

2013年7月13日

## 第2回バイオ超音波顕微鏡研究会

# 超音波顕微鏡用ディッシュ処理

本多電子株式会社

小林 和人

# 生体組織観察方法

## 従来の方法(光学)

[抗体染色]

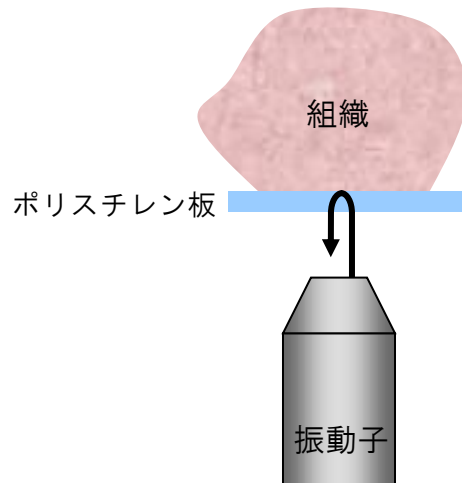
- ・目的物質を染め分けて観察することができる。
- ・組織を化学変性させるので測定までに時間がかかり、生きたまま観察できない。

## 超音波顕微鏡

[音響インピーダンス測定]

- ・組織を**生きたまま**・**迅速**に観察することができる。
- ・組織界面での測定のため、薄切不要
- ・物理的パラメータが得られる

## 音響インピーダンス測定

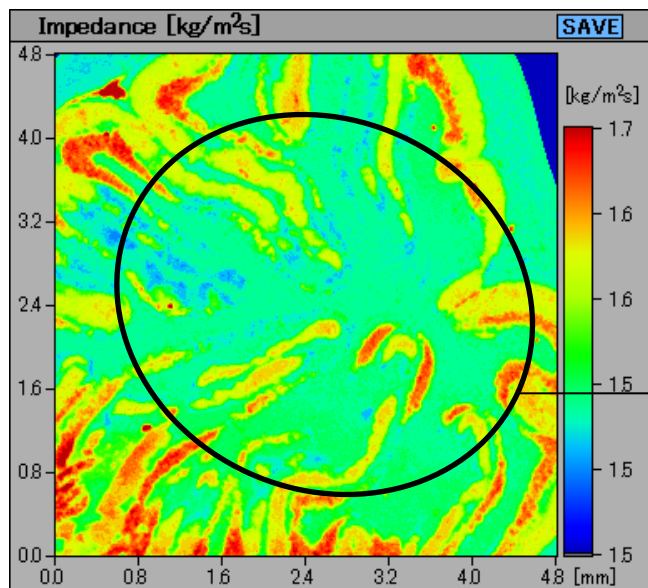


医療技術への応用が期待できる。



- 生きたまま、特定の細胞分布を可視化
- 誰でも安定したデータを得られること

# 安定したデータを得るためには・・・組織と基板の密着性を高める



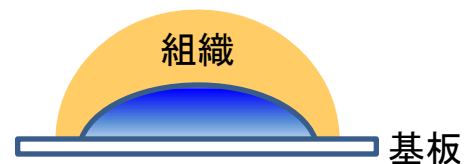
基板と組織の間に水が入り込む



組織が浮き、密着性低下

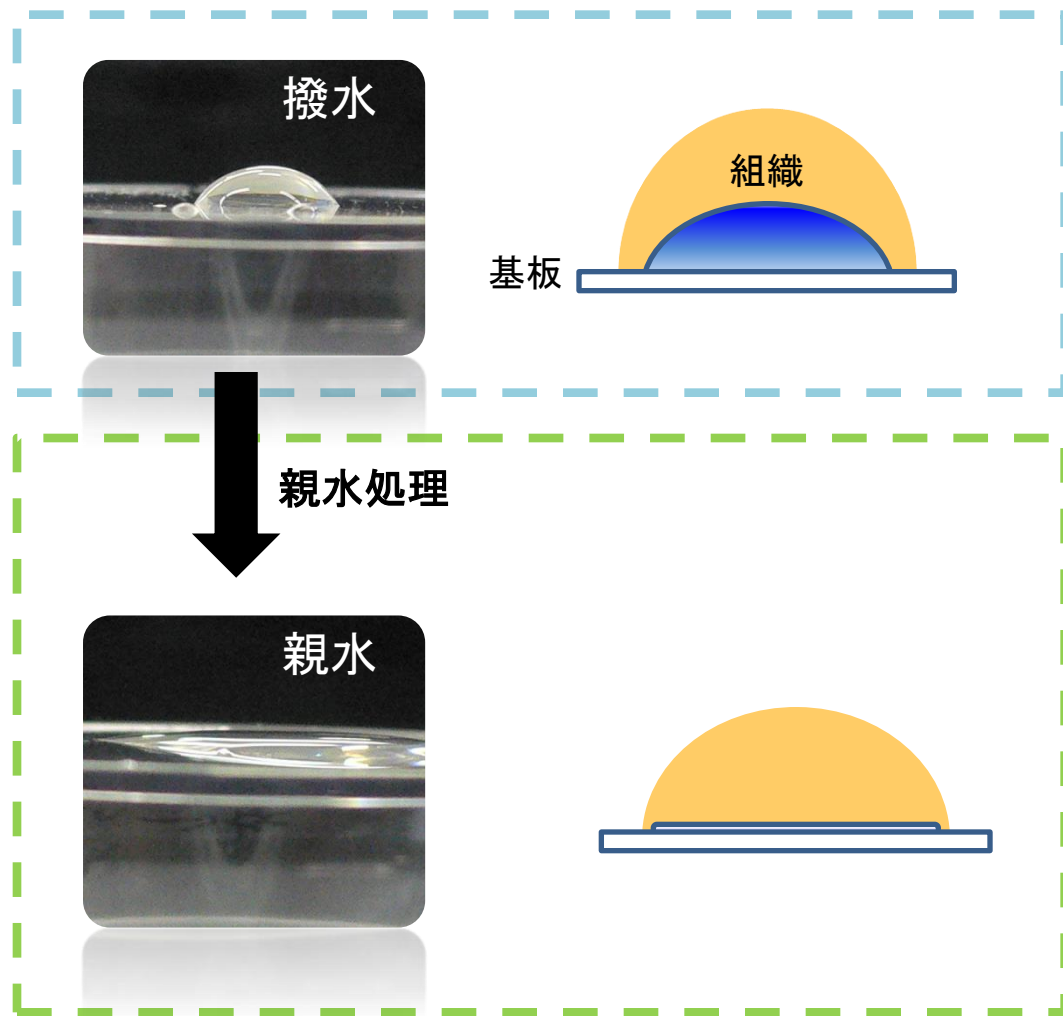
画像に「抜け」が発生

測定結果がばらつく



基板の親水性を高める

# 基板の親水処理



1. 組織と基板の間の水膜を均一な厚さにする。

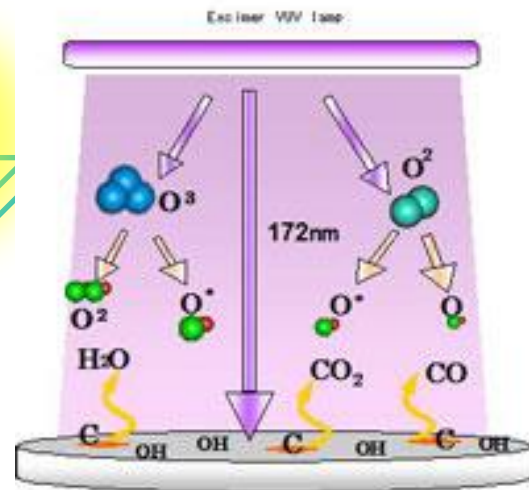
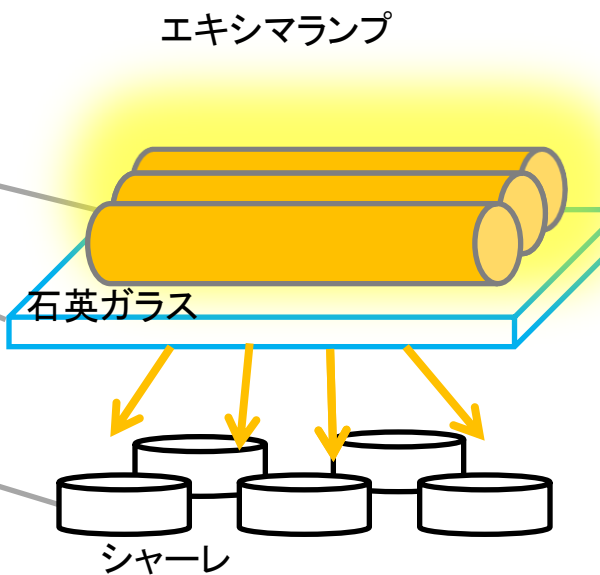
⇒組織の浮きを改善、  
測定の安定性を高める

## 基板の親水処理方法

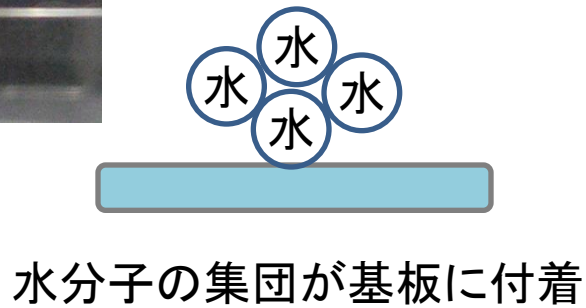
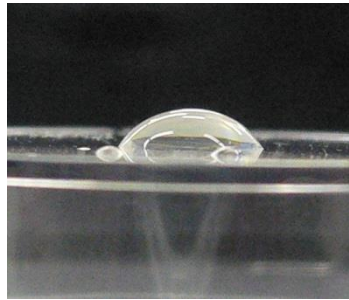
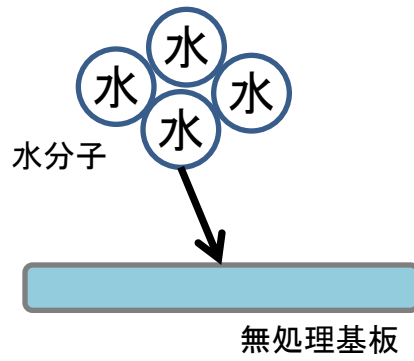
- ・ エキシマ光 (VUV) 照射

# 基板の親水処理

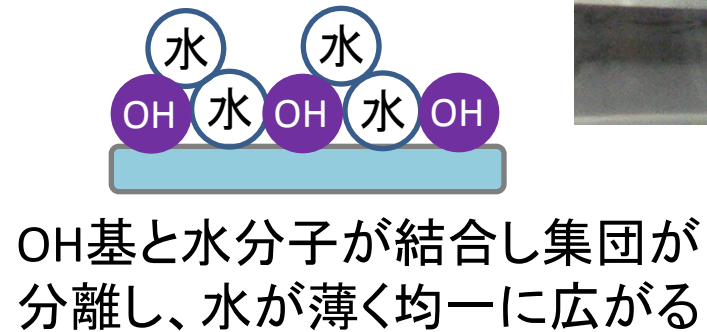
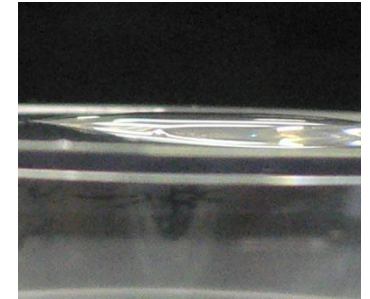
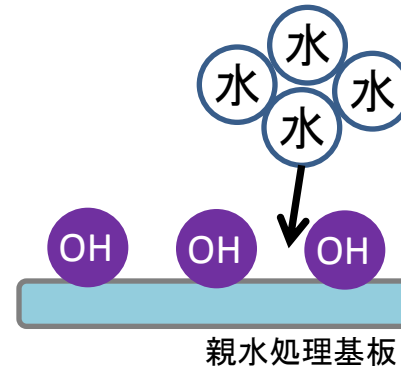
## ● 気中エキシマ照射装置



# 撥水・親水性とは



撥水



親水

# 保存方法

強い真空度にすれば保存期間が延びる



# 親水処理方法の評価

撥水 × → ○ 親水

VUV 3分	VUV 5分	VUV 10分	VUV 20分	真空1W	放置
○				○	× 1d
	○			○	× 1d
		○		○	△ 1d
			◎	◎	◎ 1d
	○				× 2d
		○			△ 2d
			◎		◎ 2d

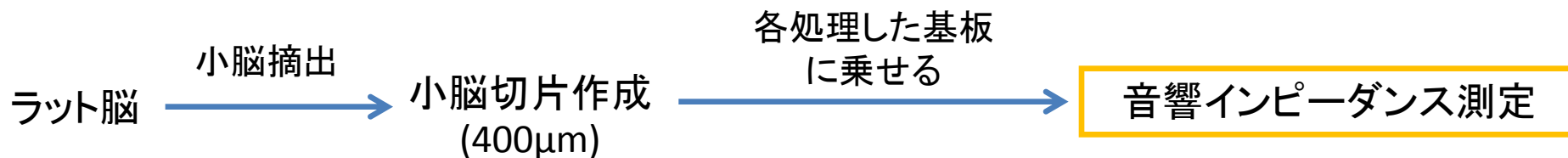


# 親水処理基板による測定

※すべて重り(約0.1g/cm<sup>2</sup>)を乗せた

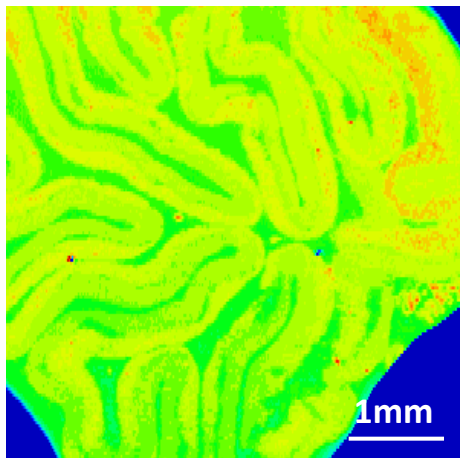
dish		測定		
エキシマ処理		別処理		
Control (なし)		1回目	2回目	
親水性	弱 中 強	3分	1	3
		10分	1	3
		20分	1	3
	5分+10分	1	3	
密着性	10分	polylysin	1	3
	10分	Glycerin 0.1%	1	3

組織と基板の密着度を直接的に高めるために、ポリリジンコート基板・グリセリン液を用いた測定も行った。

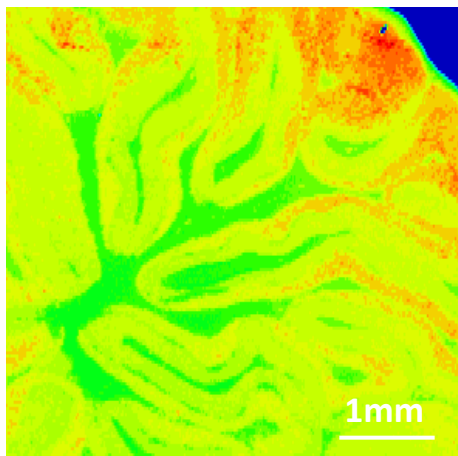


# 親水処理基板の評価

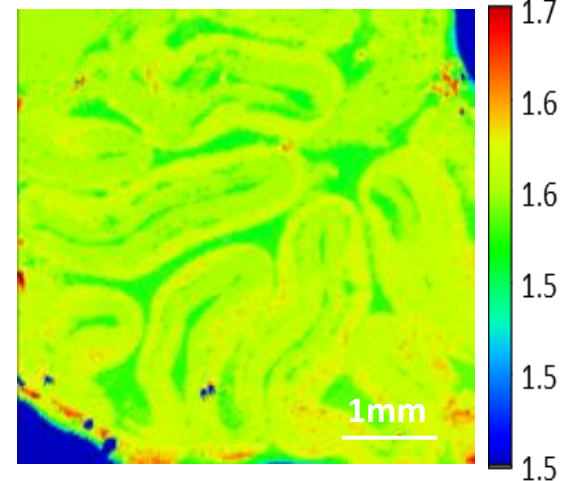
Control



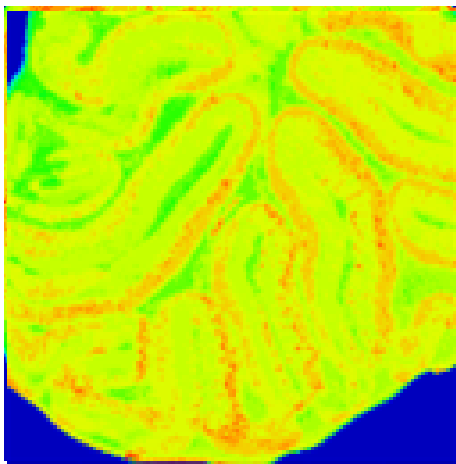
3vuv



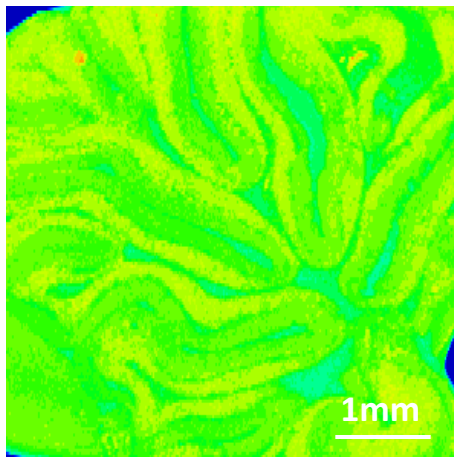
10vuv



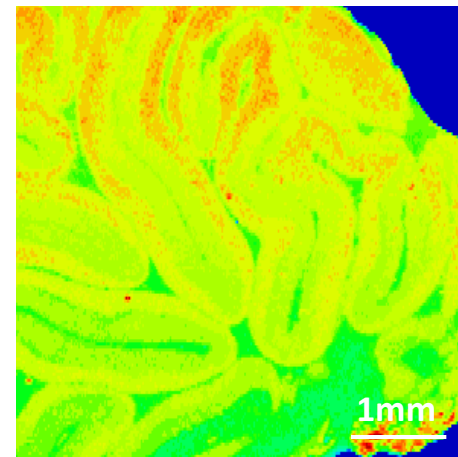
20vuv



polylysin



Glycerin



データの安定性が高い



VUV処理20分が良い。

# 親水処理基板の評価(他の結果)

Control

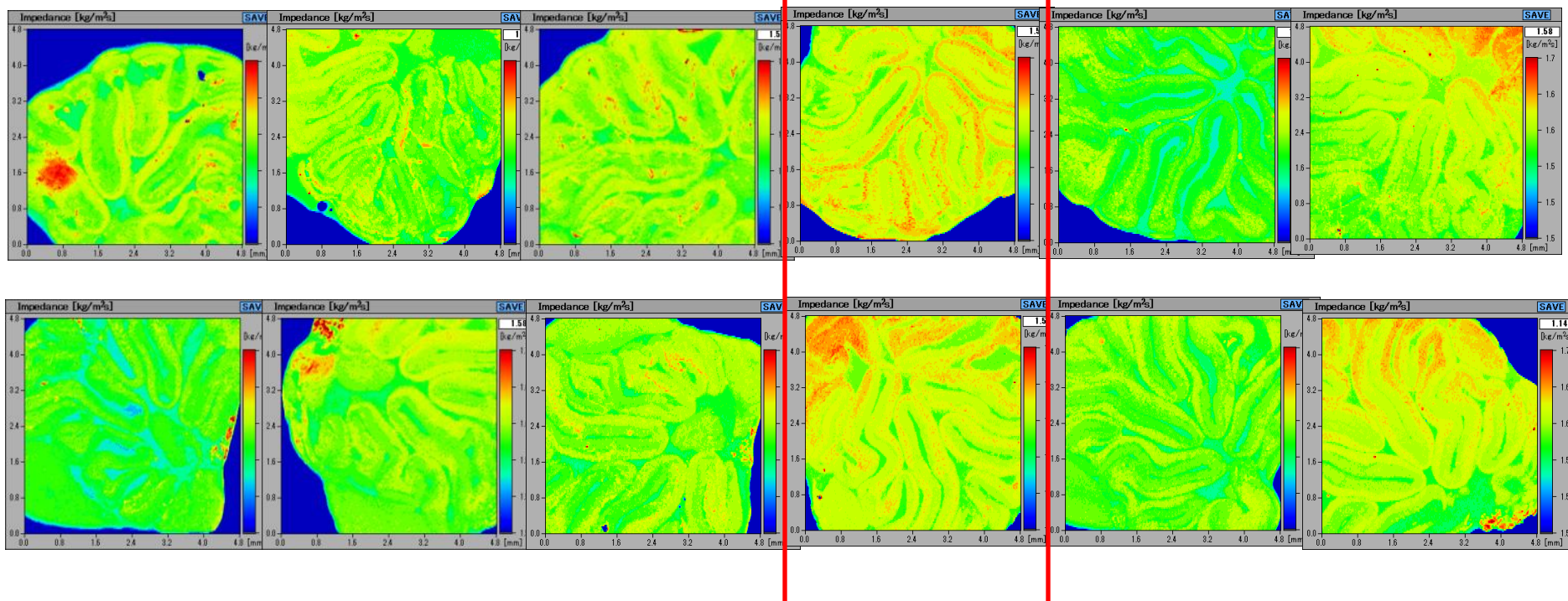
3vuv

10vuv

20vuv

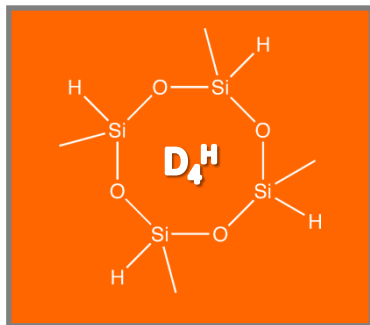
polylysin

glycerin

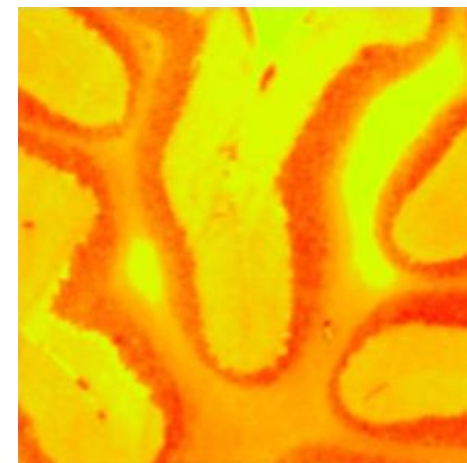
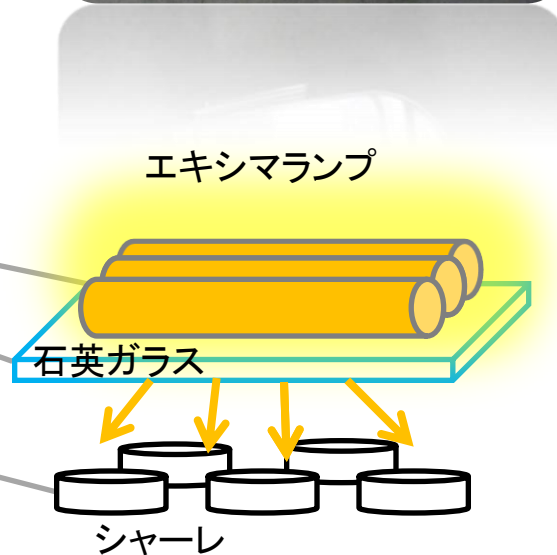


# 新しい基板の親水処理

## ● シランコーティング・・・テトラエトキシシラン蒸着



## ● 気中エキシマ照射装置



より高い親水性能

# ディッシュの供給方法

高い親水性の持続する保存法  
チツソガス封入実験中





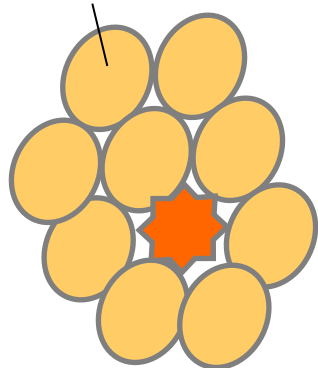
# 目的 亜鉛を用いた、病変部位(癌細胞)分布の可視化

現在の癌手術とは・・・

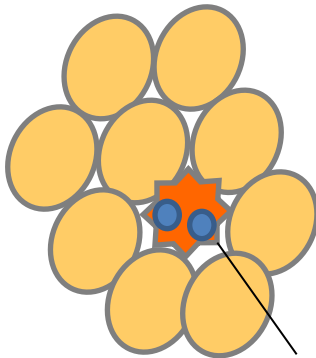
手術中に詳細な癌細胞の広がりには分からない  
見た目・医師の経験によって癌化部を取り除く

詳細な癌細胞分布を可視化する  
ために、亜鉛を用いて測定する

正常細胞



亜鉛



癌細胞が亜鉛を取り込む

音響インピーダンス値比較  
**癌細胞部位を特定**



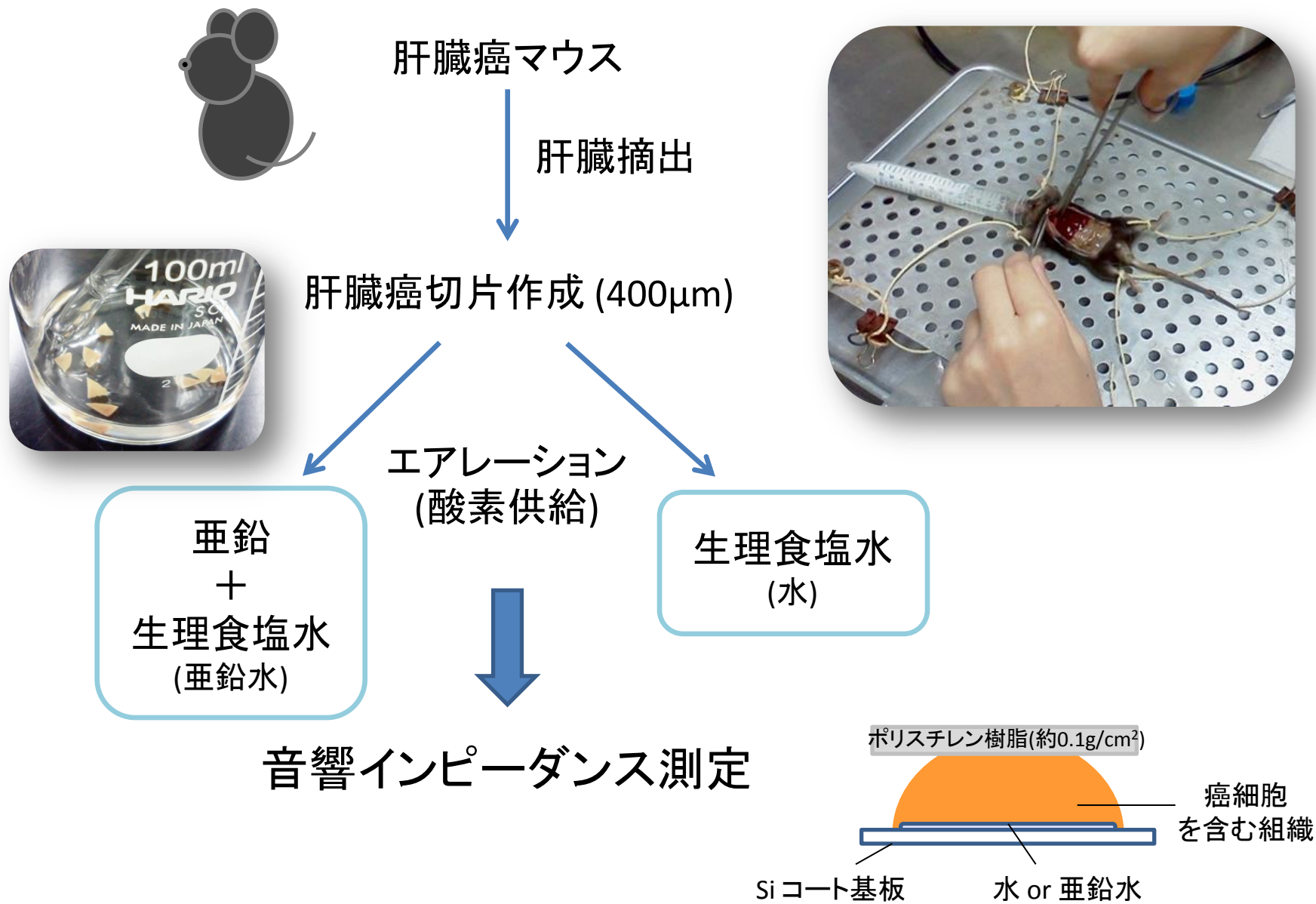
癌細胞・・・突然変異により頻繁に細胞分裂する



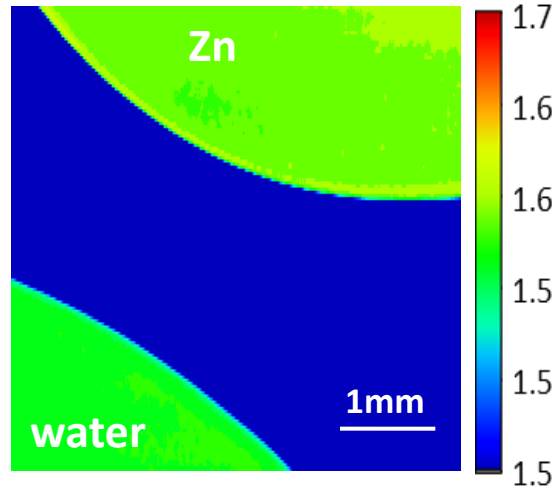
亜鉛・・・細胞分裂に必要な栄養素としての役割

音響インピーダンス値変化を見る ⇒ 安定したデータを得る必要がある

# 亜鉛イオンを用いた癌(肝臓癌)の特定実験

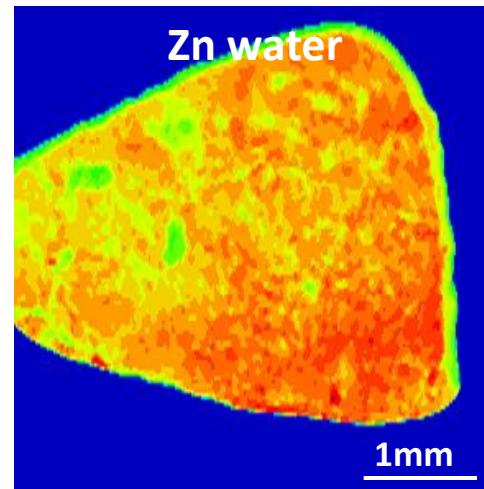
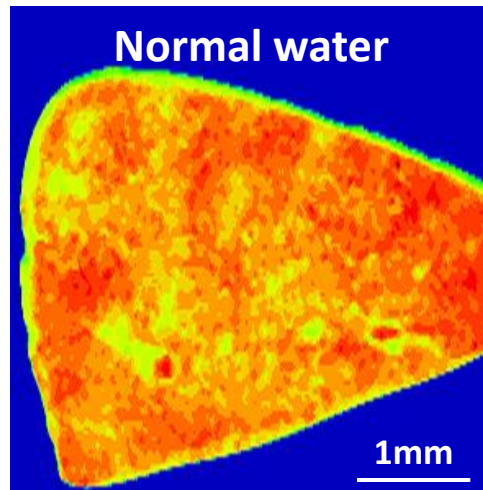


# 亜鉛水と水の音響インピーダンス測定



音響インピーダンス値差  
**0.02**

# ラットの正常肝臓細胞の音響インピーダンス測定



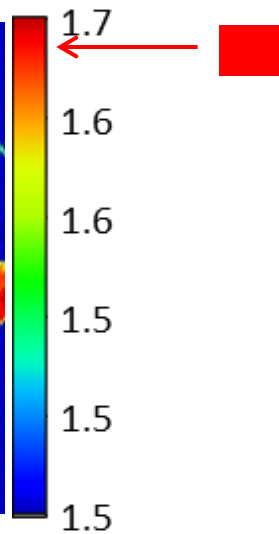
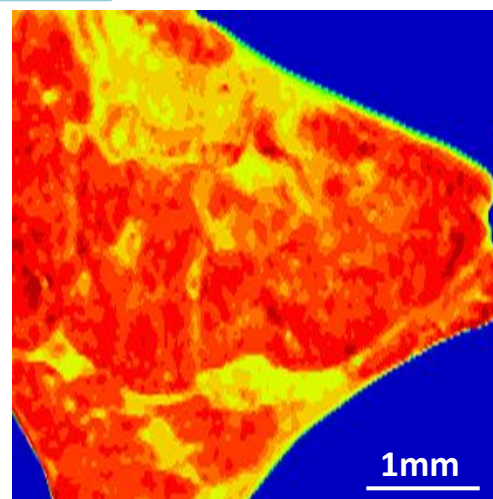
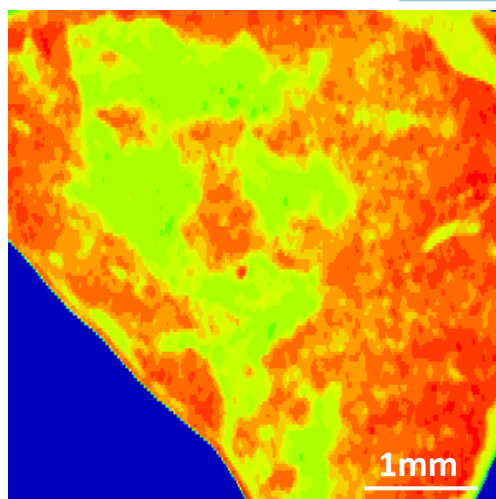
大きな差は  
見られない

➡ 正常細胞では、亜鉛を取り込んでいない。



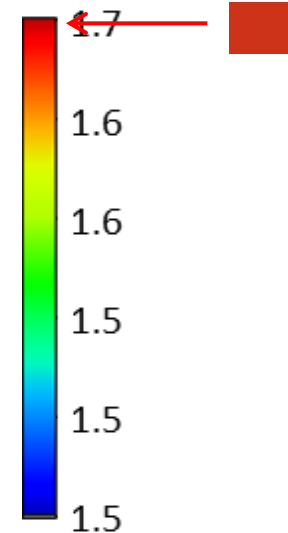
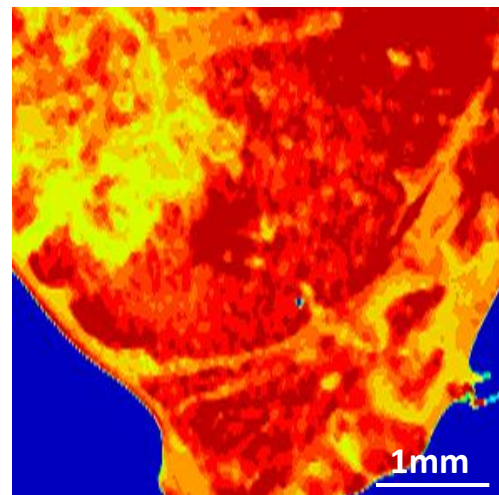
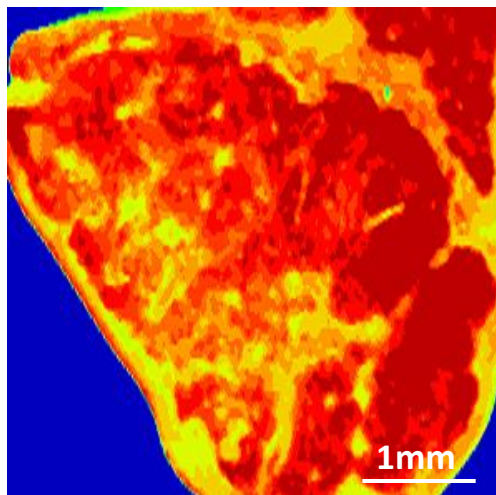
# マウス肝臓癌組織の音響インピーダンス測定

water

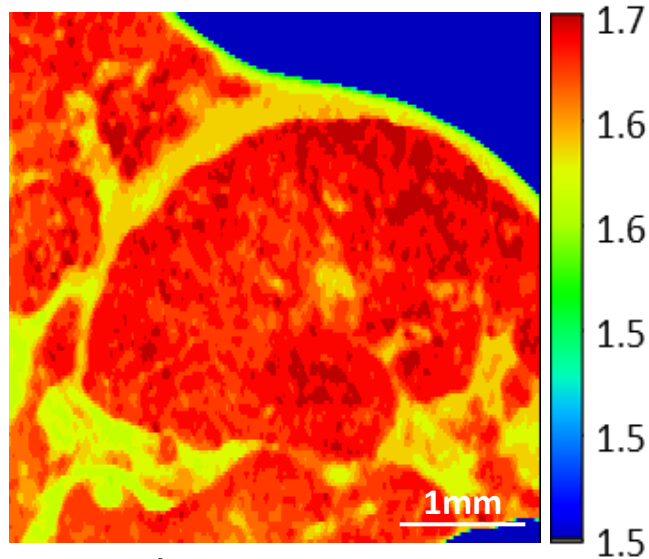


Zn water

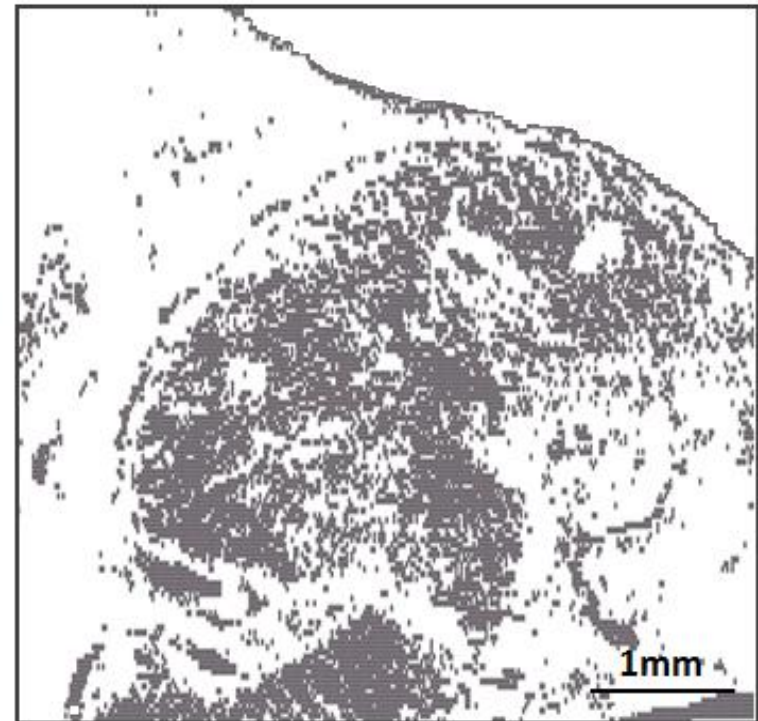
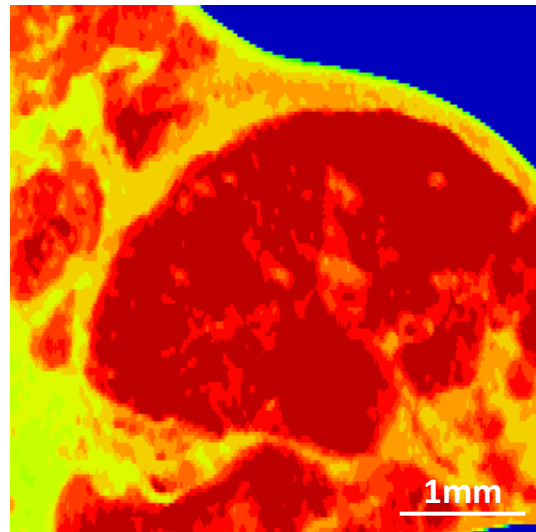
・・・赤色が濃い



# 亜鉛水滴下前と後の、音響インピーダンス値の比較

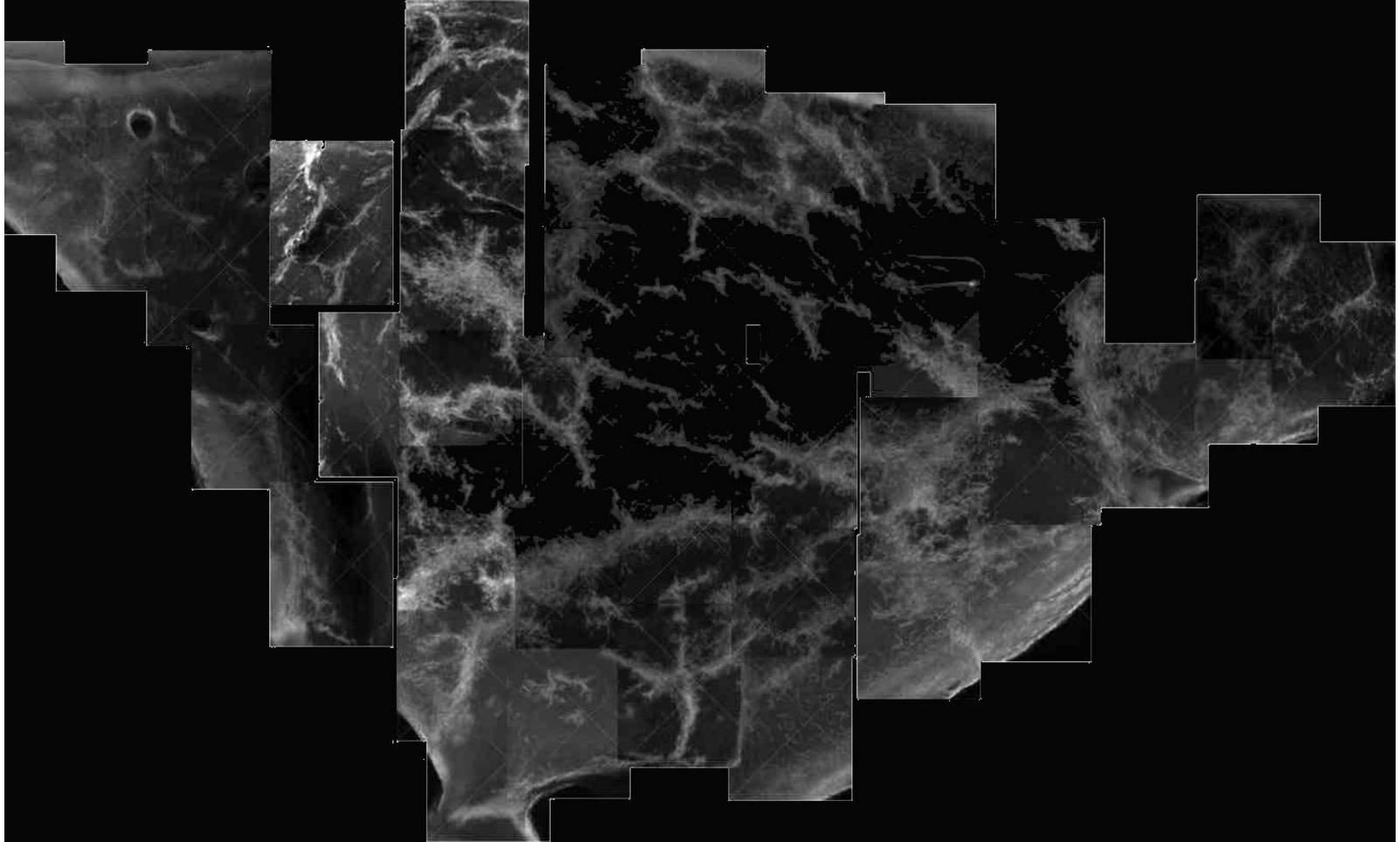


↓ Zn water 滴下



音響インピーダンス値の増加点

# 共焦点顕微鏡による抗体染色画像



# まとめ

## [ 基板の安定性 ]

- ◆ VUV15分処理することで親水性が高い基板に改質し、生体組織観察で安定したデータが得られた。
- ◆ 真空パックでシャーレが割れない程度の真空パック状態で、5日間保存した基板を2日間大気中に放置した親水処理基板でも安定した測定ができた。
- ◆ 保存時に真空度を上げると変化が少ないので。真空パックで保存

## [ 癌細胞の特定実験使用結果 ]

- ◆ 亜鉛イオンによって癌細胞部位が2%程度の音響インピーダンスの変化をとらえることができた。



## [ より高い親水処理 ]

- ◆ シランコーティング後にVUV15分処理することでより高い親水処理が可能となった。  
高い親水性を保持したまま供給できる方法を検討中。