# L総説 REVIEW ARTICLE

## 細胞観察のための光音響イメージング顕微鏡

櫛引 俊宏,石原 美弥

防衛医科大学校 医用工学講座

(平成 24 年 12 月 13 日受理, 平成 24 年 12 月 20 日掲載決定)

## Photoacoustic Microscopy for In Vitro Cells Imaging

Toshihiro Kushibiki, Miya Ishihara

Department of Medical Engineering, National Defense Medical College

(Received December 13, 2012, Accepted December 20, 2012)

## 要 旨

光で励起した超音波を検出する光音響イメージング顕微鏡は, in vivo での研究を対象としたイメージング研究だけ でなく, in vitro での培養細胞のイメージングの研究にも有用である.特に3次元立体培養を行った場合の内部情報を 取得するためには,共焦点レーザー顕微鏡では到達できない深さにある細胞のイメージングを光音響技術を用いて行 うことができる.本論文では光音響イメージング顕微鏡を用いた研究についてこれまでの報告と今後の展望について 記述したい.

キーワード:光音響、イメージング、顕微鏡観察、細胞、3次元培養

### Abstract

Photoacoustic microscopy is being established not only for the *in vivo* imaging but for the *in vitro* cellular imaging. Especially, to obtain of the internal information of 3D cell culture cluster by using photoacoustic microscopy should be useful tools for *in vitro* imaging study. In this article, we summarize recent reports regarding to photoacoustic microscopy for cell imaging and future perspects.

Key words : photoacoustic, imaging, microscopy, cells, 3D culture

## 1. はじめに

生体組織中の光吸収体に高効率にレーザー光を照射す ると、光吸収体への光エネルギーの吸収に伴った熱弾性 過程を経て超音波が発生する.光音響技術を利用した分 子イメージング技術は、この超音波を検出し、超音波の 伝搬時間から光吸収体の位置情報、信号強度から吸収係 数に関する情報を取得することで、生体組織の断層画 像を取得できる技術の一つである<sup>1-6)</sup>.光音響イメージ ングで画像を取得する方式はいくつかあり、超音波画 像診断装置にレーザー装置を組み合わせて光音響画像 と超音波画像を重畳するタイプ<sup>7-9)</sup>,血管内超音波装置 (intravascular ultrasound: IVUS)とレーザー装置を組み合 わせたカテーテルタイプ<sup>10-15)</sup>,微細な画像を得るため の顕微鏡タイプなどがある. 主に血液中のヘモグロビン 分子を主要な光吸収体とし、その光音響画像化信号を取 得することで,造影剤を使用せずに血管分布の断層画像 を取得している報告が多い<sup>16-20)</sup>.一方で、メチレンブ ルーなどの色素を用いてがん組織周辺に存在するセンチ ネルリンパ節をイメージングすること<sup>21,22)</sup>,カーボンナ ノチューブ<sup>23-28)</sup> や金コロイド<sup>29-34)</sup> を用いてがん組織を イメージングすることが光音響技術では可能となってい る. これらの報告のように、がん組織やその周辺組織、 血流が豊富な組織を光音響技術によりイメージングする 技術はすでに多くの研究が行われており、また一部では、 イメージング装置が市販され、臨床応用を目指した研究 が進められている.しかしながら、実験動物を用いた in vivo 研究やヒトでの臨床応用を目指した研究報告は非常 に多いものの、培養細胞を用いた光音響イメージングに 関する報告は非常に少ない.勿論、ヒトでの臨床応用を 目指した研究も大変重要であるが、基礎医学生物学研究 のための光音響イメージング顕微鏡の開発も重要である と筆者は考えている. その理由は次章で後述するが, 最 近では細胞を従来の平面培養ではなく、3次元的に立体 培養し試験や研究を行っていることが多いためである.

本総説では、これまでに報告されている光音響イメー ジング顕微鏡を用いた研究についてまとめ、今後の展望 について記述したい. 微細な画像を得るための顕微鏡タ イプの光音響イメージング画像化技術に関する報告は Wang LV らを中心として実験動物を用いた報告が数多く されているが、ここでは培養細胞または細胞レベルの光 音響イメージングに特化して記述したい.

#### 2. なぜ深部観察のための光音響イメージング顕微鏡が必要か

従来の細胞培養方法である2次元培養(平面培養)は 細胞の増殖や維持,1細胞レベルでの研究や物質の細胞 内動態研究に広く用いられている.イメージング手法を 用いた2次元培養系の評価手法として,光学顕微鏡,蛍 光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡があり,最近ではラマ ン分光顕微鏡による構成物質の組成の違いによるイメー ジング<sup>35-40)</sup>やエバネッセント顕微鏡による分子の挙動 観察から細胞骨格の構造変化や細胞内信号伝達まで観察 できるようになってきている<sup>4145)</sup>.しかしながら,従 来の2次元培養では3次元立体構造である生体を反映 していないだけでなく,その細胞機能も2次元培養と3 次元培養で大きく異なることが明らかとなってきてい る<sup>46-48)</sup>.3次元細胞培養は、2次元細胞培養に比べて主 に下記の点で生体に近い培養方法といわれている. ①薬 物取込や排泄のトランスポーターや薬物代謝酵素の発現 量, ②細胞外マトリクスの形成能の違いによる細胞分化 能や組織形成能、③細胞間接着の違いによる細胞間シグ ナル伝達. ④成長因子などの細胞膜受容体発現量の違い による細胞増殖能や分化能、⑤細胞極性の違いによる分 裂能や対称性. これらのことから、バイオマテリアルや 培養基材が盛んに研究・開発され、より生体内環境に近 い3次元細胞培養方法が確立しつつある。特に新規薬物 候補物質の代謝スクリーニングや薬効評価は2次元培養 細胞よりも3次元培養細胞を用いた手法が, in vivo 試験 を反映させるために重要となっている.また.近年研究 が盛んにおこなわれている再生医療の臨床応用において も細胞の3次元培養が主流となっている.すなわち、幹 細胞や分化した細胞を2次元培養し、それを患者に移植 しても速やかに組織の構築が行われないため、細胞の足 場(スキャホールド)を用いた3次元培養や3次元的に 積層する細胞シートを用いるなど、立体的な細胞凝集体 を移植する必要がある.これらのためにも.3次元的に 培養された細胞の生存率,薬物の効果や代謝・排泄速度, 細胞の機能変化や細胞の分化効率を観察し続ける必要が ある.細胞凝集体の表面に存在する細胞は、2次元培養 細胞と同様の手法で観察可能であるが、3次元培養体の 内部に存在する細胞を観察・イメージングする手法が確 立されておらず、3次元立体培養された細胞凝集体を固 定・薄切・染色により内部の情報を取得している. 共焦 点レーザー顕微鏡 (コンフォーカル顕微鏡) でも解像度 良く見える内部の深さが 100-200 μm 程度である<sup>3)</sup>. 最 近になって、より深い位置の内部情報を取得するための 多光子励起顕微鏡が開発され、ミリメートルオーダーの 深部観察が可能となりつつあるが、できるだけ侵襲が少 なく、経時的に細胞凝集体の内部情報を取得する必要が 出てくる. そのツールとして、光音響イメージング顕微 鏡が一つの有力な技術となる.

#### 3. これまでの光音響イメージング顕微鏡を用いた研究報告

培養細胞を用いた in vitro 光音響イメージングに関する 報告は in vivo 研究に比べて非常に少ない.光音響技術の 特徴である深部観察という利点を生かし,また既存機器 との違いを明らかにするために, in vivo での研究報告が 多くなるのは必然である.培養細胞を用いた光音響イメ ージングに関する研究では、2次元培養細胞をイメージ ングした報告もあるため、ここではこれらの報告も合わ せて,培養細胞を対象とした光音響イメージング技術の 中から代表的な論文を紹介する.

光音響イメージング技術では、光吸収体から発生する 超音波を検出するという原理上、細胞内に光吸収体が存 在しなければイメージング画像を取得することができな い、これまでの報告では、細胞核に存在する核酸を光吸 収体として、UV光を照射し光音響画像を取得する方法 <sup>49,50)</sup>、メラノーマ細胞を用いて細胞自身が産生するメラ ニン色素を光吸収体とする方法<sup>51,52)</sup>、比較的毒性の低い 色素を細胞内に取り込ませる<sup>53)</sup>または遺伝子的に発現 させる方法<sup>54)</sup>,カーボン<sup>25)</sup>や金<sup>34,55-58)</sup>といった光音響 技術でよく用いられる光吸収体を用いる方法がある.

## 3.1 核酸を光吸収体とした光音響イメージング

細胞内にはいくつかの光吸収体が存在するが,その中でもDNAやRNAといった核酸分子が260nm近辺に吸収ピークがあることはよく知られている.その核酸分子を標的として、UV光を用いた光音響顕微鏡によるイメージング画像がYaoらにより報告されている<sup>49,50)</sup>. 波長250nmのナノ秒パルスレーザーを用いて,わずか2nJ/pulseのエネルギーでマウスの耳表面に存在する細胞核をイメージングしている<sup>49)</sup>.35nJ/pulseのエネル ギーまで増加させた場合,マウスの口唇や小腸の柔突起の上皮細胞,マウスの耳組織における細胞核をイメージングしている(Fig.1)<sup>50)</sup>.

## 3.2 メラニン色素を光吸収体とした光音響イメージング

がん細胞であるメラノーマ(悪性黒色腫)は細胞内に 光吸収体であるメラニンを蓄積することから,光音響イ メージング技術で検出できる<sup>51-52)</sup>.ポリ乳酸-グリコー ル酸共重合体から作製したスキャホールドにメラノーマ を播種し,経時的にスキャホールド中のメラノーマをイ メージングした画像がFig.2である.この結果は,汎用 の光学顕微鏡では観察できない1.2-1.5 mmのスキャホ ールド内部に存在するメラノーマを光音響顕微鏡により イメージングすることができたという報告である.光不 透過性のスキャホールドが細胞へのレーザー光照射また は光音響信号取得を阻害しているかどうかについては疑 問点が残るものの,3次元培養細胞を非染色で非侵襲的 に光音響イメージング顕微鏡で観察することができたと いう画期的な報告である.

#### 3.3 色素を光吸収体とした光音響イメージング

上述したメラニンのように細胞自身が産生する色素を 光吸収体とする場合では、イメージング対象となる細胞 が非常に限られてしまう.そのため、メラノーマ以外の 細胞を用いて細胞内に光吸収体となる色素を取り込ませ たり、色素を遺伝子発現させることで光音響イメージ ング画像を取得する研究もおこなわれている. Zhang ら は、MTT ホルマザン色素を用いて生細胞を染色してい る<sup>53)</sup>.線維芽細胞をスキャホールド中で培養し、生細 胞のみが染色される MTT 試薬を用いて光音響イメージ ング画像を取得した結果が Fig.3 である. さらに, マウ ス ES 細胞の胚葉体(embryoid body)や肺がん細胞のス フェロイド(凝集体)を用いて同様に MTT 染色により 3次元細胞培養体の内部に存在する生細胞のイメージン グに成功している(Fig.4). 筆者らも, 線維芽細胞を用 いて作製したスフェロイドを MTT 試薬により染色し, 培養日数が長くなるとスフェロイド内部に生細胞が観察 できないことを光音響イメージング顕微鏡により観察し ている. MTT 試薬は多くの細胞種で使用できる生細胞 染色試薬であるため、3次元培養細胞の光音響イメージ ングに有用な試薬である.しかしながら一度染色してし



Fig.1 Cell-nuclear images of ex vivo and *in vivo* tissue acquired with ultraviolet photoacoustic microscopy. (a) Photoacoustic image of epithelial cells in the *ex vivo* lip of a mouse. (b) Photoacoustic image of epithelial cells in the *ex vivo* intestinal villi of a mouse. (c) *In vivo* photoacoustic images (dimensions:  $250 \times 250 \ \mu\text{m2}$ ) of cells in the ear skin of a nude mouse at different depths (0, 53, and 105  $\mu$ m). Reprinted from Publication Ref.<sup>50</sup>, Copyright (2010): Optical Society of America.



Fig.2 Photoacoustic images of melanoma cells in a scaffold acquired at 14 days post-seeding. A) Photoacoustic coronal (top) and sagittal (side) maximum amplitude projection images. The black dots correspond to melanoma cells. B) 3D depiction of the photoacoustic image, where the contour of the scaffold is marked by dotted lines.Reprinted from Publication Ref. <sup>52)</sup>, Copyright (2010): Elsevier.



Fig.3 a) Photoacoustic microscopy maximum amplitude projection image of fibroblasts cultured in an inverse opal scaffold, followed by MTT staining for 3 h; b) 3D rendering of the volumetric Photoacoustic microscopy data in (a); c) Photoacoustic microscopy maximum amplitude projection image of fibroblasts cultured in an inverse opal scaffold filled with cross-linked alginate hydrogel, followed by incubation with MTT for 4 h; and d) an optical micrograph showing the same scaffold as in (c). As indicated by arrows, the features in photoacoustic microscopy and optical microscopy match well. Scale bars in (a-d): 1 mm. Reprinted from Publication Ref.<sup>53)</sup>, Copyright (2011): John Wiley & Sons, Inc.

まうとその細胞は使用できず、同じ細胞を用いた経時的 な観察を行うことができないという欠点がある.

3.4 カーボンや金を光吸収体とした光音響イメージング

これまで報告されている培養細胞の光音響イメージン グ技術に関する論文で最も多い光吸収体がカーボンや金 を光吸収体として利用している.中でも金コロイドや金 ナノチューブ(ナノロッド)はその細胞への毒性の低さ から多くの研究で使われている<sup>8-12)</sup>.金ナノロッドを細 胞に取り込ませても、金ナノロッド自体が蛍光を発する ことはないため、汎用の顕微鏡では細胞への経時的な取 り込みや細胞内局在を判別することができない. しかし ながら、光音響イメージング顕微鏡を用いれば、2次元 培養された細胞中の金ナノロッドの局在をイメージング することができる (Fig.5)<sup>34)</sup>. さらに,シリカでコーテ ィングされた金ナノロッドを骨髄間葉系幹細胞へ取り込 ませ、マウスの筋肉内へ移植した直後に細胞をイメージ ングし、幹細胞移植の際の細胞追跡ツールとしての光音 響技術が報告されている <sup>55)</sup>.光音響イメージング画像 取得のためには 1×10<sup>5</sup> 個以上の細胞が必要であるという



Fig.4 Photoacoustic microscopy images of a) RW4 mouse embryonic stem cells and b) SK-BR-3 breast cancer cells incubated with MTT for 3 h. The cells were induced to form characteristic cell aggregates, i.e., embryoid bodies in the case of RW4 mESCs or multicellular tumor spheroids in the case of SK-BR-3 breast cancer cells, and then stained with MTT again for Photoacoustic microscopy. c, d) Photoacoustic microscopy images of an embryoid body and a multicellular tumor spheroid after MTT staining. e, f) maximum amplitude projection images taken from the middle planes (60 μm in thickness) of the spheroids shown in (c) and (d), respectively. Reprinted from Publication Ref.<sup>53</sup>, Copyright (2011): John Wiley & Sons, Inc.

結果であるが,分化した細胞まで追跡できる技術となれば,幹細胞を用いた今後の再生医療に有用な知見を与え るであろう.

## 4. おわりに

光音響イメージング技術として,培養細胞のイメージン グに特化して代表的な報告をまとめた.これらの論文は ほとんど3年以内に公表された論文であることを強調した い.つまり,臨床応用を目指した *in vivo* 研究報告は数多 くあり,一部では臨床応用が始まろうとしているが,基礎 医学生物学研究のツールとしての光音響イメージング顕微 鏡に関する研究はまだ始まったばかりである.ちょうど, 鏡開発は今後ますます用途が拡大していくと思われる.

参考文献

Max

2) B. Cox, J.G. Laufer, S.R. Arridge, P.C. Beard: Quantitative spectroscopic photoacoustic imaging: a review. J. Biomed. Opt., 17: 061202, 2012.

1) X. Wang, Y. Pang, G. Ku, X. Xie, G. Stoica, L.V. Wang:

- S. Hu, L.V. Wang: Photoacoustic imaging and characterization of the microvasculature. J. Biomed. Opt., 15: 011101, 2010.
- C. Li, L.V. Wang: Photoacoustic tomography and sensing in biomedicine. Phys. Med. Biol., 54: R59-97, 2009.
- S. Mallidi, G.P. Luke, S. Emelianov: Photoacoustic imaging in cancer detection, diagnosis, and treatment guidance. Trends Biotechnol., 29: 213-221, 2011.
- L.V. Wang, S. Hu: Photoacoustic tomography: *in vivo* imaging from organelles to organs. Science, 335: 1458-1462, 2012.
- 7) Y. Sun, A.J. Chaudhari, M. Lam, H. Xie, D.R. Yankelevich, J. Phipps, J. Liu, M.C. Fishbein, J.M. Cannata, K.K. Shung, L. Marcu: Multimodal characterization of compositional, structural and functional features of human atherosclerotic plaques. Biomed. Opt. Express, 2: 2288-2298, 2011.
- Y.H. Wang, P.C. Li: Ultrafast photoacoustic imaging and its application to real-time 3D imaging with improved focusing. Ultrason. Imaging, 33: 189-196, 2011.
- 9) J.M. Yang, C. Favazza, R. Chen, J. Yao, X. Cai, K. Maslov, Q. Zhou, K.K. Shung, L.V. Wang: Simultaneous functional photoacoustic and ultrasonic endoscopy of internal organs in vivo. Nat. Med., 2012.
- 10) A.B. Karpiouk, B. Wang, J. Amirian, R.W. Smalling, S.Y. Emelianov: Feasibility of *in vivo* intravascular photoacoustic imaging using integrated ultrasound and photoacoustic imaging catheter. J. Biomed. Opt., 17: 96008-96001, 2012.
- S. Sethuraman, S.R. Aglyamov, R.W. Smalling, S.Y. Emelianov: Remote temperature estimation in intravascular photoacoustic imaging. Ultrasound Med. Biol., 34: 299-308, 2008.
- 12) S. Sethuraman, J.H. Amirian, S.H. Litovsky, R.W. Smalling, S.Y. Emelianov: Spectroscopic intravascular photoacoustic imaging to differentiate atherosclerotic plaques. Opt. Express, 16: 3362-3367, 2008.
- 13) B. Wang, A. Karpiouk, D. Yeager, J. Amirian, S. Litovsky, R. Smalling, S. Emelianov: Intravascular photoacoustic imaging of lipid in atherosclerotic plaques in the presence of luminal blood. Opt. Lett., 37: 1244-1246, 2012.
- 14) B. Wang, J.L. Su, J. Amirian, S.H. Litovsky, R. Smalling, S. Emelianov: Detection of lipid in atherosclerotic vessels using ultrasound-guided spectroscopic intravascular photoacoustic imaging. Opt. Express, 18: 4889-4897, 2010.
- 15) B. Wang, J.L. Su, A.B. Karpiouk, K.V. Sokolov, R.W. Smalling, S.Y. Emelianov: Intravascular Photoacoustic Imaging. IEEE J. Quantum Electron, 16: 588-599, 2010.
- 16) Z. Guo, C. Favazza, A. Garcia-Uribe, L.V. Wang: Quantitative photoacoustic microscopy of optical absorption coefficients from acoustic spectra in the optical diffusive regime. J. Biomed. Opt., 17: 066011, 2012.
- A. Krumholz, L. Wang, J. Yao, L.V. Wang: Functional photoacoustic microscopy of diabetic vasculature. J. Biomed. Opt., 17: 060502, 2012.
- 18) L.D. Liao, C.T. Lin, Y.Y. Shih, H.Y. Lai, W.T. Zhao, T.Q. Duong, J.Y. Chang, Y.Y. Chen, M.L. Li: Investigation of



Fig.5 Photoacoustic microscopic imaging of cells and the intracellular gold nanorods. (a) Photoacoustic image of cell nucleus with excitation wavelength of 532 nm laser. (b) Photoacoustic image of gold nanorods in the cytoplasm with excitation wavelength of 720 nm laser. (c) Overlay image of (a) and (b). (d) Photograph of the HE stained cells sample. Reprinted from Publication Ref.<sup>34</sup>), Copyright (2012): Optical Society of America.



Fig.6 Photoacoustic image of labeled mesenchymal stem cells (MSCs) immediately after injection. This figure presents both B-mode (gray scale) and photoacoustic (red) images of the intramuscular injection of 800,000 silica-coated gold nanorods labeled MSCs in 50% matrigel/PBS into hind limb muscle of an athymic mouse. The "b" indicates bone and the red dashed circle indicates that the injection bolus can also be seen with B-mode ultrasound. Reprinted from Publication Ref.<sup>55)</sup>, Copyright (2012): American Chemical Society.

the cerebral hemodynamic response function in single blood vessels by functional photoacoustic microscopy. J. Biomed. Opt., 17: 061210, 2012.

- 19) Y. Wang, S. Hu, K. Maslov, Y. Zhang, Y. Xia, L.V. Wang: *In vivo* integrated photoacoustic and confocal microscopy of hemoglobin oxygen saturation and oxygen partial pressure. Opt. Lett., 36: 1029-1031, 2011.
- 20) J. Yao, K.I. Maslov, Y. Zhang, Y. Xia, L.V. Wang: Labelfree oxygen-metabolic photoacoustic microscopy *in vivo*. J. Biomed. Opt., 16: 076003, 2011.
- 21) C. Kim, T.N. Erpelding, L. Jankovic, M.D. Pashley, L.V. Wang: Deeply penetrating *in vivo* photoacoustic imaging using a clinical ultrasound array system. Biomed. Opt. Express, 1: 278-284, 2010.
- 22) K.H. Song, E.W. Stein, J.A. Margenthaler, L.V. Wang: Noninvasive photoacoustic identification of sentinel lymph nodes containing methylene blue *in vivo* in a rat model. J. Biomed. Opt., 13: 054033, 2008.
- 23) A. de la Zerda, Z. Liu, S. Bodapati, R. Teed, S. Vaithilingam, B.T. Khuri-Yakub, X. Chen, H. Dai, S.S. Gambhir: Ultrahigh sensitivity carbon nanotube agents for photoacoustic molecular imaging in living mice. Nano Lett., 10: 2168-2172, 2010.
- 24) A. De la Zerda, C. Zavaleta, S. Keren, S. Vaithilingam, S. Bodapati, Z. Liu, J. Levi, B.R. Smith, T.J. Ma, O. Oralkan, Z. Cheng, X. Chen, H. Dai, B.T. Khuri-Yakub, S.S. Gambhir: Carbon nanotubes as photoacoustic molecular imaging agents in living mice. Nat. Nanotechnol., 3: 557-562, 2008.
- 25) B. Kang, D. Yu, Y. Dai, S. Chang, D. Chen, Y. Ding: Cancercell targeting and photoacoustic therapy using carbon nanotubes as "bomb" agents. Small, 5: 1292-1301, 2009.
- 26) M. Pramanik, K.H. Song, M. Swierczewska, D. Green, B. Sitharaman, L.V. Wang: *In vivo* carbon nanotube-enhanced non-invasive photoacoustic mapping of the sentinel lymph node. Phys. Med. Biol., 54: 3291-3301, 2009.
- 27) M. Pramanik, M. Swierczewska, D. Green, B. Sitharaman, L.V. Wang: Single-walled carbon nanotubes as a multimodalthermoacoustic and photoacoustic-contrast agent. J. Biomed. Opt., 14: 034018, 2009.
- 28) L. Xiang, Y. Yuan, D. Xing, Z. Ou, S. Yang, F. Zhou: Photoacoustic molecular imaging with antibody-functionalized single-walled carbon nanotubes for early diagnosis of tumor. J. Biomed. Opt., 14: 021008, 2009.
- 29) J.V. Jokerst, A.J. Cole, D. Van de Sompel, S.S. Gambhir: Gold Nanorods for Ovarian Cancer Detection with Photoacoustic Imaging and Resection Guidance via Raman Imaging in Living Mice. ACS Nano, 2012.
- 30) C. Kim, E.C. Cho, J. Chen, K.H. Song, L. Au, C. Favazza, Q. Zhang, C.M. Cobley, F. Gao, Y. Xia, L.V. Wang: In vivo molecular photoacoustic tomography of melanomas targeted by bioconjugated gold nanocages. ACS Nano, 4: 4559-4564, 2010.
- 31) W. Lu, M.P. Melancon, C. Xiong, Q. Huang, A. Elliott, S. Song, R. Zhang, L.G. Flores, 2nd, J.G. Gelovani, L.V. Wang, G. Ku, R.J. Stafford, C. Li: Effects of photoacoustic imaging and photothermal ablation therapy mediated by targeted hollow gold nanospheres in an orthotopic mouse xenograft model of glioma. Cancer Res., 71: 6116-6121, 2011.
- 32) D.R. McCormack, K. Bhattacharyya, R. Kannan, K. Katti, J.A. Viator: Enhanced photoacoustic detection of melanoma cells using gold nanoparticles. Lasers Surg. Med., 43: 333-338, 2011.
- 33) D. Pan, M. Pramanik, A. Senpan, J.S. Allen, H. Zhang, S.A. Wickline, L.V. Wang, G.M. Lanza: Molecular photoacoustic

imaging of angiogenesis with integrin-targeted gold nanobeacons. FASEB J., 25: 875-882, 2011.

- 34) S. Yang, F. Ye, D. Xing: Intracellular label-free gold nanorods imaging with photoacoustic microscopy. Opt. Express, 20: 10370-10375, 2012.
- 35) L. Burgio, R.J. Clark, R.R. Hark: Raman microscopy and x-ray fluorescence analysis of pigments on medieval and Renaissance Italian manuscript cuttings. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107: 5726-5731, 2010.
- 36) N. Gierlinger, T. Keplinger, M. Harrington: Imaging of plant cell walls by confocal Raman microscopy. Nat. Protoc., 7: 1694-1708, 2012.
- 37) N.D. Magee, J.R. Beattie, C. Carland, R. Davis, K. McManus, I. Bradbury, D.A. Fennell, P.W. Hamilton, M. Ennis, J.J. McGarvey, J.S. Elborn: Raman microscopy in the diagnosis and prognosis of surgically resected nonsmall cell lung cancer. J. Biomed. Opt., 15: 026015, 2010.
- 38) M.B. Roeffaers, X. Zhang, C.W. Freudiger, B.G. Saar, M. van Ruijven, G. van Dalen, C. Xiao, X.S. Xie: Label-free imaging of biomolecules in food products using stimulated Raman microscopy. J. Biomed. Opt., 16: 021118, 2011.
- 39) Y. Xiao, T. Stone, D. Bell, C. Gillespie, M. Portoles: Confocal Raman microscopy of protein adsorbed in chromatographic particles. Anal. Chem., 84: 7367-7373, 2012.
- Y. Zeng, M.E. Himmel, S.Y. Ding: Coherent Raman microscopy analysis of plant cell walls. Methods Mol. Biol., 908: 49-60, 2012.
- B. Barwick, D.J. Flannigan, A.H. Zewail: Photon-induced nearfield electron microscopy. Nature, 462: 902-906, 2009.
- 42) H. Brutzer, F.W. Schwarz, R. Seidel: Scanning evanescent fields using a pointlike light source and a nanomechanical DNA gear. Nano Lett., 12: 473-478, 2012.
- 43) A. Hassanzadeh, H.K. Ma, S.J. Dixon, S. Mittler: Visualization of the solubilization process of the plasma membrane of a living cell by waveguide evanescent field fluorescence microscopy. J. Biomed. Opt., 17: 076025, 2012.
- 44) A. Hassanzadeh, S. Mittler: Waveguide evanescent field fluorescence microscopy: high contrast imaging of a domain forming mixed lipid Langmuir-Blodgett monolayer mimicking lung surfactant. J. Biomed. Opt., 16: 046022, 2011.
- 45) A. Hassanzadeh, M. Nitsche, S. Armstrong, N. Nabavi, R. Harrison, S.J. Dixon, U. Langbein, S. Mittler: Optical waveguides formed by silver ion exchange in Schott SG11 glass for waveguide evanescent field fluorescence microscopy: evanescent images of HEK293 cells. J. Biomed. Opt., 15: 036018, 2010.
- 46) J.W. Haycock: 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. Methods Mol. Biol., 695: 1-15, 2011.
- A. Abbott: Cell culture: Biology's new dimension. Nature, 424: 870-872, 2003.
- 48) R. Langer, D.A. Tirrell: Designing materials for biology and medicine. Nature, 428: 487-492, 2004.
- 49) D.K. Yao, R. Chen, K. Maslov, Q. Zhou, L.V. Wang: Optimal ultraviolet wavelength for *in vivo* photoacoustic imaging of cell nuclei. J. Biomed. Opt., 17: 056004, 2012.
- 50) D.K. Yao, K. Maslov, K.K. Shung, Q. Zhou, L.V. Wang: *In vivo* label-free photoacoustic microscopy of cell nuclei by excitation of DNA and RNA. Opt. Lett., 35: 4139-4141, 2010.
- 51) Y. Wang, K. Maslov, Y. Zhang, S. Hu, L. Yang, Y. Xia, J. Liu, L.V. Wang: Fiber-laser-based photoacoustic microscopy and melanoma cell detection. J. Biome. Opt., 16: 011014, 2011.
- 52) Y. Zhang, X. Cai, S.W. Choi, C. Kim, L.V. Wang, Y. Xia:

Chronic label-free volumetric photoacoustic microscopy of melanoma cells in three-dimensional porous scaffolds. Biomaterials, 31: 8651-8658, 2010.

- 53) Y. Zhang, X. Cai, Y. Wang, C. Zhang, L. Li, S.W. Choi, L.V. Wang, Y. Xia: Noninvasive photoacoustic microscopy of living cells in two and three dimensions through enhancement by a metabolite dye. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 50: 7359-7363, 2011.
- 54) L. Li, R.J. Zemp, G. Lungu, G. Stoica, L.V. Wang: Photoacoustic imaging of lacZ gene expression *in vivo*. J. Biomed. Opt., 12: 020504, 2007.
- 55) J.V. Jokerst, M. Thangaraj, P.J. Kempen, R. Sinclair, S.S. Gambhir: Photoacoustic imaging of mesenchymal stem cells in living mice via silica-coated gold nanorods. ACS Nano, 6: 5920-5930, 2012.
- 56) B. Rao, K. Maslov, A. Danielli, R. Chen, K.K. Shung, Q. Zhou, L.V. Wang: Real-time four-dimensional optical-resolution photoacoustic microscopy with Au nanoparticle-assisted subdiffraction-limit resolution. Opt. Lett., 36: 1137-1139, 2011.
- 57) L.M. Ricles, S.Y. Nam, K. Sokolov, S.Y. Emelianov, L.J. Suggs: Function of mesenchymal stem cells following loading of gold nanotracers. Int. J. Nanomedicine, 6: 407-416, 2011.
- 58) L. Tong, Q. Wei, A. Wei, J.X. Cheng: Gold nanorods as contrast agents for biological imaging: optical properties, surface conjugation and photothermal effects. Photochem. Photobiol., 85: 21-32, 2009.

## 著者紹介



櫛引 俊宏 (Toshihiro Kushibiki)
2005年3月,京都大学再生医科学研究
所生体材料学分野において博士後期課
程修了.博士(工学).2005年4月2006年3月,大阪大学21世紀 COE プログラム「細胞・組織の統合制御にむけた総合拠点形成」特任研究員.2006

年4月-2006年9月,同特任助手.2006年10月-2011年3月,大阪大学大学院工学研究科グローバル若 手研究者フロンティア研究拠点特任講師.2006年10 月-2010年3月,科学技術振興機構さきがけ「光の創 成・操作と展開」研究者.2008年10月-2010年9月, Harvard Medical School 客員准教授,2008年10月-, Massachusetts General Hospital 客員研究員.2011年4月 -2012年3月,大阪大学臨床医工学融合研究教育セン ター招へい准教授.2011年11月-,防衛医科大学校 医用工学講座准教授.2010年11月-,日本レーザー 医学会評議員.平成18年度日本レーザー医学会総会賞, 第31回レーザー学会奨励賞,平成20年度文部科学大 臣表彰若手科学者賞などを受賞.



石原 美弥 (Miya Ishihara)

平成6年,慶応義塾大学大学院理工学 研究科修了.平成8年,防衛医科大学 校医用電子工学講座助手(平成18年に 医用工学講座に改称).平成19年,同 准教授.平成23年,同教授.東海大 学医学部整形外科学非常勤教授.日本

生体医工学会 代議員. SPIE Bios Program committee アジ ア代表委員. IFMBE The women in medical and biological engineering committee 委員. 日米先端科学 (JAFoS) シ ンポジウム プランニンググループメンバー. 日本レ ーザー医学会 理事, 渉外・広報委員会 委員, COI 委 員会 委員および編集委員会 委員. 平成 14 年, The 5th The Tissue Engineering Society International, Best Oral Presentation. 平成 17 年, 日本エム・イー学会 荻野賞. 平成 22 年, 長寿科学振興財団 会長賞.