

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03036

研究課題名(和文)皮膚再建評価のための2光子光音響法による深部微小血管可視化

研究課題名(英文) Visualization of small blood vessels in deep tissues using two-photon photoacoustic microscopy

研究代表者

山岡 禎久 (Yamaoka, Yoshihisa)

佐賀大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80405274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚再生医療において、植皮や皮弁後、組織が生着するかは微小循環が保たれているかどうか依存するため、皮膚全層(深さ数mm)において直径100マイクロメートル以下の血管走行や血行を評価する方法が切望されている。申請者が継続的に開発を行ってきた2光子光音響イメージングは生体深部を高空間分解に観察する方法として非常に有効である。本研究では、液体レンズを用いた2光子光音響イメージングの高速化を行い、従来法に比べて10倍以上の高速化に成功した。また、生体深部観察のために、透過型補償光学素子による装置を開発し、深部での空間分解能の向上を示した。

研究成果の概要(英文)：Visualization of small vessels, which diameters are less than 100 micrometers, in whole skin tissues, which thickness is several millimeters, is important to evaluate skin engraftment. Recently, we have developed two-photon photoacoustic microscopy (TP-PAM) to visualize deep structures in living tissues with high spatial resolution. In this study, we have introduced focus-tunable liquid lens in TP-PAM. As a result, we have demonstrated imaging speed 10 times faster than the conventional TP-PAM with stepping motor stages. In addition, we have developed photoacoustic microscopy with transmissive adaptive optics (AO). We showed that AO improves the spatial resolution and image contrast in deep layers for test targets, tissue slices and micro vasculatures in mouse ear.

研究分野：生体光イメージング

キーワード：光音響イメージング 非線形光学 2光子吸収 補償光学 液体レンズ

### 1. 研究開始当初の背景

マイクロサージェリーによる微小血管吻合技術の発展もあり、皮弁や植皮による組織生着率は向上しているが、血流障害により生着が困難な症例もあり、客観的に微小血管走行を評価する技術が切望されている。インドシアニングリーン (ICG) を用いた蛍光イメージングにより血管走行、血流を評価する方法も存在するが、皮膚全層 (深さ数 mm) を高空間分解で観察することは困難である。このように、生体深部での微小血管走行を正確に評価できる技術の確立が切望されている。

現在、生体深部を高コントラストに観察可能な方法として光音響イメージングに注目が集まっている。しかしながら、高空間分解能を深部で得ることは困難である。その問題を解決するために、我々は2光子吸収と光音響イメージングを組み合わせた2光子光音響イメージングを開発してきた。2光子吸収は焦点近傍の微小空間のみで起こるため高空間分解であり、発生する光音響波の低周波成分 (生体内長距離伝搬可能) を検出すれば高空間分解能を保ちながら深達距離を向上したイメージングが可能である。2光子光音響イメージングでは2光子吸収による信号のみを検出することが課題であったが、我々は光音響波周波数フィルタリング (1光子と2光子吸収により発生する光音響波の周波数の違いを利用) 2パルス光音響画像差分法 (1光子と2光子光音響波のパルス幅依存性の違いを利用) により克服してきた。

2光子光音響像は、光学的な分解能を有し、高コントラストな画像化が可能である。ヘモグロビンの2光子吸収断面積は非常に大きいため (~150 GM@820 nm)、血管走行を正確に捉えられる。直径が50 μm以下の血管も測定可能である。しかしながら、皮膚微小血管走行評価のためには、いくつかの課題が残されている。

### 2. 研究の目的

2光子光音響イメージングによる皮膚組織の微小循環評価のために、重要な解決しなければいけない課題がいくつかある。例えば、医療現場において光音響イメージング装置を使用するためには、測定時間をできるだけ短縮する必要がある。また、2光子吸収を起こさせるためには生体深部において、2光子吸収が起こるように集光スポット径をできるだけ小さくする必要がある。この2つの課題に対して、(1) 2光子光音響顕微鏡の高速化のために焦点可変液体レンズを用いた装置を構築することと、(2) 集光スポット径を小さくするために透過型液晶素子を用いた装置を構築することを主な目的として本研究を行った。

### 3. 研究の方法

(1) 最初に、焦点可変液体レンズを用いた2光子光音響顕微鏡を構築した。サブナノ秒パルスレーザーからの光パルスをファイバーに導光し、ファイバー出力部を光音響ヘッド部に結合させる。図1に示されるように、ヘッド部は液体レンズ、凹レンズ、対物レンズ、音響トランスデューサで構成される。液体レンズの焦点距離を変化させることによって深さ方向に焦点位置を走査し、ステッピングモーターステージによって横方向に走査する。結果として、3次元像を得ることができる。

液体レンズの応答速度は2-4 msであり、高速に焦点位置を電氣的に走査することができる。また、液体レンズは低コストであり、光学設計を適切に行うことにより、任意の焦点位置の走査範囲を設定することができる。

構築した液体レンズを用いた2光子光音響イメージング装置を用いて、ステッピングモーターのみを用いた既存の2光子光音響顕微鏡との比較を行った。

(2) 2光子光音響信号を効率的に発生させるためには、焦点位置での集光径の大きさをできるだけ小さくし、光子密度を増加させる必要がある。ここでは、透過型の補償光学素子を用いて、生体深部での集光径を小さくするために、空間的に位相が制御された光音響イメージング装置を構築した (図2)。結果として得られる画像から、空間分解能やコントラストを収差補正していない場合と補正した場合で比較した。

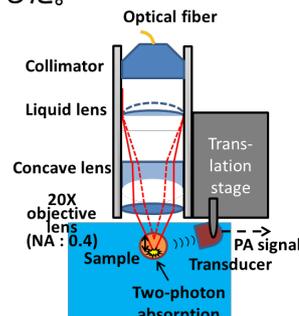


図1 焦点可変液体レンズを用いた2光子光音響顕微鏡ヘッド部の光学系。

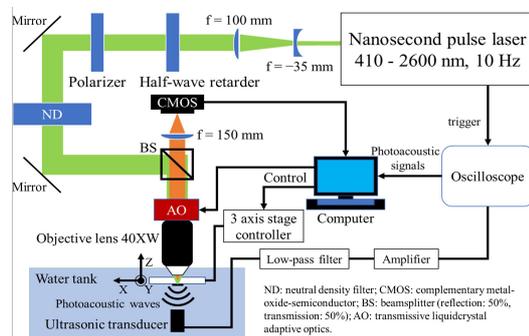


図2 透過型補償光学素子を用いた光音響顕微鏡。

#### 4. 研究成果

(1) 図1に示される2光子光音響顕微鏡ヘッド部を用いて、シリコン中空円柱に2光子吸収色素溶液を満たした試料の断面構造を測定した(図3)。比較として、液体レンズの代わりにステッピングモーターステージを用いて深さ方向に走査した場合についても計測した。この図からわかるように、どちらの場合も同等の横分解能、深さ分解能を有していることがわかる。しかしながら、それぞれの測定時間を比較すると液体レンズを用いたほうが約10倍測定時間が短い。このように、2光子光音響イメージングで問題となるイメージング速度を、液体レンズを用いることにより向上させることが可能であることが示された。

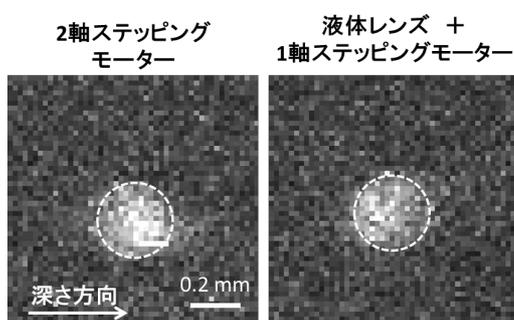


図3 ステッピングモーターステージのみを用いた従来法(左)と焦点可変液体レンズを用いた2光子光音響顕微鏡(右)により得られた光音響像。

(2) 図2に示される透過型補償光学素子を用いた光音響顕微鏡を用いて、テストターゲットによる空間分解能、コントラストの評価を行った。テストターゲットは1.2~1.5 mmのガラス板の下にプリントされており、ガラス面から観察すると波面収差が起こる。図4(左)に補償光学素子を使わない場合(上段)と使った場合(中段)のテストターゲット(グループ7エレメント6: 228 lp/mm)の測定結果を示す。下段には画像の横方向の光音響信号プロファイルを示す。このグラフから、補正ありのほうが、信号強度が高くなり、コントラストが約3倍よくなっていることがわかった(コントラスト比: 0.18(補正なし)→0.52(補正あり))。また、空間分解能をラインのエッジ部分の傾きから計算すると、1.7 μmから1.0 μmに向上していることが分かった。

図4(右)に補正なしの場合と補正ありの場合の組織切片(肺)の測定結果を図4(右)に示す。補償光学素子を用いて収差を補正した方が、より鮮明な光音響像が得られていることがわかる。この結果より、光音響顕微鏡においても波面収差補正が空間分解能の向上に有効であり、また、SNRの改善も可能であることを示唆している。

マウス耳の血管走行を可視化した結果を図5に示す。この結果からわかるように、波面補正により空間分解能が向上していることがわかる。このように、実際の生体においても、透過型補償光学素子の有効性が示された。

これらの結果は、透過型補償光学素子により深部での集光径が小さくなったことによるものである。2光子光音響顕微鏡においても透過型補償光学素子の使用は有効であることを意味している。

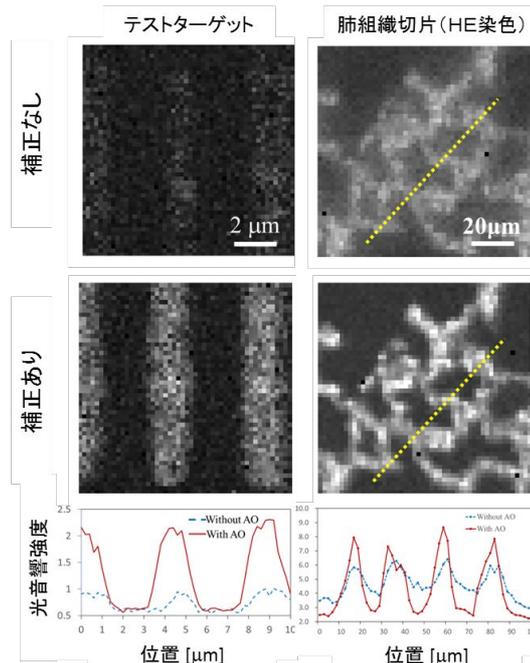


図4 補償光学素子の補正なし(上段)と補正あり(中段)の場合のテストターゲット(左)と肺組織切片(右)の光音響像。下段は光音響プロファイル(テストターゲット: 横方向、肺組織切片: 黄色点線方向)。

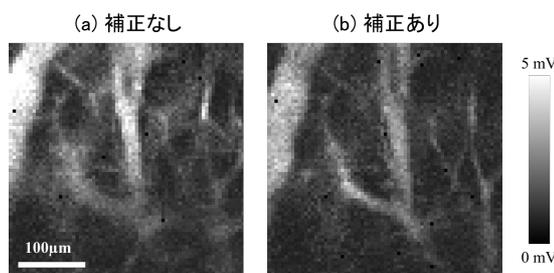


図5 (a) 補償光学素子を使用しない場合と(b) 使用した場合のマウス耳の血管走行像の比較。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

1. Yusuke Noutsuka, Makoto Kurihara, Nubuyuki Hashimoto, Yoshinori

- Harada, Eiji Takahashi, Yoshihisa Yamaoka, “Photoacoustic microscopy with transmissive adaptive optics using liquid crystal”, Proc. SPIE, 10685, 106853N. 査読有.  
DOI: 10.1117/12.2306740
2. Yoshihisa Yamaoka, Yuka Kimura, Yoshinori Harada, Tetsuro Takamatsu, Eiji Takahashi, “Fast focus-scanning head in two-photon photoacoustic microscopy with electrically-controlled liquid lens”, Proc. SPIE 10494, 104942J, 2018. 査読有.  
DOI: 10.1117/12.2287391
  3. Takeo Minamikawa, Takashi Masuoka, Ryo Oe, Yoshiaki Nakajima, Yoshihisa Yamaoka, Kaoru Minoshima, Takeshi Yasui, “Multi-dynamic range compressional wave detection using optical-frequency-comb”, Proc. SPIE 10494, 1049432, 2018. 査読有.  
DOI: 10.1117/12.2288215
  4. Takeo Minamikawa, Takashi Ogura, Takashi Masuoka, Eiji Hase, Yoshiaki Nakajima, Yoshihisa Yamaoka, Kaoru Minoshima, Takeshi Yasui, “Optical-frequency-comb based ultrasound sensor”, Proc. SPIE, 10064, 100645C, 2017. 査読有.  
DOI: 10.1117/12.2250792
- [学会発表](計 31 件)
1. Yoshihisa Yamaoka, “Photoacoustic microscopy combined with nonlinear optics”, Langevin Institute Seminar (招待講演), 2018.
  2. Yusuke Notsuka, Makoto Kurihara, Nubuyuki Hashimoto, Yoshinori Harada, Eiji Takahashi, Yoshihisa Yamaoka, “Photoacoustic microscopy with transmissive adaptive optics using liquid crystal”, Photonics Europe 2018, 2018.
  3. Yoshihisa Yamaoka, Yuka Kimura, Yoshinori Harada, Tetsuro Takamatsu, Eiji Takahashi, “Fast focus-scanning head in two-photon photoacoustic microscopy with electrically-controlled liquid lens”, Photonics West 2018, 2018.
  4. 山岡禎久, “生体光音響顕微鏡 —高空間分解能化、高深達距離化への試み—”, レーザー学会学術講演会 第 38 回年次大会 (招待講演), 2018.
  5. 能塚雄介, 栗原誠, 橋本信幸, 原田義規, 高橋英嗣, 山岡禎久, “補償光学素子を用いた光音響顕微鏡による組織標本観察”, レーザー学会学術講演会第 38 回年次大会, 2018.
  6. 山岡禎久, “光音響顕微鏡における非線形光学”, 月刊オプトロニクスセミナー「医学生物応用のための光音響イメージング技術」(招待講演), 2017.
  7. 山本壮里, 高橋英嗣, 山岡禎久, “波形の選択的検出による光音響イメージングの高感度化”, 第 78 回応用物理学会 秋季学術講演会, 2017.
  8. 能塚雄介, 山本壮里, 栗原誠, 橋本信幸, 高橋英嗣, 山岡禎久, “補償光学素子を用いた光音響顕微鏡の高空間分解能化”, 第 78 回応用物理学会 秋季学術講演会, 2017.
  9. 遠藤大輔, 山本壮里, 多々見純一, 高橋英嗣, 山岡禎久, “光音響イメージングを用いた窒化ケイ素の表面欠陥評価”, 第 78 回応用物理学会 秋季学術講演会, 2017.
  10. 増岡孝, 小倉隆志, 南川丈夫, 中嶋善晶, 山岡禎久, 美濃島薫, 安井武史, “ファイバー型光コム共振器を用いたマルチダイナミックレンジひずみセンシング”, 第 78 回応用物理学会 秋季学術講演会, 2017.
  11. Yoshihisa Yamaoka, Akisato Yamamoto, Yusuke Notsuka, Daisuke Endo, Eiji Takahashi, “Generation of photoacoustic signals using femtosecond optical pulses for photoacoustic imaging”, ICO-24 (the 24th General Congress of International Commission for Optics), 2017.
  12. 山岡禎久, “深部観察のための光音響顕微鏡 - 光と超音波の融合 -”, 脳科学セミナー・ミニシンポジウム(招待講演), 2017.
  13. 山岡禎久, “生体深部観察のための光音響顕微鏡と非線形光学の融合”, 第 11 回 NIBB バイオイメージングフォーラム (招待講演), 2017.
  14. 山本 壮里, 高橋 英嗣, 山岡 禎久, “光音響イメージングにおける相互関法を用いた信号の選択的検出” レーザー学会学術講演会第 37 回年次大会, 2017.
  15. 増岡孝, 小倉隆志, 南川丈夫, 中嶋善晶, 山岡禎久, 美濃島薫, 安井武史, “光音響波検出のための RF 変換ファイバー光コムの開発”, レーザー学会学術講演会第 37 回年次大会, 2017.
  16. 遠藤大輔, 吉田克己, 多々見 純一, 高橋英嗣, 山岡禎久, “セラミックス内部欠陥評価を目指した光音響イメージング技術の開発”, レーザー学会学術講演会第 37 回年次大会, 2017.
  17. 南川丈夫, 増岡孝, 小倉隆志, 中嶋善晶, 山岡禎久, 美濃島薫, 安井武史, “光コムセンシングキャビティによる超音波計測”, Optics and Photonics Japan 2016, 2016.
  18. 南川丈夫, 小倉隆志, 増岡孝, 中嶋善晶,

- 山岡禎久, 美濃島薫, 安井武史, “ファイバー光コム共振器によるひずみセンシング”, 2016 年度精密工学会秋季大会, 2016.
19. 南川丈夫, 小倉隆志, 中嶋善晶, 山岡禎久, 美濃島薫, 安井武史, “ファイバー光コム共振器型ひずみセンサーの開発”, 第 57 回光波センシング技術研究会, 2016.
  20. 山岡禎久, “医療応用を目指した生体深部光音響イメージング技術”, 第 141 回微小光学研究会「メディカル・バイオフォトンクスに革新をもたらす微小光学」(招待講演), 2016.
  21. 山岡禎久, 宇野友貴, 山本壮里, 原田義規, 高松哲郎, 高橋英嗣, “2 光子光音響顕微鏡高速化のための光学系最適化”, 第 55 回日本生体医工学会大会, 2016.
  22. 山岡禎久, 山本壮里, 高橋英嗣, “光音響法を用いた超音波トランスデューサ指向性評価の検討”, 第 89 回日本超音波医学会学術集会 シンポジウム「光と超音波融合によるイメージングモダリティの新展開」(招待講演), 2016.
  23. Yoshihisa Yamaoka, “Improvement of imaging speed and contrast in two-photon photoacoustic microscopy (TP-PAM)”, Biomedical Imaging and Sensing Conference 2016 (BISC'16) (国際学会), 2016.
  24. 山岡禎久, 宇野友貴, 山本壮里, 高橋英嗣, 原田義規, 高松哲郎, “断面構造可視化へ向けた 2 光子光音響装置高速化”, 日本超音波医学会第 4 回光超音波画像研究会, 2016.
  25. 山本壮里, 宇野友貴, 高橋英嗣, 山岡禎久, “光音響顕微鏡高感度化のための円錐台リング型トランスデューサの開発”, 第 63 回応用物理学会春季学術講演会, 2016.
  26. 山岡禎久, 宇野友貴, 山本壮里, 原田義規, 高松哲郎, 高橋英嗣, “2 光子光音響顕微鏡高速化のための光学系最適化”, 第 55 回日本生体医工学会大会, 2016.
  27. 山岡禎久, “非線形光学を融合した光音響イメージング”, The 1<sup>st</sup> ImPACT Symposium on Photoacoustic Imaging and Bio-Medical Imaging for Vascular Health Science, 2016.
  28. 小倉隆志, 中嶋善晶, 山岡禎久, 美濃島薫, 安井武史, “光音響イメージングのためのファイバー光コム型音響波センサーに関する基礎研究”, 2015.
  29. 山岡禎久, 原田義規, 田中秀央, 高松哲郎, 高橋英嗣, “液体レンズによる 2 光子光音響顕微鏡の高速化”, 第 56 回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 2015.
  30. 山岡禎久, 原田義規, 坂倉政明, 南川丈夫, 西埜繁, 前原正司, 浜野修次郎, 高松哲郎, “時間ゲート法による 2 光子光音

響像の高コントラスト化”, 第 54 回日本生体医工学会大会, 2015.

31. Yoshihisa Yamaoka, Yoshinori Harada, Takeo Minamikawa, Shigeru Nishino, Seiji Maehara, Shujiro Hamano, Tetsuro Takamatsu, “Precise cross-sectional imaging using two-photon photoacoustic microscopy with image subtraction and time-gated detection”, The 5<sup>th</sup> Asian and Pacific-Rim Symposium on Biophotonics (APBP'15) (国際学会), 2015.

〔図書〕(計 4 件)

1. 山岡禎久 (共著), “ライフサイエンス顕微鏡学ハンドブック「第 X 部 多彩な顕微鏡 2 光音響顕微鏡」 pp. 25-259”, 朝倉書店, 2018.
2. 山岡禎久, 高松哲郎, “非線形光学現象を利用した光音響顕微鏡イメージング”, 光アライアンス 28, 11-15, 2017.
3. 山岡禎久, “光音響顕微鏡における非線形光学”, OPTRONICS 429, 76-80, 2017.
4. 山岡禎久, 高松哲郎, “生体精緻観察のための 2 光子光音響イメージング”, 超音波テクノ 27, 82-87, 2015.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山岡 禎久 (YAMAOKA, Yoshihisa)  
佐賀大学・大学院工学系研究科・准教授  
研究者番号: 80405274

### (2) 連携研究者

原田 義規 (HARADA Yoshinori)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号: 10381956