科学研究費助成事業 研究成果報告書

科研費

 令和 3 年 6 月 4 日現在

 機関番号: 11501

 研究種目:基盤研究(C)(一般)

 研究期間: 2018~2020

 課題番号: 18 K 1 2 0 5 1

 研究課題名(和文) In vivoラット深部脳組織における神経線維の三次元断層画像測定

 研究課題名(英文) Three dimensional imaging of nerve fibers at deep tissues of in vivo rat brain

 研究代表者 佐藤 学(Sato, Manabu)

 山形大学・大学院理工学研究科・教授

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究者番号:50226007

研究成果の概要(和文):直径125µm,長さ7.4mmの光通信用ファイバーをイメージプローブ(SMMF)に用いて, 生きたラット脳の断層画像を測定した.深さ分解能,横方向分解能は,それぞれ2.14µm,2.3µmである.SMMF を最大4mmまで挿入して視野直径47µm,深さ147µmの断層画像を測定した。粒状や5µm-10µmの繊維状の空間形 態情報が得られ、接続や屈曲状態が確認された.さらに、画像信号の積算値が灰白質の底部で最大値となってお り、文献との比較から神経線維の断層画像と確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義 我々は、光通信用光ファイバーを用いて、直径125µm,長さ7.4mmのイメージプローブを作成し、実際に生きた ラットの脳神経組織を測定した。現在,このプローブはOCT画像測定ができる世界最細のイメージングプローブ であり、光ファイバーの新しい応用とイメージプローブの進展に寄与した。また、このような画像測定技術は、 未解明な部分が多い白質の病変解明や小動物を用いた脳神経分野の新薬開発への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文): We demonstrate full-field optical coherence microscopy (FF-OCM) using an ultrathin forward-imaging short multimode fiber (SMMF) probe with a core diameter of 50 µm, outer diameter of 125 µm, and length of 7.4 mm, which is a typical graded-index multimode fiber used for optical communications. The axial and lateral resolutions were measured to be 2.14 µm and 2.3 µm, respectively. Inserting the SMMF 4 mm into the cortex of an in vivo rat brain, depths were scanned from a SMMF facet to 147 µm with a field of view of 47 µm. Three-dimensional (3D) OCM images were obtained at depths from about 20 µm to 90 µm. From morphological information of the resliced 3D images and the dependence of the integration of the OCM image signal on the inserted distance, the 3D information of nerve fibers have been demonstrated.

研究分野:光計測工学

キーワード: 光波断層画像測定 イメージプローブ マルチモードファイバー 神経線維

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等に ついては、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1.研究開始当初の背景

OCT(optical coherence tomography)は, すでに眼科臨床で実用化され,その応用が広がって いる.この特徴は,無侵襲性と数十µmから数µmの高い空間分解能である.しかし,生体は高 吸収と多重散乱性を有するために,光を生体表面に直接照射する直接測定では測定深さが3mm程 度であり,技術的な困難さから現実的には,低侵襲性の各種プローブが世界中で研究開発されて きた.

プローブの要件として,極細・小型化,安定性,信頼性,低価格などが求められ,タイプでは, 挿入プローブに垂直方向にビームを出射して挿入プローブの回転により円盤状の断層画像を得 る側方視野型と,挿入プローブの前方にビームを出射して二次元走査により断層画像を得る前 方視野型に分けられる.当然,挿入方向が見える前方視野で細いプローブが望まれるが,前方視 野型は走査機構をプローブ前部に有するために側方視野型に対して小型化が困難であった.課 題は,前方視野で極細なプローブと測定システムの実現である.

一方,大脳白質病変は,脳小血管病の一つで高齢者の7-8割に見られ,アルツハイマー病や脳 血管性認知症との関連やうつ病などの精神疾患との関連も指摘されている[1].また,神経線維 やオリゴデンドロサイトも虚血に対して非常に脆弱であり,ヒトの急性脳虚血による脳障害に おいても白質障害の重要性が認識されているが,白質については研究が遅れているのが現状で ある[2].齧歯類の in vivo 脳では,安楽死による虚血でのOCT 信号変化は我々により報告され ているが, in vivo 深部脳で神経線維に関してµmスケールでの三次元形態変化測定については 未着手が現状である.

2.研究の目的

本研究では,極細で前方視野を有するイメージング用プローブと三次元断層画像測定システム を実現してその測定方法を確立し, in vivo で神経線維の三次元形態情報を取得し、脳科学かつ 臨床応用に有益な新しい知見を得ることを目的とする.

3.研究の方法

1年目	SMMF 先端加工1:現状では SMMF の先端形状が円柱状なため組織への挿入,密着に
	問題があるので,放電によりボール状に加工する.
	FF-0CMの改良1
	高感度化:高速化により平均回数を上げて S/N を向上させる.
	高分解能化:位相分布測定を導入して取得情報の高精度化を図る.
2 年目	SMMF 先端加工2:光を出射させて放電を行い,先端のボール状加工時の屈折率変
	化を定量測定し,加工の制御性・再現性を高める.
	FF-OCM の改良2:前年度の課題があれば改良を行い,ラット脳を用いて装置を完
	成させる.
	高感度化では , フーリエドメイン化に向けた検討を進める。
	三次元化処理・表示技術:高精度に測定を行った3D画像データに対して立体的に
	認識ができるよう , 三次元化表示ソフトを導入して , 三次元データの表示・情報
	抽出を試みる.
3年目	FF-0CMの改良3:フーリエドメイン化へ向けた検討を進める。

(1) SMMF 先端加工

生体組織に SMMF を挿入して深部を測定する際,スムーズな挿入性や安定したイメージング特 性から組織との密着性が重要である.現状,SMMF の端面はカットしただけのため,垂直端面と なっている.挿入性,密着性を高めるために SMMF 先端の球面化が望まれ,先端加工が必要であ る.ファイバー融着器の実績などから放電プラズマによる SMMF 先端球状加工を検討した(図1). そこで、放電プラズマを用いた SMMF の加工条件を調査し,実際に加工した SMMF の光学特性の評 価を行った(図2).約12000 V,11秒で放電加工された SMMF の二次式フィッティング時の係数 a は,標準偏差の最小値に近い値となり、先端の曲率半径は 77µm,変位は 50µm となった.画像 測定では局所的なぼやけや歪みがあったが,テストパターンのライン間隔4.38µm は識別するこ とができ,コントラストはわずかに向上した.結像条件及び倍率は,屈折率分布の乱れは考慮せ ずに二乗分布の屈折率と球面のみの光学モデルでの計算を行ったがほぼ対応した.生体試料測 定では,鶏の腱組織の透過画像において顕微鏡で測定した 10µm 程度の繊維のものと同様のもの が見られた.加工により SMMF の先端の密着性,挿入性が改善されると考えられる.





図1 放電加工システム, (a) 光源, ファイバー, SMMF, 電極, CCD カメラ1, (b) SMMF, 電極, CCD カメラ1, CCD カメラ2.

図 2 (a)SMMF 先端の曲率半径,(b)曲率半径と放 電時間の関係.

(2)SMMF FF OCM による in vivo ラット脳の三次元断層画像測定

SMMF FF OCM の実験光学系は、基本的に,4ステップ位相シフト法を用いて断層画像を測定している.光源のハロゲンラップからの光は,対物レンズ(×10, NA 0.25)で集光され,バンドパスフィルター,偏光子を通り, 偏光波長板を経てビームスプリッター(BS)に入射される.参照光路は, 照光波長板,可変アッテネーター,分散補償素子,対物レンズ1,PZT付きの参照ミラーで構成される.信号光路は対物レンズ1と同じレンズ2,SMMF,試料で構成される.波長板, CCD前の偏光子は,SMMF入射端面からの強い反射光をカットし,試料内で発生した偏光解消成分を検出するために用いている.CCDカメラは,PC に直接出力している.OCM 画像の測定速度は,深さ走査固定では17fps である.SMMF は光通信用の GI ファイバー(Fujikura LTD., Future Guide-MM50)であり,ファイバークリーバー(Fujikura, CT-22)でカットされ、長さ7.4mm でSMMF の両端面はクラックがない端面となっている.結像条件と倍率については,計算値に近い結果が得られている.深さ分解能は2.14µm が得られ、横方向分解能については,計算値は2.01µmと求まり,実測値2.3µmに近いこと値が確認された.

ラットを用いた実験においては,山形大学の動物実験委員会の承認を得て行った.歯科用ドリルを用いて直径 6mm 程度の"窓"を設けた.図3(a)に示すように対物レンズの先端に冶具でSMMFが固定されている.ラットは冶具ごと3軸のマイクロステージに固定され,上部からの CCD カメラでモニターしながら SMMF がアプローチされ,挿入される(図3(b)).上部 CCD カメラの画像(図3(c))により,SMMFの挿入状態が確認された.ラット1の SMMFの挿入箇所は図3(d)に示すように灰白質より深部に至っている.測定手順は,まず SMMFを一定長さ(IL: insertion length)だけ組織内に挿入する.その後,参照ミラー(RM)を2µmステップで100回,鉛直断層画像(XY 画像)の測定を繰り返す.深さ方向の走査距離は200µmとなるが,組織の屈折率1.35を考慮す





図 3 (a)SMMF とラット脳, (b)(a)の拡大写真,(c) 挿入 SMMF とラット脳,(d) ラット 1での SMMF 位置.

図 4 (a) IL=2mm での鉛直断層画像,(b)(a)のリスライス画像 (xz),(c) (a)の深さ2.055 mm での断面画像,(d)(a)の深さ2.536 mm での断面画像,(e) IL=4mm での断層画像 (x-y),(f) (e)のリスラ イス (x-z)画像,(g) 深さ2.038 mm での断層画像,(h) 深さ 2.547mm での断層画像.

ると実際の走査距離は 147 µm となる.XY 画像の大きさは 200 × 200 画素で,各ステップでの 平均化回数は 50 回である.100 ステップの測定時間は約 5 分である.IL は 0.5mm 間隔で最長 4mm まで行った.

ー例として、IL2.0mmでの鉛直断層画像(XY画像)とリスライス画像(XZ画像)を図4(a),(b)に示 す.これらの画像には,粒状や短い繊維状の形態情報が見られ,深さ方向では30-60µmに多くが 分布している.また、深さ2.055mmと2.536mmでの鉛直断層画像を図4(c),(d)に示す.これらは灰 白質底部で同様に粒状や短い繊維状の形態情報が見られ,繊維の直径はその強度プロファイル から約2µmで長さは5-10µmである.神経線維は高散乱性で直径は0.5-4µmと報告されている. ラット2の測定位置は,深さ方向に運動野から海馬に及んでいる.IL4.0mmでの鉛直断層画像と リスライス画像を図4(e),(f)に示し,IL2.0mmでの深さ2.038mmと2.547mmの鉛直断面画像を図 4(g),(h)に示す.同様に粒状や短い繊維状の形態情報が見られ,繊維の直径はその強度プロファ イルから約2µmで長さは5-10µmである.図4(c)の円形の点線は測定領域で直径47µmである.

図5(a),(b)の位置は,それぞれ図4(a)の点線の領域である.図5(a)では短い繊維の三次元状態がわかる.また,得られた画像は,報告論文の画像にほぼ対応するのがわかる.図5(b)では,神経線維の直径が約2µmであり,これは00Mの空間分解能を考慮すると限界の値,実際の直径はもっと細い可能性もある.しかし,接続や三次元的形状の情報は確認されている.

鉛直断層画像において,神経線維は,灰白質のI層とIV層からVI層で顕著なことが報告されて いる.我々は深さ方向の0CM信号量の変化を検討した.まず,それぞれのILにおいて147µmまで の100ステップを対象に各ステップでの鉛直断層画像信号の総和量を求めた.鉛直断層画像信号 の総和量は,画像内の背景成分を除去して,各画素値を積算した量である.図6(a),(b)に,それ ぞれラット1,2においてILにおける総和量の深さ(ステップ)依存性を示した.これらの依存性 は,0CM光学系の焦点深度と組織内の散乱体である神経線維の密度分布が関係していると考えら れる.これらは,SMMFから深さ20µmから90µmに分布しているのがわかる.散乱体が主に神経線



図 5 (a)図 2(a)の点線で示された部位の断層画像、領域:X 51.5µm, 49pixel, Y:51.5µm,49pixel,Z:104µm,3pixel, (b)図 2(a)の点線で示された部位の断層画像、領域:X 14.9µm,13pixel,Y 12.4µm, 11 pixel,Z 8.1µm 4pixel.



図 6 (a) ラット1 での各鉛直断層画像での信号の積分値、 (b) ラット2 での各鉛直断層画像での信号の積分値、(c) ラット1,2 における三次元断層画像信号積分値の深さ 依存性.

維と考えると,神経線維の増加と共に OCMの画像信号も増加する.そこで,そ れぞれのILにおいて,SMMFから深さ方 向のOCM画像の信号量の積算値を求め, この積算値のIL依存性を求めた.ラッ ト1とラット2の結果を図6(c)に示す. ラット1では最大値がIL2.0mmで得ら れ,ラット2では平均値の深さ依存性 が算出され.最大値がIL2.5mmで得られ

た.これらの結果は,積算量の最大値は灰白質の底部で得られているのがわかる.これらの結果 は報告論文とも一致している.従って,図4,5の形態的情報と図6(c)の積算値のIL依存性から, 神経線維の鉛直断面画像が測定できたと結論付けた.

(3) SMMF FF OCM の改良-差分位相画像測定の検討-

高感度化として、位相画像は波長以下のわずかな光路長変化に敏感なことが知られており、深 部組織での位相画像取得に着目した。位相画像測定により代謝に反映した画像測定が可能なり、 組織活性評価などの高機能化につながる。しかしながら本 0CM では、基本的に二次元のマイケル ソン干渉計なので、位相ドリフトが大きく、現状では安定した位相測定が困難である。そこで、 基準位相面を設けて差分によるコモン位相ドリフト除去して安定化を図る差分位相画像測定法 を提案した。信号光路に部分的にガラス素子を挿入して 0CM 画像を分割し、SMMF 端面を位相基 準画像とし、組織内のある深さの断面を測定面として分離する。これにより、測定面の位相のド リフトを基準位相を差分することで低減する。差分により測定位相の標準偏差が 64%に減少す ることで、原理動作が確認された。図7(a)は、ガラス基板と SMMF 端面の同時測定画像,(b)は (a)で の同時位相画像,(c)は ガラス基板を離した際の SMMF 基板との同時測定画像,(d)は (c)での同時位相画 像である。図8(a)は、190 s にサンプルのガラス基板にステップ電圧を印加した際の基準位相を 減算した測定位相である。図8(b)は、測定位相のステップで電圧依存性で、測定結果は PZT の 特性にほぼ一致していることがわかる。フーリエドメイン化については、基本的なところから、 深さ成分情報の新たな抽出方法について検討を行った。



図 7 (a)ガラス基板と SMMF 端面の同時 測定画像,(b)(a)での同時位相画像,(c) ガラス基板を離した際の SMMF 基板との 同時測定画像,(d)(c)での同時位相画 像.0CM 画像の直径:50µm,画像サイズ: 100×100.



図 8 (a) 基準位相を減算した際の測定位相の時間変化、 190 s にガラス基板にステップ電圧を印加、(b) 測定した 位相変化のステップ電圧依存性.2本の点線は PZT の特性 直線.

参考文献

[1]今泉俊雄, "大脳白質病変の成因と臨床", 脳卒中, pp.1-8(2015).
 [2]中尾慎一, "脳虚血における脳白質傷害", 近畿大学医学誌, vol.36, no.1, pp.3-7(2011).

謝辞

研究支援に関して、(株)フジクラハイオプト 桑木伸夫氏,(株)フジクラ 光応用技術 R&D センター愛川和彦氏に感謝する.

5.主な発表論文等

〔 雑誌論文 〕 計6件(うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件)

1.著者名	4.巻
佐藤 学,江藤 魁,増田 純平	48
2.論文標題	5 . 発行年
生体深部を診る内視鏡型0CTの進展	2019年
3. 雑誌名 光学	6 . 最初と最後の頁 140-144
掲載論文のDOI(デジタルオプジェクト識別子)	査読の有無
なし	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	

	4.
Manabu Sato, Kai Eto, Junpei Masuta, Kenji Inoue, Reiko Kurotani, Hiroyuki Abe and Izumi	9
Nishidate	
2.論文標題	5 . 発行年
In Vivo Rat Brain Imaging through Full-field Optical Coherence Microscopy Using Ultrathin Short	2019年
Multimode Fiber Probe	
3.雑誌名	6.最初と最後の頁
Applied Science	1-14
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)	査読の有無
10.3390/app9020216	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスとしている(また、その予定である)	-

1.著者名	4.巻
Manabu Sato, Kai Eto, Junpei Masuta, and Izumi Nishidate	57
2.論文標題	5.発行年
Depolarization characteristics of spatial modes in imaging probe using short multimode fiber	2018年
3.雑誌名	6.最初と最後の頁
Applied Optics	10083-10091
掲載論文のDOI(デジタルオプジェクト識別子)	査読の有無
し なし	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	-

1.著者名	4.巻
Sato Manabu、Eto Kai、Masuta Junpei、Inoue Kenji、Kurotani Reiko、Abe Hiroyuki、Nishidate Izumi	41
2. 論文標題	5 . 発行年
Sectional Imaging of <i>in vivo</i> Rat Brain Using Short Multimode Fiber Probe	2020年
3. 雑誌名	6.最初と最後の頁
Nippon Laser Igakkaishi	9~17
掲載論文のD01(デジタルオブジェクト識別子)	査読の有無
10.2530/islsm.islsm-40.0053	有
	15
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスとしている(また、その予定である)	-

1.著者名 Katahira Motoshi、Eto Kai、Hirano Takaya、Masuta Junpei、Nishidate Izumi、Sato Manabu	4.巻 474
2.論文標題	5 . 発行年
Processing conditions using electric discharge and optical characteristics for a short	2020年
multimode fiber imaging probe	
3.雑誌名	6.最初と最後の頁
Optics Communications	126089 ~ 126089
掲載論文のD01(デジタルオブジェクト識別子)	査読の有無
10.1016/j.optcom.2020.126089	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスとしている(また、その予定である)	-

1.著者名	4.巻
Sato Manabu、Masuta Junpei、Nishidate Izumi	59
2.論文標題	5 . 発行年
Differential phase imaging in full-field optical coherence microscopy using a short multimode	2020年
fiber probe	
3.雑誌名	6.最初と最後の頁
Applied Optics	10512 ~ 10512
掲載論文のDOI(デジタルオプジェクト識別子)	査読の有無
10.1364/A0.405226	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスとしている(また、その予定である)	-

〔学会発表〕 計14件(うち招待講演 2件/うち国際学会 3件)

1 . 発表者名 Kai Eto,Junpei Masuta,Hiroyuki Abe,Izumi Nishidate, and Manabu Sato

2.発表標題

In vivo hippocampus imaging using a short multimode fiber probe

3 . 学会等名

OSA joint シンポジウム(第80回応用物理学会秋季学術講演会)(国際学会)

4 . 発表年 2019年

1.発表者名

Kai Eto, Junpei Masuta, Reiko Kurotani, Hiroyuki Abe, Izumi Nishidate, and Manabu Sato

2.発表標題

In vivo rat brain imaging using a short multimode fiber probe

3 . 学会等名

SPIE Photonics West 2020, BiOS(国際学会)

4 . 発表年 2020年 1.発表者名 片平基思、増田純平,西舘泉,佐藤 学

2.発表標題

放電加工SMMFプローブの光学基礎特性

3.学会等名 Optics & Photonics Japan 2019

4.発表年

2019年

 1.発表者名 江藤 魁, 増田純平, 阿部宏之, 西館 泉, 佐藤 学

2.発表標題
 SMMF-FF-OCMによる位相画像測定の検討

3.学会等名

Optics & Photonics Japan 2019

4.発表年 2019年

 1.発表者名 江藤 魁, 増田純平, 阿部宏之, 西館 泉, 佐藤 学

2.発表標題 SMMF FF OCM による位相画像測定の検討

3.学会等名第67回応用物理学会春季学術講演会

4.発表年 2020年

1.発表者名

Manabu Sato, Kai Eto, Junpei Masuta, Reiko Kurotani, Hiroyuki Abe, and Izumi Nishidate

2.発表標題

Short multimode fiber imaging probe for full field optical coherence microscopy

3 . 学会等名

Second World Congress on Microscopy : Instrumentation, Techniques and Applications in Life Sciences and Materials Sciences(WCM2018)(招待講演)(国際学会) 4.発表年

2018年

1.発表者名

江藤魁,増田純平,西舘泉,佐藤学

2.発表標題

ショートマルチモードファイバーを用いた鶏脂肪組織の3次元断層画像測定

3.学会等名第79回応用物理学会秋季学術講演会

4 . 発表年

2018年

1 . 発表者名 江藤魁,増田純平,西舘泉,佐藤学

2.発表標題

ショートマルチモードファイバーを用いた鶏脂肪組織の三次元断層画像測定

3.学会等名 Optics & Photonics Japan 2018

4 . 発表年

2018年

1.発表者名
 江藤 魁, 増田純平, 阿部宏之, 西館 泉, 佐藤 学

2.発表標題 SMMF FF OCMによる位相画像測定の検討

3.学会等名第80回応用物理学会秋季学術講演会

4.発表年 2019年

1.発表者名 増田純平,江藤 魁,西舘 泉,佐藤 学

2.発表標題

SMMF FF OCM における位相揺らぎ低減処理法の基礎検討

3 . 学会等名

応用物理学会東北支部第74 回学術講演会

4 . 発表年 2019年 1.発表者名 木村勇稀,増田純平,西舘泉,佐藤 学

2.発表標題

離散フーリエ変換におけるスペクトル高分解能化の検討

 3.学会等名 応用物理学会東北支部第75回学術講演会

4.発表年 2020年

1.発表者名

佐藤 学、増田 純平、西舘 泉

2.発表標題

ショートマルチモードファイバーによるin vivo深部ラット脳の光波断層画像測定

3 . 学会等名

レーザー学会学術講演会第41回年次大会(招待講演)

4.発表年 2021年

1.発表者名 鈴木章裕,増田純平,西館泉,佐藤 学

2 . 発表標題

SMMFイメージファイバープローブにおけるファイバーの比較

3 . 学会等名

Optics & Photonics Japan 2020

4.発表年 2020年

1.発表者名
 木村勇稀,増田純平,小坂哲夫,西舘 泉,佐藤 学

2.発表標題

周波数サブビンによるスペクトル高分解能化の基礎検討

3 . 学会等名

第68回応用物理学会春季学術講演会

4 . 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

佐藤 学 研究室 http://msatolab.yz.yamagata-u.ac.jp/index.html

6 . 研究組織

0			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
	西舘 泉	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授	
研究分担者	(Nishidate Izumi)		
	(70375319)	(12605)	

7.科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8.本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------