

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 医療分野研究成果展開事業 産学共創基礎基盤研究プログラム
(英語) Medical Research and Developmental Programs Focused on Technology Transfer : Collaborative Research Based on Industrial Demand

研究開発課題名：(日本語) 高速誘導ラマン散乱スペクトルイメージングシステムの開発
(英語) Development of stimulated Raman fast spectral imaging system

研究開発担当者 (日本語) 北海道大学大学院情報科学研究科 教授 橋本 守
所属 役職 氏名：(英語) Graduate School of Information Science, Hokkaido University, Professor Mamoru Hashimoto

実施期間：平成28年4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) 並列化誘導ラマンイメージングシステムの開発
開発課題名：(英語) Development of paralleled stimulated Raman imaging system

研究開発分担者 (日本語) 北海道大学大学院情報科学研究科 教授 橋本 守
所属 役職 氏名：(英語) Graduate School of Information Science, Hokkaido University, Professor Mamoru Hashimoto

分担研究 (日本語) 並列化誘導ラマンロックインカメラの開発
開発課題名：(英語) Development of a paralleled stimulated Raman lock-in camera

研究開発分担者 (日本語) 静岡大学電子工学研究所 教授 川人祥二
所属 役職 氏名：(英語) Research Institute of Electronics, Shizuoka University, Professor Shoji Kawahito

II. 成果の概要(総括研究報告)

ラマン散乱は、無染色に分子種・分子構造に関する知見が得られるために、化学分析、物理化学研究、半導体物性研究等に用いられてきたが、近年になって生体観測への応用が盛んに行われるようにな

ってきた。しかしながら、ラマン散乱は非常に微弱であるために、そのイメージをリアルタイム観測することは困難であった。

本研究では、非線形ラマン散乱顕微鏡の多焦点化を行い、非共鳴バックグラウンドの影響なく、分子識別能力の高い指紋領域($500\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$)でのリアルタイム(33 ms/image)・ラマン・イメージングを実現すること、これを内視鏡へ展開することを目標に研究を行った。

非線形ラマン散乱の一種であるコヒーレントアンチストークスラマン散乱(CARS)顕微鏡とマイクロレンズアレイを用いた多焦点ビーム走査系を最適化し、 100 frame/s とビデオレート以上の高速化に成功した。また、指紋領域をフルにカバーすることが可能な、波長走査範囲が 1000 cm^{-1} を超える同期波長走査レーザーの高性能化を行なった。レーザー共振器の波長分散の2次微分の最小化、水蒸気による吸収の影響、エンドミラーに取り付けられた同期用ピエゾアクチュエーター高帯域化等を行い、指紋領域($500\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$)を30秒で誘導ラマン散乱のスペクトルイメージを測定できることを実証した。マルチモーダル観測システムを構築し、動脈硬化巣のイメージングを行った。誘導ラマン散乱によるプラーク、第二高調波によるコラーゲン線維性被膜、二光子励起自家蛍光によるエラスチンが明瞭に可視化された。また、CARSによる硬性鏡を開発し、切片試料だけでなく、前立腺周囲筋膜の末梢神経のイメージングに成功した。

また、ラテラル電界制御型電荷変調の原理に基づく、新しい電荷変調素子により、 80MHz のキャリア周波数の誘導ラマン散乱(SRS)信号を、微小なピクセルによって復調することに成功した。さらに、この素子を復調器として用い、低域通過フィルタ・サンプリング回路・スイッチトキャパシタ積分回路を通して信号成分を増幅するピクセル型 SRS 信号検出器を考案し、励起レーザー光による大きなオフセットの中に含まれる微弱な SRS 信号を抽出して増幅することが可能となった。特に、考案した2重変調法を適用することで、ピクセル型 SRS 信号検出器の $1/f$ ノイズを低減することにも成功し、SN比を大きく改善することができた。 $0.11\text{ }\mu\text{m}$ CIS テクノロジーに基づく、 10×10 画素による多焦点 SRS ロックインイメージャを設計・試作し、これを用いた顕微鏡装着用小型・検討なロックインカメラを完成した。その1ピクセルを用いて、ベンゾニトリルとステアリン酸のスペクトルを測定し、自発ラマンによるスペクトルとして報告されている結果とほぼ同等のスペクトルが得られた。また、ステージ走査 ($32\times 32@1\text{ }\mu\text{m/step}$) により、ステアリン酸と 3T3-L1 細胞内の脂肪滴の非標識 SRS イメージングに成功した。さらに、複数ピクセルによりステアリン酸のスペクトル測定を実施し、2つのピクセルにおいてほぼ同等のスペクトルが得られることが示され、半導体による微小なサイズのディテクタでの多点 SRS 計測が行えるという提案技術の利点の実証まで行った。

Raman spectroscopy has been used in the fields of analytical science, physical chemistry, semiconductor manufacturing, and so on, because of its potential to obtain the information of molecular structure and species without staining. Recently, biological applications of Raman imaging have been popular. However, since the cross-section of Raman scattering is quite small, real-time Raman imaging was unable by spontaneous Raman scattering.

In this study, we proposed the parallel excitation and detection of stimulated Raman scattering (SRS) to realize real-time (33 ms/image) in the fingerprint region ($500\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$), and to apply the imaging technique to endoscopy.

We succeeded in the 100 frame/s (10 ms/image) by CARS (coherent anti-Stokes Raman

scattering) by the optimization of the optical system of excitation beams including the microlens array scanner for parallel excitation. The synchronized tunable laser system for nonlinear Raman light source, which covers whole fingerprint region, has been improved. The laser system was stabilized synchronization during the wavelength tuning by removing of the second deviation of laser cavity dispersion and affection of water vapor absorption, and improving the response of piezo actuator for adjusting the laser cavity length. As the results, we succeeded in the spectral imaging of stimulated Raman scattering in the full fingerprint region of 500 – 1800 cm^{-1} within 30 s. A multimodal microscopy system simultaneously observing SRS, CARS, second harmonic generation (SRS), and two photon excited fluorescence (TPF) was developed and was applied to the imaging of atherosclerotic plaque. Lipid, collagen, and elastin were clearly visualized by SRS, SHG, and TPF, respectively. We also developed a CARS rigid endoscopy system, which has a 300 mm length and 12 mm diameter tube. Nerve imaging was demonstrated by using the developed system and we succeeded in the nerve imaging within 5 s.

A complementary metal-oxide semiconductor (CMOS) lock-in pixel based on lateral electric field modulator (LEFM) was developed and we succeeded in the demodulation of SRS signal. In order to suppress the offset components while amplifying high-frequency modulated small SRS signal components, the lock-in pixel uses a high-speed LEFM for demodulating the SRS signal, resistor-capacitor low-pass filter and switched-capacitor (SC) integrator with a fully CMOS differential amplifier. In order to suppress further the residual offset and the low frequency noise ($1/f$ noise) components, a double modulation technique was proposed and introduced in the SRS signal measurements. A lock-in imager with 10 x 10 pixels based on 0.11 μm CIS technology was designed and developed. A lock-in camera for microscopy imaging was also developed using the imager. Observation of the SRS spectra of benzonitril and stearic acid was demonstrated using a pixel of the camera. Imaging of stearic acid crystals and lipid droplets in cells was also demonstrated without labeling. The detection of spectra using two pixels was also demonstrated. The availability of multi-focus SRS detection we proposed were confirmed using small semiconductor pixels

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 3 件)

1. D-X. Lioe, K. Mars, T. Takasawa, K. Yasutomi, K. Kagawa, M. Hashimoto, S. Kawahito, “A CMOS image sensor using high-speed lock-in pixels for stimulated Raman scattering”, Proc. SPIE Vol. 9720, 97200J, (2016).
2. D. X. Lioe, K. Mars, S. Kawahito, K. Yasutomi, K. Kagawa, T. Yamada, and M. Hashimoto, “A stimulated Raman scattering CMOS pixel using a high-speed charge modulator and lock-in amplifier”, Sensors, Vol. 16, No. 4, 532 (2016).

3. Y. Matsuda, J. Miura, M. Shimizu, T. Aoki, M. Kubo, S. Fukushima, M. Hashimoto, F. Takeshige, and T. Araki, “Influence of dental caries on nonenzymatic glycation of human dentin”, *Journal of Dental Research*, Vol. 95, No. 13, 1523 (2016).

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. “コヒーレントアンチストークスラマン散乱硬性鏡を用いた前立腺筋膜内の神経の無染色イメージング”, 口頭, 廣瀬敬吾, 福島修一郎, 古川 太一, 橋本守, 第 64 回応用物理学会春季学術講演会, 17p-413-2, パシフィコ横浜, 2017/3/14, 国内.
2. “Coherent Raman scattering microscopy and endoscopy”, 口頭, M. Hashimoto, Japan-Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium / 14th Annual Meeting of the Japan Association of Medical Spectroscopy, Awaji, 2016/12/6, 国内.
3. “A Stimulated Raman Scattering CMOS Image Sensor Using a Large-Area High-Speed Charge Modulator and Lock-in Amplifier”, ポスター, D-X. Lioe, K. Mars, K. Yasutomi, K. Kagawa, M. Hashimoto, S. Kawahito, The 18th Takayanagi Kenjiro Memorial Symposium, Poster-17, Shizuoka, Japan, 2016/11/15, 国内.
4. “A Stimulated Raman Scattering CMOS Imager using a High-speed Charge Modulator and Lock-in Amplifier”, ポスター, D. X. Lioe, K. Mars, K. Yasutomi, K. Kagawa, M. Hashimoto, S. Kawahito, The 14th International Conference of Near-Field Optics, Nanophotonics and Related Techniques (NFO-14) , We-14P-18, pp.293, Shizuoka, Japan, 2016/9/7, 国内.
5. “非線形ラマン散乱を用いた顕微イメージングと内視鏡への展開”, 口頭, 橋本守, 第 57 回日本組織細胞化学会総会・学術集会シンポジウム「新しい手法による “観る・診る・看る” 組織細胞化学」, 杏林大学井の頭キャンパス, 2016/9/3, 国内.
6. “A Stimulated Raman Scattering CMOS Image Sensor Using a High-Speed Charge Modulator and Lock-in Amplifier”, ポスター, D-X. Lioe, K. Mars, K. Yasutomi, K. Kagawa, S. Kawahito, M. Hashimoto, Taiwan and Japan Conference on Circuits and Systems (TJCAS'16), S2B, Tainan, Taiwan, 2016/8/1, 国外.
7. “A Low-Noise CMOS Image Sensor Using High-Speed Charge Modulator and Lock-in Pixel Amplifier for Stimulated Raman Scattering” , 口頭, K. Mars, D-X. Lioe, S. Kawahito, K. Yasutomi, K. Kagawa, T. Yamada, M. Hashimoto, 第 41 回 光学シンポジウム, 講演予稿集, pp.51-52, 東京, 2016/6/24, 国内.
8. “コヒーレントアチスクラマ散乱硬性鏡の色収差補正”, 口頭, 廣瀬敬吾, 青木拓也, 古川太一, 福島修一郎, 橋本守, 平成 28 年度日本分光学会国際シンポジウム・年次講演会, 大阪大学豊中キャンパス, 大阪, 2016/5/24, 国内.
9. “術中での無染色神経イメージングを目指したコヒーレントアンチストークスラマン散乱硬性鏡の開発”, 口頭, 廣瀬敬吾, 青木拓也, 福島修一郎, 坂口良幸, 古川太一, 橋本守, 第 55 回日本生体医工学会大会, 3T4-3-2, 富山国際会議場, 富山県, 2016/4/28, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

染めずに見る顕微鏡とその周辺技術 橋本守，川人祥二，川人日本医療研究開発機構（AMED） 生体イメージング 新技術説明会，2016/7/12，国内.

(4) 特許出願

なし