

ナノ秒パルス光の機械的・音響的作用を用いた  
薬剤輸送および薬剤動態観測一体型技術の開発

2015 年度

角 井 泰 之

学位論文 博士（工学）

ナノ秒パルス光の機械的・音響的作用を用いた  
薬剤輸送および薬剤動態観測一体型技術の開発

2015 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

角井 泰之

## 本論文の構成と目的

薬剤療法において所望の治療効果を得るためには、標的部位に薬剤を望ましい時間に最適な濃度で輸送し、適正に分布させる必要がある。そのためには、標的部位の薬剤分布を観測しながら、その結果に応じて薬剤分子を輸送する薬剤分布の観測・制御一体型システムの実現が強く望まれる。

著者は、光と生体組織との多様な相互作用、その中でも固体材料へのパルス光照射により生じる圧力のエネルギー依存的な発生過程に着目した。低エネルギーパルス光を照射すると、光吸収体で熱弾性波（光音響波）が発生し、同吸収体の深さ分解イメージングが可能である。この光音響イメージング法は、励起光の波長を選択することにより血管と薬剤の可視化が可能であり、経血管的薬剤輸送の観測技術として有望である。一方、一定閾値以上の高パワーパルス光を照射するとプラズマが生成し、その膨張に伴いフォトメカニカル波（photomechanical wave, PMW）が発生する。PMWは血管壁透過性亢進作用を有し、高空間選択的な経血管的薬剤輸送に応用可能である。光音響波とPMWはともにナノ秒パルス光により発生可能であり、同一システムによる薬剤の輸送と観測に応用可能と考えた。

本研究は、PMWによる経血管的薬剤輸送と光音響イメージングによる薬剤の動態観測を技術的に統合させた診断・治療一体型システムを実現することを目的として行われたものである。本論文は次の5章で構成されている。

第1章は序論である。まず本論文で述べる光学的診断・治療技術を理解するための光と生体組織の相互作用について説明している。次に、薬剤の輸送経路である血管、そして血液と組織の物質交換について概説している。そして血管イメージング技術について各手法の特徴と課題をまとめた上で、本研究で採用する光音響イメージング法の特徴と研究動向を述べている。続いて、薬剤分布の制御技術として、化学的・物理的な各種薬剤輸送技術について概説した後、本研究で採用するPMWによる薬剤輸送技術について説明している。そして、本研究を説明する上で重要な概念となる診断・治療一体化の概要と研究動向および課題を示した上で、本研究の目的と意義を示している。

第2章では、薬剤輸送経路である血管のイメージングに向けた光音響イメージング装置の開発について述べている。光音響イメージング法の一般的な原理について解説した後、本研究で採用した音響学的分解能光音響イメージング法に焦点を当てて理論を説明している。そして、著者が提案する光ファイバ照射型の小型・軽量の音響学的分解能光音響イメージング装置の設計開発について述べ、生体ファントム実験による本装置の性能評価の結果とラット皮膚および皮下組織を対象とした血管イメージングの結果を提示している。

第 3 章では、まず血中における薬剤の運搬体であるアルブミンと結合した模擬薬剤 (エバンスブルー) のイメージングについて述べている。アルブミン漏出モデルとして、ラット熱傷皮膚を対象としたイメージングの結果から、光吸収を持つ薬剤の動態を本装置で観測可能であることを実証している。また、光音響イメージング法の造影剤および光線力学的治療 (photodynamic therapy, PDT) の光感受性薬剤として機能するインドシアニンググリーン内包生分解性ナノ粒子 (ICG ラクトソーム) のイメージングについて述べている。診断・治療一体型の薬剤である ICG ラクトソームを用いたマウス皮下腫瘍の光音響イメージングと PDT の結果から、これら診断と治療を一体化させることの有用性を示している。

第 4 章では、上記イメージング装置に PMW による薬剤輸送機能を融合させた診断・治療一体型システムとその有用性検証について述べている。まず光音響イメージングと PMW による薬剤輸送でプローブを共有できるかどうかを検討した結果について述べている。続いて、開発した診断・治療一体型システムによるマウス皮下腫瘍へのエバンスブルーの輸送とその動態観測の結果から、本システムの有用性を示している。

第 5 章は本研究の結論であり、本研究により得られた成果を総括するとともに、今後の展望を述べている。

# 目次

	頁
<b>第1章 序論</b>	1
1.1 はじめに	2
1.2 光と生体組織の相互作用	2
1.3 血液と組織の物質交換	3
1.4 血管イメージング技術	4
1.4.1 放射線イメージング法	4
1.4.2 MRI	5
1.4.3 超音波イメージング法	5
1.4.4 光イメージング法	6
1.5 光音響イメージング法	7
1.5.1 光音響イメージング法の特徴	8
1.5.2 光音響イメージングシステム	8
1.5.3 血管および薬剤の光音響イメージング	10
1.6 薬剤輸送技術	10
1.6.1 化学的手法	11
1.6.2 物理的手法	11
1.7 診断・治療一体化	13
1.8 本研究の目的と論文の構成	14
参考文献, 図表	17
<b>第2章 ファイバ照射型音響学的分解能光音響イメージング装置の開発</b>	44
2.1 はじめに	45
2.2 光音響イメージング法の原理	45
2.3 音響学的分解能光音響イメージング法	47
2.4 体表組織を対象としたファイバ照射型音響学的分解能光音響イメージング装置	48
2.4.1 設計	48
2.4.1.1 素子の選定	48
2.4.1.2 光子分布の空間対称性の評価	50
2.4.1.3 計測の空間対称性の評価	51

2.4.2	ファントムを用いたイメージング性能の評価	52
2.4.2.1	イメージング装置	52
2.4.2.2	実験方法	53
2.4.2.3	実験結果と考察	53
2.4.3	ラット皮膚血管のイメージング	55
2.4.3.1	実験方法	55
2.4.3.2	実験結果と考察	55
2.5	皮下腫瘍を対象としたファイバ照射型音響学的分解能光音響イメージング装置	56
2.5.1	実験装置	56
2.5.2	信号処理	57
2.5.2.1	開口合成法	57
2.5.2.2	信号処理の適用	58
2.5.3	センサーの受信感度分布の測定	59
2.5.4	ラット皮膚の <i>ex vivo</i> 血管イメージング	60
2.5.5	ラット皮膚と皮下組織の <i>in vivo</i> 血管イメージング	61
2.6	まとめ	62
	参考文献, 図表	63
<b>第3章</b>	<b>光音響イメージング法によるアルブミンと生分解性ナノ薬剤の動態観測</b>	<b>88</b>
3.1	はじめに	89
3.2	熱傷皮膚中のアルブミンの光音響イメージング	89
3.2.1	アルブミン	89
3.2.2	熱傷	90
3.2.3	ラット熱傷皮膚中のアルブミン動態の長期的な光音響イメージング	90
3.2.3.1	実験方法	91
3.2.3.2	実験結果と考察	92
3.2.4	ラット熱傷皮膚中の血管とアルブミン分布の光音響イメージング	94
3.2.4.1	実験方法	94
3.2.4.2	実験結果と考察	94
3.3	インドシアニングリーン (ICG)内包生分解性ナノ粒子を用いた 皮下腫瘍の光音響学的診断と光線力学的治療	95
3.3.1	ICG ラクトソーム	96

3.3.2 ICG ラクトソームを用いたマウス皮下腫瘍の光音響学的診断と 光線力学的治療	97
3.3.2.1 実験方法	97
3.3.2.2 実験結果と考察	98
3.4 まとめ	100
参考文献, 図表	102
<b>第4章 光の機械的・音響的作用を用いた薬剤輸送と薬剤動態観測の一体型システムの 開発</b>	124
4.1 はじめに	125
4.2 薬剤輸送と薬剤動態観測の一体型システム	125
4.3 フォトメカニカル波の圧力測定	126
4.3.1 実験方法	126
4.3.2 実験結果と考察	127
4.4 マウス皮下腫瘍へのエバンスブルーの輸送と動態観測	127
4.4.1 実験方法	127
4.4.2 実験結果と考察	128
4.5 まとめ	131
参考文献, 図表	132
<b>第5章 結論</b>	142
5.1 はじめに	143
5.2 ファイバ照射型音響学的分解能光音響イメージング装置の開発 (第2章)	143
5.3 光音響イメージング法によるアルブミンと生分解性ナノ薬剤の動態観測 (第3章)	144
5.4 光の機械的・音響的作用を用いた薬剤輸送と薬剤動態観測の一体型システムの 開発 (第4章)	145
5.5 総括	145
5.6 展望	145
参考文献	148
謝辞	149



# 第 1 章

## 序論

## 1.1 はじめに

薬剤療法において所望の治療効果を得るためには、標的部位に薬剤を望ましい時間に最適な濃度で輸送し、適正に分布させる必要がある[1]. そのためには、標的部位の薬剤分布を観測しながらその結果に応じて薬剤分子を輸送する薬剤分布の観測・制御一体型システムの実現が強く望まれる. 生体ないし物体にパルス光を照射すると、エネルギー依存的に様々な物理現象により圧力波が発生する. 低エネルギーパルス光を照射すると、光吸収体で熱弾性波 (光音響波)が発生し、同吸収体の深さ分解イメージングが可能である. この光音響イメージング法は、励起光の波長を選択することにより血管と薬剤の可視化が可能であり、経血管的薬剤輸送の観測技術として有望である. 一方、一定閾値以上の高パワーパルス光を照射するとプラズマが生成し、その膨張に伴いフォトメカニカル波 (photomechanical wave, PMW)が発生する. PMW は血管壁透過性亢進作用を有し、空間選択的な経血管的薬剤輸送に応用可能である. 著者は、光音響波と PMW がともにナノ秒パルス光により発生可能であることに着目し、同一システムによる薬剤の輸送とその動態観測を目的とした診断・治療一体型技術を着想した. 本章では、まず本論文で述べる光学的診断・治療技術を理解するための光と生体組織の相互作用について説明する. 次に、薬剤の輸送経路である血管、そして血液と組織の物質交換について概説し、血管イメージング技術について各手法の特徴と課題をまとめる. その上で、本研究で採用する光音響イメージング法の特徴と研究動向を述べる. 続いて、薬剤分布の制御技術として、薬剤の化学的・物理的な輸送技術について概説した後、本研究で採用する PMW による薬剤輸送技術について説明する. そして、本研究を説明する上で重要な概念となる診断・治療一体化に関する研究動向と課題を示す. 最後に、本研究の目的と意義を示す.

## 1.2 光と生体組織の相互作用

生体組織は光に対して強散乱体であり、生体に入射した光は多重散乱により組織中を拡散する. 光はこの領域内で吸収されると、組織の特性および照射光のパラメータ (波長、照射時間、エネルギー密度など)により組織と多様な相互作用を起こすことが知られている [2]. 本節では、本研究に特に関わる光音響的作用、光機械的作用、光化学的作用について述べる.

光音響的作用および光機械的作用は、生体にパルス光を照射した際に、その強度に応じて圧力波が発生する作用である (Fig. 1-1). 光エネルギーを吸収した生体分子が励起状態か

ら基底状態へ緩和する過程では熱が発生し (光熱効果), 組織中では照射光のパラメータおよび組織の光学特性や熱特性などに依存した温度分布が生じ, 加熱領域は熱膨張を起こす. このとき, 照射パルス光の時間幅が光侵達長と音速により決定される応力緩和時間よりも十分に短い場合, 光吸収体の断熱膨張により熱弾性波 (光音響波)が発生する. この光音響的作用は主に生体イメージングに応用されており (光音響イメージング法), その特徴と研究動向については 1.5 節で, 原理および技術については第 2 章で詳述する. アブレーション閾値以上のフルエンスのパルス光を照射すると飛散物による反力が発生する. さらに高フルエンスの照射の場合は光学的絶縁破壊によりプラズマが生成し, その膨張に伴い高ピーク圧力のフォトメカニカル波 (PMW)が発生する. この光機械的作用の生体応用については 1.6.2 項で詳述する.

光化学的作用は, 光感受性薬剤を光照射により励起し, 光化学反応を生じさせる作用である. 具体的には, 励起三重項状態となった光感受性薬剤分子  ${}^3M^*$  から周辺組織に溶存する三重項酸素  ${}^3O_2$  にエネルギーが移動することにより強力な酸化作用を持つ活性酸素 (一重項酸素  ${}^1O_2^*$ ) が生成され, これが周辺組織と反応する機構である (Fig. 1-2). なお, 生成された活性酸素の一部は光感受性薬剤分子とも反応を起こし, 薬剤は破壊され失活することも知られている (光褪色)[3]. このような光化学的作用は光線力学的治療 (photodynamic therapy, PDT)として肺癌, 胃癌, 脳腫瘍などの様々な癌治療法 (腫瘍 PDT)として臨床応用されており, 外科的手術を必要とせず, また光ファイバを用いた内視鏡的な治療も可能な低侵襲癌治療法として注目を集めている. 腫瘍 PDT の主な抗腫瘍効果の機序として, 活性酸素の酸化力が腫瘍組織を直接的に破壊すること, また腫瘍組織へ酸素や栄養物などを供給するために特異的に発生する新生血管を障害して閉塞させることが知られている[4,5].

### 1.3 血液と組織の物質交換

血管は血液を身体各臓器および組織へ輸送するための通路となる器官であり, 心臓からポンプ機能により送り出された血液は動脈 (artery), 細動脈 (arteriole), 毛細血管 (capillary), 細静脈 (venule), 静脈 (vein)の順に血管系を通り全身を循環する. 細動脈・細静脈はそれぞれ動脈と静脈の末端にある太さ数百  $\mu\text{m}$  以下の血管であり, 毛細血管は動脈と静脈をつなぐさらに細い太さ約 10  $\mu\text{m}$  以下の血管である. 毛細血管では血液と組織を介する血管壁が単層の血管内皮細胞のみから成るため薄く, 血液と組織の物質交換を行うことで酸素や栄養物などを運搬しながら老廃物を回収する[6,7]. このような毛細血管とその前後の細動脈・細静脈のことを合わせて微小循環系血管と呼ばれ, 個体の生命活動を維持

するために必要不可欠な器官である。薬剤輸送においては、血管は血中の薬剤分子を循環させて標的組織へ輸送するための経路、そして血液と同組織との間の薬剤の受け渡しの 2 つの重要な役割を持ち[1]、そのイメージングは重要である。

## 1.4 血管イメージング技術

臨床現場や医学研究の場では血管の形態学的情報を無侵襲に画像化するための様々な血管イメージング技術 (アンギオ・グラフィ)が使用されている。ここでは、その主要な方法として、放射線を利用した X 線イメージング法、単一光子放射断層イメージング法 (single photon emission computed tomography, SPECT), ポジトロン断層イメージング法 (positron emission tomography, PET), 磁気を利用した核磁気共鳴画像化法 (magnetic resonance imaging, MRI), 超音波を利用した超音波イメージング法、そして光を利用した共焦点顕微鏡法, 2 光子顕微鏡法, ドップラー-OCT (optical coherence tomography), 光音響イメージング法を挙げ[8], 各手法の特徴と課題について述べる。

### 1.4.1 放射線イメージング法

1895 年に Roentgen により X 線が発見されて以来、その線量の減衰をもとに生体組織を画像化する X 線イメージング法は今日まで一世紀以上もの長い間利用され続けている[9]。1972 年には Hounsfield により X 線 CT が発明され、多方向から照射された X 線の減衰量を計測することで生体内の 3 次元構造を画像化可能になった[10]。X 線イメージング法は現在の臨床現場では主流となっている血管診断技術であり、単に「血管イメージング (血管撮像・血管造影)」または「アンギオ・グラフィ」と呼ぶとこの手法を意味する。本技術は、X 線の生体軟組織に対する高い透過性により深部イメージングが可能であり、全身の比較的大きな血管の動脈瘤、血管腫、血管奇形などの検出に適している。また、最近では数 $\mu\text{m}$  の高空間分解能を有するマイクロ CT も開発され[11,12], 取得される微小血管系の 3 次元画像から血管の径や密度などのパラメータを定量化する技術の開発や[13], 病態解明研究への利用などが進められている[14]。しかし、X 線イメージング法の最大の課題は放射線による被曝のリスクであり、特に長時間の診断ではその危険性が懸念される。また、血管造影では多くの場合、X 線を吸収しやすいヨード造影剤を用いるが、投与後の嘔吐や腎機能障害、アレルギー反応などの副作用が報告されている。

1970 年代後半にはガンマ線を用いる SPECT, さらに陽電子を利用する PET が登場した。

SPECT と PET は、生体の外部から放射線を照射する X 線イメージング法とは異なり、それぞれ生体内に投与した放射性トレーサーの放出するガンマ線または陽電子を外部で検出することで生体情報を取得する。X 線イメージング法が生体の形態学的情報を取得するのに対し、これらの診断は形態学的な異常に先立つ代謝異常などの機能学的情報を高感度に検出することに優れ、病変の早期発見を目的に使用される[9,15]。トレーサーを観測対象に応じて選定することが可能であり、例えば脳や心筋などの活動に伴う血流変化のイメージングが可能である[16-20]。しかし、これらの手法もやはり放射線被曝と造影剤による危険性がある。また、SPECT では生体内でのガンマ線の強い散乱・吸収により取得画像が低コントラストになりやすく、PET では空間分解能は現状約 1 mm である。

### 1.4.2 MRI

MRI は核磁気共鳴現象を利用する画像化法であり、1973 年に Lauterber によってその原理が提案された。静磁場中の磁場勾配により生体内の原子核の核磁気共鳴パラメータ分布を求めることで位置情報を取得して画像化する[21]。MRI は被曝の心配はなく非侵襲的に生体内の構造を 3 次元イメージング可能な技術である。複数の物理量の測定から生体の形態学的情報のみならず、代謝など機能学的情報も取得可能であり、病変に対する検出力が非常に高いため、現在の臨床現場で果たす役割は大きい。血管の走行などの形態学的情報を画像化する技術は MRA (magnetic resonance angiography) と呼ばれ、多くの場合はガドリニウム化合物などを造影剤として静脈内投与することで血液量、血管透過性、血管反応や異常血管の新生などの情報を取得できる[22,23]。また、脳活動に伴う血液流量の変化を捉える脳機能イメージング技術を fMRI (functional magnetic resonance imaging) 呼ぶ。Ogawa らは常磁性体である脱酸素化ヘモグロビンが MRI 信号を弱めることを利用し、脳機能を非造影でイメージング可能なことを提案した[24]。これは、脳血流量の過剰な増大に伴う酸素化ヘモグロビン (反磁性体) の濃度の増大により脱酸素化ヘモグロビン濃度が減少し、MRI 信号の増大が引き起こされるためであり、これを BOLD (blood oxygen level dependent) 効果と呼ぶ[25]。しかし、MRI で使用可能な磁場強度は生体への安全性の観点から制限があるため、これにより決定される空間分解能は約 1 mm である。

### 1.4.3 超音波イメージング法

超音波イメージング法は、音響インピーダンスをコントラストとして生体内を画像化する

る方法である。体表から送波した超音波は音響インピーダンスの不整合面でその一部が反射するため、反射波の大きさから反射源の音響インピーダンスの情報を、伝搬時間からその深さ情報を得られる[26]。1942年のDussikによる超音波透過法の試み以来、このような臓器の形態学的イメージング(Bモード)に加えて、ドップラー効果による反射音の周波数変化から血流イメージング(ドップラーモード)なども簡便に測定できるようになった[21,27,28]。超音波イメージング法の利点は、このような診断をベッドサイドで簡便かつリアルタイムに実施可能な点である。しかし、通常の生体軟組織間では音響インピーダンスの差は小さく、取得画像は低コントラストになりやすい。そのため、血管イメージングとしては腹腔内、頸部、四肢などの比較的太い血管の血栓や血管壁の硬化・肥厚、また血管内プラークなどのイメージングに限られる。

#### 1.4.4 光イメージング法

1665年にHookeにより昆虫や植物などの様々な生物の顕微画像を含む『Micrographia』が発刊されたように、光による生体イメージング技術は長い歴史を持つ[2]。しかし、光は生体組織中での強い散乱・吸収の影響により侵達長が短く、同じ電磁波であってもX線やガンマ線などを用いる他の診断装置のように飛躍的進歩を遂げてこなかった。しかし、1960年のMaimanによるレーザーの発明と近年の光学技術の飛躍的発展により、光診断技術は大きく成長した[29]。

上述した通り、放射線イメージング法、MRI、超音波イメージング法などは比較的太い血管を生体深部までイメージングすることに優れるが、微小血管系のイメージングには空間分解能または感度が不十分である。一方、光イメージング法は他の技術では得られない数 $\mu\text{m}$ またはそれ以下の高い空間分解能が得られ、また血液の主要成分であるヘモグロビンの可視域から近赤外領域における光学的吸収特性を利用することで、微小血管のイメージングが可能である。本節では微小血管の3次元イメージングが可能な共焦点顕微鏡法、2光子顕微鏡法、ドップラーOCT法、光音響イメージング法を紹介する。

共焦点顕微鏡は1957年にMinskyによって発明された。照射光と検出光の焦点を観測対象に合わせ、ピンホールなどの空間フィルタにより焦点の合った微小領域のみを計測することで、従来の光学顕微鏡法よりも高い数 $\mu\text{m}$ 以下の空間分解能でのイメージングが可能である[30-32]。

2光子顕微鏡法は1990年にDenkらによって提案された[33]。光源に超短パルスレーザーを使用することで、光子密度の極めて高い焦点の微小領域においてのみ蛍光を二光子励起す

ることにより、ピンホールなどを用いずに数 $\mu\text{m}$ 以下の空間分解能でのイメージングが可能である[34-40]。しかし、組織の光散乱により最大観測深度は制限され、例えば皮膚の血管を対象とした場合、これまでの報告例では通常、共焦点顕微鏡法で数百 $\mu\text{m}$ 、2光子顕微鏡法でも約1.5 mmである[8,40]。

ドップラーOCT法は、運動する光散乱体による散乱光のドップラー位相シフトから得られる血流情報をもとに、皮膚や眼底などの血流を無標識で数 $\mu\text{m}$ –数十 $\mu\text{m}$ の空間分解能でイメージング可能である[41-45]。しかし、ドップラーOCTは照射光に対する血流の方向によって感度が異なり、また毛細血管などの微量の血流に対しては感度が低い[8]。原理的には、位相変化を高感度に捉えるために対象部の断層像を一定の時間を置いて繰り返しイメージングすることが有効であるが、その分長い計測時間が必要になる[46]。そこで近年、高速性と高感度性を兼ね備えた二光束ドップラーOCTや[46,47]、位相雑音の発生を軽減した低コヒーレンス干渉計を用いた高感度なドップラーOCTなどが開発されている[48]。しかし、やはり光の散乱により、例えば皮膚の血流を対象としたイメージングの最大観測深度は約1-2 mmであり、ヒトの皮膚全層(約3 mm)のイメージングは困難である[49]。

光音響イメージング法の詳細は次節で説明するが、組織中の光吸収体の断熱膨張により発生する熱弾性波(光音響波)を検出する方法である。そのため、一般的な光イメージング法で問題となる光散乱による信号の減衰の影響を直接的には受けずに済むという利点があり[2]、深さ数mm–数cmにおいて数 $\mu\text{m}$ –数mmの空間分解能で光吸収体の分布をイメージング可能であり、ヘモグロビンの光吸収を利用することにより血管の高コントラスト画像が得られる。次節では、この光音響イメージング法の特徴と近年の研究動向の詳細を述べる。

## 1.5 光音響イメージング法

1880年、電話の発明で有名なBellは、物質への断続的な光照射により一定条件下で引き起こされる光音響的作用(光音響効果)を発見し、これを発表した[50]。以降、光音響的作用は微量物質の検出や試料の測定などの高感度分光分析法として応用されてきた[51]。そして、2000年代に入り、医学・生物学分野においても細胞、組織、臓器などの画像診断技術として盛んに研究が進められている。本節では、まず光音響イメージング法の特徴を説明する。その後、代表的なイメージング装置と血管および薬剤のイメージングに関して近年の研究動向を述べる。なお、光音響イメージング法の原理および技術の詳細は第2章で説明する。

### 1.5.1 光音響イメージング法の特徴

光音響波は、固体材料に応力緩和時間よりも十分に短いパルス光を照射することで効率よく発生し (応力閉じ込め条件), 一般に生体組織ではその物性によりナノ秒パルス光がこの条件を満たすことが知られている[52]. この光音響波を表面で検出することで, その伝搬時間から音源 (光吸収体)の深さ情報を, 振幅から光吸収係数の情報を取得可能であることから, 組織中の吸収体分布のイメージングに応用可能である (Fig. 1-3). Fig. 1-4 に示すように, 水, 脂質, メラニン, ヘモグロビンなどの内因性光吸収体は固有の吸収スペクトルを有するため, 光音響イメージング法は適切な励起波長の選択により, これらの生体物質を無標識で高コントラストにイメージングが可能である[53]. 例えば, ヘモグロビンを対象とした血管[54,55], 水を対象とした浮腫[56,57], 脂質を対象とした血管内プラーク[58,59], メラニンを対象とした悪性黒色腫 (メラノーマ)[60,61]などをイメージング可能である. また, 外因性光吸収体として有機色素, 炭素ナノ材料, 金属ナノ粒子などを造影剤として使用することもでき, 例えば腫瘍組織や炎症部位におけるこれら材料の集積性を利用した高感度イメージングが可能である[62,63].

Fig. 1-5 に光音響イメージング法とその他の代表的な光学的断層イメージング法, また比較として超音波イメージング法のコントラストメカニズムおよびイメージング特性 (観測深度と空間分解能の関係)を示す. 光音響イメージング法の観測深度および分解能はどちらも OCT と超音波イメージング法の間位置する. 観測深度に関して, 上述の通り受信信号が音響波である光音響イメージングは, 他の光学イメージングに比べて生体のより深部のイメージングが可能である. これは, 生体組織中における音響波と光の散乱による減衰がそれぞれ周波数ないし波長に依存するものの, 音響波の方が概ね2桁小さいためである[64]. 一方, 空間分解能に関しては詳細を次節で述べるが, 近年の研究開発により高分解能化が著しく進んでおり, OCT との差が小さくなってきた.

### 1.5.2 光音響イメージングシステム

光音響イメージング法の観測深度と空間分解能はトレードオフの関係にあり, イメージング装置の仕様によって細胞や細胞小器官などの微視的なイメージングから動物の臓器や組織などの巨視的なイメージングまで, 幅広い応用が可能である[65]. 本節では, 微視的なイメージング技術の代表例として音響学的分解能または光学的分解能光音響イメージン

グ法を，そして巨視的なイメージング技術として光音響コンピュータトモグラフィー (photoacoustic computed tomography, PACT)を紹介する。

光音響イメージング法では，検出領域の音響的集束または励起領域の光学的集束により高空間分解能が得られ，前者を利用した方式を音響学的分解能光音響イメージング法 (Fig. 1-6 (a))，後者を利用した方式を光学的分解能光音響イメージング法 (Fig. 1-6 (b))と呼ぶ[53]. 音響学的分解能光音響イメージング法は，2005年にワシントン大学のWangらにより初めて報告された．彼らは，中心周波数(50 MHz)の超音波センサーを用いることで，通常の光学的イメージング技術では困難な生体(ラット皮膚)の深さ3 mm以上において，横方向分解能45  $\mu\text{m}$ ，深さ方向分解能15  $\mu\text{m}$ を実現し，血管の3次元光音響画像を得た[66,67]. 一方，より高い空間分解能を得るために，Wangらは光の集束を利用した光学的分解能光音響イメージング法を開発した．同イメージング法では，組織の励起光の散乱により観測深度は通常約1 mm以下に制限されるものの，光学的解像度でのイメージングが可能であり，同著者らはマウス耳の微小血管の走行を横方向分解能約5  $\mu\text{m}$ ，深さ方向分解能約15  $\mu\text{m}$ でイメージングした[68]. このような音響学的分解能および光学的分解能光音響イメージング法は，1.4.4項で紹介した光イメージング技術では実現できない性能を持つことから，新規生体イメージング技術として注目を集めるようになり，近年ではイメージングの高速化[69,70]や更なる高分解能化[71,72]などが進められている。

一方，PACTは広範囲の光照射により光音響波を励起し，それをアレー状に配列したセンサーを用いて検出する巨視的なイメージング法である．多くの場合，広範囲かつ深部のイメージングを達成するために，生体透過性の高い近赤外領域を励起光とし，また中心周波数が数MHz以下の超音波センサーが用いられる．PACTは，線状に配列したセンサーアレーを体表に接触させて断層画像を取得する線状PACT (linear-array PACT)と，計測対象を中心に円状に配列したセンサーアレーを配置させてCT画像を取得する円状PACT (circular-array PACT)に分けられる[65,73,74]. 例えばXiaらは，512チャンネルのリング状の集束型センサーアレーの焦点とリング型照明による照射部位を共焦点にすることにより，ヘモグロビンないし近赤外蛍光色素 (IRDye800)をコントラストとしてマウスの脳，肝臓，腎臓，膀胱などの臓器を観測深度1 cm，横方向分解能250  $\mu\text{m}$ ，深さ方向分解能100  $\mu\text{m}$ で画像化した[75]. PACTは近年，このようにマウスやラットなどの小動物を対象とした病態解明研究のための形態イメージング，機能イメージング，分子イメージングなどに利用されることが多くなり，研究用の3Dイメージング装置が市販され始めている[76]. 一方，大動物を対象としたイメージングの取り組みも進められており，上記のWangらは1 MHzの比較的低周波な超音波センサーを使用し，*ex vivo*においてアカゲザルの脳を頭蓋骨越しで

イメージングし、大脳皮質の大まかな形態学的情報を取得した[77].

### 1.5.3 血管および薬剤の光音響イメージング

ヘモグロビンは生体内の主要な光吸収体であるため、光音響イメージング法では血管の高分解能・高コントラスト・無標識イメージングが可能である。これまでに、組織中を走行する正常血管に加え[78-85]、異常血管[86-89]、血流遮断[90-92]、血管新生[93-98]などを対象に、微視的なものから巨視的なものまで、様々なスケールでのイメージングが報告されている。またこのような形態学的イメージングのみならず、酸素化ヘモグロビンと脱酸素化ヘモグロビンの吸収スペクトルの違いを用いた酸素飽和度などの機能学的イメージング[67,99,100]や、酸素の運搬機能を持たない異常ヘモグロビンなどの検出[101,102]も可能である。

薬剤分布の光音響イメージングとしては、例えばインドシアニンググリーン (Indocyanine Green, ICG), Alexa Fluor 750, メチレンブルー (Methylene Blue, MB)などの生体透過性の高い赤色-近赤外領域で高い光吸収係数を持つ色素を外因性光吸収体とした応用が報告されている[75,103-107]。例えば、上述した腫瘍における薬剤分子などの集積性を利用した腫瘍イメージング[108-110]や、癌転移の際に腫瘍細胞が最初に流れ込むリンパ節 (センチネルリンパ節)のイメージング[111-114]が挙げられる。ここで、ICG や MB は PDT の光感受性薬剤としても機能することから、これら薬剤を使用した病変の診断と治療の同時適用への発展が期待される。この観点から、Hirao らは熱傷創部感染に対する PDT を想定し、ラット熱傷モデルの皮下に局所注入した MB およびポルフィマーナトリウムの深さ分布を経時的に光音響イメージングした[115]。

以上のように、光音響イメージング法は血液と薬剤のそれぞれの光吸収スペクトルに基づいて励起光の波長を選定することにより、組織中の血管と薬剤のイメージングが可能である。

## 1.6 薬剤輸送技術

近年、所望の薬剤治療結果を得るために、生体内の薬剤の動態を制御し、病変部へ望ましい時間に最適な濃度で輸送するドラッグデリバリーシステム (drug delivery system, DDS) が盛んに研究されている[116]。

薬剤の投与方法には経皮投与、経口投与、静脈内投与、皮下注入、局所投与など様々な

方法があるが、投与部位と作用部位と異なる場合は、薬剤は血液循環を経由して各部位へ輸送するのが一般的である[1]. 近年、特に腫瘍血管の特徴を利用し、癌の標的治療に向けた DDS 研究が多く報告されている[117]. 1.2 節で述べたように、腫瘍組織では新生血管が特異的に発生する. この新生血管は物質透過性が通常組織に比べて大幅に亢進していると同時に、リンパ系による物質の回収回路が未発達であることが知られており、この性質は EPR (enhanced permeability and retention)効果と呼ばれる[116,118]. これにより、正常な血管では透過しない約十–数百 nm の高分子が腫瘍組織の血管からは受動的に漏出し、組織に集積する. また、病変や感染、外傷などに伴う炎症部位についても血管拡張に伴い血管透過性が亢進されることが知られており、これらの病変部、創部では薬剤が集積しやすいことが知られる.

### 1.6.1 化学的手法

化学的手法は、キャリア (担体)の中に薬剤分子を内包することで、薬剤を生体内 (血中)で長時間かつ安定的に存在させ、またその大きさの制御により薬剤を病変組織へ選択的に輸送させることができ、薬剤による治療効果と安全性の向上を高める方法として期待されている[119,120]. しかし、薬剤の組織への移行自体はあくまで EPR 効果などの受動的な集積に依存するため、治療に十分な薬剤集積が得られるとは限らない. また、薬剤の輸送効率は周囲の温度や pH などの環境によって大きく異なるため、これらパラメータを制御することが困難な生体内ではその効率は低くなる[116]. さらに、これらの担体そのものの生体内での毒性が懸念されている[121].

### 1.6.2 物理的手法

近年、物理エネルギーにより薬剤分子を安全かつ簡便に細胞および組織へ輸送する手法が注目されている. これまでに、電気、磁気、熱、超音波、レーザーなどの物理エネルギーによる薬剤輸送が報告されている. 本節では、これらの中から特に報告例の多い電圧パルス、超音波、レーザーによる薬剤輸送法について概説する.

電圧パルスを利用する方法はエレクトロポレーション法と呼ばれる. 電極を用いて生体組織に高電圧パルスを印加することで薬剤を輸送する手法であり、これまでに様々な組織への薬剤分子の輸送が報告されている[122]. 本手法は手技が簡便かつ低コストであるが、生体内で電圧パルスを空間的に高い精度で制御することは困難であり、熱損傷の発生など

が報告されている。また、電極の体内への挿入が必要な場合も多く、侵襲的である。

超音波を用いた手法はソノポレーションと呼ばれ、生体内の微小気泡と超音波との相互作用により薬剤を輸送する。高強度の超音波を照射すると、生体内の溶存気泡が成長し、その後急速に圧壊する(キャビテーション)[26]。その際に生じる衝撃波により標的組織の細胞膜透過性が亢進することが輸送のメカニズムと考えられている。本手法は照射する超音波の時間、周波数、強度などのパラメータにより薬剤輸送効率を比較的簡便に制御可能ではあるが、輸送効率がばらつきやすいことが知られている。また、高い薬剤輸送効率を得るにはマイクロバブルなどの増感剤を用いることが有効であるが、生体内でマイクロバブルの動態を制御することは困難であるため、高い空間制御性は得られにくい。さらに、超音波照射による熱的副作用や増感剤の安全性が確立されていないことなども問題である。

レーザーを用いた手法の利点は、高い空間制御性の操作を非接触で適用可能な点である。これまでの報告は *in vitro* 系での成果が多く、集光したレーザーにより細胞膜へ直接的に直径数 $\mu\text{m}$  の小孔の形成を形成する方法[123]、細胞の周囲での集光によって生じる衝撃波の細胞膜透過性亢進作用を用いる方法[124]、色素や粒子を用いた局所の細胞膜透過性を亢進させる方法[125,126]、また光化学反応により発生する活性酸素種による膜破壊を利用する方法[127,128]などがあり、他の手法では困難な細胞単位での操作が可能である。*In vivo* では、皮膚のバリア機能を有する角質の迅速かつ非接触的なレーザーアブレーションによる薬剤の経皮吸収の促進や[129,130]、超短パルスレーザーによる小動物への遺伝子導入技術[131,132]などが報告されている。しかし、適用可能深度は生体の強い光散乱の影響により制限される。

レーザーを用いてより生体深部へ薬剤を輸送可能な方法は、PMW による薬剤輸送法である。1.2 節で述べたように、固体材料に一定閾値以上のパルス光を照射すると、光学的絶縁破壊によりプラズマが生成し、その膨張に伴い高ピーク圧力の PMW が発生する (Fig. 1-7)。このとき、ナノ秒パルス光を用いることで、発生するプラズマの持続時間とレーザーのパルス幅が時間的に重なるため、プラズマによるレーザーの高効率な吸収により内部エネルギーが急激に増大し、高ピーク圧力の PMW が得やすい[133]。1995 年以降、Doukas らのグループは PMW による細胞膜透過性亢進作用を報告し、これを用いることで細胞内への低分子薬剤 (数百 Da—数十 kDa) の輸送を達成した[134-138]。*In vivo* においては、Sato らがラットの皮膚、脳、筋肉、脊髄など様々な部位への遺伝子導入の達成を報告している[139-143]。また、同著者らは模擬薬剤 (エバンスブルー) を静脈投与したラットの皮膚、前脛骨筋、脳に PMW を適用することで、同薬剤が組織中へ輸送されたことを報告した[144]。すなわち、PMW には血管壁透過性亢進作用があり、増感剤などを用いることなく経血管的薬剤輸送に

応用可能である。本手法は、レーザの特徴を活かすことで、高空間選択的な適用や光ファイバによる内視鏡的な応用が可能であり[145,146]、また圧力波の特徴を活かし重ね合わせや集束を利用することで、適用深度を数 mm—数 cm とすることが可能である[147,148]。

## 1.7 診断・治療一体化

近年、治療法 (therapeutics) と診断法 (diagnostics) を組み合わせたセラノスティクス (theranostics) という概念が提唱されている。これは、診断と治療を同時に実施する医療技術のことであり、診断をしながらその結果に基づき治療を行うことや、治療結果を迅速に診断して次の治療戦略を選択することなどにより、治療効果の向上や治療時間の短縮などに大きく貢献するものとして期待されている。セラノスティクスは 2000 年頃に医学文献データベース (PubMed) に初めて登場し[149]、2011 年には “Theranostics” という学術雑誌が創刊されるほど (Impact Factor: 8.022 (2014))[150]、世界的に大きな注目を集めている研究分野である。その背景には、1.4 節で述べた医用画像診断技術の飛躍的進歩がある。例えば、従来は大掛かりな装置と長い撮像時間が課題であった CT, PET, MRI などの技術が、近年では術中診断にも使用可能になり、画像誘導下での低侵襲な外科的手術などを可能にした。近年のセラノスティクス研究の報告例を Table 1-1 にまとめた[151-203]。その最近の動向として、著者は当該領域の軸となる構想を①ナノ薬剤による診断・治療システム、②診断・治療のためのデバイス (装置) の一体化、の 2 つと捉えている。

上記①では、診断のための造影剤と治療のための増感剤または抗がん剤などの治療薬をナノ粒子に搭載し、これを医用画像診断技術でイメージングすることにより、その追跡や治療効果の迅速な判定などが可能となる[204]。そのために、様々な物理的・化学的作用を用いた診断および治療のための新規薬剤およびナノ粒子が次々と開発されている[205-207]。しかし、このようなセラノスティクスには課題が残されており、その一つは組織への薬剤輸送効率である。いかに高機能・高効率な薬剤であっても、その治療効果を十分に発揮するためには組織中で適正に分布する必要があるものの、上記のような研究では多く場合で EPR 効果による受動的な薬剤輸送に依存しており、必ずしも所望の治療効果が得られるとは限らない。次に②に関して説明する。CT, MRI, PET などは優れた診断装置ではあるが、それ自体に治療を行う機能はなく、セラノスティクス技術としては薬剤と組み合わせたシステムに限定される。一方、光や超音波などは生体に適用するパラメータに応じて診断と治療を使い分けることが比較的容易であり、例えば光に関しては、1.2 節で述べたような生体組織との多様な相互作用を利用した診断・治療が可能である[151-161,170-175]。超音波に

についても、診断技術としては 1.4.3 項で述べたように既に広く普及しており、また治療用としても超音波メスや高密度焦点式超音波法 (high-intensity focused ultrasound, HIFU)による癌の熱治療などに利用されている[199,208-211]。したがって、これらは一つのシステムないしデバイスで診断と治療の両方を実施するための物理エネルギーとして有望である。さらに、薬剤を併用することで応用の幅は広がる。例えば、マイクロバブルに低音圧の超音波を照射すると、マイクロバブルは崩壊せずに持続的に共振し、診断の造影剤として機能する。一方、高音圧の超音波を照射すると圧壊してキャビテーションが起き、その際に発生する衝撃波は薬剤輸送に、熱は病変組織の破壊などに利用可能である[183,199,200]。このように、マイクロバブルと超音波の組み合わせは、能動的な薬剤輸送も可能な診断・治療一体型システムとなる。しかし、1.6.2 項で述べたようにマイクロバブルの分布の制御は困難なため、治療に必要な薬剤輸送の空間制御性と効率が得られるとは限らない。

## 1.8 本研究の目的と論文の構成

薬剤療法で所望の治療効果を得るためには、薬剤を標的部位へ適正に分布させる必要があり、そのためには体内の薬剤動態を同一システムで観測・制御可能なシステムの創出が求められている。著者は、光と生体組織との多様な相互作用、その中でも固体材料へのパルス光照射によりエネルギー依存的に生じる光音響的作用と光機械的作用に着目した。光音響イメージング法は、励起光の波長を選択することにより組織中の血管および薬剤分子をどちらも高コントラストに画像化可能であり、経血管的に輸送された薬剤の動態観測技術として有望である。一方、PMW は増感剤などを用いることなく、高空間選択的な経血管薬剤輸送を可能にする。そして PMW と光音響波はともにナノ秒パルス光により発生可能である。本研究の目的は、PMW による経血管的薬剤輸送法と光音響イメージング法を技術的に統合させた診断・治療一体型システムを実現することである。本システムによる薬剤の輸送とその動態観測は相乗的に機能し、病変組織に対して以下のような診断・治療戦略を提供可能になることが期待される。①病変組織を標的に PMW により薬剤を輸送する。②同部位に薬剤が適正に分布しているかどうかを迅速にイメージングして評価する。薬剤輸送効果が不十分の場合は、適正な分布が得られるまで PMW による薬剤輸送を繰り返し適用する。③一定時間経過後に同部位のイメージングにより治療効果を判定する。以上のように、同一システムによる診断と治療を有機的に組み合わせながら病変の診断、治療、そして経過観察までを実施することで、治療効果を最大化しつつ副作用を最小化した治療を実現しうる。

本研究では、薬剤の輸送経路となる微小血管と組織へ漏出した薬剤を画像化するための高分解能光音響イメージング法と、同血管を対象とした PMW の適用による経血管的薬剤輸送の統合一体化を図り、著者の提案する診断・治療一体型システムの実現とその有効性を実証する。1.5.2 項で述べたように、高分解能光音響イメージング法の対象となる組織深度は最大で数 mm であり、本研究ではラットおよびマウスの皮膚、そして皮下組織を対象に検討を進めた。まず、太さ数十～数百  $\mu\text{m}$  の微小血管を *in vivo* で簡便にイメージングするための小型・軽量の音響学的分解能光音響イメージング装置を開発した。本装置では 1.3 節で述べた血液と組織の物質交換が盛んな毛細血管 (太さ 10  $\mu\text{m}$  以下) を直接的にイメージングすることは困難であるが、毛細血管にまで分岐する前後の細動脈・細静脈ないし毛細血管を含む血管密度分布のイメージングには有効である。次に、本イメージング装置により組織中に輸送された薬剤分布を観測が可能なこと、またその有用性を示した。そして、上記イメージング装置に PMW による経血管的薬剤輸送機能を融合させるために、イメージングと薬剤輸送でプローブを共有できるかどうかを技術的に検討した。最後に、薬剤の輸送とその動態観測のための一体型システムを開発し、その有用性を示した。

本論文の構成図を Fig.1-8 に示す。

第 2 章では、薬剤の輸送経路である血管の *in vivo* イメージングに向けた光音響イメージング装置の開発について述べる。光音響イメージング法の一般的な原理について説明した後、本研究で採用する音響学的分解能光音響イメージング法の原理を詳述する。そして、著者が提案する光ファイバ照射型の小型・軽量の音響学的分解能光音響イメージング装置の設計開発について述べる。まず熱傷皮膚などの体表組織の簡便な *in vivo* イメージングのためのプローブについて述べ、生体ファントム実験による本装置の性能評価の結果と、ラット皮膚を対象とした血管イメージングの結果を提示する。次に、皮下腫瘍を対象としたイメージングのために仕様の最適化を試みたプローブと光音響画像の解像度とコントラストを向上させるための信号処理について述べ、ラット皮膚および皮下組織の血管イメージングの結果を提示する。

第 3 章では、上記イメージング装置により組織中の薬剤動態の観測が可能なこと、またその有用性を示すために実施した実験について述べる。まず、血中における薬剤の運搬機能を有するアルブミンと結合した模擬薬剤 (エバンスブルー) のイメージングについて述べる。アルブミン漏出モデルとして使用したラット熱傷皮膚を対象としたイメージングの結果から、光吸収を持つ薬剤の動態を本装置で観測可能であることを実証する。続いて、光音響イメージング法の造影剤および PDT の光感受性薬剤として機能するインドシアニングリーン内包生分解性ナノ粒子 (ICG ラクトソーム) のイメージング結果について述べる。

診断・治療一体型の薬剤である ICG ラクトソームを用いたマウス皮下腫瘍の光音響イメージングと PDT の結果から、これら診断と治療を一体化させることの有用性を示す。

第 4 章では、上記イメージング装置に PMW による薬剤輸送機能を融合させた診断・治療一体型システムの開発と、その有用性を示すために実施した研究について示す。まず光音響イメージングと PMW による薬剤輸送でプローブを共有できるかどうかを検討した結果について述べる。続いて、開発した診断・治療一体型システムによるマウス皮下腫瘍へのエバンスブルーの輸送とその動態観測の結果から、本システムの有用性を示す。

第 5 章は本研究の結論であり、得られた成果を総括するとともに、今後の展望を述べる。

なお、本研究において実施した動物実験は、全て防衛医科大学校実験動物倫理委員会の承認の下に実施された。第 2 章と第 3 章で述べるラット皮膚と皮下組織を対象とした実験は、課題名『熱傷および放射線被曝の無侵襲光診断法の開発：ラットモデルを用いた実験』（承認番号 11037 および 14034）、第 3 章と第 4 章で述べるマウス皮下腫瘍を対象とした実験は、課題名『創部感染と悪性腫瘍を対象とした一体型光線力学的診断・治療に関する研究』（承認番号 12030 および 15040）に基づき実施した。

本論文に引用した全ての図は掲載許可を取得している。

## 参考文献 第1章

- [1] 橋田充, ドラッグデリバリーシステム—創薬と治療への新たなる挑戦— (化学同人, 1995).
- [2] 電気学会編集委員会 編, バイオメディカルフォトニクス (電気学会, 2009).
- [3] P. F. C. Menezes, C. A. S. Melo, V. S. Bagnato, H. Imasato J. R. Perussi, “Spectroscopic Studies of Photobleaching and Photoproduct of the Photosensitizer Photogem during Intense Illumination” *Laser Phys.* **14**(9), pp. 1214-1218 (2004).
- [4] D. Roberts, F. Cairnduff, I. Driver, B. Dixon, S. Brown, “Tumor vascular shutdown following photodynamic therapy based on polyhematoporphyrin or 5-aminolevulinic Acid,” *Int. J. Oncol.* **5**(4), pp. 763-768 (1994).
- [5] M. C. Mijan, J. P. F. Longo, L. N. D. de Melo, A. R. Simioni, A. C. Tedesco, R. B. Azevedo, “Vascular shutdown and pro-inflammatory cytokine expression in breast cancer tumors after photodynamic therapy mediated by nano-sized liposomes containing aluminium-chloride-phthalocyanine,” *J. Nanomed. Nanotechnol.* **5**(4), 1000218 (2014)
- [6] 神谷瞭, 循環系のバイオメカニクス (コロナ社, 2005).
- [7] 水流弘通, 川崎博己, “微小循環,” *日本薬理誌* **113**(4), pp. 201-202 (1999).
- [8] S. Hu, L. V. Wang, “Photoacoustic imaging and characterization of the microvasculature,” *J. Biomed. Opt.* **15**(1), 011101 (2010).
- [9] 桂川茂彦, 医用画像情報学 (南山堂, 2002).
- [10] 小川誠二, 上野照剛 監修, 非侵襲・可視化技術ハンドブック (NTS, 2007).
- [11] A. A. Folarin, M. A. Kondering, J. Timonen, S. Nagl, R. B. Pedley, “Threedimensional analysis of tumour vascular corrosion casts using stereoinaging and micro-computed tomography,” *Microvascular Research* **80**(1), pp. 89-98 (2010).
- [12] C. L. Duvall, W. R. Taylor, D. Weiss, R. E. Guldberg, “Quantitative microcomputed tomography analysis of collateral vessel development after ischemic injury,” *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **287**(1), pp. H302-H310 (2004).
- [13] L. Nebuloni, G. A. Kuhn, J. Vogel, R. Müller, “A novel *in vivo* vascular imaging approach for hierarchical quantification of vasculature using contrast enhanced micro-computed tomography,” *PLoS one* **9**(1), e86562 (2014).
- [14] E. F. Morgan, A. I. Hussein, B. A. Al-Awadhi, D. E. Hogan, H. Matsubara, Z. Al-Alq, J. Fitch, B. Andre, K. Hosur, L. C. Gerstenfeld, “Vascular development during distraction osteogenesis

proceeds by sequential intramuscular arteriogenesis followed by intraosteal angiogenesis,” *Bone* **51**(3), pp. 535-545 (2012).

- [15] 佐治英郎, 田畑泰彦 編, ますます広がる分子イメージング技術 生物医学研究から創薬, 最先端医療までを支える分子イメージング技術・DDS との技術融合 (メディカルドゥ, 2008).
- [16] S. Pappata, M. Fiorelli, T. Rommel, A. Hartmann, C. Dettmers, T. Yamaguchi, H. Chabriat, J. B. Poline, C. Crouzel, L. Di Giamberardino, J. C. Baron, “PET study of changes in local brain hemodynamics and oxygen metabolism after unilateral middle cerebral artery occlusion in baboons,” *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **13**(3), pp. 416-424 (1993).
- [17] J. Benathan-Tordjmann, P. Bailly, M. E. Meyer, J. Daouk, “Cerebral arterial inflow assessment with F-18-FDG PET: Methodology and feasibility,” *Comput. Methods Programs Biomed.* **116**(3), pp. 177-183 (2014).
- [18] F. P. Kuhn, G. Warnock, T. Schweingruber, M. Sommerauer, A. Buck, N. Khan, “Quantitative H-2[O-15]-PET in pediatric moyamoya disease: Evaluating perfusion before and after cerebral revascularization,” *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* **24**(5), pp. 965-971 (2015).
- [19] S. Yamada, M. Kobayashi, Y. Watanabe, H. Miyake, M. Oshima, “Quantitative measurement of blood flow volume in the major intracranial arteries by using I-123-Iodoamphetamine SPECT,” *Clin. Nucl Med.* **39**(10), pp. 868-873 (2014).
- [20] Y. Golzar, A. Olusanya, N. Pe, N. S. G. Dua, J. Golzar, C. Gidea, R. Doukky, “The significance of automatically measured transient ischemic dilation in identifying severe and extensive coronary artery disease in regadenoson, single-isotope technetium-99m myocardial perfusion SPECT,” *J. Nucl. Cardiol.* **22**(3), pp. 526-534 (2015).
- [21] 神谷瞭, 井街宏, 上野照剛, 医用生体工学 (培風館, 2005).
- [22] H. Degani, M. Chetrit-Dadiani, L. Bogin, E. Furman-Haran, “Magnetic resonance imaging of tumor vasculature,” *Thromb. Haemost.* **89**(1), pp. 25-33 (2003).
- [23] F. Boschi, P. Marzola, M. Sandri E. Nicolato, M. Galiè, S. Fiorini, F. Merigo, V. Lorusso, L. Chaabane, A. Sbarbati, “Tumor microvasculature observed using different contrast agents: a comparison between Gd-DTPA-Albumin and B-22956/1 in an experimental model of mammary carcinoma,” *MAGMA* **21**(3), pp. 169-176 (2008).
- [24] S. Ogawa, T. M. Lee, A. R. Kay, D. W. Tank, “Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**(24), pp. 9868-9872 (1990).

- [25] 神長達郎, “機能的 MRI (fMRI)による脳機能の解析,” 日本老年医学会雑誌 **43**(1), pp. 1-6 (2006).
- [26] 日本超音波医学会編集委員会 編, 超音波医学第2版 (医学書院, 1980).
- [27] R. Gorges, E. G. Eising, D. Fotescu, K. Renzing-Kohler, A. Frilling, L. W. Schmid, A. Bockisch, O. Dirsch, “Diagnostic value of high-resolution B-mode and power-mode sonography in the follow-up of thyroid cancer,” *Eur. J. Ultrasound* **16**(3), pp. 191-206 (2003).
- [28] D. Podlesek, T. Meyer, U. Morgenstern, G. Schackert, M. Kirsch, “Improved visualization of intracranial vessels with intraoperative coregistration of rotational digital subtraction angiography and intraoperative 3D ultrasound,” *PLoS one* **10**(3), e0121345 (2015).
- [29] 田村守, 光による医学診断 (共立出版, 2001).
- [30] D. Yelin, C. Boudoux, B. E. Bouma, G. J. Tearney “Large area confocal microscopy,” *Opt. Lett.* **32**(9), pp. 1102-1104 (2007).
- [31] D. V. Patel, C. N. McGhee. “Quantitative analysis of *in vivo* confocal microscopy images: a review,” *Surv. Ophthalmol.* **58**(5), pp. 466-475 (2013).
- [32] M. M. Batta, S. E. Kessler, P. F. White, W. Zhu, C. A. Fox, “Reflectance confocal microscopy: an overview of technology and advances in telepathology,” *Cutis* **95**(5), pp. E39-E46 (2015).
- [33] W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb, “Two-photon laser scanning fluorescence microscopy,” *Science* **248**(4951), pp. 73-76 (1990).
- [34] W. R. Zipfel, R. M. Williams, W. W. Webb, “Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences,” *Nat. Biotechnol* **21**(11), pp. 1369-1377 (2003).
- [35] F. Helmchen, W. Denk. “Deep tissue two-photon microscopy,” *Nat. Methods* **2**(12) pp. 932-940 (2005).
- [36] D. Kapsokalyvas, R. Cicchi, N. Brusino, D. Alfieri, F. Prignano, D. Massi, T. Lotti, F. S. Pavone, “*In-vivo* imaging of psoriatic lesions with polarization multispectral dermoscopy and multiphoton microscopy,” *Biomed. Opt. Express* **5**(7), pp. 2405-2419 (2014).
- [37] M. van Zandvoort, W. Engels, K. Douma, L. Beckers, M. O. Egbrink, M. Daemen, D. W. Slaafa, “Two-photon microscopy for imaging of the (atherosclerotic) vascular wall: a proof of concept study,” *J. Vasc. Res.* **41**(1), pp. 54-63 (2004).
- [38] T. P. Santisakultarm, C. Q. Paduano, T. Stokol, T. L. Southard, N. Nishimura, R. C. Skoda, W. L. Olbricht, A. I. Schafer, R. T. Silver, C. B. Schaffer, “Stalled cerebral capillary blood flow in mouse models of essential thrombocythemia and polycythemia vera revealed by *in vivo* two-photon imaging,” *J. Thromb. Haemost.* **12**(12), pp.2120-2130 (2014).

- [39] D. Fu, T. E. Matthews, T. Ye, I. R. Piletic, W. S. Warren, “Label-free *in vivo* optical imaging of microvasculature and oxygenation level,” *J. Biomed. Opt.* **13**(4), 040503 (2008).
- [40] C. O. Yanez, A. R. Morales, X. Yue, T. Urakami, M. Komatsu, T. A. Järvinen, K. D. Belfield, “Deep vascular imaging in wounds by two-photon fluorescence microscopy,” *PLoS one* **8**(7), e67559 (2013).
- [41] S. Yazdanfar, M. Kulkarni, J. Izatt, “High-resolution imaging of *in vivo* cardiac dynamics using color Doppler optical coherence tomography,” *Opt. Express* **1**(13), pp. 424-431 (1997).
- [42] V. Westphal, S. Yazdanfar, A. M. Rollins, J. A. Izatt. “Real-time, high velocity-resolution color Doppler optical coherence tomography,” *Opt. Lett.* **27**(1), pp. 34-36 (2002).
- [43] R. Leitgeb, L. Schmetterer, W. Drexler, A. Fercher, R. Zawadzki, T. Bajraszewski, “Real-time assessment of retinal blood flow with ultrafast acquisition by color Doppler Fourier domain optical coherence tomography,” *Opt. Express* **11**(23), pp. 3116-3121 (2003).
- [44] J. A. Izatt, M. D. Kulkarni, S. Yazdanfar, J. K. Barton, A. J. Welch, “*In vivo* bidirectional color Doppler flow imaging of picoliter blood volumes using optical coherence tomography,” *Opt. Lett.* **22**(18), pp. 1439-1441 (1997).
- [45] S. Yazdanfar, A. M. Rollins, J. A. Izatt, “*In vivo* imaging of human retinal flow dynamics by color Doppler optical coherence tomography,” *Arch. Ophthalmol.* **121**(2), pp. 235–239 (2003).
- [46] S. Makita, F. Jaillon, M. Yamanari, M. Miura, Y. Yasuno, “Comprehensive *in vivo* micro-vascular imaging of the human eye by dual-beam-scan Doppler optical coherence angiography,” *Opt. Express* **19**(2), pp. 1271-1283 (2011).
- [47] S. Zotter, M. Pircher, T. Torzicky, M. Bonesi, E. Götzinger, R. A. Leitgeb, C. K. Hitzenberger “Visualization of microvasculature by dual-beam phaseresolved Doppler optical coherence tomography,” *Opt. Express* **19**(2), pp. 1217-1227 (2011).
- [48] C. J. Pedersen S. Yazdanfar, V. Westphal, A. M. Rollins “Phase-referenced Doppler optical coherence tomography in scattering media,” *Opt. Lett.* **30**(16), pp. 2125-2127 (2005).
- [49] G. Liu, A. J. Lin, B. J. Tromberg, Z. Chen, “A comparison of Doppler optical coherence tomography methods,” *Biomed. Opt. Express* **3**(10), pp. 2669-2680 (2012).
- [50] A. G. Bell, “On the production and reproduction of sound by light,” *Am. J. Sci.* **20**(3), pp. 305-324 (1880).
- [51] 澤田嗣郎, 光熱変換分光法とその応用 (学会出版センター, 1997).
- [52] P. Beard, “Biomedical photoacoustic imaging,” *Interface Focus*, **1**(4), pp. 602-631 (2011).
- [53] J. Yao, L. V. Wang, “Photoacoustic microscopy” *Laser Photon Rev.* **7**(5), pp. 758-778 (2013).

- [54] P. H. Wang, J. J. Luh, W. S. Chen, M. L. Li, “*In vivo* photoacoustic micro-imaging of microvascular changes for Achilles tendon injury on a mouse model,” *Biomed. Opt. Express* **2**(6), pp. 1462-1469 (2011).
- [55] X. L. Dea'n-Ben, D. Razansky, “Functional optoacoustic human angiography with handheld video rate three dimensional scanner,” *Photoacoustics* **1**(3-4), pp. 68-73(2013).
- [56] K. Yoshida, S. Sato, K. Hatanaka, D. Saitoh, H. Ashida, T. Sakamoto, M. Obara, “Photoacoustic diagnosis of edema in rat burned skin,” *Proc. SPIE* **7564**, 75641C (2010)
- [57] Z. Xu, Q. Zhu, L. V. Wang, “*In vivo* photoacoustic tomography of mouse cerebral edema induced by cold injury,” *J. Biomed. Opt.* **16**, 066020 (2011).
- [58] K. Jansen, M. Wu, A. F. W. van der Steen, G. van Soest, “Lipid detection in atherosclerotic human coronaries by spectroscopic intravascular photoacoustic imaging,” *Opt. Express* **21**(18), pp. 21472-21484 (2013).
- [59] K. Jansen, A. F. W. van der Steen, H. M. M. van Beusekom, J. W. Oosterhuis, G. van Soest, “Intravascular photoacoustic imaging of human coronary atherosclerosis,” *Opt. Lett.* **36**(5), pp. 597-599 (2011).
- [60] Y. Zhou, W. Xing, K. I. Maslov, L. A. Cornelius, L. V. Wang, “Handheld photoacoustic microscopy to detect melanoma depth *in vivo*,” *Opt. Lett.* **39**(16), pp. 4731-4734 (2014).
- [61] Y. Zhou, G. Li, L. Zhu, C. Li, L. A. Cornelius, L. V. Wang, “Handheld photoacoustic probe to detect both melanoma depth and volume at high speed *in vivo*,” *J. Biophotonics*, **8**(11-12), pp. 961-967 (2015).
- [62] D. Wu, L. Huang, M. S. Jiang, H. Jiangm, “Contrast Agents for Photoacoustic and Thermoacoustic Imaging: A Review,” *Int. J. Mol. Sci.* **15**(12), pp. 23616-23639 (2014).
- [63] L. Nie, X. Chen, “Structural and functional photoacoustic molecular tomography aided by emerging contrast agents,” *Chem. Soc. Rev.* **43**(20), pp. 7132-7170 (2014).
- [64] H. F. Zhang, K. Maslov, L. V. Wang, “*In vivo* imaging of subcutaneous structures using functional photoacoustic microscopy,” *Nat. Protocols.* **2**(4), pp. 797-804 (2007).
- [65] L. V. Wang, S. Hu, “Photoacoustic tomography: *In vivo* imaging from organelles to organs,” *Science* **335**(6075), pp. 1458-1462 (2012).
- [66] K. Maslov, G. Stoica, L. V. Wang, “*In vivo* dark-field reflection-mode photoacoustic microscopy,” *Opt. Lett.* **30**(6), pp. 625-627 (2005).
- [67] H. F. Zhang, K. Maslov, G. Stoica, L. V. Wang, “Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive *in vivo* imaging,” *Nat. Biotechnol.* **24**(79), pp. 848-851 (2006).

- [68] K. Maslov, H. F. Zhang, S. Hu, L. V. Wang “Optical-resolution photoacoustic microscopy for *in vivo* imaging of single capillaries,” *Opt. Lett.* **33**(9), pp. 929-931 (2008).
- [69] L. Wang, K. Maslov, J. Yao, B. Rao, L. V. Wang, “Fast voice-coil scanning optical-resolution photoacoustic microscopy,” *Opt. Lett.* **36**(2), pp. 139-141 (2011).
- [70] J. Xia, G. Li, L. Wang, M. Nasiriavanaki, K. Maslov J. A. Engelbach, J. R. Garbow, L. V. Wang, “Wide-field two-dimensional multifocal optical-resolution photoacoustic-computed microscopy,” *Opt. Lett.* **38**(24), pp. 5236-5239 (2013).
- [71] A. Danielli, K. Maslov, A. Garcia-Uribe, A. M. Winkler, C. Li, L. Wang, Y. Chen, G. W. Dorn 2nd, L. V. Wang, “Label-free photoacoustic nanoscopy” *J. Biomed. Opt.* **19**(8), 086006 (2014).
- [72] L. D. Wang, C. Zhang, L. H. V. Wang, LHV. “Grüneisen Relaxation Photoacoustic Microscopy,” *Phys. Rev. Lett.* **113**(17), 174301 (2014).
- [73] M. R. Chatni, J. Xia, R. Sohn, K. Maslov, Z. Guo, Y. Zhang, K. Wang, Y. Xia, M. Anastasio, J. Arbeit, L. V. Wang, “Tumor glucose metabolism imaged *in vivo* in small animals with whole-body photoacoustic computed tomography,” *J. Biomed. Opt.* **17**(7), 076012 (2012).
- [74] L. Lin, J. Xia, T. T. Wong, L. Li, L. V. Wang, “*In vivo* deep brain imaging of rats using oral-cavity illuminated photoacoustic computed tomography,” *J. Biomed. Opt.* **20**(1), 016019 (2015).
- [75] J. Xia, M. R. Chatni, K. Maslov, Z. Guo, K. Wang, M. Anastasio, L. V. Wang, “Whole-body ring-shaped confocal photoacoustic computed tomography of small animals *in vivo*,” *J. Biomed. Opt.* **17**(5), 050506 (2012).
- [76] TomoWave Laboratories, Inc. ウェブサイト (2015年8月) <http://www.tomowave.com/>
- [77] X. M. Yang, L. V. Wang, “Monkey brain cortex imaging by photoacoustic tomography,” *J. Biomed. Opt.* **13**(4), 044009 (2008).
- [78] R. G. Kolkman, J. H. Klaessens, E. Hondebrink, J. C. Hopman, F. F. de Mul, W. Steenbergen, J. M. Thijssen, T. G. van Leeuwen, “Photoacoustic determination of blood vessel diameter,” *Phys. Med. Biol.* **49**(20), pp. 4745-4756 (2004).
- [79] R. G. M. Kolkman, E. Hondebrink, W. Steenbergen, T. G. van Leeuwen, F. F. de Mul, “Photoacoustic imaging of blood vessels with a doubling sensor featuring a narrow angular aperture,” *J. Biomed. Opt.* **9**(6), pp. 1327-1335 (2004).
- [80] E. Z. Zhang, J. Laufer, P. Beard, “Three dimensional photoacoustic imaging of vascular anatomy in small animals using an optical detection system,” *Proc. SPIE* **6437**, 64370S (2007).
- [81] J. Laufer, E. Zhang, G. Raivich, P. Beard, “Three-dimensional noninvasive imaging of the

- vasculature in the mouse brain using a high resolution photoacoustic scanner,” *Appl. Opt.* **48**(10), pp. D299-D306 (2009).
- [82] Z. Xie, S. L. Chen, T. Ling, L. J. Guo, P. L. Carson, Xueding Wang, “Pure optical photoacoustic microscopy,” *Opt. Express* **19**(10), pp. 9027-9034 (2011).
- [83] X. L. Dea’n-Ben, E. Bay, D. Razansky, “Functional optoacoustic imaging of moving objects using microsecond-delay acquisition of multispectral three-dimensional tomographic data,” *Sci. Rep.* **4**, 5878 (2014).
- [84] R. Nuster, P. Slezak, G. Paltauf, “High resolution three-dimensional photoacoustic tomography with CCD-camera based ultrasound detection,” *Biomed. Opt. Express* **5**(8), pp. 2635-2647 (2014).
- [85] M. Omar, D. Soliman, J. Gateau, V. Ntziachristos, “Ultrawideband reflection-mode optoacoustic mesoscopy,” *Opt. Lett.* **39**(13), pp. 3911-3914 (2014).
- [86] J. A. Viator, B. Choi, M. Ambrose, J. Spanier, J. S. Nelson, “*In vivo* port-wine stain depth determination with a photoacoustic probe,” *Appl. Opt.* **42**(16) pp. 3215-3224 (2003).
- [87] R. G. M. Kolkman, M. J. Mulder, C. P. Glade, W. Steenbergen, T. G. van Leeuwen, “Photoacoustic Imaging of Port-Wine Stains,” *Lasers Surg. Med.* **40**(3), pp. 178-182 (2008).
- [88] K. Yuan, Y. Yuan, Y. G. J. Gao, D. Xing, “*In vivo* photoacoustic imaging of model of port wine stains,” *J. Xray Sci. Technol.* **20**(2), pp. 249-254(2012).
- [89] Y. Lao, F. Zhou, H. Wang, “*In vivo* photoacoustic imaging of subcutaneous vasculature and vascular anomalies in small animals,” *Eur. Phys. J. Appl. Phys.* **41**(2), pp. 151-155 (2008).
- [90] L. Xiang, D. Xing, H. Gu, D. Yang, S. Yang, L. Zeng, W. R. Chen, “Real-time optoacoustic monitoring of vascular damage during photodynamic therapy treatment of tumor,” *J. Biomed. Opt.* **12**(4), 014001 (2007).
- [91] S. Sato, M. Yamazaki, D. Saitoh, H. Tsuda, Y. Okada, M. Obara, H. Ashida, “Photoacoustic diagnosis of burns in rats,” *J. Trauma: Inj., Infect., Crit. Care.* **59**(6), pp. 1450-1455 (2005).
- [92] M. Yamazaki, S. Sato, D. Saitoh, Y. Okada, H. Ashida, M. Obara, “Measurement of burn depths in rats using multiwavelength photoacoustic depth profiling,” *J. Biomed. Opt.* **10**(6), 064011 (2005).
- [93] K. Hatanaka, S. Sato, D. Saitoh, H. Ashida, T. Sakamoto, “Photoacoustic monitoring of granulation tissue grown in a grafted artificial dermis on rat skin,” *Wound. Rep. Reg.* **18**(3), pp. 284-290 (2010).
- [94] S. Yang, D. Xing, Q. Zhou, L. Xiang, Y. Lao, “Functional imaging of cerebrovascular activities

- in small animals using high-resolution photoacoustic tomography,” *Med. Phys.* **34**(8), pp. 3294-3301 (2007).
- [95] G. Ku, X. Wang, X. Xie, G. Stoica, L. V. Wang, “Imaging of tumor angiogenesis in rat brains *in vivo* by photoacoustic tomography,” *Appl. Opt.* **44**(5), pp. 770-775 (2005).
- [96] Y. Lao, D. Xing, S. Yang, L. Xiang, “Noninvasive photoacoustic imaging of the developing vasculature during early tumor growth,” *Phys. Med. Biol.* **53**(15), pp. 4203-4212 (2008).
- [97] J. Laufer, P. Johnson, E. Zhang, B. Treeby, B. Cox, B. Pedley, P. Bearda, “*In vivo* preclinical photoacoustic imaging of tumor vasculature development and therapy,” *J. Biomed. Opt.* **17**(5), 056016 (2012).
- [98] Q. Ruan, L. Xi, S. L. Boye, S. Han, Z. J. Chen, W. W. Hauswirth, A. S. Lewin, M. E. Boulton, B. K. Law, W. G. Jiang, H. Jiang, J. Cai, “Development of an anti-angiogenic therapeutic model combining scAAV2-delivered siRNAs and noninvasive photoacoustic imaging of tumor vasculature development,” *Cancer Lett.* **332**(1), pp. 120-129 (2013).
- [99] L. D. Liao, M. L. Li, H. Y. Lai, Y. Y. Shih, Y. C. Lo, S. Tsang, P. C. Chao, C. T. Lin, F. S. Jaw, Y. Y. Chen, “Imaging brain hemodynamic changes during rat forepaw electrical stimulation using functional photoacoustic microscopy,” *NeuroImage* **52**(2), pp. 562-570 (2010).
- [100] L. D. Liao, C. T. Lin, Y. Y. I. Shih, T. Q. Duong, H. Y. Lai, P. H. Wang, R. Wu, S. Tsang, J. Y. Chang, M. L. Li, Y. Y. Chen, “Transcranial imaging of functional cerebral hemodynamic changes in single blood vessels using *in vivo* photoacoustic microscopy,” *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **32**, pp. 938-951 (2012).
- [101] K. Aizawa, S. Sato, D. Saitoh, H. Ashida, M. Obara, “*In vivo* photoacoustic spectroscopic imaging of hemoglobin derivatives in thermally damaged tissue,” *Jpn. J. Appl. Phys.* **48**(6R), 062302 (2009).
- [102] M. Tang, Y. Zhou, R. Zhang, L. V. Wang, “Noninvasive photoacoustic microscopy of methemoglobin *in vivo*,” *J. Biomed. Opt.* **20**(3), 036007 (2015).
- [103] X. Wang, G. Ku, M. A. Wegiel, D. J. Bornhop, G. Stoica, L. V. Wang, “Noninvasive photoacoustic angiography of animal brains *in vivo* with near-infrared light and an optical contrast agent,” *Opt. Lett.* **29**(7), pp. 730-732 (2004).
- [104] D. Razansky, C. Vinegoni, V. Ntziachristos, “Multispectral photoacoustic imaging of fluorochromes in small animals,” *Opt. Lett.* **32**(9), pp. 2891-2893 (2007).
- [105] J. Yao, K. Masolv, S. Hu, L. V. Wang, “Evans blue dye-enhanced capillary-resolution photoacoustic microscopy *in vivo*,” *J. Biomed. Opt.* **14**(5), 054049 (2010).

- [106] J. R. Rajian, M. L. Fabiilli, J. B. Fowlkes, P. L. Carson, X. Wang, “Drug delivery monitoring by photoacoustic tomography with an ICG encapsulated double emulsion,” *Biomed. Opt. Express* **19**(15), pp. 14335-14374 (2011).
- [107] G. Kim, S. W. Huang, K. C. Day, M. O’Donnell, R. R. Agayan, M. A. Day, R. Kopelman, S. Ashkenazi, “Indocyanine-green-embedded PEBBLEs as a contrast agent for photoacoustic imaging,” *J. Biomed. Opt.* **12**(4), 044020 (2007).
- [108] S. Bhattacharyya, S. Wang, D. Reinecke, W. Kiser Jr, R. A. Kruger, T. R. DeGrado, “Synthesis and evaluation of near-infrared (NIR) dye-herceptin conjugates as photoacoustic computed tomography (PCT) probes for HER2 expression in breast cancer,” *Bioconjug. Chem.* **19**(6), pp. 1186-1193 (2008).
- [109] S. H. Yang, G. Z. Yin, D. Xing, “Pharmacokinetic Monitoring of Indocyanine Green for Tumor Detection Using Photoacoustic Imaging,” *Chin. Phys. Lett.* **27**(9), 094302 (2010).
- [110] S. Zanganeh, H. Li, P. D. Kumavor, U. Alqasemi, A. Aguirre, I. Mohammad, C. Stanford, M. B. Smith, Q. Zhu, “Photoacoustic imaging enhanced by indocyanine green-conjugated single-wall carbon nanotubes,” *J. Biomed. Opt.* **18**(9), 096006 (2013).
- [111] T. N. Erpelding, C. Kim, M. Pramanik, L. Jankovic, K. Maslov, Z. Guo, J. A. Margenthaler, M. D. Pashley, L. V. Wang, “Sentinel lymph nodes in the rat: Noninvasive photoacoustic and US imaging with a clinical US system,” *Radiology* **256**(1), pp.102-110 (2010).
- [112] C. Kim, K. H. Song, F. Gao, L. V. Wang, “Sentinel lymph nodes and lymphatic vessels: noninvasive dual-modality *in vivo* mapping by using indocyanine green in rats--volumetric spectroscopic photoacoustic imaging and planar fluorescence imaging,” *Radiology* **255**(2), pp. 442-450 (2010).
- [113] C. Kim, T. N. Erpelding, L. Jankovic, M. D. Pashley, L. V. Wang, “Deeply penetrating *in vivo* photoacoustic imaging using a clinical ultrasound array system,” *Biomed. Opt. Express* **1**(1), pp. 278-284 (2010).
- [114] J. Koo, M. Jeon, Y. Oh, H. W. Kang, J. Kim, C. Kim, J. Oh, “*In vivo* non-ionizing photoacoustic mapping of sentinel lymph nodes and bladders with ICG-enhanced carbon nanotubes,” *Phys. Med. Biol.* **57**(23), pp. 7853-7862(2012).
- [115] A. Hirao, S. Sato, D. Saitoh, N. Shinomiya, H. Ashida, M. Obara, “*In vivo* photoacoustic monitoring of photosensitizer distribution in burned skin for antibacterial photodynamic therapy,” *J. Photochem. Photobiol.* **86**(2), pp. 426-430 (2010).
- [116] 田畑泰彦 編, ドラッグデリバリーシステム DDS 技術の新たな展開とその活用法 (メ

ディカルドウ, 2003).

- [117] 西山伸宏, 片岡一則, “血管領域における DDS の最先端アプローチ ドラッグデリバリーシステム (DDS)と血管,” 血管医学 **8**(3), pp. 89-93 (2007).
- [118] Y. Matsumura, H. Maeda, “A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs,” *Cancer Res.* **46**(12), pp. 6387-6392 (1986).
- [119] J. Wang, M. Sui, W. Fan, “Nanoparticles for tumor targeted therapies and their pharmacokinetics,” *Curr. Drug Metab.* **11**(2), pp. 129-141 (2010).
- [120] S. Taurin, H. Nehoff, K. Greish, “Anticancer nanomedicine and tumor vascular permeability; where is the missing link?,” *J. Control. Release* **164**, pp. 265-275 (2012).
- [121] C. T. de Ilarduya, Y. Sun, N. Düzgüneş, “Gene delivery by lipoplexes and polyplexes,” *Eur. J. Pharm. Sci.* **40**(3), pp. 159-170 (2010).
- [122] S. Lakshmanan, G. K. Gupta, P. Avci, R. Chandran, M. Sadasivam, A. E. Jorge, M. R. Hamblin, “Physical energy for drug delivery; poration, concentration and activation,” *Adv. Drug Deliv. Rev.* **71**, pp. 98-114 (2014).
- [123] P. Soman, W. Zhang, A. Umeda, Z. J. Zhang, S. Chen, “Femtosecond laser-assisted optoporation for drug and gene delivery into single mammalian cells,” *J. Biomed. Nanotechnol.* **7**(3), pp. 334-341 (2011).
- [124] V. Venugopalan, A. Guerra 3rd, K. Nahen, A. Vogel, “Role of laser-induced plasma formation in pulsed cellular microsurgery and micromanipulation,” *Phys. Rev. Lett.* **88**(7), 078103 (2002).
- [125] C. Yao, X. Qu, Z. Zhang, G. Hüttmann, R. Rahmzadeh, “Influence of laser parameters on nanoparticle-induced membrane permeabilization,” *J. Biomed. Opt.* **14**(5), 054034 (2009).
- [126] M. Terakawa, Y. Tsunoi, T. Mitsuhashi, “*In vitro* perforation of human epithelial carcinoma cell with antibody-conjugated biodegradable microspheres illuminated by a single 80 fs near-infrared laser pulse,” *Int. J. Nanomed.* **7**, pp.2653-2660 (2012).
- [127] P. K. Selbo, A. Høgset, L. Prasmickaite, K. Berg, “Photochemical internalisation: a novel drug delivery system,” *Tumour Biol.* **23**(2), pp. 103-112 (2002).
- [128] K. Berg, M. Folini, L. Prasmickaite, P. K. Selbo, A. Bonsted, B. Ø. Engesaeter, N. Zaffaroni, A. Weyergang, A. Dietze, G. M. Maelandsmo, E. Wagner, O. J. Norum, A. Høgset, “Photochemical internalization: a new tool for drug delivery,” *Curr. Pharm. Biotechnol.* **8**(6), pp. 362-372 (2007).
- [129] S. L. Jacques, D. J. McAuliffe, I. H. Blank, J. A. Parrish, “Controlled removal of human

- stratum corneum by pulsed laser,” *J. Invest. Dermatol.* **88**(1), pp. 88-93 (1987).
- [130] A. Fujiwara, T. Hinokitani, K. Goto, T. Arai, “Partial ablation of porcine stratum corneum by argon-fluoride excimer laser to enhance transdermal drug permeability,” *Laser Med. Sci.* **19**(4), pp. 210-217 (2005).
- [131] E. Zeira, A. Manevitch, Z. Manevitch, E. Kedar, M. Gropp, N. Daudi, R. Barsuk, M. Harati, H. Yotvat, P. J. Troilo, T. G. Griffiths 2nd, S. J. Pacchione, D. F. Roden, Z. Niu, O. Nussbaum, G. Zamir, O. Papo, I. Hemo, A. Lewis, E. Galun, “Femtosecond laser: a new intradermal DNA delivery method for efficient, long-term gene expression and genetic immunization,” *FASEB J.* **21**(13), pp. 3522-3533 (2007).
- [132] S. W. Tsen, C. Y. Wu, A. Meneshian, S. I. Pai, C. F. Hung, T. C. Wu, “Femtosecond laser treatment enhances DNA transfection efficiency *in vivo*,” *J. Biomed. Sci.* **1**, pp. 16-36 (2009).
- [133] T. Ando, S. Sato, H. Ashida, M. Obara, “Effects of pressure characteristics on transfection efficiency in laser-induced stress wave-mediated gene delivery,” *Appl. Phys. A Mater.* **112**(1), pp. 129-134 (2013).
- [134] A. G. Doukas, T. J. Flotte, “Physical characteristics and biological effects of laser-induced stress waves,” *Ultrasound Med. Biol.* **22**(2), pp. 151-164 (1996).
- [135] S. Lee, T. Anderson, H. Zhang, T. J. Flotte, A. G. Doukas, “Alteration of cell membrane by stress waves *in vitro*,” *Ultrasound Med. Biol.* **22**(9), pp. 1285-1293 (1996).
- [136] S. E. Mulholland, S. Lee, D. J. McAuliffe, A. G. Doukas, “Cell loading with laser-generated stress waves: the role of the stress gradient,” *Pharm. Res.* **16**(4), pp. 514-518(1999).
- [137] T. Kodama, M. R. Hamblin, A. G. Doukas, “Cytoplasmic molecular delivery with shock waves: importance of impulse,” *Biophys. J.* **79**(4), pp. 1821-1832 (2000).
- [138] S. Lee, N. Kollias, D. J. McAuliffe, T. J. Flotte, A. G. Doukas, “Topical drug delivery in humans with a single photomechanical wave,” *Pharm. Res.* **16**(11), pp. 1717-1721 (1999).
- [139] M. Ogura, S. Sato, K. Nakanishi, M. Uenoyama, T. Kiyozumi, D. Saitoh, T. Ikeda, H. Ashida, M. Obara, “*In vivo* targeted gene transfer in skin by the use of laser-induced stress waves,” *Lasers Surg. Med.* **34**(3), pp. 242–248 (2004).
- [140] Y. Satoh, Y. Kanda, M. Terakawa, M. Obara, K. Mizuno, Y. Watanabe, S. Endo, H. Ooigawa, H. Nawashiro, S. Sato, K. Takishima, “Targeted DNA transfection into the mouse central nervous system using laser-induced stress waves,” *J. Biomed. Opt.* **10**(6), 060501 (2005).
- [141] K. Aizawa, S. Sato, M. Terakawa, D. Saitoh, H. Tsuda, H. Ashida, M. Obara, “Accelerated adhesion of grafted skin by laser-induced stress wave-based gene transfer of hepatocyte growth

- factor,” *J. Biomed. Opt.* **14**(6), 064043 (2009).
- [142] A. Kurita, T. Matsunobu, Y. Satoh, T. Ando, S. Sato, M. Obara, A. Shiotani, “Targeted gene transfer into rat facial muscles by nanosecond pulsed laser-induced stress waves,” *J. Biomed. Opt.* **16**(9), 098002 (2011).
- [143] T. Ando, S. Sato, T. Toyooka, H. Kobayashi, H. Nawashiro, H. Ashida, M. Obara, “Photomechanical wave-driven delivery of siRNAs targeting intermediate filament proteins promotes functional recovery after spinal cord injury in rats,” *PLoS one* **7**(12), e51744 (2012).
- [144] S. Sato, K. Yoshida, S. Kawauchi, K. Hosoe, Y. Akutsu, N. Fujimoto, H. Nawashiro, M. Terakawa, “Highly site-selective transvascular drug delivery by the use of nanosecond pulsed laser-induced photomechanical waves,” *J. Control. Release* **192**, pp. 228-235 (2014).
- [145] S. Sato, T. Ando, M. Obara, “Optical fiber-based photomechanical gene transfer system for *in vivo* application,” *Opt. Lett.* **36**(23), pp. 4545-4547 (2011).
- [146] K. Nakano, S. Sato, S. Kawauchi, H. Ashida, I. Nishidate, “Optical fiber-based photomechanical molecular delivery system,” *Proc. SPIE* **8938**, 89381J (2014).
- [147] T. Akiyama, S. Sato, H. Ashida, M. Terakawa, “Depth-targeted transvascular drugdelivery by using annular-shaped photomechanical waves,” *Proc. SPIE* **7902**, 79020X (2011)
- [148] T. Shimada, S. Shunichi, S. Kawauchi, H. Ashida, M. Terakawa, “Focusing of photomechanical waves with an optical lens for depth-targeted molecular delivery,” *Proc. SPIE* **8941**, 89410B (2014).
- [149] 青木伊知男, 城潤一郎, Horacio Cabral, Rumiana Bakalova, Kevin M. Bennett, “ナノ DDS がもたらす新しい MR イメージングとナノ・セラノステイクス,” *Drug Delivery System* **30**(1), pp. 47-53 (2015).
- [150] Theranostics 誌ウェブサイト (2015 年 8 月) <http://www.thno.org/>
- [151] X. Huang, I. H. El-Sayed, W. Qian, M. A. El-Sayed, “Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods,” *J. Am. Chem. Soc.* **128**(6), pp. 2115-2120 (2006).
- [152] A. M. Gobin, M. H. Lee, N. Halas, W. D. James, R. A. Drezek, J. L. West, “Near-infrared resonant nanoshells for combined optical imaging and photothermal cancer therapy,” *Nano Lett.* **7**(7) pp. 1929-1934 (2007).
- [153] S. Jiang, M. K. Gnanasammandhan, Y. Zhang, “Optical imaging-guided cancer therapy with fluorescent nanoparticles,” *J. R. Soc. Interface* **7**(42), pp. 3-18 (2009).
- [154] X. Wu, T. Ming, X. Wang, P. Wang, J. Wang, J. Chen, “High-photoluminescenceyield gold

- nanocubes: for cell imaging and photothermal therapy,” ACS Nano **4**(1), pp. 113-120 (2010).
- [155] D. K. Yi, I. C. Sun, J. H. Ryu, H. Koo, C. W. Park, I. C. Youn, K. Choi, I. C. Kwon, K. Kim, C. H. Ahn, “Matrix metalloproteinase sensitive gold nanorod for simultaneous bioimaging and photothermal therapy of cancer,” Bioconjug Chem. **21**(12), pp. 2173-2177 (2010).
- [156] E. Galanzha, J. W. Kim, V. P. Zharov, “Nanotechnology-based molecular photoacoustic and photothermal flow cytometry platform for *in-vivo* detection and killing of circulating cancer stem cells,” J. Biophotonics **2**(12), pp. 725-735 (2009).
- [157] P. Huang, J. Lin, W. Li, P. Rong, Z. Wang, S. Wang, X. Wang, X. Sun, M. Aronova, G. Niu, R. D. Leapman, Z. Nie, X. Chen, “Biodegradable gold nanovesicles with an ultrastrong plasmonic coupling effect for photoacoustic imaging and photothermal therapy,” Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **52**(52), pp. 13958-13964 (2013).
- [158] E. Galanzha, E. Shashkov, M. Sarimollaoglu, K. E. Beenken, A. G. Basnakian, M. E. Shircliff, J. W. Kim, M. S. Smeltzer, V. P. Zharov, “*In vivo* magnetic enrichment, photoacoustic diagnosis, and photothermal purging of infected blood using multifunctional gold and magnetic nanoparticles,” PLoS One **7**(9), e45557 (2012).
- [159] L. Cheng, H. Gong, W. Zhu, J. Liu, X. Wang, G. Liu, Z. Liu, “PEGylated Prussian blue nanocubes as a theranostic agent for simultaneous cancer imaging and photothermal therapy,” Biomaterials **35**(37), pp. 9844-9852 (2014).
- [160] J. Hu, X. Zhu, H. Li, Z. Zhao, X. Chi, G. Huang, D. Huang, G. Liu, X. Wang, J. Gao, “Theranostic Au cubic nano-aggregates as potential photoacoustic contrast and photothermal therapeutic agents,” Theranostics **4**(5), pp. 534-545 (2014).
- [161] M. Zhou, G. Ku, L. Pigeon, C. Li, “Theranostic probe for simultaneous *in vivo* photoacoustic imaging and confined photothermolysis by pulsed laser at 1064 nm in 4T1 breast cancer model,” Nanoscale **6**(24), pp. 15228-15235 (2014).
- [162] J. Shah, S. R. Aglyamov, K. Sokolov, T. E. Milner, S. Y. Emelianov, “Ultrasound imaging to monitor photothermal therapy - feasibility study,” Opt. Express **16**(6), pp. 3776-3785 (2008).
- [163] H. Ke, J. Wang, Z. Dai, Y. Jin, E. Qu, Z. Xing, C. Guo, X. Yue, J. Liu, “Gold-nanoshelled microcapsules: a theranostic agent for ultrasound contrast imaging and photothermal therapy,” Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **50**(13), pp. 3017-3021 (2011).
- [164] J. Kim, S. Park, J. E. Lee, S. M. Jin, J. H. Lee, I. S. Lee, I. Yang, J. S. Kim, S. K. Kim, M. H. Cho, T. Hyeon, “Designed fabrication of multifunctional magnetic gold nanoshells and their application to magnetic resonance imaging and photothermal therapy,” Angew. Chem. Int. Ed.

Engl. **45**(46), pp. 7754-7758 (2006).

- [165] W. S. Seo, J. H. Lee, X. Sun, Y. Suzuki, D. Mann, Z. Liu, M. Terashima, P. C. Yang, M. V. McConnell, D. G. Nishimura, H. Dai, "FeCo/graphitic-shell nanocrystals as advanced magnetic-resonance-imaging and near-infrared agents," *Nat. Mater.* **5**(12) pp. 971-976 (2006).
- [166] L. Cheng, K. Yang, Y. Li, X. Zeng, M. Shao, S. T. Lee, Z. Liu, "Multifunctional nanoparticles for upconversion luminescence/MR multimodal imaging and magnetically targeted photothermal therapy," *Biomaterials* **33**(7), pp. 2215-2222 (2012).
- [167] K. Yang, L. Hu, X. Ma, S. Ye, L. Cheng, X. Shi, C. Li, Y. Li, Z. Liu, "Multifunctional imaging guided photothermal therapy using functionalized grapheme nanosheets anchored with magnetic nanoparticles," *Adv. Mater.* **24**(14), pp. 1868-1872 (2012).
- [168] G. von Maltzahn, J. H. Park, A. Agrawal, N. K. Bandaru, S. K. Das, M. J. Sailor, S. N. Bhatia, "Computationally guided photothermal tumor therapy using long-circulating gold nanorod antennas," *Cancer Res.* **69**(9), pp. 3892-3900 (2009).
- [169] C. Kojima, S. H. Cho, E. Higuchi, "Gold nanoparticle-loaded PEGylated dendrimers for theragnosis," *Res. Chem. Intermed.* **38**(6), pp. 1279-1289 (2012).
- [170] A. Bogaards, A. Varma, K. Zhang, D. Zach, S. K. Bisland, E. H. Moriyama, L. Lilge, P. J. Muller, B. C. Wilson, "Fluorescence image-guided brain tumour resection with adjuvant metronomic photodynamic therapy: pre-clinical model and technology development," *Photochem. Photobiol. Sci.* **4**(5), pp. 438-442 (2005).
- [171] X. He, X. Wu, K. Wang, B. Shi, L. Hai, "Methylene blue-encapsulated phosphonateterminated silica nanoparticles for simultaneous *in vivo* imaging and photodynamic therapy," *Biomaterials* **30**(29), pp. 5601-5609 (2009).
- [172] R. Bhuvaneswari, P. S. Thong, Y. Y. Gan, K. C. Soo, M. Olivo, "Evaluation of hypericinmediated photodynamic therapy in combination with angiogenesis inhibitor bevacizumab using *in vivo* fluorescence confocal endomicroscopy," *J. Biomed. Opt.* **15**(1), 011114 (2010).
- [173] W. S. Kuo, C. N. Chang, Y. T. Chang, Y. M. Yang, Y. H. Chien, S. J. Chen, C. S. Yeh, "Gold nanorods in photodynamic therapy, as hyperthermia agents, and in near-infrared optical imaging," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **49**(15), pp. 2711-2715 (2010).
- [174] Z. Sheng, D. Hu, M. Zheng, P. Zhao, H. Liu, D. Gao, P. Gong, G. Gao, P. Zhang, Y. Ma, L. Cai, "Smart human serum albumin-indocyanine green nanoparticles generated by programmed assembly for dual-modal imaging-guided cancer synergistic phototherapy," *ACS Nano* **8**(12),

pp. 12310-12322 (2014).

- [175] A. Srivatsan, S. V. Jenkins, M. Jeon, Z. Wu, C. Kim, J. Chen, R. K. Pandey, "Gold nanocage-photosensitizer conjugates for dual-modal image-guided enhanced photodynamic therapy," *Theranostics* **4**(2), pp. 163-174 (2014).
- [176] B. Banihashemi, R. Vlad, B. Debeljevic, A. Giles, M. C. Kolios, G. J. Czarnota, "Ultrasound imaging of apoptosis in tumor response: novel preclinical monitoring of photodynamic therapy effects," *Cancer Res.* **68**(20), pp. 8590-8596 (2008).
- [177] W. Jerjes, T. Upile, Z. Hamdoon, F. Nhembe, R. Bhandari, S. Mackay, P. Shah, C. A. Mosse, J. A. Brookes, S. Morley, C. Hopper, "Ultrasound-guided photodynamic therapy for deep seated pathologies: prospective study," *Lasers Surg. Med.* **41**(9), pp. 612-621 (2009).
- [178] G. L. Li, A. Slansky, M. P. Dobhal, L. N. Goswami, A. Graham, Y. H. Chen, P. Kanter, R. A. Alberico, J. Spornyak, R. Mazurchuk, A. Oseroff, Z. Grossman, R. K. Pandey, "Chlorophyll-a analogues conjugated with aminobenzyl-DTPA as potential bifunctional agents for magnetic resonance imaging and photodynamic therapy," *Bioconjug. Chem.* **16**(1), pp. 32-42 (2005).
- [179] A. Vaidya, Y. Sun, T. Ke, E. K. Jeong, Z. R. Lu, "Contrast enhanced MRI-guided photodynamic therapy for site-specific cancer treatment," *Magn. Reson. Med.* **56**(4), pp. 761-767 (2006).
- [180] D. J. Lee, G. Y. Park, K. T. Oh, N. K. Oh, D. S. Kwag, Y. S. Youn, Y. T. Oh, J. W. Park, E. S. Lee, "Multifunctional poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for luminescence/magnetic resonance imaging and photodynamic therapy," *Int. J. Pharm.* **424**(1-2), pp. 257-263 (2012).
- [181] Y. Sun, B. O'Neill, "Imaging high-intensity focused ultrasound-induced tissue denaturation by multispectral photoacoustic method an *ex vivo* study," *Appl. Opt.* **52**(8), pp. 1764-1770 (2013).
- [182] H. Cui, X. Yang, "*In vivo* imaging and treatment of solid tumor using integrated photoacoustic imaging and high intensity focused ultrasound system," *Med. Phys.* **37**(9), pp. 4777-4781 (2010).
- [183] Y. Wang, W. Wang, J. Tang, "Ultrasound-guided high intensity focused ultrasound treatment for extra-abdominal desmoid tumours: preliminary results," *Int. J. Hyperthermia* **27**(7), pp. 648-653 (2011).
- [184] C. H. Fan, C. Y. Ting, H. J. Lin, C. H. Wang, H. L. Liu, T. C. Yen, C. K. Yeh, "SPIO-conjugated, doxorubicin-loaded microbubbles for concurrent MRI and focused-ultrasound enhanced brain-tumor drug delivery," *Biomaterials* **34**(14), pp. 3706-3715 (2013).

- [185] J. A. Feshitan, F. Vlachos, S. R. Sirsi, E. E. Konofagou, M. A. Borden, “Theranostic Gd(III)-lipid microbubbles for MRI-guided focused ultrasound surgery,” *Biomaterials* **33**(1), pp. 247-255 (2012).
- [186] M. A. Lediju Bell, N. P. Kuo, D. Y. Song, J. U. Kang, E. M. Boctor, “*In vivo* visualization of prostate brachytherapy seeds with photoacoustic imaging,” *J. Biomed. Opt.* **19**(12), 126011 (2014).
- [187] M. Baker, C. F. Behrens, “Prostate displacement during transabdominal ultrasound image-guided radiotherapy assessed by real-time four-dimensional transperineal monitoring,” *Acta Oncol.* **54**(9) pp. 1508-1514 (2015).
- [188] C. Western, D. Hristov, J. Schlosser, “Ultrasound imaging in radiation therapy: from interfractional to intrafractional guidance,” *Cureus* **7**(6), e280 (2015).
- [189] R. Pötter, P. Georg, J. C. Dimopoulos, M. Grimm, D. Berger, N. Nesvacil, D. Georg, M. P. Schmid, A. Reinthaller, A. Sturdza, C. Kirisits, “Clinical outcome of protocol based image (MRI) guided adaptive brachytherapy combined with 3D conformal radiotherapy with or without chemotherapy in patients with locally advanced cervical cancer,” *Radiother. Oncol.* **100**(1), pp. 116-123 (2011).
- [190] H. O. Wooten, O. Green, M. Yang, T. DeWees, R. Kashani, J. Olsen, J. Michalski, D. Yang, K. Tanderup, Y. Hu, H. H. Li, S. Mutic, “Quality of intensity modulated radiation therapy treatment plans using a <sup>60</sup>Co magnetic resonance image guidance radiation therapy system,” *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **92**(4), pp. 771-778 (2015).
- [191] P. Huang, L. Bao, C. Zhang, J. Lin, T. Luo, D. Yang, M. He, Z. Li, G. Gao, B. Gao, S. Fu, D. Cui, “Folic acid-conjugated silica-modified gold nanorods for X-ray/CT imaging-guided dual-mode radiation and photo-thermal therapy,” *Biomaterials* **32**(36), pp. 9796-9809 (2012).
- [192] P. J. Lou, P. S. Lai, M. J. Shieh, A. J. MacRobert, K. Berg, S. G. Bown, “Reversal of doxorubicin resistance in breast cancer cells by photochemical internalization,” *Int. J. Cancer* **119**(11), pp. 2692-2698 (2006).
- [193] Z. Zhang, L. Wang, J. Wang, X. Jiang, X. Li, Z. Hu, Y. Ji, X. Wu, C. Chen, “Mesoporous silica-coated gold nanorods as a light-mediated multifunctional theranostic platform for cancer treatment,” *Adv. Mater.* **24**(11), pp. 1418-1423 (2012).
- [194] Z. Xiao, S. Ji, J. Shi, E. M. Pridgen, J. Frieder, J. Wu, O. C. Farokhzad, “DNA self-assembly of targeted near-infrared-responsive gold nanoparticles for cancer thermo-chemotherapy,” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51**(47), pp. 11853-11857 (2012).

- [195] L. Nie, P. Huang, W. Li, X. Yan, A. Jin, Z. Wang, Y. Tang, S. Wang, X. Zhang, G. Niu, X. Chen, “Early-stage imaging of nanocarrier-enhanced chemotherapy response in living subjects by scalable photoacoustic microscopy,” *ACS Nano*. **8**(12), pp. 12141-12150 (2014).
- [196] C. Sim, H. Kim, H. Moon, H. Lee, J. H. Chang, H. Kim, “Photoacoustic-based nanomedicine for cancer diagnosis and therapy,” *J. Control. Release*. **203**, pp. 118-125 (2015).
- [197] G. A. Koning, A. M. Eggermont, L. H. Lindner, T. L. ten Hagen, “Hyperthermia and thermosensitive liposomes for improved delivery of chemotherapeutic drugs to solid tumors,” *Pharm. Res.* **27**(8), pp. 1750-1754 (2010).
- [198] N. Rapoport, Z. Gao, A. Kennedy, “Multifunctional nanoparticles for combining ultrasonic tumor imaging and targeted chemotherapy,” *J. Natl. Cancer Inst.* **99**(14), pp. 1095-1106 (2007).
- [199] R. Suzuki, Y. Osa, D. Omata, Y. Sawaguchi, M. Seki, H. Uraga, T. Naoi, Y. Negishi, K. Maruyama, “Novel strategies for ultrasound diagnostics and therapeutics by micro/nanobubbles,” *Thermal. Med.* **29**(2), pp. 37-46 (2013).
- [200] 丸山一雄, 小田雄介, 小俣大樹, 鈴木亮, “超音波セラノステイクス,” *薬剤学* **73**(4), pp. 194-202 (2013).
- [201] D. Pan, S. D. Caruthers, G. Hu, A. Senpan, M. J. Scott, P. J. Gaffney, S. A. Wickline, G. M. Lanza, “Ligand-directed nanobialys as theranostic agent for drug delivery and manganese-based magnetic resonance imaging of vascular targets,” *J. Am. Chem. Soc.* **130**(29), pp. 9186-9187 (2008).
- [202] J. H. Lee, J. T. Jang, J. S. Choi, S. H. Moon, S. H. Noh, J. W. Kim, J. G. Kim, I. S. Kim, K. L. Park, J. Cheon, “Exchange-coupled magnetic nanoparticles for efficient heat induction,” *Nat. Nanotechnol.* **6**(7), pp. 418-422 (2011).
- [203] D. Kim, Y. Y. Jeong, S. Jon, “A drug-loaded aptamer-gold nanoparticle bioconjugate for combined CT imaging and therapy of prostate cancer,” *ACS Nano*. **4**(7), pp. 3689-3696 (2010).
- [204] S. Kaida, H. Cabral, M. Kumagai, A. Kishimura, Y. Terada, M. Sekino, I. Aoki, N. Nishiyama, T. Tani, K. Kataoka, “Visible drug delivery by supramolecular nanocarriers directing to single-platformed diagnosis and therapy of pancreatic tumor model,” *Cancer Res.* **70**(18), pp. 7031-7041 (2010).
- [205] Y. Cohen, S. Y. Shoushan, “Magnetic nanoparticles-based diagnostics and theranostics,” *Curr. Opin. Biotechnol.* **24**(4), pp. 672-681 (2013).
- [206] Z. Zhang, J. Wang, C. Chen, “Gold nanorods based platforms for light-mediated theranostics,” *Theranostics* **3**(3), pp. 223-238 (2013).

- [207] A. Singh, S. K. Sahoo, “Magnetic nanoparticles: a novel platform for cancer theranostics,” *Drug Discov. Today* **19**(4), pp. 474-481 (2014).
- [208] G. T. Haar, C. Coussios, “High intensity focused ultrasound: physical principles and devices,” *Int. J. Hyperthermia* **23**(2), pp. 89-104 (2007).
- [209] Z. Yu-Feng, “High intensity focused ultrasound in clinical tumor ablation,” *World J. Clin. Oncol.* **2**(1), pp. 8-27 (2011).
- [210] O. Al-Bataineh, J. Jenne, P. Huber, “Clinical and future applications of high intensity focused ultrasound in cancer,” *Cancer Treat. Rev.* **38**(5), pp. 346-53 (2012).
- [211] E. R. Cordeiro, X. Cathelineau, S. Thüroff, M. Marberger, S. Crouzet, J. J. de la Rosette, “High-intensity focused ultrasound (HIFU) for definitive treatment of prostate cancer,” *BJU Int.* **110**(9), pp. 1228-1242 (2012).
- [212] 寺川光洋, “レーザ誘起応力波を用いた遺伝子導入技術の組織工学応用に関する研究,” 慶應義塾大学, 2008, 博士論文.

Table 1-1 Summary of therapeutic and diagnostic methods for theranostic system [151-203].

	Optical imaging	Photoacoustic imaging	Ultrasound imaging	Magnetic resonance imaging	X-ray imaging
Photothermal therapy	[151-155]	[156-161]	[162,163]	[164-167]	[168,169]
Photodynamic therapy	[170-173]	[174,175]	[176,177]	[178-180]	
High intensity focused ultrasound		[181,182]	[183]	[184,185]	
Radiotherapy		[186]	[187,188]	[189,190]	[191]
Chemotherapy	[192-194]	[195,196]	[197-200]	[201,202]	[203]

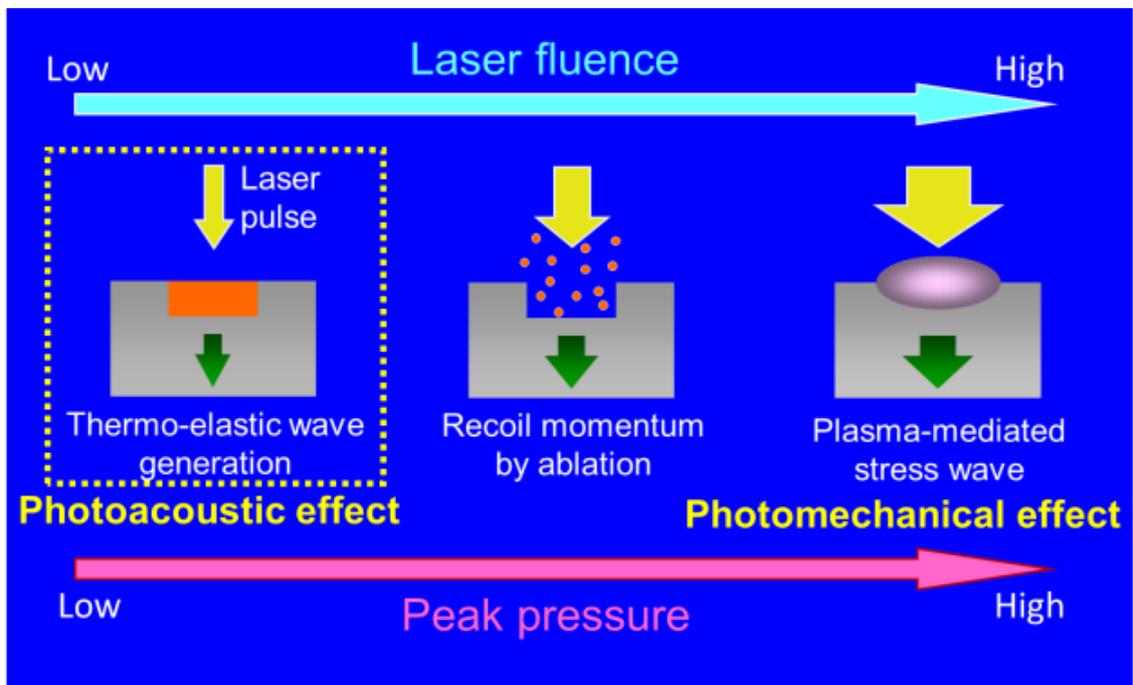


Fig. 1-1 Pulsed light interaction with solid material and generation of pressure waves. Modified based upon data from [212].

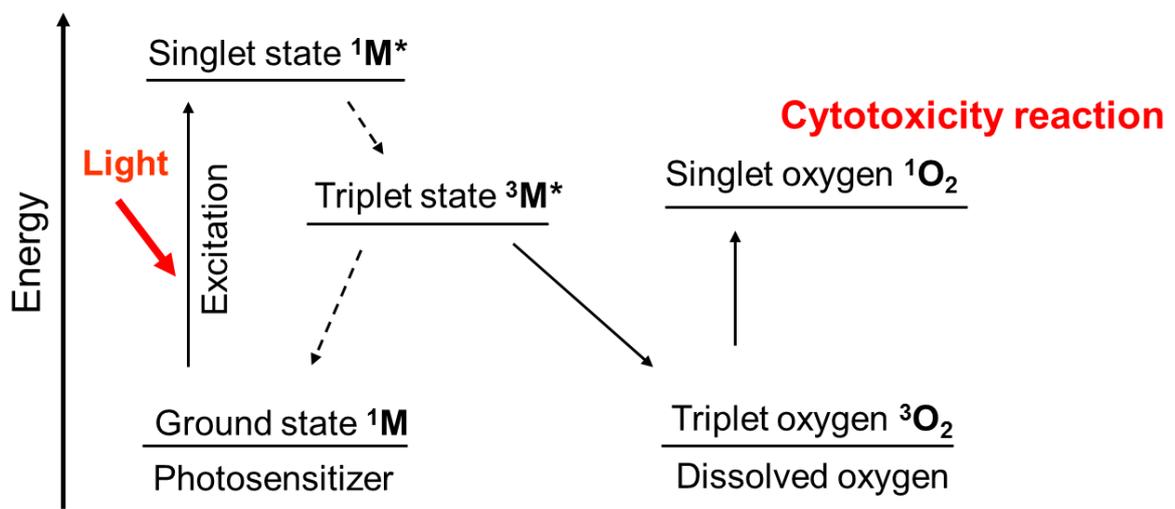


Fig. 1-2 Excitation of photosensitizer and generation of reactive oxygen.

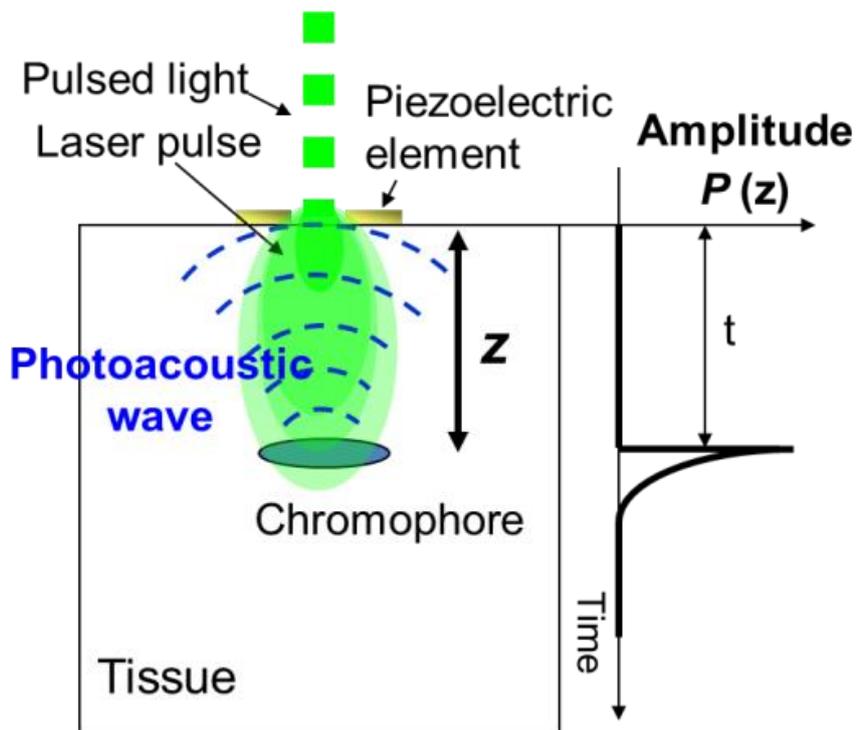


Fig. 1-3 Schematic of principle of photoacoustic (PA) imaging.

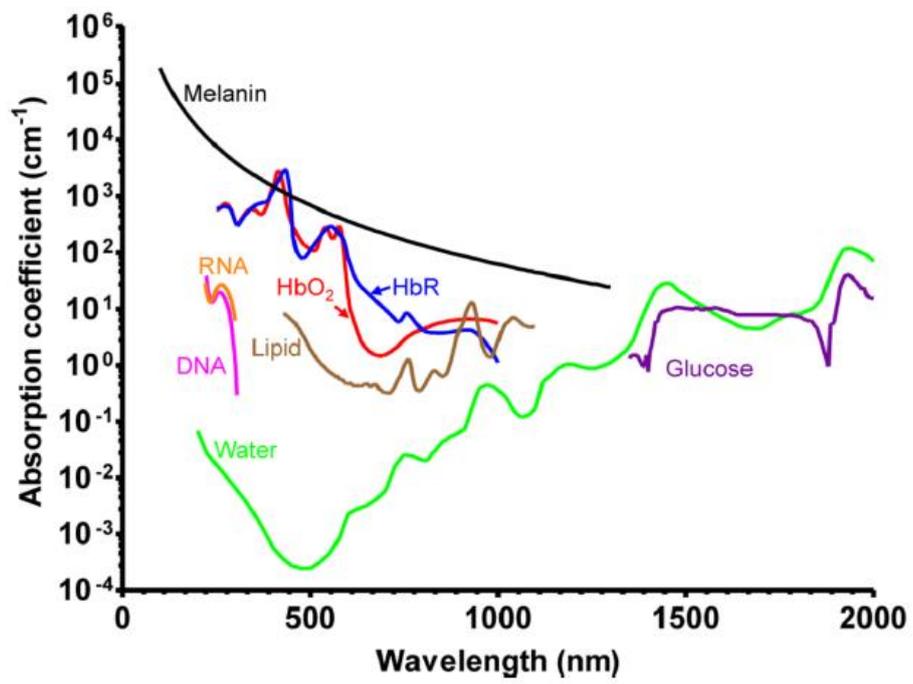


Fig. 1-4 Absorption spectra of major endogenous chromophores in tissue [53].

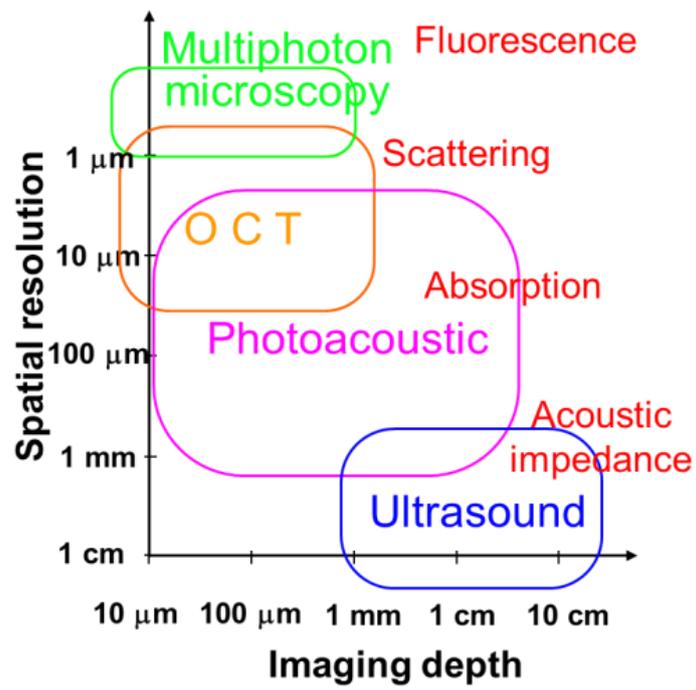


Fig. 1-5 Imaging depth versus spatial resolution in multi-scale imaging modalities.

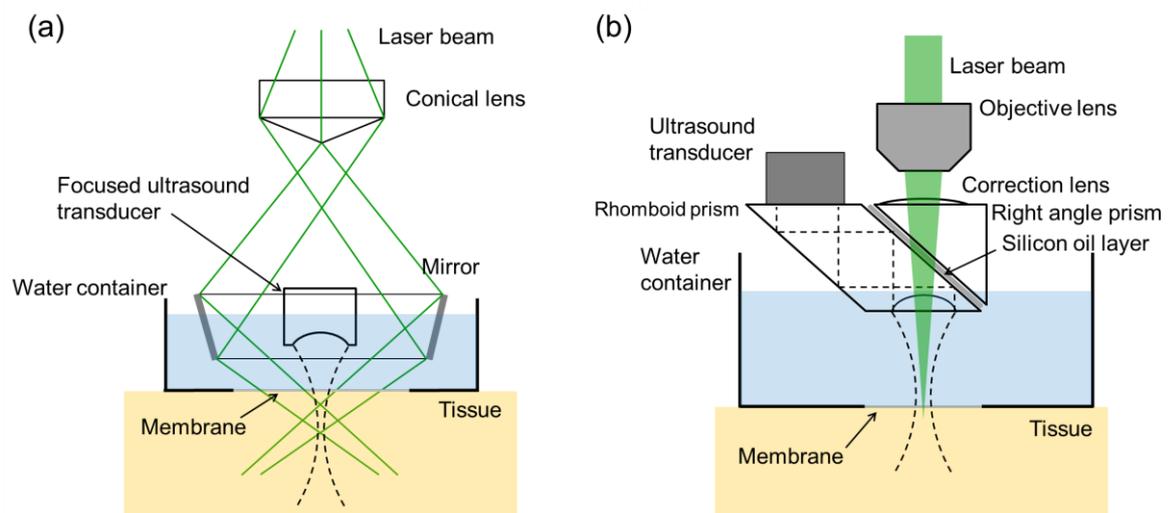


Fig. 1-6 Schematic of the (a) acoustic-resolution PA imaging system and (b) optical-resolution PA imaging system.

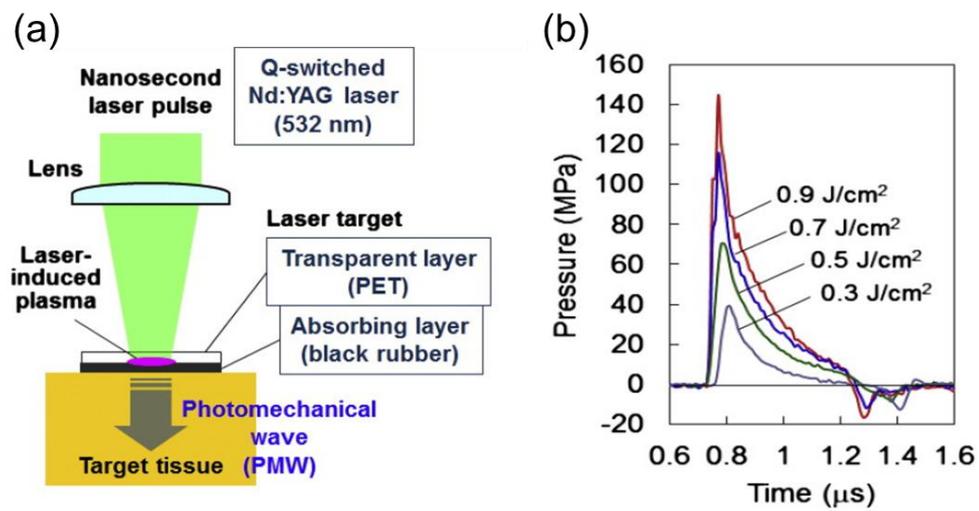


Fig. 1-7 (a) Schematics of generation of photomechanical waves (PMWs). (b) Typical waveforms of PMWs [144].

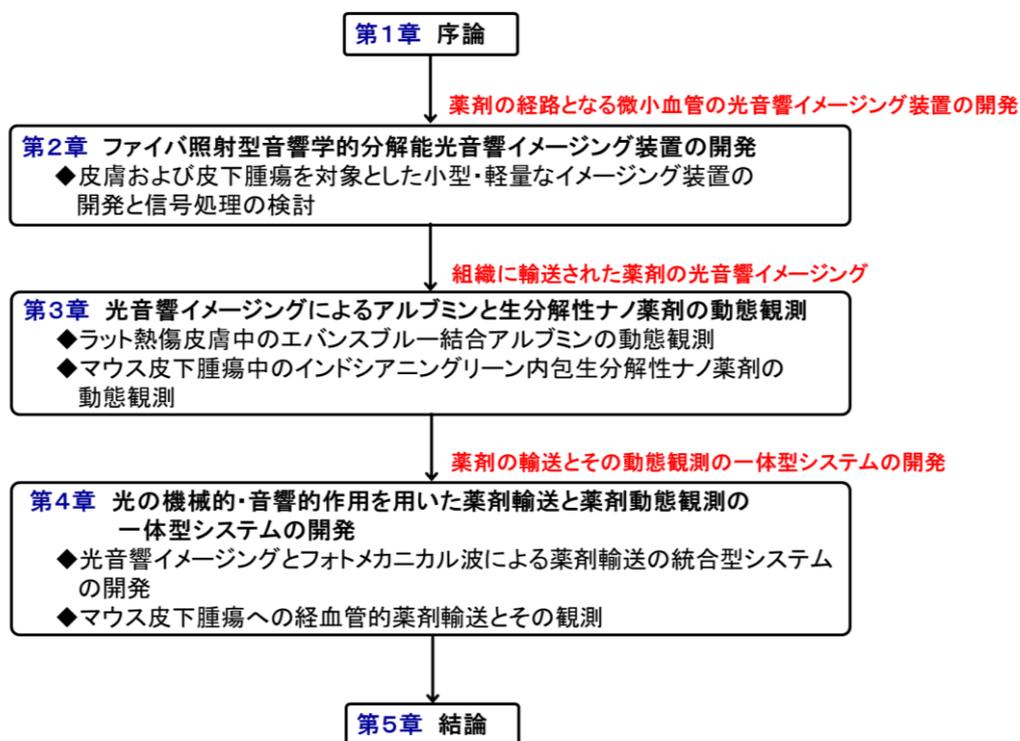


Fig. 1-8 Flow chart of this dissertation.

## 第2章

ファイバ照射型音響学的分解能  
光音響イメージング装置の開発

## 2.1 はじめに

光音響イメージング法は、励起光の波長の選択により生体内の血管と薬剤分子を高コントラストに画像化可能であり、経血管的薬剤輸送の観測技術として有望である。本章では、太さ数十～数百  $\mu\text{m}$  の微小血管を対象に、一般的な光診断技術では困難な 2 mm 以上の観測深度を得ることを目指し、前章で述べた音響学的分解能光音響イメージング法を採用した装置の開発について述べる。同イメージング法を最初に報告した Wang らの装置は、コンカルレンズによる円環状の励起光を反射ミラーによりセンサーの周囲から対象物へ照射する複雑な光学系のためスペースを要し、大型のデスクトップ型システムであるため、著者が目指す *in vivo* での生体イメージングには適用しにくい[1-3]。そこで著者は、光ファイバを用いて励起光をセンサーの近傍から斜方向照射することで、小型・軽量のイメージング装置の開発を目指した。本章では、まず一般的な光音響イメージング法の原理について説明し、その後本研究で採用した音響学的分解能光音響イメージング法の原理を詳述する。そして、著者が提案する光ファイバ照射型の小型・軽量の音響学的分解能光音響イメージング装置の設計開発について述べる。

## 2.2 光音響イメージング法の原理

生体表面からエネルギー  $E_0$  のパルス光を照射すると、組織中を伝搬する光のエネルギーは深さに伴い指数関数的に減衰し、深さ  $z$  におけるエネルギー  $E(z)$  は以下の (2.1)式に示すランベルト・ベールの式に従う。

$$E(z) = E_0 \exp(-\mu_{\text{eff}} z) \quad \dots (2.1)$$

ここで、 $\mu_{\text{eff}}$  は光の減衰係数であり、生体組織のように吸収よりも散乱による光減衰が支配的な場合の  $\mu_{\text{eff}}$  は、散乱係数  $\mu_s$ 、吸収係数  $\mu_a$ 、異方性因子  $g$  を用いて以下の (2.2)式で与えられる。

$$\mu_{\text{eff}} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + (1-g)\mu_s)} \quad \dots (2.2)$$

いま、Fig. 2-1 に示すような組織中の深さ  $z$  に吸収係数の  $\mu_a$  の層が存在する場合を考える。吸収層は光を吸収することで温度上昇により熱膨張を起こす。このとき、次の (2.3) 式に示す応力閉じ込め条件を満たすと熱弾性波 (光音響波) が効率的に発生し、周囲に伝搬する[4,5].

$$\tau_p \ll 1 / \mu_{\text{eff}} \cdot v_s \quad \dots (2.3)$$

ここで、 $\tau_p$  は照射光のパルス幅、 $v_s$  は生体内音速である。生体の場合、多くはナノ秒パルス光を用いることによりこの条件が満たされ、光音響波が効率よく発生することが知られている[6]. いま、生体内の光エネルギー分布が (2.1)式で表されるとき、深さ  $z$  に位置する光吸収体から発生する光音響波の圧力  $P$  は次の (2.4)式のように表される。

$$\begin{aligned} P &= (\beta v_s^2 / C_p) \mu_a E_0 \exp(-\mu_{\text{eff}} z) \\ &= \Gamma \mu_a E_0 \exp(-\mu_{\text{eff}} z) \end{aligned} \quad \dots (2.4)$$

ここで、 $\Gamma$  はグリュナイゼン係数という光から圧力波への変換効率を表す無次元数の係数であり、その大きさは定圧比熱  $C_p$ 、体積熱膨張率  $\beta$  に依存する。さらに、深さ  $z$  は光音響波の伝播時間  $t$  と  $v_s$  の積で置き換えられるため、 $P$  は以下の (2.5)式のようにも表される。

$$P = \Gamma \mu_a E_0 \exp(-\mu_{\text{eff}} v_s t) \quad \dots (2.5)$$

組織表面に配置した音響センサーにより検出される光音響波はこの式に従う時間波形であり、その伝搬時間から吸収体の深さ情報を、振幅から吸収係数の情報を取得可能である。音響センサーを走査する、または複数のセンサーを配列することで、吸収体の分布を2次元ないし3次元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呼ぶ。

(2.5)式より、対象物の吸収ピークを励起光波長とすることで高感度なイメージングとなる。しかしその場合、(2.2)式より光侵達長は制限される。このように、イメージングの感度と深度はトレードオフの関係にあり、励起波長は組織全体の吸収と散乱、そしてその中

に含まれる対象物 (光吸収体)の吸収係数やグリュナイゼン係数といった物性や濃度, また観測したい深さなどを考慮して選定する必要がある.

### 2.3 音響学的分解能光音響イメージング法

音響学的分解能光音響イメージング法は, 2005年に Wang らのグループによって報告された. この方式では, 超音波センサーの先端に取り付けられた音響レンズの集束効果により, 同感度領域から発生する光音響波のみを取得することで高い横方向分解能が得られる.

音響レンズの焦点距離  $D$  は, レンズの曲率半径  $A$ , レンズ中の音速  $c_1$ , 組織中の音速  $c_2$  から次式で表される[7].

$$D = A / (1 - c_2 / c_1) \quad \dots (2.6)$$

一方, 音響レンズの焦点面上において, 光音響波に対する水平方向の受信感度分布  $I$  は音響波の波数  $k$ , 音響レンズの半径  $a$ , また Fig. 2-2 に示す焦点面上の任意点と音響レンズの中心を結ぶ直線が中心軸となす角度  $\theta$  により近似的に次の (2.7)式で与えられる[8].

$$I = \left| \frac{2J_1(ka \sin \theta)}{ka \sin \theta} \right| \quad \dots (2.7)$$

一般に, 光音響イメージング法では, この式に従う受信感度分布の半値全幅のことを横方向分解能と定義することが多い. この式より, 受信光音響波の周波数が高いほど音響レンズによる集束領域は狭くなり, 横方向分解能は高くなることがわかる. 一方で, 音響波は高周波になるほど生体内での伝搬減衰が大きくなり[8-11], 例えば Bauer-Marschallinger らは, 生体軟組織であるブタ皮下脂肪中での約 10-40 MHz 帯の光音響波の減衰係数を評価し,  $\mu_{eff} = 1.7 \times f^{1.45}$  dB/cm と近似できるとしている[11]. すなわち, 横方向分解能と観測深度はトレードオフの関係にある.

一方, 深さ方向分解能は, 受信信号から 2 つの光吸収体を識別可能な最小の深さ方向の距離のことである[8]. ここで, Fig. 2-3 (a)は深さ方向に距離  $L$  の間隔で位置する 2 つの光吸収と, それらから発生する光音響波の波形 (赤線で示す)の模式図である. 1 つの吸収体から発生した光音響波は, 組織の表面 (センサーの方向)と内部の両方向に伝搬するため,

その波形は図のように正圧と負圧が組み合わさった二峰性となる[4,12]. ここでは単純のため, 2つの吸収体に由来する光音響波の波形を同じとして考える. 体表に設置したセンサーは2つの光音響波の合成波(青線で示す)を捉えるが, Fig. 2-3 (b-d)より, 受信光音響信号から2つの光吸収体を識別可能かどうかは吸収体間の距離 $L$ と光音響波の波長 $\lambda$ の関係による.  $L$ が光音響波の半波長( $\lambda/2$ )以上のときは, センサーは2つのピークを捉えられるため吸収体はそれぞれ識別可能である(Fig. 2-3 (b,c)). しかし $L$ が光音響波の半波長( $\lambda/2$ )以下のとき, 互いの正圧と負圧の打ち消しにより検出されるピークは1つとなり, 識別不可能となる(Fig. 2-3 (d)). よって, 光音響イメージング法の深さ方向の分解能も, 横方向と同様に受信光音響波の周波数に依存し, 観測深度とトレードオフの関係である.

以上のように, 音響学的分解能光音響イメージング法で得られる空間分解能と観測深度はどちらも光音響波の周波数に依存し, またこれらはトレードオフの関係にある. したがって, イメージングに際しては対象物の大きさと深さを考慮してセンサーを選定する必要がある.

## 2.4 体表組織を対象としたファイバ照射型音響学的分解能光音響イメージング装置

音響学的分解能光音響イメージングは, 生体の深さ数 mm において数十~数百  $\mu\text{m}$  の空間分解能が得られ, 微小血管の走行などの形態学的イメージング[1-3,13-15], その中を流れる血液の酸素化度などの機能学的イメージング[2,3,16-18], また造影剤の使用による腫瘍などの分子イメージング[19-21]などの幅広い目的に利用可能である. 著者は, 光ファイバにより励起光を超音波センサーの近傍から出射することで, *in vivo* イメージングに適した小型・軽量の音響学的分解能光音響イメージング装置の開発を目指した. 本節では, 3章の前半で述べる熱傷皮膚などの体表組織において, 一般的な光学イメージングでは困難な深さ 2 mm までの太さ数十~数百  $\mu\text{m}$  の血管を *in vivo* で簡便にイメージングするための装置の設計開発について述べる. 同装置により生体組織中で空間対称的な光子分布と光音響波の励起が得られるかどうかをモンテカルロシミュレーションと実測により評価した結果を述べる. その後, 生体ファントムを対象に実施した本装置のイメージング性能の評価およびラット皮膚の血管イメージングの結果を示す.

### 2.4.1 設計

#### 2.4.1.1 素子の選定

著者が考案した光ファイバ照射型の音響学的分解能光音響イメージング装置のプロープ部の構造を Fig. 2-4 に示す[22]. 先端に音響レンズを装着した超音波センサーの周囲に複数本の励起光伝送用光ファイバを配置し、皮膚を対象としたイメージングの際に、プローブを体表に直接接触させて簡便に走査するためのフロントスペーサーで先端を覆う構造とした。本研究では、一般的な光技術ではイメージングが困難な皮膚の深さ 2 mm 以上を対象に、太さ数十～数百  $\mu\text{m}$  の細動脈・細静脈などの微小血管のイメージングを目標に、プローブを構成する各素子の仕様を以下のように選定した。

音響レンズとして、直径 9.1 mm、曲率半径 4.8 mm (焦点距離 6.7 mm) の石英音響レンズを用いた。直径および材質は後述の超音波センサーに合わせ、曲率半径は上述の Wang らの従来研究を参考にした[1-3]。この音響レンズの周波数 10, 20, 30, 50 MHz の音響波に対する焦点面上の理論感度分布を (2.7)式から算出した結果を Fig. 2-5 に示す。対象とする血管の径を考慮し、分布の半値全幅が 52  $\mu\text{m}$  となる中心周波数 30 MHz の超音波センサー (V213-BB-RM, オリンパス)を用いた。フロントスペーサーは励起光および光音響波の伝搬経路となるため、材質として光学的に透明かつ低音響損失なポリスチレンやポリオレフィン系樹脂などが候補として挙げられ、ここでは後者を使用した。スペーサーの厚さは、イメージング時の音響レンズの焦点深さを決定する。本節では、焦点が体表と上記の目標観測深度との間の深さ 1.2 mm に位置するように、厚さ 2 mm のスペーサーを使用した。ただし、ラット皮膚を対象とした *in vivo* イメージングでは、プローブの走査とともに皮膚が移動しやすく光音響画像に歪みを生むため、関心領域上に厚さ 1 mm のポリスチレン板を配置し、その上でプローブを走査させることにした。このとき、スペーサーの厚さは 1.2 mm とし、焦点の位置は組織中の深さ 1 mm とした。次に、励起光の照射角度およびファイバの本数について検討した。効率的な光音響信号の励起のために、複数方向からのファイバ出射光が音響レンズの焦点位置で重なり合うように、照射角度を 60 度とした。このとき、皮膚表面の汚れや表皮中のメラニンなどに由来する強い表面信号の発生を防ぐために、センサー軸上の組織表面では照射光が直接的には当たらない暗視野領域を形成することが望ましい[1-3]。そこで、ファイバ出射光の体表でのスポット径を計算し、コア径 600  $\mu\text{m}$ 、開口数 0.37 の石英光ファイバを使用した。複数方向からのファイバ照射のためには、多分岐ファイバを用いる方法と、光源の出力光をビームスプリッターで分割させてそれぞれファイバに結合させる方法が考えられるが、本研究はエネルギー的に低損失である後者を採用した。そのため、ファイバの本数は 2 の倍数の中から検討した。ファイバの本数が多いほど生体内ではセンサー軸を中心とした空間対称的な光子分布が得られるが、一方で多数の

ファイバを使用するためには光学素子も多数必要になり、光学系は大きくなり、アライメントも複雑となる。3次元光音響画像の取得のためにプローブをラスタ走査することを考慮すると、2方向からの照射では走査方向で光子分布、延いては計測性能に偏りが生じうるため、ここでは4本のファイバを用いることにした。このときに得られる光子分布の空間対称性については、次の2.4.1.2でモンテカルロシミュレーションによる評価を述べる。

#### 2.4.1.2 光子分布の空間対称性の評価

上述の入射角60度の4本の光ファイバによって得られる生体内の光子分布をモンテカルロシミュレーションにより計算し、センサー軸に対する空間対称性を評価した。Fig. 2-6 (a) および (b) にそれぞれイメージングプローブの模式図とモンテカルロシミュレーションの座標軸を示す。センサーの中心を  $x-y$  平面の原点に、また互いに向き合う2組のファイバが  $x$  軸および  $y$  軸の直上に位置するものとした。このとき、原点を通る  $x-y$  平面に対して垂直な断面を観測面とし、その面と  $x$  軸がなす角  $\varphi$  (以下、回転角と記す) が 0, 30, 45, 60 度のときの光子分布を計算した。血管の光音響イメージングを想定し、酸素化ヘモグロビンと脱酸素化ヘモグロビンの等吸収点に近い波長 532 nm を照射波長としたとき、ヒト真皮の均一モデル ( $\mu_a=2.7 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\mu_s=200 \text{ cm}^{-1}$ ,  $g=0.8$  [23],  $n=1.37$  [24,25]) 中の光子分布を、Wang らが報告しているソースコードを基盤に計算した[26]。  $n$  は屈折率であり、生体への入射光子の初期進行方向の決定のために用いた。このとき、ファイバからの出射光は伝搬距離が短いため発散角を無視し、強度分布はガウシアンと仮定した。また生体表面での各照射スポットの形状は実測に基づき長径 2 mm, 短径 1 mm の楕円形とし、光子数は  $1.0 \times 10^7$  個 (計  $4.0 \times 10^7$  個) で計算した。

回転角  $\varphi$  が 0, 30, 45, 60 度のときの焦点位置 (深さ 1.2 mm) の光子分布を Fig. 2-7 に示す。 $\varphi=0^\circ$  のとき、光子分布の半値全幅はその他の3つの角度条件のときの約 1.29 倍となった。これは、 $x$  軸の直上に2本のファイバが位置するため、この2本のファイバの出射点から観測面までの距離が同角度条件のときに最短となり、光子が最も効率よく観測面上を通過するためだと考えられる。しかし、実際の光音響イメージングに影響するのは、音響レンズにより集束された受信領域内の光子分布である。そこで、(2.7)式から算出される 30 MHz の光音響波に対する音響レンズの集束領域の幅 (52  $\mu\text{m}$ ) よりも十分に広い -0.5 mm +0.5 mm の範囲における光子数の角度依存性を評価したところ、4つの角度条件間の光子数のばらつきは  $\pm 7.93\%$  以内であり、許容範囲の空間対称的な光子分布が得られると判断した。

### 2.4.1.3 計測の空間対称性の評価

ここでは、照射光学系に4本の光ファイバを用いた本光音響イメージング装置により、センサー軸を中心とした空間対称的な光音響波の励起が実際に得られるかを確かめることを目的に、同一の対象物に対する受信光音響信号の振幅と横方向分解能の走査方向依存性を実測により評価した。光音響計測ないしイメージングのための実験装置の詳細は後述する。細線の光吸収体として直径7  $\mu\text{m}$  の炭素繊維を用い、等価散乱係数を532 nmにおける生体組織 ( $1.5 \text{ mm}^{-1}$ )と一致させた2%イントラリピッド溶液中の深さ1.2 mm (音響レンズの焦点の深さ)に水平に配置した。上述した光子分布のモンテカルロシミュレーションと同様に、Fig. 2-6 (b)に示す座標系のようにプローブの走査方向をx軸に対する回転角 $\phi$ を0, 30, 45, 60度とし、水平面内で炭素繊維に直交する方向にプローブを5  $\mu\text{m}$  間隔で線形走査させ、受信光音響信号の振幅分布を得た。このとき、プローブを一往復させて2度計測し、平均値の半値全幅を横方向分解能とした。

各角度条件でプローブを走査して得た炭素繊維の光音響信号に対する本イメージング装置の水平方向の受信信号振幅分布をFig. 2-8 (a)に示す。このとき、各分布の原点における光音響信号のピーク振幅は $10.72 \pm 0.89 \text{ mV}$ であり、走査方向によらずほぼ一定であることが確認された。また、各分布の半値全幅 (横方向分解能)はそれぞれ136, 144, 158, 155  $\mu\text{m}$ であり ( $148 \pm 12 \mu\text{m}$ )、ばらつきは10%以内であった。これらの結果から、上述のモンテカルロシミュレーションによる光子分布計算の結果と同様に、本イメージング装置の4本の光ファイバ照射により、生体内での光音響波の励起が空間対称的であるものと判断した。しかし、本実験で得た上記の横方向分解能は、(2.7)式で算出された音響レンズの理論的な集束領域の大きさ (52  $\mu\text{m}$ )とは大きな差異があった。ここで、Fig. 2-8 (b)に $\phi=0^\circ$ の条件で炭素繊維の直上で取得した光音響信号の時間波形を示す。そして、Fig. 2-8 (c)にFig. 2-8 (b)の信号のフーリエ変換により取得した周波数スペクトルを示す。本実験では中心周波数30 MHzの超音波センサーを使用した。実際に取得した光音響波は低周波成分主体の広帯域な音響波であったことがわかる。これは、光吸収体の断熱膨張により発生する光音響波がもともと低周波成分主体であるためだと考えられる。したがって、理論値に近い高空間分解能を得るには、受信光音響信号の周波数特性を検討する必要があると考えられる。Fig. 2-8 (b)の時間波形を水中の音速 (1500 m/s)を用いて深さプロファイルに変換すると、炭素繊維に由来する光音響信号の負のピークから正のピークまでの距離 (同光音響波の半波長に相当)は66  $\mu\text{m}$ であり、2.3節で述べた原理よりこれを深さ方向分解能と見なした。

## 2.4.2 ファントムを用いたイメージング性能の評価

### 2.4.2.1 イメージング装置

作製した光ファイバ照射型音響学的分解能光音響イメージング装置のプロープ部の外観写真を Fig. 2-9 に示す。本プロープは直径 32 mm, 高さ 27 mm, 重さ 32 g と小型・軽量であり, また複雑な照射光学系およびそのアライメントを必要としない。したがって, 簡便な *in vivo* イメージングを可能にすると考えられる。

Fig. 2-10 に実験装置全体のブロック図を示す。光音響波励起用光源として, 繰り返し周波数 100 Hz の光パラメトリック発振器 (OPO, optical parametric oscillator) (パルス幅 9 ns, Opolette HR 355 LD, Oportek) または繰り返し周波数 30 Hz だが前者よりも高出力な OPO (パルス幅 6 ns, M-OPO710, Spectra Physics) を用いた。本章で述べる実験のイメージング対象は血管であり, ここでは OPO の出力波長として, 酸素化ヘモグロビンと脱酸素化ヘモグロビンの等吸収点に近く (ヘモグロビンの酸化・還元状態に影響を受けにくい), また血管イメージングの応用を考えた際に光源を得やすい波長 532 nm で一定とした。出力パルス光をビームスプリッターにより 4 分割し, イメージングプロープに装着した 4 本の光ファイバにそれぞれ結合させた。プロープをステップモーター駆動の自動ステージ (SGSP20-20 (X-Y), シグマ光機) で走査し, 各計測点での受信信号を FET (field-effect transistor) アンプ (周波数帯域 300 Hz-100 MHz, 増幅率 46 dB, SA-915D1, エヌエフ回路設計ブロック) により増幅し, オシロスコープ (サンプルリング速度 5 GS/s, 周波数帯域 140 kHz-300 MHz, TDS3054B, テクトロニクス) で記録した。受信光音響信号の時間波形は生体内音速 (1540 m/s) により深さプロファイルに変換し, Matlab (MATLAB R2013a, MathWorks) または VolVIEW (VolVIEW 3.4, Kitware) により光音響画像を作成した。

ここで, 本論文で述べる光音響イメージング実験の条件 (走査間隔, パルスエネルギー, 平均パルス数) をファントム実験, *ex vivo* 実験, *in vivo* 実験ごとに Table 2-1 に示す。走査間隔は光音響画像の解像度を決定し, イメージング時間とトレードオフの関係である。ファントム実験では対象とする模擬体の大きさを, *ex vivo* および *in vivo* での血管イメージングでは微小血管の径に基づき走査間隔を決定した。薬剤イメージングでは組織中の薬剤の連続的な分布とその早い時間変化を考慮し, 比較的大きな走査間隔で短時間にイメージングを行った。パルスエネルギーはイメージングの深度や感度などに関わり, 対象物の深度や吸収係数に合わせて調整した。なお, 本論文で述べる *in vivo* 実験においては, 照射パルスエネルギーは全てアメリカ規格協会 (ANSI, American National Standards Institute) の定める

安全閾値 ( $20 \text{ mJ/cm}^2$ )以下に設定した[27]. パルスの平均化には, 主として光源の出力パルス間のエネルギーのばらつきの補正とノイズの低減の効果がある. 平均パルス数はイメージング時間とトレードオフの関係であり, 実験に使用する光源の繰り返し周波数と出力パルス間のばらつきの大きさに基づいて決定した.

#### 2.4.2.2 実験方法

音響学的分解能光音響イメージングでは, 光学顕微鏡などと同様に焦点から外れると分解能が低下する. 前項で音響レンズの焦点位置における横方向の集束領域の大きさを評価したのに対し, 本項ではまず深さ方向の集束領域の大きさについて検討した. テストサンプルとして 4 文字のアルファベット"NDMC"を熱転写印字したラミネートテープラベルをプラスチック容器の底に配置し, 容器を 2%イントラリピッド溶液で満たした. プローブ底面からサンプルまでの深さ方向の距離を 1.2, 1.7, 2.2, 2.7, 3.2 mm と変化させ, 各深さにおいてプローブを  $2.5 \times 7.5 \text{ mm}^2$  の領域で走査して, 隣り合う計測点の受信光音響信号の振幅を一次線形補間することで光音響投影画像を作成した.

続いて模擬血管を作製し, その 3 次元的走行のイメージングを試みた. Sprague-Dawley (p)ラットから採取した血液にヘパリン (抗血液凝固剤)を加え, 太さの異なる直径 100, 200, 300, 500  $\mu\text{m}$  のテフロン製マイクロチューブ (壁厚はいずれも 100  $\mu\text{m}$ )に封入して模擬血管とし, 5 本の模擬血管を 2%イントラリピッド溶液の深さ 0.3-1.4 mm の範囲で様々な位置, 角度で配置した. 音響レンズの焦点位置を深さ 1.2 mm とし,  $7.5 \times 8.5 \text{ mm}^2$  の領域でプローブを 50  $\mu\text{m}$  で走査し, 光音響画像を取得した.

#### 2.4.2.3 実験結果と考察

"NDMC"の文字が書かれたテストサンプルの実体顕微鏡画像 (イントラリピッド溶液を満たす前)を Fig. 2-11 (a)に, 同サンプルの深さを 1.2-3.2 mm で 0.5 mm ごとに変化させて取得した光音響画像を Fig. 2-11 (b-f)に示す. 4 つの文字は焦点位置 (深さ 1.2 mm)から遠ざかるに従いぼけが大きくなる傾向が見られた. しかし, (e)に示す深さ 2.7 mm (焦点深さ+1.5 mm)まではそれぞれの文字の認識が可能である. ここで, "N"と"D"の隣接する縦線に着目し, (a)の赤破線で示した走査線に対応する各深さでの受信光音響信号の水平方向の振幅分布について, 各分布で最大振幅が 1 となるように規格化したものを Fig. 2-11 (g)に示す. 2 本の字線に由来する信号ピークが明確に分離され, 2 つのピークの間で振幅が半値以下と

なったのは深さ 2.7 mm までであり，本イメージング装置では焦点深さ+1.5 mm までは顕著な焦点ぼけの影響を受けずに画像化可能と見なせる範囲であった．通常，ラットの皮膚厚は 1 mm 以下，ヒトの場合は約 3 mm であるため，本装置はラット皮膚全層の音響学的分解能イメージングが可能であり，またヒト皮膚にも一部適用可能であることが示された．

次に Fig.2-12 (a)に血管ファントムの実体顕微鏡画像 (イントラリピッド溶液を満たす前)を示す．(b)は上方からの光音響投影画像，(c)は (b)の白破線で示す走査線で取得した光音響断層画像，(d)は 3 次元光音響画像である．最も細い直径 100  $\mu\text{m}$  の血管ファントムも含め，散乱媒質中の深さ $\sim$ 1.4 mm に配置した 5 本全ての血管ファントムの走行が明瞭に描出された．ただし，(d)より血管ファントムが交差する点において，下方のファントムに由来する信号が小さく，画像中では色が抜けていることがわかる．これは，下方の血管ファントムから発生した光音響波が媒質 (イントラリピッド溶液)と直上のファントムの壁 (テフロン)の界面において，音響インピーダンスの不整合によりその一部が反射するためであると考えられる．一般に，音響波が媒質 A から異なる媒質 B に垂直入射して伝搬するとき，その界面における音響波の反射率  $R$  はそれぞれの媒質の音響インピーダンス  $Z_A$  と  $Z_B$  を用いて以下の(2.8)式で与えられる．

$$R = \frac{Z_B - Z_A}{Z_B + Z_A} \quad \dots (2.8)$$

ここで，イントラリピッド溶液の音響インピーダンスは水とほぼ同じであると見なし  $1.5 \times 10^6 \text{ Ns/m}^3$ [9]，テフロンは  $3.0 \times 10^6 \text{ Ns/m}^3$ [28]とすると，それらの界面での反射率は約 33 % となる．後述する *in vivo* イメージングなどにおいては，実際の生体の血管壁は生体軟組織として周囲組織 (皮膚や皮下組織など)と音響インピーダンスはほぼ同等であると考えられ，このような問題は生じないことが予想される．

本実験では，光音響画像は媒質中の励起光の指数関数的減衰を係数  $0.3 \text{ mm}^{-1}$  として受信信号を補正して作成した．この減衰係数は，それぞれ浅部と深部の別の深さに配置した直径 100  $\mu\text{m}$  の 2 本の血管ファントムについて，受信光音響信号の振幅分布の半値全幅がそれぞれ 199  $\mu\text{m}$  および 198  $\mu\text{m}$  と最も近くなった条件により決定した．またこのとき，残りの直径 200, 300, 500  $\mu\text{m}$  の血管ファントムに対する受信光音響信号の強度分布の半値全幅はそれぞれ 247  $\mu\text{m}$ , 333  $\mu\text{m}$ , 514  $\mu\text{m}$  となり，5 本の血管ファントムの太さの大小関係が光音響画像中に表現された．実際の径に対する光音響画像中の径の拡がりは，全ての血管ファントムで 100  $\mu\text{m}$  以下であった．この結果に基づき，次項の *in vivo* イメージング実験でも本

係数による補正を適用することにした。

本実験では、上述の走査条件 (走査領域  $7.5 \times 8.5 \text{ mm}^2$ , 走査間隔  $50 \text{ }\mu\text{m}$ ) で約 100 分のイメージング時間を要した。2.4.2.1 で述べたように、イメージング時間は走査間隔, 検出点ごとの平均パルス数, 光源の繰り返し周波数などに依存する。本実験では、後述する薬剤のイメージングにも使用するために波長可変である OPO を使用し, その繰り返し周波数は  $100 \text{ Hz}$  であった。イメージングの対象を血管に限る場合は, 高い繰り返し周波数の単一波長光源が使用可能であり, 例えば半導体励起固体レーザーでは  $\text{kHz}$  程度の繰り返し周波数で安定な出力を得られる。そのため, このような光源を用いることで, 検出点ごとの平均パルス数を少なくし, プローブを高速かつ細かい間隔で走査することが可能となるため, イメージングの高速化および高解像化が得られることが期待される。

### 2.4.3 ラット皮膚血管のイメージング

#### 2.4.3.1 実験方法

*In vivo* イメージングとして, SD ラット (日本エスエルシー, オス, 11 週齢) の腹部および背部の皮膚の血管イメージングを実施した。ペントバルビタール  $50 \text{ mg/kg}$  の腹腔内投与による麻酔下で関心領域を除毛し, 皮膚上に配置した上記ポリスチレン板の上でプローブを走査し, 各計測点で光音響信号を受信した。このとき, 各ファイバからの出射光エネルギーを  $220 \text{ }\mu\text{J/pulse}$  とし, 組織表面でのフルエンスは ANSI の定める安全閾値 ( $20 \text{ mJ/cm}^2$ ) 以下の  $12.5 \text{ mJ/cm}^2$  に設定した[27]。

#### 2.4.3.2 実験結果と考察

Fig. 2-13 にラット腹部の皮膚血管の光音響イメージングの結果を示す。(a)に明視野像, (b)に上方からの光音響投影画像, (c)に (b)中の白破線で示す走査線で取得した光音響断層画像, (d)に 3 次元光音響画像を示す。(a)内に赤枠線で示す関心領域を斜めに走行する光音響画像上で太さ約  $700 \text{ }\mu\text{m}$  の血管をはじめ, (b)に青矢印で示すその周囲の太さ約  $200\text{-}400 \text{ }\mu\text{m}$  の血管など, 肉眼的には観察できない血管の走行を最大で深さ約  $0.8 \text{ mm}$  まで *in vivo* で画像化することができた。次に, 一般に皮膚厚が腹部よりも厚いラット背部の皮膚血管の光音響イメージングの結果を Fig. 2-14 に示す。(a)は光音響投影画像, (b)は光音響断層画像, (c)は 3 次元光音響画像である。腹部と同様に, 光音響画像中で太さ約  $200 \text{ }\mu\text{m}$ -約  $1 \text{ mm}$  の血

管走行を画像化できており，最大観測深度は(b)に示すように約 2 mm であった．また，それら血管の周囲には (a)に白矢印で示すように形状が明確でない振幅の小さな光音響信号が散在している．これらは，本イメージング装置の分解能では形態を描出できない毛細血管などのより細い血管の集団に由来する信号であると考えられる．2.4.2.3 より，本イメージング装置では焦点深さ+1.5 mm までは顕著な焦点ぼけの影響を受けずに画像化可能であり，本実験では焦点位置をラット組織の深度 1 mm としたため，Fig. 2-13 および Fig. 2-14 の光音響画像中に描出された血管の信号はすべてこの音響的集束領域内から受信した．したがって，実際の血管径に対する光音響信号の拡がりには血管ファントムの結果と同様に 100  $\mu\text{m}$  以下であったと考えられる．

以上より，本イメージング装置によりラット皮膚組織中を走行する太さ数百  $\mu\text{m}$  の血管を深さ 2 mm までイメージングできた．

## 2.5 皮下腫瘍を対象としたファイバ照射型音響学的分解能光音響イメージング装置

前節では皮膚などの体表組織の簡便な *in vivo* イメージングのためにスペーサーを先端に装着したプローブについて述べ，これは第 3 章の前半で述べる熱傷皮膚の診断に使用した．一方，本節では 3 章の後半および 4 章で述べる皮下腫瘍を対象とした光音響イメージングのために仕様を変更したプローブについて述べる．これは，皮下腫瘍のように体表に凹凸がある場合，スペーサーによってプローブを体表に接触させて走査することが困難なためである．また，血管密度が高くかつ細い血管が多く走行する腫瘍を対象とするためにはより高い空間分解能を得ることが望ましく，さらに皮下のイメージングでは前節の皮膚のイメージングよりも大きな観測深度，焦点深度が求められる．しかし，本イメージング方式では以下の点が課題として残っている．①水平方向の受信感度分布 (横方向分解能)は音響レンズの焦点から離れるほど拡がること．②受信光音響波の周波数は空間分解能および観測深度を決定する主要なパラメータであるが，光音響波は低周波主体の広帯域な音響波であり，所望の特性が得られにくいこと．そこで本節では，上記プローブの仕様変更に加え，この 2 つの課題の解決を目的とした信号処理の検討についても述べる．具体的には，前者のために開口合成法 (synthetic aperture focusing technique, SAFT)を，後者のためにデジタルバンドパスフィルタによる周波数処理を適用し，これらの効果と有用性について検討した．

### 2.5.1 実験装置

本節で用いるプローブの構成を Fig. 2-15 に示す. 光学的に透明なポリエチレン膜 (厚さ 30  $\mu\text{m}$ ) を底部に貼った容器に入れた水を介して光音響波を受信する構造とした. 皮下腫瘍のイメージングを考慮し, 観測深度 3 mm を目標に前節で述べた装置よりも大きな焦点深度を得るために, 音響レンズの曲率半径を 5.7 mm (焦点距離 7.25 mm) とし, 4 本の光ファイバの照射角はこの音響的焦点の深さに合わせて 45 度とした. また, 腫瘍では血管密度が高くかつ細い血管が多く走行することを考え, 深さ方向, 横方向いずれも 100  $\mu\text{m}$  以下の分解能を得るために前節よりも高中心周波数の 50 MHz の超音波センサー (V214-BB-RM, オリンパス) を用いた. イメージングのための実験装置は前節と同様である (Fig. 2-10).

## 2.5.2 信号処理

### 2.5.2.1 開口合成法

光音響イメージングにおける受信感度分布の横方向の広がりを補正するための信号処理として開口合成法 (SAFT) が報告されている[29]. はじめに原理説明のため, Fig. 2-16 (a) に示すように非集束型超音波センサーを使用した場合を考える. また, 励起光の分布は散乱により音響波受信領域に対して十分に広いこと, 光吸収体の特性は時間変化しないこと, 組織の音響的・光学的特性は場所によらずに均一であることを前提とする. センサーを走査させたとき, ある検出点で得られる光音響信号は, センサーの受信感度領域中に存在するすべての光吸収体から発生する光音響波の合成波である. 非集束型センサーの場合, 受信感度領域は一般的に Fig. 2-16 (a) に示すようにセンサーを原点とし, 距離が離れるほど広くなる特性を持つ. いま, ある一つの吸収体から発生した光音響波に着目すると, この光吸収体がセンサーの受信感度領域に含まれる複数の検出点で受信される. このとき, センサーまでの伝搬時間は検出点ごとに異なる. SAFT は, この伝搬時間の差を利用し, 各検出点で受信した同一の光吸収体由来する光音響信号を合成する. いま, ある検出点  $i$  で取得した信号を基準にすると, その信号に対する近接する別の検出点で受信した光音響波の伝搬時間の遅れ  $\Delta t_i$  はそれぞれの伝搬距離  $r_i$  と  $r$  また音速  $v_s$  より  $(r - r_i)/v_s$  となる. このとき, SAFT により合成される信号  $S_{SAFT}$  の時間波形は以下のように表される.

$$S_{SAFT}(t) = \sum_{i=0}^{N-1} S(i, t - \Delta t_i) \quad \dots (2.9)$$

SAFT により，光吸収体とセンサーの距離が最短となる時，隣接する検出点で取得した光音響信号に含まれる同一の光吸収体に由来する成分が音響的遅延を補正されて足し合わされる．言い換えると，センサーの受信感度領域により水平方向に広がる信号は，SAFT により吸収体の位置に集束される．これにより，水平方向の信号の拡がりも補正され，さらに SN 比向上の効果も得られる．このような SAFT の信号の拡がりの補正効果は，複数の吸収体が存在する系においても有効であり，それらの間隔がセンサーの横方向分解能と走査間隔よりも離れている場合には，それぞれを識別可能になる．さらに，SAFT の適用に加え，以下の式 (2.10) で定義される時間遅延成分補正後の信号と基準信号との位相の一致性の程度を表すコヒーレンス係数 (coherence Factor, CF) による重み付けを施すことにより，同一の吸収体に由来するメインローブ信号が抽出され，信号の拡がりがより補正されることが知られている[29-31]．

$$CF(t) = \frac{\left| \sum_{i=0}^{N-1} S(i, t - \Delta t_i) \right|^2}{N \sum_{i=0}^{N-1} |S(i, t - \Delta t_i)|^2} \quad \dots (2.10)$$

ここで， $N$  は検出点の総数である．Liao らは，ニードル型ハイドロフォンを走査することで散乱媒質中の様々な深さに配置したファントム (人工毛髪) の光音響断層画像を取得し，このとき SAFT と CF 重み付けの処理を施すことで，光音響信号の水平方向の拡がりの補正効果と画像の高コントラスト化が得られたことを報告した[29]．Li らはこの技術を音響学的分解能光音響イメージング法に拡張した．非集束型センサーでは受信感度領域の原点は検出点と同じであったが (Fig. 2-16 (a))，音響学的分解能光音響イメージング法では音響レンズの焦点が受信感度領域の原点である．そこで Fig. 2-16 (b) に示すように音響レンズの焦点に仮想的な検出点を配置し，この点を中心にして上下方向に離れるほど広がる水平方向の信号を前述の SAFT および CF 重み付けの処理により補正した．ファントム (炭素繊維髪) およびラット頭皮血管のイメージングの結果，SAFT により音響レンズの焦点外れ (深さ方向に約 2.5 mm の範囲) での信号の拡がりが補正されるとともに SN 比が向上し，光音響断層画像の画質が向上した[31]．

### 2.5.2.2 信号処理の適用

本実験で適用した信号処理のフロー図を Fig. 2-17 に示す. まず全計測点での光音響信号受信後, ヒト皮膚の波長 532 nm における光学定数 ( $\mu_a=2.7 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\mu_s=200 \text{ cm}^{-1}$ ,  $g=0.8$ )[23] をもとに減衰係数を  $\mu'_{eff}=1.859 \text{ cm}^{-1}$  とし, (2.1)式に基づき指数関数的な伝搬減衰を補正した. そして, 各計測点での信号に SAFT および CF 重み付けの処理を実施した. このとき, プローブの走査方向に隣接する前後 5 つの計測点で取得した光音響信号を SAFT の処理に用い, 生体内の音速は 1540 m/s として計算した. その後, 受信光音響信号の周波数スペクトルをもとに帯域幅 15.4 MHz (-6dB) の 3 種類のデジタルバンドパスフィルタ (0-15.4, 15.4-30.8, 30.8-46.2 MHz) を用いて光音響信号から各周波数成分を抽出し, 成分ごとに光音響画像を作成した.

### 2.5.3 センサーの受信感度分布の測定

SAFT の効果を検証するために, まず本イメージングセンサーの深さごとの受信領域の広がり进行评估した. 直径 7  $\mu\text{m}$  の炭素繊維を光吸収体とし, 2%イントラリピッド溶液中に配置した. 音響的焦点位置を深さ 1.5 mm とし, 炭素繊維の深さ条件を 0.15, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 2.85 mm と変化させ, 直交する方向にプローブを走査し, 各深さの横方向の受信感度分布を取得した.

Fig. 2-18 (a) および (b) は, 焦点位置 (深さ 1.5 mm) における横方向および深さ方向の信号プロファイルである. 2.4.1.3 と同様に評価し, 横方向および深さ方向の分解能はそれぞれ 63  $\mu\text{m}$  と 36  $\mu\text{m}$  であり, 高中心周波数の超音波センサーを用いた本装置では, 前節の皮膚を対象としたイメージング装置よりも高い分解能が得られた. イントラリピッド溶液中の炭素繊維を深さごとに取得した光音響断層画像を一枚に結合し, Fig. 2-18 (c) に示す. 音響的焦点の深さ約 1.5 mm で信号は最も集束し, 焦点から浅部方向または深部方向にいくほど信号の広がりが大きくなった. ここで, 取得した各深さの信号の横方向の広がりをもとに, それらの縁を双曲線関数によりフィッティングし, その双曲線に囲まれた領域をセンサーの受信領域と見なした. 同領域に含まれる光音響信号に SAFT を適用した結果を Fig. 2-18 (d) に示す. SAFT の適用により, 焦点から外れた深さでの横方向の信号の広がりが改善された. さらに, SAFT 処理後に CF 重み付けを適用した結果を Fig. 2-18 (e) に示す. 2.5.2.1 で述べたように, CF 重み付けによりメインローブ信号とは位相の異なるサイドローブ信号と背景雑音が抑制された結果, 信号の広がりがより改善され, その幅は深さによらずほぼ一定となった. 画像中の各深さ条件における横方向の輝度プロファイルの半値全幅, また炭

素繊維由来の光音響信号の周囲の雑音に対する振幅の比 (SN 比)を Table 2-2 にまとめた。信号の横方向の拡がりは一記処理後に大きく補正され、深さ 0.15-2.85 mm において処理前では 47-965  $\mu\text{m}$  と大きく変化しているのに対し、処理後には 47-64  $\mu\text{m}$  となり変化が著しく小さくなった。また、SN 比についても全ての深さ条件で向上し、焦点から離れるほど得られる効果は大きかった。これは信号の拡がり大きい分、処理により合成される信号の数が多いためである。また、SN 比に関しては焦点位置 (深さ 1.5 mm)においても向上が見られた。これは周囲のノイズが処理により平均化されて低減したためである。

以上より、以下に述べる動物実験においても、同 SAFT および CF 重み付け処理を適用することにした。

#### 2.5.4 ラット皮膚の *ex vivo* 血管イメージング

上記の信号処理法の効果と妥当性を評価するために、まず概ねの血管走行を目視的にも確認可能な厚さの薄い SD ラット腹部の切除皮膚を対象にイメージングを実施した。切除した皮膚 (厚さ約 0.7 mm)の深さ 0.45 mm を音響的焦点位置とし、関心領域 ( $5.0 \times 6.4 \text{ mm}^2$ ) 上でプローブを走査した。

Fig. 2-19 にラット腹部の切除皮膚のイメージングと信号処理の結果を示す。(a)は実験後に裏面よりデジタルカメラで撮影した切除皮膚の明視野像である。(b)は深さ減衰の補正処理のみ適用した同部位の光音響投影像である。(a)に見られる血管走行は (b)でよく画像化されている。反対に (b)で描出されている血管の一部は (a)では見られず、皮膚中を走行する肉眼的には観察できない微小な血管が画像化されていると考えられる。光音響画像上、最も細い血管で太さ約 80  $\mu\text{m}$  の血管をはじめ、装置の高空間分解能化により前節の皮膚イメージングと比較してより細い血管の走行を画像化できた。(c)は SAFT および CF 重み付け適用後の光音響画像である。(b)と比較して、処理後には画像のぼけが低減し、またコントラストが高くなった。これは、前述の炭素繊維を対象とした実験と同様に、SAFT が信号の拡がりの補正と SN の向上に有効であることを示している。次に、(d-f)はデジタルバンドパスフィルタ処理によりそれぞれ受信信号の 0-15.4 MHz, 15.4-30.8 MHz, 30.8-46.2 MHz の成分から作成した光音響画像である。低周波成分の画像ほど振幅が大きい傾向が見られ、これは前述の通り光音響信号が低周波成分主体の音響波であるためと考えられる。特に最も低周波帯域の (d)では、青矢印で示した最も太い血管が強調されている。一方、(f)の高周波帯域の画像では全体的に振幅が減少しているが、図中の白矢印で示すように低周波帯域の画像では見られない細い血管が多数画像化されている。また、(a)の黄矢印で示す血管

は、(d)および(e)では不明瞭であるが、(f)では比較的明瞭に画像化されている（黄矢印）。(d)および(e)のこれらの血管に相当する位置では信号のぼけが見られ、30.8-46.2 MHz のデジタルバンドパスフィルタ処理によりこれが軽減されたことにより細い血管の走行が明瞭化したように見られる。すなわち、周囲の低周波雑音と重なっていた細い血管に由来する高周波の振幅の小さな光音響信号が、デジタルバンドパスフィルタ処理により抽出された結果と考えられる。このような効果は、細い血管ほど光吸収領域、すなわち加熱領域および光音響波の発生源が小さいため、振幅は小さいが高周波の光音響波が発生するために得られるものと考えられる。(g)と(h)は(d-f)の各周波数の画像をそれぞれ赤、ピンク、白に色分けして重ね合わせた投影像および3次元画像である。周波数処理を適用する前の(c)と比べ、低周波成分主体の太い血管と高周波成分主体の細い血管がどちらも鮮明に画像化されており、適用したデジタルバンドパスフィルタ処理が皮膚血管の形態を明瞭に画像化する効果があることがわかった。

### 2.5.5 ラット皮膚と皮下組織の *in vivo* 血管イメージング

上記イメージング装置と信号処理法により皮下の血管イメージングが可能であるかを検討するために、ペントバルビタール 50 mg/kg の腹腔内投与による麻酔下で、SD ラット（日本エスエルシー、オス、15 週齢）の剃毛した背部を対象に *in vivo* イメージングを実施した。焦点位置を深さ 1.7 mm に調整し、関心領域 ( $6.0 \times 6.6 \text{ mm}^2$ ) 上でプローブを走査した。このとき、各ファイバからの出射光エネルギーを 300  $\mu\text{J}$  とし、組織表面でのフルエンスは ANSI の定める安全閾値 ( $20 \text{ mJ/cm}^2$ ) 以下の  $17 \text{ mJ/cm}^2$  に設定した[27]。

Fig. 2-20 にラット背部の *in vivo* イメージングの結果を示す。(a)はラット皮膚の明視野像であり、赤枠線は光音響イメージングのための関心領域を示す。(b)に深さ減衰の補正処理後に SAFT および CF 重み付けを適用した光音響画像を示す。(a)では観察できない血管の走行が画像化されている。(c-e)はそれぞれ 0-15.4 MHz, 15.4-30.8 MHz, 30.8-46.2 MHz のデジタルバンドパスフィルタ処理により抽出した信号成分から作成した光音響画像であり、それぞれを赤、ピンク、白で色別に表示して重ね合わせた画像を (f)に示す。デジタルバンドパスフィルタ処理前の (b)に対し、(c)では低周波成分の抽出により青矢印で示した血管が、(e)では高周波成分の抽出により白矢印で示した血管が強調され、前述の *ex vivo* 実験と同様に血管の形態が明瞭化された結果であると考えられる。次に (g-i)はそれぞれ(c-e)の周波数帯域別の光音響画像において、深さを色別に表示した画像である。最も低周波帯域の (g)では、深さ約 3 mm まで広い深さ範囲の血管が画像化されている。一方、(h)から(i)

へ帯域が高周波になるほど画像化される血管は浅いものに限定され、(i)では最大観測深度が約 1.5 mm であった。これは、超音響波の周波数依存的な伝搬減衰による影響であると考えられる。(j)は (f)の 3 次元画像である。通常、ラット皮膚厚は 1 mm 以下であり、本実験では皮膚全層および皮下組織浅部においては低周波から高周波までの幅広い周波数成分による様々な太さの血管を、それより深部では伝搬による減衰の小さな低周波成分主体の太い血管を画像化したと考えられる。

## 2.6 まとめ

これまでに報告されている音響学的分解能超音響イメージングシステムは、励起光照射のために複雑なアライメントと大きなスペースを必要とし、大型で *in vivo* イメージングに不向きであった。著者は、光ファイバによる 4 方向からの斜方向照射光学系により、モンテカルロシミュレーションと実測に基づき生体内での超音響波発生空間対照性が確保できることを確認し、小型・軽量の装置を開発することに成功した。まず、熱傷皮膚などの体表のイメージングを目的としたプローブを設計開発し、ファントム実験の結果、焦点位置において横方向分解能 148  $\mu\text{m}$ 、深さ方向分解能 66  $\mu\text{m}$  が得られた。また、ラット皮膚を対象とした *in vivo* イメージングでは、太さ数百  $\mu\text{m}$  の血管を深さ約 2 mm まで画像化した。

続いて、皮下腫瘍を対象とした超音響イメージングのためにプローブの仕様の最適化を試みた。また、超音響画像の解像度とコントラストの向上を目的に、焦点から外れた深さでの信号の水平方向の拡がりを SAFT および CF 重み付けにより補正すること、また広帯域かつ低周波主体の受信超音響信号から特定の周波数成分をデジタルバンドパスフィルタにより抽出して画像化することを検討した。その結果、SAFT および CF 重み付けは画像のぼけの低減と高コントラスト化に、周波数処理は血管径の明瞭化に寄与した。ラット皮膚および皮下組織を対象とした *in vivo* での血管イメージングでは、ヒト皮膚全層の厚さに相当する約 3 mm の観測深度で太さ数十～数百  $\mu\text{m}$  の血管を画像化することができた。

以上より、本イメージング装置および信号処理法により、細動脈・細静脈などの太さ数十～数百  $\mu\text{m}$  の微小血管のイメージングを達成可能であり、またその観測深度は一般的な光イメージングでは得ることが困難な約 3 mm であった。次章では、本装置により組織中の微小血管およびそこから漏出して周辺組織へ移行した薬剤の分布をイメージングし、その有用性を検討した実験について述べる。

## 参考文献 第2章

- [1] K. Maslov, G. Stoica, L. V. Wang, “*In vivo* dark-field reflection-mode photoacoustic microscopy,” *Opt. Lett.* **30**(6), pp. 625-627 (2005).
- [2] H. F. Zhang, K. Maslov, G. Stoica, L. V. Wang, “Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive *in vivo* imaging,” *Nat. Biotechnol.* **24**(79), pp. 848-851 (2006).
- [3] H. F. Zhang, K. Maslov, L. V. Wang, “*In vivo* imaging of subcutaneous structures using functional photoacoustic microscopy,” *Nat. Protocols.* **2**(4), pp. 797-804 (2007).
- [4] 電気学会編集委員会 編, バイオメディカルフォトニクス (電気学会, 2009).
- [5] C. Li, L. V. Wang, “Photoacoustic tomography and sensing in biomedicine,” *Phys. Med. Biol.* **54**(19), pp. R59-R97 (2009).
- [6] L. V. Wang, S. Hu, “Photoacoustic tomography: *In vivo* imaging from organelles to organs,” *Science* **335**(6075), pp. 1458-1462 (2012).
- [7] 斎藤繁実, 本橋吉朗, “集束超音波による高分子板の B/A 測定,” 非線形音響研究会 第 31 回研究会 抄録集, pp. 19-21 (2007).
- [8] 日本超音波医学会編集委員会 編, 超音波医学第 2 版 (医学書院, 1980).
- [9] 超音波便覧編集委員会 編, 超音波便覧 (丸善出版, 1999).
- [10] P. N. T. Wells, “Ultrasonic imaging of the human body,” *Rep. Prog. Phys.* **62**(5), pp.671-722 (1999).
- [11] M. G. Beghi, *Acoustic Waves - From Microdevices to Helioseismology* (InTech, 2011).
- [12] J. Xia, J. Yao, L. V. Wang, “Photoacoustic tomography: principles and advances,” *Prog. Electromagn. Res.* **147**, pp. 1-22 (2014).
- [13] H. F. Zhang, K. Maslov, M. L. Li, G. Stoica, L. V. Wang, “*In vivo* volumetric imaging of subcutaneous microvasculature by photoacoustic microscopy,” *Opt. Express* **14**(20), pp. 9317-9320 (2006).
- [14] E. W. Stein, K. Maslov, L. V. Wang, “Noninvasive, *in vivo* imaging of the mouse brain using photoacoustic microscopy,” *J. Appl. Phys.* **105**(10), 102027 (2009).
- [15] P. H. Wang, J. J. Luh, W. S. Chen, M. L. Li, “*In vivo* photoacoustic micro-imaging of microvascular changes for Achilles tendon injury on a mouse model,” *Biomed. Opt. Express* **2**(6), pp. 1462-1469 (2011).
- [16] L. D. Liao, M. L. Li, H. Y. Lai, Y. Y. Shih, Y. C. Lo, S. Tsang, P. C. Chao, C. T. Lin, F. S. Jaw, Y. Y. Chen, “Imaging brain hemodynamic changes during rat forepaw electrical stimulation

- using functional photoacoustic microscopy,” *NeuroImage* **52**(2), pp. 562-570 (2010).
- [17] L. D. Liao, C. T. Lin, Y. Y. I. Shih, T. Q. Duong, H. Y. Lai, P. H. Wang, R. Wu, S. Tsang, J.Y. Chang, M. L. Li, Y. Y. Chen, “Transcranial imaging of functional cerebral hemodynamic changes in single blood vessels using *in vivo* photoacoustic microscopy,” *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **32**, pp. 938-951 (2012).
- [18] J. Yao, L. V. Wang, “Photoacoustic Microscopy,” *Laser Photon Rev.* **7**(5), pp. 758-778 (2013).
- [19] S. Mallidi, G. P. Luke, S. Emelianov, “Photoacoustic imaging in cancer detection, diagnosis, and treatment guidance,” *Trends Biotechnol.* **29**(5), pp. 213-221 (2011).
- [20] P. H. Wang, H. L. Liu, P. H. Hsu C. Y. Liu, C. R. C. Wang, P. Y. Chen, K. C. Wei, T. C. Yen, M. L. Li, “Gold-nanorod contrast-enhanced photoacoustic micro-imaging of focused-ultrasound induced blood-brain-barrier opening in a rat model,” *J. Biomed. Opt.* **17**(6), 061222 (2012).
- [21] X. Cai, A. Krumholz, Z. Guo, T. N. Erpelding, C. Zhang, Y. Zhang, Y. Xia, L. V. Wang, “Multi-scale molecular photoacoustic tomography of gene expression,” *PLoS ONE* **7**(8), e43999 (2012).
- [22] Y. Tsunoi, S. Sato, R. Watanabe, S. Kawauchi, H. Ashida, M. Terakawa, “Compact acoustic-resolution photoacoustic imaging system with fiber-based illumination,” *Jpn. J. Appl. Phys.* **53**(12), 126701 (2014).
- [23] M. Yao, A. Yaroslavsky, F. P. Henry, R. W. Redmond, I. E. Kochevar, “Phototoxicity is not associated with photochemical tissue bonding of skin,” *Laser. Surg. Med.* **42**(2), pp. 123-131 (2010).
- [24] H. Ding, J. Q. Lu, W. A. Wooden, P. J. Kragel, X. H. Hu, “Refractive indices of human skin tissues at eight wavelengths and estimated dispersion relations between 300 and 1600 nm,” *Phys. Med. Biol.* **51**(6), pp. 1479-1489 (2006).
- [25] J. K. Barton, T. J. Pfefer, A. J. Welch, “Optical Monte Carlo modeling of a true portwine stain anatomy,” *Opt. Express* **2**(9), pp. 391-396 (1998).
- [26] L. V. Wang, S. L. Jacques, L. Zheng, “MCML - Monte Carlo modeling of photon transport in multi-layered tissues,” *Comput. Methods Programs Biomed.* **47**(2), pp. 131-146 (1995).
- [27] American National Standards Institute, American National Standard for Safe Use of Lasers : ANSI Z136. 1-2007 (Laser Institute of America, Orlando, 2007).
- [28] 雨宮功, 田沼千秋, 斉藤史郎, 工藤紀子, 八木均, “インクジェット記録装置,” 特開平 9-248908 号 (1997-09-22).
- [29] C. K. Liao, M. L. Li, P. C. Li, “Optoacoustic imaging with synthetic aperture focusing and

coherence weighting,” Opt. Lett. **29**(21), pp. 2506-2508 (2004).

[30] R. Ma, S. Sontges, S. Shoham, V. Ntziachristos, D. Razansky, “Fast scanning coaxial optoacoustic microscopy,” Biomed. Opt. Express **3**(7), pp. 1724-1731 (2012).

[31] M. L. Li, H. F. Zhang, K. Maslov, G. Stoica, L. V. Wang, “Improved *in vivo* photoacoustic microscopy based on a virtual-detector concept,” Opt. Lett. **31**(4), pp. 474-476 (2006).

Table 2-1 Experimental conditions for photoacoustic (PA) imaging described in this dissertation.

Application		Scan step ( $\mu\text{m}$ )	Pulse energy ( $\mu\text{J}$ )	Number of pulses for averaging
Phantom		50 - 100	220 - 500	4, 32
<i>Ex vivo</i>	Blood vessel	40	150	32
<i>In vivo</i>	Blood vessel	50 - 65	150 - 300	4, 32
	Drug distribution	130 - 150	70 - 300	4, 32

Table 2-2 Lateral widths of PA signals originating from a 7- $\mu\text{m}$  diameter carbon fiber placed at various depths in a 2% Intralipid solution with and without SAFT+CF weighting. Ratios of signal to noise ratios (SNRs) with the processing to those without the processing are also shown (improved ratio of SNR).

Depth (mm)	0.15	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	2.85
Raw data							
FWHM ( $\mu\text{m}$ )	677	486	210	47.3	377	726	965
SAFT+CF							
FWHM ( $\mu\text{m}$ )	52.0	56.2	53.1	47.3	53.2	63.6	62.1
Improved ratio of SNR	2.69	2.32	1.67	1.11	2.17	2.83	3.15

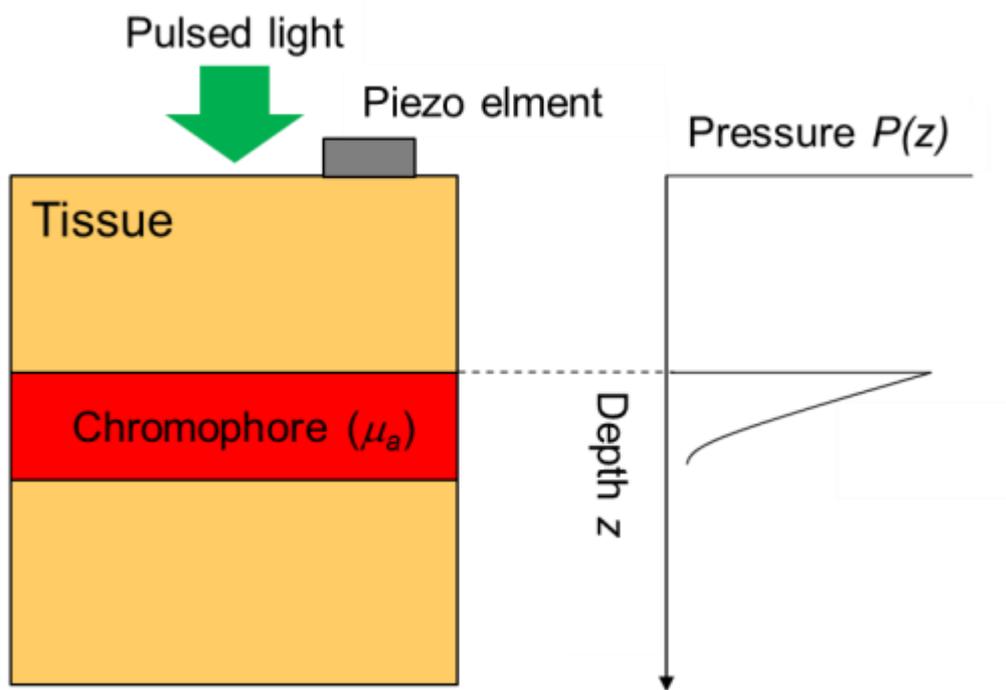


Fig. 2-1 Schematic of principle of PA imaging.

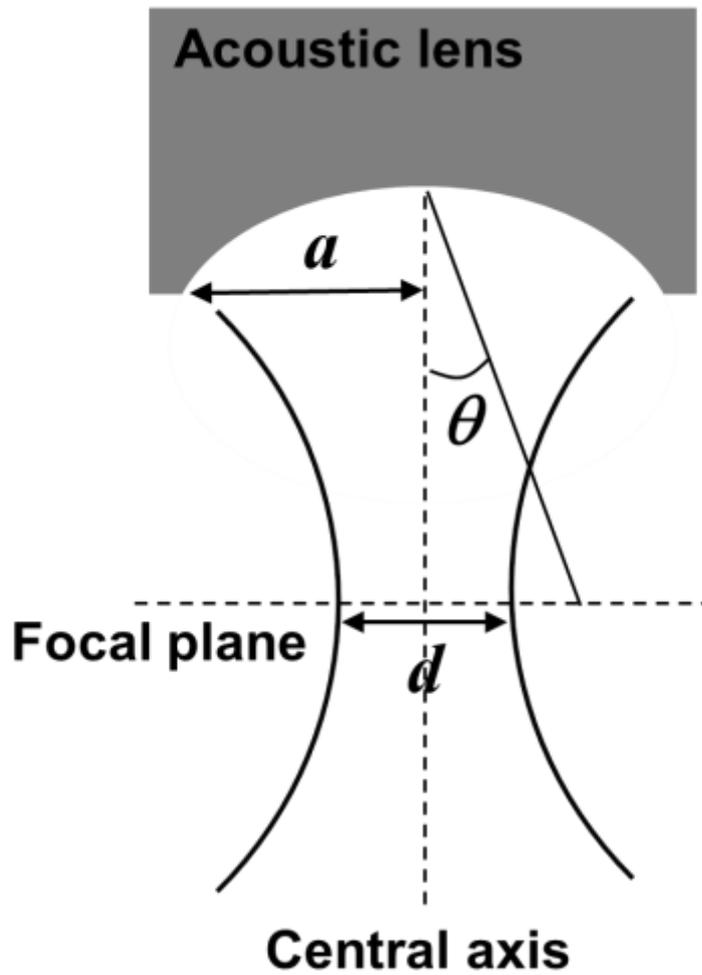


Fig. 2-2 Geometrical parameters for an acoustic lens, where  $d$  is the focal diameter,  $a$  is the radius of an acoustic lens, and  $\theta$  is the azimuth angle (relative to the central axis of an acoustic lens) of a point on the focal plane.

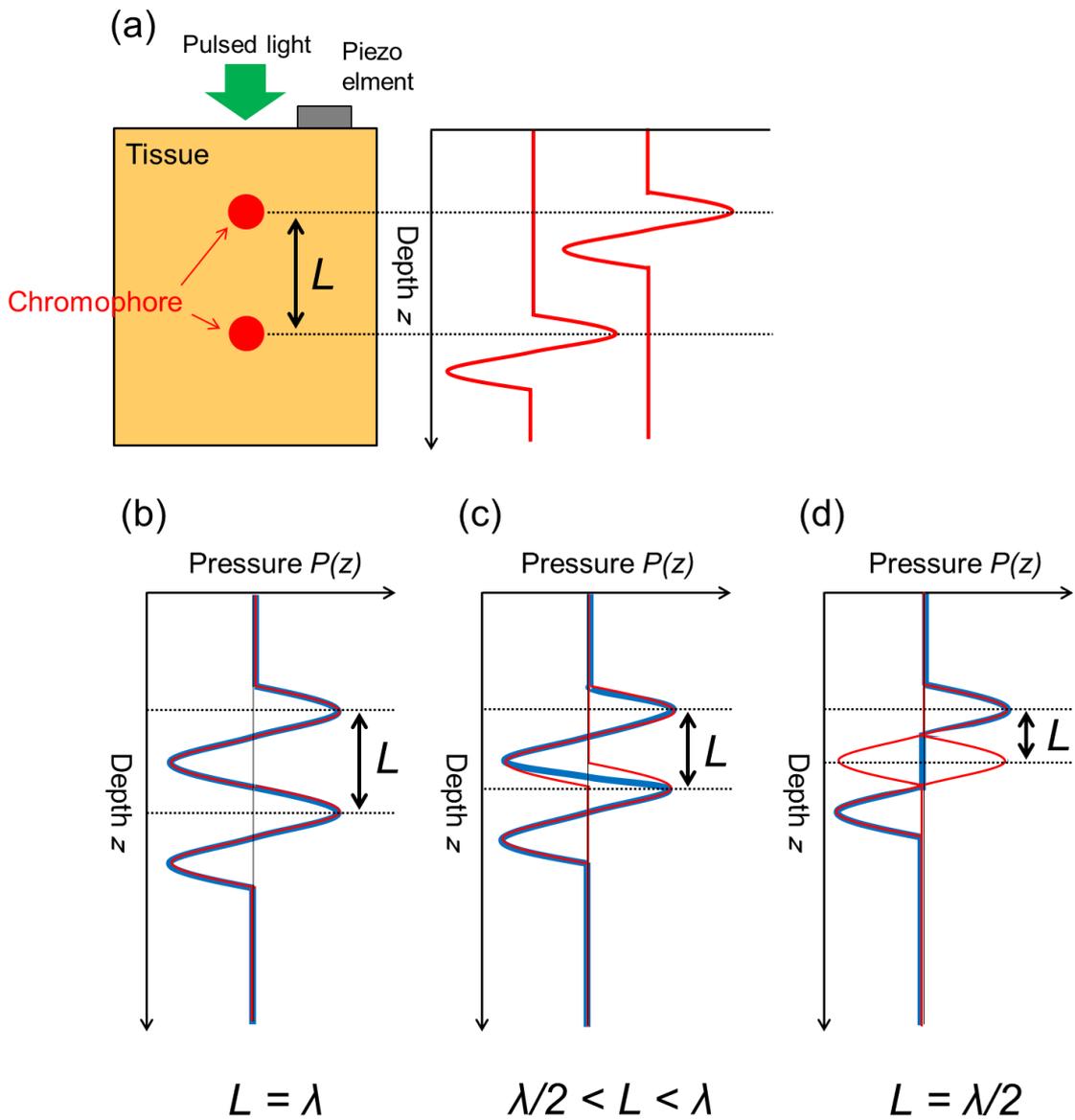


Fig. 2-3 Schematics to explain the axial resolution of PA imaging. (a) Two chromophores located at different depths on the same vertical line in tissue and the corresponding PA signals.  $L$  is the axial distance between two chromophores. (b-d) Superpositions of two PA signals: (b)  $L = \lambda$ , (c)  $\lambda/2 < L < \lambda$  and (d)  $L = \lambda/2$ , where  $\lambda$  is the wavelength of each PA wave.

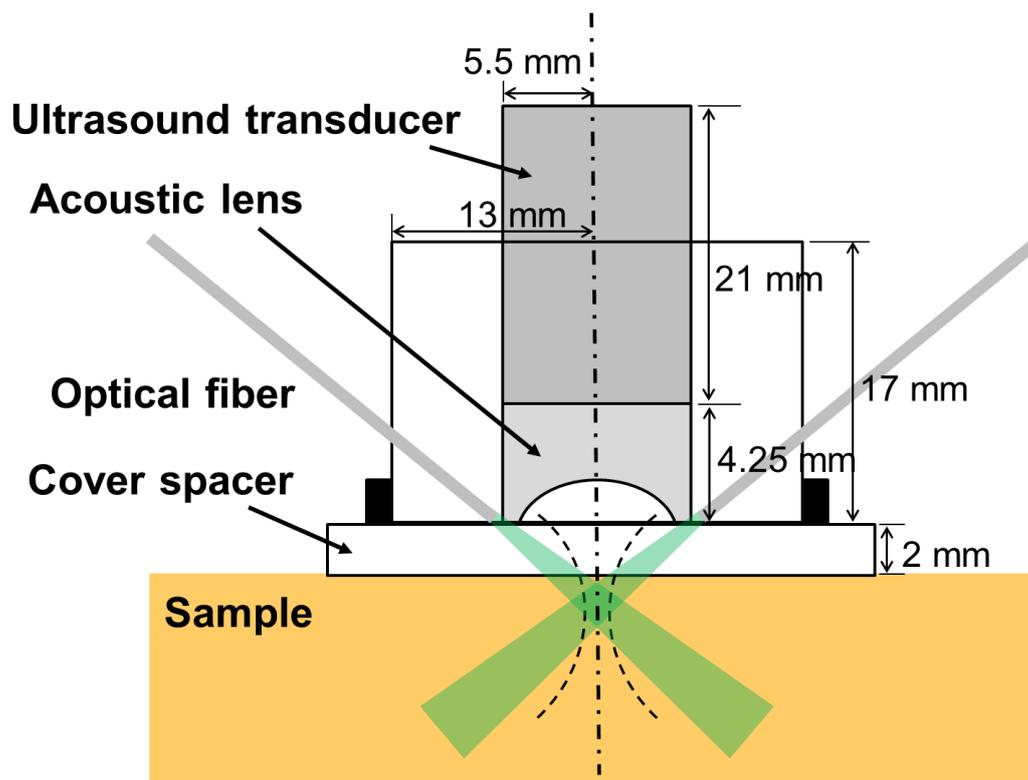


Fig. 2-4 Structure of the fiber-illumination based PA imaging sensor head.

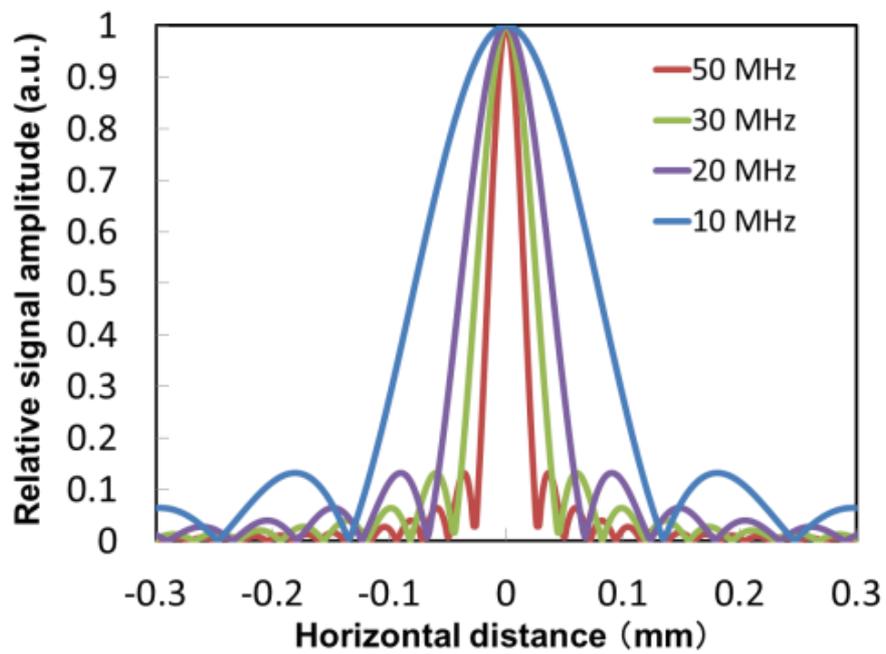


Fig. 2-5 Distributions of the received acoustic signals on the focal plane of the acoustic lens used in this study (diameter, 9.1 mm; focal length, 6.7 mm) for various center frequencies.

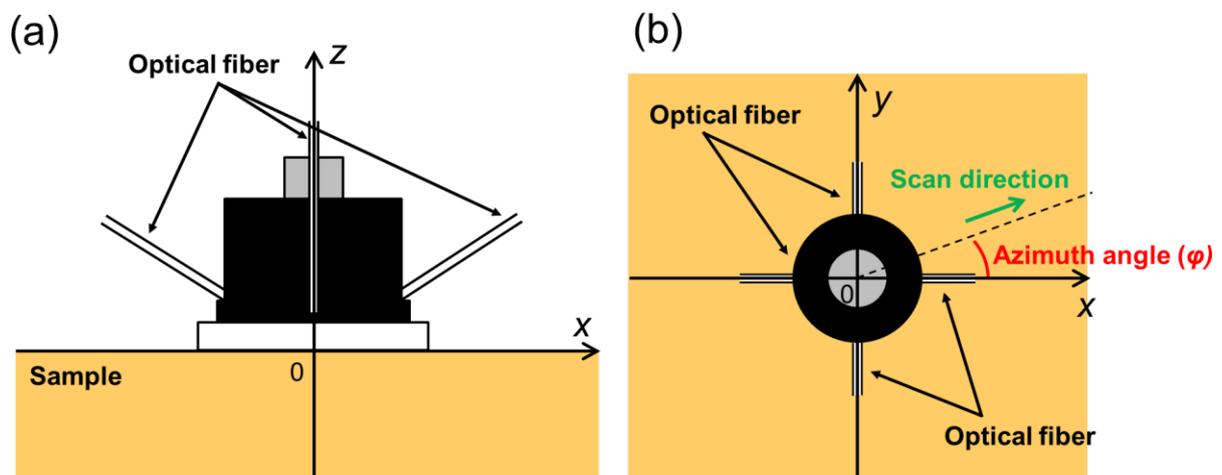


Fig. 2-6 Schematics of the sensor head and coordinate system for Monte Carlo simulation (MCS): (a) side view and (b) top view [22]. The photon distributions were calculated on the view plane with azimuth angles relative to the  $x$ -axis ( $\phi$ ) of 0, 30, 45 and 60 deg. Copyright (2014) The Japan Society of Applied Physics.

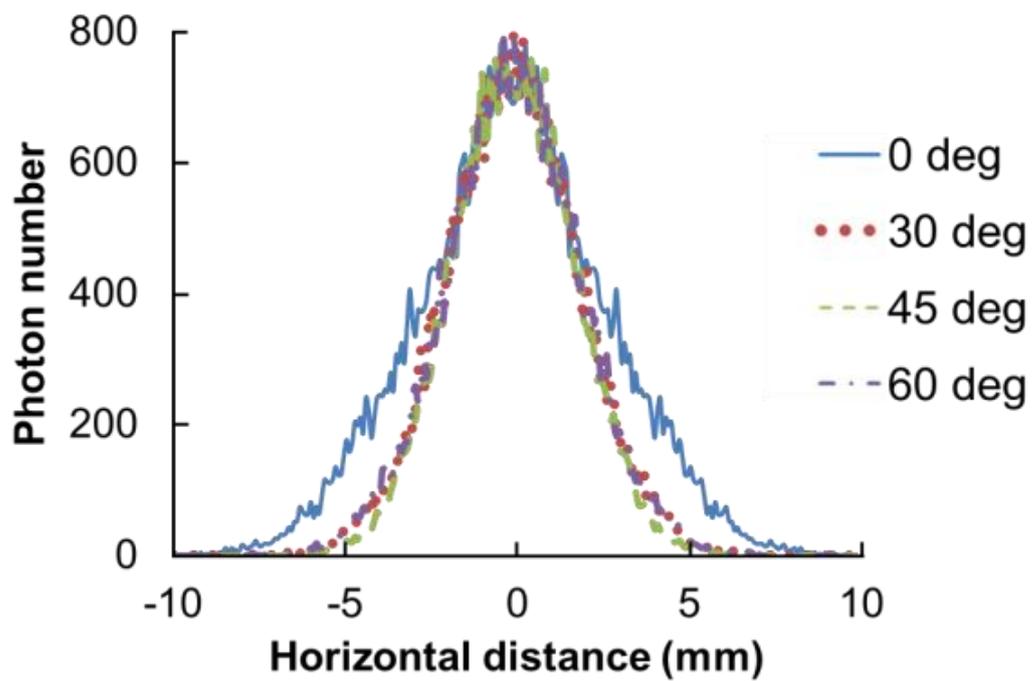


Fig. 2-7 Results of MCS of photon distributions at the depth of the focal point of the acoustic lens on view planes with  $\varphi=0, 30, 45$  and  $60$  deg [22]. Copyright (2014) The Japan Society of Applied Physics.

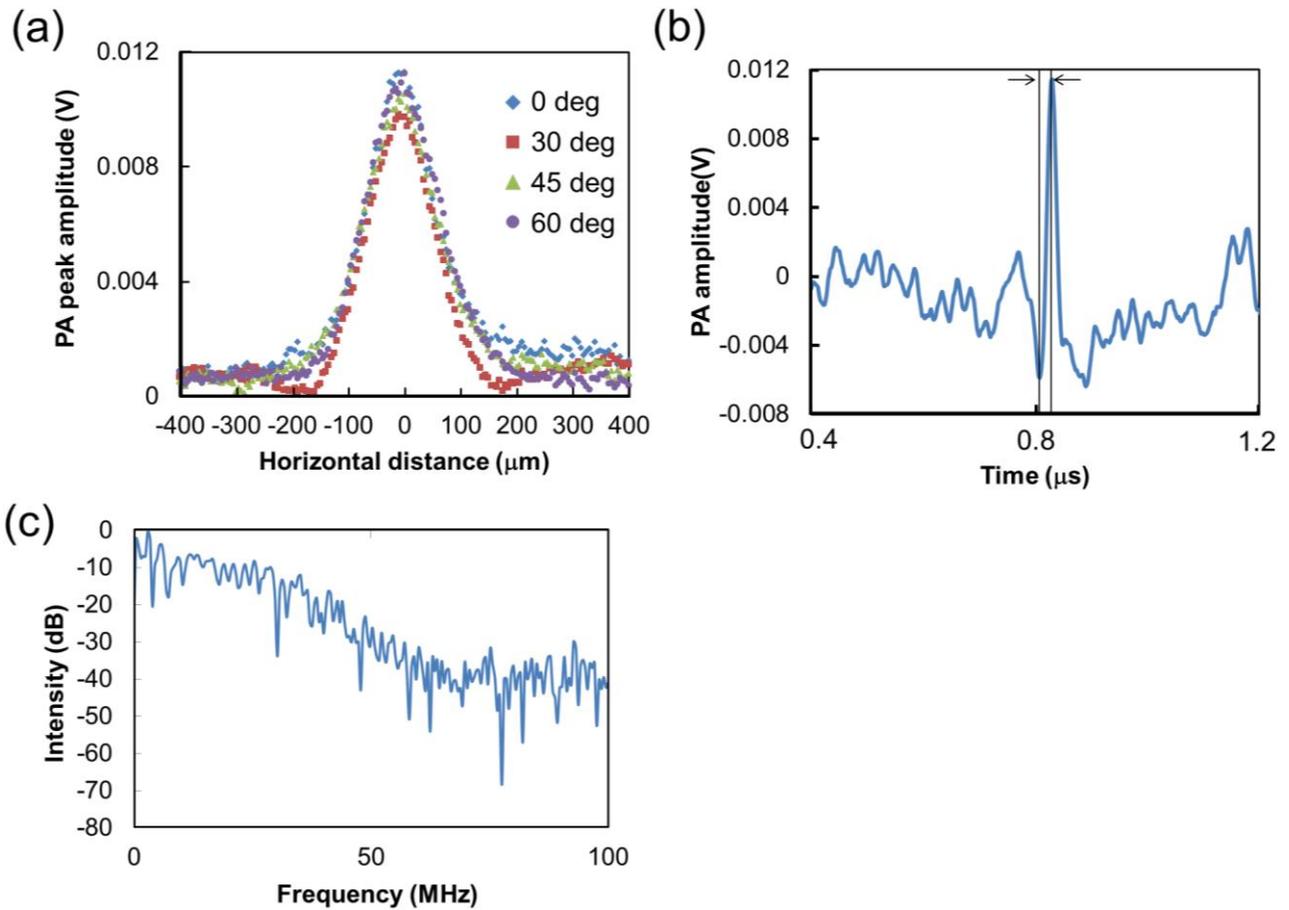


Fig. 2-8 Spatial resolution and its dependence on the scan direction of the imaging system [22]. (a) Lateral distributions of the peak amplitude of PA signals originating from a 7- $\mu\text{m}$  diameter carbon fiber for azimuth angles  $\varphi$  of 0, 30, 45 and 60 deg. (b) Temporal waveform of the PA signal originating from a carbon fiber located under the center of the sensor head for  $\varphi=0$  deg. (c) Frequency spectrum of the PA signal shown in (b). (a) and (b) are reproduced from Jpn. J. Appl. Phys. Vol. 53, No. 12, pp. 126701/1-6, November 2014. Copyright (2014) The Japan Society of Applied Physics.

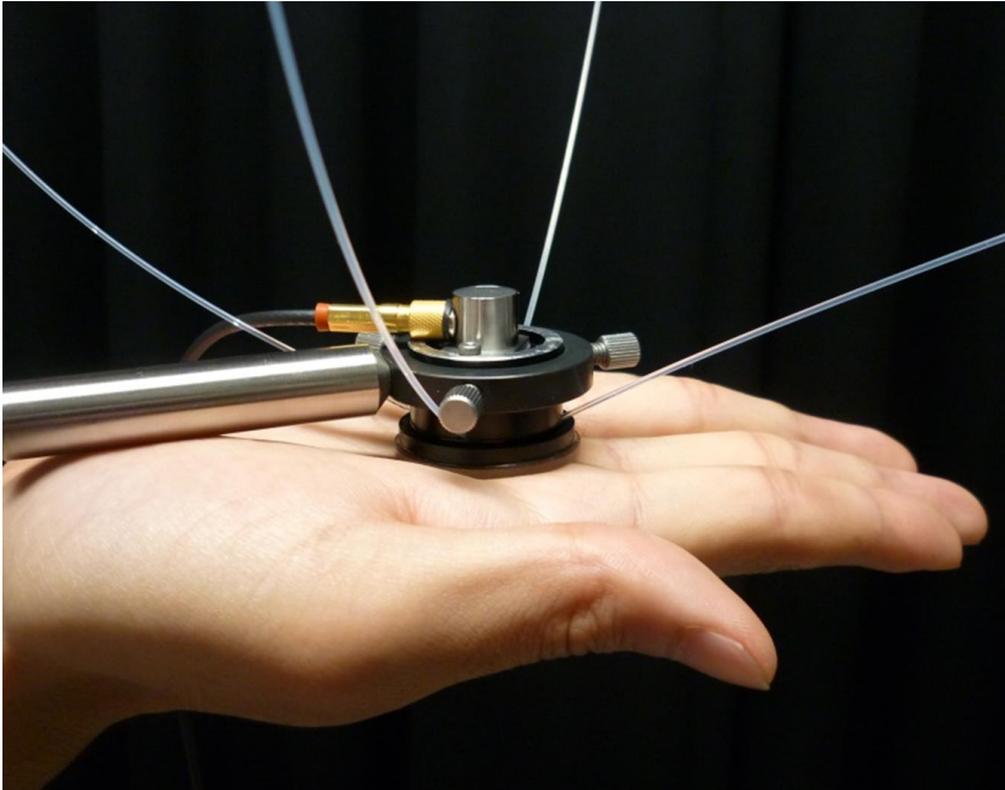


Fig. 2-9 Photograph of the PA imaging sensor head [22]. Copyright (2014) The Japan Society of Applied Physics.

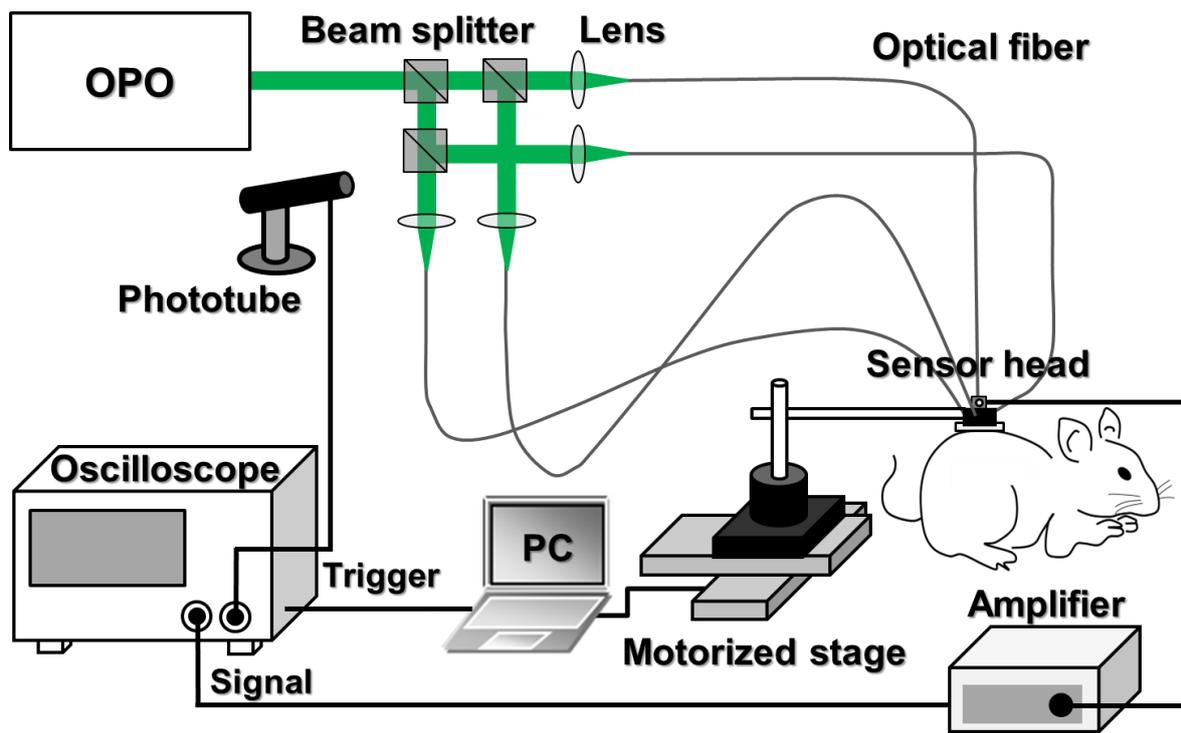


Fig. 2-10 Diagram of the PA imaging system [22]. Copyright (2014) The Japan Society of Applied Physics.

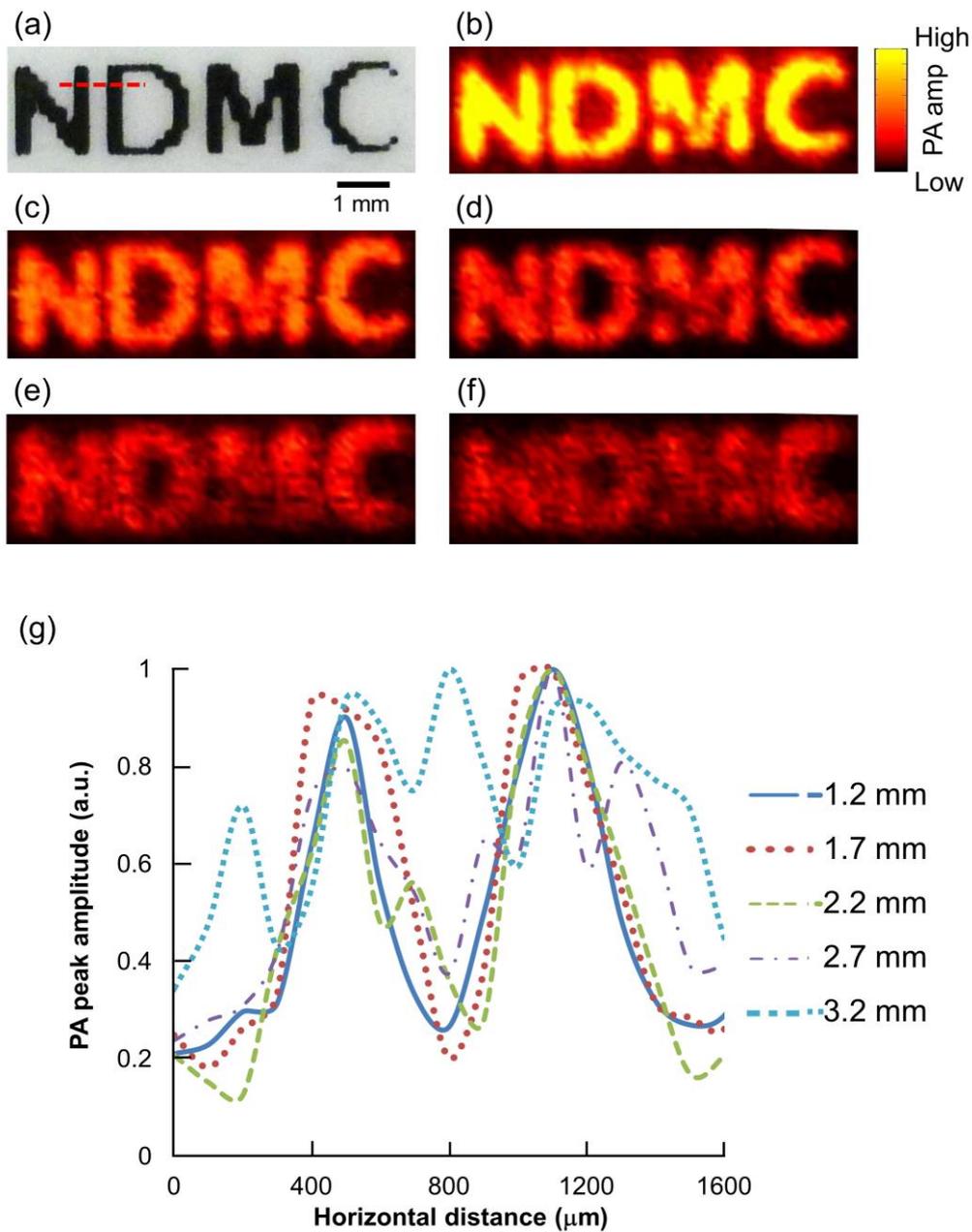


Fig. 2-11 Focusing characteristics as a function of depth of the imaging system [22]. (a) Stereomicroscopic image of the letters “NDMC” on a laminated tape. (b-f) maximum amplitude projection (MAP) PA images ( $2.5 \times 7.5 \text{ mm}^2$ ) of the letters placed at the depths of (b) 1.2 mm, (c) 1.7 mm, (d) 2.2 mm, (e) 2.7 mm and (f) 3.2 mm below the bottom surface of the sensor head in a 2% Intralipid solution. (g) Lateral distributions of the PA peak amplitudes measured on the scan line shown by a red broken line in (a) at different depths. Copyright (2014) The Japan Society of Applied Physics.

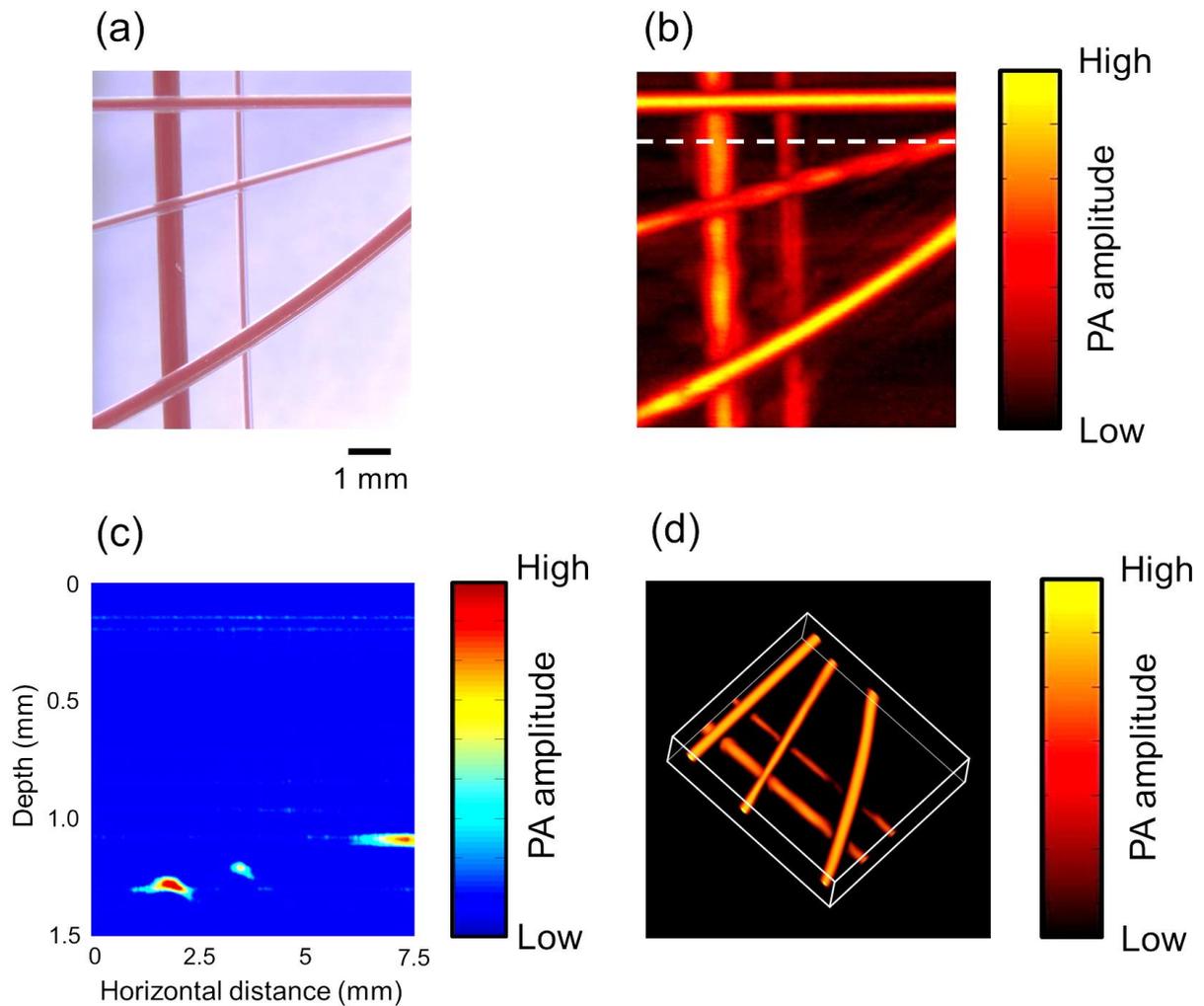


Fig. 2-12 Results of PA imaging of the phantom mimicking different diameter blood vessels (Teflon tubes filled with rat blood) in a 2% Intralipid solution [22]. (a) Stereomicroscopic image (without Intralipid solution) and (b) MAP PA image ( $7.5 \times 8.5 \text{ mm}^2$ ) of the phantom. (c) PA tomogram ( $7.5 \times 1.5 \text{ mm}^2$ ) corresponding to the scan line shown by a white broken line in (b). (d) 3D PA image ( $7.5 \times 8.5 \times 2.4 \text{ mm}^3$ ). (a), (b) and (d) are reproduced from *Jpn. J. Appl. Phys.* Vol. 53, No. 12, pp. 126701/1-6, November 2014. Copyright (2014) The Japan Society of Applied Physics.

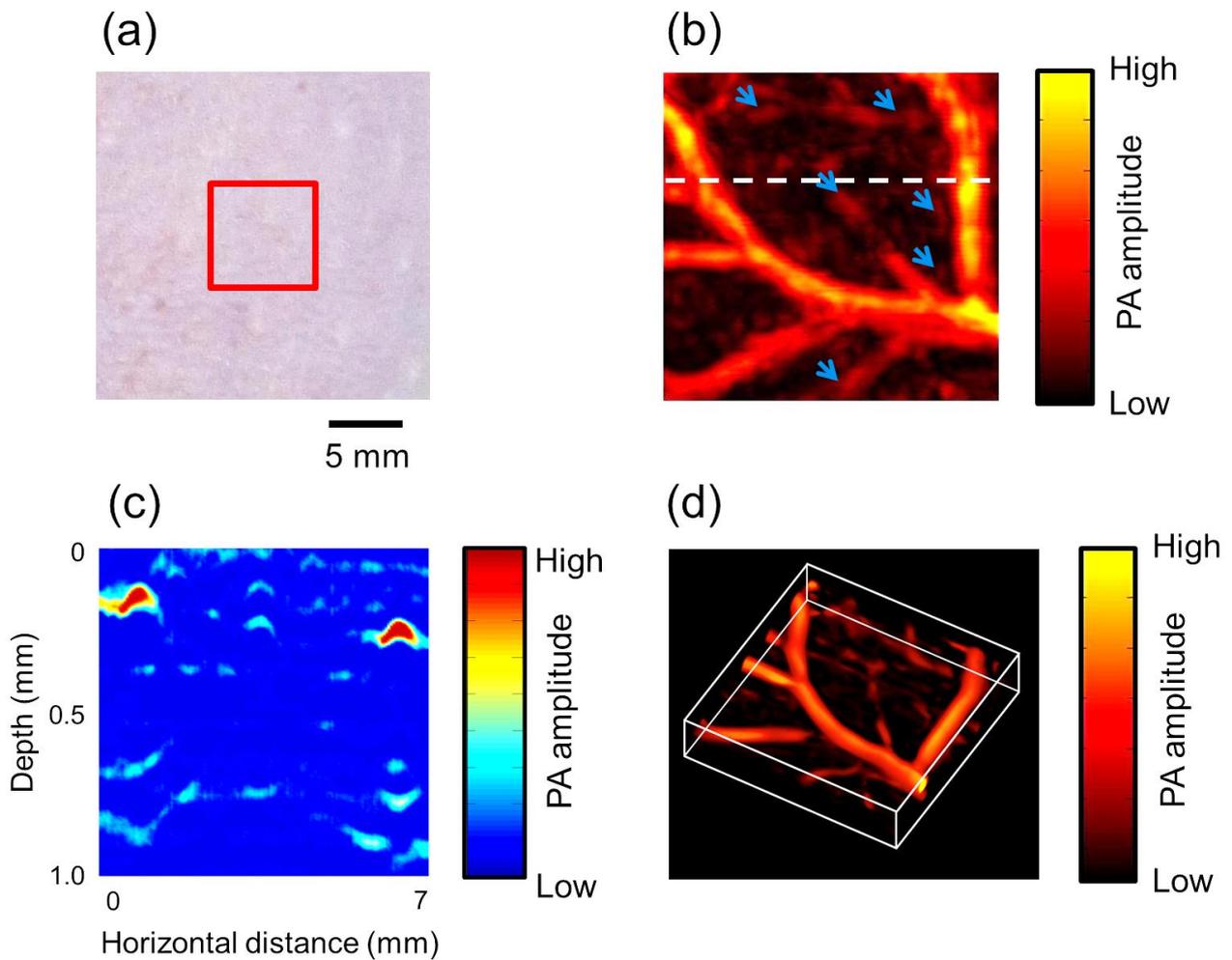


Fig. 2-13 Results of *in vivo* PA imaging of blood vessels in the rat abdominal skin [22]. (a) White-light photograph and (b) MAP PA image of the rat skin; a red frame in (a) indicates the region of interest (ROI) for PA imaging ( $7.0 \times 7.0 \text{ mm}^2$ ). Blue arrows indicate blood vessels with diameters of a few hundred micrometers. (c) PA tomogram ( $7.0 \times 1.0 \text{ mm}^2$ ) corresponding to the scan line shown by a white broken line in (b). (d) 3D PA image ( $7.0 \times 7.0 \times 1.5 \text{ mm}^3$ ). (a), (b) and (d) are reproduced from Jpn. J. Appl. Phys. Vol. 53, No. 12, pp. 126701/1-6, November 2014. Copyright (2014) The Japan Society of Applied Physics.

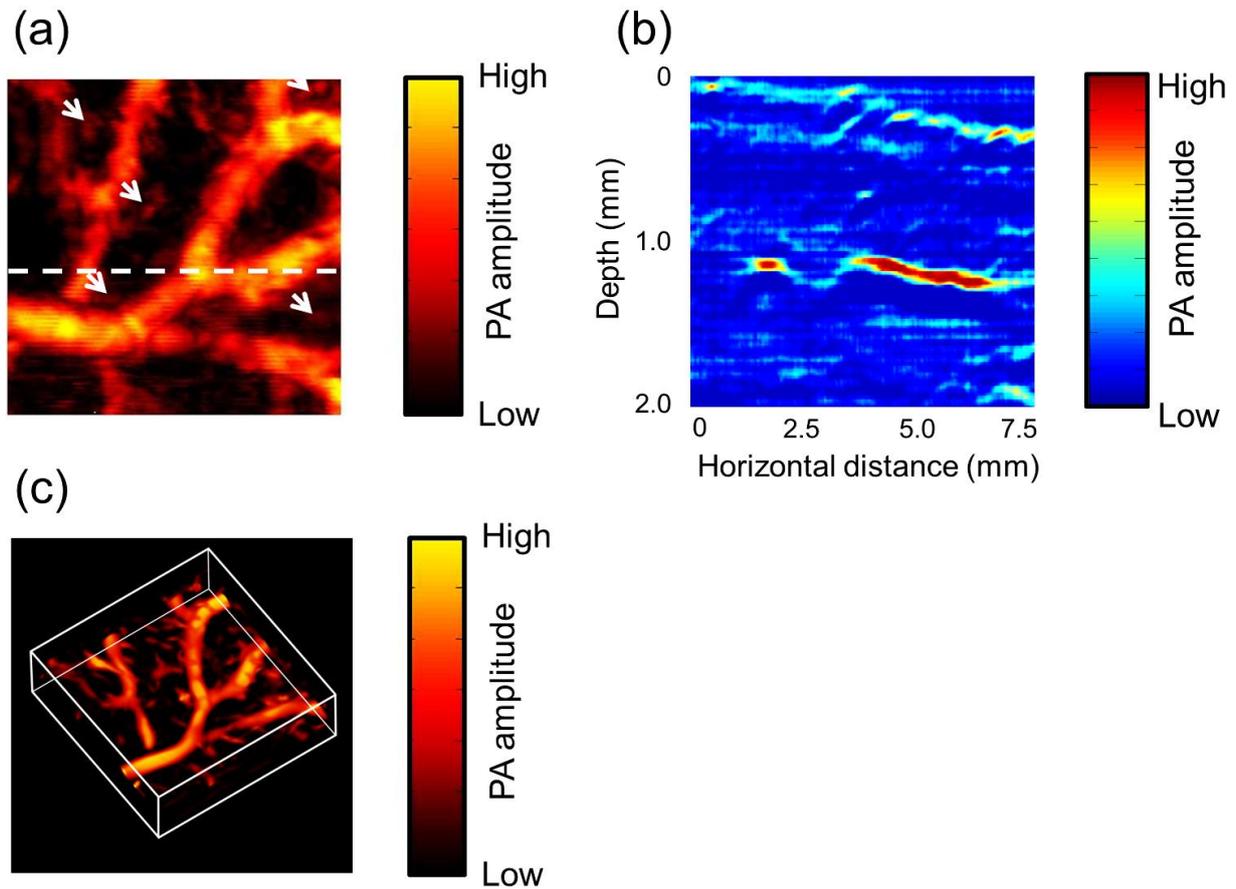


Fig. 2-14 Results of *in vivo* PA imaging of blood vessels in the rat dorsal skin [22]. (a) MAP PA image ( $7.5 \times 7.5 \text{ mm}^2$ ) of the rat skin. White arrows indicate low-level distributed PA signals, which would have originated from vessels with smaller diameters such as capillaries. (b) PA tomogram ( $7.0 \times 2.0 \text{ mm}^2$ ) corresponding to the scan line shown by a white broken line in (b). (c) 3D PA image ( $7.5 \times 7.5 \times 2.4 \text{ mm}^3$ ). (a) and (c) are reproduced from Jpn. J. Appl. Phys. Vol. 53, No. 12, pp. 126701/1-6, November 2014. Copyright (2014) The Japan Society of Applied Physics.

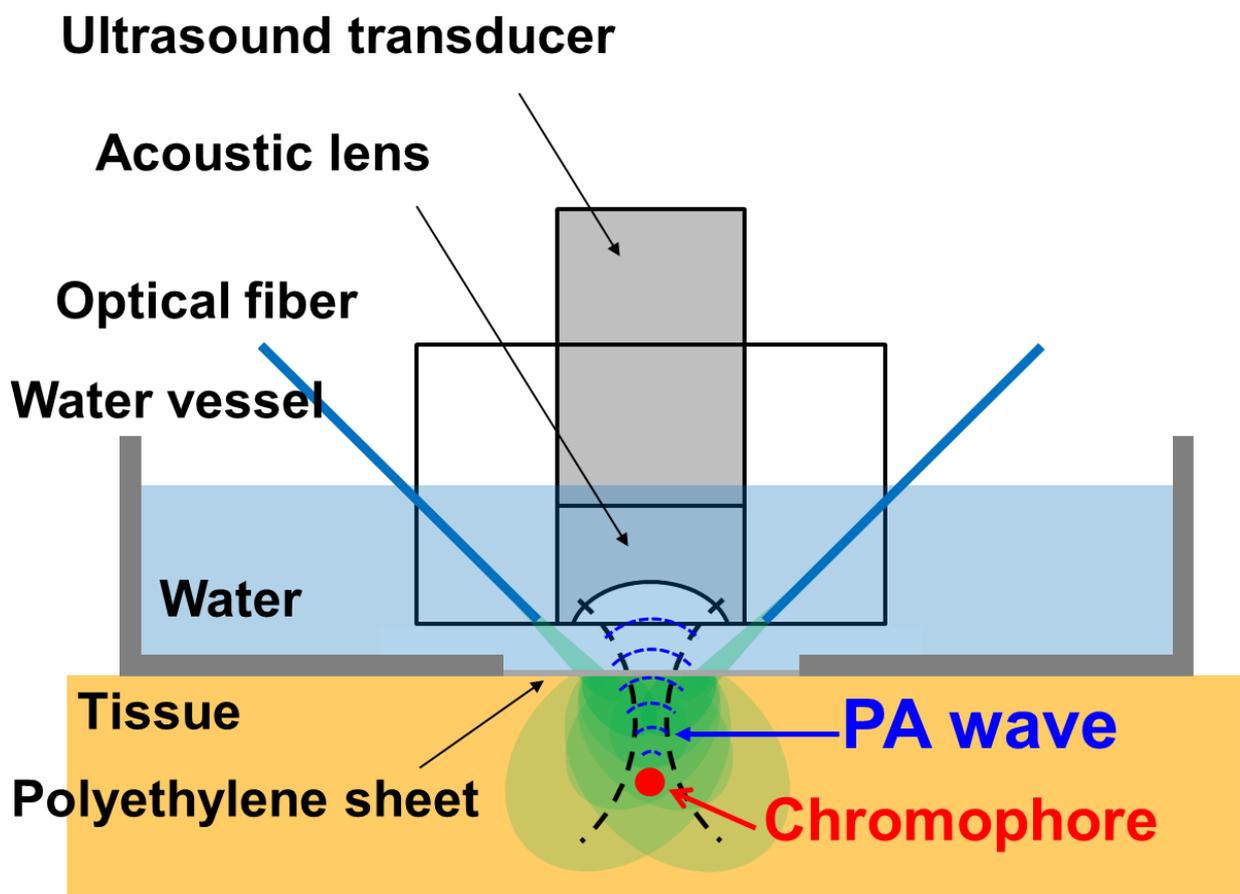


Fig. 2-15 Structure of the PA imaging sensor head.

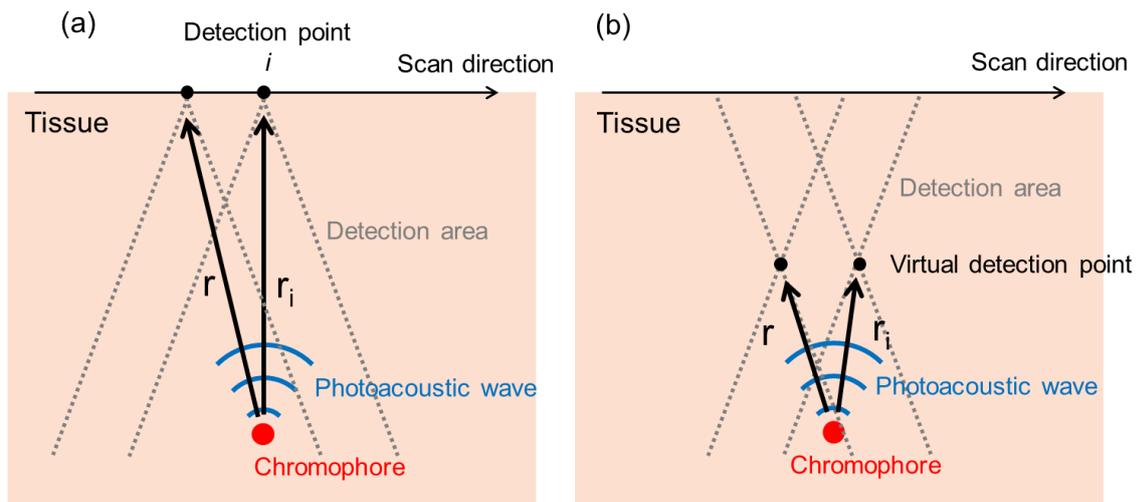


Fig. 2-16 Schematics of SAFT processing for PA imaging using (a) unfocused and (b) focused transducer, where  $i$  is a detection point for PA signal, and  $r_i$  and  $r$  are a propagation distance from a chromophore to the detection point  $i$  and that from the chromophore to the point adjacent to the point  $i$ , respectively.

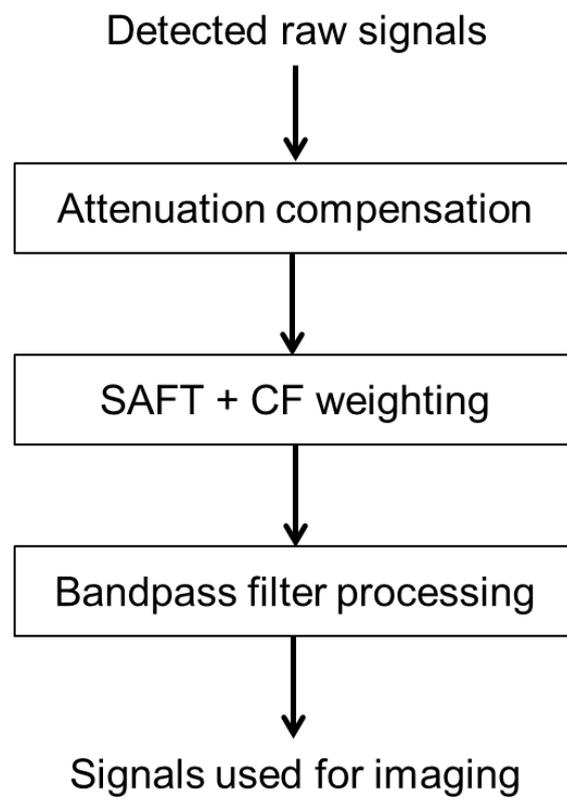


Fig. 2-17 Flow diagram of the signal processing used in this study.

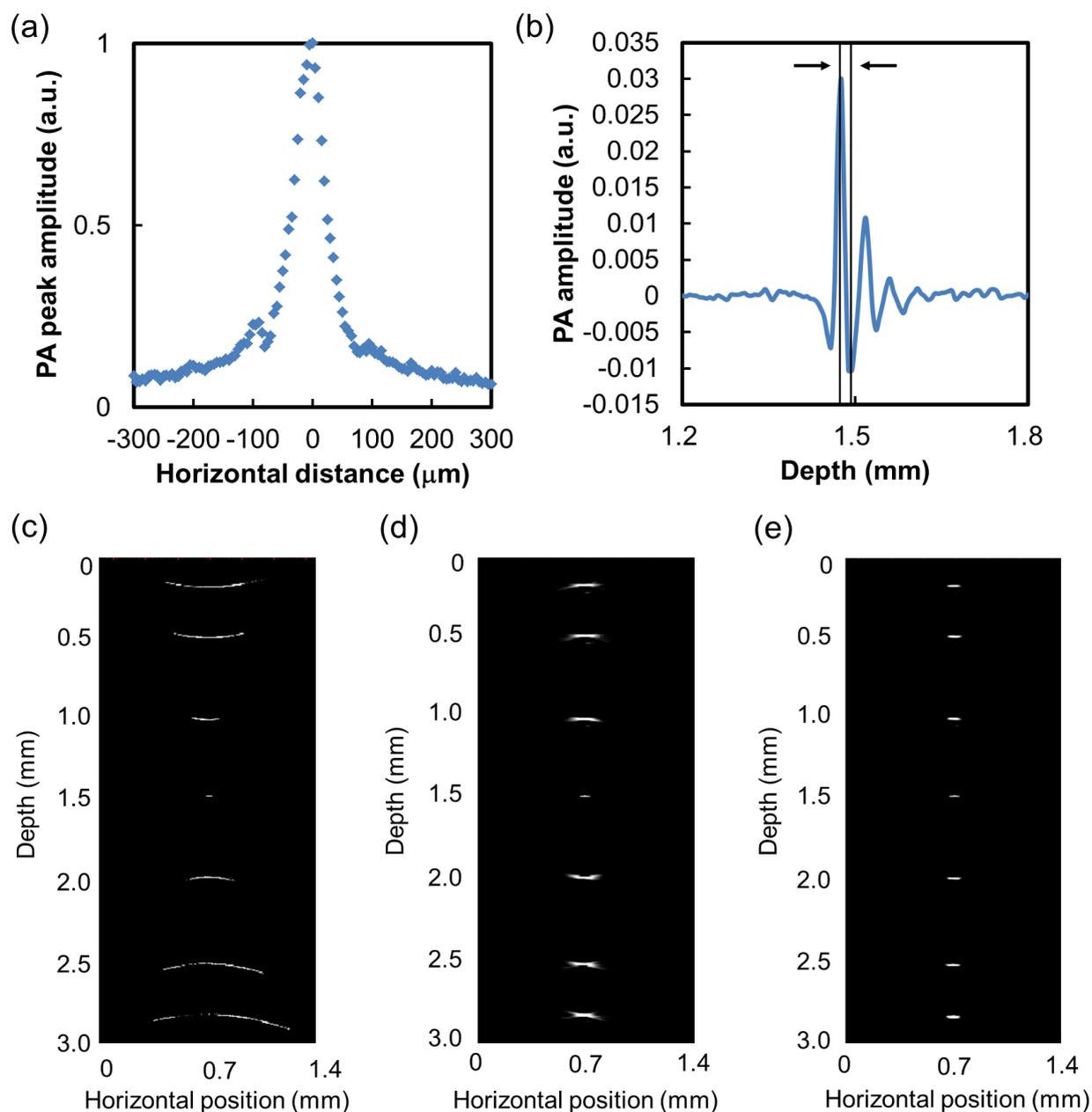


Fig. 2-18 (a) Lateral distribution of the peak amplitude of the PA signal originating from a 7- $\mu\text{m}$  diameter carbon fiber located at the depth of 1.5 mm. (b) Depth profile of the PA signal originating from the carbon fiber located under the center of the sensor head for the depth of 1.5 mm. (c-e) PA tomograms of the carbon fiber placed at various depths: (c) original and after applying (d) SAFT and (e) SAFT+CF weighting.

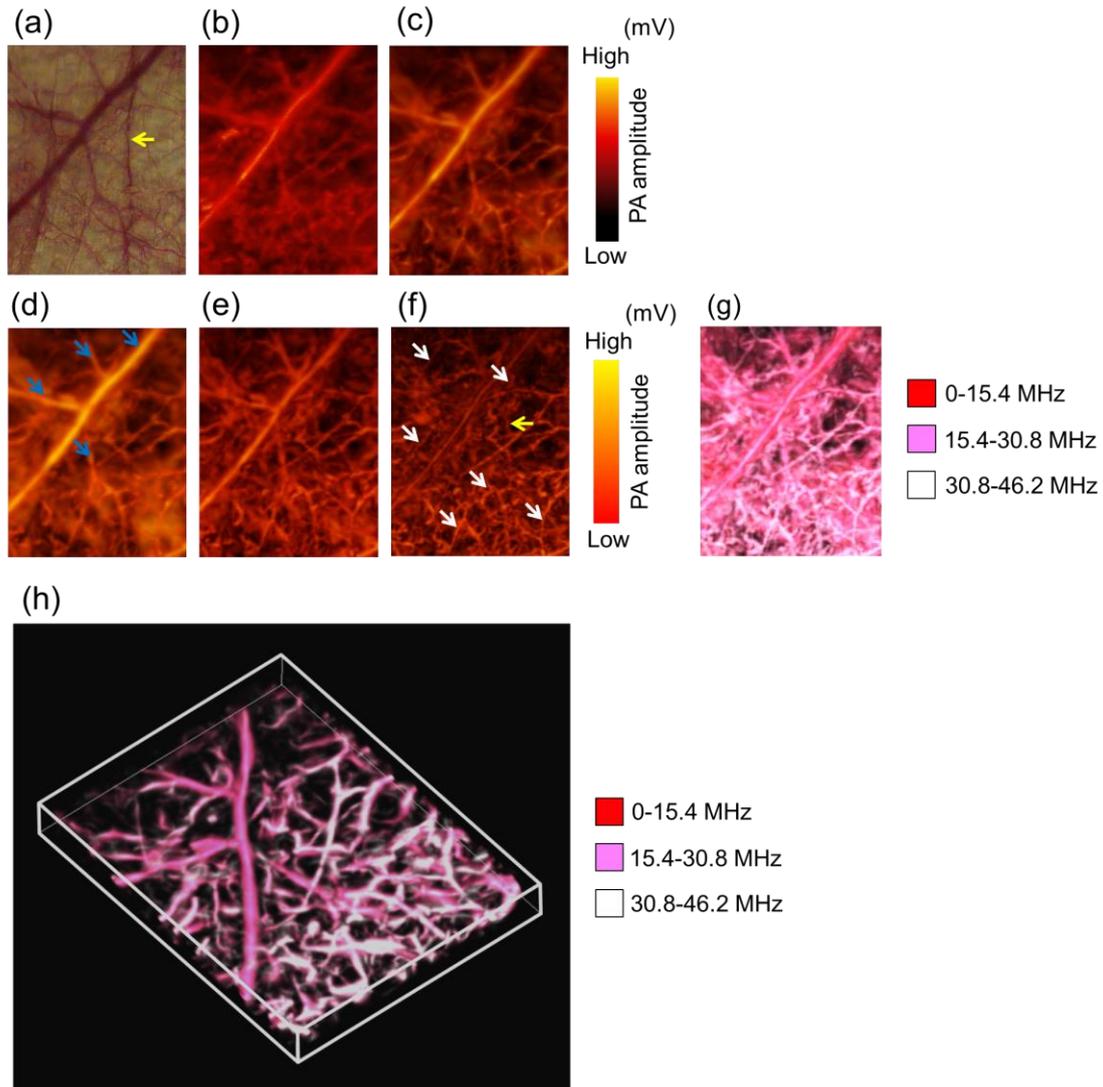


Fig. 2-19 Results of PA imaging of the rat excised abdominal skin. (a) White-light photograph of the excised skin taken from the back side. A yellow arrow indicates a blood vessel with relatively large diameter running in the longitudinal direction in the ROI. MAP PA images of the skin reconstructed (b) before and (c) after SAFT+CF weighting. (d-f) MAP PA images of the skin in the frequency band of (d) 0-15.4, (e) 15.4-30.8 and (f) 30.8-46.2 MHz. Blue arrows in (d) indicate large-diameter blood vessels, which were emphasized in this image. White arrows in (f) indicate small-diameter blood vessels, which were clearly visualized in the image in the frequency band of 30.8-46.2 MHz. A yellow arrow in (f) indicates the same blood vessel as that shown by the yellow arrow in (a), which was most clearly visualized in this image. (g) Merged MAP image and (h) 3D PA image of (d) in red, (e) in pink and (f) in white. Volume for the 3D PA image was  $5.0 \times 6.4 \times 0.8 \text{ mm}^3$ .

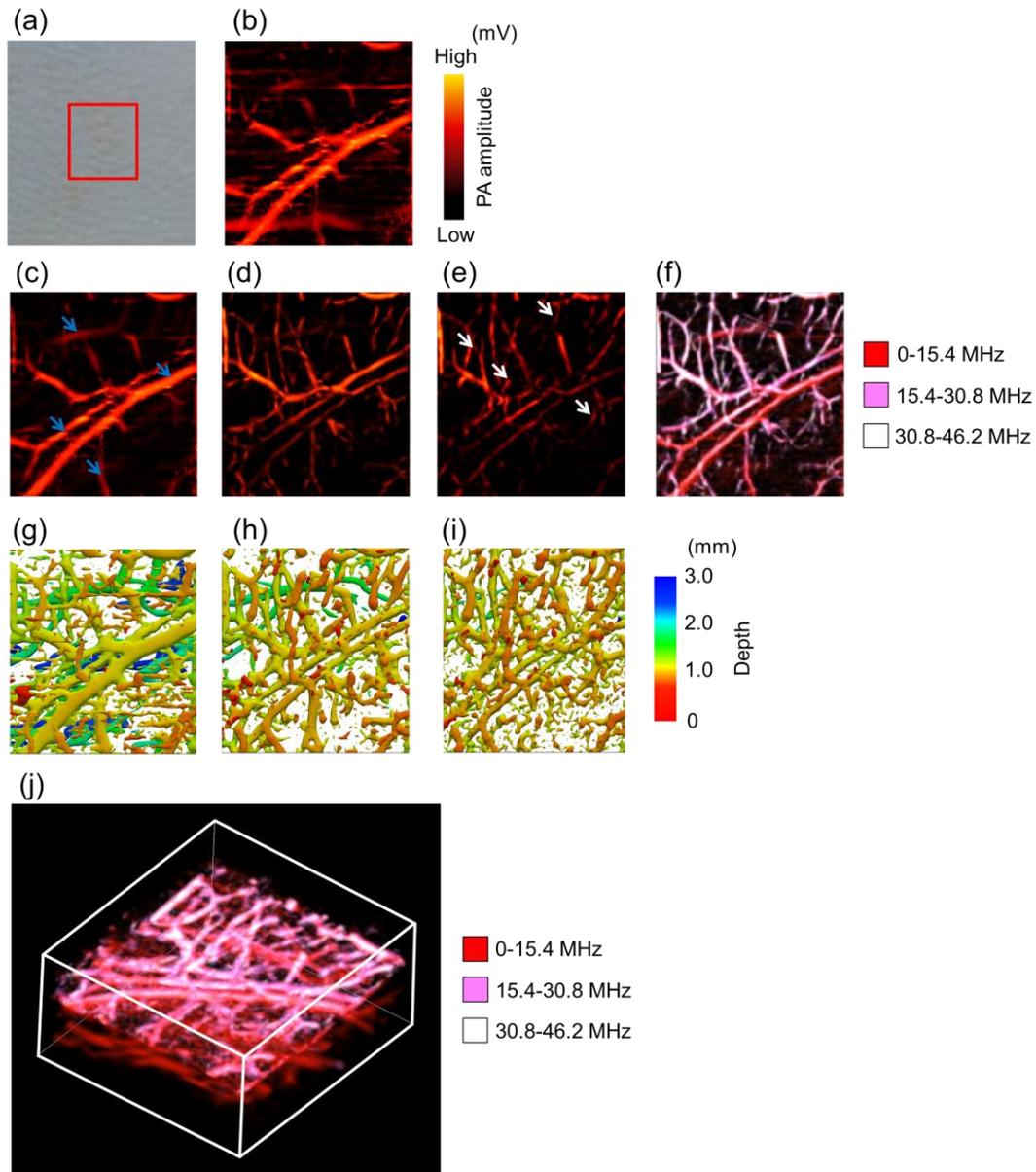


Fig. 2-20 Results of *in vivo* PA imaging of the rat dorsal skin and subcutaneous tissue. (a) White-light photograph of the skin. A red frame indicates the ROI for PA imaging. (b) SAFT+CF weighted MAP PA image. (c-e) MAP PA images in the frequency band of (c) 0-15.4, (d) 15.4-30.8 and (e) 30.8-46.2 MHz. Blue arrows in (c) indicate large-diameter blood vessels, which were emphasized in the image in the frequency band of 0-15.4 MHz. White arrows in (e) indicate small-diameter blood vessels, which were most clearly visualized in this image. (f) Merged MAP PA image of (c) in red, (d) in pink and (e) in white. (g-i) Depth encoded PA images of (c-e), respectively. (j) 3D merged PA image of (c-e). Volume for the 3D PA image was  $6.0 \times 6.6 \times 3.0 \text{ mm}^3$ .

## 第3章

# 光音響イメージング法によるアルブミンと 生分解性ナノ薬剤の動態観測

### 3.1 はじめに

本研究の目的である薬剤の輸送とその動態観測のための診断・治療一体型システムの開発に向け、第2章では薬剤の輸送経路である血管、具体的には細動脈や細静脈などの微小血管系の構造を *in vivo* で画像化可能な小型・軽量なファイバ照射型音響学的分解能光音響イメージング装置の開発について述べた。本章では、本装置により血管から漏出して組織中に移行した薬剤の動態を観測可能であるかどうか、またその有用性に関して検討した結果について述べる。まず、血中の主要な血漿蛋白であるアルブミンと結合したエバンスブルー (Evans Blue, EB) のイメージング結果について述べる (3.2 節)。アルブミンは血中における薬剤の運搬機能を有する血漿蛋白であるため、アルブミンと結合した EB の光音響イメージングを達成することで、本システムにより同様に光吸収を持つ薬剤を幅広く観測可能であることを示す。ここでは、アルブミン漏出モデルとしてラット熱傷皮膚を対象とした。続いて、光音響イメージング法の造影剤および光線力学的治療 (photodynamic therapy, PDT) の光感受性薬剤として機能することが期待されるインドシアニンググリーン (Indocyanine Green, ICG) 内包生分解性ナノ粒子 (ICG ラクトソーム) (島津製作所社製) を用いた実験の結果について述べる (3.3 節)。ICG ラクトソームは生分解性ポリマーから成る生体への安全性の高いナノ薬剤であり、また 1.7 節で述べたような診断・治療一体型の薬剤として機能するため、これを用いた高効率かつ安全な治療の実現が期待できる。EPR (enhanced permeability and retention) 効果によりマウス皮下腫瘍へ輸送された本薬剤により同部位の光音響イメージングと PDT を行い、これら診断と治療を一体化させることの有用性を検討した。

### 3.2 熱傷皮膚中のアルブミンの光音響イメージング

本節では、まずアルブミンに関して、薬剤輸送の観点からその特性や機能について概説する。次いで、本実験でアルブミン漏出モデルのために扱う熱傷について、アルブミンと関連の深い体液動態を中心に病態を概説する。そして、EB を造影剤としてラット熱傷皮膚中のアルブミンを光音響イメージングした実験について述べる。

#### 3.2.1 アルブミン

生体に投与されて血中へ移行した薬剤は、種類により程度に差はあるものの、一定の割

合で血漿蛋白と結合して全身を循環する。この結合は可逆的であり，非結合型の薬剤分子のみが生体膜を透過し，組織へ輸送されて薬理効果を発揮することができる[1]。一方，結合型の薬剤は，非結合型の薬剤が消費されるとその分だけ遊離し，薬理効果を持つようになる。アルブミンは585個のアミノ酸残基から成る分子量約66,500の蛋白質である。血漿蛋白としてヒトの血液中に最も多く含まれ，生体内で恒常性の維持に必要な膠質浸透圧を調整する。また薬剤を含む様々な物質を血中で運搬する機能を有し，様々な種類の血漿蛋白がある中で，最も多くの薬物との親和性を持つことが知られている[1]。このように，アルブミンは生体内の薬剤の分布やその治療効果の発現などに関わり，薬剤輸送の観点からも極めて重要な分子である。

### 3.2.2 熱傷

熱傷とは熱による生体の損傷の総称であり，その範囲が狭く深度の小さい軽症であれば数日間で自然治癒するが，範囲が広く深度の大きい重症熱傷では大規模かつ急激な体液動態の変化が生じる。その主たる原因の一つが，受傷部およびその周辺部で生じる血管壁透過性亢進作用である。その機序は未だに不明な点も多いが，主に毛細血管への直接的な熱作用や，血小板や好中球などから放出される化学物質の作用によるものと考えられている[2]。熱傷受傷領域では血流の遮断ないし血管壁透過性亢進が生じ，血中の血漿成分（主に水と血漿蛋白）が細胞間質へ漏出して浮腫を形成し（Fig. 3-1 (a)），広範囲熱傷では血中の血漿成分が多量に損失されることで循環血液量が急激に減少し，重篤なショック状態に陥ることがある。この期間をショック期と呼ぶ。熱傷受傷から一定時間経過後，血管壁透過性は徐々に正常化することで減少していた心拍出量も元に戻り，ショック状態を離脱し，以降は一転して代謝亢進状態により心拍出量が正常の倍近くに増加する[2]。このとき，血管壁透過性が正常化した後も浮腫として組織中に残存していた血漿成分が急速に血管内に再分布し始める現象（リフィリング）が起き（Fig. 3-1 (b)），余分な水分は尿として体外に排出される。この期間を利尿期と呼ぶ。以上のように，重症熱傷後の体液動態の変動に伴い，組織中のアルブミン分布も変化する。しかし，著者の知る限り，これまでにアルブミンを *in vivo* で計測ないし観測可能な技術は確立されておらず，その動態について詳細は明らかになっていない。

### 3.2.3 ラット熱傷皮膚中のアルブミン動態の長期的な超音響イメージング

本実験では、上述した熱傷の受傷に伴うアルブミンの組織への移行とその後の動態変化を利用し、血中でアルブミンと強固に結合する EB を造影剤としてラット熱傷モデルに投与し、皮膚組織中のその動態を超音響イメージング法により観測した。EB は分子量 960.8 の低毒性のアゾ色素であり、波長 610 nm に大きな吸収ピークを有し (Fig. 3-2)[3]、超音響イメージングではこれまでにマウス脳の血流動態の評価や耳の毛細血管のイメージングなどのために使用されている[4,5]。

まず、本実験で使用したラット熱傷モデルにおいて、受傷後の皮膚組織中のアルブミンがどのような時間的・空間的な挙動を取るかを明らかにするために、熱傷部、非熱傷部、その境界部の 3 領域を含む広い関心領域 ( $8 \times 8 \text{ mm}^2$ ) でアルブミンの動態を長期的 (~144 時間) に観測した結果について述べる。ここでは、熱傷受傷後に組織中で時々刻々変動するアルブミンの動態を広範囲で素早くイメージングするために、分解能を犠牲にしたセンサーを 1 mm 間隔で走査して超音響画像を作成した。ここで得られた結果をもとに、次にアルブミンが血管から盛んに漏出する受傷早期 (~24 時間) に焦点をあて、組織中の血管とアルブミンの深さ分布を高分解能で観測し、それらの関係を明らかにした。ここでは、2.4 節で述べた皮膚の簡便な *in vivo* イメージングのためのファイバ照射型音響学的分解能超音響イメージング装置を使用した。

### 3.2.3.1 実験方法

ペントバルビタールナトリウム 50 mg/kg animal weight の腹腔内注射による麻酔下において、SD ラット(日本エスエルシー、オス、9 週齢、体重 270 - 320 g)背部を剃毛し、脱毛クリームを塗布して体毛を除去した。Walker-Mason 法[6]に基づきラット背部に総体表面積の約 20% の深 II 度熱傷 (損傷が真皮深部に達する熱傷) を作製した。熱傷作製から 30 分後に造影剤として EB 生理食塩水溶液をラット尾静脈から 5 mg/kg animal weight で投与した。この投与量では、EB の分子はすべて血中のアルブミンと結合するものと見なすことができる [7]。

本実験では時々刻々と変化するアルブミン動態を広範囲 ( $8 \times 8 \text{ mm}^2$ ) で観測するために、同領域を素早くイメージングする必要がある。また、観測対象は組織中で連続的に分布するアルブミンであるため、微小血管のイメージングのような高空間分解能性は求められない。そこで、ここでは計測点を減らして迅速にイメージングをするために、Fig. 3-3 に示す集束型の P(VDF/TrFE) フィルム圧電素子 (直径 5.5 mm, 中心周波数 30 MHz) から成る横方向分解能が約 1.4 mm の超音波センサーを使用し、関心領域 ( $8 \times 8 \text{ mm}^2$ ) を 1 mm 間隔で走

査し、全 81 点の光音響信号を 10 分以内を取得した。本センサーは、中央の差し込み用の孔にファイバを通し、励起光を組織へ同軸照射する機構である。Fig. 3-4 は実験装置のブロック図である。光音響波の励起用光源として繰り返し周波数 30 Hz の OPO (パルス幅 6 ns, 繰り返し周波数 30 Hz, M-OPO710, Spectra Physics) を使用した。本実験では、皮膚中の EB 結合アルブミンの動態変化を高感度に捉えることを目的に、EB の吸収ピークである 610 nm を励起波長とし (Fig. 3-2), 出力パルス光を石英光ファイバ (コア径 0.6 mm, 開口数 0.37) に結合した。イメージングのためのその他の実験装置は 2.4 節および 2.5 節と同様である。

アルブミンの光音響イメージングは、熱傷受傷前および受傷後 2 時間から 144 時間まで経時的に実施した。ラット背部皮膚の関心領域  $8 \times 8 \text{ mm}^2$  は、熱傷部位と隣接する非熱傷部位を  $4 \times 8 \text{ mm}^2$  ずつ含まれるようにした。Fig. 3-5 に受傷 72 時間後の関心領域の明視野像を示す。1-9 番の破線は走査線を示し、5 番の走査線が熱傷-非熱傷部の境界部に位置する。関心領域は非熱傷部 (走査線 1-3 番)、境界部 (走査線 4-6 番) および熱傷領部 (走査線 7-9 番) の 3 つの領域に分類して評価した。

また、光音響イメージング法によるアルブミンの動態観測の結果と尿量との関係について明らかにした。3.2.2 項より、尿量の急増は浮腫が血管への再分布するリフィリングの到来を反映する指標となり、現在の臨床現場でも熱傷患者を対象に計測されるパラメータである。同熱傷ラットモデルを採尿ケージ (Diuresis cage; テクニプラスト社製) 内で飼育し、熱傷受傷前から受傷 144 時間後まで、24 時間おきに尿量を測定した。

さらに、アルブミンとともに血漿の主成分である水の動態を評価するために、皮膚含有水分量を計測した。生検した組織サンプルを乾燥させ、乾燥前後の質量の比から元の組織に含まれていた水分量を算出した [8-10]。熱傷受傷前および作製後 2, 6, 24, 48, 72, 96, 144 時間後に同ラットモデルの皮膚全層を上述の 3 領域でそれぞれ直径 3 mm で生検し、組織の重量を計測後、60°C の乾燥機に 24 時間放置した。乾燥後に再び組織の重さを測り、元の組織の含有水分量を算出した。

### 3.2.3.2 実験結果と考察

Fig. 3-6 は Fig. 3-5 に示した各部 (点 X, 点 Y, 点 Z) において経時的に取得した光音響信号の深さプロファイルである。点 X (非熱傷部) ではどの計測時間においても EB 結合アルブミン由来の光音響信号はほとんど得られなかった。これは、同部位では浮腫が形成されなかったことを示している。このことは受傷 72 時間後に、同部位が EB の青色を示さなかったことと一致する (Fig. 3-5)。一方、点 Y (境界部) と点 Z (熱傷部) では受傷 2 時間後から

超音響信号が現れ、受傷 72 時間後までその振幅は時間の経過に伴い増大し続け、各部位における EB 結合アルブミンの時間依存的な集積が示された。点 Y と点 Z における超音響信号を比較すると、全ての計測時間で点 Y の振幅が大きく、EB 結合アルブミンの集積が境界部において最も大きいことを意味する。また熱傷受傷初期において、境界部では信号のピークが深さ約 0.4 mm から立ち上がり始めたのに対し、熱傷部ではより深部の約 0.8 mm から信号が立ち上がった。Fig. 3-7 は経時的に取得した EB 結合アルブミンの 3 次元超音響画像である。熱傷受傷直後、EB 結合アルブミンは主として境界部の浅部から漏出し、その後周囲へ拡散したことが示されている。熱傷部では深さ約 0.8 mm において振幅の大きな超音響信号が現れ、その後は時間経過に伴い浅部方向へ拡散している。非熱傷部では深度に関わらず EB 結合アルブミンに由来する超音響信号は観測されなかった。Fig. 3-8 は EB 結合アルブミンに由来する超音響信号のピーク振幅値を平均し、その経時変化を領域別に示した結果である (n=4)。熱傷部および境界部では、EB 結合アルブミンの超音響信号の振幅が受傷直後から 6 時間後、および受傷 24 時間後から 72 時間後の 2 段階で大幅に増大している。信号の振幅は境界部において常に最も高く、非熱傷部では変化はごく小さかった。

Fig. 3-9 はラット背部皮膚の水分含有量の時間変化を領域別に表した結果である。いずれの領域においても、熱傷受傷後早期に含有水分量は増加したが、境界部では受傷 6 時間後に、熱傷部および非熱傷部では受傷 24 時間後に最大となった。その後はいずれの領域でも受傷 72 時間後まで値が減少し続けた。

Fig. 3-10 は尿量計測の結果である。尿量は熱傷受傷 24 時間後から 48 時間後にかけて顕著に増え、48 時間以降は減少し、72 時間後から 96 時間後には元のレベルになった。

以上の結果をもとに、EB 結合アルブミンに由来する超音響信号の振幅の変化が大きな熱傷受傷直後-24 時間後と熱傷受傷 24-72 時間後について、EB 結合アルブミンの動態をそれぞれ考察する。まず熱傷受傷直後-24 時間後において、熱傷部および境界部での EB 結合アルブミンに由来する超音響信号の振幅の増大は、受傷に伴う EB 結合アルブミンの血管からの漏出を示していると考えられる (Fig. 3-8)。またこの時間帯は、Fig. 3-9 に示すように熱傷部および境界部の皮膚水分含有量も急激に増大していることから、熱傷受傷直後には、EB 結合アルブミンは水とともに血管壁透過性亢進作用により血管から周辺組織へ漏出し、浮腫を形成したと考えられる。熱傷受傷後に EB 結合アルブミン由来の信号が現れた熱傷部の深さ約 0.8 mm および境界部の表面付近は、これらの領域で血管壁透過性が亢進したことを示唆するが、本実験結果のみではその詳細を議論することはできない。一方、非熱傷部位では超音響信号の振幅は小さかったにも関わらず (Fig. 3-8)、皮膚含有水分量は熱傷受傷早期に増大した (Fig. 3-9)。上述した通り、アルブミンと水はともに血漿の主成分である

が、これらの分子量に着目するとアルブミン (分子量約 66,500)は水 (分子量 18)よりも約 3700 倍大きく、非熱傷部では水のみが移動度の高さにより周囲の熱傷部や境界部から移動して来られたものと考えられる。次に、熱傷受傷 24-72 時間後の EB 結合アルブミンの動態を考察する。全ての部位での皮膚含有水分量の減少と (Fig. 3-9), その他の時間より値の大きい尿量は (Fig. 3-10), 同時間帯が本ラット熱傷モデルのリフィリング期であることを示している。したがって、同時間帯は水の血管への再分布が EB 結合アルブミンよりも早く、組織中の EB 結合アルブミン濃度が増大したため、EB 結合アルブミン由来の光音響信号の振幅が増大したと考えられる (Fig. 3-8)。

以上より、EB を造影剤とした光音響イメージングにより、本熱傷ラットモデルの皮膚組織中の EB 結合アルブミンの時空間的動態が明らかになった。また、アルブミンと水はともに血漿の主成分であるが、それらの動態は異なることが示された。

### 3.2.4 ラット熱傷皮膚中の血管とアルブミン分布の光音響イメージング

本項では、熱傷皮膚組織中の血管とアルブミンの分布の関係に関する検討について述べる。前項で述べた実験結果をもとに、アルブミンが血管から盛んに漏出する受傷早期 (~24 時間)に焦点をあて、アルブミンの漏出の経路である血管の深さ分布を明らかにした上でアルブミンの動態観測を行った。そのために、本実験では 2.4 節で述べた体表組織のイメージングのためのファイバ照射型音響学的分解能光音響イメージング装置を用いた。

#### 3.2.4.1 実験方法

イメージングのための実験装置は 2.4.2 節と同様である。前項と同様にラット背部に深 II 度熱傷を作製し、1 時間後に励起波長 532 nm で皮膚組織中の血管の光音響イメージングを行った。その 30 分後にラット尾静脈より EB を 50 mg/kg animal body weight で投与し、熱傷受傷 2, 3, 4, 6, 24 時間後に励起波長 610 nm (300  $\mu$ J/pulse/fiber)でアルブミンの光音響イメージングを実施した。プローブを熱傷部と非熱傷部をそれぞれ 4 mm ずつ含む計 8 mm の直線区間を 50  $\mu$ m 間隔で線形走査し、光音響断層画像を取得した。

#### 3.2.4.2 実験結果と考察

Fig. 3-11 は波長 532 nm により取得した熱傷受傷 1 時間後の血管の深さ分布を示す光音響

断層画像, Fig. 3-12 はその後経時的に取得した EB 結合アルブミンの深さ分布を示す光音響断層画像である. 非熱傷部では, 表層から深さ約 1 mm まで幅広い範囲で血流の存在を示す光音響信号が多数観測されたが (Fig. 3-11), EB 結合アルブミン由来の光音響信号はほとんど得られなかった (Fig. 3-12). このことは, 同部位で血管壁透過性は亢進されなかったことを示している. 一方, 熱傷部の浅部では血液由来の光音響信号はほとんど観測されず, 深さ約 0.6 mm から振幅の小さな複数の光音響信号が観察された (Fig. 3-11). この結果は, 本個体の熱傷深度 (血流遮断領域の深度)が約 0.6 mm であったことを示している. 同部位では, EB 結合アルブミン由来の光音響信号もこれと一致する深さ約 0.6 mm から現れ, その後時間の経過とともに振幅を増大させながらその領域が徐々に浅部方向へ拡大した (Fig. 3-12). 血流遮断領域 (受傷部)では血管壁透過性は亢進しながらも血流の遮断により EB 結合アルブミンが漏出できないのに対し, その周囲では血管壁透過性が亢進しながら血流も存在するため, EB 結合アルブミンが効率よく漏出し, その後組織中を拡散するものと考えられる. EB 結合アルブミンに由来する光音響信号の振幅は熱傷-非熱傷部の境界で受傷直後から非常に大きく, 表面付近では時間経過とともに信号領域が拡大し, 深さ 0.2-1.3 mm では新たな信号が現れてその領域が浅部方向へ広がった (Fig. 3-12). 同部位でも上述と同様の理由により, 血管壁透過性が亢進されながらそこに血流が存在するため (Fig. 3-11), 血中の EB 結合アルブミンが効率よく漏出したものと考えられる.

以上より, 音響学的分解能光音響イメージングによりラット熱傷皮膚組織中の血管の分布を明らかにした上で EB 結合アルブミンの動態観測を行った結果, 熱傷による血流遮断領域と血流非遮断領域の境界において高い血管透過性亢進作用が得られ, EB 結合アルブミンが効率よく漏出することが示された.

### 3.3 インドシアニンググリーン (ICG)内包生分解性ナノ粒子を用いた皮下腫瘍の光音響学的診断と光線力学的治療

光音響イメージング法は, 腫瘍血管を深さ分解的にイメージング可能であることから腫瘍の新規診断法として注目されている[11,12]. また, 腫瘍組織は正常組織に比べて酸素飽和度が低い特徴があり, 酸素化ヘモグロビンと脱酸素化ヘモグロビンの光吸収スペクトルの違いを利用した分光学的光音響イメージングによる診断も有効である[13,14]. さらに, 造影剤 (外因性光吸収体)を使用し, 1.6 節で述べた腫瘍組織の EPR 効果によるその集積性を利用することで同部位の検出感度はより高くなる.

これまで, 生体透過性の高い近赤外領域に吸収ピークを有する金属ナノ粒子[15,16]や炭

素ナノ材料[17,18]などの無機材料を造影剤として用いた腫瘍の高感度な光音響イメージングが多数報告されてきた。その多くは光熱治療にも利用可能である。しかし、これらの材料は生体内での残留性と毒性が臨床応用の大きな障壁となっている。一方、近赤外領域で高い光吸収係数を持つ ICG や Alexa Fluor 750 などの蛍光色素も光音響イメージングの造影剤として使用されてきた[19-22]。特に ICG は肝機能の検査薬として既に臨床で使用されている薬剤であり、また PDT 用の光感受性薬剤としても機能する。しかし、ICG 単体では生体内での排泄が早く、また腫瘍親和性が低いため、腫瘍組織で効率的に集積しにくい。そこで著者は、生分解性を有しかつ 1.7 節で述べたような診断・治療一体型薬剤として機能しうる ICG ラクトソームに着目し、同薬剤が腫瘍の光音響イメージングの造影剤および PDT 用の光感受性薬剤として有用であるか、またこれら診断と治療の一体化が有用であるかを検討した。

本節では、まず ICG ラクトソームの特性とこれを用いた診断ないし治療への応用研究の動向に関して概説する。そして、従来技術の課題と本実験の目的を明確にした上で、マウス皮下腫瘍を対象に実施した ICG ラクトソームによる光音響イメージングと PDT について述べる。

### 3.3.1 ICG ラクトソーム

ラクトソームは、生分解性ポリマーである疎水性のポリ乳酸と親水性のポリサルコシンからなる両親媒性高分子の自己組織化により形成される直径約 30 nm のミセルであり、EPR 効果により腫瘍組織への高効率な経血管的輸送が可能である[23]。

Kimura らの報告では、ICG を造影剤として内包させたラクトソーム (ICG ラクトソーム) をマウス肝臓移植癌モデルおよび前肢または大腿部への膵臓癌移植マウスモデルに投与することで、同部位の高感度な *in vivo* 蛍光イメージングを達成した[24-26]。特に、肝臓移植癌モデルを用いた実験では蛍光強度が腫瘍の悪性度と相関し、診断の有用性が示された。Sakane らのグループは、ヒト乳癌転移マウスモデルに ICG ラクトソームを投与し、溶骨性の転移性骨腫瘍を蛍光イメージングした[27]。また、上述の通り ICG ラクトソームは PDT 用の光感受性薬剤としても利用可能であり、同グループは *in vitro* でヒト乳癌細胞に対する ICG ラクトソームによる PDT の殺細胞効果を示すとともに[27]、*in vivo* において乳腺腺癌のラット脊椎転移モデルの下肢に発生する麻痺の進行を PDT の施行により遅らせることができることを示した[28]。Tsujiimoto らは、ICG ラクトソームによるマウス胃癌腹膜播種モデルを対象とした腫瘍の蛍光イメージングと PDT 施行による腫瘍の縮小効果および生存期

間の約2倍の延長について報告した[29]. このように、ICG ラクトソームを用いた蛍光イメージングおよび PDT はこれまでに一定の成果が得られており、特に診断と治療を組み合わせることは、診断結果に基づく治療を施すこと、またイメージングにより治療効果をその場で評価することが可能となり、高効率・低副作用を得ることが期待できる。しかし、蛍光イメージングでは治療上重要な薬剤の深さ分布および治療深度の評価が原理的に困難である。

### 3.3.2 ICG ラクトソームを用いたマウス皮下腫瘍の光音響学的診断と光線力学的治療

著者は、診断・治療の一体化薬剤として ICG ラクトソームを用い、深さ分解性を有する光音響イメージング法によりマウス皮下腫瘍中の同薬剤の分布をイメージングし、EPR 効果による薬剤集積、また PDT に伴い生じる薬剤の光褪色を観測した。また、励起波長を変えることで血管もイメージングし、腫瘍 PDT の抗腫瘍効果の機序の一つである腫瘍血管の閉塞を評価した[30]. 光音響イメージングには、2.5 節で述べた皮下腫瘍を対象としたファイバ照射型音響学的分解能光音響イメージング装置を用いた。

#### 3.3.2.1 実験方法

CO<sub>2</sub> インキュベータ内 (37°C, 95% air, 5% CO<sub>2</sub>)において、ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞 (FaDu 細胞)をディッシュを用い培養した。培地溶液として Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) に 10% ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)と 2% の抗生物質ペニシリン/ストレプトマイシンを加えて使用した。イソフルラン麻酔下のヌードマウス (日本エスエルシー, メス, 7-9 週齢)の脇腹へ FaDu 細胞の HBSS 懸濁液 (濃度  $1 \times 10^8$  cells/mL)を 40  $\mu$ l 皮下注入し、接種約 1 週間後 (腫瘍径 $\sim$ 100 mm<sup>3</sup>)に実験を実施した。

光音響イメージングの造影剤としての ICG ラクトソームは、イメージング中に光褪色を起こさないことが望ましい。そのため、まず以下に記す本実験での光音響イメージングの条件下で、励起パルス光による ICG ラクトソームの光褪色の程度を評価した。マウス皮下腫瘍モデルに ICG ラクトソームを 150 mg/kg animal weight で尾静脈投与し、従来研究より ICG ラクトソームの高い腫瘍集積性が得られる 17.5 時間後に腫瘍組織中の同薬剤分布の光音響イメージングを実施した[28,29]. イメージングのための実験装置は 2.5.2 項と同様である。光源には繰り返し周波数 30 Hz の OPO (パルス幅 6 ns, M-OPO710, Spectra Physics)を用い、励起波長は分光光度計 (U-3300, 日立ハイテクノロジーズ)により実測したラクトソ

ームの吸光スペクトルに基づき (Fig. 3-13), そのピーク波長である 796 nm とした. 各ファイバからの出射エネルギーは 200  $\mu\text{J}$  とし, このとき組織表面でのレーザフルエンスは 15.5  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  であった. 関心領域は腫瘍領域中の  $3.9 \times 3.9 \text{ mm}^2$  の範囲に設定し, その上でプローブを 150  $\mu\text{m}$  間隔で約 10 分間ラスタ走査して光音響画像を取得した. 光音響イメージングの前後での腫瘍部の ICG ラクトソームの分布を ICG の蛍光イメージング用の赤外線観察カメラシステム (励起波長 760 nm, 観察波長 830 nm, C10935-20, 浜松ホトニクス) で撮像し, 蛍光分布と輝度値の変化から光褪色の程度を評価した.

続いて, 関心領域中の ICG ラクトソームの分布と血管の経時的な光音響イメージングを行い, ICG ラクトソームの腫瘍集積と PDT による光褪色, また PDT による血管反応 (血管閉塞) を評価した. Fig. 3-14 に実験の手順を示す. ICG ラクトソームを上記と同量でマウスに尾静脈投与し, 従来研究より ICG ラクトソームの高い腫瘍集積性が得られる 18 時間後に PDT を施行した [28,29]. PDT の光源には波長 808 nm の CW 半導体レーザ (BWF2-2-808-1-200-0.22-SMA, B&W Tek) を使用し, 腫瘍全体を十分に覆うようにスポット径 10 mm で照射し, パワー密度  $600 \text{ mW}/\text{cm}^2$  で 10 分間照射した. ICG ラクトソームの光音響イメージングは上記条件により, 投与 0.5 時間前, 0.5 時間後, 17.5 時間後 (PDT 施行 0.5 時間前), 18.5 時間後 (PDT 施行 0.5 時間後) に実施した. 取得した各光音響画像において, 全計測点の光音響信号の最大振幅を平均し, 時間条件間で多群間の比較のためにフリードマン検定を行い,  $P < 0.05$  を統計学的に有意であるとした. 一方, 血管の光音響イメージングには繰り返し周波数 100 Hz の OPO (パルス幅 9 ns, Opolette HR 355 LD, Opotek) の波長 532 nm の出力パルス光を用い, 各ファイバからの出射エネルギーは 170  $\mu\text{J}$  とした. PDT 施行 1 時間前 (ICG ラクトソーム投与 17 時間後) と 1 時間後 (ICG ラクトソーム投与 19 時間後) にそれぞれ光音響画像を取得し, 全計測点の光音響信号の最大振幅を平均し, 2 群の比較のために対応のある t 検定を用いて解析を行い,  $P < 0.05$  を統計学的に有意であるとした.

### 3.3.2.2 実験結果と考察

Fig. 3-15 (a) と (b) は, ICG ラクトソーム投与 17.5 時間後に実施した光音響イメージングの前後で取得したマウス腫瘍部の蛍光画像であり, とともに ICG ラクトソームの同部位での高い集積性を表す高強度の蛍光が観察された. 本実験で使用した全 6 体に関して腫瘍部の蛍光輝度値の変化から光褪色を評価した結果を Fig. 3-15 (c) に示す. 光音響イメージング後の蛍光輝度値の低下率は約 0.7 % であり, 本実験における光音響イメージングの条件下では,

ICG ラクトソームの褪色はごく限定的であることがわかった。

Fig. 3-16 (a)は腫瘍領域と超音響イメージングの関心領域を示す明視野像である。Fig. 3-16 (b-e)は、それぞれ薬剤投与前、投与 30 分後、および PDT 施行 (投与 18 時間後)の前後に取得した ICG ラクトソームの分布を示す超音響投影画像である。投与 18 時間後まで、薬剤濃度を表す信号は範囲を拡げながら顕著に増大したが、PDT 施行後は急激に減少した。これらはそれぞれ EPR 効果による腫瘍への薬剤漏出と PDT による光褪色を捉えた結果である。1.2 節で説明した原理から、光感受性薬剤の光褪色は活性酸素の生成を示している。Fig. 3-16 (f-i)は (b-e)の白破線部で示した走査線に対応する超音響断層画像である。PDT 施行前には深さ約 1 mm まで ICG ラクトソームの分布を確認できるが、PDT 後にはほぼ褪色したことがわかる。Fig. 3-16 (j,k)は PDT 施行前後の血管の超音響投影画像、Fig. 3-16 (l,m)は(j,k)の白破線部で示した走査線に対応する断層画像である。超音響イメージングにより、目視的には観測できない深さ約 1.2 mm までの腫瘍血管が画像化されている。PDT 施行前後で血管の走行を比較すると、PDT 後には微小血管由来と考えられる信号を中心に、全体的に振幅が減少している。これは、PDT による血管の閉塞や狭窄などにより、血管内のヘモグロビン量が減少したことに由来すると考えられる。

ICG ラクトソームの腫瘍集積に関し、関心領域内の全計測点で取得した超音響信号の最大振幅の平均値の経時変化を Fig. 3-17 に示す (n=8)。投与 17.5 時間後 (PDT 施行前)の振幅はその他の全時間条件に対して有意に高く、同時間における腫瘍部での ICG ラクトソームの高い集積性が示された。一方、同信号の PDT 施行後の振幅は ICG ラクトソーム投与直後とほぼ同程度であり、PDT の施行により、腫瘍部へ集積した ICG ラクトソームがほぼ光褪色したことがわかる。

続いて、PDT 施行 1 時間前 (ICG ラクトソーム投与 17 時間後)と 1 時間後 (ICG ラクトソーム投与 19 時間後)の血管の超音響投影画像について、全超音響信号の最大振幅を Fig. 3-18 に示す (n=6)。PDT 適用後に血液由来の超音響信号の振幅は有意に低下し、PDT による皮下腫瘍の血流低下の効果が示された。血管閉塞は腫瘍 PDT の抗腫瘍効果の機序の一つであるため、この結果は ICG ラクトソームが腫瘍 PDT の光感受性薬剤として有用であることを示唆している。

Fig. 3-19 は PDT 適用による ICG ラクトソーム由来の超音響信号の低下率と、PDT 適用による血液由来の超音響信号の低下率の関係を示した図である。これら 2 つの要素に関する相関係数は 0.77 (決定係数 0.59)となり、両者の間には正の相関があることが示された。このことは、ICG ラクトソームによる活性酸素種の生成量が、腫瘍 PDT の抗腫瘍効果の機序の一つである血管閉塞または血流低下の程度を決定する可能性を示している。また、本

実験で実施した腫瘍組織中の薬剤動態観測および血管反応の評価が，治療結果の予測および治療へのフィードバックのために有用であること，すなわち診断と治療を組み合わせることが重要であることを示唆している．同様の手順および条件で実験をしているにも関わらず，Fig. 3-19 の通りデータには個体差ごとの大きなばらつきが見られる．これは腫瘍または個体間で血管の分布やその透過性などに違いがあるためと考えられる．このことから，腫瘍組織中で適正な薬剤分布を得て，PDT による所望の治療効果を得るためには，同部位の薬剤動態および血管の観測が極めて重要であり，そのために光音響イメージング法が有用であることが示された．

### 3.4 まとめ

本章では，第 2 章で述べたファイバ照射型音響学的分解能光音響イメージング装置により血管から漏出して組織中に移行した薬剤の動態を観測可能であるかどうか，またその有用性を検討した結果について述べた．

3.2 節では，血中における薬剤の運搬機能を有するアルブミンと結合した EB を対象とした光音響イメージングについて述べた．アルブミン漏出モデルとして，ラット熱傷皮膚を対象に組織中の EB 結合アルブミンをイメージングした結果，血管透過性亢進部位から効率的に漏出した EB 結合アルブミンの組織中の時空間的動態を観測することができた．アルブミンは血中における薬剤の運搬機能を有するため，本実験結果は本システムが EB と同様に光吸収を持つ薬剤を幅広くイメージング可能であることを示す．

3.3 節では，光音響イメージングの造影剤および PDT の光感受性薬剤として機能することが期待される生分解性の診断・治療一体型薬剤である ICG ラクトソームによるマウス皮下腫瘍の光音響イメージングと PDT について述べた．その結果，ICG ラクトソームの光音響イメージングにより同薬剤の腫瘍部での集積と PDT による光褪色を観測し，また腫瘍血管のイメージングにより腫瘍 PDT の抗腫瘍効果の機序の一つである血管閉塞または血流低下を捉えた．また，PDT による腫瘍部での ICG ラクトソームの褪色量が腫瘍血管の閉塞または血流低下の程度と高い正の相関を示すことが明らかになった．以上の結果は，ICG ラクトソームが腫瘍の光音響イメージングの造影剤および PDT 用の光感受性薬剤として有用であること，またこれら診断と治療を組み合わせることの重要性を示唆している．しかし，本実験では ICG ラクトソームの腫瘍部への輸送はあくまで EPR 効果に依存しており，同薬剤の腫瘍集積性および PDT による血流変化量は個体ごとに大きくばらついた．したがって，所望の治療効果を安定して得るには，能動的な薬剤輸送機能が求められる．そこで 4 章で

は、上記イメージング装置にフォトメカニカル波 (photomechanical wave, PMW)による経血管的薬剤輸送機能を融合させた、標的組織中の血管と薬剤のイメージングに加えて同部位への薬剤輸送を同一デバイスで達成可能な診断・治療一体型システムの開発について述べる。

### 参考文献 第3章

- [1] 小田切優樹, “薬物の血清タンパク結合に関する研究,” 薬学雑誌 **129**(4), pp. 413-425 (2009).
- [2] 波利井清紀, 熱傷の治療 最新の進歩, (克誠堂出版, 2003).
- [3] Y. Tsunoi, S. Sato, S. Kawauchi, H. Ashida, D. Saitoh, M. Terakawa, “*In vivo* photoacoustic molecular imaging of the distribution of serum albumin in rat burned skin,” *Burns* **39**(7), pp. 1403-1408 (2013).
- [4] C. Li, A. Aguirre, J. Gamelin, A. Maurudis, Q. Zhu, L. V. Wang, “Real-time photoacoustic tomography of cortical hemodynamics in small animals,” *J. Biomed. Opt.* **15**(1), 010509 (2010).
- [5] J. Yao, K. Maslov, S. Hu, L. V. Wang, “Evans blue dye enhanced capillary resolution photoacoustic microscopy *in vivo*,” *J. Biomed. Opt.* **14**(5), 054049 (2009).
- [6] H. L. Walker, A. D. Mason, “A standard animal burn,” *J. Trauma*. **8**(6), pp. 1049-1051 (1968).
- [7] H. H. LeVeen, W. H. Fishman, “Combination of evans blue with plasma protein: Its significance in capillary permeability studies, blood dye disappearance curves, and its use as a protein tag,” *Am. J. Physiol.* **151**(1), pp. 26-33 (1947).
- [8] B. H. Brouhard, H. F. Carvajal, H. A. Linares, “Burn edema and protein leakage in the rat I. Relationship to time of injury,” *Microvasc. Res.* **15**(2), pp. 221-228 (1978).
- [9] H. F. Carvajal, H. A. Linares, “Effect of burn depth upon oedema formation and albumin extravasation in rats,” *Burns* **7**(2), pp. 79-83 (1980).
- [10] O. Cetinkale, M. Demir, H. B. Sayman, F. Ayan, C. Onsel. “Effects of allopurinol, ibuprofen and cyclosporin A on local microcirculatory disturbances due to burn injuries,” *Burns* **23**(1), pp. 43-49 (1997).
- [11] J. Laufer, P. Johnson, E. Zhang, B. Treeby, B. Cox, B. Pedley, P. Bearda, “*In vivo* preclinical photoacoustic imaging of tumor vasculature development and therapy,” *J. Biomed. Opt.* **17**(5), 056016 (2012).
- [12] Q. Ruan, L. Xi, S. L. Boye, S. Han, Z. J. Chen, W. W. Hauswirth, A. S. Lewin, M. E. Boulton, B. K. Law, W. G. Jiang, H. Jiang, J. Cai, “Development of an anti-angiogenic therapeutic model combining scAAV2-delivered siRNAs and noninvasive photoacoustic imaging of tumor vasculature development,” *Cancer Lett.* **332**(1), pp. 120-129 (2013).
- [13] G. Ku, X. Wang, X. Xie, G. Stoica, L. V. Wang, “Imaging of tumor angiogenesis in rat brains

*in vivo* by photoacoustic tomography,” *Appl. Opt.* **44**(5), pp. 770-775 (2005).

- [14] S. Mallidi, K. Watanabe, D. Timerman, D. Schoenfeld, T. Hasan, “Prediction of tumor recurrence and therapy monitoring using ultrasound-guided photoacoustic imaging,” *Theranostics* **5**(3), pp. 289-301 (2015).
- [15] H. W. Yang, H. L. Liu, M. K. Li, I. W. Hsi, C. T. Fan, C. Y. Huang, Y. j. Lu, M. Y. Hua, H. Y. Chou, J. W. Liaw, C. C. Ma, K. C. Wei. “Magnetic gold-nanorod/PNIPAAmMA nanoparticles for dual magnetic resonance and photoacoustic imaging and targeted photothermal therapy,” *Biomaterials* **34**(22), pp. 5651-5660 (2013).
- [16] K. A. Homan, M. Souza, R. Truby, G. P. Luke, C. Green, E. Vreeland, S. Emelianov, “Silver nanoplate contrast agents for *in vivo* molecular photoacoustic imaging,” *ACS Nano* **6**(1), pp. 641-650 (2011).
- [17] A. D. L. Zerda, Z. Liu, S. Bodapati, R. Teed, S. Vaithilingam, B. T. Khuri-Yakub, X. Chen, H. Dai, S. S. Gambhir, “Ultrahigh sensitivity carbon nanotube agents for photoacoustic molecular imaging in living mice,” *Nano Lett.* **10**(6), pp. 2168-2172 (2010).
- [18] Y. W. Wang, F. Yu-Ying, P. Qiaoli, G. Shan-Shan, L. Gang, L. Juan, Y. Huang-Hao, C. Guo-Nan, “Dye-enhanced graphene oxide for photothermal therapy and photoacoustic imaging,” *J. Mater. Chem. B* **1**(42), pp. 5762-5767 (2013).
- [19] X. Wang, G. Ku, M. A. Wegiel, D. J. Bornhop, G. Stoica, L. V. Wang, “Noninvasive photoacoustic angiography of animal brains *in vivo* with near-infrared light and an optical contrast agent,” *Opt. Lett.* **29**(7), pp. 730-732 (2004).
- [20] D. Razansky, C. Vinegoni, V. Ntziachristos, “Multispectral photoacoustic imaging of fluorochromes in small animals,” *Opt. Lett.* **32**(19), pp. 2891-2893 (2007).
- [21] J. R. Rajian, M. L. Fabiilli, J. B. Fowlkes, P. L. Carson, X. Wang, “Drug delivery monitoring by photoacoustic tomography with an ICG encapsulated double emulsion,” *Biomed. Opt. Express* **19**(15), pp. 14335-14374 (2011).
- [22] G. Kim, S. W. Huang, K. C. Day, M. O’Donnell, R. R. Agayan, M. A. Day, R. Kopelman, S. Ashkenazi, “Indocyanine-green-embedded PEBBLEs as a contrast agent for photoacoustic imaging,” *J. Biomed. Opt.* **12**(4), 044020 (2007).
- [23] A. Makino, R. Yamahara, E. Ozeki, S. Kimura, “Preparation of Novel Polymer Assemblies, “Lactosome”, Composed of Poly(L-lactic acid) and Poly(sarcosine),” *Chem. Lett.* **36**(10), pp. 1220-1221 (2007).
- [24] A. Makino, S. Kizaka-Kondoh, R. Yamahara, I. Hara, T. Kanzaki, E. Ozeki, M. Hiraoka, S.

- Kimura, "Near-infrared fluorescence tumor imaging using nanocarrier composed of poly(L-lactic acid)-block-poly(sarcosine) amphiphilic polydepsipeptide," *Biomaterials* **30**(28), pp. 5156-60 (2009).
- [25] A. Makino, S. Kimura, "Preparation of peptide- and protein-based molecular assemblies and their utilizations as nanocarriers for tumor imaging," *React. Funct. Polym.*, **71**(3), pp. 272-279(2011).
- [26] E. Hara, A. Makino, K. Kurihara, M. Sugai, A. Shimizu, I. Hara, E. Ozeki, S. Kimura, "Evasion from accelerated blood clearance of nanocarrier named as "Lactosome" induced by excessive administration of Lactosome," *Biochim. Biophys. Acta.* **1830**(8), pp. 4046-4052 (2013).
- [27] T. Tsukanishi, T. Funayama, E. Ozeki, I. Hara, T. Abe, S. Onishi, M. Yamazaki, M. Sakane, "Indocyanine green-lactosome and near-infrared light-based intraoperative imaging and photodynamic therapy for metastatic bone tumors," *J. Photopolym. Sci. Technol.* **27**(4), pp. 449-452 (2014)
- [28] T. Funayama, T. Tsukanishi, I. Hara, E. Ozeki, M. Sakane, "Tumor-selective near-infrared photodynamic therapy with novel indocyanine green-loaded nanocarrier delays paralysis in rats with spinal metastasis," *Photodiagnosis Photodyn. Thera.* **10**(4), pp. 374-378 (2013).
- [29] H. Tsujimoto, Y. Morimoto, R. Takahata, S. Nomura, K. Yoshida, H. Horiguchi, S. Hiraki, S. Ono, H. Miyazaki, D. Saito, I. Hara, E. Ozeki, J. Yamamoto, K. Hase, "Photodynamic therapy using nanoparticle loaded with indocyanine green for experimental peritoneal dissemination of gastric cancer," *Cancer Sci.* **105**(12), pp. 1626-1630 (2014).
- [30] L. Xiang, D. Xing, H. Gu, D. Yang, S. Yang, L. Zeng, W. R. Chen, "Real-time optoacoustic monitoring of vascular damage during photodynamic therapy treatment of tumor," *J. Biomed. Opt.* **12**(1), 014001 (2007).

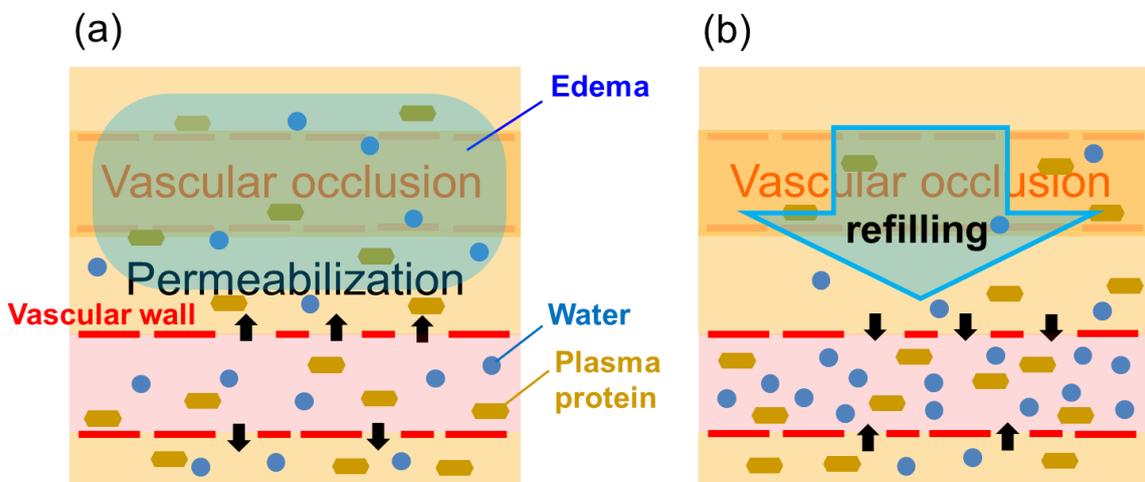


Fig. 3-1 Dynamics of burn edema. (a) Shock phase: blood plasma leak out of the vessels, forming edema in the tissue. (b) Diuretic phase: the vessels are refilled with the leaked plasma.

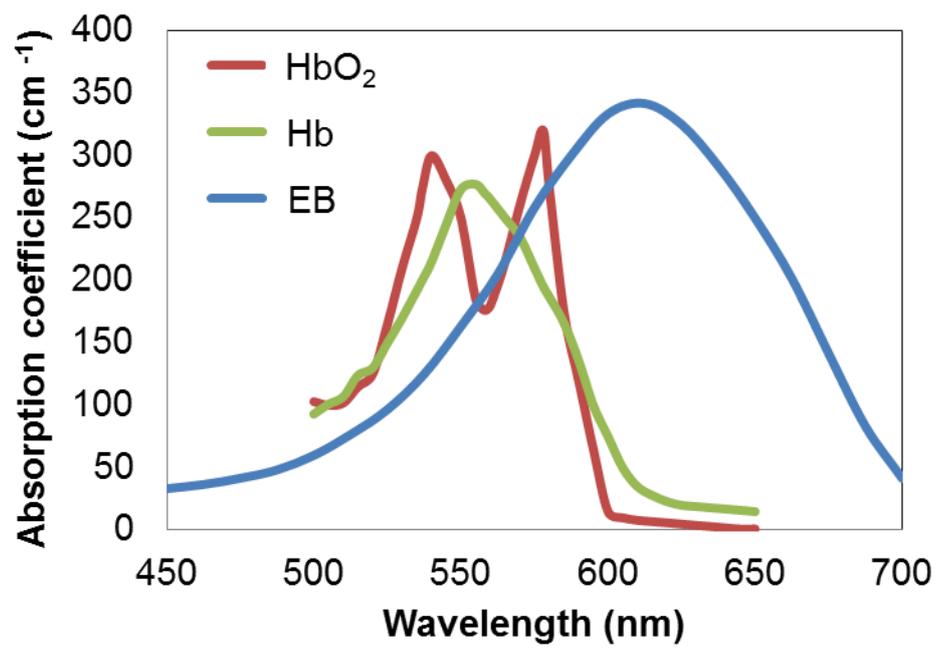


Fig. 3-2 Absorption spectra of EB solution (0.5 wt%), oxyhemoglobin (HbO<sub>2</sub>) and deoxyhemoglobin (Hb) in rats [3].

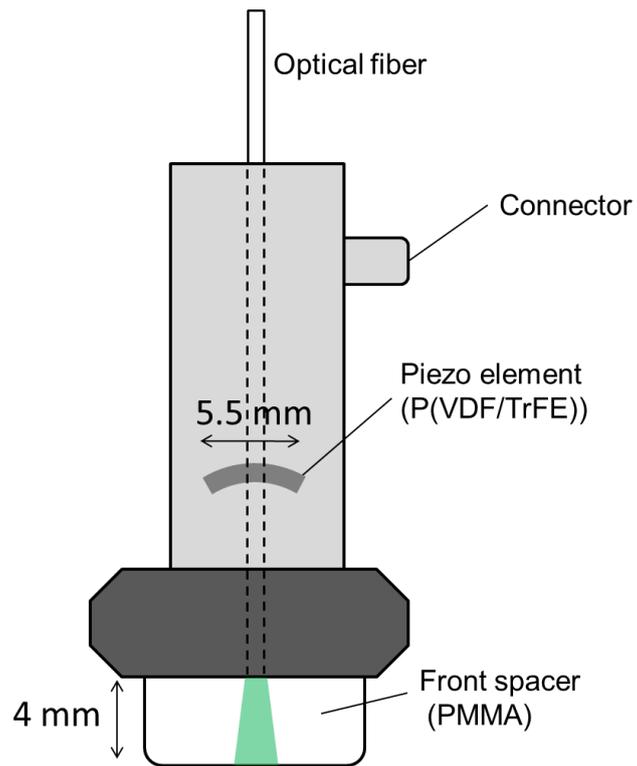


Fig. 3-3 Schematics of the coaxial illumination-based photoacoustic (PA) imaging sensor.

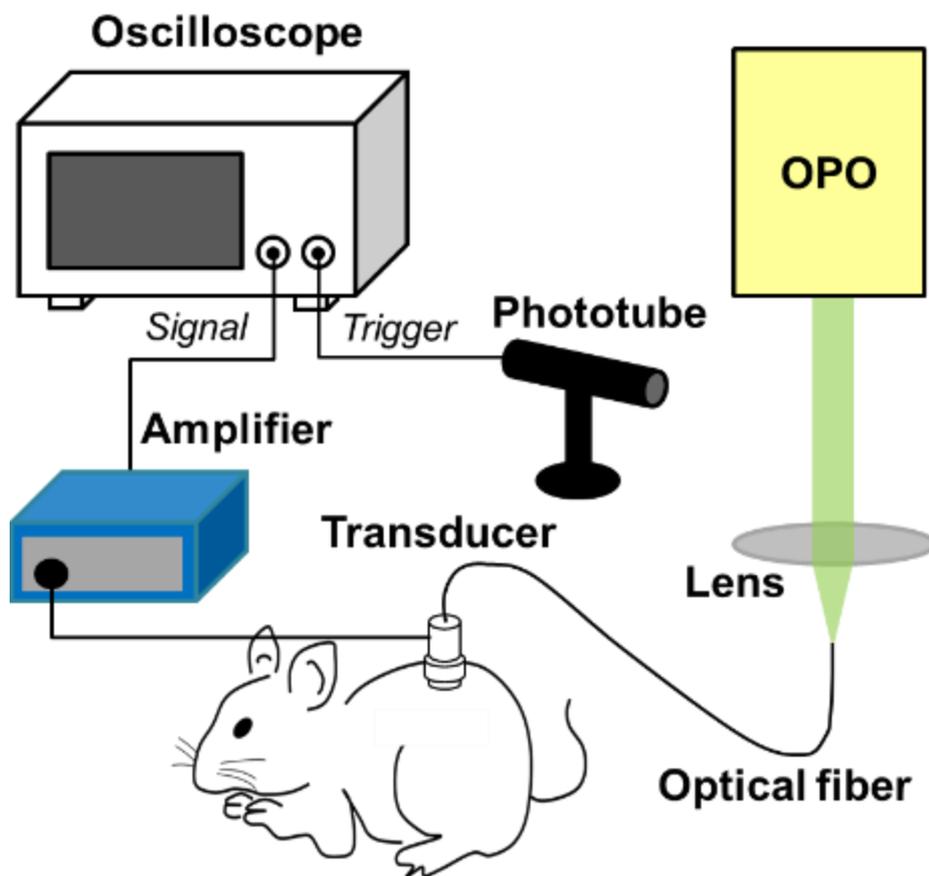


Fig. 3-4 Experimental setup for PA imaging [3].

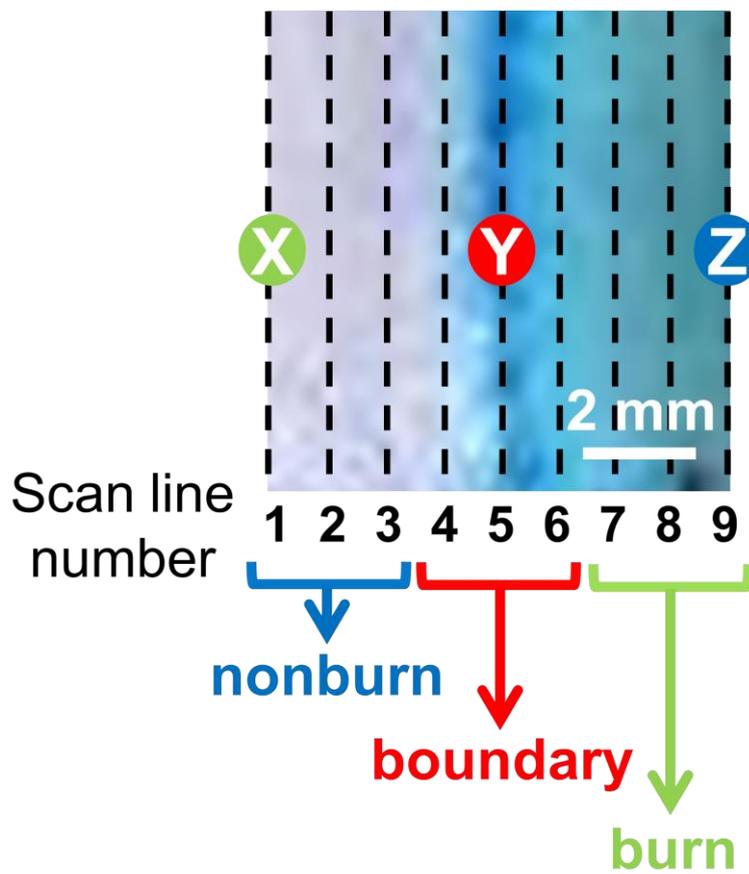


Fig. 3-5 Photograph of the region of interest on the dorsal skin in a rat deep dermal burn model for PA imaging at 72 h postburn. Broken lines (numbered 1-9) indicate detector linear scan lines [3].

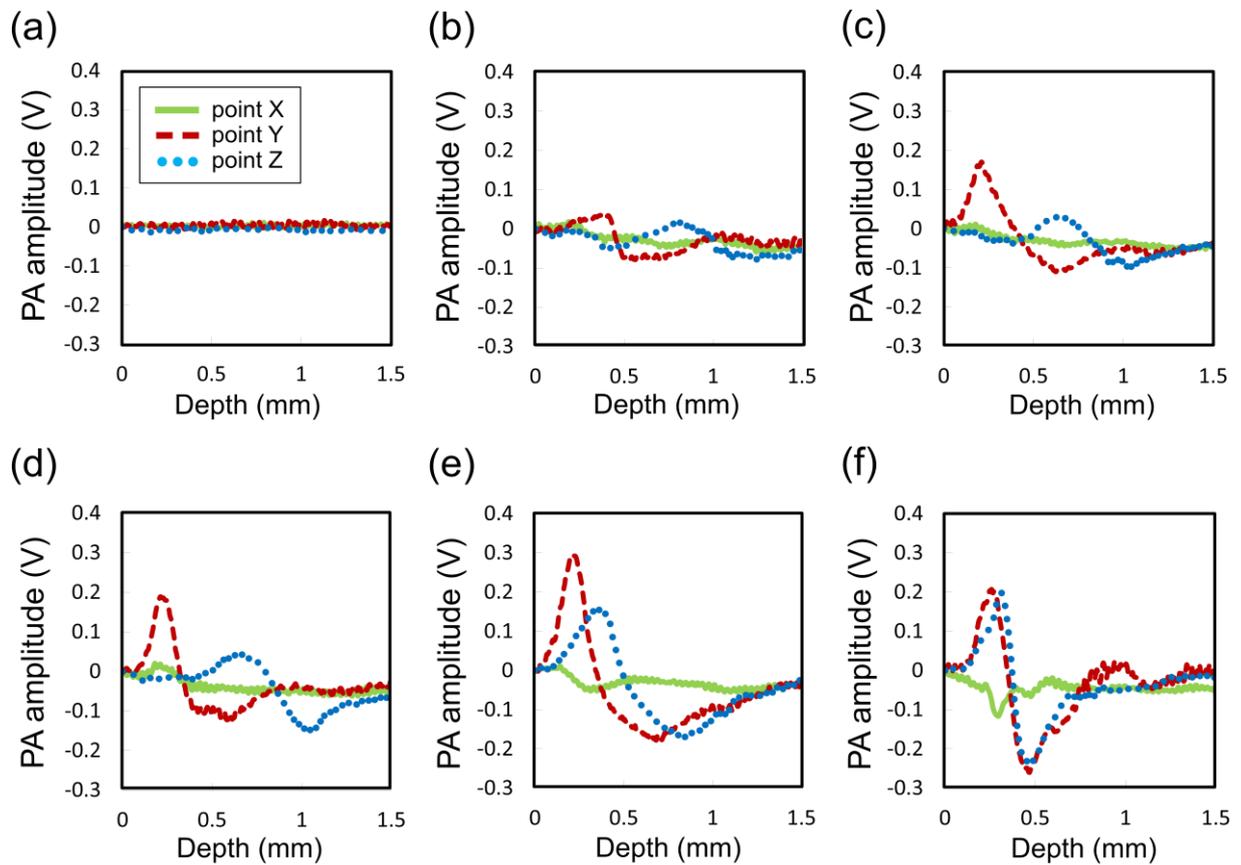


Fig. 3-6 Depth profiles of the PA signals at points X (solid line), Y (broken line) and Z (dotted line) located on detector scan lines 1 (nonburn), 5 (boundary) and 9 (burn) shown in Fig. 3-5, respectively: (a) before injury and (b) 2 h, (c) 6 h, (d) 24 h, (e) 72 h and (f) 144 h postburn [3].

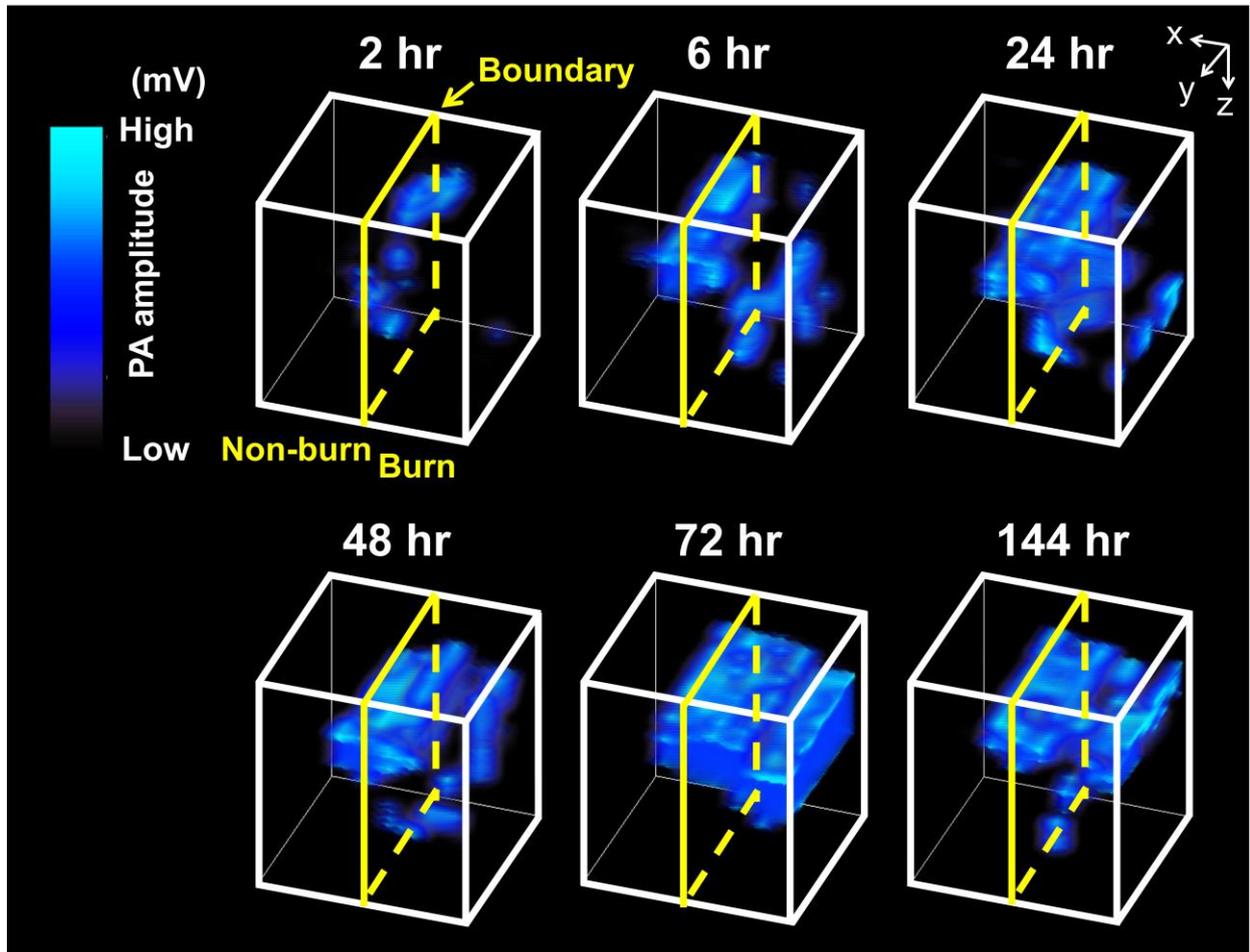


Fig. 3-7 3 D PA images of EB-albumin (EBA) for the ROI shown in Fig. 3-5 at 2 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h and 144 h postburn (image scale, 8 mm × 8 mm × 1 mm in depth) [3]. Vertical square frames with solid and broken lines indicate the burn-nonburn interfaces.

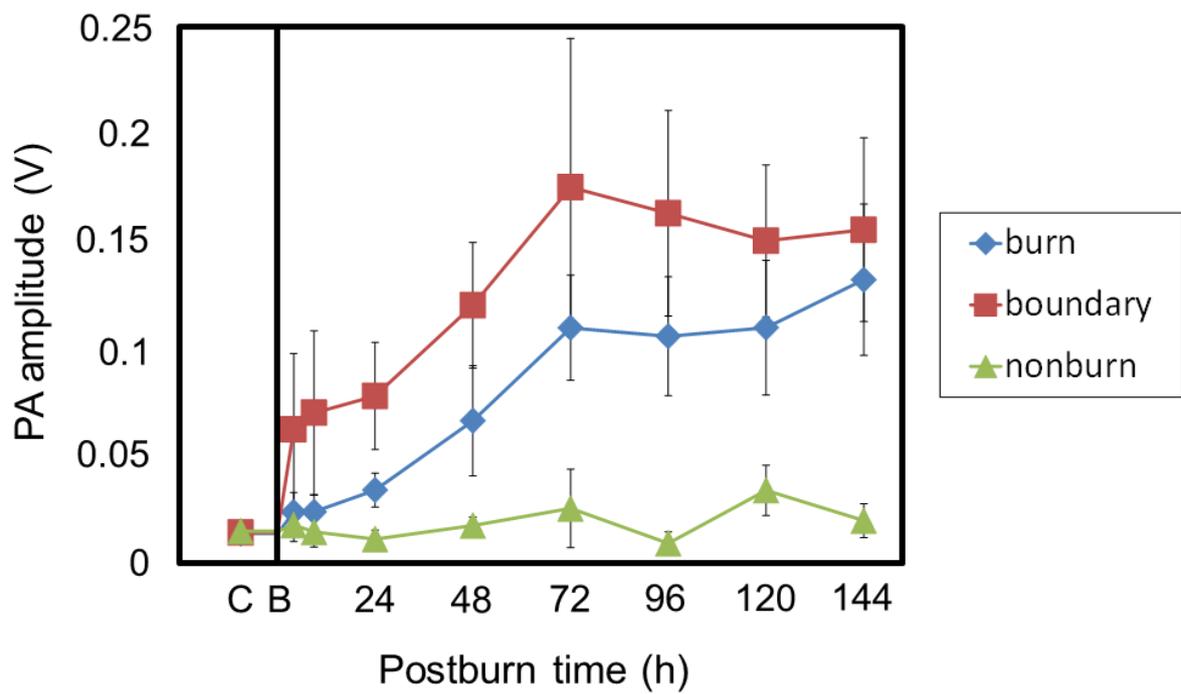


Fig. 3-8 Time courses of PA signal amplitudes originating from EBA for all of the rats used in this study (n=4) [3]. Symbols B and C indicate burn and preburn control respectively. Values are expressed as means  $\pm$  standard error.

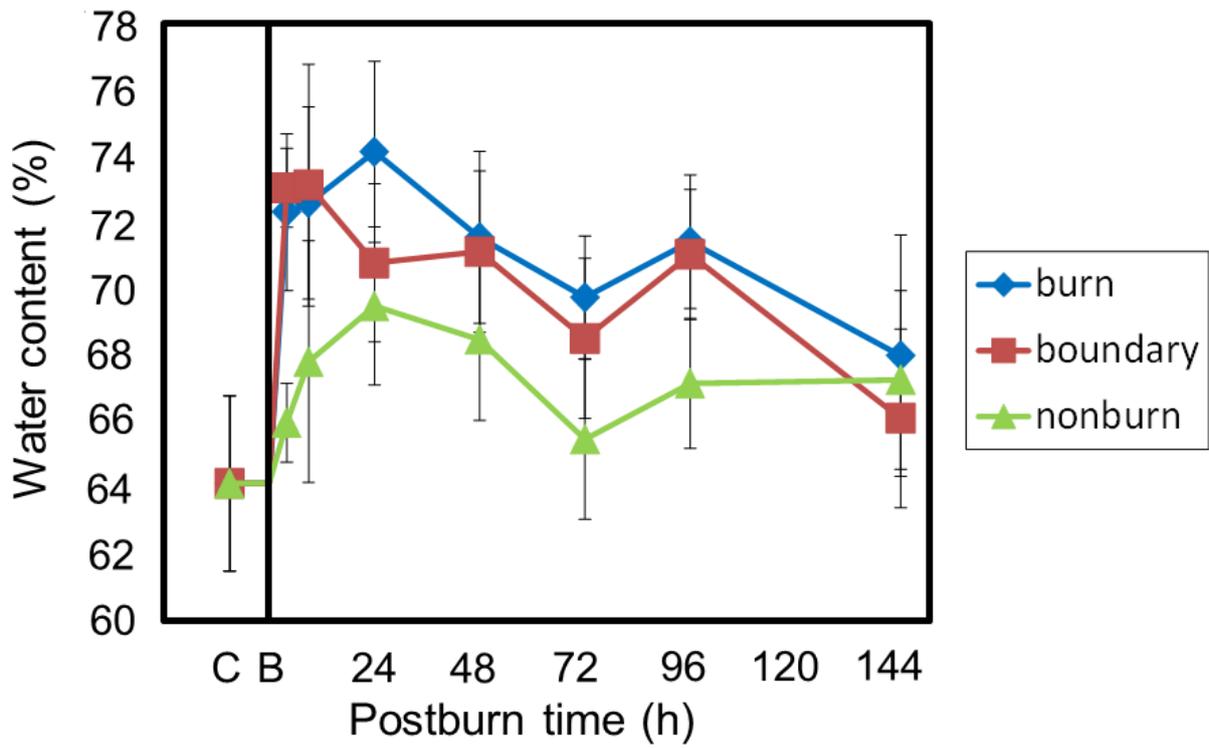


Fig. 3-9 Results of measurements of water content (percentage of weight) in the skin (n=12-24, each group) [3]. Values are expressed as means  $\pm$  standard error.

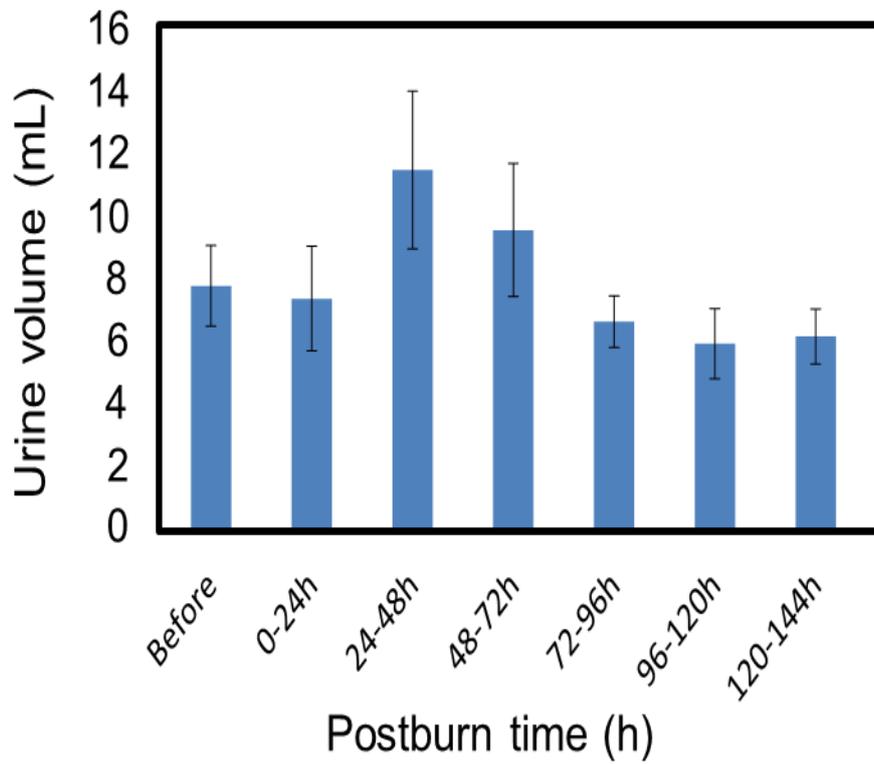


Fig. 3-10 Results of measurements of daily urine volume for rats with deep dermal burns (n=4) [3]. Symbols B and C indicate burn and preburn control respectively. Values are expressed as means  $\pm$  standard error.

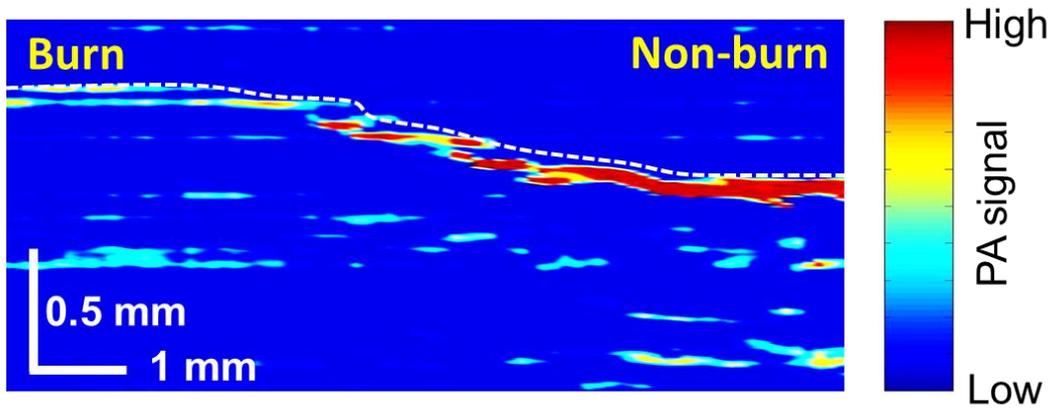


Fig. 3-11 PA tomogram of blood vessels in the rat dorsal skin at 1 h postburn. The white dotted line indicates surface of the rat skin.

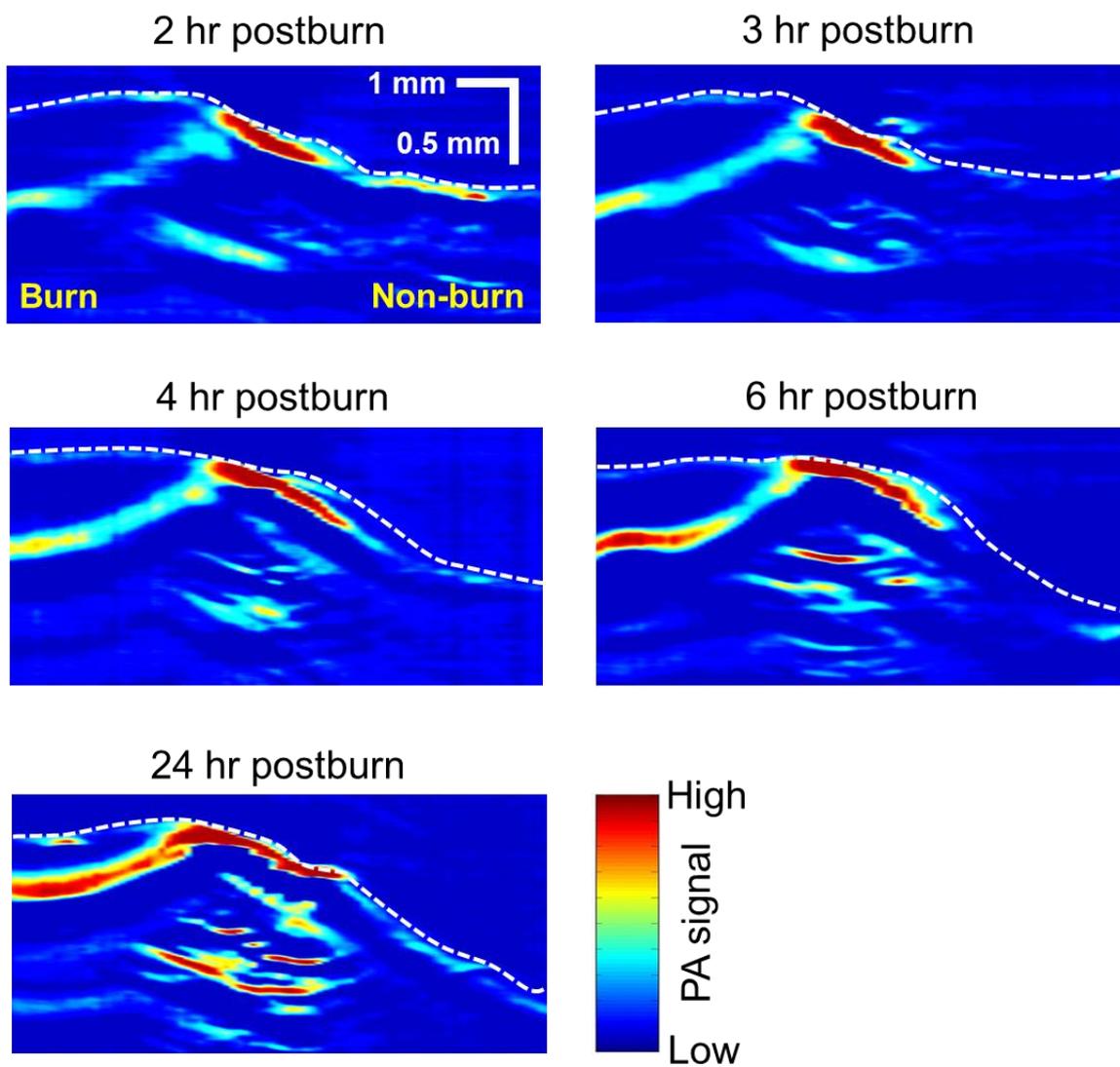


Fig. 3-12 PA tomograms of EBA in the rat dorsal skin at 2 h, 3 h, 4 h, 6 h and 24 h postburn. The white dashed lines indicate surface of the rat skin.

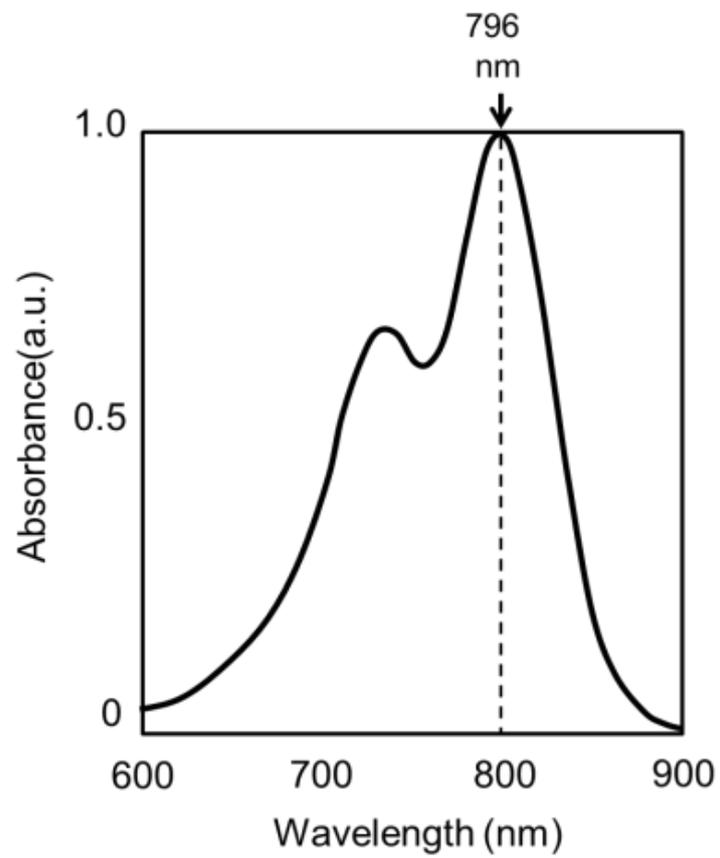


Fig. 3-13 Absorption spectrum of saline solution of ICG-lactosome.

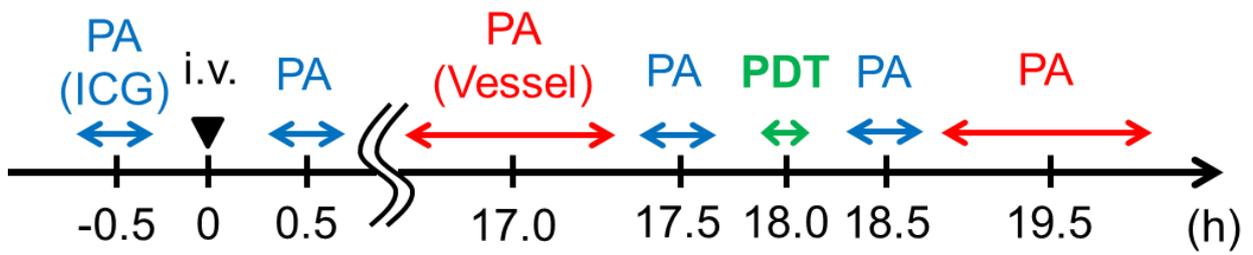


Fig. 3-14 Time chart of the experiment of PA imaging and PDT for subcutaneous tumor in mice.

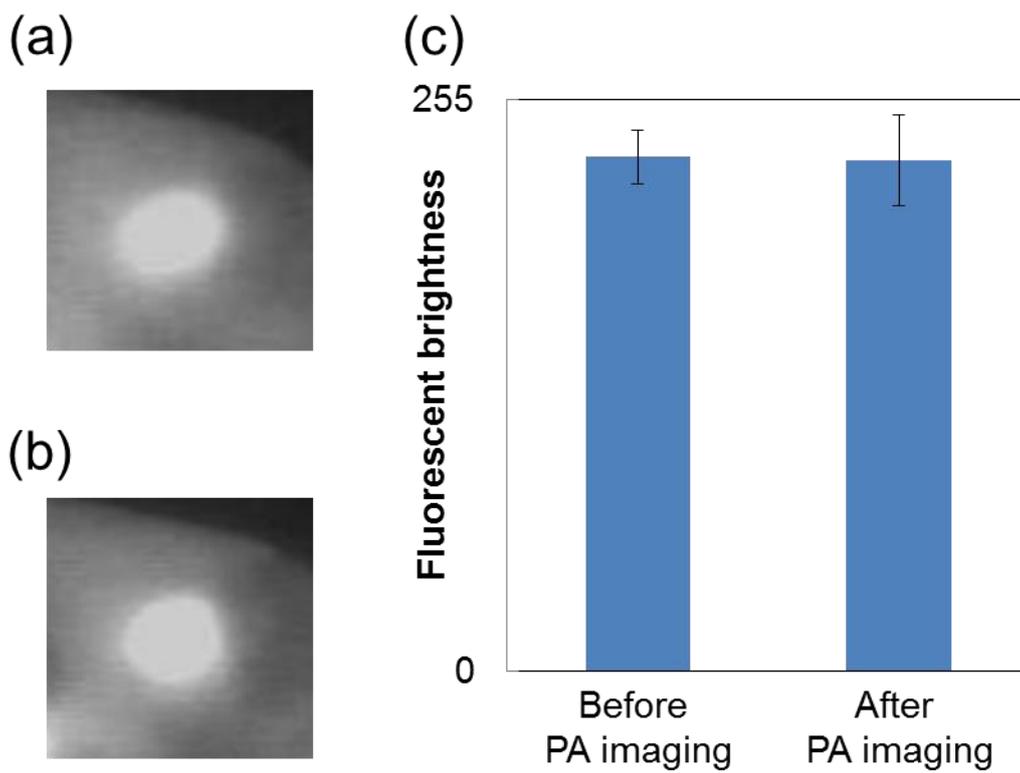


Fig. 3-15 Fluorescent images of the skin over the tumor in a mouse (a) before and (b) after PA imaging. (c) Fluorescent intensities of ICG-lactosome in the mice tumors before and after PA imaging (n=6). Values are expressed as means  $\pm$  standard error.

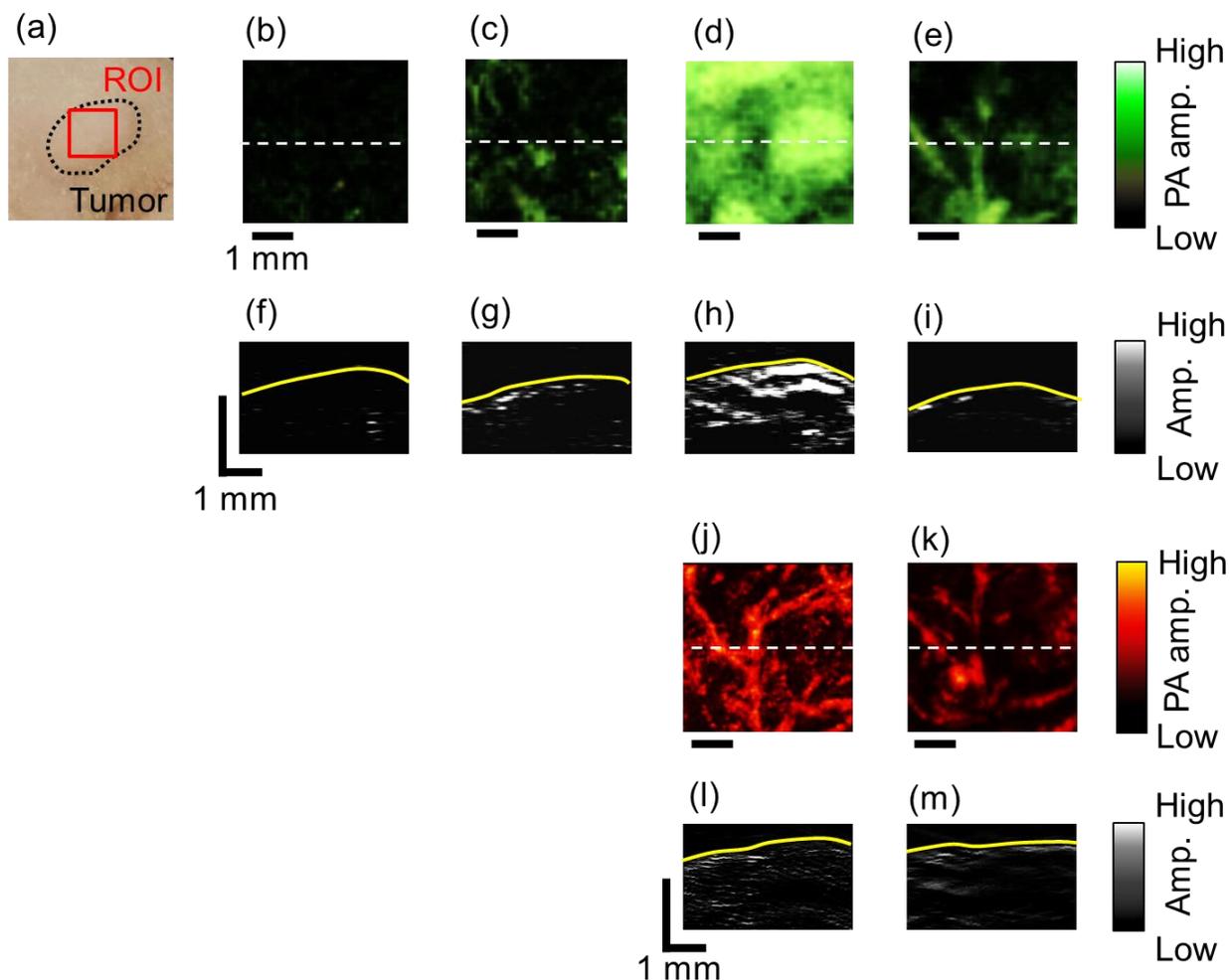


Fig. 3-16 (a) White-light photograph of the skin over the tumor in a mouse; a red dashed-line frame indicates the ROI for PA imaging ( $3.9 \times 3.9 \text{ mm}^2$ ). (b-e) maximum amplitude projection (MAP) PA images ( $3.9 \times 3.9 \text{ mm}^2$ ) obtained at 796 nm (distribution of ICG-lactosome) in the tumor: (b) before injection, (c) 0.5 h after injection, (d) 0.5 h before PDT and (e) 0.5 h after PDT. (f-i) PA tomograms ( $3.9 \times 1.4 \text{ mm}^2$ ) corresponding to the scan lines shown by white broken lines in (b-e), respectively. Yellow lines indicate the tissue surface. (j,k) MAP PA images obtained at 532 nm (blood vessels) before and after PDT, respectively. (l,m) PA tomogram ( $3.9 \times 1.4 \text{ mm}^2$ ) corresponding to the scan lines shown by the white broken lines in (j) and (k), respectively.

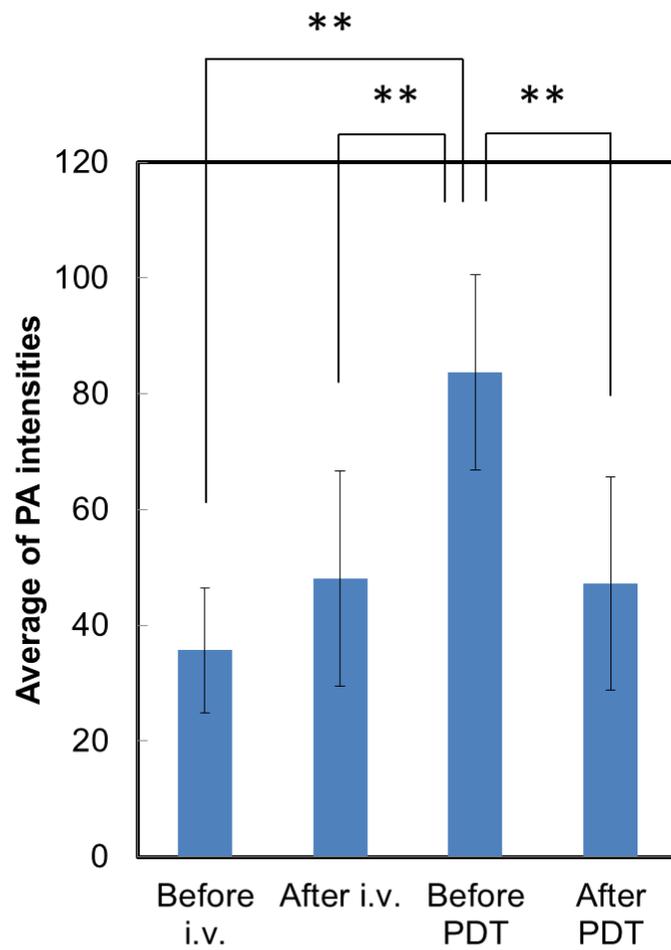


Fig. 3-17 PA intensities of ICG-lactosome at each measurement time point (n=8). Values are expressed as means  $\pm$  standard error. \*\* depicts  $P < 0.01$ .

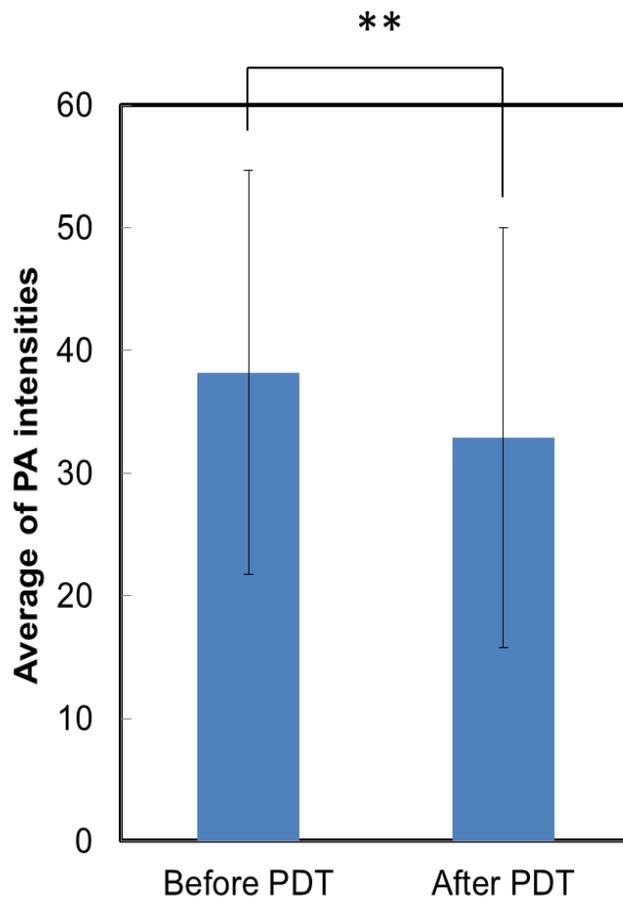


Fig. 3-18 PA intensities of hemoglobin before and after PDT (n=6). Values are expressed as means  $\pm$  standard error. \*\* depicts  $P < 0.01$ .

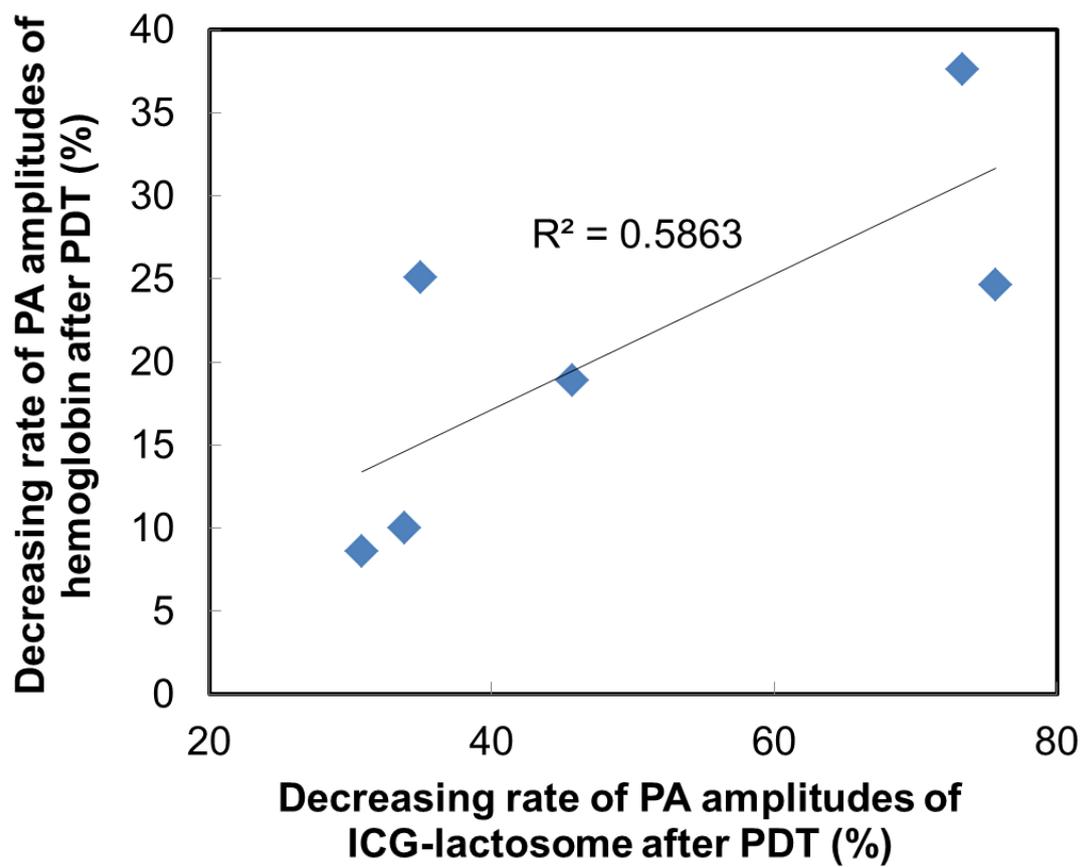


Fig. 3-19 Interrelation between consumption of ICG-lactosome and reduction in blood flow due to PDT.

## 第4章

光の機械的・音響的作用を用いた薬剤輸送と  
薬剤動態観測の一体型システムの開発

## 4.1 はじめに

薬剤療法で所望の治療効果を得るためには、投与した薬剤が標的部位で適正に分布する必要があり、近年、そのための様々な物理的・化学的な薬剤輸送技術[1-7]および薬剤分布の *in vivo* イメージング技術[8-10]に関する研究が精力的に進められている。特に、薬剤の輸送とその動態観測を同一システムで実施できれば、標的組織中の薬剤分布を観測しながら、その結果に応じて薬剤輸送を制御できるようになり、高効率・低副作用の薬剤療法を実現しうる。本章では、光音響波とフォトメカニカル波 (photomechanical wave, PMW) がともにナノ秒パルス光により効率よく発生可能であることを利用した同一システムによる薬剤の輸送とその動態観測のための診断・治療一体型システムについて述べる (Fig. 4-1)。本研究が目指すシステムでは、低エネルギーパルス光 (数十～数百  $\mu\text{J}$ ) で光音響イメージングを、高エネルギーパルス光 (数  $\text{mJ}$  以上) で PMW による薬剤輸送を行うことが想定され、このような使用するエネルギーの差が大きな診断と治療を共通の構成により実施可能なシステムを考案した。2 章で開発を述べたファイバ照射型音響学的分解能光音響イメージング装置を構成する石英光ファイバは、その透過領域 (波長 300-2100 nm) では優れたレーザーパワー伝送路として機能し、治療用レーザー装置にも使用される。そこで著者は、本イメージング装置に PMW による経血管的薬剤輸送機能を融合させ、標的組織中への薬剤の輸送とその動態観測の両方を達成可能な診断・治療一体型システムを開発することを考えた。まず、同ファイバを損傷なく安定して伝送可能なパルスエネルギーにより、経血管的薬剤輸送が可能な圧力特性を有する PMW を発生させられるかどうか、すなわちイメージングと薬剤輸送でシステムを共有できるかどうかを検証した。そして開発した装置を用いてマウス皮下腫瘍を対象とした模擬薬剤 (EB) の輸送とその動態観測を行い、システムの有用性を検証した。

## 4.2 薬剤輸送と薬剤動態観測の一体型システム

Fig. 4-2 に薬剤の輸送とその動態観測のための一体型システムの構成を示す。(a) は光音響イメージングのためのシステムの模式図および外観写真である。本章では、動物モデルは皮下腫瘍マウスとし、3.3.2 節にて述べた同モデルを対象とした ICG ラクトソームの動態観測実験と同様の構成にした。(b) は PMW による経血管的薬剤輸送のための模式図および外観写真である。PMW 発生のための固体材料 (光吸収材) は、従来研究を参考に、光吸収係数が高くかつ生体組織への PMW の効率的な伝搬のために組織と音響インピーダンスの近

い黒色天然ゴム (音響インピーダンス約  $1.5 \times 10^6 \text{ Ns/m}^3$ [11])を採用した[12,13]. 光源のパルス幅は, 1.5.3 項で述べた通りプラズマの効率的な光エネルギーの吸収を考慮し, ナノ秒とした. 波長は, 上記黒色天然ゴムの吸収係数が波長 500-900 nm の範囲で  $\mu_a = 2000 \text{ cm}^{-1}$  以上と大きいことから[13], 幅広い波長が許容される. 以上を満たす光源として, 本研究では Q スイッチ Nd:YAG レーザ (繰り返し周波数 10 Hz, パルス幅 6 ns)の第 2 高調波 (波長 532 nm)を使用することとし, 出力パルス光を光音響イメージングの場合と同様にビームスプリッターで 4 分割し, それぞれ光ファイバへ結合した. 光音響波の伝搬媒質となる水を満たす容器の底部に穴を開けて黒色天然ゴムを貼り, その上面 (水との界面)で 4 本のファイバからの出射光のビームスポットが空間的に重なるように照射し, 発生するプラズマが水に閉じ込められる効果を利用して PMW を生体へ適用する機構とした. 従来研究では, プラズマを閉じ込める材料にポリエチレンテレフタレートを使用し, 黒色天然ゴムに対する照射スポット径を 3 mm としてフルエンス  $0.9 \text{ J/cm}^2$  以上でレーザ照射したときにピーク圧力 133 MPa 以上の PMW が発生し, ラット健常皮膚への経血管的薬剤輸送が達成された[12]. PMW のピーク圧力はプラズマを閉じ込める材料やレーザの照射スポット径などにも依存するが[13], ここでは上記の  $0.9 \text{ J/cm}^2$  をフルエンスの目安として考えた. そして, 著者の提案する上記の構造において, 4 本のファイバからの出射光の重なりによるビームスポット径がゴム上面で 1.5 mm となり, 16 mJ のパルス光の照射により約  $0.9 \text{ J/cm}^2$  のフルエンスが得られるコア径 600  $\mu\text{m}$ , 開口数 0.39 の石英マルチモード光ファイバを使用することにした. なお, 従来研究により, 同ファイバにより上記 Nd:YAG レーザ (第 2 高調波)の 18 mJ 以下のパルス光を損傷なく安定に伝送可能であることがわかっている[14].

### 4.3 フォトメカニカル波の圧力測定

#### 4.3.1 実験方法

Fig. 4-3 は, PMW の圧力測定のための実験装置のブロック図である. Fig. 4-2 (b)で示した水を満たす容器底面の黒色天然ゴムの直下に超音波ゼリー (Echo Jelly, 日立アロカメディカル)を介してニードル型ハイドロフォン (応答周波数 0.2-10 MHz, 指向角  $15^\circ$ , HNR-1000, Onda)を配置した. 4 本の各光ファイバからの出射パルスエネルギーを 2, 4, 8, 16 mJ と変化させて PMW を発生させ, ハイドロフォンの出力信号をオシロスコープ (サンプルリング速度 5 GS/s, DPO4104B, テクトロニクス)で記録した.

### 4.3.2 実験結果と考察

Fig. 4-4 に各ファイバ出射エネルギーにより発生させた PMW の圧力時間波形を示す。出射エネルギーを 2, 4, 8, 16 mJ (ゴム上面でのフルエンスをそれぞれ 0.11, 0.23, 0.45, 0.91 J/cm<sup>2</sup>), としたとき, PMW のピーク圧力はそれぞれ 23.9, 40.0, 78.8, 168.5 MPa であった。本実験で対象とする皮下腫瘍は, EPR (enhanced permeability and retention)効果により血管壁透過性が正常血管よりも高いと考えられるため, PMW による経血管的薬剤輸送に必要なピーク圧力閾値は上述のラット健常皮膚よりも低いと考えられる。また, そのような圧力条件では, 薬剤は健常組織では漏出せずに, 腫瘍部へ選択的に輸送されることが期待できる。そこで, 従来研究ではピーク圧力 91 MPa 以下の PMW ではラット健常皮膚への経血管的薬剤輸送の効果が認められなかったことから[12], 以下のマウス皮下腫瘍を用いた実験では, 上記条件の中から PMW のピーク圧力が 78.8 MPa となるファイバ出射エネルギー 8 mJ (フルエンス 0.91 J/cm<sup>2</sup>)をレーザ照射条件とした。

## 4.4 マウス皮下腫瘍へのエバンスブルーの輸送と動態観測

### 4.4.1 実験方法

3.3.2 項と同様の手順でマウス皮下腫瘍モデルを作製した。本実験では, 模擬薬剤として EB を用い, PMW による腫瘍部へ経血管的輸送と光音響イメージングによる血管および薬剤分布の観測を行った。光音響イメージングの励起波長として, 血管のイメージングには波長 532 nm を, EB の分布のイメージングには皮下への光侵達を考慮し, EB の吸収ピーク (610 nm)よりも長波長で血液との吸収のコントラストが大きな波長 620 nm を用いた (Fig. 3-2)[15]。Fig. 4-5 (a)は関心領域の模式図であり, 光音響イメージングの関心領域は腫瘍 (目視および触診により判定)を含むように 6.5 × 6.5 mm<sup>2</sup> と設定した。PMW は腫瘍全体に適用するためにプローブを 2 mm 間隔で走査し, 関心領域の中心 4 mm 四方において 9 点 (3 × 3 点)でレーザを 5 秒間隔で 3 パルスずつ照射し (エネルギー 8 mJ/pulse/fiber, スポット径 1.5 mm), PMW を発生させた。

本実験の手順を Fig. 4-5 (b)に示す。まず, EB 投与前に励起波長 532 nm (150 μJ/pulse/fiber)によって血管の光音響イメージングを実施し (走査間隔 65 μm), その後励起波長 620 nm (70 μJ/pulse/fiber)によるイメージングも実施した (走査間隔 130 μm)。続いて, EB を 20 mg/kg animal weight でマウスへ尾静脈注射し, 投与 0.5 時間後と 1 時間後に励起波長 620 nm で組

織中の EB の分布を光音響イメージングした。EB 投与 1.5 時間後、腫瘍部での EB の集積を促進させることを目的に上記条件で PMW を適用した。その後、PMW 適用 0.5 時間後 (EB 投与 2 時間後) と 1.5 時間後 (EB 投与 3 時間後) に再び EB の分布を光音響イメージングした。PMW 非適用群 (EB 投与のみ) についても同じ条件で EB の分布の光音響イメージングを実施し、光音響信号の振幅の経時変化を PMW 適用群と比較した。このとき、EB 投与 0.5 時間後の振幅が 1 となるように規格化し、各時間の振幅値を平均値±標準誤差で表示し、同じ時間における 2 群間の値をノンパラメトリック Mann-Whitney 検定により比較し、 $P<0.05$  を統計学的に有意であるとした。全てのイメージング終了後、マウスは速やかに犠牲死させ、腫瘍部を生検し、同組織を固定後に凍結薄切切片 (厚さ 10  $\mu\text{m}$ ) を作製し、倒立顕微鏡により組織断面内の EB の蛍光分布を観察した (励起波長 539-585 nm, 観察波長 600-682 nm)。

#### 4.4.2 実験結果と考察

Fig. 4-6 に結果の一例を示す。(a)はマウス腫瘍部およびその周辺部の明視野像であり、赤破線枠は光音響イメージングの関心領域を示す。(b)は EB 投与前に励起波長 532 nm で取得した血管の光音響投影画像である (表面信号を除去)。(c)は (b)の白破線で示した走査線に対応する断層画像で、黄破線は組織表面を表す。マウス皮膚および皮下を走行する深さ約 2 mm までの血管由来の光音響信号が検出されている。(d-h)は波長 620 nm で経時的に取得した光音響投影画像である。(d)は EB 投与前に取得した画像であり、同波長ではヘモグロビンなどの生体内因性吸収体の吸収係数は小さいため、光音響信号の振幅は全体的に小さかった。(e,f)はそれぞれ EB 投与 0.5 時間後および 1 時間後に取得した EB の分布を示す画像である。信号の分布が (b)に示す血管の分布と部分的に一致しており、主に血中を循環する EB に由来する光音響信号を捉えていると考えられる。(g,h)は PMW 適用 0.5 時間後 (EB 投与 2 時間後) および 1.5 時間後 (EB 投与 3 時間後) の EB の分布を示す画像である。PMW 適用により腫瘍中心部の光音響信号は急激に増大し、かつその領域は拡大した。この結果は、PMW による経血管的薬剤輸送の効果を示していると考えられる。(i-m)は、それぞれ (d-h)の光音響投影画像中の白破線で示した走査線に対応する断層画像である。(j,k)の信号の分布は (c)と部分的に一致しており、これは上述したように、投与後に血中を流れる EB に由来する光音響信号を捉えていると考えられる。PMW 適用後の (l,m)では、深さ約 0.5 mm にそれまで見られなかった振幅の大きな光音響信号が現れている (黄矢印)。(c)の血管の断層画像において、同深さ領域に信号が見られることから (黄矢印)、PMW が同領域の

血管に作用したことでその透過性が亢進し、EB が組織へ輸送されたと考えられる。(n)に超音響断層画像と対応する生検した腫瘍部位の薄切標本の EB の蛍光分布を示す。皮下腫瘍の上部 (深さ約 0.5 mm)で強い蛍光が見られ (黄矢印), その深さは上述した (l,m)の振幅の大きな超音響信号の深さとほぼ一致した。これらの結果は、超音響イメージングにより蛍光イメージングなどでは困難な組織中の薬剤の深さ情報を *in vivo* で取得可能であることを示している。それに対し、組織の浅部 (皮膚)では蛍光強度が低い。これは、腫瘍血管の透過性が EPR 効果により亢進しているのに対し、健常皮膚中の血管は血管壁透過性亢進の圧力閾値が高く、PMW の効果が限定的であったためと考えられる。腫瘍の深部 (0.8 mm〜)で蛍光強度が低いのは、組織中で PMW が急速に減衰するためと考えられる。(c)では深さ 1.7-1.9 mm の深さ領域にも血管に由来する超音響信号が見られるが (青矢印), (n)より同深度は腫瘍の外 (下部)にあたるため、これらの信号は正常組織中の血管に由来すると考えられ、そのために上述の皮膚と同様の理由により EB は漏出しなかったと考えられる。

Fig. 4-7 は薬剤動態の傾向が異なる別個体の結果を示している。(a)はマウス腫瘍部およびその周辺の明視野像, (b)は EB 投与前の血管の超音響投影画像 (表面信号を除去), (c)は (b)の白破線で示した走査線に対応する断層画像である。(d-g)は波長 620 nm による超音響投影画像であり, (d)は EB 投与前, (e,f)はそれぞれ投与 0.5 時間後および 1 時間後, (g)は PMW 適用 0.5 時間後 (EB 投与 2 時間後)にそれぞれ取得した。(h-k)は (d-g)のそれぞれの白破線で示した走査線に対応する断層画像である。Fig. 4-6 に示した個体の結果と大きく 2 つの違いが見られる。まず、本個体では関心領域の中心 (腫瘍中心)における血管由来の超音響信号の振幅が小さかった。これは、腫瘍の新生血管が十分に成長していないことを示していると考えられる。(e,f)より EB 投与後の腫瘍中心における EB 由来の超音響信号の振幅と分布にはほとんど変化はなく、EPR 効果による EB の集積が限定的であることを示している。(g)に示すように、PMW 適用後には EB 由来の超音響信号の振幅は急激に増大した。(k)に示すように、PMW 適用後に腫瘍の上部 (深さ約 0.2 mm)と底部 (深さ約 1.3 mm)に振幅の大きな超音響信号が現れ (それぞれ黄色と青色の矢印), これらの深さは (l)に示す蛍光分布と一致した。さらに、血管の超音響断層画像 (c)の同等深さにも比較的振幅の大きな超音響信号が見られることから (それぞれ黄色と青色の矢印), PMW はこの領域の血管に作用して EB が漏出したと考えられる。

以上のように、Fig. 4-6 と Fig. 4-7 の 2 個体より取得した超音響画像および生検した腫瘍組織の蛍光画像は、同様の手順および条件で実験したにも関わらず、傾向の大きく異なる薬剤動態を示した。これは、Fig. 4-6 (b)と Fig. 4-7 (b)の血管の超音響画像が示したように、腫瘍または個体ごとに血管の分布やそれらの透過性などが異なることによると考えられる。

このことは、共焦点顕微鏡法や2光子顕微鏡法などを用い、毛細血管なども含めた血管情報を *in vivo* で取得し、超音響画像と比較することでより詳細な検討が可能になると考えられる。

Fig. 4-8はPMW適用群 (n=7)および非適用群 (n=4)で取得したEB由来の超音響信号の振幅(関心領域の中心3 mm四方における超音響信号の最大振幅)の経時変化を示す。非適用群では振幅の経時変化は小さく、EPR効果による腫瘍部での薬剤集積が限定的であることを示している。一方、PMW適用群では、超音響信号の振幅はPMW適用後に急激に増大し、PMW適用前後(EB投与1時間後から2時間後まで)の振幅の増加率は、EB投与0.5時間後から1時間後まで増加率の約8.9倍であった。PMW適用1.5時間後(EB投与3時間後)の超音響信号の振幅値は非適用群に対して有意に高く、PMWによる腫瘍部への経血管的薬剤輸送の効果を示している。同一の手順および条件でPMWを適用しているにも関わらず、PMW適用後の超音響信号の振幅はばらつきが大きい。これはFig. 4-6とFig. 4-7の個体間の違いと同様に、腫瘍または個体間で血管の分布やその透過性に違いがあるためと考えられる。これら結果は、標的組織中で適正な薬剤分布を得るためには、PMWによる薬剤の輸送と同時に、その場での輸送薬剤の動態観測が極めて重要であることを示している。Fig. 4-2に示したように、本システムではイメージングと薬剤輸送に同一のプロープを使用し、照射光エネルギーおよびプロープの高さの調整と、プロープ直下への黒色ゴムの挿入または取り外しにより、両機能を簡便かつ迅速に切り替え可能である。薬剤投与後、一般に血中薬剤濃度はある時間に最大となった後、代謝や排泄などにより時間経過に伴いほぼ指数関数的に減少する。そのため、血中薬剤濃度が高い時間内に、経血管的な薬剤輸送とその動態観測を迅速かつ繰り返しの適用可能な本システムは、標的組織への高効率な薬剤輸送による高い治療効果の獲得、また薬剤の投与回数を最小限に抑えることで低副作用の治療の実現に貢献すると考えられる。

最後に、本システムの応用について考える。まず、使用する薬剤に超音響イメージングで使用可能な光吸収特性がある光熱治療や光線力学的治療(photodynamic therapy, PDT)などへの応用が有望である。例えば、PDTの光感受性薬剤には、本実験で用いたEBよりも長波長の赤色領域ないし近赤外領域に吸収ピークを有するものが多数存在し[16-18]、より深部の組織を対象とした診断・治療への応用が期待できる。光感受性薬剤は蛍光法によるイメージングも可能であるが、治療上重要な薬剤の深さ分布および治療深度の評価は難しい。その点で、超音響イメージング法は深さ分解性を有し、また波長を変えることで血管の走行や血行動態もイメージング可能であり、病変に対する新しい包括的診断技術となりうる。一方、それ自体には光吸収特性がない治療薬についても、それらを搭載したキャリ

アを光吸収体で標識することにより、その体内動態の追跡と治療効果を観測が可能となり、様々な薬剤を用いた応用が期待できる。その例として、近年、ナノ粒子に PDT や光熱治療の光増感剤 (光吸収体) と抗癌剤をともに搭載させ、その動態を観測しながら組み合わせ治療を行う診断・治療一体化の研究が多数報告されており、動物実験レベルでは高い治療効果が得られている[19-21]。しかし、このような優れた治療効果を得ながら、同時に抗癌剤のような強力な薬剤を投与した場合の副作用を極力抑えるためには、薬剤が標的組織中で適正に分布することが必要不可欠である。そのため、本研究で開発した薬剤輸送と薬剤動態観測の一体型システムがこのような診断・治療に寄与することが期待できる。

#### 4.5 まとめ

本章では、ファイバ照射型超音響イメージング装置に PMW による経血管的薬剤輸送機能を融合させて開発した、標的組織中への薬剤の輸送とその動態観測の両方を達成可能な診断・治療一体型システムについて述べた。ファイバ伝送した高エネルギーパルス光により PMW を発生させて経血管的薬剤輸送を行うとともに、同ファイバで伝送した低エネルギーパルス光を用いて輸送薬剤の動態を超音響イメージングにより観測可能なシステムとし、マウス皮下腫瘍への EB の輸送と動態観測を行った。その結果、PMW 適用後に EB 由来の超音響信号の振幅は顕著に増大し、適用 1.5 時間後には PMW 非適用群に対して有意に高くなり、PMW による腫瘍部への薬剤輸送効果が示された。このとき、PMW 適用後の EB に由来する超音響信号の振幅は個体ごとに大きくばらつき、PMW による薬剤の輸送と同時に、その場での輸送薬剤の動態観測が極めて重要であることが示された。以上より、本研究で開発した薬剤輸送と薬剤動態観測の一体型システムの有用性が示された。

## 参考文献 第4章

- [1] B. Geers, H. Dewitte, S. C. De Smedt, I. Lentacker, “Crucial factors and emerging concepts in ultrasound-triggered drug delivery,” *J. Control. Release* **164**, pp. 248-255 (2012).
- [2] M. D. Bednarski, J. W. Lee, M. R. Callstrom, K. C. Li, “*In vivo* target-specific delivery of macromolecular agents with MR-guided focused ultrasound,” *Radiology* **204**(1), pp. 263-268 (1997).
- [3] J. L. Nelson, B. L. Roeder, J. C. Carmen, F. Roloff, W. G. Pitt, “Ultrasonically activated chemotherapeutic drug delivery in a rat model,” *Cancer Res.* **62**(24), pp. 7280-7283 (2002).
- [4] J. Dobson, “Magnetic nanoparticle for drug delivery,” *Drug Dev. Res.* **67**(1), pp. 55-60 (2006).
- [5] P. A. Garcia, J. H. Rossmeisl Jr., J. L. Robertson, J. D. Olson, A. J. Johnson, T. L. Ellis, R. V. Davalos, “7.0-T magnetic resonance imaging characterization of acute blood–brainbarrier disruption achieved with intracranial irreversible electroporation,” *PLoS One* **7**(11), e50482 (2012).
- [6] J. Wang, M. Sui, W. Fan, “Nanoparticles for tumor targeted therapies and their pharmacokinetics,” *Curr. Drug Metab.* **11**(2), pp. 129-141(2010).
- [7] S. Taurin, H. Nehoff, K. Greish, “Anticancer nanomedicine and tumor vascular permeability; where is the missing link?” *J. Control. Release* **164**, pp. 265-275 (2012).
- [8] C. J. H. Ho, G. Balasundaram, W. Driessen, R. McLaren, C. L. Wong, U. S. Dinish, A. B. E. Attia, V. Ntziachristos, M. Olivo, “Multifunctional photosensitizer-based contrast agents for photoacoustic imaging,” *Sci. Rep.* **4**, 5342 (2014).
- [9] C. Lutzweiler, R. Meier, E. Rummeny, V. Ntziachristos, D. Razansky, “Real-time optoacoustic tomography of indocyanine green perfusion and oxygenation parameters in human finger vasculature,” *Opt. Lett.* **39**(14), pp. 4061-4064 (2014).
- [10] 渡辺恭良, “創薬・DDS における分子イメージング,” *Drug Delivery System* **23**(1), pp. 49-60 (2008).
- [11] 超音波便覧編集委員会 編, 超音波便覧 (丸善出版, 1999).
- [12] S. Sato, K. Yoshida, S. Kawauchi, K. Hosoe, Y. Akutsu, N. Fujimoto, H. Nawashiro, M. Terakawa, “Highly site-selective transvascular drug delivery by the use of nanosecond pulsed laser-induced photomechanical waves,” *J. Control. Release* **192**, pp. 228-235 (2014).
- [13] 安藤貴洋, “レーザー誘起応力波による遺伝子導入法を用いた脊髄損傷モデルラットの運動機能改善,” 慶應義塾大学, 2013, 博士論文.

- [14] 中野洸輝, “フォトメカニカル波を用いた光ファイバ型ドラッグデリバリーデバイスの開発,” 東京農工大学, 2015, 修士論文.
- [15] Y. Tsunoi, S. Sato, S. Kawauchi, H. Ashida, D. Saitoh, M. Terakawa, “*In vivo* photoacoustic molecular imaging of the distribution of serum albumin in rat burned skin,” *Burns* **39**(7), pp. 1403-1408 (2013).
- [16] Y. Tsunoi, S. Sato, H. Ashida, M. Terakawa, “Photoacoustic imaging of intravenously injected photosensitizer in rat burn models for efficient antibacterial photodynamic therapy,” *Proc. SPIE* **8210**, 82100D (2012).
- [17] K. Hatz, U. Schneider, P. B. Henrich, B. Braun, S. Sacu, C. Prünte, “Ranibizumab plus verteporfin photodynamic therapy in neovascular age-related macular degeneration: 12 months of retreatment and vision outcomes from a randomized study,” *Ophthalmologica* **233**(2), pp. 66-73 (2015).
- [18] C. M. Moore, A. R. Azzouzi, E. Barret, A. Villers, G. H. Muir, N. J. Barber, S. Bott, J. Trachtenberg, N. Arumainayagam, B. Gaillac, C. Allen, A. Schertz, M. Emberton, “Determination of optimal drug dose and light dose index to achieve minimally invasive focal ablation of localised prostate cancer using WST11-vascular-targeted photodynamic (VTP) therapy,” *BJU Int.* **116**(6), pp. 888-896 (2015).
- [19] L. Nie, P. Huang, W. Li, X. Yan, A. Jin, Z. Wang, Y. Tang, S. Wang, X. Zhang, G. Niu, X. Chen, “Early-stage imaging of nanocarrier-enhanced chemotherapy response in living subjects by scalable photoacoustic microscopy,” *ACS Nano.* **8**(12), pp. 12141-12150 (2014).
- [20] A. C. Poulouse, S. Veerananarayanan, M. S. Mohamed, Y. Nagaoka, R. R. Aburto, T. Mitcham, P. M. Ajayan, R. R. Bouchard, Y. Sakamoto, Y. Yoshida, T. Maekawa, D. S. Kumar, “Multi-stimuli responsive Cu<sub>2</sub>S nanocrystals as trimodal imaging and synergistic chemophotothermal therapy agents,” *Nanoscale* **7**(18), pp. 8171-8646 (2015).
- [21] C. Sim, H. Kim, H. Moon, H. Lee, J. H. Chang, H. Kim, “Photoacoustic-based nanomedicine for cancer diagnosis and therapy,” *J. Control. Release* **203**, pp. 118-125 (2015).
- [22] Y. Tsunoi, S. Sato, S. Kawauchi, Y. Akutsu, Y. Miyagawa, K. Araki, A. Shiotani, M. Terakawa, “Theranostic system for drug delivery and pharmacokinetic imaging based on nanosecond pulsed light-induced photomechanical and photoacoustic effects,” *Jpn. J. Appl. Phys.* **54**(11), 116601 (2015).

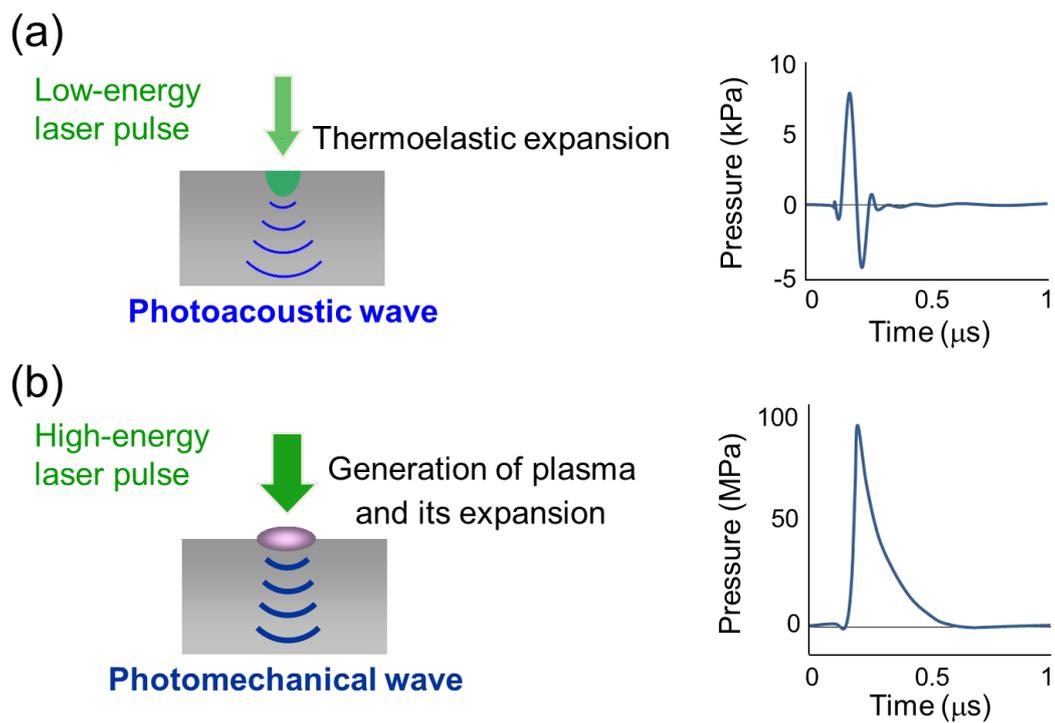


Fig. 4-1 Schematics of pulsed laser interactions with solid material or tissue to generate pressure waves and their temporal waveforms: (a) photoacoustic (PA) effects induced by low-energy pulses and (b) photomechanical effects induced by high-energy pulses [22]. Copyright (2015) The Japan Society of Applied Physics.

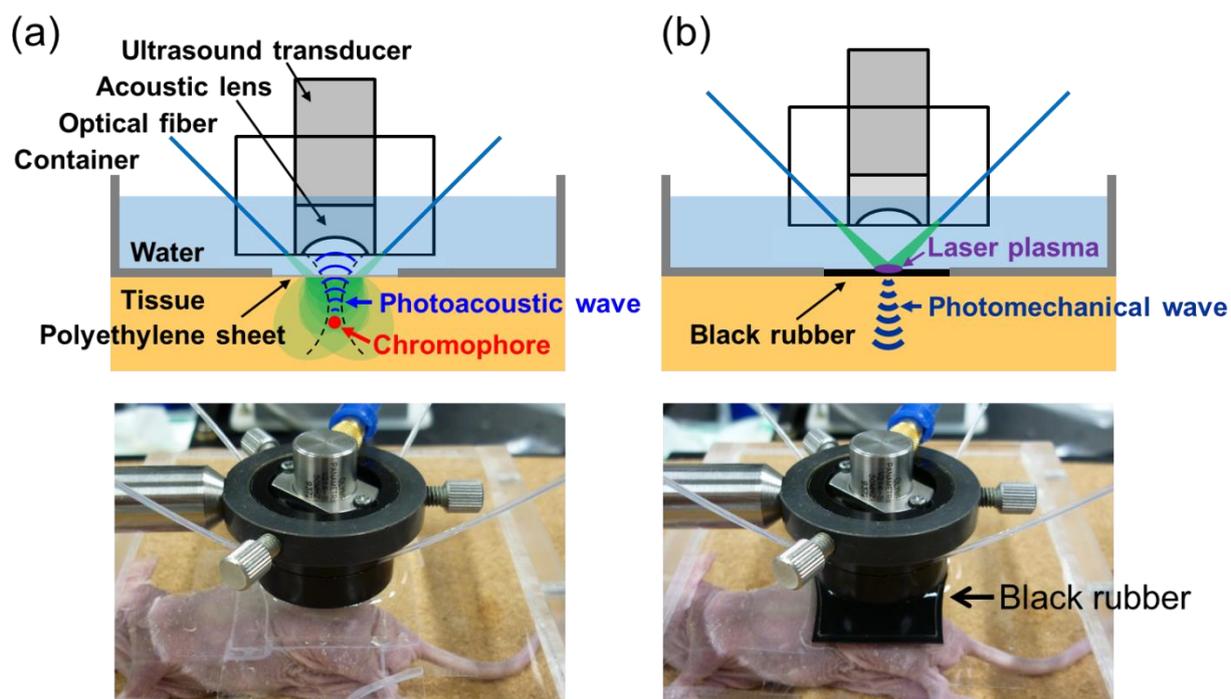


Fig. 4-2 Schematics and photographs of the theranostic system. Configurations for (a) PA imaging and (b) drug delivery by PMWs [22]. Copyright (2015) The Japan Society of Applied Physics.

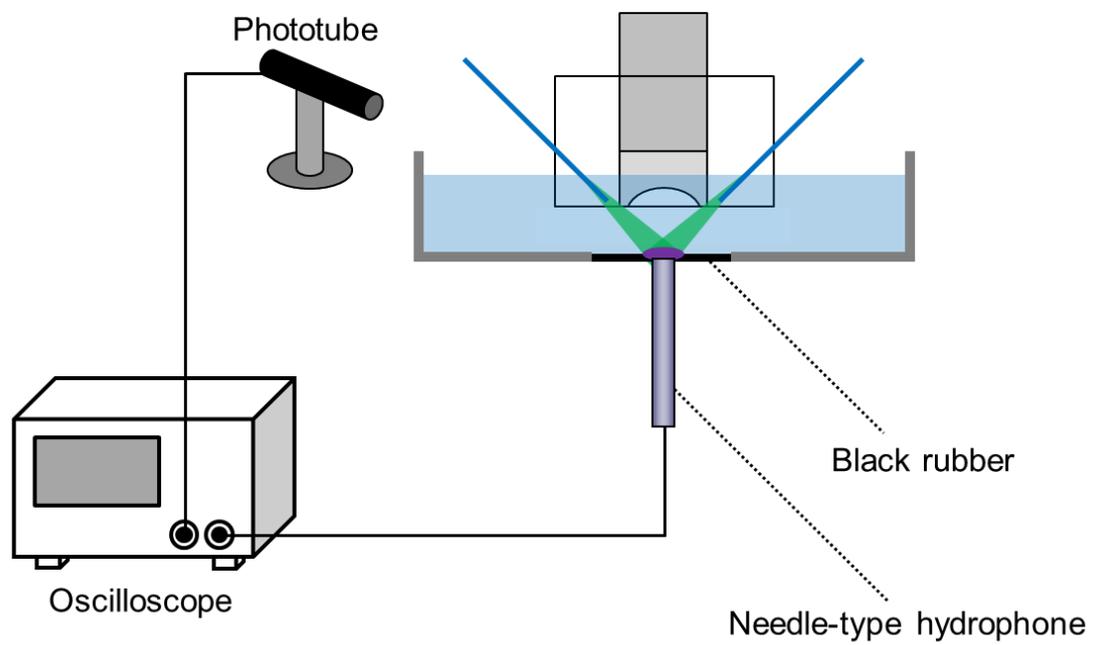


Fig. 4-3 Diagram of the experimental setup for measurement of temporal pressure profiles of PMWs.

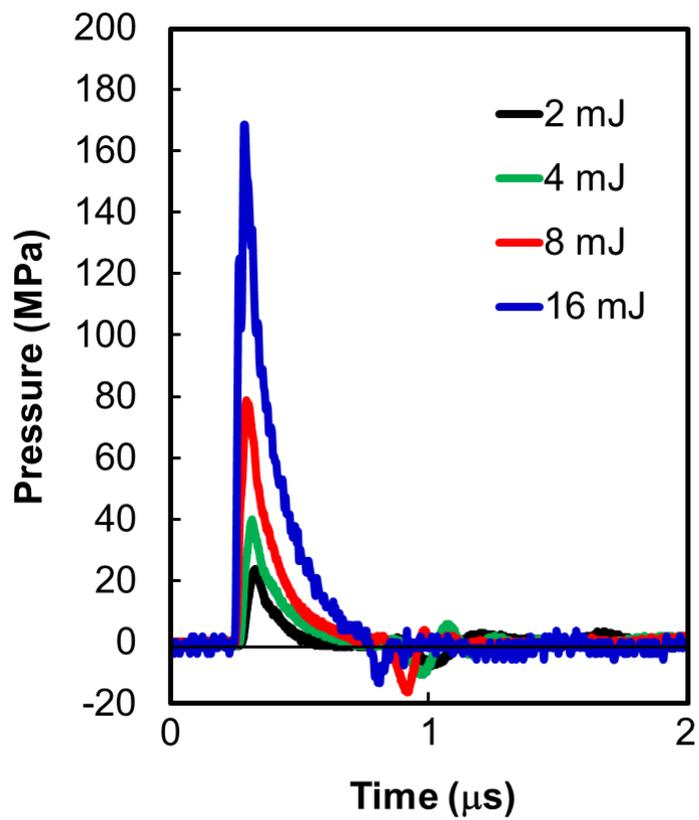


Fig. 4-4 Temporal waveforms of PMWs induced by laser pulses at various energies [22]. Copyright (2015) The Japan Society of Applied Physics.

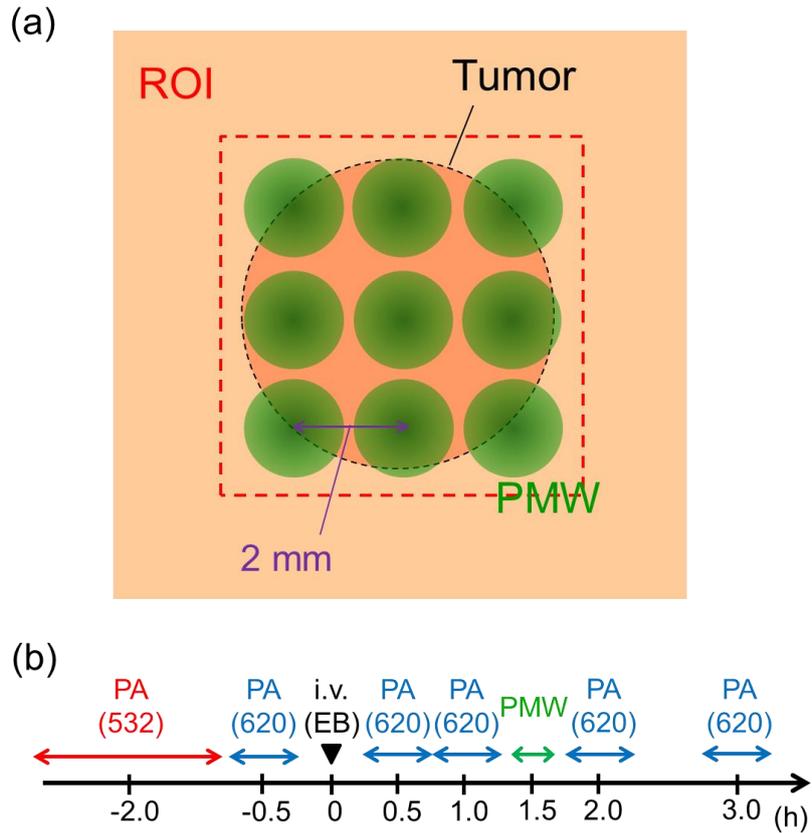


Fig. 4-5 (a) Schematics of the region of interest (ROI) ( $6.5 \times 6.5 \text{ mm}^2$ ) for PA imaging and application points for PMWs to the tumor [22]. (b) Time chart for the animal experiment. (a) is reproduced from Jpn. J. Appl. Phys. Vol. 54, No. 11, pp. 116601/1-6, October 2015. Copyright (2015) The Japan Society of Applied Physics.

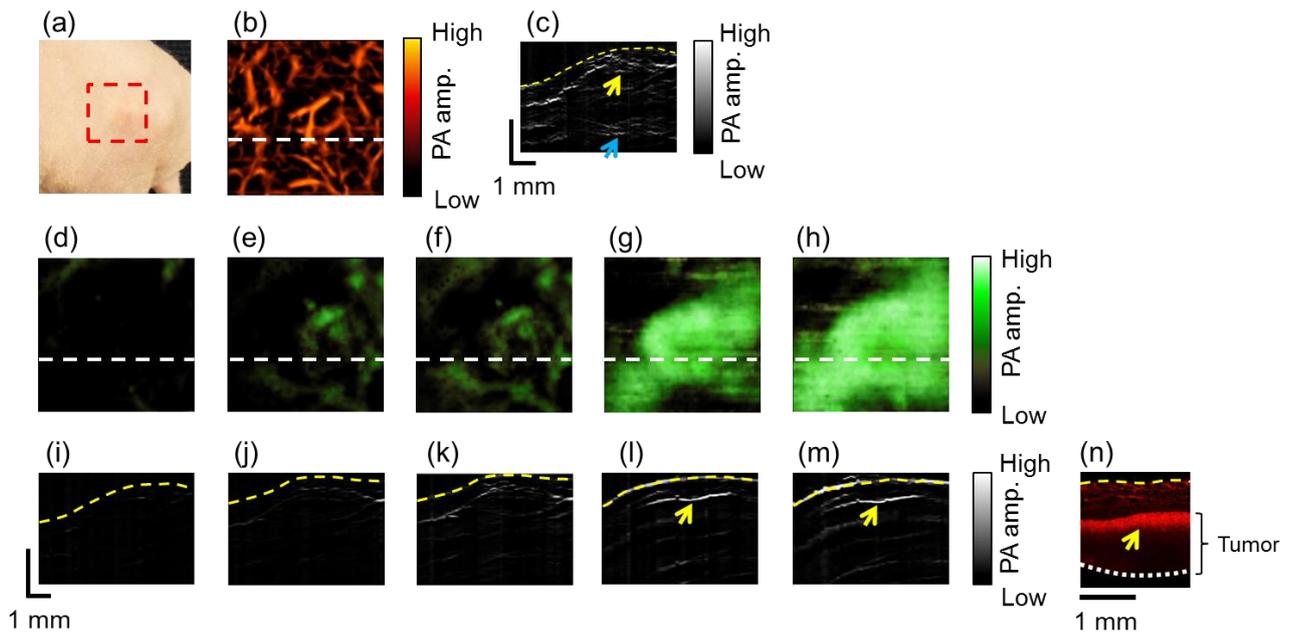


Fig. 4-6 Results of transvascular drug delivery by PMWs and PA imaging of the distribution of the drug delivered in the tumor [22]. (a) White-light photograph and (b) maximum amplitude projection (MAP) PA image obtained at 532 nm (blood vessels) of the skin over the tumor in a mouse; a red dashed-line frame in (a) indicates the ROI for PA imaging ( $6.5 \times 6.5 \text{ mm}^2$ ). Surface signals are removed in (b). (c) PA tomogram ( $6.5 \times 2.35 \text{ mm}^2$ ) corresponding to the scan line shown by the white broken lines in (b). A yellow broken line indicates the tissue surface. Yellow and blue arrows indicate hemoglobin-originated PA signals; the deeper signal (blue arrow) is located under the tumor. (d-h) MAP PA images obtained at 620 nm (EB distribution): (d) before injection, (e) 0.5 h and (f) 1 h after injection, and (g) 0.5 h and (h) 1.5 h after PMW application. Surface signals are removed. (i-m) PA tomograms ( $6.5 \times 2.35 \text{ mm}^2$ ) corresponding to the scan lines shown by white broken lines in (d-h), respectively. Yellow arrows indicate EB-originated PA signals in the top region of the tumor. (n) Cross-sectional EB fluorescence image of the excised tissue. The yellow arrow indicates the region with high-intensity EB fluorescence and the white dotted line indicates the bottom of the tumor. Copyright (2015) The Japan Society of Applied Physics.

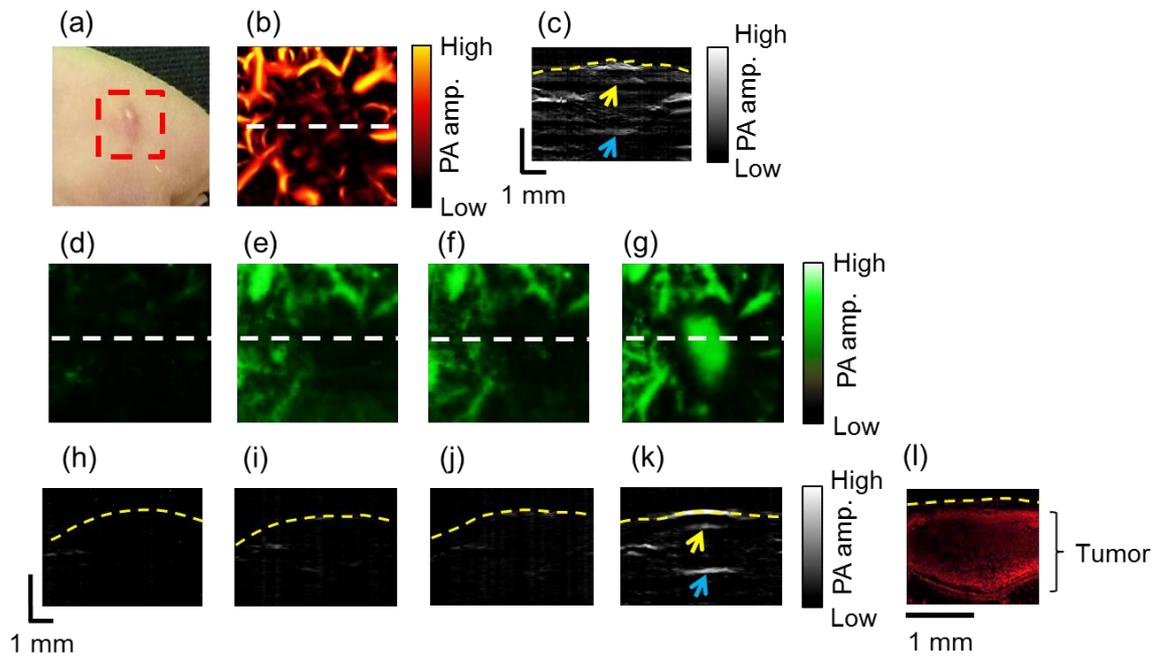


Fig. 4-7 Results of transvascular drug delivery by PMWs and PA imaging of the distribution of the drug delivered in the tumor [22]. (a) White-light photograph and (b) MAP PA image obtained at 532 nm (blood vessels) of the skin over the tumor in a mouse; a red dashed-line frame in (a) indicates the ROI for PA imaging ( $6.5 \times 6.5 \text{ mm}^2$ ). Surface signals are removed in (b). (c) PA tomogram ( $6.5 \times 2.5 \text{ mm}^2$ ) corresponding to the scan line shown by the white broken lines in (b). A yellow broken line indicates the tissue surface. Yellow and blue arrows indicate hemoglobin-originated PA signals in the top and bottom regions of the tumor, respectively. (d-g) MAP PA images obtained at 620 nm (EB distribution): (d) before injection, (e) 0.5 h and (f) 1 h after injection, and (g) 0.5 h after PMW application. Surface signals are removed. (h-k) PA tomograms ( $6.5 \times 2.5 \text{ mm}^2$ ) corresponding to the scan lines shown by white broken lines in (d-g), respectively. Yellow and blue arrows indicate EB-originated PA signals in the top and bottom regions of the tumor, respectively. (l) Cross-sectional EB fluorescence image of the excised tissue. Copyright (2015) The Japan Society of Applied Physics.

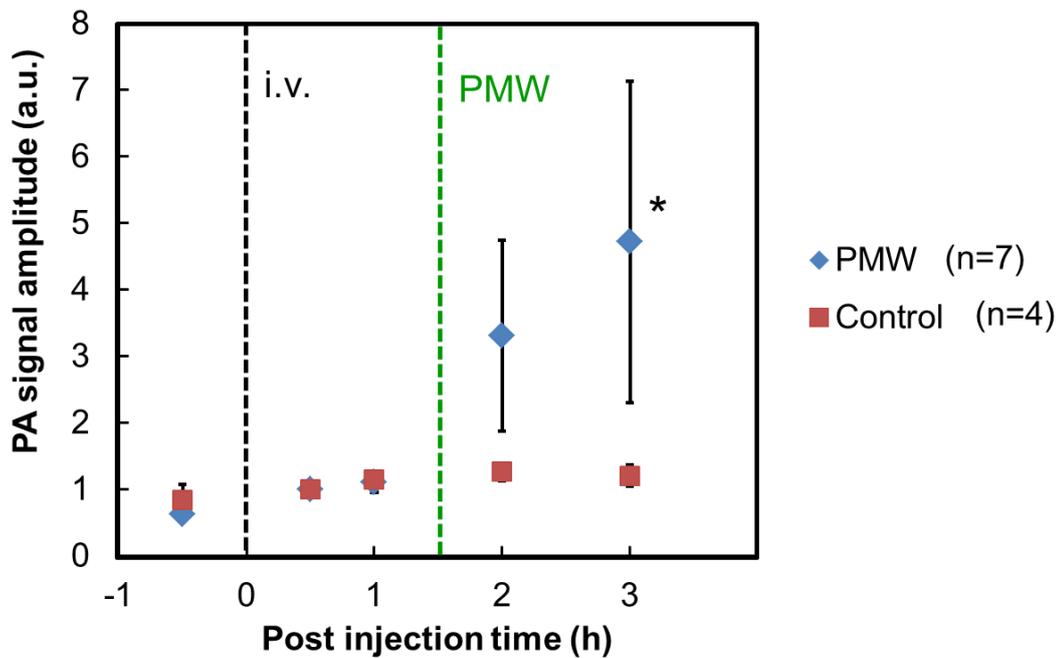


Fig. 4-8 Time courses of the amplitudes of EB-originated PA signals [22]. Plots represent values averaged for a  $3 \times 3 \text{ mm}^2$  area in the central region of the ROI for PA imaging. Values are expressed as means  $\pm$  standard error. \* depicts  $P < 0.05$  versus control. Copyright (2015) The Japan Society of Applied Physics.

## 第 5 章

### 結論

## 5.1 はじめに

薬剤療法において所望の治療効果を得るためには、投与した薬剤が標的部位で適正に分布する必要があり、そのためには体内の薬剤の分布を観測・制御可能な診断・治療一体型システムの開発が強く望まれる。著者が本論文において述べた研究に着手した時期以降も、このようなセラノスティクスを志向した研究報告は相次ぎ、例えば2013年には超音波と薬剤キャリアと造影剤の両機能を有するバブルリポソームを用いた方法が報告された[1-3]。しかし、1章で述べたように、所望の部位で十分な薬理効果を得られる決定的な方法は現在も確立していない。本研究では、ナノ秒パルス光を低エネルギーで照射することにより発生する光音響波を用いて血管および薬剤分布のイメージングを、また高エネルギーパルス光で照射することで発生するフォトメカニカル波 (photomechanical wave, PMW)により薬剤輸送を行うシステムの実現を目指した。そのために、まず薬剤の輸送経路である血管のイメージングのために、小型・軽量のファイバ照射型音響学的分解能光音響イメージング装置を開発した。次に、同イメージング装置により組織中の薬剤分布を観測可能であること、そしてその有用性を示した。最後に、同イメージング装置にPMWによる経血管的薬剤輸送機能を融合させることで薬剤の輸送とその動態観測の一体型システムとし、マウス皮下腫瘍を対象に模擬薬剤の輸送とその動態観測を行い、システムの有用性を実証した。以下に各章ごとに得られた成果をまとめ、最後に総括する。

## 5.2 ファイバ照射型音響学的分解能光音響イメージング装置の開発 (第2章)

光音響イメージング法の一般的な原理について述べた後に、本研究で採用した音響学的分解能光音響イメージング法に焦点を当て、イメージングの理論を説明し、経血管的薬剤輸送の観測に向けた音響学的分解能光音響イメージング装置の開発について述べた。研究着手時まで報告されていた同種の装置は、励起光照射のために複雑なアライメントと大きなスペースを必要とし、大型で *in vivo* イメージングに不向きであった。2012年にMaらは光ファイバにより励起光を組織へ同軸照射する機構の音響学的分解能光音響イメージング装置を開発し、生体の深さ約6 mmまでの血管画像を得たことを報告したが[4]、同方式では生体表面の汚れや表皮中のメラニンなどに由来して強い表面信号が発生し、生体の浅部にある吸収体の画像化は困難である。Zerdaらは市販のリング状照射用ファイババンドルを励起光学系に利用した同種の装置を報告した[5]。しかし、規格の決まった市販照射光学系では装置を柔軟に設計することは困難であり、応用範囲が限定される。著者は、光ファ

イバによる 4 方向からの簡便な斜方向照射光学系により，モンテカルロシミュレーションと実測に基づき生体内での光音響波発生空間対照性が確保できることを確認し，*in vivo* イメージングに適した小型・軽量の装置を開発することに成功した．これを用いてラット皮膚および皮下組織を対象とした *in vivo* イメージングを行った結果，光音響画像の解像度およびコントラストの向上を目的とした開口合成法 (synthetic aperture focusing technique, SAFT) とコヒーレンス係数 (coherence Factor, CF) の重み付け処理，またデジタルバンドパスフィルタ処理の適用により，太さ数十～数百  $\mu\text{m}$  の微小血管を深さ 3 mm まで画像化できた．すなわち，研究着手後にも相次いだ本イメージング法の新規装置開発に関する研究事例の中でも，簡便かつ柔軟性の高い照射光学系と小型・軽量性を持つ著者の装置は *in vivo* イメージングに適しており，その適用範囲は広い．

### 5.3 光音響イメージング法によるアルブミンと生分解性ナノ薬剤の動態観測 (第 3 章)

上述したファイバ照射型音響学的分解能光音響イメージングにより組織中の薬剤の動態を観測可能であるかどうか，またその有用性を検討した結果について述べた．まず，アルブミンと結合した EB の動態を，アルブミン漏出モデルとしてのラット熱傷皮膚を対象に観測した．その結果，血管透過性亢進部位から効率的に漏出した EB 結合アルブミンの組織中の時空間的動態を観測できた．アルブミンは血中における薬剤の運搬機能を有するため，本実験結果により本システムが EB と同様に光吸収を持つ薬剤をイメージング可能であることを示した．続いて，光音響イメージングの造影剤および光線力学的治療 (photodynamic therapy, PDT) の光感受性薬剤として機能することが期待される診断・治療一体型薬剤である ICG (Indocyanine Green) ラクトソームを用い，マウス皮下腫瘍の光音響イメージングと PDT を実施した．本薬剤は，ICG が生分解性ポリマーに内包された生体適合性の高いナノ薬剤であり，高い治療効果と安全性が期待される．実験の結果，ICG ラクトソームの EPR (enhanced permeability and retention) 効果による腫瘍部での集積と PDT による光褪色，また腫瘍 PDT に対する血管反応を捉えることに成功し，ICG ラクトソームが腫瘍の光音響イメージングの造影剤および PDT 用の光感受性薬剤として有用であることが示唆された．また，PDT による同薬剤の褪色量が，抗腫瘍効果の機序の一つである血管閉塞または血流低下の程度と高い相関を示すことが明らかになり，腫瘍に対するこれら光音響イメージング (診断) と PDT (治療) の組み合わせが重要であることも示唆された．しかし，本実験では ICG ラクトソームの腫瘍部への輸送は EPR 効果に頼るため，結果は個体ごとに大きくばらつき，能動的な薬剤輸送機能の必要性も示された．

## 5.4 光の機械的・音響的作用を用いた薬剤輸送と薬剤動態観測の一体型システムの開発 (第4章)

上記ファイバ照射型光音響イメージング装置に PMW による経血管的薬剤輸送機能を付加することにより、標的組織中への薬剤の輸送とその動態観測の両方を達成可能な診断・治療一体型システムを実現した。マウス皮下腫瘍を対象とした模擬薬剤 (EB) の輸送とその動態観測を行った結果、光音響信号の振幅は PMW 適用直後に急激に増大し、適用 1.5 時間後の振幅は非適用群に対して有意に高くなり、PMW による腫瘍部への薬剤輸送効果が示された。PMW 適用後の薬剤由来の光音響信号の振幅は個体ごとに大きくばらつき、標的組織で適正な薬剤分布を得るためには、PMW により輸送した薬剤の動態をその場で観測することが重要であることが示された。

## 5.5 総括

本研究は、標的部位で薬剤の適正な分布を得るために、ともにナノ秒パルス光により効率よく発生可能な光音響波と PMW を用いた診断・治療一体型のシステムを実現することを目的に実施した。まず、ファイバ照射型の小型・軽量の音響学的分解能光音響イメージング装置を開発し、ラット皮膚および皮下組織を対象とした *in vivo* イメージングより、同装置が太さ数十～数百  $\mu\text{m}$  の微小血管系の構造を観測深度 3 mm でイメージング可能であることを示した。次に、薬剤の運搬体であるアルブミンのラット熱傷皮膚中での動態、および実際の薬剤として ICG ラクトソームのマウス皮下腫瘍中での動態を観測し、同イメージング装置により経血管的薬剤輸送の観測が可能であることを示した。最後に、同イメージング装置に PMW による経血管的薬剤輸送機能を付加した診断・治療一体型システムを開発し、マウス皮下腫瘍への薬剤輸送とその動態観測を達成することによりシステムの有効性を実証した。本システムは、標的組織の薬剤分布の観測とその結果に応じた制御を可能にし、高効率・低副作用の薬剤療法の実現、延いては重要疾患の予後改善と QOL (quality of life) 向上に貢献することが期待される。

## 5.6 展望

本節では、本研究で開発したシステムに関して、基礎および臨床での展望についてそれ

それぞれ述べる。

まず、基礎医学研究分野への寄与として、病態研究や創薬研究などにおける小動物モデル用の実験装置としての利用が有望である。2003年にヒトの遺伝情報の完全な解析を目的としたヒトゲノム計画が完了し、近年の医学およびその周辺分野の研究は生体分子機能の解明に移りつつある[6]。その中で、本システムは組織ないし細胞レベルで選択的に送達された分子(分子プローブ)の動態、また病変の進行や治癒過程などの評価指標となる微小血管を *in vivo* でどちらもイメージングでき、生物学的・分子生物学的現象を観察すること、さらには組織の機能や病態などを多角的に評価・解析するために有用であると考えられ、その成果は難治性疾患の病態解明やそれに対する有効な新薬や診断・治療法の開発などに貢献することが期待できる。

一方、ヒトを対象とした場合、皮膚(厚さ約 3 mm)の疾患に対する診断・治療への応用が有望である。ここでは、近年のオゾン層の破壊に伴う紫外線量の増大などにより患者数の増大が深刻化している皮膚癌を対象に、本システムにより期待される効果を述べる。悪性黒色腫や有棘細胞癌などの皮膚癌では、その病期に応じて治療戦略が異なり、重篤化した場合には転移を起こし致命的になることも多く、組織の外科的切除が不可欠である。一方、比較的早期の場合には抗癌剤や分子標的薬などによる治療、また表在型の基底細胞癌などの非メラノーマ性の早期皮膚癌の場合には PDT も有効であり[7]、患者の整容性の確保や QOL などの観点からは、このような保存療法が望ましい。皮膚癌では、病変の深さが進行の一つの重要な指標となる[8]。そのため、深さ分解的かつ高空間分解能な光音響イメージング法は、皮膚癌の深さを定量的かつ高精度に評価可能であり、治療戦略の決定を支援するための診断技術として有望である。また、上記の薬剤治療や PDT などに際して病変の深さ情報を予め取得しておくことは、これを標的深さとして高効率かつ空間選択的に薬剤を輸送するためにも役立つ。以上のことから、本システムにより、皮膚癌に対して以下の診断・治療戦略を提供可能と考えられる。①光音響イメージング法により腫瘍を検出し、その範囲を特定する。②診断結果より、薬剤治療ないし PDT による治療が望める場合には、腫瘍領域の情報に基づき PMW の適用パラメータを決定し、同部位を標的に薬剤を輸送する。③同部位に薬剤が適正に分布しているかどうかを迅速にイメージングして評価する。薬剤輸送の結果が不十分であった場合には、適正な分布が得られるまで薬剤の輸送と観測を繰り返す。④術中または術後一定時間経過後に①と同様のイメージングにより治療効果を判定する。以上のように、病変の検出から治療後の経過観察まで、本システムにより診断と治療を有機的に組み合わせながら実施することで、皮膚癌に対する高効率・低副作用な治療の実現が期待できる。その成果は、患者の生存期間の延長や予後の改善、また整容

性の確保や QOL の向上などに寄与するであろう。

## 参考文献 第5章

- [1] Y. Endo-Takahashi, Y. Negishi, A. Nakamura, D. Suzuki, S. Ukai, K. Sugimoto, F. Moriyasu, N. Takagi, R. Suzuki, K. Maruyama, Y. Aramaki, “pDNA-loaded Bubble liposomes as potential ultrasound imaging and gene delivery agents,” *Biomaterials* **34**(11), pp. 2807-2813 (2013).
- [2] Y. Endo-Takahashi, Y. Negishi, A. Nakamura, S. Ukai, K. Ooaku, Y. Oda, K. Sugimoto, F. Moriyasu, N. Takagi, R. Suzuki, K. Maruyama, Y. Aramaki, “Systemic delivery of miR-126 by miRNA-loaded Bubble liposomes for the treatment of hindlimb ischemia,” *Sci. Rep.* **24**(4), 3883 (2014).
- [3] Y. I. Yoon, Y. S. Kwon, H. S. Cho, S. H. Heo, K. S. Park, S. G. Park, S. H. Lee, S. I. Hwang, Y. I. Kim, H. J. Jae, G. J. Ahn, Y. S. Cho, H. Lee, H. J. Lee, T. J. Yoon, “Ultrasound-mediated gene and drug delivery using a microbubble-liposome particle system,” *Theranostics* **4**(11), pp. 1133-1144 (2014).
- [4] R. Ma, S. Sontges, S. Shoham, V. Ntziachristos, D. Razansky, “Fast scanning coaxial optoacoustic microscopy,” *Biomed. Opt. Express* **3**(7), pp. 1724-1731 (2012).
- [5] A. D. L. Zerda, C. Zavaleta, S. Keren, S. Vaithilingam, S. Bodapati<sup>1</sup>, Z. Liu, J. Levi, B. R. Smith, T. J. Ma, O. Oralkan, Z. Cheng, X. Chen, H. Dai, B. T. K. Yakub S. S. Gambhir, “Carbon nanotubes as photoacoustic molecular imaging agents in living mice,” *Nat. Nanotechnol.* **3**(9), pp. 557-562 (2008).
- [6] 渡辺恭良, “創薬・DDSにおける分子イメージング,” *Drug Delivery System* **23**(1), pp. 49-60 (2008).
- [7] L. E. Rhodes, M. de Rie, Y. Enström, R. Groves, T. Morken, V. Goulden, G. A. Wong, J. J. Grob, S. Varma, P. Wolf, “Photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinate vs surgery for nodular basal cell carcinoma: results of a multicenter randomized prospective trial,” *Arch. Dermatol.* **140**(1), pp. 17-23 (2004).
- [8] Y. Zhou, W. Xing, K. I. Maslov, L. A. Cornelius, L. V. Wang, “Handheld photoacoustic microscopy to detect melanoma depth *in vivo*,” *Opt. Lett.* **39**(16), pp. 4731-4734 (2014).

## 謝辞

本研究は、慶應義塾大学大学院理工学研究科総合デザイン工学専攻において、2014年度末まで寺川 光洋 准教授の御指導のもと、2015年度は 斎木 敏治 教授および 寺川 光洋 准教授の御指導のもとに行われたものである。本研究を行うにあたり、多大なる御指導、御鞭撻を賜りました 斎木 敏治 教授と 寺川 光洋 准教授に深く感謝の意を表します。また、修士課程修了まで多大なる御指導を賜りました慶應義塾大学 小原 實 名誉教授に心より厚く御礼申し上げます。

本論文の完成にあたり、多くの御指導と御助言を頂きました慶應義塾大学理工学部 荒井 恒憲 教授、同 木下 岳司 准教授、同 塚田 孝祐 准教授に心より感謝申し上げます。

防衛医科大学校防衛医学研究センター情報システム研究部門 佐藤 俊一 准教授には6年間、日頃より研究に関する御指導のみならず、研究に対する心構えや姿勢等、多くの貴重な御助言を頂戴し、感謝の念が絶えません。厚く御礼申し上げます。また、共同研究の実施に御理解を下さいました同部門の 芦田 廣 前々教授、竹村 俊哉 前教授、伊古美 文隆 教授に御礼申し上げます。本研究に関して多くの御指導と御助言を賜りました同部門の 川内 聡子 助教、コンピュータ環境の整備に関してお世話になりました 脇坂 仁 助教 (現防衛医科大学校病院医療情報部)に深く感謝致します。同部門の 菅原 摩利子 技官、関根 志保 技官 (現防衛医科大学校図書館)には、日々の研究活動を行う上で様々な御援助を頂き感謝申し上げます。防衛医科大学校防衛医学研究センター外傷研究部門の 齋藤 大蔵 教授、同大学耳鼻咽喉科学講座の 荒木 幸仁 准教授、宮川 義弘 先生、同大学脳神経外科学講座の 富山 新太 助教には本研究に関して数々の御助言と実験手技の援助を頂きました。厚く御礼申し上げます。

株式会社アドバンテストの 川口 康 博士、伊田 泰一郎 氏には、光音響イメージング装置の開発に際し多大な御助言を頂き、また日頃の実験では光源を使用させて頂きました。厚く御礼申し上げます。株式会社計算力学研究センターの 熊井 規 氏、吉見 顕一郎 氏には信号処理に関するソフトウェアを御提供頂き、深く感謝致します。株式会社島津製作所の 小関 英一 博士、原 功 氏には ICG ラクトソームを御提供頂き、また実験結果に関し数多くの貴重な御意見を頂戴しました。厚く御礼申し上げます。

慶應義塾大学理工学部小原研究室および寺川研究室の諸兄、諸氏には公私にわたり多々御配慮を頂きました。特に、研究に対する心構えや姿勢等、多大な御指導と御助言を頂きました 安藤 貴洋 博士 (現株式会社日立製作所)には感謝の念が絶えません。厚く御礼申し上げます。防衛医科大学校での共同研究を遂行するにあたり、多くの御指導を頂きま

した 秋山 琢也 氏 (現 住友商事株式会社), 長谷川 博之 氏 (現 アンリツ株式会社)に厚く御礼申し上げます. また, 常日頃より数え切れないほどの御協力を頂きました 三橋 龍樹 氏 (現 東京ガス株式会社), 島田 卓一郎 氏 (現 トヨタ自動車株式会社), 渡辺 了太 氏 (現 株式会社豊田自動織機), 阿久津 佑介 氏に厚く御礼申し上げます. 日頃より多くの御協力を頂きました東京農工大学電気電子工学科西館研究室の 奥田 航 氏 (現 コニカミノルタ株式会社), 中野 洸輝 氏 (現 シスメックス株式会社), 宮木 麻衣 氏, 石渡 直人 氏, 松原 智大 氏に感謝致します. 研究室の同輩であり, 互いに切磋琢磨して研究に励んできた 平野 広大 氏 (現 東海旅客鉄道株式会社), 本多 俊之 氏 (現 JFE スチール株式会社), 前田 直輝 氏 (現 株式会社ニトリ), 村上 方美 氏 (現 東海大学医学部), 鳥養 真広 氏 (現 東京電力株式会社)に深く感謝致します. また, 研究室の全ての諸兄, 諸氏に心より感謝の意を表します.

本研究を遂行するにあたり, 博士課程に特別研究員 (DC1)として研究生活を財政面で支えて頂きました独立行政法人日本学術振興会, 修士課程に奨学金を頂きました独立行政法人日本学生支援機構および慶應義塾大学に厚く御礼申し上げます. また, 国際会議発表のための渡航費用を御支援頂きました慶應義塾先端科学技術研究センター (KLL)および一般財団法人丸文財団に厚く御礼申し上げます.

最後に, 大学院後期博士課程への進学に御理解頂き, 絶え間ない御支援と御協力を賜りました家族に深く感謝致します.

## 著者論文目録

### 1. 原著論文

#### 1.1 本研究に関連する論文

1. Y. Tsunoi, S. Sato, S. Kawauchi, H. Ashida, D. Saitoh, M. Terakawa, “*In vivo* Photoacoustic Molecular Imaging of the Distribution of Serum Albumin in Rat Burned Skin,” *BURNS*, Vol. 39, No. 7, pp. 1403-1408 (2013).
2. Y. Tsunoi, S. Sato, R. Watanabe, S. Kawauchi, H. Ashida, M. Terakawa, “Compact acoustic-resolution photoacoustic imaging system with fiber-based illumination,” *Japanese Journal of Applied Physics*, Vol. 53, No. 12, pp. 126701/1-6 (2014).
3. Y. Tsunoi, S. Sato, S. Kawauchi, Y. Akutsu, Y. Miyagawa, K. Araki, A. Shiotani, M. Terakawa, “Theranostic system for drug delivery and pharmacokinetic imaging based on nanosecond pulsed light-induced photomechanical and photoacoustic effects,” *Japanese Journal of Applied Physics*, Vol. 54, No. 11, pp. 116601/1-6 (2015).

#### 1.2 その他の論文

1. M. Terakawa, Y. Tsunoi, T. Mitsuhashi, “*In vitro* perforation of human epithelial carcinoma cell with antibody-conjugated biodegradable microspheres illuminated by a single 80 fs near-infrared laser pulse,” *International Journal of Nanomedicine*, Vol.7, pp. 2653-2660 (2012).

### 2. 総説論文

1. 佐藤俊一, 角井泰之, 齋藤大蔵, 寺川光洋, “光音響イメージング法による皮膚の多機能診断,” *O plus E*, 第34巻, 第11号, pp.1056-1061, 2012年11月.

### 3. 国際会議

1. Y. Tsunoi, S. Sato, H. Ashida, M. Terakawa, “Photoacoustic imaging of intravenously injected photosensitizer in rat burn models for efficient antibacterial photodynamic

- therapy,” SPIE Photonics West 2012 Biomedical Optics (BiOS 2012), San Francisco, USA (January, 2012) / Proceedings of SPIE, Vol. 8210, pp. 82100D/1-7, 2012.
2. Y. Tsunoi, S. Sato, S. Kawauchi, D. Saitoh, H. Ashida, M. Terakawa, “Simultaneous photoacoustic monitoring of edema and hemodynamics for comprehensive diagnosis of bur injury,” Conference on Laser Surgery and Medicine (CLSM 2012), Yokohama, Japan (April, 2012).
  3. Y. Tsunoi, S. Sato, S. Kawauchi, H. Ashida, M. Terakawa, “Dosimetry of Intravenously Injected Photosensitizer by Photoacoustic Imaging for Antibacterial Photodynamic Treatment of Burn Infection,” The 8th Asia Pacific Laser Symposium (APLS2012), Huangshan, China (May, 2012).
  4. Y. Tsunoi, S. Sato, R. Watanabe, S. Kawauchi, H. Ashida, M. Terakawa, “Acoustic-resolution Photoacoustic Imaging System with Simple Fiber Illumination,” SPIE Photonics West 2013 Biomedical Optics (BiOS 2013), San Francisco, USA (February, 2013) / Proceedings of SPIE, Vol. 8581, pp. 85812U/1-6, 2013.
  5. Y. Tsunoi, S. Sato, R. Watanabe, S. Kawauchi, D. Saitoh, H. Ashida, M. Terakawa, “Acoustic-resolution photoacoustic microscopy of serum albumin in rat burned skin,” European Conferences on Biomedical Optics 2013 (ECBO 2013), Munich, Germany (May, 2013).
  6. Y. Tsunoi, S. Sato, R. Watanabe, S. Kawauchi, H. Ashida, M. Terakawa, “Development of a Compact Acoustic-resolution Photoacoustic Imaging System with Fiber-based Illumination and Its Application to Vascular Imaging,” Biomedical Imaging and Sensing Conference 2014 (BISC 2014), Yokohama, Japan (April, 2014).
  7. Y. Tsunoi, S. Sato, R. Watanabe, S. Kawauchi, Y. Miyagawa, D. Mizokami, N. Tanaka, K. Araki, A. Shiotani, T. Takemura, M. Terakawa, “Integrated system for drug delivery and its imaging by the use of nanosecond pulsed laser-induced photomechanical and photoacoustic effects,” Biomedical Molecular Imaging 2014 (BMI 2014), Taipei, Taiwan (November, 2014).
  8. Y. Tsunoi, S. Sato, R. Watanabe, S. Kawauchi, Y. Miyagawa, D. Mizokami, N. Tanaka, K. Araki, A. Shiotani, T. Takemura, M. Terakawa, “Integrated System for photomechanical drug delivery and photoacoustic imaging of pharmacokinetics,” SPIE Photonics West 2015 Biomedical Optics (BiOS 2015), San Francisco, USA (February, 2015).
  9. R. Watanabe, S. Sato, Y. Tsunoi, S. Kawauchi, T. Takemura, M. Terakawa, “Photoacoustic imaging for transvascular drug delivery to the rat brain,” SPIE Photonics West 2015 Biomedical Optics (BiOS 2015), San Francisco, USA (February, 2015). / Proceedings of SPIE, Vol. 9305, pp. 930523/1-5, 2015.

10. Y. Tsunoi, S. Sato, R. Watanabe, S. Kawauchi, Y. Miyagawa, K. Araki, A. Shiotani, T. Takemura, M. Terakawa, “Theranostics based on nanosecond laser pulses enabling photomechanical drug delivery and photoacoustic imaging for pharmacokinetics,” The 5th Asian and Pacific-Rim Symposium on Biophotonics (APBP 2015), Yokohama, Japan (April, 2015).
11. Y. Tsunoi, S. Sato, R. Watanabe, S. Kawauchi, Y. Miyagawa, D. Mizokami, N. Tanaka, K. Araki, A. Shiotani, T. Takemura, M. Terakawa, “Photoacoustic imaging of subcutaneous tumor in mice and its vascular response to photodynamic effect using indocyanine green-labeled biodegradable nanocarrier,” European Conferences on Biomedical Optics 2015 (ECBO 2015), Munich, Germany (June, 2015).

#### 4. 国内会議

1. 角井泰之, 佐藤俊一, 芦田廣, 寺川光洋, “新しい集束型超音波検出器による高分解能光音響断層画像,” 第 11 回レーザー学会東京支部研究会, 東京, 2011 年 3 月.
2. 佐藤俊一, 角井泰之, 長谷川博之, 四ノ宮成祥, 齋藤大蔵, 寺川光洋, “光の音響的・機械的作用を用いた光感受性薬剤のドシメトリーとデリバリー,” 第 21 回日本光線力学学会学術講演会, 大阪, 2011 年 7 月.
3. 角井泰之, 佐藤俊一, 齋藤大蔵, 芦田廣, 寺川光洋, “光音響法を用いた循環動態観測による包括的熱傷診断,” 第 9 回医用分光学研究会, 松江, 2011 年 11 月.
4. 角井泰之, 佐藤俊一, 芦田廣, 寺川光洋, “皮膚組織中の光感受性薬剤分布の *in vivo* 光音響イメージング,” 日本光学会年次学術講演会 Optics & Photonics Japan 2011, 大阪, 2011 年 11 月.
5. 佐藤俊一, 角井泰之, 齋藤大蔵, 寺川光洋, “光音響イメージングの研究動向と皮膚科学分野への応用,” 第 48 回 光波センシング技術研究会講演会, 東京, 2011 年 11 月.
6. 角井泰之, 佐藤俊一, 川内聡子, 齋藤大蔵, 芦田廣, 寺川光洋, “組織中アルブミン濃度の光音響計測による熱傷浮腫の時空間診断,” 第 12 回レーザー学会東京支部研究会, 東京, 2012 年 3 月.
7. 角井泰之, 佐藤俊一, 渡辺了太, 川内聡子, 齋藤大蔵, 芦田廣, 寺川光洋, “薬剤送達の高分解能観測を目指した光音響診断システムの開発,” レーザー学会第 430 回研究会, 仙台, 2012 年 9 月.
8. 角井泰之, 佐藤俊一, 渡辺了太, 川内聡子, 芦田廣, 寺川光洋, “光ファイバー照射型光音響マイクロコピー,” 第 33 回レーザー学会年次大会, 姫路, 2013 年 1 月.
9. 角井泰之, 佐藤俊一, 渡辺了太, 川内聡子, 芦田廣, 齋藤大蔵, 寺川光洋, “音響的

空間分解能を有する小型光音響マイクロスコープの開発,” 第 24 回慶應医用レーザー研究会, 東京, 2013 年 2 月.

10. 角井泰之, 佐藤俊一, 渡辺了太, 川内聡子, 芦田廣, 齋藤大蔵, 寺川光洋, “光音響顕微イメージング法によるラット熱傷モデルにおけるアルブミンの動態観測,” 日本超音波医学会第 86 回学術集会, 大阪, 2013 年 5 月.
11. 角井泰之, 佐藤俊一, 川内聡子, 芦田廣, 齋藤大蔵, 寺川光洋, “光音響イメージング法によるラット熱傷皮膚組織中のアルブミン動態観測,” 第 39 日本熱傷学会総会・学術集会, 名護, 2013 年 6 月.
12. 角井泰之, 佐藤俊一, 渡辺了太, 川内聡子, 芦田廣, 寺川光洋, “光ファイバーを用いた小型・軽量な光音響顕微イメージング装置の開発,” 第 11 回医用分光学研究会, 福井, 2013 年 12 月.
13. 渡辺了太, 佐藤俊一, 角井泰之, 川内聡子, 芦田廣, 寺川光洋, “脳組織への薬剤輸送観測を目的としたラット脳血管の光音響イメージング,” 第 53 回日本生体医工学会大会, 仙台, 2014 年 6 月.
14. 阿久津佑介, 富山新太, 佐藤俊一, 角井泰之, 川内聡子, 芦田廣, 森健太郎, 寺川光洋, “フォトメカニカル波を用いた血液腫瘍関門の制御: ラットグリオーマモデルを用いた実験,” 第 24 回日本光線力学学会学術講演会, 浜松, 2014 年 6 月.
15. 角井泰之, 佐藤俊一, 渡辺了太, 川内聡子, 宮川義弘, 溝上大輔, 田中伸明, 荒木幸仁, 塩谷彰浩, 竹村俊哉, 寺川光洋, “ナノ秒パルスレーザー光の機械的・音響的作用を用いた薬剤輸送とその動態観測を目的とした統合システムの開発,” 日本光学会年次学術講演会 Optics & Photonics Japan 2014, 東京, 2014 年 11 月.
16. 渡辺了太, 佐藤俊一, 角井泰之, 川内聡子, 竹村俊哉, 寺川光洋, “ラット脳組織への薬剤輸送観測を目的とした血管および薬剤分布の光音響イメージング,” 日本光学会年次学術講演会 Optics & Photonics Japan 2014, 東京, 2014 年 11 月.
17. 阿久津佑介, 佐藤俊一, 富山新太, 角井泰之, 川内聡子, 森健太郎, 寺川光洋, “フォトメカニカル波によるラットグリオーマへの経血管薬剤デリバリー,” 2014 年度日本生体医工学会専門別研究会 分子デリバリー研究会, 横浜, 2014 年 12 月.
18. 阿久津佑介, 佐藤俊一, 富山新太, 角井泰之, 川内聡子, 竹村俊哉, 森健太郎, 寺川光洋, “ラットグリオーマモデルを用いたフォトメカニカル波による血液腫瘍関門の薬剤透過性亢進に関する研究,” 第 54 回日本生体医工学会大会, 名古屋, 2015 年 5 月.
19. 角井泰之, 佐藤俊一, 川内聡子, 宮川義弘, 荒木幸仁, 塩谷彰浩, 原功, 小関英一, 寺川光洋, “インドシアニングリーン (ICG) 内包生分解性ナノ粒子を用いたマウス皮下腫瘍の光音響学的診断と光線力学的治療,” 第 25 回日本光線力学学会学術講演会, 東京, 2015 年 7 月.

## 5. 受賞

1. 角井泰之, 佐藤俊一, 芦田廣, 寺川光洋, “新しい集束型超音波検出器による高分解能光音響断層画像,” 第 11 回レーザー学会東京支部研究会, 東京, 2011 年 3 月. ポスター講演特別賞.
2. 角井泰之, 佐藤俊一, 齋藤大蔵, 芦田廣, 寺川光洋, “光音響法を用いた循環動態観測による包括的熱傷診断,” 第 9 回医用分光学研究会, 松江, 2011 年 11 月. 優秀ポスター発表賞.
3. 角井泰之, 佐藤俊一, 渡辺了太, 川内聡子, 芦田廣, 寺川光洋, “光ファイバー照射型光音響マイクロコピー,” 第 33 回レーザー学会年次大会, 姫路, 2013 年 1 月. 優秀論文発表賞.
4. 角井泰之, 佐藤俊一, 渡辺了太, 川内聡子, 宮川義弘, 溝上大輔, 田中伸明, 荒木幸仁, 塩谷彰浩, 竹村俊哉, 寺川光洋, “ナノ秒パルスレーザー光の機械的・音響的作用を用いた薬剤輸送とその動態観測を目的とした統合システムの開発,” 日本光学会年次学術講演会 Optics & Photonics Japan 2014, 東京, 2014 年 11 月. OPJ ベストプレゼンテーション賞.
5. 角井泰之, 佐藤俊一, 川内聡子, 宮川義弘, 荒木幸仁, 塩谷彰浩, 原功, 小関英一, 寺川光洋, “インドシアニングリーン (ICG)内包生分解性ナノ粒子を用いたマウス皮下腫瘍の光音響学的診断と光線力学的治療,” 第 25 回日本光線力学学会学術講演会, 東京, 2015 年 7 月. Young Investigator Award.