

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15662

研究課題名(和文)近赤外組成イメージングシステムを用いた新しい組織障害評価法の開発

研究課題名(英文)Development of novel method to estimate in vivo tissue injury using near infrared imaging system

研究代表者

小池 薫 (Koike, Kaoru)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10267164

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)：近赤外(NIR)スペクトル法は、非破壊、非接触で、瞬時に測定できる電磁波計測法で、救急・集中治療領域では、リアルタイム計測ツールとして大きな魅力をもつ。小腸虚血・再灌流(I/R)ラットで虚血前、虚血45分後、再灌流4時間後の小腸を調べると、肉眼的には再灌流4時間後に浮腫と腸管内出血が確認されたが、NIR再構成画像でも同様の画像所見が得られた。NIR再構成画像上選択した複数の関心領域から得られたNIRスペクトルの経時変化を比較観察すると、sham群では変化は見られなかったが、I/R群では、虚血前、虚血45分後、再灌流4時間後で明らかに異なるスペクトルパターンを示した。

研究成果の概要(英文)：Near infrared (NIR) spectroscopy is a noninvasive, contactless and real-time analytical technology that may yield a variety of promising bedside monitoring systems in the field of emergency and critical care medicine. Intestinal ischemia/reperfusion (I/R) was conducted by 45 min of superior mesenteric artery occlusion followed by 4h of reperfusion in rats.

The reconstructed pictures produced by "in vivo" NIR imaging system demonstrated that the small intestine in the I/R 4h group was different from that in the before I group. Next we selected several regions of interest (ROIs) from each reconstructed picture, produced NIR spectrum for each ROI, and compared the temporal changes of NIR spectra. The NIR spectra obtained from the I/R 4h group showed apparently different pattern from those of the before and after I groups. No temporal change in NIR spectra was observed in the sham group. The NIR imaging system may become a novel tool to estimate tissue injury in vivo.

研究分野：救急医学

キーワード：近赤外 小腸 虚血 再灌流 スペクトル イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

近赤外分光法は、物質に近赤外光(750nm~2,500nm)を照射し、分子振動により吸収される振動数の電磁波を調べて、物質の定性・定量評価を行う方法である。臓器等の生体サンプルから得られる近赤外信号には、疾患や病態に関する膨大な情報が含まれるが、医療の現場での利用は、経皮的動脈血酸素飽和度(SpO<sub>2</sub>)や脳局所酸素飽和度(rSO<sub>2</sub>)の測定に限られている。

我々は10年以上にわたり、臨床に役立つ新規病態解析法の開発をめざし、血液や臓器由来の電磁波信号の解析に関する研究を続けてきた。そして近年、生体サンプル由来の電磁波信号に適した独自の信号処理方式を考案した(特願2012-157593号、特願2013-255181号)。本技術は、近赤外等の電磁波信号に含まれる、生体サンプル固有の物理情報を、精度よく迅速に検出するデータ処理方法である。本技術を用いると、

lipopolysaccharide (LPS) 2 mg/kg 投与ラット血清と LPS 10 mg/kg 投与ラット血清由来の近赤外データの特徴を抽出することができ、両者の識別が可能であった。

最近、近赤外組成イメージングシステム(近赤外分光カメラを用いて対象物をスキャンし、得られたデータを可視化する装置)が開発され、食品・飲料・薬品・バイオ燃料等の品質管理の分野では一定の成果が得られている。しかし、医学・医療分野における研究はほとんど進んでいない。我々は同システムを用いて予備的検討を行い、ラット正常肝と冷虚血1時間後の肝の近赤外画像の吸収スペクトルデータから差スペクトルを算出し、両者の違いを確認することができた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ラットで小腸虚血・再灌流(I/R)動物モデルと敗血症動物モデルを作成し、小腸・肝を被検試料として、1)近赤外組成イメージングシステムによる計測を行い、2)生物サンプルに最適化した近赤外データの処理法を開発し、3)臓器障害の把握を可能とする新しい解析アルゴリズムを考案することであった。そして、「近赤外組成イメージングシステムを用いて、迅速に組織障害を検出し評価する新技術」を開発することを本研究の最終目標とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物実験

#### ①I/R群(3匹)

体重280~330gの雄性Sprague-Dawleyラットを3~5%イソフルラン麻酔下に開腹し、クリップを用いて上腸間膜動脈の血行遮断を行い、45分後に血流を再開した。再灌流1時間後に縫合糸を用いて閉腹し、一旦吸入麻酔を終了した。再灌流4時間後に再度3~5%イソフルラン麻酔下に開腹した。

#### ②sham群(2匹)

血行遮断以外の他の手術手技はすべてI/R群と同様に行った。

### (2) NIR イメージングと可視画像の記録

#### ①NIR イメージング

NIR イメージングには、近赤外分光ラインカメラを搭載したCompovision<sup>®</sup>(住友電気工業(株))を使用し、各個体について虚血前、虚血45分後、再灌流4時間後に、非侵襲的計測(スキャン)を行った。撮像時には、ラットを麻酔下で開腹し、一時的に腸管を露出させた状態で装置にセットした。腸管表面にfocusが合うよう、個体ごとに高さ調整を行う必要があった。

近赤外分光ラインカメラの条件は、装置付属のマニュアルに従い、以下のように設定した。測定ソフトは、付属のCompovision Spectra Measurement<sup>®</sup>を使用した。

センサ: Type II 量子井戸型 InGaAs フォトダイオード FPA

使用波長: 1000~2350nm、6nm 間隔で同時取得

データ: 320 画素/ライン

ダイナミックレンジ: 14Bit

Camera config: 100Hz / 9.0ms

スライダースピード: 20.0mm/s

光源調整: ハロゲン光源 50,000~55,000 カウント

上記条件で、Black & White 補正後、各計測について1回のスキャンを行い、raw、hdrの2ファイル形式で保存した。

#### ②可視画像の記録

NIR イメージング時に、デジタルカメラ(PENTAX OpticRZ10)を用いて可視画像の記録を並行して行った。

#### ③画像データの処理と出力

取得したNIR画像データの処理は、付属のソフト(Compovision Spectra Analysis<sup>®</sup>(CSA) ver1.10.0.0)を用いて行った。RGBカラーモデルで色変換し、再構成画像(擬似カラー画像)として可視化した。モニタ上で再構成画像を観察した後、同時に撮影した可視画像との比較も行った。再構成画像は、bmp形式で保存した。

### (3) NIR スペクトルデータの取得と解析

#### ①NIR 反射スペクトルデータの取得

再構成したNIR画像上で、関心領域(region of interest; ROI)をそれぞれ5か所選択し、各ROIにおけるNIR反射スペクトルデータを取得した。データは数値(csv形式)および画像(jpeg形式)にて保存した。

## ②NIR スペクトルデータの解析

NIR 反射スペクトルデータの解析を行うために、Unscrambler-X® ver10.3 (CAMO) にすべてのスペクトルデータを読み込み、sham 群および I/R 群のスペクトルパターンの変化を肉眼的に観察した。また、虚血 45 分後および再灌流 4 時間後の sham 群と I/R 群のスペクトルパターンの相違点について、特に再灌流 4 時間において、I/R 群に特徴的なピークが認められるか、詳細に検討した。

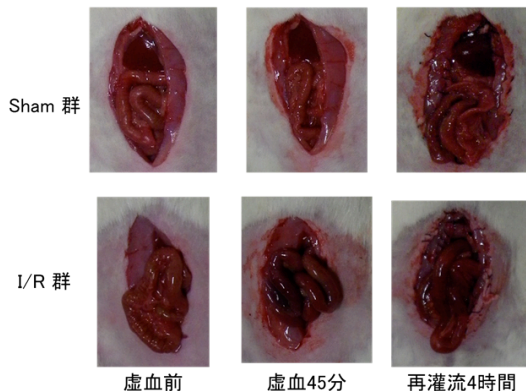
## 4. 研究成果

### (1) 画像所見

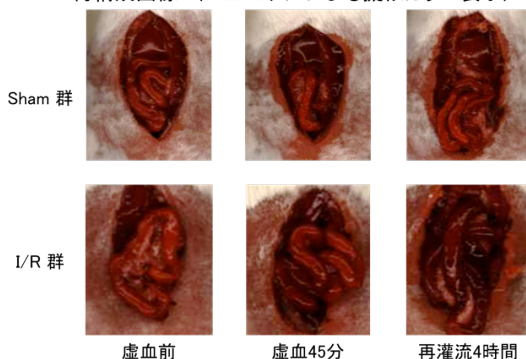
デジタルカメラで撮影した可視画像と NIR イメージングシステムでスキャン後再構成した RGB モデルによる擬似カラー表示による NIR 画像例を示す。

sham 群、I/R 群それぞれ同一個体の虚血前、虚血 45 分および再灌流 4 時間に取得したデータである。

可視画像(デジタルカメラで撮影)



NIR再構成画像 (RGBモデルによる擬似カラー表示)



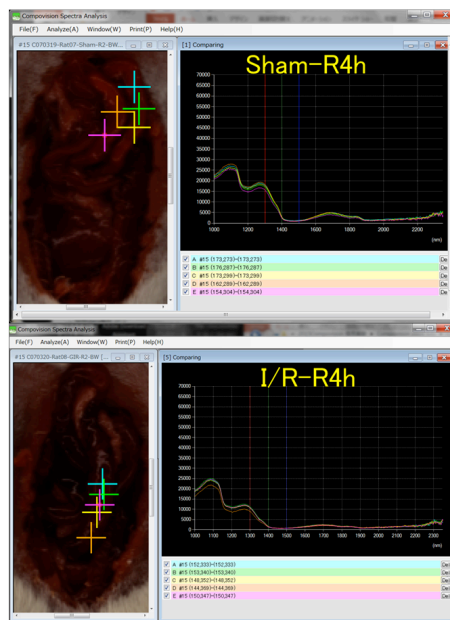
I/R 群の小腸は、肉眼的に見て、虚血前と比較して、虚血 45 分後に大きな変化は見られなかったが、再灌流 4 時間後では浮腫と腸管内出血の出現が確認された。sham 群の小腸では、経時的な変化は見られなかった。

NIR 再構成画像も、小腸の同様の变化を捉えた。

## (2) NIR スペクトルの解析

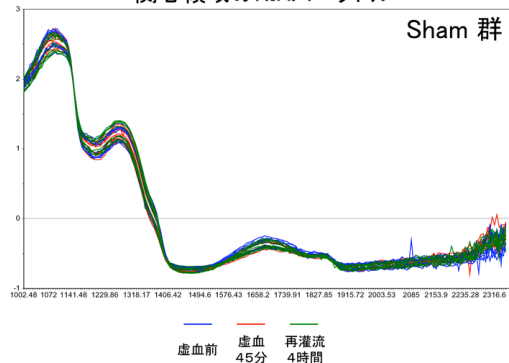
装置付属の解析ソフト (CSA) で、NIR 画像データについてそれぞれ 5 か所の ROI を選択し該当する ROI の NIR 反射スペクトルを取得した。実施例を下図に示す。

### 関心領域の選択とNIRスペクトルの取得

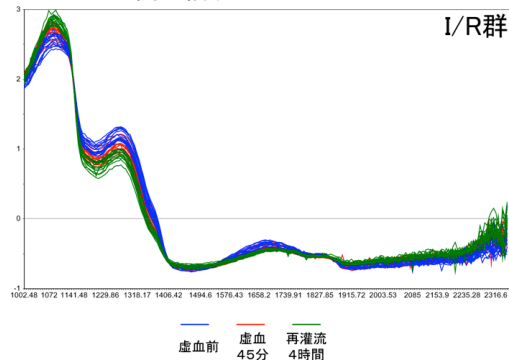


まず、sham 群 (5ROI × 2 匹) と I/R 群 (5ROI × 3 匹) のスペクトルデータをそれぞれ単独にプロット (下図) し、それぞれの群の虚血前、虚血 45 分後および再灌流 4 時間後のスペクトルパターンの推移を観察した。

関心領域のNIRスペクトル

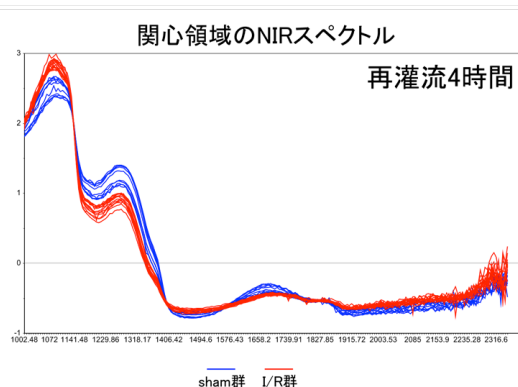
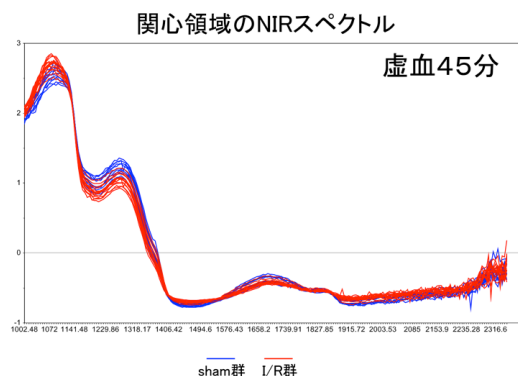


関心領域のNIRスペクトル



sham 群では経時的なスペクトルパターンの変化は見られなかったが、I/R 群では、虚血前、虚血 45 分後、再灌流 4 時間後で明らかに異なるスペクトルパターンを示した。

次に、虚血 45 分後および再灌流 4 時間後の sham 群と I/R 群のデータをそれぞれ同一グラフに plot (下図) し、虚血 45 分後および再灌流 4 時間後におけるスペクトルパターンを比較した。



虚血 45 分後に数か所の波長域で微細な相違が観察されたが、再灌流 4 時間後においては、両群のスペクトルパターンに明瞭な相違が認められた

### (3) まとめ

本研究の目的は、ラットで小腸 I/R モデルと敗血症動物モデルを作成し、小腸・肝を被検試料として、1) 近赤外組成イメージングシステムによる計測を行い、2) 生物サンプルに最適化した近赤外データの処理法を開発し、3) 臓器障害の把握を可能とする新しい解析アルゴリズムを考案することであった。

「1) 近赤外組成イメージングシステムによる計測」に関しては、上記のとおり、NIR 組成イメージングシステムを用いて小腸 I/R ラットの腸を非侵襲的に計測し、スキャンした近赤外 raw データを RGB カラーモデルによる再構成カラー画像にすることができた。次に、デジタルカメラで同時に撮影した画像と比較すると、両者は肉眼的に比較しても類似した所見を示した。可視化された画像上で選択した関心領域で得られた近赤外スペク

トルデータを解析したところ、組織障害に特徴的なピークを検出することができた。

一方、1 年の短い研究期間では、「2) 生物サンプルに最適化した近赤外データの処理法を開発する」「3) 臓器障害の把握を可能とする新しい解析アルゴリズムを考案する」に関しては、着手することができなかった。今後、敗血症動物モデルにおける検討を含め、「2) 生物サンプルに最適化した近赤外データの処理法を開発する」「3) 臓器障害の把握を可能とする新しい解析アルゴリズムを考案する」を進める予定である。

## 5. 主な発表論文等 特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小池 薫 (KOIKE KAORU)  
京都大学 医学 (系) 研究科 (研究院)  
教授  
研究者番号 : 10267164

### (2) 研究分担者

平川 慶子 (HIRAKAWA KEIKO)  
日本医科大学 医学部 助教  
研究者番号 : 30165162

### (3) 研究分担者

金涌 佳雅 (KANAWAKU YOSHIMASA)  
日本医科大学 医学部 講師  
研究者番号 : 80465343

### (4) 研究分担者

佐藤 格夫 (SATO NORIO)  
京都大学 医学 (系) 研究科 (研究院)  
准教授  
研究者番号 : 30409205

### (5) 研究分担者

鈴木 崇生 (SUZUKI TAKAO)  
京都大学 医学 (系) 研究科 (研究院)  
研究員  
研究者番号 : 40328810