

各ピクセルの吸収スペクトルを 取得する超解像顕微鏡を 可能にする検出法

東京理科大学 理学部第一部 物理学科

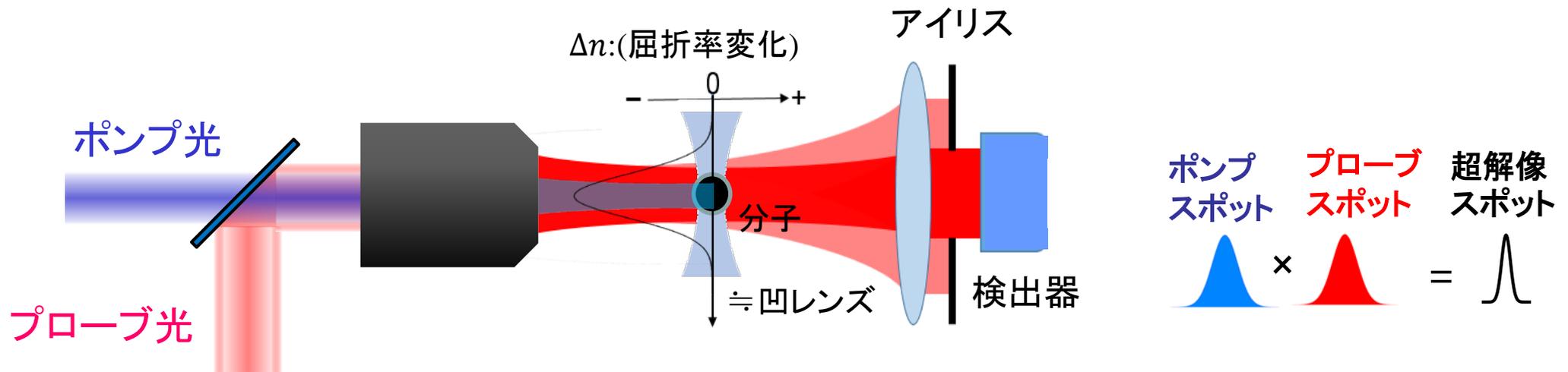
助教 瀬戸 啓介

2019年10月31日

アウトライン

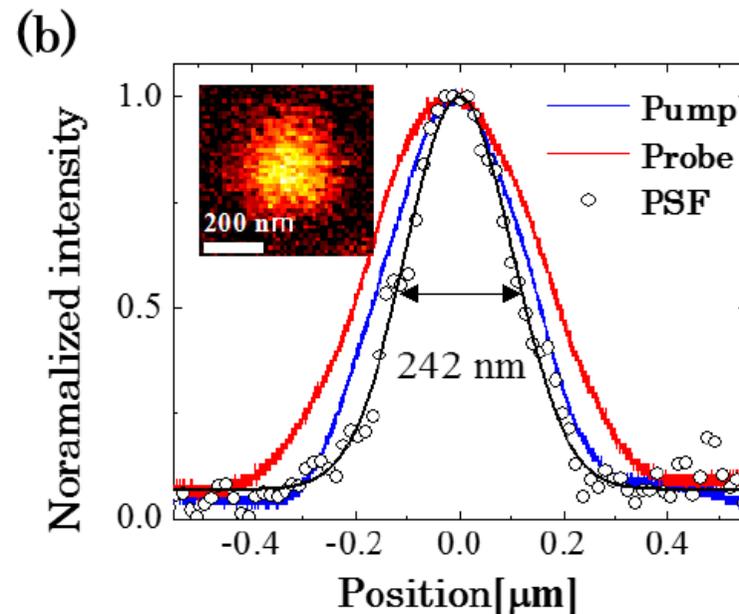
- 本技術の要点
 - 吸収スペクトルも取得する超解像(光熱)顕微鏡において同時多波長計測をしながらもスペクトルの歪みを無くす
- 光熱顕微鏡の概要
 - コントラストを生じる機序
 - 超解像の原理
- 光熱顕微鏡で吸収スペクトルを測定するには
 - 従来法
 - 本技術の原理・特徴
- 原理実証実験
- 課題
- 企業への期待

光熱顕微鏡：コントラスト生成・超解像の原理



- (従来の)生物顕微鏡
 - 主に染色した試料の吸収を観測
 - 解像度は光の波動性に起因する、回折限界で制限
- 光熱顕微鏡
 - 試料が吸収する波長のポンプ光と吸収しない波長のプローブ光の2つの光を照射
 - ポンプ光で発熱 → レンズ形成 → プローブ光の発散角変化
 - ポンプとプローブ光スポットが重なり合った部分の信号 → **超解像**
 - **信号は発熱量とプローブ光強度の積に比例し、吸収が微弱でも増幅可能 → 非染色でイメージング**
- 分析できることの例
 - メラノーマ(悪性黒色腫)などの病理分析
 - 赤外吸収超解像イメージング、生体分子イメージング
 - ガラス材料などの光学特性分析

超解像スポット



- 実効的なスポットサイズ縮小(20 nm金ナノ粒子で評価)*
- ポンプ光回折限界スポット(488 nm)とプローブ光回折限界スポット(640 nm)の両方よりも実効的なスポットは小さい
 - 得られる像はスポット中の構造の平均の集合なので、**スポットが小さい程、解像度は高い**

*J. Miyazaki et al., *Photonics* **32** (2017) 4.

超解像イメージング

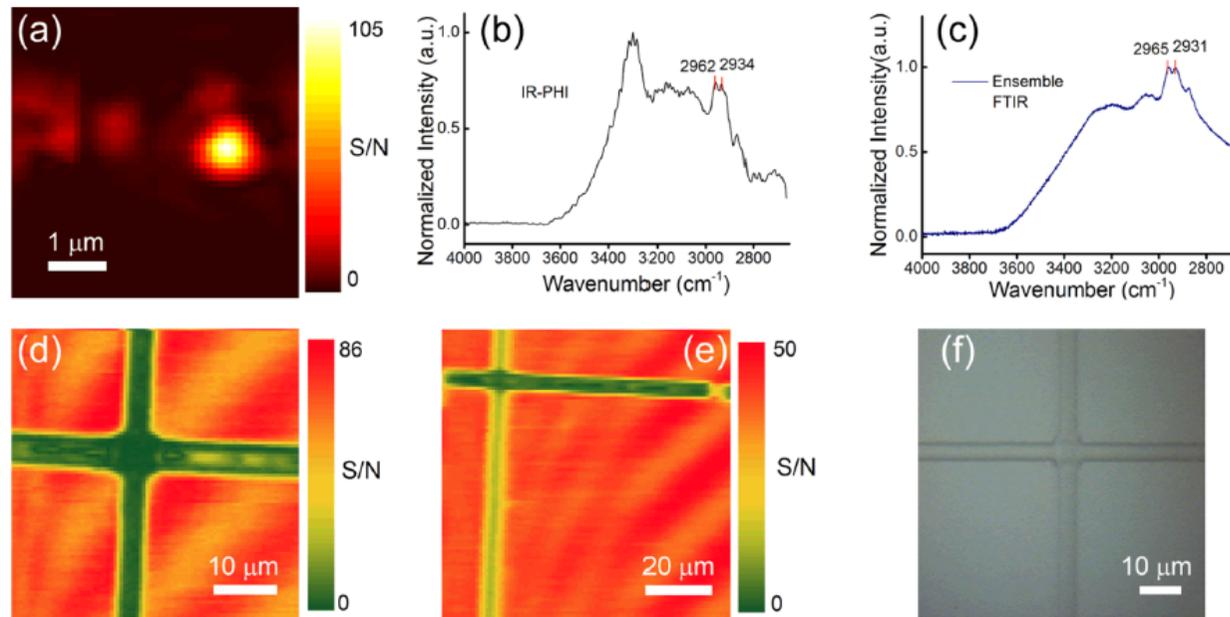


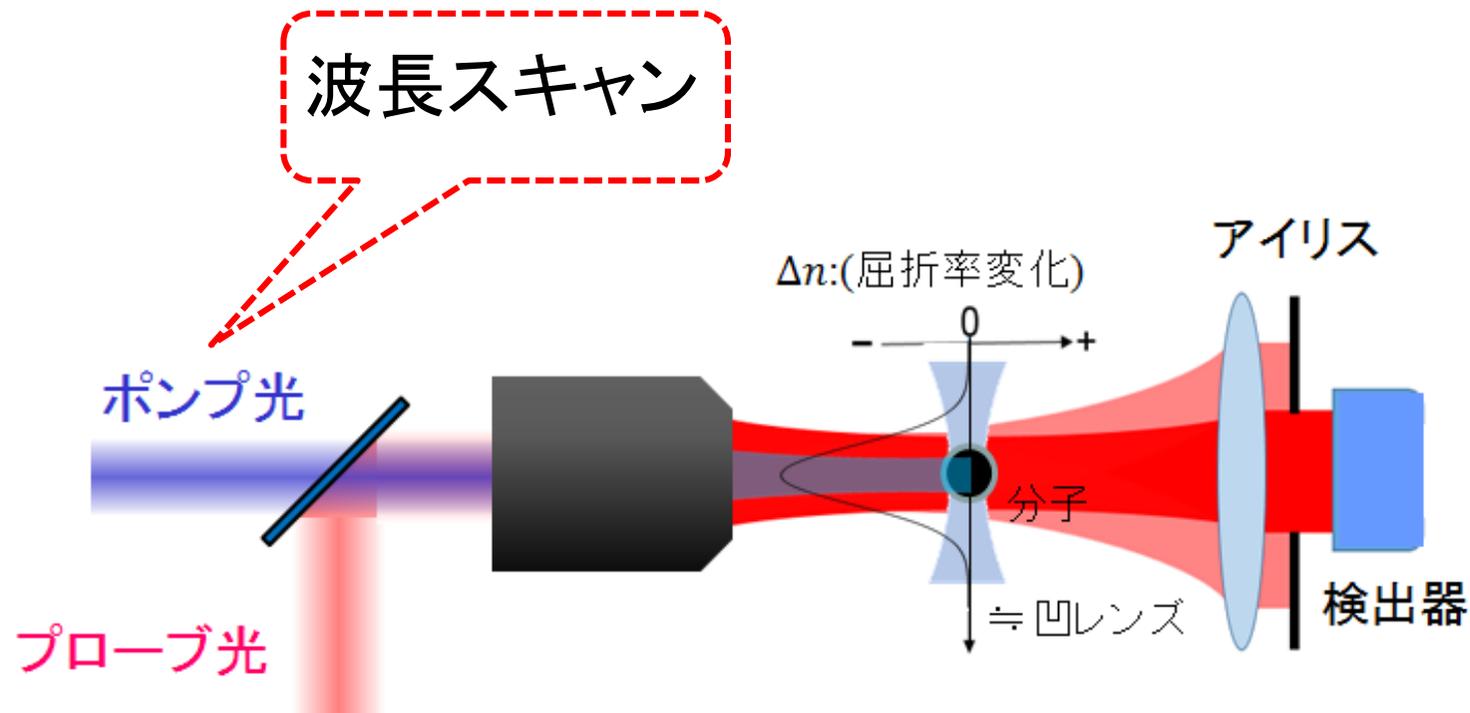
Figure 3. (a) IR-PHI images of a single *E. coli* cell at 2968 cm^{-1} . (b) IR-PHI spectrum of a single *E. coli* cell. (c) Ensemble FT-IR spectrum of the *E. coli* sample. (d, e) IR-PHI images of a patterned photoresist recorded over different fields of view. (f) The corresponding white light image for panels (d) and (e). The pump and probe powers were 2 and 10 mW, respectively, and the step sizes for the images were $0.1\text{ }\mu\text{m}$ for panel (a), $0.5\text{ }\mu\text{m}$ for panel (d) and $1\text{ }\mu\text{m}$ for panel (e).

赤外吸収(分子振動)に基づくイメージ*

- $\sim 3,000\text{ cm}^{-1}$ の波長は $\sim 3\text{ }\mu\text{m}$ で、論文の実験条件では回折限界は $\sim 4.5\text{ }\mu\text{m}$ となる。
- ポンプ光の回折限界を超えた $1\text{ }\mu\text{m}$ 以下の構造を観測
- プローブ光波長は $0.53\text{ }\mu\text{m}$

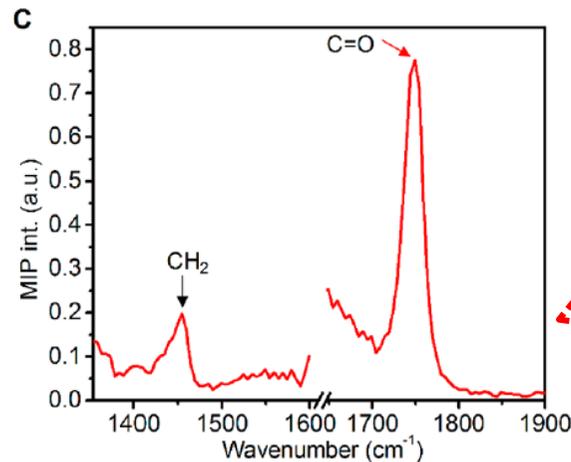
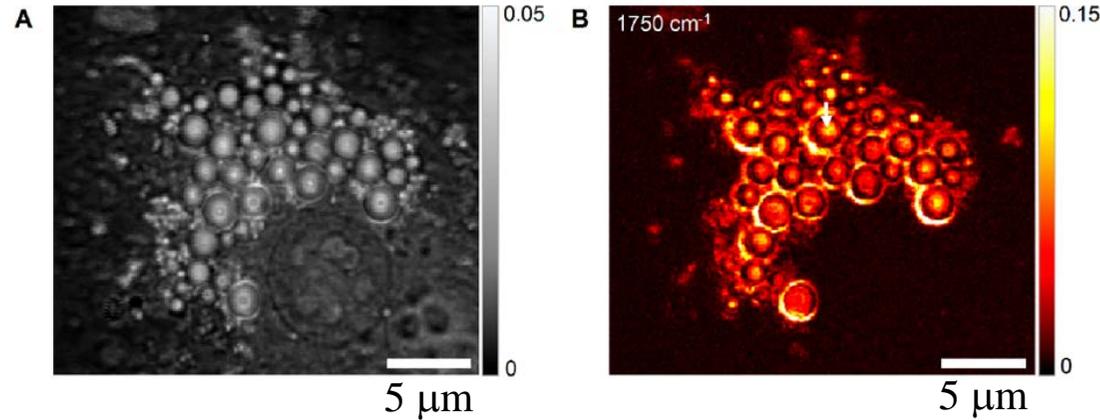
* Zhongming Li et al., *J. Phys Chem B* **121** (2017) 8838-8846.

スペクトル取得の従来法1(光源波長スキャン)



- 吸収スペクトルを取得すると、試料中に含まれる物質の定性、定量分析が可能になる。
 - 生体組織内の生理活性物質分布の分析
 - 薬剤動態の分析

スペクトル取得の従来法1(光源波長スキャン)



赤外吸収
スペクトル
1波数あたり
30 msかかる

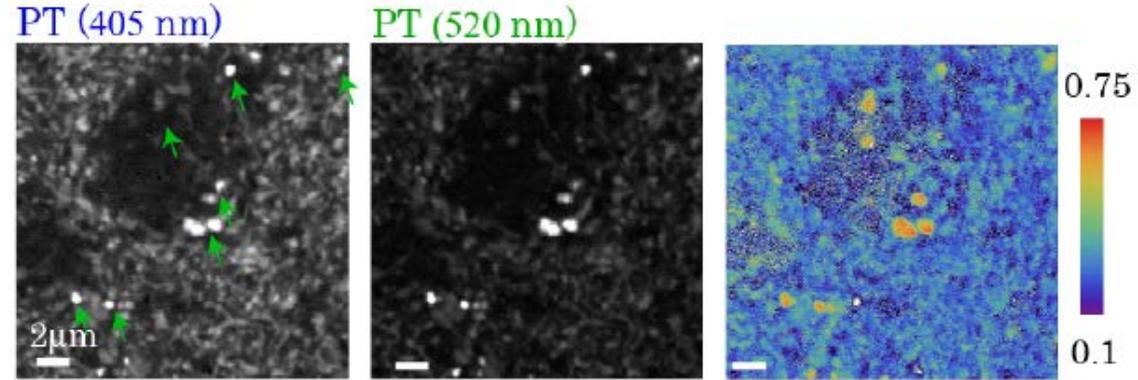
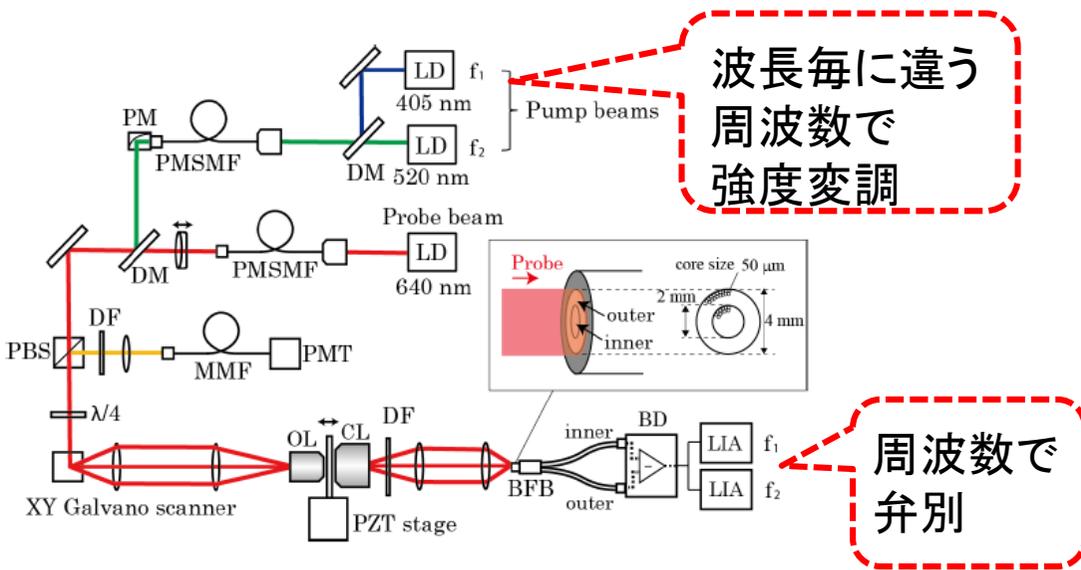
赤外吸収(分子振動)に基づくリピッドの選択的イメージ

L. Xiaojie et al., *Anal. Chem.* **91** (2019) 10750.

- 光熱顕微鏡ではポンプ光波長をスキャンすると、超解像を保ったまま、吸収スペクトルを取得できる(上図のポンプ光波長は $\sim 5 \mu\text{m}$)。
- 波長スキャンは時間が掛かる、、、

スペクトル取得の従来法2(離散的スペクトル)

光熱2色イメージング



リピッド?

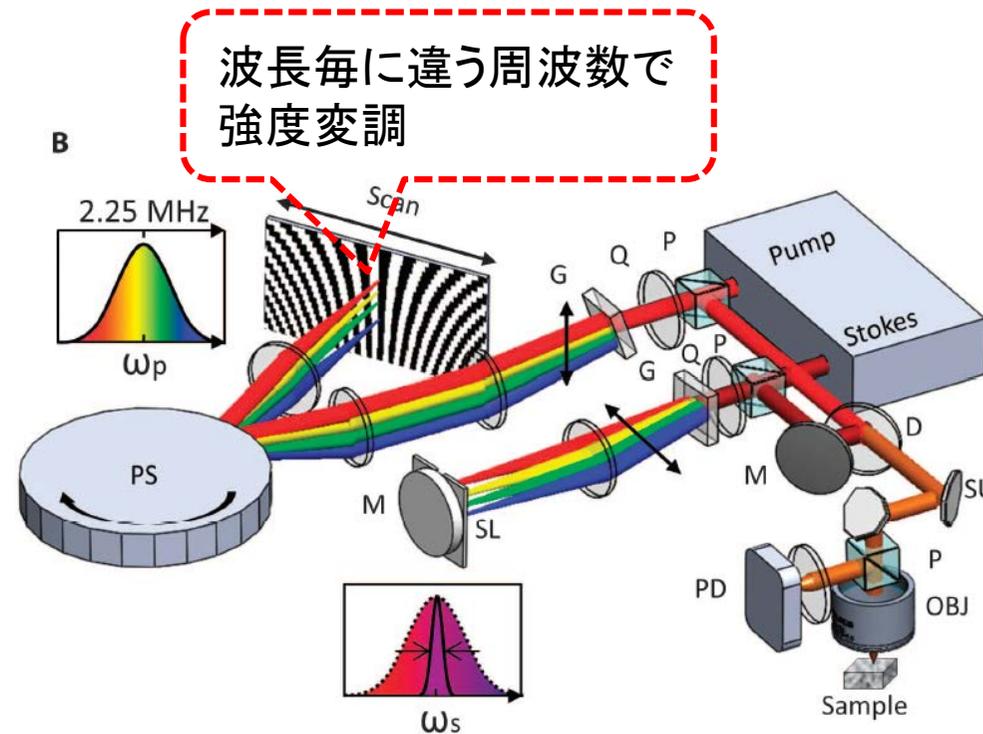
シトクロームC?
神経細胞

比のイメージ

J. Miyazaki et al., *Biomed. Opt. Express* 7 1702 (2016).

- 異なる波長のポンプ光を異なる周波数で変調し、プローブに含まれる信号を周波数で弁別(周波数多重化法)
- 例えば、、、ポンプ光波長をAMラジオ放送のチャンネルに対応させると、沢山のラジオで同時に多数の放送を受信するのと近い原理。プローブ光は電波に相当。

スペクトル取得の従来法2(連続的スペクトル)

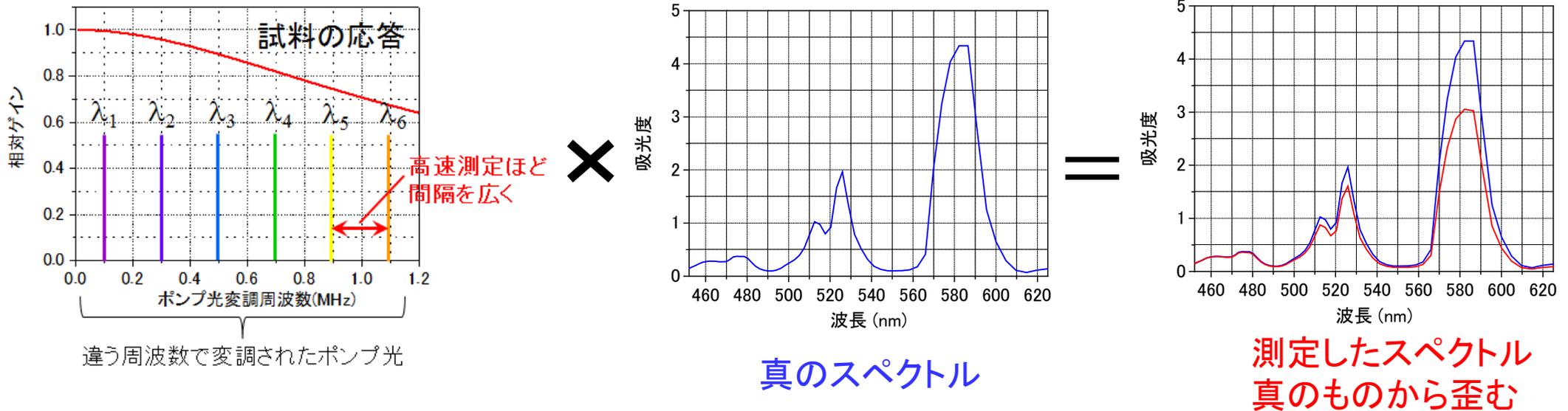


L. Chien-Sheng et al., *Sci. Adv.* **1** (2015) e1500738.

(但し、光熱顕微鏡ではなく、誘導ラマン顕微鏡に使用)

- 白色ポンプ光の波長を空間的に分け、パターンマスク上をスキャンして、波長毎に違う周波数で強度変調
- 波長に関して連続的に強度変調を掛ける

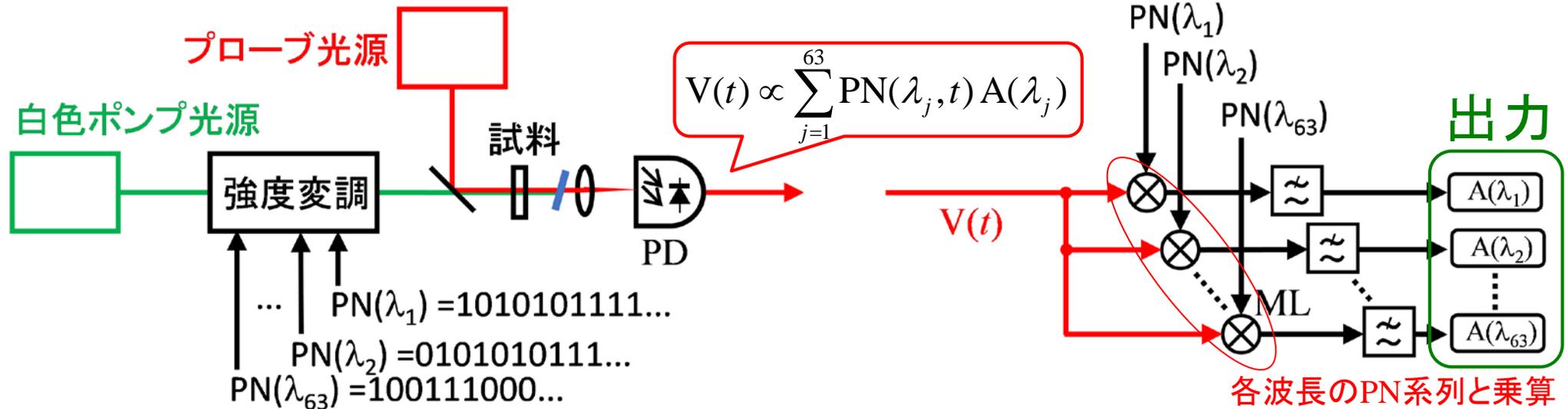
従来法2の問題点



- 熱レンズの生成と消滅には時間が掛かるので、強度変調の周波数が高くなると応答できなくなる(ゲインが下がる)。
 - 典型的な遮断周波数は~1 MHz
- 周波数多重化法では、高い周波数に割り当てる波長と低い周波数に割り当てる波長で、ゲインが異なる → スペクトルが歪む
 - 特に波長の数を増やし、かつ高速に測定する場合に問題。

本技術の原理・特徴

本技術の原理・特徴



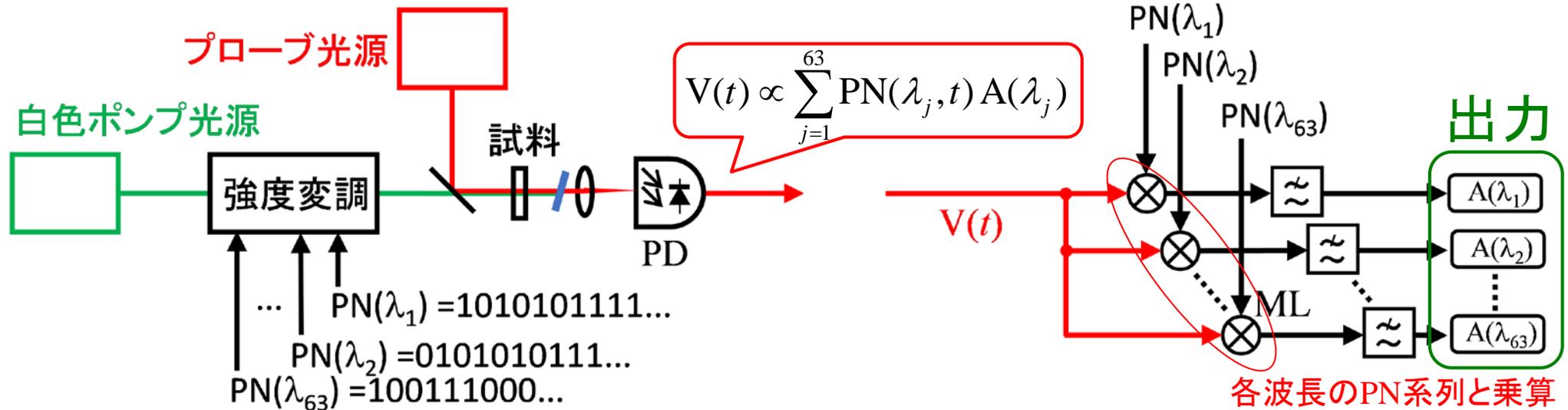
● ポンプ光

- 波長毎にビットがずれた疑似乱数(1010101111...)で強度変調
- ビットがずれているだけなので、使う周波数帯域は全波長で同じ
- 波長が違ってても試料のゲインは変わらない → スペクトルが歪まない

● プローブ光

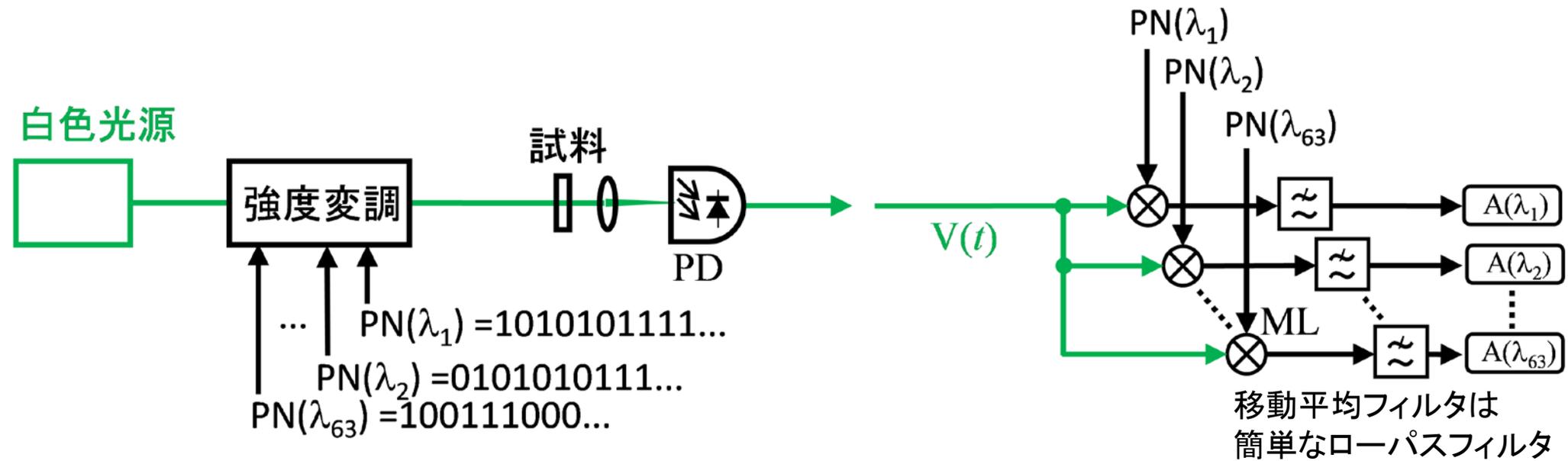
- 各々の波長での、ポンプ光で生成した熱レンズと疑似乱数の積の総和

本技術の原理・特徴



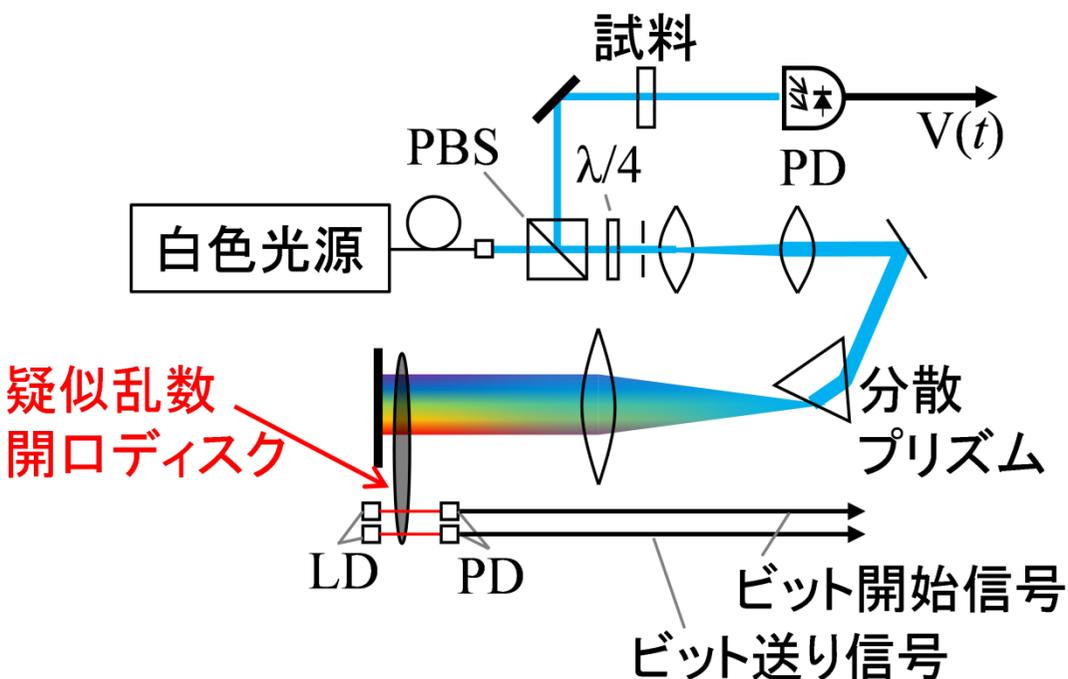
- プローブ光検出信号と波長に対応する疑似乱数系列と乗算し、移動平均すると、その波長の吸収の信号を取り出せる
- 全ての波長でこの操作をすると、**同時多波長・スキャンレスで吸収スペクトル取得可能**

原理実証実験

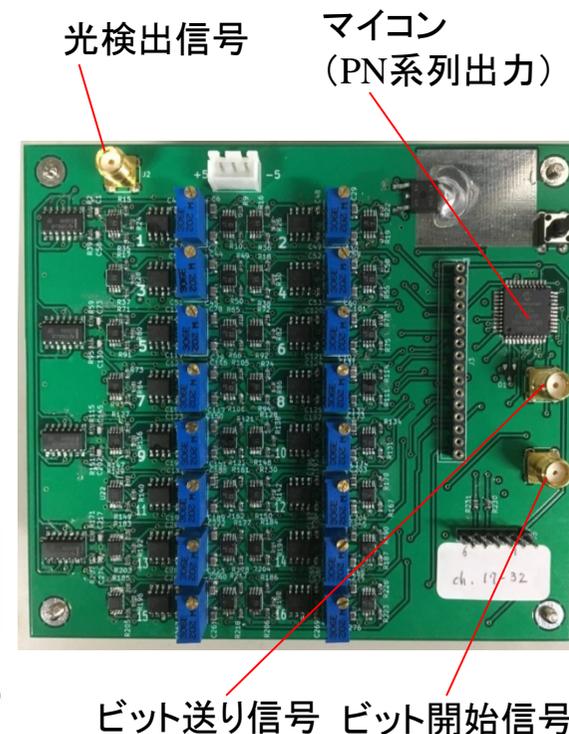


- ポンプ光源が分光されて検出できるのを確認
- 簡単のために、プローブ光源を省略し、ポンプ光そのものをプローブ光と捉える
 - 試料の透過率を測定

装置

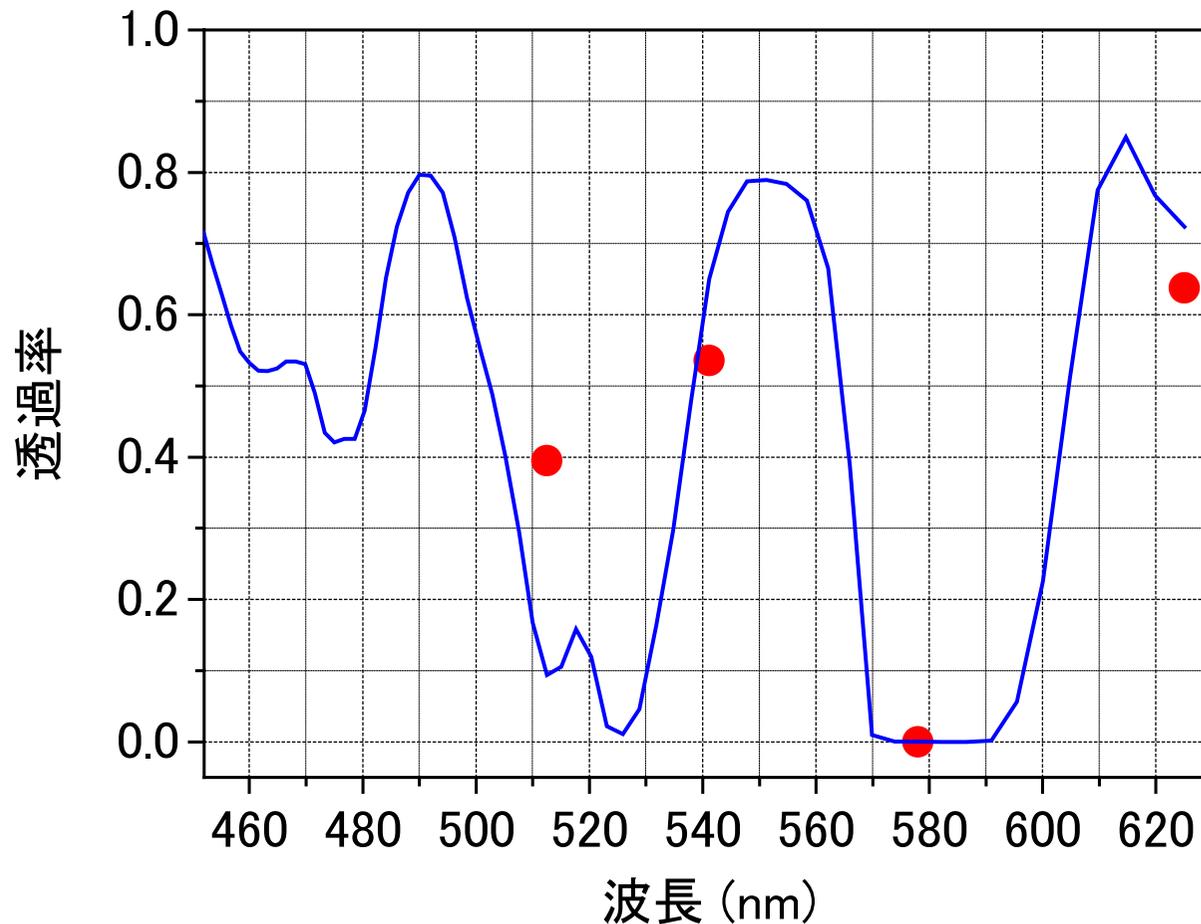


疑似乱数ディスク(4周期)



- ポンプ光源を分光し、回転する疑似乱数開口ディスクで波長毎に変調し、再び重ね、試料に入射
- 復調の疑似乱数系列はマイコンで生成
 - ビット開始とビット送り同期は、予め回転ディスクに開口し、レーザーで検出してマイコンと同期

測定結果 (Ndガラス)



- 概ね良好に分光できた。
- 誤差要因
 - 移動平均フィルタを簡単なローパスフィルタとしたため
 - クロストークを最小化するためには、正確に1周期の移動平均を取る

まとめ

- 超解像吸収測定が可能な、光熱顕微鏡向け低歪み分光測定法を開発した
 - ポンプ光の波長に応じてビットをずらした疑似乱数系列で強度変調
 - 波長に対する試料の応答をプローブ光は含む
 - 各波長における疑似乱数系列とプローブ光と乗算・移動平均をとることで各波長における試料の吸収スペクトルを一度に抜き出す
- 光熱顕微鏡では試料の応答が遅く、従来の周波数多重化法ではスペクトルが歪む
- 本技術は波長でビットをずらしただけの同じ疑似乱数系列なので全ての波長が占有する周波数帯域が等しい
 - ゲインに違いが無いので、スペクトルが歪まない

想定される用途

- 高速な吸収分光超解像イメージング
 - イメージング(複数の物質の濃度分布)
 - 生体内の非染色、微小部位の構造解析、異物分析
 - 赤外域白色光源をポンプ光とする
 - **分子振動と計測**する定性・定量性が高い赤外吸収超解像イメージング可能
 - 薬剤動態分析
 - 小分子薬剤はラベル剤で動態が乱されるが、分子振動を観測する場合、ラベリング不要
 - 赤外線は~10 μm までしか空間分解できないが、可視プローブを用いると、~1 μm まで空間分解できる

実用化に向けた課題①

- 本方法により、ポンプ光分光できる原理実証ができた段階。
- 実用化に向けた課題（光変調部）
 - 疑似乱数開口ディスクの回転速度が速度制限となっている
 - 空気抵抗を減らすため、変調器部分を真空にするか。
 - ディスクを回転させるのではなく、ガルバノミラーやポリゴンミラーで光の方をスキャンする
 - Digital micromirror device (MEMSミラー) を用いる

実用化に向けた課題②

- 実用化に向けた課題（検出部・インターフェイス）
 - 移動平均部を簡単なアナログローパスフィルタとしたので、誤差を生じる
 - 移動平均フィルタによりクロストークを減らす
 - 多数の波長計測用インターフェイス
 - ポンプとプローブを重ねるのはやや高度な光学調整を要する、堅牢な光学系が必要

企業への期待

- 顕微鏡を開発する光学機器メーカー様には本技術の導入が有効と思われる。
- 移動平均フィルタはデジタル信号処理(DSP)の技術により克服できると考えている。
- インターフェイスの問題は機器とコンピュータを接続する汎用の技術である。
- 光学計測機器・オプトエレクトロニクスの技術を持つ、企業との共同研究を希望。
 - 製品にするために、性能と信頼性やコストとのバランスなど、最適な方法を模索

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 作用スペクトル出力装置及び作用スペクトル出力方法
- 出願番号 : 特願2018-208256
- 出願人 : 学校法人東京理科大学
- 発明者 : 瀬戸 啓介、他3名(計4名)

お問い合わせ先

東京理科大学

研究戦略・産学連携センター

名久井 恒司（担当URA）

TEL 03-5228-7431

FAX 03-5228-7442

e-mail ura@admin.tus.ac.jp