

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H00125

研究課題名(和文) 先端分光手法によるラベルフリー温度生物学

研究課題名(英文) Label-free thermal biology with advanced spectroscopy techniques

研究代表者

井手口 拓郎 (Ideguchi, Takuro)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・准教授

研究者番号：30735999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内の熱拡散や光加熱時の温度変化をラベルフリーで定量する新規計測法を開発し、生きた細胞の計測を行ったところ、蛍光温度プローブを用いた計測とは異なる結果を得た。開発した手法による計測では、細胞内の熱拡散率は水に対して93-94%程度であり、細胞内では主に水分子が熱拡散を担うことを示した。また、秒スケールでの光加熱による温度変化の計測において、蛍光プローブを用いた場合には数度にわたり変化する温度上昇が見られたのに対し、ラベルフリー計測では一定の温度上昇であった。これらの結果は蛍光温度プローブが温度で決まる熱エネルギー以外の内部エネルギーの変化の影響を受けていることを示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

温度が生命活動にとって重要な役割を果たしていることは個体レベルでは明らかであるが、一細胞レベルでどのような役割を果たしているのかは分かっていない。本研究で得られた成果は細胞を対象にした温度生物学という基礎研究分野に新たな知見をもたらすものである。また、温度を切り口とした生命の理解や医療への応用などにつながるという意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：A new label-free measurement technique was developed to quantify the heat diffusion within cells and temperature changes during photothermal heating. Measurements were performed on living cells, yielding results different from those obtained using fluorescent temperature probes. The label-free measurements revealed that the thermal diffusivity inside the cell is about 93-94% relative to water, suggesting that water molecules are primarily responsible for heat diffusion within the cell. Furthermore, in the measurement of temperature changes due to photothermal heating on a second scale, a varying temperature rise over several degrees was observed when using fluorescent probes, while the temperature rise was constant in label-free measurements. These results suggest that fluorescent temperature probes may be influenced by changes in internal energy other than the thermal energy determined by temperature.

研究分野：光科学

キーワード：温度生物学 光計測

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生命活動にとって温度は重要な働きをしていることが知られているが、細胞活動と細胞温度の関係には未解明な部分が多い。これまでの細胞温度計測は、局所温度に応じて強度や寿命を変える蛍光温度プローブにより行われてきたが、蛍光プローブによる間接的な計測は細胞内の他の環境変化にも依存しうるため、温度計測の正確さに不定性があった。また、蛍光温度プローブによる細胞内温度分布計測において 1 度を超える温度分布が観測されている一方、細胞内が水環境であると仮定した場合の熱拡散を計算すると  $10^5$  度程度の分布にしかならないという理論計算による反駁があり、温度生物学における  $10^5$  ギャップ問題として知られていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、蛍光温度プローブを用いずにラベルフリーで細胞内の熱拡散や温度を計測する先端分光および顕微鏡手法を開発することで、 $10^5$  ギャップ問題の神髄に迫り、温度生物学の発展に寄与することを目的とする。

### 3. 研究の方法

- (1) ラベルフリー分光および顕微鏡手法の開発  
ラベルフリーで細胞内の熱現象を定量的にイメージングをする手法として、中赤外フォトサーマル定量位相顕微鏡を開発する。また、自発ラマン散乱を用いた温度計測の手法や、赤外分光やラマン分光の最先端計測手法の開発も行う。
- (2) 細胞内熱拡散のラベルフリー計測  
開発したラベルフリー計測手法を用いて細胞内の熱拡散計測を行い、熱伝導方程式を司る熱拡散率を定量する。
- (3) 細胞内温度のラベルフリー計測  
開発したラベルフリー計測手法を用いて細胞内の温度計測を行う。また、蛍光温度プローブでの温度計測も行い、両者の比較を行う。

### 4. 研究成果

- (1) ラベルフリー分光および顕微鏡手法の開発

#### 中赤外フォトサーマル定量位相顕微鏡の開発

細胞内の熱拡散および温度を顕微画像として定量することのできる独自技術「中赤外フォトサーマル定量位相顕微鏡」の開発を行い、中赤外フォトサーマル顕微鏡において世界初となるビデオレートを超える高速計測 (50 フレーム/秒) を実現した [1]。この顕微鏡の性能を評価する原理検証実験として細胞内の軽水 ( $H_2O$ ) - 重水 ( $D_2O$ ) の置換が数百ミリ秒で生じることを観測した (図 1)。

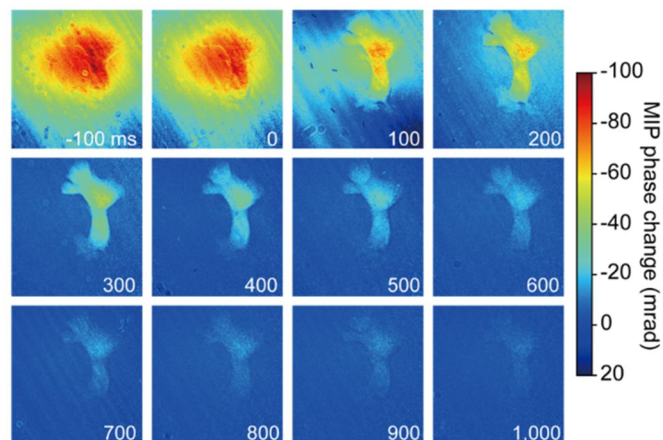


図 1. 中赤外フォトサーマル定量位相顕微鏡で時間分解計測した軽水-重水置換。図中

の信号は軽水の分子振動を表している。時間 0 秒での置換開始後に細胞内での軽水の信号が数百ミリ秒の時間スケールで減衰して重水に置き換わっていることが観測された。

#### 自発ラマン温度計の開発

ストークスラマン散乱とアンチストークスラマン散乱を同時に計測できる自発ラマン散乱顕微分光計を開発し、原理検証として水の温度計測を行った。また、自家蛍光を持つ細胞の温度を計測するため、自家蛍光スペクトルと自発ラマン散乱スペクトルを分離する計測手法および解析アルゴリズムの開発を行った。

#### その他の赤外分光法およびラマン分光法の開発

- ラベルフリー分子振動分光として、超高速のフーリエ変換赤外分光法 (FTIR) の開発を行い、24,000 スペクトル/秒の高速分光に成功した[2]。
- 光周波数コムを用いた超高速フーリエ変換分光として知られるデュアルコム分光に圧縮センシングの原理を導入し、ランダムサンプリングされデータ圧縮された干渉波形からスペクトルを復元できることをシミュレーションで実証した[3]
- 2 つの非線形光学結晶を用いたカスケードパルス内差周波発生を用いた相補振動分光法を開発し、振動分光の両翼である赤外分光とラマン分光を同時にかつ広帯域に計測できることを実証した[4]。
- レーザー光源を用いた広帯域赤外分光に用いることのできる簡便な赤外フェムト秒パルスレーザーの開発にも成功した[5]。
- 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」に非線形光学によるアップコンバージョン技術を導入し、計測可能スペクトル点数を大幅に向上し、また、気体分子の分光が可能な高スペクトル分解能を実現した[6]。

### (2) 細胞内熱拡散のラベルフリー計測

開発した中赤外フォトサーマル定量位相顕微鏡を用いて細胞内の熱拡散率の定量を行い、核、細胞質の異なる場所において、水の熱拡散率に対して 93-94%程度という結果を得た。これは蛍光温度プローブを用いた熱拡散率 (および熱伝導率) の計測で得られていた極端に小さな値とは大きく異なる結果である。

### (3) 細胞内温度のラベルフリー計測

開発した中赤外フォトサーマル定量位相顕微鏡を用いて赤外光による水の振動励起で加熱した際の細胞内の温度変化を計測し、蛍光温度プローブを用いた場合との比較を行った。秒スケールの加熱計測において、蛍光温度プローブで数度にわたり変化する温度上昇がみられたのに対し、ラベルフリー計測では一定の温度上昇が見られた。ラベルフリー計測の結果は(2)で得られた熱拡散率で細胞内の熱が拡散することと辻褃が合う結果である。これらの結果から、蛍光温度プローブは温度で決まる熱エネルギーとは異なる内部エネルギーの影響も受けうることを示唆される。

#### < 引用文献 >

- [1] Genki Ishigane, Keiichiro Toda, Miu Tamamitsu, Hiroyuki Shimada, Venkata Ramaiah Badarla, Takuro Ideguchi, "Mid-infrared photothermal single-live-cell imaging beyond video rate," arXiv:2208.11969
- [2] Kazuki Hashimoto, Venkata Ramaiah Badarla, Takuro Ideguchi, "High-speed Fourier-transform infrared spectroscopy with phase-controlled delay line," Laser & Photonics Reviews 15, 2000374 (2021)
- [3] Akira Kawai, Takahiro Kageyama, Ryoichi Horisaki, Takuro Ideguchi, "Compressive dual-comb spectroscopy," Scientific Reports 11, 13494 (2021)
- [4] Kazuki Hashimoto, Venkata Ramaiah Badarla, Takayuki Imamura, Takuro Ideguchi, "Broadband complementary vibrational spectroscopy with cascaded intra-pulse difference frequency generation," Optics Letters 46, 5517-5520 (2021)
- [5] Takuma Nakamura, Venkata Ramaiah Badarla, Kazuki Hashimoto, Peter G. Schunemann, Takuro Ideguchi, "Simple approach to broadband mid-infrared pulse generation with a mode-locked Yb-doped fiber laser," Optics Letters 47, 1790-1793 (2022)
- [6] Kazuki Hashimoto, Takuma Nakamura, Takahiro Kageyama, Venkata Ramaiah Badarla, Hiroyuki Shimada, Ryoich Horisaki, Takuro Ideguchi, "Upconversion time-stretch infrared spectroscopy," Light: Science & Applications 12, 48 (2023)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hashimoto Kazuki, Nakamura Takuma, Kageyama Takahiro, Badarla Venkata Ramaiah, Shimada Hiroyuki, Horisaki Ryoich, Ideguchi Takuro	4. 巻 12
2. 論文標題 Upconversion time-stretch infrared spectroscopy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Light: Science & Applications	6. 最初と最後の頁 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41377-023-01096-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 戸田圭一郎、玉光未侑、石金元気、井手口拓郎	4. 巻 51
2. 論文標題 中赤外光熱ホログラフィック顕微鏡	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 光学	6. 最初と最後の頁 219-225
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 戸田圭一郎、玉光未侑、井手口拓郎	4. 巻 51
2. 論文標題 アダプティブダイナミックレンジシフト定量位相顕微鏡	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 光学	6. 最初と最後の頁 265
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 井手口拓郎	4. 巻 50
2. 論文標題 赤外フォトサーマル定量位相顕微鏡	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 レーザー研究	6. 最初と最後の頁 442-446
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 井手口拓郎	4. 巻 622
2. 論文標題 次世代赤外分光	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 現代化学	6. 最初と最後の頁 30-31
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 Nakamura Takuma, Ramaiah Badarla Venkata, Hashimoto Kazuki, Schunemann Peter G., Ideguchi Takuro	4. 巻 47
2. 論文標題 Simple approach to broadband mid-infrared pulse generation with a mode-locked Yb-doped fiber laser	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Optics Letters	6. 最初と最後の頁 1790 ~ 1790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/OL.450921	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 該当する

1. 著者名 Hashimoto Kazuki, Ramaiah Badarla Venkata, Imamura Takayuki, Ideguchi Takuro	4. 巻 46
2. 論文標題 Broadband complementary vibrational spectroscopy with cascaded intra-pulse difference frequency generation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Optics Letters	6. 最初と最後の頁 5517 ~ 5517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/OL.444003	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 Kawai Akira, Kageyama Takahiro, Horisaki Ryoichi, Ideguchi Takuro	4. 巻 11
2. 論文標題 Compressive dual-comb spectroscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-93005-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto Kazuki、Badarla Venkata Ramaiah、Ideguchi Takuro	4. 巻 15
2. 論文標題 High Speed Fourier Transform Infrared Spectroscopy with Phase Controlled Delay Line	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Laser & Photonics Reviews	6. 最初と最後の頁 2000374 ~ 2000374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lpor.202000374	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 戸田圭一郎, 玉光未侑, 井手口拓郎	4. 巻 6
2. 論文標題 中赤外フォトサーマル定量位相顕微鏡による生細胞の非標識分子イメージング	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 フォトニクスニュース	6. 最初と最後の頁 137 ~ 141
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 -

[学会発表] 計48件(うち招待講演 29件/うち国際学会 21件)

1. 発表者名 Takuro Ideguchi
2. 発表標題 Advanced mid-infrared spectroscopy and microscopy
3. 学会等名 11th Advanced Lasers and Photon Sources (ALPS2022) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuki Hashimoto, Takuma Nakamura, Takahiro Kageyama, Venkata Ramaiah Badarla, Hiroyuki Shimada, and Takuro Ideguchi
2. 発表標題 Mid-Infrared Upconversion Time-Stretch Spectroscopy
3. 学会等名 CLE02022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satoko Yagi, Kazuki Hashimoto, Takuma Nakamura, Shotaro Kawano, Venkata Ramaiah Badarla, Hiroyuki Shimada, and Takuro Ideguchi
2. 発表標題 Mid-Infrared Time-Stretch Optical Coherence Tomography
3. 学会等名 CLEO2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takuro Ideguchi
2. 発表標題 Mid-Infrared Photothermal Quantitative Phase Imaging (MIP-QPI)
3. 学会等名 CLEO2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井手口拓郎
2. 発表標題 赤外フォトサーマル定量位相顕微鏡
3. 学会等名 量子生命科学会第4回大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takuro Ideguchi
2. 発表標題 High-speed mid-infrared spectroscopy and microscopy
3. 学会等名 Atoms, Molecules and Clusters in Motion conference (AMOC2022) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井手口拓郎
2. 発表標題 超高速振動分光および顕微イメージング
3. 学会等名 第3回レーザープロセッシング先端技術と応用調査専門委員会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Genki Ishigane, Keiichiro Toda, Miu Tamamitsu, Hiroyuki Shimada, Takuro Ideguchi
2. 発表標題 High-speed Live-cell Vibrational Imaging with a Mid-infrared Photothermal Quantitative Phase Microscope
3. 学会等名 CLEO Pacific Rim (CLEO-PR) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石金 元気、戸田 圭一郎、玉光 未侑、島田 紘行、井手口 拓郎
2. 発表標題 中赤外フォトサーマル定量位相顕微鏡によるビデオレート生細胞分子振動イメージング
3. 学会等名 第83回応用物理学会秋季学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takuro Ideguchi
2. 発表標題 High-speed mid-infrared spectroscopy and microscopy
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 Shotaro Kawano, Keiichiro Toda, Haruyuki Sakurai, Kuniaki Konishi, Takuro Ideguchi
2. 発表標題 Time-Resolved Complex Optical-Field Imaging of Laser Ablation Dynamics
3. 学会等名 IEEE Photonics Conference (IPC) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井手口拓郎
2. 発表標題 中赤外フォトサーマル定量位相顕微鏡
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takuro Ideguchi
2. 発表標題 Mid-infrared photothermal quantitative phase imaging with high signal-to-noise ratio
3. 学会等名 SPIE. Photonics West (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井手口拓郎
2. 発表標題 中赤外フォトサーマル定量位相顕微鏡による単一生細胞イメージング
3. 学会等名 第70回応用物理学会春季学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takuma Nakamura, Kazuki Hashimoto, Takuro Ideguchi
2. 発表標題 Time-Stretch Coherent Raman Scattering Spectroscopy Running at 50,000,000 Spectra/s
3. 学会等名 CLEO2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takuro Ideguchi
2. 発表標題 ideo-rate live-cell imaging with mid-infrared photothermal quantitative phase imaging (MIP-QPI)
3. 学会等名 Biomedical Raman Imaging (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takuro Ideguchi
2. 発表標題 High-speed mid-infrared spectroscopy and microscopy with high signal-to-noise ratio
3. 学会等名 High-Resolution Molecular Spectroscopy (HRMS) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井手口 拓郎
2. 発表標題 先端振動分光および顕微鏡
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第42回年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井手口 拓郎
2. 発表標題 先端レーザー技術を用いた赤外分光および顕微鏡
3. 学会等名 日本分光学会赤外・ラマン分光部会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井手口 拓郎
2. 発表標題 先端レーザー技術を用いた振動分光および顕微鏡
3. 学会等名 第5回日本光学会関西支部講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takuro Ideguchi
2. 発表標題 Advanced vibrational spectroscopy and microscopy for biochemical analysis
3. 学会等名 13th European Biophysics Conference, EBSA2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takuro Ideguchi
2. 発表標題 Mid-infrared photothermal quantitative phase imaging
3. 学会等名 Photonics West, Proc. SPIE 11656, Advanced Chemical Microscopy for Life Science and Translational Medicine 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takuro Ideguchi
2. 発表標題 High-speed vibrational spectroscopy using nonlinear optical sources
3. 学会等名 Photonics West, Proc. SPIE 11670, Nonlinear Frequency Generation and Conversion: Materials and Devices XX (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井手口拓郎
2. 発表標題 先端光技術による赤外分光および顕微鏡
3. 学会等名 第6回超高速光エレクトロニクス研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井手口 拓郎
2. 発表標題 先端ラベルフリー振動分光および顕微鏡
3. 学会等名 第一回研究会「科学技術イノベーションを創成する先進システムナノ技術」電子情報通信学会エレクトロニクスソサイエティ、システムナノ技術に関する特別研究専門委員会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井手口 拓郎
2. 発表標題 先端光技術によるラベルフリー振動分光および顕微鏡
3. 学会等名 国際画像機器展2020日本映像処理研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takuro Ideguchi
2. 発表標題 Next-generation Mid-infrared Spectroscopy and Microscopy with Various Laser Sources
3. 学会等名 OSA High-brightness Sources and Light-driven Interactions Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takuro Ideguchi
2. 発表標題 Advanced vibrational spectroscopy and microscopy
3. 学会等名 CLEO Pacific Rim (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 M. Tamamitsu, K. Toda, T. Ideguchi
2. 発表標題 Label-free biochemical refractive-index tomography of single cells with mid-infrared photothermal effect
3. 学会等名 Imaging and Applied Optics Congress (OSA) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 K. Toda, M. Tamamitsu, T. Ideguchi
2. 発表標題 Dynamic-range-expanded quantitative phase imaging
3. 学会等名 Imaging and Applied Optics Congress (OSA) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 K. Hashimoto, V. Badarla, T. Ideguchi
2. 発表標題 Mid-infrared phase-controlled Fourier-transform spectroscopy
3. 学会等名 CLEO (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akira Kawai, Tatsuo Dougakiuchi, Venkata Ramaiah Badarla, Kazuki Hashimoto, Takayuki Imamura, Tadataka Edamura, and Takuro Ideguchi
2. 発表標題 Mid-infrared time-stretch spectroscopy
3. 学会等名 CLEO (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 K. Hashimoto, V. Badarla, T. Ideguchi
2. 発表標題 Ultra-broadband complementary vibrational spectroscopy with cascaded intra-pulse difference frequency generation
3. 学会等名 CLEO (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 画像生成装置、画像生成方法およびプログラム	発明者 井手口拓郎、堀崎遼一、上條叡、藏田力丸、戸田圭一郎、石	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-199721	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 タイムストレッチ光測定器およびタイムストレッチ分光法	発明者 井手口拓郎、橋本和樹、影山豪大、中村卓磨、島田紘行	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-201928	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------