

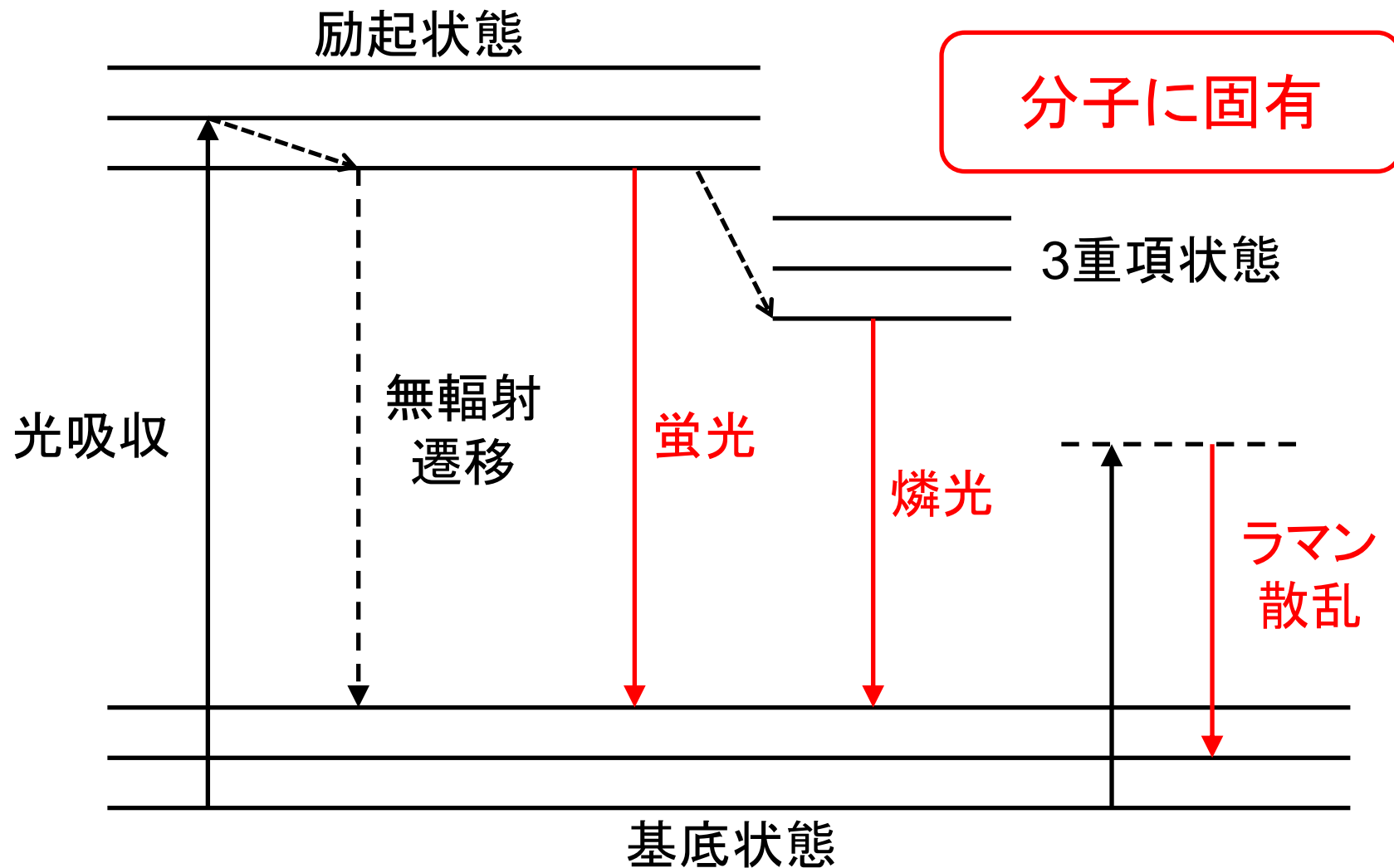
# 2光子吸収を利用した 光音響イメージング技術の開発

佐賀大学大学院工学系研究科  
先端融合工学専攻 先端融合工学講座  
山岡禎久

2015年11月17日 徳島大学

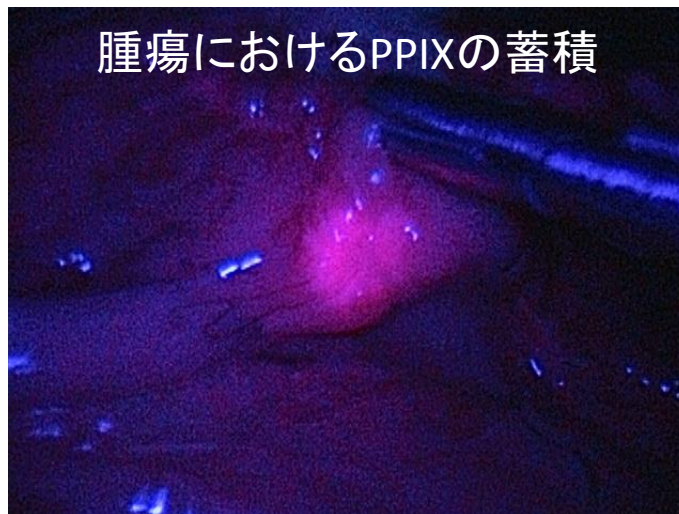
1. 生体光イメージング（光を使う利点、問題点）
2. 光音響イメージング
3. 2光子光音響顕微鏡
  - A) 2光子光音響波の検出
  - B) 高速化
4. まとめ

# 光と分子の相互作用の多様性

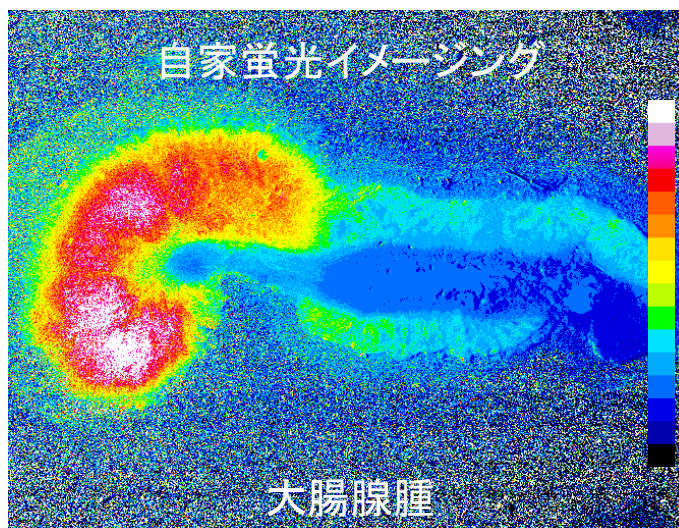
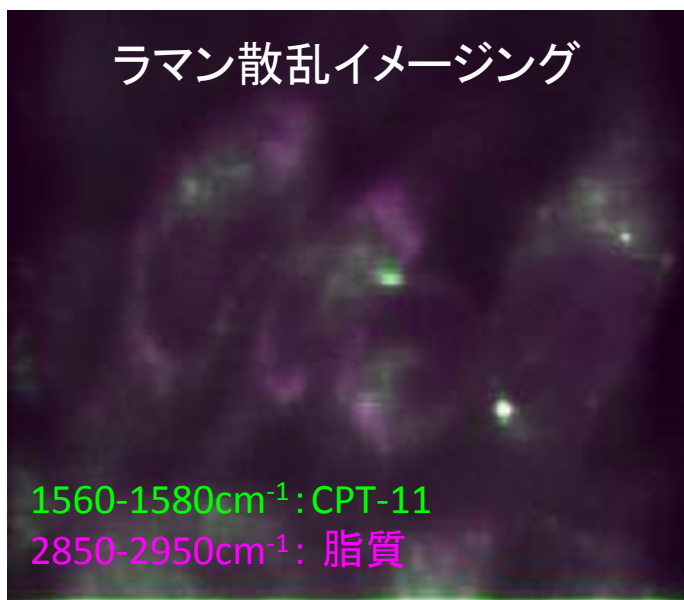


分子コントラストで対象を観察可能

# 光イメージング



<長所>  
高空間分解能  
分子特異的  
低侵襲  
リアルタイム  
無染色



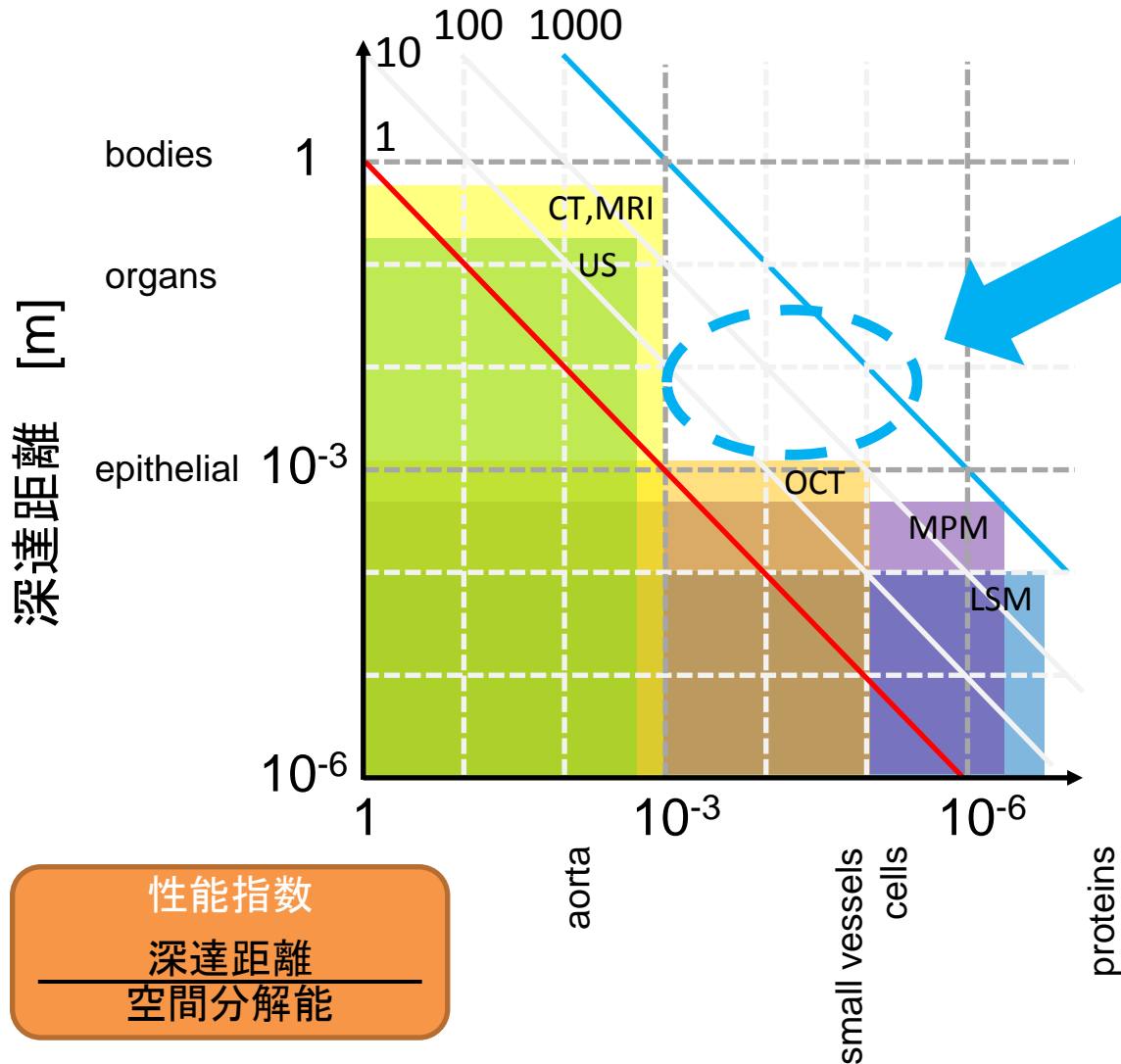
<短所>  
低深達距離

PPIX: Koizumi N, et al, Ann Surg Oncol 20 (2013) 3541-3548.

Raman: Harada Y, et al, Histochem Cell Biol 132 (2009) 39-46.

Autofluorescence: Imaizumi K, et al, Gastrointestinal endoscopy 75 (2012) 110-117.

# 生体イメージング技術



従来技術では観察できない領域

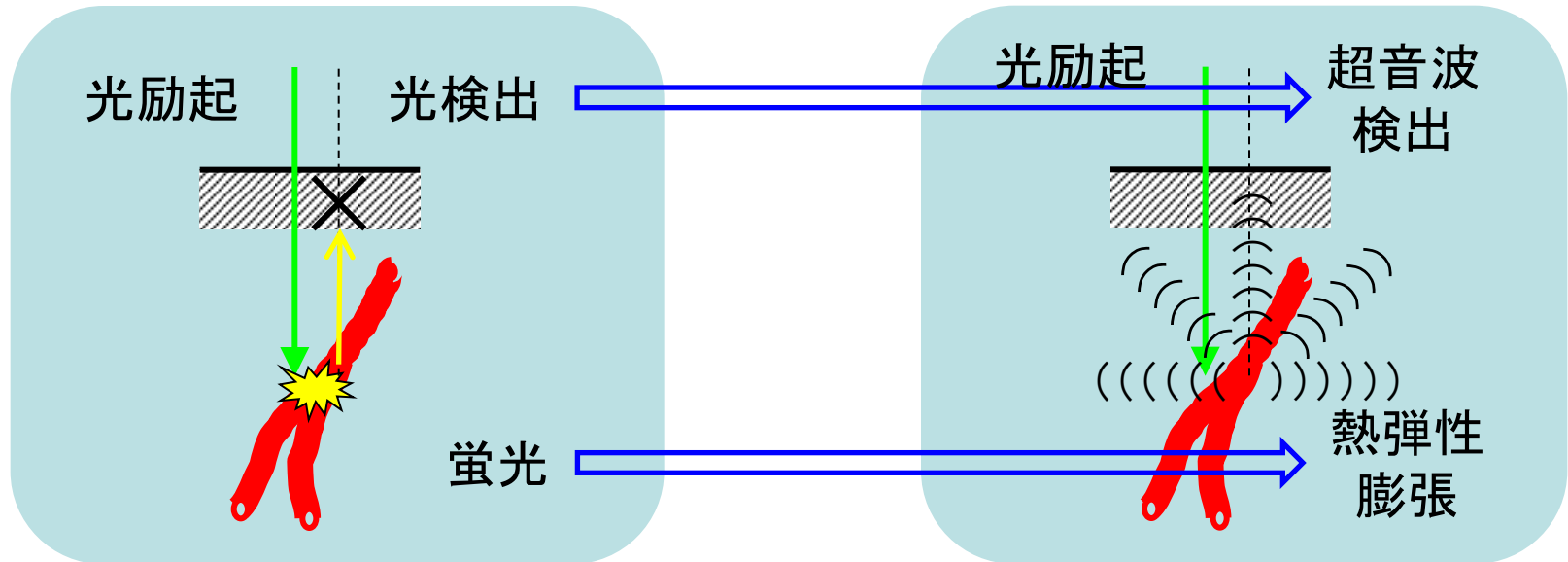
光音響イメージング

CT: Computed tomography,  
 MRI: Magnetic resonance imaging,  
 US: Ultrasonography,  
 OCT: Optical coherence tomography,  
 LSM: Laser-scanning confocal microscopy,  
 MPM: Multiphoton microscopy

# 光音響イメージング

蛍光顕微鏡

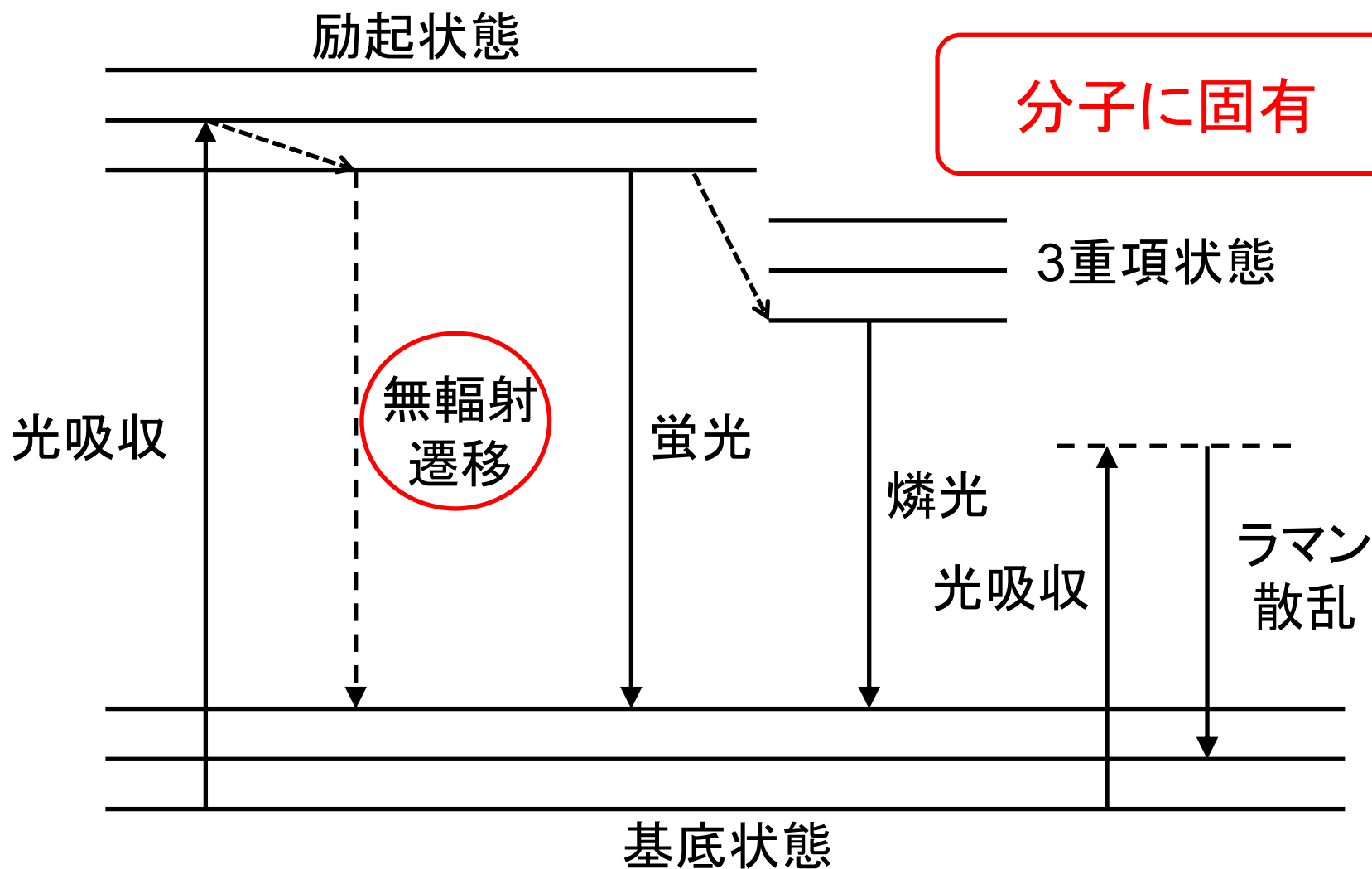
光音響イメージング



超音波 : 生体内長距離伝搬  
光 : 高コントラスト

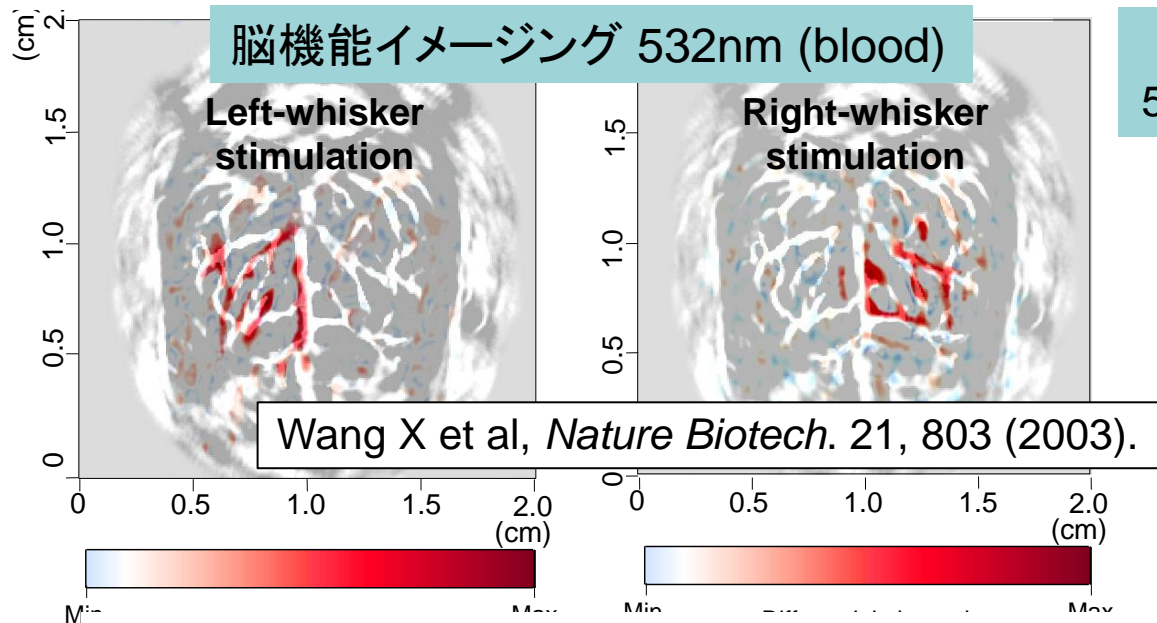
深部イメージング可能 !!

# 光と分子の相互作用の多様性

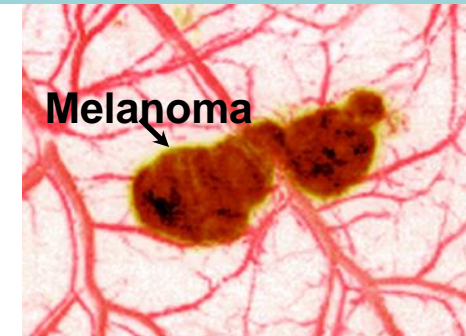


無輻射遷移 ⇒ 熱弾性膨張 ⇒ 光音響波

# 光音響イメージングの例

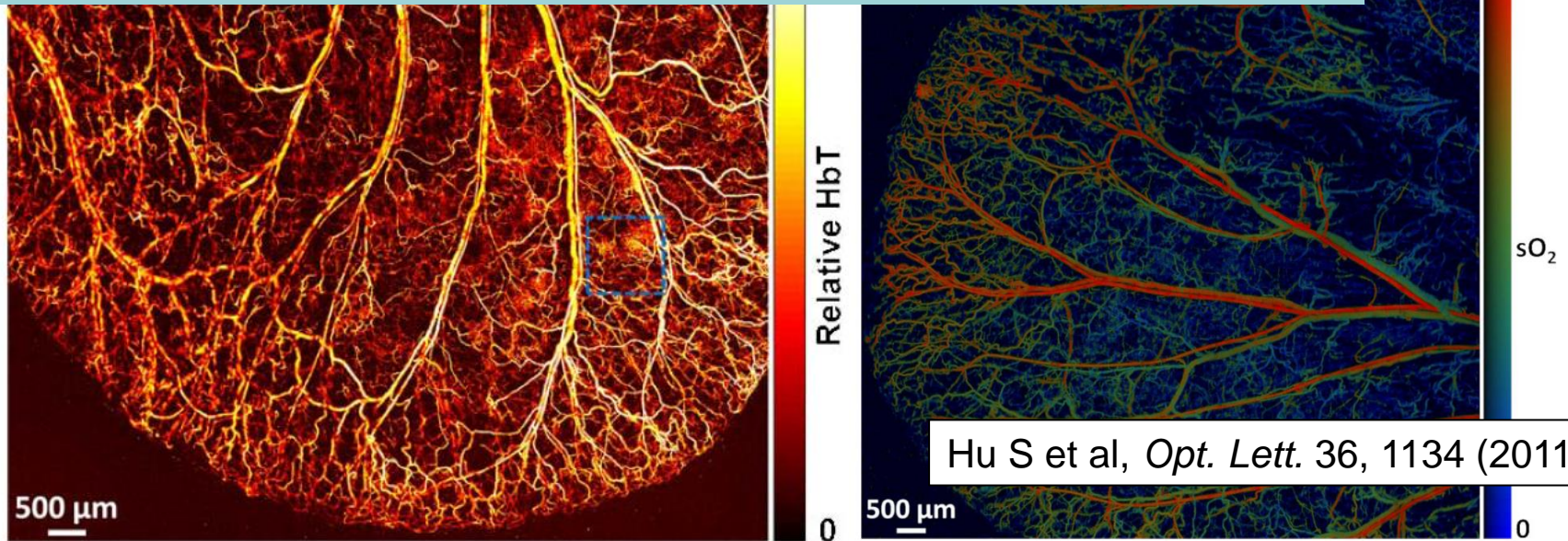


悪性黒色腫検出  
584nm (blood) & 764nm (melanoma)



Zheng HF et al, *Nature Biotech.* 24, 848 (2006).

微小血液循環 570nm(Isosbestic) & 561nm (oxygenated hemoglobin)

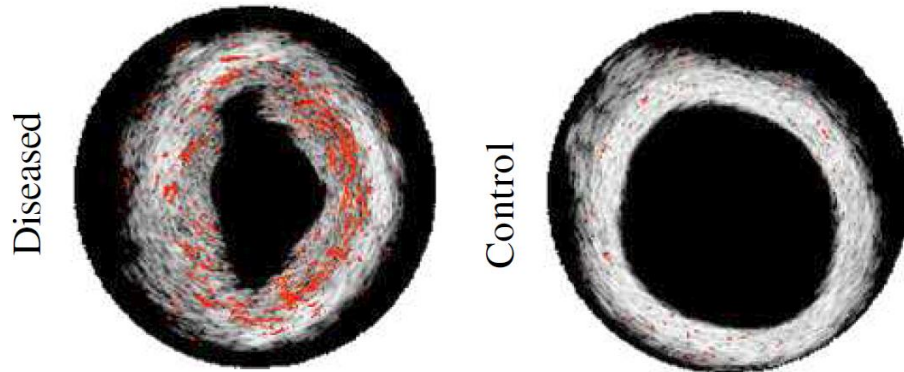




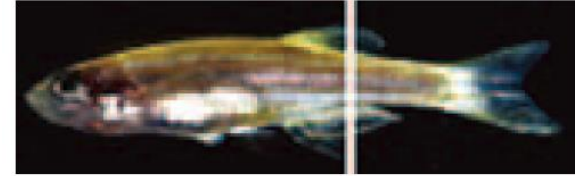
アテローム性動脈硬化  
IVPA 1200-1230 nm (lipid)

蛍光タンパク質 mCherry 585nm  
(transgenic adult zebrafish)

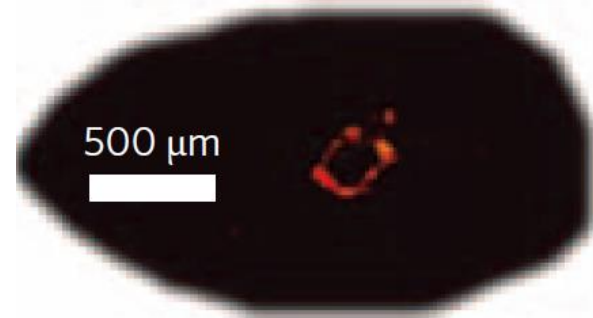
IVUS:白、IVPA(光音響):赤



Wang B et al, *Opt. Express* 18, 4889 (2010).



光音響像(脊索)

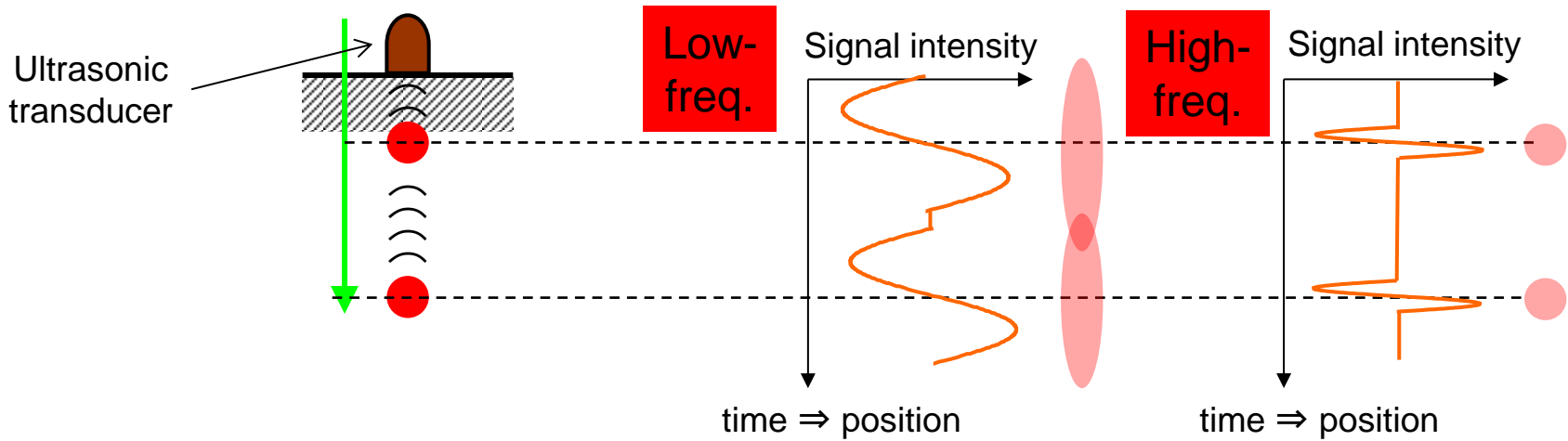


Razansky D et al, *Nature Photonics* 3, 412 (2009).

光音響イメージング  
(高コントラスト、深部観察)

低侵襲、簡便、造影剤を用いないイメージング  
(分子直接観察、機能観察による正確な診断)

# 光音響イメージングの空間分解能

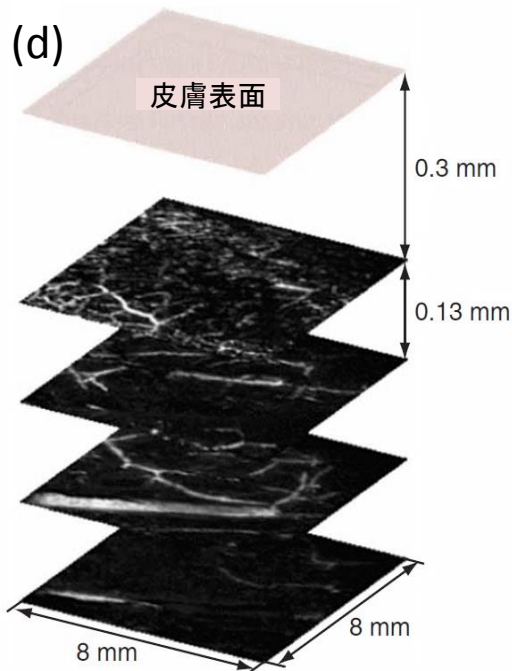
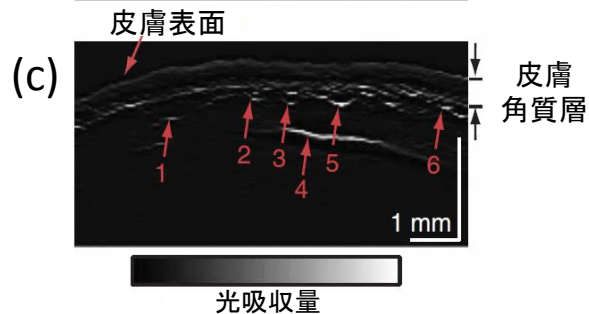
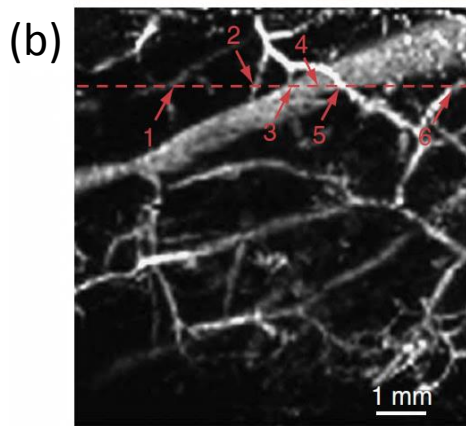
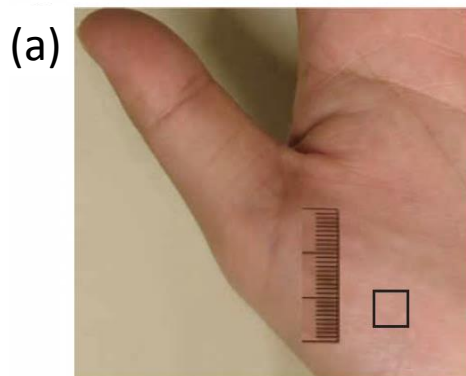


Ultrasonic frequency	Spatial resolution	Transmittance (skin 3mm)	Transmittance (brain 3mm)
1MHz	1.5mm	0.9	$\sim 1$
10MHz	150 $\mu$ m	0.6	0.69
100MHz	15 $\mu$ m	0.15	0.01
1GHz <b>high</b>	1.5 $\mu$ m <b>high</b>	$5 \times 10^{-4}$	$\sim 0$ <b>large</b>

Ref) Wang LV ed., *Photoacoustic Imaging and Spectroscopy*.

高周波光音響波 (生体伝搬距離：短い)  
 $\Rightarrow$  高い分解能を保ったまま深部観察が困難 !!

# 断面方向の情報を捉えることが困難



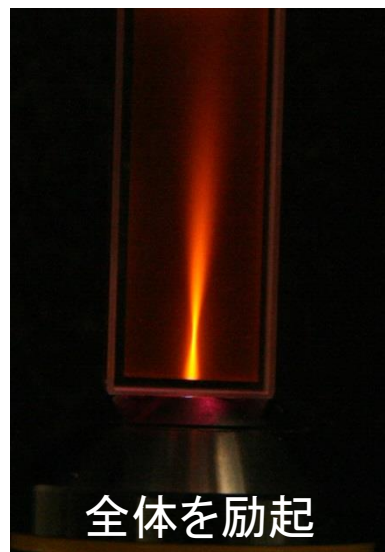
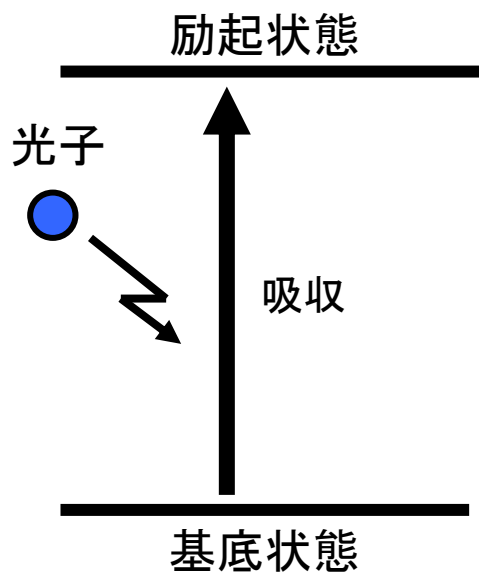
血管の断面を正確に捉えてはいない。

Ref) Zhang H.F., Maslov K., Stoica G., Wang L.V. (2006) Nat. Biotechnol. 24: 848-851.

# 2光子励起

## 1光子励起

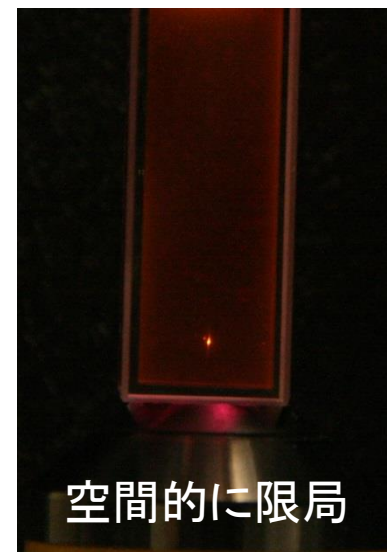
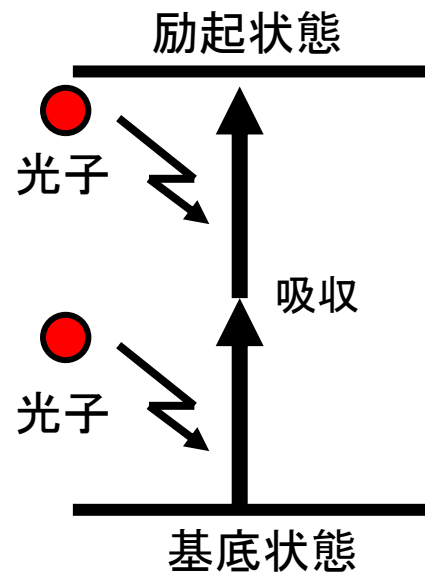
連続光  
(低い光子密度)



通常の吸収

## 2光子励起

超短パルスレーザー  
(高い光子密度)

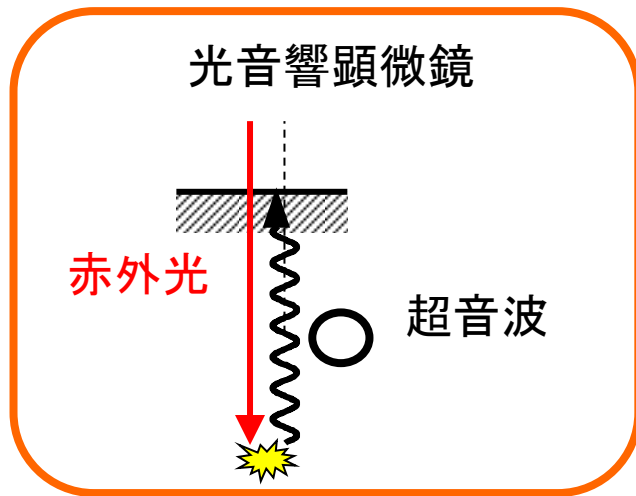


2個の光子の同時吸収

深さ分解能: 音響的  $\Rightarrow$  光学的分解能 (2光子吸収)  
高周波光音響波は必要でない !!

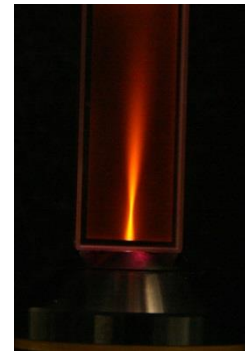
# 2光子光音響顕微鏡

Two-photon excitation-induced photoacoustic microscopy  
(TP-PAM)

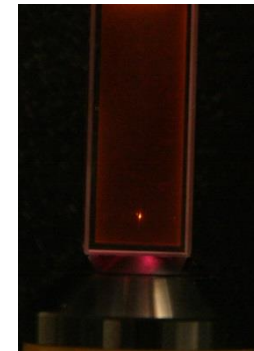


+

1光子励起



2光子励起



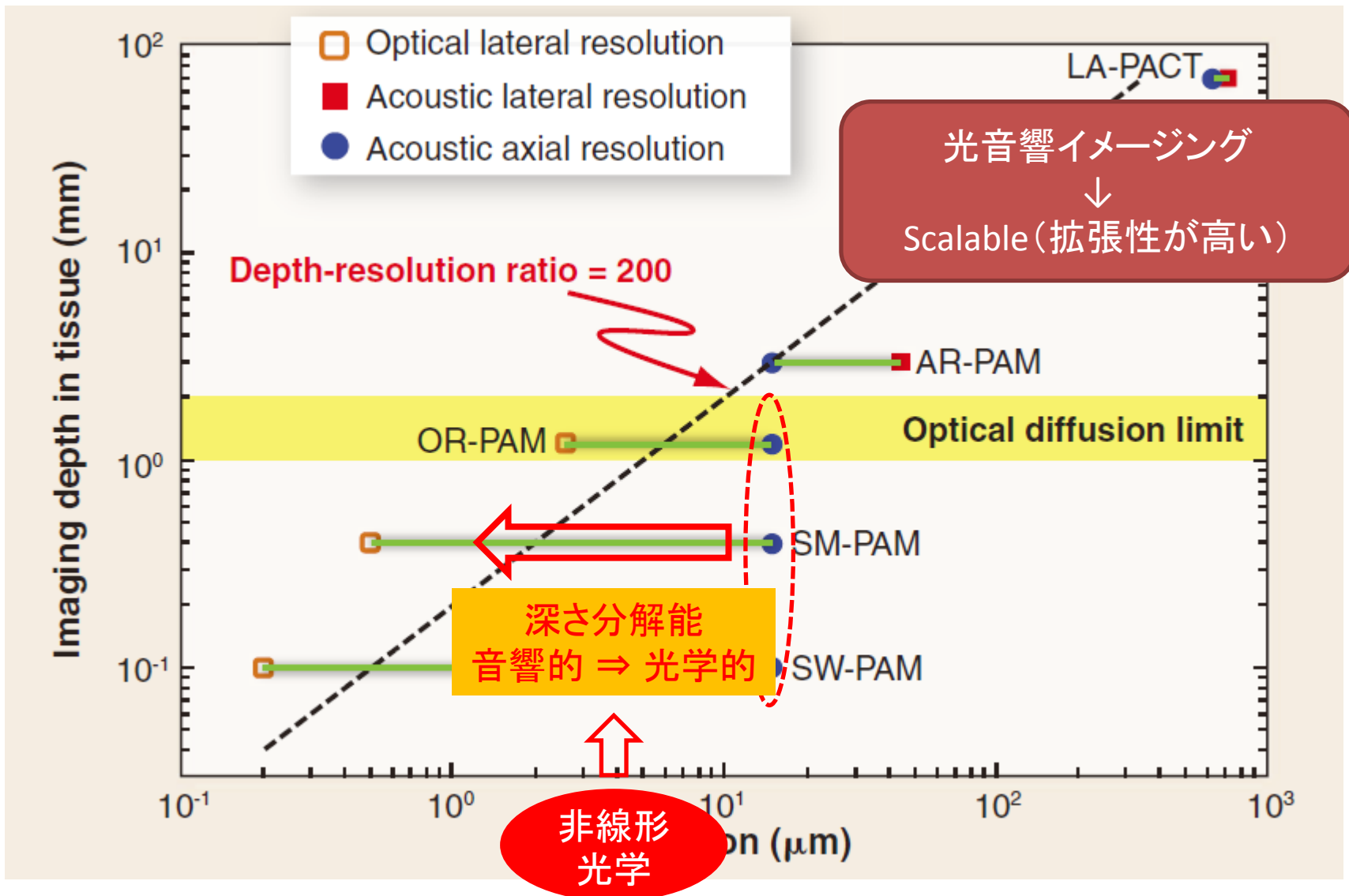
2光子励起

⇒

低周波光音響波の検出  
(音響的 ⇒ 光学的分解能)  
表面の信号を避けることができる

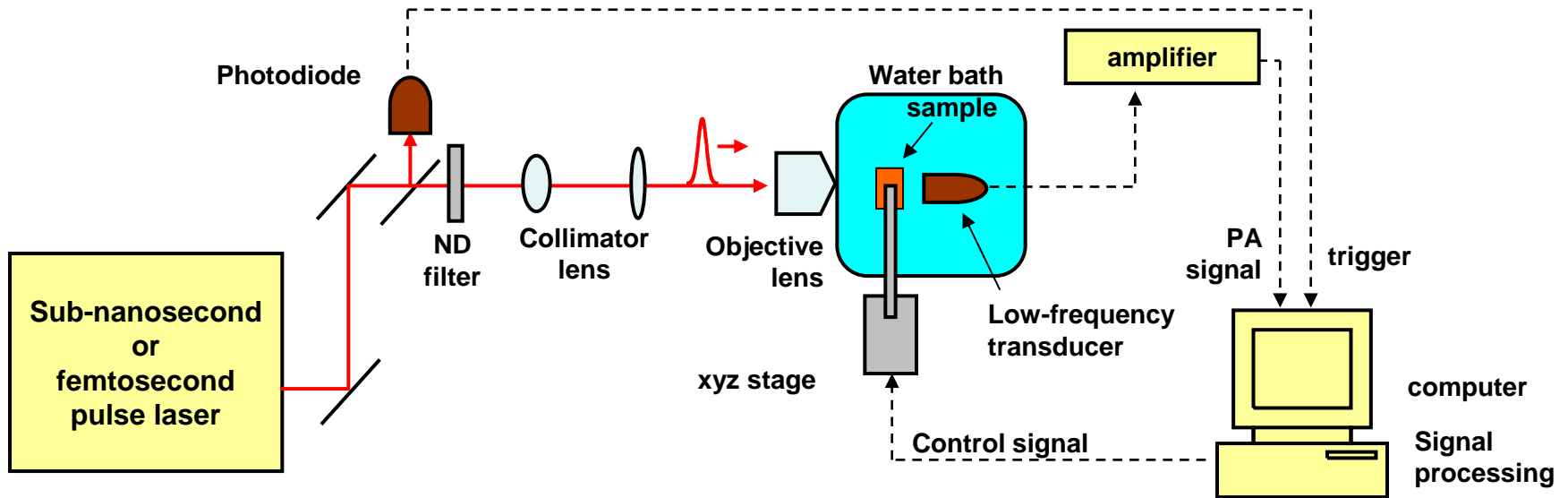
Yamaoka Y, et al, Opt. Express, 19: 13365 (2011).

Yamaoka Y, et al, Opt Express 22: 17063 (2014).



LA-PACT: Linear-array photoacoustic computed tomography, PAMac: Photoacoustic microscope  
 AR-PAM: Acoustic-resolution photoacoustic microscopy, OR-PAM: Optical-resolution PAM  
 SM-PAM: Submicrometer PAM, SW-PAM: Subwavelength PAM

# 2光子光音響顯微鏡裝置



1. LD-pumped microchip sub-ns pulse laser

wavelength: 1064 nm, pulse width: 0.6 ns, pulse energy: 4.3  $\mu$ J, repetition rate: 7.3 kHz

2. Femtosecond pulse laser

wavelength: 780 nm, pulse width: 250 fs - 7 ps, pulse energy: < 1 mJ, repetition rate: 1 kHz

**Low-frequency acoustic transducer** (resonance frequency: 10 MHz, bandwidth: 8 MHz, diameter: 6.4 mm, thickness: 0.2 mm, sample-transducer distance: 1.5 cm)

# 2光子光音響顕微鏡

いかに2光子励起による  
光音響波を抜き出すかが重要！

1. 周波数フィルタリング
2. 光音響画像差分法
3. 時間ゲート法

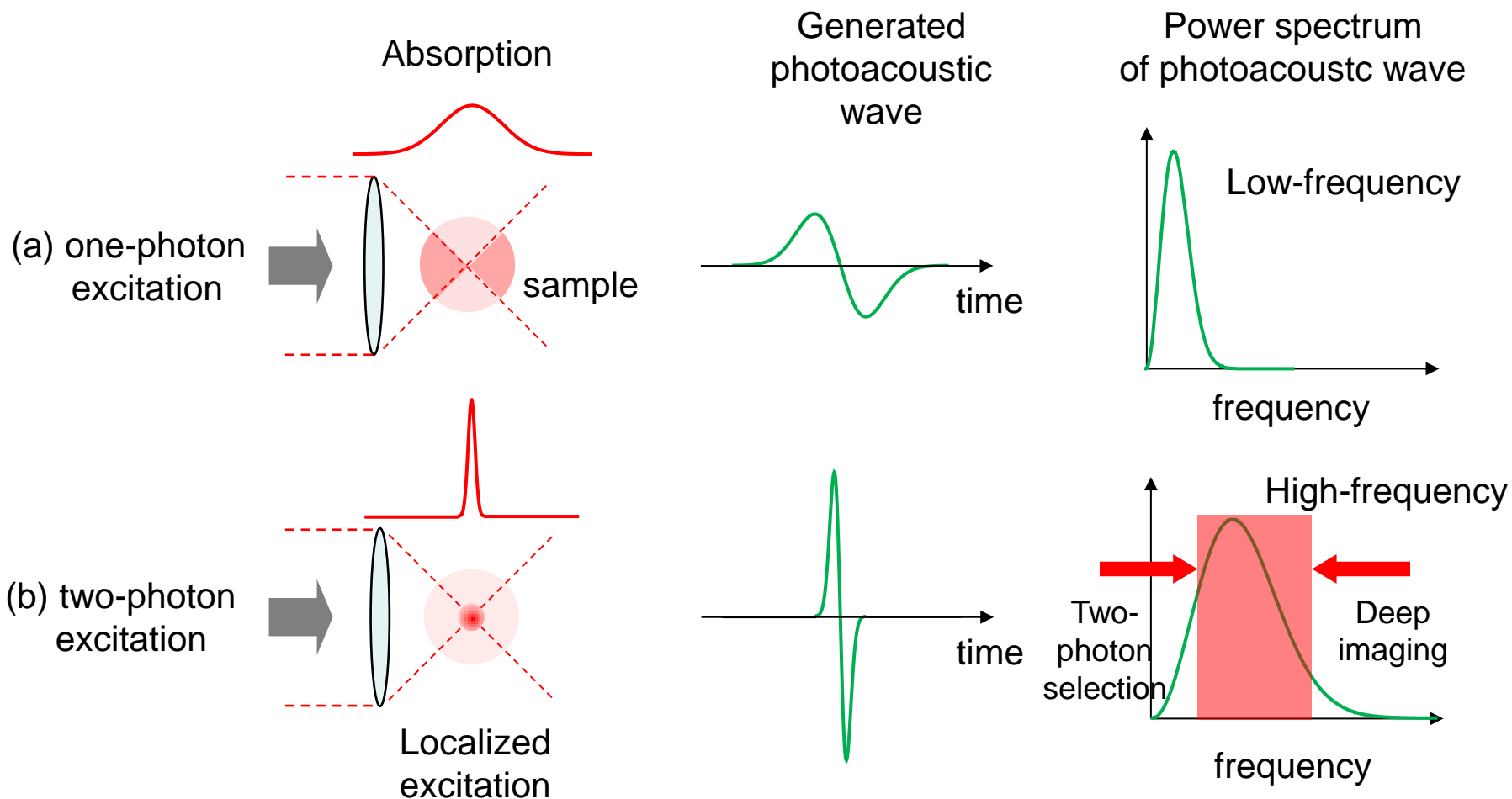


# 2光子光音響顕微鏡

いかに2光子励起による  
光音響波を抜き出すかが重要！

1. 周波数フィルタリング
2. 光音響画像差分法
3. 時間ゲート法

# 2光子光音響波の選択的検出 (音響波周波数フィルタリング)



**Low-frequency bandpass filtering**

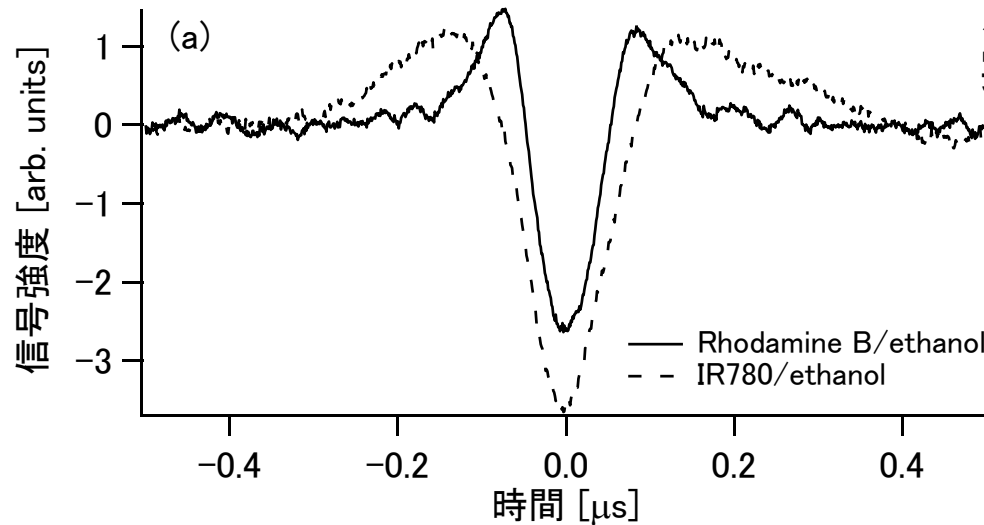
# 1光子と2光子光音響波の違い

1cm セル(真ん中に集光)

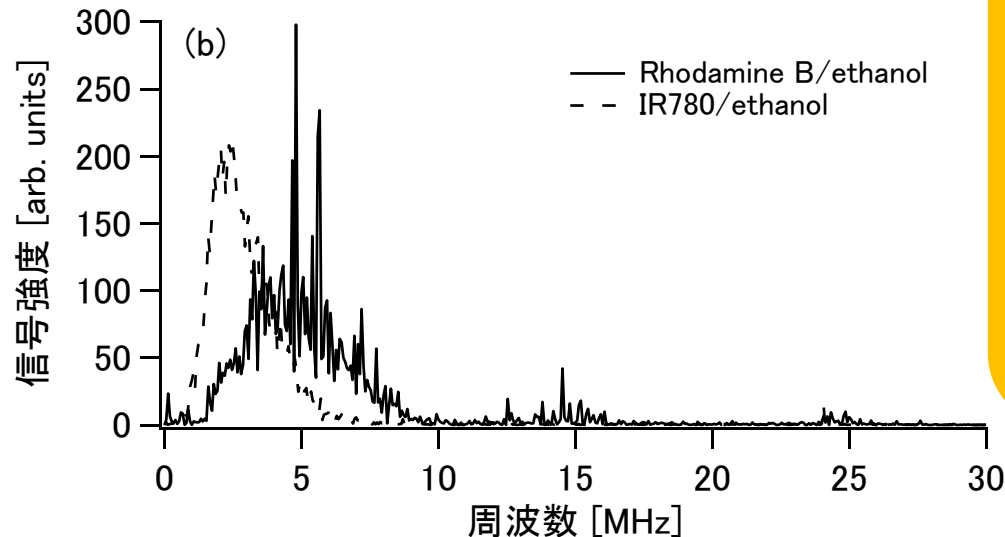
1光子吸収溶液

2光子吸収溶液

時間波形



パワースペクトル

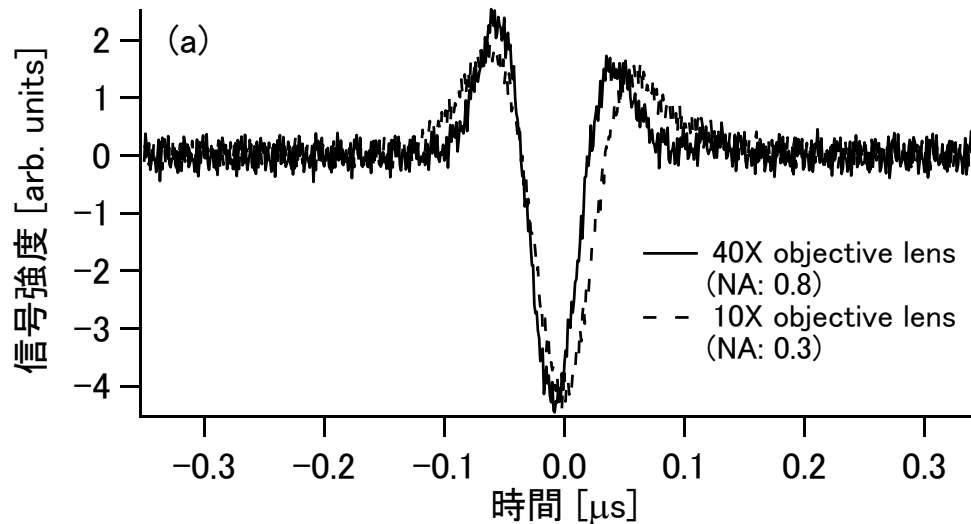


2光子光音響  
のほうが  
高周波成分  
が多い

2光子吸収の  
局所励起  
による

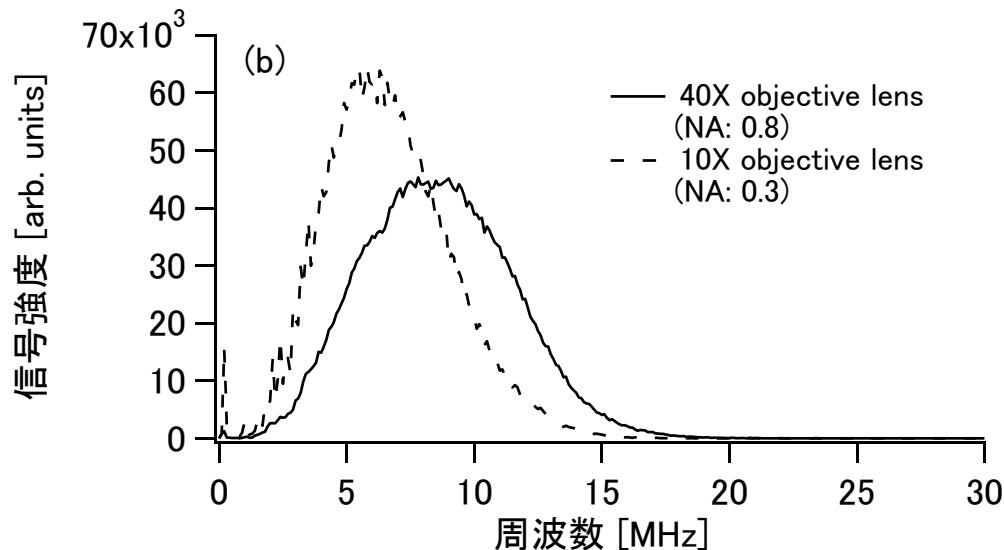
# 2光子光音響波の対物レンズ依存性

時間波形



点線: 10倍対物レンズ  
実線: 40倍対物レンズ

パワースペクトル



高倍の対物  
レンズ  
(高NA)

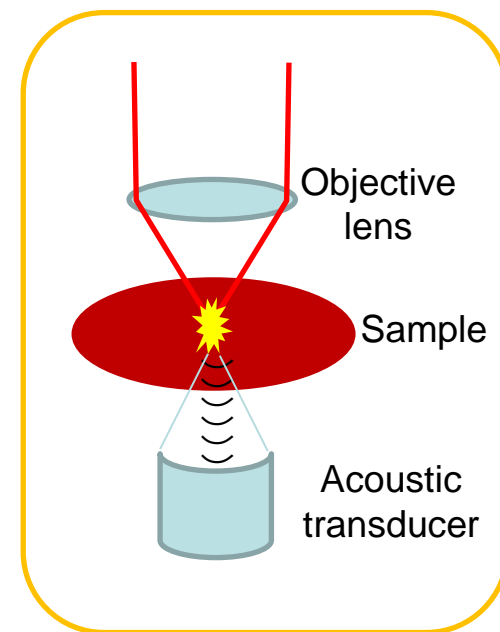
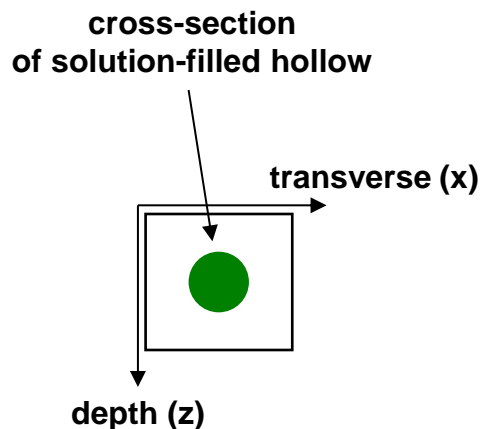
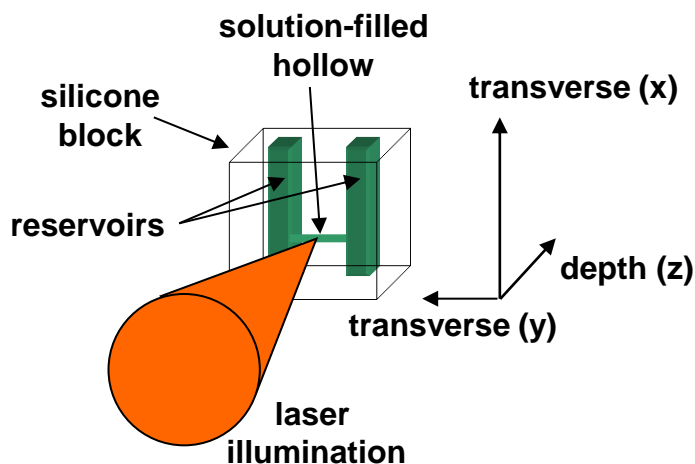


集光領域が  
小さい



高周波成分  
が多い

# テストターゲット (空間分解能の評価)

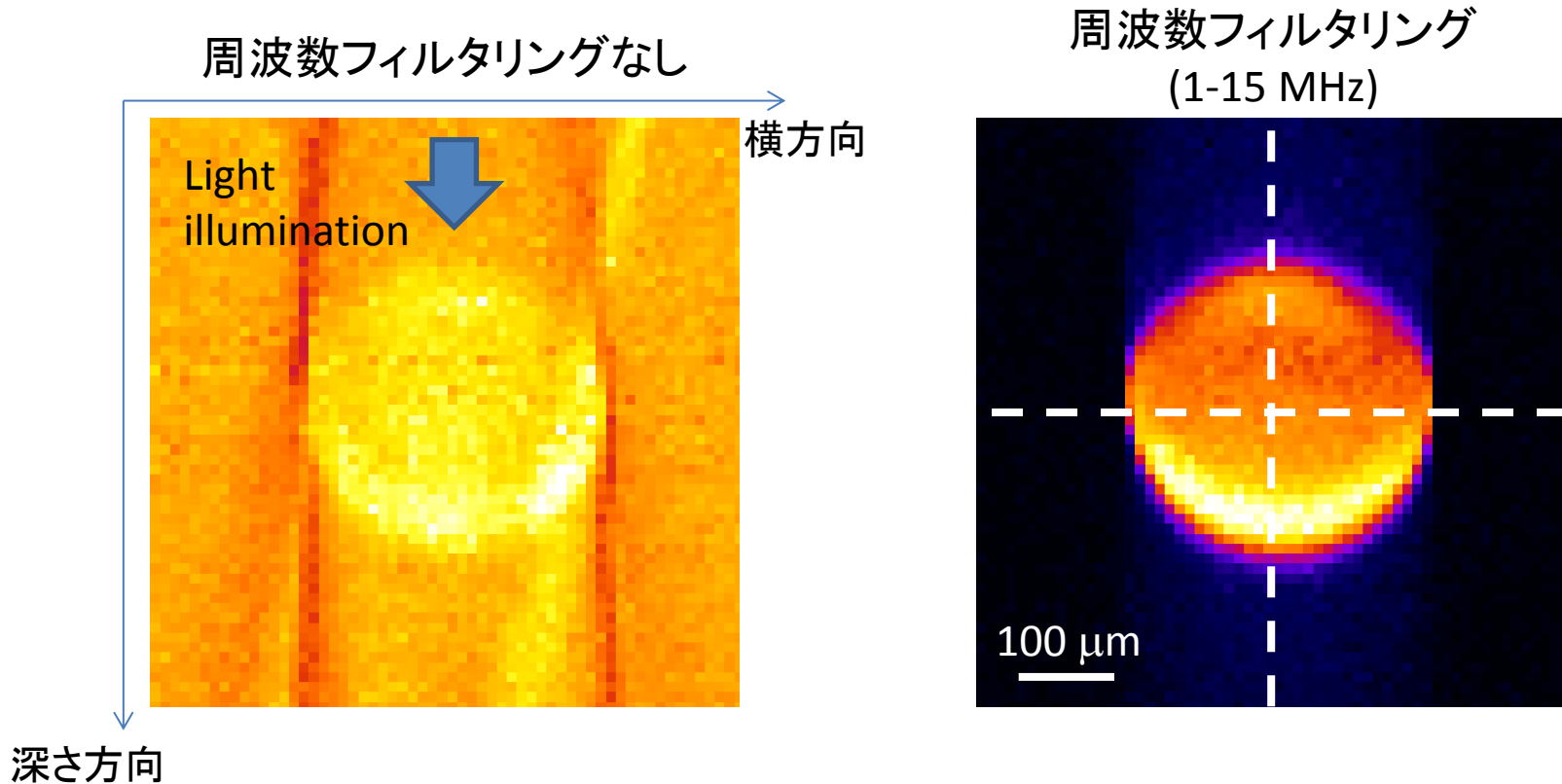


Silicone hollow (diameter :  $300\mu\text{m}$ ) filled with solutions

テスト溶液 : Rhodamine B/ethanol : Two-photon absorption (absorption peak :  $540\text{nm}$ )  
IRA980BT/ethanol : One-photon absorption

# 周波数フィルタリング

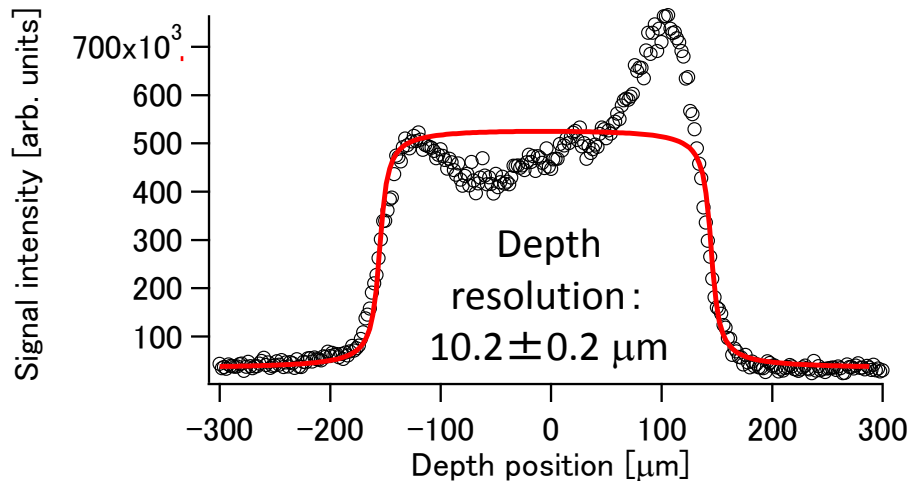
20X objective lens (NA:0.4)、1064nm、1.2 $\mu$ J、Rhodamine B/ethanol concentration 25mM



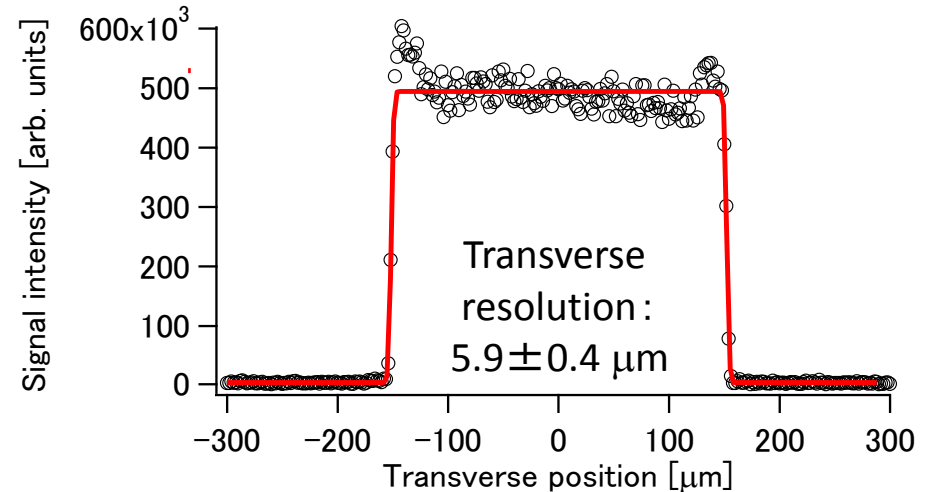
周波数フィルタリングにより2光子光音響波を選択的に検出

# 空間分解能の評価

深さプロファイル



横プロファイル



Assumption: Gaussian beam. Resolution is determined by FWHM.

Signal is proportional to the square of intensity.

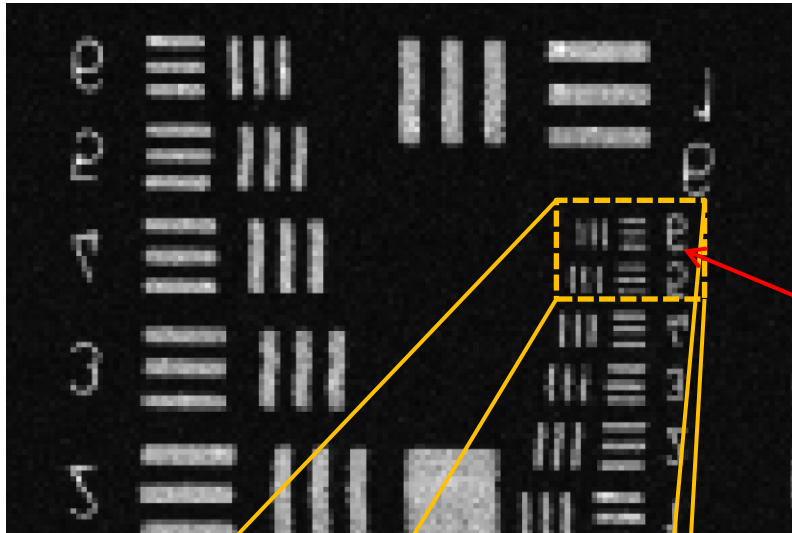
Theoretical value (20X objective lens (NA:0.4)、1064nm、FWHM)

depth resolution:  $10.8 \mu\text{m}$ 、transverse resolution:  $1.0 \mu\text{m}$

Ref) Nat Biotech 21,1369 (2003).

光音響波の高周波成分を使用せずに高空間分解能化(光学的分解能)

# 空間分解能評価



USAFテストターゲット  
20倍対物レンズ (NA:0.4)  
波長: 1064 nm、Fill factor > 1

Group 7 element 6  
Number of line pairs per mm : 228  
間隔 : 4.4  $\mu\text{m}$ 、MTF value : 0.8



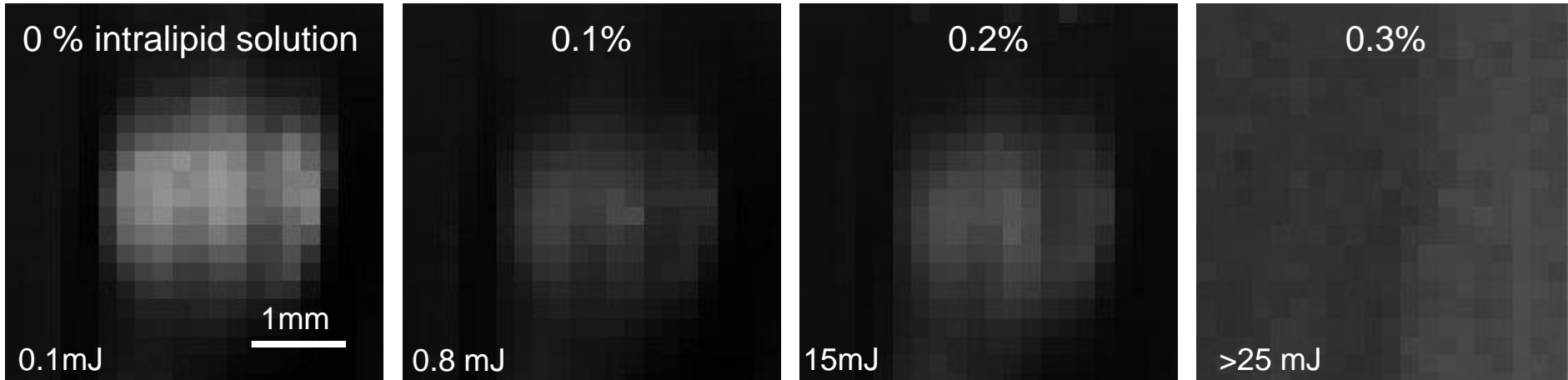
横分解能 : 1.9  $\mu\text{m}$

理論値 (FWHM) :  $\sqrt{2 \ln 2} \frac{0.320 \lambda}{NA} = 1.0 [\mu\text{m}]$   
Ref) Nat Biotech 21,1369 (2003).

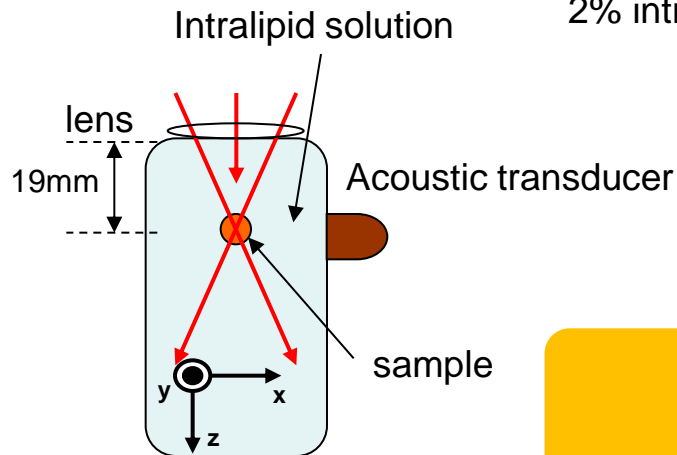
光学分解能を有する!



# 深達距離



Rhodamine B/chloroform (10.4 mM) in glass tube (inner: 2.4 mm, external: 3.0 mm)  
10X objective lens (NA : 0.25), 1-10 MHz frequency filtering  
2% intralipid solution provides suitable skin tissue phantom (ref. JBO 6, 167-176, 2001)



Intralipid solution 0.2–0.3% 19mm



Intralipid solution 2% 1.9–2.9 mm

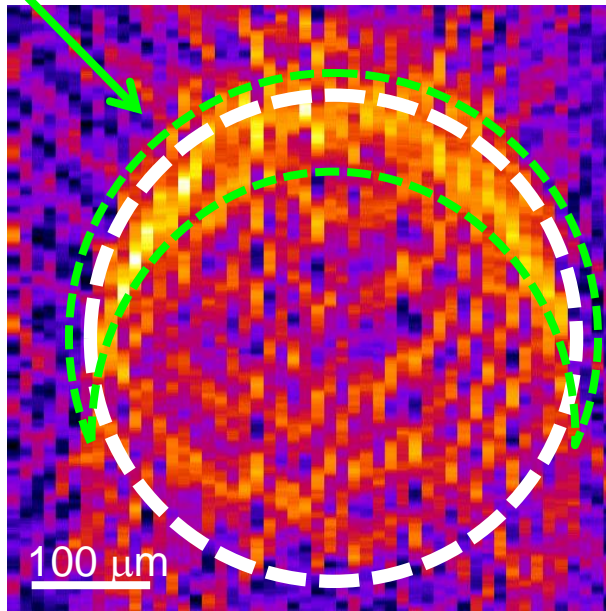
1.9 mm < 深達距離 < 2.9 mm

# 1光子と2光子光音響像の比較

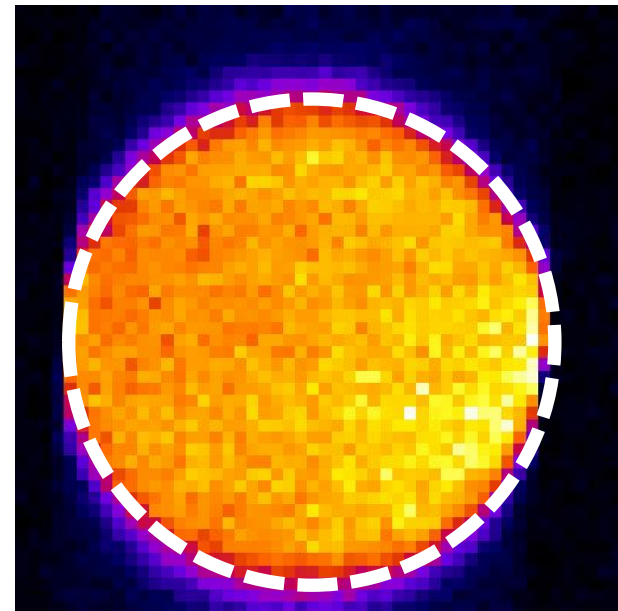
入射面の信号が強い

1光子光音響

2光子光音響



(IRA980BT/EtOH)



(Rhodamine B/EtOH)

時間 => 深さ

深さ 周波数フィルタリング(1-10MHz)  
(焦点位置)

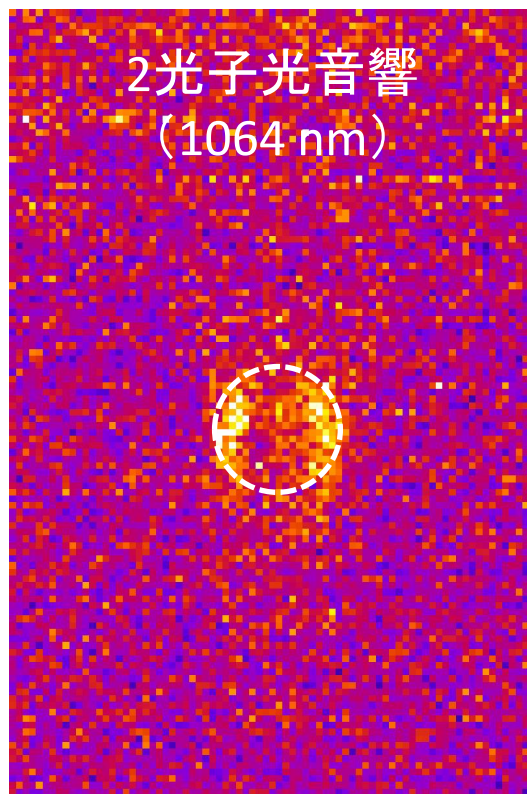
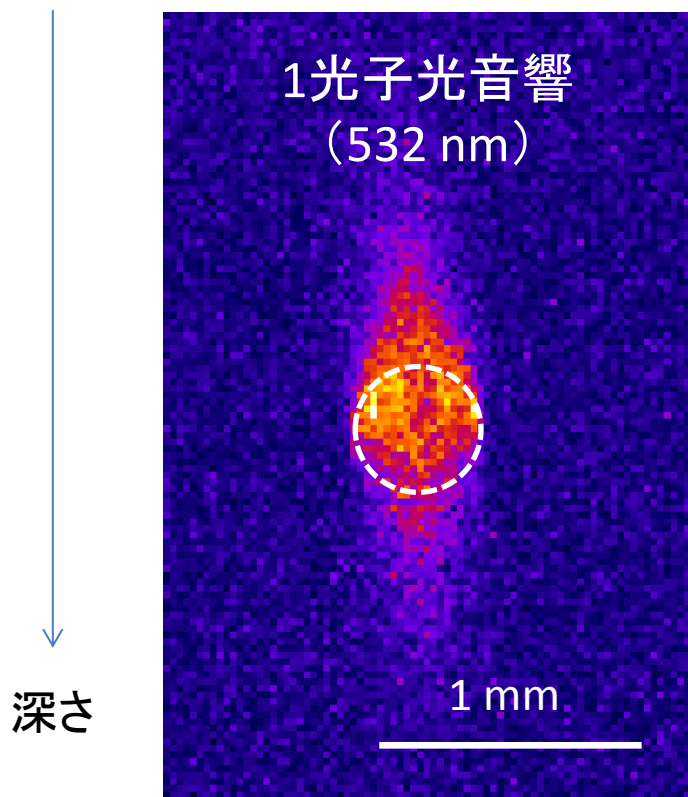
2光子光音響像: 正確な断面像測定が可能!!

# 循環血液の断面測定 (1光子と2光子との比較)

450 $\mu$ m直径のチューブ内を血液を循環。

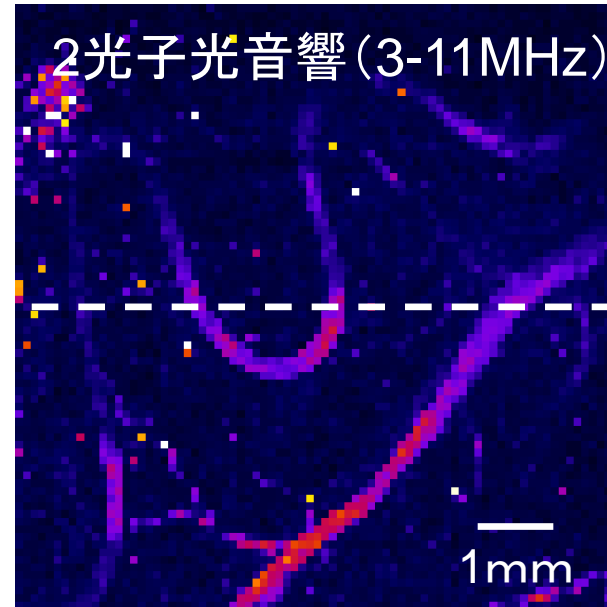
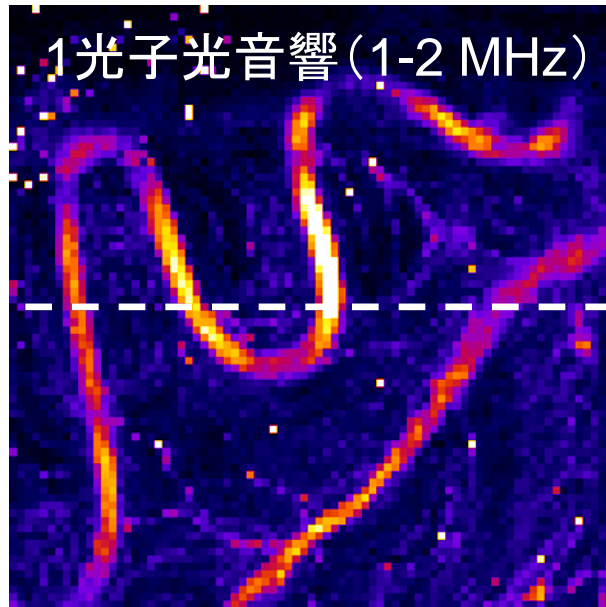
ヘモグロビンの2光子吸収断面積は非常に大きい( $\sigma_{\text{TPA}} = \sim 10^2 \text{ GM}$ ) (J. Chem. Phys. 126, 025102 (2007).)

1064nm励起、40X水浸対物レンズ (NA:0.8)、周波数フィルタリング (3-11MHz)

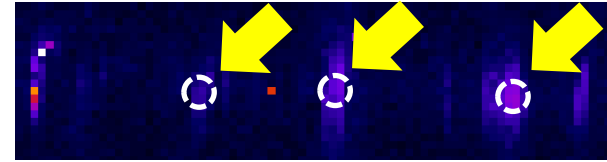
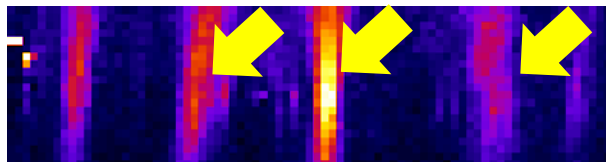


2光子光音響  
による  
深さ識別能  
の向上

# ラット精巣血管像



xy平面像



断面像

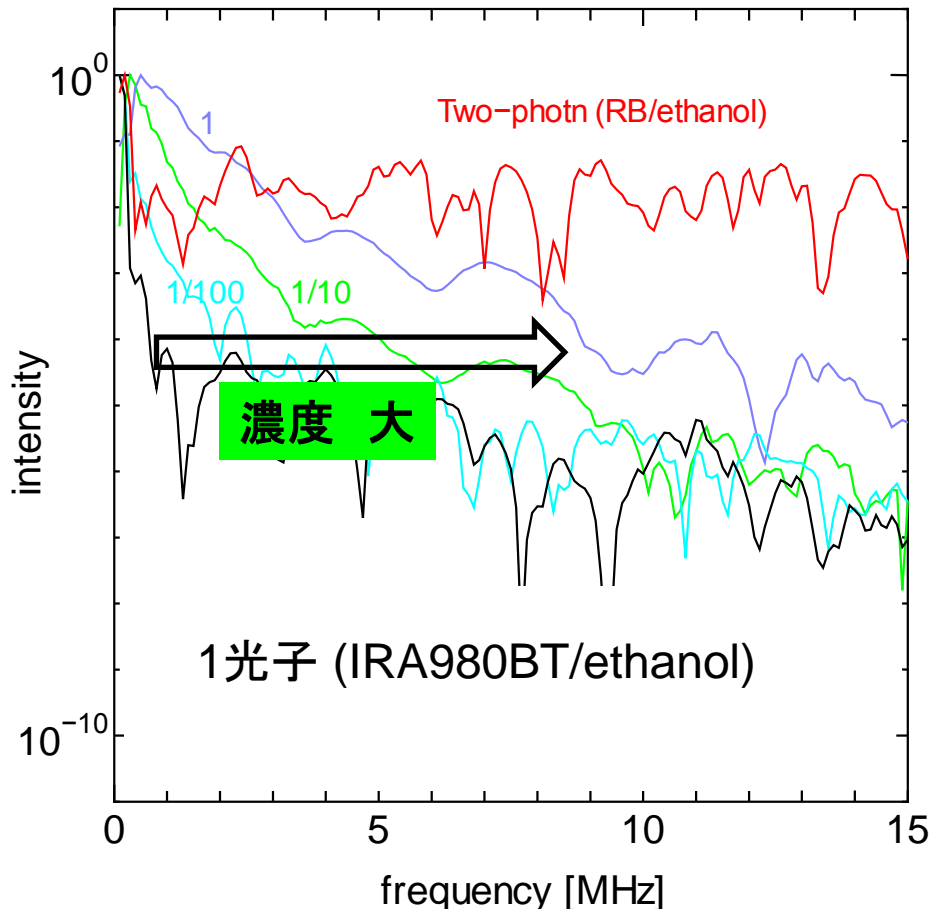
周波数フィルタリングによる2光子励起光音響



ボケの少ない**高空間分解スライス像**！

## 2. パルス幅の異なる 2つの超短光パルスを用いた 光音響画像差分法

# 周波数フィルタリング法の問題点



1064nm

2光子光音響  
吸収領域 小

↓  
高周波成分 増加

1光子と2光子光音響波を  
区別することが可能

1光子光音響波  
濃度 大

↓  
吸収領域 小

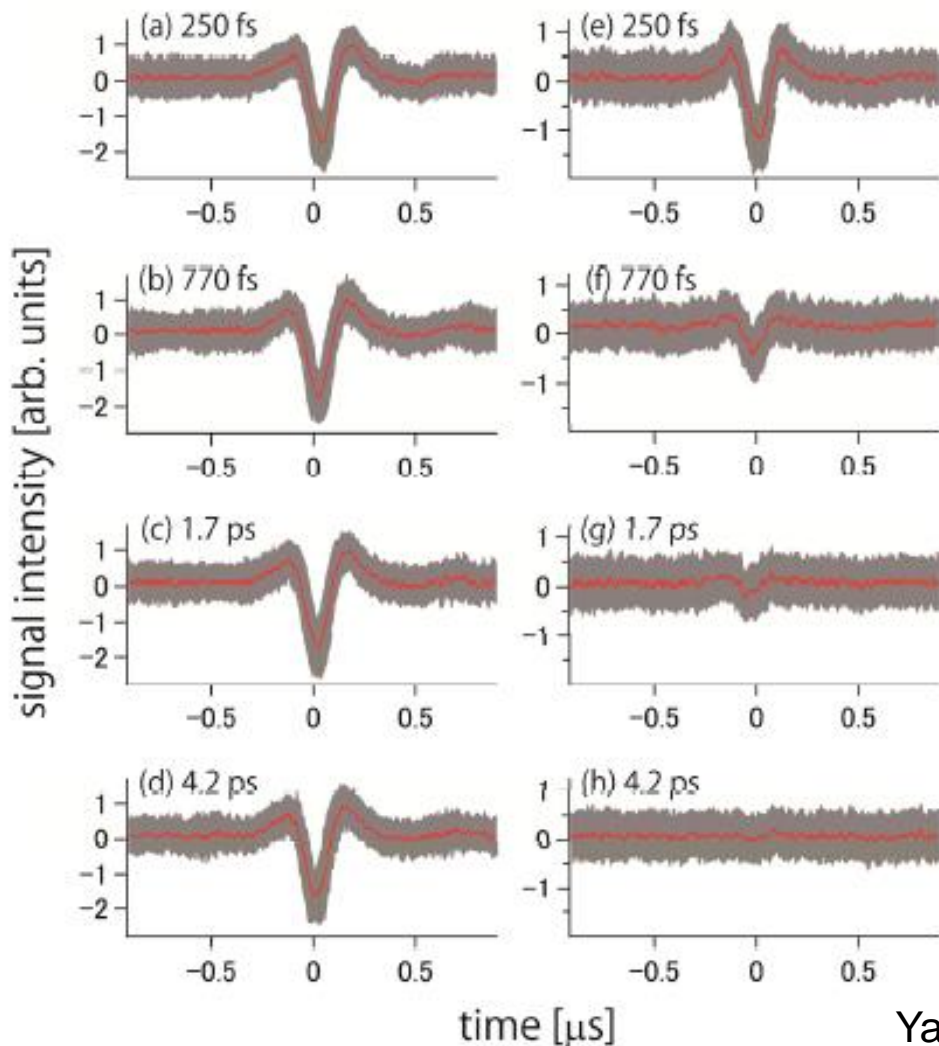
↓  
高周波成分 増加

しかしながら、1光子  
光音響波は濃度に依存  
(高濃度物質から発生する  
1光子光音響波を分けることが困難)

# 1光子、2光子光音響波の パルス幅依存性

1光子光音響波

2光子光音響波



パルスエネルギー:一定

パルス幅  
大

1光子光音響波

変化なし

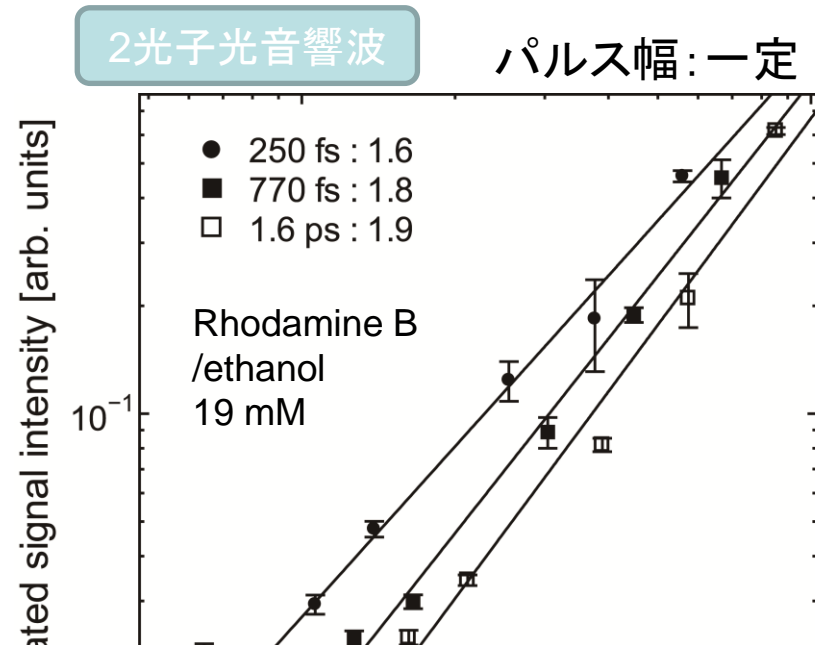
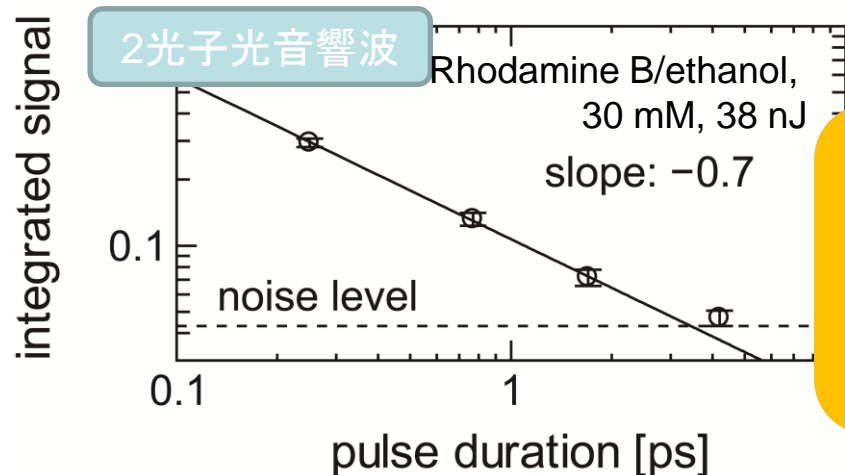
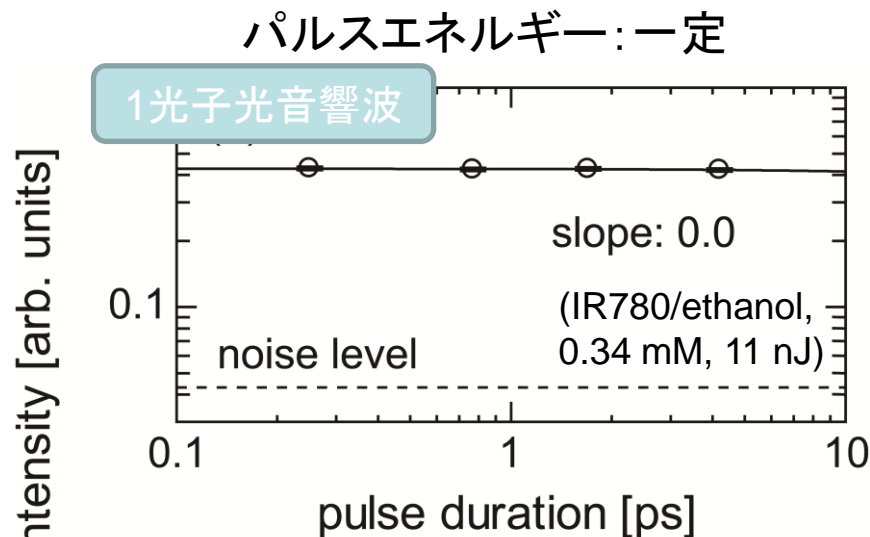
2光子光音響波

パルス幅 大

↓  
信号 小

# 2光子光音響波のパルス幅依存性

## パルスエネルギー依存性

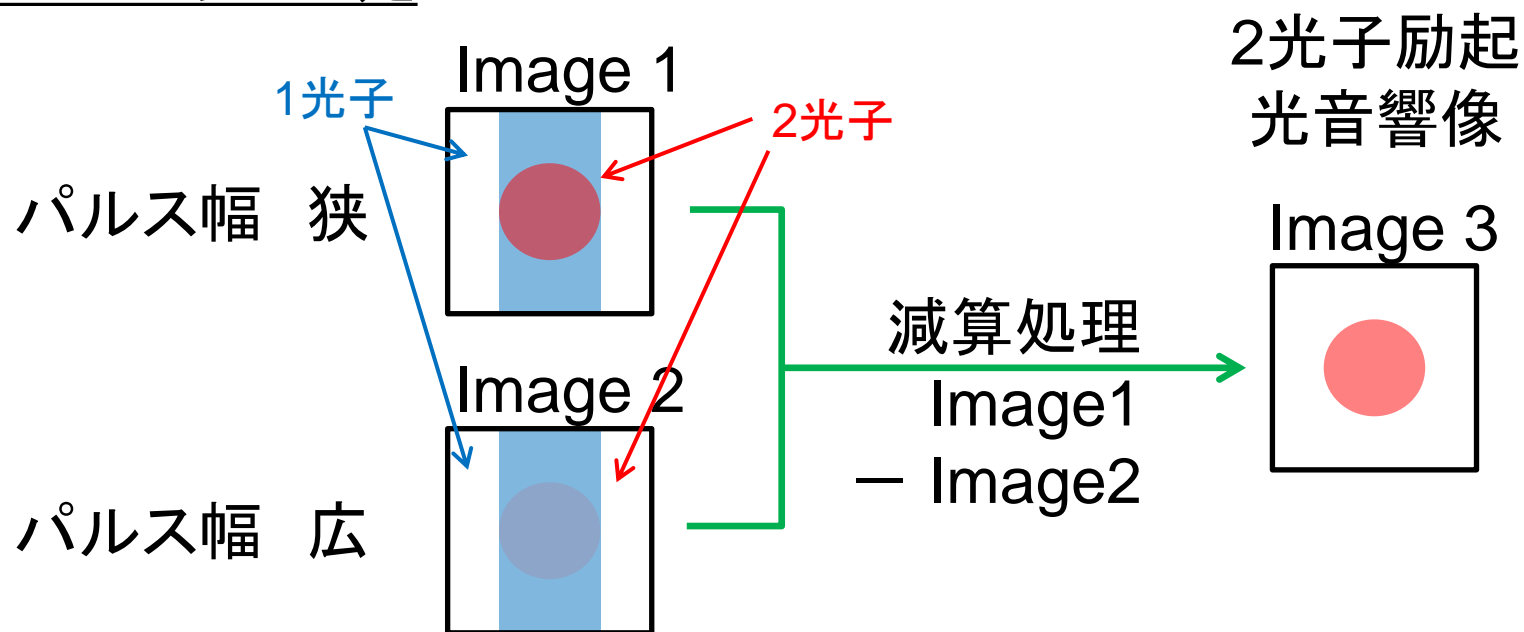


2光子光音響波  
2光子蛍光と同様の振る舞い  
↓  
2光子吸収量に比例



# 2光子励起光音響信号の抽出

エネルギー一定



パルス幅の異なる2つの超短光パルスを用いた  
光音響画像差分法

✓ 単純な減算処理

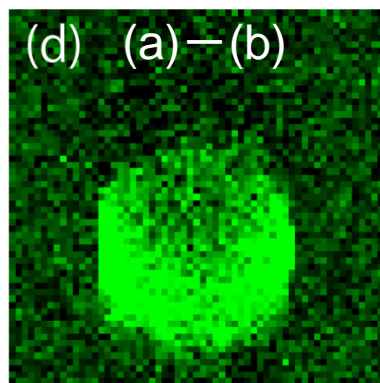
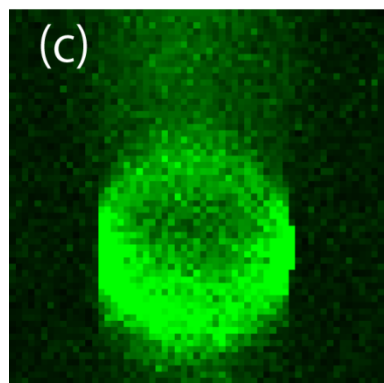
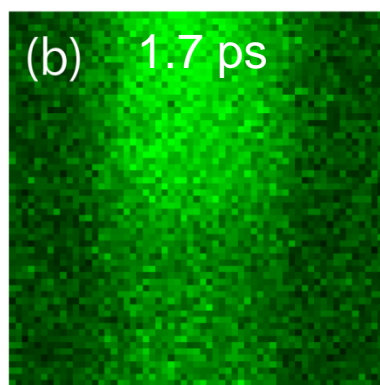
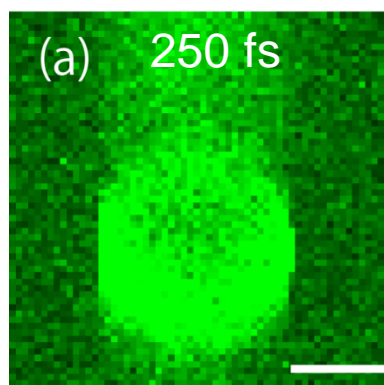
# 超短光パルスを用いた光音響画像差分法

エネルギー一定

1光子と2光子吸収色素混合溶液

1光子 (IR780/ethanol, 0.14mM)

2光子 (Rhodamine B/ethanol, 30mM)

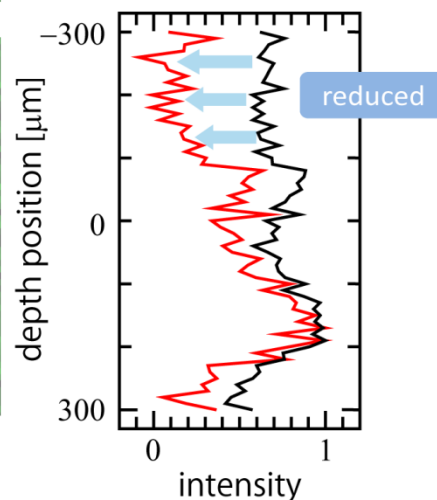


(c) 従来法  
周波数  
フィルタリング  
(3-15MHz)

(d) 超短光パルス  
による  
光音響画像減算法

lateral  
depth

(e)

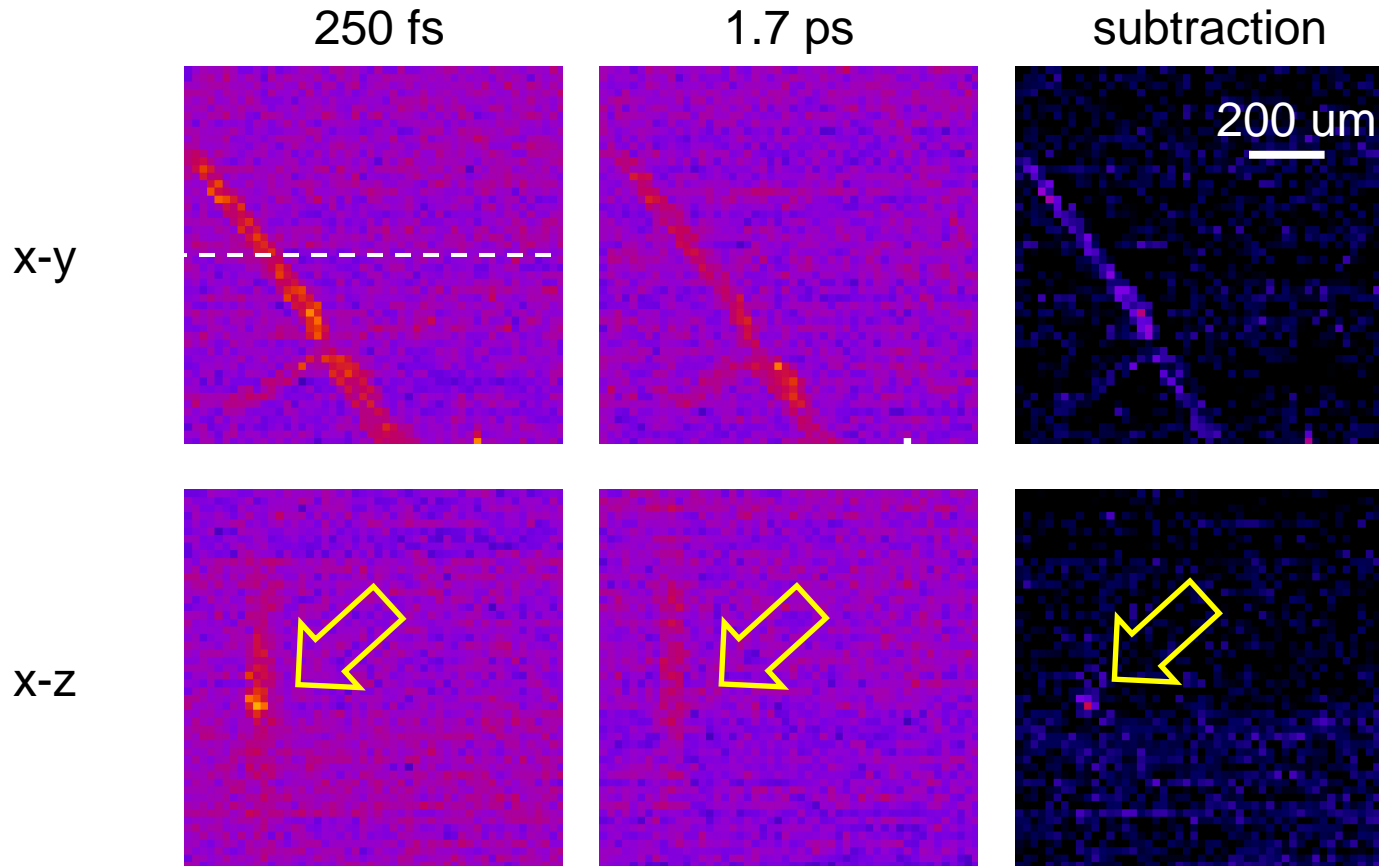


超短光パルスを用いた  
光音響画像差分法



2光子励起  
光音響波を  
選択的に検出  
(コントラスト向上)

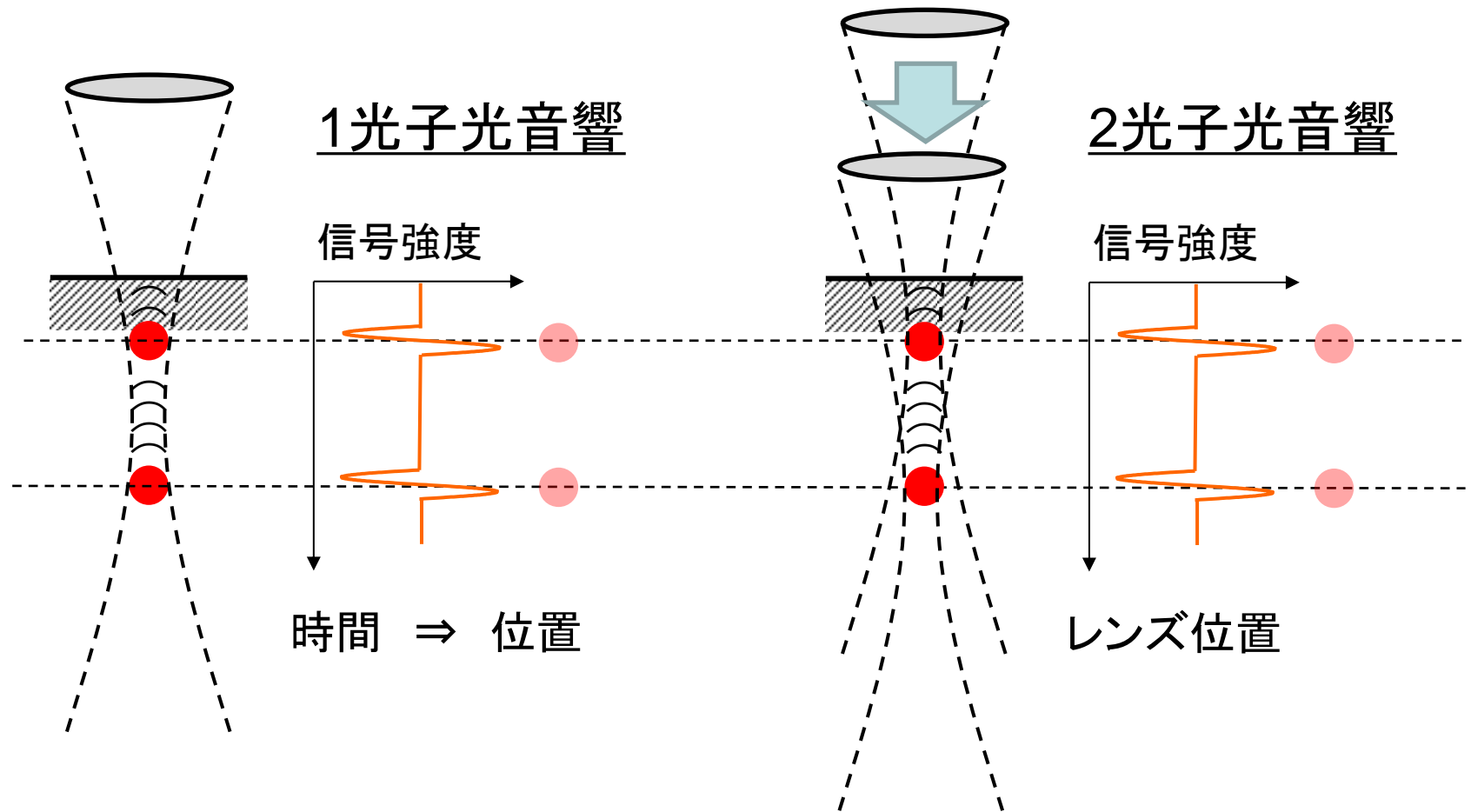
# 光音響像差分法(ラット精巣血管)



差分法により  
正確に  
断面を  
捉えられる。

38nJ, 10X Olympus Objective lens,  
1KHz, 10MHz focus transducer,  
LPF < 20MHz, 100 averaging

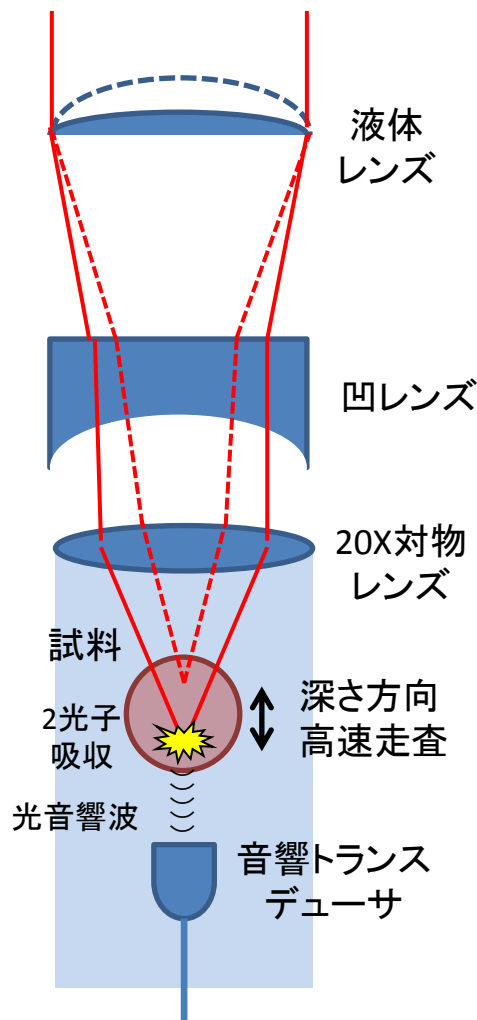
# 2光子光音響イメージングの速度



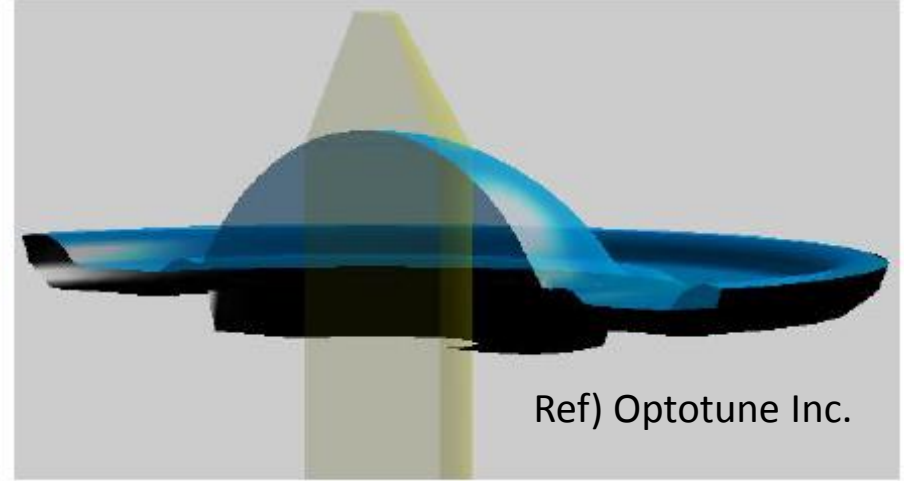
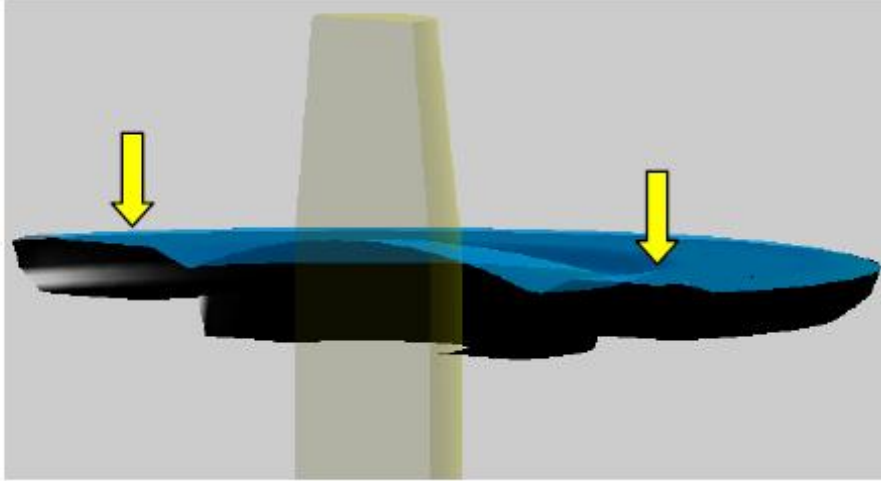
画像化するためには3次元のレーザー走査が必要 ⇒ 測定時間 長

焦点可変液体レンズによる2光子光音響顕微鏡の高速化

# 焦点可変液体レンズを用いた光学系



# 焦点可変液体レンズ



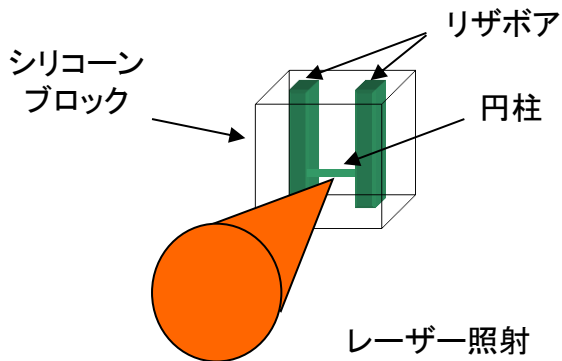
EL-10-30-NIR-LD  
(Optotune Inc.)

焦点距離: 50~125 mm

電流値により**焦点距離を高速に制御**

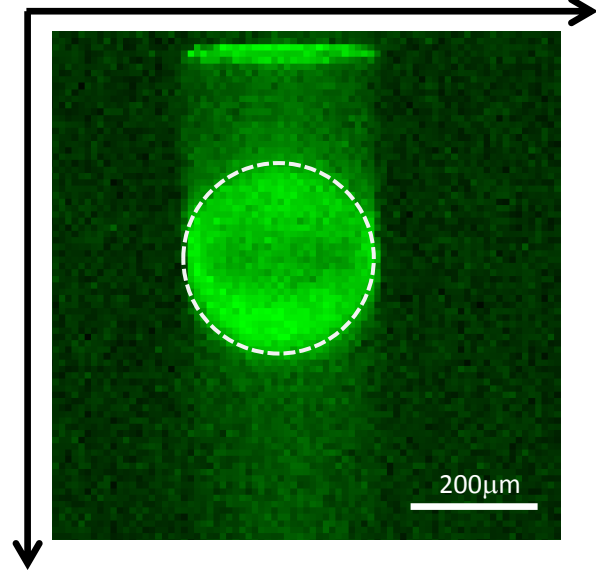
# 300 $\mu\text{m}$ 円柱断面

(Rhodamine B/ethanol 21mM)

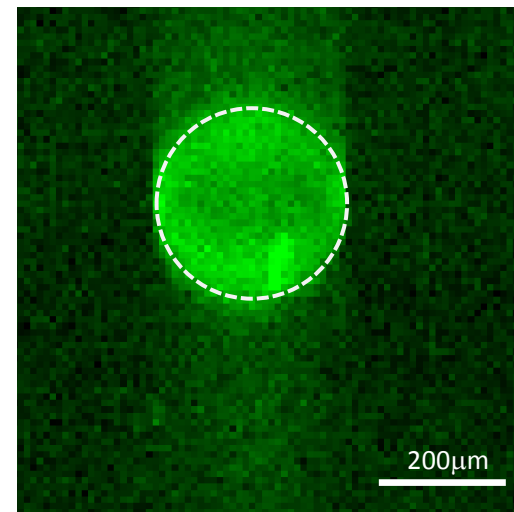


## 液体レンズ

横方向



## ステッピング モーター



	画像取得時間 (80X80 10 $\mu\text{m}$ step)
ステッピング モーター	1300 s
液体レンズ	66 s

波長:1064 nm, パルス幅:0.6ns, 繰り返し:7.3 kHz  
10MHz音響トランスデューサ, 45dB増幅, 10回平均

焦点可変液体レンズ使用による**約20倍**のイメージング**速度向上**  
(ほぼ同等の空間分解能)

# まとめ

- 2光子吸収を融合させた光音響イメージング技術を開発
  - 高周波光音響波を用いず光学的深さ分解能
  - 断面を正確に捉えることが可能
  - 2光子光音響波の選択検出  
(周波数フィルタリング、光音響像差分法)
  - 液体レンズによる画像取得速度高速化



# 謝辞

- 京都府立医科大学  
高松哲郎特任教授(医学フオトニクス講座)  
田中秀央教授、原田義規准教授(細胞分子機能病理学講座)  
戴平准教授(細胞再生医学講座)
- 京都大学  
三浦清貴教授、坂倉政明准教授
- 徳島大学  
南川丈夫特任講師
- 寺崎電気産業株式会社
- 科学研究費補助金、公益財団法人村田学術振興財団研究助成  
京都発革新的医療技術研究開発助成