

201114010A

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業

光超音波マンモグラフィにおける乳がん診断基準の整備と
高機能化のための広帯域 PAT プローブの開発に関する研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 戸井 雅和

平成24(2012)年 5月

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業

光超音波マンモグラフィにおける乳がん診断基準の整備と
高機能化のための広帯域 PAT プローブの開発に関する研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者

戸井 雅和

京都大学大学院医学研究科外科学講座乳腺外科学 教授

研究分担者

椎名 毅

京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻・生体医工学 教授

富樫 かおり

京都大学大学院医学研究科放射線医学講座(画像診断学・核医学) 教授

佐藤 亨

京都大学情報学研究所・電磁波計測理論 教授

浅尾 恭史

キヤノン(株)総合 R&D 本部・医用イメージング第二開発推進プロジェクト
主幹研究員

金尾 昌太郎

京都大学医学部附属病院放射線部 助教

片岡 正子

京都大学医学部附属病院放射線診断科 特定病院助教

平成23(2011)年 5月

目 次

I. 総括研究報告

光超音波マンモグラフィにおける乳がん診断基準の整備と
高機能化のための広帯域 PAT プロブの開発に関する研究
戸井雅和

----- 1

厚生労働科学研究費補助金(医療技術実用化総合研究事業)

統括研究報告書

光超音波マンモグラフィにおける乳がん診断基準の整備と高機能化のための広帯域 PAT プローブの開発に関する研究

研究代表者 戸井 雅和 京都大学大学院医学研究科 外科学講座 乳腺外科学教授

研究要旨

平成23年度の本研究事業の進捗は次の通りである。①光超音波マンモグラフィ(PAM)の1次試作機を用いた探索的臨床研究を完了し、他モダリティならびに病理組織と PAM 像を対比検討させる手法を確立した。②広帯域 PAT プローブの2次試作を完了し、課題の抽出と対策法の提示を行った。

①はPAM試作機による臨床研究を推進するとともに、手術前に撮像したPAM像(血管集簇度ならびに酸素飽和度)と、手術後の病理標本から得られる免染結果とを対比させるための手法を確立した。②は平成22年度に引き続き、2つのPATプローブの候補技術(Focus transducerを用いた顕微鏡方式とFabry-Perot型干渉計を用いた光検出方式)について、装置の改良を行った。これを用いて基礎データの取得、ならびに動物実験を行った。またFP方式において世界で初めて高速カメラによる超音波像のイメージングを実現した。

本テーマは以下の研究グループで推進しているが、研究代表者の戸井のもとに、互いに連携して広帯域 PAT プローブの開発を行っているため、報告書に関しても総括研究報告書と分担研究報告書に分けることなく、すべてを総括研究報告書としてとりまとめて作成した。

戸井 雅和	京大院医学研究科乳腺外科学教授
椎名 毅	京大院医学研究科人間健康科学系専攻・生体医工学教授
富樫 かおり	京大院医学研究科・画像診断学・核医学教授
佐藤 亨	京大院情報学研究科・電磁波計測理論教授
金尾 昌太郎	京都大学医学部附属病院放射線部 助教
片岡 正子	京都大学医学部附属病院放射線診断科 特定病院助教
浅尾 恭史	キャノン(株)・総合R&D本部・医用イメージング第二開発推進プロジェクト主幹研究員

A. 研究目的

本研究は、文部科学省「先端融合イノベーション事業」(京都大学-キャノン協働研究プロジェクト:CKプロジェクト)の1つとして、取り組んでいる「光超音波マンモグラフィ」の臨床現場への適用を迅速かつ効率的に進める上で必要な、広帯域PATプローブの開発と活用を進めるものである。

乳がん罹患者は全世界で 110 万人に達し、年々増加傾向にある。日本でも女性のがん罹患の1位は乳がんであるが、日本人の乳がんの好発年齢は 40 歳代であり、欧米よりも若いという特徴がある。乳がん検診ではマンモグラフィが普及してきたが、乳腺密度が高い 40 歳代では精度が低下し、また、被曝の問題から 30

歳代には適さないと言われている。

「光超音波マンモグラフィ」(以下 PAM)は、被曝の心配がなく、また乳腺密度の高い若年層の乳がん診断に適する超音波像との同時計測も可能なため、高齢者だけでなく30～40歳代の若年層の乳がん診断に関して飛躍的な精度向上が期待できる。また、形態と機能イメージングの統合を可能とする装置を目指している。これにより例えば腫瘍の新生血管の描出によるがんの超早期診断や、良悪性の鑑別診断、治療効果の正確な評価が可能となることで、適切な治療法選択につながり、患者のQOLの向上や医療費削減などの経済的効果も期待できる。また、簡便さに加え将来の小型化技術の開発により近くの診療所で受診可能になれば、乳がんの早期診断率も飛躍的に向上し、死亡率低下につながる事が予想される。本手法は、造影剤などを必要としないものであるが、さらに将来は分子プローブの開発により、腫瘍特異的に高コントラストなイメージを得られる可能性があり、更なる高精度な診断が期待できる。

PAMは、これまでの基礎研究(J. Biomed. Opt.9. 1129 (2004)等)で、近赤外光の吸収分布から、がん腫瘍の微細血管増殖の状態や組織性状の違いを捉えることで、早期検出に効果的であるとの見通しを得ている。一方で、各病態と超音波像との詳細な関係は解明されていない。このため、PAMの臨床応用を迅速かつ適切に行うために、各病態と超音波像との関係を明らかにして診断基準を整備するとともに、新規診断情報を提供する画期的な医療機器としての有効性を明らかにすることを本研究の目的とする。

B. 研究方法

B-1. 概要

PAM装置については、京都大学-キャノン協働研究プロジェクトにおいて、これまで培ってきた高次超音波画像技術と、キャノンの光イメージング技術を結集して、世界初の全乳房撮影可能なプロトタイプ機を開発し5

年以内の医療機器の薬事申請を目指している。平成23年度は計画通り、乳がん患者を対象とし、PAM 試作1号機を用いた探索的臨床研究を完了させた。また、この開発を加速するため、先端医療開発特区「イメージングが拓く革新的医療機器創出特区」(研究代表：平岡真寛)にて早期実用化を図るべく開発を推進した。さらに、平成23年度に完成した経済産業省「先端医療機器開発・臨床研究センター」を拠点とし、PAM 試作2号機による臨床研究を進める準備を整えた。

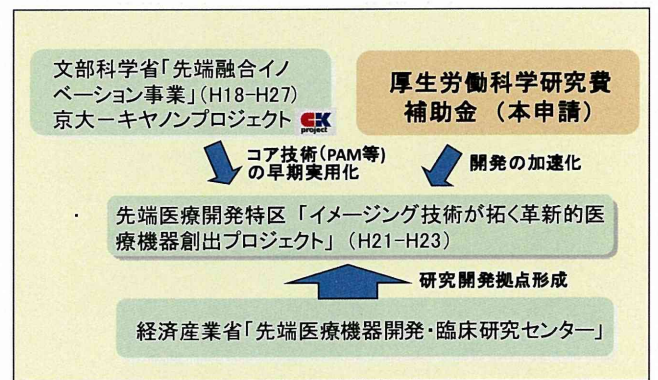


図1 研究スキーム

本研究テーマでは、上記PAMの実用化を更に加速することを目指して、PAMで得られた画像の臨床的価値を明らかにするための診断基準の整備を行う。その手段として、血管像を詳細に観測するための高解像PATプローブを開発する。

すなわちPAMではがん部位で血管が集簇している領域が高コントラストとして描出されることを利用して、全乳房範囲でのがんの分布を撮影するため、解像度よりもむしろ十分な診断深度の確保を優先させている。このため現在開発中のPAM装置単独では空間分解能が不足しており微細血管の詳細な描出には適さない。

そこで本研究では、新生血管など100μm以下の微細血管の構造を詳細に捉え、さらにマルチスペクトルの光超音波像を計測できる、広帯域PAT(Photo Acoustic Tomography)プローブを開発する。このプロ

ープは高解像な像を得るために、PAM 装置よりも高周波帯(例えば数十 MHz)の範囲までの超音波が受信可能なものである。この場合、超音波や光の減衰によって体表から深部を見ることは困難であるが、逆に体表近くは詳細に観察することが可能となる。これにより、浅在性の腫瘍に対しては体表から、あるいは術中に患部近くに当てて計測することを想定すれば、高解像な血管イメージングを行うことが可能となる。この広帯域 PAT プローブにより、詳細な病態と PAM で得られる光超音波像との関係を明らかにすることを計画している。これにより PAM の診断基準の構築と、高機能化に向けて探索的な臨床研究を進め、その早期実用化を図る。

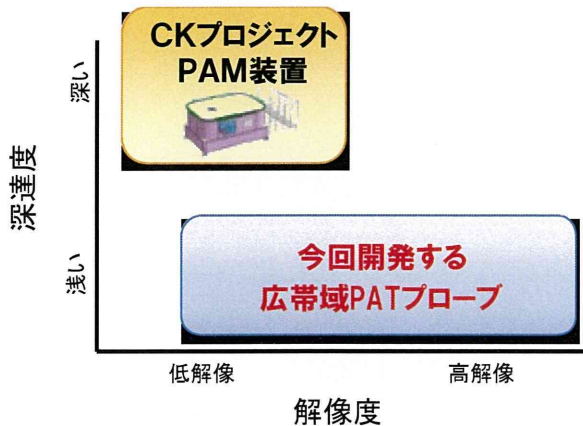


図2 広帯域 PAT プローブの狙い

また本 PAT プローブは詳細な血管像を描出できることから、化学療法等による血管収縮の様子を観測できる。このため、効果的ながん治療に役立てる装置としての臨床応用が期待できる。更に乳腺に限らず、他の診療科に対しても応用できるものと期待できる。

B-2. 研究計画

本研究は下図のロードマップに示すように、

- (1)広帯域PATプローブの開発、
- (2)診断基準の整備、
- (3)マルチスペクトルによる高機能化

の3つの課題について取り組む。(1)は、生体医工学を専門とする椎名と、装置開発を担当とするキャンノンの

浅尾が主として担当する。(2)は、乳腺外科を専門とする戸井による臨床評価を中心に、富樫が画像診断学の立場からPAMとMRIの対比などマルチモダリティの画像解析を行う。(3)は椎名、浅尾に加え、電磁波計測が専門の佐藤が広帯域レーダー技術の応用の視点から加わる。実際には、相互に関連しあうので、研究代表者である戸井の統括のもとに、密接に協力して推進する。

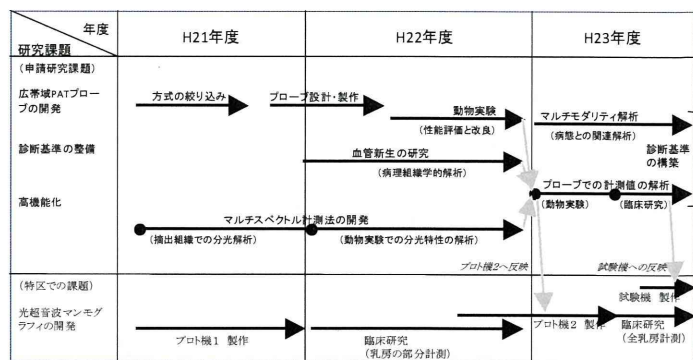


図3 研究計画のロードマップ

平成21年度は上記ロードマップに準拠して、広帯域 PAT プローブの候補技術の絞り込みと、マルチスペクトル計測法のための開発環境の整備を行った。平成22年度は、各病態の微細血管構造と PAM 像との相関を明らかにして診断基準を構築し、PAM 装置実用化を加速するための研究を推進した。平成23年度は微細血管を描出可能な装置を完成させ、動物実験を通して効果の検証を行った。

B-3. 研究の手段

本年度は各病態の微細血管構造と PAM 像との相関を明らかにするために、以下の二つの研究を推進した。

1. 新生血管の病理組織学的解析
2. 広帯域 PAT プローブの開発

一つ目はがんの成長にともなって形成される新生血管の病理組織学的解析であり、摘出がん病理標本での血管像と PAM 像とを対比する研究である。これは現在の PAM 臨床研究のエビデンス構築を狙いとしてい

る。

本年度は、当初より検討を続けている CD31 染色を用いた血管密度の定量化を推進するとともに、特殊染色を用いることによって低酸素状態に曝されていた組織を描出させる手法を構築した。これにより、PAM によって得られる酸素飽和度画像と病理染色とを対比させる研究を推進した。また組織の低酸素状態と、血管密度ならびに血管の成熟度を同時に解析し、新生血管の生成メカニズム解明に迫りうる手法の確立を狙いとして研究を推進した。

二つ目は冒頭に述べた広帯域 PAT プローブの新規開発である。平成22年度に試作を進めた二つの候補技術について、本年度はさらなる改善検討を行い、ファントム評価および動物実験を行った。こうした実験により課題を抽出し実用化に向けた構想設計を実施した。

以下、これら研究の手段について詳細に述べる。

[新生血管の病理組織学的解析]

PAM では、組織内の吸収係数とヘモグロビンの酸素飽和度を画像化することが可能である。これらの画像はがんによって生成される新生血管と強い相関がある。この新生血管を病理組織学的に解析する方法を述べる。

PAM の臨床研究プロトコールに基づいて、手術する直前の患者を対象として被験者を選択し、PAM 画像を取得した。その後、通常の診療方針に基づき手術を行い、摘出組織をパラフィンブロックとした。得られた病理組織は、通常診療に必要な染色及び診断が行われた後、本研究に必要な特殊染色を実施した。

PAM によって得られる吸収係数は主としてヘモグロビンの濃度を示すものであるため、がんの成長に伴って生成される新生血管の量と相関する。そこで、血管内皮細胞を CD31 によって染色させ、画像処理によって定量化を行った。この結果と PAM の吸収係数を表す画像とを対比させた。

一方 PAM は、複数のレーザー波長によって得られた PAM 像から吸収係数の波長依存性を求め、酸素飽和度画像を計算し、表示させることが可能である。これに関し、従来酸素飽和度を表す画像に対しては病理染色によって傍証する手段がなかった。そこで、文献調査を実施した結果、CA IX (シーエーナイン) という抗体を採用することによって組織の低酸素状態を見積もることが可能であることがわかった。この抗体と、従来構築してきた画像処理技術を組み合わせ、低酸素領域を定量化することによって PAM の酸素飽和度画像の傍証とすることができるかどうかを検討した。

これらの検討と並行し、SMA による染色を行った。これにより、血管を正常に働かせるための機能を付与するペリサイトの有無を見積もることが可能となり、その結果血管の成熟度を見積もることができる。つまり、これら CD31, SMA, CA IX の結果を同時に考察することによって、酸素飽和度の多寡と、血管の機能および量を見積もることが可能となる。

つまり本研究によって PAM 像のエビデンスが構築されるだけでなく、癌による新生血管発生のメカニズムの理解につながられることが期待される。

[広帯域 PAT プローブの新規開発]

上記のとおり病理解析により血管像を求め定量化する一方で、微細血管を in vivo でイメージングする手法に関して開発を進めている。これを実現する手段が広帯域 PAT プローブである。これにより PAM 測定結果と微細血管構造との対応関係が非侵襲で測定可能となるため、診断基準の構築に極めて有効な手段となる。

平成22年度までは候補となる技術を選定し、1次試作を行ってきた。平成23年度は前年度までの結果を更に発展させ、光音響顕微鏡方式 (Photo Acoustic Microscopy: 以下、PA-MS 方式と称する) と、Fabry-Perot 干渉系を超音波センサとして用いた方式 (以下、FP 方式と称する) の2種について実用化に向

けた検討を行った。

ここでまずこれらの原理を簡単に述べる。

PA-MS 方式は Washington 大学を中心に研究が進められている方式であり、光音響波を受信する際にフォーカストラנסデューサを用いることが特徴である。被験体の広い範囲に光が照射された場合、様々な位置から光音響波が生じるが、その一部分のみ、すなわちフォーカストラנסデューサの焦点となる微小な範囲のみ信号を受信するように設定する。これにより微小な領域での光音響信号を得ることが可能となる。また時間軸方向で強度変化の解析を行うことによって、奥行き(Z)方向に存在する吸収体の分布を知ることができる。こうした光音響波受信を被験体の水平面内(XY 平面内)において走査しながら測定し、データ保存し、全体を統合して画像化することによって、高解像な三次元光音響像を得る方式である。

一方の FP 方式は図4に表される原理によって超音波受信を行う。

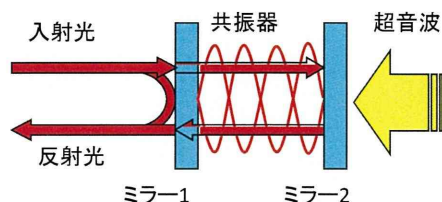


図4 FP方式の原理図

図4に示すとおり、2枚の平行なミラーを構成することによって光干渉が生じる共振器が得られる。共振波長はミラー間の距離と用いる波長によって決定される。図5はシミュレーションによって求めた FP 方式の特性を示す図である。この図のように干渉条件を満たす膜厚において急峻に反射率が変化する。

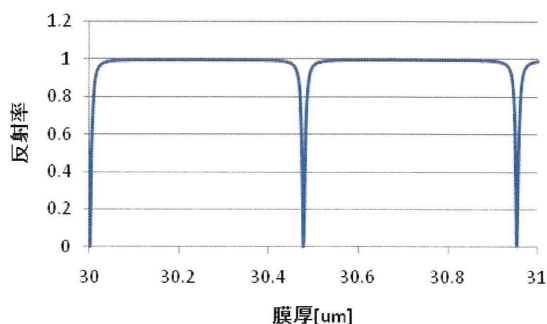


図5 FP方式の特性を示す図

ここで、共振器にパリレンなどの所定の弾性を有する高分子樹脂膜を用いれば、外部からの圧力によって変形が生じる結果、ミラー間の距離を変化させることが可能となる。これを利用すれば、音波の到達による圧力変化に伴って膜厚が変化するため、反射率の変化として検知することが可能となる。例えば、無圧の条件において図6における反射率50%の条件に膜厚を設定しておけば、音波受信によるわずかな膜厚変化を反射率の変化として観測することが可能となる。

反射率を測定する光のスポット径はレンズによって自由に変化させることが可能である。このため、光を絞ることによって微小な領域の圧力変化を検知することが可能となる。このため、簡便な構成で二次元アレイ型探触子と同等の素子を得ることが可能となる。これにより、得られた音波を画像再構成することによって、高精細な三次元光音響画像を得ることが可能となる。また一般に二次元アレイ型探触子では素子面積を小さくすれば感度が低下するが、本FP素子では測定する光の強度を増加させることで受信光強度を確保することができるため、超高精細な素子であっても原理的に感度を低下させることがないことが特徴である。

本年度は前年度までの試作を更に発展させるとともに、実用化に向けた検討を推進した。光学系など、用いる部品は可能なかぎり市販の汎用品を用い、必要に応じて特注の加工を行った。

(倫理面への配慮)

試作した装置を用いてヌードマウスによる動物実験を行った。実験動物の使用は、本研究における課題抽出に必要な最小限の量とした。

ヒトを対象とした PAM 臨床研究や病理組織の解析においては、京都大学医の倫理委員会ならびにキヤノン株式会社生命倫理委員会に諮り、倫理的に問題がないことを十分確認した上で検討を行った。

C. 研究結果

C-1. 新生血管の病理組織学的解析

(血管密度の解析)

PAMによって得られる吸収係数分布の画像と血管密度との対比を行うために、昨年度まで検討を進めてきた CD31 染色部位の自動カウントと、PAM 像との対比を継続して検討を進めている。

その結果、PAM によって強い信号が得られた位置には血管が集簇している様子が観測された。これにより、PAM 像と病理像とが関連していることが明らかとなった。なお本年度の結果も、昨年度までの報告書に記載とほぼ同等であるため、本報告書では省略する。

ただし、これまでは完全な自動化を目指して検討を進めてきたが、詳細に観察してみると、CD31 染色では、必ずしも血管内皮細胞のみを染色するわけではなく、血管以外の異なる場所に非特異的な染色が生じた場合があった。この場合、画像のみで判定し自動処理させるだけでは誤った結果を導いてしまうことがあった。このため、染色像をつぶさにチェックし、非特異的な染色の有無を確認しながら定量化検討を進めている。

同時に、非特異的な染色が生じないような染色条件の再検討も進めている。これはまだ完全な結果が得られておらず、今後の課題として残されている。

(低酸素領域の解析)

次いで、PAM によって得られる酸素飽和度分布の画像と組織の低酸素領域との対比を行うために、本年度は新たに CA IX による染色を実施した。また、がんによる新生血管と正常血管との間には血管としての機能の成熟度に違いが存在し、そこには血管周囲にペリサイトが存在するか否かが重要であるという仮説がある。そこで新たに SMA 染色を実施した。

また、更に本研究では、①血管密度、②血管分化度(成熟度)、③血流動態、④組織の低酸素状態が関連し、がん周囲の血液のヘモグロビン酸素飽和度が決定されるという仮説を立てた。そこで、まずは①を解析するための CD31 染色に引き続き、②を解析するための SMA 染色(ペリサイトの有無)、ならびに④を解析するための CA IX 染色を実施した。

図6はPAMによって得られる酸素飽和度画像の一例である。ここでは皮下にある表在血管部位の画像を示しており、画像の明るさが吸収係数の大小を表し、画像の色相が酸素飽和度の大小(赤→酸素飽和度大、青→酸素飽和度小)を表している。

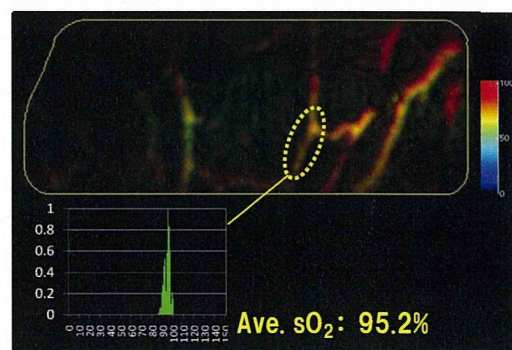


図6 PAM によって得られる酸素飽和度像の一例

こうして得られる PAM 画像と病理結果とを対比させるために、血管集簇、酸素飽和度および血管の成熟度を、同一の領域内で評価することを狙いとし、研究をスタートさせた。

しかしながらこの場合、単一のスライドのみを用いて複数の抗体を染色させることは、組織へのダメージが生じるなどの理由で困難であることが予想された。検討

の結果、2種の抗体までであれば Double staining 手法により実現が可能であった。しかしながら、今回の検討で必要とされた3種の抗体の同時染色が非常に困難であったため、別の手段を検討する必要が生じた。

そこで、パラフィンブロックを4 μ m ずつ連続的にスライスした病理スライドを用いてそれぞれの抗体による染色を行い、染色されている領域を画像処理によって抽出し画像上で重畳させる手法を採用した。結果の一例を図7に示す。

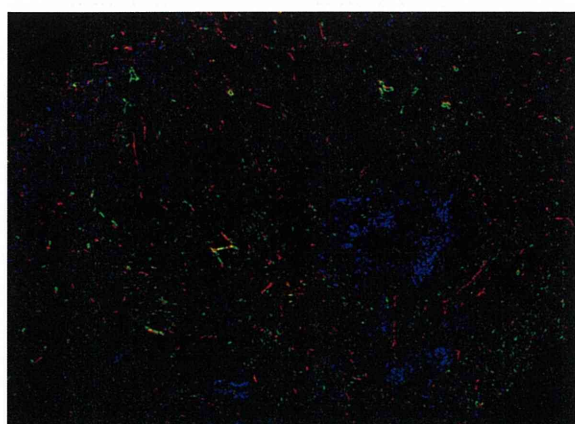


図7 結果の一例

ここで、赤が CD31 染色部位、緑が SMA 染色部位、青が CA IX による染色部位である。この図から、CD31 染色が少ない領域に CA IX 染色が多い様子が観測される。これは血管量が少ない領域では酸素供給が不十分であり、低酸素状態になると考えると妥当な結果である。

さらに詳細に観察すると、CD31 と SMA が二色同時に染色されている領域では CA IX 染色が少ない状態が観察されている。これは血管としての機能が働いている領域では酸素供給が円滑であるため、低酸素領域が少ないことを示唆している。今後は PAM によって得られる酸素飽和度と、本研究の病理血管との相関を解析する計画である。

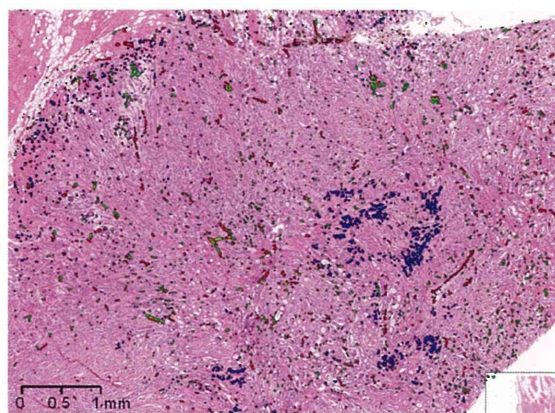


図8 HE 染色画像に重畳

さらに、図8は図7の結果をHE染色画像に重畳させたものである。こうした病理像との対比データを蓄積しながら、がん細胞の悪性度などと血管の質・量および組織の低酸素状態との相関を解析することが、今後の新生血管の発生メカニズムの解明につながるものと期待される。

C-2. 広帯域 PAT プローブの開発

先に述べたとおり、本検討では PA-MS 方式と FP 方式とを同時並行で開発を行った。それぞれについて結果を示す。

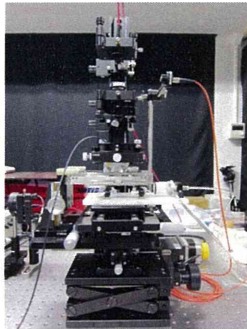
(PA-MS 方式)

[1] in vivo 測定用装置改良

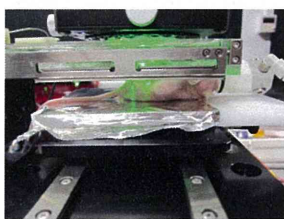
生きた状態でのマウスの微細血管を測定するために装置の改良を行った。音響マッチングをとるため、生体と探触子の間に水槽を配置し、水槽の底面は超音波の反射を抑えるためにポリエチレンフィルムを用いた。水槽の底面により生体を軽く押し当てて保定した。水温はマウスの苦痛にならないよう体温(約 37°C)になるように制御した。

測定中は吸入麻酔を行い、麻酔薬にはエスカインを用いた。一連の PA-MS 測定後に吸入麻酔から開放した後は、マウスが実験前の活動状態に戻ることを

確認した。



(a) PA-MS 装置外観



(b) 測定中の様子

図9 in vivo マウス測定系

・測定時間短縮化システム作成

マウスへの負担を軽減するために測定時間の短縮化を行った。NI 社製の PXI-5154 を用いて、データ転送にかかる時間を大幅に短縮した。ブロックダイアグラムを図10に示す。

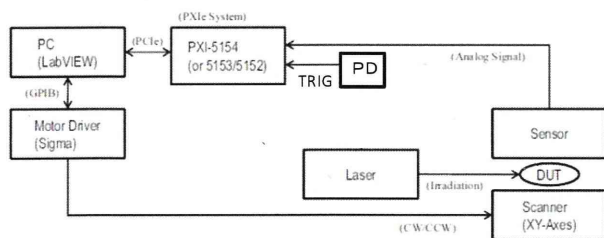


図10データ取得のブロックダイアグラム

これにより昨年度までの約4分の1の測定時間で画像取得が可能となった。例えば 10mm 角の領域を取得する場合、従来 60 分かかっていたものが本検討によって 16 分で取得できるようになった。現在その測定時間の律速となっているのは、光音響信号を励起するためのレーザーの繰り返し周波数である。

現在のところ10Hz の繰り返し周波数を有するレーザーを使用しているが、今後は高繰り返し周波数のレーザー (DPSSレーザー等) を用いて更なる測定時間の短縮化を行う計画である。

[2] 担癌マウス in vivo 測定

吸入麻酔下にて生きた状態における担がんマウスを測定した。測定に用いたマウスは、ヌードマウス (BALB/cAJcl-nu) であり、ヒト乳がん (MDA-MB231 株) を左足の付け根に担がんさせ腫瘍を成長させた。腫瘍径が約 5mm になった時点でSPF環境下から取り出し、48時間以内に光音響顕微鏡を用いた腫瘍部の血管の測定を行った。

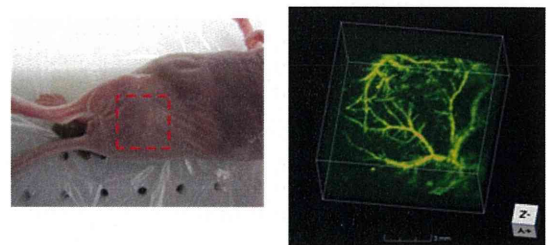


図11 測定結果例 (左: データ取得範囲、右: 撮影結果)

本実験で用いたレーザーの測定波長は 532nm、サンプリングレートは 500MHz、X 方向と Y 方向の走査は共に 0.1mm ピッチで 101 ステップの走査を行った。測定時間は約 16 分であった。

図11左の写真内の点線部を画像化し3D 表示したものが図11の右図である。腫瘍まわりの血管がイメージングされている結果が得られた。

・腫瘍有無による血管密度の比較

同一マウスにおける腫瘍部位(左足)と担癌していない部位(右足)の PA-MS 像を測定し比較した。本検討では、ヒト表皮がん A431 株を担癌したマウスを測定した。本測定は X 方向と Y 方向の走査は共に 0.05mm ピッチで 101 ステップの走査を行った。結果を図12に示す。

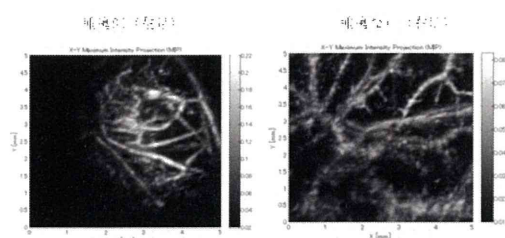


図12 腫瘍有無の比較
(左:腫瘍あり、右:腫瘍なし)

この結果、健常側(右足)よりも腫瘍側(左足)の血管密度の方が高い様子が観察された。

・腫瘍細胞株による血管密度の比較

次いで様々ながんの細胞株を培養し、担がんさせた腫瘍を測定した。今回は、ヒト類表皮癌 A431、ヒト結腸腺癌 LS180、ヒト繊維肉腫 HT1080、ヒト乳腺癌 MDA-MB231 を用いた。結果を図13に示す。

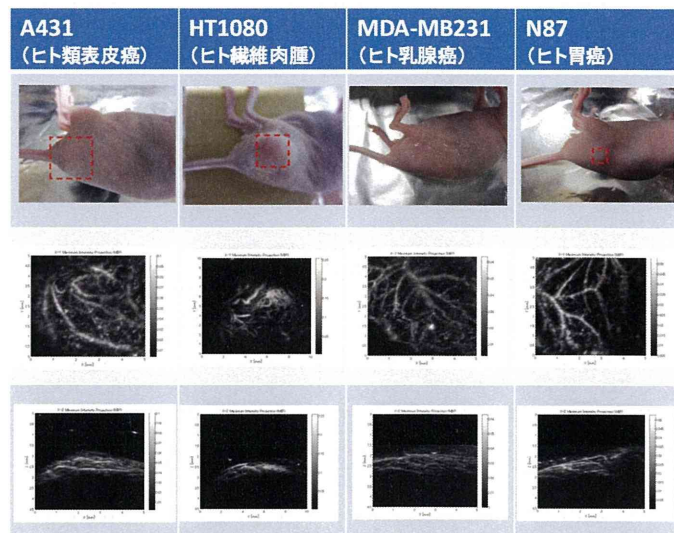


図13 さまざまな株の担がんマウス

現在のところ、血管の量や形態に若干の差異が見られるが、現段階ではまだ多くのマウスを用いた実験を実施できていないため、単なるマウスの個体差なのか株の差が現れているのかは明らかではない。今後は実験数を増やして傾向を解析する予定である。

また、乳がん系の細胞株についても今後検討を進める予定である。

[3] 光音響画像と免疫染色画像との比較

ヒト表皮がん A431 株を担癌したマウスを PA-MS にて測定し、その結果と免疫染色の結果との比較を行った。

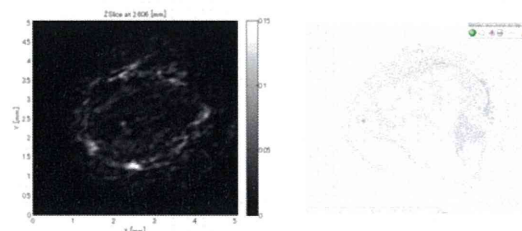


図14 PA-MS 像と免疫染色画像との比較 (左: PA-MS の断面像、右:腫瘍断面の CD31 染色画像)

この3D 画像を走査面(XY 面)でスライスして表示したものが図14左図である。腫瘍周囲の強度が強いことが分かる。

PA-MS 測定後に腫瘍を摘出してスライスしたものを Zinc 固定液で固定した後パラフィンブロックとし、スライドを作成し CD31 により染色した。図14右図は染色後の顕微鏡画像であり、腫瘍周囲が多く染色されている。これらの結果より、腫瘍周囲に血管が多く内部には少ないという免疫染色の結果を PA-MS 画像で再現できることが分かり、PA-MS 画像の妥当性が示された。

[4] 血液の酸素飽和度測定

PA-MS において血液の酸素飽和度のイメージングを行うにあたり、値の妥当性を検証した。実験の流れを図15に示す。

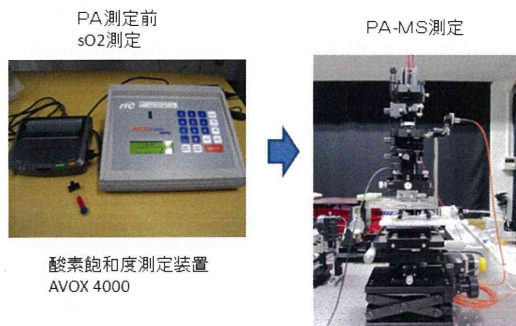


図15 酸素飽和度値の妥当性検討の流れ

PA-MS 測定前に市販で実用化されている酸素飽和度測定器(AVOX 4000)を用いて酸素飽和度を計測した。その後、PA-MS 測定を行い、測定後に再度 AVOX 4000 による計測を行った。PA-MS 測定中の酸素飽和度はこの測定前と測定後の値の間に入るようになる。

血液は図16に示すキュベットにいれて PA-MS、AVOX 共に同一サンプルで測定した。

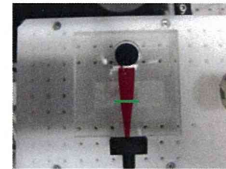


図16 使用したキュベット

PA-MS は図16の緑の実線上を走査しながら測定した。0.1mm ピッチで 121 ステップの走査を行った。測定波長は 756nm と 797nm の 2 波長を用い、この波長のデータから酸素飽和度を算出した。

サンプルは4つ酸素飽和度の異なるものを作製した。血液の酸素化は酸素置換し、脱酸素化は二酸化炭素で置換することにより行った。それぞれの、サンプルの AVOX での値を表1に示す。測定前と測定後の値はほとんど変化がなかった。

表1 酸素飽和度の経時変化

酸素飽和度値@ Avox		
Sample	測定前	測定後
1	95.5 %	95.5 %
2	77.1 %	76.6 %
3	61.3 %	61.7 %
4	11.4 %	12.3 %

図17は、各サンプルの PA-MS による実線上の酸素飽和度値をヒストグラム表示したものである。各サンプルにおけるピーク値は AVOX による値とほぼ一致している結果が得られた。

この結果により PA-MS により酸素飽和度のイメージング画像が定量的に解釈可能であることが分かった。

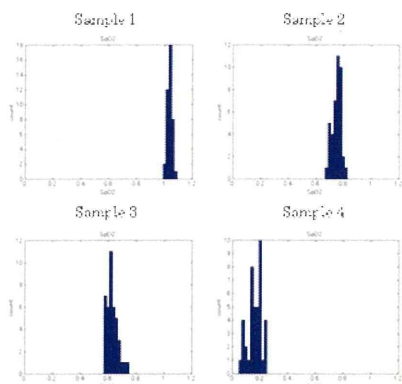


図17 PA-MS による酸素飽和度値のヒストグラム

次にタイゴンチューブ内に酸素化血(左、AVOX 値 97%)と脱酸素化血(右、AVOX 値 20%)を入れた血管ファントムを作製して PA-MS 測定を測定した。図18に血管ファントムの写真を示す。

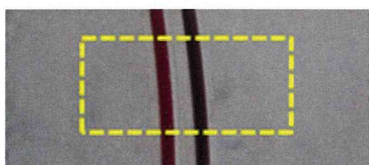


図18 血管ファントム

図19は PA-MS による酸素飽和度イメージングの結果である。酸素飽和度の大小が良好にイメージングされている結果が得られた。数値データを比較検討した結果、今回の血管ファントムで得られた脱酸素化血の酸素飽和度の値が、概ね30%程度であり、AVOXによって測定された値より約10%高かった、これはチューブに血液を封入する際に、大気に触れ酸素化されてしまったためであると考えられる。一方の酸化血に関しては、両者はほぼ同一の値を示していた。

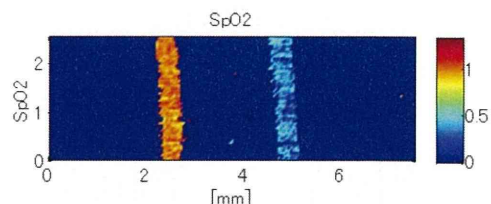


図19 血管ファントムの酸素飽和度測定結果

引き続き、上記の検討結果を元にして、in vivo マウスの酸素飽和度測定を行った。図20にマウス尾血管の酸素飽和度測定結果を示す。

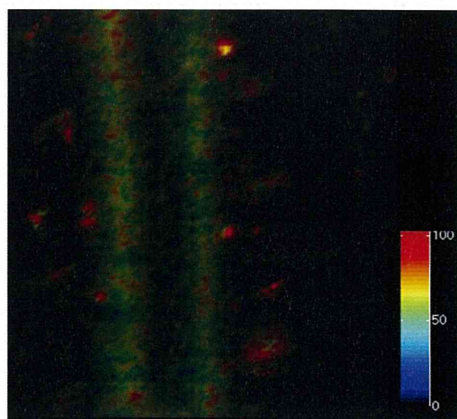


図20 マウス尾血管の酸素飽和度測定結果

このように生きたままのマウスの血液の酸素飽和度を画像化することができた。現在のところノイズの影響により、場所によって数値にばらつきが存在しているが、今後、SN比を改善することによって画質改善を図り、正しく定量データが得られるものと考えている。その上で本研究にて構築した実験系を用いて腫瘍の状態や性質と酸素飽和度との関係を測定し、医学的な知見を蓄積する予定である。

(FP方式)

平成22年度に引き続き、平成23年度は University College London(UCL)の研究グループから報告されたFP方式(L.J. Zhang et al., Applied Optics, 48(10),

2009)を、広帯域プローブとして実用化する際に生じる課題の抽出と、課題解決に向けた検討を行った。さらに、測定の高速度化を目的として平成22年度に検討したガルバノミラーを用いた方式に加え、ビデオカメラを用いてプローブ受信部の二次元面内の音響圧力分布を一括でデータ取得する方式の検討を実施した。

本年度検討した主な課題は次の通りである。

- [1] 従来のFP方式の測定時間の改善
- [2] 高速二次元エアセンサ方式システム構築
- [3] 新たな課題の抽出
- [4] 今後の改善方針

[1] 従来のFP方式の測定時間の改善

図21に昨年度の試作に用いたガルバノミラー方式の装置構成図を示す。

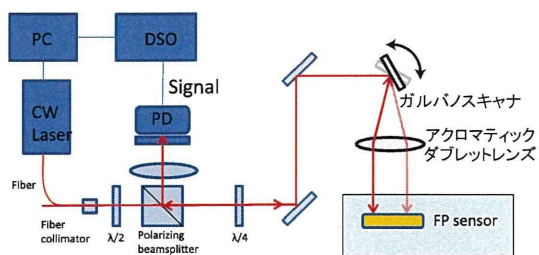


図21 FP方式の装置構成図

現状ではガルバノミラー方式の測定において、各測定箇所における光音響信号に対する感度が最も高くなるレーザー波長(以後、最適波長と呼ぶ)の探索処理が測定時間の主なボトルネックになっている。今回、昨年度の測定シーケンスを見直し、フォトダイオードの測定データのPCへの転送を各箇所の測定ごとに行うのではなく、すべての測定が終了した時点で行うことで、最適波長探索時間を約 1/2 に短縮することが可能になった。例えばこれにより 51×51(4.35mm 角)の測定点数で約 20 分に短縮させることができた。

ところが、この測定時間ではまだ実用には程遠いため、更なる改善を要する。具体的な対策としては、あらかじめ個々のセンサーの最適波長分布を探索してお

き、実際に測定する際には探索波長領域をある程度絞った状態にしておくことや、現状では波長探索のための反射強度と光音響信号をともに同じオシロスコープで取得しているが、これを別の計測器で行うことで処理速度を上げることが想定された。

しかしながら、こうした検討を盛り込んだとしても臨床に適用できるほどの高速化が出来る見通しを得ることができなかった。そのため、ガルバノミラー方式による検討はここまでとし、二次元エアセンサによる画像取得方式を検討することとした。

[2] 高速二次元エアセンサ方式システム構築

上記結果を受け、二次元エアセンサを用いたFP方式の検討を開始した。エアセンサ(CCD)を用いた検討は UCL の研究グループで超音波センサーとして論文として報告されている(Elec. Lett., 2006, Vol. 42, No. 3)ものの、単発の発表にとどまっております、光音響への応用事例など、その後の継続的な発表がない。

これが実現出来れば、FPセンサーによって受信された超音波信号の二次元面内の音圧分布を、エアセンサを用いて一括でデータ取得することができるため、リアルタイムでの測定が実現可能になる。

そこで平成23年度はFP素子開発と並行し、エアセンサ方式による実験システムの立ち上げを行った。我々の検討に用いた二次元エアセンサは Phantom V710(ノビテック社製)という高速CMOSエアセンサであり、最短露光時間は 300 ナノ秒である。画像は 12bit の階調分解能を有している。

UCL ではパルス光源を測定光としているが、本検討では CW 光源を測定光とし、CMOS エアセンサの高速度性を利用して音響波をイメージングしている点が異なっている。

図22にエアセンサ方式による実験装置の構成図、図23にこの装置の外観を示す。

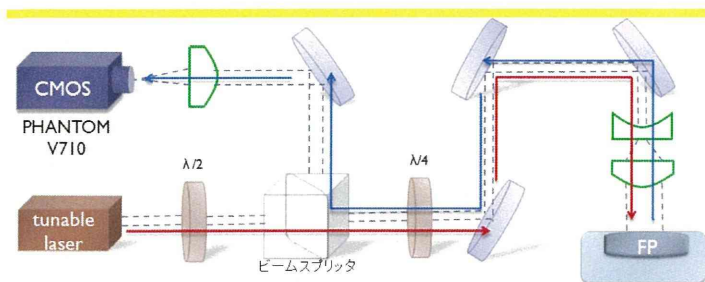


図22 エリアセンサ方式の構成図

次いで、本素子を用いた音圧検知について検討を行った。超音波の音源として1MHzの中心周波数を有するフォーカストランスデューサを用いて、FP膜に周波数1MHzの正弦波を印加して超音波を照射した。一方CWレーザーを測定光としてFP膜に光を照射し、フォトダイオードを使って反射率の変化を観察した。図25(a)がトランスデューサへの入力波形、(b)が反射率を測定した際のフォトダイオードの応答波形である。

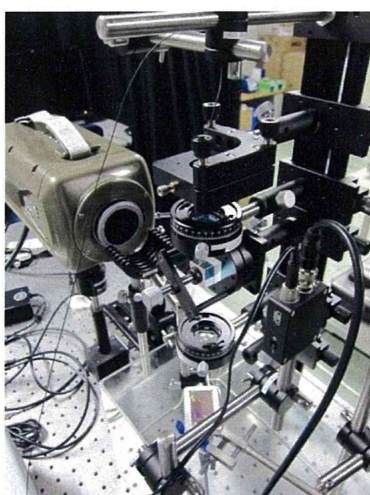


図23 エリアセンサ方式の実験系の外観

また、この方式に用いるFPセンサーの特性評価を行った。図24に反射強度の波長依存性を示す。これによりFP特性に起因する反射率の落ち込みが観測されていることが確認された。

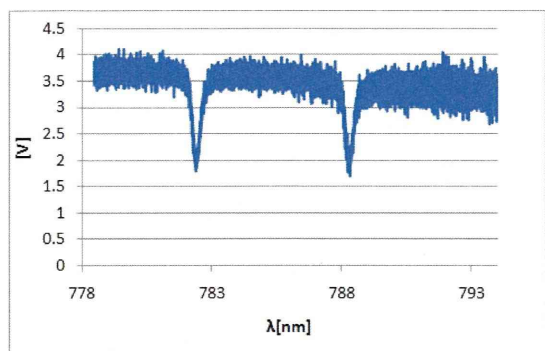
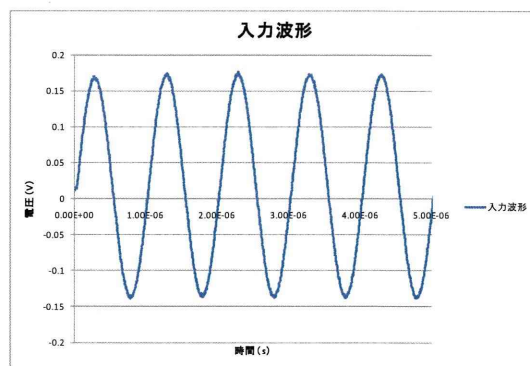
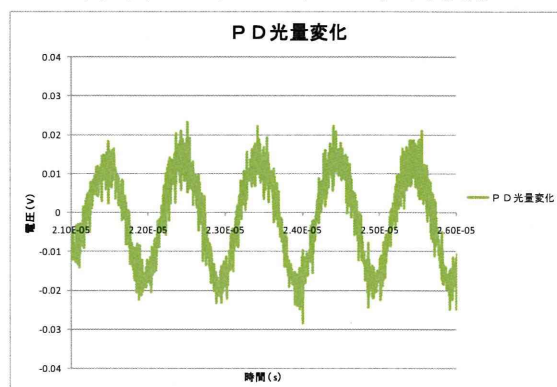


図24 FPセンサーの反射強度の波長依存性



(a) トランスデューサへの入力波形



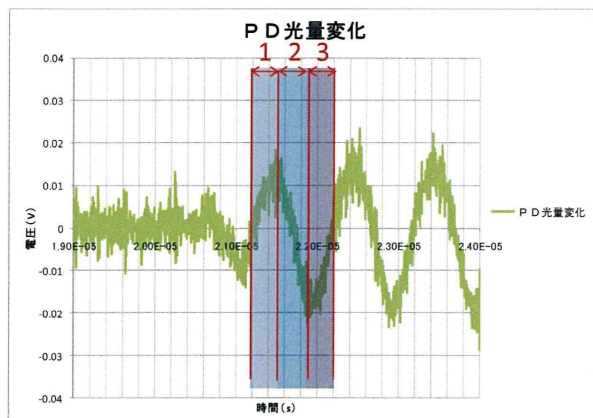
(b) フォトダイオードの応答

図25 音圧印加による反射率応答

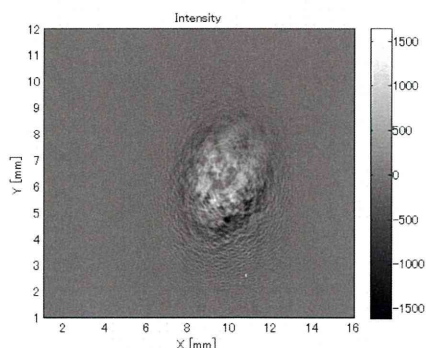
この結果より、入力波形と同じ周波数を有する正弦波状の光量変化が得られることが確認できた。

次いで、この素子でエリアセンサによる測定を行った。エリアセンサの露光時間を333nsとして正弦波の1周期を3分割した。それぞれのタイミングで露光し、得られた画像を記録した。超音波受信時に得られたそれ

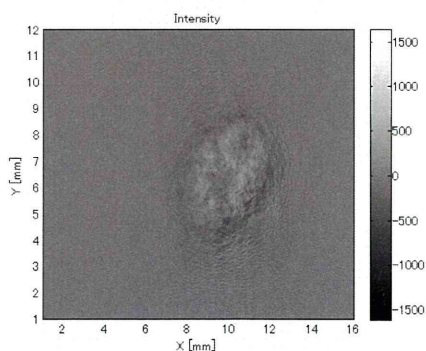
それぞれの画像について、無音状態で得られた画像との差分を計算した。結果を図26に示す。



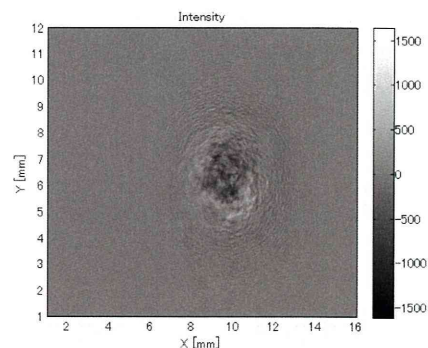
(a) 画像取得のタイミング



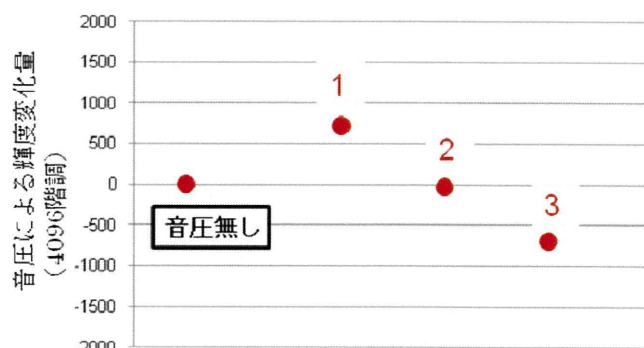
(b) 1のタイミングでの露光時間で取得した画像



(c) 2のタイミングでの露光時間で取得した画像



(d) 3のタイミングでの露光時間で取得した画像



(e) (b)~(d)の各画像の中央近傍での輝度

図26 エリアセンサによる音圧検知結果

図26の結果より、今回の実験によって音圧の有無および音圧の正負によって画像の変化を取得することが可能となった。また図26(e)の結果より、画像の中央近傍では音圧によって ± 500 階調以上(全12bit(4096)階調)の輝度変化が得られることが確認できた。

以上より本研究によって、世界で初めて高速撮像カメラを用いて、超音波像のイメージングを実現することができた。

[3] 新たな課題の抽出

昨年度までの検討によって、FP素子用の膜として使用しているパリレン膜の微小粒塊と膜厚分布の問題が明らかになっていた。微小粒塊については画像処理によってデータ上で補正を行うことで対応可能としたが、

膜厚分布問題は依然として解決していない。つまり、上記のエリアセンサを用いる素子を作成する場合には、面内での一括データ取得が必要となるため、一発のレーザー、すなわち単一波長の光源を用いて1画面分の画像を取得する必要がある。そのためには膜厚分布の課題を解決しなければならない。そこで本年度は数十社のプロセス技術や材料を調査したが、仕様を満足する成膜条件を得ることができなかった。

さらに、新たな課題として、実験系の温度変化に伴って、レーザーの最適波長が変化するという課題が新たに抽出された。つまり実験環境の温度変化がプローブの感度に大きく影響することが明らかとなった。そこで、その温度依存性について調査した。

最適波長の温度依存性を調べるために用いた実験装置を図27に示す。

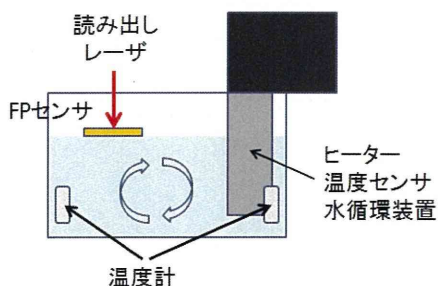


図27 温度可変実験装置の構成図

ヒーターと温度センサーにより装置内の水温を変化させ、その時のFPセンサー面内の最適波長分布を求めた。図28にFPセンサー面の中心点での最適波長の温度依存性を取得した結果を示す。

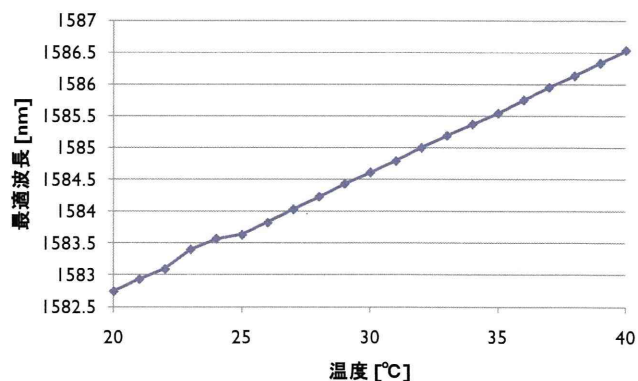


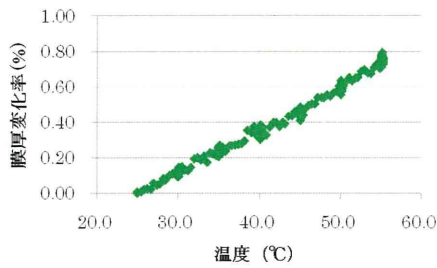
図28 最適波長の温度依存性

この結果より、温度が1°C変化すると、最適波長が約0.2nm 変化するため、環境温度や体温の影響などによって感度の変動してしまうことになる。このため素子の温度依存性についても重要な課題として新たに取り上げた。

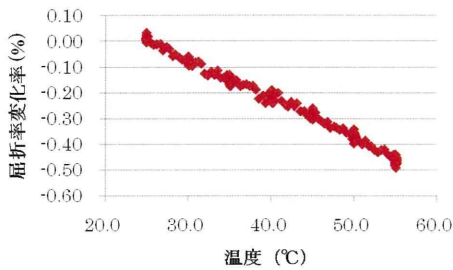
[4] 今後の改善方針

温度依存性の課題に対して、その発生原因について解析を行った。そこで、分光エリプソメトリ M-2000VI (ジェー・イー・ウーラム・ジャパン株式会社製)を用いた光学パラメータ解析を行い、膜厚と屈折率異方性の波長依存性ならびに温度依存性を解析し、評価を行った。ただし、分光エリプソメトリの精度の関係上、パリレン厚を3μmとして評価を行った。

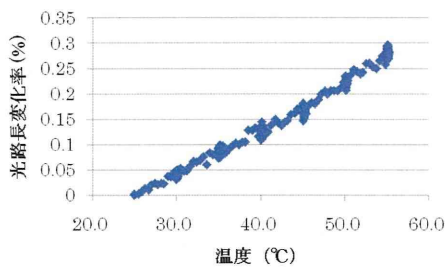
結果を図29(a)~(c)に示す。



(a) 膜厚 d の温度依存性



(b) 基板法線方向の屈折率 n_z の温度依存性



(c) 光路長 ($d \times n_z$) の温度依存性

図29 パリレン膜の温度依存性評価結果

図29(a)の結果より、パリレン膜の線膨張係数は文献値(H. Huang et al., Polymer, Vol. 46, 2005, pp.5949)と合致する値であることが確認された。また、光路長がその変化率よりも小さいのはパリレン膜の基板法線方向の屈折率の温度依存性によって若干キャンセルされていることに起因していることが明らかとなった。

今後こうした温度依存性の問題を解消するためには、膜厚や屈折率の温度依存性がパリレンとは異なる材料を探索し、それらの積である光路長の温度依存性が無いような材料を探索することが解決の指針となる。

一方で上記のような温度依存性の無い膜が実現できるまでは、パリレン膜などの既存材料を使用せざるを

得ない。そのため温度依存性の問題は常に生じることから、温度制御を行うなどして、素子面内にて温度分布や温度変化が極力発生しないような構成のセンサー開発を進める方針である。

次いで、膜厚分布の課題について改善の方針を述べる。上述の通り、成膜プロセスの改善によって面内均一化を図ることができなかつたため、膜厚分布があってもなお、単一波長光源を利用できる手法を検討した。

昨年度の報告書に記載した通り、FP 基板面内にパリレンの膜厚分布が存在することによって、基板面内にて最適波長に分布を生じる。一方、上記の温度依存性によって、温度が変化すると最適波長が変化してしまう。そこでこれら2つの現象を鑑みて、仮に面内に温度分布を付与することが出来れば、使用する波長を固定することができるのではないかと考えた。

そこで図28の実験の際に得られた最適波長の面内分布の結果を用い、仮に波長を 1585nm に固定したとすれば、基板面内にどのような温度分布を付与すれば最適条件となるかを、計算によって導いた。結果を図30に示す。

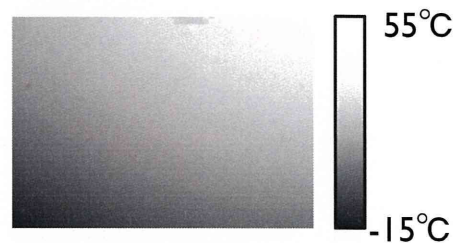


図30 1585nm が最適となる FP 基板面内の温度

つまりこの結果より、温度分布を付与し光路長を素子面内で適宜調整することによって、単一の波長の光源であっても常に 1585nm に最適化されている条件があることが示された。

ここでは基板面内に積極的に温度分布を付与して光路長を制御する場合についてシミュレーションしたが、

現実的の素子に温度分布を付与することには限界がある。そこで、電氣的に光路長を制御できる手法として、液晶ディスプレイの原理を活用することとした。つまり、液晶素子では電圧を印加することによって分子配向状態を変化させ、光路長を制御することができる性質を利用する。図31に素子の構成図を示す。

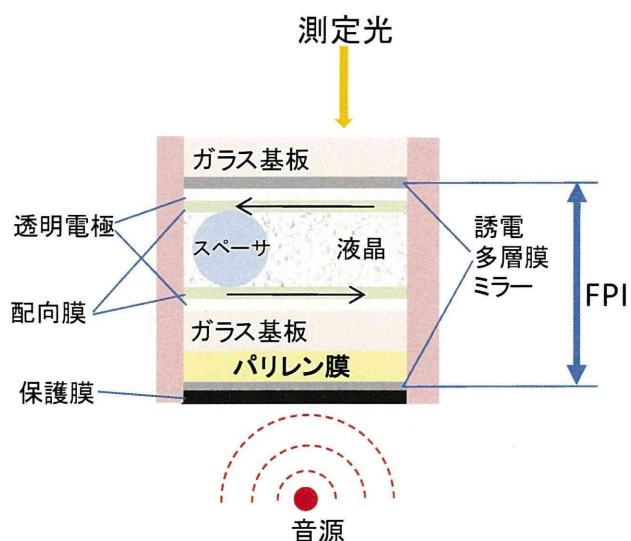


図31 液晶を用いた膜厚分布補償構成

この方式では、液晶層を二枚の誘電多層膜ミラーの間に設け、液晶に電圧を印加することによってFPセンサーの二枚の反射部間の光路長を制御することでパリレン膜の膜厚ばらつきを補正する。これによって図30の温度分布付与と同等の効果が得られることから、面内の各場所で同一の波長で面内全域の音圧分布測定を行うことができる。さらに液晶素子は数十 μm 角以下の画素サイズという高精細化が容易に実現できるため、本研究の高精細 PAT プローブにも適用可能である。

本年度はこうした方式の提案を行い、その方針に基づいて開発を開始した。今後この方式の特性評価を行い、有効性の確認を行う予定である。

D. 考察

D-1. 新生血管の病理組織学的解析

昨年度までに立ち上げた病理組織の定量化システムは高速に血管の定量化を進めることが可能となった。そこで PAM の探索的臨床研究の中で、PAM 画像や MRI 画像のような広い撮像範囲を有する画像診断方法と、病理による血管解析というマイクロな解析結果とについて半定量的な解析検討を続けてきた。しかしながら CD31 が呈する非特異的な染色によって、こうした半定量比較にも影響を及ぼす場合が存在した。そのため目視によるチェックをまず行い、非特異染色の有無を確認してから進めている。若干の手間はかかるが、従来行われていたような手作業での血管カウントよりは、依然として圧倒的に短時間で済んでいる。

今後はこうした目視によるチェックを併用した自動定量化技術を高めていくとともに、元のスライドに関しても染色法を改良することで非特異染色を減少させることが重要である。

一方、本年度から PAM によって得られる酸素飽和度画像のエビデンス構築のために低酸素マーカーによる染色の検討を開始した。今回は時間の関係で探索的な結果を提示するにとどまったものの、今回の検討により、血管密度と低酸素状態と血管の成熟度とを同時に解析しうる基盤を構築できたものと考えている。つまり今回の複数マーカーによる画像解析についても半自動化技術が完成すれば、PAM 画像の撮像範囲全体というマクロな画像とマイクロな組織状態とを対比することが可能となる。またこの手法を多様な腫瘍に適用することにより、新生血管の発生メカニズム解明に迫る結果につながることを期待でき、今後の医学研究の発展につながるものと考えられる。

D-2. 広帯域 PAT プローブの開発

PA-MS 方式は概ね計画通り、良好な成果が得られている。本年度の検討により麻酔下で in vivo マウス測定を可能にしたことと合わせて、測定時間短縮等により