

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22979

研究課題名(和文)分子種識別トモグラフィを実現する非弾性散乱光干渉断層画像計の開発

研究課題名(英文)Non-elastic light scattering interferometer for chemical contrast tomography

研究代表者

由井 宏治 (Yui, Hiroharu)

東京理科大学・理学部第一部化学科・教授

研究者番号：20313017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：まず任意の試料内部に埋もれた構造体を高空間分解能で分子識別可能な手法として、誘導ラマン散乱干渉計を開発した。この手法を深さ数百nmの凹凸を持つシリコン基板と水との界面に適用し、水が微小凹凸の内部にまで入り込んでいることを実証した。

さらに、不均一な試料の局所粘弾性計測を目的に、動的散乱光及び光音響波形解析を試みた。前者の手法では、凹凸のある表面で乾燥・流動するスラリーの粘弾性を時空間的に追跡することに成功した。後者の手法では、試料が生体組織程度に柔らかい場合からゴムのように比較的硬い場合まで(ヤング率 数十～数千kPa)、それが強光散乱体に埋もれていても粘弾性計測可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

時空間的に不均一な試料の分子分布や局所粘弾性を高空間分解能で計測できることは、医療診断や食品の検査に重要である。濃厚コロイド分散系や光散乱体に埋もれた構造体は食品・医薬品・生体組織内部などに普遍的に存在するため、本課題で開発した手法の応用範囲は多岐にわたる。

実際に本手法は多くの注目を集め、例えば生きたままの動物の内部組織における局所粘弾性を直接計測・イメージングする発展的研究として、AMED-CRESTの研究課題(加齢性難聴の克服に資する次世代型医療の基盤技術の創出、研究代表者：日比野浩(大阪大学)、分担研究)へと昇華した。

研究成果の概要(英文)：At first, we have developed a stimulated Raman scattering interferometer, which enables us to identify chemical species of buried structures in materials with a high spatial resolution. This technique was applied to nanometer-structured silicon wafers buried in water, and it was demonstrated that the water went into the nanometer-sized holes on the wafers were observable even under buried configuration.

Then, dynamic light scattering and photoacoustic waveform imaging techniques were developed for viscoelastic imaging of local areas in the samples. The former successfully tracked spatially and temporarily heterogeneous viscoelasticity of condensed slurries flowing/drying on rough surfaces. The latter probed the elasticity of samples buried in strong light scatterer, varying wide-range of tens to thousands kPa in Young's modulus.

研究分野：分析化学

キーワード：局所粘弾性 光音響 光干渉計 イメージング トモグラフィ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

時空間的に不均一な試料の分子分布を高空間分解能で識別することは、材料開発・医療診断・食品検査など幅広い分野において重要である。しかしこのような計測においては、例えば生体組織のように、興味深い系の多くは計測対象が光散乱体に埋もれていることが多いことが課題となっていた。埋もれた試料の観察法として一般的な光干渉断層法(OCT)は、非破壊・非接触かつ高空間分解能で内部構造を観察可能な優れた手法であるが、分子識別能を持たない。一方で分子識別に有力な振動分光法は、埋もれた試料における任意の計測位置からの信号を選択的に取得することが困難であった。

また、生体組織や食品などの診断・検査のためには、その分子分布だけでなく局所粘弾性などの力学特性をマッピングすることも重要であることが多い。しかし、生体組織中の細胞や食品のように、流動や乾燥によってその力学特性が空間的に不均一かつ時々刻々と変化していく系や、固体材料において光散乱体に埋もれている試料についてその局所粘弾性を、マイクロメートルスケール以上の高空間分解能かつ非接触で計測することはこれまで困難であった。

2. 研究の目的

本研究課題では、上記の課題を克服し、強光散乱体に埋もれた試料の分子種選択的な断層画像を構築可能な、新しい手法の開発を目指した。特に、振動分光法として非弾性散乱光である誘導ラマン散乱(SRS)に着目し、これを OCT と同様に光干渉させることで、埋もれた試料に対して高空間分解能を保ったまま分子種を識別することを着想した。

また、試料の局所粘弾性を非接触に計測するため、動的散乱法と光音響法に着目し、各々について計測・解析手法の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) 誘導ラマン散乱-光干渉断層法 (SRS-OCT) :

Ti: Sapphire ピコ秒レーザーにより 2 台の OPO を励起し、波長 1100 nm 及び 1336 nm (ストークス光; 水の変角振動に共鳴) のピコ秒パルスを得た。1100 nm の光はさらに 2 つに分け、ラマンポンプ光および参照光として使用した。この際、ポンプ光と参照光はそれぞれ 3 および 5 MHz で強度変調した。ポンプ光とストークス光を同軸に重ねたうえで顕微対物レンズにより試料に集光し、試料を透過したポンプ光を対向する顕微対物レンズで平行化した。これを参照光と干渉させ、振動数 8 MHz にてロックイン増幅検出した。

試料には高さ 280 nm、直径 2.5 μm の柱状構造 (5.8 μm ピッチ) を形成したシリコン基板を用いた。表面にナノメートルスケールの凹凸がある材料が液体に触れた場合、液体が凹凸に入り込む Wenzel 濡れと凹凸部分に空気が残存する Cassie-Baxter 濡れの 2 つの状態を取り得る。そこでこのシリコン基板を水に浸漬し、水に埋もれた凹凸構造部分を高空間分解能で分子識別すること (濡れ状態の判別) を目指した。

(2) 暗視野配置動的散乱法 :

波長 532 nm の連続光レーザーを顕微対物レンズにより試料に集光し、散乱光の強度変化を連続的に記録可能な光学系を構築した。この時、微弱な散乱光が試料表面からの反射光に埋もれてしまう問題を解決するため、レーザー光を対物レンズの端から入射する (暗視野配置) ことで、散乱光と反射光を空間的に分離した。アイリスによって散乱光のみを透過させ、その強度を CMOS 検出器によって記録した。得られた信号強度の揺らぎを自己相関解析し、その緩和時間から局所粘弾性を検討した。

試料には、平滑またはマイクロメートルスケールの凹凸を持つモデル皮膚基板に滴下した濃厚スラリーを用いた。スラリーとして、直径 200 nm のポリスチレンビーズを 1 vol% で水に懸濁させたものを用いた。滴下量を 2 μL に統一し、乾燥に伴う局所粘弾性の時間変化を追跡した。

(3) 光音響法 :

波長 532 nm のナノ秒パルスを試料に集光し、発生する光音響波をハイドロフォンにより取得した。高空間分解能を得るため、振動数 MHz 帯域の超音波に着目した。また、通常的光音響法では発生した光音響波の強度のみに着目するが、本研究では光音響の時間波形を取得し、その振動数と試料の弾性との相関を解析した。

試料には硬さの異なる黒色ゴム (ヤング率 0.5~2 MPa) 及び濃度を変えて作成したアガロースゲル (2~8 wt%; ヤング率 0.1~1 MPa) を用いた。黒色ゴムは、光散乱体である 2 wt% アガロースゲルに深さ 2 cm で埋め込み、ゴムの光吸収を利用して光音響を発生させた。硬さを変えたアガロースゲルの測定においては、ゲル中に直径約 0.5 mm の管状の孔をあけ、内部を 15 g/dL のヘモグロビンを含むリン酸緩衝溶液 (pH 7.4) で満たした。これを光散乱体である 2 wt% アガロースゲルに深さ 1 cm で埋め込み、ヘモグロビン溶液を光吸収体として光音響波を発生させた。

4. 研究成果

(1) 図 1-1 は、ポンプ光とストークス光の集光深さ(Z)を掃引しながら、誘導ラマン干渉信号の強度をプロットしたものである。ストークス光の波長を 1336 nm としてポンプ光との差周波数が水の振動に共鳴している場合 (赤線) には集光深さに応じて強度が変化しているのに対し、波長を 1342 nm にして振動共鳴を回避した場合 (青線) には位置依存性が消失している。このことは、我々の開発した SRS-OCT では最低でもマイクロメートルスケールの空間分解能で分子識別可能であることを示しており、およそ $Z = 2 \mu\text{m}$ の位置にシリコンと水の界面があることがわかる。

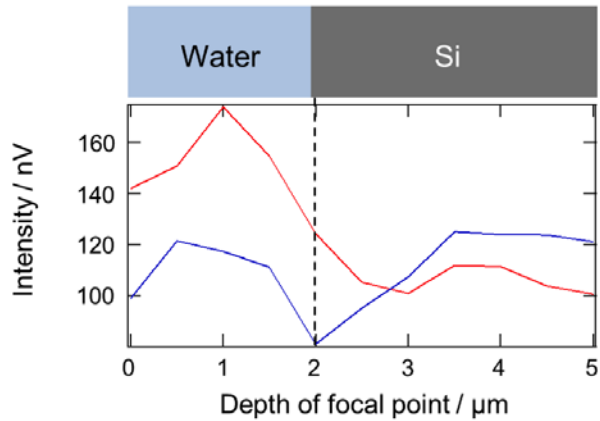


図 1-1. SRS-OCT 信号の集光深さ依存性. 赤線: 振動共鳴条件、青線: 非共鳴条件.

また、面内方向 (X) と深さ方向 (Z) の両方を掃引しながら干渉光の位相を変化させたところ、図 1-2 に示す依存性が得られた。まず X 方向の依存性に着目すると、いずれの Z においても $X = 2 \mu\text{m}$ において位相が急激に変化していることがわかる。このことから、シリコンに形成した柱と水との境界は $X = 2 \mu\text{m}$ の位置にあることがわかる。さらに、この位相変化の急激さに着目すると、 $Z = 2.5 \mu\text{m}$ の時に最も急激な位相変化を示していることがわかる。このことはシリコンと水の界面が $Z = 2.5 \mu\text{m}$ にあることを示している。これにより、SRS 光の位相に着目して解析することでサブマイクロメートルの深さ方向分解能を達成できることが実証できた。

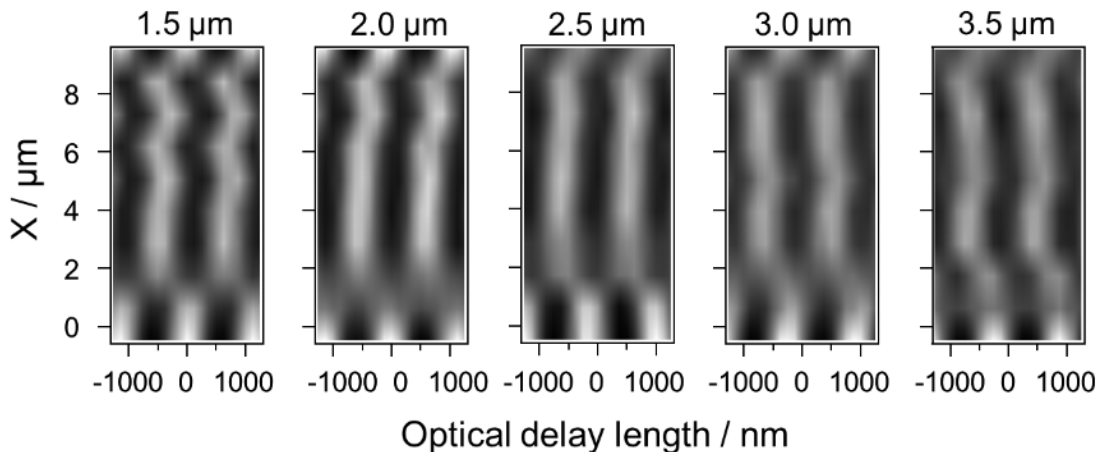


図 1-2. 集光位置に対する SRS-OCT 信号の位相変化. 深さ方向(Z)の集光位置は各パネルの上を示した。

さらに、この位相変化を定量的に解析すると、図 1-3 に示す通りになった。 $X = 2 \sim 6 \mu\text{m}$ の領域においては、柱と柱の間が水で満たされていると仮定した場合の位相に一致しているのに対し、 $X = 7, 8 \mu\text{m}$ の領域では空気が満たされていると考えた場合の位相となっている。このことは、この試料が完全な Wenzel 濡れになっておらず、部分的に空気が残存していることを示している。このような部分的 Cassie-Baxter 状態はシミュレーションにより予測されていたが、本研究課題で開発した SRS-OCT によってこれを実証することに成功した。

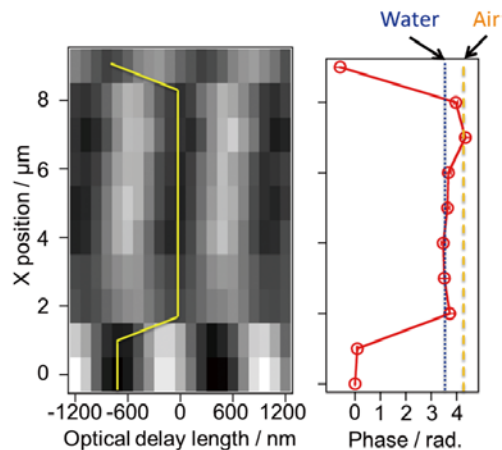


図 1-3. $Z = 2.5 \mu\text{m}$ における SRS-OCT 信号の位相変化.

(2) まずグリセリン水溶液を用いて自己相関関数の緩和時間と試料の粘性の関係を検討したところ、図 2-1 に示す依存性を得た。この結果より、我々の装置では 60 cP までの幅広い粘性領域において緩和時間から粘性を決定できることが示された。

そこでこの手法を基板上に滴下された濃厚スラリーに応用したところ、凹凸のあるモデル皮膚基板上で、乾燥に伴って緩和時間が図 2-2 のように変化した。皮丘と皮溝のそれぞれ滴下後 22 分 40 秒、ならびに 23 分 20 秒で緩和時定数が小さな値となっているのは、ここでスラリーが完全に乾燥したためである。どちらの場合でも滴下後 19 分程度までは一定の緩和時間を示すのに対し、乾燥の数分前から大きな値となっていることがわかる。図 2-1 に示す通り緩和時間の増加は粘性の増大を意味するため、これは乾燥に伴うスラリー粒子の濃縮によって実効的な粘性が増大したことを示している。すると、時定数が増大し始めてから（皮丘 20 分 00 秒、皮溝 21 分 20 秒）完全乾燥するまでの間が、半乾燥状態に対応することがわかる。ここで、完全乾燥までにかかる時間に注目すると、皮溝の方が乾燥に時間がかかっていることがわかる。このことは、皮丘の方が空気に接している面積が大きいために効率的に蒸発が進行していることを示しており、直観に一致する結果である。ところが、前述の半乾燥状態を維持している時間に注目すると、皮丘の場合で 2 分 40 秒間、皮溝の場合で 2 分間となっており、乾燥が高速に進むはずの皮丘の方が長期間に渡って半乾燥時間を維持していることがわかる。このことは、皮溝から皮丘に向かって溶媒が供給されている（図 2-3）ことを意味している。溝から丘へ向かって溶媒が供給されるような流れの原因は蒸発に伴う表面張力の不均一性にあると考えられ、この完全乾燥直前にのみ見られる特異な流れは、本研究で初めて見出されたものである。

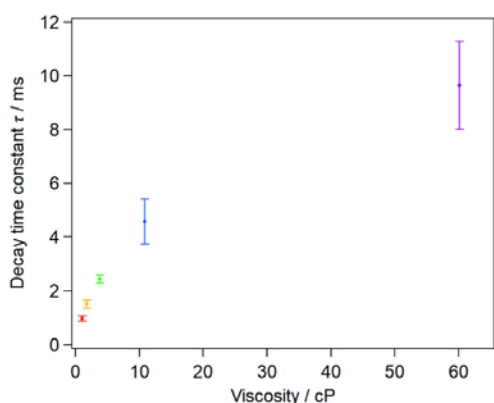


図 2-1. 緩和時間の粘性依存性.

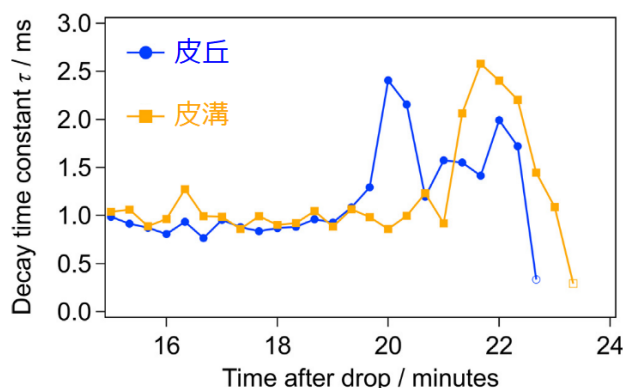


図 2-2. スラリーの乾燥に伴う緩和時間変化.

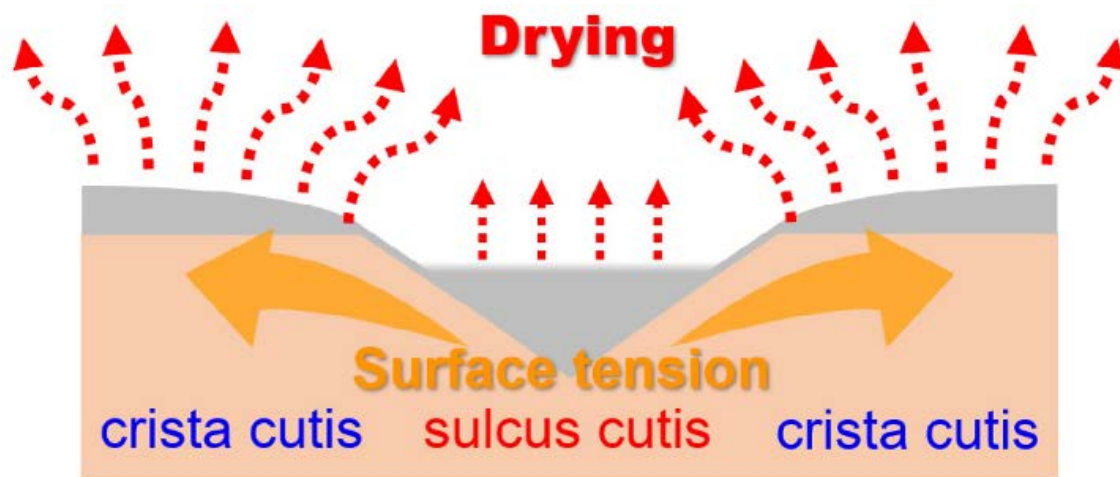


図 2-3. 凹凸基板上で半乾燥状態にある濃厚スラリーに生じる流れ.

(3) 図 3-1 はゴムに対して測定された光音響波の時間波形(a)およびそれをフーリエ変換して得られた振動数スペクトル(b)である。図 3-1 (b)に示す通り、ゴムのヤング率が增大する（硬くなる）につれて振動数のピークが高振動数側にシフトしていることがわかる。

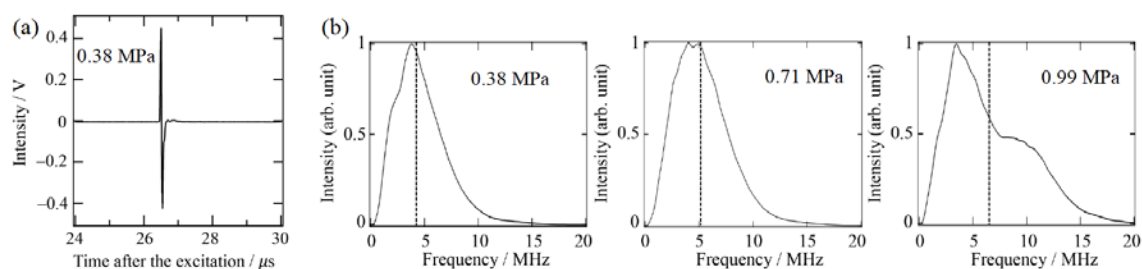


図 3-1. ゴム試料における光音響波の時間波形 (a) およびそのフーリエ変換スペクトル(b). (b) 中の縦破線は重心振動数を表す。

そこで、この振動数分布に対して重心を取り、ゴムのヤング率に対してプロットすると、図 3-2 の相関が得られた。特にヤング率 1 MPa 以下の領域では弾性と振動数の間に線形性が見出されたことから、光音響波の時間波形を取得することにより試料の弾性を非接触に計測することが可能であることが実証された。

さらに、同様の計測をアガロースゲルに対しても行った。ただし、ゴムの系では光吸収体であるゴム自身の硬さを変化させていたのに対し、アガロースゲルの系では光吸収体はゲルに接したヘモグロビン溶液であり、硬さを変化させるアガロースゲルが直接光音響を発生させることはない。これは、光吸収体（赤血球）に触れた毛細血管の硬さが変化していく状況を模したモデル系と捉えることができる。また、今回使用したアガロースゲルのヤング率は 1 MPa 以内の領域であり、これは皮膚や動脈などの生体組織のそれに対応する。図 3-3 に示す通り、この条件でも弾性に対して光音響波の振動数が正の相関を示すことが確かめられた。光音響法は原理的にマイクロメートルスケールの空間分解能を持つため、この成果は、従来の手法では評価が難しかった毛細血管の硬さを評価する手法として、本研究課題で開発した手法が有力であることを示唆している。

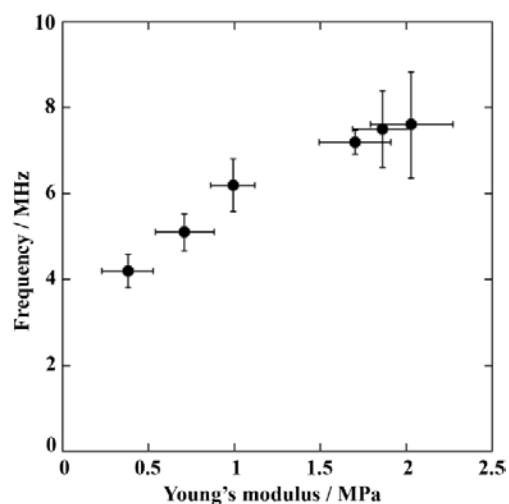


図 3-2. ゴムのヤング率に対する光音響信号の振動数変化。

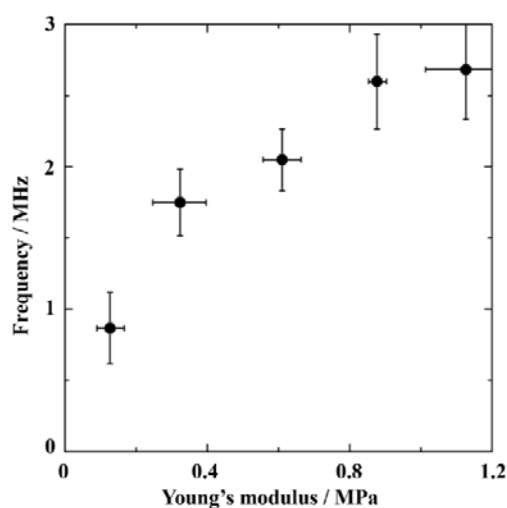


図 3-3. 光吸収体に接したアガロースゲルのヤング率と光音響振動数の相関。

本研究は多くの注目を集め、生きたままの動物の内部組織における局所粘弾性を直接計測・イメージングする発展的研究として、AMED-CREST の研究課題（加齢性難聴の克服に資する次世代型医療の基盤技術の創出、研究代表者：日比野浩（大阪大学）、分担研究）へと昇華した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ayaka Naka, Toshinori Morisaku, Shu-hei Urashima, Hiroharu Yui	4. 巻 36
2. 論文標題 Characterization of the elasticity of small objects buried in media based on the measurements of photoacoustic temporal waveforms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ANALYTICAL SCIENCES	6. 最初と最後の頁 1487-1493
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.20P076	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 Masaru Shiraiishi, Shu-hei Urashima, Toshinori Morisaku, Rui Takahashi, Keiko Matsuo, Hiroharu Yui	4. 巻 584
2. 論文標題 Development of dark-field dynamic light scattering microscopy and its application: Tracking dynamics of particles in condensed slurries spreading on planar/nonplanar substrates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE	6. 最初と最後の頁 723-728
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcis.2020.09.095	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 -

1. 著者名 Motohiro Banno, Sumire Takahashi, Hiroharu Yui	4. 巻 35
2. 論文標題 Measurement of water distribution on micro-structured surface buried in water as a model of super water repellent surface by stimulated Raman scattering interferometer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 911-915
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.19P060	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Miki Sunada, Toshinori Morisaku, Atsushi Miyazaki, Takaya Sakai, Keiko Matsuo, Hiroharu Yui
2. 発表標題 Contribution of the thermal fluctuation of lipid bilayers to the control of membrane fusion: Development of an evanescent-wave illumination dynamic light scattering microscope
3. 学会等名 Okinawa Colloids 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaru Shiraiishi, Toshinori Morisaku, Rui Takahashi, Yuu Oshima, Shu-hei Urashima, Keiko Matsuo, Hiroharu Yui
2. 発表標題 Dark-field laser speckle microscope for micro-rheological measurements of slurries on a substrate during wetting and spreading accompanied by drying
3. 学会等名 Okinawa Colloids 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中 彩香, 木村 真衣子, 森作 俊紀, 浦島 周平, 由井 宏治
2. 発表標題 レーザー光音響分光法を用いた生体組織深部レオロジー計測
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村 真衣子, 中 彩香, 森作 俊紀, 浦島 周平, 由井 宏治
2. 発表標題 レーザー光音響分光法を用いた毛細血管模擬試料の弾性計測
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019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
研究分担者	浦島 周平 (Urashima Shu-hei) (30733224)	東京理科大学・理学部第一部化学科・助教 (32660)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	森作 俊紀 (Morisaku Toshinori) (00468521)	東京理科大学・研究推進機構総合研究院・助教 (32660)	2020年度まで

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