

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560235

研究課題名(和文) 金属微粒子によるマクロファージの光音響分子イメージング

研究課題名(英文) Photoacoustic molecular imaging of macrophage with metal nanoparticle

研究代表者

西條 芳文 (SAIJO, YOSHIFUMI)

東北大学・医工学研究科・教授

研究者番号：00292277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：音響分解能および光学分解能光音響顕微鏡を構築し、金属の光音響特性および金ナノロッドの吸収スペクトルを実測した。次に、マクロファージに金属ナノロッドを貪食させ、光音響信号の発生を確認した。金ナノロッドを貪食させたマクロファージを光音響イメージングで観察することで、炎症のバイオマーカーとして、動脈硬化における不安定プラークなどに応用できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Acoustical-resolution and optical-resolution photoacoustic microscope system were developed. Photoacoustic properties of some metals was measured and macrophage phagocytosing gold nanorod was observed by the system. Photoacoustic imaging of macrophage with gold nanorod has a potential to be a biomarker of inflammation.

研究分野：医用イメージング

キーワード：光音響イメージング レーザー 超音波 マクロファージ 金属微粒子 金ナノロッド 炎症 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

生体内におけるマクロファージの挙動は、細菌感染等に対する生体防御メカニズムだけでなく、酸化 LDL を貪食した泡沫細胞による動脈硬化の初期病変形成やマトリックス分解酵素によるコラーゲン線維の脆弱化によるプラークの不安定化にも重要な役割を果たしている。

研究代表者は、平成 21~22 年度科学研究費補助金・挑戦的萌芽研究「Vasa vasorum 可視化のための超音響顕微鏡の開発」および平成 23~25 年度 JST 産学共創基礎基盤研究プログラム「透明圧電素子の応用による革新的超音響顕微鏡の開発」で、生体組織にごく短いパルスレーザーを照射する際に発生する超音波を検出することで、超音波の送受信では可視化できない深部組織の血管網を高コントラストに検出することに成功した。

これらの研究成果により、マクロファージにレーザー光を吸収しやすい金属微粒子を貪食させれば、組織深層に存在するマクロファージを超音響分子イメージングにより高解像度かつ高コントラストに検出できるという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、すでに超音響効果が高いことが知られている金ナノロッド以外に、銀、銅、などの金属の超音響効果を定量的に計測し、マクロファージを装飾するのに最適な金属微粒子を明らかにする。さらに、金属を貪食させたマクロファージ内に集簇した金属微粒子が発生する超音響信号を計測することで、金貪食マクロファージの炎症バイオマーカーとしての可能性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 超音響イメージングシステムの構築

超音響信号の励起にマイクロチップレーザー(浜松ホトニクス社、L11038-02Y)を用いた。レーザーのパラメータは、波長 1064 nm、パルス幅 1.1 ns、平均パルスエネルギー 1.4 mJ、繰り返し周波数は可変であり 10-150 Hz である。

音響分解能超音響イメージング (AR-PAM)

超音響信号の受信には、凹面超音波探触子を使用した。超音波トランスデューサは、フッ化ビニリデンとトリフルオロエチレン、(PVDF-TrFE)であり、中心周波数は 20 MHz である。この振動子の最大の特徴は中心に直径 1 mm の孔を有しており、この孔に光ファイバを通すことが可能であるという点で、レーザーと超音波振動子を同軸にすることが可能である。

本研究で用いた凹面超音波振動子のパラメータは、中心周波数 20 MHz、焦点距離 15 mm、開口直径 4.5 mm、方位分解能 61.2 μm 、距離分解能 30 μm である。

図 1 は超音波振動子の外観である。



図 1 凹面超音波振動子の外観

光学分解能超音響イメージング (OR-PAM)

本研究では波長 532 nm と 1064 nm のレーザーを使用した。波長 1064 nm のレーザーの各種パラメータは、平均パルスエネルギー 348 μJ 、パルス幅 1 ns、繰り返し周波数 50 Hz である。

超音響信号の受信には、平面超音波探触子を使用した。超音波トランスデューサは PZT 製で、中心周波数は 8.26 MHz であった。探触子面積は 5 mm 四方であった。

図 2 は平面超音波振動子の外観を示す。

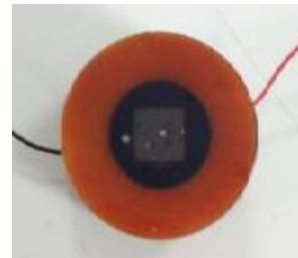


図 2 平面超音波振動子の外観

(2) 金属棒の超音響信号計測

測定対象として、比熱が異なり、吸収係数が近い金属である金、銀、銅を用いた。それぞれ直径は 1 mm で、長さは 5 cm であった。

(3) 金ナノロッドの吸収特性の計測

金ナノロッドの吸収スペクトル測定のために、白色光源(アドバンテスト社、TQ8111)、石英ファイバ、光スペクトラムアナライザ(安藤電気社、AQ-6315B)を用いた。

白色光源の出力は 450 μW である。白色光は様々な波長の光を有しており、光源を出た光を石英ファイバ(700 μm 径、コア径 550 μm)を通じて液体セル内の金ナノロッドに照射した。金ナノロッドを通った後、光スペクトラムアナライザに白色光の各波長の出力が表示されるので、液体セルに金ナノロッドを入れたときの出力を入れないときの出力で規格化し、伝搬長で割ることにより、吸

収スペクトルを求めた。

(4)金ナノロッドを貪食したマクロファージの光音響イメージング

本実験ではマウスの骨髄から分化したマクロファージを使用した。

以下の通りに金ナノロッドを貪食させた。

[day0] マウスの骨髄をメディウムとエタノールで洗い流し、遠心分離で下に細胞のみを落とす。そこにメディウムと 10%CMG を入れて混ぜ、マクロファージを撒いて培養した。

[day3] メディウムを変えた。

[day6] 細胞を回収し、メディウムを洗い流した。トリプシンを入れ、5 分間培養した。

[day7] 2 倍メディウムと金ナノロッドを混ぜ、さらに培養した。18 時間後に回収し、ウェルのふたにマクロファージをまきなおした。

4. 研究成果

(1)光音響イメージングシステム

構築した AR-PAM および OR-PAM の外観は図 3 の通りであった。

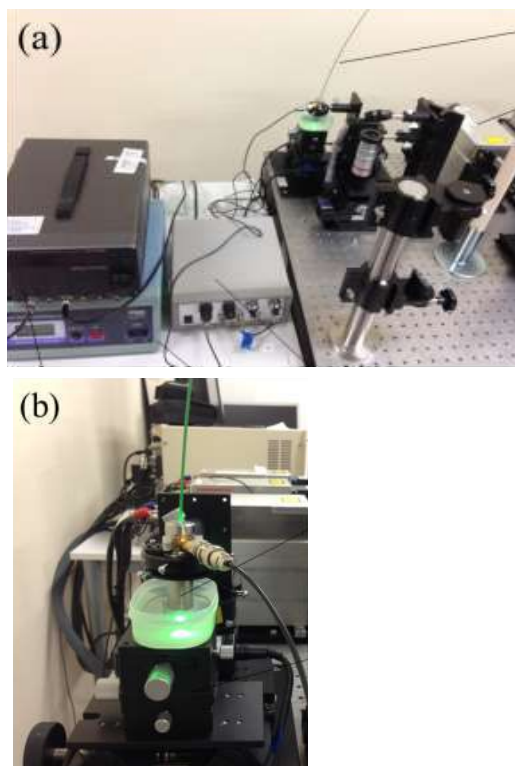


図 3 (a)AR-PAM の全体像
(b)拡大像

(2)金属棒の光音響スペクトル

金、銀、銅の光音響信号のスペクトルは図 4 の通りであった。

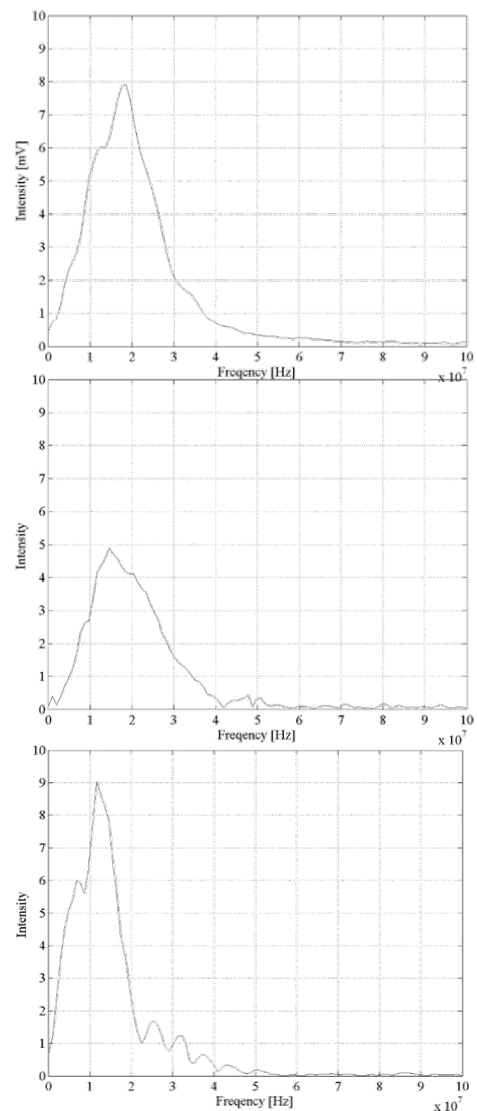


図 4 金、銀、銅の光音響スペクトル

(3)金ナノロッドの吸収特性

金ナノロッドの吸収特性は図 5 の通りとなり、1064 nm 付近にピークを有することが示された。

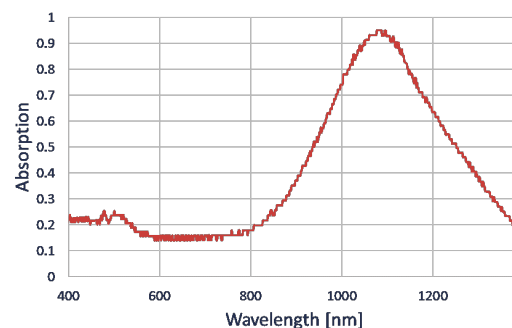


図 5 金ナノロッドの吸収スペクトル

(4)金ナノロッドを貪食したマクロファージの光学顕微鏡像と光音響イメージング

図6は金属ナノロッドを貪食したマクロファージの位相差顕微鏡像と光音響イメージングとの重畳像である。ナノロッドの向きや感度の関係で一部分の細胞のみが光音響信号を発生している。

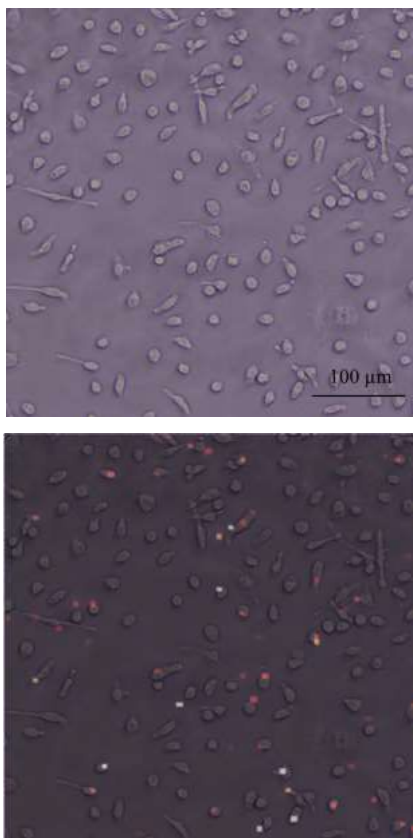


図6 金属ナノロッドを貪食したマクロファージの位相差顕微鏡像と光音響イメージングとの重畳像

(5)総括

AR-PAM および OR-PAM を構築し、金属の光音響特性および金ナノロッドの吸収スペクトルを実測した。次に、マクロファージに金属ナノロッドを貪食させ、光音響信号の発生を確認した。

金ナノロッドを貪食させたマクロファージを光音響イメージングで観察することで、炎症のバイオマーカーとして、動脈硬化における不安定プラークなどに応用できる可能性が示された。

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 11 件)

1. Hagiwara Y, Izumi T, Yabe Y, Sato M, Sonofuchi K, Kanazawa K, Koide M, Saijo Y,

Itoi E. Simultaneous evaluation of articular cartilage and subchondral bone from immobilized knee in rats by photoacoustic imaging system. J Orthop Sci. Vol. 20, No. 2, 397-402, 2015. doi: 10.1007/s00776-014-0692-2

2. Izumi T, Sato M, Yabe Y, Hagiwara Y, Saijo Y. Ultrasonic and photoacoustic imaging of knee joints in normal and osteoarthritis rats. Conf Proc 35th IEEE Eng Med Biol Soc. 1116-9, 2013. doi: 10.1109/EMBC.2013.6609701

ほか

〔学会発表〕(計 82 件)

1. 西條芳文. レーザー光と高周波数超音波による生体組織性状診断. 日本超音波医学会関西地方会第 41 回学術集会(シンポジウム). ホテルグランピア京都, 京都, 2014 年 11 月 22 日.

2. 西條芳文, 鷲尾勝由, 松浦祐司. 透明圧電素子の応用による革新的光音響顕微鏡の開発. 第 53 回日本生体医工学会大会(シンポジウム ヒト生体イメージングを目指した革新的バイオフォトンクス技術の構築), 2014 年 6 月 26 日, 仙台国際センター, 仙台.

3. 佐藤みか, 萩原嘉廣, 羽鳥弘毅, 西條芳文. 光音響顕微鏡を用いた動脈硬化症の観察. 第 53 回日本生体医工学会大会, 2014 年 6 月 26 日, 仙台国際センター, 仙台.

4. 西條芳文, 佐藤みか, 山崎玲奈, 長岡亮, 鷲尾勝由, 松浦祐司. 光音響イメージングによるミクロレベルの組織血流評価. 日本超音波医学会第 87 回学術集会(光超音波画像研究会・基礎技術研究会共同企画 超音波マルチモダリティ技術の最新動向), 2014 年 5 月 9~11 日, パシフィコ横浜, 横浜.

5. Sato M, Yamazaki R, Koide M, Hagiwara Y, Matsuura Y, Kobayashi K, Saijo Y. Development of optical resolution photoacoustic microscopy. 8th Student Workshop of East Asian Consortium on Biomedical Engineering, Aoba Memorial Hall, March 12-13, 2014, Aobayama Campus, Tohoku University, Sendai, Japan.

6. 西條芳文. 光音響イメージングによる生体組織評価 - 現状と展望 -. 日本音響学会 2014 年春季研究発表会(招待講演). 2014 年 3 月 10 日, 日本大学理工学部(駿河台キャンパス), 東京.

7. 佐藤みか, 山崎玲奈, 渡邊裕二, 仲村春和, 松浦祐司, 西條芳文. 光音響イメージングを用いたニワトリ胚の心血管系の可視化. 第 34 回超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム, 2013 年 11 月 20~22 日, 同志社大学室町キャンパス, 京都.

8. 佐藤みか, 山崎玲奈, 渡邊裕二, 仲村春和, 松浦祐司, 西條芳文. 光音響イメージングを用いたニワトリ胚の心血管系の可視化. 平成 25 年度 第 1 回光超音波画像研究会.

2013年8月2日,京都大学医学研究科杉浦地域医療研究センター,京都.

9. Sato M, Izumi T, Watanabe Y, Nakamura H, Saijo Y. Three-dimensional imaging of the vasculature in chicken embryo by combination of ultrasonic and photoacoustic imaging. 2013 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS), Joint IEEE International Symposium on the Application of Ferroelectrics (ISAF) and Piezoresponse Force Microscopy and Nanoscale Phenomena in Polar Materials (PFM), Joint IEEE International Frequency Control Symposium (IFCS) and European Frequency and Time Forum (EFTF), July 21-25, 2013, Prague, Czech Republic.

10. 西條芳文. 高周波数超音波およびレーザー光を用いた生体組織のマイクロイメージング. 可視化情報シンポジウム 2013 (ワークショップ: 未来医療と可視化). 2013年7月16日, 工学院大学新宿キャンパス, 東京.

11. Izumi T, Sato M, Yabe Y, Hagiwara Y, Saijo Y. Ultrasonic and photoacoustic imaging of knee joints in normal and osteoarthritis rats. 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society in conjunction with the 52nd Annual Conference of Japanese Society for Medical and Biological Engineering (JSMBE), July 3-7, 2013. Osaka International Convention Center, Osaka, Japan.

12. 西條芳文. 超音波と光を用いた医用イメージング. スマート・アクチュエータ/センサ委員会第99回定例会(特別講演). 2013年6月10日, キャンパス・イノベーションセンター, 東京.

13. Saijo Y. Evaluation of biological tissues by high frequency ultrasound and photoacoustics. Plenary Talk in Laser Ultrasonics and Advanced Sensing (LU2013). June 25-28, 2013, Yokohama Pacifico, Yokohama, Japan.

14. Saijo Y. Multimodal ultrasound microscopy for biomedical imaging. Invited Paper in the 21st International Congress on Acoustics, 165th Meeting of the Acoustical Society of America, 52nd Meeting of the Canadian Acoustical Association, June 3-7, 2013, Montreal, Canada.

15. Izumi T, Sato M, Nagaoka R, Tada A, Yabe Y, Hagiwara Y, Saijo Y. Three-dimensional photoacoustic imaging of cartilage-bone complex. International Congress on Ultrasonics 2013. May 2-5, 2013, Singapore, Singapore.

ほか

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://ecei.tohoku.ac.jp/imaging/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西條 芳文 (SAIJO, YOSHIFUMI)

東北大学・大学院医工学研究科・教授

研究者番号: 00292277

(2) 研究分担者

小笠原 康悦 (OGASAWARA, KOETSU)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号: 30323603