

《様式7》

第32回助成研究完了報告書

令和3年3月31日

一般財団法人 東海産業技術振興財団
理事長 豊田 鐵郎 様

住 所 浜松市東区半田山 1-20-1

申請者

氏 名 三浦 克敏 印

助成金交付決定番号 令和2年 3月 4日付 第 4 号
研究テーマ「 超音波顕微鏡の臨床診断への応用 」

上記助成研究は、令和 3 年 3 月 31 日に完了いたしましたので、別紙書類を添えて報告いたします。

記

1. 研究助成金収支明細書
2. 研究の実施内容および成果に関する報告
 - (1) 研究テーマ
 - (2) 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要
 - (3) 実施内容および成果の説明

《様式B》

研究テーマ	「 超音波顕微鏡の臨床診断への応用 」		
研究責任者	所属機関名	浜松医科大学	
	官職又は役職	教授	
	氏名	三浦 克敏	メールアドレス kmiura@hama-med.ac.jp
共同研究者	所属機関名	本多電子株式会社	
	官職又は役職	研究部 部長	
	氏名	小林 和人	
	所属機関名	浜松医科大学	
	官職又は役職	助教	
	氏名	田村 和輝	

(令和元年度募集) 第32回 助成研究 完了報告書

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1,000字程度)

本研究は超音波を用いて人体組織計測を行う新たな画像診断法の確立を目指し、臨床診断に応用できる高性能な超音波顕微鏡の開発を目標とした。以下に本助成により得られた成果と今後予想される効果を示す。

はじめに、臨床診断に応用可能な高性能超音波顕微鏡に必要な超音波振動子の条件を割り出すために、現行型超音波顕微鏡を用いて、人体組織標本の計測、特に腎動脈及び肺組織の加齢性変化を観察した。一般的に加齢により動脈は硬化し、血圧の上昇をもたらす。動脈硬化とは動脈内壁に脂質が溜まり、粥腫の形成、線維化、石灰化が現れる病態である。解剖例の腎動脈を計測し、動脈の主要な部分である中膜の構造変化に伴って中膜平滑筋の弾性が低下していくことを証明した。機能の変化は構造の改変と結びつき、腎動脈の外方への拡張

や内膜の肥厚と関連した。

肺についても手術標本を用いて加齢性変化を検討した。気管支、血管、肺胞の音速を年齢別に比較し、加齢と共に気管支、動脈壁、肺胞の音速が低下することを証明した。この変化は気管支や肺胞の拡張、細動脈硬化の亢進と関連することを明らかにした。

次により高い空間分解能が要求される細胞の計測を行った。材料として培養癌細胞や臨床で実際に採取された液状癌細胞を用いた。培養細胞への抗がん剤の投与では濃度が高くなるにつれ、また培養期間が長くなるにつれて、音速は上昇、減衰と厚みは低下することを証明し、これらの変化がアポトーシスや分裂再生に関連することが示唆された。また臨床で採取された癌細胞に対して障害作用を持つタンニン酸や酢酸への浸漬、マイクロウェーブ照射をして超音波顕微鏡で障害を受ける細胞像の変化を追跡した。酸やマイクロウェーブの照射により、音速と減衰が上昇し、厚さは低下することを発見した。

上記の現行型超音波顕微鏡を用いた多数の組織・細胞を計測した知見をもとに計測上の問題点を整理し、超音波顕微鏡の心臓部とも言える超音波振動子の改良品の試作を行った。この改良試作品を用いた解析では、これまでの音速に基づいた細胞観察ではなく、インピダンスを計測することでがん細胞を生きた状態で経時的に観察可能であることが確認できた。

以上の研究から改良型振動子を用いた超音波顕微鏡が癌細胞に対する抗がん剤や温熱化学療法の効果を正確に予測でき、さらに疾患の病態解明や予防法の開発にも利用できることがわかり、論文として発表をおこなった（PLOS ONE 2020 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234759>、Atherosclerosis open access 2021, 6: 2）。

現在、超音波顕微鏡のさらなる解像度や操作性の向上を図り、臨床への実用化を進めている。

2. 実施内容および成果の説明（A 4 で、5 ページ以内）

超音波を用いた音速計測に よって血管の老化の機序の解明

加齢により動脈には脂質が溜まり、粥腫の形成、線維化、石灰化が現れる、いわゆる動脈硬化と言われる状態になる。この動脈硬化が進むことで血管は硬く脆くなると考えられている。今回、解剖例 64 名の腎動脈を材料として、現行型の超音波顕微鏡と光学顕微鏡を用いて、弾性と加齢の関係を計測した。

超音波を用いて年齢別に腎動脈断面の音速を計測し、同時に血圧や壁の厚さや広がり、2 箇所の大動脈の弾性との関連を検討した。動脈は内側から内膜、中膜、外膜の 3 層構造をとるが、このうち中膜の弾性の低下によって、血管は外側に拡張し、内膜は血管の弱さを補うために厚くかつ硬くなっている可能性が示唆された(図 1)。また中膜の弾性低下は動脈の構造変化と関連し、外側に拡張性の肥大と相関した。腎動脈の平滑筋の弾性低下は胸部大動脈の弾性低下と正の相関があった。動脈硬化を発症した被検者では、内腔が狭く、壁が硬くなることと血圧上昇が相関した。コラゲナーゼ消化による経時的な音速像の変化を若年と高齢者と比較すると、若者ほど蛋白分解の影響を受けやすく、老年になると、蛋白分解の影響が少ないことを示した(図 2)。この分解反応によって中膜平滑筋が断裂し、加齢と共に弾性が低下していくと推測された。この解析の成果は国際誌に発表した(論文 1)。本研究により、超音波顕微鏡を用いることにより、血管の組織から老化の程度を測定可能になり、さらに分解能を上げることにより予防法の開発等に利用できる可能性が示された。

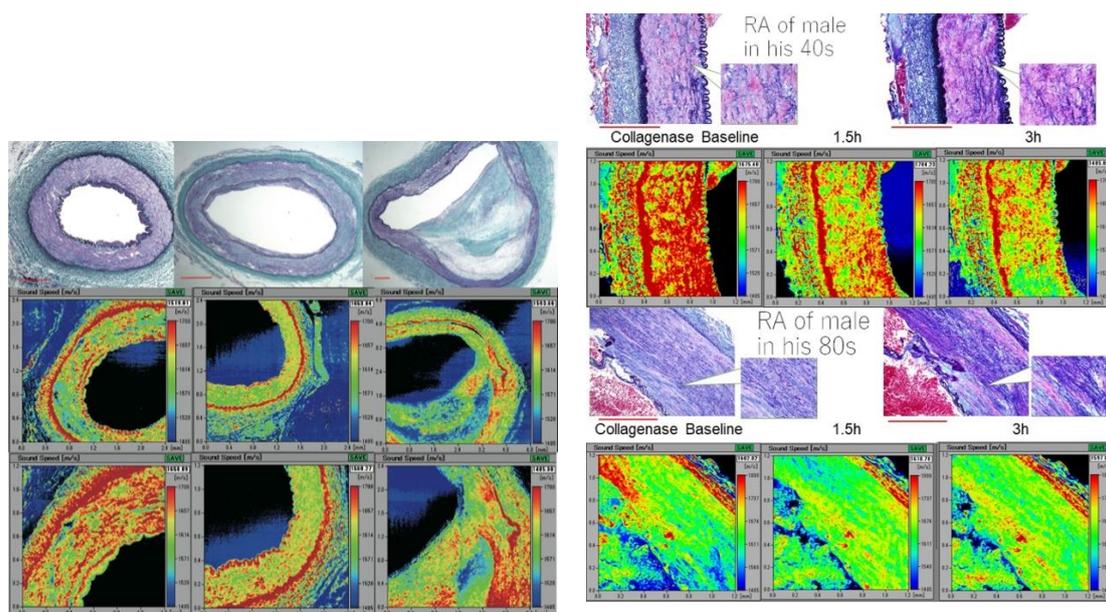


図1 加齢に伴う腎動脈の超音波像と光学顕微鏡像（左から若年、中年、高齢者）
 図2 年齢によるコラゲナーゼ処理に対する反応の違い（上図:若年、下図:高齢者）

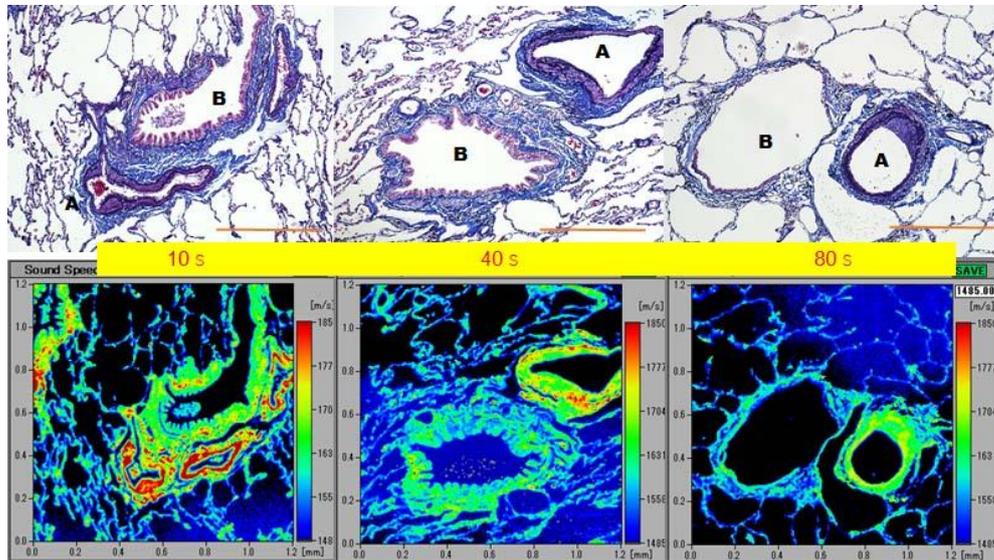


図3 加齢に伴う肺の組織像（上図；光学顕微鏡、下図；超音波場像）左から若年者（10代），中年者（40代），高齢者（80代）。

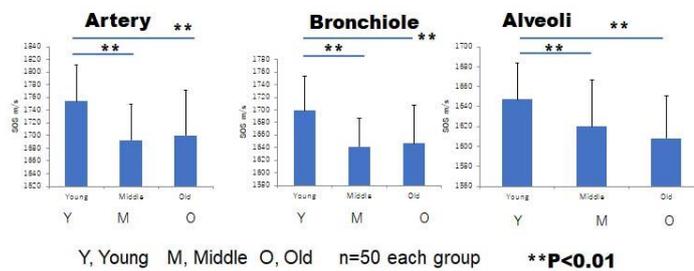


図4 動脈、気管支、肺胞の年齢別の音速値

音速を指標とした肺の老化推定

さらに、人の肺組織を年齢別に比較して、気管支、血管、肺胞の老化を現行型超音波顕微鏡で解析した。図3は年齢の異なる試料の肺構造音速を示す。また、図4は10代、40代、80代の摘出試料（気管支、動脈壁、肺胞）の音速の関係を示すが、若年者に比べて中年および高齢者では音速値が有意に低下することを発見した。さらに、この変化は気管支や肺胞の拡張、動脈硬化の亢進と相関していた。また、コラゲナーゼ処理を行ったところ、若年や中年では有意に音速が低下したが、高齢では有意な低下を認めなかった。よって、高齢者の肺

は既に蛋白分解が進み、コラゲナーゼ処理における分解が起こりにくい状態になっていると推測された。

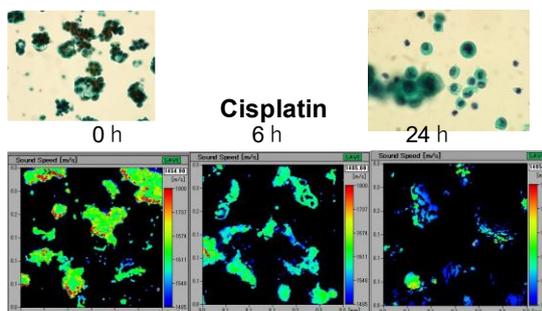
この結果は現在英文誌である **Scientific Reports** の査読結果を待っている状態である。

がん細胞への抗がん剤効果の超音波観察

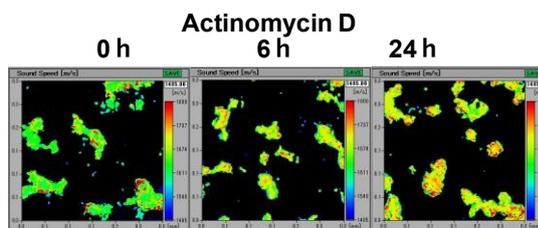
続いて、抗がん剤の一種であるシスプラチンを培養がん細胞に添加し、現行型超音波顕微鏡を用いて薬効を検出できるか検討した。濃度が高くなるにつれ、音速は上昇、減衰は低下、厚みは低下した。シスプラチン投与後 2 日から 5 日にかけての経時的な変化では音速の上昇、減衰の低下、厚みの低下を認めた。これらの数値の変化はアポトーシス/壊死と分裂再生の形態の変化に連動していた。この結果は細胞変性や再生の状態を超音波顕微鏡で計測される数値で比較できることを示している。腫瘍の種類によって抗がん剤の効果には差があることが分っており、音速、減衰、厚さの変化を計測することで抗がん剤の効果を予測する手段としての超音波顕微鏡が応用できる可能性を示した。これらの結果はグラスゴーで Web 開催された国際病理学会で発表した（2020 年 12 月）。

さらに、臨床で得られた細胞診検体と培養癌細胞を用いて各種の抗がん剤による細胞変性像を現行型超音波顕微鏡で調べた。

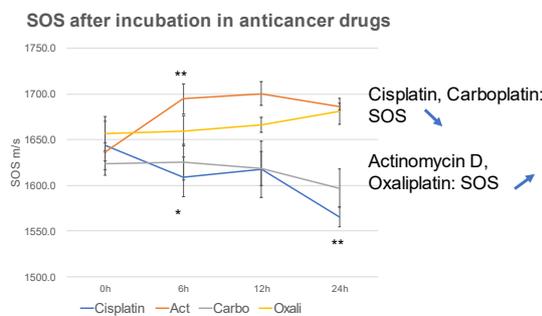
シスプラチンでは経時的に音速の低下が認められ、逆にアクチノマイシン D では音速が増加した(図 5)。一方で光学顕微鏡像では細胞変性の評価が困難であった。この成果により、音速を比較することで細胞の変性を客観的に評価することが可能であることが示された。



(a)



(b)



(c)

図 5 抗がん剤投与による音速像の変化とグラフ

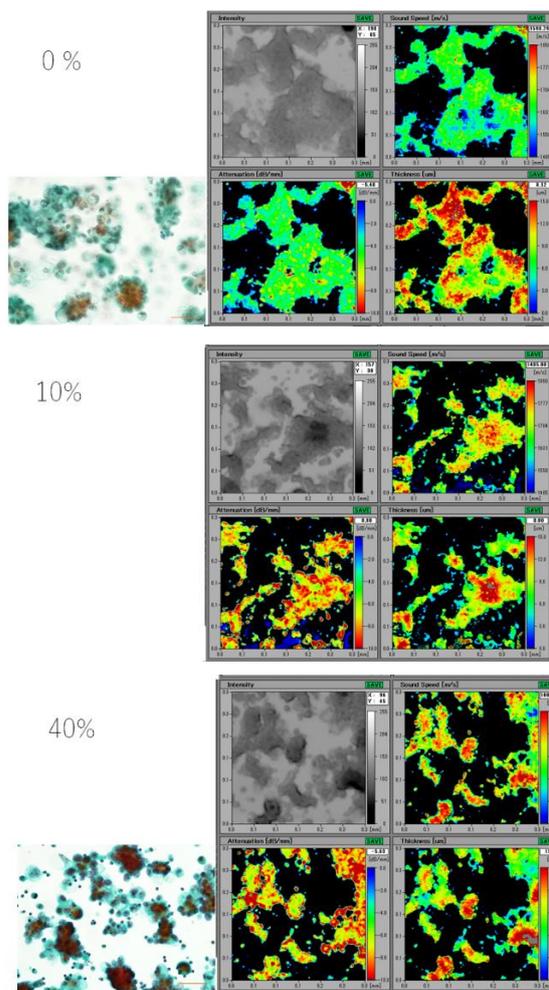


図 6 癌細胞へのタンニン酸効果。上段から下段にかけて濃度を高くした結果

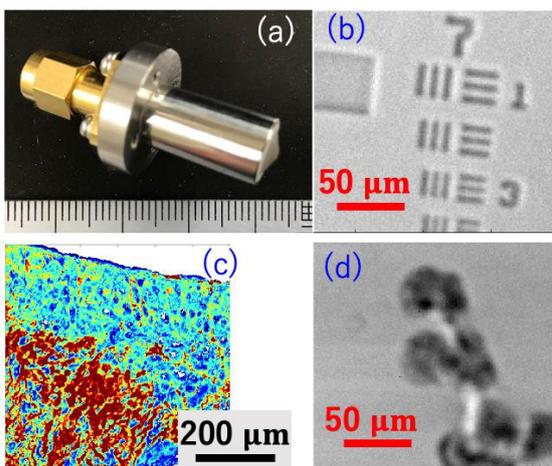


図 7 試作した超音波振動子の計測例。(a) 外観 (b)空間分解能評価 (c) 薄切試料（心筋梗塞）の計測 (d) 膵がん細胞の計測

酸や熱の癌細胞への効果

本検討は酸やマイクロウェーブを使って細胞に障害を発生させ、障害の程度を超音波顕微鏡で評価可能かを検討した。酸としてタンニン酸と酢酸を用いた。タンニン酸はタンパク質を凝集させ、皮革の鞣しに用いられる酸である。腺癌細胞を濃度の異なるタンニン酸液につけ、室温 10 分間反応させ、音速像の変化を比較した (図 6)。濃度が高くなるにつれ、音速、減衰は有意に上昇し、厚みはやや減少したが有意差は認めなかった。以上の結果は蛋白凝集の効果を細胞レベルで客観的に評価できたことを示した。酢酸やマイクロウェーブによる熱効果も同様の蛋白凝集の効果を評価できた。超音波の音速や減衰値を比較することで酸や熱による細胞障害の程度が数値で評価できることを示した。

ライブ・音速計測両用振動子の試作

これまでの生体組織と細胞の計測を通して、細胞が生きた状態でも細胞の計測が可能であることは超音波顕微鏡の臨床的な応用に不可欠であると考えた。細胞が生きた状態で機械物性を計測することはこれまでも行われてきたが、専用の超音波振動子を要した。超音波振動子における超音波振動子の役割は光学顕微鏡における対物レンズに相当するため、生細胞や薄切標本を観察する際には適宜最適なものを選ぶ必要がある。一方で、

超音波振動子は光学顕微鏡の対物レンズのように簡単に着脱・交換することは難しい。よって臨床的な視点では、一定以上の空間分解能を維持したまま、組織観察に一般的に使用する薄切試料、塗抹標本、培養細胞をはじめとする生の試料を同じ超音波振動子で評価できることが望ましい。これらの観点とこれまでの研究成果を踏まえて、改良型振動子を試作した。図7に試作した改良型超音波振動子と計測例を示す。空間分解能を評価した結果、薄切試料の計測に十分な空間分解能を維持していることを確認した。薄切試料および培養細胞の計測結果から、両計測で現行型を上回る十分な解像度の画像を取得できることを確認し、両用が可能であることを示した。

本研究課題の総括

抗がん剤、酸、熱などの外部の環境が細胞へ与える効果を音速、減衰、厚さの変化を追う超音波顕微鏡を用いることで、客観的に評価できることがわかった。今後、抗がん剤による化学療法や温熱療法の効果判定や予後推測に超音波顕微鏡を利用することが期待できる。また、本研究結果を基盤に改良型超音波振動子を試作した。本改良型振動子は、細胞を詳細に観察する音速計測とライブセルで計測する音響インピーダンスモードで両用可能で、本研究により両計測に耐えうる振動子を開発することができたと考えている。

国際会議及び論文発表一覧（査読中を含む）

1. [査読付き論文] Tunica intima compensation for reduced stiffness of the tunica media in aging renal arteries as measured with scanning acoustic microscopy（老化腎動脈における中膜の脆弱性を内膜が代償する一 走査型超音波顕微鏡を用いた計測）, Katsutoshi Miura; PLOS ONE (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234759>)
2. [査読付き論文] Histological and mechanical information based on biochemical alterations of cardiovascular diseases using scanning acoustic microscopy with proteinases: A novel technique for cardiovascular research（走査型超音波顕微鏡と蛋白分解酵素を用いた心臓循環疾患の生化学的変化に基づく組織学と機械的情報）, Katsutoshi Miura; Atherosclerosis open access 2021, 6 : 2
3. [査読中] Elasticity reduction and collagenase resistance of an aging lung measured with scanning acoustic microscope（走査型超音波顕微鏡を用いた加齢肺の弾性低下とコラゲナーゼ抵抗性）, Katsutoshi Miura; Scientific Reports
4. [査読中] Cellular imaging with structural and mechanical alterations against external stimuli using scanning acoustic microscopy（走査型超音波顕微鏡を用いた外部刺激に対する構造と機械的変化を伴う細胞の画像化）, Katsutoshi Miura, Yasuko Fukushi; Heliyon
5. [国際会議] Prediction of cellular damages to anti-cancer drugs by speed-of-sound（音速を用いた抗がん剤による細胞障害の予測） XXXIII Congress of the International Academy of Pathology 6-8 December 2020 - Virtual Meeting（国際病理学会）