

機関番号：53203
 研究種目：新学術領域研究
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20200015
 研究課題名（和文） レーザを応用した生体内血管血流情報計測による新規癌診断装置と癌治療装置の開発
 研究課題名（英文） Development of a New Cancer Diagnostic and Treatment Device by 3-D Imaging Techniques for Microvessels Using a Laser
 研究代表者
 八賀 正司（HACHIGA TADASHI）
 富山高等専門学校・商船学科・教授
 研究者番号：80123305

研究成果の概要（和文）：

多点同時レーザードップラー血流測定装置の医療診断分野への新規応用を目指し、皮膚癌モデルマウスを用いて癌原発巣の診断を行うことを主たる目的として研究を展開した。In vivo 血管血流三次元画像計測を行い、ある程度の深部病変での本診断装置の有用性を確認し、その改良を試みた。健常組織への障害を最小限に抑え、ある程度の深部病変での癌病巣のみに、2 ビーム交差型レーザー照射によるポイント加熱を行い、選択的に治療する癌治療装置の性能を確認した。

研究成果の概要（英文）：

We have developed a laser Doppler velocimeter to measure blood flow, named the Micro-Multi point Laser Doppler Velocimeter (μ MLDV). The μ MLDV was developed primarily for use in the diagnosis of cancer. We attempted to perform blood flow velocity imaging of a malignant melanoma which had been transplanted in the ear of a mouse. With this device we have succeeded in non-invasively measuring the blood flow velocity in microvessels. Moreover, we are able to measure absolute velocity and based on this can display the flow within blood vessels. Further experimentation confirmed the ability for the μ MLDV to be used as a heating device for cancer treatment. Cancer lesions are targeted by crossing the two laser beams producing overheating at the site of the malignant cells. The experimental results suggest that this device has the potential to become a new non-invasive diagnostic method for distinguishing benign nevi from malignant melanomas.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 7,700,000 | 2,310,000 | 10,010,000 |
| 2009年度 | 7,200,000 | 2,160,000 | 9,360,000 |
| 2010年度 | 7,200,000 | 2,160,000 | 9,360,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 22,100,000 | 6,630,000 | 28,730,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：検査・診断システム、流体計測

1. 研究開始当初の背景

日本人の死亡原因の第1位は癌、第2位は心疾患、第3位は脳血管疾患である。血管系病変による死亡率は癌とほぼ同じである。癌

原発巣への血管新生がその増殖に重要な役割をしているので、死亡原因の大部分が血管関連疾患ということになる。従って、血流測定は、これら疾患の早期発見につながる可能

性がある。

(1) がん診断装置の研究の背景

日本人の死亡原因の第1位は癌である。その早期の診断及び治療により癌を克服することは現在の医療技術により可能である。現在の診断の多くが、原発巣及び転移巣の膨潤の経過観察（断層撮影や外科領域での生検による組織採集）やバイオマーカーによる診断が主である。これらの診断法は、癌巣がかなり大きくなるまでその検査に対応できないため、癌原発巣構築の初期段階の診断はほぼ不可能である。癌原発巣では血管新生が盛んであり、このことは局所血流量が増大していることを示唆している。癌原発巣を早期非侵襲的に発見するために、腫瘍新生血管の異常値を検出し癌原発巣を早期発見する診断装置の開発が必要である。そこで、研究代表者らは血管の三次元位置、太さ、血流速の測定が可能な多点同時レーザドップラー血流測定装置の開発を行ってきた。

(2) 血流測定の研究背景

近年の血流測定には1本のレーザビームを被検体内に入射する1光束方式のレーザドップラー流速測定法、粒子画像流速測定法（PIV）、マイクロPIV法、超音波血流計法、MRIやCT法及び数値シミュレーションとの融合による方法などがある。一般に二次元流れの情報が得られるPIV計測はin vitro計測である。また、現在のMRIやCTの性能では空間および時間分解能が十分でないため、詳細な血行動態の情報を得るのは困難である。超音波を用いた計測はin vivo計測による血流速度情報を得ることができるが、血管径に適するようにビーム幅を小さくしても、ビーム径は進むにつれて大きくなるので、空間分解能は数mm程度になる。1光束LDV法は血流速度の方向成分と深さ方向の詳細な情報がなく、測定部位を特定できない。2光束LDV法は高時空間分解能でin vivo計測が可能であるが、1点のみの計測である。癌の発生や進行には周囲の新生血管の地下イメージング情報や新生血管内の血流情報が重要である。また、血管病変には好発部位があり、血管内の血流速度分布などの高時空間情報が不可欠である。

(3) レーザ治療装置の研究の背景

非外科的治療としてのレーザ治療には、「気化蒸散法」と「光線力学的治療法」の2つがあるが、両者とも癌治療は病変表層部のみに使われている。従来のレーザ治療は、ビーム軌跡の生体組織すべてが損傷を受ける。気化蒸散法はレーザ焼灼術で、ハイパワーのレーザを腫瘍に当て蒸散させるもので、ビーム軌跡の生体組織すべてが損傷を受ける。光線力学的治療法は、主な癌親和性光感受性薬剤の光吸収端波長が可視域の波長になるため、深部での病変の治療には、適用できない。

健常組織への障害を最小限に抑え、ある程度の深部病変での癌病巣のみを選択的に治療する装置が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに開発してきた多点同時レーザドップラー速度分布測定装置の医療診断分野への新規応用を目指し、その基礎研究として皮膚癌・乳癌・肺癌モデルマウスを用いて原発巣の発見を行うべく、ある程度の深部病変での本診断装置の有用性を確認し、その改良を試みる。健常組織への障害を最小限に抑え、ある程度の深部病変での癌病巣のみに、2ビーム交差型レーザ照射によるポイント加熱を行い、選択的に治療する本治療装置の性能を確認しその改良を試みる。

(1) 通常の2光速式LDV法は高時空間分解能でin vivo計測が可能であるが、1点のみの計測である。癌の発生や進行には周囲の新生血管の地下イメージング情報や新生血管内の血流情報が重要である。また、血管病変には好発部位があり、血管内の血流速度分布などの高時空間情報が不可欠である。研究代表者らは2光束式の点計測LDV法を多点同時に計測する線測定LDV法に拡張し、この手法によって透明液体での多点同時計測及びその時間変動の計測を行っている（時間分解能：数十kHz、空間分解能：250 μ m \rightarrow 受光系の倍率を10倍にすると数十 μ mまで拡大が可能）。透過型・多点同時計測レーザドップラー(MLDV)血流速度測定装置は一本のレーザ光をレンズと鏡を用いて二枚の「平面」に分け、その面を交差させることで生じる「交差線」と接触する全ての血管の個々の血流速度を測定する。交差線を走査することにより、in vivo非侵襲で個々の細血管の血流速度の三次元画像を得ることが可能である。この「交差線」上の全領域で流速測定が可能となる。

(2) 本研究のレーザ治療は、近赤外の2本のレーザビームを一点に集光することにより、生体内部に低浸襲・非接触な1点集中加熱を行い、生体内部の特定部位のみを加熱する。1本のレーザビームのパワーは弱く、加熱温度は小さく、人体への影響は少ない。複数本のレーザを一点に集光し、同時加熱するので、1点への加熱の程度は大きく、その1点に癌細胞があれば、癌細胞を破壊できると考えている。特定部位に、大きな損傷を与える。本研究のレーザ治療装置は正常組織への障害を最小限に抑え、ある程度の深部病変での癌病巣のみを選択的に治療する。

上記システムを用いて、癌原発巣及びその周辺の病的新生血管に着目しレーザドップラー血流測定方法及び装置【特願2007-330112：血管の三次元位置・太さ・血流速が分る】による広範囲の同時血流速度測定

を行うことにより、異常値を検出し癌原発巣を早期発見し、改良型レーザービーム照射装置を用いて低侵襲的に、ある程度深部での癌細胞を破壊することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) レーザ治療装置

本研究のレーザー治療は、近赤外の2本のレーザービームを一点に集光することにより、生体内部に低侵襲・非接触な1点集中加熱を行い、生体内部の特定部位のみを加熱する。1本のレーザービームのパワーは弱く、加熱温度は小さく、人体への影響は少ない。複数本のレーザーを一点に集光し、同時加熱するので、1点への加熱の程度は大きく、その1点に癌細胞があれば、癌細胞を破壊できると考えられる。特定部位だけに大きな損傷を与えることが可能となる。

本研究のレーザー治療装置は健常組織への障害を最小限に抑え、ある程度の深部病変での癌病巣のみを選択的に治療する。

(2) 血流シミュレーション

本実験で求まる血管内の血液速度の妥当性を検討するため、血液流れを Casson 式に従う非ニュートン流体として、円管内の狭窄部の流れや分岐を持つ流路系における流動状態を、独自の熱流体解析用 GTT コードを用いて三次元数値解析を行った。

(3) 前方散乱型多点同時計測血流速度測定装置による3D血管血流イメージング

本装置は1本のレーザー光をビームスプリッター、鏡、ロッドレンズ及びシリンドリカルレンズを用いて二枚のシート光に分けてから交差させる。交差線と接触するすべての血管の個々の血流速度を測定する。交差線には明・暗・明・暗のような干渉縞が出来ている。この干渉縞を赤血球などの粒子が通過するとピッカピッカと光る。このピッカピッカの光を40chの光ファイバーアレイに導き、ピッカピッカの時間を40chの光検出器で測定する。本装置の時間分解能は0.2msec、空間分解能は光ファイバーアレイの光ファイバーのコア径と光学倍率に依存し、本実験ではコア径を0.24mmと0.1mmのファイバーを使用した。

最初に、コア径を0.24mmの光ファイバーを用いて、マウスの耳動脈を測定し、次にコア径0.1mmの光ファイバーを用いて、マウスの耳動脈を測定した。

(4) 皮膚癌細胞であるメラノーマ細胞をマウスの耳に移植した部位の血管血流画像実験には、雄性8週齢のc57BL/6系マウス(日本SLC、静岡)を用いた。マウスは、室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ の環境下で、水および餌は自由に摂取させて、飼育した。本実験計画は、富山大学動物実験委員会の承認を得ている。本実験は、ペントバルビタール麻酔下

で行った。c57BL/6系マウス由来B16-BL6皮膚癌メラノーマ細胞は、10%牛胎児血清を含むイーグルMEMで培養した。同細胞は、107細胞/mLにMEMを用いて調整し、マウスの片耳に $10 \cdot \text{L}$ の容量で皮内注射した。動物モデルの作出のために、B16-BL6メラノーマ細胞(107細胞/mL, 10 μl)をマウスの片耳に移植し、その後、細胞増殖の経過を写真撮影した。耳の血流画像の実験方法は、前述のとおりである。

4. 研究成果

(1) レーザによる癌治療装置

本研究で目指す装置は、照射する近赤外波長の複数本のレーザービームを癌組織内の一点に集光することにより、組織内の特定部位を低侵襲・非接触で集中的に加熱することのできる装置である。

実験結果①→1本の近赤外レーザービームのパワーをON-OFFのパルス制御することで生体での加熱を 40°C 程度とし、さらに2本のレーザービームを組織内の1点に集光することにより、組織内の1点の加熱温度を $60 \sim 100^\circ\text{C}$ までの温度に加熱することができた。マウスの皮膚を用い、2本の近赤外レーザーの交差点を皮膚組織下部に固定し、交差点の温度上昇を調査した。2本の60mWのレーザーをON-OFFパルス制御し、ON-OFFのデューティー比50%とした場合の2本のレーザーの交差点での組織の温度は 65°C であった。

実験結果②→摘出マウス皮膚を用い、2本のグリーンレーザーの交差点を皮膚表面に固定し、加熱温度と熱刺による神経電流の関係を調査した。レーザー透過部位及び非透過部位の凍結皮膚切片を作製し、ディフクイック染色液を用いて染色したところ、レーザー透過部は、非透過部と比較して特に皮膚内細胞への影響は認められなかった。

(2) 血流シミュレーション

狭窄部での流速の半径方向分布は、血液相当液体の場合、中心軸付近で、水の場合よりなだらかな分布となることが分かる。多数のT型分岐を持つ流路系での血液相当液体の流動状態を数値解析した結果、水の場合より、各分岐流路への流入が阻害されることが分かった。

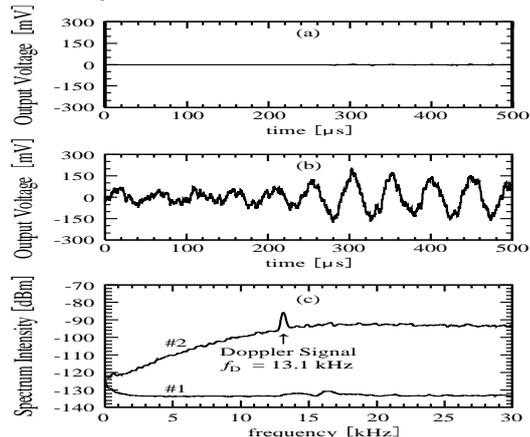


Fig.1 Time series and spectrum data

(3) 前方散乱型多点同時計測血流速度測定装置による In-vivo 血管血流画像

Fig. 1 (a) と (b) に、アバランシェフォトダイオードの出力(ドップラー信号)を示す。Fig. 1(c) に、同信号をフーリエ変換したあとのドップラー周波数を示す。アバランシェフォトダイオードより得られた入力信号は血管・血液の流れのない状態では Fig. 1(a) のようになり、血管血液の流れのある状態では、Fig. 1(b) のようになる。このデータが A/D 変換されて、そのデジタル信号を高速フーリエ変換し、さらにノイズ除去処理等を施して、ドップラー信号を算出する。ドップラー周波数は、Fig. 1(c) のように検出した信号のスペクトラムにおいて、ドップラー周波数を示すピークが表われることにより、求まる。ドップラー周波数が求まると、その周波数から血球の速度が算出され、血球の速度は血流の流速であることから血流速度が算出さ

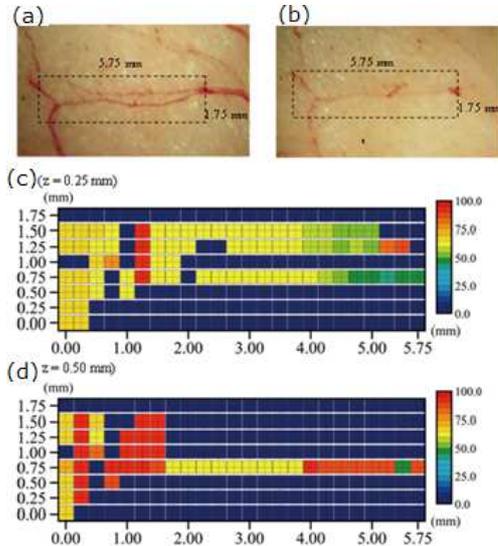


Fig. 2 In-vivo 3D mapping of blood flow velocity される。

Fig. 2 (a) はマウスの耳を表側から見た部位の写真、(b) はマウスの耳を裏側から見た部位の写真 (Flip Image) を示す。(c) は測定深度 0.25 mm における血管血流速度の二次元イメージを表し、(d) は測定深度 0.5 mm における血管血流速度の二次元イメージを表す。さらに、測定深度 0.75 mm 及び測定深度 1.0 mm の血管の 2D イメージング測定を行い、Fig. 3 に血管の in-vivo 3D マッピングを示す。

この実験より、本システムを用いることにより生体の血管内の血流速度情報を持った In-vivo 3次元画像の取得が可能であることを示した。

コア径が 0.1 mm の光ファイバーを受光系に用いることにより空間分解能を上げ、マウスの耳の微小血管の 3次元画像の測定結果を Fig. 4 に示す。Fig. 4 (a) に示した写真の破線で囲んだ領域を測定した。Fig. 4 (b) に

血管三次元イメージング

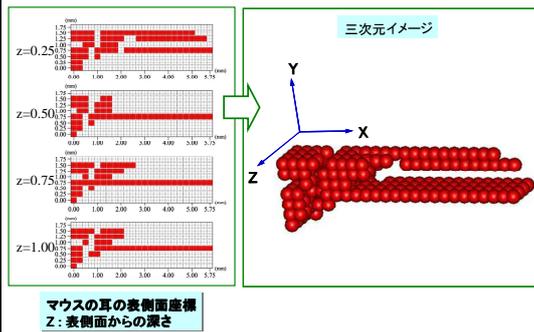


Fig. 3. In-vivo 3-D mapping of blood vessels.

3次元画像の測定結果を示す。Fig. 4(c) と 4(d) は、それぞれ Fig. 4(b) を垂直方向に 90度ごとに回転させた画像である。これらの結果が、写真で示した血管の血管走行と良い一致を示していることが分かる。空間分解能

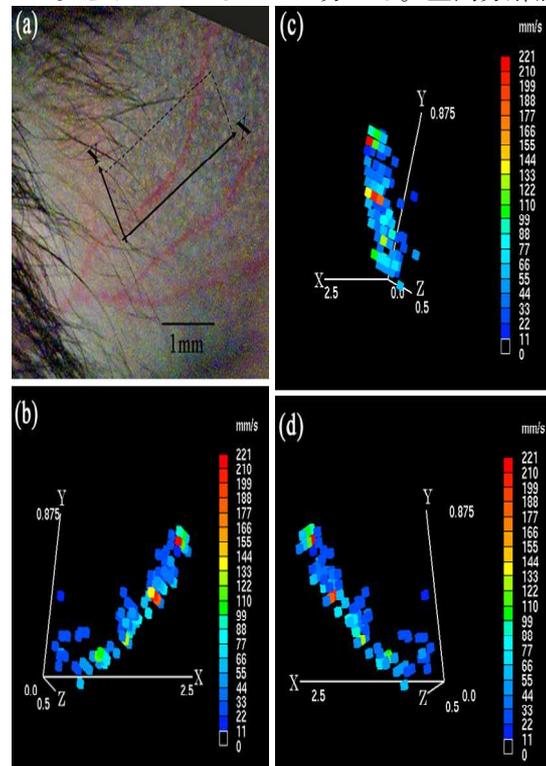


Fig. 4 3D image of the flow velocity for a microvessel.

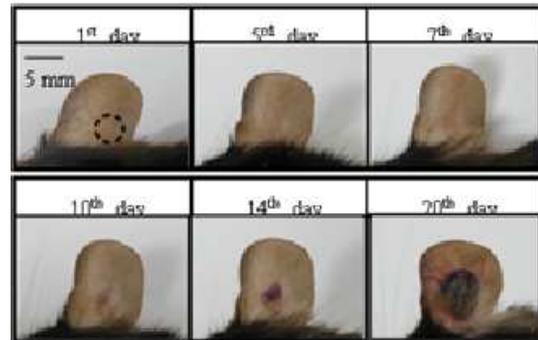


fig. 5 Time course of melanoma growth in the mouse ear

は $250\ \mu\text{m}$ から $100\ \mu\text{m}$ に向上した。

(4) 皮膚癌細胞であるメラノーマ細胞をマウスの耳に移植した部位の血管血流画像

Fig. 5 はマウスの耳にメラノーマ細胞を移植し、癌細胞増殖の経過の写真を示す。病変の状況の日にち経過の写真である。移植後 10 日間で、黒赤色のスポットが移植された位置で固定された。腫瘍は 20 日経過後急速に成長することが分かる。

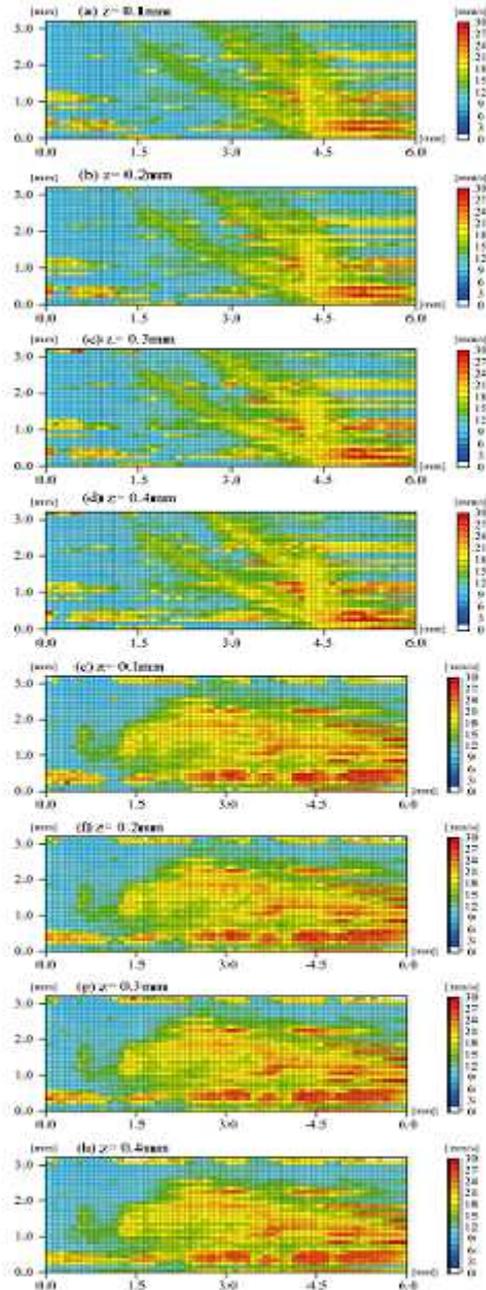


Fig. 6 Blood flow velocity images of malignant melanoma transplanted to the mouse ear. a-d data and e-h data obtained from the seventh and 14th day, respectively.

メラノーマをマウスの耳に移植後 7 日後と 14 日後の 2 次元血流画像を Fig. 6 に示す。Z は深度を示す。7 日後の画像はすべて、耳の付け根から比較的大きな血管 ($0.5\ \text{mm}$ 程度

の直径) を示している。また、14 日目の二次元血流速度画像から示されるように、Fig. 5 の写真で示される 14 日目の楕円状の腫瘍を、血流速度二次元画像でイメージングすることが出来た。また、腫瘍に伴う新生血管の血流速度は、正常な真皮の毛細血管や皮下組織の微小血管のそれよりも早いことが実験的に確かめられた。

(5) 後方散乱型レーザドップラー流速分布測定装置の開発と生体計測への応用

細流路内の 2 方向の流速情報を持った 2 次元画像及びマウスの腸間膜部における In-vivo 血管血流の測定を行い、二次元画像を取得することが出来た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. H. Ishida, D. Kobayashi, T. Andoh, S. Akiguchi, T. Wakisaka, M. Ishizuka and T. Hachiga, “Reflection-type micro multipoint laser Doppler velocimeter for measuring velocity distributions in blood vessels”, Review of Scientific Instruments, (ACCEPT) June 21(2011). (査読有)
2. H. Ishida, T. Andoh, S. Akiguchi, H. Shirakawa, Y. Kuraishi, and T. Hachiga, “Blood Flow Velocity Imaging of Malignant Melanoma by Micro Multi-point Laser Doppler Velocimetry”, Applied Physics Letters 97, 103702 pp1-3 (2010) (査読有)
3. Yu. Omori, T. Andoh, H. Shirakawa, H. Ishida, T. Hachiga and Y. Kuraishi, “CAItch-related responses of dorsal horn neurons to cutaneous allergic stimulation in mice”, NeuroReport Vol. 20(5) pp. 478-481 (2009) (査読有)
4. T. Andoh, H. Ishida, S. Akiguchi, H. Shirakawa, Y. Kuraishi and T. Hachiga, ” High Resolution In-Vivo Three Dimensional Mapping of Blood Flow and Blood Vessels by Using Advanced Multi-Point Laser Doppler Velocimeter”, Jpn. J. Appl. Phys. 48(017002) (2009) p. 1-5 (査読有)
5. H. Ishida, T. Andoh, S. Akiguchi, H. Shirakawa, Y. Kuraishi, and T. Hachiga, “Three-Dimensional Imaging Techniques for Micro-vessels Using Multipoint Laser Doppler Velocimeter”, J. Appl. Phys., Vol. 106, 054701 (1-6) (2009). (査読有)

〔学会発表〕(計10件)

1. 安江陽一、坂本貴一、一島耀、石田弘樹、秋口俊輔、八賀正司、安東嗣修、“後方散乱型レーザドップラー流速分布測定装置の開発と生体計測への応用”、日本伝熱学会北陸信越支部・春季セミナー、p1-2、(2011.05.14)
2. 坂本貴一、安江陽一、石田弘樹、秋口俊輔、安東嗣修、八賀正司、“多点同時計測LDV法によるサーペンタイン流路内の流速分布測定”、日本伝熱学会北陸信越支部・秋季セミナー、p1-2、(2010.11.27)
3. 一島耀、秋口俊輔、八賀正司、“非侵襲マイクロマルチLDV法による血流速度の画像化”、平成22年度電気関係学会北陸支部連合大会、(2010.09.11)、福井工業高等専門学校
4. 脇坂知行、落合利紀、高田洋悟、八賀正司、安東嗣修、榎伸司、石田弘樹、秋口俊輔、“血流シミュレーション Casson式に従う流体のGTTコードによる流動数値解析”、日本機械学会関西支部第85期定時総会講演論文集 No.104 8-14 (2010.03.16)
5. 落合利紀、脇坂知行、高田洋悟、八賀正司、安東嗣修、榎伸司、石田弘樹、秋口俊輔、“模擬血液の作製および流動特性測定”、日本機械学会関西学生会学生員研究発表講演会講演前刷集 p.2-7 (2010.03.15)
6. 大鷲泰三、坂本貴一、石田弘樹、秋口俊輔、安東嗣修、脇坂知行、八賀正司、榎伸司、“MLDV法によるサーペンタイン流路内の血流の流速測定”、日本機械学会北陸信越支部第47期定時総会講演論文集 No.107-1 pp499-500 (2010.03.10)、富山大学
7. 石田弘樹、小林大、安東嗣修、白川博樹、秋口俊輔、榎伸司、上山幸司、八賀正司、“マイクロマルチLDVによる微小血管の3次元イメージング”第70回応用物理学会学術講演会 (2009-9月)
8. 小林大、安東嗣修、石田弘樹、秋口俊輔、白川博樹、八賀正司、“In-Vivo血管血流三次元マッピング高精度計測”、平成20年度電気関係学会北陸支部連合大会論文集、pp.212 (2008.09.13)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：レーザドップラー血流測定方法及び装置

発明者：八賀正司、石田博樹、秋口俊輔、白川博樹、安東嗣修、倉石泰

権利者：国立高等専門学校機構・富山大学

種類：特許

番号：JP2008/073245

出願年月日：2008年12月19日

国内外の別：外国

〔その他〕

ホームページ等

読売新聞、2011.1.17掲載、“極細血流、レーザで測定…富山大・富山高専”

(<http://www.yomidr.yomiuri.co.jp/page.jsp?id=35618>)

6. 研究組織

(1)研究代表者

八賀 正司 (HACHIGA TADASHI)

富山高専・商船学科・教授

研究者番号：80123305

(2)研究分担者

安東 嗣修 (ANDOH TSUGUNOBU)

富山大学大学院・医学薬学研究部・准教授

研究者番号：50333498

秋口 俊輔 (AKIGUCHI SHUNSUKE)

富山高専・電子情報工学科・助教

研究者番号：50462130

石田 弘樹 (ISHIDA HIROKI)

富山高専・電子情報工学科・准教授

研究者番号：50413761

(H22年4月～H23年3月：連携研究者)

脇坂 知行 (WAKISAKA TOMOYUKI)

大阪市立大学大学院・工学研究科・客員教授

授

研究者番号：10089112

(H21年4月～H22年3月：1年間)

(3)連携研究者

倉石 泰 (KURAIISHI YASUSHI)

富山大学大学院・医学薬学研究部・教授

研究者番号：80111970