

2005年分子構造総合討論会奨励賞受賞記念 解説記事

## スーパーコンティニューム光を用いたコヒーレントラマン分光

## Coherent Raman Spectroscopy Using a Supercontinuum Light Source

加納 英明<sup>a</sup>

Hideaki Kano

Ultrabroad supercontinuum is generated when ultrashort laser pulses are injected into a photonic crystal fiber (PCF). Owing to the low threshold for the supercontinuum generation, the experimental setups have been significantly simplified by PCFs. We have applied the PCF-based supercontinuum light source to develop unique coherent Raman spectrometers. In the present paper, I would introduce two coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) systems, namely femtosecond CARS spectroscopy and ultrabroadband multiplex CARS microspectroscopy, both of which require only a single Ti:sapphire oscillator as a laser source. The former allows us to investigate vibrational dynamics in real time, while the latter provides molecular specific multi-color images for biological samples with high speed. In particular, we have successfully visualized the mitosis process of living fission yeast cells at the molecular level.

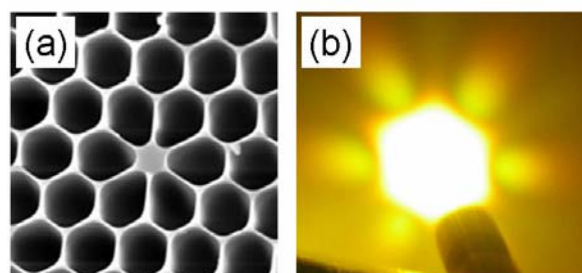
**Keywords:** supercontinuum, photonic crystal fiber, PCF, Raman spectroscopy, nonlinear Raman spectroscopy, coherent Raman spectroscopy, coherent anti-Stokes Raman scattering, CARS, multiplex CARS, microscopy, microspectroscopy, vibrational imaging, molecular imaging, pollen grain, living cell, yeast cell

## 1. はじめに

高い尖頭出力を持つ超短パルスレーザーを用いることで、様々な非線形光学過程を実現することができる。この中でも、スーパーコンティニューム光 (Supercontinuum; SC) 発生は、高強度かつ広帯域の、いわば“白色レーザー”の発生を可能とするため、超高速分光や波長変換をはじめ、広範な分野に応用されている。SC 光は 1969 年に Alfano と Shapiro によりはじめて観測された<sup>1,2</sup>。彼らは、この SC 光の発生に自己位相変調効果が寄与していることも明らかにしている<sup>1</sup>。超短パルスレーザー、とりわけモード同期レーザーの発展に伴い、SC 光の発生とその応用は益々進み、その技術的基盤は確立したかに見えたが、近年開発されたフォトニック結晶ファイバー (Photonic crystal fiber; PCF)<sup>3-5</sup>と、それから得られる SC 光<sup>6</sup>の報告により、新たなブレイクスルーがもたらされた。従来の SC 光発生には MW 程度の尖頭出力が必要であったため、発振器からのフェムト秒レーザーパルスを増幅したり、発振器にキャビティダンパを導入したりすることが必要であったが、PCF の登場により、kW 程度の尖頭出力で容易に SC 光が発生するようになった。このため、レーザー発振器からの出力をそのまま SC 光発生に利用できるようになり、セットアップが革新的に簡便なものとなった。これに加えて、SC 光の発生波長帯域も飛躍的に増大し、現在は 350 nm から 3000 nm まで広がった SC 光発生も報告さ

れている<sup>7</sup>。

SC 光の発生には、PCF という新しいタイプの非線形光ファイバーが一般に用いられている (SC 光の発生には、他にテーパー状ファイバーという、通常の光ファイバーを伸延してコアを極細に変形させたものも使われている<sup>8</sup>)。図 1(a)に PCF の断面図を示す。PCF の大きな特徴の一つに、多数の空孔が蜂の巣状に規則的に配列したクラッドと、シリカガラスからなる極細のコアという、マイクロストラクチャー構造が挙げられる。このため PCF はマイクロストラクチャーファイバー (Microstructured fiber) またはホーリーファイバー (Holey fiber) と呼ばれる場合もある。シリカのコアと空孔よりなるクラッド間の大きな屈折率差のため、PCF に導入された光はコア中に強く閉じこめられる。また、PCF の波長分散特性は、コアを取り囲む空孔の大きさやその配列の仕方により調整することができる。コアへの強い光閉じこめと分散特性の制御の結果、幅広い



**Figure 1.** (a) Cross section of a photonic crystal fiber. This is obtained by Crystal Fibre A/S and NKT Research (<http://www.crystal-fibre.com/>); (b) Far-field beam pattern of supercontinuum.

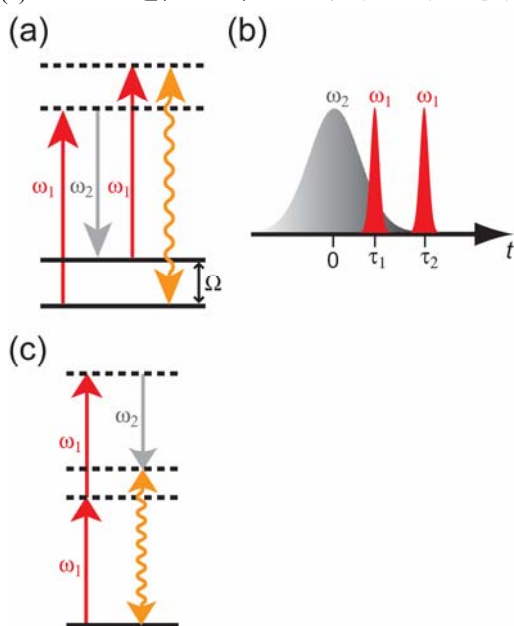
<sup>a</sup>東京大学 大学院理学系研究科 化学専攻  
連絡先 〒113-0033 文京区本郷 7-3-1  
電子メール hkano@chem.s.u-tokyo.ac.jp

スペクトル成分を持つフェムト秒光パルスが、そのパルス幅を広げることなく PCF 中で伝搬することが可能となる。このように、PCF 中で時間的及び空間的に光子数密度の高い状態を維持させることができるため、PCF 中で様々な非線形光学効果を生じさせることが可能である。SC 光は、それら一連の非線形光学効果の結果発生する。図 1(b)に、発生した SC 光のビームパターンの一例を示す。蜂の巣状のクラッド構造を反映して、六角形状のビームパターンを示している。SC 光発生については、理論的解析も進み、そのメカニズムについての理解も深まっている<sup>9,10</sup>。現在、SC 光は光の絶対周波数計測<sup>11</sup>、光コヒーレンス・トモグラフィ (Optical Coherence Tomography; OCT)<sup>12</sup>、時間分解分光<sup>13-15</sup>、顕微鏡<sup>16-23</sup>等、様々な分野で応用されている。このように、SC 光は魅力溢れる新しい分光光源として、高いポテンシャルを持つことが期待される。本項では、筆者らが開発したいくつかの分光システムを中心に、SC 光の分子科学への応用例を紹介する。

## 2. フェムト秒コヒーレント・アンチストークス・ラマン散乱分光

### 2.1 はじめに

フェムト秒・コヒーレント・アンチストークス・ラマン散乱 (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering; CARS) は、時間領域で振動ダイナミクスを研究する手段の一つである。Leonhardt らの初めての報告以来<sup>24</sup>、実験、理論両側面から、様々なフェムト秒 CARS の研究が行われている<sup>25-29</sup>。CARS とは、三次の非線形光学過程の一つである。図 2(a)に CARS 過程のエネルギーダイアグラムを示す。

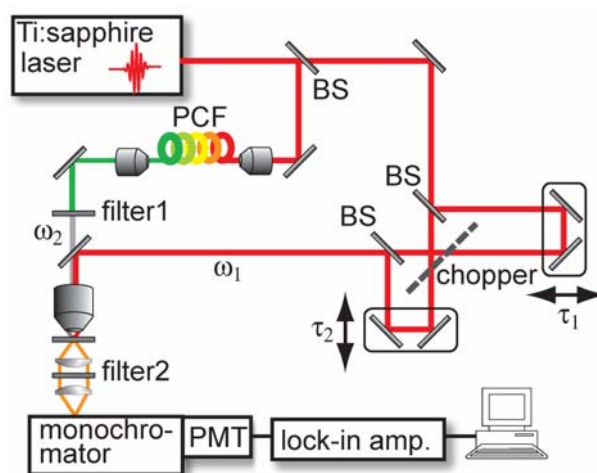


**Figure 2.** (a) Energy diagram for coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) process; (b) Time ordering of the pump, Stokes, and probe pulses. Gradation in the Stokes ( $\omega_2$ ) pulse indicates temporal chirp; (c) Energy diagram for the nonresonant background.

CARS では、一般に角振動数の異なる二つのレーザー光 ( $\omega_1, \omega_2$  光) を用いる。はじめに分子と相互作用する  $\omega_1, \omega_2$  光はポンプ光及びストークス光とも呼ばれる。これら二つの入射光の角振動数差  $\omega_1 - \omega_2$  が試料分子の持つ振動モードの角振動数  $\Omega$  と一致すると、多数の試料分子の振動モードが共鳴的にかつ位相を揃えて、すなわちコヒーレントに励振される。発生した振動分極は、位相緩和時間の間持続しているため、その間にプローブ光であるもう一つの  $\omega_1$  光と分子が相互作用することにより、三次の非線形分極に由来する分極波として CARS 光を取り出すことができる。図 2(b)に入射するレーザーパルスの時間順序を示す。ポンプ光及びストークス光と、プローブ光との間の遅延時間を変化させることにより、分子振動の位相緩和時間に関する情報を得ることができる (このときに得られる減衰時定数には、不均一幅の寄与が含まれる)。我々は当初、SC 光の可視域の波長成分を用いたコヒーレント逆ラマン分光の実験に取り組んでいたが<sup>14</sup>、実験中に偶然、SC 光の近赤外域の波長成分による CARS 光を発見した<sup>30</sup>。逆ラマンと CARS では信号光の伝搬方向が異なるにも関わらず、非常に強い CARS 光を検出したため、SC 光を CARS に応用することにより、高感度なコヒーレントラマン光の検出が可能になることが予想された。これをきっかけとして、SC 光を用いた新しい CARS 分光法の研究に取り組んだ。

### 2.2 実験装置

図 3 に我々が開発したフェムト秒 CARS 分光の実験装置を示す。光源にはモード同期チタン・サファイアレーザー (Coherent 社; Vitesse) を用い、出力の一部を PCF (Crystal Fiber 社; NL-1.7-690) に導入して SC 光を発生させた。発振器からの残りの基本波をマイケルソン型の干渉計に導入し、得られた二つのパルスをポンプ光、プローブ光 ( $\omega_1$  光) とした。一方、SC 光の近赤外成分をストークス光 ( $\omega_2$  光) として、ポンプ・プローブ光と共に対物レ



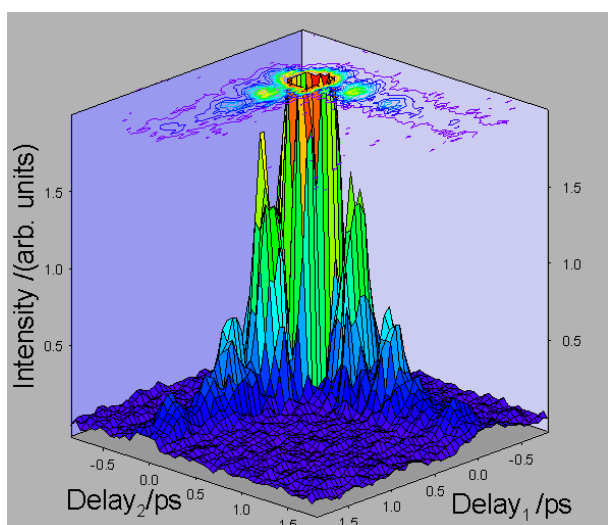
**Figure 3.** Experimental setup for fs-CARS spectroscopy; BS: beam splitter; filter1: long-pass filter; filter2: short-pass filter; PMT: photomultiplier tube.

レンズを通して同軸に試料に照射した。試料から発生した CARS 光はレンズで集められ、分光器(Acton 社; SpectraPro 300i)の後、光電子増倍管へと導いた。マイケルソン干渉計にチョッパーを導入することにより、ポンプ光及びプローブ光に周波数の異なる強度変調を施し、ダブルロックイン検出を行った。これにより、ポンプ光のみまたはプローブ光のみにより発生する信号を除去することができる。

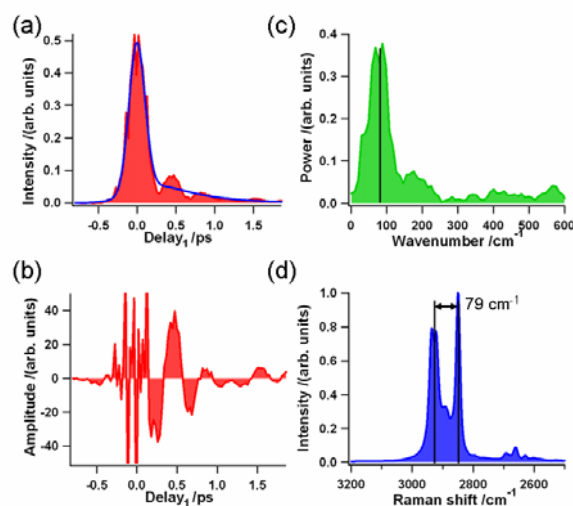
既報のフェムト秒 CARS 分光と比べて、本セットアップでは SC 光の波長の時間特性に由来する際だった特徴がある。ストークス光として用いる SC 光はチャープしているため、図 2(b)に示すように、ポンプ光とストークス光との時間的重なりが変わると角振動数差 $\omega_1 - \omega_2$ も変化する。このため、 $\tau_1$ を制御することで、ラマン励起する振動モードを選択することもできる。

### 2.3 実験結果

図 4 にシクロヘキサンを試料としたフェムト秒 CARS 分光の実験結果を示す。ポンプ光及びプローブ光の波長は約 800 nm であるため、検出波長を 652.5 nm とすることにより、C-H 伸縮振動領域の振動ダイナミクスを研究することができる。図 4 では、 $\tau_1$  及び  $\tau_2$  の二つの遅延に対して CARS 強度を二次元プロットしている。ポンプ光とプローブ光は同等のパルスであるため、 $\tau_1 = \tau_2$  に沿って対称な実験結果を与えている。また、信号は  $\tau_1 = 0$  及び  $\tau_2 = 0$  に沿って現れている。図 5(a)に、 $\tau_2 = 0$  における CARS 強度の  $\tau_1$  依存性を示す (赤線)。時間原点には大きな信号が観測される。これは、振動共鳴によらない非共鳴バックグラウンドと呼ばれる信号である。この信号の発生過程には複数の経路があり得る。図 2(c)に、その一例を示す (非共鳴バックグラウンドについては、次節で詳述する)。図 4 を見ると、原点における非共鳴バックグラウンドに加え、正の遅延に裾を引く信号が観測されていることがわかる。さら



**Figure 4.** Two-dimensional intensity plot of fs-CARS signal. The sample is cyclohexane containing in a 1-mm thick cell. Delay1 and Delay 2 correspond to  $\tau_1$  and  $\tau_2$ , respectively.



**Figure 5.** (a) Delay-time dependence of the fs-CARS signal of cyclohexane (red) and fitted result (blue); (b) Difference of the experimental and fitted results shown in (a); (c) Fourier-power spectrum of the oscillating component in the positive delay time in (b); (d) Spontaneous Raman spectrum of cyclohexane.

に、この信号には約 430 fs の変調が重畳している。この変調成分を詳しく調べるため、次の式で CARS 信号の遅延時間依存性をフィットした。

$$I(\tau_1) = \left( A\delta(\tau_1) + B \exp\left(-2\tau_1/T_2^{\text{av}}\right) \right) * G(\tau_1) \quad (1)$$

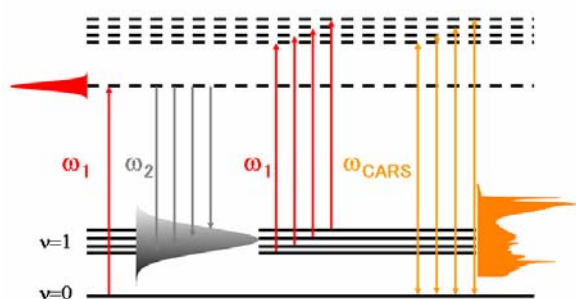
ここで、 $\delta(\tau_1)$ ,  $G(\tau_1)$ ,  $*$ ,  $A$ ,  $B$ ,  $T_2^{\text{av}}$  はそれぞれデルタ関数、装置関数 (半値全幅 230 fs)、畳み込み積分、フィッティングパラメータである。特に、 $T_2^{\text{av}}$  は不均一広がり of 寄与を含む、平均化された振動位相緩和時間である。図 5(a) にフィットの結果を示す (青線)。実験結果からフィッティング結果を差し引くことで、変調成分を抽出することができる (図 5(b))。原点付近に見られる振動構造は、線形な干渉に由来するものである。この部分を除いて、正の遅延に見られる変調成分のみをフーリエ変換した結果を図 5(c)に示す。フーリエ・パワー・スペクトルには約 75  $\text{cm}^{-1}$  の位置にピークが見られる。自発ラマンスペクトル (図 5(d)) と比較すると、これは  $\text{CH}_2$  対称・逆対称伸縮振動の波数差によく対応することがわかる。以上のように、SC 光を用いたフェムト秒 CARS 分光により、振動位相緩和時間や振動分極同士の干渉を実時間で観測することが可能であることが示された。従来のフェムト秒 CARS 分光では、振動モードに応じて光源の波長を変えることが必要であったが、SC 光は広帯域なスペクトルを有するため、光源の調整が不要であり、簡便に CARS 光を発生させることができる。これは SC 光を CARS 過程に応用することの利点の一つである。

### 3. 超広帯域マルチプレックス CARS 顕微分光

#### 3.1 はじめに

ラマン分光法は分子の個性を鋭敏に反映するスペクトルを与えるため、分子種、分子構造とそのダイナミクスについての詳細な知見を得ることが可能である。従って、ラマン分光法を顕微鏡と組み合わせることにより<sup>31,32</sup>、細胞などの生体試料を、染色することなく分子レベルで可視化することができる<sup>33</sup>。生体試料を研究対象とする際、赤外分光では水の強い吸収がしばしば問題となるが、ラマン分光ではその影響は小さいため、“生きたまま”の細胞を *in situ* で可視化することも可能である<sup>33-49</sup>。我々の最近の研究から、ラマンスペクトルを“読む”ことで、細胞内の分子種・分子構造の同定のみならず、細胞の生命活性をも選択的にモニタできることが明らかとなってきた<sup>36-39</sup>。このように、ラマン顕微分光法は生命科学においてもユニークな手法として現在普及しつつあるが、いくつかの短所も存在する。まず、自発ラマン散乱の散乱断面積は一般に小さいため、信号強度が微弱で、多くの場合数秒～数分程度の長時間の露光を必要とする。次に、蛍光性の試料の場合、微弱なラマン信号が蛍光に埋もれてしまうことがある。これは、自家蛍光を発する試料の場合特に深刻な問題となる。後者については、波長領域 1 $\mu\text{m}$  付近でラマン分光を行うことで、肺組織のような非常に蛍光性の強い試料についても良好なラマンスペクトルが得られるようになってきている<sup>50,51</sup>。本節で紹介する CARS 顕微分光法は、蛍光の影響を避け、微弱なラマン信号を増幅し、その結果ラマンイメージを高速かつ高い振動コントラストで得ることのできる手法であり、非線形ラマン顕微分光法の中でも特に注目を集めている手法の一つである。

CARS 顕微鏡は 1982 年にはじめて開発され<sup>52</sup>、現在は様々な特徴を持つユニークな CARS 顕微鏡が実現している<sup>16,53-66</sup>。しかしながら、ほとんどの顕微鏡が特定の振動共鳴を用いた固定波数の CARS イメージングであった。ラマン (CARS) スペクトルは各々の振動モードに由来す

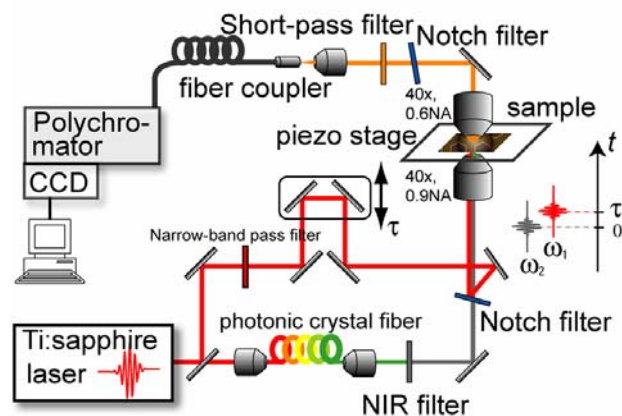


**Figure 6.** Energy diagram for a multiplex CARS process. A narrow-band pump (red) and broad-band Stokes (gray) laser pulses drive multiple vibrational coherences simultaneously. The vibrational coherences are probed by the pump pulse, giving rise to a multiplex CARS signal (orange).

る多くのバンドから構成されているため、その豊富な情報を有効に活用できることが望ましい。この CARS スペクトルを得る方法として、マルチプレックス CARS 過程の利用が考えられる。図 6 にマルチプレックス CARS 過程の概要を示す。前節のフェムト秒 CARS 過程と同様、ポンプ光 ( $\omega_1$ ) とストークス光 ( $\omega_2$ ) を用意する。ただし、ポンプ光は狭帯域、ストークス光は広帯域のレーザー光とする。この二つのレーザー光の角振動数差  $\omega_1 - \omega_2$  が分子の振動モード  $\Omega$  と一致すると、コヒーレントな振動分極が励振される。狭帯域なポンプ光と広帯域なストークス光の組み合わせにより、角振動数差  $\omega_1 - \omega_2$  は幅広い波数領域を覆うことができるため、複数の振動モードを同時に励振することが可能である。最後に、狭帯域プローブ光 ( $\omega_1$  光) との相互作用により、複数の振動共鳴の情報を持った CARS 光が発生する。本スキームでは、ポンプ光とプローブ光とは同一の光パルス ( $\omega_1$  光) となっている。このため、CARS 光強度は  $\omega_1$  光の強度の二乗、 $\omega_2$  光の強度の一乗に比例して増大する。また、全体の波数分解能は、主に  $\omega_1$  光の波数幅により与えられる。マルチプレックス CARS 過程を顕微鏡に応用した報告はいくつかあったが<sup>55, 67, 68</sup>、ストークス光の帯域がレーザーの発振帯域幅により制限されていたため、測定可能波数領域が  $< 600\text{cm}^{-1}$  程度に限られていた。これに対するブレイクスルーとなったのが、SC 光の出現であった<sup>17, 18, 69, 70</sup>。SC 光の持つ広帯域特性をマルチプレックス CARS 過程に活かすことで、CARS の測定可能波数帯域が  $> 2800\text{cm}^{-1}$  と飛躍的に向上した<sup>70, 71</sup>。

#### 3.2 実験装置

図 7 に、我々が開発した超広帯域マルチプレックス CARS 顕微鏡の実験装置を示す<sup>18</sup>。光源にはモード同期チタン・サファイアレーザー発振器 (Coherent 社; Vitesse) を用い、出力の一部を PCF (Crystal Fiber 社; NL-PM-750) に導入して SC 光を発生させた。SC 光の波長成分のうち、近赤外成分を広帯域ストークス光 ( $\omega_2$ ) として用いた。一



**Figure 7.** Experimental setup for multiplex CARS microscopy.

方、発振器からの残りの基本波をバンドパスフィルターにより狭帯域化してポンプ光 ( $\omega_1$ ) とし(波数幅約  $20 \text{ cm}^{-1}$ ), 光学遅延を経由させた後、ノッチフィルターによりストークス光と同軸に顕微鏡へと導入した。二つの光パルスは対物レンズにより試料に集光される。通常、CARS 発生には位相整合条件が満たされる必要があるが、対物レンズの高い NA 値のため、この条件は緩和され、幅広い波数領域で CARS 光の発生が可能となっている。試料から発生した CARS 光を対向させた対物レンズで集め、各種フィルターを経由させた後、分光器(Acton 社; SpectraPro 300i)及び CCD カメラ (Roper Scientific 社; Spec-10:400BR/XTE または PIXIS 100B) で分光測定した。試料は三軸ピエゾステージ (MadCity; Nano-LP-100) 上に載っており、三次元的なスキャンが可能である。

CARS 過程は非線形光学過程であるため、レーザー光が強く集光された部分からのみ信号光が発生する。その結果、共焦点顕微鏡のようにピンホールを導入する必要がなく、本質的に高い三次元空間分解能を実現することができる。本装置の空間分解能は、面内・面外方向でそれぞれ約  $0.5 \mu\text{m}$ ,  $1.5 \mu\text{m}$  であった<sup>72</sup>。

CARS スペクトルの測定により、複数の振動共鳴成分を同時に測定することが可能となるが、これに加えてもう一つ重要な利点が挙げられる。CARS には、一般に非共鳴バックグラウンドと呼ばれる信号が重畳する。非共鳴バックグラウンドとは、図 2(c)などの経路で生じる、三次の非線形光学過程の一つである。この信号は振動準位に“非共鳴”であるが、特に図 2(c)の過程で生じる場合、 $2\omega_1$  の波長が電子準位に近づくと、電子的な共鳴効果を受けて増大する。この非共鳴バックグラウンドは、振動コントラストを低下させる“コンタミネーション”としてしばしば扱われるが、我々は、逆にこの信号を利用することで、振動共鳴成分を効率よく取り出す方法を考案し、実現している<sup>73</sup>。これは、振動共鳴した CARS 光、非共鳴バックグラウンドともにコヒーレントである、という性質を利用している。信号強度は一般に以下の式で表される。

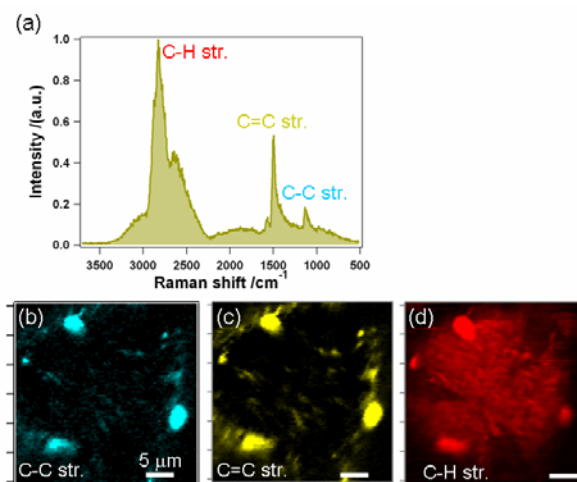
$$I(\omega) = \left| A_{\text{NR}} e^{i\phi} + \sum_{\text{R}} \frac{A_{\text{R}} \Gamma_{\text{R}}}{\Gamma_{\text{R}} - i(\omega - \Omega_{\text{R}})} \right|^2 \quad (2)$$

ここで、 $I(\omega)$  は観測される信号の強度スペクトル、 $A_{\text{NR}}$  と  $\phi$  は非共鳴バックグラウンドの振幅と位相、 $A_{\text{R}}$  は振動共鳴 CARS 光の振幅、 $\Omega_{\text{R}}$  は振動共鳴角振動数、 $\Gamma_{\text{R}}$  は線幅に比例する係数である。ここで、第一項の非共鳴バックグラウンドと第二項の振動共鳴成分はお互いに干渉するため、両者が共存する波数領域では、波数の高い方が谷、低い方が山、という非対称な“分散型”のスペクトル形状を与える。従って、このスペクトルパターンを解析することで、振動共鳴成分のみを抽出することが可能である。これは、振動共鳴 CARS 光を、非共鳴バックグラウンドに

よりヘテロダイン検波することに相当する。以上のように、CARS スペクトルを活用することで、振動共鳴成分のみのイメージを得ることができる。これは、単一波数のみで CARS イメージを構成する従来の方法では得難い、マルチプレックス CARS 顕微分光法の特徴の一つである。

### 3.3 SC 光による花粉の振動分光イメージング

図 8 にサクらの花粉を試料とした実験結果を示す<sup>74</sup>。非常に強い自家蛍光のため、花粉のラマンスペクトルを前処理無しに得ることは困難であったが<sup>75,76</sup>、CARS を用いることにより、蛍光の妨害を受けずに高速でスペクトルを得ることができた。露光時間は一点あたり  $100 \text{ ms}$  である。図 8(a)に示したマルチプレックス CARS スペクトルは複数のピークから構成されている。特に  $1100, 1500 \text{ cm}^{-1}$  付近のピークはカロテノイドに特徴的な信号であり、それぞれ C-C, C=C 伸縮振動に帰属される。これに対して、 $2850 \text{ cm}^{-1}$  付近に観測される強い信号は、C-H 伸縮信号に帰属される。これまでの我々の研究から、カロテノイドではこのように強い信号が C-H 伸縮領域に見られないこと、そして、リン脂質は長鎖アルキル鎖から構成されており、非常に強い信号を C-H 伸縮振動領域に与えること、がわかっている。これに加え、花粉にはカロテノイドや脂質が構成成分として含まれることが知られているため、C-C, C=C 伸縮振動における信号はカロテノイドに、C-H 伸縮振動における信号は脂質に由来するバンドであると考えられる。図 8(b-d)には C-C, C=C, C-H 伸縮振動それぞれによる CARS イメージを示す。図 8(b)及び(c)は同じイメージを与えており、どちらも顆粒状の部分で特に強いコントラストを示している。これは、C-C 及び C=C 伸縮振動に由来するバンドが同一の化学種(カロテノイド)からのものであるという我々の同定と矛盾しない。一方、C-H 伸縮振動による CARS イメージ(図 8(d))は、図 8(b)及び(c)と異なり、花粉全体



**Figure 8.** (a) CARS spectrum of a pollen grain of flowering cherry; CARS image of a pollen grain at the C-C (b), C=C (c), and C-H (d) stretching vibrational modes.

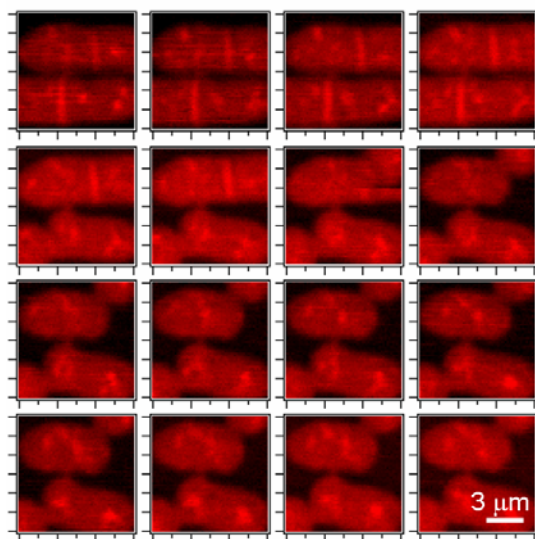
の形状を与えている。また、発芽孔も三カ所の位置で見られる。C-H伸縮振動によるイメージでも、顆粒状の部分で強い信号が観測されることから、この部分でカロテノイドと脂質が高濃度で共存していることが予想される。このように、マルチプレックス CARS 顕微分光法を用いることにより、異なる化学種を異なる振動コントラストで可視化することが可能である。

### 3.4 SC光による細胞分裂過程の振動分光イメージング

CARS光は高強度でかつ指向性があり、イメージを高速に得ることができるため、細胞分裂時の細胞内オルガネラの動態など、生細胞内で起こるダイナミックな過程を研究する手法として用いることも可能である。一例として、図9に分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*; *S. pombe*) 生細胞の C-H伸縮領域における CARS イメージングの結果を示す。一画像あたり約3.8分で取得している。この結果は、酵母の細胞分裂を明瞭に捉えている。酵母の内部には、信号強度の強いスポットが複数箇所存在し、分裂中に細胞内を移動する様子も観察できる。これらはリン脂質を豊富に含むミトコンドリア等の膜系オルガネラであると考えられる。また、分裂前には、細胞中央付近に多糖類から構成される隔壁も可視化できている。以上のように、CARSを用いることで生細胞のダイナミクスを染色せずに追跡することも可能である。

## 4. まとめ

PCFの出現により、複雑で高価な高強度短パルス光源を必要とせず、レーザー発振器のみでSC光を利用することができるようになった。SC光の発生部分は光ファイバーで構成されているため、コンパクト化・モジュール化も容



**Figure 9.** CARS imaging of living yeast cells at the C-H stretching vibrational mode. The time course is from upper-left to lower-right. Exposure time at each spatial point is 50 ms. All the images consist of 61x61 pixels, and are measured in 3.8 min per one image.

易であり、“コヒーレントでコンパクトな白色レーザー”として、超高速分光、顕微分光はじめ、これからも様々な分野で活躍することが期待される。特に今回、顕微鏡との組み合わせにより、生細胞などの生体試料を分子レベルで研究できる可能性も示された。SC光は、分子科学・生命科学の枠組みを越えた未踏の領域、すなわち“生細胞の分子科学<sup>77)</sup>”とも呼べる、新しい境界領域を明るく照らす光源として、今後も益々活躍するであろう。

本研究はすべて、東京大学大学院理学系研究科化学専攻濱口宏夫教授の研究室にて行われました。共同研究者である濱口宏夫教授には、伸び伸びと実験できる研究環境の中、日々有益な議論をして頂きました。ここに記して深く感謝いたします。一部のPCFは、Crystal fibre社と理経のご厚意によりご提供頂きました。また、酵母を用いた研究は黄郁珊博士、中塚岳氏(東京大学化学専攻)、辛島健博士、山本正幸博士(東京大学生物化学専攻)との共同研究によるものです。ここに記して感謝いたします。報告した成果の一部は、文部科学省研究費学術創成研究(No. 15GS0204)、文部科学省研究費若手研究B(No. 15750005, 18750007)、倉田記念日立科学技術財団の研究助成のもと行われました。ここに記して感謝いたします。

## 引用文献

- (1) Alfano, R. R.; Shapiro, S. L. *Phys. Rev. Lett.* **1970**, *24*, 592-594.
- (2) Alfano, R. R. *The supercontinuum Laser Source*; Springer-Verlag: Berlin, 1989.
- (3) Russell, P. *Science* **2003**, *299*, 358-362.
- (4) Dudley, J. M.; Genty, G.; Coen, S. *Rev. Mod. Phys.* **2006**, *78*, 1135-1184.
- (5) Bjarklev, A.; Broeng, J.; Bjarklev, A. S. *Photonic Crystal Fibres*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 2003.
- (6) Ranka, J. K.; Windeler, R. S.; Stentz, A. J. *Opt. Lett.* **2000**, *25*, 25-27.
- (7) Omenetto, F. G.; Wolchover, N. A.; Wehner, M. R.; Ross, M.; Efimov, A.; Taylor, A. J.; Kumar, V. V. R. K.; George, A. K.; Knight, J. C.; Joly, N. Y.; Russell, P. S. J. *Opt. Express* **2006**, *14*, 4928-4934.
- (8) Birks, T. A.; Wadsworth, W. J.; Russell, P. S. J. *Opt. Lett.* **2000**, *25*, 1415-1417.
- (9) Husakou, A. V.; Herrmann, J. *J. Opt. Soc. Am. B* **2002**, *19*, 2171-2182.
- (10) Herrmann, J.; Griebner, U.; Zavoronkov, N.; Husakou, A.; Nickel, D.; Knight, J. C.; Wadsworth, W. J.; Russell, P. S. J.; Korn, G. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *88*, 173901.
- (11) Jones, D. J.; Diddams, S. A.; Ranka, J. K.; Stentz, A.; Windeler, R. S.; Hall, J. L.; Cundiff, S. T. *Science* **2000**, *288*, 635-639.
- (12) Hartl, I.; Li, X. D.; Chudoba, C.; Ghanta, R. K.; Ko, T. H.; Fujimoto, J. G.; Ranka, J. K.; Windeler, R. S. *Opt. Lett.* **2001**, *26*, 608-610.
- (13) Nagarajan, V.; Johnson, E.; Schellenberg, P.; Parson, W.; Windeler, R. *Rev. Sci. Instrum.* **2002**, *73*, 4145-4149.
- (14) Kano, H.; Hamaguchi, H. *Opt. Lett.* **2003**, *28*, 2360-2362.
- (15) Nagahara, T.; Imura, K.; Okamoto, H. *Rev. Sci. Instrum.* **2004**,

- 75, 4528-4533.
- (16) Paulsen, H. N.; Hilligsoe, K. M.; Thogersen, J.; Keiding, S. R.; Larsen, J. J. *Opt. Lett.* **2003**, *28*, 1123-1125.
- (17) Kee, T. W.; Cicerone, M. T. *Opt. Lett.* **2004**, *29*, 2701-2703.
- (18) Kano, H.; Hamaguchi, H. *Appl. Phys. Lett.* **2005**, *86*, 121113.
- (19) Shi, K.; Li, P.; Yin, S.; Liu, Z. *Opt. Express* **2004**, *12*, 2096-2101.
- (20) McConnell, G.; Riis, E. *J. Biomed. Opt.* **2004**, *9*, 922-927.
- (21) Lindfors, K.; Kalkbrenner, T.; Stoller, P.; Sandoghdar, V. *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93*, 037401.
- (22) Isobe, K.; Watanabe, W.; Matsunaga, S.; Higashi, T.; Fukui, K.; Itoh, K. *Jpn. J. Appl. Phys., Part 2* **2005**, *44*, L167-L169.
- (23) Palero, J. A.; Boer, V. O.; Vijverberg, J. C.; Gerritsen, H. C.; Sterenborg, H. J. C. M. *Opt. Express* **2005**, *13*, 5363-5368.
- (24) Leonhardt, R.; Holzapfel, W.; Zinth, W.; Kaiser, W. *Chem. Phys. Lett.* **1987**, *133*, 373-377.
- (25) Okamoto, H.; Yoshihara, K. *J. Opt. Soc. Am. B* **1990**, *7*, 1702-1708.
- (26) Okamoto, H.; Yoshihara, K. *Chem. Phys. Lett.* **1991**, *177*, 568-572.
- (27) Joo, T.; Albrecht, A. C. *J. Chem. Phys.* **1993**, *99*, 3244-3251.
- (28) Heid, M.; Schlucker, S.; Schmitt, U.; Chen, T.; Schweitzer-Stenner, R.; Engel, V.; Kiefer, W. *J. Raman Spectrosc.* **2001**, *32*, 771-784.
- (29) Hattori, T.; Terasaki, A.; Kobayashi, T. *Phys. Rev. A* **1987**, *35*, 715-724.
- (30) Kano, H.; Hamaguchi, H. *Appl. Phys. Lett.* **2004**, *85*, 4298-4300.
- (31) Delhaye, M.; Dhamelincourt, P. *J. Raman Spectrosc.* **1975**, *3*, 33-43.
- (32) Rosasco, G. J.; Etz, E. S.; Cassatt, W. A. *Appl. Spectrosc.* **1975**, *29*, 396-404.
- (33) Puppels, G. J.; De Mul, F. F. M.; Otto, C.; Greve, J.; Robert-Nicoud, M.; Arndt-Jovin, D. J.; Jovin, T. M. *Nature* **1990**, *347*, 301-303.
- (34) Peticolas, W. L.; Patapoff, T. W.; Thomas, G. A.; Postlewait, J.; Powell, J. W. *J. Raman Spectrosc.* **1996**, *27*, 571-578.
- (35) Wood, B. R.; McNaughton, D. *Biopolymers* **2002**, *61*, 259-262.
- (36) Huang, Y.-S.; Karashima, T.; Yamamoto, M.; Hamaguchi, H. *J. Raman Spectrosc.* **2003**, *34*, 1-3.
- (37) Huang, Y.-S.; Karashima, T.; Yamamoto, M.; Ogura, T.; Hamaguchi, H. *J. Raman Spectrosc.* **2004**, *35*, 525-526.
- (38) Huang, Y.-S.; Karashima, T.; Yamamoto, M.; Hamaguchi, H. *Biochemistry* **2005**, *44*, 10009-10019.
- (39) Naito, Y.; Toh-e, A.; Hamaguchi, H. *J. Raman Spectrosc.* **2005**, *36*, 837-839.
- (40) Notingher, I.; Verrier, S.; Haque, S.; Polak, J. M.; Hench, L. L. *Biopolymers* **2003**, *72*, 230-240.
- (41) Xie, C.; Li, Y.-q. *J. Appl. Phys.* **2003**, *94*, 6138-6142.
- (42) Notingher, I.; Jell, G.; Lohbauer, U.; Salih, V.; Hench, L. L. *J. ell. Biochem.* **2004**, *92*, 1180-1192.
- (43) Verrier, S.; Notingher, I.; Polak, J. M.; Hench, L. L. *Biopolymers* **2004**, *74*, 157-162.
- (44) Rosch, P.; Hartz, M.; Schmitt, M.; Popp, J. *J. Raman Spectrosc.* **2005**, *36*, 377-379.
- (45) Van Apeldoorn, A. A.; Van Manen, H.-J.; Bezemer, J. M.; de Bruijn, J. D.; Van Blitterswijk, C. A.; Otto, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13226-13227.
- (46) Singh, G. P.; Creely, C. M.; Volpe, G.; Grotzsch, H.; Petrov, D. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2564-2568.
- (47) Rosch, P.; Harz, M.; Pesche, K.-D.; Ronneberger, O.; Burkhardt, H.; Popp, J. *Biopolymers* **2006**, *82*, 312-316.
- (48) Singh, G. P.; Volpe, G.; Creely, C. M.; Grotzsch, H.; Geli, I. M.; Petrov, D. *J. Raman Spectrosc.* **2006**, *37*, 858-864.
- (49) Chan, J. W.; Esposito, A. P.; Talley, C. E.; Hollars, C. W.; Lane, S. M.; Huser, T. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 599-603.
- (50) Min, Y.-K.; Yamamoto, T.; Kohda, E.; Ito, T.; Hamaguchi, H. *J. Raman Spectrosc.* **2005**, *36*, 73-76.
- (51) 関, 伊藤, 瀧口, 分光研究 **2004**, *53*, 318-331.
- (52) Duncan, M. D.; Reintjes, J.; Manuccia, T. *J. Opt. Lett.* **1982**, *7*, 350-352.
- (53) Zumbusch, A.; Holtom, G. R.; Xie, X. S. *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *82*, 4142-4145.
- (54) Hashimoto, M.; Araki, T.; Kawata, S. *Opt. Lett.* **2000**, *25*, 1768-1770.
- (55) Wurpel, G. W. H.; Schins, J. M.; Mueller, M. *Opt. Lett.* **2002**, *27*, 1093-1095.
- (56) Cheng, J.-X.; Jia, Y. K.; Zheng, G.; Xie, X. S. *Biophys. J.* **2002**, *83*, 502-509.
- (57) Dudovich, N.; Oron, D.; Silberberg, Y. *Nature* **2002**, *418*, 512-514.
- (58) Schaller, R. D.; Ziegelbauer, J.; Lee, L. F.; Haber, L. H.; Saykally, R. J. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 8489-8492.
- (59) Cheng, J.-X.; Xie, X. S. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 827-840.
- (60) Ichimura, T.; Hayazawa, N.; Hashimoto, M.; Inouye, Y.; Kawata, S. *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *92*, 220801.
- (61) Marks, D. L.; Boppart, S. A. *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *92*, 123905.
- (62) Knutsen, K. P.; Johnson, J. C.; Miller, A. E.; Petersen, P. B.; Saykally, R. J. *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *387*, 436-441.
- (63) Evans, C. L.; Potma, E. O.; Puoris'haag, M.; Cote, D.; Lin, C. P.; Xie, X. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 16807-16812.
- (64) Lim, S.-H.; Caster, A. G.; Nicolet, O.; Leone, S. R. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 5196-5204.
- (65) von Vacano, B.; Backup, T.; Motzkus, M. *Opt. Lett.* **2006**, *31*, 2495-2497.
- (66) Ogilvie, P. J.; Beaurepaire, E.; Alexandrou, A.; Joffre, M. *Opt. Lett.* **2006**, *31*, 480-482.
- (67) Otto, C.; Voroshilov, A.; Kruglik, S. G.; Greve, J. *J. Raman Spectrosc.* **2001**, *32*, 495-501.
- (68) Cheng, J.-X.; Volkmer, A.; Book, L. D.; Xie, X. S. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 8493-8498.
- (69) Yakovlev, V. V. *J. Raman Spectrosc.* **2003**, *34*, 957-964.
- (70) Kano, H.; Hamaguchi, H. *J. Raman Spectrosc.* **2006**, *37*, 411-415.
- (71) Kee, T. W.; Zhao, H.; Cicerone, M. T. *Opt. Express* **2006**, *14*, 3631-3640.

- (72) Kano, H.; Hamaguchi, H. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 3120-3126.
- (73) Kano, H.; Hamaguchi, H. *Opt. Express* **2005**, *13*, 1322-1327.
- (74) Kano, H.; Hamaguchi, H. *Chem. Lett.* **2006**, *35*, 1124-1125.
- (75) Ivleva, N. P.; Niessner, R.; Panne, U. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 261-267.
- (76) Sengupta, A.; Laucks, M. L.; Davis, E. J. *Appl. Spectrosc.* **2005**, *59*, 1016-1023.
- (77) 2007年5月22-23日, 分子科学研究所にて, 分子研研究会「生細胞の分子科学」が開催された。

(受理日 2007年5月28日)

加納英明氏は、2005年の分子構造総合討論会（東京）における研究発表、「非線形ラマン顕微分光による高速分子振動イメージング～分子J会合体から単一生細胞まで～」などの業績により奨励賞を受賞され、翌2006年の分子構造総合討論会（静岡）において「コヒーレント白色光によるCARS, 二光子蛍光同時イメージング」と題する奨励賞招待講演を行われました。本稿は、その研究内容の解説です。



加納英明（かのうひであき）

所属：東京大学大学院理学系研究科化学専攻

専門分野：分子分光学, 分子イメージング, 連絡先：〒113-0033 文京区本郷 7-3-1

電子メール：hkano@chem.s.u-tokyo.ac.jp, URL：http://www.chem.s.u-tokyo.ac.jp/%7Estruct/index.html