

超短赤外パルス光源を用いた顕微 イメージング装置の開発と生命科 学への応用

藤 貴夫 (豊田工業大学)

古谷 祐詞 (名古屋工業大学)

村越 秀治 (生理学研究所)

堀田 昌克 (ファイバーラボ株式会社)

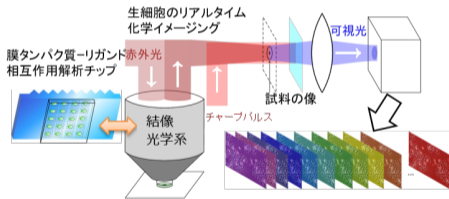
概要

- ▶ 研究のねらいと構想、研究体制
- ▶ これまでの成果、今後の予定と展望
 - ▶ **赤外ハイパースペクトル (HS) イメージング**
 - ▶ 植物細胞、蜘蛛の円網の赤外イメージング
 - ▶ 今後の予定と展望
 - ▶ **1.8 μm 励起による多光子蛍光顕微鏡**
 - ▶ In vivo 3光子及び4光子イメージング
 - ▶ 今後の予定と展望

研究のねらいと構想

新規赤外フェムト秒パルスレーザーの開発

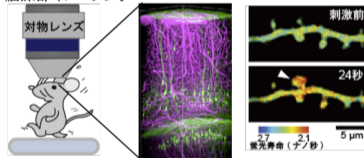
赤外ハイパースペクトル イメージング装置の開発



細胞の代謝・応答などの
リアルタイム測定

1800 nm 励起による 3光子顕微鏡の構築

運動学習中マウス
脳深部イメージング

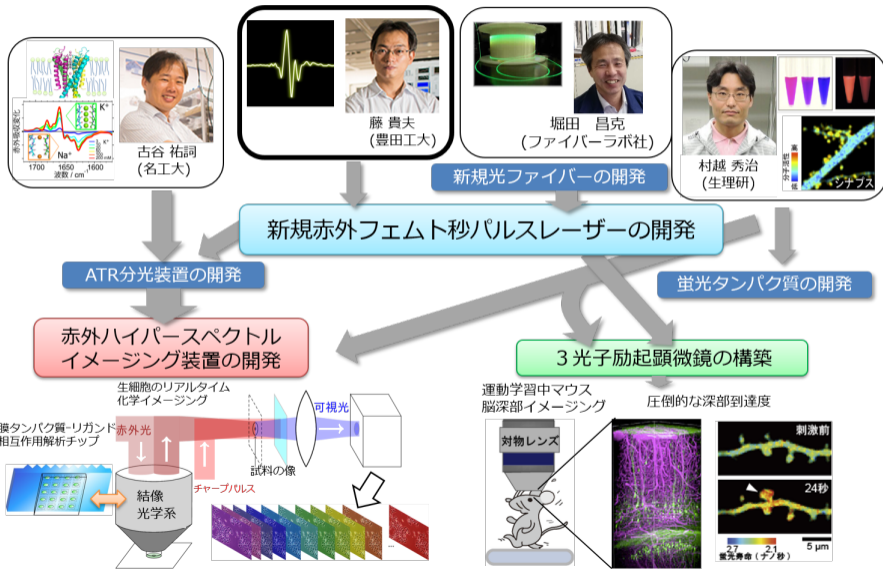


現在の限界を大きく超えた
深部での細胞イメージング
分子活性化イメージング

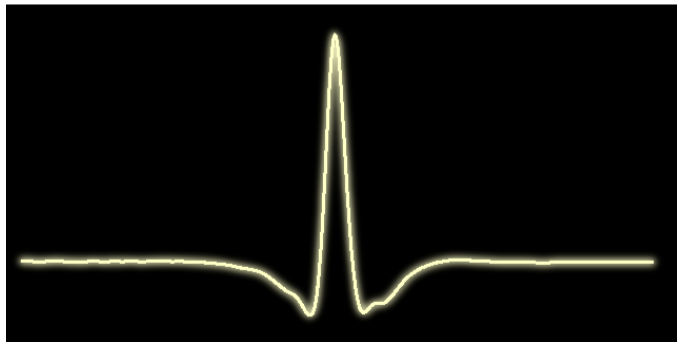
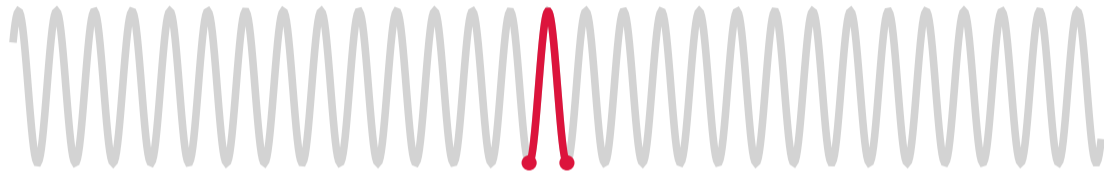
新規赤外パルス
レーザーの高度
化と小型化

↓
生命現象可視化・
解析と医療診断
装置への応用と
普及を目指す

研究体制



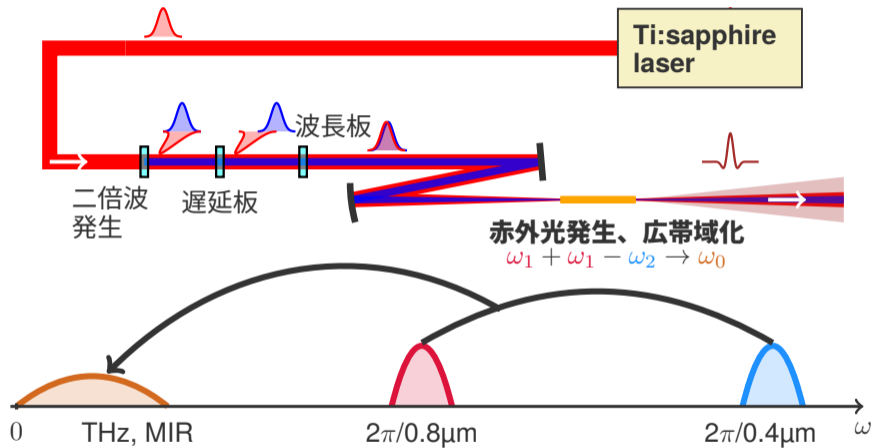
サブサイクルパルス



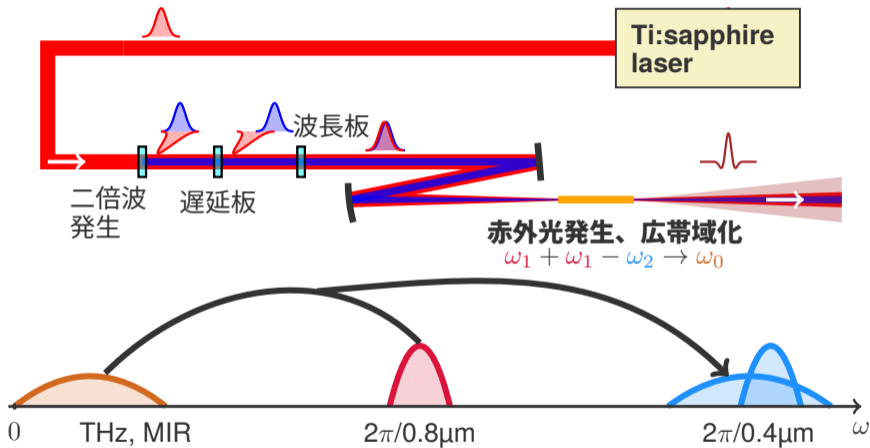
sub-half cycle pulse
shortest MIR pulse
13.7 fs@10 μm

Opt. Express **28**, 36527
(2020)
top downloads
in Nov. and Dec. 2020

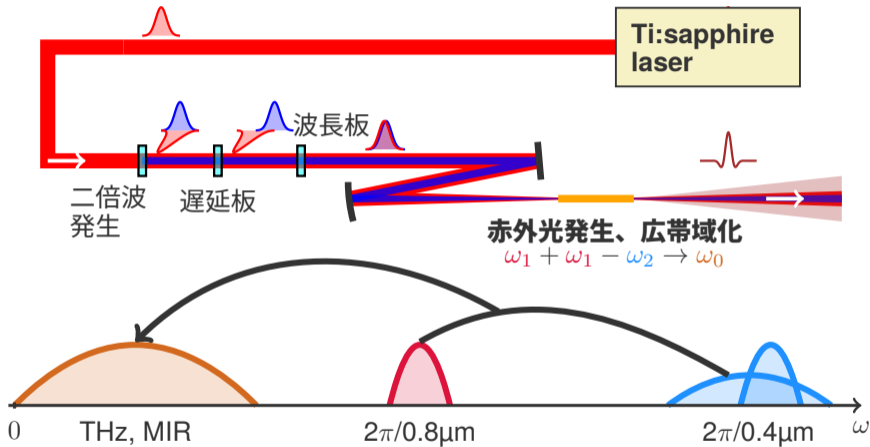
サブサイクル中赤外光パルス発生装置



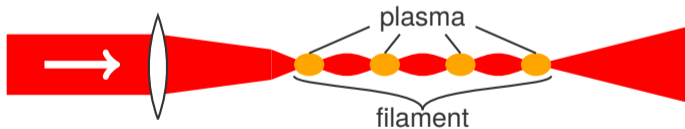
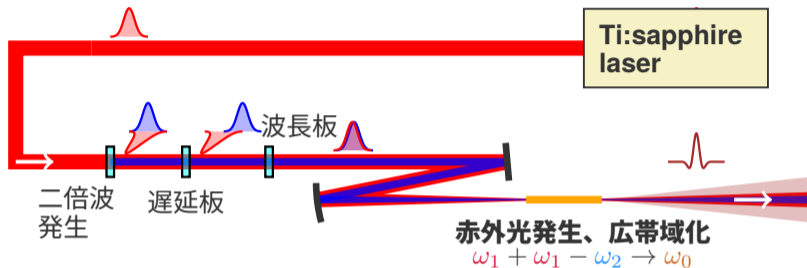
サブサイクル中赤外光パルス発生装置



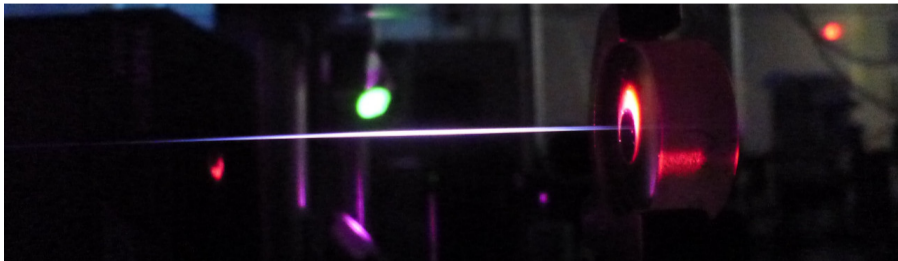
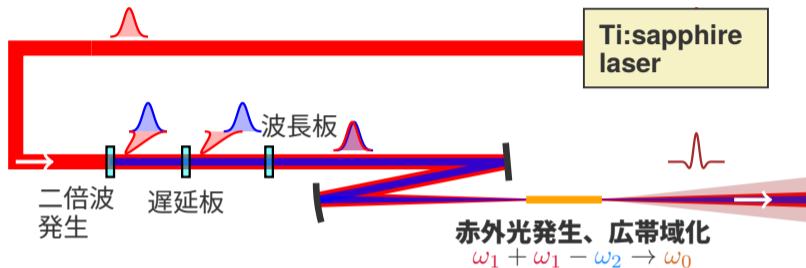
サブサイクル中赤外光パルス発生装置



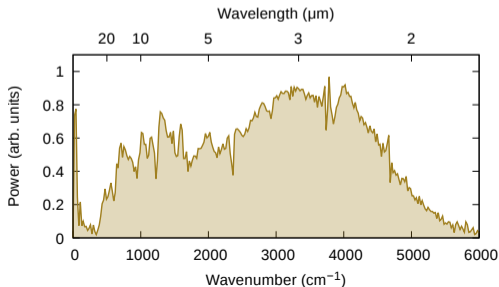
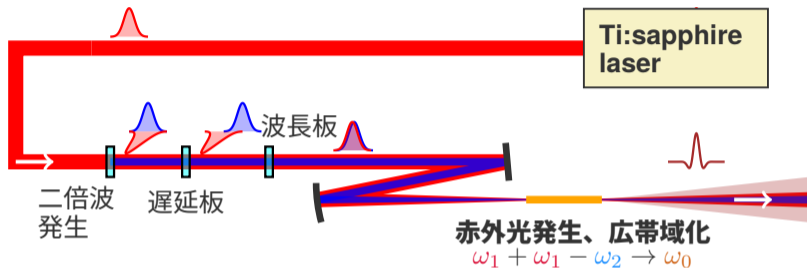
サブサイクル中赤外光パルス発生装置



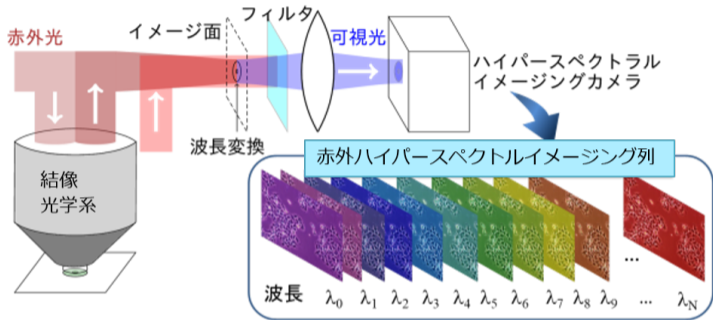
サブサイクル中赤外光パルス発生装置



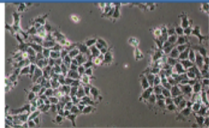
サブサイクル中赤外光パルス発生装置



赤外ハイパースペクトルイメージング

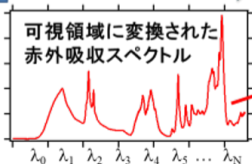


化学構造情報を含まない

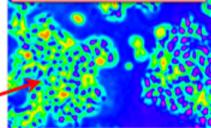


通常の光学像

可視領域に変換された
赤外吸収スペクトル



豊富な化学構造情報



赤外ハイパースペクトル像

*概念図です。

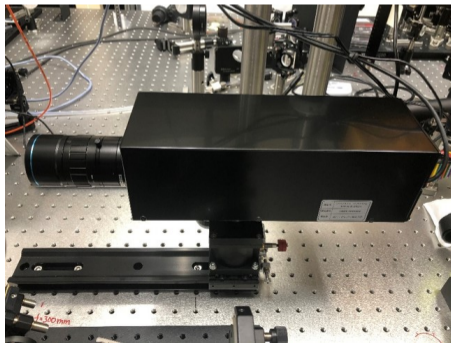
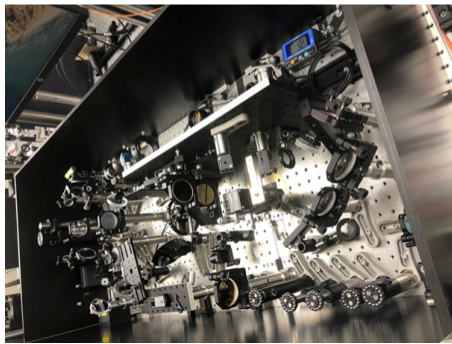
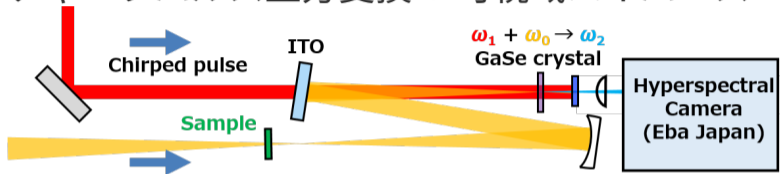
超広帯域かつ高いピーク出力

↓
可視光領域に波長変換

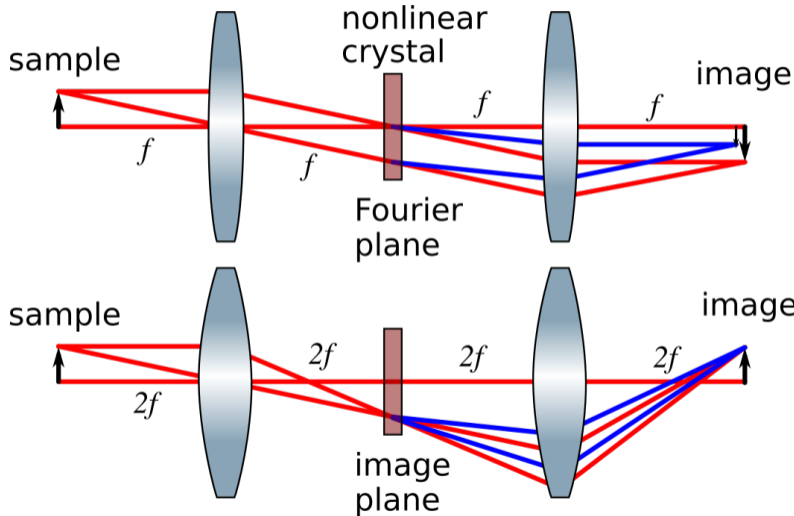
↓
従来ではできなかった
高速・高解像度・広帯域
の赤外イメージング

中赤外分光イメージング装置

チャープパルス上方変換 + 可視域ハイパースペクトルカメラ



波長変換とイメージング



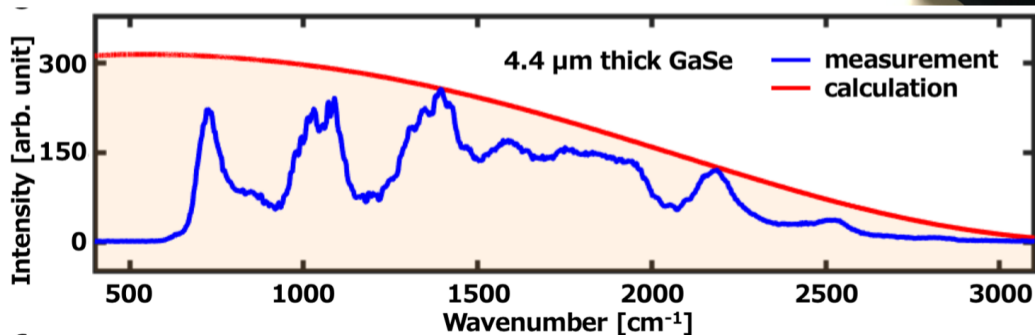
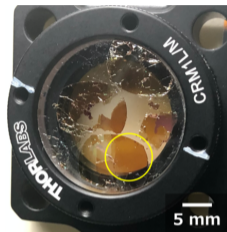
従来の方法: **フーリエ面での波長変換**
像の大きさが波長に依存する。
結晶面での強度が高い。

本研究: **結像面での波長変換**
像の大きさは波長に依存しない。
結晶面での強度は低い。← サブサイクルパルスの高い強度でカバーする。

上方変換の非線型光学結晶

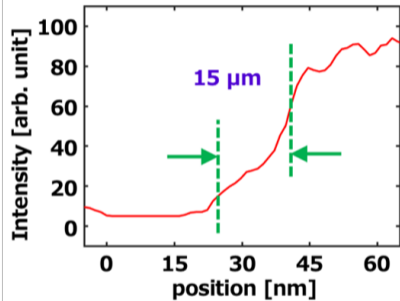
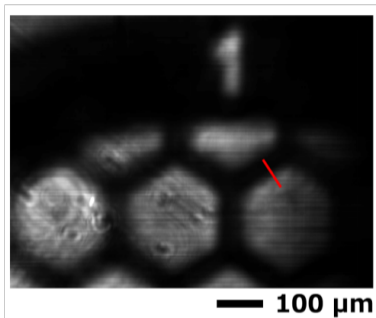
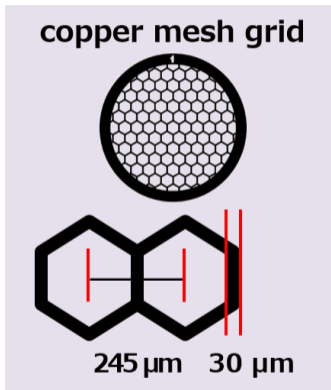
GaSe 結晶 厚み: $4.4\ \mu\text{m}$

スコッチテープ法：へき開性を利用
熔融石英基板 (5 mm) 上に両面テープ ($t=5\ \mu\text{m}$) で接着。

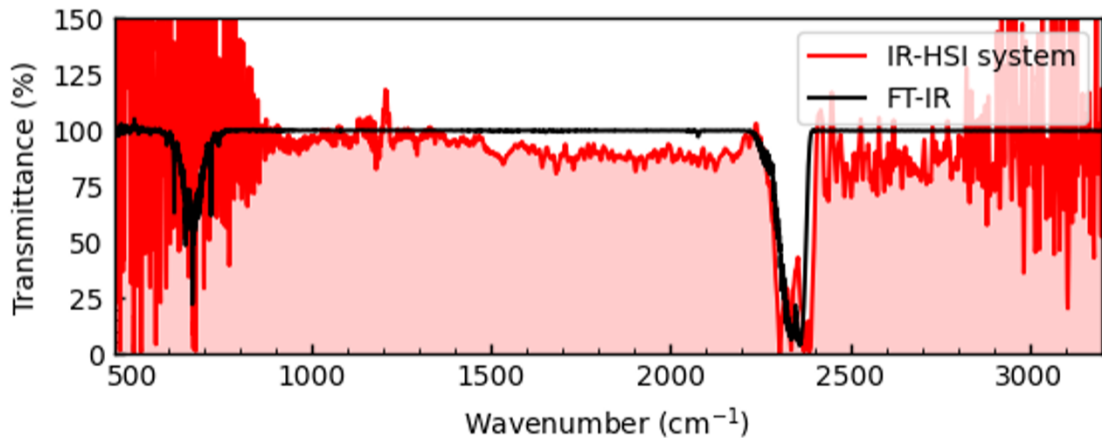


分解能

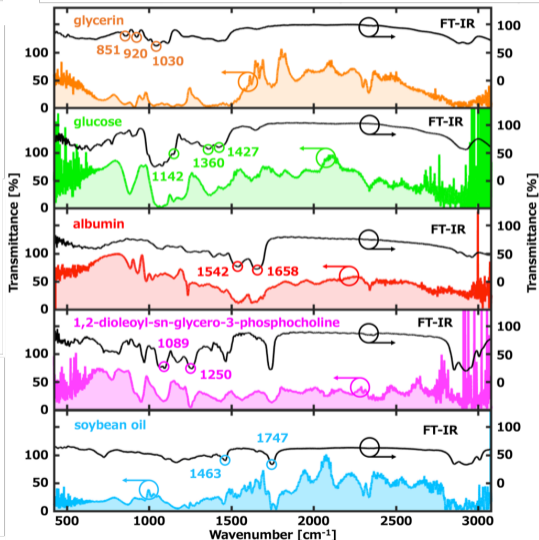
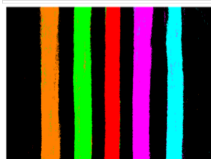
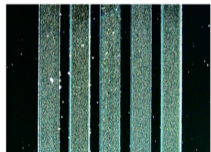
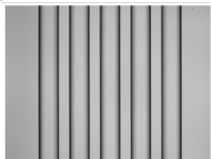
➤ 空間分解能 15 μm



炭酸ガスの吸収スペクトル



マイクロ流路



グリセリン

- 851 cm^{-1} : C-C 伸縮
- 920 cm^{-1} : C-O 対称伸縮
- 1030 cm^{-1} : C-O 伸縮

グルコース

- 1142 cm^{-1} : CH_2 変角
- 1360 cm^{-1} : C-H 変角
- 1427 cm^{-1} : CH_2 変角

アルブミン

- 1542 cm^{-1} : Amide II (N-H, C-N)
- 1658 cm^{-1} : Amide I (C=O)

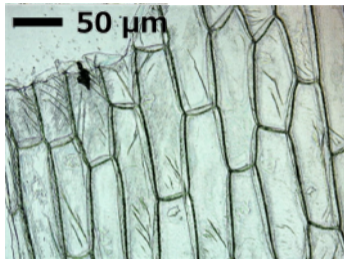
りん質

- 1089 cm^{-1} : PO_2 対称伸縮
- 1250 cm^{-1} : PO_2 非対称伸縮

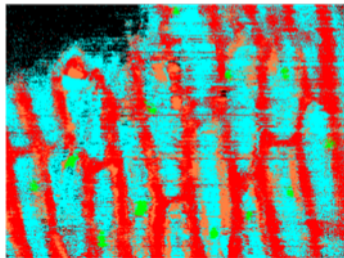
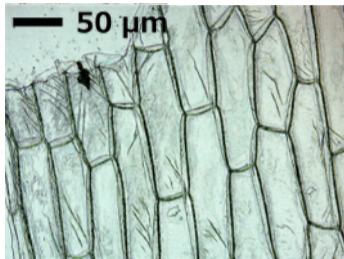
大豆油

- 1463 cm^{-1} : C-H 伸縮
- 1747 cm^{-1} : C=O 伸縮

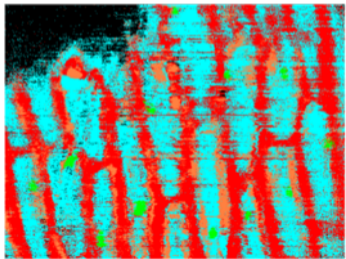
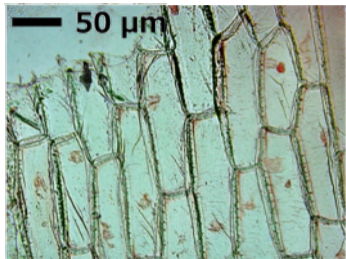
タマネギの細胞



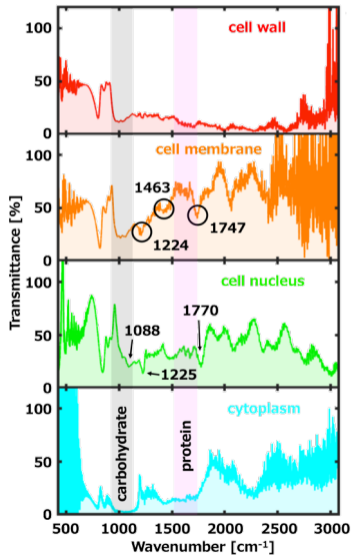
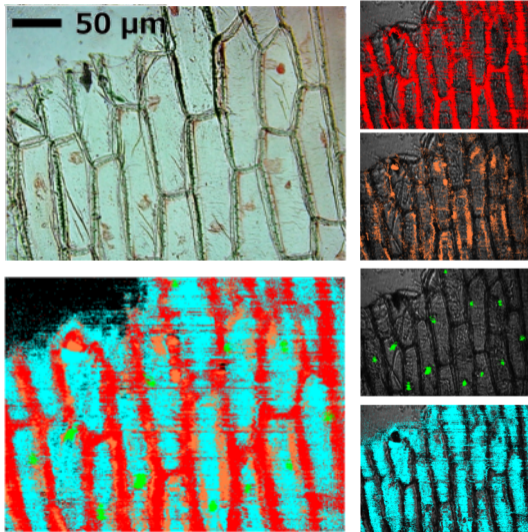
タマネギの細胞



タマネギの細胞



タマネギの細胞



細胞膜

1224 cm^{-1} : リン酸基
1463 cm^{-1} : CH 伸縮
1747 cm^{-1} : C=O 伸縮

核 (DNA)

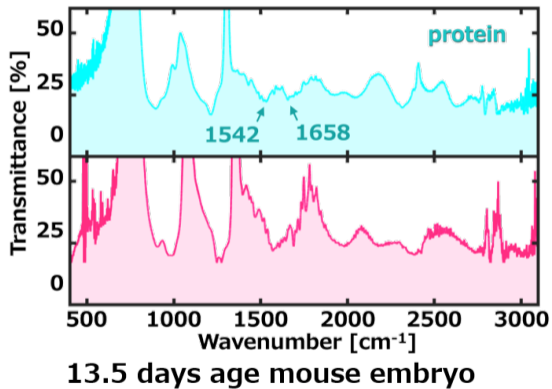
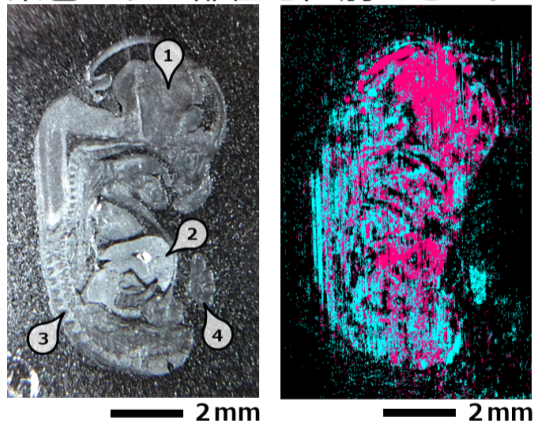
1225 cm^{-1} :
リン酸基 非対称伸縮
1085–1090 cm^{-1} :
リン酸基 対称伸縮
1770 cm^{-1} : 脂質

細胞質

1640 cm^{-1} : Amide I and II

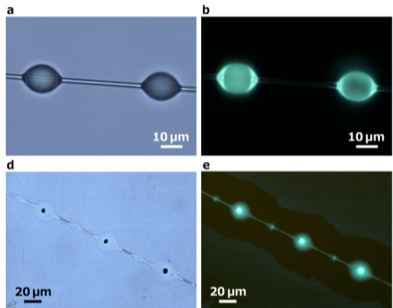
マウス胚子の矢状面

染色せずに部位を区別できた。



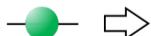
S/N比がもっと高ければより細かい判別ができたかもしれない。

蜘蛛の円網における粘性物質： 天然イオン液体



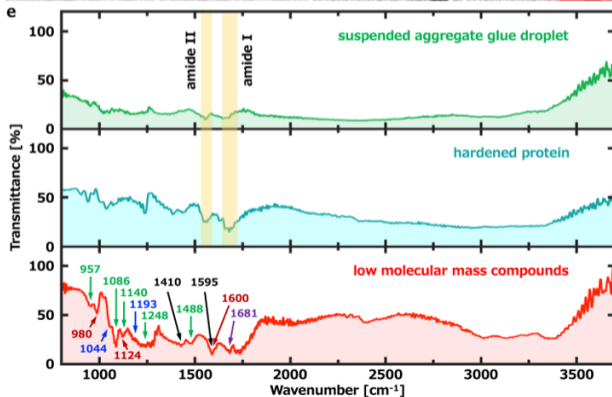
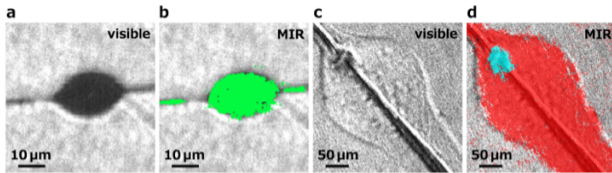
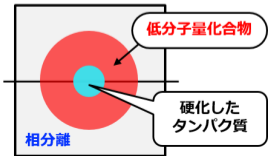
浮いている粘球

天然イオン液体

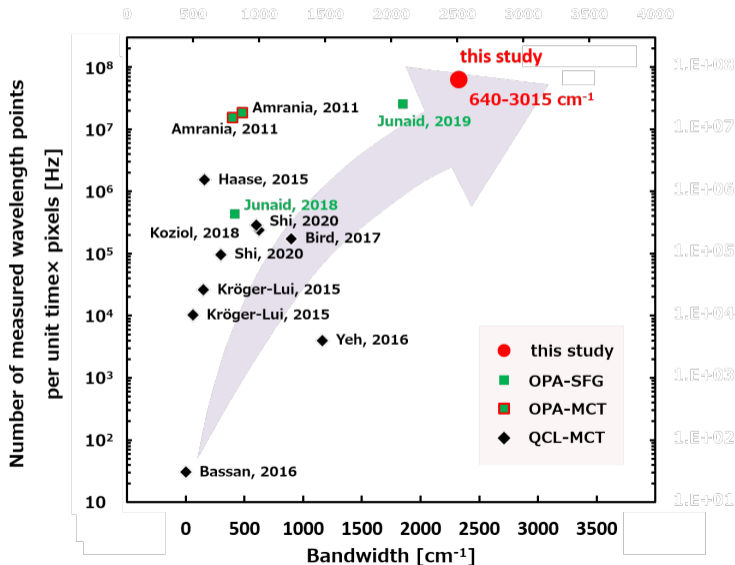


糖タンパク質、リン酸塩、低分子化合物、水など均一的な分布

付着した粘球



他の研究グループとの比較



- ▶ バンド幅 640–3015 cm⁻¹
- ▶ 分解能 ~3 cm⁻¹
- ▶ 波長点数 1069
- ▶ 解像度 640×480 pixels
- ▶ 視野 0.8 mm×0.6 mm (最大 12 mm×9 mm)
- ▶ 空間分解能 15 μm
- ▶ 計測速度 8 s

波長を限定すれば、単一ショット計測も可能 (時間分解能 0.2 ms)

今後の予定と展望

- ▶ 計測予定試料: ロドプシン、がん細胞など
- ▶ 細胞の光操作、化学分析、医療診断装置としての可能性を追求

Y. Zhao, et al. arXiv:2209.06372

Nat. Commun. submitted

趙越 2022年度 豊田奨学基金研究賞 研究奨励賞

多光子蛍光顕微鏡

新規赤外フェムト秒レーザー

非侵襲的超深部イメージング

赤外フェムト秒レーザー

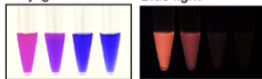
1800 nm

PC

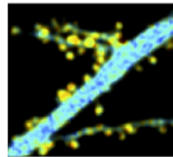
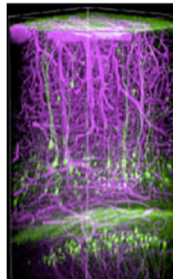
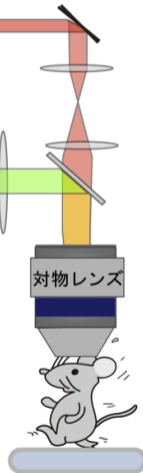
3光子励起顕微鏡の開発

Daylight

Blue light



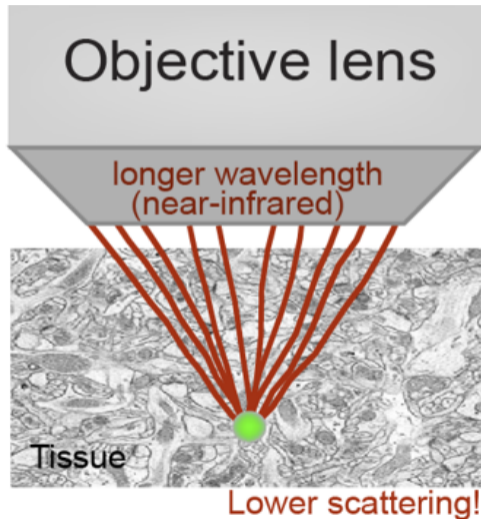
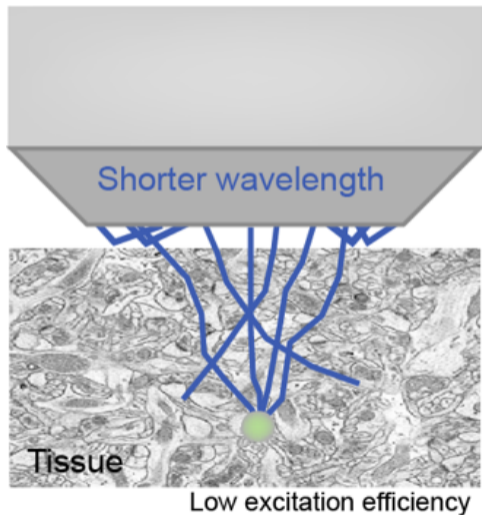
3光子励起用蛍光タンパク質の開発



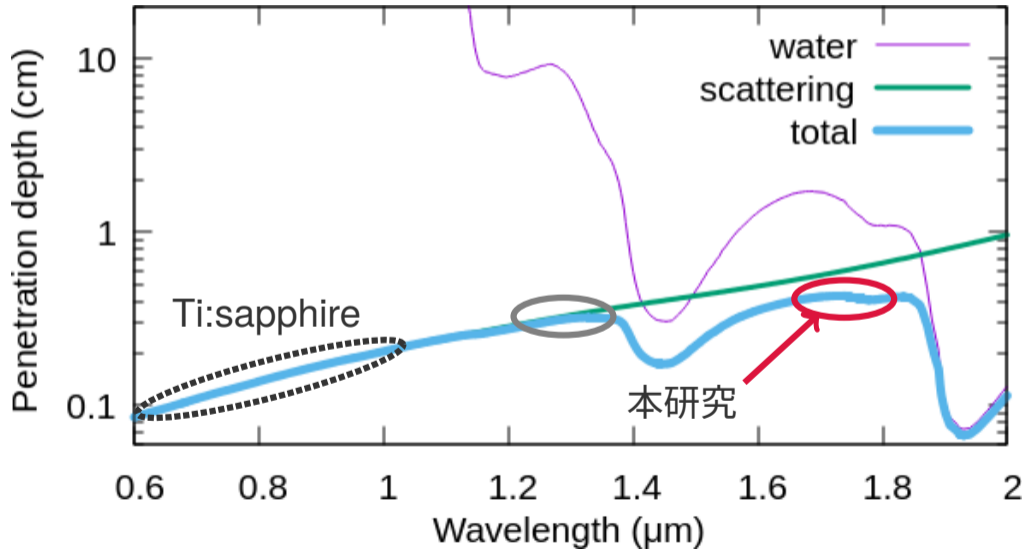
2.7 2.1
蛍光寿命 (ナノ秒)

5 μ m

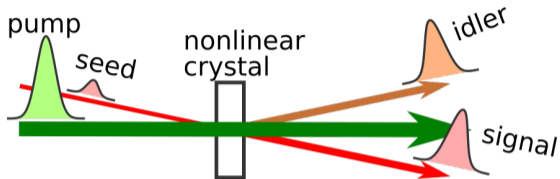
浸透度の波長依存性



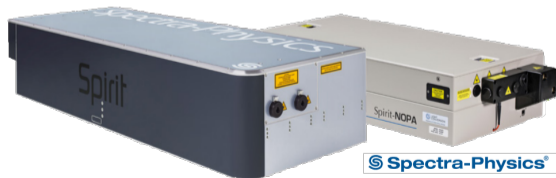
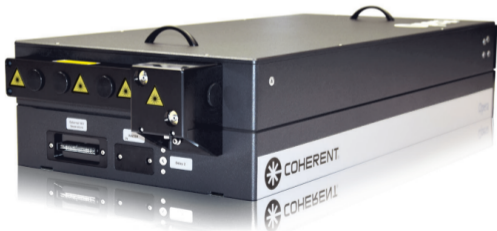
浸透度の波長依存性



光パラメトリック増幅器



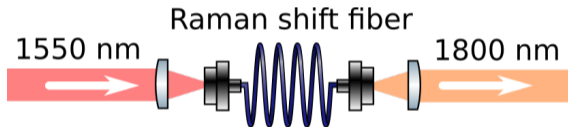
- ▶ 非線型光学過程による増幅 (高強度励起, $> \sim 100$ MW)
- ▶ 寿命のない増幅 (精密な遅延制御)



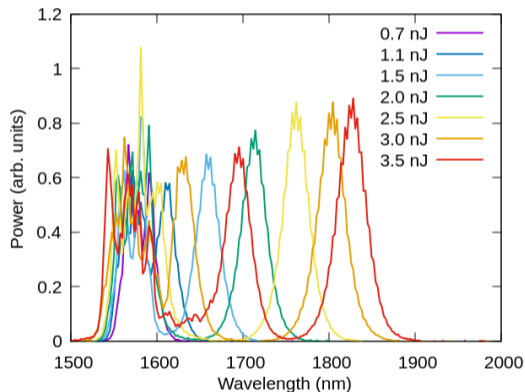
Spectra-Physics®

ファイバーレーザーシステム

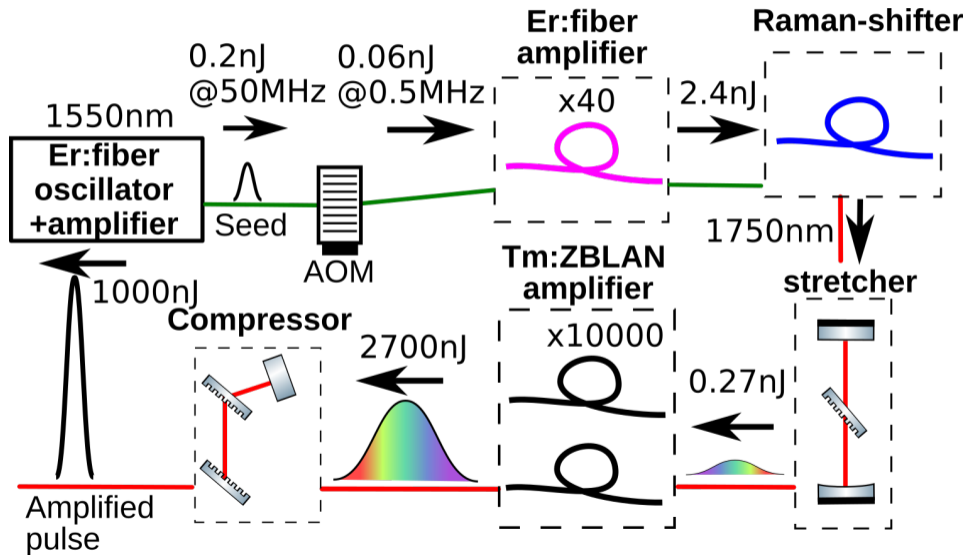
ラマンシフト + Tm:ZBLAN増幅器



- ▶ 高い強度は必要ない
(~ 2.5 kW)
- ▶ 分岐・結合のない光学系



ファイバーレーザーシステム



ファイバーレーザーシステム

Er ファイバー発振器



Er ファイバー増幅器

音響光学素子

励起レーザー

顕微鏡

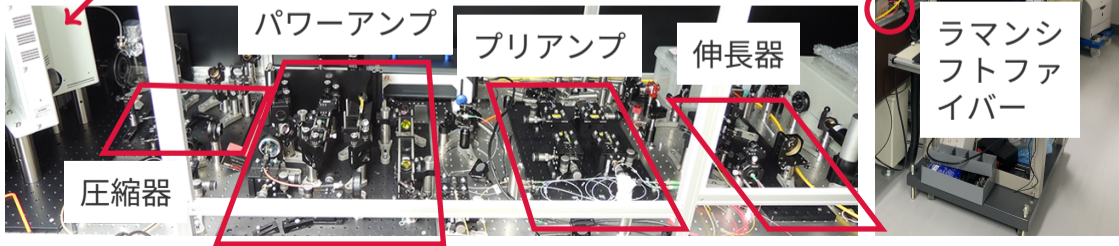
パワーアンプ

プリアンプ

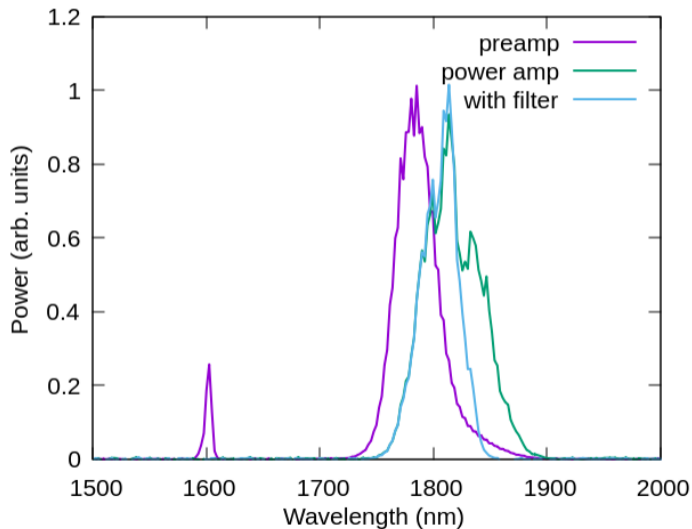
伸長器

圧縮器

ラマンシフトファイバー



Tm:ZBLAN 増幅器

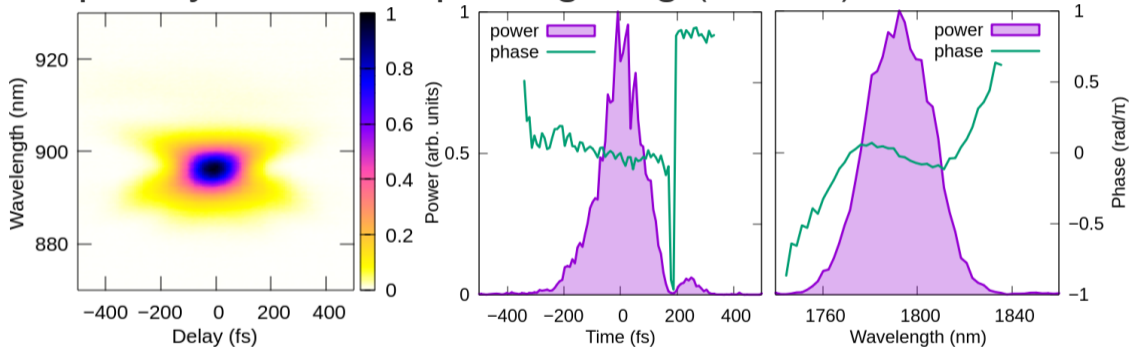


プリアンプ: 40 nJ
パワーアンプ: 2.7 μ J
@5.15W 励起

スロープ効率
26.1%

パルス圧縮

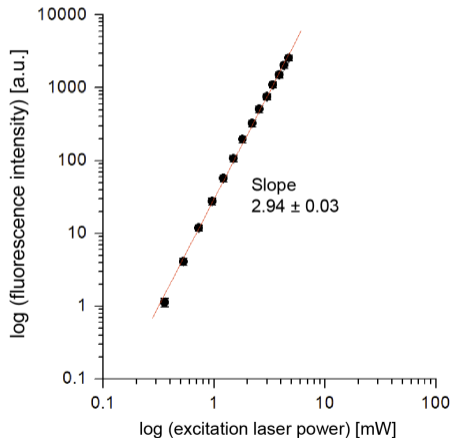
frequency-resolved optical gating (FROG)



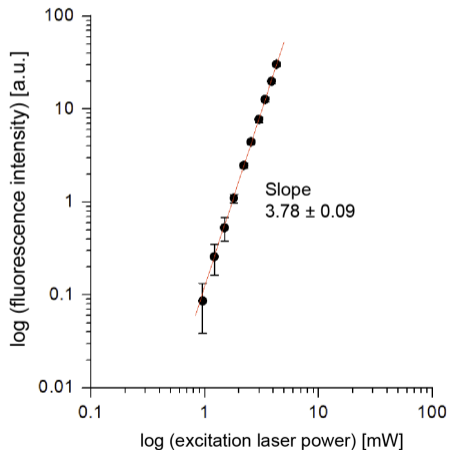
パルス幅: 142 fs (顕微鏡の直前),
パルスエネルギー: 1.0 μJ @0.5 MHz

Power dependence

TurboFP635 3光子励起

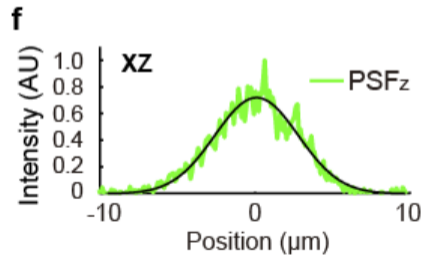
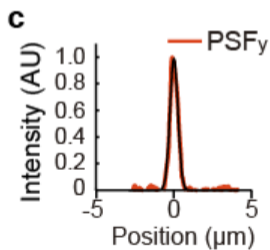
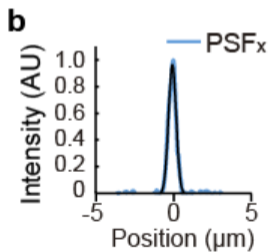
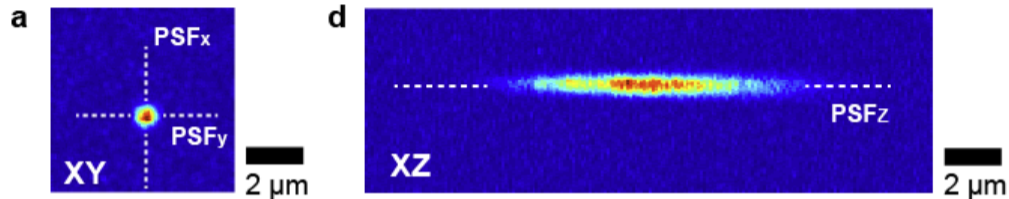


Clover 4光子励起



大腸菌から精製した蛍光タンパク質

点像分布関数



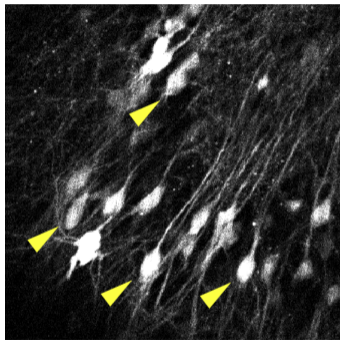
3-photon, 0.2 μm beads

X, Y: 0.56 μm, Z: 6.2 μm (FWHM)

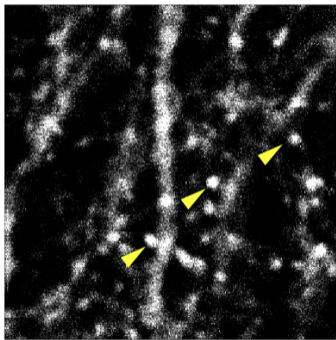
マウス海馬スライスの神経細胞

somata

spines



50 μm

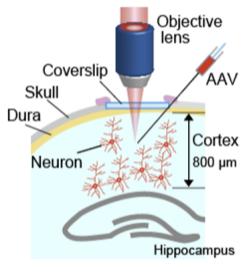


10 μm

TurboFP635 を発現させたマウス海馬スライスの3光子
イメージ像

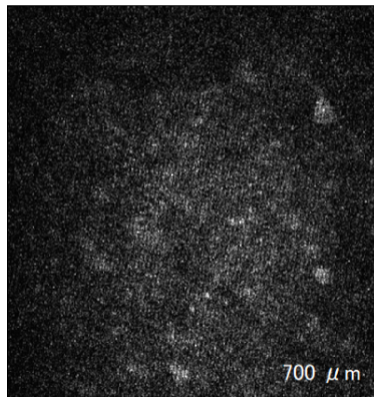
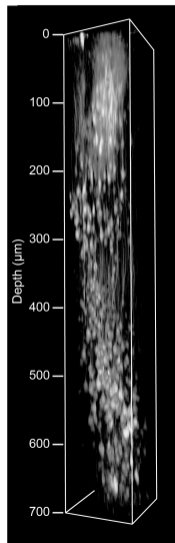
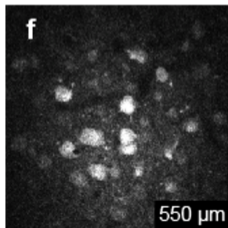
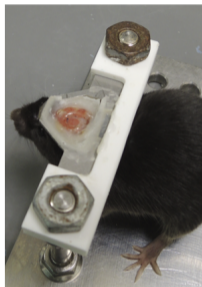
in vivo イメージング: 3光子

mouse(C57BL/6N)
adeno-associated virus(AAV)
→observed after two weeks



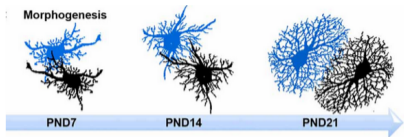
adeno-associated virus (AAV)

CaMKII P0.4 TurboFP635



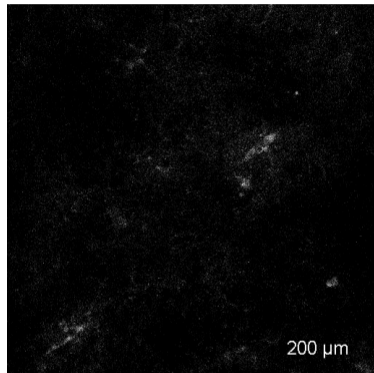
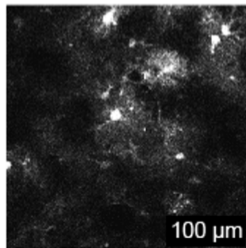
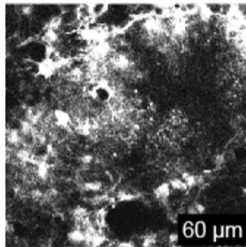
麻醉状態のマウス

in vivo イメージング: 4光子



Juliane Schiweck et al. 2018

mouse(C57BL/6N)
adeno-associated virus(AAV)
→observed after two weeks



gfaBC1D Clover

麻醉状態のマウス

まとめ

- ▶ 多光子励起蛍光顕微鏡のための $1.8\ \mu\text{m}$ ファイバーレーザー: **147 fs, 1 μJ , 0.5 MHz**
→ 光パラメトリック増幅器に代わる選択肢
- ▶ **in vivo** イメージング:
3光子で浸透度 **0.7 mm**, **4光子**で浸透度 **0.15 mm**

H. Murakoshi, et al.
Biomed. Opt. Express **14** 326 (2023)
top downloads in Jan. 2023

謝辞

- ▶ **分子研、豊田工大:** 野村雄高、工藤哲弘、趙越、河瀬広樹、Neil Irvin Cabello, Seyed Ali Rezvani、熊木文俊、草間翔太、濱田航輔、山泉虹輝、岡田海門、本藤史浩、小澤進太
- ▶ **名工大:** 古谷祐詞
- ▶ **生理研:** 村越秀治、植田大海、長谷川裕太郎
- ▶ **ファイバーラボ:** 三村榮紀、堀田昌克、後藤龍一郎、小川和彦、梶川詠司
- ▶ **台湾国立陽明交通大学:** 羅志偉、黃威紘
- ▶ **ウィーン工科大学:** Pavel Malevich、Andrius Baltuška
- ▶ **パリ国立高等化学学校:** Clément Livache、Jean-Vincent de Montgolfier