

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24360162

研究課題名(和文) 走査型触覚顕微鏡の高機能化設計：電荷・密度の同時計測の可能性の追求

研究課題名(英文) Possibility of the simultaneous measurements of surface charge and density by the scanning haptic microscope

研究代表者

高見沢 計一 (TAKAMIZAWA, KEIICHI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員

研究者番号：10163312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：表面形状、弾性率分布観察に続くSHMの新規計測機能の開発として、密度計測の可能性を見出し、大動脈壁の微細密度構造のイメージングに世界で初めて成功した。先端直径が5 $\mu$ m程度のガラス針を用い、ガラス針の二次、三次共振周波数近傍を測定周波数にそれぞれSHM測定を行い、両周波数での測定で得られた周波数変化率の差を求めることで、表面形状と弾性率分布の観察機能を損なわずに試料表面の密度イメージングを実現した。イヌ大動脈壁をサンプルとすると、エラスチンエラスチンリッチな領域が高密度であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：As the development of the new measurement function of SHM following surface morphology and elasticity distribution measurements, this study found the possibility of the density measurement and succeeded in microimaging of the density structure of the aortic wall for the first time in the world. Tip diameter used a glass needle of around 5 $\mu$ m, and SHM measured the second, the third resonance frequency around glass needle to measurement frequency each and realized density imaging of the sample surface without spoiling a surface shape and an observation function of the coefficient of elasticity distribution by demanding the difference of a frequency rate of change provided by the measurement at both frequency. We found that the domain where elastin elastin was rich was high-density by using a canine aortic wall as a sample.

研究分野：生体医工学

キーワード：触覚顕微鏡 弾性率分布 密度分布 計測機器

## 1. 研究開始当初の背景 生体組織の精密物性測定の必要性

動脈硬化や癌が組織を硬くするように、生体組織に異常が発生した際にはその力学的特性が大きく変化するため、生体組織を力学的に精密計測することは、診断や治療など医療分野の発展に重要と考える。古くから生体組織の力学的特性の計測は行われており、引っ張り試験や押し込み試験などによるバルクレベル、最近では原子間力顕微鏡(AFM)を用いた顕微計測によるナノレベルに大別される。しかし、それらの中間領域であるマイクロレベルでの計測技術はほとんどなかった。

## 走査型触覚顕微鏡(SHM)の開発

我々は、組織の弾性構造をマイクロレベルで精密に分布観察できる、走査型触覚顕微鏡(SHM: Scanning Haptic Microscope)と名付けた新しい生体顕微鏡の開発を行っている。

SHMは、先端径数 $\mu\text{m}$ のガラス針と圧電素子から成る触覚センサで測定サンプルを数 $\mu\text{m}$ 押しこみ、各測定点における接触インピーダンスを測定しながら試料上をスキャンすることによって、表面の弾性率分布を可視化できる。SHMの空間分解能は $1\mu\text{m}$ 以下であり、ガラス針の移動機構にはステッピングモータを用いているため数百 $\mu\text{m}$ 角以上の大領域を観察できる。

## 密度計測に関して

一方、密度は弾性率と同様、生体組織の強度を評価する上で非常に重要な物性である。例えば、骨密度測定は骨の強度を調べる最も基本的な診断方法である。また、弾性率や密度の変化から病変部を特定するために超音波検査が臨床現場に広く取り入れられている。超音波検査は非侵襲的な測定であり、軟組織の描出能に優れるので、様々な生体組織で弾性率や密度に密接にかかわる音響インピーダンスを明らかにするための研究が行われている。近年では、超音波イメージングの利便性や空間分解能が向上し更なる活躍が期待されているが、定量性の低さが問題となっている。

これまでSHMを用いて様々な生体組織や人工組織体の弾性率分布を明らかにしてきた。SHMはセンサプローブの振動周波数変化を用いて試料表面の機械的特性を調べる超音波検出技術の一種であるため、原理的に密度検出が可能である。SHM測定において、センサプローブの先端直径と発振周波数が十分に小さい場合、試料接触時に検出される周波数変化は試料の弾性率を反映するが、先端直径もしくは発振周波数がある程度大きいと試料の密度も周波数変化に反

映する。すなわち、先端直径がある程度小さいセンサプローブを用い異なる発振周波数でSHM測定を2回行えば、得られた2枚の画像の比較から試料表面の弾性率分布と密度分布の両方が可視化できると考えられる。

## 2. 研究の目的

SHMの高機能化をめざして、従来の弾性率と表面形状分布の同時計測に加えて、1)生体組織の密度分布あるいは、2)電荷分布の同時計測をも可能とするように装置の改造を行い、システム化する。これまで未知であった生体組織内部の密度並びに電荷分布情報を非侵襲で得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 試料

測定試料には、寒天ゲル(Nacalai Tesque)、シリコーンゴム(KE-116; Shin-Etsu Chemical Co., Tokyo, Japan)とビーグル犬の大動脈を用いた。

電子レンジ加熱と室温冷却によって、1 - 2.5 wt%の4種の寒天ゲル(弾性率: 19, 60, 108, 170 kPa、密度: 10, 15, 20, 25  $\text{mg}/\text{cm}^3$ )を作製した。また、4種のシリコーンゴム(弾性率: 13, 48, 104, 201 kPa、密度: 約 1300  $\text{mg}/\text{cm}^3$ )を架橋剤の量を変化させることで作製した。なお、これらのサンプルのマクロ弾性率は、force-deformation法(プランジャ径: 1 mm)で測定した。

本研究で用いたビーグル犬(年齢: 約1年、体重: 約10 kg)の扱いについては、厚生労働省によって定められた動物実験等の実施に関する基本指針に従い、本研究プロトコルは国立循環器病研究センター研究所の承認を受けて実施した。下行大動脈を摘出し、 $-30^\circ\text{C}$ で冷凍保存した。室温で解凍した後、4 wt%寒天ゲル(Nacalai Tesque)に包埋し、ミクロトーム(Leica Microsystems Japan)を用いて厚さ1 mmの円周方向断面に平行にスライスし、平滑な表面のリング状の大動脈壁を含むディスク状の血管サンプルを得た。

### 寒天ゲル-シリコーンゴムの周波数変化率の違いの比較

寒天とシリコーンのSHM測定を、各MTS( $n=10$ )の2次共振周波数近傍(177 - 210 kHz)と3次共振周波数近傍(225 - 295 kHz)を発振周波数に設定し行った。各試料とも測定は生理食塩水中で行い観察領域と測定点間距離はそれぞれ $160 \times 100 \mu\text{m}$ 、 $10 \mu\text{m}$ に設定した(測定点数: 100)。MTSの先端直径は約 $5 \mu\text{m}$ で、侵入量、測定スピードはそれぞれ $10 \mu\text{m}$ 、3 points/sに設定した。

#### 大動脈壁の表面特性分布観察

先に示す寒天とシリコンの SHM 測定の後、同じセンサ、発振周波数でイヌ大動脈壁の SHM 測定を行った ( $n=10$ )。観察領域は  $150 \times 150 \mu\text{m}$ 、測定点間距離は  $2 \mu\text{m}$  に設定した (測定点数: 5625)。

#### 4. 研究成果

##### 試料密度による周波数変化率の違いの検討

密度検出の可能性を検討するため、密度が極端に異なる 2 種類の試料の SHM 測定を生理食塩水中にて行った。寒天ゲルは溶媒である水を考慮しなければ密度は  $25 \text{ mg/cm}^3$  以下である。一方、シリコンゴムは水を含まず、その密度は約  $1300 \text{ mg/cm}^3$  である。両試料において 4 つの試料を約  $10 - 200 \text{ kPa}$  の弾性率の範囲で測定した。

SHM で測定された周波数変化率と Force-deformation 法で測定された弾性率との関係を得た。両試料とも両測定周波数で線形関係が得られた。これらの線形関係を 2 次 - 3 次共振周波数間で比較すると、傾きにおいて寒天、シリコンともに顕著な差が見られなかったが、切片においてシリコンで顕著な差が認められた。10 本のセンサに対し発振周波数間で傾き、切片の差を求めると、切片の差において寒天シリコン間で有意差が認められた。

##### 大動脈壁の密度分布観察

2 次、3 次共振周波数近傍での SHM 測定を大動脈壁で行った。表面形状像は、両測定周波数間で大きな違いは見られなかった。一方、周波数変化率分布は、3 次共振周波数近傍での測定像の方が、2 次共振周波数近傍での測定像よりもほぼ全域で周波数変化率が高かった。各測定点において、両測定周波数での測定で得られた周波数変化率の差を求め、密度分布像を作成した。

極端に密度が異なる試料を SHM 測定した際の周波数変化の違いを比較することで、密度検出の可能性を検討し、生体組織観察の一例として、大動脈の密度分布観察を行った。密度測定は、表面形状、弾性率測定に続く SHM の新たな機能であり、本機能で生体組織の表面構造の微視的な観察するのは初めての試みである。試料には、寒天ゲル (密度:  $25 \text{ mg/cm}^3$  以下) とシリコンゴム (約  $1300 \text{ mg/cm}^3$ ) を用いた。なお、SHM 測定は試料の乾燥を防ぎ生体内と近い環境で測定するために生理食塩水中で行っているため、密度の算出において水の質量は無視している。寒天では溶液濃度を、シリコンでは架橋剤の量を調節することで

試料の弾性率は制御できる。本章では、生体の軟組織の弾性率範囲である約  $10 - 200 \text{ kPa}$  の間で、密度が大きく異なる 2 種類の材料から試料を用意した。この 2 種類の試料は密度検出の可否を判断するのに適していると考えられる。

2 次共振周波数での測定において、両試料で弾性率の増加に伴い周波数変化率は直線的に増加した。この低周波数側で測定した周波数変化率の値は、前章までに記載した通り、測定点における弾性率の大きさを示す。一方、3 次共振周波数での測定では、低密度試料である寒天では、2 次共振での測定で得られた線形関係と類似した結果が得られたが、高密度試料であるシリコンでは、2 次共振測定時よりも周波数変化率が高くなった。上記のとおり、孔周波数での測定は密度の影響を増大させる。本章での測定において、MTS の振動を拘束する試料の粘性や静電気力などの影響は無視できるほど小さいと考えることができ、2 次 - 3 次共振周波数間で得られた周波数変化率の差は試料の密度を反映していると考えられる。

本測定では、極端に密度が異なる試料の測定を行ったが、次のステップとしては、弾性率と同様に密度も調節できる試料を用いる必要がある。例えば、酸可溶性ゼラチンは溶液濃度のみならず溶液の pH でも試料の弾性率が調節できる。このような試料を用いて密度に対し校正を行えば、SHM で定量的な密度測定が可能だと考えられる。SHM の計測理論では、針の先端直径を  $1 \mu\text{m}$  以下にすればほぼ弾性率のみを反映する測定が、 $50 \mu\text{m}$  以上にすればほぼ密度のみ反映する測定が行えると考えられる。さらに、本測定では、2 次共振での測定後に 3 次共振周波数での測定を行ったが、各測定点で両共振周波数での測定を交互に行えば、得られる画像間の (空間的な) ずれは無視できるほど小さくなると考えられる。

2 次共振周波数での測定で得られた血管壁の SHM 観察像には、弾性率の高い領域と低い領域との積層構造が見られた。この弾性率の高い領域は主にエラスチン線維から、弾性率が低い領域は主にコラーゲン線維から構成されている。この積層構造は密度分布像でも観察された。つまり、エラスチン線維はコラーゲン線維よりも高い密度を有することになる。Ng らや Conde らは、ラットの動脈壁においてエラスチン、コラーゲン線維量がそれぞれ約 60%、30% 程度であることを組織学的評価から報告している。一方、Debrah らは、マウスの動脈壁の全タンパク量におけるコラーゲン量が 20% 以下であると、また、Tran らはヒト動脈壁においてコラーゲン量はエラスチン量の 100 分の

1 以下であるという結果を酵素処理後の組織の重量計測から報告している。これらの報告はコラーゲンリッチ部よりもエラスチンリッチ部の方が高密度だという本章の結果と一致する。エラスチン線維はコラーゲン線維よりも軟らかい線維であるが、コラーゲンは無負荷状態の血管壁においては弛緩しておりまばらに存在しているので、個々のエラスチンはコラーゲンより柔らかくても、エラスチンの太く密な線維束はまばらなコラーゲンリッチな領域よりも硬く、それゆえ SHM 測定でエラスチンリッチな領域はコラーゲンリッチな領域より高弾性率で高密度な領域として測定されたと考えられる。

マイクロレベルでの密度分布測定は個々の細胞外マトリクスの密度の評価が可能である。特に組織工学的な人工組織の開発において、密度測定は設計指針の提案と作製物の完成度の評価に有用である。さらに腫瘍部は周囲の健全な組織とは密度、弾性率がともに異なるため、これらの違いを同時に観察する SHM 測定は腫瘍の早期発見に役立つと期待できる。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

- 1) Moriwaki T, Oie T, Takamizawa K, Murayama Y, Fukuda T, Omata S, Nakayama Y, Surface density mapping of natural tissue by a scanning haptic microscope (SHM). *Journal of Medical Engineering & Technology* 査読有 2013;37:96-101.  
DOI: 10.3109/03091902.2012.747008
- 2) Moriwaki T, Oie T, Takamizawa K, Murayama Y, Fukuda T, Omata S, Nakayama Y, Observation of local elastic distribution in aortic tissues under static strain condition by use of a scanning haptic microscope *Journal of Artificial Organs* 査読有 2013;16:91-97.  
DOI: 10.1007/s10047-012-0674-0
- 3) Takamizawa K, Nakayama Y, Non-euclidean stress-free configuration of arteries accounting for curl of axial strips sectioned from vessels. *Journal of Biomechanical Engineering* 査読有 2013;135:114505-1-5.

DOI: 10.1115/1.4025328

- 4) Takamizawa K, Nakayama Y, Stress distribution in a bilayer elastic model of a coronary artery. *Journal of Applied Mechanics* 査読有 DOI: 10.1115/1.4007863
- 5) Nakayama Y, Tsujinaka T, Acceleration of robust "biotube" vascular graft fabrication by in-body tissue architecture technology using a novel eosin Y-releasing mold. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 査読有 2014;102:231-238.  
DOI: 10.1002/jbm.b.32999
- 6) Nakayama Y, Takewa Y, Sumikura H, Tamanami M, Matsui Y, Oie T, Kishimoto Y, Arakawa M, Ohnuma K, Kanda K, Tastumi E, In-body tissue^engineered aortic valve (Biovalve type VII) architecture based on 3D printer molding. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 査読有 2014;103:1-11.  
DOI: 10.1002/jbm.b.33186
- 7) Takamizawa K, Biaxial contractile mechanics of common carotid arteries of rabbit. *Journal of Biomechanical Engineering* 査読有 2015;137:031010-1  
DOI: 10.1115/1.4028988

[学会発表](計8件)

- 1) 森脇健司, 大家智憲, 高見沢計一, 山南将志, 村山嘉延, 福田達, 尾股定夫, 中山泰秀, バイオチューブ人工血管の移植前後での力学的構造変化 走査型触覚顕微鏡(SHM)観察 第64回日本生物工学会大会(神戸, 2012,10/23-26)
- 2) 森脇健司, 大家智憲, 高見沢計一, 山南将志, 村山嘉延, 福田達, 尾股定夫, 中山泰秀, 走査型触覚顕微鏡(SHM)を用いたバイオチューブ人工血管の力学的再生度の評価 第50回日本人工臓器学会大会(福岡, 2012,11/22-24)
- 3) 森脇健司, 滝山直昭, 水野壮司, 福田達, 尾股定夫, 上地正実, 中山泰秀, 走査型触覚顕微鏡によるバイオシート人工角膜移植時の力学的適合化過程の観察 日本人工臓器学会(パシフィコ横浜, 2013,9/26-29)

- 4) 滝山直昭, 水野壮司, 森脇健司, 上地正実, 中山泰秀, 生体内組織形成術により作製したコラーゲン膜(バイオシート)の代用角膜としての検討  
日本人工臓器学会(パシフィコ横浜, 2013,9/26-29)
- 5) 水野壮司, 岩井良輔, 辻中貴大, 中山泰秀, 再生医療と人工臓器 体内培養による大網一体型 ADSC シートの作成  
日本人工臓器学会(パシフィコ横浜, 2013,9/26-29)
- 6) 武輪能明, 中山泰秀, 岸本 諭, 伊達数馬, 住倉博仁, 神田圭一, 田地川 勉, 田中孝晴, 妙中義之, 巽英介, 生体内組織形成術による次世代型自家組織心臓弁の開発  
第 52 回日本人工臓器学会大会(2014,10/17-19 札幌)
- 7) 中山泰秀, 3D プリンターを用いた光造形と生体内組織形成術による体内造形の融合によるバイオバルブ心臓弁の開発  
第 76 回日本臨床外科学会総会(2014,11/20-22 郡山)
- 8) 中山泰秀, 古越真耶, 船山麻理菜, 森脇健司, 生体内組織形成術(IBTA)の可能性拡大:線で面を捉える  
第 14 回日本再生医療学会(2014,3/19-21 パシフィコ横浜)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

高見沢 計一 (TAKAMIZAWA KEIICHI)  
独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員  
研究者番号:10163312

### (2)研究分担者

中山 泰秀 (NAKAYAMA YASUhide)  
独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・室長  
研究者番号:50250262

神田 圭一 (KANDA KEIICHI)  
京都府立医科大学・医学部・講師  
研究者番号:60295649

渡辺 太治 (WATANABE TAIJI)  
京都府立医科大学・医学部・助教  
研究者番号:20448723