

## 研究終了報告書

### 「任意のスペクトル次元を測定できる functional Raman 分光法の開発」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：平松 光太郎

#### 1. 研究のねらい

分光イメージングは細胞、生体組織内や材料内の分子挙動を測定する手法として現代科学に欠かすことのできない手法である。緑色蛍光タンパク質をはじめとする蛍光プローブやラマンイメージングの開発により、生きた細胞内のタンパク質や脂質の分布をリアルタイムに観測できるようになってきた。特にラマン分光イメージングは生きた細胞中の分子(脂質、タンパク質、核酸)を無標識に測定できる手法として近年多くの研究者に使われるようになってきている。しかしながら、従来のラマンイメージング法では、測定の帯域と速度の間に本質的なトレードオフの関係があり、速くイメージングを行うと限られた構造情報しか得られないという問題点がある。

本研究のゴールは、1回(または数回)の測定で生体機能・物性と最も相関の大きい情報だけを取得する手法(functional Raman: fRaman 分光法)の開発を行うことである。fRaman 分光法では、計測の高速化のために、測定におけるスペクトル次元数の削減を行うが、特定のラマン周波数 $\omega_i$ の強度を測定する従来のアプローチとは異なり、生体機能と最も相関の大きい次元 $s_j = \sum a_{ji} \omega_i$ を直接的に測定する手法の開発を行う。そのため、有意な情報量を保ちつつ、ラマンイメージングの高速性が実現される。

本研究では医療応用へのベンチマークとして、がん細胞の高速・無標識判別に取り組む。乳がん細胞株である MCF-7 及び乳腺上皮細胞株である MCF-10A 細胞の広帯域ラマン測定を多数(> 100 細胞)行い、その違いを特徴づけるスペクトル次元の探索を行う。抽出したスペクトル次元を直接的に観測するラマン測定パルスを実装し、fRaman 測定値を取得する。MCF-7、MCF-10A の fRaman 測定値に基づく判別の原理実証を行う。fRaman 分光法はがん診断のみならず、様々な物質科学(半導体、液晶、薬剤の品質検査、高分子材料の生体適合性の判別など)及び生命科学(幹細胞の分化能、微生物の産出する薬剤生産性、藻類細胞の油脂産出能の評価など)の研究に応用可能であると期待される。また、パルス整形を用いてスペクトルの任意次元をインテリジェント計測するアイデアは様々な分光測定(紫外可視吸収分光法、赤外分光法、エリプソメトリー、円二色性分光法、二次元相関分光法など)で実装可能である。本研究は情報科学、計算数理研究者が計算機上で実現する“理想の測定”をテーブルトップで実現するための手段を提供するものであるといえる。

## 2. 研究成果

### (1) 概要

本研究では、1回(または数回)の測定で生体機能・物性と最も相関の大きい情報だけを取得する手法(functional Raman: fRaman 分光法)の開発を目標として研究開発を遂行した。さきがけ研究期間中に、4つのサブテーマ、「fRaman 光学系の開発」、「解析による有意なスペクトル特徴量の抽出」、「fRaman イメージング法の実証」、「fRaman フローサイトメトリー法の実証」を設定し、fRaman 分光法の開発と応用の開拓を進めた。また、領域内での議論等を通じて着想した2つのサブテーマ「スパースモデリングによるスペクトル復元」、「fSorter の開発」についても研究開発を遂行した。「fRaman 光学系の開発」では、ラマン信号発生を入射パルス形の関数として表現し、最適化問題を内点法によって解くことで得られたパルスを入射光として用いることで、ターゲットとする分子のみを選択的に観測できることを実証した。「解析による有意なスペクトル特徴量の抽出」では、実際の計測でターゲットとなるスペクトル成分を抽出するための枠組みを構築した。多数細胞(ユーグレナ細胞、ヘマトコッカス細胞)のフローサイトメトリー計測データから、多変量解析によって独立に変化するスペクトル成分を抽出し、ターゲットとする高付加価値分子のスペクトル成分を抽出することに成功した。「fRaman イメージング法の実証」では、上記で開発した fRaman 分光法を顕微イメージング光学系と融合することで高い空間分解能でイメージング計測を行う手法を構築した。ポリマーブレンドを対象としてビデオレート fRaman イメージングを実証した。「fRaman フローサイトメトリー法の実証」では、fRaman 分光法とマイクロ流体デバイスとを融合することで大規模細胞計測を行う事を目指して研究を実施した。半導体プロセスによってシリコン基板上に流路を作成し、音響波を印加することで細胞を精密に整列させた。また、Raman タグマイクロビーズを合成し、毎秒 20-30 細胞程度の高速計測を実現した。「スパースモデリングによるスペクトル復元」では、圧縮センシング技術を導入することで、Nyquist 限界以下でのサンプル数でラマンスペクトルの復元が可能であることを実証した。「fSorter の開発」では、マイクロ流路内に機械学習によって最適化されたパターン照明を照射することで、形状選択的な細胞分取が可能であるという仮説のもとに開発を実施した。研究期間中に装置及びアルゴリズムを開発し、今後多数の分取データを学習させ、形状選択的分取を行うための基盤を構築した。

(2) 詳細

研究テーマ A「functional Raman 光学系の開発」

functional Raman (fRaman)分光計測の実証のために、図1に示す光学系を開発した。fRaman 測定のために必要な広帯域かつハイパワーのフェムト秒パルスの発生のために、非同軸光パラメトリック増幅器 (NOPA)を開発し、出力> 100 mW, 帯域> 1000 cm<sup>-1</sup> のフェムト秒パルスの発生に成功した。発生させた広帯域パルスをパルス圧縮した後に、干渉計を用いて pump, probe のパルス対を生成した。Probe 光はパルス整形光学系で任意のパルス形へと整形することができる。パルス整形光学系は空間位相変調器と回折格子を用いることで、各波長成分に異なった位相遅延を与える事ができ、プローブ光のパルス系を整形することで特定の分子のみを選択的に計測できるように設計されている。

次に、パルス整形光学系で生成するパルス形を決定するために、内点法を用いたパルス整形シミュレーションを実施した。図2 青線で示されるスペクトル形状の pump/probe 光を用い、図2 赤線で示される波長領域でラマン信号の計測を行うとき、j番目の分子からのその信号強度が以下の式で表せるとした。

$$S_j(T, \omega; \phi) \propto \sum_k \int_{\omega_1}^{\omega_2} d\omega \int_{\omega_1'}^{\infty} d\omega' A_{jk} \frac{\exp[-i\{2\pi(\omega - \omega')T + \phi(\omega')\}]}{(\omega - \omega') - \Omega_{jk} - i\Gamma_{jk}} \quad (1)$$

ここで、 $T, \omega, \omega', \phi, A_{jk}, \Gamma_{jk}$  はそれぞれ pump-probe 間の delay time、検出周波数、励起周波数、probe 光のスペクトル位相、j番目分子のk番目振動モードの振幅、減衰係数である。(1)式が非ターゲット分子に関しては 0 になるという制約のもとでターゲット分子での値が最大となる

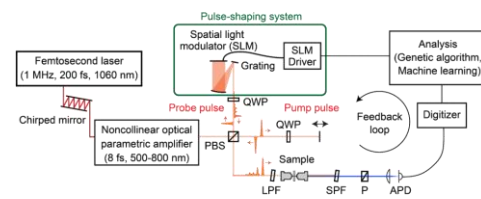


図 1. 開発した fRaman 分光計測装置の概略図及び外観写真

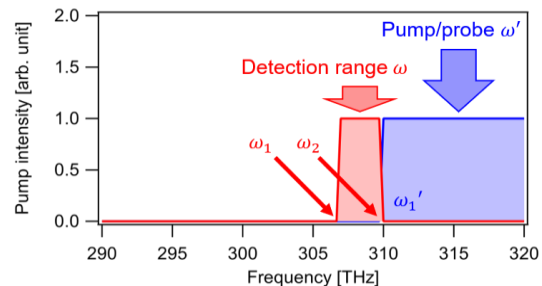


図 2. fRaman 計測のシミュレーションに用いた pump/probe 光のスペクトルと信号検出領域

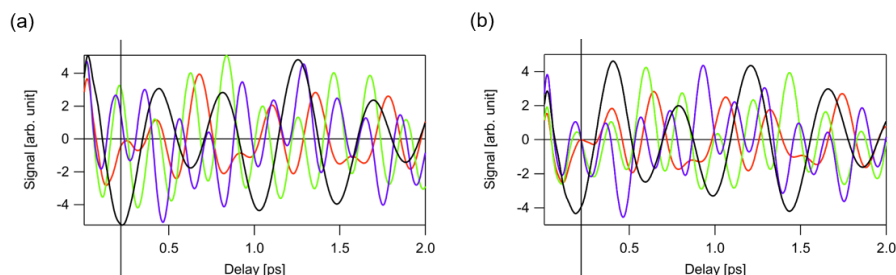


図 3. fRaman シミュレーションの原理検証. (a)パルス整形無し (b)内点法によるパルス整形有りの場合. 黒線がターゲット分子からの信号、その他の線 (緑、赤、紫) が非ターゲット分子からの信号

ように、内点法を用いて $\phi(\omega')$ の関数形を最適化した。図 3 に示すように、指定した $T$ において、ターゲット分子のみから信号が出るようにパルス整形を行えることが示された。

本手法によって最適化したパルスを用いて実際に複数サンプルの計測を行ったところ、図 4(a)に示すように、意図した計測時刻において、ターゲット分子(Sample 1)からのみ信号が発生し、非ターゲット分子(Sample 1,2,3)からの信号は抑制されることが実験的に示された。同様の条件でシミュレートした信号(図 4(b))ともよく一致しており、本手法によって fRaman 計測用のパルスが最適化できることが示された。

### 研究テーマ B「解析による有意なスペクトル特徴量の抽出」

本テーマでは、測定した大量のスペクトルからの物質分布を定量的に解析するフレームワークの構築を実施した。高付加価値物質であるアスタキサンチンを算出する細胞としてヘマトコッカス細胞を対象とし、スペクトル分類を実施した。図 5 に様々な条件で培養したヘマトコッカス細胞(各条件で 500 細胞を測定)から取得した平均の FT-CARS スペクトルを示す。得られた 10 通りのスペクトルを化学的に解釈するための多変量解析法の一つである Multivariate curve

resolution alternating least-square (MCR-ALS)法を適用し、各スペクトルが独立な 2 成分から構成されていることを明らかにした(図 6)。得られたスペクトルを振動分光学的に解析すると、それぞれ主にアスタキサンチンとクロロフィルに帰属されることがわかる。このように、多数のスペクトルから独立に変化する成分を多変量解析によって抽出することで、化学的に意味のあるスペクトル成分を議論することができるようになる。同様に、ユーグレナ細胞中にもスペクトル解析を実施し、多変量解析によって高付加価値物質であるパラミロンのスペクトル成分の抽出が可能であることを示した。これにより、解析したい細胞集団において、ターゲットとするスペクトル成分を抽出し、fRaman 計測によって高速計測するための基本的な枠組みが構築できた。

### 研究テーマ C「fRaman イメージング法の実証」

### 研究テーマ D「fRaman フローサイトメトリー法の実証」

今後、知財取得・論文出版予定のため非公開

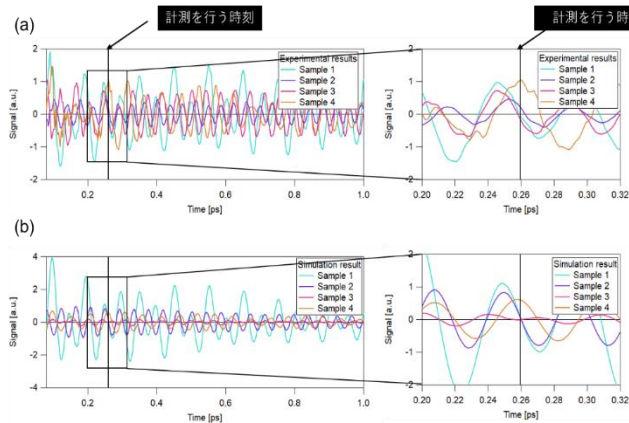


図 4. fRaman 分光計測の原理実証。内点法を用いたアルゴリズムによって最適化されたパルスを用いて取得した異なる分子からの time-domain interferograms. (a)実験 (b)計算。

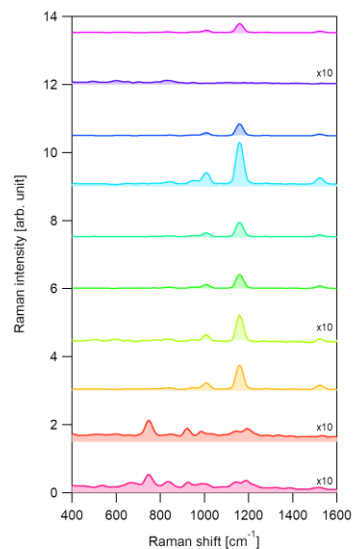


図 5: 10 通りの異なる条件で培養したヘマトコッカス細胞から測定した FT-CARS スペクトルの平均



### 研究テーマ E「スパースモデリングによるスペクトル復元」

当初計画にはなかったが、領域会議での助言を受け、スペクトル情報を効率的に取得する異なるアプローチの実証も行った。ここでは、タイムドメインインターフェログラムからラマンスペクトルを取得する際に、通常行うフーリエ変換による方法ではなく、スペクトルのスパース性

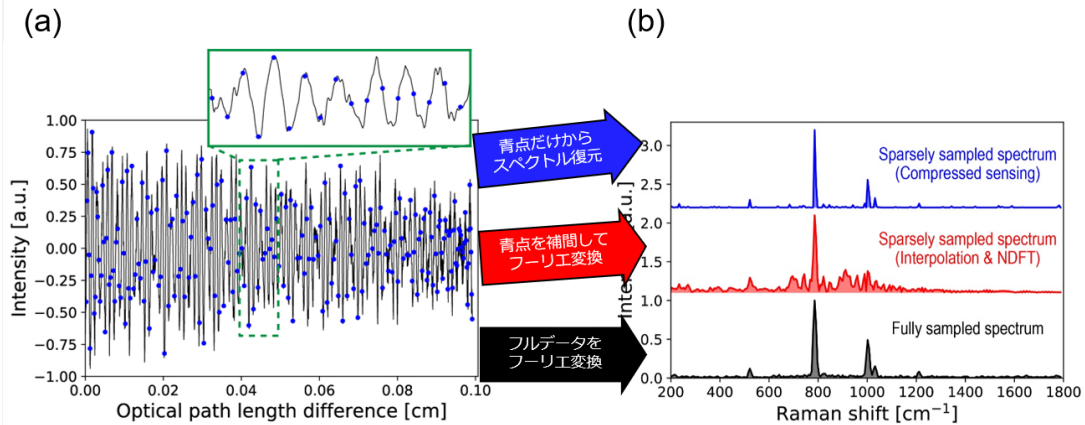


図 11. スパースモデリングによるラマンスペクトルの復元 (a) トルエンから計測したタイムドメインインターフェログラム、(b) 各手法で復元したスペクトル。青線：(a)の青点のサンプルのみから ISTA で復元したスペクトル。赤線：(a)の青点のサンプルのみからフーリエ変換で復元したスペクトル。黒線：(a)の黒線のサンプルからフーリエ変換で復元したスペクトル

を仮定して L1 ノルム正則化を行う方法を検討した。図 11(a)に示した光学系では、高速(12 kHz)に振動するレゾナントスキヤナを用いて pump-probe 間の遅延を走査しているが、走査速度が一定ではないため、等間隔に発生するレーザーパルスを用いて計測すると、タイムドメインインターフェログラムのサンプリング間隔は不等間隔となる(図 11(b))。

この実験的に実現される不等間隔なサンプリングにより、圧縮センシングが可能となる。Iterative soft thresholding algorithm (ISTA)を用いて得られる L1 ノルムが最小化されるスペクトルを求める事で、Nyquist 周波数を超えた周波数成分についても復元することが可能となる。図 11(a)にトルエンから計測したタイムドメインインターフェログラム、図 11(b)に復元したスペクトルを示す。スパースモデリングを用いる事によってフーリエ変換で復元したスペクトルよりも高い周波数成分まで信号を復元できることが実験的にも示された。

### 研究テーマ F「fSorter の開発」

今後、知財取得・論文出版予定のため非公開。

### 3. 今後の展開

本研究で、fRaman 分光計測の基盤を開発するとともに、イメージング光学系、フローサイトメトリー光学系との融合を進めた。今後は応用展開を行っていく予定である。特にイメージングでは、様々な分子、混合比、照射強度でのポリマーブレンドの光重合化過程の可視化に挑んでいく。ポリマーブレンドの物性を決定するのに重要な相構造を決定するメカニズムの解明に向けて研究を進めていく。また、高速計測を活用することによって、材料の破壊などの不可逆過程の可視化にも応用展開していく予定である。今後 5 年程度で更に装置の高感度化・高速化を進めるとともに、様々な材料の計測を進め、上記応用展開によって材料

開発研究へとフィードバックを与えられる研究成果の創出を目指す。フローサイトメトリーでは、細胞の超多色計測による精密な細胞サブタイピングへと応用展開を行う。本研究で開発したラマンタグと抗体染色を組み合わせるとともに、fRaman 計測に用いるパルスを高速変調するメカニズムを開発することで、10 種類以上の生体分子を同時に可視化できるフローサイトメトリーを 5 年程度の期間で開発し、10 年以内の社会実装を目指す。

#### 4. 自己評価

当初計画で予定していた fRaman 分光計測の基盤部分を開発できた部分は高く評価したい。一方で、イメージング及びフローサイトメトリー計測において大きなインパクトのある成果を出すに至れなかったのは反省点である。今後は、社会的インパクトの大きい対象を見つけ応用展開を進めていきたい。また、領域内での議論によって研究の新たな展開を開拓し、成果を残せた部分は本領域に参加したことによって得られた成果であり本研究期間を有意義なものにできた。CREST 小松崎グループとの連携によってラマン分光計測と機械学習の融合という分野において相当に深い議論を交わすことができ、研究進捗に大きな寄与があった。また、スパースサンプリングを用いたスペクトル復元では東工大の小野氏との議論で本質的な進展があった。当該部分の成果は現在論文準備中である。また、指導学生が小野研究室でインターンを実施するなどの知識交流・人材育成も進めており、本領域での交流を通じて次世代の情報計測分野を担う研究者の育成にも貢献できた点は高く評価したい。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 22 件

1. K. Hiramatsu, K. Yamada, M. Lindley, K. Suzuki, and K. Goda, Biomed. Opt. Express 11, 1752 (2020).

研究サブテーマ「解析による有意なスペクトル特徴量の抽出」部分の成果をまとめて論文として出版した。ユーグレナ細胞を対象として大規模ラマン分光計測を行い、高付加価値物質であるパラミロン分子のスペクトル特徴量を抽出した。更に、その細胞間分布について定量的な議論を行い、今後本手法を用いて高価値細胞を創出するための基礎的知見の構築を行った。

2. S. Takizawa, K. Hiramatsu, and K. Goda, Vib. Spectrosc. 107, 103042 (2020).

研究テーマ「スパースモデリングによるスペクトル復元」部分の成果をまとめて論文として出版した。Nyquist 限界以下のサンプル数で計測した高速走査フーリエ変換コヒーレントアンチストークスラマン散乱のインターフェログラムを、圧縮センシングを用いて解析することで、高精度にスペクトル復元が可能であることを実証した。

3. M. Lindley, J. Gala de Pablo, R. Kinogawa, K. Hiramatsu, and K. Goda, Opt. Lett. 46, 4320 (2021).

研究テーマ「functional Raman 光学系の開発」における成果の一部を論文として出版した。遺伝的アルゴリズムを用いてパルス形状を最適化することで、高速走査フーリエ変換コヒーレントアンチストークスラマン散乱分光計測を高感度化出来ることを示した。

## (2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のものも含む)

## (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

### 受賞

- 2021 年 11 月, 日本分光学会年次講演会若手講演賞(オンライン), シリコンナノディスクアレイを用いたキラル場増強ラマン光学活性
- 2020 年 12 月, 研究開発奨励賞 エヌエフホールディングス特別賞 振動分光計測に基づく無標識・大規模一細胞解析法の開発 エヌエフ基金
- 2019 年 9 月 第 47 回(2019 年秋季)応用物理学会講演奨励賞, 振動分光フローサイトメトリーによる大規模無標識 1 細胞解析
- 2019 年 4 月, 優秀講演賞(学術) 日本化学会
- 2019 年 2 月, Best Presentation Award, SPIE Photonics West SPIE

### 招待講演

- “High-speed Fourier-transform spectroscopy by non-mechanical cavity modulation”, Kotaro Hiramatsu, Smart Photonic and Optoelectronic Integrated Circuits 2022, SPIE Photonics West, January 2022
- “Raman image-activated cell sorting and beyond”, Kotaro Hiramatsu, Keisuke Goda, Advanced Chemical Microscopy for Life Science and Translational Medicine 2022, SPIE Photonics West, January 2022
- “Raman flow cytometry on a chip”, Kotaro Hiramatsu, High-Speed Biomedical Imaging and Spectroscopy VII, SPIE Photonics West, January 2022
- “蛍光エンコーディングによる超高感度ラマン分光計測”, 平松 光太郎, レーザー学会学術講演会第 42 回年次大会, オンライン, 2022 年 1 月
- “高スループットラマンフローサイトメーターによる多細胞分析”, 平松 光太郎, レーザ顕微鏡研究会第 46 回講演会, オンライン, 2021 年 11 月
- “Raman spectroscopy and imaging of single cells in flow”, Kotaro Hiramatsu and Keisuke Goda, SciX2021, Online, October 2021
- “High-throughput vibrational flow cytometry”, Kotaro Hiramatsu and Keisuke Goda, SPIE Photonics West, Advanced Chemical Microscopy for Life Science and Translational Medicine, Photonics West, San Francisco (USA), February 2020
- “高スループット振動分光フローサイトメトリー”, 平松 光太郎, 合田 圭介, レーザー学会学術講演会 第 40 回年次大会, 宮城, 2020 年 1 月
- “多元的分光計測による大規模一細胞解析”, 平松 光太郎, 分光学会生細胞分光部会シンポジウム, 茨城, 2019 年 12 月
- “Vibrational flow cytometry for label-free large-scale single-cell analysis”, Kotaro

- Hiramatsu and Keisuke Goda, 30<sup>th</sup> International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science, Nagoya (Japan), December, 2019 (基調講演)
- “高速ラマン分光法による大規模一細胞解析”, 平松 光太郎, 第17回医用分光学研究会, 神奈川, 2019年 11月
  - “High-throughput Raman flow cytometry”, Kotaro Hiramatsu and Keisuke Goda, SelectBio 2019 – Microfluidics & Organ-on-a-Chip Asia 2019, Narita (Japan), November, 2019
  - “Large-scale single-cell analysis by ultra-rapid time-domain Raman spectroscopy”, Kotaro Hiramatsu and Keisuke Goda, The 12th International Photonics and OptoElectronics Meetings, Wuhan (China), November, 2019
  - “High-throughput Raman spectroscopic flow cytometry”, Kotaro Hiramatsu and Keisuke Goda, The Australia and New Zealand Nano and Microfluidics 2019, Wollongong (Australia), July, 2019
  - “フェムト秒時間分解 CD 分光法”, 平松 光太郎, 第23回 HiSOR 研究会 ~分子キラリテ  
ィの計測・理論技術の革新から迫る生命機能研究の新展開~, 広島, 2019年 3月