

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25年 6月 1日現在

機関番号：31303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500440

研究課題名（和文） 超音波タグ蛍光検出法によるセンチネルリンパ節画像診断装置の開発

研究課題名（英文） Development of sentinel-lymphnode imaging system by ultrasonic tagging fluorescence imaging 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）：生体内に投与した蛍光マーカの集積部位を，外部から画像計測する蛍光検出法の研究を行った。音響光学効果により光強度変調し画像化する超音波タグ蛍光断層画像計測法を，がん転移診断のためのセンチネルリンパ節検索に応用するための開発研究を行い，専用プローブの試作およびその評価を行った。蛍光微粒子を蛍光マーカとして用い，生体組織内部 20mm での蛍光画像の計測に成功した。さらに，臨床で用いられている蛍光マーカを実用濃度で検出するため高感度化手法の開発を行った。

研究成果の概要（英文）：Fluorescence imaging technique for detecting sentinel-lymphnodes has been studied. A prototype of a probe-device using ultrasonic modulation of fluorescence, ‘ultrasonic tagging’, was designed and manufactured. Performance to detect a localized fluorophore located at the depth of 20mm in a biological tissue was achieved. To improve the sensitivity for clinical application, which determines fewer amounts of fluorescent molecules, the method to extract the small component of modulated signal has been developed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：画像診断システム，生体光，蛍光，超音波

1. 研究開始当初の背景

光を用いて生きた生体内の構造や機能情報を可視化する技術は，生体への非侵襲性，安全性を担保した上で生体情報のリアルタイム画像計測を実現する技術として，他の手法にはない優れた可能性をもつことから，医用画像診断技術として早期の実用化が期待されている。生命科学研究においては，蛍光，

発光レポーターを使った遺伝子発現のリアルタイム可視化や，様々な原理に基づく蛍光プローブを用いた蛍光ラベル法による生命現象の解明に大きな成果を上げ，生理作用の発現を細胞内の「その場」で観測することのできる手法として必須のアクセシ技術となっている。同時に，新たなメカニズムに基づく蛍光プローブの研究は長足の進展をとげ，細

胞レベルにおいてはがんをはじめとする、様々な疾患の特異的診断への道を開きつつある。しかし光学的手法を、X線CTやPETのようにマクロな生体レベルを扱う医用画像診断技術に適用するためには、新たな原理に基づく光散乱媒質内画像計測法が必要とされる。

近年、パルス光による光音響効果を用いて生体内で発生する音波から光吸収特性を断層画像計測する手法が注目を集めている。われわれはそれに対し、超音波源を用いて、光と超音波の相互作用による音響光学効果を利用した生体内蛍光画像計測法として、超音波タグ蛍光検出法と呼ぶ画像計測法を提案し、その医用画像計測・診断装置への応用をめざした研究を行ってきた。これまでにその基礎技術の研究を行い、水槽内に設置した動物筋肉組織の内部の蛍光画像を計測することに成功した。またその実用化要素技術として、音響光学変調プローブの基礎検討を行い、測定対象に接触させて蛍光2次元画像計測することができる、実用上有効なプローブデバイスの可能性を示した。

以上の研究過程を背景として、本研究課題を実施した。

2. 研究の目的

蛍光ラベルされた生体分子や生体内の構造を、音響光学効果により断層画像計測することのできる超音波タグ蛍光検出法を、がん転移診断を目的としたセンチネルリンパ節検索のための画像計測に応用する技術の開発を行う。そのため、音響光学変調プローブの実用化技術の開発研究と、医用画像診断装置に向けた性能評価およびシステム化研究を行った。

3. 研究の方法

1. で述べた知見にもとづき、超音波発振デバイスとして凹面形状固定焦点型超音波トランスデューサを用いた集束超音波による音響光学変調プローブの実用研究を行った。各種蛍光変調動作特性データの収集とシミュレーションにより、超音波による蛍光変調メカニズムの検討を行い、それをもとに、走査、検出機構の設計、試作と光変調動作特性の計測実験を通じ、画像化装置としてのシステム化研究を行った。以下にその手順を示す。

(1) 音響光学変調プローブの開発と評価

- ① これまでの試作機による測定データを元に、生体接触型の凹面形状の集束型超音波トランスデューサを走査機構とともに容器内に収納したプローブを設計試作する。
- ② プローブが形成する測定試料内の音場を2次元測定し、集束超音波焦点の走査特性

を評価する。液体媒質を用い、とくに焦点を走査した際の音場パターンの変化について計測を行い、画像計測のための補正処理法について検討を行う。

- ③ 光散乱媒質と混合したアガロースゲルを生体組織模擬媒質とし、その内部に蛍光体を局在させた生体模擬試料を作製し、試作プローブによる蛍光変調信号の特性を測定し、評価する。

(2) 蛍光変調メカニズムの検討

- ① 超音波により屈折率が周期的に変化する媒質内での光散乱特性を光拡散近似により記述する方法を考察し、数値解析によるシミュレーションを通じて、超音波音場における蛍光の音響光学変調メカニズムを検討する。
 - ② シミュレーション結果に関して、実験データを元に評価する。
- ### (3) 画像診断装置システム化研究
- ① 光送受信器を含む画像計測システムとして計測制御機構を構築する。
 - ② 生体試料を用いて画像計測実験を行い、センチネルリンパ節検出に必要な性能評価を行う。

4. 研究成果

(1) 音響光学変調プローブの試作開発

超音波焦点扇状走査機構をもつ生体組織接触型の音響光学変調プローブを設計試作した。プローブは、凹面形状の集束型超音波トランスデューサを、回転および並進モータ機構とともに収納した構造をもつ。図1にプローブの写真を、接触面となる前面および背面から示す。

局在する蛍光体を内部に有する光散乱媒質を生体模擬試料として用いて、試作プローブによるファントム内音圧分布の評価、および変調蛍光信号強度の入射光強度特性などのプローブ性能評価実験を行った。また、生体組織として厚さ40mmに成形したブタ肉組織内部に局在する蛍光ポリスチレンビーズ由来の蛍光画像の計測を、蛍光体の深さを変化させながら行った。深さ20mmで得られた計測画像を図2に示す。

(2) 蛍光変調メカニズムの検討とシミュレーション

超音波焦点扇状走査型プローブと光学系との最適な結合方法の検討と画像計測装置としてのシステム化研究を目的として、蛍光変調メカニズムについて検討を行った。生体のような多重光散乱系における光伝搬特性を記述する光の輸送方程式に関して、超音波による、屈折率非均一系での取扱方法の検討を行った。音響光学効果による超音波変調メカニズムを、媒質の屈折率変化と散乱係数変化、および蛍光分子の密度変化の観点から考

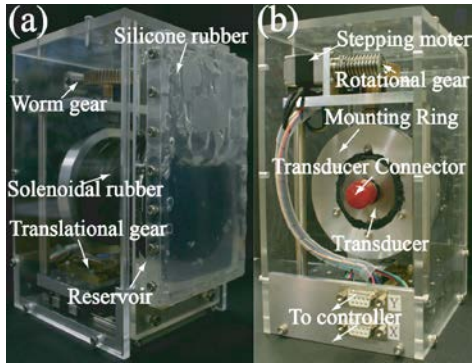


図1 試作したプローブの写真
(a) 正面, (b) 背面

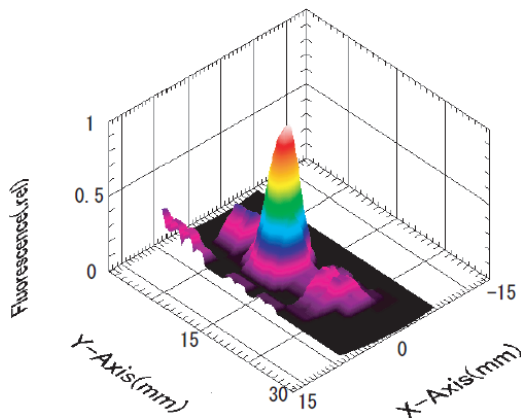


図2 厚さ 40mm のブタ肉内部 20mm に埋設した蛍光ポリスチレンビーズの蛍光画像

察した。屈折率分布系における輸送方程式の光拡散近似を用いて、有限要素法による数値解析を行い、それらの蛍光変調信号への寄与と散乱媒質内光子分布を評価した。図3はシミュレーションにより得られた散乱媒質内部の蛍光変調光成分の分布であるが、(a)は中央に蛍光体が存在する場合であり、(b)は蛍光体が存在しない場合である。中央部での突起が局在する蛍光体の変調信号成分の存在を表している。

図4は、蛍光変調に寄与する励起光の変調光分布を、超音波焦点における屈折率変化による強度変調成分(a)と、散乱係数の変化による励起光強度変調成分(b)に分離して比較示したものである。これらの結果から励起光変調においては、屈折率変化が主因であることが示唆された。これに音圧変化に伴う蛍光分子の濃度変化に起因する変調成分が加わり、図3で示したような強度変調光分布となるものと推定された。

(3) 画像診断装置システム研究と高感度化

本手法によりセンチネルリンパ節検出を行うために必要な、蛍光分子濃度に関する評

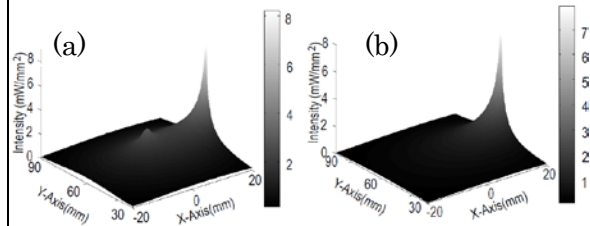


図3 散乱媒質内における変調蛍光強度分布の拡散近似によるシミュレーションの結果

- (a) 媒質中央に蛍光体が存在する場合
- (b) 蛍光体が存在しない場合

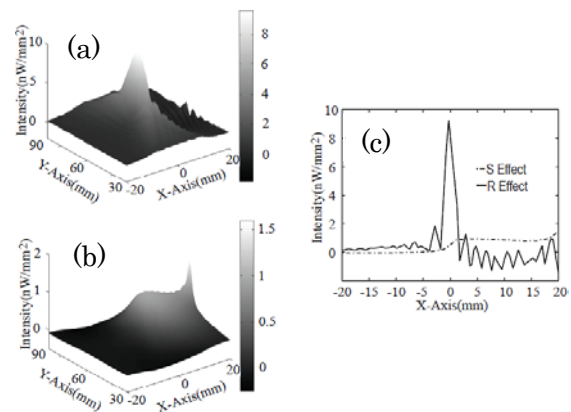


図4 散乱媒質内における集束超音波による励起光変調強度分布の各種条件によるシミュレーション結果

- (a) 屈折率分布変化による成分
- (b) 散乱係数変化による成分
- (c) 両者の超音波焦点における X 軸プロファイル

価を、ファントム試料による測定実験を通じて行った。実用条件を満たすための課題として、(1)で述べた実験に用いた蛍光量子収率の高い蛍光微粒子を蛍光マーカとして測定対象とするだけでなく、臨床においてリンパ節、リンパ管の染色に用いられているインドシアニングリーン(ICG)の近赤外蛍光による生体内画像計測の可能性について評価実験を行った。その結果、実際の深度にて、実用濃度、実用計測時間で ICG を検出するには、さらに検出感度の向上が必要であることがわかった。そのことから、変調信号の検出において蛍光選択性能を高めるため、これまで用いてきたアナログ周波数解析法を改良し、より狭帯域化が可能なデジタル検出法による高感度化技術の検討を行った。実験の結果、これまでに開発した超音波プローブ走査系や光学系はそのまま用いて、光検出器からの信号処理系の変更により ICG 検出に

対応できる高感度化が可能であることが示唆された。

(4) まとめと今後の課題

生体用超音波タグ蛍光画像診断装置として実用可能なプローブ機構について考察し、人体に接触させて使用することのできるプローブを試作した。生体試料を用いてその性能評価を行い、深度 20mm に局在する蛍光物質の検出に成功した。

本研究課題では、生体診断用蛍光画像計測の新規技術の提案と、そのメカニズムの解析を行い、センチネルリンパ節検出に応用可能な画像計測技術であることを示した。今後実用化に向けて更なる高感度化が必要であることから、本研究で開発した高選択的検出法に基づいた検討を引き続き行う。

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 7 件)

- ① M. Hikage, K. Gonda, M. Takeda, T. Kamei, M. Kobayashi, M. Kumasaka, M. Watanabe, S. Satomi, N. Ohuchi, Nano-imaging of the lymph network structure with quantum dots, Nanotechnology, 査読有, 2010, Vol. 21, 185103, DOI: 10.1088/0957-4484/21/18/185103
- ② L. Cong, M. Takeda, Y. Hamanaka, K. Gonda, M. Watanabe, M. Kumasaka, Y. Kobayashi, M. Kobayashi, N. Ohuchi, Uniform silica coated fluorescent nanoparticles: synthetic method, improved light stability and application to visualize lymph network tracer, PLoS ONE, 査読有, 2010, Vol. 5, e13167, DOI:10.1371/journal.pone.0013167
- ③ 小林正樹, 生物フォトンに学ぶ生体医用技術への応用, 光技術コンタクト, 査読無, 2010, Vol. 48, 155-163
- ④ Q. D. Trinh, S. Kaneta, M. Kobayashi, Development of ultrasonic modulation probe for fluorescence tomography based on acousto-optic effect, Int. J. Optics, 査読有, 2011, Vol. 2011, 818302, DOI: 10.1155/2011/818302
- ⑤ Q. D. Trinh, S. Kaneta, M. Kobayashi, Study on mechanism of ultrasonic fluorescence modulation in light scattering medium based on diffusion approximation with varying refractive index, Optical Review, 査読有, 2012, Vol. 19, No. 3, 159-166, DOI: 10.1007/s10043-012-0027-5

[学会発表] (計 10 件)

- ① 熊坂増高, 近彬光, 武田元博, 大内憲明, 小林正樹, Development of novel method for the assessment of anticancer agents based on the continuous imaging of biophoton emission from cancer transplant mice, 第 49 回日本生体医工学会大会, 2010 年 6 月 27 日, 大阪国際交流センター (大阪市)
- ② 金田俊輔, Trinh Quang Duc, 小林正樹, 超音波タグ生体蛍光イメージングのための扇形走査超音波プローブの開発 II - 生体組織の計測 -, 平成 23 年東北地区若手研究者研究発表会, 2011 年 3 月 12 日, 仙台高等専門学校 (仙台市)
- ③ 古積聖太, 米沢広史, 星裕貴, 細田明, 小林正樹, 小動物用脳内遺伝子発現 in vivo 可視化システムの開発, 平成 23 年東北地区若手研究者研究発表会, 2011 年 3 月 12 日, 仙台高等専門学校 (仙台市)
- ④ Q. D. Trinh, S. Kaneta, M. Kobayashi, 第 72 回応用物理学会学術講演会, 2011 年 9 月 2 日, 山形大学 (山形県)
- ⑤ 金田俊輔, Trinh Quang Duc, 小林正樹, 音響光学効果を用いた生体内蛍光断層イメージングのための蛍光変調超音波プローブの開発, 電気関係学会東北支部連合大会, 2011 年 8 月 26 日, 東北学院大学 (宮城県)

[図書] (計 0 件)

[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 4518549 号

取得年月日: 2010 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: 90332981

(2) 研究分担者

なし

(4) 連携研究者

なし