



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	脳神経外科領域の診断治療における光学的技術の応用 : 近赤外蛍光色素を用いた神経機能測定法の開発
Author(s)	酒谷, 薫
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第4418号
Issue Date	1998-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3137134
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51473
Type	doctoral thesis
File Information	000000322324.pdf



脳神経外科領域の診断治療における
光学的技術の応用:

近赤外蛍光色素を用いた神経機能測定法の開発

北海道大学工学部大学院

システム情報工学専攻生体システム工学講座

酒谷 薫

①

脳神経外科領域の診断治療における

光学的技術の応用：

近赤外蛍光色素を用いた神経機能測定法の開発

北海道大学工学部大学院

システム情報工学専攻生体システム工学講座

酒谷 薫

目次

第1章 序論	・・・	3
第2章 研究の背景	・・・	5
2-1 脳神経外科領域の神経補助診断法の現状と問題点	・・・	5
2-1-1 最近の神経補助診断法	・・・	5
2-1-2 術中モニタリング法	・・・	6
2-2 光を用いた新しい神経機能検査法	・・・	8
2-2-1 神経活動の光イメージング	・・・	9
2-2-2 近赤外光分光法	・・・	13
2-2-3 CCD カメラによる脳の透視	・・・	16
2-3 光学的造影剤	・・・	20
2-3-1 インドシアニンググリーンの光学的特性	・・・	21
2-3-2 インドシアニンググリーンによる吸光イメージング	・・・	23
2-3-3 インドシアニンググリーンによる蛍光イメージング	・・・	27
2-4 まとめ	・・・	29
第3章 インドシアニンググリーン蛍光イメージング法の開発	・・・	30
3-1 インドシアニンググリーン蛍光像と吸光像の比較実験	・・・	31
3-2 インドシアニンググリーン蛍光イメージング法の 限界特性実験	・・・	37
3-3 まとめと考察	・・・	44
第4章 無侵襲近赤外蛍光プローブの開発	・・・	46
4-1 インドシアニンググリーンと α -リボ蛋白質の結合	・・・	47
4-2 インドシアニンググリーンと α -リボ蛋白質複合体の 光学的特性	・・・	48

4-3	まとめと考察	・・・	49
第5章	脳脊髄クモ膜下腔および髄液流の蛍光イメージング	・・・	50
5-1	脊髄クモ膜下腔の蛍光イメージング	・・・	51
5-2	脳クモ膜下腔の蛍光イメージング	・・・	56
5-3	髄液流の蛍光イメージング	・・・	62
5-4	まとめと考察	・・・	65
第6章	今後の課題と展望	・・・	66
6-1	髄液循環障害の診断への応用	・・・	66
6-2	脳腫瘍のイメージング	・・・	67
6-3	光ファイバースコープへの応用	・・・	68
第7章	結論	・・・	69
参考文献		・・・	70
研究業績		・・・	74
謝辞		・・・	81

第1章 序論

脳は、人の臓器の中で最も重要かつ複雑な臓器である。このため脳に対する外科的手術には高度な技術と細心の注意が必要である。外科的手術は主に術前の神経放射線診断の結果に基づいて術式が決定されるが、手術操作は基本的に術者による手作業であり、経験に基づいた判断力のみならずこれまで養われた“勘”が手術結果を左右することも多い。この術者の判断や勘を補助する目的で種々の術中モニタリング法や手術支援システムが開発されてきた。

脳機能の不可逆性にもかかわらず、脳外科手術における術中モニタリングの歴史は比較的新しい。1970年代後半に脳誘発電位が術中モニタリングに導入される以前は、全身的な呼吸循環機能のモニターにとどまっていた(滝 1981)。現在、誘発電位はある神経路全体の機能を反映することから種々の脳外科手術に応用されている。しかしながら脳誘発電位は心電図等と比較して電気信号強度がはるかに小さいため平均加算を必要とし、この平均加算に要する時間の遅れが神経機能モニタリングとしての有用性を大きく妨げている。すなわち術者は誘発電位により手術操作の判断を行うのではなく、すでに行った手術操作の結果を知らされるのである。このように脳機能の術中モニタリングには未だに解決すべき課題が多い。

このような脳機能の術中モニタリングに加えて、1980年代半ばから脳内の位置情報を術者に知らせる各種の脳内ナビゲーション法が開発されるようになった(Watanabe 1991)。脳という複雑な臓器の中で目的の部位に到達したり手術操作の脳内における位置を的確に知ることは、経験の浅い外科医のみならず熟練した外科医にとっても必ずしも容易なことではない。術前のX線CTやMRIの画像をコンピュータに入力し、そのデータを基にして術者に脳内の3次元位置をリアルタイムに知らせるという画期的な術中モニタリング法であるが、手術の進行とともに脳が変形、変位するため正確さの点で問題が残る。

また診断法とともに新しい治療法の開発も急速に進んでいる。ガンマナイフ (Lunsford 1995) あるいは血管内手術 (根来 1991) は、これまで開頭手術が必要であった脳腫瘍や血管障害に対する新しい治療として確立されつつある。さらに低侵襲外科手術の一つである内視鏡を用いた手術は、切開範囲が小さく術後の回復も早いため、脳外科領域の手術にも適応が広がりつつある (Caputy 1995)。このように脳外科領域における診断治療法は、現在大きく変貌しつつある過渡期にあるといえる。

脳外科領域の診断治療法の変革はエレクトロニクス技術や画像処理技術の発展によりもたらされたと考えられるが、これらの技術革新はまた光技術の医療分野への応用をも大きく促進した。例えば近赤外光の生体透過性を応用した生体酸素代謝モニターは既に実用化され、現在その臨床応用が進められている (Edwards 1994, Hoshi 1993, 1994, Sakatani 1995, Reynolds 1988)。また光 CT も実用化に向けて開発が進んでいる。さらにレーザーメスによる無血手術の試み (Brown 1984, Frank 1984) や光力学療法の開発 (McCaughan 1996) など治療分野においても光技術の応用は進んでいる。このように医療技術の進歩は光技術の発展と密接に結び付いている。

本研究では現在の脳外科領域における課題の一つである術中モニタリングや手術支援システムに焦点をあて、これらが有する諸問題を光技術を応用することにより解決する方法について検討し、光を用いた新しい神経補助診断法の基礎となる光技術を開発した。

第2章 研究の背景

2-1 脳神経外科領域の神経補助診断法の現状と問題点

2-1-1 最近の神経補助診断法

脳神経外科領域における神経補助診断法は、近年のエレクトロニクス技術や画像処理技術の発展に伴い急速に進歩してきた。特にMRIを用いることにより脳神経の解剖学的構造や脳腫瘍の詳細な断層イメージングが得られるのみならず、phase contrast 法などの開発によりMR-angiography が出現し、脳血管を無侵襲的に描出することも可能となっている (Wedeen 1986)。さらにこれまではPETに頼ってきた神経活動に伴う局所脳血流変化も、functional MRIによりアイソトープ等を使用することなく無侵襲的に測定されるようになってきた (Ogawa 1992, Kwong 1992)。

このようにMRIは万能の神経補助診断法となりつつあるが、現時点では次のように幾つかの欠点もある。1) 検査時間が比較的長く、迅速な診断を要する場合には問題がある。2) 体内にペースメーカーや外科的金属(動脈瘤クリップ、人工弁、人工骨頭等)を入れた患者では検査不能である。3) 強い磁場を使用するため機器設置の条件が厳しく、また機器自体の価格や管理コストも非常に高い。

一方、MRIにより測定できない神経機能も少なくない。例えばNMRスペクトロスコピーによりATP、Piやglucose代謝などが測定できるが、それらの代謝変化を画像化することは一般化していない(成富 1990)。さらにfunctional MRIも、還元型ヘモグロビンの変化を測定しているだけで、脳酸素代謝のごく一部を計測しているにすぎない (Ogawa 1992, Kwong 1992)。またMRIによる髄液流の測定については、局所における髄液の速い流れはCSF flow-void

sign により計測できるが、脳室系の全体的な髄液循環を診断することはできない (Mascalchi 1993、Gideon 1994)。このためアイソトープを使用した RI 髄液槽撮影法 (RI cisternography) が必要となる症例も少なくない。

2-1-2 術中モニタリング法

脳神経外科領域の神経補助診断法は、術前後の診断のみならず、術中においても重要な役割がある。現在、手術の安全性を高めるため脳機能をモニターしながら開頭手術を行うことは一般化している。脳波や誘発電位は大腦皮質や神経路の機能を測定できることから、脳血管障害や脳腫瘍等の幅広い分野の手術に利用され、正常脳神経の機能保護に応用されている (滝 1981)。またこのような電気生理学的測定法は、特殊な病巣の検索に用いられることもある。例えば脳皮質の多点から記録する脳波測定は、てんかんの手術におけるてんかん焦点の同定に使用される (King 1981)。

脳動静脈奇形や脳動脈瘤等の術中に、脳血流を測定することも可能である。熱電対法等はプローブ直下の皮質血流を連続的かつ無侵襲に測定できるため比較的一般的に使用されている (早川 1984)。しかしながらその方法は、プローブ直下の狭い範囲の血流測定に限定されており、2次元的な血流分布や皮質下の深部血流は測定できない等改良すべき点も多い。

脳腫瘍、特に悪性脳腫瘍の脳内に占める位置を同定したり、正常脳組織との境界を明らかにすることは脳外科手術において極めて重要である。近年、情報処理技術の発展により、術前の CT や MRI から術中に脳腫瘍などの位置をリアルタイムに表示するナビゲーションシステムが実用化された (Watanabe 1991)。これまで術者の勘に頼ってきた脳内のオリエンテーションを3次元画像により客観的に表示できるという画期的なものである。しかしながら脳は柔らかい組織であり手術中に変形、変位していくため、その手法では術前の CT や MRI で得られた脳内オリエンテーションの信頼性が低下するという致命的な

欠点を有する。

このナビゲーションシステムの欠点を補うために、最近手術室に CT やさらに MRI を設置し、術中に脳の断層イメージングを行う試みが報告されている (Lunsford 1996)。これまでも術中に腫瘍をイメージングする方法として超音波診断法が試みられているが、解像度に問題がありあまり一般化していないのが現状である。これを一挙に解決する目的で術中 CT や MRI が考案されたが、これらの方法は超音波診断法と比較し解像度は格段に向上するものの、操作が繁雑となりまた設備も大がかりになるという欠点がある。

このように現時点の脳神経外科領域の術中モニタリング法においては、血流測定法や脳腫瘍イメージングをはじめ改善すべき点は少なくない。

2-2 光を用いた新しい神経機能検査法

最近、種々の波長の光を用いて神経機能や構造を計測する試みが急速に進歩してきた。光は基本的に生体に無侵襲であり、また生体内の化学物質が代謝反応に伴い光学的特性を変えることから代謝変化を光計測できる可能性が考えられる。さらに特殊な色素を用いて神経活動電位や細胞内イオン変化も測定できるようになってきた。この節では脳神経外科領域において最近試みられている光診断法について述べる。

2-2-1 神経活動の光イメージング

近年、光を用いて神経活動の伝播を2次元的に画像化する神経活動光イメージングが、神経生理学の分野で注目を集めている。神経活動光イメージングには、電圧感受性色素などの特殊色素を用いる外因性シグナルを計測する方法 (Tasaki 1968, Frostig 1990, Cinelli 1992) と、神経活動時の脳神経の構造変化により生じる光学的特性変化や血流変化すなわち内因性シグナルを計測する方法 (Cohen 1968, Grinvald 1986, MacVicar 1991, Haglund 1992) がある。ともに原理的には1960年代に既に確立していたが、画像処理技術の発展に伴い近年再び注目を集めるようになった。

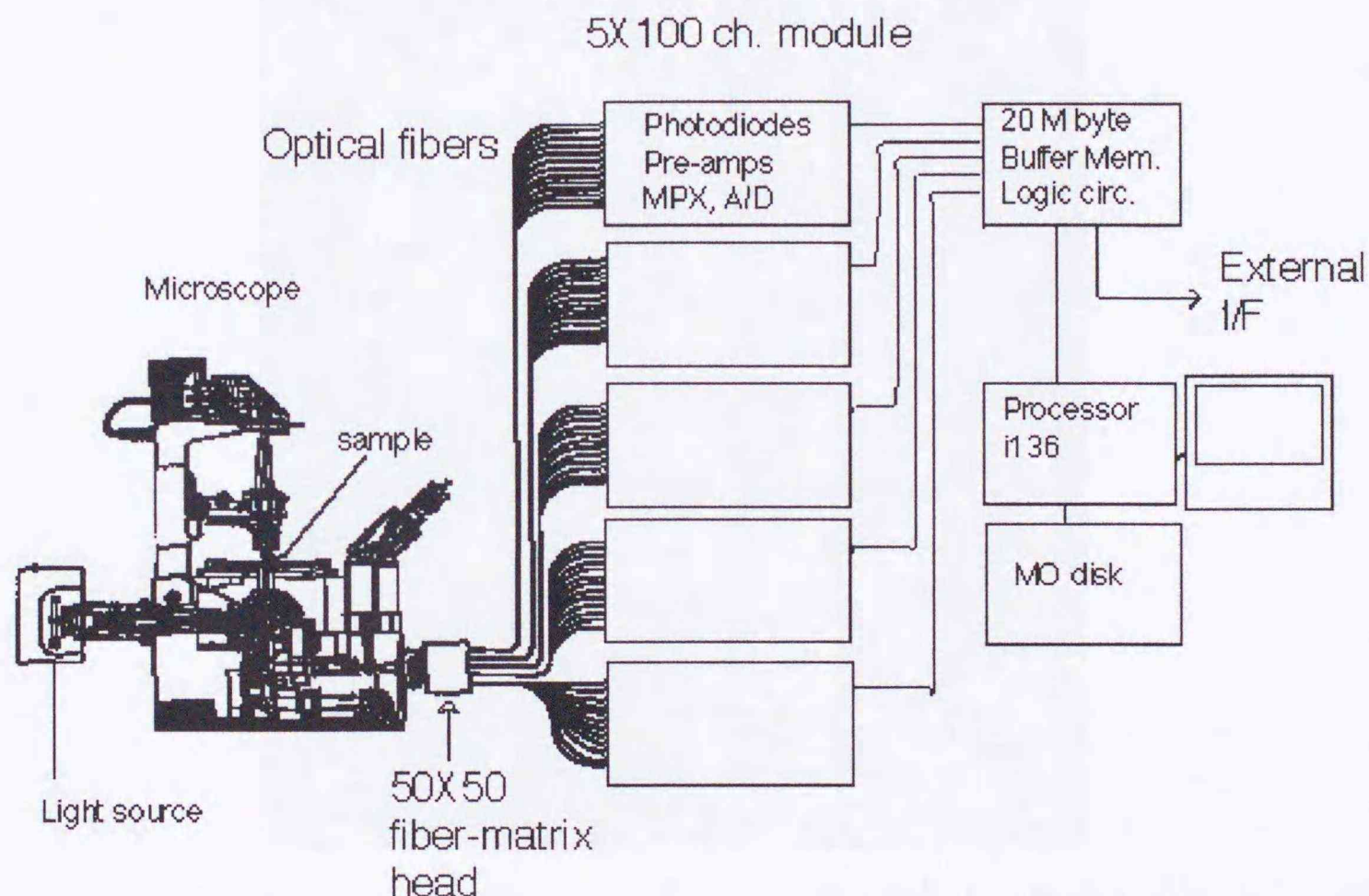
神経活動光イメージングの最大の利点は、神経組織の多点より同時に神経活動を計測できることである。電気生理学的計測では電極の数も限定されるため、神経活動の詳細なマッピングを得るのは不可能である。さらに細胞内電位変化を測定するには電極を細胞内に刺入する必要がある侵襲的にならざるを得ない。光イメージングでは特殊カメラを使用して光計測するため、比較的容易に神経活動の伝播を2次元的にイメージングでき、また神経と測定機器が接触しないため非侵襲的計測が可能である。この手法は、このような利点を応用して神経ネットワークの研究での活躍が期待されている。

(1) 嗅覚系の神経活動の光イメージング画像 (Jibu, Sakatani et al. 1997)

図1に使用した光イメージングシステムの概要を示す。2500個のシリコンフォトダイオード (TPST23, 東芝製) の各々に直径0.5mmの光ファイバーを取付け、ファイバー束の先端を25mmX25mm、即ち50本X50本、のアレイ状にプラスチックで固定した。各フォトダイオードには独立したACアンプを並列に接続し、これにより増幅された信号は250個のアンプごとに3段階のマルチプレクサーを介してADコンバーター (1MH, 12ビット) に取り込まれる。2500画素に対しては合計10台のADコンバーターを使用した。

デジタル化された信号は、20M バイトのメモリーに一時的に書き込まれるが、0.256msec 毎に1枚の画面メモリを使うことにより最大4000枚までの画面情報を蓄えることができる。これらのデータ処理はパーソナルコンピューター(9801, NEC)で行ない、データは光ディスクに保存した。

図1 光イメージングシステムの概要 (Jibu, Sakatani et al. 1997)

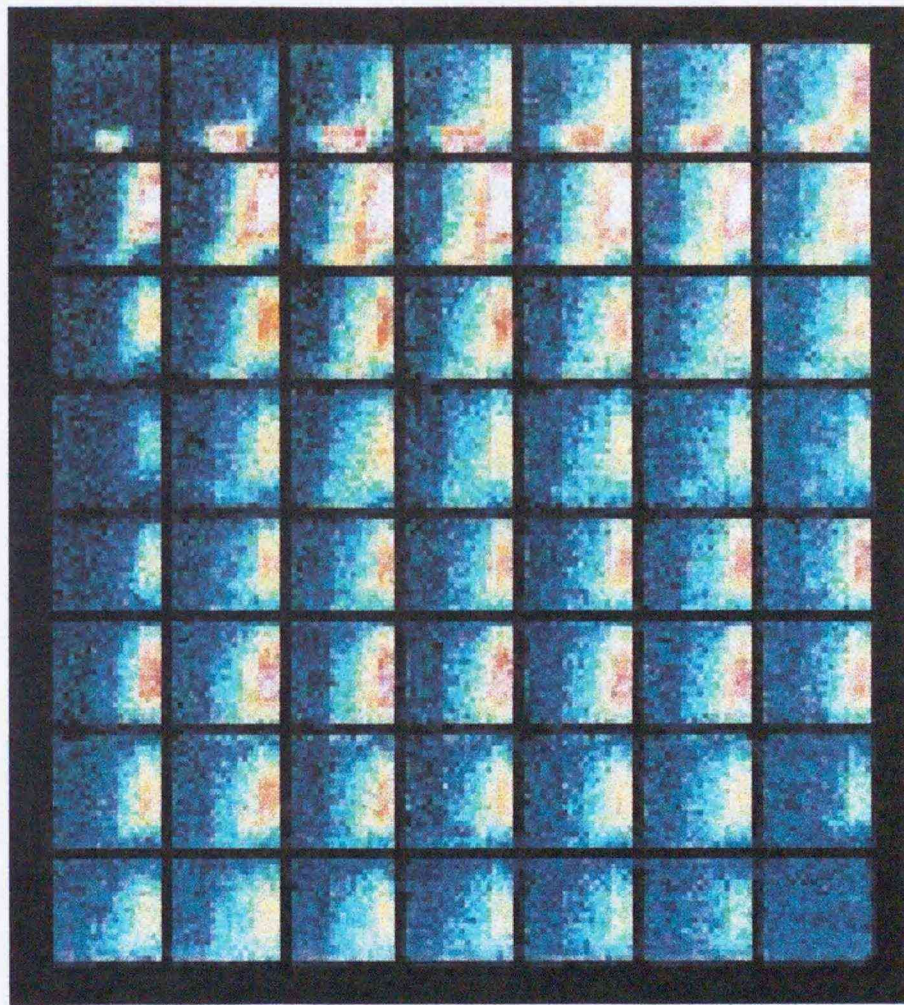


光学系には、神経組織のスライス標本などの *in vitro* モデルより光シグナルが記録できるように、倒立型顕微鏡 (IMT-2, オリンパス) を使用した。顕微鏡のカメラマウントの結像面に前述の光ファイバーアレイの先端を設置することにより、光シグナルはファイバーを介して2500個のフォトダイオードに導かれる。照射光源には100Wの超高圧水銀ランプを用い、赤外光はコールドフィルターにて除去した。照射光は546nmの干渉フィルターを通り、ハーフミラーを介して神経標本の方に導かれる。

図 2 はこの光イメージングシステムを用いて、嗅覚系の神経活動の時空間的広がりを記録したものである。

図 2 カエル嗅球における神経活動の光イメージング

(Jibu, Sakatani et al. 1997)



注：各画像は 1 msec 毎のイメージングで、1 段目の左より開始し右に進み、順次下段に進んでいく。各画像の左下は刺激された嗅神経で右上方が嗅球である。

カエル (*Rana ridibunda*) を低体温麻酔下に断頭して、嗅神経、嗅球を一塊に摘出し、次に膜電位感受性色素 RH292 (Molecular Probe, Inc., Eugene, OR) $3 \mu\text{M}$ を含む室温のリンゲル液に浸し染色した。倒立顕微鏡下に嗅神経をタングステン製単極電極にて電気刺激 (500 mV, 1 msec, 2 Hz) した。刺激開始後より 1 msec 毎に、嗅神経、嗅球の光シグナルの変化を平均加算を行わずに記録した。

刺激後 3 msec (1 段 3 列) より嗅球に向かって活動電位が広がりはじめ、

10-14 msec (2 段 3、4 列) で神経活動の拡大は最大となった。神経活動は一旦減少するが、再び臭神経側の臭球から活動が始まり臭球全体に伝播した (5 段)。

本手法は、このように比較的容易に神経活動の伝播を 2 次元的にイメージングできるため、神経ネットワークの研究での活躍が期待されている。

(2) 光イメージングの臨床応用例

近年、このような光イメージングの特性を生かして脳外科領域の術中モニタリングに応用する試みがある。1992 年、Haglund らのグループはてんかん外科手術において、てんかんの焦点や感覚野、言語野における内因性シグナルの変化を記録することに成功した (Haglund 1992)。脳表の解剖と神経機能を対比した詳細な 2 次元マッピングが得られることは、臨床的にはてんかん焦点の切除範囲を正確に決定できるという利点があるばかりでなく、人脳機能を理解する上でも大きな意義がある。

(3) 光イメージングの問題点

内因性シグナルは前述のごとく神経活動に付随した間接的变化であり、直接的な神経回路網におけるインパルスの伝達を示しているものではない。ことに神経回路網内のシナプス結合が、抑制性なのか興奮性なのかは内因性シグナルの測定のみでは明らかにすることはできない。

また電圧感受性色素に強い光を長時間照射すると、フリーラジカルを発生し神経毒作用 (フォトダイナミック効果) を示すために、現在のところ人脳に対して用いることはできない。今後、神経毒のない人体にも使用可能な無害の電圧感受性色素の開発が望まれる。

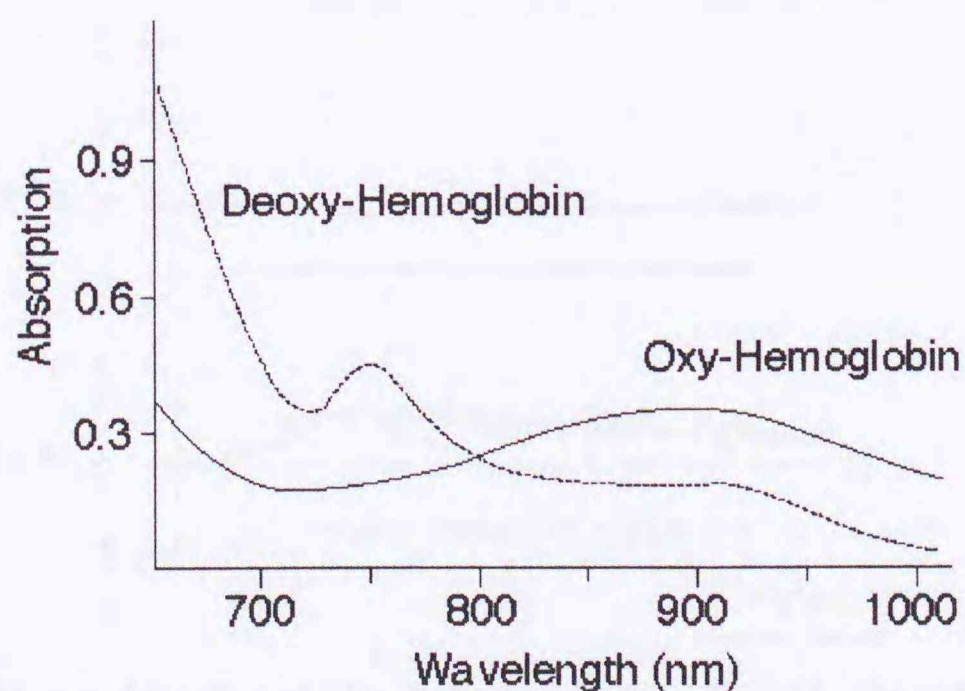
2-2-2 近赤外光分光法

近赤外光分光法 (near infrared spectroscopy、以下 NIRS と略す) は、現在最も実用化が進んでいる光診断法である。この手法によれば、脳内の酸素代謝や循環動態がリアルタイムにかつ無侵襲的に測定できるため (Jöbsis 1977)、脳神経外科領域の術中モニタリングのみならずベットサイドや外来で利用できる利点がある。このため麻酔科、神経内科、小児科等の分野でも臨床応用が進められている (Edwards 1994、Hoshi 1993,1994、Sakatani 1995、Reynolds 1988)。

(1) 測定原理および装置の概要

測定原理：近赤外光は生体透過性に優れているが、一旦生体内に光が入ると生体内の様々な構成成分 (血液、骨、脳組織など) により吸収と散乱を受け減衰する。この時生体の酸素化状態により吸光度が変化する主な成分は血液中のヘモグロビン (以下 Hb と略す) である。

図3 ヘモグロビンの吸光スペクトル



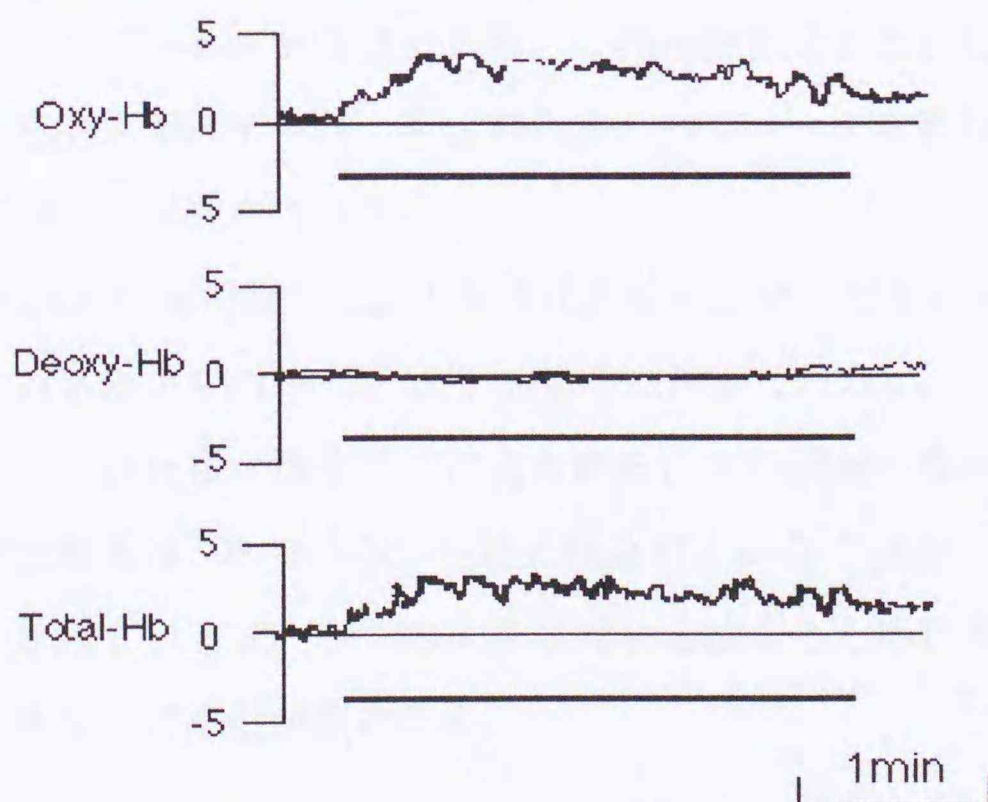
すなわち生体の酸素化状態が変化すると Hb の吸光度が吸光スペクトル（図 3）に従って変化し、これに伴って生体を通過してくる光の強度が変化する。この光の変化を捉えることにより Hb の酸素化状態を知ることが出来る。

NIRS 装置の構成：半導体レーザーの光源からは複数の波長の近赤外光が発生され、生体に照射される。生体を通過した光は光電子増倍管あるいは光半導体に導かれ、各々の波長の光の強度変化が測定される。これらの変化はマイクロコンピュータにより演算され、酸化型 Hb、還元型 Hb、および両者の和である総 Hb（これは血液量を示す。）の濃度変化が算出される。

(2) 近赤外光分光法による脳酸素代謝の測定例

近赤外光分光装置（NIRO-500、浜松ホトニクス社製）を用いて、成人の左前頭葉の脳酸素代謝が言語活動によりどのように変化するか検討した。図 4 にその結果を示す。

図 4 言語活動時の脳内酸素代謝の変化



注：Oxy-Hb, Deoxy-Hb, Total-Hb は各々酸化型、還元型、および総ヘモグロビンを表わす。縦軸は濃度変化を数値で示し、太線はタスク期間を示す。

タスク（音読）開始直後より酸化型および総ヘモグロビンの上昇が認められる。しかしながら還元型ヘモグロビンはほとんど変化していない。タスク終了後は徐々にコントロール値に復帰した。これらの変化は左前頭葉の局所脳血流の上昇を示し、神経活動に伴って発生したものと考えられる。

一方、脳血管障害による失語症患者では、言語負荷時の脳酸素代謝の変化パターンが正常例と異なっていた。すなわち、失語症患者では酸化型 Hb、総 Hb の上昇に伴って還元型 Hb が上昇する例が少なからず認められた。この変化は局所脳血流の上昇とともに脳酸素消費率の上昇を示し、失語症患者の左前頭葉は言語活動時に正常例よりもより多くの酸素を消費することを示している。このように NIRS は高次脳機能を検査する上で極めて有用であり、将来は失語症患者、痴呆症患者の診断、治療などに応用されると思われる。

(3) 近赤外光分光法の問題点

現在市販中の NIRS は、センサーを装着した時点での酸素代謝の絶対値を示すものではなく、臓器の酸素代謝に変化が発生するか、あるいは何らかの負荷を加えたときの相対的变化値が測定される。このため臨床上の NIRS の使用範囲が限定されているのが現状である。これを解決するために、現在短パルス光を用いて光路長が算出され、脳酸素代謝のパラメータの絶対値が測定できる次世代の NIRS が開発中である。

また NIRS は無侵襲的に脳内酸素代謝をモニターできるが、脳のどの領域を測定しているのか PET や SPECT のように明かではない。照射部と受光部を結ぶ線の直下の脳皮質が測定領域に含まれることは間違いないが、現在のところ正確な測定領域は不明である。現在市販されている NIRS は1チャンネルの測定に限定されているが、左右の大腦半球を比較するためにも最低2チャンネルのマルチチャンネル化が望まれる。

2-2-3 近赤外光と CCD カメラによる脳の透視

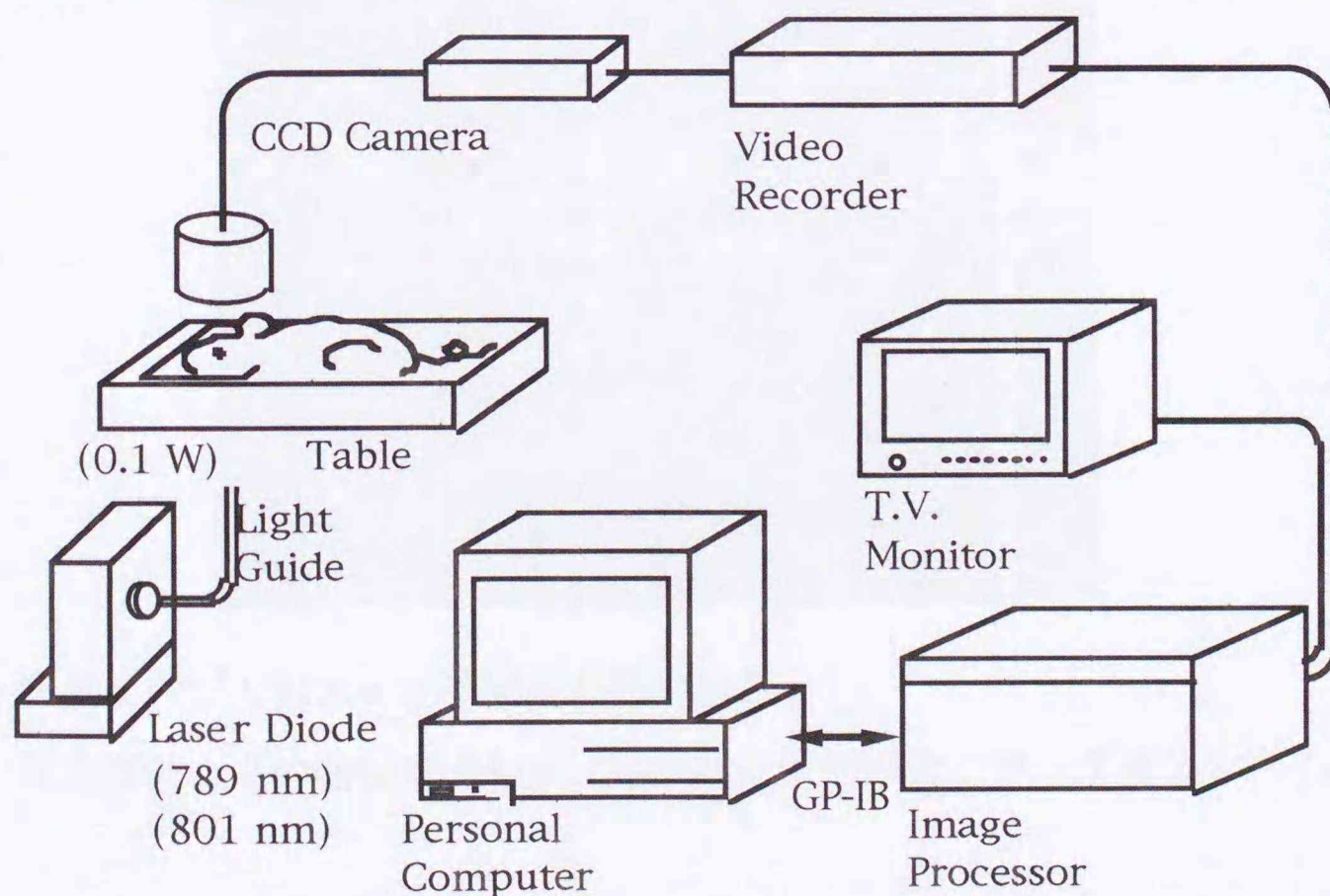
近赤外光の生体透過性を応用して、頭部の透過光を CCD カメラを用いて 2 次元的に測定し脳機能や構造を計測する試みがある (Taka et al. 1995, 1996, 1997)。CCD カメラを使用するため、光 CT よりも単純なイメージングシステムで 2 次元的画像を得ることができる。

(1) ラット脳血液量および脳酸素化状態の 2 次元イメージング

(高、酒谷、他 1996)

図 5 にイメージングシステムを示す。光源には半導体レーザ (波長 789 nm と 801 nm) を用いた。光源から出た光はライトガイドにより導かれ、ラット下顎部より照射される。頭頂方向へ透過してきた光は CCD カメラ (XC77RR、SONY 社製) により受光される。CCD カメラにより撮影された画像はイメージプロセッサー (PIP4000、ADS 社製) に取り込まれ画像処理される。

図 5 実験方法およびイメージングシステムの概要 (高、酒谷、他 1996)

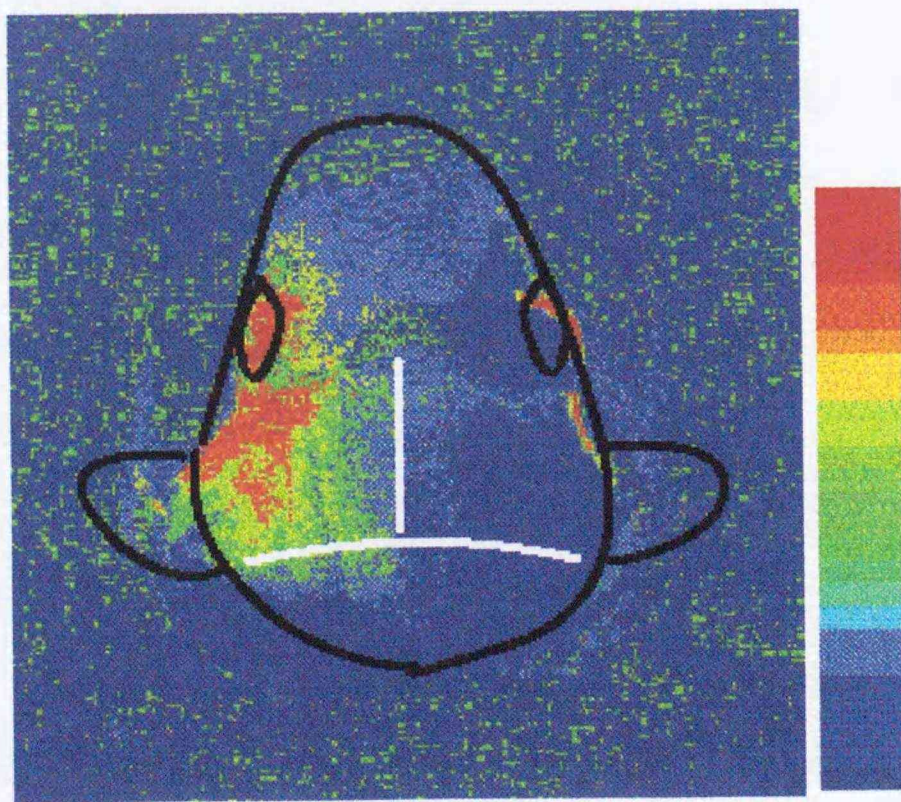


Wister 種ラット（5－10 週齢、90－140 g）をペントバルビタールの腹腔内投与（40 mg/Kg）にて麻酔し、頭部から背部の毛を市販の脱毛クリームにて除去した。ラット頭部を専用の固定台に固定した後、外部から回り込む光をできるだけ少なくするため、頭部周囲を黒い粘土で覆った。

脳血流を変化させるために、両側椎骨動脈を電気凝固した後に、頸部頸動脈を露出し、それらを閉塞できるようにした。頭皮血流の影響を避けるため、両側の外頸動脈はあらかじめ閉塞した。

図 6 に左内頸動脈の血流を 5 分間遮断した前後の頭部透過光量変化を示す。照射した光の波長は 801 nm である。この波長はヘモグロビンの等吸収点の波長とほぼ一致しており、血液量の変化を表わしていると考えられる。図に示す如く、閉塞した側の大脳半球の脳血液量が増加していることが分かる。

図 6 左内頸動脈閉塞時の脳血液量変化（高、酒谷、他 1996）

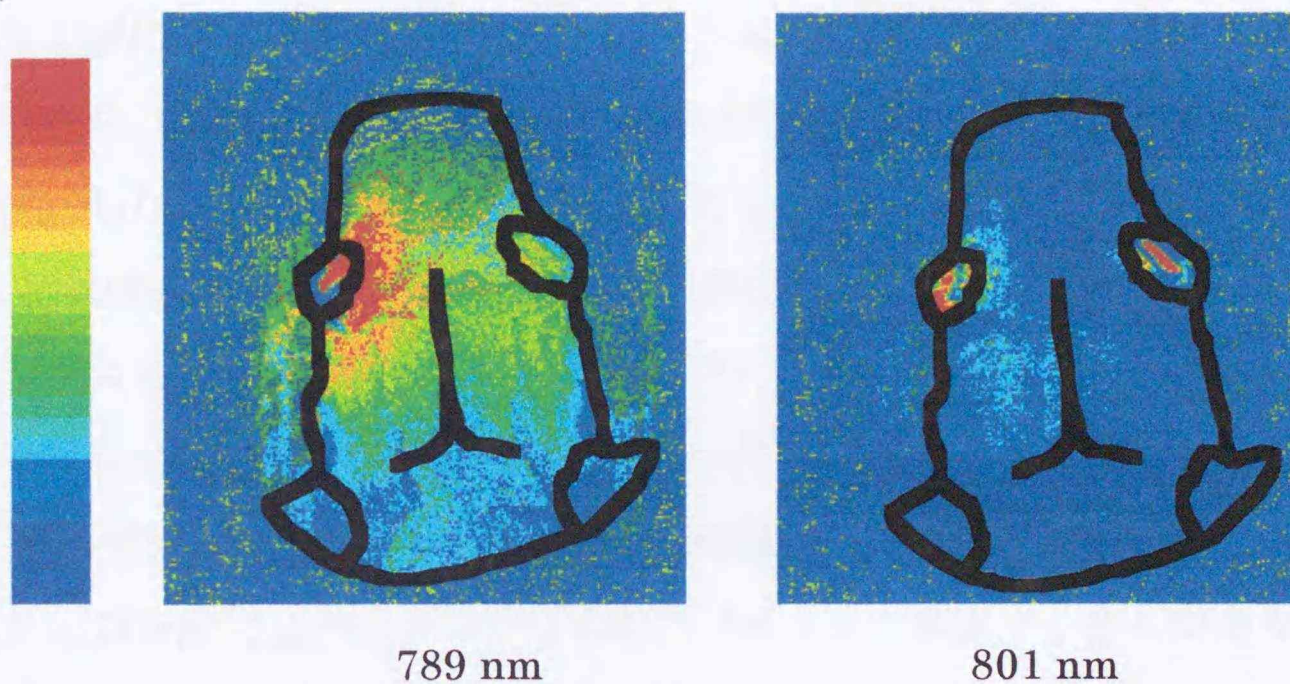


注：明色に近づく程大きな透過光変化を示す。

黒線はラットの輪郭を表わす。白線は上矢状縫合、ラムダ縫合を示す。

次に脳酸素化状態（脳血液ヘモグロビンの酸素化状態）の変化を測定するために、内頸動脈閉塞期間中の前半（0-0.5 分）と後半（4.5-5 分）の各 30 秒間の血液量変化が安定した時点で、801 nm と 789 nm の画像を比較した（図 7）。

図 7 左内頸動脈閉塞時の脳酸素化状態の変化（高、酒谷、他 1996）



注：明色に近づく程大きな血液量変化を示す。

黒線はラットの輪郭および上矢状縫合とラムダ縫合を示す。

ヘモグロビンの吸光スペクトル（図 3）より、801 nm の画像は血液量変化、789 nm の画像は酸素化状態の変化を示す。図のごとく血液量変化に比較して酸素化状態に大きな変化が認められている。

以上の結果よりラット頭部の透過光を CCD カメラで計測することにより、脳の血液量変化や酸素化状態が 2 次元的に計測できることが確かめられた。さらにこのように一側内頸動脈の血流遮断という大きな血流変化のみならず、末梢神経刺激による神経活動に伴った局所脳血流変化など比較的小さな血流変化も 2 次元的に測定できることが確かめられた。

(2) CCD カメラによるイメージングの利点と欠点

CCD カメラは 2 次元イメージを比較的容易に得ることができる上に、小型で

あるために手術用顕微鏡等にも装着が可能である。

CCD カメラを脳外科領域の術中イメージングに用いる上で、以下の利点が考えられる。

1. 術者の視野と同一の2次元像が得られる。

この利点は特に脳腫瘍の摘出操作において、術者に腫瘍や正常脳組織の位置情報を正確にかつ理解し易く提供する点で重要である。すなわち他の術中イメージング法（超音波診断法や術中 CT、MRI 等）では得られた情報を実際の術野と比較しながら手術操作を行う必要がある。

2. 撮像操作が簡単であり、術者の手術操作の妨げとなることが少ない。

近年試みられている術中 CT や MRI では、手術操作を中断し手術台を撮像機器の中に移動するなどの複雑な操作が要求される。

3. 撮像機器が脳と接触しないため脳の感染や損傷の危険がない。

超音波診断法では探査プローブを脳に接触させて測定する必要があり、撮像時に感染したり脳を損傷する危険を伴う。

4. 比較的簡易で安価な装置として実現できる可能性が高い。

一方、CCD カメラによるイメージングの欠点として次のことが考えられる。

1. 透過光を測定する場合には光量が少なく、撮像対象が小さな生体に限定される。

光電子増倍管と比較すると感度が低く、透過光を測定する場合、撮像対象はラットなど小さな生体に限定される。

2. 生体深部のイメージングが困難である。

光源に連続光を用いて透過光を計測する場合、生体内の散乱によりイメージングできる生体内の深さは制限される。

3. 3次元情報を得ることができない。

CT 等の断層像を得ることができないので、撮像対象物の生体内における深さの情報が得られない。

2-3 光学的造影剤の応用

体内物質の光学的変化を応用した生体計測が不可能な構造や機能を可視化したり、あるいはより鮮明な画像を得るために、生体外より色素を注入して光学的に生体機能や構造を計測する試みがある。例えば、インドシアニンググリーン（以下 ICG と略す）は近赤外光領域で強い吸光特性を有しかつ生体に無害であることから循環機能や肝臓機能の臨床検査などに用いられてきた（Leevy 1967, Lund-Johansen 1990）。この ICG を光学的造影剤として生体イメージングに応用する試みがある。

この章では ICG を光学的造影剤として用いたイメージング法について述べる。

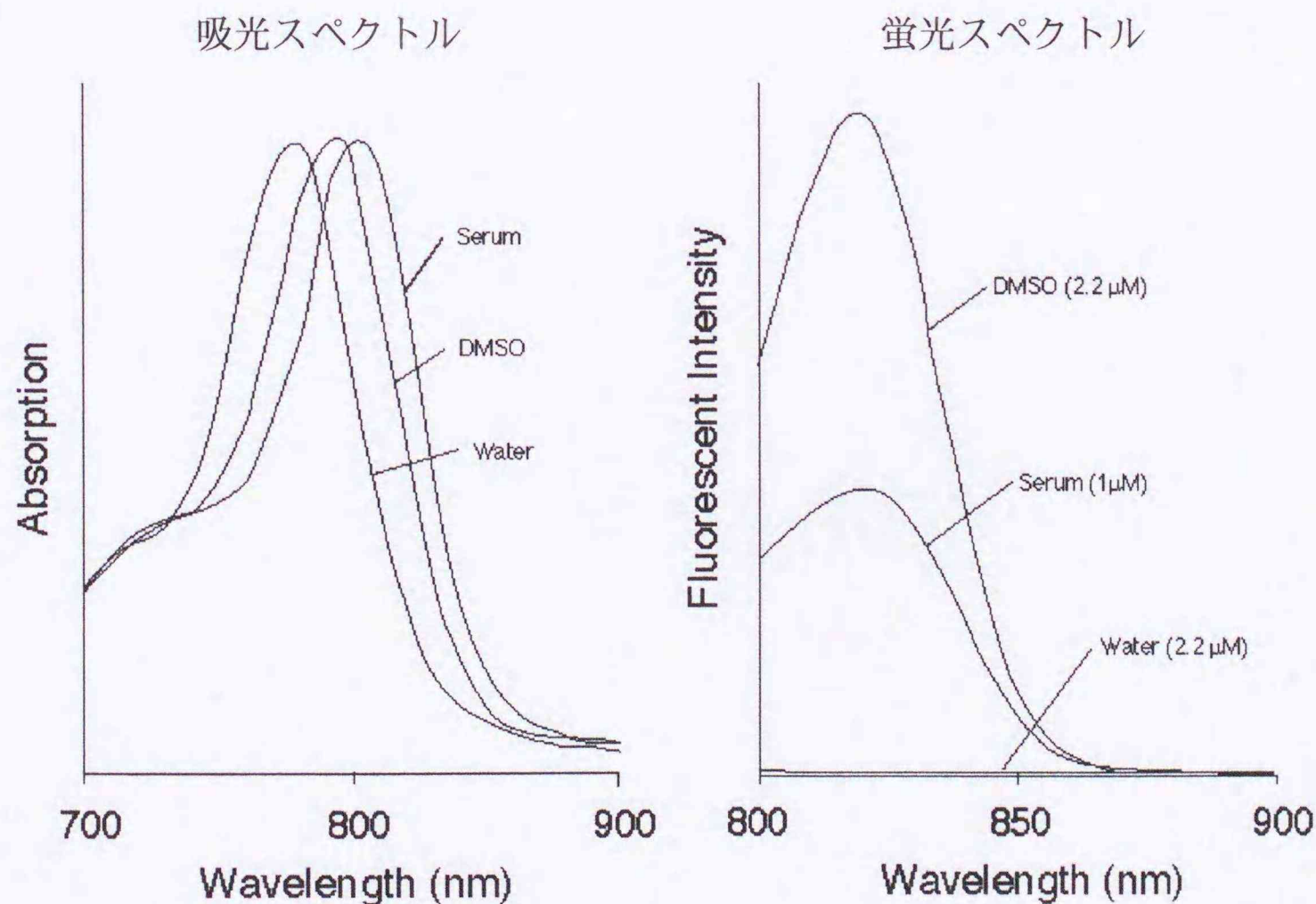
2-3-1 インドシアニングリーンの光学的特性

ICG は分子量 775 の **tricarbo-cyanine dye** ($C_{43}H_{47}N_2NaO_6S_2$) である。ICG は血管内に投与されると、 α -lipoprotein などの血清蛋白と直ちに結合する。体外への排泄は肝臓の肝実質細胞よりなされ、半減期は 2 分半から 3 分と短い。ICG は近赤外光領域の波長で吸光特性を有するが、溶媒の種類により吸光極大波長が異なる。

また ICG は、水溶液中では蛍光性をほとんど認めないが、**dimethyl sulfoxide** (DMSO) に溶解したり α -lipoprotein などの血清蛋白と結合すると、近赤外光領域の蛍光を発生する (Baker 1966, Benson 1978)。

図 8 に ICG の吸光スペクトルと蛍光スペクトルを示す。吸光スペクトルは二波長分光光度計 (日立製、557 型) により測定した。

図 8 ICG の吸光スペクトルと蛍光スペクトル



蛍光スペクトルは波長 720 nm の励起光で蛍光を励起し、蛍光分光光度計（日立製、850 型）により測定した。ICG は蒸留水、DMSO および血清の 3 種類の溶媒に溶解した。

吸光のピークは水溶液では 789 nm、DMSO 溶液では 794 nm、ラット血清に溶解したものでは 804 nm であった。

蒸留水では蛍光発生をほとんど認めないが、DMSO やラット血清に溶解したものでは 820 nm 付近で蛍光を発生している。

2-3-2 ICG 吸光イメージング

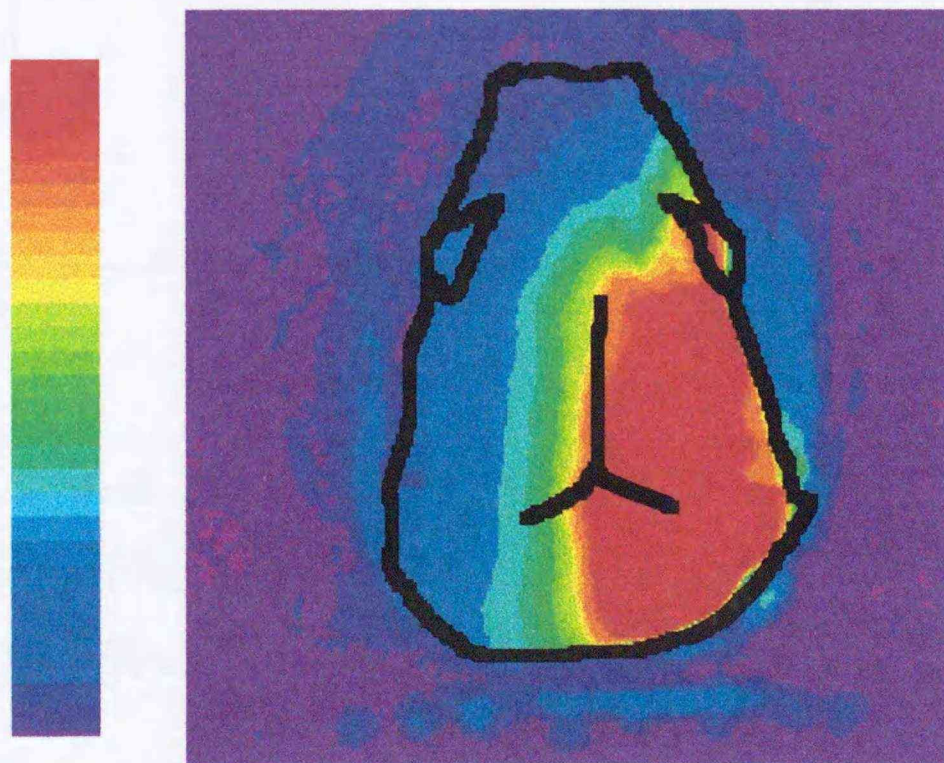
ICG の吸光ピークに一致する波長の光を生体に照射し、体内に蓄積した ICG と周囲組織との光学的コントラストを得ることにより、ICG の蓄積した構造物を可視化することができる。さらに体内に蓄積した ICG のクリアランスを測定することにより、血流などの機能的情報も得ることができる。

(1) ICG 吸光イメージング法によるラット脳血流の2次元イメージング

(高、酒谷、他 1996)

図9に ICG を用いたラット脳血流の2次元イメージングの結果を示す。実験システムは、前述の脳酸素化状態のイメージングに使用したもの(図5)と同様である。ネンブタール麻酔下に内頸動脈に選択的に ICG を注入し、CCD カメラで頭部の透過光を測定することにより、脳内の吸光度変化を2次元的にイメージングした。

図9 ラット脳血流の ICG 吸光イメージング (高、酒谷、他 1996)



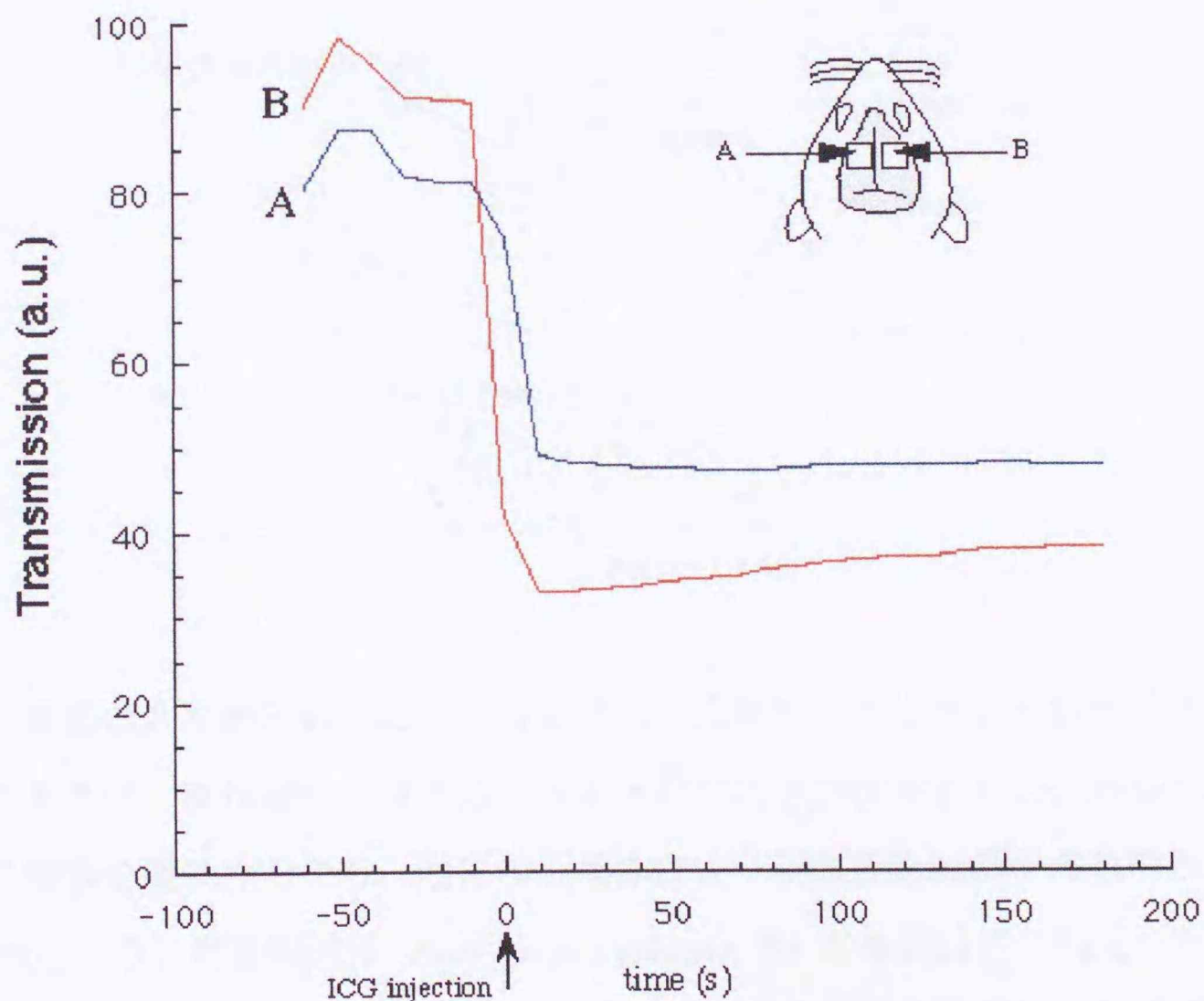
注：明色に近づく程大きな透過光量変化を示す。

黒線はラットの輪郭を表わす。白線は上矢状縫合、ラムダ縫合を示す。

図9はICG注入前後の透過像の輝度比をとったもので、明色に近づくほど変化が大きいことを示す。ICG注入後に注入側の脳に大きな透過光量変化（低下）がおきたことが分かる。

図10はROIを設定し吸光度の時間的变化を示したものである。注入直後よりROIの吸光度が急速に低下した後に徐々に回復して行くのが分かる。

図10 ICG 吸光イメージングによる局所脳血流の測定



注：左側（A）右側（B）頭頂部の ICG クリアランスを示す。

縦軸は透過光強度（輝度）を示す。ICG は右側内頸動脈に注入。

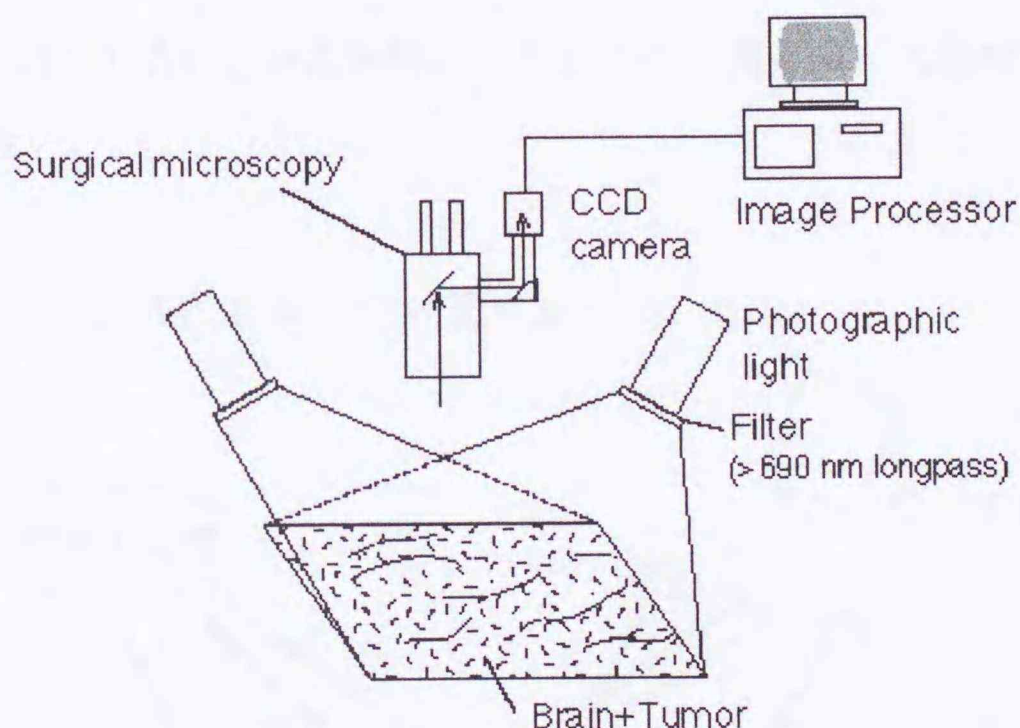
左側頭頂部の低下は前交通動脈による血流による。

このように注入後の ICG のクリアランスを測定することにより、特定部位の血流変化も計測できる。

(2) ICG 吸光イメージング法の臨床応用

最近、Huglund らは ICG 吸光イメージング法を応用して術中脳腫瘍イメージングを試みた (Haglund 1994, 1996)。図 1 1 に彼等の術中イメージングの方法を示す。

図 1 1 ICG 吸光イメージングを応用した術中脳腫瘍イメージングの方法
(Haglund 1996)



脳腫瘍の外科的手術においては正常脳と脳腫瘍との境界を見い出すことが重要であるが、悪性腫瘍ではその境界が肉眼的に不鮮明であることが多く、このため腫瘍を取り残したり、逆に手術操作により正常脳を損傷する危険がある。Huglund らは悪性脳腫瘍 (malignant glioma 等) の血流は正常脳よりも豊富であることに着目し、ICG 静脈内投与後のクリアランスを脳腫瘍周辺部位で測定することにより境界部位を同定する方法を考案した。

(3) ICG 吸光イメージング法の問題点

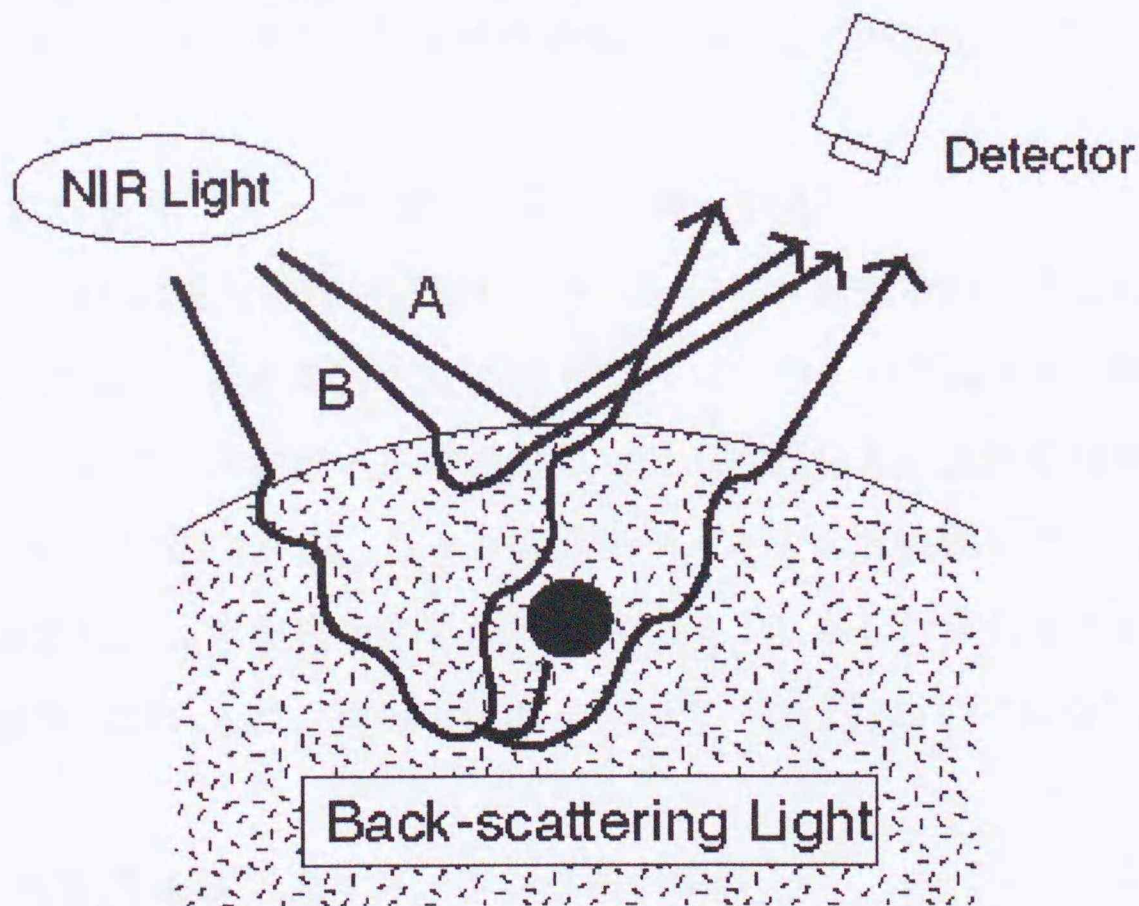
ICG 吸光イメージング法を脳神経外科等の術中イメージングに応用する上で次のような欠点もある。すなわち成人脳など厚みのある組織では光の散乱と吸収が大きく、透過方式 (光源がカメラの反対側に位置する) を用いてイメージ

ングすることは現実的ではない。このため反射方式（光源とカメラが同側に位置する）を用いることになる。

反射方式による吸光像のイメージングで得られる目的信号は、対象部位からの後方散乱光（図12の back-sacttering light）であるため、生体組織における強い散乱と吸収に影響される。さらに表面反射や浅部組織からの強い後方散乱に妨げられ、深部の対象を鮮明にイメージングすることは困難である。

実際、Huglund らの術中脳腫瘍イメージングでは近赤外光を用いているが、脳表面の ICG クリアランスを測定しているのに過ぎず、大脳皮質内の情報は得られていない。

図12 反射方式による ICG 吸光イメージング法



A は表面反射、B は浅部組織からの後方散乱光を示す。

2-3-3 ICG 蛍光イメージング

ICG の近赤外光領域の蛍光を用いて、体内に蓄積した ICG を光学的に同定することが可能である。このイメージング法では励起光も蛍光も生体透過性の高い近赤外光領域の波長であるため、生体深部に蓄積した ICG 蛍光を計測できる可能性がある。

(1) ICG 蛍光イメージング法の臨床応用

近年、眼底カメラに CCD カメラと近赤外光レーザー光源を装着し、増殖した網膜新生血管のイメージングが試みられた (Schneider 1992)。ICG 蛍光イメージング法を用いることにより、網膜表面の血管のみならず網膜下に位置する異常血管もイメージングできるため臨床的有用性は高いと考えられている。

(2) ICG 蛍光イメージング法の腫瘍診断への応用

最近、ICG の蛍光特性を応用してラットの腫瘍組織を検出する試みが報告された (Li 1995)。前項で述べた ICG 吸光イメージング法による術中脳腫瘍イメージングと同様に、腫瘍と正常組織における血流量の差異から腫瘍組織を検出しようというものである。ラット腫瘍モデルと人の乳癌における血流クリアランスを測定し、正常組織との差異が示された。しかしながら蛍光の検出には光電子増倍管が用いられ、腫瘍自体のイメージングは行われていない。

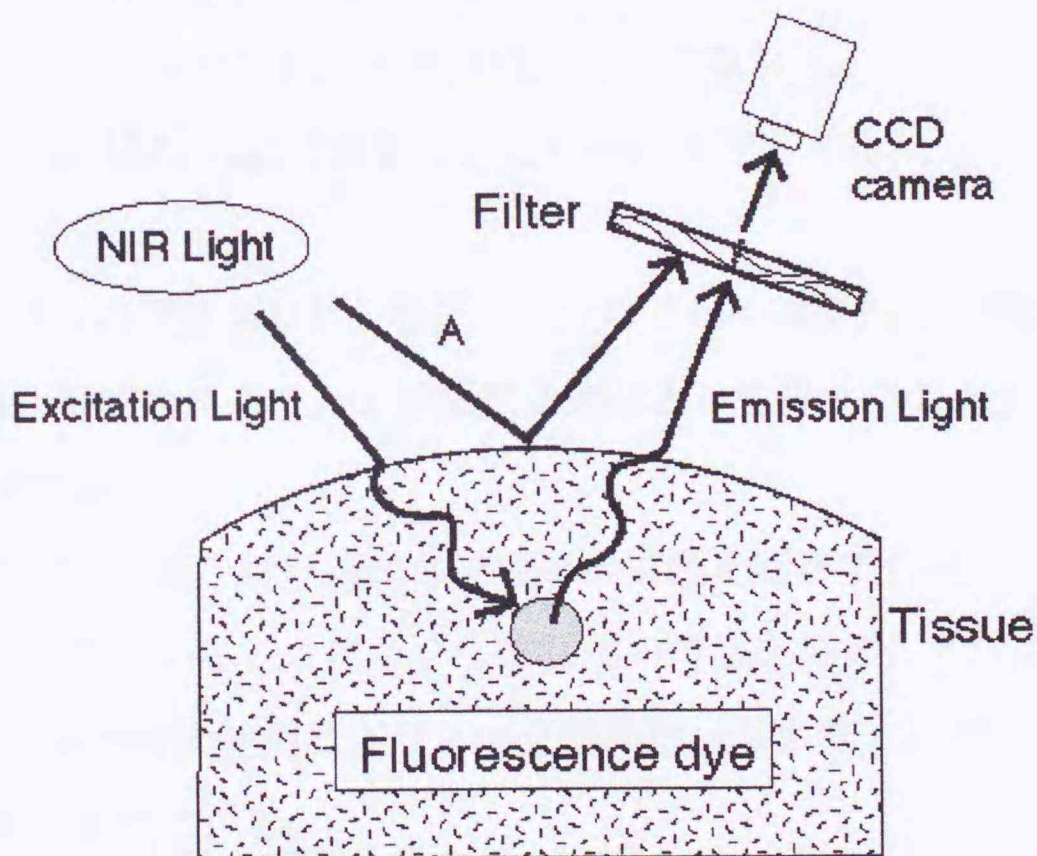
(3) 反射式 ICG 蛍光イメージング法の利点

ICG 蛍光イメージング法では励起光と蛍光の波長が異なるため、反射方式による ICG 吸光イメージングで問題となる表面反射を抑制できるという利点も考えられる (図 1 3)。特に CCD カメラを用いた術中イメージング等の臨床応用を考える上で、表面反射を抑制できる利点は大きい。

また蛍光イメージングの場合、体内の対象部位そのものが光源となるため、

蛍光イメージングに比べ、重要な利点が生ずる。生体の光透視における画像劣化の大きな原因は、生体組織における強い散乱と吸収の影響である。この影響は、光路長の増加に伴い指数関数的に増加する。蛍光イメージングでは、この光路長を半減させることができる。また蛍光イメージングで得られる目的信号は、対象部位からの後方散乱光であるが、蛍光イメージングの場合は前方散乱光となり、より大きな光強度が期待できる。

図13 反射方式による ICG 蛍光イメージング



注：励起光（Excitation Light）と蛍光（Emission Light）の波長が異なるため表面反射光（A）はフィルター（Filter）により遮断される。

（4） ICG 蛍光の断層イメージング

近赤外蛍光色素は現在急速に注目を集めており、光 CT 技術を応用して散乱体内に蓄積した近赤外蛍光色素を 3 次元的にイメージングする試みが散見されるようになった（O'Leary 1994, Wu 1996）。しかしながら、現時点ではファントム実験の段階であり、生体イメージングが可能になるには今後さらなる研究が必要である。

2-4 まとめ

MRI は脳神経の解剖学的構造や機能が無侵襲的に描出できるため、脳神経外科領域の診断、特に術前後の診断では最も有用な神経補助診断法として確立されつつある。しかしながら幾つかの改善を要する面もある。

1. 測定機器や設備が大型でコストが高い。
2. 測定患者が限定される場合（ペースメーカー等を有する例）がある。
3. リアルタイムのイメージングができない。
4. 術中モニタリングに使用するの是一般的ではない。
5. functional MRI により測定できない神経機能もある。

開発中の種々の光診断法は、現在使用されている神経補助診断法や MRI の持つ欠点を補う可能性がある。光診断法の利点として以下のことが考えられる。

1. 無侵襲である。
2. 代謝変化、血流、神経活動など種々の機能を測定できる。
3. 近赤外光を用いることにより生体深部の情報を得ることができる。
4. CCD カメラ等の使用により 2 次元的測定（多点測定）が可能である。
5. 機器を小型化できる。
6. 低コストである。

CCD カメラは、手術用顕微鏡に装着できるため、脳外科領域の診断、特に術中モニタリングに適した撮像装置と考えられる。また ICG を用いた近赤外蛍光イメージングは、これまで方法が確立されていない術中脳腫瘍イメージングや無侵襲髄液循環測定法などに応用できる可能性がある。

本研究の目的は、CCD カメラによる近赤外蛍光イメージング法を応用した新しい神経補助診断法を開発することにある。

第3章 ICG 蛍光イメージング法の開発

このようにいくつかの利点が考えられる ICG 蛍光イメージング法であるが、*in vivo* で系統的に検討した光学的研究は見当たらない。ICG 蛍光イメージング法の臨床応用を目指してまず以下の実験を行った。

1. ICG 蛍光像と吸光像の比較

生体内に蓄積した ICG の 2 次元分布の蛍光像と吸光像を比較し、どちらの方式がより臨床応用に適しているか、マウス頭部（死体）を用いて検討した。

2. ICG 蛍光イメージング法の限界特性

種々の条件下における生体内 ICG の 2 次元蛍光像を撮像し、ICG 蛍光イメージング法の限界特性等をマウス頭部（死体）を用いて検討した。

3-1 ICG 蛍光像と吸光像の比較実験

3-1-1 実験方法

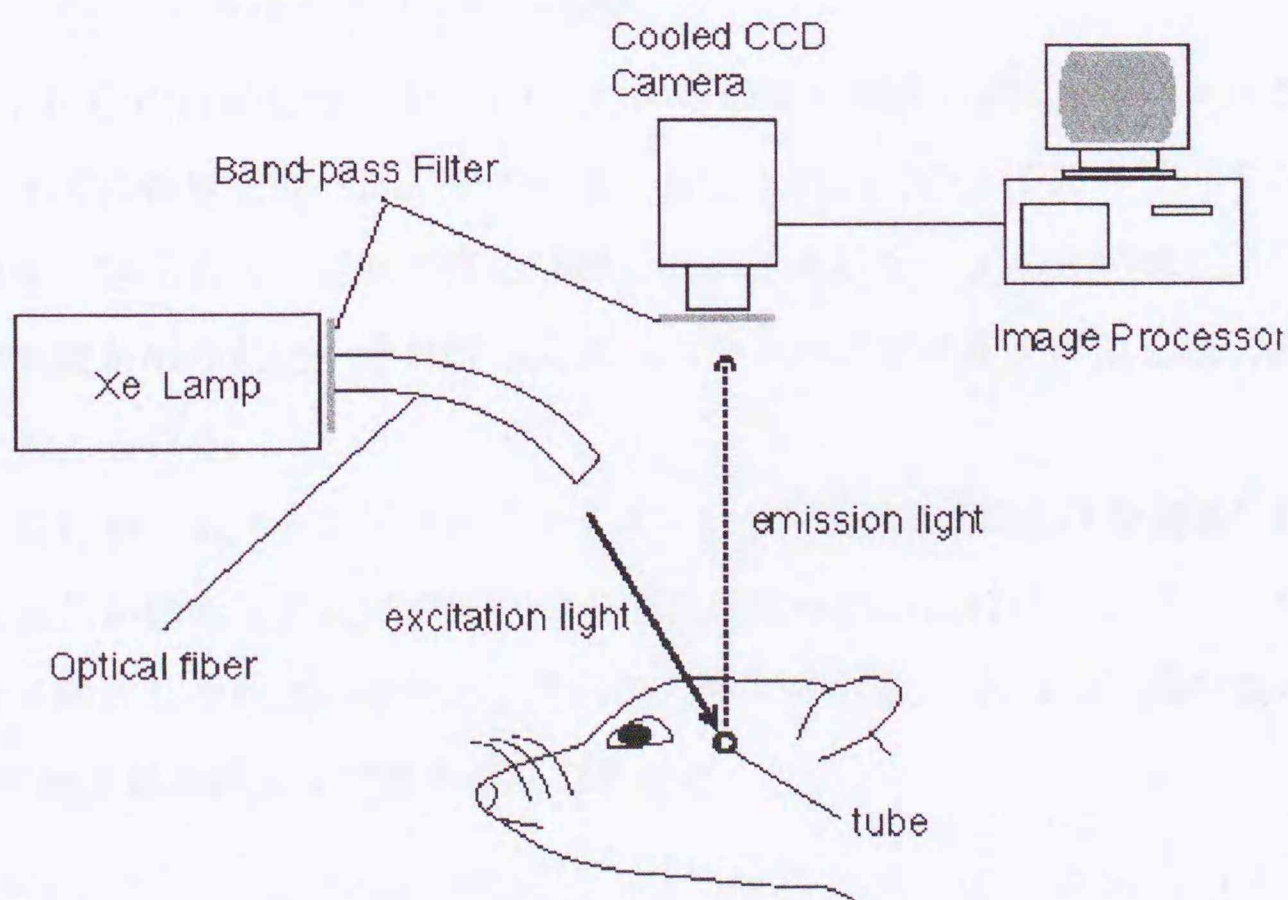
(1) ICG 溶液

ICG はジアグノグリーン注TM（第一製薬製）を用いた。ICG は DMSO 溶液に種々の濃度で溶解した。DMSO に溶解した ICG の近赤外光領域における蛍光特性は図 8 に示した。

(2) 測定装置

図 1 4 に測定装置の概略を示す。光源にはキセノンランプ（Fiber Optic Light Source, 150 W、ニコン製）を使用した。ガラス製光ファイバー（UV 透過用石英ファイバー、開口数 1、バンドル半径 5 mm）の先端部には干渉膜バンドパスフィルター（中心波長 700, 720, 740, 760, 780 nm、朝日分光製）を装着した。

図 1 4 実験方法および測定装置の概略



ICGより発する蛍光は、干渉膜バンドパスフィルター(中心波長820, 840, 860, 880 nm、朝日分光製)を介して、カメラ用レンズ(F55 mm、Micro-Nikkor、ニコン製)を装着した水冷式冷却 CCD カメラ(浜松ホトニクス製、C-4880-11、512X483 pixel, 16 bit, 冷却温度 -34 °C)にて撮像した。画像はイメージプロセッサー(浜松ホトニクス製、ARGUS-50)および専用ソフトウェアにて解析した。

(3) 測定系の波長特性

まずシャーレ内の ICG (338 μ M) を用いて、今回使用した測定系の波長特性を調べた。実験では、上記の励起光側および記録側のフィルター波長を種々に組み合わせて ICG の蛍光強度を測定した。シャーレ内の ICG の蛍光強度を測定すると、記録側の波長にかかわらず 720 nm で励起すると強い蛍光が得られた。これは吸光極大波長と異なるが、キセノンランプの放射スペクトルが 720 nm 付近で高パワーの分布をしているためである。また記録側の波長は干渉フィルター840 nm で最大蛍光強度が得られた。

(4) バックグラウンドノイズの測定

次に、ICG の存在しない DMSO だけからの蛍光強度を測定し、バックグラウンドノイズの強度を調べた。その結果、特定の波長でのノイズのピーキングは見られず、励起波長と記録波長の間隔の大小に応じて、ノイズが減少、増加することが確かめられた。それは単純に、バンドパスフィルタの阻止域透過光の増減と考えられる。

各波長におけるバックグラウンドノイズ(シャーレ内の DMSO を撮像)は、記録側の波長が励起波長に近づくにつれて強くなった。これはバンドパスフィルターでも除去しきれない迷光によるものと考えられる。SN 比は、励起波長 720 nm、記録波長 840 nm で最も良好であった。

(5) フィルタの設定

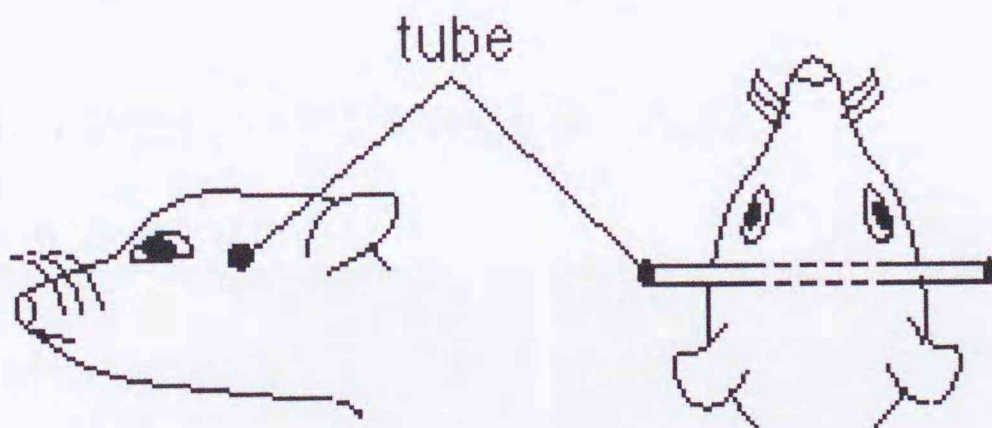
上述の検討結果より、ICG 蛍光像のイメージングでは、励起波長 720 nm、記録波長 840 nm を用いることとした。

ICG 吸光像のイメージングでは、光源側に 780 nm のバンドパスフィルターを、記録側にはカットオフ波長 590 nm のロングパスフィルターを装着して撮像した。

(6) 動物実験

マウス (BALB/c、雄、8 週齢) をペントバルビタール (ネンブタール、ダイナボット社製) の腹腔内投与 (100 mg/Kg) にて屠殺し、頭頸部の毛を市販の脱毛クリームにて除去した。左右の側頭部の皮膚、頭蓋骨に小孔を開けポリエチレンチューブ (直径 0.8 mm) を貫通させた (図 15)。

図 15 マウス頭部へのチューブの貫通方向



チューブは種々の深さ (頭頂部の頭皮よりチューブ表面までの距離をノギスにて計測) に挿入した。ICG の DMSO 溶液はこのチューブ内に注入した。また一部のマウスでは、ICG と完全吸光体の吸光像を比較するため 20G の注射針を挿入した。

(7) 照射方法

ICG 吸光像と蛍光像の比較実験では、各々の反射像と透過像を比較検討した。

反射像の撮像では照射光はマウスの頭頂側（頭部より 5 cm 離し、約 45 度の角度で照射）より行った。透過像の撮像ではは下顎直下より垂直上向きに光を照射した。反射像と透過像とも撮像は頭頂側より行った。

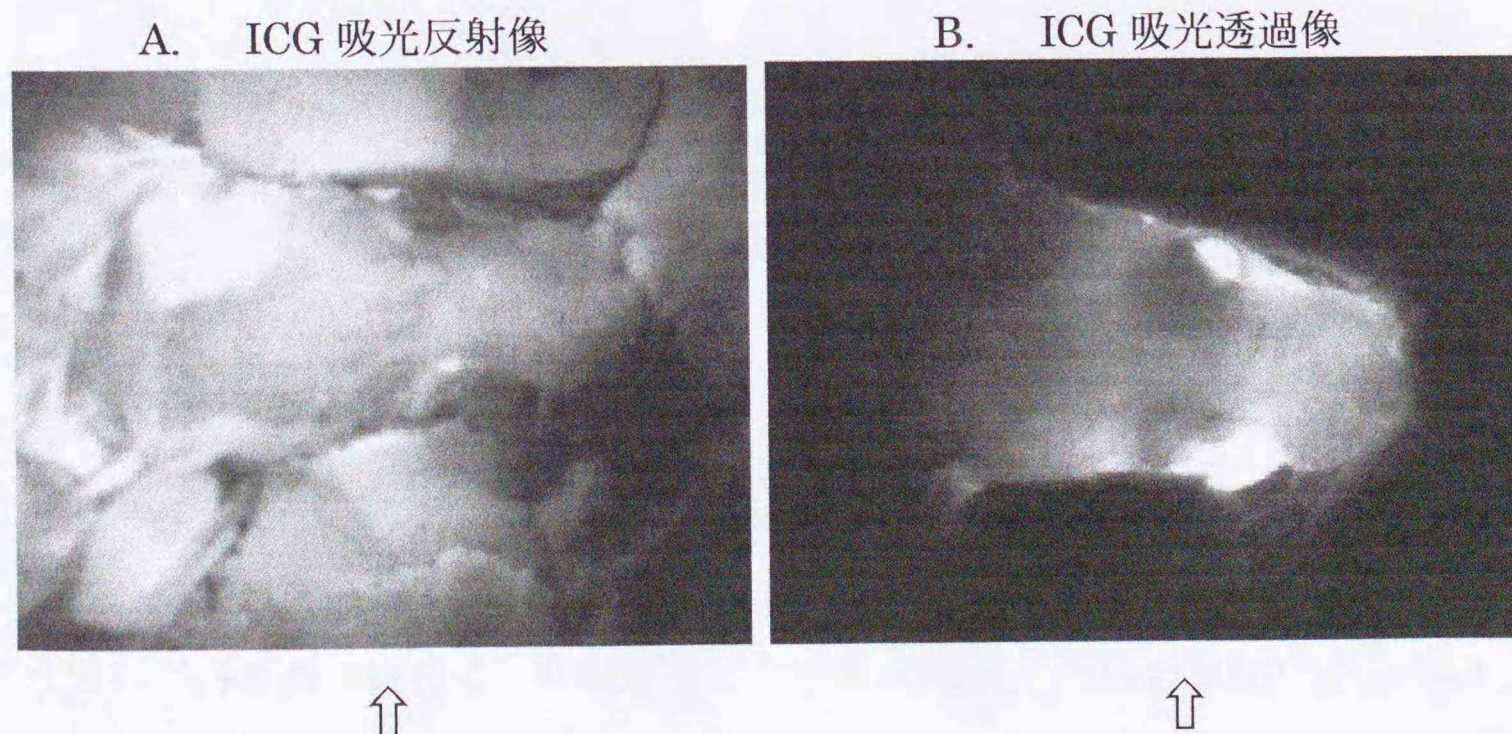
透過像を撮像する場合、照射光源の光がカメラに直接入るのを防ぐためにマウス頭部の周囲を粘土で覆った。さらにマウスの側頭部より露出しているチューブも粘土で覆い、この部分の ICG 蛍光の影響を取り除いた。

3-1-2 実験結果

(1) ICG 吸光イメージング

図 1 6 に ICG 吸光イメージングの反射像 (A) と透過像 (B) を示す。ICG の濃度は $338 \mu\text{M}$ で、ICG 溶液を注入したチューブは頭皮、頭蓋骨、脳組織を介して頭頂部では頭皮表面下 2 mm に位置している。

図 1 6 ICG 吸光イメージングの反射像と透過像



注：矢印（↑）は ICG チューブの位置を示す。

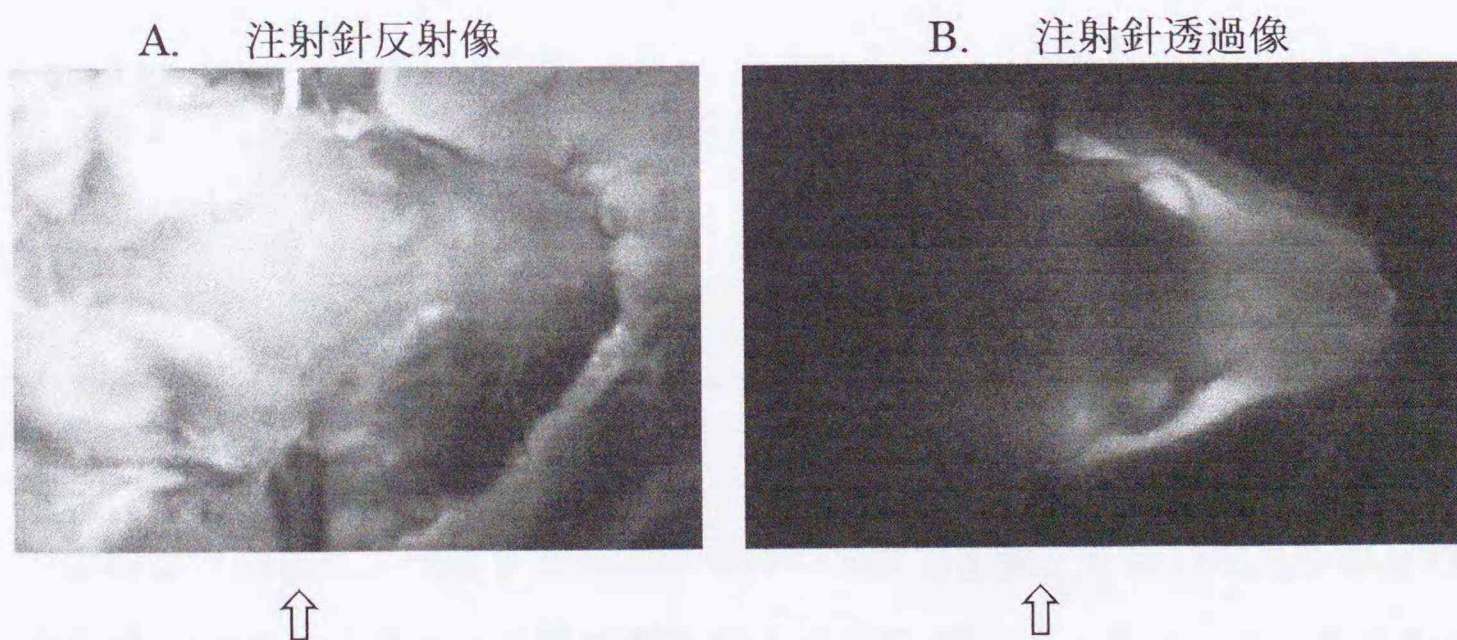
反射像ではマウスの皮膚表面の画像が得られるのみで、ICG は全く同定出来ない。この図では露光時間は 0.02 秒であったが、これ以上に設定してもマウス表面の反射光により画像は飽和傾向を示すのみで、0.1 秒で画像は完全飽和した。

透過像では頭部の透過像が得られているが、ICG の注入されたチューブは同定出来ない。

ICG の吸光像が得られない原因として、ICG の吸光度が不足している可能性がある。そこで ICG チューブの代わりに完全吸光体に近い金属性注射針を同じ条件で撮像した。

図 1 7 は注射針の吸光反射像および吸光透過像を示しているが、いずれの照射方法でも吸光物体の像を得ることは出来なかった。

図 1 7 吸光イメージングによる注射針の反射像と透過像



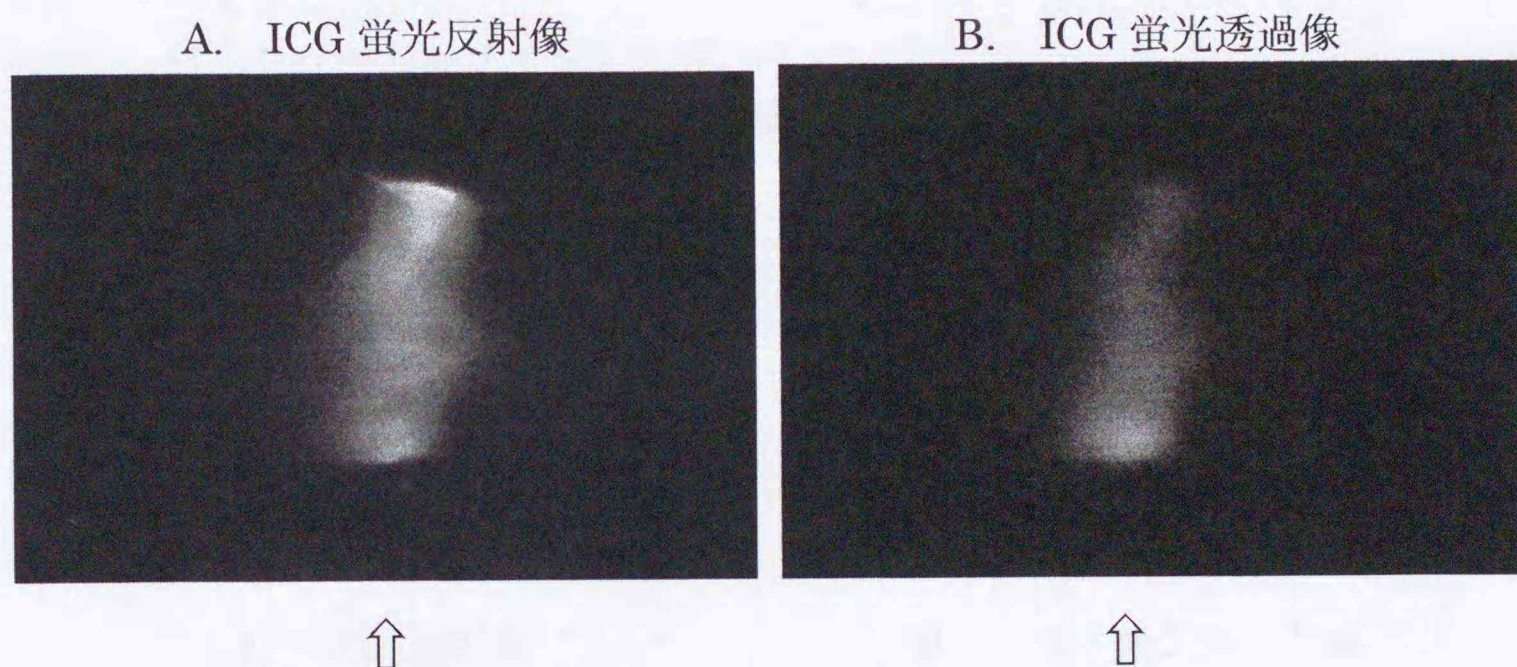
注：矢印（↑）は注射針の位置を示す。

この結果から、ICG の吸光像をイメージングできないのは、ICG の吸光度が不足しているのではなく、生体組織における光散乱など他の原因によるものと考えられた。

(2) ICG 蛍光イメージング

図18に ICG 蛍光イメージングの反射像 (A) と透過像 (B) を示す。ICG 濃度やチューブの位置は吸光像撮像の場合と同じ条件である。露光時間はともに5秒である。

図18 ICG 蛍光イメージングの反射像と透過像



注：矢印 (↑) は ICG チューブの位置を示す。

ICG チューブの輪郭は散乱によりぼけているが、反射像、透過像ともに頭皮、頭蓋骨、脳組織を介しても十分な ICG の蛍光が検出されており、チューブの位置が同定可能である。

反射像と透過像を比較すると、反射像の方が透過像より強い蛍光が得られた。これは、体表からチューブまでの距離が前者の場合は小さいこと、すなわち励起光が通過する生体組織の厚みの違いによる励起光強度の差異によるものと考えられる。

また、吸光イメージングの反射像では露光時間を 0.1 秒以上に設定すると生体表面からの反射光により画像が飽和したが、蛍光イメージングでは5秒以上の露光が可能であった。

3-2 ICG 蛍光イメージング法の限界特性実験

3-2-1 実験方法

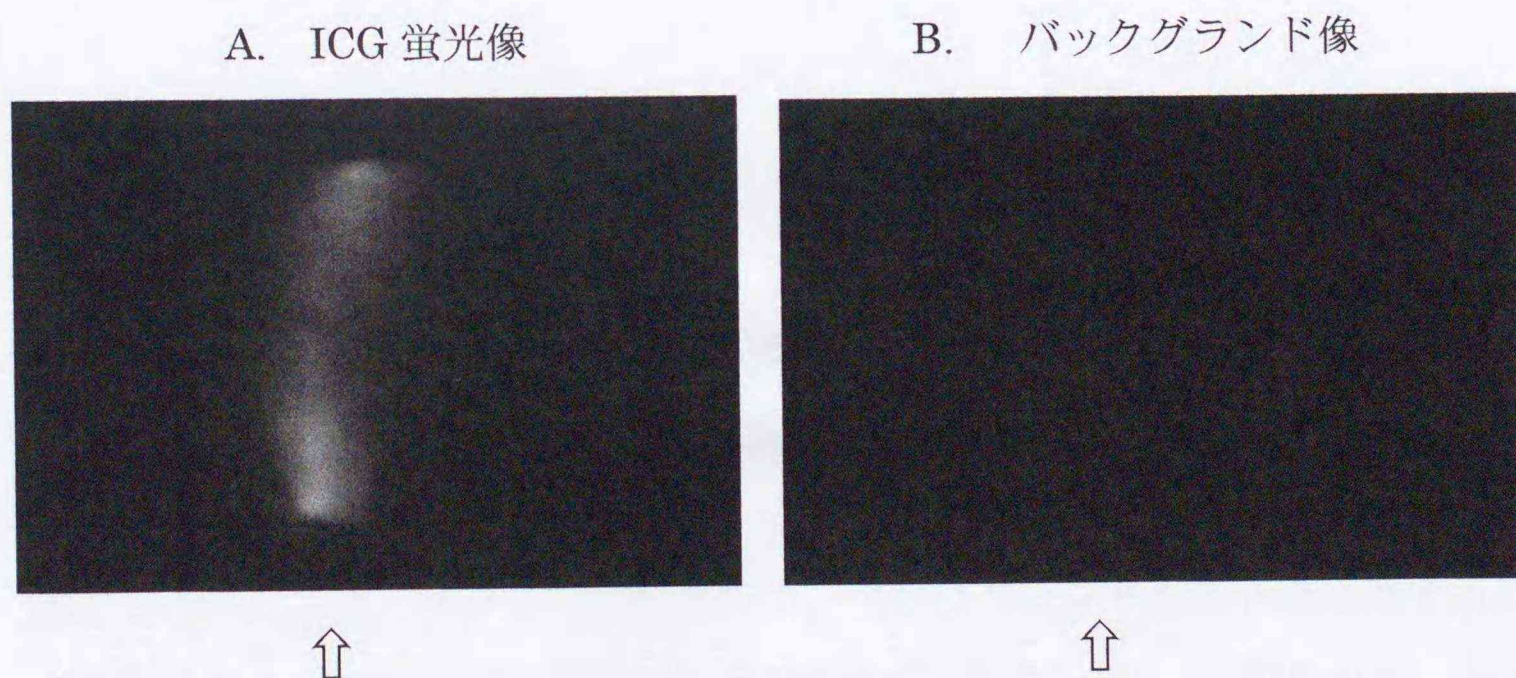
前述の ICG 吸光像と蛍光像の比較実験と同様の方法で実験した。

3-2-2 実験結果

(1) バックグランドノイズの影響

図 19 は ICG の蛍光像とバックグランド像を比較したものである。チューブは頭部表面より 3 mm の深さに位置しており、ICG 濃度は $1350 \mu\text{M}$ である。バックグランド像はチューブ内に DMSO のみを注入し、他は同一条件で撮像した。励起光はカメラ側より照射した。

図 19 ICG の蛍光像とバックグランド像の比較



注：矢印（↑）は ICG チューブの位置を示す。

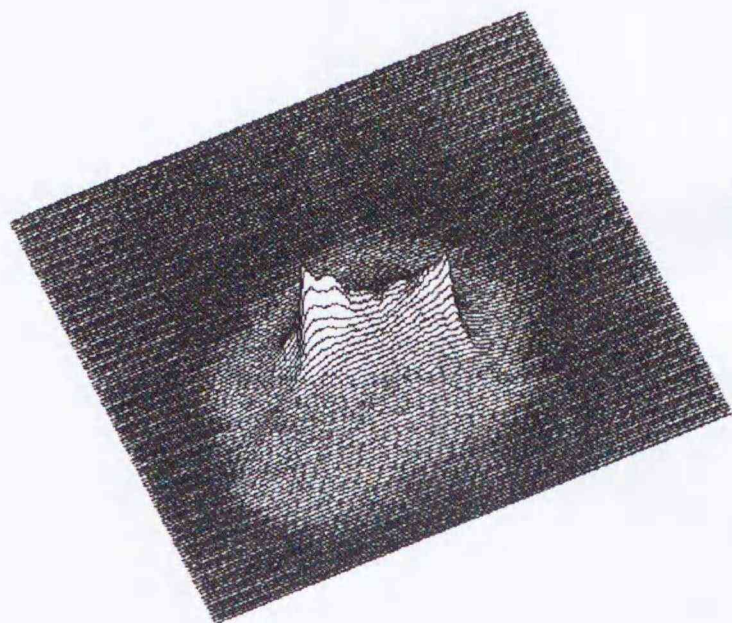
蛍光像ではチューブの走行に対応した明瞭な蛍光強度の増強が認められるが、バックグランド像では明らかな蛍光強度の増強が認められない。

図 20 は ICG の蛍光像とバックグランド像の蛍光強度の 2 次元分布を示している。バックグランド像でも、蛍光強度が若干増強している部分が認められる

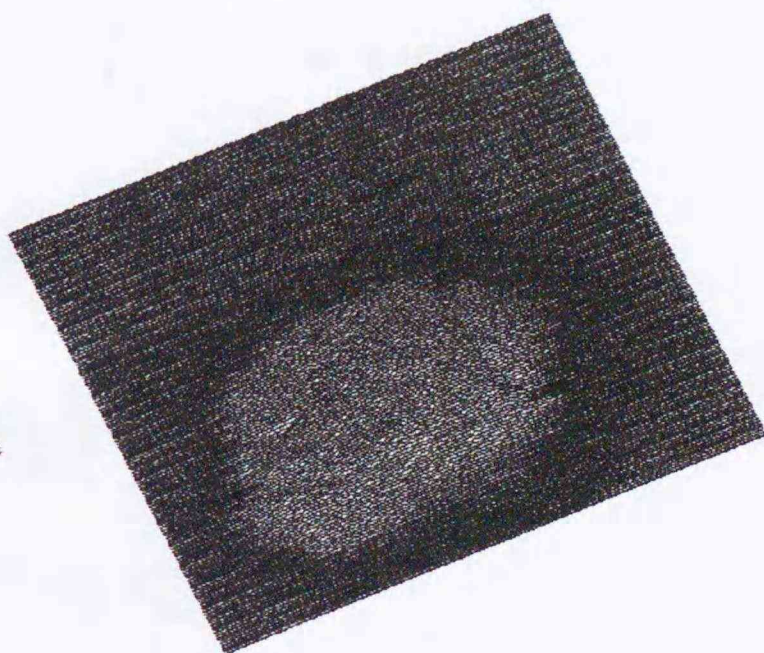
が、チューブに対応するような明らかな光強度分布は認められていない。

図 2 0 ICG の蛍光像とバックグランド像の蛍光強度 2 次元分布

A. ICG 蛍光像



B. バックグランド像

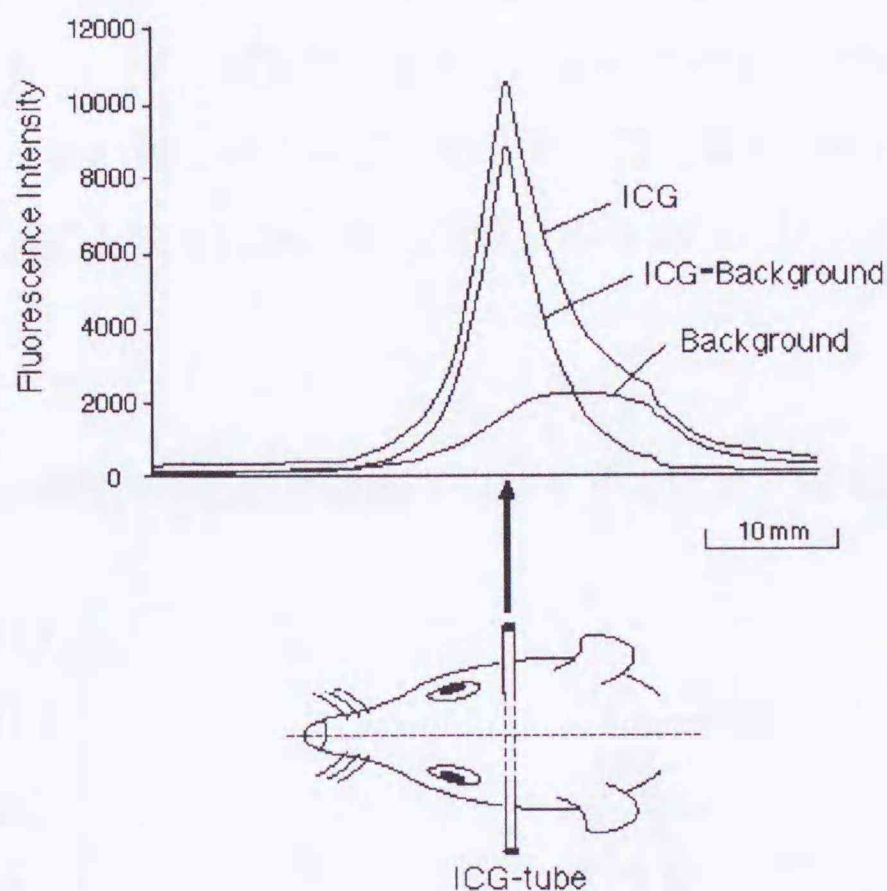


ICG 蛍光像とバックグランド像の差異を評価するために、頭部正中部で矢状方向における光強度の分布を解析した(図 2 1)。ICG, Background は各々 ICG 蛍光とバックグランドを示す。ICG-Background は ICG 蛍光からバックグラウンドをサブトラクションしたものの、すなわち真の蛍光強度分布を示す。

ICG の蛍光強度曲線の頂点はチューブの位置に一致しており、チューブから離れるにつれ急激に減少している。一方、バックグランドは蛍光と比較すると光強度は弱く、チューブと無関係に光強度が分布している。このためサブトラクションを行っても、最大蛍光強度やその位置の変化は少ない。

さらに、光を照射する方向を変えることによりバックグランドの光強度の分布も変化した。これらより、バックグランドノイズは頭部表面の微弱な反射光の迷光によるものと考えられた。

図 2 1 マウス頭部正中部における光強度のプロファイル



注：光強度プロファイルと下段のマウス頭部は対応している。

図 2 2 は ICG 蛍光からバックグラウンドをサブトラクションした像としていない像を比較してものである。画像上ほとんど差異は認められない。

図 2 2 バックグラウンドのサブトラクションの ICG 蛍光像に対する影響

A. サブトラクション (-)

B. サブトラクション (+)



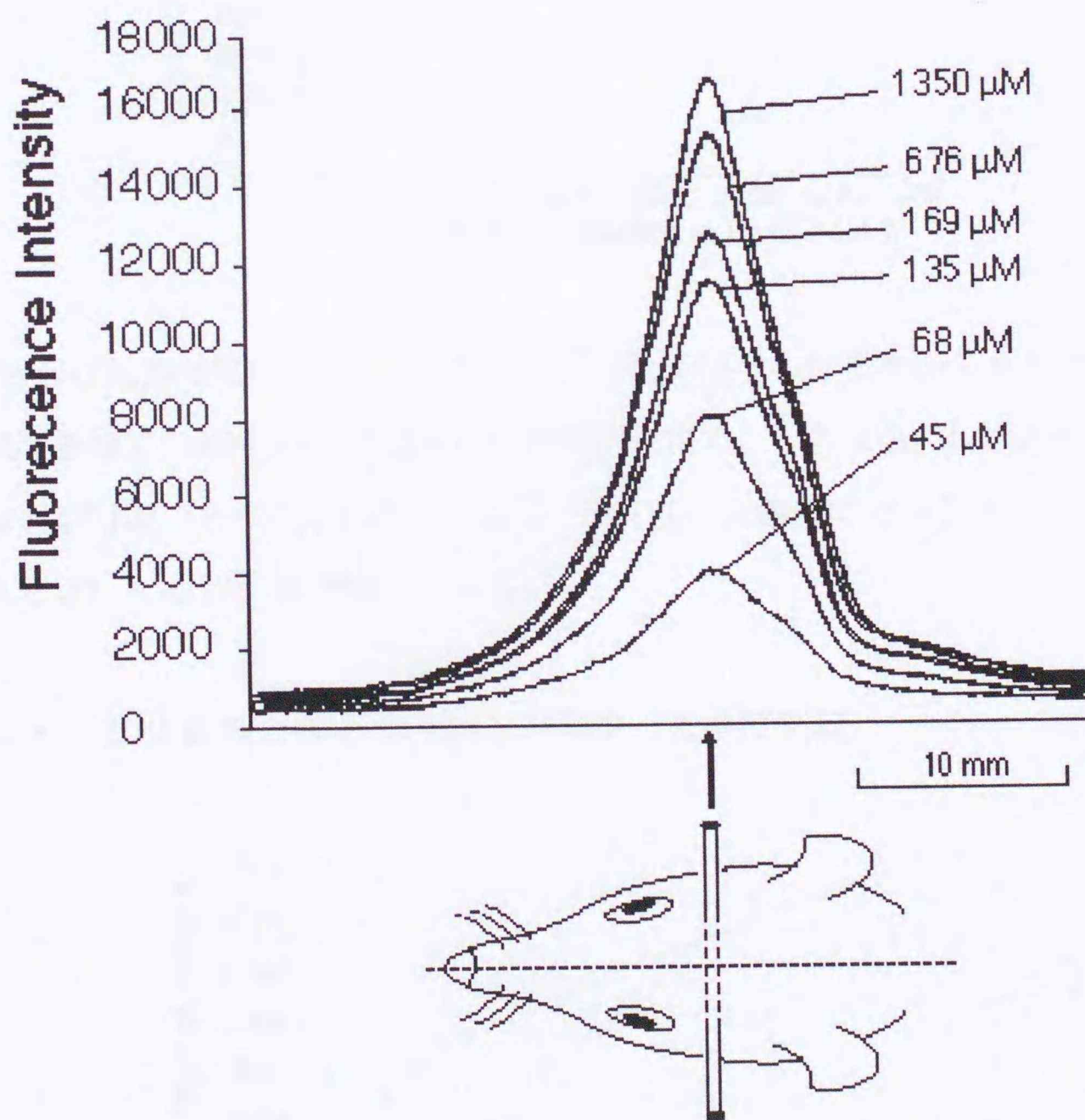
注：矢印（↑）は ICG チューブの位置を示す。

(2) ICG の濃度による蛍光量変化

図 2 3 は ICG 濃度を変化 (45-1350 μ M) させた時の頭部正中線上の蛍光強度分布である。チューブは頭頂部の表面下 2 mm に位置している。

濃度が減少するのに伴いチューブに相当する部位の蛍光強度は減少するが、チューブ位置を頂点とする山形の蛍光強度分布は 50 μ M 以下の低濃度でも保たれていた。

図 2 3 マウス頭部正中部の光強度プロファイルに対する ICG 濃度の影響



注：光強度プロファイルと下段のマウス頭部は対応している。

図 2 4 はマウス頭部正中部における最大蛍光強度と ICG 濃度の関係を示したものである。ICG 濃度が上昇するにつれ蛍光強度は上昇するが、300 μ M 以上では増加の割合は少なくなる。これは濃度消光によるものと考えられる。

図 2 4 ICG 濃度と ICG 蛍光強度の関係（高濃度領域）

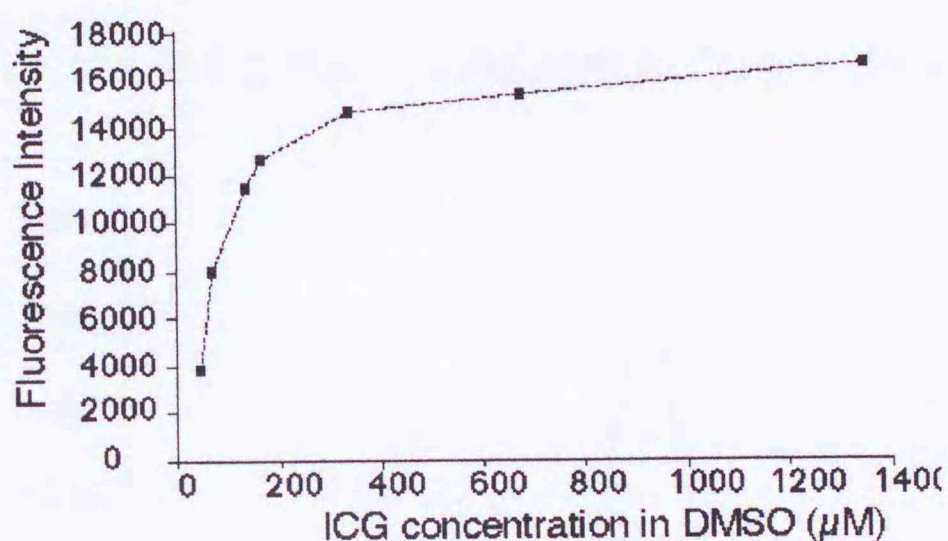
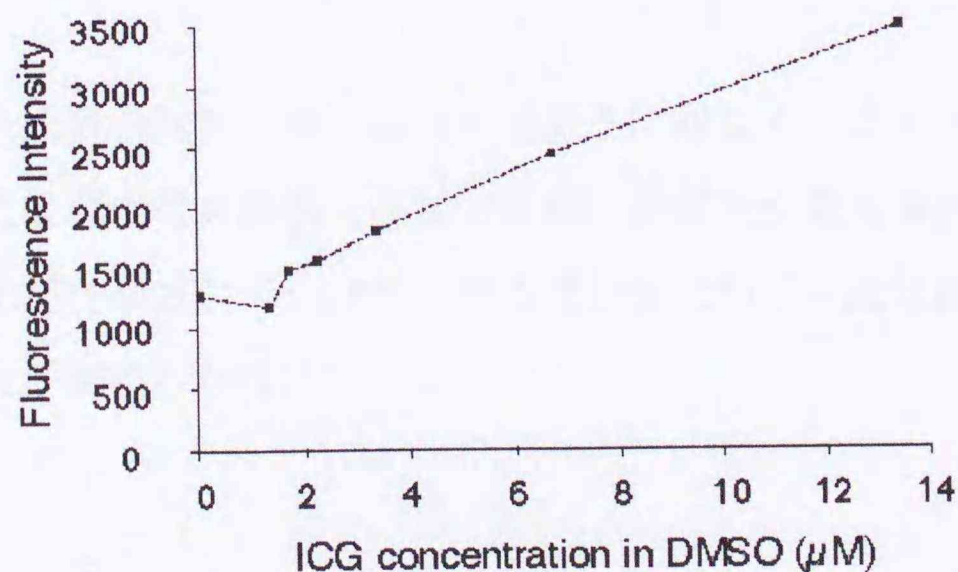


図 2 5 は低濃度における ICG 濃度と最大蛍光強度の関係を示したものである。低濃度領域では濃度と蛍光強度が直線関係にあり、1.7 μ M までチューブ位置の同定が可能であった。しかしながら、それ以下の濃度ではコントロール（ICG 濃度ゼロ）との判別が困難であった。

図 2 5 ICG 濃度と ICG 蛍光強度の関係（低濃度領域）

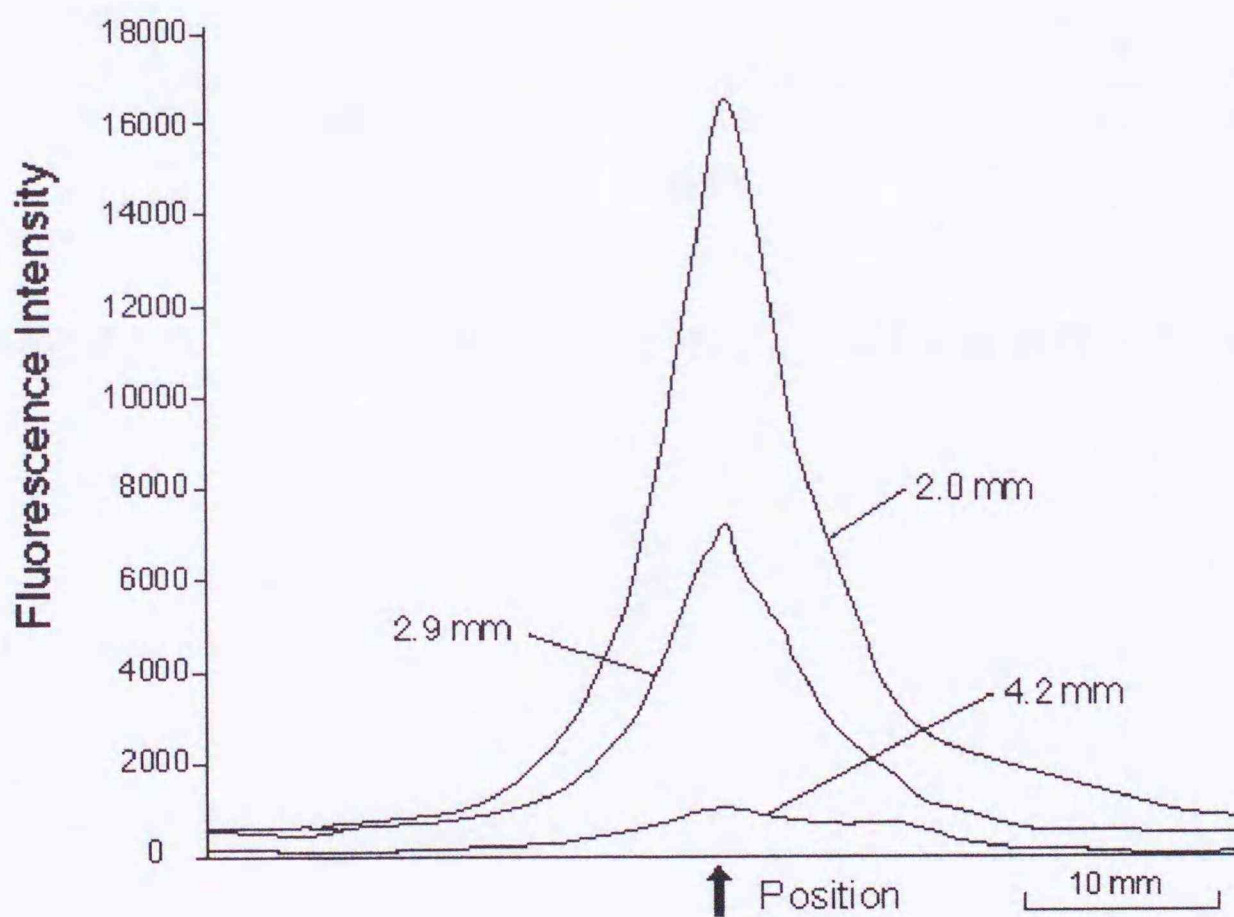


(3) 生体内部の深さによる蛍光量変化

図26はチューブの深さを2.0, 2.9, 4.2 mmに変化させた時の頭部正中線上の蛍光強度変化を示している。ICG濃度は1350 μ Mである。

チューブが深くなるにつれ蛍光強度は減衰していくが、深さ4.2 mmにおいてもチューブの位置に一致した蛍光のピークが認められた。

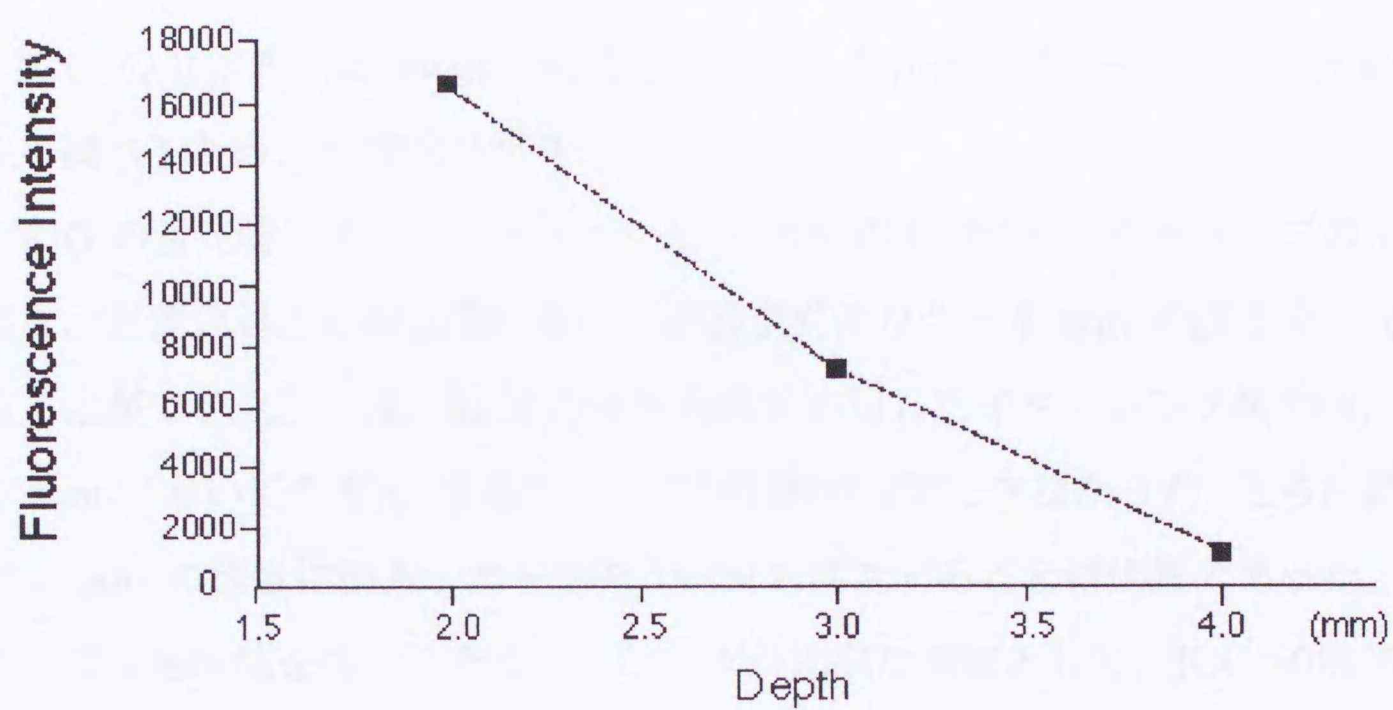
図26 チューブの深さと頭部正中部の光強度プロファイルの関係



注：矢印（↑）はチューブの位置を示す。

図27は各深さの蛍光強度の最大値を深さに対してプロットしたものである。深さが増すと組織内での散乱と吸収のため、励起光や蛍光強度が指数関数的に減少することが予想される。実際、深さの増加に伴って蛍光強度は大きく減少していくことが認められた。

図 2 7 ICG チューブの深さと ICG 蛍光強度の関係



以上の結果より、本条件下の蛍光による可視深さは 4 mm 程度と考えられる。

3-3 まとめと考察

ICG の近赤外光領域の蛍光特性を利用した生体機能イメージング手法の可能性を調べるため、基礎的検討を行った。

ICG の蛍光特性を応用したイメージング法では、ICG 含有チューブの位置を頭皮、頭蓋骨および脳組織を介して頭部表面より 2-4 mm の深さまで同定することができた。一方、ICG の吸光特性を応用したイメージング法では、深さ 2 mm においても ICG 含有チューブの位置は同定できなかった。さらに同条件で 2 mm の深さに刺入した金属性注射針も同定することは困難であった。このことは吸光特性を応用したイメージングが困難な原因として、ICG の吸光が不十分なためではないことを示している。以上の結果は、生体内に蓄積した ICG の可視化には、蛍光イメージングの方が吸光特性を応用したイメージングよりも優れていることを示す。

反射式と透過式を比べると、実用における前者の有利さは大きい。すなわち反射方式では、透過光の得られないような厚い生体でも、後方散乱光の得られる深さの体内部位であればイメージングが可能である。透過方式では、たとえ観測側の浅い部位であっても、透過光が得られない限りイメージングは不可能となる。このように大きな特長をもつ反射方式ではあるが、吸光像のイメージングでは、表面反射や浅部組織からの強い後方散乱に妨げられ、体内イメージングは困難である。これに対し、蛍光像を利用する本手法では、励起波長と蛍光波長の違いを利用して、反射方式の最大の難点を克服することができる。

また蛍光像の場合、体内の対象部位そのものが光源となるため、通常の反射方式に比べ、重要な利点が生ずる。生体の光透視における画像劣化の大きな原因は、生体組織における強い散乱と吸収の影響である。この影響は、光路長の増加に伴い指数関数的に増加する。蛍光方式では、この光路長を半減させることができる。また通常の反射方式で得られる目的信号は、対象部位からの後方散乱光であるが、蛍光方式の場合は前方散乱光となり、より大きな光強度が期

待できる。これらの結果、反射方式の蛍光像を利用することにより、散乱によるぼけが比較的少ないイメージングが可能となり、可視深度も向上する。

さらに本手法では、表面反射を抑制するための照射光接触入射や界面の屈折率整合の問題がないことも実用上有利な点である。また ICG が生体の比較的浅い位置に存在する場合は、S/N 比が高くサブトラクションの必要が少ないことも術中イメージングに応用する上において大きな利点となる。すなわち実際の手術用顕微鏡を用いた脳外科手術では手術の進行に伴って顕微鏡の方向を刻々と変える必要があり、ICG が生体に蓄積するために時間を要する場合は、コントロール画像を撮像することは困難であるからである。

以上のように ICG が生体の比較的浅い位置に存在する場合には、CCD カメラを用いた ICG 蛍光イメージング法は、CT などの複雑なイメージングシステムを使用することなくその位置を同定でき、実用上ポテンシャルの高いイメージング法と考えられる。

第4章 無侵襲近赤外蛍光プローブの開発

ICG は水溶液中では蛍光を発生しないが、DMSO 等の有機溶媒に溶解したり血清蛋白と結合すると、近赤外光領域の励起光により近赤外光領域の蛍光を発生するようになる (Baker 1996, Benson 1978)。

近赤外蛍光を応用して血管系を描出する場合、ICG は血管内に投与された後速やかに血清蛋白と結合し蛍光性を有するようになる。このため蒸留水で溶解した ICG を蛍光プローブとして使用することが可能である。しかしながら、血清蛋白の存在しない血管外の構造物や機能を近赤外蛍光で描出しようとする場合、生体に対する毒性の強い有機溶媒に溶解した ICG を投与することはできず、生体に無侵襲な近赤外蛍光プローブが必要となる。

ICG と α -リボ蛋白質の高い親和性に着目し、ICG と α -リボ蛋白質の複合体を作成し、その近赤外光領域の蛍光特性を調べた。

4-1 ICG と α ーリポ蛋白質の結合

4-1-1 リポ蛋白質 (lipoprotein)

リポ蛋白質とは脂質と蛋白質の複合体で、血清リポ蛋白質などの可溶性リポ蛋白質と細胞膜などの構造リポ蛋白質に分類される。

血清中の脂質はすべて特定の蛋白質と非共有結合で結合しているが、このうち遊離脂肪酸—血清アルブミン複合体を除いたものを血清 α ーリポ蛋白質という。遊離脂肪酸を除く脂質成分は超遠心法や電気泳動法によりキロミクロン (密度 $d < 0.96$ g/ml)、超低密度リポ蛋白質 (VLDL、プレー β ーリポ蛋白質、 $d < 0.95$ - 1.006 g/ml)、低密度リポ蛋白質 (LDL、 β ーリポ蛋白質、 $d < 1.006$ - 1.063 g/ml)、高密度リポ蛋白質 (HDL、 α ーリポ蛋白質、 $d < 1.063$ - 1.21 g/ml)、超高密度リポ蛋白質 (VHDL、 $d < 1.21$ - 1.25 g/ml) の5つに分類される。

ICG が血管内に投与された場合、血清蛋白のアルブミンやグロブリンと速やかに結合するが、最も親和性の高いものは α ーリポ蛋白質で、人体の場合投与された ICG の約 80% が α ーリポ蛋白質と結合している。

4-1-2 ICG と α ーリポ蛋白質の複合体の作成

ICG (Diagnogreen ®、第一製薬株式会社製)をまず蒸留水に溶解し、次いで人精製高密度リポ蛋白質 (製品番号 CPL-59433, Organon Technika 社製) に溶解し、ICG と α ーリポ蛋白質を自然結合させた (以下この複合体は ICG-lipoprotein と略す)。

第5章の動物実験では ICG 濃度を 5.54 mM となるように蒸留水に溶解し、この ICG 溶液 5 μ L を 500 μ L の高密度リポタンパク質に溶解したものを使用した。

4-2 ICG と α -リポ蛋白質の結合体の蛍光特性

ICG-lipoprotein の近赤外光領域における蛍光特性を検討するため、DMSO に溶解した ICG の蛍光特性と比較検討した。

4-2-1 実験方法

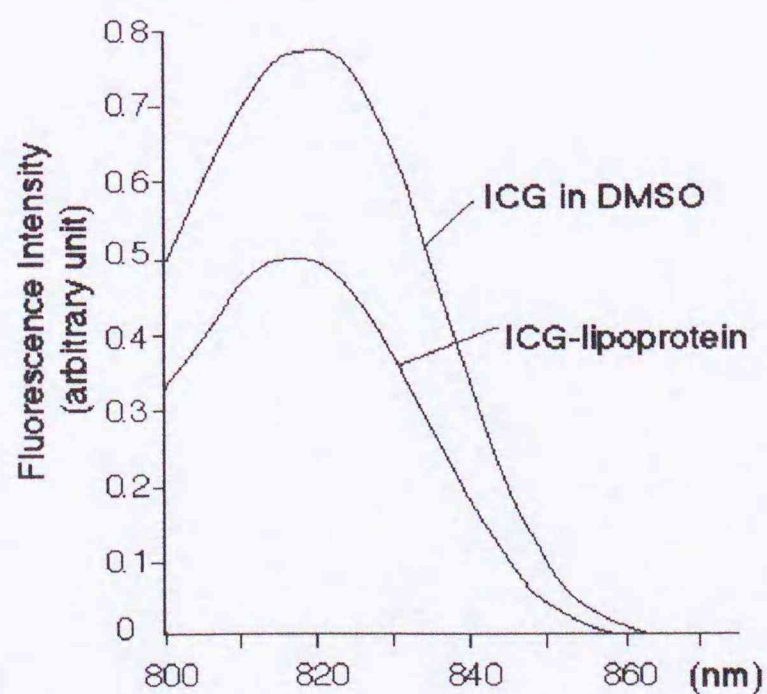
ICG-lipoprotein は、ICG が高密度リポ蛋白質に対して濃度 $1.1 \mu\text{M}$ になるように調整した。DMSO に溶解した ICG も濃度 $1.1 \mu\text{M}$ とした。

蛍光スペクトルは波長 720 nm の励起光で蛍光を励起し、蛍光分光光度計（日立製、850 型）により測定した。

4-2-2 結果

図 2 8 に ICG-lipoprotein と DMSO に溶解した ICG の蛍光特性を示す。図のごとく、ともに 820 nm 付近で蛍光のピークがあり、ICG-lipoprotein は DMSO 溶解の ICG の約 60% の蛍光強度を有していた。

図 2 8 ICG-lipoprotein と DMSO に溶解した ICG の蛍光特性の比較



4-3 まとめと考察

ICG-lipoprotein は DMSO 溶解の ICG と比較して、ほぼ同様の波長で蛍光ピークがある。さらに同濃度の DMSO 溶解の ICG の約 60% の蛍光強度を有しており、比較的強い蛍光性を有していると考えられる。

ICG は肝臓機能や循環機能の臨床検査にも使用され、血管内に投与されると血清中のリポ蛋白と自然結合する。今回使用したリポ蛋白は人血清から生成したものを使用しており、その結合体である ICG-lipoprotein は人体に対する毒性は極めて小さいと考えられる。しかしながら、人体の血管外における毒性については今後検討が必要である。

第5章 脳脊髄クモ膜下腔および髄液流の 蛍光イメージング

この章では第4章で述べた無侵襲蛍光プローブの *in vivo* における有効性を検討するため、生きたラットの脳脊髄クモ膜下腔に蛍光プローブを投与し、クモ膜下腔や脳脊髄液の循環動態が体外からイメージングできるか否か検討した。

5-1 脊髄クモ膜下腔の ICG 蛍光イメージング

5-1-1 実験方法

(1) ICG 蛍光プローブ

前述の ICG-lipoprotein を用いた。ICG を蒸留水に溶解し 5.54 mM とし、その 5 μ L を 500 μ L の purified human high density lipoprotein (CPL-59433, Organon Technika 社製) と混合し、ICG と lipoprotein を結合させた。

(2) 測定装置

図 2 9 に測定装置の概略を示す。光源にはレーザーダイオード (波長 789.8 nm、SLD-304XT, SONY 社製) を使用した。光源から出た光はライトガイドによりラット頭部に導かれる。発光部の光出力は約 900 mW であるが、ラットへの入射点では約 100 mW であった。

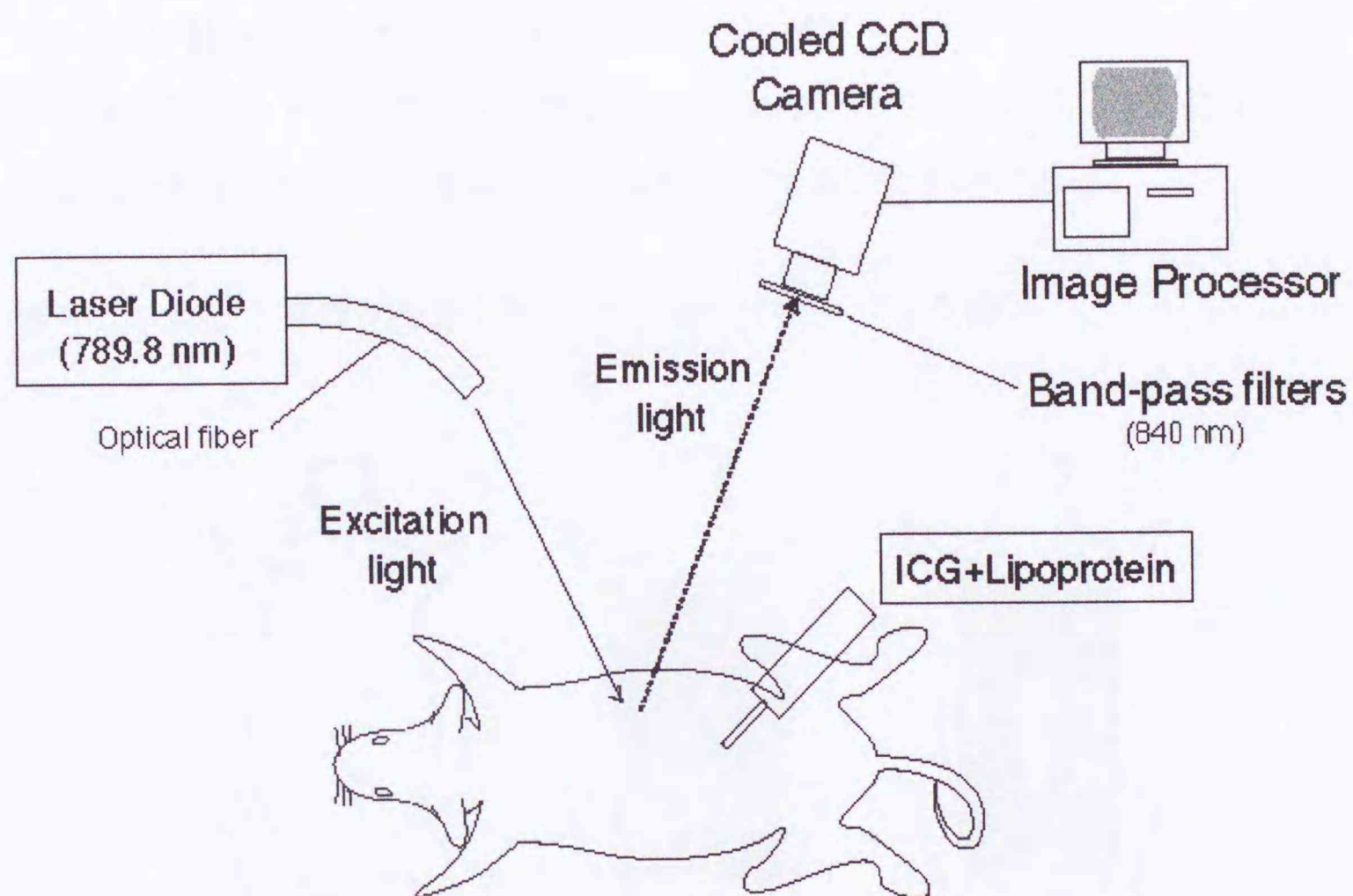
ICG-lipoprotein の蛍光は、干渉膜バンドパスフィルター (中心波長 840 nm、朝日分光製) を介して、カメラ用レンズ (F55 mm、Micro-Nikkor、ニコン製) を装着した水冷式冷却 CCD カメラ (浜松ホトニクス製、C-4880-11、512X483 pixel, 16 bit, 冷却温度 -34°C) にて撮像した。

(3) 画像処理

画像はイメージプロセッサー (浜松ホトニクス製、ARGUS-50) および専用ソフトウェアにて解析した。

これまでの ICG 蛍光イメージング法に関する知見より (第 3 章 3-2 ICG 蛍光イメージング法の限界特性実験 図 2 2 参照)、画像処理は単純加算のみ行い、コントロール画像のサブトラクションなどは行わなかった。なお図に示した ICG 蛍光画像は 100 回加算したものであるが、20 回加算でもほぼ同様の画像を得ることができた。

図 2 9 実験方法と測定装置の概略



(4) 動物実験

Wister 種ラット (100-150 g、5-7 週齢) をペントバルビタールの腹腔内投与 (40 mg/Kg) にて麻酔し、頭頸部から背部の毛を市販の脱毛クリームにて除去した。第 6 腰椎の椎弓切除を行い脊髄硬膜を露出した。

50 μ L の ICG-lipoprotein を注射器にて椎弓切除部位のクモ膜下腔に注入した。ラットはプラスチックフレームに固定した。ICG 蛍光を撮像している間は頭部を約 30 度下げて、ICG-lipoprotein が注入部位より頭部側に移動しやすいようにした。

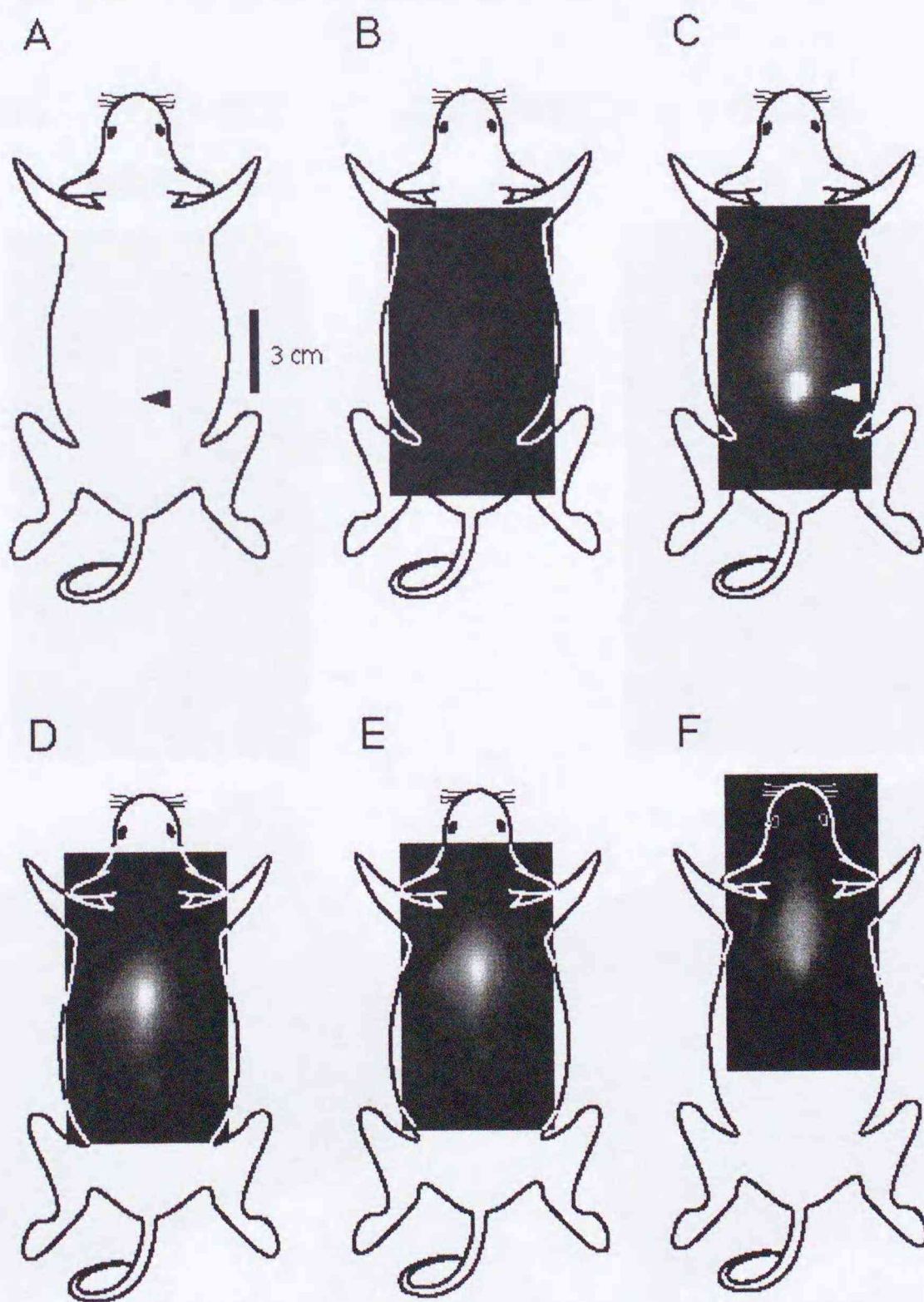
照射光はラットの背側もしくは頭頂側 (体表より 5 cm 離し、約 45 度の角度で照射) より照射した。

5-1-2 実験結果

(1) 脊髄クモ膜下腔の ICG 蛍光イメージング

図 3 0 にラット脊髄クモ膜下腔の ICG 蛍光イメージング像を示す。これは撮像部位を腰椎レベルより順次頭側へ移動して撮像したものである。

図 3 0 ラット脊髄クモ膜下腔の ICG 蛍光イメージング像

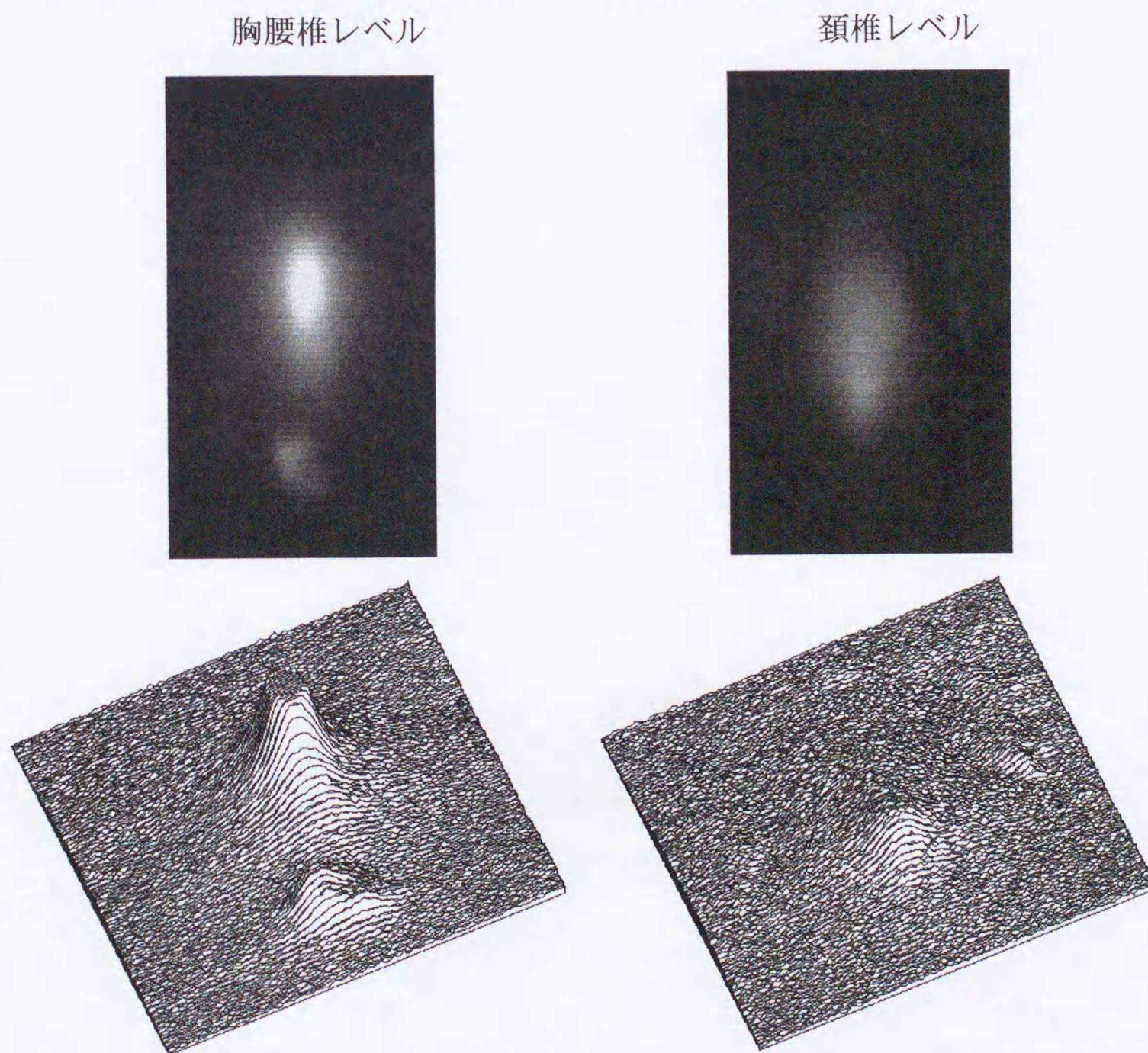


注：黒矢印は ICG 注入部位を示す (A)。B は ICG 注入前のコントロール画像である。白矢印は漏出した ICG の蛍光である (C)。

図のごとく、ICG の蛍光は注入部の腰椎から胸椎下部にかけて脊髄に沿って鮮明に検出されているのが分かる (C) 。注入部位ではクモ膜下腔から皮下に漏出した ICG も認められた。撮像部位を頭側に移動すると、胸椎レベル (D、E) と頸椎レベル (F) で ICG 蛍光が検出された。しかしながら頸椎レベルの ICG 蛍光像は胸腰椎部の ICG 蛍光像と比較し鮮明度が低かった。

さらに頸椎レベルと胸腰椎レベルの ICG 蛍光像の鮮明度の差異を明らかにするために、蛍光強度の 2 次元分布を比較した (図 3 1) 。

図 3 1 頸椎レベルと胸腰椎レベルの蛍光強度 2 次元分布の比較



注：上段は ICG 蛍光像、下段は蛍光強度の 2 次元分布を示す。蛍光像の上方は頭側、下方は尾側。腰椎レベルの尾側の蛍光増強は ICG 漏出による。

蛍光強度の2次元分布が示すごとく、胸腰椎レベルと比較し頸椎レベルの蛍光強度は低く、また幅広く分布しているのが分かる。

このように胸腰椎レベルと比較して頸椎レベルにおいてICG 蛍光像が不鮮明かつ蛍光強度も低い原因として、厚い頸部筋肉による光の散乱と吸収が考えられる。すなわち解剖学的にラットの頸椎背側周囲の筋肉は胸腰椎レベルよりも発達している。このため頸椎レベルのイメージングでは厚い筋肉層により励起光も蛍光も吸収と散乱を受け、蛍光強度が低下し画像のぼけが大きくなるものと考えられる。

5-2 脳クモ膜下腔の ICG 蛍光イメージング

5-2-1 実験方法

(1) ICG 蛍光プローブ、(2) 測定装置、(3) 画像処理および(4) 動物実験方法は脊髄クモ膜下腔の ICG 蛍光イメージングと同様である。

(5) 蛍光イメージングされた脳クモ膜下腔の同定

脳クモ膜下腔は幾つかのコンパートメントに分かれ、さらに脳室とも交通しているため構造が複雑である。ICG 蛍光イメージング法により撮像された脳クモ膜下腔が解剖学的にどのクモ膜下腔に一致するのか検討した。高濃度 ICG (5.54 mM の蒸留水溶解液) 300 μ L を注射器にて第 6 腰椎クモ膜下腔に注入した。ラットをプラスチックフレームに固定し、頭部を約 30 度下げて 1、2 時間待機し、脳を摘出した。肉眼下に ICG の脳クモ膜下腔内の分布を調べ、ICG 蛍光イメージング法により撮像された頭部クモ膜下腔と比較検討した。

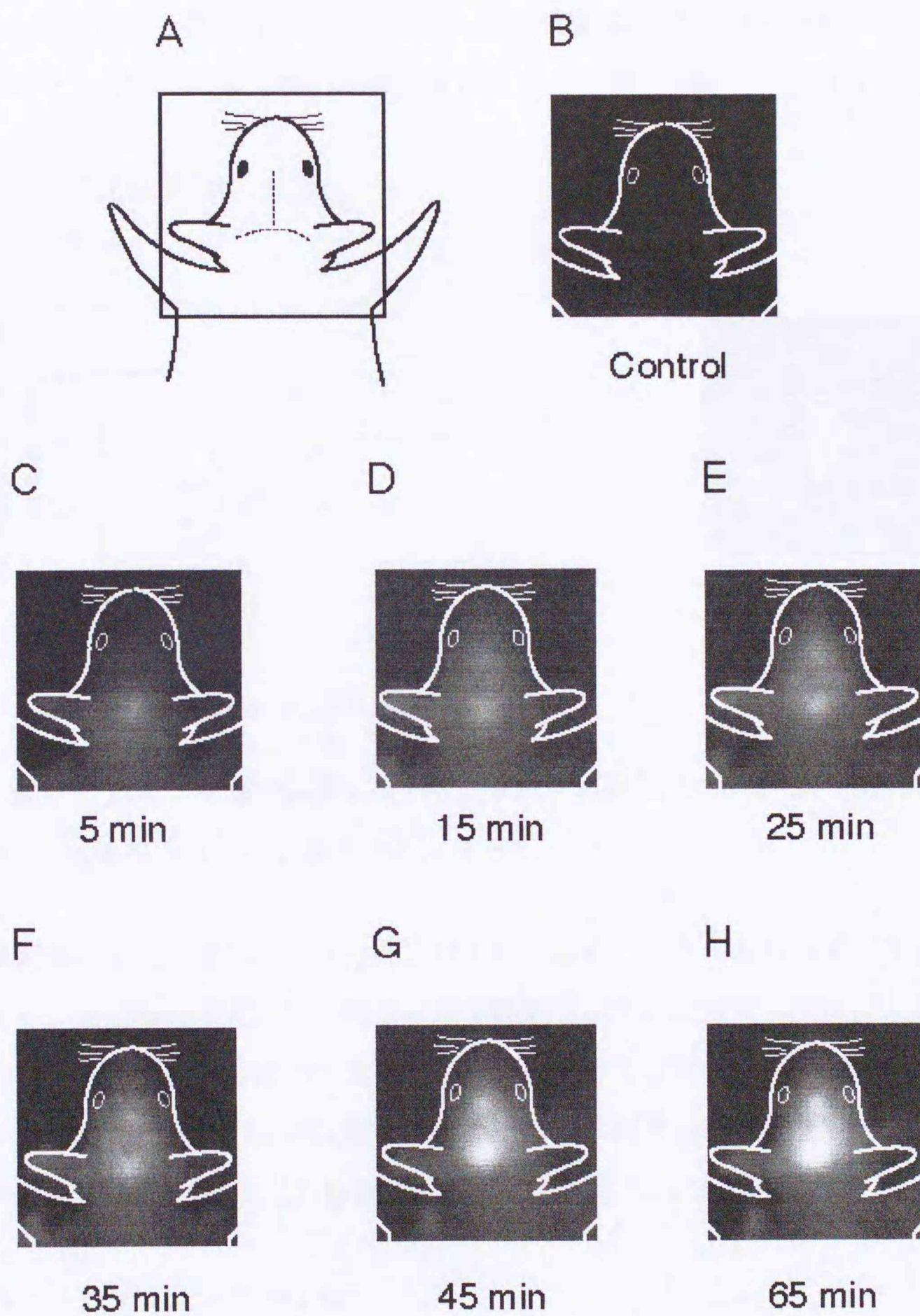
5-2-2 実験結果

(1) 脳部クモ膜下腔のイメージング

図 3 2 にラット頭部クモ膜下腔の ICG 蛍光イメージング像を示す。ICG を第 6 腰椎レベルのクモ膜下腔に注入した後に、頭部を下げて連続的に撮像した。

ICG を注入して 5 分後より、後頭部のラムダ縫合付近に円形の蛍光が検出された (C)。そしてこの部の蛍光強度が増加するにつれ、前頭部にも蛍光が検出された (D, E, F)。注入後約 50 分には前頭部と後頭部の蛍光が融合するような形で楕円形の蛍光像が得られた。注入後 60 分以上経過しても蛍光像の大きな変化は得られなかった。

図 3 2 ラット脳クモ膜下腔の ICG 蛍光イメージング像の経時的変化



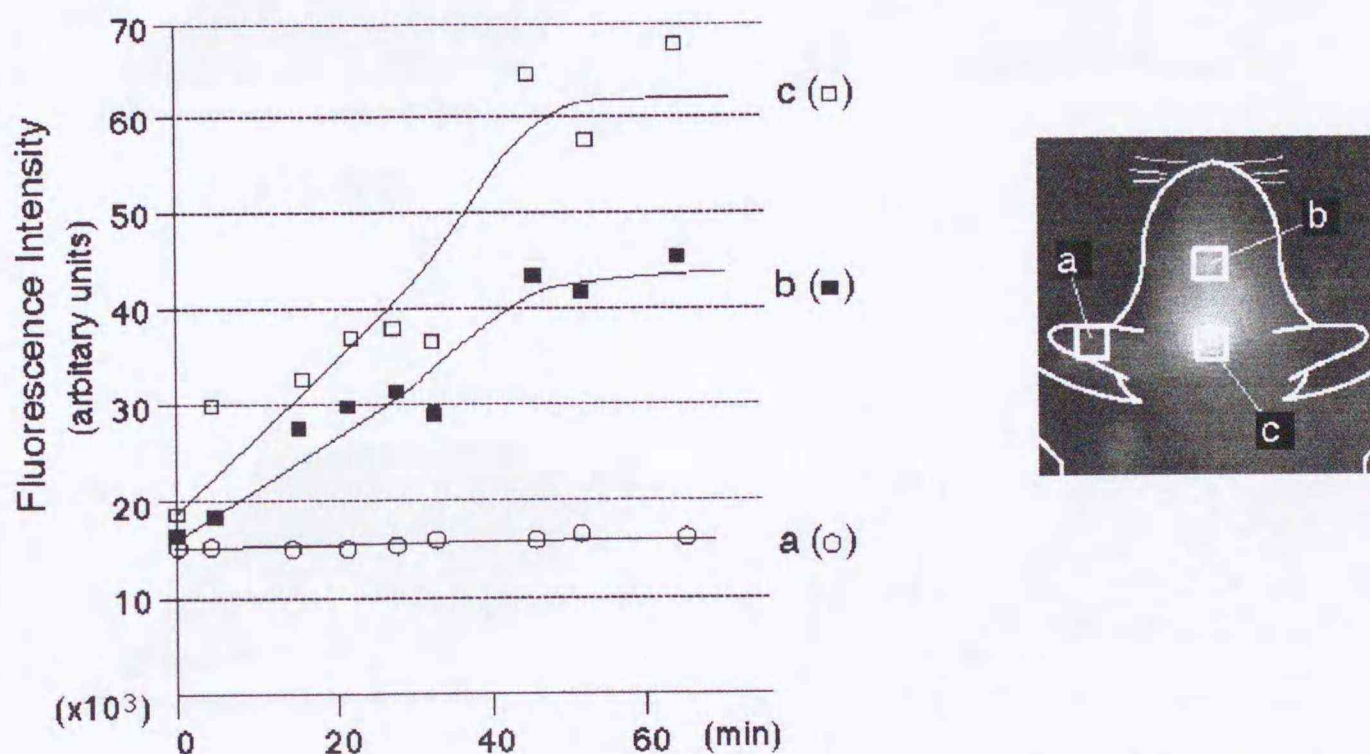
注：A の黒枠は撮像範囲を示す。頭部の点線は上矢状縫合、ラムダ縫合を示す。

画像下の時間は ICG 注入後の経過時間を示す (C-H)。

(2) 蛍光強度の時間的変化

さらに前頭部と後頭部に ROI を設定し蛍光強度の時間的変化を検討した。コントロールとして左耳介部にも ROI を設定した。図 3 3 にその結果を示す。

図 3 3 蛍光強度の時間的変化



注：図右に ROI の位置を表示している。a は左耳介部（コントロール）、b は前頭部、c は後頭部（ラムダ縫合付近）を示す。

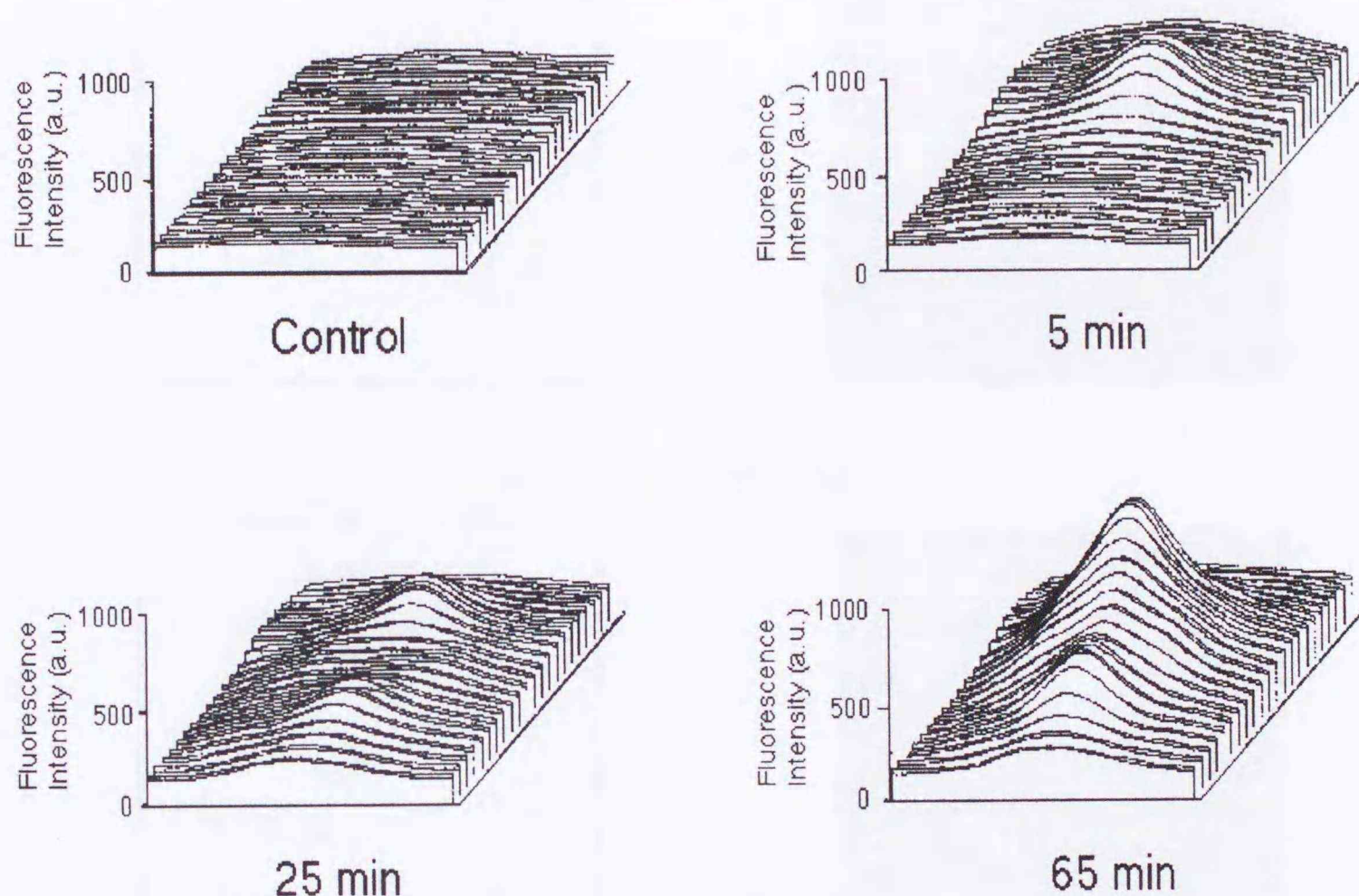
後頭部の蛍光強度は注入 5 分後より上昇し始め、40ー50 分でプラトーに達する。前頭部の蛍光強度も同様の時間経過を示すが、蛍光強度は後頭部よりも小さかった。左耳介部の蛍光強度は注入後 5 分で軽度の上昇が認められた。しかしながらその後の有意な変化は認められず、耳介部の蛍光強度の上昇は頭部クモ膜下腔の ICG 蛍光のもれ（反射光）と考えられた。

(3) 蛍光強度 2 次元分布

図 3 4 は蛍光強度の 2 次元表示を示したものである。前頭部と後頭部で明らかに蛍光強度が増加しているのが分かる。

図3 4 ラット脳クモ膜下腔蛍光イメージング像の蛍光強度2次元分布

2D-Profiles of Fluorescence Intensity



注： 画像下の時間は ICG 注入後の経過時間を示す。

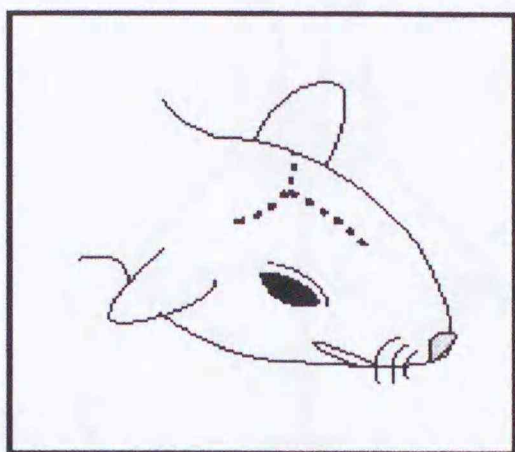
(4) 蛍光イメージングされた脳クモ膜下腔の同定

図3 5は ICG 注入6 0分後に左右斜めより頭部クモ膜下腔をイメージングしたものである。

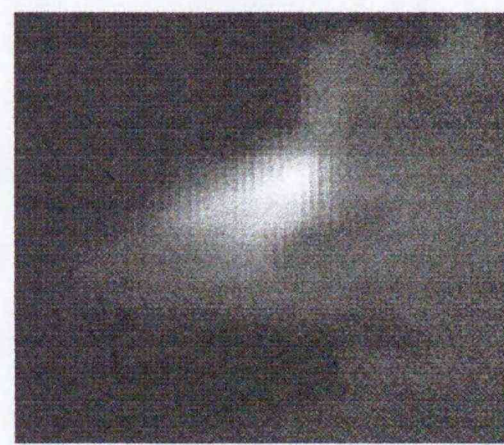
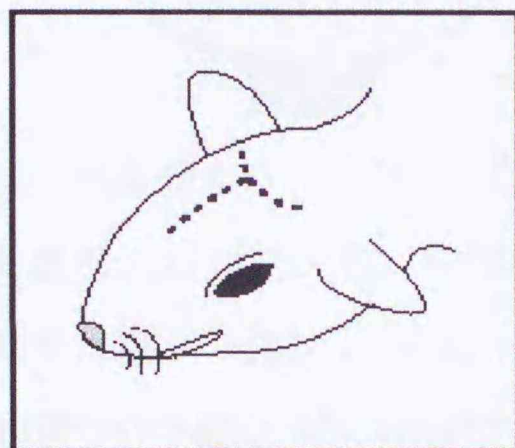
頭頂部より前頭部、特にラムダ縫合部付近に強い蛍光強度を認めた。さらに両側の側頭一頭頂部にも比較的高い蛍光強度を認めた。しかしながらラムダ縫合より尾側と眼窩と耳孔を結ぶ線 (OM line) より下には明らかな蛍光を認めなかった。

図 3 5 ラット脳クモ膜下腔の蛍光イメージングの斜位像

Right Oblique View



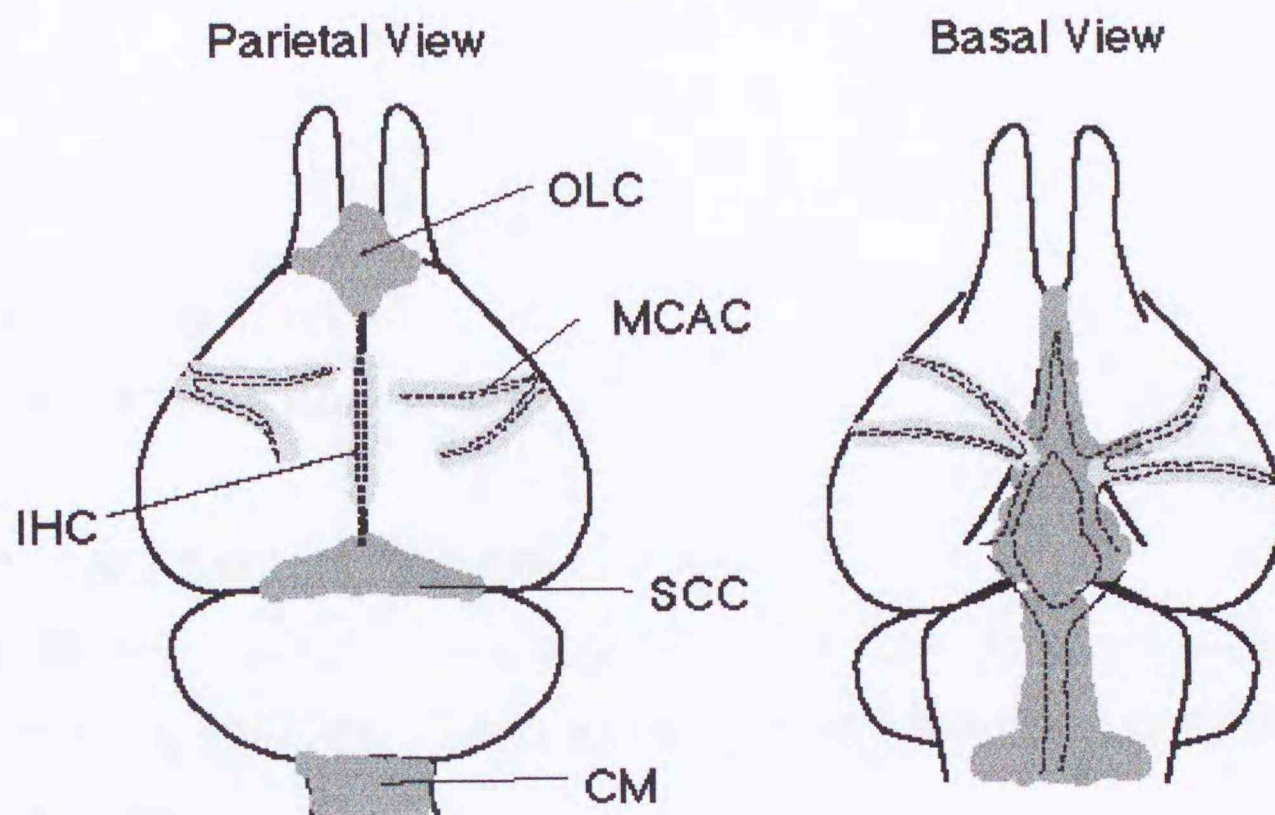
Left Oblique View



注：上段は右前斜位、下段は左前斜位像を示す。ともに ICG 注入 6 0 分後の像

図 3 6 は高濃度 ICG を脊髄クモ膜下腔に注入し 1 - 2 時間後に摘出した脳を示す。図のごとく各クモ膜下腔により ICG の分布程度が異なった。頭頂側より見ると、高濃度 ICG は supracerebellar cistern、olfactory cistern と cisterna magna に認められる。また interhemispheric cistern と middle cerebral artery cistern にも ICG は認められるが、前述のクモ膜下腔よりも ICG 濃度は低かった。脳底部の各クモ膜下腔には高濃度 ICG が認められた。さらに脳の冠状断では側脳室内にも ICG の分布を認めた。

図 3 6 脳クモ膜下腔の ICG の分布



注： 左は頭頂側より、右は脳底部側より見た図。

高濃度 ICG は暗灰色、中等度 ICG は明灰色で示している。

略字は以下の通り： SCC (supracerebellar cistern), OLC (olfactory cistern), CM (cisterna magna), IHC (interhemispheric cistern), MCAC (middle cerebral artery cistern).

脳底部クモ膜下腔には ICG が高濃度に分布しているが、蛍光像ではこの部位からの明らかな蛍光を検出していない（図 3 5）。これは脳底部クモ膜下腔周囲の下顎部の厚い筋層等により励起光や蛍光が散乱と吸収を受けるためによると考えられる。同様に大槽（cisterna magna）にも ICG の高濃度分布が認められながら蛍光が検出されないのは、頸部筋層による散乱と吸収が原因と考えられる。一方、 supracerebellar cistern や olfactory cistern は頭部表面まで頭蓋骨と皮膚があるのみで、また ICG も高濃度に分布している。

以上の結果より脳クモ膜下腔蛍光イメージングで高い蛍光性が認められた部位は、主に supracerebellar cistern と olfactory cistern と考えられる。

5-3 髄液流の ICG 蛍光イメージング

5-3-1 実験方法

(1) ICG 蛍光プローブ

前述の ICG-lipoprotein を用いた。

(2) 測定装置および画像処理

光源はキセノンランプに中心波長 720 nm のバンドパスフィルターを組み合わせたものを使用した。これは ICG 蛍光像と吸光像の比較実験（第3章）と同様のものである。

ICG-lipoprotein の蛍光は、干渉膜バンドパスフィルター（中心波長 840 nm、朝日分光製）を介して、カメラ用レンズ（F55 mm、Micro-Nikkor、ニコン製）を装着した水冷式冷却 CCD カメラ（浜松ホトニクス製、C-4880-11、512X483 pixel, 16 bit, 冷却温度 -34 °C）にて撮像した。

画像はイメージプロセッサー（浜松ホトニクス製、ARGUS-50）および専用ソフトウェアにて解析した。画像処理は単純加算（100回）を行った。

(3) 動物実験

Wister 種幼弱ラット（生後5-7日）を冷却麻酔し（体動が止まるまで氷にて体全体を冷却）、100 μ L の ICG-lipoprotein を注射器にて右前頭頭頂部のクモ膜下腔に注入した。しかしながら幼弱ラットの頭部は小さく、大脳皮質内へ ICG-lipoprotein が迷入することを避けるのは困難であった。

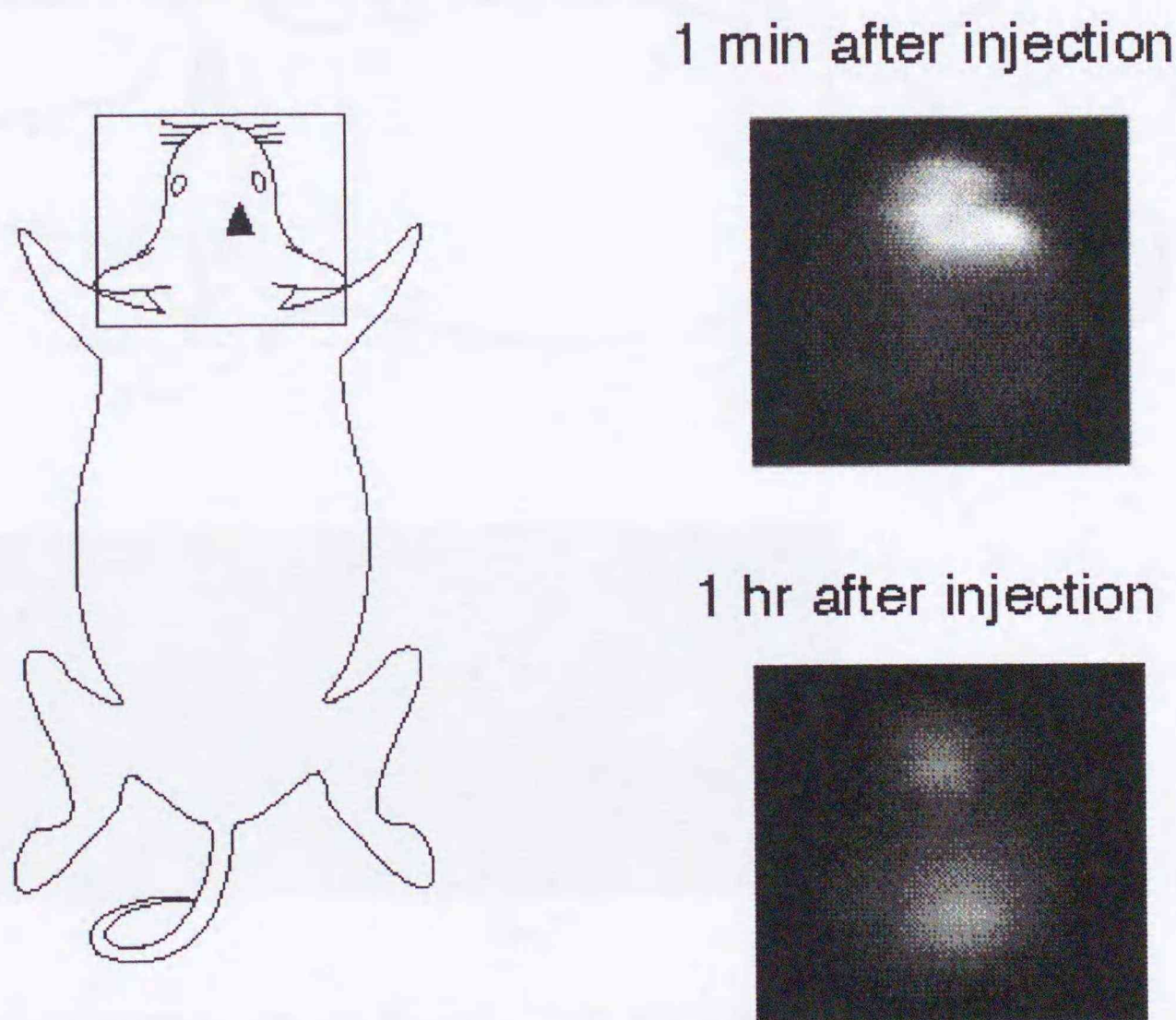
ICG 注入後8時間まで経時的に ICG 蛍光を撮像したが、撮像時にはラットを再び冷却麻酔し、プラスチックフレームに固定して撮像した。

照射光はラットの背側もしくは頭頂側（体表より 2 cm 離し、約 45 度の角度で照射）より照射した。

5-3-2 実験結果

図37にICG注入後のICG蛍光イメージングを示す。ICG注入直後では強いICG蛍光が注入部周囲に局限して認められた。注入1時間後にはICG蛍光は小脳を含む後頭部にも認められるようになった。

図37 髄液流の蛍光イメージング (I)



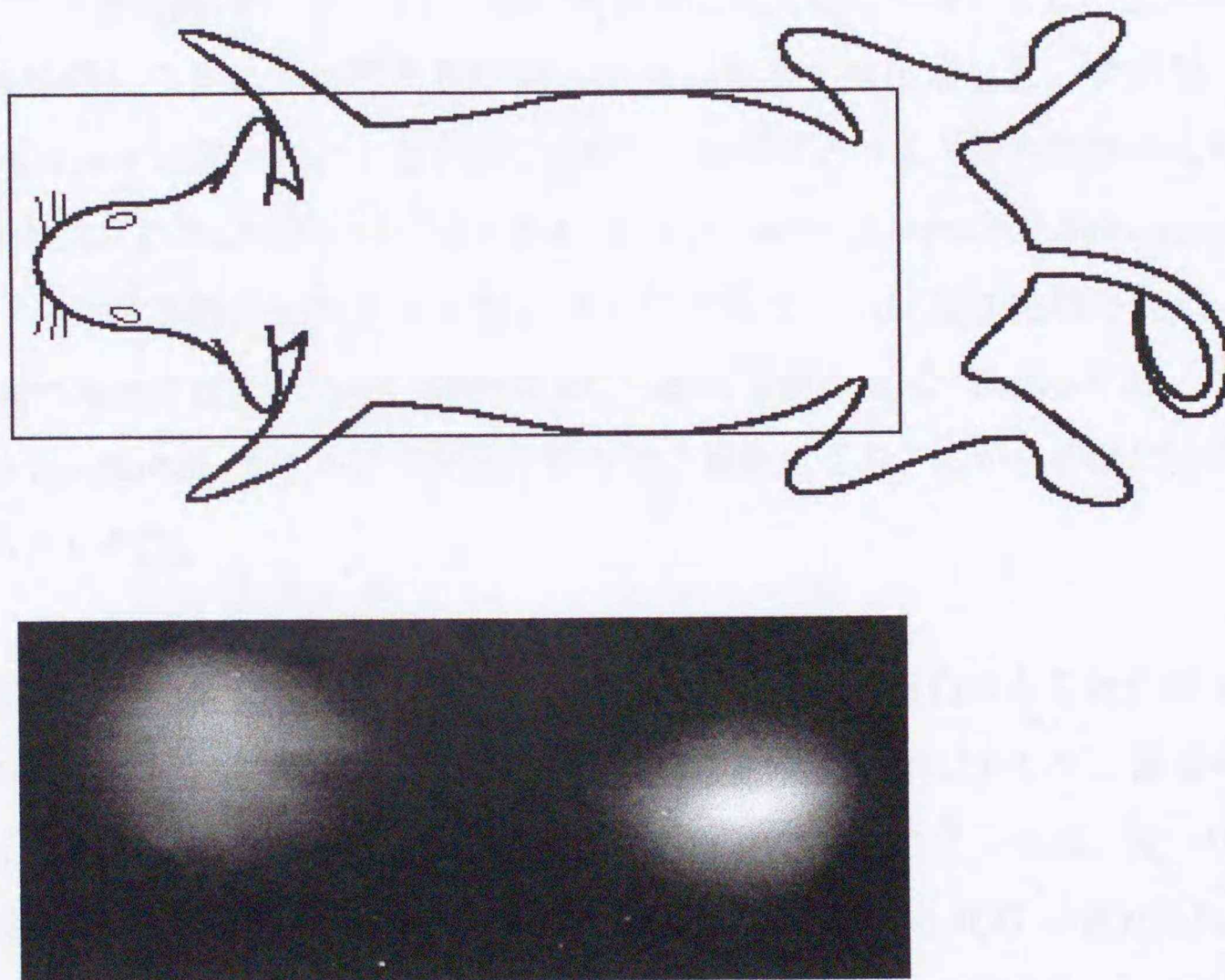
注：左図は撮像範囲（黒枠）、ICG注入部位（矢印）を示す。

右上段はICG注入後1分、下段は注入後60分の蛍光像。

図38はICG注入8時間後の蛍光像を示す。注入8時間後には、ICG蛍光は頭部および腰部脊髄にも検出された。頭部のICG蛍光強度は腰部脊髄における蛍光強度と比較して明らかに低かった。このようにICG注入後長時間経過しても頭部にICG蛍光を認めることは、ICG-lipoproteinを脳クモ膜下腔に注入する

際に ICG-lipoprotein が脳実質内に迷入したことによると思われる。実際、生後 1 週間程度のラットは極めて小さく、ICG-lipoprotein を脳クモ膜下腔に選択的に注入することは困難である。

図 3 8 髄液流の蛍光イメージング (II)



注：上図は撮像範囲（黒枠）を示す。下段は注入後 8 時間の蛍光像。

一方、腰部脊髄にも ICG 蛍光が検出されたことは、ICG-lipoprotein が腰部脊髄クモ膜下腔に移動したことを示す。すなわち脳クモ膜下腔より腰部脊髄クモ膜下腔まで、拡散と髄液流により運搬されたと考えられる。

5-4 まとめと考察

ICG 蛍光イメージングの臨床応用の可能性を検討するため、生きたラットの脳脊髄クモ膜下腔に ICG-lipoprotein を投与し、クモ膜下腔や脳脊髄液の循環動態を体外からイメージングできるか否か検討した。

ICG-lipoprotein をラットの腰部脊髄クモ膜下腔に注入すると、注入部位から胸頸髄レベルにかけて脊髄に沿った強い蛍光が検出された。その後 ICG-lipoprotein は脳内のクモ膜下腔に移動し、前脳部とラムダ縫合部周囲に強い蛍光が検出された。解剖の結果より各々 olfactory cistern と supracerebellar cistern がイメージングされたと考えられた。さらに幼弱ラットの脳クモ膜下腔に ICG-lipoprotein を注入すると、8 時間後には腰部脊髄に蛍光が検出された。これは ICG-lipoprotein がクモ膜下腔内の髄液流と拡散により、脳から脊髄に移動したと考えられた。

脳脊髄クモ膜下腔には髄液が存在するが、髄液中の蛋白含有量は血液中よりはるかに少ない。例えば人血液中の蛋白含有量は 5-7 g% に対して、髄液中ではわずかに 0.02-0.05 g% である (太田 1991)。このようにクモ膜下腔では ICG と結合する蛋白がほとんど存在せず、本実験で測定された ICG の蛍光性は、ICG が髄液中の蛋白質と結合したことによるものではなく、ICG-lipoprotein の蛍光性によるものと考えられる。

ICG は肝臓機能や循環機能の臨床検査にも使用され、血管内に投与されると血清中のリポ蛋白と自然結合する。今回使用したリポ蛋白は人血清から生成したものを使用しており、ICG-lipoprotein は人体に対する毒性はないと考えられる。本実験では ICG-lipoprotein を生きたラットのクモ膜下腔に投与したが、痙攣発作や神経麻痺などの異常症状は認めなかった。このことは ICG-lipoprotein の生体に対する非侵襲性を示唆すると考えられるが、人体の血管外における毒性については今後さらなる検討が必要である。

第6章 今後の展望と課題

6-1 髄液循環障害の診断への応用

脳脊髄液は脳室内の脈絡叢において分泌産生され、脊髄や脳のクモ膜下腔を循環した後、上矢状静脈洞周囲のクモ膜顆粒を介して上矢状静脈洞に吸収される。人の場合一日に約500 ml 産生され同量が吸収される（太田 1991）。この脳脊髄液の循環が障害されると頭蓋内圧が上昇し、水頭症など重篤な脳障害を発生する。

最近のMRIでは“CSF flow void sing”により中脳水道など生理的に狭くなっている部分における脳脊髄液の循環状態が測定できることから、閉塞性水頭症などの診断に威力を発揮している（Mascalchi 1993, Gideon 1994）。しかしながらMRIはこのような局所的な髄液流の閉塞性病変は診断できるが、脳脊髄液の産生や吸収障害など全般的な髄液循環動態の異常は診断することができない。このためRI髄液槽撮影法など侵襲的診断法が未だ必要となる。

この章で示した実験結果は、近赤外蛍光法がRI髄液槽撮影法に換わり利用される可能性を示している。人の場合は脳脊髄クモ膜下腔から体表までの組織が厚く、今回使用した画像システムではクモ膜下腔のイメージングは困難である。しかしながら、水頭症患者に対する脳室-腹腔シャント手術ではシャントチューブは皮膚の直下に位置しており、シャント手術後に度々発生するシャントチューブの閉塞を本画像システムを用いて診断できる可能性はある。

また水頭症に対する動物実験では、本画像システムとICG-lipoproteinを用いて髄液循環動態を調べることができる。特にHTX-ratsなど先天性水頭症モデル（Kohn 1981）は本研究と同様のサイズのラットを用いており、本法により経時的に髄液循環動態の変化を調べられるという大きな利点が得られるものと考えられる。

6-2 脳腫瘍のイメージング

悪性脳腫瘍細胞に対するモノクローナル抗体を ICG-lipoprotein と結合させることができれば、腫瘍を ICG 蛍光イメージング法により可視化できる可能性がある。最近、悪性脳腫瘍細胞 (glioma) に対して親和性を有するヒト型モノクローナル抗体 CLN-IgG が作成され、免疫療法として臨床応用が試みられている (Kokunai 1990)。このような抗腫瘍抗体を ICG-lipoprotein と結合させた複合体を術前に投与し、術中に ICG 蛍光イメージング法を用いて悪性脳腫瘍細胞を可視化できれば、手術時に正常脳組織を損傷する危険が少なくなるとともに全摘率も高くなる。このように抗腫瘍抗体を用いて腫瘍自体をイメージングする方法は、腫瘍組織周囲の脳血液関門障害や腫瘍組織と正常組織の血流差を利用する間接的な腫瘍イメージング法と比較してより正確な腫瘍の同定が可能と考えられる。

術中における脳腫瘍イメージングが最も有効に使用されるのは、手術初期に正常脳との境界を明らかにする場面である。この場合、正常脳との境界を直視下に切開していくため、切開部位の表面より数 mm 程度深いところの境界がイメージングできれば実用性は高いと考えられる。また手術後半に残存腫瘍を検索する時にも腫瘍イメージングは有効と考えられるが、この場合も腫瘍は大部分切除された後であり、術野より数 mm 程度の深さにある腫瘍がイメージングできれば十分と考えられる。特に残存腫瘍の検索では腫瘍の有無と切除方向の情報が重要であり、イメージングの鮮明度が低くても致命的な欠点にはならないと思われる。

このように術中脳腫瘍イメージングでは、本研究で示した CCD カメラによる ICG 蛍光イメージング程度の撮像精度があれば臨床的な有効性は高いと思われる。

6-3 光ファイバースコープへの応用

脳室鏡等の光ファイバースコープに CCD カメラを組み込むことも可能である。近年、手術の侵襲性を軽減するために脳室内腫瘍を脳室鏡を用いて脳腫瘍摘出術を行うようになってきた (Caputy 1995)。脳室は髄液で満たされた脳内の空間であり、胃癌のファイバースコープによる腫瘍摘出や腹腔鏡による胆嚢摘出術と同様に脳室に光ファイバースコープを挿入することにより手術操作が可能である。脳室内腫瘍には正常組織との境界が不鮮明な悪性腫瘍も少なく、また脳室壁の正常脳組織に腫瘍が被われていることもあり、脳腫瘍イメージングが可能となれば臨床的な有効性は高いと思われる。

光ファイバースコープに CCD カメラを組み込み脳室等の臓器内部で腫瘍をイメージングする場合、イメージング操作はより簡便となり手術操作の妨げとなることが少ない。すなわち手術用顕微鏡に CCD カメラを組み込んで腫瘍を蛍光イメージングする場合には、一旦手術室内の電灯を消し術野を暗くした状態で励起光を照射する必要がある。蛍光に近い波長の迷入光はイメージングの SN 比に大きな影響を及ぼすため、かなり厳密に術野周囲を暗くする必要がある。それに対して、光ファイバースコープでイメージングする場合では、ファイバースコープの可視光光源を止めるだけで術野である臓器内部は十分に暗くなり、特別な工夫を必要としない。このようにイメージング操作時に手術室内の光源の状態を変える必要がないことは、術者のみならず麻酔医や看護婦にとっても大きな利点である。

第7章 結論

ICG の近赤外光領域の蛍光性を応用した体内機能の非接触反射方式イメージングの実現をめざし、一連の基礎的研究を行った。実験的解析を通し、まず ICG による体内機能イメージングには反射方式の蛍光手法が適することを明らかにした。次いで ICG 蛍光イメージング法により血管外の形態機能を非侵襲的にイメージングできる近赤外光蛍光プローブ (ICG-lipoprotein) を開発した。この蛍光プローブを用いて、生きたラットの脳脊髄クモ膜下腔および髄液流を体外から非侵襲的にイメージングし、本手法の *in vivo* における有効性を実証し臨床応用への可能性を示した。

ICG 蛍光イメージング法の生体診断への応用範囲は少なくない。ICG-lipoprotein を用いた脳脊髄クモ膜下腔や髄液流の *in vivo* でのイメージング結果は、小動物を用いた水頭症の実験的研究のみならず脳室-腹腔シャント術後の機能不全の診断に本手法を応用できることを示している。また ICG-lipoprotein を腫瘍細胞に対するモノクローナル抗体と結合させることができれば、腫瘍の術中イメージングも可能になる。特に正常領域との境界が不鮮明な悪性腫瘍では、手術中に腫瘍を可視化することにより手術の根治性を高めると共に正常組織に対する侵襲を軽減させることができる。

このように生体の比較的浅い部位における蛍光物質の存在を知る技術の応用範囲は広いものと考えられる。また将来実用化が期待される光 CT の造影剤として用いられる可能性もある。本研究の結果は、光散乱の問題などまだ解決すべき点も残されているが、今後の脳神経外科領域の研究や診断治療に新たな可能性を提供するものと思われる。

参考文献

1. Baker KJ Binding of Sulfobromophthalein (BSP) Sodium and Indocyanine Green (ICG) by plasma α 1 lipoproteins. *Proc Soc Exp Biol Med* 122: 957-963 (1966)
2. Benson RC, Kues H A Fluorescence properties of indocyanine green related to angiography. *Phys Med Biol* 23: 159-163 (1978)
3. Brown JT, Cerullo LJ Laser workshops in neurological surgery. *Lasers Surg Med* 4: 241-6 (1984)
4. Caputy A, Starr J, Riedel C Video-assisted endoscopic spinal surgery: thoracoscopic discectomy. *Acta Neurochir (Wien)* 134: 196-9 (1995)
5. Cinelli A, Kauer JS Voltage-sensitive dyes and functional activity in the olfactory pathway. *Annu. Rev. Neurosci.* 15:321-351 (1992)
6. Cohen LB, Keynes RD, Hille B Light scattering and birefringence changes during nerve activity. *Nature* 218:438-441 (1968)
7. Edwards AD The clinical role of near infrared spectroscopy. *Journal of Perinatal Medicine*.22: 535-539 (1994)
8. Flower RW, Hochheimer BF A clinical technique and apparatus for simultaneous angiography of the separate retinal and choroidal circulations. *Invest Ophthalmol* 12: 248-255 (1973)
9. Frank F Biophysical basis and technical requisites for the use of Nd-YAG laser in neurosurgery. *Neurosurg Rev* 7: 145-50 (1984)
10. Frostig RD, Lieke EE, Ts'o DY, et al. Cortical functional architecture and local coupling between neuronal activity and the microcirculation revealed by in vivo high-resolution optical imaging of intrinsic signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6082-6086 (1990)
11. Gideon P, Stahlberg F, Thomsen C, et al Cerebrospinal fluid flow and production in patients with normal pressure hydrocephalus studied by MRI. *Neuroradiology* 36: 210-217 (1994)
12. Grinvald A, Lieke E, Frostig RD, et al. Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals. *Nature* 324: 361-364 (1986)
13. Haglund MM, Ojemann GA, Hochman DW Optical imaging of epileptiform and functional activity in human cerebral cortex. *Nature* 358:668-671 (1992)
14. Haglund MM, Hochman DW, Spence AM, et al. Enhanced optical imaging of rat gliomas and tumor margins. *Neurosurgery* 35: 930-40 (1994)
15. Haglund MM, Berger MS, Hochman DW Enhanced optical imaging of human gliomas and tumor margins. *Neurosurgery* 38: 308-17 (1996)
16. 早川徹 熱電対法による術中脳表血流測定：とくに臨床的意義について. *Neurosurgeons* 4: 183-190 (1984)

17. Hoshi Y, Tamura M. Dynamic multichannel near-infrared optical imaging of human brain activity. *J Appl Physiol* 75: 1842-1846 (1993)
18. Hoshi Y, Onoe H, Watanabe Y, et al. Non-synchronous behavior of neuronal activity, oxidative metabolism and blood supply during mental tasks in man. *Neuroscience Letters* 172: 129-133 (1994)
19. Jibu-Kasiwasake M, Sakatani K, Hosoi S, et al. "Time-resolved imaging of membrane potentials and cytoplasmic ions at the cellular level with a 50X50 photodiode camera" in Chance B., Tamura M, Zuo H, Sakatani K (eds): *Non-Invasive Optical Diagnosis: Basic Science and its Clinical Application*. Beijing: Magazine office of the China-Japan Friendship Hospital, pp.191-200 (1997)
20. Jöbsis FF. Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science* 198: 1264-1267 (1977)
21. King RB. Intraoperative cortical monitoring. *Neurosurgeons* 5: 63-67 (1981)
22. Kogure K, Noble DJ. Infrared absorption angiography of the fundus circulation. *Arch Ophthalmol* 83: 209-214 (1970)
23. Kohn DF, Chinookoswong N, Chou SM. A new model of congenital hydrocephalus in the rat. *Acta Neuropathol (Berl)* 54: 211-218, 1981
24. Kokunai T, Tamaki N, Matsumoto S. Antigen related to cell proliferation in malignant gliomas recognized by a human monoclonal antibody. *J Neurosurg* 73 : 901-8 (1990)
25. Kwong KK, Belliveau JW, Chesler DA, et al. Dynamic magnetic resonance imaging of human brain activity during primary sensory stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89: 5675-5679 (1992)
26. Leevy CM, Smith F, Longueville J. Indocyanine green clearance as a test for hepatic function. *JAMA* 200: 236-240 (1967)
27. Li X, Beauvoit B, White R, et al.: Tumor localization using fluorescence of indocyanine green in rat models. *SPIE* 2389: 789-797 (1995)
28. Lunsford LD, Kondziolka D, Pollock BE, et al. Gamma knife radiosurgery for brain arteriovenous malformation: What we have learned. *Neurosurgeons* 14: 77-83 (1995)
29. Lunsford LD, Kondziolka D, Bissonette DJ. Intraoperative imaging of the brain. *Stereotact Funct Neurosurg* 66: 58-64 (1996)
30. Lund-Johansen P. The dye dilution method for measurement of cardiac out put. *Eur Heart J* 11-Suppl1: 6-12 (1990)
31. MacVicar BA, Hochman D. Imaging of synaptically evoked intrinsic optical signals in hippocampal slices. *J Neurosci* 11:1458-1469 (1991)
32. Mascalchi M, Arnetoki G, Inzitari D, et al. Cine-MR imaging of aqueductal CSF flow in normal pressure hydrocephalus syndrome before and after CSF shunt. *Acta Radiol* 34: 586-295 (1993)

33. McCaughan JS Jr, Ellison EC, Guy JT et al. Photodynamic therapy for esophageal malignancy: a prospective twelve-year study. *Ann Thorac Surg* 62: 1005-9 (1996)
34. 成富博章 脳代謝とNMR: 脳卒中実験ハンドブック、アイピーシー出版、東京、pp. 533-544 (1990)
35. 根来真 血管内外科: 適応、カテーテル、塞栓物質について. *Neurosurgeon* Vol. 11 : 229-235 (1991)
36. O'Leary MA, Baos DA, Chance B, et al: Reradiation and imaging of diffuse photon density waves using fluorescent inhomogeneities. *J Luminescence* 60&61: 281-286 (1994)
37. Ogawa S, Tank DW, Menon R, et al. Intrinsic signal changes accompanying sensory stimulation: functional brain mapping with magnetic resonance imaging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89: 5951-5955 (1992)
38. 太田富雄 脳神経外科学 金芳堂 pp.916-917 (1991)
39. Reynolds EOR, Wyatt JS, Azzopardi D, et al. New non-invasive methods for assessing brain oxygenation and haemodynamics. *Br Med Bull* 44: 1052-1075 (1988)
40. Sakatani K, Ohtaki M, Jibu M, Hashi K. Effects of hyperventilation and CO₂ inhalation on cerebral oxygen metabolism of Moyamoya disease measured by near infrared spectroscopy. In: Tubokawa T., Marumarou A., Robertson C. Teasdale G. eds. *Neurochemical monitoring in the intensive care unit*. Hong Kong: Springer-Verlag; pp. 226-234 (1995)
41. Schneider A, Kaboth A, Neuhauser L: Detection of subretinal neovascular membranes with indocyanine green and an infrared scanning laser ophthalmoscope. *Am J Ophthalmol* 113: 45-51 (1992)
42. Taka Y, Sakatani K, Shimizu K, et al: Imaging of cerebral functions by transillumination. *JJME* 33 Suppl: 213 (1995)
43. 高義礼、酒谷薫、北間正宗、清水孝一、山本克之 “光透視による脳機能イメージングの試み—ラット脳における血液量変化の可視化” 信学技報、MBE, 95-176, pp.13-18 (1996)
44. Taka Y, Sakatani K, Shimizu K, et al: Transillumination imaging of physiological functions, in Chance B, Tamura M, Zuo H, Sakatani K: *Proceedings of International Symposium on Non-invasive Optical Diagnosis*. Beijing, China Communication Publisher, pp 180-188 (1997)
45. Tasaki I, Watanabe A, Sandlin R, Carnay L: Changes in fluorescence, turbidity, and birefringence associated with nerve excitation. *Proc Natl Acad Sci USA* 61:883-888 (1968)
46. 滝浩志 短潜時体性感覚誘発電位の術中モニタリングへの応用. *Neurosurgeons* 5: 37-54 (1981)

47. Watanabe E, Mayanagi Y, Kosugi Y et al. Open surgery assisted by the neuronavigator, a stereotactic, articulated, sensitive arm. *Neurosurgery* 28 : 792-9 (1991)
48. Wedeen VJ, Rosen BR, Buxton R et al. Projective MRI angiography and quantitative flow-volume densitometry. *Magn Reson Med* 3: 226-41 (1986)
49. Wu J, Perelman L, Dasari RR, et al: Tomographic detection of fluorophores embedded in tissue-like phantom, in Alfano RR, Fujimoto JG: *OSA TOPS on Advances in Optical Imaging and Photon Migration*. Washington, Bellingham, Vol 2 pp 116-118 (1996)

研究業績

英文雜誌

(1) Sakatani K., Jibu-Kasiwasake M., Taka Y., Wang S., Zuo H., Yamamoto K., Shimizu K.

“Non-invasive optical imaging of subarachnoid space and cerebrospinal fluid pathways based on near infrared fluorescence.”

Journal of Neurosurgery, Vol. 87, pp.738-745 (1997)

(2) Sakatani K., Ohtaki M., Morimoto S., Hashi K.

“A new irrigating fluid, an isotonic mannitol, to prevent local heat generation and tissue adherence during electrical coagulation by bipolar diathermy forceps.”

Journal of Neurosurgery, Vol. 82, pp.669-671 (1995)

(3) Sakatani K., Chesler M., Hassan A.Z.

“Effects of GABA on axonal conduction and extracellular potassium activity in the neonatal rat optic nerve.”

Experimental Neurology, Vol. 127, pp.291-297 (1994)

(4) Sakatani K., Chesler M., Hassan A.Z., Lee M., Young W.

“Nonsynaptic modulation of dorsal column conduction by endogenous GABA in neonatal rat spinal cord.”

Brain Research, Vol. 622, pp.43-53 (1993)

(5) Sakatani K., Black J., Kocsis J.D.

“Transient presence and functional interaction of endogenous GABA and GABA-A receptors in developing rat optic nerve.”

Proc. R. Soc. Lond. B, Vol. 247, pp.139-142 (1992)

(6) Sakatani K., Chesler M., Hassan A.Z.

“GABA-A receptors modulate axonal conduction in dorsal columns of neonatal rat spinal cord.”

Brain Research, Vol. 542, pp. 273-279 (1991)

(7) Sakatani K., Iizuka H., Young W.

"Randomized double pulse stimulation for assessing stimulus-frequency dependent conduction in injured spinal and peripheral axons."

Journal of EEG and Clinical Neurophysiology, Vol. 81:108-117 (1991)

(8) Sakatani K., Hassan A.Z., Ching W.

"Age-dependent extrasynaptic modulation of axonal conduction by exogenous and endogenous GABA in the rat optic nerve."

Experimental Neurology, Vol. 114, pp. 307-314 (1991)

(9) Sakatani K., Hassan A.Z., Chesler M

"GABA-sensitivity of dorsal column axons: An in vitro comparison between adult and neonatal rat spinal cords."

Brain Research: Developmental Brain Research, Vol. 61, pp.139-142 (1991)

(10) Sakatani K., Iizuka H., Young W.

"Somatosensory evoked potentials in rat cerebral cortex before and after middle cerebral artery occlusion."

Stroke, Vol. 21, pp.124-132 (1990)

(11) Sakatani K., Ohta T., Shimo-oku M.

"Conductivity of dorsal column fibers during experimental spinal cord compression and after decompression at various stimulus frequencies."

Central Nervous System Trauma, Vol. 4, pp.161-179 (1987)

(12) Chesler M., Young W., Hassan A.Z., Sakatani K., Moriya T.

"Elevation and clearance of extracellular K⁺ following graded contusion of the rat spinal cord."

Experimental Neurology, Vol. 125, pp.93-8 (1994)

(13) Lee M., Sakatani K., Young W.

"A role of GABA-A receptor activation in hypoxia-induced conduction failure of neonatal rat spinal cord in vitro."

Brain Research, Vol. 601, pp.14-19 (1993)

(14) Lee M., Sakatani K., Young W.

"Interaction of hypoxia and hypothermia on dorsal column conduction in adult rat spinal cord in vitro."

Experimental Neurology, Vol. 119, pp.14-145 (1993)

(15) Honmou O., Sakatani K., Young W.

"GABA effects on ascending and descending tracts in isolated dorsal columns of neonatal rat spinal cord."

Neuroscience, Vol. 54, pp.93-104 (1993)

(16) Lim J.Y., Utzschneider D.A., Sakatani K., Kocsis J.D.

"The attenuation of GABA-sensitivity in the maturing myelin-deficient rat optic nerve."

Brain Research: Developmental Brain Research, Vol. 72, pp.15-20 (1993)

(17) Ochi S., Lim J.Y., Rand M.N., During M.J., Sakatani K., Kocsis J.D.

"Transient presence of GABA in astrocytes of developing optic nerve."

Glia, Vol. 9, pp.188-198 (1993)

(18) Chesler M., Sakatani K., Hassan A.Z.

"Elevation and clearance of extracellular K⁺ following contusion of the rat spinal cord."

Brain Research, Vol. 556, pp.71-77 (1991)

(19) Iizuka H., Sakatani K., Young W.

"Neuronal damage in the rat thalamus after cortical infarcts."

Stroke, Vol. 21, pp.790-794 (1990)

(20) Iizuka H., Sakatani K., Young W.

"Corticofugal axonal degeneration in rats after middle cerebral artery occlusion."

Stroke, Vol. 20, pp.1396-1402 (1989)

(21) Iizuka H., Sakatani K., Young W.

"Selective cortical neuronal damage after middle cerebral artery occlusion in rats."

Stroke, Vol. 20, pp.1516-1523 (1989)

- (22) Young W., Rosenbluth J., Wojak J.C., Sakatani K., Kim H.
“Extracellular potassium activity and axonal conduction in spinal cord of the myelin-deficient mutant rat.”
Experimental Neurology, Vol. 106, pp.41-51 (1989)

英文書籍

- (23) Sakatani K., Jibu M., Taka Y., Yamamoto K., Zuo H., Shimizu K.
“Optical imaging of subarachnoid space and CSF flow using near infrared fluorescence.”
Proceedings of 11th International Congress of Neurological Surgery,
Bologna-Italy, Monduzzi Editors, pp.1975-1979 (1997)

- (24) Sakatani K. and Jibu M.
“Two-dimensional near infra-red fluorescence imaging of Indocyanine Green accumulated in subarachnoid space: Visualization of CSF in neonatal rats.”
Non-Invasive Optical Diagnosis: Basic Science and its Clinical Application
(eds. Chance B., Tamura M, Zuo H, Sakatani K), Beijing, Magazine office of the China-Japan Friendship Hospital, pp.185-189 (1997)

- (25) Sakatani K., Ohtaki M., Kashiwasake M., Hashi K.
“Effects of hyperventilation and CO₂ inhalation on cerebral oxygen metabolism of Moyamoya disease measured by near infrared spectroscopy.”
Neurochemical Monitoring in the Intensive Care Unit (eds. Tsubokawa T., Marmarou A., Robertson C., Teasdale G.), Hong Kong, Springer-Verlag, pp.226-234 (1995)

- (26) Sakatani K., Ochi S. Hashi K. and J, Kocsis J.D.
“Axon-glia interaction via GABA/GABA-A receptors in developing CNS white matter.”
Advance in Neurotrauma Research, Vol.4, pp.35-41 (1992)

- (27) Sakatani K., Hatabu Y., Young W., Gruner J.A., Iizuka H., Taniguchi K.
“New and sensitive methods for detecting acute axonal dysfunction after experimental spinal cord and root compression injury.”
Spinal cord monitoring and Electrodiagnosis (ed. Shimoji K.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp.141-151 (1991)

(28) Sakatani K., Ohta T., Yamagata Y., Shimo-oku M.

“Effects of spinal cord compression on repetitive impulse conduction of the ascending fibers of the dorsal column.”

Neurosurgical Review Vol. 12 : Advances in Neurotraumatology (eds. Voth D., Sano K.), Berlin, Walter de Gruyter, pp.575-581 (1989)

(29) Sakatani K., Ohta T., Yamagata Y., Shimo-oku M.

“Effect of spinal cord compression on repetitive impulse conduction of ascending fibers in the dorsal column.”

Neurophysiology and Standards of Spinal Cord Monitoring (eds. Ducker T.B., Brown R.H), New York, Springer-Verlag, pp.52-57 (1988)

(30) Hosoi S., Tsuchiya H., Takahasi M., Kashiwasake-Jibu M., Sakatani K., Hayakawa T.

“Time-resolved imaging of membrane potentials and cytoplasmic ions at the cellular level with a 50×50 fiber array photodiode camera.”

Modern Optics, Electronics and High Precision Techniques in Cell Biology (ed. Isenberg G.), Berlin, Springer-Verlag, pp.77-87 (1998)

(31) Liang C., Sakatani K., Zhao F., Zuo H.

“Changes of cerebral oxygen metabolism and hemodynamics during single-lung ventilation in thoracic surgery: Investigation by near infra-red spectroscopy.”

Non-Invasive Optical Diagnosis: Basic Science and its Clinical Application (eds. Chance B., Tamura M., Zuo H., Sakatani K.), Beijing, Magazine office of the China-Japan Friendship Hospital, pp.59-63 (1997)

(32) Feng Q., Miao H., Chou C., Chou L., Cheng X., Sakatani K., Zuo H.

“Influence of hypoxia on cerebral blood circulation and oxygen supply to brain of neonatal rats.”

Non-Invasive Optical Diagnosis: Basic Science and its Clinical Application (eds. Chance B., Tamura M., Zuo H., Sakatani K.), Beijing, Magazine office of the China-Japan Friendship Hospital, pp.65-70 (1997)

(33) Zhang S., Sakatani K., Zuo H.

“Alterations of cerebral oxygen metabolism after superior sagittal sinus occlusion in rat models: Comparison with NIRS and Histology.”

Non-Invasive Optical Diagnosis: Basic Science and its Clinical Application

(eds. Chance B., Tamura M., Zuo H., Sakatani K.), Beijing, Magazine office of the China-Japan Friendship Hospital, pp.71-75 (1997)

(34) Taka Y., Shimizu K., Sakatani K., Yamamoto K.

“Transillumination imaging of physiological functions.”

Non-Invasive Optical Diagnosis: Basic Science and its Clinical Application

(eds. Chance B., Tamura M., Zuo H., Sakatani K.), Beijing, Magazine office of the China-Japan Friendship Hospital, pp.179-184 (1997)

(35) Jibu-Kasiwasake M, Sakatani K., Hosoi S., Hayakawa T.

“Time-resolved imaging of membrane potentials and cytoplasmic ions at the cellular level with a 50X50 fiber array photodiode camera.”

Non-Invasive Optical Diagnosis: Basic Science and its Clinical Application

(eds. Chance B., Tamura M., Zuo H., Sakatani K.), Beijing, Magazine office of the China-Japan Friendship Hospital, pp.191-200 (1997)

(36) Young W. and Sakatani K.

“Neurophysiological mechanisms of somatosensory evoked potential changes.”

Intraoperative spinal cord monitoring (ed. Salzman S.), The Humana Press, pp.115-148 (1990)

和文雑誌 (1995 年以降)

(37) 酒谷 薫, 李寧章、遠越、張思迅、王紅、左換宋

“脳循環に影響を及ぼす薬剤の効果判定に対する NIRS の応用”

Therapeutic Research Vo.18, No. 7, pp.52-190-193 (1997)

(38) 酒谷 薫, 治部 (柏酒) 雅貴

“体内インドシアニンググリーンの蛍光イメージング：非接触反射方式イメージングの可能性”

医用電子と生体工学、 Vol.34, No. 4, pp.26-32 (1996)

(39) 高義礼、酒谷 薫、北間正宗、清水孝一、山本克之

“光透視による脳機能イメージングの試み—ラット脳における血液量変化の可視化”

信学技報、**MBE**, 95-176, pp.13-18 (1996)

(40) 高 義礼、酒谷 薫、清水孝一、山本 克之

“光透視による脳機能イメージングの試み “

医用電子と生体工学, Vol.33-特別号, pp.213 (1995)

その他外国語（中国語）論文

(41) Guo G., Li N., Sakatani K., Dong H., Zhuang F., Fu R., Zuo H.

Effects of Tongluoxifeng on the metabolism of cerebral oxygenation and blood pressure during cerebral ischemia-reperfusion in the rats.

Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formula, Vol. 4, pp.21-24 (1998)

(42) 酒谷 薫、王世蒸、左換宋

“光診断法の臨床応用”

基礎医学与臨床 Vol.17, No. 3, pp.177-181 (1997)

(43) 酒谷 薫

“大腦気代謝近紅外線観測法の臨床意義.”

中国实用内科雜誌 Vol.16, pp.690-691 (1996)

謝辞

本研究をご指導いただいた北海道大学工学部システム情報工学専攻生体システム工学講座 清水 孝一教授には、研究に関する多くの有益なご助言、ご指導を頂きました。ここに深く感謝の意を表します。本研究を進めるにあたり貴重なご意見、ご助言を頂きました同講座 山本 克之教授に厚く感謝いたします。

また本研究を行うにあたり色々と協力してくれた同講座大学院生の高 義礼君ならびに小野寺 陽一君に深く感謝いたします。

本研究の共同研究者である浜松ホトニクス（株）つくば研究所 治部 雅貴氏ならびに同研究所における実験の機会を与えて下さり、また貴重なご意見、ご助言を頂きました早川 毅氏には、ここに深く感謝の意を表します。

