

学 位 論 文 題 名

Absorbance measurements in turbid media by the time-of-flight method and its application to biological systems

(光子飛行時間計測による光散乱媒質内吸光物質の定量測定とその生物系への応用)

学位論文内容の要旨

生体組織などに代表されるの光の多重散乱媒質内では、光は散乱を繰り返しながら媒質内を伝搬する。このため光学測定を行ったとき、実際に光が進行してきた光路長が物理的な距離と一致しない。よって、透明溶液での吸光度測定に用いられる Beer-Lambert 則が適用できないために、光の多重散乱媒質内では定量的な光吸収測定が困難となっている。ピコ秒領域の時間分解計測は光の飛行時間を直接計測できることから、生体組織の近赤外分光計測に定量性を持たせる有力な手法の一つである。一方、生体組織は 600-1300nm の波長領域の近赤外光に対して比較的高い透過性を示し、また透過光強度が生体組織の酸素代謝状態に応じて変化する。これは、生体組織内に存在するヘモグロビン、チトクロームオキシダーゼ等の生体の酸素代謝に関連する物質の吸光度が酸素濃度に依存して変化するためである。よって、生体組織内の定量的な吸光度測定により生体組織内の酸素代謝測定が可能になる。

本研究では近赤外分光計測に時間分解計測を導入する事により定量的な生体組織内酸素代謝計測（生体組織内ヘモグロビン濃度計測）法の実現を目指し、光多重散乱媒質内の定量的光吸収計測法の確立とそれを用いた生体組織の近赤外領域における光吸収特性の測定を通してその可能性を検討した。

最初に、光散乱物質としてイースト菌（1-3%）を用いた混濁液に吸光物質として血液より精製したヘモグロビンを加えたものをファントムモデルとして用意し、時間分解測定を行った。光パルス光源としてモード同期式 Nd:YAG レーザ励起色素レーザー（690-710nm）を、測定にはストリークカメラを時間分解測定系として用いた。ファントムモデルに光パルスを入射して、ファントムモデル内での多重散乱により時間的に広がった光パルスを光ファイバーで集めストリークカメラに導いた。測定は主に反射型で行い光パルスの入射点より 3cm 離れたところに反射してきた光パルスを受光用ファイバーで集めた。そして、ファントムモデル内のヘモグロビンが酸素化状態（HbO₂）、脱酸素化状態（Hb）の時を比較した。測定結果の解析は Time-Resolved Beer-Lambert Law :

$$f_{\lambda}(t) = f_{0\lambda}(t) \exp(-\mu_{a\lambda} \nu c t) \quad (1)$$

（ $f_{\lambda}(t)$ 、 $f_{0\lambda}(t)$ ：光散乱媒質によって時間的に広がった光パルスの波長 λ における時間プロファイルと、光吸収がない場合の時間プロファイル、 $\mu_{a\lambda}$ ：吸光物質の波長 λ における吸光係数、 ν ：吸光物質濃度、 c ：媒質内の光速度、 t ：時間）を多波長計測に拡張した以下に示す式を用いた：

$$\Delta Abs_{\lambda_2-\lambda_1} = [\ln\{f_1(t)/f_2(t)\}]/cl = (\mu_{a\lambda_2} - \mu_{a\lambda_1})\nu, \quad (2)$$

ここで、 $\Delta Abs_{\lambda_2-\lambda_1}$ は波長 λ_2 、 λ_1 間の吸光度差である。時間分解測定結果を (2) 式によって解析し、 $\Delta Abs_{690-710nm}$ の値を算出したところ、酸素化状態のときの $\Delta Abs_{690-710nm}$ はヘモグロビン濃度に関係なく一定 ($\Delta Abs_{690-710nm} \cong 0$) であり、脱酸素化状態では $\Delta Abs_{690-710nm}$ の値がヘモグロビン濃度に比例して増加した。ここで、測定を行った 690-710nm の波長領域では波長変化に対して酸素化ヘモグロビン (HbO_2) はほとんど変化せず、脱酸素化ヘモグロビン (Hb) は大きく変化する。脱酸素化状態の $\Delta Abs_{690-710nm}$ の値はヘモグロビン透明溶液を分光光度計より得られた値とよく一致し、この測定システムで光散乱媒質中の吸光物質濃度が定量測定できることが確認された。

同じ測定システムでラット (9-12 週齢) 頭部の測定を行いラット頭部内の脱酸素化ヘモグロビン (Hb) 濃度を決定した。そして、ラット頭部内の全ヘモグロビン濃度を 0.32mM (文献値) と仮定して、血液酸素飽和度 (SO_2) を導いたところ通常の呼吸状態 (吸入酸素濃度 (FiO_2) 20.9%) では約 60%、 FiO_2 100% としてラットへの酸素供給増加させたときでは約 80% であった。これにより、ラット頭部内の酸素代謝状態の定量的な評価が時間分解測定を用いることによって可能なことが示された。

次に、パルス光源を波長 730-860nm で発生可能な Ar^+ レーザ励起 Ti:Sapphire レーザを用いた時間分解測定システムを構成してラット頭部の時間分解測定を行い、800nm における時間分解測定結果を基準に 730-860nm の波長領域での $\Delta Abs_{\lambda-800nm}$ の変化スペクトルを決定した。この波長領域は酸素化ヘモグロビン (HbO_2)、脱酸素化ヘモグロビン (Hb) とともに吸光スペクトルが大きく変化する両吸光物質の濃度定量が可能である。

このシステムを用いてラット体内の血液を人工血液 (FC-43、乳白色) に置き換えたラットと通常のラットの頭部で時間分解測定を行った。測定は 730-860nm の波長領域で約 10nm おきに行い、800nm での測定を基準にして (2) 式によってラット頭部の吸光スペクトルを決定した。はじめに、血液-FC-43 置換ラットの場合では、95% O_2 +5% CO_2 を吸入したときのラット頭部の吸光スペクトルは水 (H_2O) によるものと考えられスペクトル回帰によってラット頭部内の水含有量は 60-70% と見積もられた。そして、95% N_2 +5% CO_2 を吸入してラット頭部内を脱酸素化すると 780nm 以上で光吸収の減少がみられ、これはラット頭部内のチトクロームオキシダーゼの還元が原因である。この減少量よりラット頭部内のチトクロームオキシダーゼの濃度は約 5 μ M と見積もられた。一方、通常のラットではラット頭部内の水含有量を 70% と仮定したスペクトル回帰より酸素化ヘモグロビン (HbO_2) と脱酸素化ヘモグロビン (Hb) 濃度が決定でき、ラット頭部内の酸素飽和度 (SO_2) が決定可能であった。

最後にピコ秒パルス光源に半導体レーザ、時間分解測定部に単光子検出時間相関法を用いた移動可能な 3 波長 (755, 779, 831nm) 時間分解測定システムを構成した。そして、ファントムモデルと人前腕部での測定を行ったところそれぞれの酸素状態をよく反映し良好な結果を得た。

従来、光散乱媒質内の光吸収計測にピコ秒領域の時間分解測定を導入する事によって、従来困難であった定量計測が可能であることが示された。本研究ではもっとも身近な光散乱媒質である生体への応用を試みた。現在、均一系から不均一系へのアプローチとして、光による断層イメージングの実現への試みが始まっている。一方、実験でも示したように時間分解測定システムは持ち運び可能な装置としてまとめることが可能であり、医療分野での有力な診断法へと発展させたい。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 村 守

副 査 教 授 喜多村 昇

副 査 教 授 下 村 政 嗣

学 位 論 文 題 名

Absorbance measurements in turbid media by the time-of-flight method and its application to biological systems

(光子飛行時間計測による光散乱媒質内吸光物質の定量測定とその生物系への応用)

生体組織に代表される多重散乱系において、光は散乱を繰り返しながら媒質内を伝搬する。このため光学測定に際し、実際に光が進行してきた光路長が物理的な距離と一致しない。よって、透明溶液での吸光度測定に用いられるBeer-Lambert則が適用できないために、光の多重散乱媒質内では定量的な光吸収測定が困難となっている。

本研究では近赤外分光計測に時間分解計測を導入する事により定量的な生体組織内酸素代謝計測（生体組織内ヘモグロビン濃度計測）法の実現を目指し、光多重散乱媒質内の定量的光吸収計測法の確立とそれを用いた生体組織の近赤外領域における光吸収特性の測定を試みた。

最初に、光散乱物質としてイースト菌（1-3%）を用いた混濁液に吸光物質として血液より精製したヘモグロビンを加えたものをファントムモデルとして用意し、時間分解測定を行った。光パルス光源としてモード同期式Nd:YAGレーザー励起色素レーザー（690-710nm）、測定にはストリークカメラを時間分解測定系として用いた。ファントムモデルに光パルスを入射して、ファントムモデル内での多重散乱により時間的に広がった光パルスを光ファイバーで集めストリークカメラに導いた。測定は主に反射型で行い光パルスの入射点より3 cm離れたところに反射してきた光パルスを受光用ファイバーで集めた。そして、ファントムモデル内のヘモグロビンが酸素化状態（HbO₂）、脱酸素化状態（Hb）の時を比較した。その結果、Time-Resolved Beer-Lambert Lawが成立することを確認した。

パルス光源を波長730-860nm で発生可能なAr⁺レーザー励起Ti:Sapphireレーザーを用いた時間分解測定システムを構成してラット頭部の時間分解測定を行い、800nm における時間分解測定結果を基準に730-860nm の波長領域での吸収スペクトルを決定した。この波長領域は酸素化ヘモグロビン（HbO₂）、脱酸素化ヘモグロビン（Hb）とも吸光スペクトルが大きく変化し両吸光物質の濃度定量が可能であった。

次にピコ秒パルス光源に半導体レーザー、時間分解測定部に単光子検出時間相関法を用いた移動可能な3波長（755, 779, 831nm）時間分解測定システムを構成した。そして、ファントムモデルと人前腕部での測定を行ったところそれぞれの酸素状態をよく反映し良好な結果を得た。

以上の結果、光散乱媒質内の光吸収計測にピコ秒領域の時間分解測定を導入する事により、従来困難であった定量計測が可能であることが示された。

よって申請者は北海道大学・博士（理学）の学位を授与される資格があるものと認める。