

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19300162

研究課題名 (和文) 超音波タグ蛍光断層画像計測・診断装置の開発

研究課題名 (英文) Development of the fluorescence imaging system for medical applications based on the ultrasonic tagging technique

研究代表者

小林 正樹 (KOBAYASHI MASAKI)

東北工業大学・工学部・教授

研究者番号：90332981

研究成果の概要 (和文) : 生体の機能やがんなどの病巣を診断するため、生体内に投与した蛍光ラベル剤からの蛍光を、体外から断層画像計測する技術の研究を行った。蛍光励起のためのレーザー光と同時に超音波を照射し、生体内で発生した蛍光に発生源を知らせる超音波タグ (超音波による光変調) を付加しそれを高感度検出することで、生体内部の蛍光画像情報を得る技術を開発し、深さ 30mm 程度の生体内に局在する蛍光物質の位置を数 mm 程度の分解能で画像化することに成功した。

研究成果の概要 (英文) : Non-invasive imaging technique of fluorescent marker in living body for diagnosis of physiological and pathological condition has been studied. Ultrasonic tagging technique based on the acousto-optic effect has been examined and the tomographic imaging system to determine the localized fluorescent substances at the depth of 30mm has been developed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
総計	9,500,000	2,850,000	12,350,000

研究分野：生体医用光学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：蛍光，超音波，音響光学効果，診断装置，医用画像，センチネルリンパ節

1. 研究開始当初の背景

蛍光ラベルを利用した生体機能や生理作用の高感度リアルタイム計測技術は、生命科学や基礎医学研究において必須のアッセイ技術となっている。とくに近年、蛍光ラベル剤として量子ドットに代表されるような光学特性に優れた材料の開発が進み、これに抗体を修

飾して様々な生理機能の発現を単一分子レベルでトレースしたり、またがん細胞の特異的検知を行ったりする技術、あるいは GFP (緑色蛍光タンパク) 発現遺伝子を導入したトランスジェニック動物を使って遺伝子機能の解析を行う技術などが広く普及している。これは蛍光法のもつリアルタイムでしかも画像情

報として計測が可能であるという大きな特長を生かしたものである。しかしながら実用上その適用が可能な対象は、顕微鏡レベルあるいは試験管内 (in vitro) での生命科学研究に限られている。生理機能や遺伝子機能の観察において、実際にその作用が起こっている「その場」すなわち in vivo での解析を求める要求は大きい。生体組織における光散乱により生体内部で発生した蛍光の画像化はきわめて困難である。生きた状態でしかも非侵襲で観察する技術の実現は、分子生物学などの基礎医学、生命科学研究だけでなく臨床医学における強力な診断ツールを提供することになる。

光による生体機能可視化技術は、その安全性・経済的優位性から、また高齢化・高福祉社会の到来という社会的要請からも、欧米を中心に国内外の多くの研究者、研究機関により盛んに研究され、先端工学研究における重要な一分野として期待されている。

我々の研究グループでは、各種蛍光マーカーやレポーター遺伝子を導入した実験用小動物を用いた生体機能の非侵襲 in vivo 蛍光分析法の開発をめざし、新しい画像計測技術の研究開発を行ってきた。そのための手法として、超音波と光の相互作用を利用した超音波タグ蛍光断層画像計測法を提案し (特開 2006-055396 蛍光断層画像計測装置)、その原理の検証に関する研究を行った結果、散乱媒質中での蛍光断層画像計測に成功し、生体計測への適用が可能であることを示した (Appl. Phys. Lett. 89, 181102 (2006))。このような研究シーズを背景とし、全く新しい画像診断装置の実用開発をめざし、本研究を遂行した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、本手法をヒト生体を対象とした蛍光断層画像計測システム、すなわち臨床用画像診断装置として実用展開するための装置化研究にある。目標としたのは、超音波タグ蛍光断層画像計測法による医用診断装置プロトタイプ機の試作開発であり、そのための目標性能として、生体深部 30mm を解像度 1mm 程度で計測時間 1 分以内での計測時間を設定した。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために「実用化要素技術研究」、「実用システム化研究」の二段階の研究フェーズを設定した。

(1) 実用化要素技術研究

従来の原理検証のための計測実験系では、単一素子固定焦点形超音波トランスデューサを超音波源とし、測定対象物を水中に浸漬して超音波照射を行い、測定試料内部をその水槽と一体化した超音波トランスデューサを機械的に二次元走査することにより画像化を行う方式を採用していた。これに対し、

測定対象を水中に浸漬することなく、測定物表面に接触させて使用することのできる専用プローブの開発を要素技術の課題とした。

同時に固定焦点単一素子型超音波トランスデューサの機械的走査法を、超音波焦点の電子走査が可能な多素子アレイ型超音波トランスデューサに置き換え、超音波タグ蛍光計測系へ適用するためのフェイズドアレイ素子による連続波集束超音波の発生と走査機構の開発、およびそれによる蛍光変調検出法について、以下の内容で検討を行った。

- アレイ型超音波発振素子による連続波による集束超音波発生制御システムの構築と特性評価
- フェイズドアレイ素子による蛍光変調特性計測、シミュレーションおよび画像計測実験による評価

(2) 実用システム化研究

要素技術研究の結果に基づき、あるいはそれと並行して発光受光機能を組み込んだ超音波プローブ、超音波制御-光検波システム、画像処理ソフトウェアの開発からなるシステム化研究を、主に生体を模擬した蛍光物質内在試料を用いて行った。また同時に、不均質な生体試料への適用のためのデータ補正法としてシミュレーションによる蛍光変調メカニズムの検討も行った。これらのシステム化研究の結果を受け、動物組織による実証試験、とくに臨床装置化における初期ターゲットとしての蛍光マーカーによるセンチネルリンパ節検索・イメージング技術への適用試験を行った。

4. 研究成果

(1) 水中計測法による生体組織深部蛍光画像計測

摘出した動物組織に蛍光体を埋め込んで作成した試料を用い、本手法が計測可能な生体内深度についての検討を行った。実験に用いた計測システムを図 1 に示す。測定試料はその中心に蛍光体が包埋されており、これを自動ステージに設置したアクリル製水槽 (幅 150mm, 奥行 200mm) 内に浸漬し、その水槽を二次元走査することにより水槽壁面に取り付けた超音波トランスデューサにより試料内部での焦点位置を走査して画像化を行った。超音波ビームは周波数 1MHz の進行波であり、焦点のビームウエストは約 3mm である。試料として市販のブタモモ肉のほぼ均質な筋肉部を 60×60×80mm に成形したものを用いた。その中央部に蛍光波長 755nm 近赤外蛍光微粒子をゲル化成形した直径 3mm 高さ 5mm の円柱形蛍光体を埋め込んだ。光源には波長 726nm の Ti:Sapphire レーザーを用いた。図 2 は試料中心部を 20×36 mm の範囲で 1mm の分解能で計測した断層画像を示したものである。画像中央部に蛍光ピークが検出され、実際に測

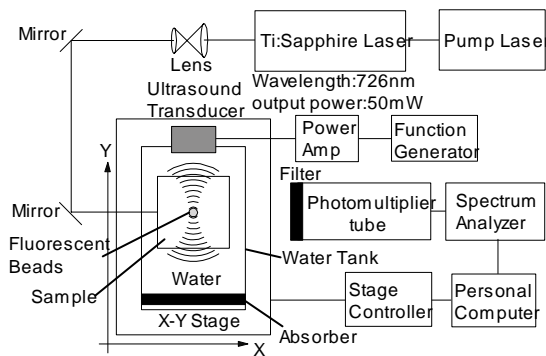


図1 水中測定用超音波タグ蛍光画像計測システムのブロック図

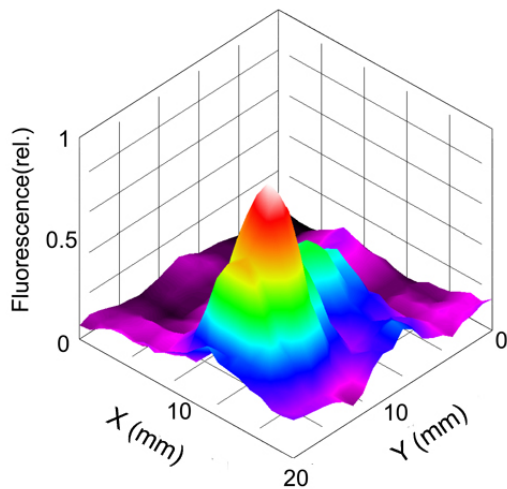


図2 ブタモモ肉深さ 30mm に埋設した蛍光体の蛍光断層画像

定後に試料を切断して内部を観察したところ、蛍光体位置と信号ピーク位置の一致を確認した。ピーク幅から、焦点サイズ程度の分解能でその位置が検出できることが明らかとなった。

(2) フェイズドアレイ素子を用いた超音波タグ蛍光変調法の検討

一次元アレイ超音波トランスデューサを用い、アレイ素子間の位相制御により形成された超音波焦点による蛍光変調、蛍光画像計測に関する検討を行った。

フェイズドアレイ法とは、圧電振動子を多数配列したアレイプローブを用いて、各振動子への励振波に各々異なる位相差を与え、素子間の超音波干渉により集束音場を形成し、さらにその位相差を制御することで焦点を電子的に走査する方法である。本研究では64素子アレイを用い、蛍光強度変調を行うため、連続波駆動により焦点形成することのできる64素子独立位相制御遅延回路、増幅回路を新たに設計し試作した。試作したフェイズドアレイ超音波トランスデューサ駆動シス

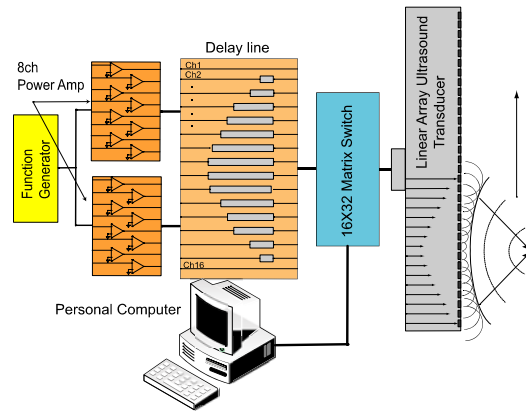


図3 フェイズドアレイ素子による連続波位相制御システムのブロック図

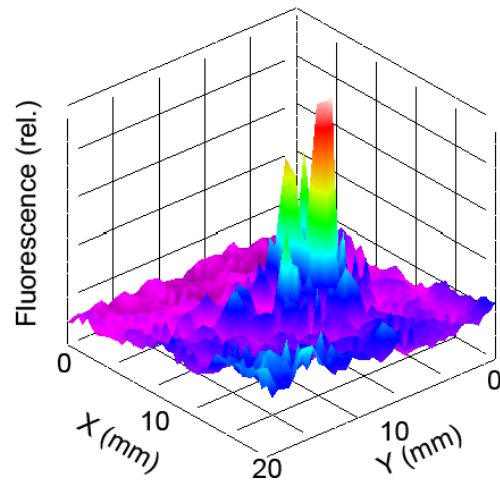


図4 フェイズドアレイ素子を用いて計測した散乱媒質内蛍光変調画像

テムのブロック図を図3に示す。これを図1に示した水中測定用超音波タグ蛍光画像計測システムの固定焦点単一素子型超音波トランスデューサと置き換え、連続波による音場焦点の形成とその走査機能評価、および蛍光変調計測の実験を行った。

本システムでは共振周波数 5MHz、素子間ピッチ 0.6mm (高さ 10mm) の 64 チャンネル一次元アレイ型超音波トランスデューサを用いた。連続波位相制御には、64 チャンネル遅延回路とアナログフィルターを用い、64 チャンネル独立アンプシステム (入力電圧 1.2Vp-p, ゲイン 20dB) を設計し、蛍光変調専用フェイズドアレイ超音波トランスデューサ駆動システムを試作した。また音場焦点の電子走査を行うため、16ch の素子を1ブロックとし、アンプ出力を結合する超音波素子を順次切り替えを行うようマトリクススイッチング装置をトランスデューサ各素子とアンプ出力の間に配置した。各素子の位相条件は、焦点距離が 40mm となるよう設定した。

実際にハイドロフォンを用いて音圧分布を測定したところ、焦点距離は 38mm であり、

ほぼ設計値に近い結果となった。音場焦点でのY軸方向の半値幅は約25mm, X方向の半値全幅は2mmであり, フェイズドアレイ音場シミュレーションによる設計値とほぼ一致した。

図4はイントラリピッド光散乱媒質中に蛍光体を設置し, 蛍光断層画像計測を行った結果である。ほぼ蛍光体サイズと同程度の蛍光変調信号のピークを確認することができた。しかしながら, ピークが得られた位置はX軸方向においては蛍光体の位置と一致したものの, 超音波ビーム伝搬方向であるY軸方向では焦点位置よりトランスデューサ側に近い位置に現れ, またいくつかのピークからなるピーク群として観測された。その原因としては, 実験では16素子により焦点形成を行ったが, 有限個数の超音波発振素子からの超音波干渉による音場の連続性が不十分であり, 水中での音圧パターンとしては集束形状となるものの, 個々の素子からの超音波がそれぞれ光変調に影響を及ぼしたため, このような現象が起こったものと推察された。これは凹面形状単一素子による蛍光変調では見られないことから, アレイ素子数を増やすか, または画像処理による位置補正法の検討が求められる。

(3) 蛍光超音波タグ計測用プローブの開発

被測定物に接触させて計測する超音波タグ蛍光計測用プローブの開発を行った。従来法では, 生体試料と超音波源とのインピーダンス整合のため超音波トランスデューサが壁面に固定された水槽中に測定試料を入れ, 水中で蛍光計測を行った。これに対して, 超音波診断用ゲルにより生体と結合する, 蛍光変調超音波プローブ装置の開発を行った。超音波源には固定焦点型単一素子超音波トランスデューサを用いた。図5に試作した超音波タグ蛍光計測用プローブおよび測定対象

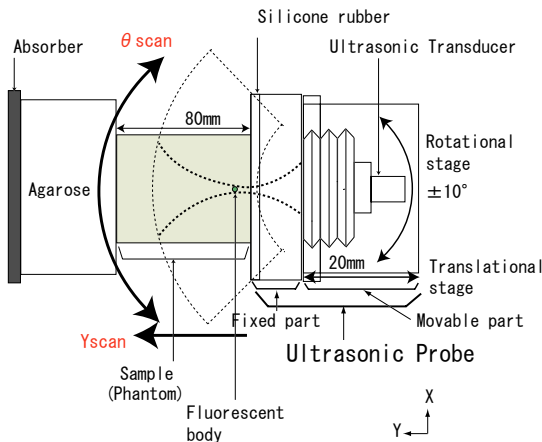


図5 固定焦点型超音波トランスデューサを用いた超音波タグ蛍光検出用プローブの模式図

を含め上から見た模式図を示す。プローブ本体は測定対象と接触する固定部分と超音波トランスデューサを取り付けた可動部分から構成され, 超音波診断用ゲルで内部を充填した。測定対象との接触面にはシリコンシートを用いた。超音波トランスデューサは1軸並進ステージ(Y-scan)と回転ステージ(θ-scan)に装着しており, 並進動作では可動プローブ部分全体が, 回転動作では超音波プローブを固定したステージ部分が回転することで扇状に超音波焦点の走査を行うことができる構成とした。最大可動範囲はY方向20mm, 回転範囲 $\pm 10^\circ$ とした。

試作したプローブを, 図1に示した計測実験系内に配置し計測システムを構築した。従来法との比較実験のため, 光軸を超音波伝搬方向と直交する配置とし, ステージ上に設置した生体模擬試料に入射させた。超音波焦点におけるビーム幅は4mm, 焦点距離は41mmである。試作プローブの蛍光検出性能の比較を行うため, 光散乱体を混入したアガロースゲル内部に蛍光体を封入した厚さ60mmの生体模擬試料を用いて画像計測実験を行った。蛍光体(蛍光波長755nm)は生体模擬試料へのレーザー光入射点から深さ30mmの位置に埋め込んだ。

アガロースゲル生体模擬試料での蛍光断層画像の計測結果を, 従来法で得られた結果と比較した結果, 信号強度, X方向解像度どちらにおいてもほぼ同等の性能であることが確認された。図6は, 厚さ60mmのブタモモ肉の中央部に蛍光体を埋め込んだ試料によって計測された蛍光断層画像である。走査範囲はθ方向に $\pm 10^\circ$, Y軸方向に10mmであり走査分解能をそれぞれ, 0.5° , 0.5mm とした。蛍光体埋め込み位置と一致する蛍光信号ピークが得られた。X方向の半値幅は約3.5mmであり, 超音波ビーム焦点径とほぼ一致した。図中のY軸数値は使用した超音波トランスデ

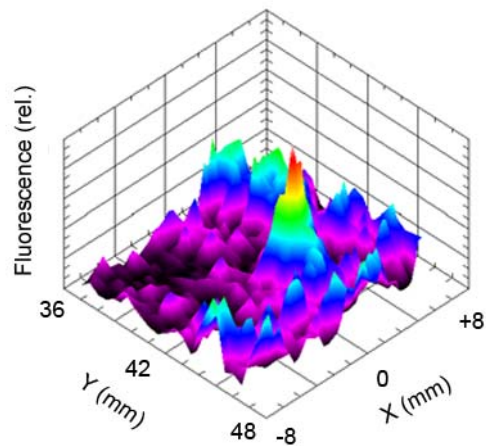


図6 試作プローブを用いて計測したブタモモ肉内30mm深度の蛍光体画像

ューサからの距離を示すが、信号ピーク位置はその焦点距離と一致した。

(4) まとめと今後の課題

本研究は、生体内に投与した各種蛍光ラベル剤からの蛍光分布を断層画像として計測することにより、生体生理機能やがんなどの病巣を非侵襲診断することのできる超音波タグ蛍光断層画像計測技術の開発を目的として実施された。平成 19 年度では、本手法による蛍光検出可能到達深度について、実際の生体試料を用いた実験を行い、近赤外光励起一蛍光検出により深さ 30mm にある直径 3mm の蛍光体を数 mm の分解能で検出することが可能であることを実験的に示した。

平成 20 年度には、本手法をアレイ型超音波発振素子を用いて実現するため、コンピュータシミュレーションに基づいたフォーカススキニング駆動制御回路およびソフトウェアの設計を行い、超音波タグ蛍光検出用プローブ駆動装置として試作した。蛍光変調画像計測実験の結果、液体散乱媒質内に設置した直径 3mm の蛍光体試料を画像計測することができた。アレイ素子の位相制御により形成した超音波焦点での蛍光変調、およびその画像化実験の結果から、電子走査化への課題を抽出した。これらの結果を踏まえ平成 21 年度は、固定焦点形素子による機械走査法に基づいて、専用プローブを直接被対象物に接触させて使用することのできるプローブ機構を設計し、その試作と実験による検討を行った。生体模擬試料による計測実験を行った結果、測定対象物がヒトのように大型であっても、そのサイズによらず接触させて使用することができることを確認し、生体内蛍光画像計測用音響光学プローブとして診断装置に利用可能な性能を有するものと判断された。これをプロトタイプ機とし、今後は臨床装置としてのターゲットであるセンチネルリンパ節蛍光断層画像計測装置として、ヒトに適用するための臨床試験に向け、大型動物による実験および装置改良を行っていく予定である。

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 8 件)

- ① Nano-imaging of the lymph network structure with quantum dots, M. Hikage, K. Gonda, M. Takeda, T. Kamei, M. Kobayashi, M. Kumasaka, M. Watanabe, S. Satomi, N. Ohuchi, *Nanotechnology* (査読有) Vol. 21, 185103 (2010)
- ② Imaging of Ultraweak Spontaneous Photon Emission from Human Body

Displaying Diurnal Rhythm, M. Kobayashi, D. Kikuchi, H. Okamura, *PLoS ONE* (査読有) Vol. 4, e6256 (2009)

- ③ 超音波変調による生体蛍光イメージング, 小林正樹, *光学* (査読無), Vol. 38, pp. 316-321 (2009)
- ④ In vivo single molecular imaging and sentinel node navigation by nanotechnology for molecular targeting drug-delivery systems and tailor-made medicine, M. Takeda, H. Tada, H. Higuchi, Y. Kobayashi, M. Kobayashi, Y. Sakurai, T. Ishida, N. Ohuchi, *Breast Cancer* (査読有), Vol. 15, pp. 145-152 (2008)
- ⑤ 生命科学・医学応用のための極微弱発光・蛍光イメージング技術, 小林正樹, *顕微鏡* (査読無), Vol. 43, pp. 202-206 (2008)
- ⑥ Fluorescence tomography of biological tissue based on ultrasound tagging technique, M. Kobayashi, T. Mizumoto, T. Q. Duc, M. Takeda, *Proc. SPIE 6633* (査読有), pp. 663306-1-5 (2007)
- ⑦ Spontaneous ultraweak photon emission during the growth of the cell population of cultured HeLa cell line, J. Kim, Y. Kim, Y. J. Lee, M. Kobayashi, Y. Tsutsumi, R. Kondo, S. K. Lee, K. S. Soh, *J. Health Sci.* (査読有) Vol. 53, pp. 481-485 (2007)
- ⑧ Highly sensitive determination of transient generation of biophotons during hypersensitive response to cucumber mosaic virus in cowpea, M. Kobayashi, K. Sasaki, M. Enomoto, Y. Ehara, *J. Exp. Botany* (査読有) Vol. 58, pp. 465-472 (2007)

[学会発表] (計 10 件)

- ① Q. D. Trinh, Y. Nanbu, T. Suzuki, S. Takahashi, M. Takeda, M. Kobayashi: Fluorescence tomography based-on acousto-optic modulations with phased-array ultrasound transducer. BiOS Part of SPIE Photonic West, paper No. 7177-57 (San Jose, USA) (January 27, 2009)
- ② M. Hikage, M. Takeda, T. Kamei, M. Kobayashi, K. Gonda, M. Kumasaka, T. Nakano, Y. Sakurai, M. Kawai, C. Li-man, Y. Hamanaka, Y. Hamada, S. Satomi, N. Ohuchi: Basic examination of the endoscopic surgery using nanoparticle tracer. 2nd International Symposium on Nanomedicine 2009 (Okazaki, Japan) (February 6, 2009)

- ③ Q. D. Trinh, Y. Nanbu, T. Suzuki, S. Takahashi, M. Takeda, M. Kobayashi: Basic study on application of the phased-array transducer to determine fluorescence in turbid media based on acousto-optic effects. International Conference on Laser Applications in Life Sciences (LALS 2008), Abstract book p. 7 (Taipei, Taiwan) (December 4, 2008)
- ④ M. Hikage, M. Takeda, T. Kamei, M. Kobayashi, K. Gonda, M. Kumasaka, T. Nakano, Y. Sakurai, M. Kawai, C. Li-man, Y. Hamanaka, Y. Hamada, S. Satomi, N. Ohuchi: Basic examination of the fluorescent endoscopic surgery using nanoparticle tracer. 11th World Congress of Endoscopic Surgery (Yokohama, Japan) (September 5, 2008)
- ⑤ 熊坂増高, 日景允, 亀井尚, 武田元博, 大内憲明, 小林正樹: ナノ蛍光微粒子によるセンチネルリンパ節検索のための腹腔内視鏡蛍光イメージングシステムの開発. 平成 20 年度電気関係学会東北支部連合大会, 講演番号 2E15, 講演論文集 p. 184 (郡山) (2008 年 8 月 22 日)
- ⑥ 南部雄也, 鈴木知佳, 高橋誠樹, Trinh Quang Duc, 小林正樹: 超音波タグ蛍光断層イメージング法による生体組織の蛍光断層画像計測. 平成 20 年度電気関係学会東北支部連合大会, 講演番号 2E14, 講演論文集 p. 183 (郡山) (2008 年 8 月 22 日)
- ⑦ 武田元博, 樋口秀男, 小林正樹, 小林芳男, 大内憲明: 機能性ナノ粒子によるナノからマクロレベルの生体イメージング. 第 55 回応用物理学関係連合講演会 (日本大学・船橋) (2008 年 3 月 29 日)
- ⑧ Q. D. Trinh, T. Mizumoto, Y. Nanbu, M. Takeda, M. Kobayashi: Tomographic Imaging of Fluorophore Embedded in Biological Tissue Based on Ultrasound Tagging Technique. The 7th Pacific Rim Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO), Abstract pp. 1193-1194 (Seoul, Korea) (August 30, 2007)
- ⑨ M. Kobayashi, T. Mizumoto, T. Q. Duc, M. Takeda: Fluorescence Tomography of Biological Tissue Based on Ultrasound Tagging Technique. European conferences on Biomedical Optics/ in 18th International Congress on Photonics in Europe (Munich, Germany) (June 18, 2007)
- ⑩ 水本喬, Trinh Quang Duc, 武田元博, 小林正樹: 音響光学効果を利用した超音

波タグ生体蛍光断層イメージング I. 第 54 回応用物理学関係連合講演会講演予稿集, 講演番号 28a-R-5, p.1087 (青山学院大学・相模原) (2007 年 3 月 28 日)

〔図書〕 (計 2 件)

- ① 武田元博, 小林芳男, 小林正樹, 桜井遊, 甘利正和, 石田孝宣, 鈴木昭彦, 大内憲明: 機能性ナノ粒子による生体イメージングーがん診療への応用ー. ナノメディシン ナノテクの医療応用 (宇理須恒雄編) pp. 64-74, オーム社 (2008)
- ② 小林正樹: 量子ドットを用いた生体機能非侵襲計測のための蛍光画像計測技術の開発. 量子ドットの生命科学領域への応用 (山本重夫監修), pp. 231-239, シーエムシー出版 (2007)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称: 蛍光断層画像計測装置

発明者: 小林正樹

権利者: 小林正樹, (株) システム計測

種類: 特許

番号: 特許第 4 5 1 8 5 4 9

取得年月日: 平成 22 年 5 月 28 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

http://www.tohtech.ac.jp/~elecs/ca/kobayashilab_hp/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 正樹 (KOBAYASHI MASAKI)

東北工業大学・工学部・教授

研究者番号: 9 0 3 3 2 9 8 1

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

武田 元博 (TAKEDA MOTOHIRO)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 1 0 3 3 3 8 0 8

榎本 幹 (ENOMOTO MASARU)

東北工業大学・工学部・教授

研究者番号: 1 0 0 8 5 3 9 2

(平成 19~20 年)