

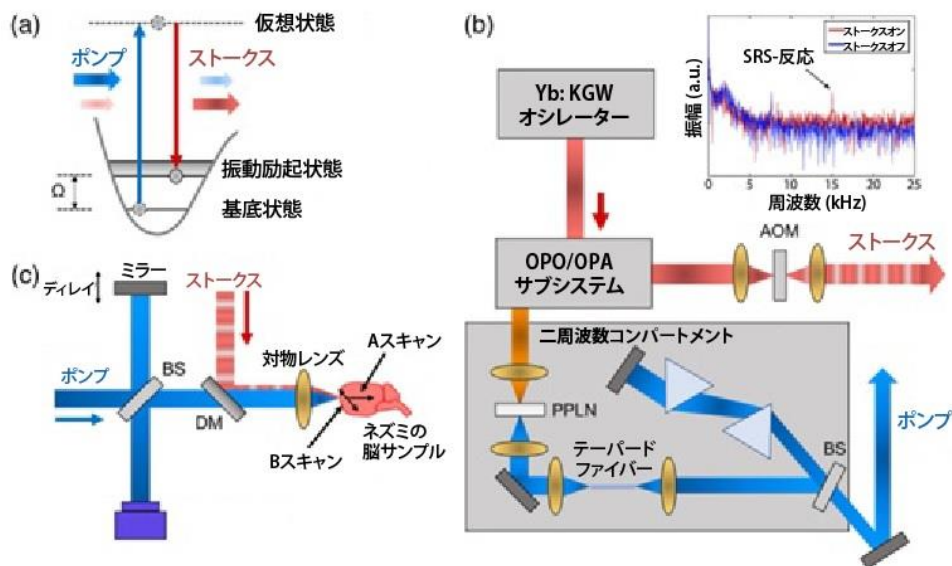
誘導ラマン散乱分光光干渉断層法を用いた 9L 神経 膠肉腫ラットモデルにおける脳腫瘍の無標識検出

Soheil Soltani,^{1,†} Zhe Guang,^{1,†} Zhaobin Zhang,^{1,2,3} Jeffrey J. Olson,^{1,2,3} and
Francisco E. Robles^{1,2,3,*}

^a Georgia Institute of Technology and Emory University, Wallace H. Coulter Department
of Biomedical Engineering, Atlanta, Georgia, United States

^b Emory University, Winship Cancer Institute, Atlanta, Georgia, United States

^c Emory University School of Medicine, Department of Neurosurgery, Atlanta, Georgia,
United States



梗概

意義: 脳神経外科手術では、腫瘍切除を最大限にしながら重要な健康な脳組織への損傷を最小限に抑えるために、腫瘍と健康な脳領域を区別することが不可欠です。しかし、脳神経外科手術を誘導するために使用される従来の術中画像ツールでは、特に浸潤性腫瘍領域や低悪性度神経膠腫では、腫瘍の境界を区別できないことがよくあります。

目的: 本研究の目的は、(1) 深さの関数としての信号の減衰率から得られる構造バイオマーカーと、(2) SRS 信号から抽出された脂質とタンパク質の組成の相対的な違いに基づく分子バイオマーカーに基づいて、健康な脳組織と腫瘍を区別するための誘導ラマン散乱分光光干渉断層撮影 (SRS-SOCT) と呼ばれるラベルフリー分子イメージングツールの実現可能性を評価することです。

アプローチ: SRS-SOCT は、SRS の分子感度 (振動分光法に基づく) と SOCT の空間およびスペクトル多重化機能を組み合わせて、高速で空間およびスペクトル分解された分子イメージングを可能にします。SRS-SOCT は、高い増殖能力、高い血管新生、および辺縁部の浸潤など、ヒトの高悪性度神経膠腫を再現する、十分に特徴付けられたモデルである 9L 神経膠肉腫ラット腫瘍モデルのイメージングに適用されます。SRS-SOCT から取得された構造的および生化学的シグネチャが抽出され、健康な組織と腫瘍組織が識別されます。

結果: データは、SRS-SOCT が従来の OCT と同様に、腫瘍の存在と相関する光散乱ベースのシグネチャを提供することを示しています。さらに、SRS-SOCT で測定された SRS 相互作用からの非線形位相変化は、腫瘍組織を健康な脳領域から明確に区別するための追加の尺度を提供します。また、SRS-SOCT の非線形位相信号は、腫瘍を識別するための非線形振幅信号よりも信号対雑音比に優れていることも示しています。

結論: SRS-SOCT は、9L 神経膠肉腫ラットモデルの腫瘍領域を識別する空間的特徴とスペクトル的特徴の両方を区別できます。このツールは、高速、ラベルフリー、非破壊、空間的に分解された分子情報を提供し、将来の開発により、脳神経外科における腫瘍境界の識別に役立つ可能性があります。

© The Authors. Published by SPIE under a Creative Commons Attribution 4.0 Unported License. Distribution or reproduction of this work in whole or in part requires full attribution of the original publication, including its DOI. [DOI: [10.1117/1.JBO.26.7.076004](https://doi.org/10.1117/1.JBO.26.7.076004)]

キーワード: 光干渉断層撮影、誘導ラマン散乱、分子イメージング。

Paper 210043R received Feb. 8, 2021; accepted for publication Jun. 29, 2021; published online Jul. 14, 2021.

*Address all correspondence to Francisco E. Robles, robles@gatech.edu

*These authors contributed equally.

1 はじめに

切除は脳腫瘍を管理する第一選択療法であり、切除範囲が広いほど患者の生存率が高まります。1-3しかし、患者に深刻な結果をもたらす可能性のある脳機能障害を避けるために、健康な脳組織の除去を最小限に抑えることも非常に重要です。したがって、脳腫瘍と健康な組織を区別する能力は、患者の全生存率と生活の質に直接関係するため、脳神経外科では最も重要です。4-6腫瘍組織と良性組織の間には病理学のおよび生化学的違いがあるにもかかわらず、手術中に腫瘍の境界を特定することは依然として大きな課題です。

脳神経外科手術のガイドとして、磁気共鳴画像法^{7,8}、コンピューター断層撮影法⁹、5-アミノレブリン酸蛍光法¹⁰、超音波法¹¹など、さまざまな画像技術が提案されています。しかし、これらの方法には、非常に高額な費用、生体内画像化機能の欠如、浸潤性腫瘍や低悪性度疾患に対する感度の欠如など、重要な制限があります。最近では、ラベルフリーの光学的方法が提案されており、低コスト、高解像度、潜在的に非常に特異的な生体内腫瘍マージン検出など、重要な利点があります。例えば、光干渉断層撮影 (OCT) は、腫瘍組織と良性組織の光減衰の差を利用して脳腫瘍手術を誘導するために使用されています。¹²もう一つの例は、分子の固有振動特性を測定する誘導ラマン散乱 (SRS) です。¹³以前の研究では、SRS で測定された脂質とタンパク質の含有量によって、健康な脳組織と腫瘍の脳組織を区別できることが示されています。¹⁴⁻¹⁶SRS は確かに脳神経外科手術の誘導にうまく適用されていますが、切除された組織のみを使用しており、¹⁷⁻²¹生体内の術中画像誘導への実装は困難でした。^{17,22-24}さらに、OCT とは異なり、SRS はポイントスキャン法であり、OCT を高速ボリュームイメージングツールにする便利な空間多重化機能を提供しません。それでも、SRS で利用できる独自の分子情報、特にラマン断面積が大きいタンパク質と脂質から得られる情報は、生化学的コントラストに基づいて腫瘍の境界を特定するための魅力的な候補になります。

本研究では、誘導ラマン散乱分光干渉断層撮影 (SRS-SOCT)^{25,26} と呼ばれる方法を適用し、画像誘導脳神経外科手術における腫瘍の縁の特定に対するその可能性を評価します。SRS-SOCT は、SOCT の空間およびスペクトル多重化機能と SRS の分子感度および特異性を組み合わせて、高速でラベルフリーの断層分子情報を提供することで、各技術 (OCT および SRS) の限界を克服します。本研究では、9L 神経膠肉腫ラット腫瘍モデル (高い増殖能力、高い血管新生、縁での浸潤を示す、十分に特徴付けられたヒトの高悪性度神経膠腫モデル^{27,28}) を使用して、脳神経外科手術の誘導に役立つ SRS-SOT の可能性を評価します。結果は、SRS-SOCT が腫瘍領域を識別する空間的特徴とスペクトル特徴の両方を区別できることを示しています。この独自の方法は、脳腫瘍検出の重要なツールになる可能性があります。

2 手法と材料

2.1 非線形光学 SRS プロセス

SRS は、図 1(a) に示すように、高エネルギーのポンプ光子から低エネルギーのストークス光子への分子との振動相互作用によるエネルギー移動があるときに発生します。この場合、ポンプビームは生体分子を基底状態から仮想状態に励起します。次に、ストークスビームが(瞬時に)分子を振動状態に戻すと、コヒーレン

トなストークス光子が生成されます。ポンプビームとストークスビームの周波数差は、 $\Omega = \omega_{\text{pump}} - \omega$ と表されます。ポンプ場が経験する非線形変化は、次のように表されます。

$$E(\omega) \propto E_0(\omega) \exp\left(-i \frac{\tilde{n}_{\text{NL}}(\omega)\omega \cdot 2z_0}{c}\right), \quad (1)$$

$$\tilde{n}_{\text{NL}}(\omega) = \frac{3}{4n_0^2\epsilon_0 c} \chi^{(3)}(\Omega) I_{\text{Stokes}}, \quad (2)$$

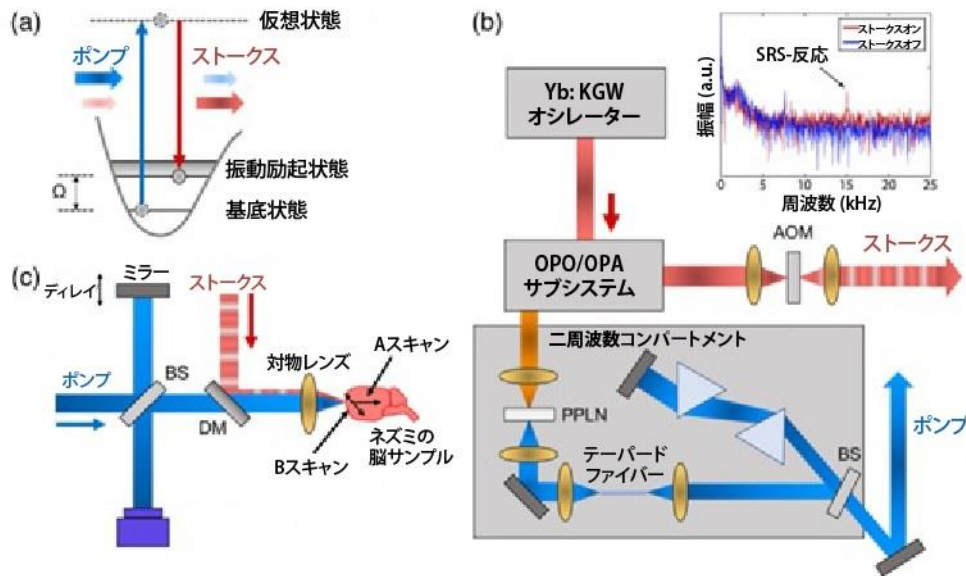


図1: SRS相互作用と実験的SRS-SOCTセットアップの概略図。(a)SRSプロセスエネルギー図。(b)SRSSOCT用のポンプビームとストークスビームを供給するように設計された超高速レーザーシステム。(c)マイケルソン干渉計を使用した分光検出を備えたイメージングセットアップ。DM、ダイクロイックミラー、BS、ビームスプリッター、OPO、光パラメトリック発振器、OPA、光パラメトリック増幅器、AOM、音響光変調器、およびPPLN、周期分極反転ニオブ酸リチウム。(b)の挿入図には、周波数領域で測定された信号が表示されており、SRS応答のピークはAOM変調周波数によって15kHzに現れます。ピークはストークスビームがオンするときのみ現れ、非線形光学プロセスを示しています。

ここで、 $E_0(\omega)$ は初期入射ポンプ場、 $\tilde{n}_{\text{NL}}(\omega)$ は媒体の複素非線形屈折率、 z_0 は相互作用長、 I_{Stokes} はストークスビーム強度、 n_0 は媒体の屈折率、 ϵ_0 は自由空間の誘電率です。 $\tilde{n}_{\text{NL}}(\omega)$ の複素特性はSRS-SOCTで直接測定でき、3次非線形光学感受率 $\chi^{(3)}$ に比例し、非常に特異的な生化学的(ラマン)特性が得られることに注意してください。以下のセクション2.3で説明するように、ここではラマンスペクトルの高波数領域をターゲットにします。これは(1)脂質とタンパク質からの分子情報を提供し、(2)脳腫瘍の特定に使用されています。¹⁸

2.2 SRS-SOCT用超高速レーザーシステム

私たちは最近、SRS-SOCT用に特別に設計された超高速レーザーシステムを導入しました。²⁶システムの概略図を図1(b)に示します。全体として、このシステムは40MHzの繰り返し周波数で動作し、2つの出力があります。1つはストークスビーム用、もう1つはポンプビーム用で、ポンプビームは図1に示すようにSOCT光源としても機能します。

SRSポンプパルスの場合、まず、高出力(約8W)Yb:KGWオシレーター(約450fs、1040nm)がレーザーシステムのポンプソースとして使用されます。次に、出力は光パラメトリック発振器(OPO)と光パラメトリック増幅器(OPA)に送られ、1.4~2 μm の調整可能な出力が生成されます。次に、パルスは周期分極反転ニオブ酸リチウム(PPLN)結晶を使用して周波数2倍になり、790nmの狭帯域パルスが生成されます。次に、テーパードSMF28ファイバー(長さ78mm)を使用して自己位相変調によりパルスのスペクトルが広がられます。このステップは、SRSおよびSOCTに適した低ノイズで圧縮可能な広帯域パルスを生成するために重要です。最後に、

プリズムパルスコンプレッサを使用して色分散を補正し、出力パルスの持続時間を短縮します(約 50fs)。

SRS ストークスパルスについては、Yb:KGW オシレーターの出力の一部を直接分割します。このパルスは、ロックイン検出のために音響光変調器(AOM、Gooch&Housego、AOM03200-124)によって 15kHz でアクティブに変調されます。

全体として、当社のレーザーシステムは、帯域幅が約 40nm、圧縮可能期間が 50fs 未満で、中心波長が 790nm (740~975nm で調整可能) のポンプパルスを出力します。レーザーからの平均ポンプ出力は約 115mW に設定されており、そのうち 50mW 未満がサンプルに入射します。ストークスパルスは 1040nm に固定されており、持続時間は 450fs、平均出力は約 200mW です (サンプルに入射するのは約 95mW)。他の研究^{13,17,18}と同様に、これらの出力レベルでは目立った組織損傷は発生しませんでした。この構成により、OCT で軸方向分解能が約 10 μ m になり、ラマンスペクトル領域が約 2700~3200cm⁻¹ になります。SRS 信号は OCT と同じ軸方向解像度を共有しますが、他の SOCT 法と同様に、分子シグネチャは深さに沿って蓄積されます。^{25,26} ポンプとストークスパワーによる SRS-SOCT 信号のスケールリングは、十分に制御された合成サンプルと新鮮な組織を使用した以前の研究で厳密に特徴付けられています。^{25,26}

2.3 SRS-SOCT における干渉分光検出

SRS-SOCT システムのイメージング部分を図 1(c)に示します。まず、レーザーから出力された SRS ポンプビームは、マイケルソン干渉計に送られ、そこで光は 2 つの同一ビームに分割されます。1 つは参照ビームとして使用され、もう 1 つはサンプルビームとして使用されます。前述のように AOM によって 15kHz で変調されたストークスビームは、ダイクロイックミラーを介してポンプビームと結合されます。ポンプビームとストークスビームの両方が、5 倍対物レンズ(Zeiss、A-Plan5 倍、NA=0.12)を使用して、生物学的サンプル(ラットの脳、詳細はセクション 2.4 を参照)に焦点を合わせます。レーザーのビーム径が 2mm の場合、OCT 信号と SRS 信号の両方に適用される横方向の解像度は 5.2 μ m になります。サンプルビームにエンコードされて生成された SRS 信号は、光が後方散乱した後に収集され、従来のフーリエ領域 SOCT と同様に干渉法で検出されます。ここでは、高速分光計(BaySpec、OCTS-0780-08400900-SLIT)を使用して干渉信号を記録します。スペクトルは 50kHz(カメラのラインスキャン速度)で記録され、各 A スキャンで 2048 のスペクトルが記録されます。15kHz のストークスビーム変調周波数は、SRS 信号への熱の寄与を回避するために、サンプルの熱帯域幅より十分に高い値に選択されます²⁹⁻³¹[Choi, 2001#55]。また、2D ガルボシステム(Thorlabs、GVS012)を使用してビームを操縦し、横方向のスキャンを実行します。

反射されたサンプルフィールドと参照フィールド $E_0(\omega)$ (初期ポンプフィールドと同じ)間の記録されたスペクトル干渉は、 $I_{\text{spec}}(\omega) = |E_0(\omega) + rE(\omega) \exp(-i\frac{\omega \cdot 2z}{c})|^2$ と表されます。ここで、 $E(\omega)$ は式(1)で与えられ、 r は反射率、 z は 2 つのビーム間の経路長差(つまり深さ)です。 $I_{\text{spec}}(\omega)$ から、関心のある項は、 $E(\omega)$ に埋め込まれた非線形屈折率 n_{NL}^{\sim} を含む振動項です。式(1)と(2)を考慮すると、振動項は次のように表されます。

$$\begin{aligned} \tilde{I}_{\text{spec}}(\omega) \propto r I_0(\omega) \exp\left(\frac{-i2\omega z}{c}\right) \exp\left(\frac{z_0 \beta \omega}{2c} \text{Im}\{\chi^{(3)}(\Omega)\} I_{\text{Stokes}}\right) \\ \times \exp\left(-iz_0 \beta \frac{\omega}{c} \text{Re}\{\chi^{(3)}(\Omega)\} I_{\text{Stokes}}\right), \end{aligned} \quad (3)$$

ここで $\beta = \frac{3}{2n_0^3 \epsilon_0}$ は定数、 $I_0(\omega)$ は初期ポンプ場(参照場でもある)の強度です。2 番目の指数項は、非線形応答 $\chi^{(3)}$ の虚数部によって課される強度変化に対応し、3 番目の項は、 $\chi^{(3)}$ の実数部によって生じる位相変化に対応する。したがって検出された信号が受ける振幅と位相の変化、 $\Delta I(\Omega)$ および $\Delta \phi(\Omega)$ は、それぞれ次のように与えられます。

$$\Delta I(\Omega) \propto rI_0 \times I_{\text{Stokes}} \times \text{Im}\{\chi^{(3)}(\Omega)\}, \quad (4)$$

$$\Delta\phi(\Omega) \propto I_{\text{Stokes}} \times \text{Re}\{\chi^{(3)}(\Omega)\}. \quad (5)$$

これらの式は弱い非線形摂動を仮定しており、これは SRS-SOCT の妥当な近似です。25,32SRS 強度(従来の SRS 測定)はポンプフィールドの初期強度 I_0 とサンプル反射率 r に依存しますが、SRS 位相は依存しないことに注意してください。この結果、位相信号はレーザー出力の変動に対してより堅牢になり、サンプルの反射率とは無関係になり、 32 信号対雑音比が向上します。

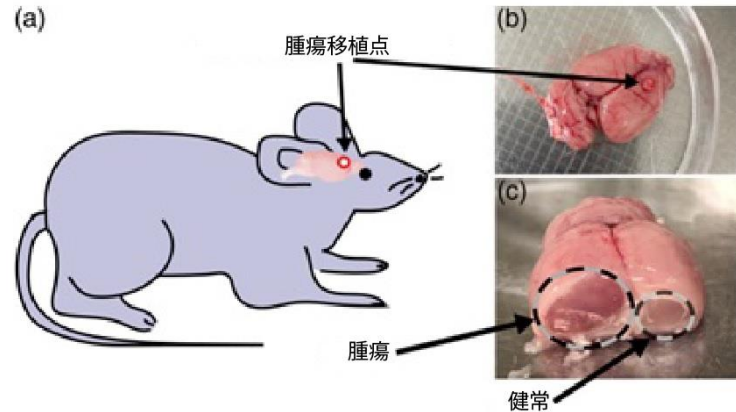


図 2(a)ラットの脳移植の概略図。(b)摘出された脳の上面図。移植箇所は黒い矢印で示されています。(c)腫瘍領域(破線の円でマーク)を含む脳の断面。

2.4 生物学的サンプルの準備

SRS-SOCT の脳腫瘍検出能力をテストするために、我々は 9L 神経膠肉腫ラット腫瘍モデルを使用しました。このモデルは、高い増殖能力、血管新生、浸潤パターンなど、ヒトの高悪性度神経膠腫を模倣しています。28 すべての動物実験プロトコルは、ジョージア工科大学とエモリー大学の動物実験委員会によって承認されました。図 2(a)に示すように、クローン化された 9L 神経膠芽腫癌細胞を $N=6$ Fischer ラットの脳に移植しました。ラットを屠殺する前に、腫瘍を 9~12 日間成長させました。腫瘍の断面を取得するために、外科的に除去した脳を、腫瘍の移植位置を横切って冠状に 2 つに切断しました。SRS-SOCT イメージングは、腫瘍(目視検査で特定)と、対照として使用した反対側の健康な脳領域で実施しました。合計 54 の領域が画像化されました(腫瘍領域 34 と健康領域 20)。各脳から 8~10 のスキャンを取得しました(腫瘍領域から約 4~5 ポイント、健康領域から約 4~5 ポイント)。図 2(b)と 2(c)は、摘出および切断されたラットの脳の代表的な写真を示しています。

2.5 SRS-SOCT 信号の測定

SRS-SOCT システムを使用して、ラットの脳の SRS 応答を含む干渉信号を測定しました。切り取ったばかりの脳 ($n = 6$) ごとに、8 ~ 10 回の B スキャン (合計 54 回の B スキャン) を取得しました。各スキャンは、約 $480 \mu\text{m}$ のラインシフトに沿った 200 回の A スキャン (2048 の連続記録スペクトルから合成) で構成されていました。軸方向では、画像は約 2 mm の範囲をカバーしますが、脳組織への浸透は約 0.7 ~ 1 mm にすぎません。スキャンされたポイントは、片側の腫瘍と反対側の健康な領域の両方をカバーするために等距離の位置で選択されました。SRSSOCT イメージングでは、染色やその他のサンプル準備は行われませんでした。この実行可能性調査では (確立された動物モデルを使用しているため)、同じ動物からの測定値であっても、すべての測定値は独立したものとして取得されました。隣接領域の腫瘍領域は組織病理学 (H&E 染色組織切片を使用) で分析され、画像化されたすべての動物で腫瘍の存在が確認されました。健康な領域も確認されました。

3 結果と考察

3.1 SRS-SOCT データセットの処理

複雑な非線形 SRS 信号を抽出するために、まず干渉スペクトルを波長から線形波数配列($k=2\pi/\lambda$)に補間し、次にスペクトル領域から空間領域にフーリエ変換して深度情報(A スキャン)を取得します。B スキャンの各横方向の位置について、

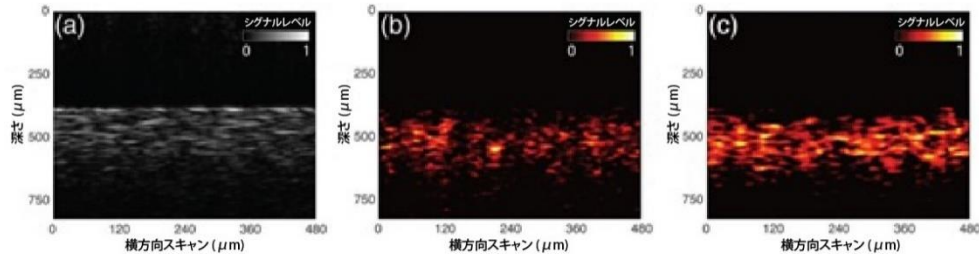


図 3: ラット脳の SRS-SOCT 空間分解画像(B スキャン): (a) 対流 OCT 画像、(b) SRS 振幅画像、(c) ラット脳の腫瘍領域の SRS 位相画像。B スキャン画像は、480 μm をカバーする 200 個の A スキャン(x 次元)から合成されています。

50kHz で記録された 2048 のスキャンがあります。次に、サンプルの SRS 応答を抽出するために、時間次元に沿って別のフーリエ変換を実行して、A スキャンの周波数応答を取得します。図 1(c)の挿入図に示すように、15kHz 変調(つまり、ロックイン検出)に対応する信号のみを選択します。このようにして、SRS 振幅項と位相項の両方を取得し、次に文献 25 および 32 で行われたように、それぞれのバックグラウンドノイズで正規化します。最後に、200 回の取得を合成して断面画像(B スキャン)を作成します。

SRS-SOCTB モード画像(x-z 次元)の例を図 3 に示します。図 3(a)は従来の OCT 画像を示し、図 3(b)と 3(c)は SRS 振幅画像と位相画像(高波数領域全体の平均応答)を示しています。ここでも、OCT 画像は線形光子散乱からの空間分解情報を示していますが、SRS-SOCT 画像にはサンプルの 3 次非線形応答に関する空間分解情報が含まれています。

SRS-SOCT データセットには、空間情報とスペクトル情報の両方が含まれています。次のセクションでは、まず SRS-SOCT データをスペクトル的に分析して分子固有の情報を提供し、次に OCT および SRS 信号からの深さの関数として減衰挙動を分析して、腫瘍組織と健常組織を区別する追加のバイオマーカーを示します。

3.2 SRS-SOCT データのスペクトル解析

以前に報告されたように、^{18,33} 脳の脂質とタンパク質の含有量は、白質では脂質に富み、腫瘍領域ではタンパク質に富み、皮質では脂質とタンパク質に富む傾向があります。これらの微妙な分子の違いにより、ラマンスペクトル応答にわずかな違いが生じ、ほとんどのスペクトルの違いは、高波数領域の 2 つの特定の領域で発生します。^{18,33} 最初の領域は脂質のスペクトルシグネチャに起因し、おおよそ 2800~2900 cm^{-1} の範囲をカバーします。2 番目のウィンドウはタンパク質のスペクトルシグネチャを示し、2900~3000 cm^{-1} の領域をカバーします。したがって、腫瘍のコントラストを生み出す分子固有の情報を提供するために、タンパク質を検出するための高周波ラマンバンド(中心 2947 cm^{-1})と脂質を検出するための低周波ラマンバンド(中心 2861 cm^{-1})の 2 つのスペクトル領域を検討しました。これら 2 つのウィンドウは、サンプルの脂質およびタンパク質含有量の平均累積 SRS 応答を提供します。この分析では、干渉 SOCT データは、対応するスペクトル領域で 80 cm^{-1} (~5nm)帯域幅の Butterworth フィルターを使用してフィルタリングされ、次にセクション 3.1 で説明した手順に従って非線形振幅および位相の変化が計算されます。また、より高いスペクトル分解能での完全な時間周波数分析の代わりに 2 つのウィンドウを使用することで、より高い信号対雑音比のデータ、改善さ

れた空間分解能、およびより高速で計算集約度の低い処理が実現されることにも注意してください。

腫瘍領域と健常領域を区別するために、次の指標を定義します。SRS 振幅については、高周波数帯域値と低周波数帯域値の比を選択しました。SRS 位相については、これら 2 つの帯域の位相値の差を単純に取得します。したがって、これらの指標の両方について、タンパク質が豊富な腫瘍領域は、正常領域よりも高い

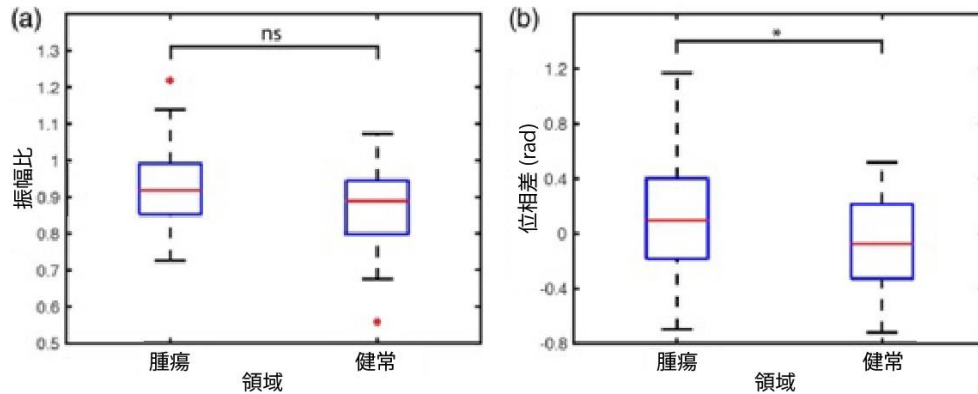


図 4:(a)高周波数帯域値と低周波数帯域値の SRS 振幅の比。差は統計的に有意ではない(n.s.)、 p 値は 0.0973(両側 t 検定)。(b)同じ周波数帯域間の SRS 位相の差。 p 値は 0.0243(両側 t 検定)であり、統計的に有意(p 値 <0.05)であり、星印(*)で示されている。

振幅比と高い位相差を持つことが予想されます。さらに、SRS-SOCT 信号は深さに沿って累積されるため 25、脳表面から 100~150 μm の深さ範囲からこれらの指標を抽出します。これにより、十分な信号蓄積が可能になり、より深い深さでのノイズの多い低振幅信号を回避できます。信号は、6 匹のラットの脳すべてについて、各 B スキャン(合計 54 領域)にわたって平均化されます。

この分析の結果は、標準的な箱ひげ図の形で図 4 に示されています。箱の中には四分位範囲が示され、ひげは外れ値でない最大値と最小値を示しています。図 4(a)は SRS 振幅比を示しており、腫瘍領域の方が健常領域よりも振幅比がわずかに高いことがわかりますが、その差は統計的に有意ではありません。図 4(b)はまた、両側 t 検定を使用して p 値 <0.05 で腫瘍領域の方が SRS 位相差が高いことを示しています。前述のように、これらの結果は、比較的タンパク質組成が豊富な腫瘍領域では位相差が大きくなるという私たちの予想と一致していますが、確かにその差は弱いものです。振幅比が高くなることもまた予想されていましたが、わずかな差が見られ、これはこれらの予想と一致していますが、統計的に有意ではありません。

スペクトル分析により、局所的な生体分子の内容に関する洞察が得られますが、腫瘍領域と健常領域の間の分離は依然として小さく、統計的に有意なのは位相信号のみであることに注意してください。さらに、スペクトルシグネチャのみに基づいてこれら 2 つのグループを区別する能力は非常に低いです。これらの結果は、腫瘍を検出するための SRS 戦略^{18,34}と一致しており、堅牢な腫瘍検出を実現するには、スペクトルシグネチャを構造パラメータと組み合わせて使用する必要があります。したがって、腫瘍の識別を改善するために、SRS-SOCT からの構造信号を組み込みます。

3.3 SRS-SOCT データの空間分析

SRS-SOCT データの重要な特性の 1 つは、イメージング深度の関数として信号が減衰する速度です。このパラメータは、細胞密度、タンパク質濃度、核対細胞質(NC)比、ミエリン含有量の変化、壊死巣の存在、組織の不均一性など、散乱とラマン信号に影響を与える脳組織の特性によって影響を受けます。^{12,35-39} さらに、SRS 位相信号は干渉信号の引数に含まれているため、ポンプビームの強度変動の

影響を受けにくく、非線形振幅信号よりも堅牢な測定が可能で、4 倍以上の高い SNR が得られます。^{25,26}したがって、この分析では SRS 位相信号のみを使用し、OCT と比較します。

関心のあるポイントでの減衰率を計算するために、OCT および SRS 位相信号の指数近似を実行し、各領域(B スキャン)の平均減衰係数を計算します。表面の不均一性によって生成されるアーティファクトを回避するために、指数近似の開始点をサンプル表面から約 50 μm 下に設定しました。図 5(a)および 5(b)は、

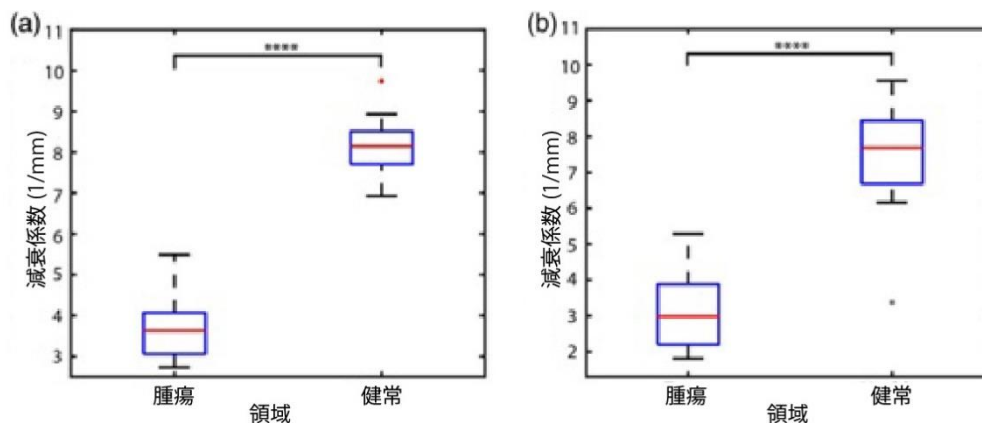


図 5:(a)ラットの脳の OCT 信号の減衰率。腫瘍と健常者の p 値は 1.74×10^{-16} (両側 t 検定)である。(b)同じ脳の SRS 位相信号の減衰率。腫瘍と健常者の p 値は 3.13×10^{-10} (両側 t 検定)である($n=54$)。

それぞれ OCT および SRS 位相の減衰係数のプロットを示しています。OCT および SRS 位相の両方において、健常領域の減衰率は腫瘍領域よりも大幅に高くなっています。腫瘍領域の減衰率が低いのは、NC 比の変化とミエリン含有量の劣化によるものと考えられます。¹²具体的には、OCT 信号における腫瘍領域と健常領域に関連する減衰率は、それぞれ平均値が 3.73 および 8.17mm^{-1} で、判別閾値は約 6mm^{-1} です。同様に、SRS 位相信号では、腫瘍領域と健常領域の平均値はそれぞれ 3.14mm^{-1} と 7.83mm^{-1} で、判別値は約 6mm^{-1} です。これらの結果は、がんの減衰値が $2.7\sim 3.5\text{mm}^{-1}$ 、健常領域の減衰値が 7.0mm^{-1} で判別閾値が約 5.5mm^{-1} であると報告している以前の OCT 研究と非常によく一致しています。^{12,40}減衰カットオフがわずかに高いのは、OCT システムの中心波長が短い(790nm に対して 1310nm)ためと考えられます。腫瘍領域と健常領域の減衰率の判別は、OCT と SRS の両方が腫瘍組織と健常組織を p 値 $\ll 10^{-4}$ で非常によく分離できることを示唆しています。

最後に、我々のデータでは、OCT と SRS 位相の A スキャン信号は両方とも、減衰係数が小さいにもかかわらず、腫瘍領域で後方散乱応答が弱いことに注目します。言い換えると、腫瘍領域の A スキャンには弱い長い信号が含まれるのに対し、健常領域には強い短い信号が含まれます[図 6(a)と 6(b)]。腫瘍領域と健常領域の A スキャンの違いを示すために、表面から最初の 100 μm の曲線下面積を曲線下の総面積に対する比率で計算します。図 6(c)と 6(d)に示すように、腫瘍領域では健常領域と比較して散乱と SRS 位相応答が弱いことが明らかです。脳腫瘍の散乱係数の減少は、細胞密度、NC 比、ミエリン含有量の変化など、いくつかの重要な要因に起因します。¹²これにより、脳腫瘍領域の減衰率が低くなります。

確かに、OCT と SRS-SOCT のパラメータは、単独では健常領域と腫瘍領域の間で同様の識別レベルを示していますが、これらの指標を組み合わせることで、腫瘍を識別する複合法の能力を高める補完的な情報が得られます。この点を説明するために、図 7(a)は、OCT の減衰係数と SRS-SOCT 位相信号面積比をプロットしています。この複合 2D パラメータ空間では、2つのパラメータのいずれかを単独で使用する場合よりも、腫瘍と健常組織をより適切に区別できます。次に、図 7(a)の破線(0 から 1 に再スケール)に沿った各ポイントの座標を計算します。これ

は、2つのグループを最も区別できる方向を表します。注目すべきは、線が対角線であるため、2つのパラメータを組み合わせると最も分離が良好になるということです。次に、これらの座標を使用して統計的有意性を計算し、図 7(b)に示すようにボックスプロットを生成します。結果は p 値が 6.63×10^{-23} となり、統計的に非常に有意です。

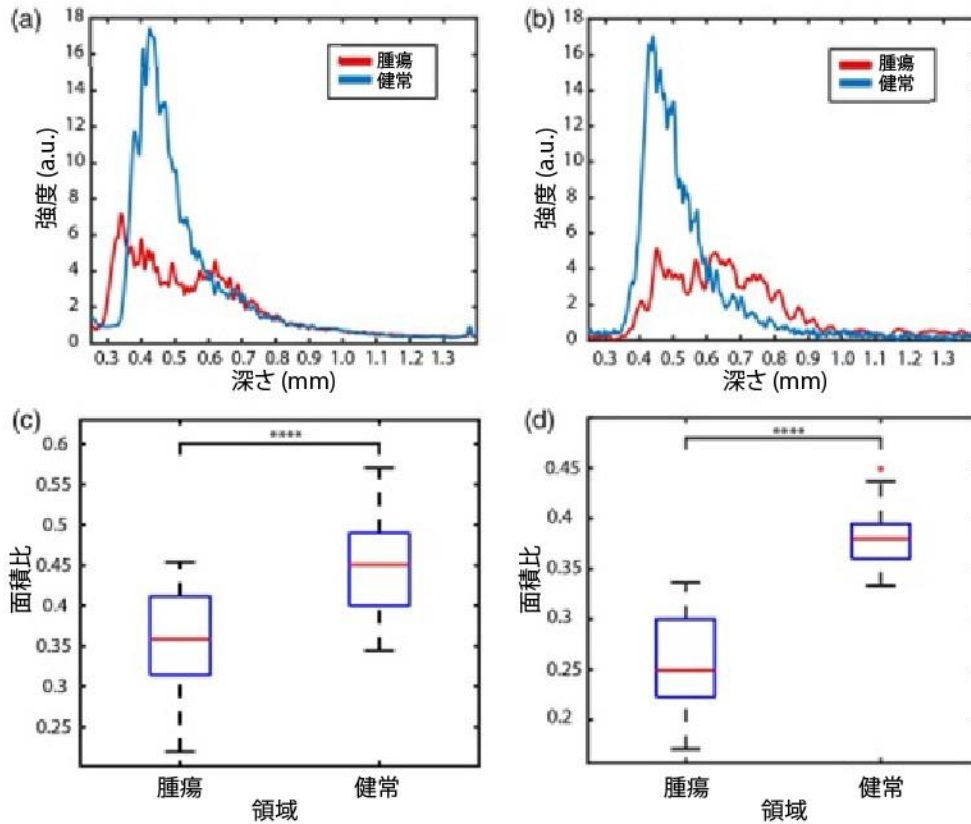


図 6:(a),(b)OCT および(b)SRS フェーズからの腫瘍(赤)と健康(青)領域の A スキャンプロファイル。(c),(d)表面から最初の $100 \mu\text{m}$ の曲線下面積と曲線下総面積の比率(各 B スキャンで平均)、(a)OCT および(b)SRS フェーズ。健康領域と腫瘍領域の p 値は、OCT では 2.71×10^{-5} 、(d)SRS フェーズでは 1.63×10^{-14} です。腫瘍領域の A スキャンでは減衰率が小さく、後方散乱が弱いに対し、健康領域では減衰率が大きく、後方散乱が強くなっています。

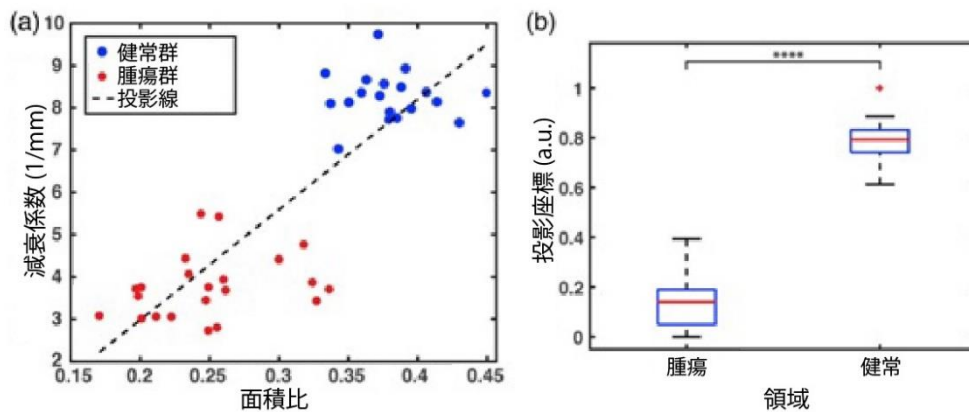


図 7:(a)OCT 信号の減衰係数と SRS-SOCT 位相信号面積比の関係を示す散布図。(b)(a)の投影線に沿った基準点からの散乱点の投影距離のボックスプロット。

4 結論

ラベルフリーの非線形光学法である SRS は、非破壊的で生物組織の生体分子内容に敏感であるという利点があります。一方、SOCT は線形散乱構造の詳細を高速かつ空間的およびスペクトル的に分解して提供しますが、分子ターゲットがありません。これら 2つの方法を組み合わせることで、SRS-SOCT は SOCT の空間お

よびスペクトル多重化機能を備えた豊富な分子情報を提供します。ここでは、9L 神経膠肉腫ラット腫瘍モデルを使用して、SRS-SOCT がスペクトル領域と空間領域の両方で脳腫瘍と健康な組織の識別可能な特徴を生み出す能力があることを示しました。さらに、SRS-SOCT は特徴(ラマン信号と構造を組み合わせた位相面積比など)を高度に差別化して明らかにしますが、スペクトル特徴のみでは、より高い差別化のためにシステムのさらなる改善が必要であることを示しました。SRS-SOCT データからは複数のパラメータを定量化することもできます。これらのパラメータは補完的な情報を提供し、正常な脳と腫瘍組織を最も強力に区別します。さらに、OCTによる高速データ取得により、比較的広い領域にわたって空間分解された SRS マップを作成できます。当社のセットアップでは、A スキャンはわずか数秒で完了し、約 0.5mm×1mm(横方向 X 軸)の領域をカバーする分子情報を含む B スキャンは数秒でキャプチャされます。この速度により、脳手術中に腫瘍の構造的および生化学的特徴に基づいてタイムリーな診断フィードバックが可能になる可能性があります。

今後の研究でも、SRS 信号レベルの向上が続けられるでしょう。レーザー出力の分散と制御の改善により、生物サンプル内でより短く強力なポンパルス(損傷閾値以下)が得られ、SRS 信号レベルが向上する可能性があります。さらに、以前に実証したように、当社のレーザーシステムは 250kHz を超える周波数でショットノイズに近い特性を示します。²⁶そのため、250kHz に近い周波数またはそれ以上の周波数で動作させることで、ノイズをさらに低減できます。これは、新しい高速ラインカメラを使用することで可能になるかもしれません。このツールを臨床使用に進めるには、たとえばハンドヘルドデバイスや多関節アームを使用した便利なパルス配信方法も開発する必要があります、これは今後の開発が必要です。

開示事項

著者は本論文に関していかなる金銭的利益も有しておらず、開示すべき潜在的な利益相反もありません。

謝辞

この研究は、バローズ・ウェルカム基金 (BWF) (No. 1014540)、国立衛生研究所 (NCI) (No. R21CA223853)、国立科学財団 (NSF CBET CAREER) (No. 1752011)、ジョージア工科大学から資金提供を受けました。

References

1. N. Sanai et al., "An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas: clinical article," *J. Neurosurg.* 115, 3⁷8 (2011).
2. S. N. Kalkanis et al., "The role of surgical resection in the management of newly diagnosed brain metastases: a systematic review and evidence-based clinical practice guideline," *J. Neurooncol.* 96, 33⁷43 (2010).
3. A. M. Molinaro et al., "Association of maximal extent of resection of contrast-enhanced and non-contrast-enhanced tumor with survival within molecular subgroups of patients with newly diagnosed glioblastoma," *JAMA Oncol.* 6, 495⁷503 (2020).
4. D. Orringer et al., "Extent of resection in patients with glioblastoma: limiting factors, Perception of resectability, and effect on survival," *J. Neurosurg.* 117, 851⁷859 (2012).
5. M. J. McGirt et al., "Independent association of extent of resection with survival in patients with malignant brain astrocytoma: clinical article," *J. Neurosurg.* 110, 156⁷162 (2009).

6. G. E. Keles, K. R. Lamborn, and M. S. Berger, "Low-grade hemispheric gliomas in adults: a critical review of extent of resection as a factor influencing outcome," *J. Neurosurg.* 95, 735–745 (2001).
7. K. Özdoğan et al., "Using intraoperative dynamic contrast-enhanced T1-weighted MRI to identify residual tumor in glioblastoma surgery: technical note," *J. Neurosurg.* 120, 60–66 (2014).
8. I. C. Mundinano, P. A. Flecknell, and J. A. Bourne, "MRI-guided stereotaxic brain surgery in the infant and adult common marmoset," *Nat. Protoc.* 11, 1299–1308 (2016).
9. D. J. Engle and L. D. Lunsford, "Brain tumor resection guided by intraoperative computed tomography," *J. Neurooncol.* 4, 361–370 (1987).
10. W. Stummer et al., "Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial," *Lancet Oncol.* 7, 392–401 (2006).
11. R. Sastry et al., "Applications of ultrasound in the resection of brain tumors," *J. Neuroimaging* 27, 5–15 (2017).
12. C. Kut et al. "Detection of human brain cancer infiltration ex vivo and in vivo using quantitative optical coherence tomography," *Sci. Transl. Med.* 7, 292ra100 (2015).
13. C. W. Freudiger et al. "Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy," *Science* 322, 1857–1861 (2008).
14. L. S. Eberlin et al., "Classifying human brain tumors by lipid imaging with mass spectrometry," *Cancer Res.* 72, 645–654 (2012).
15. B. Taïb et al., "Lipid accumulation and oxidation in glioblastoma multiforme," *Sci. Rep.* 9, 19513 (2019).
16. H. Abramczyk and A. Imiela, "The biochemical, nanomechanical and chemometric signatures of brain cancer," *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 188, 8–19 (2018).
17. F. K. Lu et al., "Label-free neurosurgical pathology with stimulated Raman imaging," *Cancer Res.* 76, 3451–3462 (2016).
18. M. Ji et al., "Rapid, label-free detection of brain tumors with stimulated Raman scattering microscopy," *Sci. Transl. Med.* 5, 201ra119 (2013).
19. R. R. Zhang and J. S. Kuo, "Detection of human brain tumor infiltration with quantitative stimulated Raman scattering microscopy," *Neurosurgery* 78, N9–N11 (2016).
20. T. C. Hollon et al., "Near real-time intraoperative brain tumor diagnosis using stimulated Raman histology and deep neural networks," *Nat. Med.* 26, 52–58 (2020).
21. C. S. Liao et al., "In vivo and in situ spectroscopic imaging by a handheld stimulated Raman scattering microscope," *ACS Photonics* 5, 947–954 (2018).
22. D. DePaoli et al., "Rise of Raman spectroscopy in neurosurgery: a review," *J. Biomed. Opt.* 25, 050901 (2020).
23. F. Daoust et al., "Handheld macroscopic Raman spectroscopy imaging instrument for machine-learning-based molecular tissue margins characterization," *J. Biomed. Opt.* 26, 022911 (2021).
24. T. C. Hollon and D. A. Orringer, "An automated tissue-to-diagnosis pipeline using intraoperative stimulated Raman histology and deep learning," *Mol. Cell. Oncol.* 7, 1736742 (2020).
25. F. E. Robles et al., "Stimulated Raman scattering spectroscopic optical coherence tomography," *Optica* 4, 243 (2017).

26. F. E. Robles et al., "Coherently broadened, high-repetition-rate laser for stimulated Raman scattering-spectroscopic optical coherence tomography," *Opt. Lett.* 44, 291 (2019).
27. A. Bouchet et al., "Characterization of the 9L gliosarcoma implanted in the Fischer rat: an orthotopic model for a grade IV brain tumor," *Tumor Biol.* 35, 6221–6233 (2014).
28. R. F. Barth and B. Kaur, "Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas," *J. Neurooncol.* 94, 299–312 (2009).
29. B. Choi and A. J. Welch, "Analysis of thermal relaxation during laser irradiation of tissue," *Lasers Surg. Med.* 29, 351–359 (2001).
30. K. Kim and Z. Guo, "Thermal relaxation times in biological tissues subjected to pulsed laser irradiation," in *Collect. Tech. Paper—9th AIAA/ASME Jt. Thermophys. Heat Transf. Conf. Proc.*, Vol. 1, pp. 327–336 (2006).
31. M. J. Murphy and P. A. Torstensson, "Thermal relaxation times: an outdated concept in photothermal treatments," *Lasers Med. Sci.* 29, 973–978 (2014).
32. F. E. Robles, M. C. Fischer, and W. S. Warren, "Dispersion-based stimulated Raman scattering spectroscopy, holography, and optical coherence tomography," *Opt. Express* 24, 485 (2016).
33. D. W. Shipp, F. Sinjab, and I. Notingher, "Raman spectroscopy: techniques and applications in the life sciences," *Adv. Opt. Photonics* 9, 315 (2017).
34. D. A. Orringer et al., "Rapid intraoperative histology of unprocessed surgical specimens via fibre-laser-based stimulated Raman scattering microscopy," *Nat. Biomed. Eng.* 1, 1–25 (2017).
35. E. A. Genina et al., "Optical properties of brain tissues at the different stages of glioma development in rats: pilot study," *Biomed. Opt. Express* 10, 5182 (2019).
36. B. Grobben, P. P. De Deyn, and H. Slegers, "Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion," *Cell Tissue Res.* 310, 257–270 (2002).
37. S. Yamaguchi et al., "Origin and quantification of differences between normal and tumor tissues observed by terahertz spectroscopy," *Phys. Med. Biol.* 61, 6808–6820 (2016).
38. L. Dai et al., "In vivo detection of reduced scattering coefficient of C6 glioma in rat brain tissue by near-infrared spectroscopy," *J. Biomed. Opt.* 13, 044003 (2008).
39. N. Honda et al., "Determination of optical properties of human brain tumor tissues from 350 to 1000 nm to investigate the cause of false negatives in fluorescence-guided resection with 5-aminolevulinic acid," *J. Biomed. Opt.* 23, 075006 (2018).
40. W. Yuan et al., "Robust and fast characterization of OCT-based optical attenuation using a novel frequency-domain algorithm for brain cancer detection," *Sci. Rep.* 7, 44909 (2017).

Biographies of the authors are not available.