

令和 3 年 10 月 21 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14717

研究課題名（和文）広視野高速3D分子マッピングのためのスナップショットラマン分光顕微鏡の開発

研究課題名（英文）Snapshot Raman microscopy for wide-field 3D molecular mapping

研究代表者

市村 垂生 (Ichimura, Taro)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・上級研究員

研究者番号：50600748

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：ミリメートルの生体組織試料の蛍光およびラマン散乱の分光イメージングの高速化を目指し、新規手法を提案・開発した。従来のレーザー走査方式ではなく、2次元分光イメージングとComputed Tomographyに基づく逆問題の考え方を組み合わせて、1度の撮像により、元の3次元画像（空間2次元+波長1次元）を取得する方法を確立した。複数の異なる波長の量子ドットを用いた検証実験とシミュレーションにより、本提案手法の有効性を示すことができた。本手法は、他の様々な分光イメージングを高速化できるため、幅広い応用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顕微鏡イメージングによる画像取得は分布、形状の情報を与えてくれるが、分光計測によるスペクトル取得は分子種や分子の状態などの詳細な情報を与えてくれる。これらを同時に実施する「分光イメージング」は、生命システムの動作原理を解明するための研究には有効な手段となるため、その技術開発は重要な研究課題であった。本研究では、分光イメージングを高速化できる手法を提案・開発し、その有効性を実証することで、将来的に生命システム解明研究に貢献できる可能性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：We proposed and developed a novel method for faster spectroscopic imaging of fluorescence and Raman scattering of millimeter-sized biological tissue samples. By combining 2D spectroscopic imaging with the concept of inverse problem based on Computed Tomography, instead of the conventional laser scanning method, we have established a method to acquire the original 3D image (2D in space + 1D in wavelength) with a single imaging. Verification experiments and simulations using quantum dots of several different wavelengths have shown the effectiveness of the proposed method. The proposed method is expected to have a wide range of applications because it can accelerate various other spectroscopic imaging.

研究分野：バイオイメージング

キーワード：ラマン散乱分光 顕微分光 蛍光分光

1. 研究開始当初の背景

近年、生命科学において、細胞塊や組織内を一細胞レベルの空間分解能・感度で計測する必要性が増している。細胞集団内での非均一性が、細胞の分化・発生のカギを握っていると考えられており、その分布、時間発展を計測し、生物学的な意義を明らかにしようという潮流がある。また、脳神経科学分野では、全脳内の一細胞マッピングの必要性が叫ばれていて、様々なイメージング法が提案されている。

細胞観察のメインツールが蛍光顕微鏡であるの言うまでもない。蛍光顕微鏡は標識によって分子を選択的に観察できる利点がある一方で、標識できない情報は見えないという難点もある。他の物理化学情報を得るために、様々な顕微鏡モダリティの可能性の探究は常に続いている。その一つとして近年有力視されているのが手法の一つがラマン散乱を観察する顕微鏡(ラマン顕微鏡)であり、この10年余りの間に、多くの研究者によって生命科学での有効性が示されてきた。研究代表者は、幹細胞の細胞分化や免疫細胞の活性化による細胞状態遷移をラマンスペクトル変化として検出できること[Ichimura, et al. Plos One 2014, Ichimura, et al. Scientific Reports 2016]、そこからエビジェネティック地形を推定できることを報告した[Ichimura, et al. Scientific Reports, 2015]。さらに、ラマンスペクトルと蛍光による遺伝子発現計測との相関を見だし、ラマン顕微鏡により非標識で遺伝子発現推定が可能であることを報告した[L.-d. Chiu, et al. Scientific Reports, 2016]。

しかしながら、ラマン散乱の本質的な暗さのため、既存のレーザー走査方式での細胞塊や組織の3次元イメージングは長時間を要するため応用範囲は制限される。このため高速化を目的とした技術開発は、重要な取り組みである。高速化の手法として、スリット共焦点方式[Hamada, et al. J. Biomed. Opt. 2008]やライトシート照明方式[Ohshima, et al., Opt. Exp. 2012]が提案されているが細胞塊や組織の3次元イメージングを実現するには、さらなる技術発展が必要である。

2. 研究の目的

ミリメートルの生体組織試料のラマン分光イメージングの実現を目指し、従来と異なるタイプの分光イメージング法を開発する。従来のレーザー走査方式ではなく、2次元分光イメージングとCT (computed tomography) の考え方を組み合わせ、1度の撮像により、元の3次元画像(空間2次元 + 波長1次元)を取得する方法を確立し、高速化の実現を目指す。本手法は、ラマン分光イメージングのみにとどまらず、他の様々な分光イメージングを高速化できるため、幅広い応用が期待できる。

3. 研究の方法

画像回復のための方法として、Computed tomography の考えを利用する。二次元分光画像を空間2次元、波長1次元で構成される仮想的な三次元画像と見なすことができる。CT では、三

次元物体を様々な角度方向に投影した画像群から、元の3次元画像を回復する。上記分光画像においては、二次元画像を回折格子やプリズムなどの波長分散素子によって、一方向に分光することで、仮想的な三次元画像を斜め方向の「投影像」を得ることができる。様々な方向に分光した像を集め、これらの投影像から、元の3次元画像を回復できる。この原理に基づく分光画像推定法は1980年代に提案されたが(Okamoto, et al. Opt. Lett. 1991)、当時の方法では、蛍光分光やラマン分光などの高スペクトル分解能を要する分光イメージングには、適用できなかった。本研究では、蛍光分光とラマン分光に応用可能な、光学システムとその要素技術および画像回復法を提案し、原理検証に取り組んだ。

4. 研究成果

計測原理を実証するための基礎実験系を構築した。検証のための試料としてラマン散乱の代わりに多数の異なる蛍光波長をもった量子ドットを用いた。観察用の光学系は、全反射照明顕微鏡と分散型の分光器によって構成される。顕微鏡と分光器の間のリレー光学系を分岐し、蛍光像を回転させて、入射スリット上に縦に並列で入射する。これにより、異なる方向に分光された像を同時に得ることができる。

1つの視野の蛍光分布を、0度と90度の2方向に分光した分光投影像を撮像し、2枚の画像から原画像の蛍光プローブの分布を回復した(図1)。2枚の画像は、カメラの検出面を分割することで同時取得できるため、動画として取得できる。試料としてモータータンパク質の一つであるミオシンを用いた。7色の量子ドットプローブでランダムに標識することで異なる波長のプローブが高確率で隣接する状況にした。アクチンフィラメント上を運動する様子を高速に捉えることができた。この実験系では、プローブ分布にスパース性があることが自明なので、2つの分光像からの画像回復が可能になり、さらにナノメートル精度での局在化が可能となった。

この系では、回折限界より近接した2つのミオ

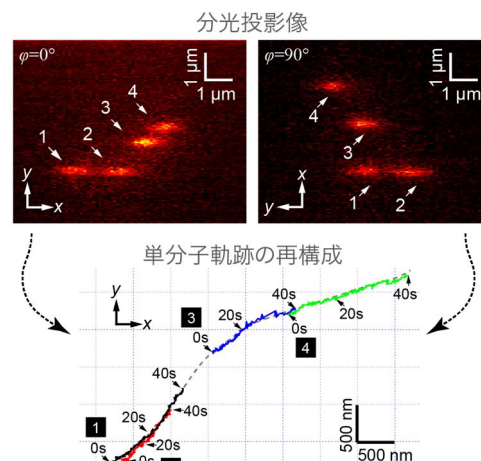


図1: 2つの分光投影像からの画像回復。異なる波長の蛍光プローブを標識したミオシン分子の運動を観察した。

シン分子でも量子ドットの波長の違いによって、スペクトル上で分離されるため、同時にナノ動態観察できることも示した(Kakizuka, et al. Biomed. Opt. Exp. 2016)。

図2に、マルチカラー蛍光像について、複数の方向への分光投影像群からのスペクトル像回復のシミュレーション結果を示す。いずれの場合も、提案する手法によって、原画像の空間分布とスペクトルをよく回復できることが明らかになった。蛍光像では、7色の蛍光プローブ200個をランダムに分散させたモデルデータ(左)を、9方向への0次および1次回折による分光投影像を計算した(中)。そこから、スペクトル像を回復させた(右)。このシミュレーションでは、分光スペクトルの先験情報(成分スペクトルによる線形結像性、各成分濃度の非ガウス性)を導入した新規アルゴリズムを用いた。その結果、いずれの場合も通常のCTアルゴリズムに比べて信頼性の高い画像回復を実現できた。本手法により高精度での回復が可能であることを示した。

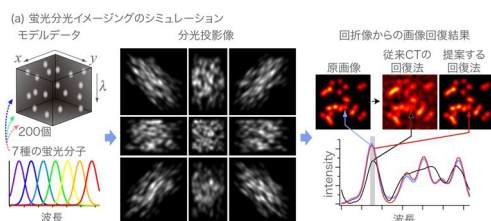


図2: 提案する手法による蛍光スペクトル像の回復シミュレーション。左: 蛍光のモデルデータ。中: 分光投影像。透過像と8方向の1次回折像。右: 3次元像の回復結果。

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6件)

S. Kawata, T. Ichimura, A. Taguchi, and K. Kumamoto, Nano-Raman scattering microscopy: Resolution and enhancement, Chem. Rev., 査読有, 2017, Vol. 117, 4983-5001.

DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00560

A. Germond, V. Kumar, T. Ichimura, J. Moreau, H. Fujita, and T. M. Watanabe, Raman spectroscopy as a tool for ecology and evolution, J. Roy. Soc. Int., 査読有, Vol. 14, 2017, 20170174.

DOI: 10.1098/rsif.2017.0174

L.-d. Chiu, T. Ichimura, T. Sekiya, H. Machiyama, T. M. Watanabe, H. Fujita, and K. Fujita, Protein expression guided chemical profiling of living cells by the simultaneous observation of Raman scattering and anti-Stokes fluorescence emission, Scientific Reports, 査読有, Vol. 7, 2017, 43569.

DOI: 10.1038/srep43569

T. Ichimura, L.-d. Chiu, K. Fujita, H. Machiyama, T. Yamaguchi, and H. Fujita, Non-label immune cell state prediction using

Raman spectroscopy, Scientific Reports, 査読有, Vol. 6, 2016, 37562.

DOI:10.1038/srep37562

T. Kakizuka, K. Ikezaki, J. Kaneshiro, H. Fujita, T. M. Watanabe, T. Ichimura, Simultaneous nano-tracking of multiple motor proteins via spectral discrimination of quantum dots, Biomed. Opt. Exp., 査読有, Vol. 7, 2016, 2475-2493.

DOI: 10.1364/BOE.7.002475

金城純一、渡邊朋信、市村垂生、偏光分解光学イメージングのための高速偏光制御システム、分光研究、査読有、Vol65, 2016, 207-209.

(学会発表) (計7件)

T. Ichimura, T. M. Watanabe, Brillouin scattering imaging of stiffness heterogeneity in multicellular systems, SPIE Photonics West BiOS 2018, San Francisco, CA, USA, January 27-February 1, 2018. [口頭発表]

市村垂生、ラマン散乱分光スペクトルから読み解く生体情報、第15回医用分光学会、筑波大学、2017年11月29-30日。[招待講演]

市村垂生、Light scattering microscopes to quantify the cellular and molecular states、第55回生物物理学会年会、熊本大学、2017年9月19-21日。[招待講演]

T. Ichimura, A. Germond, L.-d. Chiu, K. Fujita, T. M. Watanabe, H. Fujita, Cellular fingerprinting based on Raman spectral imaging, The 24th Congress of the International Commission for Optics, Keio Plaza Hotel, Tokyo, August 21-25, 2017. [口頭発表]

市村垂生、ラマン分光による細胞状態計測、理研公開シンポジウム「観る・測る・解く」4次元細胞計測の現状と未来、理化学研究所和光キャンパス、2017年6月28日。[ポスター発表]

T. Ichimura, T. Kakizuka, J. Kaneshiro, T. M. Watanabe, Multiple single-molecule nano-tracking based on spectral discrimination of fluorescent probes, SPIE Photonics West BiOS 2017, San Francisco, CA, USA, January 28-February 2, 2017. [口頭発表]

市村垂生、渡邊朋信、ラマン散乱光顕微鏡法を用いた細胞指紋技術の開発と応用、第138回BRCセミナー、理化学研究所バイオリソースセンター、2016年11月25日。[招待講演]

(図書) (計3件)

市村垂生、藤田英明、渡邊朋信、「分化状態を可視化する非侵襲検査技術」(分担執筆)、技術情報協会、iPS細胞の安全・高品質な作製技術、2016、6章6節、373-378

新井由之、市村垂生、「1分子局在化顕微鏡の自作と撮像例」(分担執筆)、羊土社、

初めてでもできる！超解像イメージング、
2016、実践編1章、48-67
渡邊朋信、市村垂生、「蛍光相関超解像法
SOFI 自己明滅する蛍光プローブによる
超解像」(分担執筆)、羊土社、初めてでもで
きる！超解像イメージング、2016、原理・応
用編1章、250-256

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称:細胞分泌物の分析方法、マルチウェルプレ
ート

発明者:市村垂生、渡邊朋信、藤田英明、ジェル
モンドアルノ、野地博行

権利者:国立研究開発法人理化学研究所

種類:特許

番号:特願 2016-149438

出願年月日:平成 28 年 7 月 29 日

国内外の別:国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

市村 垂生 (Ichimura, Taro)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム

研究センター・上級研究員

研究者番号:50600748