

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 医療分野研究成果展開事業 産学共創基礎基盤研究プログラム  
(英語) Medical Research and Developmental Programs Focused on  
Technology Transfer: Collaborative Research Based on Industrial Demand

研究開発課題名： (日本語) ヒト組織深部のイメージングを可能とする定量的蛍光分子イメージング基盤技術の確立  
(英語) Quantitative fluorescence optical tomography technique to image deep human tissue

研究開発担当者 (日本語) 北海道大学 電子科学研究所 助教 西村 吾朗  
所属 役職 氏名： (英語) Goro Nishimura, Assistant Professor, Res.Inst.Elec.Sci., Hokkaido Univ.

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 反射型時間分解システムによる蛍光イメージングシステムの開発と定量的  
3次元画像再構成アルゴリズムの確立  
開発課題名： (英語) Development of a time-domain reflectance-mode fluorescence imaging system and a quantitative 3D image reconstruction algorithm

研究開発分担者 (日本語) 北海道大学 電子科学研究所 助教 西村 吾朗  
所属 役職 氏名： (英語) Goro Nishimura, Assistant Professor, Res.Inst.Elec.Sci., Hokkaido Univ.

分担研究 (日本語) 蛍光—PET 同時測定のためのナノプローブの開発 (1)  
開発課題名： (英語) Development of fluorescence-PET multimodal nano-probes (1)

研究開発分担者 (日本語) 京都大学 大学院薬学研究科 教授 佐治 英郎  
所属 役職 氏名： (英語) Hideo Saji, Professor, Kyoto Univ.

分担研究 (日本語) 蛍光—PET 同時測定のためのナノプローブの開発 (2)  
開発課題名： (英語) Development of fluorescence-PET multimodal nano-probes (2)

研究開発分担者 (日本語) 福井大学 高エネルギー医学研究センター 准教授 牧野 顕

所属 役職 氏名: (英語) Akira Makino, Associate Professor, Fukui Univ.

分担研究 (日本語) 蛍光-PET 同時測定のための技術開発と実証研究

開発課題名: (英語) Development of a fluorescence-PET multimodal measurements

研究開発分担者 (日本語) 浜松医科大学 光先端医学教育研究センター 教授 尾内 康臣

所属 役職 氏名: (英語) Yasuomi Ouchi, Professor, Hamamatsu University School of Medicine

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

生体組織中での分子動態を蛍光により可視化するための3次元定量化画像再構築技術の確立とその技術のセンチネルリンパ節(SLN)検出への応用を目的として研究を行った。

組織に埋め込まれた蛍光体の高感度検出および3次元画像再構築のためのデータ取得のために、術場等実験室外に移動可能な2点入射x2点検出でそれらが同時測定可能な時間分解蛍光計測システムを試作した。さらに、実験室外に移動しPET測定室で小動物の同一個体計測を行い試作したシステムが実験室外でも実験室内と同様な性能で計測が可能であることを立証した。測定システムを構築する上で、励起検出ファイバ配置に関してa)接触型、b)等間隔配置、c)ファイバ間隔20mmが妥当であると結論し、またそれを保持するホルダは黒色の樹脂を用いることが有効であると結論した。またバックグラウンドの原因には、光ファイバ自身が励起光により発光すること、遮光フィルタによっては、それからの発光が寄与するなどが分かった。これらは強散乱体で強い励起光が検出系に入るがゆえに起こることとわかり、通常の蛍光測定と比べ光学部品の選択に留意する必要があると結論された。

得られた蛍光の時間応答関数を用いると、深部(>1cm)より深い位置にある直径2mm長さ1cm程度の蛍光ターゲットを高感度に検出することが可能であることが示された。これは術場で通常の蛍光アンジオグラフィでは見えないSLN(Sentinel Lymph Node)の検出に有効であると結論された。

画像再構成においては、a)クオリティの揃ったデータを用いる b)バックグラウンドの影響を軽減するためある程度の励起検出ファイバ間距離が必要であることがわかった。さらに生データ自身を評価関数として画像再構成するのは計算規模が大きくなり現時点では現実的ではなく、デコンボリューションなどの前処理が有効であると結論された。励起光の伝播に対して蛍光体の吸収の影響を無視しても大きく結果は変わらなかった。この近似が計算の簡略化高速化に有用であると示された。さらにLevel-set法になどよる2値化は位置および吸収係数の再構成に有効であることがわかった。それらの結果を用いた画像再構成により、シミュレーションデータ、鶏肉および牛肉ファントムに埋め込まれた蛍光ターゲットの画像再構成を行い、位置特に深さの特定ができることを示した。

検証実験のための蛍光とRI(PET)同時測定が可能なナノプローブを作成した。最初に、褪色の少ない蛍光色素を安定に存在させる、Lactosomeに内包させたDy780が有効であると示された。またLactosomeに内包させる色素分子は3個程度が最も蛍光効率が良いと結論された。それと同時に、Lactosomeに<sup>18</sup>Fを導入し、PET測定が可能なプローブを作成した。<sup>18</sup>Fが蛍光プローブに問題を与えないことも確認された。作成したLactosome蛍光プローブが小動物(HWY/Slcラット)に植えられた腫瘍に集積することを蛍光およびPETで確かめた。またその際に投与後6時間がPETでの最大コン

トラストになることが確かめられた。

PET での同一個体計測のためにラット固定ホルダを試作し、1mm 以内の位置精度でホールドすることができるようになった。先に作成した Lactosome プローブを尾静脈投与し、PET-蛍光の同一個体測定を行った。PET では腫瘍部位に集積するプローブが可視化できたが、蛍光では非特異的な蛍光の強度が深部の蛍光ターゲットイメージングのバックグラウンドとして大きく寄与し、コントラストを得ることができなかった。この結果から、RI のプローブ設計より、より特異性の高いプローブ設計が、深部の蛍光イメージングを成功させるのに必須であることがわかった。

さらに深部の蛍光検出に特化した、定常光を用いた、より小型高感度蛍光検出装置を試作した。

We aimed to demonstrate a methodology to visualize fluorescence targets in deep human tissue, reconstructing a quantitative 3D image of the targets for detection of sentinel lymph nodes (SLN) in a relatively deep region. The project consisted in a system and numerical algorithm developments, a development of a fluorescence-PET multimodal nano-probe for validation and actual validation measurements with small animals using these system, algorithm and probes.

We employed a time-domain reflectance-mode technology for the fluorescence measurement system. We have made a small time-domain fluorescence measurement system with two injection and two detection channels, which were simultaneously measuring fluorescence temporal profiles at 4-different injection-detection pairs. This system could be transferred by a standard delivery service without any problem and used at a room outside of a laser facility. For the injection-detection optics, we concluded that the actual contact of the optical fibers to the sample surface was required and the injection and detection fibers were placed at the node of a triangular grid about 2-cm on a side. The holder was made by a black plastic resin to reduce the undesired reflection. We also found that the selection of the optical fiber for detection was very important to reduce the background generated by the strong excitation light scattered.

We conducted some measurements with meat phantoms to mimic the fluorescence measurements of tissue. Then, we could selectively detect the fluorescence emitted by a target (2-mm in diameter and 1-cm length) at more than 1-cm below the surface using temporal profiles of fluorescence. We have concluded that this technique can be very useful for surgical guidance in the SLN fluorescence angiography.

The 3D fluorescence image construction was succeeded with both simulation and phantom measurement data. The point of the data management was that data with a similar statistical quality and with a smaller background contribution were selected. In the pre-process, data were deconvolved by the instrumental response function to reduce the complexity of the calculation. We have shown that an assumption, where the absorption by the target was ignored, for calculation of the excitation light was effective to reduce the computational cost without degradation of the reconstructed image. Finally, the image quality was greatly improved by a level-set method to set two values, the absorptions by the fluorophores and the background.

We have also developed fluorescence-PET multimodal nano-probes using lactosome, which encapsulated near-infrared fluorescence dyes and  $^{18}\text{F}$  modified poly L-lactic acid (PLLA). For the

near-infrared dye, Dy780, was selected because of its stability and a dye-lactosome ratio 3:1 was the best ratio of the brightness. We have confirmed that this probe accumulated at a tumor implanted into a rat (HWY/Slc) and the best contrast of the PET image could be achieved at 6-hours after the injection.

Finally, the measurements with fluorescence and PET were conducted. The PET measurements could visualize the tumor site however the background by remained probes in the blood circulation hid the fluorescence from the tumor site. Therefore, it could be concluded that the specificity of the fluorescence probes was the key issue of the design and it is more serious than the design of PET probes.

A fluorescence detection device using continuous wave laser was also constructed and was planned to use in diagnosis of aspiration.

### III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 2 件、国際誌 5 件）
  1. 西村吾朗, 近赤外生体分光に関する最新技術, 光アライアンス, in press (2017).
  2. K.Prieto and G.Nishimura, “A new scheme of the time-domain fluorescence tomography for a semi-infinite turbid medium,” *Opt.Rev.*, **24**, 242-251 (2017).
  3. Hiroyuki Fujii, Shinpei Okawa, Yukio Yamada, Yoko Hoshi, Masao Watanabe, “Renormalization of the highly forward-peaked phase function using the double exponential formula for radiative transfer,” *J.Math.Chem.*, **54**, 2048-2061 (2016).
  4. H. Fujii, Y. Yamada, K. Kobayashi, M. Watanabe and Y. Hoshi, “Modeling of light propagation in the human neck for diagnoses of thyroid cancers by diffuse optical tomography,” *International Journal for Numerical Methods in Biomedical Engineering*, Version of Record online : 27 Oct., DOI: 10.1002/cnm.2826 (2016).
  5. G.Nishimura, K.Awasthi, and D.Furukawa, “Fluorescence lifetime measurements in heterogeneous scattering medium”, *J.Biomed.Opt.*, **21**, 075013 (2016).
  6. Yoko Hoshi and Yukio Yamada, “Overview of diffuse optical tomography and its clinical applications,” *J.Biomed.Opt.*, **21**, 091312 (2016).
  7. 西村吾朗, 生体組織イメージング蛍光画像再構成のその方法と課題, 光アライアンス, **27** 6-11 (2016).
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
  1. 西村 吾朗, “Time-domain fluorescence diffuse optical tomography for quantitative imaging of a fluorescence target in deep biological tissue”, 第 94 回日本生理学会大会, アクトシティ浜松, 浜松市, 静岡県(2017.3.28-30), 国内,口頭
  2. K.Prieto, “A new scheme for the time-domain fluorescence imaging of a semi-infinite turbid medium: Monte Carlo evaluation”, *Inverse Problem and Medical Imaging*, The University of Tokyo Komaba-campus, Tokyo, 2017.2.15-17. 国内(国際シンポジウム), 口頭
  3. G.Nishimura, “Optical Tomography for Near-infrared Fluorescence Imaging,” *Inverse*

Problem and Medical Imaging,,The University of Tokyo Komaba-campus, Tokyo, 2017.2.15-17. 国内(国際シンポジウム), 口頭

4. Kernel Prieto and G.Nishimura, “A novel approach for the time-domain imaging of a semi-infinite turbid medium”, Photonics West BIOS2017, The Moscone Center, San Francisco, USA, 2017.1.28-2.2. 国外,口頭
5. Kernel Prieto, 西村 吾朗, 反射型拡散光トモグラフィー — 半無限媒体中の蛍光ターゲットイメージング, 日本光学会年次学術講演会(OPJ2016), 筑波大学東京文京校舎, 東京都(2016.10.30-11.2). 国内, 口頭
6. Kernel Prieto, Goro Nishimura, “A new strategy of the time-domain fluorescence imaging for semi-infinite turbid media, Biomedical Imaging and Sensing Conference 2016 (BISC’16), Pacifico Yokohama, 横浜市, 神奈川県(2016. 5. 18-20) 国内(国際会議), 口頭

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 西村 吾朗、表面から組織等散乱体内部に含まれる蛍光体の位置などを定量する技術、AMED 産学共創基礎基盤研究プログラム 生体イメージング 新技術説明会 JST 東京本部別館 1F ホール(東京・市ヶ谷) 2016. 7. 12.
2. 西村 吾朗「国民との科学・技術対話 出張講義「光で生体組織を見る！」(北海道立札幌西高等学校、札幌) 講師、(2016年10月25日)

(4) 特許出願

なし