2-Color Optical Coherence Dosigraphy を用いた 粥状硬化不安定プラークにおける脆弱性マイクロ断層診断法*

中道 友^{*1}, 佐伯 壮一^{*1}, 杉山 雅邦^{*2}
齊藤 俊^{*1}, 廣 高史^{*3}, 松崎 益徳^{*4}

Vulnerability Diagnosis of Unstable Atherosclerotic Plaque Using 2-Color Optical Coherence Dosigraphy

Yu NAKAMICHI, Souichi SAEKI^{*5}, Masakuni SUGIYAMA,
Takashi SAITO, Takafumi HIRO and Masunori MATSUZAKI

^{*5} Applied Medical Engineering Science, Graduate School of Medicine, Yamaguchi University,
2-16-1 Tokiwadai, Ube-shi, Yamaguchi, 755-8611 Japan

Recently, optical coherence tomography (OCT) has been being applied to cardiovascular medical diagnosis as a tomographic visualizing technique of unstable atherosclerotic plaque with high resolution of 1 to 10 micrometer. Nevertheless, the vulnerability associated with macrophage invasion into atherosclerotic plaque can never be *in vivo* detected by any diagnostic approach. Previously, we proposed 2-Color Optical Coherence Dosigraphy (2C-OCD), which can provide microscale tomographic images of drug infiltration. In this study, the vulnerability diagnosing technique of unstable plaque is proposed, by means of 2C-OCD using selective uptake of PDD photosensitizer to lipid-rich plaque and macrophage. In order to evaluate the bio-availability, 2C-OCD was *ex vivo* applied to aorta segments of rabbits with photosensitizer AIPcS administered, comparing between drug infiltration obtained by 2C-OCD and their histological images. Consequently, drug infiltration was only observed to increase significantly at plaque lesion where photosensitizer's fluorescence could be captured. Additionally, AIPcS accumulation appeared to be similar to macrophage invasion visualized by immuno-staining. Therefore, it was confirmed that 2C-OCD could diagnose specific tissue characteristics of unstable plaque as well as the vulnerability attributed to macrophage invasion, based on the obtained drug infiltration.

Key Words: Atherosclerosis, Macrophage, Vulnerability, Photosensitizer, Drug Delivery System, Optical Coherence Tomography, 2-Color Optical Coherence Dosigraphy, Tissue Diagnosis

1. 結 論

急性冠症候群は世界の死因における第2位を占める疾患であり⁽¹⁾, 動脈内壁上に沈着した不安定プラークの破綻によって引き起こされる。不安定プラークは脂質に富んだコアを百 μm 以下の線維性被膜が覆う構造を有しており, その脆弱箇所における破綻によって脂質成分が流出し, 血管閉塞が発生する⁽²⁾。また, プラークの破綻と炎症細胞であるマクロファージの浸潤には相関があることが, 近年明らかとなっている⁽³⁾。血管内膜下に遊走したマクロファージは, その食食作用により酸化 LDL を取り込み泡沫化し, その肥大化に

よって脂質コアを形成することで周辺組織の脆弱化を促す。さらに, マクロファージ泡沫化の活性によって, タンパク質分解酵素の分泌により組織の脆弱化に至ることが議論されている⁽³⁾。このため, 不安定プラーク内に浸潤したマクロファージを検出することは組織の脆弱性診断と同義であり, 動脈硬化の予防や治療方針の決定に有効である。一般に動脈硬化の診断には, 超音波の反射エコーを利用した断層イメージング法 (Intravascular Ultrasound; IVUS)⁽⁴⁾が使用されている。しかし, その空間分解能は約 $100\mu\text{m}$ であるため, 血管組織内の詳細な形態把握は困難であり, 線維性被膜の検出は不可能である。近年, マイクロスケールの血管内断層イメージング手法として, Optical Coherence Tomography (OCT)⁽⁵⁾の臨床応用が進められている⁽⁶⁾。OCT は光干渉を利用したマイクロ断層画像法であり, 約 $10\mu\text{m}$ の高空間分解能を有するため, 詳細な組織形

* 原稿受付 2009年4月20日。

^{*1} 正員, 山口大学大学院医学系研究科応用医工学系専攻 (〒755-8611 宇部市常盤台 2-16-1)。

^{*2} 准員, 山口大学大学院医学系研究科応用医工学系専攻。

^{*3} 日本大学医学部内科学系循環器内科学分野 (〒173-8610 東京都板橋区大谷口上町 30-1)。

^{*4} 山口大学大学院医学系研究科器官病態内科学。

E-mail: s-saeki@yamaguchi-u.ac.jp

態分布を可視化できる。しかし、組織の細胞密度に依存した散乱強度と散乱減衰さらに組織内の光吸収物質に依存した吸収減衰のため、その断層画像は複雑なスペックルパターンを有する。このため、詳細な組織性状の把握やマクロファージの検出、すなわち脆弱性の診断は実現できていない。

著者らは⁽⁷⁾, OCT 信号の定量化を行う 2-Color Optical Coherence Dosigraphy (2C-OCD) 法を提案してきた。2C-OCD は薬剤の光吸収特性が異なる 2 波長帯の OCT を併用し、散乱体濃度と薬剤濃度の断層分布を分離検出する手法であり、前報⁽⁷⁾では、薬剤濃度断層分布をマイクロスケールにて定量検出可能であることを示した。本研究では、光線力学診断法 (Photodynamic Diagnosis; PDD)⁽⁸⁾に用いられるドラッグデリバリー薬剤 (Photosensitizer)⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾ が、動脈硬化プラークの脂質組織に残存する特性^{(11)~(14)}や、マクロファージに取り込まれる特性^{(15)~(17)}を利用する。すなわち、2C-OCD によって得られる薬剤浸潤度分布を基にした組織性状とマクロファージの検出から、不安定プラークの脆弱性をマイクロ断層診断する手法を提案する。photosensitizer の投与を行った粥状動脈硬化症の兎大動脈血管プラーク形成部位に対して 2C-OCD を適用し、算出した薬剤浸潤度分布とマクロファージ病理免疫染色画像を比較することにより、提案診断法の脆弱性検出能力について検討する。

2. 脆弱性マイクロ断層診断法

2-1 2-Color Optical Coherence Dosigraphy

OCT⁽⁵⁾は生体組織内部からの後方散乱光を検出し、組織形態を数 μm の空間分解能にて断層画像化する手法である。一般に、光ファイバーにより構築されたマイケルソン干渉計やマッハツェンダー干渉計が用いられ、参照鏡の光軸方向走査と照射ビームの光軸垂直方向走査により組織断層画像を計測する。照射光には Super Luminescent Diode (SLD) 光源の低コヒーレンス近赤外光を用い、そのコヒーレンス長によって奥行き方向の空間分解能が決定される。一方、光軸垂直方向の分解能は、光源の中心波長と対物レンズに依存したビームスポット径によって決定される。光源のコヒーレンス長とスポット径をマイクロスケールに設定することにより、被写界深度内において高空間分解能な組織形態分布を取得できる。OCT により得られる後方反射光強度 $I^{\lambda_c}(x, y, z)$ は (1) 式として表すことができる⁽⁵⁾⁽⁷⁾。 $I_0^{\lambda_c}(z)$ は対物レンズによって決定する入射光強度分布、 r^{λ_c} , R^{λ_c} は組織内外におけるエネルギー反射率、 $\mu_s^{\lambda_c}$ と $\mu_a^{\lambda_c}$ は散乱係数と吸収減衰

Fig. 1 Experimental apparatus of 2C-OCD system⁽⁷⁾

を示しており、入射光の中心波長 λ_c に依存した物理量である。

$$I^{\lambda_c}(x, y, z) \approx I_0^{\lambda_c}(z) (1 - R^{\lambda_c}(x, y))^2 r^{\lambda_c}(x, y, z) \times \exp\left[-2 \int_0^z (\mu_s^{\lambda_c}(x, y, z') + \mu_a^{\lambda_c}(x, y, z')) dz'\right] \quad (1)$$

2C-OCD 法⁽⁷⁾は、光線力学診断法 (PDD) に用いられるドラッグデリバリー薬剤 (Photosensitizer) を OCT 造影剤として用い、その光吸収特性が異なる 2 波長帯の OCT から組織の散乱係数分布と薬剤の吸収係数分布を算出する手法である。図 1 に示すような、照射光の中心波長が 680nm と 830nm の 2 波長帯 OCT システムを用いて OCT 画像を計測する場合、後方散乱光強度は (1) 式に従い、2 波長帯に対するそれぞれの物理量に依存する。さらに、図 2 に示す光吸収特性を持つ AlPcS (Al(III) Phthalocyanine Chloride Tetrasulfonic Acid; Frontier Scientific Inc.)⁽¹⁹⁾ を photosensitizer として使用する場合、AlPcS が浸潤した組織において、680nm 波長光は光吸収作用により後方散乱光強度が指数関数的に減衰するが、830nm 波長光の後方散乱光強度には薬剤による光吸収作用が現れない。この 2 波長帯の光吸収特性の相異を利用することによって、薬剤吸収係数分布を検出可能とする。

AlPcS は腫瘍親和性が高く、近赤外蛍光の発光が可能であるため、次世代の photosensitizer として PDD に適用が期待されている。photosensitizer が腫瘍組織だけでなく動脈硬化プラークに取り込まれることは、第 1 世代 photosensitizer の代表である Photofrin (Axcan Pharama Inc.)^{(9)~(11)}の頃から知られており、ヘマトポルフリン誘導体 (HpD) について多く確認されている⁽¹¹⁾。近赤外励起を目的として精力的に開発されてきた第 2 世代の photosensitizer も、クロリン系である Mono-L-aspartyle chlorin e6 (NPe6)⁽¹²⁾、広義ポルフィリン系である Motexafin Lutetium⁽¹³⁾、フタロシアニン

Fig. 2 Emission and absorption spectra of two light sources and AlPcS respectively

系の AlPcS⁽¹⁴⁾においても, HpD と同様の性質を持つことが確認されている. 動脈硬化組織への浸潤メカニズムの詳細は証明されていないものの, 一般に疎水性に依存する脂質成分との結合が理由として挙げられている^{(11)~(14)}. しかし, 上記の NPe6 や Motexafin Lutetium や, さらに疎水性を高めた photosensitizer などは, 動脈硬化プラークに遊走したマクロファージに堆積する報告^{(15)~(17)}があり, 腫瘍細胞の場合と同様にレセプターを介したマクロファージの貪食作用との関連も示唆されている. 本稿で使用した AlPcS が動脈硬化内のマクロファージに浸潤する報告は, 著者が知る限り確認できないが, 動脈硬化病変に堆積することは確認されており⁽¹⁴⁾, 同様な特性を共有する第2世代の photosensitizer として, AlPcS もマクロファージマーカーとして機能すると予測する.

本研究では, 不安定プラークに photosensitizer が残存する特性を利用する. 特に, 組織脆弱部位と相関があるマクロファージの貪食作用を利用し, 2C-OCD により取得する薬剤吸収係数分布に基づいた組織脆弱性のマイクロ断層診断法を提案する. 実際には, (1) 式に対して自然対数を取り, 奥行 z 方向の空間微分である (2) 式を検討する. 生体試料を考えた場合, 散乱係数や吸収係数に比べ組織内部のエネルギー反射率 r^{λ_c} の空間変化は小さいと仮定できる. 更に, 入射光強度分布 $I_0^{\lambda_c}$ も被写界深度内において一定と仮定し, (3)(4) 式を導出する.

$$\frac{\partial}{\partial z} [\ln(I^{\lambda_c}(x, y, z))] = \frac{d}{dz} [\ln(I_0^{\lambda_c}(z))] + \frac{\partial}{\partial z} [\ln(r^{\lambda_c}(x, y, z))] - 2(\mu_s^{\lambda_c}(x, y, z) + \mu_a^{\lambda_c}(x, y, z)) \quad (2)$$

$$\frac{\partial}{\partial z} [\ln(I^{\lambda_c}(x, y, z))] \approx \begin{cases} -2(\mu_s^{680}(x, y, z) + \mu_a^{680}(x, y, z)) & (3) \\ -2(\mu_s^{830}(x, y, z)) & (4) \end{cases}$$

Fig. 3 2C-OCD Algorithm

なお, 830nm 帯の AlPcS のモル吸光係数は微小であるため, (4) 式の吸収係数は無視している. これより, μ_s^{830} から散乱係数分布が算出でき, 組織性状に依存した散乱強度減衰分布として組織形態を診断できる. さらに対象組織の散乱係数比 $\kappa = \mu_s^{680} / \mu_s^{830}$ を予め算出しておくことにより, (3)(4) 式から薬剤の吸収係数 μ_a^{680} が算出でき, 組織性状とマクロファージの浸潤度分布, 即ち脆弱性断層診断が可能となる.

2.2 提案アルゴリズム 提案診断法における散乱係数分布 μ_s と吸収係数分布 μ_a の算出アルゴリズムを図3に示す. 本システムでは, (1) 式に示す入射光強度分布 $I_0^{\lambda_c}$ とスペックルノイズの影響低減のため, 対物レンズの光軸方向走査を行い, 各焦点位置における OCT 画像に対しアンサンブル平均を施している. 対数処理の後, Weighted Moving Least Square Method (WMLSM)⁽¹⁸⁾を新たに導入し, (3)(4) 式に示す微係数(減衰係数)の算出を行う. WMLSM は, ランダム性の高い散乱特性を持つ生体組織の OCT 画像に対し, 移動最小2乗法によって空間平滑化を行うとともに, 局所的な微係数の安定算出を可能とする手法である. WMLSM に使用する2乗誤差式 $J(x, z)$ を (5) 式に示す. $f(x_i, z_j)$ は対数化を行った後方散乱光強度に対する近似関数, $W(r)$ は窓関数を表す. なお, 近似関数 $f(x_i, z_j)$ には2次元2次多項式を使用した.

$$J(x, z) = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M W(r) [\ln(I^{\lambda_c}(x_i, z_j)) - f(x_i, z_j)]^2 \quad (5)$$

$$W(r) = \frac{\exp[-(r/\sigma)^2] - \exp[-(r_0/\sigma)^2]}{1 - \exp[-(r_0/\sigma)^2]} \quad (6)$$

(5) 式に示すように, 近似関数 $f(x_i, z_j)$ に窓関数 $W(r)$ を乗ずることにより, 算出する微係数の局所性を高めている. (6) 式に示す窓関数は, 微係数算出位置 (x, z) と OCT 画像計測位置 (x_i, z_j) との距離 r を変数とした

Table.1 Aortic samples classification

feed	sex	age	weight	AlPcS administration	tissue characterization	group
high-cholesterol diet	♂	6month	3.1kg	Yes	fatty streak/ media	A/ B
high-cholesterol diet	♂	4month	2.7kg	No	fatty streak/ media	C/ D
normal diet	♂	17month	4.0kg	Yes	media	E
normal diet	♀	3month	2.8kg	No	media	F

ガウス関数であり、任意に与える影響領域半径 r_0 をパラメータとして重み付け処理を行っている。なお、定数 σ は一般に用いられる $\sigma = 0.5r_0$ を与えた⁽¹⁸⁾。影響領域半径 r_0 として、微係数が安定算出可能であった $r_0 = 100\mu\text{m}$ を経験的に決定し、OCT 分解能に基づき $10\mu\text{m}$ 毎に微係数を算出する。次に、2 波長光の光路長差により発生する、2 波長信号の検出位置ずれの補正を行う。OCT 画像における試料表面には強い干渉ピークが観測でき、この検出信号の極値が試料表面位置を与える。そこで、WMLSM により算出する微係数分布から計測試料表面近傍における極値を抽出し、2 波長信号における試料表面位置を一致させることにより、2 波長信号の検出位置ずれを補正する。最後に、事前に算出した散乱係数比 κ を用い、(3)(4) 式に基づき吸収係数分布を算出する。なお、微係数分布における任意の正常領域において散乱係数比分布を算出し、この平均値を散乱係数比 κ として使用した。

3. 実 験

3.1 実験システム 本研究で用いた OCT 実験装置を図 1 に示す。これは 680nm と 830nm の中心波長をもつ 2 つの SLD 光源から構成され、分光素子 (WDM) により両光源に対する OCT 信号を同時取得する 2 波長ファイバー型 OCT システムである。photosensitizer には、図 2 に示す吸収特性を持つ AlPcS を用いた。中心波長 $\lambda_c = 680\text{nm}$ の光源は半値全幅 $\Delta\lambda = 15\text{nm}$ の SLD (Amonics, 5mW) を用い、photosensitizer 検出用光源とした。中心波長 $\lambda_c = 830\text{nm}$ の光源は、中心波長 795nm と 840nm の 2 つの SLD (Optolink, 30mW) をファイバカプラによって合波し、半値全幅 $\Delta\lambda = 75\text{nm}$ の広帯域光源としたものを使用した。分光器を用いて取得した 2 光源のスペクトルを図 2 に示す。光源のスペクトルをガウス分布と仮定すると、コヒーレンス長の理論値は、680nm 光源に対し $l_c = 13.6\mu\text{m}$ となる。一方、830nm 光源に対しては $l_c = 4.05\mu\text{m}$ であるが、スペクトル形状を考慮するとサイドロープの影響から、光軸 z 方向の空間分解能は $10\mu\text{m}$ 程度と考えられる。光軸垂直 x 方向の空間分解能を示すビームスポット径 $\Delta\Omega$ は、非球面レンズ (NEW FOCUS, N.A.=0.25, $f=11\text{mm}$) により集光し、680nm 光源と 830nm 光源に

対して $9.52\mu\text{m}$ と $11.6\mu\text{m}$ となる。このため、光軸垂直方向に対するビームの走査は $10\mu\text{m}$ 毎とした。被写界深度 DOF は $233\mu\text{m}$ となり、この領域においてコヒーレンスゲートが掛かり干渉信号が得られる。干渉信号の取得においては、焦点位置を試料表面位置から内部 $200\mu\text{m}$ の範囲において $40\mu\text{m}$ 毎に変化させ、6 点の焦点位置における参照鏡走査によって干渉信号を取得し、アンサンブル平均を行った。本システムでは組織の屈折率を考慮すると、 $300\mu\text{m}$ 程度のダイナミックレンジにて計測が可能と考えられるが、これは組織の散乱特性、ビーム強度や設定波長にも依存しているため、システムの変更によりダイナミックレンジの拡大は可能である。干渉信号の取得は、参照鏡を一定速度 $v\text{ m/s}$ にて走査することにより、ロックインアンプを用いて干渉信号のドップラーシフト周波数成分 ($f_D = 2v/\lambda_c$) を増幅検出した。ただし、参照鏡ステージの走査速度変化によるノイズも増幅してしまうため、増幅前にハイパスフィルタを設置した。

3.2 計測対象 計測対象には高コレステロール食家兎および正常家兎 (Kbl:JW, KBT オリエンタル) の大動脈血管を使用した。各兎の雌雄、安楽死時の月齢、体重などの情報を表 1 に示す。なお、高コレステロール食家兎と正常家兎の各群に 2 匹使用し、そのうち各 1 匹に対して AlPcS の投与を行った。高コレステロール食家兎には、1 日あたり 100g のコレステロール 1% 添加飼料 (RC-4, ORIENTAL YEAST Co., Ltd.) を 3 ヶ月間給餌し、大動脈血管内に心筋梗塞を引き起こす原因となる fatty streak⁽²⁰⁾ を発症させた。AlPcS は NaOH と Phosphate-Buffered Salines (PBS) を用いて 1mg/ml, pH=7.2 に調整した後、耳静脈から 5ml/kg 投与した。投与 6 時間後に安楽死させ大動脈血管を摘出し、任意部位を切り出すことにより、各群において 3~5 枚の切片試料を作成した。切片試料の白色光画像と蛍光画像の撮影に続き、試料を水没させた状態で OCT 計測を行った。蛍光画像は、試料に対して 680nm 半導体レーザ (OZ Optics Ltd., 10mW) をビームエキスパンダーを用いて一様照射し、AlPcS の蛍光波長帯に含まれる $760\pm 10\text{nm}$ ⁽²¹⁾ のバンドパスフィルタ (FY0760, $\phi 50\text{mm}$, 朝日分光) を通して、光電子倍增型 EMCCD

カメラ (512×512pixel, 14bit, C9100-12, Hamamatsu) により撮影した。

なお、本研究は山口大学動物管理委員会の審査を受け、「山口大学動物に関する規定」、「動物の愛護及び保管に関する法律」(法律第 105 号)、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(環境省告示第 88 号) 及び「研究機関における動物実験などの実施に関する基本指針」(文部科学省告示第 71) の規制に基づいて行われた。

3.3 病理組織診断 計測試料の組織性状の判別と、マクロファージ浸潤分布を検出するため、病理組織診断を行った。OCT 計測の後、血管切片試料をホルマリン固定しパラフィン・サンプルを作成した。厚さ $4\mu\text{m}$ の血管断片組織をクライオスタットにより切り出し、白色光画像を用いて OCT 計測断面と血管断片組織の位置を一致させた。なお、試料の脱水処理によって不均一な組織収縮が発生するが、病理切片を詳細に作成したため、断面の定性的な一致は実現できていると考える。切り出した血管断片組織に対して Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行い、顕微鏡にて組織観察を行った。さらにマクロファージの浸潤分布を観察するため、mouse monoclonal anti-rabbit macrophage antibody RAM11 免疫染色 (Dako, Carpinteria, CA) も施した。これより、組織の脆弱部位を表すマクロファージ免疫染色画像と 2C-OCD によって得られる吸収係数分布を比較し、本手法による組織性状と脆弱性の検出能力について検討することができる。また、マクロファージの浸潤分布と AIPcS の浸潤分布を直接比較するため、無染色切片から AIPcS 蛍光画像を取得した。落射型蛍光顕微鏡 (BX-51, Olympus) を使用し、AIPcS を 330 ~ 385nm の紫外光励起し、600nm のハイパスフィルタを通して EMCCD カメラ (C9100-12, Hamamatsu) により AIPcS 蛍光画像を取得した。

3.4 統計処理 2C-OCD から得られた薬剤吸収係数 μ_a に関して、不安定プラーク検出の有意性を検討するため、t 検定を用いた統計処理を行った。表 1 に示すように、給餌の種類と AIPcS 投与の有無、さらに組織性状を考慮し、評価対象を 6 群 (A~F) に分類した。組織性状は病理組織診断により撮影した HE 染色画像から、医師の所見により fatty streak と中膜に分類した。各群において、それぞれ 3 ~ 5 の切片試料における吸収係数分布を算出した後、さらに任意の関心領域 ($100\mu\text{m} \times 150\mu\text{m}$) を 20 箇所抽出し検体数とした。なお、提案手法の動脈硬化プラーク検出に関して、有意水準 $p < 0.001$ として有意差判定を行った。

Fig. 4 Images of plaque segment in rabbit aorta (Group A), (a) white light image, (b) AIPcS fluorescence image

4. 実験結果および考察

4.1 2C-OCD 結果と病理画像の比較 AIPcS の投与を行った高コレステロール食家兎大動脈血管切片 (A 群) に対して撮影した、白色光画像と蛍光画像の一例を図 4 に示す。白色光画像より、試料中央にプラークの隆起形成を確認できる。また、蛍光画像よりプラーク部位において AIPcS の蛍光発光を確認でき、定性的に AIPcS がプラーク病巣に堆積していることが分かる。前述したように、photosensitizer にはプラーク病巣に取り込まれる特性があることが一般に知られている^{(11)~(14)}。図 4 より、AIPcS もこれと同様の特性を持つと考えられ、動脈硬化マーカーとして機能していることが示唆できる。しかし、AIPcS の蛍光画像では組織内部の薬剤浸潤分布を把握することができないため、たとえ血管内視鏡を用いたとしても脆弱性の *in vivo* 診断は不可能である。なお、表 1 の B~F 群に対する蛍光画像も別途撮影しており、蛍光は検出されなかったことを確認している。

薬剤投与を行った高コレステロール食家兎大動脈血管 (A 群) の 830nm 帯における OCT 画像と、2C-OCD の適用結果である吸収係数分布を図 5 に示す。OCT 画像において血管組織を表層より奥行き $300\mu\text{m} \sim 400\mu\text{m}$ 程度計測できており、 $x=200\mu\text{m} \sim 1000\mu\text{m}$ の範囲にてプラークの隆起を確認できる。プラーク部位における散乱減衰は、正常部位である $x=0\mu\text{m} \sim 100\mu\text{m}$ と $x=1100\mu\text{m} \sim 1300\mu\text{m}$ に比べ若干大きいため、脂質の存在を推測することはできる。しかし、組織形態を表示する OCT 画像だけでは組織性状の判別は困難であると共に、マクロファージの浸潤に相関を有する脆弱性の検出は不可能である。一方、図 5(b) に示す吸収係数分布から分かるように、プラーク病巣に対応する

Fig. 5 Images of plaque segment in rabbit aorta (Group A), (a) OCT image ($\lambda_c=830\text{nm}$), (b) absorption coefficient distribution

$x = 150\mu\text{m} \sim 550\mu\text{m}$ と $x = 650\mu\text{m} \sim 1100\mu\text{m}$, 試料表面より深さ $100\mu\text{m}$ の範囲にて吸収係数の増大が確認できる。これより、薬剤浸潤度を示す吸収係数分布と図 4 に示す蛍光画像は、同様の傾向を示していることが分かる。

次に、吸収係数分布と脆弱性を示すマクロファージの対応を調べるため病理組織診断を行った。HE 染色および RAM11 マクロファージ免疫染色画像、さらに無染色切片における AIPcS 蛍光画像を図 6 に示す。なお、OCT 画像に比べ試料が小さく表面形状にも相異が見られるが、これは病理切片の作成過程における組織の収縮変形が原因である。図 6(a) における隆起部は OCT 画像と良く一致し、内膜下に脂質の沈着が確認できる。これは fatty streak⁽²⁰⁾ と呼ばれるコレステロールを蓄積したマクロファージ (泡沫細胞) の集合体であり、粥状プラーク (Atheroma) や心筋梗塞の原因となる粥状硬化プラーク (Atherosclerotic plaque) の形成途中段階である。一方、プラーク下部に存在する波状の組織は中膜と呼ばれる弾性組織である。図 6(b) に示す RAM11 免疫染色画像において、プラーク部位における茶色掛かった箇所がマクロファージ陽性部位であることを専門医師により確認された。プラーク病巣に対応する $x = 400\mu\text{m} \sim 600\mu\text{m}$ の範囲にてマクロファージの集積が確認でき、中膜においては存在が認められなかった。また、図 6(c) の蛍光画像より、プラーク

Fig. 6 Histological images of plaque segment in rabbit aorta (Group A), (a) HE staining image, (b) RAM11 immuno-staining image, (c) AIPcS fluorescence image

病巣に対応する $x = 300\mu\text{m} \sim 600\mu\text{m}$ と $x = 800\mu\text{m} \sim 1100\mu\text{m}$ の範囲にて AIPcS の蛍光所見が得られ、2C-OCD により算出された吸収係数分布と定性的な一致が示された。さらに、図 6(b) におけるマクロファージ陽性領域と類似した分布傾向が確認できることに加え、photosensitizer がマクロファージ親和性を有する報告^{(15)~(17)}を考慮すると、AIPcS がマクロファージのマーカーとして機能していると示唆できる。

これに対し、E 群に対応する AIPcS 投与を行った正常家兎大動脈血管の実験結果として、830nm 帯における OCT 画像と吸収係数分布、さらに HE 染色による病理画像を図 7 に示す。OCT 画像において血管組織を表層より奥行き $400\mu\text{m}$ 程度計測できているが、プラークの形成は確認できず、ほぼ一様な散乱強度分布を示している。また吸収係数分布においては、AIPcS

Fig. 7 Image of segment in rabbit aorta (Group E), (a) OCT image ($\lambda_c=830\text{nm}$), (b) absorption coefficient distribution, (c) HE staining image

の投与にも拘わらず小さな吸収係数値が一様に分布していることが分かる。病理画像および免疫染色画像についても、中膜の確認ができるだけで、マクロファージを含有する病巣組織は確認できなかった。なお、B～F群に関しても RAM11 によるマクロファージ免疫染色および蛍光計測を行ったが、共に陰性であったことを付記する。

以上の結果より、本提案手法は動脈硬化プラークの断層検出に有効であり、組織性状診断能の向上に効果があることが確認された。また、病理検査結果より AIPcS とマクロファージの相関関係が示唆されたため、2C-OCD によって算出される薬剤吸収係数分布からマクロファージ浸潤分布を検出し、不安定プラークの脆弱性診断に有用な知見を提供できると考えられる。

4.2 有意差検定 表 1 の分類に基づき算出した平均吸収係数を図 8 に示す。結果より、AIPcS の投与

Fig. 8 Statistical evaluation by t-test of absorption coefficient

を行った兎の fatty streak における平均吸収係数が、最も大きい値を示した。この有意性を評価するため、A 群と他群において t 検定を行ったところ、全ての群に対し有意差 ($p < 0.001$) が認められた。さらに、B～F 群の全組み合わせに対しては有意差が認められなかった。これより、AIPcS が堆積した fatty streak においてのみ、2C-OCD によって算出された吸収係数は、有意な増大を示すことが明らかとなった。

この結果から、本手法は生体組織内の薬剤分布をマイクロスケールにて断層検出する有効な機能を有するため、動脈硬化プラークを有意検出可能であることに加え、光線力学診断法 (PDD)⁽⁸⁾ に代わる微小癌検出にも応用可能であると考えられる。特に、脳外科領域における Micro Surgery⁽²²⁾ においては、有用なセンシング技術として利用価値が高いと考えられる。一方、マクロファージ浸潤と AIPcS の集積との相関関係に関しては、更なる検討が必要と考える。近年、分子細胞学の知見とナノテクノロジーの台頭を基に、マクロファージへの取り込み性能を向上させたフタロシアニン系やクロリン系の新たな photosensitizer の開発が活発化している^{(16)(17)(23)~(25)}。このため、これらの新規 photosensitizer と本手法の併用によって、不安定プラーク内のマクロファージ浸潤を有意に検出し、その脆弱性の断層診断は実現化できると考える。特に、本システムのカテーテル化により、動脈硬化の *in vivo* 診断には大きな貢献が期待できる。また、本手法によるマクロファージの *in vivo* 検出は、その過剰機能によって発症する動脈硬化をはじめ糖尿病発症に至る膵炎など、炎症や免疫異常などの様々な疾患発症メカニズムに対して新たな知見が期待できると共に、それらの治療法として注目されているドラッグデリバリーシステム⁽²⁶⁾ の *in vivo* 評価法としても波及可能であると考えられる。

5. 結 言

動脈硬化プラークに photosensitizer が残存する特性や、組織脆弱性と相関関係を持つマクロファージが

photosensitizer を取り込む特性を利用し、2C-OCD により算出する薬剤浸潤度分布から、動脈硬化プラークの脆弱性をマイクロ断層診断する手法を提案した。家兎大動脈血管を用いた *ex vivo* 検証実験を行い、算出した薬剤吸収係数分布と、それに対応する病理画像、マクロファージ免疫染色画像、蛍光画像の検討を行った。Photosensitizer (AIPcS) の投与を行った fatty streak においてのみ、薬剤吸収係数分布は有意 ($p < 0.001$) な増大を示したことから、2C-OCD は生体組織に対して適応可能であり、動脈硬化プラークの検出に貢献できることが示された。更に、病理診断結果よりマクロファージ浸潤と AIPcS 集積の相関関係が示唆されたことから、2C-OCD を用いてマクロファージ浸潤分布を検出可能であり、不安定プラークの脆弱性診断に対する有用性を示唆した。

文 献

- (1) World Health Organization, *The world health report 2008*, (2008), Chapter 1, pp.7-11.
- (2) Burke, A. P. et al., Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly, *New England Journal of Medicine*, (1997), Vol.336, pp.1276-1282.
- (3) Moreno, P. R. et al., Macrophage infiltration in acute coronary syndromes: implications for plaque rupture, *Circulation*, (1994), Vol.90, pp.775-778.
- (4) Kawasaki, M. et al., In vivo quantitative tissue characterization of human coronary arterial plaques by Use of Integrated Backscatter Intravascular Ultrasound and Comparison With Angioscopic Findings, *Circulation*, (2002), Vol.105, pp.2487-2492.
- (5) Schmitt, J. M., Optical coherence tomography (OCT): A review, *IEEE Journal of selected topics in quantum electronics*, Vol.5, No.4, (1999), pp.1205-1215.
- (6) Stamper, D. et al., Plaque characterization with optical coherence tomography, *Journal of the American College of Cardiology*, Vol.47, No.8, (2006), pp.C69-C79.
- (7) Nakamichi, Y. et al., Quantitatively visualizing assay of drug delivery system using 2-Color Optical Coherence Dosigraphy, *Transactions of the Japan Society of Mechanical Engineers, Series B*, Vol.74, No.743, (2008), pp.110-116. (in Japanese)
- (8) Weissleder, R. et al., In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes, *Nature Biotechnology*, Vol.17, (1999), pp.375-378.
- (9) Roberts, W. G. et al., In vitro photosensitization I. Cellular uptake and subcellular localization of mono-L-aspartyl chlorin e6, chloro-aluminum sulfonated phthalocyanine, and photofrin II, *Lasers in Surgery and Medicine*, Vol.9, (1989), pp.90-101.
- (10) Roberts, W. G. et al., In vitro photosensitization II. An electron microscopy study of cellular destruction with mono-L-aspartyl chlorin e6 and photofrin II, *Lasers in Surgery and Medicine*, Vol.9, (1989), pp.102-108.
- (11) Katoh, T. et al., In vivo intravascular laser photodynamic therapy in rabbit atherosclerotic lesions using a lateral direction fiber, *Lasers in Surgery and Medicine*, Vol.20, (1997), pp.373-381.
- (12) Hayashi, J. et al., Transadventitial localisation of atheromatous plaques by fluorescence emission spectrum analysis of mono-L-aspartyl chlorin e6, *Cardiovascular Research*, Vol.27, (1993), pp.1943-1947.
- (13) Hayase, M. et al., Photoangioplasty with local motexafin lutetium delivery reduces macrophages in a rabbit post-balloon injury model, *Cardiovascular Research*, Vol.49, (2001), pp.449-455.
- (14) Corbani, E. A. et al., Photodynamic diagnostic in atherosclerotic artery wall of rabbits, *Proceedings of SPIE*, Vol.4244, (2001), pp.434-441.
- (15) Aizawa, K., Pathognostic image pattern of a spectrum of photosensitizers, *OYO BUTURI*, Vol.70, No.6, (2001), pp.666-671. (in Japanese)
- (16) Hamblin, M. R. et al., Macrophage-targeted photodynamic detection of vulnerable atherosclerotic plaque, *Proceedings of SPIE*, Vol.4949, (2003), pp.466-476.
- (17) Brasseur, N. et al., Receptor-mediated targeting of phthalocyanines to macrophages via covalent coupling to native or maleylated bovine serum albumin *Photochemistry and Photobiology*, Vol.69(3), (1999), pp.345-352.
- (18) Belytschko, T. et al., Element-free Galerkin methods, *International Journal for Numerical Methods in Engineering*, Vol.37, Issue.2, (1994), pp.229-256.
- (19) Derycke, A. S. L. et al., Transferrin-conjugated liposome targeting of photosensitizer AIPcS₄ to rat bladder carcinoma cells, *Journal of the National Cancer Institute*, Vol.96, No.21, (2004), pp.1620-1630.
- (20) Dodson, P. M. et al., The nature of atheroma, *Proceedings of the Nutrition Society*, Vol.46, (1987), pp.331-336.
- (21) Juzenas, P. et al., Spectroscopic evidence of monomeric aluminium phthalocyanine tetrasulphonate in aqueous solutions, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, Vol.75, (2004), pp.107-110.
- (22) Bopart S. A., Optical coherence tomography: Technology and applications for neuroimaging, *Psychophysiology*, Vol.40, No.8, (2003), pp.529-541.
- (23) Vries, H. E. et al., Oxidized low-density lipoprotein as a delivery system for photosensitizers: Implications for photodynamic therapy of atherosclerosis, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Vol.289, No.1, (1999), pp.528-534.
- (24) Li, H. et al., High payload delivery of optical imaging and photodynamic therapy agents to tumors using phthalocyanine-reconstituted low-density lipoprotein nanoparticles, *Journal of Biomedical Optics*, Vol.10, (2005), pp.0412031-0412037.
- (25) McCarthy, J. R. et al., A macrophage-targeted theranostic nanoparticle for biomedical applications, *Small*, Vol.2, (2006), pp.983-987.
- (26) Adlakha-Hutcheon, G. et al., Controlled destabilization of a liposomal drug delivery system enhances mitoxantrone antitumor activity, *Nature Biotechnology*, Vol.17, No.8, (1999), pp.775-779.