

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590445

研究課題名(和文)超音波顕微鏡画像の感度と特異性を向上させる方法の開発

研究課題名(英文)Development for the elevation of sensitivity and specificity of imaging with a scanning acoustic microscope

研究代表者

三浦 克敏(Miura, Katsutoshi)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：20173974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：超音波顕微鏡(SAM)画像の感度を向上させるために、固定による違いを明らかにした。ホルマリン固定では新鮮標本と比べ、組織が収縮し、音速(SOS)が大きくなった。ホルマリン固定時間経過では3分から1日まではSOSは上昇した。通常の組織観察に用いられるホルマリン固定パラフィン標本については1日から3か月の固定時間では差が認められなかった。特異的な画像を描出するために、金コロイド標識抗体法またはペルオキシダーゼNi-DAB染色法は陽性部分のSOSを増し、特異的な描出ができた。またPAS反応を行うと、糖化の程度に応じて陽性部のSOSが増した。蛋白分解酵素処理では経時的な組織の消化を観察できた。

研究成果の概要(英文)：To increase the sensitivity of imaging with a scanning acoustic microscope, we compared the difference of fixation method. By formalin fixation, cells or tissues shrunk and the speed-of-sound (SOS) and the attenuation-of-sound of fixation areas increased. From 3 min through 1 day of fixation period, the SOS rose accordingly. In routine formalin-fixed, paraffin-embedded section, no differences were found among fixation period from 1 day through 3 months. To obtain specific images, colloidal gold fixed antibody or Ni-DAB staining method improved the positive images by increasing SOS. With periodic acid-Schiff (PAS) reaction, positive area showed greater SOS in proportion to the degree of glycosylation. By protease digestion, we could followed the time course of tissue breakdown.

研究分野：人体病理学

キーワード：超音波顕微鏡 組織弾性 音速 減衰 組織化学 架橋反応 加齢 細胞診

1. 研究開始当初の背景

(1) 光を用いる光学顕微鏡 (LM) にくらべ、音を用いる超音波顕微鏡 (SAM) の歴史は浅く、一般 LM の病理診断への応用を目指すために、LM と比較して SAM にはどんな長所と短所があるのか。解像度が高く、組織の特徴を表す SAM 像を得るために、どのような工夫をすればよいか。当初はわからなかった。

(2) 超音波は種々の臓器で日常診療に使われているが、安全に繰り返して利用できるメリットをもっている。ただし、他の放射線や MRI などの画像診断と比べて、解像度が低い。

2. 研究の目的

SAM の解像度をあげるにはどういう工夫が必要になるか。SAM 像を利用して、組織や病変の特徴を捉えるにはどんな工夫が必要か。

3. 研究の方法

(1) 組織切片の作成：10 ミクロンに薄切したパラフィン切片をスライドグラスに張り付ける。可能な限り、平坦な切片を用意する。平坦な面をだすのは大変だが、凍結組織切片も使用可能。切片は通常の脱パラフィンの後、数時間水になじませた。

(2) 細胞診検体：95%エタノール固定した細胞診断用の液状余剰検体から単層の細胞診スライドを作成した (BD CytoRich™; Franklin Lakes, NJ, USA)。

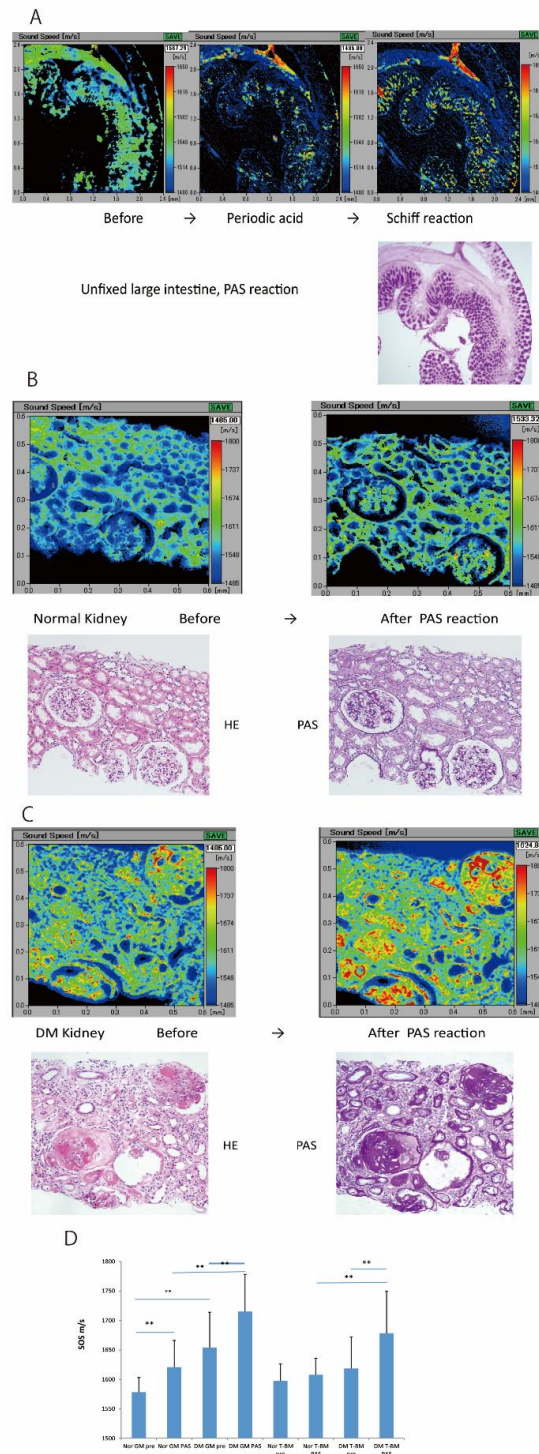
(3) SAM による観察：本田電子製の超音波顕微鏡 (AMS-50AI) を用いて、120MHz または 400MHz のトランスデューサーで観察した。切片の各部位の音速、減衰、厚さのデータが 2 次元のカラー画像としてディスプレイに映し出された。各部位のデータは数値で表されるので、標本ごとの統計学的比較を行った

(4) 抗体を用いる特異的画像：金コロイド法と Ni-DAB 法を用いて、抗体の沈着部位の SAM 観察を行った。

(5) 糖鎖の染色：過ヨウ素酸-シッフ (PAS) 反応を切片上で行った (図 4A；マウス結腸の新鮮凍結切片を用いた PAS 反応、反応経過中の SAM 像。B；正常腎切片の PAS

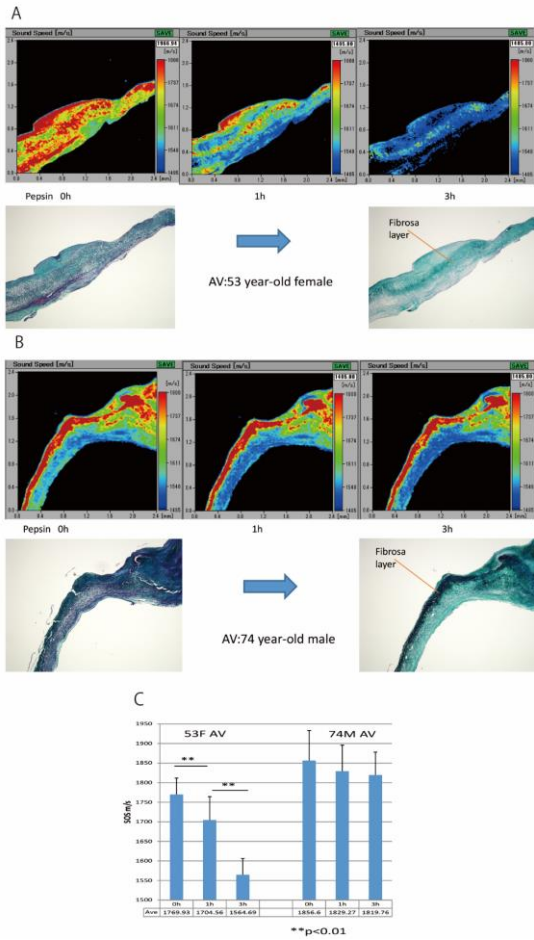
反応前後の SAM 像。C；糖尿病腎切片の PAS 反応前後の SAM 像)。D；腎切片上各部位の SOS の比較。

Fig. 4



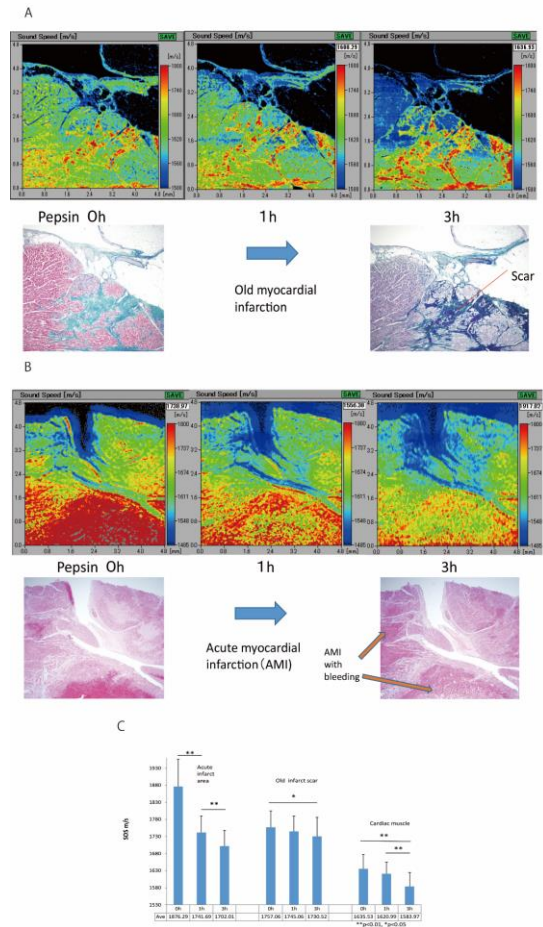
(6) 蛋白分解処理：ペプシンおよびコラーゲナーゼを切片上にマウントして、消化を行った (図 6；若年者 (A) と高齢者 (B) の大動脈弁の SAM 像、ペプシン消化後の経時的変化。C は SOS の経時変化)。

Fig. 6



(図 7 ; 陳旧性 (A) および急性 (B) 心筋梗塞巣の SAM 像、ペプシン消化後の経時的变化。C は部位別の SOS の経時的变化)

Fig.7



4. 研究成果

まず、超音波の利用できにくい空気を含む肺について、組織切片を用いて各種の病変の描出に成功した。その成果を病理の国際誌に発表した (Miura & Yamamoto, 2012)。

SAMを用いてリンパ節の炎症または腫瘍性病変の特徴を国際誌に発表した (Miura, Nasu, Yamamoto 2013)

SAMを用いて甲状腺の病変について国際誌に報告した (Miura & Mineta 2014)。

SAMを用いて胃の病変について、国際誌に報告した (Miura & Yamamoto 2014)。

肺の石灰化病変について、SAM画像の所見をつけて国際誌に発表した (Nakamura 他、2015)。

ホルマリン固定、PAS反応 (図4)、蛋白分解 (図6, 7) を行った組織の変化をSAM像で捉えることができ、病理の国際誌に発表した (Miura ほか 2015)。

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 6 件)

Miura K, Yamamoto S: Pulmonary imaging with a scanning acoustic microscope discriminates speed-of-sound and shows structural characteristics of disease. *Lab Invest* **92**:1760-1765, 2012

Miura K, Nasu H, Yamamoto S. Scanning acoustic microscopy for characterization of neoplastic and inflammatory lesions of lymph nodes. *Sci Rep* **3**:1255; 2013; DOI 10.1038/srep01255.

Miura K, Mineta H. Histological evaluation of thyroid lesions using a scanning acoustic microscope. *Pathology and Laboratory Medicine International*. 6:1-9, 2014

Miura K, Yamamoto S. Histological imaging of gastric tumors by scanning acoustic microscope. *British Journal of Applied Science & Technology*. 4:1-17, 2014

Nakamura Y, Miura K, Yasumizu R, Sato M, Suda T. Dendriiform pulmonary ossification visualised by scanning acoustic microscope. *Thorax*. 70(5):512-3, 2015 doi: 10.1136/thoraxjnl-2015-206831. Epub 2015 Mar 6.

Miura K, Egawa Y, Moriki T, Mineta H, Harada H, Baba S, Yamamoto S.

Microscopic observation of chemical modification in sections using scanning acoustic microscopy.

Pathol Int. 2015. doi: 10.1111/pin.12288.

[Epub ahead of print]

[学会発表] (計 3 件)

三浦克敏, Application of Scanning Acoustic Microscope to evaluate lymph node lesions, European society of Pathology 24th, 2012

年 9 月、プラハ (チェコ)

三浦克敏, Detecting chemical modification on tissues by scanning acoustic microscopy, 26th ヨーロッパ病理学会総会, 2014 年 8/30-9/3, London

三浦克敏, A scanning acoustic microscope-A novel tool for cytological discrimination, EB2015, 2015 年 3/28-4/1, Boston

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦克敏 (MIURA, Katsutoshi)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号: 20173974