

研究終了報告書

「光駆動非線形音響波による生体深部メカノイメージング」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：石島 歩

1. 研究のねらい

蛍光顕微鏡による分子イメージングは、生体内の多種多様な分子を蛍光プローブにより可視化する技術として、生命科学分野の発展に貢献している。しかし、細胞それぞれに異なる硬さなどの力学的情報を取得することは難しい。本研究では、非線形音響波を光学顕微鏡の力学プローブとして利用し、光の高速性と干渉性を最大限活用することで、生体内の力学情報を細胞レベルの分解能でイメージングする光技術の創成を目指す。

組織の力学特性が生命の形成・機能獲得過程に大きく影響していることがわかってきた。しかし、生体深部の力学特性を高い分解能で測定する手法が存在しないため、生体は多細胞の相互作用を伴う複雑なシステムであるにも関わらず、培養皿上に単純化して得られた知見に限定されているのが現状である。生体内における力学動態と機能獲得過程との関連性等を探求するためには、既存技術の観察深度とイメージング速度を大幅に向上させることが求められる。

本研究では、振動(力学)情報をチャープパルスの時間波形に転写し、分光的に空間領域で検出する新規高速ブリルアン振動計測に基づくメカノイメージング手法を開発する。研究期間内の達成目標として、生体深部の1 mm²観察領域について、空間分解能~1 μm, 画像取得速度~30 msを達成することを掲げた。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では3点の研究項目「分散コヒーレント散乱顕微法の開発」、「ライトシートブリルアン散乱顕微法の開発」、「光音響波形整形の基盤技術の開発」において研究成果が得られた。

分散コヒーレント散乱顕微法では、チャープパルスの瞬時周波数に対して、時間発展するブリルアン振動を転写する。更に、チャープパルスを周波数領域でヘテロダイン分光することにより、ギガヘルツ帯域のブリルアン振動をイメージング型分光器で1フレーム読み出しすることができ、遅延時間を走査することなくコヒーレント音響フォノンからの振動情報を抽出することを可能にした。これにより、提案手法は遅延時間走査にメカニカルディレイラインを用いた従来法と比較して126倍の高速化が実現された。原理実証として、不均一な薄膜や生体細胞をナノメートルの深さ分解能で広帯域にイメージングした。

ライトシートブリルアン散乱顕微法では、分散コヒーレントブリルアン散乱分光法に対して、試料横方向への空間多重化計測を可能にする光学系を組み合わせることで、試料の断層像のスキャンレス計測を実現した。空間多重化計測の中核となるアイデアは、分光計測の検出器に用いるイメージセンサの二次元平面の横軸をブリルアン振動波形軸に、縦軸をライン計測の空間軸として利用することにある。1画素あたりの計測時間は57 μs/pixelであり、これまでに報告されている世界最高速度のブリルアン顕微法(20 ms/pixel)と比較して3桁程度高速なブリ

ルアン顕微法が実現できる可能性を示した。

光音響波形整形の基盤技術の開発では、音響波束を制御し、細胞のブリルアン周波数に等しい周波数帯域の音響波を整形することで、高感度のブリルアン分光を実現する。これまでに、GHz 帯域での音響波励起のための独自マルチ光パルス整形器を開発し、バースト周波数を GHz 帯域で制御可能なことを立証した。

(2) 詳細

「分散コヒーレント散乱分光法の開発」研究成果 5.1.1., 5.3.4., 5.3.5.

周波数領域および時間領域のブリルアン散乱分光法は、音響フォノンを光計測することで、材料科学や生命科学における複雑なシステムの力学的特性の読み取りを可能とする。時間領域法で用いられるコヒーレント音響フォノンは、周波数領域法で用いられるインコヒーレント音響フォノンよりも優れた深さ分解能と高い信号光強度が得られる。しかし、コヒーレント音響フォノンを励起し、プローブするためには、レーザーパルス間の遅延時間を走査する必要があった。本研究成果では、時間領域と周波数領域にまたがるブリルアン散乱分光法を提案し、コヒーレント音響フォノンからのブリルアン散乱光をマルチチャンネルで検出することを実証した。本手法は、チャープパルスの瞬時周波数に対して、時間発展するブリルアン振動を転写する。

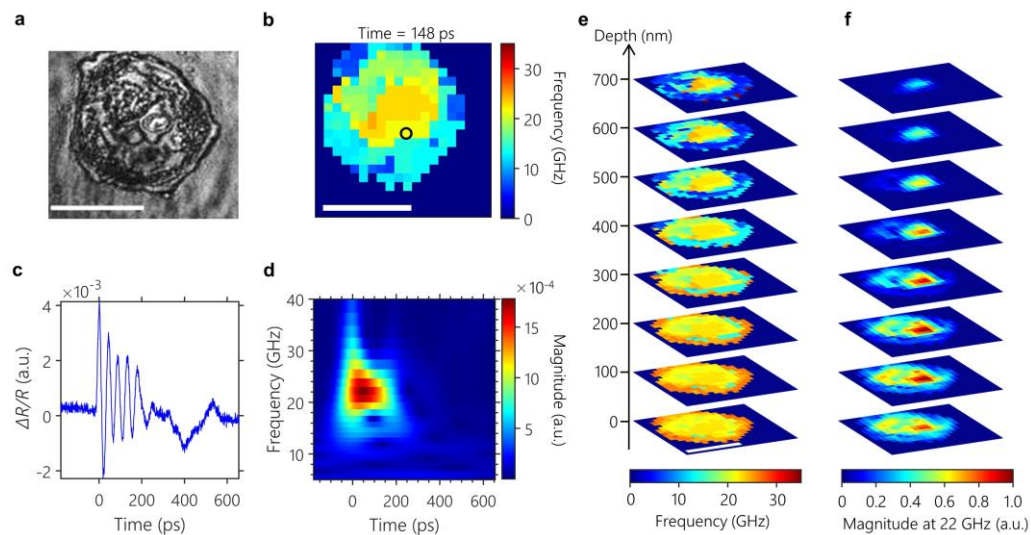


Fig. 1 Three-dimensional dispersive coherent Brillouin scattering microscopy of biological cell. (a) Brightfield image and (b) Representative cross-sectional Brillouin frequency image of the HeLa cell at 148 ps. (c) Recorded Brillouin oscillations and (d) corresponding time evolution of the Brillouin frequency at the position identified as a black circle in Fig. 4(b). (e) 3D Brillouin frequency images and (f) 22 GHz spectral images at various calculated depth positions. The images are masked to remove the high frequency regions around the cells in the shallow area, which originate from the displacement of the Ti film surface. Scale bars are 30 μm .

更に、チャープパルスを周波数領域でヘテロダイン分光することにより、ギガヘルツ帯域のブリルアン振動をイメージング型分光器で 1 フレーム読み出しすることができ、遅延時間を走査することなくコヒーレント音響フォノンからの振動情報を抽出することを可能にした。これにより、提案

手法は遅延時間走査にメカニカルディレイラインを用いた従来法と比較して 126 倍の高速化が実現された。原理実証として、不均一な薄膜や生体細胞 (Figure 1) をナノメートルの深さ分解能で広帯域にイメージングした。

「ライトシートブリルアン散乱顕微法の開発」 研究成果 5.3.1., 5.3.2., 5.3.3.

分散コヒーレント散乱顕微法では、時間軸に相当するコヒーレント音響フォノンの伝播方向のブリルアン周波数空間分布を走査なしに取得することができた。一方で、2D イメージングをするためには、依然として、試料もしくはレーザーパルスの空間走査が必要である課題を抱えていた。そこで、分散コヒーレントブリルアン散乱分光法に対して、試料横方向への空間多重化計測を可能にする光学系を組み合わせることで、試料の断層像のスキアンレス計測を実現した。空間多重化計測の中核となるアイデアは、分光計測の検出器に用いるイメージセンサの二次元平面の横軸をブリルアン振動波形軸に、縦軸をライン計測の空間軸として利用することにある。このアイデアを実現するために、ライトシート照明系と結像光学系を分散コヒーレントブリルアン散乱分光法に組み合わせた。これにより、1 つの空間軸の機械的走査のみで試料の三次元イメージングが可能となった。

これまでに、固定化した HeLa 細胞の三次元イメージングが可能となることを示した (Figure 2)。構築した実験システムを用いて、前述と同様の試料を 2 μm ピッチで一軸方向のみにスキヤニングし、取得した深さ毎の断層像を 100 nm ごとに Figure 2 に示す。細胞核と思われる領域からは 22 GHz 程度のブリルアン周波数が計測され、それ以外で 22 GHz よりも低い値となっている。つまり細胞核が細胞内で相対的に硬い物性を有していることがわかる。Figure 3 には、水溶液中に固定化された HeLa 細胞のイメージング結果を示す。尚、ブリルアン画像はブリルアン周波数を深さ方向に平均化した結果を表示している。細胞が存在している領域が可視化さ

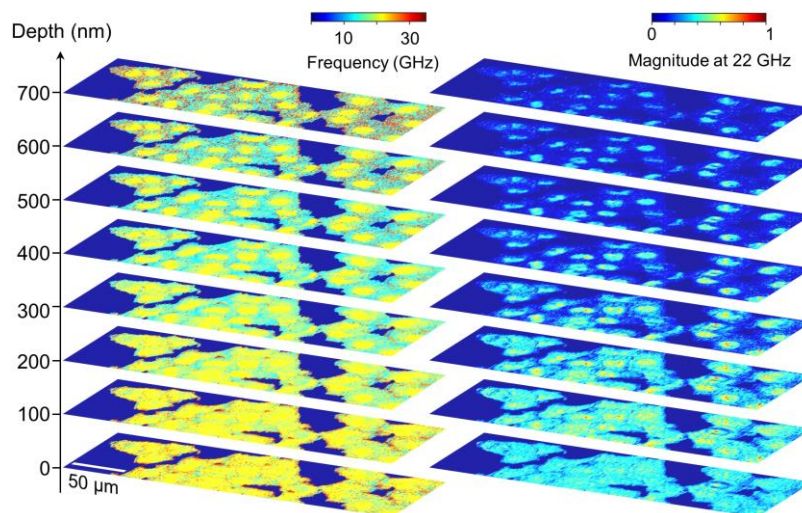


Fig. 2 Three-dimensional light-sheet Brillouin scattering microscopy of dehydrated fixed HeLa cells. (left) 3D Brillouin frequency images and (f) 22 GHz spectral images at various calculated depth positions. The images are masked to remove the high frequency regions around the cells in the shallow area, which originate from the displacement of the Ti film surface.

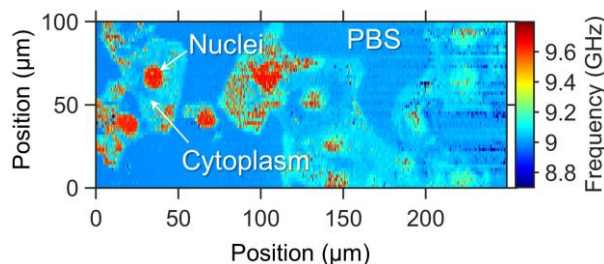


Fig. 3 Light-sheet Brillouin scattering microscopy of fixed HeLa cells inside phosphate-buffered saline. Brillouin frequency images were averaged in depth direction.

れており、細胞核と細胞質のブリルアン周波数の違いが視認できる。1画素あたりの計測時間は $57 \mu\text{s}/\text{pixel}$ であり、これまでに報告されている世界最高速度のブリルアン顕微法 ($20 \text{ms}/\text{pixel}$) と比較して3桁程度高速なブリルアン顕微法が実現できる可能性を示した。

「光音響波形整形の基盤技術の開発」

音響波束を制御し、細胞のブリルアン周波数に等しい周波数帯域の音響波を整形することで、高感度のブリルアン分光を実現することを目指した。単一のフェムト秒パルスで励起した広帯域な音響波からのブリルアン散乱光よりも、高い光強度のブリルアン散乱光が得られることが期待される。音響波束の制御は、光パルスのバースト周波数をギガヘルツ帯域で周波数調整可能な独自マルチ光パルス整形器を用いて、単一のフェムト秒パルスをマルチパルスに整形し、これをトランスデューサで光-音変換することで実現する。マルチパルス整形器に入射された単一のフェムト秒パルスは部分透過ミラーの異なる位置で反射されることで、時空間上に等間隔に並んだパルス列を形成する。各パルス強度は部分透過ミラーの反射率分布により決定される。各パルスの時間間隔を後段の平行ミラーペアにより補正することで、全てのパルスが時間的に重なり合う。平行ミラーペアの片側のミラーに設置したディレイラインを移動させることでパルスの繰り返し周波数をギガヘルツ帯域で調整できる。

これまでに、ギガヘルツ帯域での音響波励起のための独自マルチ光パルス整形器を構築し、バースト周波数をギガヘルツ帯域で制御可能なことを実証した。第1ミラーセット間距離と第2ミラーセット間距離の差 ($\Delta Y = Y_1 - Y_2$) を変化させることで、バースト周波数をギガヘルツ帯域で調整できた。ここで、青線は設計値から導かれる設計値曲線、赤点はフォトダイオードで計測したバースト周波数の実測値であり、設計通りのバースト周波数を有するパルス列を生成できることを確認した。現在論文投稿にむけた準備を行っている。

3. 今後の展開

生きた動物のありのままの状態における生体内力学ダイナミクスを観察するために、乗り越えなければならない技術的ハードルが幾つか存在する。これまでの研究において、秒オーダーでの溶液中に存在する固定化細胞のイメージングに成功している観点から、生きた培養細胞のイメージングは実現可能性が極めて高いと考えている。一方で、生物個体の観察はこのままでは難しいと考えている。まずは、生命科学分野でモデル生物として広く用いられている線虫 (直径 $\sim 100 \mu\text{m}$, 長さ $\sim 1 \text{mm}$) を試料としたイメージングを考えている。線虫イメージングにおける問題は、トランスデューサから観察領域まで音響波を伝播させる必要があるわけだが、GHz音響波は生体試料による減衰の影響を強く受ける。つまり、トランスデューサか

らの距離数十 μm の位置において、十分な強度のブリルアン散乱光が得られないことが懸念される。そこで、観察領域まで音響波を伝播させるという方向性から、観察領域で音響波を発生させる方向性に転換する必要性を感じている。

イメージング速度について、目標値として掲げた仕様を達成していない。生物個体をイメージングするためには更なる高速化が必須であり、新たな光学システムの導入を検討している。

ブリルアン散乱顕微法の性能を飛躍させることに加えて、取得したブリルアン画像と細胞構造の関連性を明確にするためには、蛍光イメージング系との統合によるマルチモーダル化が必要と考えている。マルチモーダルイメージングシステムの構築は、細胞機能獲得もしくは破壊と力学特性変化の関連性の追及を可能とする。これを実証すれば、生命科学研究者の高い注目を集めることができると期待される。

4. 自己評価

• 本研究課題の目標に対する達成度

研究提案書の中で、研究期間内の達成目標として、生体深部の 1 mm^2 観察領域について、空間分解能 $\sim 1 \mu\text{m}$ 、画像取得速度 $\sim 30 \text{ ms}$ を達成することを掲げた。

まず、「生体深部」に関して、目標値として明言はしていなかったが、深さ $\sim 100 \mu\text{m}$ を想定していた。本研究を進めて行く中で、GHz帯域音響波の生体試料による減衰の影響が極めて大きいことを痛感した。当初は、トランスデューサから音響波を計測対象領域まで伝播させることを想定していたが、今ではこの方法は非現実的であると考えている。そのため、音響波を計測領域で励起する必要がある、今後の研究課題である。生体深部計測に向けたアプローチを実験的に示せなかった点は悔いが残る。

空間分解能に関しては、既存のブリルアン散乱顕微法と遜色ない $\sim 1 \mu\text{m}$ を達成できた。

画像取得速度に関しては、目標値を達成できなかった。空間解像度との兼ね合いもあるため、先行研究と比較するために、1ピクセル当たりの換算計測時間として $1 \mu\text{s}/\text{pixel}$ を掲げ直した。表1で先行研究と本研究で開発しているライトシートブリルアン散乱顕微法の画像取得速度に関して比較した。1ピクセル当たりの換算計測時間は従来手法と比較して3桁程度高速化できている。一方で、1フレームの取得に要する時間は10倍程度に留まっている。これはライトシートブリルアン散乱顕微法で取得した画像が従来法の解像度と比較して高かったためである。ライトシートブリルアン散乱顕微法では検出器にイメージセンサを用いており、ピクセル数を限局することで、1フレームの取得に要する時間をさらに短縮できる。また、光音響波形整形によりブリルアン散乱光を増大させることで、繰り返し計測回数を低減でき、さらなる高速化が期待される。

Table 1. Comparison of achieved and initial target specifications with previous studies.

	自発ブリルアン散乱顕微法 <small>Zhang & Scarcelli, Nat. Protocols (2021)</small>	誘導ブリルアン散乱顕微法 <small>Remer et al., Nat. Methods (2020)</small>	ライトシートブリルアン 散乱顕微法	当初目標値
Non-contact sensing	Yes	Yes	Yes	Yes
Spatial resolution	$\sim 1 \mu\text{m}$	$\sim 1 \mu\text{m}$	$\sim 1 \mu\text{m}$	$\sim 1 \mu\text{m}$
Pixel dwell time (ms/pixel)	40	20	0.06	0.001
2D image acquisition time (s/frame)	~ 10	~ 10	~ 1	0.01

• 研究の進め方

研究費執行状況としては、計画的に研究費を執行できたと考える。また、さきがけ研究スタートアップの支援により、異動先研究機関においても滞りなく、さきがけ研究を継続できる研究環境を構築できた。研究実施体制としては、修士課程学生のサポートを受けながら研究を進められた。

研究の進め方を振り返ると、1年目と2年目前半までの期間を、提案手法の原理検証に必須な時間領域ブリルアン分光法(基本的なポンプ・プローブ計測に基づく従来手法)の実験系構築に費やした。当初予定では、半年で終わらせる予定であったため、見通しが甘かったと言わざるを得ない。2年目後半からは、チャープパルス(Chirped Pulse)の時間波形にブリルアン振動を転写し、チャープパルスを分光することで、空間領域でブリルアン振動計測が実現できる可能性の検証を最優先に取り組んだ。つまり、まずは繰り返し計測を容認し、微小なブリルアン振動をシングルショットで計測することを先送りにした。3年目前半の期間は、シングルショットでのブリルアン振動計測を実現すべく、計測システムに要求される光子数検出範囲または信号対雑音比を低く抑えることに取り組んだ。しかし、システムの変更に時間を要することが予想された。研究計画に記載した生体試料計測を優先的に遂行すべく、上記の実装を先送りにした。3年目後半の期間は、生体試料計測が一筋縄ではいかないことが予想できたため、4年目前半に予定していた培養細胞の計測を前倒して取り組んだ。加えて、提案手法をライトシートブリルアン散乱顕微法へと発展させられたため、3年目後半の期間は、研究の大きな進展があった期間であった。4年目は溶液中での細胞計測とマルチパルス生成器の構築に成功したものの、新しい研究機関への異動が決まり、異動の準備と異動先での研究環境の整備に多くの時間を費やした。

当初の研究計画通りに研究を推進できなかった研究項目(4年目後半に予定していた *in vivo* 計測)もあった一方で、研究提案の中核を担う高速なブリルアン散乱顕微法を実証できたことに加え、当初予定していなかったライトシートブリルアン散乱顕微法へ進展させることができた。自身にとって、これまでの研究の延長線上にない研究内容であり、研究途上で幾つかの困難に直面してきたが、その困難を克服すべく、絶え間なく新しいアイデアを生み出し、その壁を乗り越える挑戦を続けた。

• 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、生体内における力学動態と機能獲得過程との関連性を探求するために、ブリルアン散乱顕微法の高速化という軸で研究を進めてきた。これにより新しい技術の提案・開発による光科学分野の発展はもちろん、生体システムを維持した状態で、器官形成・損傷治癒・発病過程における、細胞とその周囲環境の力学動態の究明が期待される。すなわち、提案技術は生命科学分野の基盤技術として、その発展に貢献し、さらには生理機能破綻と力学特性変化の関連性が特定されることで、医療分野のイノベーションに伴う新しい診断治療法の開発が促進され、健康長寿社会の実現に繋がるのが期待される。

一方で、究極のイメージング速度に加えて究極の周波数分解能を持ち合わせたブリルアン散乱顕微法が開発できれば、生命科学研究者に高い関心が寄せられている研究トピック

の発展に寄与することが期待できる。今後は、さきがけ研究を足掛かりにして、新たな革新的技術シーズの創出にも挑戦していきたい。

• 当初計画では想定されていなかった展開やそれによる成果、及び研究者としての飛躍につながるような成果

ブリルアン散乱顕微鏡をライトシート計測モダリティへと発展させることは、研究開始当初は想定していなかった。当初計画ではブリルアン振動のシングルショット計測を考えていたが、実現に向けた課題が多いことを実感したため、代替案を平行して進めることとした。明確なアイデアを持ち合わせていない状況ではあったが、研究を進めて行く中で分散コヒーレントブリルアン散乱分光法は、試料横方向への空間多重化計測が可能となる点に気がついた。このアイデアに基づき、ライトシートブリルアン散乱顕微鏡を構築し、先行研究を上回るイメージング速度を達成できることを示せた。現在、ライトシートブリルアン散乱顕微鏡の論文化に向けた実験を進めている。

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: 1件

1. **Ayumu Ishijima***, Shinga Okabe, Ichiro Sakuma, and Keiichi Nakagawa. Dispersive coherent Brillouin scattering spectroscopy. *Photoacoustics* 29, 100447, 2023.

周波数領域および時間領域のブリルアン散乱分光法は、音響フォノンを光計測することで、材料科学や生命科学における複雑なシステムの力学的特性の読み取りを可能とする。しかし、コヒーレント音響フォノンをプローブするためには、レーザーパルス間の遅延時間を走査する必要があった。本論文では、時間領域と周波数領域にまたがるブリルアン散乱分光法を提案し、コヒーレント音響フォノンからのブリルアン散乱光をマルチチャンネルで検出することで、遅延時間を走査することなくコヒーレント音響フォノンから振動情報を抽出することを可能にした。本成果を *Photoacoustics* (IF=9.656) の Special Issue on Ultrafast Photoacoustics に掲載した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 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)

1. [招待講演] **石島歩**, 岡部真我, 佐久間一郎, 中川桂一. ライトシートブリルアン散乱顕微鏡法の原理実証. 第 70 回応用物理学会春季学術講演会, 上智大学四ツ谷キャンパス (3 月中旬発表予定), 口頭.
2. **石島歩**. 超音波のバイオ・医療応用. 第 8 回北大・部局横断シンポジウム, pp. O-23, オンライン (2022.10.28), 口頭.
3. [講演奨励賞受賞] **石島歩**, 岡部真我, 中川桂一, 佐久間一郎. ライトシートブリルアン散

乱頭微法の提案と実証. 第 83 回応用物理学会秋季学術講演会, pp. 20p-C301-17, 仙台 (2022.9.20), 口頭.

4. [招待講演] **Ayumu Ishijima**. Dispersive coherent Brillouin scattering spectroscopy for biomaterial characterization. *International Conference on Materials Science, Engineering & Technology 2022*, National University of Singapore (2022.9.9), Oral.
5. [招待講演] **石島歩**, Stefan Wunderl, 中川桂一. 音響波による生体試料中の光伝播操作. レーザー学会学術講演会第 41 回年次大会, pp. S07-18p-IX-02, オンライン (2021.1.18), 口頭.