

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04017

研究課題名(和文)超音波による生きた細胞の非侵襲粘弾性イメージング

研究課題名(英文)Non-invasive visco-elastic imaging for living cells by ultrasound

研究代表者

穂積 直裕 (Hozumi, Naohiro)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30314090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、個々の培養細胞を、集束超音波を用いて連続的・非侵襲的に定量観察し、絶対値としての弾性パラメータと等価な意味をもつ音響インピーダンスで表示するシステムを開発した。細胞の弾性には細胞骨格の状態が大きく反映されることから、これらの変化が現れやすい抗癌剤投与後のガン細胞の細胞骨格の変性過程、および筋芽細胞の分化過程を連続観察し、観察手法の有効性を実証した。あわせて再生医療への応用を目指し、iPS細胞の観察を試みた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed an observatoin system that displays quantitatively and continuously the cultured cells continuously and non-invasively using focused ultrasound, and displays with acoustic impedance that is equivalent to elastic parameter. As the condition of the cytoskeleton highly reflects onto the elasticity of the cell, the degenerative process of the cytoskeleton of the cancer cell after being exposed to anticancer drugs, and the differentiation process of the myoblast calls were observed non-invasively and continuously in live condition. Together with the aim of application to regenerative medicine, we attempted to observe iPS cells.

研究分野：計測工学，超音波工学，高電圧工学

キーワード：超音波顕微鏡 生体細胞 粘弾性イメージング

1. 研究開始当初の背景

光学顕微鏡による生体の観察は医学・生物学研究分野で頻繁に行われ、臨床医学においては生体組織診して確立されている。しかし、しばしば染色操作が必要であり、生きた状態での観察には不向きである。超音波顕微鏡を用いると、音速や特性音響インピーダンスなどの定量的な音響物性像が得られ、弾性率などの機械物性、すなわち「硬さ」に近い情報の画像化が期待できる。

報告者らは広帯域パルス超音波の応答から試料切片の音速像を取得できる「音速顕微鏡」や、切片加工が不要な「音響インピーダンス顕微鏡」を提案試作した。これらは、染色を必要としない術中組織診や、患部組織に直接接触させて観察できる顕微プローブなどへの応用が進められている。

一方、近年の再生医療において、培養される細胞の分化過程や健全性を個別に非侵襲的かつ連続的に定量観察するニーズが浮上している。また、医学・生物学分野において動物実験の3R(代替・削減・改善)のため、薬物投与の効果を培養細胞レベルで確認したいとの要望が寄せられるようになった。特に、細胞骨格の状態を表すと考えられる弾性パラメータを非接触で定量測定するためには音響的手法が不可欠となることから、申請者らが提案する超音波による観察手法を高い空間分解能で行う必要が生じている。

これらの背景から、本研究では、観察の分解能を細胞レベルにまで高めた上で、弾性に関係する物理量で細胞の内部構造を定量表現するために必要な音響パラメータの取得できるシステムを設計試作し、必要な解析を行う。さらに実際に細胞を観察し、その有効性を実証する。

2. 研究の目的

本研究では、個々の培養細胞を、集束超音波を用いて連続的・非侵襲的に定量観察し、絶対値としての弾性パラメータと等価な意味をもつ音響インピーダンスで表示するシステムを開発する。細胞の弾性には細胞骨格の状態が大きく反映されることから、これらの変化が現れやすい抗癌剤投与後のガン細胞の細胞骨格の変性過程、および筋芽細胞の分化過程を連続観察し、観察手法の有効性を実証する。併せて再生医療への応用を目指し、iPS細胞の観察を試みる。

3. 研究の方法

フィルム基板の上に培養した生体細胞を、200~500 MHz 帯の広帯域集束超音波を用いて定量観察し、弾性パラメータによる2次元プロファイルとして表示するシステムを開発する。具体的には、弾性パラメータと等価な意味をもつ音響インピーダンスの空間分布を観測する。

超音波が透過しやすい高分子フィルムで囲まれた空間に細胞を培養するため、培養器

を新たに設計試作する。音場解析と波形解析により、出来る限り正確に音響パラメータを導出し顕微画像として表示できるアルゴリズムを実装する。

抗癌剤投与後のガン細胞の細胞骨格の音響インピーダンス変化、および筋芽細胞の分化過程における音響インピーダンスの変化など連続観察し、観察手法の有効性を実証する。併せて再生医療への応用を目指し、iPS細胞の観察を試みる。

また、研究の過程でビーム奥行方向の音響インピーダンスの分布を計算できる可能性が示されたため、3次元音響インピーダンスマッピングに関する基礎検討と予備実験を行うこととした。

4. 研究成果

(1) 観察システム

基本システムの概要を図1に示す。この図では基板の上面に培養した細胞に対し、基板の背面から200~500 MHzまで広がる集束パルス超音波を出射している。反射強度を音響インピーダンスに変換する。振動子を平面走査することにより、2次元音響インピーダンスマッピングを行う。

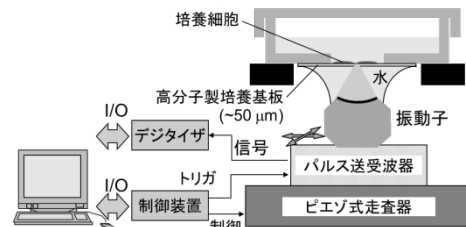


図1 観察システムの概略図。

(2) 投薬効果の評価

開発した技術により、細胞の弾性を表す音響インピーダンスを、非侵襲、連続的に2次元プロファイルとして観測できる。これを使用して、細胞に対して投薬を行ったときの変化を観察した。

集束超音波ビームを細胞培養したプラスチック基板に対して入射させ、その応答(反射)を、視野の中で「細胞がない部分」と「ある部分」について測定・比較することにより細胞の音響インピーダンス分布を推定した。「細胞がない部分」からの反射には培養液の音響物性が反映されるため、これを参照波形として利用した。

図2はC127I乳癌細胞にbetulinic acid (BA)を投与したときの音響インピーダンス像の時間変化と音響インピーダンス値の比較結果である。投薬後ミトコンドリアの断片化とアクチンフィラメントの崩壊が発生する傾向にあることが蛍光染色試料の観察結果から示唆されており、これらによる弾性の低下が音響インピーダンスの低下となって現れたものと考えられる。

図3は、異なる濃度のBAを投じて2時間

経過後の音響インピーダンス像と細胞部分の平均音響インピーダンス値の比較を行ったものであり、薬剤の濃度にしたがって音響インピーダンスの低下が著しくなる傾向が示されている。

同様の実験を異なる種類の抗癌剤を用いて行い、音響インピーダンス顕微鏡による細胞の生きた状態での定量観察が投薬効果の評価の強力なツールとなる可能性が示された。

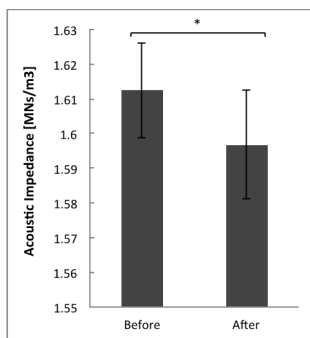
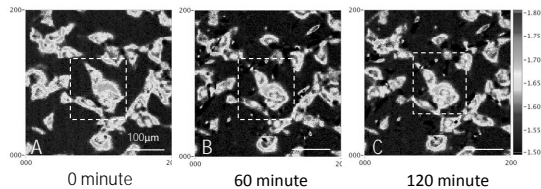


図2 C1271 乳癌細胞に betulinic acid (BA)を投与したときの音響インピーダンス像の時間変化と音響インピーダンス値の比較。投与量 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

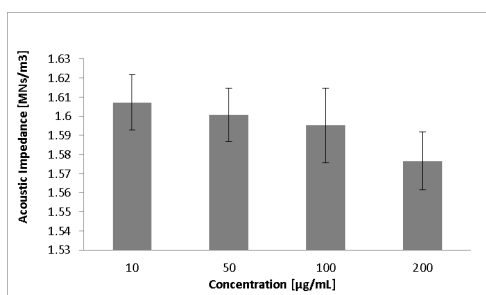
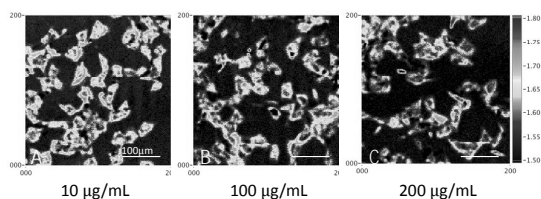


図3 C1271 乳癌細胞に betulinic acid (BA)を投与し、2時間経過したときの音響インピーダンス像と音響インピーダンス値の比較。

(3) 分化過程の定量観察

筋芽細胞を培養し、分化の過程を超音波により観察した。図4に結果の一例を示す。培養細胞は培養器表面に密着しているとは限らず、分化の過程で3次元構造が変化するとともに、培養器表面からの剥離を生じる。こ

のため培養器表面と細胞底面からの反射が干渉し、正しい音響インピーダンスが得られないことが判った。そこで、これらの状況を超音波の反射波形から波形分離の手法を用いて把握する方法を検討した。実際のデータに適用し、分化とともに剥離が発生することを見極め、剥離距離を考慮した上で細胞本体の音響インピーダンス値を補正計算する方法を提案した。

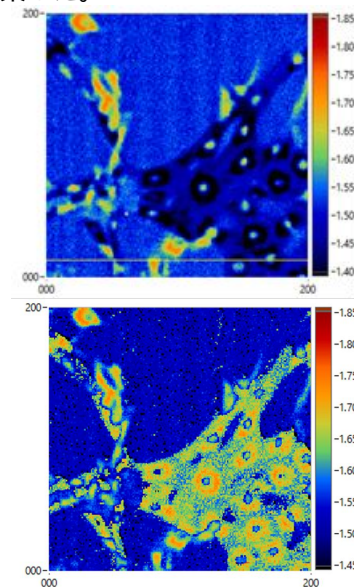


図4 筋芽細胞の音響インピーダンス像。400 \times 400 μm 。音響インピーダンスはカラースケール表示(MNs/m³)。上：補正前，下：補正後。

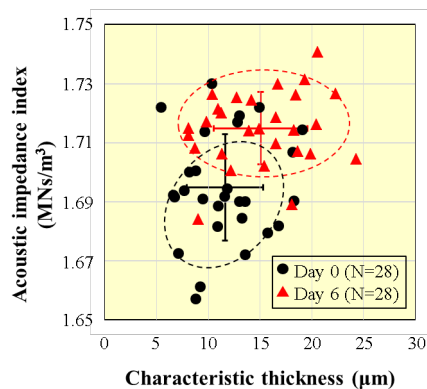


図5 筋芽細胞の分化に伴う細胞骨格の形成と音響インピーダンスの変化。

図5は筋芽細胞が分化するのにともない骨格が形成され、音響インピーダンスの高い部分の厚さ(図4下図における輪環の太さ)が増大すること、音響インピーダンス指標が高くなること、および両者に相関があることを示したものであり、分化過程の連続モニタ手法として音響インピーダンスによる定量観察が有効であることを示唆している。

(4) iPS細胞の観察

開発した技術を利用し、iPS細胞の観察を

行った。iPS 細胞は Cellular Dynamics 社の iCell Neuron を 7 日間培養したものをを用い、光学顕微鏡観察で神経突起の伸長が確認されたものを超音波観察した。図 6 に観察例を示す。培養にともない、細胞間ネットワークが形成されてゆく過程が音響インピーダンス像により明瞭に観察された。細胞の集積とは別に、弾性率の高い領域が散在して観察され、iPS 神経細胞間の結合であることが示唆された。

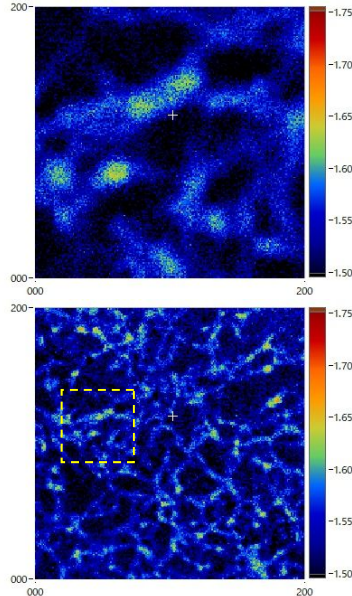


図 6 培養 iPS 細胞の音響インピーダンス像のカラースケール表示(MNs/m³)。上：400×400 μm，下：100×100 μm。

(5) 3次元音響インピーダンスマッピング

(3)で提案した波形分離アルゴリズムをさらに改良し、3次元形状を考慮した細胞内の弾性分布計算方法を検討した。超音波ビームが解析対象奥行に比較して十分長い焦点深度をもち、平面波で近似できるとすると、ビームに沿った伝搬経路を1次元の伝送路で等価表示できる。ここでは系が、異なる特性インピーダンスをもつ無損失の伝送路の集合体であると仮定して検討する。図7において、入射波 $s_0(t)$ に対し、特性インピーダンスが Z_0 である伝搬路の終端において観測される標的エコー信号 $s_{igt}(t)$ をフーリエ変換したものを $S_{igt}(\omega)$ とすると、

$$\Gamma_0 = \frac{Z_{x0} - Z_0}{Z_{x0} + Z_0} = \frac{S_{igt}}{S_0}$$

は伝送路 Z_0 からインピーダンス Z_{x0} に入射した波形の衝撃応答であるので、これを逆フーリエ変換した $g_0(t)$ の第 1 項は伝送路 Z_0 から特性インピーダンス Z_1 を有する半無限長線路に入射した波形の反射特性(衝撃応答)となる。これは多重反射の影響を受けない。伝送路 Z_1 が無減衰であると仮定すると、反射特性から実数 Z_1 を推定することができる。

$$Z_1 = \frac{1 + g_0(t_0)}{1 - g_0(t_0)} Z_0$$

Z_{x0} と Z_1 の値をもとに、 Z_1 の終点における反射スペクトル Γ_1 を推定することができる。すなわち、

$$Z_{x0} = \frac{1 + \Gamma_0}{1 - \Gamma_0} Z_0 = \frac{e^{j\gamma_1 \Delta t} + \Gamma_1 e^{-j\gamma_1 \Delta t}}{e^{j\gamma_1 \Delta t} - \Gamma_1 e^{-j\gamma_1 \Delta t}} Z_1 = \frac{e^{j2\gamma_1 \Delta t} + \Gamma_1}{e^{j2\gamma_1 \Delta t} - \Gamma_1} Z_1$$

より Γ_1 を求める。これは伝送路 Z_1 からインピーダンス Z_{x1} に入射した波形の衝撃応答であるので、これを逆フーリエ変換した $g_1(t)$ の第 1 項は伝送路 Z_1 から特性インピーダンス Z_2 を有する半無限長線路に入射した波形の衝撃応答となり、反射特性から実数 Z_2 を推定することができる。すなわち、

$$Z_2 = \frac{1 + g_1(t_0)}{1 - g_1(t_0)} Z_1$$

これを順次繰り返すことにより、伝送路の各微小部分の特性インピーダンス $Z_1 \sim Z_N$ を推定できる。

送波信号 $S_0(\omega)$ の計算は以下のように行う。界面を挟む半無限媒質のインピーダンス Z_0 と Z_{ref} が既知である系に測定時と同じ信号波形を入射させたときに帰来する参照信号を S_{ref} とすると、

$$S_{ref} = \frac{Z_{ref} - Z_0}{Z_{ref} + Z_0} S_0 \quad \text{より} \quad S_0 = \frac{Z_{ref} + Z_0}{Z_{ref} - Z_0} S_{ref}$$

同条件で被測定系に送波したときの反射信号は、

$$S_{igt}(\omega) = \frac{Z_{igt}(\omega) - Z_0}{Z_{igt}(\omega) + Z_0} S_0$$

基板表面における反射係数は、

$$\Gamma_0(\omega) = \Gamma_{igt}(\omega) = \frac{S_{igt}(\omega)}{S_0} = \frac{Z_{ref} - Z_0}{Z_{ref} + Z_0} \cdot \frac{S_{igt}(\omega)}{S_{ref}}$$

となり、被測定信号と参照信号の比で表される。超音波振動子を 1 次元走査すると音響インピーダンス断層像が得られ、振動子を平面走査すると 3 次元像が得られる。

この手法をヒトの皮膚を対象とした観察に適用し、従来の B モードエコー像に比較して解剖学的特徴を良好に捉えた画像を得ることができた(図 8)。培養細胞を観察対象とした実験は次期フェーズで実施する準備を行っている。

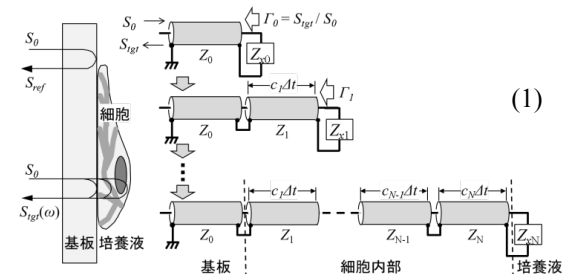


図 7 解析方法の概略図。 Z_i は微小部分の特性インピーダンス、 Z_{xi} は Z_i の端点から右側のインピーダンス c は伝搬速度、 t は時間。

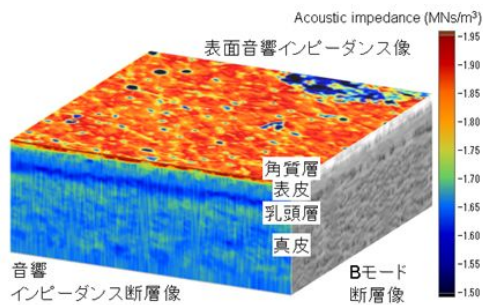


図 8 皮膚の三次元観察。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Rahma Hutami Rahayu, Takanashi K, Tiong T, Seviaryna I, Maev R, Kobayashi K, Hozumi N, Yoshida S: "Reaction assessment of cultured breast cancer cells exposed to anti-cancerous agents by means of micro-scale acoustic impedance profile", Jpn. J. Appl. Physics (2018).掲載決定済
2. Tan WC, Hozumi N, Yoshida S, Kobayashi K: "Mutual conversion between B-mode image acoustic impedance image", Jpn. J. Appl. Physics, Vol. 56, 07JF18, pp. 1-6 (2017).
3. Mastui T, Hozumi N, Otaka A, Matsumoto T: "Nondestructive fault localization of IC interconnection by using ultrasonic heating", Jpn. J. Appl. Physics, Vol. 56, 07JC11, pp. 1-6 (2017).
4. Soon T T K, Tan W C, Yamada H, Takahashi K, Hozumi N, Kobayashi K, Yoshida S: "Effects of anticancer drugs on glia-glioma brain tumor model characterized by acoustic impedance microscopy", Jpn. J. Appl. Physics, Vol. 56, 07JF15, pp. 1-5 (2017).
5. Takanashi K, Washiya M, Ota K, Yoshida S, Hozumi N, Kobayashi K: "Quantitative evaluation method for differentiation of C2C12 myoblasts by ultrasonic microscopy", Jpn. J. Appl. Physics, Vol. 56, 07JF11, pp. 1-6 (2017).
6. Gunawan AI, Hozumi N, Yoshida S, Saijo Y, Kobayashi K, Yamamoto S: "Numerical analysis of ultrasound propagation and reflection intensity for biological acoustic impedance microscope", Ultrasonics, Vol. 61, pp. 79-87 (2015).
7. Gunawan AI, Hozumi N, Takahashi K, Yoshida S, Saijo Y, Kobayashi K, Yamamoto S: "Numerical analysis of acoustic impedance microscope utilizing acoustic lens transducer to examine cultured cells", Ultrasonics, Vol. 63, 102-110 (2015).
8. Watanabe K, Takahashi N, Hozumi N, Yoshida S: "Improvements in

enzyme-linked photoassay systems for spatiotemporal observation of neurotransmitter release", Sensors and Materials, Vol. 27-10, pp. 1035-1044 (2015).

9. Mabuchi H, Ong HY, Watanabe K, Yoshida S, Hozumi N: "Visualization of spatially distributed bioactive molecules using enzyme-linked photo assay", IEEE Transactions on Fundamentals and Materials, Vol. 136-2, 99-104 (2015).

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 穂積直裕: "音響インピーダンス顕微鏡とその生体組織観察への応用", 日本音響学会2018年春季研究発表会スペシャルセッション2-10-9, 2018年3月14日, 日本工業大.
2. Nur Dalila Binti Jalaluddin, Rahma Hutami Rahayu, 高梨恭一, 川島朋裕, 吉田祥子, 村上義信, 穂積直裕, 小林和人: 「培養生体細胞の3次元音響インピーダンスマッピング」, 超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム, #3P2-9, Proc. Vol. 38, 25-28 October, 2017, 多賀城.
3. 岩本早起, 高梨恭一, Seviaryna I, Maev R, 小林和人, 穂積直裕, 吉田祥子: 「音響インピーダンスパターンによる自閉症モデル動物の小脳神経回路変性の定量モニタリング」, 超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム, #3P5-3, Proc. Vol. 38, 25-28 October, 2017, 多賀城.
4. Rahma Hutami Rahayu, 高梨恭一, Soon TTK, Seviaryna I, Maev R, 穂積直裕, 小林和人, 吉田祥子: 「超音波顕微鏡を使用した培養乳癌細胞に対する抗癌剤効果の定量評価」, 超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム, #3P5-4, Proc. Vol. 38, 25-28 October, 2017, 多賀城.
5. 高梨恭一, 鷲谷衛, 太田一樹, 吉田祥子, 川島朋弘, 村上義信, 穂積直裕, 小林和人: 「超音波顕微鏡により取得した音響特性にもとづくC2C12筋芽細胞の分化過程の定量評価」, 超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム, #3J2-4, Proc. Vol. 38, 25-28 October, 2017, 多賀城.
6. Hozumi N, Takanashi K, Washiya M, Yoshida S, Kobayashi K, Saijo Y: "Non-invasive in-situ quantitative observation of biological cells by acoustic microscopy", 第5回日米音響学会ジョイ

- ントミーティング招待講演 2016年12月1日, 米国ハワイ.
7. Hozumi N, Tan WC, Yoshida S, Ogura Y, Kobayashi K, Yamaguchi T: "Mutual interpretation between B-mode image and cross-sectional acoustic microscopy", 第5回日米音響学会ジョイントミーティング招待講演 2016年11月30日, 米国ハワイ.
 8. 穂積直裕: "超音波顕微鏡による深さ方向の音響インピーダンスマッピングに関する基礎検討", パイオ超音波顕微鏡研究会, 2016年11月12日, アクトシティ-浜松.
 9. Tan WC, Hozumi N, Yoshida S, Kobayashi K: "Mutual Conversion between B-mode Image and Acoustic Impedance Image", Symposium on Ultrasonic Electronics, #1P5-10, Proc. Vol. 37, 16-18 November, 2016, Busan, Korea.
 10. Soon TTK, Tan WC, Yamada H, Takahashi K, Hozumi N, Kobayashi K, Yoshida S: "Quantitative Research on the Effects of Anticancer Drugs on Glioma Brain Tumor Model Using Ultrasonic Microscope", Symposium on Ultrasonic Electronics, #1P5-14, Proc. Vol. 37, 16-18 November, 2016, Busan, Korea.
 11. Takanashi K, Washiya M, Ota K, Yoshida S, Hozumi N, Kobayashi K: "Quantitative Evaluation Method of Differentiation Process in C2C12 Myoblasts Using Ultrasonic Microscope", Symposium on Ultrasonic Electronics, #1P5-13, Proc. Vol. 37, 16-18 November, 2016, Busan, Korea.
 12. Washiya M, Takanashi K, Ota K, Hozumi N, Kobayashi K, Yoshida S: "Subcellular Observation of C2C12 Myoblast Differentiation Using Ultrasonic Microscope", Symposium on Ultrasonic Electronics, #2E2-6, Proc. Vol. 37, 16-18 November, 2016, Busan, Korea.
 13. Matsui T, Hozumi N, Otaka A, Matsumoto T: "Nondestructive Failure Analysis Technique for IC-interconnection by using Ultrasound Heating", Symposium on Ultrasonic Electronics, #3E2-2, Proc. Vol. 37, 16-18 November, 2016, Busan, Korea.

〔図書〕(計1件)

Hozumi N: "Acoustic Microscopy", Compendium of Surface and Interface Analysis, pp. 1-8, The Surface Science Society of Japan (EDT), Springer (ISBN: 978-9811061554).

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 表面特性測定方法、表面特性測定装置、

及び表面特性測定プログラム

発明者: 小倉有紀, 穂積直裕, 吉田祥子

小林和人, 原祐輔

権利者: 資生堂, 豊橋技術科学大学, 本多電子

種類: 特許(審査請求予定)

番号: 特願 2016-221213

出願年月日: 2016/09/08

国内外の別: 国内

○取得状況(計2件)

名称: 超音波画像構築方法, 超音波画像構築装置, 超音波画像構築プログラム, 皮膚の評価方法

発明者: 穂積直裕, 吉田祥子, 小倉有紀, 原祐輔, 小林和人

権利者: 豊橋技術科学大学, 資生堂, 本多電子

種類: 特許(成立済, 番号未定)

番号: 特願 2017-552180

出願年月日: 2016/05/10

国内外の別: 国内

名称: 光学観察装置、光学観察方法、標本観察画像の画像処理プログラム

発明者: 吉田祥子, 穂積直裕, 氏家雅彦, 須山洋行

権利者: 豊橋技術科学大学, パールステック工業

種類: 特許

番号: 6295396

取得年月日: 2018/03/02

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等: <http://icceed.tut.ac.jp/hozumi/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

穂積直裕(HOZUMI NAOHIRO)

豊橋技術科学大学・工学系研究科・教授

研究者番号: 30314090

(2)研究分担者

田中直彦(TANAKA NAOHIKO)

芝浦工業大学・システム工学部・教授

研究者番号: 10255648

吉田祥子(YOSHIDA SACHIKO)

豊橋技術科学大学・工学系研究科・講師

研究者番号: 40222393

山本清二(YAMAMOTO SEIJI)

浜松医科大学医学部医療光子学センター・教授

研究者番号: 60144094

西條芳文(SAIJO YOSHIFUMI)

東北大学・医工学研究科・教授

研究者番号: 00292277

(3)連携研究者

小林和人(KOBAYASHI KAZUTO)

本多電子株式会社・研究部・部長