ファイバレーザ光を用いたリアルタイム誘導ラマン散乱顕微鏡の開発

小関 泰之^{1,2}, 岸 達也¹, 能勢 啓輔¹, 伊東 一良¹¹大阪大学大学院 工学研究科生命先端工学専攻 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1)²科学技術振興機構 さきがけ (〒332-0012 埼玉県川口市本町4-1-8)

Real-time Stimulated Raman Scattering Microscopy Using Fiber-laser Sources

Yasuyuki OZEKI,^{1,2} Tatsuya KISHI,¹ Keisuke NOSE,¹ and Kazuyoshi ITOH¹¹Department of Advanced Science and Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University

2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871

²PRESTO-JST, 4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama 332-0012

(Received April 19, 2013)

We developed a laser-scanning stimulated Raman scattering microscope using a fiber-based pulse source, which is comprised of second-harmonic Er-doped and Yb-doped fiber lasers. The intensity noise of the former was decreased by the collinear balanced detection technique using a fiber-based delay-and-add line. We successfully imaged polymer beads with 200×200 pixels in only 0.4 s.

Key Words: Nonlinear microscopy, Stimulated Raman scattering, Fiber laser

1. はじめに

分子の振動分光情報を活用するラマン顕微鏡は、生体の無染色観察手法のひとつとして注目されている。中でも誘導ラマン散乱(stimulated Raman scattering: SRS)顕微鏡は、高速観察が可能で、試料分子の分光情報を定量的に得られるという特長を有している¹⁻³。既にビデオレート観察の可能なSRS顕微鏡がハーバード大学により報告されている⁴。また我々は、異なるラマンシフトの像をフレーム毎にビデオレートで取得する高速SRS分光顕微鏡を開発し、生体組織観察を通じてその高速観察性能と高い分子識別能を実証した⁵。

このようにSRS顕微鏡のポテンシャルを最大限に活用するための光源技術は確立されつつある。しかしながらSRS顕微鏡を医学・生物学に応用する上では、光源の更なる実用性向上が重要である。SRS顕微鏡では主に大型の固体レーザーが用いられてきた。これを、小型かつ安価で長期安定動作の可能なファイバレーザ(FL)に置き換えることができれば、SRS顕微鏡の導入がより容易になる。そのような研究が日米欧で進められている⁶⁻⁸。

我々は、FLをSRS顕微鏡に適用するためのキー技術としてコリニアバランス検出(collinear balanced detection: CBD)法を提案した⁷。しかし光パワーが低い上、試料ステージ走査を用いてイメージングを行っていたため、1枚の像取得に1分程度を要していた。本稿では、CBD法を用いたSRS顕微鏡において、FL光源を高性能化するとともにレーザー走査系を導入することで、ピクセル積

算時間10 μ s, フレーム取得時間0.4 sのリアルタイムイメージングに成功したので報告する。

2. SRS顕微鏡及びCBD法の原理

SRS顕微鏡の原理模式図をFig. 1に示す。光周波数 ω_1 , ω_2 (但し $\omega_1 > \omega_2$)を有する2色の光パルス的一方に強度変調を施し、試料に集光する。集光点に存在する分子の振動共鳴周波数 ω_R が $\omega_1 - \omega_2$ に一致するとSRSが生じ、 ω_1 の光パルスが減衰し、 ω_2 の光パルスが増幅される。その結果、強度変調がもう一方の光パルスに転写される。この転写された強度変調成分をロックイン検出することで、SRS信号を得る。SRS信号は3次非線形感受率の虚部に比例する。このため自発ラマン散乱と同じ信号が得られる。また、誘導ラマン過程を用いることで信号が増強され、高速なイメージングが可能となる。

Fig. 1 Schematic of stimulated Raman scattering microscopy. IM: intensity modulator. OB: objective lens.

SRS信号の信号対雑音比は、光パルスの強度雑音により制限される。SRS信号の信号対雑音比を高めるには、雑音をショット雑音限界まで低減することが必要である³⁾。固体レーザーパルスは、低周波において比較的大きな強度雑音を有するものの、数MHz以上の高周波においてはショット雑音が主である。このため、固体レーザーを用いたSRS顕微鏡ではショット雑音限界感度が得られる。

一方、FLの典型的な発振器出力強度はmWオーダーと微弱であるため、SRS顕微鏡に必要な数十mWの光強度を得るためには光増幅を行う必要がある。この際に、増幅自然放出(amplified spontaneous emission: ASE)光が重畳する。また、SRS顕微鏡に最適な波長に波長変換を行う際にも過剰雑音が発生する。これらの影響により、FL光源を用いる場合はその雑音レベルがショット雑音より高くなり、SRS信号の信号対雑音比が低下することが予想される。

FLの強度雑音の影響を低減する手法として、我々はCBD法を提案した⁷⁾。その原理をFig. 2に示す。光パルスを2分割し、一方に時間遅延 τ_0 を与えて合波する。このパルスをフォトダイオードに入射すると、その光電流は、各々のパルスの光電流の和となる。時間遅延は周波数領域において周波数 ω に比例した線形位相シフト $-\omega\tau_0$ に相当する。したがって、位相シフトが π となる周波数において、各々のパルスの過剰雑音が打ち消しあうとともに、確率的過程に由来するショット雑音のみが残留する。

なお、光計測において過剰雑音の影響を低減する一般的な方法として、バランスド検出法が知られている。これは既にFL型SRS顕微鏡への適用もなされている⁶⁾。バランスド検出法では、レーザーパルスを2分割し、その一方を直接光検出し、もう一方を計測系に導入した後に光検出する。これらの光電流の差を取ることで、過剰強度雑音の影響を除去する。バランスド検出においては、両光電流のバランスを一定に保つことが重要である。特に、イメージング応用においては、レーザー走査に伴い、試料による光散乱などの影響で光透過率が数割変化する場合もあり、バランスド検出の効果が十分に得られない。一方、CBD法では2つのパルスが同じ光路を通るため、光透過率が変化してもバランスが一定に保たれ

る。これがCBD法の特長である。

3. ファイバレーザ光源によるSRS顕微鏡

CBD法により雑音を低減したFL光源の実験系をFig. 3に示す。繰り返し周波数51.2 MHzのEr-FLパルスをEr添加光増幅器(EDFA)により光増幅した。増幅後の光パルスを空間に射出し、Siプリズムベアにより分散補償を行った後、長尺の周期極反転LiNbO₃結晶を用いて時間幅約3 psの第二次高調波(second harmonic generation, SHG)パルスを発生させた。その後、SHGパルスを光ファイバによる分岐遅延線に導入した。光分岐及び合波に偏波ビームスプリッタ(PBS)及び偏波ビームコンバイナ(PBC)を用いた。遅延線の入射端に設置した半波長板(HWP)を用いて分岐比を調整した。

我々の従来報告⁷⁾と比較して、Fig. 3では以下の改善を行った。まず、従来はCBDに必要な時間遅延を与えるために数mの空間伝搬を用いていた。これに対して今回、遅延線を光ファイバで構成することで系を小型化した。一方で、ファイバへの結合損失に由来する光パワー低下が生じたため、増幅系及び分散補償系を最適化し、SHG効率の向上を図った。その結果、PPLN直後で85 mW、ファイバ遅延線後で25 mWの光パワーを得ることができた。これは、フレーム取得時間が秒オーダーのリアルタイムイメージングに十分な光パワーである。

この光パルスの強度雑音を測定した。測定には、SRS信号検出用フォトダイオード(PD)とRFスペクトラムアナライザを用いた。PDには中心周波数25.6 MHzのバンドパスフィルター、51.2 MHzのバンドエリミネーションフィルター、高周波増幅器を実装した。また、遅延線の光分割比を制御することでCBDのON/OFFを行った。Fig. 4に示すように、CBDをONにすることで、光電流の雑音を22dB抑制することができた。

この光源を用い、Fig. 5に示すSRS顕微鏡を製作した。もう一色の光パルスには、繰り返し周波数25.6 MHzのYb-FLを用いた。この繰り返し周波数はEr-FLの半分である。この状況は、Yb-FLパルスが25.6 MHzで強度変調された状況と等価であり、このような二色のパルスを用いることでロックイン周波数を最大化することができ

Fig. 2 Principle of collinear balanced detection technique.⁷⁾
DAL: delay-add-line.

Fig. 3 Schematic of the pump pulse source (ω_1) with a fiber-based delay-add-line. EDFA: Er-doped fiber amplifier. FC: fiber collimator. L: lens. M: mirror. SiP: silicon prism. RP: retro prism. PPLN: periodically poled LiNbO₃. F: short-pass filter. HWP: half-wave plate. PBS: polarization beam splitter. PBC: polarization beam combiner.

Fig. 4. Result of intensity noise measurement. Optical power: 25.4 mW. Dotted line: without CBD. Solid line: with CBD.

Fig. 5 Schematic of FL-based SRS microscopy. M: mirror. DM: dichroic mirror. GS: galvanomirror scanner. OL: objective lens. L: lens. F: short-pass filter.

る⁹⁾。また、これらのレーザーを同期させるため、二光子吸収光検出器を用いてタイミング差を検出するとともに、Yb-FL内に電気光学位相変調器とピエゾステージを設置し、繰り返し制御を行った⁹⁾。さらに、Yb-FLパルススペクトルの一部分を切り出し、時間幅約3 psのパルスを発生させた。

両パルスを合波し、ガルバノスキャナーによるレーザー走査系を介して対物レンズ(60倍、水浸、NA1.2)により試料に集光した。集光点におけるSHG-Er-FLパルス及びYb-FLパルスの光パワーはそれぞれ11 mW、37 mWである。試料透過光のうち、SHG-Er-FLパルスのみを光検出し、その光電流をロックインアンプに入力することでSRS信号を得た。

本システムによるイメージング例をFig. 6に示す。試料としてポリスチレン及びPMMAビーズを用いた。ピクセル積算時間を10 μ sとし、200 $\times$ 200ピクセルの像を0.4 sで取得することができた。ラマンシフトを3036 cm^{-1} に設定したため、芳香族CH伸縮振動を有するポリスチレンが強く光っている。現在、Yb-FLの波長可変性を活用した

Fig. 6 SRS image of polymer beads including polystyrene and poly (methyl methacrylate). Raman shift: 3036 cm^{-1} . Number of pixels: 200 $\times$ 200. Pixel dwell time: 10 μ s. Acquisition time: 0.4 s.

分光イメージングシステムの開発に取り組んでいる。

4. まとめ

コリニアバランスド検出法により強度雑音を低減したファイバレーザ光源を用いてSRS顕微鏡を製作し、0.4 s/フレームのリアルタイムイメージングに成功した。今後、更なる系の最適化と小型化を進め、レーザーの専門家でなくても扱いやすいSRS顕微鏡システムを実現したい。

謝 辞

Erファイバレーザを貸与頂きました、アイシン精機の太田 通春様、堀 喬様に感謝致します。本研究の一部は科研費挑戦的萌芽研究及びJSTさがけの支援を受けました。ここに感謝致します。

参考文献

- 1) C. W. Freudiger, W. Min, B. G. Saar, S. Lu, G. R. Holtom, C. He, J. C. Tsai, J. X. Kang, and X. S. Xie: *Science* **322** (2008) 1857.
- 2) P. Nandakumar, A. Kovalev, and A. Volkmer: *N. J. Phys.* **11** (2009) 033026.
- 3) Y. Ozeki, F. Dake, S. Kajiyama, K. Fukui, and K. Itoh: *Opt. Express* **17** (2009) 3651.
- 4) B. G. Saar, C. W. Freudiger, J. Reichman, C. M. Stanley, G. R. Holtom, and X. S. Xie: *Science* **330** (2010) 1368.
- 5) Y. Ozeki, W. Umemura, Y. Otsuka, S. Satoh, H. Hashimoto, K. Sumimura, N. Nishizawa, K. Fukui, and K. Itoh: *Nature Photon.* **6** (2012) 845.
- 6) A. Gambetta, V. Kumar, G. Grancini, D. Polli, R. Ramponi, G. Cerullo, and M. Marangoni: *Opt. Lett.* **35** (2010) 226.
- 7) K. Nose, Y. Ozeki, T. Kishi, K. Sumimura, N. Nishizawa, K. Fukui, Y. Kanematsu, and K. Itoh: *Opt. Express* **20** (2012) 13958.
- 8) W. Yang, C. W. Freudiger, G. R. Holtom, and X. S. Xie: *Photonics West, BiOS 2013*, paper 8588-80.
- 9) Y. Ozeki, Y. Kitagawa, K. Sumimura, N. Nishizawa, W. Umemura, S. Kajiyama, K. Fukui, and K. Itoh: *Opt. Express* **18** (2010) 13708.