

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H04950

研究課題名(和文)非線形ラマン散乱顕微内視鏡の開発と無染色その場診断への応用

研究課題名(英文)Development of coherent Raman scattering microendoscope and application to unstained in-situ diagnosis

研究代表者

橋本 守 (Hashimoto, Mamoru)

北海道大学・情報科学研究院・教授

研究者番号：70237949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,800,000円

研究成果の概要(和文)：無染色にその場診断することができる内視鏡の実現のために、CARS (coherent anti-Stokes Raman scattering)を利用した内視鏡光学系検討を行なった。光ファイバーバンドルを用いた励起光の伝送・画像化を行う際に問題となる光ファイバー自身による発光の回避方法を提案し、光ファイバーからの発光を3289分の1まで減少させ、CARS観測が可能であることを示した。また、よりCARS光の発光効率を向上させる励起ビームの走査法、偏光の制御法を検討した。さらに、より高精細画像を得るために光ファイバーバンドルの構造を除去するための深層学習を用いた画像再構成法の検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化管内視鏡での検査では、その場で確定診断することは難しく、生検により組織の一部を取り出して確定診断を行う。もし生検を行わずに、しかも安全のために無染色にその場で確定診断を行うことができれば、安全性の向上、患者の負担の軽減、医療コストの削減を達成することが可能となる。このような顕微内視鏡を実現するための光学系システムの検討を行い、イメージングが可能であることを示し、さらにより大きな信号を取得する手法、高精細な画像を取得する方法の開発を行なった。

研究成果の概要(英文)：An endoscopic optical system using coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) was investigated to realise an endoscope that enables in situ diagnosis without staining. We proposed a method to avoid light emission from the optical fiber itself, which is a problem when transmitting and imaging excitation light using an optical fiber bundle. We showed that CARS observation is possible by reducing the emission from the optical fiber to 1/3289. We also investigated methods for scanning and controlling the excitation beam's polarisation to improve CARS light emission efficiency. Furthermore, we have studied an image reconstruction method using deep learning to remove the structure of the optical fiber bundle to obtain higher-resolution images.

研究分野：生体光計測

キーワード：ラマンイメージング 内視鏡 非線形光学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

消化管癌を確定診断するために、無染色に細胞レベルの分解能で細胞の形状を観測することが可能な内視鏡の開発が望まれている。上部消化管内視鏡(胃カメラ)では光ファイバーバンドルを用いたものから、先端に CCD 等の 2 次元検出器を配置した電子内視鏡に移り変わり、Narrow band imaging などにより、コントラスト強調した画像が得られるようになってきた。しかしながら、現在の消化管内視鏡では空間分解能が十分ではなく、消化管癌を確定診断するためには、生検により細胞を体外に採取して染色・標本化し、病理医が細胞を顕微鏡で観測して診断、すなわち病理検査を行う必要がある。

近年、プローブ型共焦点レーザー顕微内視鏡が開発され、検体標本の病理像と同等レベルの観察像を内視鏡で得ることで、診断後すぐに内視鏡手術を実施することも可能となってきた。この手法では蛍光色素(フルオレセイン)等を静脈投与し、蛍光色素で染色された細胞からの蛍光を高空間分解能で観測する。内視鏡には、数千本以上の細径光ファイバーからなる直径 1 mm から 2 mm 程度の光ファイバーバンドルと、その先端に小型の対物レンズで構成されたものが用いられ、ガルバノミラーで構成されたレーザービームスキャナで、励起光を伝送する光ファイバーバンドルのコアを切り替えることで励起・観測箇所を走査する。発生した蛍光を光ファイバーバンドルで逆伝搬させることで共焦点効果を得、顕微鏡に匹敵するほどの高空間分解能で細胞の形状まで観測することができる。また、光ファイバーバンドルの直径が非常に細く、プローブヘッドも小型なため、消化管内視鏡の鉗子孔に挿入することで、広い視野の通常の胃カメラによる観測と、高空間分解能であるプローブ型共焦点レーザー顕微内視鏡観測を両立させている。ただし、現状では胃上皮性病変の診断に対する先進医療として研究が進められてはいるものの、蛍光色素の静脈投与を行う必要があり保険収載されていない。したがって、消化管内視鏡の鉗子孔に挿入することができ、無染色に細胞レベルの分解能で細胞形状までも観測できる内視鏡の開発が望まれている。

これを打破する手法として、無染色に癌組織を分別する自発ラマン散乱を用いた内視鏡が開発されている。原子(質点)が化学結合(ばね)でつながれた分子は振動することができ、この振動を分子振動と呼び、分子振動の周波数は分子の組成や構造に強く依存ことから、これを観測することで分子種に関する情報を得ることができる。ラマン散乱分光は分子振動を観測する手法であり、すべての分子が持つ分子振動により無染色に分子種や分子構造の情報を得ることができる。ところが、ラマン散乱光は蛍光に比べ数桁以上微弱で、観測に長時間を要するため、内視鏡への応用も一点での観察に限定されている。また、コンピュータを用いたラマン散乱スペクトル解析により癌が正常組織か見分るといふ、医師の判断を経ない診断を行うこととなり、現状の医療体制に馴染むものではない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、消化管内視鏡での検査中に、生検を行わずに、かつ色素を使わず無染色に細胞の形状、配列を明らかにするような高精細なイメージを取得できる、CARS (coherent anti-Stokes Raman scattering) 顕微内視鏡を開発することである。

CARS は非線形ラマン散乱の一種で、波長の異なる 2 種類の光(角周波数  $\omega_1$  および  $\omega_2$ ) の角周波数差 ( $\omega_1 - \omega_2$ ) が分子振動の角周波数 ( $\omega$ ) と一致した際に、入射光より波長の短い光(角周波数  $\omega = \omega_1 - \omega_2$ ) の光が放射される現象である。自発ラマン散乱にくらべて 3 桁以上強いラマン散乱光を得ることができるため、顕微鏡観察ではビデオレート以上の高速なイメージングが達成されている。また、CARS によって無染色に細胞の形状や核の形が明瞭に観測できていることが示されている。これまでに、幾つかのグループが細径の非線形ラマン散乱内視鏡の開発を行っているが、未だ曲がった消化管内視鏡の鉗子孔に挿入して使用することができるようなものは開発されていない。この原因は光ファイバー内に励起光を伝送する際に生じる四光波混合による妨害が原因である。

### 3. 研究の方法

本研究では、光ファイバーバンドルでの四光波混合発生を回避するために、2 波長の励起光を異なるコアで伝送し、プローブヘッドで合波するプローブ型 CARS 顕微内視鏡を開発する。原理図を図 1 に示す。光ファイバーバンドルへの入射部において 2 波長の励起光を別個の光コアに集光・伝送する。別個のコアで伝送された 2 波長の光は、レンズ L で平行光とされるが、空間的に離れた別個のコアから射出されるため、角度の異なる平行光となる。このとき、両者の偏光を直交した偏光とすることで、ウォラストンプリズムによって同軸上の光とする。ただし、CARS の効率は偏光が直交しているよりも、同一方向の方が著しく高いので、直交偏光している 2 波長の光を同一方向となるように 2 波長波長板 (2WP: 一方の波長には 0 位相差、もう一方の波長に対して  $\pi/2$  位相差となるように設計する) を用いて同一の偏光に変換する。四光波混合は、2 波長の励起光を同一のコアで伝送するために生じる。したがって、2 波長の励起光を別個のコアで伝送すれば四光波混合は生じることはない。

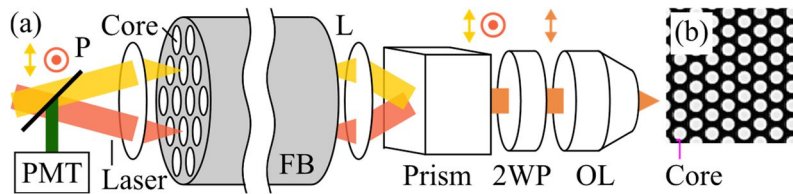


図1 2波長励起光を光ファイバーバンドルの個別コアで伝送するCARS内視鏡の原理図

(1) 原理検証システムの構築

提案手法を検証するために、図2に示すような原理検証システムの構築を行なった。光源には2台の同期したピコ秒モードロックレーザーを用い、これらをダイクロイックミラーで重ね、1対のガルバノスキャナ(GM)で反射した後対物レンズで光ファイバーバンドルに集光する。別々のファイバーを透過したのち、対物レンズで平行光束としてウオラストンプリズムで同軸上に重ねる。その後2WPで同一方向の偏光として試料へ照射し、発生したCARS光は逆の光路を通過したのち光電子増倍管(PMT)で検出する。

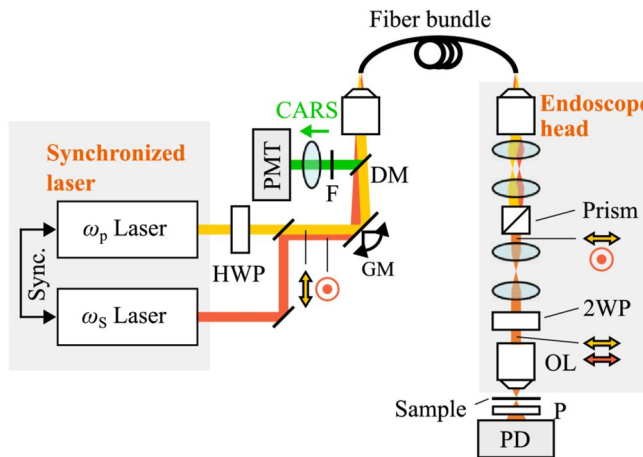


図2 原理検証システム

(2) 2対のガルバノスキャナによる個別走査

より高強度なCARS信号を取得するため、2対のガルバノスキャナによる個別ビーム走査法の検討を行なった。ファイバーバンドルは完全に規則的ではなく、ある程度のずれを持つ。このため、2つの励起光を一樣に走査すると光は同時にコアを透過せずCARS光強度の低下が生じる。そこで、励起光を個別に走査するために2対のガルバノミラーを組み込み、2つの励起光が同時にコアを透過するように、2つのビームで得られる透過像の相関係数が最も高い値の位置へ一方のビームの走査位置を補正するシステムを構築した。

図3にその原理を示す。まず励起ビーム1,2で透過像を観測する。光ファイバーバンドルは完全に規則的ではないため、予め決めた量だけシフトさせた像を重ねても完全には重ならない。そこで、励起ビーム2を並行移動、回転、拡大縮小させることで、両者の重なりが最大となるように走査するパラメータを取得する。

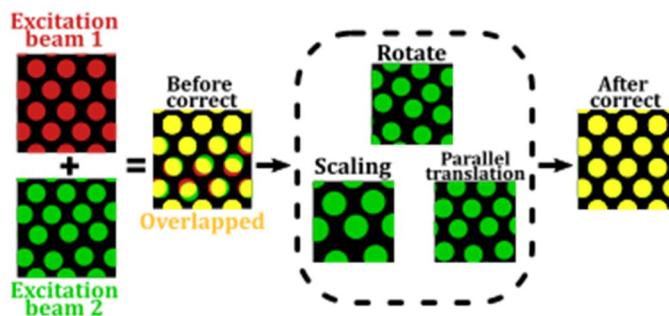


図3 2対のガルバノスキャナによる個別走査によるCARS光増強の原理

(3) 2台の電気光学変調器による偏光補償

別個のコアで伝送された2つの励起光は、ウオラストンプリズムによって偏光を利用して重ね合わせている。しかしながら、光ファイバーバンドルで伝送される光は、曲げなどの影響によりその偏光状態がコアごとに変化して射出される。そこで、図4に示すように、入射光の偏光状態を2台の電気光学変調器(EOM)で補償する手法の開発を行なった。

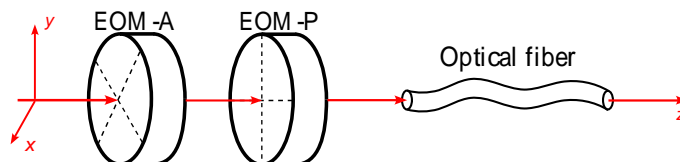


図4 2台の電気光学変調器による偏光補償システムの原理図

#### (4) 深層学習を用いたバンドル構造除去手法

光ファイバーバンドルを用いるため得られる画像にはバンドル構造が重畳し、空間分解能が悪化する。そこで、深層学習を用いたバンドル構造除去手法について検討した。深層学習では大量の正解画像の取得が必要とされるが、CARS 顕微鏡の検出側に光ファイバーバンドルを挿入したシステムを構築した。図 5 に構築したシステムを示す。CARS 顕微鏡の観測部分に、通常の CARS 像を検出する系（正解画像）に加えて光ファイバーバンドルを通して観測する系（光ファイバーバンドル画像）を加えた。

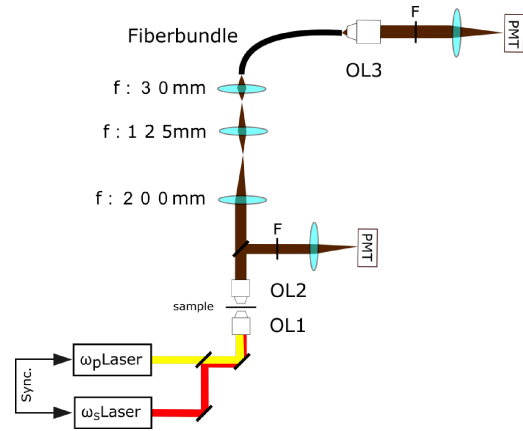


図 5 深層学習のためのバンドル構造信号取得光学システム

### 4. 研究成果

#### (1) 原理検証システムの構築

提案手法による四光波混合の低減効果と、光ファイバーバンドルを通しての CARS イメージングが可能であることを示すため原理検証システムを構築し CARS 像の取得を行なった。図 6 に提案手法による四光波混合の削減効果を示す。2 波長の光を同一コアで伝送させた時(a)に比べて、別個のコアで伝送させると(b)光ファイバーバンドルからの発光を 1/3289 まで小さくすることができた。なお、別個のコアを伝送させたときの発光は、ファイバーからの蛍光と思われる。また、図 7 は直径 25 μm のポリスチレンビーズを観測した結果で、(a)が視野中央にビーズがあるとき、(b)がビーズのない場合の CARS 像、(c)が(a)と(b)の差の画像である。図から、ビーズの CARS 画像が得られていることが分かる。

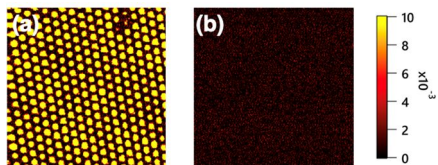


図 6 四光波混合の削減効果

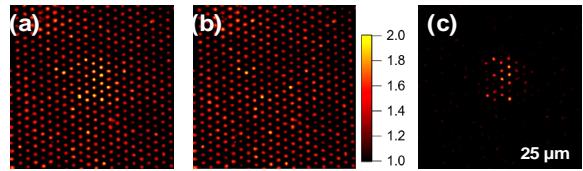


図 7 光ファイバーバンドルを通した CARS イメージング

#### (2) 2 対のガルバノスキャナによる個別走査

個別走査により信号の増強が行えるかどうかを検証するため、バンドギャップの大きな GaP フォトダイオードにレーザー光を集光し、非縮退 2 光子吸収信号を取得した。GaP 検出器は、バンドギャップが大きいので、650 nm より長波長の光の 1 光子吸収電流が生じない。しかしながら、超短パルス光を集光すると 2 光子吸収による電流が生じる。2 台のレーザーを同時に照射した信号と時間差を設けて照射した信号の差から、2 つの光が時空間的に重なった際に生じる非縮退 2 光子吸収信号を取得した。図 8 にその結果を示す。補正前の 2 レーザー光の透過光の重畳は 39.4%であったが、補正後 54.6%まで向上した。また、非縮退 2 光子吸収信号は最大強度で 4.2 倍、平均強度で 9.1 倍増強した。

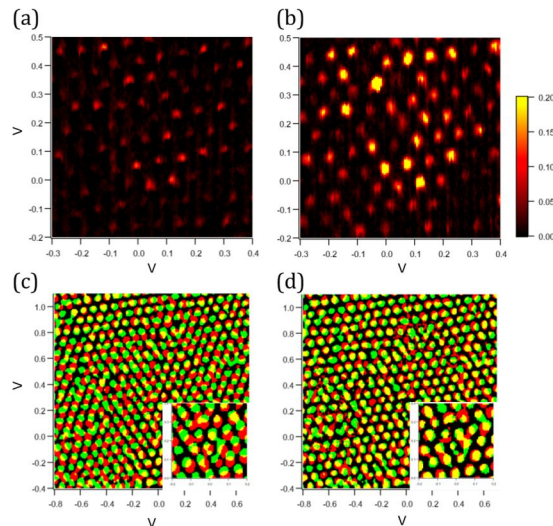


図 8 非縮退 2 光子吸収信号(a, b)と光ファイバー透過光の透過像(c, d)。(a, c)は補正前、(b, d)は補正後

#### (3) 2 台の電気光学変調器による偏光補償

まずは、シングルモード光ファイバを用いて偏光補償ができるか検討を行なった。図 4 の EOM-A、EOM-P への印加電圧走査し、回転検光子法によってその偏光状態を観測した。EOM-A、EOM-P への印加電圧走査に 2.5 秒、検光子の回転に 0.1 秒程度かかるため、検光子を 5 度ずつ 360 度回転させると、約 3 分で網羅的に偏光状態を観測することができ、これから目的偏光を得ることができる。しかしながら、光ファイバーバンドルへの適用を考えた場合、網羅的に観測することで制御電圧を得ることは難しい。シングルモードファイバーの場合 3 分程度で



網羅的観測が行えているが、光ファイバーバンドルへと適用した場合、例えば、 $250 \times 250$  ピクセルの画素全てで網羅的に偏光状態を得ようとする計測に 130 日程度かかる。そこで、ダウンヒルシンプレックス法により目的とする偏光と、現在の偏光との差を表す評価関数

$$f(\psi, \chi) = (\psi - \psi_0)^2 + (\chi - \chi_0)^2$$

が最も小さくなるような探索を行うこととした。ここで、 $\psi, \chi$  はそれぞれ観測された偏光軸角、楕円率角、 $\psi_0, \chi_0$  は目的偏光の偏光軸角、楕円率角である。図 9 はダウンヒルシンプレックス法により  $f(\psi, \chi)$  を最小化するように探索した結果であり、数回の反復で十分な偏光状態を得られることがわかった。

次に、本手法を光ファイバーバンドルへと適用した  $250 \times 250$  ピクセルで偏光補償を行なった結果、初期状態で評価関数の値が  $0.39 \pm 0.33$  であったものを、10 回の反復（130 分）で  $0.059 \pm 0.051$  まで低減することができた。探索的手法により、高速に光ファイバーバンドルの偏光補償を行うことが可能となった。

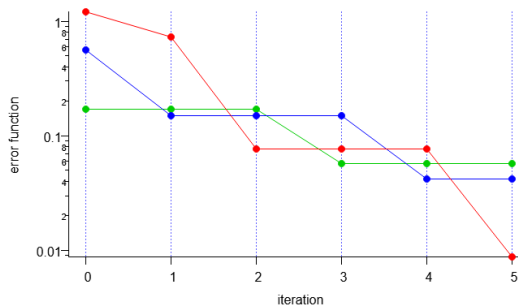


図 9 ダウンヒルシンプレックス法による偏光補償

#### (4) 深層学習を用いたバンドル構造除去手法

深層学習を用いたバンドル構造除去手法について検討した。深層学習では大量の正解画像の取得が必要とされるが、まずは顕微鏡で観測した細胞の CARS 画像をマスク加工したシミュレーション画像を用いて事前学習を行なった。その後図 5 に示した CARS 顕微鏡の検出側に光ファイバーバンドルを挿入したシステムを構築し、通常の検出器で観測した画像を正解画像として追加の学習を行った。SSIM (structural similarity) を 0.589 から 0.660 まで向上できることが分かった。

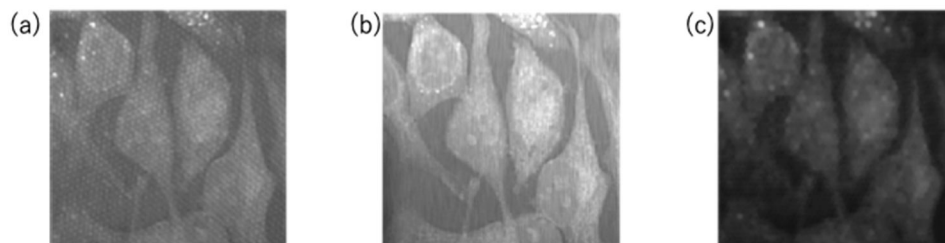


図 10 深層学習によるバンドル構造の除去

(a)光ファイババンドル像, (b)顕微鏡像, (c)深層学習像

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shukri Bin Korakkottil Kunhi Mohd, De Xing Lioe, Keita Yasutomi, Keiichiro Kagawa, Mamoru Hashimoto and Shoji Kawahito	4. 巻 12
2. 論文標題 A CMOS Double-Demodulation Lock-In Amplifier for Stimulated Raman Scattering Signal Detection	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Electronics	6. 最初と最後の頁 4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/electronics12010004	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 大和尚記, 新岡宏彦, 三宅淳, 橋本守	4. 巻 41
2. 論文標題 深層学習を用いた非線形ラマン散乱硬性内視鏡 による神経イメージングの高速化と神経抽出	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 光学	6. 最初と最後の頁 231-237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Kizawa Shun, Hashimoto Mamoru	4. 巻 155
2. 論文標題 Ultrahigh-speed multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy using scanning elliptical focal spot	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 144201 ~ 144201
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/5.0063987	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 Ogawa Hiroki, Hashimoto Mamoru	4. 巻 46
2. 論文標題 Avoidance of four-wave mixing in optical fiber bundle for coherent anti-Stokes Raman scattering endomicroscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Optics Letters	6. 最初と最後の頁 3356 ~ 3356
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1364/OL.425644	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 Yamato Naoki, Niioka Hirohiko, Miyake Jun, Hashimoto Mamoru	4. 巻 11957
2. 論文標題 Near real-time nerve visualization using coherent Raman scattering rigid endoscope and deep learning-based image processing for nerve-sparing surgery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of SPIE	6. 最初と最後の頁 119570B
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1117/12.2609483	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 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 五十崎 凜太郎, 川崎 優花, 大和 尚紀, 橋本 守
2. 発表標題 二台の電気光学偏光素子を用いた偏光補償法の検討
3. 学会等名 第58回応用物理学会北海道支部 / 第19回日本光学会北海道支部合同学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 橋本守, 本間宗一郎, 木澤駿
2. 発表標題 楕円スポット走査マルチプレックスCARS分光イメージング
3. 学会等名 医用分光学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 N. Yamato, H. Niioka, J. Miyake, and M. Hashimoto
2. 発表標題 Fast peripheral nerve imaging with coherent Raman scattering rigid endoscope by noise reduction utilizing deep learning
3. 学会等名 25th Congress of the International Commission for Optics (国際学会)
4. 発表年 2022年

1 . 発表者名 M. Hashimoto, R. Abe, and S. Kizawa
2 . 発表標題 Multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy using elliptical focus spot
3 . 学会等名 25th Congress of the International Commission for Optics ( 国際学会 )
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 S. Homma and M. Hashimoto,
2 . 発表標題 Label free isomeric metabolism measurement with multiplex coherent anti-stokes raman scattering microspectroscopy
3 . 学会等名 Conference on Lasers and Electro-Optics PacificRim2022 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Y. Kashimura, R. Matsuda, N. Yamato, and M. Hashimoto
2 . 発表標題 Second-harmonic generation arthroscope with integrated femtosecond Yb fiber laser
3 . 学会等名 Conference on Lasers and Electro-Optics PacificRim2022 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Y. Kawasaki and M. Hashimoto
2 . 発表標題 Design of dual-wavelength waveplate made of single crystal for coherent anti-Stokes Raman endoscopy
3 . 学会等名 Conference on Lasers and Electro-Optics PacificRim2022 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2022年



1. 発表者名 大和尚記, 新岡宏彦, 三宅淳, 橋本守
2. 発表標題 非線形ラマン散乱硬性内視鏡と深層学習による神経イメージング装置の開発
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第42回年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松田陸, 橋本守
2. 発表標題 Yb ファイバーレーザーを用いた光源一体型第二高調波発生関節鏡の開発
3. 学会等名 第57回応用物理学会北海道支部/第 18 回日本光学会北海道支部合同学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 M. Hashimoto
2. 発表標題 Coherent Raman endoscopy for label-free imaging during surgery
3. 学会等名 The 22nd RIES-Hokudai International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本守
2. 発表標題 非線形ラマン散乱を用いた顕微内視鏡の開発
3. 学会等名 大学医工連携オンラインセミナー ~光×超音波×近赤外蛍光による医工連携イメージングと健康長寿への道~ (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本間宗一郎, 橋本守
2. 発表標題 コヒーレント反ストークスラマン散乱分光顕微鏡の楕円スポットによる信号増強効果の実験的検証
3. 学会等名 レーザー顕微鏡研究会第46回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田陸, 橋本守
2. 発表標題 Ybファイバーレーザーを用いた第二高調波発生関節鏡の開発
3. 学会等名 Optics & Photonics Japan 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大和尚記, 松谷真奈, 新岡宏彦, 三宅淳, 橋本守
2. 発表標題 非線形ラマン散乱硬性内視鏡と深層学習による実時間神経抽出
3. 学会等名 第60回日本生体医工学会大会・第36回日本生体磁気学会大会
4. 発表年 2021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	七戸 俊明  (Shichinohe Toshiaki)  (70374353)	北海道大学・医学研究院・准教授   (10101)	

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	新岡 宏彦  (Niioka Hirohiko)  (70552074)	九州大学・データ駆動イノベーション推進本部 健康医療 DX 推進部門・教授（常勤）    (17102)	

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