

特集 超音波技術

超音波顕微鏡

Acoustic microscopy

西條 芳文

(東北大学)

Yoshifumi SAIJO

Key Words: Ultrasound, acoustic microscopy, sound speed, attenuation

1 はじめに

1949年ロシア(当時ソビエト連邦)のSokolovは、3000MHzの超音波を用いることにより、不透明な試料を光学顕微鏡と同等の解像度で観察することができるというultrasonic microscopeの概念を提唱した[1]。当時は、現在臨床診断に用いられている数MHz帯域の超音波断層法も実現しておらず、この画期的な顕微鏡の開発も夢物語とされていた。その後、超音波診断の臨床応用が進み超音波技術が進歩すると同時に、宇宙産業のめざましい発展による高周波数技術の進歩もともなって、1959年イリノイ大学のDunnらによる12MHzの超音波を用いたultrasonic absorption microscopy[2]、1972年Kesslerらによるレーザ光走査型超音波顕微鏡(SLAM: scanning laser acoustic microscopy)が開発され[3]、1973年には現在われわれが用いている超音波顕微鏡の原形である200MHz帯域の機械走査型超音波顕微鏡(SAM: scanning acoustic microscopy)がスタンフォード大学のQuateとLemonsらにより発表された[4]。

東北大学においては1980年に超音波顕微鏡の開発が始まり、1985年からは生体組織に対する応用が開始され、今日に至っている[5]。

超音波顕微鏡による生体組織の音響特性の計測は、次のような3つの目的をもつ。

第1は組織を無染色で観察することである。手術の際に癌組織を完全に取ったかどうかは、一般に、術中迅速診断と呼ばれる凍結切片を光学顕微鏡により観察することで確認されている。この方法では組織の輪郭を観察することにより診断を行うため、通常の染色

により輪郭の内部に”塗り分けられる”はずの色、すなわち細胞内部の蛋白質や糖類の種類に関する情報が失われた状態で診断することになる。組織を音響特性により”塗り分ける”ことで迅速診断の正確さの向上が期待されていたが、事実、皮膚科領域では凍結切片を光学顕微鏡で観察するのと同様の臨床的意義が認められている[6]。

第2の目的は臨床超音波画像を理解するための基礎的データの収集である。かつては、臨床超音波診断は組織の形や長さなどのdimensionの測定が中心的な利用法であり、エコーの境界の描出が重要視されていた。ところが、近年では、超音波組織性状診断(ultrasonic tissue characterization)が重要視されるようになってきた。著者の専門領域である循環器系疾患、特に動脈硬化の超音波診断を例示すると、脳梗塞の危険性を予測する指標として、頸動脈のエコー輝度が狭窄度よりも重要であるという大規模臨床試験の結果が発表されている[7]。このため、エコー輝度に影響を及ぼす組織の音響特性をマイクロレベルで計測することが、超音波画像の理解には不可欠と考えられるようになった。超音波顕微鏡により組織要素の音響特性を計測することにより、組織のエコー輝度についての理論的な裏付けが得られるようになった[8]。

第3の目的は、組織の物理的特性、つまり組織の弾性の計測である。従来の光学顕微鏡は組織の化学的性質に注目して、特定の物質を染色し観察することがその原理であるが、超音波顕微鏡は組織の物理的性質の違いを超音波により検出することを原理とする。したがって、心臓、動脈硬化などその物理的性質が注目される臓器においては、超音波顕微鏡による計測は非常に重要な情報をもたらすことになる[9]。

連絡先: 西條芳文, 〒980-8575 仙台市青葉区星陵町6-1, 東北大学加齢医学研究所, e-mail: saijo@idac.tohoku.ac.jp

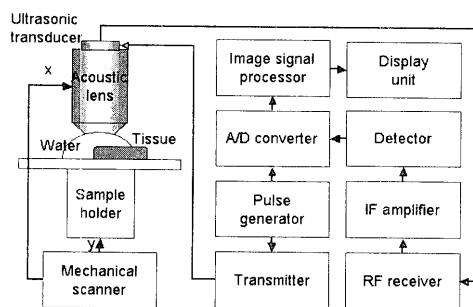


Fig. 1 Block diagram of the scanning acoustic microscope (SAM) system

2 超音波顕微鏡システム

SAM は超音波を送受信するトランスデューサが 2 次元面を機械的に走査してデータを収集する方法で、Fig. 1 に示すように 5 つの部分から構成される。すなわち、(1) 超音波素子部 (Ultrasonic transducers)、(2) 機械走査部 (Mechanical scanner)、(3) アナログ信号処理部 (Analogue signal processor)、(4) 画像信号処理部 (Image signal processor)、(5) 画像表示部 (Display unit) の 5 部分である。

超音波素子部は中心周波数 170MHz の ZnO 型圧電膜トランスデューサを用い、サファイア製の音響レンズにより超音波を円錐状に集束させることで、100MHz で $10\mu\text{m}$ 、200MHz で $5\mu\text{m}$ の方位分解能を実現している。

機械走査部は超音波素子部に対して図中の x 方向に電磁駆動による 60Hz の往復運動を加え、y 方向は組織保持台をステップモーターによって移動することにより、2 次元的走査を行なわせている。したがって、超音波顕微鏡で得られる画像は通常の B モード断層エコー像ではなく、 $2\text{mm} \times 2\text{mm}$ を走査範囲とする C モード像である。表示に要する時間は現状では 1 画面について 8 秒である。

各計測点における減衰定数、音速値はカラースケールにしたがって画像表示部にカラー表示される。これにより減衰定数、音速値の 2 次元分布の定量的表示が可能になる。

3 超音波顕微鏡用試料

超音波顕微鏡用試料の条件として、(1) 表面が平滑で厚みが一様であること、(2) 試料台を走査しても試

料が安定していること、(3) 超音波が透過反射しても受信器が受信できる程度の減衰であることの 3 点あげられる。このため、従来は光学顕微鏡用標本と同様に、ホルマリン固定、パラフィン包埋された組織をミクロトームで約 $10\mu\text{m}$ に薄切し、計測の直前にキシレイン、アルコールで脱パラフィン処理を施したものを超音波顕微鏡用試料として用いていた。最近では、凍結切片や未処理の培養細胞などについても超音波顕微鏡による検討を始めたが、ホルマリン固定およびパラフィン包埋では、組織の脂肪成分は除去されるものの主成分の蛋白質については音響特性が変化しないことが確認されている。

4 超音波顕微鏡写真の実例

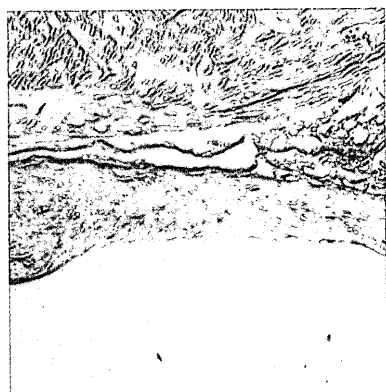
前述したように、動脈硬化組織の超音波診断は臨床的にも有用性が証明されているが、遺伝子操作動物の病態を明らかにするためにも重要である。ここでは、動脈硬化マウスとして知られている Apo-E 欠損マウスの動脈硬化組織の超音波顕微鏡所見を示す [10]。

Fig. 2 は C57/BL マウスにおける正常大動脈組織の (a) 光学顕微鏡像 (Picrosirius red 染色)、(b) 偏光顕微鏡像、(c) 超音波強度像である。内膜はほとんど肥厚しておらず、中膜の中の弾性線維が観察可能である。

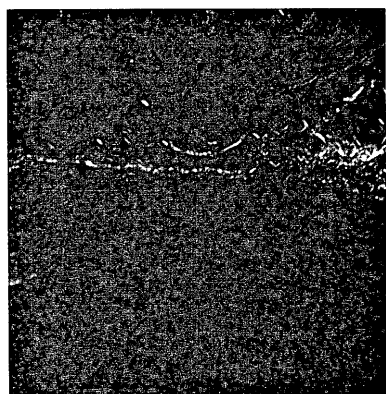
Fig. 3 は Apo-E 欠損マウスの動脈硬化組織である。中央の空白部分は、実際の超音波顕微鏡計測時には脱パラフィン処理により脂肪が失われているが、その形状からはコレステロールが存在していたことは明らかで、周囲のコラーゲンを主体とする線維性被膜に覆われた状態は、いわゆる "Fibrous cap" と称され、動脈硬化組織の典型像である。

Picrosirius red 染色を施した組織を偏光顕微鏡により観察することで、コラーゲン組織が特有に可視化されるが、さらにその色を解析することで、コラーゲンのタイプが定性的に解析可能である。Fig. 4 はコラーゲンの色別の音響特性の相違、および弾性線維、中膜平滑筋、外膜の音響特性を示す。

一般に、Type I のコラーゲンは偏光顕微鏡にてオレンジ色を呈し、機械的特性としては硬い組織であることが計測されている。マクロファージを主体とする細胞の出現および Matrix Metalloproteinase (MMP) の分泌により、このような硬いコラーゲンが変性を受け、Cleaved Type I コラーゲンあるいは Type III コ



(a)



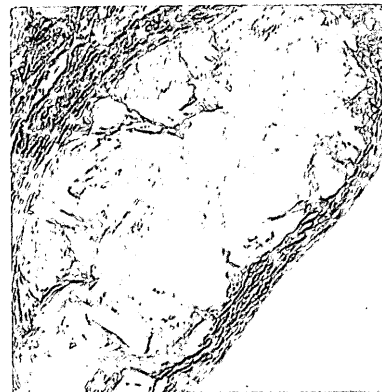
(b)



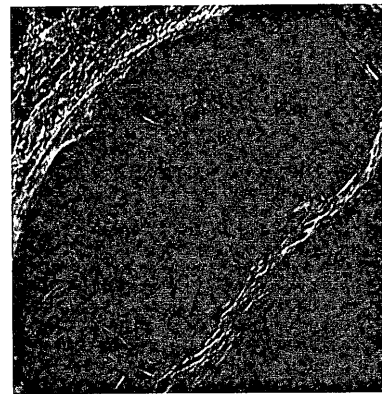
(c)

0.1 mm

Fig. 2 Normal (upper), polarized (middle) light microscopic and acoustic (lower) imaging of normal aorta in a C57/BL mouse



(a)



(b)



(c)

0.1 mm

Fig. 3 Normal (upper), polarized (middle) light microscopic and acoustic (lower) imaging of normal aorta in an Apo-E deficient mouse

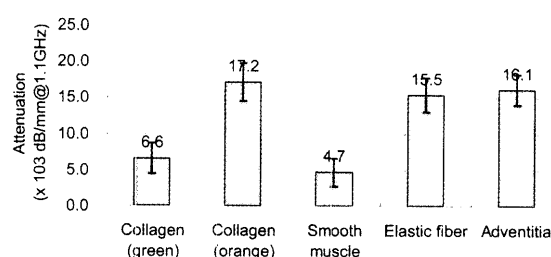


Fig. 4 Ultrasonic attenuation in tissue components of atherosclerosis in Apo-E deficient mice



Fig. 5 Acoustic microscopic image of renal vascular smooth muscle cell. Ultrasonic frequency is 1.1 GHz. The striation in the cell indicates the difference of thickness. Red and blue color indicate the cellular motility.

ラーゲンに変化すると、偏光の色がオリーブグリーンを呈し、超音波の減衰が小さくなる。したがって、プラークの機械的性質が脆弱化することが音響学的に確認され、この機械的特性の変化が急性冠症候群の原因とされる不安定プラークの破綻につながる事が明らかになり、超音波顕微鏡の動脈硬化の病態解明に対する有用性が示された。

医学・生物学用の超音波顕微鏡の周波数は1GHz以上まで可能となっており、その研究対象は生きている細胞にまで及んでいる。Fig. 5は腎動脈血管平滑筋細胞である。細胞の厚さの違いによって縞模様が認められている。また、細胞の自動性による緩やかな動きも検出可能でカラー表示されている。

5 おわりに

超音波顕微鏡による各種組織の音響特性の計測により、心筋梗塞組織ではミクロレベルの音響特性とエコーとの関連が、動脈硬化組織では組織の硬さの情報が得られることが実証された。超音波顕微鏡は単に音響特性の定量的計測が可能だけでなく、医学・生物学的に非常に重要な情報をもたらすことから、今後の益々の発展が期待される。

参考文献

- [1] Sokolov S: The ultrasonic microscope. Akadema Nauk SSSR, Doklady 64, 333-335, 1949.
- [2] Dunn F, Fry WJ: Ultrasonic absorption microscope. J Acoust Soc Am 31: 632-633, 1959.
- [3] Kessler LW, Palermo PR, Korpel A: Practical high resolution acoustic microscopy. Wade G ed, Acoustic Holography 4, Plenum Press, New York, 51-71, 1972.
- [4] Lemons RA, Quate CF: A scanning acoustic microscope. Proc IEEE Ultrason Symp: 18-20, 1973.
- [5] Okawai H, Tanaka M, Chubachi N, Kushibiki J: Non-contact simultaneous measurement of thickness and acoustic properties of a biological tissue using focused wave in a scanning acoustic microscope. Jpn J Appl Phys 26: 52-54, 1987.
- [6] Jones JP: Applications of acoustical microscopy in dermatology. Dunn F ed, Ultrasonic Tissue Characterization, Springer-Verlag, Tokyo, 1996, 201-212.
- [7] Gronholdt MLM, Nordestgaard BG, Schroeder TV, Vorstrup S, Sillesen H. Ultrasonic echolucent carotid plaques predict future strokes. Circulation 104: 68-73, 2001.
- [8] Saijo Y, Tanaka M, Okawai H, Sasaki H, Nitta S, Dunn F: Ultrasonic tissue characterization of infarcted myocardium by scanning acoustic microscopy. Ultrasound in Med and Biol 23: 77-85, 1997.
- [9] Saijo Y, Ohashi T, Sasaki H, Sato M, Jorgensen CS, Nitta S. Application of scanning acoustic microscopy for assessing stress distribution in atherosclerotic plaque. Ann Biomed Eng, 29: 1048-53, 2001.
- [10] Saijo Y, Jorgensen CS, Falk E. Ultrasonic tissue characterization of collagen in lipid-rich plaques in apoE-deficient mice. Atherosclerosis 158: 289-295, 2001.