

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20505

研究課題名(和文) コヒーレントラマン分光と信号飽和を利用した観察対象を指定しない超解像顕微鏡の開発

研究課題名(英文) Coherent Raman microspectroscopy with signal saturation for super resolution label-free imaging

研究代表者

桶谷 亮介 (Oketani, Ryosuke)

九州大学・理学研究院・助教

研究者番号：00908890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、コヒーレントアンチストークスラマン散乱(CARS)とその信号飽和を用い、観察後に試料内部の観察対象を指定できる超解像観察法を開発することを目的とした。飽和信号の取得とそれを用いた超解像観察を可能にする顕微分光装置を開発し、評価と測定を行った。構築装置で取得したCARSスペクトルに一部ピーク欠損が見られた。色収差が原因であることを見出し、新たに色収差補正法を開発・広帯域スペクトルの取得に成功した。また、CARSスペクトルの強度依存性を測定し、CARS信号の飽和応答が分子振動モードにより異なることを発見した。これらの成果は無標識超解像顕微分光観察を達成するための基盤となり得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白色光を用いたCARS分光顕微鏡において、信号飽和の励起が可能であることを示した。また、CARS信号の飽和特性が分子振動モードによって異なることを発見した。この成果は、観察後に試料内部の観察対象を指定できる超解像観察法の可能にするための基盤技術となりうる。また、色収差解決のために開発した補正方法は、他の非線形光学顕微鏡にも応用できる可能性がある。色収差によってこれまで達成できなかった、近赤外域の白色光の利用が顕微鏡開発で進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop a super resolution microscopy using coherent anti-stokes Raman scattering and its saturation, which allows us to specify the object to be observed inside the sample after observation. The developed system includes CARS spectroscopic imaging part and measurement system of signal saturation. Measured CARS spectra showed some peak defects, which is presumably due to chromatic aberration in high numerical aperture measurement. We developed a correction method to the chromatic aberration and succeeded in obtaining broadband spectra without any peak defects. We also measured the excitation intensity dependence of the CARS spectrum and found that the saturation of the CARS signal depends on the molecular vibration mode. These results can be a basis achieving label-free super-resolution microspectroscopy.

研究分野：光工学

キーワード：光学顕微鏡 超解像観察 ラベルフリー コヒーレントラマン 分光イメージング CARS

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光学顕微鏡は、非破壊・低侵襲な観察手法であるため、生きた細胞試料などの微細構造を観察するために広く用いられてきた。近年は、超解像観察技術の発展により、回折限界を超えた空間分解能による観察が可能になり、その応用範囲をさらに拡大してきた。

超解像顕微鏡の多くは、蛍光の非線形応答を用いて達成されている。観察対象に付加した蛍光分子の蛍光飽和、蛍光抑制、光スイッチング特性などの非線形応答を利用することで、蛍光発光を空間的あるいは時間的に制御し、従来よりも小さな領域からの信号を区別することに成功した。これらの技術は、2014年にノーベル化学賞を受賞したことでさらに注目を浴び、多色化、高速化など、さらなる研究開発が行われてきた。

超解像蛍光顕微鏡法で制限となるのが、「観察対象を事前に指定しなければならない」ということである。蛍光顕微鏡では、観察対象に対して、事前に蛍光分子を付加する必要があるため、試料作製段階で観察対象の決定が必要となる。しかし、測定する現象やその原因因子が未知の場合、観察対象を事前に指定することは難しい。そのため、顕微鏡観察において、未知の現象を発見・解明するためには、試料内の細胞内小器官や分子を、「網羅的に」かつ「高い空間分解能」で観察する手法が期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、分子振動分光法と超解像顕微鏡法を組み合わせることで、観察後に試料内部の観察対象を指定できる超解像観察法を開発することである。ラマン散乱を用いた分子振動分光法を採用することで、試料の分子分布を無標識で可視化することができ、試料調整時に観察対象を事前指定する必要がなくなる。また、分光検出を行うことで、試料内分子の構成をスペクトルとして、網羅的に取得可能である。これらを超解像技術と組み合わせることで、測定対象を事前指定しない超解像顕微鏡の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) 白色光を用いた超解像非線形ラマン顕微鏡の構築

開発した手法は、白色光を用いたコヒーレントアンチストークスラマン散乱(CARS)分光顕微鏡と差分型飽和励起顕微鏡を組み合わせたものである。構築済みのCARS顕微鏡を改良し、超解像観察が可能な系の構築を行なった。

CARS顕微鏡では、振動数の異なる2種類の光源を用いて、その差に相当する分子振動をラマン散乱として高い光強度検出できる。一方の光源に白色光を用いて複数の分子振動モードを同時に励起することで、ラマンスペクトルの取得が可能になる。

差分型飽和励起顕微鏡では、信号光の飽和を利用する。信号光の飽和はレーザー走査顕微鏡の照明スポット中心部で生じるため、飽和信号を検出することでスポットサイズ以下の領域のみからの信号を区別でき、空間分解能が向上できる。

CARS顕微鏡の超解像観察を可能にするために、照明対物レンズの開口数(NA)を効果的に利用する照明系の開発を行った。しかし、NAを効果的に利用することによる色収差の問題が白色照明に発生したため、新たに色収差補正方法の開発を行った。対物瞳面パターンを空間変調することで、照明スポットの形状を変化させ、色収差の補正を試みた。

(2) CARS 信号飽和測定装置の導入と飽和測定

CARS 信号の飽和特性を測定するため、CARS スペクトルの励起強度依存性を測定する装置を顕微鏡に導入した。まず、励起光強度を一定間隔で変更するために電動可変 ND フィルターを導入した。励起光強度を変化させながら、試料の定点・あるいは空間平均スペクトルを取得するために、制御システムの開発を行った。開発したシステムで、CARS スペクトルの各分子振動に対して、ピーク強度の励起光強度依存性を測定した。

4. 研究成果

(1) 白色光を用いた超解像非線形ラマン顕微鏡の構築

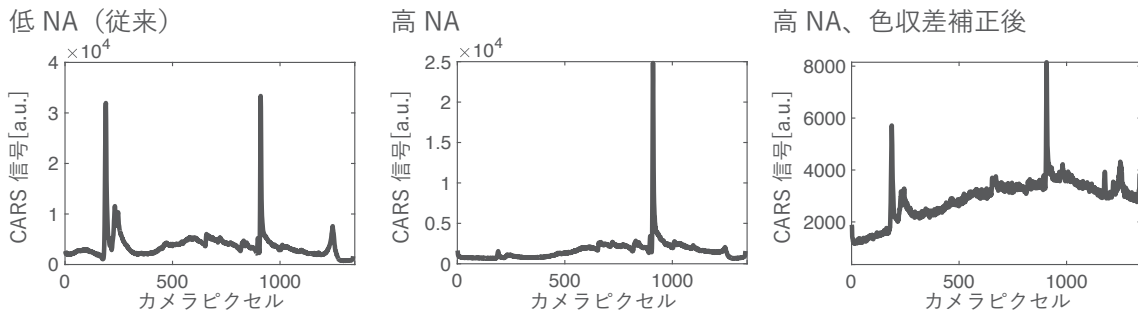


図1 構築した CARS 分光顕微鏡によるポリスチレンビーズの CARS スペクトル。スペクトルが広帯域に取得できていた低 NA の場合に比べ、高 NA では色収差のため、一部が欠損した。色収差補正を行うことで、高 NA でも広帯域のスペクトルを取得することに成功した。

構築した顕微鏡で CARS 分光顕微鏡観察を行った。ポリスチレンビーズの測定では、照明対物レンズの NA を効果的に利用したことで、空間分解能の向上が見られた。しかし、同時取得した CARS では、一部のピークの欠損が確認された (図 1)。検証により色収差が原因と考えられたため、新たに開発・導入した色収差補正法を適用したところ、高 NA の場合でもピークの欠損なくスペクトルを取得することに成功した。これにより、超解像 CARS 分光顕微鏡の達成に向けた基盤技術の確立が完了した。

(2) CARS 信号飽和測定装置の導入と飽和測定

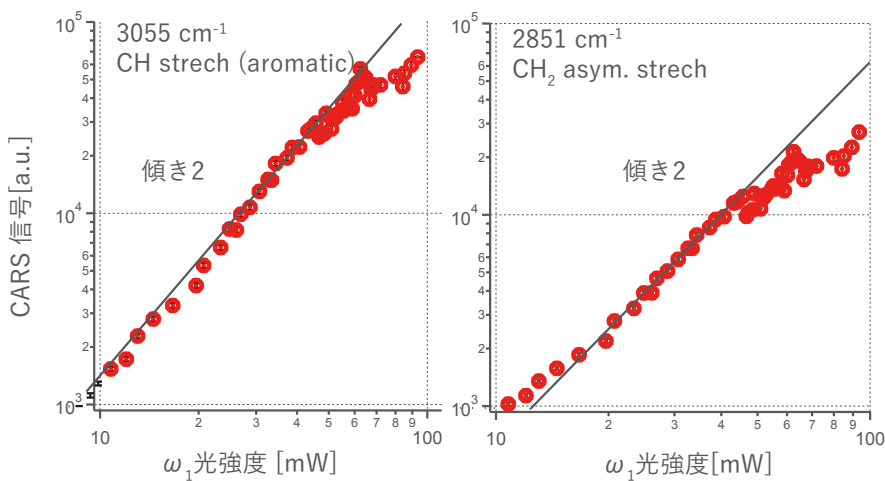


図2 構築した CARS 信号飽和測定装置による CARS 信号の励起光強度依存性。直径 10 μm のポリスチレンビーズを使用。

構築した CARS 信号飽和測定装置を用いて、CARS スペクトルの励起光強度依存性を測定した。白色光源の光強度は一定にし、もう一方の単色光源の強度を変化させた。図 2 に測定したスペクトルのうち、aromatic CH 伸縮振動と CH_2 非対称伸縮振動に対応するピークの強度依存性を示す。

高い励起光強度において、共に CARS 信号の飽和が検出された。また、分子振動によって飽和特性が異なることを発見した。これらの測定結果は、白色光を用いた超解像非線形ラマン顕微鏡において、飽和を用いた超解像観察が実現可能であることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	加納 英明 (Kano Hideaki)	九州大学・理学研究院・教授 (17102)	
研究協力者	田中 京介 (Tanaka Kyosuke)	九州大学・理学府・学生 (17102)	

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