

# 研究報告書

## 「誘導ラマンによる高感度光学活性検出及び高分解能イメージング」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 小関 泰之

### 1. 研究のねらい

生命の機能や仕組みを知る上で、生体の観察技術は極めて重要な役割を果たしている。生体は多くの場合透明であるため、光学顕微鏡での観察には染色や標識技術が用いられる。これらの技術は生体分子を可視化する強力な手法であるものの、時間と手間を要する。そこで、染色の不要な観察技術が医療現場等において求められている。

生体分子のラマン散乱を検出してイメージングを行うラマン顕微鏡は、ラマン散乱の豊かな分子振動分光情報を活用することで、染色や標識を必要とせずに可視化する光学顕微鏡として注目されている。しかし、ラマン散乱光の微弱さゆえに、ラマン顕微鏡の信号対雑音比を高めるためには数十分程度の長い積算時間が必要であった。一方、高速観察の可能なラマン顕微鏡として、2色のパルスレーザーを用いたコヒーレント反ストークスラマン散乱(CARS)顕微鏡も研究されているが、スペクトルが歪む、定量計測が難しい、等の課題を抱えていた。

このような状況の中、私は 2009 年に誘導ラマン散乱(stimulated Raman scattering, SRS)を用いた光学顕微鏡をハーバード大学・シュツットガルト大学のグループと独立に実証した。図 1 に示すように、SRS 顕微鏡では、2色のパルスレーザーの一方に強度変調を施した後、試料に集光照射する。SRS 効果が発生すると、短波長の光パルスが減衰し、長波長の光パルスが増幅される。その結果、強度変調がもう一方のパルスに転写される。この転写された強度変調成分をロックイン検出することで SRS 信号を得る。SRS 顕微鏡ではこの SRS 信号を用いてイメージングを行い、生体分子を高感度に検出し、生体を染色・標識することなく観察することができる。また、SRS 顕微鏡で得られるスペクトルは一般的なラマン散乱と同じであるためスペクトルの解析が容易であり、定量計測も可能である。

本さきがけ研究では、SRS 顕微鏡に対して、(1) 極限性能を追求すること、(2) 新しい機能を実現すること、の 2つの方向性に技術的展開を図ることで、世界をリードする性能と機能を有する生体顕微鏡の実現をねらった。

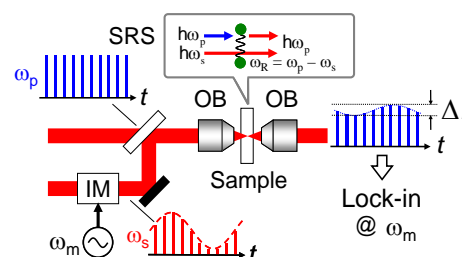


図 1. SRS 顕微鏡の原理構成図。  
OB: 対物レンズ。IM: 光強度変調器。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

研究開始当初、上記ねらいを実現するための具体的な研究内容として、(i) 空間分解能向上、及び(ii) 光学活性検出機能の実現、に取り組む計画を立案した。しかし、当時使用していたレーザー光源(フェムト秒チタンサファイアレーザー及び光パラメトリック発振器)は SRS 顕

顕微鏡にとって最適な光パルスを発生できるものではなく、また、顕微鏡システムの感度や観察速度も不十分であった。そこでまず、レーザー光源の開発と顕微鏡システムの性能向上に取り組んだ。その結果、(A) 繰り返し率が2倍異なる2波長同期光源を用いた理論限界感度の実証(論文5、論文3、論文4)、(B) 高速分光イメージング機能による分子識別能向上(論文1、論文2)に成功した。一方、当初計画の研究内容については、残された研究期間が短く、充分に取り組むことはできなかったものの、上記(A)(B)の成果が得られたことで、研究内容の基盤技術を確立することはできた。本研究全体を通じて、高速性と高い分子識別能を兼ね備え、世界をリードする性能と機能を有する無染色生体顕微鏡を実現できたと考えている。

## (2) 詳細

### 研究テーマA「繰り返し率が2倍異なる2波長同期光源を用いた理論限界感度の実証」

上述のように、SRS顕微鏡では2色のパルス間でSRSにより転写される強度変調成分をロックイン検出する。この際に、転写される強度変調の変調度は $10^{-5}$ のオーダーと非常に小さいため、SRS信号の信号対雑音比はレーザーの強度雑音により制限される。特に、レーザーは低い周波数において大きな強度揺らぎを有するので、ロックイン周波数が低い場合にレーザー強度雑音が問題となる。従って、高感度にSRS信号を検出するためには、強度変調周波数を高周波化する必要がある。そこで、図2に示すように、繰り返し率が2倍異なるレーザーを同期させた高調波同期光源を考案した。これは、一方のレーザーが最高周波数で強度変調された状況と等価である。従って、本方式によってロックイン周波数を高周波化すれば、レーザー強度雑音の影響を抑制できると期待される。

図3に高調波同期光源を用いたSRS顕微鏡の実験系を示す(論文5)。光源として繰り返し76 MHzのチタンサファイアレーザーと繰り返し38 MHzのYbファイバーレーザーを用いた。両レーザーを同期させるため、位相同期ループを製作した。両光パルスを合波し、2光子吸収(GaAsP)検出器に集光することで、強度相互相関信号を得る(図4(a))。この信号が一定値を取るように、Ybファイバーレーザーの繰り返し周波数を制御する。繰り返し周波数制御のため、Ybファイバーレーザー内に光位相変調器とピエゾステージを導入した。その結果、図4(b)(c)に示すようにループ内ジッター4 fsで同期させることができた。また、ループ外ジッターも8 fs以下であり、光パルスの時間幅300 fsと比較して十分に高精度な同期ができた。

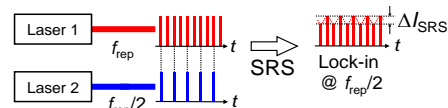


図2. 高調波同期光源の模式図。

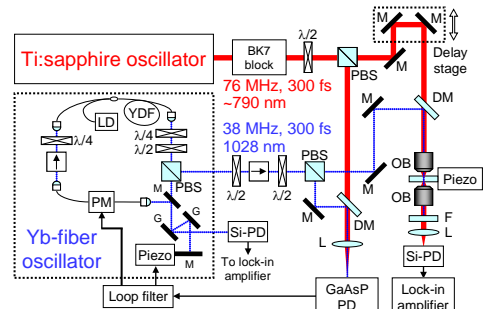


図3. 高調波同期型SRS顕微鏡の実験系。YDF: Yb添加光ファイバー。G: 回折格子。LD: レーザーダイオード。PM: 光位相変調器。PD: 光検出器。L: レンズ。OB: 対物レンズ。F: 光フィルター。

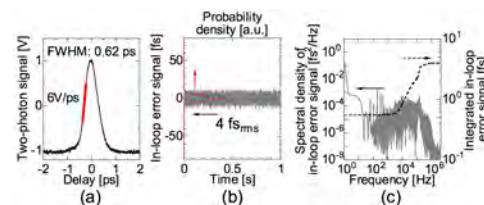


図4. 同期実験結果。(a) 2光子吸収信号。(b) 同期後のループ内誤差信号。(c) (b)のスペクトル。

この高調波同期光源を用いた SRS 顕微鏡を製作した。図 3 に示すように、両パルスを合波し、対物レンズで試料に集光し、試料透過光を再び対物レンズでコリメートする。Yb パルスを光フィルターで除去した後、チタンサファイアレーザーパルスを Si フォトダイオードで光検出する。光電流をロックインアンプで検出することで SRS 信号を得た。

図 5 に本 SRS 顕微鏡の雑音特性の測定結果を示す。横軸は平均光電流、縦軸はロックイン信号の雑音レベルである。青丸で示すように、光電流が微小な場合は回路雑音が支配的であるが、光電流が増大するとともにロックイン信号の雑音が増大する。光電流から計算されるショット雑音の理論値(緑実線)に 1.6 dB まで迫る低雑音性が得られた。また、我々の光強度変調器を用いるシステム(ロックイン周波数:10.7 MHz)の雑音特性と比較して、雑音を 12.4 dB 低減することに成功した。さらに、SRS 顕微鏡に最適な、時間幅 5 ps 程度の光パルスを用いて同期実験を行ったところ、ジッター120 fs 程度の充分高精度な同期が可能であることもわかった(論文 3)。また、SRS 顕微鏡のためのレーザー雑音低減法も提案した(論文 4)。これは、更なる実用性向上を図るために小型なファイバーレーザーを用いる場合に有効である。

以上の結果を通じ、高調波同期光源というオリジナルなレーザーを用いて、SRS 顕微鏡の感度向上と理論限界感度の実証に成功した。

#### 研究テーマ B「高速分光イメージング機能による分子識別能の向上」

SRS 顕微鏡の分子識別能には向上の余地が多く残されている。それは、SRS 顕微鏡では 2 色のレーザーの差周波数で決まる単一の分子振動周波数しか検出できないからである。SRS において分子振動スペクトルを得てそれを詳細に解析することができれば、スペクトル形状の僅かな違いを捉えることができ、分子識別能が更に向上すると期待される。

そこで、SRS 顕微鏡において高速分光イメージングという新しい機能を実現し、分子識別能の向上を図った。具体的には、無染色生体試料をビデオレートで観察しながら、フレーム毎に波数を変えることで、わずか数秒で分光イメージングを行った。

高速分光イメージング機能を実現するために新規考案した波長可変光源の原理構成図を図 6 に示す(論文 2)。広帯域 Yb ファイバーレーザーパルスのスペクトルの一部を波長可変フィルター(TBPF)で切り出し、偏波保持型 Yb 添加ファイバー増幅器(PM-YDFA)で増幅する。TBPF はガルバノミラー(GM)、4f レンズ系、回折格子(G)から構成される。GM の角度を変えると TBPF の透過波長を制御できる。この TBPF の応答時間はガルバノスキャナーの速度により決定され、ミリ秒オーダーである。この光源の出力パルスのスペクトルを図 7 に示す。波長 1030 nm を中心として、300  $\text{cm}^{-1}$  にわたる波長可変性を確認することができた。また、スペクトル半値全幅はおよそ 3  $\text{cm}^{-1}$  であり、中心波長における光パワーは約 120 mW であった。この光源を用いたビデオレート SRS 顕微鏡を製作し、500 x 480 ピク

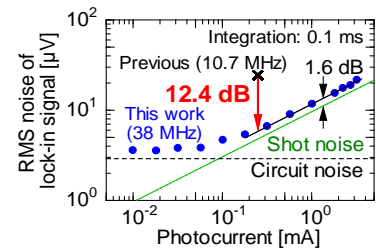


図 5. SRS 顕微鏡の雑音特性。

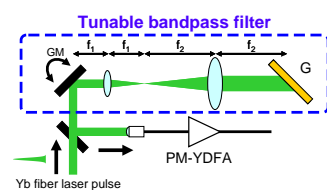


図 6. 波長可変光源の構成。

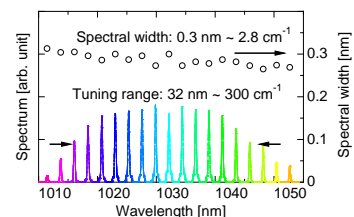


図 7. 波長可変光パルスのスペクトル。

セルの画像を 30.8 枚/秒で取得しつつ、フレーム毎に TBPF の波長を制御することで、高速分光イメージング機能を実現した(論文1)。

高速分光イメージング機能を有する SRS 顕微鏡を用い、ラットの肝臓を観察した。波数 2800~3100  $\text{cm}^{-1}$  にわたって 91 枚の分光像を取得した。信号対雑音比を高めるため、10 回積算を行ったものの、総取得時間は 30 秒以下であった。

得られた分光像を独立成分分析(ICA)により解析した。その結果を図 9 に示す。図 9(a)-(c)は第1~第3 独立成分(IC)像である。また、図 9(d)は対応する信号源スペクトルである。スペクトルは非常に似通っているが、わずかな違いがある。例えば、第 1 IC は 2850  $\text{cm}^{-1}$  の  $\text{CH}_2$  伸縮振動が強い。第 2 IC は 3400  $\text{cm}^{-1}$  の OH 伸縮振動の裾が支配的である。第 3 IC は 2930  $\text{cm}^{-1}$  の  $\text{CH}_3$  伸縮振動成分が支配的である。これらのスペクトル情報から、第 1 IC(図 9(a))は脂肪滴及び細胞質を、第 2 IC (図 9(b))は水分の多い血管(類洞)構造を、第 3 (図 9(c))は繊維や細胞核を可視化していると推定される。これらの像を用いて、カラー画像を生成することもできた(図 9(e))。

また、マウスの小腸を観察した結果を図 10 に示す。SRS 顕微鏡の三次元分解能を活用し、深さを 5.6  $\mu\text{m}$  ずつ変えながら、それぞれの深さにおいて 91 枚の分光像を得た。像 1 枚当りの取得時間は 3 秒、総取得時間は 24 秒であった。図 10(a)-(h)は ICA により得られたカラー合成像であり、また図 10(i)は IC スペクトルである。青(核)や赤(細胞質)などの 3 次元構造をクリアに可視化できた。

以上の結果から、SRS 顕微鏡において高速分光イメージングという新しい機能を実現することで分子識別能を向上させ、生体組織の無染色観察における本機能の有効性を実証した。

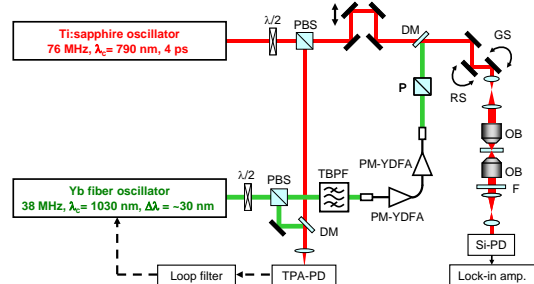


図 8. 高速 SRS 分光顕微鏡の実験系。

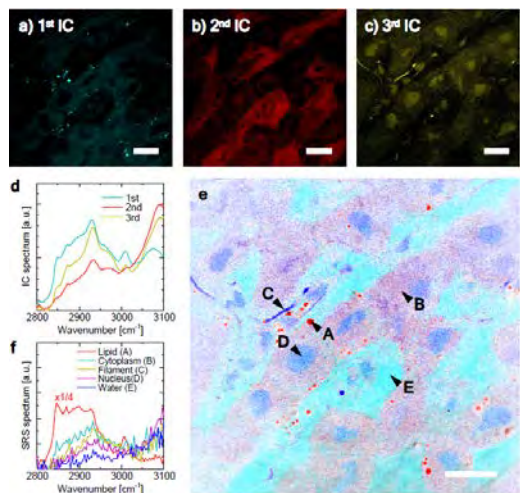


図 9. 高速 SRS 分光顕微鏡によるラット肝臓組織観察結果。a-c: 第 1~3 独立成分像。d: 独立成分スペクトル。e: カラー合成像。A: 脂肪滴。B: 細胞質。C: 繊維。D: 細胞核。E: 類洞。f: SRS スペクトル。

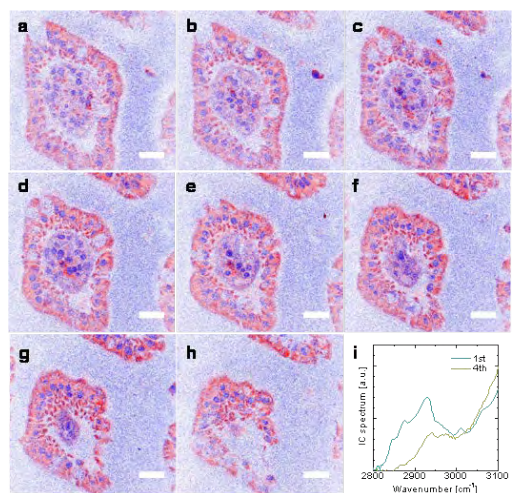


図 10 マウス小腸の 3 次元観察結果。a-h: 深さを 5.6  $\mu\text{m}$  ずつ変えながら観察したカラー合成像。青: 細胞核、赤: 細胞質。総取得時間: 24 秒。i: 独立成分スペクトル。スケールバー: 20  $\mu\text{m}$ 。

### 3. 今後の展開

本研究成果によって、高速性と分子識別能を両立する強力な無染色イメージング法を実現できた。今後の展開としては、以下の3つの方向性が挙げられる。

- ・ レーザーの波長可変範囲を拡大し、特に指紋領域と呼ばれる  $500\sim 1800\text{ cm}^{-1}$  の波数帯における詳細なラマンスペクトルを取得できるようにする。これにより分子識別能の更なる向上が期待できる。
- ・ 分光像の処理アルゴリズムを最適化し、より短時間かつ少ない波長数で分子識別ができるようにする。
- ・ ファ이버レーザーなど、コンパクトかつ実用性の高いレーザーを適用する。

また、本さがけ研究で十分に実現できなかった光学活性検出及び高分解能化についても、その可能性を追求していきたい。

### 4. 自己評価

さがけ研究期間で得られた成果である感度向上と高速分光イメージングは、研究のねらいである「極限性能の追求」と「新しい機能の実現」に沿ったものである。また、本さがけ研究の結果として、世界をリードする性能と機能を持った無染色顕微鏡を実現できたと考えている。

### 5. 研究総括の見解

独自に開発した誘導ラマン散乱顕微法の極限性能を追求し、生体のイメージング技術の革新を目指した。その結果、理論限界感度を達成するとともに高速分光イメージングを実現し、誘導ラマン散乱顕微法が高速性と分子識別機能を兼ね備えた染色を必要としない生体顕微法として優れた手法であることを示した。同時期に、米・独グループからも誘導ラマン散乱顕微法が提案されたが、このさがけ研究で実現した性能と分子識別能は世界最高レベルにあるものと高く評価する。この顕微法には更なる高性能化、高機能化の余地があると考えられるので、他との差別化を図り、我が国オリジナルの「光を利用」した顕微法の開発をリードしていただきたい。

### 6. 主な研究成果リスト

#### (1) 論文(原著論文)発表

- |  |
|--|
| [1] Y. Ozeki, W. Umemura, Y. Otsuka, S. Satoh, H. Hashimoto, K. Sumimura, N. Nishizawa, K. Fukui and K. Itoh, "High-speed molecular spectral imaging of tissue with stimulated Raman scattering," Nature Photon., 2012, 6, 845-851.  |
| [2] Y. Ozeki, W. Umemura, K. Sumimura, N. Nishizawa, K. Fukui, and K. Itoh, "Stimulated Raman hyperspectral imaging based on spectral filtering of broadband laser pulses," Opt. Lett., 2012, 37, 431-433.   |
| [3] W. Umemura, K. Fujita, Y. Ozeki, K. Goto, K. Sumimura, N. Nishizawa, K. Fukui, and K. Itoh, "Subharmonic synchronization of picosecond Yb fiber laser to picosecond Ti:sapphire laser for stimulated Raman scattering microscopy," Jpn. J. Appl. Phys, 2012, 51, 022702. |

[4] K. Nose, Y. Ozeki, T. Kishi, K. Sumimura, N. Nishizawa, K. Fukui, Y. Kanematsu, and K. Itoh, "Sensitivity enhancement of fiber-laser-based stimulated Raman scattering microscopy by collinear balanced detection technique," *Opt. Express*, 2012, 20, 13, 13958-13965.

[5] Y. Ozeki, Y. Kitagawa, K. Sumimura, N. Nishizawa, W. Umemura, S. Kajiyama, K. Fukui, and K. Itoh, "Stimulated Raman scattering microscope with shot noise limited sensitivity using subharmonically synchronized laser pulses," *Opt. Express*, vol. 18, no. 13, pp. 13708-13719, 2010.

(2) 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)

・国際会議招待講演(8件)

・Y. Ozeki, "High-speed SRS spectral microscopy with two-color wavelength-tunable picosecond pulses" *Ultrafast Optics (UFO2013)*, Mo 4.1, Davos, Switzerland, Mar. 5th, 2013.

・Y. Ozeki, Y. Otsuka, S. Sato, H. Hashimoto, W. Umemura, K. Sumimura, N. Nishizawa, K. Fukui, and K. Itoh "Label-free observation of tissues by high-speed stimulated Raman spectral microscopy and independent component analysis," *Photonics West 2013, BiOS*, paper 8588-6, San Francisco, Feb. 3rd, 2013.

・Y. Ozeki, "High-speed stimulated Raman spectral imaging," *microCARS2012*, Naurod, Germany, Oct. 15th, 2012.

他

・受賞(2件)

「2011年光学論文賞」

「第28回(2010年春季)応用物理学会講演奨励賞」

・プレスリリース

「波長が変化するレーザーを用いた新しい顕微鏡を開発—染色せずに生体の三次元構造などの観察が可能に—」平成24年11月12日。

・新聞報道

「生体組織の観察 染めずに可能に」*日本経済新聞* 2012年11月13日15面。

「生体組織の無染色観察」*日経産業新聞* 2012年11月13日16面。

・解説論文

小関泰之「誘導ラマン散乱顕微鏡による分光イメージング」*分光研究*, 2012, 61, 6, 215-223.

小関泰之、伊東一良「誘導ラマン散乱分光イメージング」*光アライアンス*, 2012, 23, 9, 47-50.

小関泰之、伊東一良「誘導ラマン散乱顕微法による無染色生体イメージング」*レーザー研究*, 2011, 39, 12, 887-892.