

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12058

研究課題名(和文) 顕微ブリルアン散乱分光法による1細胞レベルでの癌診断

研究課題名(英文) Cancer diagnosis at the single cell level by microscopic Brillouin scattering spectroscopy

研究代表者

石飛 秀和 (Ishitobi, Hidekazu)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：20372633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：輪帯照明とアイリスを用いて基板/サンプル界面からの正反射レイリー光成分をカットすることで、ブリルアン散乱光成分のS/Nを向上させることに成功した。またHeLa細胞の細胞核および細胞質でのブリルアン散乱スペクトルを測定した結果、ブリルアンシフト量および半値幅に有意な差があることを確認した。さらにドリフト校正用の新たな光学系を構築することで神経細胞のブリルアンイメージングを試みた結果、半値幅については明視野像との相関があり、正しく測定できていることを確認できたが、シフト量については、その変動が小さく、明視野像との相関は確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、光を用いてリモートに直接接触することなく細胞の硬さを定量的に測定できるブリルアン顕微鏡の開発を目的として行われた。実際に細胞内の異なる部位を測定することで硬さの違いを測定でき、さらに画像を取得することで粘性の分布を定量的に測定することに成功した。これらの研究成果から、1細胞レベルでの癌診断の実現可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：I succeeded in improving the S/N of the Brillouin scattered light component by cutting the Rayleigh light reflected at the substrate/sample interface using annular illumination and an iris. In addition, the Brillouin scattering spectra in the cell nucleus and cytoplasm of HeLa cells were measured, and it was confirmed that there was a significant difference in the amount of Brillouin shift and the half width. Furthermore, the Brillouin image of neural cells was obtained by using a new optical setup for compensating drift, and it was confirmed that the half width had a correlation with the bright-field image while the peak shift was no correlation. These results suggest that the viscosity was correctly measured but the elasticity could not be measured because the amount of the peak shift was too small to measure.

研究分野：分子ナノフォトニクス

キーワード：ブリルアン散乱 1細胞レベル 癌診断 粘弾性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在実用的に用いられる癌診断の方法として、レントゲン画像診断、PET 画像診断、細胞染色による病理検査などが挙げられるが、いずれも放射線照射による人体へのダメージ、造影剤による副作用、細胞採取時の患者への痛み、診断結果確定まで時間がかかる、などの問題がある。特に実際の手術現場では、腫瘍を全部除去できたかどうか確認できないため、余分に正常な組織ごと除去している。もしくは細胞染色による病理検査によって確認する場合でも、確定検査に時間がかかることから、手術時間が長くなり、患者への負担が大きい。よって手術中に、その場ですぐに診断する方法が切望されている。

近年、原子間力顕微鏡(AFM)を用いて、癌化した細胞と健康な細胞を測定した結果、癌化した細胞は正常な細胞より柔らかいことが分かっている[S.E.Gross et al., Nature Nanotech.(2007)]。具体的には癌化細胞(HeLa細胞)のヤングの弾性係数は2.48 kPa、癌化していない健康な細胞(End1/E6E7)のそれは5.50 kPaであった。この約2倍という大きな弾性係数の違いから、もし光を用いて細胞の硬さを測定することができれば、光によるリモートアクセスと細胞への低侵襲性を利用して、その場で、かつ1細胞レベルでの癌診断ができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

試料に光を照射すると、試料中の弾性波と光との相互作用により光が散乱され、光の周波数がわずかにシフトする。この現象はブリルアン散乱と呼ばれ、散乱スペクトルを分光計測することで試料の硬さ(粘弾性)を測定することができる。そこで本研究では、このブリルアン散乱分光法を顕微鏡化で適用し、細胞の硬さを測定することで、1細胞レベルでの癌診断のための基盤技術の確立を目的とした。具体的には、サンプルとして、癌化細胞と癌化していない健康な細胞を用いて、顕微鏡下でブリルアン散乱光スペクトルを測定し、個々の細胞の形、大きさなどの個体差を考慮に入れ、どれくらいブリルアン散乱光のシフト量とスペクトル幅に影響するのかを統計的に測定することで、1細胞レベルで癌診断を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

分光素子として、入射ウィンドウ(反射率~数%)を設けたエタロンを用いた。まず、ウィンドウから光を斜めに入射する。入射した散乱光は反射率95%の面で反射され、次に反対側の反射率99.9%(理想的には100%)の面でも反射される。このように入射した散乱光はエタロン内で多重反射され、反射率95%の面の各点から光が透過する。各点から透過した散乱光同士は多重反射によってお互いに光路長差が異なる。散乱光を集光してエタロンに入射することで、透過した散乱光同士が干渉し、干渉条件を満足する方向に光が回折される。散乱光の波長が異なれば、異なる角度に散乱光は回折される。この回折光をCCDなど2次元検出器に結像し検出することで、ブリルアン散乱光スペクトルを測定した。励起光源として波長532 nm、出力=150 mW、バンド幅=5 MHzの縦単一周波数発振(シングルモード)レーザーを用いた。この励起光を対物レンズでサンプルに集光することでブリルアン散乱を誘起し、サンプルからのブリルアン散乱光を同じ対物レンズで集め、レンズを用いてエタロンの入射ウィンドウに集光した。その後VIPAで分光されたブリルアン散乱光をレンズでEMCCD上に結像させ、分光計測した。

4. 研究成果

S/N向上を目的として、輪帯照明とアイリスを用いて入射光方向と異なる方向に散乱される散乱光を検出することで、基板/サンプル界面からの正反射レイリー光成分を抑え、相対的にブリルアン散乱光成分を増強させることを試みた。これまで、細胞観察には基板と細胞との屈折率差に由来する基板/細胞界面からの入射光の正反射光成分が大きいことと、細胞の厚さが15-20 μ m程度であることから、細胞からのブリルアン散乱光を検出することは困難であった。テストサンプルとして水を入れたガラスボトムディッシュを用いた。実験の結果、アイリスの大きさおよび瞳面上での位置を最適化することで、ガラス基板と水との界面に光を集光した場合においても、水のブリルアン散乱光を検出することに成功した。輪帯照明とアイリスを用いない場合、集光点をガラス基板上から水中に向かって20 μ m以上移動させても、正反射レイリー光成分が強すぎて、水のブリルアン散乱光を検出できなかったことから、本手法の有効性を確認した。また、液体には存在せず、固体にのみ存在する横モード音波によるブリルアン散乱スペクトル測定を試みた。上記と同じ光学系を用い、サンプルとしてポリカーボネートを用いた。その結果、弱いながらも縦モード音波によるブリルアン散乱光だけでなく横モード音波によるブリルアン散乱光を測定することに成功した。

HeLa細胞と神経細胞のブリルアン散乱スペクトル測定およびイメージングを行った。まずHeLa細胞の細胞核および細胞質でのブリルアン散乱スペクトルを測定した。その結果、ブリル

アンシフト量について、細胞核は 7.7 GHz、細胞質は 7.5 GHz であることが分かった。ブリルアンシフト量が大きいほど試料の弾性率が大きいので、細胞核の方が細胞質より弾性率が大きいことが分かった。また半値幅について、細胞核は 1.4 GHz、細胞質は 1.2 GHz であることが分かった。半値幅が大きいほど試料の粘性が高いので、細胞核の方が細胞質より粘性が大きいことが分かった。神経細胞についても同様に測定を行い、部位によってスペクトル形状が異なることを確認した。次に HeLa 細胞および神経細胞のイメージングを試みた。現状スペクトル測定に時間がかかるため、スペクトルのドリフトが問題となったが、ドリフト校正用の新たな光学系を構築することで解決した。両細胞について、場所によっては細胞核からのレイリー散乱光が強く、散乱スペクトルをフィッティングすることができないピクセルがあった。神経細胞について、細胞核を含まない樹上突起部分にフォーカスすることでイメージングを行った。半値幅については明視野像との相関があり、正しく測定できていることを確認できたが、シフト量については、その変動が小さく、明視野像との相関は確認できなかった。細胞核を含む部分のイメージングには、さらなる S/N 比の向上、シフト量についてはさらなるスペクトル分解能の向上が必要となることが分かった。

さらに S/N 比を向上させるため、レンズによるフーリエ変換作用を利用した空間周波数フィルタリングを試みた。高散乱体や異なる材料間の界面近傍を測定する場合、高散乱体や界面からのレイリー散乱光同士の干渉縞がブリルアン散乱光と重畳し、ブリルアン散乱光を測定することが困難である。そこで、干渉計光路上のレンズのフーリエ面にピンホールを配置し、高周波ノイズであるレイリー散乱光による干渉縞をカットした。ピンホールのサイズを変化させながら、ブリルアン散乱光と背景光の強度比を測定・評価した結果、S/N 比を向上させることに成功した。またスペクトル分解能を向上させるため、自由スペクトル範囲(Free Spectral Range: FSR)をオンデマンドに調節できるエアギャップ VIPA を用いたブリルアン分光計の設計および構築を行った。入射側(入射ウィンドウ有り)および射出側のエタロンを設計し、それぞれのエタロン同士が完全に平行になるように配置した。エタロン間を縮めると FRS は広がり、またエタロン間を伸ばすと FRS は縮む。実際にエタロン間の距離を変化させることで、FRS が変化することを確認した。特に FRS を縮めることで、スペクトル分解能を向上させることに成功した。またこれまで用いていた一枚物のソリッドエタロンと比較した結果、S/N 比がほとんど同等レベルであることを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Minoshima Wataru, Masui Kyoko, Tani Tomomi, Nawa Yasunori, Fujita Satoshi, Ishitobi Hidekazu, Hosokawa Chie, Inouye Yasushi	4. 巻 11
2. 論文標題 Deuterated Glutamate-Mediated Neuronal Activity on Micro-Electrode Arrays	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 830 ~ 830
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi11090830	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ishitobi Hidekazu, Akiyama Tomoko, Sekkat Zouheir, Inouye Yasushi	4. 巻 124
2. 論文標題 Optical Trapping of Photosoftened Solid Polymers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry C	6. 最初と最後の頁 26037 ~ 26042
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.0c08068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Andam Najat, Refki Siham, Ishitobi Hidekazu, Inouye Yasushi, Sekkat Zouheir	4. 巻 8
2. 論文標題 Optical Characterization of Ultra-Thin Films of Azo-Dye-Doped Polymers Using Ellipsometry and Surface Plasmon Resonance Spectroscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Photonics	6. 最初と最後の頁 41 ~ 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/photonics8020041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 S. Elhani, H. Ishitobi, Y. Inouye, A. Ono, S. Hayashi, and Z. Sekkat	4. 巻 10
2. 論文標題 Surface Enhanced Visible Absorption of Dye Molecules in the Near-Field of Gold Nanoparticles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-60839-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 N. Andam, S. Refki, S. Hayasi, A. Rahmouni, H. Ishitobi, D. V. Nesterenko, Y. Inouye, and Z. Sekkat	4. 巻 10722
2. 論文標題 Plasmonic coupled modes in metal-insulator-metal structures for sensing applications	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of SPIE	6. 最初と最後の頁 072200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1117/12.2319936	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 13件)

1. 発表者名 Hidekazu Ishitobi and Yasushi Inouye
2. 発表標題 Polymer movement induced by two-color light
3. 学会等名 SPIE Optics + Photonics 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本多 巧一、石飛 秀和、井上 康志
2. 発表標題 伝搬型表面プラズモン共鳴によるローダミン6Gの増強ラマン散乱
3. 学会等名 第81回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 宏知、増井 恭子、Zouheir Sekkat、石飛 秀和、井上 康志
2. 発表標題 表面プラズモン共鳴を用いたイオン濃度分布の顕微イメージング
3. 学会等名 第81回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 箕嶋 涉、増井 恭子、谷 知己、名和 靖矩、藤田 聡史、石飛 秀和、細川 千絵、井上 康志
2. 発表標題 多電極アレイ上の神経回路網における重水素化グルタミン酸に活性化された神経活動特性
3. 学会等名 第81回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本多 巧一、石飛 秀和、井上 康志
2. 発表標題 伝搬型表面プラズモン共鳴により励起されたローダミン6Gの増強ラマン散乱における共鳴ラマン効果
3. 学会等名 第68回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Y. Inouye, K. Masui, and H. Ishitobi
2. 発表標題 Observation for conformation change of DNA via local surface plasmon resonance
3. 学会等名 SPIE Optics + Photonics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Masui, S. Morishita, T. Hamamoto, W. Minoshima, C. Hosokawa, V. R. Daria, H. Ishitobi, and Y. Inouye
2. 発表標題 Live-cell Raman imaging of hippocampal neuronal cells
3. 学会等名 Biomedical Raman Imaging 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Nakatani, M. Fujieda, H. Ishitobi, and Y. Inouye
2. 発表標題 Two-photon excited fluorescence of Platinum Nanoclusters
3. 学会等名 Global Nanophotonics 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Honda, K. Masui, H. Ishitobi, and Y. Inouye
2. 発表標題 Raman scattering of Rhodamine 6G enhanced by propagating surface-plasmon resonance on a flat silver film
3. 学会等名 Global Nanophotonics 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Inouye, H. Ishitobi, and Z. Sekkat
2. 発表標題 Highly sensitive ion detection based on propagating surface plasmon resonance for bio-sensing and bio-imaging
3. 学会等名 Global Nanophotonics 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本多 功一、望月 葵、増井 恭子、名和 靖矩、石飛 秀和、細川千絵、Vincent R. Daria、藤田克昌、井上康志
2. 発表標題 海馬神経細胞のラマン分光計測
3. 学会等名 第18回産総研・産技連LS-BT合同発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 智也、澤 淳史、石飛 秀和、井上 康志
2. 発表標題 輪帯照明によるブリルアン散乱分光法のS/N比向上
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 箕島 渉、増井 恭子、細川 千絵、谷 知己、石飛 秀和、井上 康志
2. 発表標題 重水素置換グルタミン酸濃度に依存した神経自発活動解析
3. 学会等名 第67回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本多 巧一、石飛 秀和、井上 康志
2. 発表標題 伝搬型表面プラズモンによる増強ラマン散乱
3. 学会等名 第67回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tanaka, K, Masui, C. Hosokawa, H. Ishitobi, Z. Sekkat, and Y. Inouye
2. 発表標題 Determination of metal ion concentration using surface plasmon resonance
3. 学会等名 Global Nanophotonics 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Fujieda, K. Masui, C. Hosokawa, H. Ishitobi, and Y. Inouye
2. 発表標題 Fluorescent Imaging of Live Hippocampal Neurons with Platinum Nanoclusters
3. 学会等名 Global Nanophotonics 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Inouye, H. Ishitobi, K. Masui, Z. Sekkat
2. 発表標題 Advanced Surface Plasmon Resonance Sensing for Enormous Enhancement of Resolution and Electric Field
3. 学会等名 Global Nanophotonics 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Fujieda, K. Masui, C. Hosokawa, H. Ishitobi, and Y. Inouye
2. 発表標題 Fluorescent Imaging of Live Hippocampal Neurons with Platinum Nanoclusters
3. 学会等名 The 79th Japan Society of Applied Physics Autumn Meeting, JSAP-OSA Joint Symposia (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 望月 葵、増井 恭子、名和 靖矩、石飛 秀和、細川 千絵、ダリア ヴィンセント、藤田 克昌、井上 康志
2. 発表標題 海馬神経細胞のラマン分光計測
3. 学会等名 第79回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Ishitobi
2. 発表標題 Photochemical imaging of plasmonically enhanced near-fields using light-induced mass transport in azo-polymer films
3. 学会等名 SPIE Optics + Photonics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Ishitobi, K. Masui, and Y. Inouye
2. 発表標題 Fluorescent Pt nanoclusters and their applicaiton to bio-imaging
3. 学会等名 SPIE Optics + Photonics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Z. Sekkat, S. Refki, S. Hayashi, H. Ishitobi, Y. Inouye, and D. Nesterenko
2. 発表標題 Resolution enhancement of plasmonic sensors by metal-insulator-metal structures
3. 学会等名 SPIE Optics + Photonics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 望月 葵、増井 恭子、名和 靖矩、石飛 秀和、細川千絵、Vincent R. Daria、藤田克昌、井上康志
2. 発表標題 海馬神経細胞のラマン分光イメージング
3. 学会等名 応用物理学会関西支部 平成30年度第1回講演会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------