

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26286063

研究課題名(和文) 構造化照明を利用した超解像ラマン分光イメージング技術の開発

研究課題名(英文) Super resolution Raman microscopy using structured illumination

研究代表者

藤田 克昌 (Fujita, Katsumasa)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80362664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、試料の無標識分析観察が可能なラマン散乱顕微鏡の空間分解能の向上を目的とし、構造化ラマン照明法を用いたラマン散乱顕微鏡法の開発を行った。開発した顕微鏡を用い、ポリスチレン、PMMA等のポリマー粒子、グラフェン、グラファイト等のカーボン材料、脂質組織等の生体材料のラマン散乱観察において従来法よりも1.8倍、理論限界よりも1.5倍の空間分解能の向上を達成した。

研究成果の概要(英文)：A structured illumination Raman microscopy has been developed in order to realize a label-free analytical imaging technique with an improved spatial resolution. The light illumination optics has been newly designed and implemented to a line illumination Raman microscopy. The introduction of structured pattern into the line illumination for Raman scattering detection provided about a twice improvement of the spatial resolution in practical conditions, which corresponds about 1.5-fold improvement from the theoretical limit. The improvement of the spatial resolution has been confirmed by observing polymer nanoparticles (a mixture of polystyrene and PMMA), carbon nanomaterials (CVD graphene and graphite), biological tissue (fibrous structure of lipid) samples.

研究分野：応用物理学

キーワード：ラマン顕微鏡 ラマン分光 超解像顕微鏡 構造化照明

1. 研究開始当初の背景

ラマン散乱分光法は、分子や結晶格子の分子振動を計測できるため、非常に広い分野での材料やデバイスの分析・評価に必須のツールとして利用されてきた。近年では、ラマン散乱分光法と顕微イメージング技術の融合が進んでおり、試料中に含まれる物質を分析しながら、その物質の空間分布を高い空間分解能で得ることが可能になってきた。このラマン散乱イメージング法は、細胞や生体組織内の分子の無標識イメージングや、各種材料・デバイスの評価への利用が進み、分析イメージングという新しい分野を形成した。

ラマン散乱分光法の分析能力は高いが、それを顕微鏡応用した際の空間分解能は、まだまだ不十分である。光の回折限界のため、ラマン散乱顕微鏡の空間分解能は波長の半分程度までしか向上できない。生体細胞のような複雑な試料や微細化された半導体デバイス、薬品、機能性材料の分析では、この空間分解能は十分でなく、回折限界を超えた空間分解能の実現が求められている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、回折限界を超える空間分解能をもつラマン散乱顕微鏡を開発することである。ラマン散乱顕微鏡は分子や結晶格子の振動数を計測しながら、それらの空間分布も取得できるため、材料工学、医療診断、創薬等の幅広い分野の普及しつつある。しかし、その空間分解能は光の波動性により制限されてきた。本研究では、ラマン散乱顕微鏡の空間分解能を向上することで、各種材料やデバイスのより詳細な観察を可能とし、さらに空間的なラマン散乱スペクトルの重畳を軽減し、スペクトル解析をより正確なものとする。本研究では、構造化照明法をスリット走査型ラマン散乱顕微鏡に組み込むことで、空間分解能を向上する。また、開発した顕微鏡を用いて、カーボン材料、生体細胞等の微細構造の観察を行い、超解像ラマン散乱観察の有用性を実証する。

3. 研究の方法

本研究では、ラマン散乱顕微鏡の空間分解能の向上のために、これまで蛍光顕微鏡の空間分解能向上に実績のある構造化照明法の利用を試みた。構造化照明法では、試料を縞状の空間分布をもつレーザー光で試料を照明し、空間分解能を3次元方向に2倍向上させる。図1に示すように、研究代表者がこれまで開発してきたライン照明の光強度分布に周期構造を導入した。これにより、照明光学系の伝達関数に高空間周波数成分をもたせることが可能になり、その結果、顕微鏡光学系の周波数帯域が構造化し、ラインに平行な方向に対して空間分解能を向上できる。この構造化ライン照明を用いることで分光器を通したラマンスペクトルの取得と、構造化照明による空間分解能の向上を両立させるこ

とができる。また、分光器のスリットを通した光検出(図2)により焦点面以外からのラマン光の影響を除去でき、奥行き方向の空間分解能も得ることができる。

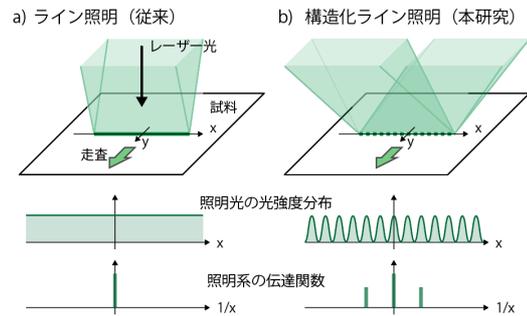


図1 ライン照明(従来)と構造化ライン照明(本研究)

図2に開発した構造化ライン照明ラマン散乱顕微鏡の光学系を示す。レーザーからの光は回折格子に3光束に分けられ、そのうちの1次回折光、-1次回折光のみを光学系に伝搬させる。それぞれの光束はシリンドリカルレンズによりライン状の焦点を形成するが、それらは試料面上で干渉するため、その干渉効果をライン焦点上で得ることにより構造化ライン照明を形成する。照明ラインからのラマン散乱光は結像光学系を通して、イメージング分光器上のスリット上に結像され、分光器を通してライン照明上の各部位のラマン散乱スペクトルが冷却 CCD カメラにより同時に検出される。ガルバノメーターミラーにより構造化ライン照明をその垂直方向に走査しながらラマン散乱スペクトルの記録を繰り返すことにより2次元のラマン散乱スペクトルを得た。また回折格子をピエゾステージにより移動させることにより複数の構造化照明パターンでラマン散乱スペクトルの空間分布を取得し、その画像データから高解像度の構造化照明ラマン散乱像を再構成した。

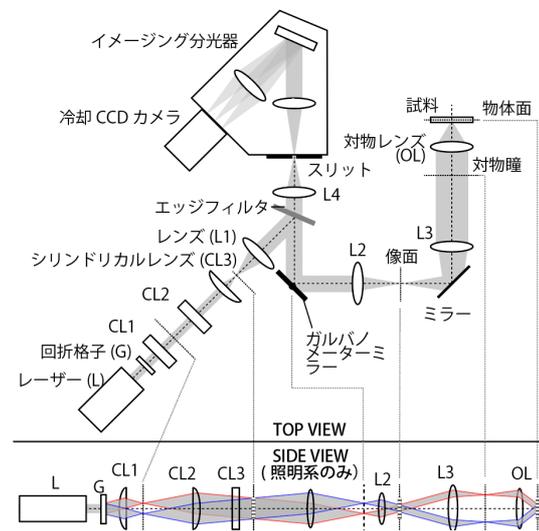


図2 開発した構造化ライン照明ラマン散乱顕微鏡の光学系

4. 研究成果

図3に従来のライン照明法、および本研究で開発した構造化照明法で取得した高分子ナノ粒子(ポリスチレンとPMMAの混合試料)の観察像を示す。それぞれの観察像の比較から、構造化照明法では、隣接する微小球がより分離されて観察されており、空間分解能が向上していることが確認できる。ポリスチレン、PMMAのどちらにおいても空間分解能が向上しており、さらにそれらの物質のスペクトル分離能の向上していることが確認された。また、微小球の観察において、開発した手法が従来法に比べて、周波数空間で約2倍の空間分解能の向上が達成されていることを確認した。

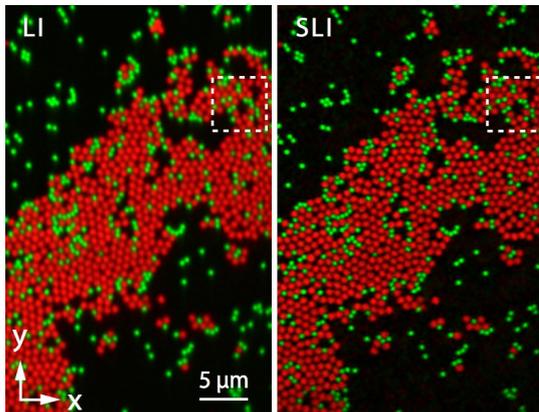


図3 高分子ナノ粒子のラマン散乱像(ポリスチレン(緑, 直径 500nm, 3055cm^{-1}), PMMA(赤, 直径 800nm, 2957cm^{-1})). 従来のライン照明法(LI)および構造化ライン照明法(SLI)により観察。

同様の測定をCVD法により作製されたグラフェンに対して行った(図4)。使用したグラフェンでは、グラフェンの単層、および多層膜の空間分布が、それぞれに特徴的なラマン散乱スペクトルを検出することにより観察された(緑)。また成長するグラフェンの境界における結晶構造の不整合、およびグラフェンの形成に至らなかったグラファイトも、それぞれの特徴的なラマン散乱スペクトルから確認された(赤、および青)。それらのカーボン構造体の空間分布は構造化ライン照明により高い空間分解能で観察されており、開発した顕微鏡がカーボン材料の高解像度ラマン散乱イメージングに利用可能であることを示している。また、上記以外にも、細胞内小器官、生体組織の観察も行い、生体試料の無標識観察にも開発した手法が有用であることを確認した。

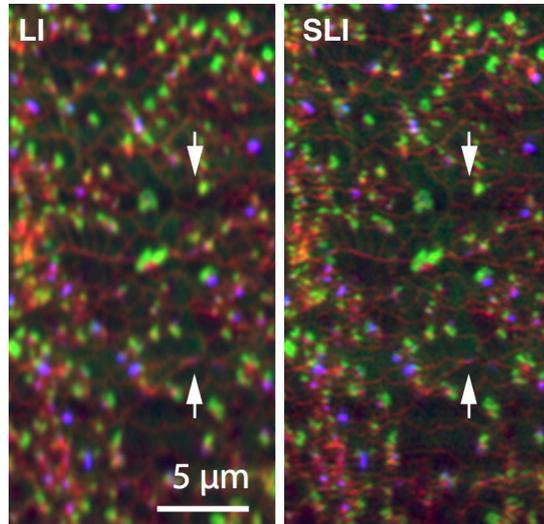


図4 CVD法により作製したグラフェンの観察像(赤: $1307-87\text{cm}^{-1}$, 緑: $2682-94\text{cm}^{-1}$, 青: $1589-98\text{cm}^{-1}$)。従来のライン照明法(LI)および構造化ライン照明法(SLI)により観察。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

1. L.-d. Chiu, T. Ichimura, T. Sekiya, H. Machiyama, T. Watanabe, H. Fujita, T. Ozawa, K. Fujita, "Protein expression guided chemical profiling of living cells by hybrid fluorescence-Raman microscopy," *Sci. Rep.* 7: 43569 (2017). doi:10.1038/srep43569
2. T. Ichimura, L.-d. Chiu, K. Fujita, H. Machiyama, T. Yamaguchi, T. Watanabe, H. Fujita, "Non-label immune cell state prediction using Raman spectroscopy," *Sci. Rep.* 6: 37562 (2016). doi: 10.1038/srep37562
3. 渡辺 梢, 藤田克昌, "構造化照明顕微鏡による高解像ラマンイメージング," *レーザー研究*, Vol.44, No.10, pp.648-652 (2016).
4. K. Watanabe, A. F. Palonpon, N. I. Smith, L.-d. Chiu, A. Kasai, H. Hashimoto, S. Kawata, K. Fujita, "Structured line illumination Raman microscopy," *Nat. Commun.* 6:10095 (2015). doi: 10.1038/ncomms10095
5. K. Fujita, "Follow-up review: Recent progress in the development of super-resolution optical microscopy," *Microscopy*, 65(4), 275-281(2016). doi: 10.1093/jmicro/dfw022
6. J. Ando, A. F. Palonpon, M. Sodeoka, K. Fujita, "High-speed Raman imaging of cellular processes," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 33, 16-24 (2016). doi: 10.1016/j.cbpa.2016.04.005
7. 藤田克昌, "超解像光学顕微鏡の原理と医療応用に向けた課題," 光技術コンタ

クト, 53 (7), 31-36 (2015).

〔学会発表〕(計 22 件)

1. K. Fujita, "Improvement of spatial and spectral resolution in Raman microscopy," Biomedical Imaging and Sensing Conference (BISC) 2017, 2017年4月20日, パシフィコ横浜・横浜
2. 藤田克昌, "Raman microscopy for molecular imaging of living cells,"第94回日本生理学会大会, 2017年3月29日, アクトシティ浜松・浜松
3. 藤田克昌, "ラマン散乱顕微鏡における超解像," 第64回応用物理学会春季学術講演会, 2017年3月15日, パシフィコ横浜・横浜
4. K. Fujita, "Raman imaging of molecular dynamics during cellular events," SPIE 2017 Nano-Bio Sensing, Imaging & Spectroscopy, 2017年2月24日, 済州(韓国)
5. K. Fujita, "Improvement of spatial- and temporal-resolution in Raman microscopy," Japan-Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium (14th Annual Meeting of the Japan Association of Medical Spectroscopy), 2016年12月7日, 淡路夢舞台国際会議場, 夢舞台
6. 藤田克昌, "ラマン散乱を利用した高解像度分子イメージング," 日本光学会ナノオプティクス研究グループ 第23回研究討論会, 2016年11月29日, 大阪大学・吹田
7. 藤田克昌, "ラマン散乱を用いた顕微分析イメージング," 高分子学会 高分子表面研究会, 2016年10月21日, 東京理科大学森戸記念館・新宿
8. K. Fujita, "Raman microscopy beyond the limit," SCIX2016, 2016年9月19日, ミネアポリス(アメリカ)
9. 藤田克昌, "ラマン散乱顕微鏡による細胞/組織の分子イメージング," 第55回生体医工学会大会オーガナイズドセッション, 2016年4月28日, 富山国際会議場・富山
10. K. Fujita, "Super-resolution microscopy using nonlinear light emission," Workshop on microscopy, biology, medicine, and advanced CMOS imagers, 2015年11月20日, 静岡大学・浜松
11. K. Fujita, "Surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectroscopy for intracellular chemical imaging and protein analysis," SCIX 2015, 2015年9月28日, プロビデンス(アメリカ)
12. 藤田克昌, "超解像顕微鏡," 日本分光学会夏期セミナー, 2015年9月3日, 幕張メッセ・幕張
13. K. Fujita, "Super-resolution confocal microscopy using nonlinear optical emission," International Symposium on Surface Topography & Optical Microscopy 2015 (IS2TOM 2015), 2015年7月24日, 哈爾濱(中国)
14. K. Fujita, "Chemical imaging of living cells by Raman microscopy," OSK Biophotonics symposium, 2015年7月15日, 慶州(韓国)
15. A. F. Palonpon, K. Watanabe, N. I. Smith, L.-d. Chiu, A. Kasai, H. Hashimoto, S. Kawata, K. Fujita, "Toward label-free super resolution imaging with Raman microscopy," Focus on Microscopy 2016, 2016年3月21日, 台北(台湾)
16. A. F. Palonpon, K. Watanabe, N. I. Smith, L.-d. Chiu, A. Kasai, H. Hashimoto, S. Kawata, K. Fujita, "Enhancement of the lateral resolution of Raman microscopy by use of structured illumination," 応用物理学会秋季講演会, 2015年9月19日, 名古屋国際会議場・名古屋
17. K. Fujita, "Molecular imaging of cells by Raman scattering," Advanced Microscopy Meeting - Super Resolution in Different Dimensions, 2015年6月2日, モスクワ(ロシア)
18. 藤田克昌, "Molecular imaging of cells by using Raman scattering," 第10回日本分子イメージング学会 学術集会, 2015年5月20日, タワーホール船堀・船堀
19. K. Fujita, "Raman microscopy for molecular imaging of cells," Applied Optics and Photonics, China. 2015年5月6日, 北京(中国)
20. K. Watanabe, A. F. Palonpon, N. I. Smith, L.-d. Chiu, A. Kasai, H. Hashimoto, S. Kawata, K. Fujita, "Raman microscopy using structured line illumination," Focus on Microscopy 2015, 2015年3月31日, ゲッティンゲン(ドイツ)
21. 藤田克昌, 安藤 潤, 袖岡幹子, "アルキン標識イメージング," 日本分光学会赤外ラマン分光部会「第7回シンポジウム」, 2015年1月27日, 大阪大学・豊中
22. K. Fujita, "Development of a high-resolution and polarization-sensitive Raman microscope," FACSS (SCIX2014), 2014年10月29日, リノ(アメリカ)

〔図書〕(計 6 件)

1. K. Fujita, K. Mochizuki, N. I. Smith and et. al., CRC Press, Super-resolution imaging in biomedicine, 2016, 426 (295-313).
2. 山中真仁、藤田克昌 他, 羊土社, 超解像イメージング, 2016, 307 (204-211).
3. N. Pavillon, K. Fujita, N. I. Smith and et. al., Springer Netherlands, Encyclopedia of Nanotechnology, 2016, 4427 (1-8).
4. 藤田克昌 他, 朝倉書店, 発光の事典, 2015, 788 (636-650).

5. 藤田克昌, 袖岡幹子 他, 化学同人, が
んの分子イメージング, 2015, 200
(186-194).
6. 藤田克昌 他, 化学同人, 1分子ナノバ
イオ計測, 2014, 240 (200-208).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：ラマン顕微鏡及びラマン散乱光観察方
法

発明者：藤田克昌、渡辺梢、河田聡

権利者：大阪大学

種類：特許

番号：特願 2014-165760

出願年月日：2014 年 8 月 18 日

国内外の別： 国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://lasie.ap.eng.osaka-u.ac.jp/ap1g1
kat/index_j.html](http://lasie.ap.eng.osaka-u.ac.jp/ap1g1kat/index_j.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 克昌 (FUJITA, Katsumasa)

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：80362664