

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06104

研究課題名(和文)超音波造影剤の非接触濃度計測手法の開発と生体内分子イメージングへの応用

研究課題名(英文)Development of non-contact measurement for ultrasonic contrast agent and its application to molecular imaging

研究代表者

吉田 憲司 (Yoshida, Kenji)

千葉大学・フロンティア医工学センター・助教

研究者番号：10572985

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)：超音波分子イメージングにおける定量性を向上させる試みとして、パルスエコー法を用いたバブル濃度推定法の提案と検証用実験システムの試作を行った。減衰係数の解析からバブル濃度・サイズを定性的に評価可能であることを確認した。検証用実験システムとして圧電共振子をベースとするシステムにパルスエコー法用の振動子を組み込んだ。標的分子を模擬したアビジンと造影剤を模擬したビオチン化バブルの相互作用を対象に試作システムにより評価を行ない、エコー信号により造影剤の特異的吸着を検出できる可能性を示した。送液の自動制御が可能なフロー型セルを用いることで、検証用システムの安定性を飛躍的に改善した。

研究成果の概要(英文)：In order to increase the quantitative performance of ultrasonic molecular imaging, the method to estimate the number density of contrast agents was proposed and the evaluation system was constructed to verify the performance of proposed method. The transducer for pulse-echo method was incorporated into the evaluation system based on quartz crystal microbalance for the verification. Using the evaluation system, the interaction between avidin as target molecule and biotinylated bubbles as contrast agents was monitored by pulse echo method. As a result, we succeeded in detecting the interaction by analysis of the echo signal. In addition, we developed the evaluation system into more stable one by using flow cell where the liquid was automatically sent.

研究分野：計測工学

キーワード：マイクロバブル 超音波 造影剤 減衰係数 後方散乱係数 圧電共振子 分子イメージング 非線形振動

1. 研究開始当初の背景

種々の疾患に対するバイオマーカーの研究が飛躍的に進展したことを背景に、病態の情報を的確に映像化し、治療効果の判定や治療戦略の立案に役立つ技術として分子イメージングが注目されている。超音波診断・治療技術分野においても、標的とする分子を選択的に可視化することができる分子標的超音波造影剤が提案されている。操作性が良い超音波診断装置を使用するため、リアルタイムに分子レベルでの生体機能情報を映像化できる可能性がある。造影剤は超音波に対する良好な散乱体であるナノ・マイクロバブルであり、その内部ガスを覆う皮膜物質（リン脂質など）に標的分子を特異的に認識する分子を固定化することで標的指向性が実現される。標的分子が多数存在する場所に造影剤が集積するため、該当部位を超音波診断像において明瞭な高輝度部位として認識することが可能になる。すでに動物実験レベルでは、血管内皮細胞増殖因子を標的にした造影剤を用いて腫瘍の選択的可視化が可能であることが実証されているが、他の分子イメージング手法と比較すると定量性に乏しいという点が課題として挙げられる。

2. 研究の目的

超音波による定量的な生体機能情報イメージングを実現するためには、造影剤の基礎性能（振動特性と標的部位に対する集積能）を理解した上で、生体内の造影剤の動態と量をエコー信号から推定する手法が必要となる。当該研究では、(1) 標的分子の濃度と相関すると想定される“造影剤の集積量（濃度）”を、エコー信号から“定量的”に推定する手法を提案すること、(2) 標的分子量と集積した造影剤の濃度の関係性を検証するための新規の実験システムを構築し、提案法の実現性を検証する *in-vitro* システムの基盤を築くことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 造影剤を含む懸濁液の減衰係数、後方散乱係数は、造影剤の濃度（数密度；単位体積当たりの個数）、粒径分布が既知であれば造影剤の動力学を基に理論的に計算可能である。したがって、受波エコー信号から減衰係数、後方散乱係数を求め、さらに逆問題を解くことで、造影剤の数密度、粒径分布の推定が可能となる。

流路ファントムを用いて造影剤濃度推定の提案法の検証を実施した。血管を想定した直径 8 mm の流路に流量 40 mL/min の条件で、造影剤を循環させた。本実施内容は提案法の基礎的検証であるため、造影剤としては分子標的化バブルではないソナゾイドを用いた。超音波の送受信については、中心周波数が 5 MHz のリニアアレイプローブを、超音波ビームの焦点位置が流路中心と一致するように設置し、流路内の造影エコーおよび流路壁エ

コーを取得した。後方散乱係数は流路内の造影エコーを切り出し、周波数解析を行うことで算出した。減衰係数は造影剤を循環させていない場合の流路壁エコーを参照信号とし、周波数領域において参照信号と造影剤循環時の流路壁エコーの比をとることで評価した。

上記の推定理論は造影剤に照射される音圧が低く、その振る舞いが音圧に対して線形的であるという前提において成立する。照射音圧が高い場合、造影剤の非線形的応答や崩壊が起こることが想定される。また、音圧は生体組織に対する安全性の面からも重要なパラメータであり、世界的な基準はメカニカルインデックス (MI) 1.9 以下である。このような背景から、MI 1.9 以下において、照射音圧と推定値 (N , R_E , R_{SD}) の関係性について検討し、高音圧の場合に推定理論の最適化が必要であるかどうかについて検討した。

(2) 標的分子量と造影剤の相互作用を定量的に評価するシステムとして、代表者の研究グループにおいて既に構築済みの横波励振圧電共振子を用いたモニタリングシステムをベースとして使用し、同システムへの音響計測機構の組み込みを実施した(図1)。圧電共振子により標的分子と造影剤濃度の定量が可能であり、標的分子に吸着した造影剤の濃度評価がパルスエコー法を用いて可能であるかを検証するシステムである。

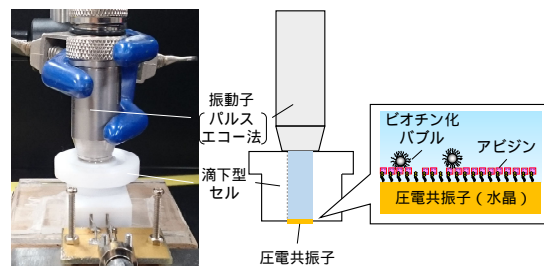


図1 造影剤・標的分子相互作用モニタリングシステムへのパルスエコー法用振動子の組み込み

円筒形の滴下型セルの底部に圧電共振子の表面が位置しており、その上部に液体を貯留することができる。圧電共振子表面に標的分子を固定し、その後に造影剤懸濁液を滴下することで、標的分子に吸着した造影剤を圧電共振子の電気的特性の変化として検出することが可能である。円筒形滴下型セルの上面から超音波を送受信できる機構を組み込み、パルスエコー法により圧電共振子表面における分子と造影剤の相互作用を評価できるかについて検討した。造影剤としてはビオチン化バブルを、標的分子としてはアビジン分子を用い、両者の相互作用を評価対象とした。

将来的に、圧電共振子を用いて定量化したバブル濃度を参照値として使用し、パルスエコー法により評価した値と比較検証してい

く予定である．比較対象となる参照値の信頼性（正確性と精度）を高めるため，圧電共振子を用いた評価システムの精度検証とその改善法についても検討した．

4．研究成果

(1) 造影剤の粒子径分布が対数正規分布に従うという前提において，後方散乱係数および減衰係数を造影剤の数密度 (N) と粒子サイズ (平均 R_E と標準偏差 R_{SD}) を変数として表現した．この理論値とエコー信号から評価される実測値との残差二乗和が最小となる造影剤サイズおよび数密度を解とした．

流路ファントムを用いた推定実験の結果，後方散乱係数の周波数特性はサイズ・濃度推定が実行できるほど安定しないことを確認した．原因としては，流路内で複雑に造影剤が移動していることにより造影エコーの干渉性に再現性がないことが想定された．減衰係数の周波数特性の解析により求めた推定値 (N および R_E) は光学顕微鏡により算出した値よりも低く推定する傾向にあったが，推定値と参照値の関係性は比例関係にあり，定性的な評価は可能であることを確認した．定量性については，造影剤振動を記述する運動方程式に造影剤を覆うシェル物質の粘弾性を考慮することで改善が期待される．

MI 値 0.4, 0.5, 0.7, 1.1 の範囲で照射音圧に対する減衰係数と推定値 (N および R_E) の変化傾向を整理した結果，減衰のピーク周波数が低周波数側に遷移するという現象が確認され，この影響により R_E の値が大きく誤推定される可能性が示唆された．MI 値 0.4 の結果を基準とすると，MI 値 0.5 では 10% 程度，MI 値 0.7 では 30% 程度，MI 値 1.1 では 50% も過大評価されることもあった．これについてはバブル振動の非線形性から定性的な説明が可能であり，その影響を補正する推定法を考案し，追加の検証実験が必要である．一方で，数密度 N については推定値の音圧に対する依存性は小さいという傾向を確認した．MI 値 0.4 の結果を基準とすると，MI 値 1.1 以外では値の差異は 10% 未満であった．MI 値 1.1 の場合 50% ほど過小評価される場合も見うけられたが，これは造影剤が崩壊したためであると考えられる．これらの結果から，音圧が低くバブル振動が音圧に対して線形的に応答する条件では，減衰係数の解析から造影剤のサイズ，数密度を推定可能だと判断した．

(2) 圧電共振子表面上に標的分子 (アビジン) のみを固定化した状態と，標的分子に造影剤 (ピオチン化バブル) が特異的に吸着した状態において，中心周波数 15 MHz の超音波パルスを圧電共振子に照射し，パルスエコー法により圧電共振子表面からの反射信号を記録した．両者の結果を比較すると反射エコーの波形形状に差異が確認され，アビジン分子へのピオチン化バブルの特異的吸着を

パルスエコー法により評価できる可能性が示唆された．吸着バブルの大きさを考慮し，パルスエコー法における周波数帯域を最適化する必要がある．吸着バブルの大きさは光学顕微鏡で実測可能であり，引き続き検討を実施していく予定である．

滴下型セルでは試料液体の蒸発，試料液体内での造影剤の浮遊などの影響，または標的分子固定時におけるヒューマンエラーの問題から，圧電共振子の電気インピーダンスの再現性の低さが問題となった．実験セルを滴下型セルからフロー型セルに変更し，試料液体をすべて自動で送液するシステムに変更することで実験条件の再現性が改善されることが期待された．滴下型セルとフロー型セルの両者においてバブル吸着時の圧電共振子の共振周波数のシフト量を計測したところ (図 2)，両者の間で周波数シフト量の平均値に大きな差異は確認されなかったが，そのばらつき (変動係数) は滴下型セルの場合 0.16-0.76 の範囲で，フロー型セルの場合 0.02-0.06 の範囲となり計測精度が格段に改善されることを確認した．また，共振子表面上に固定された造影剤数を光学顕微鏡により観察し，付着バブルの個数を計測したところ，そのばらつき (変動係数) は滴下型セルの場合では 0.079-0.190，フロー型セルの場合には 0.003-0.017 となり，この結果からもフロー型セルの使用でシステムの安定性が改善されることが示された．将来的に，フローシステムへのパルスエコー法用超音波送受信システムの組み込みを行ない，実験を継続する方向で検討している．

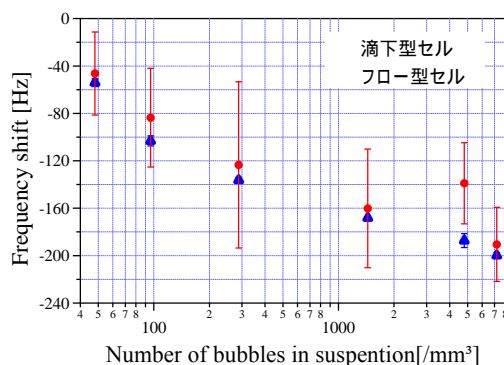


図 2 懸濁液中のバブル濃度と圧電共振子の共振周波数のシフト量

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 2件)

1. Yasuhiro Yokoi, Kenji Yoshida, Yuta Otsuki, Yoshiaki Watanabe, Area density of streptavidin can be evaluated by the number density of biotinylated microbubbles, Applied Physics Letters, 査読有, 110, 2017, 073702

DOI: 10.1063/1.4975830

2. Kenji Yoshida, Kazuki Tamura, Tadashi Yamaguchi, Estimation of size and number density of microbubbles based on analysis of frequency-dependent attenuation, Japanese Journal Applied Physics, 査読有り, 55, 2016, 07KC03
DOI: 10.7567/JJAP.55.07KC03

〔学会発表〕(計 11件)

1. 田畑拓、小山大介、松川真美、吉田憲司、Kreff Marie-Pierre, 超音波照射下におけるポロキサマー膜をもつマイクロバブルの振動特性、日本音響学会、2018

2. Yuta Otsuki, Kenji Yoshida, Yoshiaki Watanabe, Experimental investigation on chemical kinetics between biotinylated microbubbles and streptavidin, IEEE International Ultrasonics Symposium, 2017
3. 大月裕太、吉田憲司、横井康弘、渡辺好章、ピオチン修飾バブルとストレプトアビジン間の化学反応における反応速度の解析、第38回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、2017

4. 横井康弘、吉田憲司、大月裕太、渡辺好章、超音波分子イメージング用造影剤と標的分子の相互作用モニタリング資すシステムの構築、日本音響学会、2017

5. Kenji Yoshida, Yasuhiro Yokoi, Yoshiaki Watanabe, Development of sensor system using quartz crystal microbalance for detecting nano- and microbubbles, The 37th Symposium on UltraSonic Electronics, 2016

6. Kenji Yoshida, Yasuhiro Yokoi, Yoshiaki Watanabe, Estimation of size and number density of microbubbles under irradiation of finite-amplitude ultrasound, IEEE International Ultrasonics Symposium, 2016

7. Kenji Yoshida, Kazuki Tamura, Tadashi Yamaguchi, Measurement of concentration of molecule by evaluating the number density of targeted microbubble, IEEE International Ultrasonics Symposium, 2016

8. 吉田憲司、田村和輝、山口匡、有限振幅超音波照射時の超音波診断用造影剤のサイズ・密度推定、日本音響学会、2016

9. 安藤 優、西村 ジュン、谷村 望美、香川 幸大、田畑 拓、吉田 憲司、小山 大介、渡邊 好章, Krafft Marie Pierre, レーザドップラ振動計を用いた超音波照射下におけるPluronic F68 マイクロバブルの振動計測、日本音響学会、2016

10. 吉田憲司、田村和輝、山口匡、低流速定常流における気泡懸濁液の減衰、後方散乱係数の測定、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、2015

11. Yasuhiro Yokoi, Kenji Yoshida, Ryosuke Shimoya, Yoshiaki Watanabe, The evaluation system for measuring sensitivity of microbubbles to target molecules using a

quartz crystal microbalance, IEEE International UltraSonic Symposium, 2015

12. 横井康弘、吉田憲司、下谷遼資、渡辺好章、水晶振動子を用いた分子標的超音波造影剤の感度評価法の提案、日本音響学会、2015

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 憲司 (YOSHIDA, Kenji)
千葉大学・フロンティア医工学センター・助教
研究者番号: 10572985

(2) 研究分担者

渡辺 好章 (WATANABE Yoshiaki)
同志社大学・生命医科学部・教授
研究者番号: 60148377

(3) 研究協力者

山口 匡 (YAMAGUCHI Tadashi)
千葉大学・フロンティア医工学センター・教授
研究者番号: 40334172