

平成 30 年 5 月 9 日現在

機関番号：13201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06619

研究課題名(和文)多チャンネル高周波数超音波プローブを用いた光音響サイトメトリーの開発

研究課題名(英文)Development of photoacoustic flow cytometry by employing multi-channel high frequency ultrasonic probe

研究代表者

長岡 亮 (Nagaoka, Ryo)

富山大学・工学部・特命助教

研究者番号：60781648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：従来の光音響サイトメトリーでは、レーザマニピュレーションによって血球を1列に整列させ、レーザーによって血球から発生した光音響波を受信することで細胞分類を提案している。しかしながら、生体中では光の散乱・吸収の影響を大きく受け、体表に近い橈骨動脈(深さ3 mm)でさえもレーザマニピュレーションによる血球の整列は困難である。本研究では、音響的に焦点を設定することで生体の光学的散乱吸収を最小にし、生体深部の観察を可能にする手法の開発を行った。

研究成果の概要(英文)：In a traditional photoacoustic flow cytometry, cells in vessels are aligned in one line by laser manipulation, and the photoacoustic signals induced from the cells are measured to classify the characteristics. However, scattering and absorption in the living tissues has effects on the propagation of the radiated laser, and the alignment of the cell by the manipulation cannot be achieved owing to the effect. In this study, the effect of the scattering and absorption was minimized by acoustical focusing, and the method could visualize the living tissues at the deeper part was developed.

研究分野：医工学

キーワード：超音波計測 光音響スペクトロスコーピー計測 多チャンネル高周波数超音波プローブ 計測工学 光音響計測

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 日本の死因第 1 位は悪性新生物であり、28.5 %もの割合を占めている。悪性新生物の標準治療としては、局所療法である外科手術が挙げられるが、術中に血管・リンパ管を介したがん細胞の遠隔転移が問題となっており、がん細胞の術中診断手法の確立が求められている。さらに、マライアは現在でも年間 800 万人の感染が確認されており、80 万人近くが死亡している。マライアの確定診断法は確立しているが、注射器の使い回しにより HIV ウィルス・C 型肝炎ウィルスの感染拡大の問題も存在しているために、非侵襲的に簡便な診断手法が必要である。従って、細胞レベルの空間分解能を有し、非侵襲的に診断可能な計測手法へのニーズが高まっている。

### 2. 研究の目的

(1) 光音響サイトメトリーはフローサイトメトリー技術と光音響波を用いたイメージングを融合させた手法である。光音響波は短パルスレーザーによって、細胞に熱膨張を生じさせることで発生する。また、細胞の光学的吸収係数によって、光音響信号強度が決定される。つまり、光音響波は細胞の色によって異なり、その波を解析することで細胞を識別することが可能である。さらに、フローサイトメトリーは、流体中に 1 列に整列させた細胞にレーザーを照射し、その前方散乱・側方散乱を測定することで細胞を分類する手法であるが、光の散乱・吸収が大きい生体に適用することは困難であり、体表から深い位置にあるがん細胞まで観察することができないのが実情である。従来の光音響サイトメトリーでは、レーザマニピュレーションによって血球を 1 列に整列させ、レーザーによって血球から発生した光音響波を受信することで細胞分類を提案しているが、生体中では光の散乱・吸収の影響を大きく受け、体表に近い橈骨動脈(深さ 3 mm)でさえもレーザマニピュレーションによる血球の整列は不可能である。

本研究では、超音波を空間的に絞る超音波フォーカシングを用いて、5-10  $\mu\text{m}$  の空間分解能を実現し、細胞単体からの光音響波を検出することで細胞の高精度分類を目指す。加えて、細胞の光学的吸収係数の波長依存性に着目することで、赤血球・マライアに感染した赤血球・がん細胞を非侵襲的に検出可能な光音響サイトメトリーのプロトタイプを開発する。

### 3. 研究の方法

本研究では、以下の 3 点に着目して研究を行った。

(1) ZnO 薄膜多チャンネル高周波数超音波プローブの開発

図 1 に多チャンネル高周波数超音波プローブの概要を示す。X 方向は受信ビームフォー

ミング、Y 方向は直線集束ビーム(LFB音響レンズ)によって 5-10  $\mu\text{m}$  の空間分解能を実現する。音響レンズ上に順に Au-Cr 電極蒸着、ZnO 薄膜をスパッタリング、最後に Au-Cr 電極蒸着することで多チャンネル高周波数超音波プローブを作製した。この時に必要な蒸着・スパッタリング用のメタルマスクは設計し、外注する予定である(精度: 1  $\mu\text{m}$ )。電気的なインピーダンスマッチングも考慮し、素子サイズは 0.3 x 4 mm とした。

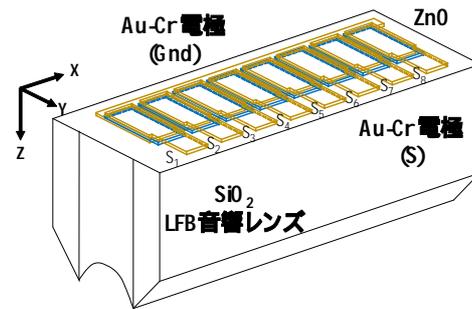


図 1 プローブの概要

複数チャンネルで受信した光音響信号は Low Noise Amplifier(LNA)で 40 dB 増幅し、サンプリング周波数 1 GHz の高速デジタイザカードを用いてワークステーションに取り込んだ。生体の不均一性(最大で 10 %程度の音速差)を考慮し、取得した光音響信号に対して自己相関法を用いた受信ビームフォーミングを行った。(S. W. Flax, et al. "IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control 1988 35(6) 758-767)

(2) 細胞の光学的吸収係数の波長依存性に着目した細胞分類アルゴリズムの検討

計測対象の光学的吸収特性の波長依存性に着目した分類アルゴリズムでは、400-1200 nm の波長領域を用いて検討を行った(当初計画していた波長領域 700-1000 nm では血流分布を把握するために不十分であったために、より広い波長領域を用いた)。計測対象としては、光学的特性が明らかである微粒に加えて、生体に適用可能である染色液を用いた。これらの光学的吸収係数と提案手法によって得られた光音響強度の波長依存性とを比較した。

(3) 開発した超音波プローブを用いた細胞分類アルゴリズムの検討および精度検討

計測対象は基礎実験として、蛍光微小粒子と染色した培養細胞を用いて、光音響強度の波長依存性の計測を行った。さらに、培養細胞をマウスに移植し、体表から開発したイメージング手法を用いて可視化することが可能であるかどうかも確認した。

### 4. 研究成果

(1) ZnO 薄膜多チャンネル高周波数超音波プローブの開発に関する結果

多チャンネル高周波数超音波プローブは当初の計画通り、設計した音響レンズ上に順に Au-Cr 電極蒸着、ZnO 薄膜をスパッタリング、最後に Au-Cr 電極蒸着することで多チャンネル高周波数超音波プローブを作製する。この際には、音響レンズは平面音響レンズ(幾何学的フォーカス無し)と直線集束ビーム(LFB)音響レンズ(幾何学的フォーカス有り)の2種類用意し、それぞれの比較を行った。この多チャンネル超音波プローブ製作において、シミュレーションの結果、4チャンネルでも期待した性能を得られることが判明したため、仕様を変更した。図2は作成した多チャンネル高周波数プローブの光学像である。

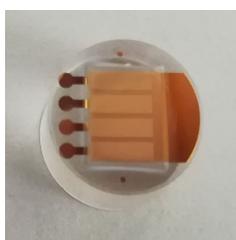


図2 多チャンネル高周波プローブ

計測結果としては、各チャンネル間でのばらつきは期待していたよりも少なく、ビームフォーミング適用可能範囲であった。また、抵抗値も期待した値が得られた。また、シングルエレメントの超音波センサとの比較も行った。

(2) 細胞の光学的吸収係数の波長依存性に着目した細胞分類アルゴリズムの検討に関する結果

細胞用の染色液に関しても検討を行い、結果として得られた光音響強度の波長依存性は計測対象の光学的な吸収係数と非常によく一致を示した。検討に用いた染色液は以下の6種類である。

- Chlorin e6 (C6): 吸収ピーク 404 nm
- Indocyanine green (ICG): 吸収ピーク 780 nm
- Acridine orange (AO): 吸収ピーク 502 nm
- Protoporphyrin ix (PPIX): 吸収ピーク 405 nm
- Gold nanorod (AuNR): 吸収ピーク 808 nm
- IR 780: 吸収ピーク 795 nm

- が現在臨床の場でも使用されているもの、- が研究段階のものである。図3に比較結果を示す。赤点が光音響信号の強度、青の実線が別手法で計測を行った吸収係数である。染色液のうち4つの結果を示す。

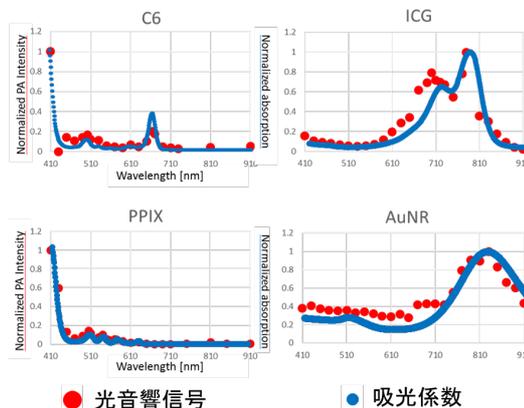


図3 光音響強度と光学特性との比較

以上の結果より、光音響スペクトロスコーピー計測のアルゴリズムが確立できたと考える。

(3) 開発した超音波プローブを用いた細胞分類アルゴリズムの検討および精度検討に関する結果

染色した培養細胞を用いて、光音響強度の波長依存性の計測を行った。計測した光音響強度の波長依存性は計測対象の光学的な吸収係数と非常によく一致を示した。図4は染色した細胞を高周波数プローブによって可視化した結果である。観察領域は  $300 \times 300 \mu\text{m}$  である。提案した手法を用いることで、染色した細胞のみを可視化することが可能であった。

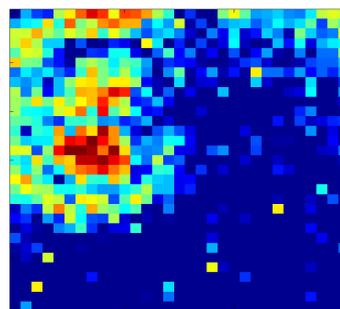


図4 可視化した染色細胞

さらに、培養細胞をマウスに移植し、体表から開発したイメージング手法を用いて可視化することが可能であり、開発した手法の有用性を示した。

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3件)

R. Nagaoka, S. Yoshizawa, S.-I.

Umemura, Y. Saijo, Basic Study on Improvement of Axial Resolution and Suppression of Time Side Lobe by Phase-Corrected Wiener filtering in Photoacoustic Tomography, Jpn. J. Appl. Phys., (査読有), 印刷中, 2018.

R. Nagaoka, T. Tabata, S. Yoshizawa, S.-I. Umemura, Y. Saijo, Visualization of murine lymph vessels using photoacoustic imaging with contrast agents, Photoacoustics, (査読有), Vol. 9, pp. 39-48, 2018.

R. Nagaoka, T. Tabata, R. Takagi, S. Yoshizawa, S.-I. Umemura, Y. Saijo, Development of Real-Time 3-D Photoacoustic Imaging System Employing Spherically Curved Array, IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control, (査読有), Vol. 64, pp. 1223-1233, 2017.

〔学会発表〕(計 8 件)

R. Nagaoka, S. Yoshizawa, S.-I. Umemura, Y. Saijo, Development of Photoacoustic Tomography System for Visualization of Micro-Circulation, International Young Researchers' Workshop on Multimodal Medical Engineering 2018 (招待講演), 2018.

R. Nagaoka, T. Tabata, R. Takagi, S. Yoshizawa, S.-I. Umemura, Y. Saijo, Visualization of the microcirculation in micro vasculatures by Photoacoustic Tomography with high frequency Spherical Array Transducer, Symposium, 2017.

T. Tabata, R. Nagaoka, S. Yoshizawa, S.-I. Umemura, Y. Saijo, Differentiation of Vein and Lymphatic Vessel by Photoacoustic Imaging System with Parabolic Array Transducer and Tunable Laser, 2017 IEEE International Ultrasonics Symposium, 2017.

長岡 亮, 吉澤 晋, 梅村 晋一郎, 西條 芳文, 光音響波イメージングのための線音源及び点音源における光音響波音場に関する基礎検討, 日本音響学会 2017 年秋季研究発表会, 2017.

長岡 亮, 高木 亮, 吉澤 晋, 梅村 晋一郎, 西條 芳文, 球面アレイトランスデューサを用いた血管網の光音響イメージング, 日本超音波医学会第 90 回学術集会, 2017.

長岡 亮, 高木 亮, 吉澤 晋, 梅村 晋一郎, 西條 芳文, パラボリックアレイトランスデューサを用いたリアルタイム光音響イメージング, 日本音響学会 2017 年春季研究発表会, 2017.

長岡 亮, 高木 亮, 吉澤 晋, 梅村 晋一

郎, 西條 芳文, 光音響波イメージングのための半球面アレイトランスデューサの設計とその応用, 圧電材料・デバイスシンポジウム 2017, 2017.

Y. Saijo, R. Nagaoka, I. U. Haq, S. Siregar, R. Takagi, S. Yoshizawa, S.-I. Umemura, Skin vasculature imaging by acoustical resolution photoacoustic microscope with parabolic array transducer, 5th Joint Meeting of the Acoustical Society of Japan, 2017.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称: 光音響イメージングにおける信号処理  
発明者: 長岡亮, 西條芳文, 梅村晋一郎, 吉澤晋

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2017-084155

出願年月日: 2017 年

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

長岡 亮 (NAGAOKA, Ryo)

富山大学・大学院理工学研究部・特命助教  
研究者番号: 60781648

(2)研究協力者

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

梅村 晋一郎 (UMEMURA, Shin-ichiro)

東北大学・大学院医工学研究科・教授  
研究者番号: 24300178

吉澤 晋 (YOSHIZAWA, Shin)

東北大学・大学院医工学研究科・准教授  
研究者番号: 30455802

荒川 元孝 (ARAKAWA, Mototaka)

東北大学・大学院医工学研究科・准教授  
研究者番号: 00333865

石川 一夫 (ISHIKAWA, Kazuo)

東北大学・工学部・電気系技術部