

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5月15日現在

機関番号：53203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700521

研究課題名（和文） 血流速画像による悪性黒色腫の識別法および装置の開発

研究課題名（英文） New diagnostic technique for malignant melanoma by blood flow velocity imaging

研究代表者

石田 弘樹 (ISHIDA HIROKI)

富山高等専門学校・電子情報工学科・准教授

研究者番号：50413761

研究成果の概要（和文）：悪性黒色腫を血流速情報に基づき可視化するための装置として、マイクロ・マルチレーザードップラー血流計を開発した。実験用マウスに癌細胞移植後9日目、腫瘍内部および周囲の血管の血流速は、癌細胞の急激な増殖にともなう酸素、栄養素、代謝を担うため癌細胞移植前の二倍になった。移植後12日目、腫瘍内の新生血管の可視化に成功した。マイクロ・マルチレーザードップラー血流計は、悪性黒色腫を識別するための有用なツールである。

研究成果の概要（英文）：We have developed a micro multipoint laser Doppler velocimeter (μ -MLDV) for in-vivo visualization of melanoma tumor based on flow velocities. Malignant transformation results in a sudden rapid increase in growth along with the formation of new blood vessels to supply oxygen, nutrients, and metabolites to cancer cells. The blood flow velocity in a lesion more than doubled 9 days after transplantation. After 12 days, we observed the formation of new blood vessels in the tumor. The μ -MLDV is potentially a useful diagnostic technique for distinguishing benign and malignant tumors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：画像診断システム、腫瘍診断

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫（メラノーマ）は、皮膚の疾患のなかで最も死亡率が高いが、リンパ節転移前に腫瘍を適切に切除できれば完全に治癒できる。よって、早期発見が極めて重要であ

る。初期の段階においてメラノーマは、黒子“いわゆるホクロ”と色や形状が酷似している。一般的にダーモスコープと呼ばれる拡大鏡を用いて診断するが、その識別には多くの経験を要する。よって、定量的な識別方法が求

められてきた。

腫瘍内部および周囲の血流は、癌細胞の急激な増殖に必要な、酸素、栄養、および代謝を担うため活発であると考えられている。1982年、Solesvikらは初めてメラノーマ腫瘍内部の新生血管を調べ、血管径の分布を明らかにした[1]。1989年、Srivastavaらは、超音波ドップラー流量計を用いて腫瘍の大きさとドップラー信号の関係を調べた[2]。1999年、Stückerらは、レーザードップラー血流量画像装置を用いてメラノーマおよび黒子のイメージングを行い、両者を相対的に比較した[3]。これらの先駆的な研究により、血流はメラノーマを識別する際の有用な情報であることは明らかである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、メラノーマの定量的な識別方法の確立である。指針は、癌腫瘍の成長にともなう血管新生を発見することである。この新生血管の流速は、癌細胞の急激な増殖に必要な酸素や栄養素を供給するため正常な血管よりも速いと考えられる。一方、黒子はメラニン細胞やヘモグロビンの濃度が高いことが原因であり、黒子内の血流速は正常な皮下の血流速とあまり変わらないものと推測できる。この血流速の違いにより両者を識別することが可能になると考えている。現在、微小な血管の流速を絶対的な速度として計測でき、かつ血管の走行を非侵襲で画像化できる装置は無い。本研究では、血流速に基づいた血管の走行を2次元もしくは、3次元で画像化（血流速画像）できるマイクロ・マルチレーザードップラー血流速計（ μ -MLDV）を開発し、血流情報よりメラノーマを特徴付ける。

3. 研究の方法

研究期間内で実施した研究内容を以下に示す。(i) μ -MLDVを設計・製作した。(ii) 人工流路を用いて本装置の検定試験を行った。(iii) 実験用マウスを用い皮下の細血管の血流速画像の取得を試みた。(iv) 動物モデルとしてマウスの耳にメラノーマを定着させた。この動物モデルを計測し、メラノーマの血流速画像の取得を試みた。(vi) メラノーマの成長に伴う血流速の変化や、腫瘍内の新生血管の生成過程などの詳細なデータの収集を行った。

尚、動物実験は、富山大学の動物実験に関する規定に基づき適切に実施された。また、実験は麻酔下で行い動物への苦痛軽減に努めた。

4. 研究成果

既存のレーザードップラー血流計は、ビーム状のレーザー光を皮膚に照射し、赤血球の

動きによりドップラーシフトした反射光と入射光の干渉により発生するビート信号の周波数から流速値を求める手法を採っている。この手法は、無数の血球からのドップラーシフトを同時に受光するため（いわゆる多重散乱光）、光強度の周波数分布は、ランダム過程に基づきおおよそ $1/f$ の形になる。周波数分布の期待値から平均流速が求められる。しかし、受光した光の大部分が皮膚や組織からの単なる反射光である。さらに、計測機器自体がもつノイズもおおよそ $1/f$ の形になる。従って周波数分布の期待値から平均流速を求めると多くの誤差を含むことになる。

仮に赤血球ひとつひとつの速度を計測し、その平均値を平均流速とすれば、計測精度、感度ともに飛躍的に向上すると思われる。研究代表者は、この指針のもと新たなレーザードップラー血流計の開発を行ってきた。実現のためには、1) 小さな体積の測定領域を形成させること、すなわち高い空間分解能、2) 計測のサンプリング速度を向上させる、すなわち高い時間分解能、3) ドップラー干渉光を選択的に受光する、すなわちS/N比の飛躍的な改善、が必要である。

図1に μ -MLDVの光学系の概略を示す。その特徴は、前述したように(1) 高空間分解能(x-y方向 $100\mu\text{m}$)、(2) 高時間分解能(サンプリング速度 20MS/s)、(3) 血流速情報をもとに血管走行の2次元もしくは3次元の断層画像を取得、さらに(4) 2.0mm/s 程度の低流速まで測定可能、等が挙げられる。これらの能力は、近赤外波長($\lambda = 808\text{nm}$)のレーザービームを極薄いシートにして交差させることで実現している。この直線状の交差線が測定領域となる。この測定領域では、コヒーレント性を保ったレーザー光が干渉し干渉縞を形成しているため、特定の粒子が通過するとドップラー干渉光が発生する。この干渉光を光ファイバーアレイに集光させることで測定領域を同時計測(最大64チャンネル)できる。光ファイバーの直径は、 $125\mu\text{m}$ であるため最大で 8.0mm ($125\mu\text{m} \times 64$ チャンネル)の線上を同時計測できる。さらに、レーザーの交差線を電動ステージにより左右に走査することで2次元の速度分布を取得できる。スリットや偏光板は、皮膚や組織からの迷光を取り除き干渉光を選択的に受光するための役割を果たす。

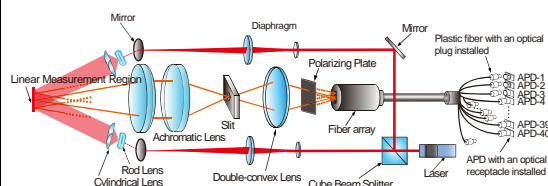


図1. μ -MLDVの光学系

計測例として図2に内径1.5 mmのガラス管に水を流した場合の2次元の速度分布を示す。水には、シーディング粒子として直径10 μm のポリエチレン粒子を濃度0.5 mg/litterの割合で混ぜてある。尚、血液の場合は、赤血球自身がシーディング粒子の役割を果たす。ポアズユ流れ特有のパラボリックな速度分布が観測された。図3は、水を送り込んだシリンジポンプの流量の指示から求めた平均流速と $\mu\text{-MLDV}$ で計測した平均流速を比較したものである。挿入図は、スペクトルデータの一例。両者の計測値は、完全に一致しており、その誤差(最確値からの偏差)は3%以内である。

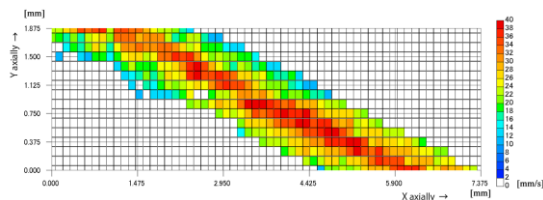


図2. ガラス管内の水の速度分布

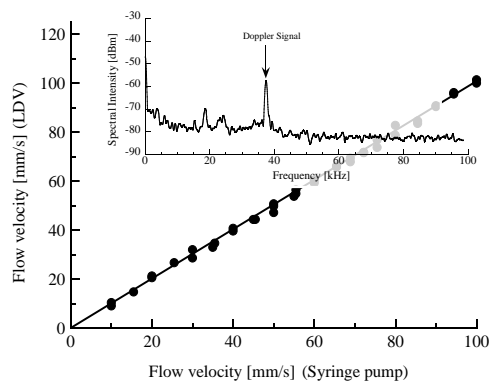


図3. $\mu\text{-MLDV}$ の精度検定結果

$\mu\text{-MLDV}$ において赤血球が有効なシーディング粒子として機能するか否かについては未検討である。そのため、図2で示した実験と同様にガラスチューブの中に血液を流し、速度分布を計測することを試みた(図4参照)。血液中には、体積占有率40~45%の血球を含んでおり、その粘性係数は一定ではない。よって、厳密には水のようなニュートン流体としての挙動とは異なる。速度分布は、おおよそパラボリックになった。ただし、強い粘性によりガラス壁面付近の流速は非常に遅く、水での速度分布とは、様子が異なることがわかった。興味深い点としてガラス管内にある小さな突起(*印の位置)により、流線が大きく蛇行する様子が見取れる。この現象も血液の強い粘性に起因したものであると考えられる。本実験により $\mu\text{-MLDV}$

においても赤血球が有効なシーディング材として機能することが確かめられた。

臨床での応用を考慮した場合、計測時間は重要である。測定時間を短縮化するため装置は全て自動化した(レーザーを走査させる精密ステージの制御など)。しかし、処理するデータ容量は膨大であり、例えば、図4の場合、データ容量は約2 Gバイトである。このデータの記録時間に大半を費やすが記録時間を含め計測時間は、約10分程度である。今後もコンピュータの高性能化が進めばさらに計測時間が短縮可能である。

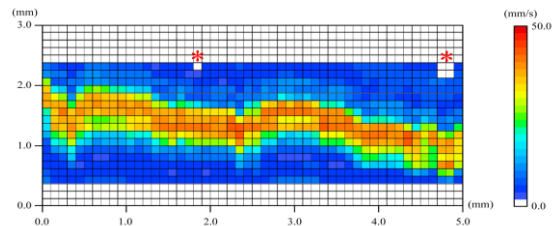


図4. ガラス管内の血液の速度分布

癌腫瘍の成長ともなう新生血管の直径は、大きくても100 μm 程度と予想される。よって、細血管が画像化できるか否かについて検証した。細動脈および細静脈の流速は大きく異なる。ヒトの場合、細動脈の流速は20 mm/s程度、細静脈の流速は3 mm/s程度であることが一般的に認識されている。既存のレーザードップラー血流計では、細静脈を計測することはできない。しかし、本研究の目的からすれば、細静脈の流速を計測し、かつ画像化する能力は不可欠である。マウスの耳の細静脈を対象として実験を行った。

図5は血管でのスペクトルの典型例である。挿入図が血管の写真である。血管の直径は、太い部分で200 μm 程度である。写真にマークした測定ポイント(a), (b), (c)とスペクトル(a), (b), (c)は対応している。測定ポイント(a), (b)ではドップラー干渉光のものと思われる明瞭なピークが、周波数1.6 kHzおよび2.1 kHzの位置に確認できた。これを流速に換算すると2.2 mm/sおよび2.9 mm/sに相当する。ポイント(c)でのスペクトルには、明瞭なピークが確認できない。写真からもわかるようにポイント(c)に対応する血管は極細く、そこでの流速は $\mu\text{-MLDV}$ の検出限界を超えていると考えられる。

図6(a)は、図5の写真の破線で囲んだ範囲をスキャンした2次元の血流速画像である。深さ方向は、皮膚から極浅い位置($z = 0.1$ mm)において測定した。血管走行は、写真と良く一致している。ただし、血流速画像から見た血管のサイズは、実際の写真より太く見える。この要因は、動物は麻酔下ではあるものの呼吸による微動があるために測定中

に僅かながらブレが生じるためである。前述したようにポイント(c)に対応した血管は、検出限界を超えているため血流速度画像には写し出されなかった。これらの結果より μ -MLDV の検出限界は 1.8 mm/s 程度であることがわかった。また、マウスの細静脈（直径約 200 μ m）の流速は 2.5 - 2.8 mm/s であることがわかった。この血流速度は、ヒトの場合とほぼ同じである。

図 6 (b) は、図 5 と同じ測定領域を深さ ($z = 0.5$ mm) を変えてスキャンしたものである。血管走行は、大きく様変わりしている。肉眼では確認できない内部の血管が可視化できたと解釈できる。研究代表者の知る限りにおいて細静脈を非侵襲で可視化した報告はこれまでにない。

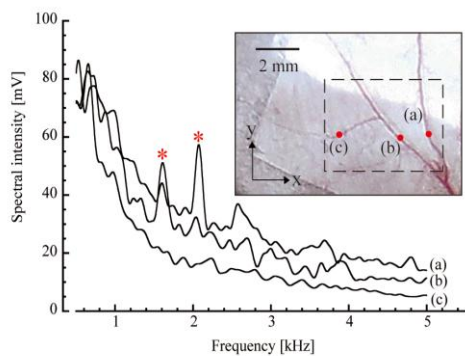


図 5. 細静脈から得られたスペクトルデータ、挿入図は計測した血管の写真

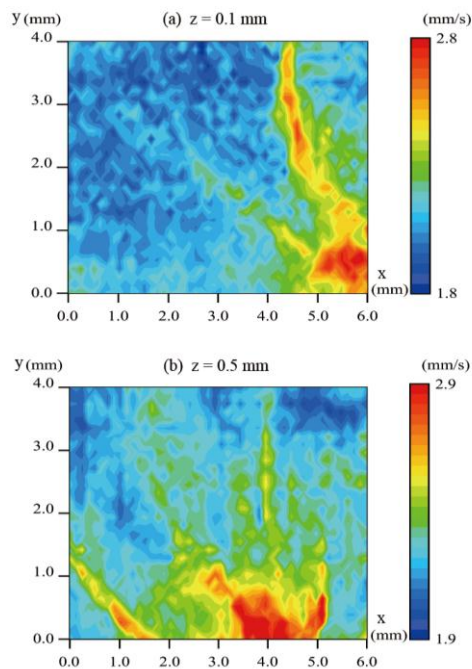


図 6. 細静脈の血流速度画像, (a) $z = 0.1$ mm, (b) $z = 0.5$ mm

実験用ヘアレスマウス (Male c57BL/6) の耳に B16-BL6 メラノーマ細胞を移植した。時間経過を観察した写真を図 7 に示す。メラノーマ細胞は、3 本に分岐した細血管(#1-3)の#2 の分岐点に移植した。9 日目まで腫瘍が肉眼で確認できた。16 日目になると腫瘍は大きく成長し耳の大部分に広がっており癌細胞が完全に定着したことがわかる。写真の破線で囲まれた領域を μ -MLDV によりスキャンした。

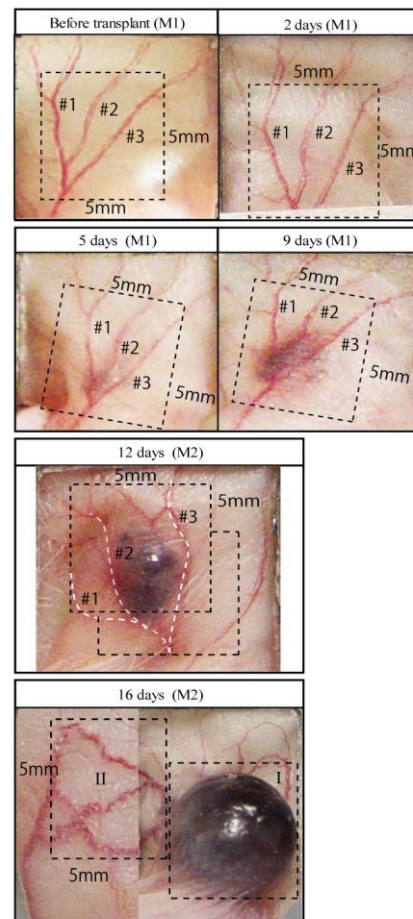


図 7. メラノーマ細胞移植後の時間経過

図 7 に対応する血流速度画像を図 8 に示す。図 8(a)からわかるように移植前の細血管での血流速度は遅く 2.0 m/s 前後であった。実験時は、麻酔により拍動が 600 回/分から 250 回/分まで低下しているので正常時はよりも速いと予測できる。移植後 2 日後 (図 8(b)), 全体的に若干流速が増したように見えるが移植箇所には顕著な変化は観られなかった。移植 5 日後 (図 8(c)), 明らかに移植箇所の流速は増し 3.0 m/s を越えている。また、分岐する手前の血流も増していることがわかる。移植 9 日後 (図 8(d)), 5 日目で観られた傾向はより顕著になり移植箇所の流速は増し 4.0 m/s を越えた。注目すべき点は、腫瘍から先

の分岐への血流が非常に少ないことである。移植から12日後(図8(e)),直径3mm程度まで成長した腫瘍内部に新生血管の走行を確認した。移植から16日後(図8(f)),腫瘍内部の新生血管での血流速は遅くなった。むしろ腫瘍の周囲の細血管の流速が速いことがわかった。

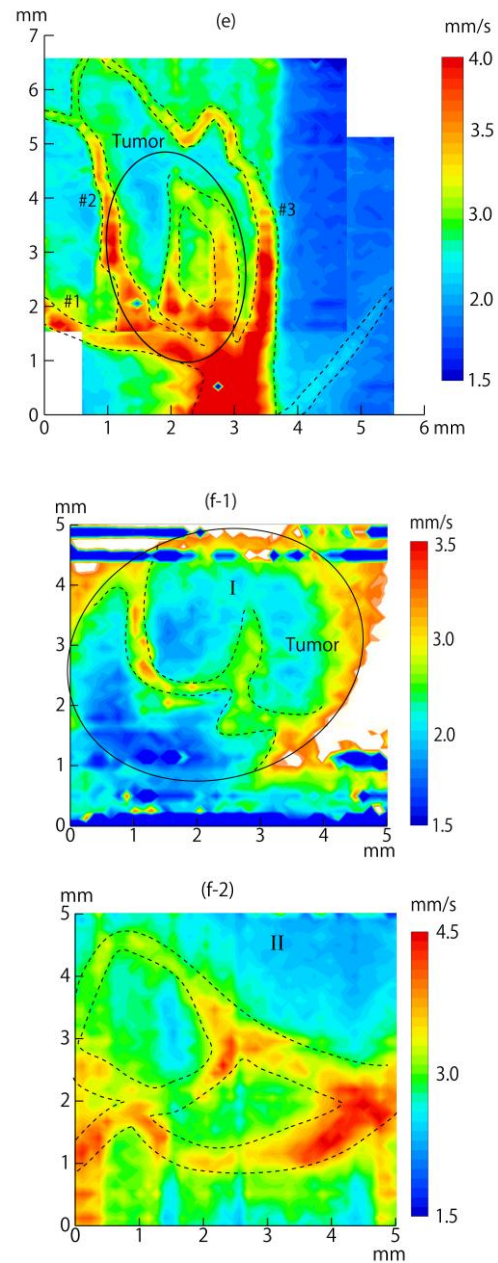
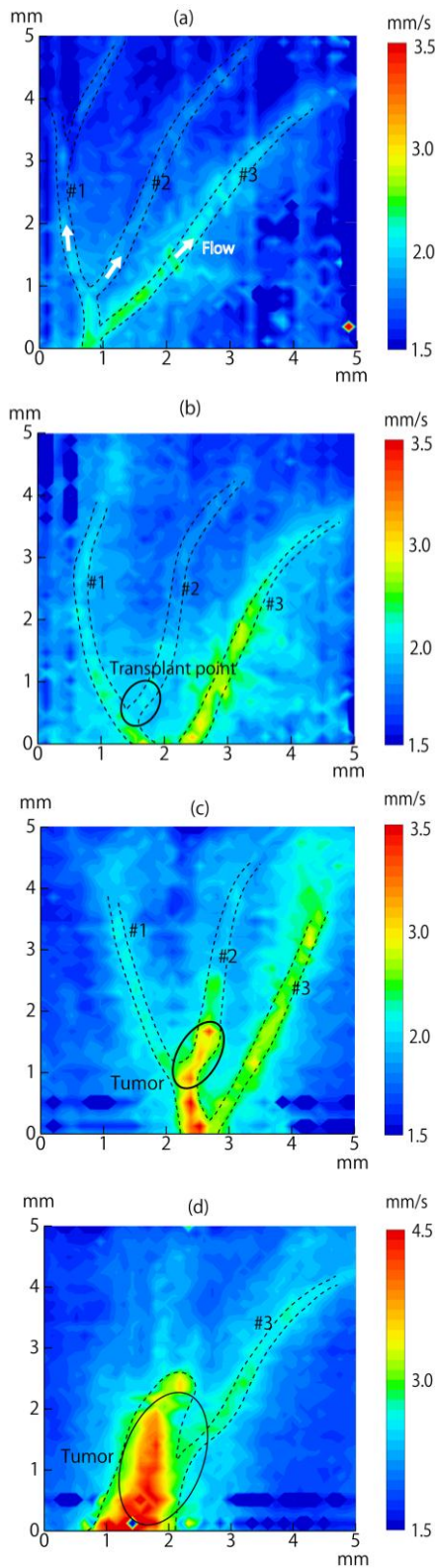


図 8. メラノーマの成長にともなう血流速画像の変化。(a)移植前, (b)移植2日後, (c)5日後, (d)9日後, (e)12日後, (f)16日後。

本研究において初めて、メラノーマの成長にともなう周囲の血流速の変化および血管走行の変化を計測することに成功した。また、腫瘍内部の新生血管をダーモスコピー以下の手法により可視化することに成功した。血流速の急激な変化、新生血管の有無は、メラノーマを識別する際の重要な判断基準になると考えられる。

参考文献

[1] O. V. Solesvik, E. K. Rofstad, and T. Brustad, Br. J. Cancer 46, 557 (1982).
 [2] A. Srivastava, L.E. Hughes, J.P.

Woodcock, and P. Laidler, Br. J. Cancer 59, 89 (1989).

[3] M. Stücker, I. Horstmann, C. Nüchel, A. Röchling, K. Hoffmann, and P. Altmeyer, Clin. Exp. Dermatol. 24, 107 (1999).

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4件)

① S. Akiguchi, H. Ishida, T. Andoh, T. Hachiga, T. Shimizu, Y. Kuraishi, H. Shirakawa, and K. Ueyama, Measurement of blood flow velocity in a model of stenosis in vitro and in mesenteric vessels in vivo using non-invasive micro multi laser Doppler velocimetry, Measurement Science and Technology, 査読有, vol. 23, 045702 (1)-(8) (2012).

[doi:10.1088/0957-0233/23/4/045702](https://doi.org/10.1088/0957-0233/23/4/045702)

② H. Ishida, T. Andoh, S. Akiguchi, T. Hachiga, M. Ishizuka, T. Shimizu, H. Shirakawa, and Y. Kuraishi, Noninvasive In-vivo Measurements of Microvessels by Reflection-type Micro Multipoint Laser Doppler Velocimeter, Japanese Journal of Applied Physics, 査読有, vol. 51, 032701 (1)-(5) (2012).

[DOI: 10.1143/JJAP.51.032701](https://doi.org/10.1143/JJAP.51.032701)

③ H. Ishida, D. Kobayashi, H. Shirakawa, T. Andoh, S. Akiguchi, T. Wakisaka, M. Ishizuka, and T. Hachiga, Reflection-type micro multipoint LDV for measuring velocity distributions in blood vessels, Review of Scientific Instruments, 査読有, vol. 82, 076104 (1)-(3) (2011).

[doi:10.1063/1.3609864](https://doi.org/10.1063/1.3609864)

④ H. Ishida, T. Andoh, S. Akiguchi, H. Shirakawa, D. Kobayashi, Y. Kuraishi, and T. Hachiga, Blood flow velocity imaging of malignant melanoma by micro multi-point laser Doppler velocimetry, Applied Physics Letters, 査読有, vol. 97, 103702 (1)-(3) (2010).

[doi:10.1063/1.3486678](https://doi.org/10.1063/1.3486678)

6. 研究組織

(1)研究代表者

石田 弘樹 (ISHIDA HIROKI)

富山高等専門学校

電子情報工学科・准教授

研究者番号：50413761