

生体深部精緻観察のための  
透過型液晶補償光学素子を用いた  
光音響顕微鏡

2022年3月

佐賀大学大学院工学系研究科  
システム創成科学専攻

能塚 雄介

# 目次

第 1 章	序論 .....	1
1.1.	研究背景.....	1
1.1.1.	光音響イメージングの特徴と原理 .....	1
1.1.2.	光音響顕微鏡と空間分解能.....	4
1.1.3.	2 光子励起光音響顕微鏡 .....	6
1.1.4.	PAM の高空間分解能化に向けた波面収差補正技術 .....	7
1.1.5.	透過型液晶セルの電氣的制御による位相変調 .....	9
1.2.	本研究の目的 .....	10
1.3.	本論文の構成 .....	11
第 2 章	透過型液晶補償光学素子を用いた光音響顕微鏡.....	12
2.1.	緒言 .....	12
2.2.	実験方法.....	13
2.2.1.	反射検出型 透過型液晶補償光学付 光音響顕微鏡 .....	13
2.2.2.	球面収差補正の透過型液晶補償光学素子の制御 .....	15
2.2.3.	光音響顕微鏡における透過型液晶補償光学素子を用いたビーム径の評価 .....	17
2.2.4.	反射検出型 AO-PAM における USAF 1951 テストターゲットを用いた 横方向分解能評価 .....	19
2.2.5.	血管を模したシリコーンブロック中の金線.....	20
2.2.6.	血管の可視化.....	21
2.3.	実験結果.....	22
2.3.1.	透過型液晶 AO 素子を用いたビーム集束評価 .....	22
2.3.2.	反射検出型 AO-PAM を用いたガラス基板下における横方向分解能評価 .....	25
2.3.3.	シリコーンブロック中の金線 PA イメージングによる深さ識別力の評価.....	28
2.3.4.	マウス耳の <i>in vivo</i> 血管 PA イメージング .....	33
2.4.	結論 .....	36

<b>第 3 章</b>	<b>透過型液晶補償光学素子を用いた 2 光子励起光音響顕微鏡.....</b>	<b>37</b>
3.1.	緒言.....	37
3.2.	実験方法.....	38
3.2.1.	2 光子励起光音響顕微鏡システム, および光音響スペクトル測定装置 .....	38
3.2.2.	測定試料と測定方法 .....	40
3.3.	実験結果.....	42
3.3.1.	光音響スペクトル測定および光パルスエネルギー依存性.....	42
3.3.2.	ガラスセル中の 2 光子光音響断面イメージング .....	45
3.3.3.	シリコーンブロック中空の 2 光子光音響断面イメージング .....	49
3.3.4.	ラット下大静脈の 2 光子光音響断面イメージング .....	51
3.4.	結論.....	52
<b>第 4 章</b>	<b>総括 .....</b>	<b>53</b>
謝辞	.....	55
研究業績	.....	56
参考文献	.....	62

# 第1章 序論

## 1.1. 研究背景

### 1.1.1. 光音響イメージングの特徴と原理

光音響イメージングは、深い観察深さにおける光学イメージングと超音波イメージングの長所を兼ね備えたハイブリッドモダリティである [1-3]. 図 1.1 は横軸に空間分解能、縦軸に深達距離（観察可能深さ）をとり、様々な生体イメージング技術により観察できる領域を示したものである。生体イメージングでは、非侵襲性・リアルタイム性・簡便性が求められ、光および超音波を用いたイメージングはともにこれらの条件を満たしており、医療および生物学の分野において応用されている。光学イメージングでは、反射光を見る内視鏡、光の干渉を利用した光干渉断層法 (optical coherence tomography: OCT)、蛍光イメージングなどが挙げられる。しかし、生体内では光の散乱および吸収が大きく、生体表面（数百マイクロメートル以下）であれば高い空間分解能が得られるが、生体深部（1 mm 以上）であれば光の透過率が低下し、侵入深さに応じて分解能は劣化する。一方、超音波イメージングでは、光同様に低侵襲性であるが、光に比べて生体内での散乱係数が 2-3 桁程度小さく、超音波検出器の中心周波数に応じて数十センチメートル以上の深い深達度を有する。しかし、超音波画像は組織間の音響インピーダンスの差を検出して画像化しているために、観察ターゲットの形状に関する情報は得られるが、空間分解能は低い。

これらに対して光音響イメージング (Photoacoustic imaging: PAI) は、光と同様の低侵襲性を有し、励起光が観察ターゲットに到達できれば、そこから発生する光音響波 (PA 波) を超音波イメージングと同様の方法で検出して画像化できる。深達度は光の侵入深さに依存する。光音響イメージングは、光音響効果を利用したイメージング技法であり、観察ターゲットの光吸収から生じた光音響波 (応力波) をもとに分布画像を構成している [図 1.2]. 異なる組織間の光吸収の差は音響インピーダンスの差よりも遥かに大きいので、光音響イメージングは超音波イメージングよりも優れた組織識別および特異性を提供することができる。すなわち、観察ターゲットの光吸収体に選択的に吸収される光波長を用いることで、高いコントラストを有する画像を取得できる。一般的に、可視および近赤外 (Near infrared: NIR) スペクトル領域 (550–900 nm) の波長が使用さ

れる。特に、NIR スペクトル領域（600–900 nm）において、光は数センチメートルまで深達する [1]。医療応用として現在報告されている主なターゲットは血管（血液）であるが、血管の形状を抽出するだけでなく、脳血流の変化からの脳機能の評価 [4]、新生血管の観測による腫瘍の悪性度の評価、組織再生のモニタリングが試みられている [5]。さらに、複数の波長を用いて、酸素化と脱酸素化ヘモグロビンの吸収スペクトルの差からそれらの濃度を定量化することで、酸素飽和度の評価（血液中に酸素が十分に取込まれているか）も可能である。血液の他にも、メラニン、脂肪の分布の可視化も行われている [6]。

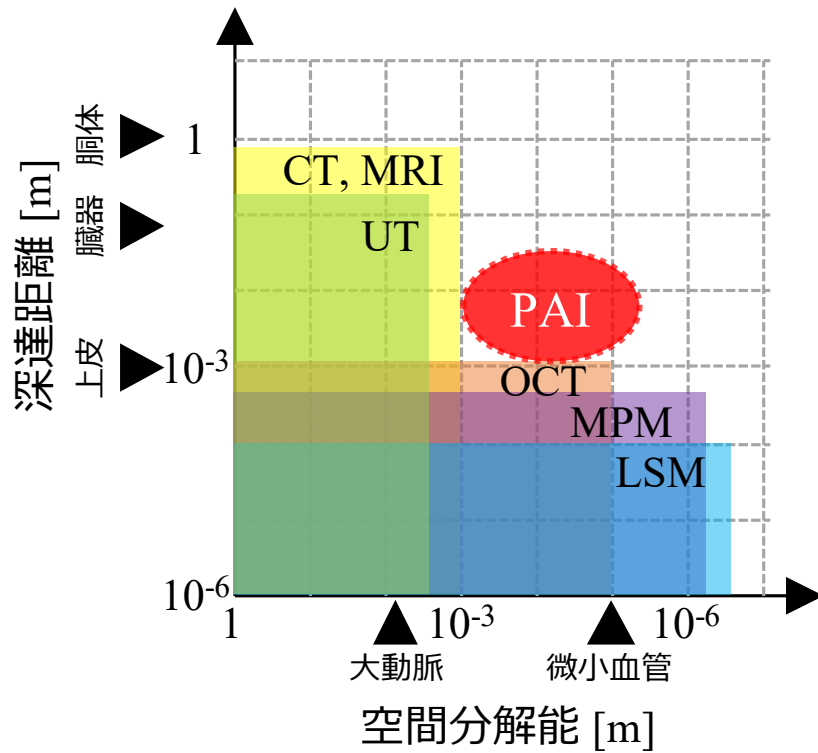


図 1.1. 生体イメージング技術の性能. CT: computed tomography (コンピュータ断層撮影法); MRI: magnetic resonance imaging (核磁気共鳴画像法); US: ultrasonography (超音波エコー); OCT: optical coherence tomography (光干渉断層法); LSM: laser scanning microscopy (レーザー走査型共焦点顕微鏡); MPM: multiphoton microscopy (多光子顕微鏡); PAI: photoacoustic imaging (光音響イメージング).

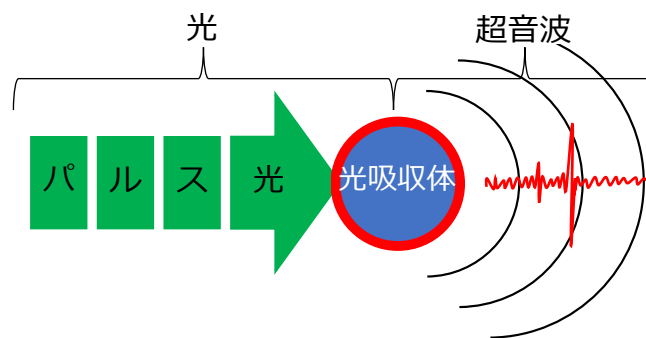


図 1.2. 光音響効果.

### 1.1.2. 光音響顕微鏡と空間分解能

光音響顕微鏡 (Photoacoustic microscopy: PAM) は、生体表面から数ミリメートル程度の深さを高い空間分解能および高い信号対雑音比で観察できる顕微鏡である。特に、光学的分解能を有する PAM (Optical resolution photoacoustic microscopy: OR-PAM) は、サブマイクロメートル以下の横方向分解能を示す [7-13]。図 1.3 に示すように、対物レンズによって光を集光させたスポットを走査し、各スポットで発生した PA 波を UT などの検出器で検出する。OR-PAM で可視化できる例として、微小血管 [10]、細胞 [14]、メラノーマ [8, 15]などが挙げられる。脳 [11]や眼 [16]などの厚い組織や臓器に存在する数十マイクロメートルもの大きさの動脈を *in vivo* で可視化するためには反射検出型が必要である。

OR-PAM の横方向分解能は、約 1 mm 未満の短い光侵入深さにおいて光学的な横方向分解能と同様に、理想的には、対物レンズの開口数 (Numerical aperture: NA) と光波長  $\lambda$  に依存する光焦点の直径で決定される。光学的開口数  $NA_o(\text{optical})$  は、物体からレンズに入射する光軸に対する最大角度を  $\theta$ 、物体と対物レンズの間の媒質の屈折率を  $n$  として、 $NA_o = n \times \sin \theta$  と定義され、光学的横方向分解能  $LR_{\text{OR-PAM}}$  は、 $LR_{\text{OR-PAM}} = 0.51 \times \lambda / NA_o$  で表される [17]。1 mm を超える光侵入深さでは、光散乱等の影響でビームの焦点がぼけて分解能が低下する。垂直分解能は、音響減衰によって制限される [1]。

一方、音響学的分解能を有する PAM (Acoustic resolution photoacoustic microscopy: AR-PAM) の横方向分解能は、検出器に到達する PA 波の周波数成分と検出器の NA で決定される。音速を  $v$ 、検出器される PA 信号の中心周波数を  $f_c$ 、音響学的開口数を  $NA_a(\text{acoustic})$  とすると、音響学的横方向分解能  $LR_{\text{AR-PAM}}$  は、 $LR_{\text{AR-PAM}} = 0.71 \times v / NA_a \times f_c$  で表される [17]。発生する PA 波をどれくらい狭い領域から集音できるかによって決定される。集音の範囲は超音波の周波数が高くなるほど狭くなるため、高空間分解能を得るためには、PA 波の高周波成分を検出する [18]。しかし、軟組織の種類による周波数に依存する音響減衰のために、伝搬する光音響波の最大周波数成分を制限され、また、空間分解能は深度に比例する。光音響イメージングの音響的空間分解能の目安として、侵入深度がセンチメートル、ミリメートル、数百マイクロメートルでは、それぞれ空間分解能がサブミリメートル、サブ百マイクロメートル、サブ十マイクロメートルになる [1]。

深さ方向の分解能 (Axial resolution: AR) は、発生した PA 波の検出周波数に依存する。検出周波数が高くなると、深さ方向の分解能が向上する。しかし、検出周波数を高くすると PA 波の検出効率が低下する。そのため、高周波数の音響検出器は、薄いサン

ブルや細胞培養物の観察にしか使えない [19]. PA 信号の帯域幅を  $\Delta f_c$  とすると,  $AR_{OR-/AR-PAM}$  は,  $AR_{OR-/AR-PAM} = 0.88 \times v / \Delta f_c$  で表される [17]. 光音響効果によって生体組織から発生する PA 信号の帯域幅は, 約 1 MHz–100 MHz の広帯域を有する [20] ので, AR は検出器の音響帯域幅で決定される.

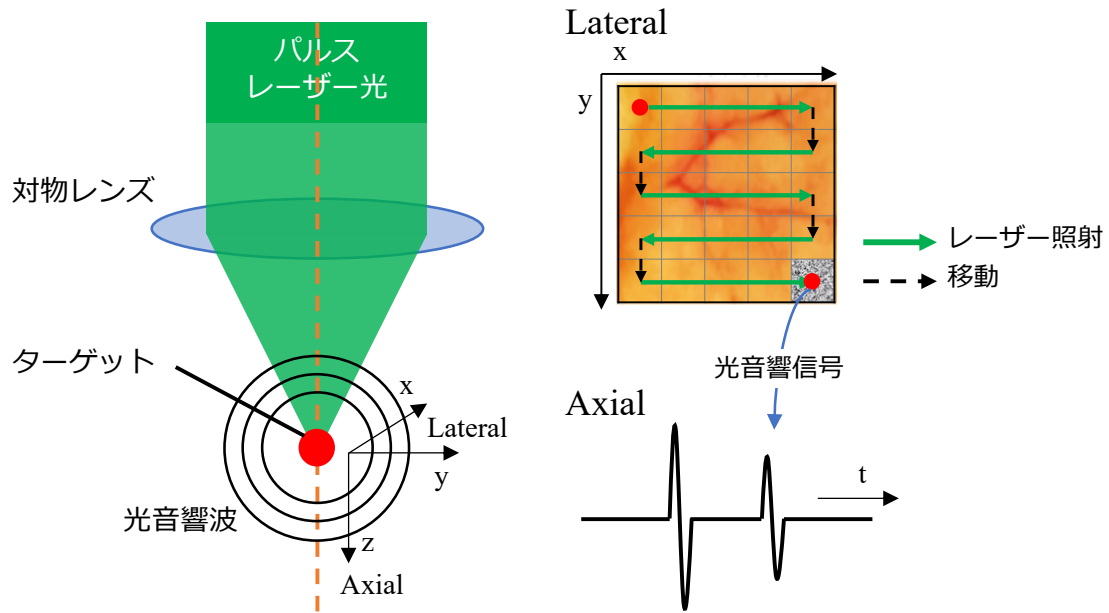


図 1.3. 光音響顕微鏡.



### 1.1.3. 2光子励起光音響顕微鏡

2光子励起光音響顕微鏡 (Two-photon excitation photoacoustic microscopy: TP-PAM) は、非線形光学現象の1つである2光子吸収を光音響顕微鏡に組み合わせることで高い空間分解能を保ちながら深部観察が可能な顕微鏡である [21]. 通常の光吸収は、1つの分子が1つの光子を吸収することで電子が基底状態から励起状態へと遷移する. 2光子吸収は、1つの分子が2つの光子を同時に吸収することで電子が励起状態へと遷移する非線形現象である [図 1.4(a)]. 2光子吸収過程では、1つの光子で励起する2倍のエネルギーを持つ光子を与えることで励起される. 1つの光子あたりのエネルギーは1光子励起の約半分、つまり約2倍の波長を使用することで、1光子励起と同等のエネルギー準位に励起される. 一方、2光子吸収が生じる確率は極めて低いため、光子密度を高くする必要がある. 2光子励起 PA 信号の生成効率を向上させるために、フェムト秒オーダーの光パルスを使用することでピークパワーを高くすることが提案されている [21, 22]. 可視光領域の波長の約2倍の波長となる近赤外領域の励起光を使用することで、生体組織への光侵入深さ距離が長くなり、PAMの深部イメージングが可能になる. また、焦点近傍の微小空間のみで2光子吸収が生じるため、1光子顕微鏡法と比較して焦点外のバックグラウンドを大幅に低減することができ、2光子吸収によるPA波を検出すれば高空間分解能化が可能である [図 1.4(b)]. これらの特性により、TP-PAMは生体深部組織の高空間分解能観察に向けて研究が進められている.

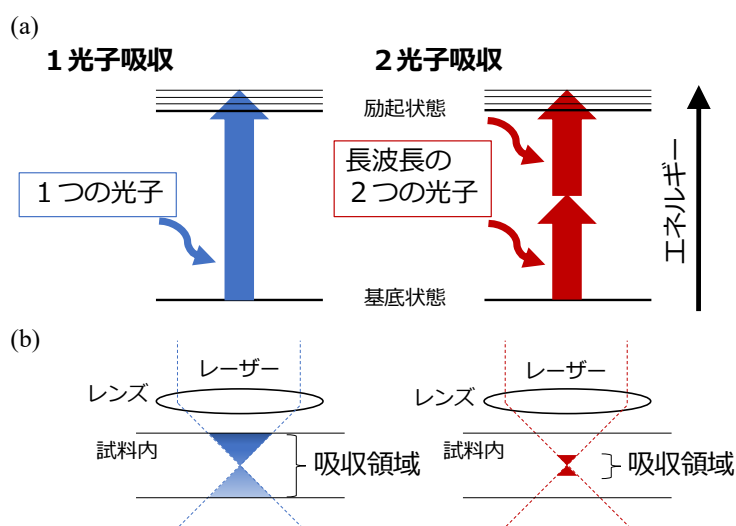


図 1.4. 1光子吸収と2光子吸収. (a) エネルギー準位図. (b) レンズで集光させた場合の吸収領域.

#### 1.1.4. PAM の高空間分解能化に向けた波面収差補正技術

PAM における空間分解能を向上させるために、高い NA の対物レンズ [23, 24] と、高周波数の音響トランスデューサ (Ultrasound transducer: UT) [19] の使用が報告されている。しかし、高 NA の対物レンズは波面収差を増大させ、高周波の UT は観察深さを制限し、PA 信号を減衰させる。

生体深部ではターゲットまでの光路中の屈折率の不一致や組織表面の形状に起因する波面収差などによって、組織内の光焦点が拡大する。特に、高 NA 対物レンズにおいては、観察深さに伴い球面収差による波面の歪みが大きくなる [25, 26]。その結果、PA 画像の横方向分解能が劣化する。球面収差を補正するために、高 NA 対物レンズには補正環が組み込まれていることが多い。補正環を回すことで対物レンズ中のレンズ群の一部が光軸方向に移動し、発生した球面収差を補正する。しかし、補正環を調整するには観察者が対物レンズに触れる必要がある。そのため、調整精度に影響を与える可能性がある。その他、有効管長 [27] や対物レンズ浸液の屈折率 [28] を調整することで球面収差を補正する手法が提案されており、レンズの加工や手動制御なしに収差を簡単に補正することができる。しかし、これらの手法は静的に行われるため、観察中に操作することは困難であり、また複雑な波面収差の補正ができないという欠点がある。

これらの問題を解決するアプローチとして、電氣的に波面を制御する補償光学 (Adaptive optics: AO) が注目されている [25, 26, 29-33]。可変形状ミラー (Deformable mirror: DM) や LCOS (Liquid crystal on silicon) 等の反射型空間光位相変調器は、顕微鏡観察における収差補正に使用されており [34]、球面収差だけでなく様々な波面収差を補正することが可能である。この AO 技術は、大気乱流によって誘発される収差を補正するために、天文光学分野で用いられている。光学顕微鏡においては、回折限界のスポットサイズを達成するために導入されている。市販の AO モジュールは、シャックハルトマン波面センサと DM を用いて構成される。シャックハルトマン波面センサで実際のビームの波面を参照波面と比較して歪みを測定し、DM が波面収差プロファイルと対になる表面形状に変化して波面を補正する。この閉ループシステムは、波面の位相を位置の関数として測定し、DM を変形させて補正する。位相収差が時間的に変化するのであれば、必要に応じて繰り返し手順を踏むことで、光学分解能を向上させることができる。しかし、これらのシステムは装置が複雑であり、また高価である。

このような問題を解決するために、近年、液晶分子を用いた透過型の AO デバイスが開発されている [35-38]。この透過型 AO 素子を搭載した 2 光子蛍光顕微鏡で波面収

差補正を行うことで、横方向分解能が改善された報告がされている [37-39]. 従来の反射型 AO デバイスを導入した PAM [40]と比較して、透過型 AO は、光学系の大幅な改造を必要とせず、容易に PAM に導入することができる. また、液晶分子を用いて電氣的に制御できる AO 素子は、小型であり低価格、また消費電力も少ないといった特徴がある.

### 1.1.5. 透過型液晶セルの電氣的制御による位相変調

透過型液晶セルを用いて光の振幅や位相・偏光などの空間的分布を電氣的に制御することができる。棒状または円盤状の液晶分子は、長軸方向と短軸方向で屈折率に異方性を持ち、長軸方向の屈折率は異常光線屈折率  $n_e$  (extraordinary refractive index)、短軸方向の屈折率は常光線屈折率  $n_o$  (ordinary refractive index) と定義される。液晶分子は、電圧を印加することで分子の並び方が電界方向に対して変化する性質を持つ。

図 1.5 に示すように、液晶セルは、透明電極 (Indium tin oxide: ITO) がコートされた 2 枚のガラス基板の間に液晶分子が平行に配向されている形で構成されている [37, 41]. 透明電極の分割パターンによって位相変調パターンを決定することができる。透明電極に交流電圧が印加されると、電位差に応じて、液晶分子が電界方向に対して連続的にその向きを変える。分割された 2 つの透明電極の上方に電圧が印加された場合、液晶層の厚さを  $d$ 、2 つの液晶層の屈折率を  $n_a$  および  $n_b$  ( $n_a \geq n_b$ )、直線偏光の入射光の波長を  $\lambda$  とすると、2 つの電極上の液晶層を透過した  $y$  方向に電場の振動成分を持つ直線偏光の位相差は、 $2\pi(n_a - n_b)d / \lambda$  となる。ここで、液晶層の厚み  $d$  を大きくすると位相変調量は大きくなるが、液晶分子の応答速度は、 $d^2$  に比例して遅くなる [38, 41].

本論文では、光学顕微鏡で使用される透過型液晶補償光学素子を用いた波面収差補正技術を光音響顕微鏡に導入し、様々な試料の深部 PA 画像を補正前後で比較することで、その性能評価を行った。

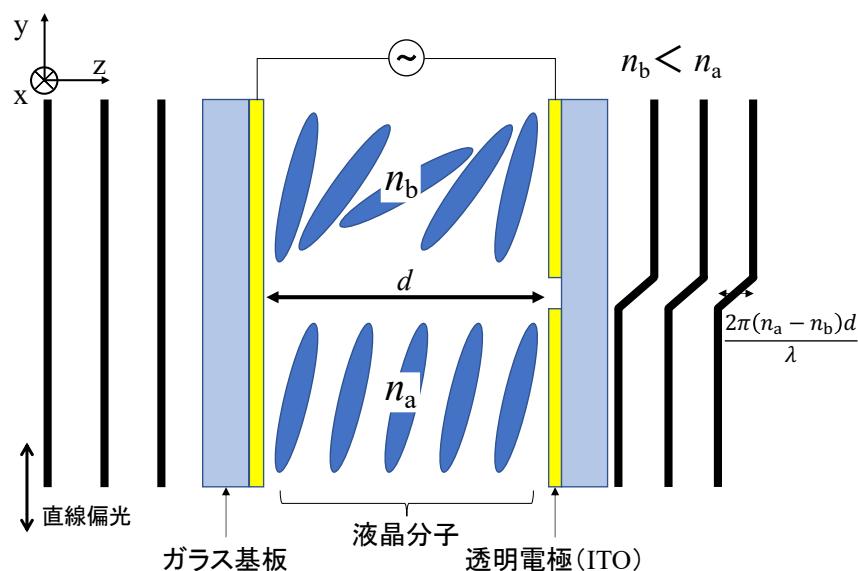


図 1.5. 透過型液晶セルによる位相変調.  $d$ : 液晶層の厚み ;  $n_a, n_b$ : 液晶層の屈折率 ;  $\lambda$ : 入射光の波長.

## 1.2. 本研究の目的

本研究の目的は、透過型液晶 AO 素子による波面補正技術を、低周波 UT を用いた反射検出型 OR-PAM に応用し、横方向分解能と深さ識別力を向上させることにある。OR-PAM の高空間分解能化に高 NA 対物レンズの使用は有効であるが、試料の屈折率や形状による波面収差により集光を困難にする。その結果、PA 信号強度や空間分解能が低下する。この問題を解決するために、観察深さに応じて電氣的に制御可能な透過型の液晶 AO 素子を OR-PAM に導入したシステムを構築する。対物レンズの NA が高い場合、主に影響を与える球面収差を対象とした AO 素子を用いて、生体深部組織の PA 画像の高空間分解能化を試みた。

### 1.3. 本論文の構成

本論文は全4章で構成される。

第1章では、本研究の背景と研究目的について述べる。初めに、PA イメージングの原理と生体イメージングにおける位置付け、PA スペクトルを説明する。次に、一般的な1光子励起によるPAMおよび2光子励起によるPAM (TP-PAM) の概略を紹介する。問題点として、PAMの高空間分解能化に伴う球面収差がPA画像を劣化させることを示し、既に光学分野で利用される波面収差補正技術である透過型補償光学 (AO) 素子について紹介する。さらに、本研究で採用した透過型液晶セルによる位相変調の原理を説明する。

第2章では、構築した反射検出型PAMシステムへの透過型液晶AO素子の導入を示す。本研究で用いた球面収差を補正する透過型液晶AO素子の構造について説明する。AO-PAMにおける有効性を示すため、透過型液晶AO素子による深部ビーム径の縮小を、PA信号を用いて実験的に確認した結果について説明する。反射検出型AO-PAMにおいて、USAF 1951 テストターゲットおよび重ねた金線のPA画像評価から、透過型液晶AO素子による補正がある場合に横方向分解能および深さ識別力の向上を示す。さらに、*in vivo* マウス耳の血管走行PAイメージングにおいても、透過型液晶AO素子によりPA画像の改善について説明する。

第3章では、透過型液晶AO素子のTP-PAMへの有効性を検証する。初めに、PAスペクトル測定装置および透過型液晶AO素子を導入したTP-PAMシステムを説明する。次に、1光子吸収および2光子吸収を有する試料の説明をする。測定試料のPAスペクトルおよびパルスエネルギー依存性を測定し、2光子PAが1光子吸収によるものでないことを明らかにしている。2光子吸収分子のみ、および1光子吸収分子と2光子吸収分子を溶かした混合溶液を作成し、ガラスセルおよびシリコン内の中空にそれぞれ満たした場合の2光子PA断面像のAO補正がない場合とある場合を比較している。さらに、2光子PA造影剤を注入したラット下大静脈を用いた場合の2光子PA断面像のAO補正がない場合とある場合を比較している。結果として、AO補正によりPA強度増強および深部側の試料形状把握に成功し、TP-PAMにおける透過型液晶AO素子の有効性を示している。

第4章では、これまでの研究成果を総括し、本研究の結論をまとめる。

## 第2章 透過型液晶補償光学素子を用いた 光音響顕微鏡

### 2.1. 緒言

1.1 節で述べたように、光音響イメージングは近年注目されている生体イメージング技法の 1 つである。光音響イメージングの一種である OR-PAM は、光侵入深さ制限である 1 mm 程度の深さを、数十マイクロメートル以下の光学的分解能を維持したままで観察可能である [42, 43]。高空間分解能化には高 NA 対物レンズの使用は有効である。しかし、多くの生体試料において、深部組織に光が届くまでに、対物レンズ浸液と試料、または試料間の屈折率差や試料形状によって波面収差が発生し、PA 画像が劣化する。特に、高 NA 対物レンズを使用して深部を観察した場合、球面収差が主に影響するため、波面収差を補正する AO 素子を導入した。本章では、OR-PAM の高空間分解能化のために透過型液晶 AO 素子を導入し、*in vivo* 測定に向け試作した反射検出型の PAM について述べる。結果として、低周波 UT であっても、AO 補正によって横方向分解能だけでなく、深さ識別力も改善したことを報告する。

## 2.2. 実験方法

### 2.2.1. 反射検出型 透過型液晶補償光学付 光音響顕微鏡

本研究で構築した高 NA の対物レンズと狭い反射板を用いた光音響顕微鏡システムの概略図を図 2.1(a)に示す。AO 素子は、対物レンズの背面開口部付近に設置した。レーザー光源は、波長可変のナノ秒パルスレーザー (NT342A-10-AW, EKSPLA, パルス幅 5 ns, 繰り返し周波数 10 Hz) を用いた。励起光パルスの立ち上がりエッジを PA 信号取得のトリガーとして使用した。レーザービームは、凹レンズ ( $f = -35$  mm)と凸レンズ ( $f = 100$  mm) によって直径 1.0 cm にコリメートされた。パルスエネルギーは、波長板 ( $1/2\lambda$  板), 偏光板, ND (Neutral density) フィルタを用いて光量を制御した。焦電エネルギーセンサ (919E-0.1-12-25K, Newport) を用いてパルスエネルギーの変動を記録し, 取得した PA 信号の規格化に用いた。レーザー光は, 透過型液晶 AO 素子と対物レンズを通過してターゲットに集光される。集光径位置を CMOS カメラ (DCC1645C, Thorlabs) で確認した。ステッピングモーターステージ (TAMM100-50C and HSC-103, OptoSigma) を用いて, 試料を 2 次元的にジグザグスキャンした。

低周波 UT (10K6.4I PF15, Japan Probe, 焦点距離 15mm, 中心周波数 10MHz) を, ターゲットから 15 mm の位置に配置した。PA 波の検出方法は反射検出型で, 光軸に対して垂直に検出された。図 2.1(b)に示すように, 2.0 mm の長方形にカットしたカバーガラスを狭音響反射板として, 対物レンズと試料の間に y 軸方向に沿って挿入した。検出された PA 信号は, ローパスフィルタ (BLP-21.4+, Mini-Circuits; bandwidth, DC-22MHz) と増幅器 (AU-1647, MITEQ; bandwidth, 0.1 K-400 MHz; gain, 57 dB) を介した後, デジタルオシロスコープ (DS-5654A, IWATSU) を用いて記録した。



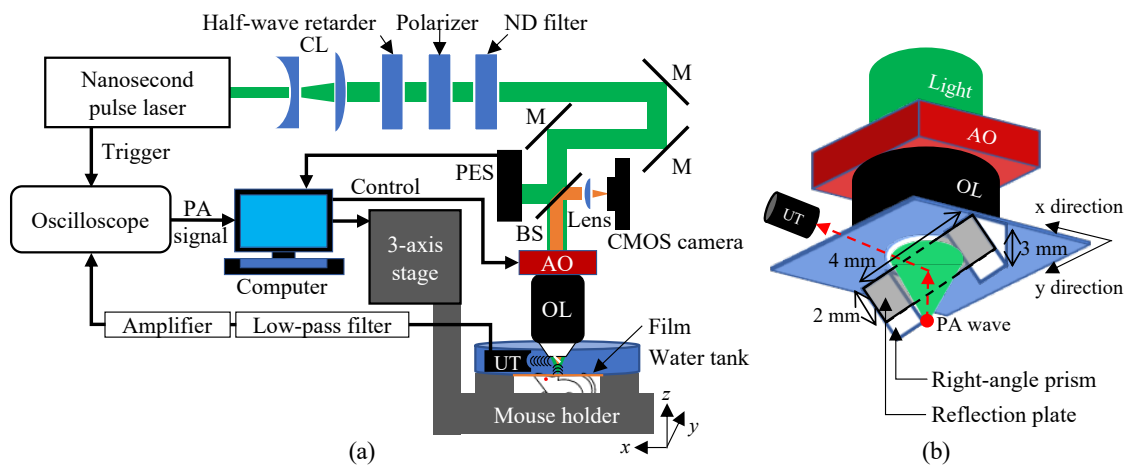


図 2.1. 光音響顕微鏡システム. (a) 高 NA 対物レンズと狭反射板を挿入した AO-PAM システム. (b) 高 NA 対物レンズ直下に挿入した狭反射板のレイアウト. AO: 透過型液晶補償光学素子; BS: ビームスプリッタ (反射: 透過 = 90 : 10, 対応波長 400–700 nm); CL: コリメーターレンズ; M: ミラー; OL: 対物レンズ; PA: 光音響; PES: 焦電エネルギーセンサ; および UT: 音響トランスデューサ.

### 2.2.2. 球面収差補正の透過型液晶補償光学素子の制御

本研究では、実験で用いる 40 倍の水浸対物レンズ (LUMPLFLM 40XW, OLYMPUS) と試料の屈折率差によって生じる球面収差に限定して液晶セルの透明電極が分割されている [図 2.2(a)]. 1 枚あたりの液晶セルの厚さは 0.8 mm であり, 3 枚の液晶セルで構成された透過型液晶補償光学 (AO) 素子の寸法は 28 mm×26 mm×2.4 mm である [図 2.2(b)]. 液晶セルは, それぞれ独立して駆動電圧が与えられる. 位相変調量が最大となる位置および最低となる位置に対応する電極を決定し, 最大位相変調量となる印加電圧  $V_{\text{high}}$  と最低位相変調量となる  $V_{\text{low}}$  を電極に加える. 駆動電圧は, 周波数 1kHz の矩形波形である. 液晶セルに必要な駆動電圧は, 1.3 Vrms と 2.5 Vrms の間で生成される電位差である. 印加電圧が 5 V 未満であることから高価な電圧源を必要とせず, パーソナルコンピュータの電源によって動作可能である. ある球面収差に対する逆位相分布が AO 素子中に形成されるような電位差を印加することで波面収差を打ち消すことができる [37,38]. AO 素子に印加する電位差と観察するターゲット位置の最適化は以下の手順で行った:

- ① ターゲット位置の深さで PA 信号が最大となるように試料位置と AO への印加電位差を大まかに調整;
- ② AO 印加電位差を固定したままターゲットのエッジ部分における PA 強度プロファイルの傾きが最大となるように試料位置を調整;
- ③ 試料位置を固定したままターゲットのエッジ部分における PA 強度プロファイルの傾きが最大となるように AO 印加電位差を調整;
- ④ ②と③の作業を繰り返し行い, 観察位置における最適な AO 印加電位差を決定.

透過型液晶 AO 素子への電圧値は, LabVIEW を用いて作成したプログラムにより, 設定できるようにした.

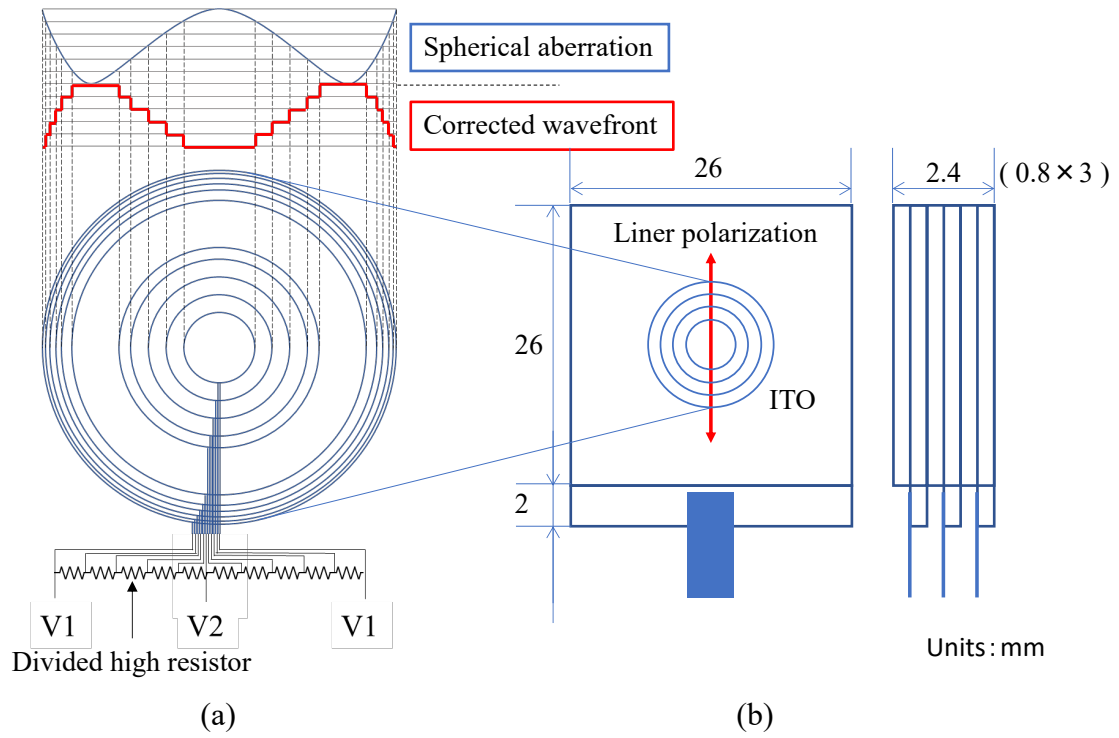


図 2.2. 透過型液晶補償光学素子の概観. (a) 液晶セル中の透明電極分割パターンの概略図. (b) 素子の外観図.

### 2.2.3. 光音響顕微鏡における透過型液晶補償光学素子を用いたビーム径の評価

透過型液晶 AO 素子の動作確認のために、AO 素子を搭載した PAM を用いた励起光のビーム径の評価を行った。図 2.3 は、深さ位置に応じて発生した PA 信号を用いてビーム径を評価するための実験装置である。ここで、UT は対物レンズと反対側の光軸上に設置している。ビーム径を評価するための試料として、USAF 1951 テストターゲット (R3L1S4P, Thorlabs) を用いた。水とは異なる屈折率の媒質を通過した後の球面収差の寄与を大きくするために、試料の上部にスライドガラス (S2441, 松浪硝子, 厚さ 1.2 mm, 屈折率 1.515) を設置した。テストターゲットとスライドガラスは一緒に移動させた。横方向に 0.1  $\mu\text{m}$ 、深さ方向に 10  $\mu\text{m}$  の間隔でスキャンした [図 2.3(i)]。深さ位置に応じて光軸に垂直な方向にスキャンしたテストターゲットのクロム線エッジ部分の PA 強度プロファイルを測定した [図 2.3(ii)]。取得した PA 信号は同時計測されたパルスエネルギーを用いて規格化した。各深さ位置で取得した PA 強度プロファイルは、ステップ関数とビーム径の半値全幅 (full-width-at-half-maximum: FWHM) を示すガウス関数のコンボリューションで表せると仮定し、ビーム径を表すガウス関数をフィッティングにより求めた [図 2.3(iii)]。各深さ位置で得られたガウス関数を並べて表示した [図 2.3(iv)]。深さ方向のビームの広がりに対してもガウス関数でフィッティングした。球面収差がない場合、深さ位置の関数であるビーム径は焦点位置に対して対称である [44]。もし、観測深さで球面収差が AO 素子によって補正されていれば、ビーム径の深さプロファイルは焦点位置に対して対象になっていなければならない。そこで、以下に示す 3 つの条件でビーム径の深さ位置依存性を比較した：

- ① AO 素子なし、スライドガラスなし；
- ② AO 素子なし、スライドガラスあり；
- ③ AO 素子あり、スライドガラスあり。

異なる AO 素子に印加された電位差 (0 Vrms, 0.2 Vrms, 0.4 Vrms, 0.6 Vrms) に対して、ビーム径の試料深さ位置依存性を測定し、その最小値 (lateral FWHM) を比較した。また、深さ方向の半値全幅 (depth FWHM) は、線形補間された PA 強度プロファイルに対してピーク強度が半分となる 2 つの位置の差によって評価した。

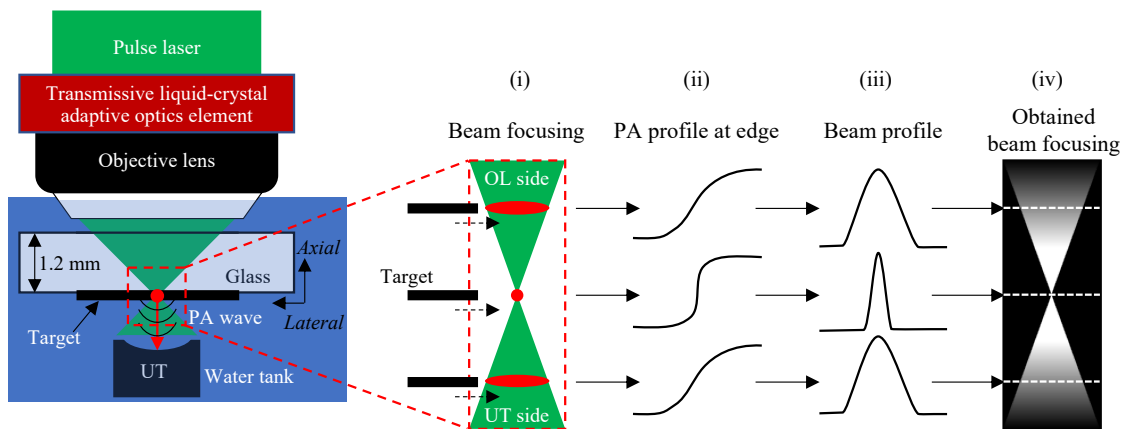


図 2.3. 生成された PA 信号を用いて透過型液晶補償光学素子によるビーム径の変化を評価するための実験セットアップ. OL: 対物レンズ; PA: 光音響; および UT: 音響トランスデューサ.

#### 2.2.4. 反射検出型 AO-PAM における USAF 1951 テストターゲットを用いた横方向分解能評価

ターゲット試料として、USAF 1951 テストターゲットのグループ 7 要素 6 のクロムパターンを測定して、異なる観察深さにおける反射検出型 AO-PAM の横方向分解能を推定した。光源は波長 500 nm の光パルスを用いた。クロムパターン蒸着面、または蒸着面上に設置したガラス基板を透過した場合の PA 画像を、AO 素子を使用しない場合と使用した場合で比較した。ガラス基板は、カバーガラス (C24601, 松浪硝子, 厚さ 0.12 mm, 屈折率 1.5255), およびスライドガラスを使用した。ビームプロファイルの横方向分解能は、ガウス関数の FWHM とした。FWHM は PA 画像のエッジ領域における PA 強度プロファイルの測定値を、ガウス関数とステップ関数のコンボリューションでフィッティングすることで算出した。挿入した音響反射板が横方向分解能に与える影響を確認するため、x および y 軸方向の横方向分解能を評価した。これらの比較には、Welch's *t*-test を用いた。データは、平均値と標準偏差 (means ± SD) の形で示した。有意な P 値は 0.05 未満のものと定義した。また、横方向分解能向上は、AO 補正がない場合の横方向分解能 (LR<sub>w0</sub>) と AO 補正がある場合の横方向分解能 (LR<sub>w</sub>) との改善率  $(|LR_w - LR_{w0}| / LR_{w0})$  として推定した。

### 2.2.5. 血管を模したシリコーンブロック中の金線

シリコーンブロック (SYLGARD 184, Dow, 屈折率 1.44) に, 毛細血管の直径と同等の直径 30  $\mu\text{m}$  の金線 (AU-171095, Nilaco) を埋め込んだ. ディッシュの底をくり抜きラップフィルムで覆って作成した水槽の下に, シリコーンブロックを設置した. シリコーンブロックと水槽の間にスライドガラス (厚さ 1.0 mm) を設置した. シリコーンブロック中の金線は, ラップフィルムとスライドガラスを通して観察された. 実験セットアップは *in vivo* イメージングを想定して行った. 光源は波長 450 nm の光パルスを用いた. 反射検出型の AO-PAM を用いて, 2 本の重なった金線を観察した. 横方向分解能は, 薄いターゲットのエッジにおける PA 強度プロファイルの傾きの逆数に比例することが数値的に確認された [図 2.4]. この事実に基づき, 横方向分解能の向上率を, AO 補正がない場合から AO 補正がある場合における金線エッジの傾きの増加率で評価した. 規格化された PA 強度プロファイルの最大値の 30 % から 70 % のデータの傾きを線形最小二乗法で推定した. ここで規格化された PA 強度は, 金線がない状態で測定された PA 強度を, 規格化前の金線に垂直な横方向プロファイルの PA 強度から減算し, その PA 強度プロファイルの最大値で規格化している. 横方向分解能の向上は, AO 補正がない場合と AO 補正がある場合の金線のエッジの平均化した傾きを比較することで評価した. また, 深さ方向の識別力を評価するために, 金線に垂直な深さ方向に規格化された PA 強度の深さプロファイルの幅をガウス関数でフィッティングして算出した. 金線の浅い位置と深い位置の金線に対して, AO 素子への印加電位差を最適化した場合の PA 画像の評価も行った.

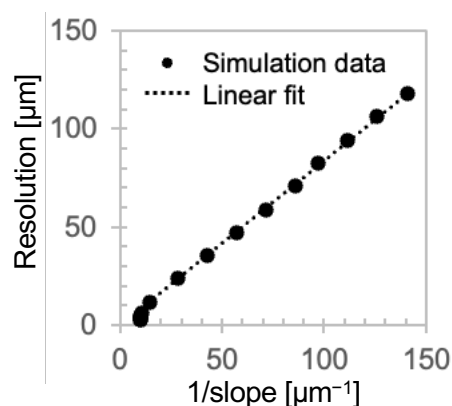


図 2.4. 薄いターゲットのエッジにおける PA 強度プロファイルの傾きの逆数を関数とした横方向分解能のシミュレーション結果.

## 2.2.6. 血管の可視化

反射検出型の AO-PAM を用いて、マウス耳の血管 PA イメージングを *in vivo* で可視化した。マウスの耳が平に設置されるようにマウス全体をラップフィルムの下に固定した [図 2.5]。皮膚下の血管はラップフィルムを介して観察された。本研究は、佐賀大学動物実験委員会の承認を得て、佐賀大学動物実験規程に基づいて実施された（承認番号：30-058-0）。麻酔薬は、0.75 mg/kg の塩酸メドミジン（Domitor, ZENOAQ）、4.0 mg/kg のミダゾラム（Midazolam Injection, SANDOZ）、5.0 mg/kg の酒石酸ブトルファノール（Butorphanol, Meiji Seika Pharma）を混合したものを使用した。この麻酔液を 5 週齢のオスの Jc1 : ICR マウス（CLEA Japan）に腹腔内注射で投与した。波長 577 nm の光パルスを用いてマウス耳の血管を観察した。取得した PA 画像から、血管のエッジ部分の傾きと深さの識別を評価した。傾きは、規格化された PA 強度プロファイルの最大値の 30% から 70% のデータを用いて、線形最小二乗法で求めた。ここで規格化された PA 強度は、測定された PA 強度から血管がない場合の PA 強度を差し引いて得られた PA 強度プロファイルの最大値で規格化している。AO 補正がない場合から AO 補正がある場合の横方向分解能の改善率を評価した。



図 2.5. マウス耳の血管の写真.



## 2.3. 実験結果

### 2.3.1. 透過型液晶 AO 素子を用いたビーム集束評価

提案した AO-PAM における補正効果を評価するために、2.2.3 節に説明している実験結果を示す。AO 素子にさまざまな電位差を印加させたときに発生する PA 信号由来のビーム集束を図 2.6(a)–図 2.6(e)に示す。最適化設計された水浸対物レンズでは球面収差がほとんど発生しないため、深さ方向に集束するビームプロファイルは焦点位置に対して対称であった [図 2.6(a)]。このとき、対物レンズとテストターゲットの間に障害物（ガラス板）がない状態で得られた lateral FWHM および depth FWHM は、それぞれ  $0.59\ \mu\text{m}$  および  $10.1\ \mu\text{m}$  であった。我々の PAM システムで得られた lateral FWHM および depth FWHM は、それぞれ  $0.51\lambda/\text{NA}$  および  $1.8\lambda/\text{NA}^2$  [45]で数学的に求められる横方向分解能 ( $0.32\ \mu\text{m}$ ) および深さ分解能 ( $1.40\ \mu\text{m}$ ) と異なることがわかった。これは、ナイフエッジ法 [46]を用いて、対物レンズのバックアパーチャー（直径：8.0 mm）におけるビーム径（FWHM）を評価した結果、3.9 mm と推定され、入射ビームが対物レンズのバックアパーチャーを完全に満たされていなかったためである。有効 NA がほぼ半分になったため [47]、lateral FWHM および depth FWHM はそれぞれ約 2 倍および約 4 倍（あるいはそれ以上）になったと考えられる。厚さ 1.2 mm のスライドガラスの直下にターゲットを設置して観察した場合、ビーム集束プロファイルは焦点位置に対して非対称となった。球面収差により、深さ方向の PA 強度分布が UT 側にシフトしていた [図 2.6(b)]。電位差  $0.4\ \text{V}_{\text{rms}}$  を AO 素子に印加すると、ビーム集束プロファイルは焦点位置に対して対称的になった [図 2.6(d)]。電位差が  $0.2\ \text{V}_{\text{rms}}$  のとき、ビーム集束プロファイルは焦点位置に対して非対称であり、PA 強度分布も UT 側に偏っていた [図 2.6(c)]。また、印加電位差が  $0.6\ \text{V}_{\text{rms}}$  のとき、PA 強度分布は対物レンズ側にシフトしており、焦点位置に対しても非対称なビーム集束となっていた [図 2.6(e)]。これらの結果から、AO 素子に適切な電位差を印加させることで球面収差を補正していることが示唆された。

$0\ \text{V}_{\text{rms}}$ ,  $0.2\ \text{V}_{\text{rms}}$ ,  $0.4\ \text{V}_{\text{rms}}$ ,  $0.6\ \text{V}_{\text{rms}}$  の電位差を AO 素子に印加したときの最小ビーム径（depth position =  $0\ \mu\text{m}$ ）を図 2.6(f)に示す。スライドガラスなしのテストターゲットでは、ビームプロファイルの横方向の FWHM（lateral FWHM）は  $0.59 \pm 0.15\ \mu\text{m}$  であった。スライドガラス（厚さ 1.2 mm）をテストターゲット蒸着面上に設置した場合、AO 補正なしのターゲットの lateral FWHM は  $0.94 \pm 0.26$  に劣化した。AO 印加電位差が  $0.4\ \text{V}_{\text{rms}}$  および  $0.6\ \text{V}_{\text{rms}}$  の場合、lateral FWHM は  $0.2\ \text{V}_{\text{rms}}$  の場合よりも小さくなった。

0 Vrms, 0.2 Vrms, 0.4 Vrms, 0.6 Vrms の電位差を AO 素子に印加したときのビーム集束中心 (lateral position = 0  $\mu\text{m}$ ) における深さ方向の FWHM (depth FWHM) を図 2.6(g) に示す. スライドガラスなしのテストターゲットでは, depth FWHM は  $10.1 \pm 0.4 \mu\text{m}$  であった. スライドガラスをテストターゲット蒸着面上に設置した場合, AO 補正なしの depth FWHM は  $24.7 \pm 7.5 \mu\text{m}$  に劣化した. AO 印加電位差が 0.4 Vrms のとき, depth FWHM は  $9.8 \pm 0.8 \mu\text{m}$  に向上した.

焦点付近からの PA 強度は, 0.4 Vrms の電位差を印加した場合が他の電位差を印加させた場合と比較して最も強く検出された. これらの結果から, PA 強度が最大となるように AO 素子に印加する電位差を最適化することで, 焦点付近の lateral FWHM と depth FWHM を大きく向上できることがわかった.

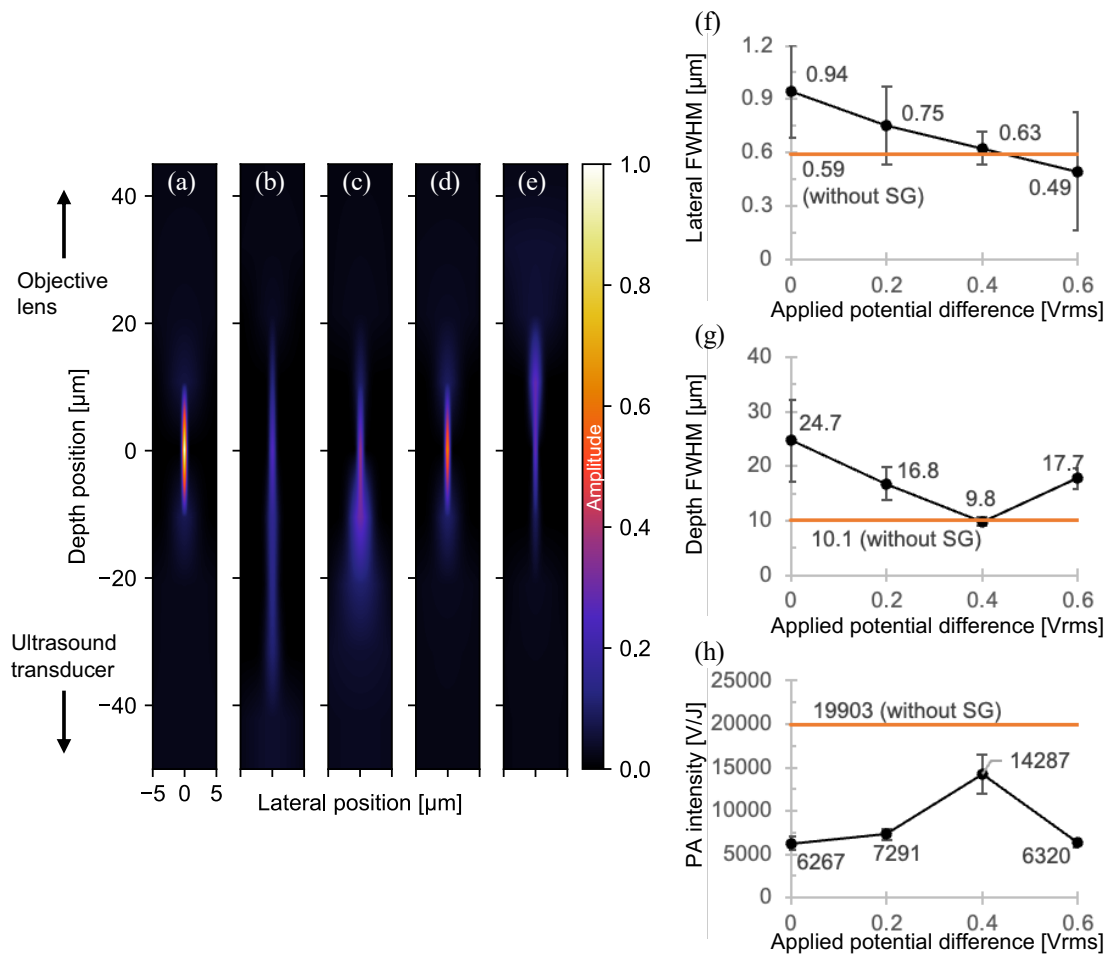


図 2.6. (a) AO 素子なしおよびスライドガラスなしで PA 信号により評価したビーム集束の様子. (b)–(e) AO 素子に電位差 (b) 0 Vrms, (c) 0.2 Vrms, (d) 0.4 Vrms, (e) 0.6 Vrms を印加させてスライドガラス (厚さ 1.2 mm) 越しのビーム集束の様子. (f)–(h) AO 素子の印加電位差と (f) lateral FWHM, (g) depth FWHM, および (h) ピーク PA 強度の関係を表すグラフ. オレンジの実線は (a) AO 素子なしおよびスライドガラスなしの場合に得られたビーム集束から推定される最適値を示す. SG: スライドガラス.

### 2.3.2. 反射検出型 AO-PAM を用いたガラス基板下における横方向分解能評価

横方向分解能評価のため、2.2.4 節に説明しているように、試料として USAF 1951 テストターゲットのグループ 7 要素 6 を観察した。観察深さは、カバーガラス（厚さ：0.12 mm）またはスライドガラス（厚さ：1.2 mm）を蒸着面上に設置することで調整した。AO 補正がない場合と AO 補正がある場合の PA 画像を図 2.7(a)–図 2.7(e) に示す。得られた PA 画像の FOV (Field of View) は  $32 \times 18 \mu\text{m}$ 、シングルピクセルサイズは  $0.5 \mu\text{m}$  である。各ピクセルの値は、8 回平均化した PA 信号のピークエンベロープ値を示す。図 2.7(f)–図 2.7(k) は、PA 画像の x 方向（青の実線）と y 方向（オレンジの実線）に沿ったクロムパターンの平均エッジ PA プロファイルをそれぞれ示している。理論的には、波長  $500 \text{ nm}$  で NA 0.8 の対物レンズを使用した場合、ガラス基板表面での焦点径は  $320 \text{ nm}$  と計算される。AO 補正がない場合とある場合で、観察深さに応じた PA 画像の x、y 方向の横方向分解能と PA 信号の減衰量の推定値を表 2.1 にまとめた。ガラス基板のないテストターゲット蒸着面（深さ：0 mm）における x および y 方向の推定横方向分解能は、AO 補正がない場合、それぞれ  $0.59 \pm 0.19 \mu\text{m}$ 、 $0.51 \pm 0.15 \mu\text{m}$  であった [図 2.7(f), 図 2.7(g)]。

カバーガラスをテストターゲット上に設置した場合（深さ：0.12 mm）、x および y 方向の横方向分解能はそれぞれ  $0.91 \pm 0.48 \mu\text{m}$ 、 $1.57 \pm 1.14 \mu\text{m}$  に劣化した。AO 素子に最適な電位差（0.06 Vrms）を印加すると、x および y 方向の横方向分解能はそれぞれ  $0.72 \pm 0.18 \mu\text{m}$ 、 $0.61 \pm 0.21 \mu\text{m}$  に向上した [図 2.7(h), 図 2.7(i)]。また、AO 補正がある場合の PA 画像は、AO 補正がない場合よりも明瞭に可視化された [図 2.7(b), 図 2.7(c)]。クロムパターンから発生する PA 信号の平均強度は、AO 補正がない場合に比べて約 80% 増強した。

スライドガラスをテストターゲット上に設置した場合（深さ：1.2 mm）、AO 補正がない場合の平均 PA 強度は著しく低下した [図 2.7(d)]。AO 素子への印加電位差を  $0.42 \text{ Vrms}$  に最適化した場合、AO 補正によって PA 強度が 240% 程度増強された。また、x および y 方向の横方向分解能も同様に向上し、AO 補正がない場合の  $1.20 \pm 0.42 \mu\text{m}$  および  $1.64 \pm 1.48 \mu\text{m}$  から、それぞれ  $0.52 \pm 0.17 \mu\text{m}$  および  $0.79 \pm 0.25 \mu\text{m}$  となった [図 2.7(j), 図 2.7(k)]。ここで注意すべき点は、AO 素子への最適な印加電位差（ $0.42 \text{ Vrms}$ ）が、2.3.1 節で報告した厚さ  $1.2 \text{ mm}$  のスライドガラスを用いたセットアップでのビーム集束を評価する実験で得られた  $0.4 \text{ Vrms}$  と異なることである。これは、反射検出型の AO-PAM では対物レンズと試料の間に音響反射板を挿入していたが、ビーム集束実験

では音響反射板を使用しなかったためである。

これまでの結果から、ガラス基板の厚さに応じて発生した球面収差を、AO素子を用いて補正することで、xおよびy方向ともに横方向分解能が向上し、またPA強度も増強したことを示した。しかし、深さ1.2mmにおいては、AO補正によって得られた横方向分解能がx方向とy方向で僅かに異なっていた。この差は、x方向とy方向の波面の歪みの違いによって生じたものである。原因として、反射検出型AO-PAMにおいて、PA波を反射させるために、幅の狭い音響反射板を対物レンズと試料の間に挿入したことが挙げられる [図 2.1(b)]。斜めに設置した音響反射板は、x方向とy方向で波面への影響が異なるため、波面の歪みもx方向とy方向で異なっていた。このような非中心対称な収差は、本研究で用いた中心対称な球面収差を補正するAO素子では補正できない。しかし、コマ収差や非点収差などのさまざまな非中心対称な波面収差を補正するAOデバイスが、2光子励起レーザー走査型顕微鏡の透過型液晶AO素子で開発されている [39]。今後の反射検出型AO-PAMは、これらの透過型液晶AO素子を組み合わせることで横方向分解能がさらに向上すると予想される。

表 2.1. ガラス基板下における AO 補正がない場合とある場合の x 方向および y 方向の横方向分解能と PA 信号の減衰量。

ガラス 基板厚 z [mm]	Without AO correction			With AO correction		
	横方向分解能 ( $LR_{wo}$ ) [ $\mu\text{m}$ ]		減衰量	横方向分解能 ( $LR_w$ ) [ $\mu\text{m}$ ]		減衰量
	x 方向	y 方向	$20\log(P_0/P_z)$ [dB]	x 方向	y 方向	$20\log(P_0/P_z)$ [dB]
0	$0.59 \pm 0.19$	$0.51 \pm 0.15$	0	–	–	–
0.12	$0.91 \pm 0.48$	$1.57 \pm 1.14$	12	$0.72 \pm 0.18$ (20.9%)	$0.61 \pm 0.21$ (61.1%)	7.8
1.2	$1.20 \pm 0.42$	$1.64 \pm 1.48$	20	$0.52 \pm 0.17$ (56.7%)	$0.79 \pm 0.25$ (51.8%)	* 8.2

$P_0$  と  $P_z$  はそれぞれ、表面と深さ  $z$  における PA 強度を示す。値は独立した 10 箇所 の平均値  $\pm$  標準偏差を示す。アスタリスク (\*) は Welch's  $t$ -test により x 方向と y 方向の横方向分解能の間に有意な差 ( $*p < 0.05$ ) があることを示す。括弧内のパーセンテージは、x 方向と y 方向のそれぞれにおける横方向分解能について、AO 補正がない場合 ( $LR_{wo}$ ) とある場合 ( $LR_w$ ) の横方向分解能向上率 ( $|LR_w - LR_{wo}| / LR_{wo}$ ) を示す。

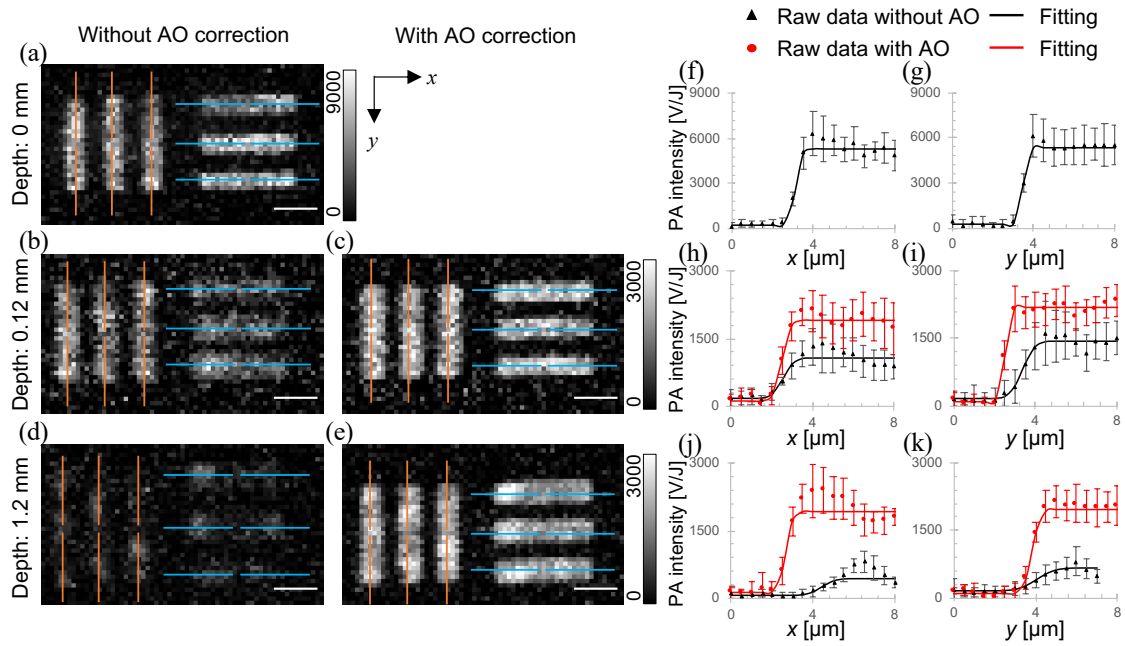


図 2.7. USAF 1951 テストターゲット (グループ 7 要素 6) の PA 画像 : (a) カバーガラス (厚さ : 0.12 mm) およびスライドガラス (厚さ : 1.2 mm) なし, AO 補正なし ; (b) カバーガラスあり, AO 補正なし ; (c) カバーガラスあり, AO 補正あり ; (d) スライドガラスあり, AO 補正なし ; (e) スライドガラスあり, AO 補正あり . (f)および (g)はそれぞれ, (a)で示した青実線 (x 方向) とオレンジ実線 (y 方向) に沿った平均 PA 強度プロファイルを示す . (h)および(i)はそれぞれ, (b)および(c)で示した青とオレンジの実線に沿った平均 PA 強度プロファイルを示す . (j)および(k)はそれぞれ, (d)および(e)で示した青とオレンジの実線に沿った平均 PA 強度プロファイルを示す . スケールバーは 5  $\mu\text{m}$ .

### 2.3.3. シリコンブロック中の金線 PA イメージングによる深さ識別力の評価

試料として、厚さ 1.0 mm のスライドガラスの下に設置したシリコンブロックの表面から約 100  $\mu\text{m}$  の深さに埋め込んだ金線を観察した。2.2.5 節に説明しているように、直径 30  $\mu\text{m}$  の円柱状の金線を血管に見立てた。図 2.8(a)および図 2.8(b)に、シリコンブロック内の金線から発生した PA 信号の最大振幅投影 (MAP) 像を、AO 補正がない場合とある場合でそれぞれ示す。PA 画像はガウスフィルタ処理で平滑化した。PAMAP 画像の各画素の強度から、金線非存在下の平均バックグラウンド強度を差し引いた。光焦点は、深い位置にある金線に合わせた。AO 素子への印加電位差 (0.2 V<sub>rms</sub>) は、図 2.8(a)および図 2.8(b)の矢印で示した円の部分で、金線から発生する PA 信号が最大になるように最適化した。AO 補正後の PA ピーク強度は、AO 補正前の 57 %程度高い値を示した。PA 画像が得られるまで AO 印加電位差は固定した。PA MAP 画像の FOV は 500 × 500  $\mu\text{m}$  で、シングルピクセルサイズは 5  $\mu\text{m}$  である。ラップフィルム表面でのレーザーパルスエネルギーは約 840 nJ であった。提案した AO-PAM において、2.3.1 節に示したように、ガラス基板 (厚さ 1.2 mm) 下の焦点におけるビーム径が約 0.6  $\mu\text{m}$  と見積もられることを利用して、単位面積あたりのパルスエネルギーは 110 J/cm<sup>2</sup> 以下であると算出した。図 2.8(c)および図 2.8(d)は、図 2.8(a)および図 2.8(b)に示した各 PAMAP 画像の破線に沿った断面画像である。シリコン中の PA 波の伝播速度が 1000 m/s であるとして、図 2.8(e)および図 2.8(f)のマゼンダの PA 画像は、図 2.8(c)および図 2.8(d)のマゼンダの破線で示した深さ領域 1.07–1.09 mm に対応する 940–960 ns の時間領域における PA 信号のエンベロープ最大値をプロットした画像である。図 2.8(g)および図 2.8(h)の緑の PA 画像は、図 2.8(c)および図 2.8(d)の緑の破線で示した深さ領域 1.17–1.19 mm に対応する 1020–1040 ns の時間領域における PA 信号のエンベロープ最大値をプロットした画像である。AO 補正によって最適化された深さ領域では、PA 強度が増強していた [図 2.8(g)および図 2.8(h)]。AO 補正がない場合とある場合それぞれのマージ画像を図 2.8(i)および図 2.8(j)に示す。

図 2.8(e)–図 2.8(h)の各 PA 画像の実線(I–III)に沿った PA 強度プロファイルを図 2.8(k)–図 2.8(m)に示す。図 2.8(k)–図 2.8(m)の PA 強度プロファイルから得られた金線の直径を、ガウス関数を用いたフィッティングにより推定した。図 2.8(k)の AO 補正前後の推定された金線の直径を比較すると、AO 補正がある場合の推定直径の方が実際の直径 30  $\mu\text{m}$  に近い値となった。しかし、図 2.8(l)および図 2.8(m)から推定された深い位置にある金線の直径は、浅い位置にある金線の直径よりも小さいことがわかった。これ

は、ビームが金線上面に集光され、金線断面から見て上部だけに強く照射されたためであると考えられる。そこで、PA 画像中の 10 箇所金線エッジ PA 強度プロファイルを取得し、その傾きの平均値から横方向分解能の向上を推定した [表 2.2]。深さ領域 1.07–1.09 mm における金線のエッジ部分の傾きは、AO 補正がない場合の  $0.029 \pm 0.007 \mu\text{m}^{-1}$  から、AO 補正がある場合の  $0.037 \pm 0.005 \mu\text{m}^{-1}$  に改善された [図 2.8(e), 図 2.8(f), および図 2.8(k)]。また、深さ領域 1.17–1.19 mm における金線のエッジ部分の傾きも、AO 補正がない場合の  $0.047 \pm 0.008 \mu\text{m}^{-1}$  から、AO 補正がある場合の  $0.059 \pm 0.006 \mu\text{m}^{-1}$  に改善された [図 2.8(g), 図 2.8(h), 図 2.8(l), および図 2.8(m)]。

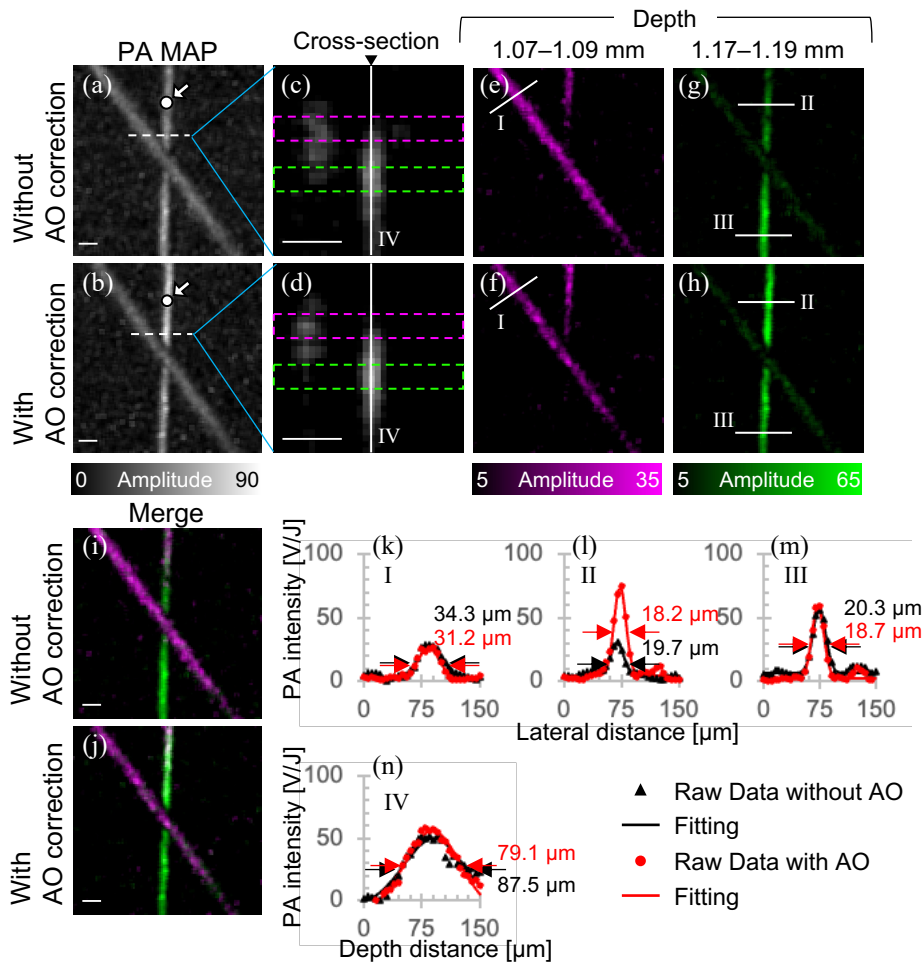
図 2.8(c)および図 2.8(d)の黒三角で示した白の実線(IV)に沿った PA 強度プロファイルを図 2.8(n)に示す。金線の深さ方向の PA 強度プロファイルの 10 箇所の平均値は、AO 補正がない場合の  $87.0 \pm 13.5 \mu\text{m}$  から、AO 補正がある場合の  $76.9 \pm 2.9 \mu\text{m}$  へと約 11.6% 狭くなった。AO 補正がない場合、マージ画像の上半分に示す深部側金線の色相はマゼンダに見える [図 2.8(i)]。一方、AO 補正がある場合、マージ画像の上半分に示す深部側金線の色相は緑であった [図 2.8(j)]。これは、AO 補正によって異なる深さの金線を区別することが可能であることを示している。2 本の金線の深さは約  $100 \mu\text{m}$  離れていた。低周波 UT による検出可能な距離は、シリコン中の音速を考慮すると  $100 \mu\text{m}$  程度と判断される。提案された PAM では、中心周波数 10 MHz の低周波 UT を使用しているにもかかわらず、AO 補正によって深さ識別力が向上している。これらの結果は、低周波 UT であっても、PAM に AO 補正を組み合わせることで、横方向分解能と深さ識別力が向上することを示唆している。提案された反射検出型 AO-PAM は、深層部の正確な情報を提供することが可能である。

表 2.2. AO 補正がない場合および AO 補正がある場合における金線 PA 画像のエッジ部分の傾きと横方向分解能の向上率の推定値。

深さ [mm]	エッジ部分の傾き [ $\mu\text{m}^{-1}$ ]		横方向分解能の向上率 [%]
	Without AO correction	With AO correction	
1.07–1.09	$0.029 \pm 0.007$	$0.037 \pm 0.005$	27.6
1.17–1.19	$0.047 \pm 0.008$	$0.059 \pm 0.006$	25.5

値は独立した 10 箇所の平均値  $\pm$  標準偏差を示す。





**図 2.8.** ガラス基板（厚さ 1.0 mm）の下にあるシリコンブロック中の金線 PA MAP 画像 : (a) AO 補正なし ; (b) AO 補正あり . AO 素子への印加電位差を最適化するために、矢印で示した円の部分における PA 信号を最大化した . (c) および (d) PA MAP 画像 (a) および (b) にそれぞれ示した破線に沿った断面画像 . (e) および (f) PA MAP 画像 (a) および (b) の深さ領域 1.07–1.09  $\mu\text{m}$  における PA 強度をそれぞれマゼンダで示した PA MAP 画像 . (g) および (h) PA MAP 画像 (a) および (b) の深さ領域 1.17–1.19  $\mu\text{m}$  における PA 強度をそれぞれ緑で示した PA MAP 画像 . (i) および (j) 深さ領域に応じて色分けした PA 画像をマージした AO 補正がない場合およびある場合の PA 画像 . (k)–(m) 深さ領域に応じて色分けした PA 画像のそれぞれに示した実線に沿った PA 強度プロファイル . (n) 断面画像 (c) および (d) に黒三角で示した白の実線に沿った PA 強度プロファイル . グラフ (k)–(n) の値は、ガウスフィットによる金線の直径を示す . MAP: 最大振幅投影 . スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  .

図 2.9 は、浅い位置と深い位置で AO 印加電位を最適化した金線の PA MAP 画像を比較したものである。図 2.9(a)–図 2.9(f)は、金線上の浅い位置にある点を用いて AO 印加電位を最適化した場合の PA 画像と PA 強度プロファイルを示したものである。AO 素子に 0.4 Vrms の電位差を印加すると、図 2.9(a)および図 2.9(b)の矢印で示した開円部での PA 強度が最大になることが確認された。また、AO 補正がある場合の実線(I)に沿った PA 強度プロファイルのピークは、AO 補正がない場合に比べて約 125 %高くなった [図 2.9(c)]. 図 2.9(c)および図 2.9(d)は、それぞれ図 2.9(a)および図 2.9(b)に示した PA MAP 画像の破線に沿った断面画像である。また、図 2.9(c)および図 2.9(d)の黒三角上に示した実線(II)に沿った PA 強度のプロファイルを図 2.9(f)に示す。AO 補正がない場合と AO 補正がある場合の断面画像の深さ方向の PA プロファイルを比較すると、浅い位置の金線の PA プロファイルの幅は、AO 補正がない場合の 96.7  $\mu\text{m}$  から AO 補正がある場合の 86.7  $\mu\text{m}$  へと 10.3 %狭くなっている [図 2.9(f)]. 一方、最適化のポイントを深い位置の金線に設定した場合の PA 画像と PA 強度プロファイルを図 2.9(g)–図 2.9(l)に示す。AO 素子に 0.46 Vrms の電位差を印加した場合、図 2.9(g)および図 2.9(h)の矢印で示した開円部での PA 強度が最大となった。また、AO 補正がある場合の実線(III)に沿った PA 強度プロファイルのピークは、図 2.9(k)の矢印で示すように、AO 補正がない場合に比べて約 132 %高くなった。図 2.9(i)および図 2.9(j)は、それぞれ図 2.9(g)および図 2.9(h)に示す PA MAP 画像の破線に沿った断面画像である。図 2.9(i)および図 2.9(j)の黒三角上に示した実線(IV)に沿った PA 強度のプロファイルを図 2.9(l)に示している。AO 補正がない場合と AO 補正がある場合の PA 断面像の深さ方向の PA プロファイルと比較すると、深い位置にある金線の PA プロファイルの幅は、AO 補正がない場合の 106.7  $\mu\text{m}$  から AO 補正があり場合の 88.0  $\mu\text{m}$  へと 17.5 %狭まっている [図 2.9(l)]. これらの結果から、AO 補正は選択された深さにおける金線の PA 画像の空間分解能の向上が可能であることが推測される。AO 素子への印加電位差の最適化は、深さ方向の識別力を向上させるだけでなく、選択された深さに置かれたターゲットの PA 強度を選択的に向上させることができる。

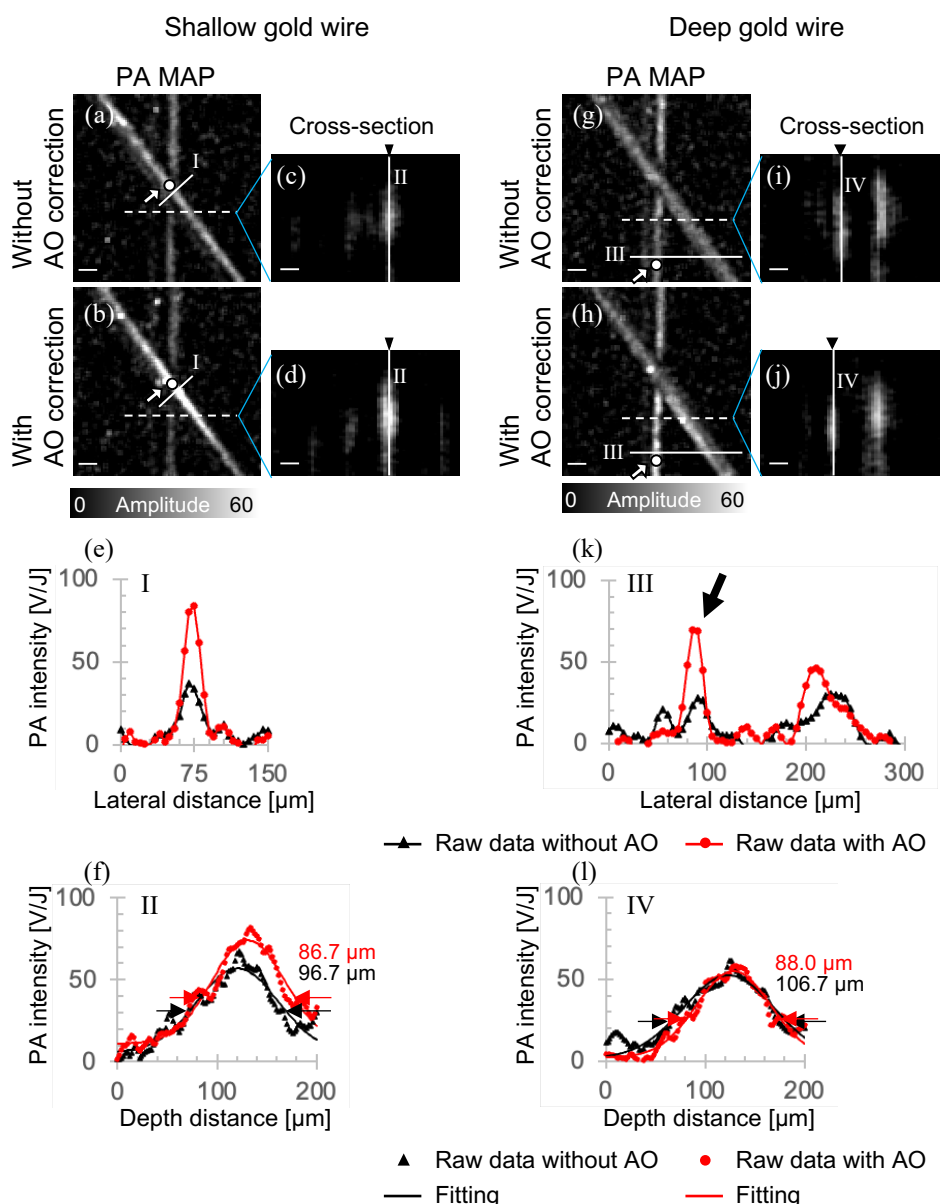


図 2.9. ガラス板下のシリコンブロック中の金線における AO 補正位置を変えた場合の PA MAP 画像. (a)–(d)および(g)–(j)は、金線に対して浅い位置と深い位置でそれぞれ AO 補正が最適化されている: (a)および(g) AO 補正がない場合の PAMAP 画像; (b)および(h) AO 補正がある場合の PA MAP 画像; (c)および(i) PAMAP 画像(a)および(g)における破線に沿った PA 断面画像; (d)および(j) PA MAP 画像(b)および(h)における破線に沿った断面画像; グラフ(e)および(k) AO 補正がない場合[(a)および(g)]と AO 補正がある場合[(b)および(h)]の PA MAP 画像における実線[(I)および(III)]に沿った PA 強度プロファイル; グラフ(f)および(l) AO 補正がない場合[(c)および(i)]と AO 補正がある場合[(d)および(j)]の PA 断面画像における黒三角上の実線[(II)および(IV)]に沿った PA 強度プロファイル. (f)および(l)の値は、ガウスフィットによる金線の直径を示す. MAP: 最大振幅投影. スケールバーは 50 $\mu\text{m}$ .

### 2.3.4. マウス耳の *in vivo* 血管 PA イメージング

2.2.6 節に説明しているように、マウス耳の *in vivo* における血管イメージングの実験結果を示す。図 2.10(a)および図 2.10(b)は、AO 補正がない場合とある場合の *in vivo* マウス耳の血管 PAMAP 画像を示す。PAMAP 画像は血管非存在下の平均バックグラウンドを差し引いている。PAMAP 画像の FOV は、 $750 \times 600 \mu\text{m}$  で、シングルピクセルサイズは  $5 \mu\text{m}$  である。ラップフィルム表面におけるレーザーパルスエネルギーは約  $84 \text{ nJ}$  であった。単位面積あたりのレーザーパルスエネルギーは、焦点におけるビーム径を  $0.6 \mu\text{m}$  と仮定して、 $30 \text{ J/cm}^2$  以下と見積もられた。図 2.10(a)および図 2.10(b)の矢印で示した円の部分において、AO 素子への印加電位差を最適化した。AO 印加電位差が  $0.4 \text{ V}_{\text{rms}}$  のとき、PA ピーク強度が AO 補正前の約 20%高い値を示した。PA 画像取得中は AO 印加電位差を固定した。PAMAP 画像はガウスフィルタ処理で平滑化した。

生体内における PA 波の伝播速度を  $1500 \text{ m/s}$  と仮定した場合における深さ領域  $110\text{--}140 \mu\text{m}$  ( $972\text{--}992 \text{ ns}$ )、 $140\text{--}215 \mu\text{m}$  ( $992\text{--}1042 \text{ ns}$ )、および  $215\text{--}260 \mu\text{m}$  ( $1042\text{--}1072 \text{ ns}$ ) の PAMAP 画像はそれぞれマゼンダ [図 2.10(c)および図 2.10(d)]、赤 [図 2.10(e)および図 2.10(f)]、および緑 [図 2.10(g)および図 2.10(h)] で PA 強度を色分けした。AO 補正のための AO 印加電位差を最適化するために用いた観察深さは  $110\text{--}140 \mu\text{m}$  であった [図 2.10(c)および図 2.10(d)]。色分けした PAMAP 画像をマージした PA 画像を図 2.10(i)および図 2.10(j)に示す。図 2.10(k)および図 2.10(l)は、マージした PA 画像 [図 2.10(i)および図 2.10(j)] に示した破線で囲まれた長方形の領域を拡大した PA 画像を示す。図 2.10(k)および図 2.10(l)の破線で囲まれた円の領域から、AO 補正がある場合のマージした PA 画像は、AO 補正がない場合と比較して、マゼンダで色分けされた血管が明瞭に可視化されている。この結果は、異なる深さに存在する血管（深さ方向の間隔は約  $110 \mu\text{m}$ ）を、低周波 UT を用いても AO 補正によって正確に PA 画像で識別できていることを意味する。

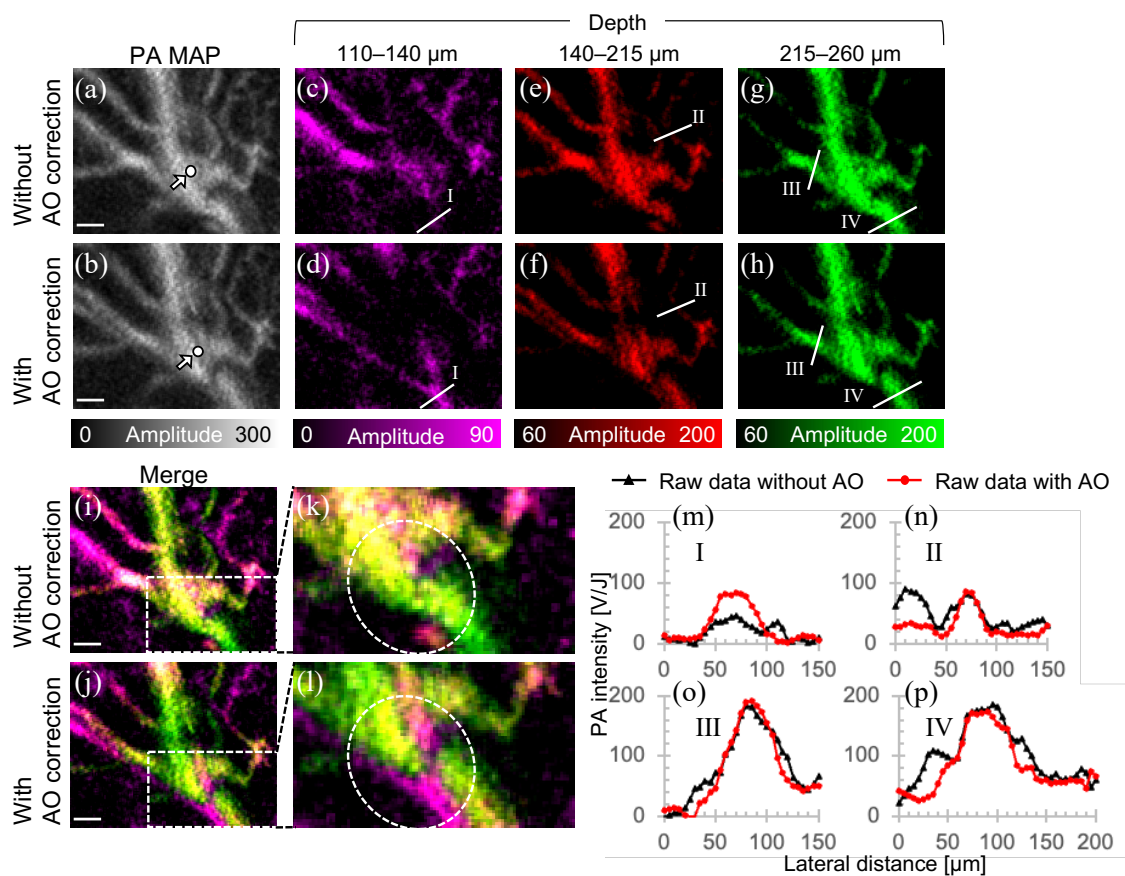
図 2.10(c)–図 2.10(h)の各 PA 画像で示した実線(I–IV)に沿った PA 強度プロファイルを図 2.10(m)–図 2.10(p)に示す。AO 補正がある場合の PA 強度プロファイルは、AO 補正がない場合に比べてエッジが急峻になり、背景ノイズも低下したため、横方向分解能が向上したことがわかる。また、図 2.10(n)および図 2.10(p)において、AO 補正がない場合の PA 強度プロファイル（黒線）は深さ識別力が低いために 2 つのピークが発生している。左側のピークは、深さの浅い領域 ( $110\text{--}140 \mu\text{m}$ ) に存在する血管から発生した PA 信号であり、AO 補正がない場合では深い領域に存在する血管との区別ができていない。

しかし、AO 補正がある場合、深さに応じて浅い領域および深い領域に存在する血管が識別される [図 2.10(n)および図 2.10(p)の赤線]. 表 2.3 は、異なる深さ領域において、AO 補正がない場合とある場合の血管 PA 画像のエッジを 10 箇所平均した傾きを示す. 表 2.3 より、深さ領域 110–140  $\mu\text{m}$ , 140–215  $\mu\text{m}$ , および 215–260  $\mu\text{m}$  におけるエッジの傾きが、AO 補正がない場合の  $0.020 \pm 0.011 \mu\text{m}^{-1}$ ,  $0.026 \pm 0.007 \mu\text{m}^{-1}$ , および  $0.028 \pm 0.012 \mu\text{m}^{-1}$  から、AO 補正がある場合の  $0.043 \pm 0.020 \mu\text{m}^{-1}$ ,  $0.035 \pm 0.009 \mu\text{m}^{-1}$ , および  $0.039 \pm 0.006 \mu\text{m}^{-1}$  となり、それぞれ急峻になっていることがわかる. これらの結果から、提案された反射検出型 AO-PAM は、低周波 UT を用いても、*in vivo* 血管イメージングにおける深さ識別力と横方向分解能を向上させることができると結論づけた.

**表 2.3. AO 補正がない場合および AO 補正がある場合における血管 PA 画像のエッジ部分の傾きと横方向分解能の向上率.**

深さ [ $\mu\text{m}$ ]	エッジ部分の傾き [ $\mu\text{m}^{-1}$ ]		横方向分解能の向上率 [%]
	Without AO correction	With AO correction	
110–140	$0.020 \pm 0.011$	$0.043 \pm 0.020$	115
140–215	$0.026 \pm 0.007$	$0.035 \pm 0.009$	34.6
215–260	$0.028 \pm 0.012$	$0.039 \pm 0.006$	39.3

値は独立した 10 箇所の平均値  $\pm$  標準偏差を示す.



**図 2.10.** *In vivo* マウス耳の血管 PA MAP 画像 : (a) AO 補正なし ; (b) AO 補正あり .  
 AO 素子への印加電位差を最適化するために、矢印で示した円の部分における PA 信号を最大化した . (c)および(d) PA MAP 画像(a)および(b)の深さ領域 110–140  $\mu\text{m}$  における PA 強度をそれぞれマゼンダで示した PA MAP 画像 . (e)および(f) PA MAP 画像 (a)および(b)の深さ領域 140–215  $\mu\text{m}$  における PA 強度をそれぞれ赤で示した PA MAP 画像 . (g)および(h) PA MAP 画像(a)および(b)の深さ領域 215–260  $\mu\text{m}$  における PA 強度をそれぞれ緑で示した PA MAP 画像 . (i)および(j) 深さ領域に応じて色分けした PA 画像をマージした AO 補正がない場合およびある場合の PA 画像 . (k)および(l) マージした PA 画像(i)および(j)に示した破線で囲まれた長方形の領域の拡大像 . (m)–(p) 深さ領域に応じて色分けした PA 画像のそれぞれに示した実線に沿った PA 強度プロファイル . MAP: 最大振幅投影 . スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  .

## 2.4. 結論

ガラス基板下の USAF 1951 テストターゲット，およびガラス基板下のシリコーンブロック中の金線を対象に，低周波 UT を用いても，透過型液晶 AO 素子により PAM の横方向分解能と深さ識別力を向上させることが可能であることがわかった．また，任意の観察深さを選択し，その深さに対して AO 素子の印加電圧を最適化することにより，選択した観察深さの PA 強度が向上することが明らかとなった．*in vivo* でのマウス耳血管に対しても，生体深部を高空間分解能で観察できることを示した．

## 第3章 透過型液晶補償光学素子を用いた 2光子励起光音響顕微鏡

### 3.1. 緒言

第2章において、高NA対物レンズを使用した光音響顕微鏡(PAM)に透過型液晶補償光学(AO)素子を導入し、PAMの空間分解能の向上を明らかにした。本章では、光子密度が高い集光点のみで生じる2光子吸収と光音響顕微鏡(PAM)を組み合わせた2光子光音響顕微鏡(TP-PAM)に対して検討を行った。結果として、TP-PAMに透過型液晶AO素子を導入することにより、深部における光音響信号が増強されることを明らかにした。ガラスセルに入れた1光子吸収と2光子吸収の両方を起こす水溶液の深さ方向の2光子光音響プロファイルを測定した結果、光照射側の表面付近における1光子吸収によって低下していく2光子PA波が、AO補正によって、深部においても効率よく発生させることができることを明らかにした。



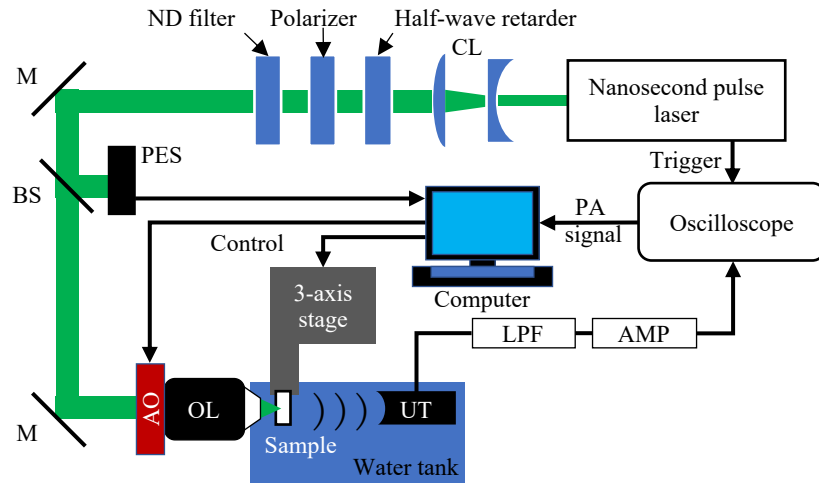
## 3.2. 実験方法

### 3.2.1. 2光子励起光音響顕微鏡システム, および光音響スペクトル測定装置

本研究で構築した TP-PAM システムを図 3.1(a)に示す. 基本的なシステムの光学系は 2.2.1 節で述べた図 2.1(a)と同様である. この実験において, 音響検出系は透過型に変更した. すなわち, PA 波は対物レンズと反対側の光軸上に設置した UT によって検出される. TP-PAM 観察において, 40 倍の水浸対物レンズ (LUMPLFLM 40XW, OLYMPUS), 狭帯域 UT (10K6.4I PF15, Japan Probe) を使用し, 水槽中に試料を設置し, 測定を行った. 2 光子 PA 信号は, 試料内に集光点がある場合のみ, 集光点から発生するので, 集光点と UT の位置が固定されている場合, 同じタイミングで PA 波が検出される. したがって, UT によって検出される PA 波に時間窓 (Time window: TW) を設定し, その TW 内のピーク PA 強度を抽出した.

図 3.1(b)に示される PA スペクトル測定装置を用いて, 測定試料の PA 信号強度の波長依存性 (PA スペクトル) を評価した. 対物レンズは 20 倍の対物レンズ (DIN 20, Edmund, NA: 0.4), UT は広帯域 UT (B10K6.4I PF15, Japan Probe, 焦点距離: 15 mm) を使用し, 試料は空気中に設置し測定を行った. 試料と UT の間を超音波用検査用ゲル (4973210412320, Jex) で埋め, PA 波は検出された. 通常, 測定される PA 信号強度は光吸収量に比例するため, PA スペクトルは光吸収スペクトルと相似形となる. 光吸収スペクトルは通常, 透過光強度の波長依存性により測定されるが, PA スペクトルは, 透過光強度の測定が困難な粉末試料, 懸濁試料, 生体試料といった光散乱が著しい物質に対しても応用できる [48].

(a) TP-PAM system



(b) PA spectrometer system

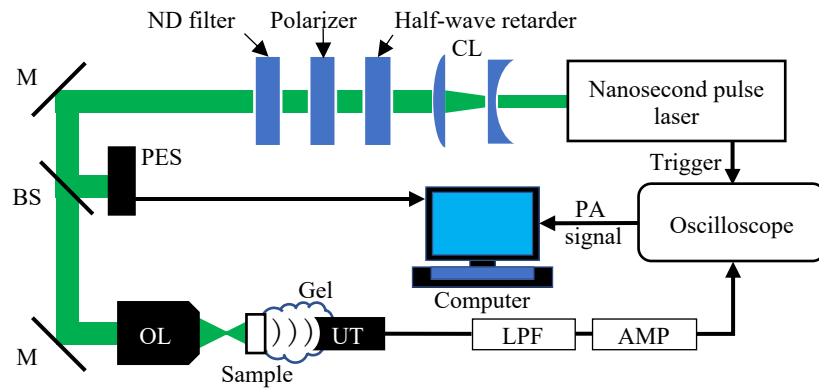


図 3.1. (a) 2 光子励起光音響顕微鏡システム. (b) 光音響スペクトル測定装置図.  
AMP: 増幅器; AO: 透過型液晶補償光学素子; BS: ビームスプリッタ (反射:透過 = 50:50); CL: コリメータレンズ; LPF: ローパスフィルタ; M: ミラー; OL: 対物レンズ; PA: 光音響; PES: 焦電エネルギーセンサ; UT: 音響トランスデューサ.

### 3.2.2. 測定試料と測定方法

測定試料として、水溶液の Rhodamine B /water, およびエタノール溶媒の Rhodamine B /ethanol と IRA 980BT/ethanol の混合溶液を用意した。容器として、ガラスセル（光路長 2.0 mm, 光路幅 10 mm, 板厚 1.0 mm), およびシリコンブロック内に中空（直径 730  $\mu\text{m}$ ）を作成したものを用いて、試料溶液で満たした [図 3.2].

初めに, ガラスセルを満たした Rhodamine B /ethanol と IRA 980BT /ethanol に対して, 試料表面に直径 5 mm の平行光を照射し, 波長を可変させて PA スペクトルを測定した。また, 吸収ピーク波長照射 (1 光子励起) による PA 信号のパルスエネルギー依存性を測定した。2 光子励起 (Rhodamine B /ethanol に対して波長 1064 nm の光照射) による PA 信号は, 試料内集光照射により発生する信号のパルスエネルギー依存性を測定した。パルスエネルギーは正確に PA 信号を発生させる光パルスに対して評価し, 対物レンズの透過率の波長依存性も正確に考慮した。

次に, ガラスセルおよびシリコンブロック中空に満たした試料溶液の 2 光子 PA 断面像を測定した。光源は 1064 nm の光パルスを用いた。AO 補正がない場合とある場合に対して 2 光子 PA 断面像を比較した。

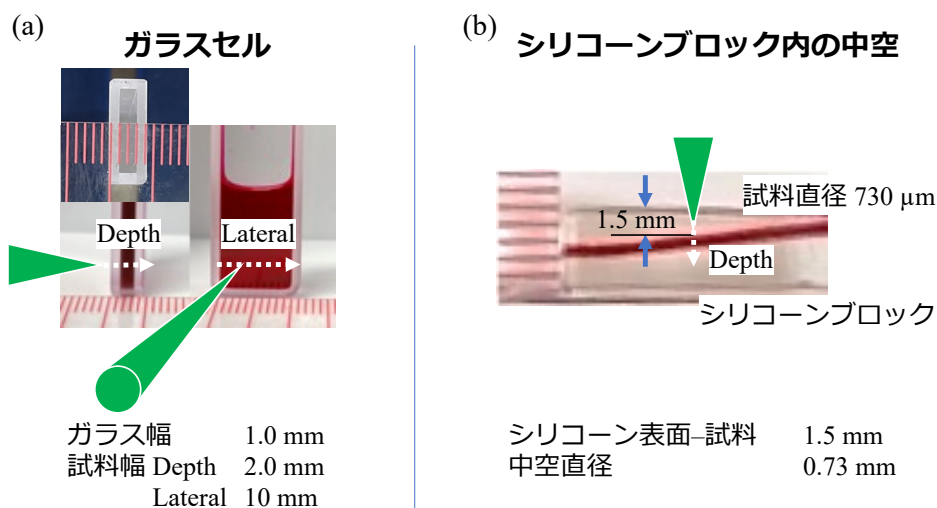


図 3.2. 測定試料. Rhodamine B /ethanol と IRA 980BT /ethanol の混合溶液を (a) ガラスセル, および(b) シリコンブロック内の中空に満たした。

最後に、ラットから取り出した下大静脈の2光子PA断面像を測定した。この実験は、佐賀大学動物実験委員会の承認を得て、佐賀大学動物実験規程に基づいて実施された（承認番号：30-058-0）。5週齢のオスのJc1：Wisterラット（CLEA Japan）にヘパリン（約0.1 mL）を静注後、下大静脈に留置針を残し、シリンジを用いて2光子PA造影剤を注入した。このとき、2光子PA造影剤が測定範囲で留まるように血管の前後を結紮しながら注入した。取り出した下大静脈を発泡スチロール上にホッチキス針で固定した [図 3.3]。電氣的に制御されたAO素子により、波面補正のない場合とある場合に対して、2光子PA血管断面像を比較した。

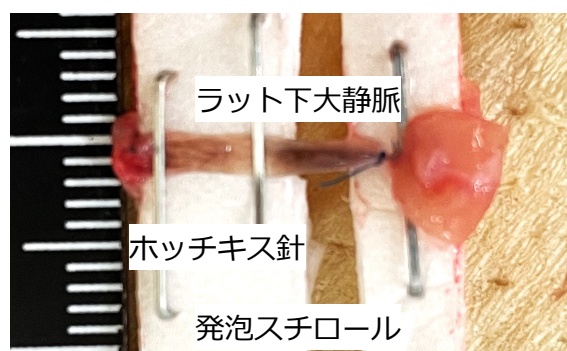


図 3.3. 2光子PA造影剤を注入したラット下大静脈を試料台に固定した様子。

### 3.3. 実験結果

#### 3.3.1. 光音響スペクトル測定および光パルスエネルギー依存性

Rhodamine B /ethanol (40 mg/mL) および IRA 980BT /ethanol (0.1 mg/mL) の PA スペクトルを図 3.4 に示す。励起波長 410–650 nm および 800–1200 nm の領域を 5 nm 間隔で測定した。波長ごとに取得した PA 信号はパルスエネルギーで規格化している。Rhodamine B /ethanol および IRA 980BT /ethanol の PA スペクトルピーク波長は、それぞれ 575 nm および 985 nm 付近であった。PA スペクトルは、光吸収スペクトル (IRA 980BT [49], および高濃度 Rhodamine B [50]) に類似した特徴をそれぞれ示した。IRA 980BT /ethanol の 1 光子励起 (波長 980 nm) による PA 信号と、Rhodamine B /ethanol の 1 光子励起 (波長 560 nm) および 2 光子励起 (波長 1064 nm) による PA 信号のパルスエネルギー依存性を図 3.5 に、表 3.1 にべき乗関数フィッティングによって得られた指数を示す。両対数グラフにデータをプロットし、べき乗関数を用いて最小二乗法により指数を求めると、IRA 980BT /ethanol および Rhodamine B /ethanol の 1 光子 PA 信号に対して、それぞれ 0.89 および 0.94 となった。Rhodamine B /ethanol の 2 光子励起による PA 信号は、パルスエネルギーの 2.0 乗に比例した。これらの結果より、Rhodamine B /ethanol に対して励起波長 1064 nm を用いた場合、1 光子励起による PA 波は発生せず、2 光子 PA 波が発生していることが分かる。

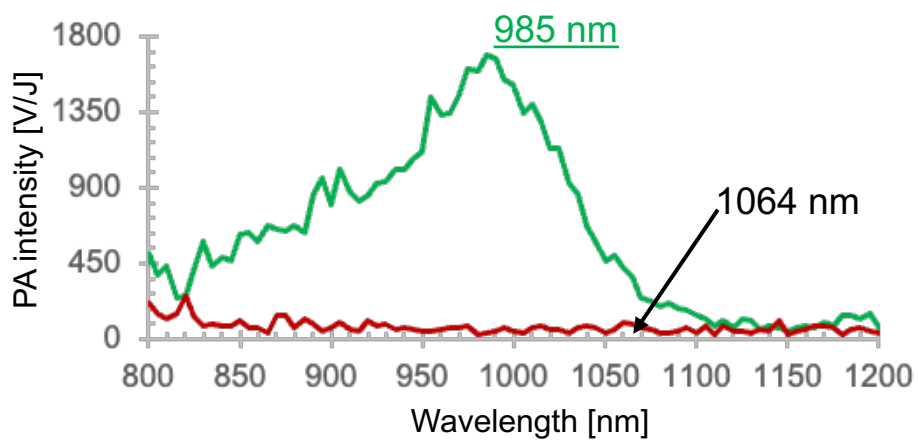
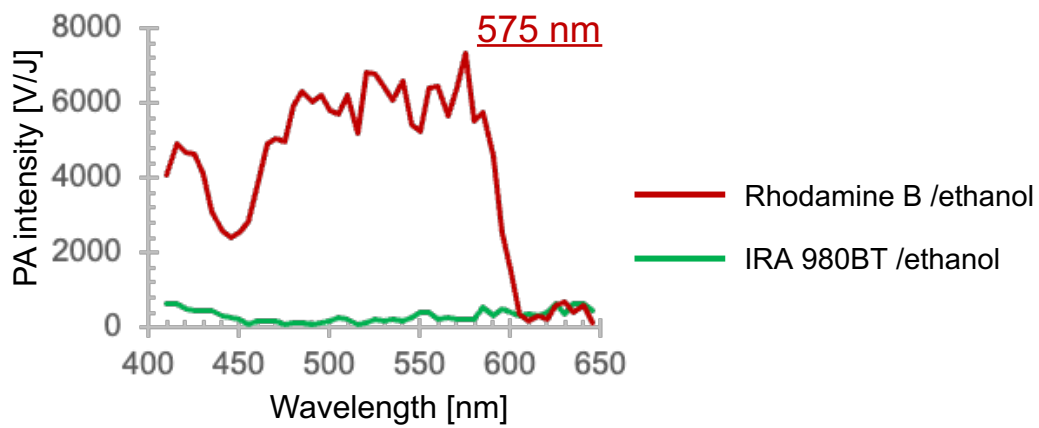


図 3.4. Rhodamine B /ethanol (40 mg/mL), および, IRA 980BT /ethanol (0.1 mg/mL) の光音響スペクトル.

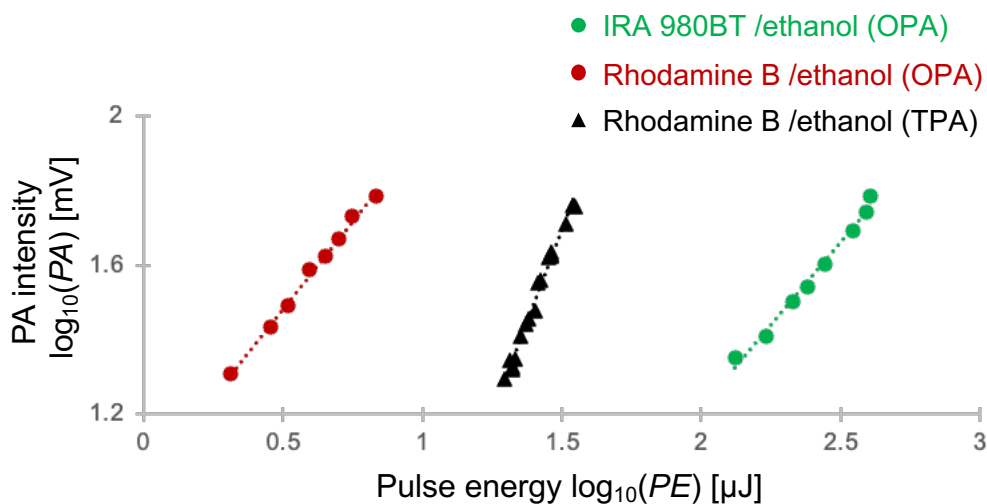


図 3.5. IRA 980BT/ethanol (0.1 mg/mL) の 1 光子 (励起波長 980 nm) PA 信号, Rhodamine B/ethanol (40 mg/mL) の 1 光子 (励起波長 560 nm) および 2 光子 (励起波長 1064 nm) PA 信号のパルスエネルギー依存性. OPA : 1 光子光音響 ; PA : 光音響 ; PE : パルスエネルギー ; TPA : 2 光子光音響.

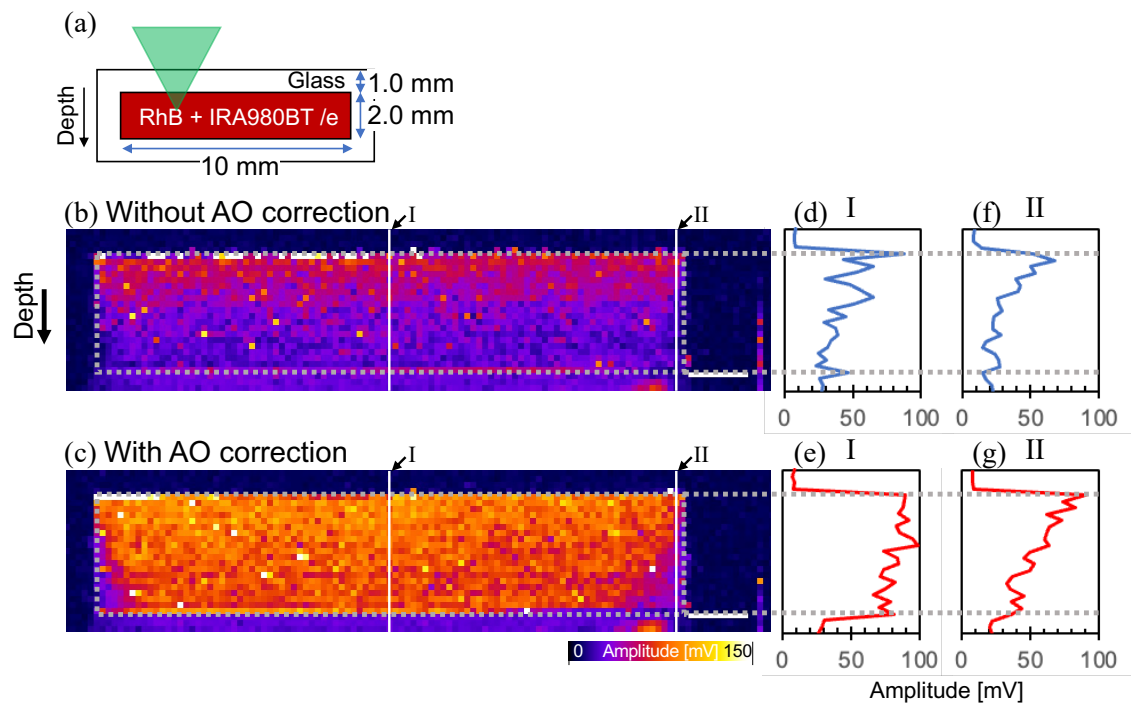
表 3.1. 光音響強度のパルスエネルギー依存性の評価結果.

試料 (エタノール溶媒)	励起波長 [nm]	指数
IRA 980BT	980	0.89
Rhodamine B (1 光子)	560	0.94
Rhodamine B (2 光子)	1064	2.00

### 3.3.2. ガラスセル中の 2 光子光音響断面イメージング

ガラスセル中に満たした Rhodamine B /ethanol (40 mg/mL) と IRA 980BT /ethanol (0.1 mg/mL)を 1:1 に混合した溶液に対して得られた 2 光子 PA 断面像を図 3.6(a)に示す. 図 3.6(b)および図 3.6(c)は, AO 補正がない場合とある場合に TW (時間幅: 400 ns) を設定することにより抽出した 2 光子 PA 信号の MAP 画像を示す. FOV は, 12.0 × 2.6 mm で, シングルピクセルサイズは 100  $\mu\text{m}$  である. 各ピクセルの値は, 4 回平均化した PA 信号のエンベロープの最大値を示す. 励起波長は 1064 nm で, パルスエネルギーは 4.8  $\mu\text{J}$  であった. PA 画像中の実線 I に沿った PA 強度プロファイルを図 3.6(d)および図 3.6(e)に, 実線 II に沿った PA 強度プロファイルを図 3.6(f)および図 3.6(g)にそれぞれ示す. AO 補正がない場合, 2 光子 PA 信号は, 光照射側の表面で強く検出され, 深部に進むほど減衰している [図 3.6(b)および図 3.6(d)]. しかし, AO 補正を深部側で最適化することで深部での PA 信号が約 2.4 倍増強された. また深部側の深さ方向のエッジにおいて, AO 補正がない場合と比較すると, 試料とガラスの境界が明確になっていることがわかる [図 3.6(c)および図 3.6(e)]. 一方, 深部側のセル側面の境界において, AO 補正により PA 強度は約 1.6 倍増強されているが, 表面側と比較すると AO 素子による補正が最適化できていない [図 3.6(f), 図 3.6(g)]. これは, 今回用いた AO 素子は球面収差に対してのみ補正できるため, 側面エッジ付近の複雑な波面収差が補正できなかったと考えられる.





**図 3.6.** ガラスセル中に満たされた混合溶液の 2 光子 PA 断面像 : (a) 観察した試料のイメージ図 ; (b) AO 補正なし ; (c) AO 補正あり. (b)および(c)中の破線枠は実際の試料幅を示す. (d)および(e) 画像(b)および(c)中の実線 I (ガラスセル中央) に沿った PA 強度プロファイル ; (f)および(g) 画像(b)および(c)中の実線 II (ガラスセル側面近傍) に沿った PA 強度プロファイル. e: ethanol; RhB: Rhodamine B. スケールバーは 1.0 mm.

次に、生体の散乱を模擬するためによく使用される Intralipid 水溶液を用いて、散乱体を介したガラスセル中の 2 光子 PA 深さ断面像を AO がない場合とある場合で比較した。試料として、Rhodamine B /water (10 mg/mL)を用いた。試料の前に Intralipid 水溶液で満たした自作したカバーガラスで挟んだゴム板セル（光路長 1.0 mm）を置き、測定を行った。Rhodamine B /water で満たしたガラスセルの板厚が 1.0 mm であったため、Intralipid 水溶液表面からガラス基板を介した試料表面まで約 2.0 mm であった。図 3.7 は Intralipid の濃度を変化させて測定した 2 光子 PA 断面像を示す。PA 画像の FOV は、1.0 × 1.2 mm で、シングルピクセルサイズは 50 μm である。各ピクセルの値は、4 回平均化した PA 信号のエンベロープの最大値を示す。観察試料は深さ約 800 μm まで測定した。AO 補正がない場合、Intralipid 濃度が高くなるに従って光散乱が大きくなり、また界面による屈折率の違いで 2 光子 PA 信号強度が減衰している。表 3.2 に試料内の平均 2 光子 PA 信号強度とその変化を示す。Intralipid 濃度 0.75 %および 1.0 %においては、界面の区別が困難であった [図 3.7(e)および図 3.7(g)]。AO 補正がある場合、球面収差補正によって集光率が向上し、今回の実験では Intralipid 濃度 0.75 %まで観察できた [図 3.7(f)]。この結果は、例えば、波長 1000 nm におけるヒト大腿部の散乱係数が  $10.45 \text{ cm}^{-1}$  であり、Intralipid 濃度 2.0 %が生体皮膚組織に対応している [51]と報告されていることから、生体深さ 360 μm 程度まで AO 補正の効果があると考えられる。

表 3.2. AO 補正がない場合および AO 補正がある場合における試料内の平均 2 光子 PA 信号強度と信号増幅率.

Intralipid 濃度 [%]	試料内の平均 2 光子 PA 信号強度 [mV]		信号増幅率 [%]
	Without AO	With AO	
0.25	7.0 ± 6.9	14.9 ± 11.5	113
0.50	5.8 ± 6.0	15.2 ± 12.2	162
0.75	3.3 ± 5.3	7.7 ± 6.3	133
1.00	2.0 ± 1.5	2.6 ± 1.4	30

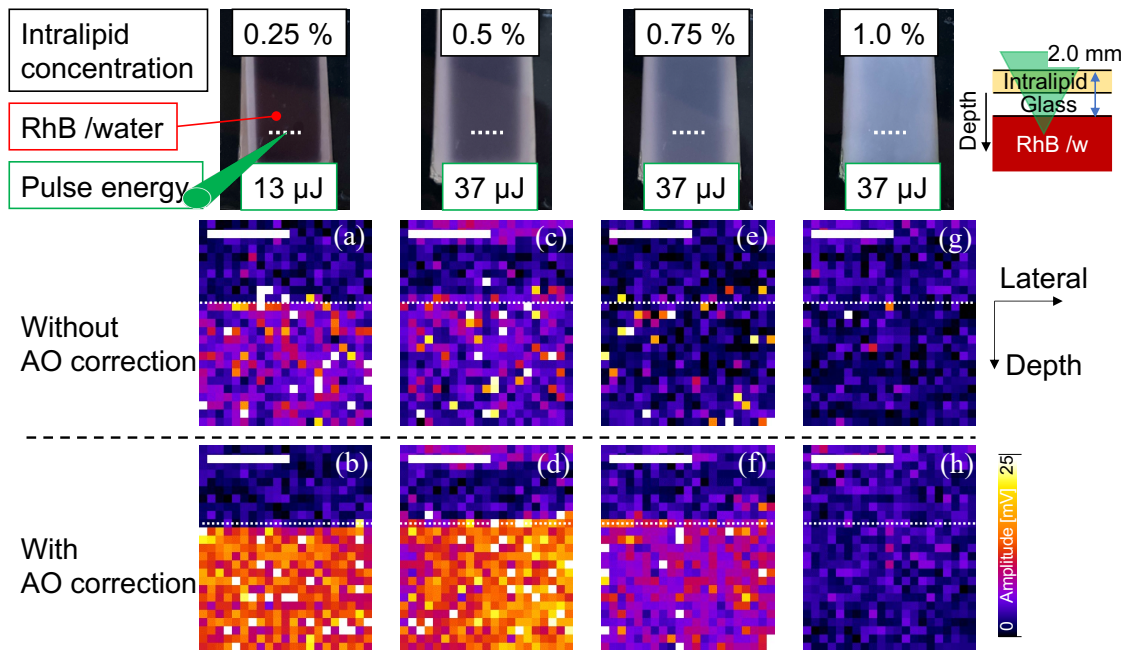


図 3.7. 散乱体 (Intralipid) を介した場合のガラスセル中に満たされた Rhodamine B /water における 2 光子 PA 断面像. Intralipid 濃度 0.25 % の場合 (a) AO 補正なし, (b) AO 補正あり ; Intralipid 濃度 0.5 % の場合 (c) AO 補正なし, (d) AO 補正あり ; Intralipid 濃度 0.75 % の場合 (e) AO 補正なし, (f) AO 補正あり ; Intralipid 濃度 1.0 % の場合 (g) AO 補正なし, (h) AO 補正あり. RhB: Rhodamine B. スケールバーは 500  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.3. シリコーンブロック中空の 2 光子光音響断面イメージング

シリコーンブロック内の中空に満たした Rhodamine B /ethanol (20 mg/mL) と IRA 980BT /ethanol (0.05 mg/mL) の混合溶液における 2 光子 PA 断面像のイメージ図を図 3.8(a)に示す。AO 補正がない場合、中空表面（光照射側）および中空深部で AO 補正がある場合における 2 光子 PA 断面像と PA 強度プロファイルを図 3.8(b)–図 3.8(j)にそれぞれ示す。PA 画像の FOV は、 $1.5 \times 1.5 \text{ mm}$  で、シングルピクセルサイズは  $10 \mu\text{m}$  である。励起波長は  $1064 \text{ nm}$  で、パルスエネルギーは  $2.2 \mu\text{J}$  であった。図 3.8(b)–図 3.8(d)および図 3.8(e)–図 3.8(f)は、ルックアップテーブル (LUT) がそれぞれ  $0\text{--}300 \text{ mV}$  および  $0\text{--}25 \text{ mV}$  に割り当てられている。AO 補正がない場合、3.3.2 節のガラスセル中の 2 光子 PA 断面像 [図 3.6(b)]と同様に、光照射側表面で強く 2 光子 PA 信号が検出され、深部に進むに従って信号強度が低下する [図 3.8(b)および図 3.8(e)]。実際の中空直径  $730 \mu\text{m}$  と比較して、表面から  $180 \mu\text{m}$  程度観察されたが試料形状を把握することは困難であった [図 3.8(h)]。中空内における AO 素子への印加電位差を 2 光子 PA 強度が最大化される電位差で画像化すると、中空表面付近で最大となった [図 3.8(c)および図 3.8(f)]。AO 補正がない場合と比較して信号強度が約 2.8 倍増強された。試料深さも  $250 \mu\text{m}$  程度まで観察可能となった [図 3.8(i)]。しかし、試料形状を把握することは困難であった。これは、界面が曲面であるため、3.3.2 節と同様に今回用いた球面収差のみを補正する AO 素子では複雑な収差を補正することが困難であったためと考えられる。一方、2 光子 PA 強度を最大化せず、光照射側表面から反対側の界面までの試料内における 2 光子 PA 強度が深部側と一定となるように AO 素子への印加電位差を制御して画像化すると、明瞭な中空断面像を取得することができた [図 3.8(d)および図 3.8(g)]。このとき、AO 補正がない場合と比較して、AO 補正がある場合の中空表面 PA 強度は、約 0.28 倍に減少したが、中空深部側は約 1.2 倍増強された。推定された中空直径は約  $690 \mu\text{m}$  であった [図 3.8(j)]。これらの結果より、選択的に AO 素子への印加電位差を制御することで、球面収差補正のみであっても、2 光子 PA 信号強度の増強または深部側試料形状の把握が可能であることを示した。ただし、界面の屈折率差増大および複雑な試料形状の場合は球面収差のみでは補正が困難になると予想されるため、第 2 章と同様に、非対称な波面補正技術との組み合わせが重要である。

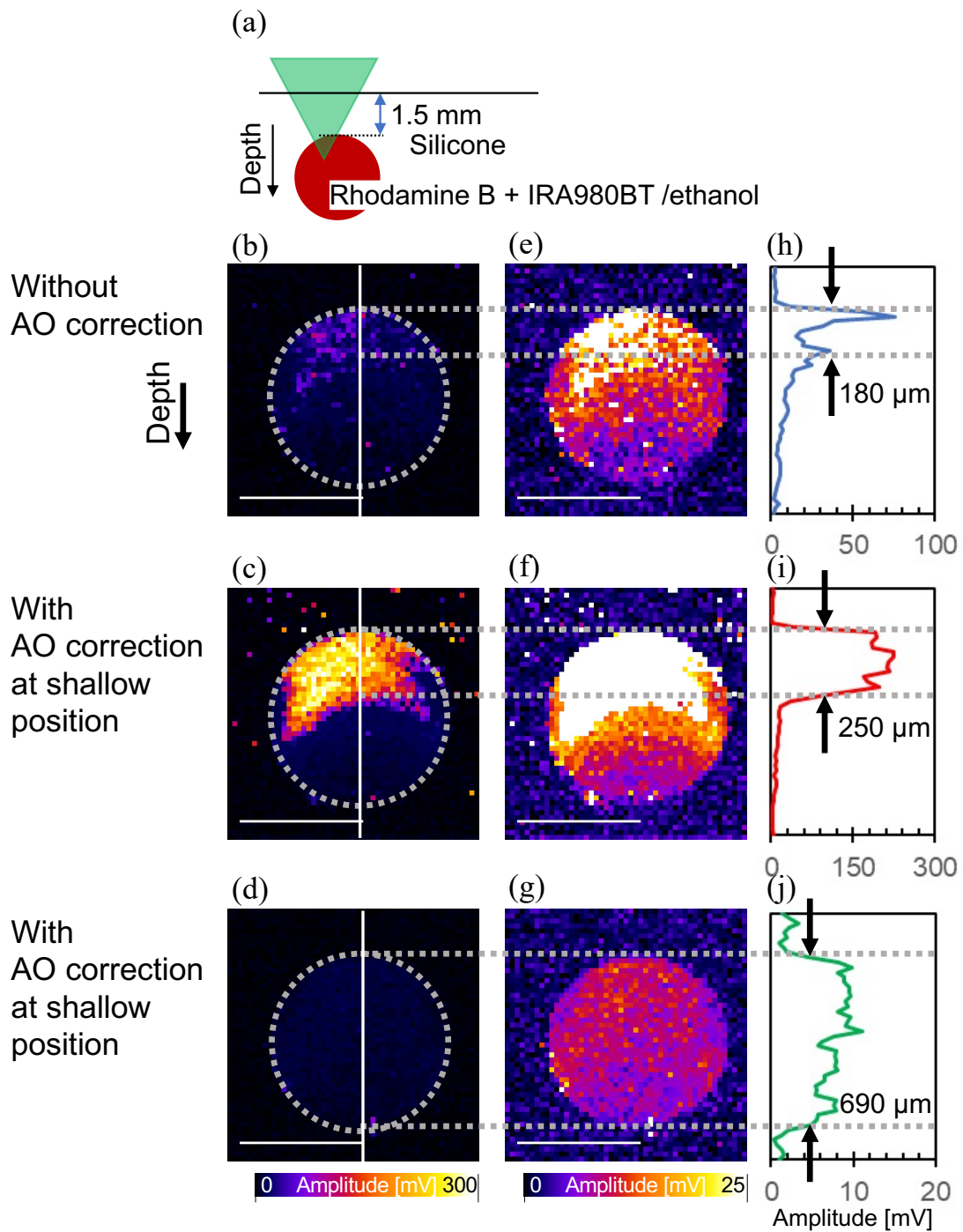


図 3.8. シリコンブロック内の中空に満たされた混合溶液の 2 光子 PA 断面像 : (a) 試料観察イメージ ; (b) および (e) AO 補正なし ; (c) および (f) 中空表面における AO 補正あり ; (d) および (g) 中空深部における AO 補正あり . (b)–(d) および (e)–(g) は, LUT がそれぞれ 0–300 mV および 0–25 mV に割り当てられている ; グラフ (h)–(j) 画像 (b)–(d) 中の実線に沿った PA 強度プロファイル . スケールバーは 500  $\mu\text{m}$  .

### 3.3.4. ラット下大静脈の 2 光子光音響断面イメージング

ラット下大静脈の白色像を図 3.9(a)に示す. 図 3.9(b)および図 3.9(c)は, 図 3.9(a)中の青破線に沿った 2 光子 PA 血管断面像における AO 補正がない場合とある場合をそれぞれ示す. FOV は,  $2.4 \times 2.4 \text{ mm}$  で, シングルピクセルサイズは  $30 \mu\text{m}$  である. 励起波長は  $1000 \text{ nm}$  で, パルスエネルギーは約  $1.5 \mu\text{J}$  であった. AO 補正がない場合, 血管表面 (光照射側) 付近で 2 光子 PA 信号が強く検出された後, 深部になるにつれ信号は低下した. 一方, AO 補正がある場合, 3.3.3 節で示したように光照射側表面から反対側の界面までの試料内における 2 光子 PA 強度が深部側と一定となるように AO 素子への印加電位差を制御して画像化すると, 明瞭な断面像を取得することができた. 特に, 図 3.9(b) および図 3.9(c)中の矢印において, 血管深部側の界面は, AO 補正がある場合の方がより深部形状が可視化された. PA 信号強度も約 2 倍に増強した. これらの結果より, 透過型液晶 AO 素子の導入が 2 光子 PA 信号の増強と深部形状の可視化に有効であることを明らかにした

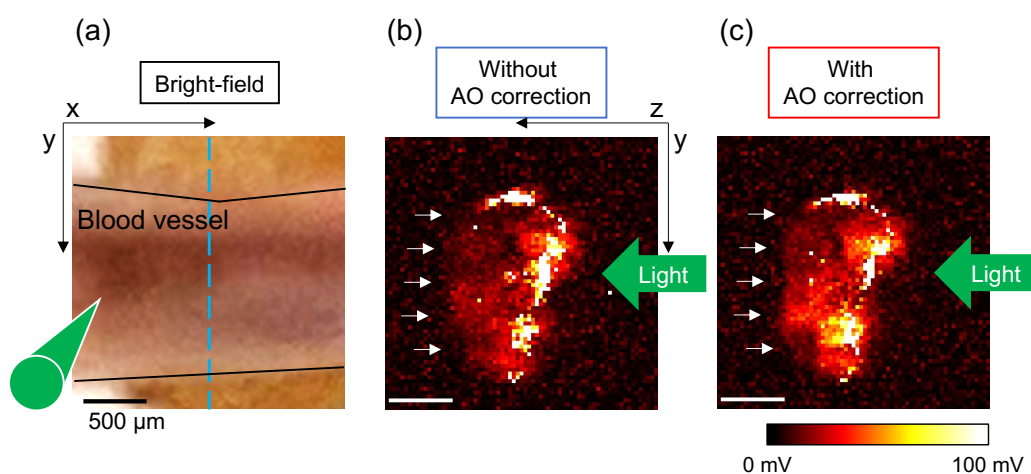


図 3.9. (a) 血管側面の白色像. (b) AO 補正なし, および(c) AO 補正ありの場合の 2 光子 PA 血管断面像.

### 3.4. 結論

透過型液晶 AO 素子を用いた 2 光子光音響顕微鏡システムの構築を行った。ガラスセル内を満たした溶液の 2 光子 PA 断面イメージングにおいて、収差や散乱により減衰した 2 光子 PA 信号が AO 補正によって増強することを実証した。ガラスセル（ガラス幅 1.0 mm）中を測定した場合、深部において約 2.4 倍の PA 信号の増強を確認した。散乱体（Intralipid）を介してガラスセル中を測定した場合、ヒト皮膚における約 360  $\mu\text{m}$  の深さまで AO 補正による 2 光子 PA 信号の増強可能性を示した。シリコーンブロック内の中空およびラット下大静脈の断面像を測定した場合、AO 印加電位差制御による信号増強および形状把握が可能であることを示した。

## 第4章 総括

本研究では、波面補正のための透過型液晶補償光学（AO）素子を組み込んだ 1 光子および 2 光子励起における光音響顕微鏡（PAM）を開発した。透過型液晶 AO 素子は、PAM システムの光学系を大幅に改造することなく容易に組み込むことが可能である。USAF 1951 テストターゲット、シリコン内に設置された重ねた金線、*in vivo* マウス耳の血管に対して測定を行った結果、今回使用した AO 素子は高 NA 対物レンズの使用により発生する球面収差のみに限定したものであったが、深部での空間分解能、深さ識別力、信号強度向上が可能であることを明らかにした。2 光子励起 PAM（TP-PAM）に対しても、PA 強度増強および深部側の試料形状把握に成功し、TP-PAM における透過型液晶 AO 素子の有効性を示した。以下、第 2 章および第 3 章の研究成果を要約する。

第 2 章では、構築した反射検出型の PAM システムへの透過型液晶 AO 素子の導入を示した。球面収差を補正する透過型液晶 AO 素子によるビーム径の縮小を、PA 信号を用いて実験的に確認した。反射検出型 AO-PAM による USAF 1951 テストターゲットおよび重ねた金線の PA 画像評価から、透過型液晶 AO 素子による横方向分解能および深さ識別力が向上した。さらに、*in vivo* マウス耳の血管走行 PA イメージングにおいても、透過型液晶 AO 素子による補正がある場合で PA 画像の改善に成功した。

第 3 章では、透過型液晶 AO 素子の TP-PAM への有効性を検証した。1 光子吸収および 2 光子吸収を有する試料の PA スペクトルおよび光パルスエネルギー依存性を測定し、2 光子 PA 波が 1 光子励起による PA 信号ではないことを明らかにした。2 光子吸収分子のみ、および 1 光子吸収分子と 2 光子吸収分子を溶かした混合溶液を作成し、ガラスセルおよびシリコン内の中空にそれぞれ満たした場合の 2 光子 PA 断面像の AO 補正がない場合とある場合の比較を行った。2 光子 PA 造影剤を注入したラット下大静脈においても、2 光子 PA 断面像の AO 補正がない場合とある場合の比較を行った。結果として、AO 補正により PA 強度増強および深部側の試料形状把握に成功し、TP-PAM における透過型液晶 AO 素子の有効性を示した。

今後の展望として、本研究では、PA 画像の PA 強度が最大となるように AO 素子に印加する電位差を決定したが、本来は深さごとに最適な印加電位差があり、その作業は自動化されていない。球面収差補正前後の焦点位置の変化（フォーカスシフト）に関してもマニュアルで位置調整を行っている。例えば、電圧を変えるごとに画像を取得し、



屈折率, 観察深さ, AO印加電位差およびフォーカスシフトの関係を探っていくことで, PA強度が最大となる工程を自動化し, 透過型液晶 AO素子を組み込んだ PAMシステムの操作性を改善していきたい. TP-PAMに関して, AO素子の印加電位差が PA強度を最大化させる場合の 2光子 PA断面像は, ターゲットの形状によって光照射側表面と深部側で PA強度増強効果が異なっていた. 3.3.3 節および 3.3.4 節で示したように, 球面収差のみに限定しても, ターゲットから発生する PA強度が一定になるような電位差を AO素子に印加することで形状把握が可能になる. 例えば, 光照射側表面から深部側までを光軸沿ってスキャンし, AO印加電位差ごとに得られた 2光子 PA強度プロファイルから断面イメージングに最適な電位差を決定するまでの工程を自動化することで, 効率的に 2光子 PA断面像を取得および明瞭性を改善していきたい. また, 非対称な波面補正技術の組み合わせにより, 複雑な試料中の観察領域に因らずに 1光子および 2光子 PA画像の高空間分解能化が実現できる可能性がある. 従って, 生体深部精緻観察における新たな知見や, 特定の臓器や部位の構造に関して, より正確な情報を取得できることに期待したい.

## 謝辞

本研究は、佐賀大学大学院 工学系研究科 システム創成科学専攻 先端融合工学コース バイオイメーjing・センjing研究室において行ったものであり、本研究を遂行するにあたり多くの方々にご教授いただきました。ここに記して深く感謝の意を表します。

本論文を執筆するにあたり、指導教員である山岡禎久准教授には大変お世話になりました。研究の進め方だけでなく論文の書き方など、至極丁寧なご指導およびご協力を賜りました。心より感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、ゼミ等で多くのご指導、ご助言を賜りました高橋英嗣教授、木本晃准教授に心より感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、様々なご配慮、ご助言を賜りました日本女子大学の橋本信幸氏、シチズン時計株式会社の栗原誠氏、田辺綾乃氏に心より感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、試料を供与していただきました京都府立医科大学大学院 医学研究科 細胞分子機能病理学の原田義規准教授に心より感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、光音響造影剤を供与していただきました九州大学大学院工学府 物質創造工学専攻 応用精密化学講座 有機機能分子化学研究室の古田弘幸教授、石田真敏助教に心より感謝いたします。

本研究は、科学研究費補助金基盤研究 (B) (15H03036, 19K12787)、および、花王メラニン研究会補助金のサポートを受けて行われた研究成果です。ここに感謝いたします。

本研究のために尊い命をいただきましたラットやマウスたちに深く感謝の意を表します。

平素より様々なご配慮とご協力を賜りましたバイオイメーjing・センjing研究室の皆様方に厚く御礼申し上げます。

最後に、バイオイメーjing・センjing研究室の皆様の、今後の多岐にわたるご活躍をお祈りし、謝辞とさせていただきます。

# 研究業績

## 1. 査読付学術論文

### 1.1. 主著

- [1]. Yusuke Notsuka, Makoto Kurihara, Nobuyuki Hashimoto, Yoshinori Harada, Eiji Takahashi, Yoshihisa Yamaoka, “Improvement of spatial resolution in photoacoustic microscopy using transmissive adaptive optics with a low-frequency ultrasound transducer,” Opt. Express **30**(2), 2933–2948 (13 January 2022).

## 1.2. 共著

- [1]. Keito Shimomura, Hiroto Kai, Yuma Nakamura, Yongseok Hong, Shigeki Mori, Koji Miki, Kouichi Ohe, **Yusuke Notsuka**, Yoshihisa Yamaoka, Masatoshi Ishida, Dongho Kim, and Hiroyuki Furuta, “Bis-Metal Complexes of Doubly N-Confused Dioxohexaphyrins as Potential Near-Infrared-II Photoacoustic Dyes,” *J. Am. Chem. Soc.* **142**(9), 4429–4437 (9 February 2020).
- [2]. Yoshihisa Yamaoka, Kaito Funatsu, Yuta Yoshidumi, Akari Kubo, **Yusuke Notsuka**, and Eiji Takahashi, “A compact scanning probe for photoacoustic microscopy using ultrasonic actuator stage,” *Jpn. J. Appl. Phys.* **59**, 030906 (17 February 2020).
- [3]. Wang, Yue; Kai, Hiroto; Ishida, Masatoshi; Gokulnath, Sabapathi; Mori, Shigeki; Murayama, Tomotaka; Muranaka, Atsuya; Uchiyama, Masanobu; Yasutake, Yuhsuke; Fukatsu, Susumu; **Notsuka, Yusuke**; Yamaoka, “Synthesis of a Black Dye with Absorption Capabilities Across the Visible-to-Near-Infrared Region: A MO-Mixing Approach via Heterometal Coordination of Expanded Porphyrinoid,” *J. Am. Chem. Soc.* **142**(14), 6807–6813 (22 March 2020).
- [4]. Yue Wang, Koki Ogasahara, Daisuke Tomihama, Radomir Mysliborski, Masatoshi Ishida, Yongseok Hong, **Yusuke Notsuka**, Yoshihisa Yamaoka, Tomotaka Murayama, Atsuya Muranaka, Masanobu Uchiyama, Shigeki Mori, Yuhsuke Yasutake, Susumu Fukatsu, Kim Dongho, Hiroyuki Furuta, “Near-Infrared-III Absorbing and Emitting Dyes: Energy Gap Engineering of Expanded Porphyrinoids via Metallation,” *Angewandte Chemie* **59**(37), 16161–16166 (29 May 2020).
- [5]. Kazuhisa Yamasumi, **Yusuke Notsuka**, Yoshihisa Yamaoka, Shigeki Mori, Masatoshi Ishida, Hiroyuki Furuta, “Synthesis of Helically  $\pi$ -Extended N-Confused Porphyrin Dimer via meso-Bipyrrole-Bridge with Near-Infrared-II Absorption Capability,” *Chemistry - A European Journal* **26**(60), 13590–13594 (9 June 2020).

## 2. 査読付国際会議プロシーディング

- [1]. Yusuke Notsuka, Makoto Kurihara, Nobuyuki Hashimoto, Eiji Takahashi, Yoshihisa Yamaoka, “*In vivo* visualization of blood vessels in mouse ear by photoacoustic microscopy with transmissive liquid-crystal adaptive optics,” Proc. SPIE **11240**, 1124039 (17 February 2020).

### 3. 一般講演

#### 3.1. 国際会議

##### 3.1.1. 筆頭

- [1]. Yusuke Notsuka, Makoto Kurihara, Nobuyuki Hashimoto, Eiji Takahashi, Yoshihisa Yamaoka, “*In vivo* visualization of blood vessels in mouse ear by photoacoustic microscopy with transmissive liquid-crystal adaptive optics,” SPIE. PHOTONICS WEST 2020 (San Francisco, California, United States), 2nd February 2020.

##### 3.1.2. 共著

- [1]. Yoshihisa Yamaoka, Koki Matsumoto, Yusuke Notsuka, Eiji Takahashi, “Photoacoustic microscopy by spatial overlap modulation using femtosecond optical pulse train,” SPIE. PHOTONICS WEST 2020 (San Francisco, California, United States), 4 February 2020.
- [2]. Koki TSUCHIYA, Hideo TAKAKURA, Yusuke NOTSUKA, Yoshihisa YAMAOKA, Mikako OGAWA, “Photoacoustic Imaging of Cancer Cells using pH-Activatable Imaging Agents,” 31st International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA2021) (Kyoto, Japan), 31 August 2021.

## 3.2. 国内会議

### 3.2.1. 筆頭

- [1]. 能塚雄介, 栗原誠, 橋本信幸, 高橋英嗣, 山岡禎久, 「透過型液晶補償光学素子を用いた光音響顕微鏡による *in vivo* マウス耳内部血管走行観察」, 第 80 回応用物理学会秋季学術講演会 (北海道), 2019 年 09 月 20 日.
- [2]. 能塚雄介, 栗原誠, 橋本信幸, 高橋英嗣, 山岡禎久, 「透過型液晶補償光学素子を用いた *in vivo* 高 NA 光音響顕微鏡の空間分解能向上」, 一般社団法人レーザー学会学術講演会第 41 回年次大会 (オンライン), 2021 年 01 月 20 日.
- [3]. 能塚雄介, 栗原誠, 橋本信幸, 山岡禎久, 「透過型液晶補償光学素子を用いた 2 光子光音響イメージング」, 第 82 回応用物理学会秋季学術講演会 (オンライン), 2021 年 09 月 13 日.
- [4]. 能塚雄介, 栗原誠, 橋本信幸, 金子昂司, 山岡禎久, 「透過型液晶補償光学素子を用いた 2 光子光音響顕微鏡の高感度化」, レーザー顕微鏡研究会第 46 回講演会 (オンライン), 2021 年 11 月 04–05 日.
- [5]. 能塚雄介, 栗原誠, 橋本信幸, 石田真敏, 山岡禎久, 「透過型液晶補償光学素子を用いた 2 光子光音響顕微鏡による血管断面像観察」, 第 16 回 (第 2 期第 5 回) レーザー学会光音響イメージング技術専門委員会 (オンライン), 2022 年 03 月 18 日.

### 3.2.2. 共著

- [1]. 山岡禎久, 船津海斗, 能塚雄介, 高橋英嗣, 「超音波アクチュエータステージを用いた光音響顕微鏡の小型化」, 第 58 回日本生体医工学会大会, 2019 年 06 月 08 日.
- [2]. 東祐希, 能塚雄介, 高橋英嗣, 山岡禎久, 「血管走行可視化のための光音響 LED 励起光源の最適化」, 2019 年度第 4 回光超音波画像研究会, 2020 年 02 月 28 日.
- [3]. 井上翔太, 能塚雄介, 高橋英嗣, 山岡禎久, 「光音響イメージングにおける信号対雑音比向上のための波形相互相関法」, 電気学会バイオメディカル・フォトニクス先端技術の応用に向けた協同研究委員会 第 1 回研究会「バイオメディカルフォトニクス応用」, 2020 年 02 月 28 日.
- [4]. 吉積雄太, 能塚雄介, 高橋英嗣, 山岡禎久, 「超音波アクチュエータステージを用いた光音響顕微鏡システムの構築および性能評価」, 光・量子デバイス研究会「バイオメディカルフォトニクス応用」, 2020 年 09 月 28 日.

- [5]. 井上翔太, 能塚雄介, 高橋英嗣, 山岡禎久, 「血管走行可視化を目指した波形相互相関光音響イメージング」, 一般社団法人レーザー学会学術講演会第41回年次大会, 2021年01月20日.
- [6]. 濱野純, 能塚雄介, 高橋英嗣, 山岡禎久, 「円偏光ビームを用いた光音響イメージング装置の開発」, 第68回応用物理学会春季学術講演会, 2021年03月19日.
- [7]. 濱野純, 能塚雄介, 山岡禎久, 「生体深部可視化へ向けた円二色性光音響スペクトル評価」, 電気学会バイオメディカル研究会, 2021年09月27日.
- [8]. 土屋光輝, 高倉栄男, 能塚雄介, 山岡禎久, 小川美香子, 「pH 応答性光音響イメージング剤のがんイメージングへの応用」, 第80回日本癌学会学術総会, 2021年09月30日.



## 参考文献

1. P. Beard, “Biomedical photoacoustic imaging,” *Interface Focus*. **1**(4), 602–631 (2011).
2. L. V. Wang, and S. Hu, “Photoacoustic tomography: In vivo imaging from organelles to organs,” *Science* **335**(6050), 1458–1462 (2012).
3. J. Xia, J. Yao, and L. V. Wang, “Photoacoustic tomography: Principles and advances,” *Prog. Electromagn. Res.* **147**, 1–22 (2014).
4. X. Wang, Y. Pang, G. Ku, X. Xie, G. Stoica, and L. V. Wang, “Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional in vivo imaging of the brain,” *Nat. Biotechnol.* **21**(7), 803–806 (2003).
5. G. Ku, X. Wang, X. Xie, G. Stoica, and L. V. Wang, “Imaging of tumor angiogenesis in rat brains in vivo by photoacoustic tomography,” *Appl. Opt.* **44**(5), 770–775 (2005).
6. 椎名 毅, “【光音響（光超音波）画像の最前線】光と超音波の融合による医用イメージング技術の新たな展開,” *日本レーザー医学会誌* **33**(4), 367–373 (2013).
7. H. F. Zhang, K. Maslov, G. Stoica, and L. V. Wang, “Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive in vivo imaging,” *Nat. Biotechnol.* **24**(7), 848–851 (2006).
8. J. T. Oh, M. L. Li, H. F. Zhang, K. Maslov, G. Stoica, and L. V. Wang, “Three-dimensional imaging of skin melanoma in vivo by dual-wavelength photoacoustic microscopy,” *J. Biomed. Opt.* **11**(3), 034032 (2006).
9. S. Hu, K. Maslov, V. Tsytarev, and L. V. Wang, “Functional transcranial brain imaging by optical-resolution photoacoustic microscopy,” *J. Biomed. Opt.* **14**(4), 040503 (2009).
10. S. Hu, K. Maslov, and L. V. Wang, “In vivo functional chronic imaging of a small animal model using optical-resolution photoacoustic microscopy,” *Med. Phys.* **36**(6Part1), 2320–2323 (2009).
11. J. Yao, and L. V. Wang, “Sensitivity of photoacoustic microscopy,” *Photoacoustics* **2**(2), 87–101 (2014).
12. M. W. Schellenberg, and H. K. Hunt, “Hand-held optoacoustic imaging: A review,” *Photoacoustics* **11**, 14–27 (2018).
13. A. B. E. Attia, G. Balasundaram, M. Moothanchery, U. S. Dinish, R. Bi, V. Ntziachristos, and M. Olivo, “A review of clinical photoacoustic imaging: Current and future trends,” *Photoacoustics* **16**, 100144 (2019).
14. A. Danielli, K. Maslov, A. Garcia-Urbe, A. M. Winkler, C. Li, L. Wang, Y. Chen, G. W. Dorn, and L. V. Wang, “Label-free photoacoustic nanoscopy,” *J. Biomed. Opt.* **19**(8), 086006 (2014).
15. C. Zhang, K. Maslov, and L. V. Wang, “Subwavelength-resolution label-free photoacoustic microscopy of optical absorption in vivo,” *Opt. Lett.* **35**(19), 3195–3197 (2010).

16. S. Jeon, H. B. Song, J. Kim, B. J. Lee, R. Managuli, J. H. Kim, and C. Kim, "In vivo photoacoustic imaging of anterior ocular vasculature: A random sample consensus approach," *Sci. Rep.* **7**(1), 4318 (2017).
17. S. Jeon, J. Kim, D. Lee, J. W. Baik, and C. Kim, "Review on practical photoacoustic microscopy," *Photoacoustics* **15**, 100141 (2019).
18. 山岡 禎久, 高松 哲郎, "【「光生体イメージングの進歩と医療」】医療応用へ向けた2光子励起光音響イメージング," *京都府立医科大学雑誌* **122**(4), 219–228 (2013).
19. E. M. Strohm, E. S. Berndl, and M. C. Kolios, "High frequency label-free photoacoustic microscopy of single cells," *Photoacoustics* **1**(3–4), 49–53 (2013).
20. M. Vallet, F. Varray, M. A. Kalkhoran, D. Vray, and J. Boutet, "Enhancement of photoacoustic imaging quality by using CMUT technology: Experimental study," in *Proceeding of IEEE International Ultrasonics Symposium (IEEE, 2014)*, pp. 1296–1299.
21. Y. Yamaoka, Y. Harada, M. Sakakura, T. Minamikawa, S. Nishino, S. Maehara, S. Hamano, H. Tanaka, and T. Takamatsu, "Photoacoustic microscopy using ultrashort pulses with two different pulse durations," *Opt. Express* **22**(14), 17063–17072 (2014).
22. Y. Yoshihisa, H. Yoshinori, N. Shigeru, M. Seiji, H. Shujiro, and T. Tetsuro, "Improvement of signal detection selectivity and efficiency in two-photon absorption-induced photoacoustic microscopy," *Proc. SPIE* **8943**, 89433C (2014).
23. W. Song, W. Zheng, R. Liu, R. Lin, H. Huang, X. Gong, S. Yang, R. Zhang, and L. Song, "Reflection-mode in vivo photoacoustic microscopy with subwavelength lateral resolution," *Biomed. Opt. Express* **5**(12), 4235–4241 (2014).
24. C. Liu, J. Liao, L. Chen, J. Chen, R. Ding, X. Gong, C. Cui, Z. Pang, W. Zheng, and L. Song, "The integrated high-resolution reflection-mode photoacoustic and fluorescence confocal microscopy," *Photoacoustics* **14**, 12–18 (2019).
25. J. M. Girkin, S. Poland, and A. J. Wright, "Adaptive optics for deeper imaging of biological samples," *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**(1), 106–110 (2009).
26. N. Matsumoto, T. Inoue, A. Matsumoto, and S. Okazaki, "Correction of depth-induced spherical aberration for deep observation using two-photon excitation fluorescence microscopy with spatial light modulator," *Biomed. Opt. Express* **6**(7), 2575–2587 (2015).
27. C. J. R. Sheppard, M. Gu, K. Brain, and H. Zhou, "Influence of spherical aberration on axial imaging of confocal reflection microscopy," *Appl. Opt.* **33**(4), 616–624 (1994).
28. D. S. Wan, M. Rajadhyaksha, and R. H. Webb, "Analysis of spherical aberration of a water immersion objective: Application to specimens with refractive indices 1.33–1.40," *J. Microsc.* **197**(Pt3), 274–284 (2000).
29. M. J. Booth, M. A. Neil, R. Juskaitis, and T. Wilson, "Adaptive aberration correction in a confocal microscope," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**(9), 5788–5792 (2002).

30. D. R. Williams, "Imaging single cells in the living retina," *Vision Res.* **51**(13), 1379–1396 (2011).
31. J. Tang, R. N. Germain, and M. Cui, "Superpenetration optical microscopy by iterative multiphoton adaptive compensation technique," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**(22), 8434–8439 (2012).
32. D. Scoles, Y. N. Sulai, C. S. Langlo, G. A. Fishman, C. A. Curcio, J. Carroll, and A. Dubra, "In vivo imaging of human cone photoreceptor inner segments," *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **55**(7), 4244–4251 (2014).
33. K. Wang, W. Sun, C. T. Richie, B. K. Harvey, E. Betzig, and N. Ji, "Direct wavefront sensing for high-resolution in vivo imaging in scattering tissue," *Nat. Commun.* **6**, 7276 (2015).
34. 白井 智宏, "液晶空間光変調素子を利用した補償光学技術," *光学 = Japanese journal of optics : publication of the Optical Society of Japan* **36**(3), 136–142 (2007).
35. K. Otomo, T. Hibi, Y. Kozawa, M. Kurihara, N. Hashimoto, H. Yokoyama, S. Sato, and T. Nemoto, "Two-photon excitation STED microscopy by utilizing transmissive liquid crystal devices," *Opt. Express* **22**(23), 28215–28221 (2014).
36. M. Reddikumar, A. Tanabe, N. Hashimoto, and B. Cense, "Optical coherence tomography with a 2.8-mm beam diameter and sensorless defocus and astigmatism correction," *J. Biomed. Opt.* **22**(2), 26005 (2017).
37. A. Tanabe, T. Hibi, K. Matsumoto, M. Yokoyama, M. Kurihara, S. Ipponjima, N. Hashimoto, and T. Nemoto, "Transmissive liquid crystal device correcting the spherical aberrations in laser scanning microscopy," *Proc. SPIE* **9335**, 933502 (2015).
38. A. Tanabe, T. Hibi, S. Ipponjima, K. Matsumoto, M. Yokoyama, M. Kurihara, N. Hashimoto, and T. Nemoto, "Correcting spherical aberrations in a biospecimen using a transmissive liquid crystal device in two-photon excitation laser scanning microscopy," *J. Biomed. Opt.* **20**(10), 101204 (2015).
39. A. Tanabe, T. Hibi, S. Ipponjima, K. Matsumoto, M. Yokoyama, M. Kurihara, N. Hashimoto, and T. Nemoto, "Transmissive liquid-crystal device for correcting primary coma aberration and astigmatism in biospecimen in two-photon excitation laser scanning microscopy," *J. Biomed. Opt.* **21**(12), 121503 (2016).
40. M. Jiang, X. Zhang, C. A. Puliafito, H. F. Zhang, and S. Jiao, "Adaptive optics photoacoustic microscopy," *Opt. Express* **18**(21), 21770–21776 (2010).
41. H. Nobuyuki, "Electro holography and active optics," in *Optical Applications of Liquid Crystals*, L. Vicari, ed. (CRC Press, 2003), pp. 150–200.
42. S. Hu, K. Maslov, and L. V. Wang, "Second-generation optical-resolution photoacoustic microscopy with improved sensitivity and speed," *Opt. Lett.* **36**(7), 1134–1136 (2011).
43. M. Moothanchery, A. Sharma, and M. Pramanik, "Switchable acoustic and optical resolution photoacoustic microscopy for in vivo small-animal blood vasculature imaging," *J. Vis. Exp.* (124), 55810 (2017).

44. M. Baranski, S. Perrin, N. Passilly, L. Froehly, J. Albero, S. Bargiel, and C. Gorecki, "A simple method for quality evaluation of micro-optical components based on 3D IPSF measurement," *Opt. Express* **22**(11), 13202–13212 (2014).
45. J. Yao, and L. V. Wang, "Photoacoustic microscopy," *Laser Photonics Rev.* **7**(5), 758-778 (2013).
46. A. H. Firester, M. E. Heller, and P. Sheng, "Knife-edge scanning measurements of subwavelength focused light beams," *Appl. Opt.* **16**(7), 1971–1974 (1977).
47. W. Laure, L. Pierre-Francois, M. Didier, and R. Herve, "Fluorescence correlation spectroscopy to determine diffusion laws: Application to live cell membranes," *Proc. SPIE* **5462**, 92–102 (2004).
48. 杉谷 嘉則, "光音響分光法," *光学* **14**(2), 108–116 (1985).
49. Luxottica Exciton, "IRA 980BT: Infrared Absorber,"  
<https://exciton.luxottica.com/pub/media/productattach/Datasheet/22143.pdf>.
50. C. V. Bindhu, S. Harilal, G. K. Varier, R. Issac, V. P. N. Nampoore, and C. P. G. Vallabhan, "Measurement of the absolute fluorescence quantum yield of rhodamine B solution using a dual-beam thermal lens technique," *J. Phy. D: Appl. Phys.* **29**(4), 1074–1079 (1996).
51. T. Troy, and S. Thennadil, "Optical properties of human skin in the near infrared wavelength range of 1000 to 2200 nm," *J. Biomed. Opt.* **6**(2), 167–176 (2001).