

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業(H17-ナノ-001)

生体内超音波ナノ・イメージング法の開発  
に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

東北大学 加齢医学研究所 西條 芳文

平成19(2007)年 3月

# 目 次

## I. 統括研究報告書

組織・細胞のナノレベル超音波診断  
東北大学 加齢医学研究所 助教授  
西條 芳文

1

## II. 分担研究報告書

1. 音響インピーダンス顕微鏡の開発と小脳組織の観察  
愛知工業大学 工学部 電気学科 教授  
穂積 直裕

10

2. 超音波ビーム特性を考慮した画像の改善  
本多電子株式会社 研究開発部 部長  
小林 和人

16

3. 高周波数超音波画像の定量的解析  
東北大学 加齢医学研究所 博士研究員  
エズメラルド ドス サントス フィロ

22

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

31

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

34

生体内超音波ナノ・イメージング法の開発  
組織・細胞のナノレベル超音波診断

主任研究者 西條 芳文（東北大学 加齢医学研究所 助教授）

**研究要旨：**

本プロジェクトの目的は、組織を採取せずに体内でナノレベルの組織診断を行う低侵襲的検査方法を実現するために、周波数 1.2GHz の超音波を生体組織上で 2 次元スキャンし、組織表面からの超音波の反射強度を画像化する生体内超音波ナノ・イメージング法を開発することである。具体的には、高周波数帯域の超音波振動子、広帯域高周波数パルス発生装置、高精度スキャナーを開発し、臨床応用を念頭に置いた形状に一体化した装置を完成させ、定量的信号解析および画像解析を行う。

平成18年度には、前年度に作製した小型走査装置と薄いプラスチック板を一体化し、プラスチック板と組織表面の境界から生じる超音波の反射を高感度で検出することで、本装置の最大の特長である、組織を切除しないでナノレベルで画像化する方法を具現化した。また、高速アナログ/デジタル変換ボードを用いることで、超音波パルスの発生、走査、受信、信号解析、画像化を同一のワークステーション上で可能にした。また、作製した装置を利用してラット脳組織および培養線維芽細胞の可視化を行い 800 ナノメートルの解像度を実現した。

**A. 研究目的**

組織の悪性度判定や心筋組織のバイアビリティの判定のためには、組織の採取後の病理組織検査が必要であるが、これらの組織採取には稀ではあるが合併症が発生することがある。したがって、組織を採取せずに体内で顕微鏡レベルの画像化を行う低侵襲的検査方法が切望されており、このような方法により、手術成績の向上や入院期間の短縮など、国民の医療の向上および医療経済の効率化に結びつくことは明白である。

現在、組織の悪性度判定や心筋組織のバイアビリティの判定には、内視鏡や X 線透

視などでアシストしながら鉗子生検や針生検で組織の一部を採取することや、小規模の手術により病巣の一部を切除するなどして、組織の採取後に病理組織検査を行っている。これらの組織採取には多少のリスクを伴い、稀ではあるが合併症が発生するため、術前病理診断は侵襲的な検査に位置づけられていた。また、がん手術中における組織の悪性度判定および炎症・壊死の検出、心臓血管外科領域における壊死心筋および動脈硬化組織の同定など、手術中、組織を切除する前に顕微鏡レベルの病理組織検査が要求される場面は多い。

本研究の目的は、周波数 1.2GHz の超音波

を生体組織上で 2 次元スキャンし、組織表面からの超音波の反射強度の違いを画像化することで、解像度 800 ナノメートルの生体内超音波ナノ・イメージング法を開発することである。

生体組織のイメージング方法としては、X 線 CT (コンピュータ断層法)、MRI (磁気共鳴イメージング)、PET (陽電子放射断層法)、SPECT (単一光子放射断層法) などがすでに臨床応用されている。CT や MRI では、コンピュータ技術の発達により、3 次元再構築が行えるなどして、マクロの形態イメージングとしては確立した感があり、PET や SPECT では脳組織や心筋組織などにおいてはその機能もイメージングできるなど、それぞれに有用な点があるが、本研究で提案する超音波ナノ・イメージング法は、その解像度がほかのイメージング法に比較して 2 桁以上高い点が最大の特長である。前述した診断法の中で CT と MRI は解像度が高いが、現時点では数十ミクロンレベルであり、本方法で目的としている 800 ナノメートルの解像度には遠く及ばない。超音波断層法においては、超音波の周波数を高めることで画像の解像度が向上することが理論的にも現実的にも実証されており、周波数 2~5MHz の体表超音波に始まり、10 数 MHz 領域の頸動脈エコー、15~30MHz の消化管用超音波内視鏡、20~40MHz の血管内超音波法、60MHz の眼科領域における超音波生体顕微鏡などが臨床応用されており、その解像度は 50 ミクロン程度まで向上している。従来の超音波断層法は、超音波の進行方向に平行な組織断面を観察する、いわゆる B モード法であったが、今回提案するイメージング方法は超音波の進行方向に直交する平面の組織を観察する、いわゆる C モード法である点が最大の特長である。

組織表面を観察することで、組織中を伝わるときの超音波の減衰を考慮することなく、周波数を上げることが出来るため、高解像度の生体イメージングが可能であることが独創的な点であり、超高解像度の内視鏡としての臨床応用が可能である。

本研究では、組織を採取せずに生体組織をナノレベルで画像化することが可能であり、従来の病理診断方法を補完する低侵襲的検査として、術前・術中の組織検査を実現し、本方法の開発により、直接的には、手術術式の適切な選択および手術成績の向上が期待され、国民の医療の向上に結びつくことが期待される。また、超音波検査は非侵襲的であることが特色であるので、術前検査が全て外来において完結可能ということになり、不要な入院を削減し、医療経済的側面においても医療費の有効な利用に結びつくことが期待される。

## B. 研究方法

### 1. 本システムのご概念

申請者らを中心とする研究グループは、15 年以上にわたり、高周波数超音波を用いた超音波顕微鏡の開発・医学応用に携わってきた。超音波顕微鏡は、100MHz~2GHz の高周波数超音波を対象物の上で 2 次元走査することで、組織を画像化する方法である。超音波顕微鏡では組織の染色をせずに組織を観察可能であることや、超音波の反射が組織の機械的・物理的特性に密接に関連することから、組織の弾性イメージングが可能である点が最大の特長で、心筋梗塞、動脈硬化、がんの線維化、軟骨や滑膜の形成や腱の断裂部位などの推定など、その病態に組織の機械的特性が強く関与している領域においては、非常に有用な情報をもた

らす。図1は申請者らが平成14～15年度に開発したパルス励起型超音波顕微鏡による冠動脈の音速像である。

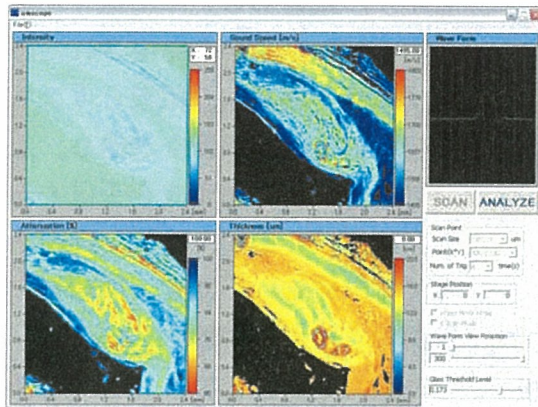
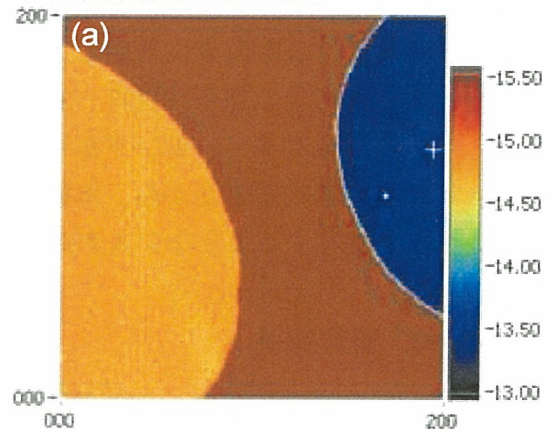


図1 平成14～15年度に開発したパルス励起型超音波顕微鏡による冠動脈の音速像

しかしながら、従来の超音波顕微鏡では、曲率半径の一定な音響レンズを用いて超音波を焦点に絞り込むため、超音波のプロープと観察面の距離が一定である、つまり組織が平滑で安定している必要があった。このため、その観察対象は、摘出された組織を薄切化しスライドガラス上に載せたものや、培養皿の上に培養された細胞などに限定され、臨床的に生体内で用いることは原理上困難であった。

平成14～15年度の東北大学・豊橋技術科学大学・本多電子などの共同研究による、「生体組織診断のためのパルス励起型超音波音速顕微鏡の開発」の研究途中で、周波数300MHzの高周波数超音波を用いても、薄いプラスチック板の裏側まで超音波が到達し、超音波トランスデューサから見てプラスチック板の向こう側に密着した試料もイメージング可能であることが判明した。



(b)

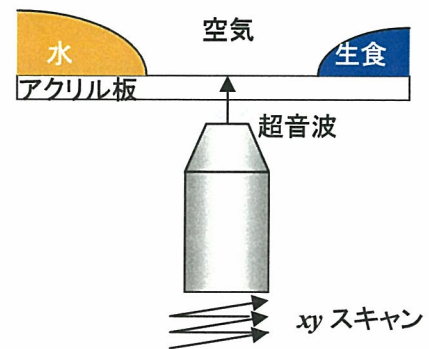


図2(a) アクリル板上に滴下した水(左)と生理的食塩水(右)をアクリル板の裏側から見た像

図2(b) 実験系の模式図

図2(a)は、実際のイメージング結果で、左側の橙色の半円はアクリル板の上に滴下した水、右側の青色の半円は生理食塩水、そのほかの茶色の部分はアクリル板の上に何も存在しない部分(空気の部分)をアクリル板の下の超音波プロープにより観察した像である。図2(b)は、実験系の模式図で、アクリル板の下側の超音波プロープを2次元走査させ、アクリル板の上側からの超音波の反射を捉えることで、画像を作成している。

この原理を応用することで、トランスデューサを覆うようなプラスチックのケースを作製し、一体化すれば、トランスデューサとプラスチックの間の距離が一定に

なり、プラスチックを組織表面に接触させれば、日常臨床に使用しているのと同じような形状の超音波プローブでも組織表面の高解像度イメージングが可能になることが期待されることから、本研究プロジェクトで提案するようなシステムを考案した。

## C. 研究結果

### 1. システムの開発

平成18年度は、このイメージングシステムの最大の特長である、プラスチック板越しの組織表面形状の可視化を目的とした研究を進めた。

#### (1) 試作装置および解析アルゴリズムの改造

平成17年度に試作したシステムを改造し、スキャンの高速化を行うとともに、振動子の周囲にプラスチックケースを配置して、その中に音響カプラとして純水を入れ、プラスチックケースの中で振動子を2次元走査できるように改造した。プラスチックケースを組織に接触させて、プラスチック板と表面の境界で発生する反射波を計測する方法を反射モードと名付け画像化を行った。

#### (2) 超音波振動子の高周波数化

前年度までに構築した高周波数用超音波振動子の設計思想に基づき、さらなる高周波数化を図り、従来型超音波顕微鏡と同様のイメージングを透過モードと名付け、細胞1個のイメージングを可能にした。

#### (3) 超音波受信装置の改造

デジタルオシロスコープのフロントエンドを利用することで、超音波パルスの発生、走査、受信、信号解析、画像化を同一のワークステーション上で可能にした。

### 2. 生体組織の音速計測

図3は平成18年度に作製したナノ・イメージングシステムの透過モードの模式図を示す。組織あるいは細胞の上部に設置した超音波振動子から発信された超音波が、まず組織を透過し、組織とガラス面の境界面で反射し再び組織を透過し、上部のトランスデューサで超音波を受信する方式である。細胞に非接触であり、細胞を取り出さなくても細胞内小器官（核など）の音速を計測できる点が画期的である。

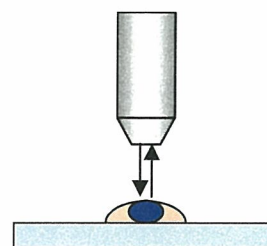


図3 組織を透過しガラス面からの反射を画像化（透過モード）

各計測ポイントにおいて、図4(a)に示すように組織表面からの反射とガラス面からの反射を周波数領域の情報を用いて分離することで、細胞の厚みや音速を計測することも可能となった。

超音波振動子に入力される信号はインパルス波形に近いが、トランスデューサは圧電素子の厚さなどのために共振特性をもったものを使わざるを得ない。このため出射波は振動成分を含み、細胞がある部分からの反射波は表面と背面の反射が干渉した複雑な波形となる。この波形は、基板が露出している部分からの反射波形をもとに規格化することができる。図4(b)は、この処理を行ってインパルス応答を求めた後、シングルレットに対する応答を描いたものである。得られた波形は細胞表面と背面からの反射が明瞭に見られる。適当な窓関数を用いて

両者を 2 つの波形に分離した後、それぞれフーリエ変換し、基板が露出した部分からの基準波形との位相差をもとに厚さと音速を求める。

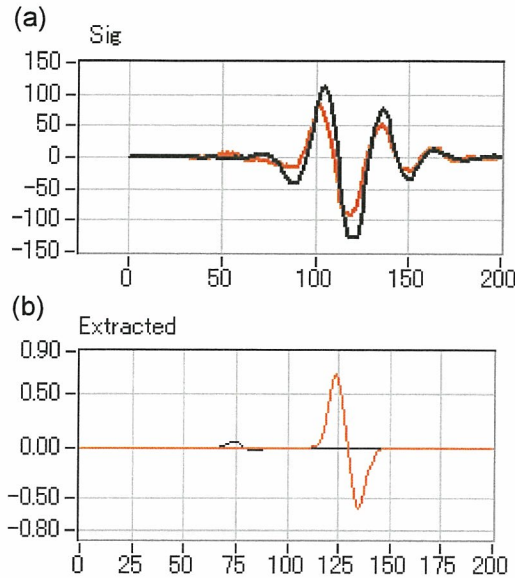


図 4 電気信号と超音波波形

- (a) 基板(黒)と組織(赤)からの反射超音波波形  
(b) Singlet に対する応答

媒質の音速を  $c_0$ 、細胞内の音速を  $c$ 、細胞の厚さを  $d$ 、任意の周波数  $f$  における表裏の反射波の規格化位相をそれぞれ  $\phi_{front}$  および  $\phi_{rear}$  とすると、

$$2\pi f \times \frac{2d}{c_0} = \phi_{front}$$

$$2\pi f \times 2d \left( \frac{1}{c_0} - \frac{1}{c} \right) = \phi_{rear}$$

これより細胞の厚さと音速は、

$$d = \frac{c_0}{4\pi f} \phi_{front}$$

$$c = \left( \frac{1}{c_0} - \frac{\phi_{rear}}{4\pi f d} \right)^{-1}$$

で計算することができる。このように透過モードにおいては細胞を通過する超音波の音速と減衰を定量的に計算することができる。

### 3. 生体組織のイメージング例

図 5 は平成 18 年度に作製したナノ・イメージングシステムによる培養線維芽細胞画像である。

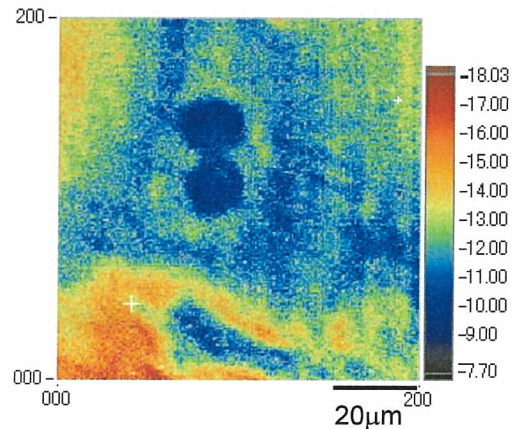


図 5 培養線維芽細胞の透過モード像

このように細胞を観察すると、核の部分と細胞質周辺の部分に超音波強度の高い部分が認められ、細胞内小器官のダイナミクス計測への応用が可能と考えられた。また、周辺の部分はアクチンフィラメントなどの細胞内骨格に相当し、細胞のバイオメカニクス計測が可能と考えられた。

本研究最大の特徴であるプラスチック板越しの音響計測は、組織の音響インピーダンスの違いを画像化するものなので、インピーダンス顕微鏡として発表した。また、この計測モードを反射法と名づけた。

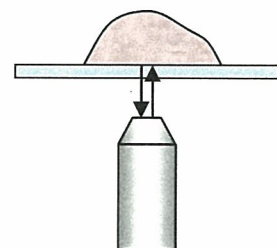


図 6 プラスチック板の向こうの組織とプラスチック板の境界からの反射を画像化(反射モード)

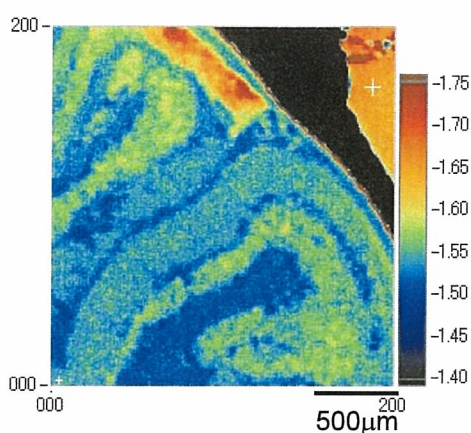


図7 ラット脳組織の反射モード像

図7は摘出ラット小脳組織の反射モード像である。従来は免疫染色などを駆使して脳の層構造を可視化していたが、本システムにより摘出脳をシステムに載せるだけで層構造の可視化が可能になった。

#### D. 考察

従来の超音波顕微鏡では、平面振動子に音響レンズを接着することで、超音波を絞り込むため、超音波プローブと観察対象との間の距離が音響レンズの焦点に合うときにはじめて観察対象からの強い反射を得ることが出来た。したがって、超音波プローブを2次元走査するときにも、プローブと対象との間は常に一定である必要があり、結果的に、薄切した組織または血管内皮細胞など基質に対して1層に固着するような性質の培養細胞の観察のみが可能であった。

本研究では、この超音波顕微鏡の限界を打破すべく、薄いプラスチック板と超音波振動子の間の距離が一定になるように一体成型し、通常の超音波診断装置と同様に、対象物に接触させるだけで、表面形状が観察できる、生体内超音波ナノ・イメージングシステムの開発を最終的な目標とした。

平成18年度には、イメージングシステムの最大の特長である、プラスチック板越しの組織表面形状の可視化を実現した。ラット脳組織を薄切せずにイメージングすることが可能で、培養線維芽細胞については細胞分裂における各の分裂像まで観察する子音が可能であった。

平成19年度には、動物実験により生体内のイメージングを実証する。また、装置の小型化や医療機器としての応用を念頭に置いた安定性やノイズ対策などについても検討を進めることが十分可能であると考えられた。

#### E. 結論

平成17年度に作製した小型走査装置と薄いプラスチック板を一体化し、プラスチック板と組織表面の境界から生じる超音波の反射を高感度で検出することで、本装置の最大の特長である、組織を切除しないでナノレベルで画像化する方法を具現化した。また、高速アナログ/デジタル変換ボードを用いることで、超音波パルスの発生、走査、受信、信号解析、画像化を同一のワークステーション上で可能にした。また、作製した装置を利用してラット脳組織および培養線維芽細胞の可視化を行い800ナノメートルの解像度を実現した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### (1) 英文論文

- 1) van der Steen AFW, Baldewsing RA, Degertekin FL, Emelianov S, Frijlink ME, Furukawa Y, Goertz D, Karaman M,



- Khuri-Yakub PT, Kim K, Mastik F, Moriya T, Oralkan O, Saijo Y, Schaar JA, Serruys PW, Sethuraman S, Tanaka A, Vos HJ, Witte R, O'Donnell M. IVUS beyond the horizon. *Eurointerv*, Vol. 2; 132-142, 2006.
- 2) Sano H, Hattori K, Saijo Y, Kokubun S. Does decalcification alter the tissue sound speed of rabbit supraspinatus tendon insertion? In vitro measurement using scanning acoustic microscopy. *Ultrasonics*, Vol. 44, No. 3: 297-301, 2006.
- 3) Saijo Y, Hozumi N, Lee C, Nagao M, Kobayashi K, Oakada N, Tanaka N, Santos Filho ED, Sasaki H, Tanaka M, Yambe T. Ultrasonic speed microscopy for imaging of coronary artery. *Ultrasonics*, Vol. 44; Suppl. 1: e51-55, 2006.
- 4) Saijo Y, Tanaka A, Iwamoto T, Dos Santos Filho E, Yoshizawa M, Hirosaka A, Kijima M, Akino Y, Hanadate Y, Yambe T. Intravascular two-dimensional tissue strain imaging. *Ultrasonics*, Vol. 44; Suppl. 1: e147-151, 2006.
- 5) Liu H, Saijo Y, Zhang X, Shiraishi Y, Luo Y, Maruyama M, Higa M, Sekine K, Yambe T. Impact of type A behavior on brachial-ankle pulse wave velocity in Japanese. *Tohoku J Exp Med*, Vol. 209, No. 1: 15-21, 2006.
- 6) Saijo Y, Tanaka A, Santos Filho ED, Iwamoto T, Li S, Yoshizawa M, Yambe T. Multiple parametric IVUS imagings for detection of vulnerable plaque. *Proc 9th Sendai Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization*. Vol. 1: 13-17, 2006.
- 7) Hozumi N, Terauchi S, Kimura A, Nagao M, Yoshida S, Kobayashi K, Saijo Y. Development of cerebella tissue of rat characterized by acoustic impedance microscope. *Proc 9th Sendai Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization*. Vol. 1: 18-21, 2006.
- 8) Sasaki H, Saijo Y, Kanno T, Tanaka M. Classification of flow-limiting thrombus in acute coronary syndrome by acoustic microscopy. *Proc 9th Sendai Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization*. Vol. 1: 29-31, 2006.
- 9) Sano H, Hattori K, Komatsuda T, Saijo Y, Sugita T, Itoi E. Tissue sound speed of anterior cruciate ligament in estrogen-controlled rabbits. - A measurement using the scanning acoustic microscope - *Proc 9th Sendai Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization*. Vol. 1: 32-35, 2006.
- 10) Sano H, Saijo Y, Kokubun S. Non-mineralized fibrocartilage shows the lowest elastic modulus in the rabbit supraspinatus tendon insertion: measurement with scanning acoustic microscopy. *J Shoulder Elbow Surg*, Vol. 15, No. 6: 743-9, 2006.
- 11) Hagiwara Y, Saijo Y, Chimoto E, Akita H, Sasano Y, Matsumoto F, Kokubun S. Increased elasticity of capsule after immobilization in a rat knee experimental model assessed by scanning acoustic microscopy. *Uppsala J Med Sci*. Vol. 111, No. 3: 303-313. 2006.

## (2) 和文論文

- 1) 西條芳文. 特集 DES 時代の Beyond Angiography Virtual Histology の基礎. *Coronary Intervention* Vol. 2, No. 1: 82-87, 2006.
- 2) 西條芳文、佐藤正明、穂積直裕、鈴木聡、小林和人. 科研費研究課題の成果 ●基盤研究 (B) 超音波による血管内皮細胞のナノ・イメージング. *INNERVISION* Vol. 21, No. 7: 48, 2006.
- 3) 西條芳文. 医用超音波ナノ・イメージング = 周波数 500MHz の医学用超音波音速顕微鏡の開発 = . *超音波 TECHNO* Vol. 19, No. 1; 4-9, 2007.

## 2. 学会発表

### (1) 国際学会

- 1) Saijo Y, Hozumi N, Kobayashi K, Okada N, Lee CK, Sasaki H, Yambe T, Tanaka M.

Development of ultrasonic nano-imaging system for visualization of cells. *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2006*. Seoul, Korea, Aug 31, 2006.

- 2) Santos Filho E, Saijo Y, Tanaka A, Yambe T, Li S, Yoshizawa M. Automated calcification detection and quantification in intravascular ultrasound images by adaptive thresholding. *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2006*. Seoul, Korea, Sep 1, 2006.
- 3) Saijo Y, Kobayashi K, Hozumi N, Okada N, Santos Filho ED, Yambe T. 3D Acoustic Microscopy for Imaging of Liver Tissue with 100 MHz Ultrasound. *5th International Conference on Ultrasonic Biomedical Microscanning*. Cargese, France, Sep 14, 2006.

## (2) 国内学会

- 1) Saijo Y, Tanaka A, Akino Y, Hanadate Y, Yambe T. Automatic segmentation of IVUS image by self-organizing map. 日本循環器学会第 70 回学術集会. 名古屋, 2006 年 3 月 25 日.
- 2) 西條芳文, Esmerald dos Santos Filho, 田中明, 吉澤誠, 秋野能久, 花立安志, 山家智之. 組織の自動解析を目的とした IVUS 信号の自己組織化マッピング. 第 17 回日本心エコー学会学術集会. さいたま, 2006 年 4 月 28 日.
- 3) 西條芳文, 齋木佳克, 井口篤志, 田林暁一, 白石泰之, 関根一光, 山家智之. 左心補助装置装着症例の術中経食道心エコー所見. 第 17 回日本心エコー学会学術集会. さいたま, 2006 年 4 月 28 日.
- 4) 西條 芳文, 穂積 直裕, 小林 和人, エズメラルド ドス サントス フィロ, 田中 元直, 山家 智之. 超音波によるナノ・イメージングの医療への応用. 第 45 回日本生

体医工学会大会. 福岡, 2006 年 5 月 15 日.

- 5) 西條芳文, 齋木佳克, 井口篤志, 田林暁一, 白石泰之, 関根一光, 山家智之. 経食道心エコーによる左室補助装置装着患者の心機能評価. 第 45 回日本生体医工学会大会. 福岡, 2006 年 5 月 16 日.
- 6) 西條芳文, 大庭和夫, 玉村一樹, 山崎豊, 秋野能久, 花立安志, 渡辺さち子. 圧・容積脈波の左右同時計測による FMD の自動計測. 第 45 回日本生体医工学会大会. 福岡, 2006 年 5 月 16 日.
- 7) 西條芳文, 岡田長也, 小林和人, 穂積直裕, Esmeraldo dos Santos Filho, 白石泰之, 関根一光, 山家智之. 100MHz 超音波による肝組織の 3 次元イメージング. 日本超音波医学会第 79 回学術集会. 大阪, 2006 年 5 月 27 日.
- 8) 西條芳文, 白石泰之, 関根一光, 山家智之, 佐野博高, 萩原嘉広, 服部弘之, 田中明, 穂積直裕, 小林和人. 再生医療の評価方法としての高周波数超音波の可能性. 第 44 回日本人工臓器学会大会. 横浜, 2006 年 11 月 2 日.

## 3. 招待講演

### (1) 海外での招待講演

- 1) Saijo Y: Evaluation of Cardiac Function of the Patients with Left Ventricular Assist Device by Transesophageal Echocardiography. *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2006*, Seoul, Korea, Aug 28, 2006.
- 2) Saijo Y: Twenty Years' Development of Acoustic Microscopy for Medicine and Biology. *4th joint meeting of the Acoustical Society of America and the Acoustical Society of Japan (152nd Annual Meeting on Acoustical Society of America)*, Honolulu, HI, USA, Nov 30, 2006.

## (2) 国内での招待講演

- 1) 西條芳文. 超音波による心臓・血管の中の流れの医工学的解析. 第43回日本小児外科学会総会. 秋田、2006年6月8日.
- 2) 西條芳文. 誰も語らなかった VH-IVUS の光と影. 第11回 i-IVUS.jp 研究会, 名古屋、2006年7月8日.
- 3) 西條芳文. Visualization of Vulnerable Plaque by Serial Parametric IVUS Imagings. 第6回日本心血管カテーテル治療学会. 広島、2006年11月24日.

## H. 知的所有権の取得状況

- 1) 特願 2006-142040  
バイパスグラフト評価のための超音波血流診断装置  
出願日：2006年4月21日
- 2) 特願 2006-287512  
フレーム相関法を用いた血流の検出  
出願日 2006年10月23日

生体内超音波ナノ・イメージング法の開発  
音響インピーダンス顕微鏡の開発と小脳組織の観察

分担研究者 穂積 直裕（愛知工業大学 工学部 教授）

**研究要旨：**

平成18年度は、前年度に作製した小型走査装置と薄いプラスチック板を一体化し、プラスチック板と組織表面の境界から生じる超音波の反射を高感度で検出することで、本装置の最大の特長である、組織切片を作製しないでプローブとの接触面における音響インピーダンス分布を顕微画像化する方法を具現化した。高速アナログ/デジタル変換ボードを用いることで、超音波パルスの発生、走査、受信、信号解析、画像化を同一のワークステーション上で可能とした。この顕微鏡装置を用いてラットの小脳皮質組織を観察し、日齢変化に伴う各層の音響インピーダンスの変化を定量的に評価した。

**A. 研究目的**

超音波顕微鏡を用いた生体組織の音響イメージングは染色過程なしで実施可能であり、化学的に非破壊であるとともに観察を短時間で終了できる可能性を持つ。本研究グループでは既に「フーリエ変換型超音波顕微鏡」の開発を行い、実用化を達成した。しかし、この段階では加工切片の準備が必要であった。さらに、スライスすることにより組織の機能に損傷を与えることも懸念される。これらの理由により、生体組織用超音波顕微鏡一つとして、プラスチック基板に接する組織断面の局所的音響インピーダンスを画像化する「音響インピーダンス顕微鏡」の提案を行った。音響インピーダンスは密度の分散が大きくない時には音速や体積弾性率とよい相関を持ち、組織評価のための強力なツールになると考えられる。本研究では、顕微鏡の開発及び試作機で応用例の一つとして日齢に伴うラットの小脳

組織観察・定量評価を行い顕微鏡の有用性を評価した。

**B. 研究方法**

**B-1. 観測システム**

図1に音響インピーダンス顕微鏡の概要を示す。音響インピーダンスが既知のプラスチック板を基板とし、その上に観察対象と解析の際必要となる参照物質を同視野に

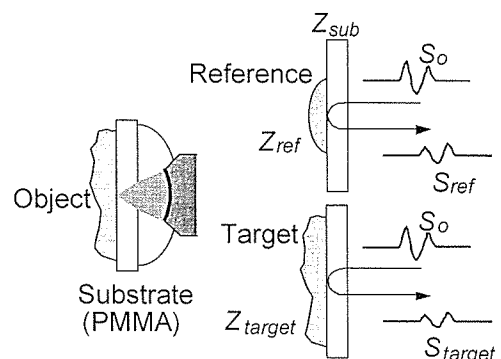


図1 音響インピーダンス顕微鏡の原理

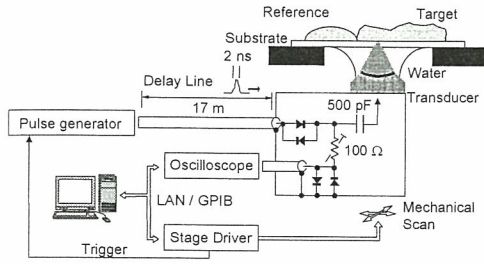


図2 システム概要図

なるように置き、広帯域音響パルスを基板の裏側から送波する。このとき焦点を基板と組織の界面に保つ。反射波形を取り込みながら振動子を平面走査する。システムの概要を図2に示す。後述するラットの小脳皮質観察では、取り扱いやすいように小脳組織を約  $300 \mu\text{m}$  に切り出し、酸素を含ませたリン酸化緩衝液中で処理・保存を行ったものを使用した。

## C. 研究結果

### C-1. 音響インピーダンスの校正

視野内に音響インピーダンスが既知である参照物質が入るようにして対象組織を観察する。音響インピーダンスは音圧反射率の式から算出される。反射係数を考慮すると対象組織からの信号は以下のように示される。

$$S_{target} = \frac{Z_{target} - Z_{sub}}{Z_{target} + Z_{sub}} S_0 \quad (1)$$

ここで、任意の周波数における信号の周波数成分は、 $S$  で表記され、 $Z_{target}$  と  $Z_{sub}$  はそれぞれ対象組織と基板の音響インピーダンスである。 $S_0$  は送波であり、観察中常に一定である。一方、反射信号は以下のように示される。

$$S_{ref} = \frac{Z_{ref} - Z_{sub}}{Z_{ref} + Z_{sub}} S_0 \quad (2)$$

ここで  $Z_{ref}$  は参照物質の音響インピーダン

スである。 $S_{target}$  は直接測定でき、 $Z_{ref}$  は既知であるが、 $S_0$  は測定できない。対象組織の音響インピーダンスは  $Z_{target}$  と  $S_0$  に関する連立方程式の解として、以下のように計算される。

$$Z_{target} = \frac{1 - \frac{S_{target}}{S_0}}{1 + \frac{S_{target}}{S_0}} Z_{sub} = \frac{1 - \frac{S_{target}}{S_{ref}} \frac{Z_{sub} - Z_{ref}}{Z_{sub} + Z_{ref}}}{1 + \frac{S_{target}}{S_{ref}} \frac{Z_{sub} - Z_{ref}}{Z_{sub} + Z_{ref}}} Z_{sub} \quad (3)$$

参照物質としては水、寒天、シリコーンゴムなどを適宜利用している。水を参照物質とした場合、音響インピーダンスは  $1.5 \times 10^6 \text{Ns/m}^3$  である。パルス波形の切出しと整形、周波数成分の取出しなどに、デジタル信号処理を多用する。

### C-2. 基板の選択

音響波の反射と透過は異なる媒質の界面で生じる。この顕微鏡では、図3に示すよ

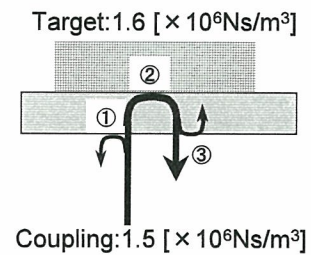


図3 音響波の反射

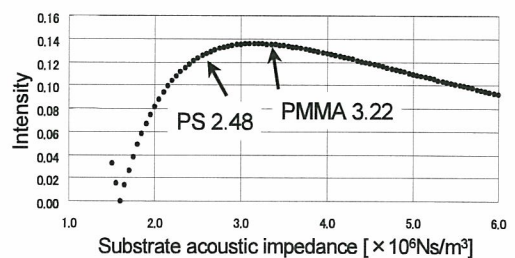


図4 最適な基板の音響インピーダンス

うに、基板の表裏で計 3 回の反射と透過を経て振動子で検出される。カップリングの水音響インピーダンスを  $1.5 \times 10^6 \text{ Ns/m}^3$  とし組織の音響インピーダンスを  $1.6 \times 10^6 \text{ Ns/m}^3$  とし、基板の音響インピーダンスを変数として、音圧反射率の式から振動子に受波される信号強度を求めた。その結果を図 4 に示す。信号強度のピークは  $3.0 \times 10^6 \text{ Ns/m}^3$  でありこの付近の音響インピーダンスをも平滑性の良いものとしてアクリル板を基板とした。

### C-3. 参照物質の選択

観察の際、参照物質と観察対象が近接している事が望まれる。その参照物質として理想的なものは純水である。しかしアクリルの撥水性が高いため微小な振動により純水は遊走しやすくなり、観察対象に接し結果正確な観察が行えない。そこで固体の参照物質を考慮する必要が出てきた。条件としては、基板に付着し、観察対象に近い音響インピーダンスを持つこと、そして一定の状態を保てるものとして工業製品とした。その結果現在は主にシリコンゴムを参照物質としている。

### C-4. 精度評価

音響インピーダンス測定の精度を評価するために、蒸留水を参照物質として濃度の異なる食塩水の音響インピーダンスを測定した。図 5 に結果を示す。各々の点は 600 点の平均値をプロットしており、エラーバーの長さは標準偏差の 2 倍を示している。音響インピーダンスの測定値は NaCl 含有量の増加に伴い次第に増加した。破線はハンドブックのデータベースから抽出した音速と密度の積による音響インピーダンスを示しており、測定結果とよく一致している。軟組織の音響インピーダンスは概ね  $1.5 \sim 1.8 \times 10^6 \text{ Ns/m}^3$  の間に分布しているので、顕微鏡

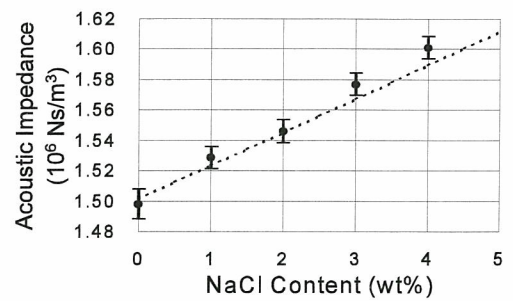


図 5 NaCl 含有量による音響インピーダンスの変化

の精度は組織評価の必要条件を満足していると言える。

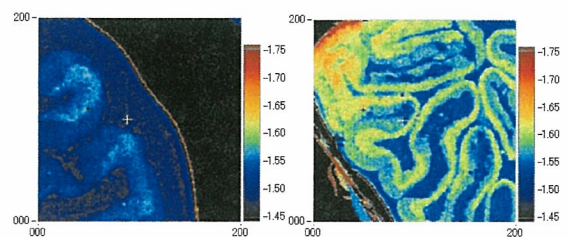
## D. 生体組織の観察および考察

### D-1. 問題点

外形・音響特性が良いアクリル樹脂を基板として観察を行ったところ生体組織に対する基板の親和性が悪く画像が劣化する問題が出た。そこで明確な音響インピーダンス増を得るために以下の 2 つのことを行った。

### D-2. プラズマ処理

アクリル樹脂を基板としたときには基板表面の親水性が十分ではなく、組織と基板の間の接触を保てないことがある。図 6 (a) の例では、組織の外側は明確に観察できるが、内側は一連に見えるはずの層が観察できない。これを解決するために観察前に基板表面にプラズマを照射し表面の親水性を



(a) 処理なし (b) 処理あり

図 6 基板のプラズマ処理の影響

向上させた。プラズマ処理を行ったことで表面エネルギーが上昇し、水滴の接触角が55度から39度に減少した。表面処理を施した図6(b)は内部まで層が一連に見え、かつ各層のコントラストも十分に得られている。

### D-3. 観察中における組織の乾燥の防止

組織は乾燥が早く、そのために音響インピーダンス値が高くなってしまふ。これを防ぐために組織を基板上に乗せた後に全体に覆いかぶさるカバーを取り付けた。このカバーの影響を調べるために2 wt%の食塩水 ( $1.55 \times 10^6 \text{ Ns/m}^3$ ) を使用し、経過時間による音響インピーダンスの変化観察を行った。その結果を図7に示す。カバー無しの場合、10分後、インピーダンスは無視できない程度まで上昇し、40分後には  $1.75 \times 10^6 \text{ Ns/m}^3$  となった。逆にカバー有りの場合、時間変化はほとんど見られず40分後でも元の値に近い値を示した。1回の観察には視野の決定を含めて数分を要することから、観察実施時にはカバーなどをかけ内部の湿度を飽和させて組織の乾燥を防止することが望ましい。

### D-4. 小脳皮質の定量評価

供試試料は未熟期(生後7日目:P7)、過渡

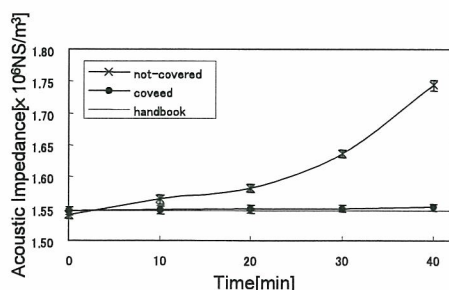


図7 2wt%食塩水の音響インピーダンスの経時変化

期(P14)、成熟期(P21)のものである。図8に組織構造を示す。過渡期以降は、4つの異なった層すなわち白質層(WM)・内顆粒細胞層(IGL)・プルキンエ層(PL)・分子層(ML)が確認される。図9に各時期のIGL・ML・WMの音響インピーダンスを示す。MLは誕生直後においては未形成であり、音響インピーダンス像でも明瞭な層構造が観察されない。P7ではMLの音響インピーダンスは一旦大きな値を示す。しかしその後の成長に伴いMLの音響インピーダンスが低下する傾向が見られた。これらの変化は、誕生直後に小脳表層側にあった顆粒細胞が内側に移動しながら平行線維を伸ばして分子層を分化する過程で、分子層に顆粒細胞が混在している状態から平行線維のみの状態への発達を反映しているものと考えられる。WMでは成長とともに小脳出力線維のミエリン化が進むことが知られており、音響インピーダンスは低下傾向を示すべきものと考えられるが、元来脂質を多く含む層であることから、MLに見られたような大きな変化は見られなかった。IGLは微小な細胞の集合体であり成長とともにその形態が大きく変化しないことが染色法などの手法により確認されている。このため音響物性の変化も小さかったものと考えられる。

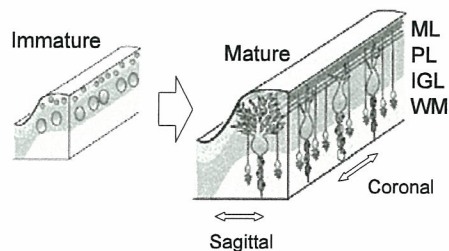


図8 ラットの小脳組織  
ML: 分子層 PL: プルキンエ細胞  
IGL: 内顆粒細胞層 WM: 白質

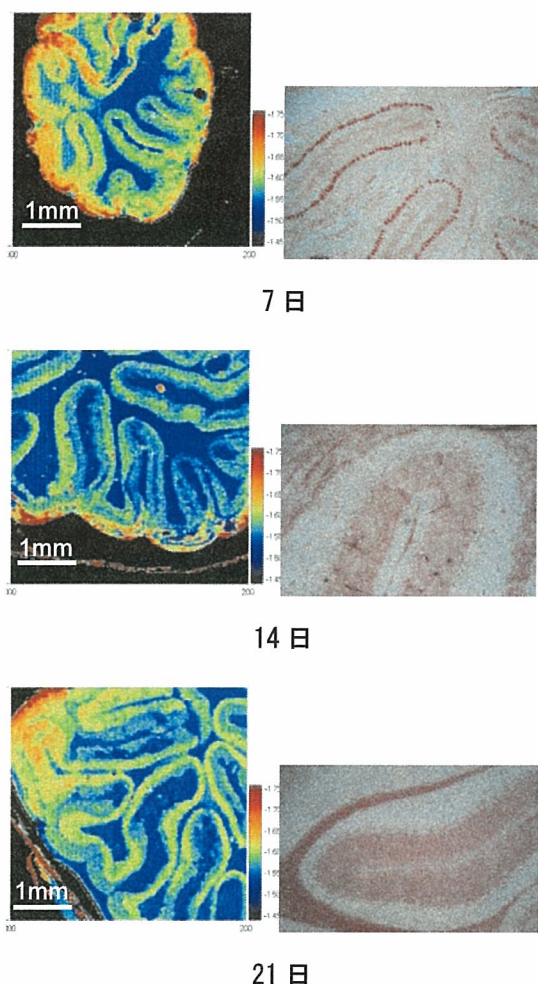


図9 ラットの小脳組織観察結果

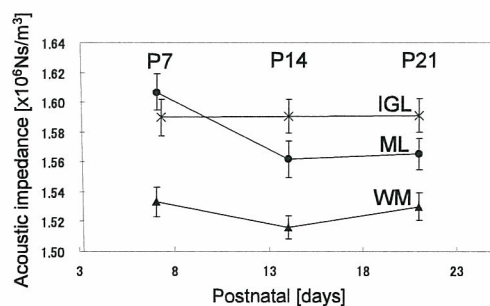


図10 日齢に伴う各層の音響インピーダンス変化

## E. 結論

以上のように、音響インピーダンス像により成長にともなう各層の経時変化が定量評価できることが示されたことから、提案する方法は脳組織の発達過程の有効な評価手法となりうるものと期待される。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### G-1.論文

N. Hozumi, A. Kimura, S. Terauchi, M. Nagao, S. Yoshida, K. Kobayashi & Y. Saijo: "Acoustic Impedance Microscopy for Biological Tissue Characterization", Ultrasonics 投稿中

### G-2.学会発表

#### G-2-1.国際会議

- 1) A.Kimura, N.Hozumi, S.Terauchi, M.Nagao, S.Yoshida, K.Kobayashi, Y.Saijo: "Development of Cerebella Tissue of Rat Characterized by Acoustic Impedance Microscope", 2006 IEEE International ultrasonic symposium Vancouver No. P1H-8 (2006).

#### G-2-2.口頭発表

- 1) 木村あゆみ、寺内智、村上義信、穂積直裕、長尾雅行、吉田祥子、小林和人、西條芳文: "音響インピーダンス顕微鏡による生体組織イメージング", 平成18年電気学会全国大会 No.1-114 (2006).
- 2) 木村あゆみ、寺内智、村上義信、穂積直裕、長尾雅行、吉田祥子、小林和人、西條芳文: "音響インピーダンス顕微鏡によるラットの小脳皮質発達評価", 平



成 18 年度 電気関係学会東海支部連合大会 No. O-074 (2006).

- 3) 寺内智、木村あゆみ、村上義信、長尾雅行、吉田祥子、穂積直裕、小林和人、西條芳文: "生体組織用音響インピーダンス顕微鏡の校正法の検討", 平成18年度 電気関係学会東海支部連合大会 No. O-073 (2006).
- 4) 木村あゆみ、寺内智、村上義信、穂積直裕、長尾雅行、吉田祥子、小林和人、西條芳文: "音響インピーダンス顕微鏡における生体組織 in vivo 観察", 電子情報通信学会 技術研究報告 US2005-106 p.25-29 (2006).
- 5) 穂積直裕: "誘電・絶縁材料研究と医療との接点", 電気学会誘電絶縁材料研究会 DEI-06-44 (2006).

### G-3.新聞報道

該当なし

### H.知的所有権の取得状況

該当なし

生体内超音波ナノ・イメージング法の開発  
超音波ビーム特性を考慮した画像の改善

分担研究者 小林 和人（本多電子株式会社 研究開発部 部長）

**研究要旨：**

高分子圧電フィルムを用いて焦点形の振動子を作るには、焦点距離にあわせた凹面状に加工した金属棒に圧電フィルムの接着を行い、接着時の接着剤の厚みやフィルムのしわによって理想的な焦点ができない場合がある。そこで、超音波振動子の指向特性を測定してその指向特性を利用したぼけ画像の改善方法を検討した

画像の引き締めを2DFFTの手法で行なうことで簡単な演算処理で行なうことができるようになった。また、リファレンスの画像を取得するときのS/Nを考慮し、補正值の決定時にノイズ分を含まないようにすることで、実観察において副作用なしに高分解能な観察ができることがわかった。今後、高周波振動子にも適用して細胞の観察などの高分解能が必要な分野での応用を行なっていく。

**A. 研究目的**

パルス励起型超音波音速顕微鏡は組織音速の定量評価機器として有用である。しかし、組織音速の測定にパルス波を用いるために、パルス波で感度良く測定するために高分子系振動子を用いている。高分子圧電フィルムを用いて焦点形の振動子を作るには、焦点距離にあわせた凹面状に加工した金属棒に圧電フィルムの接着を行い、接着時の接着剤の厚みやフィルムのしわによって理想的な焦点ができない場合がある。また、高分子系の振動子では100 MHzより高い周波数の振動子を作ることができない。そのために、現状のパルス励起型超音波音速顕微鏡では80 MHzの振動子を用いているためにその分解能は18  $\mu\text{m}$  となっている。組織観察を行う病理部門では通常光学顕微鏡で観察しているため18  $\mu\text{m}$  の分解能の超

音波画像では普段用いている光学顕微鏡の分解能と異なるために組織の構造判別が難しい。そこで、超音波振動子の指向特性を測定してその指向特性を利用したぼけ画像の改善方法を検討したので報告する。

**B. 研究方法**

**B-1. 原理**

超音波顕微鏡で送受信を行い画像化すると図1のように、超音波振動子が持っている指向特性により実際の構造よりもぼけた画像となる。このぼけた画像は真の構造に使用した振動子の指向特性関数を伝達関数として得られた画像となる。

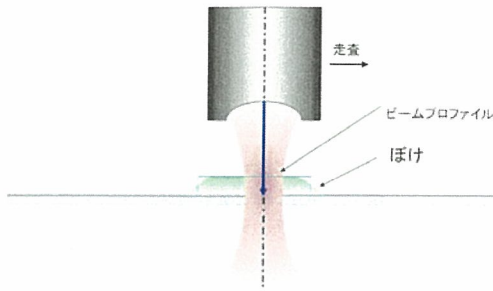


図1 超音波顕微鏡におけるぼけ

このぼけを1次元的に捕らえると図2のように真値に伝達特性Hを畳み込み積分した形となる。

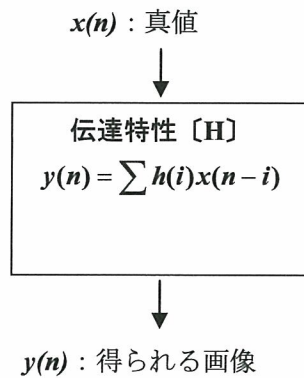


図2 ぼけの仕組み

2次元で考えると真の音響強度像と実際に観測される音響強度像との関係は以下の式で表される。

$$actual(x, y) = \iint h(u, v) Ideal(x - u, y - v) du dv = h(x, y) * ideal(x, y) \dots (1)$$

(ideal(x, y) : 真の音響強度像

actual(x, y) : 実際に観測される音響強度像

h(x, y) : 観測系の伝達関数

(\* は畳み込み積分を表す)

超音波送受において焦点が観測面の一点

で結ばれている場合、伝達関数はデルタ関数となり、

$$h(x, y) = \delta(x, y) = 1 \{x = 0, y = 0\} \\ 0 \{ else \} \\ actual(x, y) = ideal(x, y)$$

観測される音響強度像は、真の音響強度像に一致する。一方、一点で結ばれずに観測面で広がりを持つ場合、伝達関数は周波数依存性を持ち高域になるにつれて信号が減衰する特性になるため、観測される像にぼけが生じ、真の像と一致しなくなる。しかし、信号成分が高域において減衰するものの、完全に失われてしまうわけではない。

ここで、(1)式のフーリエ変換を行い、周波数領域での関係を導くと、

$$ACTUAL(\omega x, \omega y) = (\omega x, \omega y) \bullet IDEAL(\omega x, \omega y) \dots (2)$$

$$IDEAL(\omega x, \omega y) = FT\{ideal(x, y)\}$$

$$ACTUAL(\omega x, \omega y) = FT\{actual(x, y)\}$$

$$H(\omega x, \omega y) = FT\{h(x, y)\}$$

(FTは、{}内のフーリエ変換を表す)

となり、(1)式の畳み込み積分の関係が(2)式の単純な積の関係になる。これより、周波数領域では観測像から真の像を復元する式は以下の式で与えられ、その結果を逆フーリエ変換することによって実画像領域での像を得ることができる。

$$IDEAL(\omega x, \omega y) = \{1/H(\omega x, \omega y)\} \bullet ACTUAL(\omega x, \omega y) \dots (3)$$

$$ideal(x, y) = IFT\{IDEAL(\omega x, \omega y)\}$$

(IFTは、{}内の逆フーリエ変換を表す)

復元においては伝達特性の逆特性が必要となるので、真の画像を想定できるサンプルを用い、想定画像と実際の観測画像から予め求めておく。

$$\begin{aligned} & \{1/H(\omega x, \omega y)\} \\ & = IDEAL\_ref(\omega x, \omega y)/ACTUAL\_ref(\omega x, \omega y) \\ & \dots(4) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} IDEAL\_ref(\omega x, \omega y) & = FT\{ideal\_ref(x, y)\} \\ ACTUAL\_ref(\omega x, \omega y) & = FT\{actual\_ref(x, y)\} \end{aligned}$$

厳密には振幅情報だけでなく位相情報も考慮して（複素数として）(4)式を求める必要があるが、ぼけの特性はほぼ点対称であるため、位相情報を無視し、単純に振幅スペクトラムの比として求める。

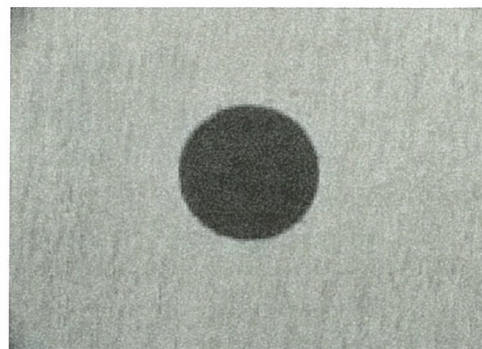
$$\begin{aligned} & \{1/H(\omega x, \omega y)\} \\ & = \frac{Amp\{IDEAL\_ref(\omega x, \omega y)\}}{Amp\{ACTUAL\_ref(\omega x, \omega y)\}} \dots(5) \end{aligned}$$

(Amp は、{}内の振幅成分を表す)

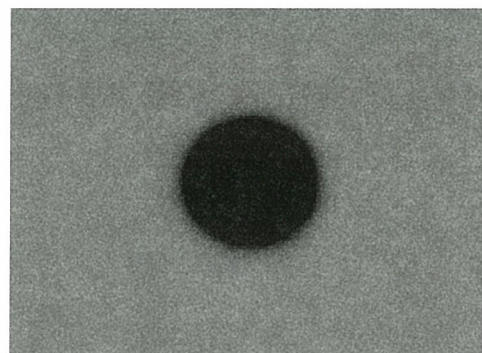
逆特性は、スカラー値で得られるため、(3)式においても単純な復元ゲインテーブルとして扱うことができる。

## B-2. リファレンスに用いたサンプル

復元ゲインテーブルを求める際のリファレンスとして、図3(a)に示すような金属に直径200 μmのピンホールを貫通させたサンプルを用いた。そして、光学顕微鏡で測定したデータをピンホール部分は音響強度零(0)、ピンホール以外の部分の音響強度は実際の観測画像のピンホールから十分離れた部分における平均音響強度と同じ値で一様であるとして、真の像を想定した。また、図3(b)は実際に超音波顕微鏡で観察した画像を示す。



(a)100 μm 穴の光学画像



(b)100 μm 穴の超音波画像

図3 リファレンス 100 μm 穴の  
光学画像と超音波画像

## B-3. 復元ゲインテーブルの制限

ぼけの伝達関数は、図4(a)のように高域になるにつれ信号成分が減衰する特性を有する。復元ゲインテーブルは、その逆に高域になるにつれ大きくなるが、実際の音響強度測定において雑音の混入を完全に防ぐことはできないため、復元ゲインテーブルの値を制限する必要がある。そうしないと、減衰した信号を復元しようとするあまりに、雑音成分が強調され、かえって画質を劣化させてしまう。

リファレンスに用いたピンホールサンプルの観測画像を評価したところ、ぼけにより信号成分が 1/5 以下になる帯域においては雑音成分が信号成分と同等、もしくはそ