医療診断に向けて進展する光音響イメージング

クリス・チュン・ホイ・ホー、マリニ・オリーヴォ

近年、レーザ、トランスデューサソフトウエア、造影剤、イメージ再構築アルゴリズムが技術的に発展したことで、光音響イメージングが進展中だ。腫瘍学、皮膚科学、治療モニタリングで新しいアプリケーションが登場しており、進展のスピードは加速している。

この10年間、光音響イメージングの進展は著しい。この進展は、レーザ、トランスデューサソフトウエア、造影剤、イメージ再構築アルゴリズムの発展によるものであり、腫瘍学、皮膚科学、治療モニタリングに需要をもたらす。この分野の成長を示す出来事として、2013年に新しいオープンアクセスジャーナル『Photoacoustics』が創刊された[1]。本記事では、特に臨床解釈のコンテクストを中心に、近年の光音響イメージング進展のスナップショットをお見せしたい。

造影剤

さまざまな光音響造影剤があるなかで利用されているものは、蛍光色素分子、金ナノ粒子、銀ナノ粒子、炭素ベースの化合物、遺伝子レポーター、“スマート”な活性プローブである。これらのうち、いくつかの光増感剤と、FDA承認のインドシアニングリーン（ICG）は、すでに臨床試験で使われており、臨床解釈に向けて進展しているだろう。

光増感剤はセラノスティクスの可能性、腫瘍の優先的取り込み、臨床的関連といった長所がある。さらに、いくつかの光増感剤における低い蛍光量子収率の限界は、光音響イメージングでは利点となる。これは、エネルギー緩和の経路における蛍光と熱発生との競合によって、蛍光色素分子が光音響信号を強く発するからである。このため、科学者はさまざまなタイプの光増感剤の実現可能性を模索している。期待できそうな光音響造影剤には、メチレンブルー、ポルフィリン、スクアライン、BODIPY、フタロシアニン、ナフタロシアニンがある。

例として、オリーヴォ氏とそのチームは、代表的な5種類の光増感剤の光音響活性を評価、比較した[2]。用いたのは、亜鉛ナフタロシアニン（ZnPc）、プロトポルフィリンIX、2,4-bis［4-（N,N-ジベンジルアミノ）-2,6-ジヒドロキシフェニル］スクアラニン、クロリンe6、メチレンブルーであり、マルチスペクトル光音響トモグラフィ（MSOT）を使用するファントム（人体パーツ模型）で評価した。その結果、5種類のなかでは、ZnPcが最も強い光音響信号を発した。次に彼らは、*in vivo*イメージングに取り組んだ。ZnPcを異種移植モデルのマウ

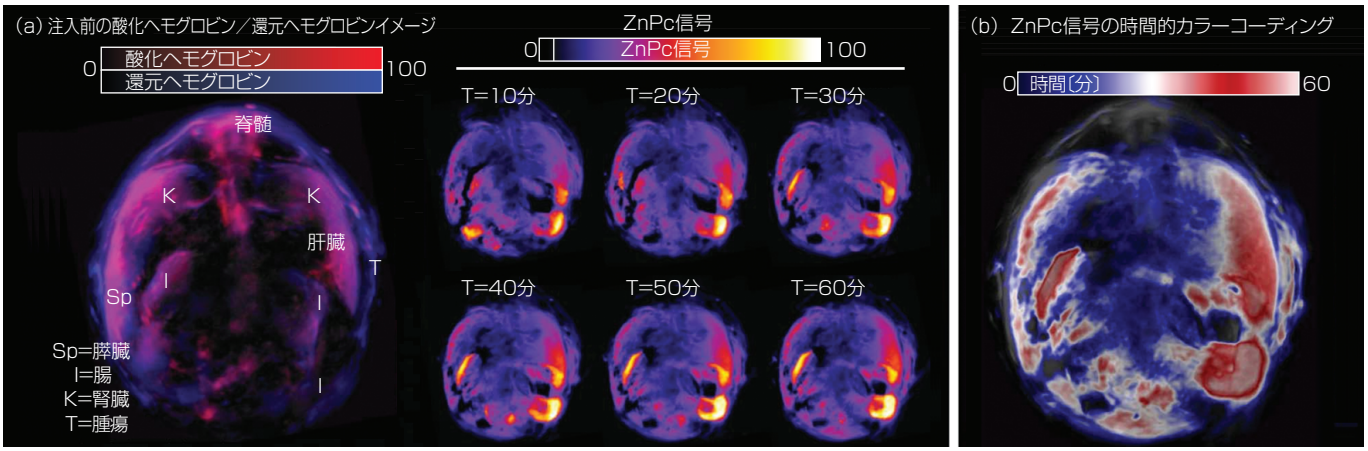

図1　（a）注入前、注入後1時間までにおけるマウスの*in vivo*横断面イメージ。最大値投影法（MIP）によるイメージングで、バックグラウンド補正済み。腫瘍部位とさまざまな臓器で、時間が経つにつれてプローブが漸次的に蓄積していることがわかる。（b）注入後1時間までにおけるMSOT信号の時間分解カラーコーディングしたもの。腫瘍部位とさまざまな臓器で、注入後1時間でプローブの局在がピークに達することがわかる。（いずれもホー氏（Ho）らの許可を得て転載[2]）

スに投与し、光音響イメージングを通じて生体内分布と腫瘍の取り込みを観察した。**図1**に示すように、ZnPcを静脈注入すると腫瘍で蓄積するようになり、腫瘍取り込みがピークに達したのは1時間後であった。この時間は光力学治療の処置で局在化するのに理想的である。その後の研究では、3種類のフタロシアニンの光増感剤、すなわちフタロシアニンテトラスルホン酸（PcS4）、亜鉛（II）フタロシアニンテトラスルホン酸、アルミニウム（III）フタロシアニン塩化テトラスルホン酸の光音響活性を比較しており、PcS4がファントム、マウスいずれにおいても最も強い光音響信号を発することが明らかになった[3]。

ニッィアクリストスと彼のチームは、ダイナミックコントラストを改善するためにICGを用いている。肝臓や腎臓などの臓器や腫瘍における受動的取り込みをイメージするためである。最近では例えば、PEG化したリポソームにICGを封入し（LipoICG）、高感度で腫瘍におけるLipoICGの分布をイメージした（**図2**）[4]。ICG組み込みナノ粒子、ICG複合単層カーボンナノチューブなど、他のICG複合体も、光音響イメージングを目的に開発されている。

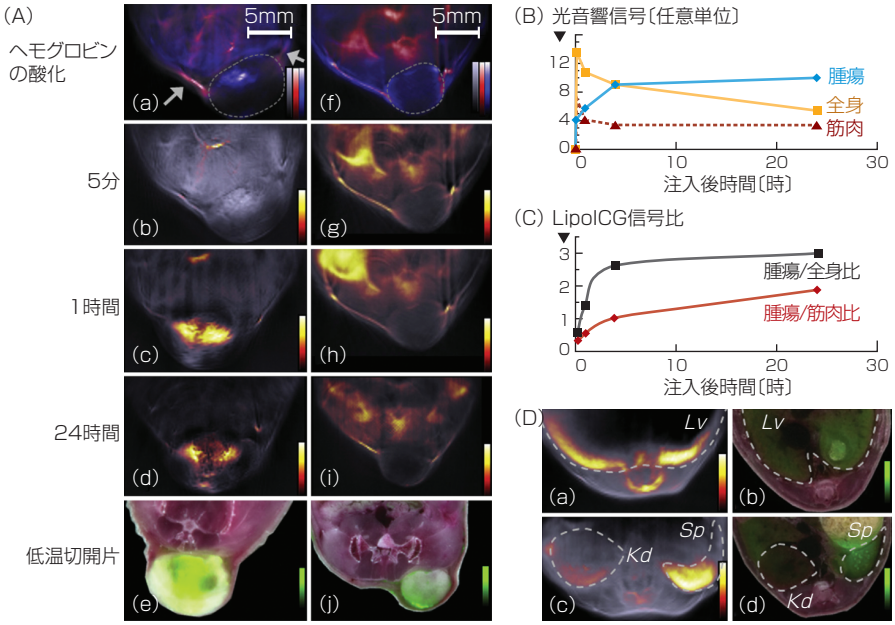

図2　4T1とHT29腫瘍モデルにおけるLipoICG75の蓄積の動態をMSOTでイメージしたもの。（A）（a）LipoICG（グレースケール）注入前の4T1腫瘍の横断MSOTイメージ。酸化ヘモグロビン（赤）と還元ヘモグロビン（青）からの信号を重ねている。矢印は、腫瘍に供給される主な血管を示す。（b-d）注入後5分、1時間、24時間におけるバックグラウンドイメージ（グレースケール）にMSOTのLipoICG75信号（ホットスケール）を重ねたもの。（e）一致する低温切開片にICG蛍光信号（グリーンスケール）を重ねたカラーイメージ。（f-j）HT29腫瘍で行われた同様の実験。（B）LipoICG75の最大信号強度。それぞれ、青の実線は腫瘍、黄色の実線は腫瘍以外の全身、赤の点線は背部筋肉における強度を示す。（C）LipoICG75の最大信号強度比。黒の実線は腫瘍と全身の比率、赤の実線は腫瘍と背部筋肉との比率と示す。（D）（a）LipoICG75信号（ホットスケール）を重ねた、肝臓（Lv）の担がん動物のMSOTイメージ。（b）一致する低温切開片にICG蛍光（グリーンスケール）を重ねたもの。（c,d）同じ動物における腎臓（Kd）と膵臓（Sp）領域。（いずれもベジーレ氏（Bézière）らの許可を得て転載[4]）

光源と検出器

光音響イメージングでは、組織が吸収するエネルギーをもつナノ秒パルス発生光源を使う。このパルスレーザ源を患者に使うには、米国国家規格協会（ANSI）が定める最大許容線量（MPE）である20mJ/cm^{2}の制限を満たしたうえで、標的組織に均一表面照射しなければならない。高パルス繰り返し率は動きアーチファクトを最小化でき、特にハンドヘルドのイメージングでは有効だが、パルスあたりのエネルギーはMPEの制限を受ける。

出力を測定するときには、感度とロバスト性に優れているという理由から圧電検出器が一般的に用いられる。しかしながら、広帯域で容電性であるマイクロマシンベースのような、より複雑な検出器も開発されている[10]、[11]。

近年におけるレーザ、トランスデューサ技術、演算能力の発展により、従来の光音響システムのサイズとコストが下がり、ハンドヘルドのプローブベースのシステムに組み込めることができようになっている。これにより、ポータブル超音波システムとほぼ同じサイズにできる。例として、科学者らはビデオ速度を改良し、ハンドヘルドベースのMSOTイメージングシステムを開発することで、ヒトのボランティアにおける組織形態と血管系を解像しようとしている[12]、[13]。他には、リアルタイムで超音波・光音響イメージングという二重イメージングを実現するために、従来の超音波システムと接続できるハンドヘルドなプローブを設計している[14]。このようなリアルタイムイメージングは、心血管疾患、リンパ管疾患、炎症、腫瘍学などのアプリケーションにおいて大きな診断可能性をもたらす。

アプリケーション

光音響イメージングは生物医学において大きな可能性を秘めている。なぜなら光音響イメージングには、非電解放射線、高解像度、十分な侵入深さ、構造的情報・機能的情報・分子情報という

多重コントラストなど、魅力的なベネフィットがあるからだ。これらにより、がん診断ではリスクを減らしながら精度が増すと期待されている。

組織における吸光が比較的弱い近赤外線（NIR）領域内では、内因性コントラストを作るために、ヘモグロビン、メラニン、脂質など、強い吸光性をもつ内因性発色団を利用する。例えば、酸化ヘモグロビンと還元ヘモグロビンの相対濃度は、血管や組織における酸素飽和度を推定するために用いられる。メラニンの分布は黒色腫と毛包のイメージングに、脂質量はアテノーム性動脈硬化プラークや皮脂腺のイメージングに使われる。そして、外因性の造影剤が投与されると、コントラストが向上したり、リガンドとの生体共役反応による標的特異性が得られたりする。しかし前述したように、臨床用途として現在FDA承認されているNIR色素はICGのみである。

光音響イメージングは腫瘍学のアプリケーションにおいて、血管や酸素化のイメージング、腫瘍における血管新生の観察のために用いられている。腫瘍部位では通常の組織と比べて血管密度が高いため、ヘモグロビンのコントラストをもとに腫瘍を検出する光音響が用いられる。蛍光色素や金ナノ粒子などの外因性造影剤も、イメージのコントラストを向上するために用いられる。具体的には、ワン氏と彼のチームは、黒色腫のアクティブ標的のイメージングを目的に、αメラノサイト刺激ホルモンと生体共役反応する金ナノケージ（AuNC）を開発した（**図3**）[5]。同時に彼らは、黒色腫周囲の血管の酸素飽和度を縦断的に測定することで、黒色腫の生理状態を観察することができた。

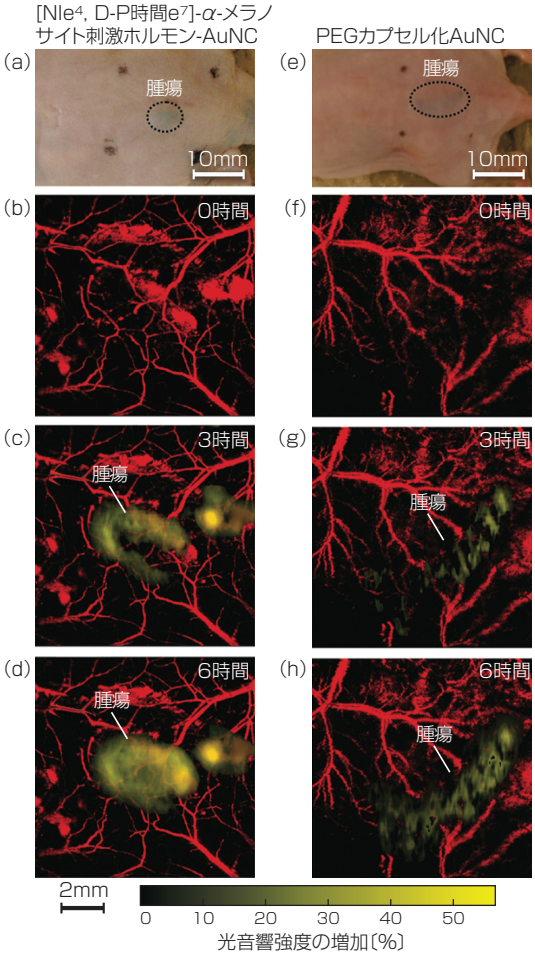

図3　黒色腫を移植されたヌードマウス。（a）生体共役反応するAuNCの注入前。（e）コントロールであるPEGカプセル化AuNCの注入前。（b-d）生体共役反応するAuNCを静脈注入してからの黒色腫の光音響イメージの経時変化。（f-h）同様の経時変化を、コントロールであるPEGカプセル化AuNC静脈注入後で見たもの。カラースキーム：赤は血管、黄色は光音響強度の増加。（いずれもキム氏（Kim）らの許可を得て転載[5]）

ヒトの患者における黒色腫の特性化を目的とした、光音響イメージングの有効性を評価する予備試験が実施中だ[6]、[7]。黒色腫のステージ診断は腫瘍の深さを基準にするが、一般的には経験豊富な病理医が生検と組織学から診断する。光音響イメージングは、検査中の臨床医にリアルタイムでフィードバックできるため、黒色腫を迅速にスクリーニングできる新たな非侵襲的技術となり得るだろう。

光音響イメージングは皮膚学、例えば経皮的水分吸収、経皮的薬物送達、皮膚疾患、外傷や火傷などにも応用できる。毛乳頭をイメージングして、毛髪や頭皮の疾患、具体的には円形脱毛症、女性の男性ホルモン性脱毛症、連珠毛、ネザートン症候群などの診断に有用だ。現在、評価法のゴールドスタンダードには皮膚鏡検査法や毛髪の生検サンプルの解析があるが、これらは侵襲的な手法である。MSOTは非侵襲的な診断法であり、毛包の構造、毛乳頭周辺の毛細血管床の酸素化状態、毛包脂腺ユニットの脂質組成をイメージングする（**図4**）[8]。光音響イメージングは、慢性的な外傷、潰瘍、火傷における皮膚形態や血液の酸素化のイメージングにも有用であることがわかっており、治療プロセスにおいて必要不可欠である。一例には、真皮の血管を4μmの距離分解能という高解像度でイメージングするラスタ走査光音響顕微鏡（RSOM）がある[9]。

今後の展望

未来を先触れするかのように、米セノ・メディカルインスツルメンツ社（Seno Medical Instruments）は最近、乳がんイメージングを目的とした光音響システムのCEマーク認証を初めて取得した。このシステムは、光音響の臨床解釈に向けた動きの重要なマイルストーンだ。また、解剖学的な視点に基づく多くのイメージング手法とは異なり、機能的イメージングに基づくため、臨床ケアにおいてもマイルストーンとなる。

システムは短いレーザパルスを用いて組織の広い領域に照射する。腫瘍は通常の組織よりも優先的に吸光すると

いう性質を利用したものである。腫瘍ではわずかに発熱し、それによる一時的な熱弾性膨張が圧力（光音響）波を放射する。この光音響波を、プローブが接する乳房表面の周囲に位置する広帯域の超音波センサアレイで検出する。レーザの光音響イメージングは2mmの腫瘍を同定、ミリメートル未満の構造を可視化できるので、腫瘍が成長して転移する前に、初期の段階で腫瘍を検出できると期待される。

この手法と物理特性から、NIRを照射することで、ヘモグロビン濃度と酸素飽和度を明らかにするイメージコントラストを作製できる。ヘモグロビン濃度と酸素飽和度は、いずれも腫瘍の病態生理学と密接に関連する。血管新生そのものは良性病変が悪性に分化するのに十分ではないが、ヘモグロビン濃度と相対的な酸素化の組み合わせは、診断精度としては優良である。

アルゴリズムはセンサからのシグナルを解析、集合化して、高コントラスト・高解像度イメージで病変を鮮やかなカラーで描く。悪性腫瘍は良性のものよりも微小血管が多く、酸素量の減少率が高いため、悪性と良性の違いは明確だ。脱酸素化（還元）された血液は、より短い光の波長があると明るいイメージとなる。再構成アルゴリズムによって、時間領域データから光吸光体の空間的位置を決定できる。

光音響イメージングの今後は、造影剤、光源、センサ、システム、新規のイメージ再構成、スペクトル非混合的高精度アルゴリズムが進展するほど期待できるものになる[15]、[16]。概して、将来的な発展によって、科学的可能性と臨床的関連性の間にあるギャップが埋まり、この手法が疾患の診断、疾患の進行、治療応答における新たな知見をもたらすかどうか明らかになるだろう。

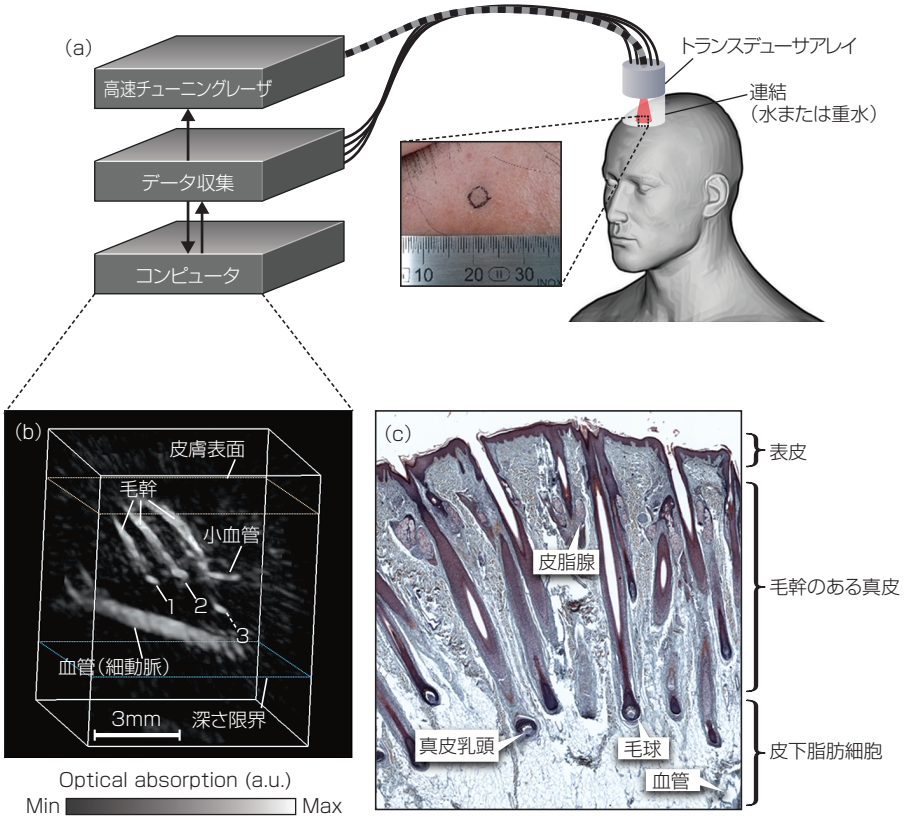

図4　毛包を高解像度でリアルタイムイメージングするハンドヘルドな光音響プローブ。（a）イメージングシステムと手法の概要。（b）3Dの光音響イメージング。毛幹、毛球、真皮乳頭（数字が示す箇所）、血管がわかる。（c）健常者の頭髪をパラフィンに植え込み、マッソントリクローム染色した顕微鏡画像（10倍拡大）。光音響イメージと比較して、真皮乳頭、毛幹、毛球、巨大な表皮血管の構造が類似する。（いずれもストッフェルス氏（Stoffels）らの許可を得て転載[6]）

参考文献

(1) See http://www.journals.elsevier.com/photoacoustics.
(2) C. J. H. Ho et al., Sci. Rep., 4, 5342-5347（2014）.
(3) A. B. E. Attia, G. Balasundaram, W. Driessen, V. Ntziachristos, and M. Olivo, Biomed. Opt. Express, 6, 591-598（2015）.
(4) N. Béziére et al., Biomaterials, 37, 415-424（2015）.
(5) C. Kim et al., ACS Nano, 4, 8, 4559-4564（2010）.
(6) I. Stoffels et al., J. Nucl. Med., 56, 40（2015）.
(7) A. Breathnach et al., Proc. SPIE, 9303, Photonic Therapeutics and Diagnostics XI, 930303（Mar. 9, 2015）; doi:10.1117/12.2078309.
(8) S. J. Ford et al., J. Invest. Dermatol.（accepted 2015）.
(9) M. Omar, M. Schwarz, D. Soliman, P. Symvoulidis, and V. Ntziachristos, Neoplasia, 17, 2, 208-214（2015）.
(10) C. Zhang, T. Ling, S.-L. Chen, and L. J. Guo, ACS Photon., 1, 11, 1093-1098（2014）.
(11) S.-R. Kothapalli et al., IEEE Trans. Biomed. Eng., 59, 5, 1199-1205（2012）.
(12) A. Buehler, M. Kacprowicz, A. Taruttis, and V. Ntziachristos, Opt. Lett., 38, 9, 1404-1406（2013）.
(13) X. L. Deán-Ben and D. Razansky, Photoacoustics, 1, 68-73（2013）.
(14) K. Daoudi et al., Opt. Express, 22, 21, 26365-26374（2014）.
(15) C. Lutzweiler and D. Razansky, Sensors, 13, 7345-7384（2013）.
(16) G. P. Luke, S. Y. Nam, and S. Y. Emelianov, Photoacoustics, 1, 2, 36-42（2013）.

著者紹介

クリス・チュン・ホイ・ホー博士は、シンガポールバイオイメージングコンソーシアム（SBIC）のリサーチフェロー、シンガポールSIM大准講師。マリニ・オリーヴォ教授は、シンガポール科学技術研究庁傘下のSBICの生物光学イメージンググループ長。

LFWJ