

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 9 月 24 日現在

機関番号：12102
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21659336
 研究課題名（和文）偏光を用いた脳神経機能・組織の術中顕微鏡下イメージングの開発

研究課題名（英文） Intraoperative neuroimaging using polarized microscopy

研究代表者

鮎澤 聡 (AYUZAWA SATOSHI)
 筑波大学・医学医療系・講師
 研究者番号：20400682

研究成果の概要（和文）：光学的特徴による脳神経機能や術中の組織の弁別を目的として、偏光を用いた脳神経外科手術中の術中顕微鏡イメージングを検討した。ラットを用いた実験では、反射照明を用いた偏光顕微鏡では、複屈折の差や変化で脳神経組織や機能を捉えることは困難であった。一方、余分な散乱光を軽減することにより、表面より深部の情報が可視的に得られた。これらの結果から、実際の術野で用いることができる顕微鏡を試作した。

研究成果の概要（英文）：We investigate the intraoperative neuroimaging using polarized microscopy in order to discriminate structure and function of the brain tissues. It was difficult to detect the birefringence of the tissues with reflected illumination. By reducing the scattered light came from the surface of the tissues, the characteristics beneath the surface could be obtained. Based on these results we made a polarized microscopy for clinical use experimentally.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 2,000,000 | 0 | 2,000,000 |
| 2010 年度 | 600,000 | 0 | 600,000 |
| 2011 年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 150,000 | 3,250,000 |

研究分野：脳神経外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：偏光・複屈折・術中イメージング

1. 研究開始当初の背景

近年、脳神経外科手術において各種の術中イメージング・機能モニターリングが行われており、適切かつ安全な手術に寄与している。手術用顕微鏡の機能も、従来からの形態の観察のみならず、特定の色素や薬物を投与して脳血流や脳腫瘍を蛍光観察するなど多様化している。一方、脳神経機能に関しては主に電気生理学的手法で行われており、光学的な形態イメージングとは原理的な解離がある。

神経興奮に光学的変化を伴うことは以前より知られているが、内因性の発光が微弱であることなどから、これまで臨床への応用は少なかった。また神経活動に伴う電位変化を光学的手法を用いて観察するにしても、光感受性色素を生体投与する必要があり臨床での応用には問題があった。一方、発光以外の光学的変化として、複屈折の変化がある。複屈折とは結晶や液晶において、屈折率を二つ持つ特性であり、すなわちこれを秩序性の指標

として置き換えることができる。神経興奮に伴う複屈折の変化は、光学的変化量としては比較的大きいことが知られている。

我々はこれまで、生体の機能を秩序生成として捉え、特にタンパク質の振動領域であるミリ波領域の振動の関与を臨床的・理論的に検討してきた経緯があり、生体におけるこれらの動的な秩序構造を複屈折を用いて可視的にかつライブでイメージングすることを検討していた。観察スケールとして比較的マクロな領域における共同性・秩序性の観察が目的であり、脳神経組織においてこのような観察ができれば、手術支援として臨床的に有用であると思われる。そのような背景から、本研究では偏光を用いた脳神経機能・組織のイメージングの可能性を検討した。

偏光を用いた方法として、結晶や液晶の観察に偏光顕微鏡が古くから用いられている。これは結晶や液晶が有する複屈折の様子が秩序構造として観察される。近年、蛍光観察の普及に伴い偏光顕微鏡は生物学ではあまり用いられなくなったが、偏光顕微鏡は、複屈折をライブかつ無染色で観察できるという大きな特徴をもつ。これが臨床において生かされれば、複屈折という光学的特徴から術中に組織を弁別できる可能性があり、腫瘍からの神経組織の剥離や腫瘍境界の同定に有用であると考えた。また、複屈折という特徴のみならず、照射光に偏光を用いることでコントラストを上げて組織の特徴の弁別が容易になる可能性があり、これも手術顕微鏡に生かすことができると考えた。

偏光による組織の弁別はレーザーを用いた光断層撮影では皮膚や眼底で可能であることが示されているが、これが肉眼的に広い領域でかつ鏡視下でどこまで可能かを明らかにする必要があった。

2. 研究の目的

偏光を用いて生体の持つ複屈折および脳神経機能変化に対応する複屈折の変化を同定するための方法を検討する。また、それらが脳神経外科手術支援として応用可能かどうかを検討する。さらに、複屈折という指標以外に、偏光を用いた観察の臨床的有用性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 偏光を用いた生体組織・脳神経組織の観察

①小生物を用いた検討：生物の持つ弱い複屈折を観察する適切な方法を検討する。ミジンコを生きた状態で偏光顕微鏡(Zeiss Axioimager POL)でクロスニコル法(アナライザーとポラライザーを直交させることで、複屈折を呈した部位を観察する方法)を用いて観察した。複屈折が明瞭に観察される条件

を、特に波長板の挿入角に注目して検討を行った。また、透過照明・反射照明での検討を行った。

②ラットを用いた検討：ラット末梢神経(坐骨神経)および大脳皮質において、反射照明を用いて同様の検討を行った。

③上記①②において、通常の白色光を用いた場合と偏光を用いた場合との見え方の違いについて比較検討した。

④従来の手術用顕微鏡に偏光板などを装着することで、臨床的に有益な偏光観察が得られるかについて検討した。

(2) 偏光を用いた脳神経活動の同定

上記で設定した条件をふまえて、高感度ハイスピードカメラ(MiCAM02,Brainvision)を用いて、頭蓋骨を菲薄化させたラットの大脳の運動感覚野を人工呼吸器下に偏光・反射照明を用いてクロスニコル法にて測定し、光量の変化を測定した。また、坐骨神経に電気刺激を加えた場合について、刺激に同期させて加算平均処理を行い、光量の変化を検討した。解析には専用のソフトウェア(BV-ANA, Brainvision)を用いた。

(3) (1)・(2)の結果を踏まえて、実際の脳外科手術で用いることのできるプロトタイプの顕微鏡を試作した。

4. 研究成果

(1) 偏光を用いた生体組織・脳神経組織の観察

①ミジンコを偏光顕微鏡で透過照明を用いてクロスニコル法で観察すると、複屈折する組織が認められた。波長板(鋭敏色板)を通常の方法である45度で挿入すると、干渉色を呈して観察された。波長板の挿入角を変えて比較すると、45度ではなく7度程度の小さな挿入角でより明瞭なコントラストを得ることができた(図1)。この結果はNewton et.al(1995)の報告と同様であった。複屈折を呈する部位の多くは筋組織であることが解剖学的に予測された。これらは、通常の白色光を用いても弁別されるものもあったが、一部にまったく弁別できず、しかも既存の解剖図譜にも未記載の部位があった。したがって、これらの部位の解剖学的同定をHE染色を用いて行ったところ、細い筋組織であることが明らかになった。複屈折は固有複屈折・構造複屈折・流動複屈折などに分類される。筋組織が呈していた複屈折の性状に関しては今後の検討を要するが、ミジンコを脱水状態にすると輝度が低下することから、構造複屈折の要素が大きいことを予測している。

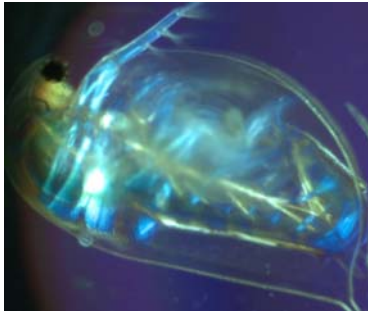


図1 ミジンの偏光顕微鏡写真。

②ラットの末梢神経を偏光顕微鏡・反射照明を用いたクロスニコル法で観察した。その結果、神経表面に明らかな複屈折性は同定できなかった。試料表面の散乱光の影響を少なくする目的で波長の長い近赤外光も試験的に用いてみたが、同様の結果であった。これらの結果から、実際の術野で反射照明を用いて複屈折性の変化を鏡視下に同定するのは困難であると結論した。

一方、反射照明を用いた観察で、通常の白色光を用いた像と、偏光を用いてクロスニコル法で観察している像とを比較すると、後者の方が表面の微細な血管や神経の輪状の構造が明瞭に観察された(図2)。これは、神経周膜による散乱光が軽減されたためと考えられた。しかしながら立体感は悪くなり、全体にベタっとした像を呈した。



図2 ラット坐骨神経の顕微鏡写真。左：白色光反射照明、右：偏光反射照明・クロスニコル法にて撮影。

③ラットの大脳表面を偏光・反射照明を用いたクロスニコル法で観察をした。その結果、明らかな複屈折は同定されなかった。絞りを強くかけて焦点深度を深くし、ごく小さな視野で観察すると、僅かに複屈折によると思われる色調の変化が得られ、大脳皮質の複屈折性を観察している可能性があったが、小さな視野であるためラットの呼吸による体動により持続的な観察が不可能であり、複屈折かどうかの確認ができなかった。また、この方法では広い領域での観察という当初の目的が達成されない。

⑤通常の手術用顕微鏡に偏光板などを装着することで、②のような観測が可能かどうか、試行錯誤的に検討を行った。その結

果、既存の手術用顕微鏡では、偏光フィルターを挿入すると光量が不足することがわかった。また、手術用顕微鏡のような実体顕微鏡は偏光観測には不向きであることがわかった。このため、別に単眼鏡筒を用いて観察機器を組み立てることとした。

(2) 偏光を用いた脳神経活動の同定

安静時の計測、刺激時の計測(加算)とも、有意な変動は観察できなかった。これは、(1) - ③の結果からも、散乱光の影響で複屈折の測定が困難であることから予測された。さらに呼吸・刺激に伴う体動の問題が計測に影響していると思われる。神経興奮に伴い複屈折変化があることは確かであると思われ、今後実験系の工夫が必要であるが、いずれにしても脳神経外科手術での応用は困難であると結論した。

(3) 術野用偏光観測のプロトタイプを試作 複屈折の変化の直接的観察は反射照明を用いた方法では困難であると考えたが、(1) - ②の結果から、術野での組織の弁別に有用である可能性があった。これを明らかにするため、単眼の鏡筒を使った顕微鏡を試作した。単眼を用いることで、通常の手術顕微鏡に求められている立体視は犠牲にしたが、光学の特徴が強調されることに重点をおき、さらに直視ではなくモニターでの観察とした。照明の方法には、同軸落射照明・斜照明・リング照明などを試みたところ、リング照明が比較的偏光の特徴を生かせるようであったため、試作機にはそれを搭載した。

試作した機器を図4に示す。鏡筒にはアルミ製で軽量ズーム鏡筒(DZ101、ユニオン光学)を用い、アームに装着して使用可能である。術野での試用のために270cmの作動距離を確保し、倍率は3~20倍で観察可能である。ハイビジョンビデオカメラ或はビデオカメラを装着して観察した。



図3 試作機の写真

試験的に観察した人の皮膚を図3に示す。白色光での観察は、皮膚表面の肌理はよく観察される。同じ部位を偏光・反射照明・クロス・ニコル法で観察すると、肌理は不明瞭になるがその下の色調や血管が観察されるようになる。今回150Wのハロゲン照明を用いて観

察したが、やや光量が不足していると思われ、光量を上げるとより特徴が明瞭になると予測された。



図 4 試作機で撮影した人皮膚（指関節部位腹側）の写真。左：白色光反射照明、右：偏光反射照明・クロスニコル法にて撮影。

(4) 今後の展望

今回の検討では、脳神経外科手術で展開されるような、比較的広い範囲での脳神経組織の複屈折性を反射照明を用いて観測することは困難であった。また、複屈折性の違いや変化による組織弁別あるいは機能測定にも至らなかった。複屈折を用いた機能計測そのものが否定された訳ではないため、レーザー光を用いた計測などが今後の課題となると思われる。一方、偏光照明を用いて余分な散乱光をカットするという比較的簡易な方法で、より深部の情報を可視的に得ることが可能であることがわかり、こちらは手術への臨床応用が可能と思われた。偏光は角度の扱いが複雑であり実際の術野でどこまで耐えられるか、という問題があるが、今後作成した試作機を用いて検討を進める予定である。近赤外光・単色光での検討も今後の課題としたい。

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)

[学会発表] (計 1 件)

① 鮎澤聡、偏光を用いたミジンコのライブ観察、第 56 回日本応用動物昆虫学会、2012. 3. 28、奈良

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鮎澤 聡 (AYUZAWA SATOSHI)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：20400682

(2) 研究分担者

松下 明 (MATSUSHITA AKIRA)
筑波大学・最先端サイバニクス研究コア・研究員
研究者番号：80532481