

丸文学術賞 受賞者

小関 泰之

東京大学 大学院工学系研究科  
准教授

## 高速誘導ラマン分光イメージング法の開発と医学・生物学応用

パルスレーザー技術を駆使して生体の構造と働きを可視化する

### ■ 研究の背景

医学・生物学において、生体の構造や働きを可視化することは極めて重要です。生体可視化法には様々な方式がありますが、中でも、光学顕微鏡法は、サブミクロンの空間分解能を有し、生きたままの生体観察が可能であることから広く使われています。しかし、生体はミクロなスケールではほぼ透明であるため、従来の光学顕微鏡法では生体試料に対して染色もしくは蛍光標識を施す必要があります。このため、染色・標識の困難な生体分子からなる試料の観察は困難であり、また、生命活動に対する染色・標識の影響も無視できません。

近年、生体を無染色・無標識で観察する手法として、ラマン散乱を用いた光学顕微鏡法の研究がなされてきました。ラマン散乱とは分子振動を介した光散乱のひとつであり、その光スペクトルを計測すると分子構造に関する情報が得られます。このことからラマン散乱は「分子の指紋」とも呼ばれてい

ます。しかし、ラマン散乱光は極めて微弱であるため、ラマン顕微鏡法によるイメージングには数十分～数時間程度の長時間を要し、その応用は限られていました。高速なラマン顕微鏡法として、2色の同期した光パルスを用いるコヒーレント反ストークスラマン散乱(CARS)顕微鏡法などが提案されてきましたが、不要なバックグラウンドやスペクトル歪みが発生し、観察結果の解析が困難であるなどの問題を抱えていました。

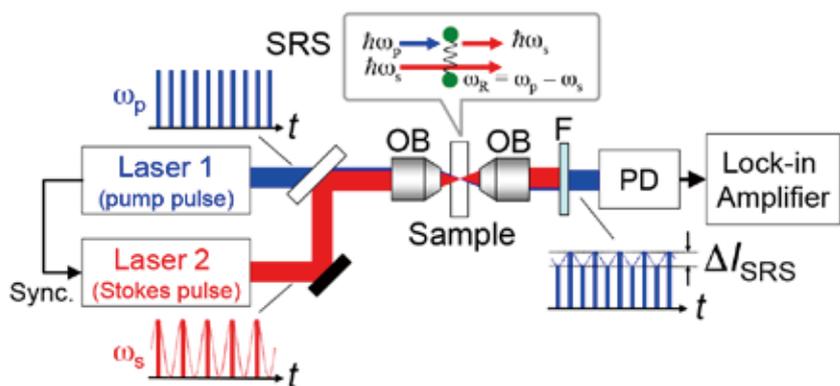
### ■ 高速誘導ラマン分光イメージング法の開発とその応用

私は、高速なラマン顕微鏡法の実現手法として、「誘導ラマン散乱(SRS)」を活用することを、アメリカ・ドイツのグループと独立に提案しました[1, 2]。SRS顕微鏡法の原理模式図を図1に示します。2色の同期したピコ秒光パルス(ポンプパルス、ストークスパルス)を用い、一方のパルスのみ強度変

調を施しておきます。これらの光パルスを合波し、対物レンズで試料に集光します。ポンプパルスとストークスパルスの光周波数差が分子の振動周波数と一致するとSRSが生じ、ポンプパルスの減衰とストークスパルスの増幅が生じます。その結果、ストークスパルスの強度変調がポンプパルスに転写されます。この転写された強度変調をロックイン検出することでSRS信号を得て、レーザービームを走査することでイメージングを行います。

私は特に、SRS顕微鏡法において高速かつ高感度な無標識イメージングを行う上で「量子限界感度」を達成することの重要性を指摘しました[1, 2]。つまり、SRS信号はレーザー強度のわずかな変化(0.1%以下)として検出されますが、レーザーの強度雑音や検出系の雑音を理論限界まで抑えることで、SRSの高感度性が得られるということです。その後、独自のレーザー光源や光学系を開発し、SRS顕微鏡法の可能性を大きく広げてきました。そのひとつの到達点が「分光イメージングシステム」[3]です。従来のSRS顕微鏡法では、単一の分子振動周波数におけるSRS像しか得られませんが、開発した分光イメージングシステムでは、1秒間に30回画像を取得する高速SRSイメージングを行いつつ、フレーム毎にレーザーパルスの波長を変化させ、複数の分子振動周波数の情報を取得することができます。このキー技術が波長可変ピコ秒パルス光源[4]です。Ybファイバーレーザーにより発生する波長1 μm帯の超短光パルスが有する広帯域スペクトルの一部を光フィルタリングし、Yb添加光ファイバーで増幅することで、パルスを発生します。光フィルタはガルバノスキャナと4-f光学系、回折格子から構成される独自の

図1 SRS顕微鏡法の模式図



OB: 対物レンズ  
F: 光フィルタ  
PD: フォトダイオード

光学系によるものであり、その透過波長をミリ秒程度で切り替えることができます。

この分光イメージングシステムの医学応用として、肝臓や小腸などの様々な観察実験を進め、図2に示すように、透明な生体組織を染色することなく、数秒～数十秒でカラー可視化できることを実証しました[3]。本技術は、手術中の病理診断に対するSRS顕微法の高速イメージング性能の有効性を強く示唆する結果です。また、生物学応用として、生きて動くミドリムシ細胞に含まれる油脂や多糖類等の代謝物の可視化に成功しました[5]。近年、微細藻類を用いた物質生産が注目を集め、特に脂質や多糖類のバイオ燃料やバイオ医薬品への応用が期待されていますが、その生産効率の向上が課題とされています。細胞ごとの生産量には大きなばらつきがありますが、従来の解析手法では多数の細胞の平均的な生産量しかわかりません。本研究で実証した細胞解析法は、生産効率の高い細胞を探索し、さらには創出していく上で大きな役割を果たすものと期待されます。

また、レーザー光源の実用性向上にも取り組み、固体レーザーよりも小型・安定なファイバーレーザー[6]や半導体レーザー[7]を用いたパルス光源の積極的な導入を進めてきました。近年、パルスレーザー技術の発展には目を見張るものがありますが、応用に特化したレーザー光源の開発はまだまだ発展途上と感じています。今後も継続的に光源開発を続け、SRS顕微法の実用性をさらに高めていきたいと考えています。

図2 SRSイメージングによる臓器切片の無染色可視化例[3]

- (a) ラット肝臓のカラー像。細胞核、細胞質、脂肪滴、繊維構造、血管構造等を無染色で可視化した。  
 (b) ラット肝臓血管周辺の繊維構造の3次元像  
 (c) マウス小腸のカラー像。細胞質や核の3次元構造を可視化した。

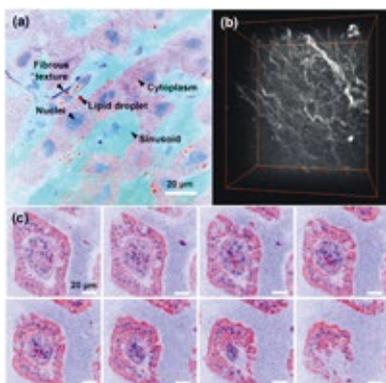
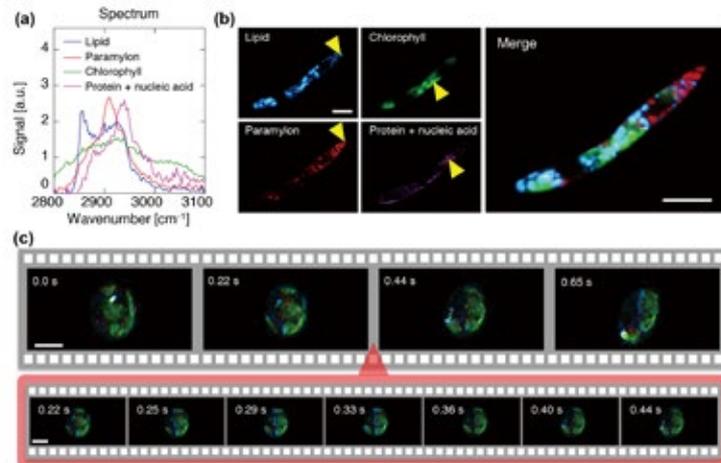


図3 微細藻類ミドリムシのSRSイメージング[5]

- (a) ミドリムシが有する脂質、パラミロン(多糖類)、葉緑体、タンパクと核酸のSRSスペクトル  
 (b) 薬剤で固定したミドリムシのSRSイメージング。91波数におけるSRS像を3秒で取得し、4成分をスペクトル分離し、カラー合成した。  
 (c) 生きて動くミドリムシのSRSイメージング結果。毎秒110フレーム、4波数で取得した。



## ■ 今後の抱負

本研究は、応用に特化したレーザー光源を開発し、無標識生体イメージングの可能性を大きく広げたと自負しています。今後、光源のさらなる性能向上と実用性向上を進めつつ、本手法のキラーアプリを増やしていくことが重要であり、その研究を継続したいと考えています。また、本研究の特徴のひとつは異分野融合にあると考えます。そもそも、私のバックグラウンドは電子工学や光ファイバー通信ですが、バイオイメージングという異なる分野に飛び込み、分からないことだらけの中でもがいたことが、幸いにも

新しい技術の創出に結びつきました。また、医学・生物学応用は、様々な分野の研究者との共同研究が進められたものです。異な

る分野のバックグラウンドを持つ人々が、新しい分野に飛び込むことは、新しい技術を開拓し、社会を活性化する上で今後ますます重要になると考えます。このような異分野融合を進めていく上では、失敗が許され、再チャレンジが奨励され、その中から新しい技術を生み出すダイナミズムが必要です。今後も、そのような雰囲気作りを進めていきたいと考えています。

## 謝辞

本研究は、大阪大学 伊東一良教授(現名誉教授)の研究室でスタートし、多くの共同研究者と学生のハードワークで進められたものです。全ての皆様に深く感謝いたします。また、本研究はJSTさきがけ、科学研究費補助金、内閣府ImpACT、先端量子科学アライアンスの支援を受けて実施されました。この場をお借りして御礼申し上げます。

## References(参考文献)

- [1] 巖文宏ら, Optics & Photonics Japan, 5pC12 (2008).
- [2] Y. Ozeki et al., Opt. Express 17, 3651 (2009).
- [3] Y. Ozeki et al., Nature Photon. 6, 845 (2012).
- [4] Y. Ozeki et al., Opt. Lett. 37, 431 (2012).
- [5] Y. Wakisaka et al., Nature Microbiology 1, 16124 (2016).
- [6] K. Nose et al., Opt. Express 20, 13958 (2012).
- [7] K. Tokunaga et al., Opt. Express 24, 9617 (2016).