

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350520

研究課題名(和文)超低侵襲性ニードル型イメージング技術の基盤研究

研究課題名(英文)Basic study on imaging technique by ultra-low invasive needle

研究代表者

佐藤 学 (Sato, Manabu)

山形大学・理工学研究科・教授

研究者番号：50226007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：長さ8.8mm、直径125 μ mの光通信用屈折率分布型ファイバーを切り出したショートマルチモードファイバー(SMMF)をイメージングプローブとして用い、結像特性、倍率、空間分解能、最適波長を検討し、トリの腱組織の表面反射画像をLED光源で測定した。さらに、5mmのSMMFをOCTと融合し、深さ分解能2 μ m、横方向分解能4.4 μ mを測定し、メダカの乾燥ヒレの断層画像を測定し、超低侵襲性イメージングプローブの基盤技術を実現した。

研究成果の概要(英文)：Using the short multimode fiber(SMMF) with length 8.8mm and diameter 0.125mm made from graded index multimode fiber for optical communications as an imaging probe, basic characteristics such as imaging condition, spatial resolution and wavelength-dependence have been studied theoretically and experimentally, and the reflection images of chicken tendon were measured using 635nm LED as a light source. Further, the SMMF (L:5mm and D:0.125mm) was combined with the full field OCT, and the axial and lateral resolutions were evaluated at 2 μ m and 4.4 μ m, respectively. The three dimensional OCT images of dried fin of small fish were measured. The basic technique of an ultrathin low invasive imaging probe has been developed.

研究分野：光計測

キーワード：深部生体組織 低侵襲性 光学イメージング 断層画像 高空間分解能

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、数十 μm の高い空間分解能と、微弱な近赤外光による無侵襲性が特徴であるOCT(optical coherence tomography)の研究が、眼科・循環器系臨床を中心に拡大し、産業界まで広がっている。一方、OCTによる直接の深さ測定領域は、生体組織の高吸収・高散乱性のため約3mm程度であり、より深い部位の画像測定技術が強く望まれている。これに対して、ニードル型光学素子を用いた低侵襲性イメージングが試みられてきた。すでに、直径450 μm のバンドルファイバーを用いたニードル型反射ファイバー顕微鏡が報告され、空間分解能3.5 μm でグリーンオニオンの細胞壁や生体細胞の境界などが確認されている。また、深部に対応可能で低侵襲性のニードル型OCTプローブも研究されている。これは直径330 μm で側方視野であり、プローブに対して垂直の円盤状のOCT画像が得られる。組織に対して低侵襲性のためにはより極細化のプローブが望まれる。

一方、2006年の死因では、がん、心臓病、脳血管疾患(脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血)で58.2%を占めている。この脳血管疾患に加えて、交通事故などによる頭部外傷や新生児低酸素虚血症などに対して脳の組織活性(Viability)を迅速にモニターし、適切な処置をすることが重要である。我々は、三次元空間分解能を持つOCTの脳組織活性モニターへの応用についてラット脳で研究を行い、安楽死の際、心停止前にOCT信号が増大すること、組織を恒温に保っても同様の変化を示すこと、ATP生成と関係深い組織温度とOCT信号との負の相関関係、虚血時の組織の光学特性変化などを報告してきた。

ヒト大脳は厚さ2-4mm程度の皮質が内部の白質を覆う二重構造であり、皮質は6層構造を有している。虚血などにより組織活性が低下した際、皮質と白質では異なる変化、特に白質は虚血に脆弱であることが指摘されている。しかし、従来、白質に及ぶ深さではin vivo 画像測定技術が乏しく十分な情報が得られていない。これより、空間分解能が数 μm で深部画像計測を可能とする低侵襲性のイメージングプローブが望まれている。

2. 研究の目的

救急医療や移植医療でニーズの高い脳組織活性モニターへのOCT応用を検討し、可能性を示してきた。しかし、さらなるOCT信号の機構解明には、表面から組織深部に渡り高い空間分解能の新しいin vivo 画像測定技術が必要である。そこで、OCTより深い5-6mmでの組織画像測定のために、直径140 μm 程度の汎用マルチモードファイバーを用いる新しい方法を提案し、脳組織の虚血時の形態学的情報の取得、分光機能による内因性画像信号の取得、さらには、OCTや内視鏡との融合も検討する。これにより、深さ

5-6mmの組織画像測定の応用領域を開拓する。本研究では、3年間の研究期間内に、主にこの技術の確立に取り組み、先の展望を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)SMMF(Short multimode fiber)の解析・設計と光学特性評価

SMMFの使用にあたり、基本的な結像特性、倍率、開口数、空間分解能などの基礎特性を解析により明らかとし、実験結果と比較検討する。

(2)OCTとの融合検討

光源にハロゲンランプを用いた高空間分解能のフルフィールドOCTのサンプルアームにSMMFをイメージングプローブとして使い、空間分解能などの基本特性を評価し、OCTへの応用の有用性を検討する。

(3)分光技術の立ち上げ

組織内のヘモグロビンの量や酸素飽和度の情報を抽出するためのシングルファイバーを用いた分光測定技術を確立する。

4. 主な研究成果

(1)SMMF(Short multimode fiber)の解析と光学特性評価

光通信用のマルチモードファイバーをイメージングに使用するにあたって、まずはABCD行列による光線追跡を行い、結像特性、倍率を計算した。クラッド径は125 μm 、コア径は50 μm として、コア内の屈折率は理想的な二乗分布とした。物体面とSMMF間距離を L_1 、SMMFの長さを L_S 、SMMFと結像面との距離を L_2 として、 L_S が8.7mmで L_1 が57 μm とき、空気中では L_2 が132 μm 、組織内を想定した水中では L_2 が163 μm と求まり、倍率では、同条件で、それぞれ、-1.37、-1.64と求まった。結像条件、倍率ともに、試料にテストパターン(TP)を用いた測定結果とよく一致した。

次に、開口数(NA)について解析した。解析では、コアに入射し、コア内を伝搬する光線の最大入射角を求めた。NAと波長からスポットサイズを求め、空間分解能の評価を行った。いずれも、空気雰囲気と水雰囲気で解析を行った。 L_1 が57 μm 、波長が852nmで横方向分解能(スポットサイズの半値全幅)が2.2 μm と得られ、実験では4.4 μm 程度と測定され、違いについては、SMMF内の屈折率分布の揺らぎから実効的な開口が減少し、測定値が大きくなったと理解している。

測定光学系(図1(a))は光学顕微鏡をベ-

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

スにしている。SMMF の端面は切断法が 2 面で異なるので図 1(b)のようになり、1 回目の切断はきれいな面となるが、2 回目の切断ではクラックが生じている。透過画像測定では、ハロゲンランプからの光を長波長透過フィルターを用いて測定し、反射画像測定では波長 635nm の LED 光源を用いてクロスニコル法で表面からの反射光を除いている。ファイバーとの結合は対物レンズの NA が影響し、照射と集光の両方に関係するので、0.25(10 倍)、0.40(20 倍)、0.65(40 倍)、1.25(100 倍)と変えて測定を行い(図 2) 0.40-0.65 が比較的良好であることがわかった。次に NA を 0.40、サンプルはパターン間隔 4.4 μm の TP として、信号強度とコントラストの波長依存性を測定した。ハロゲン光源からの光を中心波長 550nm, 635nm, 730nm, 840nm の干渉フィルター(バンド幅 10nm)で波長選択を行った。

図 3 より、短波長側では、信号強度は高いが、結像のボケによりコントラストが低下し、長波長側では、強度の低下によりコントラストの低下が起こっている。この理由としては屈折率の揺らぎによる光の散乱が原因と考えている。波長では、600nm 以上が適切で、長波長側は光源のスペクトルによる。図 4 に長さ 8.8mm の SMMF を用いたトリの腱組織の反射画像測定を示す。(a)は試料全体写真、(b)は反射顕微鏡写真、(c)は倍率の異なる反射顕微鏡写真、(d)は SMMF による透過照明による画像、(e)は SMMF による反射画像である。組織表面の画像情報が得られるのがわかる。

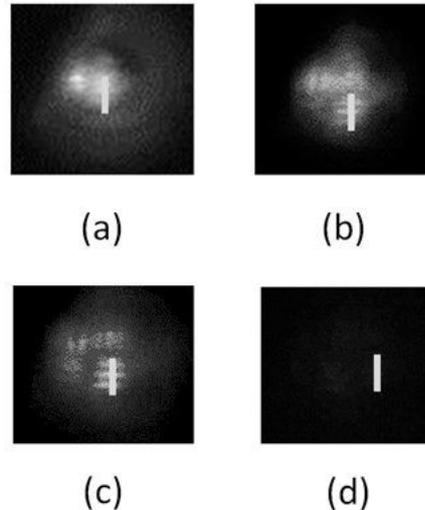


図 2 (a)NA0.25、TP の反射画像、パターン間隔は 4.4 μm 、(b)0.40、(c)0.65、(d)1.25

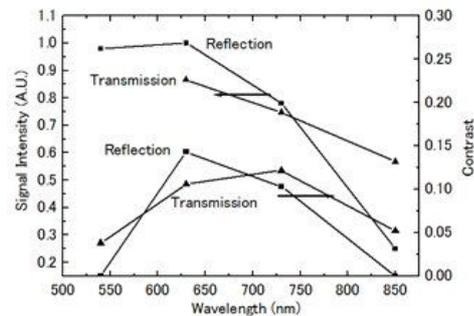


図 3 信号強度とコントラストの波長依存性

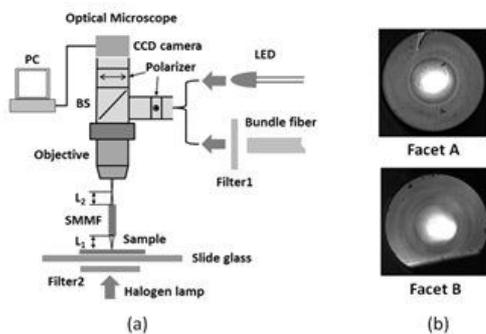


図 1 (a)実験光学系、(b)SMMF 端面写真

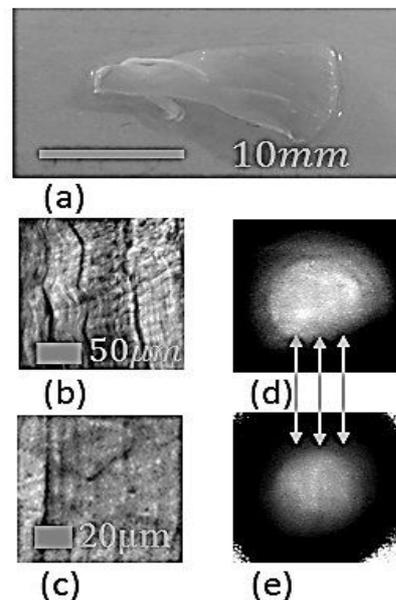


図 4 トリの腱組織の反射画像測定、(a)試料写真、(b)反射顕微鏡写真 1、(c)反射顕微鏡写真 2、(d)SMMF による透過照明画像、(e) SMMF による反射画像照明画像

(2)OCT との融合検討

SMMF との融合では、サンプルアームに SMMF をイメージプローブとして挿入するので、まず SMMF による分散特性を解析した。分散は、材料分散、モード分散、構造分散があり、広帯域光源のために分散のアンバランスがあると深さ方向分解能が低下する(図5)。解析の結果、材料分散が支配的で、モード分散は材料分散の 2.3% と小さく、構造分散は影響がないことが分かった。次に、実験光学系を構築した(図6(a))。光源は広帯域光源としてハロゲンランプを用い、光学系は基本的に二次元マイケルソン干渉光学系である。CCD カメラで干渉画像を測定し、4ステップ位相シフト法で OCT 画像を測定した。波長特性は、2枚のフィルターにより制限され、中心波長が 784nm、バンド幅が 132nm となる。使用した長さ 5.12mm の SMMF の全体写真と端面の写真を図6(b)に示す。深さ方向分解能は、補償板の厚さを変えた際の深さ分解能を評価し、最適厚さを実験的に 0.885mm と求め、解析結果とも一致した(図5)。このとき、深さ方向の計算値は、 $2.06\mu\text{m}$ と求め、実験では、 $2.15\mu\text{m}$ が得られた。次に、信号光画像と OCT 画像を結像条件を変えて比較した。図8では、(a)-(c)が信号光画像で、(d)-(f)が OCT 画像であり、結像条件を満たしているのが、(b)と(e)である。OCT 画像の場合、コヒーレントゲートにより不要な背景ノイズが除去されているのがわかる。背景ノイズの発生は、屈折率分布が理想的な二乗分布から波長レベルで揺らいでおり、前述したように非結像成分が広い分布となって生じ、これはより短波長で顕著になる傾向がある。TP の周期はすべて $4.4\mu\text{m}$ であり、横方向分解能は $4.4\mu\text{m}$ 以下であることがわかる。

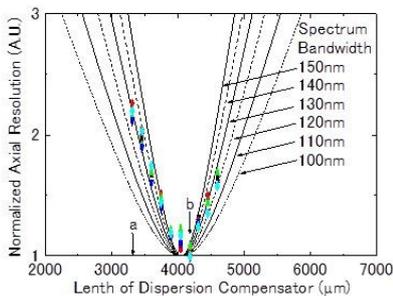


図5 規格化深さ分解能の補償板厚さ依存性、実線は計算値、点は測定値

次に生体試料として、メダカの乾燥ヒレの断層画像を測定した。SMMF をほぼサンプルにコンタクトさせて、参照ミラーを $2\mu\text{m}$ ステップで 55 回シフトさせて測定した。全深さ走査距離は、 $110\mu\text{m}$ であり、生体の屈折率 1.33 を仮定すると、 $83\mu\text{m}$ となる。それぞれの深さで 100 回測定し、平均処理を行った。図9(a)は、垂直に切断したサンプルの光学顕微鏡による反射画像、(b)は、垂直のリスライス画像で、Z 軸が光軸方向である。(c)は、XY 平面の鉛直断面画像であり、(d)は(b)と異なる位置での垂直のリスライス OCT 画像である。測定した 110 枚の鉛直断層画像を汎用ソフト(ImageJ)で三次元表示したのが、図10である。内部の構造が測定されているのがわかる。

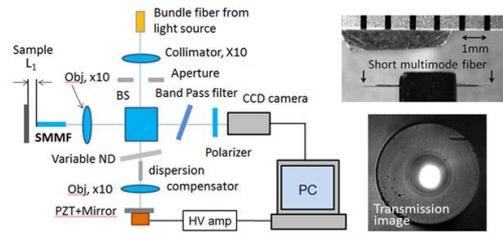


図6 SMMF FFOCT の構成と SMMF 写真

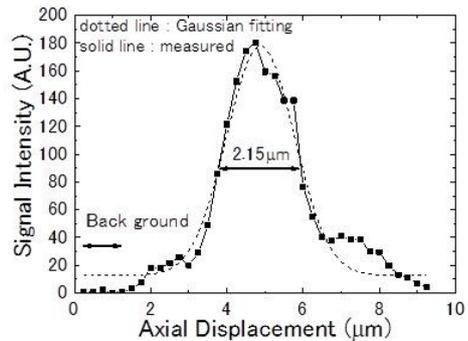


図7 測定した深さ方向分解能

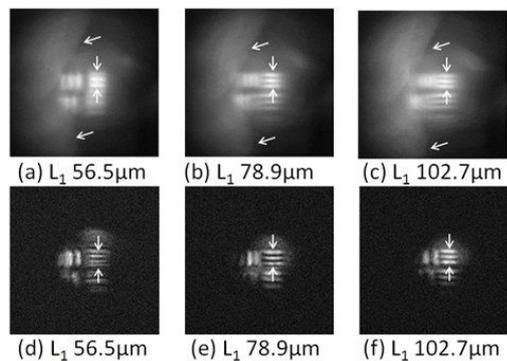


図8 (a)-(c)信号光画像と(d)-(f)OCT 画像、(b)と(c)がフォーカス条件、TP 周期は、 $4.4\mu\text{m}$

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

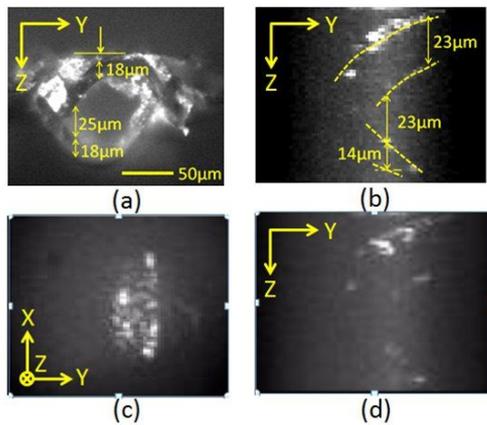


図9 (a)メダカ乾燥ヒレの断面顕微鏡写真、(b)垂直にリスライスしたOCT画像、(c)XY平面の鉛直断面OCT画像、(d)異なる位置でのリスライスしたOCT画像

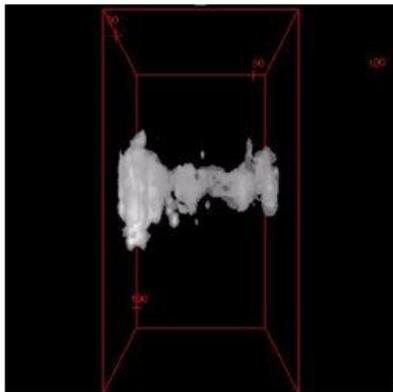


図10 図9のデータの三次元表示

・参考文献

- J. Sun et al., J. Biomed. Opt., **15**, 4, 040502 (2010).
 D. Lorensen, X. Yang, R. W. Kirk, B. C. Quirk, R. A. McLaughlin, and D. D. Sampson: Opt. Lett. **36** (2011) 3894.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

- (1)Manabu Sato, Kou Shouji, Daisuke Saito, and Izumi Nishidate, "Imaging characteristics of an 8.8 mm long and 125 µm thick graded-index short multimode fiber probe", Applied Optics, 査読有, Vol. 55(12), pp. 3297-3305, (Apr, 2016)
- (2)佐藤 学, 西館 泉, "光コヒーレンストモグラフィの脳組織活性モニターへの応用研究", 日本レーザー医学会誌, 査読有, Vol.35, No.4, pp.424-431 (2015).
- (3)Manabu Sato and Izumi Nishidate, "Application of wide-field optical coherence tomography to monitoring of viability of rat brain in vivo", Optical Review, 査読有, Vol.21, No.3, pp.333-338 (2014)

(4)Manabu Sato, Takahiro Kanno, Syoutarou Ishihara, Hiroshi Suto, Toshihiro Takahashi, and Izumi Nishidate, "Reflectance Imaging by Graded-Index Short Multimode Fiber", Applied Physics Express, 査読有, Vol.6, pp.052503, (2013)

〔学会発表〕(計5件)

(1)Manabu Sato, Daisuke Saito, Kou Shouji, and Izumi Nishidate, "Full-field optical coherence tomography using ultrathin forward-imaging short multimode fiber," Optics & Photonics International Congress 2016, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (May 17-20, 2016)

(2)Manabu Sato, Yuuki Sekine, Toshihiro Takahashi, and Izumi Nishidate, "Full field OCT using short multimode fiber probe", 5th Asian and Pacific-Rim Symposium on Biophotonics (APBP'15), APBPp2-5, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (Apr. 22-24, 2015).

(3)Manabu Sato, Yuuki Sekine, Hiroshi Suto, Takahiro Kanno, Shoutarou Ishihara, Toshihiro Takahashi, and Izumi Nishidate, "Imaging by Tandem Optics using Short Multimode Fiber and GRIN Lens", Biomedical Imaging and Sensing Conference 2014 (BISC'14), BISC5-6, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan (Apr. 22-24, 2014).

(4)Manabu Sato, Takahiro Kanno, Syoutarou Ishihara, Hiroshi Suto, Toshihiro Takahashi, Reiko Kurotani, Hiroyuki Abe, Izumi Nishidate, "Imaging of rat brain using short graded-index multimode fiber", 8928-47, Session 9, BIOS2014 West, Moscone Center, San Francisco, California, United States, (Feb.1-6, 2014).

(5)Manabu Sato, Takahiro Kanno, Syoutarou Ishihara, Hiroshi Suto, Toshihiro Takahashi and Izumi Nishidate, "Reflectance images using 5 mm graded-index multimode fiber", The 10th Conference on Lasers and Electro-Optics Pacific Rim (CLEO-PR 2013), and The 18th Opto Electronics and Communications Conference, WPJ-15, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan (Jun.30- Jul.4, 2013).

〔その他〕

<http://msatolab.yz.yamagata-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 学 (SATO, Manabu)
 山形大学・大学院理工学研究科・教授
 研究者番号: 50226007

(2)研究分担者

西館 泉 (NISHIDATE, Izumi)
 東京農工大学・大学院研究科・准教授
 研究者番号: 70375319