

前立腺癌における in vivo 血中循環腫瘍細胞
(CTC) 検出に向けた光音響顕微鏡技術の開発

たち かずよし

田地 一欽

(泌尿器科学専攻)

防衛医科大学校

令和4年度

目次

第1章 緒 言	1 頁
第2章 透過型光音響顕微鏡の構築	
2. 1 背景および目的	9 頁
2. 2 透過型光音響顕微鏡の構築および超音波センサの評価	
2. 2. 1 背景および目的	10 頁
2. 2. 2 対象および方法	11 頁
2. 2. 2. 1 実験系	
2. 2. 2. 2 受信感度特性	
2. 2. 2. 3 空間感度分布	
2. 2. 3 結果および考察	18 頁
2. 2. 3. 1 受信感度特性	
2. 2. 3. 2 空間感度分布	
2. 3 透過型光音響顕微鏡による実証実験	
2. 3. 1 背景および目的	20 頁
2. 3. 2 対象および方法	20 頁

2. 3. 2. 1 実験系

2. 3. 2. 2 赤血球の観察

2. 3. 2. 3 微小血管の観察

2. 3. 2. 4 染色前立腺癌細胞皮下腫瘍の観察

2. 3. 3 結果および考察 25 頁

2. 3. 3. 1 赤血球の観察

2. 3. 3. 2 微小血管の観察

2. 3. 3. 3 染色前立腺癌皮下腫瘍の観察

2. 4 小 括 27 頁

第3章 反射型光音響顕微鏡の構築

3. 1 背景および目的 29 頁

3. 2 反射対物レンズの導入

3. 2. 1 背景および目的 31 頁

3. 2. 2 対象および方法 33 頁

3. 2. 2. 1 実験系

3. 2. 2. 2 色収差による光学焦点位置移動の評価

3. 2. 2. 3 光学焦点位置移動が光音響顕微画像に及ぼす影響の評価

3. 2. 3	結果および考察	38 頁
3. 2. 3. 1	色収差による光学焦点位置移動の評価	
3. 2. 3. 2	光学焦点位置移動が光音響顕微画像に及ぼす影響の評価	
3. 3	反射型光音響顕微鏡の構築	
3. 3. 1	背景および目的	42 頁
3. 3. 2	対象および方法	43 頁
3. 3. 2. 1	実験系	
3. 3. 2. 2	赤血球と染色前立腺癌細胞の混合物の観察	
3. 3. 2. 3	マウス耳の毛細血管の in vivo 観察	
3. 3. 3	結果および考察	47 頁
3. 3. 3. 1	赤血球と染色前立腺癌細胞の混合物の観察	
3. 3. 3. 2	マウス耳の毛細血管の in vivo 観察	
3. 4	小 括	49 頁
第 4 章 反射型光音響顕微鏡による模擬前立腺癌循環腫瘍細胞の観察		
4. 1	背景および目的	51 頁
4. 2	対象および方法	
4. 2. 1	実験系	51 頁

4. 2. 2 観察対象	51 頁
4. 3 結果および考察	53 頁
4. 4 小 括	54 頁
第5章 総括と今後の課題	
5. 1 総 括	55 頁
5. 2 本研究の限界、今後の課題	58 頁
第6章 結 言	61 頁
研究業績	63 頁
謝辞	65 頁
略語一覧	66 頁
用語集	68 頁
引用文献	74 頁
図表	80 頁

第1章 緒 言

未曾有の高齢化社会を迎える本邦において、前立腺癌罹患率は増加の一途を辿っている(1)。転移のない限局癌は外科的治療や放射線治療をはじめとした局所療法により根治が可能であり、良好な予後が期待できる一方で、血行性・リンパ行性に転移をきたした有転移癌の予後は一般的に不良で、ホルモン療法、化学療法、放射線治療等、昨今めざましい進歩を遂げた集学的治療をもってしても、治癒はほとんど期待できない状況にある(2-9)。

その予後を向上させるためにはその転移を予測・早期発見し、早期に治療介入することが不可欠である。その一つの手法として、血液中を循環する腫瘍細胞、すなわち循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cell; CTC) の検出による転移の早期発見があげられる。CTC は悪性腫瘍が血行性に転移する上での主要因と考えられており(10)、血中の CTC を検出することで、画像検査で発見できない微細な転移が存在する可能性を判別できる(11)ほか、患者によっては CTC 検出数と癌原発巣のサイズに相関があることが報告されている(12)ことから、CTC を癌治療におけるバイオマーカーとして利用する検討もなされている。このように、CTC は癌の転移の診断のみならず、治療効果判定の面でも有用な情報となりうると考えられており、CTC 検出を目指した研究が数多くなされている(12-16)。その反面、CTC は血液中の存在確率が極めて低く (数個～数百個/ml)、これまで報告されている CTC 検出法はそのほとんどが採血検体から *in vitro* で CTC を検出する方法であること(17)から、全血中に CTC が存在する場合にも採血検体に CTC が含まれないサンプリングエラーが生じる可能性があることが課題とされて

いる。そこで本研究では、採血せずに血管内の血液中の CTC を検出する in vivo CTC 検出を実現することにより、採血に伴い生じるサンプリングエラーの問題を解決する、というアプローチによる問題解決を図った。

本研究では、光音響イメージング技術をその検出原理として用いた。これは、1880 年に Bell が発表した光音響現象(18)に基づく技術で、観察対象に含まれる光吸収体（光吸収係数が高い物質）が光を吸収した際に生じる熱膨張により発生した超音波（以下、光音響波と称する）を観測し、生体内部の光吸収体の分布を画像化するものである(19)。可視から近赤外の波長域においてはヘモグロビンやメラニンが特に高い光吸収係数を有しており、光音響イメージングはこれらに対して高い感度を有する。また、物質ごとに異なる吸収スペクトル（光吸収係数の波長依存性）に応じて励起光の波長を適切に設定することで、ヘモグロビンやメラニン以外の物質も撮像可能であり、インドシアニンググリーンをはじめとする色素や、金属ナノ粒子等を光音響造影剤として用いた報告もなされている。光音響イメージングは、他の光を用いたイメージング手法同様に低侵襲であり、リアルタイム性に優れる。さらに光と比較して生体組織内での散乱係数が小さい超音波を観測する原理により、励起、観測とも光を用いる光学イメージングよりも生体内部をより深くまで撮像可能な利点がある。

CTC の in vivo 観察を目指した先行研究として、蛍光イメージングを用いる方法(20, 21)や、金属ナノ粒子による表面増強ラマン散乱（surface-enhanced Raman scattering: SERS）を用いる方法(22)等が検討されているが、in vivo CTC 観察を行うにあたっては、それら光を用いたイメージング技術よりも、光音響イメージングは観

察可能な深さの面で有利であると考えた。

また、光音響イメージングでは生体からの情報を光と比較して速度が遅い超音波の形で検出することから、光による励起から超音波の検出までの時間差をもとに、光吸収体と超音波センサとの間の距離を特定でき、奥行き方向の情報を得られるという、光学顕微イメージングや蛍光イメージングといった他の光学イメージング法にはない特徴がある(19)。

本学における先行研究では、防衛医科大学校医用工学講座が企業と共同で、主にヘモグロビンが吸収する波長のレーザーと一般臨床にも利用されているアレイ型の超音波センサとを用いたイメージング装置を開発し、生体内の血液の分布を画像化できることを示した(23)。さらに、防衛医科大学校泌尿器科学講座においては、これを悪性腫瘍の観察手法として応用し、体内の血管分布を描出可能であること、悪性腫瘍による血管増生を画像化できることが報告されている(24, 25)。

本研究の目的である *in vivo* CTC 検出を達成するためには、低侵襲であり、かつ体表から CTC が流れる血管内部を細胞レベルで観察しうる観察深度と空間分解能を有する画像化技術が必要である。そこで本研究では、細胞レベルの構造を観察可能な光音響技術を用いたイメージング法である光音響顕微鏡 (Photoacoustic Microscopy; PAM) を応用した、*in vivo* CTC 検出に関する基礎的技術の研究を行った。

PAM はパルス光を観測対象物に集光して照射し、集光範囲にある光吸収体が発生する光音響波を単素子超音波センサで観測することにより、光学顕微鏡相当の空間分解能で光吸収体の分布を画像化する技術である(26)。PAM はその測定原理上、一度の観

測では光軸に沿った 1 ラインの情報しか得られないため、断面画像あるいは 3 次元画像を得るためには何らかの方法で観測部位を移動（走査）する必要がある。

PAM を *in vivo* 観察に適用した先行研究として、血液中の酸素化ヘモグロビンと脱酸素化ヘモグロビンをマルチカラー観察（2 種類以上の異なる波長の励起光を照射し観察することで光吸収体の弁別を行う方法）することにより、血管内の酸素飽和度を画像化した報告(27, 28)や、色素を光音響造影剤としてリンパ管内に投与し、血管と弁別した(29)報告がなされている。

PAM を用いた *in vivo* CTC 検出の報告としては、腫瘍細胞自体がメラニン色素を産生するメラノーマ細胞の CTC を血液中で観察した報告(30-32)等があるが、光音響イメージングの原理上、光吸収体と光吸収体の吸収スペクトルに合致する波長の励起光の 2 要素が必須であることから、メラノーマ以外の生体由来の色素をもたない腫瘍細胞を対象とした PAM による CTC 検出についてはこれまでのところ報告がなされていない。そこで、本研究では前立腺癌 CTC を光音響造影剤で修飾することにより、PAM で *in vivo* 検出することを目指した。

しかしながら、PAM の励起光源に必要とされる仕様（パルス幅、パルスエネルギー、繰り返し周波数）の制約から PAM に関する先行研究ではいずれも主に単一波長レーザーによる励起や複数の単一波長レーザーを組み合わせるマルチカラー観察する方式が用いられており、励起光の波長の制約から光音響造影剤として用いる光吸収体の選択肢は大きく制限されているのが現状である。

本研究では、これを解決する目的でスーパーコンティニウム（Super Continuum:

SC) 光と呼ばれる広帯域光から目的の波長の光を抽出して励起光として用いることとした。SC 光源は可視光から近赤外 (Near InfraRed; NIR) 光まで単一モードのビーム特性をもつパルス光を発生させられるため、誘導放出抑制顕微鏡 (Stimulated Emission Depletion Microscope; STED) (33)、コヒーレント反ストークスラマン散乱顕微鏡(34)、多光子顕微鏡(35)等に用いた研究の報告がなされている。近年、PAM への使用に十分なエネルギーを持つパルス光を出力可能な SC 光源が開発(36, 37)され、PAM への応用例も報告されている(37-41)。

PAM の励起光として SC 光を採用することで、これまで励起光の波長による制限で用いることができなかった様々な種類の光吸収体を光音響造影剤の候補とすることができるようになる。このため、前立腺癌をはじめとした、生体由来の色素をもたない腫瘍細胞においても光音響造影剤を含む抗体等で修飾することにより、in vivo CTC 検出が実現できる可能性があると考えた。

本研究では、PAM により光音響造影剤で修飾した CTC を in vivo 検出するのに必要な性能として、

- ①細胞レベルのサイズの光吸収体を画像化できる空間分解能
- ②血管を描出し、かつ、マルチカラー観察により血管内でヘモグロビンと光音響造影剤で修飾した CTC を弁別する能力
- ③それらを実現するのに十分な感度
- ④ in vivo 観察を実現できる構造
- ⑤CTC が観察範囲内に存在している間に観察を完了できる撮像速度

を想定し、開発した PAM にそれらがそれぞれ備わっているかを検討した。

①の空間分解能について、PAM は空間分解能を規定する因子により、AR (Acoustic-Resolution) -PAM と OR (Optical-Resolution) -PAM に大別される。

AR-PAM は広い範囲に励起光を照射し、焦点型超音波センサ（音響レンズ等により信号検出範囲を限定している超音波センサ）により光音響波の発生部位を特定する方式で、空間分解能の規定因子は超音波センサの音響焦点の大きさである。AR-PAM を用いた先行研究において *in vivo* 観察における観察可能な深さは 3 mm 程度、水平方向空間分解能は 45 μm 程度と報告されている(42)。

これに対し、OR-PAM は対物レンズ等で励起光を集光し、超音波センサが観察する部位よりもはるかに小さい範囲に存在する光吸収体のみを励起することにより光音響波の発生部位を制限する方式であり、空間分解能の規定因子は集光によって得られる光学焦点の大きさである。OR-PAM に関する先行研究の結果では、超音波よりも光の方が生体内での散乱係数が高いことを反映し、*in vivo* 観察における観察可能な深さは 700 μm 程度と AR-PAM と比較すると短い、水平方向空間分解能は 5 μm 以下と報告されており(43)、AR-PAM よりも高い分解能で観察できる。

ここで、前立腺癌患者における CTC の平均サイズは約 8 μm と報告されており(44)、前立腺癌に対する *in vivo* CTC 検出を実現するためには、高い空間分解能が求められると想定されるため、本研究では OR-PAM を基礎とした技術開発を行った。

本研究では、光音響造影剤で修飾した前立腺癌 CTC の *in vivo* 観察という目的を達成するため、第 2 章では高感度が得られる超音波センサを選定し、励起光を照射する

対物レンズと超音波センサとで観測対象を挟む形状の透過型 PAM を構築し、①～③の性能を満たすことが原理的に可能なことを実証した。

第 3 章では、④の性能を満たすため対物レンズと超音波センサとを観測対象から見て同方向に配置することで、in vivo イメージングに適する反射型 PAM を構築した。

反射型 PAM に移行する第一段階としてマルチカラー観察時に問題となりうる色収差（光の波長によって光学レンズ入射時等の屈折率が異なるため、対物レンズの焦点距離が変わる等の影響を生じる現象）の影響を除去する目的で、その集光原理上、色収差の影響を受けない反射対物レンズの優位性について評価を行い、これを反射型 PAM の励起光を集光する対物レンズとした。

また、⑤の性能について、PAM による in vivo CTC 検出を実現するためには、観察範囲内に CTC が存在する間に撮像を終える必要があるが、前述の通り PAM はその光音響波の測定原理上断面画像を得るのに観察部位を走査する必要があるため、所要の撮像速度を得るためには、一定以上の走査速度を担保する必要があると考えられる。そこで反射型 PAM を構築するにあたっては、血中を流れる物質の経時的な動きを観測可能とするため、高速なイメージング法を適用した。

第 4 章では、第 3 章で作成した反射型 PAM を用いて実際に光音響造影剤で修飾した模擬 CTC の in vivo 観察を行った。ここで、PAM による in vivo 観察において考慮すべき内容として生体の光透過性がある。特に波長 600 – 1000 nm の NIR 光を含む波長域は光が生体を透過しやすく(23)「生体の窓」とも呼ばれている。この波長域の光を励起光とすることで光音響画像を取得する際、生体由来の背景ノイズを低減することが

できる。PAM に関連する先行研究においては、この波長域の励起光を用いてメラニンを赤色光～ NIR 光で画像化したり(30, 32)、SC 光から抽出した NIR 光で脂肪組織を画像化したり(45)する試みがなされている。この波長範囲に吸収ピークを示す物質を光音響造影剤として利用し CTC を染色して PAM で観察することにより、in vivo CTC 検出における血管内のヘモグロビン等生体組織と染色 CTC との弁別が実現できると考えた。

しかしながら、先行研究で用いられている観察手法は、単一波長レーザーの組み合わせでは前述した励起光波長の制限があり、SC 光を用いているものでは光源の繰り返し周波数や走査速度で規定される撮像速度が遅く、いずれの手法でも本研究の目的である光音響造影剤で修飾した CTC の in vivo 検出を実現するために必要な性能が得られない。本研究の目的を達成するためには、NIR 光を含む広い波長範囲でのマルチカラー観察性能と高い撮像速度を両立させる必要がある。

これらの背景から、本研究では高速な SC 光を励起光源とし高速走査が可能な PAM を開発し、近赤外色素で標識した CTC 模擬細胞を in vivo で観測できることを実証した。

第2章 透過型光音響顕微鏡の構築

2. 1 背景および目的

本章では、PAM を用いることで、in vivo CTC 観察が原理的に実現可能か検討する目的で、透過型 PAM の構築とそれを用いた実験を行った。

透過型 PAM の概略図を図 1 に示す。透過型 PAM とは、対物レンズから励起光を照射して観察対象物の対物レンズ側の面近傍に光音響波を発生させ、観測対象物内部を透過した光音響波を超音波センサで光音響信号に変換し収録する方式の PAM である。本実験では、研究開発用のコアユニット顕微鏡（明視野観察用）（CUS-BF, シグマ光機, 東京）をベースとして透過型 PAM を作製することにより、光学系の構成部品や超音波センサ等の各種構成要素の配置・交換・調整の自由度が高く、各実験においてより適切な実験条件を容易に設定できる構造とした。透過型 PAM を用いた実験を行うことで、PAM に用いる超音波センサの選定や PAM を用いた各種実験の条件の最適化等、第3章で述べる in vivo 観察が可能な構造の PAM を作成するための基礎的知見を得ることも目的とした。

まず、透過型 PAM を構築し、それを用いて超音波センサの素子材料や形状等につき横断的に比較し、PAM に搭載する超音波センサを検討した。第1章で挙げた通り先行研究で報告されている PAM は主に血液やメラノーマ細胞を観測対象としている。これらの観測対象は特定波長の励起光に対する光吸収係数が高く、効率よく光音響信号を発生する。これに対して、本研究では、染色細胞を観測対象とする。一般に染色細胞の光吸収係数は血液やメラニンと比較して低いと想定されるため、これを検出す

るためには高感度な PAM 装置が必要である。そこで、PAM 全体の感度を決定する主要因である超音波センサについて検討し、高感度が得られる条件を同定した。

次に、作成した透過型 PAM の実証実験を行った。本章では、第 1 章で挙げた *in vivo* CTC 検出に必要な PAM の性能のうち、①～③の機能、すなわち、①細胞レベルのサイズの光吸収体を画像化できる空間分解能、②血管を描出し、かつ、マルチカラー観察により血管内でヘモグロビンと光音響造影剤で修飾した CTC を弁別する能力、および③それらを実現するのに十分な感度、がそれぞれ備わっているかを検討した。

2. 2 透過型光音響顕微鏡の構築および超音波センサの評価

2. 2. 1 背景および目的

PAM において光音響信号を検出するために用いる超音波センサは、PAM システム全体の感度や撮像可能範囲等、イメージング装置としての性能を決定付ける重要な要素技術であり、その性能は超音波を電圧に変換する役割を担う圧電素子の材料、形状に強く依存する。表 1 に超音波センサに広く使用されている代表的な圧電素材の特性値を示す(46)。理論的には、超音波から電圧への変換効率に相当する圧電出力定数 g_{33} [Vm/N] の素子材質を用いて、素子厚み l [m] で作製されている超音波センサで音圧 p [N/m²] の超音波を観測した場合の出力電圧 V_{out} [V] は、次の式で導かれる(46)。

$$V_{out} = g_{33} \cdot l \cdot p \quad (1)$$

設計上の素子周波数に対する素子厚み l [m] は素子材質中の音速 cl [m/s] に比例するため、超音波センサの感度は圧電出力定数 g_{33} [Vm/N] と、素子材質中の音速 cl [m/s]

に比例する。

しかしながら、上記理論値はあくまでセンサ素子全体を圧電素材単体で作成した場合にのみ適用できるものであり、実際に作成した超音波センサの感度はセンサの圧電素材自体に対するコンポジット化等の加工、バックリング材の付加や素子形状の設計による圧電素子の機械的な共振周波数の設定や伝送ケーブルやアンプによる電氣的な損失等、圧電素材単体でみた性能以外の要因にも強く影響される。このため、最適な超音波センサを選定するためには、超音波センサを実際に製作し横断的に比較する必要があると考えられる。

そこで本実験では、PAM を構築する上で最適な超音波センサを選定するために、広帯域な周波数を発する点音源を用いた超音波センサ評価実験系を確立し、PAM システム全体の検出感度に影響する感度特性と、ガルバノミラーシステムによる光学焦点走査を実装する場合の撮像可能範囲に影響する空間感度分布に着目して、圧電素子材料および共振周波数が異なる超音波センサの性能を比較した。

2. 2. 2 対象および方法

2. 2. 2. 1 実験系

本研究で用いた実験系の模式図を図 2 に示す。本実験では、前述の通り研究開発用のコアユニット顕微鏡（明視野観察用）（CUS-BF, シグマ光機, 東京）をベースとして透過型 PAM を作製し、そこに超音波センサの評価に必要な機材を組み込んで実験を行った。光学顕微鏡に組み込むことにより撮影した光音響顕微画像と光学顕微観察画像

の比較が行える環境を構築した。

SC 光源 (SM-30-W, Leucos, Limoges, France: 波長帯域幅 500-1900 nm, パルス幅 <1 ns, 繰り返し周波数 20 kHz) から射出された広帯域光から、バンドパスフィルタ (PB0124, 朝日分光, 東京: 透過波長 630-670 nm) とコールドフィルタ (CLDF-50, シグマ光機, 東京: カットオフ波長 700 nm) により抽出した 630-670 nm の狭帯域光を励起光とした。

縮小光学系により励起光のビーム径を対物レンズの瞳径と一致させ、倍率 50 倍の対物レンズ (EPL-50, シグマ光機, 東京: 開口数 (Numerical Aperture; NA) 0.55, 作動距離 8.2 mm) に導入した。

光学焦点上に音源となる光吸収体をおき光音響現象によって発生した光音響波を超音波センサで観測し、電気信号 (以下、光音響信号と称する) として観測した。評価対象の超音波センサは 3 軸自動ステージに設置した治具で鉛直に固定し、光学焦点との位置関係を任意に設定できるようにした。

PAM の先行研究で用いられている超音波センサの多くは市販品で、平面型センサと音響レンズを組み合わせて光音響波を観測する形式が多く報告されている(47-49)。ここで、OR-PAM の励起部位のような点音源から発生した超音波の音圧は音源の距離の 2 乗に反比例して減衰 (拡散減衰) するため、より高い感度で光音響波を観測する、すなわち、光音響波をより強い音圧で受けるためには、超音波センサはできるだけ励起光照射部位に近づける必要がある。そのため、本研究では、超音波センサの素子自体を球状凹面型に加工し、その曲率半径 (spherical radius; SR) に相当する距離で感度

が極大となる音響焦点を有する焦点型センサを用いた。

本実験で評価対象とした超音波センサの一覧を表 2 に示す。本実験では、それぞれ異なるメーカーに仕様を提示して製造を依頼したポリフッ化ビニリデン - 三フッ化エチレン (P(VDF-TrFE))、チタン酸ジルコン酸鉛 (Pb(Zr・Ti)O₃; PZT) 1-3 composite、ニオブ酸リチウム (Li-Niobate; Li-Nb) 1-3 composite の超音波センサを比較した。

超音波センサで取得した光音響信号は、バイポーラアンプ (SA-230F5, エヌエフ回路設計ブロック, 神奈川: 入力インピーダンス 50 Ω , 利得 46 dB) 或いは FET (Field Effect Transistor) アンプ (SA-220F5, エヌエフ回路設計ブロック, 神奈川: 入力インピーダンス 1 M Ω , 利得 46 dB) で増幅し、オシロスコープ (DSO8104A, Agilent, CA, USA) で収録した。

本研究で使用した FET アンプの入力換算雑音電圧密度は 0.5 nV/Hz^{1/2} であるのに対し、バイポーラアンプの入力換算雑音電圧密度は 0.25 nV/Hz^{1/2} とおおよそ 1/2 であり、バイポーラアンプはより低雑音である。一方で、FET アンプは入力インピーダンスが大きいため、出力インピーダンスの高い超音波センサで検出した信号を高効率に増幅可能である。また、超音波センサの出力インピーダンスは超音波センサごとに異なり、それぞれ強い周波数依存性を有する。このため、評価実験においては超音波センサごとに適したアンプを使用する必要があった。P(VDF-TrFE) 製の超音波センサは出力インピーダンスが高いため FET アンプを、PZT 製の超音波センサは出力インピーダンスが低いためバイポーラアンプを使用して光音響信号を増幅した。Li-Nb 製の超

音波センサの出力インピーダンスは未知であったため、両方のアンプを用いて評価した。以後、Li-Nb センサの結果を表記する場合には、使用したアンプのインピーダンスを末尾につけて区別する（例: Li-Nb1 センサをバイポーラアンプに接続した場合、Li-Nb1_50 と称する）。

センサ評価に用いる光音響波発生音源について、超音波センサの感度特性を適切に評価するためには、音源は超音波センサが観測対象とする周波数帯を全域にわたってカバーする広帯域な超音波を発生する必要がある。また、空間感度特性を評価するためには、光音響波が発生する範囲、すなわち音源の大きさは超音波センサで観測可能な超音波の波長に比して十分に小さく、点音源とみなせる必要がある(50)。本実験では、光吸収係数が十分に大きい黒インク（以下 BI, INK350B, パイロットコーポレーション, 東京）をスライドガラス上に置き、両者の界面上に励起光の焦点を合わせて水平方向スポット径を $1\ \mu\text{m}$ 以下とした。光音響波の周波数の最大値はスポット径が小さいほど高くなり、スポット径 $1\ \mu\text{m}$ の励起部位からは最大で 100 MHz を超える光音響波が発生すると想定された。これは今回実験で用いた超音波センサが主な観測対象とする周波数よりも十分高い。

次に、励起光の侵達長を推定するために分光光度計（UV-1900, 島津製作所, 京都）を用いて BI の光吸収係数を測定した。分光光度計において計測範囲として設定可能な Optical Density（OD）の最大値が 4 であるため、吸収ピーク波長における OD が 4 以下となるように BI を 500 倍に希釈し、光路長 10 mm の光路長の石英セルに注入して光吸収スペクトルを計測した。吸光度の計測値に、希釈倍率に相当する 500 と吸光

度を光吸収係数に換算する係数 $\ln(10)$ を乗じたところ、630-670 nm の波長範囲における光吸収係数は $1510\text{-}1890\text{ cm}^{-1}$ であった。ランベルト・ベールの法則(51)より照射した光の 86.5% (\div 透過率 $1/e^2$) は界面から $10.6\text{-}13.2\text{ }\mu\text{m}$ の深さで吸収される。この長さは超音波の波長（水中音速 1500 m/s ）でいえば $114\text{-}141\text{ MHz}$ に相当し、励起光の侵達長の面からも、今回作成した音源は本実験で超音波センサが観測対象とする周波数帯を十分カバーする広帯域の光音響波を発生する点音源であると判断した。

BI から発生した光音響波を超音波センサ表面まで伝播させる方法を図 3 に示す。ステージ上に設置したスライドガラス上に BI 約 0.3 ml を滴下し、液柱の高さを確保するスペーサ（ 1 mm 厚）をスライドガラス上に置いた。その上に底面に直径 10 mm の穴をあけ、外側にポリ塩化ビニリデンフィルム（業務用サランラップ、旭化成ホームプロダクツ、東京：平均シート厚 $11\text{ }\mu\text{m}$ ）を漏水の無いよう貼りつけて音響的開口部とした水槽を設置することで、スライドガラスと音響的開口部との間に高さ 1 mm の黒インク柱を作製し、光音響波の発生源、および媒質とした。水槽内に脱気した純水を入れ、音響的開口部から超音波センサまでの光音響波の媒質とした。

励起光のパルスエネルギーは減光（Neutral Density; ND）フィルタを用いて 11.3 nJ/pulse とした。超音波センサで取得した光音響信号を、増幅率 46 dB のバイポーラアンプ（SA-230F5, エヌエフ回路設計ブロック, 神奈川）で増幅して計測し、解析時にこの増幅分を補正し、本実験における波形収録の際は 512 回の加算平均処理を施した。

2. 2. 2. 2 受信感度特性

図 2 の実験系で、各超音波センサについて音響焦点と音源が一致するように配置し、光音響信号を収録した。このとき、音源と超音波センサとの距離は各超音波センサの SR に相当する 10 mm に設定した。水中音速は 1500 m/s (52) であるので、励起光を照射してから超音波センサで光音響信号を検出するまでの遅延時間が 6.67 μ s となるように超音波センサの位置を調整した。以後の実験でも同様の方法で超音波センサと音源の距離を設定した。励起光のパルスエネルギーは各超音波センサで信号の飽和を起こさないよう調整し、2.25 nJ/pulse とした。

単位照射エネルギーあたりの信号強度 si (signal intensity) [V/J] を、励起光のパルスエネルギー E [J] と得られた光音響信号 s [V] から、次式により求めた。

$$si = s/E \quad (2)$$

si の絶対値の最大値 $\max |si|$ を各超音波センサの受信感度特性の指標とした。

2. 2. 2. 3 空間感度分布

本研究で作成した OR-PAM では、水平方向の空間分解能は主として、対物レンズの倍率や NA、および対物レンズに入射するレーザーの質によって規定される光学焦点の大きさによって決定づけられる。このため、音響焦点が光学焦点より十分に大きい場合、音響焦点の範囲内で光学焦点を走査しても感度が落ちないのでガルバノミラー等を用いた光学走査の導入(53)を検討したり、その場合の撮像範囲を決定したりする因子となるため音響焦点の大きさは PAM システム全体の設計に関する知見として重要であ

る。

今回は、本実験系において光学焦点が音響焦点よりも十分小さいことの確認、および超音波センサの作成精度の確認の 2 点を目的として、超音波センサ水平方向の空間感度分布を検討した。

超音波センサの理論上の半値全幅 (full width at half maximum; FWHM) Δy_{ideal} は超音波ビームの太さ d [m] の半分であり、超音波の波長を λ [m]、超音波センサと対象物の間の距離を X [m]、センサ直径を D [m] とすると、以下の式で近似される(54)。

$$\Delta y_{ideal} = 1.22 \cdot \lambda \cdot X / D \quad (3)$$

Δy_{ideal} を算出する際、超音波センサごとに波長 λ が異なるため、各超音波センサの周波数感度特性を測定した。

まず、音源から発生する光音響波の周波数特性 P [Pa] を校正済みのハイドロホン (PAL-HPM05, Precision Acoustics, Dorset, UK) を用いて解析した。ハイドロホンと音源の距離は、各超音波センサの SR に相当する 10 mm に設定した。

ハイドロホンの周波数感度特性 M_H [V/Pa] は既知であるため、ハイドロホンを用いて得られる光音響信号 $s_H(t)$ のフーリエ変換 $S_H(f)$ [V] から、 P [Pa] は以下の式で表される。

$$P = S_H(f) / M_H \quad (4)$$

音源の位置が各超音波センサの音響焦点と一致するように超音波センサの位置を微調整して光音響信号を観測し、得られた光音響信号 $s_s(t)$ のフーリエ変換 $S_s(f)$ [V] を求めた。これと (4) 式で求めた周波数特性 P [Pa] を用いて、次式により超音波センサの

周波数感度特性 M_S [V/Pa] を次式により求めた。

$$M_S = S_S/P \quad (5)$$

各超音波センサで M_S を求め、周波数感度スペクトルの重心となる周波数を、各超音波センサの感度特性における代表的な周波数とした。それに対応する波長 λ を (3) 式に代入して各超音波センサの Δy_{ideal} を算出した。

次に超音波センサを水平方向に走査 (5 $\mu\text{m}/\text{step}$, 100×100 step) させ、それぞれの点における $\max |s_i|$ を測定した。X 方向と Y 方向の空間感度分布に大きな違いがないことを確認し、X 方向の空間感度分布について解析し、得られた FWHM を各超音波センサで算出した Δy_{ideal} と比較した。

2. 2. 3 結果および考察

2. 2. 3. 1 受信感度特性

それぞれの超音波センサで測定した $\max |s_i|$ を比較したグラフを図 4 に示す。これを見ると、P(VDF-TrFE) センサが最大で、次いで Li-Nb センサ、PZT センサの順となった。

表 1 に示した各素子材料の圧電出力定数、音速から求められる素子厚の比を (1) 式に代入することによって得られる素子ごとの $\max |s_i|$ の序列と今回の実験結果の序列は一致した。しかしながら、P(VDF-TrFE) センサと PZT センサでは予測される $\max |s_i|$ に 2.5 倍の開きがある一方で、 $\max |s_i|$ の実測値の差は 2 倍未満で、理論値と実測値の乖離が見られた。素子材質のパラメータ以外の要因として、

- ・素子表面での音響インピーダンス不整合による反射
- ・コンポジット化による素子特性の変化
- ・素子とアンプとでの分圧、素子と超音波センサとを接続するケーブルによる損失
(素子材料の誘電率、ケーブルの特性インピーダンスが影響)
- ・機械的共振効果の影響

等が考えられる。素子材料、特に、コンポジット化した場合の素子材料特性値はばらつきが非常に大きいため、これらをすべて考慮した理論計算は困難であり、超音波センサを実際に作成して実験的に比較する必要があると考えられる。

2. 2. 3. 2 空間感度分布

空間感度分布測定の一例として、Li-Nb1_50 センサでの結果を図 5 に示す。本センサの感度分布の FWHM は $165\ \mu\text{m}$ との結果を得た。他の超音波センサについても同様に FWHM を計測し、これを実測値 Δy_{act} として理論値 Δy_{ideal} と比較した。

結果を表 3 に示す。 Δy_{act} と Δy_{ideal} との比は一定の傾向を示し、 $\Delta y_{\text{act}}/\Delta y_{\text{ideal}}$ は 1.20-1.33 の範囲の値を示した。空間感度分布は素子材料によらず、素子形状により規定されることが確認された。これにより、第 3 章で光学焦点走査による撮像速度の高速化を実装する際に、素子形状のパラメータから一定以上の感度が得られる撮像範囲を推定できると考えた。

2. 3 透過型光音響顕微鏡による実証実験

2. 3. 1 背景および目的

本項では、2. 2 で得られた結果をもとに、P(VDF-TrFE) センサを超音波センサとして採用した透過型 PAM を構築した。

これを用いた実験を行い、第 1 章で挙げた *in vivo* CTC 検出に必要な PAM の性能のうち、①細胞レベルのサイズの光吸収体を画像化できる空間分解能、②血管を描出し、かつ、マルチカラー観察により血管内やその周囲でヘモグロビンと CTC 等を模擬した染色腫瘍細胞を弁別する機能、③それらを実現するのに十分な感度、がそれぞれ備わっているかを検討した。

2. 3. 2 対象および方法

2. 3. 2. 1 実験系

本実験で用いた透過型 PAM の模式図を図 6 に示す。

2. 2 の実験同様、SC 光源から射出された広帯域光からコールドフィルタで赤外光をカットし、バンドパスフィルタにより目的の波長帯を抽出した狭帯域光を励起光とした。必要に応じ ND フィルタを光路上に設置し、励起光のエネルギーを調整した。対物レンズは観測対象に応じて換装可能とした。

光学焦点上に観察対象物を配置し、発生した光音響波は光軸上、観察対象物の反対側に光学焦点と音響焦点が一致するよう配置した超音波センサで光音響信号として観測した。観察対象物は 3 軸自動ステージ上に設置し、観察位置を任意に設定できるよ

うにした。超音波センサについては、2. 2で最も高感度であった P(VDF-TrFE) センサを使用して、取得した光音響信号は、FET アンプ (SA-220F5, エヌエフ回路設計ブロック, 神奈川: 入力インピーダンス 1 M Ω , 利得 46 dB) で増幅し、オシロスコープで収録し、コンピュータで解析を行い、画像化した。

また、光学顕微観察を可能とするため、カメラを設置し、顕微観察用照明光として、発光ダイオードスポット照明 (SLSI-22G, シグマ光機, 東京) からの光を対物レンズに導入し、落射型光学顕微鏡としての機能を持たせた。

2. 3. 2. 2 赤血球の観察

透過型 PAM が細胞レベルのイメージングに必要な感度および空間分解能を有することを実証するために、日本白色家兎から採血した血液から抽出した赤血球を対象にイメージングを行った。本実験は、防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て行った (承認番号 17027: 近赤外線を用いた無侵襲生体検査技術の臨床価値探索)。

日本白色家兎から採血した 10 mL の血液に 4000 単位のヘパリンを加えた後に、2000 G, 4 $^{\circ}$ C, 15 分の条件で遠心分離し、血漿およびバフィーコートを除去しリン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline; PBS) で洗浄した。この処理を 3 回繰り返すことにより洗浄ウサギ赤血球溶液を得た(55)。これを hematocrit 0.2 % 相当に希釈し、厚さ 50 μ m の分光光度計用分解セル (AB20-UV-0.05, GL Science, 東京) 上に滴下した。液面の上面にポリ塩化ビニリデンフィルム (業務用サランラップ, 旭化成ホームプロダクツ, 東京: 平均シート厚 11 μ m) を張り、これを介して透過型 PAM で観察した。

励起光は SC 光源 (SM-30-W, Leucos, Limoges, France) を用いて、出射光からコールドフィルタ (CLDF-50, シグマ光機, 東京: カットオフ波長 700 nm) で赤外光をカットし、バンドパスフィルタ (PB0120, 朝日分光, 東京: 透過波長 550-590 nm) でヘモグロビンが高い光吸収係数を有する 550-590 nm の狭帯域光を励起光として抽出した。これを倍率 5 倍の対物レンズ (EPL-5, シグマ光機, 東京: NA 0.13, 作動距離 11.6 mm) で集光させて光音響顕微観察を行った。観察対象物を自動ステージで水平方向にスキャン ($1\text{ }\mu\text{m/step}$, $80\times 80\text{ step}$) し、各点でそれぞれ 64 回の加算平均処理を行った。ヒルベルト変換を利用して信号波形の包絡線を算出し、包絡線の最大値をその点における光音響信号の最大値としてプロットした。

2. 3. 2. 3 微小血管の観察

透過型 PAM により生体内のヘモグロビンの局在を顕微観察し、毛細血管や細動脈、細静脈レベルの微小血管を描出することができることを実証するために、切除したヌードマウス耳を対象としたイメージング実験を実施した。本実験は、防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て行った (承認番号 17026: 腫瘍モデルマウスに対する光-超音波法による分子イメージング および承認番号 21040: 光-超音波法によるがんの分子イメージングに関する研究)。

犠牲死後のヌードマウスの耳の付け根を鉗子で挟み血管を挫滅させるとともにうっ血させて切除し、水槽底面に固定した。

2. 3. 2. 2 同様、ヘモグロビンを光音響観察の主ターゲットとし、SC 光源

(SM-30-W, Leucos, Limoges, France) から出射された SC 光からコールドフィルタ (CLDF-50, シグマ光機, 東京: カットオフ波長 700 nm) で赤外光をカットし、バンドパスフィルタ (PB0120, 朝日分光, 東京: 透過波長 550-590 nm) で波長 550-590 nm の狭帯域光を抽出し、励起光とした。これを倍率 10 倍の対物レンズ (EPL-10, シグマ光機, 東京: NA 0.3, 作動距離 6.4 mm) に入射させて観察対象物の表面に集光し、光音響顕微観察を行った。

観察対象物を自動ステージで水平方向にスキャン ($8\text{ }\mu\text{m/step}$, $400\times 400\text{ step}$) し、各点でそれぞれ 256 回の加算平均処理を行い、ヒルベルト変換を利用して信号波形の包絡線を算出し、包絡線の最大値をその点における光音響信号の最大値としてプロットした。

2. 3. 2. 4 染色前立腺癌細胞皮下腫瘍の観察

透過型 PAM により生体内の微小血管のイメージング、およびマルチカラー観察による光吸収体の弁別が可能なことを実証するために、細胞染色試薬で染色した前立腺癌細胞株を用いて作成した皮下腫瘍とその周囲の血管を対象としたマルチカラー観察を実施した。本実験は、防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て行った（承認番号 17026: 腫瘍モデルマウスに対する光-超音波法による分子イメージング および承認番号 21040: 光-超音波法によるがんの分子イメージングに関する研究）。

PC-3 細胞（ヒト前立腺癌細胞）は、最小必須培地（Minimum Essential Medium; MEM, Gibco 11095080, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）に 10 % ウ

シ胎児血清 (SH3091003, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) と 1 % 抗菌薬 (15240-062; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を加え 37 度、二酸化炭素濃度 5 % で培養した。

次に染色を行った。培養細胞をトリプシン処理し浮遊細胞とした後、近赤外細胞膜染色色素 (CellBrite NIR750 Cytoplasmic Membrane Dye (以下 CellBrite NIR750) , Biotium, Fremont, CA, USA) を添加しその濃度が 20 μ M となるよう調製した培地に浮遊させ、37 度、二酸化炭素濃度 5 % の培養器内に設置した振盪機 (NA-101N, 日伸理化, 東京) 上で 24 時間の震盪培養を行った後、ハンクス平衡塩溶液 (Hank's Balanced Salt Solution; HBSS) で洗浄し、CellBrite NIR750 染色 PC-3 細胞を得た。

3×10^6 個の CellBrite NIR750 染色 PC-3 細胞をオスのヌードマウスの大腿部皮下に接種して皮下腫瘍を形成させ、7 日後に皮膚を切開、皮下組織を剥離して腫瘍を露出させ、露出面から光学顕微鏡および透過型 PAM で観察を行った。

SC 光源 (SC-Pro-HP, YSL photonics, 武漢, 中華人民共和国: 波長帯域幅 430-2400 nm, パルス幅 <1 ns, 繰り返し周波数 100 kHz) から出射された SC 光からコールドフィルター (SC1101, 朝日分光, 東京: カットオフ波長 1100 nm) で赤外光をカットした、マルチカラー観察を行う目的で複数のバンドパスフィルター (86-952 および 84-800, Edmund Optics, Barrington, NJ, USA: 中心波長 575 および 750 nm, 帯域幅 50 nm) で抽出した狭帯域光を用いて、それぞれ同一視野の観察を行った。励起光のパルスエネルギーは十分な信号強度を得られ、なおかつ信号強度が観察可能上限を超えない範

囲に収まるよう、750 nm で 120 nJ、575 nm で 90 nJ にそれぞれ設定した。

観察対象物を自動ステージで水平方向にスキャン (4 $\mu\text{m}/\text{step}$, 1200 \times 1200 step) し、各点でそれぞれ 64 回の加算平均処理を行い、各波長でヒルベルト変換を利用して信号波形の包絡線を算出し、包絡線の最大値をその点における光音響信号の最大値としてプロットし、重ね合わせ画像を作成した。また、励起光照射から光音響波観測までの遅延時間から光音響信号波形の時間分解を行い、それぞれの時間範囲における信号波形の最大値をプロットし、深さ別の画像再構成を行った。

2. 3. 3 結果および考察

2. 3. 3. 1 赤血球の観察

図 7(a) に透過型 PAM システムで観察した赤血球の光顕像、図 7(b) に透過型 PAM で観察し、得られた光音響顕微画像の水平投影像をそれぞれ示す。開発した透過型 PAM により、細胞・赤血球レベルのサイズの構造を弁別してイメージング可能な空間分解能と単一赤血球から発せられる光音響信号を観測可能な感度が得られることを確認した。

2. 3. 3. 2 微小血管の観察

図 8(a) に肉眼的観察所見を示す。四角で示す部位を透過型 PAM で観察し、得られた光音響顕微画像の水平投影像を図 8(b) に示す。肉眼的に観測できる血管に加え、目視では観測できない太さの微小血管が画像化されていることが確認できる。

2. 3. 3. 3 染色前立腺癌皮下腫瘍の観察

図 9(a) に観測対象とした皮下腫瘍の光学顕微鏡画像を示す。写真中の四角は PAM での観察範囲である。図 9(b) に実験模式図を示す。皮膚を剥離し、皮膚裏面から観察したため、皮下腫瘍の存在により周囲の皮膚が腫瘍裏面側に持ち上がっている状態で観察した。575 nm で励起しヘモグロビンを主な観察対象とした光音響顕微画像の水平投影像を図 9(c) に示す。腫瘍に相当する部位およびその周囲、それぞれで血管が描出されている。y=0 における光照射から光音響波の観測までの時間を奥行き情報としてプロットした垂直方向 (x-z) 断面画像を図 9(e) に示す。腫瘍部では表面側に、周囲の皮下組織に相当する部位では腫瘍の裏面側に、それぞれ血管が描出されている。

図 9(d) に、750 nm で励起し細胞染色試薬 (CellBrite NIR750) を主な観察対象とした光音響顕微画像の水平投影像を示す。皮下腫瘍が描出される他、その周囲に散在する光音響信号を認める。皮下に注射した腫瘍細胞の周囲に進展する腫瘍細胞と考えた。y=0 における垂直方向 (x-z) 断面画像を図 9(f) に示す。腫瘍の表面で特に強い光音響信号が観測されている。

図 10 に 575 nm と 750 nm それぞれの光音響信号波形を時間分解して観察深度を絞った水平投影像を作成し、それらを重畳することにより作成した深さごとのマルチカラー観察画像 (z スタック画像) を示す。図 10(a) に示す腫瘍表面では主に腫瘍表面の微小血管が確認される。図 10(b) に示す腫瘍表面から 90 μm の深さの信号から作成した画像では腫瘍内部にヘモグロビン分布を認め、新生血管を検出しているものと考え

られた。図 10(c) に示す腫瘍表面から 300 μm の深さの信号から作成した画像では、腫瘍内部で強い信号を認めるほか腫瘍辺縁に細胞染色試薬で染色された細胞が検出され、皮下腫瘍が周囲に浸潤しているものと考えた。10(d) に示す腫瘍表面から 690 μm の深さの信号から作成した画像では、腫瘍の周辺に、腫瘍周囲の正常皮膚の血管分布が観察される。

本実験の結果から、透過型 PAM を使用してマルチカラー観察を行うことで複数の光吸収体の弁別が可能であることと、SC 光を励起光に用いることでこれまで励起光波長の制限から観察対象とすることが困難であった細胞染色試薬も光音響造影剤として用いることができる可能性が示された。また、光音響信号波形を時間分解することにより、光吸収体の深度に関する情報が得られることが示唆された。

2. 4 小 括

2. 2 (超音波センサの評価) では、評価項目として主に受信感度、空間感度分布に着目し、各種材質の超音波センサを横断的に評価した。結果として、P(VDF-TrFE) センサが最も高い $\max |s_i|$ を示し、本実験系においては、P(VDF-TrFE) センサが受信感度の面では他の超音波センサと比較し優位にあると推察された。

なお、超音波センサの評価実験の趣旨は、2019 年 9 月に開催された電気学会 光・量子デバイス研究会で口演発表を行った。

田地 一欽、石原 美弥、辻田 和宏、平沢 壮、大川 晋平、櫛引 俊宏、佐藤 正人、伊藤 敬一. 「透過型正立 PAM に用いる超音波センサの評価」『電気学会研究会

続いて作成した透過型 PAM では、2. 2において最も受信感度が高かった P(VDF-TrFE) センサを超音波センサに採用した。作成した透過型 PAM を用いて、単一赤血球が発生する信号を観測可能であること、生体表面における毛細血管のイメージングが可能であることと、マルチカラー観察により、毛細血管と染色前立腺癌細胞で作成した皮下腫瘍とを *in vivo* で弁別可能であることを実証した。また、腫瘍浸潤の先進部で染色前立腺癌細胞由来の信号を細胞単位でイメージングできていることが示唆された。また、光音響信号波形を時間分解することにより光吸収体の深度に関する情報が得られるという光音響イメージングの利点が PAM でも活用できる可能性が示された。これらの結果から、PAM を用いることにより本研究の目的である、CTC 観察のために必要なイメージング性能、すなわち、第 1 章で *in vivo* CTC 検出を実現するための必要条件として挙げた 5 つの条件のうち①～③まで満たす見込みが立ったと考える。次に解決すべき技術的課題として、第 1 章で *in vivo* CTC 検出を実現するための必要条件として挙げた 5 つの条件のうち、④*in vivo* 観察を実現できる構造、⑤CTC が観察範囲内に存在している間に観察を完了できる撮像速度があるが、次章でこれらの技術的課題を解決する。

第3章 反射型光音響顕微鏡の構築

3. 1 背景および目的

ここまで透過型 PAM を用いた実験を行い、PAM を用いることで CTC を観察するために必要なイメージング性能、第1章で in vivo CTC 検出を実現するための必要条件として挙げた 5 つの条件のうち、①～③を満たす見込みが立った。その上で、本研究の最終目的である in vivo CTC 検出を実現するためには、残る課題である、④in vivo 観察を実現できる構造、⑤CTC が観察範囲内に存在している間に観察を完了できる撮像速度をそれぞれ実現する必要がある。

まず構造の面について、透過型 PAM による in vivo 観察を検討する上で問題となるのが、その構造上、励起光照射部位と超音波センサとの間に観察対象物を配置する必要があるという点であるが、これにより 2 つの問題が生じうる。1 つは、測定可能な観察対象物の厚みの上限が超音波センサの SR によって規定される、すなわち超音波センサの SR よりも厚みのある観察対象物は励起光照射部位と超音波センサの間に入らないという問題であり、もう 1 つは光音響波が観察対象物内部の音響特性の影響を受ける可能性である。

前者について、超音波センサが発生させる電圧は超音波センサにかかる音圧に比例する(46)こと、PAM の励起部位で発生した光音響波の音圧は音源の距離の 2 乗に反比例して減衰することを考慮すると、超音波センサはできるだけ音源に近く配置することが感度を確保する上で有利である。逆に言えば、測定可能な観察対象物の厚みを確保するために超音波センサの SR を長くし、超音波センサを励起部位から離すという解

決法は、システム自体の感度低下という新たな問題の原因となりうる。

後者について、透過型 PAM ではその原理上、光音響波は励起光照射部位から超音波センサに到達するまでに観察対象物を透過する。培養細胞等薄い観察対象物であれば大きな問題となることはないが、その厚みが増すと観察対象物内部の超音波伝搬特性を無視できなくなってくる。特に生体を観察する場合、内部に含まれる肺、腸管といったガスを含む組織や、骨等周囲の軟部組織との音響インピーダンスが大きく異なる組織の存在が光音響波の伝搬に支障を来す原因となる。

これらの制限を回避し、生体をはじめとする厚みのある材料へと適用できる PAM の方式のひとつとして、反射型 PAM が挙げられる(42)。反射型 PAM の模式図を図 11 に示す。そもそも PAM で光音響波を発生させる場合、対物レンズから観察対象物に励起光を当てると発生した光音響波はその発生原理上、励起部位から球面波として伝搬する(56)。この性質を応用することで超音波センサを透過型 PAM とは逆に対物レンズと同方向に、光学焦点と音響焦点を共焦点となるように配置した超音波センサで観察する方式である。これにより観察対象物の表面側から励起し、発生した光音響波を同じ方向から観測することができるため、観察対象物の厚みの問題を解決できる。また、観測対象物の励起光照射部位側から光音響波を観測することで、観測対象物内部を光音響波が透過する必要がなくなり、観測対象物内部の音響伝搬特性の影響を受けることなく光音響信号を計測可能となる。

本章では、反射型 PAM を構築し、第 2 章で残された課題を解決することとした。反射型 PAM では設計上対物レンズと超音波センサを同軸上に配置する必要があるため、

励起光を集光するのに反射対物レンズを用いることを検討した。反射対物レンズの模式図を図 12 に示す。反射対物レンズは、Schwarzschild 光学系、すなわち曲面中心が一致する 2 枚の凹面（主鏡）と凸面（副鏡）の球面鏡を軸上に配置することで、顕微観察やコリメート光（平行光）の集光を可能とする光学系に基づいて設計されている (57)。ここで、コリメート光を反射対物レンズで集光する場合、副鏡に遮蔽されることにより光の中心に影ができる。ここに超音波センサを配置することとした。

まず、反射型 PAM への移行の第一段階として透過型 PAM に反射対物レンズを適用して透過対物レンズと比較し、反射対物レンズで透過対物レンズ同様に光音響顕微観察が可能であること、PAM に反射対物レンズを適用することにより、色収差の影響を受けずにマルチカラー観察を行えることを確認した。次に、反射型 PAM を作成した。反射型 PAM がその設計上 *in vivo* 観察に適することを確認し、また、反射型 PAM を構築する際にガルバノミラーシステムを採用し、これにより光学焦点を高速に走査し撮像を高速化することで、第 1 章で挙げた *in vivo* CTC 検出に必要な性能をすべて満たすことを確認した。

3. 2 反射対物レンズの導入

3. 2. 1 背景および目的

本研究では、広い波長範囲を対象としたマルチカラー観察を実現するために、SC 光からバンドパスフィルタを用いて任意の波長の光を抽出する方式により、励起波長を選択可能とした。これにより、広い波長範囲でマルチカラー観察が可能な構成となる

が、対物レンズによる色収差が問題となりうる。

色収差とは、屈折を用いて集光を行う光学レンズで、光の波長により焦点距離が変わる現象である。例えば、汎用的な単レンズの焦点距離 f [m] はレンズ材質の屈折率 n とレンズ両面の曲率 r_1 [m] および r_2 [m] から次式で求められる（ただし、曲率半径は、光の進行方向を正として計算する）。

$$1/f = (n - 1) \left(\frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2} \right) \quad (6)$$

ここで、レンズ材質の屈折率 n は光の波長に依存するため、焦点距離に波長依存性が生じる。顕微鏡用対物レンズにおいては色収差を補正するために、材質の異なるレンズを組み合わせることで色収差が補正されているが、広い波長域での補正は技術的に困難である。ここまで透過型 PAM で用いてきた対物レンズ（EPL/EPLE シリーズ）は可視光域（波長 400 – 700 nm）で色収差の補正がなされているが、その範囲を超えて NIR 光を励起光とする場合、対物レンズが色収差を補正している波長範囲を超え、光学焦点の移動が起こる可能性がある。この問題は PAM のみならず、マルチカラー顕微観察法に広く共通している問題であるが、これに対して、反射対物レンズを用いることでこれを解決できるとする報告がある(58)。

前述のとおり、反射対物レンズでは集光光学系を構成する 2 枚のミラーの曲率のみで焦点距離が決まる(58-60)。反射対物レンズの焦点距離 f [m] は主鏡の曲率 r_1 [m] および副鏡の曲率 r_2 [m] から、次式の通り表される。

$$f = r_1 \cdot r_2 / 2(r_1 - r_2) \quad (7)$$

反射対物レンズは一般的な光学レンズと異なり、波長依存性を持つ屈折率 n に依存し

ないことから、色収差の影響を受けず、広い波長範囲にわたって均一な集光を得られることが知られている(58)。

本章では、これまで用いてきた、光学レンズの屈折を利用した対物レンズ（反射対物と対比して透過対物レンズと称する）で色収差によっておこる影響を検討し、NIR光を含むマルチカラー光音響顕微観察を行う場合に色収差の影響を受けない反射対物レンズの有用性を確認する目的で、実験を行った。

3. 2. 2 対象および方法

3. 2. 2. 1 実験系

本実験における実験系を図 13 に示す。基本構成は第 3 章で作成した透過型 PAM を踏襲し、光源として SC 光源 (SM-30-W, Leucos, Limoges, France: 繰り返し周波数 27.62 kHz, 他の条件は第 2 章同様) を用いた。反射型コリメータ (RC08APC-P01, Thorlabs, Newton, NJ, USA) を用いて光をコリメートし、反射型ビームエキスパンダ (BE02R/M1, Thorlabs, Newton, NJ, USA) を用いて拡大することで、屈折光学系による色収差の影響を可及的に排除し、対物レンズによる色収差だけを評価できる光学系とした。励起光はコールドフィルタ (SC1101, 朝日分光, 東京: 透過波長 \sim 1100 nm) およびバンドパスフィルタ (86-951 および 84-789, Edmund Optics, Barrington, NJ, USA: 中心波長 525 および 800 nm, 帯域幅 50 nm) により狭帯域光とし、可変式 ND フィルタ (NDHN-U100, シグマ光機, 東京) で減光した。ビームプロファイラを用いて検討したところ、525 nm と 800 nm でのビーム径はそれぞれ 6.58 mm と 8.48 mm

であった。

対物レンズは倍率 10 倍の反射対物レンズ (OBLR-10A, シグマ光機, 東京: NA 0.2, 作動距離 19.9 mm) と透過対物レンズ (EPL-10, シグマ光機, 東京: NA 0.3, 作動距離 20 mm) を使用した。それぞれの対物レンズで同じ観察対象物に対して 2 種類の励起光を用いてマルチカラー光音響顕微観察を行うことにより、励起光の波長による色収差の影響の有無を比較した。

3 軸自動ステージを設置したサンプルステージ上に観察対象物を配置し、ステッピングモーター走査により観察位置を任意に設定できるようにした。発生した光音響波は光軸上、観察対象物の反対側に光学焦点と音響焦点が一致するように配置した P(VDF-TrFE) 製の超音波センサ (HD30-3.5-8, 本多電子, 愛知: 中心周波数 31.4 MHz, 素子直径 3.5mm, 焦点距離 8.2mm) で光音響信号として観測した。

光音響信号はバイポーラアンプ (SA-230F5, エヌエフ回路設計ブロック, 神奈川: 入力インピーダンス 50 Ω , 利得 46 dB) を 2 台用いて 92 dB の増幅を行い、ハイパスフィルタ (EF509, Thorlabs, Newton, NJ, USA) を用いて低周波成分のノイズを除去し、オシロスコープで記録した。

3. 2. 2. 2 色収差による光学焦点位置移動の評価

本実験では、まず、反射対物レンズを対象としたシミュレーションを行い、反射対物レンズでその集光原理上色収差が発生しないことの確認を行った。光学設計ソフトウェア (Optics Studio, Zemax, Kirkland, WA, USA) を用いて、レイトレーシング法

によるシミュレーションを行い、525 nm の励起光を入射したときの焦点面における集光度を 1 とした集光度合の比率（ストレール比: Strehl Ratio）を、525 nm と 800 nm それぞれの光を入射した場合における焦点面および焦点面 $\pm 20\text{ }\mu\text{m}$ 、 $40\text{ }\mu\text{m}$ で算出し比較した。525 nm と 800 nm でのビーム径はそれぞれ実測値である 6.58 mm と 8.48 mm を用いてシミュレーションを行った。

次に色収差が光音響顕微鏡画像に与える影響を評価する目的で、クロームコーティングされた顕微鏡校正用スケール（OBJT001, 渋谷光学, 埼玉県）を PAM で観察した。実験の模式図を図 14 に示す。観察対象物のスライドガラス内で発生する色収差の影響を除去するため、観察対象物のクロームコーティングを対物レンズ面に向けて励起光が直接クロームコーティングに照射されるよう配置した。

色収差による光学焦点の位置移動を検証するため、校正用スケールと対物レンズの距離を変えて校正用スケール上のエッジの断面画像を取得した。励起光波長 525 nm で光学焦点と観察対象物の高さを合わせ、サンプルステージを垂直方向にスキャン ($2\text{ }\mu\text{m/step}$, 40 step) しながら各高さで水平方向にスキャン ($0.5\text{ }\mu\text{m/step}$, 120 step) し、各点での信号強度をプロットした。その後、観察対象物の位置を変えずに励起光波長を 800 nm に変えて同様の撮像を行い、励起光波長が光学焦点の位置に与える影響を評価した。励起光のエネルギーは、クロームコーティングへのダメージを防止しつつ、十分な信号強度を得るため、各波長で 6.20 nJ/pulse に調整した。

各高さにおける信号強度の水平方向プロファイルをエッジ広がり関数にフィッティングし、エッジ広がり関数（edge spread function; ESF）の導関数として得られる線

広がり関数 (line spread function; LSF) の FWHM を求め、空間分解能の指標とした。各高さにおける FWHM をプロットし、最も FWHM が狭くなった高さを光学焦点面とした。

3. 2. 2. 3 光学焦点位置移動が光音響顕微画像に及ぼす影響の評価

透過対物レンズと反射対物レンズを用いて、それぞれマルチカラー PAM 観察を行った場合に複数の光吸収体を弁別できるかを検証する目的で赤血球とマウスメラノーマ細胞株 B16-F0 細胞を用いたイメージング実験を行った。図 15 に酸素化ヘモグロビン (15g/dl) (61)およびメラノソーム(62)の吸収スペクトルを示す。赤血球に含まれるヘモグロビンは酸素分圧が大気と平衡状態にある各種試薬に混合した時点で酸素化されるため、赤血球の吸収スペクトルは酸素化ヘモグロビンの値を用いた。メラニンにはユーメラニンとフェオメラニンの 2 種があるが、メラノーマのメラノソームに含まれるのは大部分がユーメラニンであり(62, 63)、その割合は 30 % w/w と報告されている(62)ため、メラノソームの吸収スペクトルにはユーメラニン 30 % w/w の値を用いた。

赤血球中の酸素化ヘモグロビンは 525 nm の励起光を強く吸収し、メラノーマ細胞中のメラノソームは 525 nm と 800 nm いずれの波長も強く吸収する。このため、800 nm で取得した画像ではメラノーマを高いコントラストで画像化でき、800 nm で撮像した PAM 画像を 525 nm で撮像した PAM 画像から加重差分（メラノソームの光吸収係数の比をかけて差分処理を行う）することにより、理想的には画像からメラノーマの成分を除去し、赤血球の高コントラスト画像を得ることができる。しかし、色収差

により空間分解能の低下や光音響信号強度の低下が起こると、差分処理をしてもメラノーマ由来の光音響信号が残り、ヘモグロビン由来の光音響信号と弁別できない。

観察対象物の赤血球部分として、2. 3. 2. 2と同様の手法で洗浄ウサギ赤血球溶液を作製し、0.1 % ゼラチン溶液内に hematocrit 0.04 % となるよう混合してガラスボトムディッシュをコーティングした。その上からメラノーマを播種、定着させて観察対象とした。B16-F0 細胞（マウスメラノーマ）を、D-グルコース、L-グルタミン、ピルビン酸ナトリウムを含むダルベッコ改変イーグル培地（Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM, 11885-084, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA）に 10 % ウシ胎児血清と 1 % 抗菌薬を加え、37 度、二酸化炭素濃度 5 % で培養した。トリプシン処理した B16-F0 細胞を HBSS に浮遊させ、上で準備した、赤血球混合ゼラチンでコーティングしたガラスボトムディッシュに播種し、37 度、二酸化炭素濃度 5 % で 2 時間培養し、ゼラチンコーティング面に接着させた。これにより、B16-F0 細胞と赤血球を同一平面、同一視野内で観察できる観察対象物を作製した。

これを対象に励起波長 525 nm と 800 nm でマルチカラー観察を行い、加重差分によりメラノーマ由来の信号を除去し、赤血球と弁別することが可能か検討した。励起光のパルスエネルギーは、十分な信号強度を得られ、なおかつ信号強度が観察可能上限を超えない範囲に収まるよう、それぞれ 525 nm で 4.00 nJ、800 nm で 8.90 nJ に設定した。

透過対物レンズ、反射対物レンズそれぞれで観察対象物を自動ステージで水平方向にスキャン（1 $\mu\text{m}/\text{step}$, 100 \times 100 step）し、各点における最大信号強度をプロットし

た。加重差分処理では、525 nm で撮像した画像から、800 nm で撮像した画像をメラノソームの吸収係数の比である 4.66 を係数として加重差分した。

3. 2. 3 結果および考察

3. 2. 3. 1 色収差による光学焦点位置移動の評価

525 nm の励起光を入射したときの焦点面における集光度を 1 とした場合の 525 nm と 800 nm それぞれのシミュレーション結果における焦点面および焦点面 $\pm 20\ \mu\text{m}$ 、 $40\ \mu\text{m}$ で算出したストレーン比を図 16 に示す。525 nm の焦点面と同一平面で測定した 800 nm のストレーン比は 0.999 であり、焦点面 $\pm 20\ \mu\text{m}$ 、 $40\ \mu\text{m}$ で算出したストレーン比は 525 nm、800 nm いずれでも焦点面の上下で同様の下落傾向を示した。集光原理上、反射対物レンズが色収差の影響を受けないことを示す結果である。なお、525 nm と 800 nm との間で焦点面から上下に移動させた場合にストレーン比の下落率が異なるが、この原因については、波長によって入射ビーム径に差があり（ファイバーからの出射広がり角に由来する）、800 nm で入射ビーム径がより大きいことから実質 NA が大きくなり、より強い光学焦点形成が得られたため焦点面からの移動量に対するストレーン比の下降が大きくなったことを反映しており、対物レンズの性能とは無関係と考えられる。

続いて、対物レンズと校正スケールの距離に対する FWHM の関係を図 17 に示す。図 17(a) に示す透過対物レンズを用いたデータでは、最も FWHM の小さい平面が励起波長 525 nm と 800 nm で $30\ \mu\text{m}$ の差を示している。メーカーから提供された透過対

物レンズの仕様から励起波長 525 nm と 800 nm との間で生じる色収差による焦点移動距離を推定すると 30.21 μm となり、実験結果と一致した。

今回の実験条件では、透過対物レンズにおいて 525 nm の焦点面で測定した 800 nm での FWHM は 8 μm であり、焦点位置移動により同一平面上での 525 nm で測定した FWHM よりも約 4 μm 大きくなる結果であった。光学顕微観察であればこの影響は画像の空間分解能低下として現れるが、光音響顕微観察を行う場合、空間分解能が低下するだけでなく、光学焦点が光吸収体よりも大きくなった場合に吸収されるエネルギーの総量が減少し、システムの感度自体が影響を受ける可能性がある。

これに対して、反射対物レンズでは、図 17(b) に示すように明らかな焦点位置の移動は起こらなかった。シミュレーションの結果と一致し、反射型対物レンズを用いることで、可視光～NIR 領域に至るまで、色収差の影響を受けないマルチカラー PAM 観察が可能であることを示している。

空間分解能を対物レンズ間で比較すると、反射対物レンズでは焦点面での FWHM が 5-6 μm であったのに対し透過対物レンズでは約 4 μm と透過対物レンズの方が優れているという結果であったが、これは反射対物レンズでは構造上副鏡があり透過対物レンズ (NA 0.3) よりも NA が小さい (NA 0.2) ため、光学焦点形成が相対的に弱くなり空間分解能が低下したことに起因すると考えられる。

3. 2. 3. 2 光学焦点位置移動が光音響顕微画像に及ぼす影響の評価

メラノーマ細胞と赤血球を混合して作成した観察対象をマルチカラー観察した画像

を図 18 に示す。図 18(a)-(d) が反射対物レンズを用いた実験結果、図 18(e)-(h) が透過対物レンズを用いた実験結果である。図 18(a),(e) に示すように、いずれの対物レンズを用いた場合でも 525 nm では赤血球とメラノーマの両方が観察可能であった。これに対して、800 nm では図 18(b),(f) に示すようにメラノーマだけが観察可能であった。図 15 に示すように、メラノーマ内のメラノソームは 525 nm と 800 nm の両方で高い吸収係数を示す一方、800 nm におけるオキシヘモグロビンの光吸収係数は 525 nm の $1/37.8$ であり、これはメラノソームの 800 nm における光吸収係数の約 $1/100$ である。本実験の条件では励起光のパルスエネルギーを上げたとしても、赤血球由来の信号を観測できるよりも前にメラノーマ細胞からの信号強度が測定系の飽和レベルに達してしまったと考えられる。この結果から、本実験では、800 nm でメラノーマを観察できる条件下では赤血球由来の光音響信号は無視できるほど小さく、800 nm で撮像した画像ではメラノーマだけが画像化されているものとして解析を行った。図 18(c),(g) に反射対物レンズ、透過対物レンズそれぞれで撮像した結果から得られた加重差分画像を示す。図 18(c) に示す反射対物レンズを用いて観察した画像では、メラノーマ由来の光音響信号が差分処理により低減され、ほとんど観察できないのに対し、図 18(g) に示す透過対物レンズを用いて観察した画像では、加重差分によって低減しきれなかったメラノーマ由来の信号の一部が残っている。

図 18(d),(h) に反射対物レンズ、透過対物レンズそれぞれで撮像した結果から得られた加重差分画像で得られた赤血球の画像を赤で、800 nm で得られたメラノーマの画像を規格化して緑色で重ね合わせたものを示す。反射対物レンズを用いて撮像した場合

には、図 18(d) に示すようにメラノーマと赤血球を正しく識別することが可能であった。一方、図 18(h) に示すように、透過対物レンズで得られた撮像結果では、加重差分によって低減しきれなかったメラノーマ由来の信号の一部が残ってしまい、メラノーマ部に赤血球由来の信号であるかのように赤く表示されている。

メラノーマ由来の信号がどれだけ除去できているかを比較する目的で、加重差分の前後で赤血球由来の最大信号強度とメラノーマ由来の最大信号強度の比を取ったところ、反射対物レンズによる観察では加重差分の前後で 0.46 から 4.66 となった一方、透過対物レンズでは 0.57 から 1.45 への増加にとどまり、メラノーマ由来の信号が除去しきれずに残っていることに由来すると考えた。

PAM でマルチカラー観察を行う利点として、スペクトル微分(64)やスペクトルフィッティング解析(55)を用いて光吸収体の吸収スペクトルに関する情報を得ることが挙げられるが、本実験の結果からは色収差の影響を十分補正できていない対物レンズを用いた場合、色収差による焦点位置移動が生じる結果、水平方向空間分解能が低下するほか、光音響顕微鏡特有の問題として、感度が大きく影響を受ける可能性があると考えられた。

光学焦点よりはるかに大きな観察対象物を対象とする場合には、光学焦点が多少大きくなっても全体的な吸収エネルギーはほとんど変化しないため、光音響信号強度の低下は限定的であると考えられる。ただし、本実験におけるメラノーマ内のメラノソームのように観察対象物が光学焦点のサイズと同程度かそれより小さい場合には、焦点位置の移動によって単位面積あたりのエネルギー密度が低下し、観察対象物に吸収

されるエネルギーの総量が低下することで観測される光音響信号強度が低下し、マルチカラー観察による光吸収体の弁別を行ううえで障害となる可能性が示された。

色収差の影響を除去するための方策として、ソフトウェア的にぼかし除去の処理を加えたり、色収差の影響を補償する光学系を追加して高速撮像を試みたり(65)する技術も研究されているが、反射対物レンズを用いることにより、そういった手法を必要とせず、色収差の問題を物理的に解決することができる。

本研究では、励起光の光源として広帯域の SC 光源を用い、そこから目的波長の光を抽出するという方式をとっており、結果として励起波長の範囲も広くなることが想定される。この方式は集光原理上色収差の影響を受けない反射対物を用いた PAM との親和性が高いと考えられる。反射対物レンズを用いた反射型 PAM の作成の試みについてはすでに報告されている(66)が、PAM とその光源について広く調査されているレビュー論文(67)を含めて精査しても SC 光源と反射対物を用いた反射型 PAM の構築の試みは報告がなく、新規性があると考えた。

3. 3 反射型光音響顕微鏡の構築

3. 3. 1 背景および目的

3. 2 の結果から、PAM によるマルチカラー観察を行う上で反射対物レンズを適用することの利点が示された。本項では、そこにここまで作成した透過型 PAM で蓄積した基礎技術を合わせ、超音波センサを小型化して反射対物レンズ側に設置することで、SC 光を光源とした反射型 PAM を新規に構築する。また、励起光照射系にガルバノミ

ラーシステムを組み込むことで、光学焦点の高速走査を実現し、撮像速度の高速化を図った。これにより、本研究の目的である *in vivo* CTC 検出が実現できる可能性があるか検討した。

3. 3. 2 対象および方法

3. 3. 2. 1 実験系

本実験における実験系を図 19 に示す。SC 光源 (SC-Pro-HP, YSL photonics, 武漢, 中華人民共和国: 波長帯域幅 430-2400 nm, パルス幅 <1 ns, 繰り返し周波数 100 kHz) から射出された広帯域光を拡大光学系に入射させてビーム径を対物レンズの瞳径に合わせ、コールドフィルタ (SC1101, 朝日分光, 東京: 透過波長 1100 nm 以下) で赤外光をカットした後、バンドパスフィルタにより目的の波長帯を抽出した狭帯域光を励起光とした。透過型 PAM では励起光を定点照射し、自動ステージ上の観察対象物をステッピングモーター走査する方式を採用していたが、反射型 PAM では、従来同様のステッピングモーター走査の他、撮像の高速化を目的としてガルバノミラーシステムを搭載し、光学焦点の水平方向走査も選択可能とした。

励起光を 2 軸ガルバノミラーシステム (GVS012/M, Thorlabs, Newton, NJ, USA) に導入し、制御回路として用いたデジタルシステム開発ボード (ELVIS III, National Instruments, Austin, TX, USA) からガルバノミラーに入力する電圧を変えることによりビームの角度を 2 軸で走査し、対物レンズに入射させた。ガルバノミラーシステムによる角度走査によって生じる励起光の入射角度の変化は、反射対物レンズにより

二次元平面上での光学焦点位置移動に変換される。

広範囲のイメージングを行う場合、ガルバノミラーに入力する電圧は一定のまま、すなわち光学焦点走査は行わず自動ステージを用いたステッピングモーター走査を行い、狭い範囲を高速撮像する場合、ガルバノミラーシステムによる光学焦点高速走査を行う、というように、2種類の撮像方法を使い分けた。

対物レンズは倍率 10 倍の反射対物レンズ（OBLR-10A, シグマ光機, 東京: NA 0.2, 作動距離 19.9 mm）を使用した。

超音波センサについては、透過型 PAM では P(VDF-TrFE) 製の超音波センサを用いていたが、本実験では超音波センサを対物レンズと観察対象物の間に配置する構造上の条件を達成するため、薄型センサを作成できる PZT 1-3 composite 製の超音波センサ（20K1.2-SR6.8, 検査技術研究所, 神奈川: PZT 1-3 composite, 中心周波数 20 MHz, 素子直径 1.2 mm, SR 6.8 mm）を用いた。超音波センサは光学ガラスに貼付し、光軸と同軸、反射対物レンズの副鏡の陰に入るよう配置し、光学焦点走査の中心と超音波センサの音響焦点が共焦点となるよう調整した。ガルバノミラーシステムにより光学焦点走査を行う場合、過大な観察範囲を設定すると励起部位が音響焦点から外れて感度低下が生じることが想定されるが、本実験で使用した超音波センサの設計パラメータを超音波センサの空間感度分布の FWHM 理論値である Δy_{ideal} を導く(4)式に当てはめると本センサの Δy_{ideal} は $518.5 \mu\text{m}$ となった。光学焦点走査範囲を空間感度分布の FWHM よりも小さい $200 \times 200 \mu\text{m}$ に設定したところ、観察範囲内で明らかな感度低下は認められなかった。

取得した光音響信号は、バイポーラアンプ（SA-230F5, エヌエフ回路設計ブロック, 神奈川: 入力インピーダンス $50\ \Omega$, 利得 46 dB）を 2 台用いて 92 dB の増幅を行い、オシロスコープで記録した。また、光音響信号の取得と同時に、ガルバノミラーシステムから出力される位置フィードバック信号を観測し、光焦点位置と光音響信号とを対応付けて記録した。各点の光音響信号の包絡線を算出した後に、光焦点位置情報を用いてマッピングすることで三次元光音響顕微画像を得た。

3. 3. 2. 2 赤血球と染色前立腺癌細胞の混合物の観察

本実験では、開発した反射型 PAM の実証実験を行う目的で、赤血球と染色前立腺癌細胞とを混合したものを観察対象としてマルチカラー PAM 観察を行った。

まず、染色前立腺癌細胞を作成した。2. 3. 2. 4 同様の手法で培養した PC-3 細胞をトリプシン処理し浮遊細胞とした後、細胞染色試薬 CellBrite NIR750 を添加しその濃度が $20\ \mu\text{M}$ となるよう調製した培地に浮遊させ、37 度、二酸化炭素濃度 5 % の培養器内に設置した振盪機（NA-101N, 日伸理化, 東京）上で 24 時間の震盪培養を行った後、HBSS で洗浄し、染色前立腺癌細胞（CellBrite NIR750 染色 PC-3 細胞）を得た。

次に、2. 3. 2. 2 と同様の手法で洗浄ウサギ赤血球溶液を作成し、0.1 % ゼラチン溶液内に hematocrit 0.04 % となるよう調製し、そこに CellBrite NIR750 染色 PC-3 細胞を混合し、100 mm シャーレ（3020-100, AGC テクノグラス, 静岡）の底面をコーティングした。

これを反射型 PAM でマルチカラー観察した。バンドパスフィルタ (86-952 および 84-800, Edmund Optics, Barrington, NJ, USA: 中心波長 575 および 750 nm, 帯域幅 50 nm) で抽出した狭帯域光を用いて、同一視野の観察を行った。励起光のパルスエネルギーは十分な信号強度を得られ、なおかつ信号強度が観察可能上限を超えない範囲に収まるよう、それぞれ 575 nm で 60.1 nJ、750 nm で 31.2 nJ に設定した。

ガルバノミラーシステムを用いて光の角度走査を行い、200×200 μm の範囲で光学焦点の高速走査を行い、光音響信号と観察位置情報とを収録した。その結果から、2 $\mu\text{m}/\text{step}$ 、100×100 step、加算平均回数 64 回に相当する光音響イメージング画像を再構成した。

3. 3. 2. 3 マウス耳の毛細血管の in vivo 観察

ガルバノミラーシステムによる光学焦点走査を用いることで、高速に画像を取得できることを実証するために、マウスの耳の毛細血管を対象としたイメージング実験を実施した。本実験は、防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て行った（承認番号 17026: 腫瘍モデルマウスに対する光-超音波法による分子イメージング および承認番号 21040: 光-超音波法によるがんの分子イメージングに関する研究）。

水槽底面の一部をポリ塩化ビニリデンフィルム（業務用サランラップ, 旭化成ホームプロダクツ, 東京: 平均シート厚 11 μm ）で置換し、フィルム底面に光音響波の媒質として超音波ゼリーを塗布し、麻酔下においたヌードマウスの耳を対象とした PAM 観察ができるように固定した。励起光はヘモグロ빈を対象とした中心波長 575 nm の光

をバンドパスフィルタ（86-952, Edmund Optics, Barrington, NJ, USA: 中心波長 575 nm, 帯域幅 50 nm）で抽出した。励起光のパルスエネルギーは十分な信号強度を得られ、なおかつ信号強度が観察可能上限を超えない範囲に収まるよう、60.1 nJ に設定した。

まず、自動ステージを用いた広範囲のスキャン（4 $\mu\text{m}/\text{step}$, 300 \times 300 step）を行い、観察範囲を決定したのち、ガルバノミラーシステムを用いて 160 \times 160 μm の範囲で光学焦点の高速走査を行い光音響信号と観察位置情報とを収録した。その結果から、2 $\mu\text{m}/\text{step}$ 、80 \times 80 step、加算平均回数 64 回に相当する光音響イメージング画像を再構成した。

3. 3. 3 結果および考察

3. 3. 3. 1 赤血球と染色前立腺癌細胞の混合物の観察

赤血球と CellBrite NIR750 染色 PC-3 細胞を混合して作成した観察対象をマルチカラー観察した画像を図 20 に示す。図 20(a) の光学顕微鏡像で四角に示す範囲を観察したところ、図 20(b) に示すように、750 nm では CellBrite NIR750 染色 PC-3 細胞だけが観察可能であった。また、図 20(c) に示すように、575 nm で励起した光音響画像では赤血球のみが観察可能であった。図 20(d) にそれぞれで撮像した結果から得られた加重差分画像で得られた赤血球の画像を赤で、PC-3 細胞の画像をシアンで重ね合わせたものを示す。

反射型 PAM でも、透過型 PAM 同様、赤血球および細胞を描出可能な空間分解能お

よび感度が得られている。メラノーマのようにそれ自体が色素をもつ細胞であれば、PAM を用いて血液中で弁別ができる可能性があることはすでに先行研究で示されているが、生体由来の色素をもたない細胞であってもヘモグロビンの吸収係数が低い波長範囲に吸収ピークを有する試薬を造影剤として細胞を染色することにより、血液中で検出可能となる可能性が示された。

3. 3. 3. 2 マウス耳の毛細血管の *in vivo* 観察

図 21 に、ヌードマウスの耳を *in vivo* 観察した結果を示す。図 21(a) にステッピングモーター走査で広範囲にスキャンした PAM 画像を、図 21(b) に図 21(a) の四角に示す部位をガルバノミラーシステムによる光学焦点の高速走査で連続観察した結果を示す。ガルバノミラーシステムを用いた高速走査により、旧来のステッピングモーター走査による撮像では約 2 分かかっていた $2\text{ }\mu\text{m/step}$ 、 $80\times 80\text{ step}$ 、加算平均回数 64 回の撮像が 1 枚あたり約 4 秒で完了するようになり、大幅な高速化を実現できた。図 21(b) に示す連続画像では、各フレームにおいて右下の毛細血管内を流れる赤血球を単独で描出できている。CTC に適切な光吸収体を結合させ、赤血球と同等の強さで光音響波を発生させることにより *in vivo* に単独の CTC を検出することが可能であると考えた。図 21(c) に、各フレームの画像から撮像した 10 フレーム分の画像の平均を差分した画像を示す。全フレームの平均を差分することで、フレーム間で変化している成分のみを抽出でき、毛細血管内を流れる赤血球のみを強調して表示できる。血中を流れる物質の動きを検知可能な撮像速度が得られることが確認でき、これによって血管

内を流れる細胞を漏らすことなく観測できると考えられた。

3. 4 小 括

3. 2では、反射対物レンズを用いることで色収差の影響を物理的に排除し広い波長域で顕微観察が可能なマルチカラー PAM システムが開発できることを示した。本実験の趣旨は、Applied Optics. 2021;60(31):9651-9658 で発表した。

Kazuyoshi Tachi, Takeshi Hirasawa, Shinpei Okawa, Akio Horiguchi, Keiichi Ito, and Miya Ishihara. Chromatic-aberration-free multispectral optical-resolution photoacoustic microscopy using reflective optics and a supercontinuum light source. Applied Optics. 2021;60(31):9651-9658

3. 3では、ここまでの研究結果をもとに反射対物レンズを利用した反射型 PAM を作成した。これまで報告されてきた PAM の多くは、単一波長での計測であるか(47, 68, 69)、可視光(27)や NIR(70)における狭い波長域を用いたイメージング法であった。一部に SC 光を励起光として PAM を作成したとする報告もなされている(71, 72)が、いずれも透過対物を使用した透過型 PAM である。

3. 2の結果を受けて、3. 3では作成した反射型 PAM では、集光に反射対物レンズを用いた。これにより色収差の影響を受けることなく、NIR を含めた広い波長範囲でのマルチカラー PAM 観察が可能となる。今回作成したような SC 光を反射対物レンズで集光する反射型 PAM についてはこれまでのところ報告例がなく、今回作成した、SC 光を励起光として用いる反射型 PAM は、システムとして新規性があるもの考える。

作成した反射型 PAM を用いた実験を行い、反射型 PAM で赤血球と染色前立腺癌細胞を描出可能な感度が得られること、血中を流れる血球の動きを検知可能な撮像速度が得られることが示された。これらの結果から SC 光を用いた反射型 PAM は、第 1 章で挙げた *in vivo* CTC 検出に必要な条件をすべて満たしたと考える。

第4章 反射型光音響顕微鏡による模擬前立腺癌循環腫瘍細胞の観察

4. 1 背景および目的

ここまでで開発した反射型 PAM が、本研究の主目的である前立腺癌における *in vivo* CTC 検出に必要な性能を有するかを確認するため、染色した前立腺癌細胞を模擬 CTC として、*in vivo* 模擬 CTC 検出が可能か検討する実験を行った。

4. 2 対象および方法

4. 2. 1 実験系

本実験における実験系は 3. 3 で作成した反射型 PAM を用いた。実験系の構成は 3. 3. 2. 1 と同様である。

4. 2. 2 観察対象

本実験では、染色前立腺癌細胞を模擬 CTC としてヌードマウス尾静脈の末梢側から尾静注し、尾静脈の中枢側を反射型 PAM で連続観察し、模擬 CTC の検出が可能か検討した。本実験は、防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て行った（承認番号 17026: 腫瘍モデルマウスに対する光-超音波法による分子イメージング および承認番号 21040: 光-超音波法によるがんの分子イメージングに関する研究）

まず、染色前立腺癌細胞を作成した。2. 3. 2. 4 同様の手法で培養した PC-3 細胞をトリプシン処理し浮遊細胞とした後、細胞染色試薬 CellBrite NIR750 を添加しその濃度が 100 μ M となるよう調製した培地に浮遊させ、37 度、二酸化炭素濃度 5 % の

培養器内に設置した振盪機（NA-101N, 日伸理化, 東京）上で 24 時間の震盪培養を行った後、HBSS で洗浄し、染色前立腺癌細胞（CellBrite NIR750 染色 PC-3 細胞）を得た。

次に *in vivo* 観察する生体の準備を行った。水槽底面の一部をポリ塩化ビニリデンフィルム（業務用サランラップ, 旭化成ホームプロダクツ, 東京: 平均シート厚 11 μm ）で置換し、フィルム底面に光音響波の媒質として超音波ゼリーを塗布し、麻酔下においてオスのヌードマウスの尾根部の尾静脈を対象とした PAM 観察ができるように固定した。

励起光は 3. 3. 2. 3 同様、バンドパスフィルタ（86-952 および 84-800, Edmund Optics, Barrington, NJ, USA: 中心波長 575 および 750 nm, 帯域幅 50 nm）で抽出した狭帯域光を使用した。

まず、ヘモグロビンを観察対象とした 575 nm の励起光を用いて、自動ステージによる広範囲のスキャン（4 $\mu\text{m}/\text{step}$, 400 \times 800 step、加算平均回数 256 回）により、尾静脈を同定し、観察範囲を決定した。次に、染色前立腺癌細胞を観察対象とした 750 nm の励起光を照射し、ガルバノミラーシステムによる光学焦点走査で連続撮影しながら、尾静脈の末梢から模擬 CTC 溶液（細胞数 1×10^5 個、液量 100 μl ）を注入し、中枢側の尾根部の尾静脈を PAM で観察した。光学焦点の走査範囲は 160 \times 160 μm とし、得られた光音響信号と観察位置情報から、2 $\mu\text{m}/\text{step}$ 、80 \times 80 step、加算平均回数 64 回に相当する光音響イメージング画像を再構成した。

励起光のパルスエネルギーは十分な信号強度を得られ、なおかつ信号強度が観察可

能上限を超えない範囲に収まるよう、それぞれ 575 nm で 60.1 nJ、750 nm で 31.2 nJ に設定した。

4. 3 結果および考察

本実験で得られた画像を図 22 に示す。図 22(a) の光学顕微鏡像の四角に示す部位を 575 nm で励起し、自動ステージで観察した血管の PAM 画像を図 22(b) に示す。観察範囲の中心にある、撮像時の位置合わせに使用した血管が尾静脈の本幹であることを確認し、同部位をガルバノミラーシステムによる高速観察の中心とした。図 22(b) の四角に示す部位 ($160 \times 160 \mu\text{m}$) を対象に高速観察を行った。観察開始と同時に模擬 CTC の注入を開始したところ、投与開始直後にはノイズレベルを超える信号は検出されなかったが、注入開始から約 30 秒経過したところで模擬 CTC 由来と考えられる信号が検出されはじめ、その後も血管を流れる模擬 CTC の存在を示唆する光音響信号が継続的に検出された。注入開始から約 30 秒経過し、模擬 CTC 由来と考えられる信号が検出され始めた時点の水平断面投影像を図 22(c) に、光音響信号の時間分解から深さ方向の情報を得て作成した、垂直方向 (x-z) 断面投影画像を図 22(d) にそれぞれ示す。複数の模擬 CTC が描出されていることを示唆する結果である。

各画像における全点の平均信号強度の時間的推移をプロットしたグラフを図 23 に示す。図 22(c) に示した、血管内で模擬 CTC 由来の信号を観測し始めた時点より後の結果ではそれ以前と比較して画像全体の平均信号強度が上昇している。模擬 CTC が観察範囲に到達する以前の背景ノイズと比較して、模擬 CTC が観察範囲に到達した後は模

擬 CTC 由来の光音響信号を検出したことを反映していると考えられる。以上の結果より本技術により細胞染色試薬で染色された CTC を細胞単位で検出できる可能性が示された。

4. 4 小 括

第3章で作成した反射型 PAM を用いてマルチカラー観察することで、模擬 CTC としてヌードマウス血管内に投与した染色前立腺癌細胞を *in vivo* イメージングにより検出できることを実証した。

この結果からヘモグロビンを含む生体組織の光吸収係数が低い波長範囲、すなわち生体の窓にあたる波長範囲(73)に吸収ピークを示す物質を光音響造影剤として利用し、CTC を *in vivo* 染色して PAM で観察することにより *in vivo* CTC 検出が可能であることが示唆された。

第5章 総括と今後の課題

5. 1 総 括

本研究では、光音響技術を用いた画像化技術を用いてミクロレベルの構造を観察可能なデバイスとして PAM を開発し、前立腺癌の進展、予後、治療反応性等の指標として (11, 74-76)研究が進められている CTC を *in vivo* 検出するための新しい手法となるか検討した。

表 4 に本研究で構築した透過型 PAM と反射型 PAM それぞれの諸元を示す。本研究では、それぞれの PAM を用いて、CTC を *in vivo* 検出するのに必要な性能として、第 1 章で挙げた

- ①細胞レベルのサイズの光吸収体を画像化できる空間分解能
- ②血管を描出し、かつ、マルチカラー観察により血管内でヘモグロビンと染色 CTC を模擬した染色腫瘍細胞を弁別する能力
- ③それらを実現するのに十分な感度
- ④*in vivo* 観察を実現できる構造
- ⑤CTC が観察範囲内に存在している間に観察を完了できる撮像速度

を想定し、構築した PAM がこれらの要求性能を満たすかを段階的に検討した。

第 2 章では PAM に関する基礎技術を確立するとともに、PAM の技術そのものに、上にあげた①～③の性能が備わっていることを確認する目的で、透過型 PAM の作成を行った。これまで PAM の励起光に用いられてきたレーザー光源はその多くが単波長レ

ザー(32)やその組み合わせによる多波長観察(77)であるのに対し、本研究では、SC光源から目的波長の光を抽出する方式をとった。これにより、従来の励起光ではその波長と適合せずに観察対象とすることができなかった様々な光吸収体を光音響造影剤の候補として活用できる可能性があると考ええる。

作成した透過型 PAM を用いて、洗浄ウサギ赤血球を対象に PAM が細胞レベルのイメージングに必要な感度および空間分解能を有すること、ヌードマウス耳を対象に PAM により微細な血管を描出することができること、細胞染色試薬で染色した前立腺癌細胞を用いて作成した皮下腫瘍を対象としたマルチカラー観察を実施し、PAM により生体内の微小血管の画像化、およびマルチカラー観察による光吸収体の弁別が可能なことをそれぞれ実証した。これらの結果から赤血球内のヘモグロビンと同等の強度で光音響波を発生する構造物であれば、PAM を用いて単一細胞レベルのサイズで弁別可能なレベルで顕微観察することが可能であり、CTC を光音響造影剤等で修飾することにより、PAM による観察が可能であると考えた。

ここで透過型 PAM には、励起光照射部位で発生した光音響波のうち、観察対象物を透過した成分を観測するという原理上、

- ・測定可能な観察対象物の厚みの上限が超音波センサの焦点距離で制限を受ける
- ・光音響波の伝播が観察対象物内部の音響特性（骨、ガス等）の影響を受ける

という制限があり厚みのある観察対象物への適用が困難である。生体への応用を念頭に、上記の問題を解決する、すなわち、PAM を前述した CTC を *in vivo* 検出するのに必要な性能の④に挙げた *in vivo* 観察を実現できる構造とする目的で、第3章で反射型 PAM

の構築を行った。それに先立ち、3. 2において、構造上色収差の影響を受けない反射対物レンズを用いて励起光を集光することにより NIR を含む広い波長範囲でマルチカラー観察が可能となることを示し、学位申請論文として発表した。

その結果をもとに3. 3で反射型 PAM を作成した。反射対物レンズを集光に用いる反射型 PAM については既に報告(66)があるが、SC 光と反射対物レンズとを組み合わせた PAM については報告がなく、新規性があるものと考えている。また、透過型 PAM では自動ステージで観察対象物をステッピングモーター走査していたのに対し、作成した反射型 PAM では前述した CTC を *in vivo* 検出するのに必要な性能の⑤に挙げた、高速撮像を実現する目的でガルバノミラーシステムを導入し、光学焦点の水平走査による撮像速度の高速化（1～4 秒/画像）を実現した。

最後に、作成した反射型 PAM を用いて第4章で模擬 CTC の *in vivo* 観察を行った。PAM による CTC 検出の先行研究ではその発生母地から生体由来の色素を含有するメラノーマを対象とした報告(30, 70, 78)しか報告されておらず、生体由来の色素を持たない他の癌腫を対象として、光音響イメージングで癌そのものを検出しようとする場合、何らかの光音響造影剤で修飾する必要がある。

本研究では、細胞染色試薬 CellBrite NIR750 で前立腺癌培養細胞を染色することにより、染色前立腺癌模擬 CTC として、*in vivo* 観察が可能であることを示した。

癌細胞が生体由来の色素を持っている、あるいは染色により色素を含有させることの利点の一つとして、光音響画像診断における光吸収体となる他に高強度の励起光を照射することにより、光線力学的治療として色素を含有する細胞そのものを破壊する

作用を期待する、セラノスティクス (Theranostics = 治療 Therapeutics + 診断 Diagnostics) への応用が挙げられる。生体由来の色素を有するメラノーマでは CTC に対して高強度の NIR 光を照射することにより破壊する試みが報告されており、(30)、前立腺癌でも、インドシアニンググリーン含包ナノバブルを用いて前立腺癌に対する光音響画像診断と光線力学的治療を同時に行う試み(79)が報告されている。将来的には、原発巣に対する光温熱治療と CTC スクリーニングを同時に行うといった応用も考えられる。

この他、本学では他にも PAM に関連する研究を進めており、光の波長によって媒質中の光速が異なるという性質を応用し、長距離光ファイバーを用いて、SC 光を時間的に分光することで複数回の観察を要さず、単回の PAM 観察結果からマルチカラー観察結果の取得が可能となること、これを用いて細胞レベルのサイズで PAM 観察が可能であることが示されている(80)。本手法ではバンドパスフィルタでの分光を要さず、SC 光の広い波長帯の光を時間分解して励起する方法であり、これと本研究で開発した反射対物レンズ + SC 光を用いた、色収差の影響を受けない PAM の技術を組み合わせることにより、応用範囲がさらに広がる可能性があると考ええる。

5. 2 本研究の限界、今後の課題

本研究では主として医用工学的側面からのアプローチで in vivo CTC 検出に向けた新規技術の開発を試みた。これにより、SC 光を励起光とし、反射対物レンズを用いた、新規性のある反射型 PAM を開発し、マウスの尾静脈から投与した染色模擬 CTC

を中枢部の尾根部の尾静脈で検出できるという結果を示す事ができたが、今後、生体内で目的の組織、細胞を光音響技術で可視化する光音響造影剤に関する技術についても発展させる必要があると考える。

今回用いた染色模擬 CTC は、細胞膜の脂質を非特異的に染色する色素を用いて体外で染色したものであるため、本研究の成果をもとに、*in vivo* CTC 検出を実現するためには、いかにして体内で癌細胞を選択的に光吸収体で修飾するかという課題を解決する必要がある。前立腺癌に対する光音響イメージングの先行研究では、前立腺癌に多く発現する細胞膜タンパクである PSMA に対する抗体と、光音響造影剤とを結合させて前立腺癌細胞を染色し、*in vivo* 観察している報告がある(81)。PSMA を対象とした抗体医学については光音響イメージング以外の方面でも研究が進められており、PSMA を対象とした抗体に放射性同位元素を結合させた前立腺癌に対する新しい放射線治療のアプローチの報告がなされている(82)。目的とする腫瘍細胞を特異的に光音響造影剤で染色する技術を開発することにより、PAM による CTC 検出だけでなく、上で挙げた光線力学的治療に抗体特異性を持たせた新しい光免疫療法としての側面でも活用できると期待される。

次に、医用工学的側面からの今後の課題として反射型 PAM のさらなる改良の可能性が挙げられる。第3章で作成した反射型 PAM では、反射対物レンズを用いることにより、市販品を用いて簡便に対物レンズ由来の色収差を除外することができたが、反射対物レンズの特性として副鏡による遮蔽で入射したレーザーの中央部が励起光として寄与せず（今回使用した OBLR-10 では遮蔽率 36 %）、反射鏡の反射率（同、一面あた

り 90 %、主鏡と副鏡の 2 枚で約 80 % に減衰) によるエネルギー損失が起きる。

本実験では、両者のエネルギー損失をあわせると入射したレーザーのエネルギーの半分程度しか励起光として利用できないという制限があった。今回は大きな問題とならなかったが、今後、光吸収体の光音響信号の発生効率が低く励起光のエネルギーを上げる必要がある場合に問題となる可能性がある。

また、透過対物レンズと比較すると高い NA で大きな入射角で輪帯状の励起光を照射するため、光学焦点から高さ方向にずれた場合の焦点サイズの拡大、すなわち照射エネルギー密度の低下と焦点サイズの増大が顕著である。これにより、光音響イメージングのメリットの一つである時間分解による深さ方向分解のメリットが得にくくなるという問題点がある。励起光をより高効率かつ広い深さ方向の範囲で均一な集光を得られるように観察対象物に照射するための改良を加える余地が残っていると考え

第6章 結 言

本研究では、光音響技術を応用した顕微観察手法として PAM に関する技術開発を行い、PAM による *in vivo* CTC 検出の可能性について研究した。PAM の励起光として SC 光を採用することで、これまでの PAM では励起光の波長の制限から光音響造影剤として用いることができなかった様々な光吸収体をその候補とする可能性を広げた。

まず、透過型 PAM を構築し、光音響波の検出側の条件設定として、PAM に用いる超音波センサの候補として各種圧電素材から作成した超音波センサを横断的に比較した。次に、励起光を含めた PAM の観察条件設定について検討し、PAM が細胞レベルでの空間分解能を有すること、かつ生体内の微小血管の画像化、およびマルチカラー観察による光吸収体の弁別が可能なことをそれぞれ実証した。

続いて、集光原理上、色収差の影響を生じない反射対物レンズを PAM に用いることにより、NIR を含む広い波長範囲でのマルチカラー観察が色収差の影響を受けずに可能となることを示し、その結果をもとに、反射対物レンズを用いて SC 光を励起光とした反射型 PAM を新規に開発した。反射型 PAM を構築する際には、*in vivo* CTC 検出が可能な撮像速度を実現するためガルバノミラーシステムによる光学焦点走査を実装し、撮像の高速化を図った。

作成した反射 PAM を用いて先に構築した透過型 PAM と同様、細胞レベルの光音響顕微観察が可能であること、マルチカラー観察による細胞の弁別が可能であること、光学焦点走査による高速撮像で、血管内を流れる細胞が弁別可能であることを示し、最終的に模擬 CTC として染色前立腺癌細胞を対象とした *in vivo* 観察に成功した。今

回構築した反射型 PAM は体表部の光吸収体を体表から低侵襲かつ経時的に *in vivo* マルチカラー観察することを可能とする技術であり、発展性が高いと考える。

今後、SC 光を励起光に用いた反射型 PAM とその関連技術をさらに発展させることにより、本研究の最終目的である癌の進展、予後、治療反応性等を反映する指標として *in vivo* CTC 検出を実現する新規診断法とできるだけでなく、血管内を流れる様々な光吸収体のモニタリング、すなわち *in vivo* フローサイトメトリーや、光免疫療法と関連したセラノスティクス分野への応用、動物実験における治療反応性の新規評価法としたりする等、これまでにない価値を提供できる可能性があると考ええる。

研究業績

学位申請論文

1. Kazuyoshi Tachi, Takeshi Hirasawa, Shinpei Okawa, Akio Horiguchi, Keiichi Ito, and Miya Ishihara. Chromatic-aberration-free multispectral optical-resolution photoacoustic microscopy using reflective optics and a supercontinuum light source. *Applied Optics*. 2021;60(31): 9651-9658

本研究に関連する学術論文（査読あり）

1. Takeshi Hirasawa, Kazuyoshi Tachi, Manami Miyashita, Shinpei Okawa, Toshihiro Kushibiki, Miya Ishihara. Spectroscopic photoacoustic microscopic imaging during single spatial scan using broadband excitation light pulses with wavelength-dependent time delay. *Photoacoustics*, 2022(26)

本研究に関連する学術論文（査読なし）

1. 石原 美弥、平沢 壮、田地 一欽、大川 晋平、櫛引 俊宏、堀口 明男、佐藤 正人、伊藤 敬一. 様々なクロモフォアを対象にした光音響信号の解析. 電子情報通信学会技術研究報告（超音波）. 2020. 120. 174. 63-66

本研究に関連する国際学会発表

1. Takeshi Hirasawa, Kazuyoshi Tachi, Shinpei Okawa, and Miya Ishihara. Design optimization of P(VDF-TrFE) film sensor element to detect deep-seated contrast agents. SPIE BiOS, 2020, San Francisco, CA, USA
2. Takeshi Hirasawa, Kazuyoshi Tachi, Shinpei Okawa, and Miya Ishihara. Spectroscopic photoacoustic microscopic imaging during single spatial scan using a supercontinuum light source. SPIE BiOS, 2022, San Francisco, CA, USA

本研究に関連する国内学会発表

1. 田地 一欽、石原 美弥、辻田 和宏、平沢 壮、大川 晋平、櫛引 俊宏、佐藤 正人、伊藤 敬一. 「透過型正立 PAM に用いる超音波センサの評価」電気学会 光・量子デバイス研究会 2019 年 9 月 24 日 (東京)
2. 平沢 壮、田地 一欽、大川 晋平、石原 美弥. 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. 第 60 回 生体医工学会、2021 年 6 月 17 日、オンライン開催
3. 平沢 壮、宮下愛美、田地一欽、櫛引俊宏、石原美弥. 分子イメージングのための分光光音響顕微鏡の開発. 日本分子イメージング学会 第 16 回総会・学術集会、2022 年 5 月 京都

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究において終始懇切に多大なる直接の御指導、御高閲を賜りました防衛医科大学校医用工学講座教授 石原美弥先生に深甚なる感謝の意を表します。

防衛医科大学校泌尿器科学講座教授 伊藤敬一先生、防衛医科大学校放射線医学講座教授 新本弘先生には本論文の作成にあたり、副査として適切なお助言を賜りました。ここに深謝の意を表します。

防衛医科大学校医用工学講座助教 平沢壮先生には、実験の技術的指導、データ解析等、多方面にわたり数多くのお助言等を賜りました。厚く御礼申し上げます。その他、多岐にわたってご助力を賜りました防衛医科大学校医用工学講座 助教 石川智啓先生、同講座 宮下愛美様、防衛医科大学校泌尿器科学講座准教授 堀口明男先生、ほか、防衛医科大学校医用工学講座および防衛医科大学校泌尿器科学講座の皆様にも感謝申し上げます。

略語一覽

CTC; Circulating Tumor Cell

PAM; Photoacoustic Microscopy

SC; Super Continuum

NIR; Near InfraRed

STED; Stimulated Emission Depletion Microscope

NA; Numerical Aperture

FET; Field Effect Transistor

SR; spherical radius

P(VDF-TrFE); Poly (vinylidene fluoride-trifluoroethylene)

PZT; $\text{Pb}(\text{Zr} \cdot \text{Ti})\text{O}_3$

Li-Nb; Li-Niobate

BI; Black ink

OD; Optical Density

ND; Neutral Density

si; signal intensity

OR-PAM; Optical-Resolution PAM

FWHM; full width at half maximum

PBS; phosphate-buffered saline

MEM; Minimum Essential Medium

HBSS; Hank's Balanced Salt Solution

ESF; edge spread function

LSF; line spread function

DMEM; Dulbecco's Modified Eagle's Medium

NCC; Normalized Cross-Correlation

用語集

●循環腫瘍細胞（Circulating Tumor Cell; CTC）

原発腫瘍組織または転移腫瘍組織から上皮間葉転換を経て血中へ遊離し、血流中を循環する腫瘍細胞のこと。血中へ遊離した後、CTCは血液中を循環し、毛細血管から組織中へと移行し、転移巣を形成する。CTCを検出し、その数を比較したり、抽出したCTCの遺伝子解析を行ったりすることで、転移の過程や転移巣の有無を推定したり、治療の予後予測や治療効果判定に役立てることができる、という報告が近年なされている。

●光音響現象

光吸収体にパルス光を照射すると、光吸収体が光エネルギーを吸収して、蛍光として放出されなかった分のエネルギーにより温度が上昇する、温度上昇による熱膨張により応力波（熱弾性波）が発生する。この現象を光音響現象と呼ぶ。

●光音響波

光音響現象により発生する超音波のこと。本研究では、これを単素子超音波センサで観測し、画像化した。

●圧電素材（圧電素子）

加えられた力を電圧に変換する圧電効果、あるいは入力された電圧を力に変換する逆圧電効果を発生する素材（また、それを用いた素子）。圧電効果の応用例としてガスコ

シロやライターの点火火花への応用、逆圧電効果の応用例として、圧電スピーカーやソナー等がある。医療にも応用されている超音波画像診断装置はプローベに圧電素子を用いており、逆圧電効果を利用して発振した超音波の反射波を、圧電効果を利用して検知している。本研究では単素子超音波センサを用いて、光音響波を観測した。

●光音響信号

光音響波を超音波センサで観測し、電気信号に変換したもの。本研究では、これをアンプで増幅して収録し、解析、画像化した。

●光音響顕微鏡 (Photoacoustic Microscopy; PAM)

光音響現象を用いて顕微観察を行うデバイス。分類として、音響レンズや焦点型超音波センサ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 AR(Acoustic-Resolution)-PAM と、励起光を収束することで励起部位を空間的に制限して分解能を獲得する方式の OR(Optical-Resolution)-PAM に大別される。本研究では、対物レンズで励起光を集光することで、超音波センサの音響焦点よりも小さな範囲を励起する、OR-PAM を作成した。

●透過型 PAM

対物レンズから照射された励起光により、観察対象物の光照射面で発生した光音響波を、対物レンズの反対側に設置した超音波センサで光音響信号に変換し収録する方式の PAM。光音響波の伝達様式から、透過型 (transmissive) PAM と称される。

●反射型 PAM

対物レンズから照射された励起光により、観察対象物の光照射面で発生した光音響波を、対物レンズと同じ側に設置した超音波センサで光音響信号に変換し収録する方式の PAM。光音響波の伝達様式から、反射型 (reflective) PAM と称される。

●スーパーコンティニューム (Super Continuum: SC) 光源

可視光から近赤外 (Near InfraRed: NIR) 光まで、連続する広帯域 (広い波長帯)、かつ単一モードのビーム特性をもつパルス光を発生させる光源装置。近年、PAM の励起光として十分なエネルギーを持つ SC 光が開発され、応用が進んでいる。

●色収差

光を透過、屈折させる光学レンズにおいて、光の波長 (色) によって焦点距離が変わる現象。屈折が起こるとき、一般的に波長が長い光の屈折率は小さく、短い光の屈折率は大きくなる傾向があることに由来する。色ごとに焦点距離がかわる軸上色収差や、色によって倍率が変わる倍率色収差が問題となることがある。これに対して、屈折率の差が異なる、様々な種類のガラスのレンズを複数組み合わせることで、色収差の影響を低減させることができる。一般的に、顕微鏡の透過対物レンズでは、観察対象に応じた波長範囲で、色収差の補正がなされている。本研究で用いた透過対物レンズは光学顕微鏡用の対物レンズであり、近赤外領域まで補正の対象とはなっていなかった。3. 2 ではこの透過対物レンズによって起こる軸上色収差について検討した。

●ストレール比

光学撮像システムの性能を示す指数の一つ。収差が全くない理想的な状態で円形ビームを入射させた場合の点像強度分布の最大強度、すなわち焦点面での焦点輝度を 1 として、瞳径一定、同一平面で測定した点像の最大強度値の比率。1 に近いほど収差の影響が少ない光学系であるといえる。

●開口数 (Numerical Aperture; NA)

レンズ、特に対物レンズの分解能を示すのに用いられる指標。観測対象物から対物レンズに入射する光の光軸に対する最大角度を θ [rad]、物体と対物レンズの間の媒質の相対的な屈折率を n として、次の式で表される。

$$NA = n \cdot \sin \theta$$

NA が大きいほど対物レンズを光学顕微鏡の対物レンズとして用いた場合の分解能は高くなる。対物レンズを OR-PAM の集光レンズとして用いる場合、NA が高いほど強い焦点形成が得られ、焦点面での高い水平方向分解能が得られるが、その反面、焦点面から外れた高さでの光学焦点の拡大が顕著になる。

また、対物レンズに入射させる励起光のビーム径が、対物レンズの瞳径（対物レンズの後側から観測/入射することができる軸上平行光束の最大径）を下回る場合には、実質的な NA が低下し、光学焦点スポット径が拡大する。

●加算平均処理

反復取得したデータを同期させて加算平均することで、周期的な信号に混入する不規

則なノイズの影響を減じる目的で行う処理。一般的に n 回の反復による加算平均後のノイズレベルは $1/\sqrt{n}$ に低下する。本研究では、光音響信号を残して背景ノイズの影響を減じるために加算平均処理を行った。

●コールドフィルタ

対象とするカットオフ波長よりも短い波長の光を透過する光学フィルタ。本研究では波長が長い赤外光による影響を除去するために用いた。

●バンドパスフィルタ

目的とする波長帯のみを透過させ、それ以外の光をカットさせる光学フィルタ。本研究では SC 光から光吸収体にあわせた帯域の励起光を抽出する目的で使用した。

●マルチカラー観察

光イメージングにおいて異なる波長の狭帯域光を照射することで、観察対象の弁別を行う手法。光音響イメージングにおいては、複数波長の励起光を用いて対象を励起することで、複数の光吸収体の弁別を行う手法。

●パルスエネルギー

パルスレーザーの 1 パルス当たりのエネルギー[J]。パワーメーターで測定したレーザーパワー[W]を繰り返し周波数[Hz]で割って求めた。

●ステッピングモーター走査

パルス信号によって駆動し時計の秒針のように、一定角度ずつ回転するステッピングモーターによって、精密ステージを駆動させる走査法。ステッピングモーターに入力するパルス信号の周波数、時間によって回転角度（ \propto 水平方向移動距離）を制御できるため、高精度かつ再現可能な位置決めを実現できる。本研究では、透過型 PAM、反射型 PAM 両方に搭載し、光学焦点を固定して観察対象物側を走査して光音響顕微画像を取得するのに用いた。

●ガルバノミラーシステム

検流計を発明したガルヴァーニの名に由来する。検流計はコイルに流れる電流の大きさに応じて指針の向きが変化し、測定した電流を示す測定機器である。この原理を利用して、指針のかわりに鏡を配置することで、制御電流の大きさを変化させることによりレーザー光を角度走査する光学機器がガルバノミラーシステムと呼ばれる。本研究では 2 軸ガルバノミラーシステムを採用し、励起光の角度走査を行い、これを対物レンズで水平方向（ x, y 方向）の光学焦点走査に変換した。

引用文献

1. 全国がん罹患データ（2016年～2019年）. 国立がん研究センターがん情報サービス「がん統計」（全国がん登録）.
2. de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, Fizazi K, North S, Chu L, Chi KN, Jones RJ, Goodman OB, Saad F, Staffurth JN, Mainwaring P, Harland S, Flaig TW, Hutson TE, Cheng T, Patterson H, Hainsworth JD, Ryan CJ, Sternberg CN, Ellard SL, Fléchon A, Saleh M, Scholz M, Efstathiou E, Zivi A, Bianchini D, Loriot Y, Chieffo N, Kheoh T, Haqq CM, Scher HI. Abiraterone and Increased Survival in Metastatic Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2011;364(21):1995-2005.
3. Beer TM, Armstrong AJ, Rathkopf DE, Loriot Y, Sternberg CN, Higano CS, Iversen P, Bhattacharya S, Carles J, Chowdhury S, Davis ID, de Bono JS, Evans CP, Fizazi K, Joshua AM, Kim C-S, Kimura G, Mainwaring P, Mansbach H, Miller K, Noonberg SB, Perabo F, Phung D, Saad F, Scher HI, Taplin M-E, Venner PM, Tombal B. Enzalutamide in Metastatic Prostate Cancer before Chemotherapy. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(5):424-33.
4. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Théodore C, James ND, Turesson I, Rosenthal MA, Eisenberger MA. Docetaxel plus Prednisone or Mitoxantrone plus Prednisone for Advanced Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2004;351(15):1502-12.
5. Fizazi K, Tran N, Fein L, Matsubara N, Rodriguez-Antolin A, Alekseev BY, Özgüroğlu M, Ye D, Feyerabend S, Protheroe A, Sulur G, Luna Y, Li S, Mundle S, Chi KN. Abiraterone acetate plus prednisone in patients with newly diagnosed high-risk metastatic castration-sensitive prostate cancer (LATITUDE): final overall survival analysis of a randomised, double-blind, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2019;20(5):686-700.
6. Kyriakopoulos CE, Chen Y-H, Carducci MA, Liu G, Jarrard DF, Hahn NM, Shevrin DH, Dreicer R, Hussain M, Eisenberger M, Kohli M, Plimack ER, Vogelzang NJ, Picus J, Cooney MM, Garcia JA, DiPaola RS, Sweeney CJ. Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer: Long-Term Survival Analysis of the Randomized Phase III E3805 CHAARTED Trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(11):1080-7.
7. Davis ID, Martin AJ, Stockler MR, Begbie S, Chi KN, Chowdhury S, Coskinas X, Frydenberg M, Hague WE, Horvath LG, Joshua AM, Lawrence NJ, Marx G, McCaffrey J, McDermott R, McJannett M, North SA, Parnis F, Parulekar W, Pook DW, Reaume MN, Sandhu SK, Tan A, Tan TH, Thomson A, Tu E, Vera-Badillo F, Williams SG, Yip S, Zhang AY, Zielinski RR, Sweeney CJ. Enzalutamide with Standard First-Line Therapy in Metastatic Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2019;381(2):121-31.
8. de Wit R, de Bono J, Sternberg CN, Fizazi K, Tombal B, Wülfing C, Kramer G, Eymard J-C, Bamias A, Carles J, Iacovelli R, Melichar B, Sverrisdóttir Á, Theodore C, Feyerabend S, Helissey C, Ozatilgan A, Geffriaud-Ricouard C, Castellano D. Cabazitaxel versus Abiraterone or Enzalutamide in Metastatic Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2019;381(26):2506-18.
9. Parker CC, James ND, Brawley CD, Clarke NW, Hoyle AP, Ali A, Ritchie AWS, Attard G, Chowdhury S, Cross W, Dearnaley DP, Gillessen S, Gilson C, Jones RJ, Langley RE, Malik ZI, Mason MD, Matheson D, Millman R, Russell JM, Thalmann GN, Amos CL, Alonzi R, Bahl

- A, Birtle A, Din O, Douis H, Eswar C, Gale J, Gannon MR, Jonnada S, Khaksar S, Lester JF, O'Sullivan JM, Parikh OA, Pedley ID, Pudney DM, Sheehan DJ, Srihari NN, Tran ATH, Parmar MKB, Sydes MR. Radiotherapy to the primary tumour for newly diagnosed, metastatic prostate cancer (STAMPEDE): a randomised controlled phase 3 trial. *The Lancet*. 2018;392(10162):2353-66.
10. Reymond N, d'Água BB, Ridley AJ. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nature reviews Cancer*. 2013;13(12):858-70.
 11. Broncy L, Paterlini-Bréchet P. Clinical Impact of Circulating Tumor Cells in Patients with Localized Prostate Cancer. *Cells*. 2019;8(7):676.
 12. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, Smith MR, Kwak EL, Digumarthy S, Muzikansky A, Ryan P, Balis UJ, Tompkins RG, Haber DA, Toner M. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*. 2007;450(7173):1235-9.
 13. Inuma H, Okinaga K, Adachi M, Suda K, Sekine T, Sakagawa K, Baba Y, Tamura J, Kumagai H, Ida A. Detection of tumor cells in blood using CD45 magnetic cell separation followed by nested mutant allele-specific amplification of p53 and K-ras genes in patients with colorectal cancer. *International Journal of Cancer*. 2000;89(4):337-44.
 14. Naume B, Borgen E, Beiske K, Herstad TK, Ravnås G, Renolen A, Trachsel S, Thrane-Steen K, Funderud S, Kvalheim G. Immunomagnetic techniques for the enrichment and detection of isolated breast carcinoma cells in bone marrow and peripheral blood. *Journal of hematotherapy*. 1997;6(2):103-14.
 15. Schneck H, Gierke B, Uppenkamp F, Behrens B, Niederacher D, Stoecklein NH, Templin MF, Pawlak M, Fehm T, Neubauer H, Disseminated Cancer Cell Network D. EpCAM-Independent Enrichment of Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer. *PLOS ONE*. 2015;10(12):e0144535.
 16. Königsberg R, Obermayr E, Bises G, Pfeiler G, Gneist M, Wrba F, de Santis M, Zeillinger R, Hudec M, Dittrich C. Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*. 2011;50(5):700-10.
 17. Joosse SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO molecular medicine*. 2015;7(1):1-11.
 18. Bell AG. On the production and reproduction of sound by light. *American Journal of Science*. 1880;s3-20(118):305-24.
 19. Beard P. Biomedical photoacoustic imaging. *Interface Focus*. 2011;1(4):602-31.
 20. Kienast Y, von Baumgarten L, Fuhrmann M, Klinkert WEF, Goldbrunner R, Herms J, Winkler F. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nature Medicine*. 2010;16(1):116-22.
 21. He W, Wang H, Hartmann LC, Cheng J-X, Low PS. In vivo quantitation of rare circulating tumor cells by multiphoton intravital flow cytometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(28):11760-5.
 22. Nima ZA, Mahmood M, Xu Y, Mustafa T, Watanabe F, Nedosekin DA, Juratli MA, Fahmi T, Galanzha EI, Nolan JP, Basnakian AG, Zharov VP, Biris AS. Circulating tumor cell identification by functionalized silver-gold nanorods with multicolor, super-enhanced SERS and photothermal resonances. *Scientific Reports*. 2014;4(1):4752.

23. Irisawa K, Hirota K, Hashimoto A, Murakoshi D, Ishii H, Tada T, Wada T, Hayakawa T, Azuma R, Otani N, Itoh K, Ishihara M. Photoacoustic imaging system for peripheral small-vessel imaging based on clinical ultrasound technology. *Photons Plus Ultrasound - Proceedings of SPIE*. 2016;9708.
24. Horiguchi A, Tsujita K, Irisawa K, Kasamatsu T, Hirota K, Kawaguchi M, Shinchu M, Ito K, Asano T, Shinmoto H, Tsuda H, Ishihara M. A pilot study of photoacoustic imaging system for improved real-time visualization of neurovascular bundle during radical prostatectomy. *The Prostate*. 2016;76(3):307-15.
25. Horiguchi A, Shinchu M, Nakamura A, Wada T, Ito K, Asano T, Shinmoto H, Tsuda H, Ishihara M. Pilot Study of Prostate Cancer Angiogenesis Imaging Using a Photoacoustic Imaging System. *Urology*. 2017;108:212-9.
26. Wickramasinghe HK, Bray RC, Jipson V, Quate CF, Salcedo JR. Photoacoustics on a microscopic scale. *Applied Physics Letters*. 1978;33(11):923-5.
27. Liu C, Liang Y, Wang L. Optical-resolution photoacoustic microscopy of oxygen saturation with nonlinear compensation. *Biomedical Optics Express*. 2019;10(6):3061-9.
28. Zhao H, Li K, Chen N, Zhang K, Wang L, Lin R, Gong X, Song L, Liu Z, Liu C. Multiscale Vascular Enhancement Filter Applied to In Vivo Morphologic and Functional Photoacoustic Imaging of Rat Ocular Vasculature. *IEEE Photonics Journal*. 2019;11(6):1-12.
29. Liu C, Chen J, Zhang Y, Zhu J, Wang L. Five-wavelength optical-resolution photoacoustic microscopy of blood and lymphatic vessels. *Advanced Photonics*. 2021;3.
30. He Y, Wang L, Shi J, Yao J, Li L, Zhang R, Huang CH, Zou J, Wang LV. In vivo label-free photoacoustic flow cytography and on-the-spot laser killing of single circulating melanoma cells. *Sci Rep*. 2016;6:39616.
31. Wang L, Yao J, Zhang R, Xu S, Li G, Zou J, Wang L. Photoacoustic imaging of single circulating melanoma cells in vivo. *Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE*. 2015;9323.
32. Wang Y, Maslov K, Zhang Y, Hu S, Yang L, Xia Y, Liu J, Wang LV. Fiber-laser-based photoacoustic microscopy and melanoma cell detection. *J Biomed Opt*. 2011;16(1):011014.
33. Auksoy E, Boruah BR, Dunsby C, Lanigan PMP, Kennedy G, Neil MAA, French PMW. Stimulated emission depletion microscopy with a supercontinuum source and fluorescence lifetime imaging. *Optics Letters*. 2008;33(2):113-5.
34. Kano H. Molecular vibrational imaging of a human cell by multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy using a supercontinuum light source. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2008;39(11):1649-52.
35. Lefort C, O'Connor RP, Blanquet V, Magnol L, Kano H, Tombelaine V, L  v  que P, Couderc V, Leproux P. Multicolor multiphoton microscopy based on a nanosecond supercontinuum laser source. *Journal of Biophotonics*. 2016;9(7):709-14.
36. Lee C, Han S, Kim S, Jeon M, Jeon MY, Kim C, Kim J. Combined photoacoustic and optical coherence tomography using a single near-infrared supercontinuum laser source. *Applied Optics*. 2013;52(9):1824-8.
37. Bondu M, Brooks C, Jakobsen C, Oakes K, Moselund PM, Leick L, Bang O, Podoleanu A. High energy supercontinuum sources using tapered photonic crystal fibers for multispectral photoacoustic microscopy. *Journal of Biomedical Optics*. 2016;21(6):061005.

38. Shu X, Bondu M, Dong B, Podoleanu A, Leick L, Zhang HF. Single all-fiber-based nanosecond-pulsed supercontinuum source for multispectral photoacoustic microscopy and optical coherence tomography. *Optics Letters*. 2016;41(12):2743-6.
39. Bondu M, Denninger M, Moselund PM, Podoleanu A, editors. Using a single supercontinuum source for visible multispectral photoacoustic microscopy and 1300 nm optical coherence tomography. *Opto-Acoustic Methods and Applications in Biophotonics III*; 2017 2017/06/25; Munich: Optica Publishing Group.
40. Bondu M, Marques MJ, Moselund PM, Lall G, Bradu A, Podoleanu A. Multispectral photoacoustic microscopy and optical coherence tomography using a single supercontinuum source. *Photoacoustics*. 2018;9:21-30.
41. Dasa MK, Nteroli G, Bowen P, Messa G, Feng Y, Petersen CR, Koutsikou S, Bondu M, Moselund PM, Podoleanu A, Bradu A, Markos C, Bang O. All-fibre supercontinuum laser for in vivo multispectral photoacoustic microscopy of lipids in the extended near-infrared region. *Photoacoustics*. 2020;18:100163.
42. Zhang HF, Maslov K, Stoica G, Wang LV. Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive in vivo imaging. *Nature Biotechnology*. 2006;24(7):848-51.
43. Maslov K, Zhang HF, Hu S, Wang LV. Optical-resolution photoacoustic microscopy for in vivo imaging of single capillaries. *Optics Letters*. 2008;33(9):929-31.
44. Park S, Ang RR, Duffy SP, Bazov J, Chi KN, Black PC, Ma H. Morphological differences between circulating tumor cells from prostate cancer patients and cultured prostate cancer cells. *PLoS One*. 2014;9(1):e85264.
45. Dasa MK, Markos C, Maria M, Petersen CR, Moselund PM, Bang O. High-pulse energy supercontinuum laser for high-resolution spectroscopic photoacoustic imaging of lipids in the 1650-1850 nm region. *Biomed Opt Express*. 2018;9(4):1762-70.
46. Oraevsky A, Karabutov A. Ultimate sensitivity of time-resolved optoacoustic detection: SPIE; 2000.
47. Kim JY, Lee C, Park K, Han S, Kim C. High-speed and high-SNR photoacoustic microscopy based on a galvanometer mirror in non-conducting liquid. *Scientific Reports*. 2016;6(1):34803.
48. Jiang B, Yang X, Luo Q. Reflection-mode Bessel-beam photoacoustic microscopy for in vivo imaging of cerebral capillaries. *Optics Express*. 2016;24(18):20167-76.
49. Chen M, Duan X, Lan B, Vu T, Zhu X, Rong Q, Yang W, Hoffmann U, Zou J, Yao J. High-speed functional photoacoustic microscopy using a water-immersible two-axis torsion-bending scanner. *Photoacoustics*. 2021;24:100309.
50. Roumeliotis M, Ephrat P, Patrick J, Carson JLL. Development and characterization of an omni-directional photoacoustic point source for calibration of a staring 3D photoacoustic imaging system. *Optics Express*. 2009;17(17):15228-38.
51. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019-) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.1351/goldbook>. [Internet].
52. 森秀夫、角倉敏彦、鈴木達朗. 超音波による回折スペクトルの測定方法と音速および吸収測定への応用. *応用物理*. 1969;38(12):1126-32.

53. Allen TJ, Spurrell J, Berendt M, Ogunlade O, Alam S, Zhang E, Richardson D, Beard P. Ultrafast laser-scanning optical resolution photoacoustic microscopy at up to 2 million A-lines per second. *Journal of Biomedical Optics*. 2018;23(12):126502.
54. 甲子乃人. コンパクト超音波シリーズ vol.6 超音波の基礎と装置 三訂版(ベクトル・コア). 2006:29.
55. Hirasawa T, Iwatate RJ, Kamiya M, Okawa S, Urano Y, Ishihara M. Multispectral photoacoustic imaging of tumours in mice injected with an enzyme-activatable photoacoustic probe. *Journal of Optics*. 2016;19(1):014002.
56. 佐藤俊一、小原實. 光と超音波・圧力波の複合的作用を利用した医療技術の進展. *光学*. 2009;38(6):288-97.
57. Artiukov I, Krymski K. Schwarzschild objective for soft x-rays. *Optical Engineering*. 2000;39(8).
58. KABIR MM, CHOUBAL AM, TOUSSAINT Jr. KC. Application of a reflective microscope objective for multiphoton microscopy. *Journal of Microscopy*. 2018;271(2):129-35.
59. Artyukov I. Schwarzschild objective and similar two-mirror systems: SPIE; 2012.
60. Lan G, Twa MD. Theory and design of Schwarzschild scan objective for Optical Coherence Tomography. *Optics Express*. 2019;27(4):5048-64.
61. Prahl SA. Optical absorption of hemoglobin. 1999.
<http://omlc.org/spectra/hemoglobin/index.html>.
62. Jacques SL. Optical properties of biological tissues: a review. *Phys Med Biol*. 2013;58(11):R37-61.
63. Jimbow K, Miyake Y, Homma K, Yasuda K, Izumi Y, Tsutsumi A, Ito S. Characterization of melanogenesis and morphogenesis of melanosomes by physicochemical properties of melanin and melanosomes in malignant melanoma. *Cancer Res*. 1984;44(3):1128-34.
64. Hirasawa T, Iwatate RJ, Kamiya M, Okawa S, Fujita M, Urano Y, Ishihara M. Spectral-differential-based unmixing for multispectral photoacoustic imaging. *Appl Opt*. 2018;57(10):2383-93.
65. Chen J, Zhang Y, Li X, Zhu J, Li D, Li S, Lee C-S, Wang L. Confocal visible/NIR photoacoustic microscopy of tumors with structural, functional, and nanoprobe contrasts. *Photon Res*. 2020;8(12):1875-80.
66. Wang H, Yang X, Liu Y, Jiang B, Luo Q. Reflection-mode optical-resolution photoacoustic microscopy based on a reflective objective. *Optics Express*. 2013;21(20):24210-8.
67. Cho S-W, Park SM, Park B, Kim DY, Lee TG, Kim B-M, Kim C, Kim J, Lee S-W, Kim C-S. High-speed photoacoustic microscopy: A review dedicated on light sources. *Photoacoustics*. 2021;24:100291.
68. Yao J, Wang L, Yang J-M, Gao L, Maslov K, Wang L, Huang C-H, Zou J. Wide-field fast-scanning photoacoustic microscopy based on a water-immersible MEMS scanning mirror. *Journal of Biomedical Optics*. 2012;17(8):080505.
69. Zhou H-C, Chen N, Zhao H, Yin T, Zhang J, Zheng W, Song L, Liu C, Zheng R. Optical-resolution photoacoustic microscopy for monitoring vascular normalization during anti-angiogenic therapy. *Photoacoustics*. 2019;15:100143.
70. Hai P, Zhou Y, Zhang R, Ma J, Li Y, Shao J-Y, Wang L. Label-free high-throughput detection and quantification of circulating melanoma tumor cell clusters by linear-array-based photoacoustic tomography. *Journal of Biomedical Optics*. 2016;22(4):041004.

71. Buma T, Conley NC, Choi SW. Multispectral photoacoustic microscopy of lipids using a pulsed supercontinuum laser. *Biomedical Optics Express*. 2018;9(1):276-88
72. Ishihara M, Hirasawa T, Le Z, Miyashita M, Matsuda T, Murakoshi H, Nagai T. Photoacoustic microscopy using supercontinuum light for imaging of chromoproteins in living cells: SPIE; 2022.
73. Shi L, Sordillo LA, Rodríguez-Contreras A, Alfano R. Transmission in near-infrared optical windows for deep brain imaging. *J Biophotonics*. 2016;9(1-2):38-43.
74. Danila DC, Heller G, Gignac GA, Gonzalez-Espinoza R, Anand A, Tanaka E, Lilja H, Schwartz L, Larson S, Fleisher M, Scher HI. Circulating Tumor Cell Number and Prognosis in Progressive Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(23):7053-8.
75. A Higher Number of Circulating Tumor Cells (CTC) in Peripheral Blood Indicates Poor Prognosis in Prostate Cancer Patients - A Meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2011;12(10):2629-35.
76. Hu B, Rochefort H, Goldkorn A. Circulating Tumor Cells in Prostate Cancer. *Cancers*. 2013;5(4):1676-90.
77. Shi J, Wong TTW, He Y, Li L, Zhang R, Yung CS, Hwang J, Maslov K, Wang LV. High-resolution, high-contrast mid-infrared imaging of fresh biological samples with ultraviolet-localized photoacoustic microscopy. *Nat Photonics*. 2019;13:609-15.
78. He Y, Wang L, Shi J, Yao J, Li L, Zhang R, Huang C-H, Zou J, Wang LV, editors. Real-time photoacoustic flow cytography and photothermal lysis of single circulating melanoma cells in vivo. *Photons Plus Ultrasound: Imaging and Sensing 2017*; 2017: International Society for Optics and Photonics.
79. Yin T, Wang K, Qiu C, Zhang X, Zhou H, You Y, Ren J, Mao R, Yang B, Miao X, Tian J, Zheng R. Simple structural indocyanine green-loaded microbubbles for dual-modality imaging and multi-synergistic photothermal therapy in prostate cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2020;28:102229.
80. Hirasawa T, Tachi K, Miyashita M, Okawa S, Kushibiki T, Ishihara M. Spectroscopic photoacoustic microscopic imaging during single spatial scan using broadband excitation light pulses with wavelength-dependent time delay. *Photoacoustics*. 2022;26:100364.
81. Zhang HK, Chen Y, Kang J, Lisok A, Minn I, Pomper MG, Boctor EM. Prostate-specific membrane antigen-targeted photoacoustic imaging of prostate cancer in vivo. *J Biophotonics*. 2018;11(9):e201800021.
82. Sartor O, de Bono J, Chi KN, Fizazi K, Herrmann K, Rahbar K, Tagawa ST, Nordquist LT, Vaishampayan N, El-Haddad G, Park CH, Beer TM, Armour A, Pérez-Contreras WJ, DeSilvio M, Kpamegan E, Gericke G, Messmann RA, Morris MJ, Krause BJ. Lutetium-177-PSMA-617 for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *The New England journal of medicine*. 2021;385(12):1091-103.

図 表

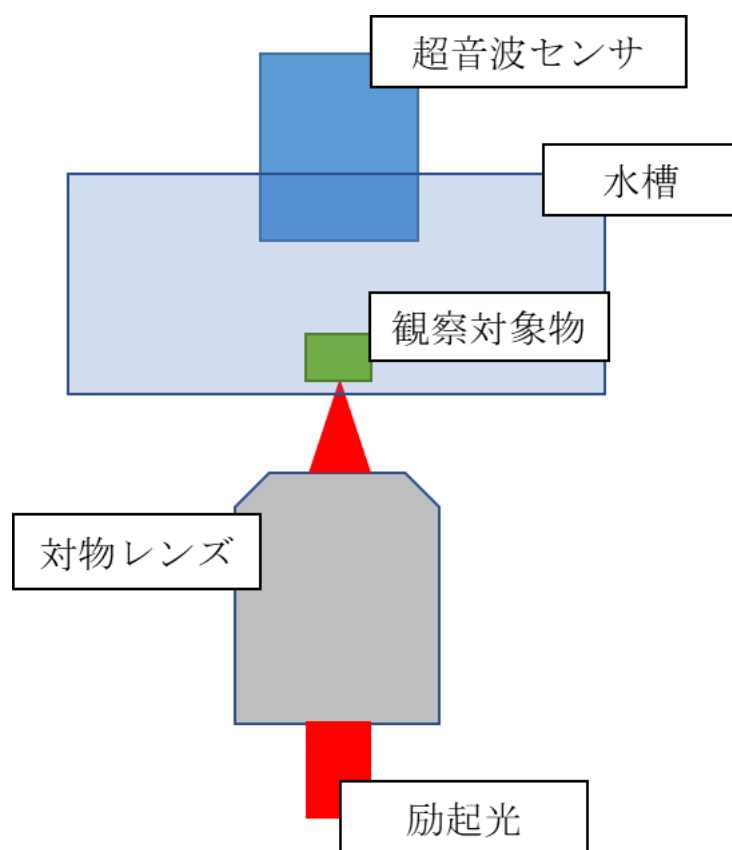


図 1 第 2 章 透過型 PAM の概略図

第 2 章で構築した透過型 PAM の概略図。対物レンズで励起光を観察対象物の底面に集光し、光音響波を発生させる。発生した光音響波のうち、観察対象物を透過してきた成分を超音波センサで観測することから、透過型 PAM と称される。

特徴として、設計の自由度が高く、超音波センサの形状や配置に制限がないため、高感度の超音波センサを選択して使えるという利点がある反面、観察部位と超音波センサの距離は超音波センサの焦点距離で規定され、かつ、発生した光音響波が観察対象物内部の音響特性の影響を受けるため、厚みのあるサンプルへの適用が制限される、という欠点がある。

本研究では、透過型 PAM を用いた実験により、最適な超音波センサの選定や PAM を用いた各種実験の条件の最適化を行ったほか、PAM で in vivo CTC 検出が可能であるか検討するため、段階的に実験を行った。

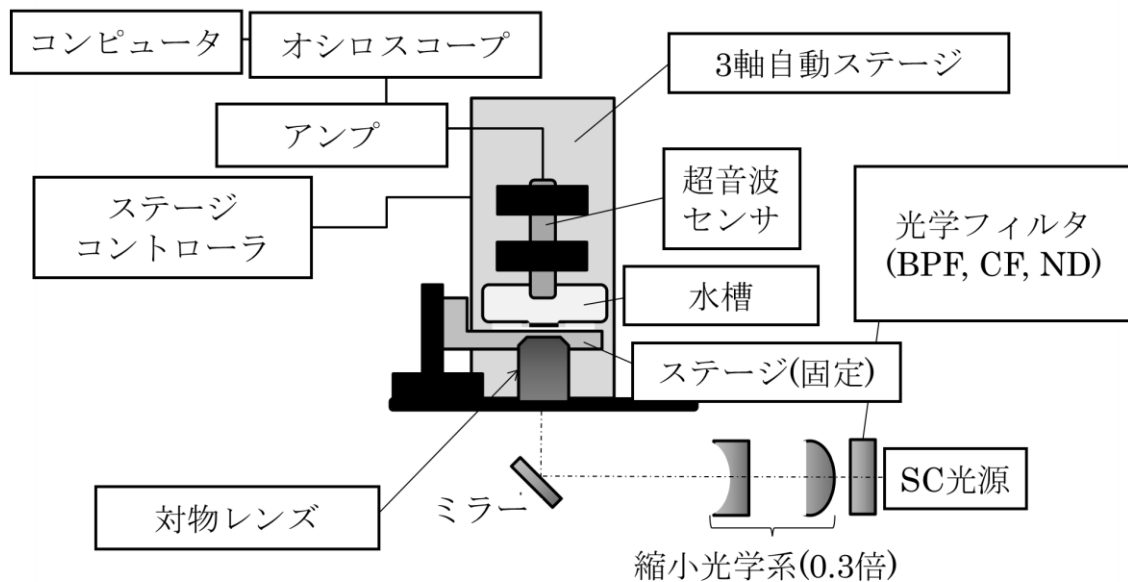


図 2 第 2 章 超音波センサ評価の実験系

2. 2 透過型光音響顕微鏡の構築及び超音波センサの評価 で使用した実験系の概略図。

透過型 PAM を構築し、超音波センサ保持治具に自動ステージを追加した。超音波センサを走査することで、音源と超音波センサの位置関係を任意に設定し、各超音波センサの空間感度分布を評価できる設計とした。

SC 光源: スーパーコンティニウム光源、BPF: バンドパスフィルタ、CF: コールドフィルタ、ND: 減光フィルタ

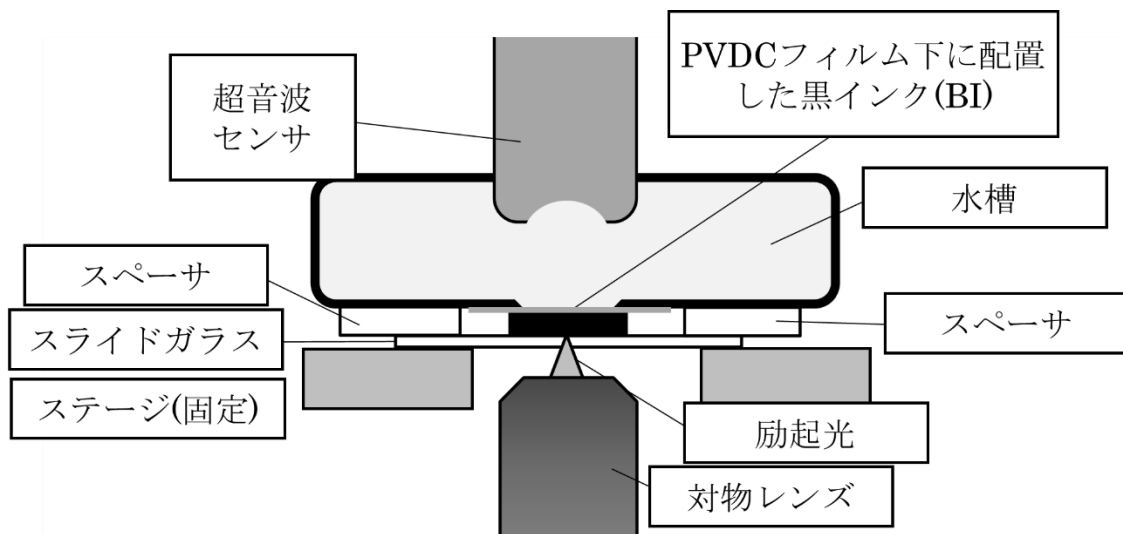


図3 第2章 超音波センサ評価の音源部概略図

2. 2 透過型光音響顕微鏡の構築及び超音波センサの評価 で使用した実験系のうち、光音響波発生源とそこから発生した光音響波を超音波センサまで伝播させる構造の概略図。

スペーサでスライドガラスと水槽の間に間隙を作り、そこに黒インクをおいた。水槽底面は一部をポリ塩化ビニリデン (PVDC) フィルムで置換し、音響的開口部とした。

励起光がスライドガラスと BI の界面上に焦点を形成するよう配置し、広帯域の光音響波を発生させた。発生した光音響波は黒インク、PVDC フィルム、水槽内の脱気水を通して超音波センサに到達し、光音響信号として観測される。

PVDC: ポリ塩化ビニリデン、BPF: バンドパスフィルタ、CF: コールドフィルタ、ND: 減光フィルタ

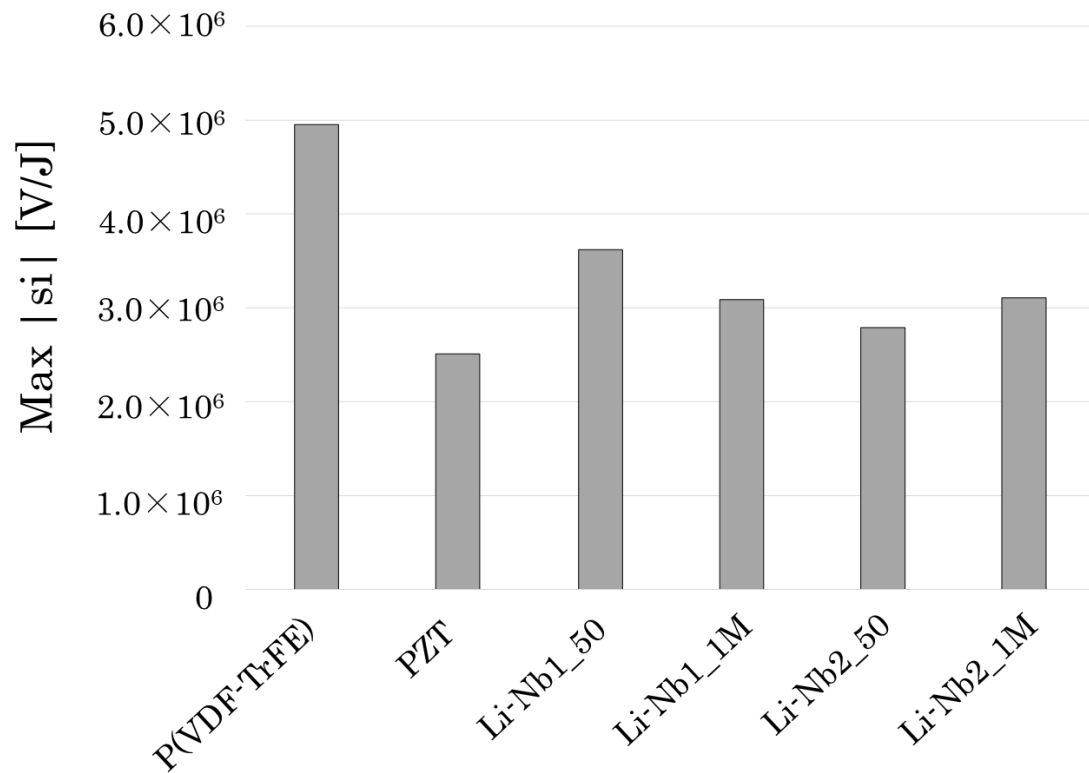


図4 第2章 受信感度特性の比較: 各超音波センサの $\max |s_i|$
 2. 2 透過型光音響顕微鏡の構築及び超音波センサの評価 の結果。
 各超音波センサの受信感度特性として $\max |s_i|$ を比較した。

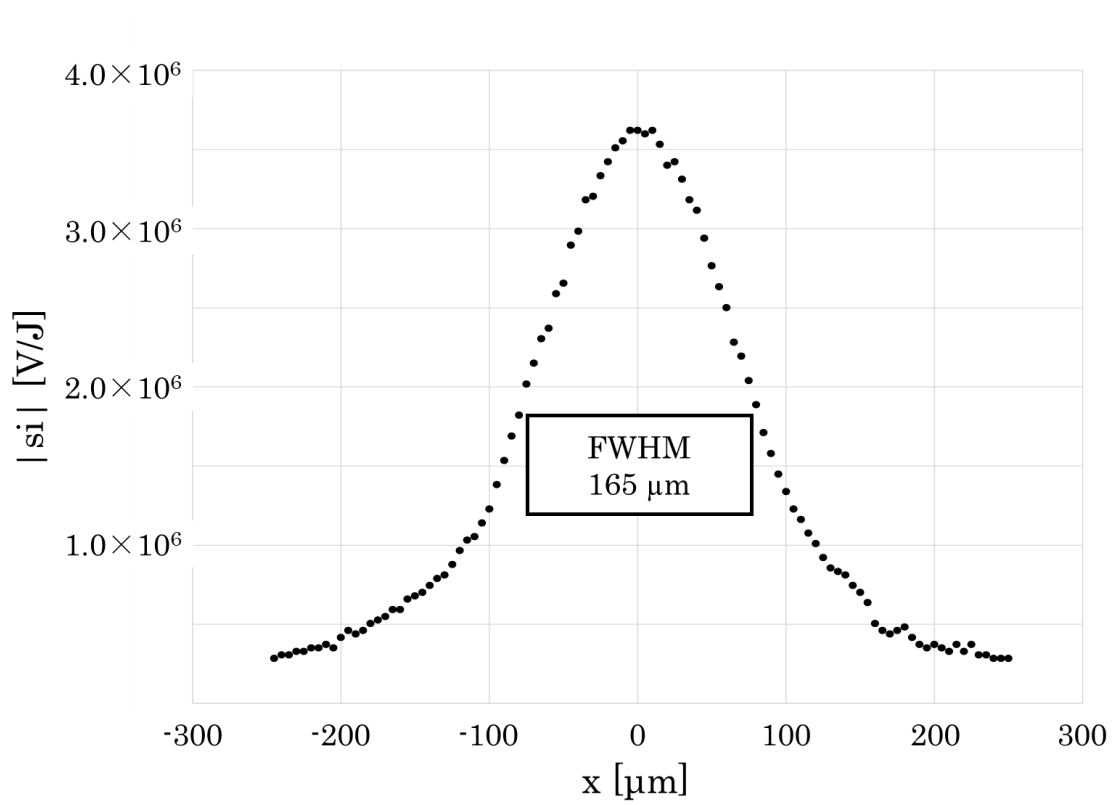


図 5 第 2 章 空間感度分布測定の一例: Li-Nb1_50 水平方向感度分布

各超音波センサで空間感度分布の最強点、すなわち音響焦点を通る水平方向感度分布から、感度の FWHM: 半値全幅を算出した。本図では例として Li-Nb1_50 で得られた結果を示す。

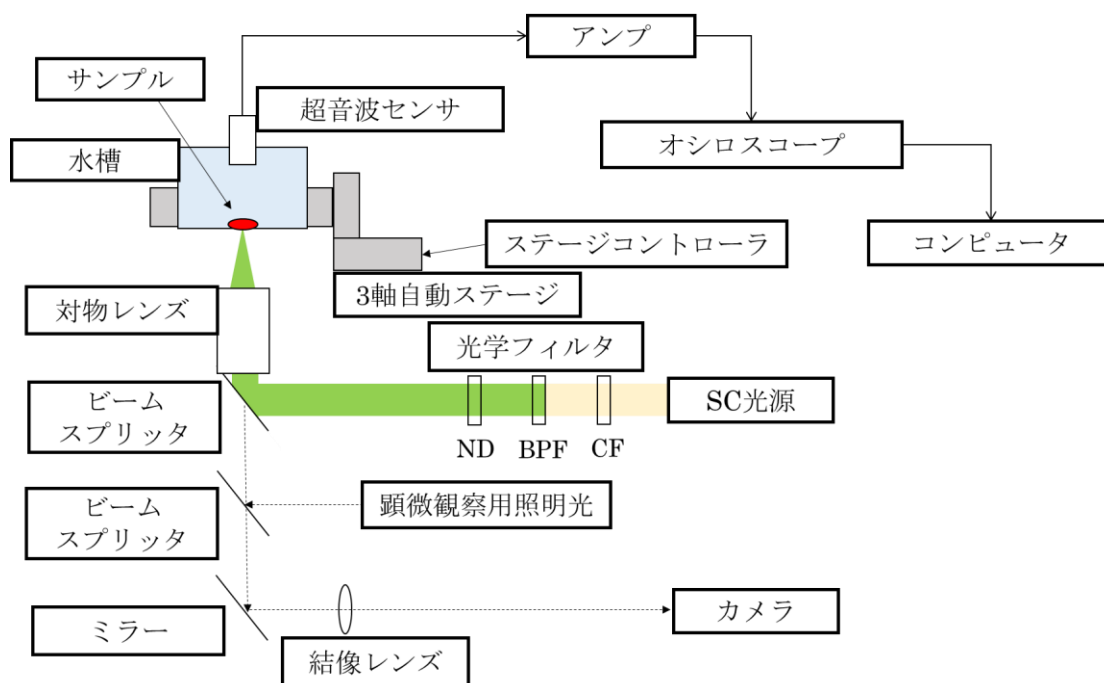


図 6 第 2 章 透過型 PAM の実験模式図

2. 3 透過型光音響顕微鏡による実証実験 で用いた透過型 PAM の模式図。

研究開発用のコアユニット顕微鏡をベースとして、光学顕微観察も選択可能な透過型 PAM を構築した。超音波センサはその音響焦点が対物レンズの光学焦点、すなわち励起光照射部位と一致するように配置した。

SC 光源: スーパーコンティニューム光源、CF: コールドフィルタ、BPF: バンドパスフィルタ、ND: 減光フィルタ

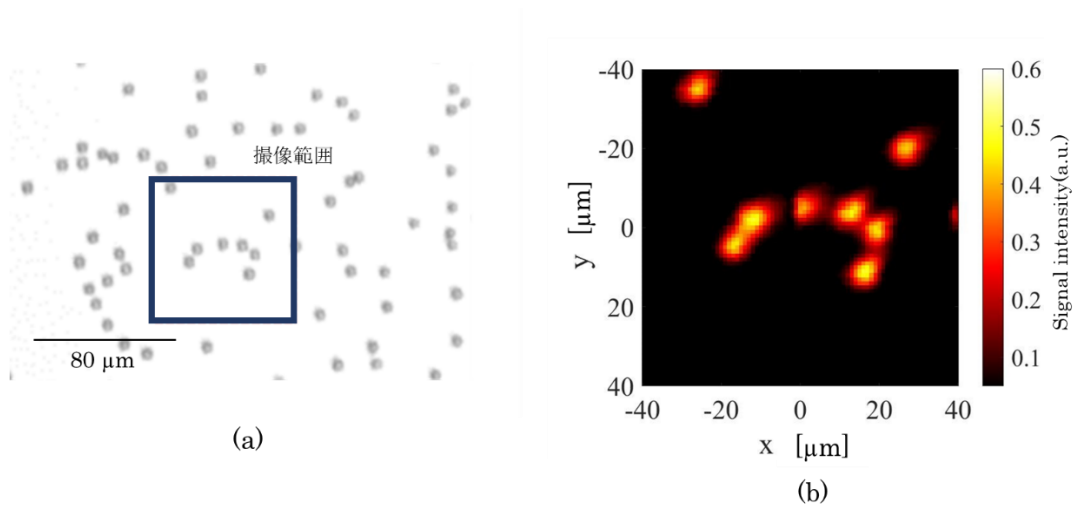


図 7 第 2 章 透過型 PAM システムで観察した赤血球の画像

2. 3. 3. 1 赤血球の観察 で示している結果。

(a)光学顕微鏡像。四角で示す範囲を PAM で観察した。

(b)光音響顕微観察画像。単一赤血球を画像化できている。

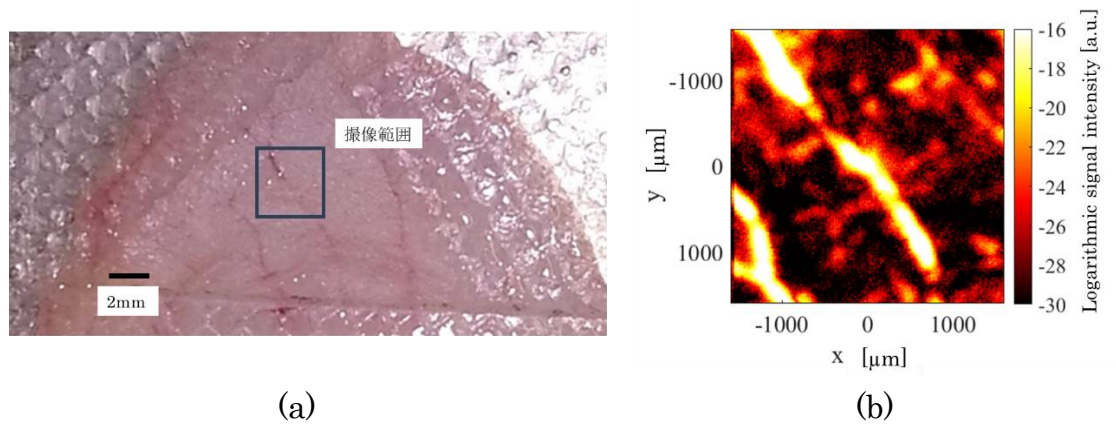
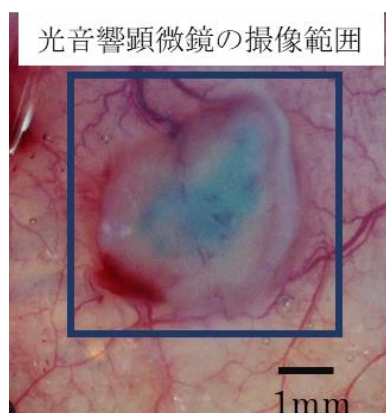


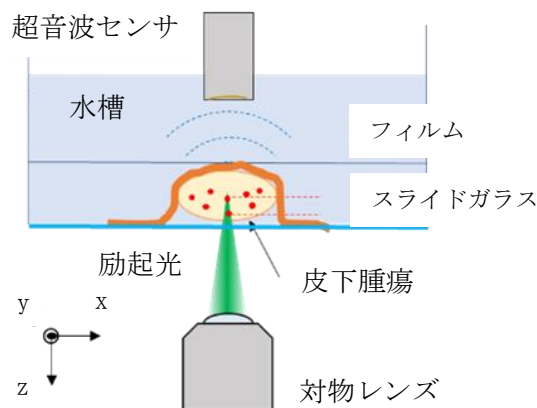
図 8 第 2 章 マウス耳の微小血管の観察

(a)肉眼像。四角で示す範囲を PAM で観察した。

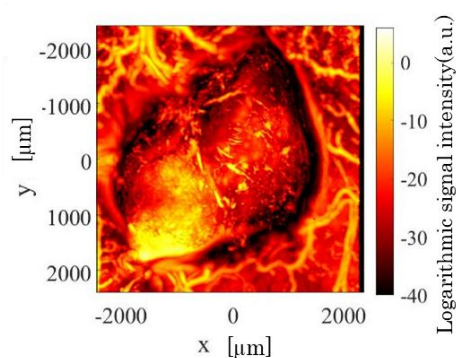
(b)光音響顕微観察画像。肉眼像では確認できない太さの微小血管まで描出できている。



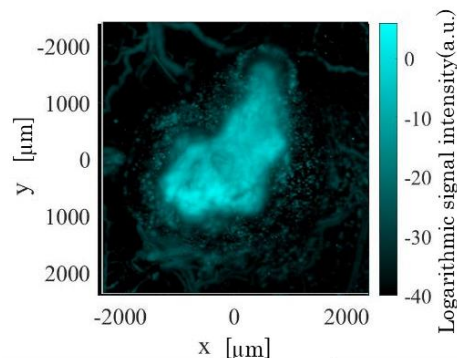
(a)



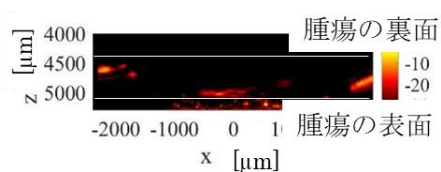
(b)



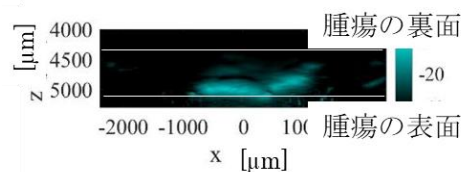
(c)



(d)



(e)



(f)

図9 第2章 染色前立腺癌皮下腫瘍の観察

(a)皮下腫瘍の光学顕微鏡画像。四角で示す範囲をPAMでマルチカラー観察した。

(b)実験模式図。皮膚を剥離し、皮膚裏面から観察した。

(c)575 nm: 水平投影像。腫瘍内部とその周囲の微小血管が画像化されている。

(d)750 nm: 水平投影像。皮下腫瘍と周囲に散在する腫瘍細胞が画像化されている。

(e)575 nm: $y=0$ における光照射から光音響波の観測までの時間を奥行き情報としてプロットした垂直方向(x - z)断面像。腫瘍表面と周囲の皮膚の血管が画像化されている。

(f)750 nm: $y=0$ における垂直方向(x - z)断面像。腫瘍表面で特に強い光音響信号が観測されている。

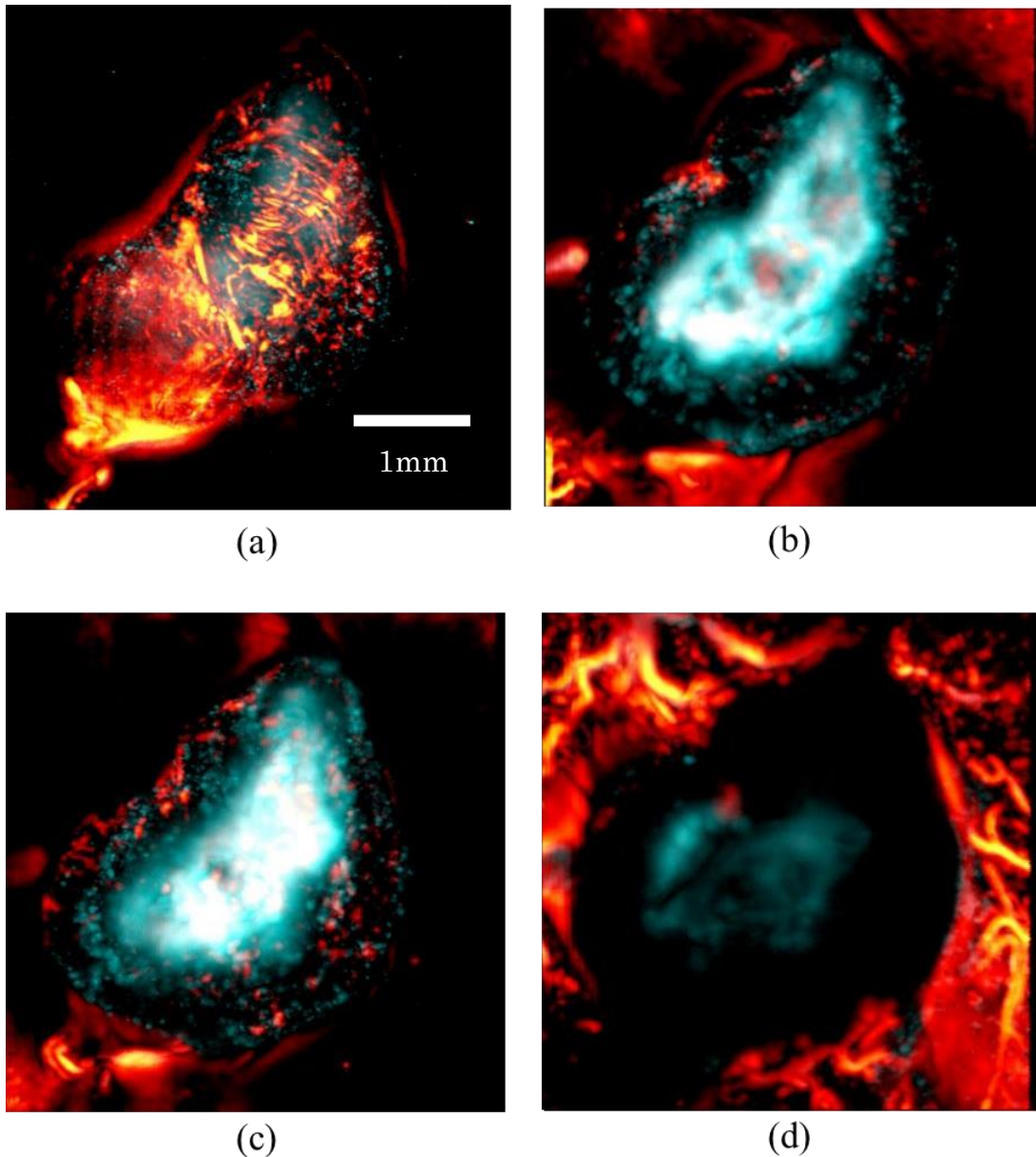


図 10 第 2 章 染色前立腺癌皮下腫瘍のマルチカラー PAM 画像を深さ方向に分解した z スタック画像

(a)腫瘍表面の結果。腫瘍表面の微小血管が描出されている。

(b)腫瘍表面から深さ $90\ \mu\text{m}$ の結果。皮下腫瘍内部に新生血管のネットワークを示すヘモグロビン分布を認める。

(c)腫瘍表面から深さ $300\ \mu\text{m}$ の結果。腫瘍内部で強い信号を認めるほか、腫瘍辺縁に細胞染色試薬で染色された細胞が分布している。

(d)腫瘍表面から深さ $690\ \mu\text{m}$ の結果。腫瘍周辺の正常皮膚の血管分布が観察される。

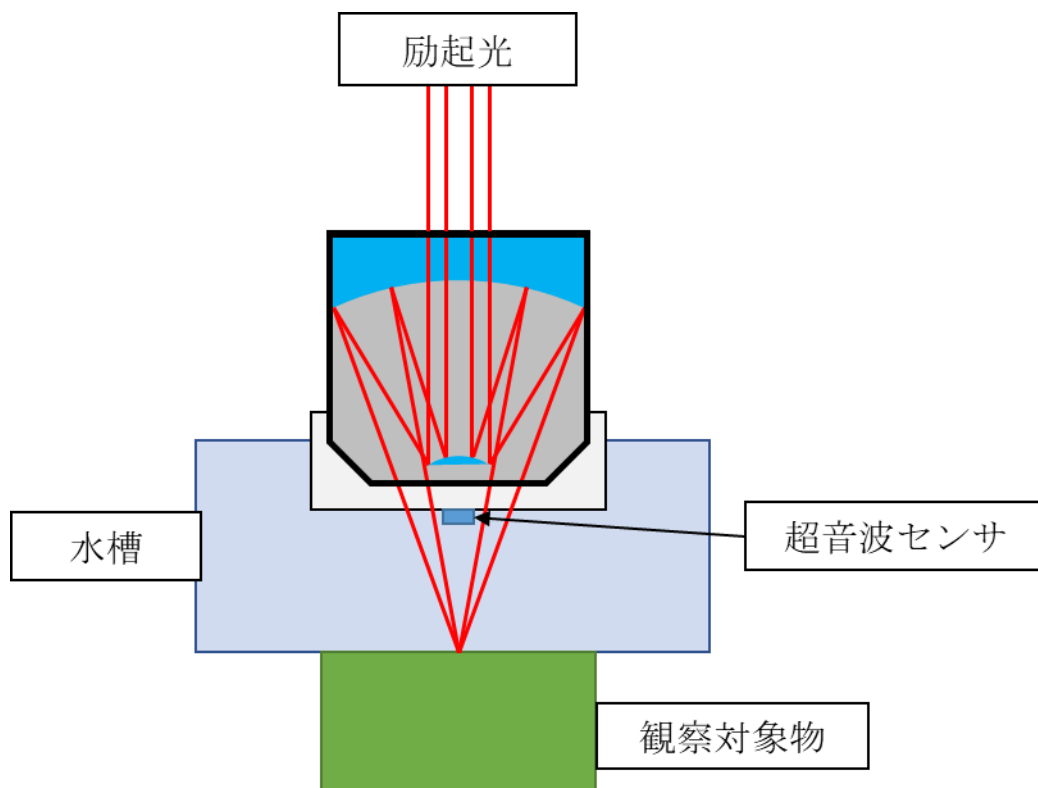


図 11 第 3 章 反射型 PAM の概略図

第 3 章で構築した反射型 PAM の概略図。

反射対物レンズと超音波センサを同軸、同方向に配置し、対物レンズで励起光を観察対象物の表面に集光し、発生した光音響波のうち、対物レンズ側に伝搬してきた成分を超音波センサで観測することから、反射型 PAM と称される。

特徴として、励起と観測を同じ側から行うことにより、透過型 PAM で問題となりうる観察対象物の厚み制限や、観察対象内部の音響特性の影響を受けずに光音響波を観測できる、という利点がある反面、構造が複雑で、超音波センサを小型化する必要がある等の欠点がある。

本研究では、まず透過型 PAM を構築して PAM に関する基礎的知見を得た後に反射型 PAM を構築した。

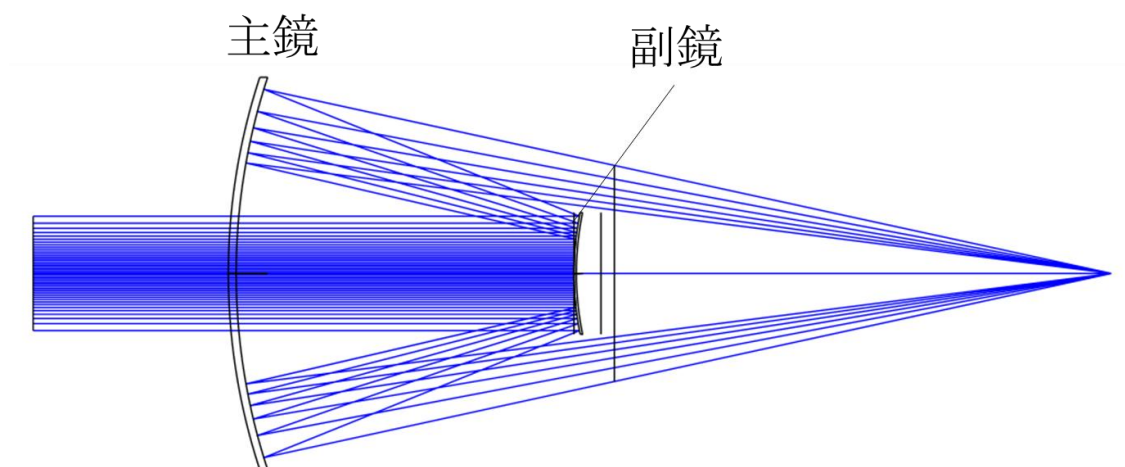


図 12 第 3 章 反射対物レンズの模式図

反射対物レンズは局面中心が一致する 2 枚の凹面(主鏡)と凸面(副鏡)の球面鏡を光軸上に配置することで、顕微観察やコリメート光の集光を可能とする Schwarzschild 光学系に基づいて設計されている。

その集光原理として屈折を用いないため、色収差の影響を受けず広い波長範囲にわたって均一な集光が得られる。

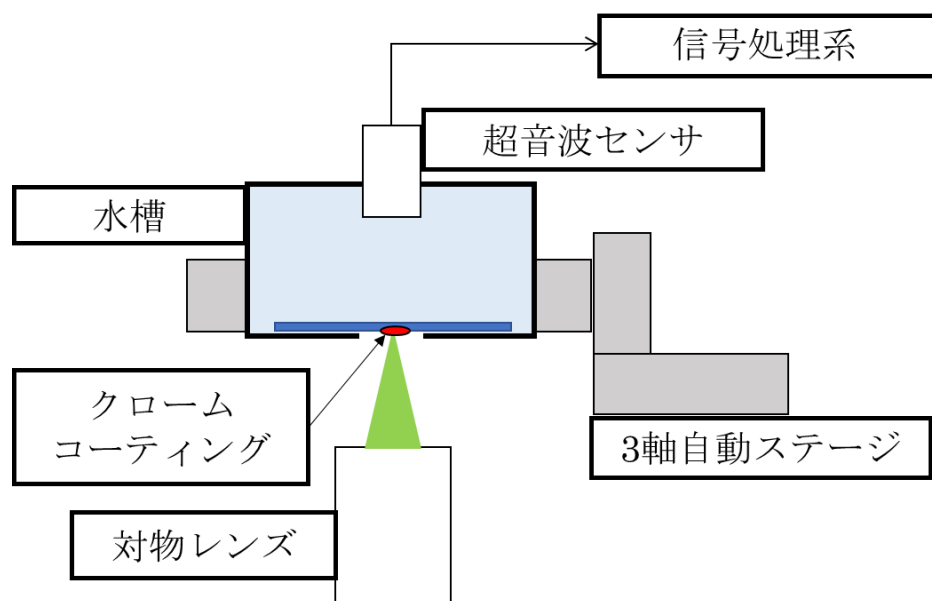


図 14 第 3 章 色収差による光学焦点位置移動の評価実験の模式図

3. 2 反射対物レンズの導入 で色収差による光学焦点位置移動の評価を行った際に用いた実験系の模式図。

顕微鏡校正用スケールのクロームコーティング面を対物レンズ側に向け、対物レンズ以降に生じる色収差の影響を除去した。

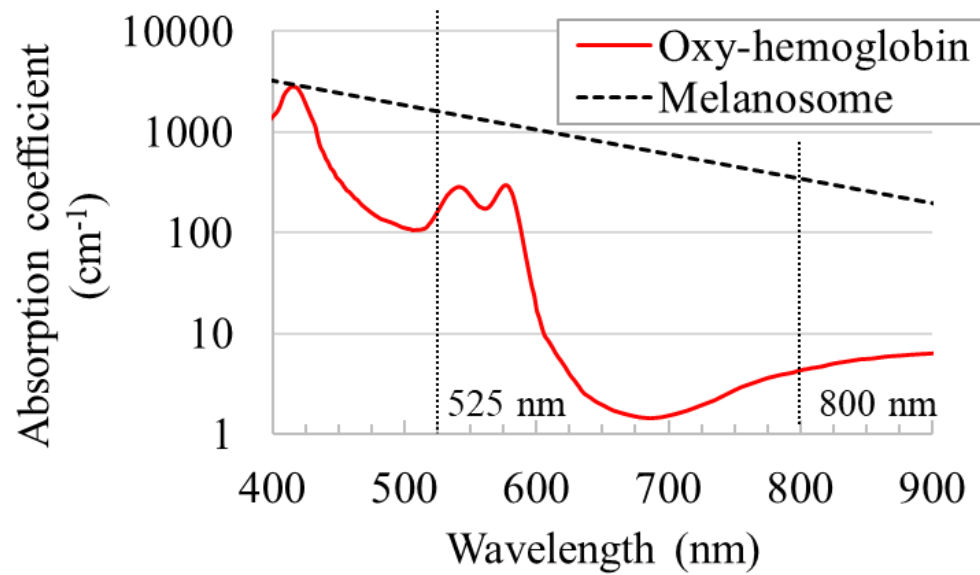


図 15 第 3 章 酸素化ヘモグロビン (15g/dl) およびメラノソームの吸収スペクトル

引用文献

酸素化ヘモグロビンの吸収スペクトル：引用文献 61

メラノソームの吸収スペクトル：引用文献 62

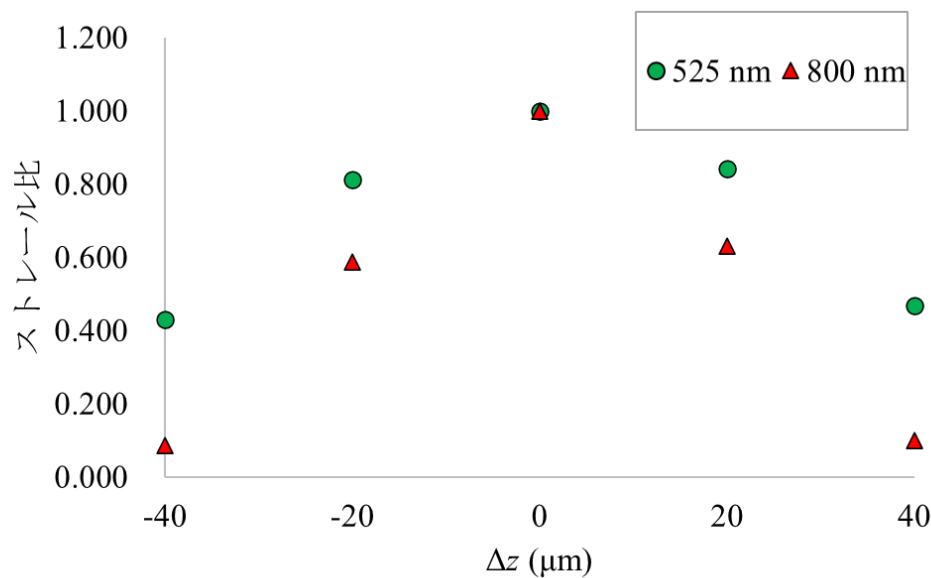
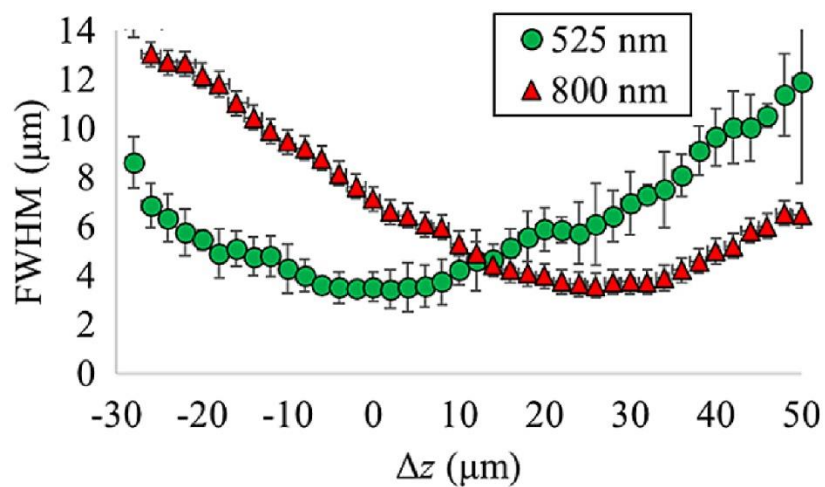


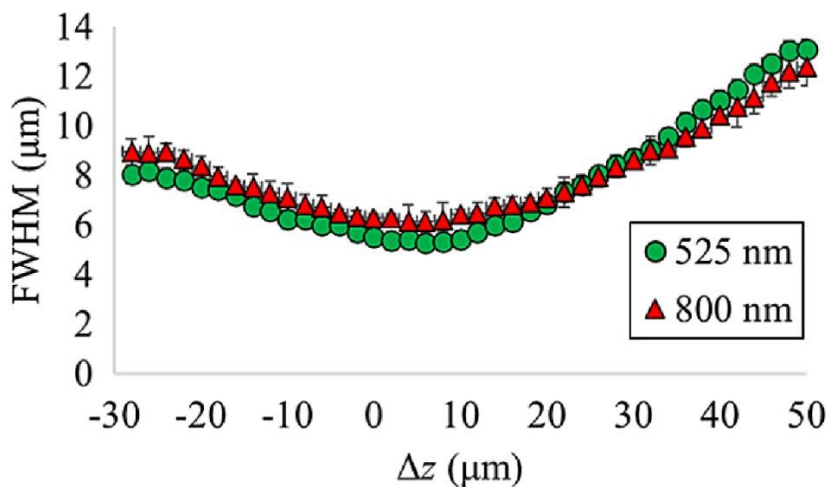
図 16 第 3 章 レイトレーシング法によるシミュレーション結果から算出した反射対物レンズにおけるストレーンル比の変化

525 nm の励起光を入射したときの焦点面における集光度を 1 とした。525 nm と 800 nm それぞれのシミュレーション結果における焦点面および焦点面 $\pm 20 \mu\text{m}$ 、 $40 \mu\text{m}$ で算出したストレーンル比を示す。

波長を変えてもストレーンル比は焦点面 ($\Delta z=0$) を中心として対称の下落傾向を示す。軸上色収差の影響を受けないことが確認された。波長により下落傾向の強さに差があるのは、波長によって入射ビーム径に差があるためと考えた。



(a)



(b)

図 17 第 3 章 対物レンズと校正スケールの距離に対する FWHM の関係

(a)透過対物レンズの結果。励起波長 525 nm と 800 nm で FWHM が最小となる焦点面が約 30 μm の差を示している。

(b)反射対物レンズの結果。励起波長の変化による焦点面の移動は起こっていない。

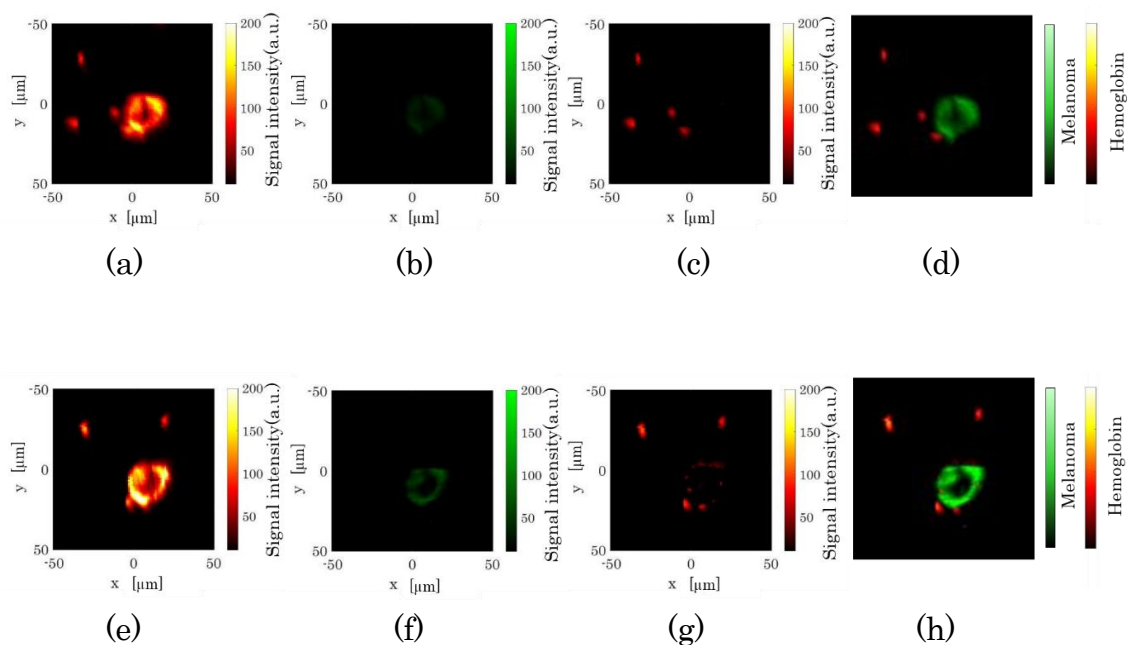


図 18 第 3 章 反射対物レンズと透過対物レンズでマルチカラー観察したメラノーマ・赤血球混合物の観察結果

(a)反射対物: 525 nm。メラノーマと赤血球の両方が観察される。

(b)反射対物: 800 nm。メラノーマだけが観察される。

(c)画像(a)と画像(b)の加重差分画像。メラノーマ由来の成分はほとんど観察されない。

(d)画像(b) (緑)、画像(c) (赤) の重ね合わせ画像。赤血球とメラノーマがマルチカラー観察により弁別できている。

(e)透過対物: 525 nm。

(f)透過対物: 800 nm。

(g)画像(d)と画像(e)の加重差分画像。色収差による焦点位置移動により、メラノーマ由来の信号が低減しきれない。

(h)画像(f) (緑)、画像(g) (赤) の重ね合わせ画像。加重差分しても低減しきれなかったメラノーマ由来の信号が赤血球由来の信号として、メラノーマ部に赤く表示される。

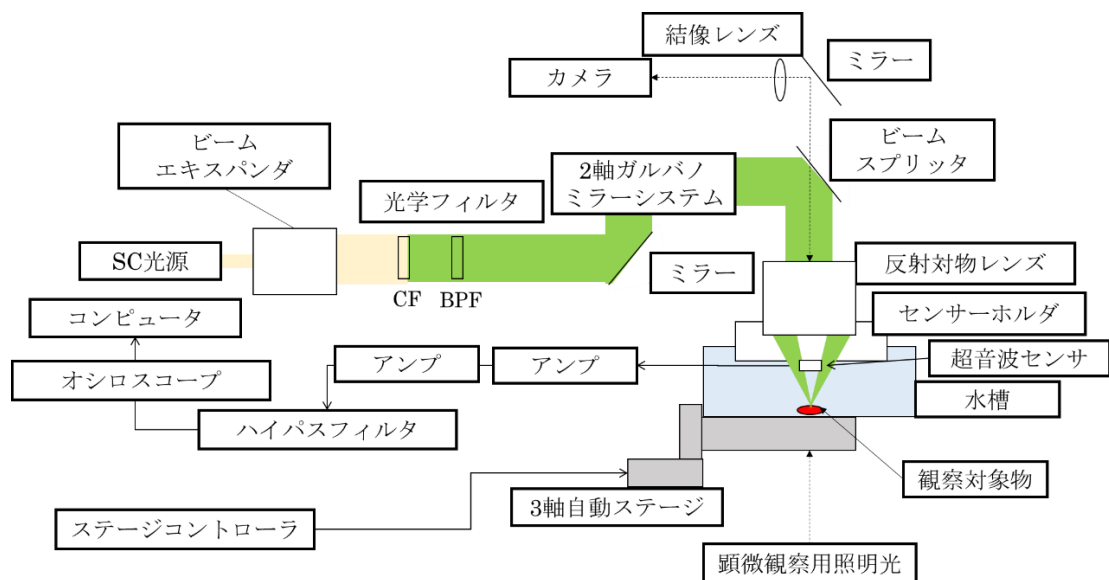


図 19 第 3 章 反射型 PAM の実験模式図

3. 3 反射型光音響顕微鏡の構築 で作製した反射型 PAM の模式図。

励起光の集光に反射対物レンズを用いて、対物レンズ側、副鏡の影に小型化した超音波センサを配置することで反射型 PAM を構築した。

ステッピングモーター走査により観察対象物を移動させる従来の走査方式に加えて、光路に 2 軸ガルバノミラーシステムを導入し、光学焦点の高速走査（励起光の角度走査が対物レンズで光学焦点の水平方向走査に変換される）を選択可能とした。

SC 光源: スーパーコンティニウム光源、CF: コールドフィルタ、BPF: バンドパスフィルタ、ND: 減光フィルタ

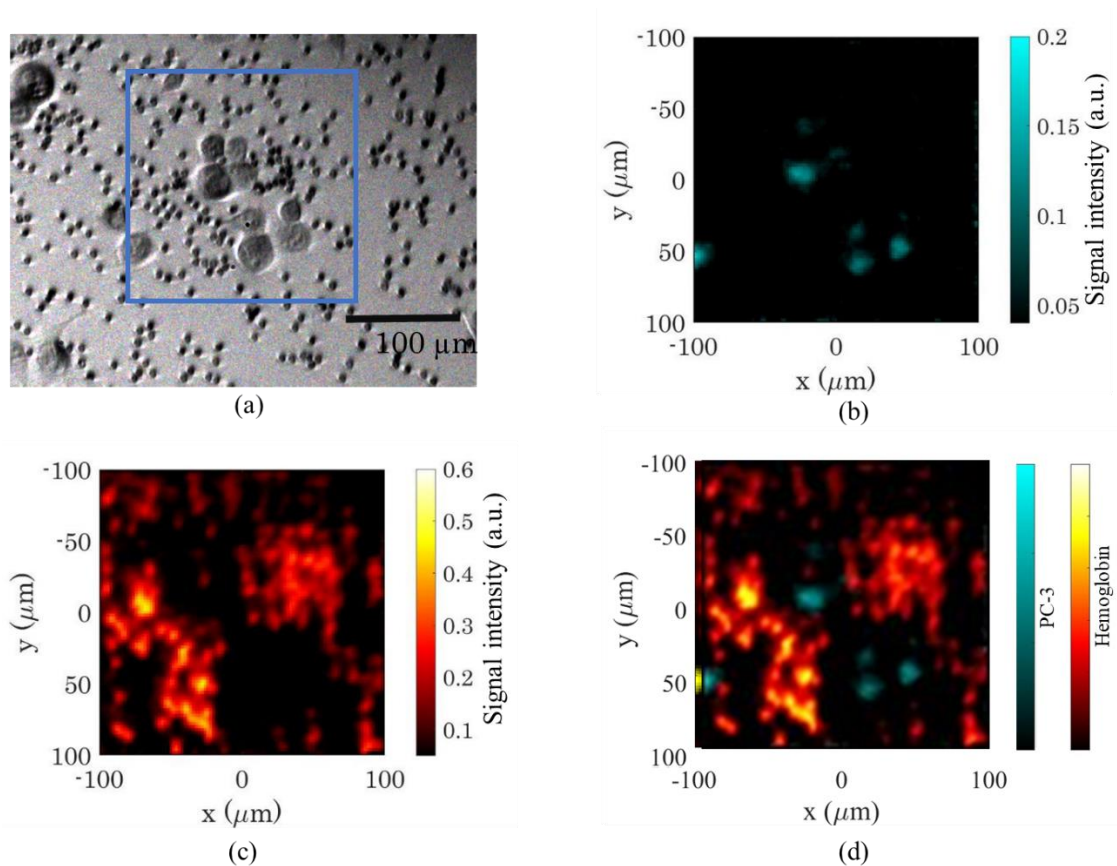
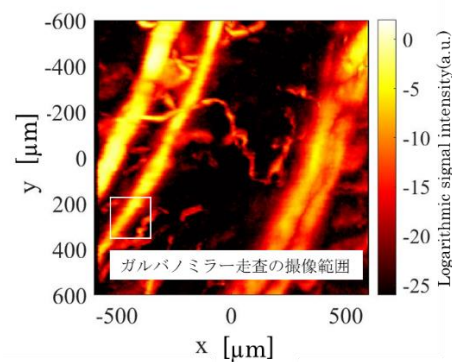
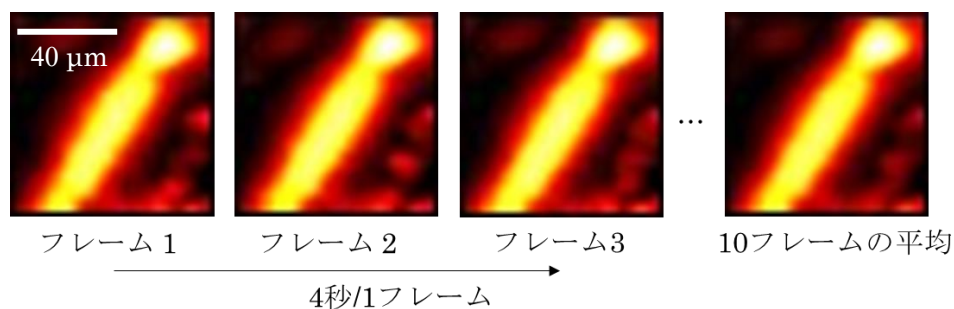


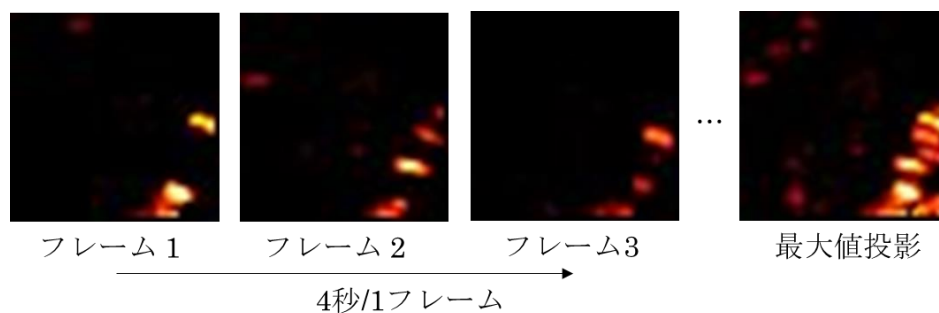
図 20 第 3 章 赤血球と染色前立腺癌細胞の混合物を反射型 PAM で観察した画像
 (a)光学顕微画像。四角に示す範囲を反射型 PAM でマルチカラー観察した。
 (b)750 nm で観察した光音響顕微鏡画像。染色前立腺癌細胞だけが観察される。
 (c)575 nm で観察した光音響顕微鏡画像。赤血球だけが観察される。
 (d)画像(b)と画像(c)それぞれ規格化して重ね合わせた画像。染色前立腺癌細胞と赤血球
 がマルチカラー観察により弁別できている。



(a)



(b)



(c)

図 21 第 3 章 ノードマウス耳の毛細血管を反射型 PAM で観察した画像

(a)ステッピングモーター走査の結果。四角に示す部分をガルバノミラー走査した。

(b)連続画像の最大値投影画像。右下の毛細血管内部を流れる赤血球の動きが見える。

(c)各フレームの画像から、全フレームの平均を差分し、規格化した画像。

全フレームの平均を差分すると、フレーム間で変化している部分のみを抽出でき、毛細血管内を流れる赤血球のみが強調して表示される。最大値投影画像は閾値処理なし、平均を差分した画像は最大値の 15%の値で閾値処理を行った。

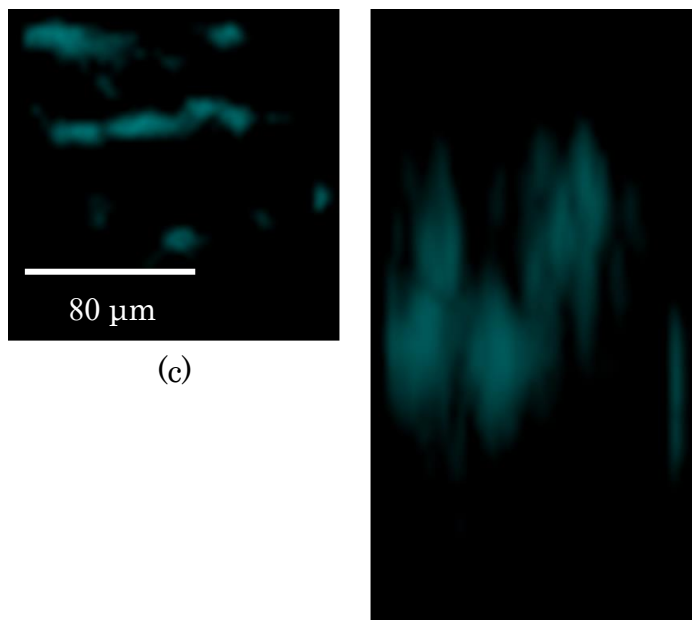
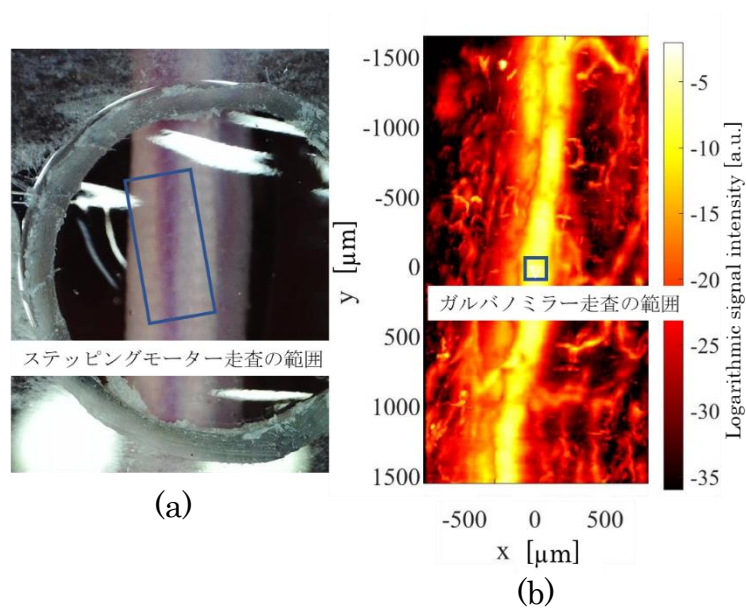


図 22 第 4 章 反射型光音響顕微鏡による模擬前立腺癌循環腫瘍細胞の in vivo 観察結果

- (a) 光学顕微鏡画像。四角に示す部分をステッピングモーター走査で観察した。
- (b) 575 nm、ステッピングモーター走査: 四角に示す部分をガルバノミラー走査した。
- (c) 750 nm、ガルバノミラー走査: 観察視野内に複数の模擬 CTC が観察されている。
- (d) 画像(c)と同じタイミングの垂直 (x-z) 断面投影像。様々な深さから模擬 CTC 由来の信号が検出されている。

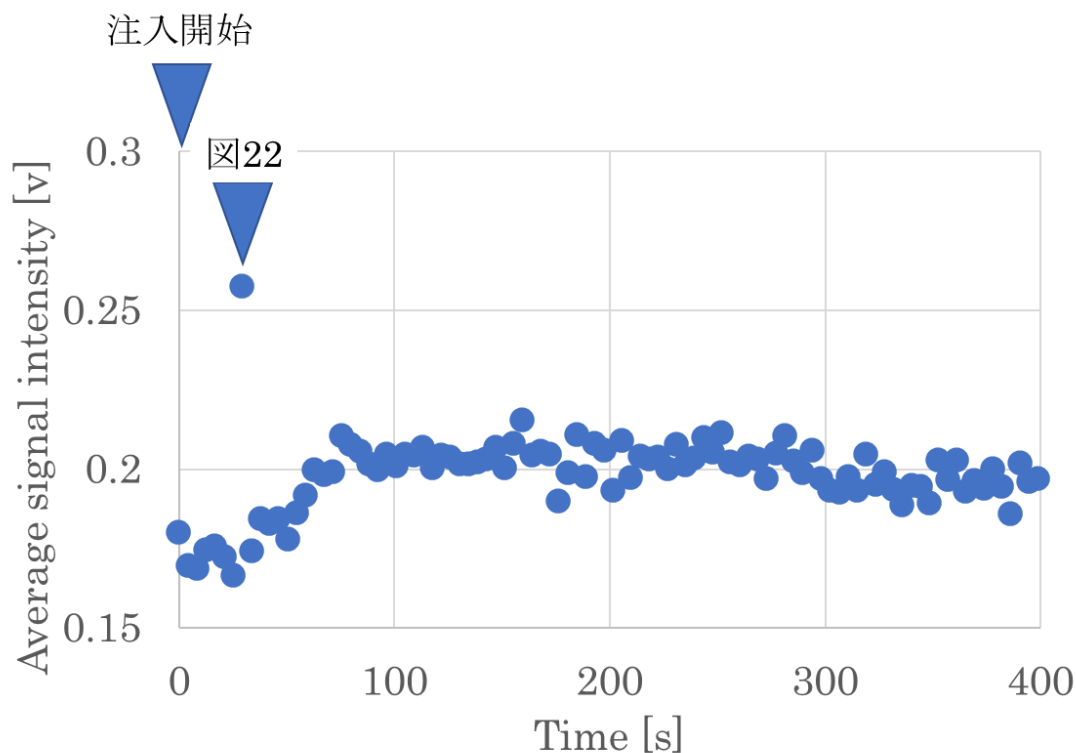


図 23 第 4 章 励起波長 750 nm、ガルバノミラー走査で連続撮影した画像の平均輝度値

各画像において、取得した光音響信号の **signal intensity** の平均値を算出し、横軸を模擬 CTC 注入開始からの時間としてプロットした。模擬 CTC 注入開始後は背景ノイズの範囲で推移していたが、約 30 秒で模擬 CTC が観察範囲に到達した（図 22）後、模擬 CTC 由来の光音響信号を反映し、画像全体の **signal intensity** の平均、すなわち平均輝度値が上昇した。

表 1 第 2 章 各種圧電素材の特性値

(引用文献 46 “Ultimate sensitivity of time-resolved optoacoustic detection” Table 1)

Material	d_{33} [pC/N]	g_{33} [Vm/N]	c_l [10^3 m/s]	ρ [g/cm ³]	Q
P(VDF-TrFE)	1.50×10^2	0.180	1.40	1.8	80
PZT-5	2.66×10^3	0.025	4.00	7.5	2.5×10^3
Li-Nb	5.91×10^2	0.230	7.26	4.63	$>1.0 \times 10^5$

d_{33} : 圧電歪み定数, g_{33} : 圧電出力定数, c_l : 音速, ρ : 密度 Q: 機械的共振の品質係数

表 2 第 2 章 評価対象とした超音波センサの仕様

	Material	D [mm]	SR [mm]	f_c [MHz]
P(VDF-TrFE)	P(VDF-TrFE)	6	10.0	20.0
PZT	PZT 1-3 composite	4	10.0	20.0
Li-Nb1	Li-Nb 1-3 composite	6	10.0	20.0
Li-Nb2		4	10.0	30.0

それぞれの超音波センサはそれぞれ、

- ・ P(VDF-TrFE): クレハ/エルメック、東京
- ・ PZT: 検査技術研究所, 神奈川
- ・ Li-Nb: ジャパンプローブ, 神奈川

に製造を依頼した。

D: 素子直径、SR: 超音波センサ素子の曲率半径（焦点距離）、 f_c : 設計上の動作中心周波数

表 3 第 2 章 水平方向感度分布半値幅の理論値と実測値

	f_c [MHz]	λ_c [μm]	D [mm]	SR [mm]	Δy_{ideal} [μm]	Δy_{act} [μm]	$\Delta y_{\text{act}}/\Delta y_{\text{ideal}}$
P(VDF-TrFE)	21.5	69.7	6	10.0	142	170	1.20
PZT	23.7	63.2	4	10.0	218	280	1.29
Li-Nb1_50	24.5	61.2	6	10.0	132	165	1.25
Li-Nb1_1M	23.5	63.9	6	10.0	138	170	1.24
Li-Nb2_50	29.8	50.5	4	10.0	154	205	1.33
Li-Nb2_1M	29.1	51.5	4	10.0	157	195	1.24

f_c : スペクトル重心周波数、 λ_c : スペクトル重心周波数の水中波長(音速 1500 m/s で計算)、D: 素子直径、SR: 超音波センサ素子の曲率半径 (焦点距離)、 Δy_{ideal} : スペクトル重心周波数で計算した感度分布 FWHM の理論値、 Δy_{act} : 感度分布 FWHM の実測値

表 4 第 4 章 構築した PAM の性能

	透過型 PAM	反射型 PAM
励起波長	430-1100 nm (SC 光源、CPF により規定) から BPF で任意の波長を抽出	
超音波センサ中心周波数	20 MHz/30 MHz	20 MHz
水平方向空間分解能	~2 μm	~4 μm
走査方式 最大観察可能範囲	ステッピングモーター 約 4×8 cm	ステッピング：約 1×1 cm ガルバノ：約 200×200 μm
撮像速度 (2 $\mu\text{m}/\text{step}$, 80×80 step, 加算平均回数 64 回)	ステッピングモーター 約 2 分間	ステッピング：約 2 分間 ガルバノ：約 4 秒間
観察可能な深さ (観察結果から推定)	~約 800 μm	~約 300 μm
観測対象物の厚み制限	~数 mm 程度。超音波 センサの SR 等により制限	制限なし

SC 光源: Supercontinuum 光源、CPF: コールドパスフィルタ、BPF: バンドパスフィルタ、SR: 超音波センサ素子の曲率半径 (焦点距離)