

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21360200

研究課題名（和文）

生物用高分解能 2 次元 3 次元複合音響インピーダンス顕微鏡の開発

研究課題名（英文） Development of high-resolution 2D-3D hybrid acoustic impedance microscope for biological use

研究代表者

穂積 直裕 (HOZUMI NAOHIRO)

豊橋技術科学大学・工学教育国際協力研究センター・教授

研究者番号：30314090

研究成果の概要（和文）：

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た。ラットの脳腫瘍モデルを観察した結果をもとに、腫瘍部における音響物性のばらつきを画像化して、腫瘍をハイライトすることに成功した。培養したグリオーマ細胞に抗癌剤を投与し、細胞の形態変化を追跡した。さらに、細胞や腫瘍組織の 3 次元画像と、断面の音響インピーダンス画像を同時に取得することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

We proposed a new ultrasonic microscope for medical and biological use. The target is placed on a plastic substrate, and ultrasonic signal is transmitted and received across the substrate. In this phase of research, we improved spatial resolution, and observed brain tumor model and cultured glioma cells. As for brain tumor tissue, we succeeded in highlighting the tumor by quantifying "local roughness of acoustic impedance". As for cell size observation, we succeeded in observing morphological change of glioma cells after being exposed to anticancer agent. Finally, we succeeded in three dimensional observation of tumor and cultured cells simultaneously with the observation of cross sectional acoustic impedance image.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2010 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

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

研究代表者らは広帯域パルス超音波計測技術を背景に、生物研究や手術中迅速組織診断に応用を目的とした生体組織用超音波顕微鏡の開発を進めてきた。2008 年度までに、

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)で微細構造の観察ができる観察システムとして、「音響インピーダンス顕微鏡」をはじめ提案し、基礎技術開発を行った。

一連の研究成果として提案した手法の一部については、すでに臨床応用に耐えるレベルの装置の実用化を果たし、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変化を定量的に捉えることに成功している。

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、*in vivo* 状態で細胞の内部構造レベルの分解能をもつシステムに対する要望が強いことが判った。特に、従来から行われている病理検査の時間短縮の方法論として超音波顕微鏡を適用する場合、光学顕微鏡を凌駕する程度の空間分解能が必要とされる。また、ベッドサイドでリアルタイム組織観察を行う手段として用いた場合、2次元顕微画像が得られたとして、異常部位がどの程度奥まで広がっているかを推定できる3次元情報を併せて取得できる方法論に対しては要望が多かった。

## 2. 研究の目的

本研究では現在の音響インピーダンス顕微鏡の空間分解能を向上させ、実際に生体組織や細胞の観察を行う。病変組織の識別可能性や投薬効果の評価など、医学生物学的応用展開について検討する。また、3次元形態観察を併用したシステムとする。

## 3. 研究の方法

音響インピーダンス顕微鏡と較正の概念図を図 3-1 に示す。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射出する。基板表面には生体組織が密着しており、界面での反射を同一の振動子で受波する。参照波と比較することにより、組織の局所特性音響インピーダンスを算出し、振動子を2次元走査することにより顕微画像を得る。時間軸上の情報を加えることにより、基板に近い領域であれば3次元形状を観察することも可能である。

サンプリング周波数 8 ギガサンプル/秒の A/D コンバーター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。取得した信号全てを A/D コンバータ内のメモリに格納して一回で転送することにより、これまで観察速度を律速していたデータ転送の問題を解決し、1枚の画像が 30 秒程度で取得できるレベルの高速観察を実現した。中心周波数 120 MHz を有するものと、同 300 MHz を有するものを使用し、組織レベルから細胞レベルの観察を可能とした。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る。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とする。

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。

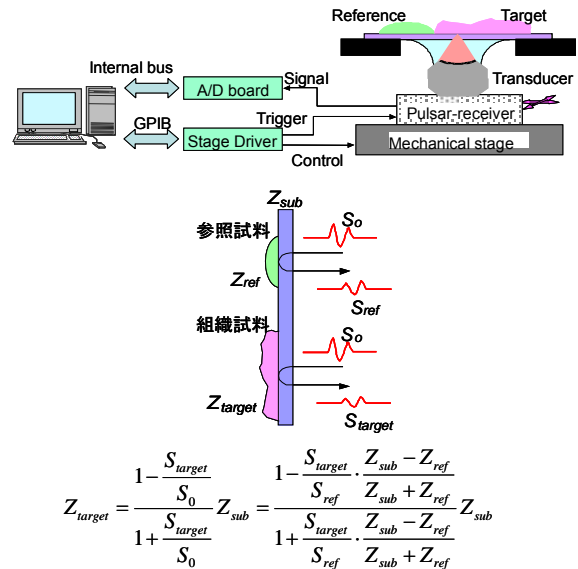


図 3-1 音響インピーダンス顕微鏡と較正の概念図。

## 4. 研究成果

### (1) 高分解能化と高精度化

音響インピーダンス顕微鏡では、平面波ではなく集束させたビームを使用する。そのため異なる角度で入射した音波は、基板表面で屈折し、入射角によって異なる透過率と反射率で振動子に戻るとともに、角度によって中心軸から外れたところで焦点を結ぶ。さらに、反射面への往復時間も入射角によって異なる。高分解能化にあたって集束角を大きくすると、見かけの反射係数の角度依存性および、平面・時間方向の収差が無視できなくなる。

この収差を補正できれば、空間分解能をさらに向上させることが可能となる。そこで、系の3次元インパルス応答、すなわち、振動子の各点から同時に発せられた音波が振動子に戻るときの時間遅れ分布と反射面の音場分布を計算した。実際にビーム走査で得られたデータと、系のインパルス応答の計算結果をもとに、3次元逆畳み込み処理を行い、音響インピーダンス画像を高精細化するアルゴリズムを作成した。これにより収差が補

正されるので、音響インピーダンスの測定精度も向上する。実際に脳組織の形態と音響インピーダンス分布を測定観察するとともに、高精細化の効果を評価した。実際にラットの小脳組織を観察し、その効果を確認した。

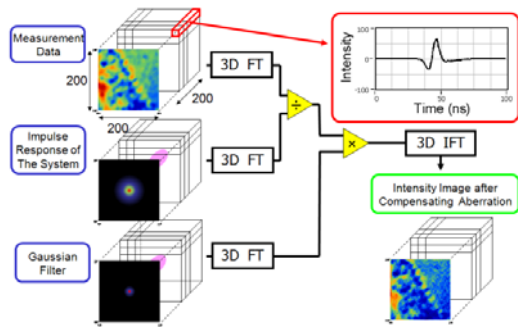


図 4-1 ソフトウェアによる空間分解能の向上。

細胞観察に関しては、中心周波数 300 MHz の振動子を使用して使用周波数帯域を高くするとともに、基板として厚さ 80  $\mu\text{m}$  程度のフィルムを使用することによって短い焦点距離に対応できるようにし、観察の空間分解能を向上させた。ラット小脳由来のグリア細胞をフィルム上に培養し、音響インピーダンス像を取得した。細胞の内部構造、すなわち細胞骨格、核、細胞質などを観察できることが判った。

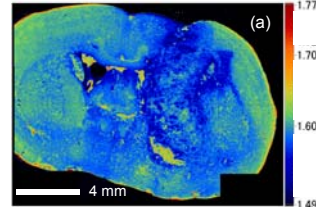
## (2) 腫瘍組織の観察と評価

ラットの脳腫瘍モデルを観察した。腫瘍部の音響インピーダンスは、平均値で見ると正常部に比較して大きな差がみられなかったが、画像で見ると正常部に比較して荒れていることが判った(図 4-3 (a)および(b))。そこで、この画像の荒れを数値化するため、音響インピーダンスの局所粗さを表す局所標準偏差を計算することとした。画像の自己相関関数から特性相関距離を求めたところ、正常部、腫瘍部とも 140  $\mu\text{m}$  より小さい値となった(図 4-3 (c))。これより広い範囲の標準偏差を計算することとした。空間分解能をよくするためにはできるだけ狭い範囲の標準偏差を計算する必要がある。これらを勘案し、140  $\mu\text{m}$  角の正方形を計算範囲とした。音響インピーダンスの局所標準偏差で画像を再表示した結果、腫瘍部分をハイライトすることができた(図 4-4)。

再現性を確認するため、合計 5 個体について同様の実験を行ったところ、いずれも良好な結果が得られた(図 4-5)。また、B モード、C モード複合表示を行うことにより、断面の奥に腫瘍がどの程度広がっているのかを測定するため、3次元観察を行った(図 4-5)。



(a) 観察時の試料配置。



(b) 腫瘍組織の音響インピーダンス像。

図 4-2 ラットの脳腫瘍モデルの観察。

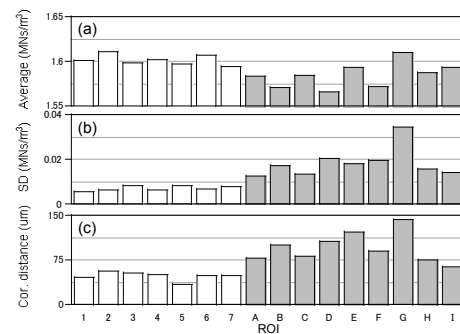


図 4-3 腫瘍組織と正常組織の比較。(a) 音響インピーダンス、(b) 音響インピーダンスの局所粗さ、(c) 特性相関距離。

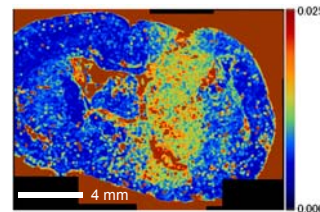


図 4-4 ハイライトされた腫瘍組織。

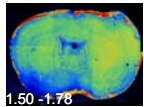
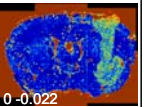

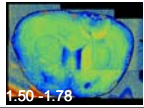
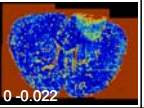

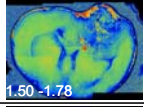
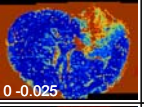

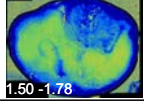
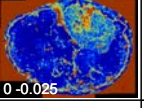


No.	CAI (MNs/m <sup>3</sup> )	SD in CAI	Stained Slice
1	 1.50 - 1.78	 0 - 0.022	
2	 1.50 - 1.78	 0 - 0.022	
3	 1.50 - 1.78	 0 - 0.025	
4	 1.50 - 1.78	 0 - 0.025	
	 min max 6 mm		

図4-5 再現性の確認。

### (3) 培養細胞の観察

細胞観察については、300 MHz 程度の中心周波数をもつ超音波信号によりラットのグリア(図 4-6)およびグリオーマ細胞(図 4-7)を観察した。細胞核および細胞骨格が音響インピーダンス像で明瞭に観察できた。この状態で薬物(抗癌剤)を投与すると、正常細胞に対する副作用により細胞骨格が消失していくことが観察された(図 4-7)。細胞が生きた状態で連続観察できる手法としてすぐれたものであることが実証された。次年度以降はグリオーマ細胞を使用した実験を行い、抗癌剤の効果を評価する。

併せて、細胞骨格の状態を変化させる種々の薬品を投与し、音響インピーダンス分布の経時変化をトレースすることに成功した。

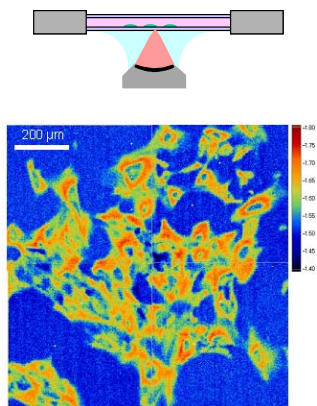
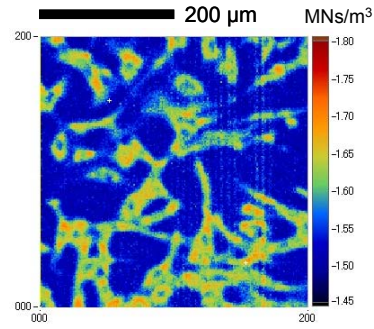
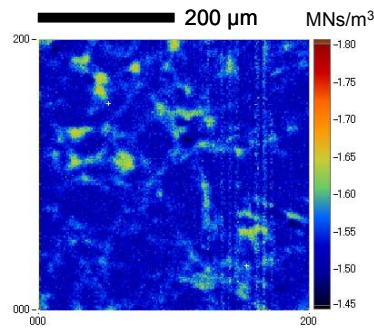


図 4-6 グリア細胞の音響インピーダンス像。



(a) 投薬前。



(b) 投薬後。

図 4-7 グリオーマ細胞の観察。

### (4) 三次元形態観察

音響インピーダンス顕微鏡は、観察対象が基板と接触する面における反射から対象の音響インピーダンスを表示するが、基板面よりも深い部分からも若干の反射信号が帰来する。基板の音響インピーダンスを対象のそれより大きく設定して基板面からの反射を強くしているため、深部からの反射信号は小さい。参照信号と相関が大きい成分を除去し、深部からの反射信号のみを抽出することにより、基板に近い部分の3次元形状表示を可能とした。図 4-8 は脳腫瘍組織の結果であり、深さ方向の断面図に腫瘍の奥行き方向の拡がりが見られる。

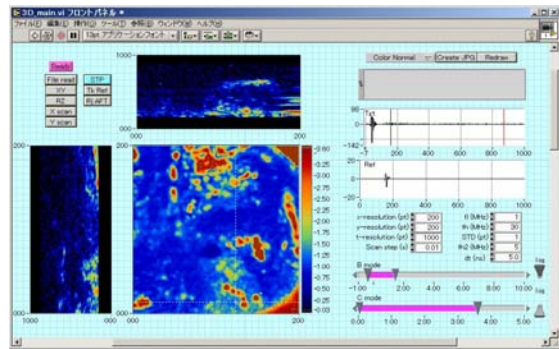


図 4-8 脳腫瘍組織の3次元形態観察。

図 4-9 は培養グリア細胞の結果であり，音響インピーダンス像(上)に加えて 3 次元形状が把握できるものとなっている。

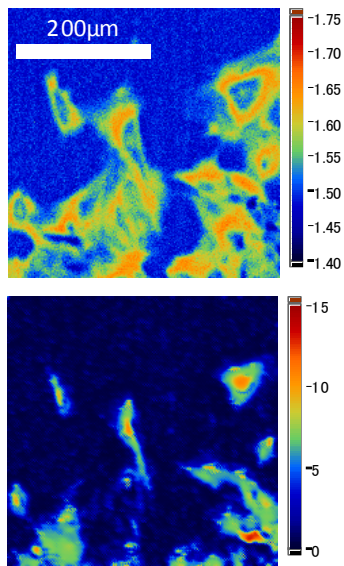


図 4-9 グリア細胞の音響インピーダンス像(上)と，3次元形状表示(下)。

#### 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 澤田規，中村辰三，綾田剣一，穂積直裕，小林和人: "超音波画像診断装置を用いた筋断裂の定量的評価法の開発～ラットにおける筋断裂の数値化の試み～"，柔道整復接骨医学(査読有)第 18 巻 2 号 99-103 (2010)
- ② Taizo Tsuji<sup>1</sup>, Katsumi Uchida, Naohiro Hozumi, Susumu Hiei, Takashi Kurihara, Tatsuki Okamoto: "Study on Pulse Response Aiming to Water Tree Diagnosis for Power Cables with Spatial Resolution", Proc. Int'l Conf. Condition Monitoring and Diagnosis (査読有), 659-662 (2010)
- ③ Masumi Fukuma, Ruji Funo, Yoshinobu Murakami, Masayuki Nagao, Naohiro Hozumi: "Simultaneous Measurement of Space Charge Distribution and Thickness in Dielectric Materials", Proc. Int'l Conf. Condition Monitoring and Diagnosis (査読有), 507-510 (2010)
- ④ Tsutomu Uemura, Takaya Suzuki, Kunihiro Hanai, Naohiro Hozumi, Sachiko Yoshida, Kazuto Kobayashi, Seiji Yamamoto, Yoshifumi Saijo: "Aberration Correction for Biological Acoustic Impedance Microscope", Proc. IEEE International Ultrasonics Symposium (査読有), P1-J-10 (9-2009) [学会発表] (計 14 件)

- ① 山崎智司，梶間翔太，村上義信，長尾雅行，穂積直裕，大木義道: "超音波顕微鏡によるエポキシ硬化過程の定量観察"，平成 24 年電気学会全国大会 (2-090)，2012 年 3 月 21-24 日，広島工業大学
- ② 花井邦彦，鈴木貴也，依田正之，小林和人，山本清二，西條芳文，穂積直裕，吉田祥子: "音響インピーダンス顕微鏡による培養細胞の 3 次元形状観察"，平成 23 年度電気関係学会東海支部連合大会 (K4-6)，2011 年 9 月 26-27 日，三重大学
- ③ 鈴木貴也，花井邦彦，依田正之，小林和人，山本清二，西條芳文，穂積直裕，吉田祥子: "音響インピーダンス顕微鏡による脳腫瘍の観察と相関解析"，平成 23 年度電気関係学会東海支部連合大会 (K4-6)，2011 年 9 月 26-27 日，三重大学
- ④ 穂積直裕，辻泰三，栗原隆史，岡本達希: "電力ケーブルの水トリー劣化点標定のための基礎研究"，第 41 回電気電子絶縁材料システムシンポジウム，2010 年 11 月 15 - 17 日，田市民交流プラザ
- ⑤ 花井邦彦，植村努，鈴木貴也，穂積直裕，小林和人，吉田祥子，山本清二，西條芳文: "セラミック超音波振動子による細胞観察"，第 41 回電気電子絶縁材料システムシンポジウム，2010 年 11 月 15 - 17 日，田市民交流プラザ
- ⑥ 鈴木貴也，花井邦彦，植村努，穂積直裕，小林和人，吉田祥子，山本清二，西條芳文: "高分子フィルム型超音波振動子のインパルス応答を利用した脳腫瘍の観察と画像処理"，電気電子絶縁材料システムシンポジウム，2010 年 11 月 15 - 17 日，秋田市民交流プラザ
- ⑦ Naohiro Hozumi: "Development of acoustic impedance microscope and its medical / biological applications", Int'l Conf. Ultrasonic Biomedical Microimaging (UBM2010)，2010 年 9 月 13 - 16 日，宮城県松島町大観荘
- ⑧ 植村努，鈴木貴也，花井邦彦，穂積直裕，小林和人，吉田祥子，山本清二，西條芳文: "3次元逆畳込による生物用音響インピーダンス顕微鏡の収差補正と評価"，2010 年電気学会全国大会 1-132 (3-2010)，2010 年 3 月 17 日，明治大学
- ⑨ 鈴木貴也，植村努，花井邦彦，穂積直裕，小林和人，吉田祥子，山本清二，西條芳文: "超音波によるラットの脳腫瘍モデルの観察と画像処理"，2010 年電気学会全国大会 1-133 (3-2010)，2010 年 3 月 17 日，明治大学
- ⑩ 花井邦彦，植村努，鈴木貴也，穂積直裕，小林和人，吉田祥子，山本清二，西條芳文: "2次元音響インピーダンス測定機能付き 3次元超音波顕微鏡を実現するため

の複合焦点振動子", 2010年電気学会全国大会 1-134 (3-2010), 2010年3月17日, 明治大学

- ⑪ 鈴木貴也, 植村努, 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よるラットの脳腫瘍モデルの観察と定量解析", 電気関係学会東海支部連合大会 O-231 (9-2009), 2009年9月10日, 愛知工業大学
- ⑫ 植村努, 中野愛子, 花井邦彦, 穂積直裕, 小林和人, 吉田祥子, 山本清二, 西條芳文: "3次元逆畳込による生物用音響インピーダンス顕微鏡の収差補正", 電気関係学会東海支部連合大会 O-232(9-2009), 2009年9月10日, 愛知工業大学
- ⑬ 穂積直裕: "高分子圧電膜型超音波振動子の衝撃応答を利用した生物顕微鏡", 電気電子絶縁材料システムシンポジウム S-1 (8-2009), 2009年8月27日, 松江テルサ
- ⑭ 植村努, 中野愛子, 花井邦彦, 穂積直裕, 小林和人, 吉田祥子, 山本清二, 西條芳文: "高分子フィルム型超音波振動子のインパルス応答を利用した生物顕微鏡における収差の補正", 電気電子絶縁材料システムシンポジウム P-23 (8-2009), 2009年8月27日, 松江テルサ

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

- ① 名称: 超音波画像表示装置及び超音波画像表示方法  
発明者: 小林 和人, 穂積 直裕  
権利者: 本多電子株式会社  
種類: 特許  
番号: 特願 2008 - 293931 (P2008 - 293931)  
出願年月日: 平成 20 年 11 月 17 日  
国内外の別: 国内

○取得状況 (計5件)

- ① 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: 特許第 4830100 号(P4830100)  
取得年月日: 平成 23 年 9 月 30 日  
国内外の別: 国内
- ② 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: 特許第 4830099 号 (P4830099)

取得年月日: 平成 23 年 9 月 30 日

国内外の別: 国内

- ③ 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: 特許第 4654352 号 (P4654352)  
取得年月日: 平成 23 年 3 月 16 日  
国内外の別: 国内
- ④ 名称: 超音波画像検査方法, 超音波画像検査装置  
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: 特許第 4654335 号 (P4654335)  
取得年月日: 平成 23 年 3 月 16 日  
国内外の別: 国内
- ⑤ 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: 特許第 4613269 号 (P4613269)  
取得年月日: 平成 22 年 10 月 29 日  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等: <http://icceed.tut.ac.jp/hozumi/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

穂積直裕(HOZUMI NAOHIRO)

豊橋技術科学大学・工学教育国際協力研究センター・教授

研究者番号: 30314090

(2)研究分担者

吉田祥子(YOSHIDA SACHIKO)

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・講師

研究者番号: 40222393

山本清二(YAMAMOTO SEIJI)

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

西條芳文(SAIJO YOSHIFUMI)

東北大学・医工学研究科・教授

研究者番号: 00292277

(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