

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：31303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350571

研究課題名(和文) 超音波タグ蛍光検出法による生体内ICG(インドシアニングリーン)イメージング

研究課題名(英文) Tomographic imaging of indocyanine green (ICG) in living body based on the ultrasound 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、生体内の構造・機能を計測するための造影剤として一般に用いられている、蛍光色素インドシアニンググリーンの生体内分布を断層画像計測する技術の研究開発を行った。蛍光物質を含む化学発光系に低パワーの集束超音波を照射することで化学発光反応を促進し、発光が増強される効果を見出し、超音波焦点を走査することで生体内蛍光物質分布の画像計測が可能であることを示した。化学発光の増強メカニズム、解像度に関する検討を行い、および蛍光色素(蛍光プローブ)濃度の定量計測が可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Development of a novel optical tomographic imaging technique with assistance of focused ultrasound to detect indocyanine green (ICG), staining biological structure in living body, was studied. We found that chemiluminescence (CL) reaction system coexisting with ICG was enhanced with low power ultrasonic beam, and succeeded to detect and image ICG in thick biological tissue. We also represented the properties of spatial resolution for imaging and possibility for quantitative detection of ICG.

研究分野：生体医工学

キーワード：生物・生体工学 生体医用光学 医用画像 蛍光 化学発光 超音波

1. 研究開始当初の背景

光を用いて生体内部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、安全性を担保しながら生体情報のリアルタイム計測を実現する技術であり、他の手法にはない優れた特長をもつ。このことから医用画像診断技術としての実用化が期待されている。蛍光に関しては、蛍光レポーター遺伝子による遺伝子発現のリアルタイム可視化や、蛍光マーカーや蛍光プローブによる生理作用や1分子レベルでの生体物質の可視化など、生命科学において幅広く利用されている。しかしその適用は細胞、組織あるいは小動物レベルにとどまり、ヒト生体を対象とした画像化技術は依然として研究段階である。マクロな生体レベルでの蛍光断層画像計測が実現すると、がんや各種疾患の画像診断など、その有用性は極めて高い。われわれは、このような医用診断への応用を目的とした、光散乱媒質内蛍光画像計測技術の研究を行っている。

近年、超音波を併用して散乱媒質中での光吸収や蛍光特性の空間分布を計測する手法が注目されている。超音波タグ光画像計測法と呼ばれる、超音波によるスペックル変調を利用した画像計測法や、蛍光変調画像計測法が知られているが、われわれは2006年に超音波による蛍光強度変調を利用した超音波タグ蛍光断層画像計測法を開発し、生体組織を用いて深さ25mmの内部に集積した蛍光微粒子の画像計測に成功した。さらにこの手法をセンチネルリンパ節検出に適用するため、リンパ節染色に広く用いられているインドシアニングリーン(ICG)の断層画像検出法の検討を進めてきた。しかし蛍光微粒子の場合と異なり、ICGは変調信号が小さく、十分な検出感度が得られないことが判明し、これを解決するための高感度検出技術の開発が必要となっていた。

2. 研究の目的

これまでの研究を背景として、がん転移診断を目的とした、ICG染色センチネルリンパ節画像検出に応用可能な、超音波タグ蛍光検出法の高感度化技術の開発を行う。生体画像診断装置への応用を視野に入れ、目標とする性能を生体内観察深度20~30mm、解像度1mm程度とした。

3. 研究の方法

高感度化のための手法として、まず単一光電子検出に基づく蛍光変調信号検出法の検討を行った。微弱光検出のための計測システムを構築し、ICG検出能、感度特性評価を中心とした実験を生体模擬試料や生体組織を用いて行い、システム化に繋げることにした。具体的には以下の内容について検討を行った。

(1) 高感度超音波タグ蛍光検出系の開発

従来変調蛍光検出に用いていたスペクトラムアナライザーによる狭帯域アナログ検

出法に代え、単一光電子計数法に基づく検出法を開発する。ゲート型光電子計数システムを用いた時間相関検出により、微弱蛍光の分離性能を高めることで高感度検出を図る。

(2) 生体模擬試料による画像計測実験

イントラリピッド溶液により各種光散乱濃度に調整したアガロースゲルを生体組織模擬媒質として用い、その内部にICGを含む化学発光試料を封入した生体模擬試料を作成して感度特性を評価する。またその2次元分布を計測し、感度、画像分解能を評価する。

検出感度評価の結果、生体計測に必要な感度に到達しなかった場合には、強度変調に基づく検出法に限定せず、超音波を援用して検出する各種の方法について広く検討することとした。

4. 研究成果

(1) 高感度超音波タグ蛍光検出系の開発

この手法は集束超音波による選択的蛍光強度変調を利用して、散乱媒質内の光特性の空間情報を取得するものであるが、低変調度のICG蛍光信号に対する高感度検出技術として、ゲート式単一光電子計数法に基づいた光変調信号デジタル検出法の検討を行った。システムの構築とゲートパラメータの最適化検討を経て、生体模擬試料を用いた検出性能の評価試験を行った。ゲート条件に依存した微弱な変調蛍光成分の検出と、その画像化が可能であることを示すことができた。しかし生体深部の計測を目標としたのに対し、散乱媒質濃度、深度において十分な検出性能を得るには至らなかった。その原因は、蛍光プローブとして微粒子やマイクロバブルのような微細構造体を用いる場合と異なり、ICG溶液では変調度が小さく、背景光となる励起光ショット雑音により最小検出可能濃度が制限されるためであることがわかった。このことから背景光の低減、すなわち励起光を用いない検出法の検討を行うこととし、当初計画において想定した超音波による音響光学効果による原理に限定することなく、超音波を補助的に利用して光学的な位置情報を獲得する計測法について広くその可能性を探ることとした。

その結果、音響化学効果を利用する方法が有効であることを見出した。これは超音波により化学発光反応を音響化学的に促進し、発光を増強することで蛍光物質を検出するものである。その原理を検証するために高効率な化学発光系として知られている、過シュウ酸エステル化学発光(POCL)系を採用し検討を行った。POCLは過酸化水素を酸化剤としてシュウ酸エステルを過酸化することにより、高エネルギー中間体であるジオキセタンジオンを生成し、それが反応系に存在する蛍光物質と電荷移動錯体を形成することにより蛍光色素を化学励起する反応系である。このような化学発光系に、生体計測に用いること

のできる低レベルの超音波を照射することで化学発光が増強する効果を捉えることができた。図1は超音波照射により発光が増強する様子を観測した結果である。また、図2はその発光強度増強率の超音波音圧特性を示したものである。

音響化学効果は一般にキャビテーションの発生に起因する化学反応の促進効果によるものであるが、本実験で用いたような生体に対して安全な弱い超音波によっても、検出可能なレベルの化学発光反応促進作用が存在することが明らかとなった。化学発光増強のメカニズムについては、詳細は未解明であるが、親水性環境下では弱い超音波であっても超音波の疎密波によってキャビテーションが発生し、それによる局所的な高温高压状態が水分子の熱分解を引き起こしフリーラジカルが発生することが知られていることから、ここで観察された化学発光増強効果も音響化学的な酸化反応の促進によるものと推察される。

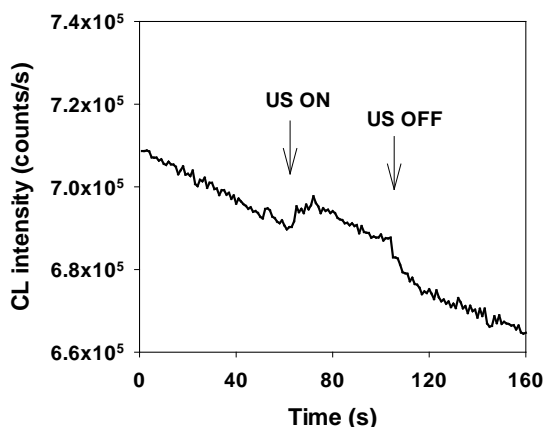


図1 超音波照射による化学発光強度の変化

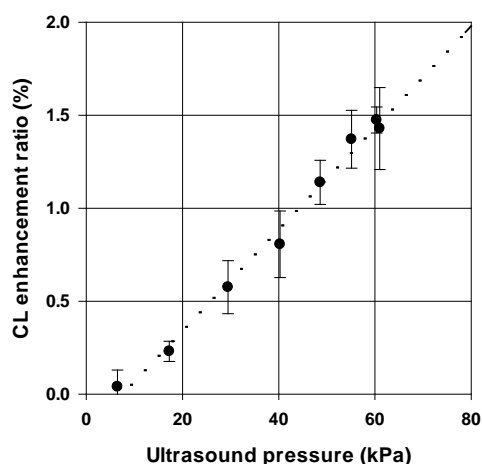


図2 超音波による化学発光増強率の音圧特性

(2) 生体模擬試料による画像計測実験

集束超音波を利用して光散乱媒質内に超音波焦点を形成することで、空間選択的に化学発光を増強し、焦点を走査することにより位置情報を得ることができる。図3に化学発光試料を光散乱媒質中心に埋設した生体模擬試料を用いて、超音波焦点を1軸走査して得られた化学発光強度プロファイルを示す。この結果から、超音波を位置検出の手段として化学発光反応の変化を計測することが可能であり、焦点サイズ程度の分解能で解像できることがわかった。また生体組織と同等な散乱係数をもつ光散乱媒質内で焦点を2次元走査し、画像計測が可能であることを確認した。その他、超音波による発光の増強量が超音波音圧に比例すること、空間分解能が散乱媒質濃度に依存しないことなど、新しい生体トモグラフィ技術として有用であることを示し、その研究成果は Applied Physics Letters **106**, 021103, 1-6 (2015)に掲載された。

(3) 生体試料による画像計測実験とメカニズムの検討

図4は実際の生体試料として50(X)×50(Y)mmのブタ肉ブロックを用いて断層画像計測した結果である。試料中心に化学発光試料を埋設したものであり、中心に発光のピークがとらえられている。この結果から、実際の生体組織においても深さ25mm程度までの画像計測が可能であることが示唆された。さらに、ICGの定量検出、および化学発光増強のメカニズムに関する検討を行った。図5は、発光増強量に対するICG濃度依存性を測定した結果である。発光増強量はICG濃度0.1mM以下においてはほぼ比例関係にある。このことから発光増強率は、ICG濃度に依存しないことがわかる。発光増強率は約1.3%でほぼ一定であった。この結果は、発光強度の増加量を測定することで、ICG濃度を超音波焦点に限局した領域内において定量計測できることを示すものである。

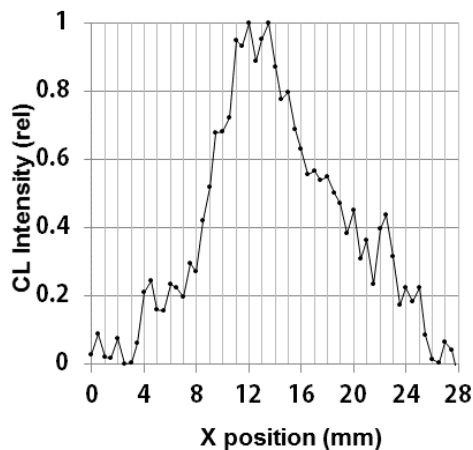


図3 化学発光試料を光散乱媒質内(深さ25mm)に埋設し、超音波焦点を1軸走査して得られた発光増強ピーク

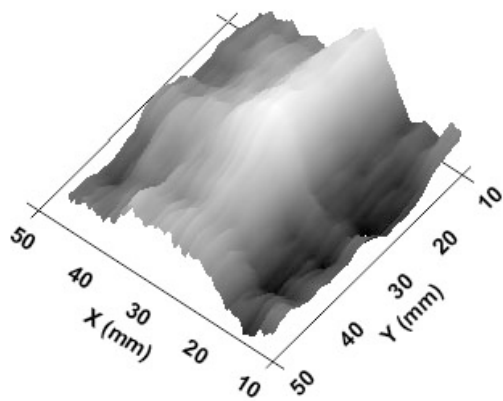


図 4 化学発光試料をブタモモ肉中心（深さ 25mm）に埋設して測定した 2 次元断層画像（X: 超音波進行方向に直交する方向, Y: 超音波進行方向）

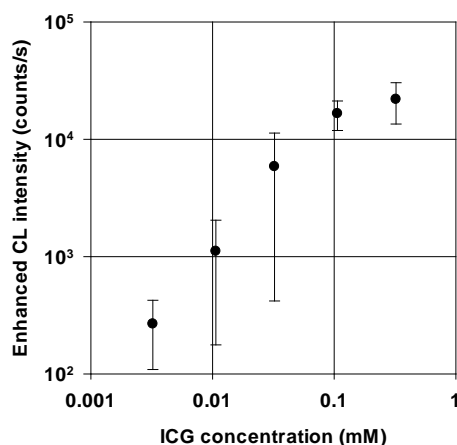


図 5 化学発光増強の ICG 濃度特性

(4) まとめと今後の課題

本研究では、超音波による化学反応の促進効果を利用することで、蛍光物質を化学的励起により検出する新しい画像計測法を開発した。今後この手法を生体計測に適用するためには、ルミノールなどの化学発光系を用いることが必要であるが、ここで得られた結果は、ICG に限らず様々な蛍光プローブの定量画像計測の可能性を示すものである。生体に投与した各種の蛍光色素プローブの濃度分布を定量的に断層計測することが可能であり、音響化学効果による新しいイメージングの可能性を示すことができた。本研究の成果は、ソノケミストリーの専門誌 *Ultrasonics Sonochemistry* **31**, 1-6 (2016) に掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- ① M. Kobayashi, N. Kikuchi, A. Sato, Ultrasound-enhanced chemiluminescence tomography in biological tissue, *Ultrasonics Sonochemistry*, 査読有, Vol. 31, 1-6 (2016)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch>.

2015. 11. 027

- ② M. Kobayashi, N. Kikuchi, A. Sato, Optical tomography of fluorophores in dense scattering media based on ultrasound-enhanced chemiluminescence, *Appl. Phys. Lett.*, 査読有, Vol. 106, 021103, 1-6 (2015)
<http://dx.doi.org/10.1063/1.4905660>
- ③ M. Kobayashi, T. Iwasa, M. Tada, Polychromatic spectral pattern analysis of ultra-weak photon emissions from a human body, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 査読有, Vol. 159, 186-190 (2016)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobio> l. 2016. 03. 037
- ④ M. Kobayashi, Highly sensitive imaging for ultra-weak photon emission from living organisms, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 査読有, Vol. 139, 34-38 (2014)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobio> l. 2013. 11. 011

〔学会発表〕(計 23 件)

- ① 佐藤彰洋, 菊地直斗, 青木孝輔, 小川和訓, 小林正樹, ルミノール化学発光の超音波増強効果を用いた散乱媒質内イメージング, 第 63 回応用物理学会春季学術講演会, 東京都・東京工業大学 (2016. 03)
- ② 小川和訓, 佐藤彰洋, 菊地直斗, 青木孝輔, 小林正樹, 超音波による化学発光増強を用いた生体ルミノールイメージング法の検討, 平成 28 年東北地区若手研究者研究発表会, 郡山市・日本大学 (2016. 03)
- ③ 菊地直斗, 佐藤彰洋, 青木孝輔, 小林正樹, 超音波による化学発光増強を用いた生体イメージング, 第 76 回応用物理学会秋季学術講演会, 名古屋市・名古屋国際会議場 (2015. 09)
- ④ 佐藤彰洋, 菊地直斗, 青木孝輔, 小林正樹, 超音波による化学発光増強効果を利用した光散乱媒質内化学発光プローブイメージング, 平成 27 年度電気関係学会東北支部連合大会, 滝沢市・岩手県立大 (2015. 08)
- ⑤ 佐藤彰洋, 菊地直斗, 青木孝輔, 小林正樹, 化学発光増強を利用した超音波タグ生体光イメージング, 平成 27 年東北地区若手研究者研究発表会, 郡山市・日大 (2015. 02)
- ⑥ 菊地直斗, 佐藤彰洋, 小林正樹, 光散乱媒質内化学発光イメージングの検討, 応用物理学会東北支部第 69 回学術講演会, 仙台市・東北大 (2014. 12)
- ⑦ 菊地直斗, 高橋巧, 小松健太, 高橋良, 小林正樹, 超音波を援用した生体内活性種光イメージング法の検討, 平成 26 年東北

地区若手研究者研究発表会, 仙台・東北工
大 (2014.02)

- ⑧ M. Kobayashi, Biophoton imaging
technology and its application,
Conference on Ultra-weak Photon
Emission From Living Systems (invited
talk), Olomouc, Czech Republic
(2013.06)

[その他]

ホームページ等

[http://www.eis.tohtech.ac.jp/study/labs
/kobayashi/](http://www.eis.tohtech.ac.jp/study/labs/kobayashi/)

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