

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18925

研究課題名(和文)末梢組織血行の評価に特化したICG蛍光造影撮影解析装置の開発

研究課題名(英文)Development of ICG fluorescence contrast imaging analysis system specialized for evaluation of peripheral tissue blood circulation

研究代表者

御任 大輔(Mito, Daisuke)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：80746412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：再建手術中の移植皮弁の組織灌流をリアルタイムで評価するために、撮影装置や解析方法を最適化し、より正確で信頼性の高い方法を提供するためにインドシアニングリーン(ICG)を用いた蛍光造影法に関して、撮影装置や解析方法を最適化し、より正確で信頼性の高い末梢組織血流評価法を開発することを目的として以下3つのフェーズに分けた研究開発を行った。

イメージングシステムの最適化、多方向からのICG蛍光像映像の同時撮影と三次元再構成、皮下血管網分布の三次元化、動物実験におけるイメージングシステムの開発と最適化を行い、動物モデルにおける解析結果と組織の生存率の関係を調査した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再建外科手術では、血管柄付きで移植された組織の血行動態が重要である。そのため、インドシアニンググリーン(ICG)蛍光血管造影法が末梢皮膚弁領域の血行動態評価に適用されているが、精度や信頼性に限界がある。より正確で信頼性の高い末梢組織血流評価法を開発、研究した。

本研究において組織の血行動態に関する信頼性の高い情報を提供するための計測機器開発と実装に成功した。本手法を用いた生体での研究データをさらに蓄積することで、再建手術における皮弁生着領域に関する予測率の向上が期待され、ICG蛍光造影の新たな方向性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：A study was conducted in three phases to develop a more accurate and reliable method of evaluating tissue perfusion in implanted skin valves during reconstructive surgery in real-time. The aim was to optimize imaging equipment and analysis methods. The development process comprised the following phases:(1)Optimization of the imaging system, (2) Simultaneous imaging of ICG fluorescence images from multiple directions, three-dimensional reconstruction, and three-dimensional subcutaneous vascular network distribution, (3)Development and optimization of the imaging system in animal experiments to investigate the relationship between analysis results and tissue viability in animal models.

研究分野：形成外科

キーワード：インドシアニンググリーン蛍光造影法

## 1. 研究開始当初の背景

再建外科手術領域では、欠損した組織を再建するため身体各部位から採取した複合組織の移植手術を頻繁に行う。採取する組織は欠損に合わせて選択するが、移植後に血管茎からの血行で栄養可能な組織の量は、移植組織の血管解剖や血流動態、移植床血管の状態、手術手技など多くの因子の影響を受ける。移植後の組織の血行状態は、組織の生着、ひいては手術結果に重要であり、近年ではインドシアニングリーン(ICG)蛍光造影法が皮弁末梢部の血行動態のリアルタイムな把握に応用されるようになりつつある。術中のリアルタイムな組織血行の評価方法として、ICG 蛍光造影法を用いた試みは数多くなされており、所見と組織生着との相関関係を検討し、精度を増すための実験的試みもされてきているが、これらの報告はほとんどすべてが、既存の撮影装置、既成品を用いて撮影することを前提として ICG の注入量や撮像のタイミングの最適化を試みたものであり、撮影機器、解析方法自体に対して開発的アプローチを図っている研究はほとんどない。

また再建時に皮弁の厚みが問題となるケース(腫瘍切除後の四肢末梢や顔面の再建)において、従来は術者の感覚に頼り時間のかかっていた皮弁の除脂・細薄化の技術を、術中に 3D 再構成像を参照しながら脈管の位置を意識して安全にかつ短時間で行うことができれば手術時間の短縮による患者・術者の負担の低下だけでなく、術後に皮弁の部分壊死の生じない安全な術式とすることができる。また逆に組織欠損が大きく深下腹壁動脈穿通枝皮弁などで厚い脂肪織を移植する必要がある症例(乳房再建、上顎再建の症例など)において、皮弁に対する体表からの 2 次元的な ICG 造影検査で壊死域を予測する試みの報告はあるものの、自験例では単独の診断法として手術方針に影響を及ぼすほど精度、信頼性に足るものがなかったなどの問題点があった。

## 2. 研究の目的

今回の研究では皮弁手術の術中・術後の組織灌流をリアルタイムで評価するために、撮影装置や解析方法をハードウェアレベルで最適化し、より正確で信頼性の高い方法を提供するための撮影装置や解析方法についての検討と、より正確で信頼性の高い末梢組織血流評価法を開発することを目的とする。また正確な関連性がわかっていない ICG 不染域と短中期的な皮弁壊死領域との関連性について、実験動物に作成した皮弁モデルで検討し、臨床における ICG 造影法の有効な利用となるための指針を作成することについても目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 末梢組織血液循環のリアルタイム評価に最適な ICG 蛍光造影システムの開発

レンズ、撮像素子、励起光源については市場に流通しているものを準備し、可及的に多くの組み合わせで最適化を試行した。これらを組み合わせた 1 つのパッケージを 1 ユニットとし、被撮像体の立体構造を観察するために 7~10 度の輻輳角をつけた 2 つのユニットを作成した。お互いのユニットはレーザーダイオード駆動用のドライバーを含めた電子回路を共有し、またユニット内のセンサーからの撮影データを演算装置上で処理し、モニターへと描出するようなシステムとした。

### (2) 高解像度 3D 画像を再構成するソフトウェアの開発

作成した装置によって得られた ICG 蛍光造影の動画データからフレームを取り出し、RGB の 3 チャンネルから 1 チャンネルへとグレースケール化した上で、コントラスト制限適応ヒストグラム平均化とノイズ除去を実施した(これにより強信号域のみではなくさらに肉眼では判別困難な弱信号域において勾配差をデジタルに増幅することができる)。増幅した画像からコンピュータが対象を認識する際にポイントとなるような、アルゴリズムに則った特徴点を抽出し、これら 1 連の処理を同時に別のカメラで得られた複数枚の画像に対しても行い、複数方向から見た特徴点群の画像を作成し、同一の特徴点同士を重ね合わせてポイントクラウドを作成、隣接するポイントクラウドを特徴点でレンダリングし 3 次元メッシュモデルを作成した。

### (3) 動物モデルを用いた解析結果と組織生着との関連性の検討

本研究ではさらに皮弁における皮膚、脂肪織の組織灌流評価および実際の生着の程度について関連性の検討を行った。ラット背部には、外側胸動脈、後肋間動脈、深腸骨回旋動脈の 3 つのアンギオソームが存在するが、ラット背部に一方の外側胸動脈(1)を血管茎として、尾側方向へと後肋間動脈(2)、深腸骨回旋動脈(3)へと隣接した計 3 つのアンギオソームを含んだ有茎皮弁を挙上し、皮膚の生着域、壊死域を含む部分壊死皮弁モデルを作成した。この際、皮弁に腋窩脂肪織(1')、鼠径部脂肪織(3')を含めることによって皮下脂肪の生着と壊死も観察できるようにした。過去の研究から、外側胸動脈を血管茎とした場合、1、2、1'領域の皮膚は全生着し、3 あるいは 3'領域で部分壊死が生じると考えられた。外頸静脈から 2.5mg/cc に希釈した自インドシアニングリーンを 0.05cc 静注し、作成した皮弁における生着域、壊死域、その境界域それぞれの領域において、従来の皮膚色調と上記作成した装置による蛍光造影所見と合わせて検討した。実験終了後、造影された領域と、壊死した領域を濃度分布の形と経時変化で比較した。

## 4. 研究成果

(1) ウィスター・リタイアラットに作成した皮弁モデルで実験を行った。レンズは使用したセンササイズにも左右されるが、1/2 インチ以下のセンサの場合、ラット皮弁などの被写体が小さく、その内部の細かな毛細血管までを詳しく観察するためには、焦点距離は 30 ミリメートル前後が最も適していることがわかった。撮像素子として一般的な相補型金属酸化膜半導体(CMOS)の他に、近赤外光領域に感度の高い(皮弁深部の組織の血行を観察するために生体透過性が高く、

信号周辺のにじみが少ない 1000nm 以上の近赤外領域の蛍光を検出するため)インジウムガリウム砒素素子 (InGaAs) も用いたが、裏面照射型の CMOS よりシグナルノイズ比 (SNR) の高い画像を得ることができなかった。市場流通品レベルの InGaAs では、バリエーションが多く各波長帯域に特化した選択肢の多い CMOS に対する優位性が得られないためだと考えられた。励起光源として、迷光を可能な限り除外し、蛍光画像特有の滲みの少ない鮮明な蛍光画像とするために 760nm をピークとした LED 素子および半導体レーザー (LD) を検討した。血中の リポタンパク質と結合した ICG の吸光極大は 790nm 前後であるが、790nm をピークに持つ LED を使用した場合 SNR はカットフィルターの性能に大きく影響され、蛍光側への迷光を減らそうとした場合には却って低効率であった。逆に吸光極大からは外れるものの 740nm 前後の波長ピークを持つ LED を用いた場合に最も高い SNR が得られる結果となった。また LD を用いた場合、市場流通品で高出力なものが入手できるのは 760nm と 808nm であった。その素子特性からピーク外への迷光は比較的少なく、蛍光側のカットオフフィルタ波長を調整した場合脈管や表面毛細血管など比較的表層の造影は周辺へのにじみが少なく明瞭な造影像が得られたが、脂肪織や深部の血管の造影については低 SNR なものしか得られなかった。780nm の LD は 50mW 程度までの低出力のものしか使用できなかったが、上記と同様に表層のもの描出は良好であったが深部の描出には不適であった。

(2) 撮像素子から得られた造影データを用いて演算装置上で 3. で述べた処理を行った。取得フレームレートは 30FPS で必要十分であった。輻輳角については 10 度前後を設計デザインの目安としていたが、蛍光造影法の検査原理上、得られる造影像はピントの合ったシャープなものではなくある程度周辺へのにじみを含んでいるものであるため、10 度では不十分であり、より大きな輻輳角が必要であることがわかった。得られた動画から造影されている細血管の走行をモデル化し、OpenCV ライブラリーを用いて ORB 特徴量/AKAZE 特徴量のそれぞれを照合してポイントを対応させた後、Meshmixer と Maya を用いてレンダリングし三次元モデル化した。結果として、作成した 3D モデルはラットに作成した皮弁分の厚みしかなく、この厚みが一次元の ICG 造影像によって生じている周辺の滲みの座標距離よりも小さいため、3 次元モデルと 2 次元モデルにおける脈管の前後関係などの立体構造を描出する事は困難であることがわかった。より厚い皮弁もしくは脂肪織を含んだ皮弁を作成するためにニワトリやウサギ、ブタなどの大型哺乳類を使った追加の実験を行う必要があることがわかった。

(3) 5 匹のウィスターライタイアラットの背部に前述の方法で皮弁を作成し、壊死域と ICG 蛍光造影域の関連を調査した。作成した皮弁に ICG 不染領域は生じなかったが、ICG 静注直後から 1~2 分の経過で造影域にわずかな伸長が生じた (図 1)。72 時間後の皮弁は伸長した造影域を含むようにそこよりも皮弁遠位でやや皮膚色調の悪化があったが (図 2)、1 週間後には菲薄化と収縮した様子があったものの生着していた。今後は作成する皮弁を片側茎のまま体側まで伸ばし、含まれるアンジオソーム数をさらに増やして確実な壊死域を作成すること、また縫着した下床の皮下組織からの脈管の侵入を素子するために生体親和性のある遮断材料を使用し、植皮として生着する要因を減らすなどの実験系の見直しが必要と考えられた。

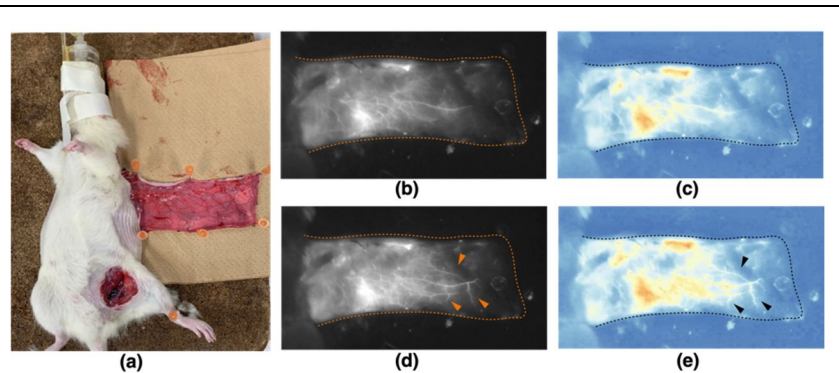


図 1 (a)ラット背部に作成した皮弁と実験セットアップのマクロ像、(b)ICG 静注直後の蛍光像映像、(c) ICG 静注直後の蛍光造影像の疑似カラー画像、(d) ICG 静注 2 分後の蛍光像映像、(e) ICG 静注 2 分後の蛍光造影像の疑似カラー画像。b と d の橙破線および c と e の黒破線は皮弁縁を示し、d の橙三角と e の黒三角は伸長した造影域の細血管を示す。

もの生着していた。今後は作成する皮弁を片側茎のまま体側まで伸ばし、含まれるアンジオソーム数をさらに増やして確実な壊死域を作成すること、また縫着した下床の皮下組織からの脈管の侵入を素子するために生体親和性のある遮断材料を使用し、植皮として生着する要因を減らすなどの実験系の見直しが必要と考えられた。

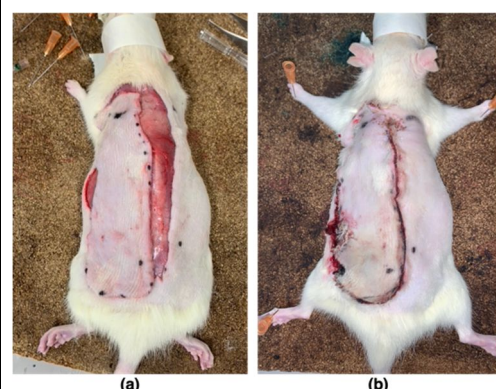


図 2 (a)皮弁の実験直後のマクロ像、(b)皮弁の実験 72 時間後のマクロ像

リアルタイム末梢組織血行評価法は、再建手術中の組織灌流をリアルタイムで評価するための、より正確で信頼性の高い方法を提供するものである。本手法は、末梢組織の血行動態に関するよりミクロレベルでの信頼性の高い情報を提供するための計測機器開発と実装を行うことができた。本手法を用いた生体での研究データをさらに蓄積することで、再建手術における皮弁生着領域に関する予測率の向上が得られる可能性があり、手術成績を向上させるための新たな方向性を示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mito Daisuke, Wang Yu-Ming, Wu Shao-Chun, Lin Wei-Che, Tsai Pei-Yu, Hsieh Ching-Hua, Yang Johnson Chia-Shen	4. 巻 Publish Ahead of Print
2. 論文標題 Use of Microscope-Integrated Near-Infrared Fluorescence for Enhancing Deep Lymphatic Vessel Detection during Supermicrosurgical Lymphaticovenous Anastomosis: A Longitudinal Cohort Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plastic and Reconstructive Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PRS.0000000000009050	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 Mito Daisuke, Kurita Masakazu, Miyamoto Shimpei, Okazaki Mutsumi	4. 巻 145
2. 論文標題 Miniaturization of Indocyanine Green Fluorescence Imaging Device Using a Smartphone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plastic and Reconstructive Surgery	6. 最初と最後の頁 230e ~ 232e
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PRS.0000000000006365	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 御任大輔、黒住健人、乾貴博、松井健太郎、石井桂輔、鈴木卓、渡部欽忍、河野博隆
2. 発表標題 インドシアニングリーンを用いた蛍光造影検査で静脈の開通性の評価を行った一例
3. 学会等名 日本骨折治療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 御任大輔、栗田昌和、宮本慎平、岡崎睦
2. 発表標題 ICG蛍光造影における 撮影機器の最適化
3. 学会等名 第62回日本形成外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 御任大輔、栗田昌和、宮本慎平、岡崎睦
2. 発表標題 インドシアニングリーンを用いた 抗菌光線力学療法についての検討
3. 学会等名 第28回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 手術用デジタル顕微鏡システムおよび手術用デジタル顕微鏡システムの制御方法	発明者 御任大輔	権利者 帝京大学 産学 連携推進セン ター
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-181130	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------