

波長・半値幅連続可変光学フィルターを基盤とする光音響 顕微鏡の開発

防衛医科大学校 医用工学講座 石原美弥

Development of a Photoacoustic Microscopy Based on Tunable Optical Filter with
Adjustable Bandwidth

Miya Ishihara

Department of Medical Engineering, National Defense Medical College

医学生物応用向けの光音響顕微鏡は、これまでに血管を対象としたイメージングの報告が多くされていて、研究開発の主流となっている。光音響顕微鏡の用途を拡大するためには、様々な撮像対象をイメージングできるように、分光光音響顕微鏡として開発する必要がある。

我々は、白色光源(スーパーコンティニウム光源)を用いた光音響顕微鏡を既に構築している。この利点を活かして、波長選択性を本研究の主目的とした。中心波長と半値幅を制御することで、光音響画像のコントラストや輝度の最適化条件を探索した。

Photoacoustic microscopy for medical and biological applications are currently predominantly researched on images of blood vessels. In order to expand the applications of photoacoustic microscopy, it is necessary to be able to image various imaging objects with spectroscopic photoacoustic microscopy.

We successfully used the nano-second pulsed supercontinuum (SC) light source for photoacoustic microscopy. In this research, we focus on selection of the wavelength range. To find the optimum conditions for high-contrast and high-brightness photoacoustic image, the center wavelength and bandwidth was controlled independently.

1. はじめに

PAS (Photoacoustic spectroscopy)を基本原理とする光音響イメージング技術は、光照射により発生する超音波を検出して画像化する手法である。医学生物応用向けの光音響イメージングは、光照射法と超音波励起法を上手く組み合わせることで、ダイナミックレンジの広い生体内部の画像化手法として着目されている。生体や生命現象を俯瞰的に観察したいというニーズを満たす可能性のある技術である。市販装置は未だないが、乳がん診断応用は2021年にFDAの承認が得られている。

光音響イメージングには、ナノ秒パルス光を励起光に使用するのが一般的である。撮像対象の吸収スペクトルを参考に、使用する波長を決定する。研究用大型装置は、波長可変光源を装置に導入することが多いが、可搬性を考えると1~2波長で装置化されていることが多い。

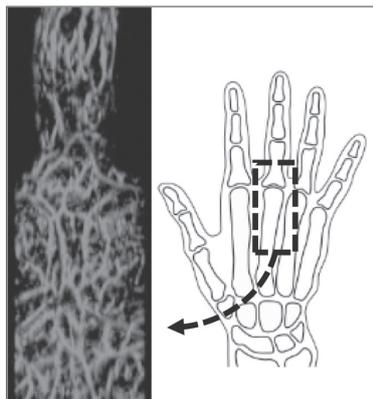


図1. 大面積光照射の光音響イメージング装置で取得したヒト指の血管画像。指を対象にした光音響画像をX-Y面に投影した画像。微細な血管網が可視化できている(ヘモグロビンの吸収波長である750nmのレーザー光を使用)。

これまで医学生物応用向けの光音響イメージングの研究分野では、ヘモグロビンの光吸収を利用した血管イメージングが多く報告されている。図1は我々の報告例である。ヘモグロビンは、広い吸収スペクトル特性を有する(図2)ため、励起に使用する波長によって特徴的な画像が取得できる。例えば、図1に示した画像は、近赤外光領域の波長750nm(アレキサンドライトレーザー)を励起光に使用したヒト指内の血管画像である。

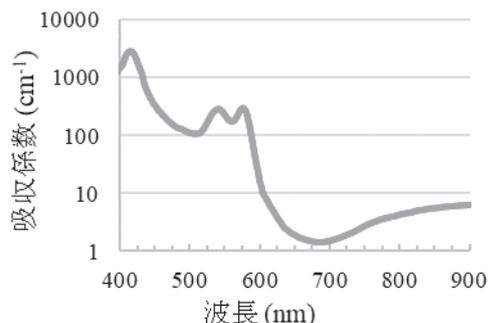


図2. ヘモグロビン(15 g/dL)の吸収スペクトル。

血管以外を撮像対象とするために必要な要素研究を推進することにより、光音響イメージングの用途拡大が見込まれる。また、汎用性を考慮すると広く利用されている光学顕微鏡との親和性がある装置系の必要性がある。

そこで、本研究では、対物レンズを用いた顕微鏡タイプの光音響顕微鏡装置を構築し、撮像対象を拡充するための分光画像取得に必要な検討を行なった。

2. 実験方法

2.1 光音響顕微鏡の構築

図3に示すのは、対物レンズを用いた顕微鏡タイプの装置の構成図である。このシステムは、測定試料に対して光照射と超音波検出が対向した形式である。様々な吸収スペクトルを持つ撮像対象に対応できるように、励起光源に白色光源(スーパーコンティニウム光源)を導入し、市販のバンドパスフィルターを用いることを前提とした構成になっている。

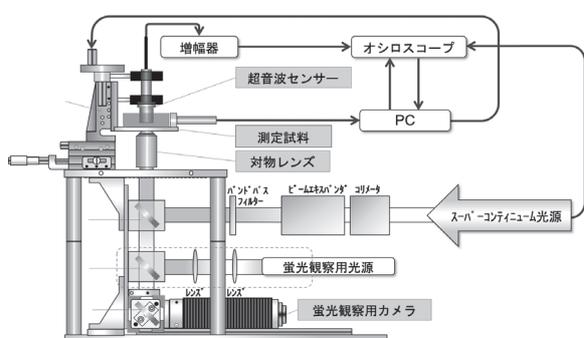


図3. 光音響顕微鏡の構成図。中心周波数30 MHzの広帯域なP(VDF-TrFE)超音波センサー、対物レンズは5-40倍まで可変である。蛍光画像を同軸で取得できるようになっている。スーパーコンティニウム光源は、波長域(500-2400nm)、パルス幅(4ns)、PRF(100kHz(1 MHz maximum))、パルスエネルギー(300nJ @ 725-775 nm)の仕様である。(Tachi et al., Applied Optics, 2021¹)を一部改変)。

2.2 分光学的検討

単一の対象を画像化する場合、一般的なバンドパスフィルターを用いて、光音響画像のコントラストや輝度が良い条件で取得すれば良い。赤血球を対象に、中心波長570nmで

半値幅 40nm のバンドパスフィルターを用いて光音響画像を取得した。

複数の対象を画像化するには、各々の対象の吸収スペクトルに合わせたバンドパスフィルターの特性だけでなく、背景信号のスペクトルや、スーパーコンティニウム光源のスペクトル特性も併せて考慮する必要がある。Eff を Excitation efficiency (励起効率) とすると、以下のように示すことができる。

$$Eff = \frac{\int I(\lambda) \cdot A(\lambda) d\lambda}{\int I(\lambda) d\lambda} \cdot \frac{1}{A(\lambda_{max})}$$

ここで、 $I(\lambda)$ は励起光強度、 $A(\lambda)$ は吸光度、 λ は波長、 λ_{max} は吸収ピーク波長であり、第一項は励起帯域中の吸光度の重みつき平均である。有限の波長帯域を有する光を使用する場合に、波長 λ_{max} の狭帯域光を使用する場合と比較して、どの程度の効率で励起できるかを示す指標である。

この検討を実証するために、培養細胞を対象にマルチカラー光音響画像を取得した。生命現象のイメージング(生細胞観察)に欠かせない蛍光タンパク質で特に蛍光量子収率の低い、あるいは非蛍光性を総称して色素タンパク質とすると、HeLa 細胞に発現している ShadowG と ShadowY を対象とした。そのモル吸光スペクトルを図 4 に示す。

本研究における動物実験は、防衛医科大学校実験動物倫理委員会の承認を受けたうえで実施した。

3. 結果と考察

単一の対象の光音響画像化結果として、図 5 には、5 倍の対物レンズを用いて、 $1 \mu\text{m}$ ピッチで、 $80 \mu\text{m} \times 80 \mu\text{m}$ の走査条件で取得した赤血球混濁液の光音響投影画像を示す。この画像の場合には、570nm 中心波長、半値幅 40nm のバンドパスフィルターを用いた。血液から赤血球を精製する過程で抗凝固剤であるヘパリンを加え、PBS で希釈しているが、その影響はないことを確認している。

複数の対象の光音響画像化結果として、図 6 には、5 倍の対物レンズを用いて、 $2 \mu\text{m}$ ピ

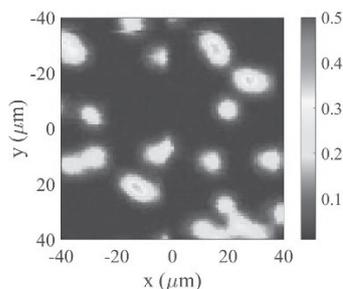


図 5. 実験動物の血液から精製した赤血球懸濁液を対象に取得した光音響投影画像。対物レンズを用いた光音響顕微鏡で取得した。

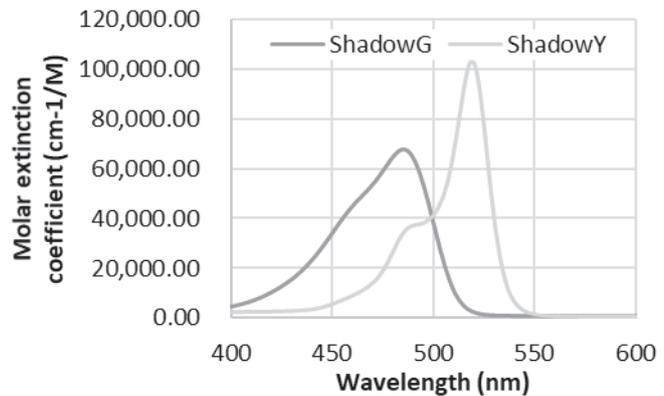


図 4. ShadowG²⁾ と ShadowY³⁾ のモル吸光スペクトル。ShadowG は 486nm, ShadowY は 519nm に吸収ピークがある。

図 6. 色素タンパク質(ShadowG, ShadowY)を各々に発現させた HeLa 細胞を共培養した細胞を対象に取得した光音響投影画像。自然科学研究機構生理学研究所村越秀治博士より細胞を提供。(投稿準備中)。

ツチで、 $600\ \mu\text{m} \times 300\ \mu\text{m}$ の走査条件で取得した色素タンパク質発現培養細胞の光音響投影画像を示す。

研究計画当初、感度補正(画像輝度補正)のために、2つのエッジフィルターの組み合わせによる波長半値幅連続可フィルターを用いた制御を計画していたが、汎用性を考慮して、本研究では、Excitation efficiency (励起効率)を指標とした補正を中心に検討した。図6の光音響画像のケースでは、表1の結果となった。

表1. 色素たんぱく質発現細胞の光音響画像化における補正。

	励起効率(%)	波長レンジ (nm)
ShadowG	81	475-500
ShadowY	69	500-525

4. 結論

光音響顕微鏡の用途拡大という観点で、反射対物レンズを用いた系も別途構築しているが、今回取得した光音響画像から、システムとして更なる改良が必要であることも明らかとなった。特に、生体を対象にすると、経時的な変化が重要な場合があり、高速に画像を取得する必要性が生じる。ガルバノ走査方式を導入することで、励起光の高速走査は可能になるが、バンドパスフィルターを入れ替えて画像を取得する時間が問題となる。この課題に対して、広帯域なスーパーコンティニューム光に波長依存の時間遅延(波長分散)を加えて励起をする方法を提案している(Hirasawa et al., Photoacoustics, submitted)。

5. 謝辞

本研究は、2019年度日本板硝子材料工学助成会の研究助成を受けて行ったものである。同助成会に心より感謝致します。

6. 参考文献

- 1) K. Tachi, T. Hirasawa, S. Okawa, A. Horiguchi, K. Ito, and M. Ishihara, Applied Optics, 60, 9651-9658 (2021).
- 2) H. Murakoshi, A. C. Shibata, Y. Nakahata, and J. Nabekura, Scientific reports, 5, 1-11 (2015).
- 3) H. Murakoshi and A. C. Shibata, Scientific reports, 7, 1-10 (2017).