

## 2 光子コヒーレンストモグラフィー法の開発

### Two-photon coherence tomography

2181023



研究代表者

東京大学大学院 理学系研究科

助教

平松 光太郎

#### [研究の目的]

光コヒーレンストモグラフィー (Optical Coherence Tomography: OCT) 法は光を用いて組織の断層像を測定する方法として広く用いられている。市販の OCT 装置を用いた臨床応用が広く行われており、緑内障や糖尿病による網膜症の診断に有用なツールとして認識されている。OCT の利点は生体組織の 3 次元的画像を短時間・非侵襲に取得できることであるが、一方で、蛍光イメージングやラマンイメージングといった手法に比べて分子特異性が乏しい。本研究では、非線形分光法と OCT 法を組み合わせたイメージング手法を開発し、分子情報を有する 3 次元イメージングを目標として要素技術開発を実施した。また、蛍光とラマンといった異なる光学現象を組み合わせることによる新しい分光測定法の開発にも取り組んだ。干渉分光法を活用することで、ラマン分光と蛍光分光という従来同時に測定することが困難であった 2 つの測定モードの両立に成功し、マイクロ粒子解析への応用も行った。

#### [研究の内容, 成果]

##### 1. 光周波数コムを用いた 3 次元イメージング法の開発

本研究ではまず、高速な 3 次元イメージングを実現するために、2 台の光周波数コムを光源

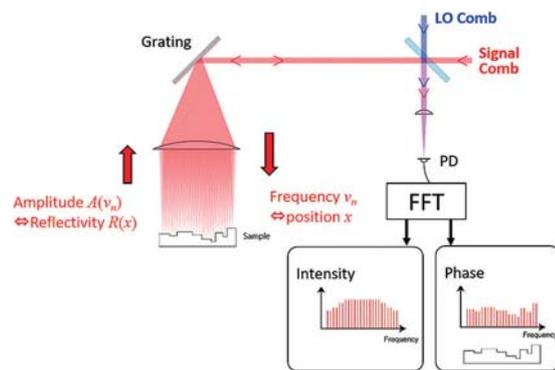


図1 デュアルコム 3次元イメージングの原理

として用いるデュアルコム法の利用を検討した。図1に測定原理の概略を示す。繰り返し周波数の安定化されたモードロックレーザー (Taccor, Laser Quantum, 800 nm, 20 fs, 1 GHz) からの出力を回折格子によって波長分散させたのちサンプルに照射する。

分光器と同様、異なる波長の光が異なる場所に集光されるため、サンプルの位置情報を周波数にエンコードすることができる。サンプルからの反射光を周波数の異なる別の周波数コムと重ね合わせることで、2つのレーザー間の干渉信号を測定することで、サンプルから反射した光の複素スペクトルを測定することができる。上述のように、空間情報が波長にエンコードされているため、スペクトルの位相と振幅からサンプルの 1 次元断層像を取得できる。

開発した装置をもちいて測定した断層像を図2に示す。ガルバノスキャナを用いて 1 軸を走査し、図1の原理で 2 軸分を測定することで 3

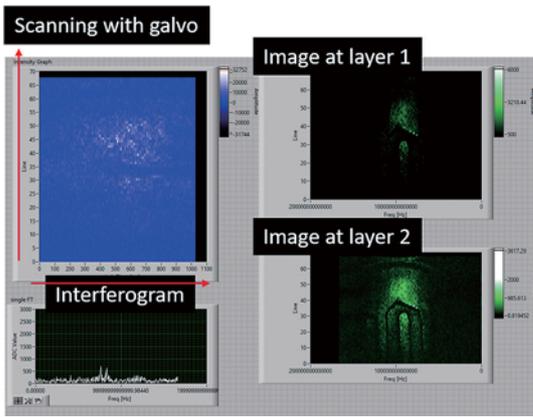


図2 デュアルコム3次元イメージングによる100円硬貨のイメージング

次元測定を実現した。図2の右上図，右下図は光軸方向に異なる断面で測定した100円硬貨のイメージだが，断面位置の違いに対応して異なる像が得られており，3次元的に解像した測定が実現していることがわかる。今後，さらなる高感度化及び高精度化を進め，生体組織のイメージングへと応用していく予定である。

## 2. 高速走査干渉分光法を用いた蛍光・ラマン同時測定法の開発

本研究では当初干渉分光法による3次元2光子蛍光イメージング法の実現を主たる目的として研究を進めていたが，本手法を拡張することで2光子蛍光励起スペクトル及びラマンスペクトルの同時測定が可能であることを見出し，その開発も並行して行った。

図3に干渉分光法による2光子励起 (Two-photon excitation: TPE) スペクトル測定法の原理を示す。フェムト秒レーザーからの広帯域パルスを2つに分け，一定の遅延ののちに重ね

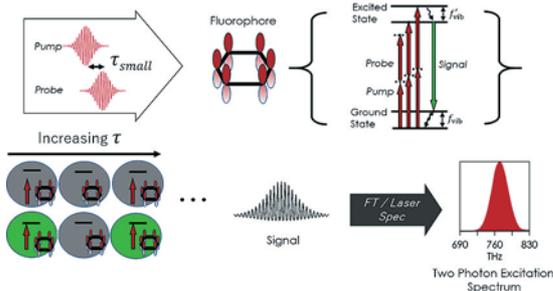


図3 干渉分光法を用いた蛍光励起スペクトル測定の原理

合わせたパルス対を分子に照射すると，パルス間の間隔に対応してトータルの光強度が変調を受ける。この光変調は光パルスの自己相関に対応しているため，そのフーリエ変換によって光パルスのパワースペクトルが測定可能である。

仮に分子が全ての周波数に対してフラットに応答して蛍光を発するならば (吸収スペクトルが入射光の第二高調波スペクトルに対して十分幅広いとき)，得られる蛍光信号のフーリエ変換は入射光のパワースペクトルに等しい。一方で，吸収スペクトルが入射光の第二高調波スペクトルと同程度，あるいは狭いスペクトル広がりを持つ場合は，特定の周波数成分のみに分子が応答するため，蛍光信号のフーリエ変換はレーザー光のパワースペクトルに分子の応答 (励起スペクトル) が掛け合わされたものとなる。そのため，パルス間の遅延を走査しながら蛍光信号を測定し，フーリエ変換することで間接的に分子の励起スペクトルを求めることが可能となる。

次に，図4にラマンスペクトルの測定原理を示す。分子振動周期よりも十分短いパルス光 (ポンプ光) が分子に照射されると，分子振動がコヒーレントに励起される。一定時間後に照射されるもう1つの短パルス光 (プローブ光) を用いて分子振動の時間発展を追跡することで，分子の固有振動数を求めることができる。ポンプ光によって励起される分子振動によって物質の屈折率が時々刻々変化し，プローブ光の周波

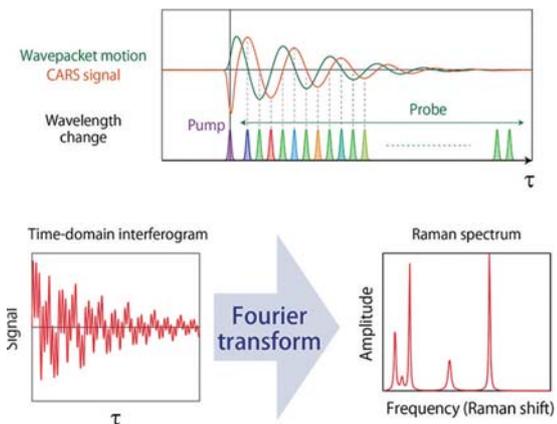


図4 干渉分光法を用いたラマンスペクトル測定の原理

数が変調を受ける。ポンプ・プローブ光の間隔を走査して得られるインターフェログラムをフーリエ変換することによって分子のラマンスペクトルを取得することができる。

時間領域で分子振動の測定を行うことで、単一ピクセルの光検出器を用いて高速かつ広帯域なスペクトル測定が可能となる。

図3と図4に示したラマン散乱及び蛍光の測定は同じ短パルスペアを入射光として用いて行うことができるため、同時測定が可能である。2光子蛍光と分子振動によるプローブ光の周波数変調成分は別の波長に現れるので、波長フィルターを用いてこれらを容易に区別することができる。実際に開発した装置を図5に示す。フェムト秒のチタンサファイアレーザーを光源として、マイケルソン干渉計へと導入することでパルス対を生成する。ポンプ・プローブパルスの間隔をレゾナントスキャナと4f光学系を用いて高速に走査し、各遅延時間におけるラマン散乱強度と蛍光強度をアバランシェフォトダイオード及び光電子増倍管で検出する。また、測定に用いるチタンサファイアレーザーと同軸に連続発振レーザーを導入し、その干渉信号を同時に測定する。それにより各測定におけるポンプ・プローブ間の遅延を正確に測定することができる。

開発した装置を用いて測定したTPE及びラマン散乱のインターフェログラムを図6に示す。原理検証としてCoumarin314のクロロホルム

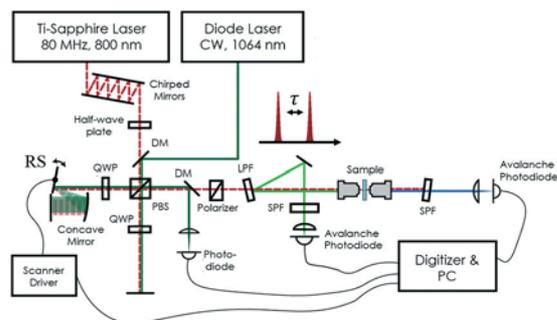


図5 開発した蛍光・ラマン同時測定分光計 DM: Dichroic Mirror, LPF: Longpass Filter, PBS: Polarizing Beamsplitter, QWP: Quarter-wave Plate, SPF: Shortpass Filter

溶液の測定を行った。TPEでは時間原点付近にCoumarin314の2光子蛍光に由来する干渉信号が測定された。

一方、ラマンインターフェログラムでは、 $>200$  fsの領域にクロロホルムの分子振動に由来する振動が測定された。

測定されたTPE及びラマンインターフェログラムをフーリエ変換することで得られるラマン及びTPEスペクトルを図7に示す。Coumarin1のエタノール溶液及びCoumarin314のクロロホルム溶液を測定した。Coumarin1と314の励起スペクトルの違いが本手法で測定したTPEスペクトルの違いに反映されており、単純な蛍光強度のみの測定ではなく、電子状態の違いによる分子特異的な測定が可能であることが分かる。また、ラマンスペクトルでは溶媒の分子振動の違いが明瞭に反映されており、本手法を用いてより複雑な系の化学分析が可能であることがわかる。

本手法の高速性とラマン・TPEの同時測定

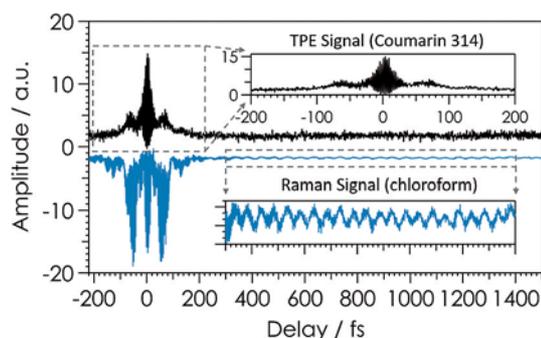


図6 Coumarin314のクロロホルム溶液から測定した2光子励起(TPE, 上)及びコヒーレント反ストークスラマン散乱(CARS, 下)のインターフェログラム

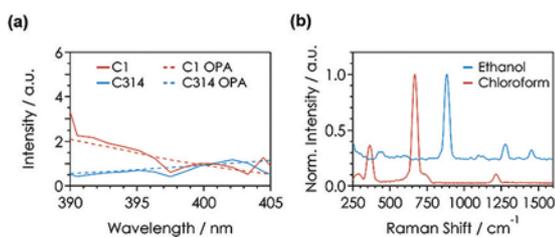


図7 開発した蛍光・ラマン同時測定分光計で測定したインターフェログラムをフーリエ変換することで得られる(a) TPE及び(b) ラマンスペクトル。サンプルはCoumarin1のエタノール溶液及びCoumarin314のエタノール溶液

性能を活用した応用として、マイクロ流路中で高速に流れる粒子の分析を行った。緑色色素で染色されたポリスチレン及びPMMAのマイクロビーズおよび無線色のPSマイクロビーズをマイクロ流体デバイス中で高速に測定した。PMMAに特徴的なラマンピークがある $600\text{ cm}^{-1}$ におけるラマン強度と蛍光強度を用いて図8に示す散布図を作成したところ各々のピー

ズが明瞭に分離されており、本手法をもちいてマイクロビーズの解析にも有用であることが実証された。

#### [今後の研究の方向、課題]

今後、上記手法を生体組織の3次元測定や多数細胞の一細胞解析へと応用していく予定である。そのためには、装置のさらなる高感度化や細胞分取機能の実装などが技術的課題として解決される必要がある。また、本研究で開発した3次元計測法とラマン・蛍光同時測定法を組み合わせることができれば、さまざまな生体組織・生細胞の詳細な3次元計測が可能となり、医療および基礎生命科学分野で有用なツールとなり得る。ラマン・蛍光の同時測定が可能となる3次元測定法の開発にも今後取り組んでいく予定である。

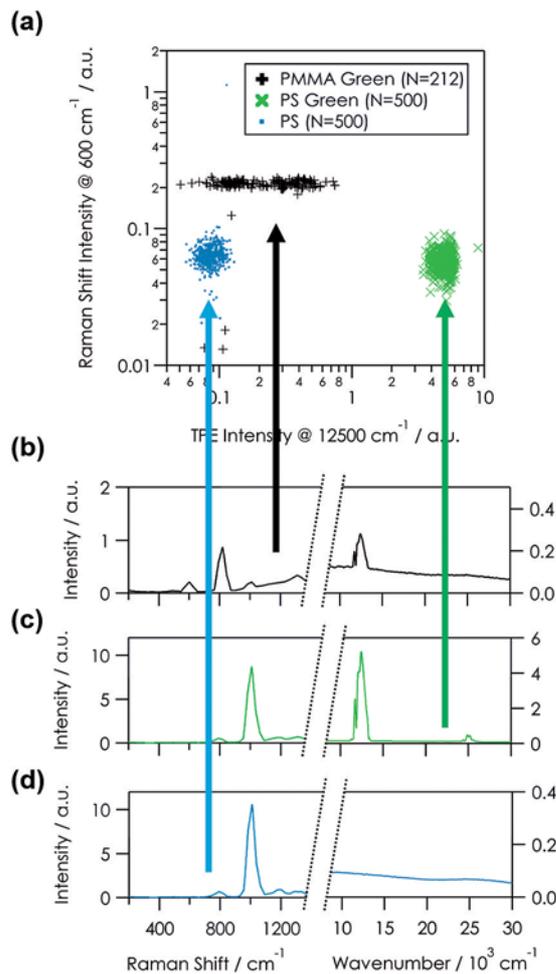


図8 TPE・ラマン同時測定分光計とマイクロ流体デバイスを組み合わせることによるマイクロ粒子解析。(a)  $600\text{ cm}^{-1}$ におけるラマン強度と $12,500\text{ cm}^{-1}$ におけるTPE強度を軸として作成した散布図 (b) 緑色PMMAビーズ, (c) 緑色PSビーズ, (d) 無染色PSビーズの平均スペクトル

#### [成果の発表、論文等]

1. “High-speed simultaneous Raman-fluorescence spectrometer”, Matthew Lindley, Hayate Nomoto, Kotaro Hiramatsu, Keisuke Goda, 第79回応用物理学会秋季学術講演会, 19p-438-10, 名古屋, 2018年9月
2. “時間領域ラマン分光法の生命科学研究への応用”, 平松光太郎, 合田圭介, 第8回光科学異分野横断萌芽研究会, 神奈川, 2018年8月
3. “Simultaneous FT-CARS and fluorescence spectroscopy at 24,000 spectra per second”, Matthew Lindley, 野元颯, 平松光太郎, 合田圭介, 日本分光学会年次講演会, 東京, 2018年5月
4. “Ultrafast simultaneous Raman-fluorescence spectroscopy” Matthew Lindley, Kotaro Hiramatsu, Hayate Nomoto, Fukashi Shibata4, Tsuyoshi Takeshita, Shigeyuki Kawano, Keisuke Goda, To be submitted.