

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462982

研究課題名(和文) 光音響顕微鏡を利用した非侵襲型 in vivo 硬組織イメージング装置の開発

研究課題名(英文) Development of noninvasive in vivo hard tissue imaging system using photoacoustic microscope

研究代表者

羽鳥 弘毅 (Hatori, Kouki)

東北大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40372320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生後20週齢Wistar系雄性ラットを用いた。光音響顕微鏡を用いて下顎頭軟骨を観察した。光音響顕微鏡により、軟骨下骨下層から海綿骨に至るまでの領域を可視化した。超音波顕微鏡により、軟骨表層から軟骨下骨に至るまでの軟骨領域を可視化した。両顕微鏡像より、軟骨表層から軟骨下骨を経て海綿骨に至るまでの3次元画像情報を得た。

生後16週齢においてWistar系雄性ラットの上顎臼歯3本を抜歯した。抜歯後1および4週間後に両側咬筋を摘出し光音響顕微鏡にて観察を行った。4週の片側咬合支持では抜歯側咬筋に光音響信号の減少が、また咬合側咬筋に超音波信号の低下が認められた。

研究成果の概要(英文)：Male Wistar rats of 20-week-old (n=5) were used in this study. Mandibles were resected and fixed. Mandibular condylar cartilage was observed with photoacoustic microscopy (PAS). PAS visualized the lesion from subchondral bone to cancellous bone. Ultrasound microscopy visualized the whole cartilage lesion. Thus PAS could visualized the 3-dimentional color image of from cartilage to cancellous bone.

Male Wistar rats of 16-week-old (n=5) were used in this study. Right three molars of maxilla were extracted. After 4 weeks of extraction, both masseter muscles were resected and fixed. Masseter muscle was observed with PAS. Photoacoustic signal was lower in extracted side than in non-extracted side. Ultrasound signal was higher in non tracted side than in non-extracted side.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：光音響顕微鏡 光音響効果 硬組織イメージング 非侵襲 in vivo 血液循環 組織弾性

### 1. 研究開始当初の背景

「光音響顕微鏡」は、動脈硬化に対する臨床的画像評価装置として血管内超音波画像法への応用を目的として開発されてきた。東北大学医工学研究科・医用イメージング研究分野 西條芳文 教授らが開発した「光音響顕微鏡」は、C-mode, B-mode とともに「光音響顕微鏡」が「超音波顕微鏡」に比べ優れた深部撮像能 (C-mode) と画像解像度 (B-mode) を有している。しかしながら、この「光音響顕微鏡」では硬組織を鮮明に撮像するまでには至っていない。

光音響効果の原理に基づき、「光音響顕微鏡」の深深度および解像度はレーザー光の出力 (W) および超音波振動子の精度と密接に関連していることが知られている。レーザー光の出力 (W) は、 $W = \text{パルスエネルギー (J)} \times \text{レーザー周波数 (Hz)}$  で定義されるため、「パルスエネルギー (J)」、「レーザー周波数 (Hz)」、「超音波振動子の精度」の設定変更や改良を加えることにより、「硬組織の撮像を可能とする光音響イメージング装置の開発」との着想に至った、ことを背景とした。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究課題では、「光音響効果」を背景として「レーザー光の出力特性」、「超音波振動子の精度」などを改良することにより、「光音響顕微鏡を利用した非侵襲型 *in vivo* 硬組織イメージング装置」の開発を念頭に置いた。「レーザー光の出力特性」においては、「パルスエネルギー (J)」、「レーザー光周波数 (Hz)」、「レーザー光波長」および「レーザー照射時間」を調整することにより、撮影に最適な条件を決定することを目的とした。同時に、「超音波振動子の精度」改良を行った。最適条件下での、硬組織イメージング (頭蓋骨、上下顎骨、椎骨、大腿骨、脛骨など) を行い「光音響顕微鏡」について検討を加えることを目的とした。

(2) 「軟組織イメージング装置」としての可能性について検討することも目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 種々の条件下で光音響顕微鏡のレーザー光出力特性を検討した結果、レーザー出力 283  $\mu\text{J}$ 、レーザー波長 532 nm、パルス幅 1 ns で光音響信号を励起し、中心周波数 20 MHz の凹面超音波振動子で超音波信号の受信を行うことが最適条件であった。ただこの条件は下顎頭軟骨に対する最適条件であった。骨に関してはレーザー光が透過しないため、本実験期間内においての観察は行わなかった。レーザーと超音波振動子は同軸で計測を行い、3次元画像構築を行った。

実験には生後 20 週齢 Wistar 系雄性ラット 5 匹を用いた。ラットの安楽死後、下顎骨を摘出し浸漬固定を行った。下顎骨より両側の下顎頭を周囲骨とともに切除して、光音響イメージングの撮像に供した。

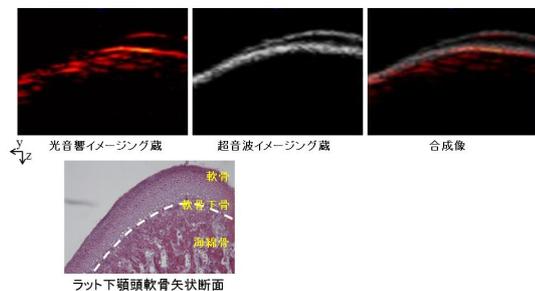
イメージングは、マイクロチップレーザー (出力 283  $\mu\text{J}$ 、波長 532 nm、パルス幅 1 ns) で光音響信号を励起し、中心周波数 20 MHz の凹面超音波振動子で超音波信号の受信を行った。レーザーと超音波振動子は同軸で計測を行い、1.8 mm  $\times$  1.5 mm の B モード画像を 120  $\mu\text{m}$  間隔で 25 枚取得し、3次元画像構築を行った。

(2) 実験動物には生後 16 週齢 Wistar 系雄性ラットを用いた。右側の上顎臼歯を 3 本抜去後、1 および 4 週間飼育した。その後両側咬筋を摘出して光音響および超音波顕微鏡撮像を撮影した。光音響および超音波顕微鏡撮像では、咬筋の中央部を 1 mm  $\times$  1 mm、各 25 点で画像化する。MATLAB で B モード画像を 25 枚作成し、ImageJ で 1 mm  $\times$  1 mm  $\times$  1.5 mm の 3次元画像を構築する。計測には波長 532 nm のレーザーと中心周波数 20 MHz の凹面超音波振動子を使用した。1つの試料から得られた 25 のデータから 6 データを選出し、専用ソフトにて光音響信号および超音波信号を測定した。統計処理には一元配置分散分析後に Bonferroni 法による多重比較検定を行った。有意水準は 5% とした。

### 4. 研究成果

(1) 光音響イメージングにより、軟骨下骨下層から海綿骨に至るまでの領域を可視化することに成功した。また超音波イメージングにより、軟骨表層から軟骨下骨に至るまでの領域を可視化することに成功した。両イメージングを重ね合わせることで、軟骨表層から軟骨下骨を経て海綿骨に至るまでの 3次元画像情報を詳細に描写することを可能とした。以上より、光音響イメージングは顎関節症においても下顎頭の形態変化を正確に診査・診断するための新たな画像診断装置となり得ることが示唆される。

#### 実験結果 下顎頭矢状断面像



## 実験結果 下顎頭前頭断面像



## 実験結果 画像まとめ

**超音波イメージング**

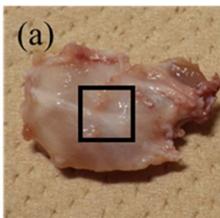
- 軟骨や軟骨下骨の表面で強い信号が発生
- 軟骨と軟骨下骨で音響インピーダンスが異なるため

**光音響イメージング**

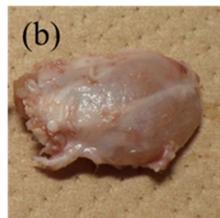
- 海綿骨で強い信号が発生
- 海綿骨には赤色の骨髓が存在するため
- 赤色は使用レーザーの波長532nmに対して吸光度が高い

(2) 光音響顕微鏡により、光音響信号（赤血球分布）および超音波信号（組織弾性）により咬筋の鮮明な3次元画像が得られた。抜歯後4週群において、抜歯側咬筋の光音響信号は咬合側咬筋に比べ有意に低下した。また抜歯後1週群および4週群における抜歯側咬筋の光音響信号の比較では、抜歯後4週群が有意に低下した。さらに、抜歯後4週群の咬合側咬筋の超音波信号は、他の全ての群よりも上昇した。本研究より、長期間の片側咬合支持では抜歯側咬筋において機能低下による咬筋内血液循環量の減少が、また咬合側咬筋において機能亢進による咬筋組織弾性の低下が示された。以上より、筋機能の変化は筋組織内血液循環および筋組織弾性の変化を引き起こす可能性が示唆された。さらに、光音響顕微鏡は筋の廃用もしくは過負荷などに起因する筋組織変性を検査・診断可能とする非侵襲型イメージング装置となりうる可能性も示唆された。

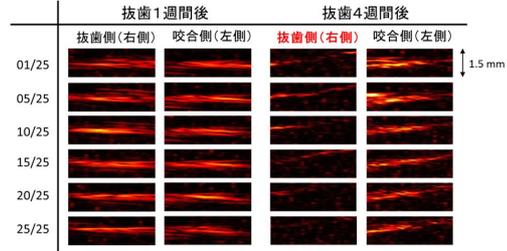
(a) 右側咬筋



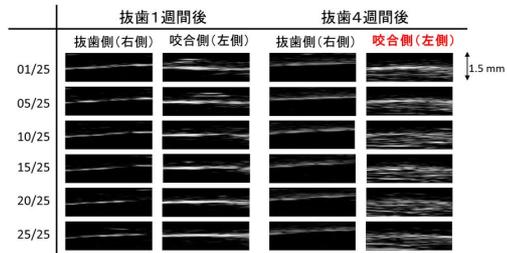
(b) 左側咬筋



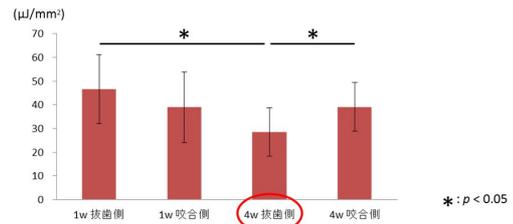
## 1. 光音響イメージング像(赤血球分布)



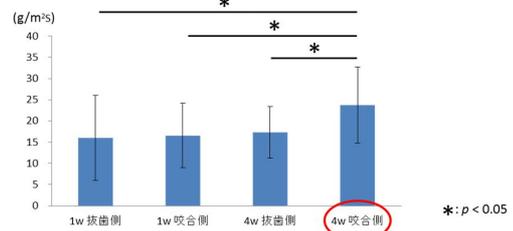
## 2. 超音波イメージング像(咬筋弾性)



## 3. 平均光音響信号



## 4. 平均超音波信号



## 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 1件)

K. Hatori, Y. Naganuma, Y. Saijo, Y. Hagiwara, M. Iikubo, K. Igari, K. Sasaki. Acoustic Impedance Microscope for Imaging Human Carious Dentin. 12th Western Pacific Acoustics Conference 2015. 査読無, Vol. 1, 2015, pp. 1-4.  
DOI: 10.3859/978-981-09-7961-4\_0100161

[学会発表](計 8件)

K. Hatori. Acoustic diagnosis device for dentistry. Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium the 6th International Symposium for Interface Oral Health Science. 2016/01/18-19. Gonryo Kaikan, Sendai, Japan.

K. Hatori, Y. Naganuma, Y. Saijo, Y. Hagiwara, M. Iikubo, K. Igari, K. Sasaki. Acoustic Impedance Microscope for Imaging Human Carious Dentin. 12th Western Pacific Acoustics Conference 2015. 2015/12/06-09. Grand Copthorne Waterfront Hotel, Singapore.

羽鳥弘毅, 西條芳文, 飯久保正弘, 萩原嘉麿, 佐々木啓一. 光音響超音波顕微鏡を利用した片側咬合支持モデルラットにおける咬筋の経時的変化. 公益社団法人日本補綴歯科学会東北・北海道支部総会・学術大会 2015年10月24~25日. 岩手県歯科医師会館 8020 プラザ, 盛岡, 岩手.

山崎玲奈, 羽鳥弘毅, 飯久保正弘, 萩原嘉麿, 佐々木啓一, 西條芳文. 光音響顕微鏡によるラット咬筋の評価. 第48回日本生体医工学会東北支部大会. 2014年12月06日. 東北大学工学部青葉記念会館, 仙台, 宮城.

K. Hatori, Y. Naganuma, Y. Saijo, Y. Hagiwara, Y. Shimizu, K. Igari, K. Sasaki. The Application of Ultrasound Microscope for Human Caries Dentin. The 62nd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research. 2014/12/04-05. KKR HOTEL OSAKA, Osaka, Japan.

Hatori K, Naganuma Y, Saijo Y, Hagiwara Y, Shimizu Y, Igari K, Sasaki K. Ultrasound Microscope for Investigation of Elasticity of Human Carious Dentin. INDONESIA PROSTHODONTIC SOCIETY and JAPAN PROSTHODONTIC SOCIETY JOINT MEETING. 2014/10/30-11/01. Grand Nikko, Nusa Dua, Bali, Indonesia.

Y. Naganuma, K. Hatori, Y. Saijo, Y. Hagiwara, Y. Shimizu, K. Igari, K. Sasaki. Ultrasound Microscopic Imaging of Human Caries Dentin. East Asian Consortium on Biomedical Engineering 8th Student

Workshop. 2014/03/12-13. Aoba Memorial Hall, Aobayama Campus, Tohoku University, Sendai, Japan.

羽鳥弘毅, 佐藤みか, 西條芳文, 萩原嘉麿, 富士岳志, 高橋健太, 佐々木啓一. 光音響イメージングを利用したラット下顎頭の可視化. 平成25年度第4回光超音波画像研究会. 2014年1月28日. 産業技術総合研究所つくば東事業所第1会議室, つくば, 茨城.

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

羽鳥 弘毅 (HATORI Kouki)  
東北大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号: 40372320

(2)研究分担者

西條 芳文 (SAIJO Yoshifumi)  
東北大学・大学院医工学研究科・教授  
研究者番号: 00292277

佐々木 啓一 (SASAKI Keiichi)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号: 30178644

萩原 嘉麿 (HAGIWARA Yoshihiro)  
東北大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 90436139