

ス予稿集, p.3-1-3-22, 2011.09.

- 5) Ishihara M, Sato M, Kutsuna T, Mochida J, Kikuchi M. "Photoacoustic measurement technology in regenerative medicine of articular cartilage". 第50回日本生体医工学学会(CD-ROM). 2011.04.
- 6) 平沢壮, 石原美弥, 辻田和宏, 入澤寛, 北垣学, 藤田真敬, 菊地眞. "深部組織の高分解能画像化に向けた光音響画像診断法の開発と評価". 第50回日本生体医工学学会(CD-ROM). 2011.04.
- 7) Hirasawa T, Ishihara M, Kitagaki M, Bansaku I, Fujita M, Kikuchi M. "Analysis and verification of dominant factor to obtain the high resolution photo-acoustic imaging". *Proceedings of SPIE*, 7899, p.789932-1-789932-6, 2011.02.
- 8) Ishihara M, Hirasawa T, Tsujita K, Kitagaki M, Bansaku I, Fujita M, Kikuchi M. "Multifunctional photoacoustic signals detected by P(VDF/TrFE) film sensor with a wide range of frequency". *Proceedings of SPIE*, 7899, p.78992Z-1-78992Z-5, 2011.02.
- 9) 石原美弥, 平沢壮, 菊地眞. "光音響画像化技術の現状". 電気学会研究会資料光・量子デバイス研究会, QOD-10-046s 054, p.35-38, 2010.12.
- 10) 石原美弥. "光音響原理を利用した非侵襲的診断法". 第2回 BioOpto Japan 2010 カンファレンス, p.3-1-3-14, 2010.10.
- 11) 石原美弥, 平沢壮, 北垣学, 番作勲, 藤田真敬, 菊地眞. "光音響断層画像化技術による機能診断イメージング". 日本レーザー医学会誌, 31(3), p.325, 2010.10.

- 12) 石原美弥, 佐藤正人, 杓名寿治, 三谷玄弥, 持田讓治, 菊地眞. "光音響計測技術の軟骨再生医療への可能性と展開". 日本レーザー医学会誌, 31(3), p.297, 2010.10.
- 13) 石原美弥, 菊地眞, 北垣学, 加納隆, 小野哲章. "医療機器における医療機器の保守点検ガイドラインに関する研究". 医療機器学会, 80(5), p.591-592, 2010.10.
- 14) 平沢壮, 石原美弥, 北垣学, 番作勲, 藤田真敬, 菊地眞. "生体深部の高分解能画像化に向けた光音響画像化法の開発". 日本レーザー医学会誌, 31(3), p.325, 2010.10.
- 15) 平沢壮, 石原美弥, 北垣学, 藤田真敬, 菊地眞. "光音響画像の高分解能化のための画像再構成手法の検証". 電気学会研究会資料光・量子デバイス研究会, OQD-10-032 038, p.31-35, 2010.09.
- 16) 石原美弥, 佐藤正人, 谷川待子, 松村耕治, 持田讓治, 菊地眞. "軟骨細胞シート評価のためのハイパースペクトル顕微鏡システムの構築". 日本整形外科学会雑誌, 84(4), p.S1331, 2010.08.
- 17) Ishihara M, Tsujita K, Hirasawa T, Bansaku I, Sato Y, Kitagaki M, Fujita M, Kikuchi M. "Development of the photoacoustic imaging system toward functional deep tissue imaging". 第49回日本生体医工学学会(CD-ROM), 2010.06.
- 18) Kutsuna T, Sato M, Ishihara M, Furukawa K, Nagai T, Kikuchi M, Ushida T, Mochida J. "Noninvasive Evaluation of Tissue Engineered Cartilage with Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy". *Tissue Engineering Part C: Methods*, 16(3), p.365-373, 2010.05.

国際学会発表

- 1) Hirasawa T, Ishihara M, Tsujita K, Hirota K, Irisawa K, Kitagaki M, Fujita M, Kikuchi M. “Continuous wavelet-transform analysis of photo-acoustic signal waveform to determine optical absorption coefficient”. SPIE Photonics West Biomedical Optics, BiOS 2012, *SPIE Photonics West BiOS Technical Summaries*, p.268, 2012.01.
- 2) Matsumura K, Ishihara M, Ichiki Y, Arai M, Ishihara M, Kobayashi Y, Kikuchi M. “Development of methods to inhibit tumorigenesis after transplantation of differentiated iPS cells”. CiRA国際シンポジウム, 2011.03-2011.04.
- 3) Hirasawa T, Ishihara M, Kitagaki M, Bansaku I, Fujita M, Kikuchi M. “Analysis and verification of dominant factor to obtain the high resolution photo-acoustic imaging”. SPIE Photonics West Biomedical Optics, BiOS 2011, *SPIE Photonics West BiOS Technical Summaries*, p.260, 2011.01.
- 4) Ishihara M, Hirasawa T, Tsujita K, Manabu K, Bansaku I, Fujita M, Kikuchi M. “Multifunctional photoacoustic signals detected by P(VDF/TrFE) film sensor with a wide range of frequency”. SPIE Photonics West 2011 Biomedical Optics, BiOS 2011, *SPIE Photonics West BiOS Technical Summaries*, p.259, 2011.01.

国内学会発表

- 5) 平沢壮, 石原美弥, 藤田真敬, 北垣学,

大谷直樹, 堀口明男, 菊地眞. “光音響技術を利用した選択的イメージングの動物モデルによる検証”. 第32回日本レーザー医学会総会, 日本レーザー医学会誌, 32(3), p.334, 2011.10.

- 6) 平沢壮, 石原美弥, 藤田真敬, 北垣学, 大谷直樹, 菊地眞. “光音響画像化技術の要素技術開発とシステム化:動物モデルによる性能検証”. Optics and Photonics Japan 2011, Optics & Photonics Japan 2011, p.P65-1-P65-2, 2011.11.

- 7) 石原美弥. “【特別講演】光音響画像化技術の最新動向”. BioOpto Japan 2011, 第3回 BioOpto Japan カンファレンス「医療・診断セッション」カンファレンス予稿集, p.3-1-3-22, 2011.09.

- 8) 石原美弥, 佐藤正人, 沓名寿治, 持田讓治, 菊地眞. “【シンポジウム】光音響原理と分光特性を利用した関節軟骨再生の評価”. 第50回日本生体医工学会大会, 生体医工学, 49(特別), p.197, 2011.04.

- 9) 平沢壮, 石原美弥, 辻田和宏, 入澤覚, 北垣学, 藤田真敬, 菊地眞. “深部組織の高分解能画像化に向けた光音響画像診断法の開発と評価”. 第50回日本生体医工学会大会, 生体医工学, 49(特別), p.311, 2011.04.

- 10) 石原美弥, 平沢壮, 菊地眞. “光音響画像化技術の現状”. 光・量子デバイス研究会, 電気学会研究会資料光・量子デバイス研究会, QOD-10-046s 054, p.1-1, 2010.12.

- 11) 石原美弥, 佐藤正人, 沓名寿治, 三谷玄弥, 持田讓治, 菊地眞. “【シンポジウム】光音響計測技術の軟骨再生医療への可能性と展開”. 第31回日本レーザー医学会総会, 日本レーザー医学会誌, 31(3), p.297,

2010.10.

12) 石原美弥, 平沢壮, 北垣学, 番作勲, 藤田真敬, 菊地眞. “光音響断層画像化技術による機能診断イメージングに関する研究”. 第31回日本レーザー医学会総会, 日本レーザー医学会誌, 31(3), p.325, 2010.10.

13) 平沢壮, 石原美弥, 北垣学, 番作勲, 藤田真敬, 菊地眞. “生体深部の高分解能画像化に向けた光音響画像化法の開発”. 第31回日本レーザー医学会総会, 日本レーザー医学会誌, 31(3), p.325, 2010.10.

14) 石原美弥. “【特別講演】光音響原理を利用した非侵襲的診断法”. BioOpto Japan 2010, 第2回 BioOpto Japan 2010 カンファレンス, 2010.09.

15) 石原美弥, 佐藤正人, 谷川待子, 松村耕治, 持田讓治, 菊地眞. “軟骨細胞シート評価のためのハイパースペクトル顕微鏡システムの構築”. 第25回日本整形外科学会基礎学術集会, 日本整形外科学会雑誌, 84(8), p.S1331, 2010.08.

16) 平沢壮, 石原美弥, 北垣学, 藤田真敬, 菊地眞. “光音響画像の高分解能化のための画像再構成手法の検証”. 電気学会研究会光・量子デバイス研究会, 電気学会研究会資料光・量子デバイス研究会OQD-10-032 038: p.1, 2010.09.

17) 石原美弥, 辻田和宏, 平沢壮, 番作勲, 佐藤良彰, 北垣学, 藤田真敬, 菊地眞. “【シンポジウム】 Development of the photoacoustic imaging system toward functional deep tissue imaging”. 第49回日本生体医工学会大会, 生体医工学, 48 (特別), p.108, 2010.06.

解説・総説

1) 藤田真敬, 平沢壮, 石原美弥. “次世代の画像診断装置としての光音響画像化技術開発と医師の期待”. O Plus E (optics +electronics), 34(2), p.151-154, 2012.02.

光音響原理に基づく力学特性計測法を用いた 軟骨シート移植時の機能評価に関する研究

研究分担者 石原 美弥 防衛医科大学校 医用工学講座 教授
研究分担者 谷川 待子 防衛医科大学校 医用工学講座 研究員

研究要旨：軟骨細胞シートによる関節治療の評価には、シートの移植前後で同じ手法で測定し、同じパラメータで評価する必要がある。我々が独自に開発した光音響原理に基づく力学特性計測法は、対象の組織に害がない非侵襲的で、繰り返し計測が可能であることから、その評価法になりうる。そこで、既に我々が構築した光音響原理に基づく力学特性計測法のプロトタイプ装置を用いて、軟骨シート移植前の移植部位の計測をした。その結果、正常部と変性部を対象にした測定値より、軟骨細胞シートによる関節治療の評価法としての可能性が確認できた。

A. 研究目的

軟骨再生医療のバリデーション（再生医療が有効であることを立証すること）のために、我々は既に光音響原理に基づく力学特性計測法を開発している。本研究で軟骨細胞シートによる関節治療の臨床研究を実施した際、軟骨細胞シート移植後に、関節軟骨が所望の機能が回復しているかを開発した光音響原理に基づく力学特性計測法で評価できれば、バリデーションが可能となる。

B. 研究方法

光と生体は図 1 に示すように多様な相互作用であるため、光計測技術により得られる情報は多く、多角的な測定が可能である特長を持つ。研究者らは、既に Photoacoustic（光音響）作用を用いて力学特性を計測する方法を提案している。計測原理を図 2 に示す。

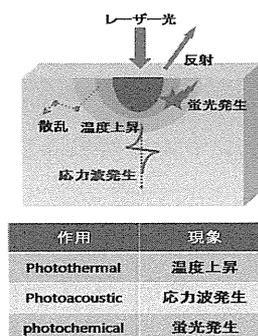
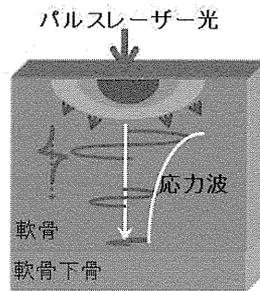


図 1 レーザー光と生体の相互作用



パルスレーザーを軟骨に照射して
 発生する音波の減衰 ↔ 軟骨の粘弾性

音波の減衰時間(τ) = η/G
 (η : 粘性, G : 弾性)

図2 力学特性計測原理

レーザーで励起される応力波（生体に一定条件の光を照射すると、吸収体において熱弾性過程により応力波（光音響波）が誘起される）が媒体（生体組織）の力学特性（力学特性）の影響を受けながら伝搬することを利用して、レーザーを組織に照射して発生させたレーザー誘起応力波の強度の経時的変化から組織の力学特性を評価する原理である。この方法は研究者らが世界で初めて提案し、力学特性分析法（レオメータ）

で測定される固有の力学特性（粘性と弾性の比）と一致することを世界で初めて実証した。本計測法は、我が国発の技術である。本法は、光計測の最大の欠点である散乱の影響を受けず、また超音波計測よりも高い空間分解能が得られる特色を持つ。すでに生体モデルとして濃度を変化させたゼラチンファントムを用いて原理検証実験を行なった。

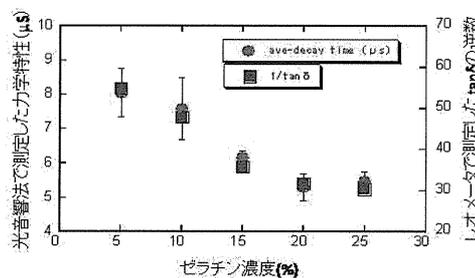


図3 生体ファントムを対象にした原理検証実験

図3に示す結果からわかるように、従来の破壊的力学特性分析法（レオメータ）の結果と高い相関を有することを確認した。NEDOプロジェクト「再生医療の早期実用

化を目指した再生評価技術開発」の一貫として、担体を用いた組織工学的軟骨組織を対象に提案した方法の有用性を示している。光音響原理に基づく力学特性計測法の要

素技術は、主にレーザー（光音響信号が効率よく発生する）、超音波センサー（光音響信号を高感度に検出する）、信号処理系（正確に軟骨の力学特性を算出する）の3要素から成る。我々が開発している技術で最もオリジナリティがあり特筆すべき技術は、レーザーを導光する光ファイバーと超音波センサーを一体化したプローブである。

この両方の技術を関節鏡視下で使用する必要がある。実際には光音響信号の励起源にナノ秒パルスレーザーを使用するので導光には光ファイバーを使用し、圧電素子からなるセンサーとともに、関節鏡視下で使

用できる一体型プローブを開発した。その他にも独自に開発した信号解析を開発した。

独自の信号解析法について以下に記す。波形の各ピーク(I_{Pi})値を利用して、次式から力学特性値である τ を算出するので、ピーク値である(I_{Pi} , t_{Pi})の精度が τ 算出の精度を決める1つの要因になる。

$$I_{Pi} = k \times R^{(i-1)} \times \exp(-t_{Pi}/\tau)$$

受信信号のフレキシブルな処理及び解析が可能となっている。さらに、下記のようなプログラムを作成して、調整パラメータを設けた。

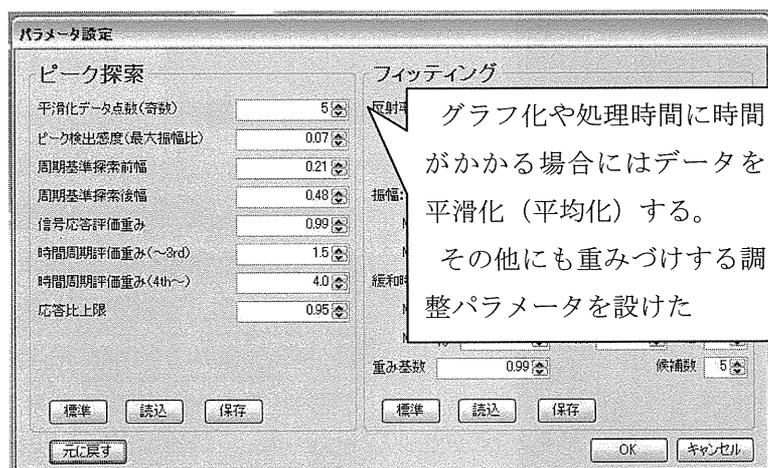


図4 開発したプログラムの調整パラメータを設定する画面

既に開発した可搬式の装置と滅菌可能なプローブを以下に示す（図 5～図 9）。

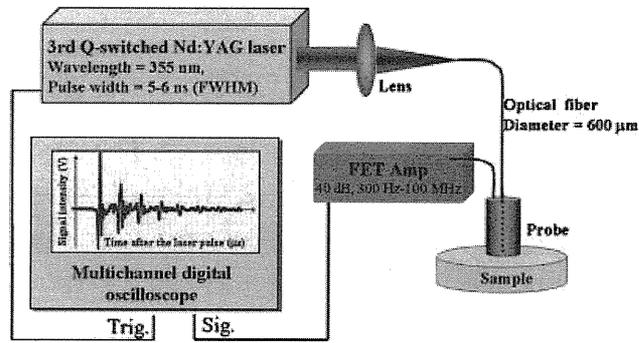


図 5 装置の模式図

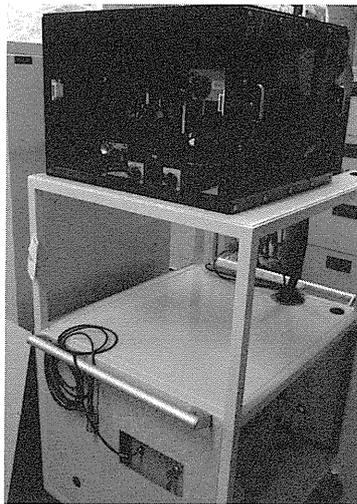


図 6-a 装置の概観図



図 6-b レーザー発振部及び光軸調整部

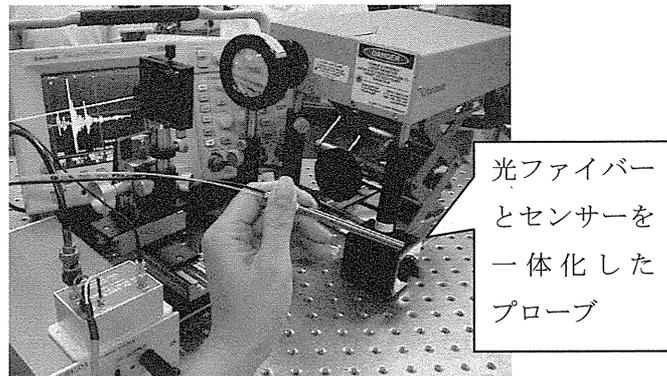


図7 装置とプローブ図

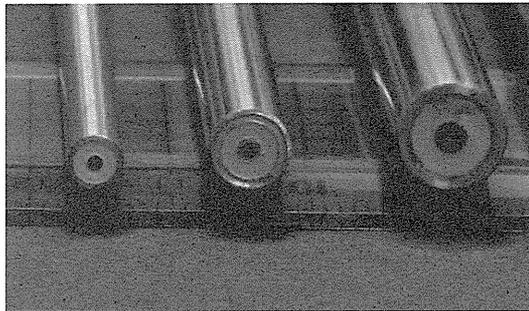


図8 開発したプローブの細径化の過程

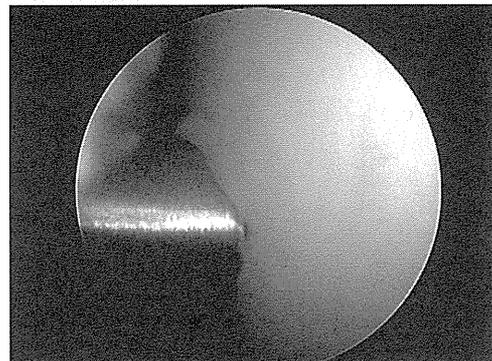


図9-a プローブの関節鏡視下適用

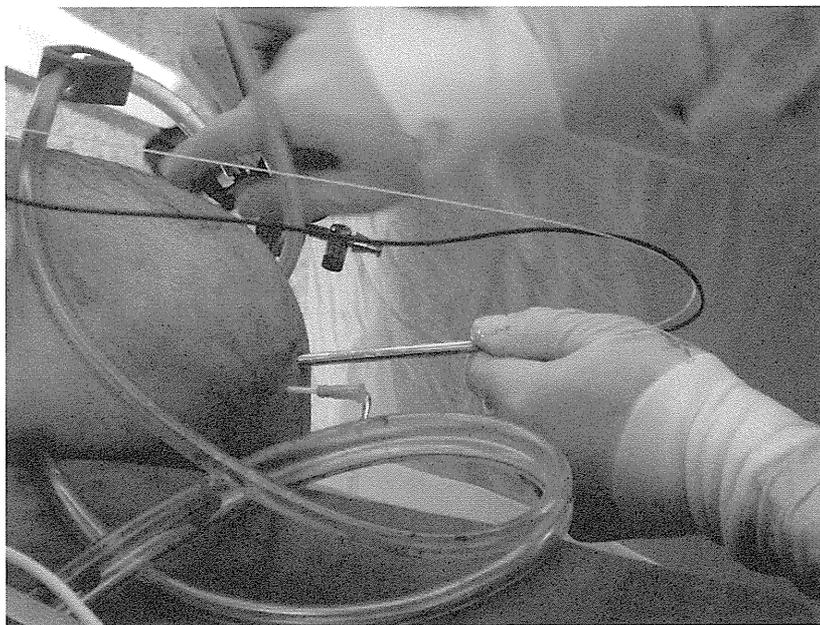


図9-b プローブを関節鏡に適用しているところ

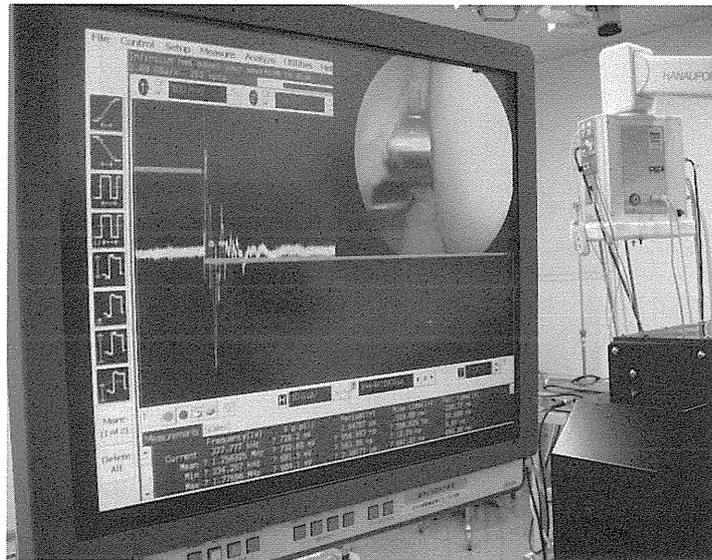


図 9-c 関節鏡のモニターにオシロスコープ観察波形と関節鏡の観察画面を同時にモニターしている様子

臨床の現場でより使いやすくするために、関節鏡のモニターに光音響原理に基づく力学特性計測法の測定波形がリアルタイムに提示されるように、イメージコンバータと

イメージミキサー（UIM：関節鏡モニター画面に異なる2つの映像表示を可能にすることが出来る）を導入して、以下のシステムを構築した（図 10）。

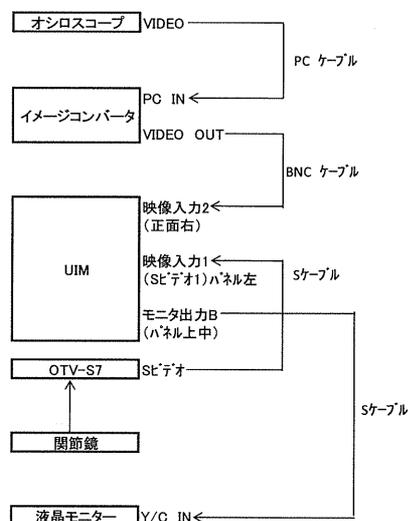


図 10 関節鏡にオシロスコープの波形を提示するシステム

本システムを関節鏡視下の膝前十字靭帯損傷手術と人工膝関節置換術の際に変性部と正常部で比較して計測した。正常部と変

性部を比較することで、測定した日による測定値差、個人差が考慮でき、症例数の集積が有効と考える（表 1）。

表 1 超音響法検査：粘弾性評価

Day	手術前	12ヶ月
評価日	/	/
移植部	—	—
周辺軟骨部	1	1

C. 研究結果

測定波形（対象：大腿骨内課）の 1 例を示す。

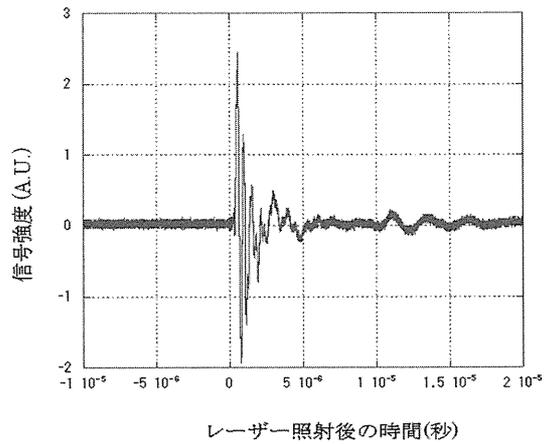


図 11 測定波形（対象：大腿骨内課）

表 2 測定結果まとめ

ICRS グレード	測定結果 (ICRS グレード 0 の値を 1 として正規化)
0	1
1	1.4
2	1.7
3	2.0

測定波形は、レーザーが光ファイバーを通して軟骨に照射された際に、軟骨表面に発生した光音響波が軟骨内の伝搬と界面での反射を反映している。軟骨の力学特性（硬さ）のうち、弾性率が大きい（正常に近い）と光音響波の減衰は大きく、測定結果は小さい傾向となり、粘性率が大きい（変性が進行している）と光音響波の減衰時間は長くなり、測定結果は大きい傾向となる。

全測定結果を、ICRS (International Cartilage Repair Society) による Outerbridge 分類(Grade I~Grade IV)で分けて表示した。統計処理が出来るほど測定数が多くないが、全体的に、ICRS グレードが大きくなるほど、測定結果が大きくなり、すなわち、変性が進行していることが示された。また、その再現性についてであるが、Grade I、Grade II については、繰り返し計測しても、測定日が違っても、測定対象が変わっても測定値はほぼ一定で変化はなかった。逆に、Grade III、Grade IV

については、測定値にばらつきがあった。これは、見かけ（見た目）で分類する ICRS グレードでの変性の進行度と力学特性の関係には、ばらつきがある可能性があると考えられる。

H23 年度は、術前の病変部の状態診断（関節鏡視下）として病変部と周囲の正常部位との比較を実施した。軟骨シート移植を H23 年度は 2 例実施したので、2 例分を計測した。1 例目で実施した関節鏡視下で計測した病変部と周囲の正常部位の波形を示す（図 12、図 13）。

クロの点線は力学特性（粘弾性）評価用フィッティング線である。この比較から、正常部位に比べて病変部位は減衰時間が長く、弾性が小さくなっている（粘性が大きくなっている）ことが分かる。なお、2 例目の病変部はほぼ骨がむき出しで、軟骨というよりも薄い線維性組織で覆われていたので、軟骨からの信号は観測されなかった。

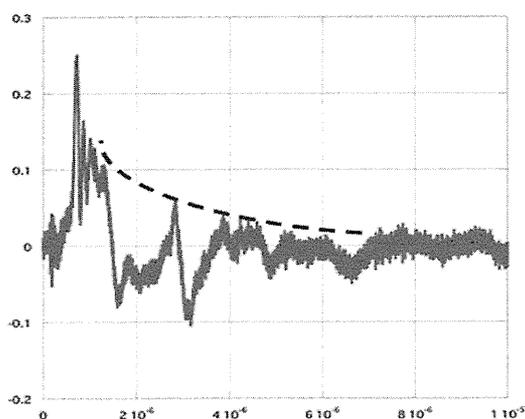


図 12 1 例目病変部

横軸：時間(s)

縦軸：信号強度(v)

赤線：測定波形

黒点線：フィッティング曲線

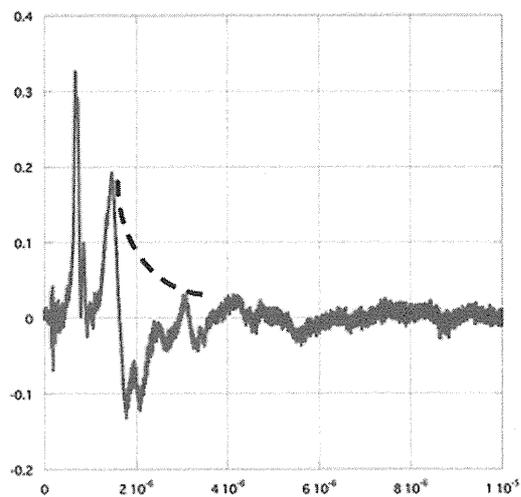


図 13 1 例目正常部位

横軸：時間(s)

縦軸：信号強度(v)

赤線：測定波形

黒点線：フィッティング曲線

測定波形から粘弾性値の指標を求めるための独自に開発したプログラムについて以下に示す。

[1] 光音響波形のピーク選択及びフィッティング

(1) プログラム設定

①センサー（プローブ）タイプ選択

反射型・透過型のいずれかを選ぶ。

②測定データ読込

測定データ(CSV)を読み込み、波形を表示する。

またパラメータに従ってピーク探索（候補の抽出および自動選択）を行う。

③再読込

読込済みの測定データを用いて、再

度読込時の処理を行う。

④解析

パラメータに従ってフィッティングを行う。

⑤解析結果読込

保存してある解析結果を読み込む。

⑥解析結果保存

解析結果をファイルに保存する。

⑦パラメータ設定

ピーク探索およびフィッティングを行う際のパラメータを編集する。

⑧閉じる

プログラムを終了する。

(2) 測定波形例およびピークポイント検出例

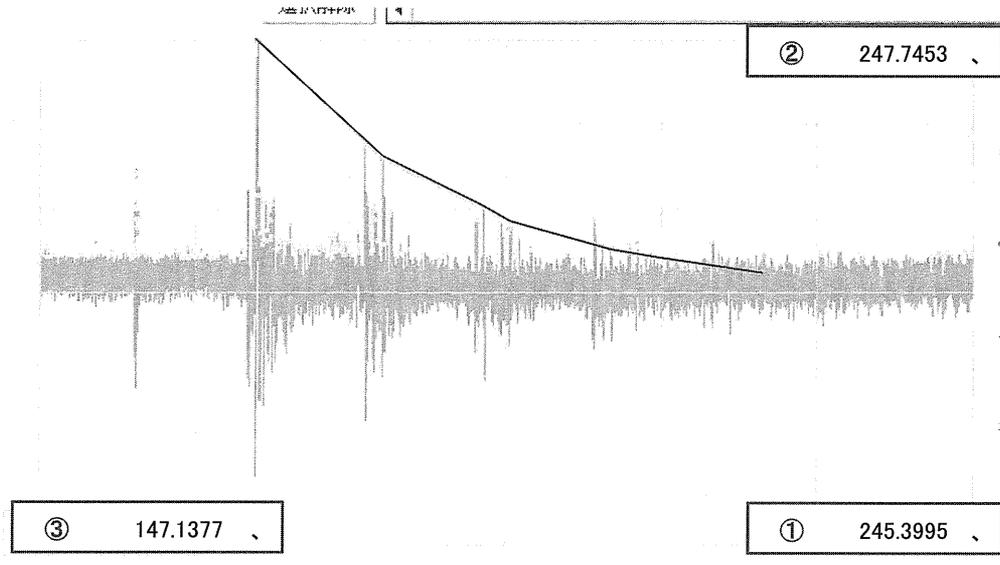


図 14 測定波形例およびピークポイント検出例

(3) 画面上の操作について

・座標表示

- ① マウスポインタの指している座標
- ② 左下隅の座標
- ③ 右上隅の座標

・拡大・縮小

左クリックしたままマウスを上下
(↑拡大 ↓縮小)

※ マウスホイールの前進/後退でも可

・平行移動

右クリックしたままマウスを移動

・ピーク選択の切り替え

ピーク候補の位置にマウスポインタを合わせてクリック

・表示位置の初期化

左クリックをしたまま右クリック

・その他

ダブルクリックした位置が表示枠の中央に移動

[2] 時間分解自家蛍光スペクトル蛍光寿命計算プログラム本データ解析では、MATLAB を使用する。

- ① スタートメニューから MATLAB7.01 を起動する
- ② 画面左上にある Current Directory の  をクリックする（図 15 参照）
- ③ ファイル一覧が表示されるので “Plot_3D_ver3_3_m M-ファイル” があることを確認する（図15参照）この時、日付の一番新しい物を選択
- ④ 画面右にあるCommand Windowの ” >> ” の横に ” >>| ” カーソルを移動する
- ⑤ PGUP キーを数回押し “Plot_3D_ver3_3” と表示されたら ENTER をクリックする（図 15 参照）

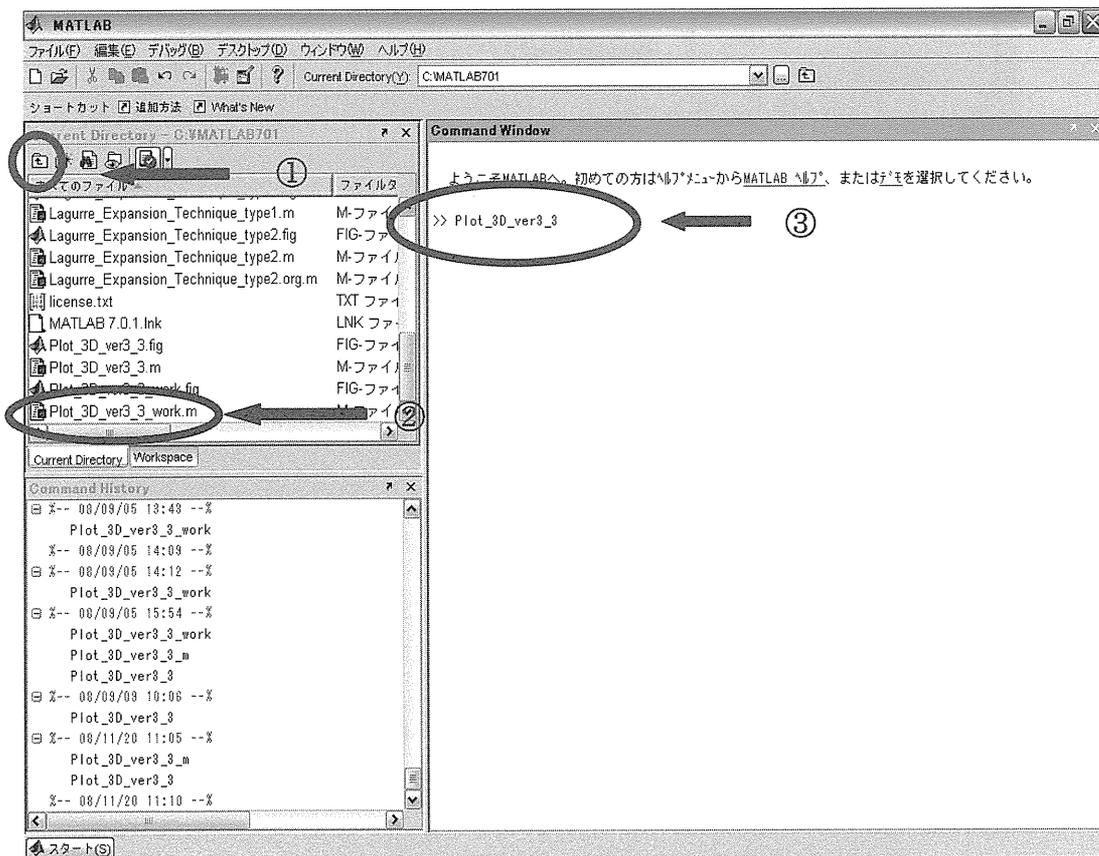


図 15 MATLAB 基本操作画面

- ⑥ 解析するデータファイルを選択し開く
- ⑦ Plot_3D_ver3_3ウィンドウのPlot Type でshading、VIEWを調整し、Surfをクリックする（図16参照）
- ⑧ Save Fig をクリックしデータを保存する（図 16 参照）

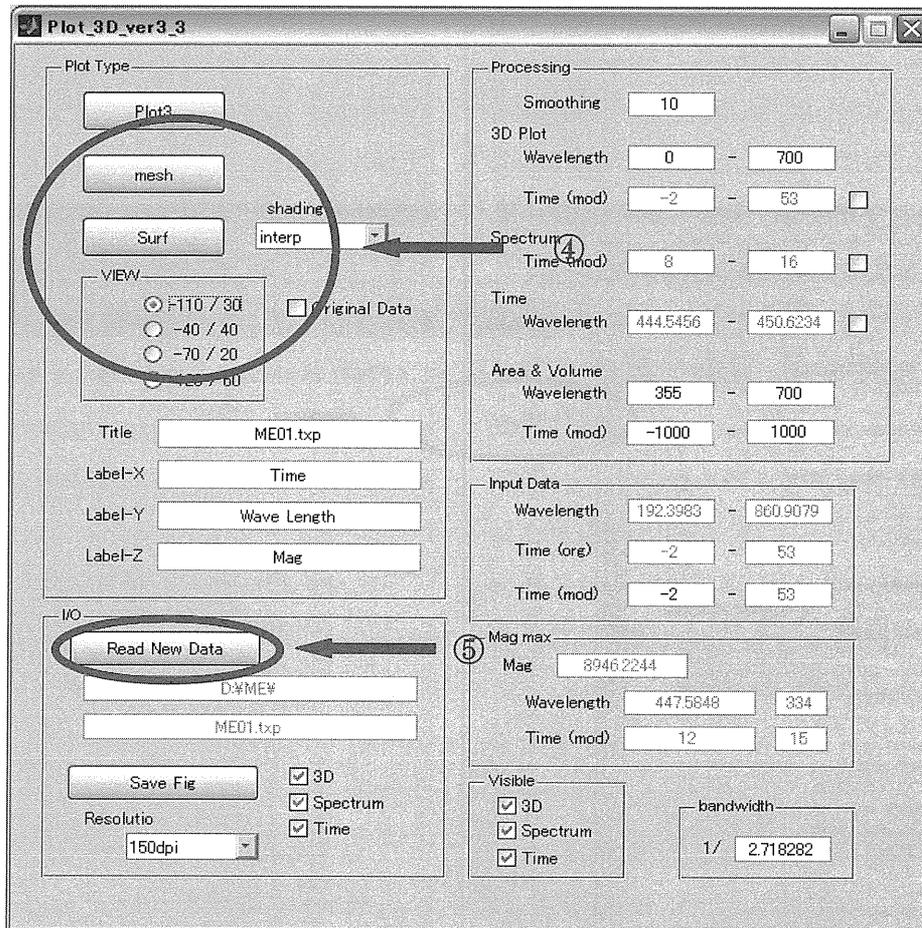


図 16 測定データ 3D 表示設定画面

⑨ MATLAB の Current Directory ウィンウ” Lagurre_Expansion_Technique_type2.m
 M-ファイル最新更新日” を右クリックし実行を選択する（図 17 参照）

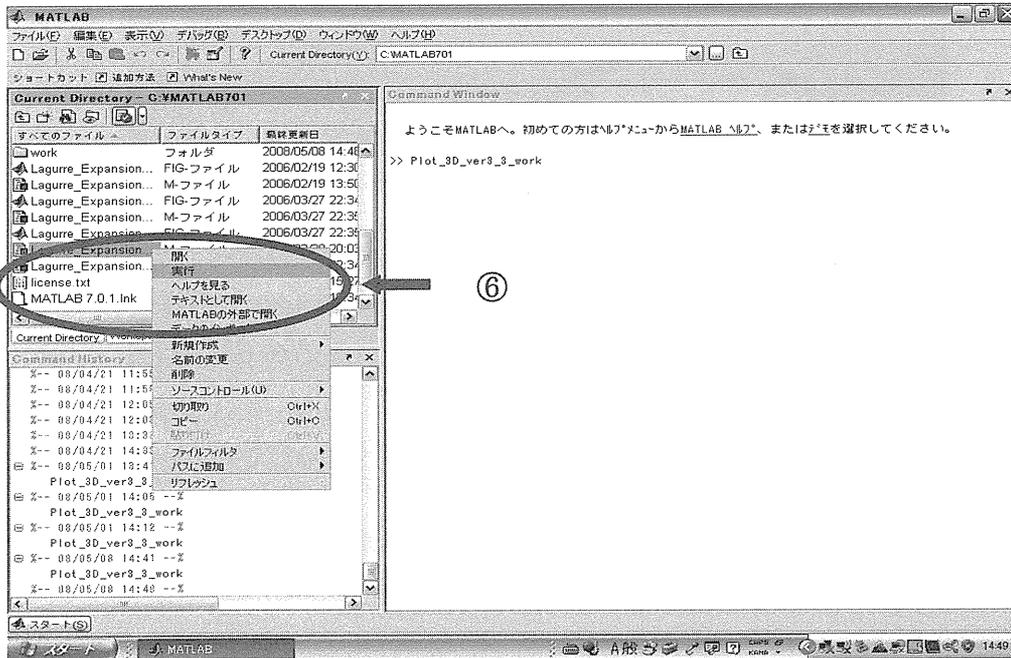


図17 Lagurre 関数 読み込み画面

- ⑩ 減衰時間をだす為に、lagurre関数で解析しIRFデータを作成する必要がある
- ⑪ まず、 スタートメニュー>マイコンピュータ>C>Selector>波長選択プログラムを開く
- ⑫ 先程保存したサンプル名(ti_all)を開き、 解析したい波長を選択し保存する

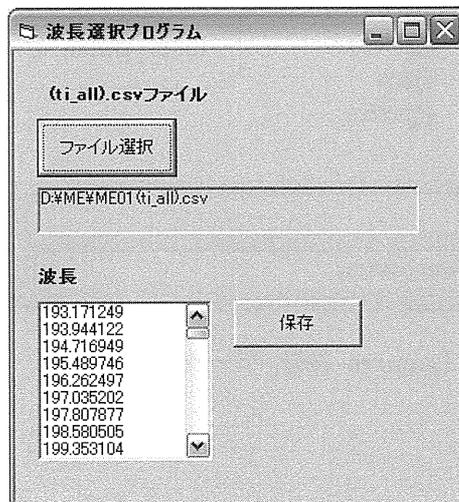


図18 蛍光寿命算出波長設定画面

- ⑬ Lagurre_Expansion_Technique_type2 ウィンドウの Data Read をクリックする

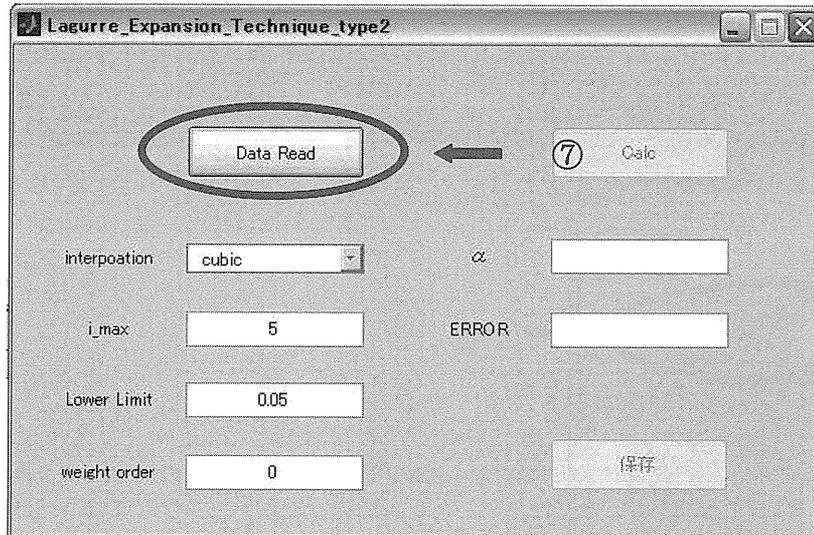


図19-1 Lagurre 関数 データ読み込み画面 - 1

- ⑭ Laser Pulse ウィンドウで MATLAB701>Lagurre_data>laser_pulse を開く

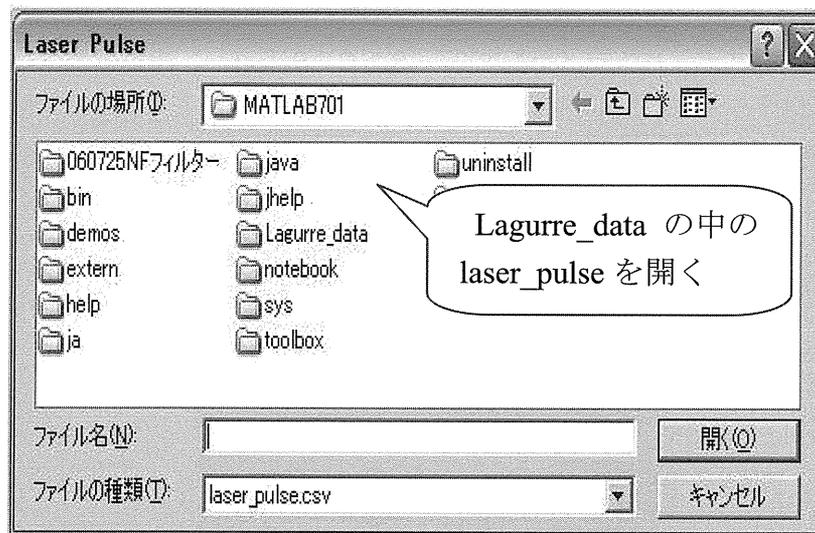


図19-2 Lagurre 関数 データ読み込み画面 - 2

- ⑮ Measured Emission Response ウィンドウで⑫で保存したデータのうちサンプル名（ti 波長）データを開く

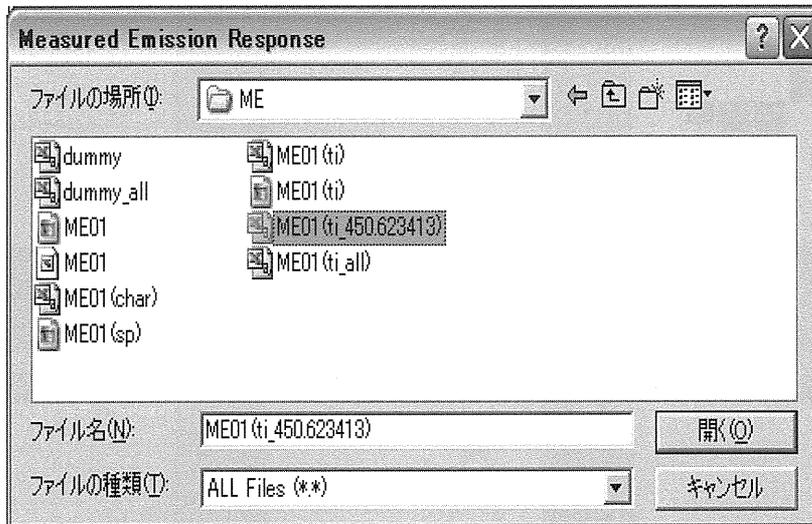


図19-3 Lagurre 関数 データ読み込み画面-3

- ⑯ Calc をクリックする（図 20 参照）

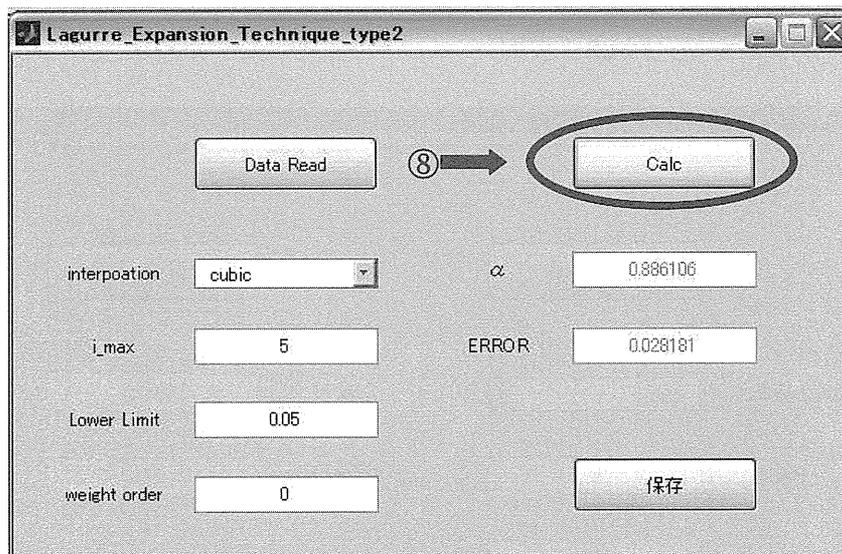


図20 Lagurre 関数 計算実行画面

下記グラフが表示される

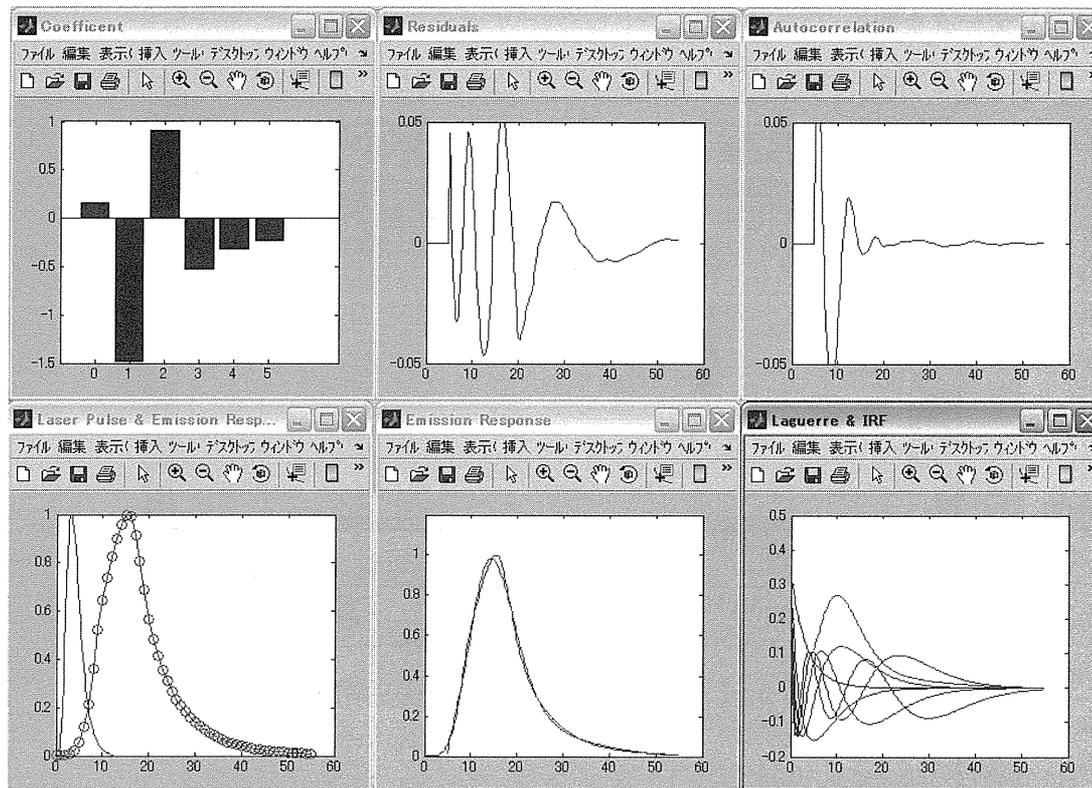


図 21 Lagurre 関数 計算過程画面

⑰ 保存をクリックする（図 22-1 参照）

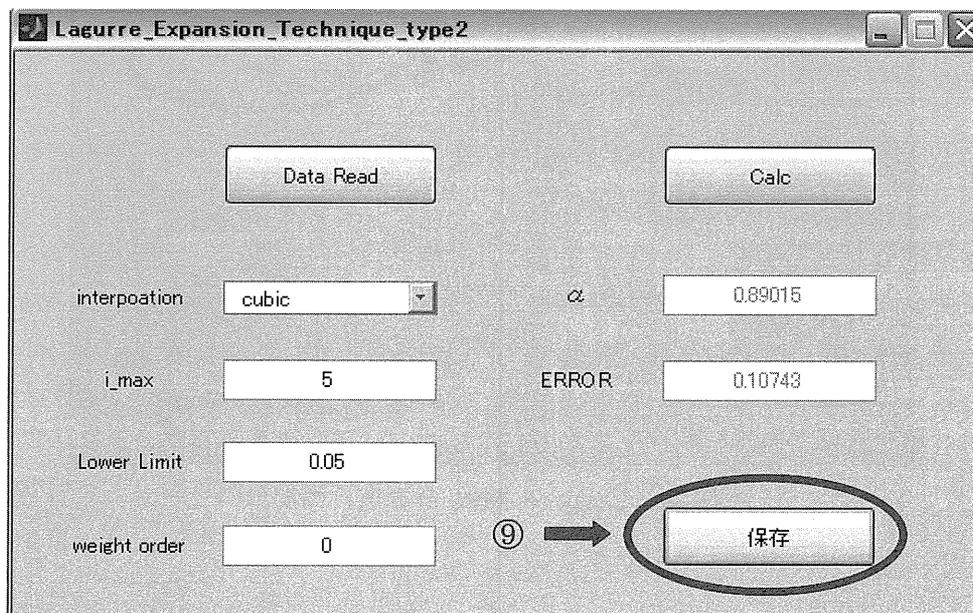


図 22-1 Lagurre 関数 保存設定画面 - 1

- ⑱ 解析したサンプル名（ti 波長）に“IRF”を付けて保存する（図 22-2 参照）

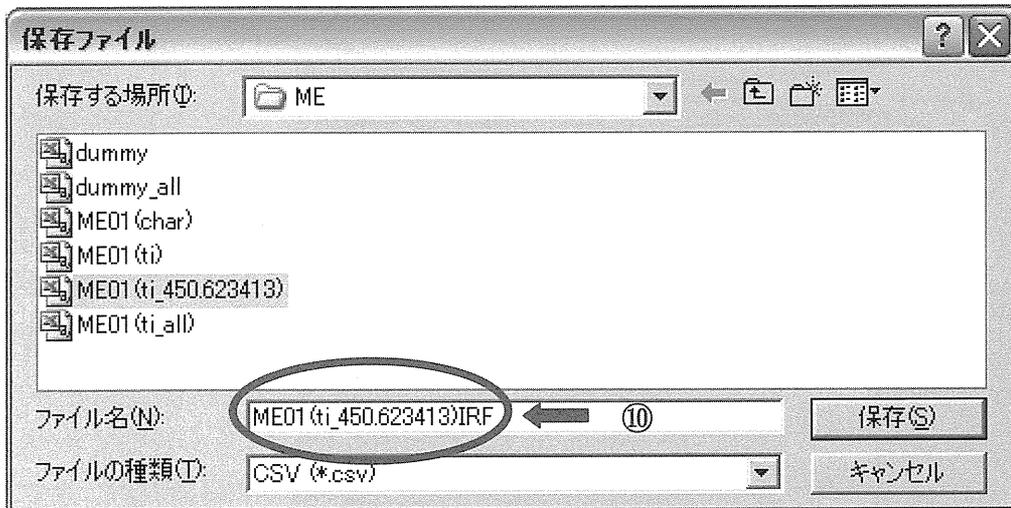


図 22-2 Lagurre 関数 保存設定画面 - 2

- ⑲ スタートメニュー>マイコンピュータ>double_exp_func>double_exp_func_rev1 を開き、IRFデータ指定をクリックし⑱で保存したIRFデータを選択する（図23参照）
- ⑳ 結果ファイル指定をクリックしあらかじめ作成しておいたテキストファイル（メモ帳）を選択し解析をクリックする（図 23 参照）