

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17年度～19年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告

生体内超音波ナノ・イメージング法の開発に関する研究

東北大学 加齢医学研究所 准教授

西條 芳文

1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

30

III. 研究成果の刊行物・別刷

36

生体内超音波ナノ・イメージング法の開発

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 17～19 年度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。最終年度には、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。

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、現時点では数十マイ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マイ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、組織中を伝わる際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。図1は超音波顕微鏡による腎動脈血管平滑筋細胞像、図2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

顕微鏡による冠動脈の音速像である。



図1 超音波顕微鏡(周波数 1.1GHz)による腎血管平滑筋細胞

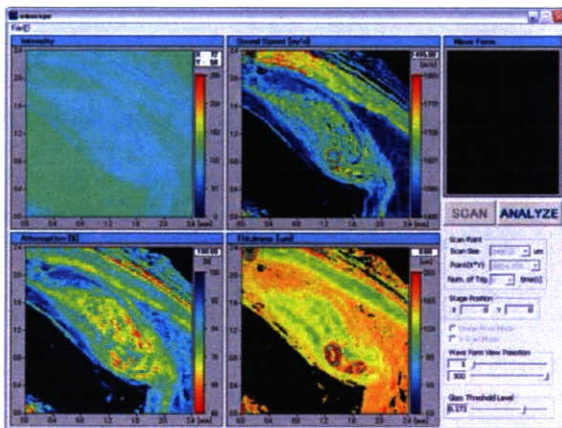
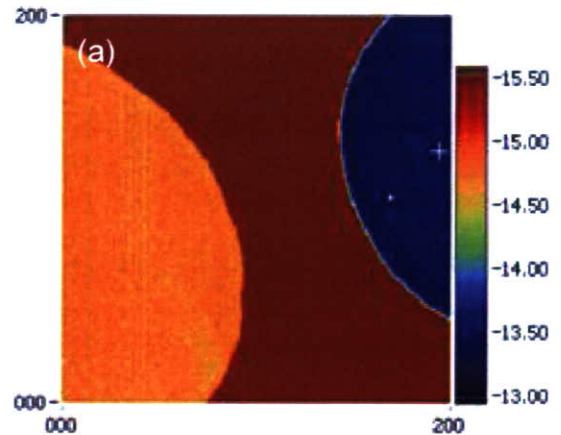


図2 平成 14～15 年度に開発したパルス励起型超音波顕微鏡による冠動脈の音速像

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片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)

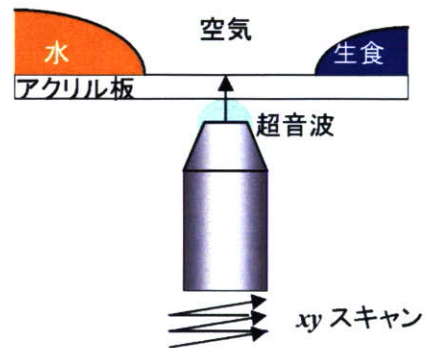


図 3(a) アクリル板上に滴下した水(左)と生理的食塩水(右)をアクリル板の裏側から見た像

図 3(b) 実験系の模式図

図 3(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ブにより観察した像である。図 3(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ブを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。

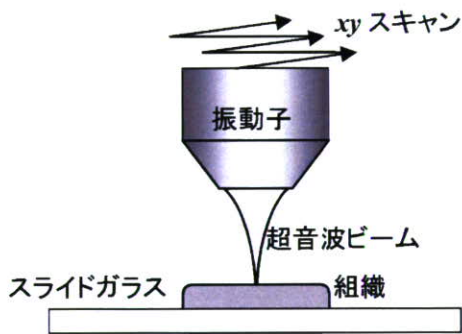


図4 従来の超音波顕微鏡

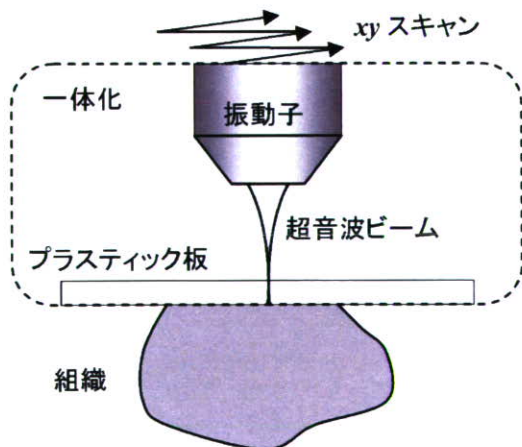


図5 本研究で提案するシステム

2. 超音波顕微鏡システムの概念設計

ナノスケールにおよぶ超音波生体イメージングを可能とするため、最大 1GHz 程度まで広がる広帯域超音波パルス波形の送受を想定した超音波顕微鏡システムの概念設計を行った。従来のバースト波形による方法では周波数を走査することにより強度および位相スペクトルを得、これを解析しているが、本研究で提案する方法では、広帯域の周波数成分を持つパルス波形を時間領域でデジタル計測し、周波数解析を行う。トランスデューサがもつ周波数特性を考慮し、測定に適した電圧パルス波形と、波形観測系を検討した。また、走査装置と信号測定系とのマッチングを考慮した全体システムの概念設計を行った。

図6に超音波顕微鏡の原理図を示す。生体試料は適当な厚さの切片または細胞組織の形で、基板上に固着している。基板にはガラスまたは適当な高分子材料を使用することができる。水を超音波媒体として、基板面に焦点を結ぶ超音波を照射し、反射波形を測定する。生体試料の音響物性によって反射波形が異なるので、これを解析する。

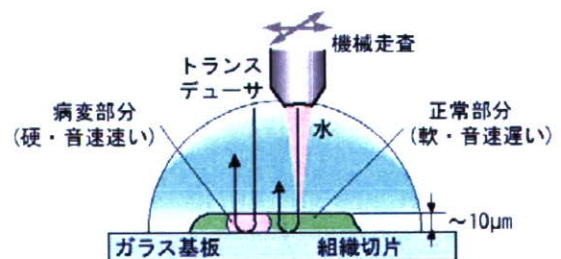


図6 超音波顕微鏡の原理図

図7に、平成17年度に開発した超音波顕微鏡システムの概略を示す。本研究では、数10ns程度の広がりをもつパルス超音波を利用する。波形の測定は汎用のデジタルオ

シロスコープを利用し、LAN ケーブルを介して制御用コンピュータに転送する。観察視野内の 1 点に対して 4 回程度の波形を平均化処理し、ノイズの低減を図っている。

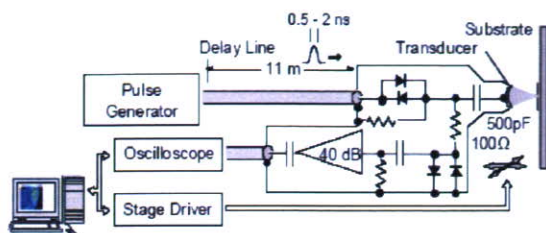


図 7 超音波顕微鏡システム

観察視野内を 200×200 ピクセル程度で機械走査しながら送受信を行うことにより、2次元のプロファイルが得られる。ナノスケールの位置分解能をもつ機械走査のため、平成 17 年度には、従来使用していたステッピングモータードライブによる XY 走査を、リニアモーターによる走査に変更した。

3. 音響インピーダンス顕微鏡

図 8 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なるように置き、広帯域音響パルスを基

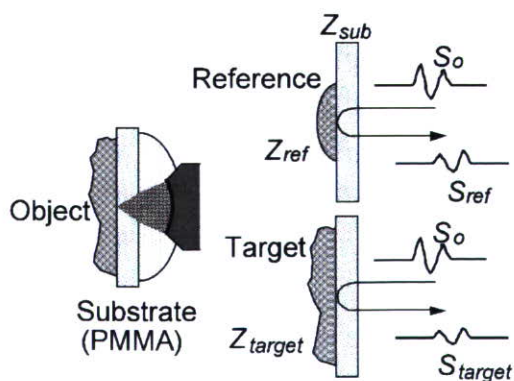


図 8 音響インピーダンス顕微鏡の原理

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。

音響インピーダンス顕微鏡システムの概要を図 9 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。

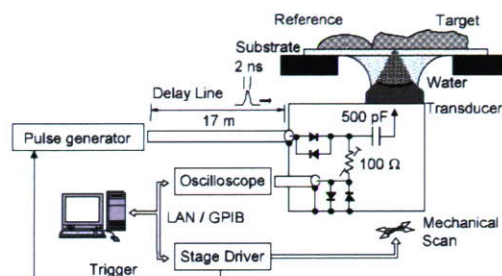


図 9 音響インピーダンス顕微鏡システム

図 10 は、平成 19 年度に開発した培養細胞の観察系で、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。後述するように、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。

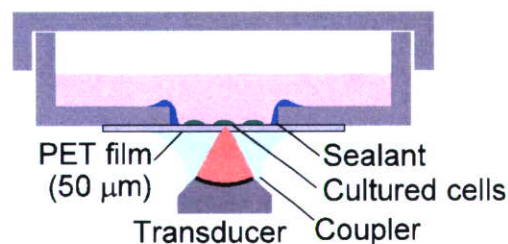


図 10 培養細胞の観察系

図 11 は、本研究における最終的な超音波ナノ・イメージングシステムの模式図で、

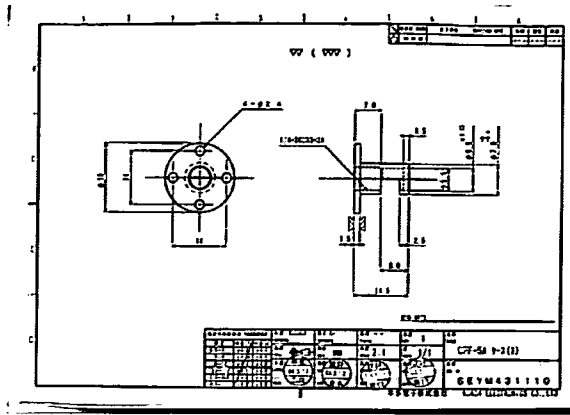
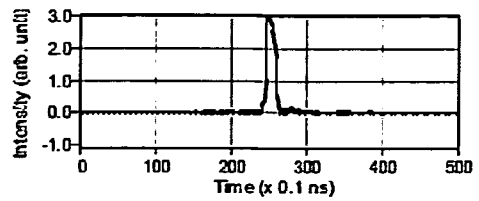


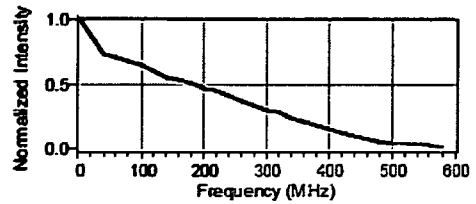
図 14 ケース図面

5. 超音波パルスの発生

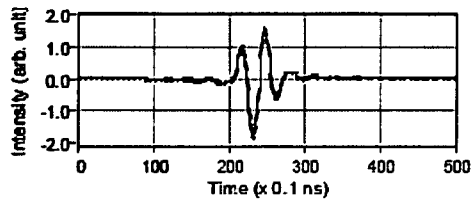
高速電子スイッチを用いたパルス発生器により、立ち上がり 400ps 以下、パルス幅 2ns 程度、先頭値 20~40V 程度の電気パルスを発生させた。図 15(a)に電気パルスの波形、同図(b)にスペクトルを示す。500MHz 程度まで広がるスペクトルが得られている。これをトランスデューサに入力し、水中でガラス基板焦点を結ぶように調整して超音波を照射したときに得られた反射波形を図 15(c)に示す。トランスデューサはサファイアロッドを使用した中心周波数 300MHz のものを採用した。トランスデューサがもつ周波数特性のため、超音波波形は電気パルスと異なる形状をもち、振動成分を含んでいる。超音波波形は同図(d)のように、概ね 100~500MHz の帯域まで広がる広帯域信号となっている。



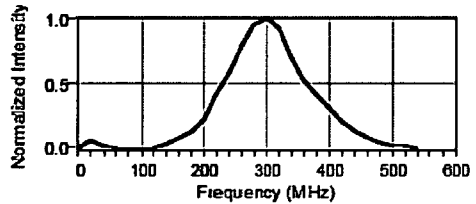
(a) 電気パルス。



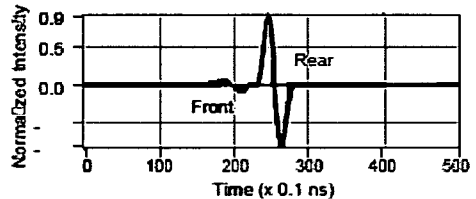
(b) 電気パルスの強度スペクトル。



(c) 基板からの反射超音波波形。



(d) 反射超音波の強度スペクトル。



(e) 細胞がある部分からの信号を基板露出部からの信号で規格化し、singletに対する応答を表示した波形。

図 15 電気信号と超音波波形

6. 超音波顕微鏡用信号処理アルゴリズムの作成

図 15(e)は、この処理を行ってインパルス応答を求めた後、シングレットに対する応答を描いたものである。得られた波形は試料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た。媒質の音速を c_0 、細胞内の音速を c 、試料の厚さを 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 ϕ_{front} および ϕ_{rear} とすると、

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

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

これより試料の厚みと音速は

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

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

で計算することができる。

7. 音響インピーダンス顕微鏡用のアルゴリズムの作成

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。

$$S_{target} = \frac{Z_{target} - Z_{sub}}{Z_{target} + Z_{sub}} S_0$$

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。

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

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。

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

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。

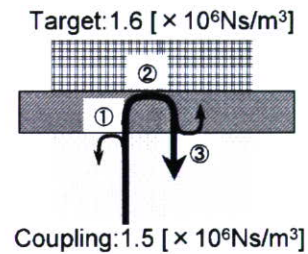


図 16 音響波の反射

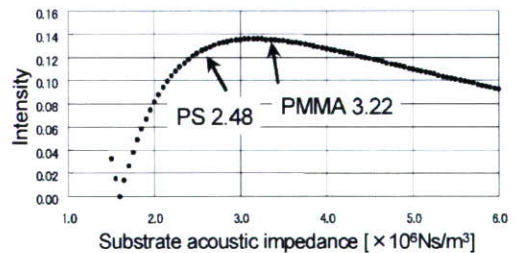


図 17 最適な基板の音響インピーダンス

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 16 に示すように、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 17 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。

8. 超音波ビーム特性を考慮した画像の改善

(1) 原理

超音波顕微鏡で送受信を行い画像化すると図 18 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。

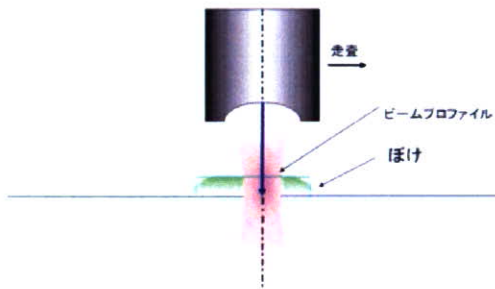


図 18 超音波顕微鏡におけるぼけ

このぼけを 1 次元的に捕らえると図 19 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。

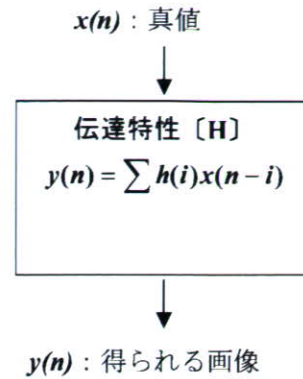


図 19 ぼけの仕組み

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。

$$\begin{aligned} \text{actual}(x, y) &= \iint h(u, v) \text{Ideal}(x-u, y-v) du dv \\ &= h(x, y) * \text{ideal}(x, y) \dots (1) \end{aligned}$$

($\text{ideal}(x, y)$) : 真の音響強度像

$\text{actual}(x, y)$: 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、

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

$$0 \{ \text{else} \}$$

$$\text{actual}(x, y) = \text{ideal}(x, y)$$

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、

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

$$IDEAL(\omega x, \omega y) = FT\{ideal(x, y)\} \\ ACTUAL(\omega x, \omega y) = FT\{actual(x, y)\} \\ H(\omega x, \omega y) = FT\{h(x, y)\}$$

($FT\{\}$ 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。

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

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

($IFT\{\}$ 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。

$$\{1/H(\omega x, \omega y)\} \\ = IDEAL_ref(\omega x, \omega y) / ACTUAL_ref(\omega x, \omega y) \\ \dots (4)$$

$$IDEAL_ref(\omega x, \omega y) = FT\{ideal_ref(x, y)\} \\ ACTUAL_ref(\omega x, \omega y) = FT\{actual_ref(x, y)\}$$

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。

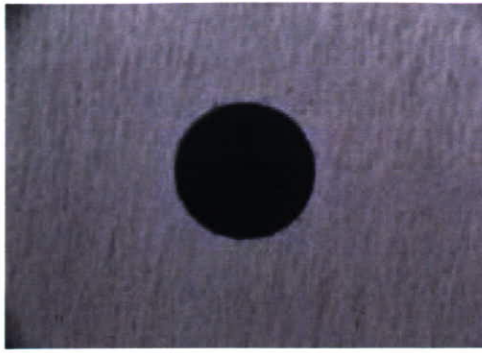
$$\{1/H(\omega x, \omega y)\} \\ = \frac{Amp\{IDEAL_ref(\omega x, \omega y)\}}{Amp\{ACTUAL_ref(\omega x, \omega y)\}} \dots (5)$$

(Amp は、 $\{\}$ 内の振幅成分を表す)

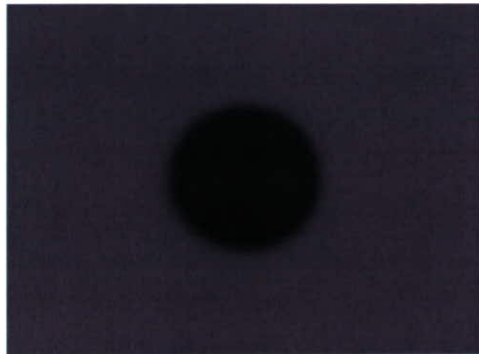
逆特性は、スカラー値で得られるため、(3)式においても単純な復元ゲインテーブルとして扱うことができる。

(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19(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同様であるとして、真の像を想定した。また、図19(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 19 リファレンス 100 μm 穴の
光学画像と超音波画像

(3) 復元ゲインテーブルの制限

ぼけの伝達関数は、図 20(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、もしくはそれ以上になっていた。この結果をもとに、

より多くの雑音が入る場合も想定して、図 20(b)のように復元ゲインテーブルの値は 3 倍に制限した。

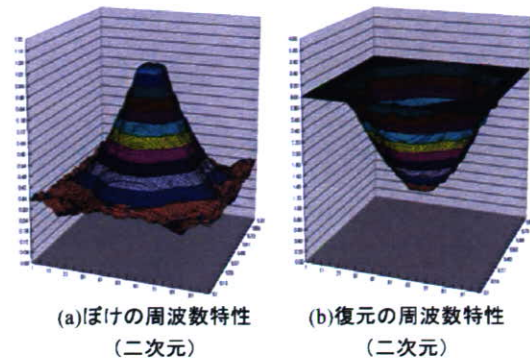


図 20 ぼけの周波数特性と復元の周波数特性

C. 研究結果

1. 高周波トランスデューサの開発

図 21 に加工されたサファイアレンズを示す。



図 21 サファイアレンズ

このサファイアレンズに 400MHz に $\lambda/4$ 整合する厚みの SiO_2 を RF スパッタにより生成した。



図 22 RF スパッタ装置

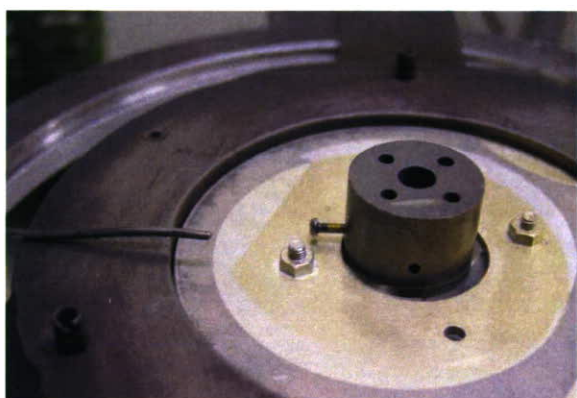


図 23 RF スパッタ装置 セッティング状況

整合層のついたサファイアレンズに対して単結晶を生成し超音波センサーとして使用するために ZnO の生成前に裏面の電極用にサファイアレンズ側に金電極を蒸着させた。



図 24 蒸着装置



図 25 蒸着装置 セッティング状況

蒸着したサファイアとその電極の形を図 26、図 27 に示す。



図 26 蒸着されたサファイア

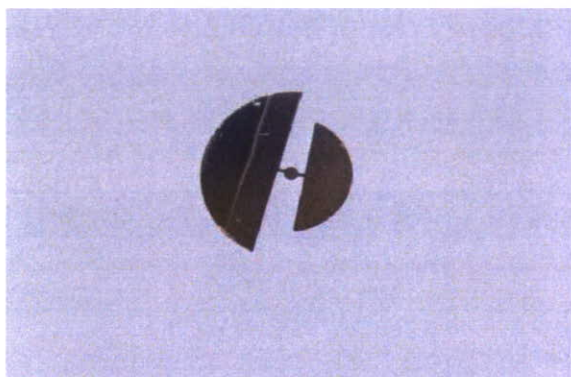


図 27 生成されたサファイア電極の形

この電極の上に ZnO の単結晶を DC スパッタ装置により生成した。



図 28 DC スパッタ装置



図 29 DCスパッタ装置 セッティング状況

ZnO が生成された後、サファイアとの逆面に再度、金電極を蒸着してケーシングすることにより完成する。これを図 30 のケースに入れ配線をして充填を行い、振動子の作製を行なった。



図 30 振動子ケース



図 31 完成した振動子

完成した振動子のスペクトル特性とバースト波での受信波形を示す。

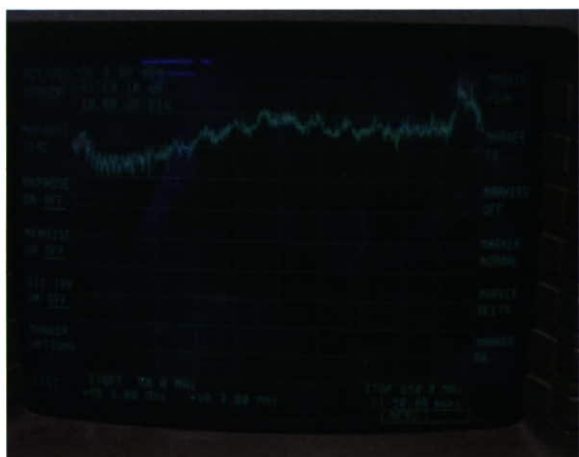


図 32 振動子の周波数スペクトル

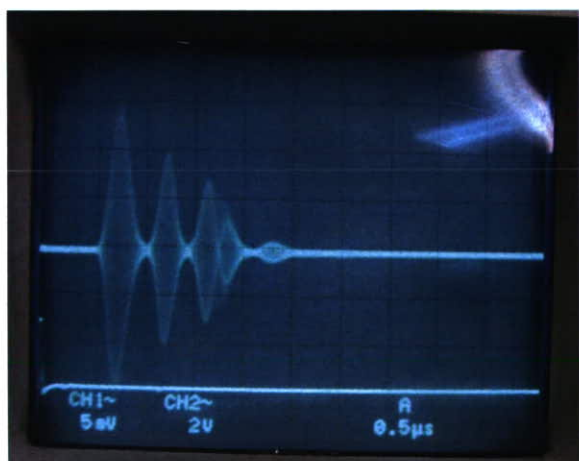


図 33 受信波形

表 1 に示すように、作成した振動子の特

性では受信のピークが 326MHz であり、挿入損失は 48dB であった。受信波を得るために水を媒体にして受信波を得ているために、水の周波数依存減衰から想定して、当初の目標の 400MHz 近傍の共振周波数の振動子が完成した。このことから、次回実質 500MHz の振動子の完成を目指すため、設計目標として振動子単体で 600MHz の振動子を作成することで実質 500MHz の受信信号を得ることが必要となる。

また、バースト波で 48dB の挿入損失では、パルス駆動時の送受効率の低下を考えると、挿入損失 40dB を目指す必要性がある。

項目	周波数	送受挿入 損失	焦点距離
単位	[MHz]	[dB]	[mm]
規格※	400	55 以上	0.29±0.03
測定値	326	48	0.31
	400	55	

表 1 振動子の特性

2. 超音波顕微鏡による生体試料のイメージング例

図 34 は平成 17 年度に作製した超音波顕微鏡システムによる冠動脈組織の描出結果を示す。xy 走査にはリニアモーターを用いており、マイクロコンピュータボードおよびパーソナルコンピュータにて、トランスデューサの位置を制御可能であるため、2.4mm x 2.4mm の範囲のスキャンを 4 回重ね合わせることが出来、広範囲を撮像することが出来た。また、冠動脈の層構造に関しても、内膜側から高速、低速、高速の順に音速が対応しており、血管内超音波にて観察する像と同様の傾向が見られた。

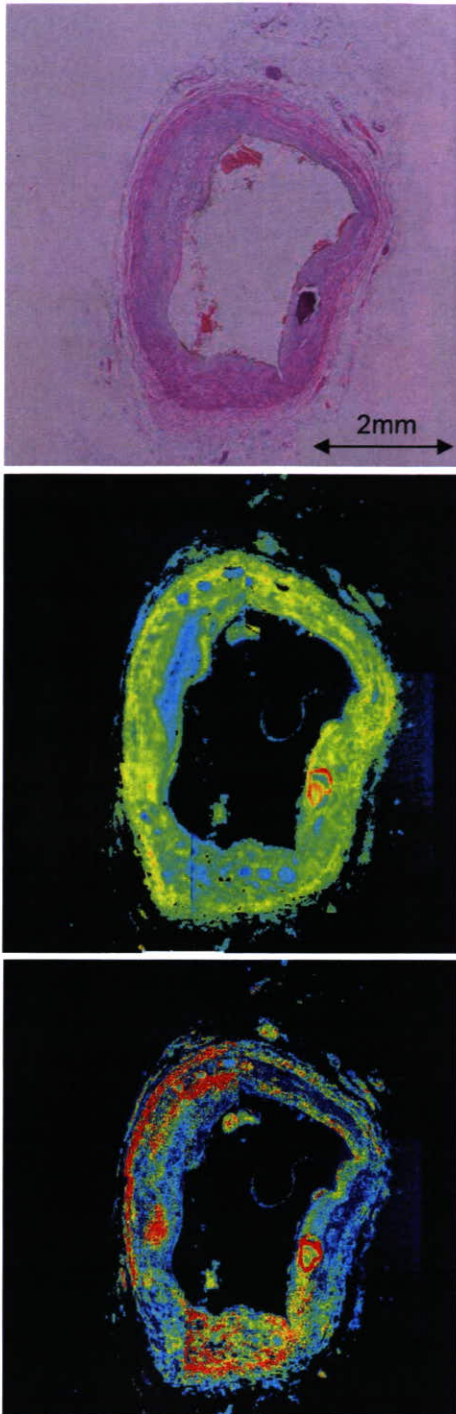


図 34 平成 17 年度に開発した超音波顕微鏡システムによる冠動脈(上:光学顕微鏡像、中:減衰像、下:音速像)

3. 音響インピーダンス顕微鏡による生体組織の観察

(1) 精度評価

音響インピーダンス測定精度の評価のために、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 35 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ため、顕微鏡の精度は組織評価の必要条件を満足し

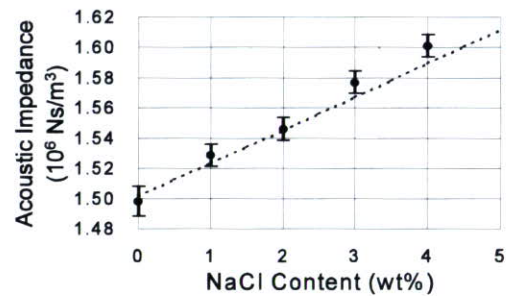


図 35 NaCl 含有量による音響インピーダンスの変化

ていると言える。

(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 36(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

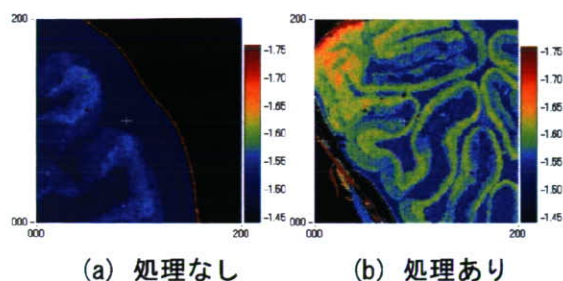


図 36 基板のプラズマ処理の影響

層のコントラストも十分に得られている。

(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。

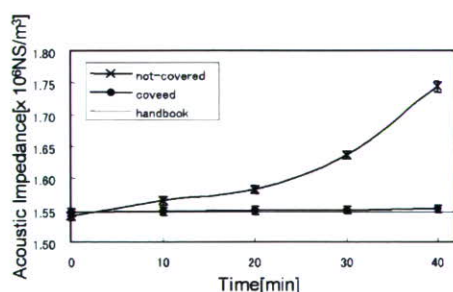


図 37 2wt%食塩水の音響インピーダンスの経時変化

その結果を図37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。

(4) 小脳皮質の定量評価

供試試料は未熟期（生後7日目：P7）、過渡期（P14）、成熟期（P21）のものである。図38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。

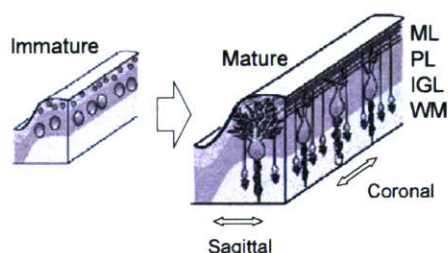


図 38 ラットの小脳組織
ML: 分子層 PL: プルキンエ細胞
IGL: 内顆粒細胞層 WM: 白質

図39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。

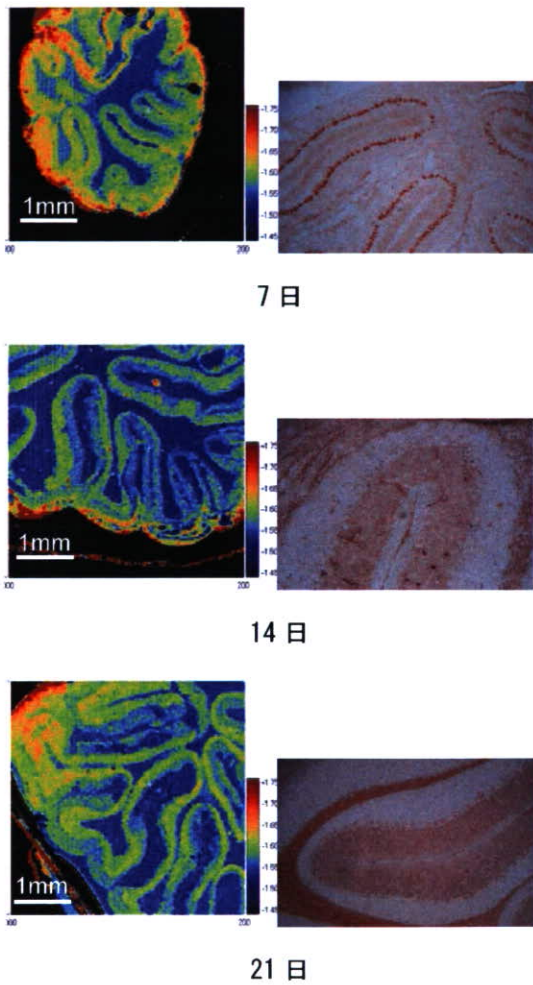


図 39 ラットの脳組織観察結果

4. 超音波ビーム特性を考慮した画像の改善

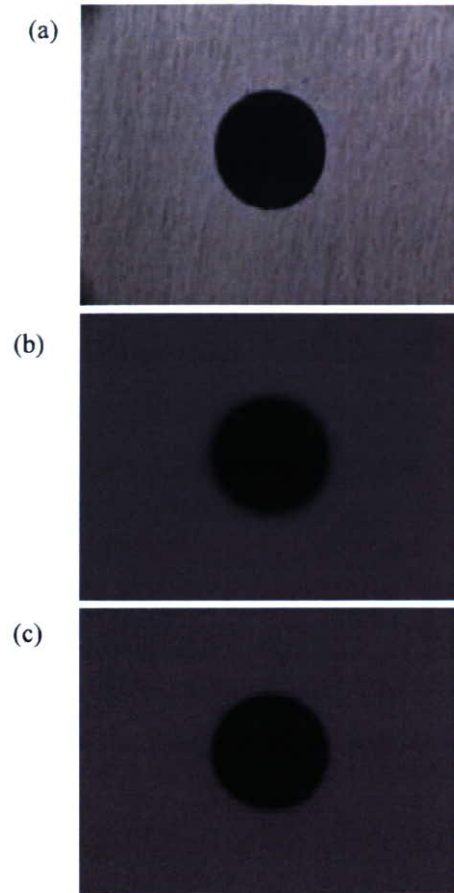


図 40 リファレンス穴の(a)光学顕微鏡像、(b)超音波顕微鏡元画像、(c)超音波顕微鏡画質改善画像

今回測定したボケ関数を利用して、リファレンスに使用した穴の超音波観察画像を復元した結果を図40に示す。

次に同じ100 μm の穴の周囲に約 ϕ 130 μm の線のある試料の復元画像を図6に示す。100MHzで18 μm の分解能の穴と周辺の線が分解されて観察することが可能であった。

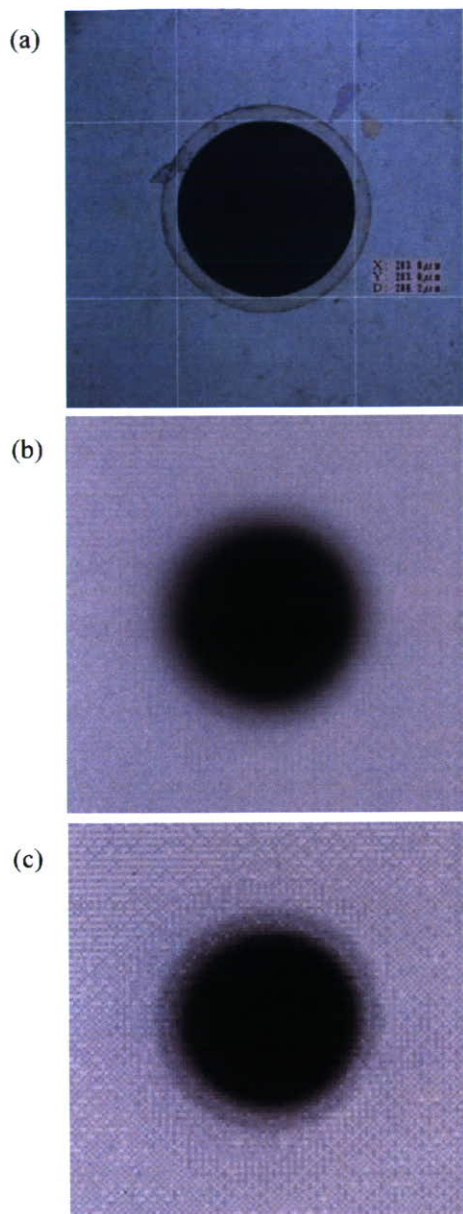


図 41 リング付き穴の(a)光学顕微鏡像、(b)超音波顕微鏡元画像、(c)超音波顕微鏡画質改善画像

実際の生体組織の観察例を処理しても、図 42（食道）図 43（乳腺）に示すようにぼけを解消し光学画像に近い画質を得ることができ、臨床の立場でも光学画像のイメージに近くなり、判断がしやすくなったと評価を得た。

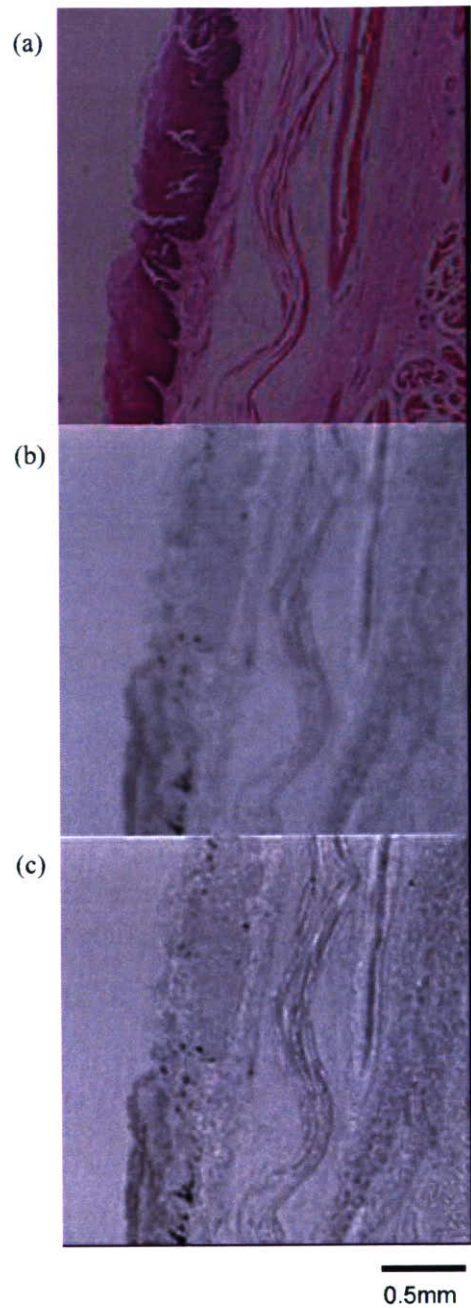


図 42 食道組織の(a)光学顕微鏡像、(b)超音波顕微鏡元画像、(c)超音波顕微鏡画質改善画像