

令和 3 年 10 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19099

研究課題名（和文）光周波数コムを用いた磁気共鳴測定法の開発とバイオイメージングへの応用

研究課題名（英文）Magnetic resonance spectroscopy with optical frequency combs and its application to bio imaging

研究代表者

平松 光太郎（Hiramatsu, Kotaro）

東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・助教

研究者番号：60783561

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：生細胞や組織内の生体分子を可視化するバイオイメージングは現代の生命科学において必要不可欠の技術である。特に細胞や組織を染色せずに計測できる磁気共鳴イメージングや振動分光イメージングは再生医療等の応用においてその重要性が増してきている。本研究では、最先端のレーザー技術である光周波数コムを用いた磁気共鳴及び振動分光イメージング法の開発を行った。磁気共鳴計測に関しては装置開発を行い、計測を試みたが残念ながら信号の検出には至らなかった。デュアルコム振動分光計測に関しては従来法の100倍程度の効率化を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

デュアルコム振動分光法は高速かつ無標識に生体分子を可視化できる手法として注目を集めている。その高効率化は今後のデュアルコム振動分光計測に基づく様々な生命科学・物質科学的発見を加速することが期待される。また、計測の効率をほぼ100%まで高めたことは、本手法における感度・速度の限界を達成したことを意味しており、分子分光学のマイルストーン的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：Bioimaging, which visualizes biomolecules in living cells and tissues, is an indispensable technology in modern life sciences. In particular, magnetic resonance imaging and vibrational spectroscopic imaging, which can measure cells and tissues without staining, are becoming increasingly important in applications such as regenerative medicine. In this study, we have developed magnetic resonance and vibrational spectroscopic imaging using a state-of-the-art laser technology, optical frequency combs. As for the magnetic resonance measurement, we developed a new device and tried to measure it, but unfortunately we could not detect the signal. For the dual-comb vibration spectroscopy measurement, the efficiency was improved by about 100 times compared to the conventional method.

研究分野：分子分光学

キーワード：デュアルコム分光法 振動分光 磁気共鳴 バイオイメージング 高速分光法

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

バイオイメージングは細胞、生体組織内の分子挙動を測定する手法として現代生命科学に欠かすことのできない手法である。緑色蛍光タンパク質をはじめとする蛍光イメージング法により、生きた細胞内のタンパク質や脂質の“分布”をリアルタイムに観測できるようになってきた。しかしながら、生体機能の発現に寄与する生体分子の詳細な“構造”やその時間変化を細胞内で直接観測することは依然として挑戦的な課題である。

赤外・ラマン分光のような振動分光法と顕微鏡を組み合わせることによる無標識かつ構造情報を豊富に含んだバイオイメージング法が注目を集めているが、様々な細胞の計測に用いるためには、依然として感度や検出速度の上で課題が多い。また、ダイヤモンドの NV センターを量子センサーとして用いることで、細胞内の温度や電場といった情報を可視化しようといった研究も進められているが、ナノダイヤモンドの導入やマイクロ波の印加が必要であり、計測装置が複雑になるといった課題がある。

### 2. 研究の目的

#### (1) デュアルコム分光による核スピン検出

本研究では、先端レーザー技術であるデュアル光周波数コムと非線形光学を組み合わせた核スピンの新しい光学検出法の開発を行い、細胞内分子の高感度 NMR 検出を目指す。具体的には、外部磁場によって分裂したゼーマン準位間の遷移を、光周波数コム(OFC)を光源とする誘導ラマン過程によって検出する。OFC は高精度な周波数の“ものさし”であり、その発振線を精密に制御することが可能である。OFC を用いることで、光の周波数より 6-7 桁周波数の低い核スピンのラーモア周波数の高精度検出が可能となると期待される。

#### (2) デュアルコムによる振動分光計測の高速・高感度化

また、赤外・ラマン分光のような振動分光法の更なる高速化・高感度化による無標識バイオイメージングの高性能化も本研究の目的とする。本研究開始時までに開発を進めてきたデュアルコムコヒーレントラマン分光法をベースとし、速度、感度を 1 桁向上させるような計測法の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) デュアルコム分光による核スピン検出

本研究では図 1 に示す測定スキームで核スピンのゼーマン分裂を測定する。通常、NMR 分光法では強磁場中で生じる核スピン状態のエネルギー分裂をマイクロ波領域の振動磁場の吸収ないしはパルス波で状態間のコヒーレンスを励起し、その後の Free induction decay(FID)として測定する。一方で、本研究では中間状態を介した多光子過程(誘導ラマン過程)としてゼーマン分裂した状態間の遷移を測定することを目指す。これは振動分光として広く用いられているラマン散乱と同様の光学過程であるが、分子振動のエネルギーが  $100\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  程度(3-100 THz)であるのに対し核スピンのゼーマン分裂のエネルギーは典型的には 100 MHz 程度と非常に小さい。そのため、市販の分光計の周波数分解能ではゼーマン分裂を測定するのは困難である。

本研究では、このような僅かなエネルギー差を感度よく測定するために、非線形光学過程の一つである誘導ラマン過程を用いる。誘導ラマン過程とは、2色のレーザーを分子に照射したとき、レーザーの周波数差が分子の 2 つの状態間のエネルギー差に等しいとき高周波数の電磁波から低周波数の電磁波にエネルギー移動

本研究では、このような僅かなエネルギー差を感度よく測定するために、非線形光学過程の一つである誘導ラマン過程を用いる。誘導ラマン過程とは、2色のレーザーを分子に照射したとき、レーザーの周波数差が分子の 2 つの状態間のエネルギー差に等しいとき高周波数の電磁波から低周波数の電磁波にエネルギー移動

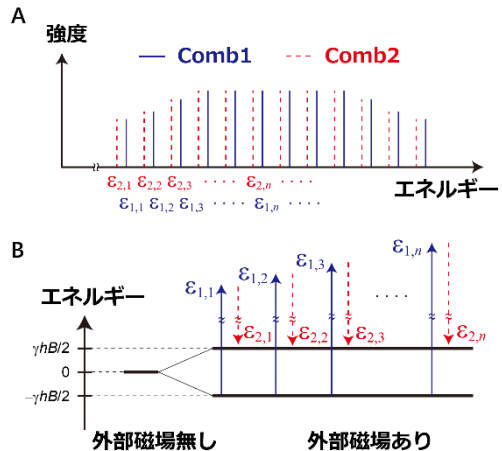


図 1 デュアルコム誘導ラマン分光法によるゼーマン準位の検出 A: 2 台の周波数コムの発振スペクトル B: 2 台のコム間の周波数差でゼーマン準位間の遷移を引き起こす

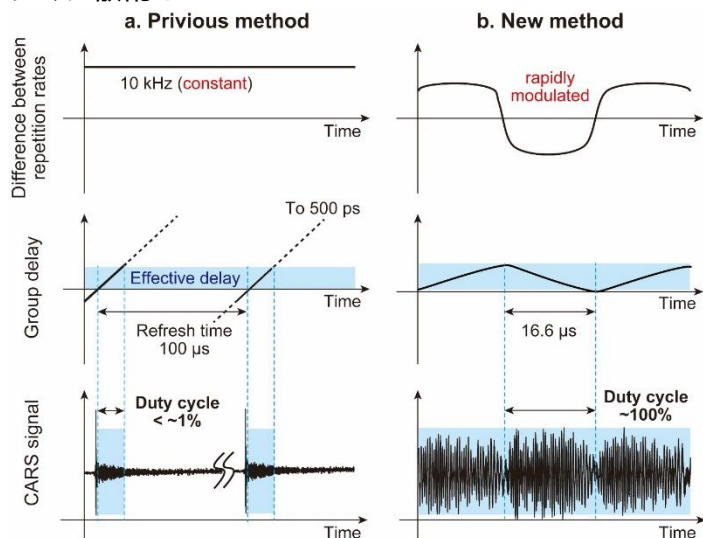


図 2 繰り返し周波数変調デュアルコム CARS 分光法におけるパルス走査法 a: 従来の dcCARS 分光法におけるパルス走査スキーム b: 開発した方法におけるパルス走査スキーム

が起きる現象である (図 1B)。

(2) デュアルコムによる振動分光計測の高速・高感度化

デュアルコムコヒーレント反ストークスラマン散乱(dual-comb coherent anti-Stokes Raman scattering: dcCARS)分光法は、繰り返し周波数のわずかに異なる二台のフェムト秒レーザーを用いて、高速かつ高分解能でのスペクトル取得を可能にする時間領域ラマン分光法である[1]。しかし、分子振動コヒーレンスの寿命(~ 3 ps)がモードロックレーザーの典型的な繰り返し周期(~ 1 ns)より 2 桁以上短く、レーザーパルスのうち 1%以下しか測定に用いることが出来ないという課題がある。

本研究では、図 2 に示す新しいパルス走査スキームを実装した quasi-dual-comb (qDC)分光法を開発することで、従来法よりも 100 倍程度高いエネルギー効率を達成し、それにより速度\*(感度)<sup>1/2</sup> で表される性能指数を 100 倍程度まで向上させることを目指す。

4. 研究成果

(1) デュアルコム分光による核スピン検出に向けた装置開発

まず、本研究では、図 3 に示すデュアルコム分光装置を開発した。2 つの Ti:Sapphire レーザーを光源として用い、それぞれの出力のスペクトル上のコム構造が図 1 に示す配置となるように調整する。そのために、それぞれのレーザーの繰り返し周波数及び Carrier envelop offset(CEO)周波数の差を計測し、レーザーのキャビティ長及び励起光強度をフィードバック制御する。繰り返し周波数に関しては、レーザーの出力をフォトダイオードで測定し、信号生成器からの出力とミキシングした信号を入力とするフィードバック制御によってレーザーのキャビティ長を制御することで安定化した。一方で、CEO 周波数に関しては、CW レーザーとの干渉信号を計測することで計測し、レーザーの励起光強度をフィードバック制御することで安定化した。

開発したシステムの安定性を見積もるために、図 3 の矢印で示した部分において信号のスペクトルを計測した(図 4)。干渉信号のフーリエ変換によって見積もられた周波数コムの相対的な線幅は 10 Hz 以下であり、将来的に周波数コムを用いて磁気共鳴遷移を測定するのに十分な線幅を有していると考えられる。しかしながら、今回開発した安定化システムによる OFC の安定化では、フィードバック制御が数分程度しか持続せず、OFC を光源とした磁気共鳴測定を行うのに十分ではなかった。今後、更なる装置の安定化などを行い、磁気共鳴信号の取得を目指す。

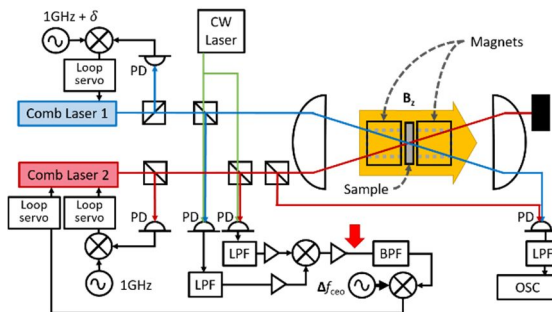


図 3. 本研究で開発したデュアルコム分光装置の概略図. LPF: Low Pass Filter, BPF: Band Pass Filter, PD: Photodiode, OSC: Oscilloscope

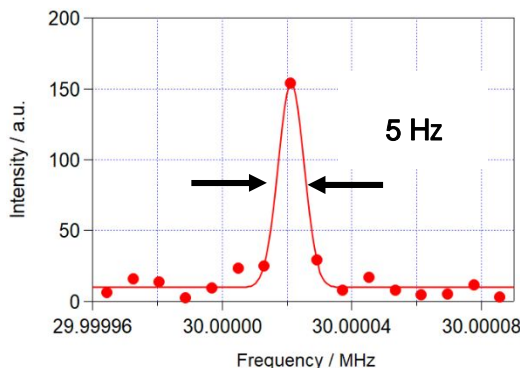


図 4. 2 台の周波数コムの発振周波数の差周波スペクトル

(2) デュアルコムによる振動分光計測の高速・高感度化

図 5 に開発した qDC-CARS 分光装置の概略を示す。モードロックレーザーの励起光強度を高速に制御することにより繰り返し周波数を変調し、パルス間隔が常に振動コヒーレンスの寿命以下となるように制御し、時間領域ラマン分光測定を行う。パルス間隔を 2 色干渉(Two-color interferogram: TCI)によってモニターし、測定した時間領域ラマン信号の時間軸の校正に用いた。原理実証として、繰り返し

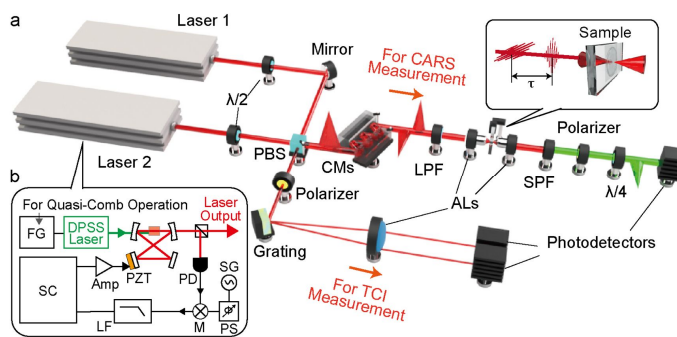


図 5 qDC-CARS 分光装置の概略図

し周波数を最大 100 kHz で変調し、トルエンのラマンスペクトルを測定した。開発した quasi-dual-comb CARS 法によって計測したトルエンの TCI, TCI から求めた遅延時間、CARS 信号（時間領域）、及び CARS スペクトルを図 6 a, b, c, e にそれぞれ示す。1 回の広帯域（200 - 1600  $\text{cm}^{-1}$ ）ラマン分光計測が 10  $\mu\text{s}$  で完了しており、従来の dual-comb CARS 法に比べて 10 倍の高速化が達成されていることが分かる。さらに、図 7 に示すように従来法と同じ計測速度で比べたとき、20 倍程度の信号雑音比の向上が見られ、速度のみならず大幅な感度向上も実現した。本成果によってラマン分光計測の応用範囲を拡げることができると期待される。特に従来のポンプ-プローブ分光法では捉える事が難しかった、ミリ秒からマイクロ秒オーダーの非再現的な（光照射によってトリガーすることの出来ない）高速現象を測定するのに本手法は適しており、今後、相転移現象やプラズモン増強ラマン信号の明滅現象の過渡的な変化を分子構造レベルで捉えることでより深い知見が得られるようになると期待される。

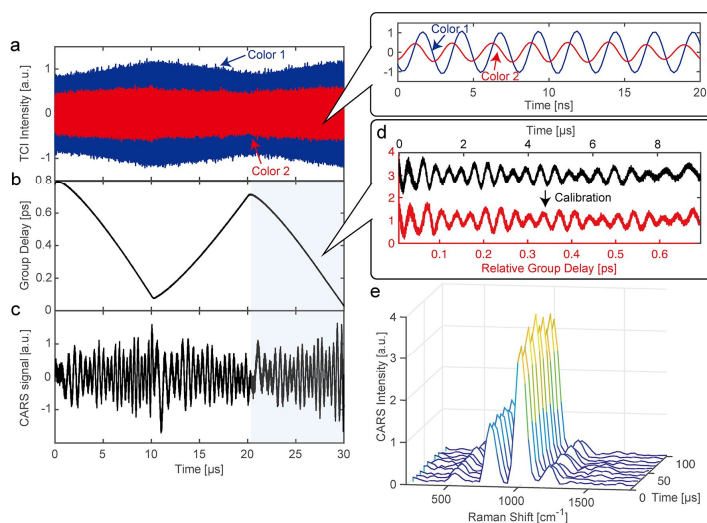


図 6. Quasi-dual-comb CARS 計測 (a) TCIs, (b) ポンプ-プローブ遅延 (c) Time-domain CARS interferogram (d)TCIs から求めた遅延による Time-domain CARS interferogram の校正 (e) ラマンスペクトル

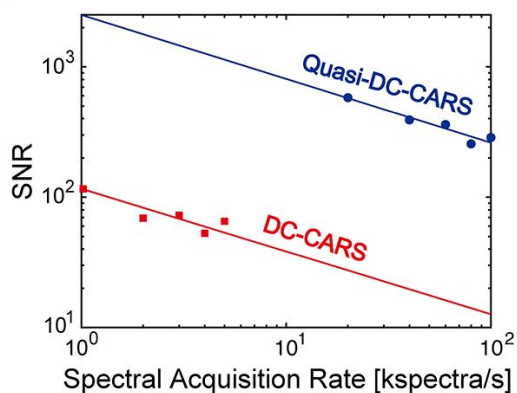


図 7.様々な測定レートにおける Quasi-dual-comb CARS 法及び dual-comb CARS 法で計測したスペクトルの信号雑音比

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6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 1件）

1. 著者名 Ryo Kinogawa, Kotaro Hiramatsu, Kazuki Hashimoto, Venkata Ramaiah Badarla, Takuro Ideguchi, Keisuke Goda	4. 巻 未定
2. 論文標題 High speed broadband Fourier transform coherent anti stokes Raman scattering spectral microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Raman spectroscopy	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jrs.5630	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 Peterson Walker, Hiramatsu Kotaro, Goda Keisuke	4. 巻 44
2. 論文標題 Sagnac-enhanced impulsive stimulated Raman scattering for highly sensitive low-frequency Raman spectroscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Optics Letters	6. 最初と最後の頁 5282 ~ 5282
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1364/OL.44.005282	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 Hiramatsu Kotaro, Yamada Koji, Lindley Matthew, Suzuki Kengo, Goda Keisuke	4. 巻 11
2. 論文標題 Large-scale label-free single-cell analysis of paramylon in Euglena gracilis by high-throughput broadband Raman flow cytometry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Optics Express	6. 最初と最後の頁 1752 ~ 1752
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1364/BOE.382957	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 Lindley Matthew, Hiramatsu Kotaro, Nomoto Hayate, Shibata Fukashi, Takeshita Tsuyoshi, Kawano Shigeyuki, Goda Keisuke	4. 巻 91
2. 論文標題 Ultrafast Simultaneous Raman-Fluorescence Spectroscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 15563 ~ 15569
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.9b03563	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 Kameyama Risako, Takizawa Shigekazu, Hiramatsu Kotaro, Goda Keisuke	4. 巻 8
2. 論文標題 Dual-Comb Coherent Raman Spectroscopy with near 100% Duty Cycle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Photonics	6. 最初と最後の頁 975 ~ 981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsp Photonics.0c01656	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 McCann Phillip C., Hiramatsu Kotaro, Goda Keisuke	4. 巻 12
2. 論文標題 Highly Sensitive Low-Frequency Time-Domain Raman Spectroscopy via Fluorescence Encoding	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 7859 ~ 7865
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.1c01741	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20件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 Kotaro Hiramatsu, Ryo Kinogawa, Kazuki Hashimoto, Venkata Ramaiah Badarla, Takuro Ideguchi, Keisuke Goda
2. 発表標題 High-speed broadband Fourier-transform CARS microscopy
3. 学会等名 SPIE Photonics West, High-Speed Biomedical Imaging and Spectroscopy III: Toward Big Data Instrumentation and Management (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平松 光太郎, 合田 圭介
2. 発表標題 時間領域Raman分光法の生命科学研究への応用
3. 学会等名 第8回光科学異分野横断萌芽研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木下川 涼, 平松 光太郎, 橋本 和樹, Venkata Ramaiah Badarla, 井手口 拓郎, 合田 圭介
2. 発表標題 高速フーリエ変換CARSスペクトラルイメージング
3. 学会等名 量子生命科学研究会 第2回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kotaro Hiramatsu and Keisuke Goda
2. 発表標題 High-throughput vibrational flow cytometry
3. 学会等名 SPIE Photonics West, Advanced Chemical Microscopy for Life Science and Translational Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平松 光太郎, 合田 圭介
2. 発表標題 高スループット振動分光フローサイトメトリー
3. 学会等名 レーザー学会 学術講演会 第40回年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平松 光太郎, 合田 圭介
2. 発表標題 多元的分光計測による大規模一細胞解析
3. 学会等名 分光学会生細胞分光部会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kotaro Hiramatsu and Keisuke Goda
2. 発表標題 Vibrational flow cytometry for label-free large-scale single-cell analysis
3. 学会等名 30th International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平松 光太郎, 合田 圭介
2. 発表標題 高速ラマン分光法による大規模一細胞解析
3. 学会等名 第17回医用分光学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kotaro Hiramatsu and Keisuke Goda
2. 発表標題 High-throughput Raman flow cytometry
3. 学会等名 SelectBio 2019 - Microfluidics & Organ-on-a-Chip Asia 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kotaro Hiramatsu and Keisuke Goda
2. 発表標題 Large-scale single-cell analysis by ultra-rapid time-domain Raman spectroscopy
3. 学会等名 The 12th International Photonics and OptoElectronics Meetings (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Kotaro Hiramatsu and Keisuke Goda
2. 発表標題 High-throughput Raman spectroscopic flow cytometry
3. 学会等名 The Australia and New Zealand Nano and Microfluidics 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平松 光太郎
2. 発表標題 フェムト秒時間分解CD分光法
3. 学会等名 第23回HiSOR研究会 ~分子キラリティの計測・理論技術の革新から迫る生命機能研究の新展開~ (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Walker Peterson, Kotaro Hiramatsu, Keisuke Goda
2. 発表標題 1."Highly sensitive low-frequency Raman spectroscopy enabled by Sagnac-enhanced impulsive stimulated Raman scattering
3. 学会等名 SPIE Photonics West, Label-free Biomedical Imaging and Sensing (LBIS) 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Matthew Lindley, Kotaro Hiramatsu, Fukashi Shibata, Tsuyoshi Takeshita, Shigeyuki Kawano, Keisuke Goda
2. 発表標題 High-throughput multimodal Raman-fluorescence flow cytometry
3. 学会等名 SPIE Photonics West, High-Speed Biomedical Imaging and Spectroscopy V (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kotaro Hiramatsu and Keisuke Goda
2. 発表標題 High-throughput Broadband Vibrational Flow Cytometry
3. 学会等名 Biomedical Raman Imaging (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 滝沢 繁和、平松 光太郎、合田 圭介
2. 発表標題 圧縮センシングを用いた時間領域コヒーレントラマン分光
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matthew Lindley, Kotaro Hiramatsu, Fukashi Shibata, Tsuyoshi Takeshita, Shigeyuki Kawano, Keisuke Goda
2. 発表標題 Simultaneous Raman-Fluorescence Flow Cytometry
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平松 光太郎, Matthew Lindley, 山田 康嗣, 鈴木 健吾, 合田 圭介
2. 発表標題 振動分光フローサイトメトリーによる大規模無標識1細胞解析
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kotaro Hiramatsu, Yusuke Yonamine, Takuro Ito, Yu Hoshino, and Keisuke Goda
2. 発表標題 Coherent Raman spectroscopic flow cytometry for large-scale single cell analysis
3. 学会等名 International conference on vibrational spectroscopy
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kotaro Hiramatsu, Yusuke Yonamine, Takuro Ito, Yu Hoshino, and Keisuke Goda
2. 発表標題 Label-free molecularly specific flow cytometry and beyond
3. 学会等名 34th Congress of the International Society for Advancement of Cytometry
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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