

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K17918

研究課題名(和文) 高感度蛍光分光画像計測技術の開発

研究課題名(英文) Development of highly sensitive hyperspectral imaging method

研究代表者

島田 林太郎 (Shimada, Rintaro)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任助教

研究者番号：70548940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：レーザー走査用と信号光の走査用の2つのガルバノミラー装置を搭載し、これらを同期制御することで疑似的に多空間点同時計測するハイパースペクトルイメージング法を新たに開発した。開発した装置を用いて培養細胞や生物組織の蛍光及び、ラマン分光顕微画像計測を行い、1スペクトルあたり12 msという高速でスペクトルを取得できることを示した。得られた分光画像データの解析により複数の生体分子の局在の同時可視化に成功した。得られた信号の空間分解能も単焦点共焦点蛍光・ラマン顕微分光計と同等であることを示した。これにより分光顕微画像計測技術の従来の問題点である高分光性能と高イメージング性能の両立を達成した。

研究成果の概要(英文)：A new hyperspectral imaging spectrometer has been developed. The newly designed system is based on a conventional confocal microscope with additional two galvano-mirror scanner units, one for the excitation laser, and the other for the signal light. By driving the scanner units synchronously, simultaneous detection of signal light from multiple spots on the sample on a charge-coupled-device (CCD) detector has been realized. Hyperspectral imaging of cultured cells and bio-tissue was demonstrated to show fast (12 msec / spectrum) and high sensitive spectral acquisition capability of the system. Owing to its spectral information, localization of multiple biomolecules in a sample was visualized simultaneously with the spatial resolution of the images comparable to that obtained by conventional confocal microscopes.

研究分野：分析化学

キーワード：分光画像計測 蛍光分光 ラマン分光

1. 研究開始当初の背景

蛍光顕微鏡に代表される分光顕微画像計測技術は、強力な非侵襲分析手法として生命科学をはじめとした様々な科学技術分野でなくてはならない必須のツールである。計測技術の向上は広範な分野領域において研究を推進する強力な原動力となりうる。しかし、これまでの分光画像計測法は主に発光体の位置と光強度に着目した計測がなされることが多く、発光信号の波長情報(スペクトル)は補助的な利用に止まっていた。最先端の分光顕微鏡技術開発も超分解顕微鏡をはじめとする空間分解能の向上やデータ取得スピード向上に焦点が当てられることが多く、信号強度の画像(座標)情報とスペクトル(波長)情報の同時取得に関わる測定性能の追求は十分ではなかった。

既存手法による分光画像計測は単一波長における画像測定装置を構成し、「測定波長を掃引する」か、あるいは局所空間点(多焦点あるいは単一線焦点)における同時スペクトル測定装置を構成し、「測定空間点を掃引する」方式が主流である。このような測定においては掃引される次元の要素数を密にすればするほど測定時間が要素数に比例して増えるため、分光性能(スペクトル分解能やスペクトルチャンネル数など)と画像性能(空間分解能、画像画素数など)はトレードオフの関係にあった。分子から得られる詳細な分光情報を高い空間分解能で取得するためには高分光性能と高イメージング性能を両立する必要があり、新たな測定方式・装置の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

分光画像計測において画像情報及び分光情報の同時取得と、その高感度化・高速化は喫緊の課題である。本研究では、測定の多点同時計測化と取得データの数値的解析に基づいた新規分光画像計測技術の開発を行い、既存手法ではトレードオフの関係にあった高分光性能及び高イメージング性能を同時に実現し、かつ既存の手法に比べ高感度・高速化を達成することにより、生命科学の発展に資することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)【装置の製作】

掃引次元の要素数に比例して増大する測定時間は、多数の空間点(あるいは波長)で並行して測定を行う「多重化」により、短縮が可能である。本研究では以下に挙げる二種類の装置を製作し測定の多重化を行った。下記の(B)方式は、当初の計画にはなく、本研究の実施中に着想したものである。

(A) アダマール変換をもとにした多空間点同時計測分光計測顕微鏡の製作

本方式では、励起光として2次元的な広

がりを持つ縞状多焦点照射を用い、各焦点位置から発生した信号光を分散型分光器によってスペクトル次元も展開した後、2次元検出器上に結像する。この結果、2次元検出器の縦方向の画素は空間の1次元が、横方向の画素は空間の1次元及びスペクトル次元が重畳して展開されたものに対応する。重畳した信号の分離にはアダマール分光として知られている多重化分光解析法を応用した。n列の縞からなる照射パターンをアダマール行列に基づく時間変調を加えるながらn回測定し、得られた測定データを代数的方法により再構成することで、重畳した信号をn個の焦点それぞれに由来した分光信号として選別した。照射パターンの生成・制御、ならびに取得した画像データの解析による再構成はそれぞれ自作のコンピュータプログラムを用いた。

(B) 機械的ストリークカメラを用いた多空間点同時計測分光計測顕微鏡の製作

本方式では、従来のレーザー走査型単焦点共焦点顕微分光計を元に、さらに信号光経路に1軸のガルバノスキャンミラーを追加し、レーザー走査用と信号光の走査用の2つのガルバノミラー装置を搭載した顕微分光計を設計・製作した。追加した信号光側ガルバノミラーを制御することにより、信号光をCCD検出器上の任意の位置に結像することが可能である。このスキャンミラーをレーザー走査と同期して制御することにより、レーザー走査経路中の異なる場所で発生した蛍光・ラマン信号光をCCD検出器上の異なる位置に結像し、単焦点照射構成のまま多スペクトルを同時並列的にCCD上で積算、検出することが可能である。これらの装置の制御のためのコンピュータプログラムも自作した。

(2)【モデル試料系の測定による分光画像計測性能の評価】

研究の方法(1)で制作した装置を用い、空間分布やスペクトルのよく知られた標準物質の分光画像計測を行い、開発した装置の分光性能(スペクトル分解能やスペクトルチャンネル数など)と画像性能(空間分解能、画像画素数など)を評価した。

(3)【生細胞試料の測定】

開発した装置を用い、蛍光標識した生細胞のハイパースペクトルイメージングを行った。重なりあう蛍光・ラマン信号のスペクトル分離や、局所的なスペクトルピーク位置変化の有無を検証し顕微測定におけるスペクトル情報利用の可能性を探求した。さらに、生細胞の分枝画像計測について本手法と既存手法の比較を行い、分光性能、イメージング性能、測定速度・感度それぞれについての性能向上を評価した。

4. 研究成果

(1) 【アダマール変換をもとにした多空間点同時計測分光計測顕微鏡の製作】

縞状の照射パターンの生成には、当初の計画ではガラス基板状にアダマール配列をクロム蒸着したものを複数種作成し、使用する予定であったが、これを変更し、デジタルミラーデバイス(DMD)を用いた。DMDは電氣的に制御可能な微小ミラーの集合体であり、コンピューター制御により、自由にマスク形状を制御することが可能な光学装置である。DMD装置を利用することにより、多様なアダマールマスクの形状の検討や、測定ルーチンの完全自動化・高速化・照射光学系への応用などを行うことができた。

アダマール行列は歪種も含めて数学的にいくつかの表現がこれまでに知られている。DMDの自由度の高さを生かし、これら歪種も含めた異なるアダマール行列パターンについて比較検討を行った。

(2) 【モデル試料系の測定：DMD アダマール変換方式】

モデル系としてビーズ試料をガラス基板上に散布したものをを用いた。製作したアダマール変換多空間点同時計測分光計測顕微鏡を用いた分光画像計測によって試料由来の信号光の検出は可能であったが、再構築画像の歪みの問題が生じた。画像歪みはアダマール行列の種類にはよらず発生した。このため、この問題はDMDの低励起光利用効率(<1%)と、不完全な反射特性に由来する縞状照射パターンの不完全性によって、理想的なアダマール照射パターンの生成が為されていないことに起因すると考えられる。照射パターンの不完全性をデータ解析に繰り込み、再構築画像の歪みを低減することを試みたが良好な結果は得られず、本方式による装置開発は現時点では困難であると結論した。

(3) 【機械的ストリークカメラを用いた多空間点同時計測分光計測顕微鏡の製作】

上記の問題点を解決するために、DMDを用いた設計を改め、レーザースポットの高速スキャンによる、擬似的な縞状照射を行う顕微分光計を新たに設計した。その際、通常的设计に一工夫加え、機械的ストリークカメラを検出器に組み合わせることで、共焦点光学配置を完全に保った状態で多空間点を同時計測可能な、新たな分光計測顕微鏡(研究の方法(2)-B)の着想し、これにもとづく新たな顕微分光装置を制作した。(図1)ガルバノミラーの駆動方式や動作周波数、同期方法を検討し、分光性能が最適化される条件を明らかにした。

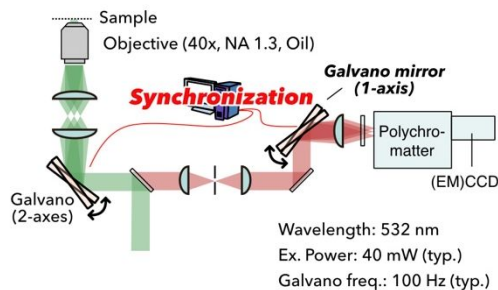


図1 機械的ストリークカメラを用いた多空間点同時計測分光計測顕微鏡の装置図

(4) 【モデル試料系の測定：機械的ストリークカメラ方式】

モデル系としてビーズ試料をガラス基板上に散布したものをを用いた。製作した機械的ストリークカメラ多空間点同時計測分光計測顕微鏡を用いた分光画像計測によって、顕微鏡視野中心を含む、 $80\ \mu\text{m} \times 80\ \mu\text{m}$ 程度の領域内において均一な高分光性能と高画像性能を両立することが確認できた。分光性能としては、2000点のスペクトルチャンネル同時計測を $0.1\ \text{nm}$ 以下のスペクトル分解能で達成した。また、画像性能としては、200画素の同時計測と、面内 $500\ \text{nm}$ 以下、深さ方向 $1\ \mu\text{m}$ 以下の空間分解能を達成した。上記性能は、全ての指標においてこれまでに提案されている種々の高速分光画像計測法の中で最も優れた水準にある。

(5) 【生細胞試料の測定】

研究成果(3)で製作した装置を用い、培養細胞の蛍光及び、ラマン分光顕微鏡画像計測を行った。直線状にレーザースポットを高速走査し機械的ストリークカメラ検出と同期することにより、144点の蛍光・ラマンスペクトルを1秒の露光時間で同時に取得した。この擬似線照射測定をレーザー照射領域を順次ずらしながら繰り返すことで試料上の縦 $80\ \mu\text{m}$ 、横 $70\ \mu\text{m}$ の領域から $195 \times 144 (=2.8\ \text{万})$ 点のスペクトルデータを得た。約3万点のスペクトル計測は全体で339秒で完了し、1スペクトルあたり12ミリ秒という短時間で分光画像計測を達成した。

図2に本装置を用いて計測したHEK293T培養細胞の分枝画像計測結果を示す。それぞれ(a)タンパク質(ラマンバンド $1003\ \text{cm}^{-1}$)、(b)シトクロム(ラマンバンド $750\ \text{cm}^{-1}$ 、及び自家蛍光)、(c)脂質(とタンパク質)(ラマンバンド $1450\ \text{cm}^{-1}$)の局在を示す。(カッコ内は画像構成に利用したスペクトル情報)スペクトルを用いた分子情報の解析により、画像(b)は主にミトコンドリア、画像(c)は脂質顆粒に対応すると考えられ、これらの局在を同時に明瞭に可視化することに成功した。

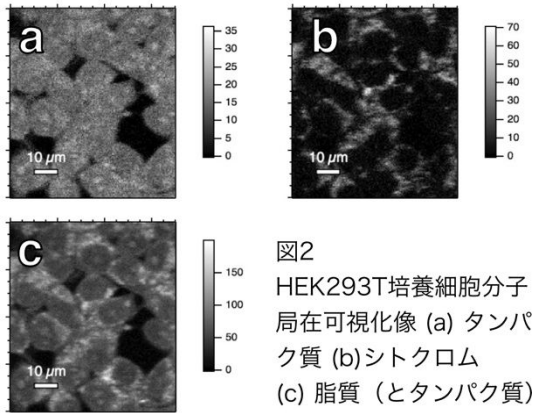


図2
HEK293T培養細胞分子
局在可視化像 (a) タンパ
ク質 (b) シトクロム
(c) 脂質 (とタンパク質)

(7) 【得られた成果のインパクト及び今後の展望】

本研究は分光画像計測法に新たな手法を提案するものである。本研究で製作した新たな分光画像計測装置は、従来の分光顕微画像計測技術の問題点であった高分光性能と高イメージング性能を両立するものであり、高速性、高感度両面において既存の技術を凌駕する。また、本方式は、これまでに提案されてきた先進的な高速・高感度分光顕微画像計測技術に比して装置構成が大幅に単純化されており、既存の分光顕微装置への導入が比較的容易であると考えられる。本手法が標準の計測技術となればこれまで分光情報のみで行っていた化学分析に画像情報という新たな軸を、あるいは、画像情報のみで行っていた生物研究に分光情報という新たな軸を追加することが可能となり、広範な分野領域において研究を推進する強力な原動力となると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3件)

- 1) Rapakousiou Amalia, Sakamoto Ryota, Shiotsuki Ryo, Matsuoka Ryota, Nakajima Ukyo, Pal Tigmansu, Shimada Rintaro, Hossain Amran, Masunaga Hiroyasu, Horike Satoshi, Kitagawa Yasutaka, Sasaki Sono, Kato Kenichi, Ozawa Takeaki, Astruc Didier, Nishihara Hiroshi, Liquid/Liquid Interfacial Synthesis of a Click Nanosheet, Chemistry - A European Journal, 査読有, Vol.23, 2017, 8443-8449
DOI: 10.1002/chem.201700201
- 2) Liang-da Chiu, Shih-Hsin Ho, Rintaro Shimada, Nan-Qi Ren, Takeaki Ozawa, Rapid in vivo lipid/carbohydrate quantification of single microalgal cell by Raman spectral imaging to reveal salinity-induced starch-to-lipid shift, Biotechnology

for Biofuels, 査読有, Vol.10, 2017, 9

DOI: 10.1186/s13068-016-0691-y

- 3) Toshimichi Yamada, Hideaki Yoshimura, Rintaro Shimada, Mitsuru Hattori, Masatoshi Eguchi, Takahiro K. Fujiwara, Akihiro Kusumi, Takeaki Ozawa, Spatiotemporal analysis with a genetically encoded fluorescent RNA probe reveals TERRA function around telomeres, Scientific Reports, 査読有, Vol.6, 2016, 38910
DOI: 10.1038/srep38910

〔学会発表〕(計 5件)

- 1) 島田 林太郎・邱 亮達・小澤 岳昌, 多スペクトル並列検出を用いた単焦点共焦点ラマン顕微分光計によるハイパースペクトルイメージング高速化の試み, 日本分析化学会第66年会, 2017年
- 2) Rintaro Shimada, Liang-da Chiu, Takeaki Ozawa, "Rapid (10 ms/spectrum) single-focus confocal Raman hyperspectral imaging by multi-spectra parallel detection", 平成29年度日本分光学会年次講演会, 2017
- 3) Rintaro Shimada, Takeshi Nakamura, Takeaki Ozawa, Separation of Raman and fluorescence signals by fast wavelength modulation Raman spectroscopy, Japan-Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium, 2016年

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chem.s.u0tokyo.ac.jp/~analyt/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 林太郎 (SHIMADA Rintaro)
東京大学・理学系研究科・特任助教
研究者番号：70548940

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()