

研究終了報告書

「光音響高速サイトメトリーの創成」

研究期間：2017 年 10 月～2021 年 3 月

研究者：中川 桂一

1. 研究のねらい

人間の構成単位である細胞は、古くから大きな関心をもたれ、現在でも様々な研究が盛んになされている。その中でも近年、細胞のもつ性質として硬さ(弾性率)が注目されている。例えば、がん細胞は他の細胞に比べ優位に柔らかい(※がん組織は硬い)ことが報告されている。細胞の硬さは原子間力顕微鏡や超音波顕微鏡にて計測することが可能であるが、一点を計測するポイントスキニングであり、一細胞の計測に 10 秒から数分を要する。もしこの計測を格段に高速化することができれば、弾性率という従来とは異なる軸で細胞の統計的解析を行うことが可能となり、がん診断や創薬スクリーニング、再生医療における未分化幹細胞の検出など、幅広く医療に貢献することが期待される。

本研究では、申請者が考案・開発した超高速イメージング法 STAMP (Sequentially timed all-optical mapping photography) 技術と、申請者が持つ独自の光音響技術を融合した技術を開発することで、細胞と音響波の相互作用の観察に挑戦し、提案手法である光音響高速サイトメトリーの実現可能性を検証する。細胞と音響波の相互作用を観察により明らかにすることは、細胞診断の観点だけでなく、音響波が細胞に与えるメカニカルストレスを追究するメカノバイオロジーの観点からも極めて重要であり、新たな知見を与える。

光音響高速サイトメトリーの創成という大目標に対し、3.5 年間のさきがけ研究期間内に、新規の光学素子、新規の光学系、光技術を用いた音響波の発生制御法など要素技術の開発を行う。本研究提案に直接的にかかわる高速度イメージングや光音響法の技術的基盤を堅実に作り上げてゆくと同時に、本研究のスコープ外の光学分野にも広く資する技術を創出してゆく。これらの新技術に立脚した光学システムにより、ナノ秒のフレーム間隔・ピコ秒の露光時間という高時間分解能でありながら、サンプルへの光ダメージを可能な限り低減させた超高速イメージングと、イメージングに完全同期したパルス音響波発生を実現し、細胞を伝播する音響波を動画像として捉える。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、「光音響高速サイトメトリー」という大目標に向け、大きく4つのテーマを進めた。研究テーマ A「スライスミラーの超精密加工と複数パス 4f 光学系の開発」では、超精密加工により、スライスミラーという小さなミラーが並んだ特殊な光学素子を開発した。加工の結果、表面粗さ Ra は 4.5 nm となり、使用する波長 800 nm に対し十分に小さな値となった。また、このスライスミラーを用いて、途中で枝分かれする 4f 光学系を構築し、STAMP において 18 フレームの撮影を実現した。研究テーマ B「入れ子型高速度撮影の提案と実証」では、これまでの高速度撮影の概念を拡張する、マルチスケールの高速度撮影を実証した。ピコ秒という非常に高い時間分解能で、ミリ秒の高速で繰り返す現象をシングルショットで捉えることに成功

した。研究テーマ C「ナノ秒のパルス伸展を実現する Spectrum circuit」では、STAMP の撮影時間領域を拡張する、Spectrum circuit と呼ぶ新規の光学系を開発した。Spectrum circuit では、これまで困難であった超短パルスのナノ秒時間領域へのパルス伸展を実現した。これにより、STAMP の撮影領域が 10 ナノ秒の時間オーダーまで拡張され、市販の高速度カメラの 100 ナノ秒までを補完することとなった。研究テーマ D「細胞と音響波の相互作用の可視化」では、細胞に対しレーザパルスを用いて音響波を発生させ、その伝播する様子を捉えることに成功した。撮影は STAMP を用いて行い、ナノ秒のフレーム間隔、ピコ秒の露光時間という非常に優れた時間分解能にて、動画像がシングルショットにて得られた。

(2) 詳細

研究テーマ A「スライスミラーの超精密加工と複数パス 4f 光学系の開発」 図1

超高速イメージング STAMP の撮影枚数の向上を目指し、スライスミラーを用いた複数パス 4f 光学系を提案・開発した(原著論文)。スライスミラーは短冊状のミラーが、少しずつ傾いた構造をしており、かつそれぞれのミラーが高い位置姿勢精度で構成されたものである。このミラーを超精密加工によりつくり、表面粗さ Ra は 4.5 nm、ミラーの PV が 43 nm(およそ $\lambda/19$)であった。この

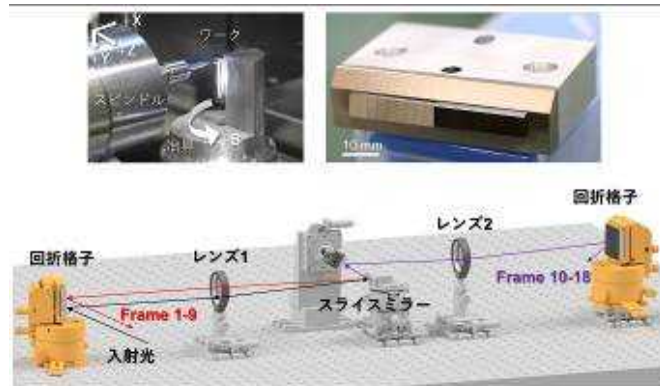


図1 スライスミラーの超精密加工(上) スライスミラーを用いた複数パスの 4f 光学系(下)

ミラーを用いた、複数パスの 4f 光学系を考案し、実証した。4f 光学系のフーリエ面に配置したスライスミラーにより、像情報を保ったまま波長ごとにパルスを分割するスペクトラルイメージングが実施されるが、複数パスにすることで、光学素子の大きさによる制限を解決することができた。この光学系を STAMP に組み込むことで、18 フレームの超高速撮影が達成された。

研究テーマ B「入れ子型高速度撮影の提案と実証」 図2

高速度撮影の新しい概念として、複数の時間スケールが混在した、入れ子型高速度撮影を実現した(国内学会発表, 招待講演等)。従来は、単体の高速度撮影技術を用いた撮影により、ある特定の時間領域を高速に捉えることがなされてきた。本研究では、STAMP と高速度カメラを組み合わせることで、STAMP によりフェムト秒やピコ秒という超高速な時間領域を、ミリ秒の時間領域を高速度カメラで同時に捉えることを行った。つまり、高速に繰り返される超高速現象を、全てシングルショットで撮影することができる。本技術は、短時間で多くのデータを集められ、かつシステムにリアルタイムにフィードバックをかけられることから、機械学習やマシンビジョンへの応用が期待される。

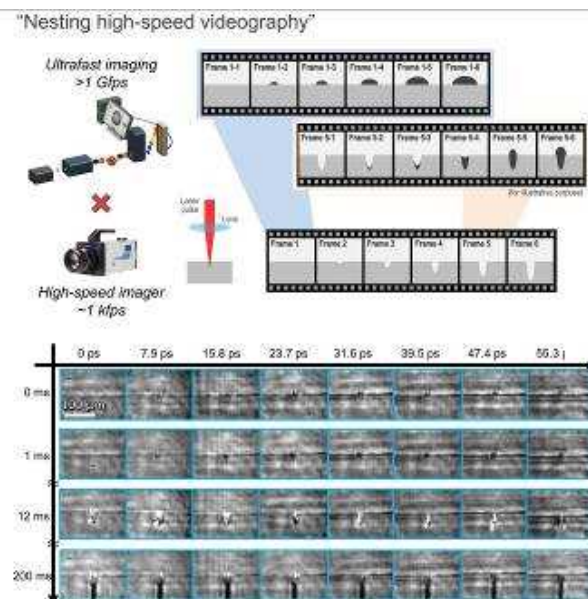


図2 入れ子型高速度イメージングの概念(上) と撮影例(下)

研究テーマ C「ナノ秒のパルス伸展を実現する Spectrum circuit」 図3

超短パルスを時間領域にて伸展・圧縮する技術は、超短パルスを用いる研究において非常に重要な技術である。STAMP においては、パルス伸展が撮影の時間窓を決める。ところが、従来の技術では、細胞と音響波の相互作用ダイナミクスの時間スケールである、 10^{-9} – 10^{-8} 秒の時間スケールにおけるパルス伸展技術は存在しなかった。

そこで、図3に示すような、新規のパルス伸展光学システム(Spectrum circuit と呼ぶ)を考案・開発した(国際会議発表)。本手法では、波長の異なるパルスが、それぞれ異なる光路長をもってシステムから出射される。時間差は光学遅延ステージを変更することで、パルス数はサーキットのミラー位置を変更することで、調整可能である。また、フリースペースの光学系であるため、高強度のレーザパルスのパルス伸展を行うことができる。構築した光学系を用いて、例えば 2 ナノ秒間隔で 9 パルスの伸展パルス列を実現している。

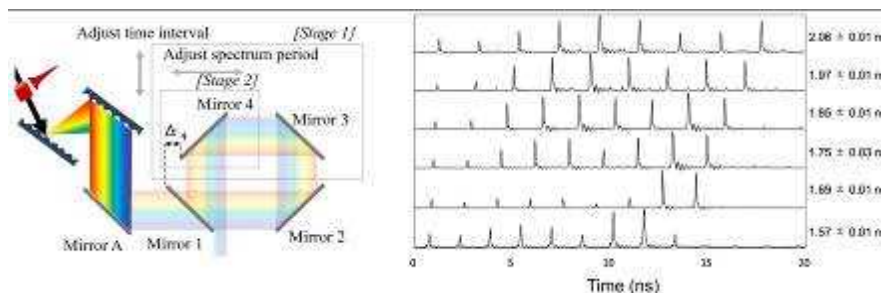


図3 Spectrum circuit の光学系(左) とパルス間隔を変化させた時間波形(右)

研究テーマ D「細胞と音響波の相互作用の可視化」

本研究における大きなマイルストーンである、細胞と、その領域を伝播する音響波の動画撮影に成功した。

可視化のために、細胞よりわずかに大きい厚みの細胞コンテナを作成し、そこに細胞を播

種した。また、細胞の近辺でパルスレーザを線集光させることで、パルス音響波を形成した。このパルス音響波は細胞を平面波として通過する。

STAMPはこれまで開発してきたスライスミラーシステム、Spectrum circuitを利用した。細胞のサイズに合わせてフレーム間隔は設定可能である。例えばフレーム数は9、フレーム間隔は1.5 ns とすると、撮影時間は12 ns となる。これは音波が18 μm 進む時間に相当し、まさに細胞のサイズと合致する。また、露光時間はピコ秒であり、全くブレのない音響波可視化を実現する。

撮影した結果、各フレームにて細胞と音響波が可視化されており、特に細胞の境界において音響波の波面に変化がみられていることが確認された。

3. 今後の展開

本研究で達成された、細胞と音響波の相互作用の観察を推し進め、細胞解析への応用を試みる。必要な要素技術は研究テーマ A-C で開発済みであり、それらのシステムをより高精度化してゆく作業が必要である。また、様々な細胞腫での音響波データを蓄積する必要がある。これらの研究進展により、本研究で目指している、音響波での高速な細胞診断の道筋が見えてくると考える。先行研究にて、硬さが細胞識別に有用であることが報告されており、撮影において十分な画質が得られた場合、本原理により細胞が識別できる可能性は高いと考えている。

また、機器が普及するためには、システム改良が必須である。本研究では基礎研究として、時間スケールの調整や撮影倍率の変更など、自由度の高いシステムを構築してきた。本システムを用いて計測データを積み重ねることで、機器の要求仕様が明確になり、格段に低コストかつ小型で、利用者にとって使いやすいシステムを提案できると考えている。本提案技術の一つのターゲットとして、再生医療で用いられる細胞を識別することが挙げられる。再生医療で用いる膨大な細胞を、非染色で、かつ高速に検査することで、より安全・安心な医療を提供できることを目指して、今後も研究を進めてゆく。

4. 自己評価

【研究目的の達成状況】

研究期間内に細胞と音波の相互作用の可視化を実現し、光音響高速サイトメトリーの創成の骨子となる技術と知見を得られた。その過程で、複数の新規光学システムを開発しており、そのそれぞれを独立したテーマとしても成果としてまとめ、発表を行っている。これらの観点から、研究目的を達成できたと考えている。一方、期間内で細胞解析技術として確立するには至っていない。

【研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)】

本研究成果は、申請者を中心に進めてきたが、当研究室の修士課程学生(当時)の尽力があつてのものである。かつ、短期間ではあつたがポスドクの方にも圧力計測に関する貴重な知識と技術を提供いただいた。さらに、さきがけ光極限領域のメンバーと密な意見交換や共同研究を行うことで、光を基軸とした極めて広大なアスペクトの上で研究活動を行う環境が構築された。このような恵まれた研究実施体制を大いに活用し、研究を進めることができたと考えている。

研究費の大部分が、本研究の遂行に必須である光源設備に利用された。そのほか、レンズ等の光学部品や細胞培養関連の消耗品、領域会議・学会等の旅費、成果発表費など必要な項目に利用した。先述の通り、作製可能な光学素子や光学システムについては自ら開発した。本研究において、研究費は適切に運用されたと考えている。

【研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果】

本研究では要素技術として、光学素子、光学システムを開発してきた。これらの技術は、本研究で行ってきた高速度撮影に限らず、広く光学分野に利用可能な技術である。応用として、天文分野における分光計測、超短パルスを用いた顕微鏡技術などが挙げられる。実際にこれらの分野の研究者と協力して研究を行っており、これらのシーズをもとに、これから新たな技術を生み出す準備しながら、研究を進められていると考えている。

音響波は古くからバイオ・医療分野で用いられているが、人間の基本単位である細胞と音響波の相互作用を、人類の研究において最も根源的な方法の一つである「観察」というアプローチで解析しようとしている研究は、世界でも類を見ない。音響波はそのパラメータ(例えば強度)によって、生体に非侵襲(影響を無視できる)な診断にも、生体をアクティブに制御する治療にも利用することが可能である。それらの基盤に本研究は位置づけることができ、音波を用いた既存の医療技術においてはより安全・安心・効率的な技術の確立に貢献し、一方で全く新しい医療技術の創成につながってゆくことが期待される。

【その他】

4年次は新型コロナウイルス感染症の影響で、実験が進められない期間が半年間続いた。2020年度の後期も制限がある中で研究を進めており、満足に実験が行えている状況ではない。そのような状況下ではあったが、早い段階からリモートで研究を行える環境を整え、これまでの研究結果の詳細解析や数値シミュレーション、成果のまとめなどに着手し、可能な限り研究を前進させられたと考える。

このような困難な時期に、さきがけ領域の研究者や統括・アドバイザー、JSTの方々と情報をシェアし、支え合い、また改めて研究の価値や社会的課題を問い直すような経験ができたことは幸運であった。状況に柔軟に対応しつつも、信念を貫くタフさを身につけることができた。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1件

1. T. Saiki, T. Hosobata, Y. Kono, M. Takeda, A. Ishijima, Miu Tamamitsu, Y. Kitagawa, K. Goda, S. Morita, S. Ozaki, K. Motohara, Y. Yamagata, K. Nakagawa* and I. Sakuma, "Sequentially timed all-optical mapping photography boosted by a branched $4f$ system with a slicing mirror." Optics Express 28, 31914-31922 (2020).

本研究では、フェムト秒の時間分解能をもつ超高速イメージングである STAMP の性能向上のため、スライスミラーという特殊な光学素子を用いた、新しい分光光学系を提案・開発しました。超精密加工により、表面粗さ 4.5 nm のスライスミラーが得られました。このミラーを用い

て分岐型 4f 光学系を構築し、超短パルスレーザによりガラス表面に発生したプラズマの進展を、7.9 ps のフレーム間隔で 18 フレーム撮影することに成功しました。

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【学会発表】

- T. Saiki, A. Ishijima, I. Sakuma and K. Nakagawa, “Spectrum circuit for producing spectrally separated nanosecond pulse train in free space.” **Conference on Lasers and Electro-Optics 2020**, San Jose, USA, May 2020. (online conference)

他, 国内学会発表 3 件

【解説論文】

- 中川桂一, 佐伯峻生, 鈴木敬和「シングルショット超高速イメージング STAMP の展開」**光学** 49 (2020).

【招待講演】

- K. Nakagawa, “Single-shot ultrafast imaging using spatiotemporal dispersion of ultrashort pulse.” **Ultrafast imaging and tracking instrumentation, methods & applications 2018**, Chicago, USA, September 2018.

他, 国際学会招待講演 3 件, 国内学会招待講演 5 件

【受賞】

- 里見賞 (2020 年, 公益財団法人 里見奨学会)
- コニカミノルタ画像科学奨励賞・奨励賞 (2019 年, 公益財団法人 コニカミノルタ科学技術振興財団)

【報道】

- 2019 年 8 月 1 日, TOSHIN TIMES 「世界が注目する日本の若手研究者による高校生のための特別講義: 世界最速のカメラが挑む1兆分の1秒の世界」
- 2018 年 10 月 2 日, 日経産業新聞 「細胞のわずかな動き観察 ～東大、高速撮影カメラ開発～」