

臨床デバイスの改良を支える バイオイメーシングの進展

ジャスティン・マーフィー

ラマンベースの原理を活用することで、より高感度かつ高速なバイオメディカルデバイスの実現に近づくことができる。

新たなラベルフリーの非侵襲的手法であるコヒーレント反ストークスラマン散乱(CARS)顕微鏡は、既存の手法よりもさらに迅速かつ効率的に、生体サンプルの画像とヒト組織・細胞の化学成分を取得できる。その可能性は？疾患診断のためのより効率的な臨床デバイスだ。

伊ミラノ工科大(Politecnico di Milano)の物理学准教授であるダリオ・ポッリ氏(Dario Polli)の研究チームは、ウマニタス研究病院(Humanitas Research Hospital)と、イタリア学術会議(Italian National Research Council)の遺伝・生体医学研究所とフォトンクス・ナノテクノロジー研究所と共同で、CARS顕微鏡と技術を開発した。この技術は、ラベルフリーのモダリティや化学的特異性、高速といったラマンベースの利点を利用している。

標準手法を超える

ラマン分光法はラベルフリーで非侵襲的な化学分析の標準的な手法であり、細胞や組織といった生体サンプルの振動スペクトルがわかり、化学成分を同定するためのユニークな特徴を作成する。

生体サンプルに対するラマンイメージングの最も単純なアプローチでは、準単色の可視レーザー光または近赤外レーザー光を試料に照射する。また、同時に放射されて振動情報を持つ非弾性散

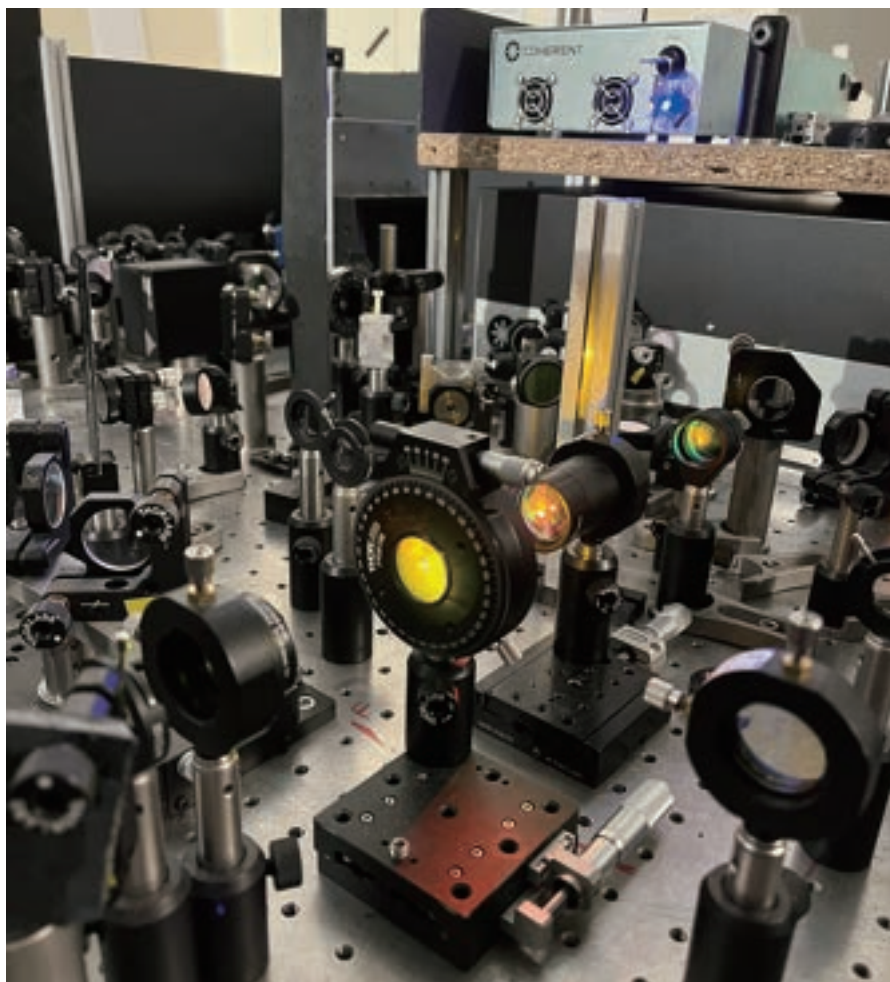


図1 2MHzの繰り返し周波数を採用したことで、バルク結晶中の白色光スーパーコンティニウムを用いてフィンガープリントの振動領域全体をカバーするような広帯域で赤方偏移したストークス光を発生できる

乱スペクトルを測定する。「しかし、この技術では散乱弾面積が非常に小さいため、1ピクセルあたり1秒程度という長い取得時間が必要となり、高速イメージングができない」とポッリ氏は言う。

CARS技術はこの制限を克服し、数けたレベルで高速化する。焦点面で分子をコヒーレントに励起させるためである。ポッリ氏の手法では、ポンプ光とストークス光という2つの超短パルスレーザーと生体サンプルの相互作用を

利用し、レーザービームによって分子がどう振動するかという情報を得ることができる。

生体サンプルのイメージングに使われる標準的な手法には、他に蛍光顕微鏡や自発ラマン(SR)散乱顕微鏡がある。

蛍光顕微鏡は高感度な高速イメージング技術だが、化学的に特有の蛍光マーカーを必要とする。マーカーの添加は、調べたい細胞や組織に強い刺激をもたらして生体機能に干渉する可能性がある。このような場合に、蛍光マーカーが不要なラベルフリー技術であるSR顕微鏡が有効とされる。

「SR顕微鏡によって生体組織内の多くの生体分子を選択的に識別できる」と、ミラノ工科大の博士課程学生であるフェデリコ・ヴェルヌッチョ氏(Federico Vernuccio)は話す。しかし、欠点も述べる。「非常に遅く、3D断面機能が無い」。

欠点を克服する

CARSは3次元非線形工学プロセスであるため、蛍光・SR技術の制限を克服し、共焦点開口部を必要としないラベルフリーな3D断面を作成できる。また、試料面で分子をコヒーレントに励起することでSR顕微鏡よりも高速に試料をイメージングできる。

CARSシステムは2MHzレートで動作する。これは、標準的なシステムよりもはるかに小さい繰り返し周波数だ。これにより連続する2つのパルス間に0.5マイクロ秒の時間遅延が生じ、システム内の熱エネルギー散逸の時間が確保され、最終的に光熱損傷が低減される。

フィンガープリントの振動領域全体をカバーするような広帯域で、赤方偏移したストークス光を発生できることも利点である。ここでは、フォトニッ

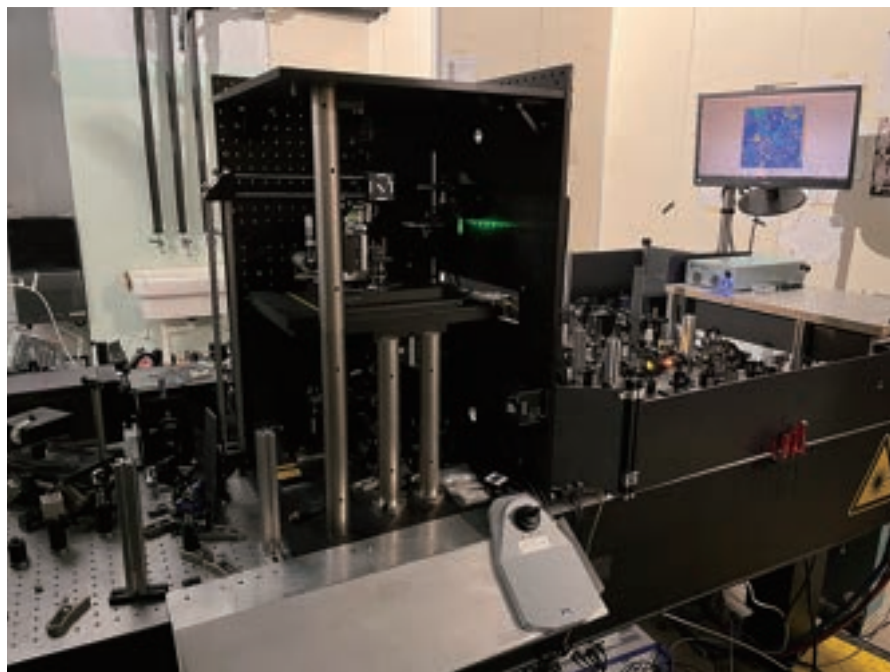


図2 直立状態で透過させる機器構成となっている、独自製作した垂直顕微鏡。検査サンプルはxyz並進ステージでラスタースキャンされ、同時に1ピクセルスペクトルを取得するためのCCDセンサーで構成される検出スキームにかけられる。開口数0.85の対物レンズが2つあり、サンプル照射とシグナル取得のために使われる。赤外線LEDによる擬似ケラー白色光を用いることで、CARS技術によるイメージングが可能となってサンプルを可視化できる

ク結晶ファイバではなくバルク結晶中の白色光スーパーコンティニウム(WLC)発生を利用する(図1)。バルク媒質中のWLCはよりコンパクトで堅牢、シンプルであり、アライメントの影響を受けないため、さらにシンプルな技術ソリューションになると、ポッリ氏は解説する。

彼は、「WLCはスペクトル成分の強度に高い相互相関があり、パルス間の変動が小さく、ポンプレーザー光源と同等の優れた長期安定性がある」と話す。「加えて、焦点における平均出力がサンプル劣化によって制限されることを考慮すると、繰り返し周波数が小さいことでパルスエネルギーとピーク強度がともに高くなり、光学効果の非線形性によって、より強いCARS信号を生成する」。

赤方偏移したスペクトル領域(ポンプ光は1035nm、ストークス光は1050～

1300nm)で動作する設定によって性能はさらに向上した(図2)。光損傷が始まる前にレーザー強度を高めたことで、細胞や組織の色素やDNAからの多光子吸収が抑えられたと考えられる。

ポッリ氏は、「人工知能手法と数値アルゴリズムを組み合わせたデータ処理パイプラインを使用しており、記録されたCARS画像から最大量の情報を注出している」と話す。「我々の顕微鏡は、分光器のリフレッシュレートに制限されてサンプルの完全性を損わないピクセル滞留時間1ミリ秒以下という最先端の取得速度で、高画質画像を得る」。

CARS技術は、分子の振動スペクトルの特定部位であるフィンガープリント領域にもアクセスできる。この領域は検出が難しいと、ミラノ工科大の物理学教授で非線形光学研究者のジュリオ・セルロ氏(Giulio Cerullo)は話す。

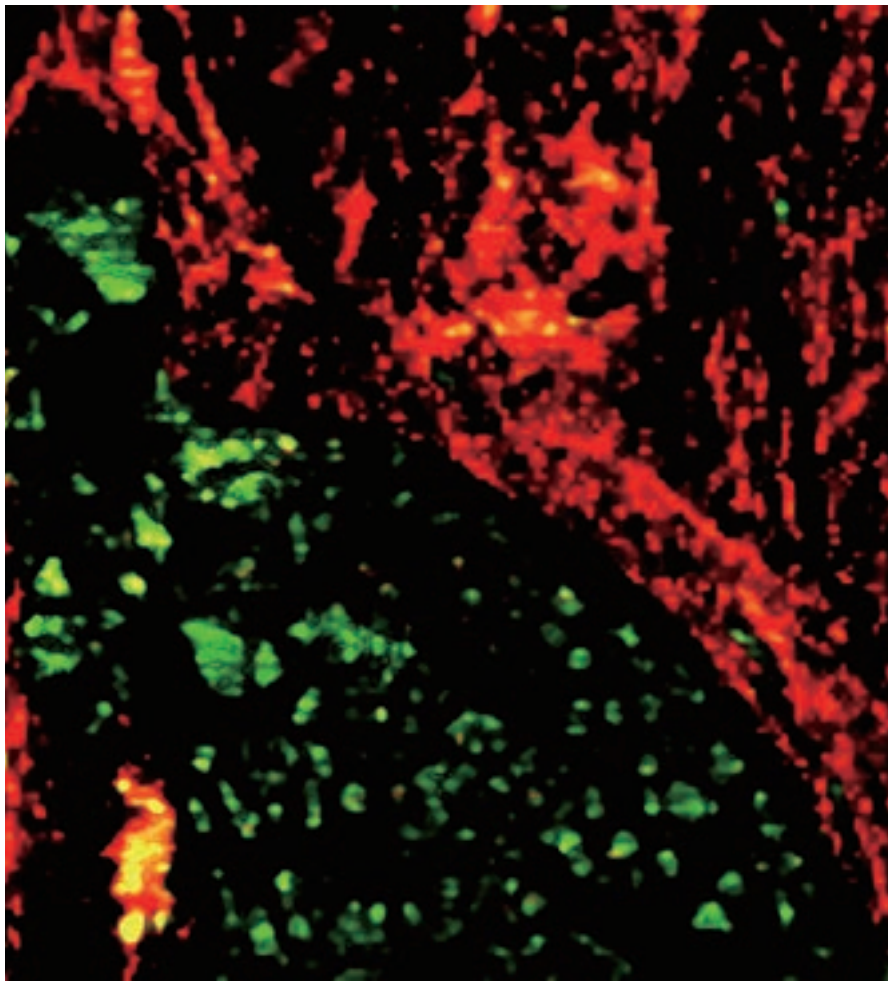


図3 マウス脊椎の6 μm スライスの大帯域CARS画像。骨髓(緑)と骨(赤)のサンプルの合成マップ。CARSデータセットのイメージング設定は、スケールバー50 μm 、150 \times 150ピクセル、ピクセルサイズ1 μm 、1340の点スペクトル、ピクセル滞留時間10ミリ秒

信号が弱いからだ。しかし、「このスペクトル領域では化合物によってパターンのピークが異なるため、各分子のユニークな特徴が得られる」と述べる。

この技術の大帯域アプローチによって、単一の振動モードでの情報収集が可能となり、1回の撮影時間で重要なフィンガープリント領域全体をカバーできる。これを実現するため、研究者は半値全幅が10 cm^{-1} の狭帯域ポンプビームを生成した。これによってスペクトル分解能が得られたとして、『Optics Express』に彼らの研究成果が掲載された。

ポッリ氏は、「こうした実験装置の特性によってピクセル滞留時間を1ミ

リ秒以下に短縮でき、CARSスペクトルを収集できる。その結果、振動イメージング技術が高速化し、高速CARS顕微鏡が実現した」と言う。

この技術ではハイパースペクトルデータも取得する。これを、深層学習ベースのアルゴリズムと数値アルゴリズムの両方と組み合わせることで、不均一な生体サンプル中における化学的に異なる種類を区別できる化学マップを作成できる(図3)。

CRIMSON プロジェクト

本研究は、欧州委員会が資金提供しているCRIMSONプロジェクトの一部で

ある。このプロジェクトでは、振動分光法に基づく次世代バイオフォトニクスイメージング装置の実現を目指すものだ。疾患の原因となる細胞の研究に革命をもたらす可能性があり、個別化医療に向けた新しいアプローチとなる。

CRIMSONのコーディネータも務めるポッリ氏によると、このプロジェクトではフィンガープリントのスペクトル帯で最高感度と最速イメージングスピードを持つ、ラベルフリーの大帯域コヒーレントラマン散乱イメージング構想に焦点を当てている。

同氏は、「人工知能による分光データ分析と組み合わせることで、これまでにない生化学的感度で細胞や組織を高速に分類するターンキー装置の提供を目指している」と話す。

ポッリ氏の研究チームによるCARS顕微鏡の開発と研究は、CRIMSONの1年目の最後に達成したトップマイルストーンの1つである。「我々のシステムは、特にがん研究の分野において緊急かつタイムリーな生体医学的な疑問に答えることができるかもしれない」と同氏は話す。「例えば、頭頸部がんにおけるがん細胞と免疫細胞の相互作用の分析や、初期における化学療法によって誘導される老化細胞の特徴づけと検出がある」。

組織病理学もまた、新しいCARSシステムがもたらす利点の恩恵を受けるかもしれない。なぜなら、正確な診断を下すためには比較的大きなサンプル面積を可視化して特性評価する必要があるからだ。ポッリ氏は、「高い空間分解能で関連する組織領域をカバーしながらフィンガープリント領域全体にわたる複雑な振動の特徴を検出することは、臨床現場におけるラマンベースのスペクトル組織病理学の導入に役立つだろう」と述べる。