

公益社団法人日本超音波医学会平成 28 年度光超音波画像研究会抄録

代表：椎名 毅（京都大学大学院医学研究科医療画像情報システム学）

第 1 回

日時：平成 28 年 5 月 27 日（日）

会場：グランドプリンスホテル京都地下 2 階ゴールドルーム（京都市）

日本超音波医学会 第 89 回学術集会「シンポジウム 基礎 1 光と超音波の融合によるイメージングモダリティの新展開」として開催のため、「超音波医学」43 巻 Supplement 号に掲載されていますので、ご参照下さい。

第 2 回

日時：平成 28 年 8 月 6 日（土）

会場：北海道大学 大学院情報科学研究科棟（高層棟）11 階大会議室（札幌市）

日本音響学会 平成 28 年度第 2 回アコースティックイメージング研究会，平成 28 年度第 3 回基礎技術研究会，第 1 回超音波分子診断治療研究会と共催のため，平成 28 年度基礎技術研究会抄録に掲載されていますので，ご参照下さい。

第 3 回

日時：平成 27 年 11 月 12 日（土）

会場：研究交流センター（浜松市楽器博物館併設） 6 階 62 研修交流室（浜松市）

共催：バイオ超音波顕微鏡研究会

1) 細胞観察のためのフィルム型培養器の新規開発

Thomas Tiong Kwong Soon¹，陳 偉健¹，横山康弘²，今安正樹²，小林和人³，穂積直裕¹，吉田祥子¹（¹豊橋技術科学大学，²株式会社メニコン，³本多電子株式会社）

細胞の高周波音響観察に不可欠なフィルム型培養器として，従来市販の汎用品を使用してきたが，今回，新たに超音波顕微鏡用フィルム型培養器を開発した．底面のフィルム厚を 75～85 μm から 50 μm と改良し，上面からの細胞操作が可能な形状とした．試作器を用いた音響観察像と合わせて報告する．

2) 核磁気共鳴エラストグラフィと走査型超音波顕微鏡による髄膜腫弾性率の評価

小泉慎一郎¹，三浦克敏²，鮫島哲朗¹，難波宏樹¹（¹浜松医科大学脳神経外科学講座，²浜松医科大学基礎看護健康科学講座）

頭蓋内腫瘍の弾性率は，病変が頭蓋骨に囲まれていることから非侵襲的に評価することは困難で，これまで弾性率の観点から頭蓋内腫瘍の病理組織学的特性が検討されたことは

なかった．核磁気共鳴エラストグラフィー（Magnetic Resonance Elastography: MRE）は生体を外部から振動させながら撮影し，内部組織に伝わるせん断波の伝播速度を画像化し，弾性率を導き出す画期的な新たな方法で，非侵襲的に生体内臓器の弾性率を画像化することが可能である．2014 年 4 月に本学付属病院に設置され以降，頭蓋内腫瘍の弾性率への撮影条件を最適化し，応用方法を見出した．走査型超音波顕微鏡（Scannig Acoustic Microscopy: SAM）は通過する音速や音響インピーダンスの差を利用して，病理組織切片の弾性率を数値化，画像化でき，組織弾性率の客観的診断方法として確立している．今回，MRE より得られた髄膜腫の弾性率と，手術中の腫瘍弾性率，SAM から得られた病理組織切片の弾性率との相関性を評価することで，MRE の術前弾性率評価の有用性を検証した．

3) 散乱特性に着目した皮膚軟組織の組織性状評価

大村眞朗¹，吉田憲司²，秋田新介³，山口 匡²（¹千葉大学大学院工学研究科，²千葉大学フロンティア医工学センター，³千葉大学医学部形成外科）

皮膚潰瘍の治癒状況を非侵襲かつ定量的に診断する手法が求められている．潰瘍組織の特徴について，エコー信号の振幅分布特性に着目し，数学モデルを用いて非感染・感染組織を指標化することを目指した．さらに，エコー信号の差に関係する組織性状を理解するために，顕微レベルでの音響物性解析と組織病理評価を検討した．

4) 光音響顕微鏡による皮膚組織定量化のための基礎的検討

村田勇也¹，浪田 健²，近藤健悟²，山川 誠²，椎名 毅³（¹京都大学医学部，²京都大学大学院医学研究科，³京都大学人間健康科学系（大学院医学研究科））

光音響イメージングによる皮膚の状態評価，疾患診断をめざし，光超音波顕微鏡により，状態の異なる動物皮膚組織の光音響スペクトルを計測した．波長 400–500 nm 付近の可視領域においては，波長が短いほど光音響信号強度が強いことを明らかにした．また，可視領域の波長において，皮膚の状態変化を評価できる可能性を確認した．

5) Vascular Reconstruction in Optical Resolution Photoacoustic Microscopy using Wavelet and Hessian based Method

Israr Ul Haq，長岡 亮，Syahril Siregar，西條芳文（東北大学大学院医工学研究科）

光超音波はノイズの影響を非常に受けやすい短所が存在する．そこで，本報告ではウェーブレットフィルタリング及びヘッシアン行列による分類によって，動静脈の光超音波画像のノイズを低減し，動静脈を強調する手法を提案する．また，その結果を報告する．

6) 高度光制御技術を用いた光計測・情報処理システム

豊田晴義，井上 卓，田中 博，原 勉（浜松ホトニクス株式会社中央研究所）

我々はレーザー光の 2 次元光位相を制御するための空間光変調器 (Spatial light modulator: SLM) の研究開発とその応用を進めてきた．ここでは，高精度な 2 次元位相変調を実現した光デバイスである LCOS-SLM (Liquid Crystal on Silicon - Spatial Light Modulator) の基本機能と，本デバイスを用いたレーザー加工・顕微鏡・補償光学システム・光ピンセット・特異光生成などの様々な応用事例を紹介する．

7) 光音響イメージングの現況と課題

西條芳文（東北大学大学院医工学研究科）

光音響イメージングは超音波医工学においても医用光学においても急速に発展してきた研究領域である。すでに種々の画像化方式が提案され、数社が実用機を販売し医学・生物学的有用性の検討が行われている。ここでは光音響イメージングの現況を解説するとともに、新たに課題とされてきた点を列挙し、今後のさらなる発展に向けて研究すべき技術につき考察する。

8) 超音波顕微鏡による深さ方向の音響インピーダンスマッピングに関する基礎検討

穂積直裕¹，陳 偉健¹，吉田祥子¹，小林和人²（¹豊橋技術科学大学，²本多電子株式会社）

所謂 B モードエコー画像のもとになる反射波形から，time-domain reflectometry(TDR)を参考とした簡単なアルゴリズムにより生体組織の深さ方向の音響インピーダンス分布を推定することを提案した。皮膚組織を対象とした測定観測実験で良好な結果を得た。

第 4 回

日時：平成 29 年 1 月 8 日（日）

会場：徳島大学 常三島キャンパス 共通講義棟 K502（徳島市）

共催：レーザー学会学術講演会第 37 回年次大会

※第 4 回光超音波画像研究会抄録はレーザー学会学術講演会第 37 回年次大会と共催で行っております。

パラボリックアレイセンサを用いた光音響イメージングシステムの構築

Photoacoustic imaging system with a parabolic array sensor

○西條 芳文 (東北大学)

Yoshifumi SAIJO (Tohoku Univ.)

1. はじめに

ナノ秒レベルのごく短いパルスレーザーを対象に照射すると光エネルギーが熱エネルギーに変換され、対象がごく短時間熱膨張する。このときに発生する超音波を検出し画像化することが光音響イメージングの原理である。

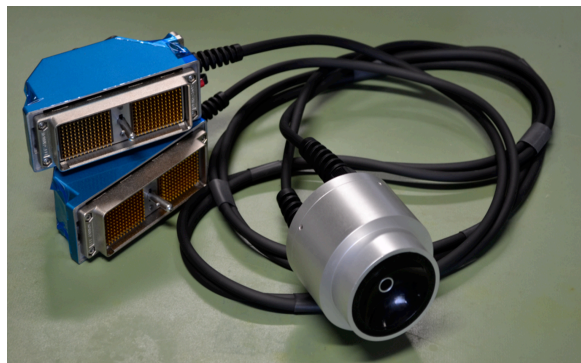
理論的には光音響信号は点音源から発生するが、現実的には対象のマクロな構造や光の照射方向に依存しセンサに近い面から強い信号が発生することを経験している¹⁾²⁾。たとえば、血管では内部に存在する赤血球1個1個が点音源になり血管全体から信号が生じるはずだが、実際には血管の外形のうちセンサに近い方の面からの光音響信号が強い。したがって、対象の構造をより詳細に可視化するためには、多方向から光を照射するか、多方向から超音波を取得するか戦略が必要になる。

本研究の目的は、発生した光音響信号を多方向から検出するために、チリのアルマ望遠鏡のような形状のパラボリックアレイセンサにより細い血管の三次元構造を可視化することである。

2. 方法

(a) 計測システム

直径約4 cm、開口角度45度、中心に約1 cmのレーザー光照射用の穴が開いた256chのパラボリックアレイ型センサを作製した。このセンサを256ch独立送受信可能なプログラマブル超音波送受信機に接続し光音響信号を受信する。使用したレーザーは波長532 nm、パルス幅7 ns、繰り返し周波数20 Hzで、光ファイバーを通して上部からレーザー光を照射する。パラボリック



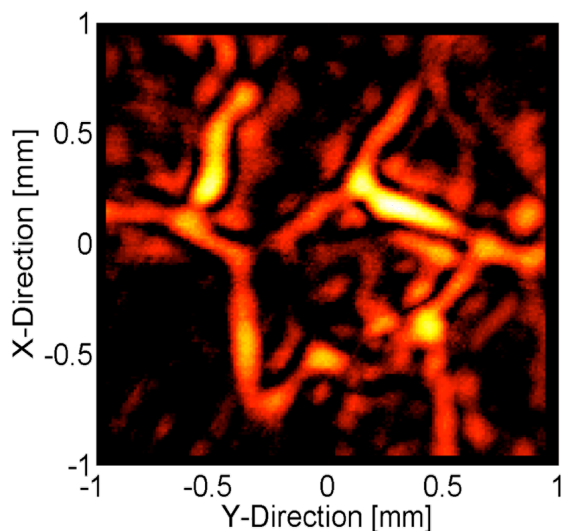
(b) 対象

システムの解像度を評価するために、直径約100 μm の髪の毛を対象として可視化実験を行った。次いで、レーザー光の安全性を十分確認し、画像化アルゴリズムを十分検証したうえで生体の手掌皮下の微小血管の可視化を行った。

(c) 結果

髪の毛に周波数超音波を送受信した際の空間分解能は140 μm 、光音響信号を受信した際の空間分解能は80 μm と計測された。

下図は手掌皮下の血管網で、直径80 μm 程度の血管が十分に視認できる。



参考文献

- 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.
- 2) Yamazaki R, Ogasawara K, Fujiwara M, Kobayashi K, Saijo Y. Macrophage with gold nanorod visualized by optical-resolution and acoustic-resolution photoacoustic microscopes. *Conf Proc 37th IEEE Eng Med Biol Soc*, 2387-90, 2015.

フォーカストシャドウグラフ法による治療用超音波音場の可視化

Visualization of therapeutic ultrasound field using focused shadowgraphy

工藤信樹 (北海道大学)

Nobuki KUDO (Hokkaido University)

1. はじめに

強力集束超音波 (high intensity focused ultrasound) を用いた超音波治療が注目を集めている。腎臓や胆嚢内の結石を衝撃波で破碎する体外衝撃波結石破碎や、肝臓や脳組織を焼灼するホットメスなどに利用されている。体外衝撃波結石破碎装置の音圧は数 10MPa に達し、ホットメスの強度は数 $10^3 \sim 10^4$ W/cm² のオーダーである。このような強力な超音波の音場をセンサで測定することは難しく、古くから光学的手法が利用されてきた。我々は、簡易な光学系で実現できるフォーカストシャドウグラフ法を用いた音場可視化の手法を提案し、その有用性を検討してきた¹⁾。本発表では、本手法を治療用 HIFU 音場の可視化に応用した結果を述べる。

2. 原理と方法

光学的手法による音場可視化は、音場を横切る光の伝搬方向が曲げられる現象を利用している。フォーカストシャドウグラフ法の光学系を Fig. 1 に示す。基本となる光学系は、シャドウグラフ法の光学系である。しかし、一般のシャドウグラフではスクリーンに生じる音場の影を観察するのに対し、フォーカストシャドウグラフ法では音場の直後に置かれた仮想スクリーンに生じる影をカメラで撮影する点に特徴がある。

3. 結果および検討

口径 110 mm, 焦点距離 100 mm, 共振周波数 1.58 MHz の集束型振動子が発生する集束音場を投入電力 10 W と 100 W で可視化した結果を Fig. 2 に示す。本手法では瞬時音場が撮影されるため、撮影タイミングを超音波の 1/10 周期 (60 ns) ずつずらして 10 枚の瞬時音場像を撮影し、重ね合

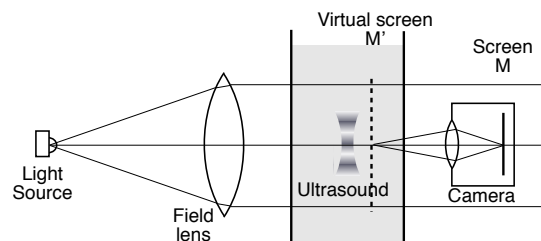


Fig. 1. Optical system for focused shadowgraphy.

わせることにより音場像を作成した。

投入電力 10 W と 100 W における焦点強度は、それぞれ約 400 W/cm², 4,000 W/cm² である。(a) 投入電力 10 W の音場には音軸上に集束するメインビームとその左右にサブビームが確認できる。これに対し、(b) 投入電力 100 W の音場では、メインビームへのより強い集中が観察された。その一方、10W の音場像で見られたサブローブはほぼ消失しており、音圧増加による超音波の非線形伝搬の増強が音場を大きく変化させることが実験的に確認された。

4. まとめ

治療用の強力集束超音波の音場をフォーカストシャドウグラフ法により可視化した。その結果、入力電力に応じて音場分布は大きく変化し、低音圧の音場分布から高音圧の音場分布を推測することの難しさと、高音圧音場を直接可視化することの重要性が確認された。

参考文献

1) N. Kudo, A simple technique for visualizing ultrasound fields without Schlieren optics, *Ultrasound Med Biol*, 41:2071-2081, 2015.

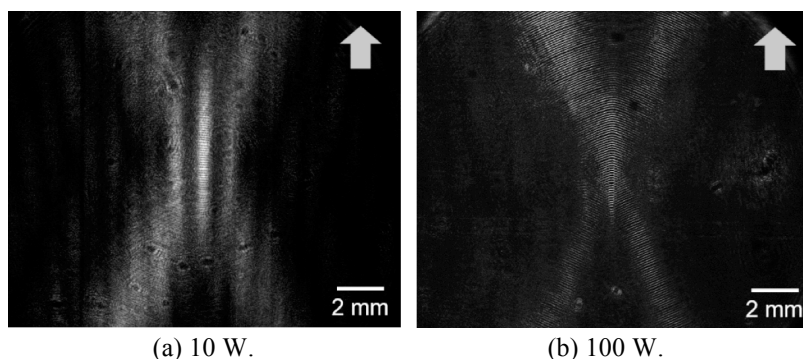


Fig. 2. HIFU fields visualized using focused shadowgraphy.

光ファイバ型音響センサを用いた全光学式光音響イメージングプローブ

All-optical photoacoustic imaging probe using fiber-optic acoustic sensor

○松浦 祐司, 関 淳 (東北大学)

Yuji MATSUURA, Atsushi SEKI (Tohoku Univ.)

1. はじめに

ナノ秒パルスレーザー光を生体に照射した際に生じる超音波を検出する光音響イメージングは、従来のモダリティでは観察できなかった深部の新生血管を高分解能にイメージングできることが期待されている。我々の研究グループでは、内視鏡やカテーテルに挿入して血管や臓器内壁の観察が可能なシステムの実現を目指し、これまでレーザー光伝送用中空光ファイババンドルと音響波検出用ファイバとを組み合わせたイメージングプローブを開発した[1]。本研究では、分解能およびプローブのフレキシビリティの向上を目指し、内径 $100\ \mu\text{m}$ の超細径中空光ファイバによるバンドルを作製し、イメージングを試みたので報告する。

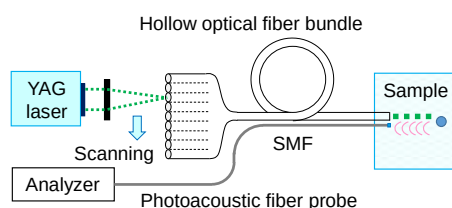


図1 イメージングシステム構成

2. 測定系

図1に開発を行っているイメージングシステムの構成を示す。光音響励起用のパルスレーザー光は中空光ファイバにより伝送されサンプルに照射される。ファイバをバンドル状にし、その直線状の入射端に順次レーザー光を走査することによりイメージングが可能である。中空光ファイバからの光は、ほぼ平行に出射するため、端面にレンズ等を配置しなくても、イメージングが可能となる。また我々が開発した音響波検出用光ファイバプローブと組み合わせることにより、細径かつフレキシブルなイメージプローブを実現できる。今回は、従来のシステムで使用されていた内径 $320\ \mu\text{m}$ の中空光ファイバを $100\ \mu\text{m}$ に細径化し、図2に示すように37本束ねることによりバンドルを構成した。バンドルの外

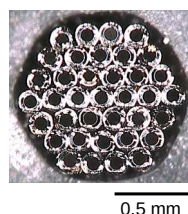


図2 ファイババンドル端面。

径は $1.2\ \text{mm}$ 、最小曲げ半径は $10\ \text{mm}$ 程度である。超細径中空光ファイバに効率よく光を入射するために、光源としてビーム品質の優れたマイクロチップレーザー（波長 $532\ \text{nm}$ 、 $100\ \text{Hz}$ ）を用い、焦点距離 $76\ \text{mm}$ のレンズを用いてファイバに入射した。イメージング実施時のファイバからの出射エネルギーは $0.1\ \text{mJ}$ 程度である。なお光音響波の受信素子として、今回はニードル型ハイドロフォンを使用した。

3. 測定結果

直径 $150\ \mu\text{m}$ の銅線2本をサンプルとしてイメージングを行った。これを図3(a)のように、深さ方向に $700\ \mu\text{m}$ の間隔でX型に配置した。ファイバ素子に対して検出した光音響信号にMATLABを用いてデジタルフィルタリングを行った後、ある時刻における振幅を素子毎にマッピングすることにより図3(b)のCモード画像を取得した。また包絡線検波をすることによりバンドルの列毎のBモード画像を構成し、それらを組み合わせることで図3(c)に示す3次元的画像を構成した。これらの結果より、2本の銅線の識別に成功するとともに、これまでよりも高解像度に画像取得可能であることを確認した。

参考文献

- 1) Y. Miida and Y. Matsuura, Optics Express. **21** (2013) 22023.

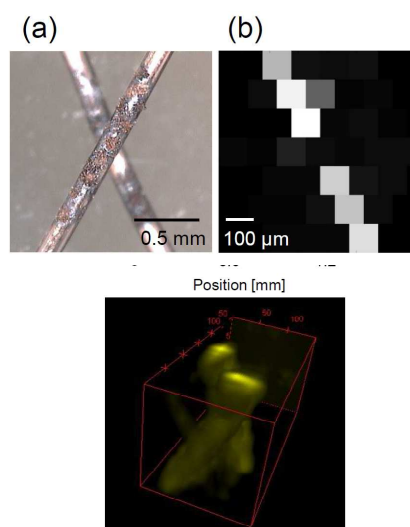


図3 光音響イメージング結果。
(a) サンプル（外観） (b) Cモード画像
(c) 3次元画像

ハンドヘルド型光音響撮像装置を用いた脂質性プラークの検出

Evaluation of lipid-rich plaque using handheld photoacoustic imaging system

○浪田 健, 平野 進, 近藤 健悟, 山川 誠, 椎名 毅(京都大学)

○Takeshi NAMITA, Susumu HIRANO, Kengo KONDO, Makoto YAMAKAWA, Tsuyoshi SHIINA
(Kyoto Univ.)

1. はじめに

脳梗塞や心筋梗塞の原因となる病態に動脈硬化(アテローム硬化)がある。アテローム硬化では高血圧、高血糖などにより血管内皮細胞が損傷し、血管壁内に脂肪成分が沈着することにより脂肪性プラークを形成する。形成されるプラークには安定プラークと不安定プラークの2種類があり、前者は退縮・無変化・長期間をかけて肥大し慢性的に血管を狭窄・閉塞するといういずれかの転帰をとることがほとんどである。しかし、後者の不安定プラークは外部からの刺激により崩壊し、急性に血管を閉塞する可能性があり、早期に発見し、病態の進行の抑制・崩壊の予防を行う必要がある。超音波検査によりプラークの検出は可能であるが、そのプラークの性状を識別することは困難である¹⁾。

そこで、光音響イメージングにより血管内プラークの性状診断を行うことを検討した。光音響イメージングでは、パルス光を照射し、組織が光を吸収し発生させる超音波を検出することで、音源である吸光体の分布や性質を画像化する。血管カテーテルを使用した光音響イメージングによりプラークの性状診断を試みている研究もあるが^{2,3)}、侵襲性が比較的高くまた操作も煩雑である。そこで本研究では、通常の超音波診断装置のプロープに光照射部を取り付けることにより、非侵襲かつ簡便に体表から撮像可能な装置の開発を行った⁴⁾。また、実用条件下において、本手法の有用性を検証した。

2. 光音響スペクトル

吸収体からの光音響信号の初期音圧 P は以下の式より表すことができる⁵⁾。

$$P(\lambda) = \Gamma \mu_a(\lambda) F, \quad (1)$$

$$\Gamma = \beta c_s^2 / C_p. \quad (2)$$

ここで、 λ は波長、 Γ はグリュナイゼン係数、 μ_a は吸収係数、 F は組織表面での照射フルエンスである。また、 β は熱膨張係数、 c_s は音速、 C_p は定圧比熱である。

(1)式に示すように、光音響信号の振幅は吸収係数 μ_a に比例する。物質はそれぞれ固有の吸光スペクトルを有しており、複数の波長で計測を行い、その振幅の変化(光音響スペクトル)を求めることにより、組織性状を識別することが可能となると考えられる。

3. 実験システムおよび試料

実験系を Fig. 1 に、ハンドヘルド型プローブ((株)オプトラインに製作委託)の外形を Fig. 2 に示す。波長 800–1030 nm, 1090–1400 nm のナノ秒パルスレーザー光(PG152B-T, 東京インスツルメンツ, 繰り返し周波数: 30 Hz, 照射光量: 1.5–7.6 mJ/pulse, 5 nm 間隔)を超音波リニアプローブに装着したバンドルファイバ(素線: 三菱電線工業, SFM230M, コア径: 230 μ m, 出射端に集光用プリズム装着)を介してファントム表面に照射し、各波長での光音響信号(I, Q 信号)をリニアプローブ(SL15-4, Supersonic Imagine, 周波数帯域: 4–15 MHz)によりサンプリング周波数 20 MHz で計測した。入射光の一部をバンドルファイバ前に設置したビームサンプラで反射させてその強度を計測し、光音響信号強度の正規化を行った。また、同じプローブを用い、超音波像も同時に撮像した。

ファントムの模式図を Fig. 3 に示す。血管模倣ファントムとして、計測表面から深さ 5 mm の位置に寒天で固めた円柱状のヒツジの保存血液(直径: 7 mm)を埋入させたゲル状ファントム(基材: 2%寒天, 大きさ: 60×66×42 mm³)を使用した。オレイン酸コレステロールとリノ

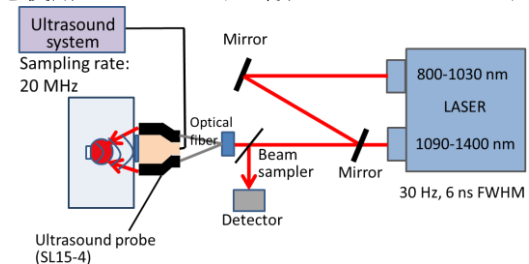


Fig. 1. Experimental setup.

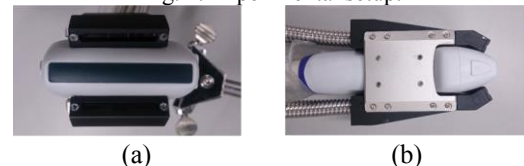


Fig. 2. Developed handheld photoacoustic probe: (a) front view, (b) side view.

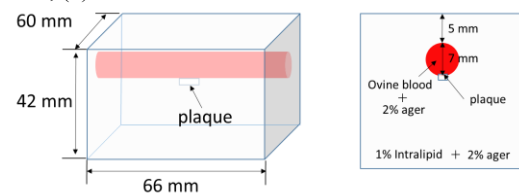


Fig. 3. Schematic view of artery plaque model.

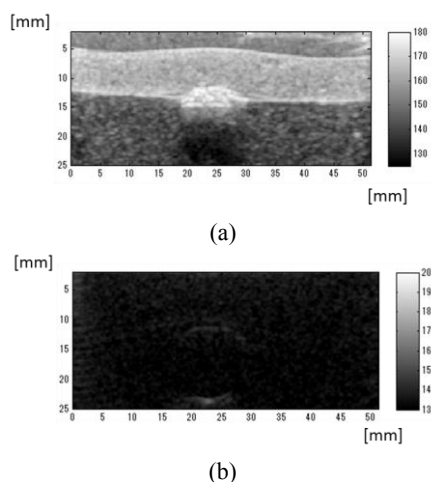


Fig. 4. Results for a phantom experiment: (a) ultrasound image, (b) photoacoustic image at 1210 nm.

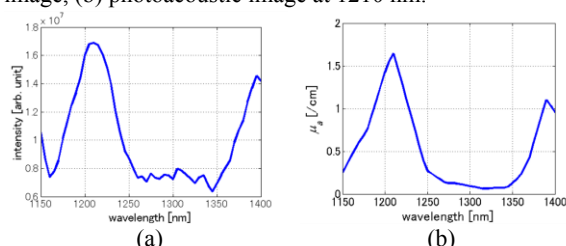


Fig. 5. Results for phantom experiment and absorption spectrum: (a) spectrum of photoacoustic signals observed from plaque model, (b) absorption spectrum of lipid^{6,7)}.

ール酸コレステロールを生体における各コレステロールの存在比⁶⁾に相当する 5:1 の割合で混合したコレステロールを模擬プラークとして、円柱状の血液の下部の一部に付着させた。一般的な生体の光学特性を考慮し、周辺媒質のイントラリピッドの濃度は 1 wt.% とした。

4. 脂質性プラークの検出

撮像結果の一例として、脂肪の吸収が大きい波長 1210 nm における光音響像を Fig. 4 に示す。また、同時に計測した超音波像 (B モード像) も合わせて示す。プラークを埋入した位置から強い光音響信号が得られていることがわかる。

そこで、高輝度部の光音響スペクトルの算出を行った。結果を Fig. 5 に示す。また、脂肪の吸光スペクトル^{7,8)}も合わせて示す。吸光スペクトルとほぼ同様の光音響スペクトルが得られていることがわかる。脂肪の吸光スペクトルの形状が特徴的な 1150–1300 nm において、正規化相互相関マッチング法により光音響像の各画素の光音響スペクトルと吸光クトルの類似度を求めた。結果を Fig. 6 示す。埋入したプラークの位置において高い相関を示していることがわかる。

これらの解析をとおり、開発したハンドヘルド型プローブにより、実用条件下において脂質性プラークを検出できることを確認した。

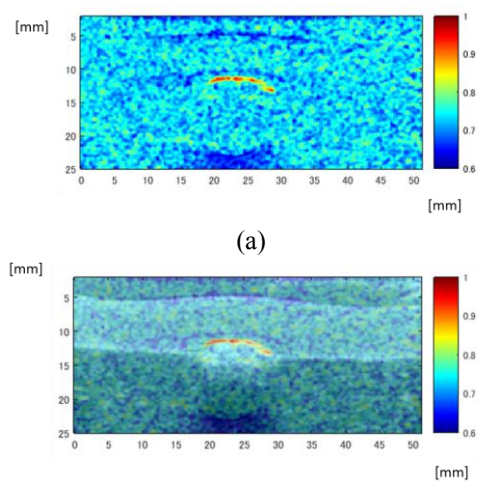


Fig. 6. Result of a phantom experiment: (a) distribution of correlation coefficient between absorption spectra of lipid and photoacoustic spectrum, (b) superimposition of the detected lipid-rich area on B-mode image.

5. おわりに

非侵襲的かつ簡便な頸動脈不安定プラークの検出をめざし、体表から撮像可能なハンドヘルド型光音響イメージング装置の開発を行った。頸動脈プラークを模した生体ファントムを用いた実験により、実用条件下において、少なくとも深さ 12 mm まではプラークを検出できることを実証した。

今後、検出精度の高精度化を図るとともに、*in vivo* により、その実用性を検証する必要があると考える。

謝辞

本研究は、総合科学技術・イノベーション会議により制度設計された革新的研究開発推進プログラム(ImPACT)により、科学技術振興機構を通して委託されたものです。

参考文献

- 1) I. Kronzon, and P. A., Tunick: *Circulation* **114** (2006) 63.
- 2) K. Jansen *et al.*: *Photoacoustics* **2** (2014) 12.
- 3) D. van der Laan *et al.*: *Proc. IEEE Ultrason. Symp.* (2014) 1591.
- 4) S. Hirano, T. Namita *et al.*: *Proc. SPIE* **9708** (2016) 97084Y.
- 5) L. V. Wang, Ed.: *Photoacoustic Imaging and Spectroscopy* (CRC Press, Boca Raton, 2009).
- 6) C.-L. Tsai *et al.*: *J. Med. Biol. Eng.* **21** (2001) 7.
- 7) R. L. P. van Veen *et al.*: *OSA BIOMED Top. Meet.* (2004) SF4.
- 8) G. B. Altshuler *et al.*: *USA Patent* (2003) US6605080 B1.

術中迅速がんイメージングを目指した、activatable 蛍光・光音響プローブの開発

Development of activatable fluorescence and photoacoustic probes for intraoperative rapid imaging of tumors

○浦野 泰照 (東京大学大学院薬学系研究科・医学系研究科、AMED CREST)

Yasuteru Urano (Grad. Sch. Pharmaceutical Sciences & Grad. Sch. Medicine, Univ. Tokyo; CREST AMED)

1. はじめに

蛍光イメージング技法は、生きている細胞や動物体内における各種生体応答を、リアルタイムかつ高感度に捉えることが可能であるため、現代の医学・生物学領域研究に必須の手法となっている。本手法の実現には、観測対象分子と反応・結合することで初めて蛍光を発するようになる機能を持つ分子、いわゆる蛍光プローブが必須であるが、筆者らはこれまでに、有機小分子蛍光プローブの論理的精密設計法を多数開発してきた。本発表ではその中で、分子内スピロ環化を原理とする設計法の確立による、術中迅速がんイメージングプローブの開発について紹介する。

2. 分子内スピロ環化を原理とする蛍光プローブの論理的設計・開発

筆者らはこれまでに、分子内スピロ環化平衡を蛍光制御原理とする蛍光プローブの新設計法の確立に成功し、活性酸素種やレポーター酵素活性を生細胞で可視化する蛍光プローブの開発に成功してきた^{1,2}。本分子設計法は、特定の蛍光団近傍に求核性置換基を適切に配置することで蛍光団への求核付加が起こり、pH 7.4 の生理的条件下でも、可視光領域に吸収を持たない無色のスピロ環化状態で存在するようになることを利用したものである。このスピロ環化構造は、求核性置換基側の求核能、あるいは蛍光団側の求電子性が低下することで不安定となり、元の蛍光団が復活して蛍光を発するようになる。よって可視化対象分子や環境によってこの変化を誘発することが出来れば、蛍光プローブの論理的な開発が可能となる。

スピロ環化を原理として開発した蛍光プローブの一つに、アミノペプチダーゼ活性検出蛍光プローブがある。これは、通常のリダミングリーンのカルボキシ基を求核性置換基であるヒドロキシメチル基へと置換したヒドロキシメチルリダミングリーンの母核とする。HMRG のキサンテン蛍光団は、その求電子性が少し足りないため、弱アルカリ性環境でなければスピロ環化構造が安定とならないが、HMRG の一つのアミノ基をアミド化すると、その求電子性が向上して中性 pH 環境でもスピロ環化体が優先するようになる。この原理に基づき、HMRG の一つのアミノ基をグルタミン酸のγ位カルボキシ基でアミド化した GGT 活性検出

光プローブ gGlu-HMRG の開発を達成した (図 1a)^{3,4}。gGlu-HMRG は、多くのがん細胞でその発現が亢進しているとの報告があるγ-グルタミルトランスペプチダーゼ (以下 GGT) の良い基質となり、GGT によってグルタミン基部分が加水分解されて強蛍光性の HMRG を生成する。gGlu-HMRG によるがん細胞イメージング機構を図 1b に示した。中性 pH 環境ではほぼ無蛍光である gGlu-HMRG は、正常細胞環境ではその GGT 活性が低いいためほぼ無蛍光のまま存在し、よってバックグラウンド蛍光は極めて低く抑えられるが、がん細胞が存在する環境では、がん細胞表面に高発現している GGT によって加水分解され、強蛍光性の HMRG を細胞膜のすぐ外側で生成する。HMRG はその高い疎水性から細胞膜を容易に透過し、がん細胞内に取り込まれてリソソームに集積する。この原理によってがん部位が強い蛍光を発するようになる。

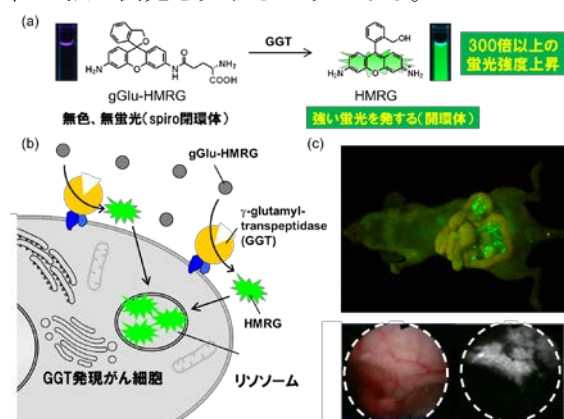


図 1 HMRG をプローブ骨格とする新規プロテアーゼ活性検出蛍光プローブの精密分子設計法の確立 (a) 新規 GGT 活性検出蛍光プローブ gGlu-HMRG の開発 (b) GGT 活性検出蛍光プローブ gGlu-HMRG によるがん細胞イメージング機構 (c) gGlu-HMRG の腹腔内投与による腸間膜上微小播種がんの迅速イメージング (プローブ投与 10 分後) 上: 市販のデジタルカメラによる撮像 下: 蛍光内視鏡下での gGlu-HMRG の局所散布による微小がん検出 (左: 通常の白色光像、右: 蛍光像(プローブ散布 5 分後))

実際に開発した gGlu-HMRG を活用したがん蛍光イメージング結果を図 1c に示した。GGT 活性の高い卵巣がん細胞を腹腔内に播種させたがんモデルマウスを作成し、これに gGlu-HMRG

の PBS 溶液を腹腔内投与し、5 分後に開腹して蛍光イメージングを行った。その結果、がん部位が極めて強い蛍光を発生し、1 mm 以下の微小がんであっても、明確にこれを検出可能であることが明らかとなった (図 1c 上)⁴。なおこの写真は特別な装置で撮像したものではなく、筆者が個人所有している市販のデジタルカメラで、515 nm のロングパスフィルター越しに撮ったものである。すなわち本プローブの散布により、裸眼でも十分に検出できるだけの強い蛍光ががん部位から発生されており、これは次々とプローブを高蛍光性生成物へと変換する酵素のターンオーバーによるものであり、他の可視化技術では全く達成できないレベルの明るさである。さらに麻酔したがんモデルマウスの腹膜に小さな穴をあけ、ここから蛍光内視鏡 (オリンパス (株) と共同開発) を挿入し、鉗子孔からスプレーヤーでプローブを局所的に散布した結果、プローブスプレー直後から徐々にがん部位が光り始め、プローブ散布後わずか数十秒～数分程度で、通常の白色光内視鏡では識別不可能な微小がん部位でも、これを明確に蛍光可視化できることが明らかとなった (図 1c 下)⁴。

3. GGT 活性検出蛍光プローブによるヒト新鮮臨床検体を用いたがん部位迅速可視化

前項で達成した短時間でのがん部位可視化技術は、がんの外科手術、内視鏡下切除術のタイムフレームに挿入可能な実用性の高い技術であるため、実臨床への応用が強く期待される技術である。しかしながら一方で、がんは非常にヘテロ性の高い疾患であり、gGlu-HMRG によって実際の患者さんのがんの検出が可能かどうかを検証することが必須となる。

一般に体内がん診断薬の有効性は、患者さん体内に注射などによって導入して検証する必要があるが、このためには診断薬の安全性試験を全て完了する必要がある、費用と時間の問題からこれを達成することは容易ではない。よりハードルの低い方法として、外科手術などで摘出したヒトがん臨床検体に体外でプローブを適用し、*ex vivo* でその機能を検証する方法が考えられるが、最終的に全ての臨床検体は病理組織検査を行う必要があるため、摘出臨床検体を病理検査用にホルマリン固定するまでに 1 時間以上かかってしまうと、病理の観点からの問題を生じる可能性があり、このような実験の許可を倫理委員会から得ることは難しい。この意味において、1～10 分程度でがんイメージングが可能な gGlu-HMRG によるがん迅速イメージング手法は、病理の問題を突破してヒト臨床検体での検証が可能な初めての方法である。

以上の理由から、gGlu-HMRG による迅速がんイメージング手法は多くの臨床外科医の興味を

引き、実際に外科手術で体外に取り出したばかりのヒト摘出新鮮臨床がん検体を用いたプローブ機能の検証が始まった。例えば、乳がん手術で摘出された実際の新鮮臨床検体に gGlu-HMRG を散布し、その有用性を検証した。その結果、非浸潤性乳管癌 (図 2 上)、浸潤性乳管癌 (図 2 下) など様々な乳腺腫瘍を数分程度の迅速性で検出できることが明らかとなり、これまで肉眼ではわからなかった腫瘍を明瞭に描出することに成功した⁵。100 例以上の臨床検体での検証の結果、1 mm 以下の微小がんであっても、プローブ適用後 5 分以内で検出可能であること、またヘテロ性の高い疾患であるがんとしては異例に高い感度、特異度 (90% 以上) での検出が可能であることが明らかとなった。本手法は切除断端全体をイメージング対象にできることから、目視では検出不可能な微小がんが断端に遺残している場合でもこれを明確に検出することが可能となり、局所再発の頻度を劇的に低下させるものと大いに期待している⁵。

さらに本プローブ技術の発展により、新たな光音響イメージングも可能であることが明らかとなりつつある。このように、化学を駆使して設計・開発した高機能蛍光プローブは、新医療技術として大きく実臨床に貢献できるポテンシャルを有しており、今後も本研究を継続していく予定である。

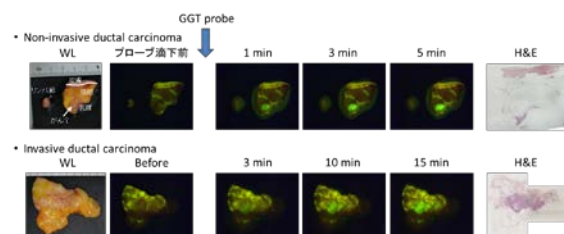


図 2 ヒト乳がん新鮮臨床検体への gGlu-HMRG 散布による切除断端微小がんの可視化 プローブ投与後 1 分でも微小がん部位が可視化され、数分後には術者の目でも十分視認可能な強い蛍光を発生するようになった。蛍光を発生する部位と術後の病理組織染色像 (H&E) は良い一致を示した。上段：非浸潤性乳管がん、下段：浸潤性乳管がん

参考文献

- 1) Kenmoku S, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 129: 7313-7318, 2007.
- 2) Kamiya M, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 133: 12960-12963, 2011.
- 3) Sakabe M, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 135: 409-414, 2013.
- 4) Urano Y, et al., *Sci. Transl. Med.*, 3: 110ra119, 2011.
- 5) Ueo H, Shinden Y, et al., *Sci. Rep.*, 5: 12080, 2015.

金ナノ粒子を用いた activatable 光音響イメージングプローブの開発

Development of activatable photoacoustic imaging probes based on gold nanoparticles

寺西 利治 (京都大学)

Toshiharu TERANISHI (Kyoto Univ.)

1. はじめに

光音響イメージングは従来の光イメージングに比べて、生体深部を可視化できる優れた特長をもつ一方、低感度という大きな欠点を有する。そのため、光音響シグナルを高感度化し *in vivo* で可視化する光音響イメージングプローブの開発が必要不可欠である。なかでも、癌組織をターゲットとする **activatable** イメージングプローブは、癌に特徴的な酵素活性によりペプチド結合などが切断されることで光音響特性が変化するプローブであり、シグナルとの分離性が向上できることが望ましい。光音響シグナルの高感度化には、局在表面プラズモン共鳴波長におけるモル吸光係数の大きい金ナノ粒子の利用が合目的である^{1,2)}。金ナノ粒子を **activatable** 光音響プローブとして用いる場合、癌に特徴的な酵素による金ナノ粒子の表面有機配位子（ペプチダーゼ基質を含む）開裂がトリガーとなり金ナノ粒子を凝集させ、光音響シグナル発生波長を可視領域から近赤外領域にシフトさせることが、金ナノ粒子プローブの設計指針の一つとなる（図1）。本講演では、このような特定の癌に対する **activatable** 金ナノ粒子プローブ開発に向けた、種々の有機配位子保護金ナノ粒子の細胞取り込み挙動と光音響シグナル発生に関する最近の成果を紹介する。

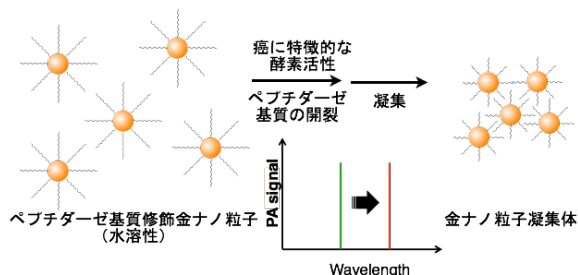


図1. 金ナノ粒子プローブの設計指針

2. 金ナノ粒子界面電位が細胞取り込み挙動と光音響シグナルに及ぼす影響^{3,4)}

金ナノ粒子プローブの癌細胞への取り込み挙動に関する知見を得るために、種々のイオン性有機分子で保護された水溶性金ナノ粒子を合成し、ヒト肺基底上皮腺癌細胞由来の A549 細胞（GGT 酵素活性高）、扁平上皮癌由来の H226 細胞（GGT 酵素活性低）、ヒト臍帯静脈内皮細胞の HUVEC（GGT 酵素活性極低）への取り込みについて検討した。

まず、生体適合性が高いカチオン性高分子であるポリ-L-リジン臭化水素塩（PLL，図2a）で保護した 9.7 nm 金ナノ粒子を合成し、ゼータ電位測定ならびに細胞への取り込み実験を行った。ゼータ電位は+32.5 mV@pH7.2 であり、いずれの細胞にもリソソーム内に分散状態で取り込まれており（図2b），培養時間の増加とともに取り込み量も増加した。また、他のカチオン性有機配位子を用いた場合も、金ナノ粒子は細胞内に分散状態で取り込まれることが分かった。一方、pH7 付近でアニオンとなるグルタチオン（GSH，図2c），クエン酸三ナトリウム，ポリアクリル酸ナトリウムなどのアニオン性有機分子を金ナノ粒子の保護剤として用いると、ゼータ電位は全て負の値をとり、細胞のリソソーム内に凝集して取り込まれることが分かった（図2d）。

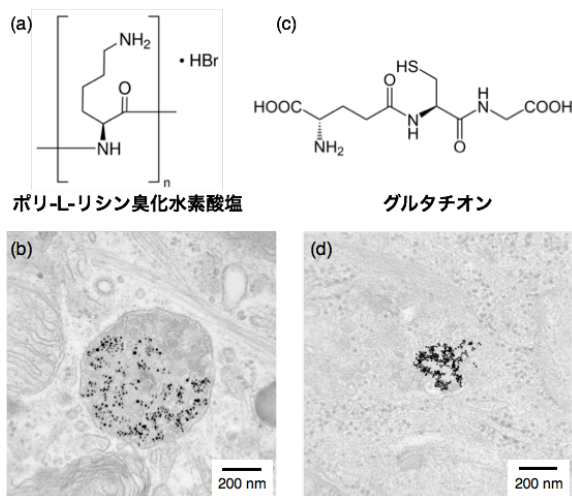


図2. (a) PLL の化学構造，(b) H226 細胞へ取り込まれた PLL 保護金ナノ粒子の透過電子顕微鏡像（ナノ粒子濃度：3.2 nM，培養時間：180 分），(c) GSH の化学構造，(d) H226 細胞への GSH 保護金ナノ粒子の取り込み結果（ナノ粒子濃度：3.2 nM，培養時間：180 分）

次に、細胞内で分散・凝集状態にある金ナノ粒子が発生する光音響シグナルについて検討した。10 nm 程度 of 金ナノ粒子は、分散状態で約 520 nm に局在表面プラズモン共鳴に由来する極大吸収を示し、同波長で光音響シグナル強度も極大となる。図3に、PLL 保護金ナノ粒子および GSH 保護金ナノ粒子の細胞取り込み時間に対する光音響シグナル強度比（625 nm/525 nm）の

変化を示す。カチオン性 PLL 保護金ナノ粒子では、525 nm における光音響シグナル強度に比べ 625 nm の強度が小さい。一方、アニオン性 GSH 保護金ナノ粒子では、取り込み時間とともに 625 nm のシグナル強度が大きくなっており、金ナノ粒子の凝集を示唆している。すなわち、細胞の酵素活性の差異によらず、アニオン性金ナノ粒子は凝集状態で細胞に取り込まれ、近赤外領域に強い光音響シグナルを発生することが明らかとなった。

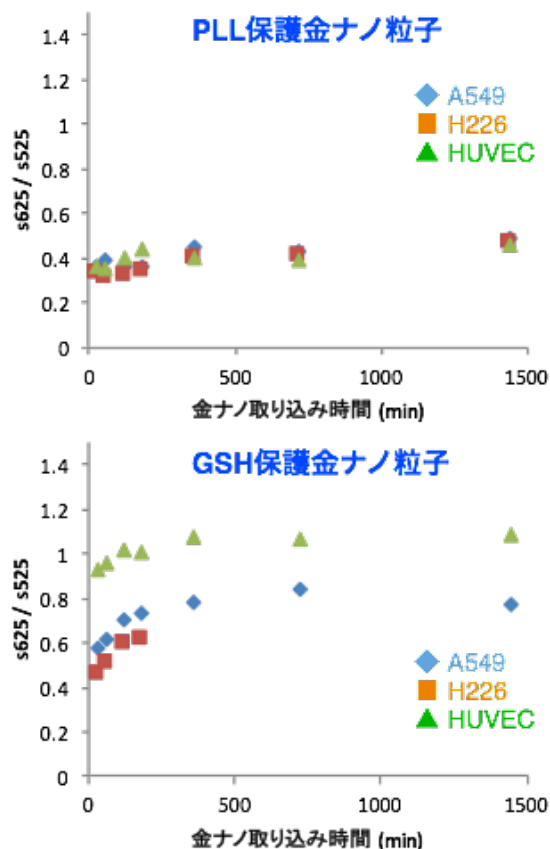


図3. PLL 保護金ナノ粒子および GSH 保護金ナノ粒子の細胞取り込み時間に対する光音響シグナル強度比 (625 nm/525 nm) の変化 (フルーエンス $2.5 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$, 40 パルス照射)

3. 有機配位子の化学構造が金ナノ粒子の細胞取り込みと光音響シグナルに及ぼす影響

アニオン性有機配位子として、ポリビニルピロリドン (PVP) およびポリエチレングリコール (PEG) を用い 15 nm 金ナノ粒子を合成し、上記と同様にゼータ電位測定ならびに細胞への取り込み実験を行った。PVP 保護金ナノ粒子では、アニオン性金ナノ粒子と同程度のゼータ電位を有しており、細胞取り込み実験でもリソソーム内に凝集して取り込まれ、近赤外領域に強い光音響シグナルを発生することが分かった。一方、PEG 保護金ナノ粒子は、非常に特異的な挙動を示すことを見出した。すなわち、PEG で

表面を完全被覆した金ナノ粒子を用いた場合、 -34.8 mV@pH7.1 のゼータ電位をもっているにもかかわらず、いずれの細胞にも金ナノ粒子は取り込まれず、光音響シグナルもほとんど観測されなかった。これは、anti-cancer drug delivery 分野の「PEG ジレンマ」に見られる現象 (EPR 効果を示すが細胞に取り込まれにくい) と同じであると考えられる。この結果は、金ナノ粒子の細胞への取り込みには、界面電位ではなく有機配位子の化学構造が大きく影響していることを示唆している。PEG 鎖の細胞への取り込まれにくさを利用することにより、癌細胞に特異的に凝集体として取り込まれる activatable 金ナノ粒子プローブを設計・合成できるものと期待される。

4. 結論

界面電位の異なる種々の金ナノ粒子の細胞取り込み実験を行った結果、カチオン性金ナノ粒子は細胞のリソソーム内に分散状態で取り込まれる一方、アニオン性金ナノ粒子は細胞のリソソーム内に凝集して取り込まれることが分かった。さらに、保護配位子として PEG を用いると、金ナノ粒子の細胞への取り込み抑制が観察された。この現象を利用してペプチダーゼ基質と結合させた有機配位子を合成することにより、近い将来、癌細胞に特異的に凝集体として取り込まれる activatable 金ナノ粒子プローブが合成できるであろう。

謝辞

本研究は、日本医療研究開発機構産学共創基礎基盤研究プログラム (16im042001h0206)、ならびに、京都大学化学研究所共同利用・共同研究 (#2016-44) の助成を受け行われた。

参考文献

- 1) C. Li, T. Teranishi et al.: Chem. Mater. **25** (2013) 2580.
- 2) M. Eguchi, T. Teranishi et al.: Langmuir **28** (2012) 9021.
- 3) 石原美弥, 寺西利治, 化学工業 **66** (2015) 725.
- 4) M. Ishihara, T. Teranishi et al.: Proceedings of SPIE **8943** (2014) 8943D-1-6.

がん可視化のための光音響イメージング技術開発

Development of photoacoustic imaging technologies for cancer detection

石原 美弥(防衛医科大学校)

Miya ISHIHARA (National Defense Medical College)

1. はじめに

パルスレーザー光を生体に照射すると光吸収に伴う熱弾性過程により超音波（超音波画像診断での超音波エネルギーとは発生原理や周波数特性が異なるので光音響波と呼ぶこともある）が発生する．この現象を利用して，光吸収体で発生する超音波を検出して光吸収体の分布画像を再構成して得られるのが光音響画像である．

生体組織を対象とした光計測では，散乱と吸収によって生体深部の計測が困難で空間分解能が低下する．光音響イメージングは，散乱係数が光と比較して2～3桁小さい超音波を検出信号とするために，光イメージングにおける光散乱に起因する分解能及び感度の悪化が生じず，高いコントラストで生体深部を可視化できる特長を持つ¹⁾．

2. 光音響イメージングにおける励起光

光音響現象に基づいて高効率に超音波を発生させるには，(1)式で示される熱閉じ込め条件と，(2)式で示される応力閉じ込め条件を満たすパルス光を励起光の条件とする．この際に発生する音圧 P_0 は(3)式となる．

$$\tau_p < \tau_{th} = \frac{d_c^2}{4D_T} \quad (1)式$$

$$\tau_p < \tau_{st} = \frac{d_c}{v_s} \quad (2)式$$

$$P_0 = \frac{\beta v_s^2}{C_p} \mu_a F_0 \exp(-\mu_a z) \quad (3)式$$

τ_p はレーザーのパルス幅， d_c は空間分解能（計測対象のサイズ）， D_T は熱拡散係数（軟組織 約 $0.14 \text{ mm}^2/\text{s}$ ）である． v_s は音速， β は熱膨張係数， C_p は定圧比熱， μ_a は吸収係数で， F_0 は入射フルエンスである．

我々の研究グループのデータではナノ秒オーダーのパルス幅で発生効率が高く，パルス幅が短い方が超音波の高周波成分が多いという実験的結果が得られている²⁾．

照射するレーザパルスエネルギーに関してはフルエンスが ANSI(米国国家規格協会)で規定されており，光音響イメージングにおいて想定される使用波長とパルス幅では $20 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ 以下であるため，照射面積によって必要なパルスエネ

ルギーが決まる．繰り返し周波数は高速測定に重要なファクターであるが，市販されている光源を使用する場合，波長域だけでなく，繰り返し周波数やパルスエネルギーは限定される．ミリジュール(mJ)以上のパルスエネルギーでは繰り返し周波数は数十 Hz，繰り返し周波数を kHz オーダーにするとパルスエネルギーは $100 \text{ }\mu\text{J}$ 程度となるのが現況である．

波長については，イメージング対象は光吸収体であることから，その吸収スペクトルを把握してよりコントラストを高く，より深部のイメージングのために選択する．生体内には多くの光吸収体(内因性の光吸収体)がある．現在までの報告では光吸収の比較的大きい血液中のオキシヘモグロビン(Oxyhemoglobin)や，デオキシヘモグロビン(Deoxy hemoglobin)，メラニン色素がイメージング対象のケースが多く，特にヘモグロビンを光吸収体とした光音響血管画像が主流となっている³⁾⁴⁾．その他にも脂質や核酸を対象としたイメージング例も報告されている．

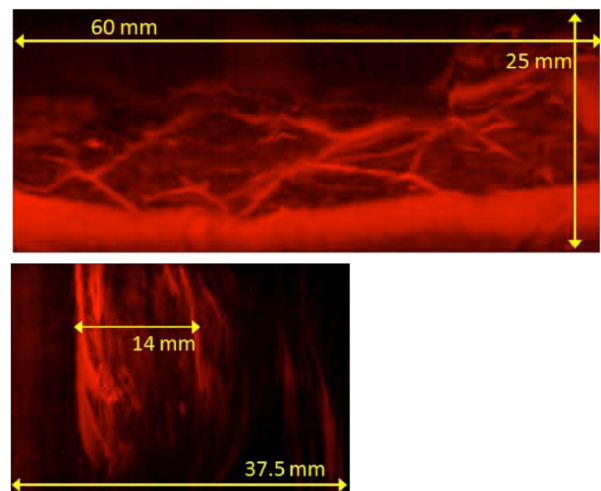


図1．ヒト前腕を対象とした光音響血管イメージング（倫理委員会承認済）

(上)センサをスキャンして画像を再構成．上からの投影画像．(下) スキャン方向への投影画像．体表から 14 mm の深さの血管を可視化．

Reprinted from Publication Ref.³⁾, Copyright (2015), with permission from international society for optics and photonics (SPIE).

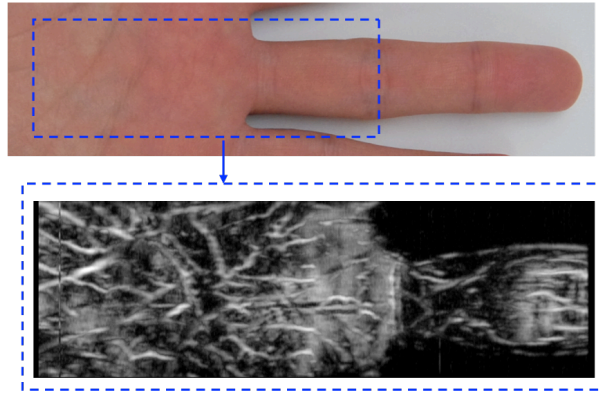


図 2. ヒト中指を対象とした光音響血管イメージング（倫理委員会承認済）

（上）撮像範囲．（下）最大値投影画像．

Reprinted from Publication Ref.⁴⁾, Copyright (2016), with permission from international society for optics and photonics (SPIE).

3. 光音響イメージングにおける超音波検出

光音響イメージングの空間分解能は光側で決まる場合と超音波側で決まる場合の両方がある．光側で決まる場合は、光拡散長で決まる深度内で光を焦点化した場合である．光音響イメージングの特徴である深部イメージングを指向した場合には、超音波側で決まる場合が多い．光吸収に伴う熱弾性過程により発生する超音波の周波数特性は広帯域であるため、超音波検出に使う周波数帯により空間分解能が決まり、一般的に高周波数の方が空間分解能が向上する．しかし、観察深部と空間分解能はトレードオフであり、目的に応じてセンサの仕様を決定することになる．

我々のグループでは広帯域センサを独自に開発し、信号の周波数特性を利用した信号処理法を提案している⁵⁾．

他方、医療応用を指向すると、超音波診断装置のプロープをそのまま利用すれば臨床で使い慣れているという利点がある．

4. がんの可視化への挑戦

血管新生はがんの増殖進展に深く関わっており、結果的にがん組織は周囲の正常前立腺組織と比べて血管密度や血管構築が異なるため、光音響血管画像ががん検出のランドマークとなり得る⁶⁾．

酸素化ヘモグロビン(HbO₂)とヘモグロビン(Hb)の光吸収の波長特性が異なるので、これを利用して励起光の波長を選べば、血中酸素飽和度の分布画像が提示でき、がんの特徴的な低酸素環境を反映したイメージングの可能性が考えられる．

光音響イメージングの特徴として生体内の光

吸収体だけでなく、体外から投与する外因性の光吸収体を利用すればイメージング対象や適応が広がる．観たいものを直接観ることができるからである．すなわち、真のがんの可視化には、イメージングプロープの開発が必要不可欠である．蛍光イメージングで研究が盛んな色素プロープや金ナノ粒子を利用したプロープなどがその有力候補である⁷⁾⁸⁾．

4. 結論

なぜ今、光音響イメージングのバイオメディカル応用が盛んに研究されているのか．光音響イメージング装置を構成するハードウェアが成熟し、装置の仕様により選択肢が増えて、医用画像から顕微鏡画像まで幅広い応用が可能になったことが技術側の要因と考える．ニーズ側の要因としては、より微細なものを可視化したいというニーズと同様に俯瞰的に生命現象を捉えるために深部イメージングへの期待があるからと考える．

謝辞

本研究の一部は日本医療研究開発機構（医療機器開発推進研究事業）、日本医療研究開発機構（医療分野研究成果展開事業、産学共創基礎研究プログラム）、高松宮妃癌研究基金（15-24703；石原美弥）の助成を受け実施された．

参考文献

- 1) 石原美弥, 応用物理 **85** (2016) 186.
- 2) K. Irisawa, M. Ishihara et al.: Proc. SPIE **8223** (2012) 8223W.
- 3) M. Ishihara, et al.: Proc. SPIE **9323** (2015) 93232K.
- 4) K. Irisawa, M. Ishihara, et al.: Proc. SPIE **9708** (2016) 970807.
- 5) T. Hirasawa, M. Ishihara et al.: Appl. Opt. **52** (2013) 8562.
- 6) M. Ishihara, et al.: Proc. SPIE **9708** (2016) 970852.
- 7) 石原美弥, 寺西利治, 化学工業 **66** (2015) 725.
- 8) 浦野泰照 編：がんの分子イメージング(化学同人, 京都, 2015) **24**章