

二国間交流事業 共同研究報告書

平成 23 年 4 月 1 日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

共同研究代表者所属・部局 東京大学・大学院理学系研究科

職・氏名 ^(ふりがな) 准教授 加納英明
かのうひであき

1. 事業名 相手国（ロシア）との共同研究 振興会対応機関（RFBR）
2. 研究課題名 機能性フォトニック結晶ファイバを用いた高波数分解CARS顕微・内視分光装置の構築
3. 全採用期間

平成 21年 4月 1日 ~ 平成 23年 3月31日（2年 0ヶ月）

4. 研究経費総額

(1) 本事業により交付された研究経費総額 5,000 千円

初年度経費 2,500 千円、 2年度経費 2,500千円、 3年度経費 千円

(2) 本事業による経費以外の国内研究経費総額 30,000 千円

5. 研究組織

(1) 日本側参加者

| 氏名 (ふりがな) | 所属・職名 | 研究協力テーマ |
|--------------------------|-------------|-----------------------------|
| 加納英明 かのうひであき | 東京大学・准教授 | CARS 顕微・内視鏡分光装置の開発 |
| 瀧口宏夫 はまぐちひろお | 東京大学・教授 | CARS・ラマン顕微鏡の開発 |
| 加藤拓也 かとうたくや | 東京大学・博士課程学生 | パルス光を用いた分光測定装置の開発 |
| 川手千枝子 かわてちえこ | 東京大学・修士課程学生 | パルス光を用いた分光測定装置の開発 |
| 富永正治 とみながしやうじ | 東京大学・修士課程学生 | 顕微ラマンシステムの開発 |
| 本間脩 ほんまおさむ | 東京大学・修士課程学生 | 白色光を用いた分光測定装置の開発 |
| 南哲 みなみさとる | 東京大学・修士課程学生 | 白色光を用いた分光測定装置の開発 |
| 吉田匡佑 よしだきょうすけ | 東京大学・博士課程学生 | パルス光を用いたラマン分光測定 |
| Liang-da Chiu リヤンダチュウ | 東京大学・博士課程学生 | フォトニック結晶ファイバによる CARS 顕微鏡の応用 |
| 石原良太 いしはらりょうた | 東京大学・博士課程学生 | パルス光を用いたラマン分光測定 |
| 奥野将成 おくのまさなり | 東京大学・博士課程学生 | フォトニック結晶ファイバによる CARS 顕微鏡の開発 |
| 松崎惟信 まつざきこれのぶ | 東京大学・修士課程学生 | パルス光を用いたラマン分光測定 |
| 廣崎拓登 ひろさきたくと | 東京大学・修士課程学生 | フォトニック結晶ファイバによる CARS 顕微鏡の開発 |
| 和田大我 わだたいが | 東京大学・修士課程学生 | 顕微ラマンシステムの開発 |

(2) 相手国側研究代表者

所属・職名・氏名 International Laser Center, Physics Department, M.V. Lomonosov Moscow State University・
Associate Professor・Fedotov Andrey Borisovich

(3) 相手国参加者（代表者の氏名の前に○印を付すこと）

| 氏名 | 所属・職名（国名） | 研究協力テーマ |
|-----------------------------|---|---|
| ○ Fedotov Andrey Borisovich | International Laser Center, Physics Department, M.V. Lomonosov Moscow State University (Russia)・Associate Professor | Analysis of supercontinuum generation from photonic crystal fiber |
| Dmitrii Sidorov-Biryukov | International Laser Center, Physics Department, M.V. Lomonosov Moscow State University (Russia)・Senior Researcher | Analysis of supercontinuum generation from photonic crystal fiber |
| Aleksander Voronin | International Laser Center, Physics Department, M.V. Lomonosov Moscow State University (Russia)・Ph.D. Student | Analysis of supercontinuum generation from photonic crystal fiber |
| Aleksander Savvin | International Laser Center, Physics Department, M.V. Lomonosov Moscow State University (Russia)・Ph.D. Student | Analysis of supercontinuum generation from photonic crystal fiber |
| Aleksander Lanin | Lomonosov Moscow State University (Russia)・Ph.D. Student | Analysis of supercontinuum generation from photonic crystal fiber |

6. 研究概要（研究の目的・内容・成果等の概要を簡潔に記載してください。）

研究目的：生体内における化学反応を分子レベルでリアルタイムに追跡することは、分子科学・生命科学双方における究極の目標の一つである。この実現のために、生体内で機能する分子の動的な振る舞いが様々な方法で研究されている。この中でも、ラマン分光法は、生きた細胞内の分子分布やその構造変化を非染色・非破壊・非侵襲で観測することのできる、非常に強力な方法である。分子の構造変化は、ラマンスペクトルの微細な変化として現れるが、これらは分子からの直接の情報に他ならない。このような分子の構造情報やそのダイナミクスを生体内から直接取り出すことができれば、分子レベルでの詳細な細胞内ダイナミクスの研究が可能となり、生命科学・医学双方における大きなブレイクスルーを創出することが期待される。そこで本研究では、フォトニック結晶ファイバーからの新規な白色レーザーという新しい光源を用いて、まったく新しい顕微鏡及び内視鏡を開発し、生細胞・生体組織を分子レベルで可視化することを目標として、研究を行った。

研究内容・成果

本研究では、微弱なラマン散乱光を増幅し、高効率かつ高速にラマンイメージを得ることのできる **Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS)**過程を採用した。研究の過程で、CARS 光の他に、第二高調波など複数の非線形光学効果の発生を生細胞中に見いだしたため、様々な非線形光学過程を用いた複眼的な生細胞可視化を実現することが出来た。CARS 過程では、一般に波長の異なる二つの光を必要とする。この光の周波数差が分子振動と一致したときに、非常に強い CARS 光が発生する。本研究では、二つの光のうち一方を広帯域なスペクトルを持つ光源に置き換え、スペクトル情報をも取得することのできるマルチプレックス CARS 分光法を、顕微鏡及び内視鏡下にて実現した。本システム構築のため、ロシアとの共同研究により、フォトニック結晶ファイバーから発生するスーパーコンティニューム光（以降白色レーザーと呼ぶことにする）の特性評価・最適化を行い、信号発生のお最適化を試みた。以下に各成果について詳述する。

1. 白色レーザーを用いた CARS 分光顕微鏡の開発と生細胞への応用

白色レーザーのスペクトル特性は、フォトニック結晶ファイバー中の様々な非線形光学過程が蓄積することで決まるため、特性評価は容易ではない。本研究では、非線形光学・ファイバー光学についての専門知識を有するロシア側研究者が白色レーザーの発生について理論的な解析及び計算を行い、その結果を分子分光が専門の日本側研究者にフィードバックすることで、相互に補い合いながらシステム全体の最適化を目指した。日本側研究者は、ピコ秒レーザー、ナノ秒レーザーなど様々な光源を用いて、生細胞の分子分光イメージングに最適なシステムの構築を目指した。

ピコ秒レーザーを用いた白色レーザーの発生では、白色レーザーに大きなチャープ構造が存在することがわかった。実験結果及び理論解析の結果などを踏まえ、白色レーザー発生に用いたフォトニック結晶ファイバーのファイバー長さについて

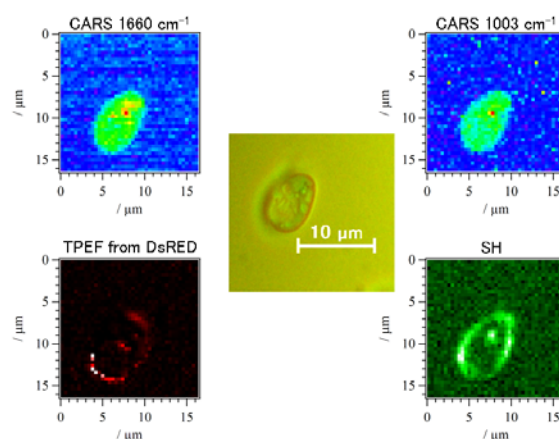


図 1. 出芽酵母生細胞を用いた、CARS、第二高調波・二光子蛍光による非線形マルチモーダル・イメージング

検討を行った。また、回折格子などの分散素子を用いてパルス圧縮を試みた。その結果、白色レーザーの出力として、近赤外 1064 nm 以上の波長成分で 1 W 程度の出力を得ることが出来た。本光源を CARS 分光顕微鏡に組み合わせることで、分子振動指紋領域を十分カバーできるマルチプレックス CARS 測定が可能になった。一方、C-H 伸縮振動などの、比較的高波数の振動モードについては、信号強度が当初予想に比べ桁程度小さいことがわかった。この原因として、白色レーザーの 1600–1700 nm 付近のスペクトル密度が低いことが考えられる。実験・理論両面からの更なる改善が、今後必要である。この他、白色レーザーを用いた時間分解分光の可能性についても検討を行い、基礎データを得ることができた。

ナノ秒レーザーを用いた白色レーザーの発生では、ピコ秒の際に生じたチャープの問題が回避できる。そこで、この光源を用いて単一パルスにて CARS 光発生という、まったく新しい CARS 分光イメージング手法の開発を目指した。研究期間内に、単一パルスによる CARS 光発生を実現することはできなかったが、その副産物として、CARS の他に、第二高調波、二光子蛍光など、様々な光学プロセスが同時に発生していることを見出した。複数の非線形光学過程を用いたマルチモーダル・イメージングは、フェムト秒レーザーを用いた報告が多々行われているが、ナノ秒レーザーを用いたものは、本研究が初めてのものである。成果の一例として、出芽酵母生細胞を用いた、CARS、第二高調波・二光子蛍光による非線形マルチモーダル・イメージングの結果を図 1 に示す。特に、第二高調波で見られる細胞内のスポットは、動物細胞で中心体に相当する、スピンドル極体ではないかと考えている。このオルガネラは、蛍光プローブを用いて可視化した報告はあるが、非染色で可視化したのは本研究が初めてである。現在、投稿論文を準備している。

2. 白色レーザーを用いた CARS ファイバークローブの開発と分子性結晶への応用

CARS 分光顕微鏡により、生細胞の細胞内分子分布やその動態などが可視化できることがわかったが、生命現象の解明には、細胞が機能している“場”である生体での直接計測が欠かせない。そこで本研究では、内視鏡による生体組織の非染色 *in vivo* 計測を目指して、CARS ファイバークローブの開発を行った。ファイバークローブの写真及び実験装置を図 2(a) に示す。光源にはピコ秒レーザーを用いた。発振器からの出力を二分岐し、一方を第二高調波に変換後、光パラメトリック発振器 (optical parametric oscillator; OPO) のポンプ光として用いた。OPO からはシグナル光 (690 – 990 nm) 及びアイドラー光 (1150 – 2300 nm) の二つの波長可変パルスが同時に出力される。本研究では、アイドラー光 (~1147 nm) を用いた。光源から分岐したもう一方の光パルスは、基本波のままフォトニック結晶ファイバーに導入して白色レーザー光を発生させた。これらの光パルスを、時間的遅延 (τ) を合わせた後、同軸にしてシングルモードファイバーに導入した。*p*-ニトロアニリン微結晶や及びポリ(3-ヘキシルチオフェン)のキャスト膜について、良好な信号対雑音比で CARS スペクトルを得ることができ、かつ *p*-ニトロアニリン微結晶については、NO₂ 対称伸縮のバンドを用いた CARS 分光イメージングも行うことができた。その結果、CARS ファイバークローブを用いることで、マイクロメートルスケールの分解能で CARS スペクトル及びイメージの取得が可能であることが示された。

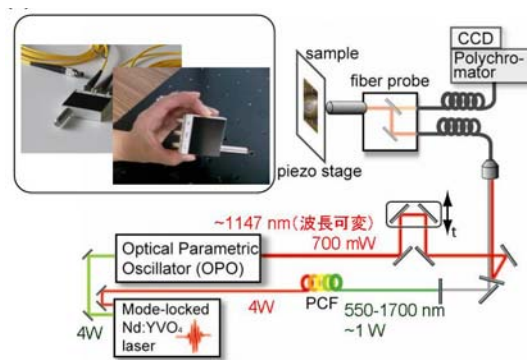


図 2 CARS ファイバークローブの写真 (挿入図) 及び実験装置図 ; PCF (photonic crystal fiber)