

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26670565

研究課題名(和文)高周波帯超音波による組織診断法の開発

研究課題名(英文)Developing the method of diagnosis using ultrasound microscopy

研究代表者

熊谷 秀規(Hideki, Kumagai)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60364353

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)：マウスで脂肪肝炎を作製し超音波顕微鏡像と光学顕微鏡像とで比較した。また、ヒトのヒルシュスプリング病のパラフィン包埋大腸組織を用いて同様に観察した。肝臓は、安楽死後直ちに切り出し、大腸はパラフィン包埋ブロックを薄切して観察直前に脱パラし観察した。肝臓の超音波顕微鏡像は、脂肪沈着や線維の増生が光学像のそれと相違し、病変の進行度をintensityに基づいた画像で評価することは困難だった。一方、インピーダンス値は脂肪化率の増加に伴って一過性に低下したあと、炎症や線維化の進行に伴って上昇する傾向があった。大腸は粘膜層や筋層が明瞭に描出され、320 MHz帯プローブ観察で神経細胞節細胞を同定し得た。

研究成果の概要(英文)：We used steatohepatitis mouse-models to compare the pathologic findings of the liver between using an ultrasound microscope and using a conventional microscope. We also observed paraffin embedded specimens from the large intestine of a child suffering from Hirschsprung's disease.

Based on the deposition rate of fat as well as the degree of fibrosis, the graphical findings from the liver using the ultrasound microscopy were different from those using the conventional microscopy. Thus, it was difficult to evaluate the pathological grade of steatohepatitis based on the ultrasound intensity. On the other hand, impedance of the liver showed that it temporarily decreased with fat deposition level and then increased depending on the advancement of inflammation or fibrosis. During the observation of the large intestine, we could see the mucosal layer and muscular layer clearly using the ultrasound microscopy, and even identify the ganglion cells using 320 MHz ultrasound probe.

研究分野：小児科

キーワード：超音波顕微鏡

### 1. 研究開始当初の背景

われわれは、超音波診断装置の臨床応用に向けた研究に取り組んでいる。テーマのひとつに、超音波を用いた組織レベルの画像の取得があり、細径ファイバーを用いた高周波帯超音波伝送についての研究を行ってきた。石英を用いたり、細径ファイバーの先端を凹面状に加工したりすることで、ファイバーを伝播した超音波を集束できるようになった。これにより、方位分解能を細胞レベルにまで高めることができ、超音波を用いた組織診断の臨床応用に向けた動きにつながった。われわれは、組織を採取しなくても細胞や組織構造の情報を直接取得できる、いわば「バーチャル生検」の実現に向けて研究を進めている。

### 2. 研究の目的

臨床応用に向けて、疾病と超音波組織像との関連を解析する必要がある。そこで、疾患における超音波組織像を得て光学顕微鏡像のそれと比較検討し、課題と有用性を明らかにすることを目的とした。研究代表者が小児消化器病学を専攻しているため、まずは消化器疾患である、非アルコール性脂肪肝炎とヒルシუსプルング病を選択した。

### 3. 研究の方法

(1) 5週齢のマウスにコリン・メチオン欠乏特殊飼料を与えて、脂肪肝および脂肪肝炎を作製した。実験開始 2, 5, 9, 24, 56週において、それぞれ 2匹の対象マウスと 1匹のコントロールマウス(通常の餌を摂取)を安楽死させ、すみやかに肝臓組織を切り出し、400 $\mu$ mの厚さにロータースライサーで切り出して医用超音波顕微鏡(AMS-40SI, 本多電子株式会社)で像を得た。それぞれの試料において、最初に 80 MHz、つぎに 320 MHz 領域の超音波プローブを用いて画像とインピーダンス等の音響特性を取得した。計測後、試料はすみやかに 10%ホルマリン液で固定し、包埋、薄切してヘマトキシリン・エオジン染色とアザン染色を行い、光学顕微鏡標本を作製した。それぞれにおいて、光学顕微鏡像と超音波画像とを比較検討した。前者は、Brunt の非アルコール性脂肪肝炎病理学的重症度分類 (Am J Gastroenterol 94:1999) に基づいて評価した。インピーダンス値は、取得した生データをもとに 1 サンプル中任意の 5 か所からデータをサンプリングして平均値を算出した。

なお、今回 320 MHz プローブの観察で試料を静置するフィルムについては、従来 Opticell (Medline Industries 社) を流用して用いていたが、国内入手が難しくなった。そこで、メニコン社であらたに開発された特性ディッシュを用いた。

### (2) ヒトのヒルシუსプルング病患者の

パラフィン包埋切除大腸標本を用い、医用超音波顕微鏡で観察した。患者の同意を得て、当施設に保存してあるパラフィンブロックを 10 $\mu$ m に薄切し、観察直前に型どおり脱パラして医用顕微鏡で観察した。光学顕微鏡像はヘマトキシリン・エオジン染色を行い、超音波画像と比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) マウス脂肪肝炎モデル:

320 MHz 帯の高周波帯プローブを使用した肝臓の超音波顕微鏡像の観察では、脈管構造や小葉構造がある程度識別できうる場合もあるが、同一の切片を用いて観察した光学顕微鏡像とは必ずしも一致せず、特に肝細胞への脂肪沈着の様子や線維の増生に関しては、分布や密度などに相違を認めた。また、炎症細胞浸潤は同定困難であった。そのため、炎症の程度や線維化の進展の様子を、超音波顕微鏡の intensity に基づいた画像のみで評価することは困難であった。

医用超音波顕微鏡の観察においては、切片を生理食塩水に浸潤させウェットな状況下で観察しなくてはならぬ。しかし、実験脂肪肝は疎水性が増していることから、親水性環境で観察する医用超音波顕微鏡では、微細な構造がとらえにくいかもしれない。そこで、親水性を増す工夫として 40, 50, 60% に調整したアルコール水を用いて観察したが、有意な所見は得られなかった。別な工夫として、試料に数グラムの重りを載せてフィルムに圧着させる方法を取り入れた。これにより計測の安定感が増したが、重りが重くなりすぎるとインピーダンス値への影響が懸念された。そして intensity に基づいた画像上も有意な変化はなかった。また、脂肪肝では脂肪滴が組織において密になることで、超音波ビームが散乱(乱反射)するために光学像のような所見が得られなかった可能性も考えられた。いずれにせよ、我々の目指す「バーチャル生検」においては、超音波により生体組織構造をリアルタイムに描出することを目指しているため、さらなる分析を進める必要がある。たとえば、なんらかの試薬を加えて、明瞭な組織像の描出を試みるなど工夫が必要と考える。

一方、インピーダンス値の経時的推移を追った解析では、脂肪沈着によって実験開始後第 5 週まで直線状に低下し、その後脂肪沈着度の減少や炎症の進行、線維化に伴ってインピーダンス値が上昇傾向に転じた。実験開始約 1 年後のインピーダンス値はコントロールの値に近い値となった。なお、コントロールのインピーダンス値は各実験においてやや不安定な値を示した。これは、実験環境の差や手技に起因すると思われた。例えば、観察までの時間が長くなるとインピーダンス値は低下する傾向を認めた。肝組織の変性によるものを疑い、(脳組織の超音波顕微鏡実験

方法に準じて)クラッシュした氷の環境下でクーリングしつつ,40分間酸素気泡をエアレーションして観察するといった工夫も行ったが,肝臓のインピーダンス値はこの低温環境によって上昇した。そこで,最終的には可及的速やかに処置を行うなど手技を安定させて対応した。脂肪肝炎モデル肝のインピーダンス値の評価は,毎回コントロール値との差を求めて行った。下のグラフは,横軸に実験週数を,縦軸にコントロールラット肝のインピーダンスとの差をプロットしたものである。

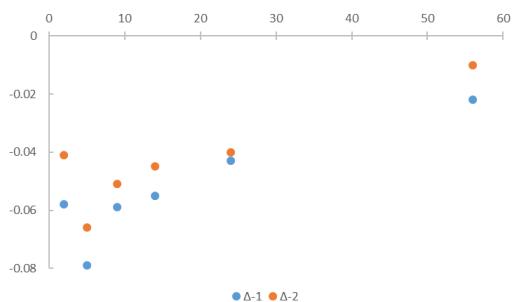


図 1. マウス脂肪肝炎における肝臓インピーダンス値の経時的変化

また,脂肪肝炎組織を Brunt の病理学的重症度分類に沿って評価した表を下に示す。

表. Brunt の病理学的重症度分類結果

飼料開始後(週)	Grading NALFD		Staging NAFLD	
	1. Macrovesicular steatosis		2. Necroinflammatory activity	
	Grade		Grade	
				Stage
2	1	1	0	0
2	1	1	0	0
5	3	1	0	0
5	3	1	0	0
9	3	2	1	1
9	3	2	1	1
14	3	1	2	2
14	2	2	2	2
24	3	2	2	2
24	2	3	3	3
56	2	3	3	3
56	1	2	3	3

肝組織の脂肪化は実験開始後 grade が増加するものの炎症や線維化によって終盤は低下した。線維化は週を重ねることに増加したが,最終的に再生結節を示すような典型的な肝硬変の所見までは得られなかった。

#### (2) ヒトヒルシュルプルング病:

消化管に関しては,大腸の粘膜層や筋層が光学像とほぼ同様に描出され,320 MHz 帯のプロブ観察では,ヒルシュスプルング病を診断する際のポイントとなる神経細胞節細胞が同定しうることが判明した(図2)。ヒルシュスプルング病に関する神経節細胞の同定を *ex vivo* で試みる点については今後の課題である。また,320 MHz 帯の超音波ビームは,腸管の筋間神経叢の深さ(2.5 mm 程度)まで,そのままでは到達できないと考えられる。ヒルシュスプルング病の診断における臨床応用にあたっては,単に直腸粘膜にプロブをあてるだけでなく工夫が必要となる。

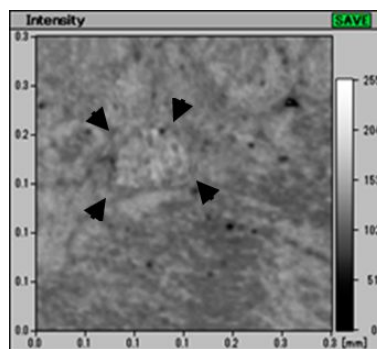


図 2. 超音波顕微鏡像. 矢頭は筋間神経叢を指す

まとめ:非アルコール性脂肪肝炎モデル動物の肝臓インピーダンス値を経時的に追った報告はこれまでにない。インピーダンス値は,脂肪化率に沿っていったん低下するものの,炎症や線維化および脂肪滴の減少によって徐々に上昇することが認められた。一方,*ex vivo* での超音波顕微鏡組織所見は,光学像のそれと乖離があった。パラフィン包埋ブロックを薄切した消化管標本組織は,超音波顕微鏡で神経節細胞を同定し得るが,*ex vivo* あるいは *in vivo* での評価が今後の課題である。超音波顕微鏡を通して「見えるものと見えないもの」をさらに解明していく必要がある。

#### 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2件)

熊谷秀規, 横山孝二, 今川智之, 吉田祥子, 小林和人, 山形崇倫: 超音波顕微鏡の臨床応用の可能性. 日小児栄消肝会誌(査読無); 30 増刊:2016, 90.

入江喬介, 田川憲男, 田邊将之, 守屋 正, 吉澤昌純, 飯島高志, 伊東紘二, 横山 卓, 熊谷秀規, 谷口信行. 100MHz 帯超音波の石英ファイバーへの伝搬. 超音波医学(査読有); 41:2014, 553-561.

[学会発表](計2件)

熊谷秀規, 横山孝二, 今川智之, 吉田祥子, 小林和人, 山形崇倫: 超音波顕微鏡の臨床応用の可能性. 第 43 回日本小児栄養消化器肝臓学会. 2016 年 9 月 16~18 日, つくば.

熊谷秀規. 小児の生検診断における侵襲性低減への挑戦 -超音波病理組織診断学の確立-. 平成 27 年度第 26 回川野小児医学奨学財団研究会 川越 2016 年 3 月 5 日.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊谷 秀規 (KUMAGAI, Hideki)  
自治医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：60364353

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

伊東 紘一 (ITHO, Koichi)  
自治医科大学・医学部・名誉教授  
研究者番号：60095007

谷口 信行 (TANIGUCHI, Nobuyuki)  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10245053

(4) 研究協力者

小林 和人 (KOBAYASHI Kazuto)  
本多電子株式会社  
吉田 祥子 (YOSHIDA Sachiko)  
豊橋技術科学大学・環境生命工学系  
山田 ひかり (YAMADA Hikari)  
豊橋技術科学大学・環境生命工学系  
岩本 早起 (IWAMOTO Saki)  
豊橋技術科学大学・環境生命工学系  
ラーマ ラハユ (RAHMA H Rahayu)  
豊橋技術科学大学・環境生命工学系  
廣田 紀男 (HIROTA Norio)  
株式会社廣田外科病理研究所