

## 超音波変調による生体蛍光イメージング

小林 正 樹

### Biomedical Fluorescence Imaging Based on Acousto-Optic Modulation

Masaki KOBAYASHI

Fluorescence tomography based on ultrasonic modulation is described. The technique detecting fluorescent marker, fluorescent label, and fluorescent reporter to determine biofunction, physiological information, and genetic function plays key roll in the field of life science. I describe the basic study of fluorescence tomography for a new diagnostic imaging technique based on interaction of light and ultrasound.

**Key words:** acousto-optic effect, ultrasonic tagging, fluorescent labeling, fluorescence imaging, fluorescent modulation

蛍光を利用して微量物質を検出・分析する技術は、その高感度性から分析化学の分野では古くから利用されている。生体内において特定の生理活性を有するタンパク質等の物質や、特定の機能を有する細胞を蛍光標識し、その時空間動態を検出する方法は、生きた状態の生体において生体内作用が起こっているまさに“その場”においてリアルタイムでの観察を可能とする可視化法として、生命活動のメカニズムを探る生命科学の分野においては必須の技術であり、非常に強力な研究ツールとなっている。特定の物質や細胞に対して免疫化学的に標識したり、昨年の下村脩博士のノーベル賞受賞で話題となった緑色蛍光タンパク質 (GFP) に代表される蛍光タンパク質遺伝子を導入したトランスジェニック生物を利用する研究手法は、遺伝子レベルでの生命科学の飛躍的な発展の大きな牽引力となった。当然のことながら、蛍光計測の高感度性能やリアルタイム性能を医学診断へ応用する試みもさまざまな分野で研究され、あるいは臨床応用されはじめている。比較的古くから実用化されている蛍光物質を用いた臨床診断法としては、腫瘍親和性光感受性物質を用いた光線力学的治療 (PDT) にとまう光線力学的診断 (PDD) による悪性腫瘍の診断法がよく知られている。しかしながら、蛍光イメージング

が適用できる対象は比較的透明な組織や組織表面に限られ、たとえば眼底の血管蛍光造影や、内視鏡による組織表面の自家蛍光悪性腫瘍診断のほかは、細胞レベルでの検査等に限定されているのが現状である。ヒトを対象とした生体計測・医用診断において、光を情報媒体とすることは生体への侵襲やその取り扱いの簡便さを考えると非常に魅力的ではあるが、計測対象が組織レベルになると生体組織の光散乱特性により、その適用可能な深さは組織のごく表層に限られる。生体深部での蛍光物質分布を X 線撮影のように外部から観察することができれば、その利用価値はきわめて高い<sup>1)</sup>。

一方で、近年のナノテクノロジーの発展により、生体物質の蛍光標識に半導体量子ドットを用いることが可能となり、その生命科学研究への利用も急速に広がっている<sup>2)</sup>。これは量子ドットが、量子収率の高さや光耐性、長蛍光寿命、ストークスシフトを大きくとることができるなど、生体計測に用いるうえで、魅力的な光学特性を有しているからである。一般的に Cd-Se や Cd-Te をコアとし Zn-S などをシェルとする構造をもち、表面を官能基修飾することにより水溶性化して用いられる。タンパク質アビジンやビオチンをこの量子ドットに結合し、これにビオチン標識し

た抗体を結合することで標的とするタンパク質抗原を特異的に検出する。このようにして最近、生体細胞や生体物質の蛍光標識に用いられるようになってきた。たとえば、特定のがん細胞膜上の特異抗原に対し抗体標識量子ドットを用いて、生きたマウス内でがんを画像検出したり<sup>3)</sup>、分子標的抗がん剤として用いられている抗体に量子ドットを架橋し、その細胞膜への結合と細胞内への取り込みの動態を単一分子レベルで細胞内イメージングし<sup>4)</sup>、さらにそれを生きたマウス内で単分子レベルでの動態として *in vivo* 観察することで抗がん剤のドラッグデリバリー動態のイメージングの可能性を示した研究などが報告されている<sup>5)</sup>。最近、赤色、近赤外波長の蛍光をもつ量子ドットが簡単に入手できるようになり、ヘモグロビンを中心とした生体物質による吸収や、コラーゲン、エラスチン、フラビン、ポリフィリン化合物など生体に内在する蛍光性物質による自家蛍光を避けることができることから、これらの利用は今後もますます広がっていくものと想定される。臨床診断に用いるためには、その安全性の確保が課題となるが、量子ドットのシリコーティング技術の研究も進んでおり、このようなナノ材料の医療への応用は“ナノメディシン”“ナノ医療”という新しい研究分野を創出しつつある。材料の開発の進展にともなって、臨床診断に応用することのできる蛍光イメージング技術への期待は大きい。

生体内蛍光イメージングに対しては、これまでにさまざまな方法でのアプローチが試みられており、生体の光散乱特性を考慮し観測された拡散光から逆問題を解く手法である拡散蛍光イメージング法や、時間分解蛍光イメージング、周波数ドメイン蛍光イメージング法による研究が数多く報告されている<sup>6-8)</sup>。われわれは、散乱媒質内部の蛍光を計測する新たな手法として、蛍光計測に超音波を援用し、音響光学効果を受けた蛍光を選択的に検出する蛍光イメージング法の提案を行い、種々の生体模擬試料を用いてその可能性について検討を行ってきた<sup>9,10)</sup>。臨床応用をめざしてまずターゲットとしている対象は、がんの転移診断のためのセンチネルリンパ節のイメージングである。センチネルリンパ節とは、がんの転移においてがん細胞が最初に通過するリンパ節であり、手術中に腫瘍周辺のこのリンパ経路を蛍光微粒子をマーカーとして検出することで、リンパ節の細胞診断を的確に行い、病態に応じてリンパ節郭清の範囲を適切に決めることができる。従来、放射性同位元素を用いて行われているこの検査を、蛍光造影に置き換えることができれば、そのメリットは非常に大きいことが予想されることから、センチネルリンパ節蛍光イメージング技術への期待は大きい<sup>11-13)</sup>。

本解説では、医用診断を目的とした光散乱媒質内の蛍光イメージング法として、光計測に超音波を組み合わせて散乱媒質内部の蛍光特性を計測する方法について、各種試料を用いて行った実験結果を紹介しながら述べる。この技術は、生きた状態での生体内部の機能情報の可視化をめざすものであり、基礎医学、生命科学研究における蛍光法のメリットを臨床医学、創薬産業など非常に広範な生命医科学分野に拡張する可能性をもち、将来の強力な計測・診断ツールを提供するものと予想される。

## 1. 超音波変調蛍光イメージング法

超音波と光の相互作用を利用して、音響光学効果により強度変調された光を空間選択的に計測するこの手法は、一般に“超音波タグイメージング法”とよばれる。超音波は生体内部の形態情報を高い分解能で画像化することができるが、生化学的性状に関する情報を得ることは困難である。それに対して光は、生体物質との相互作用を通じて生体組織や細胞の生化学的性質に関する情報を、分光情報として計測することができる。超音波の生体内における透過性を補助的に利用し、生体光計測で障害となる多重散乱による空間分解の劣化を排除するために考案された手法が超音波変調光計測法である。このような、超音波と組み合わせて光計測を行う散乱媒質内光計測法は、1990年代中ごろからいくつかのグループにより報告されており、おもにがん組織の光吸収特性の違いを利用した乳がん診断を目的とした研究が行われている<sup>14-19)</sup>。その原理は、超音波音場内での散乱粒子の振動による微小な位置変位や、超音波による媒質密度の変化すなわち屈折率変化による光路長の変化、これが観測面でのスペックル強度変調として現れることを利用するものである。このとき集束超音波を用いて空間に二次元音圧分布を形成したり、パルスにより時間-空間情報変換することにより変調光の位置情報を得ることができる。

これに対して、外因性蛍光物質からの蛍光を超音波による音響光学効果を利用して強度変調し、蛍光を空間選択的に計測する手法が、超音波蛍光変調法であり、それに基づくイメージング技術をわれわれは“超音波タグ蛍光断層イメージング法”とよんでいる。

### 1.1 超音波変調蛍光計測法の原理

蛍光物質が光散乱媒質中に局在する場合、励起光と同時に集束超音波を照射することにより、発生した超音波周波数で強度変調された蛍光を観測することができる。前述のコヒーレント光の超音波スペックル変調の場合と異なり、インコヒーレントな蛍光はスペックル変調には寄与しない

が、超音波音場内の媒質の屈折率勾配による光偏向は音場内に蛍光強度分布を形成する。進行波超音波が蛍光源に照射されることにより、蛍光強度は超音波周波数により強度変調されることになる。いま、音圧振幅  $P$ 、角周波数  $\Omega$ 、波数  $K$  の平面波超音波が媒質中を  $x$  方向に伝搬するとき、媒質中の音圧は

$$p = P \sin(\Omega t - Kx) \quad (1)$$

で表される。音圧が印加されていないときの媒質屈折率を  $n_0$  とすると、媒質密度の振幅により

$$n = n_0 + \delta p \quad (2)$$

で表される屈折率振動が生じる。ここで  $\delta$  は、音圧非印加時の媒質密度  $\rho_0$ 、音速  $c_0$  を用いて

$$\delta = \frac{(n_0 - 1)(n_0^2 + 1.4n_0 + 0.4)}{(n_0^2 + 0.8n_0 + 1)\rho_0 c_0^2} \quad (3)$$

で表される係数である<sup>20)</sup>。透明な媒質であれば、超音波波面に平行に入射した光は、屈折率勾配により偏向し、その偏向角は、 $\Lambda$  を音波波長、 $L$  を平面波超音波のビーム幅とし

$$\sin \theta = \frac{2\pi L}{\Lambda} \left( \frac{dn}{dp} \right) p \quad (4)$$

で表される。媒質が水の場合は、 $dn/dp = 1.47 \times 10^{-10}$  [ $\text{Pa}^{-1}$ ] となる。散乱媒質中をさまざまな方向に伝搬する光も、平均光路長内でこのような屈折率勾配による光偏向を受けることから、統計的に光子密度の振動を生じる。

また、媒質密度の振動は媒質中の光散乱粒子の振動や偏在も誘起することから、これらも超音波音圧変化に依存した光子密度分布の原因となる。散乱媒質中に蛍光物質が存在すると、音場内で発生した蛍光は強度変調され、これらの要因が音圧変化の場において光強度変調をもたらすと考えられる。そのほか、蛍光分子や蛍光粒子そのものの振動や、音場内の励起光の強度変調も蛍光強度変調の原因として考えられる。変調周波数成分を狭帯域検出し、非変調光のショット雑音を上回る変調光成分を検出することができれば、超音波焦点における蛍光強度を空間選択的に検出することが可能となる。また、超音波ビームを媒質内で集束させ音圧焦点を形成すると、焦点と蛍光物質の位置が一致したとき変調蛍光信号が最大となるため、超音波焦点を機械的に二次元走査することにより、蛍光物質分布を画像計測することができる。

圧電超音波トランスデューサーによって発生する超音波音場焦点サイズは、超音波トランスデューサーの開口径および焦点距離、超音波発振周波数（共振周波数）により決

まる。以下の実験で使用した超音波トランスデューサーは、超音波周波数 1 MHz、超音波発振面直径 25 mm、焦点距離 46 mm の凹面型探傷用トランスデューサーであり、超音波伝搬軸方向に垂直な面内での焦点直径の半値幅は約 3 mm、伝搬軸方向には半値幅約 20 mm である。このサイズが、観測できる蛍光画像の空間分解能を決定する。観察可能深度は、発生する蛍光強度、変調度、自家蛍光（生体に内在する物質由来の蛍光）強度によって決まるが、近赤外領域の波長を使うことにより、これまでの実験から深度 20~30 mm 程度の断層画像を計測することが可能であると見積もられている。

## 1.2 超音波変調蛍光計測システム

われわれの研究グループでは、その画像計測法としての実用可能性を検討するため、生体模擬試料や実際の生体組織標本を計測対象とした実験系による検討を行った。図 1 に、実験系ブロック図を示す。測定試料は、生体との音響インピーダンス整合と超音波焦点の機械的走査のため、水中に設置した。試料形状を直方体に成形して測定に供するため、専用の試料ホルダーに試料を挿入して水中に浸漬した。このとき、水中用超音波トランスデューサーは水槽の壁面に貫通固定し、水槽全体を 3 軸自動ステージ上に載せ、水槽自体の移動により超音波焦点の 3 軸走査を行った。測定試料を入れた容器は水槽上部から吊し、水槽に接触することなくステージ外から固定した。CW レーザーからの励起光を、水槽壁面ガラス窓から導入し、超音波伝搬方向と垂直に試料表面に入射するよう配置した。このとき、超音波焦点走査中におけるレーザー光の測定試料に対する入射位置は、常に試料中心となるようにした。光検出器には励起光カット蛍光フィルターを装着した光電子増倍管を用い、入射光軸上の入射面と対向する面に水槽に近接させて配置した。光電子増倍管出力はプリアンプを介してスペクトラムアナライザーに入力し、超音波トランスデューサー共振周波数成分を検出した。パーソナルコンピュータにより水槽を設置した自動ステージの移動と同期して、スペクトラムアナライザーからの変調信号検出を行い、必要に応じて Z 軸（高さ方向）の走査も加えながら、X 軸（光ビーム伝搬方向）、Y 軸（超音波伝搬方向）を 0.5 mm 分解能で走査することにより、二次元蛍光断層画像を得た。

## 2. 超音波変調蛍光イメージング

### 2.1 生体模擬試料による計測

蛍光断層イメージング実験のための生体模擬試料として、イントラリピッド (Intralipid-10%, Fresenius Kabi

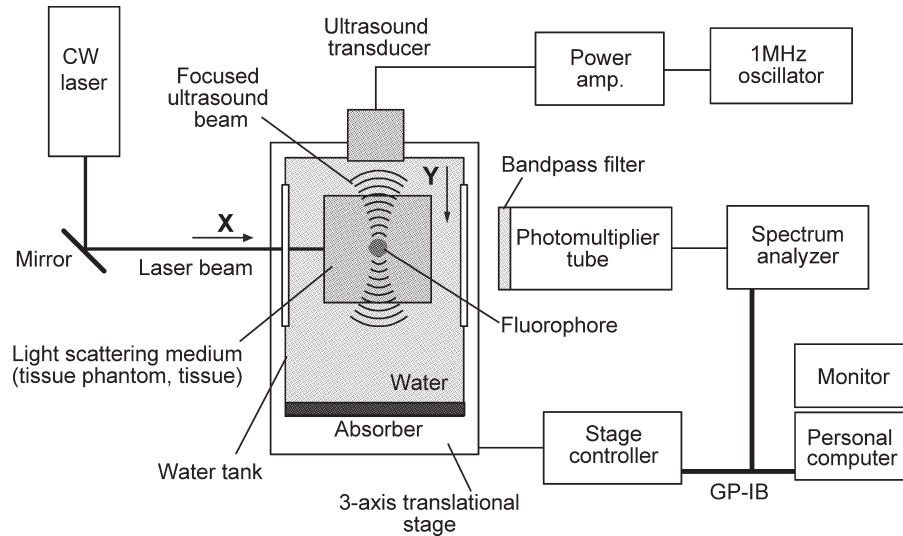


図1 音響光学効果による蛍光変調断層イメージング計測システムのブロック図。

AG, Germany) を体積濃度 40 ml/l となるよう均一に混合し成形したアガロースブロックを用いた。アガロース濃度は 5% とし、防腐剤としてグリセリンを混合した。40×40×80 mm の直方体に固化成形したのち、その中心部に蛍光体を包埋した。蛍光体は、蛍光波長 590 nm の蛍光ポリスチレン微粒子 (fluoresbrite carboxylate microspheres, NYO; Polyscience, Inc.) 20  $\mu$ l をアガロースと均一に混合し、直径 3 mm、長さ 5 mm の円柱形に成形したものをを用いた。励起光源に 532 nm グリーンレーザーを用いて断層画像計測した結果を図 2 に示す。この条件での散乱媒質の換算散乱係数は 0.61  $\text{mm}^{-1}$ 、散乱媒質表面から蛍光体までの深さは 20 mm である。図 2 (a) は、40×40 mm の範囲を 0.5 mm 分解能で二次元走査した結果である。測定後に生体模擬試料を縦方向に切断した断面写真を図 2 (b) に示す。観測された蛍光強度ピークが実際に埋設された蛍光体の位置と一致することが確認できる。比較のために、励起光入射面と対向する面から励起波長カットフィルターを介して CCD カメラで撮影した試料の蛍光像を図 2 (c) に示す。多重散乱により試料全体から発する蛍光をとらえているが、試料内部の蛍光体の位置を外から同定することはできない。

散乱媒質内に 2 個の蛍光体を包埋して計測した結果を図 3 (a) に示す。この画像は X 軸方向に 7 mm のギャップを設けて 2 個の蛍光体を並べた場合である。測定後に切断した断面の写真を図 3 (b) に示す。同様の測定を試料を 90° 回転させて測定した結果より、X 方向では約 3 mm、Y 方向では約 10 mm 程度の解像度が見込まれた。

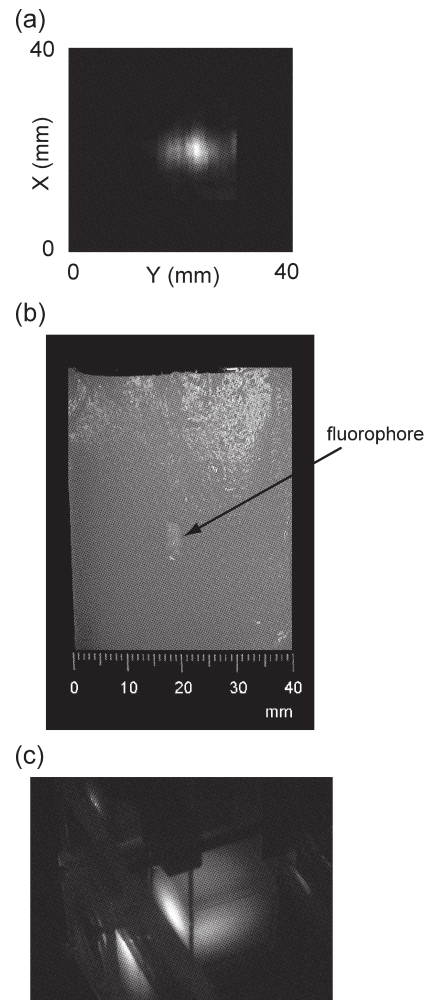


図2 (a) イントラリビッド混合アガロースゲルによる生体模擬試料 (40×40×80 mm) の蛍光断層画像、(b) 測定後に切断した模擬試料の断面写真、(c) CCD カメラで試料表面から撮影した蛍光像。

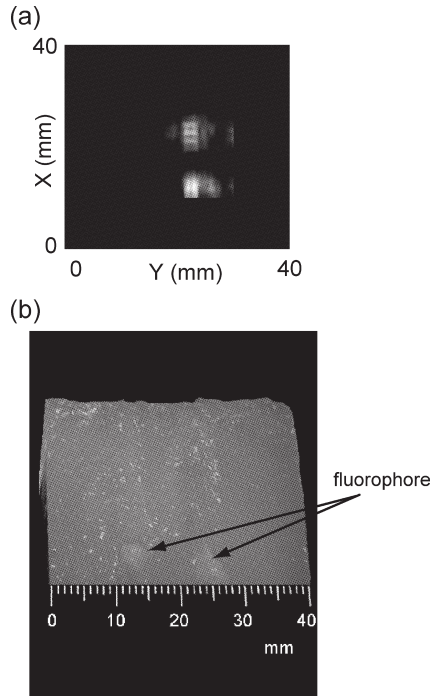


図3 (a) イントラリピッド混合アガロースゲルによる生体模擬試料に蛍光体を2箇所包埋した試料の蛍光断層画像(超音波伝搬軸上に蛍光体を配置した場合), (b) 測定後に切断した模擬試料の断面写真。

## 2.2 生体試料による計測

市販の食用肉を測定試料とし, その内部に前述の生体模擬試料と同様な形状の蛍光体を挿入した試料を作製して断層画像を計測した結果を示す。牛肉のほぼ均質な脂肪層を $40 \times 40 \times 80$  mmに成形し, その中心部に蛍光体を挿入した試料を作製した。蛍光体として蛍光波長755 nmの蛍光ポリスチレン微粒子(FluoSpheres carboxylate-modified microspheres infrared fluorescent (715/755)5% solids, Invitrogen Co.)  $20 \mu\text{l}$ をアガロースと混合し, 内径3 mm, 長さ5 mmのシリコンチューブに封入したものを作製した。励起光源には波長725 nmのチタンサファイヤレーザーを用い, 試料への入射光強度40 mWの条件にて計測した。二次元走査して得られた計測結果を図4(a)に示す。測定試料の外観写真を図4(b)に示す。測定後には試料を切断し, 蛍光ピーク位置と埋設蛍光体の位置の一致を確認した。

同様に $40 \times 40 \times 80$  mmに成形した市販ブタモモ肉を用いた場合の計測結果を図5に示す。測定には, ほぼ均質なモモ筋肉をブロック状に成形したものをを用い, その中央部にウシ脂肪試料で用いたものと同じ蛍光体を包埋した。図5(a)に二次元断層画像を示す。また, 図5(b)には測定後に縦方向に切断した試料内部の断面写真を示す。

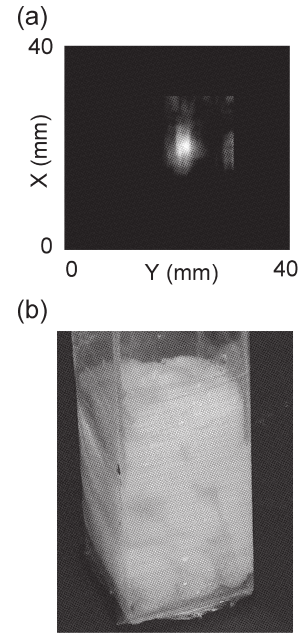


図4 (a) ウシ脂肪ブロック( $40 \times 40 \times 80$  mm)に蛍光体を包埋した試料の蛍光断層画像, (b) 測定試料の外観写真。

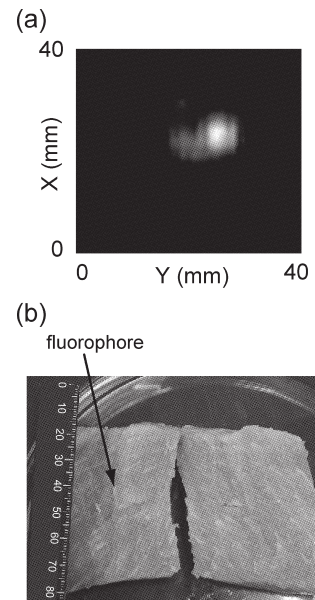


図5 (a) ブタモモ肉ブロック( $40 \times 40 \times 80$  mm)に蛍光体を包埋した試料の蛍光断層画像, (b) 測定後に切断したブタモモ肉試料の断面写真。

蛍光体が設計通りの位置に挿入されており, 断層画像で得られたピーク位置と一致することを確認した。

以上の生体試料を用いた実験から, 超音波変調による蛍光断層画像計測法は, 数mm程度の空間分解能であれば深さ30 mm程度の生体組織に分布する蛍光物質を検出する能力を有しているものと判断された。

本稿で紹介した試料による実験では、あらかじめ散乱媒質に包埋した高濃度の蛍光体を用いているため、実際の生体診断において蛍光ラベル剤を血中あるいは皮下投与し、生体内を拡散して特定のターゲットに集積したものを計測する際に想定される蛍光物質濃度を考慮すると、ここで紹介した深度での検出は必ずしも容易ではないものと予想される。しかしながら、われわれがターゲットとしているセンチネルリンパ節イメージングは、リンパ節に物理的に捕捉され、集積した蛍光微粒子を検出するものであり、体表から数十 mm 程度の断層像を空間分解能数 mm 程度で計測する能力が求められており、本手法はその計測には十分な性能を有するものと推定される。今後は検出感度を向上させるとともに、音響的に不均一な生体に対する超音波伝搬特性を考慮した蛍光イメージング法や、超音波焦点の電子走査可能な専用プローブの開発などを通じ、実用的な計測技術への改善、発展が求められる。本文で述べたように、蛍光ラベリング法のもつ、他の手法にはない非侵襲性やリアルタイム性といった特徴は生体機能の計測や病態計測・診断において非常に魅力的であり、この技術が実現すると、これまでにない新しい画像診断技術の分野を創出するものとして期待されるのは大きい。超音波との相互作用を生体光計測に応用するという試みはまだ始まったばかりだが、大きな可能性と魅力を備えており、今後の研究の進展が大いに期待される。

## 文 献

- 1) 小林正樹：“生命科学・医学応用のための極微弱発光・蛍光イメージング技術”，顕微鏡，**43** (2008) 202-206.
- 2) M. Bruchez, Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss and A. P. Alivisatos: “Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels,” *Science*, **281** (1998) 2013-2016.
- 3) X. Gao, Y. Cui, R. M. Levenson, L. W. K. Chung and S. Nie: “*In vivo* cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots,” *Nat. Biotechnol.*, **22** (2004) 969-976.
- 4) T. M. Watanabe, T. Sato, K. Gonda and H. Higuchi: “Three-dimensional nanometry of vesicle transport in living cells using dual-focus imaging optics,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **359** (2007) 1-7.
- 5) H. Tada, H. Higuchi, T. M. Watanabe and N. Ohuchi: “*In vivo* real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice,” *Cancer Res.*, **67** (2007) 1138-1144.
- 6) E. M. Sevick-Muraca, E. Kuwana, A. Godavarty, J. P. Houston, A. B. Thompson and R. Roy: “Near-infrared fluorescence imaging and spectroscopy in random media

- and tissues,” *Biomedical Photonics Handbook*, ed. T. Vo-Dinh (CRC Press, Boca Raton, 2003) pp. 33-1-60.
- 7) M. J. Niedre, R. H. Kleiner, E. Aikawa, D. G. Kirsch, R. Weissleder and V. Ntziachristos: “Early photon tomography allows fluorescence detection of lung carcinomas and disease progression in mice *in vivo*,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105** (2008) 19126-19131.
  - 8) X. D. Li, M. A. O’Leary, D. A. Boas, B. Chance and A. G. Yodh: “Fluorescent diffuse photon density waves in homogeneous and heterogeneous turbid media: Analytic solutions and applications,” *Appl. Opt.*, **35** (1996) 3746-3758.
  - 9) M. Kobayashi, T. Mizumoto, Y. Shibuya, M. Enomoto and M. Takeda: “Fluorescence tomography in turbid media based on acousto-optic modulation imaging,” *Appl. Phys. Lett.*, **89** (2006) 181102.
  - 10) M. Kobayashi, T. Mizumoto, Q. D. Trinh and M. Takeda: “Fluorescence tomography of biological tissue based on ultrasound tagging technique,” *Proc. SPIE*, **6633** (2007) 663306.
  - 11) S. Kim, Y. T. Lim, E. G. Soltesz, A. M. Grand, J. Lee, A. Nakayama, J. A. Parker, T. Mihaljevic, R. G. Laurence, D. M. Dor, L. H. Cohn, M. G. Bawendi and J. V. Frangioni: “Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping,” *Nat. Biotechnol.*, **22** (2004) 93-97.
  - 12) M. Nakajima, M. Takeda, M. Kobayashi, S. Suzuki and N. Ohuchi: “Nano-sized fluorescent particles as new tracers for sentinel node detection: Experimental model for decision of appropriate size and wavelength,” *Cancer Sci.*, **96** (2005) 353-356.
  - 13) M. Takeda, H. Tada, H. Higuchi, Y. Kobayashi, M. Kobayashi, Y. Sakurai, T. Ishida and N. Ohuchi: “*In vivo* single molecular imaging and sentinel node navigation by nanotechnology for molecular targeting drug-delivery systems and tailor-made medicine,” *Breast Cancer*, **15** (2008) 145-152.
  - 14) W. Leutz and G. Maret: “Ultrasonic modulation of multiply scattered-light,” *Physica B*, **204** (1995) 14-19.
  - 15) L. H. Wang, S. L. Jacques and X. Zhao: “Continuous wave ultrasonic modulation of scattered light to image objects in turbid media,” *Opt. Lett.*, **20** (1995) 629-631.
  - 16) M. Kempe, M. Larionov, D. Zaslavsky and A. Z. Genack: “Acousto-optic tomography with multiple scattered light,” *J. Opt. Soc. Am.*, **14** (1997) 1151-1158.
  - 17) G. D. Mahan, W. E. Engler, J. J. Tiemann and E. Uzgiris: “Ultrasonic tagging of light: Theory,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95** (1998) 14015-14019.
  - 18) S. Leveque, A. C. Boccara, M. Lebec and H. Saint-Jalmes: “Ultrasonic tagging of photon paths in scattering media: Parallel speckle modulation processing,” *Opt. Lett.*, **24** (1999) 181-183.
  - 19) L. H. Wang: “Mechanisms of ultrasonic modulation of multiply scattered coherent light: An analytic model,” *Phys. Rev. Lett.*, **87** (2001) 043903.
  - 20) G. W. Willard: “Criteria for normal and abnormal ultrasonic light diffraction effects,” *J. Acoust. Soc. Am.*, **21** (1949) 101-108.

(2009年3月3日受理)