

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：82406

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560267

研究課題名(和文) 蛍光マルチスペクトル内視鏡による標的蛍光物質の定量イメージング

研究課題名(英文) Quantitative imaging of the target fluorescent substance by fluorescence multispectral endoscope

研究代表者

守本 祐司 (Morimoto, Yuji)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医学教育部医学科専門課程・准教授)

研究者番号：10449069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)： 標識蛍光物質の定量イメージングを実現するために、内視鏡システム、蛍光マルチスペクトルイメージングシステム、スペクトルアンミキシングのカップリングを図り、オンラインで高速に稼働させ、リアルタイムにイメージを得ることができる一体型の内視鏡イメージングシステムを開発した。開発したシステムを用いた生体イメージングにおける病変の診断可能性を検証するために、マウス動脈硬化モデルやラット食道がんモデルを用いて病変検知を試みたところ、動脈硬化部位や腫瘍部位を生きたままリアルタイムに可視化することに成功した。

研究成果の概要(英文)： To achieve a quantitative imaging of labeled fluorescent substances, a novel endoscopic system equipped with a fluorescence multispectral imaging system coupled to the spectral unmixing function was established. This system can visualize a fluorescence spectral unmixing image with a rate of 1 f/s. We verified the detectability of the newly developed endoscopic system for pathological lesions. Using a mouse atherosclerosis model or a rat esophageal tumor model, we succeeded to clearly visualize an atherosclerotic plaques or esophageal tumors in real time.

研究分野：光医学、生理学、イメージング

キーワード：画像診断システム 内視鏡 蛍光

1. 研究開始当初の背景

生体内 (in vivo) の蛍光イメージングでは標的蛍光物質を定量的に計測することは難しい。これは、「生体内」計測では、測光条件を一定することが困難である (たとえば、励起光出射端と病変部位間の距離が測定毎に変わる、など) ことに起因する。さらに、標的蛍光物質が内在性蛍光物質 (フラビン、ポルフィリン等) である場合は、目的とする内在性蛍光物質が正常組織にも含まれていることが多く、これがノイズ要因 (背景蛍光) となって病変部位と正常部位との判別は容易ではない。したがって、in vivo 蛍光の定量・客観計測の実現には、測光条件に左右されず、病変部位と正常部位との識別能力 (特異度) の高い新しい方法論が求められる。

蛍光分光法に基づくイメージングは、バンドパスフィルタ (*1) による従来の蛍光強度のイメージングから、蛍光マルチスペクトルイメージングへと発展している。これは、取得する波長域を変えながら連続的にイメージ撮影することで、イメージ上の全ピクセル (画素) で蛍光のスペクトルデータを取得する技術で、蛍光強度のイメージングよりも桁違いの情報を得ることができる。

我々は本研究開始前に、悪性腫瘍や動脈硬化の内在性の蛍光変化をマルチスペクトルイメージとして捉えることに成功し (図1)、病巣の早期発見ならびに病態の定量評価が可能であることを示唆する知見を得ていた。

他方、臨床において内視鏡は欠くことのできないイメージングデバイスである。管腔臓器を対象とした診断治療から、低侵襲医療への高まりによって腹腔内・胸腔内手術へと適用範囲が拡大している。すなわち、これからの内視鏡医療においては、病変だけを低侵襲に最小限除去することを目的に、今まで以上に客観的・定量的な評価技術が求められる。

*1: 目的とする波長域の光だけを通過させ、それ以外の波長帯域の光は遮断する光学デバイス。

2. 研究の目的

スペクトルアンミキシング機構を具備する蛍光マルチスペクトルイメージングシステムを搭載した蛍光内視鏡システムを開発する。そして、標的蛍光物質を定量的かつ特異度高く描出することで動脈硬化などの病態を in vivo, リアルタイムに客観評価できる医療技術を確立する。

3. 研究の方法

(1) スペクトルアンミキシングによる光学診断システムを搭載した蛍光マルチスペクトルイメージング内視鏡の開発:

生体内の病変をリアルタイムに高感度診断できるように、内視鏡システム、蛍光マルチスペクトルイメージングシステム、スペクトルアンミキシングのカップリングを図り、オン

ラインで高速に稼働させ、リアルタイムイメージングを得ることができる一体型のシステムの開発を行った。

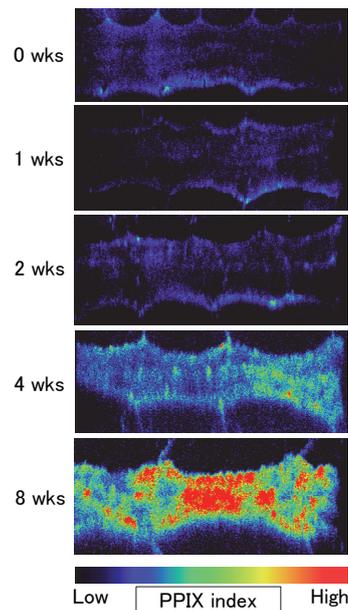


図1. ラット食道がんの自家蛍光イメージング

(2) 動脈硬化病態を反映する内因性蛍光の探索:

採取したヒト冠動脈の内腔面に蛍光励起用の青色光 (405nm) を照射し、イメージ上の各画素における蛍光スペクトルを測定した。画素数は 512×512 (約 25 万) で測定レンジは 450-800 nm の範囲とした。ヒト冠動脈サンプルに HE 染色を施し、組織スライドをバーチャルスライド (OkyVIA, オリジナル) に取り込み、蛍光マルチスペクトルイメージにおける蛍光強度と病理像における動脈硬化部位の進展 (プラークの厚さ) の相関を解析した。

なお、本実験に関わるプロトコルは、防衛医大倫理審査承認済 (簡-185) である。

(3) 動物モデルにおける動脈硬化病変の検知:

LDL 受容体欠損マウスに高コレステロール餌 (1.25% コレステロールを配合) を3か月与え、動脈硬化マウスモデルを作製した。脂質親和性の蛍光物質である 2BDP3Gd (2 boron-dipyrromethene-3Gd) を病変観察 48 時間前に静脈内投与した (7.4 μmol/kg)。血管内腔から蛍光イメージ取得するため、麻酔下にあるマウスの腹部大動脈を露出して、18G メディカットカニューレを挿入、Y 字型コネクタを経由して内視鏡を挿入して生体観察を行った。

(4) ラット食道がんの内因性蛍光のリアルタイムマルチスペクトルイメージング:

5 週令の雌性 Fissure ラットに、発がん物質であるニトロソアミン (N-Nitroso methyl butylamine) を 15 mg/L の濃度で飲水させ、

6 週間飼育した。麻酔下にあるラットの口にバイトブロックとしてラット用のゾンテ (SN7210、シナノ製作所) を挿入し、その内腔へ細径内視鏡を挿入し、胃噴門部から喉頭までの食道の観察・記録した。

4. 研究成果

(1) 蛍光マルチスペクトルイメージング内視鏡の開発：

内視鏡によって得られる光学イメージを分割し、マルチスペクトルイメージングシステムと、明視野観察のためのモニターに送達するためのデバイスを構築した。光路分割ユニットには偏光ビームスプリッターを採用し、P 偏光成分をマルチスペクトルイメージングシステムに送達し、S 偏光成分をモニターに送達する仕組みを採用した。

マルチスペクトルイメージ取得と同時に並行にアンミキシング処理を行いリアルタイムに画像構築させることができるよう、アルゴリズムを構築した。その結果、解析結果が 1 秒毎に更新され、設定値は内視鏡撮影中にも変更することができるシステムを確立した。

(2) 摘出ヒト冠動脈を用いた検討：

正常部位において、405nm の光励起により 530nm 付近にピークを有する内因性蛍光が認められた。しかし、動脈硬化の明らかな部位では、その内因性蛍光ピークが消失していた。他方、620 nm 付近の蛍光強度は正常部位と動脈硬化部位でほぼ同じであった。

そこで、内因性蛍光のピークにあたる 526 nm の蛍光強度とバックグラウンド蛍光強度 (618 nm) を用いて下記の計算式に基づく Atheromatous ratio (AT ratio) を定義し、この数値とプラーク厚の関係性を分析した。

AT ratio

$$= \frac{(FL_{526} - FL_{618}) \text{ in atherosclerotic site}}{(FL_{526} - FL_{618}) \text{ in normal site}}$$

その結果、図 2 に示すように、動脈硬化病変の肥厚に応じて AT ratio が減少するという負の相関関係が示された。

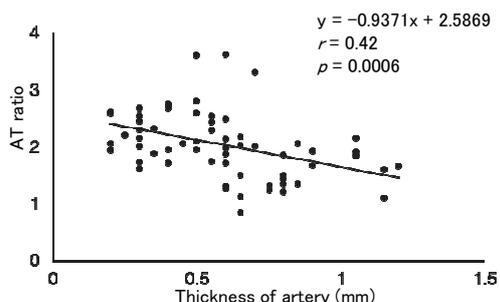


図 2. Atheromatous (AT) ratio と動脈壁厚との関係。AT ratio と血管壁厚さは負の相関を示した。

($r=0.42$, $p=0.0006$).

さらに AT ratio を元に「病変マップ」を作成したところ、プラーク部位と正常部位を明確に識別することができた (図 3)。

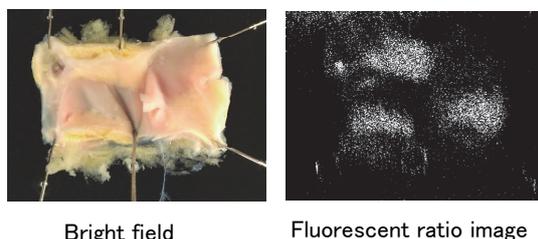
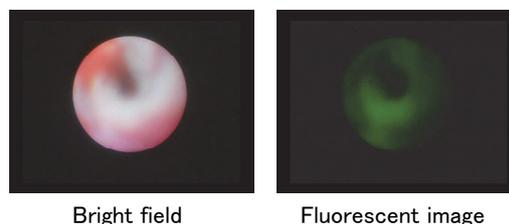


図 3. 冠動脈におけるプラーク部位の病変マッピング。AT ratio 2 以上を有するポイントのマッピングによって、プラーク部位を描出できた。

(3) 動物モデルにおける動脈硬化病変の検知：

麻酔下にあるマウスの腹部大動脈に細径内視鏡を挿入し、生理的食塩水で動脈内をフラッシングしてやることで、血管内腔をイメージングすることができた (図 4)。さらに蛍光モードによる観察によってプラークに集積した 2BDP3Gd の蛍光を明確に描出することに成功した。なお、病理学的検証より観察された蛍光は血管内プラークに由来していることを確認した。

図 4. マウス腹部大動脈に挿入した内視鏡



画像と BDP3Gd の蛍光イメージング。480 nm 励起、520 nm 蛍光。

(4) 食道がんのリアルタイムスペクトルアンミキシングイメージング：

ニトロソアミンを 6 週間飲水させたラット食道内腔を開発した内視鏡システムで観察したところ、粘膜面に白色の隆起が観察された。隆起部位は病理学的に扁平上皮の過増殖が見られ、一部乳頭状になっており、がんと判断できる所見であった。他方、隆起部位を 405 nm 光で励起すると、630 nm にピークを有する蛍光が見られた (図 1、図 5)。そこで、この蛍光を指標にしたアンミキシングイメージングを行い、リフレッシュレート約 1s で腫瘍イメージングを得ることが出来た (図 5)。

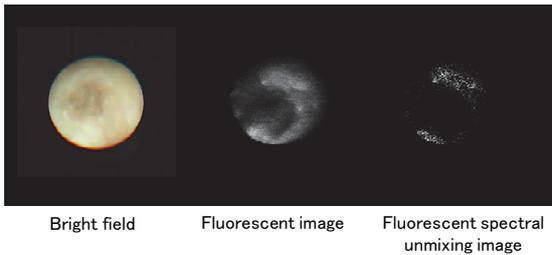


図5. ラット食道がんモデルの内視鏡イメージング。蛍光スペクトルアンミキシングによって、腫瘍部位をリアルタイムに明確に描出することができた。405 nm 励起、630 nm 蛍光。

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)

1. Iwaki S, Hokamura K, Ogawa M, Takehara Y, Muramatsu Y, Yamane T, Hirabayashi K, Morimoto Y, Hagiwara K, Nakahara K, Mineno T, Terai T, Komatsu T, Ueno T, Tamura K, Adachi Y, Hirata Y, Arita M, Arai H, Umemura K, Nagano T, Hanaoka K. A design strategy for small molecule-based targeted MRI contrast agents: their application for detection of atherosclerotic plaques. *Org Biomol Chem* 査読有, 2014; 12(43):8611-8618. DOI:10.1039/c4ob01270d

[学会発表] (計5件)

1. 谷口裕亮、守本祐司 他. 動脈硬化評価における蛍光マルチスペクトルイメージング. 第55回日本生体医工学会大会. 2016年04月. 富山
2. Cassandra Ho, Yuji Morimoto, et al. Fluorescence multispectral imaging based diagnostic system for atherosclerosis. 10th Asian Control Conference 2015. 2015年05月. Malaysia
3. 守本祐司 他. 新規開発した極細径蛍光内視鏡を用いた内因性蛍光に基づくがんの定量的病態イメージング. 第92回日本生理学会大会. 2015年03月. 神戸
4. 谷口裕亮、守本祐司 他. 動脈硬化診断における蛍光マルチスペクトルイメージング技術の有用性. 第28回日本心臓血管内視鏡学会. 2014年10月. 名古屋

5. 萩沢康介、守本祐司 他. 蛍光血管内視鏡による動脈硬化マウスのプラーク解析. 第28回日本心臓血管内視鏡学会. 2014年10月. 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

守本 祐司 (MORIMOTO, Yuji)

防衛医科大学校・その他の部局等・准教授
研究者番号：10449069

(2) 研究分担者

岩屋 啓一 (IWAYA, Keiichi)

公益財団法人佐々木研究所・その他の部局等・研究員

研究者番号：50312012