

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04987

研究課題名(和文)電子制御波長可変中赤外線レーザーによる生体内糖鎖イメージング

研究課題名(英文)In vivo sugar chain imaging by electronically tunable mid-IR laser

研究代表者

前田 康大 (Maeda, Yasuhiro)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・技師

研究者番号：10611733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：電子制御波長可変中赤外線レーザー光源の広帯域化を実施し、当初は約2.2-2.7 μm までの利用に限定されていた発振波長域を、レーザー共振機内差周波発生(DFG)を適用することによって、中分子イメージングにより適した8-9 μm 帯へ高効率に拡張することに成功した。また、中赤外線励起位相差顕微鏡による分子イメージングの技術的実証を行った。これらの成果から、電子制御波長可変中赤外線レーザー光源を用いた生体内分子イメージング技術を構築する為の基礎的な技術を確立したと言える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は中赤外線を利用した簡便かつ高度な中分子イメージングを実現するための基礎的な技術の検証を行った。中分子イメージングは現在研究開発が進められている中分子創薬の分野において重要な役割を果たすと期待される。中分子創薬には迅速かつ簡便にその機能性を検証する技術が求められている。具体的にはドラッグデリバリーの可視化が迅速かつ簡便になれば創薬のスピードも加速すると考えられる。本研究の成果は簡便・迅速な中赤外線を用いた中分子イメージング技術につながる、学術的にも社会的にも重要な成果であると言える。

研究成果の概要(英文)：We have successfully expanded the initially limited oscillation wavelength range, which was originally restricted to approximately 2.2-2.7 μm , for use in mid-infrared (mid-IR) imaging to the 8-9 μm range, which is more suitable for molecular imaging, by implementing difference frequency generation (DFG) in the laser resonator. Additionally, we performed technical demonstrations of molecular imaging using mid-IR excitation phase-contrast microscopy. Based on these achievements, it can be said that we have established the fundamental technology necessary to develop in vivo molecular imaging techniques using an electronically controlled wavelength-variable mid-infrared laser light source.

研究分野：バイオイメージング

キーワード：中赤外線 糖鎖 位相差顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

細胞表面に存在する糖鎖や、細胞に取り込まれる糖鎖腫瘍マーカーの局在を無標識で可視化するために、これまでにフーリエ変換赤外分光(Fourier Transform Infrared: FT-IR)法を含む赤外吸収分光法やラマン散乱分光法などの振動分光法を基にした手法が多く用いられてきた。これらの手法は無標識で分子の局在を可視化する手法として有用であるが、生体試料から得られる信号強度が極めて微弱なため、長時間の計測が必要となる。ラマン分光法では自家蛍光による背景光の増加とそれに伴う信号雑音強度比(SNR)の低下、赤外吸収分光法ではランプ光源から得られる照明光が微弱なため、得られる信号強度もまた微弱であるといった欠点がある。十分なSNRをもった信号を試料から得るためには長時間の露光が必要となり、結果として計測も長時間にわたることになる。無標識で生体内にある糖鎖に関する情報を迅速に可視化することができれば、大量の腫瘍組織から得た病理切片の糖鎖を利用した病理診断や、短時間で変化する薬剤の分布変化を追跡するといった医療現場や研究の場における大幅な作業効率の向上を見込むことができ、作業者の負担低減にも繋がる。短時間での計測で細胞や生体試料における糖鎖の局在を無標識で可視化するためには、より強度の高い光源技術と、高速な分光性能が必要である。

2. 研究の目的

実用的な糖鎖イメージング技術の確立に当たって、高強度かつ波長可変性の高い電子制御波長可変中赤外レーザーから得られるレーザー光を励起光として利用した高速・高感度中赤外分光イメージング技術を開発し、細胞表面に存在する糖鎖や、糖鎖腫瘍マーカーなど薬剤の生体内挙動のイメージングが可能である事を実証することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 電子波長制御 Cr:ZnSe レーザーの波長掃引領域の拡張

中赤外光を利用した中分子イメージングを実現するにあたって、既存の中赤外波長可変レーザーの波長掃引領域の拡張と高出力化を試みた。基礎となる中赤外波長可変レーザーには、レーザー材料に Cr:ZnSe を利用した電子波長制御 Cr:ZnSe (ET-Cr:ZnSe) レーザーを利用した。Cr:ZnSe は中赤外域における Ti:Al₂O₃ とも呼ばれ、2-3 μm 帯の広域な発光スペクトルと大きな誘導放出断面積を併せ持つため、高効率な 2-3 μm 帯の中赤外波長可変レーザーを構成できる。さらに非線形周波数下方変換と組み合わせることで、分子の指紋領域(7-20 μm)にアクセスでき、微量ガス分析や生体試料のラベルフリーイメージングへ展開できる。

本研究では、Cr:ZnSe レーザーの周波数下方変換として差周波発生 (DFG: Difference Frequency Generation) を利用する。DFG は、広範なパラメーター空間の制御性は高いが、2台の励起光源が必要でありシステムが複雑化する課題がある。それを回避する手段として、レーザー利得媒体に加えて非線形光学結晶を共振器内に配置し、励起光(ω_p)とレーザーの誘導放出(ω_L)を利用して DFG ($\omega_i = \omega_p - \omega_L$) を引き起こす共振器内 DFG (以下、intra-DFG) または1台の励起光源(ω_p)からレーザーの誘導放出 (ω_L)と DFG ($\omega_i = \omega_p - \omega_L$)を同じレーザー利得媒体にて連鎖で引き起こす自己差周波発生(以下、self-DFG)がある。Cr:ZnSe を利得媒体として使用した場合、その広域な蛍光スペクトル領域により、レーザー誘導放出(ω_L)の波長選択の自由度が高く、広い中赤外領域で DFG の波長選択が可能になる。

本研究では、ET-Cr:ZnSe レーザーの共振器内に非線形光学結晶である ZnGeP₂ (ZGP)を配置した intra-DFG (図 1(a)) と、Cr:ZnSe によるランダム疑似位相整合条件下での self-DFG (図 1(b)) を実証する。これにより ET-Cr:ZnSe レーザーの波長掃引領域を拡張する。

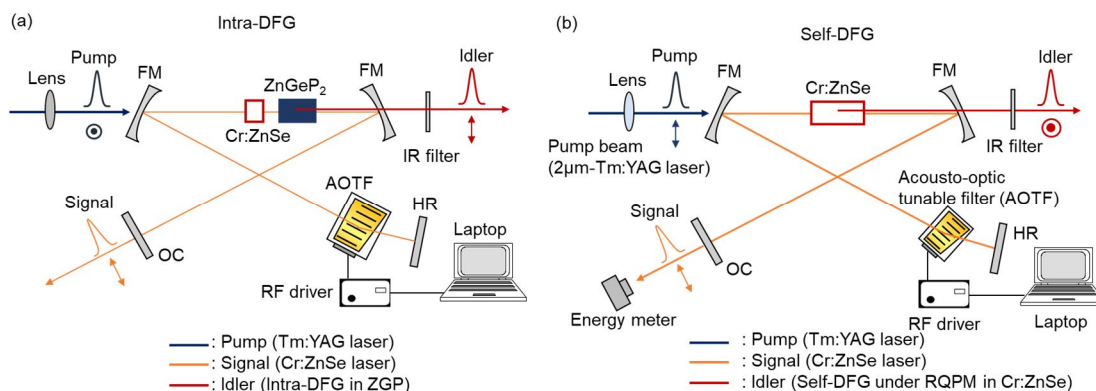


図1 (a) intra-DFG と(b) self-DFG における実験装置の概略図

(2) イメージング装置

イメージング装置は中赤外線をサンプルに照射し、透過光を検出する中赤外吸収分光イメージング光学系(図2)と、中赤外線を励起光源とし、それによって励起された分子が熱をもつことによって生じる屈折率変化を可視光によって捉える位相差顕微鏡光学系(図3)によって検出する方法の2種類を試験した。いずれの方法も電子制御波長可変中赤外線レーザーの特徴である狭線幅・高速波長制御を利用してあり、特定の分子振動のみを励起する。前者はある波長における吸収の分布の可視化することができ、特定の分子振動の空間分布を可視化できると期待される。後者はある波長の中赤外線が照射された際にその波長を吸収する分子のみが励起され、その後緩和する。その際に吸収されたエネルギーは熱として放出されるためその分子の温度は上昇し、それに伴って屈折率変化が生じる。その屈折率変化を、可視光を用いた位相差顕微鏡光学系で検出する事で特定の分子の空間分布を可視化することができる。それぞれの光学系をもちいて分子のイメージングを実施した。

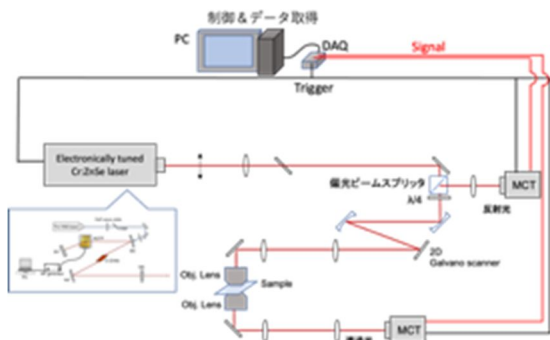


図2 透過型顕微鏡光学系

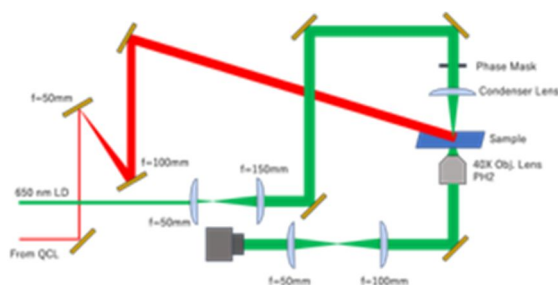


図3 位相差顕微鏡光学系

4. 研究成果

(1) 電子波長制御 Cr:ZnSe レーザーの波長掃引領域の拡張

図4(a)に intra-DFG においてレーザー共振器内の ZGP の位相整合角を $50.3^\circ, 50.4^\circ, 50.5^\circ, 50.6^\circ, 50.7^\circ$ に固定した状態で、ET-Cr:ZnSe レーザーの発振波長を変化させたときの DFG の波長掃引領域を示す。ここで励起エネルギーは 20mJ とした。位相整合角が $50.3^\circ, 50.4^\circ, 50.5^\circ, 50.6^\circ, 50.7^\circ$ の場合、それぞれ $8.3\text{--}9.2\ \mu\text{m}, 8.4\text{--}9.5\ \mu\text{m}, 8.3\text{--}9.9\ \mu\text{m}, 8.5\text{--}10.1\ \mu\text{m}, 9.0\text{--}11.0\ \mu\text{m}$ の波長可変領域が得られた。長い波長領域ほど ZGP の吸収損失により、出力エネルギーが低下するものの、例えば位相整合角を $50.3^\circ, 50.5^\circ, 50.7^\circ$ の3ポイントのみを選択するだけで、 $8.3\text{--}11\ \mu\text{m}$ の非常に広帯域の中赤外領域で DFG の波長掃引が可能になる。このとき、ET-Cr:ZnSe レーザーで波長掃引する領域は、 $2.46\text{--}2.66\ \mu\text{m}$ であった。

次に、図4(b)に self-DFG における波長掃引領域を示す。このときの励起光エネルギーは 2mJ とした。ET-Cr:ZnSe レーザーの波長を $2.41\text{--}2.81\ \mu\text{m}$ の領域でスキャンすると、DFG の出力として $7.1\text{--}10.9\ \mu\text{m}$ の波長可変領域が確認された。また Cr:ZnSe の温度を変化させたところ、温度上昇にともない $8.25\ \mu\text{m}$ 近傍を境界にして、相対強度が長波長側に比べて短波長側が大きくなっている。これは熱膨張により Cr:ZnSe のグレインサイズが大きくなり、ランダム疑似位相整合のミスマッチが生じているからと考えられる。また、波長 $9.5\ \mu\text{m}$ 近傍から出力がなだらかに減少し $11\ \mu\text{m}$ より長波長領域の出力が確認できない。これは FM (フォールディングミラー) の基板に CaF_2 が利用されているためであり、ZnSe 基板の FM を利用することで $11\ \mu\text{m}$ より長波長領域の出力も確認された(図5)。

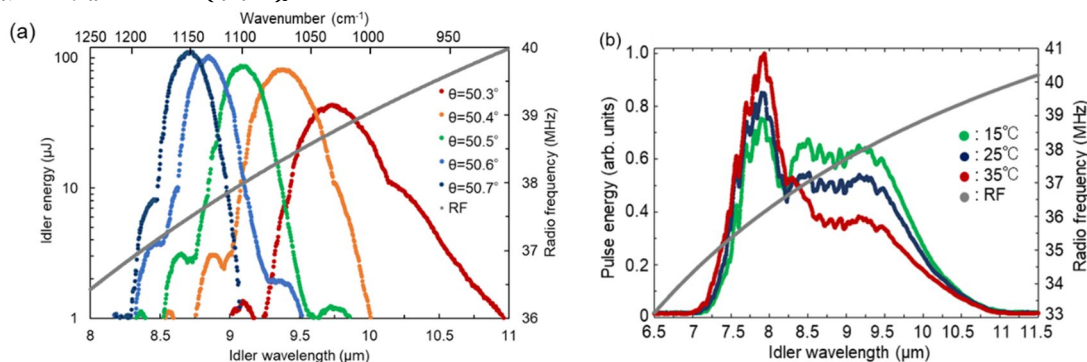


図4 (a) intra-DFG と(b) self-DFG における波長掃引領域

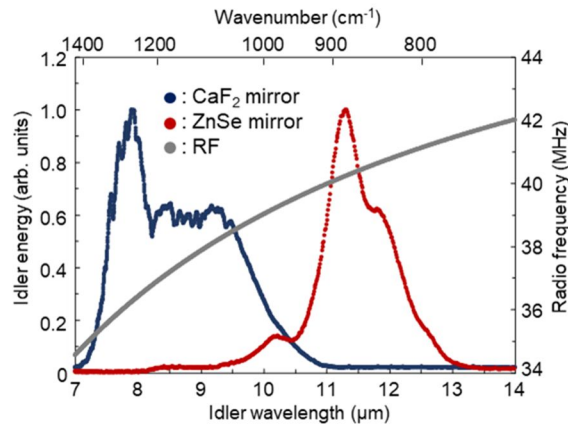


図 5 FM 基板に CaF₂ と ZnSe を利用した場合の self-DFG における波長掃引領域

(2) 中赤外線イメージング

最初に、モデルサンプルの中赤外線領域における光吸収分光を FT-IR 分光器を用いて計測を実施し、イメージングに最適な波長情報の取得を行った。作成したモデルサンプルはグルコース、フコース、シクロデキストリン、ポリスチレングリコール、ラクツシルフルクシド、スタキオース、ラクトースの濃度の異なる水溶液である。濃度は生体内濃度を想定してナノからマイクロモル濃度になるよう調整した。この計測における濃度では水の吸収が強く、十分な信号雑音比を得る事が困難であることが確認された。

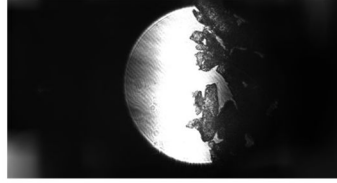
次に位相差顕微鏡光学系によるイメージングを試みた。この光学系では蒸留水に混合したセルロースについて、観察を行った。中赤外線光源の波長をセルロースの C-O 伸縮振動 (1000cm^{-1} 近傍) に対応する $10.5\mu\text{m}$ (952.4cm^{-1}) と、吸収の小さい 961.5cm^{-1} に相当する $10.4\mu\text{m}$ に設定し、それぞれ照射あり・なしの画像を可視光位相差顕微鏡光学系で取得、差分を算出することで特定分子が中赤外線によって励起されている様子を観察した。図 6 に $10.5\mu\text{m}$ で励起した場合と $10.4\mu\text{m}$ で励起した場合の差分を算出した結果を示す。両者を比較すると、 $10.5\mu\text{m}$ で励起した場合の方が明らかに可視光の位相差画像の光強度が大きいことが分かる。つまり、 $10.5\mu\text{m}$ で励起した場合の方が明らかに赤外吸収が強く、屈折率変化が大きくなった結果であると推察される。これらの結果から、中赤外線照射による屈折率変化を捉えていると言え、この装置が中赤外線励起位相差顕微鏡として機能していることを実証した。

(a) MIR: $10.5\mu\text{m}$

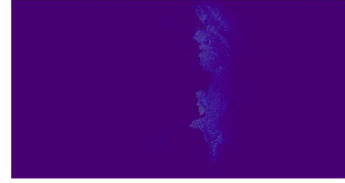
MIR: OFF



MIR: ON



OFF-ON

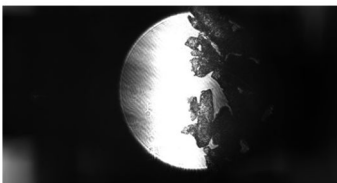


(b) MIR: $10.4\mu\text{m}$

MIR: OFF



MIR: ON



OFF-ON



また、この実験結果は水を多く含む試料であっても目標の分子まで励起光が到達していれば、可視光を用いた位相差顕微鏡画像の取得が可能である事を示唆している。

電子制御波長可変中赤外線レーザーの高い波長操作性と波長分解能と位相差顕微鏡光学系を組み合わせることで、既に報告されているフォトサーマル顕微鏡よりも優れた分光特性を実現できると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyata Kentaro, Yumoto Masaki, Kawata Yasushi, Wada Satoshi, Imai Shinichi	4. 巻 12405
2. 論文標題 Noncritically phase-matched self-difference frequency generation using transition-metal doped chalcogenides	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings Volume 12405, Nonlinear Frequency Generation and Conversion: Materials and Devices XXII;	6. 最初と最後の頁 1240507
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1117/12.2653039	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 Yumoto Masaki, Miyata Kentaro, Kawata Yasushi, Wada Satoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Mid-infrared electronic wavelength tuning through intracavity difference-frequency mixing in Cr:ZnSe lasers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3383-3386
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-20914-0	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 Miyata Kentaro, Yumoto Masaki, Kawata Yasushi, Imai Shinichi, Wada Satoshi	4. 巻 47
2. 論文標題 Parametric downconversion via vibronic transition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Optics Letters	6. 最初と最後の頁 3383 ~ 3383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1364/OL.460560	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 M. Yumoto, K. Miyata, Y. Kawata, and S. Wada
2. 発表標題 Mid-Infrared Electronic Wavelength Tuning via Intracavity Difference-Frequency Mixing in Cr:ZnSe Laser
3. 学会等名 Advanced Solid State Lasers 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022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
研究 分担 者	湯本 正樹 (Yumoto Masaki) (60585157)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・エレクトロニクス・ 製造領域・主任研究員 (82626)	

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
---------	---------