

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K12856

研究課題名(和文)ハイパースペクトル光音響顕微鏡の開発及び皮膚がん広がり診断への応用

研究課題名(英文)Development of hyperspectral photoacoustic microscopy and its application to diagnosis of spread of skin cancer lesions

研究代表者

平沢 壮(Hirasawa, Takeshi)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・医用工学・助教)

研究者番号：60583086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生体表面近傍の光吸収体(ヘモグロビン、メラニン等)の分布を、光学顕微鏡相当の解像度で3次元画像化可能な光音響顕微鏡技術においては、光吸収体を弁別するためには複数の波長の励起光で順次に計測が必要な点が課題である。そこで本研究では、1度の計測で励起波長情報を取得することで、ヘモグロビンやメラニン等の光吸収体の種類をそれぞれ弁別して可視化可能なハイパースペクトル光音響顕微鏡技術を開発した。悪性黒色腫等の一部の皮膚がんにおいてはがん細胞がメラニンを産生することが知られており、病変の広がりを肉眼よりも正確に把握できると、再手術等のリスクの低減につながるため、本技術の適用可能性を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚がん病変は肉眼的境界を越えた不規則な病変の広がりを示し、手術中に病変の広がりを正確に把握することが困難であるため、従来は腫瘍の肉眼的境界の周囲の正常に見える部分を含めて切除しているが、一定割合の症例で再手術の適用例が生じており、当該分野におけるニーズは大きい。学術的な観点では、本研究で開発したハイパースペクトル光音響顕微鏡技術は、生体内の光吸収体の3次元分光画像を体動の影響なく取得可能な新規のイメージング技術であり、ヘモグロビンやメラニンに加えて、様々な造影剤や色素タンパク等の可視化も可能であり、臨床医学のみならず基礎医学においても幅広い応用の可能性を有している。

研究成果の概要(英文)：Optical resolution photoacoustic microscopy (OR-PAM) provides the three-dimensional distribution of near-surface optical absorbers (such as hemoglobin and melanin) in living tissue at the spatial resolution of optical microscopy. In OR-PAM, multiple imaging using different excitation wavelengths was required to image multiple optical absorbers individually. In this research, we have developed a hyperspectral photoacoustic microscope that can acquire spectral information of optical absorbers in a single imaging and can image multiple light absorbers individually. In some types of skin cancer, including melanoma, the cancer cells themselves are known to produce melanin. Accurate measurement of the spread of skin cancer lesions during surgery may reduce the risk of reoperation. For this purpose, we discussed application of hyperspectral photoacoustic microscopy to diagnosis of spread of skin cancer lesions.

研究分野：医用工学

キーワード：光音響 光超音波 顕微鏡 分光 ハイパースペクトル メラニン 皮膚がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫（メラノーマ）は、メラニンを産生する色素細胞ががん化した腫瘍と考えられている。メラノーマ細胞は、多くの場合、メラニン色素を多量に産生するため黒色を呈する。また、基底細胞がんも皮膚がんの一種で、表皮の最下層である基底層や毛包などを構成する細胞から発生し、黄色人種においてはほとんどがメラノサイトやメラノファージ等のメラニン含有細胞を含むため黒褐色を呈する。両疾患の治療法は原則的には手術療法である。ダーモスコピーが診断において有用であるが、細胞単位での検出ができない点と、観察深度が真皮浅層までと浅い点より、切除範囲の決定には不十分である。このため、手術においては腫瘍の肉眼的境界の周囲の正常に見える部分（切除マージン）を含めて切除するが、腫瘍は肉眼的境界を越えた不規則な病変の広がりを示すため、一定の割合の症例で、切除断端の術後病理診断において腫瘍残存と評価され、再手術或いは放射線療法の適用となる。また、手術による皮膚欠損が大きい場合には植皮が行われるが、特に腫瘍残存のリスクが高い症例には、術後病理診断後に植皮を行う二次的手術が勧められており、複数回の手術を要する。凍結切片や専用の固定液による術中迅速病理検査で切除範囲を決定する方法が報告されているが、その診断精度は十分でなく、また追加切除ごとに複数回の病理診断が必要となり、手術時間の延長や、病理医のマンパワーの問題があり普及していない。以上の背景より、術前或いは術中に腫瘍の広がりを肉眼による観察以上の精度で把握可能な計測法が実用化されると、腫瘍残存もしくは不必要に過大な切除を避けることができる。

光音響顕微鏡は、観測対象にナノ秒パルス光を照射し、光を吸収した物質が熱弾性過程を経て発生する超音波（光音響信号）を観測する原理により、観測対象の表面から 1 mm 程度までの深度において光を吸収する物質（ヘモグロビン、メラニンなど）の分布を光学顕微鏡相当の空間分解能で可視化する（図 1）。共焦点顕微鏡や二光子顕微鏡が競合技術となるが、光音響顕微鏡は蛍光ではなく光吸収を観察する点が異なり、蛍光を発生しないヘモグロビンやメラニンなどを造影剤なしで観察できる。光音響信号の強度は光吸収体の吸光度に比例するため、複数の波長の光で計測すれば、ヘモグロビンとメラニンの吸光度の波長依存性（光吸収スペクトル）の違いを利用して弁別できるなどの特徴を有している。一方で、複数波長の計測には波長可変の光源が必要であるが、光音響顕微鏡での実時間イメージングに必要とされる仕様（パルスエネルギー 100 nJ/pulse 程度、繰り返し周波数 100 kHz 以上）を満たす波長可変光源の選択肢が多くない点に加え、複数波長の計測を行うと計測時間が倍増する点と、波長間での計測タイミングの違いに由来して位置ずれ（モーションアーティファクト）が生じる点が問題であり、本研究課題に適用する前に対応すべき技術課題がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、光音響顕微鏡技術の悪性黒色腫などの皮膚がん病変の切除範囲決定への応用可能性について検討することである。本用途への応用を検討するにあたり、光音響顕微鏡技術における技術課題である計測時間の問題とモーションアーティファクトの問題を解決する必要があるため、1 度の計測で観測対象内の光吸収体の分光スペクトル情報を得られるハイパースペクトル光音響顕微鏡技術を開発する。さらに、光音響顕微鏡を皮膚がん動物モデルに適用し、メラニン色素を産生する皮膚がん細胞の分布をヘモグロビンの分布と弁別しながら可視化できることを確認することで、皮膚がん病変の切除範囲決定への適用可能性について検討する。

3. 研究の方法

(1) ハイパースペクトル光音響顕微鏡の開発

図 2 に本研究事業において新規に開発したハイパースペクトル光音響顕微鏡技術の実験系を示す。また、図 3 にハイパースペクトル光音響顕微鏡の計測原理を示す。この手法では、スーパーコンティニューム光源で発生した広帯域のパルス光を 2 つに分岐し、その片方のみを 1 km のシングルモードファイバ内を通過させることで光ファイバの波長分散特性により波長依存の時間遅延を加えた後に合波し、励起光として観測対象に照射し、励起光を吸収した観測対象内の光吸収体が発生する光音響信号を超音波センサにより観測した。このとき、超音波センサでは

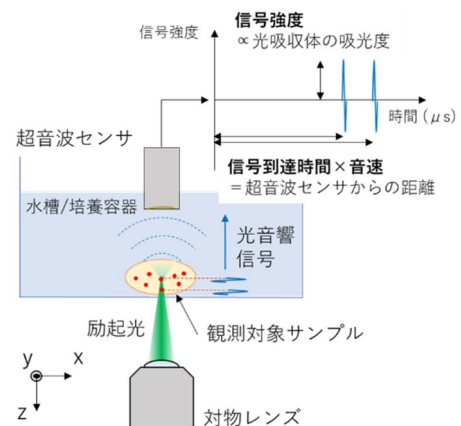


図 1 光音響顕微鏡の原理

観測対象に対物レンズで集光した励起パルス光を照射する

集光範囲内にある光吸収体が光を吸収して超音波（光音響信号）を発生する

光音響信号を時分解計測し、観測対象内の光吸収体の光軸に沿った深さ分布情報を得る

光軸を走査することで断面画像・3次元画像を得る

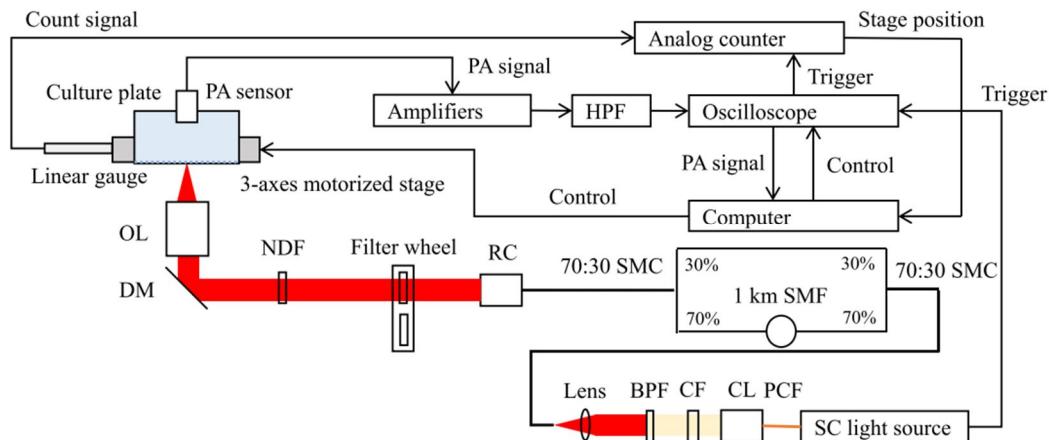


図2 ハイパースペクトル光音響顕微鏡の実験系 [1]

SC: スーパーコンティニューム, PCF: フォトニック結晶ファイバ, CL: コリメータ, CF: コールドフィルタ, BPF: バンドパスフィルタ, SMC: シングルモードカプラ, SMF: シングルモードファイバ, RC: 反射型コリメータ, NDF: ND フィルタ, DM: ダイクロイックミラー, OL: 対物レンズ, HPF: ハイパスフィルタ

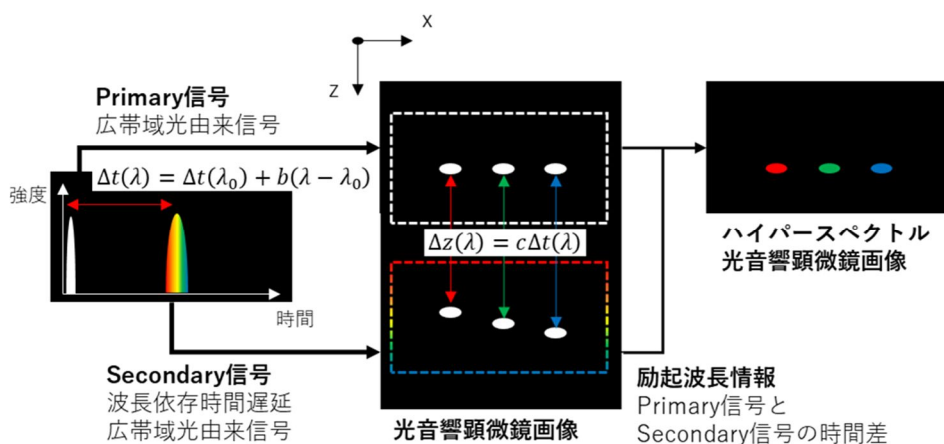


図3 ハイパースペクトル光音響顕微鏡の計測原理

時間遅延を加えていない光パルスに由来する primary 信号と、波長依存の時間遅延を加えた光パルスに由来する secondary 信号を観測できる。これらの信号間の時間差は光吸収体が吸収した光の波長（励起波長）を反映するため、これらの信号の時間差を相互相関により求めることで励起波長を求められる。さらに、primary 信号の強度は光吸収体による光吸収量を反映するため、1度の信号計測で光吸収量と励起波長の両方の情報を得られる。

初めに、観測対象に照射する励起光のパルス波形を観測し、所望の波長依存時間遅延を加えられていることを検証した。ここでは、600~900 nmの帯域幅を有する励起パルス光を、中心波長 650, 700, 750, 800, 850 nm, 帯域幅 ±25 nm のバンドパスフィルタで抽出したうえで、バイプラナ光電管で計測することで波長依存性に関する情報を得た。次に、ハイパースペクトル光音響顕微鏡により励起波長の異なる光吸収体を弁別できることを検証するために、がん細胞を励起波長の異なる 4 種類の細胞染色試薬 (CellBrite Red, CellBrite NIR690, CellBrite NIR750, CellBrite NIR790) でそれぞれ染色したものを混合し、細胞培養プレートに平面培養したサンプルをハイパースペクトル光音響顕微鏡画像で観察し、蛍光顕微鏡画像と比較した。

(2) 光音響顕微鏡による同所性移植メラノーマ腫瘍の観察

以下に示す動物実験は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て実施した（承認番号）。ヌードマウス (BALB/cSlc-nu/nu) の耳介の皮下にメラノーマ細胞 (B16) を播種し、1 週間飼育して耳介の皮下に腫瘍を作成した。腫瘍及びその周辺の皮膚について光音響顕微鏡で in vivo イメージングを実施した。In vivo イメージングを実施するために(1)に記載の装置を改良し、色収差の生じにくい反射型の集光レンズを用いた[2]、in vivo イメージングに適用可能な光音響顕微鏡装置[3]を構築し、本実験に適用した。観察範囲は 3,200 μm 四方とし、励起波長はヘモグロビンとメラニンの両方を描出する 625 nm と主にメラニンのみを描出する 800 nm とした。得られた画像について同視野を観察した光学顕微鏡画像と比較した。

4. 研究成果

(1) ハイパースペクトル光音響顕微鏡の開発

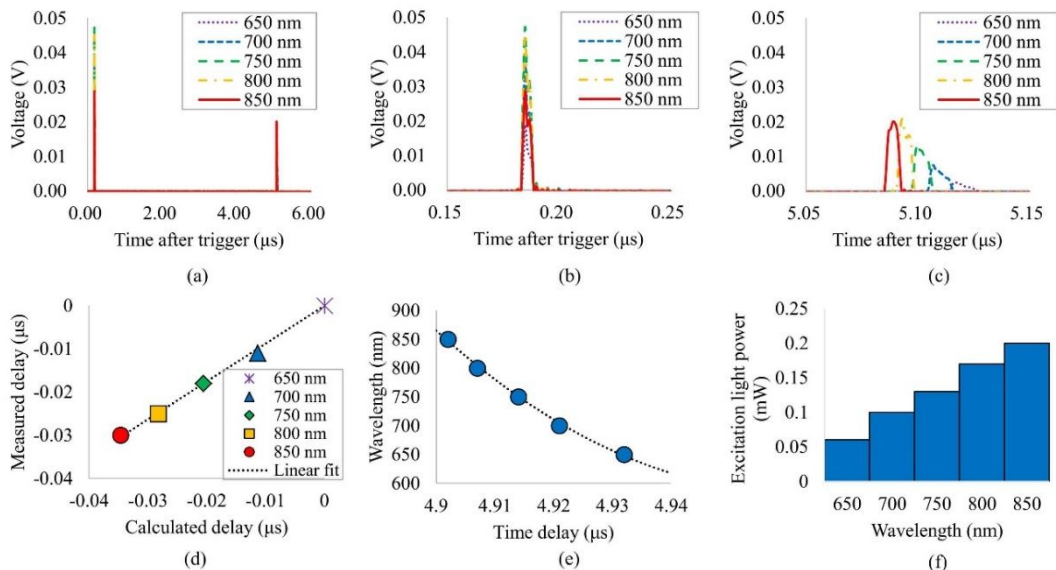


図 4 ハイパースペクトル光音響顕微鏡に用いた励起光の評価 [1]

(a) バイプラナ光電管で計測した励起光の時間波形, (b) 時間遅延なしパルスの拡大, (c) 時間遅延あり波形の拡大, (d) 光ファイバの波長分散特性から計算した遅延時間と遅延時間実測値との比較, (e) 時間遅延と波長との関係, (f) 時間遅延ありパルスのエネルギー

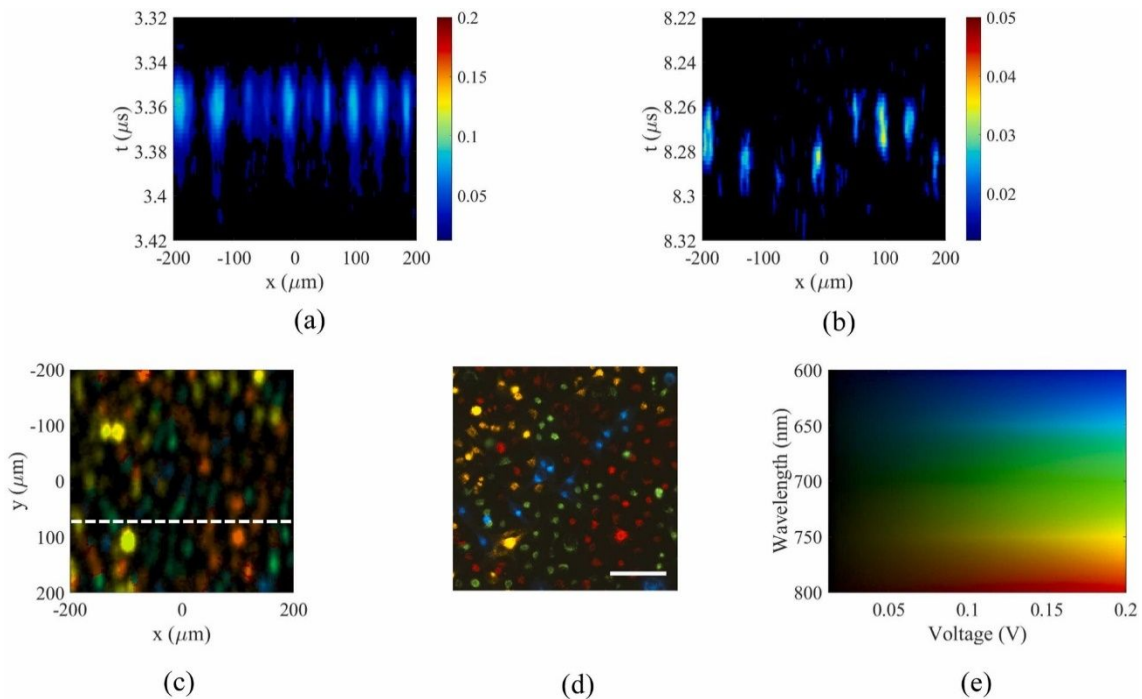


図 5 ハイパースペクトル光音響顕微鏡による多重染色細胞のイメージング [1]

(a) Primary 信号を基に作成した光音響断面画像, (b) Secondary 信号を基に作成した光音響断面画像, (c) ハイパースペクトル光音響顕微鏡画像, 点線は(a), (b)の断面に相当, (d) 対応する領域のマルチカラー蛍光顕微鏡画像, (e) ハイパースペクトル光音響顕微鏡画像のカラーマップ

図 4 にハイパースペクトル光音響顕微鏡に用いた励起光のパルス特性を示す。図 4(a)はバイプラナ光電管で計測した励起光の時間波形であり, 1 km のシングルモードファイバを光が伝搬する時間に相当する約 5 μs の時間間隔で 2 つのパルス光が出力されていることを確認できる。図 4(b)は図 4(a)に示したパルスのうち 1 つめのパルスを拡大したものであり, すべての波長帯で同時に検出されている。これに対し, 図 4(c)に示す 2 つ目のパルスにおいては, 波長ごとに時間ずれが生じていることを確認できる。これはシングルモードファイバのコアの屈折率の波長依存性に由来して伝播時間に波長依存性が生じる波長分散に由来するものである。図 4(d)はシングルモードファイバのメーカーから提供されたシングルモードファイバの波長分散特性から計算した遅延時間と, 実測の遅延時間とを比較したものであり, 両者がよく相関していることが確認できる。図 4(e)は時間遅延と波長との関係であり, この関係を用いて, 2 つの光パルスにより発生する光音響信号の時間間隔から, 光吸収体の励起波長を推定可能である。

図 5 にハイパースペクトル光音響顕微鏡で 4 色の試薬でそれぞれ染色したがん細胞を混合して平面培養したサンプルをイメージングした結果を示す。図 5(a)は光音響顕微鏡で取得した

Primary 信号に基づき作成した光音響顕微断面画像である。がん細胞は細胞培養プレートの底面に付着しているためすべて同じ深さに存在することから、各細胞に由来する信号は同じ時間にて観測されている。図 5(b)は光音響顕微鏡で取得した Secondary 信号に基づき作成した光音響顕微断面画像である。図 5(a)とは異なり図 5(b)では各細胞が発生する信号が検出される時間が異なることが確認できる。これは図 5(b)では、励起光に波長依存の時間遅延が加わっていることに由来し、励起波長の異なる細胞が発生する信号が観測されるタイミングが異なるためである。図 5(a)と図 5(b)の時間差を基に図 4(e)に記載の関係をを利用して励起波長を計算し、Primary 信号に基づき作成した光音響顕微画像の強度情報と合わせて図 5(e)の 2 次元カラーマップで表示したものが図 5(c)である。図 5(c)は複数の断面画像を取得して 3 次元画像を取得し、3 次元画像を表面からみたように投影したものである。図 5(d)に示すマルチカラー蛍光顕微画像と比較すると、図 5(c)は図 5(d)と比較して空間分解能が低いものの、細胞の色分布が一致していることが確認できる。この結果より、ハイパースペクトル光音響原理に基づいて観測対象内の光吸収体の励起波長を弁別できることを実証できた。

(2) 光音響顕微鏡による同所性移植メラノーマ腫瘍の観察

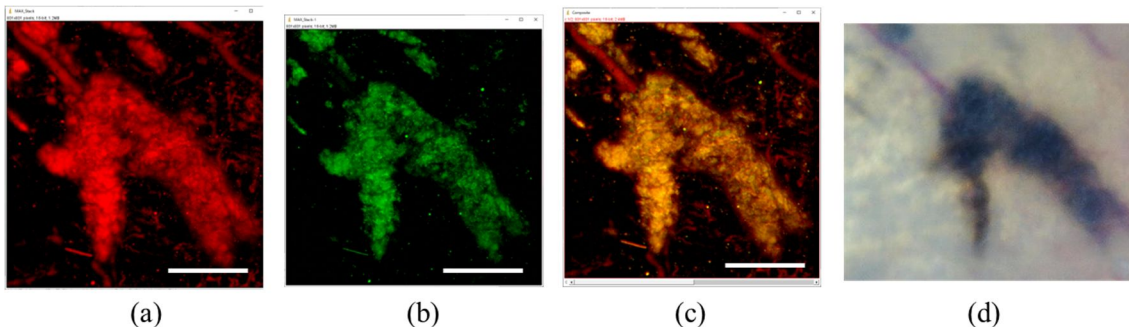


図 6 光音響顕微鏡による同所性メラノーマ腫瘍の観察

(a) 励起波長 625 nm で取得した光音響顕微鏡画像、ヘモグロビン及びメラニンの分布を示す
 (b) 励起波長 800 nm で取得した光音響顕微鏡画像、主にメラニンの分布を示す、(c) マージ画像、赤色がヘモグロビン分布、黄色がメラニン分布に相当する (d) 光学顕微鏡画像

図 6 はマウスの耳に作成したメラノーマ腫瘍を光音響顕微鏡で観察した結果である。図 6(a)と図 6(b)はそれぞれ 625 nm, 800 nm の励起波長で取得した光音響顕微鏡画像である。ヘモグロビンとメラニンの吸収スペクトルは異なるため、各波長における両者の寄与は異なり、625 nm ではヘモグロビンとメラニンの両方が、800 nm では主にメラニンのみが描出される。図 6(c)は両画像をマージしたものであり、両波長で信号が観測された箇所は黄色で表示されており、当該箇所は主にメラニンに由来すると考えられる。一方、625 nm のみで信号が観測された箇所は赤色で表示しており、主にヘモグロビンに由来すると考えられる。図 6(d)は同部位を光学顕微鏡で観察した結果である。図 6(c)と図 6(d)を比較すると、図 6(c)の方が微細なメラニン分布を可視化できていることが確認できる。この理由の一つとして、光音響顕微鏡では表層のみでなく表面から 0.7 mm 以下にある光吸収体も可視化できることが影響していると考えられる。この結果より、光音響顕微鏡により光学顕微鏡よりも高感度にメラノーマ細胞に由来するメラニンの分布を可視化できる可能性が示唆された。

<引用文献>

1. T. Hirasawa, K. Tachi, M. Miyashita, S. Okawa, T. Kushibiki, and M. Ishihara, "Spectroscopic photoacoustic microscopic imaging during single spatial scan using broadband excitation light pulses with wavelength-dependent time delay," *Photoacoustics* **26**, 100364 (2022).
2. K. Tachi, T. Hirasawa, S. Okawa, A. Horiguchi, K. Ito, and M. Ishihara, "Chromatic-aberration-free multispectral optical-resolution photoacoustic microscopy using reflective optics and a supercontinuum light source," *Applied Optics* **60**, 9651-9658 (2021).
3. T. Hirasawa, K. Tachi, M. Miyashita, T. Ishikawa, K. Ito, and M. Ishihara, "Photoacoustic microscopy using supercontinuum light for in vivo microscopic imaging of living tissue dynamics," *Proc SPIE* **12379**, 123790Y (2023).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Hirasawa Takeshi, Tachi Kazuyoshi, Miyashita Manami, Ishikawa Tomohiro, Ito Keiichi, Ishihara Miya | 4. 巻 12379 |
| 2. 論文標題 Photoacoustic microscopy using supercontinuum light for in vivo microscopic imaging of living tissue dynamics | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Proceedings of SPIE | 6. 最初と最後の頁 123790Y |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1117/12.2652280 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Hirasawa Takeshi, Tachi Kazuyoshi, Miyashita Manami, Okawa Shinpei, Kushibiki Toshihiro, Ishihara Miya | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 Spectroscopic photoacoustic microscopic imaging during single spatial scan using broadband excitation light pulses with wavelength-dependent time delay | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Photoacoustics | 6. 最初と最後の頁 100364 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pacs.2022.100364 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Tachi Kazuyoshi, Hirasawa Takeshi, Okawa Shinpei, Horiguchi Akio, Ito Keiichi, Ishihara Miya | 4. 巻 60 |
| 2. 論文標題 Chromatic-aberration-free multispectral optical-resolution photoacoustic microscopy using reflective optics and a supercontinuum light source | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Applied Optics | 6. 最初と最後の頁 9651 ~ 9658 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1364/AO.434817 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 平沢壮, 大川晋平, 辻田和宏, 神谷真子, 浦野泰照, 石原美弥 | 4. 巻 12(2) |
| 2. 論文標題 光音響イメージングにおける信号周波数に基づく分子プローブ識別法の検討 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 JSMI Report | 6. 最初と最後の頁 21-24 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takeshi Hirasawa, Kazuyoshi Tachi, Manami Miyashita, Tomohiro Ishikawa, Keiichi Ito, Miya Ishihara |
| 2. 発表標題 Photoacoustic microscopy using supercontinuum light for in vivo microscopic imaging of living tissue dynamics |
| 3. 学会等名 SPIE Photonics WEST BiOS 2023 (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 平沢 壮、宮下 愛美、田地 一欽、櫛引 俊宏、石原 美弥 |
| 2. 発表標題 分子イメージングのための分光光音響顕微鏡の開発 |
| 3. 学会等名 第16回日本分子イメージング学会総会・学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 平沢 壮、石原 美弥 |
| 2. 発表標題 光音響顕微鏡の構築とその画像取得例 |
| 3. 学会等名 第31回 バイオイメージング学会 学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 平沢 壮、田地 一欽、大川 晋平、石原 美弥 |
| 2. 発表標題 マルチスペクトル光音響法の造影剤イメージングへの適用とその展望 |
| 3. 学会等名 第60回 日本生体医工学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takeshi Hirasawa, Kazuyoshi Tachi, Shinpei Okawa, Miya Ishihara |
| 2. 発表標題 Spectroscopic photoacoustic microscopic imaging during single spatial scan using a supercontinuum light source |
| 3. 学会等名 SPIE Photonics WEST BiOS 2022 (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takeshi Hirasawa, Kazuyoshi Tachi, Shinpei Okawa, Miya Ishihara |
| 2. 発表標題 Design optimization of P(VDF-TrFE) film sensor element to detect deep-seated contrast agents |
| 3. 学会等名 SPIE Photonics WEST BiOS 2020 (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 東 隆一 (Azuma Ryuichi) (00531112) | 防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・病院形成外科・教授 (82406) | |
| 研究分担者 | 大川 晋平 (Shinpei Okawa) (20432049) | 防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・医用工学・助教 (82406) | |
| 研究分担者 | 石原 美弥 (Ishihara Miya) (30505342) | 防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・医用工学・教授 (82406) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|