

令和 2 年 11 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2018

課題番号：17H04852

研究課題名（和文）ラベルフリー超解像顕微鏡の開発

研究課題名（英文）Label-free superresolution microscopy

研究代表者

井手口 拓郎 (Ideguchi, Takuro)

東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・講師

研究者番号：30735999

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,800,000 円

研究成果の概要（和文）：振動分光を用いたラベルフリー顕微鏡において、回折限界を超える超解像の空間分解能を実現する二つの技術開発を行った。まず、回折限界解像度が数ミクロンである赤外顕微鏡の超解像技術である赤外フォトサーマル位相差顕微鏡の原理の提唱と実証を行った。分子振動由来の赤外吸収に伴う光熱変換現象で生じる屈折率変化を、可視光照明による位相差顕微鏡計測を行うことにより、可視光の回折限界の分解能を実現した。次に、近赤外パルス光を用いたコヒーレントラマン散乱顕微鏡のチップ増強による超解像化を目指す実証を開始した。超広帯域コヒーレントラマン顕微鏡の実証に成功し、チップ増強の原理検証を開始した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

開発に成功した赤外フォトサーマル位相差顕微鏡は、赤外吸収の高感度特性と可視光の高空間分解能特性を併せ持つ手法であり、また、低いフォトダメージ特性を持つ。数百ナノメートルの空間分解能を持つラベルフリー分子イメージングであるため、生命科学研究の新しいツールとなることが期待される。創薬分野における小分子薬剤の細胞内局在の可視化や、医療分野における組織の迅速病理診断などへの応用が想定される。

研究成果の概要（英文）：We developed two super-resolution techniques of label-free molecular vibrational microscopy. First, we proposed and demonstrated a super-resolution infrared microscope called mid-infrared photothermal phase-contrast microscope. The spatial resolution of this microscope is determined by the visible illumination light of the microscope which probes refractive index change due to the photothermal effect triggered by the infrared absorption of the molecules. Next, we studied chip-enhanced super-resolution coherent Raman microscopy. We developed an ultra-broadband coherent Raman microscope and started proof-of-concept demonstration of super-resolution imaging with the chip-enhancement.

研究分野：光科学

キーワード：振動分光 分子振動 ラベルフリー顕微鏡 超解像

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

蛍光計測を原理に用いた超解像顕微鏡が広く利用されるようになった一方で、振動分光を利用したラベルフリー顕微鏡（赤外顕微鏡やラマン顕微鏡）における超解像顕微鏡は広く普及していない。

### 2. 研究の目的

振動分光を用いたラベルフリー顕微鏡の超解像技術を開発する。振動分光顕微鏡のうち、感度の高い計測が可能な赤外顕微鏡とコヒーレントラマン顕微鏡に焦点を絞り、それぞれの超解像技術を開発する。

### 3. 研究の方法

- (1) 高速スキャンフーリエ変換分光法を開発する。
- (2) 赤外吸収分光とラマン散乱分光の同時計測手法を開発する。
- (3) 赤外フォトサーマル効果を用いた赤外顕微鏡の超解像技術を開発する。
- (4) 高速スキャンフーリエ変換コヒーレントラマン分光法及び顕微鏡を開発する。
- (5) 世界最高速のタイムストレッチ赤外分光法を開発する。
- (6) チップ増強効果を用いたコヒーレントラマン顕微鏡の超解像技術を開発する。

### 4. 研究成果

(1) 近年盛んに研究がなされ進展している高速・広帯域分光手法であるデュアルコム分光と同等の性能を有するフーリエ変換分光法（位相制御フーリエ変換分光法）を開発した。マイケルソン干渉計の可動鏡の掃引を、高速角度掃引鏡を用いた波形制御機構により実装することで、10.5 GHz の分解能で 1.5 THz のスペクトル帯域を 12 kHz の計測レートで取得することに成功した(図1)。また、インコヒーレント光であるスーパールミネッセントダイオードで同様の計測が可能であることも実証した[1]。

[1] K. Hashimoto and T. Ideguchi, "Phase-controlled Fourier-transform spectroscopy," Nature Communications 9, 4448 (2018)

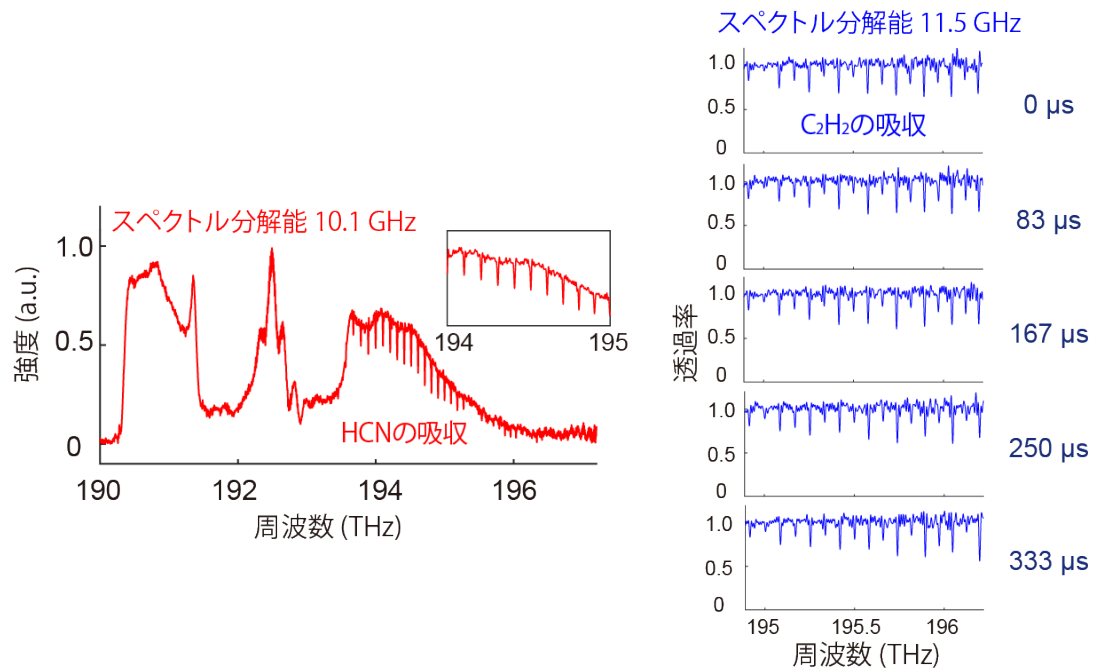


図1. 位相制御フーリエ変換分光法で取得したスペクトル

(2) 振動分光の両翼である赤外吸収分光とラマン散乱分光の広帯域スペクトルを同時に計測可能な相補振動分光法を開発した[2]。異なる対称性を持つ分子振動に感度のある赤外吸収とラマン散乱による分光スペクトルの両方を、同じ場所、同じ時間で計測できることを実証した(図2)

[2] K. Hashimoto, V. R. Badarla, A. Kawai, T. Ideguchi, "Complementary Vibrational Spectroscopy," Nature Communications 10, 4411 (2019)

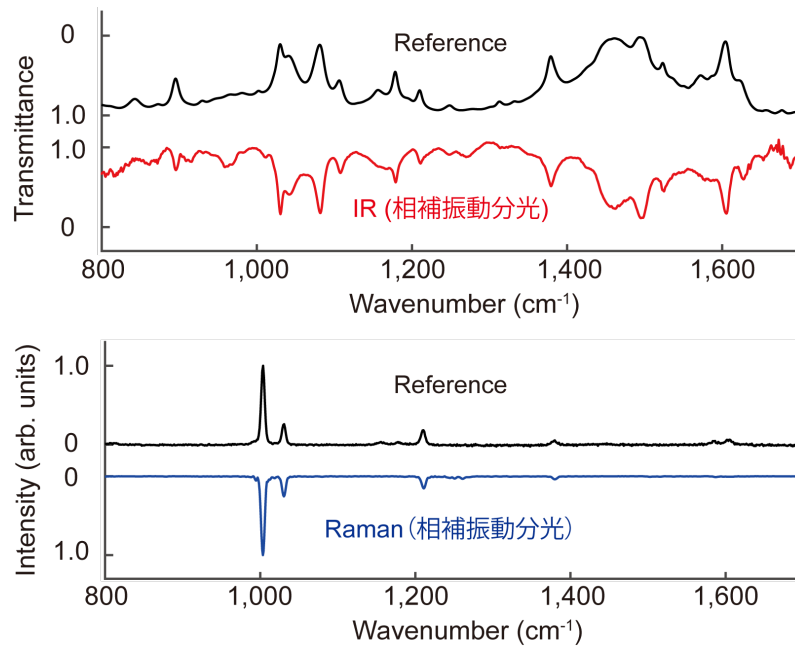


図 2 . 相補振動分光法で取得したスペクトル

( 3 ) 赤外超解像顕微鏡の新しい手法として、赤外フォトサーマル位相差顕微鏡を開発した。赤外フォトサーマル効果を介した位相差計測による超解像特性を、マイクロビーズを用いた実験で実証し、また、HeLa 細胞を用いた実験により、細胞内のタンパク質の分布を可視化することに成功した[3]。次に、デジタルホログラフィによる位相画像計測の系を立ち上げ、より定量的なフォトサーマル位相計測が可能であることを実証した[4]。さらに、光回折トモグラフィによる 3 次元計測による細胞の計測に成功した ( 図 3 ) [5]。

[3] K. Toda, M. Tamamitsu, R. Horisaki and T. Ideguchi, “Molecular contrast on phase-contrast microscope,” Scientific Reports 9, 9957 (2019)

[4] M. Tamamitsu, K. Toda, R. Horisaki and T. Ideguchi, “Quantitative phase imaging with molecular vibrational sensitivity,” Optics Letters 44, 3729-3732 (2019)

[5] M. Tamamitsu, K. Toda, H. Shimada, T. Honda, M. Takarada, K. Okabe, Y. Nagashima, R. Horisaki, T. Ideguchi, “Label-free biochemical quantitative phase imaging with mid-infrared photothermal effect,” Optica 7, 359-366 (2020)

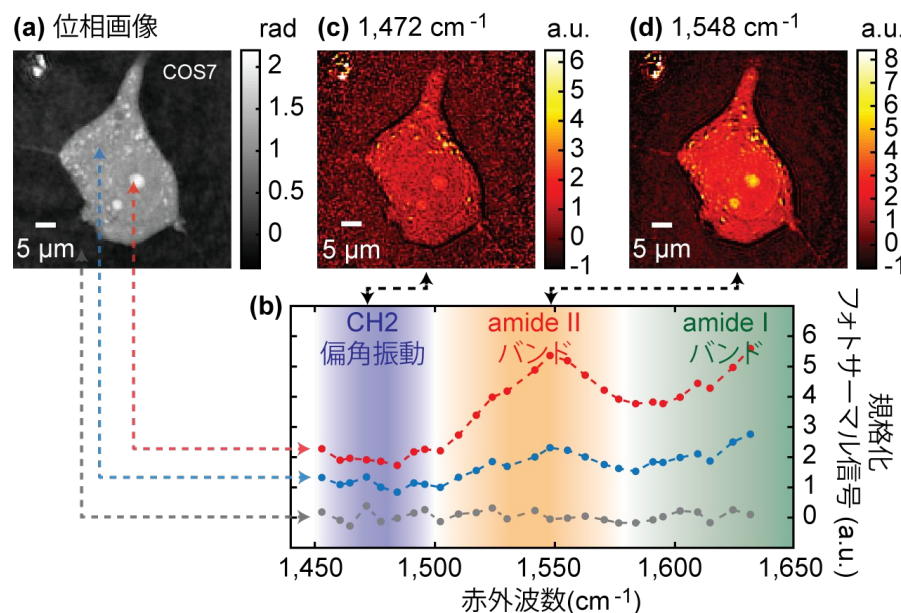


図 3 . 赤外フォトサーマル定量位相顕微鏡で取得した生細胞 ( COS7 ) のスペクトルと顕微画像

(4) 10 fs 以下のパルス幅を持つレーザーを用いて、フーリエ変換コヒーレント反ストークスラマン分光を実装し、高速かつ広帯域のコヒーレントラマン分光の開発を行った。3000  $\text{cm}^{-1}$  を超える広帯域CARSスペクトルを毎秒10000スペクトル以上の計測レートで取得することに成功した(図4) [6]。また、この手法におけるスペクトル分解能を、装置限界を超えて向上させるデータ解析手法を開発した[7]。さらに、コヒーレントラマン効果と他の非線形光学効果(二次高調波、三次高調波、2光子蛍光、3光子蛍光)を同時に計測可能であるマルチモーダル顕微鏡を開発した[8]。

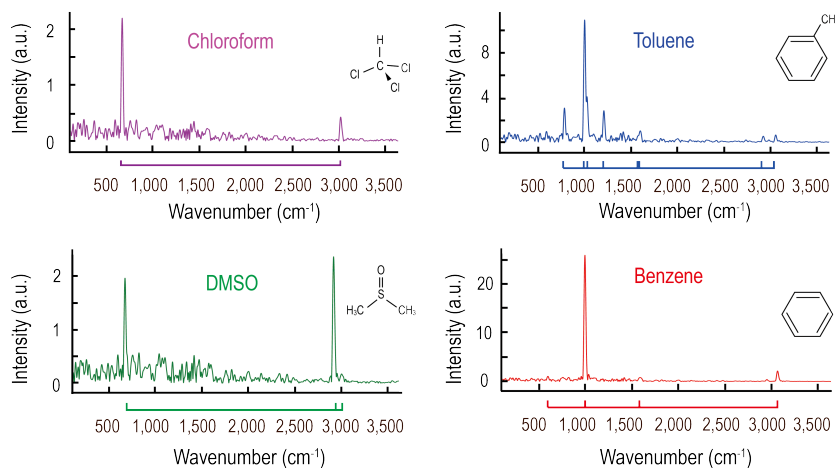


図4. フーリエ変換反ストークスラマン分光で計測した有機溶媒のスペクトル。

[6] K. Hashimoto, J. Omachi, and T. Ideguchi, "Ultra-broadband rapid-scan Fourier-transform CARS spectroscopy with sub-10-fs optical pulses," *Optics Express* 26, 14307-14314 (2018)

[7] F. Sinjab, K. Hashimoto, X. Zhao, Y. Nagashima, T. Ideguchi, "Enhanced spectral resolution for broadband coherent anti-Stokes Raman spectroscopy," *Optics Letters* 45, 1515-1518 (2020)

[8] F. Sinjab, K. Hashimoto, V. R. Badarla, J. Omachi, T. Ideguchi, "A multimodal laser-scanning nonlinear optical microscope with a rapid broadband Fourier-transform coherent Raman modality," *Optics Express* 28, 20794-20807 (2020)

(5) 世界最高速の赤外分光手法であるタイムストレッチ赤外分光法を開発した。80 MSpectra/s のレートで広帯域赤外分光計測が可能であることを実証した[9]。

[9] A. Kawai, K. Hashimoto, T. Dougakiuchi, V. R. Badarla, T. Imamura, T. Edamura, T. Ideguchi, "Time-stretch infrared spectroscopy," *Communications Physics* 3, 152 (2020)

(6) 超解像コヒーレントラマン顕微鏡の実現に向け、(3)で開発した高速広帯域コヒーレントラマン分光を用いたレーザースキャン顕微鏡を構築し、キャピラリープレート中の有機溶媒のCARSイメージを取得することに成功した。また、スキャンングプローブ顕微鏡の系を導入し、チップ増強による超解像計測の原理検証実験に着手した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

A. Kawai, K. Hashimoto, T. Dougakiuchi, V. R. Badarla, T. Imamura, T. Edamura, T. Ideguchi, "Time-stretch infrared spectroscopy," *Communications Physics* 3, 152 (2020) <https://doi.org/10.1038/s42005-020-00420-3> 査読有

F. Sinjab, K. Hashimoto, V. R. Badarla, J. Omachi, T. Ideguchi, "A multimodal laser-scanning nonlinear optical microscope with a rapid broadband Fourier-transform coherent Raman modality," *Optics Express* 28, 20794-20807 (2020) <https://doi.org/10.1364/OE.397521> 査読有

M. Tamamitsu, K. Toda, H. Shimada, T. Honda, M. Takarada, K. Okabe, Y. Nagashima, R. Horisaki, T. Ideguchi, "Label-free biochemical quantitative phase imaging with mid-infrared photothermal effect," *Optica* 7, 359-366 (2020) <https://doi.org/10.1364/OPTICA.390186> 査読有

F. Sinjab, K. Hashimoto, X. Zhao, Y. Nagashima, T. Ideguchi, "Enhanced spectral resolution for broadband coherent anti-Stokes Raman spectroscopy," *Optics Letters*

- 45, 1515-1518 (2020) <https://doi.org/10.1364/OL.388624> 査読有
- K. Hashimoto, V. R. Badarla, A. Kawai, T. Ideguchi, “Complementary Vibrational Spectroscopy,” *Nature Communications* 10, 4411 (2019) <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12442-9> 査読有
- M. Tamamitsu, K. Toda, R. Horisaki and T. Ideguchi, “Quantitative phase imaging with molecular vibrational sensitivity,” *Optics Letters* 44, 3729-3732 (2019) <https://doi.org/10.1364/OL.44.003729> 査読有
- K. Toda, M. Tamamitsu, R. Horisaki and T. Ideguchi, “Molecular contrast on phase-contrast microscope,” *Scientific Reports* 9, 9957 (2019) <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46383-6> 査読有
- K. Hashimoto and T. Ideguchi, “Phase-controlled Fourier-transform spectroscopy,” *Nature Communications* 9, 4448 (2018) <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06956-x> 査読有
- K. Hashimoto, J. Omachi, and T. Ideguchi, “Ultra-broadband rapid-scan Fourier-transform CARS spectroscopy with sub-10-fs optical pulses,” *Optics Express* 26, 14307-14314 (2018) <https://doi.org/10.1364/OE.26.014307> 査読有

[学会発表](計 39 件)

- T. Ideguchi, “Next-generation Mid-infrared Spectroscopy and Microscopy with Various Laser Sources,” OSA High-brightness Sources and Light-driven Interactions Congress, MF1C.1, online (2020.11.20)
- T. Ideguchi, “Advanced vibrational spectroscopy and microscopy,” CLEO Pacific Rim, online (2020.8.5)
- M. Tamamitsu, K. Toda, T. Ideguchi, “Label-free biochemical refractive-index tomography of single cells with mid-infrared photothermal effect,” Imaging and Applied Optics Congress (OSA), HF1G.4, online (2020.6.26)
- K. Hashimoto, V. Badarla, T. Ideguchi, “Mid-infrared phase-controlled Fourier-transform spectroscopy,” CLEO, STh3F.2, online (2020.5.14)
- A. Kawai, T. Dougakiuchi, V. R. Badarla, K. Hashimoto, T. Imamura, T. Edamura, and T. Ideguchi, “Mid-infrared time-stretch spectroscopy,” CLEO, STh3F.1, online (2020.5.14)
- K. Hashimoto, V. Badarla, T. Ideguchi, “Ultra-broadband complementary vibrational spectroscopy with cascaded intra-pulse difference frequency generation,” CLEO, SW4N.2, online (2020.5.13)
- M. Tamamitsu, K. Toda, Y. Nagashima, R. Horisaki, T. Ideguchi, “Bioimaging by molecular-vibration-sensitive quantitative phase microscopy based on wide-field mid-infrared photothermal excitation,” SPIE Photonics West, San Francisco (2020.2.3)
- F. Sinjab, K. Hashimoto, Y. Nagashima, and T. Ideguchi, “Rapid broadband CARS micro-spectroscopy using ultrafast lasers,” The 225th Infrared and Raman Discussion Group Meeting (IRDG), London (2019.12.19)
- M. Tamamitsu, K. Toda, H. Shimada, T. Honda, M. Takarada, K. Okabe, Y. Nagashima, R. Horisaki, and T. Ideguchi, “Vibrational imaging of single cells by wide-field phase-sensitive imaging of mid-infrared photothermal effect,” Biomedical Raman Imaging 2019, Osaka (2019.11.26)
- T. Ideguchi, “Nyquist-limited Fourier-transform spectroscopy with phase-controlled delay line,” OSA, Fourier Transform Spectroscopy, FW5B.1, San Jose (2019.6.26)
- M. Tamamitsu, K. Toda, R. Horisaki and T. Ideguchi, “Quantitative phase microscopy with molecular vibrational sensitivity,” CLEO®/Europe-EQEC 2019, PD-1.8 (post deadline), Munich (2019.6.26)
- F. Sinjab, K. Hashimoto, V.R. Badarla, Y. Nagashima and T. Ideguchi, “Multiphoton Microscope with a Rapid Broadband CARS Modality,” CLEO®/Europe-EQEC 2019, CH-9.4, Munich (2019.6.26)
- K. Toda, M. Tamamitsu, R. Horisaki and T. Ideguchi, “Phase-contrast microscope with molecular contrast,” CLEO®/Europe-EQEC 2019, JSII-2.2, Munich (2019.6.23)
- K. Hashimoto, and T. Ideguchi, “Nyquist-limited Efficient Fourier-transform Spectroscopy,” Conference on Lasers and Electro-Optics OSA, SM1N.4, San Jose (2019.5.6)
- J. Omachi, K. Hashimoto, and T. Ideguchi, “High-speed ultra-broadband Fourier-transform CARS spanning over 3,000 cm<sup>-1</sup>,” Conference on Lasers and

〔図書〕(計 3 件)

橋本和樹、井手口拓郎、“波形制御技術を用いた高速フーリエ変換分光法” 精密工学会誌 2019年8月号 (2019)

橋本和樹、井手口拓郎、“位相制御型フーリエ分光” 光学「2018年日本の光学研究」第48巻第6号 (2019)

長島優、橋本和樹、大間知潤子、井手口拓郎、“創薬における超高速ラマン分光法の活用” 光アライアンス Vol.29, No. 6, 2126 (2018)

〔産業財産権〕

出願状況(計 3 件)

名称：分光器

発明者：井手口拓郎、橋本和樹

権利者：東京大学

種類：特許

番号：PCT/JP2020/009387

出願年：2019年

国内外の別：国内

名称：画像生成装置及び画像生成方法

発明者：井手口拓郎、戸田圭一郎、玉光未侑、橋本和樹、堀崎遼一

権利者：東京大学

種類：特許

番号：PCT/JP2019/027754, WO2020/013325

出願年：2018年

国内外の別：国際

名称：高速スキャンフーリエ変換分光装置及び分光方法

発明者：井手口拓郎、橋本和樹

権利者：東京大学

種類：特許

番号：PCT/JP2019/026469, WO2020/009150

出願年：2018年

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://takuroideguchi.jimdo.com/>

## 6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。