

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500509

研究課題名(和文)簡易生体内蛍光イメージング実現のための新たな3次元再構成技術の開発

研究課題名(英文)Development of a new technique of three-dimensional reconstruction for simple fluorescent imaging in a living body

研究代表者

加藤 祐次(Kato, Yuji)

北海道大学・情報科学研究科・助教

研究者番号：50261582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：散乱媒質中の蛍光体深さと厚さを同時に推定する簡便な手法を新たに開発した。本手法では、多波長複数配置光源群の励起光を用い、蛍光体の深さと厚さを同時推定する。この計測原理確率確立のため、数値解析および生体試料実験等において、蛍光体深さと厚さと蛍光強度比の関係を検証した。その結果、深さと厚さ推定が原理的に可能であり、また生体組織への適用性も確かめられた。最後に、生体模擬ファントムを用いて蛍光体の深さと厚さの同時推定を行った。推定された深さ情報から散乱により劣化した蛍光像を改善した。更に厚さ情報を加えて3次元再構成することで、蛍光体の3次元像の取得が可能であることを示し、提案手法の有用性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A simple technique was newly developed to estimate the depth and the thickness of a fluorescent object in a turbid medium, such as an animal body. In this technique, we estimate the depth and the thickness using multiple excitation light sources with multiple wavelength. We analyzed the relation between the depth and thickness of a fluorescent object and the intensity ratio of the fluorescent light, and confirmed the validity of this principle. Using this principle, we have successfully estimated both the depth and the thickness of a fluorescent object in a tissue or tissue equivalent phantoms simultaneously. Finally, using the estimated depth, blurred images have successfully restored by deconvolution with a pointspread function. Using the restored images and the estimated depth, we could construct three dimensional image of a fluorescent object in a turbid medium.

研究分野：医用生体工学・生体材料学

科研費の分科・細目：医用・生体画像

キーワード：蛍光イメージング

1. 研究開始当初の背景

ライフサイエンスの急速な発展の中で、体内蛍光体イメージングの重要性が高まっている。顕微鏡下の蛍光イメージングは一般的な手法として広く普及した技術となっている。蛍光体が体内にあっても、励起光が蛍光体に届き、蛍光が体表に届けば、体内蛍光体の存在を体外から確認することができる。しかしながら、体表で観察する蛍光像は、生体組織の強い散乱により、著しく劣化したものとなり、一般的にその正確な分布を特定するには浅い領域に限られている。この問題の解決のため、国内外で様々な取り組みが行われている。拡散光トモグラフィや光音響イメージング等の応用について検討が進められている。しかしながら時間分解計測等の高度な計測技術や、逆問題解決のため高い計算機能力が必要であり、得られる空間分解能もまだ充分とは言えない。これらの問題に対して本研究においては、簡便な計測手法により体表からの蛍光体深さを推定し、その深さから劣化画像を復元する新たな手法を開発する。これまで、生体のような高濃度な光散乱媒質中における蛍光物質から発する光の伝搬について理論解析を行い、その結果を基に劣化蛍光画像の復元方法を開発してきた。これらの手法には、光学定数、蛍光物質の空間位置、特に深さに大きく依存することが分かっている。そこで、励起光源の複数配置や観測方法の考案により、蛍光物質の深さや厚さを計測する新たな技術を開発し、先に述べた劣化画像復元法と組み合わせることで、新たな蛍光イメージング技術の実現の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、体内蛍光物質のイメージングを体表から簡便な手法で行う技術の開発を目的としている。特に、体内導入可能な血管蛍光造影剤やがん親和性の光感受性薬品等の生体内の分布画像を光散乱により劣化した蛍光画像の復元を具体的な目的とする。本研究において、本手法の原理的な確認の後、理論解析やシミュレーションにより計測システムの設計を行い、基本計測システムの開発までを本研究の範囲とする。その成果は、従来技術では判別が難しい体内深部の蛍光物質の分布状態を簡便かつ明瞭にイメージングできる可能性を有するため、本技術が蛍光薬剤による診断に有用なツールになることが期待できる。

3. 研究の方法

まず基本原理確認のため、体内蛍光物質深さに対する体表蛍光強度分布の理論及び実験的解析、並びに深さ計測手法の確立を図った。さらに、簡易モデルによる深さ計測基礎

実験による検証を行った。次に、生体の光学定数に対する深さ計測精度の検討を行い、基本システムの構築を行った。更に、3次元画像化および蛍光量の定量化のため蛍光体の厚さ推定のため、2波長光源による手法を新たに開発し、前述の蛍光体深さ推定法と組み合わせた。最後に簡易モデルによる散乱媒質中での蛍光体3次元再構成を実現した。

4. 研究成果

(1) 基本原理確認

2個の蛍光体が散乱体内の異なる深さにそれぞれ存在する場合を想定する。このとき、蛍光体に対する大小各光源からの距離は、浅い蛍光体に対しては大きく異なり、深い蛍光体に対してはほぼ等しくなる。つまり、近い光源から蛍光体までの距離 l_s と遠い光源から蛍光体までの距離 l_l の比をとると、距離比 l_s/l_l は蛍光体の深さに応じて単調に変化するパラメータとなる。一方、散乱媒質内で光強度は、光の伝搬距離の増加に伴い単調に減少する。これらの特性を合わせると、大小の円状光源からの励起光により体表で観測される蛍光強度比は上記距離比と同様、蛍光体の深さに応じて単調に変化する。従って、この蛍光強度比を求めることにより蛍光体の深さを推定することが可能になると考えられる。

まず、この蛍光体深さ推定の基本原理確認を行った。理論解析および生体ファントム実験によって図1に示すような配置が異なる2種の光源から得られる蛍光強度の比は散乱体表面からの蛍光体深さに依存して単調に変化していくことが確認された。次にこの関係から、提案手法による深さ推定を行うための校正曲線を得た。この校正関数を用いて実験により蛍光体深さの推定を試みた。計測した蛍光強度の比を校正関数と照合することによって精度よい推定値を得ることができた。更に、推定深さより算出された依存点拡がり関数(PSF)で劣化蛍光像をデコンボリューション処理したところ、精度よく改善される結果が得られた。

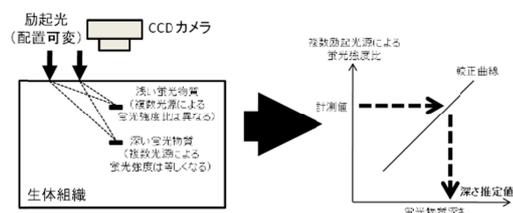
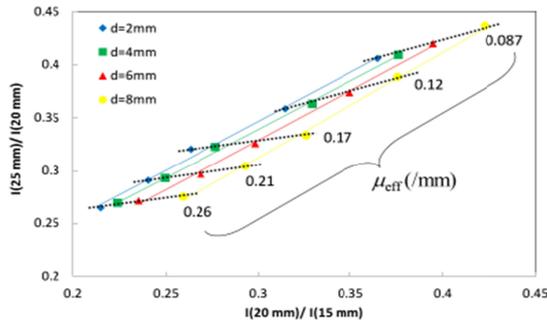


図1 蛍光体深さ推定基本原理

(2) 生体組織中蛍光体の深さ推定と画像復元

次に、本提案手法を生体組織に適用するた



め、生体組織の光学定数の変化に対して本提案手法を拡張し、配置を3か所とした光源群から蛍光体深さを推定する手法を開発した。まず、生体組織の重要な光学定数である吸収係数と散乱係数から求められる光学パラメータ $\mu_{\text{eff}} = \sqrt{3\mu_a(\mu_s + \mu_s')}$ と蛍光強度比から校正曲線群を作成した。1例を図2に示す。横軸縦軸は3光源群から選定した蛍光強度比である。

図2 蛍光体深さ推定校正曲線群

この校正曲線群を用いて、生体組織として鶏ささみ肉に蛍光体（インドシアニングリーン）を挿入した試料に対して深さ推定を行い、蛍光像復元を行った。結果を図3に示す。なお、計測点I、IIはそれぞれ深さ2、4mmとした。

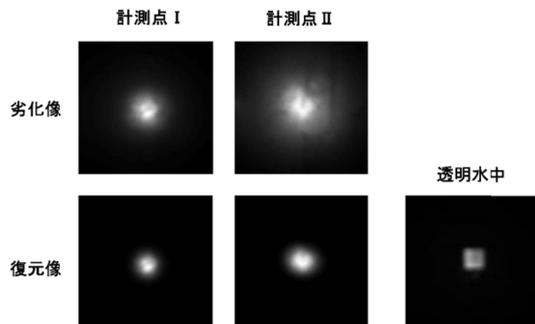


図3 鶏ささみ肉中の蛍光体復元結果

以上の結果から、復元像は深さによらずほぼ透明水中のサイズに復元されていることが明らかとなり、本手法の生体組織への適用性を確認した。

(3) 蛍光体厚さ推定

蛍光体厚さ推定のため励起光として、蛍光物質の吸収が大きな波長と小さな波長の2種の光を用いる。生体表面において、これら2種波長の励起光に対する蛍光発光強度を観測する。薄い蛍光体の場合、各波長の吸収強度と蛍光量子収率の積にほぼ比例した蛍光強度が得られる。これに対し厚い蛍光体の場合は、2波長の蛍光強度比は、この積に従わなくなる。つまり、吸収が大きい波長では蛍光体内への励起光の到達深度が小さく、蛍光は蛍光体表面付近のみで生じる。このため厚さが増しても蛍光強度はあまり増加しない。一方、吸収が小さい波長においては、励起光の到達深度が深く、蛍光は深部でも起こるた

め、厚さの増加に従い蛍光強度も増加すると考えられる。したがって、2波長の励起光に対し、吸収が大きい波長での蛍光強度を I_L 、吸収が小さい波長での蛍光強度を I_S とすると、体表で観測される蛍光強度の比 (I_L/I_S) は、体内蛍光体の厚さを反映したものとなる。計測条件に対し、あらかじめ検量線を求めておけば、体内蛍光体の厚さを推定することができる。

この原理に基づき蛍光体厚さに対する2波長の蛍光強度比の校正曲線群を図2の通り求めた。なお、波長は蛍光体インドシアニンググリーンの波長特性に併せて720、780nmとした。

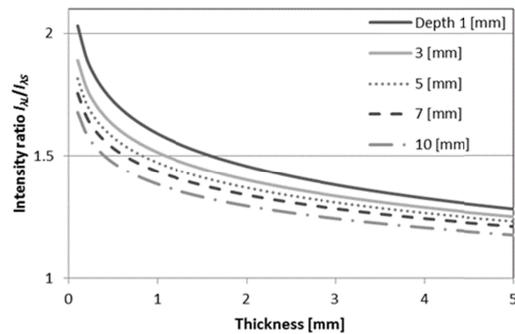


図4 蛍光体厚さ推定校正曲線群

図からわかるとおり、校正曲線は深さに応じて変化するため、まず前述の手法で蛍光体深さを求めてから、それに対応した校正曲線で厚さを推定すればよい。

この校正曲線群から生体ファントム各種試料で厚さ推定した結果、1mm以内の誤差範囲で推定可能であることがわかった。

(4) 蛍光体分布3次元再構成

前述のとおり、蛍光体の深さと厚さが推定可能であることから、これらの手法を組み合わせることで、蛍光体分布の3次元再構成が可能であると考えられる。

そこで生体ファントムを用いて、3次元再構成実験を行った。再構成する2つの蛍光体の断面は、それぞれ $20 \times 20 \text{ mm}^2$ の正方形、二辺が14mmの直角二等辺三角形とした。各蛍光体の厚さと深さはそれぞれ(厚さ3.1mm、深さ7mm)と(厚さ0.57mm、深さ3mm)である。深さ及び厚さを前述の手法で推定し、3次元再構成した結果を図5に示す。

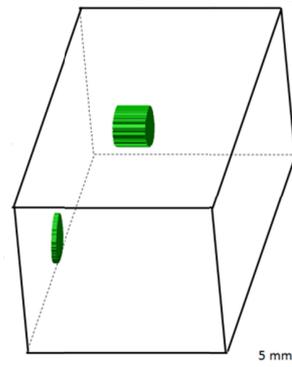


図5 蛍光体3次元再構成結果

深さと厚さがほぼ正確に反映された3次元画像が作成できていることがわかる。

(5) まとめ

明瞭な経皮蛍光イメージングの実現を目指し、複数他波長光源群と撮影装置からなる簡易な蛍光体3次元再構成撮影手法の開発を行った。

まず、蛍光体の深さと厚さの推定基本原理を確立し、校正曲線群を作成した。それらの校正曲線群から蛍光体の深さおよび厚さの同時推定および劣化蛍光像の復元を可能であることを明らかとした。更に、これらの手法を統合し蛍光体分布の3次元再構成の可能性も実証した。

本来、1方向から測定した観測像からは3次元情報を得るのは容易ではないが、提案手法により散乱媒質内部蛍光体の3次元配置やその体積を求めることが可能になると考えられる。従って、解剖しなければ得られなかった、明確な体内蛍光分布の3次元像が体表から無侵襲的に得られる可能性が示された。

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6件)

Trung Nghia Tran, Kohei Yamamoto, Takeshi Namita, Yuji Kato, and Koichi Shimizu, Three-dimensional transillumination image reconstruction for small animal with new scattering suppression technique, *Biomedical Optics Express*, 査読有, pp. 1321-1335, 2014. doi:10.1364/BOE.5.001321

Tran Trung Nghia, Takeshi Namita, Yuji Kato, and Koichi Shimizu, Application of Fluorescent PSF for 3D Reconstruction of Absorbing Structure using Slab Transillumination Images, 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 査読有, pp. 2644-2647, 2013. doi: 10.1109/EMBC.2013.6610083

Jiao Xia, Takeshi Namita, Yuji Kato, and Koichi Shimizu, Depth Estimation and Image Improvement of Fluorescent Objects in Scattering Medium with Unknown Optical Parameters, 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 査読有, pp. 2648-2651, 2013. doi: 10.1109/EMBC.2013.6610084

Koichi Shimizu, Takeshi Namita and Yuji Kato, Fundamental study for optical BAN, Lecture Notes of the Institute for

Computer Sciences, Social Informatics and Telecommunications Engineering, 査読無, Vol. 61, pp 173-178, 2012.

doi: 10.1007/978-3-642-37893-5_20

Moto Shimano, Takeshi Namita, Yuji Kato and Koichi Shimizu, Reconstruction of Three-Dimensional Structure in Turbid Medium by Scattering Suppression, The International Symposium on Photonics and Optoelectronics, 査読無, Paper ID.21040, 2011.

doi: 10.1109/SOP0.2011.5780548

Naoya Tobisawa, Takeshi Namita, Yuji Kato and Koichi Shimizu, Injection Assist System with Surface and Transillumination Images, The 5th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, 査読無, Paper ID.31863, 2011. doi: 10.1109/icbbe.2011.5780365

[学会発表](計21件)

Trung Nghia Tran, Kohei Yamamoto, Takeshi Namita, Yuji Kato, and Koichi Shimizu, Development of new optical CT for 3D animal imaging - Practical technique using transillumination images -, Biomedical Imaging and Sensing Conference, part of Optics & Photonics International 2014 Congress, paper BISC6-1, 24 Apr. 2014. (Yokohama, Japan)

山本航平, チャンチュンギア, 浪田健, 加藤祐次, 清水孝一, 光による生体透視イメージングのための拡散媒質内部吸光像の画像改善, 電子情報通信学会技術研究報告, Vol. 113, No. 499, pp. 115-120, 2014年3月18日. (町田市)

小川大貴, 浪田健, 加藤祐次, 清水孝一, 円柱状光拡散体における内部蛍光体イメージング手法の開発 ~ 生体内部蛍光体の経皮透視をめざして ~, 電子情報通信学会技術研究報告, Vol. 113, No. 499, pp. 121-126, 2014年3月18日. (町田市)

Tran Trung Nghia, Kohei Yamamoto, Takeshi Namita, Yuji Kato and Koichi Shimizu, 3D reconstruction of internal structure of animal body using near-infrared light, Proc. SPIE Vol.8952, paper 89521A, 2 Feb. 2014. (San Francisco, USA)

チャンチュンギア, 山本航平, 浪田健, 加藤祐次, 清水孝一, 点拡がり関数を用いた散乱抑制による生体内部構造の3次元像再構成, Optics & Photonics Japan 2013 講演予稿集, 演題番号 14pD2, 2013年11月18日. (奈良市)

山本航平, 田中宏幸, チャンチュンギア, 浪田健, 加藤祐次, 清水孝一, 生体透視イメージングのための点拡がり関数による吸光像改善の試み, Optics & Photonics Japan 2013 講演予稿集, 演題番号 14pD1, 2013年

11月18日。(奈良市)

夏棘鷺, 浪田健, 加藤祐次, 清水孝一, 未知の光学定数の散乱媒質中における蛍光体の深さ推定および画像改善, 電子情報通信学会技術研究報告, Vol. 112, No. 479, pp. 127-132, 2013年3月15日。(町田市)

小幡恭平, 浪田健, 加藤祐次, 清水孝一, 2波長励起による散乱体内部蛍光体厚さ推定のための基礎的検討, 電子情報通信学会技術研究報告, Vol. 112, No. 479, pp. 133-138, 2013年3月15日。(町田市)

Koichi Shimizu, Junkichi Akiyama, Takeshi Namita and Yuji Kato, Fundamental study for optical communication through human body, Proceedings of ISOB 2012 SYMPOSIUM, paper Session 7, pp. 82-84, 26 May 2012. (Graz, Austria)

加藤祐次, 浪田健, 清水孝一, 後方散乱光による高精度吸収係数分布推定法の多層構造への適用, 平成24年度電気・情報関係学会北海道支部連合大会講演論文集, 演題番号134, 2012年10月21日。(札幌市)

小幡恭平, 浪田健, 加藤祐次, 清水孝一, 複数波長励起による散乱体中の蛍光体厚さ推定のための基礎的検討, 生体医工学第50巻特別号第51回日本生体医工学会大会プログラム・論文集, 演題番号03-10-5, 2012年5月12日。(福岡市)

小幡恭平, 浪田健, 加藤祐次, 清水孝一, 多波長光源による散乱体内部蛍光体の深さと厚さ同時推定の試み, Optics & Photonics Japan 2012 講演予稿集, 演題番号24pA9, 2012年10月24日。(東京都)

Koichi Shimizu, Naoya Tobisawa, Trung Nghia Tran, Takeshi Namita and Yuji Kato, Application of transillumination imaging to injection assist system, Proceedings of the 4th International Conference on the Development of Biomedical Engineering, pp. 153-156, 10 Jan. 2012. (Ho Chi Minh City, Vietnam)

Trung Nghia Tran, Takeshi Namita, Yuji Kato and Koichi Shimizu, Feasibility study for 3D reconstruction of internal structure of animal body using NIR light, Proceedings of the 4th International Conference on the Development of Biomedical Engineering, pp. 162-164, 10 Jan. 2012. (Ho Chi Minh City, Vietnam)

戸澤英二, 浪田健, 加藤祐次, 清水孝一, 生体内三次元蛍光体再構成のための基礎的検討, 電子情報通信学会技術研究報告 Vol. 111, No. 482, pp. 123-128, 2012年3月15日。(町田市)

Takeshi Namita, Masafumi Otani, Yuji Kato and Koichi Shimizu, New technique to estimate non-absorbing temporal point spread function for diffuse optical

tomography using backscattered light, IQEC/CLEO Pacific Rim 2011 Conference Proceedings, pp. 701-703, 30 Aug. 2011. (Sydney, Australia)

Takeshi Namita, Masayuki Kawashima, Yuji Kato and Koichi Shimizu, Reliable scattering coefficient estimation against absorption inhomogeneity by time-resolved measurement of backscattered light, IQEC/CLEO Pacific Rim 2011 Conference Proceedings, pp. 1696-1698, 30 Aug. 2011. (Sydney, Australia)

戸澤英二, 浪田健, 加藤祐次, 清水孝一, 経皮蛍光透視のための円柱拡散体表面におけるPSFの導出, Optics & Photonics Japan 2011 講演予稿集, 演題番号28aB6, 2011年11月28日。(吹田市)

夏棘鷺, 浪田健, 加藤祐次, 清水孝一, 複数の励起光源セットによる蛍光体深さ推定の試み: - 実験的検証と新たな応用可能性 -, Optics & Photonics Japan 2011 講演予稿集, 演題番号29pD11, 2011年11月29日。(吹田市)

戸澤英二, 浪田健, 加藤祐次, 清水孝一, 散乱体内部蛍光体の三次元像再構成法の開発, 生体医工学第49巻特別号第50回日本生体医工学会大会プログラム・論文集演題, 番号03-6-6, 2011年5月1日。(東京都)

② 夏棘鷺, 浪田健, 加藤祐次, 清水孝一, 多点励起による蛍光体深さ推定の試み, 生体医工学第49巻特別号第50回日本生体医工学会大会プログラム・論文集, 演題番号03-7-2, 2011年5月1日。(東京都)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計2件)

名称: 濃度定量装置、光吸収係数算出方法、等価散乱係数算出方法、濃度定量方法、光吸収係数の算出を行うプログラム及び濃度の算出を行うプログラム

発明者: 西田和弘, 清水孝一, 加藤祐次, 浪田健

権利者: セイコーエプソン株式会社, 国立大学法人北海道大学

種類: 特許

番号: 特願2011-211687

出願年月日: 2011年09月27日

国内外の別: 国内

名称: 濃度定量装置、光吸収係数算出方法、濃度定量方法、光吸収係数の算出を行うプログラム及び濃度の算出を行うプログラム

発明者: 西田和弘, 清水孝一, 加藤祐次

権利者: セイコーエプソン株式会社, 国立大学法人北海道大学

種類：特許
番号：特願 2011-211688
出願年月日：2011 年 09 月 27 日
国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

加藤 祐次 (KATO, Yuji)
北海道大学・大学院情報科学研究科・助教
研究者番号：50261582

(2)研究分担者

清水 孝一 (SHIMIZU, Koichi)
北海道大学・大学院情報科学研究科・教授
研究者番号：30125322