

令和元年6月6日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H01855

研究課題名(和文) OCTと分光SDF撮像法を統合した微小循環のマルチモーダルイメージング

研究課題名(英文) Multimodal imaging of microcirculation by integrating OCT and spectral SDF camera

研究代表者

羽石 秀昭 (Haneishi, Hideaki)

千葉大学・フロンティア医工学センター・教授

研究者番号：20228521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,600,000円

研究成果の概要(和文)：微小循環における酸素飽和度モニタリングは疾患の状態の把握や機序の理解をする上で重要である。本研究では、微小循環イメージングが可能なSidestream Dark-Filed (SDF) カメラとOptical Coherent Tomography (OCT) を組み合わせたマルチモーダル計測システムの基礎研究を実施した。SDFにより吸入酸素変化時の微小循環の酸素飽和度変化を捉えることができた。構築したマルチモーダル計測システムを用いて、OCTから可視化した血管構造にSDF酸素飽和度マップを重畳することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、微小循環に対してSDFとOCTを組み合わせたマルチモーダル計測の基礎研究を行った。これまで取り組んできたSDFによる微小循環酸素飽和度マッピングに対して、OCTの深さの情報が加わることでより高次の情報を活用できる。微小循環における血流状態や酸素代謝は、疾患の状態を把握したり機序を理解したりする上で重要であることから、このマルチモーダルシステムを用いて疾患における新たな知見を得られる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Monitoring oxygen saturation (S_{O2}) in microcirculation is important to understand disease dynamics. In this study, we have constructed a multimodal measuring system that combined a Sidestream Dark-Field (SDF) camera with an Optical Coherent Tomography (OCT) and conducted basic experiments using this system. By using the SDF camera, we observed the time-lapsed S_{O2} changes in the microcirculation when the fraction inspired oxygen (F_{iO2}) was changed. Moreover, we could superimpose the S_{O2} map calculated from the SDF image on the vascular structure that was visualized from the OCT image.

研究分野：生体光学、医用画像工学

キーワード：SDF 微小循環 酸素飽和度 小動物実験 血管抽出 OCT シミュレーション 酸素分圧

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細動脈から毛細血管を経て細静脈に至る血管系を微小循環と呼ぶ。この領域での血流状態や物質交換、とりわけ酸素代謝は、疾患の状態を把握したり機序を理解したりする上で重要である。たとえば、腫瘍の血管新生やその酸素消費を把握することは、腫瘍の活性度や浸潤状態を把握したり、抗がん剤の薬効を評価したりするために極めて重要である。したがって、この微小循環を観察でき、さらに血行状態を定量的に評価できる手法及びシステムが望まれている。

2. 研究の目的

これまでの研究において、微小循環撮影手法の1つである side-stream darkfield (SDF) 法を用いた微小循環酸素飽和度イメージングに取り組んできた。本研究では、SDF に対して、分光撮影能力及び広域撮影機構を持たせることで発展させ、さらに 3 次元構造を取得できる OCT(optical coherence tomography)と組み合わせることで、マルチモーダル微小循環撮影システムを構築する。このシステムにより広範囲の微小循環の分光画像から血管構造、血流速度、酸素飽和度の情報を求め、疾患による虚血や低酸素状態を捉えることで疾患機序に関する知見を得ることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) ラット敗血症性ショックモデルの血流速度推定

図 1 に示す SDF 撮影装置では、装置先端にリング状に配置された LED から対象の組織中に光を入射させると、光は生体組織内部で吸収及び散乱を繰り返し、装置中央の開口部に返ってくる。そして、その光を装置内部のカメラで捉えることにより、微小循環のイメージングが可能となる。このとき、ヘモグロビンの光吸収により赤血球の流れを確認することができる。この装置を用いて微小循環の血流速度の算出及び評価を実施した。

血流速度の算出手法について説明する。SDF 撮影法で撮影した動画像には、体動による移動が存在するため、テンプレートマッチングによって血管の位置を合わせることでフレーム間の移動を補正する。体動補正後は動画像を低ランク成分とスパース成分に分解するロバスト主成分分析を適用し、赤血球の流れを強調した動画像を作成する。次に、スパース成分画像を用いて時空間画像を生成する。時空間画像には各フレームの赤血球の像によって直線が描かれる。この直線の角度を特定した後、血流速度への変換を行う。

敗血症モデルラットの作成のため、Cecum Ligation and Puncture (CLP)モデルを使用した。これは腸内細菌が多く存在する盲腸を穿刺し細菌性腹膜炎にする敗血症モデルである。手技の手順について説明する。まず盲腸を糸で結紮し、針で穿刺する。その後 24 時間程度で徐々に敗血症の症状を発症する。また、敗血症モデルと比較するため、盲腸を取り出すだけで結紮穿刺を行わない偽手術という意味の Sham を用いる。実験では、CLP モデルと Sham はそれぞれ 3 匹用いた。まず、観察窓としてラットの背部の真皮にチャンパーを取り付ける。その後、装着直後の微小循環を撮影し、Sham や CLP の手技を行う。手技後、5 時間後までは 1 時間毎にその後は 3 時間おきに撮影を行なった。また撮影と同時に乳酸値の計測を行なった。

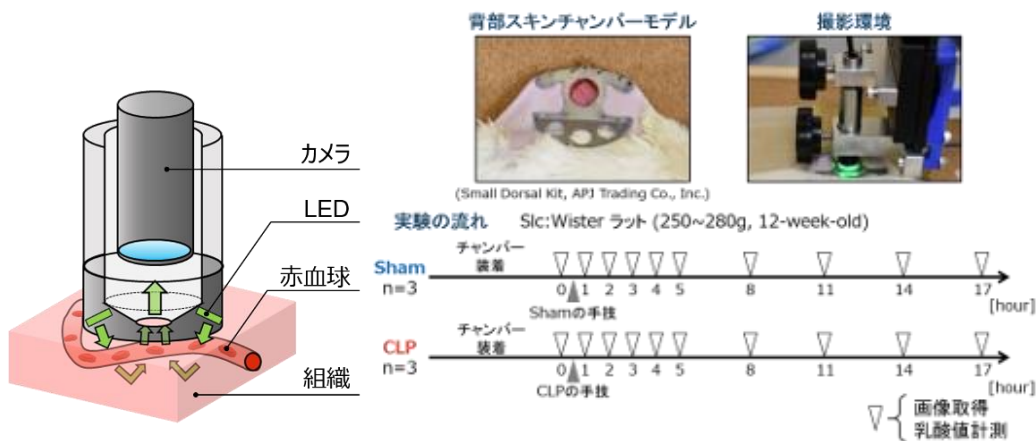


図 1 SDF 撮影法原理 [Ince, 2005]

図 2 撮影方法及び実験プロトコル

(2) SDF オキシメトリの評価

SDF オキシメトリの評価の為に、図 3 に示すように、吸入麻酔下のラットに対して窒素ガスを調整することで吸入酸素濃度を変えることができる実験系を構築した。このとき、SDF をラットの真皮に接触させ微小循環画像を取得した。さらに、参照値として市販のパルスオキシメータにより動脈血の酸素飽和度も計測した。吸入酸素濃度は図 3 に示すように、通常環境下で 3 分間経た後に、吸入酸素濃度 10% の低酸素状態を 3 分間保ち、通常の酸素濃度に戻した。本実験では、この吸入酸素濃度変化に対して SDF オキシメトリの値がどのように変化するかについて確認した。

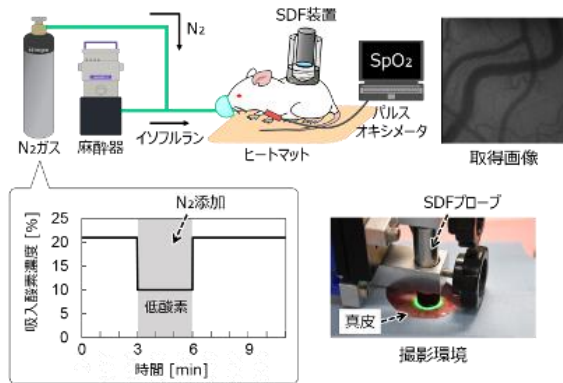


図3 吸入酸素濃度 (FiO₂: fraction of inspired oxygen) 変化を用いた SDF オキシメトリ評価実験

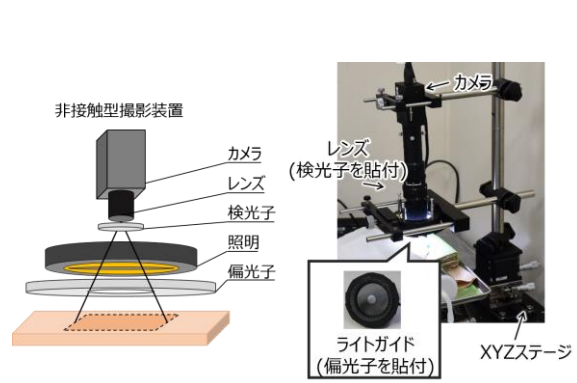


図4 非接触型微小循環イメージングシステム

(3) 非接触型微小循環撮影システムの構築及びラット敗血症性ショックモデルの観察
非接触で微小循環を観察できるイメージングシステムを構築した。構築したシステムを図4に示す。システムの構成としては、RGBカメラ、リング型照明、1組の偏向板から成る。表面反射成分の低減を目的として偏向板は照明とレンズの前にクロスニコル配置としている。非接触にする長所としては、接触の圧力による血行動態への影響なしに微小循環の観察が可能であり、さらに簡単な光学系で構成されることから光学系の自由度が高くなることが挙げられる。

(1)の実験と同様に敗血症モデルラット(12週齢、雄のWistarラット)を作成し、本システムで取得した微小循環の画像に対して、(1)の推定手法を用いて血流速度を評価した。また、このとき乳酸値の計測も実施した。

(4) OCTとSDFによるマルチモーダル微小循環撮像システムの構築

OCTとSDFによるマルチモーダル微小循環撮像システムを構築した。この2つの装置では、視野が異なる為、同じ領域を撮影する仕組みが必要となる。そこで、自動XYZステージを用いたシステムを構築し、そのシステムを用いてマウス真皮の微小循環をOCT及びSDFで撮影した。そして、SDF画像から求めた酸素飽和度マップをOCT画像に重畳させることを行った。

4. 研究成果

(1) ラット敗血症性ショックモデルの血流速度推定

CLPモデルとShamの乳酸値と血流速度の変化を図5に示す。図5の左のグラフはCLPとShamそれぞれにおける乳酸値の経時変化を示しており、右のグラフは血流速度の時間変化を示している。乳酸値ではSham群が一定であるのに対してCLP群では2倍ちかく上昇している。また、乳酸値は17時間後にCLP群とSham群の有意差が確認された。一方、血流速度ではSham群が一定なのに対して、血流速度が半分以下に低下している。血流速度については8時間後に有意差が確認された。この結果から、敗血症においては、乳酸値よりも血流速度の反応が早いことが確認された。

(2) SDFオキシメトリの評価

取得したSDF画像から作成したSO₂マップの経時変化を図6に示す。SO₂マップの変化から、低酸素刺激前後に微小循環のSO₂が低下、上昇することが確認でき、吸入酸素濃度の変化にตอบสนองしてSO₂推定値が変化していることがわかる。次に、関心領域内のSO₂推定値の経時変化を図7に示す。図7の左図に示すように、2つの関心領域のサイズは20×20ピクセルとした。図7の右図が示すようにパルスオキシメータにより計測した動脈血酸素飽和度の推移と類似した傾向が得られている。この結果から、各推移の低酸素状態に対する応答速度の違いがあることが分かる。この他に、血管の深さによって散乱の効果が異なるため、酸素飽和度の推定において深さに応じた補正を行う必要性を認識し、具体的な方法を考案した。方法の有効性をモンテカルロシミュレーションおよび牛血を用いた物理ファントム実験の両面から確認できた。

(3) 非接触型微小循環撮影システムの構築及びラット敗血症性ショックモデルの観察

図8に乳酸値と血流速度の算出結果を示す。図8の左のグラフは乳酸値の推移を示しており、2mmol/L以上であれば敗血症性ショックと診断される。したがって、Sham群はあまり変化が見られず基準を超えていないが、CLP群は上昇しており、基準を越えている。このことから、敗血症モデルラットの作成は成功していると言える。次に、図8の右のグラフは実験の経過時間に対する算出した血流速度の推移を示している。この結果から血流速度はSham群では減少していないが、CLP群は減少傾向が見られた。これらの結果から、非接触型撮影装置でもCLP群の血流速度の減少を確認可能と言える。

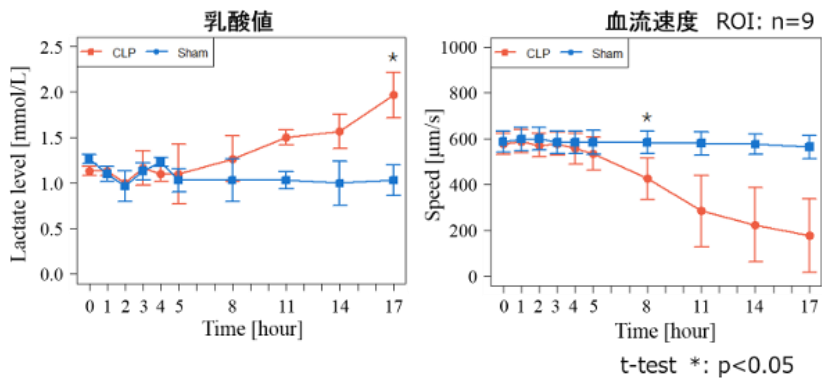


図 5 CLP と Sham における乳酸値及び血流速度の時間変化

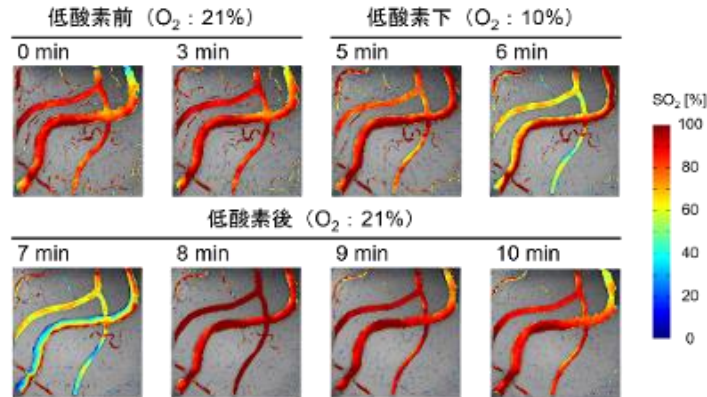


図 6 吸入酸素飽和度変化時の SDF 酸素飽和度マップ

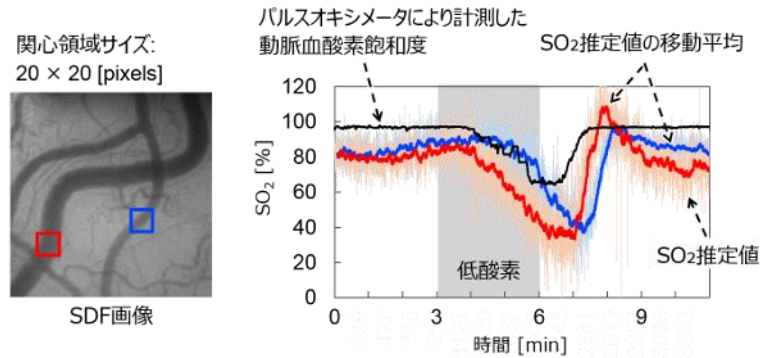


図 7 低酸素刺激実験時の酸素飽和度経時変化
(左: 取得した SDF 画像と ROI、右: 酸素飽和度の推移)

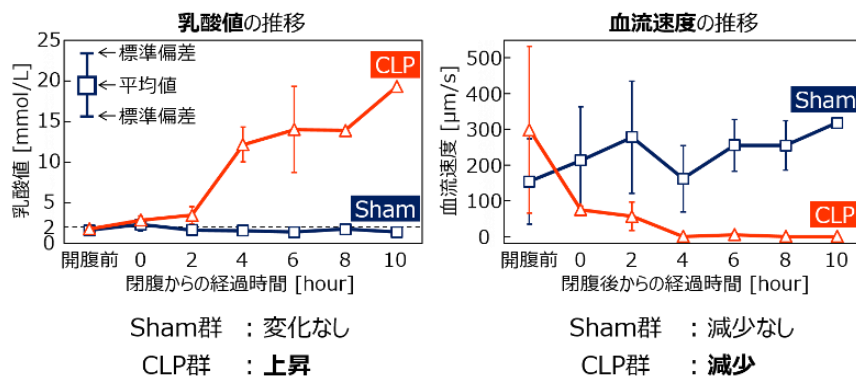


図 8 敗血症モデルラットに対する乳酸値と推定した血流速度の変化

(4) OCT と SDF によるマルチモーダル微小循環撮像システムの構築
構築した OCT と SDF によるマルチモーダル微小循環システムを図 9 に示す。SDF 及び OCT

各装置は自動ステージで固定されており、XYZの3軸での位置合わせが可能である。本システムにより、OCTと同領域のSDFの撮影が可能となった。OCTに関しては当初想定した画質が得られず、納入業者に複数回改善を要請した。この作業に数か月要したが、これにより改善がなされた。OCTを小動物の微小循環に適用して映像から血管構造を抽出し、SDF画像から求めた酸素飽和度マップを広視野のOCT画像に重畳した結果を図10に示す。今後は、本システムを用いて、腫瘍モデルを用いた血管新生の観察等を実施する予定である。



図9 マルチモーダル微小循環撮像システム

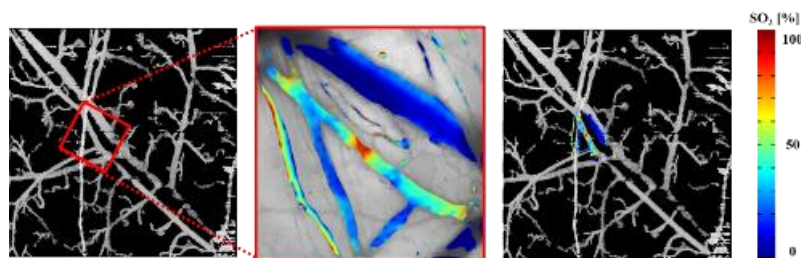


図10 OCTとSDFによるマルチモーダルイメージング
(左：OCT画像、中央：SDF画像によるSO₂マップ、
右：OCT画像にSO₂マップを重畳した画像)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2件)

- ① Ryohei Hashimoto, Tomohiro Kurata, Masashi Sekine, Kazuya Nakano, Takashi Ohnishi, Hideaki Haneishi, “Two-wavelength oximetry of tissue microcirculation based on sidestream dark-field imaging,” *Journal of Biomedical Optics*, vol.24, Issue 3, published online (2018) (DOI : 10.1117/1.JBO.24.3.031013) 査読有
- ② Tomohiro Kurata, Shigeto Oda, Hiroshi Kawahira, Hideaki Haneishi, “Correction method for influence of tissue scattering for sidestream dark-field oximetry using multicolor LEDs,” *Optical review*, vol.23, Issue 6, pp. 955-967 (2016). 査読有

[学会発表] (計 11件)

- ① M. Kawasaki, R. Hashimoto, K. Nakano, T. Ohnishi, M. Sekine, E. Watanabe, S. Oda, H. Haneishi: Improvement of optical setup for microcirculation imaging and flow analysis in septic shock rats, *International Forum on Medical Imaging in Asia (IFMIA) 2019*, 108, Nanyang Technological University, Singapore, Singapore (2019.1.6-9)
- ② 橋本涼平, 倉田智宏, 関根雅, 中野和也, 大西峻, 羽石秀昭: Sidestream Dark-Field撮影法を用いた微小循環酸素飽和度推定, 第4回日本超音波医学会基礎技術研究会, BT2018-33, 千葉大学 西千葉キャンパス, pp. 13-17 (2018.12.13)
- ③ 川崎真未, 橋本涼平, 中野和也, 大西峻, 関根雅, 渡邊栄三, 織田成人, 羽石秀昭: 非接触型撮影による敗血症モデルラットの微小循環解析, 日本光学会年次学術講演会 (Optics & Photonics Japan 2018), 1pA3, 筑波大学 東京キャンパス 文京校舎 (2018.10.30-11.2)
- ④ 橋本涼平, 倉田智宏, 関根雅, 中野和也, 大西峻, 羽石秀昭: SDF撮影法を用いた微小循環酸素飽和度推定の撮影深度補正, 第37回日本医用画像工学会大会, OP11-4, 筑波大学天王台キャンパス (2018.7.25-27)
- ⑤ R. Hashimoto, T. Kurata, M. Sekine, K. Nakano, T. Ohnishi, H. Haneishi: Oxygen Saturation Mapping of Microcirculation Using Sidestream Dark-Field Imaging, *The 40th International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC'18)*, 3364, Honolulu, USA (2018.7.17-21)
- ⑥ R. Hashimoto, T. Kurata, M. Sekine, K. Nakano, T. Ohnishi, H. Haneishi: Depth correction of the sidestream dark-field oximetry, *International Young Researchers' Workshop on Multimodal Medical Imaging 2018, 2-D*, Chiba, Japan (2018.1.17)
- ⑦ 橋本涼平, 倉田智宏, 関根雅, 中野和也, 大西峻, 羽石秀昭: SDF撮影法を用いた血管深さに依存しない微小循環酸素飽和度推定, 日本生体医工学会関東支部若手研究者発表会 2017, D-1-03, 千葉大学西千葉キャンパス (2017.11.18)
- ⑧ T. Kurata, M. Takahashi, T. Ohnishi, H. Haneishi: Visualization of oxygen transportation in microcirculation by sidestream dark-field oximetry, *SPIE PHOTONICS WEST BIOS 2017*, Vol. 10068, 1006813-1-1006813-9, San Francisco, California, USA (2017.1.28-2.2)
- ⑨ M. Takahashi, T. Kurata, T. Ohnishi, H. Haneishi: Development of quantitative perfusion evaluation methods for obstruction of blood flow of microcirculation using a rat septic shock model, *SPIE PHOTONICS WEST BIOS 2017*, Vol. 10068,

100680A-1-100680A-6, San Francisco, California, USA (2017.1.28-2.2)

- ⑩ 高橋 穂, 大西 峻, 渡邊栄三, 織田成人, 羽石秀昭: ラット敗血症性ショックモデルを用いた微小循環における血流障害の定量評価手法の開発, 日本 Shock 学会総会, Vol. 31, No. 1, pp. 49, 東京ドームホテル (2016.10.6)
- ⑪ 高橋 穂, 大西 峻, 渡邊栄三, 織田成人, 羽石秀昭: ラット敗血症性ショックモデルを用いた微小循環における血流障害の定量評価手法の開発, 電子情報通信学会技術報告, Vol. 116, No. 160, pp. 19-22, 医用画像研究会, 苫小牧市民会館 (2016.7.25-26)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: Information processing, apparatus, and program, method and system thereof

発明者: Tomohiro KURATA, Hideaki Haneishi

権利者: Tomohiro KURATA, Hideaki Haneishi

種類: 特許

番号: US20180374211A1

出願年: 2018

国内外の別: 国外

名称: 微小循環の血中ヘモグロビンの酸素飽和度の可視化のための情報処理装置及びその方法

発明者: 羽石秀昭、倉田智宏

権利者: 羽石秀昭、倉田智宏

種類: 特許

番号: 2017-124176

出願年: 2017

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 <http://www.cfme.chiba-u.jp/~haneishi/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 中口 俊哉

ローマ字氏名: (NAKAGUCHI, toshiya)

所属研究機関名: 千葉大学

部局名: フロンティア医工学センター

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 20361412

研究分担者氏名: 大西 峻

ローマ字氏名: (OHNISHI, takashi)

所属研究機関名: 千葉大学

部局名: フロンティア医工学センター

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 30706833

研究分担者氏名: 関根 雅

ローマ字氏名: (SEKINE, masashi)

所属研究機関名: 千葉大学

部局名: フロンティア医工学センター

職名: 技術職員

研究者番号 (8 桁): 70769182

研究分担者氏名: 川平 洋

ローマ字氏名: (KAWAHIRA, hiroshi)

所属研究機関名: 自治医科大学

部局名: メディカルシミュレーションセンター

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 90447285

(2) 研究協力者 なし