

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「新たな光機能や光物性の発現・利活用  
を基軸とする次世代フォトニクスの基盤技術」  
研究課題「超短赤外パルス光源を用いた顕微イメージング装置の開発と生命科学への応用」

## 研究終了報告書

研究期間 2017年10月～2023年3月

研究代表者：藤貴夫  
(豊田工業大学大学院工学研究科、  
教授)

## § 1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

本研究では、光源開発を専門とした研究グループ(藤グループ、堀田グループ)によって、先端的な超短赤外パルス光源の開発を進めるとともに、生命科学を専門とした研究グループ(古谷グループ、村越グループ)と協力して、それらを顕微イメージング装置に光源として組み込み、生命科学の研究を推進することを行った。具体的には、赤外ハイパースペクトラルイメージング装置と、多光子顕微鏡を開発した。それぞれの研究の経緯、成果を以下に示す。

### 1. サブハーフサイクル中赤外光パルス光源としたハイパースペクトラルイメージング装置

#### 光源 1: サブハーフサイクル中赤外光パルスの発生(藤グループ)

チタンサファイア増幅器の基本波と 2 倍波を窒素ガス中に集光し、4 光波混合過程によってコヒーレント中赤外光を発生させた。発生したパルスの評価を行ったところ、全スペクトル領域(3-20  $\mu\text{m}$ )で位相が揃っており、強度の半値全幅としては、中心波長の周期の半分以下になっており、サブハーフサイクルパルスになっていることがわかった。この成果は光源開発として重要なものであり、2020 年 11 月、12 月における Top downloaded の論文としても紹介された [Opt. Express **28** 36527 (2020)]。この光源開発は藤グループで行われた。

#### 光源 2: 新規 2 $\mu\text{m}$ フェムト秒パルスレーザーの開発とそれによる超広帯域コヒーレント中赤外光発生(藤グループ、堀田グループ)

ツリウムを基本とした 2  $\mu\text{m}$  フェムト秒パルスレーザーを開発した。多くの原著論文を発表し、招待講演や解説論文の依頼を受けた。この光源から中赤外全域にわたるコヒーレント光を発生させることにも成功し[Optics Express **30** 7332 (2022)]、赤外イメージングの光源として新しい選択肢を与えた。2  $\mu\text{m}$  レーザーシステムに使われているツリウム添加フッ化物ファイバーは堀田グループで開発され、光源の開発は藤グループで行われた。

#### 顕微イメージング装置: サブハーフサイクル中赤外光パルス光源とした赤外ハイパースペクトラルイメージング(藤グループ、古谷グループ)

上記のサブハーフサイクル中赤外光パルスを赤外ハイパースペクトラルイメージング装置に応用した。この装置によってタマネギ鱗茎の表皮細胞の核、マウス胎仔の脳や肝臓を無染色で区別することができた。また、クモの円網にある粘性物質における糖タンパク質の分布を明らかにし、糖タンパク質を溶解する低分子量化合物は親水性イオン液体 choline dihydrogen phosphate であること示した。イメージング装置の開発は古谷グループと協力して藤グループで開発を進めた。特に、様々な試料の複雑な赤外スペクトルの帰属は古谷グループが行った。

### 2. 長波長フェムト秒ファイバーレーザーを光源とした多光子顕微鏡

#### 光源: ファイバーレーザーを基本とした多光子顕微鏡用の光源(藤グループ、堀田グループ)

多光子顕微鏡の光源としては、一般的にチタンサファイアレーザーが使われているが、さらに長波長のレーザーを用いることで、より深部を観測できるようになる。本研究では、そのような多光子顕微鏡の光源に適している 1.3  $\mu\text{m}$  および 1.8  $\mu\text{m}$  のファイバーレーザーの開発を進めた。使用するファイバーは堀田グループで開発され、レーザー開発は藤グループで行った。

#### 顕微イメージング装置: ファイバーレーザーを光源とした 3 光子・4 光子顕微鏡(藤グループ、村越グループ)

開発したファイバーレーザーを生理学研究所に設置し、それを光源として 3 光子・4 光子蛍光顕微鏡を構築した。光源開発と同時進行で、1.8  $\mu\text{m}$  励起で 3 光子吸収する赤色蛍光タンパク質の開発を行った。生きたマウス脳内の神経細胞にそのタンパク質を発現させ、3 光子蛍光によって脳の表面から 0.8 mm 程度の深さの神経細胞を観測することができた。また、緑色蛍光タンパク質を発現させた細胞については、4 光子蛍光によって、脳の表面から 0.15 mm 程度の深さにあるアストロサイトを観察できた[Biomed. Opt. Express **14** 326 (2023)]。タンパク質の開発は村越グループが行い、生きた動物に対する実験は村越グループで行われたが、藤グループも現地での実験に参加して、レーザーの調整などを行った。

## (2) 顕著な成果

### <優れた基礎研究としての成果>

#### 1. サブハーフサイクル中赤外光パルスの発生

##### 概要:

チタンサファイア増幅器の基本波と 2 倍波を窒素ガス中に集光し、4 光波混合過程によってコヒーレント中赤外光を発生させた。発生したパルスの評価を行ったところ、全スペクトル領域(3-20  $\mu\text{m}$ )で位相が揃っており、強度の半値全幅としては、中心波長の周期の半分以下になっており、サブハーフサイクルパルスになっていることがわかった。この成果は光源開発として重要なものであり、2020 年 11 月、12 月における Top downloaded の論文としても紹介された [Opt. Express **28** 36527 (2020)]。

#### 2. 自然界に存在するイオン液体の発見

##### 概要:

本研究で開発した赤外ハイパースペクトラルイメージング法を用いて、クモの円網における粘性物質の構成成分を同定しマッピングした。その結果、その粘着物質がターゲットに付着する前後の成分分布の変化を初めて成分マッピング画像で可視化することに成功した。粘性糖タンパク質から硬化タンパク質に変質するときの分布変化、相分離を明らかにし、糖タンパク質を溶解する低分子量化合物は親水性イオン液体 choline dihydrogen phosphate であること示した。

### <科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

#### 1.

##### 概要:

ツリウムを基本とした 2  $\mu\text{m}$  フェムト秒パルスレーザーを開発した。ツリウムを添加したフッ化物ファイバーを増幅媒質とした発振器および増幅器から数  $\mu\text{J}$  で 200fs 程度のパルスを発生できた。このパルスをさらに再生増幅器で増幅し、1 mJ で 265 fs のパルスを発生させることができた。この光源から中赤外全域にわたるコヒーレント光を発生させることにも成功し[Optics Express **30** 7332 (2022)]、コヒーレント赤外光源の新しい選択肢を与えた。

#### 2.

##### 概要:

多光子顕微鏡の光源に長波長のレーザーを用いることで、より深部を観測できるようになる。本研究では、そのような多光子顕微鏡の光源に適している 1.3  $\mu\text{m}$  および 1.8  $\mu\text{m}$  のファイバーレーザーの開発を進めた。開発されたレーザーを生きた動物の脳内の細胞を観測することに用い、3 光子および 4 光子励起蛍光イメージングを行うことができた。この成果をまとめた論文 [Biomed. Opt. Express **14** 326 (2023)]は、2023 年 1 月における Top downloaded の論文としても紹介された。ファイバーレーザー開発について特許[特願 2021-009516]を申請している。

#### 3.

##### 概要:

サブサイクル中赤外光パルスを光源とした赤外ハイパースペクトラルイメージング装置の開発に成功した。これまでよりも 3 桁速い計測速度を達成し、物質の同定、細胞や生体組織のケミカルイメージング、バイオマテリアルの分析に成功した。試料の結像面で赤外光から可視光に波長変換することが特徴であり、ハイパースペクトルカメラを製造する会社が興味をもっている。特許[特願 2021-211167]も申請している。

### <代表的な論文>

1. Generation of sub-half-cycle 10  $\mu\text{m}$  pulses through filamentation at kilohertz repetition rates  
W.-H. Huang, Y. Zhao, S. Kusama, F. Kumaki, C.-W. Luo, and T. Fuji  
Optics Express **28** (24), 36527-36543 (2020)

##### 概要:

窒素ガス中での 2 色フィラメント法により、中心波長が 10.2  $\mu\text{m}$  のサブハーフサイクル位相安定

パルスの生成を実験的に実証した。中赤外光パルスのキャリア・エンベロープ位相(CEP) は、2色の入力パルス間の遅延時間によって制御できる。中赤外パルスのパルス幅は 13.7 fs で、これは 0.402 サイクルに相当する。生成されたサブハーフサイクルパルスの CEP の絶対値は、単純な 4 光波差周波数混合のモデルと一致している。また、光源 10 kHz の繰り返し周波数が、数百ミリ秒の時間スケールでパルスエネルギーの変動を引き起こすことも発見した。

## 2. High-speed full-field entire bandwidth mid-infrared chemical imaging

Y. Zhao, S. Kusama, Y. Furutani, W.-H. Huang, C.-W. Luo, and T. Fuji

arXiv preprint arXiv:2209.06372

概要:

高速かつ中赤外全帯域のハイパースペクトルイメージングを実現した。640×480ピクセルのハイパースペクトル像を8秒で取得できます。これは、1069の波長で構成され、2.6–3.7 cm<sup>-1</sup>の波数分解能で640–3015 cm<sup>-1</sup>のスペクトル範囲をカバーします。デモンストレーションとして、マイクロ流体デバイス、植物細胞、およびマウス胚子スライスのさまざまな成分を特定してマッピングした。ケミカルイメージングにおけるこの技術の大きな可能性と潜在力は、化学分析、生物学、医学などの多くの分野への応用が期待される。

## 3. In vivo three- and four-photon fluorescence microscopy using a 1.8 μm femtosecond fiber laser system

H. Murakoshi, H. H. Ueda, R. Goto, K. Hamada, Y. Nagasawa, and T. Fuji

Biomedical Optics Express 14 326-334 (2023)

概要:

多光子顕微鏡で使われているレーザーのほとんどはチタンサファイアレーザーであり、波長は650–1040 nmである。そこで、1.8 μmで約150 fsのパルスを生成するフェムト秒ファイバーレーザーシステムを開発した。開発したシステムは、エルビウム添加シリカファイバーレーザーを発振器として、その波長をラマンシフトファイバーによって1.8 μmに変換する。1.8 μmパルスは2段階のTm:ZBLANファイバー増幅器でさらに増幅される。最終的なパルスエネルギーは約1 μJで、in vivo イメージングには十分である。TurboFP635を発現した神経細胞を脳表面から0.8 mmの深さで3光子励起で、Cloverを発現したアストロサイトを4光子励起で深さ0.2 mmで観察することに成功した。

## §2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

### (1) 藤グループ(研究機関別)

① 研究代表者: 藤 貴夫 (豊田工業大学大学院工学研究科 教授)

② 研究項目

- ・赤外ハイパースペクトラルイメージング装置の開発
- ・赤外光パラメトリック増幅器の開発
- ・ファイバーレーザーおよび顕微鏡システムの改良
- ・3光子顕微鏡による細胞のイメージング

### (2) 古谷グループ(研究機関別)

① 主たる共同研究者: 古谷 祐詞 (名古屋工業大学大学院工学研究科 准教授)

② 研究項目

- ・膜タンパク質試料の調製および活性確認
- ・膜タンパク質-リガンド相互作用解析法の開発

### (3) 村越グループ

① 主たる共同研究者: 村越 秀治 (自然科学研究機構・生理学研究所、准教授)

② 研究項目

- ・3光子顕微鏡の開発
- ・3光子顕微鏡用蛍光タンパク質の開発
- ・3光子蛍光寿命イメージング顕微鏡の開発

### (4) ファイバーラボ社グループ

① 主たる共同研究者: 堀田 昌克 (ファイバーラボ株式会社、代表取締役)

② 研究項目

- ・超短赤外パルスファイバーレーザーの製品化
- ・フッ化物(ZBLAN)ファイバーの試作製造

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

・Luo 教授(台湾国立陽明交通大学)

サブサイクル中赤外光パルス発生および赤外イメージング分光において協力して研究を進めた。2018年から藤教授がLuo教授を訪問し、それをきっかけとして、Luo教授の研究室の博士学生を数か月受け入れた。2019、2020年に国際強化支援を受け、博士学生1名(Wei-Hong Huang)を1年程度受け入れ、実験やデータ解析をともに進めた。研究結果は本人の博士論文の1部となった。

・庄司教授(中央大学)

2 μmレーザーを励起光源とした赤外OPAの波長変換媒質として有力な擬似位相整合GaAs結晶を提供していただいた。

・坂本教授(工学院大学)

クモの円網における粘性物質の赤外イメージングと補完的なデータとなる質量分析イメージングを行い、その粘性物質の成分分析に貢献していただいた。

・ENSCPからの学生受け入れ

分子科学研究所において、フランス・パリのグランゼコールの一つENSCPから修士1年のインターンシップ学生(Jean-Vincent de Montgolfier)を5か月間受け入れ、2 μmレーザーの開発を進めてもらった。