

令和元年6月11日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14123

研究課題名(和文) 生体3次元組織モデルの深部構造と組成の波長1700 nm帯無標識イメージング

研究課題名(英文) Label free deep tissue imaging at 1700 nm spectral window

研究代表者

山中 真仁 (Yamanaka, Masahito)

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：90648221

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)：本研究の目的は、生体深部構造と分子情報を計測する無標識イメージング技術の開発である。本研究では、生体透過性が高い波長1700 nm帯を利用することで、無標識生体深部イメージングの実現を目指した。申請者が開発した波長1600 nm帯モード同期超短パルスファイバーレーザー光源を利用し、波長1700 nm帯無標識イメージング技術用光源を開発した。波長1700 nm帯光源を用いたスペクトル領域光コヒーレンス顕微鏡を開発し、生体試料の深部イメージングが行えることを確認した。また、ラマン散乱信号を計測する装置を開発し、試料の信号計測が出来ることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の生命科学の研究において、ガラス基板上で培養した細胞では発現しない生体機能が存在することが報告されており、生体そのものや3次元培養などで培養した細胞群を観察する重要性が高まっている。本研究で開発したイメージング技術は従来より生体深部を無標識かつ高い空間分解能で可視化出来る技術であり、生命科学分野の研究へ大きく貢献できる可能性があると考えられる。また、今回用いた波長1700 nm帯は近年生体深部イメージングに有効であることが示された波長帯であり、いまだそのイメージング技術の報告例は多くない。本研究成果は生体イメージングの技術開発という点でも新規性が非常に高いものである。

研究成果の概要(英文)：To understand natural biological behaviors and features, it is significantly important to observe deep parts in organisms or their tissue specimens. The aim of this research was the development of a label-free deep tissue imaging technique by using the 1700 nm spectral band, which is recently recognized as a promising option to realize large penetration depth in imaging turbid scattering tissues due to the low light attenuation in tissue. In this study, fiber laser source in the 1700 nm spectral band was developed and utilized to develop the imaging system. With the developed spectral domain optical coherence microscopy system, it was confirmed that deep tissue imaging with large penetration depth is feasible. The measurement of Raman scattering signals was also demonstrated.

研究分野：応用光計測工学

キーワード：無標識イメージング 波長1700 nm 光コヒーレンス顕微鏡 ファイバーレーザー ラマン散乱

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、生体内の生体機能や形態を再現できる組織モデルの作製技術が急速に進歩している。組織モデルを用いることで、多くのコストと時間を要する動物実験を行わずに薬剤動態試験などが可能になるため、今後の生命科学、再生医療や創薬研究の基盤技術になると期待されている。組織モデルや生体内で生じる生命現象を理解するには、その表面だけでなく内部で変化していく構造や組成を詳細に可視化する必要がある。従来、生体組織の高空間分解能観察には、蛍光顕微鏡技術が主に利用されてきたが、蛍光タンパク質などの標識分子は分子量が生体分子よりも大きいか、または同等程度のものが多く、生体機能を阻害する可能性がある。実際に、脂質やグルコースなどを蛍光標識すると元来の生理機能が損なわれることが報告されている。生体や組織モデル内部の生命現象をより正確に理解するためには、生体機能などを阻害することなく可視化出来る技術が必要である。

現在、生体試料のイメージングには主に光学イメージング技術が利用されている。これは生きた試料内部を非侵襲に観察できることが大きな要因である。これまでに蛍光顕微鏡、多光子励起蛍光顕微鏡、ラマン顕微鏡、光コヒーレンストモグラフィなどといった様々な光学イメージング技術が開発されてきているが、生体深部観察は未だ光学イメージング技術にとって大きな課題の一つである。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、生体深部の構造と分子情報を計測する無標識イメージング技術の開発である。本研究では、生体透過性が高い波長 1700 nm 帯 (図 1) を利用することで、無標識生体深部イメージングの実現を目指した。

光学イメージング技術で生体試料深部を観察する際には、近赤外波長が主に利用されている。近赤外波長域が利用され始めた当初は波長 800 nm 帯が主に利用されていたが、近年は光散乱係数が波長 800 nm よりも低い波長 1000 や 1300 nm 帯が生体深部観察に盛んに利用されるようになってきている。さらに、近年、イメージング深度のさらなる向上を目指した研究が盛んに行われており、その中で波長 1700 nm 帯の有用性が示されている。近赤外波長域では長波長になるほど水による光吸収係数は大きくなるが、波長 1700 nm 帯に吸収係数の極小値が存在する。光散乱係数は波長が長くなるほど小さくなるため、観察対象が眼球のような水が多すぎるサンプルではなく、不透明かつ高散乱体の場合、波長 1700 nm 帯を利用することでイメージング深度の向上が期待できる。

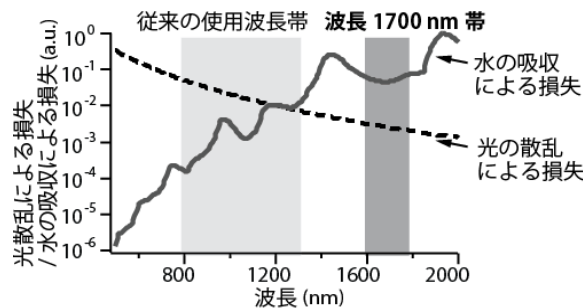


図 1：近赤外波長域における光散乱係数と水の光吸収係数

### 3. 研究の方法

本研究では、生体深部の構造と分子情報を計測する無標識イメージング技術を実現するために、下記の事項に取り組んだ。

- 1) ファイバーレーザー技術を利用した超短パルス光源の開発
- 2) 開発した光源を利用した波長 1700 nm 帯スペクトル領域光コヒーレンス顕微鏡の開発
- 3) 開発した光源を利用した非線形ラマン散乱信号計測装置の開発

### 4. 研究成果

以下に本研究で得た成果内容を下記に示す。

- 1) スペクトル領域光コヒーレンス顕微鏡とラマン散乱信号計測装置用の光源を開発した。シード光源にはエルビウム添加ファイバーを用いた超短パルスファイバーレーザー光源を利用した。シードパルス光をエルビウム添加ファイバー増幅器で増幅した後、ファイバー中におけるラマン散乱効果によるソリトン自己周波数シフト(波長シフト)、高非線形ファイバーによるスーパーコンティニューム光生成を用いることで、所望の波長と波長幅をもつパルス光を生成した。
- 2) 開発したファイバーレーザー光源を用い、波長 1700 nm 帯スペクトル領域光コヒーレンス顕微鏡システムを開発した。開発した光コヒーレンス顕微鏡システムでは、高感度信号検

出を実現するため、ラインスキャン InGaAs カメラを用いた専用分光器を Zemax ソフトウェアを用いて設計、開発した。開発した分光器では、波長 1700 nm 帯で高い深さ方向空間分解能を実現するために、検出波長域を広帯域に設定した。検出波長域を広帯域にすると高い深さ方向空間分解能が得られる反面、干渉計のゼロ遅延位置から観察位置が離れると信号検出感度が大きく低下してしまうという問題がある。スペクトル領域光コヒーレンス顕微鏡では、スペクトル領域光コヒーレンストモグラフィと同様に、信号とゴースト信号の重なり合わせを避けるために、ゼロ遅延位置をサンプル外にセットする必要があり、ゼロ遅延位置から離れた時の検出感度の低下が大きいと深部観察が難しい。そこで本研究では、ゴースト信号生成を抑制するために、フルレンジ法を導入した。ゴースト信号を抑制することで、高い信号検出感度が得られるゼロ遅延位置をサンプル内にセットすることができ、波長の広帯域検出による高い深さ方向空間分解能と大きいイメージング深度の両方を実現できる。本研究で開発したスペクトル領域光コヒーレンス顕微鏡の干渉計には、広帯域ファイバーカップラーを用いた低コヒーレンスマイケルソン干渉計を利用した。サンプルアームはレーザー走査型共焦点顕微鏡の光学系で構成されており、試料の走査は 2 軸ガルバノスキャナーを用いて行った。

図 2 に空間分解能評価のために行った実験結果を示す。観察面内方向の空間分解能はポリスチレンビーズを観察することで評価した。その結果、 $2.5 \mu\text{m}$  の面内方向空間分解能が得られていることが確認できた。深さ方向空間分解能は、ミラー表面からの反射光計測で得られた干渉信号を用いて評価した。その結果、深さ方向空間分解能は生体中で  $3.8 \mu\text{m}$  であることが確認できた。また、干渉信号計測から信号検出感度が 100 dB であることが確認できた。

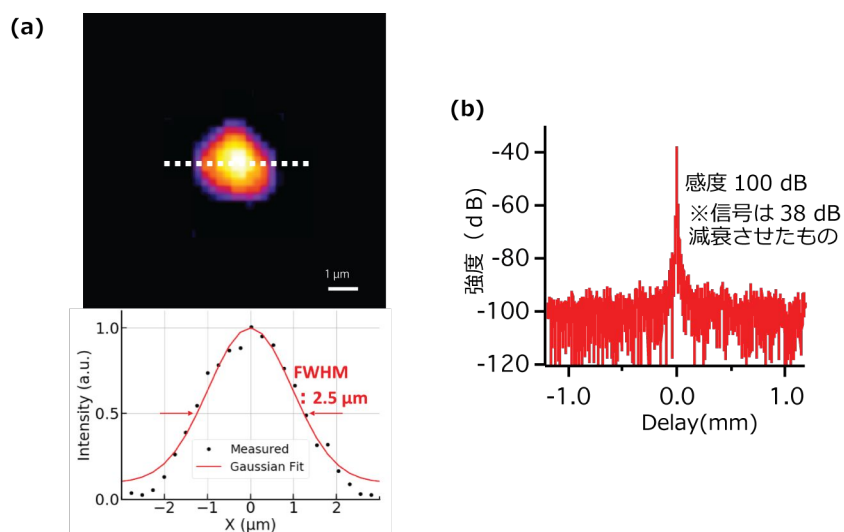


図 2 : (a)ポリスチレンビーズの観察像 ( $x$ - $y$  平面) と強度プロファイル (イメージ中の白ドット線の位置)、(b) ミラーからの反射光計測で得られた干渉信号

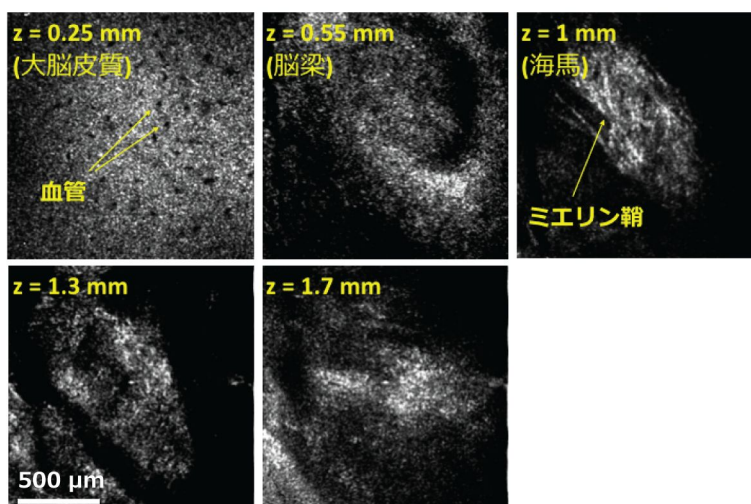


図 3 : マウス脳の光コヒーレンス顕微鏡像 ( $x$ - $y$  平面)

開発した光コヒーレンス顕微鏡でマウス脳を観察した結果を図 3 に示す。マウス脳表面が

ら深さ 0.25 mm、0.55 mm、1 mm、1.3 mm、1.7 mm の x-y 平面の観察結果である。図 3 に示すとおり、大脳皮質の血管分布や海馬のミエリン鞘などといった構造が無標識で観察することができることが確認できた。観察を行う際には、マウス脳をリン酸緩衝生理食塩水に浸し、大脳皮質側から観察を行った。図 3 に示すようにサンプル表面から 1.7 mm という大きな観察深度であっても十分な信号対ノイズ比でイメージングが可能になっている。この結果から、波長 1700 nm 帯が生体深部観察に有効であることも確認できた。今回の測定では、生体内部観察時に生じる波面収差や広帯域光が受ける分散の補償を行っていないため、観察深度が大きくなるほど空間分解能の低下とそれに伴う信号強度およびイメージコントラストの低下が確認された。収差および広帯域光の受ける分散の補償を行えば、さらに深部を無標識で観察することができる可能性があるという見通しを本研究期間で得ることが出来たと言える。

### 3) 開発した光源を利用した非線形ラマン散乱信号計測装置の開発

開発したファイバーレーザー光源を用い、試料の非線形ラマン効果で得られるラマン散乱光を計測する装置を構築した。2 波長のパルスレーザー光を対物レンズを用いて試料に集光し、発生したラマン散乱光のスペクトルを分光器を用いて計測した。溶液試料を用いた計測実験の結果、波数  $3000\text{ cm}^{-1}$  付近の信号を得ることに成功した。この結果から、開発したファイバーレーザー光源を用いることで試料の分子情報のラマン分光計測が出来るという見通しを得ることが出来た。

## 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 4 件)

M. Yamanaka, N. Hayakawa, H. Kawagoe, S. Makita, Y. Yasuno, and N. Nishizawa, "High-resolution spectral domain optical coherence microscopy in 1700-nm spectral band," BiOS in SPIE Photonics WEST 2018 (27 Jan-1 Feb, 2018, United State) (国際学会)

山中真仁、早川直紀、川越寛之、西澤典彦、"波長 1700 nm 帯スペクトルドメイン光コヒーレンス顕微鏡による生体深部イメージング、" 第 43 回レーザー顕微鏡研究会 (2018 年 1 月 19 日、大阪) (国内学会)

M. Yamanaka, H. Kawagoe, and N. Nishizawa, "High-resolution deep-tissue imaging by optical coherence microscopy in 1700-nm spectral window," The 24<sup>th</sup> Congress of the International Commission for Optics (21 Aug-25 Aug, 2017, Japan) (国際学会)

M. Yamanaka, H. Kawagoe, T. Teranishi, and N. Nishizawa, "Optical coherence tomography and microscopy in optical window (1600-1870 nm) for high-resolution deep-tissue imaging," The 5<sup>th</sup> Photonics Global Conference 2017 (31 July-4 Aug, 2017, Singapore) (国際学会) (招待講演)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nuee.nagoya-u.ac.jp/labs/optelelab/staff.html>

## 6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。