

擬似吸気時における細気管支の変形

世良 俊博^{*#}, 上杉 健太郎^{*}, 八木 直人^{*}

^{*} 財団法人 高輝度光科学研究センター 利用研究促進部門Ⅱ

兵庫県佐用郡三日月町光都 1-1-1

e-mail: {sera, ueken, yagi}@spring8.or.jp

[#] 独立行政法人 理化学研究所 生体力学シミュレーション特別研究ユニット

埼玉県和光市広沢 2-1

要旨 肺は、呼吸の際大変形し、生体内の中で最も変形する臓器の 1 つである。特に肺のやわらかさを示すコンプライアンスは、臨床だけでなく気道内の力学現象に対して重要情報である。従来肺の微細構造は、固定標本を作製し顕微鏡下で観察されており、ガス交換に重要な末梢気管支レベルでのコンプライアンスの情報は全くわかっていない。我々は、高輝度を有する SPring-8 放射光を用いた高速高空間分解能 CT システムを確立し、化学処理を行わない軟組織という生理的条件下において肺の微細構造を可視化した。本研究では、高速高空間分解能 CT システムを用いて、マウス肺の擬似吸気時における末梢細気管支の変形量を測定した。直径が 200 μm 以下の細気管支の直径と長さは、最大肺容量時にはそれぞれ 68, 30%増加し、直径が 400 μm 以上の比較的大い気管支はそれぞれ 45, 23%増加し、均一に変形していなかった。このような末梢気管支の大変形は、末梢気管支内のガス交換を促進している可能性があるだけでなく、肺機能シミュレーションの際の重要なパラメータである。

1. 始めに

肺は、生体エネルギー代謝を行うのに必要な O_2 を摂取し CO_2 を排出する唯一の臓器である。肺でのガス交換は、吸気時は胸郭が広がることによって受動的に肺は広がり、逆に呼気時は肺自身の弾性力によって能動的に収縮することによって行われる。このように肺のやわらかさは肺機能の重要な指標であり、特に肺機能検査では単位圧力あたりの肺容量の変化量を表す肺コンプライアンスが用いられる。従来、肺コンプライアンスは肺全体を反映したマクロ的な指標であった。しかし、気道の中でも肺胞直前の細気管支部位はガス交換にとって特に重要な部位であり、一旦細気管支部位に異常が起きると細気管支以降の肺胞でガス交換ができなくなり呼吸困難になりやすい。そのような場合、肺の局所である細気管支コンプライアンスと密接な関係がある細気管支の変形量が疾患の重傷度を表す指標となる。

従来気管支の変形量を測定する方法として、①肺の固定切片の利用^(1, 2)、②気管支造影法⁽³⁻⁵⁾と③摘出気管支⁽⁶⁾や摘出肺の利用^(7, 8)があった。①の方法では、試料作成中に肺が収縮するだけでなく、同一気管支の変形が比較できないため具体的な定量化が不可能であった。②の方法は一般の臨床用 CT を用いるが、それらの装置では空間分解能が不足し比較的大い気管支（直径 1 mm 以上）の気管支しか可視化されない。近

年さらに空間分解能が向上したマイクロCTが登場し⁽⁹⁾、世良らは血管内に灌流した造影剤が血管から漏れ肺組織を染色し、その後コーンビーム型マイクロCTを用いて摘出肺の微細構造を撮影する方法を提案した^(7,8)。本手法により、軟組織の状態で細気管支部位を可視化することが可能となり、さらに細気管支自身の局所変形量を評価することが可能となった。しかし、造影剤が肺胞内に漏れ出している可能性がある。さらに、肺はFig. 1のように胸郭内に存在するため、その変形量は摘出した場合より小さい可能性がある。

近年、一般利用が可能となったSPring-8放射光を用いたCTイメージングが盛んに行われている⁽¹⁰⁻¹²⁾。SPring-8の単色X線を利用したCT装置は、臨床用CTやマイクロCTと比較してはるかに濃度コントラストがよく、ほぼ定量的な取り扱いができる。

近年、SPring-8放射光を利用してマウス肺の微細構造を化学処理を施さない状態で可視化できる高速高空間分解能CTシステムを開発した⁽¹³⁾。従来SPring-8におけるCTシステムはS/Nをあげるために1スキャンに数時間必要であった。そのためスキャン中にサンプルが微小変形し、軟組織のイメージングに適していない。スキャン時間を10分以下となるようにシステムを改良し、マウスの細気管支や肺胞を可視化可能となった。本研究では、高速高空間分解能CTを用いて擬似吸気時における細気管支の形態変化を調べた。

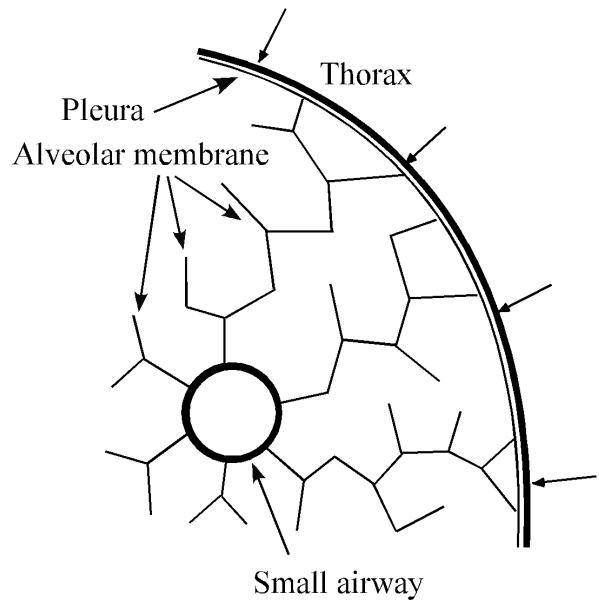


Fig. 1 Schematic model of small airway in lung thorax.

2. 実験方法

1) 実験試料

実験試料には、SPF マウス (C3H/HeJ, オス, 9 weeks) を用いた。また、空間分解能評価としてMTF用X線テストチャートを用いた。マウスは、エーテルによる安楽死後、ポリカーボネート製半円筒内部に保持した。実験試料は、Fig. 2のように回転ステージ上に固定した。

2) 実験装置

実験は、SPring-8 R&D ビームライン BL38B1 と医学イメージングビームライン BL20B2で行った。偏向電磁石によって取り出された放射光は、2結晶分光器(Si(111) or Si(311))によって分光され実験ハッチ内に輸送される。特に、BL20B2は発光点から215 m離れた場所に実験ハッチがあり、横幅300 mm縦幅15 mm以上の広いビーム幅となり3次元CTに適している⁽¹⁴⁾。本研究で用いた検出器は、可視光変換型高分解能2次元検出器(AA60+ORCA II -HR, 浜松フotonクス株式会社)を用いた。本検出器の空間分解能は、1 pixel = 11.8 μm (2×2binnig時：画素数：2000(H)×1312(V) pixel)であ

る。蛍光体に厚さ 10, 20 μm の粉末 P43 ($\text{Gd}_2\text{O}_2\text{:Tb}$) を用いた。X 線エネルギーを 20 keV とし、露光時間を 300 ms/projection とした。

従来の SPring-8 での CT システムは、撮影時に回転ステージを一旦止め、露光・画像の取り込みを繰り返して投影像を収集していた。本研究では、回転ステージを止めることなく露光を繰り返し、高速取り込み可能な CCD カメラによって連続的に投影像を収集した。その結果、スキャン時間を 10 分程度に短縮することが可能となった。

本研究では、気管支の変形量を調べるために肺体積をステップ的に変化させた。露出した気管内にポリエステルチューブを挿入し、1 ml シリンジを用いて肺体積を機能的残気量 (FRC) と最大肺容量 (TLC) と変化させて撮影した⁽¹⁵⁾。

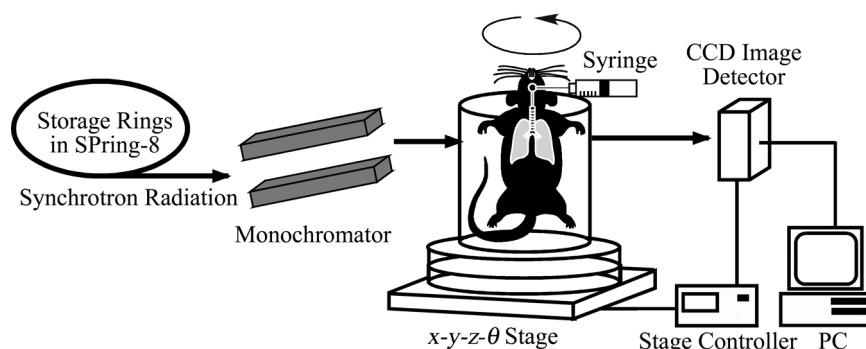


Fig. 2 The experimental apparatus.

3) 画像処理

CT 画像の再構成には、1440 枚/180°の投影画像から Convolution Back Projection 法を用いて行った。また、スキャンの前後に X 線 off 時の画像とサンプルのない X 線放射時の画像を撮影し、オフセット補正およびゲイン補正を行った。再構成ボリュームデータは、視野の広い BL20B2 では $2000 \times 200 \times 650$ voxel である。

得られた CT 画像から *the visualization toolkit* (VTK) を用いて 3 次元再構成を行った⁽¹⁶⁾。VTK は、linux や windows などのマルチプラットフォームをサポートしているオープンソースの高水準 3D ライブラリである (*kitware Inc.*, <http://www.kitware.com>)。

細気管支ネットワークの形態を解析するために、まず閾値処理で気管支内腔領域を抽出し、その後 3 次元細線化処理⁽¹⁷⁾によって骨格線・分岐点を抽出した⁽⁷⁾。本研究では、Fig. 5 のように CT 画像から閾値処理によって気道内腔を抽出した後アイソサーフェイス法によって 3 次元構築を行った。近年、CT 画像のような医療画像から血管などの注目部位を自動抽出する方法が本プロジェクトを含め盛んに研究されている。しかし、細気管支や肺胞部分では複雑な分岐を繰り返しているだけでなくピクセルノイズの影響を大きく受けるため、自動抽出では困難である。本研究では、各 CT 画像において手動で抽出する気管支を選び、閾値を変化させながら気管支内部を抽出した。

気管支を円柱と仮定し、各肺体積時における気管支の長さ (L)、直径 (D)、体積 (V) を算出し、以下のように長さや直径の変化率 (δ_L, δ_D) を定義した。 L_{FRC} と D_{FRC} は FRC 時での気管支の長さや直径であり、 L' と D' は各肺体積時の値である。また気管支の体積変化 (δ_V) は、TLC 時に対する FRC 時の割合と定義した⁽⁸⁾。

$$\delta_L = \frac{L_{TLC} - L_{FRC}}{L_{FRC}}, \quad \delta_D = \frac{D_{TLC} - D_{FRC}}{D_{FRC}}, \quad \delta_V = \frac{V_{FRC}}{V_{TLC}}$$

3. 実験結果

1) 有効空間分解能の評価

Fig. 3 に MTF の結果を示す。厚さ 10 μm の蛍光体の場合、5%, 10%MTF レベルは 32.6, 26.9 line pairs/mm であり、厚さ 20 μm の蛍光体の場合、22.3, 19.8 line pairs/mm であった。撮影条件は 1 pixel = 11.8 μm であったため、厚さ 10 μm の蛍光体の場合は、ナイキスト周波数 (42.4 line pairs/mm) に近い分解能が得られた。

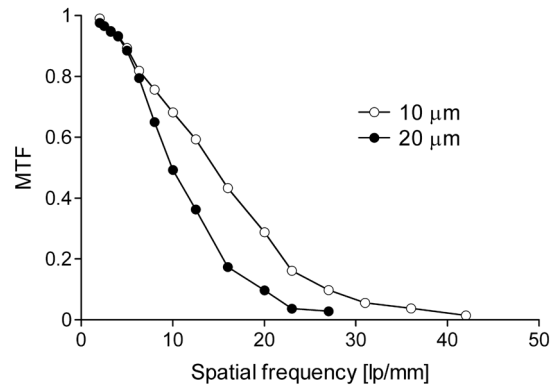


Fig. 3 Modulation transfer function (MTF) of the detector with 10- μm and 20- μm thick P43 scintillator. 1 cubic voxel size: 11.8 μm .

2) 肺の微細構造

Fig. 4 に本システムを用いて撮影した CT 画像を示す。直径 200 μm 程度の細気管支だけでなく、肺胞の構造まで確認できた。次に、BL20B2 実験ハッチ 3 で撮影した画像から気管支全体の 3 次元再構成を行った。BL20B2 実験ハッチ 3 では、ビームの幅が縦 15 mm ほどあり、1 スキャンでマウス胸部全体を撮影することが可能であった。各 CT 画像から気管支のネットワークである部分（肺胞部分を除く細気管支まで（直径 200 μm 以上））を閾値処理により抽出しアイソサーフェイス法によって 3 次元構築を行った (Fig. 5)。

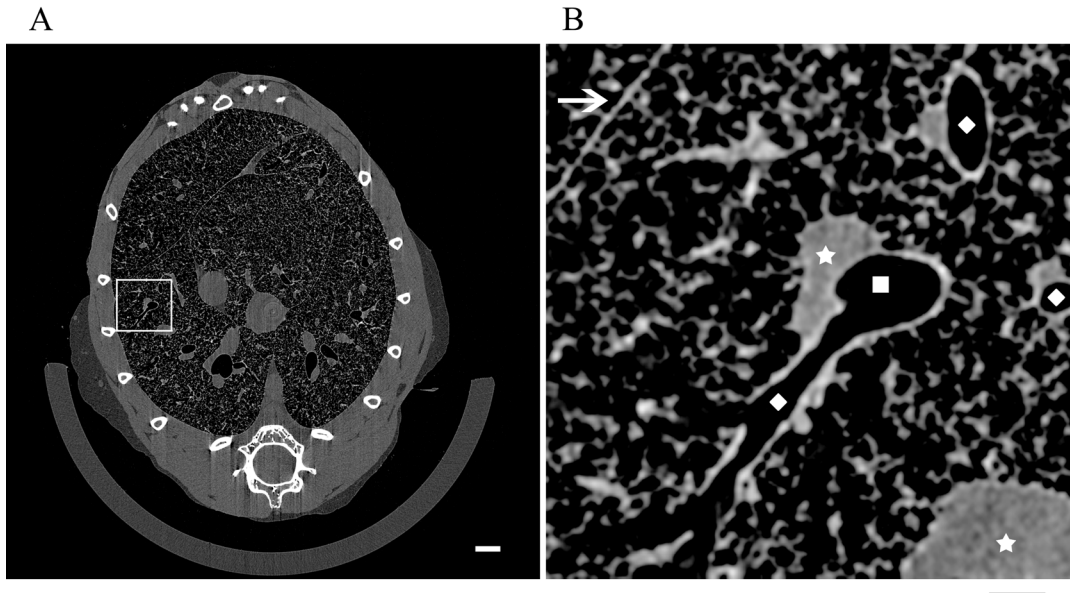


Fig. 4 Representative CT images. (A: original images. Bar: 1 mm. B: zoomed images of the square area in A. Square: conducting airways; Star: pulmonary artery; Diamond: small airway; Arrow: interlobar fissura. Bar: 250 μm).

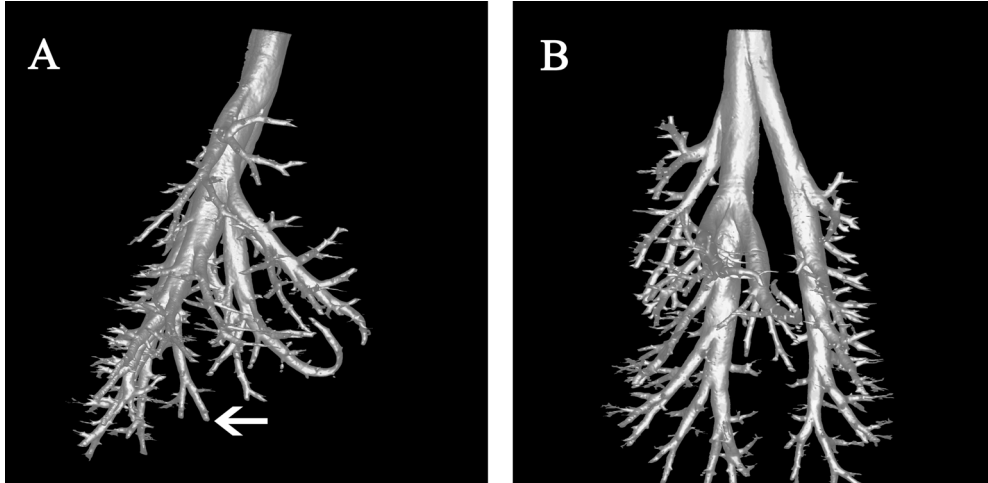


Fig. 5 Three-dimensional reconstruction of whole airway from trachea to small airways (diameter: $> 150 \mu\text{m}$). 1 cubic voxel size: $23.6 \mu\text{m}$. A: side view, and B: front view.

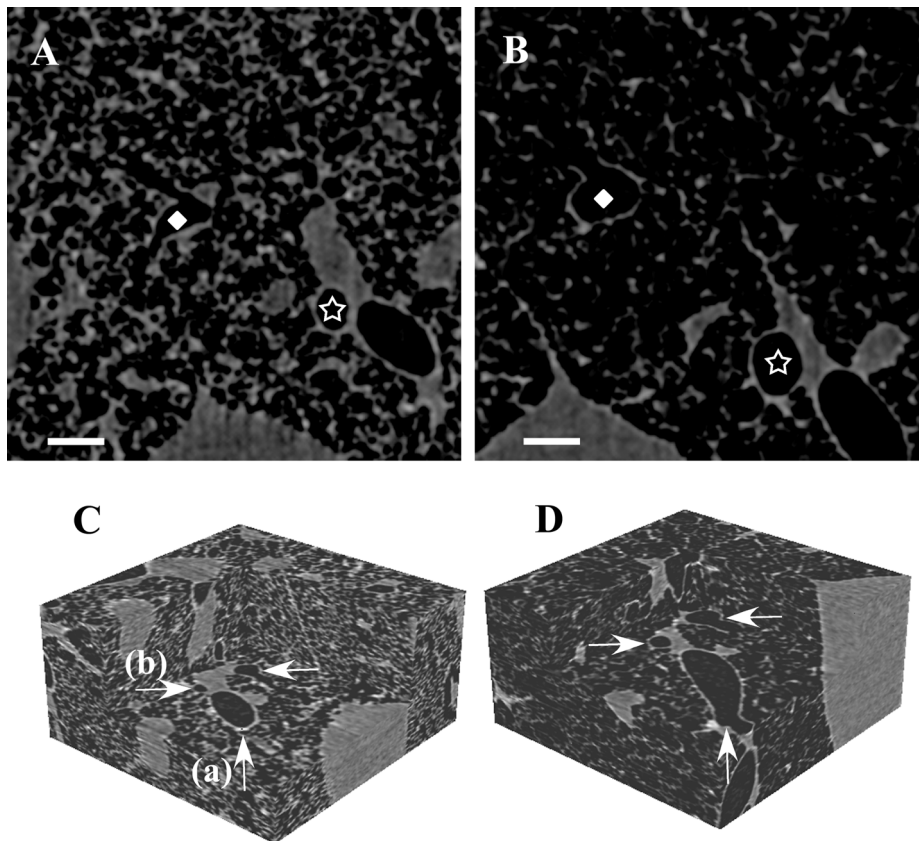


Fig. 6 The localized morphometric deformation of small airways and alveoli (A&C: at FRC, B&D: at TLC). The zoomed images (A&B) and three-dimensional volume of same small airways and alveoli (C&D). The airway diameters (diamond and star in A & B) increased 67.8, and 60.0 % at TLC, respectively (each diameter at FRC: 148 and $177 \mu\text{m}$). The arrows of same directions (C&D) indicated same airways. The airway diameters (a) and (b): $260 \mu\text{m}$ and $93 \mu\text{m}$. 1 cubic voxel: $11.8 \mu\text{m}$.

次に、細気管支の形態変化について調べた。Fig. 6 に同一細気管支や肺胞部位の変形例を示す。細い気管支ほど変形量が大きいことがわかる。Fig. 7 に気管支の大きさと変形量との関係を示す。直径が 200 μm 以下の末梢細気管支では、 δ_D と δ_L はそれぞれ 0.688 ± 0.026 , 0.295 ± 0.023 (averaged value $\pm$ S.E.) であり、直径が 400 μm 以上の比較的太い気管支では、それぞれ 0.452 ± 0.017 , 0.229 ± 0.034 であった。 δ_D は直径が小さい末梢細気管支ほど変形量が多いが、 δ_L はほとんど一定であった。また δ_V は末梢細気管支ほど小さく、呼吸の際の体積変形量が大きいことを表している。

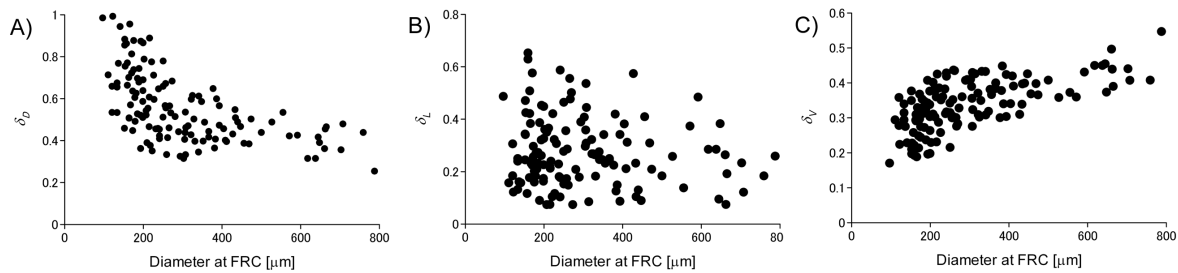


Fig. 7 The morphometric changes in D , L , and V (δ_D , δ_L , and δ_V) as a function of the original diameter at FRC.

4. 考察

従来、肺の複雑な形状や変形量は、生理的な意義だけでなく気道内の力学現象と密接な関係があることから、さまざまな方法によって報告されている^(1-8, 18)。特にコンプライアンスを測定するためには、肺の固定処理を施さずに軟組織の状態での測定することが不可欠である。近年開発が盛んであるマイクロの CT 有効空間分解能は、本研究と同じレベルである 20 μm を達成しているが、X 線フラックスが低いためスキャン時間に数時間必要である⁽⁹⁾。肺の内部はほとんど空気であり、もっとも柔らかい臓器の 1 つである。その結果、スキャン中に肺が微小変形し、CT 画像にモーションアーチファクトが生じ肺胞などの微細構造は観察できない。それに対し、SPRING-8 放射光は X 線フラックスがはるかに高いため短時間で撮影可能であり、さらにコントラスト分解能に優れている。我々は、SPRING-8 放射光を利用した高速高分解能 3 次元 CT イメージングシステムを確立し、化学処理を施していないマウス肺を可視化した。特に臨床的に重要な細気管支の立体構造を可視化することが可能となり、BL38B1 では肺胞の微細構造、BL20B2 では気管支全体（直径 200 μm 以上）を短時間でスキャンすることが可能となり、本研究では生体内の状態に近い胸郭内で細気管支の局所変形を測定した。

気管支の変形量は、胸郭や周りの柔組織の影響を大きく受ける。摘出肺を用いた細気管支の変形は、周りの柔組織が“ばね”のような働きをするため、摘出した気管支の変形より小さい⁽⁸⁾。さらに本研究結果より、胸郭内の気管支の変形量は、摘出肺の気管支の変形量（直径：89 %、長さ：43 %）より小さかった。胸郭内では、気管支は Fig. 1 のように周りを柔組織と胸郭に覆われており、肺に比べて胸郭は硬くほとんど変形しない。そのため、肺胞壁と胸郭は、それぞれ“ばね”と“壁”のような役割を果たしていると考えられる。

末梢細気管支では δ_d が大きく、 δ_r は肺全体での値(FRC/TLC=0.37)と比較してはるかに小さかった。以上の結果は、細気管支ほど呼吸の際に大変形することを示しており、呼吸に伴って肺は均一に変形しないということを示唆している。従来気管支造影法による比較的太い気管支(直径1 mm以上)については、気管支の変形は部位によらず一定であることが言われていた。しかし、気管支は気管から肺胞に至るまで徐々にその構造が変化しているため、変形量が部位によらず一定であるとは考えられない。さらに、末梢細気管支では同じ大きさに気管支でも均一に変形していない。直径が $400 \pm 10 \mu\text{m}$ である気管支の δ_d の範囲が0.40~0.57であるのに対し、 $200 \pm 10 \mu\text{m}$ である気管支の δ_d の範囲は0.36~0.89と大きい。このような末梢気管支の変形の違いは、不均一な肺機能に対する重要な要因であろう。

近年、肺の末梢部位における力学シミュレーション(粒子の沈着⁽¹⁹⁾、気道不安定論⁽²⁰⁾、サーファクタントデリバリー⁽²¹⁾など)が盛んに行われている。気管支のコンプライアンスや立体形状は末梢部位ほど柔らかくまた複雑なるため、シミュレーションの際の重要な情報である。従来、末梢気管支でのガス交換は、主に分子拡散が寄与していると考えられていた⁽²²⁾。しかし、このような大変形は、末梢部位でガス交換を促進していることが予想される。さらに、気道内の粒子沈着に関するシミュレーションでは、気管支の変形が重要なパラメータであることがわかっている⁽²³⁾。また、同一世代の気管支でも均一に沈着しないという報告もある⁽²⁴⁾。

さらに本手法は、肺の固定処理を行わずに末梢気管支まで観察できるため、動物実験による肺経路ドラッグデリバリー技術の開発にも有効である。経肺薬剤投与は主に肺疾患患者の治療に用いられてきた。また、最近では非侵襲に短時間で薬液を投与できる点から、従来注射などで投与されてきた薬剤を吸入用薬剤とする開発が活発に行われている。このような肺のドラッグデリバリー技術において重要な点は、複雑な分岐管ネットワークである気道内でいかにターゲット部位に薬剤を到達させるかということである。従来の固定切片による評価方法は、薬剤投与前後での同一気管支の局所コンプライアンスの変化を評価することは不可能であった。そのため、薬剤の効果は肺全体のマクロ的なコンプライアンスの変化から見積もっており、局所での薬剤効果は明らかではない。本システムは、肺の末梢気管支レベルでの薬剤の効果を検討することが可能であり、肺のドラッグデリバリー技術において重要である。

5. 謝辞

本研究は、SPRING-8R&D 実験課題 (Proposal Number: R03B38B1-0032N、R03B38B1-049N、R04A38N1-052N) および SPRING-8 実験課題 (Proposal Number: 2004A0169-NL3-np)のもとに実施した。

6. 文 献

- 1) Klingele, T.G., and Staub, N.C., 1971. Terminal bronchiole diameter changes with volume in isolated, air-filled lobes of cat lung. *J Appl Physiol.* 30(2), 224-227.
- 2) Okazawa, M., Paré, P.D., and Lambert, R.K., 2000. Compliance of peripheral airways deduced from morphometry. *J Appl Physiol.* 89, 2373-2381.
- 3) Hughes, J.M., Hoppin, F.G. Jr, Mead, J., 1972. Effect of lung inflation on bronchial length and diameter in excised lungs. *J. Appl. Physiol.* 32, 25-35.
- 4) Menkes, H., Gamsu, G., Schroter, R., Macklem, P.T., 1972. Interdependence of lung units

- in isolated dog lungs. *J. Appl. Physiol.* 32, 675-860.
- 5) Sittipong, R., Hyatt, R.E., 1974. Static mechanical behavior of bronchi in excised dog lung. *J. Appl. Physiol.* 37, 201-206.
 - 6) Tiddens, H.A., Hofhuis, W., Bogaard, J.M., Hop, W.C., de Bruin, H., Willems, L.N., de Jongste, J.C., 1999. Compliance, hysteresis, and collapsibility of human small airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160, 1110-1118.
 - 7) Sera, T., Fujioka, H., Yokota, H., Makinouchi, A., Himeno, R., Schtoter, R., Tanishita, K., 2003b. Three-dimensional visualization and morphometry of small airways from microfocal X-ray computed tomography. *J. Biomech.* 36, 1587-1594.
 - 8) Sera, T., Fujioka, H., Yokota, H., Makinouchi, A., Himeno, R., Schtoter, R., Tanishita, K., 2004. Localized compliance of small airways in excised rat lungs using microfocal x-ray tomography. *J. Appl. Physiol.* 96, 1665-1673.
 - 9) Marxen, M., Thornton, M.M., Chiarot, C.B., Klement, G., Koprivnikar, J., Sled, J.G., Henkelman, R.M., 2004. MicroCT scanner performance and considerations for vascular specimen imaging. *Med. Phys.* 31, 305-313.
 - 10) Ikura H, Shimizu K, Ikezoe J et al, 2004. In vitro evaluation of normal and abnormal lungs with ultra-high-resolution CT. *J Thorac Imaging* 19(1), 8-15.
 - 11) Ito M, Ejiri S, Jinnai H et al, 2003. Bone structure and mineralization demonstrated using synchrotron radiation computed tomography (SR-CT) in animal models: preliminary findings. *J Bone Miner. Metab* 21(5), 287-93.
 - 12) Uesugi K, Tsuchiyama T, Yasuda H et al, 2003. Micro-tomographic imaging for material science at BL47XU in SPring-8. *J. Phys IV France* 104, 45-48.
 - 13) Sera T, Uesugi, K, Yagi N, 2004, Three-dimensional visualization of intact mouse lung by synchrotron radiation CT. *Proceedings of the 26th Annual International Conference of the EMBS IEEE*. San Francisco, CA, USA, 1294-1297.
 - 14) Goto S, Takeshita K, Suzuki Y, et al., 2001. Construction and commissioning of a 215-m-long beamline at SPring-8. *Nucl. Instr. and Meth. A* 467-468, 682-685.
 - 15) Schulz H, Johnner C, Eder, G A et al., 2002. Respiratory mechanics in mice: strain and sex specific differences. *Acta. Physiol. Scand.* 174, 367-375.
 - 16) Schroeder, W.J., Avila L.S., Hoffman, W.A, Law, C.C., 1998. *The Visualization Toolkit Users Guide*. Kitware Inc, New York.
 - 17) Toriwaki, J., Mori, K., 2001. Distance transformation and skeletonization of 3D pictures and their applications to medical images. In: Bertrand, G., Imiya, A., Klette, R. (Eds.). *Digital and Image Geometry*, Springer, Tokyo, pp. 412-428.
 - 18) Sauret V, Halson PM, Brown IW et al, 2002. Study of the three-dimensional geometry of the central conducting airways in man using computed tomographic (CT) images. *J Anat* 200, 123-134.
 - 19) Haber S, Yitzhak D, Tsuda A, 2003. Gravitational deposition in a rhythmically expanding and contracting alveolus. *J Appl Physiol* 95(2), 657-671.
 - 20) Naire S, Jensen OE, 2003. An asymptotic model of unsteady airway reopening. *J Biomech Eng* 125(6), 823-831.
 - 21) Cassidy KJ, Gavriely N, Grotberg JB, 2001. Liquid plug flow in straight and bifurcating tubes. *J Biomech Eng* 123(6), 580-589.
 - 22) Pedly, T.J., Kamm, R.D., 1992. Dynamics of gas flow and pressure-flow relationship. In: Crystal, R.G., West, J.B., Barners, P.J., et al. (Eds.). *The lung*. Paven Press, Philadelphia, pp. 995-1010.
 - 23) Haber, S., Yitzhak, D., Tsuda, A., 2003. Gravitational deposition in a rhythmically

- expanding and contracting alveolus. J. Appl. Physiol. 95, 657-671.
- 24) van Ertbruggen, C., Hirsch, C., Paiva, M., 2005. Anatomically based three-dimensional model of airways to simulate flow and particle transport using Computational Fluid Dynamics. J Appl Physiol. 98(3), 970-80.