

手術顕微鏡下 5-ALA 誘導蛍光計測による 脳腫瘍の術中同定に関する研究

66798 島谷 浩二

指導教員 佐久間 一郎 教授

5-Aminolevulinic Acid (5-ALA) turns into a fluorescent substance called ProtoporphyrinIX (PpIX) when administered to a living body. PpIX is especially accumulated in pathological lesion, excited by blue light and emits red fluorescence by which we can know the existence of tumors. The fluorescence can assist to detect malignant brain tumors intra-operatively and improve removal rate of tumors. Resection of malignant brain tumors has been conducted by using a surgical microscope specialized in fluorescence-guided surgery. However, tumor regions are recognized subjectively by the surgeon in fluorescence-guided surgery. In this paper, spectra of brain tissues were acquired in vitro, and promising optical filters were selected through the simulation utilizing these spectra. In addition, the method for detecting tumor regions using two dimensional histogram acquired from two intensity images was proposed, and this method was evaluated through fluorescent measurement of brain tissues in vitro and the result of the measurement was matched with the simulation results. Furthermore, regions in which fluorescent properties were uniform were detected by proposed method.

Key words : 5-Aminolevulinic acid, ProtoporphyrinIX, Brain tumor, Operating microscope, Fluorescence-guided surgery, Fluorescent measurement, Intensity image

1. 背景

悪性脳腫瘍の治療法として、外科的な腫瘍摘出手術は最も有効な治療法の1つであり、腫瘍の除去率の向上と患者の予後の改善には密接な関係がある。しかし、腫瘍の浸潤性によって周辺組織との境界部分が不明瞭であることなどが腫瘍の摘出率向上の妨げとなっている。

そこで、腫瘍選択性をもつ物質として、血液の生合成過程での副産物である 5-Aminolevulinic Acid (5-ALA) を用いた術中腫瘍同定の研究が行われている。5-ALA を術前に患者に投与すると腫瘍細胞内に集積し蛍光物質 (ProtoporphyrinIX : PpIX) に変化する。この蛍光により、術中に腫瘍部位を確認することが可能となる。腫瘍部位の大部分を摘出する手術の中盤では、広領域での腫瘍部位の確認が必要とされ、先行研究[1]では手術顕微鏡に光学計測機器を組み込み、蛍光ガイド下で摘出手術を行っている。この手術方式には術中にリアルタイムで腫瘍部位を確認し、疑わしき部位を摘出できるという利点がある。しかし、先行研究[1]の1つ目の問題点として、脳組織の自家蛍光を含めた蛍光特性を考慮して、光学フィルタの選定を行っているとは言い難く、腫瘍と非腫瘍を誤認識する可能性があることが挙げられる。2つ目の問題点として、術者があくまで主観的な見地で蛍光観察を行っていることが挙げられる。

2. 目的

以上の背景を踏まえ本研究の目的は、5-ALA を用いた蛍光画像計測を、手術顕微鏡下で行い腫瘍部位を同定するため、

- 脳組織の自家蛍光を含めた蛍光特性から、腫瘍部位を同定する上で使用する光学フィルタを選定すること
- 脳腫瘍摘出手術において摘出された脳組織サンプルの蛍光画像計測から、腫瘍同定手法を提案することとする。

3. 脳組織の蛍光特性に基づいた光学フィルタの選定シミュレーション

3. 1 脳組織の蛍光スペクトル計測

(a) システム構成

手術中に摘出された脳組織サンプルの蛍光スペクトルを取得するための計測システムを Fig.1 に示す。組織サンプルに励起光を照射し、光ファイバにより収集した蛍光を小型分光器で計測する構成となっている。

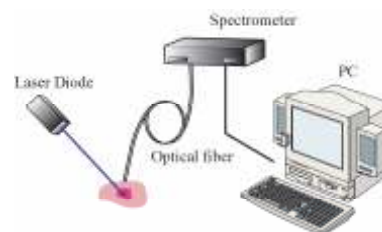


Fig.1 : Overview of the system for measuring spectra of brain tissues

(b) 計測結果

脳腫瘍の悪性度の Grading の内、最悪性である GradeIV の患者、計 9 症例の組織サンプルの蛍光

スペクトルの計測結果を Fig.2 及び Fig.3 に示す。Fig.2, Fig.3 はそれぞれ計測後、病理診断によって腫瘍及び非腫瘍と診断されたスペクトルであり、それぞれの内訳は腫瘍：22 個、非腫瘍：24 個であった。

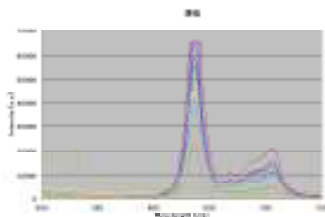


Fig.2 : Spectra of tumor tissues

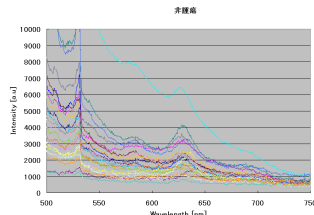


Fig.3 : Spectra of non-tumor tissues

計測結果から腫瘍組織と非腫瘍組織の蛍光特性についてまとめたものを Table.1 に示す。

Table.1 : Fluorescent property of tumor, non-tumor tissue

	630[nm]付近で 強度が最大の波長	強度 550~620[nm]	強度 620[nm]以降
tumor	636[nm]	小	大
non-tumor	628[nm]	大	小

3. 2 光学フィルタの選定シミュレーション

(a) シミュレーション方法

蛍光画像計測により腫瘍部位を同定する上で、望ましい光学フィルタの選定のため、前節にて計測した腫瘍組織と非腫瘍組織のスペクトルデータを用いてフィルタの選定シミュレーションを行った。組織サンプルのスペクトルデータにより得られる取得光量を用いたシミュレーションにより、フィルタを選定する手順を Fig.4 に示す。このシミュレーションは、スペクトル上でのある波長域の強度の積分値は、その波長域を透過するフィルタにより得られる蛍光画像の輝度に対応することを踏まえ行った。



Fig.4 : Process for selecting optical filter

シミュレーションでは先ず、先行研究[1]の場合と同条件である Cutoff 波長 550[nm]の LPF を用いた場合を検討した。また Table.1 で示した腫瘍

と非腫瘍の蛍光特性を踏まえ、550~620[nm]の波長帯域での取得光量と、630[nm]付近で腫瘍からのスペクトルの取得光量を非腫瘍と分離できるような中心透過波長が 636[nm]である BPF による取得光量を組み合わせた場合を検討した。つまりこの場合 2 枚以上の光学フィルタから得られる 2 つの波長帯域での取得光量を用いて、腫瘍部位を同定することを考えた。

LPF を用いた場合は、Cutoff 波長以降のスペクトル強度の積分値を取得光量とした。また BPF の場合は、BPF の透過特性を次式のローレンツ関数により近似し取得光量を計算した。

$$g(\lambda) = \frac{h \left(\frac{\omega}{2}\right)^2}{(\lambda - \lambda_B)^2 + \left(\frac{\omega}{2}\right)^2} \quad (1)$$

λ : 波長[nm]

h : スペクトル強度のピーク値[a.u.]

λ_B : 中心透過波長[nm]

ω : 全半値幅(FWHM)[nm]

加えて BPF の場合は取得光量を計算する前段階として、透過特性を一意に決定するため、全半値幅 (FWHM) を設定する必要がある。全半値幅は、腫瘍組織の蛍光スペクトルを重み付き最小 2 乗法を用いローレンツ関数によりフィッティングし、最適な値を決定した。フィッティングする波長範囲は、PpIX 蛍光由来のスペクトルのピークが存在する 620~650[nm]とした。

(b) シミュレーション結果

腫瘍組織のスペクトルデータ 22 個をローレンツ関数によりフィッティングし、全半値幅を算出した結果、全半値幅の平均値は 12.98[nm]であった。そのため、BPF による取得光量を計算する際は中心透過波長 636[nm]、全半値幅 12[nm]に設定した。

Cutoff 波長 550[nm]の LPF を用いた場合の各組織サンプルからの取得光量をプロットした結果を Fig.5 に示す。また、波長帯域 550~620[nm]の取得光量を横軸に、上述したように設定した透過特性を持つ BPF による取得光量を縦軸とし、各組織サンプルからの取得光量をプロットした結果を Fig.6 に示す。

(c) 考察

Fig.5 より先行研究[1]と同条件の LPF を用いると、580, 630[nm]付近において非腫瘍の自家蛍光が強い場合、強度の低い腫瘍と誤認識する場合が生じることが示された。

Fig.6 より BPF により得られる輝度画像の輝度値のみでは、腫瘍と非腫瘍を誤判別する輝度範囲が存在することがわかる。重要なことは、横軸の値である 550~620[nm]の波長帯域の取得光量を付加し両軸で輝度範囲を定めることで、ある輝度範囲を持つ領域に、病理診断で腫瘍である組織に特徴的であるスペクトルがみられるか、または非腫瘍に特徴的であるスペクトルがみられるか推定できることが示されたことである。

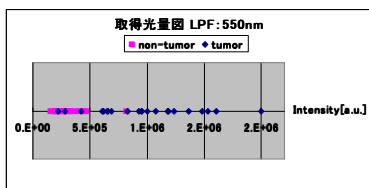


Fig.5 : Simulation result of integrated intensity with LPF550[nm]

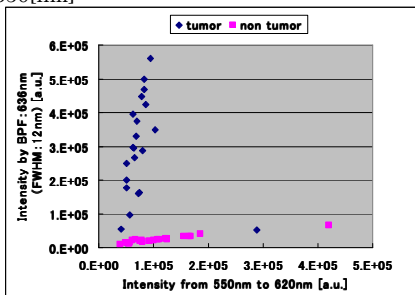


Fig.6 : Simulation result of integrated intensity with more than 2 optical filters

4. 脳組織の蛍光計測による評価実験

本節では脳腫瘍摘出手術において摘出された脳組織サンプルを用いた蛍光計測を行う。前節でのシミュレーション結果に基づき、550～620[nm]の波長帯域の光量を取得する輝度画像と、BPFによる輝度画像の両画像を用いた腫瘍同定手法を提案する。Fig.7に示すように、蛍光スペクトル特性が異なる領域をそれぞれ抽出し、その結果として腫瘍部位を抽出できるかについて検討する。複数の蛍光画像から得られる輝度分布において、組織サンプル上である輝度範囲をとる領域と、その領域内のスペクトルデータとの対応をとること、また病理診断結果との対応をとることが重要となる。そのため同一の組織サンプルを用いて、

- 高感度カメラによる広領域での蛍光画像計測
 - 局所領域での蛍光スペクトル計測
 - 病理診断
- を行い、提案手法を用いた場合について評価することを目的とする。

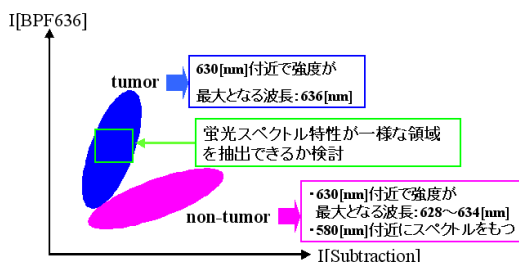


Fig.7 : Proposed method by using two fluorescent images

(a) システム構成

上述した蛍光計測実験を行うためのシステムの概観図を Fig.8 に示す。

(b) 方法

術前に 5-ALA を 20mg/kg 経口投与し、投与後 6～7 時間経過した後に摘出した組織サンプルを使用した。組織サンプルのサイズは φ6～10[mm]

とし、glioblastoma multiforme(グレードIV)の症例の組織サンプルを計測した。

Fig.8のように、広領域での蛍光画像計測ではフィルタホイールによりフィルタを切り替え、各蛍光画像の計測を行った。その際、励起レーザーの照射エネルギー密度は $7.1 \times 10^{-2} [\text{mW}/\text{mm}^2]$ (ビーム径: φ18[mm])。照射対象との距離は 90[mm]とした。また CCD カメラ側の計測環境は、蓄光時間は 1[sec](30frame)、gain は 5[dB]、実視野径は 15×14[mm]とした。

局所領域での蛍光スペクトル計測では、励起レーザーの出力は 6[mW]、照射対象との距離は 91[mm]、照射エネルギー密度は $1.91 [\text{mW}/\text{mm}^2]$ とした。また分光器の露光時間は組織サンプル毎に調整し、スペクトルデータの計測スポット径は φ2[mm]とし計測を行った。

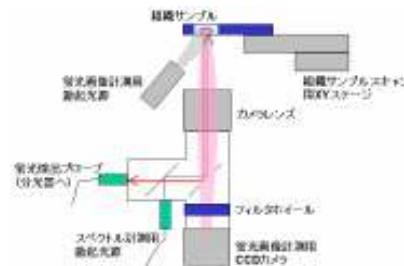


Fig.8 : Overview of the measurement system of fluorescent images and spectra

(c) 計測結果

3 症例、計 10 組織サンプルの計測を行った。sample tissue #5、及び#6 について、550[nm]～610[nm]の波長帯域の光量を表す輝度画像と BPF による輝度画像の各画素の輝度値から構成される 2次元ヒストグラムを作製した。それらの 2次元ヒストグラム、及び各組織サンプルについて計測領域内のスペクトルデータを Fig.9、Fig.10 に示す。Fig.9 より、sample tissue #5 の計測領域内のスペクトルは、3.1 節で示したような病理診断で腫瘍と診断された組織に特徴的にみられるスペクトルであった。また 630[nm]付近のピーク波長はおおよそ 636[nm]であったが、病理診断の結果は非腫瘍であった。このような組織サンプルの 2次元ヒストグラムをみると、低輝度側から高輝度側に向かって傾きが急峻な分布がみられた。また sample tissue #6 については Fig.10 に示すように計測領域内のスペクトルの計測結果から、sample tissue #5 と比較して 630[nm]付近のスペクトルが短波長側にシフトしていた。また 630[nm]付近のピーク波長は 628～634[nm]の範囲をとり、580[nm]付近にもスペクトルがみられた。加えて、3.1 節で示した病理診断で非腫瘍と診断された組織に特徴的にみられるスペクトルであり、病理診断結果も非腫瘍であった。このような蛍光スペクトル特性を持つ組織サンプルの 2次元ヒストグラムは、低輝度側から高輝度側に向かって傾斜が極めて緩やかであるという特徴がみられた。

続けて sample tissue#10 の計測結果を示す。Fig.11 に示すように、2次元ヒストグラムでは密な箇所が 3 箇所観測された。これらの密な箇所を持つ輝度範囲を著者の主観により定め、それらの輝度範囲をもつ領域の抽出を行った。抽出した各

領域を Region1~3 とし、その結果を Fig.12 に示す、また、抽出された各領域内で計測されたスペクトルの Fig.13 に示す。2次元ヒストグラムを用い各領域を抽出した結果、Fig.13 に示したように腫瘍組織に特徴的にみられるスペクトルをもつ領域と、非腫瘍組織に特徴的にみられるスペクトルをもつ領域を、それぞれ抽出することができた。

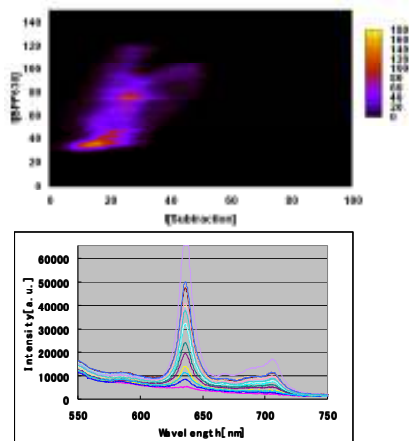


Fig.9 : 2 dimensional histogram and measured spectra, sample tissue #5

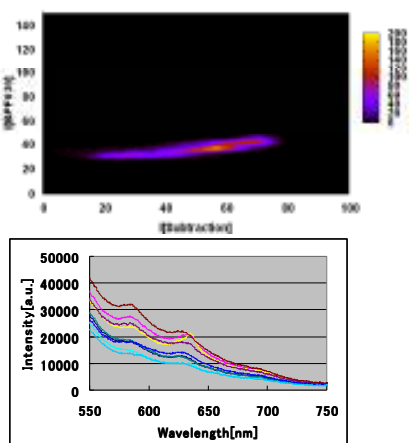


Fig.10 : 2 dimensional histogram and measured spectra, sample tissue #6

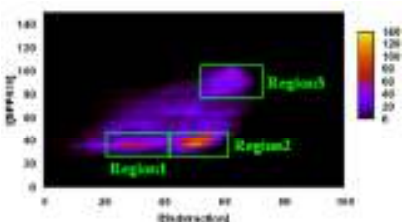


Fig.11 : 2 dimensional histogram, sample tissue #10

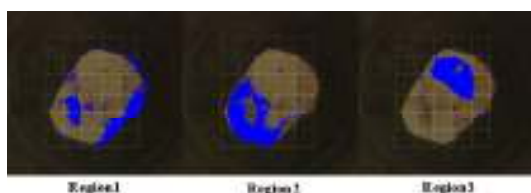


Fig.12 : Detected regions based on 2 dimensional histogram, sample tissue #10

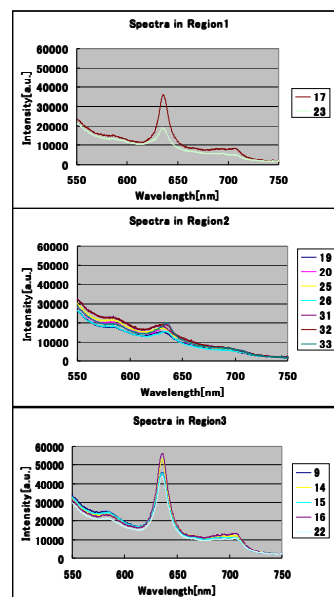


Fig.13 : Measured spectra in each detected region, sample tissue #10

(d) 考察

Fig.9, Fig.10 より、腫瘍と診断された組織に特徴的にみられたスペクトルをもつ組織サンプルと、非腫瘍と診断された組織に特徴的にみられたスペクトルをもつ組織サンプルの2次元ヒストグラム上でのデータの分布は、3.2節のシミュレーションで示した各組織サンプルによる取得光量をプロットしたデータの分布にそれぞれ一致していた。

sample tissue#10 の計測結果については Fig.13 より、2次元ヒストグラムに基づき抽出された Region1, Region3 の領域内でのスペクトルの、630[nm]付近のピーク波長はおよそ 636[nm] で一様であった。また Region2 の領域内でのスペクトルの 630[nm]付近のピーク波長の範囲は 631~634[nm]であった。蛍光スペクトル特性が一様であろう領域を、提案手法によりそれぞれ抽出することができたと考えられる。

5. 結論

本研究では手術顕微鏡下での 5-ALA の使用を念頭においた蛍光画像を用いた定量的な腫瘍同定手法の提案を行った

(1) 先行研究[1]の手法では、蛍光特性が異なる領域をそれぞれ識別することができず、結果として腫瘍と非腫瘍の誤認識を生じることが示された。
(2) 脳組織の蛍光特性についての知見が、蛍光スペクトル計測により得られ、その知見に基づきフィルタ選定シミュレーションを行い、腫瘍部位を同定する上で望ましいフィルタの組み合わせを提案した。

(3) 抽出した脳組織の蛍光計測では、提案した複数枚のフィルタを用いて得られる2枚の輝度画像の輝度分布から、蛍光特性が一様な領域を抽出する手法を提案した、また広領域での蛍光画像計測と、蛍光スペクトル計測、及び病理診断の比較を行うことによって、提案手法の有効性を示した。

参考文献

[1] Walter Stummer, et al., Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme by using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients, J. Neurosurgery, Vol.93, 1003-1013, 2000