

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461783

研究課題名(和文) マイクロバブル造影超音波とMRI画像の3次元的融合による乳癌微小環境の定量化

研究課題名(英文) Quantification of breast cancer microenvironment by three dimensional integration of micro bubble contrast ultrasound and MRI image

研究代表者

高澤 千晶 (Takasawa, Chiaki)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：60623189

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)：造影超音波の定量法は、現在臨床の機種ではtime intensity curve解析が搭載されている。Peak intensityやarea under the curveがパラメータとして算出され、これらがMVDと相関することが報告される。我々は、新法としてあるピクセルに着目して、このピクセルの色味が時間軸方向にどのように変化しているのか計測し、変化の度合いの大きいものと小さいものを閾値で分け、変化の大きいものを造影剤の検出されたピクセルとしてdetectするという方法を開発した。今回、新法の定量値が浸潤癌の病理学的MVDと相関することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The quantitative method of contrast ultrasound is currently equipped with time intensity curve analysis in clinical models. Peak intensity and area under the curve are calculated as parameters, and it is reported that these correlate with MVD. As a new method, we focus on a certain pixel, measure how the color of pixel changes in the time axis direction, divide one with a large degree of change and one with a small change by threshold. We developed a method to detect things as detected pixels of the contrast agent. Finally, an area ratio (enhancement area ratio) of the region where the contrast medium is detected is calculated with respect to the region of interest. In this study, we clarified that the enhancement area ratio correlates with the pathological MVD of invasive cancer.

研究分野：画像診断学

キーワード：乳癌 血管密度 造影超音波 定量解析

1. 研究開始当初の背景

乳癌をはじめとした悪性腫瘍が発生、増殖する際には、腫瘍細胞のみが増殖するのではなく、腫瘍間質を伴う。腫瘍間質には新生血管と膠原線維や線維芽細胞が含まれる。腫瘍血管新生は癌の増殖、転移に密接に関与しており、血管新生を標的とした分子標的治療(ペバシズマブ)は様々な癌腫での効果が期待されている。腫瘍血管新生は 癌細胞自身による血管新生促進因子、癌組織内の間質細胞やマクロファージなどから分泌される血管新生調節因子、癌増殖に伴う低酸素状態からの血管新生促進因子、により調節されている。マイクロバブル造影超音波は 2007 年より肝腫瘍、2012 年から乳癌に保険適応されている。肝腫瘍では早期相での腫瘍内血管構築像と、クッパ-相での欠損部画像化により質的診断を得る、というように画像評価方法が確立されている。一方、乳癌でのマイクロバブル造影超音波の診断基準は血管構築の形態による基準があるのみで、今後の課題となっている。マウスでの動物実験ではマイクロバブル造影超音波で血管密度を測定し、血管新生阻害薬の効果判定に有用であることを証明した報告はあるが in vivo でマイクロバブル造影効果と病理での新生血管密度を対比し、臨床応用させた報告はない。我々は、ラットのリンパ節腫大モデル実験においてマイクロバブル造影超音波での増強効果定量がリンパ節内の血管密度を反映していることを確認した。マイクロバブルは約 3 μ m というバブルの大きさの特徴により 5-30 μ m の腫瘍新生血管を可視化できる超音波造影剤なのである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マイクロバブル造影超音波による血管密度定量と病理での腫瘍新生血管の対比を行うことである。

3. 研究の方法

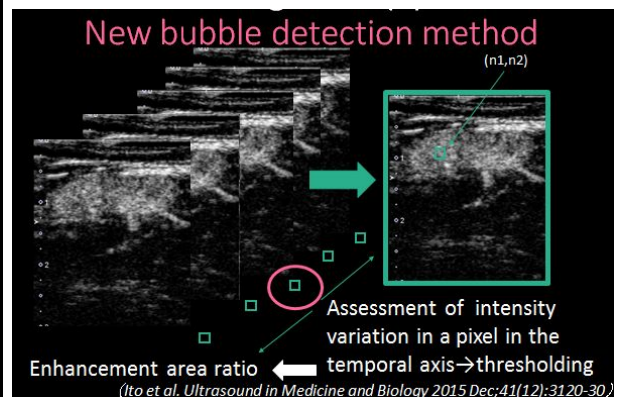
腫瘍における Microvessel density (MVD) は、新生血管の定量で、病理学的には CD31 免疫染色で血管内皮を染めることにより計測される。乳癌症例では、MVD が高値であることは、relapse free survival、overall survival の短縮と関連すると報告されている。MVD を手術前の画像で測ろうとしても、CT や MRI の造影剤は細胞外液性造影剤で、血管内皮の隙間から間質に漏れ出るため、MVD との相関がうまく得られない。これに対し、超音波造影剤は粒子径が大きく血管内に留まるため、理想的な vessel imaging が可能だと言われている。

造影超音波の定量法は、現在臨床の機種では time intensity curve(TIC)解析が搭載されている。x 軸が時間、Y 軸が信号強度で TIC が得られる。Peak intensity (PI) や area under the curve (AUC) がパラメータとして

算出され、これらが MVD と相関することが、報告されている。主に動物実験で報告され、臨床例でもいくつかの報告がある。

しかしながら信号強度は深さやゲインの設定に影響される。臨床で症例ごとに比較するときには、これらを一定にすることが必要だが、実臨床では困難である。

また、TIC 解析からえられる PI や AUC というパラメータは、造影剤注入後の連続したデータが必要であるが、臓器によっては呼吸変動などにより困難なことが多い。このように TIC 解析には limitation がある。我々の開発している新法 (new bubble detection 法) を解説する。



この方法は経時的に並んだ frame のあるピクセルに着目してこの、ピクセルの色味が時間軸方向にどのように変化しているのか、計測する。変化の度合いの大きいものと小さいものを閾値で分け、変化の大きいものを造影剤の検出されたピクセルとして detect する手法である。最終的に関心領域に対して、造影剤の検出された領域の面積比 (enhancement area ratio) が算出される。

我々は enhancement area ratio (ピークと delay の時相) が浸潤癌の病理学的 MVD と相関するのかどうかを評価した。

対象は術前に CE-US を行った浸潤癌連続 40 例 40 病変である (術前化学療法を行った症例や DCIS 症例は除外した)。ソナゾイド 0.0075ml/kg を用いた。撮像装置は以下のようなものを用いた。

- Aplio 500 (Toshiba Medical Systems, Tochigi, Japan)
- Transducer PLT-704SBT
- Frequency 6.5MHz
- Mechanical index 0.16-0.2
- Contrast agent Sonazoid (Daiichi Sankyo, Japan)
→ intravenous infusion of 0.0075ml/kg

新法での解析方法の詳細を述べる。Bubble detection のアルゴリズムは、以下の式のように着目フレームの着目ピクセルにおける色味の variance (分散) を求め、閾値で二値化する。最終的に enhancement area ratio は、分母 segmented area に対する分子造影剤があると検出された area の比 $\times 100$ として

算出される。

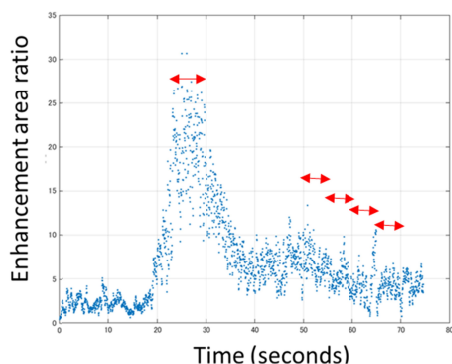
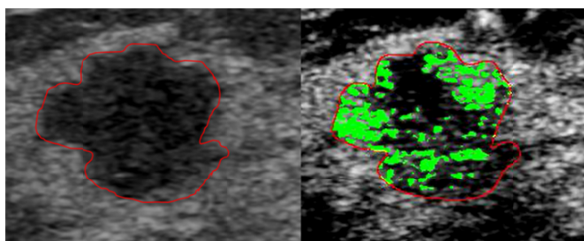
- Algorithm of bubble detection

$$v_t(n_1, n_2) = \text{var}_{-\Delta u \leq u \leq \Delta u} \{ \bar{I}_{t+u}(n_1, n_2) - \bar{I}_t(n_1, n_2) \},$$

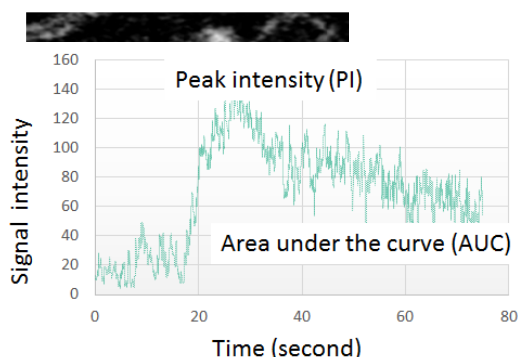
We employed threshold as 0.2

$$\text{enhancement area ratio} = \frac{\text{\# of pixels which are detected with bubbles}}{\text{\# of pixels of the segmented tumor area}} \times 100.$$

Segmentation は、二人の独立した reader によって別々に行った。最終的に time enhancement area ratio カーブが算出される。Y 軸が色味の度合いではなく、面積比であるところが TIC 解析と異なる。このカーブからピークと delay の enhancement area ratio が算出される。delay は 50-70 秒の間で 5 秒ずつ平均をとった。



従来法 (TIC 解析) も比較対象のために行った。腫瘍の中の強く造影されると思われる部位に 3 つの ROI を置き、それぞれの TIC カーブを算出、peak intensity と area under the curve を求め、三つの平均を一つの病変の代表とする PI と AUC とした。



新法による enhancement area ratio (ピークと delay の 50-70 秒の間の 4 カ所) と TIC の PI と AUC が病理組織学的 MVD と相関するかどうかを検証した。

4. 研究成果

各パラメータの observer 間の一致度 (ICC) と、組織学的 MVD との相関係数の結果を示す。一致度は、新法の enhancement area ratio で 0.9 を超えており、almost perfect agreement であった。従来法 TIC の PI と AUC は、やや低く 0.782 と 0.817 であった。MVD との相関は、新法では peak および delay のいずれのタイミングでも MVD との相関が得られ、p 値も低く、有意であった。一方、TIC 解析では PI は p 値 0.0073 で有意であったが AUC は 0.07 と有意な相関は得られなかった。

	ICC	r	P
Time-enhancement area ratio analysis			
Peak enhancement area ratio	0.971 (0.944–0.985)	0.57	0.0001
Delayed enhancement area ratio (50–54s)	0.972(0.945–0.986)	0.62	<0.0001
Delayed enhancement area ratio (55–59s)	0.961 (0.925–0.98)	0.68	<0.0001
Delayed enhancement area ratio (60–64s)	0.952 (0.906–0.976)	0.61	<0.0001
Delayed enhancement are ratio (65–69s)	0.959 (0.920–0.978)	0.58	0.0001
Time-intensity curve analysis			
Peak Intensity	0.782 (0.580–0.887)	0.43	0.0073
Area under the curve	0.817 (0.648–0.905)	0.29	0.0769

考察としては、組織学的 MVD は、200 倍視野でみた領域に対する CD31 陽性の血管の面積の比として求められる。

今回の新法の enhancement area ratio も segmentation された領域に対する bubble が検出された領域の比となっている。

MVD も enhancement area ratio も比なので、有意な相関が得られたと考えられる。今回ピークも delay も MVD と相関が得られたが、ピークは 1 回の injection で 1 回しか得られない。delay は緩やかな減衰の過程で 75 秒の撮像で少なくとも 4 回は得られていた。また動物実験では、ピークは個々の循環動態や injection speed に影響されるため、delay のほうが diagnostic window として妥当ということが報告されている。

本結果からは 75 秒までの delay のタイミングで、enhancement area ratio が MVD と有意に強く相関していたので、新法では delay を使った複数病変の評価ができるようになる可能性があると考えられる。

臨床的に 1 回の造影剤の投与で複数病変が評

働けるようになることは重要と考えている。

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 1 件)

Mori N, Mugikura S, Takahashi S, Ito K, Takasawa C, Li L, Miyashita M, Kasajima A, Mori Y, Ishida T, Kodama T, Takase K
Quantitative Analysis of Contrast-Enhanced Ultrasound Imaging in Invasive Breast Cancer: A Novel Technique to Obtain Histopathologic Information of Microvessel Density K. Ultrasound Med Biol. 2016 Dec 29. pii: S0301-5629(16)30406-9. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2016.11.009. (査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

平成 28 年度 : RSNA2016 第 102 回北米放射線学会議

2016.11.27-12.2 (11.29 発表) アメリカ合衆国シカゴ McCormick Place 2016.11.29(発表者:森菜緒子)

Quantitative analysis of contrast-enhanced ultrasound imaging in invasive breast cancer: a novel technique using enhancement area ratio to predict histopathological microvessel density

2016.5.28-2016.5.29 Ultrasonic Week2016 第 89 回日本超音波医学会学術集会 京都市グランドプリンスホテル京都

『乳癌における造影超音波を用いた血管密度定量法』森菜緒子(発表者)プログラム 93 頁

〔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 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

高澤千晶 (TAKASAWA CHIAKI)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号 : 60623189

(2)研究分担者

森菜緒子 (MORI NAOKO)

東北大学・病院・助教

研究者番号 : 90535064

高瀬圭 (TAKASE KEI)

東北大学・病院・教授

研究者番号 : 60361094

小玉哲也 (KODAMA TETSUYA)

東北大学・医工学研究科・教授

研究者番号 : 40271986

石田孝宜 (ISHIDA TAKANORI)

東北大学・病院・教授

研究者番号 : 00292318

宮下穰 (MIYASHITA MINORU)

東北大学・病院・助教

研究者番号 : 60710788