

表2 血管を構成する物質の近赤外波長域における吸収ピーク波長

波長帯	900-1100 nm	1100-1300 nm	1300-1600 nm	1600-1750 nm	備考	文献			
脂質		1157	1209	1404	1721	ラード	[4]		
	918	1195		1376	1585	1711	コレステロール	[4]	
		1205				1716	リノール酸	[4]	
		1204				1721	脂質	[5]	
		1200		1380	1460	1600	1720	コレステロール	[6]
		1200		1380		1700		コレステロールエステル	[6]
	930	1040	1170	1210				[7]	
コラーゲン		1182		1426	1569	1690	1732		[4]
		1200		1500		1730			[6]
		1190							[7]
エラスチン	1002	1180		1424	1498	1688	1732		[4]
		1190							[7]
水		1180		1450					[7]

D. 考察

【D-1】頸動脈プラークの不安定性評価における光音響技術の有効性の検証

(1) 近赤外分光計測で観測した吸収帯の帰属に関する検討

前章に示す実験結果より、プラーク形成部位と、正常部位とで違いが確認されたのは、980 nm 帯、1200 nm 帯、1400 nm 帯、1650 nm 帯である。これらの波長域に存在する吸収帯について調査を行った。表2に、動脈及びプラークを構成する物質として考えられる、脂質[4-7]、コラーゲン[4, 6, 7]、エラスチン[4, 7]、水[7]の近赤外波長における吸収波長を示す。

プラーク部位の方が2次微分スペクトルのピークが大きい波長域は、1200 nm 帯及び1600 nm 帯である。いずれも脂質及びコレステロールが吸収ピークを有することが確認できる。一方で、正常血管の方が2次微分スペクトルのピークが大きい1400 nm 帯では、水、コラーゲン、エラスチンが吸収ピークを有する。以上より、これらの違いを検知していると推察できるが、各吸収帯において様々な物質に由来する吸収帯が混在していることを表2より確認できる。吸収帯の帰属を確定するためには、標準試料を対象とした計測結果との比較が必要と考える。

(2) 血管プラーク診断における光音響技術の展望

これまでの計測結果において、プラーク形成部位と正常血管との間で大きな差が生じたのは(980, 1170, 1200, 1650 nm)である。これらの波長は脂質及びコレステロールの吸収ピークに相当するため、プラークを構成する脂質及びコレステロール由来の信号を検出できていると推察できる。特に1170, 1200 nm においては高い再現性でピークが検出された。これらの波長のレーザー光を用いて光音響画像化を行うことにより、プラークを構成する脂質或いはコレステロールをマーカとしたプラークの検出が可能と考えられる。

光音響画像化技術を用いることにより、近赤外分光計測よりも高い空間分解能で光の吸収特性が得られる。近赤外分光計測は分解能が低いため、広い範囲に存在する物質を平均化した光吸収特性が得られるが、光音響画像化技術ではより局在化した情報を得られる。

特に深さ分解能に関しては、近赤外分光計測では光の侵達長が波長ごとに異なるため、波長により異なる深さの情報を得ている。また、計測する深さは光ファイバの配置及び光の侵達長で決まるため、深さの選択はできない。一方で、光音響画像化技術では、超音波の伝播時間を利用して深さ分解で光吸収の情報を得られる利点より、検知している脂質成分が血管壁の表層からどの程度の深

さにあるのかを識別できる。さらに、プラーク内の組成の不均一性に関する解析が可能と考えられ、プラークの不安定性について解析するための新たな情報となると考えられる。このことから、光音響画像化技術をプラークの計測に適用することにより、光吸収特性から得られる構成成分に関する情報と、高い空間分解能から得られる不均一性に関する情報が得られる。これらを総合的に用いて解析を行うことにより、プラークの性状の解析に用いることが可能と考えられる。

【D-2】 血行再建術における光音響技術の有効性の検証

防衛医科大学校の倫理委員会に対して、「血行再建術における光音響技術の有効性の検証」として申請し、承認されている。次年度以降、臨床実験機を用いて臨床データの取得を行う計画である。

E. 結論

頸動脈プラークの不安定性評価に関する検討では、CEA 摘出検体を対象に得た近赤外分光計測の結果において、プラーク形成部位と正常血管との間で大きな差が生じたのは(980, 1170, 1200, 1650 nm)であり、特に 1170, 1200 nm においては高い再現性が得られた。これらの波長は脂質及びコレステロールの吸収ピークに相当するため、プラークを構成する脂質及びコレステロールに由来する信号を検出していると考えられる。本法によりプラークを構成する脂質及びコレステロールに関する情報を、近赤外光を用いた計測により取得可能なことを実証した。さらに症例数を重ねることで、不安定プラーク特有の構成成分に関する情報を得られる可能性も期待される。

また、これらの波長のレーザー光を用いて光音響画像化を行うことにより、プラークを構成する脂質をマーカーとしたプラークの検出や、プラークの不均一性に関する検討が可能と考えられる。当研究グループでは、既に当該波長のナノ秒パルス

レーザーを用いた光音響計測のセットアップを確立しているため、次年度以降は近赤外分光計測と並行して光音響計測を行い、光音響計測の有用性について検証を行う。

また、血行再建術における光音響技術の有効性検証に関しては、既に倫理委員会の承認が得られており、臨床研究に用いるプロト機も準備できているため、臨床データの取得を開始できる状態となっている。次年度は臨床データの取得を開始する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 参考文献

1. C. Pasquini, "Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications," *Journal of the Brazilian Chemical Society* **14**, 198-219 (2003).
2. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH, and C. De La Pezuela, "Near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical industry," *ANALYST-LONDON-SOCIETY OF PUBLIC ANALYSTS THEN ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY* **123**, 135-150 (1998).
3. J. Luo, K. Ying, P. He, and J. Bai, "Properties of Savitzky-Golay digital

- differentiators," *Digital Signal Processing* **15**, 122-136 (2005).
4. N. Hirosawa, Y. Sakamoto, H. Katayama, S. Tonooka, and K. Yano, " *In vivo* Investigation of Progressive Alterations in Rat Mammary Gland Tumors by Near-Infrared Spectroscopy," *Analytical biochemistry* **305**, 156-165 (2002).
5. J. Wang, Y. J. Geng, B. Guo, T. Klima, B. N. Lal, J. T. Willerson, and W. Casscells, "Near-infrared spectroscopic characterization of human advanced atherosclerotic plaques," *Journal of the American College of Cardiology* **39**, 1305-1313 (2002).
6. J. D. Caplan, S. Waxman, R. W. Nesto, and J. E. Muller, "Near-infrared spectroscopy for the detection of vulnerable coronary artery plaques," *Journal of the American College of Cardiology* **47**, C92-96 (2006).
7. C.-L. Tsai, J.-C. Chen, and W.-J. Wang, "Near-infrared absorption property of biological soft tissue constituents," *Journal of Medical and Biological Engineering* **21**, 7-14 (2001).

平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金(医療機器開発推進研究事業)
深部機能画像診断のための光音響画像化技術の有用性検証(H23-医療機器-一般-005)
分 担 研 究 報 告 書

腫瘍モデルマウスを用いた光音響画像の有用性検証

研究協力者	堀口 明男	防衛医科大学校	泌尿器科学講座	講師
研究分担者	辻田 和宏	富士フイルム株式会社	R&D 統括本部	
		メディカルシステム開発センター		専門主任研究員
研究協力者	榑引 俊宏	防衛医科大学校	医用工学講座	准教授
研究代表者	石原 美弥	防衛医科大学校	医用工学講座	教授

要旨

光音響画像の有用性を検証するための 1 つの手段として、腫瘍モデルマウスを対象に計測し、可能性を検討した。泌尿器科領域での腫瘍モデルマウスとして、ヒト前立腺癌モデルマウスとヒト腎癌モデルマウスを作成した。これらを対象に光音響画像を取得した。またコントロールのために正常マウスを取得し、比較検討した。腫瘍内に血管が豊富なヒト腎癌モデルマウスは、腫瘍内に光音響信号が認められ、ヒト前立腺癌モデルマウスとは異なる像であり、正常マウスとも異なる光音響画像であった。

A. 研究目的

人口の高齢化、食生活の欧米化に伴い、前立腺癌患者が増加しており、我が国においても深刻な社会問題となりつつある。前立腺特異抗原(PSA)が前立腺癌のスクリーニング法として定着したことにより、臨床症状を伴わない早期癌の割合が高くなっている。早期前立腺癌の増加に伴い、前立腺癌根治手術(根治的前立腺全摘術)の件数も著しい増加傾向にある。

光音響画像化技術を用いて腫瘍辺縁や腫瘍内腔の画像特性を取得し、正常組織を比較対象として、光音響画像と超音波画像を取得することを目標にしている。

そこで、平成 24 年度は、これらの目的を達成するために、ヌードマウスにヒト前立腺癌細胞株とヒト腎癌細胞株を移植した皮下腫瘍モデルマウスを作製し、皮下腫瘍モデルマウスを対象に、光音響画像の取得を行い、可能性を検証した。

B. 研究方法

本実験は防衛医科大学校動物倫理委員会から承

認されている研究課題「マウスの皮下腫瘍に対する光-超音波法による分子イメージング」に準じて実施した。

今回は、プロト機でリニアプローブを使用し、通常の超音波検査に加えて、光音響モードを実施した。波長 756 nm を励起光の波長として選択し、血管構造を主に観察した。

以下、腫瘍モデルマウスの作成について記載した。

- ・ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 の培養
ヒト前立腺癌細胞株である PC-3 は、10 % Fetal Calf Serum (FCS) とペニシリン (100 units/mL) ・ストレプトマイシン硫酸塩 (100 µg/mL) を含む Minimal Essential Medium (MEM) を用いて、37 °C ・5 % CO₂ 条件下で培養を行った。
- ・ヒト前立腺癌腫瘍モデルマウスの作製
PC-3 細胞の浮遊液 100 µL (2×10⁶ cells) を、体重 20-25 g の BALB/c ヌードマウスの左腹側部皮下に投与し、2 cm 程度の大きさになったタイミングでマウスを光音響画像観察に供した(図 1)。

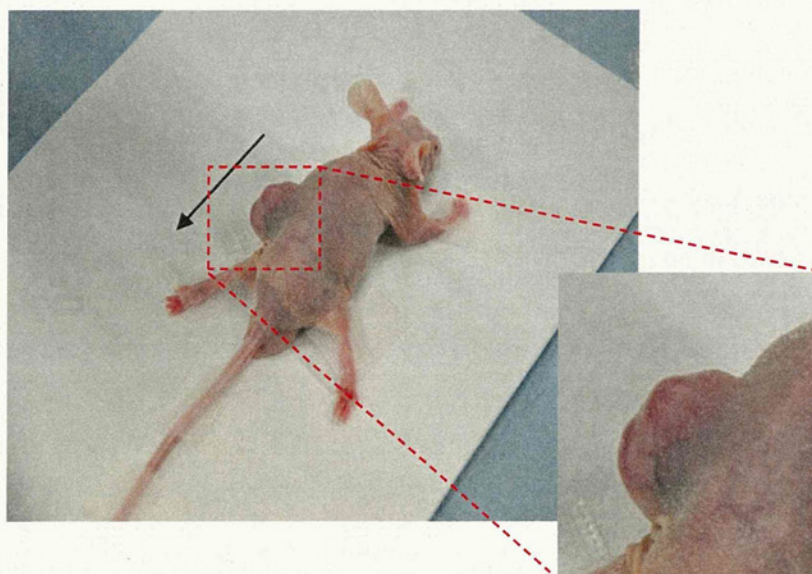


図1 ヒト前立腺癌腫瘍モデルマウス

・ヒト腎癌細胞株 Caki-1 の培養

ヒト腎癌細胞株である Caki-1 は、10 % Fetal Calf Serum (FCS) と ペニシリン (100 units/mL) ・ ストレプトマイシン硫酸塩 (100 μ g/mL) を含む Minimal Essential Medium (MEM) を用いて、37 $^{\circ}$ C・5 % CO₂ 条件下で培養を行った。

・ヒト腎癌細胞株腫瘍モデルマウスの作製

Caki-1 細胞の浮遊液 100 μ L (2 \times 10⁶ cells) を、体重 20-25 g の BALB/c ノードマウスの左腹側部皮下に投与し、4 cm 程度の大きさになったタイミングでマウスを超音響画像観察に供した(図 2)。

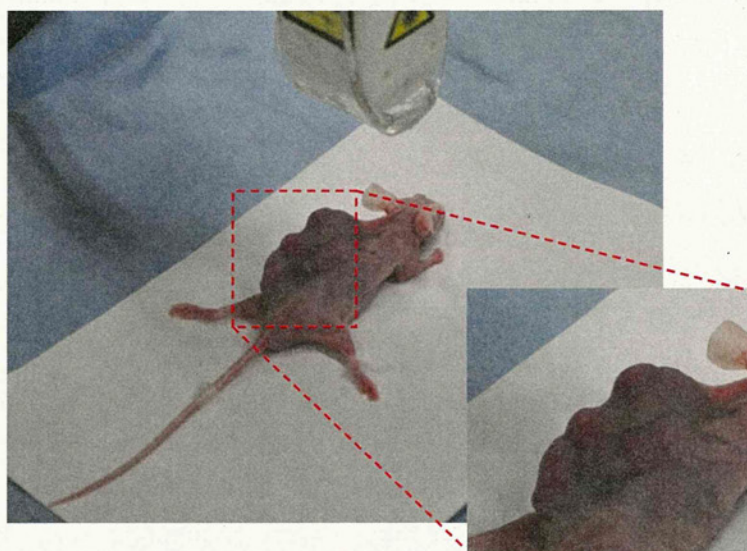


図2 ヒト腎癌細胞株腫瘍モデルマウス

・正常マウス

今回はノードマウスではないので、計測部位の体毛を除毛クリームにより、除去した。

C. 研究結果

マウスを対象にした画像を下記順に示す。

図 3(a)(b)に正常マウスの腹側からの超音響画像を示す。(b)は投影画像である。投影画像はプローブを走査した後に、画像を再構成して得られた。腹側からの血管 3 次元構造が観察できた。図 4(a)(b)に正常マウスの背側からの超音響画像を示す。(b)は投影画像である。投影画像はプローブを走査した後に、

画像を再構成して得られた。背側からの血管 3 次元構造が観察できた。

図 3, 図 4 ではマウス皮膚上を走査して得られた像は血管構造を反映しており、走査法及び、画像再構成が目的通りに出来ていることが確認できる。また、本超音響画像は、ヘモグロビンの局在を示しているため、血管構造以外の臓器からの超音響信号が観察できていることが確認できる。

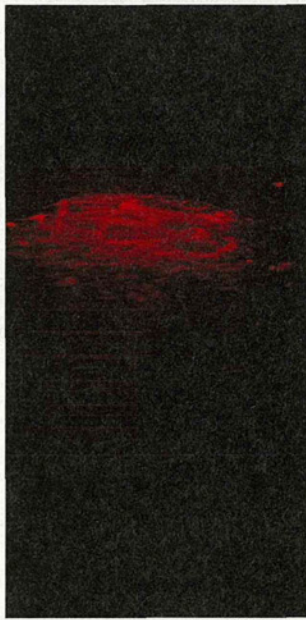


図 3 正常マウスの腹側からの超音響画像 (a) 断層像, (b) 投影像

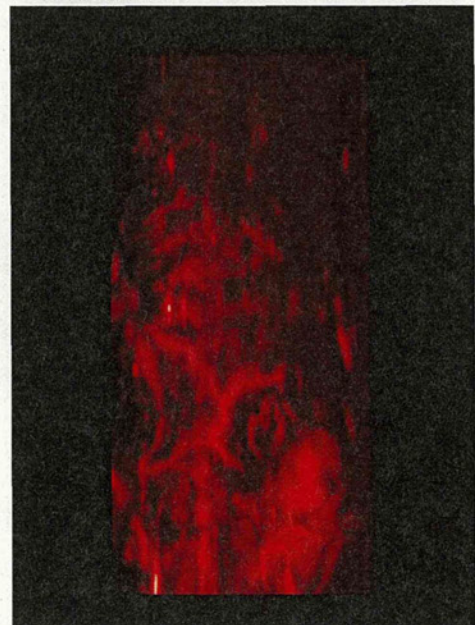
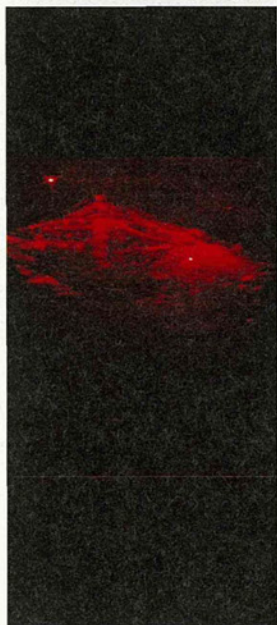


図 4 正常マウス背側からの超音響画像 (a) 断層像, (b) 投影像

図 5(a)(b)にヒト前立腺癌モデルマウスの背側(腫瘍)からの光音響画像を示す。(b)は光音響像(赤)と超音波画像(白)の重畳画像である。

死後ホルマリン固定した腫瘍を切り出した剖面像を示す。画像内にところどころ赤く見えるのが腫瘍血管である。

図 6 にヒト腎臓癌細胞株腫瘍モデルマウスの犠牲

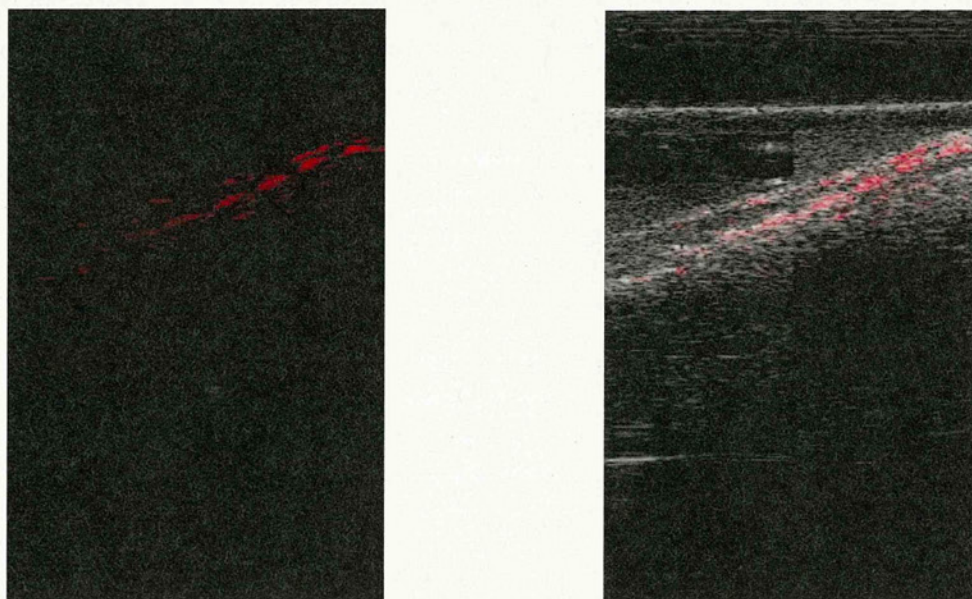


図 5(a) ヒト前立腺癌モデルマウスの背側(腫瘍)からの光音響画像
(a)は光音響画像, (b)は光音響像(赤)と超音波画像(白)の重畳画像



図 6 ヒト腎臓癌モデルの剖面像

図 7 にヒト腎臓癌モデルマウスの背側(腫瘍)からの光音響画像を示す。光音響像(赤)と超音波画像(白)の重畳画像である。腎臓癌特有の hyper vascularity により腫瘍内の信号が観察でき、これ

は剖面像と一致していることが確認できる。腫瘍血管が観察出来ている事がわかる。

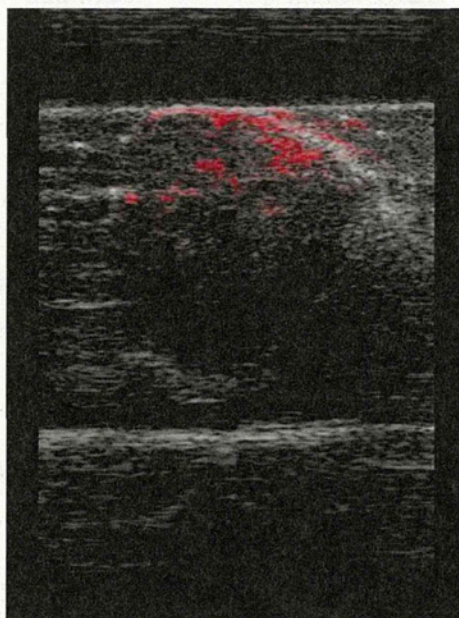


図7 ヒト腎臓癌モデルマウスの背側(腫瘍)からの光音響画像

D. 考察

正常マウスを対象にした場合に取得できた光音響画像では腹側からも背側からも主要な血管が描出できた。また、ヘモグロビンの分布ということで臓器からの信号も確認できている。

腫瘍モデルマウスについては、その血管構造に応じた画像が取得できたが、ヒト前立腺癌出の診断を想定した腫瘍辺縁や腫瘍内腔の画像特性の詳細解析には至らなかった。病理画像との比較が必要である。一方で腎臓癌特有の hyper vascularity により腫瘍内の信号が観察でき、これは断面像と一致していることが確認できた。

E. 結論

マウスを対象にしてもプロト機で光音響画像が取得できることを確認した。現在の設定(仕様)では、ヘモグロビンの局在を光音響画像で観察するため、血管構造以外の臓器からの信号が確認された。また、ヒト腎臓癌モデルマウスでは腫瘍血管が観察できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 石原美弥. “レーザー生体相互作用とその治療と診断への応用”. 光学, 41(11), p.548-555, 2012.11.
- 2) 櫛引俊宏, 平沢壮, 大川晋平, 石原美弥. “3次元培養細胞観察のための光音響イメージング顕微鏡の創製”. 日本レーザー医学会誌, 33(3), p.318, 2012.11.
- 3) 石原美弥. “光音響画像の現状”. 電気学会論文誌 C(電子・情報・システム部門誌), 132(8), p.1287-1290, 2012.08.

2. 学会発表

国際学会

- 4) Miya Ishihara. “【シンポジウム】 Photoacoustic imaging and sensing in medicine”. 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry. 14th

International Congress of Histochemistry and Cytochemistry Program and Abstracts, p.67, 2012.08.

- 5) Miya Ishihara, Takeshi Hirasawa, Ryota Sato, Toshiharu Teranishi. "Photoacoustic measurements of various gold nanoparticles to design contrast agents for in vivo imaging". XXIV IUPAC Symposium on Photochemistry, XXIV IUPAC Symposium on Photochemistry Abstract book. p.236, 2012.07.
- 6) Toshihiro Kushibiki, Takeshi Hirasawa, Masanori Fujita, Miya Ishihara. "Development and integration of photoacoustic imaging technology". Conference on Laser Surgery and Medicine 2012, Proceedings of Conference on Laser Surgery and Medicine 2012, p.78-79, 2012.04.

国内学会

- 7) 石原美弥. "金ナノ粒子の局在表面プラズモンによる光音響信号増強効果". 光・量子ビームによるナノダイナミクス応用技術調査専門委員会・第2回研究会, 2013.01.
- 8) 石原美弥. "Development of photoacoustic

technique towards deeply penetrating in vivo imaging and its clinical application". 第35回日本分子生物学会年会, 第35回日本分子生物学会年会プログラム, p.88, 2012.12.

- 9) 櫛引俊宏, 平沢壮, 大川晋平, 石原美弥. "3次元培養細胞観察のための光音響イメージング顕微鏡の創製". 第33回日本レーザー医学会, 日本レーザー医学会誌, 33(3), p.318, 2012.11.
- 10) 石原美弥. "【シンポジウム】光吸収体を超音波で画像化する光音響画像:腫瘍診断への可能性". 第7回日本分子イメージング学会総会・学術集会, 日本分子イメージング学会機関誌, 5(2), p.30, 2012.05.
- 11) 櫛引俊宏, 平沢壮, 大川晋平, 石原美弥. "光音響技術を用いた in vivo および in vitro 分子イメージングによる生体機能解析". 第5回医実隊・医大研究交流会, 2012.05.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 参考文献

なし

光音響技術を用いた血液酸素飽和度計測

研究分担者 藤田 真敬 防衛医科大学校

防衛医学研究センター

研究分担者 平沢 壮 防衛医科大学校

異常環境衛生研究部門 准教授
医用工学講座 助教

要旨

光音響画像化技術を用いた血液酸素飽和度マッピング技術の確立を目的としている。診療現場において、無侵襲に生体血管内の血液の酸素飽和度を計測可能な技術へのニーズは数多く、心臓カテーテル検査の代替としての使用や、分娩時の胎児の血液酸素飽和度モニターなど集中治療分野への応用が期待される。血液酸素飽和度マッピング技術の確立のためには、本研究事業の他分担研究にて構築している血液分布の画像化技術に加えて、血液酸素飽和度の定量化技術を開発する必要がある。そこで本分担研究では、光音響画像化技術を用いた血液酸素飽和度の定量化技術を開発し、既存の血液ガス分析器による計測値と比較して評価する。今年度は、ウサギを用いた血液酸素飽和度計測技術の精度検証のための実験系を作成した。本実験系は人工呼吸器による呼吸回数で血液酸素飽和度を制御可能で、血液ガス分析器による計測値との対比が可能である。さらに、光音響技術を用いてウサギ頸部及び鼠径部の深さ 4~7 mm の血管内血液の酸素飽和度の計測実験を行った。この結果、統計処理を行うサンプル数を得ていないものの、計測の範囲では、血液ガス分析器による計測値と近似した血液酸素飽和度が得られた。

A. 研究目的

血液酸素飽和度は血液酸素分圧に強い相関があり、特に麻酔管理や集中治療等の分野において重要な役割を担っている。血液酸素飽和度測定は現在指尖部のパルスオキシメータによる計測や、採血による血液ガス測定により行われている。しかし、パルスオキシメータは計測部位が指尖部の動脈のみに限定されるため、心内血液や短絡部などの血液を対象とした計測ができない。また、血液ガス測定は特に心臓カテーテル検査を併用する場合は侵襲的であり、繰り返しの計測が困難である。このため、無侵襲に局所の血液の酸素飽和度を繰り返し計測できる技術への需要が大きい。

血液酸素飽和度をマッピング可能な技術として、拡散光トモグラフィ、BOLD (Blood Oxygen Level Dependent) MRI, PET (Positron Emission Tomography)等が挙げられるが、それぞれ空間分解能が悪い、装置が効果かつ大型、造影剤が必要といった欠点を有する。

そこで本分担研究では、光音響画像化技術を用いた血液酸素飽和度マッピング技術の確立を目的としている。光音響画像化技術による血液酸素飽和度計測法は、光音響画像化技術の計測可能深度(15 mm)の範囲で非侵襲的に血液酸素飽和度のマッピングが可能となる。超音波エコーと同等の空間分解能で血管内血液を画像化可能であり、MRI や CT といった大型の画像診断装置と比して安価であり、生体由来の色素であるヘモグロビンを直接計測するため造影剤が不要である。特に心奇形などの治療法を決めるための心臓カテーテル検査併用の心内血液酸素飽和度計測の代替としての使用や分娩時の胎児の血液酸素飽和度モニターなど集中治療分野への応用が期待される。

今年度は、光音響技術を用いた血液酸素飽和度計測技術を開発した。さらに、本法の精度を検証するための動物実験系を作成し、皮膚表面から深さ数 mm の血管内血液の酸素飽和度を光音響技術を用いて計測する基礎実験を実施した。

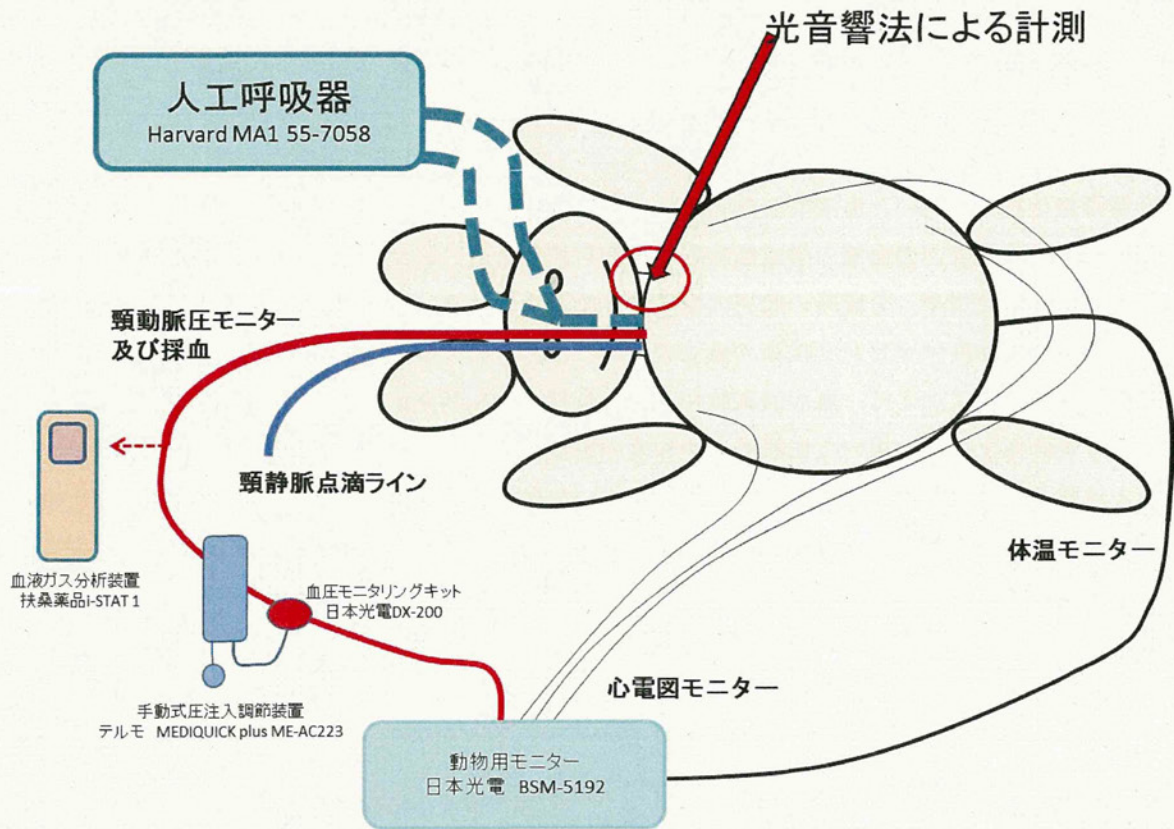


図 1 ウサギを用いた血液酸素飽和度計測の精度検証のための実験系

B. 研究方法

【B-1】動物実験系の作成

ウサギ(日本白色家兎, 体重 3.5 kg, 雌性)を 35 mg/kg ケタミン + 5 mg/kg キシラジンの筋注麻酔で沈静し, 左耳介静脈に 22 ゲージ留置針(サーフロー®, テルモ, 東京)を挿入留置。生理食塩水を接続した。バリカンで頸部, 鼠径部を剃毛, 頸部正中を切開。止血は電気メスを使用して行い, 気管を横切開し, 気管チューブ(portex tracheal tube 3 mm, smith medical, Dublin, OH, USA)を約 4 cm 挿入固定。気管に結紮した。人工呼吸器(MA1-55-7058, Inspira Advanced Safety Ventilator Volume Controlled, Harvard Apparatus, Massachusetts, USA)に接続し, 1 回換気量 22 ml, 呼吸回数 40 回/分とした。人工呼吸開始後にペントバルビタールナトリウム(25

mg/ml)を 75 mg 静脈注射により自発呼吸を消失させた。3Fr カテーテル(アトムメディカル, 東京)を固定して内腔をヘパリン生理食塩水で満たしたものを, 右頸静脈, に約 3 cm 挿入固定, 右頸動脈にも同じく約 3 cm 挿入固定し採血経路とした。血液は 0.2 ml を採取し, 血液ガス分析器(i-STAT®, 扶桑薬品工業, 大阪)及び, 計測用カートリッジ(EG6+, 扶桑薬品工業, 大阪)を用いて測定した。

実験中は手動式圧注入調節装置(MEDIQUICK plus ME-ACS223, テルモ, 東京), 血圧モニタリング・キット(DX-200, 日本光電, 東京)により血圧, 針電極により心電図 II 誘導, 直腸温度計から動物用モニター(Life Scope BSM-5192, 日本光電, 東京)を用いてモニターした。また計測中は保温マットで保温を行い, 体温を 36 ~ 37 °C に維持した。人工呼吸器を用いて, 1 回換気量 22 ml, 呼吸回数 40 回/分, 20 回/分として, 動脈血の酸素飽和度を

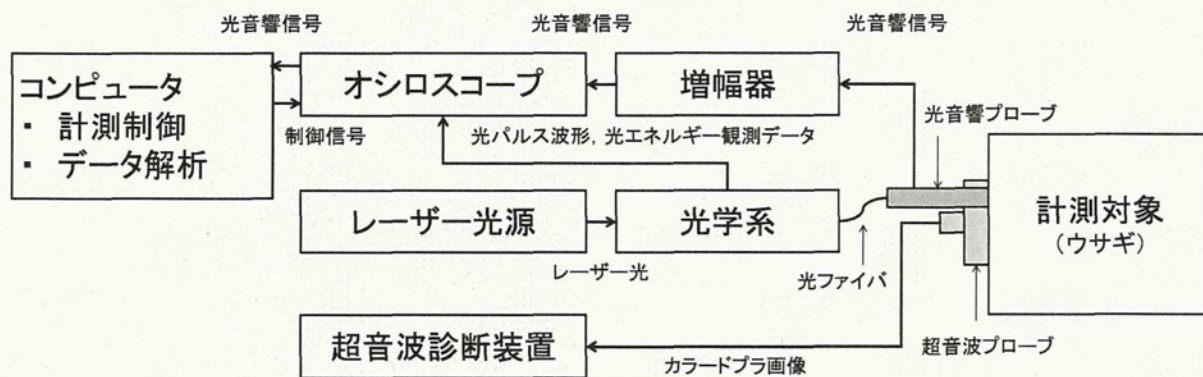


図 2 ウサギを用いた酸素飽和度計測実験系

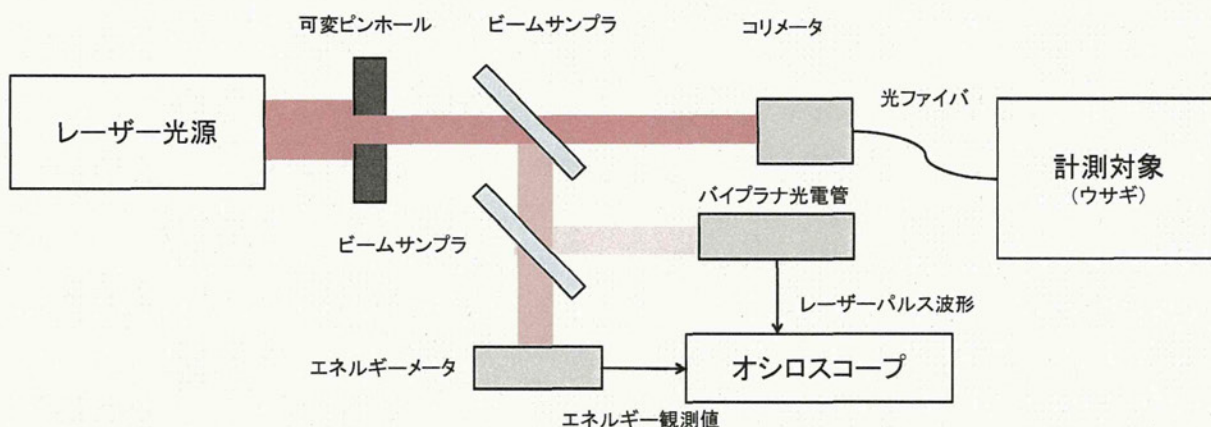


図 3 ウサギを用いた酸素飽和度計測実験に用いた光学系

変える実験を行い、40 回では 99 %、20 回では 91 % の安定した血液酸素飽和度を得られることを確認している。

【B-2】光音響技術による酸素飽和度計測

(1) 測定系の構成及び信号計測方法

光音響技術で計測する光音響信号の強度は、計測対象の光吸収の度合いを示すパラメータである光吸収係数に比例する。血液中の酸素化ヘモグロビンと、脱酸素化ヘモグロビンの光吸収係数の波長依存性(光吸収スペクトル)は異なる。このため、光音響法において励起光として照射するレーザー光の波長を変化させて、複数の励起光波長での光音響信号を観測すると、光音響信号強度の波長による変化と光吸収スペクトルを比較できる。この特徴を利用して、後述の信号処理を施すことによ

り、酸素化ヘモグロビンと脱酸素化ヘモグロビンを識別でき、結果的に酸素飽和度を計測できる。

図 2 に本実験に用いた実験系を示す。光音響信号を計測するために、防衛医科大学校医用工学講座で独自に開発した、超音波センサと光ファイバで構成される光音響プローブを用いた。超音波センサは圧電フィルム材料である P(VDF-TrFE)フィルムを用いて独自に作成した。P(VDF-TrFE)は圧電性を有する高分子材料である。P(VDF-TrFE)の音響インピーダンスは $4.21 \times 10^6 \text{ kg m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ であり [1], 生体の音響インピーダンス $1.63 \times 10^6 \text{ kg m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (軟組織の平均値 [2]) に近いので、生体とセンサとの界面における音響波の反射損失が小さい。機械的 Q 値が小さいため、受信素子の厚みで決定される共振周波数での共振が小さく、広帯域な周波

オシロスコープ
(光音響信号波形を表示)

光音響プローブ

超音波プローブ
(カラードプラ画像取得用)

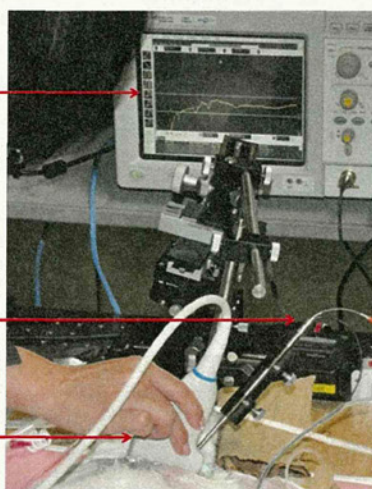


図 4 カラードプラ画像をガイドとした光音響プローブの位置合わせ

数特性を有する。また、機械エネルギーから電気エネルギーへの変換に関連する g 定数(センサ定数)が高いため、受信素子としての用途に有利である。超音波センサの受信面の形状は外径 3.0 mm, 内径 0.7 mm の円環状であり、円環中央に固定したコア径 400 μm のマルチモード光ファイバ(M40L02, Thorlabs, Newton, NJ, USA)からレーザー光を照射するものである。

レーザー光源として、Q スイッチ駆動の Nd:YAG レーザー(LS-2134, Lotis Tii, Minsk, Belarus)の第二高調波で励起される波長可変チタンサファイアレーザー(LT-2211, Lotis Tii, Minsk, Belarus)を用いた。繰り返し周波数は 15 Hz, パルス幅は 15 - 25 ns である。レーザー光を光ファイバに導入するまでの光学系を図 3 に示す。レーザーからの出力光を径 4 mm のアイリスで整形した後に、コリメータ(F280-SMA-B, Thorlabs, Newton, NJ, USA)を用いて集光して光ファイバに導入した。コリメータの前段に ND フィルタを配置して光を減衰させ、光ファイバから出力エネルギーを 3.0 mJ/pulse に設定した。

光源から出力されるパルス光のパルスエネルギーは、パルス毎に変動する。この変動分を後処理にて補正するために、光ファイバから計測対象に照射するレーザー光のエネルギーをレーザーパル

ス毎に記録する必要がある。しかし、光音響信号計測と同時に光ファイバからの出力光のエネルギーを計測することは不可能である。そこで、レーザー光を光ファイバに入射する前段で、ビームサンプラ(BSF10-B, Thorlabs, Newton, NJ, USA)を用いて一定の割合でサンプル光として分岐し、サンプル光のエネルギーをパイロエレクトリックエネルギーセンサ(PE10, Ophir, Jerusalem, Israel)により計測した。サンプル光のエネルギーと光ファイバから出力されるエネルギーの比率は一定であるため、予め計測した比率を用いることで、サンプル光のエネルギーを光ファイバから出力されるエネルギーに換算可能である。

また、レーザーパルスの時間波形は光音響信号の強度及び波形に影響するため、レーザー光のパルス幅を観測する必要がある。前述のエネルギーを観測するためのサンプル光をビームサンプラにより更に分岐し、バイプラナ光電管(R1328U-51, 浜松ホトニクス, 浜松)を用いて観測した。バイプラナ光電管で観測したレーザーパルスの時間波形は、後述のデジタルオシロスコープの同期トリガとしても用いた。

本実験では、単素子の光音響プローブを用いるため、光音響プローブの設置面に対する光吸収体の深さ分布が得られる。プロト機とは異なり、2次

元の断層画像を得ることができないため、プローブの位置合わせをする際に、目的とする血管を計測できているかを確認する必要がある。このため、図4に示すように、超音波診断装置(UF-870AG, フクダ電子, 東京)を用いてカラードプラ画像をガイドとして表示した。体表から 10 mm 程度と浅深度にある血管を対象とするため、周波数 5~12 MHz のリニアアレイプローブ(FUT-5-12L50, フクダ電子, 東京)を用いた。XYZ 軸ステージ(TAR-34805L, シグマ光機, 東京)と $\alpha\beta$ 軸ステージ(GOH-60B50, シグマ光機, 東京)とを用いて光音響プローブをカラードプラ画像に表示されている血管を計測可能な位置に合わせ、超音波ゲル(UF クリアゲル, フクダ電子, 東京)を介して光音響プローブに固定した光ファイバからレーザー光を照射して発生させた光音響信号を超音波センサにより受信した。受信した光音響信号は低雑音 FET 増幅器(SA-220F5, NF 回路設計, 神奈川)を用いて 46 dB の増幅率で増幅し、デジタルオシロスコープ(DSO-8104A, Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA)を用いて 2 GSa/s のサンプリング速度で観測した。

(2) 信号処理

本実験において使用した近赤外波長域の光に対す、生体内の光吸収体は、主に酸素化ヘモグロビンと脱酸素化ヘモグロビンの 2 種類である。計測部位に存在する光吸収体をこれら 2 種類のみと仮定すると、光吸収係数は、各光吸収体の単位濃度あたりの光吸収係数(モル吸光係数) $\epsilon_{Hb}(\lambda)$, $\epsilon_{HbO_2}(\lambda)$ に、各光吸収体のモル濃度 c_{Hb} , c_{HbO_2} で重みづけした線形和で表すことができる[3]。光音響信号の強度 $S(\lambda)$ は光吸収係数に比例するため、次式が成立する。

$$S(\lambda) \approx c_{Hb} \cdot \epsilon_{Hb}(\lambda) + c_{HbO_2} \cdot \epsilon_{HbO_2}(\lambda) \quad (1)$$

この式における未知数は、各分子の濃度 c_{Hb} , c_{HbO_2} である。本実験では、3 波長で光音響信号を計測しているため、上記の式を 3 本得られる。

これらの式に対して、次式で表す制約付き最小

二乗問題を解くことにより、式(1)の右辺と左辺との誤差を最小化する各光吸収体の相対濃度 c_{Hb}' , c_{HbO_2}' を同定した。

$$\min \| c_{Hb}' \cdot \epsilon_{Hb}(\lambda) + c_{HbO_2}' \cdot \epsilon_{HbO_2}(\lambda) - S(x, z, \lambda) \| \quad (2)$$

なお、上記の最小二乗問題の解は、MATLAB (Mathworks, Natick, MA) の条件付き最適化関数 lsqnonneg 関数を用いて得た。

c_{Hb}' , c_{HbO_2}' より、次式を用いて酸素飽和度を算出した。

$$SaO_2 = \frac{C_{HbO_2}'}{C_{Hb}' + C_{HbO_2}'} \quad (3)$$

なお、本演算において、酸素化ヘモグロビンと脱酸素化ヘモグロビンの単位濃度あたりの光吸収係数は、Oregon Medical Laser Center のホームページに公表されている値[4]を用いた。

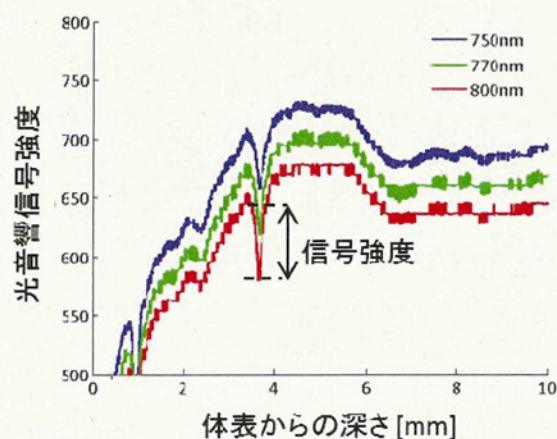
【B-3】生体安全を考慮した測定系の改良

生体に適用するためには安全性を考慮する必要がある。特にレーザー使用の際の安全性確保に関しては、最大許容露光量(MPE : Maximum Permissible Exposure)が規定されている。本技術において使用するナノ秒パルスレーザー光の皮膚の MPE は、700-1050 nm の波長域では次式で計算できる[5]。

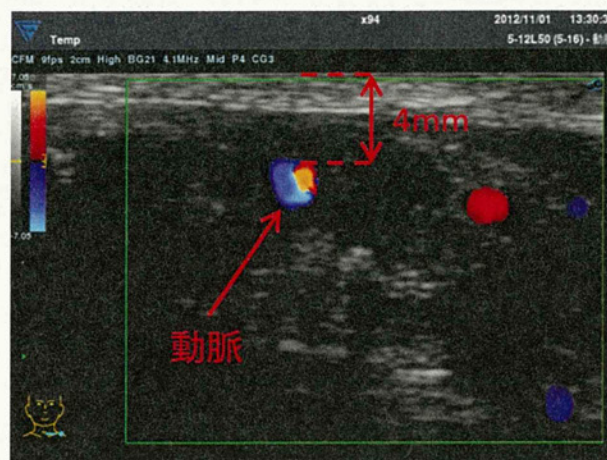
$$MPE = 20 \times 10^{-2} (\lambda - 700)^{1000} [mJ/cm^2]$$

ここで、 λ は光の波長であり、波長 750 nm の光を用いる場合、MPE は 25.18 mJ/cm² となる。MPE は単位面積当たりのエネルギーで規定されているため、照射可能なエネルギーは面積に比例する。

前述の装置系では皮膚表面にプローブを接するため、光の照射面積は光ファイバの断面積 (1.26 × 10⁻³ cm²) となる。皮膚表面におけるエネルギー密度(フルエンス)を MPE 以下とするためには、皮膚に照射するレーザー光のエネルギーを【B-1】に記載した実験条件の 1/100 程度とする必要がある。照射するレーザー光のエネルギーを弱めると、それに比例して光音響信号の強度も弱まるため、血管内の血液を検知することが困難となる。そこ



(a)



(b)

図 5 ウサギ頸部の動脈内血液を計測した光音響信号(a)とカラードブラ画像(b)。

カラードブラ画像をガイドとして光音響プローブを設定した。

で、MPE 以下の照射条件で大エネルギーを照射可能とするために、皮膚表面におけるレーザー光の照射面積を広げる方法について検討した。

光音響プローブに一体化している光ファイバから出力される光は発散光であるため、光音響プローブと皮膚との間の距離を広げることにより、照射面積を拡大できる。本技術では超音波を検知する原理上、光音響プローブと皮膚との間は、生体軟組織と同等の音響インピーダンスを有する媒質で満たし、超音波の損失を抑制する必要がある。媒質の候補として、水や超音波ゼリーが挙げられるが、水は液体であるため形状を保つことが困難であり、超音波ゼリーは厚みを増すと気泡が生じ、アーティファクトの原因となる。

そこで、超音波を伝播する半固形状のゲル素材である音響カプラ(ソナゲル, タキロン, 大阪)を用いた。音響カプラ内での超音波の減衰を考慮し、音響カプラの厚さは 10 mm とした。

10 mm の厚みにおいて、光の照射面積を拡大するために、光ファイバから出力される発散光の発散角を拡大した。我々の装置において、光ファイバから出力される発散光の発散角は、光ファイバにレーザー光を集光する際の入射角に依存するこ

とを他分担研究にて確認しているため、集光用のコリメータを焦点距離の短いものに変更した。

C. 研究結果

【C-1】血液酸素飽和度の計測結果

図 5(a)に、ウサギ頸部の動脈内血液を対象に、レーザー光の波長を 750, 770, 800 nm と順に変えて計測した光音響信号の信号波形を示す。また、図 5(b)には光音響プローブの位置合わせに用いたガイド用のカラードブラ画像を示す。光音響信号は超音波であるため、ほぼ一定の音速(1540 m/s : 生体軟組織の平均値[2])で伝播する。このため、レーザーを照射してから光音響信号を観測するまでの時間差に音速を乗ずることで深さに換算できる。図 5(a)では、カラードブラ画像との対応関係を明確にするために、信号到達時間に音速を乗じて深さに換算して表示している。図 5(b)のカラードブラ画像において、表面から深さ 4 mm に血管が描出されている。図 5(a)の信号波形においても、表面から深さ 4 mm において信号が観測されている。このため、光音響プローブにより、図 5(b)に描出されている血管内の血液を検知していると考えら

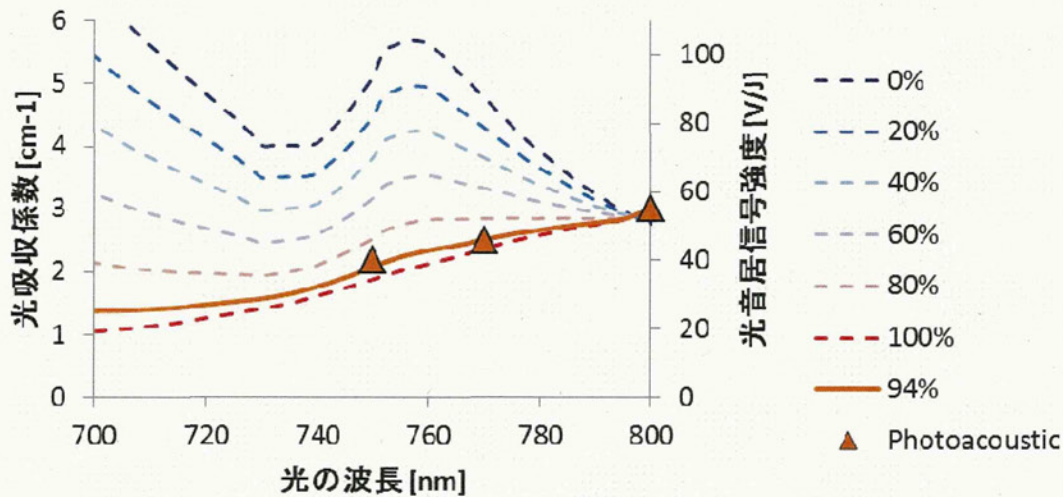


図 6 酸素飽和度によるヘモグロビンの光吸収特性の変化[4]と、光音響信号の強度との比較

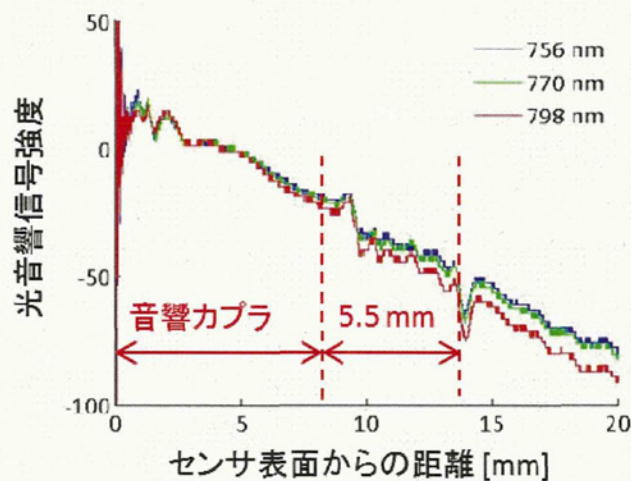


図 7 改良した装置系を用いてウサギの頸動脈内の血液を対象に計測した光音響信号波形

れ、画像を取得できない単素子のセンサを用いる場合でも、カラードプラ画像をガイドとすることにより、目的とする血管内の血液を選択して計測できることを確認できた。また、図 5(a)より、光の波長により光音響信号の強度が変化していることが確認できる。この変化と、ヘモグロビンの光吸収特性とを比較した結果を図 6 に示す。ヘモグロビンの光吸収特性は、血液ガス分析器で計測したウサギ動脈血の酸素飽和度(94%)及び総ヘモグロビン濃度(10.2 g/dL)を用いて算出した。図 6 より、光音響信号の強度変化は、ヘモグロビンの光吸収特性に非常によく対応することを確認できる。

さらに、前述の信号処理法を用いて光音響信号の強度から血液酸素飽和度を計算した結果、酸素飽和度は 93%と算出され、血液ガス分析器の計測結果と非常によく対応した。

上記の結果を含め、頸部、頸動脈、頸静脈を各々一点、鼠径部、大腿動脈、大腿静脈、大腿回旋静脈の合計五点を計測した。血液ガス分析器で計測した動脈血の酸素飽和度は 94%、静脈血の酸素飽和度は 78%であったのに対し、光音響技術による計測結果は動脈で平均 96.5%、静脈の平均は 83.2%であり、非常に近似した結果が得られた。

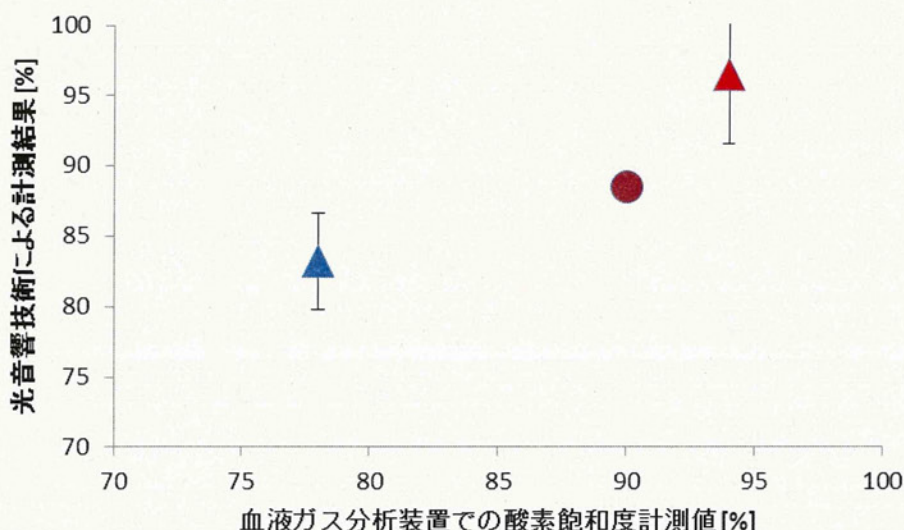


図 8 光音響技術を用いて計測した酸素飽和度と、血液ガス分析器での計測値との比較
 【C-1】で得た計測値を▲【C-2】で得た計測値を●でそれぞれプロットした。

【C-2】改良した測定系を用いた計測結果

改良した測定系を用いて、前回と同様の動物実験系を対象に光音響技術を用いて血液酸素飽和度計測を行った。人工呼吸器の呼吸回数を 20 回/分と設定することにより、動脈血の酸素飽和度を 90 % に安定させた。レーザー光の波長は、756, 770, 798 nm で順に変化させ、レーザー光のパルスエネルギーは 3 mJ/pulse とした。厚さ 10 mm の音響カプラが光音響プローブを押し当てることにより変形することを無視すると、フルエンスは 6.79 mJ/cm² となり、MPE の 3 分の 1 以下である。

上記の条件にてウサギの頸動脈内の血液を対象に計測した光音響信号の波形を図 7 に示す。図 7 より、ウサギの体表から 5.5 mm の深さにある血管内の血液を検出可能なことが確認された。現有の光学系を用いてコア径 400 μm の光ファイバで伝送可能なエネルギーは、最大で 6 mJ/pulse である。6 mJ/pulse のレーザー光を照射した場合のエネルギー密度は MPE 以下であるため、レーザー光のエネルギーを今回の実験条件である 3 mJ/pulse から 2 倍に増加可能である。現状のシステムのままでより深くの血管からも光音響信号を検出可能と考えられる。さらに、光ファイバのコア径を拡大す

ることにより、MPE と同程度のエネルギーを伝送可能となる。

また、前述の実験と同様に光音響信号の強度は光の波長により変化した。光音響信号の強度から血液酸素飽和度を計算した結果、88.5 % と算出され、一例の計測であるが、血液ガス分析器による測定値 90 % と同等の値が得られた。

D. 考察

今回我々の実験により、数サンプルの計測と比較を行った。統計処理を行うサンプル数を得ていないものの、従来の血液ガス分析器によるデータと光音響法による計測法の比較を行った限りでは、図 8 に示すとおり、計測の範囲内においては、非常に近似したデータを得ることができた。動静脈の血液酸素飽和度計測が非侵襲的な光音響技術により可能なことが示唆されている。一方で、励起光として照射するレーザー光が血管に到達するまでに、血管以外の組織によって減衰することが血液酸素飽和度計測の精度に大きく影響を与えるとの研究報告がある[6]。今回提示した実験結果においては、光減衰の影響はほとんど認められない。

計測対象の血管以外が発生する信号がほとんど観測されていないことから、周囲組織が光を吸収することによる光減衰が小さかったためであると考えられる。今後実験を進めていく過程で、光減衰の影響が大きいことが確認された場合には、組織の光学特性の波長依存性に基づく補正項を掛ける等の対策が必要と考える。

信号の取得範囲の分解識別能が現行の計測装置では約 6 mm であり、該当する範囲内に数本以上の動静脈が混在する場合には、すべての血管内の血液の平均値として血液酸素飽和度が計算されるため、各血管内血液の個別の酸素飽和度の計測は難しくなる。そのため各所の血管毎に血管内血液の酸素飽和度を計測するには、やや太い血管内の血液を狙う必要が生じる。現在の試作システムでは血液酸素飽和度の算出に数分を要するが、システムの開発を行えばリアルタイムでの算出表示は可能となるであろう。診療現場において、本法の応用可能なニーズは数多い。心臓カテーテル検査への応用や分娩時の胎児の酸素飽和度モニターなど集中治療分野への応用が期待される。酸素飽和度測定は現在指尖部のパルスオキシメータによる計測や、採血による血液ガス測定により行われている。我々の光音響技術による血液酸素飽和度計測法は、光音響の計測可能深度 15 mm の範囲で非侵襲的に血液酸素飽和度のマッピングが可能となる。

現状で行われている心房中隔欠損症や心室中隔欠損症の手術適応の決定には、短絡率の計測が必須となる。これには、大動脈、右心房、左心房(肺動脈末梢の採血で代用)、肺動脈の酸素飽和度計測が必要になる。心臓カテーテル検査という侵襲的な検査により行われる現行の手法は、非侵襲的に可能な本法の開発により置き換えられる可能性が期待される。特に新生児の検査診断には本法の利点は大きいものと考えられる。これら大血管内の酸素飽和度測定は現行の分解識別能約 6 mm の範囲内で十分可能と考えている。また、非侵襲的な

手法から、胎児の動脈の血液酸素飽和度の持続モニターとして期待されるであろう。血液酸素飽和度測定という医療技術分野において、非侵襲化、マッピング化という改良が同時に進展する可能性があり、医療界における応用の恩恵が大いに期待される。また、ヘモグロビンの存在を 3 次元で検知表示が可能になるため、漿液性の液体貯留や薬液貯留と血腫の識別が一層容易になる[7]。血腫や血管の存在がより鮮明に表示されるため、各種医療処置、外科手術の安全性が高いレベルで確保可能となるであろう。

E. 結論

本研究では、光音響技術を用いた酸素飽和度計測技術の精度を評価するための動物実験系を作成し、深さ 4-6 mm の血管内血液の酸素飽和度を光音響技術により計測する基礎実験を実施した。この結果、統計処理を行うサンプル数は得られていないものの、従来の血液ガス分析器による計測値と非常に近似した血液酸素飽和度を得ることができた。

また、装置系の改良により、MPE 以下のレーザー照射条件にて、深さ 5.5 mm 以上の血管を検出可能となった。レーザー光の強度を上げることが可能であり、本装置にて深さ 10 mm 以上の血管内血液の酸素飽和度を計測可能となることが期待される。

今後は、統計処理を行うために計測数を増加し、本法の精度を明らかにすることにより、今後の製品化に向けたデータ取得を急ぎたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takeshi Hirasawa, Masanori Fujita, Okawa Shinpei, Toshihiro Kushibiki, Miya Ishihara. "Improvement in quantifying optical absorption coefficients based on continuous wavelet-transform by correcting distortions in temporal photoacoustic waveforms". *Proceedings of SPIE*, 8581, p.85814J-1-85814J-7, 2013.03.

2) 平沢壮, 櫛引俊宏, 藤田真敬, 石原美弥. "連続ウェーブレット変換を用いた光音響信号解析による光吸収係数同定法の開発". 第 51 回日本生体医工学会論文集, 2012.05.

2. 学会発表

国際学会

3) Takeshi Hirasawa, Masanori Fujita, Okawa Shinpei, Toshihiro Kushibiki, Miya Ishihara. "Improvement in quantifying optical absorption coefficients based on continuous wavelet-transform by correcting distortions in temporal photoacoustic waveforms". SPIE Photonics West Biomedical Optics, BiOS 2013, SPIE Photonics West BiOS 2013 Technical Summaries, p.289, 2013.02.

国内学会

4) 平沢壮, 櫛引俊宏, 藤田真敬, 石原美弥. "連続ウェーブレット変換を用いた光音響信号解析による光吸収係数同定法の開発". 第 51 回日本生体医工学会, 生体医工学, 50(特別), p.212, 2012.05.

I. 参考文献

1. S. Or, H. Chan, and C. Choy, "P (VDF-TrFE) copolymer acoustic emission sensors," *Sensors and Actuators A: Physical* **80**, 237-241 (2000).
2. W. R. Hendee and E. R. Ritenour, *Medical imaging physics* (John Wiley and Sons, New York, 2002).
3. B. Cox, J. G. Laufer, S. R. Arridge, and P. C. Beard, "Quantitative spectroscopic photoacoustic imaging: a review," *Journal of biomedical optics* **17**, 061202 (2012).
4. S. L. Jacques and S. A. Prahl, "Absorption Spectra for Biological Tissues (Oregon Medical Laser Center, OR)" (2004), retrieved March 12, 2013, <http://omlc.ogi.edu/spectra/>.
5. C. Li and L. V. Wang, "Photoacoustic tomography and sensing in biomedicine," *Physics in medicine and biology* **54**, R59-97 (2009).
6. M. Sivaramakrishnan, K. Maslov, H. F. Zhang, G. Stoica, and L. V. Wang, "Limitations of quantitative photoacoustic measurements of blood oxygenation in small vessels," *Physics in medicine and biology* **52**, 1349-1361 (2007).
7. 藤田真敬, 平沢壮, 石原美弥, "次世代の画像診断装置としての光音響画像化技術開発と医師の期待," *O plus E (optics + electronics)* **34**, 151 - 154 (2012).

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし