

総 説

光音響イメージング法の外傷学分野における応用

佐藤俊一, 角井泰之, 川内聡子, 齋藤大蔵*

防医大誌 (2017) 42 (3) : 105-118

要旨: 生体組織に短パルス光 (放出持続時間の短い光) を照射すると, 組織中の光吸収体が光を吸収して断熱膨張を起し, 光音響波と呼ばれる超音波を発生する。その光音響波を組織表面で検出することにより, 当該光吸収体の濃度 (体積密度) の深さ分布を無染色, 無標識で画像化することが可能であり, これを光音響イメージング法という。著者らは外傷学分野を中心に, 同法の様々な応用技術について検討してきた。本論文では, 光音響イメージング法の原理, 特徴, 装置構成等について概説した後, 熱傷深度診断, 異常ヘモグロビンの検出, 移植皮膚の生着モニタリング, 浮腫の診断 (水分の分布イメージング), 血清アルブミンの分布計測等への応用を目的とした動物実験に基づいた検討について述べる。また新たな研究の展開として, 熱傷深度診断の臨床応用のためのトランスレーショナル・リサーチ, 移植組織中の血管網を評価するための高分解能化の検討, 光音響イメージングとフォトメカニカル波による薬剤輸送技術を組み合わせたセラノスティックス (診断・治療一体型技術) のためのシステム開発についても紹介する。

索引用語: 光音響イメージング法 / 外傷学 / 熱傷深度診断 / 異常ヘモグロビン / 皮膚移植 / 生着モニタリング / アルブミン / トランスレーショナル・リサーチ / 高分解能化 / セラノスティックス

緒 言

生体組織に光を照射すると, 組織中の光吸収体 (例えば血液) が吸収して温度上昇し, 体積膨張により応力波 (熱弾性波) が発生する。この現象を光音響効果 (photoacoustic effect), 発生する波を光音響波 (photoacoustic wave)*¹ と呼ぶ。光照射時間 (τ_p) を, 発生する応力が散逸する時間 (τ_{str}) より十分に短くすると膨張は断熱的に起き (応力閉じ込め条件: $\tau_p \ll \tau_{str}$)*², 効率よく光音響波が発生する (図1)。

*¹ 音響波と言っても耳で聞こえるわけではなく, その実体は広帯域の (広い周波数成分を持つ) 超音波である。photoacousticはoptoacousticとも言う。日本語では光超音波と言うこともあるが, 学術的には一般的でない。

*² 厳密には, 光照射時間を発生する熱の散逸時間よりも短くする必要がある。

生体組織中の代表的な光吸収体 (chromophore) であるヘモグロビンの場合, 光照射時間 (τ_p) がナノ秒オーダー (およそ 10^{-7} 秒以下) の光がその条件を満たす。発生した光音響波を組織の表面ないし裏面で検出すると, その伝搬時間から光吸収体の深度を, また信号の振幅ピークないし減衰波形より吸収係数, 従って光吸収体の濃度 (体積密度) を知ることができる (原理の詳細はp.106で述べる)。すなわち光吸収体の濃度の深さ分布を無染色, 無標識で画像化することが可能であり, これを光音響イメージング (photoacoustic imaging, PAI) 法, 光音響断層イメージング (photoacoustic tomography, PAT) 法などという。

防衛医科大学校防衛医学研究センター生体情報・治療システム研究部門

Division of Bioinformation and Therapeutic Systems, National Defense Medical College Research Institute, National Defense Medical College, Tokorozawa, Saitama 359-8513, Japan

*防衛医科大学校防衛医学研究センター外傷研究部門

Division of Traumatology, National Defense Medical College Research Institute, National Defense Medical College, Tokorozawa, Saitama 359-8513, Japan

平成29年6月5日受付

平成29年6月29日受理

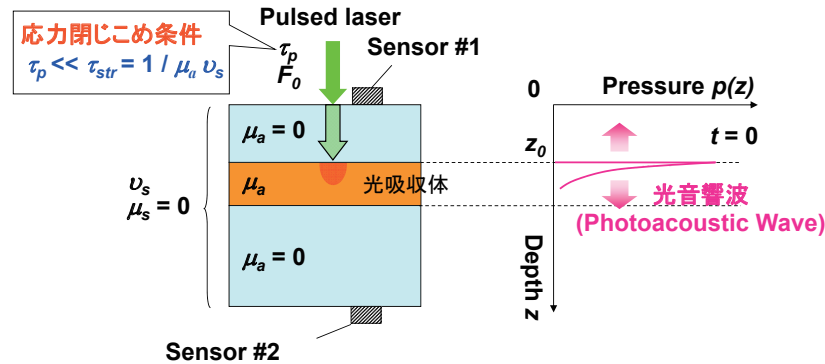


図1. 光音響（断層）イメージング法の原理

歴史的には、光音響効果は電話の発明で有名なBellにより発見された（1880年に報告¹⁾）。Bellは光無線通信の受信器への応用を意図して装置の開発を行い、自身最大の発明と自負していたとされる。しかし研究は違う方向に進み、20世紀半ばころより気体や固体の分光分析法として発展した。生体応用が本格的に始まったのは今世紀に入ってからであり、特に2003年、Wangらが*in vivo*においてラットの脳血管を頭皮の上から画像化²⁾、さらに神経刺激に伴う血行動態の変化をリアルタイムで捉えた結果を報告した頃より研究が急速に活発化した。アメリカ国立図書館が運用するデータベースPubMedによると、2016年の「photoacoustic」をキーワードとする論文数は450件超、2017年はそれ以上のペースで発行されており、精力的な研究開発競争が繰り広げられている。

著者らは2000年頃、新しい熱傷深度診断法を模索する中で光音響イメージング法の応用を着想した。その後、同法を異常ヘモグロビンの検出、移植皮膚の生着モニタリング、浮腫の診断、血清アルブミン分布のイメージングなど、外傷学分野を中心に応用研究を進めてきた。本稿では、同イメージング法の原理、特徴、装置構成等の基本事項について概説した後、上記各種応用のための検討について紹介するとともに、研究の新しい展開について述べる。

光音響イメージング法の原理、特性、装置

図1において組織の深さ方向の座標を z とし、深度 z_0 に光吸収係数 μ_a の吸収体があるとする。組織表面に上記応力閉じ込め条件を満たすエネ

ルギー密度 F_0 のパルス光を照射したときに発生する光音響波 $p(z)$ は、組織の光散乱を無視すると（散乱係数 $\mu_s=0$ ）次式で表される。

$$p(z) = \Gamma \mu_a F_0 \exp(-\mu_a z) \quad (1)$$

$$\Gamma = \frac{\beta v_s^2}{c_p} \quad (2)$$

ここで Γ はグリュナイゼン係数と呼ばれ、照射光のエネルギーが音響波（応力波）のエネルギーへ変換される効率を表す。また β は体積膨張率、 v_s は音速、 c_p は定圧比熱を表す。光音響波を組織表面ないし裏面で観測すると、その伝搬時間より吸収体の深度 z_0 が、また $p(z)$ の振幅ピークないし減衰波形より μ_a が求められ、 μ_a は吸収体の濃度に比例することから吸収体の濃度を知ることができる。このように、光音響イメージング法は光吸収をコントラストメカニズム（画像化原理）とする深さ分解画像化法である。

図2に生体組織中の代表的な光吸収体の吸収スペクトルを示す。光音響イメージング法が成立するためには、観測したい吸収体に光が選択的に吸収されなければならない。例えば、可視域においてはヘモグロビンの吸収係数が組織中の他の吸収体よりも著しく大きいため、高コントラストのイメージングが可能である。また観測したい組織中に同じ波長の光に対して同程度の吸収を示す吸収体が複数存在しても、それらの存在深度が異なれば信号の分離は可能である。皮膚のメラニンとヘモグロビンなどがその例に該当する。また、目的とする観測対象に光を選択的に吸収させることができない場合でも、適当な光吸収体で標識することにより観測できる場合もある。

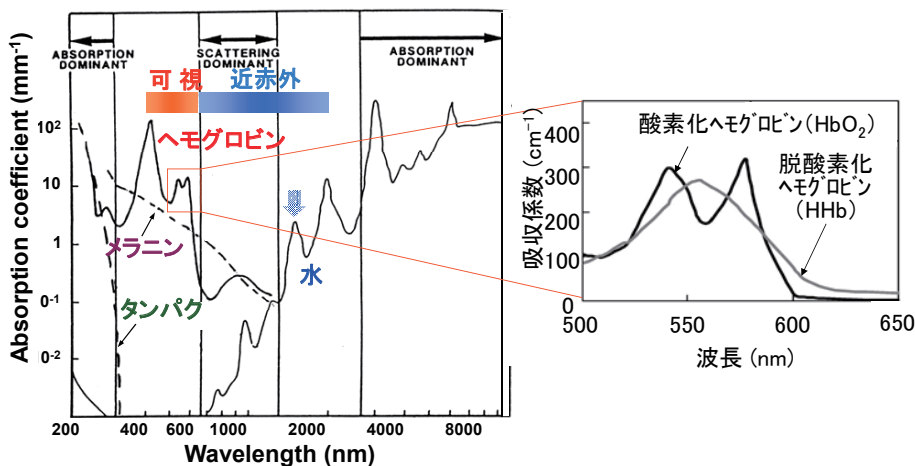


図2. 生体組織中の代表的な光吸収体 (chromophore) の吸収スペクトル

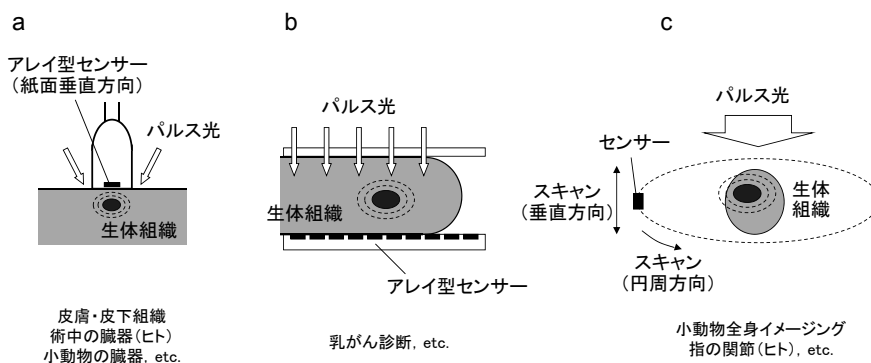


図3. 光音響 (断層) イメージング法の代表的な装置構成

通常、光音響波の検出器には超音波センサーが用いられる (脚注*1参照)。図3に示したように、センサーを走査、ないしアレイ型 (列状に並べた) センサーを使用することにより光音響信号を位置の関数として取得し、これらを再構築することにより光吸収体の断層分布画像を得ることができる。

図4に代表的な生体断層イメージング法の空間分解能と観測深度の関係を示した。光音響イメージングは、光コヒーレンストモグラフィー (optical coherence tomography, OCT) と超音波断層イメージングの中間的特性を有しているが、ここ数年で高分解能化が著しく進み (高分解能化についてはp.116で述べる)、OCTとの差は縮まっている。ただしここで、これら各種イメージング法のコントラストメカニズムが異なる、すなわちそもそも観測対象が異なることに注意しなければならない。なお上述したように、

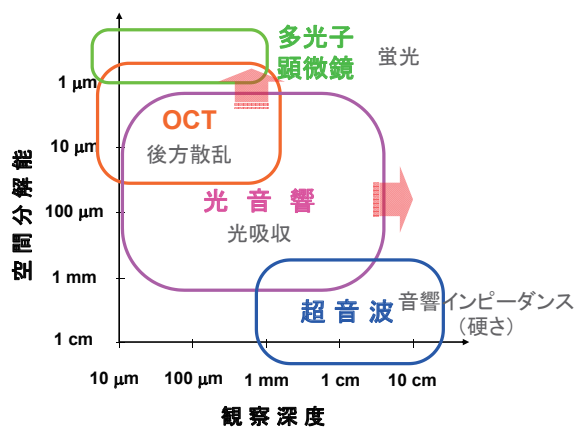


図4. 代表的な生体断層イメージング法の空間分解能と観測深度の関係
各イメージング法のコントラストメカニズムも付記した。

光音響イメージング法においては検出器として超音波センサーを用いることができることから、超音波イメージング法との親和性が高く、

両者を組み合わせたデュアルモダリティー・イメージングの研究も進められている。

光音響イメージング法の外傷学分野における応用

1. 熱傷深度診断

熱傷は受傷深度によりⅠ度（表皮のみ損傷），浅達性Ⅱ度（真皮浅部まで損傷），深達性Ⅱ度（真皮深部まで損傷），Ⅲ度熱傷（皮膚全層が損傷）に分類され，感染対策や皮膚移植の可否など，治療方針が大きく異なるため鑑別診断が重要である。しかし現在，その診断は専門医の肉眼的観察に頼ることが多く，その正確率は60-70%であるとの報告もある³⁾。日本熱傷学会診療ガイドライン（改訂第2版）においても，肉眼的診断の推奨グレードは最も低いCとされている。このため，レーザードップラー血流イメージング(laser Doppler flowmetry, LDF) 法，ビデオマイクロスコープ法等，様々な客観的診断法につき研究が進められているが，推奨グレードAの診断法は開発されていない。

著者らは，受傷組織層において血流の遮断領域（zone of stasis）が発生することに着目し，その下部にある非受傷組織層の血流に由来する光音響信号を計測することにより，熱傷深度の定量診断が可能と考えた。図5 aにその原理図

を示す⁴⁾。皮膚組織の音速は既知であり（約1500 m/s），光速に比して桁違いに遅いため，光を照射してから血液由来の光音響信号が組織表面に到達するまでの時間を計測することにより，非受傷組織の深度，すなわち受傷深度を計測可能と仮説を立てた。これを実証するため，図5 bに示した実験装置を構築し⁴⁾，ラット熱傷モデルを対象に有効性を検討した。モデル作製にはWalker-Masonテンプレート⁵⁾を用い，背部にTBSA（total body surface area）20%相当の各深度の熱傷を誘起した。光音響信号の検出にはリング状のフッ化ビニリデン/三フッ化エチレン共重合体フィルム（中心周波数，約26 MHz）を用い，その中心に照射光を伝送・照射するための光ファイバーを配置した。光源には波長可変の光パラメトリック発振器（optical parametric oscillator, OPO）を用い，本実験ではヘモグロビンの吸収係数が大きい550 nmの出力光を選択した（図2参照）。図6にラットの健常皮膚（コントロール）および浅達性Ⅱ度，深達性Ⅱ度，Ⅲ度熱傷で取得した光音響信号の原波形（横軸は時間を深さに変換）を示す。これより最浅部に現れる信号ピークが立ち上がる深度（白矢印）およびピークの深度（黒矢印）が，受傷深度の増大に伴い右方向，すなわち深部へ移動することがわかり，上記4群間でこれらの深度に高い統計学的有意差が認められた⁴⁾。さらに，上記光音響信号が示した受傷深度と病理医による組織画像に基づく診断結果がよく一致し，本法の有効性が示された。また同モデルの組織表面上の2 cm区間で，上記検出器を2 mm間隔で手動走査し，各測定点で得られた信号を補間して得た光音響断層像を図7に示す⁶⁾。血流遮断層，すなわち熱傷深度（両矢印の領域）が明瞭に画像化されていることがわかる。また照射光波長を変化させて同様の画像化を行ったところ，532～580 nmの波長帯域で高コントラストの画像を取得可能であることがわかった⁶⁾。532 nmは比較的小型で安価な汎用レーザー（Nd:YAGレーザーの第2高調波）の波長に相当することから，この波長を利用することにより実用的な熱傷深度診断装置を開発できる見通しが得られた。なお，深達性Ⅱ度以下の熱傷では損傷組織の自然治癒が期待できるが，同装置

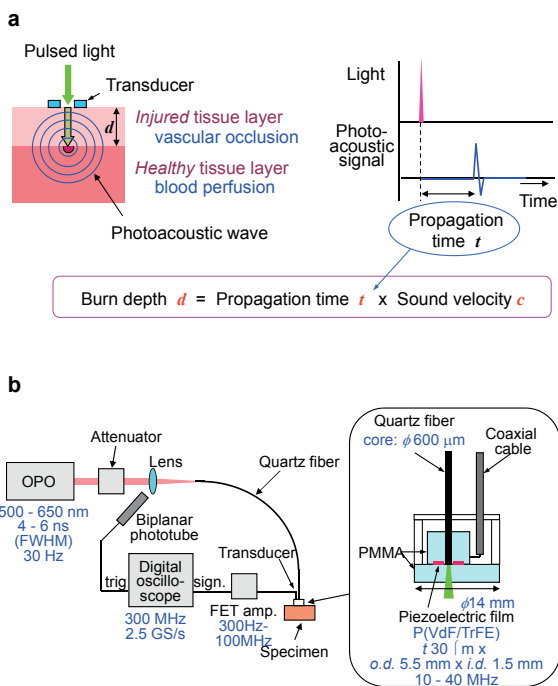


図5. 光音響イメージング法による熱傷深度診断法の (a) 原理と (b) 初期の実験装置の構成⁴⁾

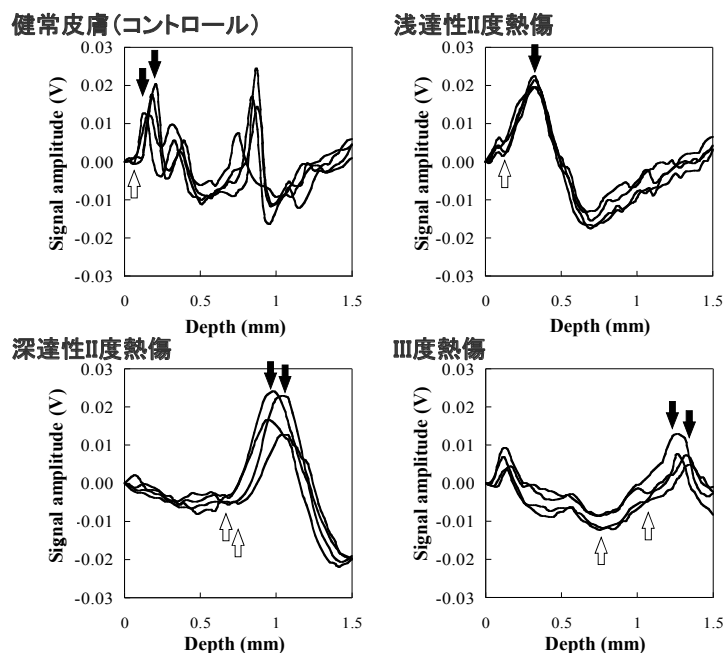


図6. ラット健常皮膚と熱傷モデル（浅達性II度，深達性II度，III度熱傷）創部の超音響信号原波形（音速を用いて横軸の時間を深さに変換）⁴⁾

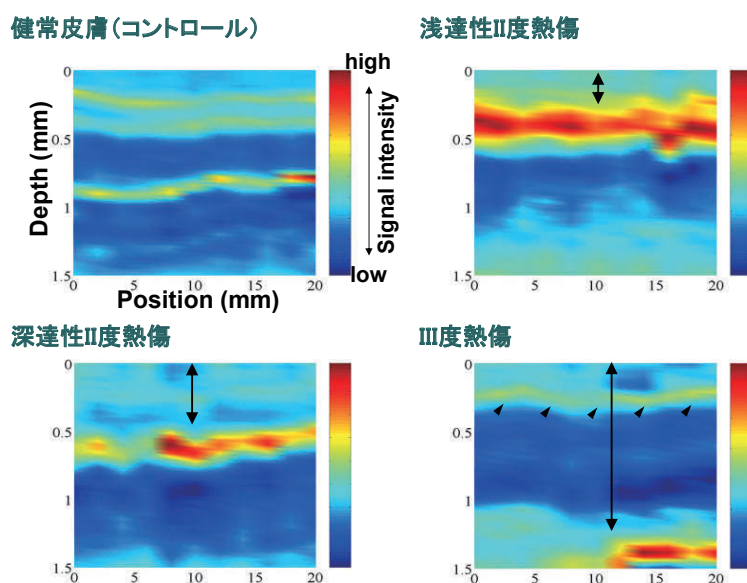


図7. ラット健常皮膚と熱傷モデル（浅達性II度熱傷，深達性II度熱傷，III度熱傷）創部の超音響断層画像⁶⁾ 両矢印が熱傷深度を表す。矢頭については後述。

で創傷治癒に伴う血行の回復をよく捉えられることも示された⁷⁾。本技術は創部管理にも有用であると考えられる。

2. 異常ヘモグロビンの検出

図7に示されたIII度熱傷の超音響断層画像を注意深くみると，浅部に弱い信号層が存在することがわかる（矢頭）。これは損傷組織中に残存するヘモグロビンに由来し，そのヘモグロ

ビンは熱影響により異常ヘモグロビンに変性している可能性が考えられた。図8aに酸素化ヘモグロビン (HbO₂)，脱酸素化ヘモグロビン (HHb) と異常ヘモグロビンの一種であるメトヘモグロビン (MetHb)，カルボキシヘモグロビン (COHb) の吸収スペクトルを示す⁸⁾。このうちMetHbの吸収スペクトルは正常ヘモグロビン (HbO₂, HHb) の吸収スペクトルと大き

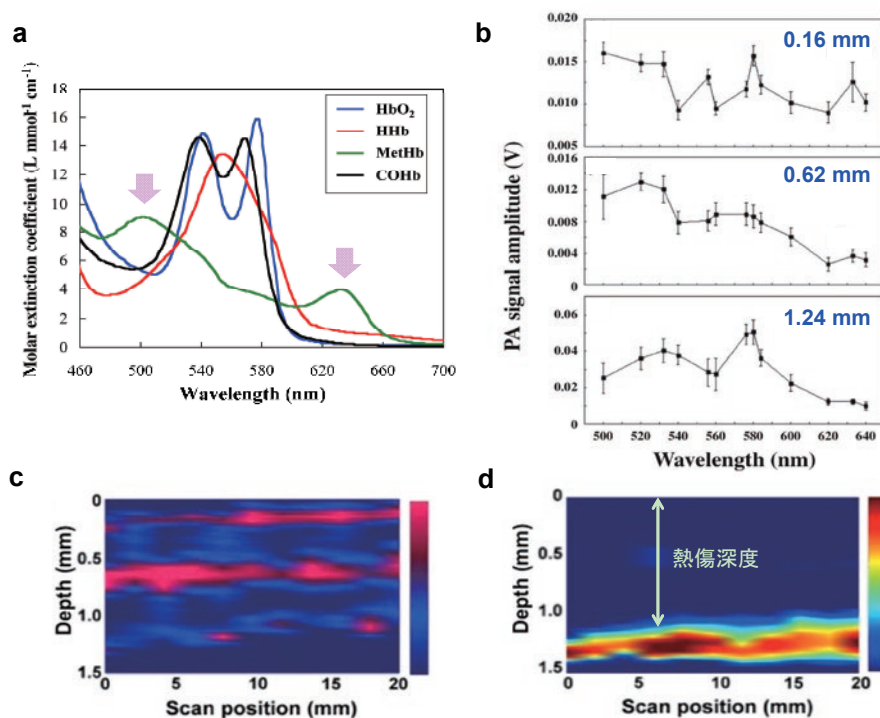


図 8. 光音響法によるメトヘモグロビンの検出⁸⁾
 (a) 酸素化ヘモグロビン (HbO₂), 脱酸素化ヘモグロビン (HHb), メトヘモグロビン (MetHb), カルボキシヘモグロビン (COHb) の吸収スペクトル。ラット III 度熱傷モデル創部の (b) 深さ 0.16 mm, 0.62 mm, 1.24 mm における光音響スペクトル, (c) MetHb 強調画像 (500 - 576 nm), (d) MetHb の影響を除去した熱傷深度診断画像 (576 - 633 nm)。

く異なり、波長 500 nm 付近と 630 nm 付近に特徴的なピークを有するため、光音響スペクトル (光音響信号の波長依存性) を調べることにより MetHb の検出が可能と考えた。

図 8 b はラット III 度熱傷創の深さ 0.16 mm, 0.62 mm, 1.24 mm の 3 箇所における光音響スペクトルを示している⁸⁾。これより最浅部 (0.16 mm) においては 500 nm と 630 nm 付近において信号値 (振幅) が大きくなっており、MetHb の存在が示唆された。またこれら両波長における信号値は深くなるに従い減少し、最深部 (1.24 mm) においては HbO₂ に近いスペクトルを示した。この深さ依存性は熱的侵襲が浅部ほど強いことにより説明可能である。これらの結果に基づき MetHb 分布の画像化を試みた結果を図 8 c に示す (MetHb の吸収が主体である 500 nm の画像から HbO₂ の吸収が主体である 576 nm の画像を減じた差分画像)⁸⁾。これより MetHb は最浅部のみならずより深部においても存在することが示唆された。

MetHb は様々な侵襲や薬物中毒、薬品被ば

く等によりヘモグロビンが酸化して生成し、酸素運搬能を有さないことから高濃度になると極めて有害である (メトヘモグロビン血症)。最近、MetHb の計測が可能なパルスオキシメーターも開発されているが、深さ分解計測は不可能である。なお図 8 d は MetHb の影響の除外を試みた光音響画像であり (HbO₂ の吸収が主体である 576 nm の画像から MetHb の吸収が主体である 633 nm の画像を減じた差分画像)、熱傷深度がより高コントラストに画像化されていることがわかる⁸⁾。

3. 移植皮膚の生着モニタリング

皮膚全層が損傷を受けた場合、面積がごく小さい場合を除き皮膚移植 (植皮) が必要となるが、移植組織の生着が遅れると感染リスクが高まるため、その管理が重要である。しかし移植皮膚の生着を高感度にモニタリングできる技術は確立されておらず、肉眼的に移植皮膚の色調変化より判断しているのが現状である。著者らは、生着の起点となる新生血管に由来する光音響信号を計測することにより、移植皮膚生着の

モニタリングが可能であると考え (図9a), その有効性につきラット皮膚移植モデルを用いて検討した⁹⁾。

図9bにラット背部の健常皮膚 (移植なし) の超音響信号を示す。一般に皮膚の超音響信号計測においては, 皮膚表面の汚れやメラニンに由来して表面近傍に強い信号が発生することが多く, これを表面信号と呼ぶ。検出器の深さ分解能によっては, この表面信号が真皮乳頭の毛細血管の血液に由来する信号と重なって観測される場合もある。図9bの信号には3つの著明なピークが存在するが, 最初のピークが表面信号 (ただし使用したラットがアルビノ種のためメラニンの影響は無視しうる), 2番目のピーク (矢印) が真皮の主要血管中の血液に由来する信号, 3番目のピークが皮下組織中の血液に由来する信号と考えられる。この皮膚を採取して移植片 (2 cm × 2 cm) とし, 同じラットの

別の部位に作製した皮膚全層欠損創に移植した場合の (自家皮膚移植モデル), 移植皮膚中央部で計測した超音響信号の経時変化を図9cに示す。ここで真皮に相当する領域に着目すると, 移植直後 (0 h) と移植3 h後においては目立った信号ピークがなく血行不良を示しているが, 予想よりかなり早い6 h後に信号ピークが現れ, 移植組織中の血行回復, すなわち生着が示唆された⁹⁾。実際にこの時間帯の移植皮膚をバイオプシーし, 血管内皮細胞の染色 (CD31免疫染色) を行ったところ陽性細胞が認められ, 血管新生が確認された⁹⁾。血管新生が移植皮膚下層で生じているのに対して信号が比較的浅部で発生しているのは, 移植組織中に元々ある血管に新生血管が接続して血行が回復するためと推察している。

次に本法を, 人工真皮 (図10a) の生着診断に使えるか検討を行った¹⁰⁾。人工真皮を移植

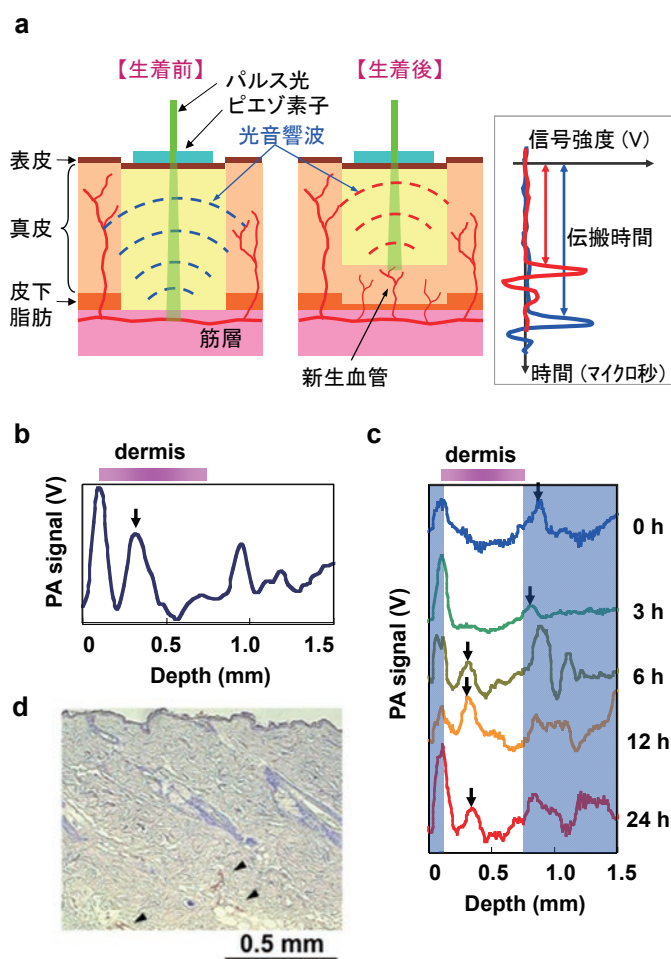


図9. 超音響法による移植皮膚の生着モニタリング⁹⁾

(a) 原理図。(b) ラット健常皮膚 (移植なし) の超音響信号。ラット自家皮膚モデル移植部位の (c) 超音響信号の経時変化, (c) 移植6 h後の移植皮膚のCD31免疫染色画像。矢頭がCD31陽性細胞 (新生血管) を示す。

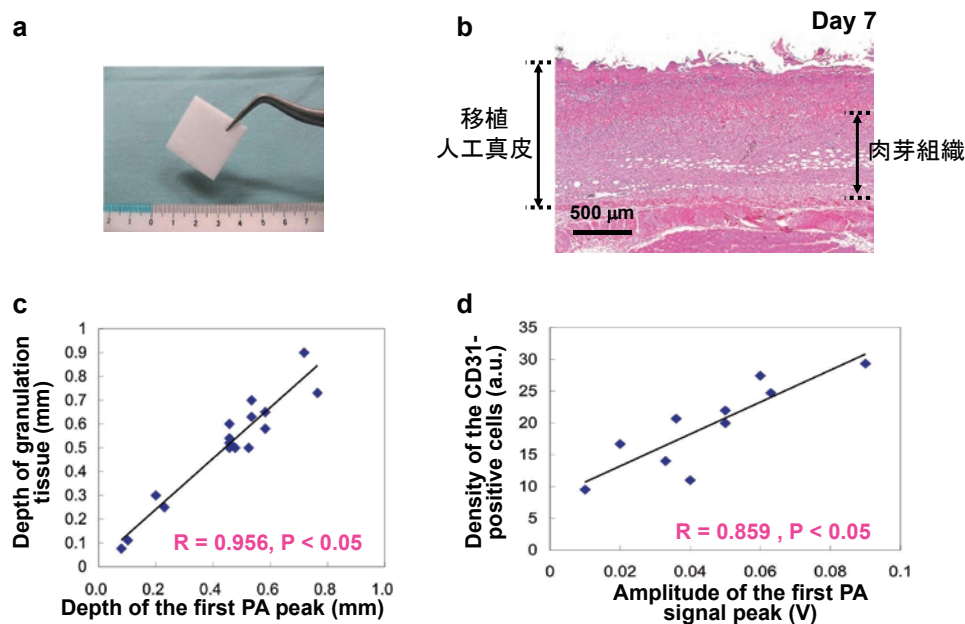


図10. 移植した人工真皮の光音響診断¹⁰⁾

(a) 使用した人工真皮(テルダーミス TD-A006S)の外観写真。ラット皮膚全層欠損創に移植した人工真皮の (b) 移植7日後のHE染色画像, (c) 光音響信号第1ピークの深度と組織画像(HE染色)により評価した肉芽組織の深さ(人工真皮表面から肉芽組織上端までの距離)の関係, (d) 光音響信号第1ピークの振幅と組織画像(CD31免疫染色)により評価した肉芽組織最上層における新生血管密度の関係。

すると、下層において肉芽組織が形成されて上方に成長し(図10b参照)、徐々に真皮様組織に変化する。ラット背部皮膚全層欠損創(2 cm × 2 cm)に同じ大きさのウシコラーゲン由来の人工真皮(テルダーミスTD-A006S)を移植し、同中心部において光音響信号を経時的に計測するとともに、計測部位の組織標本を作製し、肉芽組織の深さ、およびその最上層における新生血管(CD31陽性細胞)密度について評価した。図10b, 10dにそれぞれ光音響信号(第1ピーク)の深度と肉芽組織の深さの関係、および同じく光音響信号(第1ピーク)の振幅とCD31陽性細胞密度の関係を示す¹⁰⁾。いずれも高い相関が認められ、光音響計測により人工真皮の生着および肉芽組織の成長状態に関する重要な情報が得られることが示された。

4. 浮腫の診断

重症熱傷においては血管透過性亢進により高度の浮腫を来し、血液量減少性ショック(低容量性ショック)を招きうる。そのため大量の輸液が必要であるが、予後に重大な影響を及ぼす輸液量は経験則(Baxterの公式)に基づいて決め、バイタルサインや尿量に基づき調整するの

が一般的である。浮腫の程度を定量化できれば輸液量決定に有用と考えられるが、浮腫の診断はむくみの状態を肉眼的に観察して行っているのが現状である。著者らは、組織中の水分量を光音響法により計測することにより浮腫の診断が可能と考え、ラット熱傷モデルを対象に検討を行った¹¹⁾。

図2に示したように水の吸収スペクトルは複雑であるが、赤外域においては波長が長くなるに従い増大する傾向がある。吸収係数が大きい方が高い検出感度を期待できる一方、光侵達長が小さくなり組織表層の情報しか得られなくなる。このため本実験では、1430 nmの照射光を用いた(図2青矢印)。ラット背部に20% TBSA相当の深達性Ⅱ度熱傷を作製し、熱傷部とその近傍の非熱傷部の2箇所において経時的に光音響イメージングを行った。結果を図11aに示す¹¹⁾。熱傷部の水由来の光音響信号は受傷直後においては低下、すなわち水分量の減少を示すが、その後時間とともに増大し、24 h後付近でピークを示してその後減少した。上記2箇所の信号値の経時変化を図11bに示す¹¹⁾。24 h後以降の信号減少は、細胞外液が血管内に戻る

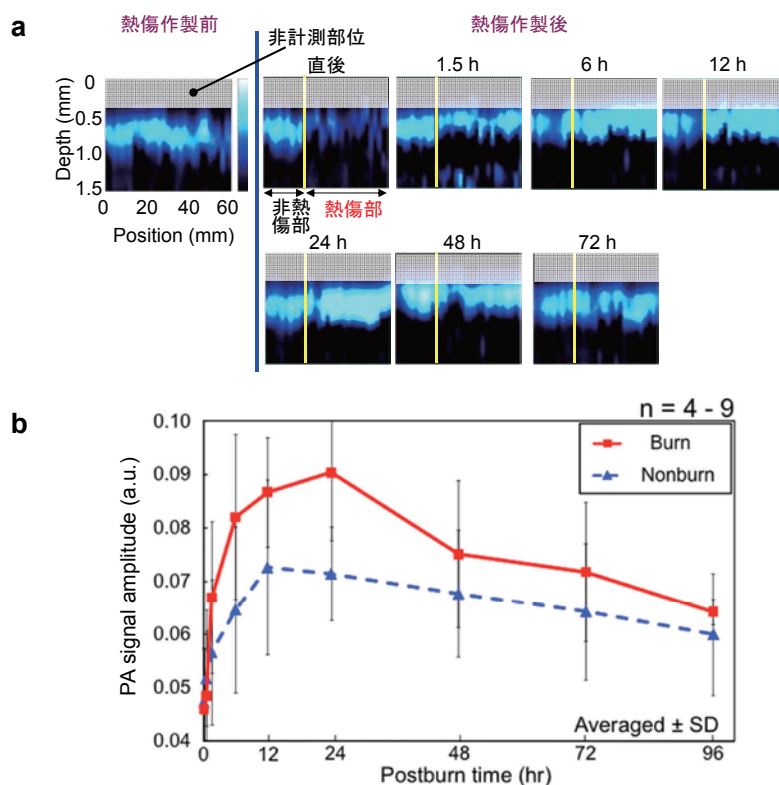


図11. ラット熱傷モデル（深達性Ⅱ度）における浮腫の超音響診断（水分分布のイメージング）¹¹⁾ 水の吸収ピークがある1430 nmの照射光を使用。(a) 熱傷作製前の皮膚と熱傷作製後の熱傷部-非熱傷部境界付近の超音響断層画像の経時変化。(b) 熱傷部と非熱傷部の超音響信号（振幅）の経時変化。

refillingによると考えられる。また非熱傷部においても、熱傷部ほどではないが信号が上昇、すなわち浮腫が発生していることが確認された（肉眼的には判別困難）。これらより、波長1430 nmにおける超音響計測が浮腫診断に応用可能であることが示され、熱傷のみならず、様々な原因により発生する浮腫の診断への応用が期待される。

5. アルブミン分布の時空間的变化の評価

上述した浮腫においては、水のみならず血漿蛋白も血管外に漏出するが、水の分子量が18であるのに対し、例えば血清アルブミン（以下単にアルブミンと言う）の分子量は66,000であり両者には大きな違いがある。従って両者の血管壁透過特性、組織内の拡散挙動には大きな違いがあるはずであるが、定量的な検討結果はほとんど報告されていなかった。そこでラット熱傷モデルにおけるアルブミンの挙動を超音響法により捉えることができないか検討を行った。ただしアルブミンには生体の超音響計測に適した可視から近赤外において顕著な吸収ピークを持

たないことから、血中でアルブミンと強固に結合するエバンスブルー（EB）を吸収マーカーとして用いることにした¹²⁾。EBは610 nm付近に吸収ピークを有し、その波長近傍ではヘモグロビンの吸収が相対的に小さいことから、同波長の照射光を用いた超音響イメージングによりアルブミンの分布を画像化可能と考えた。

図12aにラット深達性Ⅱ度熱傷モデルの熱傷部と非熱傷部の境界領域付近の610 nmにおける超音響信号、すなわちアルブミンの3次元分布を経時的に画像化した結果を示す¹²⁾。これよりアルブミンは熱傷部と非熱傷部の境界付近で漏出が始まり、その後損傷組織中を拡散してゆくことがわかった。図12bに熱傷部、非熱傷部、境界部の3領域におけるアルブミン由来の超音響信号の経時変化を示す¹²⁾。境界、熱傷部において信号は、受傷直後と受傷後24~72 hの二相性に上昇することを示している。また図12cに同モデルの尿量の経時変化を示すが、尿量は24~72 hにおいて増大しており、この時間帯がrefilling期と考えられた¹²⁾。これらより、受傷

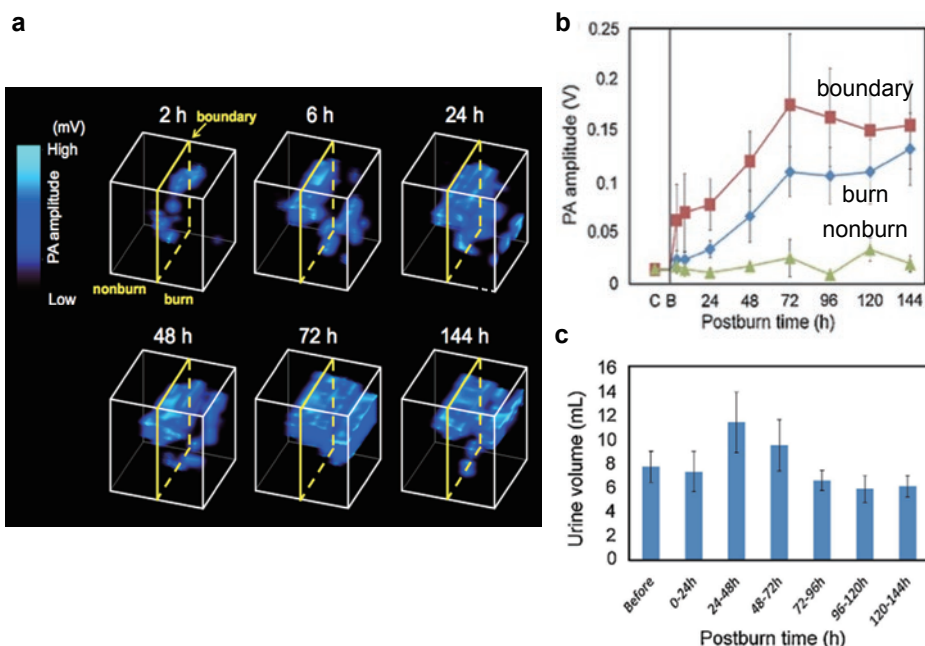


図12. ラット熱傷モデル（深達性Ⅱ度）における血清アルブミン分布の光音響イメージング¹²⁾ 光吸収マーカーとしてエバンスブルー（EB）を使用。EBの吸収ピークがある610 nmの照射光を使用。(a) 熱傷部-非熱傷部境界付近の3次元光音響画像。(b) 熱傷部、非熱傷部、境界部の光音響信号振幅値の経時変化。(c) 同モデルの尿量の経時変化。

直後のアルブミンの増大は熱傷による血管透過性亢進により，また24～72 hにおけるアルブミンの増大は水のrefillingが先に進み，アルブミンが取り残されて組織中濃度が増大することを表しているものと考えられた。これを図11bと比較すると，水とアルブミンが異なった時空間変化を示すことが明らかであり，このような情報は輸液管理に有用であると考えられる。

研究の展開

以上，光音響イメージング法の外傷学分野を中心とした応用に関する先行研究について述べた。ここでは関係する新たな研究の展開について紹介する。

1. トランスレーショナル・リサーチ

光音響イメージング法の外傷学分野における応用の1で述べたように，動物実験により光音響法による熱傷深度診断の有効性が認められたことから，臨床応用へのトランスレーショナル・リサーチ（橋渡し研究）に着手した。図13に臨床用装置を実現するための技術課題と開発の流れを示す。重要な課題として，イメージングの高速化，測定深度の増大，小型化の3つがあげられ，まず高速化については，従来装置に

おいて単一センサーを手動で走査する必要があったため創部1 cm区間の画像化に数分を要したが，アレイ型素子を用いることによりリアルタイムの画像化を可能とした。また測定深度に関しては，ラットの皮膚厚さが1 mm程度であるのに対し，ヒトの皮膚は最大3～4 mmあるため，皮下も含め5 mm程度の観測深度が必要である。このため光照射用のファイバーとセンサー素子の配置を最適化することにより，検出感度を大幅に向上させた。装置小型化の鍵は光源の小型化にある。当初は熱傷深度診断のための最適波長が不明であったため大型の波長可変光源（OPO）を用いたが，上述したように532 nmの光を利用可能であることがわかったため，第2段階として半導体レーザー（laser diode, LD）励起Nd:YAGレーザー（第2高調波）を採用して小型化を図り，臨床用装置においてはさらに小型のファイバーレーザーを搭載したオールインワン型システムを開発した¹³⁾。

完成した臨床用装置（プロトタイプ）に関しては，臨床応用に先立ち前臨床研究が求められ，再度ラット熱傷モデルを用いた評価を実施するとともに，レーザードップラー血流イメージング（LDF）法との診断性能の比較を行った。

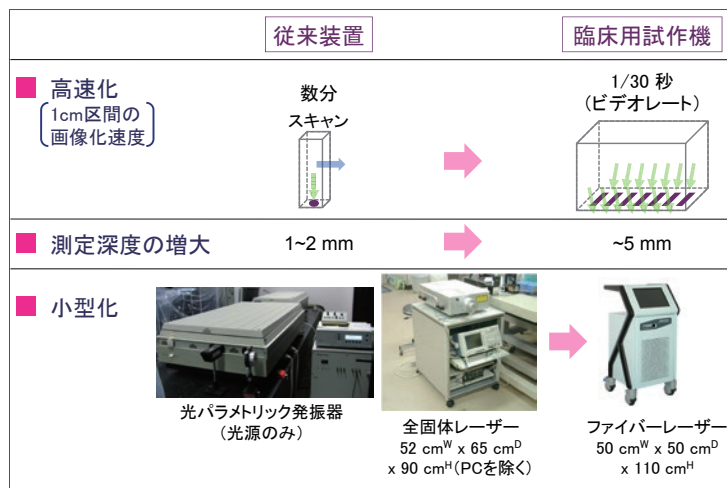


図13. 光音響イメージング法による熱傷深度診断の臨床への橋渡し研究（トランスレーションナル・リサーチ）における技術課題と開発のフロー

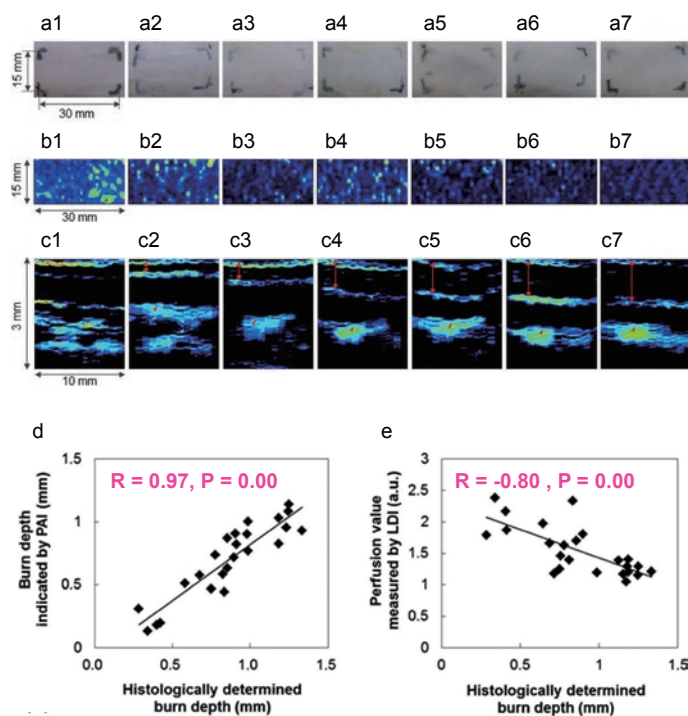


図14. 臨床用熱傷診断装置（プロトタイプ）を用いた前臨床試験の結果¹⁴⁾ 熱傷作製温度6条件（70℃, 78℃, 83℃, 88℃, 93℃, 98℃）で作製したラット熱傷モデルを使用。（a1~a7）外観写真, (b1~b7) レーザードップラー血流イメージング (LDI) 法による perfusion signal の分布, (c1~c7) 光音響断層画像。赤両矢印が熱傷深度を表す。（a1~c1）健全皮膚。熱傷作製温度：（a2~c2）70℃, （a3~c3）78℃, （a4~c4）83℃, （a5~c5）88℃, （a6~c6）93℃, （a7~c7）98℃。

ここで熱傷作製温度は、従来の70℃, 78℃, 98℃の3条件に83℃, 88℃, 93℃を加えて全6条件とし、範囲が広い深Ⅱ度熱傷についてより詳細な評価を行えるモデルを確立した（組織学的評価に基づいて上記温度の増大に伴い熱傷深

度が線形的に増大することを確認¹⁴⁾。図14a~cにコントロール（健全皮膚）とこれら6条件で作製した熱傷創の外観写真, LDF画像（何れも上方からの撮像）, および光音響断層画像を示す¹⁴⁾。外観写真, LDF画像は何れも熱傷作製温

度依存性が明確でないのに対し、光音響断層画像においては、熱傷作製温度の上昇に伴い受傷深度（赤矢印）が単調増加していることが明らかである。図13b, cにそれぞれ組織学的熱傷深度に対する光音響法に基づく熱傷深度、およびLDF法による取得信号（perfusion value）の関係を示す¹⁴⁾。光音響法においてより高い相関が得られており、本装置による熱傷深度診断の有効性が示された。そもそもLDF法で取得する信号は血流情報であって深度情報ではないため、その適用には限界があると考えられる。ただしLDF法は一度に広範囲の撮像が可能である利点はある。

以上に基づき、装置にさらに改良を加え、埼玉医大国際医療センター、地域医療機能推進機構 中京病院の協力を得て、防衛医大病院を含めた3施設での臨床研究を開始した。結果につ

いては別途報告する。

2. 高分解能化

熱傷深度診断においては、深さ方向に0.1 mm程度の分解能が求められるものの、横方向（皮膚の表面方向）に高い分解能は必要でない。一方、移植組織中の血管再構築の評価等には血管網の画像化が求められる。この目的に著者らは、小型軽量の高分解能型光音響イメージング装置の開発に取り組んでいる。図15に示したように、高分解能光音響イメージング装置の代表的な構成には音響レンズを用いて検出音場を空間的に制限して分解能を獲得する方式の音響学的分解能光音響マイクロスコピー（acoustic resolution photoacoustic microscopy, AR-PAM）と励起光を収束しそのスポットで分解能を獲得する方式の光学的分解能光音響マイクロスコピー（optical resolution photoacoustic microscopy,

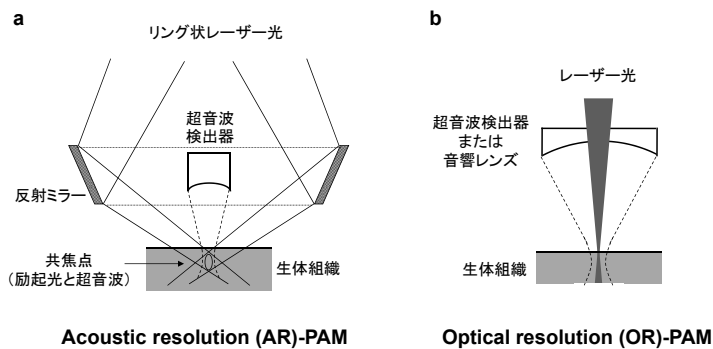


図15. 高分解能型光音響イメージング装置の代表的な装置構成 (a) 音響学的分解能光音響マイクロスコピー（AR-PAM）、(b) 光学的分解能光音響マイクロスコピー（OR-PAM）。

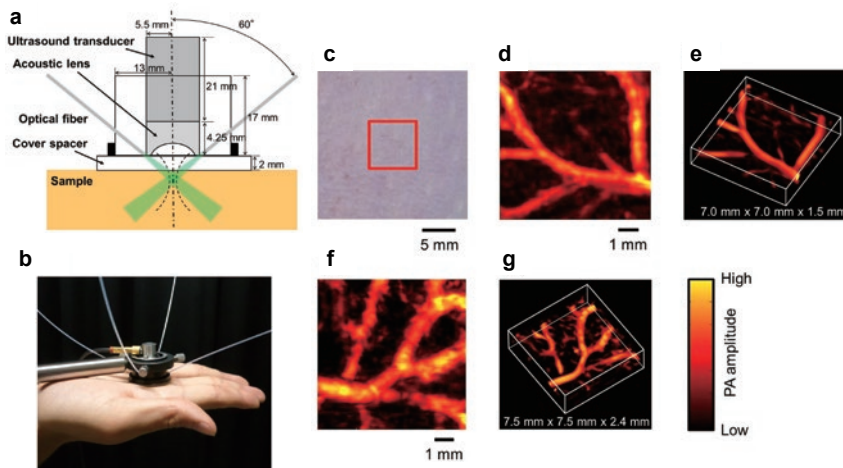


図16. 開発した小型高分解能光音響イメージング装置¹⁵⁾のイメージングヘッドの(a)構造と(b)外観写真。(c)ラット皮膚の外観写真と赤線四角部(ROI)の(d~g)光音響画像。(d, f)投影画像。(e, g)3次元画像。

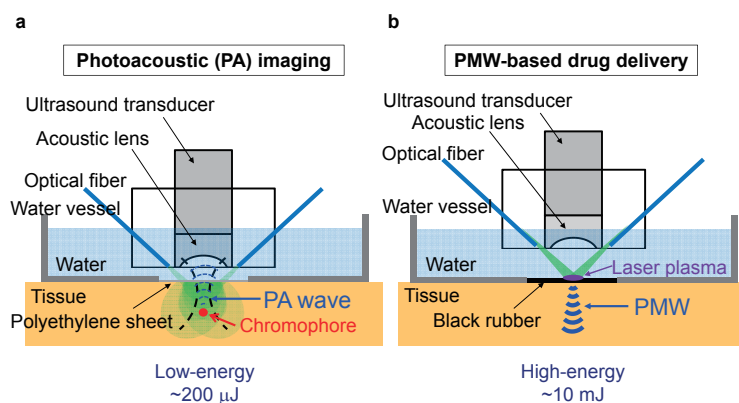


図17. セラノスティック（診断・治療一体型）システムの装置構成¹⁷⁾
 図16に示した装置に基づいて構成した。(a) 低エネルギーレーザーパルスを用いて血管や薬剤分布を光音響イメージングする構成。(b) レーザーパルスを高エネルギーとし、ターゲット（黒色ゴム）に照射してフォトメカニカル波を発生させ経血管薬剤輸送を行う構成。

OR-PAM) の二つがある。より空間分解能の高いのはOR-PAMであり毛細血管をも鮮明に画像化ができるが、観測深度が数100 μm と浅い。AR-PAMは分解能が数10 μm であるが*³数mmの観測深度が得られ、皮膚であれば全層の血管の画像化が可能である。しかし図示されているように、従来型のAR-PAMには特殊な光学系を必要とするため装置が大型になること、精密な光軸調整を要すること等の実用上の問題があった。著者らは図16a, bに示すような、ファイバーを用いて光照射を行う小型軽量AR-PAMを開発した¹⁵⁾。同装置によるラット皮膚血管の画像化例を同図d~gに示す¹⁵⁾。現在、さらなる高分解能化の検討に取り組んでいる。

3. セラノスティックス*⁴（診断・治療一体型）システム

光音響イメージングに必要なレーザーパルスエネルギーは高々数100 μJ であるが、パルスエネルギーが二桁から三桁高くなると、物質に照射した際にプラズマが誘起され、そのプラズマの膨張に伴って強い圧力波が発生する。この圧力波はフォトメカニカル波（photomechanical wave, PMW）などと呼ばれ、各種生体膜の透過性亢進作用を有することから、著者らはこれ

*³ 最近では、この程度の空間分解能はマイクロコピー（microscopy）でなく、メゾコピー（mesoscopy）と呼ぶべきとされている。

*⁴ theranosticはtherapy（治療）とdiagnosis（診断）を結合した新語で、診断と治療を一体とした技術のことをいう。

を薬剤輸送や遺伝子導入に応用する研究に取り組んできた。そこで、図16に示したイメージングヘッドを用い、光ファイバーで高エネルギーレーザーパルスを伝送することによりPMWを発生させて薬剤輸送を行い、伝送レーザーパルスを低エネルギーに切り替えることにより同薬剤の分布¹⁶⁾や血管の分布をイメージングする診断・治療一体型（セラノスティックス）システムの研究を進めている（図17）¹⁷⁾。このようなシステムを用いると、血管や薬剤分布をリアルタイムでモニタリングしながら薬剤輸送条件を制御することが可能となり、外傷学分野のみならずさまざまな分野において治療効果の向上、副作用の低減が期待される。

文 献

- 1) Bell, A. G.: On the production and reproduction of sound by light. *Am. J. Sci.* 20: 305-324, 1880.
- 2) Wang, X., Pang, Y., Ku, G., Stoica, G. and Wang, L. V.: Three-dimensional laser-induced photoacoustic tomography of mouse brain with the skin and skull intact. *Opt. Lett.* 28: 1739-1741, 2003.
- 3) Chatterjee, J. S.: A critical evaluation of the clinimetrics of laser Doppler as a method of burn assessment in clinical practice. *J. Burn Care Res.* 27: 123-30, 2006.
- 4) Sato, S., Yamazaki, M., Saitoh, D., Tsuda, H., Okada, Y., Obara, M. and Ashida, H.: Photoacoustic diagnosis of burns in rats. *J. Trauma* 59: 1450-1456, 2005.
- 5) Walker, H. L. and Mason, A. D. Jr.: A standard animal burn. *J. Trauma* 8: 1049-1051, 1968.

- 6) Yamazaki, M., Sato, S., Ashida, H., Saitoh, D., Okada, Y. and Obara, M.: Measurement of burn depths in rats using multiwavelength photoacoustic depth profiling. *J. Biomed. Opt.* 10: 064011, 2005.
- 7) Aizawa, K., Sato, S., Saitoh, D., Ashida, H. and Obara, M.: Photoacoustic monitoring of burn healing process in rats. *J. Biomed. Opt.* 13: 064020, 2008.
- 8) Aizawa, K., Sato, S., Saitoh, D., Ashida, H. and Obara, M.: In vivo photoacoustic spectroscopic imaging of hemoglobin derivatives in thermally damaged tissue. *Jpn. J. Appl. Phys.* 48: 062302, 2009.
- 9) Yamazaki, M., Sato, S., Saitoh, D., Okada, Y., Ashida, H. and Obara, M.: Photoacoustic monitoring of neovascularities in grafted skin. *Lasers Surg. Med.* 38: 235-239, 2006.
- 10) Hatanaka, K., Sato, S., Saitoh, D., Ashida, H. and Sakamoto, T.: Photoacoustic monitoring of granulation tissue grown in a grafted artificial dermis on rat skin. *Wound Rep. Reg.* 18: 284-290, 2010.
- 11) Yoshida, K., Sato, S., Hatanaka, K., Saitoh, D., Ashida, H., Sakamoto, T. and Obara M.: Photoacoustic diagnosis of edema in rat burned skin. *Proc. SPIE* 7564: 75641C, 2010.
- 12) Tsunoi, Y., Sato, S., Kawauchi, S., Ashida, H., Saitoh, D. and Terakawa, M.: In vivo photoacoustic molecular imaging of the distribution of serum albumin in rat burned skin. *Burns* 39: 1403-1408, 2013.
- 13) Ida, T., Kawaguchi, Y., Kawauchi, S., Iwaya, K., Tsuda, H., Saitoh, D., Sato, S. and Iwai, T.: Real-time photoacoustic imaging system for burn diagnosis. *J. Biomed. Opt.* 19: 086013, 2014.
- 14) Ida, T., Iwazaki, H., Kawaguchi, Y., Kawauchi, S., Ohkura, T., Iwaya, K., Tsuda, H., Saitoh, D., Sato, S. and Iwai, T.: Burn depth assessments by photoacoustic imaging and laser Doppler imaging. *Wound Rep. Reg.* 24: 349-355, 2016.
- 15) Tsunoi, Y., Sato, S., Watanabe, R., Kawauchi, S., Ashida, H. and Terakawa, M.: Compact acoustic-resolution photoacoustic imaging system with fiber-based illumination. *Jpn. J. Appl. Phys.* 53: 126701, 2014.
- 16) Hirao, A., Sato, S., Saitoh, D., Shinomiya, N., Ashida, H. and Obara, M.: In vivo photoacoustic monitoring of photosensitizer distribution in burned skin for antibacterial photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 86: 426-430, 2010.
- 17) Tsunoi, Y., Sato, S., Kawauchi, S., Akutsu, Y., Miyagawa, Y., Araki, K., Shiotani, A. and Terakawa, M.: Theranostic system for drug delivery and pharmacokinetic imaging based on nanosecond pulsed light-induced photomechanical and photoacoustic effects. *Jpn. J. Appl. Phys.* 54: 116601, 2015.

Application of photoacoustic imaging in traumatology

Shunichi SATO, Yasuyuki TSUNOI, Satoko KAWAUCHI and Daizoh SAITOH *

J. Natl. Def. Med. Coll. (2017) 42 (3) : 105 – 118

Abstract: When biological tissue is irradiated with a short-duration light pulse, the light can be absorbed by chromophores in the tissue, where an adiabatic expansion occurs, emitting ultrasonic waves called photoacoustic waves. By detecting photoacoustic waves on the tissue surface, depth-resolved imaging of the distribution of chromophore densities can be obtained without staining or labeling. This method is called photoacoustic imaging. We have been applying this method to various measurements and diagnosis mainly in the field of traumatology. In this paper, we first describe the principle, characteristics and device configurations of photoacoustic imaging and then show the results of animal studies performed to investigate the validity of various applications of photoacoustic imaging including burn depth assessment, detection of hemoglobin derivatives, monitoring of the adhesion of grafted skin, diagnosis of edema (imaging of water distribution), and imaging of the albumin distribution. We also describe our recent efforts in translational research for burn depth assessment, the development of a high-resolution imaging system for assessing vascular networks in grafted tissue, and the development of a theranostic system based on photoacoustic imaging and drug delivery using photomechanical waves.

Key words: photoacoustic imaging / traumatology / burn depth assessment
 / hemoglobin derivative / skin grafting / adhesion monitoring /
 albumin / translational research / high-resolution imaging /
 theranostic