

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282142

研究課題名(和文) フェムト秒レーザー光超音波顕微鏡の開発による細胞の断層像の可視化

研究課題名(英文) Tomographic imaging of a cell by laser ultrasound microscope with femto-second laser

研究代表者

西條 芳文 (SAIJO, Yoshifumi)

東北大学・医工学研究科・教授

研究者番号：00292277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：超短パルスレーザー照射により発生する光超音波信号をZnO薄膜の高周波数超音波センサーにより取得することで、細胞レベルの分解能を有する光超音波顕微鏡を開発した。線維芽細胞から脂肪細胞に形態を変化させる3T3-L1細胞をPETフィルム上に培養し、光超音波顕微鏡で観察した。細胞を俯瞰したCモード像および細胞の断層像であるBモード像の取得に成功した。本手法により細胞内の音速および音響インピーダンス分布からヤング率および質量分布が可視化可能で、細胞のバイオメカニクス研究への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：A laser ultrasound microscope with cellular resolution was developed by means of measuring high frequency laser ultrasound signal generated by ultra-short pulsed laser with ZnO thin film sensor. 3T3-L1 cells, which proliferated from fibroblast to adipocyte, were cultured on PET film and observed by the laser ultrasound microscope. C-mode and B-mode images were successfully obtained by the system. The method is capable of measuring sound speed and acoustic impedance and finally visualizes the distribution of Young's elastic modulus and density within a cell. The method may contribute to the future investigation on cellular biomechanics.

研究分野：医用イメージング、超音波医学、循環器病学

キーワード：光超音波 レーザー 細胞 バイオメカニクス

1. 研究開始当初の背景

細胞を力学的な観点から解析する細胞のバイオメカニクスの研究手法として、細胞内骨格であるアクチンフィラメント、微小管、中間径フィラメント等の線維状のタンパク質を蛍光染色し、その細胞内分布を可視化する方法が一般的に用いられている。通常は細胞を上方から二次元像として俯瞰するが、流れにさらされた血管内皮細胞の挙動を評価する際には、細胞の縦断面を観察する手法が有用である (Ueki Y, Sakamoto N, Sato M. *Biochem Biophys Res Commun.* 26;394(1):94-9, 2010)。これらの画像は、共焦点顕微鏡の焦点面をずらしながら複数枚の断層画像を撮影して三次元データを収集し、再構築したものであるが、試料の厚さ方向の分解能が焦点面内の分解能に比べ乏しいため鮮明な画像が得られにくい欠点がある。また、変位やひずみの計測は、超音波エラストグラフィとして一般化されている手法の方が高精度であり、細胞の超音波断層像が得られることで、これらの問題が解決することになる。

細胞の超音波計測としては、1 GHz 程度の超音波を送受信する超音波顕微鏡が用いられてきた。しかし、この帯域では信号/雑音比が低く、パルス波ではなく連続波を用いることが多いため細胞の断層像を得ることは困難であった。一方、フェムト秒レーザーにより GHz 帯域の超音波を発生させて薄膜の特性を計測する手法が細胞の計測にも応用されつつあるが (Rossignol C, Chigarev N, Ducoussou M, et. al. *Appl Phys Lett* 93;123901, 2008)、超音波の発生を光の干渉により検出するので、細胞内の音速を計測することはできるが、細胞内における超音波の進行を捉えることはできず、細胞の断層像は得られていない。

研究代表者は、高周波数超音波を用いた生体組織や細胞の高解像度イメージングに関する研究を遂行してきた。特に、中心周波数 100 MHz ~ 1.3 GHz の超音波プローブを二次元走査して画像を得る超音波顕微鏡により、生体組織における超音波の音速や減衰の二次元分布を可視化し、バイオメカニクスの観点による組織診断の手法を確立した。また、使用周波数 120 MHz の超音波顕微鏡により OCT に匹敵する解像度でより深部の皮膚の断層像を得ることに成功し、皮膚科、美容、化粧品領域で国際的にも注目を浴びている。

さらに、平成 21 年より光音響イメージングの研究に着手し、ラット膝関節の変形性膝関節症やニワトリ胚の血管系の可視化に成功してきた。これらは焦点 2 mm 程度のレーザー光を組織に照射し、発生した光音響信号を凹面超音波振動子により選択的に検出する方式で撮像された。最近では照射するレーザー光を絞りと、その焦点から発生する超音波を受信することで光学解像度のイメージングも行うことにも成功している。

ここに、フェムト秒の超短パルスレーザー

光を細胞に照射し、発生した超音波を GHz 帯域の超音波センサで直接受信することで細胞内の超音波の進行を捉え、細胞の超音波断層像を得るという発想が生じてきた。

2. 研究の目的

研究期間内の最終目標は、短パルスレーザーを応用した光超音波顕微鏡により細胞の断層像を得ることである。このために、(1) レーザーにより高周波数超音波を発生させる条件の検討、(2) 導電膜を一体化した高感度・高機能圧電素子の開発を行い、最終的には (3) 光超音波顕微鏡システムの構築による細胞の断層像の観察を行う。

高感度・高機能圧電素子については、まず、酸化亜鉛 (ZnO) 薄膜の結晶性分析により c 軸配向性に寄与する要因を解明し、高ピエゾ効果を有する ZnO 薄膜を開発する。次に、遷移金属であるバナジウム (V) を添加した低抵抗の ZnO 薄膜 (VZO) を電極として用いることで、高感度および低ノイズを両立した一体成型の GHz 超音波センサを開発する。

光超音波顕微鏡システムとしては、まず、ZnO 薄膜に置いた厚み 5 ミクロンの生体ファントムにフェムト秒レーザーを照射することで超音波信号の発生を確認する。次に、レーザー光の照射やピエゾアクチュエーターによる試料保持台の二次元スキャン、さらに、超音波信号の取得、信号プロセッシング、イメージプロセッシングにより、光超音波顕微鏡システムを構築する。

細胞の断層像の観察については、線維芽細胞から脂肪細胞に形態を変化させる 3T3-L1 細胞を PET フィルム上に培養し、PET フィルムと ZnO センサを密着させ、フェムト秒レーザーを照射して発生した超音波を ZnO センサで検出することで、培養細胞を上から俯瞰した画像および横から見た断層像の観察を行う。

3. 研究の方法

(1) フェムト秒レーザー光による超音波信号発生条件の検討

フェムト秒レーザーを薄膜に照射した際に発生する超音波信号を GHz 帯域の超高感度センサで直接受信した。フェムト秒レーザー発生装置 (Spectra-Physics 社 MaiTai、発振波長: 790 nm-820 nm、平均出力: 400mW、パルス幅: 30 fsec、繰り返し周波数: 80 MHz) から発生するフェムト秒レーザーを周波数モジュレーターを用いて 300 kHz に変調し 3 ミクロンに集光した。周波数帯域 0.8 ~ 1.0 GHz の超音波センサに 5 ミクロンの poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) フィルムを密着させ、デジタルオシロスコープに GHz 帯域のパワーアンプを経て入力し、1000 回平均することで超音波を取得できる条件を検討した。

(2) 酸化亜鉛 (ZnO) 薄膜による GHz 帯域の超音波センサの開発

ZnO 薄膜は数百 MHz ~ 数 GHz の高周波応答を有する圧電材料であることが知られている。本研究ではさらに圧電効果を高めた ZnO 薄膜の生成による高感度な GHz 帯域の超音波センサの開発を行った。

さらに、バナジウム(V)をドーパントとして用い、低抵抗の導電膜の成膜について検討した。V チップ (5 mm×5 mm) をターゲットである ZnO 焼結材のエロージョン領域上におき、両者を同時にスパッタして V-doped ZnO (VZO) を成膜した。

(3) フェムト秒レーザー光超音波顕微鏡システムの構築

ZnO 薄膜に金電極を蒸着し GHz 帯域の超音波センサとして用いた。センサ上に、生体を模擬した光学・音響を有する厚み 3 ミクロンの高分子化合物フィルムを置き、光学レンズで 3 ミクロンのスポット径に絞ったフェムト秒レーザーを照射する。取得した信号を 1000 ~ 5000 回平均することで、超音波発生を確認した。

ピエゾアクチュエーターを 3 軸コントローラーでドライブし、ワークステーションでレーザー照射および信号取得等すべてをコントロールすることでフェムト秒レーザー光超音波顕微鏡システムを構築した。

4. 研究成果

図 1 は本システムで計測された光音響信号である。GHz に近い帯域の光音響信号が取得されている。

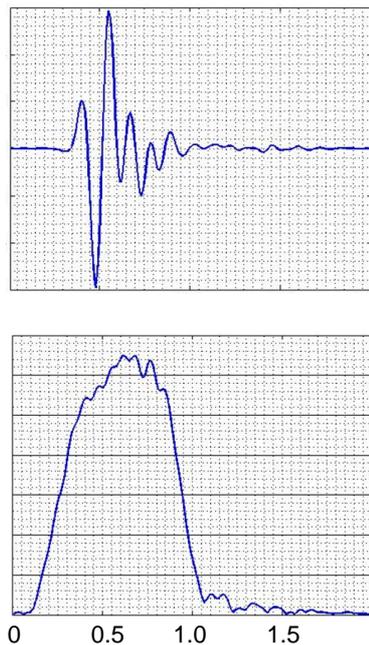


図 1 計測された光音響信号
(上：時間波形、下：スペクトル)

図 2 は線維芽細胞様に分化した 3T3-L1 細胞の位相差顕微鏡像(上)、Cモード像(中)、Bモード像(下)である。

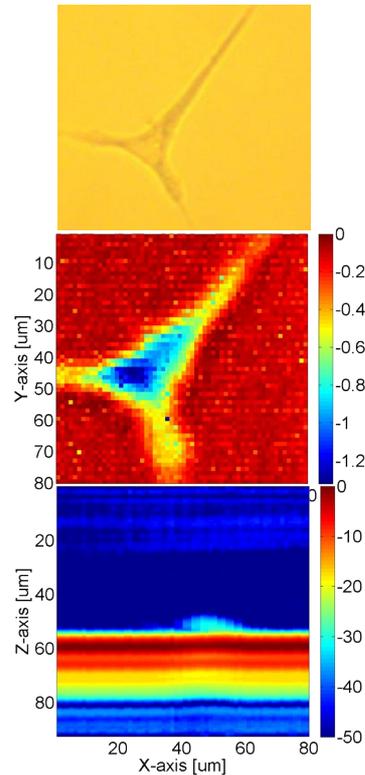


図 2 3T3-L1 線維芽細胞

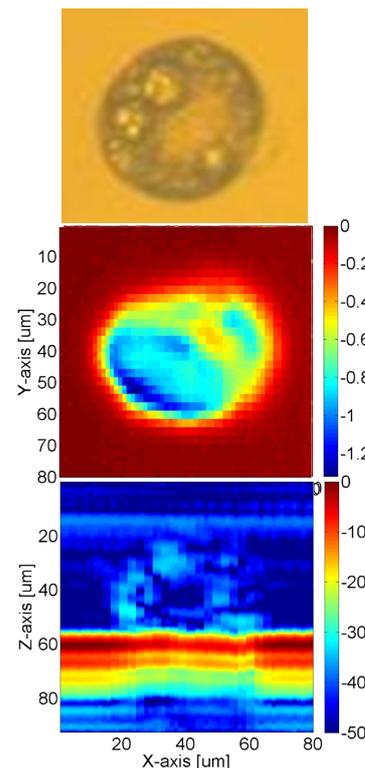


図 3 3T3-L1 脂肪細胞

図 2 は脂肪細胞様に分化した 3T3-L1 細胞の位相差顕微鏡像(上)、Cモード像(中)

Bモード像(下)である。

細胞の断層像が描出されており、線維芽細胞の厚みは約 8 μm、脂肪細胞の厚みは約 16 μm と計測された。本研究成果により、生きた状態の細胞の断層像を得ることに成功し、細胞の形態を知ることが可能となった。さらに、細胞の音速や音響インピーダンス計測から細胞内のヤング率分布や質量分布を可視化することも可能である。本手法は分解能などにまだ改善の余地はあるが、細胞のバイオメカニクス計測法として独創的な研究成果を上げることができた。

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4件)

Ul Haq I, Nagaoka R, Makino T, Tabata T, Saijo Y. 3D Gabor wavelet based vessel filtering of photoacoustic images, (査読有), Conf Proc 38th IEEE Eng Med Biol Soc, pp. 3883-6, 2016.

DOI: 10.1109/EMBC.2016.7591576

Hagiwara Y, Izumi T, Yabe Y, Sato M, Sonofuchi K, Kanazawa K, Koide M, Saijo Y, Itoi E. Simultaneous evaluation of articular cartilage and subchondral bone from immobilized knee in rats by photoacoustic imaging system, (査読有), J Orthop Sci. Vol. 20, No. 2, pp. 397-402, 2015.

DOI: 10.1007/s00776-014-0692-2

Yamazaki R, Ogasawara K, Fujiwara M, Kobayashi K, Saijo Y. Macrophage with gold nanorod visualized by optical-resolution and acoustic-resolution photoacoustic microscopes. Conf Proc 37th IEEE Eng Med Biol Soc, (査読有), pp. 2387-90, 2015.

DOI: 10.1109/EMBC.2015.7318874

Arakawa M, Shikama J, Yoshida K, Nagaoka R, Kobayashi K, Saijo Y. Development of an ultrasound microscope combined with optical microscope for multiparametric characterization of a single cell, (査読有), IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control. Vol. 62, No. 9, pp. 1615-22, 2015.

DOI: 10.1109/TUFFC.2014.006865

[学会発表](計6件)

Saijo Y, Nagaoka R, Ul Haq I, Siregar S, Takagi R, Yoshizawa S, Umemura S. Skin vasculature imaging by acoustical resolution photoacoustic microscope with parabolic array transducer. Invited Lecture in the 5th Joint Meeting of the Acoustical Society of America and the Acoustical Society of Japan. November 28, 2016, Honolulu, HI,

USA.

Saijo Y, Nagaoka R, Takagi R, Yoshizawa S, Umemura S. Photoacoustic imaging of vasculature with parabolic array transducer. Invited Lecture in International Congress on Acoustics 2016. September 5, 2016, Buenos Aires, Argentine.

Saijo Y. Recent developments of high frequency ultrasound imaging and its collaboration with optics. Invited lecture in 12th Western Pacific Acoustics Conference 2015. December 8, 2015, Singapore, Singapore.

Saijo Y, Yamazaki R, Ogasawara K. Photoacoustic imaging of macrophage with gold nanorod. The 5th Asian and Pacific-Rim Symposium on Biophotonics APBP '15, Apr 24, 2015, Yokohama (Pacifico Yokohama), Japan.

Saijo Y. Photoacoustic micro imaging of gold nanorod phagocytosing macrophage, Optics in Cardiology 2015, March 12, 2015, Rotterdam, The Netherlands.

Saijo Y, Shikama J, Yoshida K, Nagaoka R, Arakawa M, Kobayashi K, O'Brien Jr W. Characterization of a single cell with multiple ultrasound parameters, 9th International Symposium on Ultrasonic Biomedical Microscanning, September 28, 2014, Edinburgh, United Kingdom.

[図書](計0件)

[産業財産権]

該当なし

[その他]

西條研究室ホームページ

<http://www.ecei.tohoku.ac.jp/imaging/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

鷲尾 勝由 (WASHIO, Katsuyoshi)

東北大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 20417017

(3) 連携研究者

松浦 祐司 (MATSUURA, Yuji)

東北大学・大学院医工学研究科・教授

研究者番号: 10241530

(4) 研究協力者

なし