

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16389

研究課題名(和文)自家蛍光フリーラマン散乱分光法の開発と生体組織解析への応用

研究課題名(英文) Development of autofluorescence-free Raman spectroscopy and its applications to biomedical imaging

研究代表者

南川 丈夫 (Minamikawa, Takeo)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(理工学域)・講師

研究者番号：10637193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラマン散乱分光法は、分子構造に基づいた無染色・非侵襲的な生体組織解析法として有用である。しかし、組織から発生する自家蛍光の影響で、ラマンスペクトル検出能が大きく制限されるといった問題点があった。そこで本研究では、ラマン散乱と自家蛍光の励起波長依存性に着目することで、自家蛍光の影響を除去した新たなラマン散乱分光法の光学系の構築、および原理実証を行った。

研究成果の概要(英文)：Raman spectroscopy is a promising technique to visualize molecular information of cells and tissues based on molecular vibrations. This is now widely applied to biomedical imaging and its molecular analysis. However, autofluorescence from specimens limits the sensitivity of Raman spectroscopic analysis due to the autofluorescence spectrum appears at the same wavelength of the Raman spectrum and works as a strong background. In this study, we developed a Raman spectroscopy system with an autofluorescence elimination system based on the excitation wavelength dependency of the Raman scattering and autofluorescence.

研究分野：顕微分光学

キーワード：ラマン散乱分光法 ラマン散乱 自家蛍光 ラマン顕微鏡

### 1. 研究開始当初の背景

日本人の死因の第一位である悪性腫瘍の主な治療法は、外科的摘出術である。その術中に悪性腫瘍を十分に摘除できず、術後ががんの再発や転移に至る症例が数多く報告されている。また、がん組織周囲の重要な組織（末梢神経など）が摘出されたり傷ついたりすることによって温存できず、術後に後遺症を残す症例も数多く報告されている。これらは、現状では術中にがんやその周囲組織を検出する方法が存在せず、がんやその周囲組織の同定は術者の経験や解剖学的知識に頼らざるを得ないためである。

研究代表者は、これまでに非侵襲的術中組織診断法の創出を目指して、ラマン散乱分光法を用いる手法の提案及びシステムの開発を行ってきた。ラマン散乱は、光が物質にあたった際に散乱する、その物質を構成する分子固有の波長を持つ光をいう。つまり、ラマン散乱光を分光することで、その物質の構成分子をラマンスペクトル情報として捉えることができる。その際、固定や染色等の特殊な処理を必要としない。即ち、従来染色等の処理が困難であった状況（適用可能な色素がない、*in vivo*測定、医療応用など）などでも、ラマン散乱分光法により分子構造に基づいて選択的に検出できる可能性を持つ。

しかし、ラマン散乱光は非常に微弱であり、生体内物質（コラーゲン、リポフスチンなど）からの自家蛍光に埋もれてしまうという問題点があった（図2）。そのため、従来数学的自家蛍光スペクトル推定法（Lieber et al., *Appl. Spectrosc.* 2003 など）や複数波長測定法（Zhao, et al., *Appl. Spectrosc.* 2002）などにより自家蛍光成分を除去することが行われてきたが、スペクトル推定誤差、複数波長により測定時間がかかるなどの要因から、十分な精度かつ術中観察に実用的な処理時間で自家蛍光を除去することは難しかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らがこれまで行ってきたラマン散乱光を用いた組織観察法を基盤とし、自家蛍光の影響を除外した新たなラマン散乱分光法を実現することを目的とする。具体的には、ラマンスペクトルと自家蛍光スペクトルの波長依存性の違いを活用する。

### 3. 研究の方法

本研究では、特に下記の2点を行った。

- (1) ラマン散乱顕微分光システムの構築
- (2) 波長依存性に基づいた自家蛍光除去システムの開発

### 4. 研究成果

#### (1) ラマン散乱顕微分光システムの構築

まず、ラマン散乱分光を実施するためのラマン散乱分光システムの構築を行った。図1にラマン散乱分光システムの光学系を示す。

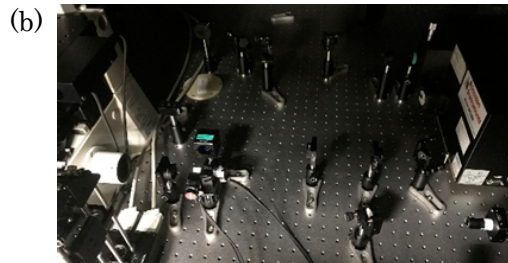
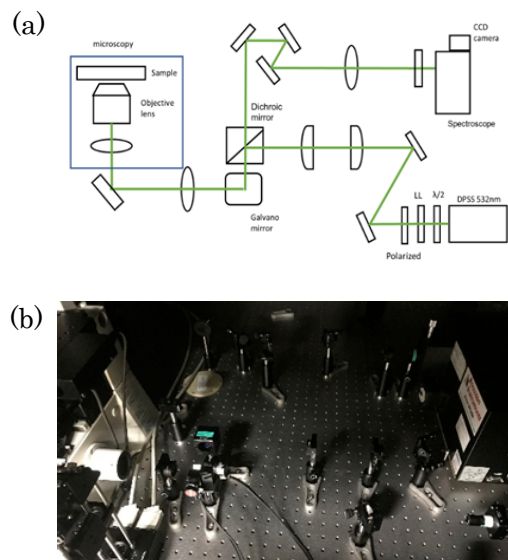


図1 開発したラマン散乱分光システム。

(a) 光学系. (b) 光学系の外観.

光源には、DPSS レーザー (532 nm) を初期仕様として設置し、波長依存性等を取得できるように交換可能とした。光源は、偏光状態を調整した後、ダイクロイックミラー、ガルバノミラー、リレーレンズ、対物レンズを介して試料へ照射した。試料から発生したラマン散乱光は、同光路を戻り、ダイクロイックミラーを透過し、分光器へ入射し、ラマンスペクトルの取得を行った。なお、イメージの取得には、ガルバノミラーを走査することで得た。

次に、開発したラマン散乱分光システムの基本特性の取得を行った。

まず、開発したラマン散乱分光システムのスペクトル分解能について評価を行った。図2に結果を示す。スペクトル分解能の評価に

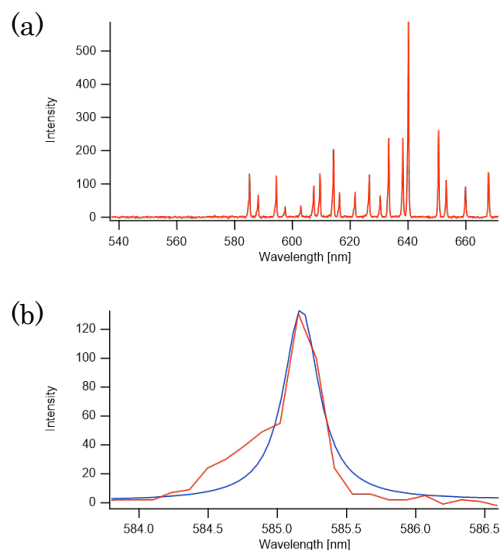


図2 開発したラマン散乱分光システムのスペクトル分解能評価。(a) 測定したネオンランプの輝線スペクトル。(b) 585 nm 付近の拡大図 (赤) およびフィッティングデータ (青)。

はネオンランプを用いた. 回折格子 300 gr/mm を用いた場合, 半値幅は波長では 0.67 nm となり, 波数では  $23.6 \text{ cm}^{-1}$  となった. また, 同様の測定を回折格子 600 gr/mm で行った場合は, 半値幅は波長では 0.31 nm となり, 波数では  $10.9 \text{ cm}^{-1}$  となった. さらに, 回折格子 1200 gr/mm とした場合は, 半値幅は波長ではおよそ 0.19 nm となり, 波数では  $6.71 \text{ cm}^{-1}$  となった.

次に, 様々な試料のラマンスペクトル測定を行った. 図 3 に 4H-SiC, 図 4 に 6H-SiC, 図 5 にパラフィンのラマンスペクトルを示す. 試料に依存して, 固有のラマンスペクトルが取得できていることがわかる.

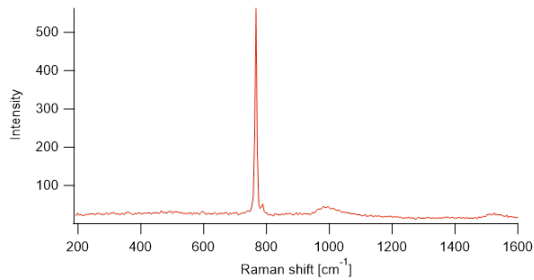


図 3 4H-SiC のラマンスペクトル

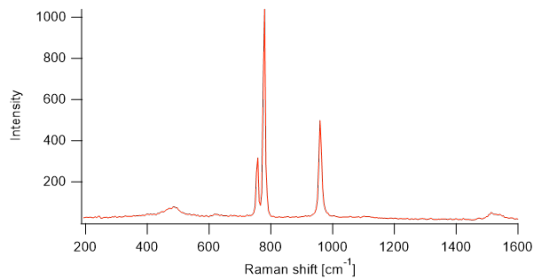


図 4 6H-SiC のラマンスペクトル

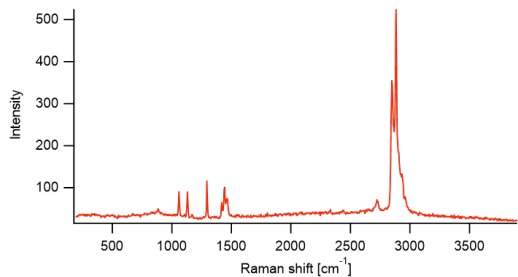


図 5 パラフィンのラマンスペクトル

さらに, 植物組織のラマンスペクトルの取得も行った. 試料には *Setaria viridis* (エノコログサ) を用いた. 外観を図 6a に示した. 対物レンズは, 倍率 60 倍, 開口数 0.95 を用いた. また, 測定時間は 10 秒とした. 測定結果を図 6 に示す.  $910, 1094, 1136, 1543 \text{ cm}^{-1}$  に特徴的なピークが見られる事がわかる. 以上のことから, 植物組織においても十分なラマンスペクトル取得ができることがわかった.

さらに, ラマンイメージングの取得も行った. 測定試料には粉末状のクロムイエローを用いた. 対物レンズには, 倍率 10 倍, 開口数 0.30 を用いた. また, 1 点あたりの露光時

間は 0.01 秒で測定した. 図 7 にクロムイエローの粉末の外観およびラマンイメージング結果を示す. クロムイエロー粉末の空間的分布が可視化されている様子がわかる.

以上のことから, 本研究により, ラマン散乱分光システムの構築をし, その基本特性の評価ができた.

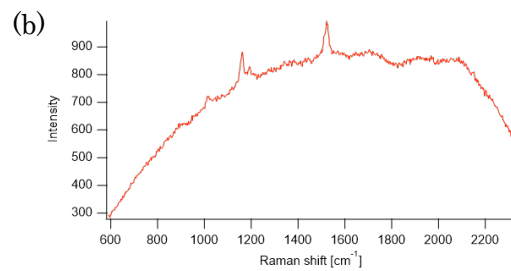


図 6 *Setaria viridis* (エノコログサ) のラマン散乱分光測定. (a) *Setaria viridis* の外観. (b) *Setaria viridis* のラマンスペクトル.

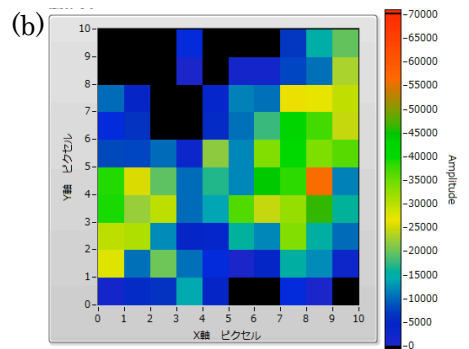


図 7 クロムイエローのラマンイメージング. (a) クロムイエロー粉末の外観. 緑四角部のラマンイメージを取得した. (b) ラマンイメージ.

(2) 波長依存性に基づいた自家蛍光除去システムの開発

次に、波長依存性に基づいた自家蛍光除去システムの開発を行った。

自家蛍光は、電子基底状態にある測定分子に対し、励起光で励起後、振動緩和過程を介して、再び基底状態に遷移する際に発光される光である。このとき、振動緩和過程を介するため、励起光波長を多少変化させても、得られる自家蛍光スペクトルに大きな変化は見られない。

一方、ラマン散乱は、電子基底状態かつ分子振動基底状態にある測定分子に対し、励起光で励起後、振動緩和過程を介さずに、電子基底状態の分子振動励起状態に遷移する際に発行される光である。この時、振動緩和状態を介さないため、励起波長が変化すると、それに対応してラマン散乱スペクトルが変化する。

以上の自家蛍光とラマン散乱の励起波長依存性を利用することで、自家蛍光のみを選択的に除去することができる。

図8に数値シミュレーションにより本手法を検証した結果を示す。Laser1の励起波長を532 nm、Laser2を532.1 nmとした場合の発光スペクトルの推定値である。波長シフト量が微小であることから、スペクトルの全体構造としては大きな変化は見られないが、多少の高波数シフトが見られる。次に、それぞれの発光スペクトルを差分した。ラマンピークが見られる位置では分散型のスペクトル構造が見られている様子がわかる。一方、ラマンスペクトル構造が無い位置では、おおよそ一定の値を取っていることがわかる。最後に、差分ラマンスペクトルを積分することで、ラマンスペクトル構造のみを復元できることがわかる。

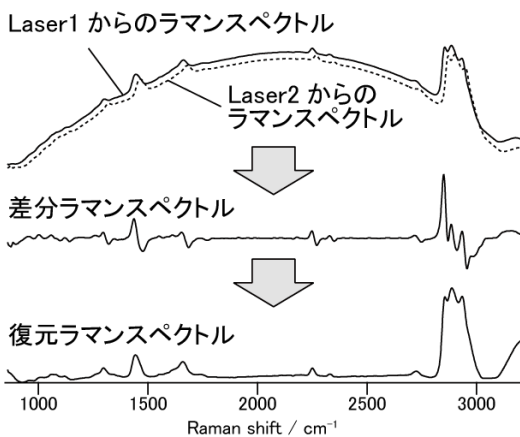


図8 波長依存性に基づいた自家蛍光除去システムの基本概念。

次に、実際の生体組織の測定を行い、波長変化に伴いラマンスペクトルの形状が維持されるかの検証を行った。図9に励起光波長を変化させた場合の脂肪組織のラマンスペクトルを示す。励起波長532 nmと励起波長671 nmにおいて、ほぼ同じようなラマンスペ

クトルが得られている様子がわかる。ただし、X軸はラマンシフト( $\text{cm}^{-1}$ )で規格化しており、実際に得られるスペクトルの波長は大きく異なっていた。このことから、励起波長を変化させてもラマンスペクトル構造が維持し、本手法が適用できる可能性を示すことができた。

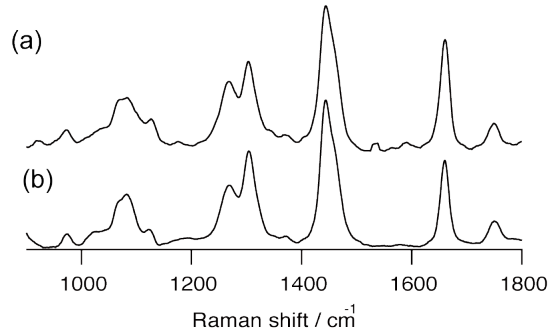


図9 脂肪組織のラマンスペクトル。(a) 励起波長532 nm。(b) 励起波長671 nm。

最後に、波長依存性のみならず、波長分解能に着目して自家蛍光を除去する手法について検討を行った。図10a, bに高い波長分解能、低い波長分解能で測定したラマンスペクトルを示す。自家蛍光の影響で全体的にバックグラウンドが乗っている様子がわかる。また、

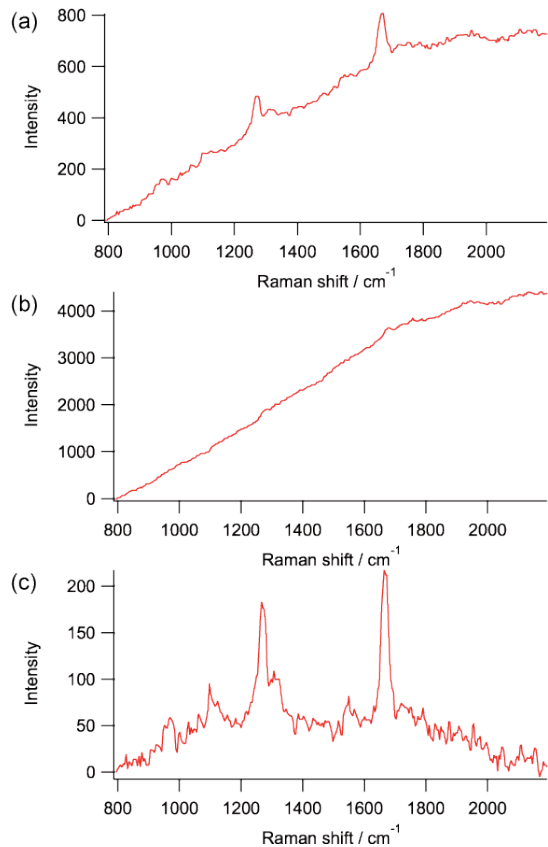


図10 波長分解能に着目した自家蛍光除去。(a) 高い波長分解能、(b) 低い波長分解能で測定したラマンスペクトル。(c) 各波長分解能スペクトルの差分スペクトル。全体的な傾向は、非常に似ている様子もわかる。ただし、高い波長分解能においては、一

部ラマン散乱由来の鋭いピークが見られることがわかる。

そこで、これら高い波長分解能と低い波長分解能で計測したスペクトルの差分を取得した結果を図10cに示す。自家蛍光成分が除去され、ラマンスペクトルが高い信号対バックグラウンド比で取得できている様子がわかる。

以上のことから、本研究ではラマン産卵分光法で問題となる自家蛍光成分の除去法について提案、検証することに成功した。今後は、本手法をさらに展開していくことで、生体組織等の自家蛍光成分が強い資料においても、高い精度で測定できるシステムへとつなげていく。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1. [査読有] **Takeo Minamikawa**, Yoshinori Murakami, Naokazu Matsumura, Hirohiko Niioka, Shuichiro Fukushima, Tsutomu Araki, and Mamoru Hashimoto, "Photo-induced cell damage analysis for single- and multi-focus coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy", *Journal of Spectroscopy*, **2017**, 5725340 (2017).
2. [査読有] **Takeo Minamikawa**, Yoshinori Harada, and Tetsuro Takamatsu, "Raman spectroscopic detection of peripheral nerves towards nerve-sparing surgery", *Proceedings of SPIE*, **10054**, 100541E (2017).
3. [査読無] **南川 丈夫**, 原田 義規, 高松 哲郎, "術中応用を目指したラマン散乱分光法～分子振動に基づく医療センシングの可能性～", *光アライアンス*, **28** (5), 42-47 (2017).

[学会発表] (計8件)

1. **Takeo Minamikawa**, "Raman spectroscopic detection of peripheral nerves towards nerve-sparing surgery", *CLEO-PR, OECC and PGC 2017*, Singapore, August 1 (2017).
2. **南川 丈夫**, "ラマン分光センシング ～分子振動に基づく新たな無染色組織診断法～", *Translational Research Center (TRC) セミナー*, 愛媛, 6月6日, (2017).
3. **南川 丈夫**, "医療応用を目指したラマン散乱分光法", *光材料・応用技術研究会 第4回研究会*, 東京, 3月3日, (2017).
4. **南川 丈夫**, 永井 大規, 金子 貴昭, 谷口 一徹, 安藤 真理子, 赤間 亮, 竹中 健司, "浮世絵技法の復元的研究のための光計測・画像解析基盤技術の創出", *文部科学省 共同利用・共同研究拠点 日本文化資源*

デジタル・アーカイブ研究拠点 2016 年度成果発表会, 京都, 2月17-18日, (2017).

5. **Takeo Minamikawa**, Yoshinori Harada, and Tetsuro Takamatsu, "Raman spectroscopic detection of peripheral nerves towards nerve-sparing surgery", *SPIE Photonics West, Biomedical Optics (BiOS 2017)*, San Francisco, California, USA, January 28 - February 2 (2017).
6. **Takeo Minamikawa**, Hisataka Matsuo, Yoshiyuki Kato, Yoshinori Harada, Eigo Otsuji, Akio Yanagisawa, Hideo Tanaka, and Tetsuro Takamatsu, "Simple and optimum background-free estimation method of PPIX fluorescence for 5-ALA-based fluorescence diagnosis of malignant lesions", *SPIE Photonics West, Biomedical Optics (BiOS 2017)*, San Francisco, California, USA, January 28 - February 2 (2017).
7. **南川 丈夫**, "術中医療センシングを目指したラマン散乱分光法", *BioOpt Japan 2016*, 神奈川, 9月14日, (2016).

[その他]

ホームページ等

徳島大学 大学院社会産業理工学研究部 理工学域 機械科学系 生産工学分野 先端フォトニクス研究室

<https://femto.me.tokushima-u.ac.jp/member/minamikawa/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

南川 丈夫 (MINAMIKAWA, Takeo)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部 (理工学域)・講師

研究者番号：10637193