

近赤外生体分光法の展望 – 1 μ m 波長域の可能性

西村 吾朗

要 旨：近赤外分光法は今までヘムの酸素化脱酸素化を反映する700～900nm波長域で発展してきた。さらに近年、水やグルコースなどの物質の吸収を反映する、1 μ m近赤外波長域にも非常に興味を持たれてきた。本稿では、この波長域を用い始めて行った組織分光実験について紹介する。特に時間分解法による組織透過光解析についての方法論を述べる。さらに現状での問題点と将来性を考察する。(J Jpn Coll Angiol, 2009, 49: 139–145)

Key words: near-infrared spectroscopy, time-resolved method, tissue spectroscopy, water

はじめに

近赤外分光法は約30年にわたって研究され、生体非侵襲計測法の一つとして広く応用されてきた。特に700～900nm近赤外波長域は、主としてヘモグロビンなどのヘムに由来する吸収を反映するため生体の酸素代謝のモニター領域として広く用いられている。近年、さらに長波長領域、1 μ mを超える波長域での生体計測も興味を持たれてきた。この波長領域は、グルコースをはじめさまざまな生理学的に重要な物質の吸収スペクトルが含まれ、その一方、ヘム由来の吸収が小さい。そのため、それら生体代謝物質の計測や外来のプローブ検出などに適すると考えられる。しかし今までこの波長域での生体組織計測とその応用は非常に限られていた。この波長領域での組織光計測、特に厚みのある組織の計測を行うための技術的方法を解説し、その生体計測への応用の試みを紹介する。

近赤外波長領域の組織の吸収

生きた組織レベルの計測は、ヘムの吸収が小さくなる約700nmより長い波長域(近赤外波長域)で可能である。700～1,400nm程度の波長域は、Fig. 1 に示したように、組織に含まれる主たる吸収体であるヘム由来の強い吸収が減少し、また水の吸収も小さく、光の透過性が最も

良い領域である。そのためこの波長域は生体の光学窓と呼ばれる。今まではその領域の中でもヘム由来の吸収が比較的大きい700～900nm付近を用い、酸素代謝のモニターへ広く応用されてきていた。

900～1,000nmを超える近赤外波長域は、ヘムなどの吸収がさらに小さくなる一方、水などの吸収が増大する領域である。さらにその領域での吸収の中にはグルコースなどの生体物質からの吸収が僅かに含まれる¹⁾。そのため、これらの物質のモニター領域として注目される。例えば、皮膚表層付近の反射スペクトルの詳細な解析によりグルコース濃度決定が、近年初めて成功した^{1,2)}。一方、より深い組織レベルの計測では、透過光は組織内部の水分量を強く反映し、それを通して水分量の決定が可能であるはずである。ここで、水の動態は数々の病態と関連するため、光学測定によりさまざまな病態のモニターや、スペクトルの温度依存性から組織内の温度なども測定可能と考えられ、第2の近赤外波長域としての応用に大変興味を持たれる。

1,350～1,400nmより長波長領域は水の吸収が極めて大きくなる領域である。一方、グルコースなどの生体物質の吸収も含まれる。先に紹介したグルコース計測ではこの波長領域も含め、広い波長域全体で解析を行っている。しかし厚みのある組織の透過光の測定を考えると、水の強い吸収により強く減衰されるため、かなり難

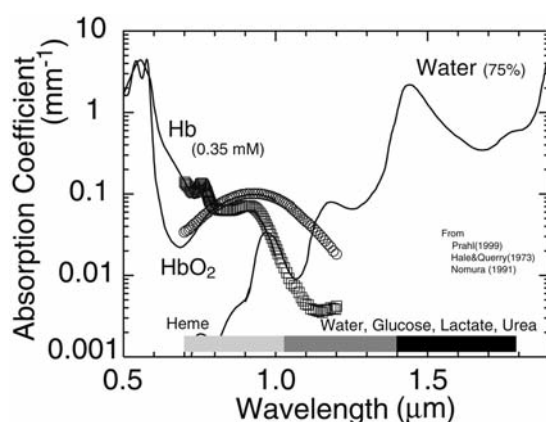


Figure 1 Absorption spectra of main absorbers in tissue.

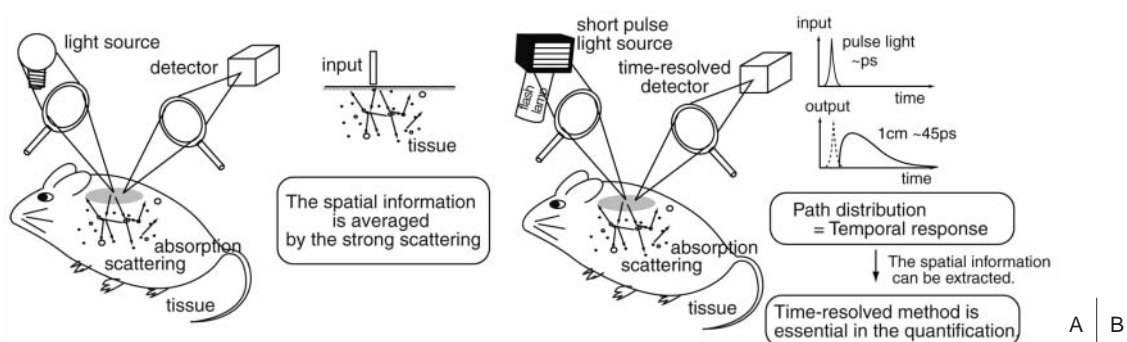


Figure 2 The advantage of the time-resolved method for tissue optical measurements.

しいと言える。もっとも、吸収が大きく変化する1,350～1,400nmは波長により光の透過距離が大きく変化するため、空間的な情報を得ることに用いることができる可能性がある。

これらの3つの近赤外波長領域の区分は、Fig. 1中下部の色の濃さの異なる線に示した通りである。それぞれの領域を本稿ではS-NIR、M-NIR、L-NIRと呼ぶことにし、特にM-NIR領域の計測に焦点を当てる。

組織透過光の時間分解計測法

組織を光で計測する場合の大きな問題は、X線などの手法と異なり、光が組織中で強く散乱され空間的情報を失ってしまうことである (Fig. 2)。そのため通常の透明溶液における吸収分光法を用いることはできない。S-NIR

領域を用いた酸素代謝モニターでは、組織の散乱による光の透過経路の長さ分布(光路長分布)を無視し、平均的な光路長を用いて解析されることが多い。すなわち透明溶液で成り立つBeer-Lambert則を仮定し、あたかも透明溶液のように吸収の波長間演算を行い、酸素化・脱酸素化ヘモグロビンの濃度を計算する。しかしこの平均光路長を用いる解析は吸収変化が小さい領域でしか成り立たない。ヘモグロビンによる酸素代謝モニターでは、絶対値ではなく相対変化が必要な情報であることが多く、比較的吸収変化は小さい領域を扱うと考えられるため、実用化においてそれなりの成功を収めているが、定量性においては大きな問題がある。M-NIRやL-NIRの領域では吸収の変化も大きく、また水分量など絶対値を議論する場合、このような仮定を用い解析することは問題がある

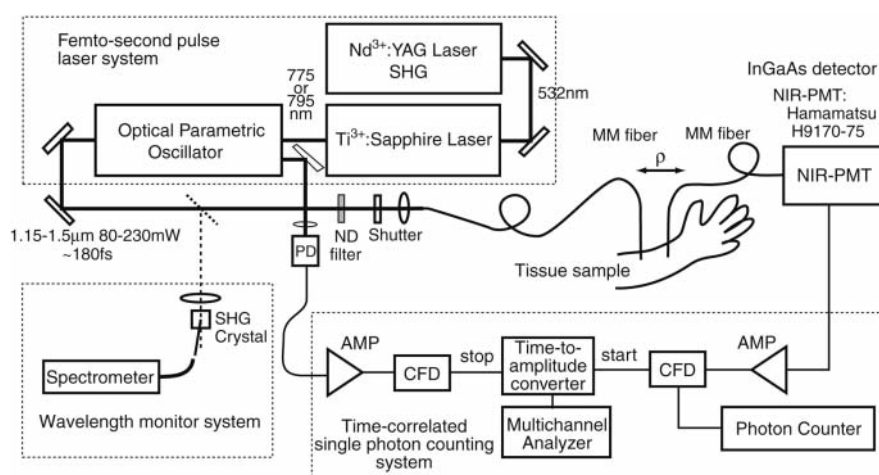


Figure 3 Experimental setup for the time-resolved measurements in the 1 μm near-infrared region.

と言える。

そこで、散乱により失った空間的な情報を補完し、より定量的に解析する方法として開発されてきたのが、散乱光の時間分解計測法である。**Fig. 2B**に示したように、通常はランプのような定常的な光源を用い計測するのに対し、ストロボのように短時間だけパルス的に光る光源を用い、その光が組織を通り抜けてくる時間とその強度を計測する方法である。光の速度は真空中で $3 \times 10^8 \text{m/s}$ であるため、光が 1cm 伝搬するための時間は $3.3 \times 10^{-11} \text{s}$ (33ピコ秒)となる。実際の組織の光速度は、組織の平均的な屈折率を1.34と仮定すると $2.2 \times 10^8 \text{m/s}$ である。したがって、数cm前後の距離を分解するためには、光源にはピコ秒のパルス光源とサンプルからの時間応答を解析するピコ秒からサブナノ秒の時間分解計測システムが必要となる。

時間分解計測法で得られるのは、組織を透過してきた光の光路長分布関数である。多くの場合、組織内で強く散乱され細かな情報を失うため、第一次近似としては一様な散乱体としてみなせ、また光は拡散的に振る舞うと考えられる。そのような場合に光の伝搬は、光拡散方程式で表される³⁾。例えば半無限の境界を持つ平板として組織の形状を近似することにより、光拡散方程式は解け、観測位置が光源から十分離れていれば(光の入射位置から観測位置までの距離 ρ が十分大きいとき)、

$$S(t, \rho) = At^{-5/2} \exp(-\mu_a ct) \exp\left(-\frac{\rho^2}{4Dct}\right) \quad (1)$$

と書ける。ここで D は光拡散定数で等価散乱係数 μ_s を用

い $D = 1/(3\mu_s)$ と与えられる。 c は組織中の光速、 A は比例定数である。実験データの解析ではデータにこの式をフィットさせることにより、吸収係数 μ_a や等価散乱係数 μ_s を決定する。また、より一般的に時間特性 $S(t)$ は

$$S(t) = S_0(t) \exp(-\mu_a ct) \quad (2)$$

と書くことができる。ここで、 $S_0(t)$ は試料の吸収がなく散乱のみである場合の時間特性である。この式を用いることにより時間応答特性の比を用いて吸収の変化の絶対値を決定できる^{4,5)}。これらの方法は、組織ヘモグロビン酸素化度の計測に応用され実用化されている。

1 μm 波長領域においてもこのような時間分解計測を行えば、S-NIR 領域での研究と同様に時間応答波形から吸収係数や等価散乱係数を決定できると考えられる。しかしながら、この計測において問題となったのは、検出器である。今までの波長域での計測では光電子増倍管 (~900nm) あるいは Si アバランシェフォトダイオード (~1,100nm) を単一光子検出器として用い、時間分解能や S/N が良いシステムを作るのは容易である。1,200nm を超えるとこれらの検出器は感度を失い、InGaAs 素子を用いた検出器のみが唯一比較的手続きしやすい高感度検出器である。われわれは、浜松ホトニクス社の H9170-75 InGaAs 光電面光電子増倍管と InGaAs アバランシェフォトダイオードを用いた日置電機製の XG021 単一光子検出器を借用し試用することができた。このうち XG021 は時間応答特性が悪く、散乱光の時間応答は解析できなかったため、定常光強度計測のみに用いた。実際にこれらを用いた計測システムのブロック図を **Fig. 3** に示した。光源は

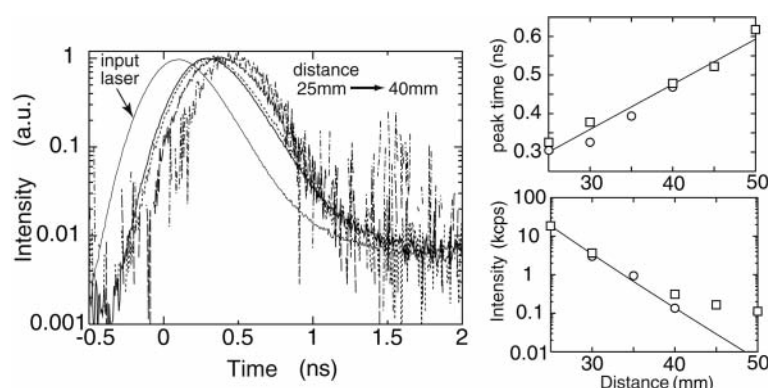


Figure 4 Time-resolved measurements with a human forearm at 1.28 μ m.

フェムト秒波長可変パルスレーザーシステムを用い、そのレーザー光を光ファイバーに結合した。その光ファイバーから、生体組織に光を入射し、さらに別の光ファイバーで組織透過光を光検出器に導いた。時間応答は、時間相関単一光子計数法で計測した⁶⁾。

1 μ m波長域の生体組織時間分解計測

ヒト前腕で入射ファイバーと検出ファイバーとの距離を変えて測定した例がFig. 4である。得られた時間応答を見ると組織透過光の時間応答関数が、ほとんど入射光の時間応答関数と変わらないことがわかる。一方、入射検出間距離が大きくなるにつれて、時間応答関数のピーク位置は時間的に遅い方向(Fig. 4では右方向)に移動した。距離が長くなるにつれ光強度は著しく減少し、測定データのS/Nも悪くなった。観測された時間応答関数が入射光のそれとほとんど違いがなかったため、上で述べたような、時間応答データを光拡散方程式でフィットしパラメータを求めるという解析法は使えない。そこで、入射検出間距離と時間応答のピーク位置の関心に注目した新たな解析法を開発した⁷⁾。時間応答データのピークの時間を t_{peak} とし、光拡散方程式の解で時間応答が表れるとすると、入射検出間距離 ρ が十分大きい領域で

$$t_{\text{peak}} = \frac{1}{2} \left(\frac{3\mu'_s}{\mu_a} \right)^{1/2} \frac{\rho}{c} + T \quad (3)$$

という関係が成り立つ。ここで、 T は定数であり距離 ρ を0に外挿したときの切片である。すなわちピークの時間は距離に対し比例し、その傾きより等価散乱係数と吸収係数の比を得る。Fig. 4右上の図に示されている結果は、この比例関係が組織試料において近似的に成り立っていることを示している。一方、定常光強度は

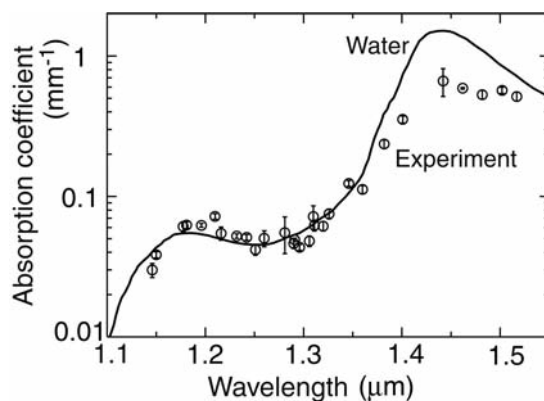


Figure 5 The absorption spectrum of the human forearm in an M-NIR region.

ることを示している。一方、定常光強度は

$$S(\rho) = A' \left(1 + \frac{1}{\mu_{\text{eff}}\rho} \right) \frac{\exp(-\mu_{\text{eff}}\rho)}{\rho^2} \quad (4)$$

と書ける。ここで $\mu_{\text{eff}} = \{(3\mu'_s + 0.6\mu_a)\mu_a\}^{1/2}$ であり、 A' は比例定数である。入射検出間距離を変えて測定した定常光強度を式(4)でフィットすることにより μ_{eff} が求まる。時間応答関数のピークシフトの傾きと μ_{eff} より、等価散乱係数と吸収係数をそれぞれ決めることができる。この実験データからは、等価散乱係数が 0.44mm^{-1} 、吸収係数が 0.051mm^{-1} と決定された。さらに、他の波長についても入射検出間距離を変えながら定常光強度測定を行い、 μ_{eff} を求めた。この波長領域で先に求めた等価散乱係数が波長によらず一定であると仮定し μ_{eff} から吸収係数を求め、スペクトルを得た(Fig. 5)。水の吸収スペクトルをこのス

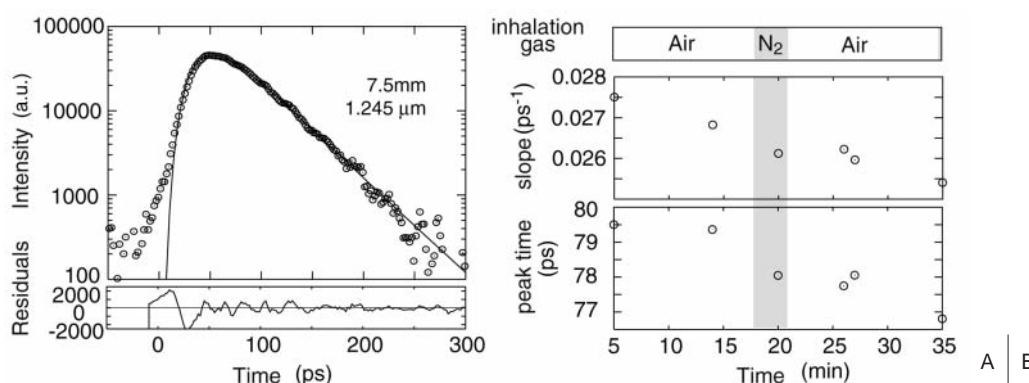


Figure 6 Time-resolved measurements with a rat head at 1.24 μm and the effect of the inhalation gas.

ペクトルと重ねると、図の実線のように示される。吸収のピーク付近を除き水のスペクトルとよく一致しており、水の含量は52%(体積百分率)と求まった。吸収の強い1.4 μm 付近のスペクトルのずれが大きい、吸収のために光は広く伝搬せず、解析での仮定を満たさなくなったと予想できるとともに、水分量の少ない表皮層の影響などの組織の不均一性が影響しているものと考えられる。

このようにM-NIR波長領域で組織レベルでの計測が可能になった。しかし、例えば、酸素代謝の影響がどの程度寄与するのかといった光学特性と生理的な条件との関連など、実際の実験から調べられてはいない。そのような影響を調べるために、小動物を用いた実験を行った。小動物を用いる場合、組織が小さく、透過光の時間的広がり小さくなる。人の計測で用いた光検出器は応答時間が遅く、小動物組織透過光の時間応答を計測することは難しいと考えられた。そのため、小動物の計測においては、より時間分解能が良い、ストリークカメラを用いることにした。現有するストリークカメラはS1と呼ばれる光電面を持つ。この光電面は1.2 μm よりも長い波長領域では極めて感度が低く、実験に用いることができるかどうか明らかではなかった。実際にラット頭部を透過する光の時間応答計測を試みると、入射・検出ファイバー間距離が7.5~10mm程度であれば、1.32 μm 付近まで時間応答を計測することができた⁸⁾。Fig. 6Aに組織透過光の時間応答関数の一例を示した。入射検出間距離は7.5mmと短く、拡散が十分でなくまた半無限の平板とみなすには無理があるため、式(1)で示した拡散方程式

の解によるフィッティング解析は用いることができない。しかし、実際には時間応答データに対し時間軸をシフトさせるとフィットさせることができ、本来はこの解で形状を再現するとは考え難いにもかかわらず形状を再現できる(Fig. 6A実線)。このフィッティングでは検出器の時間応答特性を考慮してフィットしていないこと、さらに実験データのS/Nの問題などがその理由に関与していると考えられる。いずれにせよ、形状は再現できても、フィッティングパラメータは等価散乱係数や吸収係数そのものを意味するものでない。そのため、フィットした関数を用いピークと傾きを求め、時間応答を特徴付けるパラメータと考えた。特に傾きの相対変化は式(2)が一般的に(光拡散方程式が成り立たなくても)成り立つことから吸収の相対変化を表すため、解釈が容易である。Fig. 6Bにラットの呼吸を空気から窒素へと換え測定しそれらの変化を計測した例を示す。呼吸ガスを空気から窒素に換えても、それに対応した変化はみられず、時間応答関数には影響を与えなかったことがわかる。この実験はプレリミナリなものであるが、ヘモグロビンなどの影響が非常に少ないという結果を実験的に確かめたデータと考える。

1 μm 波長域の生体組織計測の問題点と将来性

これら基礎的な実験から、この波長域の組織の光学特性を明らかにすることが可能になってきたが、一番の問題は、良いあるいは生体計測に適した光検出器がないことである。この波長域は、光通信などの分野で大き

く技術が進歩した分野であるが、単一光子レベルの、高感度で時間分解能が良い検出器はほとんど開発されていない。また暗カウント(暗電流)も非常に大きく不安定であり、かなり使い難い。光源は、通信に用いる1.3 μ m付近では半導体レーザーを中心に比較的多くのものが選択できるが、組織透過性の良い1.1~1.3 μ mでの光源は少なく、複雑なレーザーシステムが必要になる。これらの問題が、この波長域の開拓が進まない大きな原因と思われる。検出器および光源の開発が急がれる。

一方、ヘモグロビンに影響されない領域であることは、外来プローブの計測などの応用では極めて重要である。近年の「分子イメージング」はさまざまなプローブにより生体組織の中を可視化し、生体機能自身の理解から薬剤効果の計測、さらには病態の検出から治療のモニターへと展開しており、その中でも光プローブ検出は感度が高く一つの鍵となる技術である。光プローブの最大の問題は、組織の散乱と吸収の影響である。プローブ自身の計測には、これらの影響が最も少ない領域が適しており、M-NIR波長領域は最も合致すると言える。現状では、この波長域のプローブもほとんどなく、現実味が無いという意見もあるが、この波長域の光学特性は魅力的であり将来に向け開発することが必須であると強調したい。

最初に述べたような組織の水の計測は、水の分布などをイメージングすることができるMRIと相補的な計測になり得る。光学的方法はMRIのような詳細な画像を得るのには向かないが、経時的に病態をモニターするような用途には有効である。このような応用も医学的に極めて重要である。

最後に、本稿により1 μ mを超える近赤外波長領域の計測に興味を持たれ注目する機となれば幸いである。

謝 辞

本研究において、福田記念医療技術振興財団、JST地域イノベーション創出総合支援事業「シーズ発掘試験」からの助成を受けた。また、浜松ホトニクスおよび日置電機からは検出器の貸与を受けた。

文 献

- 1) Maruo K, Tsurugi M, Chin J et al: Noninvasive blood glucose assay using a newly developed near-infrared system. *IEEE J Sel Top in Quantum Electron*, 2003, **9**: 322-330.
- 2) Maruo K, Oota T, Tsurugi M et al: New methodology to obtain a calibration model for noninvasive near-infrared blood glucose monitoring. *Appl Spectrosc*, 2006, **60**: 441-449.
- 3) Ishimaru A: *Wave Propagation and Scattering in Random Media* (IEEE Press), New York, 1997.
- 4) Oda M, Yamashita Y, Nishimura G et al: A simple and novel algorithm for time-resolved multiwavelength oximetry. *Phys Med Biol*, 1996, **41**: 551-562.
- 5) Nomura Y, Hazeki O, Tamura M: Relationship between time-resolved and non-time-resolved Beer-Lambert law in turbid media. *Phys Med Biol*, 1997, **42**: 1009-1022.
- 6) Nishimura G, Kida I, Tamura M: Characterization of optical parameters with a human forearm at the region from 1.15 to 1.52 μ m using diffuse reflectance measurements. *Phys Med Biol*, 2006, **51**: 2997-3011.
- 7) Nishimura G, Tamura M: Simple peak shift analysis of time-of-flight data with a slow instrumental response function. *J Biomed Opt*, 2005, **10**: 14016.
- 8) Nishimura G, Tamura M: Optical properties on rat heads measured by the diffuse reflectance method over 1 μ m. 2008, *Biomedical Optics/Digital Holography and Three-Dimensional Imaging/Laser Applications to Chemical, Security and Environmental Analysis on CD-ROM* (The Optical Society of America, Washington, DC), BTuF29.

Near-infrared Spectroscopy in a 1- μ m Wavelength Region: Current and Future

Goro Nishimura

Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University, Hokkaido, Japan

Key words: near-infrared spectroscopy, time-resolved method, tissue spectroscopy, water

Near-infrared spectroscopy has been developed as a monitoring tool for oxygen dynamics in tissue. Recently, a longer wavelength near-infrared region beyond 1- μ m is being focused on because the region contains absorption bands of water, glucose, and some other important metabolites in tissue. However, the spectroscopy in this region has been successful only for the surface region of tissue such as skin. This paper discusses the first successful results on tissue-level measurements using a time-resolved method. In particular, a methodology, peak-shift analysis of time-resolved data, which overcomes the problems on slow response detectors in this region, is examined and a case study on measurements of a human forearm is introduced. Current technical problems and future applications in this region are discussed.

(J Jpn Coll Angiol, 2009, **49**: 139–145)