

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19700384

研究課題名（和文） 生体内超音波干渉を利用した深組織光イメージング

研究課題名（英文） Deep-tissue optical imaging using ultrasonic interference

研究代表者

山岡 禎久（YAMAOKA YOSHIHISA）

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：80405274

研究成果の概要：生体深部組織の視感度（visibility）向上のために、光と超音波の特徴を利用した新しいイメージング技術を提案した。この方法は、光の高コントラスト特性、高空間分解特性と、超音波の生体内長距離伝播特性、生体内屈折率平滑化とにより可能となる。光の生体ダミーとラット腸間膜血管を用いた実験結果から、従来法に比べて生体深部における深さ方向 visibility 向上が可能であることが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：総合領域

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：生体光計測、レーザ顕微鏡、深部イメージング、血管イメージング、超音波干渉、多光子顕微鏡、光散乱

1. 研究開始当初の背景

現在、CT、MRI、超音波エコーに代表されるような生体イメージング装置は、現在の医療においてよく利用されているが、その分解能はサブミリメートルであり、生体内の数十マイクロメートルの微小な構造を見ることは非常に難しい。例えば、再生医療のような研究分野において、臓器の再生は血管新生等によって評価されるが、現時点では、生体深部の毛細血管を詳細に見る方法が無いのが現状であり、生体深部を高空間分解にイメージングする方法が切望されている。

このことに対して、光はエックス線や超音波などに比べてコントラストを付けやすく、また光学顕微鏡に代表されるように非常に空間分解能の高い測定ができるので注目されている。例えば、光コヒーレンストモグラフィ（Optical Coherence Tomography）[1]などは光を使った高分解能深組織イメージング法として注目されている。しかしながら、光にとって生体は散乱の大きい物質であるので、散乱を避ける努力をしなければならぬ。共焦点光学系に代表されるような空間フィルタリング[2]、時間や周波数フィルタリング[3]による散乱光の除去などの改良がなさ

れているが、生体深部まで高分解能で測定するには至っていないのが現状である。

このような現状の問題点を解決するために、本研究において超音波と光の利点を活かした生体深部を観察するための新しい光計測技術を提案する。超音波は生体内を長距離、減衰することなく伝播する能力を有する。また、光は高いコントラスト能、高空間分解能を持つ計測を可能とする。これらの2つの特徴を組み合わせれば、生体深部観察を高いvisibilityを伴って行うことができるのではないかと考えた。本研究では、超音波と光とを組み合わせた計測方法として、2つの提案を行った。(1)超音波を用いた生体内屈折率平滑化による生体深部光イメージングと(2)光励起による生体深部超音波イメージングである。

- [1] J. G. Fujimoto, Nature Biotech. 21, 1361-1367 (2003).
- [2] F. M. Xu et al., Opt. Lett., 24, 1808-1810 (1999).
- [3] J. F. de Boer et al., Opt. Lett., 28, 2067-2069 (2003).

2. 研究の目的

本研究の目的は、今回提案している超音波と光の利点を活かした新しいイメージング技術により、生体深部の構造を高いvisibility、高空間分解能で観察することが可能かどうかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 超音波を用いた生体内屈折率平滑化による生体深部光イメージング

測定原理を図1に示す。図1(a)は通常の光を生体に集光した場合、図1(b)は超音波を生体内におこさせた場合を示している。生体は光にとって散乱体として働くが、生体内に振動を起こさせることにより、生体内屈折率分布を平滑化し、散乱の効果を抑えた計測が可能ではないかと考えた。この方法を使うと、様々な光計測法での深組織画像のvisibilityの向上を期待できると予想される。このように、超音波を利用することにより、様々な深さでの2D組織画像がvisibilityの向上した状態で測定でき、詳細な3D組織像構築ができる。

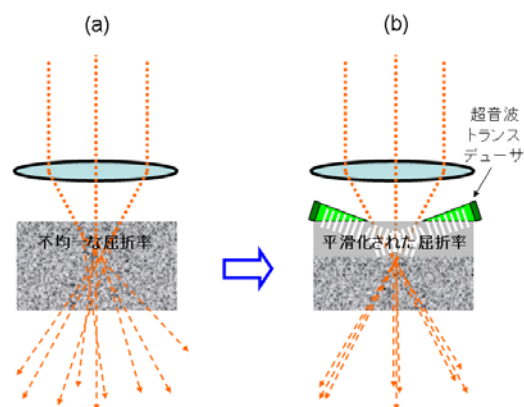


図1 超音波を用いた生体内屈折率平滑化による生体深部光イメージングの原理

具体的実験の方法としては、超音波を用いた屈折率平滑化効果により、光イメージングのvisibilityをどの程度向上させることができるのかを、屈折率の平滑化のある場合とない場合で比較する。また、様々な生体試料、様々な光イメージング手法に対して、パラメータの最適化、及び指標化を行う。

(2) 光励起による生体深部超音波イメージング

測定原理を図2に示す。まず、ピークパワーの高いパルスレーザー（ナノ秒パルスレーザー）を生体内に集光照射する。焦点付近に吸収物質があった場合、生体内で多光子吸収が起こり、熱弾性膨張により超音波が発生する。レーザーを3次元にスキャンすることにより、生体内の吸収量による3次元イメージングが可能になる。この方法は、通常の光イメージングに比べて、光伝播は観察面までの片道しか必要なく、光散乱の影響を抑えることによる深部のイメージングが可能となる(図3)。

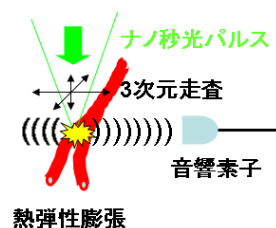


図2 光励起による生体深部超音波イメージングの原理

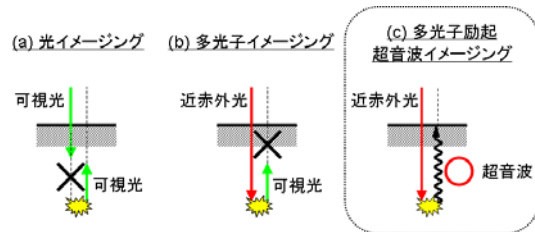


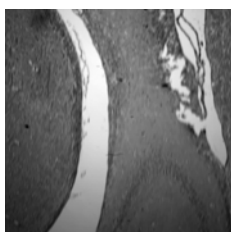
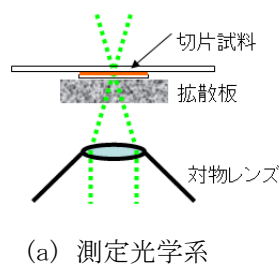
図 3 多光子励起超音波イメージングと光イメージングとの比較

具体的実験方法として、最初に多光子励起により超音波が発生することを、発生する超音波強度の光強度依存性等を用いて確認する。その後、多光子励起による超音波発生を用いて、生体ダミーを3次元走査し、正確にその構造を捉えられているかどうかを調べる。また、その際、深さ分解能を見積もり、実際に理論に従い、分解能の向上が観察されたかどうかを明らかにする。その後、実際の生体を用いて、生体内の構造、特に血管に着目し3次元像が構築できるかどうかについて調べる。

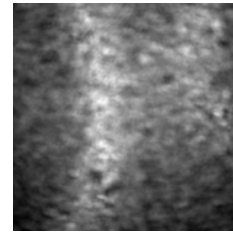
4. 研究成果

(1) 超音波を用いた生体内屈折率平滑化による生体深部光イメージング

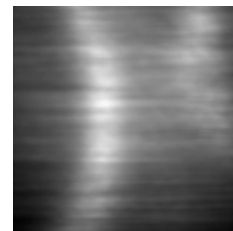
図4はラットの脳切片を切り出し、対物レンズと切片試料との間に生体のダミーとして拡散板を挿入して透過像を測定した結果を示している。図4(b)は測定したい画像を示しており、拡散板を対物レンズと試料の間に挟むと光の散乱により visibility が落ちる(図4(c))。しかしながら、拡散板を揺らすと図4(d)で示されるように visibility の向上が見られることが明らかとなった。



(b) 透過像



(c) 拡散板を挟んだ場合



(d) 拡散板を約 2Hz で動かした場合

図 4 拡散板を揺らすことによる視感度 (visibility) の向上

(2) 光励起による生体深部超音波イメージング

1064nm と 532nm のナノ秒パルスレーザを用いて、ローダミンB/クロロホルム溶液で満たした内径約 1mm のガラスキャピラリーの断面イメージングを行った。図5(a)は光パルスの強度を変化させて断面の測定を行った結果を表している。ローダミンBの吸収は530nm 近傍にあるので、1064nm の光パルスを用いた場合は2光子吸収、532nm の光パルスを用いた場合は1光子吸収が起こると予想される。この結果からわかるように、2光子励起により発生する超音波を利用した場合は、1光子を利用した場合に比べて、光軸方向(z方向)の visibility が向上していることが明らかとなった。また、発生する超音波の光強度依存性を測定すると、532nm は光強度に比例し、1064nm の場合は光強度の2乗に比例する(図5(b))。このことは発生する超音波が2光子吸収により発生していることを意味する。すなわち、2光子励起により超音波が発生し、それを用いてイメージングを行うことにより深さ分解能が向上することがわかった。さらに理論的考察から導かれる分解能の向上が実験結果と一致していることを確認した。また、通常の光イメージングで得られる深さ方向の断面像(1光子顕微鏡、2光子顕微鏡)との比較において、本提案方法では深い層までイメージング可能であることを示した(図6)。

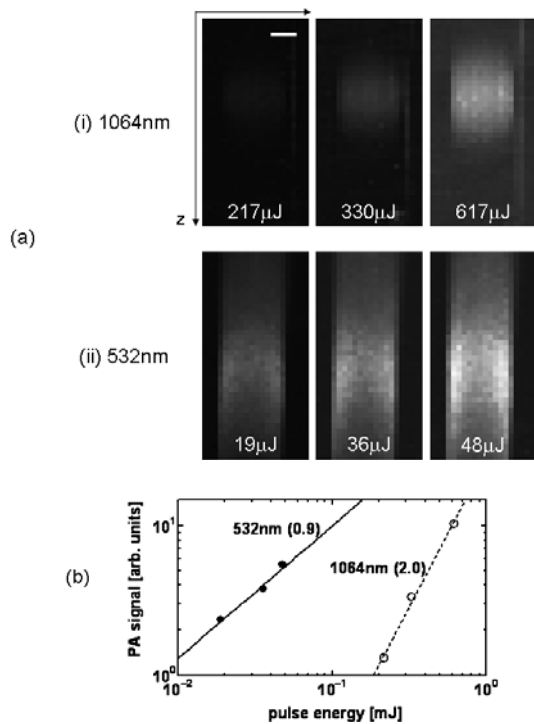


図5 (a) 1064nmと532nmのナノ秒光パルスを用いて得られたローダミンB/クロロホルムで満たされたガラスキャピラリーの断面(入射光強度依存性) (b) 発生する超音波の励起パルスエネルギー依存性

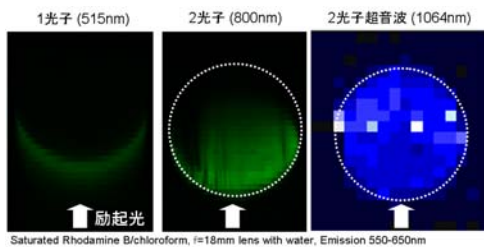


図6 1光子、2光子顕微鏡と2光子励起による超音波イメージングとの比較

さらに、散乱体中のローダミンB/クロロホルムで満たされたガラスキャピラリーの断面イメージングを、1光子励起と2光子励起の場合で比較した(図7)。散乱体としては、イントラリピッド水溶液(0.13%)を用いた。レンズの焦点距離は18mmのものを用い、およそ18mmの深さにあるガラスキャピラリーの断面のイメージングを行った。結果は、1光子励起では観察することができないキャピラリーの断面を、2光子励起を用いると観察できることがわかった。このことから、2光子励起による超音波イメージングは深さ分解能を向上し、生体深部のイメージングに適していることが明らかとなった。

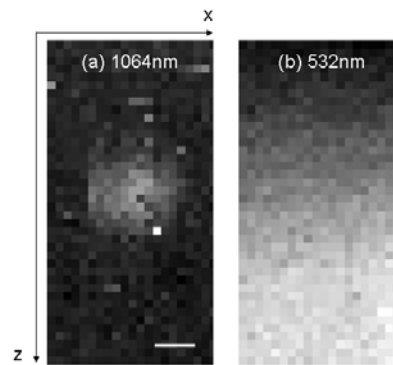


図7 イントラリピッド水溶液の中に入れたガラスキャピラリー断面像の比較

また、1064nmのナノ秒光パルスを照射したときに、ローダミンB水溶液で内空を満たしたガラスチューブとローダミンBと金ナノ粒子を混合した溶液で満たしたガラスチューブから発生する超音波の信号強度を比較した。その結果として、金ナノ粒子を混合した場合に信号は増強されることがわかった。また、金ナノ粒子をラット腸間膜の血管に入れ、多光子励起による超音波イメージングを行った場合に、血管の断面が正確に捉えられていることがわかった(図8)。これらのことから、金ナノ粒子は信号の増強効果を起こし、多光子励起による超音波イメージングのvisibilityの向上を助けることが明らかとなった。

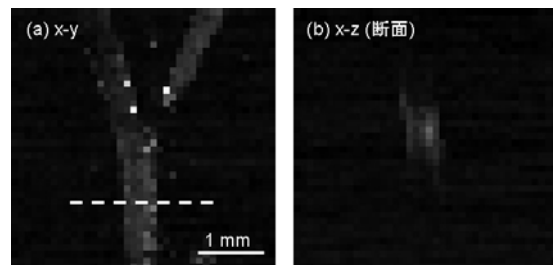


図8 金ナノ粒子を用いた多光子励起光音響による腸間膜血管イメージング(a: XY平面、b:点線部分のXZ断面)

以上の結果より、本課題で提案している光技術と超音波技術の融合により、生体深部のイメージングを高空間分解能で行うことが可能であることが示された。

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4件)

① Yamaoka Y, Takamatsu T,

Enhancement of multiphoton excitation-induced photoacoustic signals by using gold nanoparticles surrounded by fluorescent dyes, Proc. SPIE 7177, 71772A-1 – 71772A-9, 2009. 査読有.

- ② Nakano K, Harada Y, Yamaoka Y, Miyawaki K, Wakabayashi N, Mitsufuji S, Imaizumi K, Takaoka H, Nakaoka M, Takamatsu T, Mucosal layer as major source of green autofluorescence in the colon under excitation by blue light, Proc. SPIE 6853, 68531H-1 – 68531H-6, 2008. 査読有.
- ③ Ishii K, Yamaoka Y, Kushibiki T, Awazu K, Report of European Conference on Biomedical Optics 2007, The reviews of Laser Engineering 35, 602–605, 2007. 査読無.
- ④ Yamaoka Y, Fujiwara K, Takamatsu T, Improvement of depth resolution on photoacoustic imaging using multiphoton absorption, Proc. SPIE 6631, 663102-1 – 663102-9, 2007. 査読有.

[学会発表] (計 6 件)

- ① Yamaoka Y, Takamatsu T, Enhancement of multiphoton excitation-induced photoacoustic signals by using gold nanoparticles surrounded by fluorescent dyes, Photonics West 2009, 2009年1月26日, サンノゼ.
- ② 原田義規、中野圭明、山岡禎久、高松哲郎、ラット大腸自家蛍光発生機序の解析, 第49回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 2008年10月6日, 長崎.
- ③ 山岡禎久、今泉克一、原田義規、高松哲郎、FLIMを用いた生体機能解析, 第49回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 2008年10月6日, 長崎.
- ④ 原田義規、中野圭明、山岡禎久、宮脇喜一郎、今泉克一、高岡秀行、中岡正哉、高松哲郎、ラット正常大腸自家蛍光特性の解析, 第97回日本病理学会総会, 2008年5月16日, 金沢.
- ⑤ Harada Y, Nakano K, Yamaoka Y, Miyawaki K, Imaizumi K, Takaoka H, Nakaoka M, Takamatsu T, Analysis of the origin of autofluorescence in the rat colon by using combined SHG and two-photon microscopy, Focus on Microscopy 2008, 2008年4月15日, 淡路.

- ⑥ Yamaoka Y, Fujiwara K, Takamatsu T, Improvement of depth resolution on photoacoustic imaging using multiphoton absorption, European Conference on Biomedical Optics 2007, 2007年6月17日, ミュンヘン.

[図書] (計 1 件)

- ① 山岡禎久 (分担執筆), エヌ・ティー・エス (株), ナノイメージング (第1章、第1節), 2008年6月6日, pp.10–17.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

- ① 名称: 診断支援装置
発明者: 高松哲郎、山岡禎久、今泉克一
権利者: オリンパスメディカルシステムズ株式会社
種類: 特許
番号: 特願 2009–85569
出願年月日: 2009年3月31日
国内外の別: 国内
- ② 名称: 光音響断層撮影装置及び光音響断層撮影方法
発明者: 高松哲郎、山岡禎久
権利者: 関西 T L O 株式会社
種類: 特許
番号: 特願 2007-556801
出願年月日: 2007年1月31日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山岡 禎久 (YAMAOKA YOSHIHISA)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号: 80405274