

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業(H17-ナノ一般-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19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20(2008)年 3月

目 次

I. 統括研究報告書

生体組織のナノレベル超音波診断
東北大学 加齢医学研究所 准教授
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高分解能化と小脳 glia 細胞の観察
愛知工業大学 工学部 電気学科 教授
穂積 直裕

9

2. 高周波数超音波画像の定量的解析
本多電子株式会社 研究開発部 部長
小林 和人

15

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

19

IV. 研究成果の刊行物・別刷

22

生体内超音波ナノ・イメージング法の開発 生体組織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 准教授）

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19年度には、前年度までに開発した超音波ナノ・イメージング装置により、生体組織のイメージングを行った。マウスに吸入麻酔を施し、肝臓表面を露出させ、薄いプラスチック板を接触させることで、腫瘍組織と正常組織、あるいは正常組織と線維化組織の相違について細胞レベルで検討するイメージングが可能で、当初の目標とした 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が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。

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-

ブ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。

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 19 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生体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 18 年度までに試作したシステムを改造し、スキヤンの安定化を図るために、ピ

エゾドライブによる振動子の走査を行った。これにより、走査部の軽量化が可能となり、さらに、振動子とその周囲のプラスチックケースを任意の角度に調整し保持できるようなスタンドを作製することで、マウスを生きたままで観察台の上に載せて観察することのできるシステムが完成した。

図 1 はシステムの模式図を示す。

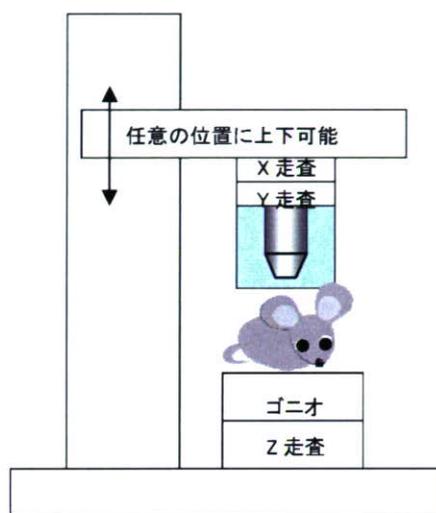


図 1 システムの模式図

(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、当初目的としていた 1.2GHz までの高周波数超音波振動子により、組織表面の細胞 1 個までがイメージングできる解像度を実現した。

(3) 長焦点超音波振動子と B モードの開発

本研究では、組織表面 10 ミクロン程度までの組織の情報を可視化していたが、*in vivo* 生体計測においては、解像度をやや犠牲にしても深くまで観察するモードも必要であるので、前年度までに開発した超音波振動子よりも開口を大きくし、焦点を深くすることで、表面下 3mm 程度まで、通常の超音波断層診断と同様の B モード像が観察可能

なシステムを構築した。図 2 は各振動子の音場を示したものである。

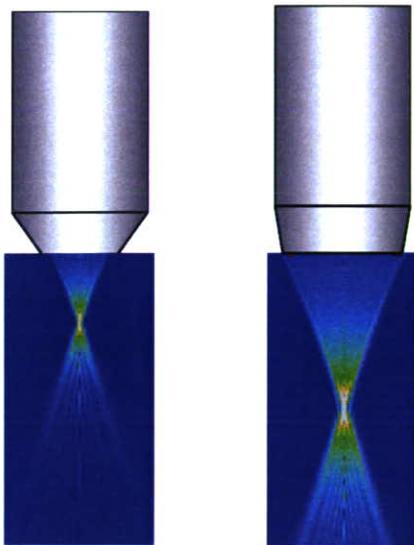


図 2 超音波振動子と音場
(左:開口 1.2mm、焦点 1.5mm
右:開口 2.4mm、焦点 3.2mm)

(4) 超音波受信装置の改造

高速デジタルカードにオンボードメモリを増設することで、受信超音波信号の平均化が高速に行うことができるようになった。また、従来よりも多くのパルス数の平均化を行うことで、S/N 比が向上し、画質の向上につながった。

(5) 組織と接触させるプラスチック板の材質

平成 18 年度には、組織と接触させるプラスチック板の材質としてポリメチル・ペンテン膜を用いていた。これは、水および生体組織との固有音響インピーダンスの差が適度だからであるが、厚みの加工が難しく、高周波数超音波を透過しにくいことがわかっていた。このため、平成 19 年度には厚さ 25 ミクロンのガス透過性特殊フィルムを用い、高周波数超音波が組織に達しやすいような状況を作った。

2. 生体組織の画像化アルゴリズム

(1) 超音波インピーダンス像

図 3 は平成 19 年度に作製したナノ・イメージングシステムの超音波インピーダンス像描出における超音波の進行の模式図を示す。

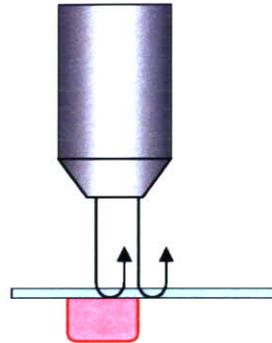


図 3 超音波の進行
(左:組織とプラスチックの間からの反射
右:参照とプラスチックの間からの反射)

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、その下に観察対象を置き、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。音響物性が既知である参照物質を同時に観察する。参照物質を観察対象と同視野に入れて観察できない場合は、同条件で別途参照物質のみを観察する。

入射が基板に垂直であると近似できるなら、参照信号と比較された測定対象信号は、以下の式によって音響インピーダンスに変換することができる。

$$Z_{tgt} = \frac{1 + \frac{S_{tgt}}{S_0}}{1 - \frac{S_{tgt}}{S_0}} \cdot Z_{sub} = \frac{1 - \frac{S_{tgt}}{S_{ref}} \cdot \frac{Z_{sub} - Z_{ref}}{Z_{sub} + Z_{ref}}}{1 + \frac{S_{tgt}}{S_{ref}} \cdot \frac{Z_{sub} - Z_{ref}}{Z_{sub} + Z_{ref}}} \cdot Z_{sub}$$

ここで、 S_0 は送信波形、 S_{tgt} と S_{ref} は測定対象と参照材料からの反射である、 Z_{tgt} 、 Z_{ref} と Z_{sub} はそれぞれ測定対象、参照材料そして基板の音響インピーダンスである。

(2) 超音波 B モード像

組織の表面よりも深い部位での画像化を行うために、受信した RF 信号を通常の超音波断層像を作成するアルゴリズムでイメージプロセッシングを行い、超音波 B モード増を作成した。このとき、中心周波数は 100MHz で、解像度は 15 ミクロン程度である。

3. 生体組織のイメージング例

図 4 は平成 19 年度に作製したナノ・イメージングシステムによるマウスの正常肝臓の表面像である。

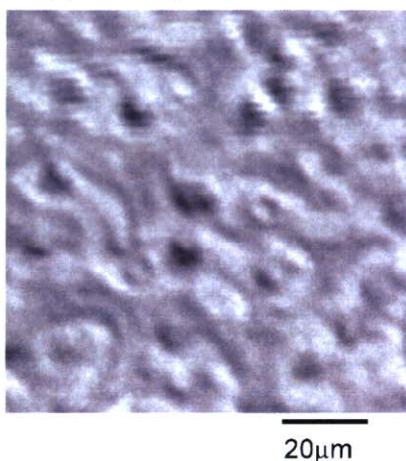


図 4 マウスの正常肝臓

図 5 は肝臓に発生した腫瘍部分である。

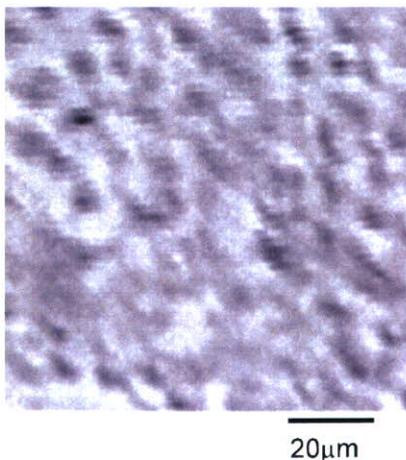


図 5 マウスの腫瘍組織

図 6 は、正常肝細胞と線維化組織が同一視野の中に認められ、音響インピーダンスの違いが明瞭に認められる。

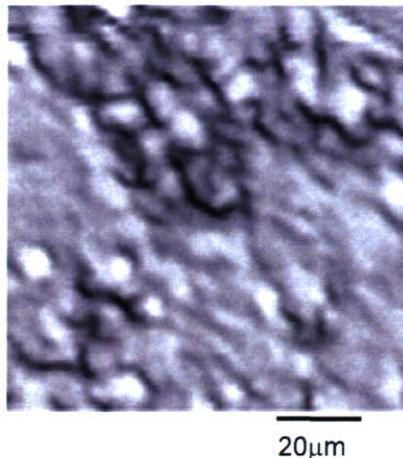


図 6 マウスの正常肝臓と線維化組織

このように、周波数ナノスケールに及ぶ超音波を用いることで、表面組織が細胞レベルで観察することができ、正常組織と腫瘍組織の鑑別や線維化組織の鑑別などが可能であることが実証された。

図 7 は皮膚モデルの B モード像で、深さ 3mm までの観察が可能であった。実用的には、この B モードで組織全体の様子を観察し、標的部位を絞ってナノ・イメージングを行うことを想定した。

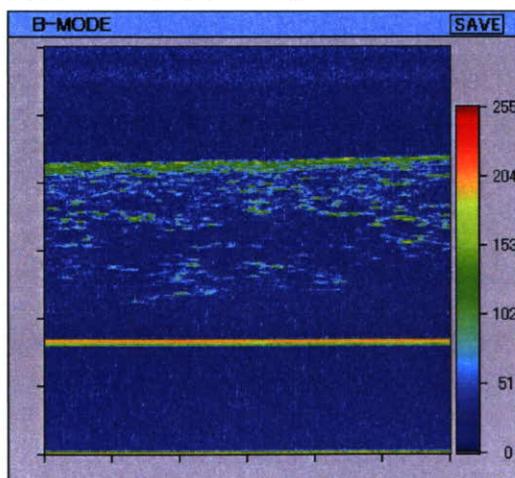


図 7 皮膚モデルの B モード像

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19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生体組織表面形状の可視化を実現した。マウス肝組織にプラスチック板を接触させるだけで、高解像度のイメージングが可能で、*in vivo*において細胞レベルでの診断が可能である。

本方式により、超音波顕微鏡研究は研究室レベルから臨床レベルへと一気に発展し、特に脳神経外科や心臓の外膜側など、術前の組織診断が難しい領域の術中診断への応用により、より多くの国民の健康に福音をもたらすものと考えられた。

E. 結論

平成19年度には、前年度までに開発した超音波ナノ・イメージング装置により、生体組織のイメージングを行った。マウス

に吸入麻酔を施し、肝臓表面を露出させ、薄いプラスチック板を接触させることで、腫瘍組織と正常組織、あるいは正常組織と線維化組織の相違について細胞レベルで検討しうるイメージングが可能で、当初の目標とした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) Saijo Y, Hozumi N, Kobayashi K, Okada N, Santos Filho ED, Sasaki H, Yambe T, Tanaka M. Ultrasonic tissue characterization of atherosclerosis by a speed-of-sound microscanning system. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*. Vol. 54, No. 8: 1571-1577, 2007.
- 2) Hattori K, Sano H, Saijo Y, Kita A, Hatori M, Kokubun S, Itoi E. Measurement of soft tissue elasticity in the congenital clubfoot using scanning acoustic microscope. *J Pediatr Orthop B*. Vol. 16, No. 5: 357-362, 2007.
- 3) Tanaka A, Saijo Y. Blood flow visualization of left atrial spontaneous echo contrast (SEC) using gradient based optical flow estimation. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. Vol. 1: 4500-3, 2007.
- 4) Shiraishi Y, Yambe T, Saijo Y, Sato F, Tanaka A, Yoshizawa M, Ogawa D, Wada Y, Itoh S, Sakata R, Park Y, Uematsu M, Umezu M, Fujimoto T, Masumoto N, Liu H, Baba A, Konno S, Nitta S, Imachi K, Tabayashi K, Sasada H, Homma D. Morphological approach for the functional improvement of an artificial myocardial assist device using shape memory alloy fibres. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. Vol. 1: 3974-7, 2007.

- 5) Saijo Y, Hozumi N, Kobayashi K, Okada N, Ishiguro T, Hagiwara Y, Dos Santos Filho E, Yambe T. Ultrasound speed and impedance microscopy for in vivo imaging. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* Vol. 1: 1350-3, 2007.
 - 6) Liu H, Luo Y, Higa M, Zhang X, Saijo Y, Shiraishi Y, Sekine K, Yambe T. Biochemical evaluation of an artificial anal sphincter made from shape memory alloys. *J Artif Organs.* Vol. 10: 223-227, 2007.
 - 7) Okazaki T, Ebihara S, Asada M, Yamanda S, Saijo Y, Shiraishi Y, Ebihara T, Niu K, Mei H, Arai H, Yambe T. Macrophage colony-stimulating factor improves cardiac function after ischemic injury by inducing vascular endothelial growth factor production and survival of cardiomyocytes. *Am J Pathol.* Vol. 171, No. 4: 1093-1103, 2007.
 - 8) Saijo Y, Hagiwara Y, Kobayashi K, Okada N, Tanaka A, Hozumi N, Tomihata K. B-mode and C-mode imaging of regenerated 3D skin model with 100 MHz ultrasound. *Proc 2007 IEEE International Ultrasonics Symposium:* 244-247, 2007.
 - 9) Hozumi N, Nakao A, Terauchi S, Nagao M, Yoshida S, Kobayashi K, Yamamoto S, Saijo Y. Precise calibration for biological acoustic impedance microscope. *Proc 2007 IEEE International Ultrasonics Symposium:* 801-804, 2007.
 - 10) Santos Filho E, Saijo Y, Tanaka A, Yambe T, Yoshizawa M. Fractal dimension of 40 MHz intravascular ultrasound radio frequency signals. *Ultrasonics*, 2007 Nov 7 [Epub ahead of print]
 - 11) Santos Filho E, Saijo Y, Tanaka A, Yoshizawa M. Detection and quantification of calcifications in intravascular ultrasound images by automatic thresholding. *Ultrasound Med Biol.* Vol. 34, No. 1: 160-165, 2008.
- 用. *Jap J Cardiovasc Cathet Therap.* Vol. 7, No. 2: 131-139. 2007.
- 2) 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.
 - 3) 西條芳文. 超音波顕微鏡により動脈硬化病変を見る. *Vascular Medicine.* Vol. 3, No. 3: 45-52, 2007.

2. 学会発表

(1) 国際学会

- 1) Saijo Y, Tanaka A, Saiki Y, Tabayashi K, Yambe T. Two-dimensional blood flow vector in left atrium obtained by pattern matching. *International Congress on Ultrasonics 2007.* Vienna, Austria, Apr 10, 2007.
- 2) Iwamoto T, Saijo Y, Tanaka A, Santos Filho ED, Li S, Yoshizawa M. Coronary plaque classification with intravascular ultrasound radio-frequency signal analysis using self-organizing map. *International Congress on Ultrasonics 2007.* Vienna, Austria, Apr 10, 2007.
- 3) Hattori K, Sano H, Saijo Y, Itoi E. Tissue sound speed of anterior cruciate ligament in estrogen-controlled rabbits - a measurement using the scanning acoustic microscope. *International Congress on Ultrasonics 2007.* Vienna, Austria, Apr 10, 2007.
- 4) Sasaki H, Saijo Y. Ultrasonic tissue characterization of thrombus in coronary atherosclerosis. *International Congress on Ultrasonics 2007.* Vienna, Austria, Apr 12, 2007.
- 5) Saijo Y, Kobayashi K, Hozumi N, Santos Filho ED, Yambe T. Ultrasonic nano-imaging of living cells. *International Congress on Ultrasonics 2007.* Vienna, Austria, Apr 12, 2007.
- 6) Saijo Y, Tanaka A, Santos Filho ED, Iwamoto T, Li S, Yambe T. Visualization of vulnerable plaque by multiple parametric IVUS. *International Congress on Ultrasonics 2007.*

(2) 和文論文

- 1) 西條芳文. パラメトリック IVUS の臨床応

Vienna, Austria, Apr 12, 2007.

- 7) Saijo Y, Hozumi N, Kobayashi K, Okada N, Hagiwara Y, Sasaki H, Santos Filho ED, Yambe T. Ultrasonic nano-imaging system for medicine and biology. *29th International Symposium on Acoustical Imaging*. Shonan, Japan, Apr 18, 2007.
- 8) Hagiwara Y, Chimoto E, Ando A, Saijo Y, Itoi E. Elastic changes of capsule in a rat knee contracture model assessed by scanning acoustic microscopy. *29th International Symposium on Acoustical Imaging*. Shonan, Japan, Apr 18, 2007.
- 9) Hozumi N, Terauchi S, Nagao M, Yoshida S, Kobayashi K, Yamamoto S, Saijo Y. Development of acoustic impedance microscope and its biological and medical applications. *29th International Symposium on Acoustical Imaging*. Shonan, Japan, Apr 18, 2007.
- 10) Saijo Y, Hozumi N, Kobayashi K, Okada N, Ishiguro T, Hagiwara Y, Dos Santos Filho E, Yambe T. Ultrasound Speed and Impedance Microscopy for in vivo Imaging. *29th IEEE EMBS Annual International Conference*, Lyon, France, Aug 23, 2007.
- 11) Saijo Y, Hagiwara Y, Kobayashi K, Okada N, Tanaka A, Hozumi N, Tomihata K. B-mode and C-mode imaging of regenerated 3D skin model with 100 MHz ultrasound. *2007 IEEE International Ultrasonics Symposium*, New York, USA, Oct 29, 2007.
- 12) Hozumi N, Nakao A, Terauchi S, Nagao M, Yoshida S, Kobayashi K, Yamamoto S, Saijo Y. Precise calibration for biological acoustic impedance microscope. *2007 IEEE International Ultrasonics Symposium*, New York, USA, Oct 30, 2007.

(2) 国内学会

- 1) Saijo Y, Tanaka A, Santos Filho ED, Iwamoto T, Yambe T. Development of IVUS attenuation imaging and comparison with multiple parametric imagings. 日本循環器学

会第 71 回学術集会. 神戸, 2007 年 3 月 15 日.

- 2) 藤田雅史、高山沙織、塩入裕樹、小山二郎、堀口聡、井上寛一、田中明、西條芳文. IVUS Attenuation Imaging による冠動脈深部の音響特性解析. 第 18 回日本心エコー図学会学術集会. 軽井沢, 2007 年 4 月 13 日.
- 3) 西條芳文、穂積直裕、小林和人、Esmeraldo dos Santos Filho. 生体内超音波ナノ・イメージング法の開発. 第 46 回日本生体医工学会大会. 仙台, 2007 年 4 月 26 日.
- 4) 西條芳文、穂積直裕、小林和人、Santos Filho Esmeraldo. 生体内超音波ナノ・イメージング法による線維芽細胞の可視化. 日本超音波医学会第 80 回学術集会. 鹿児島, 2007 年 5 月 19 日.
- 5) 西條芳文、田中明、田林暁一、山家智之. オプティカルフロー法による心血管内血流の可視化. 第 55 回日本心臓病学会. 千葉, 2007 年 9 月 11 日.

3. 招待講演

(1) 海外での招待講演

- 1) Saijo Y: Recent Progress of Biomedical Acoustic Microscopy and Multiple Parametric IVUS Imaging at Tohoku University. *Invited lecture at Paris-Sendai Symposium on Ultrasonic Tissue Characterization and Small Animal Imaging*, Paris, France, Apr 6, 2007.
- 2) Saijo Y: Toward in vivo acoustic microscopy in medicine and biology. *Invited lecture at Fraunhofer Institute of Biomedical Engineering*, Saarbruecken, Germany, Apr 13, 2007.

H. 知的所有権の取得状況

なし

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高分解能化と小脳 glia 細胞の観察

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19年度は、前年度試作した音響インピーダンス顕微鏡の分解能を向上させ、細胞レベルの観察が行えるようにした。中心周波数 300 MHz の振動子をパルス電圧で駆動し、200~400 MHz 程度に広がる広帯域超音波パルスを発生させた。前年度まで基板として使用してきたプラスチックシャーレを改良し、シャーレ底面に貼付けた 50 μ 厚の PET フィルムを基板として利用することで、焦点距離の短い高周波振動子に対応できるようにした。このフィルム上にラット由来のグリア細胞を培養し、音響インピーダンスによる非接触観察を試みた。

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。本報告者らの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、この顕微鏡装置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。

昨年度は、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

組織観察・定量評価を行い顕微鏡の有用性を評価した。本年度は画像分解能を向上させ、細胞レベルの観察を行った。

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測定の概要を示す。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、その上に観察対象を

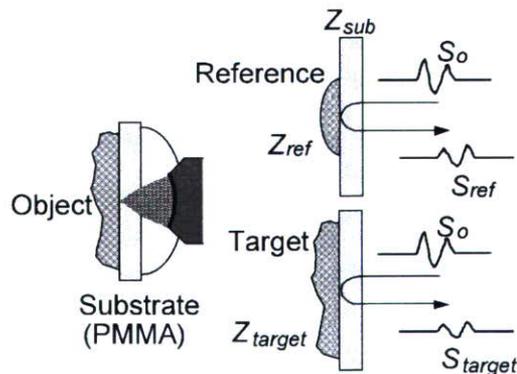


図1 音響インピーダンス顕微鏡の原理。

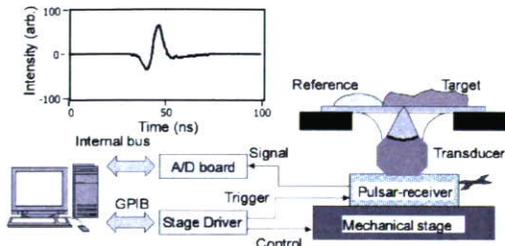


図 2 システム概要図。

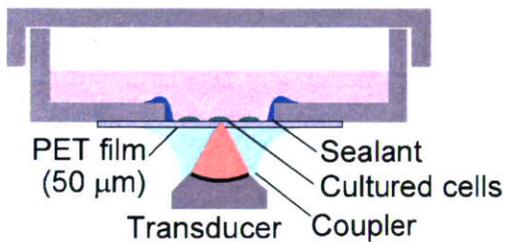


図 3 観察系。

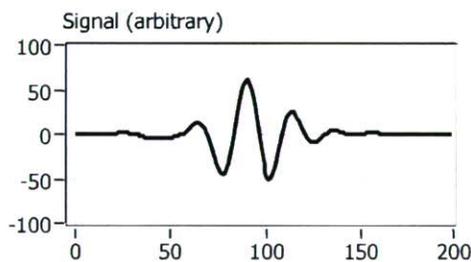


図 4 超音波信号波形。横軸は ns。

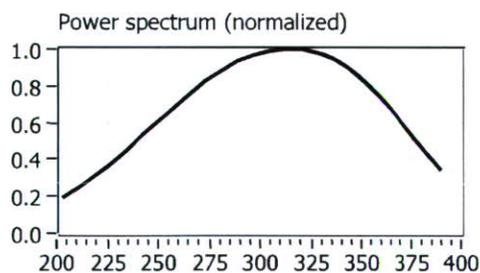


図 5 パワースペクトル。横軸は MHz。

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。音響物性が既知である参照物質を同時に観察する。参照物質を観

察対象と同視野に入れて観察できない場合は、同条件で別途参照物質のみを観察する。システムの概要を図 2 に示す。

本年度は高分解能観察のために特別に培養シャーレを加工し、底面に厚さ $50\mu\text{m}$ の PET フィルムを張った観察孔を設けた (図 3)。フィルム上にラット小脳アストロサイトを培養し、底面側から焦点をフィルム上面に結んだ超音波を 2 次元走査しながら送受波した。図 4 は反射波形である。信号は 3 波程度のパルス波形であり、図 5 に示すように中心周波数 300 MHz で $200\sim 400\text{ MHz}$ 程度に広がるスペクトルをもつことが判っている。

C. 研究結果

C-1. 音響インピーダンスの較正

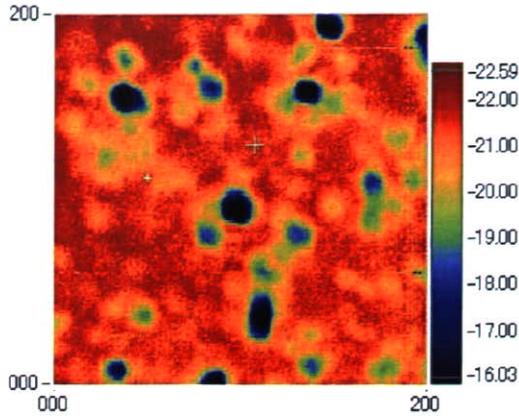
入射が基板に垂直であると近似できるなら、参照信号と比較された測定対象信号は、以下の式によって音響インピーダンスに変換することができる。

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

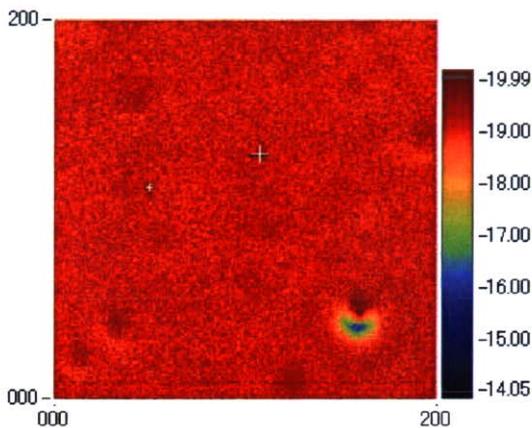
ここで、 S_0 は送信波形、 S_{tgt} と S_{ref} は測定対象と参照材料からの反射である、 Z_{tgt} 、 Z_{ref} と Z_{sub} はそれぞれ測定対象、参照材料そして基板の音響インピーダンスである。基板には厚さ 0.8 mm のポリスチレンシャーレ ($Z_{sub}=2.46\text{ MNs/m}^3$) を用い、参照材料として純水 ($Z_{ref}=1.49\text{ MNs/m}^3$) を別途観察した。

C-2. 基板フィルムの選択

本年度は分解能を向上させるために、焦点距離が短く集束角が大きい振動子を使用



(a)不均一なフィルム



(b)均一なフィルム

図 6 フィルムに水のみを接触させたときの反射強度像。任意目盛。200×200 ミクロン。

している。このため、昨年度中心周波数 80 MHz の振動子とともに使用していた厚さ 500 ~ 1000 μm 程度のプラスチック基板では背面にビームを集束させることができない。そこで、厚さ 50 μm の PET フィルムを使用した。フィルムの評価のため、細胞を培養しない状態で図 1 に示したシャーレを水で満たし、焦点をフィルムと水の界面に結んで超音波による走査・観察を行った。フィルムによっては図 6(a)に示すように、水のみをターゲットとして観察しても模様が観

察される。これはプラスチックフィルム成形時の温度履歴や成形機の平滑性などに依存する内部の不均一性によるものと考えられる。このような不均一なフィルムは使用できない。

適切なフィルムを選択することにより、図 6(b)のような比較的均一な強度分布が得られる。入手できる市販フィルムの銘柄の中からこのようなフィルムを慎重に選択し使用することが必要である。

C-3. 培養細胞の音響インピーダンス像

図 7 に培養 glia 細胞の光学顕微鏡像、図 8 に音響インピーダンス顕微鏡で観察された画像の一例を示す。音響インピーダンス像の画素は 2 μm 毎に並んでいるが、焦点径は概ね 3~4 μm 程度と考えられる。細胞試料は音響物性が明らかでない培養液で満たされているため、これとは別に純水を満たした試料を観察し、水を基準として細胞の音響インピーダンスを校正した。細胞組織の音響インピーダンスは 1.55 ~ 1.65 MN/m^3 程度と表示されているが、集束角が大きいいため、垂直入射を仮定して校正された表示値は、真値より若干大きく計算されていると考えている。今後斜め入射を考慮した補正により正しい値に近づける。

アストロサイトの突起とひだ上偽足（ラメリポディア）など、グリア細胞の特徴を示す形状が現われており、光学顕微鏡による観察結果と形態学的によく一致する画像となっている。

正確に形状が観察できるのは細胞とフィルムが接触する部分のみであるため、光学顕微鏡による観察結果とは完全に一致しないが、非接触で物性値を定量化して観察できる利点があるので、培養細胞の状態モニタツールとしての有用性が期待できると

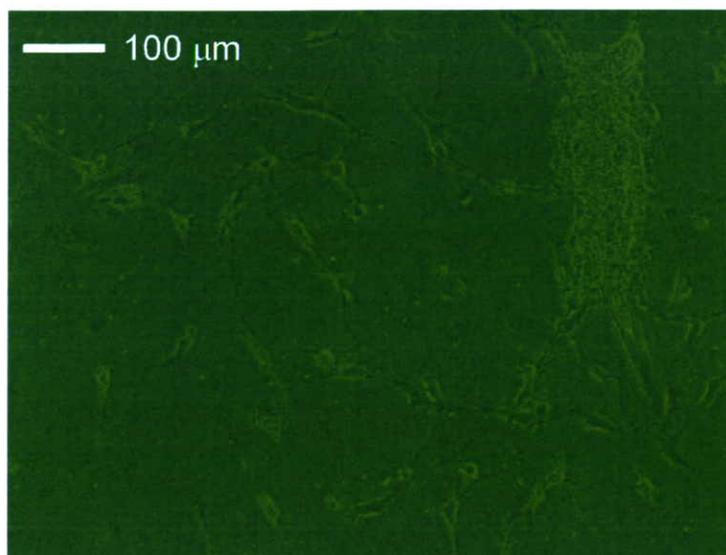


図7 glia 細胞の光学顕微鏡像。

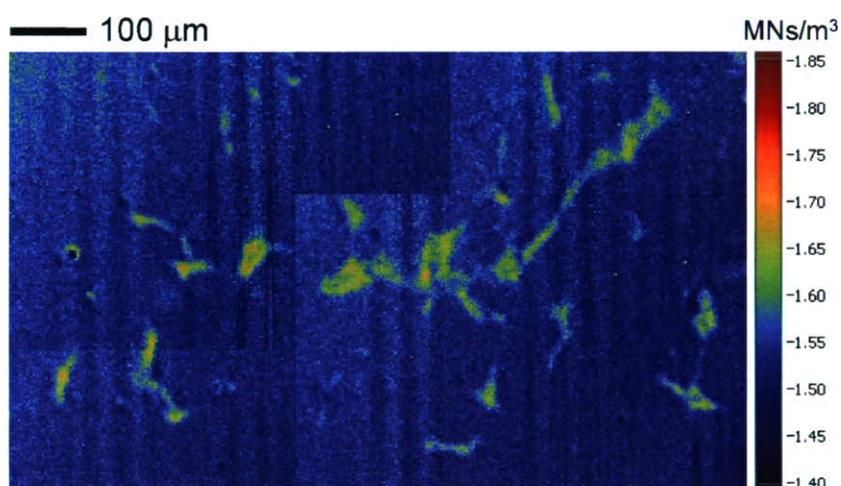


図8 glia 細胞の音響インピーダンス画像。

考えている。

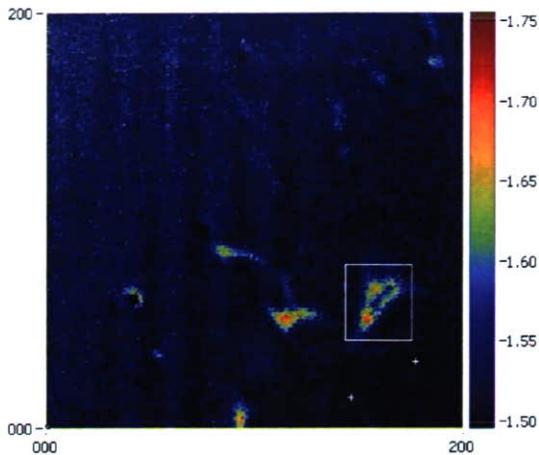
C-4. 音響インピーダンスの分布

図2は音響インピーダンス分布を示したものである。バックグラウンドが異なっているのは異なる媒質を使用しているためである。音響インピーダンスが高いところと低いところがある。

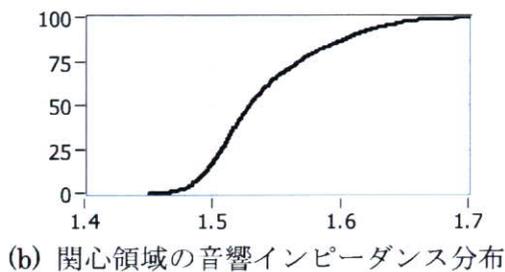
図10(a)に示した四角い領域の音響イン

ピーダンスの分布を調べた結果を同図(b)に示す。累積確率で表示されているので、これを微分すると確率密度分布が得られる。領域には細胞と接触していない部分すなわち培養液と接触している部分が含まれる。培養液と接触する部分のみの音響インピーダンス測定値の分布は同図(c)のようになっている。一様な媒質であるにもかかわらずこのような分布をもつのは、測定系のノイ

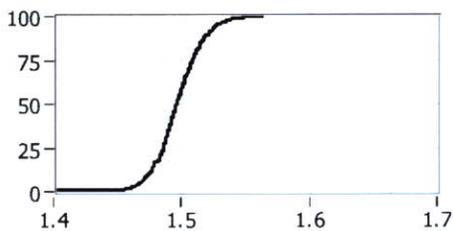
ズとフィルムの不均一性に由来すると考えている。この分布を考慮し、関心領域の音



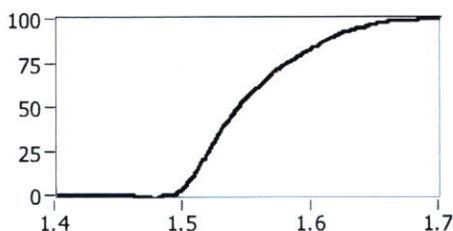
(a) 関心領域の設定



(b) 関心領域の音響インピーダンス分布



(c) 細胞がない部分の音響インピーダンス分布



(d) 分離された細胞部分の音響インピーダンス分布

図 10 ラットの小脳組織観察結果。横軸 MNs/m³、縦軸%。

響インピーダンス分布を細胞部分と媒質部分に分離した結果を同図(d)に示す。

斜め入射の補正をしていないため、正しい音響インピーダンスよりも若干高い値を表示していると考えられるが、相対比較と分布形状の把握という目的からは問題が少ないと考えている。これは必要な補正パラメータを得て将来補正できるようにする。

glia 細胞の音響インピーダンスは 1.5 から 1.7 MNs/m³ に亘る広い範囲に分布している。また、分布の形状から、単一の正規分布ではなく、少なくとも 2 種類の分布から構成されているように見える。核と周辺部に明確に分かれることに原因していると考えられる。

D. 結論

音響インピーダンス顕微鏡により非接触で培養細胞を観察できることを示した。音響インピーダンス顕微鏡により非接触で培養細胞を定量情報とともに観察できることを示した。これにより、形態のみでなく、音響物性にもとづく細胞の識別が可能となることが示唆されたと考えている。今後は画像分解能の向上、定量測定の高精度化を図るとともに、いくつかの異なる細胞を観察し、医学生物学への応用を拡げる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

F-1.論文

- 1) 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

- 2) N. Hozumi, A. Nakano, S. Terauchi, M. Nagao, S. Yoshida, K. Kobayashi, S. Yamamoto & Y. Saijo: "Development of Biological Acoustic Impedance Microscope and Its Error Estimation", *Modern Physics Letters B* 投稿中

F-2.学会発表

F-2-1.国際会議

- 1) N. Hozumi, A. Nakano, S. Terauchi, M. Nagao, S. Yoshida, K. Kobayashi, S. Yamamoto & Y. Saijo: "Development of Biological Acoustic Impedance Microscope and Its Error Estimation", 2nd International Conference on Advanced Nondestructive Evaluation (ANDE), Busan, Korea, Oct. 17-19, 2007, SO-13, .
- 2) N. Hozumi, A. Nakano, S. Terauchi, M. Nagao, S. Yoshida, K. Kobayashi, S. Yamamoto & Y. Saijo: "Precise Calibration for Biological Acoustic Impedance Microscope", 2007 IEEE International Ultrasonic Symposium, New York, USA, Oct. 28-31, 2007, No. 9D1, pp.801-804.

F-2-2.口頭発表

- 1) 中野愛子, 穂積直裕, 寺内智, 長尾雅行, 吉田祥子, 小林和人, 山本清二, 西條芳文: "音響インピーダンス顕微鏡による培養細胞の非接触観察", 平成19年度電気関係学会東海支部連合大会 No. O-288 (2007).
- 2) 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: "

生体組織用音響インピーダンス顕微鏡の精度評価—集束角の影響解析—", 平成19年度電気関係学会東海支部連合大会 No. O-287 (2007).

- 3) 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: "生体組織用音響インピーダンス顕微鏡の較正—集束角の影響解析と小脳組織観察—", 平成20年電気学会全国大会 No. 1-123 (2008).
- 4) 中野愛子, 穂積直裕, 寺内智, 長尾雅行, 吉田祥子, 小林和人, 山本清二, 西條芳文: "音響インピーダンス顕微鏡による培養細胞の定量評価", 平成20年電気学会全国大会 No. 1-124 (2008).
- 5) 浜川佑也, 穂積直裕, 寺内智, 長尾雅行, 吉田祥子, 小林和人, 山本清二, 西條芳文: "生体組織用音響インピーダンス顕微鏡の較正—食塩水による精度評価—", 平成20年電気学会全国大会 No. 1-125 (2008).
- 6) 糟谷智美, 穂積直裕, 寺内智, 長尾雅行, 吉田祥子, 小林和人, 山本清二, 西條芳文: "開口合成による3次元超音波顕微鏡の基礎検討", 平成20年電気学会全国大会 No. 1-126 (2008).
- 7) 穂積直裕: "パルス静電応力法から医学生物学用超音波顕微鏡ができるまで", 第38回電気学会電気電子絶縁材料システムシンポジウム C-1, pp.67-70 (2007).

F-3.新聞報道

該当なし

G.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 高周波数超音波画像の定量的解析

分担研究者 小林和人
(本多電子株式会社 研究部)

研究要旨

生体内超音波ナノ・イメージングを目指した超音波発生装置の開発および信号解析を行った。おもな成果を以下に示す。

- (1) 500MHz 程度まで広がる広帯域パルス超音波を送受信し、リニアモーターでトランスデューサの機械走査を行う顕微鏡システムを試作した。
- (2) 開発した装置を用いて培養細胞の観察が可能であることを確認した

A. 研究目的

超音波顕微鏡の医学生物学分野における適用は、超音波顕微鏡開発当初から盛んに行なわれてきた。生体組織音速測定として生体試料を厚さ数ミクロンの厚さの切片を作成しスライドガラスに固定し、中心周波数 80MHz のパルス波を用い試料の表面と裏面からの反射を用い干渉法を応用して組織音響特性（組織音速・組織減衰）を計測する方法が提案された。この方式で、実際に無染色状態の癌組織・梗塞した心筋組織などについて観察結果が報告されて実用化されている。今後の医用分野での応用を考えると高分解能化を行い細胞一個レベルの観察の必要性がある。そこで、500MHz 程度までの帯域のある広帯域パルスを利用して細胞 1 個レベルの観察ができる超音波顕微鏡の開発を行い細胞の観察が可能となった。

B. 研究方法

1. 計測システムのご概念設計

従来の走査型の超音波顕微鏡は、図 1 に示すように厚さ数 μm の組織切片をガラス基板上に固定してトランスデューサからバースト波を放射し、組織表面と基板（組織背面）の 2 箇所からの反射波の合成波を検出している。

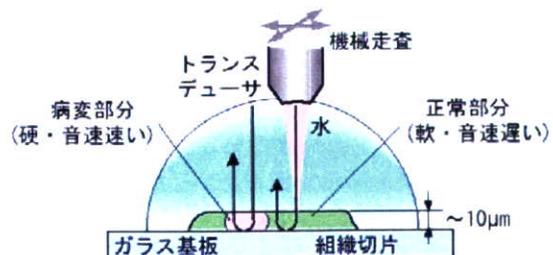


図 1 超音波顕微鏡による組織診断

これを、組織を置かない基板のみからの直接反射と比較し、両者の位相差を調べる。

試料厚さを仮定すれば位相差から音速が判るが、厚さは測定点によって異なるため、正確な測定のためには周波数を変化させた測定結果から試料厚さと音速を計算する必要がある。

パルス励起型は組織表面と背面からの反射が干渉した受波をフーリエ変換し、基板からの直接反射と比較することにより強度および位相スペクトルを得る。この測定で得られた信号強度の極小点または極大点の周波数を f_m 、そのときの位相を ϕ_m とすることで組織音速を求める方式がある。

この方式とは別に生きた組織の音響インピーダンス観察方法を提案してきた。この方式は音響物性が既知の樹脂板の上部に観察物と、やはり音響物性が既知のリファレンス物質をセットしリファレンス物質及び被観察物質を同じ視野内で測定を行う。リファレンスからの反射レベルを基準にすることで被観察物の音響インピーダンスの分布の測定が可能になる。音響インピーダンスのパラメータは生体組織観察においては組織音速と近似のパラメータである。

2. 観察システムの開発

超音波顕微鏡の測定は、視野領域を $0.6\text{mm} \times 0.6\text{mm}$ としてその視野内を視野平面内で 300×300 に分割し、1つの分割点に対して、1回の超音波を送信し、その反射波をデジタル化し、解析した結果を、1ピクセルごとの色情報として表示する。生体組織とトランスデューサの位置関係を、機械式ステージにて X-Y 方向制御しながらすべての分割点の超音波送受信を行なうことで、2次元画像を生成する。今回使用したステージとしてリニアステージで位置制御分解能は 100nm 、位置決め分解能 50nm のものを採用した。

測定した生体組織を 2次元の画像として

十分に認識するため、このステージを利用して、 $0.6\text{mm} \times 0.6\text{mm}$ の視野幅を細胞観察に必要な分解能を得るために 300×300 ピクセルの解像度で表示した。そこで、 300×300 ピクセル（1ステップ $2\mu\text{m}$ ）の画像を生成することが可能となった。動作の振動などを考慮してリニアステージを採用し 300×300 ポイントの 9000 点の各点にて 8 回の測定を行いその平均をとるシステムを完成させた。

次に、 500MHz までの帯域のあるパルス波を送信する送信機と 500MHz まで帯域のある受信回路を設計し、S/N を考慮してセンサーに直結できる構造で送受信ユニットを設計・作製を行った。

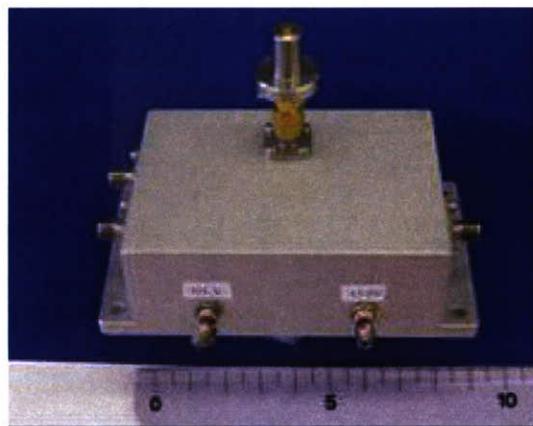


図 2 送受信ユニットの外観

送信機の性能は図 3 に示すように、 0.8nsec の立下り時間を持ち送信帯域として 600MHz までの帯域をカバーできる。

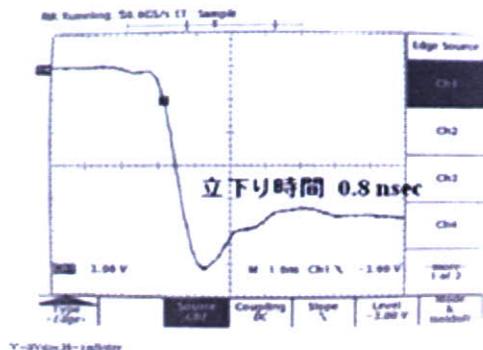


図3 送信機の性能

受信機の性能は、図4に示すように、20MHzから750MHzまでの帯域をカバーする。

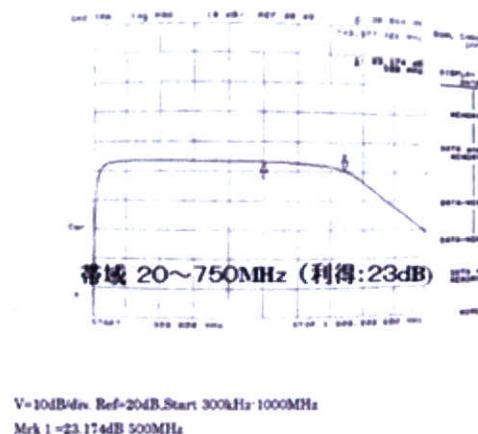


図4 受信機の性能

C. 結果

1. 医療分野での組織音速測定

今回完成したシステムに400MHz中心周波数のセンサーを取り付け、図5に示すように、50 μ m厚のPETフィルム上で培養した細胞をPETフィルムを透過して観察を行った。

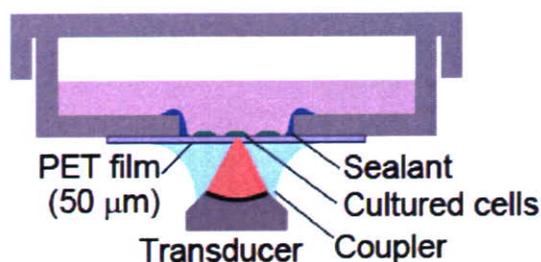


図5 細胞観察の方法

その結果、細胞のアストロサイトの突起と膜状仮足（ラメリポディア）など、グリア細胞の特徴を示す形状を観察することができ、光学顕微鏡による観察結果と形態学的によく一致する画像となった。

D. 結論

パルス励起超音波音速顕微鏡を高周波化を行い、生体細胞を0.6 \times 0.6mm幅視野を300 \times 300ピクセルにて観察を行い、細胞の観察が可能であることを確認した。

今後、500MHz・600MHzと振動子の周波数を上げてても対応できる装置は作製できたが、パルス励起の観点から、送信効率が劣化するので今回以上にS/Nの向上が必要になると考える。詳細な細胞の超音波観察は有用な情報を得られると考えるので、今後も1GHzパルスでの観察を目指して技術開発を行っていく。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Y. Saijo, N. Hozumi, K. Kobayashi, N. Okada,

- E.D. Santos Filho, H. Sasaki, T. Yambe, M. Tanaka. Ultrasonic tissue characterization of atherosclerosis by a speed-of-sound microscanning system. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*. Vol. 54, No. 8: 1571-1577, 2007.
- 2) Y. Saijo, N. Hozumi, K. Kobayashi, N. Okada, T. Ishiguro, Y. Hagiwara, E. Dos Santos Filho, T. Yambe. Ultrasound speed and impedance microscopy for in vivo imaging. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. Vol. 1: 1350-3, 2007.
 - 3) Y. Saijo, Y. Hagiwara, K. Kobayashi, N. Okada, A. Tanaka, N. Hozumi, K. Tomihata. B-mode and C-mode imaging of regenerated 3D skin model with 100 MHz ultrasound. *Proc 2007 IEEE International Ultrasonics Symposium*: 244-247, 2007.
 - 4) N. Hozumi, A. Nakao, S. Terauchi, M. Nagao, S. Yoshida, K. Kobayashi, S. Yamamoto, Y. Saijo. Precise calibration for biological acoustic impedance microscope. *Proc 2007 IEEE International Ultrasonics Symposium*: 801-804, 2007.
 - 5) 小林和人、穂積直裕、西條芳文、大槻茂雄. パルス励起法による生体組織用超音波顕微鏡の実用機開発. 日本音響学会誌, 62巻3号 (2006)
- T. Yambe. Ultrasound Speed and Impedance Microscopy for in vivo Imaging. *29th IEEE EMBS Annual International Conference*, Lyon, France, Aug 23, 2007.
- 4) Y. Saijo, Y. Hagiwara, K. Kobayashi, N. Okada, A. Tanaka, N. Hozumi, K. Tomihata. B-mode and C-mode imaging of regenerated 3D skin model with 100 MHz ultrasound. *2007 IEEE International Ultrasonics Symposium*, New York, USA, Oct 29, 2007.
 - 5) N. Hozumi, A. Nakao, S. Terauchi, M. Nagao, S. Yoshida, K. Kobayashi, S. Yamamoto, Y. Saijo. Precise calibration for biological acoustic impedance microscope. *2007 IEEE International Ultrasonics Symposium*, New York, USA, Oct 30, 2007.
 - 6) 小林和人、西條芳文、穂積直裕. 指向特性を利用した画像補正方法の検討」日本超音波医学会, 2007年5月
 - 7) 小林和人、西條芳文、穂積直裕. 超音波音速-インピーダンス顕微鏡による in vivo マイクロイメージングシステム. 日本音響学会, 2007年9月

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

2. 学会発表

- 1) Y. Saijo, K. Kobayashi, N. Hozumi, E.D. Santos Filho, T. Yambe. Ultrasonic nano-imaging of living cells. *International Congress on Ultrasonics 2007*. Vienna, Austria, Apr 12, 2007.
- 2) N. Hozumi, S. Terauchi, M. Nagao, S. Yoshida, K. Kobayashi, S. Yamamoto, Y. Saijo. Development of acoustic impedance microscope and its biological and medical applications. *29th International Symposium on Acoustical Imaging*. Shonan, Japan, Apr 18, 2007.
- 3) Y. Saijo, N. Hozumi, K. Kobayashi, N. Okada, T. Ishiguro, Y. Hagiwara, E. Dos Santos Filho,