

研究終了報告書

「広帯域スクイーズド光源による低侵襲深部多光子分光」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：衛藤 雄二郎

1. 研究のねらい

脳機能や自然界で生じている効率的なエネルギー輸送メカニズムなど、生命科学の多くの重要な謎を解き明かすためには、生体という大きな散逸を持つノイズ環境の中から必要な情報を正確に取り出す技術を開発する必要がある。2光子励起や4光波混合に代表されるような非線形光学効果を活用した光学顕微鏡は、線形光学効果のみを利用した顕微鏡に比べ、生体の深部の観察を可能にするため、これらの重要課題の解明に向けて広く利用されてきた。しかしながら、従来の非線形光学顕微鏡には、性能やコスト面に関していくつかの大きな課題が存在する。性能面に関する最も重要な課題は、深さ観察性能の限界であり、生体のより深い位置の観測を可能にする技術の確立が望まれている。また、非線形光学効果を引き起こすためには、瞬間強度の高いレーザー光が必要であり、非線形光学顕微鏡には通常、高価な超短パルスレーザーが使用されている。

本研究のねらいは、光の持つ量子的な揺らぎを利用して2光子励起効率を高め、効率を制御することで、従来の技術の課題を克服することができる新しい非線形光学顕微手法を確立することである。揺らぎは光強度のばらつきを作り出すため、瞬間的な強度を高める作用を生み出す。そのため揺らぎがない場合に比べて非線形光学効果を高めることができる。このような性質を光バンチングと呼ぶ。本研究では、低コストで導入可能なナノ秒パルスを励起源とした広帯域光パラメトリック下方変換によって、バンチング性を作り出している。広帯域パラメトリック下方変換に着目した理由は、フェムト秒オーダーの超高速なバンチング性を生み出すことができるためである。2光子励起走査型顕微鏡に光バンチング性を適用する場合、遅い強度揺らぎではピクセル毎の照射強度が変動してしまうという問題が生じる。一方で、パルス励起のパラメトリック下方変換を利用すると、パルスの内部に超高速な揺らぎが作り出され、それぞれのパルスの照射エネルギーを変えずに、バンチングの効果を得ることができる。このようなパルス内部の高速バンチングを2光子励起顕微鏡に適用するという試み自体が新規性の高いものであるが、さらにバンチング性の局所制御による超深部観察手法という独自に提案する計測手法の研究を実施した。また、量子揺らぎと散逸に関する理解を深めるという点も、本研究の重要な目的である。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、バンチングを持った光を作り出すために光パラメトリック下方変換を利用する。応用上重要なことは、光パラメトリック下方変換過程を通して作り出される光(ここではパラメトリック光と呼ぶ)の強度を、非線形光学顕微鏡に適用されるような高い瞬間強度の領域まで向上させることができるのかを明らかにすることである。本研究では、ナノ秒パルスを用起源とすることで、瞬間強度に換算してキロワットレベルの高強度パラメトリック光パルスを実現できることを明らかにした。(図1に、高い瞬間強度を持ったパラメトリック光によるローダミンからの2光子励起蛍光の写真を示す。)ナノ秒パルスをベースとして2光子励起光源の開発は、低コスト化という観点でも非常に重要である。

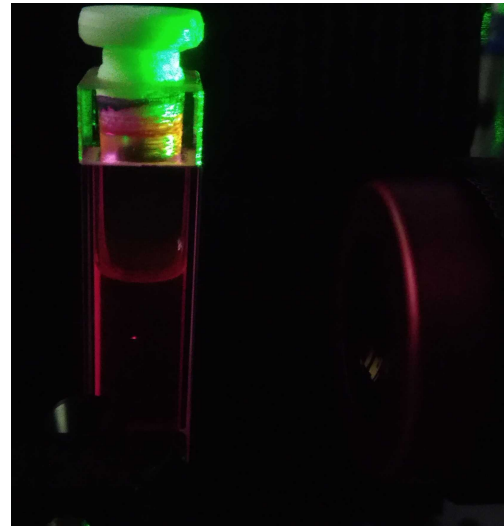


図 1: パラメトリック光によるローダミンからの2光子蛍光

本研究ではさらに、2光子励起蛍光の効率が光バンチングによってどの程度向上するのかを評価する手法を確立した。連続光の持つバンチング性による2光子励起蛍光効率の向上は、すでに先行研究において報告されている。連続光の場合、バンチングした光と同程度の波長を持つコヒーレント光(コヒーレント光はバンチング性を持たない。)を準備し、2光子励起蛍光のカウント数を比較することで、バンチングによる蛍光の向上を評価できる。しかし、パルス光にこの手法を適用することは困難である。なぜなら、スペクトルも時間波形も似通ったコヒーレント光を準備することは実際上不可能なためである。この課題を克服するために、自己相関測定器に2光子蛍光媒質を搭載した手法を開発し、2光子励起蛍光の効率を評価した。パルス光の持つバンチング性が、ローダミンや緑色蛍光タンパク(GFP)の2光子蛍光効率を2倍高効率化させることを明らかにすることに成功した。

光バンチング性は、高効率化を実現できるだけでなく、深部観察性能を改善できる可能性を有している。従来の方において、深部観察性能を低下させている原因は、生体の表面付近で発生する2光子蛍光であり、それが深部からの2光子蛍光を覆い隠してしまう。そのため2光子励起蛍光を局所的に変調し、深部からの蛍光の影響だけを抽出することができれば超深部観察が可能になる。本研究では、パラメトリック下方変換によって作り出される超高速な光バンチングを生体サンプルの深部で制御し、観察性能を改善するための手法を提案し、その原理実証実験に成功した。

(2) 詳細

研究テーマA「光バンチングを2光子励起蛍光顕微鏡に応用するための基盤技術の確立」

パラメトリック光源を非線形光学顕微鏡に応用する場合には、光源の強度を高めることが重要である。パラメトリック光の高強度化を実現するうえで懸念される問題は、パラメトリック下方変換を引き起こすための結晶へのダメージである。本研究では、ナノ秒のパルス幅を持つ数十キロワットのピーク強度の励起光源と 20 mm の周期分極反転LiNbO₃ 非線形光学結晶を用い、励起光の集光直径を 300 μm 程度に設定することで、結晶へのダメージを回避しつつ、瞬間強度に換算してキロワットレベルの高強度パラメトリック光パルスを実現した。

本研究ではさらに、パルス光の持つ超高速な光バンチングによって2光子励起蛍光が何倍高効率化しているのかを評価するための手法を開発した。光パルスが高速な光バンチング性を有していることを測定する手法はすでに先行研究によって確立されており、その方法では2光子吸収検出器として光電子増倍管が用いられている。本研究では、光バンチングが蛍光効率を向上させていることを確認するために、光電子増倍管の代わりに2光子蛍光色素を用いる手法を開発した。それによって、光バンチングがローダミンや GFP の効率を2倍高効率化させることを明らかにした。本研究開発によって、光バンチングを2光子励起蛍光顕微鏡に応用するための基盤技術が確立できたといえる。

研究テーマB「相関を持った強度揺らぎによる超深部観察手法の確立」

光パラメトリック下方変換によって作り出される超高速な揺らぎの強度相関を活用することで、生体表面からのノイズ光子の情報を除去し、深部からの情報を取り出す方法を提案し、その原理実証実験に成功した。本提案手法では、“揺らぎが大きいとバンチング性によって2光子励起蛍光が大きくなる”、“2つのビームの揺らぎに相互相関がある場合、重なり合ったビームのバンチング性は増大する”、“バンチング性の相関時間は、帯域の逆数程度であり超高速である” という3つの性質を利用する。

ここでは、ローダミン内の深部の局所領域のみから2光子蛍光を取り出すことを考える。図2(a)と(b)は、光パラメトリック下方変換によって同時生成されるシグナルとアイドラーの2つのパルス光をローダミン内で交差させ、そこから出てくる2光子励起蛍光を撮影した画像である(パラメトリック下方変換では周波数 2ω の光から周波数が $2\omega + \Delta\omega$ のシグナルと $2\omega - \Delta\omega$ のアイドラーが作り出される。)。実際の顕微イメージングでは励起ビームの方向(紙面左側)に向かって発光する蛍光を観察する。そのため、2つのビームが重なり合った部分からの蛍光を深部からの信号光と考えると、それ以外が信号を覆い隠すノイズ蛍光となる。

シグナルとアイドラーの揺らぎには同時生成に由来する相互相関があるため、2つのビームを重ね合わせた領域では、蛍光信号が増大する[図 2(a)]。一方で、パラメトリック光の帯域は非常に広く、相互相関が発生する時間も超高速である。そのため、2つのビームの間の光路長に僅かな差(ここでは670 fs)をつけると、重なり合った部分の揺らぎが小さくなり、蛍光信号も減少する[図 2(b)]。この2枚の差をとった画像が、図 2(c)である。差をとることで、ノイズ蛍光の影響がなくなり、相関によって増強した信号光子のみを抽出できることが分かる。また光バンチングは光損失があつたとしても向上レートが変化しないという特徴を持つ。本研究では、シグナルビームに損失が加えられた場合でも、局所蛍光制御が実現できることを実験的に確認した。そのため本手法は生体のような損失の大きなサンプルに対しても適用することが可能な手法であるといえる。

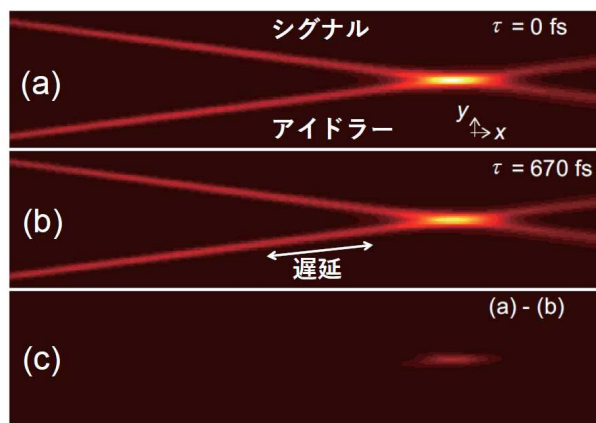


図 2: (a) シグナルとアイドラーの相関有り。(b) シグナルとアイドラーの相関無し。(c) 画像(a)から(b)を差し引く。

この原理を 2 光子励起顕微鏡に応用することで、超深部観察の実現が期待できる。例えば、小動物の脳内神経ネットワークの観測に応用することで、これまで観測することができなかった大脳新皮質を超え海馬の領域までも含んだ脳内ネットワーク観測が可能になると期待できる。

3. 今後の展開

本研究では、ナノ秒励起のパラメトリック下方変換によるバンチング光源の開発に成功した。それに加えて、本研究によってバンチング光源を用いて2光子イメージングを取得することが十分可能であることが示された。今回開発したナノ秒光源ベースのシステムは、超短パルス光源に比べて、低コストで構築することが可能である。そのため、今後の展開としては、数年以内に低コストで実現可能な2光子励起顕微鏡システムの開発をめざす。

本研究では、光バンチングを用いることで、2光子溶液深部の局所領域で発生する蛍光信号を制御することが可能であることを明らかにした。また、バンチングによる蛍光の制御方法は、光損失がある場合でも有効に機能することを実証した。もう一つの重要な特徴として、光パラメトリック下方変換は、幅広い波長可変性を実現できる。これらの結果から、本研究でのアプローチは、損失の大きなサンプルの深部観察に適していると考えられる。例えば、生体内での散乱が最も少ない1600nmから1870nmの波長領域にパラメトリック光の射出波長を調整し、さらにバンチングを使った蛍光の局所制御技術を組み合わせることで、大きな損失のある生体サンプル中での超深部観察が可能になると期待できる。しかしながら、本研究で提案している深部観察手法は原理実証を達成した段階である。実用化のための次

のステップは、マウスの脳などの生体サンプルを用いて測定することであろう。今後 1 年程度の期間を掛けて、実際に生命科学領域で使用されている生体サンプルを用いて既存技術よりも優れた深部観察が可能であることを実証する。それによって、バンチングによる2光子励起顕微鏡の技術がコスト面だけでなく、性能面でも優れたアプローチであることを示していく。

4. 自己評価

本研究の目的は、量子光学の知見を活かすことで生命科学の現場で活用可能な顕微イメージング技術を開発することである。実用的な技術を確立するという観点において、損失耐性を持った光バンチングという現象に着目した。光バンチングは強度揺らぎに起因する現象であるため、古典的な現象といえる。しかしながら、量子揺らぎを活用すると古典的な強度変調の方法では、実現することが困難な超高速の揺らぎを容易に作り出すことができる。超高速な光バンチングは、2009 年に観測されている現象である。しかしながら、これまで、パルスのもつ高速な光バンチング性を非線形光学顕微鏡に適用するという試みは成されておらず、量子光学の知見を活かした新規な応用研究であるといえる。未開拓な応用研究であったにもかかわらず、さきがけ研究を通して、2光子励起蛍光顕微鏡に応用するための基盤技術を確立したという点は、評価に値すると考えている。

当初計画にはなかった予想外の結果として、2光子励起用光源の低コスト化のための道筋を示すことに成功した。計画開始当初は、超短パルス光源と導波路素子を用いた実験を行っていた。しかしながら、領域会議での生命科学領域の先生方との議論を通して、非線形光学顕微鏡に掛かるコストが大きな問題となっていることを知り、ナノ秒パルスと非線形光学結晶を用いたシステムの開発に移行した。今後、数百万円程度で実現可能な非線形光学顕微鏡の技術が確立すれば、若手研究の科研費のレベルで非線形光学顕微鏡を構築することが可能になる。それによって、非線形光学顕微鏡の技術の普及が大いに促進すると期待できる。本研究によってコスト面の問題が解決すれば、生命科学の基礎研究だけでなく、医療分野への導入も大いに促進すると期待できる。また、経済的な観点でも非常に大きな影響があると期待できる。例えば、現在の蛍光顕微鏡の市場は、世界的に数百億円～数千億円規模である。低コスト非線形光学顕微鏡が実現すれば、蛍光顕微鏡と同程度の市場規模を持ち得るものと期待される。

その一方で、バンチングによる超深部観察を達成するための手法に関する研究(研究テーマB)が原理実証の段階にとどまってしまった点については、目標を十分に達成できたとはいえないと考えている。応用を強く念頭に置いた研究であることから、今後は早急に実際の生命科学で用いられているサンプルを使用して、超深部観察を実証する必要がある。

研究開始当初、本研究に必要な備品はほとんど整備されていなかった。本研究を通して、研究に必要な除振台、レーザー等の装置を整備することができた。また、2020 年 12 月からは、京都大学大学院工学研究科に異動し、本研究をさらに発展させている。さきがけ研究を通して、円滑に研究を実施する研究設備や体制を整えることができた。また、生命科学分野

を専門とされている塗谷准教授との共同研究や、量子生命科学会での招待講演など、専門科学領域とのつながりが作れたという点も非常に大きな成果である。

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:2件

- | |
|--|
| 1. Yujiro Eto, "Enhanced two-photon excited fluorescence by ultrafast intensity fluctuations from an optical parametric generator," Applied Physics Express 14 , 012011 (2021). |
| 2. Yujiro Eto, "Locally controlled two-photon excited fluorescence by correlated ultrafast intensity fluctuations," Applied Physics Express 14 , 022003 (2021). |

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件(特許公開前のもも含む)

(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)

- ・衛藤 雄二郎、多光子励起顕微鏡への応用に向けた高強度バンチング光源の生成と評価、日本物理学会第74回年次大会、17aK404-4、2019年3月17日
- ・衛藤 雄二郎、光バンチングによる蛍光色素の2光子励起効率の向上、日本物理学会2019年秋季大会、11aK14-4、2019年9月11日
- ・衛藤 雄二郎、明るいスクイーズド光を用いた2光子励起蛍光顕微鏡、光アライアンス2020年11月号、31(11), 1-4, 2020-11, 日本工業出版
- ・衛藤雄二郎、周期分極反転のランダムエラーに起因する高次高調波発生の高効率化、日本物理学会第75回年次大会、19aK23-7、2020年3月19日
- ・衛藤 雄二郎、【招待講演】パラメトリック下方変換によって作り出される超高速な強度揺らぎを活用した非線形光学顕微鏡、量子生命科学会第2回大会、2020年12月23日