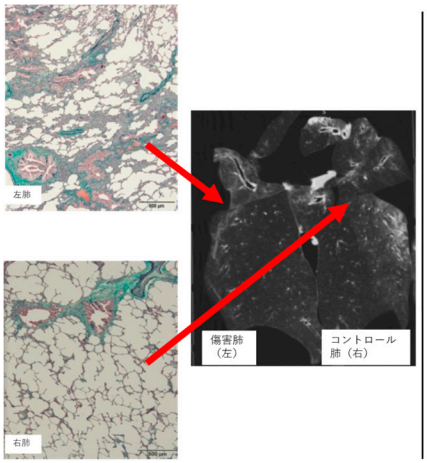
66　肺弾性計測のためのBラインエラストグラフィ法の検証	谷口　隼人

【目的】Acute Respiratory Distress Syndrome（ARDS）とは心不全・腎不全を除外した肺水腫をきたす症候群である。低酸素血症、高二酸化炭素血症を呈し、重症例では死亡率 40%近くになる。治療のために使用される人工呼吸器により、さらなる肺障害を引き起こすことが昨今明らかになり、最重症例では体外式幕型人工肺：Extracorporeal Membrane Oxygenation（ECMO）を用いて、自己肺休めながらの治療戦略が確立されてきた。しかし ECMO は治療法ではなく対症療法であるため、ECMO 導入の条件は、肺の可塑性があることである。肺の可塑性、つまり肺の線維化の評価は、一般的には CT を用いるため移動とマンパワーを要する。一方、ベッドサイドで簡便かつ経時的、非侵襲的に行える検査方法として超音波検査があり、我々は超音波のアーチファクトを用いて、肺実質の弾性を計測する方法（B ラインエラストグラフィ法）を開発した。本研究では医工学連携にて、本法の有用性を基礎研究・臨床観察を介して検証することを目的とする。

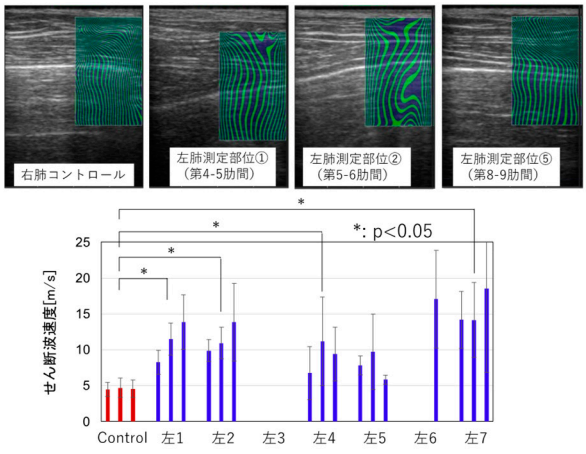
【方法】研究戦略としては、①機器開発、②実験動物を用いた基礎実験、③人を対象とした臨床試験、の順に進めることを予定し、今回は②実験動物を用いた基礎実験を行った。急性期の肺線維化モデルと慢性期の肺線維化モデルを作製し、B ラインエラストグラフィ法にて評価後、CT 所見、病理所見にて肺の線維化の評価を行った。急性期の肺線維化モデルと慢性期の肺線維化モデルを作製し、B ラインエラストグラフィ法にて評価後、CT 所見、病理所見でも線維化の評価を行った。急性期ヤギ肺線維化モデルでは、麻酔導入後、ECMO（下静脈脱血、右房送血）を導入し呼吸状態を担保した上で、0.9%生理食塩水で全肺胞洗浄し、その後侵襲的換気を 24 時間維持し、急性期のヤギ肺線維化モデルを作製した（n＝3）。慢性期ヤギ肺線維化モデルでは、麻酔導入後、気管支鏡を用いて、左主気管支にブレオマイシン 15 mg を撒布した。その後覚醒させ、抜管した。同様の操作を 2 週間後にも行い、慢性期ヤギ肺線維化モデルを作製した（n＝3）。

【結果】急性期ヤギ肺線維化モデルおいては、病理所見の結果から、肺の線維化には至っておらず、B ラインエラストグラフィ法による計測でも、コントロールとせん断波速度に有意差は認めなかった。一方、慢性期ヤギ肺線維化モデルでは、CT 所見、病理所見にて肺の線維化の所見を認め、B ラインエラストグラフィ法にてコントロールとせん断波速度に有意差を認めた。また急性期、慢性期モデルともに B ラインエラストグラフィの実施において、肺胞出血等の有害事象は認められなかった。今後は人を対象とした臨床研究を目指し、B ラインエラストグラフィ法という新しい肺の評価方法を確立していく。

慢性期の肺線維化モデルの所見と測定結果



CT 所見と病理所見



B ラインエラストグラフィ法によるせん断波速度測定結果

66. 肺弾性計測のための B ラインエラストグラフィ法の検証

谷口　隼人

横浜市立大学 市民総合医療センター 高度救命救急センター

Key words：ARDS，ECMO，線維化，せん断波

緒　言

Acute Respiratory Distress Syndrome（ARDS）とは心不全・腎不全を除外した肺水腫をきたす症候群であり、重症 ARDS では死亡率 40%以上になる［1］。2000 年から ARDS に対する呼吸管理戦略が研究され、ARDS に対して、人工呼吸器での過剰な陽圧換気はさらなる肺障害を引き起こすこと（ventilator-associated lung injury : VALI）が明らかになり、肺保護換気戦略が提唱された［2］。そして究極の肺保護換気戦略は、肺を使わないことであり、体外式幕型人工肺：Extracorporeal Membrane Oxygenation（ECMO）であればそれを可能にする。しかし ECMO は治療法ではなく対症療法であるため、ECMO 導入の条件は、自己肺の可塑性があることである。肺の可塑性は、肺の線維化とも言い換えることができ、その評価には通常 CT を用いるため移動とマンパワーを要する。また重症 ARDS ではその呼吸状態から移動自体がリスクになり得る。一方、ベッドサイドで簡便かつ経時的、非侵襲的に行える検査方法として超音波検査がある。国内外の研究状況として、Miller らが肺実質に対して shear wave elastography 法（収束超音波を照射し得られたせん断波から物質の弾性を評価する）を用いた肺の弾性計測を施行しているが、動物実験にて肺実質内に出血合併症を引き起したと報告している［3］。Zhang らは、体表からの加振により胸膜の弾性を評価する試みを報告し、合併症なく正常者と間質性肺炎を鑑別できたと報告しているが、肺を覆う胸膜の弾性評価であり、胸膜性状と肺実質の線維化は必ずしも一致しない［4］。そこで著者らは線維化等により液体が貯留した肺実質において、超音波が多重反射することで生じる B ライン（胸膜から垂直方向に伸びる虚像）を利用し、安全面から加振器で体表から肺に振動を加え、肺実質内をせん断波が伝播しているときの B ラインのドプラ信号の位相差を用いる方法（Continuous Shear Wave Elastography : C-SWE 法）を併用することで、肺実質の弾性を測定する B ラインエラストグラフィ法を開発した（図 1）［5］。従来、肺の弾性計測用途では利用されなかった超音波アーチファクトのドプラ信号源としての特徴に着目した本研究は独創的であり、世界に例がない。

今までファントムを用いた *in vitro* での B ラインエラストグラフィ法での測定を、本実験では *in vivo* で初めて行った。慢性期ヤギ肺線維化モデルにおいて、B ラインエラストグラフィ法にてコントロールとせん断波速度に有意差を認めた。また同測定部位での CT 所見、病理所見にて肺線維化の所見を認めた。B ラインエラストグラフィ法で、*in vivo* でも、*in vitro* 同様に肺線維化を評価できることが示唆され、また肺胞出血等の有害事象は認められなかった。本研究結果をもとに B ラインエラストグラフィ法に期待される臨床的な活用法としては、慢性経過での不可逆性の肺線維化を起こす間質性肺炎等に対する簡便・迅速・非侵襲な評価法になり得る可能性が高い。今後は、研究の場所を臨床現場に移し、引き続き医工学連携にて B ラインエラストグラフィ法の有用性を検証、そして将来的な実装に向けて引き続き研究を進めていく。

方　法

1. B ラインエラストグラフィ法の原理

本研究で使用した B ラインエラストグラフィ法の原理について、図 1 に示す。生体表面に設置した小型振動子

から C-SWE 法の周波数条件を満たす低周波振動を与え、せん断波を肺組織内に伝播させる。B ラインは肺胞内部あるいは肺間質内に貯留した水分内で超音波が多重反射することで生じるアーチファクトであり（acoustic trap）[6]、B ラインが出現している超音波の走査線上でドプラ信号を検出すれば得られる信号は多重反射を生じている肺組織からのドプラ信号であり、複数の B ラインが出現している対象に対して B ライン間のせん断波位相差を測定すれば肺組織の弾性を測定できる。位相検出法としては超音波診断装置で得られる受信信号を直交検波した複素直交検波信号（IQ 信号）からせん断波位相を推定する C-SWE 法を用いる。

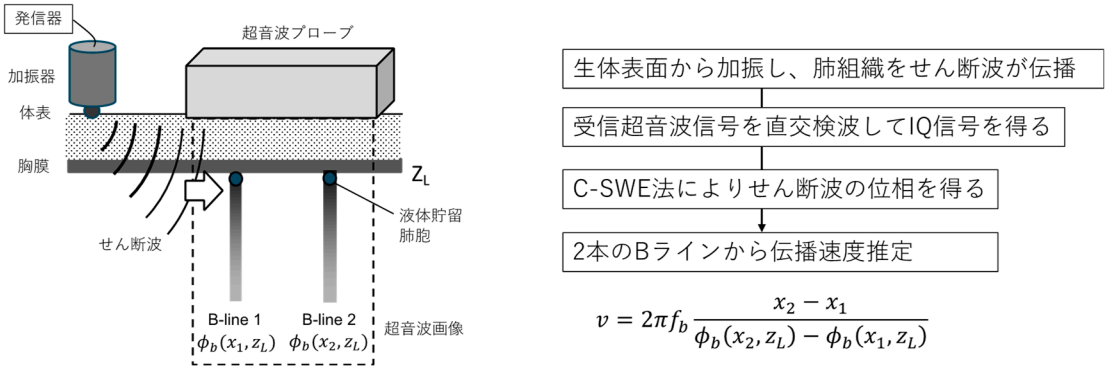


図 1. B ラインエラストグラフィの原理

体表から加振し、そのせん断波の速度、伝搬様式を計測、画像化し、組織性状を評価する。

2. 急性期・慢性期ヤギ肺線維化モデルの作製

東北大学加齢医学研究所非臨床研究推進センターにてヤギを用いて動物実験を行った。本研究は、東北大学加齢医学研究所動物倫理委員会に承認を得ている。

急性期ヤギ肺線維化モデルでは、正常ヤギに対して、キシラジン 2～10 μL/kg、ケタラール 0.1 mL/kg 筋注鎮静後イソフルラン 5%で吸入麻酔を行い、硫酸アトロピン 0.5 mg、レミフェンタニル 0.5 μg/kg/min、酸素 40～100%で導入した。挿管後イソフルラン 1.0～3.0%で維持し、レミフェンタニル 0.4～0.6 μg/kg/min で維持した。先行研究に基づき［6］、ECMO（下静脈脱血、右房送血）を導入し呼吸状態を担保した上で、0.9%生理食塩水で P/F ratio 250 mmHg 以下になるまで全肺胞洗浄し、その後気道内圧 40 cm H_2O、呼気終末期圧 0 cm H_2O、呼吸回数 10 回という侵襲的換気で 2 時間換気し、急性期 ARDS モデルをまず作製した。その後換気量（10 mL/kg）呼吸数（20 rpm）呼気終末期圧 5 cm H_2O の呼吸管理での 24 時間維持し、急性期のヤギ肺線維化モデルを作製した（n＝3）。また Sham モデルとして、ECMO（下静脈脱血、右房送血）をだけを導入し、全肺胞洗浄を行わず、換気量（10 mL/kg）呼吸数（20 rpm）呼気終末期圧 5 cm H_2O の呼吸管理での 24 時間維持したモデルも作製した（n＝1）。

慢性期ヤギ肺線維化モデルでは、正常ヤギに対して、キシラジン 2～10 μL/kg、ケタラール 0.1 mL/kg 筋注鎮静後イソフルラン 5%で吸入麻酔を行い、硫酸アトロピン 0.5 mg、レミフェンタニル 0.5 μg/kg/min、酸素 40～100%で導入した。先行研究基づき［7］、挿管後イソフルラン 1.0～3.0%で維持し、気管支鏡を用いて、左主気管支にブレオマイシン 15 mg を撒布した。その後覚醒させ、抜管した。同様に 2 週間後にも同様の処置を行い、慢性期のヤギ肺線維化モデルを作製した（n＝3）。

3. 病理所見・CT 画像・B ラインエラストグラフィでの対比

いずれのモデルにおいても初回麻酔導入後にコントロールとして B ラインエラストグラフィ法でのせん断波速度測定を行った。急性期ヤギ肺線維化モデルにおいては、6、12、18、24 時間後に両側肺を座位の状態で測定した。慢性期ヤギ肺線維化モデルにおいてはブレオマイシン散布約 1 ヶ月後に再度麻酔を導入し、B ラインエラストグラフィ法で、そのせん断波速度の変化を評価した。B ラインエラストグラフィ法は図 2 のように実施した。

B ラインエラストグラフィ法によるせん断波速度測定は、一箇所数秒で終了し、吸気呼気に同調させる必要はなかった。

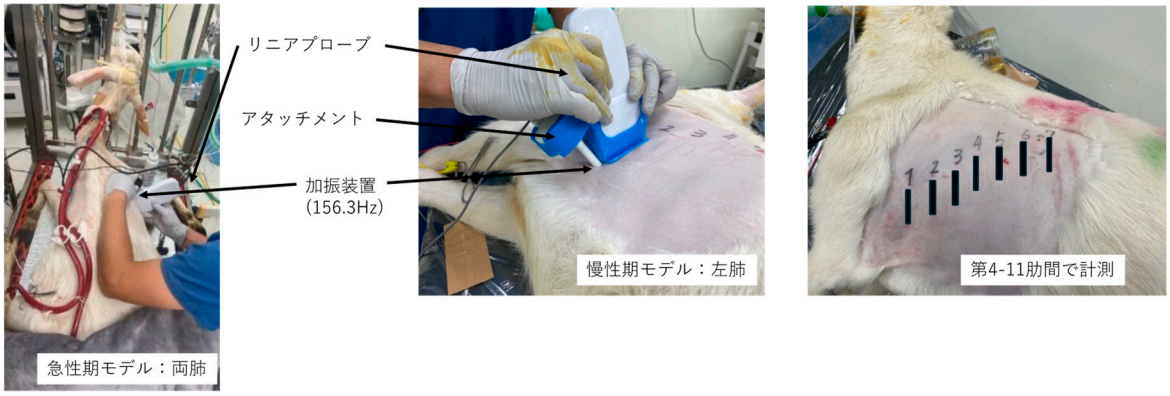


図 2. B ラインエラストグラフィ実施方法・計測部位
山羊の毛を剃った後に、体表から肋間ごとに加振装置と一体化したプローブを当て、計測を行った。

測定後は十分な麻酔深度を維持したまま塩化カリウムを 20 ml 静注し、安楽死させ、B ラインエラストグラフィ測定部位を肺実質に直接マーキングした後に、肺を摘出した。肺摘出後、コンプレッサーを用いて気道内圧を 20 cm H_2O に保ち、図 3 のように CT を撮影した。

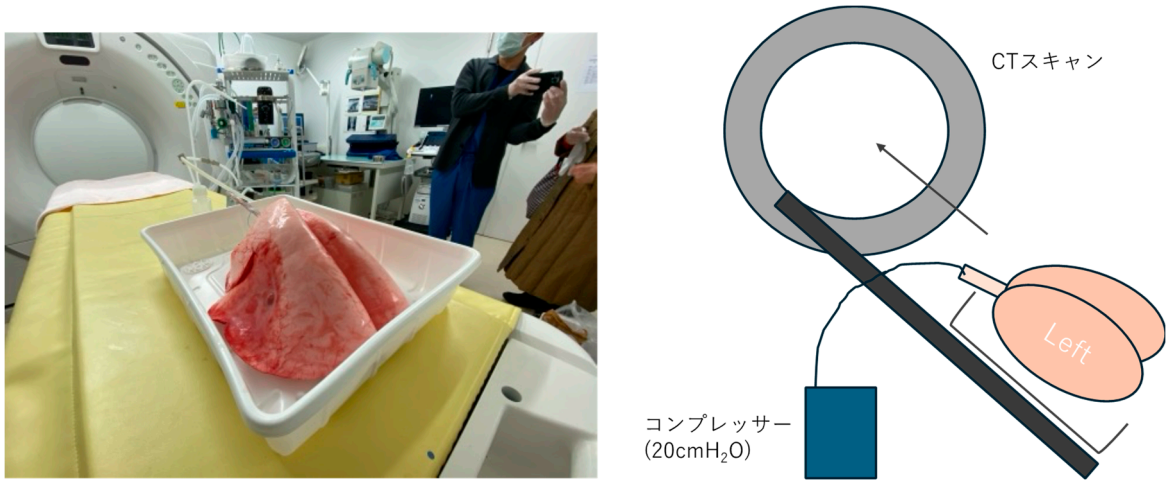


図 3. CT 撮影方法
取り出した肺を、コンプレッサーを用いて気道内圧を 20 cm H_2O に保ち、CT を撮像した。

CT 撮影後は、病理用切片切り出し、Hematoxylin Eosin 染色、Elastica Masson 染色にて肺の線維化を評価した。

結　果

1. 急性期ヤギ肺線維化モデルの B ラインエラストグラフィ法の検討

Sham モデル（n=1）においては、コントロールと ECMO 導入 24 時間後において、B ラインエラストグラフ

ィ法でのせん断波速度測定値に差は認められなかった。急性期ヤギ肺線維化モデル（n＝3）において、胸膜上に高さ 1.2 mm×幅 12 mm の関心領域を設定し、胸膜直下を含む胸膜上を伝播するせん断波速度を測定した。各測定位置にて 3 回ずつ計測を行った。全肺胞洗浄後に見られた B ラインは時間経過に伴い消失した。コントロール（肺胞洗浄前）と ECMO 導入 24 時間後では、B ラインエラストグラフィでの測定値に明らかな違いを認めなかった（図 4）。CT では肺全体にわたって炎症を確認できたが線維化の所見は認めず、病理像でも明らかな肺の線維化の所見は認められなかった（図 5）。また病理所見上、肺胞出血の所見は認められなかった。

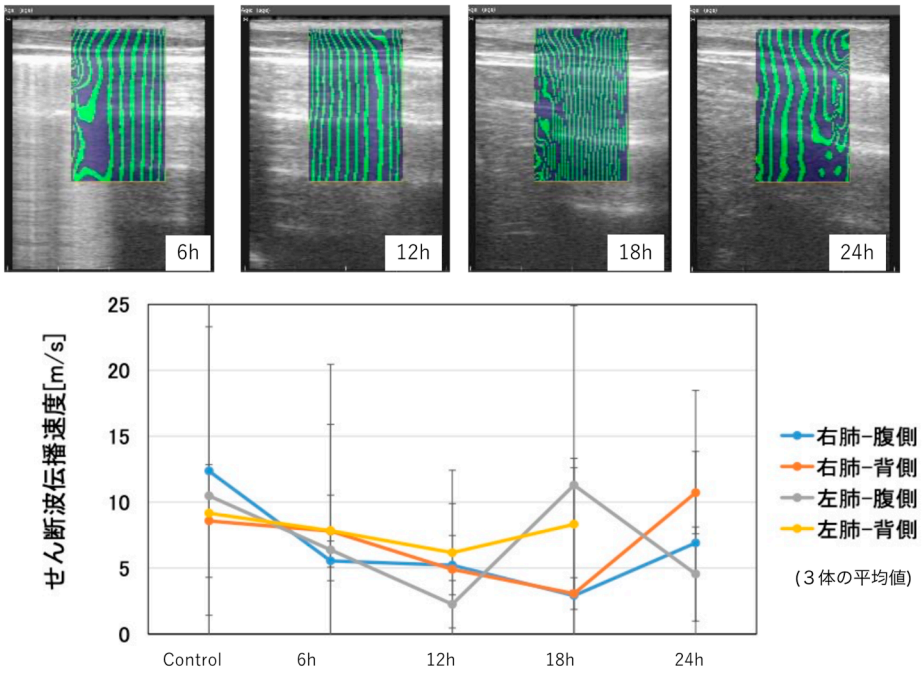


図 4. 急性期モデル　B ラインエラストグラフィ法によるせん断波速度測定結果
コントロール（肺胞洗浄前）と ECMO 導入 24 時間後では、測定値に明らかな違いを認めなかった。

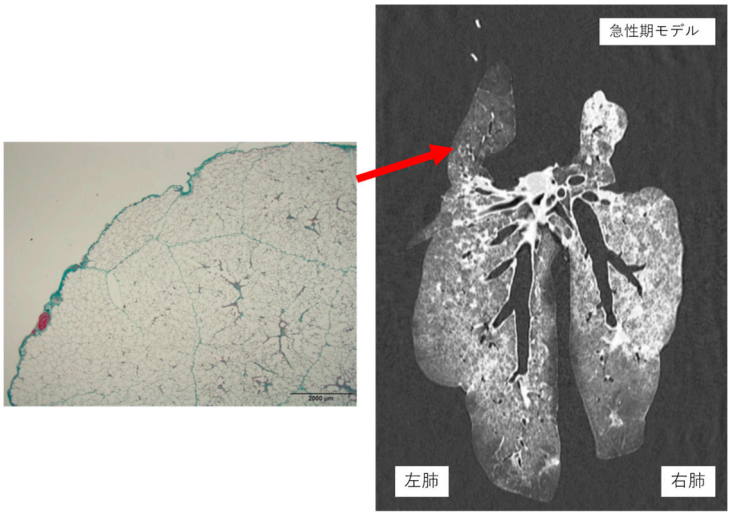


図 5. 急性期モデル CT 所見（右）と病理所見（左）
CT では肺全体にわたって炎症を確認できたが、線維化は診断できなかった。また病理像（Elastica Masson 染色）では明らかな肺の線維化の所見は認められなかった。

2. 慢性期ヤギ肺線維化モデルの B ラインエラストグラフィの検討

慢性期ヤギ肺線維化モデルにおいても、胸膜上に高さ 1.2 mm×幅 12 mm の関心領域を設定し、胸膜直下を含む胸膜上を伝播するせん断波速度を測定した。各測定位置にて 3 回ずつ計測を行った。まず左肺測定部位①（第 4〜5 肋間）において他部位よりも明瞭に B ラインを認めた。明らかにせん断波速度の逸脱を示したデータ（左肺測定部位③）を除外した上での評価では、7 カ所の測定位置中、4 カ所でコントロール（右肺：ブレオマイシン非投与側）と有意な差が認められた。CT では左肺心葉（測定部位①周囲）において炎症が認められ、同部位の病理で明らかな線維化の所見を認めた（図 7）。また本モデルにおいても病理所見上、肺胞出血の所見は認められなかった。

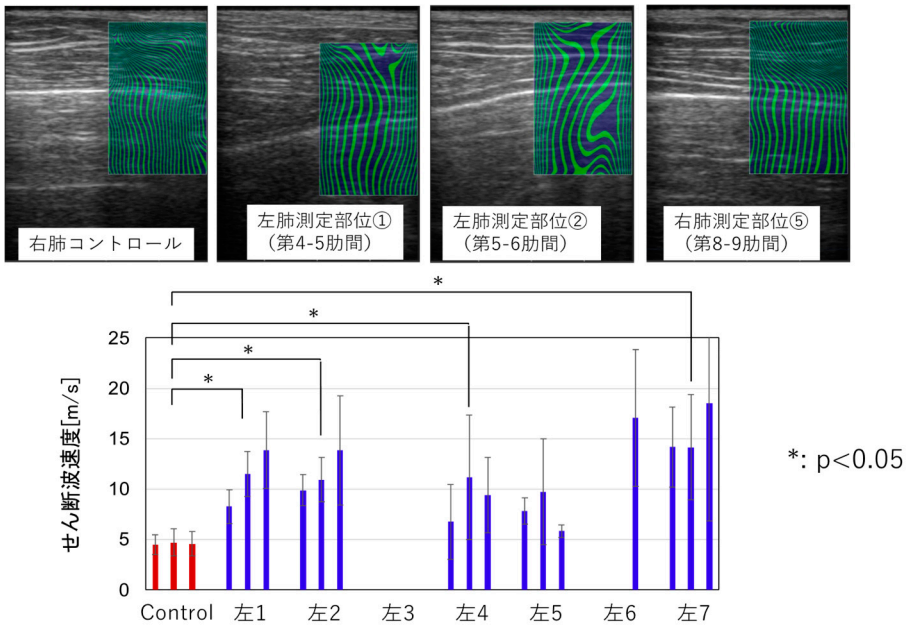


図 6. 慢性期モデル B ラインエラストグラフィ法によるせん断波速度測定結果
右肺（コントロール）と比較し、左肺は、7 カ所の測定位置中、4 カ所でコントロールと有意な差が認められた（Kruskal-Wallis test）。

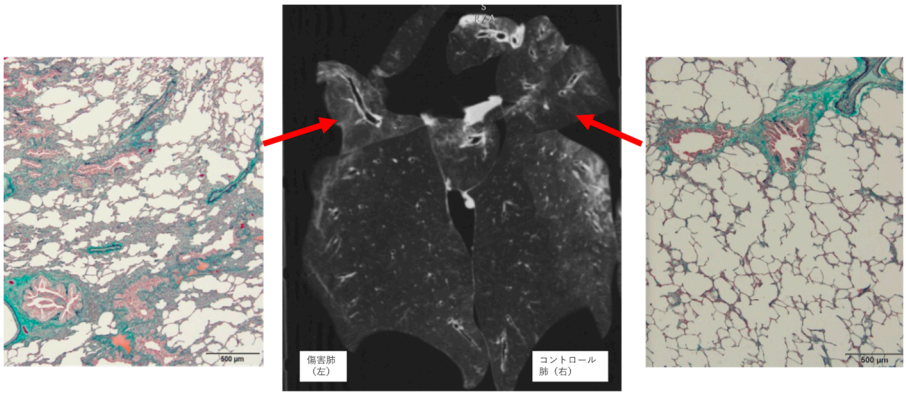


図 7. 慢性期モデル　CT 所見と病理所見（Elastica Masson 染色）
左肺（ブレオマイシン投与側）では間質の肥厚を確認し、線維化と判断されたが、右肺（コントロール）ではその所見は認められなかった。CT では、左肺に炎症所見は認められたが、画像所見だけでは線維化は診断できなかった。

3. せん断波伝播方向の検討

慢性期ヤギ肺線維化モデルにおいて B ラインエラストグラフィ法を施行した際に胸壁と胸膜下でのせん断波の変位振幅パターンが異なることを認めた。図 8 に正常肺胸壁を伝播するせん断波伝播において特徴的な伝播パターンを示した 1 例を示す。

コントロール肺、線維化モデル肺のどちらの場合も深さ約 15〜20 mm の位置に胸膜コンプレックスをエコーにて確認した。コントロール肺のせん断波伝播について、胸膜から約 5〜10 mm 手前までの範囲でせん断波波面の方向がほぼ水平になる様子が観察された。このようなせん断波波面の屈曲は他組織の観測では見られず、肺組織近傍での特有な結果と思われ、胸壁部と胸膜下の密度差が大きいことによって生じている可能性がある。一方で、線維化モデル肺においては、胸膜から約 5〜10 mm 手前までの範囲でせん断波波面の方向がほぼ水平になる様子が観察されず、胸壁部と胸膜下でせん断波波面の方向は一様であった。コントロール肺では、含気が多く肺の密度は低いと推察され、胸壁の密度と大きく異なるためにせん断波の伝播が胸壁内で屈曲するが、線維化モデル肺では、肺の線維化により密度が高まり、胸壁の密度にとの差異が減弱し、その伝搬に影響を与えたと考えている。

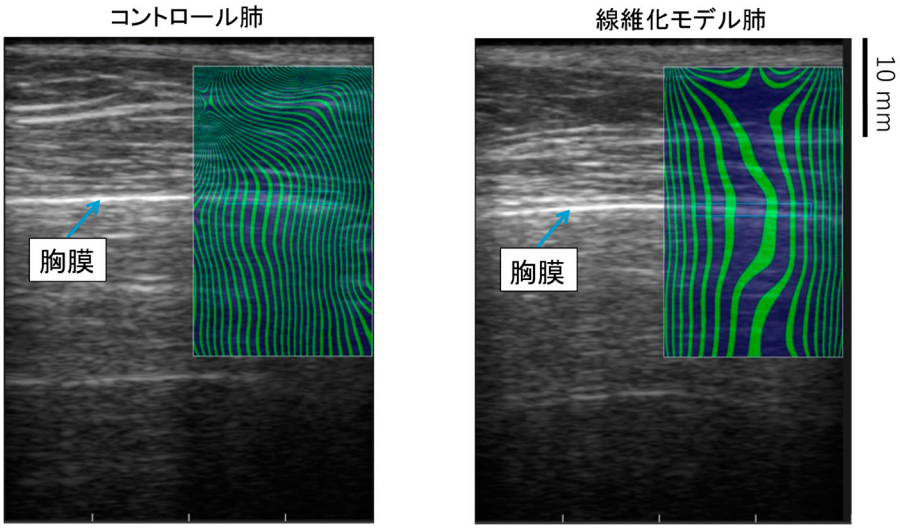


図 8. コントロール肺と線維化モデル肺におけるせん断波伝播方向の違い
コントロール肺ではせん断波の伝播が胸壁内で水平方向に屈曲するが、線維化モデル肺では屈曲せず肺実質にまで伝わっている。これらは胸壁と肺の密度差によって生じている可能性がある。

考　察

本研究は、今までファントムを用いた *in vitro* での B ラインエラストグラフィ法のせん断波速度測定を、*in vivo* で行った初めての研究である。慢性期ヤギ肺線維化モデルでは、B ラインエラストグラフィ法にてコントロールとせん断波速度に有意差を認めた。また同測定部位での病理所見にて肺の線維化の所見を認めた。B ラインエラストグラフィ法にて、*in vivo* でも、*in vitro* 同様に肺の線維化を評価できることが示唆された。また B ラインエラストグラフィ法において、肺胞出血等、有害事象は認められなかった。

また本研究ではせん断波速度を測定する B ラインエラストグラフィ法の他に、せん断波伝播方向でも肺の病態鑑別ができる可能性が示唆された。B ラインエラストグラフィ法は肺実質に B ラインを認めない場合（肺水腫がない場合）、せん断波速度が測定できないが、せん断波伝播方向であれば B ラインを認めない場合でも評価できる。しかし、本研究では線維化肺とコントロール肺の比較を検討しただけである。臨床に応用するためには、

肺水腫肺などとの検討を行い、せん断波伝播方向にて、正常、肺水腫、肺線維化を鑑別する方法を模索すると共に、各種病態が合併した場合でも判別能があるか検討する必要がある。

また本研究では、ヤギでの適切な肺病態モデルを作ることが困難であった。特に急性期ヤギ肺線維化モデルの作製においては、肺胞洗浄ならびに侵襲的換気により肺障害を一時的に与えてもその障害は 24 時間以内には改善してしまった。Millar らの報告では、オレイン酸の静脈投与等により、短時間に、過剰な障害を与えることも可能とされるが［8]、本来人体においておき得ない反応であり、そこから得られる所見を臨床応用することは現実的ではないと考えた。ARDS は VALI により悪化するものであるため侵襲的換気の暴露時間を変更し、ヤギにおける急性期肺線維化モデル作製方法を今後検討する必要がある。

また B ラインエラストグラフィ法は、超音波検査であり、本研究にて肺胞出血の所見も認めないことが明らかとなったことから、極めて安全で非侵襲な検査であることが証明された。今後作製が難しい動物モデルでの検討を行うよりも、臨床研究にステップを進め、多種多様な患者・病態でこの B ラインエラストグラフィ法という新しい肺の評価方法の意義を検討することのほうが望ましいと考える。

B ラインエラストグラフィ法に期待される臨床的な活用としては、慢性経過での不可逆性の肺線維化を起こす間質性肺炎等に対する外来診療での活用を想定する。間質性肺炎では、その治療として抗線維化薬投与が検討されるが、そのタイミングはガイドライン等にも明示されていない。一方で、抗線維化薬の投与タイミングの遅れが予後に影響するとの報告もある［9]。通常外来では、毎回 CT での評価は一般的でなく、臨床所見や胸部 Xp 等による判断が主となるため、進行した肺の線維化でなければ悪化の判断が難しい。そこで外来診療において、非侵襲で簡便な B ラインエラストグラフィ法で肺の線維化の進行が評価できれば、適切な抗線維化薬の投与タイミングを検討しうると考える。今後、研究の場所を臨床現場に移し、引き続き医工学連携にて B ラインエラストグラフィ法の有用性を検証し、将来的な実装に向けて知見を積み重ねていきたい。

謝　辞

本研究の実施においては、群馬大学理工学府の江田先生、山越先生には B ラインエラストグラフィ法の開発から、B ラインエラストグラフィ法でのせん断波速度測定について、東北大学加齢医学研究所非臨床研究推進センターの白石先生、深谷先生、植松先生には、動物実験全般について、ご協力いただいたこと感謝いたします。

文　献

1） Bellani G, Laffey JG, Pham T, et al. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries [published correction appears in JAMA. 2016 Jul 19;316(3):350] [published correction appears in JAMA. 2016 Jul 19;316(3):350]. *JAMA*. 2016;315(8):788-800. doi:10.1001/jama.2016.0291

2） Amato, M. B., Barbas, C. S., Medeiros, D. M., Magaldi, R. B., Schettino, G. P., Lorenzi-Filho, G., Kairalla, R. A., Deheinzelin, D., Munoz, C., Oliveira, R., Takagaki, T. Y., & Carvalho, C. R. (1998). Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. The New England journal of medicine, 338(6), 347–354. https://doi.org/10.1056/NEJM199802053380602

3） Miller DL, Dong Z, Dou C, Patterson B, Raghavendran K. Pulmonary Capillary Hemorrhage Induced by Super Sonic Shear Wave Elastography in Rats. *Ultrasound Med Biol*. 2019;45(11):2993-3004. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2019.07.007

4） Zhang X, Zhou B, Kalra S, Bartholmai B, Greenleaf J, Osborn T. An Ultrasound Surface Wave Technique for Assessing Skin and Lung Diseases. *Ultrasound Med Biol*. 2018;44(2):321-331. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2017.10.010

5) Koda R, Taniguchi H, Konno K, Yamakoshi Y. B-line Elastography Measurement of Lung Parenchymal Elasticity. Ultrason Imaging. 2023;45(1):30-41. doi:10.1177/01617346221149141
6) Araos J, Alegria L, Garcia P, et al. Near-Apneic Ventilation Decreases Lung Injury and Fibroproliferation in an Acute Respiratory Distress Syndrome Model with Extracorporeal Membrane Oxygenation. Am J Respir Crit Care Med. 2019;199(5):603-612. doi:10.1164/rccm.201805-0869OC
7) Organ L, Bacci B, Koumoundouros E, et al. Structural and functional correlations in a large animal model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. BMC Pulm Med. 2015;15:81. Published 2015 Jul 31. doi:10.1186/s12890-015-0071-6
8) Millar JE, Bartnikowski N, von Bahr V, et al. Extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) and the acute respiratory distress syndrome (ARDS): a systematic review of pre-clinical models. Intensive Care Med Exp. 2019;7(1):18. Published 2019 Mar 25. doi:10.1186/s40635-019-0232-7
9) Bordas-Martínez J, Gavaldà R, Shull JG, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis cluster analysis highlights diagnostic delay and cardiovascular comorbidity association with outcome. ERJ Open Res. 2021;7(2):00897-2020. Published 2021 May 10. doi:10.1183/23120541.00897-2020