

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5536908号  
(P5536908)

(45) 発行日 平成26年7月2日(2014.7.2)

(24) 登録日 平成26年5月9日(2014.5.9)

(51) Int.Cl.

F I

G O 1 N 21/65 (2006.01)

G O 1 N 21/65

請求項の数 16 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2012-549333 (P2012-549333)	(73) 特許権者	512190608
(86) (22) 出願日	平成23年1月18日 (2011.1.18)		セントレ ナショナル デ ラ ルシエル
(65) 公表番号	特表2013-517490 (P2013-517490A)		シェ サイエнтиフィックシーエヌア
(43) 公表日	平成25年5月16日 (2013.5.16)		ールエス
(86) 国際出願番号	PCT/EP2011/050619		フランス国、F-75794 パリ セデ
(87) 国際公開番号	W02011/089118		ックス 16、リュ ミカエル アンゲ
(87) 国際公開日	平成23年7月28日 (2011.7.28)		3
審査請求日	平成25年7月3日 (2013.7.3)	(74) 代理人	100105924
(31) 優先権主張番号	10/00245		弁理士 森下 賢樹
(32) 優先日	平成22年1月22日 (2010.1.22)	(72) 発明者	リグノールト、エルヴェ
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		フランス国、F-13190 アロッシュ
早期審査対象出願			、モンテ ノートル ダム デュ シャト
			ー 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 共鳴非線形光信号を検出するための方法およびその方法を実装するための装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

界面を形成する共鳴媒質(61)および非共鳴媒質(62および/または63)を含むタイプのサンプル(805)中に誘導された共鳴非線形光信号を検出するための装置であって、

第1の所定の角振動数  $\omega_p$  にて所定タイプのサンプルの共鳴媒質を励起するための、ポンプビームと呼ばれる少なくとも1つの第1の励起ビームの放射源(801)と、

前記ポンプビームが光軸に沿ってサンプルに入射することによって、サンプルの共鳴媒質と非共鳴媒質との間に形成され、光軸に垂直な平面に沿って非ゼロ成分を有する界面である横断界面の所定位置にてサンプルを横断した場合に、前記ポンプビームとサンプルとの相互作用から生じた非線形光信号を検出するための第1の光検出モジュール(803)と、

入射したポンプビームと実質的に同じ位置にて、反射したポンプビームが前記横断界面を横断するように配置された、反射したポンプビームを形成するための前記ポンプビームの反射手段(813)と、

前記反射したポンプビームとサンプルとの相互作用から生じた非線形光信号を検出するための第2の光検出モジュール(806)と、

共鳴媒質の振動共鳴もしくは電子共鳴の指標である検出された非線形光信号の差の計算を含み、前記第1および第2の光検出モジュールによって検出された非線形光信号を処理するための処理モジュール(830)と、を含む装置。

10

20

## 【請求項 2】

放射源 ( 8 0 1 ) は、第 1 の角振動数  $\omega_p$  とは異なる少なくとも第 2 の角振動数  $\omega_s$  にて、共鳴媒質を励起するための少なくとも 1 つの第 2 の励起ビームの放射を可能とし、

励起ビームのすべては、同一線上にあって、共通の焦点体中の前記位置にて前記横断界面を横断するように配置されており、

反射手段は、前記横断界面上の同じ位置にてすべての励起ビームを前記横断界面に反射するように配置され、

第 1 および第 2 の光検出モジュールによって検出された非線形光信号の差は、第 1 および第 2 の角振動数の線形結合に等しい角振動数における共鳴媒質の振動共鳴または電子共鳴の指標である請求項 1 に記載の装置。

10

## 【請求項 3】

放射源 ( 8 0 1 ) は、角振動数  $\omega_p$  のポンプビームおよび角振動数  $\omega_s$  のストークスビームの放射を可能とし、

前記ポンプビームとストークスビームとの相互作用から生じた非線形光信号は、角振動数  $\omega_{as} = 2\omega_p - \omega_s$  の CARS 散乱信号と呼ばれる信号であって、

第 1 および第 2 の光検出モジュールにより検出された非線形光信号の差は、共鳴媒質のラマン共鳴の指標である請求項 2 に記載の装置。

## 【請求項 4】

反射手段は、1 以上の励起ビームを反射でき、前記非線形光信号を透過可能な反射鏡 ( 8 1 3 ) により形成されている請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の装置。

20

## 【請求項 5】

反射鏡 ( 8 1 3 ) が球状である請求項 4 に記載の装置。

## 【請求項 6】

1 以上の入射した前記励起ビームの焦点を共通の焦点体 ( 7 1 ) 中にて合せることにより、共鳴媒質と非共鳴媒質との間の前記界面を横断することを可能にするための焦点レンズ ( 8 0 7 ) と、

入射した励起ビームとサンプルとの相互作用から生じた非線形光信号を集めるための集光レンズ ( 8 1 1 ) と、をさらに含み、

前記集光レンズ ( 8 1 1 ) は、反射した励起ビームの焦点を合せるための焦点レンズを形成し、

30

入射した前記励起ビームの焦点を合せるための前記焦点レンズ ( 8 0 7 ) は、反射した励起ビームとサンプルとの相互作用から生じた非線形光信号を集めるための集光レンズを形成する請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の装置。

## 【請求項 7】

放射源 ( 8 0 1 ) により放射された 1 以上の励起ビームをサンプルに向けることを可能とし、1 以上の反射した励起ビームとサンプルとの相互作用から生じた非線形光信号を通過させることを可能とする 2 色性ビームスプリッタ ( 8 0 4 ) をさらに含む請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の装置。

## 【請求項 8】

前記第 1 および第 2 の光検出モジュールのそれぞれは、画像記録装置を含み、

40

非線形光信号は、光軸に対してそれぞれ対称な方向にて光検出モジュールのそれぞれに集められ、検出された少なくとも 1 組の非線形光信号のペアに対して差がもたらされる請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の装置。

## 【請求項 9】

1 以上の励起ビームの角度スキャンをもたらし装置をさらに含むことによって、共鳴媒質と非共鳴媒質との間の界面の異なる位置にて、1 以上の励起ビームがサンプルを横断することを可能とする請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の装置。

## 【請求項 10】

放射源が少なくとも 1 つの可変波長励起ビームを放射することにより、共鳴媒質の振動共鳴または電子共鳴のスペクトルを得ることを可能とする請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に

50

記載の装置。

【請求項 1 1】

サンプル ( 8 0 5 ) 中に誘導された共鳴非線形光信号を検出するための方法であって、  
サンプル ( 8 0 5 ) は、界面を形成する共鳴媒質 ( 6 1 ) と非共鳴媒質 ( 6 2 および /  
または 6 3 ) とを含み、

本方法は、

ポンプビームと呼ばれる共鳴媒質の少なくとも 1 つの第 1 の励起ビームを、第 1 の所定の角振動数  $\omega_p$  にて放射するステップと、

1 つ以上の前記第 1 の励起ビームとサンプルとの相互作用から生じた第 1 の非線形光信号を検出するステップと、

1 つ以上の前記励起ビームを反射することにより、反射した 1 つ以上の前記励起ビームが 1 つ以上の入射した励起ビームと実質的に同じ位置にて、サンプルの共鳴媒質と非共鳴媒質との間に形成され、光軸に垂直な平面に沿って非ゼロ成分を有する界面である横断界面を横断するステップと、

1 つ以上の反射した前記励起ビームとサンプルとの相互作用から生じた第 2 の非線形光信号を検出するステップと、

共鳴媒質の振動共鳴または電子共鳴の指標である検出された非線形光信号間の差を計算することを含む、検出された第 1 の非線形光信号および第 2 の非線形光信号を処理するステップと、を含み、

前記ポンプビームは、光軸に沿ってサンプルへ入射することによって、前記横断界面の所定位置にてサンプルを横断する方法。

【請求項 1 2】

第 1 の角振動数  $\omega_p$  とは異なる少なくとも第 2 の角振動数  $\omega_s$  にて共鳴媒質を励起するための少なくとも 1 つの第 2 の励起ビームを放射するステップを含み、

検出された第 1 の非線形光信号と第 2 の非線形光信号との差は、第 1 の角振動数および第 2 の角振動数の線形結合に等しい角振動数における共鳴媒質の振動共鳴または電子共鳴の指標であって、

励起ビームはすべて同一線上にあって、共通の焦点体中の前記位置にて前記横断界面を横断する請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

角振動数  $\omega_p$  のポンプビームおよび角振動数  $\omega_s$  のストークスビームを放射するステップを含み、

前記ポンプビームとストークスビームとの相互作用から生じた非線形光信号は角振動数  $\omega_{as} = 2\omega_p - \omega_s$  の CARS 散乱信号と呼ばれる信号であって、

検出された第 1 の非線形光信号と第 2 の非線形光信号との差は、共鳴媒質のラマン共鳴の指標である請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記第 1 および第 2 の非線形光信号は、入射した励起ビームの光軸に関して対称な方向にそれぞれ検出され、検出された少なくとも 1 組の非線形光信号のペアに対して差がもたらされる請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5】

1 以上の励起ビームが、角度スキャンを受けることにより、共鳴媒質と非共鳴媒質との間の界面の複数の位置にてサンプルを横断する請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6】

少なくとも 1 つの励起ビームが可変の放射波長を有することにより、共鳴媒質の振動共鳴または電子共鳴のスペクトルを得ることが可能となる請求項 1 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 1 】

本願発明は、共鳴非線形光信号を検出するための方法およびその方法を実装するための装置に関する。本願発明は、特に C A R S 散乱信号の検出に適用できる。

## 【 背景技術 】

## 【 0 0 0 2 】

すべての化学結合は、それらに固有の振動数を有する。光と物質の相互作用を使用することによって、これらの分子振動に関する情報の取得を目指す方法は、振動感受性の光学技術と呼ばれる。これらの技術のうち最もよく知られているのは、赤外 ( I R ) 分光法である。赤外分光法は、サンプル中に存在する化学結合に特異的な吸収線を観察する。1928年に発見されたラマン散乱 (この効果を発見した物理学者であるチャンドラシェーカル・ヴェンカタ・ラーマンの名前に由来する) は、使用される可視光線を、光線と相互作用する分子の振動スペクトルに接近させることを可能にする。ラマン散乱では、分子に入射する角振動数  $\omega_p$  のポンプ波が、ストークス波と呼ばれる角振動数  $\omega_s$  の波 (図1 (A)) およびアンチストークス波と呼ばれる角振動数  $\omega_{as}$  の波 (図1 (B)) の中へと非弾性的に散乱される。生成された波とポンプ波との間の振動数の差は、 $\omega_p - \omega_s = \omega_a$ 、 $\omega_s - \omega_p = \omega_R$  となるように (角振動数  $\omega_R$  の) 分子ラマン遷移に依存する。この過程を光子的に見ると、ストークス波およびアンチストークス波は、それぞれ基底振動準位および励起振動準位からの吸収に相当する。励起振動準位 (B) からアンチストークス波を生成する過程は、ストークス波を生成する過程よりもずっと起こりにくい。ストークス波を生成する過程は、自発的ラマン分光法において実際に観察される唯一の過程である。ストークス波のスペクトル分布の詳細な研究によって、サンプル中に存在する化学結合の密度に関する情報が生み出される。この非弾性散乱の自発的過程は、蛍光発光に比べて非常に非効率である ( $10^{-16} \text{ cm}^2 / \text{分子に達するフルオロフォア1光子の吸収断面積に対して、ラマン断面積は } 10^{-30} \text{ cm}^2 / \text{分子のオーダーである})$ 。

## 【 0 0 0 3 】

C A R S (コヒーレントアンチストークスラマン散乱) ラマン分光法は、4つの波を混合する過程であって、サンプル中に存在する振動性結合を検出することができる。この過程は、たとえば R . W . B o y d の非線形光学 (A c a d e m i c P r e s s、ボストン、1992年) に記載されている。本方法は、角振動数  $\omega_p$  および  $\omega_s$  (または振動数  $\nu_p$  および  $\nu_s$ ) の2つのレーザパルスを送出することを含む。この方法の角振動数差は、解析中の振動準位における角振動数に等しい。 $\omega_p - \omega_s =$  というこの共鳴の形態において、角振動数  $\omega$  の振動準位は活性化された状態で存在しており、角振動数  $\omega_p$  のビームを角振動数  $\omega_{as} = 2\omega_p - \omega_s$  のビームへと非弾性的に散乱させることが可能であろう (図2 (A))。この新たな放射  $\omega_{as}$  が存在することは、サンプル中に角振動数にて振動する結合が存在する痕跡 (signature) である。C A R S の第1の実装は、スペクトル的にピコ秒という狭さの2つのパルスをサンプルに向けることを含む。これらのパルスの角振動数差によって、たった1つの特異的な振動性結合を検出することができるだけである。同定を最適にするためには、サンプル中に存在するすべての振動性結合がテストされる。これは「多重C A R S」(たとえば M . M u l l e r および J . S c h i n s の「多重C A R S 分光法を用いた脂質膜の熱力学的状態の画像化」(P h y s i c a l C h e m i s t r y B 106巻、3715~3723頁(2002年)を参照)と呼ばれるモードの操作により行われる。ここではスペクトル的に狭いパルス  $\omega_p$  とスペクトル的に広いパルス  $\omega_s$  とがサンプルに向けられる (図2 (B))。したがって、サンプル中に存在するすべての振動準位  $\omega_i$  を検出することができ、生じた信号  $\omega_{as}$  のスペクトルを得ることができる。技術的な観点から、狭スペクトルはたとえばピコ秒のレーザから生じ、広域スペクトルはたとえばフェムト秒のレーザ、または超連続体 (S C) を生み出すフォトリソニック結晶ファイバーから生じる。

## 【 0 0 0 4 】

図3 (A) には、共鳴C A R S 散乱の過程が説明されている。共鳴C A R S 散乱は、特定される分子の痕跡に接近するために使用される。しかし、図3 (B) に示された非共鳴

10

20

30

40

50

CARS寄与が存在する。非共鳴CARS寄与はサンプルの電子的寄与から生じる。この非共鳴寄与は、様々な化学結合を含むサンプルに対してCARS分光法が実行される場合に重要となりうる。

#### 【0005】

D. Gachetらによる「ノイズのないコヒーレントアンチストークスラマン分光法に対する焦点場(Focused field)の対称性」(Physical Review A 77巻(2008年))という論文には、原法が示されている。この方法は、非共鳴寄与を除去することを可能にする。図4～6は本方法を説明する。本方法の特徴は、共鳴媒質(medium)(図4(A)(B)の参照数字41)と非共鳴媒質(図4(A)(B)の参照数字42)との間の横断界面43に関して、物体とその鏡像との間の差動的な(differential)CARS画像を生成することにある。三次非線形感受率は、共鳴媒質41において共鳴項 $(^{(3)})_{1R}$ および非共鳴項 $(^{(3)})_{1NR}$ によって規定される。非共鳴媒質42では、三次非線形感受率は非共鳴項 $(^{(3)})_{2NR}$ によって規定される。図4(A)(B)は、共鳴媒質と非共鳴媒質との横断界面43に位置する能動(active)CARS体(volume)45(それぞれ振動数 $\omega_p$ と $\omega_s$ のポンプビームとストークスビームの焦点)を示す。2つの状況が想定される。つまり、ポンプビームとストークスビームが非共鳴媒質側にて入射するケースと、ポンプビームとストークスビームが共鳴媒質側にて入射するケースである。この論文で実証されているのは、ケースとケースで得られたCARS信号間の差が共鳴媒質の共鳴寄与のみを含むということである。図5は、図4(A)(B)に示すように横断界面に焦点が合わせられたポンプビームとストークスビームのベクトル特性を考慮に入れた数値計算の結果を示す。この解析の特徴は、問題 $(I(Fwd))$ および $(I(Fwd))$ にて放射されたCARS信号の差 $I_{Fwd}$ を、標準化ラマン偏移 $=(\omega_p - \omega_s - \omega_R)/\omega_{Fwd}$ (式中、 $\omega_{Fwd}$ は研究された振動線の分光幅である)の関数として研究する点にある。差 $I_{Fwd}$ は $(^{(3)})_{1R}$ の虚数部に厳密に従うことが実証されている。 $(^{(3)})_{1R}$ は中央値1のラマンスペクトルであることが知られている。本方法の実験実装が図6(B)に示されている。実験結果が図6(A)に示されている。図6(B)は、2つのスライドガラス62, 63の間におけるDMF(N,N-ジメチルホルムアミド)の層61から構成されたサンプルを表す。ケースは、ポンプビームとストークスビームとがガラス-DMF界面(62と61の間の界面)に焦点を合わせられた場合に相当する。一方、ケースは、励起ビームがDMF-ガラス界面(61と63の間の界面)で焦点を合わせられた場合に相当する。図6(A)では、それぞれラマン偏移の関数として、曲線C1は(励起ビームが共鳴媒質中に焦点を合わせられた場合に)DMF単独のCAR強度を示す。曲線C2は強度 $I(Fwd)$ を示す。曲線C3は強度 $I(Fwd)$ を示す。曲線C4は差(differential) $I_{Fwd}$ を示す。曲線C5はラマンスペクトルを示す。理論的に実証されるように、本方法は曲線C1で表されるCARS散乱信号のノイズとなる非共鳴成分を除去することを可能にするようである。

#### 【0006】

しかし、この方法には多くの欠点がある。特に、一方では共鳴/非共鳴界面に他方では非共鳴/共鳴界面に接近する必要があるために、使用が図6(B)またはこれとは逆のサンプルなどの対称なサンプルに限られる。これはこれらの特性をほとんど有さない生物学的サンプルの場合に制限となる。さらに、分光法への応用は可能となるものの、本方法は顕微鏡用途には制限がある。

#### 【0007】

本願発明は、従来技術で説明された横断界面検出の原理に基づいて、共鳴非線形光信号を検出するための新たな装置を提案する。しかし、本装置は、分光法用途および顕微鏡用途の両方に対して、共鳴媒質と非共鳴媒質との間に界面を有するあらゆるサンプルに対して用いられてもよい。

#### 【発明の概要】

#### 【0008】

10

20

30

40

50

第1の態様によると、本願発明は、界面を形成する共鳴媒質および非共鳴媒質を含むタイプのサンプル中に誘導された、共鳴非線形光信号を検出するための装置に関する。本装置は、所定タイプのサンプルの共鳴媒質を励起するための第1の所定の角振動数  $p$  におけるポンプビームと呼ばれる少なくとも1つの第1の励起光ビームの放射源と、前記入射ポンプビームとサンプルの共鳴媒質 - 非共鳴媒質間の軸方向界面との相互作用から生じた非線形光信号を検出するための第1の光モジュールと、前記入射ポンプビームと実質的に同じ位置にて、前記反射ポンプビームが前記横断界面を横断するように配置された前記ポンプビームの反射手段と、前記反射ポンプビームとサンプルとの相互作用から生じた非線形光信号を検出するための第2の光モジュールと、共鳴媒質の振動共鳴もしくは電子共鳴の指標である検出信号の差の計算を含む、前記第1および第2の検出モジュールによって検出された光信号処理モジュールと、を含む。

10

#### 【0009】

ある変形態様によると、放射源は、角振動数  $p$  のポンプビームおよび角振動数  $s$  のストークスビームの放射を可能とし、前記ポンプビームおよびストークスビームの相互作用から生じた非線形光信号は、角振動数  $a_s = 2p - s$  のCARS散乱信号と呼ばれる信号であって、第1および第2の検出モジュールにより検出された信号の差は、共鳴媒質のラマン共鳴の指標である。

#### 【0010】

別の変形態様によると、本願発明の装置は、入射励起ビームの焦点を共通の焦点体 (focal volume) 中に合せることにより、共鳴媒質と非共鳴媒質との間の前記界面を横断することを可能にするための焦点レンズと、入射ビームに焦点を合せる焦点レンズと同一のレンズであって、入射励起ビームとサンプルとの相互作用から生じた非線形信号を集めるための集光レンズと、を含む。前記集光レンズは、反射励起ビームの焦点を合せるためのレンズを形成する。入射ビームの焦点を合わせるための焦点レンズは、反射励起ビームとサンプルとの相互作用から生じた非線形信号を集めるためのレンズを形成する。

20

#### 【0011】

別の変形態様によると、光検出モジュールのそれぞれは、画像記録装置を含み、非線形光信号は、光軸に対してそれぞれ対称な方向へと、光検出モジュールのそれぞれに集められることによって、各信号対 (couple) に対して生じた差が検出される。

30

#### 【0012】

別の変形態様によると、励起ビームの角度スキャンを提供する装置によって、共鳴媒質と非共鳴媒質との間の界面の異なる位置にて、励起ビームがサンプルを妨害することを可能とする。

#### 【0013】

別の変形態様によると、放射源が少なくとも1つの可変波長励起ビームを放射することにより、共鳴媒質の振動共鳴または電子共鳴のスペクトルを得ることを可能にする。

#### 【0014】

第2の態様によると、本願発明は、サンプル中に誘導された共鳴非線形光信号を検出するための方法に関する。サンプルは、界面を形成する共鳴媒質と非共鳴媒質とを含む。本方法は、ポンプビームと呼ばれる共鳴媒質を励起させるための少なくとも1つの第1の光線を、第1の所定の角振動数  $p$  にて放射するステップと、1つ以上の前記ビームとサンプルとの相互作用から生じた第1の非線形光信号を検出するステップと、1つ以上の前記励起ビームを反射することにより、反射した1つ以上の前記励起ビームが1つ以上の入射励起ビームと実質的に同じ位置にて前記横断界面を横断するステップと、1つ以上の前記反射励起ビームとサンプルとの相互作用から生じた第2の非線形光信号を検出するステップと、共鳴媒質の振動共鳴または電子共鳴の指標である検出信号間の差を計算することを含む、検出された第1の光信号および第2の光信号を処理するステップと、を含む。前記ポンプビームは、光軸に沿ってサンプルへ入射されることにより、共鳴媒質と非共鳴媒質との間の横断界面の所定位置にてサンプルを横断する。

40

50

## 【 0 0 1 5 】

ある変形態様によると、本方法は、角振動数  $\omega_p$  のポンプビームおよび角振動数  $\omega_s$  のストークスビームを放射するステップを含む。前記ポンプビームとストークスビームとの相互作用から生じた非線形光信号は角振動数  $\omega_{as} = 2\omega_p - \omega_s$  の CARS 散乱信号と呼ばれる信号である。第 1 の検出信号と第 2 の検出信号との差は、共鳴媒質のラマン共鳴の指標である。

## 【 0 0 1 6 】

別の変形態様によると、前記第 1 および第 2 の非線形光信号は、入射励起ビームの光軸に関して対称な方向にそれぞれ検出されることによって、各信号対に対して生じた差が検出される。

10

## 【 0 0 1 7 】

別の態様によると、1 以上の励起ビームが、角度スキャンを受けることにより、共鳴媒質と非共鳴媒質との間の界面の様々な位置にてサンプルを横断する。

## 【 0 0 1 8 】

別の変形態様によると、少なくとも 1 つの励起ビームが可変の放射波長を有することにより、共鳴媒質の振動共鳴または電子共鳴のスペクトルを得ることが可能となる。

## 【 0 0 1 9 】

本願発明の他の利点および特徴は、以下の図を用いて説明された記載を読むことによって明らかとなるであろう。

## 【図面の簡単な説明】

20

## 【 0 0 2 0 】

【図 1】（説明済）図 1（A）と図 1（B）は、ラマン散乱過程におけるストークス放射およびアンチストークス放射の原理を示す。

【図 2】（説明済）図 2（A）と図 2（B）は、2 つの異なるモードにおける CARS 放射の原理を示す。

【図 3】（説明済）図 3（A）と図 3（B）は、共鳴および非共鳴 CARS 過程の図である。

【図 4】（説明済）図 4（A）と図 4（B）は、従来技術に従った方法を実装するためのケース および の図である。

【図 5】（説明済）従来技術に従った方法によって得られた数値シミュレーションの結果である。

30

【図 6】（説明済）図 6（A）と図 6（B）は、従来技術に従った方法によって対称なサンプルを用いて得られた実験結果である。

【図 7】図 7（A）と図 7（B）は、本願発明に従った方法を実装するためのケース および の図である。

【図 8】図 8（A）と図 8（B）は、本願発明に従った方法を実装するための実験設定の例である。

【図 9】図 8（B）に示すタイプのサンプルを用いて得られた実験結果である。

【図 10】図 10（A）～図 10（D）は、本願発明に従った方法によって、屈折率  $n = 1.33$  の水溶液中に浸された直径  $3\ \mu\text{m}$  のポリスチレンビーズを用いた数値シミュレーションによって得られた画像である。

40

【図 11】本願発明のある変形態様に従った方法を実装するための実験設定の例である。

【図 12】図 12（A）と図 12（B）は、図 11 の例における方法を実装するためのケース およびケース の図である。

【図 13】共鳴媒質と非共鳴媒質との間の軸方向界面において、CARS 散乱を実装するための幾何学的条件を示す略図である。

【図 14】図 14（A）～図 14（E）は、励起ビームの焦点の相対位置の関数として、共鳴媒質と非共鳴媒質との間の軸方向界面とともに CARS 散乱信号のずれを示す図である。

【図 15】図 15（A）～図 15（C）は、数値シミュレーションにより得られた曲線で

50

ある。図15(A)は、パラメータ  $= (\omega_p - \omega_s - \omega_R) / \omega$  (標準化ラマン偏移) の関数としてCARS散乱信号における偏移を説明する。図15(B)は、パラメータの関数として、空間 ( $k_x > 0$ ) および空間 ( $k_x < 0$ ) にてそれぞれ計算された光強度および光強度差を表す。図15(C)は、軸方向界面に対する励起ビームの焦点のX座標上の位置の関数として、空間 ( $k_x > 0$ ) および空間 ( $k_x < 0$ ) にてそれぞれ計算された光強度および光強度差を表す。

【図16】本願発明に従ったCARS検出を実装するための3つの可能なモダリティを説明する図である。

#### 【0021】

(詳細な説明)

図7(A)および図7(B)は、2つの図を用いてCARS散乱のケースにおける本願発明に従った検出方法の原理を説明する。本方法によると、同一直線上(collinear)にある角振動数  $\omega_p$  のポンプビームおよび角振動数  $\omega_s$  のストークスビームが横断界面70、つまり、入射ビームの軸(光軸)と垂直な平面に沿って非ゼロ成分を有する非共鳴媒質と共鳴媒質との間の界面を横断する。一般に、これら2つのビームの焦点が合わせられる。71は、横断界面70を横断する共通の焦点体を示す。本願発明によると、励起ビームが第1の方向に界面を横断し(ケースと呼ぶ)、次に、同じ界面を実質的に同じ位置ではあるが反対方向に横断するように、サンプルに向かって反射する(ケース)。図7に示す例では、励起ビームが最初に非共鳴媒質/共鳴媒質の方向(図7(A):ケース)、次に共鳴媒質/非共鳴媒質の方向(図7(B):ケース)へと界面を横切る。

およびの2つのケースでは、CARS散乱信号強度  $I(Fwd)$  および  $I(Rwd)$  がそれぞれ測定され、これらの差  $I(Fwd) - I(Rwd)$  が計算される。校正後、信号が得られる。出願人が実証した信号は、共鳴媒質の三次非線形感受率の虚数部  $Im[\chi^{(3)}(1R)]$  に比例する。本願発明によると、ケースとでサンプルを励起するためにポンプビームとストークスビームの単一パルスが使用される。これにより、図4~6に示した従来技術の方法と比較して、SN比を増大させることが可能となる。

#### 【0022】

物体および光軸に垂直な平面に関するその物体の鏡像により生成されたCARS信号の差を用いるため、本願発明による方法を以下の説明ではDz-CARSと呼ぶ(Dzは、Z軸の対称性における差動的な(Differential)画像化を意味する)。

#### 【0023】

図8(A)は、本願発明による検出方法を実装するための例示的な装置を説明する。検出装置800は通常、同一直線上にある角振動数  $\omega_p$  の第1の励起ビーム(ポンプビーム)と角振動数  $\omega_s$  の第2の励起ビーム(ストークスビーム)との放射を可能にするレーザシステム801を含む。2つの励起ビームは、矢印802によって表されている。装置800はまた、反射シート804などの光学部材を含む。これにより、2つの励起ビームを本装置の第1の光検出モジュールへと向けることを可能にする。第1の光検出モジュールには、主方向Zに従って、一般に参照数字803が割り当てられる。

#### 【0024】

レーザシステム801は、たとえばいわゆる2色用途において、2つのスペクトル的に狭く調節可能なレーザ光源808を含む。レーザ光源808は、たとえば690~1000nmの波長にて放射され、ポンプレザ809によって送出されるチタン:サファイア型、または532nmにて放射されるネオジム:YVO4型である。調節可能なレーザは、たとえば通常3ピコ秒のオーダーのピコ秒のパルスを放射することにより、角振動数  $\omega_p$  (通常は波長730nm)のポンプ励起ビームおよび角振動数  $\omega_s$  のストークス励起ビームを形成する。パルスピッカー(picker)810が使用されることにより、ピークパルス力を減らすことなく、ポンプ励起レーザおよびプローブ励起レーザのパルス反復振動数を減少させてもよい。調節可能なストークスビームまたはポンプビームを用いることにより、特にアンチストークス放射スペクトルを、共鳴媒質のラマンスペクトルを決定することを目的とした分光法における用途に対して、スキャンすることができる。たとえ

10

20

30

40

50



ば光学パラメータ式発振器（OPO）、光学的パラメトリック増幅器（OPA）、ピコ秒ネオジム：ガラス発振器、イッテルビウムまたはエルビウム添加光ファイバーなどの他の調整可能なレーザ光源が使用されてもよい。また光源は、観察されるラマン線の分光幅に応じて、ナノ秒またはフェムト秒のレーザ光源であってもよい。しかし、ナノ秒パルスはスペクトル的には非常に良いが、ピコ秒パルスよりも低い最大出力しか有さない。さらに、ナノ秒パルスに関連した熱的效果は、生物学的サンプルによりダメージを与えうる。未加工のフェムト秒パルスは一般に、スペクトルが広すぎる。凝縮相（固体または液体）では線幅が約  $10 \sim 20 \text{ cm}^{-1}$  である。これはピコ秒パルスの使用に対応する。

#### 【0025】

図8（A）に示す例では、第1の光検出モジュール803は、図8（B）に示すサンプル805を解析するための共通の焦点体において、ポンプビームおよびストークスビームに焦点を合わせるための焦点レンズ807を含む。焦点レンズの使用は、顕微鏡用途に特に好適である。しかし、特に薄いサンプルを研究する場合、CARS信号の放射が焦点ビームを用いて機能するためには、焦点レンズは必須ではない。この例では、図6（B）に示す2つのスライドガラス62, 63間のDMF（N,N-ジメチルホルムアミド）の層61の例のように、サンプルに焦点が合わせられる。第1の光検出モジュール803は同様に、放射された非線形光信号（この例ではCARS散乱信号）の集光を可能にする集光レンズ811、および検出器816を含む。検出器816は、たとえば集光レンズ818および残存励起ビームをカットするフィルタ812に続くアバランシェフォトダイオード（APD）、高速光ダイオード（PIN）、または光電子増倍管（PMT）型の点検出器である。

#### 【0026】

この例では、所定のサンプルに対するケース からケース への移行は、鏡813によって図8（A）に示すように、ポンプビームおよびストークスビームを戻すことにより行われる。鏡813の反射係数は、ポンプビームおよびストークスビームを反射して、励起ビームとサンプルとの相互作用から生じたCARS散乱信号を伝達できるように、一方では励起ビームの波長に他方ではCARS散乱信号の波長に好適である。この状況では、入射パルスの第1の経路中に、第1のCARS信号が発射され、検出器816によって集められる。つまり、これはケース に関するため、集められた信号はI（Fwd）である。ポンプパルスおよびストークスパルスが次に鏡によって反射されることにより、サンプルへと戻る。これは次に、図8（A）で全体として参照数字806が割り当てられた第2の光検出モジュールにおいて、ケース にあるとみなされる。第2の光検出モジュール806は、第1の光検出モジュールと共通してレンズ811およびレンズ807を含む。しかし、レンズ811は鏡813により戻される励起ビームに対する焦点レンズとして機能する。また、レンズ807は反射励起ビームとサンプル805との相互作用から生じた非線形光信号に対する集光レンズとして機能する。第2の光モジュール806は、検出器817をさらに含む。検出器817は、たとえば検出器816と同じタイプの点検出器であって、残存励起ビームをカットするための集光レンズ819およびフィルタ820に続く。次に、検出器817によってその後で収集された信号はI（Fwd）である。信号の差I（Fwd）- I（Fwd）は、リアルタイムに操作される。出願人は、この差が共鳴媒質のラマンスペクトルに比例することを、図8（A）で830と名付けられた処理装置を用いて示した。反射シート804は、2色性シートであることが有利である。これにより、レーザ光源801により放射された励起ビームをサンプル805に向かって反射させることが可能となる（ケース ）。一方、ケース ではCARS散乱信号が伝達される。焦点レンズ807および集光レンズ811は同一であることが有利である。これにより、ケース および において対称な配置が可能となる。実際には、検出器816, 817は測定に先立って校正される。たとえば、この校正は溶媒のみを含むサンプルに対して行われる。

#### 【0027】

図8（B）に見られるように、本願発明による装置は、同じポンプパルスおよびストロ

10

20

30

40

50

ークパルスが、それぞれおケース および の場合に横断界面の同じ位置にてサンプルを横断することを可能にする。本方法はしたがって、単に対称または可逆的なサンプルではなく、共鳴媒質と非共鳴媒質との間に界面を呈する任意のタイプのサンプルに対して使用することができる。

#### 【 0 0 2 8 】

ある例によると、装置 8 0 0 はまた、サンプルの X Y 平面中に励起ビームスキャン装置を含む（図示せず）。このスキャン装置は、サンプルを形成する共鳴媒質および非共鳴媒質の横断界面に対して励起ビームの焦点を調節するために、分光法用途において、つまり画像化用途においても有用であってもよい。このスキャン装置は、サンプルの置換を可能とする装置、または好ましくは励起ビームスキャン装置として機能してもよい。励起ビームを逆平行方向に反射できるように、球状励起ビーム - 反射鏡 8 1 3 を使用できることが有利である。これにより、反射励起ビーム（ケース ）が入射ビーム（ケース ）と同じ位置にてサンプルを横断することができる。

#### 【 0 0 2 9 】

図 9 は、図 8 ( A ) の装置および図 8 ( B ) に示すタイプのサンプルを用いて得られた実験結果を示す。ここでは、DMF ( N , N - ジメチルホルムアミド ) の微細層が、（ここでは非共鳴媒質として機能する）2つのスライドガラス間で、共鳴媒質として機能する。ポンプビームの波長は 7 3 0 nm である。ストークス励起ビームの波長は、約 8 1 4 nm である。レンズ 8 0 7 , 8 1 1 の空気中の開口数は 0 . 6 である。図 9 では、それぞれラマン偏移の関数として、曲線 D 1 は DMF 中で測定された C A R S 散乱信号を示す。曲線 D 2 は、ケース （図 6 ( B ) ）にて測定された強度  $I_{(Fwd)}$  を示す。曲線 D 3 は、ケース にて測定された強度  $I_{(Fwd)}$  を示す。曲線 D 4 は、差  $I_{Fwd}$  を示す。曲線 D 5 ( 点線 ) は、ラマンスペクトルを示す。曲線 D 6 は、ガラス上で測定された C A R S 散乱信号を示す。曲線 D 1 は、共鳴媒質の非共鳴寄与による歪み効果を明確に示す。一方、差  $I_{Fwd}$  は DMF のラマンスペクトル ( 点線 ) 上に正確に重畳されている。したがって、D z - C A R S が、共鳴媒質の非共鳴部分によるあらゆる歪みなく、共鳴媒質のラマンスペクトルを抽出する能力を有することが理解されるであろう。

#### 【 0 0 3 0 】

この実験結果は、図 6 ( A ) に示されるように、従来技術との比較によってはっきりと改善された正確性をもって、ノイズのない非共鳴 C A R S 分光法に対する D z - C A R S 法の関連性を実証する。さらに、本願発明による方法によって、作業中の界面における位置を完全に同定すること、およびケース および のように界面の同じ位置にて同一の励起パルスの焦点を合せること、特に顕微鏡に用いることが可能となる。

#### 【 0 0 3 1 】

図 1 0 ( A ) ~ ( D ) は、別のタイプのサンプルを用いて得られた数値シミュレーションを示す。この画像は、水性溶媒中にサンプルとして直径 3  $\mu$ m のビーズを用いることによって計算される（ポンプ波長：7 3 0 nm、ストークス波長：8 1 4 nm、水中における励起レンズの開口数：1 . 2、水中における集光レンズの開口数：1 . 2）。この画像は、各ケースでは励起ビームの入射方向を含む縦断面に対応するビーズの Z X 平面にて計算される。図 1 0 ( A ) および ( B ) は、従来の検出におけるビーズの画像を表す。つまり、ケース における C A R S 散乱信号のみが示されている。共鳴しているときには（図 1 0 ( A ) ）、信号は共鳴していないとき（図 1 0 ( B ) ）よりも強い。しかし、ビーズおよびその環境の非共鳴寄与のために、コントラスト差は弱い。図 1 0 ( C ) および図 1 0 ( D ) は、共鳴しているビーズと共鳴していないビーズの画像を示す。しかし、本願発明による D z - C A R S 法を用いて、つまり図 8 ( A ) に示すタイプの設定を用いてケース および において C A R S 散乱信号を減算することによって、これらは計算されている。共鳴していないとき（図 1 0 ( D ) ）、コントラストは 0 である。それは、非共鳴寄与のみを含む信号の差が相殺されるからである。一方、図 1 0 ( C ) の共鳴しているときの計算では、横断界面におけるコントラストは最大である。これらの結果によって、顕微鏡の構成において D z - C A R S の実現可能性が確立される。

## 【 0 0 3 2 】

図 1 1 は、本願発明の変形態様に従った検出を実装するための例示的な実験設定を示す。この設定は、図 8 ( A ) の設定と実質的に同一である。しかし、点検出器 8 1 6 , 8 1 7 が、たとえば C C D 型または C M O S 型のマトリックス検出器 9 0 1 , 9 0 2 に置き換えられている。この変形態様によると、検出されたレンズ開口数に含まれる波動ベクトル  $k$  のすべての空間において、それぞれケース および に対して統合された C A R S 散乱信号の差は、上述の通りもはや検出されない。代わりに、サンプルに入射する励起ビームの光軸に関して対称な方向における C A R S 散乱信号の差が測定される。信号は初めケース において、次にケース において検出される。

## 【 0 0 3 3 】

したがって、図 1 2 ( A ) に明らかなように、ケース では、主軸  $z$  に垂直な X Y 投影面において座標  $(k_x, k_y)$  の波動ベクトル  $k$  によって表される方向に C A R S 散乱信号が測定される。またケース では、X Y 投影面において座標  $(-k_x, -k_y)$  の波動ベクトル  $k$  によって表される方向に C A R S 散乱信号が測定される。ここでは、上述のとおり、ケース は入射励起ビームとサンプルとの相互作用から生じた C A R S 散乱信号の生成に対応する。一方、ケース は反射励起ビームとサンプルとの相互作用から生じた C A R S 散乱信号の生成に対応する。

## 【 0 0 3 4 】

サンプルの横断界面にて検出を可能とすることに加えて、本方法はサンプルの軸方向界面にて検出を可能とすること、つまり入射励起ビームの光軸に沿って非ゼロ成分を有することを、出願人は実際に理論的かつ実験的に示した。本出願では以下、本方法を D - C A R S と呼ぶ。

## 【 0 0 3 5 】

D - C A R S に関する理解を向上させるために、図 1 3 ~ 1 5 では軸方向界面にて検出するための D  $k$  - C A R S と呼ばれる以下のアプローチを示す ( D  $k$  は K - 空間における差動的な画像化を意味する )。

## 【 0 0 3 6 】

図 1 3 は、たとえば解析される媒質を含む媒質、つまり生物学的に興味のある媒質である共鳴媒質 1 3 1、および通常は溶媒を含む媒質である非共鳴媒質 1 3 2 を含むサンプルを示す。三次非線形感受率は、共鳴媒質 1 3 1 では共鳴項 ( 3 ) 1 R および非共鳴項 ( 3 ) 1 N R によって定義される。非共鳴媒質 1 3 2 では、三次非線形感受率は非共鳴項 ( 3 ) 2 N R によって定義される。本願発明による方法のこの態様によると、同一直線上にある角振動数  $p$  のポンプ励起ビームと角振動数  $s$  のプローブ励起ビームは、焦点体 1 3 5 にてサンプルに入射し、サンプルの軸方向界面 1 3 3 を横断する。本方法のこの態様によると、以下において詳細に説明するように、波動ベクトル  $k$  の空間、つまり C A R S プロセスにより放射された信号の放射方向の空間における、界面の両側に対する非線型光ビームの光強度が解析される。この強度は、それぞれ界面の両側にて、I F w d (ベクトル  $k$ ) および I F w d (ベクトル  $k'$ ) として図 1 3 に示されている。「F w d」との省略形は、後ろ方向に散乱された「E p i」と呼ばれる信号の対語として、前方 C A R S 散乱信号を表す。

## 【 0 0 3 7 】

実際に、出願人は軸方向界面において C A R S 過程によって放射された信号は共鳴によってずれるということを実験的および理論的に実証した。

## 【 0 0 3 8 】

図 1 4 ( A ) ~ ( E ) は、C A R S 散乱信号のずれを、界面に入射するポンプビームおよびストークスビームの相対位置の関数として、一連の略図によって示す。図 1 4 ( A ) ~ ( E ) は、能動 C A R S 体 1 3 5 (ポンプビームおよびストークスビームの焦点)を示す。能動 C A R S 体 1 3 5 は、C A R S 対象物 1 4 0 の中を移動される (各図は対象物中の能動体 ( a c t i v e v o l u m e ) の異なる位置に対応する)。C A R S 対象物は、その対象物の周囲の媒質が共鳴していないと見なされる場合に、共鳴していると

10

20

30

40

50

見なされる（以下の記載では、このCARS対象物を「溶媒」と呼ぶ）。CARS対象物と溶媒との間の界面では、CARS散乱信号はずれ（または偏向）の影響を受けるようである。出願人は、このずれは純粋にCARS対象物と溶媒との干渉過程から生じ、決して屈折の影響によるものではないことを実証している。2つの実例1（図14（A）および（E））では、溶媒中でCARS体に焦点が合わせられる。CARS散乱信号は標準的な方向（ポンプビームおよびストークスビームの入射軸に平行である。矢印141により示される）に放射される。実例2（図14（B））では、CARS体はCARS対象物と溶媒との間の界面に焦点が合わせられる。次に、（ポンプビームおよびストークスビームの入射軸に対して）正の角度にてCARS散乱信号が放射されることにより、波動ベクトル $k$ の空間において、（ $k_x > 0$ ）により規定される方向にビームをずれさせる。実例3（図14（C））では、CARS体がCARS対象物中の中心に置かれる。その結果CARS信号は強くなり、標準的な方向（ポンプビームおよびストークスビームの入射軸に平行）に向けられる。次に以下の実例（図14（D）の実例4および図14（E）の実例1）において似た状況が見られる。しかし、実例4では $\theta$ が負で、（ $k_x < 0$ ）によって規定される方向へのずれに対応することに留意することは重要である。出願人は、標準化パラメータ $\theta = (\theta_p - \theta_s - \theta_R) / \theta$ （式中、 $\theta$ は実験された振動線の分光幅である）の関数としての角 $\theta$ の変化は、媒質1を記述するテンソル $(\chi^{(3)})_1 = (\chi^{(3)})_1^R + (\chi^{(3)})_1^{NR}$ の位相に従うことを、理論的かつ実験的に実証している。出願人はまた、対称散乱方向にてCARS信号を解析することにより、ラマンスペクトルが決定可能であることを実証している。

#### 【0039】

図15（A）は、共鳴媒質1と非共鳴媒質2との間の軸方向界面（図13）に焦点が合わせられたポンプビームおよびストークスビームのベクトル特性を考慮した厳密な数値計算の結果を示す。この解析の目的は、波動ベクトル $k$ の空間において、標準化ラマン偏移 $\theta = (\theta_p - \theta_s - \theta_R) / \theta$ の関数として放射されたCARS散乱信号のずれを研究することにある。共鳴のない状態（ $\theta = 10^\circ$ ）では、ビームが中心に向けられる。一方、共鳴のある状態（ $\theta = 0^\circ$ ）では、角変位がはっきりと現れる。

#### 【0040】

図15（B）および（C）は、数値シミュレーションを示す。ここではCARS散乱信号がそれぞれ半空間（ $k_x > 0$ ）および半空間（ $k_x < 0$ ）に統合される。次に、こうして統合された信号の差が決定される。図15（B）は、ポンプビームおよびストークスビームが界面（ $x = 0$ ）に焦点を合わせられた場合の半空間（ $k_x > 0$ ）および半空間（ $k_x < 0$ ）に統合されたCARSスペクトルを、これらの差 $I$ とともに示す。この差は $I_m[(\chi^{(3)})_1^R]$ によって与えられるラマンスペクトルに正確に従う。このことは非共鳴ノイズを有さないCARS分光法に対する $Dk$ -CARS法が適切であることを示す。したがって、たとえばストークスビームの振動数を変化させることによって、共鳴媒質のラマンスペクトルを決定することが可能である。図15（C）は、界面に対してポンプビームおよびストークスビームの焦点の関数として半空間（ $k_x > 0$ ）および半空間（ $k_x < 0$ ）に積分されたCARS信号を示す。これらの差は、界面の近傍にて一意的にゼロではない。したがって、界面の近傍にて背景ノイズのない非共鳴CARS画像を得ることができる。

#### 【0041】

したがって図16（A）～（C）は、 $Dz$ -CARS法および $Dk$ -CARS法を組み合わせた $D$ -CARS顕微鏡用の3つの可能な検出モダリティを示す。各検出モダリティに対して、数値シミュレーションは水性溶媒中で直径 $3\mu m$ のビーズに対して得られた画像を示す（ポンプ波長： $730nm$ 、ストークス波長： $814nm$ 、励起レンズの水中の開口数： $1.2$ 、集光レンズの水中の開口数： $1.2$ ）。図16（A）は、 $X$ 軸に垂直な界面および $Z$ 軸に垂直な界面における検出を可能にする $XZ$ 検出モダリティを示す。このために、CARS信号を空間（ $k_x > 0$ ）（ケース、図7（A））および空間（ $k_x < 0$ ）（ケース、図7（B））にて積分することにより、それぞれケースおよびにお

けるCARS散乱信号の差が計算される。これは励起ビームの方向の信号として選択された参照系である。したがって、たとえばポンプビームおよびストークスビームの焦点の相対位置を変えることにより、ビーズの赤道面において図16(A)の画像が得られる。図16(B)は、Y軸に垂直な界面およびZ軸に垂直な界面における検出を可能にするYZ検出モダリティを示す。この例では、異なる位置に対して、空間( $k_y > 0$ ) (ケース、図7(A))および空間( $k_y < 0$ ) (ケース、図7(B))で積分された光強度差が計算される。図16(C)は、検出モダリティXYZを示す。この画像は、それぞれおケース および において、2つの逆方向のベクトル $k(k_x, k_y, k_z)$ およびベクトル $k(-k_x, -k_y, k_z)$ において測定された光強度差 $I(k_x, k_y)$ および $I(-k_x, -k_y)$ において $2 \times 2$ の差をとることにより計算される。これらの方向は、角円錐(angular cone)に含まれる。角円錐の開口角は、CARS散乱信号を集めるための開口数(たとえば水中では1.2である)によって規定される。また、波動ベクトル $k$ および $k$ の座標は、それぞれケース および に特異的な励起ビームを参照して表される。

#### 【0042】

図11に示す例では、特に顕微鏡用途に対して、励起ビームを角度スキャンするための手段を提供することを可能とすることが有利であろう。図8(A)に示す装置の例のように、励起ビーム813を反射するための球状鏡813を選択することが可能であろう。さらに、ケース および のそれぞれにおいてカメラに集中された励起ビームの入射方向を保つために、レンズ811, 807の射出瞳(exit pupils)においてそれぞれカメラ901, 902を配置することが有利である。 および の各ケースにおいて各スキャン角に対して励起ビームの方向を特定するために、溶液中におけるカメラの校正も可能である。励起ビームに対して、CARS散乱信号のずれが測定される。

#### 【0043】

2つのスペクトル的に狭いレーザ光源を用いて、2色用途に関する図8(A)および図11の実装例によって、Dz-CARSまたはD-CARSの検出を説明してきた。多重用途(multiplex)と呼ばれる用途では、たとえばフェムト秒パルスまたは光ファイバーもしくは他の分散性媒質により生成された超連続体によって生成されたストークスビームのスペクトル的に広い放射源が選択可能である。ポンプ信号は、スペクトル的に狭いままである。この用途では、たとえば2つのケース および にて検出された2つの信号が入力されるCCDカメラを備えた2つのスリット分光計または単一の分光計を用いて、単一パルスにおけるラマンスペクトルを得ることが可能となるであろう。この用途では、各ケース(または)においてスペクトルを得て、これらの差を生じさせることが問題である。

#### 【0044】

3色用途と呼ばれる用途では、関連する振動数 $\omega_1$ 、 $\omega_2$ および $\omega_3$ の3つの波長が使用されることにより、角振動数 $\omega_1 - \omega_2 + \omega_3$ にてCARS信号が生成される。ケースまたは において角振動数 $\omega_1 - \omega_2 + \omega_3$ にて信号を検出してこれらの差を算出することにより、CARS信号はノイズのない非共鳴な状態にされてもよい。

#### 【0045】

CARS散乱の場合にて検出方法を説明してきたが、この検出方法は、分光法用途および顕微鏡用途の両方に対して、軸方向界面にて検出して共鳴媒質と非共鳴媒質との間の界面を明らかにできることによって、他の非線形の2次または3次の処理にも同様に適用される。いずれの場合も、1つ以上の励起ビームの相互作用から生じた非線形光信号の解析が、共鳴媒質と非共鳴媒質との間に界面を呈するサンプルを用いて行われる。この空間解析は、共鳴媒質と非共鳴媒質との間の界面を明らかにすること、または共鳴媒質のスペクトルを特徴づけることを可能にする。

#### 【0046】

ある例によると、第3の共鳴調波(harmonic)を生成する処理は、角振動数 $\omega_p$ の単一のポンプ励起ビームを用いて共鳴媒質と非共鳴媒質との間に界面を含むサンプル

10

20

30

40

50

を励起することによって、共鳴が電子共鳴である場合に使用されうる。たとえば、発振器型のチタン：サファイア、ネオジウム：ガラス、またはイッテルビウムまたはエルビウム添加光ファイバーのピコ秒またはフェムト秒レーザ光源である。

【 0 0 4 7 】

他の例によると、4波混合処理は、共鳴が電子共鳴である場合に、角振動数  $\omega_p$  の単一のポンプ励起ビームを用いて、共鳴媒質と非共鳴媒質との間の界面を含むサンプルを励起することにより使用されうる。たとえば、発振器型のチタン：サファイア、ネオジウム：ガラス、またはイッテルビウムまたはエルビウム添加光ファイバーのピコ秒またはフェムト秒レーザ光源である。

【 0 0 4 8 】

上述の2つの例は、電子共鳴を取り扱っている。電子共鳴は、原子、分子、半導体の結晶などにおいて見られる。

【 0 0 4 9 】

別の態様によると、第2の共鳴調波は単一のポンプビームを用いて励起されうる。または、振動数の合計がポンプビームおよびプローブビームを用いて作られうる（二次の非線形効果）。

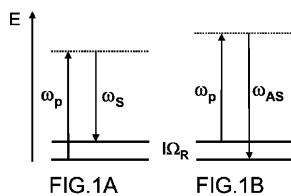
【 0 0 5 0 】

いくつかの詳細で例示的な態様を用いて本願発明を説明したが、本願発明による検出装置および方法は、当業者に明らかな異なる変形例、修正、および改良を含む。そのため、以下の特許請求の範囲に規定されるように、これらの異なる変形例、修正、および改良が本願発明の範囲に含まれることが理解されるであろう。

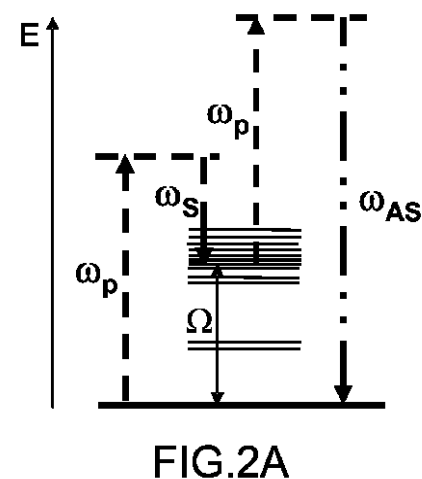
10

20

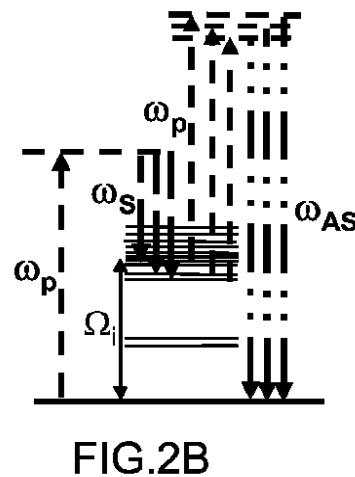
【 図 1 A - 1 B 】



【 図 2 A 】



【 図 2 B 】



【図 3 A】

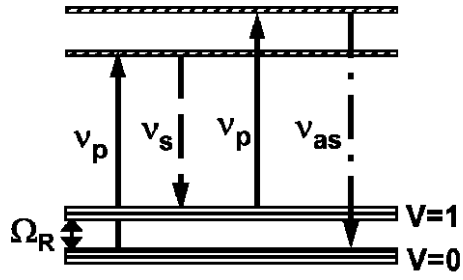


FIG.3A

【図 3 B】

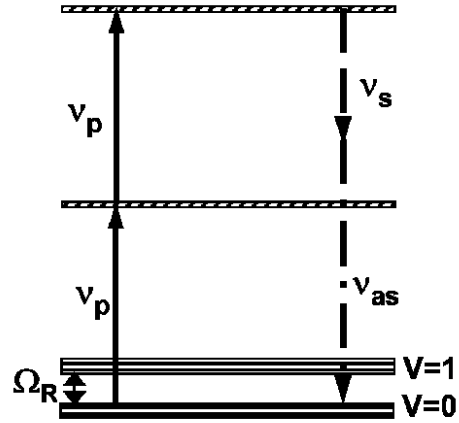
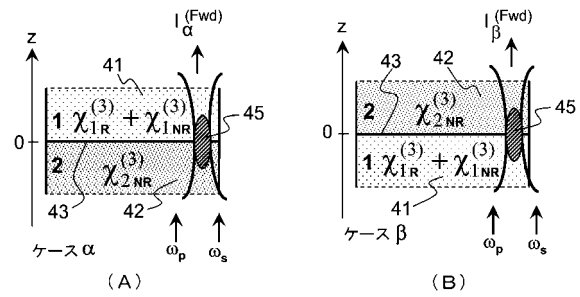
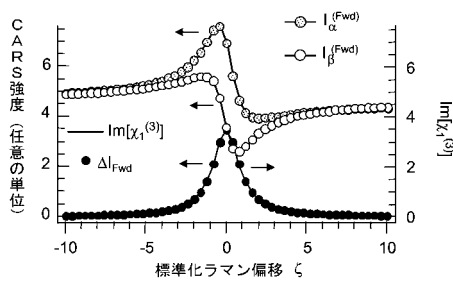


FIG.3B

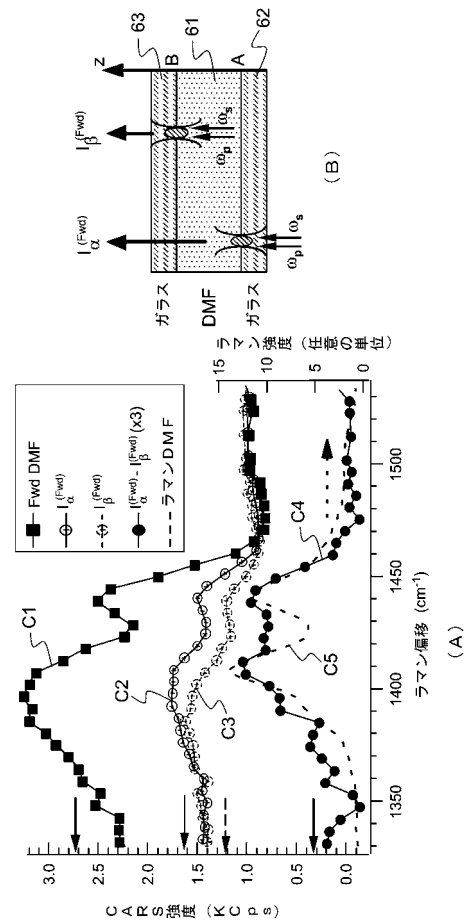
【図 4】



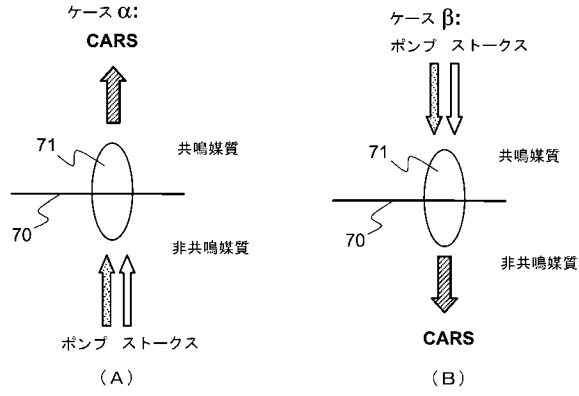
【図 5】



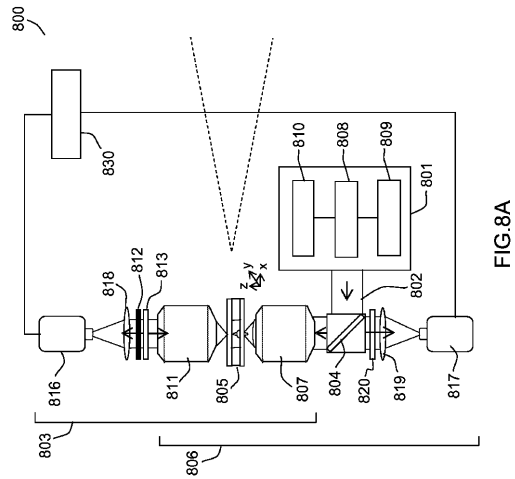
【図 6】



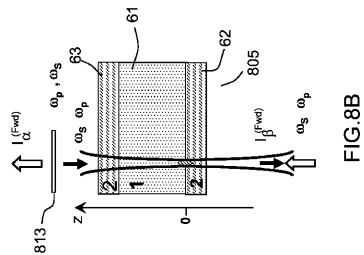
【図 7】



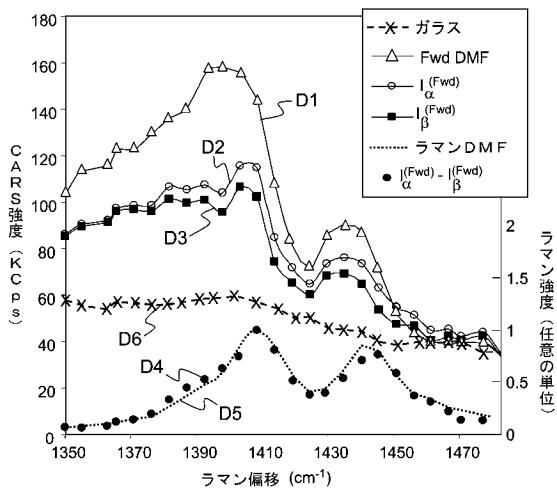
【図 8 A】



【図 8 B】



【図 9】



【図 11】

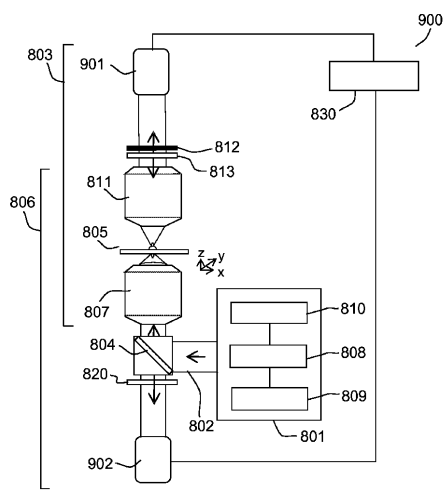
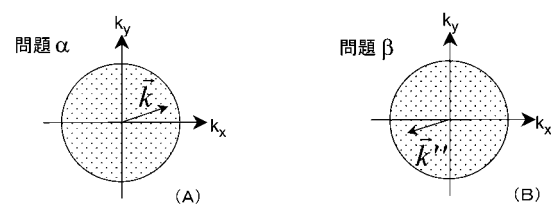


FIG.11

【図 12】





【図 13】

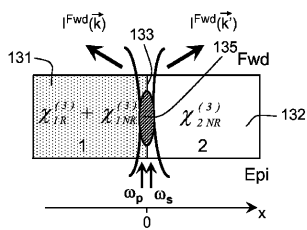
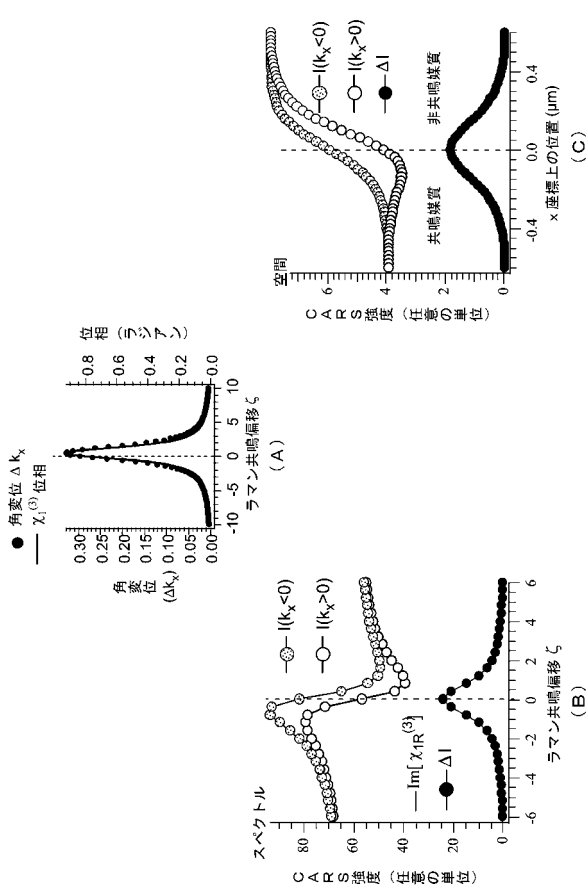
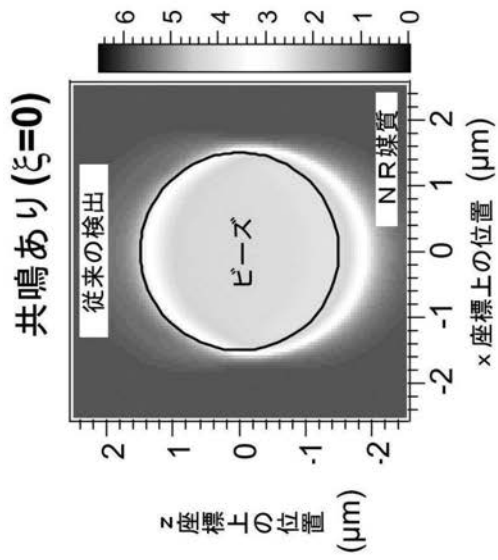


FIG.13

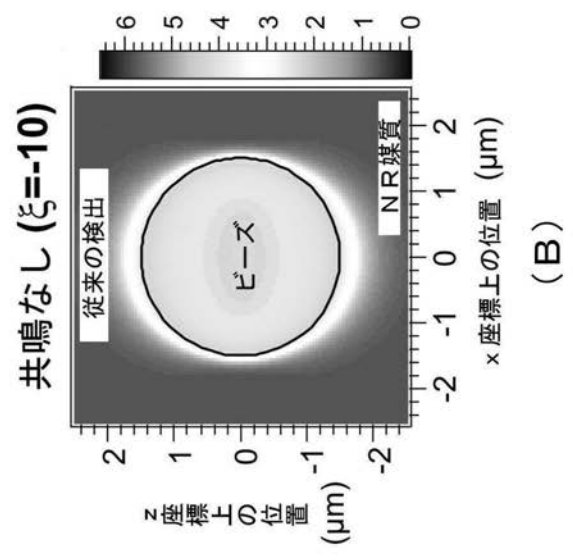
【図 15】



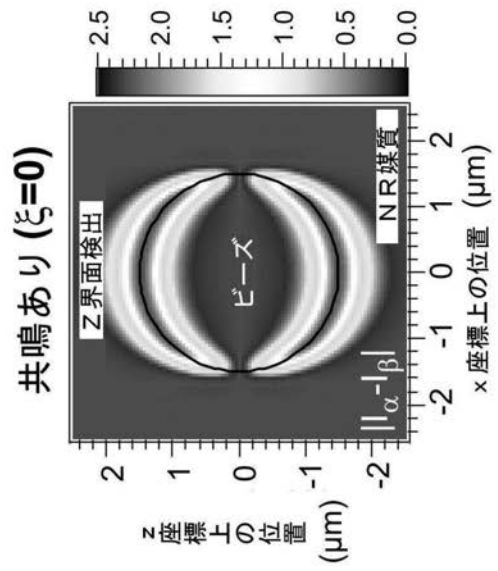
【図 10】



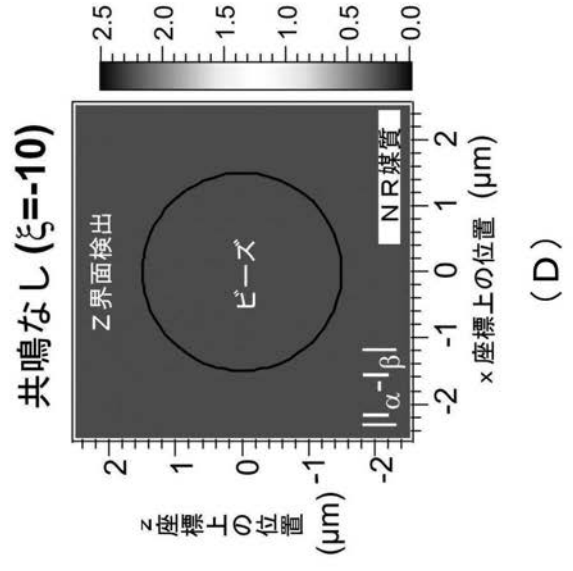
(A)



(B)

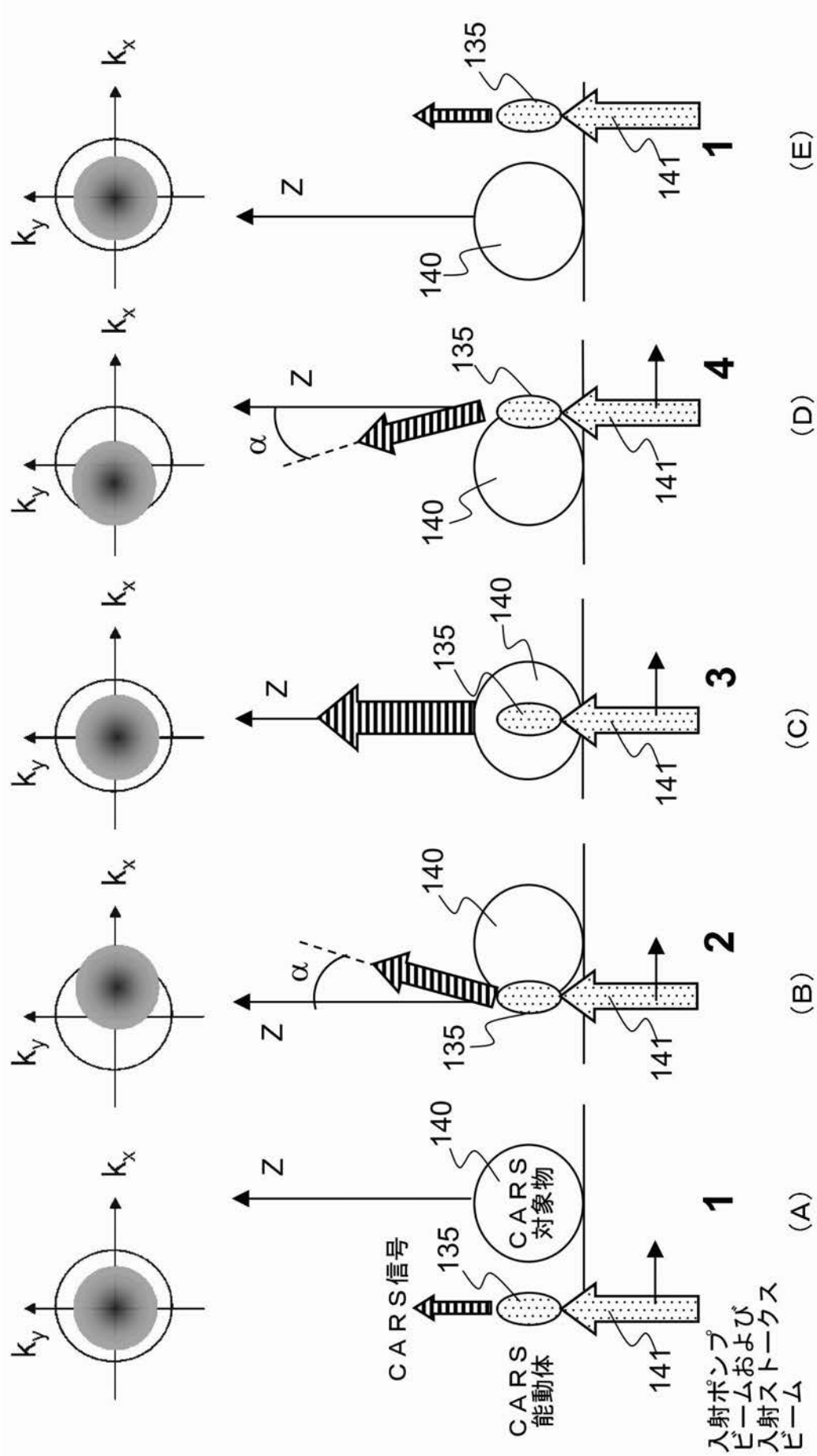


(C)

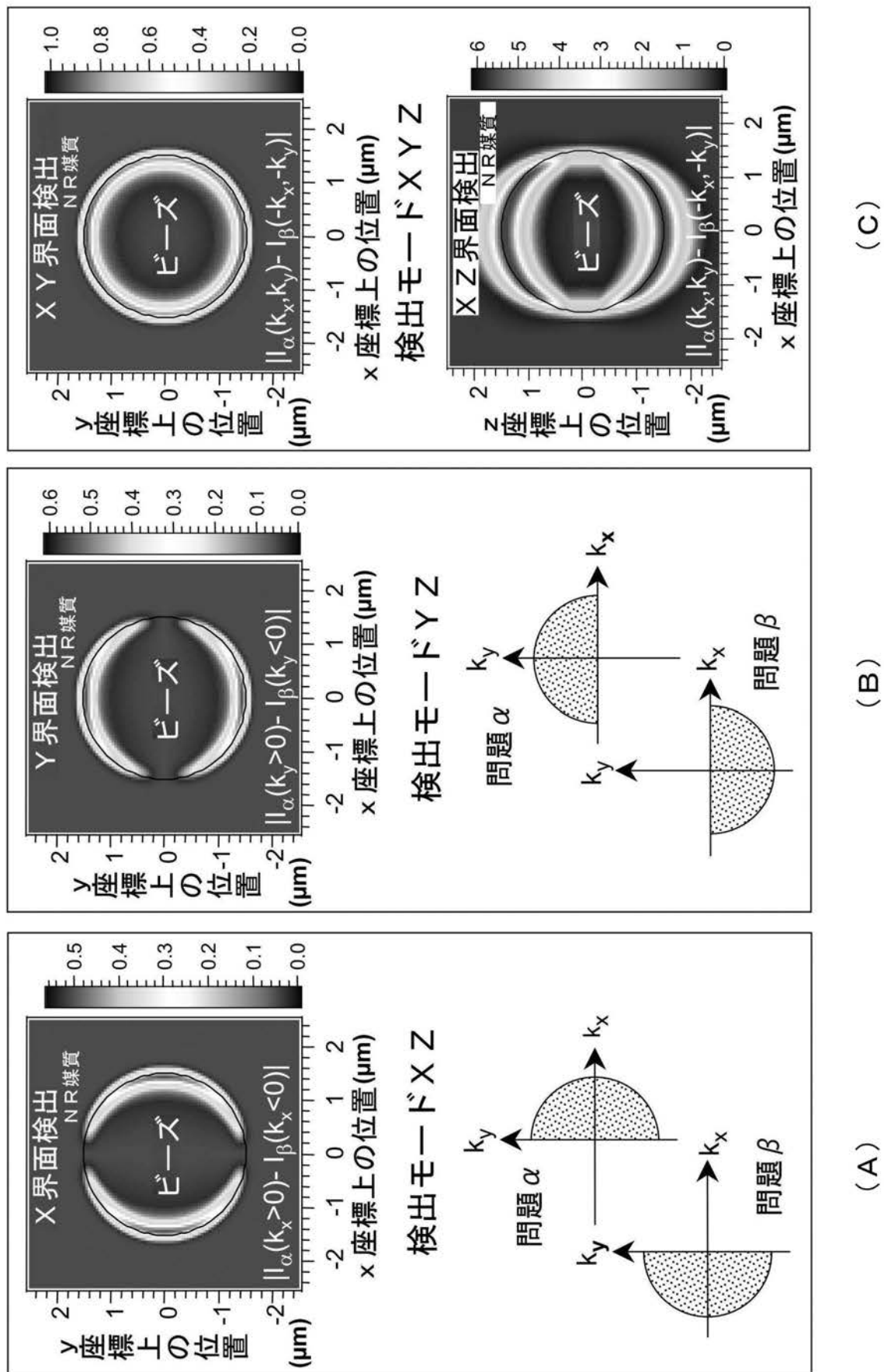


(D)

【図 14】



【図16】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 ガッシュエ、デイヴィッド  
フランス国、F - 2 6 7 6 0 ボーモン - レ - ヴァロンス、リュ デュ フォー 1
- (72)発明者 ブルストレイン、ソフィー  
フランス国、F - 1 3 0 0 6 マルセイユ、リュ セント サフレン 3 0
- (72)発明者 ピラード、フランク  
フランス国、F - 2 1 0 0 0 ディジョン、リュ デ ボルドット 2 1

審査官 波多江 進

- (56)参考文献 Gachet, D et al. , Background-free coherent anti-Stokes Raman spectroscopy near transverse interfaces: a vectorial study , Journal of the Optical Society of America B , 2 0 0 8 年 1 0 月 1 日 , Vol.25, No.10 , pp.1655-1666
- Krishnamachari, V V et al. , Imaging chemical interfaces perpendicular to the optical axis with focus-engineered coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy , Chemical Physics , 2 0 0 7 年 1 1 月 1 5 日 , Vol.341, No.1-3 , pp.81-88
- Gachet, D et al. , Focused field symmetries for background-free coherent anti-Stokes Raman spectroscopy , Physical Review A , 2 0 0 8 年 6 月 2 日 , Vol.77, No.6 , pp.061802-1 - 061802-4

- (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G 0 1 N 2 1 / 6 5

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )