

<特集「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

山岡 禎久^{*1,2}, 高松 哲郎²¹京都府立医科大学大学院医学研究科医学研究法システム学²京都府立医科大学大学院医学研究科細胞分子機能病理学Photoacoustic Imaging with
Two-Photon Absorption for Medical ApplicationsYoshihisa Yamaoka^{1,2} and Tetsuro Takamatsu²¹Department of Methodologies for Medical Research,
Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science²Department of Pathology and Cell Regulation,
Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science

抄 録

現在、人体の内部構造を観察する画像診断装置は医療現場では必須のものであり、様々な病気の診断や病態の把握に使用されている。コンピュータ断層撮影法 (CT)、核磁気共鳴画像法 (MRI)、超音波エコー (US) は人体を輪切りの画像にすることができるが、細胞一つ一つを観察する空間分解能はない。一方、光イメージングは1マイクロメートル以下の高空間分解で観察が可能である。また、生体深部 (1ミリメートル以上) を観察することは困難であるが、分子には、紫外、可視、近赤外領域においてエネルギー準位の多彩さがあるため、CT、MRI、US に比べ高コントラストであるという大きな利点を持つ。

近年、高コントラストかつ深達距離向上が可能な光音響イメージング (光と超音波のハイブリッド) に注目が集まっているが、生体深部での空間分解能はまだ十分ではない。そこで我々は、生体深部での空間分解能向上のために、2光子励起と光音響を組み合わせた新しい技術を開発した。本法は2光子励起により高空間分解能を保ちながら、それによって発生する光音響波の低周波成分を用いることにより深部観察が達成される。ここでは、光音響イメージングについて紹介するとともに、我々が開発した2光子励起光音響イメージングの技術的優位性について述べる。

キーワード：光音響イメージング、2光子励起、周波数フィルタリング、血管イメージング、生体深部観察。

Abstract

Medical imaging modalities, such as computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI) and ultrasonography (US) are routinely used to recognize and diagnose various pathological conditions throughout the whole human body. However, their spatial resolutions are not high enough to visualize

平成25年3月31日受付

*連絡先 山岡禎久 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町465番地
yamaoka@koto.kpu-m.ac.jp

micrometer-sized small vessels and single cells. On the other hand, optical modalities, such as confocal laser-scanning microscopy, can visualize the structures with sub-micrometer scale, though they cannot visualize structures over 1 millimeter deep. Optical modalities have great advantages in obtaining high-contrast images compared with CT, MRI and US, because various biomolecules have different energy levels in the ultraviolet, visible and infrared regions.

Recently, photoacoustic imaging (hybrid of optical and ultrasonic modalities) is regarded with great attention to visualize deep structures with optical high contrast. However, the spatial resolution in deep layers is not enough to visualize single cells. To improve the spatial resolution in deep layers, we have developed two-photon absorption-induced photoacoustic microscopy (TP-PAM). The use of low-frequency components of photoacoustic waves improves penetration depth while keeping high spatial resolution determined by two-photon absorption occurring at micrometer-sized spaces. Here we present photoacoustic imaging technique and discuss the advantage of our TP-PAM system.

Key Words: Photoacoustic imaging, Two-photon absorption, Frequency filtering, Vascular imaging, Deep imaging.

はじめに

生体は様々な役割を持った分子（生体分子）によって構成されている。環境の変化に従い、分子の動きや分布状態が変化したり、分子の構造変化、他の生体分子との結合により、分子のエネルギー準位も変化したりする。したがって、標的分子の動きや分布、エネルギー準位を観察することができれば、マクロな細胞、組織、臓器の構造だけでなく機能も評価することができる。すなわち、様々な病態に関わる生体の情報を抽出することができるのである。

しかしながら、分子は非常に小さく、直接目で分子の動きやエネルギー準位の変化を観察することはできない。そのための一つの方法として、光がしばしば利用される¹⁾²⁾。分子は、紫外から赤外領域に分子構造に基づく固有の電子遷移エネルギーや振動エネルギー準位を有している。光と分子が相互作用すると、エネルギー準位に依存した吸収、散乱、反射、屈折、蛍光などの現象が観察されるので、それらの違いから生体内の特定分子の動きや分布を可視化することが可能である。また、分子のエネルギー準位は、分子の構造、環境に対して変化を起こすため、相互作用の光周波数依存性を観察すると特異的に細胞や組織の状態を抽出でき、コントラストの高い、機能的なイメージングが可能となる。特に、蛍光イメージング³⁾⁴⁾、ラマン散乱イメージング⁵⁾⁶⁾などはその代表例である。

光イメージングは特異的に分子を捉えることができる有効な方法であるが、生体深部観察が困難であるという問題が付きまとう。例えば、超音波と比べると光の散乱は2から3桁以上高い⁹⁾。生体に似た光散乱係数を持つイントラリピッド溶液の中にレーザーを照射すると図1 (a)に示されるように、光を直進させることができない。生体深部の情報を得るためには、対象まで生体表面から光を到達させ、かつ、対象からの光を生体表面まで到達させ情報として取り出す必要がある(図1 (b), (c))。すなわち、生体表面から対象までの片道の距離だけでなく、対象から生体表面までの距離を加えた往復の光散乱、吸収の効果が効いてくる。そのため、光による深部観察は困難になる。

2 光子蛍光イメージング

光の深達距離の問題を解決する方法として、2光子“蛍光”イメージングが提案されている¹⁰⁾¹¹⁾。1光子吸収（通常の光吸収）は、分子の基底状態と励起状態のエネルギー差と同等のエネルギーを持つ光子が分子と相互作用すると起こる(図2 (a))。図2 (a)内の写真は、波長515 nmの連続レーザーをローダミンB溶液に集光した場合の蛍光像を示したものである。ローダミンBの吸収帯は波長530 nm近傍にあり、波長515 nmでは1光子励起が起こる。この図を見て分かるように光軸方向全体に吸収が起こり、蛍光を発していることがわかる。

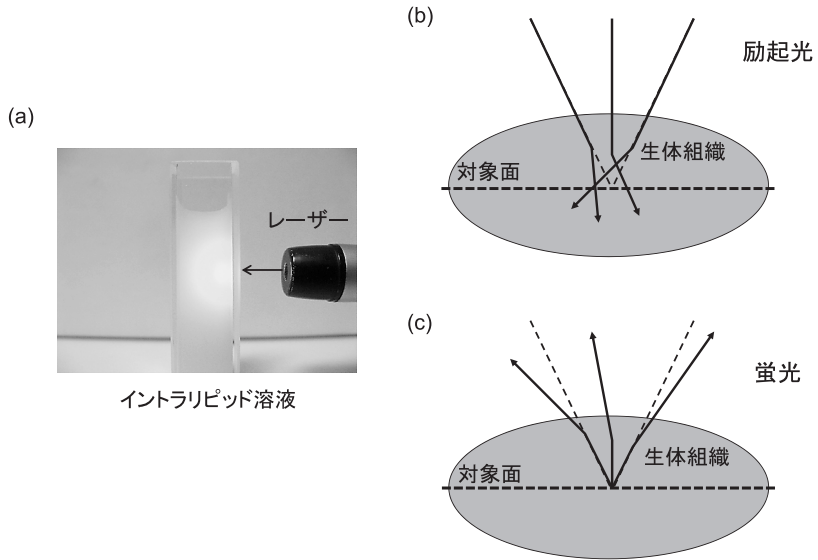


図1 光イメージングの問題点. (a) レーザーをイントラリピッド溶液に照射した時の光散乱. (b) 励起光の散乱. (c) 対象からの蛍光の散乱.

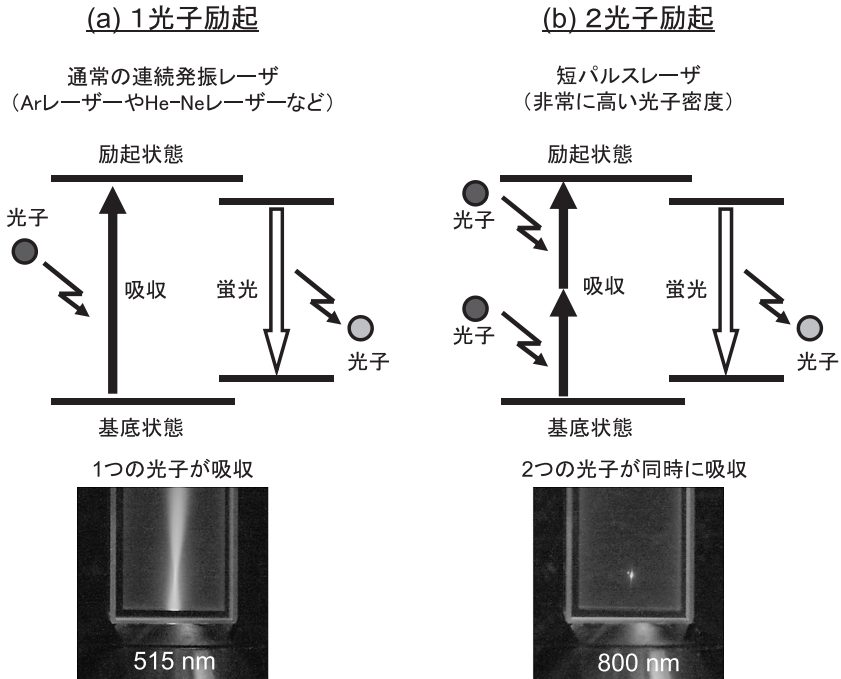


図2 (a) 1光子励起と(b) 2光子励起における光子エネルギーと分子エネルギー準位の関係. 1光子励起は光軸方向に一様に起こるが, 2光子励起は焦点の空間的に限局した領域のみで起こる.

一方、ピークパワーの高いパルスレーザー（ナノ秒 (10^{-9} s)、ピコ秒 (10^{-12} s)、フェムト秒 (10^{-15} s) などの短時間幅を持つ光パルス) を物質に集光照射すると、焦点近傍において光子密度が高くなる。分子の基底状態と励起状態のエネルギー差が光子のエネルギーの2倍にほぼ一致すると2つの光子が同時に吸収され分子が励起状態に遷移する現象が起こる¹²⁾。この現象を2光子励起と呼び、1光子励起と異なり、焦点近傍の微小空間でのみ起こる (図2(b))。図2(b)内の写真は、波長800 nmのフェムト秒光パルスをローダミンB溶液に集光した場合の蛍光を観察したものである。ローダミンBは波長800 nmに吸収はないが、その半分の波長領域には吸収があるため、2光子励起が起こる。この図からわかるように、焦点近傍の微小領域のみ選択的に吸収を起こし、蛍光を観察することが可能である。蛍光の起源が微小空間であるとわかっているため、そこから発生するすべての蛍光を利用することによって、蛍光散乱の影響が少なくなり、深い部分の観察が可能となる。しかしながら2光子蛍光イメージングは励起光や蛍光の散乱による影響をできるだけ少なくする技術であるが、更なる深部観察を目指す時、どうしても散乱、吸収を無視できなくなる。この課題を克服することが更なる深部観察を可能にする解決法となる。

光音響イメージングとは

光のみを使用した純粋な光イメージングの深部観察困難という問題点を解決するために、近年、光音響イメージングに注目が集まっている¹³⁾¹⁴⁾。光を組織に照射すると、組織を構成する分子に吸収が存在すれば、瞬間的に熱膨張を起こし、音波が発生する。この効果（光音響効果）を用いて画像化を行う方法を光音響イメージングと呼ぶ。音波は生体内を長距離伝搬可能であるため、高コントラストに生体深部を可視化できる。光音響効果自体は非常に古くから知られている現象であり、アレキサンダー・グラハム・ベルによって、1880年に最初の報告がされている¹⁵⁾。その後、蛍光を持たない物質に対

しても高感度に吸収スペクトルを検出できる方法として、光音響分光法が発展し¹⁶⁾¹⁷⁾、様々な生体への応用が示された⁹⁾¹³⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。一般的に光音響イメージングの横分解能（光軸に垂直方向の分解能）は、発生する超音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¹³⁾。集音の範囲は超音波の周波数が高くなると狭くなるため、高空間分解能を得るためには、光音響波の高周波成分を検出しなければならない。また、深さ位置情報は、超音波エコーと同じように、発生する光音響波が音響トランスデューサーに到達するまでの時間を超音波の速度を用いて位置情報に変換することによって得るのが一般的である。例えば、75 MHzの超音波成分を検出してイメージングを行うと、およそ20 μ mの分解能が得られる（分解能は生体内の波長程度、音速を1500 m/sと仮定）。このように、光音響波の高周波成分を用いると深さ分解能は向上する。しかしながら、超音波の伝播距離は組織によって異なるが高周波になると極端に短くなるといった問題点がある¹³⁾。例えば、脳組織5 mmの厚さを1 MHzの超音波を伝搬させると95%以上透過するが、75 MHzの超音波を伝搬させると0.4%しか透過しない。

2光子励起光音響イメージング

高空間分解能を保ちながら、光音響イメージングによって達成される深達距離を向上させるために、我々は2光子励起と光音響イメージングを組み合わせた2光子励起光音響イメージングを開発した²⁰⁾²³⁾。この方法は、2光子励起によって発生した光音響波を用いてイメージングを行う方法である。1光子光音響イメージングでは、高空間分解能化のために音響波の高周波成分が必要とされる。しかし2光子光音響イメージングでは、空間分解能は光すなわち2光子励起により決定されるため、長距離伝播が可能な光音響波の低周波成分を検出に用いることができ、空間分解能を高く保ちながら、深部観察が可能になる。

2 光子励起光音響 イメージングシステム

システムは主に①光音響波を発生させるためのレーザー光源、②試料に集光するための光学系、③試料からの光音響波を検出する測定系、④データ取得、画像化装置から構成される。①に関して、光子密度を高くするためには、高いピークパワーを持ち、パルス幅がナノ秒以下のレーザーが必要である。②に関して、生体深部で2光子励起を起こさせるため、作動距離の長い顕微鏡用対物レンズを用いる。③に関して、生体内の超音波の減衰を少なくするため、低周波の音響トランスデューサーを用いる。また、トランスデューサーからの信号は非常に微弱であるので増幅器が必要である。④に関して、高速デジタイザにより光音響信号を取得後、信号解析を行い、画像化する。

具体的には図3に示されるような2光子励起光音響イメージングシステムを試作した²³⁾。レーザー光源としては、サブナノ秒半導体励

起マイクロチップレーザー (SNP-13E; Teem Photonics) を用いた (波長, 1064 nm; パルス幅, 0.6 ns; 最大パルスエネルギー, 14.1 μ J; 繰り返し周波数, 7.3 KHz)。レーザービームは2つのレンズでビーム径を広げて平行光にされる。サブナノ秒の光パルスは20倍の対物レンズ (LMH-20X; Thorlabs) (NA 0.4) で水中に設置される試料に集光され、発生する光音響波を10 MHz 音響トランスデューサー (10K6.4I; Japan Probe) によって検出した。試料の位置はXYZステージによって制御される。光音響波の信号は高速デジタイザ (U1082A-AVG; Agilent Technologies, Inc.) によってコンピュータに取り込まれ、光音響波の時間波形をフーリエ変換することによってパワースペクトルが得られる。選択した周波数範囲のパワースペクトルの積分値を明るさとしてプロットすることにより、3次元のイメージが得られる。測定装置の空間分解能を評価するために、図4に示されるようなシリコンブロック内の直径300 μ mの円柱状の中空に2光子吸収色素溶液 (ローダミ

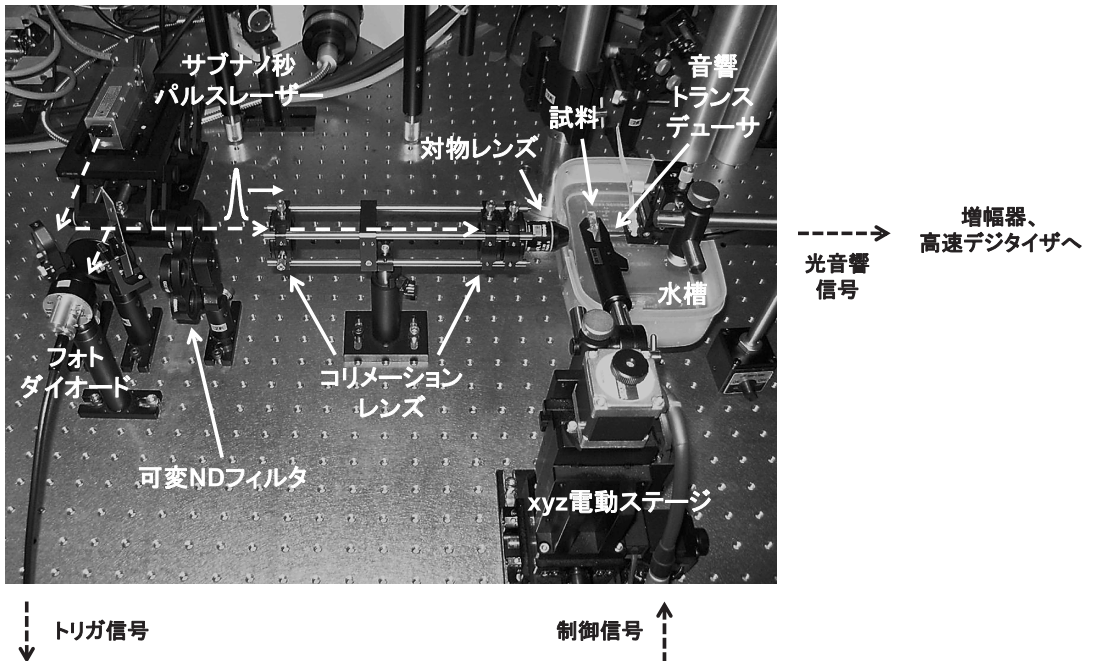


図3 2光子励起光音響イメージングシステム。白点線は光路を示す。

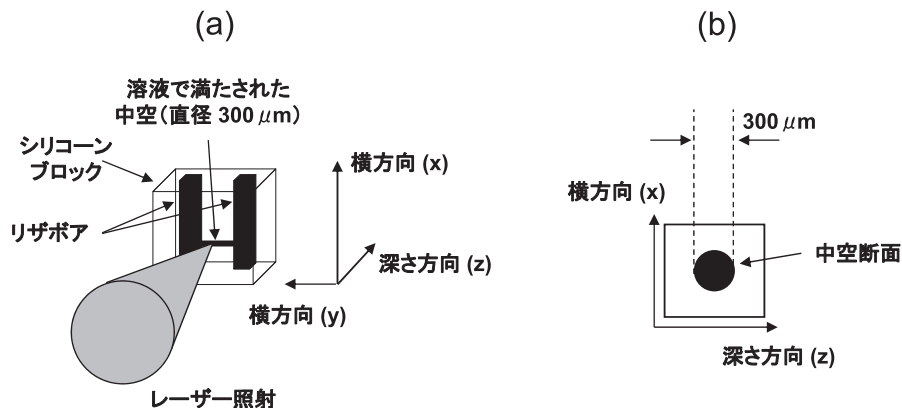


図4 (a) 空間分解能を評価するための試料と (b) 期待される中空断面のイメージ。

ンB / エタノール, 25 mM) を満たし, その断面形状を測定した. その結果から, 横, 深さ分解能を評価した.

2 光子励起光音響波の選択的検出

2 光子励起の起こる確率は 1 光子励起に比べて小さいため, 2 光子光音響イメージング像を得るには, 2 光子励起による光音響波と 1 光子励起によるものとの区別が重要である. 一般的に 1 光子励起によって発生する光音響波の時間波形は吸収係数によって変化することが知られている^{24,25}. 例えば, 吸収係数が大きい場合は, 吸収が起こる領域が小さくなるため, 高周波成分が多く含まれる²⁴. 同様に, 2 光子励起による光音響信号は非常に空間的に限局した領域から発生するため, 高周波成分が多く含まれると予想される (図5). したがって, 生体深部観察に不利な高周波成分を除く低域フィルタリングに加えて, 2 光子励起光音響波検出のために高域フィルタリングを行うこと, すなわち, 低周波領域のバンドパスフィルタリングによって, 生体深部の 2 光子光音響波を選択的に効率よく検出できるのではないかと考えた.

図4に示されるシリコンブロック内の 2 光子吸収色素溶液を満たした直径 $300\ \mu\text{m}$ の円柱に対して, 図3で示される装置を使用し (パルスエネルギー: $4.3\ \mu\text{J}$), 集光点が円柱内にある場合 (2 光子励起) とない場合 (1 光子励起) で,

光音響波の時間波形 (図6 (a), (b)) とパワースペクトル (図6 (c)) の比較をした²³. 1 光子光音響波に比べて, 2 光子光音響波は非常に急峻な時間波形を持っており, それぞれのパワースペクトルは 1 光子と 2 光子光音響波とで違いが存在する. このことは, 適切な周波数フィルタリングにより, 選択的に 2 光子光音響波を抽出できることを意味する. 加えて, 1 光子と 2 光子による光音響波の周波数成分の違いは比較的低周波領域において存在し, 生体深部観察に不利な高周波成分を使わずに, 選択的に 2 光子光音響波を検出できることが明らかとなった.

2 光子励起光音響 イメージングの性能評価

システムの空間分解能を評価するために, 図4で示したローダミン B / エタノール溶液で満たされた円柱状の中空 (直径 $300\ \mu\text{m}$) の断面形状から空間分解能を評価した²⁶. 音響トランスデューサーとして, 焦点距離が $15\ \text{mm}$ で $10\ \text{MHz}$ の共鳴周波数を持つものを使用し, レーザー集光位置とトランスデューサー集音位置を合わせることにより感度を向上させた. ビーム径は対物レンズの性能ができるだけ発揮できるように, 対物レンズのバックアパーチャー径に対して, 70%以上になるように調整した¹¹. 励起パルスのエネルギーは $1.2\ \mu\text{J}$ で測定した. 図7 (a) は周波数フィルタリングなしで得られた断

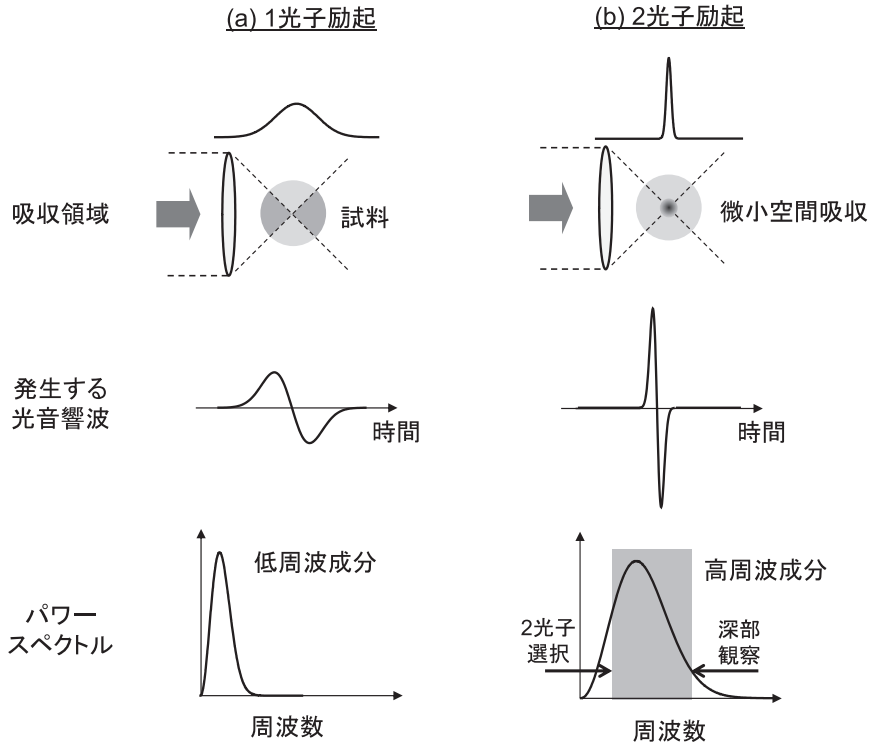


図5 周波数フィルタリングの原理。(a) 1光子励起と (b) 2光子励起の吸収領域、光音響波の時間波形、パワースペクトルの違い。パワースペクトルの高域フィルタリングより、2光子励起による光音響波を効率よく検出できる。低域フィルタリングを加えたバンドパスフィルタリング (b) 2光子励起のパワースペクトルの灰色部分) を行うことにより、深部観察が可能となる。

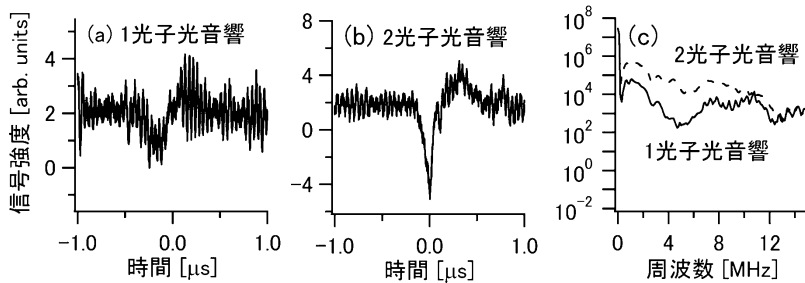


図6 (a) 焦点が試料外にある場合 (1光子励起) と (b) 試料内にある場合 (2光子励起) の光音響波の波形と (c) それらのパワースペクトル (実線: 1光子光音響, 点線: 2光子光音響). 文献²³⁾より改変.

面像, (b) は低周波バンドパスフィルタリング (1~15MHz) を用いた2光子励起光音響像を示している²⁶⁾. 光音響波のパワースペクトルは測定ターゲットの種類, 形状, 集光レンズ等に依

存するので, 本実験条件下であらかじめ測定しておいた1光子と2光子光音響波の周波数スペクトルの違いから周波数フィルタリングの範囲を決定した. 図7に示されるように, 低周波バ

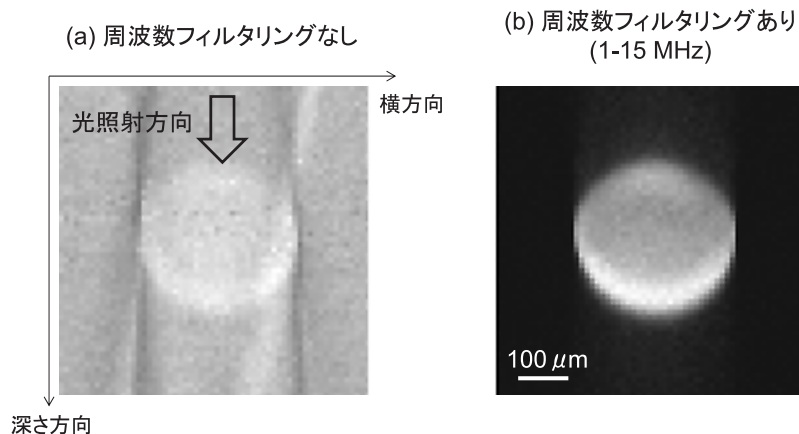


図7 低周波バンドパスフィルタリングが(a)ない場合と(b)ある場合の2光子励起光音響像。レーザーパルスは上から照射されている。スケールバーは100 μm 。文献²⁶⁾より改変。

バンドパスフィルタリングを用いることによってコントラストが向上することがわかった。得られた断面像(図7(b))の光照射と反対側の光音響信号は強くなっている。これはエッジ効果¹⁷⁾、円柱形状のターゲットによるレンズ効果、光音響波の干渉などによると推察された。断面像の中心を通る深さ方向の強度プロファイルから深さ分解能を、横方向の強度プロファイルから横分解能の評価を行った。励起光がガウシアンビームである、強度の2乗によって光音響波が発生するという仮定を用いて、フィッティングにより空間分解能を評価した²³⁾。得られた深さ、横分解能(半値全幅で評価)はそれぞれ $10.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$ 、 $5.9 \pm 0.4 \mu\text{m}$ であった²⁶⁾。低周波音響トランスデューサー(10 MHz)を使っているにもかかわらず、高周波音響トランスデューサー(75 MHz)を使った1光子励起光音響イメージングより²⁷⁾、深さ分解能の向上を示している。20倍対物レンズ(NA:0.4)を用いて得られる理想的な2光子蛍光イメージングの深さ、横分解能はそれぞれ $10.8 \mu\text{m}$ 、 $1.0 \mu\text{m}$ であるが¹⁰⁾、本法は検出に音響波を使っているにもかかわらず、光学的に決定される高い空間分解能を有していることが分かる。

小血管光音響イメージング

生体への応用を考えるために、ラット精巣内血管に対して波長1064 nmの励起光を用いた2光子励起光音響イメージングを行った。近赤外領域においてヘモグロビンは大きな2光子吸収断面積を有することが報告されており²⁸⁾、小血管は2光子励起光音響イメージングのターゲットとして適している。図8は精巣動静脈を結紮し精巣を取り出した後、精巣内に存在する血管をイメージングしたものである。(a)1~15 MHzを用いて画像化したもの、(b)から(p)は0~15 MHzまで1 MHz間隔の周波数フィルタリングを用いて画像化したものである。これらの図から、フィルタリングの周波数を変化させることで画像が変化するのがわかる。これは、高周波になるにしたがって、光音響波の1光子励起と2光子励起の寄与の割合が変化するためである。また、得られた結果を見ると、高周波成分を使用した光音響イメージングは低周波の光音響イメージングに比べてより細い血管を捉えていることがわかる。吸収領域の大きさによっても発生する光音響波の時間波形の急峻さ、すなわち、パワースペクトルが変化するため、周波数フィルタリングを行うことにより、選択的に特定のサイズの構造体が捉えられるのかもしれ

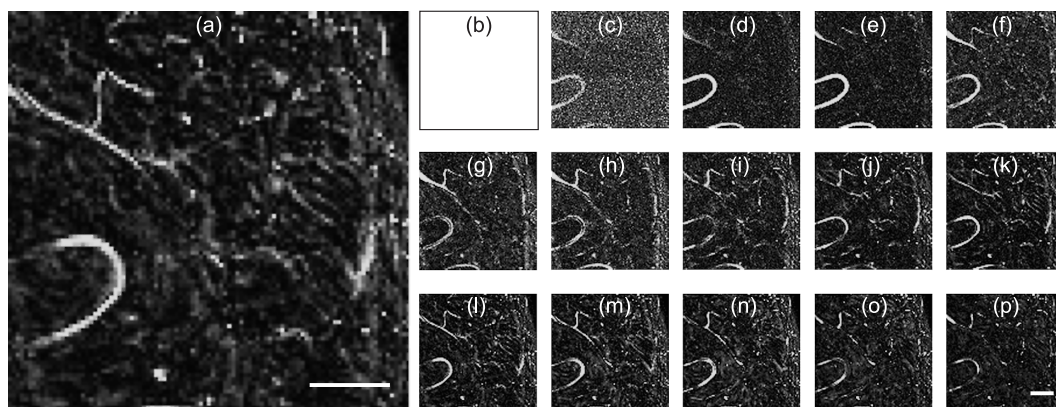


図8 波長 1064 nm 励起光音響イメージングにより得られた精巣血管像。周波数フィルタリング範囲 (a) 1~15 MHz, (b) 0~1 MHz, (c) 1~2 MHz, (d) 2~3 MHz, (e) 3~4 MHz, (f) 4~5 MHz, (g) 5~6 MHz, (h) 6~7 MHz, (i) 7~8 MHz, (j) 8~9 MHz, (k) 9~10 MHz, (l) 10~11 MHz, (m) 11~12 MHz, (n) 12~13 MHz, (o) 13~14 MHz, (p) 14~15 MHz. スケールバーは 200 μ m.

ない。今後、より良い2光子励起光音響イメージング像を得るためには、周波数フィルタリング、集光レンズ、音響トランスデューサー等の最適化がまだまだ必要である。また、現在イメージングに使用している励起波長は、ヘモグロビンの2光子吸収のピークではない²⁸⁾。適切な励起光の波長選択や特異的な光音響用プローブの開発によって更なるイメージング品質の向上が期待される。

ま と め

今回、低周波バンドパスフィルタリングを用いた2光子励起光音響イメージングについて紹介した。本法によって、生体深部観察に不利な

超音波の高周波成分を用いることなく、高空間分解、高コントラストなイメージングに成功した。さらに、血管イメージングへの可能性を示した。本法は、生体内部構造を細胞レベルの空間分解能で観察する技術として有用であると考えている。

謝 辞

本研究は、科学研究費補助金 (19700384, 23500525)、研究成果展開事業研究成果最適展開支援 A-STEP (AS232Z00989F) の交付を受けて行った成果である。

開示すべき潜在的利益相反状態はない。

文 献

- 1) Tuchin VV. Tissue optics. Bellingham: SPIE Press, 2007.
- 2) Tuchin VV ed. Handbook of optical biomedical diagnostics. Bellingham: SPIE Press, 2002.
- 3) Imaizumi K, Harada Y, Wakabayashi N, Yamaoka Y, Konishi H, Dai P, Tanaka H, Takamatsu T. Dual-wavelength excitation of mucosal autofluorescence for precise detection of diminutive colonic adenomas. *Gastrointest Endosc* 2012; 75: 110-117.
- 4) Nakano K, Harada Y, Yamaoka Y, Miyawaki K, Imaizumi K, Takaoka H, Nakaoka M, Wakabayashi N, Yoshikawa T, Takamatsu T. Precise analysis of the autofluorescence characteristics of rat colon under UVA and violet light excitation. *Curr Pharm Biotech* 2013; 14: 172-179.
- 5) Harada Y, Dai P, Yamaoka Y, Ogawa M, Tanaka H, Nosaka K, Akaji K, Takamatsu T. Intracellular dynamics of topoisomerase I inhibitor, CPT-11, by slit-

- scanning confocal Raman microscopy. *Histochem Cell Biol* 2009; 132: 39-46.
- 6) Ogawa M, Harada Y, Yamaoka Y, Fujita K, Yaku H, Takamatsu T. Label-free biochemical imaging of heart tissue with high-speed spontaneous Raman microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 382: 370-374.
 - 7) Minamikawa T, Harada Y, Koizumi N, Okihara K, Kamoi K, Yanagisawa A, Takamatsu T. Label-free detection of peripheral nerve tissues against adjacent tissues by spontaneous Raman microspectroscopy. *Histochem Cell Biol* 2013; 139: 181-193.
 - 8) Harada Y, Takamatsu T. Raman Molecular imaging of cells and tissues: towards functional diagnostic imaging without labeling. *Curr Pharm Biotech* 2013; 14: 133-140.
 - 9) Zhang HF, Maslov K, Stoica G, Wang LV. Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive in vivo imaging. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 848-851.
 - 10) Zipfel WR, Williams RM, Webb WW. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 1369-1377.
 - 11) Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods* 2005; 2: 932-940.
 - 12) Boyd RW. *Nonlinear optics*. San Diego: Academic Press, Inc., 1992.
 - 13) Wang LV ed. *Photoacoustic imaging and spectroscopy*. Boca Raton: CRC press, 2009.
 - 14) Wang LV, Wu H-I. *Biomedical optics*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2007.
 - 15) Bell AG. On the production and reproduction of sound by light. *Am J Sci* 1880; 20: 305-324.
 - 16) 澤田嗣郎 編. *光音響分光法とその応用—PAS*. 東京: 学会出版センター, 1982.
 - 17) 澤田嗣郎 編. *光熱変換分光法とその応用*. 東京: 学会出版センター, 1997.
 - 18) Wang LV, Hu S. Photoacoustic tomography: in vivo imaging from organelles to organs. *Science* 2012; 335: 1458-1462.
 - 19) Wang X, Pang Y, Ku G, Xie X, Stoica G, Wang LV. Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional in vivo imaging of the brain. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 803-806.
 - 20) Yamaoka Y, Fujiwara K, Takamatsu T. Improvement of depth resolution on photoacoustic imaging using multiphoton absorption. *Proc SPIE* 2007; 6631: 663102.
 - 21) Yamaoka Y, Takamatsu T. Enhancement of multiphoton excitation-induced photoacoustic signals by using gold nanoparticles surrounded by fluorescent dyes. *Proc SPIE* 2009; 7177: 71772A.
 - 22) Yamaoka Y, Nambu M, Takamatsu T. Frequency-selective multiphoton-excitation-induced photoacoustic microscopy (MEPAM) to visualize the cross sections of dense objects. *Proc SPIE* 2010; 7564: 75642O.
 - 23) Yamaoka Y, Nambu M, Takamatsu T. Fine depth resolution of two-photon absorption-induced photoacoustic microscopy using low-frequency bandpass filtering. *Opt Express* 2011; 19: 13365-13377.
 - 24) Li PC, Wei CW, Sheu YL. Subband photoacoustic imaging for contrast improvement. *Opt Express* 2008; 16: 20215-20226.
 - 25) Guo Z, Hu S, Wang LV. Calibration-free absolute quantification of optical absorption coefficients using acoustic spectra in 3D photoacoustic microscopy of biological tissue. *Opt Lett* 2010; 35: 2067-2069.
 - 26) 山岡禎久, 高松哲郎. 非線形光学現象を利用した光音響顕微鏡の開発. *日本レーザー医学会誌*; 33: in press.
 - 27) Ku G, Maslov K, Li L, Wang LV. Photoacoustic microscopy with 2- μ m transverse resolution. *J Biomed Opt* 2010; 15: 021302.
 - 28) Clay GO, Schaffer CB, Kleinfeld D. Large two-photon absorptivity of hemoglobin in the infrared range of 780-880 nm. *J Chem Phys* 2007; 126: 025102.

著者プロフィール



山岡 禎久 Yoshihisa Yamaoka

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科医学研究法システム学・助教

略歴：1999年3月 北海道大学大学院工学研究科博士後期課程応用物理学専攻 単位取得退学

1999年3月 産業技術総合研究所, 計測標準研究部門, 科学技術特別研究員

2002年11月 産業技術総合研究所, 単一分子生体ナノ計測研究ラボ, 産総研特別研究員

2005年4月 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, 博士研究員

2006年4月 現職

専門分野：生体医工学, 光イメージング, 非線形光学

主な業績：1. 山岡禎久, 高松哲郎. 非線形光学現象を利用した光音響顕微鏡の開発. 日本レーザー医学会誌 2013; 33: in press.

2. Nakano K, Harada Y, Yamaoka Y, Miyawaki K, Imaizumi K, Takaoka H, Nakaoka M, Wakabayashi N, Yoshikawa T, Takamatsu T. Precise analysis of the autofluorescence characteristics of rat colon under UVA and violet light excitation. *Curr Pharm Biotech* 2013; 14: 172-179.

3. Imaizumi K, Harada Y, Wakabayashi N, Yamaoka Y, Konishi H, Dai P, Tanaka H, Takamatsu T. Dual-wavelength excitation of mucosal autofluorescence for precise detection of diminutive colonic adenomas. *Gastrointest Endosc* 2012; 75: 110-117.

4. Yamaoka Y, Nambu M, Takamatsu T. Fine depth resolution of two-photon absorption-induced photoacoustic microscopy using low-frequency bandpass filtering. *Opt Express* 2011; 19: 13365-13377.

5. 山岡禎久, 高松哲郎. 生体深部観察へ向けた2光子励起光音響顕微鏡の開発. *オプトロニクス* 2011; 30: 121-125.

6. Yamaoka Y, Nambu M, and Takamatsu T. Frequency-selective multiphoton-excitation-induced photoacoustic microscopy (MEPAM) to visualize the cross sections of dense objects. *Proc SPIE* 2010; 7564: 75642O.

7. Yamaoka Y, Takamatsu T. Enhancement of multiphoton excitation-induced photoacoustic signals by using gold nanoparticles surrounded by fluorescent dyes. *Proc SPIE* 2009; 7177: 71772A.

8. Harada Y, Dai P, Yamaoka Y, Ogawa M, Tanaka H, Nosaka K, Akaji K, Takamatsu T. Intracellular dynamics of topoisomerase I inhibitor, CPT-11, by slit-scanning confocal Raman microscopy. *Histochem Cell Biol* 2009; 132: 39-46.

9. Ogawa M, Harada Y, Yamaoka Y, Fujita K, Yaku H, Takamatsu T. Label-free biochemical imaging of heart tissue with high-speed spontaneous Raman microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 382: 370-374.

10. Taniguchi D, Dai P, Hojo T, Yamaoka Y, Kubo T, Takamatsu T. Low-energy laser irradiation promotes synovial fibroblast proliferation by modulating p15 subcellular localization. *Lasers Surg Med* 2009; 4: 232-239.

11. Shiba D, Yamaoka Y, Hagiwara H, Takamatsu T, Hamada H, Yokoyama T. Localization of the Inv protein in a distinctive intra-ciliary compartment requires the C-terminal ninein-homolog containing region. *J Cell Sci* 2009; 122: 44-54.