

平成21年 6月10日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18360196

研究課題名（和文） パルス超音波による生体用 *in vivo* 高速顕微プローブの開発研究課題名（英文） Development of High-speed Microprobe for *in vivo* Observation of Biological Tissue Using Pulsed Ultrasound

研究代表者

穂積直裕 (HOZUMI NAOHIRO)

愛知工業大学・工学部・教授

研究者番号：30314090

研究成果の概要：高分子基板に接触した生体軟組織断面の特性音響インピーダンスを画像化し、非染色、非接触で定量観察できる超音波顕微鏡を提案し、細胞レベルに至る画像分解能を得た。ラット由来のグリア細胞を観察した結果、核と細胞骨格を含む内部構造が観察できた。また、ラットの脳腫瘍モデルを観察し、腫瘍部分は音響物性のばらつきが大きいことなどを明らかにした。医師が手術中に使える顕微プローブを目指し、従来のXY走査に代えて螺旋走査を提案し、予備実験を実施した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,100,000	0	8,100,000
2007年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	1,800,000	15,900,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：電気電子工学・計測工学

キーワード：超音波、生体組織、音響インピーダンス

1. 研究開始当初の背景

超音波による生体組織の顕微観察は、細胞に無処置、非接触でナノスケールに迫る解像度の観察が可能であること、音速や音響減衰といった組織の機械物性と密接に関係する物理パラメータの局所分布が得られる可能性などから、電子顕微鏡、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡などでは実現できない特徴を有している。

研究代表者らは生物研究や手術中迅速組織診断に応用を目的とし、従来使用されていた単一周波数のトーンバースト超音波に換えてパルス超音波を使用することにより、広帯域周波数資源を有効に生かした音速顕微

鏡を提案した。これにより従来1時間を要していた観察時間を数分に短縮するとともに、高精度化と高安定性を実現した。さらなる臨床応用に耐えるレベルの装置を実用化し、医療機関等と協力して、癌による線維化、心筋梗塞、動脈硬化、脳組織の発達、皮膚組織の老化などに伴う組織音響物性の微視的变化を定量的に捉えることに成功した。

しかし当時開発された超音波顕微鏡では、ガラス基板上に固定した厚さ10ミクロン程度の組織切片表裏面の反射から組織音速を算出していた。このため特殊な切片加工設備と時間を要するとともに、その観察対象は、摘出された組織を切片加工スライドガラ

ス上に載せたものや、培養皿の上に培養された細胞などに限定されていた。

一方、超音波顕微鏡に関する医療従事者や生物学者との共同研究の過程で、切片を加工せず組織に接触させるのみで迅速かつ *in vivo* (生きた状態) で微細構造の観察できる観察システムや、ベッドサイドで使用できるハンディーなリアルタイム超音波顕微プローブに対する要望が高いことが判った。

2. 研究の目的

以上の背景にもとづき、本研究では最終的にサブミクロンに迫る解像度を持った生体組織の音響物性(弾性パラメータ)像を *in vivo* 状態で得るための工学的検討を行う。そのため、「基板上に固定した切片の上から水媒体を介して超音波を送波する」という従来の超音波顕微鏡の発想を転換し、平滑なプラスチック板を組織に接触させ、裏側から広帯域収束パルス超音波を送波して反射を検出する顕微プローブを開発する。

200×200 ピクセル程度のイメージングを1分程度で完了できる装置を試作し、実際に生体組織の観察を行う。この成果にもとづき、ベッドサイドでリアルタイム組織観察ができるプローブの開発を目的とし、回転式ステージを用いた高速観察システムの検討を行う。

3. 研究の方法

(1) システムの概念設計と音響インピーダンス顕微画像の取得

図 3-1 に計測システムを示す。生物用光学顕微鏡ステージを改造し、コンデンサレンズの代わりに振動子を取り付け、基板の背面側から結合媒体を介して基板表面に収束させた超音波を出射する。振動子を XY 方向に機械走査することで、反射強度像が得られる。

超音波は観察組織と基板の界面に焦点を結んでいる。加えて、組織の音響インピーダンスよりも基板の音響インピーダンスを十分大きくとることにより、組織内部からの反射を界面からの反射に比較して無視できる程度に小さくすることができる。必要な解像度に対応する周波数成分を抽出し、反射強度を代表するパラメータとする。反射信号は(2)に述べる方法により音響インピーダンスに変換される。

- (a) 振動子: 鋭敏なパルス特性と広域のレスポンスを有する中心周波数 300MHz の振動子を試作した。
- (b) 機械走査部: ステッピングモーターとピエゾドライブを用い、10 mm~100 μm 程度の走査範囲とした。1 視野の観察時間約 1 分以内とした。
- (c) 超音波発生装置: 半導体スイッチング

- により、ピコ秒レベルのパルスを発生することの出来る超音波発生装置を作製した。
- (d) 超音波受信装置: 超音波受信装置としては、サンプリング周波数 8 GS/s の A/D 変換器を計測用コンピュータに組み込み、計測制御ソフトウェアを自作して、機械走査部と連携したデータ取得を行った。
- (e) 測定解析プログラム: 測定解析プログラムはグラフィカルプログラミングツール(LabVIEW)上で動作するものを全て自作した。

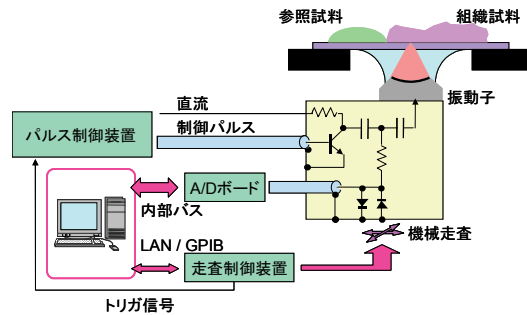
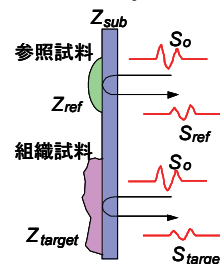


図 3-1 システム概念図。

(2) 音響インピーダンス校正法の検討と測定精度評価

図 2 に校正の概念図を示す。基板として予め特性音響インピーダンスが判っているスチロール樹脂等を用いた。この上に組織試料と参照試料を密着させた。組織と参照試料(純水など)からの反射信号を比較し、組織の音響インピーダンスに変換する。組織試料としてはラットの脳組織等の軟組織や、フィルム上に培養した細胞などを検討した。

UHF 帯まで広がる周波数資源を活かし、細胞レベルの空間分解能で音響インピーダンス画像が取得できるように装置を設計、試作した。高分解能化に当たっては、基板を音波が通過するときの減衰と収差を極力低減するため、基板として厚さ数 10 μm のプラスチックフィルムを使用した。



$$Z_{target} = \frac{1 - \frac{S_{target}}{S_0}}{1 + \frac{S_{target}}{S_0}} Z_{sub} = \frac{1 - \frac{S_{target}}{S_{ref}} \cdot \frac{Z_{sub} - Z_{ref}}{Z_{sub} + Z_{ref}}}{1 + \frac{S_{target}}{S_{ref}} \cdot \frac{Z_{sub} - Z_{ref}}{Z_{sub} + Z_{ref}}} Z_{sub}$$

図 3-2 音響インピーダンス校正の概念図。

4. 研究成果

(1) 音響インピーダンス像の取得

試作した装置と解析ソフトウェアを使用してラットの小脳を観察したところ、層構造が音響インピーダンス像として明瞭に観察できた。同じ層であっても日齢にともない音響インピーダンスが変化することから、音響インピーダンスが神経組織の発達過程を反映していることが示唆され、組織キャラクター化のツールとしての有効性が示された。

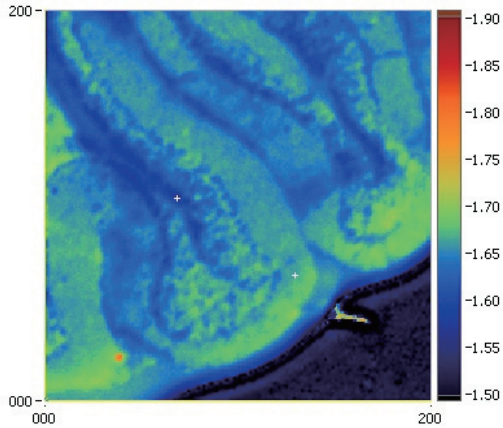


図 4-1 ラット小脳組織の音響インピーダンス像。2×2 mm。スケールは MNs/m³。

(3) 測定誤差の評価と補正

特性音響インピーダンスは、基板と組織間の反射係数をもとに計算されるが、集束ビームを使うシステムでは入射角により見かけの反射係数が異なるため、集束角が大きくなると誤差が無視できなくなる可能性がある。そこで、この誤差を推定し補正するアルゴリズムを検討し、簡単なプログラムを作成した。これにもとづき、計算を行った結果、集束角が 20 度程度以上になると無視できない測定誤差が発生することが、斜め入射を考慮した計算により正しい値に補正できることが判った。これらのアルゴリズムを測定解析システムに組み込み、正確な音響インピーダンスを表示する方法を確立した。

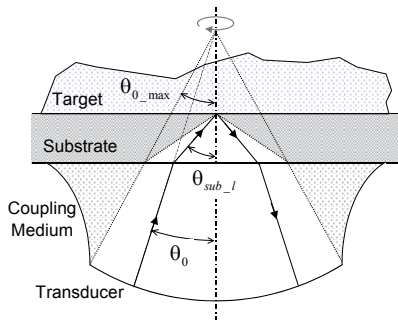


図 4-2 集束ビームの経路。

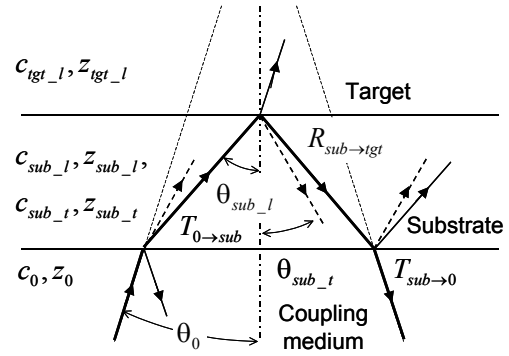


図 4-3 斜め入射ビームの伝播。基板中では縦波と横波の両方にモード変換される。

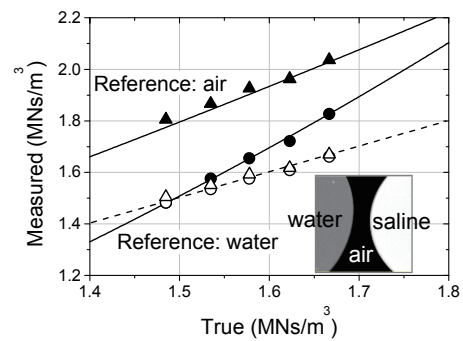


図 4-4 食塩水による測定精度の確認。黒抜きは補正前、白抜きは補正後の音響インピーダンス。

(4) 高分解能を実現するための測定システムの開発

試作した音響インピーダンス顕微鏡の分解能を向上させ、細胞レベルの観察が行えるようにした。中心周波数 300 MHz の音響レンズ付き振動子をパルス電圧で駆動し、200～400 MHz 程度に広がる広帯域超音波パルスを発生させた。約 70 μm 厚の PET フィルムを基板として利用することで、焦点距離の短い高周波振動子に対応できるようにした(図 4-5)。

このフィルム上にラット由来のグリア細胞を培養し、音響インピーダンスによる非接触観察を行った。細胞組織の音響インピーダンスは集束角を考慮した補正なしの場合 1.5～1.7 MNs/m³ 程度と表示されたが、集束角が大きいため、垂直入射を仮定して較正された表示値は、真値より若干大きく計算されていると考えている。今後音響レンズの特性と斜め入射を考慮した補正により正しい値に近づける。この観察法により、形態のみでなく音響物性にもとづく細胞組織の識別が可能となったと考えている。今後は画像分解能の向上、定量測定の高精度化を図る。

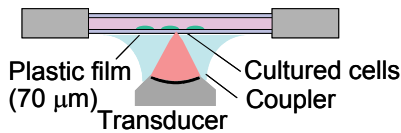


図 4-5 細胞観察のための培養セル。

(5) 各種生体組織の観察

ラット由来の星状グリア細胞、グリオーマ細胞、繊維芽細胞を高分子フィルム上に培養し、音響インピーダンス像を観察した。その結果、細胞核と細胞骨格を含む細胞の内部構造が音響インピーダンス分布として観察できることが判った。また、ラットの脳腫瘍モデルの音響インピーダンス像を観察し、腫瘍部分は音響インピーダンスの空間的ばらつきが大きいことが判った。平成 21 年度以降の研究においては、医学生物学研究者の協力を得て、臨床応用を含む応用開拓を行う。

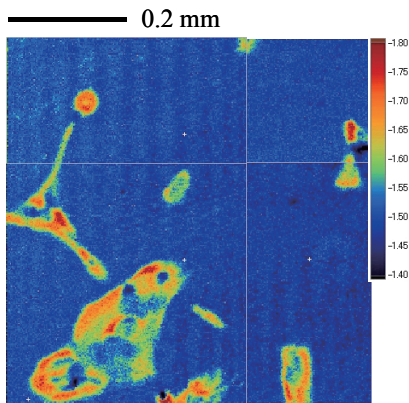


図 4-6 ラット由来の星状グリア細胞の音響インピーダンス像。スケールは $\text{MN}\cdot\text{s}/\text{m}^3$ 。

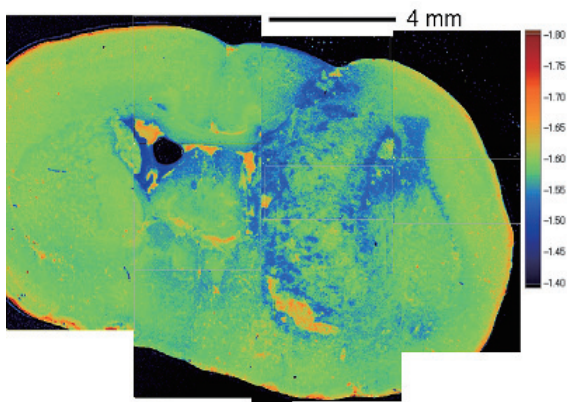


図 4-7 ラット脳腫瘍モデルの音響インピーダンス顕微画像。スケールは $\text{MN}\cdot\text{s}/\text{m}^3$ 。

(3) 螺線走査による 2 次元 3 次元複合顕微プローブの検討

外科医がベッドサイドで使える高速顕微プローブの開発を目指した走査方式の一つとして、従来の XY 走査に代えて螺線走査を提案し、簡単な予備実験を実施した。得られたプロファイルを経緯変換によって直交座標系で表示できることを示した。

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 10 件)

- ① Y. Saijo, Y. Hagiwara, K. Kobayashi, N. Okada, A. Tanaka, N. Hozumi, M. Tanaka, "Biomedical Application of Acoustic Microscopy Diagnosis, Assessing Echogenicity and Biomechanics", Proc. 2008 IEEE International Ultrasonics Symposium, 1983-1986 (11-2008)
- ② A. Nakano, T. Uemura, N. Hozumi, M. Nagao, S. Yoshida, K. Kobayashi, S. Yamamoto, Y. Saijo, "Non-contact Observation of Cultured Cells by Acoustic Impedance Microscope", Proc. 2008 IEEE International Ultrasonics Symposium, 1893-1896 (11-2008)
- ③ S. Yoshida, S. Masaki, S. Iwasa, K. Kobayashi, N. Hozumi, "Vital Observation and Featuring Techniques of Functional Cell-Surface Proteins Using Acoustic Impedance Microscope", Proc. 2008 IEEE International Ultrasonics Symposium, 112-115 (11-2008)
- ④ N. Hozumi, A. Nakano, S. Terauchi, M. Nagao, S. Yoshida, K. Kobayashi, Seiji Yamamoto, Yoshifumi Saijo (Tohoku Univ.), "Development of Biological Acoustic Impedance Microscope and Its Error Estimation", Modern Physics Letters B, Vol.22-1, 1129-1134 (5-2008)
- ⑤ N. Hozumi, S. Terauchi, S. Yamamoto, M. Nagao, S. Yoshida, K. Kobayashi, Y. Saijo, "Development of Biological Acoustic Impedance Microscope and Its Error Estimation", Advanced 2nd Int'l Conf. on Nondestructive Evaluation, 2007-590, (10-2007).
- ⑥ N. Hozumi, A. Nakano, S. Terauchi, M. Nagao, S. Yoshida, K. Kobayashi, S. Yamamoto, Y. Saijo, "Precise Calibration for Biological Acoustic Impedance Microscope" IEEE Ultrasonics Symposium, 9D-1 (10-2007)
- ⑦ Y. Saijo, Y. Hagiwara, K. Kobayashi, N. Okada, A. Tanaka, N. Hozumi, K. Tomihata,

- “B-mode and C-mode Imaging of Regenerated 3D Skin Model with 100 MHz Ultrasound” IEEE Ultrasonics Symposium, 4C-C (10-2007)
- ⑧ A. Kimura, S. Terauchi, M. Nagao, S. Yoshida, K. Kobayashi, Y. Saijo, N. Hozumi, "Development of Cerebella Tissue of Rat Characterized by Acoustic Impedance Microscope", Proc. 2006 IEEE International Ultrasonics Symposium, pp.423-426, October 3-6, 2006, Vancouver, Canada.
- ⑨ A. Kimura, S. Terauchi, M. Nagao, S. Yoshida, K. Kobayashi, Y. Saijo, N. Hozumi, "Development of Cerebella Tissue of Rat Characterized by Acoustic Impedance Microscope", Proc. 2006 IEEE International Ultrasonics Symposium, pp.423-426, October 3-6, 2006, Vancouver, Canada.
- ⑩ A. Kimura, S. Terauchi, M. Nagao, S. Yoshida, K. Kobayashi, Y. Saijo, N. Hozumi, "Development of Cerebella Tissue of Rat Characterized by Acoustic Impedance Microscope", Proc. 2006 IEEE International Ultrasonics Symposium, pp.423-426, October 3-6, 2006, Vancouver, Canada.

[学会発表] (計 15 件)

- ① 植村 努, 中野愛子, 高山靖章, 武本諒太, 穂積直裕, 小林和人, 吉田祥子, 山本清二, 西條芳文, “生体組織用音響インピーダンス顕微鏡における音場計算”, 電気学会全国大会, Vol. 1-158 (3-2009)
- ② 中野愛子, 植村 努, 穂積直裕, 小林和人, 吉田祥子, 山本清二, 西條芳文, “3次元形状観察機能を有する生物用音響インピーダンス顕微鏡”, 電気学会全国大会, Vol. 1-155 (3-2009)
- ③ 植村 努, 穂積直裕, 中野愛子, 高山靖章, 武本諒太, 小林和人, 吉田祥子, 山本清二, 西條芳文, “生体組織用音響インピーダンス顕微鏡における収差検討”, 電気学会東海大会, 0-459 (9-2008)
- ④ 中野愛子, 高山靖章, 植村 務, 穂積直裕, 吉田祥子, 小林和人, 山本清二, 西條芳文, “細胞観察のための音響インピーダンス顕微鏡の較正”, 電気学会東海大会, 0-326 (9-2008)
- ⑤ 寺内智, 村上 義信, 長尾 雅行, 吉田祥子, 小林 和人, 西條 芳文, 穂積直裕, “生体組織用音響インピーダンス顕微鏡の較正—集束角の影響解析と小脳組織観察—” 電気学会全国大会 1-123 (3-2008).
- ⑥ 中野愛子, 穂積直裕, 寺内智, 長尾雅行, 吉田祥子, 小林和人, 山本清二, 西條芳文, “音響インピーダンス顕微鏡による培養細胞の定量評価” 電気学会全国大会, 1-124 (3-2008).

- ⑦ 浜川佑也, 穂積直裕, 寺内智, 長尾雅行, 吉田祥子, 小林和人, 山本清二, 西條芳文, “生体組織用音響インピーダンス顕微鏡の較正—食塩水による精度評価—” 電気学会全国大会, 1-125 (3-2008).
- ⑧ 糟谷智美, 穂積直裕, 寺内智, 長尾雅行, 吉田祥子, 小林和人, 山本清二, 西條芳文, “開口合成による3次元超音波顕微鏡の基礎検討” 電気学会全国, 1-126 (3-2008)
- ⑨ 穂積直裕, “パルス静電応力法から医学生物学用超音波顕微鏡ができるまで超音波工学との出会い” 電気電子絶縁材料システムシンポジウム, C-1 (11-2007)
- ⑩ 寺内 智, 村上 義信, 長尾 雅行, 吉田祥子, 小林 和人, 西條 芳文, 穂積 直裕, “生体組織用音響インピーダンス顕微鏡の精度評価 集束角の影響解析” 電気関連学会東海支部連合大会, 0-287 (9-2007)
- ⑪ 中野愛子, 穂積直裕, 寺内智, 長尾雅行, 吉田祥子, 小林和人, 山本清二, 西條芳文, “音響インピーダンス顕微鏡による培養細胞の非接触観察” 電気関連学会東海支部連合大会 0-288 (9-2007)
- ⑫ 木村あゆみ, 寺内智, 正木志保, 村上義信, 長尾雅行, 吉田祥子, 小林和人, 西條芳文, 穂積直裕, “生体用音響インピーダンス顕微鏡における観察用基板表面処理の影響”, 2007年電気学会全国大会 1-136.
- ⑬ 寺内 智, 木村 あゆみ, 村上 義信, 長尾雅行, 吉田 祥子, 小林 和人, 西條 芳文, 穂積 直裕, “生体用音響インピーダンス顕微鏡における観察用基板表面処理の影響”, 2007年電気学会全国大会 1-137.
- ⑭ 木村あゆみ, 寺内智, 正木志保, 村上義信, 長尾雅行, 吉田祥子, 小林和人, 西條芳文, 穂積直裕, “生体用音響インピーダンス顕微鏡における観察用基板表面処理の影響”, 2007年電気学会全国大会 1-136
- ⑮ 寺内 智, 木村 あゆみ, 村上 義信, 長尾雅行, 吉田 祥子, 小林 和人, 西條 芳文, 穂積 直裕, “生体用音響インピーダンス顕微鏡における観察用基板表面処理の影響”, 2007年電気学会全国大会 1-137

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

名称: 被検査物の測定方法、及び被検査物の測定装置

発明者: 穂積直裕, 小林和人

権利者: 国立大学法人豊橋技術科学大学・本多電子株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2005-246895 (P2005-246895)

出願年月日: 平成 17 年 8 月 26 日

国内外の別：国内

名称：音速測定方法、及び音速測定装置
発明者：穂積直裕，小林和人
権利者：国立大学法人豊橋技術科学大学・本
多電子株式会社
種類：特許
番号：特願 2005-246894 (P2005-246894)
出願年月日：平成 17 年 8 月 26 日
国内外の別：国内

名称：音速測定方法、及び音速測定装置
発明者：穂積直裕，小林和人
権利者：国立大学法人豊橋技術科学大学・本
多電子株式会社
種類：特許
番号：特願 2005-97016 (P2005-97016)
出願年月日：平成 17 年 3 月 30 日
国内外の別：国内

名称：超音波検査方法、及び超音波検査装置
発明者：穂積直裕，小林和人
権利者：国立大学法人豊橋技術科学大学・本
多電子株式会社
種類：特許
番号：特願 2004-264712 (P2004-264712)
出願年月日：平成 16 年 9 月 10 日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

穂積直裕 (HOZUMI NAOHIRO)
愛知工業大学・工学部・教授
研究者番号：30314090

(2) 研究分担者

長尾雅行 (MASAYUKI NAGA)
豊橋技術科学大学・工学部・教授
研究者番号：30115612

西條芳文 (YOSHIFUMI SAIJO)
東北大学・医工学研究科・教授
研究者番号：00292277

吉田祥子 (YOSHIDA SACHIKO)
豊橋技術科学大学・工学部・講師
研究者番号：40222393

(3) 連携研究者

小林和人 (KOBAYASHI KAZUTO)
本多電子株式会社・メディカル事業部長

山本清二
浜松医科大学・光量子医学研究センター・
准教授
研究者番号：60144094