

# 研究終了報告書

## 「超高感度ラベルフリーイメージング法の開発」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：井手口 拓郎

### 1. 研究のねらい

細胞や組織などの生体試料の顕微観察は、生命科学研究における基本作法の一つである。中でも、侵襲性が低く、また、サブマイクロメートルの空間分解能で試料を観察できる光学顕微鏡は、生きた細胞の動態観察に適している。蛍光プローブによる染色に基づく蛍光計測は、特定の生体分子を特異的に観察することに長けており、光学顕微観察の主たる手法として広く利用されている。しかしながら、蛍光プローブを用いることには、本質的に試料ありのままの状態を観察することにならない、細胞毒性がある、蛍光退色がある、プローブの種類が限定的であるなど、多くの欠点が存在する。これらの欠点を克服し、蛍光計測では実現できない応用を切り開くためには、蛍光プローブを用いないラベルフリー顕微計測を用いる必要がある。

ラベルフリー光学顕微鏡は、形状のコントラストを得るものと、分子のコントラストを得るものとに大別することができる。前者としては、位相差顕微鏡、微分干渉顕微鏡、定量位相顕微鏡が、後者としては、赤外顕微鏡、ラマン顕微鏡、コヒーレントラマン顕微鏡などが知られている。前者と後者の顕微鏡群はそれぞれ独立に開発が進められ、各顕微鏡は特定の用途に限定した利用がなされている状況である。

本研究は、形状コントラストと分子コントラストを同時に取得でき、さらに、それぞれの計測性能が他の手法に優るラベルフリー光学顕微鏡を開発することを目的とする。量子エレクトロニクス研究の分野で培われてきた先端光学技術を駆使することにより、これまでにない技術を開発する。具体的には、分子振動を誘起する赤外吸収による光熱変換で生じる屈折率の変化を可視光による定量位相顕微計測で定量することで、形状コントラストと分子コントラストを同時に得る手法を開発する。この手法は、赤外吸収による高感度性能と可視光定量位相イメージングによる高空間分解能を両立する。開発した顕微鏡を用いることで初めて可能となる生命科学研究も模索する。上記の新規顕微鏡の開発に加え、その他のラベルフリー計測技術の開発も行う。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

ラベルフリー顕微鏡の新技术である赤外フォトサーマル定量位相顕微鏡の開発を軸に進め、位相差顕微鏡を用いた赤外フォトサーマル位相差顕微鏡の原理実証【Scientific Reports 9, 9957 (2019)】、デジタルホログラフィ顕微鏡を用いた赤外フォトサーマル定量位相顕微鏡の原理実証【Optics Letters 44, 3729-3732 (2019)】、光回折トモグラフィの原理を用いた3次元赤外フォトサーマル定量位相顕微鏡の原理実証【Optica 7, 359-366 (2020)】に成功した。開発した顕微鏡を用いて、生細胞の顕微イメージングの実証も行い、生物学研究への適用も開始した。

また、上記開発の過程で着想した定量位相顕微鏡のダイナミックレンジ拡大手法の原理検

証を行い、赤外フォトサーマル定量位相顕微鏡の感度を向上することに成功した【Light: Science & Applications, in press】。開発したダイナミックレンジ拡大定量位相顕微鏡技術は、定量位相顕微鏡の単体技術として、細胞内外のウィルスやエクソソーム等の微粒子計測など、研究提案当初に想定していた応用範囲を超えた現象の計測に適用できる可能性のあるものである。

さらに、ラベルフリー計測の可能性を探索する目的で、他の振動分光計測技術の開発も行った。超高速のフーリエ変換赤外分光法の開発【Nature Communications 9, 4448 (2018)、Laser & Photonics Reviews, 2000374 (2020)】、世界最高速の赤外分光手法であるタイムストレッチ赤外分光法の開発【Communications Physics 3, 152 (2020)】、赤外分光スペクトルとラマン分光スペクトルを同時に計測する相補振動分光法の開発【Nature Communications 10, 4411 (2019)】を行い、それぞれ原理検証実験に成功した。フーリエ変換コヒーレントラマン分光のスペクトル分解能を向上するデータ解析手法の開発【Optics Letters 45, 1515-1518 (2020)】、複数の非線形光学効果を同時取得するマルチフォトンマルチモーダル顕微鏡の開発【Optics Express 28, 20794-20807 (2020)】も行い、原理実証に成功した。

## (2) 詳細

本研究では、下記 3 テーマにおいて種々の計測手法の開発を行った。

### 研究テーマ1「赤外フォトサーマル定量位相顕微鏡の開発」

分子コントラストを得るラベルフリー顕微鏡としては、赤外吸収顕微鏡、ラマン散乱顕微鏡、および、コヒーレントラマン散乱顕微鏡の 3 種がこれまで開発されてきたが、生命科学研究の用途にはそれぞれ一長一短がある。赤外吸収顕微鏡は、感度は高いが空間分解能が低く、細胞の顕微計測には用いられていない。一方で、ラマン散乱顕微鏡は、空間分解能は高いが、感度が著しく低い。コヒーレントラマン顕微鏡は、感度向上したラマン散乱顕微鏡であるが、超短パルス光を集光することによる試料への光ダメージ等の侵襲性の問題がある。本研究では、赤外吸収の高感度特性と可視光顕微鏡の高空間分解能特性を併せ持つ、新しい原理に基づく新規顕微鏡の開発を行った。分子振動に共鳴する赤外光が分子に照射されると、分子は光を吸収し、分子振動として光のエネルギーを受け取る。この光吸収過程に起因する温度上昇は、局所的な屈折率の変化を生む(赤外フォトサーマル効果)。生じた屈折率変化を可視光による高空間分解能の位相計測でコントラストとして画像化することで、分子コントラストを得る。

#### ● 赤外フォトサーマル位相差顕微鏡

位相コントラストを得る顕微鏡として、市販の位相差顕微鏡を用いて赤外フォトサーマル位相顕微鏡の原理検証実験を行い、分子コントラストが得られることを確認した。高速カメラを用いることで、ポリマービーズの分子コントラスト像を 3,000 fps という高速で取得することに成功した【Scientific Reports 9, 9957 (2019)】。また、HeLa 細胞の核周辺に局在するタンパク質のアミドバンド由来の信号を計測することに成功した。

#### ● 赤外フォトサーマル定量位相顕微鏡(デジタルホログラフィ)

定量的な位相値抽出と画像アーティファクトのない計測を実現するために、デジタルホ

ログラフィを用いた赤外フォトサーマル定量位相顕微鏡の開発を行い、定量的な位相検出の原理検証に成功した【Optics Letters 44, 3729-3732 (2019)】。

- 赤外フォトサーマル 3 次元定量位相顕微鏡(光回折トモグラフィ)

試料の置かれた環境に存在する水分子による背景赤外吸収信号を除去すること、また、空間分解能を向上することを目的に、光回折トモグラフィによる赤外フォトサーマル 3 次元定量位相顕微鏡の開発を行い、生細胞を試料として、水の背景光が除去された高空間分解能の赤外フォトサーマル顕微イメージングに成功した【Optica 7, 359-366 (2020)】。

## 研究テーマ2「ダイナミックレンジ拡大定量位相顕微鏡の開発」

- ダイナミックレンジ拡大定量位相顕微鏡

デジタルホログラフィに代表される定量位相顕微鏡による位相計測は、試料を載せるガラス基板の表面粗さを観察できる程度に高い位相感度を持つため、これまで、感度向上の研究開発は成されてこなかった。一方で、赤外フォトサーマル定量位相顕微鏡のように画像 2 フレームの差解析を行う手法の場合、定量位相顕微鏡の位相感度を向上すれば、時間変化しない基板粗さよりも小さな位相変化を検出することが可能となる。本研究では、定量位相顕微鏡の感度を向上させる新しい技術であるダイナミックレンジ拡大定量位相顕微鏡の開発を行った【Light: Science & Applications, in press】。空間光変調器を用いた波面制御により、試料由来の位相分布を打ち消す位相キャンセリング技術と暗視野デジタルホログラフィ技術をそれぞれ開発して組み合わせることで計測ダイナミックレンジを向上し、赤外フォトサーマル定量位相顕微鏡の位相感度を約 7 倍向上させることに成功した。

## 研究テーマ3「ラベルフリー振動分光計測技術の開発」

- 位相制御型フーリエ変換赤外分光法

フーリエ変換赤外分光法 (FTIR) は広帯域赤外分光の一般的な手法であるが、干渉計の機械的な掃引が必要であるため、計測レートが小さい。本研究では、光の位相変調技術を巧みに利用することで、過去の高速計測に対して 1000 倍の計測レートの向上に成功した【Nature Communications 9, 4448 (2018)、Laser & Photonics Reviews, 2000374 (2020)】。

- タイムストレッチ赤外分光法

広帯域振動分光法における最高速の手法は、光周波数コムを用いたデュアルコム分光法による 1 MSpectra/s 程度であった。本研究では、原理上信号対雑音比の高いタイムストレッチ分光法を赤外領域で実現し、80 MSpectra/s という世界最高速の赤外分光法の開発に成功した【Communications Physics 3, 152 (2020)】。

- 相補振動分光法

振動分光には赤外吸収分光とラマン散乱分光という、互いに異なる分子振動の対称性に感度を持つ相補的な手法があることが知られている。これまで、それら二つの分光計測は異なる装置により別々に計測されてきた。本研究では、これら二つの分光スペクト

ルを同時に取得できる相補振動分光という新しい分光手法の開発に成功した【Nature Communications 10, 4411 (2019)】。

- フーリエ変換コヒーレントラマン分光のスペクトル分解能向上解析法  
広帯域コヒーレントラマン分光手法であるフーリエ変換コヒーレントラマン分光において、ハードウェアの構成で決まるスペクトル分解能よりも高い分解能を実現するスペクトルデータ解析手法を開発した【Optics Letters 45, 1515–1518 (2020)】。
- マルチフォトンマルチモーダル顕微鏡  
超短パルス光源によるマルチフォトン顕微鏡において、種々の非線形光学効果(コヒーレントラマン散乱、2次高調波発生、3次高調波発生、2光子励起蛍光、3光子励起蛍光)を同時に取得することのできるマルチモーダル顕微鏡を開発した【Optics Express 28, 20794–20807 (2020)】。

### 3. 今後の展開

開発した各種計測技術の高性能化(顕微鏡の高感度化、高空間分解能化など)を行う。また、開発した各種計測技術を用いて生命科学の基礎および応用研究を行う。生細胞の新しい解析手法の実現や、リキッドバイオプシーの新手法の実現などを旨とする

### 4. 自己評価

研究提案当初計画していた目的をおおむね達成した。また、研究提案当初の計画にはなかった種々の派生技術の着想と開発に成功したことは、自由な基礎研究の副産物である。研究の実施体制や研究費の執行は計画通りに適切になされた。研究成果は、国際的に高水準の学術論文誌に11件発表した。6件のプレスリリースを行い、また、ウェブサイトや SNS を活用し、広く国民に対する成果の公表を行った。量子エレクトロニクス分野で培われた先端光技術による生命科学向けの新規光計測技術開発の分野において、国際的に先導的な研究を推進した。

### 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: 11件

1. K. Toda, M. Tamamitsu, and T. Ideguchi, “Adaptive dynamic range shift (ADRIFT) quantitative phase imaging” Light: Science & Applications, 10, 1 (2021)

定量位相顕微鏡のダイナミックレンジを拡大し、計測を高感度化する技術に関する論文。照明光の波面制御技術と暗視野デジタルホログラフィ技術を開発し、それらを組み合わせることで、従来のデジタルホログラフィよりも約7倍大きなダイナミックレンジ(感度)の向上を実現した。

2. M. Tamamitsu, K. Toda, H. Shimada, T. Honda, M. Takarada, K. Okabe, Y. Nagashima, R. Horisaki, T. Ideguchi, “Label-free biochemical quantitative phase imaging with mid-infrared photothermal effect” Optica 7, 359–366 (2020)

赤外フォトサーマル定量位相顕微鏡の開発に関する論文。デジタルホログラフィ、および、光

回折トモグラフィを用いて、2次元、3次元の赤外フォトサーマル定量位相顕微鏡による原理検証実験を行い、生細胞の計測に成功した。

3. K. Hashimoto, V. R. Badarla, A. Kawai, T. Ideguchi, “Complementary Vibrational Spectroscopy” Nature Communications 10, 4411 (2019)

広帯域の赤外吸収分光とラマン散乱分光を同時に計測する相補振動分光法に関する論文。互いに異なる分子振動の対称性に感度のある赤外吸収とラマン散乱は分子振動の異なる情報を反映している。これまで両方のスペクトルを同時に計測することは困難であったが、超短パルスレーザーによる非線形光学効果を利用することで、この困難を克服し、原理検証に成功した。

## (2) 特許出願

研究期間累積件数: 4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)

### プレスリリース

- 1秒間に約1億回の計測が可能な分子分光法を開発～世界最高速の赤外分光法を実現～(東京大学)2020/9/1
- 光で分子を振動させて、細胞の形態と分子分布を同時に見る光学顕微鏡を開発～標識不要な定量位相顕微鏡と分子振動顕微鏡のコラボレーション～(東京大学、大阪大学、JST)2020/4/20
- 分子の振動を一網打尽に観測できる光学技術を開発～非線形光学効果の巧みな利用で複雑な分子の解析に新たな道筋～(東京大学、JST)2019/9/27
- 光学顕微鏡で分子の分布を観る新しい顕微分光手法を開発(東京大学)2019/7/18
- 光を巧みに操ることで新しい分子分光法の開発に成功～光の波形制御で分子の同定を高速・簡便化～(東京大学、JST)2018/10/25