理論/実験技術

フォトニック結晶ファイバーを用いたコヒーレントラマン散乱による分子バイオイメーjing

東京大学大学院理学系研究科化学専攻

加納英明, 濱口宏夫

1. はじめに

近年, スーパーコンティニューム (supercontinuum; SC) 光が顕微鏡の新しい光源として注目されはじめている。従来のインコヒーレントな白色光と比べ, SC 光は, (1) 紫外から近赤外まで, 実に2オクターブ以上の超広帯域スペクトルを有し^{1), 2)}, (2) 高い空間コヒーレンスをもつため白色光を小さいスポットに集光することができ, さらに (3) 短パルス光源であるため二光子蛍光など多光子過程を容易に実現できる, という際だった特徴をもつ。

SC 光の発生には, フォトニック結晶ファイバー (photonic crystal fiber; PCF)³⁾ という新しいタイプの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)。PCF の大きな特徴の1つに, 多数の空孔が蜂の巣状に配列したクラッドと, 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あげられる。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) とよばれる場合もある。ガラス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。これらの結果, 幅広いスペクトル成分をも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 中を伝搬することが可能となる。このように, PCF 中で時間および空間的に光子数密度の高い状態を実現できるため, PCF

中でさまざま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。現在, SC 光は光の絶対周波数計測⁴⁾ や時間分解分光^{5), 6)} など, 広範な分野で応用されている。

SC 光の顕微鏡への応用は 2003 年頃からはじまっており, 現在は共焦点蛍光顕微鏡⁷⁾⁻⁹⁾, 二光子励起蛍光顕微鏡^{10), 11)}, 蛍光寿命顕微鏡¹²⁾, 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) 顕微鏡¹³⁾⁻¹⁵⁾ など, さまざまなタイプの顕微鏡が登場している。この他, SC 光を光ピンセットとして用い, 三次元的な試料のトラップを実現した報告もある¹⁶⁾。本稿では, 蛍光色素を導入することなく分子レベルで試料を可視化観測することができる CARS 顕微鏡を中心に, 分子バイオイメーjingの最近の研究結果を紹介する。

2. CARS 顕微分光法の開発と分子バイオイメーjingへの応用

2.1 CARS 過程とその顕微分光への応用

ラマン分光法は, 分子の個性を鋭敏に反映する振動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。このため, ラマン顕微鏡を用いることで, 蛍光色素などの導入を行うことなく, 試料を *is situ* で可視化することが可能となる。われわれの最近の研究から, 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, 「生命のラマン分光指標」により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^{17), 18)}。このように, ラマン顕微鏡は生命科学においても非常に強力なツールとなっているが, ラマン散乱断面積は一般に小さいため, 通常用いる自発ラマン散乱では信号強度が微弱で, 多くの場合数秒~数分程度の長時間の露光を必要とする。これに対して, 今回紹介する CARS 顕微分光法は, 微弱なラマン信号を増幅し, その結果ラマンスペクトルおよびイメージを高速かつ高いコントラスト比で得ることのできる方法であり, 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1つである。

Fig. 1a に CARS 過程のエネルギーダイアグラムを示す。CARS は 3 次の非線形光学過程の1つであり, 一般に角振動数の異なる 2 つのレーザー光 (ω_1 光, ω_2 光, またはポンプ光, ストークス光ともいう) を用いる。これら 2 つの入射光の角振動数差 $\omega_1 - \omega_2$ が試料分子のも

Molecular Bioimaging by Coherent Raman Scattering Using a Photonic Crystal Fiber

Hideaki KANO and Hiro-o HAMAGUCHI

Department of Chemistry, School of Science, The University of Tokyo

Fig. 1 Energy diagram for coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) process (a) and multiplex CARS process (b). (カラー図は電子ジャーナル<http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/>参照)

つ振動モードの角振動数 Ω と一致すると、多数の試料分子の振動モードが共鳴的に励振され、その結果非常に強い、かつ指向性のよいコヒーレントなラマン散乱光を得ることができる。

CARS 顕微鏡は 1982 年にはじめて開発され¹⁹⁾、現在はさまざまな特徴をもつユニークな CARS 顕微鏡が実現している^{20)–26)}。しかしながら、いずれの顕微鏡も光源部分が複雑で、かつほとんどが特定の振動共鳴を用いた CARS イメージングであった。CARS をスペクトルの形で得るには、 ω_2 光を広帯域光源にして、複数の振動モードを同時に励振する必要がある。Fig. 1b に対応する光学過程を示す。このようにして得られる CARS スペクトルはマルチブレックス CARS スペクトルとよばれる。マルチブレックス CARS 過程を利用した顕微

鏡はいくつか報告例があったが、いずれも ω_2 光の帯域による制限のため CARS 発生可能帯域が $<600 \text{ cm}^{-1}$ 程度に限られていた^{22), 24), 26), 27)}。この問題に対するブレイクスルーとなったのが、まさに SC 光であった。SC 光のもつ広帯域特性を CARS 過程に活かすことで、CARS の測定可能波数帯域が飛躍的に向上した^{14), 15)}。

2.2 スーパーコンティニューム光を用いたマルチブレックス CARS 顕微分光法

Fig. 2 に、われわれが開発したマルチブレックス CARS 顕微鏡の実験装置を示す¹⁵⁾。光源にはフェムト秒チタン・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。発振器からの残りの基本波を狭帯域化して ω_1 光とし (波数幅約 20 cm^{-1})、白色光の近赤外成分を広帯域 ω_2 光として、対物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) および CCD カメラ (Roper Scientific 社; Spec-10:400BR/XTE) 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。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²⁸⁾。

2.3 CARS による分子バイオイメージング

Fig. 3 にサクラの花粉を試料とした実験結果を示す。露光時間は 1 点あたり 90 ms である。Fig. 3a に示した

Fig. 2 (a) Experimental setup for multiplex CARS microspectroscopy; BS: beam splitter; NBF: narrow band-pass filter; LF: long-wavelength pass filter; NF: 800-nm Notch filter; SF: short-wavelength pass filter. (b) Structure of a photonic crystal fiber (PCF) used in the present study. (c) Supercontinuum generated from a PCF. (カラー図は電子ジャーナル<http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/>参照)

Fig. 3 (a) CARS spectrum of a pollen grain of cherry blossom; CARS image of a pollen grain at the C-C (b), C=C (c), and C-H (d) stretching vibrational modes. The scale bar corresponds to 5 μm. (カラー図は電子ジャーナル<http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/>参照)

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1150, 1520 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。一方、2850 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。これまでの研究から、(1)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、(2)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、がわかっているため、C-C, C=C伸縮振動における信号とC-H伸縮振動における信号はそれぞれ別の化学種からのものであると考えている。実際、C-C, C=C, C-H伸縮振動に由来する信号成分を用いてCARSイメージを構成したところ、C-C, C=C伸縮振動のイメージは同一であったのに対して、C-H伸縮振動のイメージは異なる形状を与えた。すなわち、C-H伸縮振動のCARSイメージは花粉全体の形状を与えたのに対し、C-C, C=C伸縮振動のCARSイメージでは、表面の顆粒状の部分で特に強いコントラストを示した。

3. スーパーコンティニューム光を用いたその他の顕微鏡

PCFは、SC光発生用の光デバイスとしての応用だけでなく、他にもユニークな使い方が可能である。たとえば、コアが空孔のPCFを用いることで、フェムト秒レーザーのパルス幅を保ったまま、かつ非線形光学効果の影響を抑制して光パルスを伝搬させることもできる。これにより、光ファイバーベースの二光子蛍光顕微鏡を実現した報告もある²⁹⁾。この他、レーザー集光用と信号光捕集用の2つの役割をもたせた二重クラッド構造のPCFを用い、二光子蛍光や第二高調波(second harmonics)を測定することができる顕微鏡・内視鏡を製作した例もある³⁰⁾。さらに、SC光の光電場の位相情報も含めて波形制御を行い、多光子過程の効率的な発生を検討した報告もある³¹⁾。

4. まとめ

SC光と顕微鏡との組み合わせにより、従来の顕微鏡では実現できなかった新しい分子イメージングの可能性が次々と開拓されつつある。今後、各種非線形光学効果と非線形ラマン分光法とを組み合わせたユニーク

かつ複眼的な顕微鏡が、続々と開発されるであろう。それと同時に、光源すべてをファイバー化したコンパクトな光源開発がますます進み、パッケージ化・モジュール化された白色レーザーが、顕微鏡に特化した光源として登場することも予想される。光源技術の進歩と相まって、CARSをはじめとする非線形光学顕微鏡が、医学、生命科学をはじめ幅広い分野で手放せない装置として活躍する日が来るのは、そう遠くはないであろう。

本項で紹介した研究は、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)、倉田記念日立科学技術財団の研究助成のもと行われた。

文 献

- Ranka, J. K. *et al.* (2000) *Opt. Lett.* **25**, 25-27.
- Birks, T. A. *et al.* (2000) *Opt. Lett.* **25**, 1415-1417.
- Russell, P. (2003) *Science* **299**, 358-362.
- Jones, D. J. *et al.* (2000) *Science* **288**, 635-639.
- Nagarajan, V. *et al.* (2002) *Rev. Sci. Instrum.* **73**, 4145-4149.
- Kano, H. and Hamaguchi, H. (2004) *Appl. Phys. Lett.* **85**, 4298-4300.
- Shi, K. *et al.* (2004) *Opt. Express* **12**, 2096-2101.
- McConnell, G. and Riis, E. (2004) *J. Biomedical Optics* **9**, 922-927.
- Lindfors, K. *et al.* (2004) *Phys. Rev. Lett.* **93**, 037401/1-4.
- Isobe, K. *et al.* (2005) *Jpn. J. Appl. Phys., Part 2* **44**, L167-L169.
- Palero, J. A. *et al.* (2005) *Opt. Express* **13**, 5363-5368.
- Dunsby, C. *et al.* (2004) *J. Phys. D: Appl. Phys.* **37**, 3296-3303.
- Paulsen, H. *et al.* (2003) *Opt. Lett.* **28**, 1123-1125.
- Kee, T. W. and Cicerone, M. T. (2004) *Opt. Lett.* **29**, 2701-2703.
- Kano, H. and Hamaguchi, H. (2005) *Appl. Phys. Lett.* **86**, 121113/1-3; (2005) *Opt. Express* **13**, 1322-1327; (2006) *J. Raman Spectrosc.* **37**, 411-415; (2006) *Opt. Express* **14**, 2798-2804.
- Li, P., Shi, K. and Liu, Z. (2005) *Opt. Lett.* **30**, 156-158.
- Huang, Y.-S., Karashima, T., Yamamoto, M. and Hamaguchi, H. (2003) *J. Raman Spectrosc.* **34**, 1-3; Huang, Y.-S., Karashima, T., Yamamoto, M., Ogura, T. and Hamaguchi, H. (2004) *J. Raman Spectrosc.* **35**, 525-526; Huang, Y.-S., Karashima, T., Yamamoto, M. and Hamaguchi, H. (2005) *Biochemistry* **44**, 10009-10019.
- Naito, Y., Toh-e, A. and Hamaguchi, H. (2005) *J. Raman Spectrosc.* **36**, 837-839.
- Duncan, M. D. *et al.* (1982) *Opt. Lett.* **7**, 350-352.
- Zumbusch, A. *et al.* (1999) *Phys. Rev. Lett.* **82**, 4142-4145.
- Hashimoto, M. *et al.* (2000) *Opt. Lett.* **25**, 1768-1770.
- Wurpel, G. *et al.* (2002) *Opt. Lett.* **27**, 1093-1095.
- Schaller, R. D. *et al.* (2002) *J. Phys. Chem. B* **106**, 8489-8492.
- Oron, D. *et al.* (2003) *Phys. Rev. Lett.* **90**, 213902.
- Ichimura, T. *et al.* (2004) *Phys. Rev. Lett.* **92**, 220801/1-4.
- Cheng, J.-X. and Xie, X. S. (2004) *J. Phys. Chem. B* **108**, 827-840.
- Otto, C. *et al.* (2001) *J. Raman Spectrosc.* **32**, 495-501.
- Kano, H. and Hamaguchi, H. (2006) *J. Phys. Chem. B* **110**, 3120-3126.
- McConnell, G. (2005) *Appl. Phys. B* **81**, 783-786.
- Fu, L. and Gu, M. (2006) *Opt. Lett.* **31**, 1471-1473.
- von Vacano, B. *et al.* (2006) *Opt. Lett.* **31**, 1154-1156.

フォトリック結晶ファイバーを用いたコヒーレントラマン散乱による分子バイオイメーjing

加納英明（かのう ひであき）

東京大学大学院理学系研究科化学専攻助手

連絡先：〒113-0033 文京区本郷7-3-1

E-mail: hkano@chem.s.u-tokyo.ac.jp

濱口宏夫（はまぐち ひろお）

東京大学大学院理学系研究科化学専攻教授

連絡先：〒113-0033 文京区本郷7-3-1

E-mail: hhama@chem.s.u-tokyo.ac.jp

URL: <http://www.chem.s.u-tokyo.ac.jp/%7Estruct/index.html>