

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02081

研究課題名(和文) フェムト秒レーザーを用いた時間分解計測による生体光学特性値の推定

研究課題名(英文) Estimation of optical properties in biological tissue using time-resolved spectroscopy with femtosecond laser

研究代表者

星 詳子 (Hoshi, Yoko)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・教授

研究者番号：50332383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：拡散光トモグラフィ(DOT)は、生体機能と構造情報を可視化できる生体光計測技術の中で最も高度な技術の一つである。DOT画像再構成アルゴリズムは、基本的に順問題解析と逆問題解析によって構成される。生体の光学特性値(吸収係数と換算散乱係数)は、順問題の条件設定や逆問題解析の初期値として必要であるが、その真の値は未だ不明である。本研究は、脳組織を灰白質と白質に分けて、それぞれの光学特性値をin situ計測することを目的とした。そのために、フェムト秒時間分解計測システムを構築して生きているラットとサルを計測し、モンテカルロ法で作成したルックアップテーブルを用いて光学特性値を推定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、X線CT、MRI、PET、USなど画像診断技術の進歩は目覚ましく、診療には欠くことができない検査法である。しかし、乳幼児では薬による鎮静化が必用で、誰にでも簡単に行える検査ではない。また、神経刺激装置装着者はMRI検査を受けられないなど、計測原理に関連した制約から検査適応外の患者は多数存在する。一方、USはベッドサイドでの計測は可能であるが脳計測や機能情報を得ることは困難である。そのため、DOTは第5の画像診断法として期待されているが、光学特性値の真値が不明であることが技術開発のボトルネックの一つとなっている。本研究は、この問題を解決してDOTの実用化を加速するものである。

研究成果の概要(英文)：Diffuse optical tomography (DOT), one of the most sophisticated optical imaging techniques for observations through biological tissue, provides functional and anatomical information. DOT image reconstruction algorithm essentially consists of the forward and inverse problems. Tissue optical properties, absorption and reduced scattering coefficients, are crucial for modeling light propagation in biological tissue (the forward problem) and guessing initial values in the inverse problem, whereas these values remain unknown in detail due to difficulties in the experimental determination and significant variations in tissue constitution. The aim of this study was in situ separate estimation of the optical properties of the gray and white matter in the brain tissue. We employed the femtosecond time-resolved spectroscopy system to measure the brain tissues of living rats and a monkey, estimating the optical properties by using a look-up table created by the Monte Carlo method.

研究分野：生体医用光学

キーワード：生体内光伝播 吸収係数 換算散乱係数 脳組織 拡散光トモグラフィ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

拡散光トモグラフィ(diffuse optical tomography、DOT)は、近赤外線を生体に照射し、体内を透過してきた光を体表で検出して、光学特性値(吸収係数( $\mu_a$ )、換算散乱係数( $\mu_s'$ ))さらに $\mu_a$ から算出されるヘモグロビン(Hb)濃度などの分布を断層画像化する、生体のような不均一媒体の光計測の中で最も高度な技術の一つである[1]。DOTの画像再構成アルゴリズムは、基本的に順問題解析と逆問題解析から構成される(逐次近似画像再構成法)。順問題解析で、まず光学特性値の分布を予測して生体内光伝搬数理モデルを解いて検出される光を見積もり、逆問題解析で計算値と実測値の差を最小にする光学特性値の分布を求める。ここで取り扱う逆問題は計測データ数より未知数ははるかに多い、しかも利用できる観測データが限定され、観測誤差が微小であっても逆問題の解に大きな変動を引き起こすという不安定性を内在している非適切問題である。そのため正しい解を得るのは容易ではなく、光学特性値の初期値はできるだけ真値に近いことが要求される。しかし、生体の光学特性値の真値は不明である。

生体の光学特性値については、これまで脳、肝臓、腎臓など様々な臓器や組織に対して計測が行われてきたが、これらはいずれも摘出された臓器・組織の*in vitro*計測、あるいは*in situ*計測であっても死後の計測で、もとめられた光学特性値は真値を反映していない可能性が高い。実際、これまで報告されている値は、研究施設によって異なり[2]、生体での*in situ*光学特性値計測は必須である。時間分解計測法(time-resolved spectroscopy、TRS)は一樣媒体の光学特性値を定量計測することができるが、生体は層構造を呈していて各層を選択的に計測するためには、照射-受光(source-detector、SD)間距離を短くして、各層に光ファイバを挿入する侵襲的計測が必要である。本研究ではラットを計測対象として、超短パルス光を光源とするTRSシステムを構築し光学特性値推定を試みた。

## 2. 研究の目的

脳はDOTの計測対象として乳房(乳がん)と並んで最も一般的である。脳組織は灰白質と白質で構成されているが、それぞれを分離して計測した報告は少ない[3,4]。本研究ではラット脳で両者を分離して計測する方法を確立し、脳組織の光学特性値を推定することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) ラットとサルの外科的処置

11匹のSprague Daley rat(オス、10-15週齢、395-550g)を計測対象とした。イソフランで麻酔して静脈ラインを確保した後、気管切開を施し気管カニューレを挿入して人工呼吸器で呼吸をコントロールし、体温保持にはヒートパッドを用いた。ステレオタキシクを用いてラット脳を固定し、デンタルドリルで頭蓋骨に穴を開けて骨窓を作成した。尾動脈から血液を採取してガス分析を行い、呼吸・循環機能に問題がないことを確認した後、体性感覚野に光ファイバ(コア径、50 $\mu\text{m}$ ; クラッド径、125 $\mu\text{m}$ ; NA, 0.2)を設置した。SD間距離を1.25mm(図1、挿入図)として脳表から深さ0.9mmまで0.1mmずつ段階的にマニピュレーターを用いて挿入して各深度で計測した。光ファイバ挿入による脳損傷が最小限に抑えられていることを確認するために、3匹のラットで脳組織標本作製した。

一頭のマカクサル(オス、11歳、生理学実験終了により安楽死前のサル)は、ケタミン筋注で麻酔導入を行い、ペントバルビタール静注で麻酔を維持し、呼吸は自発呼吸とした。頭部をステレオタキシクフレームに固定して3か所(左右のV1、左の7a)に骨窓を作成し、ラット同様に光ファイバを挿入した。

本研究は、浜松医科大学ならびに東京都医学総合研究所の動物実験倫理委員会の承認を受けて行った。

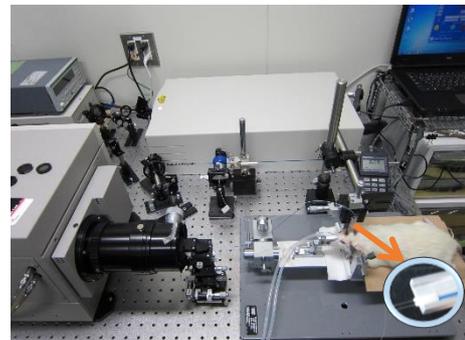


図1. 実験セットアップ. 右下挿入図は光ファイバを示す。(Ref. 10)

### (2) フェムト秒 TRS システム

光源に波長可変フェムト秒レーザー(波長、800nm; パルス幅、70fs; MaiTai, SpectraPhysics, USA)、受光部にストリークカメラを用いるTRSシステムを構築した(図1)。光をビームスプリッターで二つに分け、一方はトリガ信号とし、もう一方をさらに二つに分けてリファレンス信号と計測信号を取得した。ラット脳計測に先立って、光ファイバを対向させて装置関数(Instrumental function、IRF)を取得した(図2)。

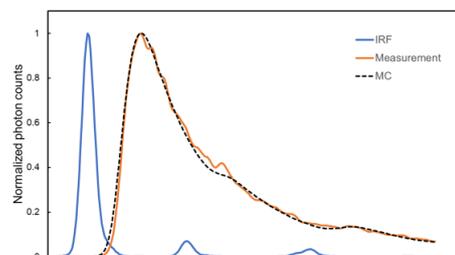


図2. 実測(オレンジ実線)とMC法(青点線)で得られたTPSF. 青実線はIRF。(Ref. 10)

### (3) 光学特性値推定

一般にTRSでは光拡散方程式(photon diffusion equation、PDE)の解析解から観察される光の時間に対する強度分布(時間点広がり関数、temporal point spread function、TPSF)を見積もり、

実測の TPSF にカーブフィッティングすることで光学特性値を求めるが[5]、SD 間隔が 1.25 mm の場合、散乱回数が少なく光が拡散する前に検出されるため PDE で光伝播を記述することができない。この場合は、輻射輸送方程式 (radiative transfer equation、RTE) による光伝播数理モデルが必需であるが[6]、RTE の解析解を求めるのは難しく、また数値解を求めるのには時間がかかる。そのため、本研究ではモンテカルロ (Monte Carlo, MC) 法を用いて look-up table を作成し、MC 法で得られる TPSF に IRF をコンボルーションした波形を実測データにカーブフィッティングして光学特性値を求めた (図 2)。

TPSF のピーク値を 100% として立ち上がり 10% から立下り 10% までの時間領域 (< 85 ps) で、実測値と MC 法で得られた TPSF の二乗平均平方根誤差 (root mean square error、RMSE) が 0.0252 より小さい場合を“best fit”と定義した。

光学特性値の灰白質と白質の差、ラットとサルの差については、Welch's t-test を用い、P 値 < 0.05 を有意とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 液体ファントム実験

動物実験を行う前に、計測並びに解析法の妥当性を検証するために、光学特性値が既知の液体ファントムを作成し、動物実験と同じ条件で計測を行った (図 3)。ファントムは、latex 粒子 (直径、0.67  $\mu\text{m}$ ; Latex microsphere suspensions 5067A, Thermo Scientific, USA) と食紅 (クチナシ緑液、共立食品) と水で、800 nm の  $\mu_a$ 、 $\mu_s$ 、 $g$  がそれぞれ 0.0231  $\text{mm}^{-1}$ 、15.6  $\text{mm}^{-1}$ 、0.836 になるように調整した。図 4 は光ファイバの先端を液面下 0.5 mm から 10 mm まで変化させた時に得られた TPSF を示している。光学的に一樣媒体であるにも関わらず、深度によって異なる TPSF が得られたのは、液体と空気層の境界における光反射の影響が深さによって異なるためと考えられた。従って、液面での反射を考慮した MC コードを作成した。

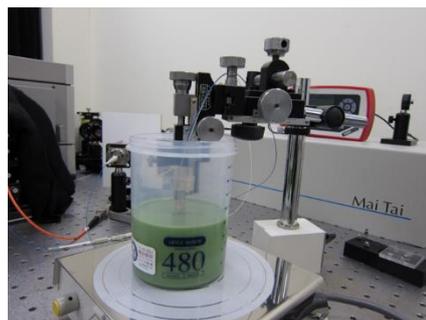


図 3. ファントム計測風景

その結果、図 1 に示すように MC 法で得られた TPSF と実測の TPSF は一致することが確認された。しかし、光ファイバの先端深度が 1 mm より深くなると、MC 法の TPSF と一致しなくなった。これは、SD 間距離が通常用いられている 30 mm の場合は、直径が 125  $\mu\text{m}$  の細い光ファイバでの光の反射を考慮する必要はないが、本研究では SD 間距離が小さく (1.25mm) 光ファイバの直径はその 10% に相当し、光ファイバでの反射を無視できないためと考えられた。しかし、光ファイバでの反射を考慮した MC コードの作成は困難であった。そこで、空間分解計測法 (spatially resolved spectroscopy, SRS) の導入を考え、SD = 1.25 mm、1.5 mm、1.75 mm で計測を行ったが、光ファイバの直径と NA を維持したままでは、SD = 1.75 mm の場合十分な強度の光を検出できなかった。そこで、大脳皮質 (灰白質) の計測では、光ファイバ先端を脳表から 0.5 mm の深度とし、白質に対しては 0.9 mm とした。

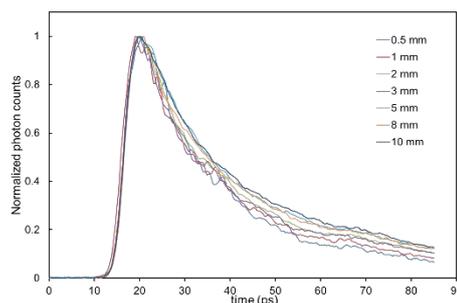


図 4. 液体ファントムの異なる深度における計測で得られた TPSF. (Ref. 10)

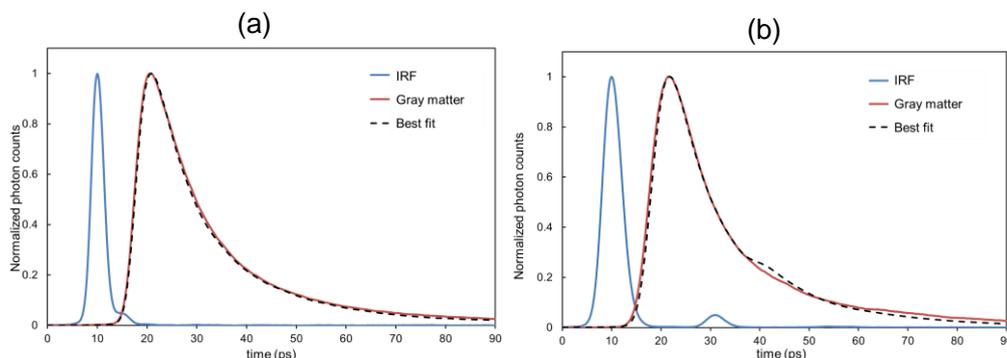


図 5. カーブフィッティングの例. (a) ラット灰白質計測で得られた TPSF (実線), MC 法で得られた best fit の TPSF (点線) (b) サル灰白質計測で得られた TPSF (実線), MC 法で得られた best fit の TPSF (点線), 青線カーブは IRF. (Ref. 10)

##### (2) 動物実験

図 5 は、ラット (a) とサル (b) の灰白質計測で得られた TPSF と MC 法で得られた best fit

の TPSF を示す。サル計測の IRF で 30 ps 付近に見られる hump はストリークカメラ内のレンズの反射によると考えられ、MC 法で得られる TPSF は IRF をコンボリューションするため hump の影響を受けて歪みが認められる。それを回避するために、サル計測では、フィッティング範囲を立ち上がり 40% から立ち下り 40% までとした。

表 1 ラットとサル脳の光学特性値 (Ref. 10)

Rat (n=8)	$\mu_a$ (SD) [mm <sup>-1</sup> ]	$\mu_s'$ (SD) [mm <sup>-1</sup> ]
Gray matter	0.054 (0.017)	1.67 (1.09)
White matter	0.029 (0.015)	2.13 (1.11)
Monkey (n=1, 3 brain regions)	$\mu_a$ (SD) [mm <sup>-1</sup> ]	$\mu_s'$ (SD) [mm <sup>-1</sup> ]
Gray matter	0.084 (0.012)	1.97 (0.29)
White matter	0.021 (0.017)	2.40 (0.60)

表 1 は、光学特性値の推定結果を示している (平均値  $\pm$  SD)。ラットでは灰白質の  $\mu_a$  は白質より大きかったが、これは脳血流が白質より灰白質の方が多くことによると考えられる[7]。一方、 $\mu_s'$  に関しては、これまでの報告[3, 4]と同様に白質の方が大きめであったが、統計的に有意差を認めなかった。サルについては、1 頭で 3 箇所を計測してその平均値と SD を示した。ラット同様  $\mu_a$  は灰白質の方が大きく、 $\mu_s'$  では灰白質と白質で有意差を認めなかった。ラットとサルの比較では、灰白質の  $\mu_a$  以外に有意差が認められず、ラットの光学特性値をヒト計測での参考値にすることの妥当性が確認された。サル灰白質の  $\mu_a$  がラットの  $\mu_a$  より大きいのは、脳血液量の違い[8, 9]を反映していると考えられ、ヒトの灰白質  $\mu_a$  を推定する場合は、年齢などによる脳血液量の違いを考慮する必要があることが示唆された。また、ヒト死後脳で計測された光学特性値は[3]、灰白質と白質での相対的な差については本研究結果とほぼ一致したが絶対値は大きく異なり、生体 *in situ* 計測の重要性が再確認された。

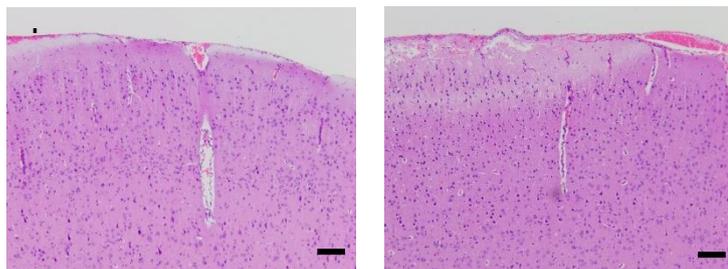


図 6 光ファイバ挿入部のラット脳組織像 (HE 染色)。左、尾側光ファイバ挿入部位；右、吻側光ファイバ挿入部位；スケールバー、100  $\mu$ m. (Ref. 10)

図 6 は、ラット脳の光ファイバ挿入部の組織像を示している。ファイバによる組織損傷は最小限におさえられていることが確認された。本研究において初めて *in situ* 計測で灰白質と白質の光学特性値を分離して推定することができたが、光ファイバの挿入深度が 0.9 mm までであったため、白質計測結果に灰白質の情報も若干含まれていることが MC 法によるシミュレーションで明らかになった。今後、RTE に基づく DOT 画像再構成アルゴリズムを構築して、より正確に白質の光学特性値を求める予定である。

#### <引用文献>

1. Hoshi Y, Yamada Y. Overview of diffuse optical tomography and its clinical applications. *J. Biomed. Opt.* 21, 091312 (2016).
2. Jacques SL. Optical properties of biological tissues: a review. *Phys. Med. Biol.* 58, R37-R61 (2013).
3. Van der Zee P, Essenpreis M, Delpy DT. Optical properties of brain tissue. *Proc. SPIE.* 1888, 454-465 (1993).
4. Bevilacqua F, et al. In vivo local determination of tissue optical properties: applications to human brain. *Appl. Opt.* 38, 4939-4950 (1999).
5. Patterson MS, Chance B, Wilson BC. Time resolved reflectance and transmittance for the non-invasive measurement of tissue optical properties. *Appl. Opt.* 28, 2331-2336 (1989).
6. Ishimaru A. *Wave Propagation and Scattering in Random Media*, IEEE Press, New York (1997).
7. Rempp KA, et al. Quantification of regional cerebral blood flow and volume with dynamic susceptibility contrast-enhanced MR imaging. *Radiology* 193, 637-641 (1994).
8. Eichling JO, et al. In vivo determination of cerebral blood volume with radioactive oxygen-15 in the monkey. *Circ. Res.* 37, 707-714 (1975).

9. Todd MM, Weeks JB, Warner DS. Cerebral blood flow, blood volume, and brain tissue hematocrit during isovolemic hemodilution with hetastarch in rats. *Am. J. Physiol.* 263, H75-H82 (1992).
10. Hoshi Y, et al. *In situ* estimation of optical properties of rat and monkey brains using femtosecond time-resolved measurements. *Sci. Rep.* 9, 9165 (2019).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujii H, Yamada Y, Chiba G, Hoshi Y, Kobayashi K, Watanabe M	4. 巻 374
2. 論文標題 Accurate and efficient computation of the 3D radiative transfer equation in highly forward-peaked scattering media using a renormalization approach.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Computational Physics	6. 最初と最後の頁 591-604
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cnm.2826	査読の有無 有
オープンアクセス 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	国際共著 -
1. 著者名 星詳子	4. 巻 447
2. 論文標題 近赤外光イメージングによる脳機能計測	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 OPTRONICS	6. 最初と最後の頁 69-74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス 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	国際共著 -
1. 著者名 Hoshi Y, Tanikawa Y, Okada E, Kawaguchi H, Nemoto M, Shimizu K, Kodama T, Watanabe M	4. 巻 9
2. 論文標題 In situ estimation of optical properties of rat and monkey brains using femtosecond time-resolved measurements	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-45736-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Jiang Y, Hoshi Y, Machida M, Nakamura G	4. 巻 9
2. 論文標題 A Hybrid Inversion Scheme Combining Markov Chain Monte Carlo and Iterative Methods for Determining Optical Properties of Random Media	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 3500 ~ 3500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/app9173500	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 17件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Yoko Hoshi
2. 発表標題 Developments towards diagnostic optical imaging.
3. 学会等名 The 21th Takayanagi Kenjiro Memorial Symposium. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星 詳子
2. 発表標題 光輸送トモグラフィ ~ 拡散光トモグラフィを越える生体情報抽出アプローチ.
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第40回年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 星 詳子
2. 発表標題 拡散光トモグラフィから"光輸送トモグラフィ"へ
3. 学会等名 理研シンポジウム 第7回「光量子工学研究」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星 詳子
2. 発表標題 拡散光トモグラフィ開発：ボトルネックと展望
3. 学会等名 第35回近赤外フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星 詳子
2. 発表標題 拡散光トモグラフィ：基礎と展望
3. 学会等名 第26回医用近赤外線分光法研究会・第23回酸素ダイナミクス研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星 詳子
2. 発表標題 拡散光トモグラフィ：強散乱体からの機能・構造情報抽出
3. 学会等名 日本光学会近赤外分光法部会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星 詳子
2. 発表標題 近赤外線スペクトロスコープによる選択的脳内ヘモグロビン定量計測
3. 学会等名 第25回医用近赤外分光法研究会・2018年度日本分光学会生細胞分光部会研究会・第7回レーザー学会ニューロフォトンクス研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 星 詳子
2. 発表標題 ヒト光イメージング：光診断・治療学への展開
3. 学会等名 輸送理論と生体医用光学研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoko Hoshi
2. 発表標題 Numerical modeling of light propagation and image reconstruction in diffuse optical tomography.
3. 学会等名 International Workshop on Tomography and Inverse Problem (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoko Hoshi
2. 発表標題 Estimation of optical properties of the cerebral tissue by femtosecond time-resolved spectroscopy.
3. 学会等名 The 17th Conference on Peace through Mind/Brain Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoko Hoshi
2. 発表標題 What is the primary bottleneck in developing diffuse optical tomography?
3. 学会等名 Inverse Problem and Medical Imaging (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoko Hoshi
2. 発表標題 Estimation of optical properties of rat and monkey brains from in situ femtosecond time-resolved measurements.
3. 学会等名 A3 Workshop on applied inverse problems and related topics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoko Hoshi
2. 発表標題 Time-domain diffuse optical tomography of thyroid gland.
3. 学会等名 14th International Conference on Photonics and Imaging in Biology and Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoko Hoshi
2. 発表標題 Towards next generation diffuse optical tomography: the issue of internal refractive index variations.
3. 学会等名 Tianyuan Workshop on Mathematical and Computational Challenges of Medical Imaging and Inverse Problem. (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 星詳子
2. 発表標題 タイムドメイン拡散光トモグラフィの課題と展望 .
3. 学会等名 第37回日本医用画像工学大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoko Hoshi
2. 発表標題 Numerical modeling of light propagation and image reconstruction in diffuse optical tomography.
3. 学会等名 International Workshop on Tomography and Inverse Problem (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星詳子
2. 発表標題 拡散光トモグラフィーによるヒト生体機能イメージング.
3. 学会等名 Optical & Photonics Japan (OPJ 2018) (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	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
研究分担者	谷川 ゆかり  (Tanikawa Yukari)  (20344202)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・情報・人間工学領域・研究部門付    (82626)	
研究分担者	清水 広介  (Shimizu Kosuke)  (30423841)	浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・准教授    (13802)	
研究分担者	岡田 英史  (Okada Eiji)  (40221840)	慶應義塾大学・理工学部(矢上)・教授    (32612)	
研究分担者	町田 学  (Machida Manabu)  (40396916)	浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・指定講師    (13802)	
研究分担者	川口 拓之  (Kawaguchi Hiroshi)  (60510394)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・情報・人間工学領域・主任研究員    (82626)	