

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02800

研究課題名（和文）格子状照明を用いた高速高解像度ラマン顕微鏡の開発

研究課題名（英文）High-speed and high-resolution Raman microscopy using patterned illumination

研究代表者

藤田 克昌 (Fujita, Katsumasa)

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：80362664

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ラマン散乱顕微鏡による観察において、高速かつ高空間分解能を実現する光学技術について研究を行った。高空間分解能を実現するために空間的パターンを有したレーザー光により試料を照明することで、試料中の微細な構造を顕在化させて観察する手法を開発した。また時間分解能の向上には、試料の照明パターンの広範囲に分布させ、従来法に比べ10-20倍の量のラマン散乱スペクトルを同時に計測する方法を開発した。さらに、複数波数域を同時に計測可能な分光光学系も開発し、試料から引き出せる分光情報を2倍程度に増大させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラマン散乱顕微鏡は、試料内の分子や結晶構造を分析しながら、それらの空間分布を観察する技術として活用されている。しかしながら、その空間分解能、および時間分解能はラマン散乱の効率の低さに大きく制限され、多くの応用においてその分析力を生かせない状態にある。本研究では、微弱なラマン散乱を用いても、高速かつ高空間分解能に各種試料の顕微鏡観察を可能とする、新規の光学技術開発の開発に成功した。また、応用研究においては、開発した技術が、高分子材料、生体試料の観察に実際に適用可能であること、細胞内に分布した高分子材料とを分光分析により見極められること、また細胞種の分別が可能であること示した。

研究成果の概要（英文）：In this research, we aimed to develop a novel Raman microscopy technique that can achieve high-speed and high-resolution imaging by using programmable patterned illumination. Using a spatial light modulator, a light illumination pattern on a sample was controlled so that one can choose an illumination mode suitable for high-speed imaging and/or high-resolution imaging. Several types of lattice illuminations have been tested and demonstrated up to two folds and 20 folds improvements of the spatial and temporal resolution, respectively. We have also developed optical systems that can detect two different wavenumber regions simultaneously to enable more chemical information from samples.

研究分野：フォトンクス

キーワード：ラマン顕微鏡 ラマン分光法 超解像顕微鏡 分光分析 無標識観察

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ラマン分光法は、様々な材料工学、化学分析において必須の技術として活用されてきた。ラマン散乱は微弱な効果であるため検出に時間がかかり、応用範囲が限られていたが、分光検出技術の高感度化が進み、生物学や、創薬、医療に向けた基礎研究への応用が広く展開されはじめた。特に最近では、ラマン分光法と顕微観察を融合させたラマン顕微分光観察技術が発展し、分光分析イメージングという新しい手法が研究分野で利用されつつある。

ラマン分光法は非常に強力な分析技術であるが、顕微イメージング技術の点では改善の余地がある。その空間分解能は光の回折限界から用いる波長の半分程度に制限され、またラマン散乱光は非常に微弱なため、撮像速度も大きく制限される。これらを改善できれば、非常に広い分野において、基礎研究から応用研究まで、強力なラマン分光技術を活用できるようになる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ラマン散乱を検出する顕微分光イメージングにおける空間分解能、撮像速度を共に向上させたラマン顕微鏡技術の開発である。ラマン顕微鏡は、分子や結晶格子の振動を直接検出・分析しながら試料を観察できる強力な分析イメージング法として浸透しつつあり、時間分解能・空間分解能を向上できればその応用範囲は飛躍的に広がる。本研究では、格子状照明を用いたラマン分光イメージング法を新たに提案し、提案する手法の結像特性、分光特性を理論的、および実験的に明らかにするとともに、実際に顕微鏡システムの試作と応用実験を行う。従来のラマン顕微鏡に比べて、空間分解能を2倍に向上し、かつ時間分解能を10~20倍向上させる。

3. 研究の方法

光学顕微鏡の空間分解能は照明光学系の特性と光検出光学系の特性の両方により決定される。本研究では、空間的に変調された光強度を有する照明光を用いることで、照明光学系側での空間分解特性を向上させラマン分光観察における空間分解能を向上すること、および、ラマン散乱スペクトル測定の同時検出数を向上させることにより撮像速度の向上すること、さらには波長検出領域の拡大による分光特性の向上を図った。

空間分解能の向上をラマン分光顕微鏡でもたらしめるための照明法として2次元格子状照明パターン照明を考案し、それを実現する光学系を設計し、ラマン分光顕微鏡に組み込むことを行った。格子状照明としては、図1aに示すような光強度パターンを有する照明とする。この照明パターンでは、低空間周波数の光強度成分を低減させることで、相対的に高空間周波数情報を向上させることができる。ラマン分光観察のような微弱光観察では、低空間周波数信号がつくる雑音により高空間周波数信号が検出されない。このため、低空間周波数信号を減らすことで実効的な空間分解能が向上する。しかし、デメリットとしては、図1aに示すように、一方向には高空間分解能を与える細かなパターン(y方向)を生じるが、もう

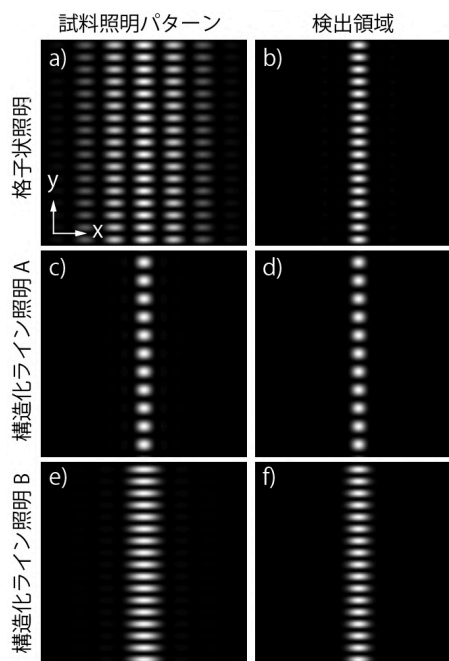


図1 様々な照明パターンと試料上での信号検出領域。a, b) 格子状照明、c-f) 構造化ライン照明 (点線状照明)。

一方向 (x 方向) には低空間分解能を与える周期構造が幅の広い照明パターンを生じる。そこで、検出光学系にスリット状の空間フィルタを導入することで、低空間分解能をもたらす周期構造からの信号が検出器への入射するのを妨げ、空間分解能の低下を抑制する (図 1 b)。先行研究で使用された構造化ライン照明 (図 1 c,e) においても、y 方向と x 方向との空間周波数にはトレードオフの関係があり、これは空間フィルタを用いても解消することが難しい (図 1 d,f) が、図 1 a のような照明パターンでは、このトレードオフを緩和させることができ、x、y の両方向において空間分解能を向上できる。さらに、xz 平面 (z=光軸) における格子状照明を用いることにより奥行き方向の画像のボケを取り除くラマン観察技術についても検討した。

加えて、より広い間隔の格子状照明を用いることで、試料のより広い領域からラマン散乱スペクトルを検出し、撮像速度を高める技術についても開発した。このために、複数の入射スリットを有するラマン分光器を用いたラマン分光顕微鏡を試作した。照明パターンの形成にはシリンドリカルレンズアレイ、もしくは空間光変調器を用いることを検討した。この手法では、光検出に使用される光検出器上に 2 次元的にラマン散乱スペクトルが配置されるため、1 スペクトルあたりの波数点数が減少する。すなわち、撮像速度とスペクトル情報量とがトレードオフの関係にある。そこで、複数波長域を検出が可能な分光光学系を新たに設計し、試作した。こうすることで撮像速度とスペクトル情報量とのトレードオフを軽減でき、より正確な分光分析が可能となる。

4. 研究成果

図 2 に試作したラマン散乱顕微鏡の構成図を示す。レーザーからの光は空間光変調素子を用いることにより、様々なパターンを有する光照明を形成できる。試料内の照明された部位からは、ラマン散乱光が発生し、結像光学系を経た後、ラマン分光器に導入される。ラマン分光器の入り口に設置されたスリットを空間フィルターとして使い、試料内で生じる不要なラマン散乱光が検出されることを妨げた。分光器にはレンズ型のイメージングポリクロメーターを用い、空間分解能の向上、および複数スリット利用時の画像の歪みを抑えた。レンズ型の分光器には色収差が生じやすいが、限定された検出波長域用に設計されたレンズを用いることで、その色収差の影響を低減した。また、この分光器には入射スリットを単一および複数に変更できる機構を組み込み、複数の撮像モードの切り替えに対応した。以下に示す測定においては、図 2 の光学系を共通に用いた。実験の目的に応じて空間光変調素子の制御や切り替えを行い、様々なパターンをもつ照明光を試料上に形成し、測定を実施した。

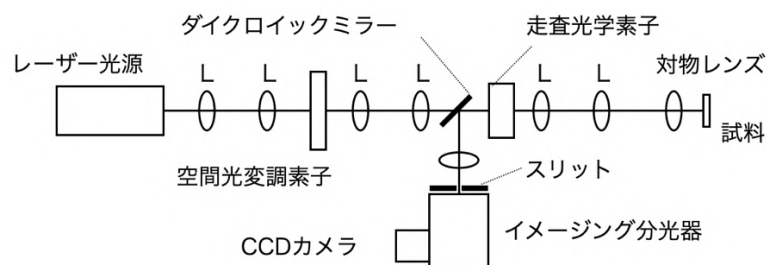


図 2 開発したラマン顕微鏡の構成図。空間光変調素子により照明パターンを制御。

まず、空間光変調素子による任意の光パターンが形成できることを確認した。図 3 に例として、試料（蛍光薄膜）上に形成した 2 次元パターンを有する照明光の光分布を示す。照明光学系の開口数を検出光学系側のそれに比べて 1/4 程度とし、空間光変調素子により形成される光強度分布

を確認した。図 3 a,b,c は空間光変調素子に入力したパターン、図 3 d,e,f は試料上に形成された光強度分布を示しており、両者一致することが確認された（図中の細かな強度分布は蛍光膜の不均一性による）。また、図 3 g,e,h に示すように分光器スリットを空間フィルタとして用いることで、x 方向への光強度広がりを抑制し、面内方向の空間分解能のトレードオフを軽減できることも確認した。図 4 a および b に、2 次元格子状の照明パターンおよび従来の構造化ライン照明を用いて観察した直径 500 nm のポリスチレン粒子の画像（同一試料の同一箇所）を示す。図 4 c、および b は、図 4 a および b に示された光強度のプロファイルを示す。これらの測定により、2 次元格子状の照明パターンにより、x 方向の空間分解能の向上が確認され、xy 平面での空間分解能のトレードオフを軽減できることが確認された。

xz 平面での 2 次元格子状照明による空間分解能向上についても検討した。図 5 a に示すような 3 次元パターンをもつ格子状照明を用いることで、z 方向への空間分解能の向上が期待され、焦点ズレ画像の除去による空間分解能の向上が期待される。図 5 c および d はそれぞれ、格子状照明および従来のライン照明を用いて観察した、ポリスチレン粒子（直径 600 nm）、および PMMA 粒子（800 nm）のラマン散乱像である。両画像を比較すると、2 次元格子状照明では、各粒子の輪郭がより明確に観察されており、空間分解能の向上が確認された。

より広い格子状の照明光を用いることによる高速ラマン散乱観察の結果を図 6 に示す。図 6 は試料上に形成された照明パターンを示している。試料にはポリスチレン粒子、PMMA 粒子を用いた。画像上の輝線が形成された格子状照明を示しており、黒い粒状の画像が各粒子を示している。こ

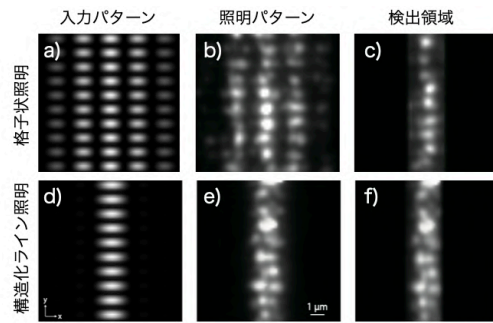


図 3 空間光変調素子による照明パターンの形成とスリット後の光検出領域。

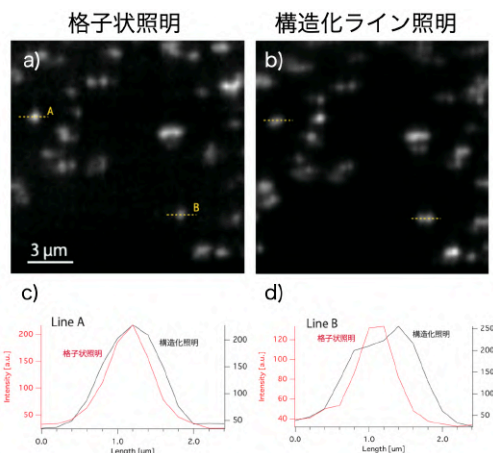


図 4 ポリスチレンビーズのラマン観察像（ 1004 cm^{-1} のラマン散乱の強度分布）。波長 532nm のレーザーを使用。

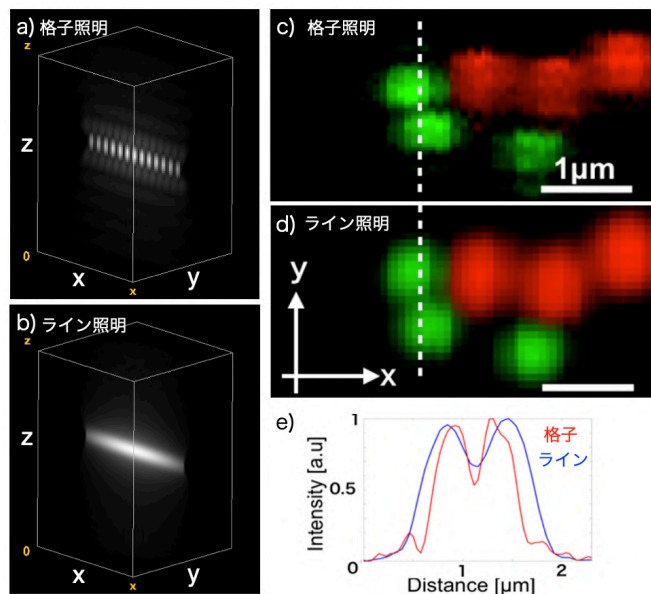


図 5 xz 平面の 2 次元格子状照明によるラマン観察。a) xy 格子照明パターン、b) ライン照明パターン、および、それらによる観察像 c, d)。e) 観察像 c, d の点線部位の強度プロファイル (PMMA)。

の条件において、ラマン分光器により形成されるラマン散乱光を図 6 b に示す。各部位からのラマン散乱スペクトルが帯状に形成されており、試料の 2 次元平面からのラマン散乱スペクトルが、光検出器上で 2 次元的に展開されていることが分かる。約 20 本のライン状のレーザー光により照明されており、従来の単一のライン照明に比べて、約 20 倍の撮像速度の向上が見込まれる。図 6 c は、上記の格子状照明を各照明ラインに対して垂直に走査しながらラマン分光スペクトルを測定して得た、ラマン散乱像を示す。20 倍 /NA0.45 の対物レンズを用いて観察をした結果、 $500\mu\text{m} \times 500\mu\text{m}$ の視野を約 11 分で撮像でき、約 20 倍の撮像速度が達成された。また、同様の手法を用いて観察した生細胞のラマン散乱像を、図 6 d に示す。40 倍 /NA1.25 の対物レンズを使用し、 $250\mu\text{m} \times 230\mu\text{m}$ の視野に対して、約 4 分の撮像時間を達成した。これは 1 細胞あたり数秒の撮像時間に相当する。この他、細胞内に取り込まれたマイクロプラスチックの高速検出、ラマンタグを導入した細胞試料の観察を試み、脂質分子、核酸、ミトコンドリアの空間分布の同時観察にも成功した。

本手法では、図 6 b に示したように、撮像速度と検出波数領域とがトレードオフの関係になる。そこで、2 つの検出波数領域を同時に検出できるよう、分光器内部にダイクロ

ミックミラーを配置させたダブルバンドラマン分光器を開発した。この光学系を用いて、図 7 に示すように、高波数領域と指紋領域とを 2 つのカメラにより同時検出することに成功した。また、異なる 2 つの波長を使用したラマン分光光学系の試作も行い、従来よりも 2 倍程度のスペクトル情報の取得が可能であることを確認した。

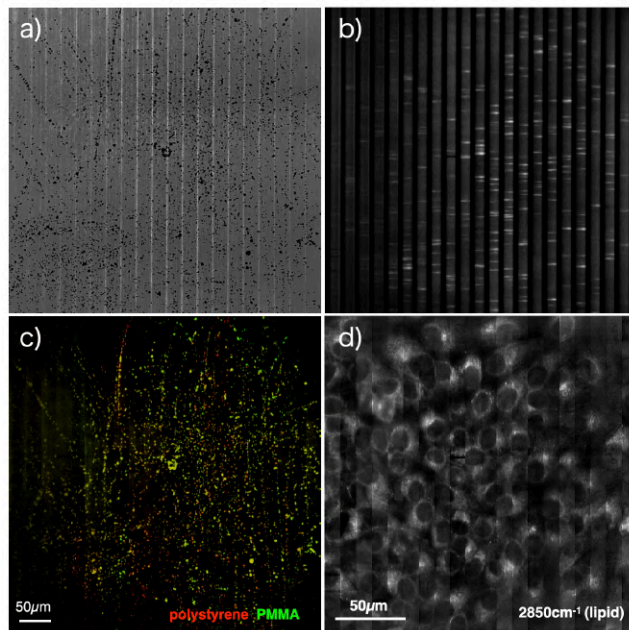


図 6 a) ポリスチレン粒子、PMMA 粒子を混合した試料の明視野観察像。複数の白い縦線はラマン観察用の照明光。b) 2 次元光検出器上で検出されたラマン散乱スペクトル。c) ポリスチレン粒子/PMMA 粒子混合試料のラマン散乱像（撮像時間 11 分、 546×473 ピクセル）。d) 生きた HeLa 細胞のラマン散乱像（撮像時間 4 分、 876×800 ピクセル）。波長 532nm のレーザー光により観察。

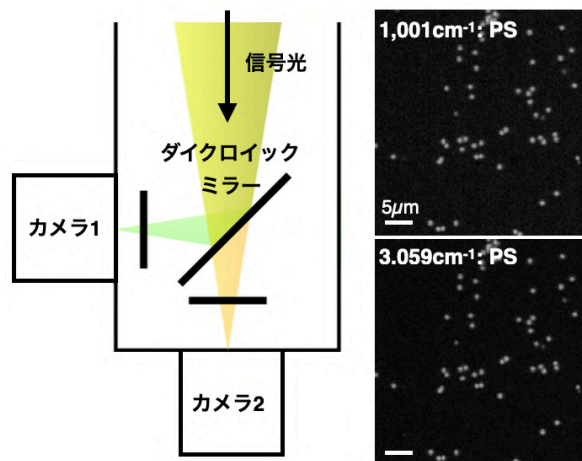


図 7 2 波数領域を同時に計測可能な分光器。指紋領域と高波数領域を格子状照明で同時に観察。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kumamoto Yasuaki, Mochizuki Kentaro, Hashimoto Kosuke, Harada Yoshinori, Tanaka Hideo, Fujita Katsumasa	4. 巻 123
2. 論文標題 High-Throughput Cell Imaging and Classification by Narrowband and Low-Spectral-Resolution Raman Microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 2654 ~ 2661
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.8b11295	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Morimoto Takeshi, Chiu Liang-da, Kanda Hiroyuki, Kawagoe Hiroyuki, Ozawa Takeaki, Nakamura Makoto, Nishida Kohji, Fujita Katsumasa, Fujikado Takashi	4. 巻 144
2. 論文標題 Using redox-sensitive mitochondrial cytochrome Raman bands for label-free detection of mitochondrial dysfunction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 2531 ~ 2540
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8AN02213E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Germond Arno, Ichimura Taro, Chiu Liang-da, Fujita Katsumasa, Watanabe Tomonobu M., Fujita Hideaki	4. 巻 8
2. 論文標題 Cell type discrimination based on image features of molecular component distribution	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-30276-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 望月健太郎, 藤田克昌	4. 巻 36
2. 論文標題 ラマン顕微鏡	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 68 ~ 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 藤田克昌, 太田泰輔	4. 巻 103
2. 論文標題 ラマン散乱顕微鏡による分析イメージング ~新しい顕微分析技術:カーボン材料から生体試料まで~	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 電気評論	6. 最初と最後の頁 24 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 藤田克昌	4. 巻 87
2. 論文標題 超解像顕微鏡の原理と展望	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 応用物理	6. 最初と最後の頁 164-170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 渡辺 梢, 藤田克昌	4. 巻 38
2. 論文標題 構造化照明ラマン顕微鏡によるバイオイメージング	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 オプトロニクス	6. 最初と最後の頁 83-87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 藤田克昌	4. 巻 68
2. 論文標題 ラマン散乱顕微鏡を用いた生細胞イメージング	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 396-397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 安藤 潤, 藤田 克昌	4. 巻 28
2. 論文標題 ラマン分光顕微鏡とライフサイエンス応用	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 光アライアンス	6. 最初と最後の頁 52-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 13件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Katsumasa Fujita
2. 発表標題 Raman microscopy for analytical imaging of living cells
3. 学会等名 SPIE Photonics West (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田克昌
2. 発表標題 ラマン顕微イメージングによる小分子検出
3. 学会等名 レーザー学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Katsumasa Fujita
2. 発表標題 Alkyne-tag Raman imaging for observation of small molecules in living cells
3. 学会等名 APC2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Katsumasa Fujita
2. 発表標題 Large-area Raman imaging by multiple slit detection
3. 学会等名 SCIX2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Katsumasa Fujita
2. 発表標題 Surpassing the diffraction limit in Raman microscopy
3. 学会等名 ICTON2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田克昌
2. 発表標題 構造化照明顕微鏡による高解像ラマンイメージング
3. 学会等名 光設計研究グループ第64回研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田克昌
2. 発表標題 超解像バイオイメージングの原理と応用,
3. 学会等名 第60回光波センシング技術研究会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤田克昌
2. 発表標題 無標識細胞分析：ラマン分光イメージングの活用
3. 学会等名 関西再生医療産業コンソーシアム 第3回検討会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Katsumasa Fujita
2. 発表標題 The taming of the SERS
3. 学会等名 SCIX 2017（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Katsumasa Fujita
2. 発表標題 High speed Raman imaging for chemical profiling of cells and tissues,
3. 学会等名 生物物理学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Katsumasa Fujita
2. 発表標題 Raman microscopy for molecular imaging of biological samples
3. 学会等名 ICAVS-9（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Katsumasa Fujita
2. 発表標題 Raman microscopy for molecular imaging of living cells
3. 学会等名 5th International Symposium on Bioimaging (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Katsumasa Fujita
2. 発表標題 Improvement of spatial and spectral resolution in Raman microscopy,
3. 学会等名 Biomedical Imaging and Sensing Conference (BISC) 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考