

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：82406

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22986

研究課題名(和文) 癌転移検査法としての in vivo リキッドバイオプシーの創成

研究課題名(英文) Creation of in vivo liquid biopsy for metastatic cancer detection

研究代表者

石原 美弥 (Ishihara, Miya)

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、共同利用研究施設、病院並びに防衛・医用工学・教授)

研究者番号：30505342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：簡便で非侵襲性を確保できるモダリティ、光と超音波を組み合わせた光音響法は、生体の光学特性と音響特性を同時に測定できる強みを生かせる点にある。これにより、末梢血管を対象とした光音響イメージングが可能となった。開発した光音響イメージング技術では、体表からの血管の3次元分布イメージングが取得できる。3次元血管ネットワーク画像から、空間的に特定した血管を選び、信号を解析することで、血管内の情報も取得できるようになった。画像取得時間を短縮化し、高い空間分解能で画像化すると、血管内のヘモグロビン単体を描出できた。これにより、血管内のヘモグロビンとがん細胞が識別できる可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

採血検査に対して、新型コロナウイルス感染拡大、パンデミックを経験し、血液暴露のリスクを確実に回避することが以前よりも強く求められるようになった。本研究で開発した光音響イメージング法は、完全に非侵襲的な手段である。すなわち、血液暴露のリスクがない。加えて簡便に体表から血管ネットワークを可視化でき、可視化された血管ネットワークから、どの血管を対象にするか選択できることが特徴である。これまで検査時の採血部位は手技の観点から決まっていたが、光音響法であれば、イメージングされた血管であればどの血管も対象になるので、検査内容によって対象血管を選択できるようになる可能性もあり、学術的社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：A photoacoustic method that combines light and ultrasound technologies with easy-to-use has the advantage of being able to measure the optical and acoustic characteristics of a living body at the same time. Non-invasiveness is another advantage of this photoacoustic technique. These advantages enabled photoacoustic imaging of peripheral blood vessels. Using the developed photoacoustic imaging technology, it is possible to acquire three-dimensional distribution imaging of blood vessels from the body surface. By selecting a spatially specified blood vessel from a three-dimensional blood vessel network photoacoustic image and analyzing the signal, it has become possible to acquire information inside the blood vessel. By increasing in speed of the image acquisition time and imaging with high spatial resolution, hemoglobin alone in the blood vessel could be visualized. This showed the possibility of distinguishing hemoglobin in blood vessels from cancer cells.

研究分野：医用工学

キーワード：血球検査 微小流路 毛細血管 細動静脈 血中循環腫瘍細胞 顕微イメージング スーパーコンティニューム光

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ガン転移を早期に非侵襲的に検出する技術への挑戦として、本研究課題を申請した。着目したのは、血中循環腫瘍細胞(CTC: Circulating Tumor Cell)である。CTCは、転移再発リスクのサーロゲートマーカー・再発転移の主要因と考えられている。すでに、血液など体液中のCTCを測定するリキッドバイオプシー(体液診断)は、転移性の乳癌、前立腺癌、大腸癌に対してFDAから承認が得られている。前立腺癌の場合ではMR画像上転移がなくても血中のCTC検出により転移のある症例が既に報告されている。すなわち、MR画像診断より早期に転移を検出するには、CTCを対象に測定することとなる。

我々はこれまで、前立腺癌の確定診断に関するアンメットメディカルニーズに光音響イメージング研究を行なってきた⁽¹⁻²⁾。光音響イメージングで前立腺生検時にガンの部位を同定できるようになれば、ターゲットバイオプシー(狙撃生検)が可能になる。この研究では、経直腸的に光音響血管画像を取得する技術を開発し、生検により摘出した組織の病理画像と比較することで、光音響血管画像からガン部位を同定するための解析を行なっている。

この研究により、ガン部位と正常部位を識別可能な画像を提示することが出来る光音響血管画像化システムとしての必要性能を明らかに出来ただけでなく、例えば体表から特定の血管をイメージングするために必要なシステム性能や、必要な空間分解能を確保するために必要なシステム仕様に関する知見も蓄積した。

そこで、ガンの転移を検査する新しい方法として着目されているリキッドバイオプシーへのアプローチを着想した。

2. 研究の目的

リキッドバイオプシーにおいて、患者だけでなく医療従事者の負担を軽減するための一手段として、採血を不要にすることを想定した。新型コロナウイルス感染拡大を経験し、この想定は社会的意義として後述するが、大きな意義を持つようになっていく。

そこで、本研究では、体表から血管の3次元分布イメージングが取得できる光音響イメージングシステムを構築すること、加えて、取得した3次元血管ネットワーク画像から、空間的に特定した血管を選んで、その血管からの信号を解析できるようにすることを目的とする。信号解析により、血管内の情報を取得できるようにする狙いである。空間分解能の設定の観点から、特定する血管とは、細動脈脈や毛細血管のことであり、これまで開発した光音響イメージングよりも高い空間分解能のシステム性能が求められる。

3. 研究の方法

高空間分解能化を図るために、対物レンズで集光した励起光を照射して発生する光音響信号の検出に必要な音響センサーについて検討した³⁾。検討の際の模式図を図1に示す。

本研究では、光音響イメージング用の光源に、広帯域の光源であるSupercontinuum (SC)光源を導入している。この意図は、分光学的なパラメーターも識別能に追加できると考えたからである。対物レンズに導光できるような縮小光学系もシステムに組み込んだ。センサーの評価では3軸自動スキャナーに設置した治具で鉛直に固定し、音源とのxyz方向の位置関係を任意に設定できるようにした。受信感度特性の評価としては、検出した信号Sを、レーザー1パルスごとのエネルギーで除算し、単位照射エネルギーあたりの信号強度(V/J)を算出した。周波数感度特性、空間分布特性を評価した。音響センサーの検討には、圧電材料を変化させて検討した。

次に、画像化性能評価のために、グリッド付きスライドガラスを対象にイメージングした(図2)。

次に、装置の性能向上のために、高速に撮像できるプログラムと、データ取得アルゴリズムを検討した。高速化前は、取得したデータを都度転送

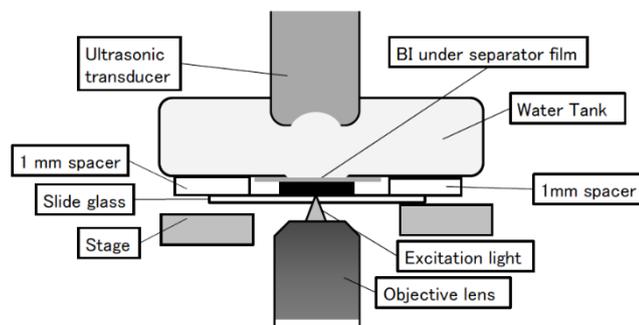


図1. 対物レンズを用いた光音響波の発生とそれを検出する基礎検討用のセットアップ³⁾

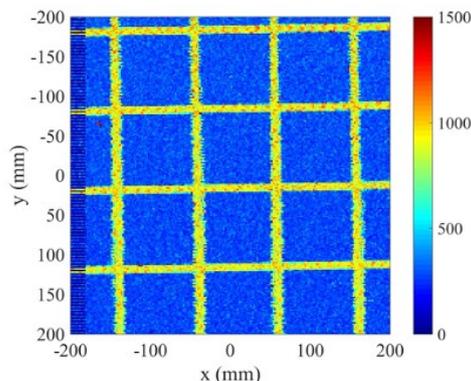


図2. 50倍の対物レンズを用いて取得したグリッド付きスライドガラスの光音響画像

し、ステージを駆動、x 軸の走査後に y 軸の捜査をするアルゴリズムであった。高速化として、データ取得とデータ転送を並列化し、ステージ駆動では連続的に x 軸が走査出来るように検討した。

本研究の最終目標は、薬剤などを投与することなく CTC 検出が可能になることであるが、研究の過程では、標識した細胞を対象にする可能性もあるため、蛍光画像も取得できるようにした。このためには、超音響用の励起光照射と、蛍光用の励起光照射は同一にし、超音響用の超音波検出と、蛍光用の光検出を同軸に配置するシステムとした。

4. 研究成果

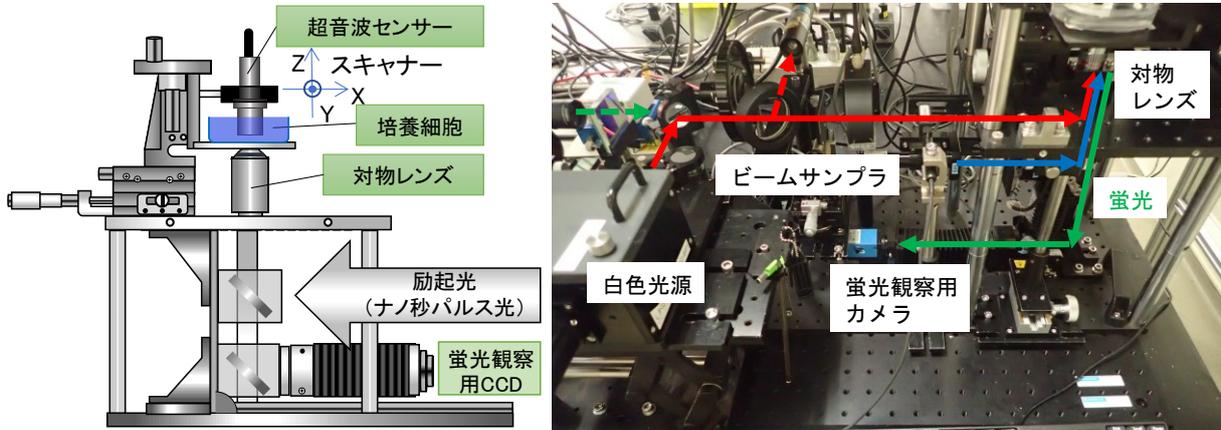


図3. 超音響と蛍光と同時計測が可能な顕微鏡型システムの概要 (左)。励起光は、超音響用と蛍光用は同一、超音響検出用超音波センサーと、蛍光観察用 CCD カメラが同軸に調整されており、超音響は透過系検出、蛍光は反射系検出の構成になっている。実際のシステムの写真 (右)。対物レンズは、5 倍から 40 倍まで使用した実績がある。

撮像速度の高速化では、データ取得とデータ転送の並列化により余剰遅延を低減することができた。加えて、ステージの走査も連続駆動可能となり、こちらの面でも余剰遅延が低減できた。この結果をグラフ化した。1 断層画像 (例えば x 軸) 取得の理論限界を、走査点数×加算平均回数/光源繰り返し周波数と設定すると、この値に近い結果が得られている (図4)。

研究開始当初は、65536 回の加算平均処理を施してデータを取得する場合、オシロスコープで 65536 セグメントに分割して信号を観測し、その信号をコンピュータに転送してコンピュータ内で加算平均処理を行っていた。オシロスコープからコンピュータへの転送の過程でセグメント毎に遅延時間が生じ、結果として1点当たり10秒以上の信号取得時間を要した。信号取得時間短縮のために、65536の加算平均を行う間データを連続的に観測し、コンピュータに転送した後

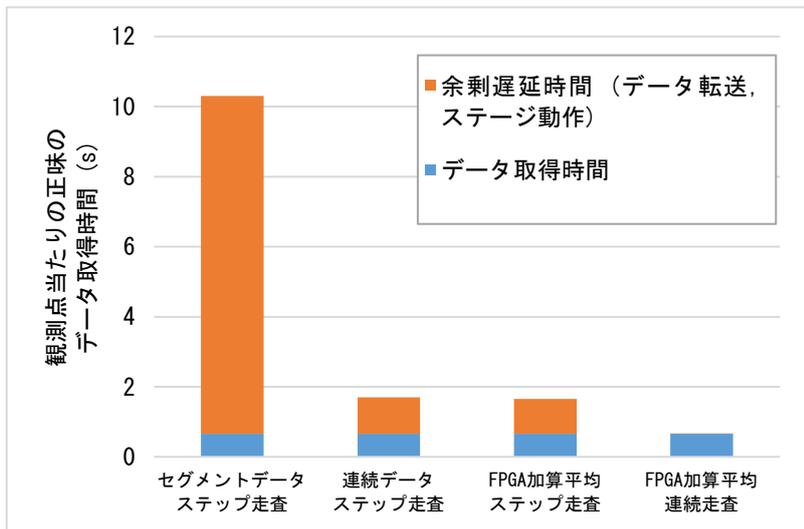


図4. 撮像速度の高速化

に分割して加算平均処理を行ったところ、セグメント毎の遅延時間の影響を抑制でき、転送するデータ量が増加するのにもかかわらず、データ転送時間を短縮できた。さらに信号取得時間を短縮するために、FPGAを内蔵したオシロスコープを導入し、65536セグメントに分割して受信した信号をFPGA内で加算平均したうえで、コンピュータに転送することにより、データ転送時間を短縮できた。しかし、データ転送と並行するステージ走査に由来する遅延時間(ステージ動作命令をコンピュータからステージに送ってから、実際にステージ動作が完了するまでの時間)がボトルネックとなり、システム全体としての信号取得時間の短縮は限定的であった。そこで、ステージを連続的に動かしながら信号を観測する仕組みを導入したところ、ステージ走査に由来する時間遅延を抑制でき、システム全体として信号取得時間が劇的に短縮化された。

構築したシステムで、ケタミンとキシラジンの混合麻酔下のヌードマウス (BALB/cAJcl-nu/nu) の耳を対象に測定した (図5)。防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認のもと実験した。励起光は、Supercontinuum (SC) 光源 (繰り返し周波数 100 kHz) から半値幅 50 nm のバンドパスフィルタにより狭帯域化して、中心波長 575 nm を設定した。照射強度は 2~6 mW と変化させてデータ取得した。5 倍の対物レンズを使用した。まず広い範囲を 4 マイクロメートルステップでスキャンし、その後、血管を特定し、2 マイクロメートルステップでスキャンして撮像した。

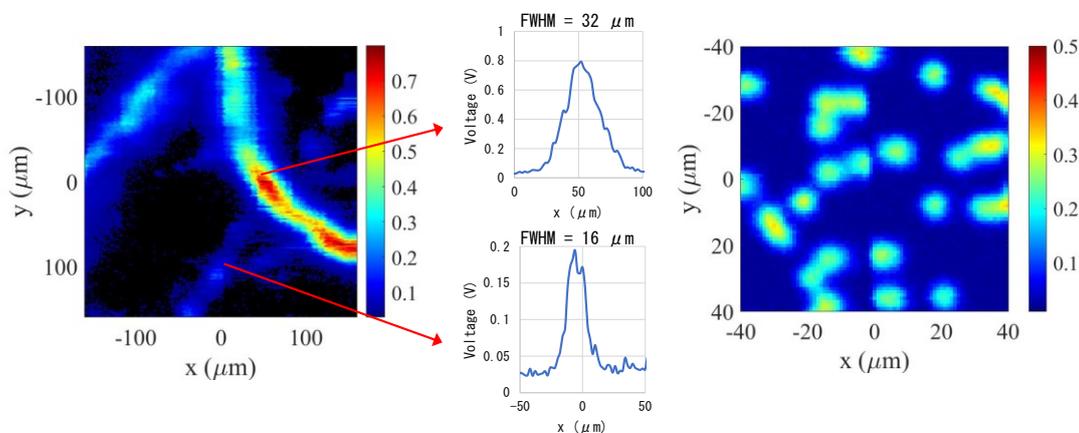


図5. ヌードマウス耳の血管 (左) と、赤血球 (右) の光音響イメージング。In vivo マウスイメージングでは体表の血管をイメージしつつ、赤血球 (赤血球であることの確認方法を検討中) 相当の画像が取得できているが、ここでは、採血した血液から分離した赤血球を画像化した結果を提示した。

図5より、体表からの血管の3次元分布イメージングが取得できる顕微システムであることが明らかとなった。さらに、3次元血管ネットワーク画像から、空間的に特定した血管を選び、信号を解析することができた。本研究の最終目標は、薬剤などを投与することなく CTC 検出が可能になることであるが、本研究では、赤血球と他細胞を識別して画像化できるかを検討し、標識した細胞を対象にした場合でも画像化出来ることも確認している。

研究成果の学術的意義や社会的意義は以下の通りである。医療では採血検査は常套手段となっている現状がある。新型コロナウイルス感染拡大、パンデミックを経験し、血液暴露のリスクを確実に回避することが以前よりも強く求められるようになった。本研究で開発した光音響イメージング法は、完全に非侵襲的な手段である。すなわち、血液暴露のリスクがない。加えて簡単に体表から血管ネットワークを可視化でき、可視化された血管ネットワークから、どの血管を対象にするか選択できることが特徴である。これまで検査時の採血部位は手技の観点から決まっていたが、光音響法であれば、イメージングされた血管であればどの血管も対象になるので、検査内容によって対象血管を選択できるようになる可能性もあり、学術的社会的意義は大きい。

【引用文献】

- 1) Horiguchi, Akio, et al. "Pilot study of prostate cancer angiogenesis imaging using a photoacoustic imaging system." *Urology* 108 (2017): 212-219.
- 2) Horiguchi, Akio, et al. "A pilot study of photoacoustic imaging system for improved real-time visualization of neurovascular bundle during radical prostatectomy." *The Prostate* 76.3 (2016): 307-315.
- 3) 田地一欽, et al. 透過型正立光音響顕微鏡に用いる超音波センサーの評価 (光・量子デバイス研究会・バイオメディカルフォトンクス応用). In: *電気学会研究会資料. OQD= The papers of technical meeting on optical and quantum devices, IEE Japan.* 電気学会, 2019. p. 7-12.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroaki Ikematsu, Miya Ishihara, Shinpei Okawa, Tatsunori Minamide, Tomohiro Mitsui, Takeshi Kuwata, Masaaki Ito, Takahiro Kinoshita, Takeo Fujita, Tomonori Yano, Toshihiko Omori, Satoshi Ozawa, Dai Murakoshi, Kaku Irisawa, Atsushi Ochiai	4. 巻 in press
2. 論文標題 Photoacoustic imaging of fresh human surgically and endoscopically resected gastrointestinal specimens	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 DEN open	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/deo2.28	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 中山瑛子, 櫛引俊宏, 土屋壮登, 東隆一, 清澤智晴, 石原美弥	4. 巻 41(4)
2. 論文標題 形成外科 皮膚科領域のPhotobiomodulation therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本レーザー医学会誌	6. 最初と最後の頁 370-384
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2530/jsism.jsism-41_0035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 石原 美弥, 平沢 壮, 田地 一欽, 大川 晋平, 櫛引 俊宏, 堀口 明男, 佐藤 正人, 伊藤 敬一	4. 巻 120(174)
2. 論文標題 様々なクロモフォアを対象にした光音響信号の解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 電子情報通信学会信学技報	6. 最初と最後の頁 63-66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinpei Okawa, Takeshi Hirasawa, Toshihiro Kushibiki, Masanori Fujita, Miya Ishihara	4. 巻 11240
2. 論文標題 Photoacoustic tomography reconstructing absorption coefficient and effect of regularization minimizing p-norm	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of SPIE	6. 最初と最後の頁 112403N-1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1117/12.2551478	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 田地 一欽 , 石原 美弥 , 辻田 和宏 , 平沢 壮 , 大川 晋平 , 櫛引 俊宏 , 佐藤 正人 , 伊藤 敬一	4. 巻 OQD-19-039
2. 論文標題 透過型正立光音響顕微鏡に用いる超音波センサーの評価	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 電気学会研究会資料	6. 最初と最後の頁 7-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 石原 美弥
2. 発表標題 【シンポジウム】光音響イメージングのマルチモダリティ化
3. 学会等名 第60回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平沢 壮 , 田地 一欽 , 大川 晋平 , 石原 美弥
2. 発表標題 【シンポジウム】マルチスペクトル光音響法の造影剤イメージングへの適用とその展望
3. 学会等名 第60回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池松 弘朗 , 大川 晋平 , 村越 大 , 入澤 覚 , 石原 美弥
2. 発表標題 【シンポジウム】消化管腫瘍性病変における光音響イメージングの可能性
3. 学会等名 日本超音波医学会第94 回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石原 美弥
2. 発表標題 光音響イメージングの基礎から最先端動向のミニレビュー
3. 学会等名 日本超音波学会 2020年度第3回光超音波画像研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miya Ishihara
2. 発表標題 Photoacoustic imaging as a bridge from medical imaging to bioimaging
3. 学会等名 Biomedical Imaging and Sensing Conference(BISC 2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miya Ishihara, Hiroaki Ikematsu, Dai Murakoshi, Kaku Irisawa, Shinpei Okawa, Toshihiko Omori, Satoshi Ozawa, Atsushi Ochiai
2. 発表標題 Photoacoustic imaging of fresh human surgical and endoscopic gastrointestinal specimens: a pilot study
3. 学会等名 SPIE Photonics WEST BiOS 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeshi Hirasawa, Kazuyoshi Tachi, Shinpei Okawa, Miya Ishihara
2. 発表標題 Design optimization of P(VDF-TrFE) film sensor element to detect deep-seated contrast agents
3. 学会等名 SPIE Photonics WEST BiOS 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大川 晋平, 平沢 壮, 櫛引 俊宏, 藤田 真敬, 石原 美弥
2. 発表標題 光音響計測による吸収係数分布の3次元画像再構成
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第40回年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石原美弥
2. 発表標題 医療に寄り添う光技術
3. 学会等名 第29回フォトニックデバイス 応用技術研究会ワークショップ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大川晋平, 平沢壮, 櫛引俊宏, 藤田真敬, 石原美弥
2. 発表標題 光音響トモグラフィによる光吸収係数分布画像化におけるp-ノルム正則化
3. 学会等名 レーザー学会547回研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石原美弥
2. 発表標題 【シンポジウム】シンギュラリティを捉えるためのダイナミックレンジの広い光音響イメージングの研究開発
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石原美弥
2. 発表標題 医学生物応用のための、光と超音波を組み合わせた光音響イメージング
3. 学会等名 マイクロ固体フォトニクス研究会第10回レーザー学会「ユビキタス パワーレーザー」専門委員会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ikematsu H, Ishihara M, Murakoshi D, Irisawa K, Minamide T, Kuwata T, Ito M, Kinoshita T, Fujita T, Yano T, Okawa S, Omori T, Ozawa S, Ochiai A
2. 発表標題 Photoacoustic imaging of fresh human surgically and endoscopically resected gastrointestinal specimens: a pilot study
3. 学会等名 DDW(Digestive Disease Week) 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石原 美弥
2. 発表標題 【招待講演】医学生物応用に必要な光音響イメージング技術開発
3. 学会等名 フォトニクス情報システム第179委員会第56回研究会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miya Ishihara
2. 発表標題 【シンポジウム】Characterization of photoacoustic imaging in bioimaging
3. 学会等名 The 6th International Symposium on Bioimaging / The 28th Annual Meeting of the Bioimaging (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石原 美弥
2. 発表標題 【招待講演】光音響イメージングの現状と医学生物応用の展望
3. 学会等名 第44 回光学シンポジウム(光学技術・学術講演会) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀井俊平, 矢田 浩崇, 伊藤 桂, 辻田和宏, 石原 美弥, 足立 健
2. 発表標題 レーザー加工技術による心房細動マウスモデル構築へ向けて
3. 学会等名 国際光デーシンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢田 浩崇, 堀井 俊平, 伊藤 桂, 辻田 和宏, 橋本 賢一, 石原 美弥, 高瀬 凡平, 足立 健
2. 発表標題 レーザー照射による長時間型心房細動マウスモデルの作成とその電気生理学的特徴について
3. 学会等名 第54 回埼玉不整脈ペーシング研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中島章夫 (編集), 氏平政伸 (編集), 石原美弥 (第6章 生体の光特性 P.93-118)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 244
3. 書名 臨床工学講座 生体物性・医用材料工学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------