
In-situ LDV monitoring system using  
two-dimensional optical fiber array for  
observing blood flow velocity  
distribution,  
International Symposium on Organic and  
Inorganic Electronic Materials and  
Related Nanotechnologies, 2015 P3-33  
(朱鷺メッセ)
- ④ 莊司成熙、秋口俊輔、経田僚昭、百生登、  
八賀正司、安東嗣修、石田弘樹、  
血管内血流動場をリアルタイムでイメー  
ジングする計測手法と解析ソフトウェア  
の基盤構築、  
日本伝熱学会北陸信越支部春季セミナー、  
2015 (富山大学)
- ⑤ 安部将太郎、高田洋吾、経田僚昭、石田弘樹、  
秋口俊輔、寺西恒宣、八賀正司、安東嗣修、  
狭窄部のある矩形流路内の脈動流を対象  
とした流動解析、  
日本伝熱学会北陸信越支部 2014 年度 秋  
季セミナー 2014 (長岡技術科学大学)
- ⑥ 谷野恭平、酒井諒、経田僚昭、寺西恒宣、  
石田弘樹、秋口俊輔、八賀正司、安東嗣修、  
高田洋吾、  
マイクロ多点同時計測 LDV 法の生体計測  
への応用(狭窄部のあるマイクロ流路内の  
脈動流速分布の瞬時計測)、  
日本伝熱学会北陸信越支部 2014 年度春  
季セミナー 2014 (富山高等専門学校)
- ⑦ 高橋里奈、経田僚昭、石田弘樹、秋口俊輔、  
安東嗣修、高田洋吾、寺西恒宣、八賀正司、  
近赤外レーザドップラー流速分布測定装  
置の生体計測への応用、  
日本機械学会第 92 期流体工学部門講演会  
講演論文集 2014, 1203 (富山大学)

[産業財産権]

なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.dap.ous.ac.jp/~ishida/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石田 弘樹 (ISHIDA, Hiroki)

岡山理科大学・理学部・准教授

研究者番号：50413761

### (2) 研究分担者

安東 嗣修 (ANDOH, Tsugunobu)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬  
学)・准教授

研究者番号：50333498

八賀 正司 (HACHIGA, Tadashi)

富山高等専門学校・商船学科・教授

研究者番号：80123305

秋口 俊輔 (AKIGUCHI, Shunsuke)

富山高等専門学校・電子情報工学科・准  
教授

研究者番号：50462130

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし

[図書]

なし