

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500504

研究課題名(和文) 生体組織病態検出のための散乱光ゆらぎイメージング技術の確立

研究課題名(英文) Diffuse Correlation Imaging for Diagnosis of Biological Tissue

研究代表者

西村 吾朗 (Nishimura, Goro)

北海道大学・電子科学研究所・助教

研究者番号：30218193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：組織を透過した散乱光強度ゆらぎ解析による組織診断イメージング技術の確立のために、高時間分解能、多点の光子計数システムを試作し光子相関解析を行った。さらに、定量的なイメージングを行うために、散乱光の時間分解解析と光子相関解析とを同時に出来るシステムを構築した。そのシステムを用いて組織模擬散乱体と生きたラット腹部の計測を行った。その結果、皮膚表面から腹部内部の血流に支配されるゆらぎの計測と同時に血液の吸収などに依存する吸収係数および組織の構築などに依存する散乱係数を決定し画像化することが出来た。この技術をガンなどの病態の評価へと応用することにより新しい光学的診断技術が確立すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The project aimed to establish a diagnosis technology by means of diffuse correlation imaging. In the project, a multi-point high time-resolution photon counting system was constructed for a multiple correlation analysis of the scattering photon through biological tissue. In addition, a time-resolved system for the scattering photon was combined to determine optical parameters such as the absorption and scattering coefficients. The system was successfully applied for measurements of phantom and rat abdominal tissue, yielding the scattering, absorption coefficients and correlation time, which carries the information of tissue structure, blood absorption and blood flow, respectively. Finally, the 2D image could be obtained to visualize these parameters. This novel technology will extend current optical methods for diagnosis of biological tissue.

研究分野：医用生体光学

キーワード：diffuse correlation photon correlation photon counting fluorescence correlation tissue diagnosis

1. 研究開始当初の背景

ガンなどの疾病による組織の病変の早期検出あるいは治療効果のモニタリングは重要な課題である。特にその中でもガンの早期検出は重要な課題である。これまで、核磁気共鳴イメージング法やX線CTあるいはPETなどの放射性核種を用いたイメージング手法が使われてきている。これに対し工学的な手法は、特殊な施設が必要なく、通常の実験室レベルの環境で実用化可能であることや、比較的簡便で小型化も可能な方法である。そのため光学的手法による病変検出は重要で広く応用可能な手法として期待される。その一方で生体組織は光に対し強い散乱体であるために、空間的な情報の多くは失われ解像度の高く定量的な画像を得るのは難しい。これらに対して、様々な方法が提案されてきたが、研究代表者のグループでは時間分解法を用いた組織レベルでの物質量のイメージングすなわち静的な物質量に関してのイメージングの研究を行ってきた。

このような静的な情報に対し、血流速などと言う動的な情報の計測も組織の評価に重要な情報を与える。そのため先の静的な情報に加え動的な情報も同時に計測できれば、より確実な組織モニタリングが可能であると考えられる。このような動的な情報を取り出す方法として、動的光散乱法を多重散乱光に拡張した拡散相関分光法 (Diffuse Correlation Spectroscopy; DCS) と呼ばれるものがあり、この方法を用いた動的な性質のイメージングなどの試みが行われてきている。この手法の定量性やイメージング手法に関して方法は確立されておらず、それを確立することが必要である。

2. 研究の目的

拡散相関分光法による定量的なイメージングを可能とするために、多点同時測定システムを構築し、さらに時間分解法を組み合わせることにより定量性を持った解析手法を構築する。

3. 研究の方法

- (1) 複数の位置で同時に多重散乱光の光子相関を計測し得る高時間分解能の光子計数システムを構築し、その評価を行う。特に、FPGA(Field Programable Gate Array)を用いて複数の単一光子検出器からの光子タイミングをすべてデータとして記録し、そのデータを計算機で後処理することにより、相関解析などを行う。光源には近赤外波長域の単一縦モードレーザーを用い、組織を模擬したサンプルやラット腹部を多点で計測する。
- (2) 光学パラメータを同時に測定するために、パルスレーザーを同一光学系で入射し散乱光の時間応答を計測する。それを同時に解析することにより、媒質の散乱および吸収係数を同時に決定する。
- (3) ラット腹部について、上記システムにより計測し、腹部の動的パラメータのイメ

ージングを行う。

- (4) 光子計数システムの高時間分解能性を生かした別の応用として、近赤外波長域での蛍光ゆらぎシステムを試作する。倒立型共焦点顕微鏡システムを構築し、それにより近赤外波長域の単一蛍光分子の蛍光ゆらぎおよび時間応答を同時に計測し、試作した光子計数装置の有効性を確かめる。

4. 研究成果

- (1) FPGA を用いた光子計数システムを構築した。特に、今回はFPGAとしてXilinx社のSpartan-6を用い、そこに含まれる高速のシリアルデータを並列化しデバイス内部でのクロック周波数を下げたためのブロックISERDES2を光子パルスサンプリングに用いた。デバイスのほぼ最大速度960MHzをサンプリングタイムとしたために、最小の時間は1.04nsとなった。さらに、そのデータを転送するためにUSB2.0を用いた。その結果1.04nsのサンプリングでは平均10Mcps程度2chのデータを取りこぼさずに計測できる。また時間分解能を1/2(2.08ns)にすることにより、最大4chのタイミングデータをすべてホストの計算機に転送し解析することが可能となった。

最初に、この装置で散乱光のゆらぎが正しく計測されるかを、動的光散乱を用いて確かめた。図1にLatexビーズ懸濁液(50,100,150nm)の動的光散乱測定を行った結果を示す。この測定では入射光に対し90度方向の散乱を検出器2台で計測し相互相関関数を計算している。図よりわかるように10nsよりも速い所まで相関関数が計算できている。2nsより速い部分で大きく下がっているのは、光子計数装置のサンプリング時間による影響である。挿入図からわかるように相関関数はほぼ単一指数関数で減衰しており、またその減衰時間はビーズの直径から予測されるものと良い一致を示した。その結果、この光子計数システムで散乱光のゆらぎ測定が正確に出来たことがわかる。

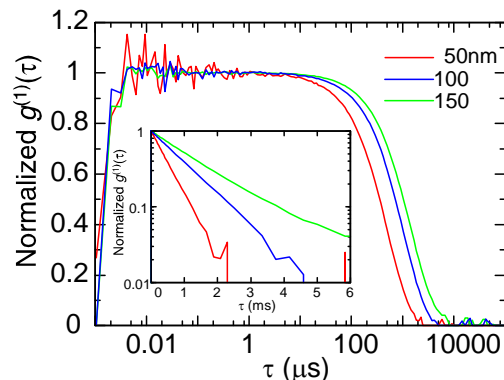


図1 Latex 懸濁液の90度散乱光の相関関数

さらに、拡散相関分光法のサンプルとしてイントラリッピッド懸濁液を用い、そ

の散乱光についても調べた。図2にその結果を示した。挿入図のように4本の単一モードファイバを入射光に対して対称な位置に置き、相関関数を同時に測定した。入射位置に対して対称の位置の相関関数はほぼ同じ形状になり、また距離が離れた場所の減衰時間は速くなった。これについて、半無限の一樣媒質についての解析的な解で解析することができた。

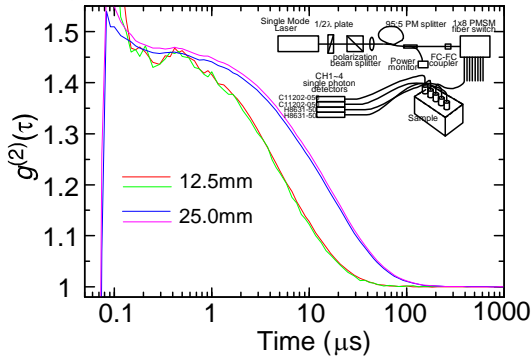


図2 1%イントラリピッド懸濁液の散乱光強度相関関数

つぎに、入射検出ファイバと試料の距離を離して非接触の計測が可能かどうかを調べた。距離が十分に離れたときには接触している場合と同様な計測が可能なることもあったが、非接触であった計測では試料だけではない散乱光が混入することにより、相関関数が大きく変形した。接触させるような配置であればそのような問題は少ないことがわかった。一方で完全な非接触での計測を行うためには、コリメータなどの光学系を改善する必要がある。

さらに、実際の生体組織について測定した。生体組織としては、ラット(HWY/Slc)の腹部にプローブを配置し、そこでの相関関数を測定した。図3に示した相関関数は、ラットに麻酔剤を過剰投与する直前から投与後100秒毎に20分間計測したものである。最初の3分程度ではほとんど変化が出なかったが、徐々に心拍数が遅くなるとともに、減衰は遅くなり、さらに心停止に至ると急速に相関関数の減衰が遅くなった。血流速が相関関数の減衰を決めると言う結果を支持している。

さらに、安楽死後経過した場合も測定すると、10msより遅い成分が特に増大した。

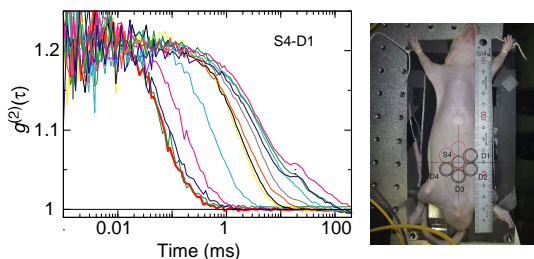


図3 ラット腹部でのDCS測

この結果から、筋肉などが硬直することによる効果と組織に残る血球や細胞内の散乱体の速い動きとの2成分があることが示唆された。以上により、このシステムで組織の動態を追うことが可能であると結論されその成果は学会にて発表を行った。

- (2) 相関関数の解析を定量的なものにするために、光学定数も全く同じ光学系で決定することを行った。光学定数の決定には、時間領域の光伝播計測(TOF)を用いる。そのためには、パルス光を入射し散乱光の時間応答関数を計測する必要がある。予備実験から、ラット腹部での時間応答関数は約1ns程度で減衰することがわかり、試作した光子計数システムでは、時間分解能が不足すると結論された。そのため時間応答関数の測定はより時間分解能が高い時間相関単一光子計数法を用いることとした。全く同一の光学系を用いるようにするために、単一縦モードレーザーとピコ秒レーザーをそれぞれ単一モードファイバに導入し、さらにそれらを光ファイバで結合したものを光源とした。検出器の出力も2分一方をDCS用の光子計数システム、もう一方を時間相関単一光子計数システムに入力した。この結果、完全に同一の光学系で光子相関と時間応答関数の計測が可能となった。

これを用いてラット腹部のTOF, DCS同時測定を試みた。

腹部のイメージングを行うために、図4のようなファイバフォルダを試作した。

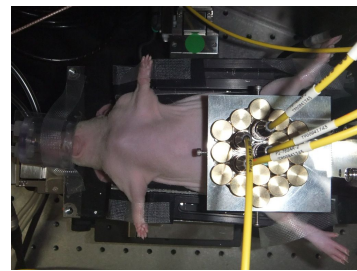


図4 ラット腹部の計測写真

今回は、入射光の照射位置を囲む3点で計測する。相関関数は3点同時に計測し、そのうちの1点では時間応答関数も計測する。

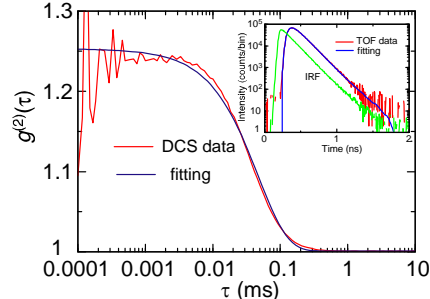


図5 相関関数(DCS)と時間応答関数(TOF)の同時測定データ

図5にその一例を示した。挿入図には、時間応答関数とそれを半無限の解析解を用いてフィットした結果(青線)が示されている。ラットの腹部は、本来様な散乱とは言えないが、半無限の解析解でかなり良くあわせることができる。このフィッティングにより、この入射ファイバの間の平均的な吸収と散乱係数が近似的に求まったと考えられる。相関関数に対しては、その減衰の特徴をとらえるために単一指数関数で合わせた。単一指数関数からは系統的なずれが見られるが、おおよその減衰時間を求めることができる。これらの精度に関しては、今後議論して行く必要があるが、いずれにせよ全く同じ光学系を用いて同時に相関関数と時間応答関数が得られそこから光学パラメータも推定することが可能になった。従ってこのような測定を平面的に繰り返すことにより、組織での動きの空間的な分布などをイメージングすることが可能であると考えられる。この考えに基づき入射検出プローブ位置を移動させながら同時測定を繰り返すことで得られたパラメータについてイメージングした例を示す。ある位置で得られたパラメータは、そのときの入射検出点の中心での値とした。擬似カラーは、計測点を含む等間隔の格子点を用意し、データ点の座標により重みを付けて各格子点での値を作り、それをスムーズな値変化になるように表示させたものである。

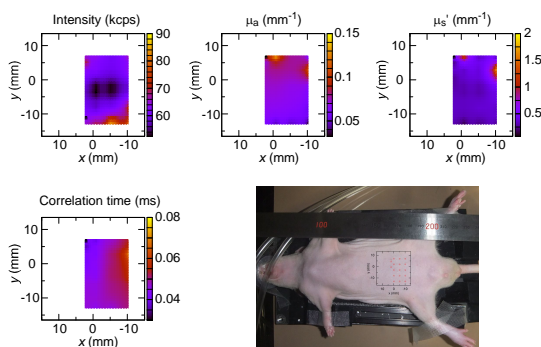


図6 光学定数と相関関数の減衰時間の空間的な分布

図6には、光強度、吸収係数、散乱係数、さらに減衰時間の空間分布を示した。吸収係数と散乱係数が上の端で大きくなっているが、これは計測ファイバの位置が体表の端に来たためのアーティファクトと考えられる。相関関数の減衰時間(correlation time)は、下肢に近づくにつれ遅くなっている結果が得られたが、これは下肢に行くに従い肝臓などの血液を多く含む臓器から離れるためではないかと考えられる。ここで得られたパラメータの妥当性と散乱吸収係数を用いた減衰時間の定量

化などは今後の課題として残るが、今回構築したシステムにより、このような複数のパラメータによるイメージングが可能であることが実証された。今回は3点の検出点のうち、時間分解測定は1点のみで可能であった。時間分解システムを複数個用意することができれば、イメージング領域を広げることが可能であり、今回の結果より精度の増した評価が可能となると考えられる。

- (3) 今回試作した光子計数システムは、ナノ秒の時間分解能を持つ。この時間領域は一般的な蛍光色素の蛍光減衰時間に近い。そのため、この光子計数システムを用いると一回の光子列計測から、寿命とゆらぎを同時に解析できるはずである。それを実証するために、近赤外波長での共焦点蛍光顕微鏡を用いた蛍光ゆらぎ測定装置を試作した。共焦点光学系を作るための検出側のピンホールは、マルチモード光ファイバのコアで代用し、検出器の組み合わせなどを自由に替えられるフレキシブルな設計にした。また励起側についても単一モード光ファイバで入射できるようにし、励起光源を容易に変更できるようにした。

近赤外波長域では、可視域と異なり標準的な測定は確立していない。特に、色素の退色や量子収率などの問題は可視域と比べると顕著であり、色素の種類は限られる。今回は、780nm 付近に吸収を持つ IR806 が BSA(bovine serum albumin) と作る複合体に注目した。この複合体は安定で作製も容易であり、また退色も他のこの波長域の色素と比べると少ないことから、標準色素に採用した。この複合体大きさはほぼ BSA のそれと考えることが出来るため、この複合体の測定結果を用いることにより、例えば水溶性近赤外量子ドットや、分子イメージング用の近赤外色素を含む高分子ミセルなどの大きさなどを評価することが可能であることがわかった。

さらに、このシステムの高い時間分解能を生かした、蛍光寿命と蛍光ゆらぎの同時計測を行った。励起光にはパルス化した半導体レーザーを用いた。

ICG(Indocyanine green) と Intralipid との複合体と IR806-BSA 複合体の蛍光相関関数と蛍光減衰関数(挿入図)を図7に示した。装置の時間応答関数(IRF)は点線で示した。IR806-BSA の蛍光相関関数と ICG-Intralipid 複合体のそれから、ICG-Intralipid の大きさや1粒子あたりの発光強度などの評価が行えた。さらに、同時に取得した蛍光減衰関数より、それぞれの蛍光寿命も評価することができた。IR806-BSA 複合体については、より高い時間分解能を持つ蛍光寿命計

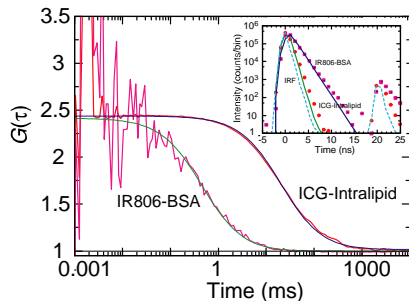


図7 近赤外蛍光プローブの蛍光相関関数と蛍光減衰関数

測で得られた値と良い一致を示した。一方、ICG-Intralipid 複合体の場合、蛍光減衰は単一指数関数ではなく、2成分以上からなることがわかっているが、今回の計測では、それらを分解することはできなかった。また得られた寿命は、やや速かった。これは今回の光子計数システムの時間分解能に対し、測定対象の蛍光寿命が無視できなかったと考えられる。このような場合には、今回のシステムで正しく評価できないことがあることがわかった。しかし多くの蛍光色素の寿命はナノ秒程度であることを考えると、今回の光子計数装置は他の多くの色素の蛍光寿命解析に用いることが可能であると言える。

近赤外波長域の特徴を生かし、血中の蛍光色素の評価に応用した。一般的に用いられる可視波長域では、血液の強い吸収と、数々の自家蛍光を発する物質が、単一分子レベル蛍光測定の際の障害になると考えられる。これに対し、近赤外波長域ではそれらの問題を回避することが可能であると考えた。ラット尾静脈よりICGを注射し、適当な時間の後の血液を採取し、それを計測した。全血を何も処理せずにそのままサンプルとして計測した場合、蛍光強度がサンプルホルダ底面からの距離に応じ大きく減衰し、またいずれの距離においても相関関数の振幅はほとんどノイズレベルであった。これは、血球が沈殿することにより、強く光が散乱し、そのため相関関数が得られなかったと考えられる。一方、全血を生理食塩水で1:100程度に希釈したのに関して測定すると、相関関数の減衰を得る事に成功した。血清にICGを混ぜ複合体を作ったものと比較すると、蛍光寿命および蛍光相関関数の減衰時間が良い一致を示した。またIR806-BSA複合体の蛍光相関関数の減衰時間よりもやや遅く、血清アルブミンよりも大きなものにICGが結合していることが示された。この結果は、以前から知られている結果と一致する。以上のことから、近赤外波長域の色素を用いた蛍光プローブを直接単一分子レベルで計測することが可能であることが示され、薬物動態などの追

跡や in vivo での高感度分析技術として応用し得ると期待できる。この成果のうち前半部分は学会により発表された。

これらにより、組織の病変などを検出するためのゆらぎイメージング技術の基礎が確立できたと結論された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) Goro Nishimura, Near-infrared fluorescence fluctuation measurement system – Its design and applications, The 5th Asian and Pacific-Rim Symposium on Biophotonics (APBP'15), 2015年4月23日、Pacifico Yokohama (神奈川県・横浜市)
- (2) 西村 吾朗, FPGAを用いた光子計数システムによる光子相関測定、日本光学会年次学術講演会(OPJ2014)、2014年11月5日、筑波大学東京キャンパス文京校舎(東京都・文京区)
- (3) 西村 吾朗, A photon-timing recorder in a nano-second resolution and its application for near-infrared fluorescence fluctuation measurements, 第52回日本生物物理学会年会、2014年9月25日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
- (4) 西村 吾朗, 光のゆらぎ計測とその応用、第9回レーザー学会「レーザーバイオ医療」技術専門委員会、2014年6月4日、北海道大学学術交流会館(北海道・札幌市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 吾朗 (NISHIMURA, Goro)
北海道大学・電子科学研究所・助教
研究者番号: 30218193