

皮膚外傷診断のための  
光音響イメージング法に関する研究  
(Photoacoustic imaging for diagnosis  
of skin trauma)

平成 27 年度

東京農工大学大学院 生物システム応用科学府

生物システム応用科学専攻

伊田 泰一郎



# 目次

|   |    |
|---|----|
| 第1章 序論.....                                 | 1  |
| 1.1 本論文の背景と目的.....                          | 2  |
| 1.2 本論文の構成と内容.....                          | 4  |
| 第2章 実時間光音響イメージング・システムの開発.....               | 5  |
| 2.1 光音響法の歴史.....                            | 6  |
| 2.2 光音響法の原理.....                            | 6  |
| 2.3 光の生体への安全性.....                          | 7  |
| 2.4 光のパルス幅と光音響波の関係.....                     | 8  |
| 2.4.1 パルス LD ユニットによる実験.....                 | 8  |
| 2.4.2 実験結果と考察.....                          | 9  |
| 2.5 皮膚診断用光音響イメージング・システム用ファントム(模擬生体)の開発..... | 11 |
| 2.5.1 ファントムの開発.....                         | 11 |
| 2.5.2 ファントムの評価結果と考察.....                    | 12 |
| 2.6 実時間光音響イメージング・システムの開発.....               | 14 |
| 2.6.1 リニアアレイセンサーの開発.....                    | 14 |
| 2.6.2 実時間断層画像.....                          | 16 |
| 2.6.3 システムの構成.....                          | 17 |
| 2.6.4 ファントムによるシステムの評価結果および考察.....           | 19 |
| 2.7 光音響信号の音圧測定.....                         | 21 |
| 2.7.1 ファントムを用いた光音響信号の音圧測定.....              | 21 |
| 2.7.2 実験結果と考察.....                          | 22 |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 2.8        | まとめ                                     | 25        |
| <b>第3章</b> | <b>超音響イメージング法による熱傷深度診断</b>              | <b>27</b> |
| 3.1        | はじめに                                    | 28        |
| 3.2        | 実験方法                                    | 29        |
| 3.2.1      | ラット熱傷モデルによる測定                           | 29        |
| 3.2.2      | 熱傷治癒過程の測定                               | 30        |
| 3.3        | 測定結果                                    | 30        |
| 3.3.2      | 熱傷深度の測定結果                               | 30        |
| 3.3.3      | 熱傷治癒過程の測定結果                             | 34        |
| 3.4        | まとめ                                     | 36        |
| <b>第4章</b> | <b>熱傷深度診断におけるレーザードップラー血流イメージング法との比較</b> | <b>37</b> |
| 4.1        | はじめに                                    | 38        |
| 4.2        | レーザードップラー血流イメージング・システム                  | 39        |
| 4.3        | ラット熱傷モデルおよび解析方法                         | 39        |
| 4.4        | 実験結果                                    | 39        |
| 4.5        | 考察                                      | 44        |
| 4.6        | まとめ                                     | 45        |
| <b>第5章</b> | <b>移植皮膚生着評価への応用</b>                     | <b>47</b> |
| 5.1        | はじめに                                    | 48        |
| 5.2        | 実験方法                                    | 49        |
| 5.3        | 実験結果                                    | 49        |

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| 5.4 考察 .....              | 53        |
| 5.4 まとめ .....             | 54        |
| <b>第6章 結論 .....</b>       | <b>55</b> |
| 6.1 はじめに .....            | 56        |
| 6.2 総括 .....              | 56        |
| 6.3 今後の展望 .....           | 59        |
| <b>本論文に関連する研究業績 .....</b> | <b>64</b> |
| <b>謝辞 .....</b>           | <b>68</b> |
| <b>参考文献 .....</b>         | <b>70</b> |



# 第 1 章

## 序論

## 1.1 本論文の背景と目的

生体内の臓器の形態や機能を非侵襲に評価することは、様々な疾患の診断において重要である。X線 CT (Computed Tomography), MRI(Magnetic Resonance Imaging), 超音波イメージングなど様々な技術が普及しているが、いずれ手法も生体の深い部分を観察できるものの、皮膚の微小な血管を撮像するには分解能が十分ではない。また、X線 CT においては放射線被曝というリスクがあり、その他の撮像法においても高コントラストな画像を取得するためには造影剤が必要である。それに対して光を用いたイメージングでは、可視光や近赤外光の吸光特性を利用することで高分解能ならびに高コントラストの画像を取得できる。可視光を用いた生体イメージングでは、生体組織の散乱の影響が大きいため、深度数 100  $\mu\text{m}$  の範囲に存在する吸収物質の撮像が可能である。一方、近赤外分光 (Near-Infrared Spectroscopy, NIRS)では表面から数 cm の深さの情報を撮像することが可能である。光コヒーレンス断層撮像法(Optical Coherence Tomography, OCT)では、多重散乱光の影響を抑制し、準単散乱光捉えることで非常に優れた深さ分解能の断層画像が得られるものの、生体の散乱の影響を受けるため皮膚の撮像では深さ方向 1 mm 程度の情報しか得られない。[1]つまり生体の数 mm 程度の深さに対して血管を正確な深さ情報とともに非侵襲にイメージングする技術は存在しない。[2] [3] [4]

皮膚は、上部から表皮と真皮からなる層構造であり、その下に皮下組織が存在する。[5] 皮膚の構造を図 1 に示す。表皮は角層、顆粒層、有棘層、および基底層からなり、皮膚の最外層であることから外部の異物からの防御機能、体内水分の保湿機能などのバリア機能を有する。その厚みは 0.2 mm 程度である。また基底層では紫外線を防ぐためにメラニン合成する。真皮はコラーゲンが大部分を占め、内部には皮下組織の動脈と静脈からつながった末梢尾血管が分布している。皮下組織は皮下脂肪であり、その下部には筋膜、筋層が存在する。ヒトの場合、表皮、真皮を合わせた皮膚の厚みは部位によって異なり、まぶたの皮膚は 1 mm 以下であるのに対し、背中、臀部などが最も分厚く 3 mm 程度である。[6] [7] 皮膚内部の血行は皮膚の疾患と密接に関係しており、血管網を撮像することによって皮膚疾患の程度を診断することができる。しかし前述の通り、皮膚全層の数 mm 深さの血管網をイメージングできる方法が確立していないため、有効な診断方法が存在しない。

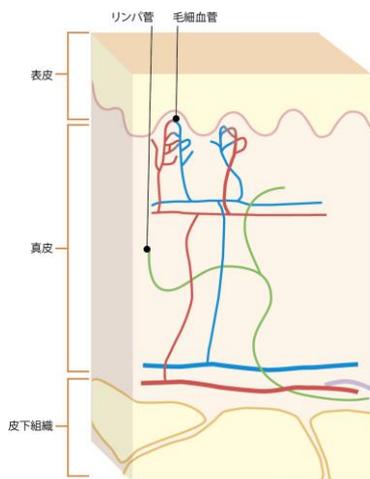


図 1-1. 皮膚の構造

生体浅部のイメージング技術として，光音響イメージング法の研究が近年盛んに行われている．光の吸収特性と超音波の伝搬特性を合わせ持つため，優れた深さ分解能， $\text{mm} \sim \text{cm}$  の測定深度が得られることが特徴である．光音響イメージングは様々な分野への応用が研究されており，乳癌の診断への応用，前立腺癌の診断，内視鏡への応用などが報告されている．[8] [9] [10] 体表臓器の皮膚の外傷診断への応用として，皮膚の血行障害を伴う熱傷の深度診断や皮膚内で血管再生が起こる移植皮膚の生着モニタリングなどの研究が行われてきた．[11] [12] [13] [14] しかし，実時間実時間イメージングではなく，測定深度が  $1.5 \text{ mm}$  程度に限られたため臨床応用には課題があった．本研究では，測定深度  $3 \text{ mm}$  以上の実時間で撮像が可能な皮膚診断用光音響イメージング・システムを開発し，その有効性を実証することを目的とする．皮膚の疾患として熱傷に着目し，その深度を診断する．熱傷疾患が進行すると損傷深度が深くなり，その程度に応じて I ～ III 度に分類される．特に III 度熱傷になると，真皮全層が損傷し自然治癒が見込めないため皮膚移植が必要となる．このように熱傷深度を正確に診断することは，治療方針に影響するため非常に重要である．しかしながら，従来のイメージング法では皮膚全層の血液分布を撮像することは不可能であるため有効な診断方法が確立できていない．本研究の手法では皮膚全層の観測が可能であるため，熱傷深度診断からの応用として熱傷の治癒過程のモニタリングも試行する．広範囲重度熱傷では多くの部位で皮膚移植が行われるが，移植部位の状態によりその生着状態は

異なる。移植皮膚が生着しない場合には再移植が必要となるため移植の生着過程をモニタリングすることは重要であるが、現状では肉眼的観でしか評価されていない。本研究の手法によって、移植皮膚の生着モニタリングの評価を行う。このように、本研究で開発した皮膚診断用超音響イメージング・システムの熱傷深度診断、熱傷治癒過程のモニタリング、ならびに移植皮膚の生着モニタリングにおける有効性を確認し、その皮膚外傷診断における実用性を示す。

## 1.2 本論文の構成と内容

本論文は本章を含む 6 章から構成されている。

第 2 章では超音響法に関する研究の歴史的背景とその原理を概説し、基礎的な実験の結果について説明する。第 3 章では開発した実時間超音響イメージング・システムの特徴を述べ、ファントム(疑似生体試料)を用いた実験によってシステムの性能を評価する。超音響イメージング法をラット熱傷モデルに適用して得られた結果と組織標本の比較によって、熱傷深度ならびに熱傷治癒効果の診断への可能性について検証する。第 4 章では、これまで熱傷深度診断において多くの研究実績のあるレーザードップラー血流イメージング・システム(Laser Doppler Imaging, LDI)との比較を行う。このことによって、超音響イメージングによる熱傷深度診断の有効性を確認する。6 種類の条件でラット熱傷モデルを作製し、組織標本から見積もった熱傷深度を比較基準として、超音響イメージングとレーザードップラー血流イメージングによって測定された深度を相互の比較し、本研究のシステムの熱傷深度診断への実効性を示す。第 5 章では、移植皮膚の生着過程の評価を行う。移植皮膚が生着する自家皮膚移植モデルと免疫反応により最終的に脱落する同種皮膚移植モデルのラットを用い、移植後の経時変化を超音響イメージング・システムによって測定する。皮膚移植部位について、生検時の移植部位の状態した皮膚の状態およびその組織標本の血管の再生状態と超音響イメージングによって撮像された画像を比較することによって、移植片内の超音響信号の強度と生着状態との関係を立証する。第 6 章では本研究の成果をまとめ、結論を述べる。さらに、超音響イメージング法の皮膚外傷診断への展望を述べる。

## 第2章

### 実時間光音響イメージング・システムの開発

## 2.1 光音響法の歴史

光音響効果は 1880 年 Alexander Graham Bell によって報告された。[15] 密閉された容器内の資料に太陽光線を断続的に照射すると、容器内部に音波が発生する現象である。その後光音響分光法として気体試料の分析などに応用されてきた。[16] 1990 年代半ばからパルスレーザー技術と、超音波技術の発展とパーソナルコンピュータ(Personal Computer,PC)の演算能力の大幅な向上により、生体イメージングへの応用が研究されるようになった。[17]

2000 年代に入ると光音響イメージング法は世界中で研究されるようになり、前述した乳がんの診断[8]、前立腺がんの診断のほか[9]、皮膚疾患の診断[18]、小動物の脳の機能計測[19]などの研究がなされている。世界各国で臨床研究は進められているものの、2015 年の時点で医療機器として承認されている装置は存在しない。

## 2.2 光音響法の原理

光音響効果は、生体組織にパルス光を照射したときに光のエネルギーを吸収した物質が断熱膨張することで熱弾性波が発生する現象である。

深さ  $z$  吸収係数  $\mu_a$  の吸収層が存在すると、照射フルエンス  $F_0$  の、パルス幅  $\tau_p$  のパルスレーザー光を照射した場合、発生する光音響波の圧力  $P$  は以下で表すことができる。[20] [21]

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

ここで、 $\Gamma$  はグリュナイゼン係数であり、光から熱弾性波への変換効率を表す。すなわち、光音響波の圧力は、光のエネルギー、対象物質の吸収係数に比例し、深さ方向に指数関数的に減少する。したがって、光音響波を効率良く発生させるためには、生体組織を伝搬する光の熱拡散が無視できる程度にパルス光の時間幅が短いことが必須であり、この条件は次式で表される。[22]

$$\tau_p \ll D/v_s \quad \dots \dots (2)$$

ここで  $\tau_p$  はレーザー光のパルス幅、 $v_s$  は生体内音速、 $D$  は光の侵達長  $1/\mu_a$  と吸収体の厚さのうち小さい方の値を表す。具体的には、生体軟組織の音速  $v_s$  は  $1540 \text{ m/s}$ 、 $\mu_a$  は  $235 \text{ cm}^{-1}$  程度であるから、血管の径  $60\sim 300 \mu\text{m}$  とすると、ナノ秒オーダーの光であれば光音響波を効率良く発生することができる。

### 2.3 光の生体への安全性

光音響波の強度は、照射光のフルエンスに比例する。光のフルエンスを大きくすることで、大きな振幅の光音響波を発生させることができる。臨床応用では、光エネルギーを照射したときに生体組織に障害が発生しないように、JIS C 6802 に最大許容露光量(MPE : Maximum Permissible Exposure)が規定されている。[23] MPE は、各種動物実験、や人体の事故例などから、各波長に対して、各部位における障害発生率が 50 %になる露光量の 1/10 を照射レーザー光強度として定義されている。表 2.1 に、波長 532 nm のレーザー光の皮膚への MPE を示す。本研究で開発したシステムでは、皮膚への開口は直径 3.5 mm の円形で定義されており、この開口に対する照射光エネルギー密度を計算するためには、MPE について以下の 3 条件を満足する必要がある。①パルス幅 20 ns の 1 パルスあたりの光エネルギーは  $200 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$  以下であること。開口直径 3.5 mm 以下の面積へのパルス光エネルギーの場合約 2 mJ 以下となる。②露光時間 10 秒以下の光エネルギーは  $1.1 \times 10^{4t^{0.25}} \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ 、③10 秒以上では  $2000 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$  が適用されること。本研究ではこれら 3 条件を満たすよう、皮膚への光照射強度が  $1400 \text{ W/m}^2$  となるように設計した。

表 2.1 波長 532 nm の皮膚への MPE

| 露光時間 t[s] \ 波長 λ [nm] | < 10 <sup>-9</sup>                   | 10 <sup>-9</sup> ~ 10 <sup>-7</sup> | 10 <sup>-7</sup> ~ 10                                 | 10 ~ 3x10 <sup>4</sup> |
|-----------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|---|------------------------|
| 400 - 700             | 2x10 <sup>11</sup> W·m <sup>-2</sup> | 200 J·m <sup>-2</sup>               | 1.1x10 <sup>4t<sup>0.25</sup></sup> W·m <sup>-2</sup> | 2000 W·m <sup>-2</sup> |

## 2.4 光のパルス幅と光音響波の関係

光音響波を効率良く発生させるには、パルス幅ナノ秒オーダーのパルスレーザー光源が必要であるが、具体的にどの程度までパルス幅を短くすべきか検討が必要である。本節では、レーザー光のパルス幅と光音響波の振幅の関係についての基礎的な知見について述べる。

### 2.4.1 パルス LD ユニットによる実験

一般的な固体レーザーではパルス幅が可変でないため、パルス幅を変化させることができるレーザーダイオード(Laser Diode, LD)ユニットを開発した。図 2.1 に、光源の外観写真を示す。開発した LD ユニットはパルスジェネレータ(33500B, Agilent)によって駆動され、そのパルス幅を変化させることによってパルス幅を変化させている。波長 638 nm, 出力 1W の LD 光源を。繰返し周波数 10 kHz, 駆動しパルス幅 20~500 ns に調整した。パルスジェネレータで設定したパルス幅に光のパルス幅が追従することを確認した。なお、光源はファイバー結合されており、LD の出力よりファイバー端でのパルスエネルギーは数 10~数 100 nJ と見積もられた。図 2.2 に、測定系のブロック図を示す。超音波センサーの材質は  $\text{Pb}(\text{Zr},\text{Ti})\text{O}_3$  であり、中心周波数 5 MHz と 10 MHz の 2 種類のセンサーを用いた。超音波センサーは圧電素子の種類、厚みなどによって中心周波数(共振周波数)が定義されており、本実験では 5 MHz と 10 MHz の 2 種類のセンサーで評価を行うことでシステムに用いるセンサーの周波数を評価した。測定対象としては、黒色ポリ塩化ビニル板を使用した。吸収率の高い黒色板を用いたのは、LD の光照射エネルギーが固体レーザーのそれよりもはるかに小さいため光音響信号が効率よく発生しないためである。LD の電流値一定の条件の下、パルスジェネレータによって光パルス幅を変化させることによって、発生した光音響信号の振幅をオシロスコープ(DSO9104B, Agilent)で測定した。

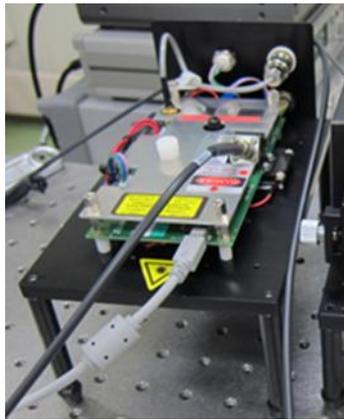


図 2-1 パルス LD ユニット外観図

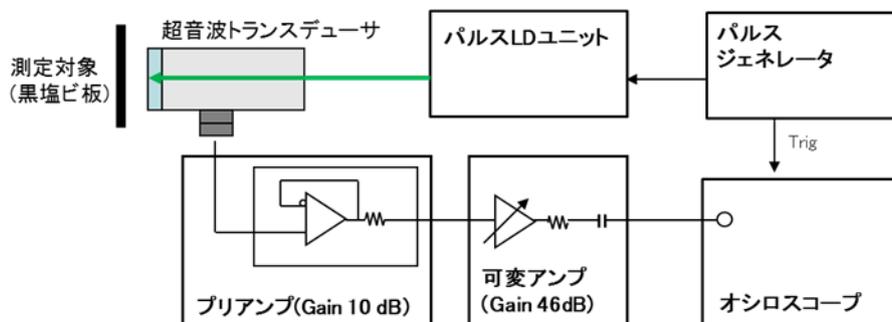


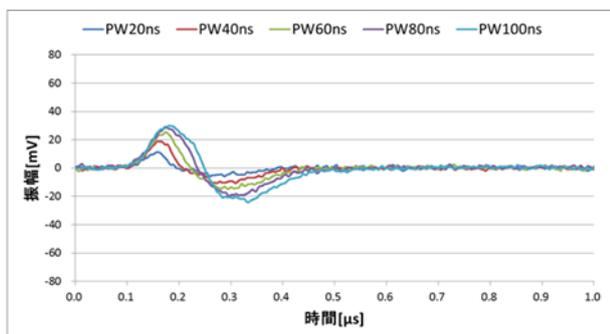
図 2-2. パルス LD ユニットを用いた測定系のブロック図

## 2.4.2 実験結果と考察

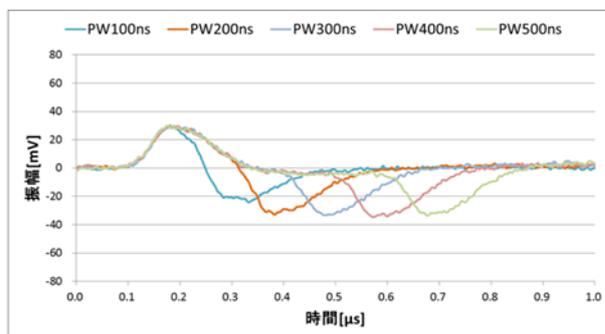
図 2.3 と図 2.4 には、それぞれ 10 MHz と、5 MHz センサーを使用したときの光音響信号波形を示す。ここで、パルス幅が 20~100 ns と 100~500 ns(b)に対する結果をそれぞれ (a)と(b)に示す。図 2-3 と図 2-4 より、パルス幅 20 ns から 100 ns までは振幅が増大するが、パルス幅 100 ns 以降は増加しない。信号パルス幅については、パルス幅が 60 ns より大きくなると信号パルス幅が長くなり周波数成分が減少する。したがって、パルス幅 100 ns を超えると光音響信号の発生効率が非常に低下することが分かる。

図 2-3 と図 2-4 の測定結果より、光源のパルス幅と光音響信号振幅との関係および、光源のパルス幅と光音響信号パルス幅との関係を、それぞれ図 2-5(a)と図 2-5(b)に示す。パルス幅 100 ns が増加すると照射光エネルギーが増加するため、光音響信号の振幅は線形に増加する。一方、光音響信号パルス幅は、パルス幅 200 ns 程度まではほぼ線形に増加して

おり，光音響信号の振幅の増加とともに，その周期も増加している．これは，光照射エネルギーの増加とともに，断熱膨張が大きくなるに従って膨張に要する時間が伸長することが光音響信号パルス幅に影響を及ぼしていると考えられる．さらに，パルス幅 100 ns より大きくなると光音響信号の振幅の増加は抑制され，パルス幅についても 200 ns より大きくなると信号パルス幅の変化は見られなくなる．これは，パルス幅が長くなり過ぎると，物質の断熱膨張および熱緩和の時間が重なるため，光音響信号が効率よく発生しないことが原因であると考えられる．本実験で用いた測定対象がポリ塩化ビニルであり生体とは条件が異なるものの，(2)式で示したとおりナノ秒レーザー光源を使用することによって光音響信号を効率的に発生させることができることを確認した．

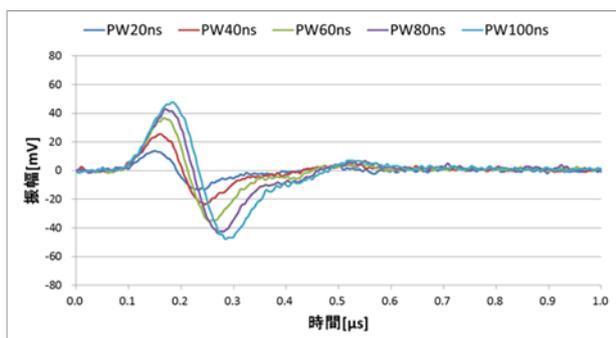


(a) パルス幅20～100 ns時の光音響信号

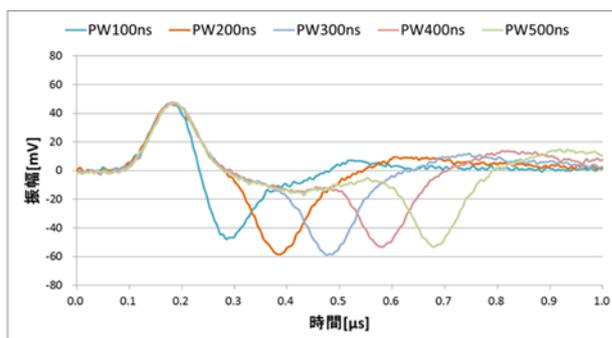


(b) パルス幅100～500 ns時の光音響信号

図 2-3. 10MHz センサーによって検出された光音響信号波形

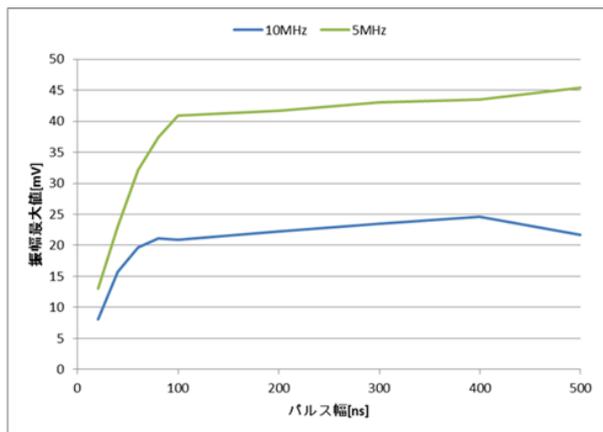


(a) パルス幅20～100 ns時の光音響信号

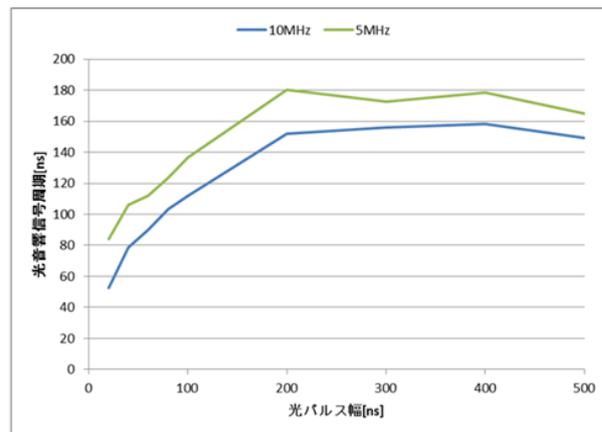


(b) パルス幅100～500 ns時の光音響信号

図 2-4. 5MHz センサーによって検出された光音響信号波形



(a) 光源パルス幅と光音響信号振幅の関係



(b) 光源パルス幅と光音響信号周期の関係

図 2-5. 光源パルス幅と光音響信号の振幅と、周期の関係

一般に、光音響イメージング・システムにおいては、センサーの中心周波数は深さ方向の分解能に影響を与える。これはセンサーの中心周波数により光音響信号パルス幅が決まり、その信号パルス幅によって深さ方向に隣接した測定対象から発生した光音響波を分離できるかどうかの限界が決まるからである。図 2-5 に示す実験結果から、光音響信号の振幅は 5 MHz の方が 10 MHz よりも大きい、信号パルス幅は 5 MHz の方が長くなる。本研究では、光音響イメージングの正確な深さ情報取得の可能性を利用して、皮膚外傷診断への応用について研究するため、深さ分解能が高い 10 MHz センサーを使用することとした。

## 2.5 皮膚診断用光音響イメージング・システム用ファントム(模擬生体)の開発

システムの評価において、ファントム(模擬生体)は重要となる。超音波診断装置用ファントムは市販されているが、[24] 光音響イメージング・システム用ファントムで市販されているものは存在しない。そこで本研究では皮膚の層構造を模擬した光音響イメージング・システム用のファントムの開発を行った。

### 2.5.1 ファントムの開発

光音響イメージング・システムに使用するためには、超音波の伝搬特性、および光の散乱、吸収特性を模擬することが重要である。また皮膚のような薄い組織内に層構造となった血管網を模擬しなくてはならない。本研究で開発したファントムには主材料にアクリルブロック共重合体を用いた。[25] この素材の特徴は厚みを最小で 0.3 mm のシート状に作製することができ、自己吸着性があるためシートを積層することが可能である。このアクリルブロック共重合体にひまし油を混入させ、超音波の伝搬特性を調整した。また光散乱体として酸化チタンを混入させた。アクリルブロック共重合体の表面にポリビニルアルコール (Polyvinyl Alcohol, PVA) の層を吸着させ、PVA にインクジェットプリンタ (Canon MG6130) で赤色のパターンを描画することで光吸収体を製作した。[26]

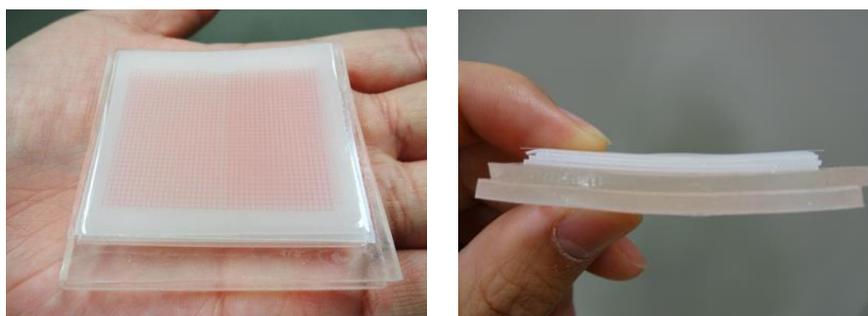


図 2-6. 光音響イメージング用ファントムの外観写真

### 2.5.2 ファントムの評価結果と考察

開発したファントムの超音波特性、光学特性の評価を行った。パルス透過法によりファントムの超音波速度、超音波減衰率を測定した。アクリルブロック共重合体にひまし油を混入したものと混入していないものおよびシリコンでの測定結果を図 2-7(a)に示す。ひまし油を混入したアクリルブロック共重合体の音速が 1527 m/s であり生体軟組織に近い値を実現したことに対し、ひまし油を混入していないものは 1581 m/s と高い値となった。このことからひまし油を混入して超音波速度を最適に調整できたことが分かる。一方、図 2-7(b)に示す超音波減衰率の測定結果では、ひまし油を混入したアクリルブロック共重合体は 13.7 dB/MHz/cm となっており生体軟組織の減衰率 0.6 dB/cm よりも大きな値となっ

ている. [27] 本研究において超音波減衰率を改善させることはできず, 今後の課題である. 超音波減衰率が大きいが厚みが薄いため高い減衰率が大きくは影響しないこと, システムでファントムを撮像できれば生体では十分使用可能なことから本研究ではこのファントムを用いて評価を行っている.

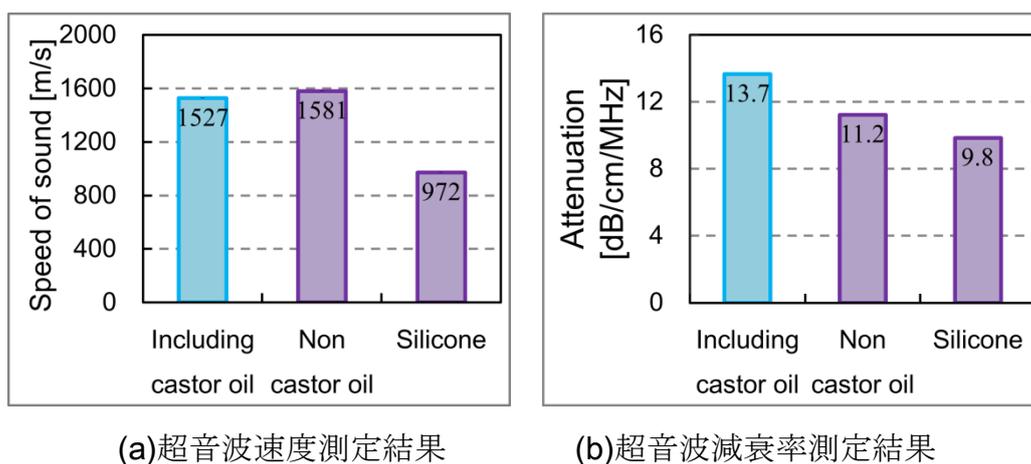


図 2-7. ファントムの超音波特性

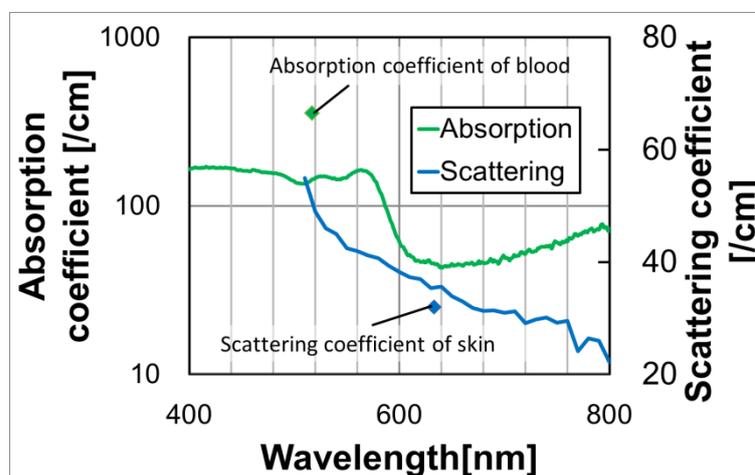


図 2-8. ファントムの光学特性

光学特性の評価として, 酸化チタンを混入したアクリルブロック共重合体の光の散乱特性および赤インクの光の吸収特性を積分球と, スペクトロメーターを用いて測定した. 測定結果を図 2-8 に示す. 真皮の散乱係数は  $57.5 \text{ cm}^{-1}$  であるのに対し, 酸化チタンを混入したアクリルブロック共重合体の散乱係数は  $46 \text{ cm}^{-1}$  であった. 一方, 血液の吸収係数が  $354$

$\text{cm}^{-1}$  に対し赤インクの吸収係数は  $149 \text{ cm}^{-1}$  である。値にわずかな違いはあるものの、ほぼ皮膚と血液の散乱係数、吸収係数は模擬できていると考えられる。

## 2.6 実時間光音響イメージング・システムの開発

本研究では皮膚の外傷診断を目的とした光音響イメージング・システムを開発した。光音響イメージング法を用いた皮膚の外傷診断では、光応用計測法の欠点を克服する手法として研究が行われてきた。[11][12][13][14] 従来の研究では測定深度が  $2 \text{ mm}$  に限られたこと、単素子のセンサーを用いていたため断層画像を実時間で取得できないことから臨床研究への応用が困難であるという課題がある。また大型のレーザーを使用していたため、装置の移動が難しいことも臨床応用の障害であった。そこで本研究では可搬型システムで、実時間で断層画像が取得できる光音響イメージング・システムを開発することを目的とした。

### 2.6.1 リニアアレイセンサーの開発

実時間での断層画像撮像のため、圧電素子を直線状に配置したリニアアレイセンサーを開発した。リニアアレイセンサーは一般的な超音波診断装置で使用されているが、光の照射機構を設けることが重要である。最初に圧電素子側面に光照射機構を設けたリニアアレイセンサーの構造を図 2-9 に示す。8 個の中心周波数  $10 \text{ MHz}$  の  $\text{Pb}(\text{Zr},\text{Ti})\text{O}_3$  の素子を平行に配置し、素子側面に光ファイバーを平行に配置している。しかしこの構造では光音響信号に十分な SN を得ることができなかった。音波に関するスネルの法則により、音速の違う物質の界面では音速の違いに応じて音波が屈折する。生体の音速  $1540 \text{ m/s}$  に対し、リニアアレイセンサーの生体に接触する部分のアクリルの音速は  $2730 \text{ m/s}$  である。スネルの法則を考慮すると光照射部の真下から発生した光音響波は、生体とアクリルの界面で屈折し圧電素子に効率的に伝搬しないことが分かった。その模式図を図 2-10 に示す。

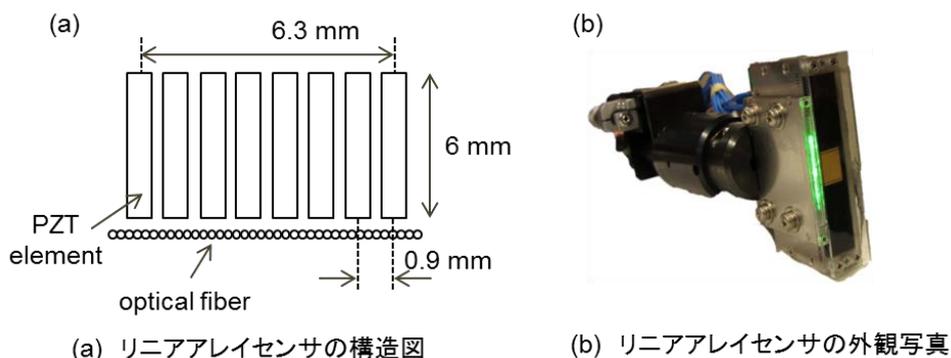


図 2-9. 圧電素子側面に光照射機構を設けたリニアアレイセンサー

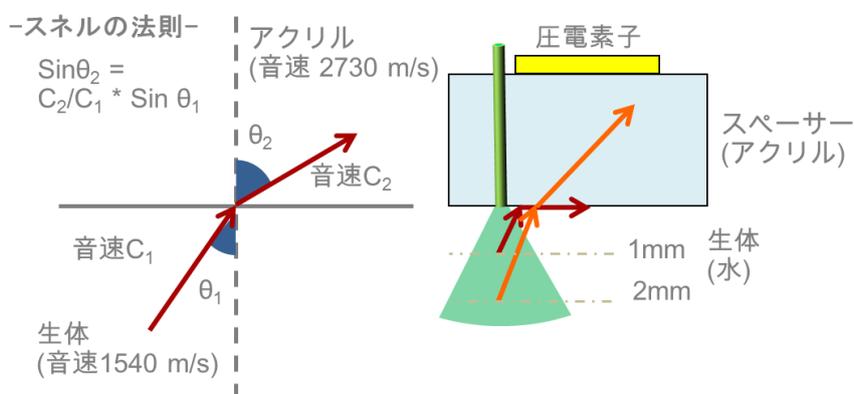


図 2-10. スネルの法則による超音波屈折の模式図

そこで光照射部の真下からの光音響波を効率的に受信するためセンサー中央に光照射機構を設けたリニアアレイセンサーを開発した。その構造図を図 2-11 に示す。センサーの構造による光音響信号の受信感度を確認するために、2.5 節で開発したファントムを用いた測定を行った。2 層の吸収層を持つファントムを、同じ光照射エネルギーで光の照射方式の異なる 2 種類のセンサーで測定した。測定図を図 2-12(a) に示す。測定結果図 2-12(b) には矢頭で示す部分に 2 層の吸収層から得られた光音響信号のピークが見られる。青が光を側面から照射したリニアアレイセンサーで得られた信号波形であり、赤が光を中央から照射したリニアアレイセンサーの波形である。この結果から分かる通り、光を中央から照射したセンサーの方が高い SN 比で光音響信号を受信していることがわかる。本試作および測定結果から、システムには光を中央から照射したタイプのリニアアレイセンサーを用いることとした。

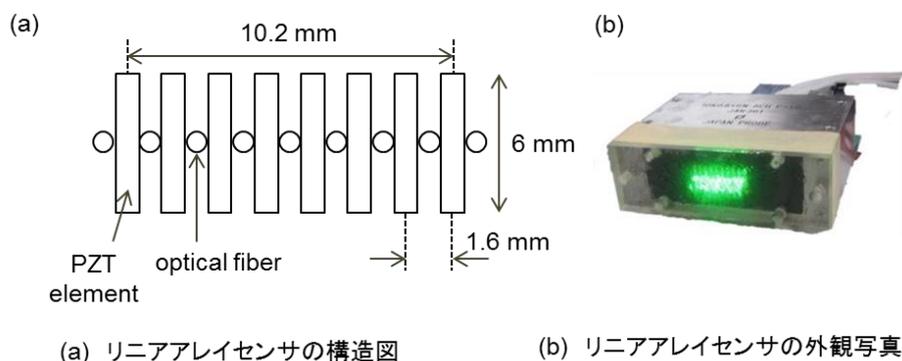


図 2-11. 圧電素子中央に光照射機構を設けたリニアアレイセンサー

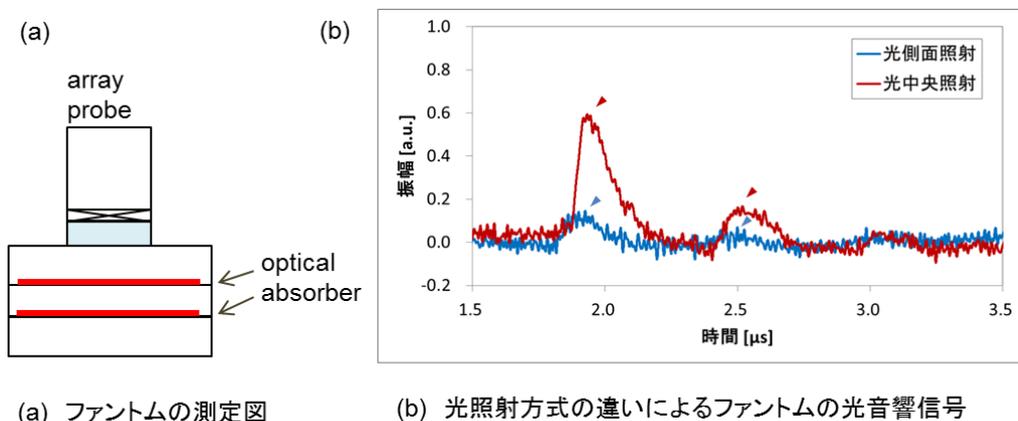


図 2-11. 光の照射方式の比較結果

## 2.6.2 実時間断層画像

開発したリニアアレイセンサーで実時間断層画像を構築するため、画像化アルゴリズムを開発した。断層画像の構築には一般的な超音波診断装置で使用されているフェイズドアレイを用いた。[29] [30] フェイズドアレイは吸収体と各センサーまでの距離差を時間差に換算し、複数のセンサーの受信信号間で位相整合をとることで SN 比を向上させる手法である。一般的な超音波診断装置に使用されるリニアアレイセンサーはセンサー間の距離が短い。本装置で使用するリニアアレイセンサーはセンサー間に光照射部があるためセンサー間の距離が長くなっている。そこでセンサー直下の領域とセンサー間の領域の 2 種類に分けたフェイズドアレイ演算を行った。それぞれの模式図を図 2-12 に示す。センサー直

下の領域に対しては図 2-12(a)に示されるように、対象のセンサーと隣接する 2 つのセンサーの受信信号を用いてフェイズドアレイ処理を行い、深さ方向の全てのデータに演算を行い画像データとしている。センサー間の領域は図 2-12(b)に示すように、隣接する 2 つのセンサーでフェイズドアレイ演算を行い、センサー直下の領域同様に深さ方向に画像データを作成した。これら 2 つの演算結果を組み合わせ、測定幅 10.4 mm の断層画像を作成した。

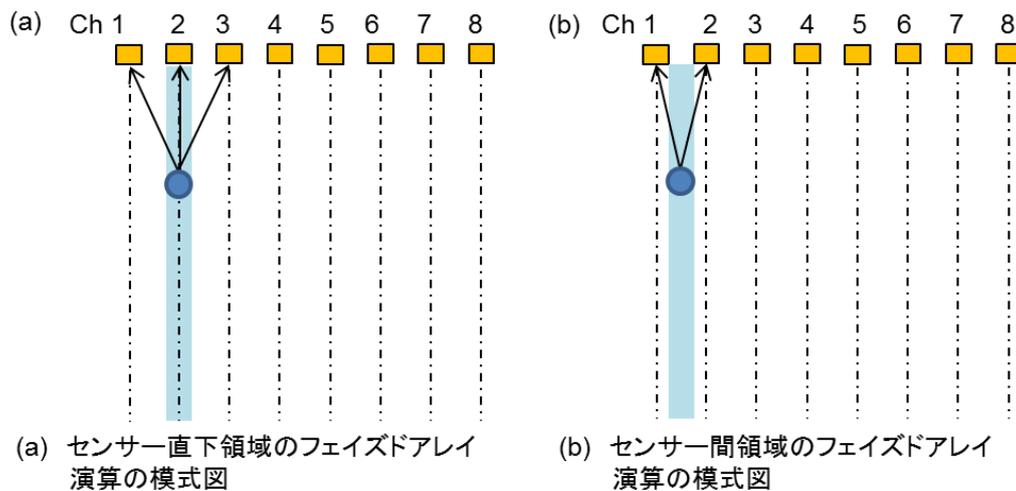


図 2-12. フェイズドアレイ演算の模式図

### 2.6.3 システムの構成

我々が開発した光音響イメージング・システムのブロック図を図 2-13 に示す。プローブには 2.6.1 節で開発したりニアアレイセンサーを実装しハンドヘルド型プローブを実現した。プローブのサイズと重量は、それぞれ 40 mm x 20~30 mm x 170 mm と、170 g である。プローブの外観の写真を図 2-14 に示す。2.6.1 節で述べたとおり、センサーの配置と光照射部の配置を最適化することにより高 SN 比で信号を受信することが可能となったことで、光源のエネルギーの出力の低光量化を実現している。光源はこれまで光音響イメージングの皮膚の外傷診断に応用されている波長 532 nm を使用することとした。実時間撮像を実現するためには高繰返し周波数の光源が必要であり、我々は株式会社アドバンテストで開発したファーマーレーザーをシステムに実装した。[28] レーザーの仕様は、波長 532 nm, パルス幅 20 ns, 光照射エネルギー 300  $\mu$ J, 繰返し周波数 500 Hz である。繰返

し周波数 500 Hz の光源を使用することで、アベレーシング数 16 回で、約 30 fps の実時間撮像が可能となる。ファイバーレーザーは 350 mm x 400 mm x 60 mm であり、システム全体の小型化に寄与している。ファイバーレーザーの出力は、バンドルファイバーで 9 経路に分岐され、センサーに結合される。プローブでの皮膚への照射エネルギー密度は 140 mW/cm<sup>2</sup> である。これは 2.3 で述べた生体組織に光照射するときの安全基準 200 mW/cm<sup>2</sup> 以下を満足している。

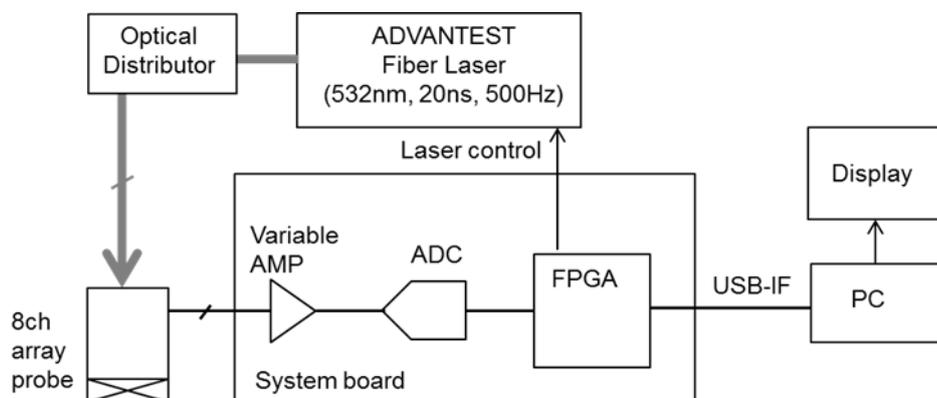


図 2-13. 実時間光音響イメージング・システムのブロック図



図 2-14. プローブ外観

本システムには、信号処理専用開発した FPGA(Field-Programmable Gate Array)ボードを実装している。受信した光音響信号はボード上のアンプで増幅され、250 MHz/s の 8bit AD コンバータで量子化され、ボード上の FPGA に転送される。各センサーからの受信信

号は生体で深さ 5 mm までの情報を得るため、1 画像あたり 1024 byte のデータを取得する。フェイズドアレイ演算を行い、画像の横方向に線形補間を行うことで、500 x 1024 の画像データを作成する。PC の中央処理装置(Central Processing Unit, CPU)で演算を行った場合、演算処理に時間がかかり実時間撮像を実現できない。そこで本装置では FPGA 内部でデジタル信号処理、および 2.6.2 節で述べたフェイズドアレイ処理を行うことで実時間撮像を実現した。FPGA で演算したデータは USB-IF を介して PC にデータが転送され、PC 上で 2 次元の光音響画像を最大 30 fps で実時間に画像表示することを可能にしている。

完成したシステム外観写真を図 2-15 に示す。装置に PC およびディスプレイを内蔵しており小型で可搬型のシステムを実現した。



図 2-15. システム外観写真

#### 2.6.4 ファントムによるシステムの評価結果および考察

システムの性能評価を行うため、2.5 節で開発したファントムを用いた評価を行った。図 2-16 にファントムの測定結果を示す。実験では、3 層型と 6 層型のファントムを用いた。3 層型の各層には吸収体が印刷されており、6 層型では 2 層目と 5 層目に吸収体が印刷されていない。ファントムの各層の厚みはデジタルマイクロメータ(MDQ-30, Mitsutoyo)にて計測を行った。3 層ファントムでは、1 層目の計測された深さは 0.70 mm、2 層目が 1.48 mm、3 層目が 2.29 mm であった。光音響イメージング法で撮像された画像では、図 2-16 に示すように 1 層目が 0.62~0.68 mm でありデジタルマイクロメータによって計測された深さ

に対する最大誤差は 80  $\mu\text{m}$ , 2 層目が 1.45~1.60 mm であり最大誤差は 120  $\mu\text{m}$ , 3 層目が 2.25~2.40 mm であり最大誤差は 110  $\mu\text{m}$  であった。

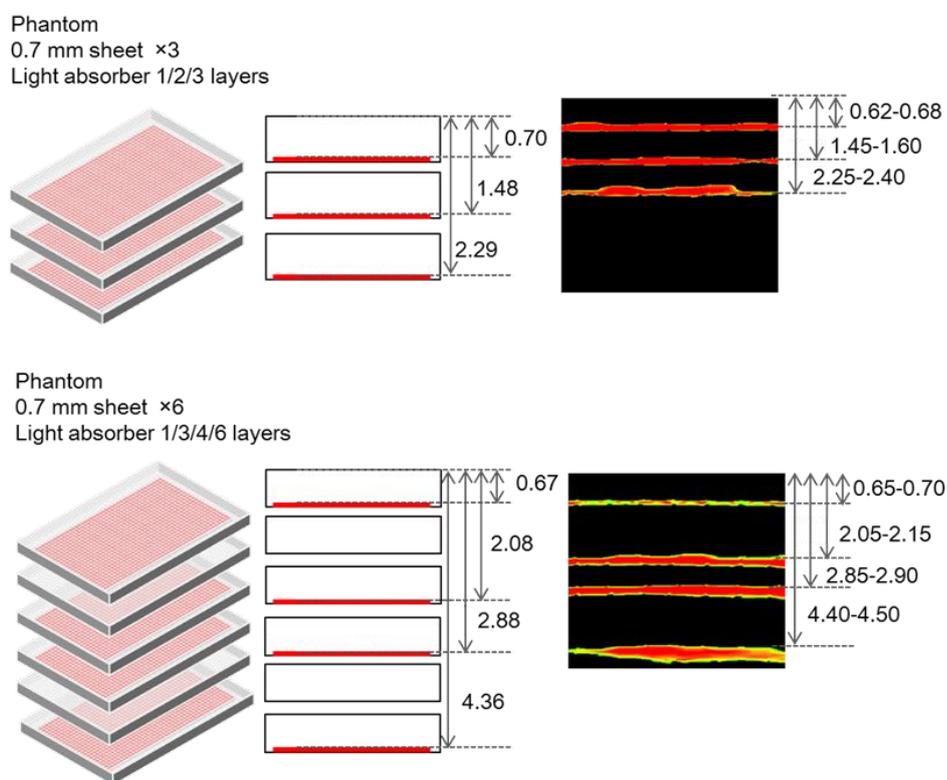


図 2-16. ファントムの撮像結果

一方, 6 層ファントムにおいては, 1 層目のデジタルマイクロメータによる計測深さ 0.68 mm に対して光音響イメージング法で計測された吸収体の深さは 0.65~0.70 mm であり最大誤差は 30  $\mu\text{m}$ , 2 層目は計測深さ 2.08 mm に対して 2.05~2.15 mm であり最大誤差 70  $\mu\text{m}$ , 3 層目は計測深さ 2.88 mm に対して 2.85~2.90 mm であり最大誤差 30  $\mu\text{m}$ , 4 層目は計測深さ 4.36 mm に対して 4.40~4.50 mm であり最大誤差 140  $\mu\text{m}$  を得た. 以上のことからファントムに対する光音響イメージング法による吸収体の深さ測定の最大誤差は 140  $\mu\text{m}$  である. この測定誤差は, センサープローブをファントムの柔らかい素材に押し当てたことによる影響が考えられる. 図 3-6 より, 本研究で開発した光音響イメージング・システムを用いると, 深さ 4 mm までの吸収体を高いコントラストで撮像できることが明らかとなり, ヒトの皮膚全層を画像化できる可能性が示唆された.

## 2.7 光音響信号の音圧測定

2.3 節において、生体に照射する光の安全基準について述べた。開発した実時間光音響イメージング・システムでは光音響信号として超音波が発生する。超音波が生体組織を伝搬することによって、超音波の振動エネルギーに起因する熱作用や、キャビテーションに起因する機械的作用などが生体組織に影響を及ぼす。[29] したがって、本節では光音響効果によってどの程度の音圧が発生しているかを実験的に検証する。

### 2.7.1 ファントムを用いた光音響信号の音圧測定

光音響効果によって生体組織内にどの程度の音圧が発生するかを実測するため、2.5 節で開発したファントムを測定対象として利用した。[26] ファントムは 1 層型のものであり深さ 0.7 mm に吸収層が配置してある。当初、水槽中にファントムとハイドロホン(PAL HPM02, Precision Acoustics)設置して、ファントムから発生した光音響信号を検出することを試みた。しかしながら、水中に設置されたファントムからはハイドロホンで検出できる音響信号が発生されず、音圧測定ができなかった。そのため、ファントムからの光音響波は 2.4 節で利用した図 2-2 に示す測定系を利用し、2.6.1 節で開発したリニアアレイセンサーの音圧－電圧変換特性は図 2-17 に示すハイドロホンを用いた実験系により計測することとした。具体的な測定の手順は以下の通りである。

- 1) 図 2-16 に示す実験系において、水中振動子(中心周波数 1/5/10/15/20 MHz)をパルサーレーザー(JPR-50P, Japan Probe)で駆動し、その送信超音波の音圧をハイドロホンで測定する。これにより水中振動子の各中心周波数に対する送信波の音圧を得る。
- 2) 図 2-17 に示す実験系において、光音響イメージング・システムで使用している中心周波数 10 MHz のアレイセンサーを用いて、1)で測定した水中振動子の送信波を受信し、角周波数毎の音圧－電圧変換係数を測定する。これにより、光音響イメージング・システムで使用されるアレイセンサーの音圧－電圧変換係数が決定される。
- 3) 図 2-2 に示す実験系によって、ファントムで測定した光音響信号の振幅波形と 2)の結果から、ファントム内に発生する光音響信号の音圧を推定する。

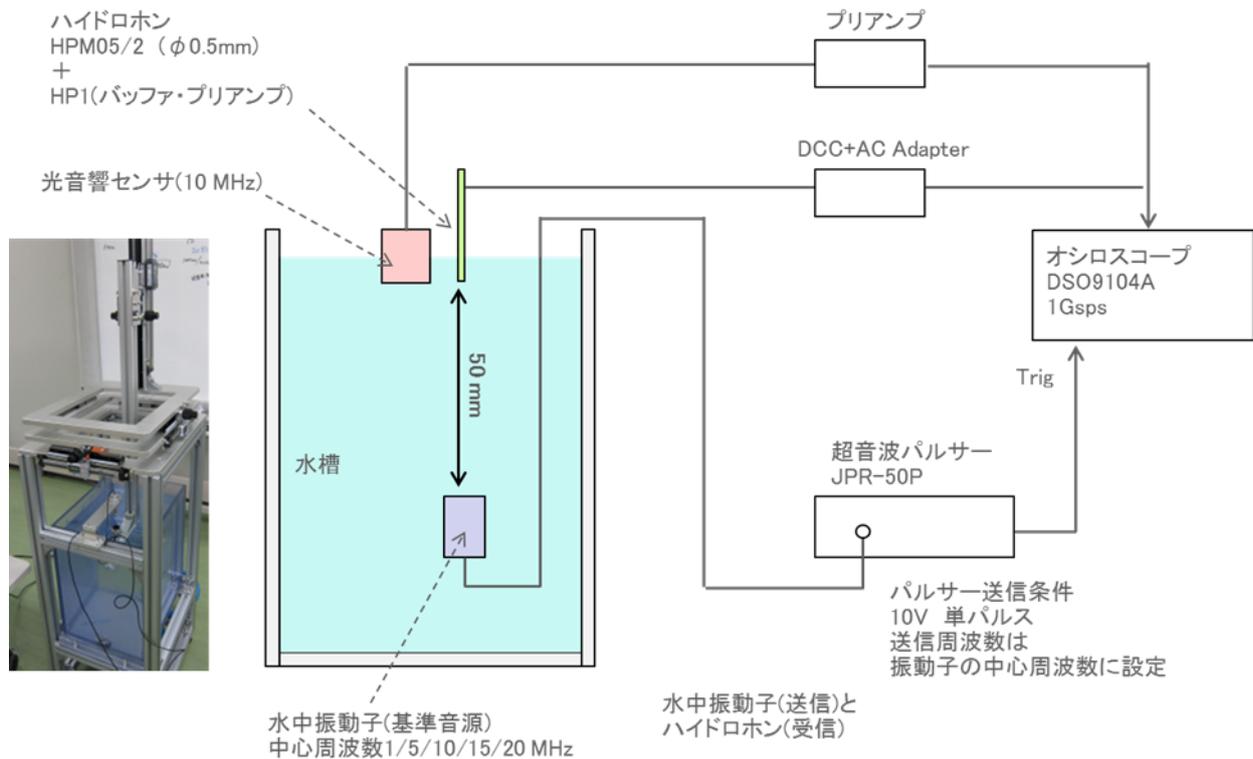


図 2-17. ハイドロホンを用いた光音響波計測系のブロック図

## 2.7.2 実験結果と考察

表 2.2 と表 2.3 には、それぞれパルサーレーザーによって駆動された水中振動子から発生した超音波出力をハイドロホンとリニアアレイセンサーによって測定した結果を示す。なお、ハイドロホンの音圧－電圧変換係数は、ハイドロホン単体の校正値である。両表より、光音響イメージング・システムで使用しているリニアアレイセンサーの音圧－電圧変換係数を決定することができた。

このアレイセンサーを用いて、ファントムから発生した超音波の波形を測定した結果を図 2-18 に示す。図より、最大振幅は 1500 mV 程度であり、センサーの中心周波数 10 MHz から表 2.3 の 10 MHz の音圧/電圧変換係数を用いると、 $1500 \text{ [mV]} / 27055 \text{ [mV/MPa]} = 0.055 \text{ [MPa]}$ となる。

表 2.2 水中振動子～発生した超音波の音圧測定結果

|                    |       |       |       |       |       |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| センサー中心周波数 [MHz]    | 1     | 5     | 10    | 15    | 20    |
| 測定振幅 [mV]          | 5.1   | 16.71 | 16.96 | 11.71 | 4.07  |
| 音圧/電圧変換係数 [mV/MPa] | 332   | 325   | 327   | 334   | 334   |
| 音圧 [MPa]           | 0.015 | 0.051 | 0.052 | 0.035 | 0.012 |

表 2.3 光音響イメージング・システムセンサーの音圧/電圧変換係数

|                    |       |       |        |        |        |
|--------------------|-------|-------|--------|--------|--------|
| 送信センサー中心周波数 [MHz]  | 1     | 5     | 10     | 15     | 20     |
| 測定振幅 [mV]          | 200.8 | 966.3 | 1403.2 | 430.13 | 136.58 |
| 音圧 [MPa]           | 0.015 | 0.051 | 0.052  | 0.035  | 0.012  |
| 音圧/電圧変換係数 [mV/MPa] | 13072 | 19377 | 27055  | 12268  | 11208  |

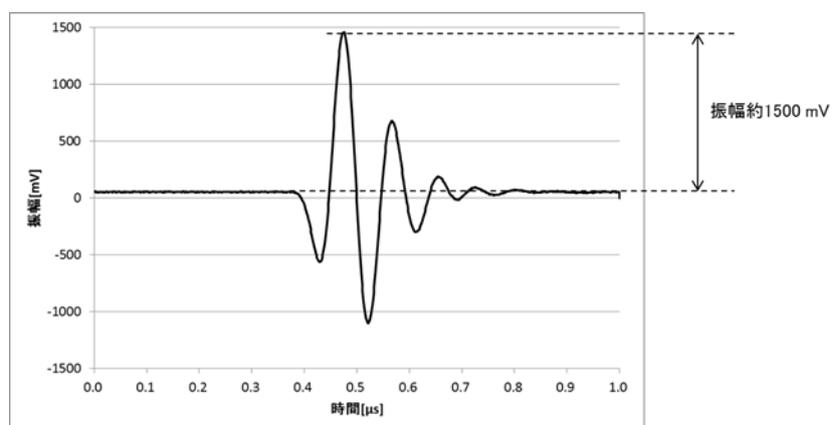


図 2-18. ファントムから発生した超音波の測定光音響信号

一般的な超音波診断装置での音圧は数 MPa であるため、それよりもはるかに小さい音圧が光音響効果によって発生していることが分かる。現在、一般に流通している超音波診断装置である SONOACE PICO, Probe (EC4-9/10ED, MEDISON CO.,LTD)を例にあげると、その音圧は 1.87~2.71 MPa であった。したがって、我々が開発した光音響イメージング・システムにおいて、光音響効果で発生する超音波による生体への影響については問題ないと考えられる。しかしながら、発生する音圧が非常に小さいということは、光音響信

号を効率良く受信するには一般的に流通している超音波診断装置のセンサーよりも高感度での受信する必要がある。超音波の減衰率は周波数に比例し、軟組織では  $0.6 \text{ dB/cm}\cdot\text{MHz}$  である。[27] [30] 図 2-19 には、減衰率  $0.6 \text{ dB/cm}\cdot\text{MHz}$  に対する、深さ 10 mm までの 1 MHz、10 MHz および 30 MHz の超音波の減衰率を示す。本システムが目標値として定めている深さ 3 mm では、30 MHz では 10.8 dB の減衰率に対し 10 MHz では 3.6 dB、1 MHz では 0.36 dB となる。これは 1 MHz の超音波が約 4 % しか減衰しないことに対し、30 MHz の超音波は約 65 % 減衰することを意味する。したがって、より高い周波数の超音波センサーを使用すると、深さ方向の分解能は向上するが、超音波の減衰が増加し光音響信号の振幅は減少する。このように、相反する条件を、考慮したシステム設計が必要となる。

図 2-20 は、本研究で開発した光音響イメージング・システムで使用する、中心周波数 10 MHz リニアアレイセンサーの受信感度特性を示す。図 2-20(a) に示すセンサー受信感度グラフによると、10 MHz が最も感度が高く、1 MHz、15 MHz、および 20 MHz では感度が  $1/2$  以下となる。しかしながら、5 MHz では 50 % 以上の感度があるため、5 MHz から 10 MHz に対して受信感度を持つことが分かる。図 2-20(b) には、センサーの出荷検査表として添付されたセンサー受信感度の周波数特性を示す。これは水中で超音波を発振しその反射波を受信して、測定波形より周波数成分を分析したものである。図より、使用したセンサーの中心周波数 11 MHz であり、5 MHz では検出感度がほぼゼロである。この結果は、送信超音波の周波数特性が重畳された結果であるため、本実験で得られた受信した超音波の周波数分布と異なる。光音響イメージングにおいて、超音波センサーは超音波の受信のみに使用するため、受信特性のみを正確に理解しておく必要がある。なお光音響波は 2.2 節で述べたとおり、光のエネルギーの吸収による物質の断熱膨張によって発生する熱弾性波であり、吸収体のサイズにより様々な周波数成分の超音波が発生する。[31] そのため理想的には広帯域のセンサーを用いることで、発生する様々な周波数成分の光音響波を効率的に捉えることが可能となる。本研究で使用したリニアアレイセンサーは、中心周波数 10 MHz よりも低い帯域に受信感度を持つが、深さ方向の分解能は  $100 \sim 300 \mu\text{m}$  であると考えられるため真皮内数 mm 内の血液分布の断層画像作成には問題ない性能であると考えられる。

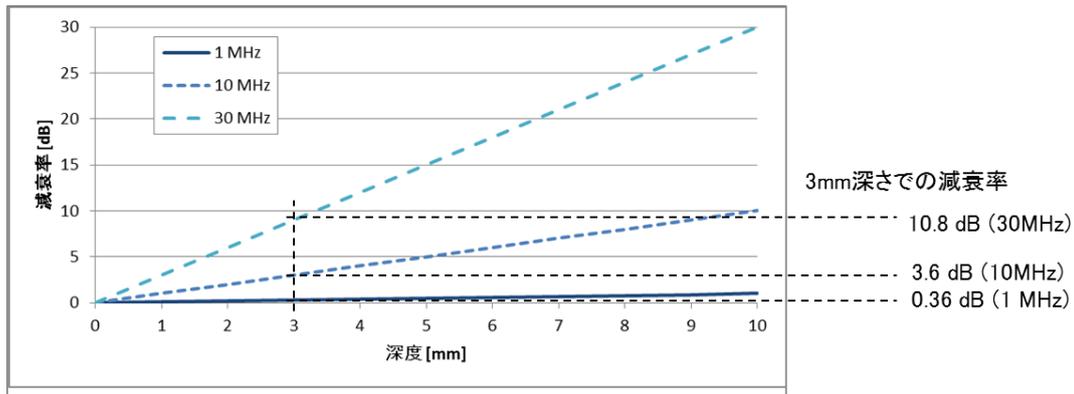
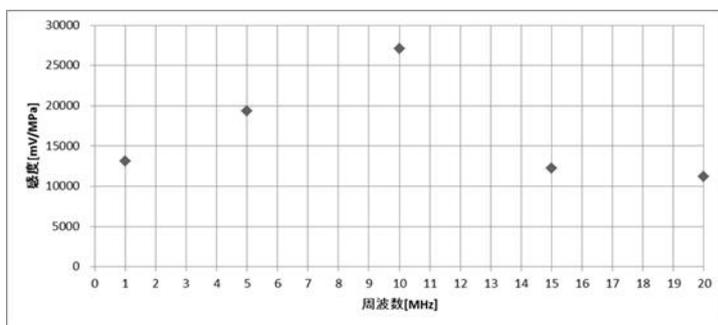
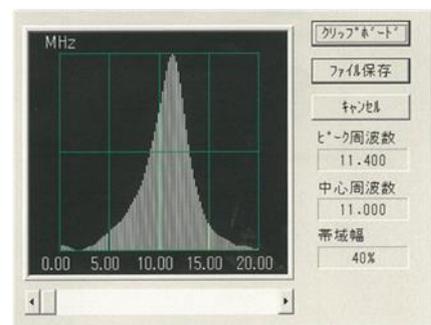


図 2-19. 超音波の減衰特性



(a) 本実験による光音響イメージングシステムのセンサの受信感度



(b) 同センサの送受信での受信感度

図 2-20. センサーの受信感度特性

## 2.6 まとめ

本章では、光音響効果の原理を概説し、システム開発の必要条件である光源のパルス幅について検討を行った。パルス LD ユニットを用いた光のパルス幅の変化に対する光音響信号の波形評価を行い、理論通りであることを確認した。システムの性能を確認するため、アクリルブロック共重合体を用いたファントムを製作した。ファントムはシート状で自己吸着性を持つため積層可能であり、皮膚の層構造を模擬可能である。開発した実時間光音響イメージング・システムについて述べた。本システムではリニアアレイセンサーを開発し、光の照射部とセンサー配置を最適化することにより受信感度を向上した。またフェイズドアレイ処理をシステム専用設計したボード上の FPGA で高速演算することで、最大 30 fps の実時間イメージングが可能となった。小型のファイバーレーザー光源を採用する

ことで、システム全体を小型化することが可能となり、可搬型のシステムを実現した。ファントムを用いた実験の結果、最大深さ **4.5 mm** の吸収体が画像化できること、ならびにその測定誤差が最大 **140  $\mu\text{m}$**  であることを実証し、臨床応用が可能な性能を有していることを確認した。また光照射エネルギーと、光音響効果によって発生する超音波の生体組織への安全性について概説し、開発する光音響イメージング・システムの臨床応用に問題がないことを実証した。

## 第3章

### 光音響イメージング法による熱傷深度診断

### 3.1 はじめに

熱傷は、熱傷深度により I 度熱傷、浅達性 II 度熱傷(Superficial Dermal Burn:SDB) , 深達性 II 度熱傷(Deep Dermal Burn:DDB), および III 度熱傷(Dermal Burn:DB)に分類される。[32] [33] [34] これらの分類に基づく熱傷の症例等を表 3-1 に示す。深達性 II 度熱傷において、熱損傷は真皮深部に達し感染を合併し易いためその感染の予防が必要である。III 度熱傷においては、真皮全層が壊死に至るため壊死した組織の切除および皮膚移植が必要となる。広範囲の重症熱傷は生死に直結し、熱傷の受傷面積と熱傷指数(Burn index = III 度熱傷面積 + II 度熱傷面積 X0.5)が増加すると死亡率が増加する傾向にある。このように熱傷は深度に応じて治療方針が大きく異なるため、熱傷深度を正確に診断することは極めて重要となる。

表 3-1. 熱傷深度の分類

| 熱傷深度  | 障害組織              | 臨床症状                       | 治癒期間            |
|---|-------------------|----------------------------|-----------------|
| I 度 [EB]<br>(epidermal burn)                | 表皮<br>(角質層)       | 紅斑, 有痛性                    | 数日              |
| 浅達性 II 度 [SDB]<br>(superficial dermal burn) | 表皮<br>(有棘層, 基底層)  | 紅斑, 水泡, 有痛性                | 2 週間程度          |
| 深達性 II 度 [DDB]<br>(deep dermal burn)        | 真皮<br>(乳頭層, 乳頭下層) | 紅斑, 紫斑~白色,<br>水泡, 知覚麻痺     | 3 週間以上          |
| III 度 [DB]<br>(deep burn)                   | 真皮全層<br>皮下組織      | 黒色, 褐色, または<br>白色, 水泡, 無痛性 | 自然治癒なし<br>植皮が必要 |

現在熱傷深度診断の多くは肉眼的所見によるものであり、医師の経験に大きく依存するが信頼性は低く、その正確度は 60 ~ 70%程度と報告されている。[35] 肉眼的観察に代わる測定法として、レーザードップラー血流イメージング法、[36] [37] [38] [39] 偏光 OCT(polarization sensitive optical coherence tomography) [40], ビデオ・マイクロスコー

ブ[41] などによる熱傷診断が報告されている。これらの手法は、生体組織の光散乱の影響のため、測定深度は 1 mm 以下に制限される。

本研究において開発する光音響イメージング法を用いた熱傷深度診断では、光応用計測法の欠点を克服する手法として研究が行われてきた。[11][12][13] 熱傷で組織が熱損傷を受けると、血流遮断が起こる。したがって、熱傷深度診断には、血流の有無が手がかりとなる。光音響イメージング法では、生体表面からパルス光を照射すると、血流遮断領域の下部にある血管から光音響信号が発生し、その深さ情報から熱傷深度を推定する。測定原理を図 3-1 に示す。本研究では、第 2 章で述べた開発した皮膚の外傷診断用実時間光音響イメージング・システムでラットに施した熱傷モデルについて検証を行うことで生体組織に対する有効性を確認する。さらに、熱傷の治癒過程についても、ラットの熱傷モデルを用いて検証する。

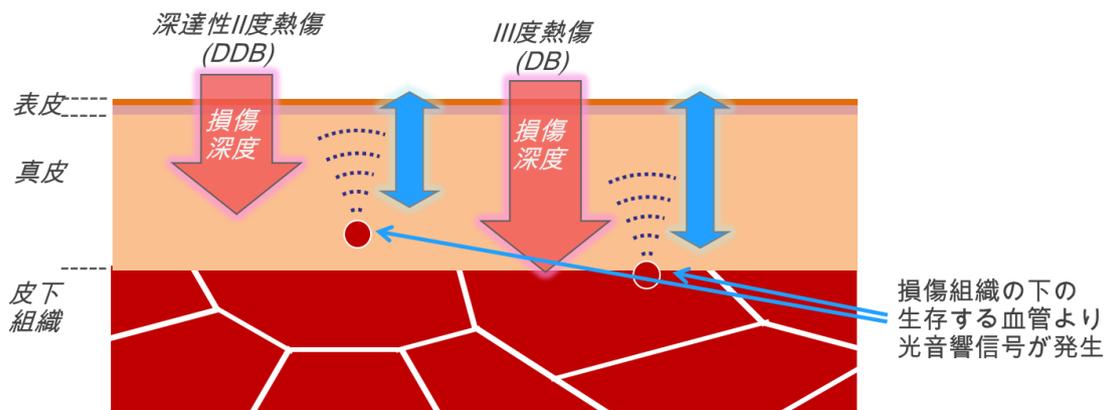


図 3-1. 光音響イメージング法による熱傷深度診断の原理

## 3.2 実験方法

### 3.2.1 ラット熱傷モデルを用いた熱傷深度診断

ラット熱傷モデルを用いて、本システムの熱傷深度診断への有効性を確認する。Walker-Mason 法を用いてラット背部に体表面積の 20%相当に熱傷部位を作製した。[42] 全身麻酔下で(ペントバルビタールナトリウム 50 mg/kg × 体重を腹腔内注射), 背部を脱毛し Walker-Mason テンプレートの開口部から特定の温度の水に 10 s 間浸漬し熱傷モデルを

作製した。熱傷深度は水の温度を調整して制御している。浅達性Ⅱ度熱傷，深達性Ⅱ度熱傷，およびⅢ度熱傷を受傷させ，熱傷モデルとした。受傷から 48 時間後に超音響イメージング・システムによって撮像を行い，測定後に当該部位を生研するために，10 %ホルマリン溶液に固定してヘマトキシリン・エオジン HE 染色標本を作製した。生検による組織学的な解析結果と超音響イメージング結果を比較することによって，イメージングの正当性を実証した。ラット熱傷モデルは，健常モデルも含めて，各条件につき 6 匹ずつ行った。

特にⅢ度熱傷については，3 次元画像を再構成するために，熱傷部位と非熱傷部位の境界部分で，32 mm をセンサー0.2 mm ピッチ毎に測定した。2 次元画像から 3 次元画像への再構成には，3 次元ソフトウェア Volview 3.4 (Kitware Inc.)を使用した。

### 3.2.2 熱傷治癒過程のモニタリング

熱傷治癒の過程をモニタリングするため，ラット深達性Ⅱ度熱傷モデルについて，受傷後 1 日，3 日，5 日目に超音響イメージングを行った。測定日の設定は，過去の研究において組織学的検証により熱傷受傷後 5 日以内に血管新生が確認されたことを参考に決定した。ただしその従前研究では測定分解能の制約により，血管新生由来の超音響信号を明確に検出できなかった。本研究においては上記各測定で，4 匹のラットに対して超音響イメージングを行い，その内 2 匹につき測定部位を生検し HE 染色を行った。その組織学的解析結果と超音響画像を比較した。

## 3.3 測定結果

### 3.3.1 熱傷深度の診断結果

図 3-2 に組織標本画像とそれに対応する超音響画像を示す。図において，健常皮膚が図(a1)-(a3)，浅達性Ⅱ度熱傷モデルが図(b1)-(b3)，深達性Ⅱ度熱傷モデルが図(c1)-(c3)，Ⅲ度熱傷モデルが図(d1)-(d3)に示されている。また，図(a3)-(d3)は，図(a2)-(d2)の白枠で示した 1 mm 角領域の拡大図である。皮膚の厚みは，健常の場合 1 mm 以下であるのに対し，浅達性Ⅱ度熱傷モデルで約 1.2 mm，深達性Ⅱ度熱傷モデルで約 1.6 mm，そしてⅢ度熱傷モデルで約 1.7 mm と，熱傷により肥厚していることが分かる。これは浮腫およびコラー

ゲンの変質のためと考えられる。

図 3-2(a3)に示すように、健常皮膚の組織標本画像からは、表皮直下の血管を鮮明に確認できる。一方、図 3-2(a1)に示す超音響画像においては、皮膚表面の汚れもしくは着色による超音響信号と表皮直下の血液由来の超音響信号が重畳していると考えられ、これにより深さ方向に広がった信号が見えている。図 3-2 (b2)と(b3)に示す浅達性Ⅱ度熱傷モデルの組織標本画像においては、表皮と真皮上部が損傷しており、図中に矢印で示した血管は存在しているが好中球の湿潤が確認できる。それらに対応する超音響画像が図 3-2 (b3)に示されているが、健常皮膚と同様に皮膚表面の超音響信号と真皮直下の血液由来の超音響信号が重畳しているものの、炎症を表していると考えられる。図 3-2 (c2)と(c3)に示す深達性Ⅱ度熱傷モデルの組織標本の画像においては、表皮および真皮の上側 3 分の 2 の領域が損傷しており、血管は確認できない。赤血球の光吸収によって血管が確認できるのは、深度約 1 mm 以下の部分である。図 3-2 (c1)に示す超音響画像では、浅い部位の信号は低くなっており、表皮直下の血流遮断を表している。一方、深さ 0.8 mm の血流遮断領域が明確に確認できる。図 3-2 (d2)と(d3)に示すⅢ度熱傷モデルの組織標本においては、真皮の大部分でコラーゲン繊維は溶解しており、深さ 1 mm まで血管は確認できないが、深さ 1.2 mm の部分に拡張した血管が確認できる。図 3-2 (d1)に示す超音響画像では、深さ 1 mm に血流遮断領域が確認できる。図 3-2 の結果より、組織標本が示す損傷組織の深さと超音響画像から見積もられた血流遮断領域の深さの比較を表 3-2 にまとめる。組織標本の解析結果と超音響画像からの結果の差異は 100~200  $\mu\text{m}$  である。誤差の原因としては、組織標本の作製過程における組織の変形と、凝固した組織では音速が異なることが超音響画像の再構成に影響している事が考えられる。このことから、*in vivo* 測定誤差についてより信頼性の高い評価を行うためには、より多くの測定結果から組織標本と超音響画像の撮像画像を比較し、熱傷組織と健常皮膚の音速の比較を行うなどの検証および実験が必要である。2 章で述べたファントム実験の結果から得られた測定誤差は最大 140  $\mu\text{m}$  であることから、本システムは深さ方向に 200  $\mu\text{m}$  以上の分解能があると考えられる。熱傷治療で行われるデブリードマンによって壊死した部位が切除されるが、それに使用されるナイフでの採皮厚は 0.1 mm 以上で設定可能であることから、熱傷深度診断における深さ方向の分解能は 100

$\mu\text{m}$  程度必要であると想定される。[43] 以上のことから、本システムは臨床における熱傷深度診断に適用できる可能性があると考えられる。

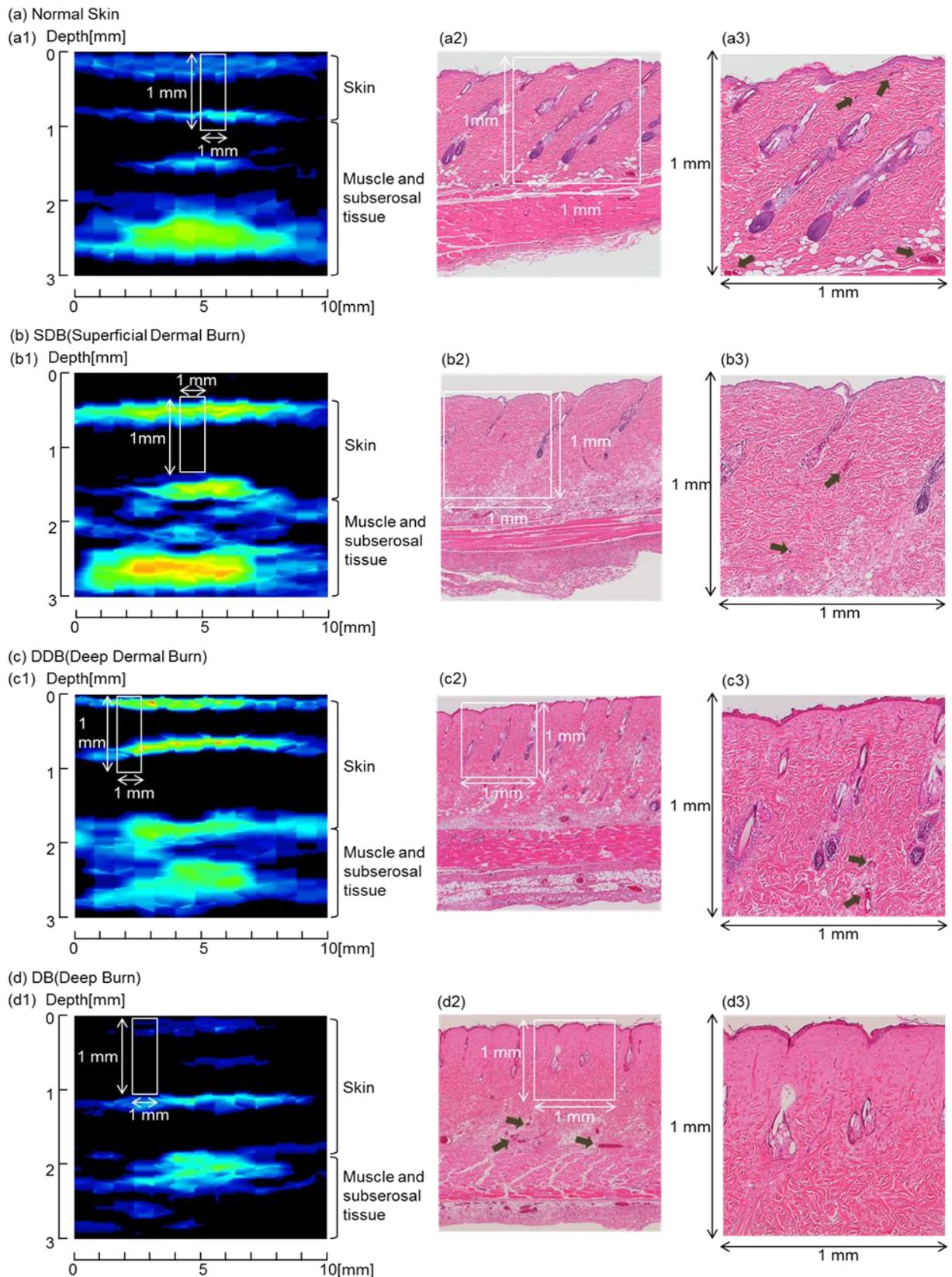


図 3-2. 組織標本と超音響画像 (a) 健常皮膚 (b) 浅達性Ⅱ度熱傷モデル  
(c) 深達性Ⅱ度熱傷モデル (d) Ⅲ度熱傷モデル

表 3-2. 組織標本から見積もった熱傷深度と超音響画像から見積もった熱傷深度

|  | Control<br>(mm) | Superficial dermal<br>burn (mm) | Deep dermal burn<br>(mm) | Deep burn<br>(mm) |
|--|-----------------|---------------------------------|--------------------------|-------------------|
| Histological analysis  |                 |                                 |                          |                   |
| Skin thickness<br>(depth from epidermis<br>to subcutaneous tissue) | ~1.0            | ~1.2                            | ~1.6                     | ~1.7              |
| Depth of damaged tissue  | 0               | 0 to 0.2                        | 0.3 to 0.6               | 0.6 to 0.9        |
| Estimation by PA imaging   |                 |                                 |                          |                   |
| Depth of vascular occlusion  | 0               | 0                               | 0.4 to 0.6               | 0.8 to 1.0        |

図 3-3(a)と(b)は、それぞれⅢ度熱傷部位と非熱傷部位の境界の外観写真と 3D の超音響画像を示す。超音響画像からは、熱傷部位と非熱傷部位の境界における血流遮断領域が明瞭に確認できる。すなわち、非熱傷部位において浅い部分の信号層が確認できるが、熱傷部位においてそれは完全に消失している。これは、図 3-3(d1)に示す 2 次元画像に観測される血流遮断領域と同じ状態である。この血流遮断領域の下層部位では、信号層の幅が広くかつ高振幅であることが確認できる。一方、図 3-3(d2)に示すように、非熱傷部位では信号層は分散しかつ振幅が小さくなっていることが確認できる。熱傷部位のこの信号層は、血管の膨張を捉えているものと考えられる。それらのさらに下層においては、皮下組織に存在する血管由来と考えられる超音響信号層が確認できるが、非熱傷部位における深度が熱傷部位におけるそれよりがわずかに深くに位置するよう観測できる。これは、コラーゲンの変性や、浮腫により皮膚が肥厚していることを捉えていると考えられる。このように、超音響イメージング・システムを用いると 3 次元画像を撮像可能であり、もし臨床診断において、もし必要となった場合有効な情報になり得ると考えている。

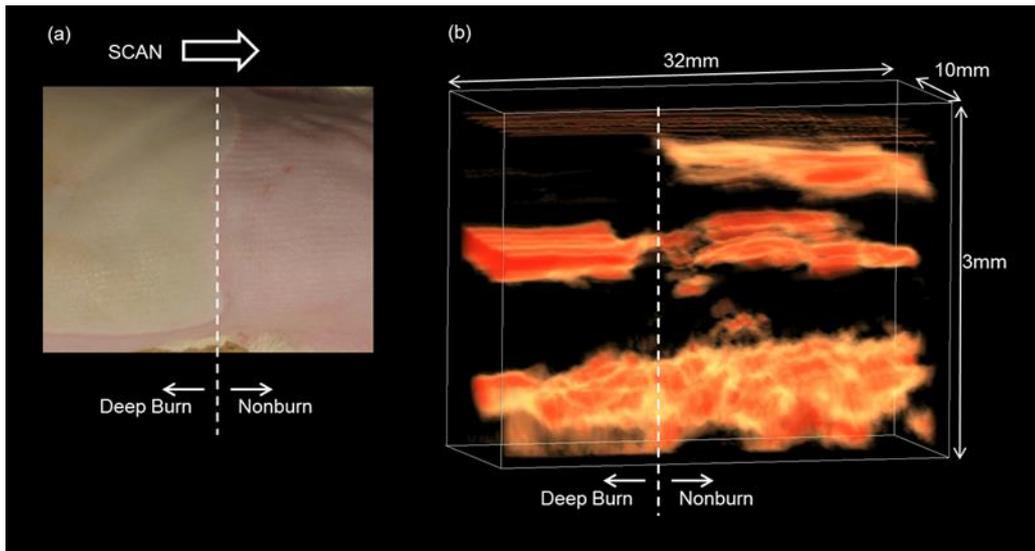


図 3-3 III度熱傷と非熱傷の境界部位における (a) 外観写真, と (b) 3次元光音響画像.

### 3.3.2 熱傷治癒過程の測定結果

図 3-4 に深達性II度熱傷モデルの熱傷受傷1日後, 3日後, 5日後の光音響画像と組織標本画像を示す. 図において, **ai** と **bi** はそれぞれ光音響画像と組織標本画像を表しており, 添え字  $i=1,2,3$  は受傷後の日数に対応している. 図 **b1** の組織標本画像において黄色矢印で示すように, 受傷1日後において早くも真皮浅部に新生血管が確認され, 図 **a1** に白色矢印で示すように光音響画像においても対応する深度に微弱な光音響信号が確認できる. 図 **b2** と **b3** より新生血管の数は時間の経過に従って増加しており, 対応する図 **a2** と **a3** に示す光音響画像においても同じ深さに光音響信号の増加が確認できる. これらの光音響信号は振幅も時間の経過に伴って増加しており, これは, 治癒過程の血行再建を表している. また真皮下部の光音響信号の変化も組織標本における血管の変化と対応している. すなわち, 受傷1日後の光音響画像では, 深さ  $0.5\text{ mm}$  の位置に強い光音響信号層が観測されるが, これは図 **b1** の組織標本画像において黒色矢印で示すように拡張した血管によるものである. 図 **b2** と **b3** を比較すると, 受傷3日後には一部に拡張した血管は見られるが, 5日後には拡張した血管はさらに減少している. また, 図 **a2** と **a3** より, 光音響信号の振幅は時間経過に従って減少しており, これも熱傷からの治癒過程を示唆していると考えられる.

これらの結果から、本システムは熱傷深度診断のみならず、その治癒過程のモニタリングにおいても有用であることが示された。

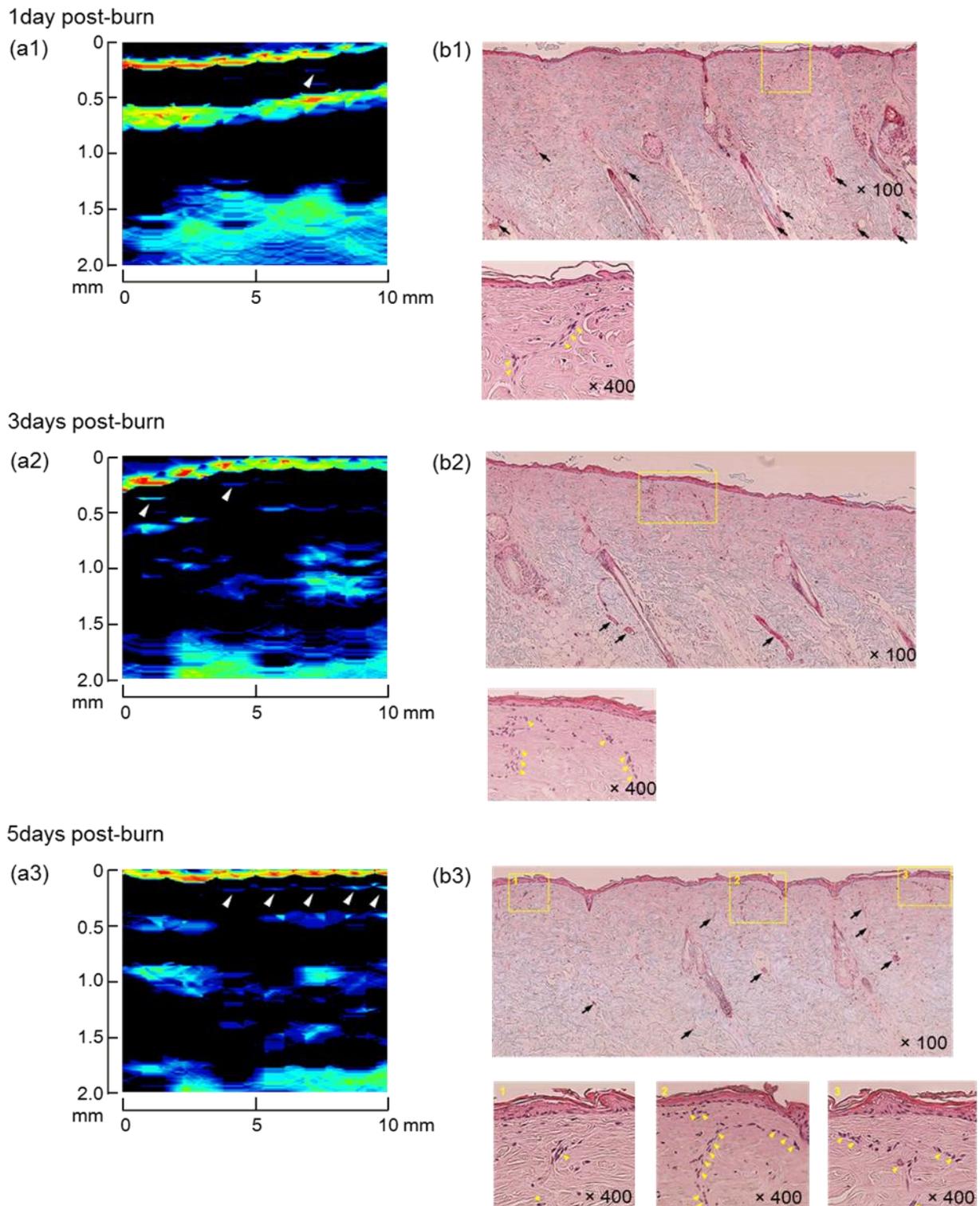


図 3-4. 深達性Ⅱ度熱傷モデルの受傷 1 日後, 3 日後, 5 日後の  
光音響画像(a1, a2, a3)と組織標本画像(b1, b2, b3).

### 3.4 まとめ

第3章では、開発した実時間光音響イメージング・システムの熱傷診断応用の可能性を実証するため、ラット熱傷モデルを作製し *in vivo* 計測を行った。その結果、開発したシステムによって見積もった熱傷深度と、組織標本から見積もったそれとよい一致を得た。また、その誤差は 100~200  $\mu\text{m}$  の範囲で一致することを確認した。さらに、深達性II度熱傷のラットを用いて、熱傷の治癒過程で発生する新生血管の存在が光音響画像から確認できることを実証し、本システムが熱傷深度診断のみならず、熱傷の治癒過程のモニタリングにも有用であることを示した。

次章では、現在多くの熱傷深度診断の研究が行われているレーザードップラー血流イメージング法との比較検討を行い、本システムの優位性を示す。

## 第4章

### 熱傷深度診断におけるレーザードップラー血流イメージング法との比較

## 4.1 はじめに

前章においては、浅達性Ⅱ度、深達性Ⅱ度、およびⅢ度ラット熱傷モデルを用いて、我々が開発した光音響イメージング・システムの熱傷深度診断における有効性を確認した。本章では、熱傷深度診断への研究成果が数多く報告されているレーザードップラー血流イメージング法と光音響イメージング法との比較研究をおこなう。[36] [37] [38] [39]

レーザードップラー血流イメージング法とは、非接触で血流速度を測定する装置であり、熱傷深度診断への応用のほか、アレルギーの判定[44]、食品機能成分の評価などにも使用されている。[45]

実験では、6種類の異なった温度でラット熱傷モデルを作製し、光音響イメージング法とレーザードップラー血流イメージング法によって熱傷深度の測定評価を行った。測定された熱傷による皮膚の損傷深度の熱傷モデル作製温度依存性を検証することによって、光音響イメージング法の優位性を実証する。

## 4.2 レーザードップラー血流イメージング・システム

生体にレーザー光を照射すると、血液(赤血球)などの移動する物質によって散乱された光はドップラーシフトの影響で周波数が増減する。これを捉えることで血流の速度および血流量を相対値として出力するのがレーザードップラー血流法の原理である。周波数のシフトの大きさは血流速度に比例し、周波数シフトした割合は赤血球数に比例するため、両者の積から血流量が算出できる。[46] 診断特性の比較を行うために市販されているレーザードップラー血流イメージング・システム(Peri Scan PIM II, Perimed AB, Stockholm)を用いた。システムはスキャナーヘッド、スキャナーアーム、オプトアイソレーター、PCから構成される。スキャナーヘッドには半導体レーザー、光受光器、スキャニングのための光学システムが内蔵されている。レーザーの波長は670 nmであり出力は1 mW以下である。本システムは非接触でスキャニングを行いそれぞれのポイントで測定した血流量をカラーコードで表示し、2次元画像を出力する。測定したドップラー信号から血流量をPerfusion valueとして算出し0~10の値として出力する。Perfusion valueは値が高いほど血流量が多いことを意味し、2次元画像では血流量の多い部分は赤色、少ない部分は青色

として表示される。[47] 本実験では関心領域(Region Of Interest, ROI)を 15 mm X 30 mm に設定し、測定対象との距離を 10 cm にて測定を行った。

### 4.3 ラット熱傷モデルおよび解析方法

ラット熱傷モデルとしては、Walker-Mason 法を用いてラット背部に約 4 cm x 10 cm の広範囲の熱傷部位を作製した。[42] 浅達性Ⅱ度熱傷、深達性Ⅱ度熱傷、Ⅲ度熱傷の作製温度はそれぞれ 70℃, 78℃, [48] [49] 98℃ [42] [50] [51] [52] である。さらに、83℃, 88℃, 93℃の 3 条件を加えて熱傷モデルを作製し、熱傷深度診断特性を詳細に評価した。各温度のラット熱傷モデルは 6 匹ずつ作製し、うち 4 匹を熱傷作製 48 時間後に超音響イメージング法およびレーザードップラー血流イメージング法によって測定を行った。第 3 章同様に測定部位を生検し、組織標本(HE 染色)を顕微鏡で観察し、存在する血管の深さから熱傷による損傷深度を決定した。超音響イメージング法によって見積もった熱傷深度とレーザードップラー血流イメージング法で得られた Perfusion value と熱傷作製温度、および組織標本に基づいて評価した熱傷深度を比較した。

### 4.4 実験結果

図 4-1 に、70℃(浅達性Ⅱ度熱傷)、78℃(深達性Ⅱ度熱傷)、および 98℃(Ⅲ度熱傷)のラット熱傷モデルの超音響信号の測定例を示す。前章で述べた実時間超音響イメージング・システムを用い、本実験ではより高精度に測定を行うためアベレーシング数を 100 回に設定して測定している。これによりフレームレートは 5 fps となる。全て信号に観測される強い第 1 ピークは、表皮の汚れや色素に由来する信号と考えられるため、このピーク位置が皮膚表面である。第 2 と、第 3 ピーク信号は、それぞれ熱損傷部位の下層の血液に由来する信号と皮下組織の血液に由来する信号と考えられる。したがって、皮膚表面の信号の立ち上がりから 2 番目の信号の立ち上がりまでの距離が、皮膚の損傷深さと定義する。

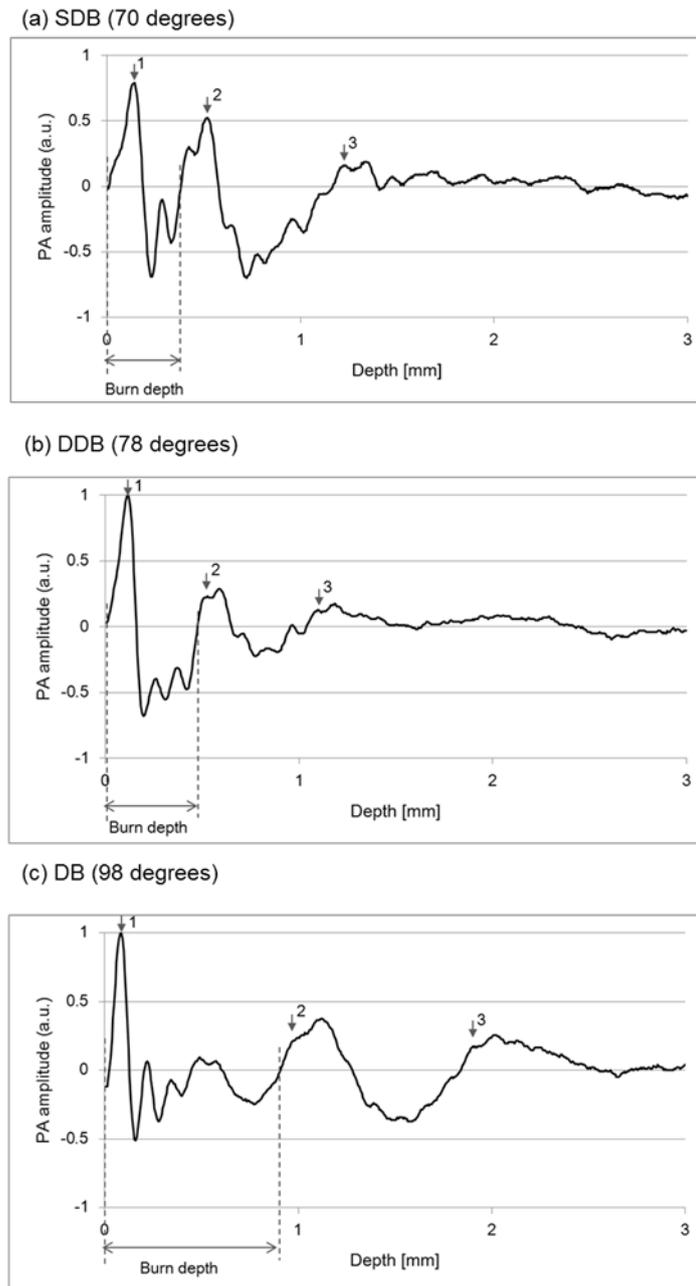


図 4-1. 熱傷作製温度 70°C, 78°C, 98°C のラット熱傷モデルの光音響信号

図 4-2 は、健康皮膚と全温度での熱傷モデルの測定部位の写真、レーザードップラー血流イメージング測定結果、および光音響画像を示す。ここで、(a1, b1, c1)は健康皮膚を示す。写真上のマーカーは、レーザードップラー血流イメージングで測定した関心領域(15 mm x 30 mm)を表す。同じ部位を測定した光音響画像を(c1-c7)に示す。図 4-2a より、健

常皮膚および 70℃と、78℃の熱傷モデルではやや赤みがかっているが差異は明確ではなく、視診での熱傷深度診断は困難であることが分かる。図 b1-b7 に示すレーザードップラー血流イメージングの測定結果では、Perfusion value が健常皮膚で最も高く、70℃の熱傷モデルが 2 番目に高いことが分かるが、より高温の熱傷モデルにおいては差異が明確ではない。

一方、図 c1-c7 に示す超音響画像では、健常皮膚と熱傷モデルとの間には、大きな差異が観測される。健常皮膚の場合は、熱傷モデルに比べて表面信号がより強くなっている。これはラットの表皮の厚みが数 10 μm と薄く、使用した超音響イメージング・システムの深さ方向の分解能よりも小さい値ため、表面の信号と真皮浅部の血液由来の信号が重畳するためと考えられる。ヒトの場合、表皮は数 100 μm と厚いため、ラットの場合のような信号の重畳は起こらないと考えられる。超音響画像において両矢印で示した 1 番目と 2 番目の超音響信号ピークの間領域が熱傷深度を表していると考えられる。本実験ではラット背部で測定を行ったが、測定部位への依存性については今後さらに検証が必要である。

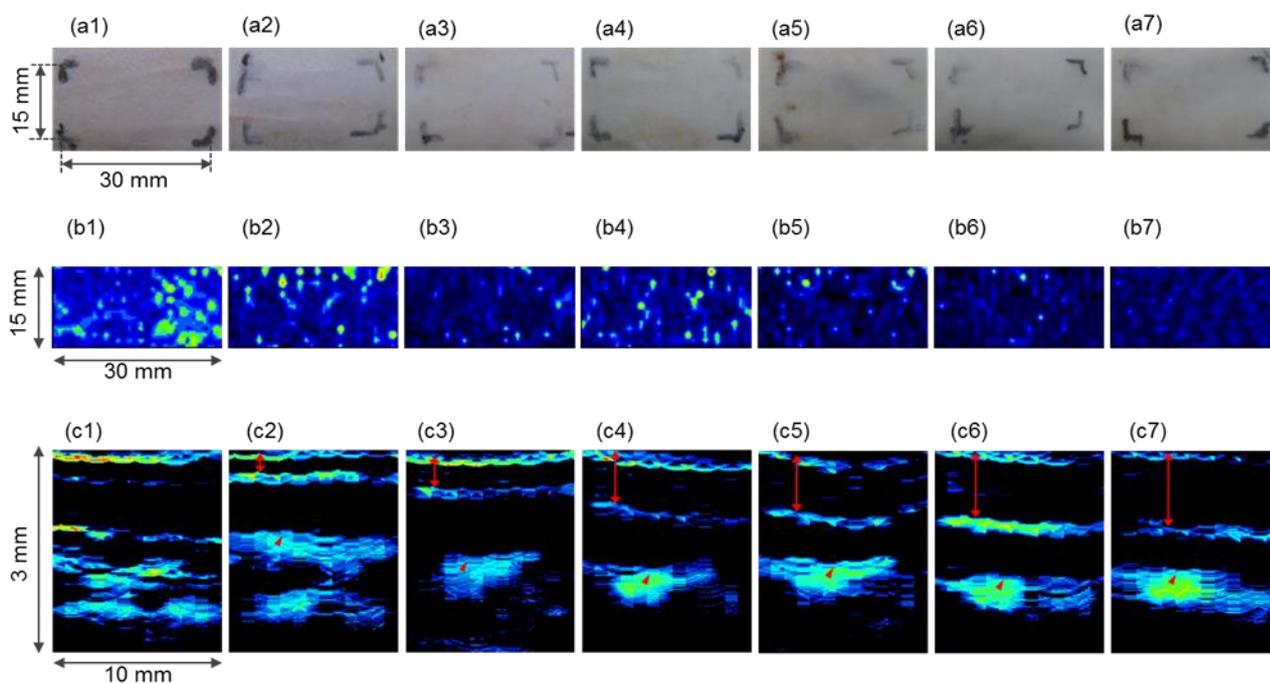


図 4-2. 健常皮膚と熱傷作製の各温度に対するラットの測定部位写真((a1)-(a7)), レーザードップラー血流イメージング画像((b1)-(b7)), および超音響画像((c1)-(c7)).

図 4-3 は、図 4-2 に示す各熱傷部位の組織を HE 染色した断層顕微画像である。矢印は、浅部位における生存血管を示す。図 4-3(a)(70°C)では、表皮と皮膚付属器のみが損傷しているが、真皮の、コラーゲン繊維の複雑な編目模様の大部分は残存している。外観観察から判断すると、この熱傷は浅達性Ⅱ度熱傷に判別される。図 4-3 (d)(88°C), (e)(93°C), および(f) (98°C)について、表皮および真皮の上部 3 分の 2 が損傷している。真皮の損傷部位では好酸球の増加と、コラーゲン繊維の溶解が認められる。しかしながら、真皮の下部 3 分の 1 の部位では、大部分の領域でコラーゲン繊維の網目模様が残存している。このことから、これらの熱傷は深達性Ⅱ度熱傷と判定される。78°Cおよび 83°Cの熱傷は浅達性Ⅱ度熱傷から深達性Ⅱ度熱傷への遷移的な特性を示している。

図 4-3 において矢印で示した生存血管は、超音響イメージング、やレーザードップラー血流イメージングの信号源となっており、表面信号とこれらの信号の深度の距離が熱傷深度を表していると考えられる。また、組織標本画像において生存している血管の深さは、スケールバーから読み取ることができる。

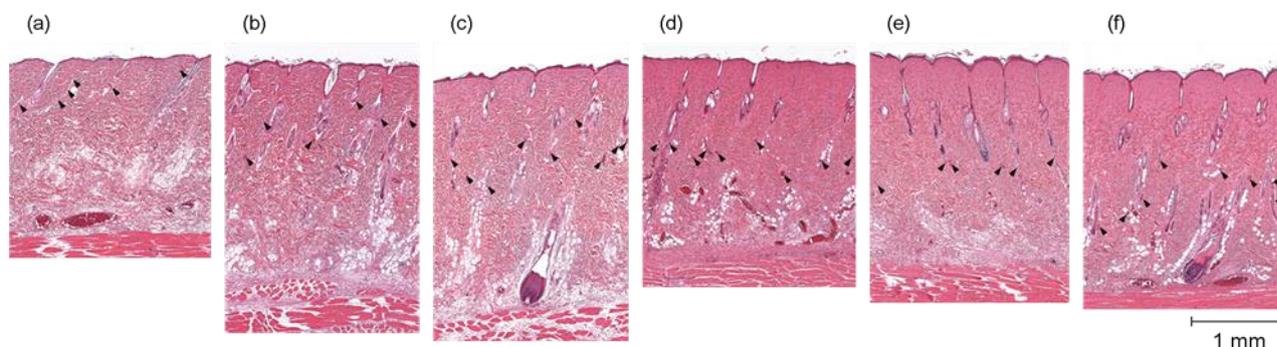


図 4-3. 各熱傷モデルの創部組織標本画像(HE 染色)

図 4-4(a)に熱傷作製温度と生存した血管の深さの依存関係を示す。それぞれの温度に対して 6 匹のラットを測定しており、合計 36 匹のラット熱傷モデルのデータとなる。熱傷作製温度の増加に対応して、生存した血管の深度も線形的に増加している。決定係数( $R^2$ )は 0.86 であり、相関係数( $R$ )は 0.93( $p=0.00$ )である。この結果から、本実験で用いたラット熱傷モデルは、超音響イメージングとレーザードップラー血流イメージングの 2 つの手法による診断特性の試験に有効であることが示された。図 4-4(b)と(c)には、4 匹のラット

熱傷モデルの作製温度に対する，光音響イメージングにおける第1と第2信号ピークの距離およびレーザードップラー血流イメージングにおける Perfusion value の変化を示す．光音響イメージングの  $R^2$  と  $R$  はそれぞれ 0.95 と 0.97 であるのに対して，レーザードップラー血流イメージングでの  $R^2$  と  $R$  はそれぞれ 0.62 と -0.79 である．

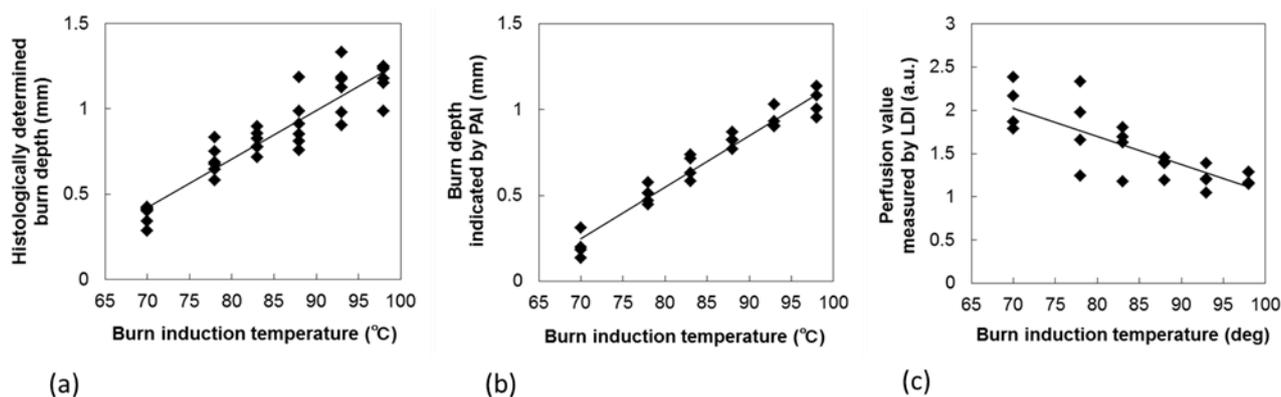


図 4-4. 熱傷作製温度と組織標本から見積もった熱傷深度の関係(a),  
熱傷作製温度と光音響信号から見積もった熱傷深度の関係(b),  
熱傷作製温度と Perfusion Value の関係(c) ((a): N=6, (b),(c): N=4)

図 4-5 は，各手法によって推定した熱傷深度と組織標本を解析することによって推定した生存血管の深度との関係を示す．光音響法およびレーザードップラー法の  $R^2$  と  $R$  は，それぞれ  $R^2$ 0.83，と 0.91 ，および 0.52 と， -0.73 である．よって，光音響法から推定した熱傷深度は，組織標本からのそれとより高い相関を示している．特に，図 4.5(a)1 に示すように，光音響法では熱傷深度の評価値は熱傷作製温度の増加に対して線形的に増加しており，かつ誤差が非常に小さい値となっている．一方，図 4.5(b)よりレーザードップラー法では，Perfusion value は大きく変動しており，かつ 88°C以上の熱傷作成温度では相関が低く熱傷深度を正確に測定できていない．

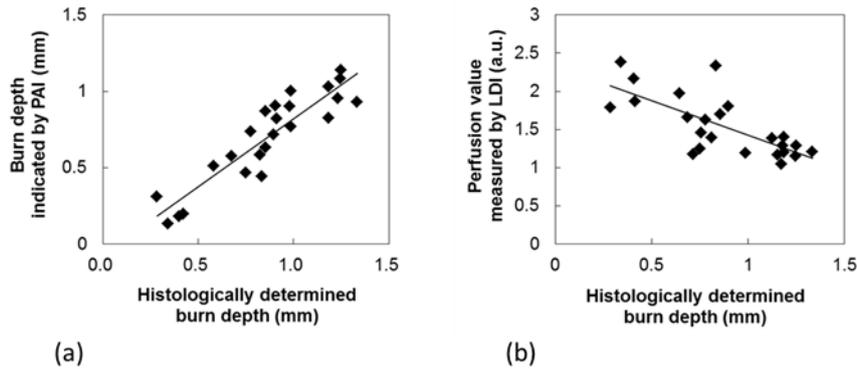


図 4-5. 光音響信号から推定した熱傷深度と組織標本解析による熱傷深度の関係(a),  
Perfusion Value と組織標本解析による熱傷深度の関係(b) (N=4)

#### 4.5 考察

光音響イメージングから評価した熱傷深度と、組織標本から決定した損傷深度との高い相関は、光音響イメージング法による熱傷深度診断の正確性を示している。光音響イメージング法においては、光の吸収によって発生した超音波がその減衰が小さい特性により組織中を減衰なく伝搬することから、組織の深部に存在する血管を高コントラストで撮像でき、優れた深さ分解能を得ることができることが特徴である。前章で報告したとおり、本実験で使用したシステムの性能試験では、ファントム中の深さ約 5 mm の吸収体をはっきりと確認することができたため、ヒトを対象とする診断に本システムが適用可能であると考えられる。レーザードップラー法や光 CT 法などの光学イメージング手法では、このような深部の血管を深さ情報と共に撮像することは困難である。

レーザードップラー血流イメージング法から得られた血流量を示す **Perfusion value** は、組織標本から決定した熱傷深度との相関は低いことが明示された。これは、レーザードップラー血流イメージングで使用する光の侵達長が低いためであると考えられる。すなわち、レーザードップラー血流イメージングでは血流で発生する光のドップラーシフトを検出するが、入射光と、検出光ともに組織を伝搬する際に減衰される。これが原因で、高い温度で作製した深い熱傷において、測定された **Perfusion value** の感度が低かったと考えられる。全ての測定モデルにおいて **Perfusion value** の値は大きく変動しているが、これは測定した血流速度が時間的に変化しているためと考えられる。

図 4-3 の 88°C, 93°C, および 98°C で作製した熱傷は, 組織標本によって深達性 II 度熱傷に分類された. しかしながら, 図 4-4(a) に示すように損傷深度は作製温度とともに増加する. 超音響イメージング法による熱傷深度診断への有効性を最初に示した研究では, 深達性 II 度と III 度の熱傷はそれぞれ 78°C と, 98°C で作製していたが, 本研究のそれとは条件が異なる. [11] これは, ラットの週齢や, 体重などが異なるため, 皮膚の厚さが異なることによって生じたと考えられる. すなわち, 過去の研究ではラットの皮膚の厚さは 0.5 mm であったが, 本研究で用いたラットの皮膚の厚さは 1 mm 以上であったため, 深達性 II 度熱傷を作製するためにはより高温にする必要があったと考えられる. このことから超音響イメージングによる熱傷診断においては皮膚の厚み情報が必要であることを示唆している. 図 4-2 の矢頭で示す, 皮膚と筋肉か皮下組織のとの境界に存在する血液から発生する信号を利用して皮膚の厚さを測定可能である.

熱傷部位の 3 層組織では, 浅部から深部にかけて凝固壊死層(zone of coagulation), 血行停止層(zone of stasis) が形成されその周囲に生存細胞と拡張した血管が存在する血管拡張層(zone of hyperemia) が形成されることが知られており, 凝固壊死層および血行停止層までが熱傷深度と考えられる. [34] 血管拡張層では充血により超音響信号の振幅は増加するため, 本研究では充血領域からは 2 番目強さの超音響信号が観察された. しかしながら, 血流遮断領域に残存する血液からも超音響信号が発生するため, 充血で発生したそれと分離する必要がある. 血流遮断領域の血液の酸素飽和度が減少することを利用して, 複数の波長を有する照射光による超音響イメージング法を用いて酸素飽和度の分布を可視化することにより, 血流遮断領域の判定が可能と考えられる. 本研究では, 単波長の光源を用いたシステムで測定を行ったが, 測定結果から分かる通り熱傷深度診断への有効性は確認された.

## 4.6 まとめ

本章では, 我々が開発した超音響イメージング・システムの熱傷深度診断における正確性を実証するために, 6 条件で作製したラット熱傷モデルによる超音響イメージング法に得られた深度と, それらの組織標本の観察によって得られた深度とを比較した. さらに,

熱傷深度測定の研究報告されているレーザードップラー血流イメージング・システムによって測定された熱傷深度との比較を行なったところ、光音響イメージング・システムで測定した結果の方が、組織標本から決定した熱傷深度に対してより高い相関性を有することが明示された。熱傷作製温度が高い（熱傷深度が深い）モデルにおいては、レーザードップラー血流イメージング法の測定値の変動が大きいことに対し、光音響イメージング法の測定値のそれは熱傷深度に依存しないことが示された。この結果は、光の吸収に基づいて高いコントラストが得られ、信号が超音波であるため高効率の伝搬特性を有する光音響イメージングの特徴によるものと考えられる。臨床応用においては、ラット皮膚よりもヒトの皮膚の方が厚いため、光音響イメージングによる熱傷深度診断が有効であることが実証された。次章では、光音響イメージング・システムの応用拡大のため、広範囲熱傷に対して行なわれる皮膚移植の生着モニタリングについて検証を行う。

## 第 5 章

### 移植皮膚生着診断への応用

## 5.1 はじめに

重症熱傷において皮膚の自然治癒が困難な場合、創部の感染からの保護や、治癒の促進を目的に皮膚移植が行われる。[53] 皮膚移植は、同一個体から移植する自家移植、同じ種の個体間で移植を行う同種移植、そしてウシやブタの腱由来のコラーゲンを用いた人工真皮移植[54] の3種類に分類される。

広範囲熱傷に対しては、自家移植が望まれるものの、採皮部が限られるときに同種移植が行われる場合がある。自家移植はほぼ生着するが、同種移植は一時的に生着するものの拒絶反応により脱落することが知られている。[55] 自家移植といえども、移植部位の状態や、移植皮膚の状態によっては生着しないこともある。したがって、移植後の部位について生着の状態をモニタリングすることは、皮膚移植治療において重要である。一般的には、移植後の生着モニタリングは肉眼による観察によって行なわれており、定量的に評価する方法は確立していない。

光音響イメージング法の皮膚移植の生着モニタリングへの応用については、図 5-1 に示すように移植皮膚内の新生血管もしくは肉芽組織由来の光音響信号を検出することで、移植皮膚の生着過程を早期にモニタリングできることが報告されている。[14]。しかし既存研究では、光照射部と超音波検出部は単一素子を用いているため、実時間イメージングは実現できておらず、さらには最大測定深度が 1.5 mm 程度に限定されているため臨床応用には課題があった。

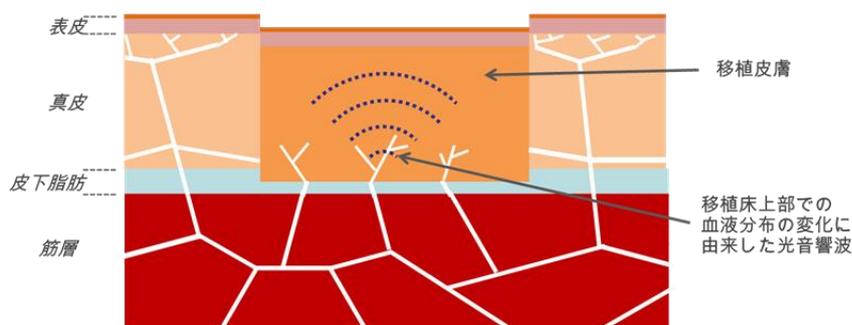


図 5-1. 光音響イメージング法による移植皮膚生着モニタリングの原理

前章まで述べてきたように、我々は、熱傷深度診断に向けて開発した実時間光音響イメ

ージング・システムの有効性を実証してきた。本章では、同我実時間光音響イメージング・システムの移植皮膚の生着モニタリングへの応用について、実験的に検証した結果について述べる。ラット自家皮膚移植モデルならびに同種皮膚移植モデルについて、移植皮膚の生着過程をモニタリングし、それらの差異について検討することにより、システムの生着モニタリングへの応用の可能性を示すことを目的とした。

## 5.2 実験方法

10 週齢オスの SD(Sprague-Dawley)ラットの背部を剃毛・除毛し、2ヶ所から 2 cm x 2 cm の皮膚を採皮し、皮下脂肪を除去して移植片とした。自家移植の場合は同一個体からの 2 枚の移植片の場所を入れ替え移植し、同種移植の場合は 2 匹の個体からの移植片を個体間で交換して移植した。移植片は、四隅および各辺を 3 箇所ずつ、計 16 箇所を縫合した。移植皮膚に対して、移植 3 時間後、6 時間後、10 時間後、1 日後、2 日後、および 4 日後にデジタルカメラによる明視野像の撮影および光音響イメージング・システムによる撮像を行なった。経過時間ごとに組織の血管内皮細胞を生検観察するため、CD31 抗体 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1)) による染色標本を作製した。

使用した光音響イメージング装置は、2 章で述べた装置と同じである。測定精度を向上させるために、4 章で述べた実験と同様にアベレーシング数 100 回で測定を行った。

## 5.3 実験結果

図 5-2 と図 5-3 にそれぞれ、自家皮膚移植モデルの移植部の明視野像および光音響画像と、対応する CD31 染色画像の経時変化 (3 時間、6 時間、10 時間、1 日、2 日、および 4 日後) を示す。なお、各時間で計測後に生検観察を行っているため、画像ごとに個体が異なる。図 5-2 の外観写真においては、(a1) 3 時間後、(b1) 6 時間後、(c1) 10 時間後および (d1) 1 日後に比べて、(e1)2 日後と(f1)4 日後はやや赤みを帯びているものの、これらの変化から生着を判定することは困難である。光音響画像においては、青、緑、黄、赤の順に信号振幅が増加していることを示す。第 3 章と、第 4 章の結果と同様に、皮膚表面には角質や汚れに由来する比較的強い信号が発生している。一方、深さ 1 mm 付近には、

移植床の血液に由来する信号が観測される。したがって、表面信号と移植床の信号の間の空間が移植皮膚(真皮)に対応する。(a2)3 時間後では移植皮膚内に信号は観測されないが、早くも(b2)6 時間後および(c2)10 時間後には白矢頭に示されるように信号が観測され、血行が再開したことを示している。(d2) 1 日後、(e2) 2 日後および (f2) 4 日後では、同領域においてより多くの箇所でも信号が観測され、かつそれらの振幅も増加した。図には、(d3)1 日後、(e3)2 日後および(f3)4 日後の生検の状況も示した。1 日後には移植皮膚は筋膜と強く結合しており、剪刀による分離が必要であったことから、遅くともこの時点で移植皮膚は生着していると判定される。図 5-3 の CD31 染色画像では、(a)移植 3 時間と(b)6 時間後でも陽性細胞が散在的に見られるが、(c-f)10 時間後以降においては皮膚全層において陽性細胞の密度が増加し、真皮最上層においても明確である。

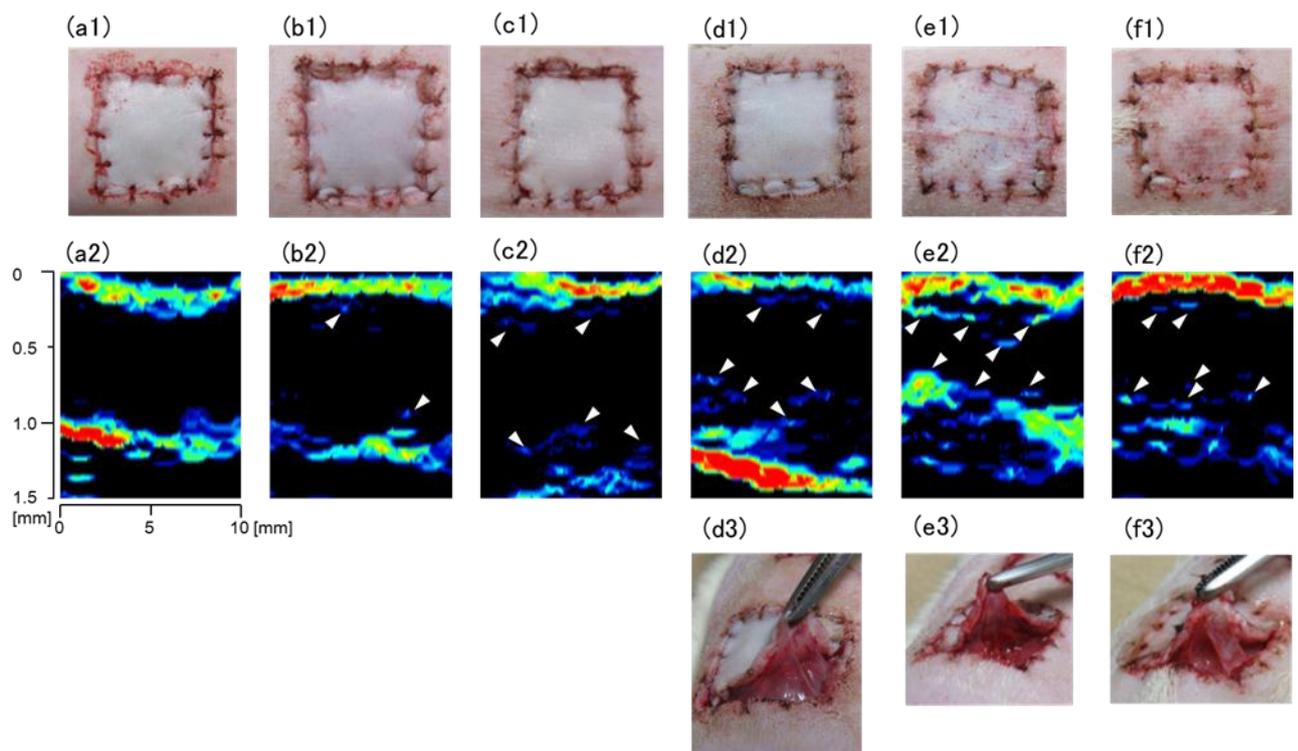


図 5-2. 自家皮膚移植モデルの移植後 3 時間(a), 6 時間(b), 10 時間(c), 1 日(d), 2 日(e), 4 日(f)の明視野像および光音響画像

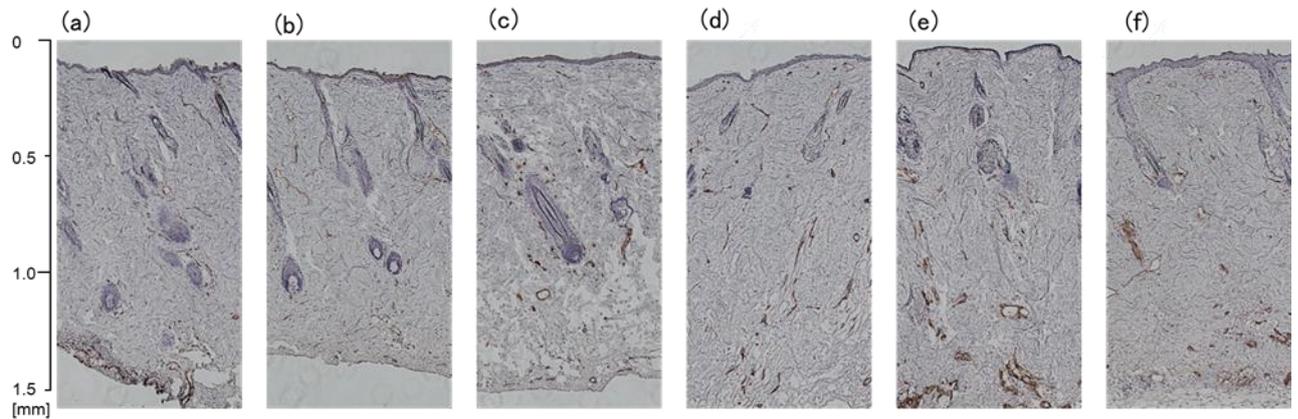


図 5-3. 自家皮膚移植モデルの移植後 3 時間(a), 6 時間(b), 10 時間(c), 1 日(d), 2 日(e), 4 日(f)の組織標本画像(CD31 染色)

次に図 5-4 と図 5-5 にそれぞれ，同種皮膚移植モデルの移植部位の明視野像および光音響画像と，それらに対応する CD31 染色画像の経時変化を示す．図 5-4 の明視野像より，(a1)3 時間後と(b1)6 時間後に比べ，(c1-f1) 10 時間後以降は黄色から赤みを帯びており，時間の経過とともに変色が目立ってくる．しかしながら，自家皮膚移植モデルの場合と同様，外観より移植皮膚内部の状況を把握することは困難である．一方，光音響画像では，自家皮膚移植モデルの場合と同様に，(b2)6 時間後と(c2)10 時間後には移植皮膚の領域に信号が現れ血行が再開したことを示すが（白矢頭），移植 1 日後以降(d2, e2, f2)では信号の振幅が低下する傾向が認められた．図には，(d3)1, (e3)2, (f3)4 日後の生検の状況も示した．1 日後には移植皮膚は筋膜と強く結合していたが，2 日後および 4 日後において移植皮膚は鑷子で容易にはがれ，生着不良であった．図 5-5 の CD31 染色結果では，(a-c)3～10 時間後では自家皮膚移植の場合と大きな相違は観測されず，(a)3 時間後と(b)6 時間後に散在的に観察されるが，(c)10 時間後から(e)2 日後でも CD31 陽性血管数は増加せず，特に(f)4 日後でも真皮表層の 3 分の 1 程度の領域で明瞭な陽性細胞は観察されなかった．

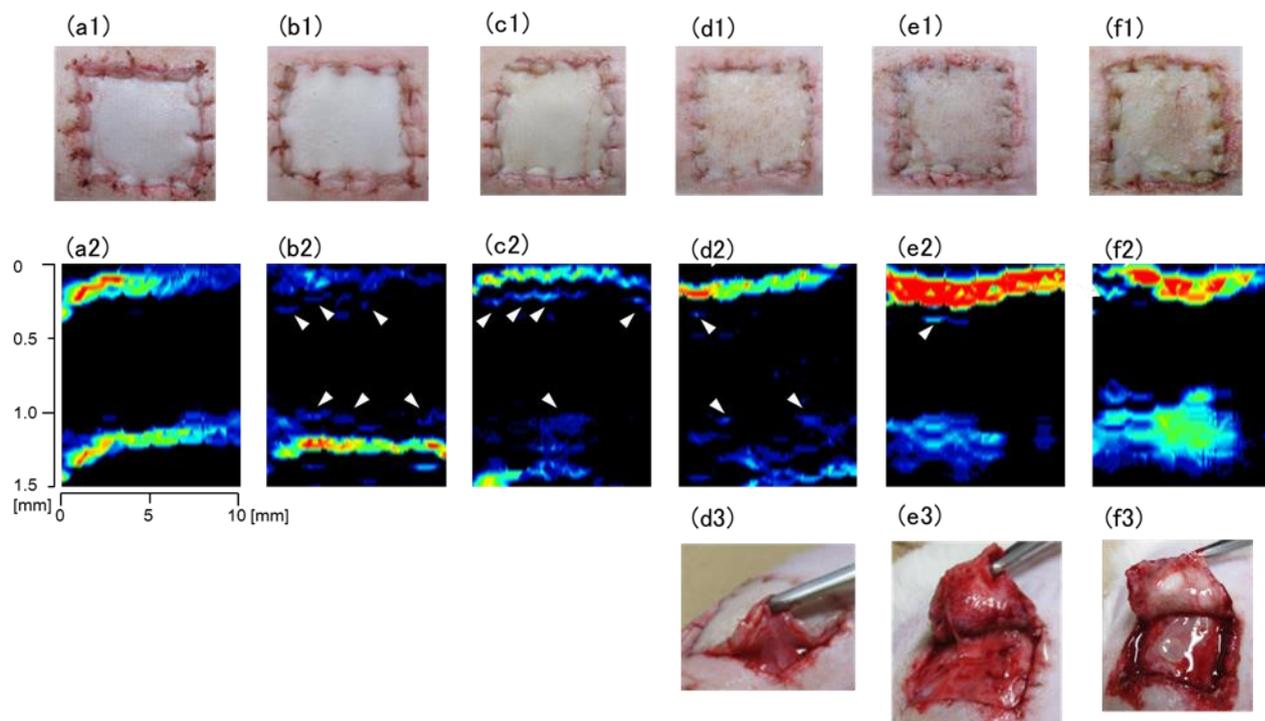


図 5-4. 同種皮膚移植モデルの移植後 3 時間(a), 6 時間(b), 10 時間(c), 1 日(d), 2 日(e), 4 日(f)の明視野像および光音響画像

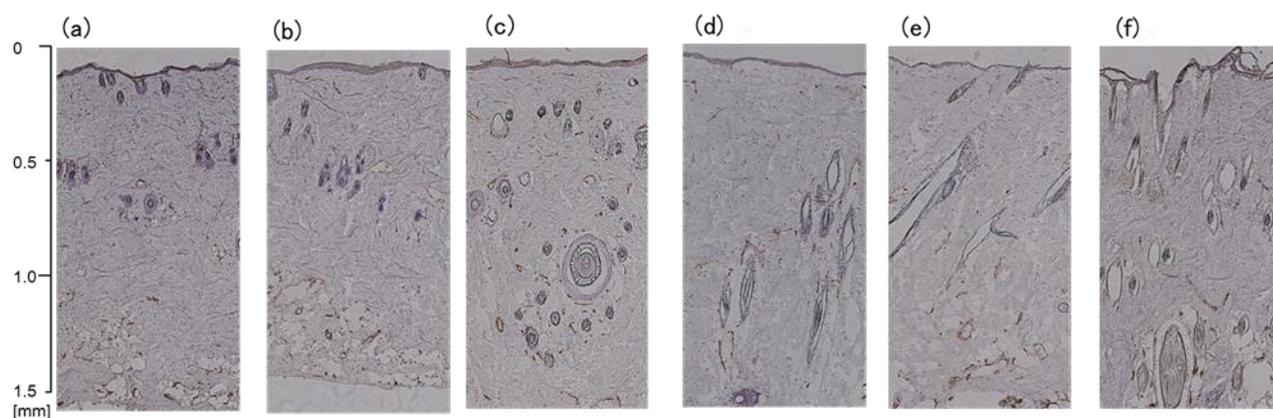


図 5-5. 同種皮膚移植モデルの移植後 3 時間(a), 6 時間(b), 10 時間(c), 1 日(d), 2 日(e), 4 日(f)の明視野像および組織標本画像(CD31 染色)

図 5-6 は、図 5-2 と図 5-4 の光音響画像において表面信号と移植床の信号との間の領域で、かつ表面信号から深度 0.5mm までにおける光音響信号の振幅積算値を示す。この振幅積算値が高いほど、血液由来の信号が強く、したがって血行が回復していることを表す。

自家移植皮膚の信号振幅積算値は移植 10 時間後から 1 日後にかけて急増したのに対し、同種移植皮膚の信号振幅積算値は移植 1 日後以降減少傾向を示した。両者についてノンパラメトリック検定のマン・ホイットニーの U 検定を行い有意性について検証した。マン・ホイットニーの U 検定は、様々な測定値について 2 群間の比較が可能であり、群の標本数に制限がないといった特徴があるが、2 群の比較にしか使用できず、両側検定(差があるという予測はできるがどちら側かは分からない)という制限もある。[56] [57] U 検定は 2 群を混ぜたときのサンプルの順位と群を比較する検定である。p 値は検定で算出される値であり、この p 値が小さい場合 2 群間に「差がある」という意味となる(2 群間に偶然大きな差があるサンプルが観測される確率が p 値である)。あらかじめ、有意水準差を決めておき、算出した p 値がこの値よりも小さな値の場合、2 群間に「有意な差がある」という結論が得られる。一般的に有意水準差は 5%(0.05)とすることが多いため、本実験でも有意水準差を 0.05 として検定を行った。自家移植皮膚片と、同種移植皮膚片の光音響信号の積算値に対してマン・ホイットニーの U 検定を行ったところ、1 日後と 4 日後の p 値が 0.05 以下となったため、有意差が認められた。

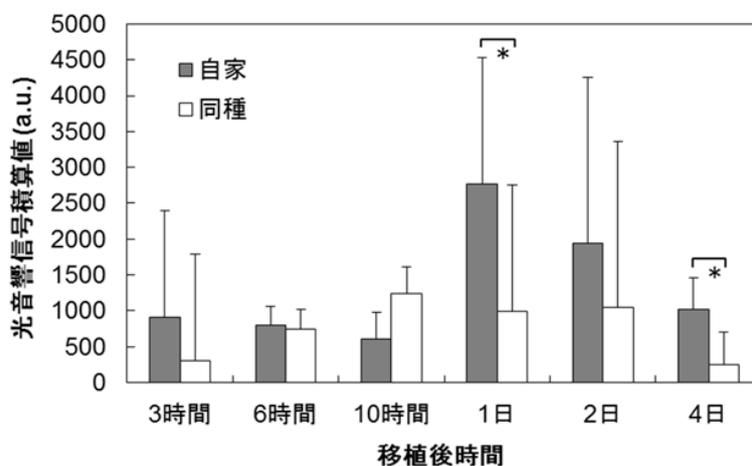


図 5-6. 自家皮膚移植モデルと同種皮膚移植モデルの皮下 0.5 mm 範囲の光音響信号の振幅積算値(N=4)

## 5.4 考察

光音響画像は、血液の深さ分布を表す。したがって、図 5-2 の自家皮膚移植と図 5-4 の

同種皮膚移植の真皮内の信号を比較すると、移植 10 時間後まではいずれの場合も漸増し血行の回復を示した。その後、自家皮膚移植が増加傾向を保持するが、同種皮膚移植では減少に転じ 4 日後ではほぼ信号が観測されなかった。このことは、同種皮膚でも移植直後には生着に向かうが、その後脱落に転ずることを示している。図 5-4 に示すように、生検の状況をもても、同種皮膚移植の(d3)1 日後では移植皮膚と筋膜が結合していたが、(e3)と(f4)では結合が観察されなかった。さらに、図 5-6 に示すように、各モデルの移植 4 部位の信号振幅積算値も同様の傾向を示した。これらは音響信号に基づき移植皮膚生着のモニタリングが可能であることを示している。

CD31 は血管内皮細胞に存在する細胞表面タンパク質で、細胞接着分子として機能する(血管新生時に血管内皮細胞間の相互作用における重要な役割を担っている)。図 5-3(a1)と図 5-5(a1)に示す移植 3 時間後の CD31 染色画像より、いずれのモデルにおいても皮膚全層において陽性細胞が存在するが、図 5-2(a2)と図 5-4(a 2)に示す光音響画像では信号が認められない。これは、この時間帯においては移植皮膚中の血管内皮細胞が保持されているため CD31 陽性を示すものの、血流自体は回復していないことを示していると考えられる。自家移植皮膚については、その後真皮内の光音響信号の増加と対応して皮膚全層に CD31 陽性細胞が増加し、良好な血行回復をした。一方、同種移植皮膚においては、CD31 陽性細胞の増加は認められず、1 日後以降は減少傾向を示し、4 日後では真皮表層にほとんど CD31 陽性細胞が存在しなかった。これは、生着不良により血管内皮細胞が消失していく過程を示していると考えられ、光音響信号の減少とよく一致している。

## 5.5 まとめ

本章では、ラット自家皮膚移植と同種移植皮膚モデルを作製し、実時間光音響イメージング法による移植組織の生着モニタリングを試みた。光音響信号の振幅強度変化と CD31 染色組織画像との比較より、光音響信号が移植皮膚の移植床への結合状況をよく表していることが示された。まとめとして、我々が開発した光音響イメージング装置は、移植皮膚の生着モニタリングについても有効であることが実証された。

## 第 6 章

### 結論

## 6.1 はじめに

光音響イメージング法は、光の吸収体の吸収スペクトル特性と、超音波の生体組織における伝搬特性を利用した断層撮像法である。特に、生体の mm から cm 深さに分布するヘモグロビンの光の吸収スペクトル特性を利用して、組織内の血液の深さ情報を性格ともに画像化することができる。これは、既存の光、超音波や X 線などの単独の波動を利用する撮像技術では実現できない領域の新しい画像情報を臨床へ提供できることを意味する。光音響イメージング法についての多くの既存研究があるが、本研究では皮膚の外傷への応用として、熱傷に注目してその深度診断と、皮膚移植における生着モニタリングについて実証した。

## 6.2 総括

本研究による成果は以下の通りである。

### (1) 実時間光音響イメージング・システムの開発(第 2 章)

従来熱傷診断に用いられていた光音響イメージング・システムは、センサーが単素子で構成されていたため、実時間測定ができず、また感度不足により測定深度が 1.5 mm に制限されていた。我々は、送受信機構を多素子化した、新規の実時間光音響イメージング・システムを開発し、その性能の評価を、まずファントムを用いて実証した。リニアアレイセンサーを開発し、発光部との配置を最適化することにより、高感度のシステムを実現した。また本システムは、撮像幅 10 mm で最大深度 5 mm までの信号を受信し、専用のシステムボードで高速画像処理を行うことで、最大 30 fps で断層画像として再構成できる。さらに小型のファイバーレーザーを採用することでシステムを小型化し、可搬型装置を実現した。ファントム実験では、最大深さ 4.5 mm の吸収体が画像化できること、ならびにその測定誤差が 140  $\mu\text{m}$  以内であることを確認した。ヒトの平均的最大の皮膚厚である 3 mm 以上の深さの吸収体を画像化できたことから、本研究で開発した光音響イメージング・システムの臨床応用の可能性を確認した。

### (2) 熱傷深度診断(第 3 章, 第 4 章)

健常皮膚と、浅達性Ⅱ度、深達性Ⅱ度、および深達性Ⅲ度のラット熱傷モデルを作製し、これらに対して、超音響イメージングと、生検した皮膚組織標本から評価した熱傷深度を比較することで、開発したシステムの熱傷深度診断への有効性を確認した。第3章では、超音響イメージングによって評価した熱傷深度と組織標本から得たそれとの誤差は100～200 μmであることについて述べた。第4章では、超音響イメージング・システムによる熱傷深度診断の正確性を確認するために、温度6条件で作製したラット熱傷モデルを用いて、超音響イメージングによる深度診断を行った結果について述べた。同時に、熱傷深度診断の研究が報告されているレーザードップラー血流イメージングによる深度診断を行い、両手法の測定結果と生検した皮膚組織標本との比較を行った。その結果、超音響イメージングで得られた熱傷深度は、レーザードップラー血流イメージングの Perfusion value よりも、組織標本から得た熱傷深度に対して相関が高いことを確認した。また熱傷作製温度の増加に対し、組織標本から得た熱傷深度は線形的に増加していることが確認され、超音響イメージングで得たそれも同様の変化を示すことを確認した。一方、レーザードップラー血流イメージングの測定結果では、熱傷深度が大きくなると変化が観測されなかった。以上の結果より、本研究で開発した超音響イメージング・システムは、熱傷皮膚の深部における熱傷の温度依存性と深部の血流遮断領域の撮像についても他の手法に比べて優位性を有することが実証された。

### (3) 熱傷治癒過程のモニタリング(第3章)

第3章では、熱傷深度診断以外の応用として、超音響イメージング・システムを用いて、ラット深達性Ⅱ度熱傷モデルの、受傷後の治癒過程のモニタリングを行った。実験においては、受傷1日、3日および5日後に超音響イメージングした結果と生検した組織標本との比較を行った。標本組織からは、受傷後の日数が増加すると、真皮上部において血管構造が増加することが確認された。これは、熱傷の治癒過程において血流が再開していることを示す。一方、それに対応する超音響イメージングの測定結果においても、血流遮断領域内に超音響信号が現れ、その振幅と密度が受傷後日数の経過に伴い増加す

ることを確認した。以上の研究によって、本研究で開発した超音響イメージング・システムは、熱傷の治癒過程モニタリングにも応用が可能であることが示された。

#### (4) 移植皮膚生着過程のモニタリング(第5章)

第5章では、ラット自家および、同種皮膚移植モデルを作製し、移植された皮膚の生着過程を超音響イメージング・システムで評価した結果について述べた。移植後3時間、6時間、10時間、1日、2日、および4日で測定部位を超音響イメージング画像で評価するとともに、生検して組織標本画像との比較を行った。移植して1日後までは、自家および同種皮膚移植モデルともに移植片内に超音響信号の増加を確認し、それらは組織標本の解析結果と一致した。移植して2日後以降では、自家皮膚移植モデルでは移植片内に超音響信号が確認されたのに対し、同種皮膚移植モデルでは超音響信号の減少が観測された。生検時、同種皮膚移植モデルでは移植片が容易に剥がれ、免疫反応による脱落の前兆と判断された。測定したラット全数について、移植片内深さ0.5 mmの領域の超音響信号の振幅積算値を算出し、その経過時間依存性を解析したところ、振幅積算値は同種皮膚移植モデルでは移植して1日後以降自家皮膚移植モデルよりも減少し、1日後と4日後において両者に有意差が認められた。以上の結果より、超音響イメージングを用いると、肉眼による観察では判断できない、生着と脱落の兆候を判断できる可能性があることが示された。

以上総括すると、本研究では、実時間超音響イメージング・システムを開発し、ラット熱傷モデルを用いて、熱傷深度診断、熱傷治癒過程のモニタリング、および移植皮膚の生着モニタリングの有用性を実証した。各実験の結果は、生検した組織標本を用いた解析結果とよく一致しており、本システムによる超音響イメージングならびに測定の有効性が確認された。開発したシステムは、光照射エネルギー密度がヒトの診断に使用する安全基準を満たし、ヒトの平均的最大の皮膚厚である3 mmより大きい深さ5 mmの領域をも実時間で撮像できる。以上より、本システムによる臨床研究への応用が現実的になったと考えられる。

### 6.3 今後の展望

光音響イメージング法は、2000年代に入ってから世界中で急速に研究開発が進められており多くの臨床研究が行われているが、2015年の時点で医療機器として承認されている装置はない。国外の数社から動物実験用や理科学機器として装置が販売されているのみである。[58] [59] [60] 本研究で開発した実時間光音響イメージング・システムを、外傷診断を目的とした医療機器として幅広く医療現場で使用するにあたっての課題を以下に述べる。

#### (1) 深さ方向分解能の向上

本研究で示した光音響画像では、ラット皮膚の表面信号と真皮上部の血管由来の信号が分解できていない。ヒトの場合、表皮下部には血液と同様の光音響信号を発生するメラニンが分布するメラノサイトが存在することもあり、ヒト真皮上部の血管を画像化するには分解能が不足している。分解能を向上させるために、センサーの中心周波数を高周波数化が考えられるが、一方では高周波数の超音波では減衰率が増加するため、受信信号のSN比が低下する。最近の研究では、広帯域の受信センサーを用いて、この問題を解決しようとする研究例がある。[61] 本研究では繰返し周波数 500 Hz の光源を用いていたが、繰返し周波数を下げると皮膚の安全基準を満たす1パルスあたりの光照射エネルギーの上限は高くなる。そのため、光源の仕様を変更し繰返し周波数を下げて1パルスあたりの光照射エネルギーを上げることで受信信号のSN比の向上が期待でき、高周波のセンサーを使用できる可能性がある。

#### (2) 多波長イメージング

ヘモグロビンの吸収スペクトルに従って光源の波長を複数化することによって、酸素化ヘモグロビン、と脱酸素化ヘモグロビンの割合から酸素飽和度を検出することが可能である。[62] これにより、動脈と、静脈を判別することが可能となる。測定対象において、うっ血や充血かの診断、動脈か静脈かの診断が必要な場合は有効である。技術的な課題としては、多波長に対応したレーザーが必要となる。一般的にはOPO(Optical

Parametric Oscillator)などの波長可変レーザーが用いられるが、波長を可変するのに時間がかかるため同時撮像に問題がある。そのため、複数の光源を使用することが考えられる。複数の光源を用いると、レーザーの光出力の差異がそれぞれの波長の光音響信号の強度に影響するが、出力をモニタし装置側にフィードバックする機構を設けることにより、本研究で開発したシステムにおいても、多波長イメージングが可能となる。ただし、システムの価格は光源が支配項であるため、多波長光音響イメージング・システムの対費用効果を検討する必要がある。

高出力のナノ秒パルスレーザー光源の市販価格は数百万円台と高額である。2010年頃は市販価格500万円以上の大型のNd:YAGレーザーのみであったが、近年では小型のナノ秒パルスレーザーも市場に流通している。[63] また、低価格な、小型光源としてLD(Laser Diode)を光源に使用した研究も行われている。[64] 現段階では、光照射エネルギー密度が小さいため光音響信号のSN比が低く生体深部のイメージング応用には至っていないが、将来光音響イメージングに応用可能な高出力のLDが生み出されれば、低価格な多波長イメージングのシステムが実現可能であると考えられる。

### (3) 水平方向への分解能向上

本研究で開発したシステムは実時間の撮像と画像再構成、深さ方向分解能の向上、および測定深度の増加に注力して開発したため、横方向の分解能は既存システムに比べ向上していない。本システムでは、センサー間の距離が1.6 mmピッチであることを考慮すると横方向の分解能は1~2 mm程度である。熱傷や皮膚移植など血流遮断が伴う疾患については現状のシステムの横方向分解能で必要条件を満たしているが、血管のごく近傍で発生する変化については解像できないと考えられる。肥厚性瘢痕やケロイドの治療においては、レーザーを用いて血管を破壊する治療が行われる。[65] 水平方向への分解能の向上を図ることで、このような治療効果を測定することが可能と考えられ、外傷診断の応用範囲の拡大が期待できる。

横方向の分解能を向上させる手段として、アレイセンサー中のセンサー素子数を増やすことによって、位相整合による分解能の向上を行うことが考えられる。[66] その場合、システム内のチャンネル数の増加を増加させることで対応可能である。

光音響イメージング・システムを臨床現場にて種々の疾患に対して誰でも使いやすい簡便なシステムとして完成させるためには、解決すべき課題がある。一方では、多機能化を無制限にするとシステムコストは無限に増大し、延いては市場に受け入れられない可能性も否定できない。本研究では、我々が開発した光音響イメージング・システムを用いれば、真皮内部の血流遮断や血管新生を伴う疾患については既存のイメージング技術で取得不可能な情報を提供可能であり、十分に臨床応用が可能であることを示した。この新しい技術を実際に利用可能な疾患対象に適応し、臨床診断の実績を蓄積することが必定である。さらに、光 CT、超音波エコー、ならびに X 線 CT などの臨床医療機器と同様に、医療画像技術として新たな付加価値を提供できる新しい外傷診断技術としての地位を確立できることを期待している。



## 本論文に関する研究業績

### 学術論文

- [1] Taiichiro Ida, Yasushi Kawaguchi, Satoko Kawauchi, Keiichi Iwaya, Hitoshi Tsuda, Daizoh Saitoh, Shunichi Sato, and Toshiaki Iwai, “Real-time photoacoustic imaging system for burn diagnosis,” *Journal of Biomedical Optics* 19(8):086013 (2014).
- [2] Taiichiro Ida, Hideaki Iwazaki, Yasushi Kawaguchi, Satoko Kawauchi, Tsuyako Ohkura, Keiichi Iwaya, Hitoshi Tsuda, Daizoh Saitoh, Shunichi Sato, and Toshiaki Iwai, “Burn depth assessments by photoacoustic imaging and laser Doppler imaging,” *Wound Repair and Regeneration* DOI: 10.1111/wrr.12374 (2015).
- [3] 伊田 泰一郎, 川口 康, 大倉 津矢子, 川内 聡子, 津田 均, 齋藤 大蔵, 佐藤 俊一, 岩井 俊昭, “リアルタイム光音響イメージング法による移植皮膚の生着モニタリング : ラット自家皮膚・同種皮膚移植モデルによる実験, ” *熱傷* 42(2) 掲載予定.
- [4] Taiichiro Ida, Yasushi Kawaguchi, Satoko Kawauchi, Keiichi Iwaya, Daizoh Saitoh, Shunichi Sato, and Toshiaki Iwai, “Real-time photoacoustic imaging system for clinical burn diagnosis,” *Proc. SPIE* 8581, Photons Plus Ultrasound: Imaging and Sensing, 858109 (2013).
- [5] Yasushi Kawaguchi, Hideaki Iwazaki, Taiichiro Ida, Taiji Nishi, Yukari Tanikawa, and Naotaka Nitta, “New polymer-based phantom for photoacoustic imaging,” *Proc. SPIE* 8945, Design and Performance Validation of Phantoms Used in Conjunction with Optical Measurement of Tissue VI, 89450A (2014).

### 口頭発表

- [1] 伊田泰一郎, 保坂智也, 川口康, 齋藤大蔵, 川内聡子, 佐藤俊一, “リアルタイム光音響イメージング法による熱傷診断, ” 日本超音波医学会第 85 回学術集会, 東京, 2012 年 5 月.

- [2] 川内聡子, 伊田泰一郎, 保坂智也, 川口康, 苗代弘, 佐藤俊一, “ラット脳のリアルタイム光音響イメージング：低酸素に対する血行動態変化の観測,” 第 51 回日本生体医工学会大会, 福岡, 2012 年 5 月.
- [3] Taiichiro Ida, Yasushi Kawaguchi, Satoko Kawauchi, Keiichi Iwaya, Daizoh Saitoh, Shunichi Sato, and Toshiaki Iwai, “Real-time photoacoustic imaging system for clinical burn diagnosis,” SPIE Photonics West 2012 Biomedical Optics (BiOS 2012), San Francisco, USA (January, 2012).
- [4] Satoko Kawauchi, Hideaki Iwazaki, Taiichiro Ida, Tomoya Hosaka, Yasushi Kawaguchi, Hiroshi Nawashiro, and Shunichi Sato “Real-time photoacoustic imaging of rat deep brain: hemodynamic responses to hypoxia,” SPIE Photonics West 2012 Biomedical Optics (BiOS 2012), San Francisco, USA (January, 2012).
- [5] 伊田泰一郎, 保坂智也, 川口康, 塚原直哉, 桜井孝夫, 増田伸, 岩屋啓一, 川内聡子, 齋藤大蔵, 佐藤俊一, 岩井俊昭, “光超音波イメージングによるリアルタイム熱傷深度診断,” 第 39 日本熱傷学会総会・学術集会, 名護, 2013 年 6 月.
- [6] 伊田泰一郎, 保坂智也, 川口康, 岩屋啓一, 川内聡子, 津田均, 齋藤大蔵, 佐藤俊一, 岩井俊昭, “光超音波イメージングによる移植皮膚生着診断,” 第 12 回日本組織移植学会総会・学術集会, さいたま, 2013 年 8 月.
- [7] 伊田泰一郎, 保坂智也, 川口康, 岩屋啓一, 川内聡子, 津田均, 齋藤大蔵, 佐藤俊一, 岩井俊昭, “光超音波イメージングによる熱傷深度診断” 第 12 回日本組織移植学会総会・学術集会, さいたま, 2013 年 8 月.
- [8] 伊田泰一郎, 保坂智也, 川口康, 塚原直哉, 桜井孝夫, 増田伸, 川内聡子, 岩屋啓一, 津田均, 齋藤大蔵, 佐藤俊一, 岩井俊昭, “光超音波イメージングによる移植皮膚生着過程のモニタリング” 第 43 回日本創傷治癒学会, 大分, 2013 年 11 月.
- [9] 伊田泰一郎, 保坂智也, 川口康, 塚原直哉, 桜井孝夫, 増田伸, 岩屋啓一, 津田均, 川内聡子, 齋藤大蔵, 佐藤俊一, 岩井俊昭, “リアルタイム光超音波イメージング・システムの熱傷および移植皮膚診断への応用,” 平成 25 年度 第 4 回 光超音波画像研究会, つくば, 2014 年 1 月.

- [10] Yasushi Kawaguchi, Hideaki Iwazaki, Taiichiro Ida, Taiji Nishi, Yukari Tanikawa, and Naotaka Nitta, “New polymer-based phantom for photoacoustic imaging,” SPIE Photonics West 2014 Biomedical Optics (BiOS 2014), San Francisco, USA (February, 2014).
- [11] 岩崎秀明, 伊田泰一郎, 川口康, 岩屋啓一, 津田均, 川内聡子, 齋藤大蔵, 佐藤俊一, “光超音波イメージングによる人工真皮生着過程のモニタリング” 第40回日本熱傷学会総会・学術集会, さいたま, 2014年6月.
- [12] Hideaki Iwazaki, Taiichiro Ida, Yasushi Kawaguchi, Keiichi Iwaya, Hitoshi Tsuda, Satoko Kawauchi, Daizoh Saitoh, and Shunichi Sato, “Real-time photoacoustic imaging grafted artificial dermis in rat burn models,” SPIE Photonics West 2015 Biomedical Optics (BiOS 2015), San Francisco, USA (February, 2015).
- [13] Taiichiro Ida, Yasushi Kawaguchi, and Shunichi Sato, “Portable, high-speed photoacoustic microscopy scanner for in vivo deep imaging of skin,” European Conferences on Biomedical Optics 2015 (ECBO 2015), Munich, Germany (June, 2015).
- [14] 伊田泰一郎. “皮膚深部の血管計測を目的とした光超音波イメージングシステム,” The 1st [ImPACT] Symposium on Photoacoustic Imaging and Bio-Medical Imaging for Vascular Health Science, 京都, 2016年1月.

## その他

- [1] 伊田泰一郎, “光超音波イメージング” OPTO NEWS 8(1), pp. 12-16 (2013).
- [2] 川口康, 伊田泰一郎, 川内聡子, 齋藤大蔵, 佐藤俊一, “光超音波イメージング：新たなモダリティ開拓への挑戦～光音響技術を誰でも使えるものに～,” 日本レーザー医学雑誌 33(4), pp. 374-379 (2013).
- [3] 川口康, 伊田泰一郎, 保坂智也, 岩崎秀明, “光超音波イメージング・システム,” 超音波テクノ, 25(4), pp. 98-102 (2013).

- [4] 伊田泰一郎, 川口康, 川内聡子, 岩屋啓一, 齋藤大蔵, 佐藤俊一, 岩井俊昭, “リアルタイム光超音波イメージング・システムによる熱傷深度診断,” ADVANTEST Probo No.41, pp. 24-29 (2014).
- [5] 川口康, 伊田泰一郎, 川内聡子, 齋藤大蔵, 佐藤俊一, “光超音波技術が拓く新たな世界,” BIO Clinica 30(2), pp. 69-75 (2015).

## 特許

- [1] “変換器および測定装置”, 特願 2010-221968, 特開 2012-75555.
- [2] “光音響波測定器”, 特願 2013-84516, 特開 2014-206474.
- [3] “光音響波測定装置, 方法, プログラム, 記録媒体”, 特願 2013-84519, 特開 2014-204868.
- [4] “光音響波測定器, 光音響波測定装置, 方法, プログラム, 記録媒体”, 特願 2013-84522, 特開 2014-206475.

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、主指導教員および主査として多大なご指導、ご助言をいただいた東京農工大学大学院生物システム応用科学府 教授 岩井俊昭先生に甚深なる謝意をさげます。

お忙しい中、本学位論文の副査をお務めいただき、ご指導賜りました東京農工大学大学院生物システム応用科学府 准教授 西舘 泉先生に厚く御礼申し上げます。

防衛医科大学校防衛医学研究センター情報誌システム研究部門 准教授 佐藤俊一先生には研究に関するご指導のみならず、研究に対する心構えや姿勢等多くの貴重なご助言を頂戴し、心より感謝申し上げます。また同研究部門 助教 川内聡子先生および大倉津矢子氏、防衛医科大学校防衛医学研究センター外傷研究部門 教授 齋藤大蔵先生および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 角井泰之氏には研究を進める上で様々なご助言をいただきました。心より感謝の意を表します。

また半導体テストシステムの開発の仕事に従事していた私に光音響イメージングという新しい分野での研究開発に導いていただいた、元株式会社アドバンテスト 甲元芳雄氏、川口康氏に心より御礼申し上げます。特に川口康氏には研究への取り組み方を一からご指導いただきました。初めてリアルタイムで光音響画像が取得できるようになった時の喜びは忘れられません。心より感謝致します。またシステムの実現のためにご協力いただきました 株式会社アドバンテスト 保坂智也氏、岩崎秀明氏、増田伸氏、桜井孝夫氏、塚原直哉氏に心より感謝の意を表します。

システムの開発には次の様々な方よりご助言、ご協力いただきました。株式会社ジャパンプローブ 馬場比路志氏、平野大輔氏、岩田典朗氏、株式会社デザインテック 李昌軍氏、齋藤克明氏、株式会社 ESS テック 神谷正人氏、株式会社マテリアルデザイン 西泰治氏、この場を借りて厚く御礼申し上げます。

また学業と会社での業務の両立のためにサポートいただきました 株式会社アドバンテスト 増田則之氏、里村裕明氏、宮島淳氏、佐藤浩行氏、田口星人氏、黒澤富央氏、芋川直氏、大室俊之氏、佐藤真生氏に心より感謝の意を表します。

最後に筆者の会社での業務と研究活動の両立を応援し支えてくれた，妻 悦子と二人の息子 隆之介，康士郎にこの場を借りて感謝の意を表します．

## 参考文献

- [1] 酒井 進吾, “第 2 世代干渉断層計技術 (FD-OCT) による皮膚内部構造の非侵襲的 3 次元観察,” 日本化粧品技術者会誌 42(2), pp. 81-88 (2008).
- [2] Pierce MC, Strasswimmer J, Park BH, Cense B, and de Boer JF, “Advances in optical coherence tomography imaging for dermatology,” J Invest Dermatol. 123(3), pp.458-63 (2004).
- [3] Eisenbeiss W, Marotz J, and Schrade JP, “Reflection-optical multispectral imaging method for objective determination of burn depth,” Burns. 25(8) pp. 697-704 (1999).
- [4] Still JM, Law EJ, Klavuhn KG, Island TC, and Holtz JZ, “Diagnosis of burn depth using laser-induced indocyanine green fluorescence: a preliminary clinical trial,” Burns. 27(4) pp. 364-371 (2001).
- [5] 清水 宏, あたらしい皮膚科学, (中山書店 , 2011).
- [6] Lee Y, Hwang K, “Skin thickness of Korean adults,” Surg Radiol Anat. 24(3-4), pp. 183-189 (2002).
- [7] Laurent A1, Mistretta F, Bottiglioli D, Dahel K, Goujon C, Nicolas JF, Hennino A, and Laurent PE, “Echographic measurement of skin thickness in adults by high frequency ultrasound to assess the appropriate microneedle length for intradermal delivery of vaccines,” Vaccine. 25(34), pp. 6423-6430 (2007).
- [8] Heijblom M, Piras D, Xia W, van Hespén JC, Klaase JM, van den Engh FM, van Leeuwen TG, Steenbergen W, and Manohar S, “Visualizing breast cancer using the Twente photoacoustic mammoscope: what do we learn from twelve new patient measurements?” Opt Express. 20(11), pp. 11582-11597 (2012).
- [9] Wang X, Roberts WW, Carson PL, Wood DP, and Fowlkes JB, “Photoacoustic tomography: a potential new tool for prostate cancer,” Biomed Opt Express. 1(4), pp. 1117-1126 (2010).
- [10] Yang JM, Maslov K, Yang HC, Zhou Q, Shung K.K, and Wang LV, “Photoacoustic Endoscopy,” Opt Lett. 34(10), pp. 1591–1593 (2009).
- [11] Sato S, Yamazaki M, Saitoh D, Tsuda H, Okada Y, Obara M, and Ashida H, “Photoacoustic diagnosis of burns in rats,” J Trauma. 59(6), pp. 1450-1456 (2005).

- [12] Yamazaki M, Sato S, Ashida H, Saitoh D, Okada Y, and Obara M, "Measurement of burn depths in rats using multiwavelength photoacoustic depth profiling," *J Biomed Opt.* 10(6), 061011 (2005).
- [13] Yamazaki M, Sato S, Saitoh D, Okada Y, Ashida H, and Obara M, "Photoacoustic monitoring of neovascularities in grafted skin," *Lasers Surg Med.* 38(3), pp. 235-239 (2006).
- [14] Hatanaka K, Sato S, Saitoh D, Ashiba H, and Sakamoto T, "Photoacoustic monitoring of granulation tissue grown in a grafted artificial dermis on rat skin," *Wound Repair Regen.* 18(3), pp. 284-290 (2010).
- [15] Bell AG, "On the Production and Reproduction of Sound by Light," *Am. J. Sci.* 20(3), pp. 305-324 (1880).
- [16] 澤田 嗣郎, 光音響分光法とその応用—PAS (学会出版センター, 1982).
- [17] Wang LV, "Tutorial on Photoacoustic microscopy and computed tomography," *IEEE J.Sel.Top. Quantum Electron.* 14(1), pp. 171-179 (2008).
- [18] Wang X, Roberts WW, Carson PL, Wood DP, and Fowlkes JB, "Photoacoustic tomography: a potential new tool for prostate cancer," *Biomed Opt Express.* 1(4), pp. 1117-1126 (2010).
- [19] Jo J, Yang X, "Detection of cocaine induced rat brain activation by photoacoustic tomography," *Neurosci Methods.* 195(2), pp. 232-235 (2011).
- [20] Viator JA, Jacques SL, and Prahl SA, "Depth Profiling of Absorbing Soft Materials Using Photoacoustic Methods," *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics.* 5(4), pp. 989-996 (1999).
- [21] Xu M, Wang LV, "Photoacoustic imaging in biomedicine," *Review of scientific instruments* 77: 041101 (2006).
- [22] 佐藤俊一, 山崎睦夫, 小原實, "光音響法の生体計測および医学診断への応用 : 解説小特集号によせて" *レーザー研究* 2004;32(10), pp. 622-626 (2004).
- [23] 光産業技術振興協会, (レーザー安全ガイドブック" アドコム・メディア, 2006).
- [24] <http://www.ost-jp.com/>, OST 株式会社.
- [25] <http://www.kuraray.co.jp/products/chemical/kurarity.html>, 株式会社クラレ.
- [26] Kawaguchi Y, Iwazaki H, Ida T, Nishi T, Tanigawa Y, and Nitta N, "New polymer-based phantom for photoacoustic imaging," *Proc. SPIE* 8945, 89450A

(2014).

- [27] Wells PNT, “Ultrasonic imaging of the human body.” *Rep. Prog. Phys* 62, pp. 671-722 (1999).
- [28] Masuda S, Niki S, and Nakazawa M, “Environmentally stable, simple passively mode-locked fiber ring laser using a four-port circulator.” *Optics Express* 17(8), pp. 6613-6622 (2009).
- [29] 長井 裕, 絵でみる超音波 (南江堂, 1994).
- [30] 伊東 正安, 望月 剛, 超音波診断装置 (コロナ社, 2002).
- [31] 椎名 毅, “光超音波生体イメージングの現状と展望,” レーザー学会学術講演会第36回年次大会講演予稿集 (2015).
- [32] 一般社団法人日本熱傷学会学術委員会, 熱傷診療ガイドライン (日本熱傷学会, 2009).
- [33] 木所 昭夫, 熱傷治療マニュアル (中央医学社, 2007).
- [34] 田中 裕, 熱傷治療マニュアル 改訂2版 (中央医学社, 2013).
- [35] Chatterjee JS, “A critical evaluation of the clinimetrics of laser Doppler as a method of burn assessment in clinical practice,” *J Burn Care Res* 27, pp. 123-30 (2006).
- [36] Pape SA, Skouras CA, and Byrne PO, “An audit of the use of laser Doppler imaging (LDI) in assessment of burns of intermediate depth,” *Burns* 2001;27(3), pp. 233-239 (2001).
- [37] Atules L, Mileski W, Spann K, Purdue G, Hunt J, and Baxter C, “Early assessment of pediatric burn wounds by laser Doppler flowmetry,” *J Burn Care Rehabil.* 16(6), pp. 596-601 (1995).
- [38] Droog EJ, Steenbergen W, and Sjoberg F, “Measurement of depth of burns by laser Doppler perfusion imaging,” *Burns* 27(6), pp. 561-568 (2001).
- [39] Riordan CL, McDonough M, Davidson JM, Corley R, Perlov C, Barton R, Guy J, and Nanney LB, “Noncontact laser Doppler imaging in burn depth analysis of the extremities,” *J Burn Care Rehabil.* 24(4), pp. 177-186 (2003).
- [40] Jiao S, Yu W, Stoica G, and Wang LV, “Contrast mechanisms in polarization-sensitive Muller-matrix optical coherence tomography and application in burn imaging,” *Appl. Opt.* 42 (25), pp. 5191-5197 (2003).

- [41] Isono N, Nkazawa H, Nozaki M, and Sasaki K, "Early assessment of second degree burn depth by means of video microscope," J. J. Burn. Inj. 24 (1), pp. 11-18 (1998).
- [42] Walker HL, Mason AD Jr, "A standard animal burn," J Trauma 8(6), pp. 1049-51 (1968).
- [43] [http://www.4med.co.il/Products/Dermatomes/The\\_Mini\\_Dermatome/](http://www.4med.co.il/Products/Dermatomes/The_Mini_Dermatome/) 4 MED LTD.
- [44] 五十幡玲子, "アレルギー反応の判定 - 機器を用いた客観的判定法" アレルギーの臨床 2007年9月増大号.
- [45] 大原 浩樹 "食品機能成分のシミ, シワの改善と予防効果 Functional food 2009 2(4), pp. 383-390 (2009).
- [46] 山田哲也, 太田敬, "レーザードップラ" 脈管学 (5), pp. 312-316 (2005).
- [47] 五十玲子, "血管診断の医用機器 第12回レーザードップラ血流画像化装置 PeriScan PIM II," Vascular Lab 3(3), pp. 68-69 (2006).
- [48] Chu CS, McManus AT, Mason AD Jr, Okerberg CV, and Pruitt BA Jr, "Multiple graft harvesting from deep partial-thickness scald wound healed under the influence of weak direct current," J Trauma 30(8), pp. 1044-1050 (1990).
- [49] Matylevich NP, Chu C, McManus AT, Mason AD Jr, and Pruitt BA Jr, "Direct current reduces plasma protein extravasation after partial-thickness burn injury in rats," J Trauma 41(3) pp. 424-429 (1996).
- [50] Chu CS, McManus AT, Pruitt BA Jr, and Mason AD Jr, "Therapeutic effects of silver nylon dressing with weak direct current on Pseudomonas aeruginosa-infected burn wounds," J Trauma 28(10), pp. 1488-1492 (1998).
- [51] Chu CS, Matylevich NP, McManus AT, Mason AD Jr, and Pruitt BA Jr, "Direct current reduces wound edema after full-thickness burn injury rats," J Trauma 40(5), pp. 738-742 (1996).
- [52] Chu CS, Matylevich NP, McManus AT, Pruitt BA Jr, and Goodwin CW, "Direct current reduces accumulation of Evans Blue albumin in full-thickness burns," J Trauma 47(2), pp.294-299 (1999).
- [53] 塚田 貞夫, 形成再建外科学, (医歯薬出版株式会社, 1998).
- [54] 副島 一孝, "人工真皮を用いた皮膚欠損創の治療,"耳鼻咽喉科・頭頸部外科 86(12), pp. 1033-1039 (2014).
- [55] 柳本 誠一郎, "同種皮膚移植の実験的研究, とくに移植皮膚片に対する物理的ならび

に生物学的前処置が拒絶反応におよぼす影響について，” 1970，学位論文.

- [56] クリス・バーナード，フランシス・ギルバート・ピーター・マクレガー，生物学の考える技術（講談社，1995）.
- [57] 秋山徹，バイオ実験に絶対使える統計の基本 Q&A（羊土社，2012）.
- [58] Adrian T, Stefan M, Neal CB, Daniel R, and Vasilis N, “Fast Multispectral Optoacoustic Tomography (MSOT) for Dynamic Imaging of Pharmacokinetics and Biodistribution in Multiple Organs,” PLoS One. 7(1):e30491 (2012).
- [59] Carolyn LB, Geoffrey PL, and Stanislav YE, “PHOTOACOUSTIC IMAGING FOR MEDICAL DIAGNOSTICS,” Acoust Today 8(4), pp. 15–23 (2012).
- [60] Wang Y, Maslov K, Zhang Y, Hu S, Yang L, Xia Y, Liu J, and Wang LV, “Fiber-laser-based photoacoustic microscopy and melanoma cell detection,” J Biomed Opt 16(1):011014 (2011).
- [61] Omar M, Gateau J, and Ntziachristos V, “Raster-scan optoacoustic mesoscopy in the 25-125 MHz range,” Optics Letters 38(14), pp. 2472-2474 (2013).
- [62] Wang LV(Ed), Photoacoustic Imaging and Spectroscopy, (CRC Press, 2009).
- [63] Xia J, Wei C, Nguyen TM, Arnal B, Pelivanov I, and O'Donnell M, “Clinically translatable integrated ultrasound and photoacoustic imaging system,” Proc. SPIE 8943, 894310 (2014).
- [64] Li ML, Wang PH, “Optical resolution photoacoustic microscopy using a Blu-ray DVD pickup head,” Proc. SPIE 8943, 894315 (2014).
- [65] 中野俊二，“炭酸ガスレーザー治療に伴う飛行船瘢痕・萎縮性瘢痕に対するロングパルスダイレーザー治療，” 創傷 4(3), pp. 170-177 (2013).
- [66] Song L, Maslov K, Shung KK, and Wang LV, “Ultrasound-array-based real-time photoacoustic microscopy of human pulsatile dynamics in vivo,” J Biomed Opt. 15(2):021303 (2010).