

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20666

研究課題名(和文) 脳組織の機械的・音響的性質と分子情報の相互理解による硬さの基礎理解

研究課題名(英文) Basic study of stiffness through mechanical and acoustic properties of brain tissue and molecular information

研究代表者

田村 和輝 (Tamura, Kazuki)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・助教

研究者番号：40822614

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)：本研究では、脳腫瘍組織を対象に硬さを指標とした病理標本の理解を目指し、硬さと分子分布との対応を検討した。硬さの計測には広帯域集束超音波を用いた超音波顕微鏡を使用し、硬さの指標として体積弾性率に関する固有音響インピーダンスおよび縦波音速の二次元像を使用した。分子分布は質量顕微鏡を用いて二次元的に取得した。質量顕微鏡では質量スペクトルを取得し、脂質に注目して分布を同定した。これらの二つの計測によって得られた生体組織の硬さと分子の関係性をから、硬さ分布と腫瘍に関係を持つ分子の分布に相違があることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪性肝疾患の肝臓を対象に組織に含まれる分子と硬さの関係について検討が行われた例が報告されている。脂肪性肝疾患の特徴はびまん性の疾患である点であり試料全体で比較的均質である。本研究ではラットの脳内の一部に局在する腫瘍を計測対象として、病理学的に腫瘍領域・周辺領域・非腫瘍領域の3つの領域の分子分布と硬さ分布を計測して比較した。分子分布では周辺領域の脂質近傍領域からも腫瘍に関係する脂質が検出されたが、硬さの面では周辺領域と非腫瘍部の違いは小さかった。以上の結果より組織の硬さの変化は脂質の蓄積だけでなく、細胞の構造的変化による変化の要因が強いことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the correspondence between elasticity and molecular distribution in brain tumor tissues, aiming to understand pathological specimens using hardness as an index. Ultrasonic microscopy using broad frequency band focused ultrasound was used to measure elasticity. Two-dimensional images of acoustic impedance and speed of sound, which are related to volume elastic modulus, were used as indices of hardness. Molecular information were obtained two-dimensionally using mass microscopy. The spectral information acquired in each measured position identified the lipid species. The relationship between the hardness of the biological tissue and the molecules obtained from these two measurements confirmed that there were differences in the distribution of hardness and the distribution of lipids related to the tumor.

研究分野：生体医工学

キーワード：生体計測 超音波計測 質量イメージング 定量的組織性状評価

1. 研究開始当初の背景

硬さは触診の一部として古くから臨床現場の基本的な所見とされてきた。しかし、技能の習得が難しく技能のばらつきが大きいために新技術による定量化が期待されてきた。近年、生体内の硬さ情報である横波伝搬速度やヤング率を医用画像情報から推定し、診断指標として用いる研究が進められており、超音波エラストグラフィやMRIエラストグラフィが乳がん(Youk et. al., Ultrasonography, 2017) やびまん性肝疾患 (Durot et.al., UMB, 2018) の鑑別に用いられ始め、保険適用も進んでいる。しかし、臨床研究に用いる装置では10 mm程度の分解能しか持たないことから、病理診断レベルで得られる生体組織の構造や性状との対応関係をとることは困難であり、現状のアプローチではエラストグラフィを病理学的レベルに発展させることは難しい。分解能の不足を補うために各社が計測シーケンスを工夫するあまり、同じ疾患であっても機器ごとに異なる指標が必要な状況である。さらに硬さにフォーカスした基礎研究の方法論が無いことも硬さの定量評価技術の発展を困難にしている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、従来は分子・遺伝子、病理、音響の各分野で個別に検討されてきた疾患の基礎理解について、総合して検討することによって、「生体軟組織の機械特性の変化を計測し、病変進行を軸に評価する方法論を確立する」事である。この成果により、脳に限らず医学・生物学分野の広い領域において“硬さ”情報を指標とした研究が活性化されることが期待できる。

従来の光学顕微鏡を用いた形態的分類だけでなく、物理・化学的な指標を加えることで、質的な変異も踏まえて高感度かつ連続的に病変を評価可能となる。つまり、分子情報を指標とすることで、これまでに積み重ねられてきた細胞小器官と“硬さ”の関係性をより細分化して検討し、病変が形態として現れる以前の変質をスケージングすることが可能なる。

3. 研究の方法

3.1 研究のフロー

研究では脳腫瘍を含む生ラット脳の物性計測プロトコルを確定した。硬さ計測にはバイオ超音波顕微鏡、分子分布の評価には質量顕微鏡を用いた。両計測の関係を図1に示す。生体試料として質量顕微鏡・超音波顕微鏡ともに計測例があるラットの脳スライスを用いた。脳スライスの特徴は解剖的に分類される多様な組織を一度に計測可能である。脳腫瘍モデルの作成はSlc:SDの脳にグリオーマ細胞を生着させて作成した。

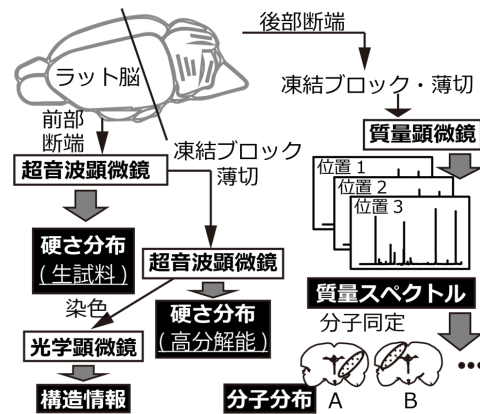


図1 実験のフロー

3.2 硬さ分布の取得

超音波顕微鏡(AMS-50SI改, 本多電子(株))及び中心周波数80 MHz・400 MHzの集束超音波振動子を用いた。計測は生試料(摘出後断面を直接計測)と固定薄切試料(一般的な光学顕微鏡観察用試料の染色を施さないもの)を対象とした。スライス標本は肉眼写真を撮影した後、断面をシャーレに貼り付けて反射波を計測した。計測した試料はシャーレごと凍結し、凍結ブロックを作成した。凍結ブロックを薄切し薄切標本を作成し、音速計測をした。音速計測後にH&E染色し光学顕微鏡を用いて観察した。つまり、肉眼観察・反射波計測・音速計測・H&E染色像を同じ断面で計測するプロトコルを確立した。また、脳組織は水分量が多くタンパク質量が少ないことから他臓器で音速計測用試料の作成で用いられるホルマリンによる化学固定では計測が困難であったため、グルタルアルデヒドを含むカルノフスキー固定液を使った音速計測プロトコルを確立した。

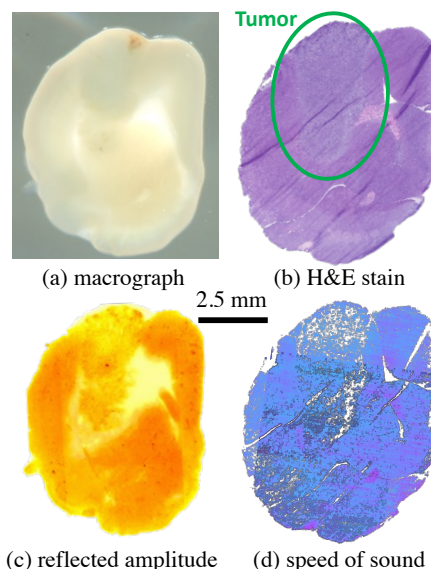


図2 硬さ計測の結果

3.3 分子情報の取得

イメージング質量顕微鏡(Solarix XR, bruker Daltonics)により matrix-assisted laser

desorption ionization (MALDI) 法を用いて三個体の薄切標本の 2 次元平面の質量スペクトル計測した. ITO コートを施したスライドガラスに切片を貼り付け, 試料表面にイオン化を支援するマトリックスを塗布した後に計測した. 計測後の試料は H&E 染色をしたのちに光学画像を取得した.

取得した質量スペクトルのうち, 脳腫瘍に関連がある Phosphatidylcholine と Sphingomyelin に関係するスペクトルを抜き出し画像化した.

4. 研究成果

4.1 硬さ分布の取得

図 2 に腫瘍領域を含むラット脳前額断の光学画像および超音波計測結果を示す. 1 mm 厚にスライスした試料の肉眼写真(図 2 a)では腫瘍領域がうっすらと確認できる. この断面の固有音響インピーダンスに関する反射強度(図 2 b, 80 MHz 振動子)では腫瘍部分が高値を示している. 同じ断面の凍結切片の音速(図 2 d, 80 MHz 振動子)では計算不能(白く表示されている箇所)な領域が多くは発生している. 音速計測後の試料を H&E 染色(図 2 b)すると音速計測後にも試料の欠落はみられなかった.

そこで試料のうち, 腫瘍部と非腫瘍部の境界領域を 400 MHz 振動子で観察した.(図 3) 音速計測後の試料を H&E 染色(図 3 a)し腫瘍の領域と細胞核の面積密度を算出した.(図 3 b) 染色像からも明らかな通り, 腫瘍部の細胞核密度は非腫瘍部に比べて高値を示した. 音速値と細胞核密度の比較を図 3 c に示す. 音速の二次元像では非腫瘍部(左側)に比べて腫瘍部(右側)の音速が高値に示されている. 非腫瘍部と腫瘍部を分けて関係性をプロットすると, 細胞核密度の上昇に伴って音速が高値をとることが示された. 非腫瘍部(青)と腫瘍部(赤)では一次関数近似の傾きおよび切片が有意に異なることから, 腫瘍部とそれ以外では細胞密度以外にも個々の細胞の音速が異なることが示唆された.

4.2 分子情報の取得

Phosphatidylcholine(PC) と Sphingomyelin(SM) のスペクトルを積分した結果を図 4 に示す. PC(図 4 b) と SM(図 4 c) のスペクトルの積分値では, 非腫瘍部と腫瘍部に間隔を開けて関心領域を設定して比較したところ PC, SM 共に腫瘍部の方が有意に低値を示した. ただし, 二次元画像で確認すると非腫瘍部と腫瘍部の境界はあいまいである. 今後, 非腫瘍部と腫瘍部の境界領域の脂質量と硬さの関係に関して検討を進める予定である.

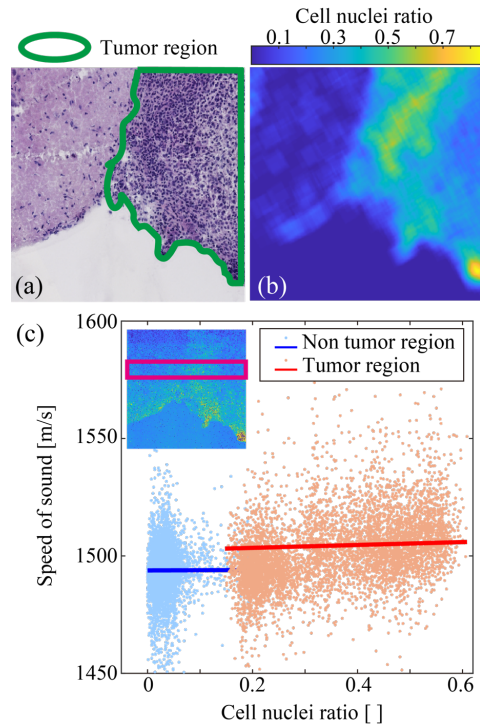


図 3 細胞スケールに注目した計測

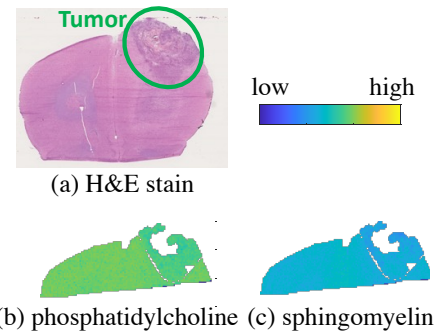


図 4 脂質の質量スペクトルの取得

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 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nagaoka Ryo, Hasegawa Hideyuki, Tamura Kazuki, Yoshida Sachiko, Hozumi Naohiro, Kobayashi Kazuto	4. 巻 118
2. 論文標題 Suppression of reflected signals from substrate as clutters for cell measurements using acoustic impedance microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ultrasonics	6. 最初と最後の頁 106580 ~ 106580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ultras.2021.106580	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 Tamura Kazuki, Mamou Jonathan, Yoshida Kenji, Yamaguchi Tadashi, Franceschini Emilie	4. 巻 148
2. 論文標題 Quantifying scattering from dense media using two-dimensional impedance maps	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of the Acoustical Society of America	6. 最初と最後の頁 1681 ~ 1691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1121/10.0001972	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 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 瀬戸 駿, 伊能 舞, 野口 和馬, 田村 和輝, 平田 慎之介, 吉田 憲司, 山口 匡
2. 発表標題 安定した生体音速評価を可能とする薄切試料作製および計測プロトコル
3. 学会等名 超音波研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀬戸 駿, 伊能 舞, 野口 和馬, 田村 和輝, 平田 慎之介, 吉田 憲司, 山口 匡
2. 発表標題 ラット臓器の凍結試料における音速評価精度の検討
3. 学会等名 日本音響学会2022年春季研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mai Ino, Kazuma Noguchi, Suguru Seto, Masaaki Omura, Kazuki Tamura, Shinnosuke Hirata, Kenji Yoshida, Tadashi Yamaguchi
2. 発表標題 Evaluation of relationship between liver structure and frequency dependency of speed of sound and attenuation
3. 学会等名 The 42nd Symposium on UltraSonic Electronics (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Suguru Seto, Kazuma Noguchi, Kazuki Tamura, Shinnosuke Hirata, Kenji Yoshida, Tadashi Yamaguchi
2. 発表標題 Examination of validity of sample preparation method for speed of sound evaluation in ultra-high frequency band
3. 学会等名 The 42nd Symposium on UltraSonic Electronics (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuki Tamura, Kazuyo Ito, Sachiko Yoshida, Jonathan Mamou, Katsutoshi Miura, Seiji Yamamoto
2. 発表標題 Chemical fixation effects on speed of sound values obtained from a healthy rat using a 250-MHz acoustic microscopy
3. 学会等名 IEEE International Ultrasonic Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀬戸 駿, 野口 和馬, 田村 和輝, 平田 慎之介, 吉田 憲司, 山口 匡
2. 発表標題 試料作製法の違いが生体組織の音速評価に与える影響の検討
3. 学会等名 日本音響学会2021年秋季研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊能 舞, 野口 和馬, 瀬戸 駿, 大村 眞朗, 田村 和輝, 平田 慎之介, 吉田 憲司, 山口 匡
2. 発表標題 ラット臓器の音速の周波数依存性に関する基礎検討
3. 学会等名 超音波研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田村和輝, 伊藤一陽, 三浦克敏, 山本清二
2. 発表標題 凍結切片法を用いた脳腫瘍組織の音速計測
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 Kazuki Tamura
2. 発表標題 Differences in acoustical property between normal and tumor cells in a rat brain tumor based on cell nuclei density
3. 学会等名 The 41st Symposium on Ultrasonic Electronics (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuki Tamura
2. 発表標題 Quantitative ultrasound fat detection using a weight filter and a double Nakagami distribution model
3. 学会等名 The IEEE International Ultrasonics Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuki Tamura
2. 発表標題 Novel method of lipid content quantification using double-Nakagami distribution model in rat liver steatosis
3. 学会等名 The 40th Symposium on UltraSonicElectronics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村和輝
2. 発表標題 構造因子を考慮した後方散乱波解析への音響特性分布の適用手法の検討
3. 学会等名 バイオ超音波顕微鏡研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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