総説**REVIEW ARTICLE****非線形光学現象を利用した光音響顕微鏡の開発**山岡 禎久^{1,2}, 高松 哲郎¹¹ 京都府立医科大学大学院医学研究科 細胞分子機能病理学² 京都府立医科大学大学院医学研究科 医学研究法システム学

(平成 24 年 12 月 4 日受理, 平成 24 年 12 月 20 日掲載決定)

**Photoacoustic Microscopy with Nonlinear Optical Effects
to Visualize Deep Structures with High Spatial Resolution**Yoshihisa Yamaoka^{1,2}, Tetsuro Takamatsu¹¹Department of pathology and cell regulation, Kyoto prefectural university of medicine²Department of methodologies for medical research, Kyoto prefectural university of medicine

(Received December 4, 2012, Accepted December 20, 2012)

要 旨

近年, 光音響イメージングは生体深部を観察する手法として注目されている. しかしながら, 高空間分解能化のためには生体深部観察に不利な超音波の高周波成分を使用しなければならないという問題がある. この問題を解決するために, 非線形光学現象の 1 つである 2 光子励起を組み合わせた光音響顕微鏡の開発を行ったので紹介する. この方法では空間分解能は 2 光子励起によって決定されるため, 生体内伝搬に不利な超音波の高周波成分を使う必要なく, 高空間分解能な観察が可能である.

キーワード: 光音響顕微鏡, 2 光子励起, 生体深部観察, 血管イメージング, 周波数フィルタリング

Abstract

Recently, photoacoustic microscopy (PAM) has attracted attention to visualize deep structures in living tissues. However, it is difficult to improve the spatial resolution of PAM without using high-frequency components of photoacoustic waves, which are not suitable for deep imaging. To overcome this drawback, we developed two-photon absorption-induced photoacoustic microscopy (TP-PAM). The spatial resolution in TP-PAM is determined by two-photon absorption (TPA). The use of low-frequency ultrasonic components generated by TPA enables PAM to visualize deeper structures while preserving the high spatial resolution.

Key words : photoacoustic microscopy, two-photon excitation, deep tissue imaging, vascular imaging, frequency filtering

1. 緒言

病気の早期発見や治療経過評価のために、生体内の臓器の形態や機能をそのまま詳細かつ低侵襲に観察することは非常に重要である。X線によるコンピューター断層撮影 (computed tomography; CT), 核磁気共鳴イメージング (magnetic resonance imaging; MRI), 超音波エコーは、生体深部を観察する方法として一般的に医療で使用されている。これらの方法は、人間の体を輪切りにできるほど生体深部を観察できる能力を持つが、空間分解能がせいぜいミリメートルを切る程度であるという問題点が存在する。画像のコントラストも造影剤を使うことで補うことができるが十分ではないのが現状である。

一方、可視光や近赤外光を用いた光イメージングは、高コントラスト、かつ、高空間分解能で生体を観察できるという特徴を持っている。可視光や近赤外光はX線に比べ低侵襲であり、分子による吸収、蛍光によってコントラストが作られるため、分子特異的な画像化が可能である。蛍光プローブの発展、自家蛍光の利用、光計測技術の発展により、様々な生体の機能や形態が観察できるようになった¹⁻⁵⁾。しかしながら、光は生体に強く散乱されるため、生体深部の観察が困難であるという問題点が存在する⁶⁾。

このように、生体を観察する場合には、CT, MRI, 超音波エコーが得意な観察領域、光イメージングが得意な観察領域が存在する (Fig.1)。しかしながら、数 mm から数 cm の深さ、数から数十 μm の空間分解能の領域に空白があり、観察する方法がないのが現状である。特に数から数十 μm の太さの小血管は臓器と血液をつなぐ働きをしており、生体の恒常性や代謝に密接に関係している。ヒトの細胞の大きさは数から数十 μm であり、細胞レベルでの観察はがんの正確な範囲診断に有効である。また、サブから数 mm は皮膚上皮や真皮、血管内膜、消化管粘膜層や粘膜下層などの厚さであり、これらの深さに存在する小血管構造や細胞機能を評価することは非常に重要である。特に再生医療分野において損傷を受けた様々な臓器の機能復元評価に、小血管構造、微小循環の観察は必要とされている。また、皮膚における悪性度の高いがんの一種である悪性黒色腫 (メラノーマ) はどのくらい真皮に深達しているかによって予後が変わってくるため⁷⁾、その正確な広がり細胞レベルで行うことが必要とされている。

そのような生体深部を観察する方法として、光音響イメージングに注目が集まっている^{1,8,9)}。光を生体に照射すると、励起光の波長と吸収スペクトルが一致した領域において熱弾性膨張が起こり、超音波が発生する。その超音波を検出することによって画像化する方法である。分子の光吸収から発生する信号を使用していることと、超音波が生体内長距離伝搬することを利用して、高コントラスト化、深達距離向上をさせている。現在提案されている光音響イメージングには様々な種類のものが存在するが、空間分解能は超音波、あるいは、光の波長オーダーとなる⁹⁾。超音波の波長は、例えば、10 MHz の超音波の1波長は水中において150 μm であり可視光の波長に比べると長く、超音波で決定される空間分解能は

Fig.1 Observable region (grey area) for various imaging modalities to visualize structures in living tissues. CT: Computed tomography, MRI: Magnetic resonance imaging, US: Ultrasonography, OCT: Optical coherence tomography, LSM: Laser scanning microscopy, MPM: Multiphoton microscopy, STED: Stimulated emission depletion microscopy.

Fig.2 Principle and depth resolution of conventional (one-photon) photoacoustic microscopy (PAM).

光波のものと比べると低い。一般的な光音響イメージングの深さ分解能は超音波の波長によって決定されるため⁹⁻¹¹⁾、高空間分解能化のためには光音響波の高周波成分を使う必要がある (Fig.2)。しかしながら、高周波になると生体深達距離が顕著に短くなるため⁸⁾、生体深部での高空間分解能化が困難であるという問題がある。

2. 2 光子励起光音響顕微鏡

前章で示した光音響イメージングにおける深さ分解能向上の問題点を解決するために、我々は非線形光学現象の1つである2光子吸収を組み合わせた2光子励起光音響顕微鏡 (Two-photon absorption-induced photoacoustic microscopy; TP-PAM) を提案した (Fig.3)¹²⁻¹⁵⁾。通常の光吸収は1つの分子が1つの光子を吸収することにより励起状

Fig.3 Principle and depth resolution of two-photon absorption-induced photoacoustic microscopy (TP-PAM).

態に遷移する。2光子吸収は1つの分子が2つの光子を同時に吸収することによって励起状態に遷移する^{16,17)}。この現象は光子密度が高い状態で起こるため、ピークパワーの高い光パルスを集光することによって得ることができる。焦点近傍の微小空間のみで2光子吸収が起こるため、2光子吸収による光音響波を検出すれば高空間分解能が可能である。本法は一般的な光音響イメージングと違い、横と深さ、両方向の空間分解能が光学的に決定される¹²⁾。通常、深さ方向の高分解能化には光音響波の高周波成分が必要とされるが、低周波成分のみで高空間分解能が可能である。したがって、TP-PAMは生体深部観察に有利であり、深さ方向の分解能の向上が可能である。

3. 2光子励起光音響顕微鏡システム

我々の開発した TP-PAM システムを Fig.4 に示す¹²⁾。励起レーザー光源としては、サブナノ秒半導体励起マイクロチップレーザー (SNP-13E; Teem Photonics) を用いた (波長, 1064 nm; パルス幅, 0.6 ns; 最大パルスエネルギー, 14.1 μJ; 繰り返し周波数, 7.3 KHz)。レーザービームは2つのレンズでビーム径を広げて平行光とした。ビーム径は対物レンズの性能ができるだけ発揮されるように、対物レンズのバックアパーチャー径に対して、70%以上になるように調整した¹⁸⁾。サブナノ秒の光パルスは20倍の対物レンズ (LMH-20X; Thorlabs) (開口数 (NA): 0.4) で水中に設置される試料に集光され、発生する光音響波を水中での焦点距離が 15 mm である 10 MHz の音響トランスデューサー (10K6.4I; JapanProbe) によって検出した。試料の位置は XYZ ステージによって制御した。光音響波の時間波形は高速デジタルサイザー (U1082A-AVG; Agilent Technologies, Inc.) によって集積回路上で高速に平均化 (1000 ~ 5000 回平均) され、得られた時間波形をコンピュータで取り込んだ。時間波形の周波数解析から選択した周波数範囲の信号強度を明るさとしてプロットすることにより、3次元の画像を得た。

Fig.4 Experimental setup for TP-PAM.

Fig.5 Comparison of absorption, generated photoacoustic waves and power spectra between one-photon and two-photon excitations.

4. 光音響波周波数フィルタリング

2光子励起による信号は1光子励起による信号より発生しにくい。SN比を向上させるためには、2光子励起光音響波を効率よく検出することが非常に重要である。2光子励起レーザー走査型“蛍光”顕微鏡では、光の周波数フィルタリングを行って2光子励起による蛍光を分けている¹⁷⁾。同様に、TP-PAMにおいても発生する超音波の周波数フィルタリングによって、2光子光音響波を効率よく検出できるのではないかと考えた^{12,13)}。一般的に1光子励起によって発生する光音響波の時間波形は吸収係数によって変化することが知られている^{19,20)}。発生する光音響波の時間波形は吸収の空間的变化と密接にかかわっており、狭い領域から光音響波が発生すると、高周波成分を多く含む。同様に、2光子励起による光音響信号も非常に空間的に限局した領域から発生するため、高周波成分が多く含まれる (Fig.5)。従って、2光子励起光音響波検出のために光音響波の高域フィルタリングを、深部観察のために低域フィルタリングを行うというバンドパスフィルタリングを用い、画像化を行った。

5. システムの空間分解能評価

測定装置の空間分解能を評価するために、シリコンブロック内に作成した直径 300 μm の円柱状の中空をローダミン B / エタノール溶液 (25 mM) で満たし、その

Fig.6 TP-PAM images of cross-section of silicone hollow filled with Rhodamine B / ethanol (a) without and (b) with frequency filtering.

Fig.7 Intensity profiles in the (a) depth and (b) transverse directions. Open circles: experimental data, solid lines: fitting curves.

Fig.8 TP-PAM image of USAF test target.

断面形状から空間分解能を評価した。ローダミン B は波長 532 nm に吸収があるため、波長 1064 nm の光を照射すると波長 1064 nm の 2 倍波 (半分の波長) である波長 532 nm で 2 光子吸収が起こる。励起パルスのエネルギーとしては 1.2 μJ を用いた。Fig.6 (a) は周波数フィル

タリングなしで得られた断面像、(b) は低周波バンドパスフィルタリング (1 ~ 15 MHz) を用いた 2 光子励起光音響像を示している。周波数フィルタリングの範囲は測定ターゲットの種類、形状、集光レンズ等に依存するので、本実験条件下であらかじめ測定しておいた 1 光子と 2 光子光音響波の周波数スペクトルの違いから決定した。結果として、低周波バンドパスフィルタリングを用いることによってコントラストが向上した画像を得ることがわかった。得られた断面像 (Fig.6 (b)) の光照射側と反対側の光音響信号が強くなっているが、これはエッジ効果²¹⁾、円柱形状のターゲットによるレンズ効果、光音響波の干渉などによるものと考えられる。断面像の中心を通る深さ方向と横方向の強度プロファイル (Fig.7 (a), (b)) から、TP-PAM の深さ分解能と横分解能に関して評価を行った。励起光をガウシアンビーム、強度の 2 乗によって信号が発生すると仮定し、空間分解能をフィッティングにより評価した¹²⁾。結果として得られた深さ方向および横方向の分解能 (半値全幅で評価) はそれぞれ $10.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$, $5.9 \pm 0.4 \mu\text{m}$ であった。低周波音響トランスデューサ (10 MHz) を使っているにもかかわらず、通常の高周波音響トランスデューサ (75 MHz) を使った 1 光子励起光音響顕微鏡より²²⁾、深さ分解能が向上していることがわかった。20 倍対物レンズ (NA: 0.4) を用いて得られる理想的な 2 光子 “蛍光” 顕微鏡の深さ、横分解能はそれぞれ 10.8 μm , 1.0 μm であり²³⁾、今回の実験により得られた TP-PAM の空間分解能はほぼ光学的に決定されている。横分解能に関して、理想的な分解能と多少開きがあるが、これは分解能の決定を円柱の中心を通る光軸に垂直な面の試料境界によって評価しているため、光路に存在するシリコンと溶液の境界によって集光が甘くなるためではないかと考えている。一般的に空間分解能は、識別可能な 2 点間距離によって定義されているので、USAF テストターゲット (NT38-257; Edmund Optics) の光音響画像を用いて、より正確な空間分解能を評価した。結果として、グループ 7 エlement 6 (228 lp/mm) のラインペアが明確に区別されていることがわかった (Fig.8)。グループ 7 エlement 6 のライン間隔は 4.4 μm であり、変調伝達関数 (modulation transfer function) の値¹⁰⁾ も 0.8 であった。したがって、横方向の分解能は 4.4 μm を十分に上回る値であることが明らかとなった。

6. 血管イメージングへの応用

ヘモグロビンは大きな 2 光子吸収断面積を有することが報告されている²⁴⁾。血流イメージングへの応用を検証するために、直径 450 μm のカテーテル (NIC-26GX3/4; NIPRO) にポリ塩化ビニルチューブ (SF-ET5527; TERUMO) を繋ぎ、ラットから採取した血液をペリスタポンプ (MP-1000; EYELA) によって循環させた。カテーテル部の断面を正確に捉えられるかどうか検証を行った。励起光の波長としては波長 1064 nm と波長 1064 nm の 2 倍波である波長 532 nm を用い、対物レンズとしては、40 倍 (NA: 0.8) のものを使用した。結果として、光音響波の低周波成分 (1 ~ 3 MHz) を用いて画像化した場合、

Fig.9 Cross-sectional images of circulated blood in catheter with (a) 532-nm and (b) 1064-nm excitations with 1-3 MHz and 3-11 MHz frequency filtering.

Fig.10 10 x-y (upper) and cross-sectional (lower) vascular images of rat testis with 1-3 MHz (left) and 3-11 MHz (right) frequency filtering.

波長 1064 nm, 波長 532 nm の両方の励起において断面がぼやけた像になっていることがわかった。これは、1 光子励起によって発生する光音響波が支配的であるためではないかと考えた。一方、高周波成分 (3 ~ 11 MHz) を用いて画像化した場合、低周波成分を用いて画像化した場合に比べて画像のボケが少なくなっていることがわかる。波長 532 nm での励起の場合は裾が深さ方向に引いているが、1064 nm の場合は明確に断面が捉えられていることがわかる。波長 1064 nm の励起の場合に中心部分が少し抜けているが、これは光音響波の干渉の効果によって起こっているのではないかと考えた。

生体内への応用を考えるために、ラット精巣内血管に対して波長 1064 nm での励起、周波数フィルタリングの効果を用いた光音響イメージングを行った (なお、本実験は京都府立医科大学動物実験委員会の承認を得、京都府立医科大学動物実験規定に基づいて行った)。Fig.10 は精巣動脈、静脈を結紮し精巣を取り出した後、精巣内に存在する血管をイメージングしたものである。(a) は低周波成分 (1 ~ 3 MHz) を用いて画像化したもの、(b) は高周波成分 (3 ~ 11 MHz) を用いて画像化したものである。上図は x-y 平面像、下図は断面像を表している。これらから、深さ分解能が高周波成分を用いることによって向上しているのがわかる。これは、高周波成分によって 2 光子励起の光音響波を効率よく検出しているためであると考えた。現在、イメージングに使用している励起波長は 1064 nm であり、ヘモグロビンの 2 光子吸収のピークではない²⁴⁾。適切な励

起光の波長選択、及び、周波数フィルタリングの最適化によって 2 光子励起光音響による血管イメージング品質の向上が可能であると思われる。

7. 結論

低周波バンドパスフィルタリングを用いた TP-PAM システムを紹介した。本法は、低周波超音波を検出に用いているにもかかわらず、高空間分解能かつ高コントラストの性能を有する。さらに、血管イメージングへの可能性を示した。本法は、生体内部構造を細胞レベルで明らかにする技術として有用であると考えている。

謝辞

本研究は、科学研究費補助金 (19700384, 23500525)、研究成果展開事業 研究成果最適展開支援 A-STEP (AS232Z00989F) の交付を受けて行った成果である。

参考文献

- 1) L. V. Wang, and H.-I. Wu: Biomedical Optics, John Wiley & Sons, 2007.
- 2) Y. Harada, P. Dai, Y. Yamaoka, M. Ogawa, H. Tanaka, K. Nosaka, K. Akaji, and T. Takamatsu: Intracellular dynamics of topoisomerase I inhibitor, CPT-11, by slit-scanning confocal Raman microscopy, *Histochem. Cell Biol.*, 132: 39-46, 2009.
- 3) K. Imaizumi, Y. Harada, N. Wakabayashi, Y. Yamaoka, H. Konishi, P. Dai, H. Tanaka, and T. Takamatsu: Dual-wavelength excitation of mucosal autofluorescence for precise detection of diminutive colonic adenomas, *Gastrointest. Endosc.*, 75: 110-117, 2012.
- 4) Y. Murayama, Y. Harada, K. Imaizumi, P. Dai, K. Nakano, K. Okamoto, E. Otsuji, and T. Takamatsu: Precise detection of lymph node metastases in mouse rectal cancer by using 5-aminolevulinic acid, *Int. J. Cancer*, 125: 2256-2263, 2009.
- 5) M. Ogawa, Y. Harada, Y. Yamaoka, K. Fujita, H. Yaku, and T. Takamatsu: Label-free biochemical imaging of heart tissue with high-speed spontaneous Raman microscopy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 382: 370-374, 2009.
- 6) V. V. Tuchin: *Tissue Optics*, 3-22, 2007, SPIE Press.
- 7) 向井清, 真鍋俊明, 深山正久編: 外科病理学, 第4版, 2006, 文光堂.
- 8) L. V. Wang, ed.: *Photoacoustic Imaging and Spectroscopy*, 2009, CRC press.
- 9) L. V. Wang, and S. Hu: Photoacoustic tomography: *in vivo* imaging from organelles to organs, *Science*, 335: 1458-1462, 2012.
- 10) K. Maslov, H. F. Zhang, S. Hu, and L. V. Wang: Optical-resolution photoacoustic microscopy for *in vivo* imaging of single capillaries, *Opt. Lett.*, 33: 929-931, 2008.
- 11) S. Hu, K. Maslov, and L. V. Wang: Second-generation optical-resolution photoacoustic microscopy with improved sensitivity and speed, *Opt. Lett.*, 36: 1134-1136, 2011.
- 12) Y. Yamaoka, M. Nambu, and T. Takamatsu: Fine depth resolution of two-photon absorption-induced photoacoustic microscopy using low-frequency bandpass filtering, *Opt. Express*, 19: 13365-13377, 2011.
- 13) Y. Yamaoka, M. Nambu, and T. Takamatsu: Frequency-selective multiphoton-excitation-induced photoacoustic microscopy (MEPAM) to visualize the cross sections of dense objects, *Proc. SPIE*, 7564: 75642O, 2010.

- 14) Y. Yamaoka, and T. Takamatsu: Enhancement of multiphoton excitation-induced photoacoustic signals by using gold nanoparticles surrounded by fluorescent dyes, Proc. SPIE, 7177: 71772A, 2009.
- 15) Y. Yamaoka, K. Fujiwara, and T. Takamatsu: Improvement of depth resolution on photoacoustic imaging using multiphoton absorption, Proc. SPIE, 6631: 663102, 2007.
- 16) R. W. Boyd: Nonlinear Optics, 1-17, 1992, Academic Press, Inc.
- 17) A. Diaspro: Confocal and Two-Photon Microscopy, 2002, Wiley-Liss.
- 18) F. Helmchen, and W. Denk: Deep tissue two-photon microscopy, Nat. Methods, 2: 932-940, 2005.
- 19) Z. Guo, S. Hu, and L. V. Wang: Calibration-free absolute quantification of optical absorption coefficients using acoustic spectra in 3D photoacoustic microscopy of biological tissue, Opt. Lett., 35: 2067-2069, 2010.
- 20) P. C. Li, C. W. Wei, and Y. L. Sheu: Subband photoacoustic imaging for contrast improvement, Opt. Express, 16: 20215-20226, 2008.
- 21) 澤田嗣郎編: 光熱変換分光法とその応用, 1997, 学会出版センター.
- 22) G. Ku, K. Maslov, L. Li, and L. V. Wang: Photoacoustic microscopy with 2- μ m transverse resolution, J. Biomed. Opt., 15: 021302, 2010.
- 23) W. R. Zipfel, R. M. Williams, and W. W. Webb: Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences, Nat. Biotechnol., 21: 1369-1377, 2003.
- 24) G. O. Clay, C. B. Schaffer, and D. Kleinfeld: Large two-photon absorptivity of hemoglobin in the infrared range of 780-880 nm, J. Chem. Phys., 126: 025102, 2007.

著者紹介

山岡 禎久 (Yoshihisa Yamaoka)

京都府立医科大学 大学院医学研究科
医学研究法システム学 助教. 工学博士,
医学博士. 1999 年, 北海道大学 大学
院工学研究科博士後期課程応用物理学
専攻 単位取得退学. 1999 年, 産業技
術総合研究所 計測標準研究部門 科学
技術特別研究員. 2002 年, 産業技術総合研究所 単一分
子生体ナノ計測研究ラボ 産総研特別研究員. 2005 年,
京都府立医科大学 大学院医学研究科 細胞分子機能病理
学 博士研究員. 2006 年より現職. 生体光イメージング,
特に光音響イメージングに関する研究に従事.