

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04517

研究課題名(和文) 癌細胞非染色ハイスループット検出を可能にする深紫外分光イメージング顕微鏡の開発

研究課題名(英文) High-throughput label-free cancer cell detection with a deep-UV hyperspectral imaging microscope

研究代表者

熊本 康昭 (Kumamoto, Yasuaki)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：30611727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：癌患者の予後は癌の早期発見の場合には良好である。癌の早期発見には細胞診が有効であるが既存の細胞診は染色などの前処理を必要とする。本研究では染色などの前処理をすることなく素早く癌細胞を検出するための深紫外分光イメージング顕微鏡の研究開発を実施した。さまざまな分光計測法と深紫外吸収イメージング光学系との融合を検討した上で、視野1mmを空間分解能1ミクロン、波長分解能1nmで高速撮像する技術を創出した。創出した技術により培養がん細胞の測定し、1細胞あたり0.1秒での分析を行えることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

深紫外分光情報の空間分布をつかった細胞の高スループット測定および分析は報告されていない。ラマン顕微鏡に代表される非染色分子イメージング技術は、医療現場における診断支援や創薬産業における迅速スクリーニングなどにおいて注目されている。深紫外分光イメージングは、ラマン顕微鏡に比べて得られる情報は少ないが、特に広視野撮像における速度と光学系の簡便性・コストにおいて優れており、用途によっては今後実用的な活用が期待される。医療診断を簡素化、迅速化、高確度化を支援する技術の実現により、国民の健康維持に貢献し、国民のウェル・ビーイングの実現をサポートする。

研究成果の概要(英文)：The prognosis for cancer patients is good when cancer is detected at an early stage. Cytological diagnosis is an effective way for early detection of cancer, but existing cytological diagnosis requires staining and other pretreatment. In this study, we conducted research and development of a deep ultraviolet spectroscopic imaging microscope to rapidly detect cancer cells without staining or other pretreatment. After examining various spectroscopic measurement methods, we developed a high-speed deep-ultraviolet hyperspectral absorbance imaging technique with a spatial resolution of 1 micrometer and a wavelength resolution of 1 nm in a 1 mm field of view. Using the developed technology, we measured cultured cancer cells and confirmed that cell analysis can be performed in the throughput of 0.1 second per cell.

研究分野：光計測工学, 医用光学

キーワード：深紫外光 イメージング 細胞診 スペクトル解析 画像解析

1. 研究開始当初の背景

がんは日本人の死亡要因1位の病気であるが、早期発見できた場合の予後は良好である。がんの早期発見に欠かせないのが細胞診である。細胞診では、患者から採取した細胞を染色したのち病理医と技師とが顕微鏡観察し、核や細胞の大きさや形状からがんを同定する。その利点は、病理医と技師とが2人で1つの標本をみるため正確な診断を行えること、及び低侵襲であり患者への負担が小さいことである。一方、手作業により1000個以上の細胞をするため、近年不足している病理医と技師の負担が大きい。また結果を得るまでに週単位の長い時間を要する。

以上の背景のもと、がん細胞診支援技術が研究されている。なかでも染色を必要としない方法は迅速に行えるため細胞診の弱点を補える。非染色法として研究されている手法の1つはラマン顕微鏡法である。ラマン顕微鏡法は分子振動により細胞内分子を網羅的にイメージングし、腫瘍細胞と非腫瘍細胞とを分子の構成や分布の違いにより正確に判別する。しかし微弱なラマン散乱光によるイメージングは、長い時間を要する。たとえば60個程度の細胞を測定する場合でもラマン顕微鏡法は30分程度の時間を要する (Kumamoto, et al., 2019; J. Phys. Chem. B 123, 2654)。多くの検体を分析する医療の現場では、既存技術の活用は困難である。

2. 研究の目的

以上の背景とし、がん細胞を非染色のままハイスループット検出できる深紫外分光イメージング法を創出を目指す。深紫外光は生体分子と強く相互作用し、吸収、自家蛍光、共鳴散乱などの光学現象を誘導する。特に、核酸塩基やアミノ酸の深紫外光吸収効率は、可視域・近赤外域のラマン散乱の発生効率に比べて10桁以上高い。そのため、深紫外吸収分光イメージングの撮像時間は分単位にまで短縮できる。これまでに深紫外光吸収分光イメージングによりがん細胞を検出したという報告はないが、細胞核内に含まれるDNA量はがん細胞と非がん細胞とでは異なっており (濱田, 2017; 京府医大誌 126, 797)、核酸分布画像はがん細胞検出の重要な指標を与えると期待される。また、がん細胞ではエネルギー代謝が亢進しているためタンパク質量が多くなり、タンパク質分布画像もがん細胞検出の指標になると期待される。深紫外分光イメージング法はラマン顕微鏡法に比べて、複雑かつ高コストな光学系を必要としないため、医療現場への導入ハードルは低いと予想される。

3. 研究の方法

本研究では細胞の深紫外吸収分光イメージングを高速に得られる光学系について研究を実施する。分光計測の方法は、波長フィルターを利用するもの、波長分散素子を利用するもの、干渉系を利用するものに大別される。本研究ではこれらの分光計測方法と深紫外吸収イメージング光学系との融合を検討する。撮像スピード、波長情報量、および広視野観察への適合性の観点等において3つの方法を比較する。以上を踏まえ、がん細胞を非染色のままハイスループット検出できる深紫外分光イメージング装置を構築する。また、撮像速度の向上および視野の拡大方法を検討する。深紫外吸収スペクトル画像データを用いるがん細胞検出法についても検討する。

4. 研究成果

まず上述した分光計測法と深紫外吸収イメージング光学系との融合を検討した。波長フィルターを利用するものは、広帯域光源を備えた透過型顕微鏡光学系の照明系と結像系に同じ波長フィルターを入れることにより撮像を行う。波長フィルターを切り替えることにより分光情報を得る。波長分散素子を利用するものは、結像系に分散型分光器を導入することによりスペクトルを計測する。一度に取得される空間情報は分光器の入射スリット上に結像される試料の1次元像に対応するため、2次元空間情報の取得は分光器入射スリットによる試料の走査により行う。干渉系を利用するものは、フーリエ分光器を導入する。二光束の光路差を変えながらインターフェログラムを複数取得し、各画素ごとにフーリエ変換することによりスペクトルを得る。

以上の手法について、広視野高速観察を仮定し比較を行った結果を表1に示す。波長フィルターを用いる方法は、計測の簡便性と広視野撮像速度において優位である一方で、同一視野を波長域ごとに順次測定するため、後の測定では深紫外光照射による試料変性の影響を受ける。また、波長分解能は低い。汎用的な波長フィルターの透過スペクトル幅は10 nm程度もあるため、波長フィルターを利用する方法では10 nm以下の波長分解能を得ることは困難である。狭透過帯域の特殊なフィルターを用いる場合には10 nm以下の波長分解能を得られるが、多数の波長フィルターを順次切り替えて測定することになるため、測定または装置は非常に煩雑となる。

波長分散素子を利用する方法は、測定の波長分解能と試料変性に対する耐性において利点を有する。照明をライン状のビームにより行い一度にスペクトル測定を行う領域のみを照射することにより、試料変性の測定データへの影響は抑制される。試料変性の影響が少ないことは、測定スペクトルを用いたがん細胞検出において重要である。深紫外照射による試料の変性(細胞構造の変化や分子レベルの変性)は一定ではないため、試料変性の影響を抑えることにより、同種

の細胞から得られる測定データのばらつきの抑制を期待できる。

波長分散素子を利用する方法の弱点は、広視野撮像の速度である。同等の波長分解能を得られる干渉系を利用する方法では、100回のインターフェログラム測定により200-300 nmの深紫外波長域を1 nmの波長分解能で測定できるが、波長分散素子を利用する方法では100回の測定では、走査方向に100点の空間情報しか得られず、広視野をカバーできない。ただし、波長分散素子を利用する方法でも、ライン照明をマルチライン照明とし分光器入射スリットをマルチスリットとすることにより、撮像を高速化できる (Kumamoto, et al., 2023; Biomed. Opt. Express 14, 1015)。高速化のファクターは、照明ライン数及びスリット数と同じであり、例えば照明ライン数およびスリット数を10とした場合、撮像速度は10倍となる。

干渉系を利用する方法は、上述した通り波長分解能と広視野撮像速度において優位である。しかし、波長フィルターを利用するものと同様に、同一視野を繰り返し測定するため、後の測定は深紫外光照射により試料変性の影響を受ける。また、深紫外光学系において顕著な収差のため、結像系において2つの像を完全に重ね合わせることは容易ではない。

表1 広視野高速観察の行うと仮定した場合の3つの分光計測法の比較

| 分光方法 | 波長フィルター | 波長分散素子 | 干渉系 |
|------------|---------|--------|-----|
| 簡便性 | ◎ | ○ | × |
| 波長分解能 | △ | ◎ | ◎ |
| 広視野撮像速度 | ◎ | ○ | ◎ |
| 試料変性に対する耐性 | △ | ◎ | × |

以上を踏まえ本研究では、波長分散素子を利用する深紫外分光イメージング光学系を構築した。構築した光学系の概略を図1に示す。広帯域高出力光源 (EQ-99X LDLS, Energetiq) から発する光を軸外し凹面鏡によりコリメートした後、ショートパスフィルター (FF01-300/80-25, Semrock) に入射し、透過する波長260-340 nmの高出力紫外光を得る。コリメート光を凹面シリンドリカルミラーによりライン状に集光する。広帯域高出力光源から発する光は十分集光されないため、集光面には可変スリットを配置している。可変スリットを通り抜けた光はコンデンサレンズにより1軸方向 (図の上下方向) にコリメートされるとともに、もう1軸方向 (図の奥行き方向) には集光される。この集光位置に反射型対物 (LMM15X-UUV, Thorlabs) の瞳を合わせ、試料にライン状照明を形成する。試料は超音波モーターステージ (TS1L80-015, Nanocontrol) 上に設置されている。試料を透過した光は、反射型対物 (LMM15X-UUV, Thorlabs) と結像レンズのペアにより、イメージング分光器 (IsoPlane 160, Teledyne Instruments) の入射スリットに結像される。イメージング分光器の射出面に取り付けたカメラ (CS66UV, Bitran) により、ライン照明領域の吸収スペクトル分布を得る。超音波モーターステージの駆動と分光器カメラの露光を逆位相で同期させることにより、空間2次元の透過分光画像を取得する。

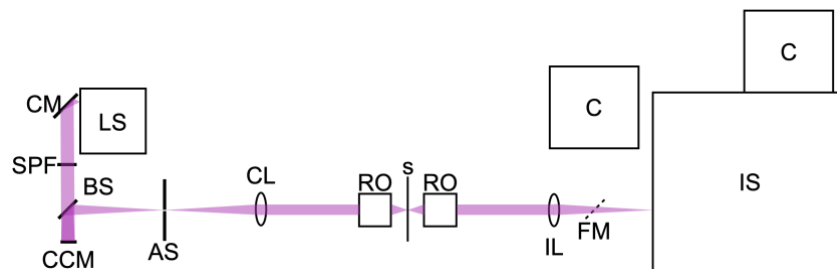


図1 開発した深紫外分光イメージング光学系の概略. LS:光源、CM:凹面鏡、SPF:短波長透過フィルター、BS:ビームスプリッター、BB:ビームブロック、CCM:凹面シリンドリカルミラー、AS:可変スリット、CL:コンデンサレンズ、RO:反射型対物、IL:結像レンズ、FM:光路切り替えミラー、C:カメラ、IS:イメージング分光器。

図1の光学系により取得したがん細胞の代表的な吸光度スペクトルと吸光度画像を図2に示す。吸光度スペクトルは細胞の核小体、核質、細胞質および細胞不在領域のものを示している。核小体と核質のスペクトルは、波長300 nm以下において顕著な吸収帯を示している。この吸収帯は、核小体および核質に多く存在する核酸とタンパク質それぞれに含まれる核酸塩基と芳香族アミノ酸に起因すると解釈できる。一方、細胞質から取得したスペクトルでは、測定波長域全体になだらかなバンドを示している。波長300 nm以下の吸収は、核酸塩基と芳香族アミノ酸に起因すると考えられる一方で、波長300 nm以上のバンドの帰属は不明である。今回の測定では透過光の強度を測定しているため、吸光度に対応する透過光振幅成分と吸光度と関係ない透過光位相成分とを分離できていない。この問題はとくに、光吸収が弱い波長域で位相物体を測定した場合に顕著となる。細胞質は核に比べて光吸収が小さいため、位相成分の影響を強く受けた可能性が考えられる。

吸光度画像は波長260 nmおよび波長280 nmの吸光度分布を示している。測定視野のうち、

上部と下部の一部は、光学系の軸外収差の影響により十分な強度を得られていない。十分な信号強度を得られている領域では、細胞や核の形状、および核小体の分布を確認できる。しかし2つの波長域における分布の違いは少ない。その原因は、それぞれの波長に核酸塩基と芳香族アミノ酸がいずれも一定以上の割合で寄与していること (Zeskind, et al., 2007; Nat. Met. 4, 567) にあると考えられる。今後、測定データのスペクトル・アンミキシングや多変量解析を行うことにより、分子ごとの分布を得られると期待している。

図2に示すデータの測定は、フレームレート 1.43 Hz、走査数 514 で行い、時間 6 分で実施された。画素サイズは走査方向 $2.32 \mu\text{m}$ × スリット平行方向 $0.58 \mu\text{m}$ である。測定視野のうち十分な信号強度を得られた領域 $1.2 \text{ mm} \times 0.58 \text{ mm}$ に着目すると、 6×10^2 の細胞を観察できていた。以上よりこの測定では 0.6 s/cell のスループットを達成したと結論づけた。

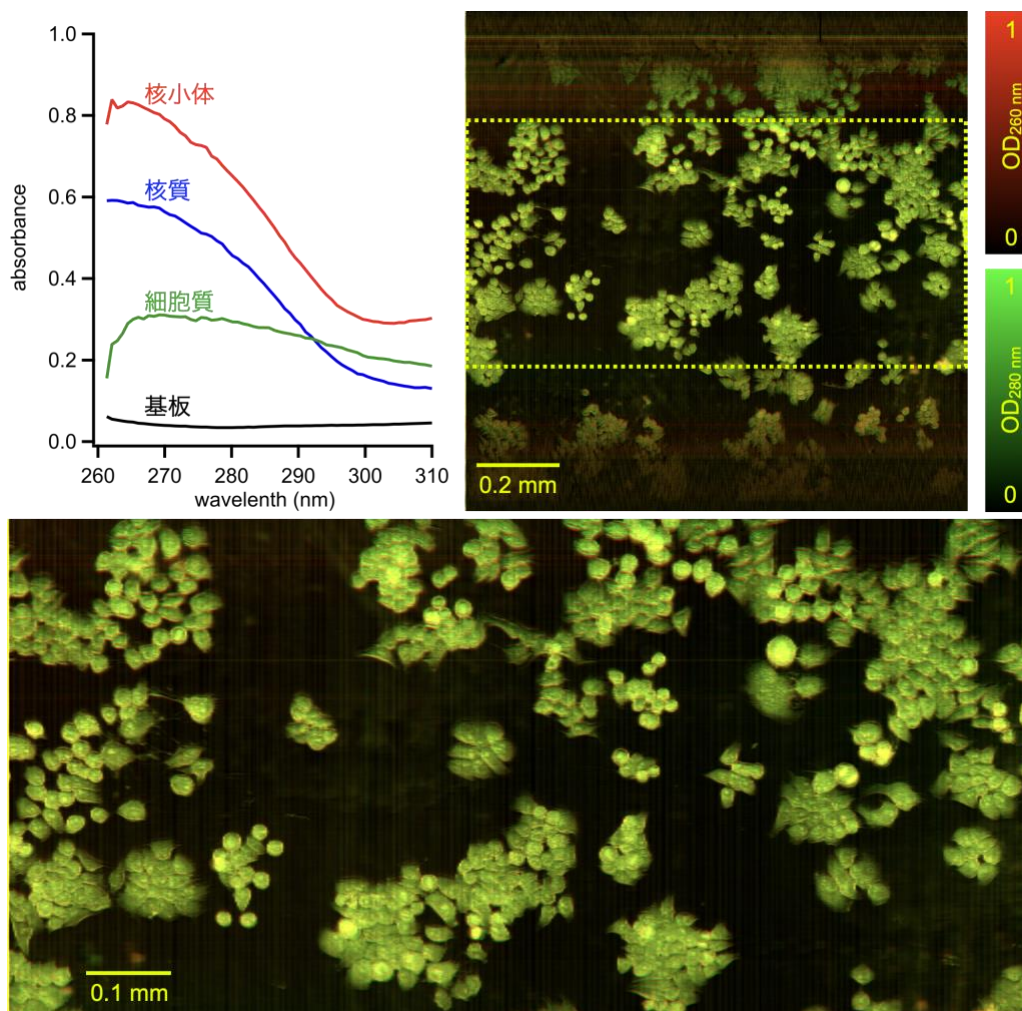


図2 構築した深紫外分光イメージング光学系により取得したがん細胞 (HeLa 細胞) の吸光度のスペクトルと画像。がん細胞は石英基板状に培養されており、測定前に化学固定されている。

図2の光学系により測定される生データの情報は、透過光強度スペクトルの空間分布である。透過光強度スペクトルの空間分布を吸光度スペクトルの空間分布に変換するため、以下のデータ処理を行なった。

1. ライン照明上の座標ごとに各波長の最大強度を抽出し推定光源スペクトル $I_0(y, \lambda)$ を生成する。
2. 分光器の入射スリットを遮蔽し取得したダークフレームと細胞から測定した透過光強度スペクトル画像データとから、カメラのバイアス値 c を求める
3. ランバート・ベール則に従い以下の式により、試料各座標 (x, y) における透過光強度スペクトル $I_1(x, y, \lambda)$ を吸光度スペクトル $A(x, y, \lambda)$ に変換する。

$$A(x, y, \lambda) = -\log_{10} \frac{I_1(x, y, \lambda) - c}{I_0(y, \lambda) - c}$$

広視野撮像の高速化を図り、図2に示す2つの反射型対物を屈折型対物レンズ (UV5xA, Nikon) に変更し測定したがん細胞の画像を図3に示す。スリット平行方向が横方向、走査方向が縦方向である。測定時間 6 分で、視野 $0.89 \mu\text{m} \times 3.53 \mu\text{m}$ の範囲に存在する 3×10^3 の細胞を観察できており、 0.1 s/cell のスループットを達成したと結論づけた。測定領域によっては色収差が顕

著であることから、データ校正方法を確立することが今後の課題である。

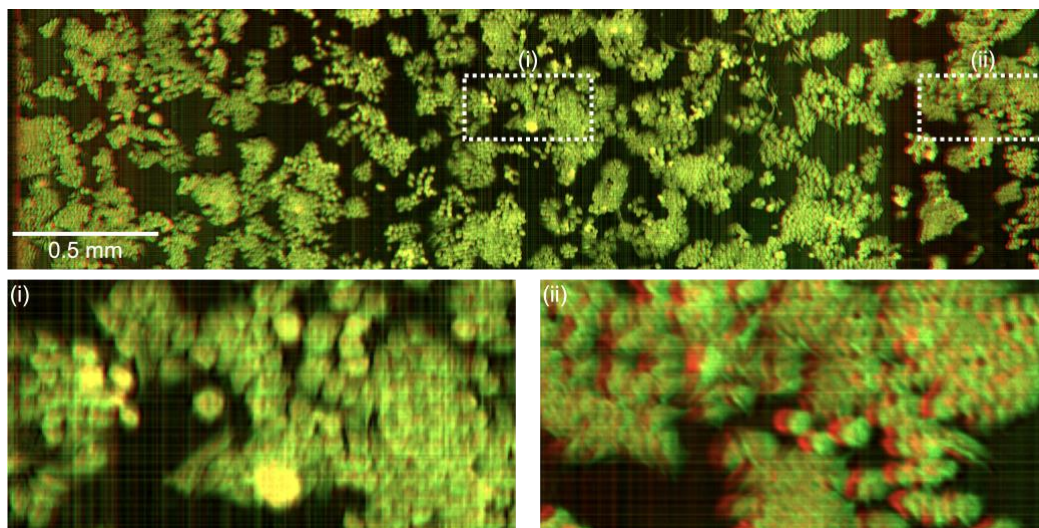


図3 反射型対物の代わりに屈折型対物レンズを用いて取得したがん細胞の代表的な画像

深紫外分光イメージングの更なる高速化を見据え、ライン照明と分光器スリットによる走査を多重化するマルチライン照明マルチスリット走査イメージング法についても検討した。上述した分光イメージングでは、260–310 nmの波長範囲を波長分散方向全長 13.3 mmのカメラにより取得した。カメラの画素数は 2048 であり、1 画素あたりの波長幅は 0.024 nm に相当する。市販の紫外可視吸光度計による吸光度測定では通常、波長幅 0.5 nm 以上であれば十分であることから、分光器の波長分散は現状の 5%でもよい。すなわち隣り合うスリットから入射する光のスペクトルがカメラ上で互いに重ならないことを条件とした場合、計測を現状より最大 20 倍高速化できる。ただし、ラマン顕微鏡において既に実現されているマルチライン照明マルチライン走査イメージング法 (Kumamoto, et al., 2023; Biomed. Opt. Express 14, 1015) は軸外収差の影響を受けやすいことがわかっており、今後は軸外収差の影響を考慮したマルチライン照明マルチスリット走査イメージング装置を開発する。

深紫外分光イメージングの高速化につながる技術として、マシンビジョンレンズと超高解像度カメラとを用いた分光イメージング法についても検討した。倍率 2 倍、開口数 0.12 のマシンビジョンレンズと、素子サイズ 1.5 μm \times 1.5 μm 、画素数 2.5 億の超高解像度カメラとを組みあわせ、センチメートルスケールの視野をマイクロスケールの空間分解能で観察可能な超広視野撮像システムを構築した。既存のマシンビジョンレンズと超高解像度カメラは深紫外波長域に対応していないため、観察は深紫外光照射により励起される可視波長域の蛍光により行なった。細胞や生体組織を観察し、視野 1 cm^2 、時間 1 s で、生体分子の深紫外スペクトルに基づく分光情報の空間分布を得られることを確認した。空間分解能は 2 μm と見積もった。

以上の成果の国内外における位置づけは重要であり、インパクトが高い。これまで、深紫外分光情報の空間分布をつかった細胞の高スループット測定および分析は報告されていない。ラマン顕微鏡に代表される非染色分子イメージング技術は、医療現場における診断支援や創薬産業における迅速スクリーニングなどにおいて注目されている。深紫外分光イメージングは、ラマン顕微鏡に比べて得られる情報は少ないが、特に広視野撮像における速度と光学系の簡便性・コストにおいて優れており、用途によっては今後実用的な活用が期待される。

最後に本研究の今後の展望を述べる。既に述べた通り、本研究により開発した技術は、マルチライン照明マルチスリット走査法により更なる高速化が見込まれる。今後の課題は、収差の影響を考慮し、マルチライン照明マルチスリット走査法を深紫外分光イメージング技術に実装することである。マルチライン照明マルチスリット走査法は、測定波長域と波長分解能、および撮像速度を用途に応じて最適化できることから、がん細胞の検出をはじめターゲットを明確にし、それに対し計測装置の最適化を進めることも課題となる。また、測定データを実用的な分析に応用するためには、吸光度スペクトル画像を活用する細胞・組織判別技術の確立も課題となる。スペクトル画像解析法はラマン分光法およびラマン顕微鏡分野において先行して研究開発されており、それらの多くは本研究における開発技術への活用を期待できる。さらに、本研究では透過光の振幅情報と位相情報とを分離せず透過光強度としてまとめて計測したが、これらを分離することでより正確により豊富な情報を試料から得られると期待される。振幅情報と位相情報の分離は干渉計測により行えるが、計測装置を煩雑化せず振幅情報と位相情報の分離を行える手法の実現も今後の課題と考えている。

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 0件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 熊本康昭 | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 深紫外分光分析による生体分子イメージング | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 ぶんせき | 6. 最初と最後の頁 376-377 |
| 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 藤田克昌, 熊本康昭, 畔堂一樹 | 4. 巻 69-5 |
| 2. 論文標題 医用分光イメージングと分解能 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 分光研究 | 6. 最初と最後の頁 165-180 |
| 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 熊本康昭 | 4. 巻 69-6 |
| 2. 論文標題 深紫外分光技術によるバイオメディカルイメージング | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 分光研究 | 6. 最初と最後の頁 191-203 |
| 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 - |

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 10件/うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 熊本康昭 |
| 2. 発表標題 深紫外励起蛍光イメージングによる癌リンパ節転移の迅速検出 |
| 3. 学会等名 日本電気学会受賞講演会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|----------------------------|
| 1. 発表者名 熊本 康昭 |
| 2. 発表標題 紫外線を照射し癌を見つけ出す |
| 3. 学会等名 日本組織細胞化学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 熊本康昭 |
| 2. 発表標題 医療現場で使える分光イメージング技術をつくる |
| 3. 学会等名 日本分光学会年次講演会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yasuaki Kumamoto |
| 2. 発表標題 Biomolecular imaging by lanthanide ions by deep-UV microscopy |
| 3. 学会等名 Pacifichem 2021（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 熊本康昭 |
| 2. 発表標題 体を診るフォトニクス計測 |
| 3. 学会等名 大阪大学大学院工学研究科テクノアリーナ フォトニクス・センシング工学グループ 第1回交流フォーラム（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 熊本康昭 |
| 2. 発表標題 深紫外生体医用分光イメージング分析法の開発 |
| 3. 学会等名 2020年度 日本分光学会年次講演会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 熊本康昭 |
| 2. 発表標題 深紫外光により生体を診る |
| 3. 学会等名 日本学会議公開シンポジウム「2022年国際光デー記念シンポジウム～中堅・若手研究者が語る光科学技術の未来～」（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 熊本康昭 |
| 2. 発表標題 低侵襲医療をサポートするスマートラマン分光法の開発 |
| 3. 学会等名 JST共創の場形成支援プログラム大阪大学フォトンクス生命工学研究開発拠点キックオフシンポジウム異分野融合型研究開発推進支援事業シンポジウム～ひとりひとりが健やかに輝く、いのちに優しいフォトンクス社会～（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 熊本康昭 |
| 2. 発表標題 深紫外ラマン分光法の最前線 |
| 3. 学会等名 日本分光学会 秋期セミナー『ラマン分光法の基礎と応用』（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 熊本康昭 |
| 2. 発表標題 深紫外光により生体をみる |
| 3. 学会等名 オプトロニクスセミナー 分光基礎セミナー 第1回 紫外分光法（招待講演） |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 R. R. Alfano, M. S. AlSalhi, H. Altan, P. Aruna, M. Atif, G. Benaim, E. Borisova, G. Cao, Y. T. Cheung, L. Cruz-Saavedra, C. de Paula D'Almeida, S. Devanesan, G. Einstein, K. Farhat, D. Gakamsky, S. Ganesan, M. R. Garcia, T. Genova, J. D. R. Gonzalez, O. Gurel, A. Iriz, Y. Kumamoto, et al. | 4. 発行年 2021年 |
| 2. 出版社 Academic Press | 5. 総ページ数 222 |
| 3. 書名 Biophotonics, Tryptophan, and Disease | |

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|