光音響イメージングに用いる造影用ナノ粒子の設計指針

深澤 智典*

Phenomenological Model for a Nanoparticle Design Strategy for Photoacoustic Contrast Imaging

Tomonori Fukasawa*

Photoacoustic (PA) imaging is one of the rapidly growing techniques for biomedical imaging because this noninvasive imaging technique combines the advantages of both optical and acoustic imaging techniques. The degree of contrast in PA imaging depends on the optical-to-acoustic conversion (optoacoustic) efficiency and can be exogenously improved by using nanoparticles (NPs) as contrast agents. With recent progress in nanotechnology, various NPs have been synthesized to serve as contrast agents. These studies focus on the improvement of absorption efficiency of light energy of the particles because the amplitude of PA signal increases with increasing absorption efficiency. Nevertheless, we have limited knowledge of the fundamental aspects of the photoacoustic phenomenon. This review presents our theoretical description of the PA pressure pulse from suspensions of NPs and some experimental results. The findings of our studies and the proposed phenomenological model provide a strategy for the design of NPs for PA contrast imaging.

Keywords: Photoacoustic imaging, Contrast agents, Nanoparticles, Phenomenological modeling, Particle design.

1. はじめに

光音響効果 (Photoacoustic effect) は、1880 年に、電話の発明で有名な Alexander Graham Bell によって報告された[1]。その後、ガスの濃度計測や固体試料の分光測定などに応用され、光音響分光法 (Photoacoustic spectroscopy; PAS) として発展してきた。近年では、生体・医学分野における診断やイメージング技術に応用され、光音響イメージング (Photoacoustic imaging; PAI) として注目されている。光音響イメージングは、光のエネルギーを吸収した部位から発生した音響波をとらえて可視化する技術である。入力側が光、出力側が音響波であり、蛍光イメージング (Fluorescence imaging; FI) と超音波イメージング (Ultrasonography; US) の特徴を併せもつ。光の波長パラメータを適切に設定することで、特定の光吸収体を選択的に励起・可視化できる。さらに、光と比較して散乱や吸収による減衰を受けにくい音響波を検出信号とするため、分解能および感度の悪化が生じず、生体深部まで高い空間解像度が得られる[2,3]。

光音響イメージングでは、ナノ粒子を光エネルギーの吸収体として用いることにより、病変細胞を特異的に認識する標的リガンドを粒子表面に修飾することで癌など

の腫瘍組織への集積や、腫瘍周辺の血管に粒子径数十 nm から 200 nm のナノ粒子が集積する EPR 効果 (Enhanced permeation and retention effect) の利用により、腫瘍部位を選択的に可視化できる[4]。本稿では、現在提案されている代表的な造影用ナノ粒子とその設計指針を紹介する。

2. 造影用ナノ粒子

生体イメージングにおいて、造影用ナノ粒子にはより細胞深部までのイメージングが可能となるよう、生体透過性の高い近赤外領域に吸収波長を有することが求められる[5]。

現在、研究・開発が進められている造影用ナノ粒子は、その光エネルギーの吸収様式により、表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance; SPR) を利用した粒子と、色素を含有した粒子の2種類に分類される。

表面プラズモン共鳴を利用した造影粒子として、金ナノシェル[6]、金ナノロッド[7]が代表的である。これらの粒子では、シェル厚みやアスペクト比の変更により吸収波長を調整できるため、同一材料での多色イメージングも可能である。また、金ナノチューブ[8]や単層カーボンナノチューブ (Single-walled carbon nanotubes; SWNTs) [9]、銀ナノシェル[10]の利用も検討されている。

色素含有粒子に用いられる色素分子としては、ICG (Indocyanine Green) が代表的である。ICG は、近赤外領域に吸収波長を有し、生体適合性も認められていることから、臨床応用に際し、非常に有用な色素である。そのほかにも、Polymethine (Cy5.5, Cy7) や Alexa Fluor 750, IRDye78 などが用いられている。これらの色素を有機修

2018 年 2 月 5 日受付
広島大学大学院 工学研究科 化学工学専攻
(〒739-8527 東広島市鏡山 1-4-1)
Department of Chemical Engineering, Hiroshima University
(1-4-1 Kagamiyama, Higashihiroshima, Hiroshima 739-8527, Japan)
* Corresponding Author fukasawa@hiroshima-u.ac.jp

Fig. 1 Schematic representation of the monodispersed particle suspension before/after laser irradiation

Fig. 2 Generation process of photoacoustic pulse: (a) laser irradiation, (b) heat generation and transfer into surrounding medium, (c) thermal expansion of particle, and (d) thermal expansion of medium

飾ケイ酸塩 (Organically modified silica; ORMOSIL) やポリ乳酸グリコール酸共重合体 (Poly lactic-co-glycolic acid; PLGA), リン酸カルシウム (Calcium phosphate) などのナノ粒子に内包することにより, 造影粒子として利用される[11-13]。

これまでの造影用ナノ粒子の研究・開発では, おもに光エネルギーの吸収効率の向上にその重きが置かれていた。より強い音響波を発生する優れた造影粒子の開発には, 光エネルギーから音響波への変換効率の向上も重要となってくる。そのため, 粒子設計の更なる合理化へ向けて, 光音響波の発生メカニズムに基づく工学モデルの活用が期待されている。

3. 光音響信号強度を推算する工学モデル

光音響波は光照射された領域内における粒子および粒子周囲媒体それぞれの熱膨張によって発生する (Fig. 1)。光エネルギーは粒子にて熱エネルギーに変換され, 粒子の熱膨張を引き起こす。また, 変換された熱エネルギーの一部は粒子の周囲媒体へ流出し, 媒体の熱膨張を引き起こす (Fig. 2)。この光照射された領域内に生じる熱膨張に起因する圧力変化 p_{tot} を, 「粒子寄与 p_p 」と「粒子周囲媒体寄与 p_m 」の和として表現した以下のモデル式が提案されている[14-16]。

$$p_{\text{tot}} = n_p e_{\text{tot}} \left[\frac{\kappa_p}{\kappa_m} \Gamma_p \times x + \Gamma_m \times (1 - x) \right] = p_p + p_m \quad (1)$$

$$\Gamma_i \equiv \frac{\beta_i}{\kappa_i c_i \rho_i}$$

$$x \equiv \frac{e_p}{e_{\text{tot}}}, 1 - x \equiv \frac{e_m}{e_{\text{tot}}}, e_{\text{tot}} \equiv e_p + e_m$$

ここで, n_p は粒子数濃度, κ は等温圧縮率, β は熱膨張係数, c は比熱容量, ρ は密度, e はエネルギーである。 Γ は Grüneisen 定数であり, 構成物質の熱膨張率と比熱などの熱物性を反映した重要なパラメータである。添え字 tot, p, m は, それぞれ全体, 粒子および粒子周囲媒体を表す。 x は光照射によって粒子 1 個が受け取る全熱エネルギー e_{tot} に対して粒子側に残るエネルギー e_p の割合である。Eq. (1) における圧力変化 p_{tot} が信号強度に対応する。また Eq. (1) より, 信号強度の増大には, Grüneisen 定数に代表される粒子および粒子周囲媒体の物性値のみならず, 熱エネルギーの配分も重要となる。たとえば, $(\kappa_p/\kappa_m)\Gamma_p > \Gamma_m$ の場合, 粒子側により多く熱エネルギーが残留することで信号強度が増大する。すなわち, 粒子の熱閉じ込めが重要な課題となる。

4. モデル粒子を用いた工学モデルの検証

光音響波の発生メカニズムに基づき導出された工学モデル (Eq. (1)) の妥当性の検証実験を紹介する。

4.1 光音響信号

光音響信号の測定装置の概略図を Fig. 3 に示す。ナノ粒子懸濁液をキュベットに入れ, 温度調整した水槽中に固定し, パルスレーザー光の照射により発生する光音響信号をハイドロフォンにて測定する。異なる光路長を有する 3 種類のキュベットを用いて測定した金ナノ粒子 (直径 8 nm) 懸濁液の光音響信号を Fig. 4 に示す[14]。いずれの光路長においても, 特徴的なピークが 2 カ所見られる。1 つ目および 2 つ目のピークは, それぞれハイドロフォン側 ($Z=L$) とレーザー側 ($Z=0$) において発生する光音響信号に対応する。また, そのピーク間隔は光路長を反映している。光音響信号強度は, レーザー光の減衰を受けないレーザー側 ($Z=0$) からの信号強度を採用する。レーザー光および音響波の減衰に関する詳細な検討については文献を参考されたい[14]。

4.2 粒子数濃度 (光学密度) と光音響信号強度

粒子サイズが小さく光の散乱が無視でき, 照射された光エネルギーのすべてが熱エネルギーとして粒子に吸収されるならば, 単位体積あたりに受け取る総熱エネルギー $n_p e_{\text{tot}}$ は光学密度 OD_λ に比例する。

$$n_p e_{\text{tot}} \propto \text{OD}_\lambda \quad (2)$$

Eqs. (1), (2) より, 信号強度は光学密度 OD_λ に比例する。Fig. 5 に, 金ナノ粒子懸濁液について, 各光学密度 (粒子数濃度) における信号強度の測定結果を示す[15]。各粒子サイズおよび懸濁液温度において, 信号強度は光学

Fig. 3 (a) Illustration of the experimental setup. BS—beam splitter, PD—photodiode, PC—computer (b) Schematic representation of the photoacoustic pressure pulse from a laser-irradiated suspension of nanoparticles

Fig. 4 Signal amplitudes observed from a laser-irradiated aqueous suspension of 8.0-nm Au nanospheres at 20°C, as a function of time for different sample cuvettes: the light path length of $L = 0.92, 4.2,$ and 10.0 mm. The laser pulse width and wavelength were 0.8 ns and 509 nm, respectively. The signals for $L = 0.92$ and 10.0 mm are shifted from the original data by $+0.15$ and -0.15 V, respectively. The arrows indicated two isolated spikes observed.

密度に比例して増加した。この結果は提案された工学モデル (Eq. (1)) と定性的に一致している。

Fig. 5 The peak values of the signals observed from a laser-irradiated aqueous of 19.9-nm (circles), 40.2-nm (diamonds), and 49.3-nm (triangles) Au nanoparticles, as a function of the optical density of suspension OD_{522} for different temperatures of 4°C (open symbols) and 20°C (filled symbols). The laser pulse width and wavelength were 0.8 ns and 522 nm, respectively.

4.3 粒子および粒子周囲媒体の物理化学特性と光音響信号強度

Eq. (1) より、粒子懸濁液からの光音響信号強度の増大には、粒子および粒子周囲媒体の物理化学特性と熱エネルギーの配分が重要となる。ここで、金属系粒子の代表例として金ナノ粒子を、高分子系粒子の代表例として色素 (DiI) 含有ポリスチレン (PS) ナノ粒子を用いたモデル実験を紹介する。

各懸濁液について、20°C および 4°C における粒子直径 d_p と光音響信号強度の関係を **Fig. 6** に示す[16]。ここで、縦軸は測定された信号強度を光学密度 OD_λ にて規格化した値を示す。Eqs. (1), (2) より、以下の関係が成り立つ。

$$\frac{p_{\text{tot}}}{OD_\lambda} \propto \frac{p_{\text{tot}}}{n_p e_{\text{tot}}} = \frac{\kappa_p}{\kappa_m} \Gamma_p \times x + \Gamma_m \times (1 - x) \quad (3)$$

Table 1 に 20°C および 4°C における各懸濁液の $(\kappa_p/\kappa_m)\Gamma_p$ と Γ_m の値を示す。20°C において、金ナノ粒子懸濁液では粒子直径の減少にともなって信号強度が増大した。**Table 1** より $(\kappa_p/\kappa_m)\Gamma_p < \Gamma_m$ であり、Eq. (3) から粒子周囲媒体 (水) へ熱エネルギーをより多く配分することにより信号強度の増大が期待される。したがって、粒子直径の減少にともなう比表面積の増加によって、粒子から粒子周囲媒体への熱エネルギーの流出が促進され、信号強度が増大したと考えられる。一方、PS ナノ粒子懸濁液では粒子直径の増加により信号強度が増大した。**Table 1** より $(\kappa_p/\kappa_m)\Gamma_p > \Gamma_m$ であり、粒子により多くの熱エネルギーを閉じ込めることが信号強度の増大に効果的となる。すなわち、粒子直径の増加による比表面積の減少により熱閉じ込めが向上し、信号強度が増大したと考えられる。また、4°C ではいずれの懸濁液においても粒子直径の増加にともない信号強度が増大した。4°C においては $\Gamma_m = 0$ ($\beta_m = 0$) となり、信号強度は粒子寄与 p_p のみとなる。そのため、熱閉じ込めが向上する粒子直径の増加により信

Fig. 6 The magnitude of photoacoustic response from a nanoparticle suspension at 20°C and 4°C, as a function of the nanoparticle diameter d_p : (a) Au and (b) PS nanoparticle. The data collected from the nanoparticle suspensions of three different concentrations were expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean. The laser pulse width and wavelength were 5 ns and 560 nm, respectively.

号強度が増大した。以上より，工学モデルに基づく理論予測と実験結果は良好な一致を示した。

Nomenclature

c : Specific heat capacity	[J/(kg·K)]	β : Thermal coefficient of volume expansion	[1/K]
d_p : Particle diameter	[m]	Γ : Grüneisen parameter	[-]
e : Thermal energy	[J]	κ : Isothermal compressibility	[1/Pa]
L : Light path length	[m]	ρ : Mass density	[kg/m ³]
n_p : Particle number concentration	[1/m ³]	Subscript	
OD_λ : Optical density	[-]	m : Medium	
p : Pressure	[Pa]	p : Particle	
x : Ratio of the thermal energy remained inside the nanoparticle to the total thermal energy	[-]	tot : Total	

References

- [1] A. G. Bell, On the production and reproduction of sound by light, *Am. J. Sci.* 20 (1880) 305–324.
- [2] L. V. Wang, S. Hu, Photoacoustic tomography: in vivo imaging from organelles to organs, *Science* 335 (2012) 1458–1462.
- [3] S. Sato, M. Obara, Progress in light-ultrasound/pressure wave combined medical technology, *Jpn. J. Optics* 38 (2009) 288–297.
- [4] D. Wu, L. Huang, M. S. Jiang, H. B. Jiang, Contrast Agents for photoacoustic and thermoacoustic imaging: a review, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 23616–23639.
- [5] J. C. Zhang, Z. Y. Qiao, P. P. Yang, J. Pan, L. Wang, H. Wang, Recent advances in near-infrared absorption nanomaterials as photoacoustic contrast agents for biomedical imaging, *Chin. J. Chem.* 33 (2015) 35–52.
- [6] W. Lu, Q. Huang, G. Ku, X. Wen, M. Zhou, D. Guzatov, P.

Table 1 Physical properties of gold (Au) and polystyrene (PS) suspensions

		$(\kappa_p/\kappa_m)\Gamma_p$	Γ_m
Au	20°C	0.038	0.108
	4°C	0.035	0
PS	20°C	0.324	0.108
	4°C	0.300	0

5. おわりに

ナノ粒子の造粒技術の発達により，この数年で本稿では取り上げきれないほどの多種多様な造影用ナノ粒子が研究・開発されている。今後の更なる発展へ向け，本稿にて紹介した工学モデルが粒子設計指針の一助となれば幸いである。

本稿では，イメージング技術に焦点を絞り，造影用粒子のいくつかの例や設計指針となる工学モデルを紹介した。今後，臨床応用を視野に入れると，ナノ粒子の毒性（ナノリスク）や生体適合性なども考慮に入れた研究が必要不可欠となろう。また，応用技術としてレーザー照射により多量の熱をナノ粒子から局所的に発生させ，腫瘍患部を焼き切る温熱療法（Thermal therapy）[17]などへの展開も可能であり，今後の発展が期待される研究分野である。

[謝辞]

工学モデルの導出・検証に際して，多大なご指導・ご鞭撻を賜りました福岡大学・新戸浩幸教授，京都大学・大嶋正裕教授に心より感謝申し上げます。また，モデル化に関する一連の研究は，地域産学官連携科学技術振興事業費補助金（高次生体イメージング先端テクノハブ）の一環として実施された。

- Brecht, R. Su, A. Oraevsky, L. V. Wang, C. Li, Photoacoustic imaging of living mouse brain vasculature using hollow gold nanospheres, *Biomaterials* 31 (2010) 2617–2626.
- [7] P. P. Joshi, S. J. Yoon, W. G. Hardin, S. Emelianov, K. V. Sokolov, Conjugation of antibodies to gold nanorods through Fc portion: synthesis and molecular specific imaging, *Bioconjug. Chem.* 24 (2013) 878–888.
- [8] C. Kim, E. C. Cho, J. Chen, K. H. Song, L. Au, C. Favazza, Q. Zhang, C. M. Cobley, F. Gao, Y. Xia, L. V. Wang, In vivo molecular photoacoustic tomography of melanomas targeted by bioconjugated gold nanocages, *ACS Nano* 4 (2010) 4559–4564.
- [9] A. De La Zerda, C. Zavaleta, S. Keren, S. Vaithilingam, S. Bodapati, Z. Liu, J. Levi, B. R. Smith, T. J. Ma, O. Oralkan, Z. Cheng, X. Y. Chen, H. J. Dai, B. T. Khuri-Yakub, S. S. Gambhir, Carbon nanotubes as photoacoustic molecular imaging agents in living mice, *Nat. Nanotechnol.* 3 (2008) 557–562.
- [10] K. Homan, J. Shah, S. Gomez, H. Gensler, A. Karpouk, L. Brannon-Peppas, S. Emelianov, Silver nanosystems for photoacoustic imaging and image-guided therapy, *J. Biomed. Opt.* 15 (2010) 021316.
- [11] K. Li, B. Liu, Polymer-encapsulated organic nanoparticles for fluorescence and photoacoustic imaging, *Chem. Soc. Rev.* 43 (2014) 6570–6597.
- [12] M. A. Hahn, A. K. Singh, P. Sharma, S. C. Brown, B. M. Moudgil, Nanoparticles as contrast agents for in-vivo bioimaging: current status and future perspectives, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 3–27.
- [13] J. Yu, D. Javier, M. A. Yaseen, N. Nitin, R. Richards-Kortum, B. Anvari, M. S. Wong, Self-assembly synthesis, tumor cell targeting, and photothermal capabilities of antibody-coated indocyanine green nanocapsules, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 1929–1938.
- [14] H. Shinto, T. Fukasawa, H. Aoki, S. Ito, M. Ohshima, Acoustic pressure pulses from laser-irradiated suspensions containing gold nanospheres in water: Experimental and theoretical study, *Colloids. Surf. A* 430 (2013) 51–57.
- [15] T. Fukasawa, H. Shinto, H. Aoki, S. Ito, M. Ohshima, Size-dependent effect of gold nanospheres on the acoustic pressure pulses from laser-irradiated suspensions, *Adv. Powder Technol.* 25 (2014) 733–738.
- [16] T. Fukasawa, S. Noguchi, H. Shinto, H. Aoki, S. Ito, M. Ohshima, Effects of physicochemical properties of particles and medium on acoustic pressure pulses from laser-irradiated suspensions, *Colloids. Surf. A* 487 (2015) 42–48.
- [17] X. H. Huang, P. K. Jain, I. H. El-Sayed, M. A. El-Sayed, Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles, *Lasers Med. Sci.* 23 (2008) 217–228.

〈著者紹介〉

深澤 智典

2010年3月 筑波大学大学院 生命環境科学研究科 持続環境学専攻 博士後期課程修了, 2010年4月 京都大学大学院 工学研究科 化学工学専攻 特定研究員, 2014年11月 京都大学大学院 工学研究科 化学工学専攻 特定助教, 2015年3月 広島大学大学院 工学研究科 化学工学専攻 助教, 現在に至る。博士(環境学) 専門: 粉体工学, コロイド界面化学, 界面動電現象