

一般セッション(口頭講演) | 3 光・フォトンクス：3.3 生体・医用光学

■ 2025年9月10日(水) 13:30 ~ 16:15 | ■ N104 (共通講義棟北)

[10p-N104-1~10] 3.3 生体・医用光学

小関 泰之(東大)、南川 丈夫(阪大)

13:30 ~ 13:45

[10p-N104-1] [第58回講演奨励賞受賞記念講演] 超高速蛍光寿命顕微鏡技術の進展と将来展望

○菅野 寛志^{1,2}、リ ボン¹、新妻 邦泰^{2,3}、合田 圭介^{1,4,5,6} (1.東大理、2.東北大医、3.東北大医工、4.東北大SRIS、5.カリフォルニア大工、6.武漢大工)

◆ 奨励賞エントリー

13:45 ~ 14:00

[10p-N104-2] 中赤外光熱イメージングフローサイトメトリーの実現に向けた実験プラットフォームの構築

○(D)菅原 優生¹、戸田 圭一郎¹、福島 誠人¹、井手口 拓郎¹ (1.東大理)

◆ 奨励賞エントリー

14:00 ~ 14:15

[10p-N104-3] カバーガラス上で急速凍結した細胞構造の評価：時間決定型光電子相関顕微法に向けて

○前田 侑希¹、辻 康介¹、齊藤 知恵子²、藤森 香帆²、山中 真仁¹、吉川 雅英²、藤田 克昌^{1,3} (1.阪大工、2.東大医、3.阪大OTRI)

◆ 英語発表

14:15 ~ 14:30

[10p-N104-4] Design and Performance Evaluation of Extended Depth of Focus Intraocular Lenses

Yen-Ting Wu¹, ○(M1)XIANG-FAN LEE¹, Jia-Han Li¹ (1. Dept. of ESOE, Natl. Taiwan Univ.)

◆ 奨励賞エントリー

14:30 ~ 14:45

[10p-N104-5] 黄色ブドウ球菌を対象とした水中での殺菌評価

○香川 達郎¹、松井 大亮¹、堀越 秀春²、神村 共住³、梅村 信弘¹ (1. 公立千歳科学技術大学、2. 東ソー・エスジーエム株式会社、3. 大阪工業大学)

15:00 ~ 15:15

[10p-N104-6] 疾患バイオマーカーの迅速 1 分子デジタルSERS計測

○安藤 潤¹、村井 和枝¹、道幸 智恵¹、高橋 育子¹、飯田 龍也¹、向後 泰司¹、豊田 雅士²、齊藤 祐子²、村山 繁雄²、栗原 正典²、渡邊 力也¹ (1. 理研、2. 東京都健康長寿医療センター)

◆ 奨励賞エントリー

15:15 ~ 15:30

[10p-N104-7] ライトシート照明ラマンフローサイトメトリーにおける光検出感度の向上

○古賀 大蔵¹、久保 俊貴^{1,2}、藤田 克昌^{1,3} (1. 阪大院工、2. 阪大院医、3. 阪大OTRI)

◆ 奨励賞エントリー

15:30 ~ 15:45

[10p-N104-8] 金ナノロッドの光凝集と光増幅効果を併用したエクソソームの高感度ラマン分光検出

○酒尾 美星¹、シャルマ アビナブ¹、田中 拓男^{1,2}、矢野 隆章^{1,2} (1. 徳島大 pLED、2. 理研)

◆奨励賞エントリー

15:45～16:00

[10p-N104-9] 多数回平均化とSERDSによる自家蛍光下でのラマン信号の回復

○(M1C)林 晃太¹、小山 卓耶²、片桐 崇史² (1.富山大理工、2.富山大工)

16:00～16:15

[10p-N104-10] 膠芽腫DNAメチル化状態の低侵襲リアルタイム予測

ー 赤外吸収スペクトルが捉える血中脂質特性 ー

○木野 彩子¹、金森 政之²、松浦 祐司¹ (1.東北大院医工、2.東北大院医)

超高速蛍光寿命顕微鏡技術の進展と将来展望

Advances and future directions in ultrafast fluorescence lifetime imaging microscopy

東大理¹, 東北大医², 東北大医工³, 東北大 SRIS⁴, カリフォルニア大工⁵, 武漢大工⁶

○菅野 寛志^{1,2}, リ ボン¹, 新妻 邦泰^{2,3}, 合田 圭介^{1,4,5,6}

Univ. of Tokyo¹, Tohoku Univ. (Med.)² (Biomed. Eng.)³ (SRIS)⁴, UCLA⁵, Wuhan Univ.⁶,

°Hiroshi Kanno^{1,2}, Fan Li¹, Kuniyasu Niizuma^{2,3}, Keisuke Goda^{1,4,5,6}

E-mail: hiroshi.kanno.b2@tohoku.ac.jp

蛍光寿命は、蛍光分子が光励起された後に基底状態へ戻るまでの平均時間として定義され、励起光の強度変動や蛍光色素の局所的濃度に依存しない定量的なパラメータである。加えて、蛍光寿命は蛍光分子の置かれた周囲環境に応じて変化するため、細胞内の微小環境の変化を測定する手段として有用である[1]。このような特性から、蛍光寿命を計測する顕微鏡技術は、従来の蛍光強度ベースの顕微鏡法と比較して、より頑健で定量性に優れた測定技術として注目を集めている[2,3]。一方で、従来の蛍光寿命顕微鏡法では、撮像速度が最大でもビデオレート程度にとどまり、高速な細胞応答の計測や、大規模な細胞集団の解析には限界があった[4]。

本発表では、我々が昨年開発した、10,000 画像/秒以上の撮像速度を実現する超高速蛍光寿命顕微鏡システム[5]を中心に、近年進展の著しい蛍光寿命顕微鏡法の高速撮像技術とその生物医学応用について概説する。顕微鏡システムは一般に、照明方式の違いにより広視野型およびビームスポット走査型に大別されるが、蛍光寿命顕微鏡の高速化においては、前者では検出系、後者では照明系の技術革新が主に進展を支えている[4]。また、撮像速度が 100 画像/秒を超えることで、神経スパイクのような高速な細胞応答の観察や、腫瘍などにおける異種細胞集団の大規模解析が現実的となってきた[3,5]。こうした進展により、蛍光寿命顕微鏡法は細胞生物学、生物物理学、神経科学などの分野において、新たな研究展開を可能にする基盤技術として期待されている。

[1] M. Y. Berezin and S. Achilefu, *Chem. Rev.* **110**, 2641 (2010).

[2] B. Torrado et al., *Nat. Rev. Methods Primers* **4**, 80 (2024).

[3] A. J. Bowman et al., *Science* **380**, 1270 (2023).

[4] H. Kanno et al., *Biophoton. Discovery* **2**, 030901 (2025).

[5] H. Kanno et al., *Nature Communications* **15**, 7376 (2024).

中赤外光熱イメージングフローサイトメトリーの実現に向けた 実験プラットフォームの構築

Development of an Experimental Platform Toward Realizing Mid-Infrared Photothermal Imaging Flow Cytometry

東大理¹ ○(M2)菅原 優生¹, 戸田 圭一郎¹, 福島 誠人¹, 井手口 拓郎¹

The Univ. of Tokyo (Science)¹, ○Yusei Sugawara¹, Keiichiro Toda¹, Masato Fukushima¹, Takuro Ideguchi¹

E-mail: yusei637pepsi@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

近年、高速に流路中を流れる細胞の画像を大量に取得するイメージングフローサイトメトリー (Imaging flow cytometry, IFC) が注目を集めている。しかし、従来の装置では蛍光標識が必要であり、細胞毒性やラベルによる生体機能への影響といった課題を抱えているため、非標識手法による IFC の実現が望まれている。実際、非標識分子振動顕微鏡を代表するコヒーレントラマン顕微鏡による IFC の報告もなされてきた[1, 2]。一方、新たな非標識手法として、ラマン散乱とは相補的な情報が取得可能な、中赤外吸収による光熱変換で生じる試料の屈折率変化を可視光顕微鏡で検出する中赤外光熱顕微鏡[3]の技術が近年急速に進展している。しかし、中赤外光熱顕微鏡では、中赤外光 ON 状態と OFF 状態のそれぞれの画像を差分処理する必要がある。従来手法ではこれらをイメージセンサの異なるフレーム(〜ms 間隔)で取得していたため、フレーム間で測定対象が動くことでモーションアーティファクトが発生し、また高速流路中のサンプルでは ON/OFF 画像取得の間に視野外へ移動してしまうため、IFC への適用が困難であった (図 1b)。

そこで本研究では、周波数多重デジタルホログラフィ技術[4]を応用し、10 ns のパルス光を用いて、20 ns 間隔で中赤外光 ON/OFF 状態の画像をイメージセンサの 1 フレーム内に分離して埋め込む独自手法を IFC に適用する。この手法を用いると、対象の移動を無視できる時間間隔での差分処理が実現できる。実際に、水流速約 9 cm/s で直径 6 μm ポリスチレンビーズを流し、振動吸収ピークである 2925 cm^{-1} におけるモーションアーティファクトのない光熱信号の取得に成功した (図 1c)。本技術は環境中マイクロプラスチックの評価や、細胞内脂質分布の統計的解析などへの応用が期待される。

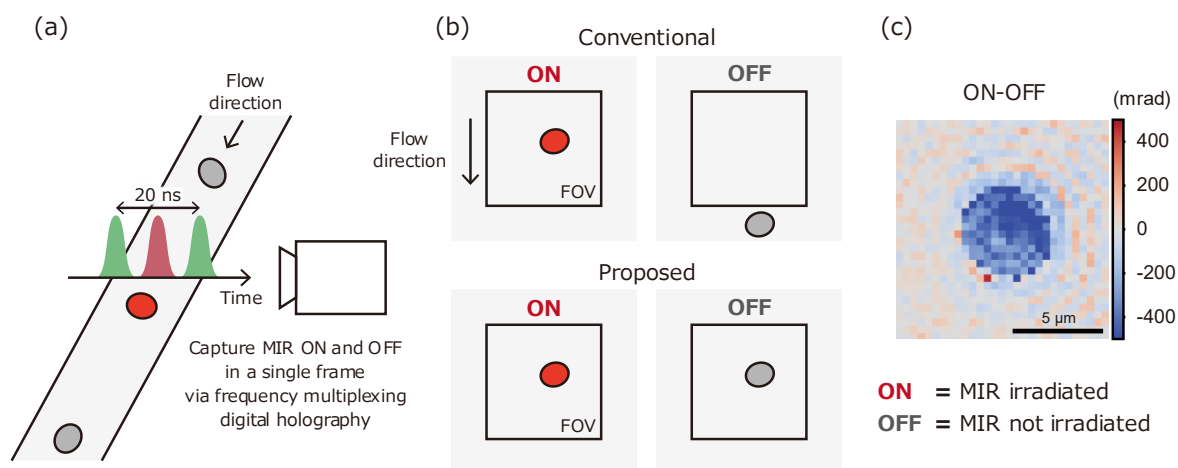


Fig. 1 Experimental platform toward realizing mid-infrared photothermal imaging flow cytometry. (a) Schematic of the experimental system. **(b)** Comparison of the conventional and proposed methods. **(c)** Photothermal images of a microbead flowing in capillary. MIR: Mid-infrared.

[1] Suzuki, Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 116, 15842–15848 (2019). [2] Nitta, N. et al., Nat. Commun., 11, 3452 (2020). [3] Xia, Q. et al., J. Phys. Chem. B, 126, 8597–8613 (2022). [4] Shaked, N. T. et al., Adv. Opt. Photonics, 12, 556 (2020).

カバーガラス上で急速凍結した細胞構造の評価： 時間決定型光電子相関顕微法に向けて

Evaluation of cellular structures in cells cultured and rapidly frozen on coverslips:
Toward time-deterministic correlative light and electron microscopy

阪大工¹, 東大医², 阪大 OTRI³, °前田侑希¹, 辻康介¹, 齊藤知恵子², 藤森香帆²,
山中真仁¹, 吉川雅英², 藤田克昌^{1,3}

UOsaka¹, UTokyo², UOsaka OTRI³, °Yuki Maeda¹, Kosuke Tsuji¹, Chieko Saito², Kaho Fujimori²,
Masahito Yamanaka¹, Masahide Kikkawa², Katsumasa Fujita^{1,3}

E-mail: fujita@ap.eng.osaka-u.ac.jp

光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いた光電子相関顕微鏡法は、光学観察で標的生体分子などの局在を観察、同定し、電子顕微鏡でその分子構造などの微細構造の観察を行う手法であり、細胞生物学などの分野の研究に幅広く利用されている。近年、我々は、光学顕微鏡観察下の細胞を、任意のタイミングでミリ秒の時間精度で凍結固定し、凍結環境下で細胞を高空間分解能かつ高い定量性で観察できる「時間決定型クライオ光学顕微鏡」を開発した [1]。本技術では、凍結直前まで細胞を光学顕微鏡観察できるため、「どのような細胞内イベント中に」「いつ」「どのようなタイミング」で細胞が固定されたかという時空間情報を正確に把握したうえで、凍結された瞬間の細胞状態を詳細に観察できる。時間決定型クライオ光学顕微鏡で凍結固定された細胞を、電子顕微鏡で観察できれば、細胞内ダイナミクスの時空間情報を把握したうえでの光電子相関顕微鏡観察が可能になり、これまで実現できていなかった細胞内ダイナミクスの時空間情報と細胞の超微細構造を関連付けた解析が可能となる。

本研究では、時間決定型クライオ光学顕微鏡と同様の凍結手法を用い、カバーガラス上で培養した細胞を急速凍結固定した後、電子顕微鏡で細胞内微小構造を観察し、光電子相関顕微鏡観察に応用できるかを検証した。番地情報付きのカバーガラス上で細胞を培養した後にミトコンドリアを蛍光標識し、細胞分布を蛍光顕微鏡で確認したうえで、キムワイプを用いて細胞周囲の緩衝液を十分に減らし、その後、カバーガラス上から-190 °C のプロパン-イソペンタン混合寒剤を試料に滴下し、急速凍結した。急速凍結した試料を凍結置換、樹脂包埋、超薄切片にした後に、走査型電子顕微鏡で観察し、凍結前に同一の細胞で観察した蛍光像と重ね合わせた結果を図 1 に示す。本実験で得られた観察像では、ミトコンドリアなどの細胞内小器官の微細構造が観察できており、氷晶形成が原因と考えられる損傷や変形は見られなかった。この結果から、時間決定型クライオ光学顕微鏡で得られる細胞凍結試料は、電子顕微鏡による観察に十分に利用できるものであり、今後、光学顕微鏡上で急速凍結した細胞試料を、低温を維持した状態で凍結置換できる技術を実装できれば、時間決定型クライオ光学顕微鏡と電子顕微鏡による光電子相関顕微鏡観察が実現できることが確認できた。

参考文献 [1] M. Yamanaka, K. Tsuji, et al., bioRxiv doi:
10.1101/2023.08.01.551103

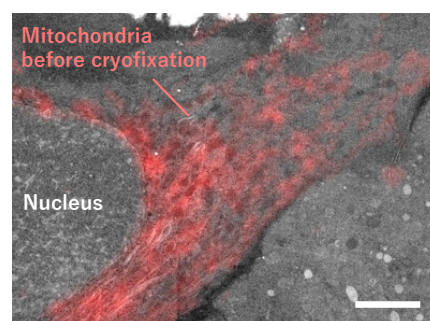


Figure 1. Marge of fluorescence (red) and SEM (gray) images of a HeLa cell cryofixed by pouring liquid cryogen from top of the sample coverslip. The cell was stained with PKmito RED (Ex : 549 nm, Em : 569 nm). Scale bar is 5 μ m.

Design and Performance Evaluation of Extended Depth of Focus Intraocular Lenses

Yen-Ting Wu, Xang-Fan Lee, and Jia-Han Li*

Department of Engineering Science and Ocean Engineering, National Taiwan University, Taipei 106319, Taiwan
E-mail: r11525148@ntu.edu.tw, r13525097@ntu.edu.tw, *: jiahan@ntu.edu.tw

1. Introduction

Cataracts are the leading cause of vision impairment globally, affecting over 50 million people and responsible for one-third of global blindness cases [1]. Caused by age-related protein aggregation in the lens, cataracts lead to opacity, contrast loss, and eventual blindness [2]. Surgical implantation of intraocular lenses (IOLs) remains the only effective treatment.

Modern IOLs have evolved from rigid PMMA materials to foldable designs using hydrophobic acrylic, improving biocompatibility and enabling minimally invasive procedures [3]. Optical designs now include aspheric, multifocal, toric, and extended depth of focus (EDOF) lenses to meet varying visual needs [4].

EDOF IOLs aim to offer continuous vision across multiple distances while reducing halos and glare seen in multifocal designs. This study presents a hybrid EDOF IOL featuring a sinusoidal diffractive posterior surface and a freeform aspheric anterior surface. Using the Liou & Brennan eye model [5] and a custom hydrogel material, we evaluate the design through optical simulations and modulation transfer function (MTF) measurements to assess its imaging performance.

2. Methodology and results

To evaluate and optimize the optical performance of an EDOF IOL, we adopted the Liou & Brennan eye model optical simulations, incorporating accurate anatomical parameters and spectral dispersion across 380–750 nm. A hybrid optical design was developed featuring a sinusoidal diffractive posterior surface with adjustable phase parameters to tune energy distribution among diffraction orders. Among three design types, the Type I configuration—balancing far, intermediate, and near focus—was selected for its stable imaging performance. The anterior surface was optimized using a Binary 2 freeform equation, with curvature, conic, and higher-order coefficients adjusted through a merit function to improve modulation transfer function (MTF) and minimize aberrations. A hydrogel material (PH30S) was used for lens fabrication, with its refractive index (1.5277 at 550 nm) and Abbe number (39.1) measured and fitted using the Schott dispersion formula. The final design was validated through optical simulation and experimental testing using the TRIOPTICS Opti-Spheric system. MTF measurements at 50 lp/mm in air yielded 0.427 (sagittal) and 0.269 (tangential), closely matching simulation results (~0.38). As shown in Figure 1, the EDOF lens consistently outperformed a commercial trifocal IOL across near (80 cm), intermediate (120 cm), and far (infinity) object distances, with the most significant improvement observed at intermediate range. These results validate the EDOF lens's ability to provide extended and continuous focus with improved contrast at all distances.

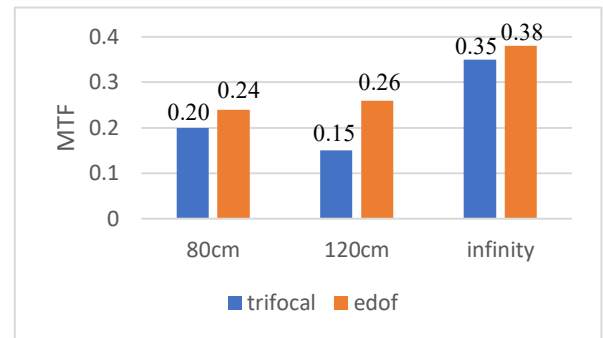


Fig.1 MTF Comparison Between EDOF and Trifocal IOL

3. Conclusions

In this study, we proposed and validated a hybrid EDOF IOL design that combines a sinusoidal diffractive posterior surface with an optimized freeform anterior surface. Using the Liou & Brennan eye model and a custom hydrogel material with experimentally measured optical properties, the design was evaluated through optical simulations and experimental MTF testing. Results demonstrated that the EDOF IOL achieved high image contrast across far, intermediate, and near distances, with superior performance at intermediate range compared to a commercial trifocal IOL. The design also showed effective control of spherical and chromatic aberrations, confirming its ability to provide continuous vision with reduced visual disturbances. These findings suggest strong clinical potential for the proposed EDOF IOL in improving postoperative visual outcomes and enhancing patient satisfaction.

Acknowledgements

We like to thank Professor Chi-An Dai at National Taiwan University for the hydrogel material preparation. This research was funded by National Science and Technology Council of Taiwan under grant number 112-2221-E-002-201-MY2. We are grateful to the National Center for High-Performance Computing, Taiwan, for providing us with the computation time and using its facilities.

References

- [1] Flaxman SR, Bourne RRA, Resnikoff S, Ackland P, Braithwaite T, Cicinelli MV, et al. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990–2020: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2017;5(12):e1221–34.
- [2] Michael R, Bron AJ. The ageing lens and cataract: a model of normal and pathological ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2011;366(1568):1278–92.
- [3] Zhao Y, Li X, Wang Y, Xu Y, He C. Development of intraocular lenses: from monofocal to accommodative. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;70(Pt 1):1019–29.
- [4] Webb ST, Smart JD, Hutchings SD. Extended depth of focus intraocular lenses: design principles and clinical outcomes. *Eye Vis (Lond)*. 2020;7:1.
- [5] Hwey-Lan Liou and Noel A. Brennan, "Anatomically accurate, finite model eye for optical modeling," *J. Opt. Soc. Am. A* 14, 1684–1695 (1997)

黄色ブドウ球菌を対象とした水中での殺菌評価

Bactericidal evaluation for *Staphylococcus aureus* in water.

香川 達郎¹, 松井 大亮¹, 堀越 秀春², 神村 共住³, 梅村 信弘¹

Tatsuro Kagawa¹, Daisuke Matsui¹, Hideharu Horikoshi²,

Tomosumi Kamimura³ and Nobuhiro Umemura¹

¹Chitose Inst. Sci. & Tech., ²TOSOH SGM Corp, ³Osaka Inst. Tech.,

E-mail: umemura@photon.chitose.ac.jp

1. 背景

以前、我々は、発振波長が 1064 nm の Nd:YAG レーザーを用いて第 4 高調波及び第 5 高調波である 266 nm 及び 213 nm の深紫外線 (DUV) パルスレーザー光照射によるマニット食塩寒天培地上での殺菌効果及び同じ菌種における水中殺菌の効果を報告した[1]。また、波長 213 nm 及び 266 nm の深紫外線パルスレーザー光の照射条件により大腸菌 NBRC 3301 の殺菌効果が異なることを報告した [2]。

本研究では、波長 266 nm 及び 213 nm 深紫外線パルスレーザー光を高強度、中強度、低強度の 3 つの照射条件にて水中の黄色ブドウ球菌 NBRC 13276 における殺菌効果の影響を調査した。加えて、黄色ブドウ球菌を寒天培地上で表面殺菌した結果との比較も行った。

2. 実験方法

波長 1064 nm の Nd:YAG レーザー (パルス幅 8 ns、繰り返し周波数 10 Hz) 光を KTP (KTiOPO₄) 及び β-BBO (β-BaB₂O₄) などの非線形光学結晶に入射して波長変換を行い、DUV 光を出力した。266 nm の照射系の配置図を Fig. 1 に示す。発生させた波長 266 nm の光を照射後、プリズムで分光し凹レンズを通してビームを拡げた。シャーレ上のレーザーの照射エネルギー密度について高パルスエネルギーでは、1.2 μJ/cm²、中パルスエネルギーでは 0.6 μJ/cm²、低パルスエネルギーでは 0.3 μJ/cm² となるように出力を調整するとともに、既定の総照射量に達するように照射時間を調整した。

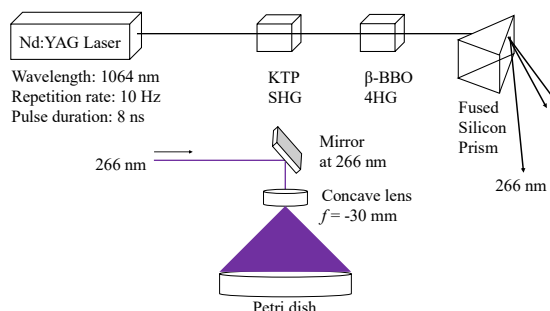


Fig. 1 Experimental Setup for DUV radiation at 266 nm

3. 実験結果

Fig. 2 は、波長 266 nm の DUV 光を高、中、低パルスエネルギーで液体中にある黄色ブドウ球菌に照射を行った結果を示したものである。グラフの縦軸は、紫外線照射を行い 24 時間培養した後の黄色ブドウ球菌 NBRC 13276 の生存率を示し、グラフの横軸は総照射量を示している。

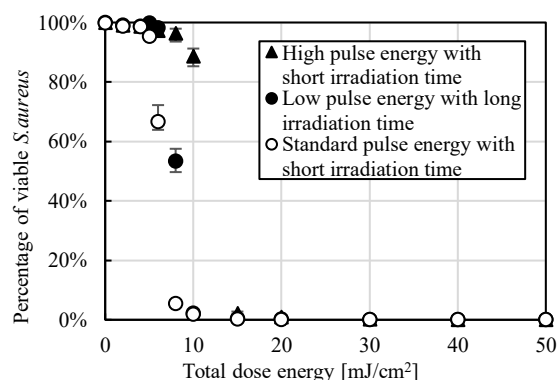


Fig. 2 Effects of DUV pulse radiation to *S. aureus*

Fig. 2 のグラフより、波長 266 nm の黄色ブドウ球菌の水中殺菌は総照射量が 8 mJ/cm² ~ 15 mJ/cm² の間で急激な生存率の低下を示している。高、中、低パルスエネルギーにおいて生存率の急落を示した総照射量は、それぞれ 15 mJ/cm²、8 mJ/cm²、10 mJ/cm² であった。波長 266 nm の深紫外線パルスレーザー光を使い黄色ブドウ球菌を寒天培地上で表面殺菌した際に生存率は、指数関数的な減少を示した。

当日は、水中での殺菌に照射強度と照射時間の相互作用による殺菌効果の検証や他の深紫外線パルスレーザー光である波長 213 nm の実験結果を表面殺菌にて行った結果

ouyoubuturigakkai

とともに報告する。

4. 参考文献

- [1] K. Dainaka *et al.*, APLS 2023, CW1-04(2023).
- [2] T. Kagawa *et al.*, 応用物理学会春季学術講演会予稿集, 15a-K306-11 (2025)

疾患バイオマーカーの迅速 1 分子デジタル SERS 計測

Rapid single-molecule digital SERS counting of disease biomarkers

理研¹, 東京都健康長寿医療センター², [○]安藤 潤¹, 村井 和枝¹, 道幸 智恵¹, 高橋 育子¹, 飯田 龍也¹, 向後 泰司¹, 豊田 雅士², 齊藤 祐子², 村山 繁雄², 栗原 正典², 渡邊 力也¹

RIKEN¹, Tokyo Metropolitan Institute for Geriatrics and Gerontology², [○]Jun Ando¹, Kazue Murai¹, Tomoe Michiyuki¹, Ikuko Takahashi¹, Tatsuya Iida¹, Yasushi Kogo¹, Masashi Toyoda², Yuko Saito², Shigeo Murayama², Masanori Kurihara², Rikiya Watanabe¹

E-mail: ando@riken.jp

酵素は、代謝や吸収、信号伝達などの生体機能を発現・調節している。血液や脳脊髄液などのヒト液性検体中にも多様な酵素が含まれ、臓器の炎症や機能不全、細胞の脱落など、疾患とこれに伴う諸症状を鋭敏に反映して検体液中の酵素活性(濃度)も増減する。検体液中で特定の疾患に応じて活性値が変化する酵素種は、疾患診断における指標、疾患バイオマーカーとして機能する。

酵素をバイオマーカーとした疾患診断法の拡充には、検体液中の微量な酵素を捉える計測感度の向上や、多様な混ざりの中から特定の酵素種の働きを見極める分子識別能の向上が重要になる。上記の状況を鑑み、我々はこれまでに、表面増強ラマン散乱(SERS)分光法と微細加工技術を融合した 1 分子デジタル SERS 計数法を開発してきた。酵素活性を 1 分子毎に捉える高い感度と狭線幅のスペクトルを活かした高い分子識別能を有し、精製酵素をモデルに用いた原理検証実験において、酵素濃度の計測感度を 100 倍向上させ、複数種の酵素の多色同時計測も実現した。

上記計測法の疾患バイオマーカー探索への展開を考える上では、計測時間が一番の障壁となる。1 分子デジタル SERS 計測では、金属ナノ構造を具備したマイクロチャンバーアレイに酵素を 1 個以下の濃度で封入し、生成物の SERS 光からチャンバー内の酵素の有無をデジタル判定する。デジタルカウントによる計測感度向上には、原理的に数万個以上のチャンバーを観察する必要がある。レーザー走査型のラマン顕微鏡では一度の計測に数時間以上を要していた。

本発表では、1 分子デジタル SERS 計数法を迅速化する広視野型のラマン顕微鏡を開発し、ヒト液性検体中の酵素の高感度検出を試みた事例について報告する。狭線幅バンドパスフィルターを活用した広視野ラマン計測システムを構築することで、計測時間を従来装置と比べて 30 倍改善し、1 分子デジタル SERS 計測の 1 回の計測時間を 8.5 分まで短縮することができた。さらに、広視野システムでも従来装置と同等の酵素検出感度を維持でき、複数酵素の多色デジタル検出にも展開できることを実証した。計測時間を短縮した開発装置を用い、実際にヒト液性検体中の微量酵素の 1 分子デジタル SERS 計測に取り組んだ。認知症疾患に着目した検証を行い、特定の病型において有意に減少する酵素種を見出すことができた。本発表では、広視野ラマン顕微鏡の装置構成や撮像方式、検出感度等について報告するとともに、1 分子デジタル SERS 計測によるヒト液性検体中の微量酵素検出と病型の判別能に関して議論する。

ライトシート照明ラマンフローサイトメトリー における光検出感度の向上

Sensitivity improvement of Raman flow cytometry using light-sheet illumination

阪大院工¹, 阪大院医², 阪大 OTRI³ ◯(M2) 古賀 大蔵¹, 久保 俊貴^{1,2}, 藤田 克昌^{1,3}

Dept. of Applied Physics, UOsaka¹, Dept. of Dermatology, UOsaka², OTRI, UOsaka³

◯Taizo Koga¹, Toshiki Kubo^{1,2}, Katsumasa Fujita^{1,3}

E-mail: fujita@ap.eng.osaka-u.ac.jp

ラマンフローサイトメトリーは、細胞集団を無標識で迅速かつ単一細胞の精度で分析する手法として注目されている[1]。蛍光染色を用いないため、細胞への影響を最小限に抑えつつ、多様な生体分子の情報を同時に取得できるという利点がある。しかしながら、ラマン散乱は微弱であるため比較的長い露光時間が必要であり、結果としてラマンフローサイトメトリーのスループットが著しく制限される。この課題に対し我々は、マイクロキャピラリー内を流れる細胞をライトシートで側方照明し、TDI (time delay integration) 技術を用いて CCD カメラの電荷移動と細胞の流速を同期させることで、移動中の細胞からのラマン信号を効率的に積算し、長い信号取得時間を維持しながらも、従来の共焦点光学系を用いた手法[2]に比べて高いスループットを実現する手法を開発した[3]。

本研究では、さらなるスループット向上のため、光学系の最適化を行うことで信号対雑音比 (SNR) の改善および水由来の背景光を減少させることを目指した。具体的には、マイクロキャピラリー周辺を水で満たす構造を構築することで、検出光学系に水浸対物レンズの適用を可能とした。これにより、乾燥系対物レンズを使用していたことで発生していた球面収差を低減し、SNR の改善および水由来の背景光を抑制できる。さらに、照明光の開口数を高めて照明系の光軸方向の照明範囲を制限し、ガルバノミラーによってライトシートをその光軸に対し垂直な方向に走査することで、細胞全体を照明しつつ細胞外領域に存在する水への照明を抑制し、信号対背景光比の向上を図った。提案した光学系の有効性を評価するため、用いる光学素子やスリット幅、CCD カメラのピクセルサイズに基づいて、検出光学系の物体面における検出効率の空間分布を算出し、さらに、その空間分布と照明光の強度分布との積からラマン信号の実効的な検出効率の空間分布を導出した。信号対背景光比を計算した結果、提案手法は従来手法に比べて約 1.8 倍向上することを確認した。また、本手法と表面増強ラマン散乱を組み合わせることによって、信号強度を大幅に向上させつつ、高スループットな測定の実現にも成功した。

[1] J. Gala de Pablo *et al.*, *Acc. Chem. Res.* **54**, 2132-2143 (2021).

[2] X. Wang *et al.*, *Adv. Sci.* **10**, 2207497 (2023).

[3] M. Lindley *et al.*, *Optica* **12**, 479-489 (2025).

謝辞：本研究は、JST、COI-NEXT、JPMJPF2009 の支援を受けたものである。

金ナノロッドの光凝集と光増幅効果を併用した エクソソームの高感度ラマン分光検出

Highly Sensitive Raman Detection of Exosomes

Using Photo-induced Aggregation of Gold Nanorods

徳島大 pLED¹, 理研², 理研³ ○(M1)酒尾 美星¹, Abhinav Sharma¹, 田中 拓男^{1,2}, 矢野 隆章^{1,2}

Tokushima Univ.¹, RIKEN², °Miho Sakao¹, Abhinav Sharma¹, Takuo Tanaka^{1,2}, and Taka-aki Yano^{1,2}

E-mail: yano.takaaki@tokushima-u.ac.jp

近年、多様な細胞種から放出される粒子であるエクソソームが、がんのバイオマーカーとして注目されている。エクソソームの物性や組成の違いを明らかにすることで、疾患の早期診断や新しい治療法の開発に貢献できる。従来のエクソソーム検出手法は、粒径や特定のタンパク質の有無に着目したものが主流であり、より高感度な組成分析手法の確立が求められている。

本研究では、金ナノロッドの光凝集効果と光増幅効果を併用し、高感度かつ高分析能なエクソソームのラマン分光分析を実現した。具体的には、静電的相互作用を利用して金ナノロッドをエクソソーム表面に吸着させ (Fig. 1a)、その後、表面プラズモン共鳴による放射圧を利用してエクソソームに吸着した金ナノロッドを基板上に凝集・堆積させた (Fig. 1b)。さらに、金ナノロッドの長軸方向のプラズモン増強場を活用し、エクソソーム表面の表面増強ラマン散乱 (SERS) を高感度検出し、組成分析を可能にした。

本実験では、負に帯電したヒト結腸腺癌由来エクソソーム (直径 約 150 nm) と陽イオン性界面活性剤が表面修飾された金ナノロッド (プラズモン共鳴波長: 650 nm) を使用した。この混合液に、波長 671 nm のレーザー光を集光照射した。エクソソーム表面に吸着した金ナノロッド凝集体の大きさはレーザー光強度と照射時間に依存した。Fig. 1c は、光凝集されたエクソソームの SERS スペクトルである。948 cm⁻¹, 1251 cm⁻¹, 1330 cm⁻¹, 1342 cm⁻¹, 1365 cm⁻¹, 1580 cm⁻¹ 付近にラマンバンドが支配的に観測された。これらはそれぞれ、多糖類に典型的な骨格モード、アミドⅢ、タンパク質含有量、DNA/RNA、必須アミノ酸の一種、DNA 塩基の振動モードに帰属された。これらのラマンバンドはエクソソームの凝集体によって個体差があることがわかり、エクソソーム表面組成の不均一性を反映していることが示唆された。

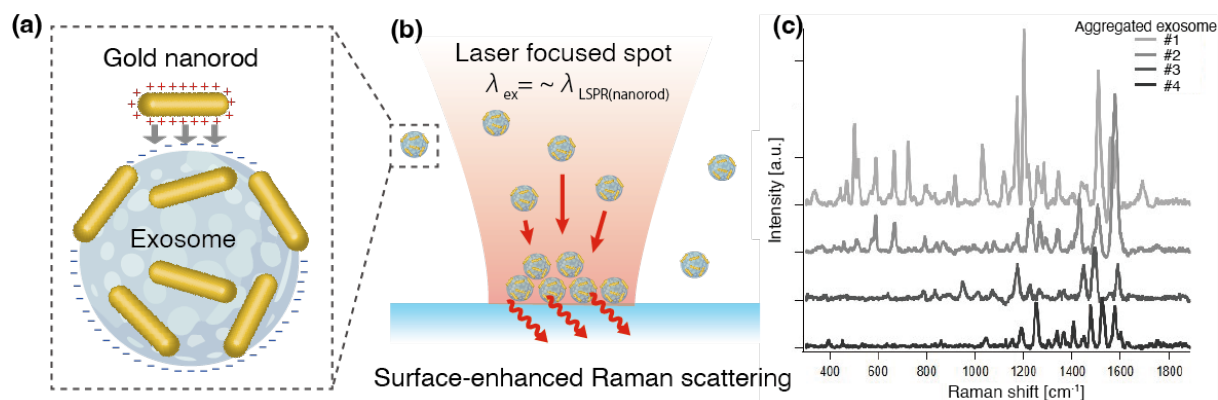


Fig. 1 (a)Electrostatic adsorption of gold nanorods on an exosome. (b) Schematic of plasmon-induced aggregation of gold nanorod adsorbed exosomes. (c) SERS spectra of four different aggregated exosomes.

多数回平均化と SERDS による自家蛍光下でのラマン信号の回復

Recovery of Raman signals under autofluorescence via extensive averaging and SERDS

富山大理工¹, 富山大工², [○](M1C) 林晃太¹, 小山卓耶², 片桐崇史²

Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama¹,

Faculty of Engineering, University of Toyama²,

[○]Kota Hayashi¹, Takuya Koyama², Katagiri Takashi²

E-mail: katagiri@eng.u-toyama.ac.jp

1. はじめに

生体組織のラマンセンシングでは、強い自家蛍光の妨害が、病変部の分類や定量計測の精度を著しく低下させる問題がある。これまで、自家蛍光からラマン信号を分離する手法として、シフト励起ラマン差分分光法 (Shifted Excitation Raman Difference Spectroscopy : SERDS) が提案されている^[1]。SERDS では、励起波長を僅かにシフトさせて取得した2つのスペクトルの差分をとることにより、蛍光成分のみを除去することが可能である。一方、従来の SERDS に関する研究は、自家蛍光が重畳したデータから高品質なラマンスペクトルを再構成するためのデータ処理法に関する検討に終始しており、ノイズ低減効果について詳細に調べた報告例はない。そこで、本研究では、多数回平均化によるノイズ低減に資する SERDS の効果を明らかにし、強い自家蛍光により測定が困難な試料からラマンスペクトルを抽出する手法の提案を目指す。

2. 多数回平均化における差分法の有効性

単一波長励起による従来のラマン分光計測システムを用いて、多数回平均化における差分法の有効性を評価した。実験系の概略を Fig. 1 に示す。波長 785 nm の励起光は 20 倍の対物レンズを介して、蛍光体粉末試料 ((Ba,Su)₃SiO₅: Eu, Yb) 表面に照射された。試料からの蛍光は、ロングパスフィルタとノッチフィルタにより励起光成分を除去した後に、分散型の分光器に取り付けた冷却 CCD により計測された。試料表面における励起光強度を 85 mW、励起光照射時間を 0.7 s とし、平均化回数を変化させたときのノイズを評価した。計測された蛍光スペクトルは、測定波長域においておおよそ 20000 ~ 60000 counts の強度を有する平坦な形状であり、ノイズは蛍光スペクトルからスペクトルの多項式近似を差し引いた後に全波長域の標準偏差を求めることにより算出した。

Fig. 2 に平均化回数とノイズの関係を示す。図より、生スペクトルには積算回数に依らず一定のノイズ成分が重畳していることが分かる。

これは、測定系の光学特性や迷光に起因する系統ノイズが平均化処理により減少されないためである。一般に、スペクトルを白色光スペクトルで割ることで測定系の応答を補正する方法が知られているが、全ての系統ノイズを除去することは困難である。一方、差分法では、平均化回数が増えるほどノイズは減少する。ここで n 回積算におけるランダムノイズの理論値 $N(n)$ は次式に従う。

$$N(n) = \frac{N(1)}{\sqrt{n}} \quad (1)$$

本研究では、1000 回の平均化処理を経ても理論値に従いノイズが減少することを確認した。この結果は、多数回平均化と SERDS により強い自家蛍光下でのラマン信号の回復が可能であることを示唆している。

参考文献

[1] F. Korinth, et.al., Sci. Rep. **10**, 11215 (2020).

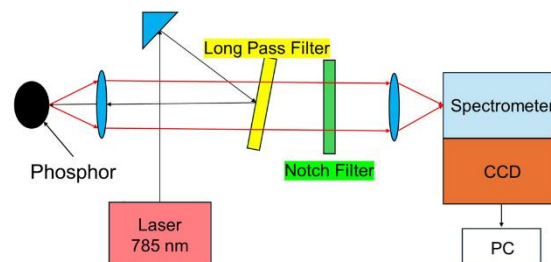


Fig. 1 Experimental setup.

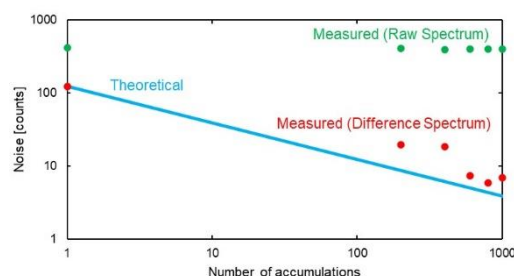


Fig. 2 Noise as a function of the number of accumulations.

膠芽腫 DNA メチル化状態の低侵襲リアルタイム予測

ー 赤外吸収スペクトルが捉える血中脂質特性 ー

Non-invasive real-time prediction of glioblastoma DNA methylation status – Blood lipid characteristics captured by infrared absorption spectra –

東北大院医工¹, 東北大院医² °木野 彩子¹, 金森 政之², 松浦 祐司¹

Graduate School of Biomedical Engineering, Tohoku Univ.¹, Graduate School of Medicine, Tohoku Univ.²

°Saiko Kino¹, Masayuki Kanamori², Yuji Matsuura¹

E-mail: saiko.kino.a3@tohoku.ac.jp

1. はじめに

O6-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼ (MGMT) タンパクは、膠芽腫の標準治療における第一選択薬テモゾロミドに対する薬剤抵抗性を持つ。腫瘍 DNA における MGMT プロモーター領域のメチル化状態は MGMT 産生能を左右し、テモゾロミド感受性および予後予測の重要な因子となる。メチル化率の測定は現状で摘出後の膠芽腫組織生検より行われるが、メチル化状態は治療経過を通じて変化するため、リアルタイムかつ低侵襲の評価法の確立が求められている。この研究では、患者血漿の中赤外吸収スペクトル解析による DNA メチル化状態評価の可能性を探索する。

2. 血漿の赤外 ATR スペクトル測定および解析結果

膠芽腫患者 46 人の生検または切除術により得られた腫瘍組織について、MGMT プロモーターメチル化率を算出した。25%をカットオフ値として、15 人の患者がメチル化群、31 人が非メチル化群に分類された。同じ患者から術前に血漿サンプルを採取し、全反射減衰(ATR)法により赤外吸収スペクトルを得た。各血漿試料 20 μ l を多重反射型台形プリズムの上底面に塗布し、20 分間の風乾後に測定を行った。得られたスペクトルの各波数における吸光度を説明変数とし、20%(9 例)をテストデータとする部分最小二乗 (PLS) 分析に基づくメチル化状態の判別、および連続値としてのメチル化率予測を行った。

メチル化状態の判別結果を図 1 に示す。判別得点の境界は 0 である。症例数の少ないメチル化群の感度がやや低いものの、非メチル化群の特異度は高く、全体の判別精度は 82.6%、受信者動作特性(ROC)の曲線下面積(AUC)は 0.886 であった。さらにメチル化率を連続値として回帰予測したところ、測定値との相関は 0.47 と、中程度の相関を示した(図 2)。MGMT プロモーター領域のメチル化状態による血漿スペクトルの差異は、おもに脂質由来の吸収帯で生じていた。図 3 にメチル化群および非メチル化群の二次微分 ATR スペクトルの群平均を示す。CH₂/CH₃ 吸収強度比 $r_1 = I_{2923} / I_{2870}$ および $r_2 = I_{2853} / I_{2870}$ はそれぞれ脂質鎖の不飽和度および鎖長を示すが、いずれも非メチル群で高く、メチル化に伴う代謝脂質特性の変化を示唆している。

膠芽腫における MGMT プロモーター領域のメチル化状態評価のための、血漿 ATR-FTIR 分光法の可能性を示した。今後も引き続き、予測精度向上を模索していく。

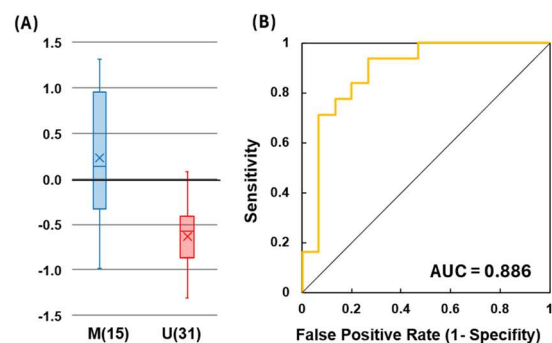


Fig.1 Methylation discrimination from plasma IR spectra. (A) Discriminant score (B) ROC Curve

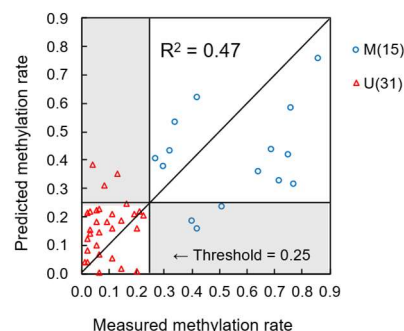


Fig.2 PLS prediction of methylation rate from plasma IR spectrum. Predicted value relative to measured value.

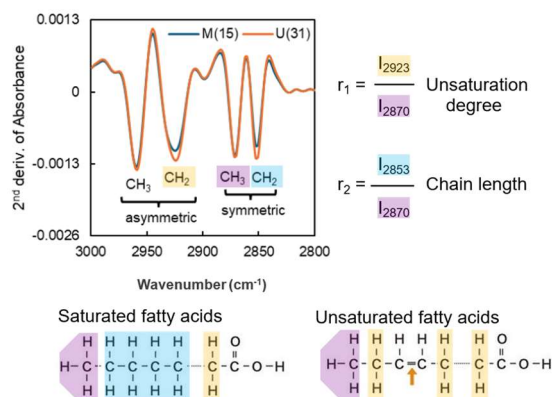


Fig.3 Second derivative group average spectra of methylated and non-methylated groups. “unsaturation degree” r_1 and “chain length” r_2