

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 24 日現在

機関番号：53203

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650279

研究課題名（和文） 皮膚組織細血管の3次元画像計測によるメラノーマとホクロ及び火傷深度の判定

研究課題名（英文） Distinguish malignant melanomas and benign nevi based on the blood flow velocity of new blood vessels in tumor with blood flow velocity 3D images

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を医療診断分野への臨床応用を目指し、皮膚癌モデルマウスを用いて癌原発巣の早期発見を行うべく、メラノーマの成長に伴う腫瘍周囲の新生血管の流速変化を詳細に調べた。モデル動物の耳部に移植した皮膚癌部位の血管の流速情報を持った2次元画像を取得し、癌細胞の増殖に伴い血流速が増加することを後方散乱型MLDVによって確認できた。また、血液流れのない血管の流速情報は流速の値がゼロに近いことから、血管の流速情報を持った2次元及び3次元画像は皮膚癌と黒子(ホクロ)の診断に有効である。

研究成果の概要（英文）：

We intend to develop a laser Doppler velocimetry (LDV) system for in-vivo imaging that can measure blood flow velocity, that can generate tomograph of blood vessels with information in the depth direction and that has a high spatial resolution to enable individual microvessels. We measured microvessels of an experimental mouse, and succeeded in imaging the blood flow velocity in microvessels as 2 or 3 dimensional images. Finally, we demonstrate that using MLDV of blood vessels is useful for diagnosing malignant melanomas by comparison with visual diagnosis by dermoscopy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：Bio-fluid Mechanics, LDV, Blood Vessel, Blood Flow Velocity, Multi Point

1. 研究開始当初の背景

(1)

従来のレーザードップラー血流装置（1本のレーザービーム+1個の光検出器）は1点の計測を走査し⇒二次元血流分布を得ることはできるが、血流速度の方向成分と深さ方向の詳細な情報が無く、測定部位を特定できない⇒三次元画像取得不可能

(2)

申請者らは、受光系にマイクロ光ファイバアレイと送光系に近赤外線レーザーシート

光を応用した新型多点同時レーザードップラー血流速度測定方法及び装置を用いて、マウスの細血管の血流速度分布を測定し、測定領域を走査することにより、マウスの細血管の血管三次元イメージングとその流速情報の取得に成功した。

(3)

申請者らは、前方散乱型多点同時レーザードップラー血流速度測定方法及び装置を用いて、マウスの耳に移植した悪性黒色腫（メラノーマ）の移植後1日目と14日後の血流画

像を計測し、メラノーマに起因した新生血管の血流速度は、正常な皮膚における毛細血管でのそれよりも非常に速いことを明らかにし、悪性腫瘍に伴う腫瘍血管の血流速度二次元画像を取得している。

2. 研究の目的

レーザーのシート光と光ファイバーアレイを活用した多点同時計測レーザードップラー血流測定方法及び装置は、以下のような特徴がある。

○生体内 (in vivo) の血流速を高次元空間分解能で直接測定できる。

○血管の有効内径と、血管内の血流速分布とその時間変動の計測が可能。

○細血管の平均血流速の三次元マッピングも可能。

(1) この血流測定装置を応用して、皮膚組織の血管血流情報の三次元イメージング測定を完全非侵襲で行う。

(2) 「火傷の深度を判定」及び「悪性黒色腫を識別」する完全非侵襲な新規診断法の開発を行う。

(3) 非接触・非侵襲で、火傷した皮膚のどの深さまでの血管が助かっているかを数値的に判断、及びメラノーマとホクロの判定・診断を行う。

3. 研究の方法

(1) ヘアレスマウスに B16-BL6 メラノーマ (皮膚癌細胞) を耳に移植することにより、モデル動物を作製する

(2) 後方散乱型・血流情報装置を用いて皮膚がん細胞の血管血流情報の三次元イメージング測定を行い、全層皮膚下での血管血流速の三次元分布を求め、流速情報を持った血流速三次元画像を求める。血管新生が盛んにおこなわれている座標情報を評価・解析。

(3) 皮膚組織に移植したメラノーマ腫瘍血管の成長過程における形態学的評価→悪性黒色腫の悪性度の分類・病態解析を行う。

(4)

マウス背中下の皮膚組織下の血液流れのある血管とない血管の流速情報を測定する。

目的①火傷の範囲と火傷の深度の評価を行い、皮膚組織下の血管が助かっているかを数値的に解析する為

目的②皮膚癌細胞と黒子との違いを判定・診断・評価する為

理由①皮膚癌細胞の周囲には、腫瘍周囲の新生血管の流速変化がある

理由②黒子 (ホクロ) の周囲には、血液流れのある血管は無い。

4. 研究成果

(1) マウス組織血管血流 In-vivo 二次元画

像と3次元画像

マウスの耳組織にある血管を対象にした実験結果の一例を図1に示す。写真の破線で囲まれた部分が計測範囲である。同時測定チャンネル数を40チャンネル、測定線の長さを5mm (0.125mm×40チャンネル=5mm) とし、深さ方向 $z = 0.25$ mmの深度においてステージを0.125mm毎に24回 (0.125mm×24回=3mm) 動かし、

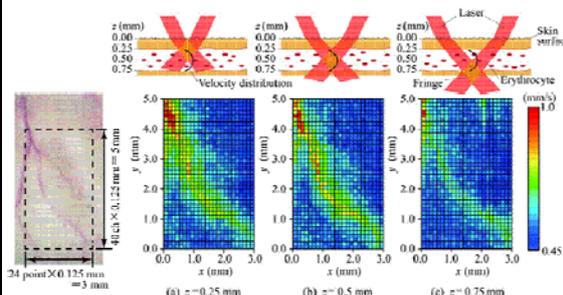


図1 Blood flow velocity images of microvessels in the mouse ear

2次元画像を取得した。さらに、深さ方向に0.25mmずつ2回移動することにより2次元画像を3枚取得した。図1(a)は深さ深度 $z = 0.25$ mmにおける血管の流速情報を持った2次元画像、図1(b)は $z = 0.5$ mmにおける2次元画像、図1(c)は $z = 0.75$ mmにおける2次元画像を示す。各図の上のイラストは血管と測定領域の関係を示している。

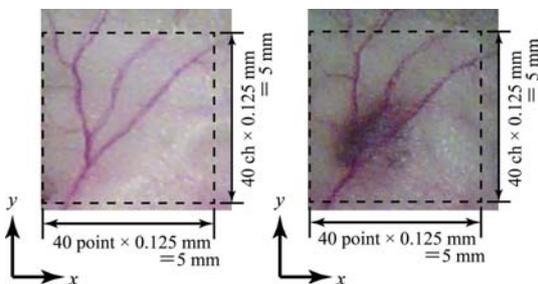
ここで、 $z=0$ は皮膚の表面である。図1の2次元画像において、 $z = 0.25$ mmの場合より $z = 0.5$ mmの場合の方が、流速が速くなっており、また、 $z = 0.75$ mmの場合では流れはほとんど観られないことから、血管中心の深度は $z = 0.5$ mm 近辺に位置していると考えられる。このことより深さ方向の情報が取得できていると思われる。ただし皮膚組織によるレーザーの散乱により z 方向の実質的な分解能を見積もることは難しい。

図1の左の写真から判断して、血管径は0.3mm程度である。血管中心の深度 z が0.5mmであったとすると、 $z = 0.25$ mmや $z = 0.75$ mmで測定した箇所に血管が無いことになるため、それらの深度で測定した血流速は0mm/sとして測定されなければならない。しかし、0mm/sとはなっていない。理由は、レーザーが交差して干渉縞が生ずる測定領域が、血管径と比較して広い領域を占めており、深度が0.25mmや0.75mmの場合における測定領域の一部が血管内に入り込んでいるためである (図1の上のイラスト参照)。測定深度を $z = 0.5$ mmとした場合についても、測定領域の広さの影響を受けて、空間的な平均処理を施した結果として数値が得られることになる。

つまり、図1で、黄色であれば、その箇所の血流速は約0.75 mm/sと読み取れるが、実際には、0.75 mm/s よりも速いはずである。血流は、赤血球の挙動によってニュートン流体とは異なる速度分布を有するため、扱いが難しいが、MLDVで得られる測定結果と数値解析によって予測される速度分布を、合成することで、定量的にも信頼性の高い血流速が求められるようになると考察している。

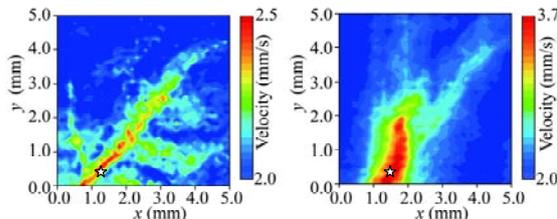
(2) マウスに移植した皮膚癌の観察

実験用マウス (Mail c57BL/6) の耳部に B16-BL6 メラノーマ細胞 (皮膚癌) を移植し、皮膚組織下血管の血流情報を持った In-vivo 血管血流速 2次元画像取得の実験を行った。図2にマウス1の耳部における測定部位の拡大写真を示す。図2(a)は皮膚癌植え付け前におけるマウス1の耳部の写真、図2(b)は皮膚癌植え付け後9日目におけるマウス1



(a) Before transplant (b) 9 days after transplantation

Fig.2 Malignant melanoma growth in the mouse1 ear

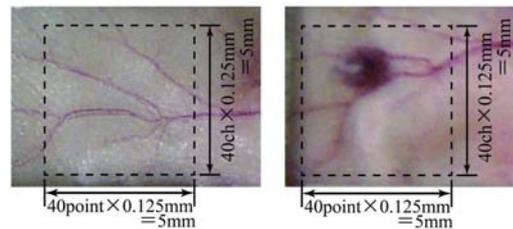


(a) Before transplant (b) 9 days after transplantation

Fig. 3 Blood flow velocity images of malignant melanoma transplanted to the mouse1 ear

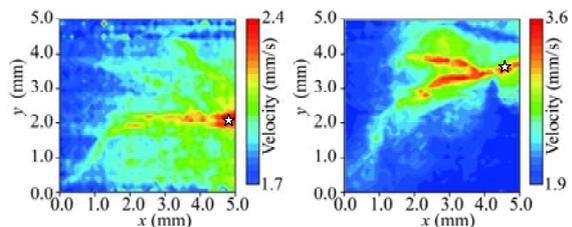
の写真を示す。測定実験を行うときは、麻酔を使ってマウスが動かないようにしている。麻酔下では、拍動は240~250回/minで、その影響が測定される血流速に影響を与えるが、全ての実験において同じ方法でマウスを扱い、測定された血流速データについて同様の時間平均処理を行っている。同時測定チャンネル数を40チャンネル、測定線の長さを5mm (0.125mm×40チャンネル=5mm)とし、自動ステージを40回 (0.125mm×40ポイント=5mm) 移動し0.125mm移動する毎

にデータを取得、2次元画像を取得した。図3(a)はマウス1の皮膚癌植え付け前における血管の流速情報を持った2次元画像、図3(b)はマウス1の皮膚癌植え付け後9日目における2次元画像を示す。2次元画像は1秒間の平均流速を各色で表示し、コンター化したものである。図3における星印を付けた血液流入部付近では、それぞれ速度が最も速く、図3(a)においては2.5 mm/s、図3(b)においては3.7 mm/sであった。癌化した皮膚組織付近では、健全な場合に比べて、約1.5倍流速が速くなることを測定することができた。



(a) Before transplant (b) 14 days after transplantation

Fig.4 Malignant melanoma growth in the mouse2 ear



(a) Before transplant (b) 14 days after transplantation

Fig.5 Blood flow velocity images of malignant melanoma transplanted to the mouse2 ear

図4(a)は皮膚癌植え付け前におけるマウス2の耳部の写真、図4(b)は皮膚癌植え付け後14日目における写真を示す。図5(a)はマウス2の皮膚癌植え付け前における血管の流速情報を持った2次元画像、図5(b)はマウス2の皮膚癌植え付け後14日目における流速情報の2次元画像を示す。図5にも血液流入部付近に星印を付けている。図5(a)の星印付近の流速は2.4 mm/s、図5(b)においては3.6 mm/sであり、マウス2に関しても癌化した皮膚組織付近では、健全な場合に比べて、約1.5倍流速が速くなった。

図5の測定は、図3の測定に対してマウスの耳を90°回転してある。LDV法はフリッジの縞に対して直角方向の速度成分のみの速度を測定できる。図3および図5は共にx軸方向の速度成分のみの流速情報を持った2次元画像を示しているため、図において上下方向流れが横方向流れに比べ強く表現され

ているが、共に植え付け前と比較して腫瘍付近の血管の血流速度が速くなっていることが明確に判断できる。これは、血液が癌細胞の急激な増殖に必要な酸素や栄養素を供給しているためと考えられる。

(3) 血液流れのある血管とない血管の流速情報

図 6 はマウス背中中の皮膚を切除して、背中中の皮膚組織下の血管を示す。図 6(a)の部分も図 6(b)の部分も、両方とも同じような血管に見えるが、図 6(a)は通常の血流のある血管、図 6(b)は皮膚を切除しているため、血管の根本が切断しており、血管内に血液が流れていない部位となっている。図 6(a)の血管には血流があり、図 6(b)の血管に血流がない。ここでは図 6 に示す皮膚裏の二か所の血管について計測を行い、比較を行った。図 6(c) に通常血管の計測結果を、図 6(d) に血液が流れていない血管の計測結果をそれぞれ示す。測定は縦方向の 1 ラインを $40 \text{ ch} \times 125 \mu\text{m} = 5.0 \text{ mm}$ と設定し、この計測線を横方向に $125 \mu\text{m}$ ずつ移動させながら計測を行った。図中の点線が血管走行を模擬的に表したものである。また、青色から赤色に表示が変わる毎に速度が速い状態を表している。図 6(c) では、図 6(a)において血管が存在する

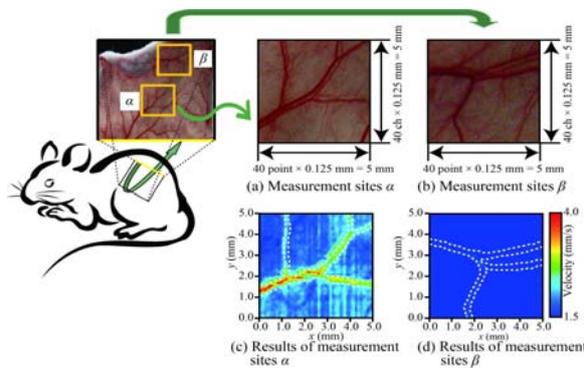


Fig.6 Blood flow and blood vessels in the subcutaneous tissue

場所に血液が流れていることが計測されている。それと比較し、図 6(d)では、図 6(b)において血管が存在する場所で血流が計測されていない。このように血液流れのない血管の流速情報は流速の値がゼロに近いことが分かる。

(4) 結言

モデル動物の耳部に移植した皮膚癌部位の血管の流速情報を持った 2 次元画像を取得し、癌細胞の増殖に伴い血流速度が増加することを後方散乱型 MLDV によって確認できた。また、血液流れのない血管の流速情報は流速

の値がゼロに近いことから、血管の流速情報を持った 2 次元及び 3 次元画像は皮膚癌と黒子(ホクロ)の診断に有効であると考えられる。

なお、本動物実験は、富山大学動物実験委員会の承認を得ており、動物実験指針に従って適切に実施された。また、実験は麻酔下で行い、動物への苦痛軽減に努めた。

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)

高田洋吾, 寺西恒宣, 石田弘樹, 秋口俊輔, 安東嗣修, 八賀正司

査読付論文

レーザードップラー流速分布測定装置の生体計測への応用 (皮膚癌の早期血流画像診断)

日本機械学会論文集 (B1 編) 印刷中 (2013)
TRANS-JSME-D-13-00156R2

<http://www.jsme.or.jp/transact.html>

(2)

S. Akiguchi, H. Ishida, T. Andoh, T. Shimizu, Y. Kuraishi, Y. Yasuda, T. Hachiga

査読付論文

Application of a Micro Multipoint Laser Doppler Velocimeter for in vivo evaluation of subcutaneous blood flow

IEEJ Trans. SM. Vol. 137.No. 7 (2013)

in press.

<http://www.iee.or.jp/index-eng.html>

(3)

H. Ishida, T. Andoh, S. Akiguchi, T. Hachiga, M. Ishizuka, T. Shimizu, H. Shirakawa, Y. Kuraishi,

査読付論文

Noninvasive In-vivo Measurements of Microvessels by Reflection-Type Micro Multipoint Laser Doppler Velocimeter,

Japanese Journal of Applied Physics, (2012) Vol. 51, 032701 (1)-(5)

DOI 10.1143/JJAP.51.032701

(4)

S. Akiguchi, H. Ishida, T. Andoh, T. Hachiga, T. Shimizu, Y. Kuraishi, H. Shirakawa, K. Ueyama

査読付論文

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,
(2012) Vol. 23, 045702 (1)-(8)
DOI 10.1088/0957-0233/23/4/045702

(5)

H. Ishida, T. Hachiga, T. Andoh, S. Akiguch
査読付論文

In-vivo visualization of melanoma tumor
microvessels and blood flow velocity
changes accompanying tumor growth
Journal of Applied Physics, (2012) Vol. 112,
104703(1)-(7)
DOI 10.1063/1.4766815

[学会発表] (計 10 件)

①

坂本 純一
レーザードップラー流速分布測定装置の生
体計測への応用(皮膚癌の早期血流画像診
断)
2013年3月9日
福井大学
日本機械学会 [No. 137-1] 北陸信越支部
第50期総会・講演会

②

一島 耀
GPUを用いた in vivo マウス腸間膜血管血流
の3次元イメージング
2013年3月9日
福井大学
日本機械学会 [No. 137-1] 北陸信越支部
第50期総会・講演会

③

藤井祥平
後方散乱型レーザードップラ流速分布測定装
置による皮膚癌への検証
2012年11月3日
月岡温泉白玉の湯 華鳳(会議室) 新潟県
発田市
日本伝熱学会北陸信越支部 2012年度秋季
セミナー

④

安江陽一
後方散乱型レーザードップラー流速分布装
置を用いた皮膚組織下皮膚癌の細血管と血
管内血流速度のイメージング
2012年9月12日
金沢工業大学(石川県)
日本機械学会 2012年度年次大会

⑤

藤井祥平
レーザードップラー流速計を用いた血流速度
分布のイメージング
2012年9月1日
富山県立大学
平成24年度電気関係学会北陸支部連合大会

⑥

四柳和也
皮膚癌部位の2D血流画像を求めるための血
管血流画像計測装置の応用
2012年5月12日
富山大学
日本伝熱学会北陸信越支部 総会・春季セミ
ナー

⑦

安江陽一
レーザードップラ流速分布測定装置の改良と
生体計測への応用
2012年3月10日
金沢工業大学(石川県)
日本機械学会 北陸信越支部 第49期総会・
講演会

⑧

安江陽一
後方散乱型レーザードップラ流速分布測定装
置の改良と生体計測への応用
2011年11月19日
若狭湾エネルギー研究センター(福井県)
日本伝熱学会北陸信越支部 秋季セミナー,
pp. 7-8, 2011

⑨

安江陽一
後方散乱型レーザードップラー流速分布測定
装置の開発(血管血流の3次元マッピング)
2011年9月7日
富山大学 五福キャンパス(富山県)
平成23年電気学会電子・情報・システム部
門大会

⑩

安江陽一
後方散乱型レーザー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
2011年5月14日
富山高専 本郷キャンパス(富山県)
日本伝熱学会北陸信越支部春季セミナー

[その他]

ホームページ等
八賀正司 教員情報
<http://www.nc-toyama.ac.jp/info/03.html>
八賀正司 研究シーズ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八賀 正司 (ハチガ タダシ)

富山高等専門学校・商船学科・教授

研究者番号：80123305

(2) 研究分担者

安東 嗣修 (アンドウ ツグノブ)

富山大学・医学薬学研究部 (薬学)・准教授

研究者番号：50333498

清水 忠道 (シミズ タダミチ)

富山大学・医学薬学研究部 (医学)・教授

研究者番号：70260396

石田 弘樹 (イシダ ヒロキ)

富山高等専門学校・電子情報工学科・准教授

研究者番号：50413761

秋口 俊輔 (アキグチ シュンスケ)

富山高等専門学校・電子情報工学科・准教授

研究者番号：50462130