

中赤外フォトサーマル顕微鏡を用いた生細胞イメージング

戸田 圭一郎, 井手口 拓郎

東京大学大学院 理学系研究科附属フotonサイエンス研究機構 (〒 113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

Live-Cell Imaging with Mid-Infrared Photothermal Microscopy

Keiichiro TODA and Takuro IDEGUCHI

Institute for Photon Science and Technology, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033

(Received April 9, 2025, Accepted June 10, 2025)

Mid-infrared photothermal (MIP) microscopy enables label-free super-resolution mid-infrared (mid-IR) imaging by capturing refractive index changes induced by MIR absorption through visible light detection. This article presents advancements in MIP quantitative phase imaging (MIP-QPI) for high-speed and high-resolution vibrational imaging. By optimizing mid-IR pulse fluence and the QPI system, we achieved a several-hundred-fold increase in MIP-QPI detection sensitivity compared to conventional approaches, which allows for high-speed live-cell imaging beyond video rate. Utilizing this system, we successfully visualized sub-second dynamics of water and heavy water exchange through the cell membrane. Furthermore, we demonstrated 120-nm spatial resolution by developing a high-resolution system employing a synthetic aperture with an NA of 2.2, enabling detailed biochemical imaging of bacterial cells. MIP-QPI holds significant potential for both fundamental biological research and biomedical applications, including protein secondary structure analysis, intracellular water state characterization, etc.

Key Words: Vibrational microscopy, Infrared spectroscopy, Photothermal microscopy, Quantitative phase imaging

1. はじめに

分子振動選択的イメージングは、中赤外吸収やラマン散乱などの分子振動過程を利用した非標識顕微鏡技術として、生命科学や医療分野で広く用いられている^{1,2)}。特に、ラマン顕微鏡は1 μm 以下の空間分解能を実現できることから、細胞レベルでの詳細なイメージングに適している。近年、非線形光学効果を活用することで、従来の自発ラマン顕微鏡が抱えていた検出感度の課題を克服したコヒーレントラマン顕微鏡が確立され、非標識分子振動イメージングの応用がさらに拡大している³⁾。一方、中赤外顕微鏡は、タンパク質などの極性分子に対する高い感度を活かし、タンパク質の二次構造解析をはじめとする生体分子分光イメージングへの応用が期待されている⁴⁾。しかし、中赤外光の回折限界により空間分解能が数 μm 程度に制約されるため、細胞など十 μm 程度の対象の内部微細構造を詳細にイメージングする用途には利用されてこなかった。

最近では、中赤外吸収に伴う屈折率変化を可視光によって検出することで、可視光の回折限界に基づく高い空間分解能を実現する中赤外フォトサーマル(Mid-Infrared Photothermal: MIP)顕微鏡の開発が進み、中赤外吸収を利用した単一細胞レベルでの高精細なイメージ

ングが可能となった⁵⁾。本稿では、MIP 顕微鏡の基本原則とその技術的進展について詳述する。

2. MIP 顕微鏡の原理

2.1 MIP 効果

特定波数の中赤外光が試料に照射されると、その波数に共鳴する分子が中赤外光を吸収し、振動励起状態となる。振動励起状態の分子は、数ピコ秒後に基底状態へと緩和する際に、そのエネルギーを周囲の分子に分配する。この励起とエネルギー移動の過程が中赤外光照射時間中に繰り返されることで、ナノ秒後には局所的な温度上昇が生じ、それに伴う屈折率変化の分布が形成される(MIP 効果)。さらに時間が経過すると、温度分布は熱拡散の影響を受け、徐々に広がっていく。

2.2 MIP 顕微鏡

MIP 顕微鏡では、MIP 効果による可視光の光学パラメータ(位相遅れ、反射率変化、散乱強度の変化など)の変化を検出することで、中赤外吸収に関する情報を可視光の空間分解能で画像化することが可能である。さらに、中赤外波数を掃引することで、異なる分子振動を励起し、中赤外スペクトル画像を取得することができる。その際

のスペクトル分解能は、各波数におけるスペクトル線幅によって決定される。

本顕微鏡において特に重要なのは、中赤外光および可視光のパラメータ(パルス幅、繰り返し周波数、パワー)である。熱拡散の効果を考慮しない場合、光ショットノイズ限界における MIP 顕微鏡の検出感度(Signal-to-Noise Ratio: SNR)は、以下の式で表される。

$$SNR \propto \frac{dn}{dT} (P_{MIR} \sqrt{P_{VIS}}) \quad (1)$$

ここで、 $dn/dT \approx 10^{-4}$ (水の熱光学定数)、 P_{MIR} は中赤外光フルエンス、 P_{VIS} は検出器位置での可視光フルエンスを表す。パルス幅によっては、熱拡散の影響を考慮する必要がある。例えば、パルス幅の長い中赤外光や可視光を用いると、熱拡散により屈折率変化(MIP 信号)の空間分布が広がり、信号強度および空間分解能の劣化を引き起こす。中赤外パルス照射後の時間に対する熱広がりは、以下の式で表される熱拡散長を用いて評価できる⁶⁾。

$$R_t = \sqrt{R^2 + 4kt} \quad (2)$$

ここで、 R は中赤外光を吸収する物体(熱源)の半径、 $k \approx 0.14 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ は水の熱拡散率、 t は中赤外パルス照射からの経過時間を表す。

さらに、高い繰り返し周波数のパルスを使用すると、次の中赤外光が試料に照射される前に視野全体の熱が十分に緩和されず、熱の蓄積を引き起こす可能性がある。これにより、試料への熱ダメージが増大するため、適切なパルス条件の選定が極めて重要である。

2.3 点走査型と広視野型

MIP 顕微鏡は点走査型⁷⁾と広視野型⁸⁾に大別される。点走査型では、中赤外光および可視光を共に回折限界程度まで集光し、MIP 効果による熱レンズで生じる可視光の強度変化をフォトディテクタで検出する。信号取得には Lock-in 検出を用いる手法が一般的である。光源には、繰り返し周波数約 100 kHz の中赤外パルス光と可視連続光を用い、試料または可視光の位置をスキャンすることでイメージングを行う。

広視野型では、中赤外光と可視光を視野全体に照射し、MIP 効果を一括してイメージセンサで検出する。イメージセンサの時間分解能の低さによる熱拡散の影響を抑えるため、中赤外光および可視光の両方に、繰り返し周波数約 1 kHz のナノ秒パルス光源を用いたポンプ・プローブ法を導入する。繰り返し周波数は視野全体の熱緩和時間を考慮して最適化されている。

点走査型では、中赤外光を回折限界(約 5 μm)程度まで集光できるため、約 100 μm のエリアに照射する広視野型と比較して約 1/100 の中赤外パルスエネルギーで十分な信号が得られる。そのため、パルスエネルギー 100 nJ 程度の中赤外量子カスケードレーザー(Quantum Cascade Laser: QCL)がよく使用される。一方、広視野型で同等の信号強度を得るには、10 μJ 程度の高強度中赤外パルスレーザー光源が必要となる。

検出速度に関して、点走査型ではレーザー走査に時間を要するため、2次元イメージングの最高画像取得レートは約 30 fps 程度である。一方、広視野型ではイメージセンサのフレームレートの半分の速度で画像取得が可能であり、kHz レベルのイメージングが実現できる。

点走査型はレーザーダイオードなどの可視連続光を用いた実装が可能であるが、熱拡散の影響を受けやすい微小物体に対しては、可視連続光の検出時間の初期に信号が減衰してしまうため、検出効率が低下する問題がある。これらの観点から、MIP 顕微鏡による高速イメージングや高分解能での微小物体の観察を目的とする場合には、広視野型がより適した手法であると言える。

可視光検出の手法として、点走査型では熱レンズ顕微鏡⁷⁾、広視野型では位相差顕微鏡⁹⁾、干渉散乱顕微鏡¹⁰⁾、定量位相顕微鏡⁸⁾などが挙げられる。我々は、屈折率の深さ方向積算の定量情報を取得可能な定量位相顕微鏡を用いた広視野型 MIP 定量位相顕微鏡の開発を進めている。本稿では、第 3 節において MIP 定量位相顕微鏡を用いた高速 MIP イメージング、第 4 節において高空間分解能 MIP イメージングについて詳述する。

3. 高速 MIP イメージング

3.1 高感度 MIP 顕微鏡システム

高速 MIP イメージングのための顕微鏡システムを Fig. 1(a)に示す。高速化を実現するためには、SNR の低さによって制限されていた広視野 MIP 顕微鏡の高感度化が不可欠である。そのため、式(1)に示す試料面における中赤外パルスフルエンスの増強および、検出器に入射する可視光の光子数の増加が必要となる。我々はこれらの最適化を通じて、従来の広視野型と比較して数百倍の感度を有する MIP 顕微鏡の開発に成功した⁸⁾。

中赤外光源には、周期分極反転ニオブ酸リチウム(Periodically Poled Lithium Niobate: PPLN)結晶を用いた中赤外光パラメトリック発振器(Optical Parametric Oscillator: OPO)を開発し、パルス幅 10 ns、パルスエネルギー 6.5 μJ 、繰り返し周波数 1 kHz の高強度ナノ秒パルスレーザー光源を実現した。これにより、従来の QCL を用いた広視野型 MIP 顕微鏡と比較して約 50 倍の中赤外フルエンスを達成した。可視光源には、OPO のポンプ光として使用した Q スイッチ Nd:YAG レーザーの 2 倍波(波長: 532 nm)を用いた。10 ns のポンプ・プローブパルスを用いて、可視光顕微鏡の空間分解能(440 nm)に相当する物体を観測することを想定すると、式(2)より熱拡散による信号の広がりは約 6 nm であり、無視できる程度であることが分かる。

可視光顕微鏡には、代表的な定量位相顕微鏡の一つであるコモンパス型の off-axis デジタルホログラフィを採用した¹¹⁾。また、従来の CMOS センサの約 100 倍の飽和電荷量を持つセンサを導入することで、定量位相顕微鏡のノイズを約 1/10 に低減することに成功した。中赤外光、可視光、光チョッパー、CMOS イメージセンサは Fig. 1(b)のように電氣的に同期されており、中赤外光

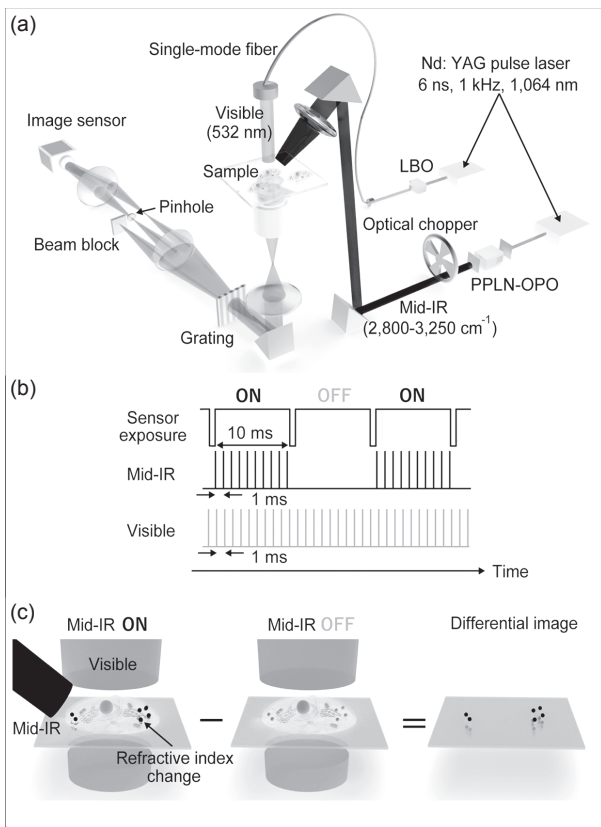


Fig. 1 High-SNR MIP microscopy for high-speed vibrational imaging. (a) Schematic of the optical system. (b) Timing diagram illustrating sensor exposure, mid-IR illumination, and visible light detection. (c) MIP image reconstruction through differential analysis between mid-IR ON and OFF states. Lithium Triborate: LBO.

ON 状態と OFF 状態が交互に取得される。中赤外光 ON/OFF 状態の画像の差分を取ることで MIP 画像を生成する (Fig. 1(c)).

3.2 細胞内の水-重水交換の高速イメージング

高感度 MIP 定量位相顕微鏡を用いて、1 秒以下の時間スケールで生じる細胞内外の水-重水分子交換ダイナミクスを 50 fps で可視化した。水分子の交換は、細胞膜上に存在するアクアポリンと呼ばれるタンパク質を介して行われる。この過程の制御は、細胞の浸透圧調整や代謝プロセスなど、さまざまな細胞機能に関与するため極めて重要である。しかし、従来の蛍光顕微鏡では水などの小分子の動態を直接観測することは困難であった。一方、高速かつ非標識に分子振動イメージを取得できる MIP 顕微鏡を用いることで、その可視化が可能となる。我々は、水 (H_2O) と重水 (D_2O) の分子振動周波数の違いを利用し、COS7 細胞外の水を瞬時に重水に置き換えた際に、細胞内に残存する水分子由来の信号の時間変化を可視化した。

Fig. 2(a) に測定システムの概略図を示す。シリンジを瞬時に引くことで、COS7 生細胞が配置されたガラスキャピラリの先端にある重水を、フレーム間隔よりも短い時間スケールで迅速にキャピラリー内へ導入した。Fig. 2

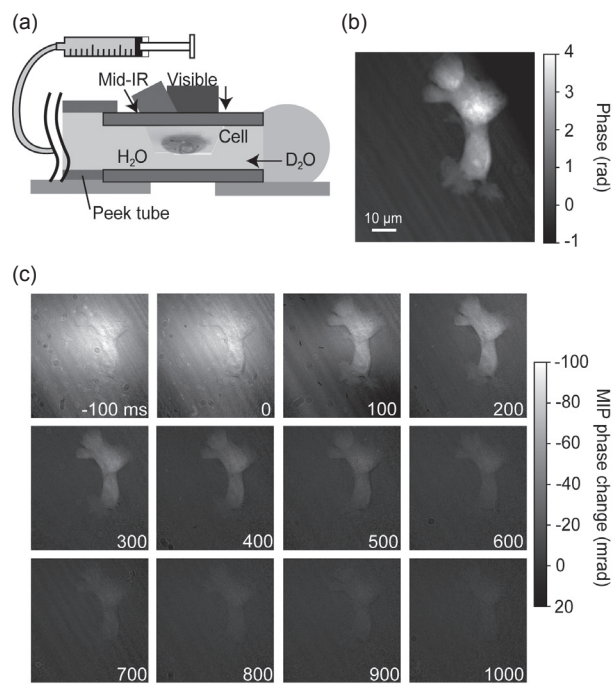


Fig. 2 High-speed MIP imaging of intracellular and extracellular water and heavy water exchange dynamics. (a) Schematic of the experimental setup. (b) Phase image captured in the mid-IR OFF state. (c) Temporal evolution of MIP images at mid-IR wavenumber of 3014 cm^{-1} .

(b) は中赤外光 OFF 状態における COS7 細胞の定量位相画像を示し、Fig. 2(c) は水分子の OH 結合の吸収帯 (中赤外波数 3014 cm^{-1}) における MIP 画像の時間変化 (100 ms 間隔) を示している。水交換が 0 ms で開始されると、細胞外の MIP 信号は急速に消失する一方で、細胞内の信号は数百 ms 間持続することが確認された。この結果は、先行研究のコヒーレントラマン顕微鏡の観測結果とも一致しており¹²⁾、MIP 顕微鏡が秒以下の時間スケールで生じる細胞内の高速現象を可視化できることを実証した。水分子の中赤外吸収は非常に強いため、MIP 顕微鏡はコヒーレントラマン顕微鏡よりも高感度で水分子のイメージングが可能である。

4. 高空間分解能 MIP イメージング

4.1 高空間分解能 MIP 顕微鏡システム

次に、120 nm の空間分解能を有する MIP 定量位相イメージング¹³⁾を実現する顕微鏡システムの概要を示す。空間分解能を制限する要因として、定量位相顕微鏡の分解能に加え、第 2 節で述べた熱拡散による分解能劣化が挙げられる。可視光顕微鏡の空間分解能が 120 nm の場合、前節のパルス幅 10 ns の光源を用いると熱拡散の影響は約 20 nm となり、無視できない。本システムでは、パルス幅 0.5 ns の中赤外光および可視光を用いることで、熱拡散の影響を約 1 nm に抑えた。

定量位相顕微鏡の空間分解能は、照明の開口数 (NA_{ill}) と検出の開口数 (NA_{collect}) の和によって決定される。通常のデジタルホログラフィでは、 $NA_{\text{ill}} = 0$ の照明 (光軸に対

して平行な平面波照明)を使用するが、この場合に取得可能な空間周波数成分は Fig. 3(a) の点線内に示される領域に限られる。一方で、 $NA_{\text{ill}} \neq 0$ の斜め照明を用いると、取得可能周波数成分が NA_{ill} 分だけシフトする (Fig. 3(a) 白丸領域)。そのため、複数の異なる照明角度からのホログラフィック検出を行い、それらを統合する開口合成技術を適用することで、広い周波数領域の情報を取得でき、最大で2倍の分解能向上を達成できる¹⁴⁾。しかし、この手法を実現するには、高 NA の対物レンズを2つ用いて試料を挟む必要があり、ガラス製対物レンズを透過できない中赤外光の導入が困難となる。

そこで我々は、試料プレートとして可視光を部分的に反射し、中赤外光を透過する基板(シリコン基板)を用いることで、1つの高 NA 対物レンズのみで構成される反射型の開口合成定量位相顕微鏡を開発した。本顕微鏡では、基板を通して対物レンズの反対側から中赤外光を導入できるため、中赤外光の照射と高分解能な定量位相イメージングを両立する設計となっている (Fig. 3(b))。

Fig. 3(c) は、高分解能 MIP 定量位相顕微鏡システムの構成を示す。本システムでは、マッハツェンダー型の off-axis デジタルホログラフィを採用し、試料を通過する光路には回転ウェッジプリズムを用いた可変の斜め照明機構を導入した。NA = 1.2 の水浸対物レンズを使用しており、照明および検出 NA は $NA_{\text{ill}} = 1.0$ および $NA_{\text{collect}} = 1.2$ である。その結果、合成開口数は $NA_{\text{SA}} = NA_{\text{ill}} + NA_{\text{collect}} = 2.2$ となり、可視光の波長 532 nm に基づくナイキスト空間分解能は $\lambda/(2NA_{\text{SA}}) = 120$ nm となる。

4.2 高分解能細菌イメージング

高空間分解能 MIP 定量位相顕微鏡を用いて、大腸菌

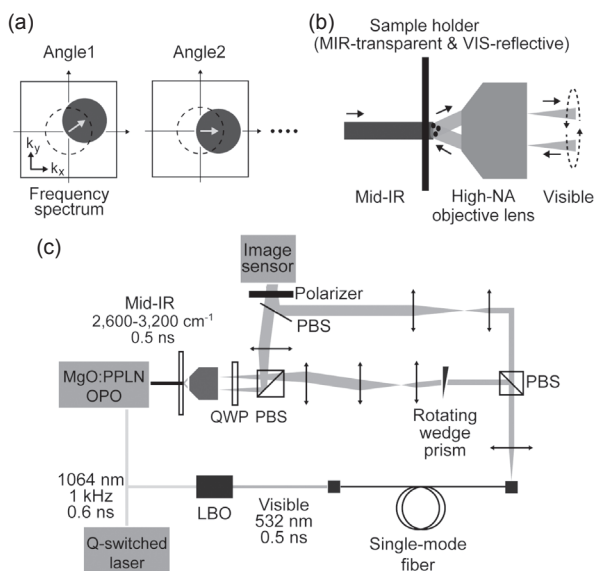


Fig. 3 High-resolution MIP microscopy. (a) Aperture synthesis in quantitative phase imaging (QPI). (b) Schematic of the single-objective synthetic aperture QPI. (c) Experimental setup. Double-sided arrows indicate lenses. Polarizing Beamsplitter: PBS. Quarter-Wave Plate: QWP.

(*E. coli*) および *R. jostii* RHA1 の2種の細菌における生化学的成分の濃度分布の違いを可視化した。後者は脂質を豊富に含むオレアジン性細菌であり、バイオディーゼルの開発の出発原料としての利用が期待されている¹⁵⁾。Fig. 4 (a) は 2920 cm^{-1} および 3000 cm^{-1} における MIP 画像を示している。特に、脂質滴内の CH_2 反対称伸縮振動モードによる MIP 信号は 2920 cm^{-1} でのみ観測されるのに対し、タンパク質分子の CH_3 反対称伸縮振動モードの MIP 信号は両方の波数で確認される。我々の観察結果により、*R. jostii* RHA1 細胞では、 2920 cm^{-1} の MIP 画像で強い局在信号を示す一方で、*E. coli* 細胞は両方の波数でほぼ同一の MIP 信号分布を示すことが明らかとなった。Fig. 4 (b) は、*R. jostii* 内で観察された約 175 nm の脂質滴様微粒子の断面プロファイルである。これは、合成開口 $NA_{\text{SA}} = 2.2$ の理論的な半値全幅 (Full Width at Half Maximum: FWHM) に相当する。よって、設計通りナイキスト空間分解能 ~ 120 nm が実現していることが実証された。Fig. 4 (c) は、*E. coli* および *R. jostii* RHA1 内の白い矢印で示された部位における MIP スペクトルの違いを示しており、それぞれのタンパク質および脂質の特性を明瞭に捉えている。

5. さらなる改良と応用

最後に、MIP 顕微鏡のさらなる技術的改良と今後の展望について述べる。第3節および第4節で扱った中赤外波数領域では、観測可能な分子結合が CH 結合や OH 結

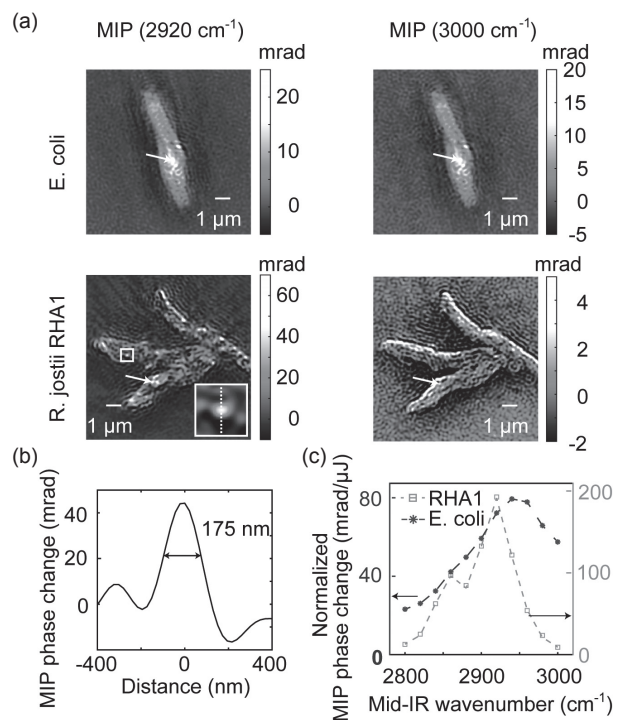


Fig. 4 High-resolution MIP imaging of bacterial cells. (a) MIP images of *E. coli* and *R. jostii* RHA1 at 2920 cm^{-1} and 3000 cm^{-1} . (b) Cross-sectional intensity profile along the white dotted line in (a). (c) MIP spectra normalized by mid-IR pulse energy.

合などに限定されていた。一方で、分子指紋領域(600~1800 cm⁻¹)には、タンパク質、核酸、糖などの特徴的な吸収振動モードが多数存在する。この領域をより包括的にカバーするため、適切な非線形光学結晶を用いたOPO^{16,17})によって10 μJレベルの高強度中赤外光パルスを発生させれば、細胞内分子振動イメージングの適用範囲を大幅に拡張できる。

高速性の向上に関しては、以下の改良が想定される。第3節のシステムでは、可視光シングルモードファイバのダメージ閾値により画像取得レートが制限(50 fps)されていた。ラージモードエリアファイバを用いてこの課題を克服することで、500 fpsまでの高速イメージングが可能となる。また、第4節のシステムにおいて、可視光の波長を400 nmとし、対物レンズのNAを1.33まで向上させることで、100 nm以下の空間分解能が達成できる。さらに、本システムは光学系の変更を必要とせず3次元イメージングが可能である。したがって、これらの技術を統合することにより、100 nm以下の空間分解能を有する3次元MIPイメージングを30 fps以上のビデオレートで取得可能となり、従来にないレベルでの高速かつ高分解能な分子振動イメージングの実現が期待される。

MIP顕微鏡の応用が特に期待される分野として、タンパク質の2次構造解析や細胞内水の状態解析が挙げられる。例えば、アルツハイマー病などの神経疾患においては、特定の2次構造を持つタンパク質の凝集が確認されており、非標識でそれらを定量的に解析できることは、疾患メカニズムの解明に大きく貢献する可能性がある¹⁸⁾。また、細胞内相分離(Liquid-Liquid Phase Separation: LLPS)¹⁹⁾が細胞機能の制御にどのように関与しているかは近年大きな関心を集めている。特に、相分離が起きている領域では無秩序タンパク質(Intrinsically Disordered Proteins: IDPs)が多く存在することが知られており、これらの形成メカニズムとタンパク質構造の密接な関連性が示唆されているため、この分野にも大きく貢献する可能性がある。

また、細胞内の水の一部は結合水と呼ばれる状態をとり、タンパク質の安定化において重要な役割を果たすと

考えられている²⁰⁾。中赤外領域は水の吸収が顕著であることから、MIP顕微鏡は細胞内の結合水分布を高感度に可視化する手法として適している。このように、MIP顕微鏡は基礎生物学から医学応用に至るまで幅広い分野での利活用が期待される。

参考文献

- 1) D. W. Shipp, F. Sinjab, and A. Notinger: *Adv. Opt. Photonics* **9** (2017) 315.
- 2) T. P. Wrobel, and R. Bhargava: *Anal. Chem.* **90** (2018) 1444.
- 3) C. W. Freudiger, W. Min, B. G. Saar, G. R. Holtom, J. C. Tsai, J. X. Kang, and X. S. Xie: *Science* **322** (2008) 1857.
- 4) M. J. Baker, J. Trevisan, P. Bassan, R. Bhargava, H. J. Butler, K. M. Dorling, P. R. Fielden, S. W. Fogarty, N. J. Fullwood, K. A. Heys, *et al.*: *Nat. Photonics* **9** (2014) 1771.
- 5) Y. Bai, J. Yin, and J. X. Cheng: *Science adv.* **7** (2021) 2.
- 6) V. P. Zharov and D. O. Lapotko: *IEEE J. Sel. Top. in Quantum Electron.* **11** (2005) 733.
- 7) D. Zhang, C. Li, C. Zhang, M. N. Slipchenko, G. Eakins, and J. X. Cheng: *Science adv.* **2** (2016) 9.
- 8) G. Ishigane, K. Toda, M. Tamamitsu, H. Shimada, V. R. Badarla, and T. Ideguchi: *Light: Sci. & Appl.* **12** (2023) 174.
- 9) K. Toda, M. Tamamitsu, Y. Nagashima, R. Horisaki, and T. Ideguchi: *Sci. Rep.* **9** (2019) 9957.
- 10) Q. Xia, Z. Guo, H. Zong, S. Seitz, C. Yurdakul, M. S. Unlu, L. Wang, J. H. Connor, and J. X. Cheng: *Nat. Commun.* **14** (2023) 6655.
- 11) G. Popescu, T. Ikeda, R. R. Dasari, and M. S. Feld: *Opt. Lett.* **31** (2006) 6.
- 12) K. Ibata, S. Takimoto, T. Morisaku, A. Miyawaki, and M. Yasui: *Biophys. J.* **101** (2011) 9.
- 13) M. Tamamitsu, K. Toda, M. Fukushima, V. R. Badarla, H. Shimada, S. Ota, K. Konishi, and T. Ideguchi: *Nat. Photonics* **18** (2024) 738.
- 14) P. Gao and C. Yuan: *Light Adv. Manuf.* **3** (2022) 6.
- 15) C. Zhang, L. Yang, Y. Ding, Y. Wang, L. Lan, Q. Ma, X. Chi, P. Wei, Y. Zhao, A. Steinbüchel, *et al.*: *Nat. Commun.* **8** (2017) 15979.
- 16) K. L. Vodopyanov, J. P. Maffetone, I. Zwieback, and W. Ruderman: *Appl. Phys. Lett.* **75** (1999) 1204.
- 17) V. Petrov, V. V. Badikov, D. V. Badikov, K. Kato, G. S. Shevyrdyaeva, K. Miyata, M. Mero, L. Wang, Z. Heiner, and V. L. Panyutin: *J. Opt. Soc. Am. B* **38** (2021) B46.
- 18) J. Zhao, L. Jiang, A. Matlock, Y. Xu, J. Zhu, H. Zhu, L. Tian, and J. X. Cheng: *Light: Sci. & Appl.* **12** (2023) 147.
- 19) S. Alberti, and A. Gladfelter, and T. Mittag: *Cell* **176** (2019) 3.
- 20) L. Shi, F. Hu, and W. Min: *Nat. Commun.* **10** (2019) 4764.