



(12) **Patentschrift**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **11 2017 001 881.1**  
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP2017/014049**  
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2017/175747**  
(86) PCT-Anmeldetag: **04.04.2017**  
(87) PCT-Veröffentlichungstag: **12.10.2017**  
(43) Veröffentlichungstag der PCT Anmeldung  
in deutscher Übersetzung: **13.12.2018**  
(45) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: **18.07.2024**

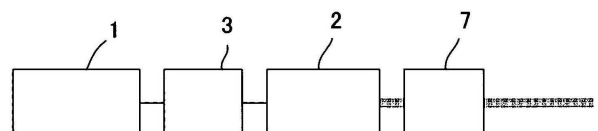
(51) Int Cl.: **G01N 21/64** (2006.01)  
**G01N 21/01** (2006.01)  
**G02B 21/06** (2006.01)  
**G02F 1/365** (2006.01)

Innerhalb von neun Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

<p>(30) Unionspriorität:</p> <table><tr><td><b>2016-076155</b></td><td><b>05.04.2016</b></td><td><b>JP</b></td></tr><tr><td><b>2016-178605</b></td><td><b>13.09.2016</b></td><td><b>JP</b></td></tr></table> <p>(73) Patentinhaber:</p> <p><b>Ushio Denki Kabushiki Kaisha, Tokyo, JP</b></p> <p>(74) Vertreter:</p> <p><b>Maiwald GmbH, 80335 München, DE</b></p>	<b>2016-076155</b>	<b>05.04.2016</b>	<b>JP</b>	<b>2016-178605</b>	<b>13.09.2016</b>	<b>JP</b>	<p>(72) Erfinder:</p> <p><b>Ichihara, Akira, Wako-shi, Saitama, JP; Nakano, Akihiko, Wako-shi, Saitama, JP; Sawada, Aiko, Tokyo, JP; Ota, Aya, Tokyo, JP</b></p> <p>(56) Ermittelter Stand der Technik:</p> <p><b>siehe Folgeseiten</b></p>
<b>2016-076155</b>	<b>05.04.2016</b>	<b>JP</b>					
<b>2016-178605</b>	<b>13.09.2016</b>	<b>JP</b>					

(54) Bezeichnung: **Superkontinuumquelle, Verfahren zum Erzeugen und Emittieren eines Superkontinuums, Multiphotonenanregungs-Fluoreszenzmikroskop und Multiphotonenanregungsverfahren**

(57) Hauptanspruch: Superkontinuumquelle zum Erzeugen und Emittieren eines Superkontinuums, umfassend einen Pulsoszillator, der einen ultrakurzen Lichtpuls oszilliert, und einen Wellenleiter, der so angeordnet ist, dass der oszillierte ultrakurze Lichtpuls von dem Pulsoszillator in ihn eintritt, wobei der oszillierte ultrakurze Lichtpuls durch einen nichtlinearen optischen Effekt in ein Superkontinuum umgewandelt und dann emittiert wird, wobei der Wellenleiter durch den nichtlinearen optischen Effekt den ultrakurzen Lichtpuls in das Superkontinuum mit einem Spektrum umwandelt, das in einer Wellenlängen-Bandbreite von zumindest 200 nm, enthalten in dem Wellenlängenbereich von 850 bis 1550 nm, kontinuierlich ist, dadurch gekennzeichnet, dass der Pulsoszillator und der Wellenleiter dazu ausgebildet sind, das Superkontinuum mit einer Spitzenleistung innerhalb von 1 bis 100 kW zu emittieren, um eine Multiphotonenanregung eines Objekts auf einer bestrahlten Ebene zu ermöglichen, der ultrakurze Lichtpuls von dem Pulsoszillator eine Pulsbreite von nicht mehr als 1 ps aufweist, und ein Pulskompressor vorhanden ist, um die Spitzenleistung des Superkontinuums durch Komprimieren des von dem Wellenleiter emittierten Superkontinuums zu erhöhen.



(56) Ermittelter Stand der Technik:

DE	10 2009 056 092	B4
DE	11 2010 006 131	B3
DE	10 2010 047 578	A1
DE	10 2012 219 977	A1
DE	10 2013 219 338	A1
DE	11 2004 002 187	T5
DE	11 2011 103 954	T5
DE	11 2012 000 796	T5
DE	11 2012 002 271	T5
DE	11 2014 001 410	T5
DE	11 2014 005 158	T5
DE	11 2015 004 310	T5
DE	60 2005 003 148	T2
US	7 277 169	B2
US	7 809 222	B2
US	2004 / 0 057 682	A1
US	2006 / 0 159 398	A1
US	2007 / 0 025 662	A1
US	2007 / 0 216 993	A1
US	2010 / 0 172 018	A1
US	2011 / 0 063 718	A1
US	2012 / 0 049 092	A1
US	2012 / 0 099 340	A1
US	2013 / 0 188 240	A1
US	2013 / 0 301 663	A1
US	2014 / 0 058 367	A1
US	2014 / 0 133 500	A1
US	2014 / 0 369 370	A1
US	2015 / 0 192 732	A1
US	2015 / 0 212 387	A1
EP	2 831 963	B1
EP	3 019 899	B1
WO	2009/ 047 189	A2
CN	1 03 296 566	A
JP	2015- 511 312	A
JP	H11- 174 503	A
JP	2007- 279 704	A
JP	2003- 149 695	A
JP	2008- 216 716	A
JP	H10- 90 737	A

Ranka, J. K.; Windeler, R. S.; Stentz, A. J.:  
Visible continuum generation in air-silica  
microstructure optical fibers with anomalous  
dispersion at 800 nm. In: Opt. Lett., Vol. 25, No. 1,  
Jan 2000, Seiten 25 – 27

**Beschreibung**

[Nicht-Patentdokument]

[Gebiet der Erfindung]

**[0001]** Die Erfindung dieser Anmeldung betrifft das Erzeugen eines Superkontinuums und betrifft die Fluoreszenzmikroskopie.

[Technischer Hintergrund]

**[0002]** Das Phänomen, bei dem ein schmalbandiger, ultrakurzer Lichtpuls mit hoher Spitzenleistung durch nichtlineare optische Effekte spektral verbreitert wird, ist als Superkontinuum bekannt. Die Patentdokumente 1-5 offenbaren bekannte Superkontinuumquellen als Stand der Technik.

**[0003]** Eine Quelle zum Erzeugen und Emittieren eines Superkontinuums (Superkontinuumquelle) umfasst einen Pulsoszillator zum Oszillieren ultrakurzer Lichtpulse und ein nichtlineares optisches Element. Ein Ultrakurzpuls-Laser-Oszillator wird oft als der Pulsoszillator verwendet, und ein Element vom Wellenleitertyp wie z. B. eine nichtlineare Faser wird oft als das nichtlineare optische Element verwendet. Wenn ultrakurze Lichtpulse, die von dem Pulsoszillator oszilliert werden, in den Wellenleiter eintreten, werden sie spektral verbreitert, indem nichtlineare optische Effekte wie Selbstphasenmodulation, gegenseitige Phasenmodulation, Vier-Wellen-Mischung und Ramanstreuung, wenn sie sich durch den Wellenleiter hindurch ausbreiten, als ein Superkontinuum emittiert werden.

[Literaturnachweise zum Stand der Technik]

[Patentdokumente]

[Patentdokument 1] JP H10-90737 A

[Patentdokument 2] JP H11-174503 A

[Patentdokument 3] JP 2003-149695 A

[Patentdokument 4] JP 2007-279704 A

[Patentdokument 5] JP 2008-216716 A

[Patentdokument 6] JP 2015-511312 A

**[0004]** Weitere Superkontinuumquellen sind aus der US 2014/0369370 A1, DE 11 2015 004 310 T5 und der US 2010/0172018 A1 bekannt. Keine dieser Veröffentlichungen offenbart eine Superkontinuumquelle, die einen Pulskompressor aufweist, mit dem die sehr geringe Pulsbreite von höchstens 1 pm eines von einem Pulsoszillator oszillierten Lichtpulses weiter verringert und ein Superkontinuum mit einer hohen Spitzenleistung von 1 bis 100 kW erzeugt wird.

**[0005]** [Nicht-Patentdokument 1] Japanese Journal of Optics: a Publication of the Optical Society of Japan, the Japan Society of Applied Physics 44(1), 11-17, 2015-01

[Zusammenfassung der Erfindung]

[Probleme, die durch die Erfindung gelöst werden sollen]

**[0006]** Hauptsächlich in Erwartung der praktischen Anwendung in der optischen Kommunikation haben Forscher Superkontinua wissenschaftlich untersucht. Um eine höhere Übertragungskapazität zu erreichen, ist eine Multiträger-(Multiplex)-Übertragung erforderlich, und als eine Technik hierfür wurde die Übernahme eines Superkontinuums in Erwägung gezogen. Allerdings hat die praktische Anwendung von Superkontinua aufgrund von Entwicklungen anderer Techniken wie z. B. mehrkernigen strukturierten optischen Fasern keinen großen Fortschritt gezeitigt.

**[0007]** Wenngleich die Situation wie beschrieben ist, weisen Superkontinua Spektralkomponenten in bestimmten verbreiterten Bereichen auf, während Eigenschaften als Laserstrahlen beibehalten werden, und aufgrund dieser überlegenen Eigenschaften werden Superkontinua auf anderen Gebieten als bevorzugt anwendbar betrachtet.

**[0008]** Die Erfindung dieser Anmeldung erfolgte unter Berücksichtigung dieser Punkte und hat das Ziel, eine Superkontinuumquelle vorzusehen, die ein auf einem neuen Gebiet brauchbares Superkontinuum emittiert.

[Mittel zur Lösung des Problems]

**[0009]** Um das beschriebene Ziel zu erreichen, stellt die in dieser Anmeldung beanspruchte Erfindung eine Superkontinuumquelle zum Erzeugen und Emittieren eines Superkontinuums mit den Merkmalen des Anspruch 1 bereit. Bevorzugte Ausführungsformen sind in den von Anspruch 1 abhängigen Ansprüchen beschrieben.

**[0010]** Des Weiteren betrifft die Erfindung, um das beschriebene Ziel zu erreichen, ein Verfahren zum Erzeugen und Emittieren eines Superkontinuums mit den Merkmalen des Anspruchs 7. Bevorzugte Verfahrensvarianten sind den von diesem Anspruch abhängigen Ansprüchen zu entnehmen.

**[0011]** Des Weiteren betrifft die Erfindung, um das beschriebene Ziel zu erreichen, ein Multiphotonenanregungs-Fluoreszenzmikroskop gemäß Anspruch

13 sowie ein Multiphotonenanregungsverfahren gemäß Anspruch 14.

[Wirkung der Erfindung]

**[0012]** Wie später beschrieben, kann die Quelle gemäß der Erfindung, wie in Anspruch 1 oder 7 beansprucht, bevorzugt zur Fluoreszenzbeobachtung, -messung und dergleichen verwendet werden, wo eine Multiphotonenanregung eingesetzt wird, da sie ein Superkontinuum mit einem Spektrum emittiert, das in einer Bandbreite von zumindest 200 nm, enthalten in dem Wellenlängenbereich von 850 bis 1550 nm, kontinuierlich ist, und das Superkontinuum ermöglicht eine Multiphotonenanregung eines Objekts.

**[0013]** Zudem kann die Quelle überdies bevorzugt zur Fluoreszenzbeobachtung biologischer Proben verwendet werden, da die Spitzenleistung innerhalb von 1 bis 100 kW liegt.

**[0014]** Die Quelle ist überdies aufgrund der Wellenlängenflachheit innerhalb von 3 dB weiter reichend verwendbar.

**[0015]** Gemäß der beanspruchten Erfindung kann überdies die hohe Wellenlängenflachheit einfach erreicht werden.

**[0016]** Da ein Superkontinuum mit einem linearen Chirpen erzeugt werden kann, ist die Charakteristik für verschiedene Verwendungen anwendbar.

**[0017]** Es ist überdies einfach, ein Superkontinuum in dem Wellenlängenbereich von 850-1550 nm zu erzeugen oder ein Superkontinuum mit einer höheren Spitzenleistung zu erzeugen.

**[0018]** Es ist überdies möglich, ein linear gechirptes Superkontinuum einfacher zu erhalten, wenn die zentrale Wellenlänge des ultrakurzen Lichtpulses innerhalb des Bereichs  $\pm 50$  nm von der Spitzendispersionswellenlänge im Gruppengeschwindigkeits-Dispersionsspektrum der Faser mit normaler Dispersion liegt.

**[0019]** Es ist überdies möglich, ein Superkontinuum mit hoher Spitzenleistung zu erhalten, da die Spitzenleistung des von dem Wellenleiter emittierten Superkontinuums durch Pulskompression erhöht wird.

**[0020]** Weiterhin ist es möglich, ein Superkontinuum mit hoher Spitzenleistung zu erhalten, da die Spitzenleistung des von dem Wellenleiter emittierten Superkontinuums durch Pulskompression erhöht wird. Dabei ist es möglich, die Kompression einfacher durchzuführen, da das Superkontinuum durch die Faser mit normaler Dispersion linear gechirpt

gemacht und dann der Kompression unterworfen wird.

**[0021]** In einer Ausführungsform ermöglicht überdies ein Laser eine Multiphotonenanregung simultan auf zwei oder mehr Arten von fluoreszierenden Proteinen mit verschiedenen Absorptionswellenlängen in dem Wellenlängenbereich von 850 bis 1550 nm. Durch Vorsehen eines Wellenlängen-Abstimmungsmechanismus ist es selbstverständlich auch möglich, Licht bei einer gewünschten Wellenlänge zu extrahieren, um eine Fluoreszenz durch monochromatische Multiphotonenanregung zu beobachten. Während eine simultane polychromatische Anregung herkömmlicherweise zwei oder mehr Laser benötigte, ist es möglich, ein raumsparendes, weithin einsetzbares Multiphotonenanregungs-Fluoreszenzmikroskop gemäß der Erfindung vorzustellen.

[Kurze Beschreibung der Zeichnungen]

**Fig. 1** ist eine schematische Darstellung einer Superkontinuumquelle in einer ersten Ausführungsform.

**Fig. 2** ist die Figur, die ein Analyseergebnis durch einen Spektrumanalysator für Licht zeigt, das von einem Beispiel der Superkontinuumquelle emittiert wird, die in **Fig. 1** gezeigt ist (Beispiel 1).

**Fig. 3** ist die Figur, die andere Analyseergebnisse für Lichter zeigt, die von Superkontinuum-Erzeugungsquellen emittiert werden, als andere Beispiele (Beispiel 2 und Beispiel 3).

**Fig. 4** ist die Figur, die die spektrale Dispersionscharakteristik eines Wellenleiters zeigt, der in der Superkontinuumquelle in der Ausführungsform vorgesehen ist.

**Fig. 5** ist die Figur, die die spektrale Dispersionscharakteristik einer nichtlinearen Faser zeigt, die als der Wellenleiter in einem Referenzbeispiel verwendet wird.

**Fig. 6** ist die Figur, die ein Analyseergebnis des Spektrums eines Superkontinuums zeigt, das auf der Ausgestaltung des Referenzbeispiels erzeugt wurde.

**Fig. 7** ist eine schematische Darstellung eines Multiphotonenanregungs-Fluoreszenzmikroskops in einer Ausführungsform.

**Fig. 8** ist die Figur, die ein Spektrogramm eines von der Superkontinuumquelle in Beispiel 1 emittierten Superkontinuums zeigt.

**Fig. 9** ist die Figur, die ein Spektrogramm eines von der Superkontinuumquelle im Referenzbeispiel emittierten Superkontinuums zeigt.

**Fig. 10** ist eine schematische Darstellung einer Superkontinuumquelle in einer zweiten Ausführungsform.

**Fig. 11** ist die Figur, die schematisch die Funktion und den Betrieb der Superkontinuumquelle in der zweiten Ausführungsform zeigt.

**Fig. 12** ist eine schematische Darstellung eines Pulscompressors, der für die Superkontinuumquelle in der zweiten Ausführungsform verwendet wird.

**Fig. 13** ist die Figur, die das Ergebnis eines Experiments zeigt, bei dem die Erhöhung einer Spitzenleistung in der zweiten Ausführungsform bestätigt wurde.

**Fig. 14** ist die Figur, die das Superkontinuum von **Fig. 13** als ein Spektrogramm zeigt.

**Fig. 15** ist eine schematische Darstellung, die andere Ausgestaltungsbeispiele zur Lichtextraktion zeigt.

**Fig. 16** ist eine schematische Darstellung, die eine andere Ausgestaltung für den Pulscompressor zeigt.

**Fig. 17** ist eine schematische Darstellung, die eine weitere Ausgestaltung für den Pulscompressor zeigt.

#### [Ausführungsformen der Erfindung]

**[0022]** Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden wie folgt beschrieben. **Fig. 1** ist eine schematische Darstellung der Superkontinuumquelle in der ersten Ausführungsform. Der Betrieb der Superkontinuumquelle in der Ausführungsform ist in der folgenden Beschreibung enthalten. Dies entspricht der Beschreibung eines Superkontinuum-Erzeugungsverfahrens in einer Ausführungsform der Erfindung.

**[0023]** Das Hauptmerkmal der Superkontinuumquelle in dieser Ausführungsform ist, dass sie ein Superkontinuum mit einer Photonendichte emittiert, die nicht kleiner ist als die minimale Dichte, die zu einer Multiphotonenanregung eines Objekts in der Lage ist. Das heißt, die Superkontinuumquelle in der Ausführungsform ist als eine Lichtquelle für Multiphotonenanregung ausgestaltet.

**[0024]** Ein Multiphotonenanregungs-Fluoreszenzmikroskop wird als eine bevorzugte Anwendung dieser Superkontinuumquelle betrachtet.

**[0025]** Die Fluoreszenzmikroskopie ist die Art von Mikroskopie, bei der ein Objekt beobachtet wird, indem Fluoreszenzemission von dem Objekt erfasst wird, das von Anregungslicht bestrahlt wird. Dies war insbesondere auf solchen Gebieten wie der biotechnologischen Forschung und der Beobachtung biolo-

gischer Proben eine bedeutsame Technik. Fluoreszenzmikroskope besitzen die Merkmale, dass nur ein Teil eines Objekts durch Färben beobachtet werden kann und dass die Aktivität einer Zelle als lebendig beobachtet werden kann.

**[0026]** In den letzten Jahren wurde die Technik der Zwei-Photonen-Anregungs-Fluoreszenzmikroskopie in der Fluoreszenzmikroskopie entwickelt. Während eine Fluoreszenzemission normalerweise durch Lichtanregung mit Absorption eines Photons in ein Molekül hinein verursacht wird, werden zwei Photonen simultan absorbiert, um angeregt zu werden, und dann wird eine Fluoreszenz in der Zwei-Photonen-Anregung bewirkt. Theoretisch ist es möglich, dass drei oder mehr Photonen simultan dazu gebracht werden, zur Anregung absorbiert zu werden. Die Fluoreszenzmikroskopie, die zwei oder mehr Photonen dazu bringt, simultan zur Anregung absorbiert zu werden, wird als Multiphotonenanregungs-Fluoreszenzmikroskopie bezeichnet. Die detaillierte Ausgestaltung eines Multiphotonenanregungs-Fluoreszenzmikroskops ist z. B. in dem Nicht-Patentdokument 1 offenbart.

**[0027]** Die Multiphotonen-Anregungsmikroskopie ist verglichen mit anderen Arten von Fluoreszenzmikroskopie in mehreren Punkten vorteilhaft. Einer davon ist die Fähigkeit der einfachen Wellenlängentrennung. In der Fluoreszenzmikroskopie ist es erforderlich, eine Fluoreszenz von Licht bei der Anregungswellenlänge zu trennen, um nur die Fluoreszenz zu beobachten. Die Wellenlänge einer Fluoreszenz liegt allerdings oft nahe bei der Anregungswellenlänge, wobei sie in der normalen Fluoreszenzmikroskopie, d. h. in der Ein-Photonen-Anregungs-Fluoreszenzmikroskopie, schwierig zu trennen ist. Solch ein Element wie ein Sperrfilter kann verwendet werden, um das Anregungslicht zu eliminieren, um nur eine Fluoreszenz zu extrahieren. Allerdings überlappt das Wellenlängenband einer Fluoreszenz oft mit dem Wellenlängenband des Anregungslichts, und die Fluoreszenz könnte oft beim Eliminieren des Anregungslichts eliminiert werden. Infolgedessen ist es unmöglich, die Fluoreszenz mit ausreichender Intensität zu erfassen.

**[0028]** Hingegen wird bei der Zwei-Photonen-Anregung die Trennung durch solch ein Element wie ein Sperrfilter erleichtert, und es ist möglich, eine Fluoreszenz ohne Verlust zu beobachten, da die Anregungswellenlänge doppelt so lang ist wie die Wellenlänge der Fluoreszenz.

**[0029]** Ein anderer Vorteil der Multiphotonenanregungs-Fluoreszenzmikroskopie besteht darin, dass die Fluoreszenzbeobachtung an jeder beliebigen Position in Tiefenrichtung ermöglicht wird. Bei einer Multiphotonenanregung müssen zwei oder mehr Photonen innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne

(ca.  $10^{-16}$  Sekunden, im Wesentlichen gleichzeitig) mit einem fluoreszierenden Molekül zusammenstoßen, und deshalb ist eine sehr hohe Photonendichte erforderlich. Wenn Anregungslicht in einem Objekt konzentriert wird, das bis zu einem gewissen Grad für das Anregungslicht transparent ist, wird daher eine Multiphotonenanregung nur an dem Konzentrationspunkt verursacht, und somit kann nur die Fluoreszenzemission an dem Punkt beobachtet werden. Darüber hinaus ermöglicht eine Verschiebung der Konzentrationsposition eine Beobachtung an jeder beliebigen gewünschten Position in der Tiefenrichtung. Es hat demzufolge den Pinhole-Effekt wie in konfokalen Mikroskopen, was auch zu keinem Verlust von Fluoreszenzemission führt, da kein Pinhole erforderlich ist. Dies ist z. B. insbesondere dann der Vorzug davon, wenn das Innere einer biologischen Probe beobachtet werden soll.

**[0030]** Um eine Multiphotonenanregung zu erreichen, ist es notwendig, die Photonendichte temporär und räumlich zu erhöhen. Deshalb wird ein Ultrakurzpuls-Laseroszillator, der einen Lichtpuls innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne, z. B. in der Größenordnung von Femtosekunden, emittiert, als eine Lichtquelle verwendet. Die auf dem Laseroszillator erzeugte Gesamtleistung wird in einer kurzen Zeitspanne konzentriert, wodurch eine hohe Photonendichte erreicht wird, die für eine Multiphotonenanregung erforderlich ist.

**[0031]** Infolge einiger Probleme ist die Multiphotonenanregungs-Fluoreszenzmikroskopie, wie beschrieben, nicht weit verbreitet, wobei sie nur zum Teil in der Praxis zum Einsatz kommt. Ein Grund dafür ist der, dass der Freiheitsgrad im Beobachtungszustand extrem niedrig ist.

**[0032]** Wie gut bekannt ist, ist die Anregungswellenlänge abhängig von fluoreszierenden Molekülen verschieden und auch die Wellenlänge der Fluoreszenzemission ist verschieden. Beim Beobachten einer anderen Art von Proben ist es daher notwendig, sie in fast allen Fällen mit Anregungslicht bei einer unterschiedlichen Wellenlänge zu bestrahlen. Für herkömmliche Multiphotonenanregungs-Fluoreszenzmikroskopie wird, da Ultrakurzpuls-Laseroszillatoren mit verschiedenen Emissionswellenlängen benötigt werden, um Anregungslicht bei verschiedenen Wellenlängen anzuwenden, logischerweise ein Ultrakurzpuls-Laseroszillator für jede Art von zu beobachtenden fluoreszierenden Molekülen benötigt. Wie gut bekannt ist, sind Ultrakurzpuls-Laseroszillatoren sehr teure Vorrichtungen, und deshalb liegt es weit jenseits des realisierbaren Bereichs, jeden individuellen Ultrakurzpuls-Laseroszillator für jede verschiedene Art von fluoreszierenden Molekülen herzustellen.

**[0033]** Das Patentdokument 6 offenbart ein Multiphotonenanregungs-Fluoreszenzmikroskop, das ein Paar Ultrakurzpuls-Laseroszillatoren verwendet, um drei verschiedenartige fluoreszierende Moleküle zu beobachten. Gemäß dieser Offenbarung ist, wenn gleich die Anzahl der Ultrakurzpuls-Laser kleiner sein kann als die Zahl der Arten von zu beobachtenden fluoreszierenden Molekülen, dennoch ein Paar von Ultrakurzpuls-Laseroszillatoren notwendig, und somit sind die höheren Kosten kein geringes Problem.

**[0034]** Bei dem Multiphotonenanregungs-Fluoreszenzmikroskop im Patentdokument 6 ist es außerdem notwendig, Ultrakurzpuls-Laserstrahlen von dem Paar Ultrakurzpuls-Laseroszillatoren innerhalb des Konzentrationspunktes zeitlich und räumlich zu überlappen. Das Erfordernis eines sehr komplizierten Mechanismus und Steuersystems in großem Maßstab wirft zusätzlich zu dem Kostenproblem das Problem von Schwierigkeiten bei der Einstellbarkeit auf.

**[0035]** Einige praktisch verwendbare Multiphotonenanregungs-Fluoreszenzmikroskope verwenden die Ausgestaltung, bei der ein Wellenlängen-Abstimmungsmechanismus in einem Ultrakurzpuls-Laseroszillator eingebaut ist, d. h. eine abstimmbare Laserausgestaltung. Diese Art von Abstimmungsmechanismus verwendet allerdings ein nichtlineares optisches Element wie z. B. einen OPO (optischer parametrischer Oszillator) mit dem Problem, dass eine mühsame Arbeit für die Wellenlängeneinstellung wie z. B. eine Phasen Anpassung erforderlich ist.

**[0036]** Der Erfinder ging davon aus, dass jedes beschriebene Problem für Multiphotonenanregungs-Fluoreszenzmikroskope durch Anwenden eines Superkontinuums gelöst werden könnte, und unternahm gründliche Forschungen. Die Superkontinuumquelle in der Ausführungsform basiert auf dem Ergebnis dieser Forschung.

**[0037]** Konkret umfasst die Superkontinuumquelle in der in **Fig. 1** gezeigten Ausführungsform einen Pulsoszillator 1, der ultrakurze Lichtpulse oszilliert, und einen Wellenleiter 2, um einen nichtlinearen optischen Effekt zu bewirken. Ein Ultrakurzpuls-Laser wird als der Pulsoszillator 1 verwendet. Dieser Ultrakurzpuls-Laser oszilliert ultrakurze Pulse in der Größenordnung von Femtosekunden, und die Pulsbreite beträgt 1 ps (Picosekunde) oder weniger. Die zentrale Wellenlänge des Ultrakurzpuls-Lasers liegt bevorzugt innerhalb von etwa 1000-1100 nm. Insbesondere kann es ein Ultrakurzpuls-Faserlaser sein, der einen Seltenerd-, z. B. Yb-dotierten Faser- oder Ultrakurzpuls-Laser verwendet, der einen Kristall auf Yb-Basis, z. B. Yb: KYW, verwendet, der durch eine Laserdiode angeregt wird.

**[0038]** Der Wellenleiter 2 dient dazu, ein Superkontinuum aus dem ultrakurzen Lichtpuls durch einen nichtlinearen optischen Effekt zu erzeugen, d. h., es handelt sich um einen nichtlinearen Wellenleiter. In dieser Ausführungsform wird eine optische Faser als der Wellenleiter 2 verwendet, der bevorzugt eine stark nichtlineare Faser ist. Die nichtlineare Faser als der Wellenleiter 2 kann eine schleifenförmige, flexible oder eine stabförmige sein. In dieser Ausführungsform ist ein Polarisations-Steuerelement 3 zwischen dem Pulsoszillator 1 und dem Wellenleiter 2 vorgesehen. Das Polarisations-Steuerelement 3 dient dazu, den nichtlinearen optischen Effekt auf dem Wellenleiter 2 zu verstärken und die ultrakurzen Lichtpulse zu gemäß den Charakteristika des Wellenleiters 2 polarisierten zu machen, bevor sie in diesen eintreten. Eine Wellenlängenplatte wie z. B. eine 1/2- oder 1/4-Wellenlängenplatte wird als das Polarisations-Steuerelement 3 verwendet. In dieser Ausführungsform macht das Polarisations-Steuerelement 3 den ultrakurzen Lichtpuls zu einem in einer gemäß der Charakteristik des Wellenleiters 2 gewünschten Richtung linear polarisierten. Die lineare Polarisation ist nur ein Beispiel, das die Erfindung nicht einschränkt.

**[0039]** Die Superkontinuumquelle in dieser Ausführungsform ist jene, die ein Superkontinuum mit einem kontinuierlichen Spektrum innerhalb eines Bandes von zumindest 200 nm, enthalten in dem Wellenlängenbereich von 850-1550 nm, emittiert. In dieser Ausführungsform emittiert die Superkontinuumquelle auch ein Superkontinuum, wobei die temporäre Spitzenleistung 1 kW oder mehr beträgt. Diese Punkte sind mit einem spezifischeren Beispiel beschrieben.

**[0040]** Fig. 2 ist die Figur, die ein Analyseergebnis durch einen Spektrumanalysator für Licht zeigt, das von der Superkontinuumquelle in der in Fig. 1 gezeigten Ausführungsform (Beispiel 1) emittiert wird. Fig. 2 (1) ist die Figur, die eine Pulsform zeigt, d. h. eine Änderung der Emissionsintensität (wellenlängenintegrierte Intensität) im Zeitverlauf. Fig. 2 (2) ist die Figur, die die spektrale Verteilung des emittierten Lichts mit der Pulsform von (1) zeigt, welche Energie pro Wellenlänge bei jeder Wellenlänge in einem Puls ist.

**[0041]** Dieses Beispiel verwendet einen Puls laser mit einem Kristall auf Yb-Basis, der Lichtpulse von 1045 nm in der zentralen Wellenlänge und 200 fs in der Pulsbreite emittiert, als den Pulsoszillator 1. Wie in Fig. 2 (1) gezeigt, beträgt die temporäre Spitzenleistung eines von dem Wellenleiter 2 emittierten Lichtpulses ca. 2 kW. Wie in Fig. 2 (2) gezeigt, ist der emittierte Lichtpuls innerhalb des Bereiches von etwa 800-1400 nm kontinuierlich, und somit wurde die Superkontinuum-Erzeugung bestätigt.

**[0042]** In der Superkontinuumquelle in der Ausführungsform beträgt die Wellenlängenflachheit der Superkontinuum-Emission 3 dB oder weniger. Unter Wellenlängenflachheit ist eine Intensitätsgleichmäßigkeit unter spektralen Komponenten zu verstehen, mit anderen Worten, eine Geringfügigkeit spektraler Intensitätsungleichmäßigkeit. „3dB oder weniger“ bedeutet, dass die Intensität bei der Wellenlänge höchster Intensität innerhalb von 3 dB gegenüber der Intensität bei der Wellenlänge niedrigster Intensität liegt. Wie in Fig. 2 (2) gezeigt, weist das Superkontinuum durch die Superkontinuumquelle in Beispiel 1 die Intensitätsungleichmäßigkeit innerhalb von 3 dB in dem Bereich von etwa 850 bis 1250 nm auf.

**[0043]** Wellenlängenflachheit innerhalb von 3 dB ist mit anderen Beispielen in näherem Detail beschrieben. Fig. 3 ist die Figur, die Analyseergebnisse von Licht zeigt, das von Superkontinuumquellen emittiert wird, als zwei andere Beispiele (Beispiel 2 und Beispiel 3).

**[0044]** Fig. 3(1) zeigt Beispiel 2, bei dem ein optisches parametrisch verstärktes System (OPA, vom engl. optical parametric amplified) von 1100 nm in der zentralen Wellenlänge und 1 ps in der Pulsbreite für den Pulsoszillator 1 verwendet wurde. In diesem Beispiel wurde die Wellenlängenflachheit innerhalb von 3 dB in dem Wellenlängenbereich von etwa 850-1550 nm erhalten.

**[0045]** Fig. 3(2) zeigt ferner Beispiel 3, wo ein Yb-dotierter Faserlaseroszillator von 1030 nm in der zentralen Wellenlänge und 170 fs in der Pulsbreite für den Pulsoszillator 1 verwendet wurde. Auch in diesem Beispiel wurde die Wellenlängenflachheit innerhalb von 3 dB in dem Wellenlängenbereich von etwa 950-1150 nm erhalten.

**[0046]** Das beschriebene überlegene Leistungsvermögen der Superkontinuumquelle in der Ausführungsform, das heißt die hohe Wellenlängenflachheit, wird stark durch die Charakteristika des Wellenleiters 2 beeinflusst. Dieser Punkt wird wie folgt beschrieben.

**[0047]** Als den Wellenleiter 2 verwendet die Superkontinuumquelle in der Ausführungsform eine nichtlineare Faser mit normaler Dispersion in dem Bereich von Emissionswellenlängen. Fig. 4 ist die Figur, die die spektrale Dispersionscharakteristik des Wellenleiters 2 für die Superkontinuumquelle in der Ausführungsform zeigt.

**[0048]** Auf dem Gebiet der optischen Kommunikation ist es wichtig, die Gruppengeschwindigkeitsdispersion (GVD, vom engl. group velocity dispersion) zu reduzieren, die eine der grundlegenden Charakteristika für optische Fasern ist. Im Gegensatz dazu

erhöht eine zur Superkontinuum-Erzeugung verwendete nichtlineare optische Faser die Gruppengeschwindigkeitsdispersion durch einen nichtlinearen optischen Effekt, und verbreitert dadurch die Bandbreite. Als Gruppengeschwindigkeitsdispersionscharakteristika sind normale Dispersion und anomale Dispersion bekannt.

**[0049]** In diesen weist die nichtlineare Faser, die als der Wellenleiter 2 in der Ausführungsform verwendet wird, eine normale Dispersion auf, wie in **Fig. 4** gezeigt. Das heißt, die GVD dieses Wellenleiters 2 ist innerhalb des Bereichs von 800 - 1600 nm negativ. Die nichtlineare Faser in diesem Beispiel weist die maximale GVD, die ca. -30 ps/nm/km beträgt, bei ca. 1000-1100 nm auf. Solch eine nichtlineare Faser wird als NL-1050-NEG-1 von NKT Photonics A/S, Dänemark, vertrieben und ist dort erhältlich. In Beispiel 1 beträgt die Länge der nichtlinearen Faser, die als der Wellenleiter 2 verwendet wird, 500 mm.

**[0050]** Unter Verwendung des Wellenleiters 2 mit normaler Dispersion im Emissionswellenlängenbereich, wie beschrieben, weist das Superkontinuum bevorzugte Wellenlängenkomponenten ohne spektrale Leerstellen noch extreme Spitzen (ultraschmalbandige intensive Wellen) auf. Es folgt die Beschreibung des Ergebnisses eines Vergleichsexperiments, bei dem dieser Punkt bestätigt wurde.

**[0051]** In diesem Experiment wurde eine nichtlineare Faser, die keine normale Dispersion in dem Wellenlängenbereich von 850-1550 nm aufwies, anstelle der in Beispiel 1 beschriebenen verwendeten nichtlinearen Faser als der Wellenleiter 2 verwendet, und es wurde in ähnlicher Weise ein Superkontinuum erzeugt, um das Spektrum desselben zu analysieren. Andere Bedingungen als die Verwendung der nichtlinearen Faser, die keine normale Dispersion aufwies, waren die gleichen wie in Beispiel 1. „Keine normale Dispersion in dem Wellenlängenbereich von 850-1550 nm aufweisen“ bedeutet, dass die Dispersion in einem Teil des oder dem gesamten Wellenlängenbereich/s von 850-1550 nm anomal ist.

**[0052]** **Fig. 5** ist die Figur, die die spektrale Dispersionscharakteristik der nichtlinearen Faser zeigt, die als der Wellenleiter 2 im Referenzbeispiel verwendet wird. Wie in **Fig. 5** gezeigt, ist die GVD der nichtlinearen optischen Faser, die im Referenzbeispiel als der Wellenleiter 2 verwendet wird, in dem Wellenlängenbereich von mehr als 1040 nm positiv (anomal). Im Spezielleren wurde eine nichtlineare Faser SC-5.0-1040, die von NKT Photonics A/S vertrieben wird, für den Wellenleiter 2 im Referenzbeispiel verwendet. Diese Faser wies eine Länge von 1000 mm auf.

**[0053]** **Fig. 6** ist die Figur, die das Analyseergebnis für das Spektrum eines im Referenzbeispiel erzeug-

ten Superkontinuums zeigt. Ebenso wie **Fig. 2** zeigt **Fig. 6(1)** die Änderung der Emissionsintensität (wellenlängenintegrierte Intensität) im Zeitverlauf, und **Fig. 6(2)** ist die Figur, die die zeitintegrierte Energie pro Wellenlänge bei jeder Wellenlänge in einem Puls zeigt.

**[0054]** In dem Referenzbeispiel, wie in **Fig. 6(2)** gezeigt, umfasst das beobachtete Spektrum des Superkontinuums eine Menge von spitzenförmigen Spitzen, die keine flache Verteilung sind. Das heißt, die Wellenlängenflachheit von 3dB oder weniger wird zumindest in 950-1150 nm nicht erreicht. Der Grund dafür ist vermutlich der folgende. Da die GVD positiv ist, wird die Ausbreitungsgeschwindigkeit einer Welle längerer Wellenlänge, die ursprünglich (früh) in einem ultrakurzen Puls erzeugt wurde, verzögert, und die Ausbreitungsgeschwindigkeit einer Welle kürzerer Wellenlänge, die darin später erzeugt wurde, wird erhöht. Infolgedessen werden nichtlineare optische Effekte wie Selbstaufsteilung, induzierte Raman-Streuung und optisches Soliton verursacht. Somit kann das Spektrum des Superkontinuums eine Menge von Spikes umfassen, wie in **Fig. 6(2)** gezeigt, wenngleich es in dem Wellenlängenband breiter geworden ist. Wie in **Fig. 2(2)** gezeigt, wird hingegen das Superkontinuum mit der hohen Wellenlängenflachheit ohne Spike-Rauschen erhalten, wenn die nichtlineare Faser mit normaler Dispersion als der Wellenleiter 2 verwendet wird.

**[0055]** Wie beschrieben, kann die Superkontinuumquelle in der Ausführungsform zur Fluoreszenzbeobachtung und -messung eines Objekts mittels Multiphotonenanregung verwendet werden, da das Superkontinuum zumindest in 200 nm Bandbreite, enthalten in dem Wellenlängenbereich von 850 bis 1550 nm kontinuierlich ist, und da das Superkontinuum in der Lage ist, eine Multiphotonenanregung auf einem Objekt durchführen.

**[0056]** Außerdem steht die Quelle aufgrund der Wellenlängenflachheit innerhalb von 3 dB für umfassendere Anwendungen zur Verfügung. Überdies kann, da die nichtlineare Faser mit normaler Dispersion als der Wellenleiter 2 verwendet wird, die hohe Wellenlängenflachheit einfach erhalten werden. Wenn eine nichtlineare Faser, die keine normale Dispersion aufweist, als der Wellenleiter 2 verwendet wird, ist es notwendig, nichtlineare optische Effekte höherer Ordnung zu steuern oder einzustellen, um die hohe Wellenlängenflachheit zu erhalten. Dies ist jedoch sehr schwierig.

**[0057]** Der Punkt, dass der Pulsoszillator ultrakurze Lichtpulse von 1000 bis 1100 nm in der zentralen Wellenlänge und 1 ps in der Pulsbreite emittiert, bringt die Effekte mit sich, dass ein Superkontinuum in dem Wellenlängenband von 850-1550 nm einfach erzeugt werden kann und dass ein Superkontinuum

mit der hohen Spitzenleistung einfach erzeugt werden kann. Das heißt, wenn die Pulsbreite der ultrakurzen Lichtpulse länger als 1 ps ist, kann das Superkontinuum kein Breitbandspektrum aufweisen. Wenn die zentrale Wellenlänge der ultrakurzen Lichtpulse in dem Bereich von 1000-1100 nm liegt, kann das Superkontinuum einfach ein durch einen nichtlinearen optischen Effekt über zumindest 200 nm verbreitertes Spektrum in dem Bereich von 850-1550 nm aufweisen.

**[0058]** Als Nächstes wird ein Multiphotonenanregungs-Fluoreszenzmikroskop gemäß einer Ausführungsform der Erfindung beschrieben.

**[0059]** Fig. 7 ist eine schematische Darstellung des Multiphotonenanregungs-Fluoreszenzmikroskops in der Ausführungsform. Das in Fig. 7 gezeigte Multiphotonenanregungs-Fluoreszenzmikroskop umfasst eine Superkontinuumquelle 4, ein optisches System 5 zum Bestrahlen eines Objekts S mit einem von der Superkontinuumquelle 4 emittierten Superkontinuum und einen Detektor 6 zum Detektieren einer Fluoreszenz, die von dem durch die Superkontinuum-Bestrahlung angeregten Objekts emittiert wird. Die Superkontinuumquelle 4 ist die beschriebene, die den Pulsoszillator 1, das Steuerelement 3 für polarisiertes Licht und den Wellenleiter 2 aufweist.

**[0060]** Das optische System 5 umfasst in dieser Ausführungsform mehrere Linsen 51, einen dichroitischen Spiegel 52, eine Scanspiegeleinheit 53 und eine Objektivlinse 54. Die Linsen 51 sind angeordnet, um das Strahlmuster des emittierten Superkontinuums zu modifizieren und/oder die Strahlgröße desselben zu verändern. Der dichroitische Spiegel 52 ist angeordnet, um das Superkontinuum als Anregungslicht und eine durch die Anregung emittierte Fluoreszenz zu trennen.

**[0061]** Die Objektivlinse 54 ist angeordnet, um das Superkontinuum auf das Objekt S zu konzentrieren. Im Speziellen ist die Objektivlinse 54 in der Lage, das Superkontinuum auf eine gewünschte Tiefenposition im Objekt S zu konzentrieren, das eine biologische Probe sein könnte.

**[0062]** Das Multiphotonenanregungs-Fluoreszenzmikroskop in der Ausführungsform ist eine Art von Laser-Scanning-Mikroskopen mit der Scanspiegeleinheit 53, um den Lichtkonzentrationspunkt auf einer Beobachtungsebene vertikal zu der optischen Achse zu rastern. Die Scanspiegeleinheit 53 umfasst ferner ein Paar Scanspiegel 531, an die ein Antriebsmechanismus (in der Figur nicht gezeigt) bereitgestellt ist, um die Lage jedes Scanspiegels 531 individuell zu verändern. Der Lichtkonzentrationspunkt durch die Objektivlinse 54 wird auf einer X-Y-Ebene vertikal zu der optischen Achse gerastert, wenn der

Antriebsmechanismus jeden Scanspiegel 531 ansteuert.

**[0063]** Ein Photomultiplier oder eine Lawinenphotodiode etc. wird als der Detektor 6 verwendet. Die Bildgebungsvorrichtung 61 ist die Vorrichtung, die den Ausgang von dem Detektor 6 speichert, ein 2D-Bild davon oder 3D-Bild durch Überlagerung von 2D-Bildern beschafft und das Bild als ein Beobachtungsergebnis anzeigt.

**[0064]** Die Bildgebungsvorrichtung 61 speichert den Ausgang von dem Detektor 6 in einem Speicher (RAM) synchron mit dem Rastern durch die Scanspiegeleinheit 53. Der Ausgang umfasst jedes Intensitätssignal der von jedem Konzentrationspunkt emittierten Fluoreszenz. Somit wird ein Bild in einem Frame mit dem den Intensitätssignalen entsprechenden Kontrast visualisiert. Wenn die Objektivlinse 54 betrieben wird, um den Lichtkonzentrationspunkt zu verändern, da er auf einem anderen Beobachtungsplan liegt, wird ein 3D-Beobachtungsbild durch Speichern desselben als neue Bilddaten und Integrieren desselben mit anderen Bilddaten auf anderen Beobachtungsplänen hergestellt. Somit umfasst, um die Datenverarbeitung durchzuführen, wie beschrieben, die Bildgebungsvorrichtung 61 einen Prozessor und ein durch den Prozessor ausführbares Programm, und sie umfasst eine Anzeige zum Anzeigen der Bilder.

**[0065]** Ein Filter 62 zum Extrahieren nur einer zu beobachtenden Fluoreszenz ist in dem optischen Pfad auf der Einfallsseite zu dem Detektor 6 angeordnet. Der Filter 62 kann ein Sperrfilter, ein Bandpassfilter oder dergleichen sein.

**[0066]** Eine Pinhole-Platte kann auf dem optischen Pfad auf der Einfallsseite zu dem Detektor 6 angeordnet sein. Das Pinhole befindet sich im Brennpunkt durch die Objektivlinse 54, wie auch das Objekt S, d. h. sie ist konfokal hergestellt, wodurch die Ausgestaltung eines so genannten konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops gebildet wird. Diese Lösung ermöglicht es, ein klares Bild zu erhalten, bei dem Rauschen in der Tiefenrichtung eliminiert wird.

**[0067]** In dem Multiphotonenanregungs-Fluoreszenzmikroskop in der Ausführungsform ermöglicht die Superkontinuumquelle 4 die Beobachtung von durch Multiphotonen angeregter Fluoreszenz in einem Objekt. Dieser Punkt wird wie folgt beschrieben.

**[0068]** Unabhängig davon, ob eine Beobachtung von durch Multiphotonen angeregter Fluoreszenz möglich ist oder nicht und ob sie eine hinreichende Intensität zur Beobachtung (d. h. zur Bildgebung) an einem Mikroskop aufweist, kann eine Fluoreszenz durch Multiphotonenanregung emittiert werden.

Demzufolge hängt sie letztlich von der Photonendichte des Anregungslichts ab. Da die Objektivlinse 54 Anregungslicht auf einen Punkt konzentriert, der bei der Bildgebung einem Pixel entspricht, ist es tatsächlich gleichgültig, ob die Anzahl oder Dichte der Photonen an dem Punkt nicht kleiner ist als die Menge, die zu einer durch Multiphotonen angeregten Fluoreszenzbeobachtung in der Lage ist. Wenn gleich theoretisch eine Anregung durch drei oder mehr Photonen möglich ist, wird eine Zwei-Photonen-Anregung herangezogen.

**[0069]** In der folgenden Beschreibung wird eine Anregung eines EGFP (vom engl. enhanced green fluorescent protein, deutsch: verstärktes grün fluoreszierendes Protein) durch Licht mit der Wellenlänge von 1000 nm als ein Beispiel herangezogen.

**[0070]** Während der Zustand eines EGFP als Objekt S gezeigt ist, wird angenommen, dass die EGFP-Dichte (Expressionsdichte) in einer Zelle  $1 \times 10^{-5}$  M beträgt, und es wird angenommen, dass der Brechungsindex einer Lösung, in der die EGFP-enthaltende Zelle eingetaucht ist, 1,47 beträgt. Die Quanteneffizienz des EGFP wird mit 0,6 angenommen.

**[0071]** Andererseits ist unter der Fähigkeit einer multiphotonen-angeregten Fluoreszenzbeobachtung zu verstehen, dass eine Fluoreszenz (üblicherweise mit der halben Wellenlänge des Anregungslichts) durch Multiphotonenanregung auf dem Detektor 6 erfasst und in elektrische Signale umgewandelt wird, die ein beobachtbares Bild ergeben. Es ist daher notwendig, die Bedingungen des optischen Systems 5 und des Detektionssystems zu berücksichtigen.

**[0072]** Es wird angenommen, dass die Größe einer X-Y-Ebene (Beobachtungsebene), in der die Scanspiegeleinheit 53 das Rastern durchführt, zum Beispiel  $512 \times 512$  Pixel beträgt. Das bedeutet, dass Anregungslicht an jedem der  $512 \times 512$  Punkte konzentriert wird, um eine Fluoreszenz durch Zwei-Photonen-Anregung zu emittieren. Dabei wird angenommen, dass die Größe eines Pixels, die dem Strahldurchmesser an dem Lichtkonzentrationspunkt durch die Objektivlinse entspricht,  $1 \mu\text{m}$  im Durchmesser beträgt. Die Anzahl der Graustufen (Grauskala) an jedem Pixel, die die Anzahl der erforderlichen Photonen beeinflusst, wird mit 12 Bit angenommen.

**[0073]** Wie lange ein Punkt mit Anregungslicht bestrahlt werden sollte, ist davon abhängig, wie lang die Frame-Periode, d. h. die Länge der Periode ist, in der ein Frame mit  $512 \times 512$  Pixeln für eine Beobachtungsebene beobachtet wird. Somit könnte, wenn gleich die Frame-Periode bevorzugt kurz ist, wenn eine Bewegung einer biologischen Probe beobachtet wird, eine Fluoreszenzbeobachtung in einer

kürzeren Frame-Periode nicht zufriedenstellend durchgeführt werden, da nur die kleinere Menge an Fluoreszenz von einem auf dem Detektor 6 zu erfassenden Punkt emittiert wird. Unter Berücksichtigung dieser wird angenommen, dass die Frame-Rate z. B. 5 fps (d. h. fünf Frames pro Sekunde (engl. frames per second)) beträgt.

**[0074]** Während Bedingungen des optischen Systems 5 und des Detektionssystems gezeigt sind, werden 30 % des von der Superkontinuumquelle 4 emittierten Lichts vermutlich von dem optischen System 5 zur Bestrahlung des EGFP gesammelt, und die photoelektrische Umwandlungseffizienz des als der Detektor 6 verwendeten Photomultipliers wird mit 40 % angenommen.

**[0075]** Wenn gleich die spezifischen Berechnungsformeln weggelassen sind, wurde die Anzahl der benötigten Photonen an einem Pixel (ein Lichtkonzentrationspunkt durch die Objektivlinsen 54) gemäß den beschriebenen Bedingungen mit 8192 berechnet.

**[0076]** Wenn andererseits angenommen wird, dass eine Superkontinuumquelle 4 mit einem 1 kW-Ausgang unter den beschriebenen Bedingungen verwendet wird, betrug die Anzahl der effektiven Photonen 10112. Dabei sind unter den effektiven Photonen Photonen zu verstehen, die auf ein EGFP angewendet werden, eine Fluoreszenz bewirken und im Detektor 6 erfasst, d. h. in ein elektrisches Signal umgewandelt werden. Somit wurde der Überschuss gegenüber der erforderlichen Anzahl bestätigt. Dabei bedeutet der 1-kW-Ausgang, dass eine temporäre Spitzenleistung in einem Puls 1 kW oder mehr und 1 kW oder mehr bei einer Wellenlänge einer Zwei-Photonen-Anregung beträgt. Die Photonendichte, die in einem Pixel erforderlich wäre, würde etwa  $8192 \times 10^{12}/\text{m}^2$  oder mehr betragen, wenn der Superkontinuumbestrahlungs-Durchmesser  $1 \mu\text{m}$  beträgt und wenn die Pixelquadratgröße  $1 \mu\text{m}$  beträgt ( $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ ), wie beschrieben. In diesem Fall würde, wenn die Anzahl der im  $1 \mu\text{m}$ -Bestrahlungsdurchmesser erhaltenen Photonen 10112 beträgt, die Photonendichte etwa  $12882 \times 10^{12}/\text{m}^2$  betragen, und somit wird die erforderliche Photonendichte erreicht.

**[0077]** Wenn gleich in der obigen Beschreibung ein EGFP als ein Beispiel herangezogen wurde, ist es für viele andere fluoreszierende Materialien möglich, die erforderliche Anzahl von Photonen durch eine adäquate Berechnung gemäß jeder Bedingung der Expressionsdichte, des Brechungsindex der Tauchlösung und der Quanteneffizienz zu kennen, und es ist möglich, den Ausgang (die Spitzenleistung) der Superkontinuumquelle 4 zu kennen, damit die Anzahl der Photonen diese überschreitet. Wenn gleich eine detaillierte Beschreibung weggelassen ist, ermöglichen 1 kW oder mehr die Bestrahlung

von Anregungslicht mit der Anzahl von Photonen von nicht weniger als der minimalen Anzahl, die für eine von durch Beobachtung von multiphotonenangeregter Fluoreszenz erforderlich ist, für fast alle Arten von biologischen Proben, wobei sie für die Multiphotonenanregungsbeobachtung von biologischen Proben vorzuziehen ist. Ein Ausgang, der 100 kW überschreitet, kann biologische Proben in vielen Fällen Schaden zufügen. Deshalb ist ein Ausgang von 1 bis 100 kW als die Superkontinuumquelle zur Beobachtung von multiphotonenangeregter Fluoreszenz von biologischen Proben vorzuziehen.

**[0078]** Unter Berücksichtigung der erforderlichen Anzahl von Photonen war die erforderliche Spitzenintensität die Spitzenintensität bei der Wellenlänge des Anregungslichts, aber wenn die beobachteten Arten von fluoreszierenden Molekülen unterschiedlich sind, ist auch das Anregungslicht unterschiedlich, und daher ist es notwendig, dass die zeitliche Spitzenintensität zu einer Anzahl von Photonen führt, die größer oder gleich der erforderlichen Anzahl von Photonen in einem bestimmten Wellenlängenbereich ist. Dieser Punkt wird ergänzend erläutert.

**[0079]** Fig. 8 und Fig. 9 sind die Figuren, die die Spektrogramme von Superkontinua zeigen, die von der Superkontinuumquelle in Beispiel 1 und der Superkontinuumquelle im Referenzbeispiel emittiert werden. Fig. 8 zeigt Beispiel 1, und Fig. 9 zeigt das Referenzbeispiel. Wenngleich die Intensitäten in den ursprünglichen Spektrogrammen durch Farbe ausgedrückt wurden, sind diese in den unteren Bereichen in Fig. 8 bzw. Fig. 9 gezeigt, da die Figuren schwarz-weiß sind.

**[0080]** Wie in Fig. 8 zu erkennen ist, befindet sich das von der Superkontinuumquelle in Beispiel 1 emittierte Superkontinuum bei einer längeren Wellenlänge anfänglich in einem Puls, und dann verschiebt sich die Emission im Zeitverlauf allmählich und kontinuierlich zu einer kürzeren Wellenlänge, das heißt, sie weist auch ein temporär kontinuierliches Spektrum auf. Dieses Beispiel, das die Leistung von 1 kW oder mehr innerhalb des Bereiches von etwa 850 bis 1550 nm aufweist, wird als bevorzugt für Multiphotonenanregungs-Fluoreszenzmikroskope, die Anregungslicht in diesem Wellenlängenbereich verwenden, beurteilt.

**[0081]** Im Gegensatz dazu ist, wie in Fig. 9 gezeigt, das Spektrum des Superkontinuums, das von der Superkontinuumquelle im Referenzbeispiel emittiert wird, nicht kontinuierlich, das heißt, es weist eine spektrale Leerstelle auf, wenngleich der gesamte Wellenlängenbereich verbreitert ist. Wenn ein Superkontinuum eine spektrale Leerstelle umfasst, ist es nicht für Multiphotonenanregungs-Fluoreszenzmikroskope geeignet, da ein fluoreszierendes Molekül,

das angeregt werden soll, im unbesetzten Band nicht beobachtet werden kann.

**[0082]** Gemäß dem Multiphotonenanregungs-Fluoreszenzmikroskop in der beschriebenen Ausführungsform ist es selbst ohne einen Wellenlängen-Abstimmungsmechanismus möglich, die Fluoreszenzbeobachtung durchzuführen, da ein Objekt durch Anregungslicht mit einer gewünschten Wellenlänge in einer Bandbreite von zumindest 200 nm, enthalten in dem Wellenlängenbereich von 850 bis 1550 nm, angeregt wird. Dieses Multiphotonenanregungs-Fluoreszenzmikroskop hat daher eine breitere Verwendbarkeit.

**[0083]** Wenngleich in der obigen Beschreibung ein EGFP als fluoreszierendes Molekül herangezogen wurde, ist eine Beobachtung von multiphotonenangeregter Fluoreszenz auf die gleiche Weise für andere Arten von natürlichen oder synthetischen fluoreszierenden Molekülen möglich. Die Superkontinuumquelle 4 in der Ausführungsform kann bevorzugt auch zur Fluoreszenzbeobachtung verwendet werden, wenn Objekte S verschiedene andere Arten von Materialien als biologische Proben sind. Es sind Prozesse bekannt, die eine andere Multiphotonenanregung als Fluoreszenzmikroskopie einsetzen (z. B. eine Messung der Multiphotonen-Anregungs-Spektren) und die Superkontinuumquelle 4 in der Ausführungsform kann auch für solche anderen Verwendungen eingesetzt werden.

**[0084]** Als Nächstes wird die Superkontinuumquelle in der zweiten Ausführungsform beschrieben. Fig. 10 ist eine schematische Darstellung der Superkontinuumquelle in der zweiten Ausführungsform.

**[0085]** Wie aus dem Vergleich von Fig. 1 und Fig. 10 verständlich, weist die Superkontinuumquelle in der zweiten Ausführungsform die Ausgestaltung auf, bei der ein Pulskompressor 7 auf der Emissionsseite an den Wellenleiter 2 bereitgestellt ist. Fig. 11 ist die Figur, die schematisch die Funktion und den Betrieb der Superkontinuumquelle in der zweiten Ausführungsform zeigt. Der obere Teil in Fig. 11 zeigt schematisch, wie die Pulsform in der zweiten Ausführungsform transformiert wird, und der untere Teil zeigt schematisch, wie das Spektralprofil transformiert wird.

**[0086]** In der zweiten Ausführungsform, wie in Fig. 11 gezeigt, ist der Ausgang des Pulsoszillators z. B. kleiner als 250 fs in der Pulsbreite, 1045 nm in der zentralen Wellenlänge und 16 nm oder kleiner in der FWHM (engl. full width at the half maximum, deutsch: Halbwertsbreite). Dieser Ausgang wird in ein Superkontinuum mit der Pulsbreite von etwa 400-500 nm transformiert, indem eine Selbstphasenmodulation in einer Faser mit normaler Dispersion verwendet wird. Dabei erstreckt sich die Pulsbreite

auf etwa einige Picosekunden. Der Pulskompressor 7 komprimiert die Pulse, während die Breite der Wellenlängen-Bandbreite erhalten bleibt, und macht die Pulsbreite anschließend kleiner als 1 ps.

**[0087]** Fig. 12 ist eine schematische Darstellung des Pulskompressors 7, der für die Superkontinuumquelle in der zweiten Ausführungsform verwendet wird. Nach Erreichen des Konzepts der Superkontinuumquelle in der ersten Ausführungsform hatten die Erfinder die Idee, den Pulskompressor 7 hinzuzufügen. Wie beschrieben, hatten die Erfinder die Absicht, ein Superkontinuum mit dem Spektrum zu erhalten, das in einer Bandbreite von zumindest 200 nm in dem Wellenlängenbereich von 850 bis 1550 nm kontinuierlich ist, so dass es bevorzugt für Multiphotonenanregungs-Fluoreszenzmikroskope oder andere Verwendungen eingesetzt werden kann, und haben eine nichtlineare Faser mit normaler Dispersion als ein spezifisches Mittel verwendet, um dies zu erreichen. Dadurch wird das Spektrum des Superkontinuums in dem Wellenlängenband flach und kontinuierlich gemacht. Infolgedessen wird das Superkontinuum mit dem auch temporär kontinuierlichen Spektrum erzeugt, wie in Fig. 8(1) gezeigt.

**[0088]** Ein Lichtpuls mit einem Spektrum, das auch temporär kontinuierlich ist, wie in Fig. 8(1) gezeigt, wird als „gechirpter Puls“ bezeichnet. Um einen gechirpten Puls zu erhalten, wird üblicherweise ein Element mit einer linearen Gruppenverzögerungsdispersion verwendet. Durch Bewirken von Zeitverschiebungen, die Wellenlängenkomponenten entsprechen, die ursprünglich in einem Puls vorhanden sind, wird ein gechirpter Puls erhalten.

**[0089]** Im Gegensatz dazu erzeugt die beschriebene erste Ausführungsform Wellenlängenkomponenten neu, die nicht ursprünglich vorhanden sind, durch nichtlineare optische Effekte wie z. B. Selbstphasenmodulation, und erzeugt dann ein Spektrum, das kontinuierlich und ohne spektrale Leerstelle über eine breitere Bandbreite von 200 nm oder mehr ist. Dabei ist das erhaltene Spektrum folglich auch temporär kontinuierlich, wie in Fig. 8(1) gezeigt. Das heißt, es wird ein gechirpter Puls erhalten. Der in Fig. 8(1) gezeigte Puls kann als „linear gechirpter Puls“ bezeichnet werden. Lineares Chirpen bedeutet, dass sich die Wellenlänge mit der Zeit kontinuierlich verschiebt. Wie in 8(1) gezeigt ist, handelt es sich dabei ferner um den gechirpten Puls, der keine Extremwerte (d. h. weder lokale Maxima noch lokale Minima) in der Wellenlängenverschiebung aufweist.

**[0090]** Angesichts der Leistungsfähigkeit der ersten Ausführungsform hatten die Erfinder die Idee, eine Pulskompression auf das erhaltene Superkontinuum anzuwenden. Der Grund dafür besteht darin, dass eine Pulskompression für solch eine Verwendung als Multiphotonenanregungstärker zu bevorzugen

ist, da die Spitzenleistung zunimmt und sie insbesondere einfach auf solche linear gechirpten Pulse, wie in Fig. 8(1) gezeigt, anwendbar ist.

**[0091]** In der zweiten Ausführungsform wird konkreter ein Prismenpaarkompressor 71 als Pulskompressor 7 verwendet, wie in Fig. 12 gezeigt. In diesem Beispiel umfasst der Kompressor zwei Paare (insgesamt vier) von Prismen 711.

**[0092]** In einem Superkontinuum, das von dem Wellenleiter 2 emittiert wird, weist eine Welle, die zu einem früheren Zeitpunkt in einem Puls existiert, eine längere Wellenlänge auf, und eine andere Welle, die zu einem späteren Zeitpunkt existiert, weist eine kürzere Wellenlänge auf, wie in Fig. 8(1) gezeigt. Das heißt, sie erfährt im Laufe der Zeit eine Spektralverschiebung zu kürzeren Wellenlängen. Die Pulskompression wird auf solch einen gechirpten Puls einfach durch ein Dispersionselement angewendet, wo die GDD (Gruppenverzögerungsdispersion) mit zunehmender Wellenlänge linear zunimmt. Der Prismenpaarkompressor 71 in Fig. 12 ist das Element, das diese Art von Dispersion durchführt. Ein Rückstrahlspiegel 712 ist an zwei Paaren von Prismen 711 angeordnet, und deshalb durchläuft ein Lichtstrahl die Prismen 711 insgesamt acht Mal.

**[0093]** Wie in Fig. 12 gezeigt, ist jedes Prisma 711 ein dreieckiges Prisma, das sich entlang der Richtung senkrecht zu der Ebene von Fig. 12 erstreckt. Zwei Paare der Prismen 711 sind symmetrisch zu einer Ebene (in Fig. 12 mit „S“ gezeigt) senkrecht zu der Figurenebene.

**[0094]** Wie in Fig. 12 gezeigt, weist eine Lichtwelle  $L_2$  mit einer längeren Wellenlänge eine längere Gesamtausbreitungslänge durch die vier Prismen 711 hindurch auf, eine Lichtwelle mit einer kürzeren Wellenlänge weist eine kürzere Gesamtausbreitungslänge auf, und dann weist die Lichtwelle  $L_1$  mit der kürzesten Wellenlänge die kürzeste auf. Somit wird eine Lichtwelle mit einer längeren Wellenlänge mehr verzögert, während eine Lichtwelle mit einer kürzeren Wellenlänge weniger verzögert wird. Wenn die Größe und das Anordnungsintervall der Prismen 711 dem Brechungsindex des Materials der Prismen 711 entsprechend gewählt sind, würde daher jede Wellenlänge in einem Puls des Superkontinuums, die nach dem Durchlaufen der Prismen 711 acht Mal zurückgekehrt ist, temporär ausgerichtet (kohärent) sein, und somit ist der Puls komprimiert.

**[0095]** Die beschriebene ausgezeichnete Pulskompressionseigenschaft beruht auf der ursprünglichen Eigenschaft von Licht, d. h. dem linearen Chirpen. Das lineare Chirpen selbst beruht auf der Korrespondenz der Wellenlängen, d. h. der Korrespondenz der zentralen Wellenlänge von ultrakurzen Lichtpulsen und der Spitzenwellenlänge in dem GVD-Spektrum

der Faser mit normaler Dispersion. Es werden lineare gechirpte Pulse erhalten, da die Gruppengeschwindigkeit von der zentralen Wellenlänge der ultrakurzen Lichtpulse gleichförmig zu der Seite kürzerer Wellenlänge und der Seite längerer Wellenlänge verteilt ist. Gemäß den Untersuchungen der Erfinder kann die zentrale Wellenlänge der ultrakurzen Lichtpulse innerhalb von  $\pm 50$  nm von der Spitzenwellenlänge in dem GVD-Spektrum der Faser mit normaler Dispersion liegen, um in einfacher Weise linear gechirpte Pulse zu erhalten.

**[0096]** Am Beispiel einer konkreteren Ausführungsform des Prismenpaarkompressors 71 würde die Dispersion bei 1000 nm etwa  $-822 \text{ fs}^2$  betragen, wenn jedes Prisma 711 aus Quarz (Brechungsindex 1,45 bei der Wellenlänge 1000 nm) hergestellt ist, der obere Winkel jedes Prismas 711  $69,1^\circ$  beträgt, das Anordnungsintervall (in Fig. 12 mit „L“ bezeichnet) 1 m beträgt und  $d1 + d2$  als die Lichteinfallssposition 10 cm beträgt. Da das Zentrum des Spektrums ca. 1000 nm beträgt, ist der Einfallswinkel  $\theta$  auf die Prismen 711 der Brewster-Winkel bei 1000 nm, d. h.  $55,4^\circ$ .

**[0097]** Die Spitzenleistung des wie beschrieben komprimierten Superkontinuums würde höher sein, da die Wellen innerhalb eines extrem engen Zeitbandes überlappt sind. Diese Situation ist in Fig. 13 gezeigt. Fig. 13 ist die Figur, die das Ergebnis eines Experiments zeigt, bei dem eine Erhöhung der Spitzenleistung in der zweiten Ausführungsform bestätigt wurde.

**[0098]** In diesem Experiment wurde das in Fig. 8 gezeigte Superkontinuum mit zwei Paaren von Prismen 711 komprimiert, wie in Fig. 11 gezeigt. Während Fig. 13(1) einige Pulsformen bei allen umfassten Wellenlängen zeigt, ist eine vor der Kompression mit einer gepunkteten Linie (die gleiche Form in dem unteren Teil von Fig. 8) dargestellt, und die andere nach der Kompression ist mit einer durchgezogenen Linie dargestellt. Während Fig. 13(2) einige der Spektralverteilungen zeigt, ist eine vor der Kompression mit einer gepunkteten Linie dargestellt, und die andere nach der Kompression ist mit einer durchgezogenen Linie dargestellt.

**[0099]** Die horizontale Achse in Fig. 13(1) ist die Zeit (ps), und die vertikale Achse ist die Leistung (kW). Die horizontale Achse in Fig. 13(2) ist die Wellenlänge, und die vertikale Achse ist die Energie (pJ/nm) normalisiert durch die Wellenlänge, d. h. Energie pro Wellenlänge.

**[0100]** Wie in Fig. 13(1) gezeigt, wird das Superkontinuum einer Pulskompression unterworfen, wenn es den Prismenpaarkompressor 71 durchläuft. Die FWHM des Pulses betrug etwa 1 ps nach der Kompression, während sie etwa 4 ps vor der Kompression

betrug. Dann nimmt die Spitzenleistung durch die Kompression um das Doppelte oder mehr zu. Darüber hinaus überlappen sich die gepunktete Linie und die durchgezogene Linie in Fig. 13(2) fast vollständig und zeigen fast keine Änderung des Spektralprofils vor und nach der Kompression. Das heißt, die spektrale Kontinuität über den Bereich von etwa 850-1350 nm wird selbst nach der Kompression beibehalten.

**[0101]** Wenngleich Fig. 13(2), in der die vertikale Achse eine zeitintegrierte Energie (pJ) darstellt, keine Änderung der zeitintegrierten Energie von Licht bei jeder Wellenlänge innerhalb des Pulses zeigt, hat jeder momentane Spitzenwert bei jeder Wellenlänge sich vergrößert, da die Pulsbreite verengt wurde. Die Situation der Zunahme ist ähnlich wie von der Leistung in dem gesamten Wellenlängenbereich, wie in 13(1) gezeigt.

**[0102]** Fig. 14 ist die Figur, in der das Superkontinuum von Fig. 13 als ein Spektrogramm gezeigt ist. Da das Original ein Farbbild ist, ist die Pulsform sowohl in dem unteren Bereich davon als auch in Fig. 8 gezeigt.

**[0103]** Wie aus dem Vergleich von Fig. 8 und Fig. 14 zu entnehmen ist, überlappt jede Welle bei jeder Wellenlänge beinahe zur gleichen Zeit durch die Pulskompression. Die Spitzenleistung nimmt infolge dieser Überlappung stark zu.

**[0104]** Wie beschrieben, wird, da die Superkontinuumquelle in der zweiten Ausführungsform den Pulskompressor 7 umfasst, der ein von dem Wellenleiter 2 emittiertes Superkontinuum komprimiert, die Spitzenleistung erhöht. Deshalb ist sie für solch eine Anwendung als Multiphotonenanregungs-Fluoreszenzmikroskopie stärker zu bevorzugen. Das heißt, sie kann aufgrund der höheren Spitzenleistung einfach eine Multiphotonenanregung bewirken und verursacht wegen der schmalen Pulsbreite weniger Schaden an einem Objekt. Es ist notwendig, dass für eine Multiphotonenanregung viele Photonen gleichzeitig (oder innerhalb eines sehr schmalen Zeitbandes) existieren, und deshalb ist die hohe Spitzenleistung vorteilhaft. Andererseits ist die thermische Schädigung von Objekten von der Bestrahlungsdosis, d. h. von der zeitintegrierten Menge von Strahlung, abhängig. Deshalb ist ein Lichtpuls mit einer schmalen Pulsbreite und einer hohen Spitzenleistung bei der Beobachtung eines Objekts mit einer geringen Wärmetoleranz wie z. B. einer biologischen Probe durch Multiphotonenanregung zu bevorzugen. Es ist z. B. möglich, Arten von fluoreszierenden Proteinen ohne Farbverblässung zu beobachten.

**[0105]** Die Superkontinuumquelle in der zweiten Ausführungsform benötigt eine Ausgestaltung, um komprimierte Lichtpulse aus dem optischen Pfad zu

extrahieren. Von einigen möglichen Lösungen wird in dem in **Fig. 12** gezeigten Beispiel eine Ausgestaltung angewendet, die einen Polarisationsstrahlteiler 713 verwendet.

**[0106]** Konkret ist der Polarisationsstrahlteiler 713 in dem optischen Pfad von dem Wellenleiter 2 angeordnet. Ein von dem Wellenleiter 2 emittierter Lichtstrahl tritt in den Polarisationsstrahlteiler 713 ein. Eine Viertelwellenlängenplatte 714 ist zwischen dem Polarisationsstrahlteiler 713 und dem Pulskompressor 7 angeordnet. Wie beschrieben, umfasst die Superkontinuumquelle in der Ausführungsform das Polarisationssteuerelement 3, um ein linear polarisiertes Superkontinuum von dem Wellenleiter 2 zu emittieren. Wenn ein von dem Wellenleiter 2 emittiertes Superkontinuum nicht linear polarisiert ist, ist zwischen dem Wellenleiter 2 und dem Polarisationsstrahlteiler 713 ein entsprechendes Polarisationssteuerelement angeordnet, um es linear polarisiert zu machen.

**[0107]** Das Superkontinuum P1 von dem Wellenleiter 2 durchläuft den Polarisationsstrahlteiler 713, wird auf der Viertelwellenlängenplatte 714 zu dem zirkular polarisierten Licht P2 und kehrt zu der Viertelwellenlängenplatte 714 zurück, nachdem es der Pulskompression durch die Prismen 711 unterworfen wurde, wie beschrieben. Dann wird es auf der Viertelwellenlängenplatte 714 zu dem linear polarisierten Licht P3, dessen Polarisationsrichtung um  $180^\circ$  verschieden ist, und erreicht den Polarisationsstrahlteiler 713. Des Weiteren wird es durch eine Reflexion in dem Polarisationsstrahlteiler 713 aus dem optischen Pfad extrahiert und dann zu einem gewünschten Ort geleitet, um genutzt zu werden.

**[0108]** Anstelle der Ausgestaltung, bei der ein Superkontinuum durch den Polarisationsstrahlteiler 713 extrahiert wird, kann die Superkontinuumquelle oft eine Ausgestaltung schräger optischer Pfade, ansonsten eine Ausgestaltung zur Verwendung eines Retroreflektors aufweisen. Diese sind unter Bezugnahme auf **Fig. 15** beschrieben. **Fig. 15** ist eine schematische Darstellung, die andere Beispiele von Ausgestaltungen zur Lichtextraktion zeigt.

**[0109]** **Fig. 15(1)** zeigt ein Beispiel, das einen Retroreflektor 716 verwendet. Der Retroreflektor 716 wird anstelle des Rückstrahlspiegels 712 in **Fig. 12** verwendet. Bei Verwendung des Retroreflektors 716 sind ein ausgehender Pfad und ein Rückpfad so gestaltet, dass sie in der Längsrichtung eines jeden Prismas 711 voneinander abweichen. Auch in diesem Fall ist ein Auskopplungsspiegel 715 an dem Ausgang des Rückweges angeordnet, um ein pulskomprimiertes Superkontinuum zu extrahieren.

**[0110]** **Fig. 15(2)** ist ein anderes Beispiel des Pulskompressors 7, der durch Verwendung von zwei Ret-

roreflektoren 718, 719 klein dimensioniert ist. Ein Superkontinuum von dem Wellenleiter 2 wird durch das Prisma 111 gebrochen, kehrt durch Reflexionen an den ersten Retroreflektor 718 zurück und durchläuft dann wieder das Prisma 711. Ferner kehrt es durch Reflexionen an dem zweiten Retroreflektor 719 zu dem Prisma 711 zurück und durchläuft nach Reflexionen an dem ersten Retroreflektor 718 noch einmal das Prisma 711. Schließlich wird es an dem Auskopplungsspiegel 715 reflektiert, um extrahiert zu werden. Diese Ausgestaltung, die der Verwendung von zwei Prismen (einem Prismenpaar) für ausgehendes und zurückkehrendes Licht gleich ist, ist insgesamt klein dimensioniert.

**[0111]** Alternativ dazu kann es möglich sein, einen geringen Neigungswinkel zwischen dem ausgehenden Weg und dem Rückweg in dem Prismenpaarkompressor 7 von **Fig. 12** vorzusehen, wenngleich dies in keiner Figur gezeigt ist. In dieser Ausgestaltung ist der Neigungswinkel gemäß dem Strahldurchmesser und der Länge des optischen Pfades des Superkontinuums entsprechend gewählt, so dass das pulskomprimierte Superkontinuum an eine andere Position zurückkehren kann, an der ein Auskopplungsspiegel angeordnet ist, um es zu extrahieren.

**[0112]** Falls ein Lichtstrahl von dem Wellenleiter 2 nicht linear polarisiert ist, benötigt die Ausgestaltung, die den in **Fig. 12** gezeigten Polarisationsstrahlteiler 713 verwendet, einen Polarisator zum linearen Polarisieren. Dies könnte zu einem Verlust führen. Im Gegensatz dazu sind die Ausgestaltung von **Fig. 15(1)(2)** und die Ausgestaltung, die den Neigungswinkel vorsieht, zu bevorzugen, da kein solcher Verlust vorhanden ist.

**[0113]** Als Nächstes werden weitere Beispiele des Pulskompressors 7 beschrieben. Wenngleich der Prismenpaarkompressor 71 als der Pulskompressor 7 in der zweiten Ausführungsform verwendet wurde, sind auch andere Arten von Kompressionsmitteln verwendbar. **Fig. 16** zeigt ein anderes Beispiel des Pulskompressors 7.

**[0114]** Wie in **Fig. 16(1)** gezeigt, kann ein Paar von Gittern (Beugungsgitter) 72 für den Pulskompressor 7 verwendet werden. In dem in **Fig. 16(1)** gezeigten Superkontinuumpuls weist die Welle  $L_1$  kürzerer Wellenlänge, die zu einem späteren Zeitpunkt erzeugt wurde, verglichen mit der Welle  $L_2$  längerer Wellenlänge, die zu einem früheren Zeitpunkt erzeugt wurde, die längere Weglänge zu dem Emissionsende des Gitterpaares 72 auf. Daher kann die Anordnung jedes Gitters 72 mit entsprechend gewählten Neigungswinkeln bezüglich der zentralen Wellenlänge des Superkontinuums jede Welle temporär ausgerichtet (kohärent) machen, um die Pulskompression herzustellen.

**[0115]** Gitterpaare sind für die Kompression eines Breitband-Superkontinuums wie in der Ausführungsform zu bevorzugen, da eine Dispersion für breitere Wellenlängenbänder möglich ist. Dennoch gibt es ein Effizienzproblem. Während der Blaze-Winkel gemäß der zentralen Wellenlänge eines Superkontinuums bei Verwendung eines Gitterpaares gewählt wird, kann ein Beugungsverlust mit einer Abweichung von dem Blaze-Winkel auftreten. Ein solcher Verlust als Abnahme der Leistung kann nämlich mit einer Abweichung von der zentralen Wellenlänge in der spektralen Leistungsverteilung auftreten. Infolgedessen könnte es passieren, dass der Wellenlängenbereich, der die Spitzenleistung umfasst, die zu einer Multiphotonenanregung in der Lage ist, schmaler sein könnte im Vergleich mit der Ausgestaltung, die ein Prismenpaar verwendet.

**[0116]** Wie in **Fig. 16(2)** gezeigt, kann alternativ dazu auch ein Gitterprisma 73 als Pulskompressor 7 verwendet werden. Das Gitterprisma 73 besitzt die Struktur, bei der ein Kammgitter 732 zwischen einem Paar von ebenensymmetrisch eingerichteten Prismen 731, 731 angeordnet ist. Das Paar von Prismen 731 stellt die Längendifferenz der optischen Pfade gemäß der Wellenlänge wie auch dem Prismenpaar bereit und hat die Funktion, die Dispersion (räumliche Dispersion) durch das Kammgitter 732 zu kompensieren.

**[0117]** Die Ausgestaltung, die das Gitterprisma verwendet, hat den Vorteil, dass sie verglichen mit dem Gitterpaar eine kleinere Größe aufweist. Das Problem des Beugungsverlustes bleibt jedoch bestehen, da immer noch ein Gitter verwendet wird.

**[0118]** Wie in **Fig. 16(3)** gezeigt, kann alternativ ein gechirpter Spiegel 74 als Pulskompressor 7 verwendet werden. Der gechirpte Spiegel 74, der einen Mehrschichtfilm auf einem Substrat aufweist, um Licht zu reflektieren, verlängert die Länge des optischen Pfades, da eine Lichtwelle mit einer längeren Wellenlänge an einer Deer-Schicht innerhalb des Mehrschichtfilms reflektiert wird.

**[0119]** Im Allgemeinen weist ein gechirpter Spiegel eine Gruppenverzögerungsdispersion von nur etwa  $-50 \text{ fs}^2$  auf, wenngleich die Pulskompression vergleichsweise einfacher durchgeführt werden kann. Demzufolge muss die Reflexion wiederholt werden, zum Beispiel 200 Mal oder mehr, um einen gechirpten Spiegel als Pulskompressor 7 in dieser Ausführungsform zu verwenden. Obwohl der gechirpte Spiegel eine hohe Reflexionsrate aufweisen kann, besitzt er den Nachteil, dass der Verlust insgesamt größer wird, wenn die Reflexion so oft wiederholt wird.

**[0120]** Wie in **Fig. 16(4)** gezeigt, kann alternativ ein SLM (engl. spatial light modulator: deutsch räumli-

cher Lichtmodulator) 75 als Pulskompressor 7 verwendet werden. Der SLM 75, der das Element ist, das ein Array vieler Pixel, wo die Brechungsindizes einzeln gesteuert werden, ebenso wie Flüssigkristallanzeigen aufweist, ist zu einer Dispersionskompensation zweiter oder anderer hoher Ordnung gemäß einer angelegten Spannung in der Lage. Ein transparenter Typ und ein Reflexionstyp sind als SLM bekannt. Ein Reflexionstyp wird z. B. zur Pulskompression in der Ausgestaltung angewendet, bei der ein Superkontinuum auf dem Gitter 751 räumlich dispersiert wird, durch eine Linse 752 in den kollimierten Lichtstrahl umgewandelt wird und dann in jedes Pixel eintritt, wie in **Fig. 16(4)** gezeigt. Der SLM 75 besitzt die Vorteile, dass Wellen in einem gewünschten Wellenlängenband selektiv verzögert (gruppenverzögert) werden können und dass auch Dispersionskompensationen hoher Ordnung möglich sind. Im Allgemeinen beträgt die Gruppenverzögerung bei einmaliger Reflexion ca. einige zehn bis zu zweihundert  $\text{fs}^2$ . Es ist daher für eine Pulskompression in dieser Ausführungsform zu bevorzugen, ihn zusätzlich für speziell ausgewählte Wellenlängen zu verwenden, die eine Gruppenverzögerungsdispersion oder eine Dispersionskompensation hoher Ordnung erfordern. Das heißt, es ist vorzuziehen, ihn für eine endgültige Einstellung zu verwenden.

**[0121]** Eine Faser mit einer spezifischen Struktur oder Funktion kann als Pulskompressor 7 in der Superkontinuumquelle in der Ausführungsform verwendet werden. Dieser Punkt wird als Nächstes unter Bezugnahme auf **Fig. 17** beschrieben. **Fig. 17** ist eine schematische Darstellung, die ein weiteres Beispiel des Pulskompressors 7 zeigt.

**[0122]** Ein ganz einfaches Beispiel der Verwendung einer Faser als Pulskompressor 7 ist eines, das eine Faser mit anomaler Dispersion verwendet. Da eine Welle mit einer längeren Länge in einer Faser mit anomaler Dispersion mehr verzögert wird, wird eine Druckkompression ermöglicht, indem ein Superkontinuum dazu gebracht wird, sich durch eine anomale Faser auszubreiten, die eine entsprechende GVD und Länge aufweist.

**[0123]** Wie in **Fig. 17(1)** gezeigt ist, kann alternativ ein gechirptes Faser-Bragg-Gitter (CFBG) als Pulskompressor 7 verwendet werden. CFBGs sind Fasern, bei denen Abschnitte mit periodisch unterschiedlichen Brechungsindizes in Kernen entlang der Längsrichtungen vorgesehen sind, die als Beugungsgitter fungieren. Es kann gesagt werden, dass unter diesen das CFBG 76 jenes Element ist, bei dem die Reflexionsposition gemäß der Wellenlänge variiert, um die Funktion eines gechirpten Spiegels in der Faser zu erreichen. Das CFBG 76 weist die Charakteristik auf, bei der eine Welle mit kürzerer Länge von einfallendem Licht an einer vorderen Position reflektiert wird, um in der Ausbreitungsrichtung

zurückzukehren, und eine Welle längerer Länge an einer tieferen Position reflektiert wird, um zurückzukehren.

**[0124]** Wie in **Fig. 17(2)** gezeigt, kann alternativ eine dispersionsverringende Faser 77 als der Pulskompressor 7 verwendet werden, um eine adiabatische Soliton-Kompression durchzuführen. Die dispersionsverringende Faser 77 besitzt die Charakteristik, bei der die Dispersion allmählich abnimmt, während sich Licht ausbreitet. Die dispersionsverringende Faser 77 weist die Struktur auf, bei der z. B. sowohl der Kerndurchmesser als auch der Hüllendurchmesser zu der Lichtausbreitungsrichtung abnehmen. Das fundamentale Soliton ist der stabile Zustand, in dem eine anomale Dispersion und Eigenphasenmodulation in einer Faser im Gleichgewicht sind. Die Verwendung der dispersionsverringenden Faser 77 ermöglicht es, dass eine Pulskompression als ein fundamentales Soliton beibehalten wird, da der fundamentale Solitonzustand gemäß dem Abstand kontinuierlich verändert werden kann. Die adiabatische Soliton-Kompression besitzt die Vorteile einer hohen Kompressionsrate und einer überlegenen Sech-Pulsqualität.

**[0125]** Wie in **Fig. 17(3)** gezeigt, kann alternativ eine kammartige dispersionsprofilierte Faser 78 als Pulskompressor 7 verwendet werden. Kammartige dispersionsprofilierte Fasern sind Fasern, bei denen dispersionsverschobene Fasern (DSF, vom engl. dispersion shift fibers) und Monomode-Fasern (SMF, vom engl. single mode fibers) abwechselnd angeordnet sind. Die kammartige dispersionsprofilierte Faser 78 besitzt den Vorteil, dass die erforderlichen Kompressionscharakteristika einfach durch im Handel erhältliche Fasern realisiert werden können, wenngleich sie das Problem des Verlusts infolge vieler Verbindungen darin aufweist.

**[0126]** Wie beschrieben, verwendet die Superkontinuumquelle in der Ausführungsform die nichtlineare Faser als den Wellenleiter 2. Die Verwendung einer Faser als Pulskompressor 7 hat den Vorteil, dass die Affinität unter den Elementen verstärkt wird und somit Handhabungen und Einstellungen einfacher vorgenommen werden, da die Erzeugung und Kompression eines Superkontinuums innerhalb des Fasersystems abgeschlossen werden kann.

**[0127]** Dennoch muss, wenn eine Faser zur Pulskompression verwendet wird, aufmerksam vorgegangen werden, so dass durch Einfall eines hochenergetischen Superkontinuums keine unerwünschten nichtlinearen Effekte hoher Ordnung auftreten können. Dennoch könnte, sobald ein flaches Superkontinuum über ein breites Band erfolgreich erzeugt wurde, ein weiterer nichtlinearer optischer Effekt bei der Pulskompression auftreten, der leere Bänder, extreme Abfälle etc. in dem Spektrum

verursacht. Das sollte vermieden werden. Diesbezüglich sind solche Elemente als Gruppenverzögerungs-Dispersionselemente wie z. B. ein Prismenpaar, ein Gitter, ein Gitterprisma und ein gekrümmter Spiegel zu bevorzugen, da diese Arten von räumlichen Elementen in der Lage sind, Strahldurchmesser frei zu vergrößern, während Strahldurchmesser für Fasern nur in der Größenordnung von Mikrometern liegen. Solche räumlichen Elemente sind auch bei der Gestaltung zu bevorzugen, da nichtlineare optische Effekte kaum auftreten.

**[0128]** Die Verwendung einer Faser erfordert Vorsicht im Hinblick auf ihre thermische Schädigung durch Selbstkonvergenz oder dergleichen, da die Spitzenleistung durch Pulskompression zunimmt. Um eine Faserbeschädigung zu verhindern, ist es wirksam, eine LMA- (Large Mode Area)-Faser oder eine Photonic Bandgap-Hohlkern-Faser (PBF) zu verwenden. Diese sind auch wirksam, um eine spektrale Verzerrung zu verhindern, die durch einen unerwünschten nichtlinearen optischen Effekt verursacht werden könnte.

**[0129]** Photonische LMA-Kristallfasern (LMA-PCF, vom engl. LMA photonic crystal fibers), die zu einer Singlemode-Ausbreitung in breiten Bändern in der Lage sind, sind bereits im Handel erhältlich. Wenngleich es gegenwärtig keine LMA-PCF mit anomaler Dispersion in dem gesamten Wellenlängenbereich für die vorliegende Erfindung gibt, kann sie verwendet werden, wenn sie entwickelt wird. Wenngleich Hohlkern-PBFs infolge ihrer Hohlkernstruktur das Merkmal von im Wesentlichen keiner optischen Nichtlinearität aufweisen, sind diejenigen, die im Handel erhältlich sind, alles Fasern mit geringer Dispersion. Allerdings kann in dem Fall, in dem eine entwickelt wird, die eine hinreichende Dispersion bereitstellt, diese auch verwendet werden.

#### [Erklärung der Bezugszeichen]

1	Pulsoszillator
2	Wellenleiter
3	Polarisationssteuerelement
4	Superkontinuumquelle
5	Optisches System
51	Linse
52	Dichroitischer Spiegel
53	Scanspiegeleinheit
531	Scanspiegel
54	Objektivlinse
6	Detektor
61	Bildgebungsvorrichtung

62	Filter
7	Pulskompressor
71	Prismenpaarkompressor
711	Prisma
712	Rückstrahlspiegel
713	Polarisationsstrahlteiler
714	Viertelwellenlängenplatte
72	Gitter
73	Gitterprisma
74	Gechirpter Spiegel
75	Räumlicher Lichtmodulator
76	CFBG
77	Dispersionsverringende Faser
78	Kammartige dispersionsprofilierte Faser

### Patentansprüche

1. Superkontinuumquelle zum Erzeugen und Emittieren eines Superkontinuums, umfassend einen Pulsoszillator, der einen ultrakurzen Lichtpuls oszilliert, und einen Wellenleiter, der so angeordnet ist, dass der oszillierte ultrakurze Lichtpuls von dem Pulsoszillator in ihn eintritt, wobei der oszillierte ultrakurze Lichtpuls durch einen nichtlinearen optischen Effekt in ein Superkontinuum umgewandelt und dann emittiert wird, wobei der Wellenleiter durch den nichtlinearen optischen Effekt den ultrakurzen Lichtpuls in das Superkontinuum mit einem Spektrum umwandelt, das in einer Wellenlängen-Bandbreite von zumindest 200 nm, enthalten in dem Wellenlängenbereich von 850 bis 1550 nm, kontinuierlich ist, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Pulsoszillator und der Wellenleiter dazu ausgebildet sind, das Superkontinuum mit einer Spitzenleistung innerhalb von 1 bis 100 kW zu emittieren, um eine Multiphotonenanregung eines Objekts auf einer bestrahlten Ebene zu ermöglichen, der ultrakurze Lichtpuls von dem Pulsoszillator eine Pulsbreite von nicht mehr als 1 ps aufweist, und ein Pulskompressor vorhanden ist, um die Spitzenleistung des Superkontinuums durch Komprimieren des von dem Wellenleiter emittierten Superkontinuums zu erhöhen.

2. Superkontinuumquelle nach Anspruch 1, wobei das Superkontinuum eine Wellenlängenflachheit innerhalb von 3 dB in einer Bandbreite von zumindest 200 nm, enthalten in dem Wellenlängenbereich von 850 bis 1550 nm, aufweist.

3. Superkontinuumquelle nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Pulsoszillator den ultrakurzen Lichtpuls mit einer zentralen Wellenlänge in einem Wellenlängenbereich von 1000 bis 1100 nm oszilliert.

4. Superkontinuumquelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Wellenleiter den ultrakurzen Lichtpuls durch den nichtlinearen optischen Effekt in ein Superkontinuum umwandelt, bei dem die zeitliche Verschiebung der Wellenlänge kontinuierlich ist.

5. Superkontinuumquelle nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Wellenleiter eine Faser mit normaler Dispersion in dem Wellenlängenbereich von 850 bis 1550 nm ist.

6. Superkontinuumquelle nach Anspruch 5, wobei die zentrale Wellenlänge des ultrakurzen Lichtpulses in dem Bereich von plus und minus 50 nm bis zu der Spitzenwellenlänge des Gruppengeschwindigkeits-Dispersionsspektrums der Faser mit normaler Dispersion liegt.

7. Verfahren zum Erzeugen und Emittieren eines Superkontinuums, umfassend Oszillieren eines ultrakurzen Lichtpulses durch einen Pulsoszillator, Eintretenlassen des ultrakurzen Lichtpulses von dem Pulsoszillator in einen Wellenleiter und Umwandeln des ultrakurzen Lichtpulses in ein Superkontinuum durch einen nichtlinearen optischen Effekt in dem Wellenleiter, und anschließendes Emittieren davon, wobei der Wellenleiter den ultrakurzen Lichtpuls in das Superkontinuum mit einem Spektrum umwandelt, das in einer Bandbreite von zumindest 200 nm, enthalten in dem Wellenlängenbereich von 850 bis 1550 nm, kontinuierlich ist, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Superkontinuum mit einer Spitzenleistung innerhalb von 1 bis 100 kW emittiert wird, um eine Multiphotonenanregung eines Objekts auf einer bestrahlten Ebene zu ermöglichen, der ultrakurze Lichtpuls von dem Pulsoszillator eine Pulsbreite von nicht mehr als 1 ps aufweist, und ein Pulskompressor die Spitzenleistung des Superkontinuums durch Komprimieren des von dem Wellenleiter emittierten Superkontinuums erhöht.

8. Verfahren zum Erzeugen und Emittieren eines Superkontinuums nach Anspruch 7, ferner umfassend das Emittieren eines Superkontinuums, das eine Wellenlängenflachheit innerhalb von 3 dB in einer Bandbreite von zumindest 200 nm, enthalten in dem Wellenlängenbereich von 850 bis 1550 nm, aufweist.

9. Verfahren zum Erzeugen und Emittieren eines Superkontinuums nach Anspruch 7 oder 8, wobei der von dem Pulsoszillator oszillierte ultrakurze Lichtpuls eine zentrale Wellenlänge in dem Wellenlängenbereich von 1000 nm bis 1100 nm aufweist.

10. Verfahren zum Erzeugen und Emittieren eines Superkontinuums nach Anspruch 7, 8 oder 9, wobei der Wellenleiter den ultrakurzen Lichtpuls in ein Superkontinuum umwandelt, bei dem die zeitliche Verschiebung der Wellenlänge kontinuierlich ist.

11. Verfahren zum Erzeugen und Emittieren eines Superkontinuums nach einem der Ansprüche 7 bis 10, wobei der Wellenleiter eine Faser mit normaler Dispersion in dem Wellenlängenbereich von 850 bis 1550 nm ist.

12. Verfahren zum Erzeugen und Emittieren eines Superkontinuums nach Anspruch 11, wobei die zentrale Wellenlänge des ultrakurzen Lichtpulses in einem Bereich von plus und minus 50 nm bis zu der Spitzenwellenlänge des Gruppengeschwindigkeits-Dispersionsspektrums der Faser mit normaler Dispersion liegt.

13. Multiphotonenanregungs-Fluoreszenzmikroskop, umfassend die Superkontinuumquelle nach einem der Ansprüche 1 bis 6, ferner umfassend ein optisches System zum Bestrahlen eines Objekts mit dem von dem Wellenleiter emittierten Superkontinuum und einen Detektor zum Detektieren einer Fluoreszenz, die emittiert wird, wenn das Objekt einer Multiphotonenanregung durch das Superkontinuum unterworfen wird.

14. Multiphotonenanregungsverfahren zum Bewirken einer Multiphotonenanregung auf einem fluoreszierenden Stoff durch ein Superkontinuum, umfassend  
einen Oszillationsschritt, bei dem ein ultrakurzer Lichtpuls durch einen Pulsoszillator oszilliert wird,  
einen Umwandlungsschritt, bei dem der von dem Pulsoszillator oszillierte ultrakurze Lichtpuls dazu gebracht wird, dass er in den Wellenleiter eintritt, durch einen nichtlinearen optischen Effekt in dem Wellenleiter in das Superkontinuum umgewandelt und dann emittiert wird,  
einen Kompressionsschritt, bei dem die Spitzenleistung des emittierten Superkontinuums durch Pulskompression erhöht wird, und  
einen Bestrahlungsschritt, bei dem das gesamte oder ein Teil des Superkontinuum/s, dessen Spitzenleistung in dem Kompressionsschritt erhöht wurde, auf den fluoreszierenden Stoff angewendet wird, um eine Multiphotonenanregung zu bewirken, wobei  
der Umwandlungsschritt der Schritt ist, bei dem der ultrakurze Lichtpuls in dem Wellenleiter in das

Superkontinuum mit einem Spektrum umgewandelt wird, das in einer Bandbreite von zumindest 200 nm, enthalten in dem Wellenlängenbereich von 850 bis 1550 nm, kontinuierlich ist, **dadurch gekennzeichnet**, dass der ultrakurze Lichtpuls von dem Pulsoszillator eine Pulsbreite von nicht mehr als 1 ps aufweist.

Es folgen 17 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

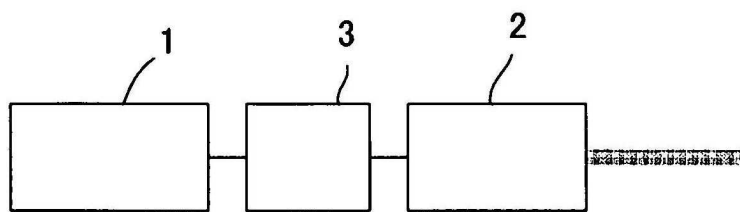


Fig. 1

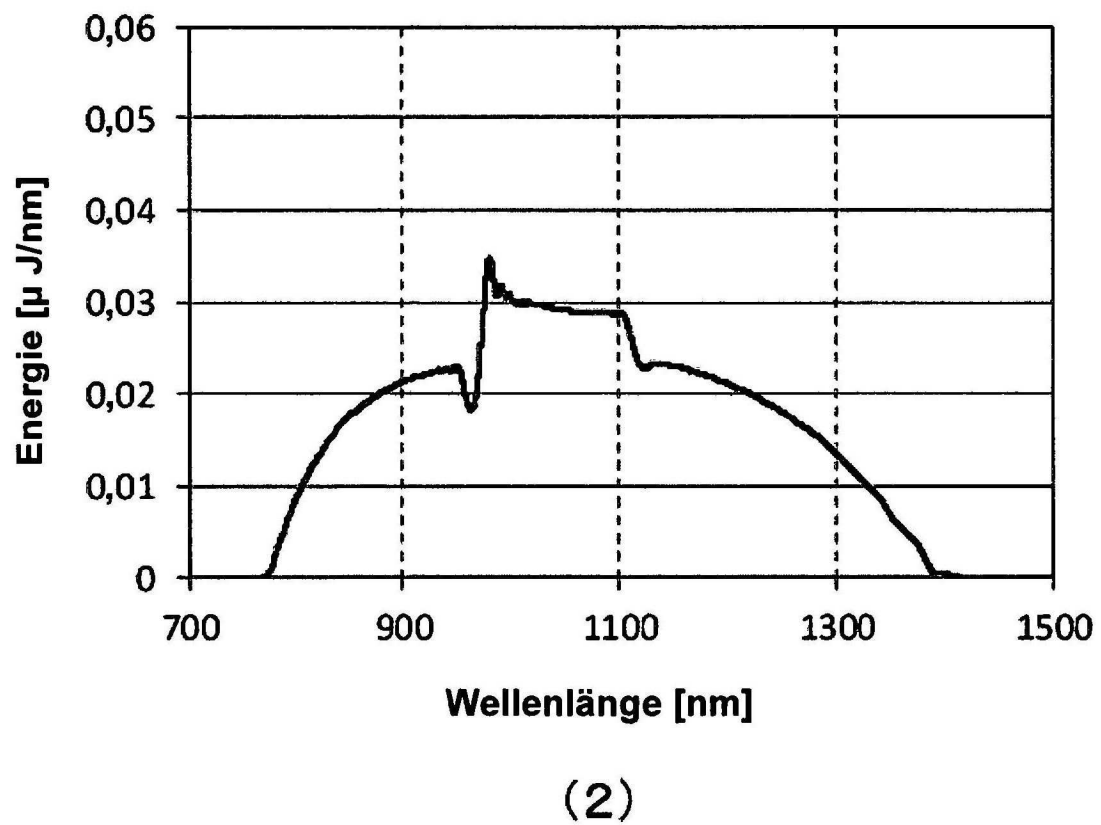
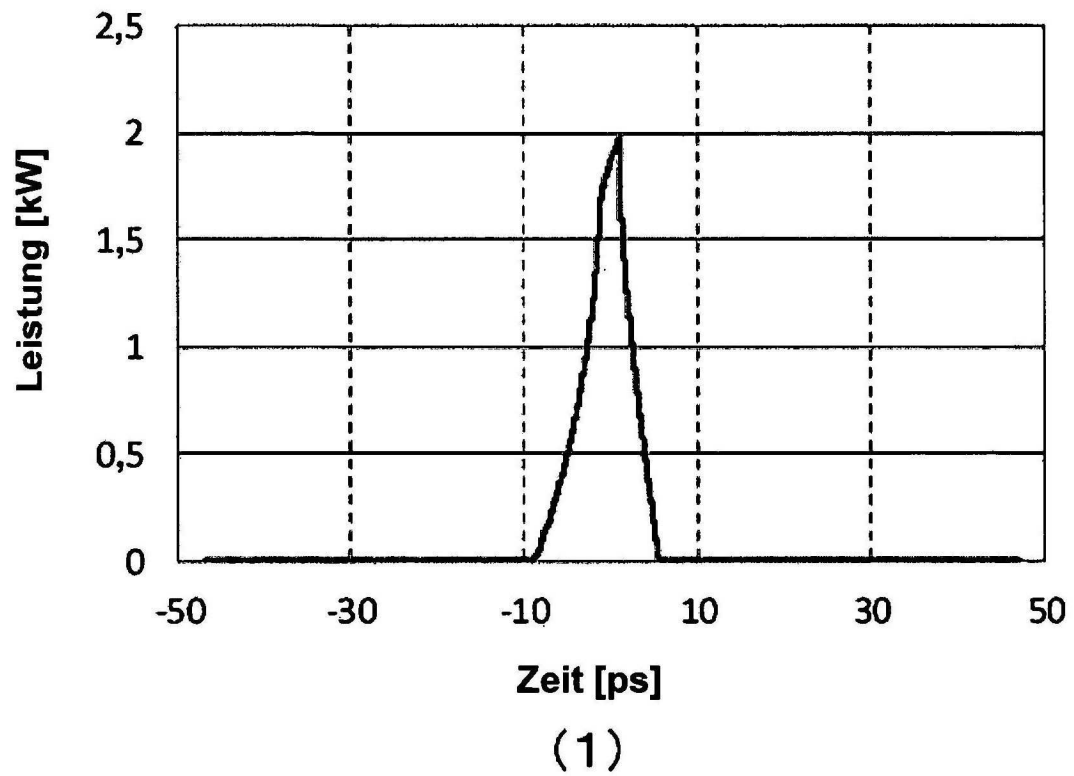
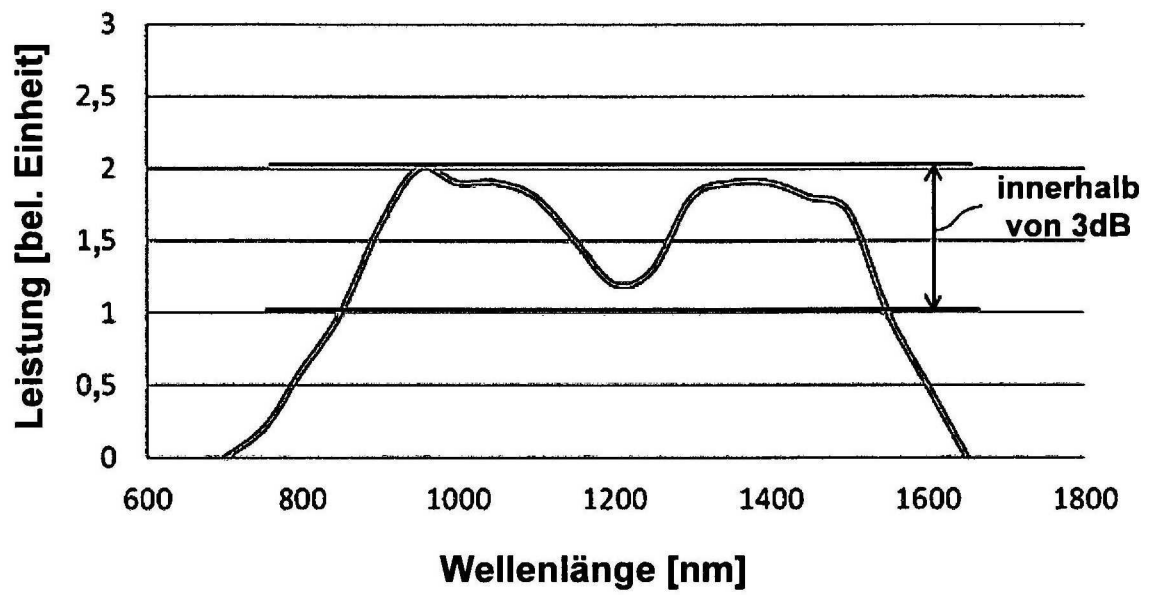
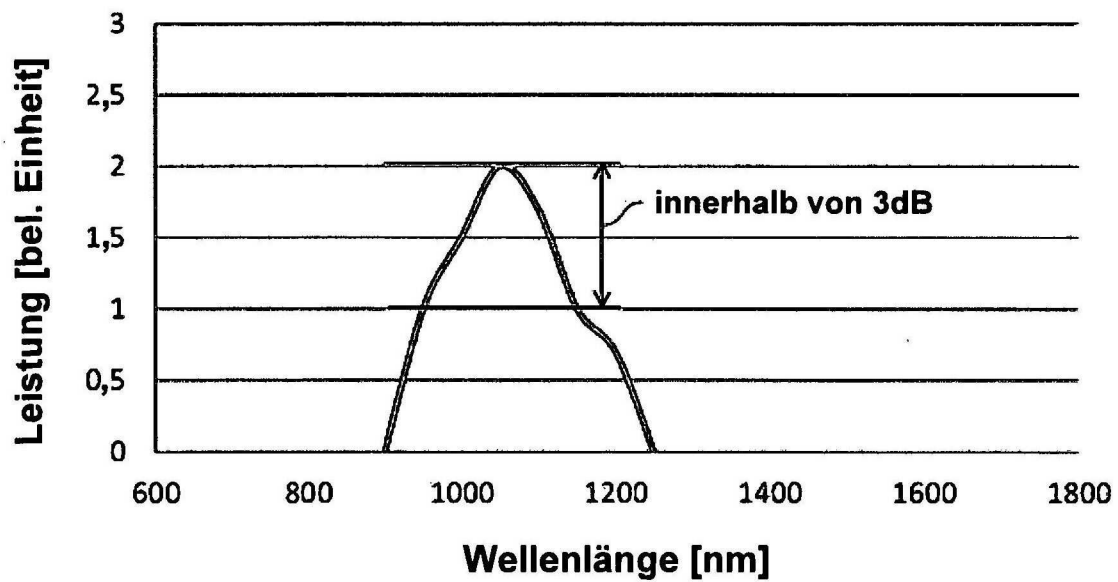


Fig. 2



(1)



(2)

Fig. 3

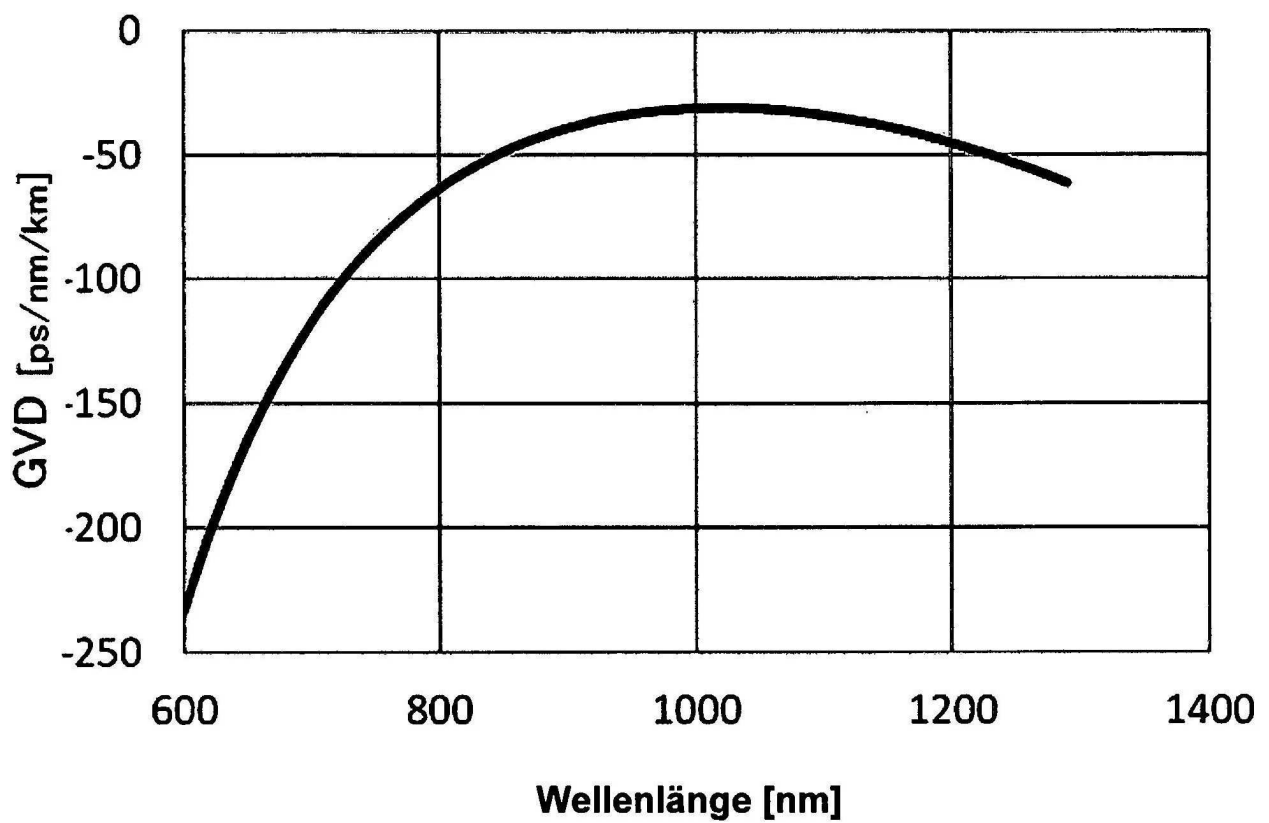


Fig. 4

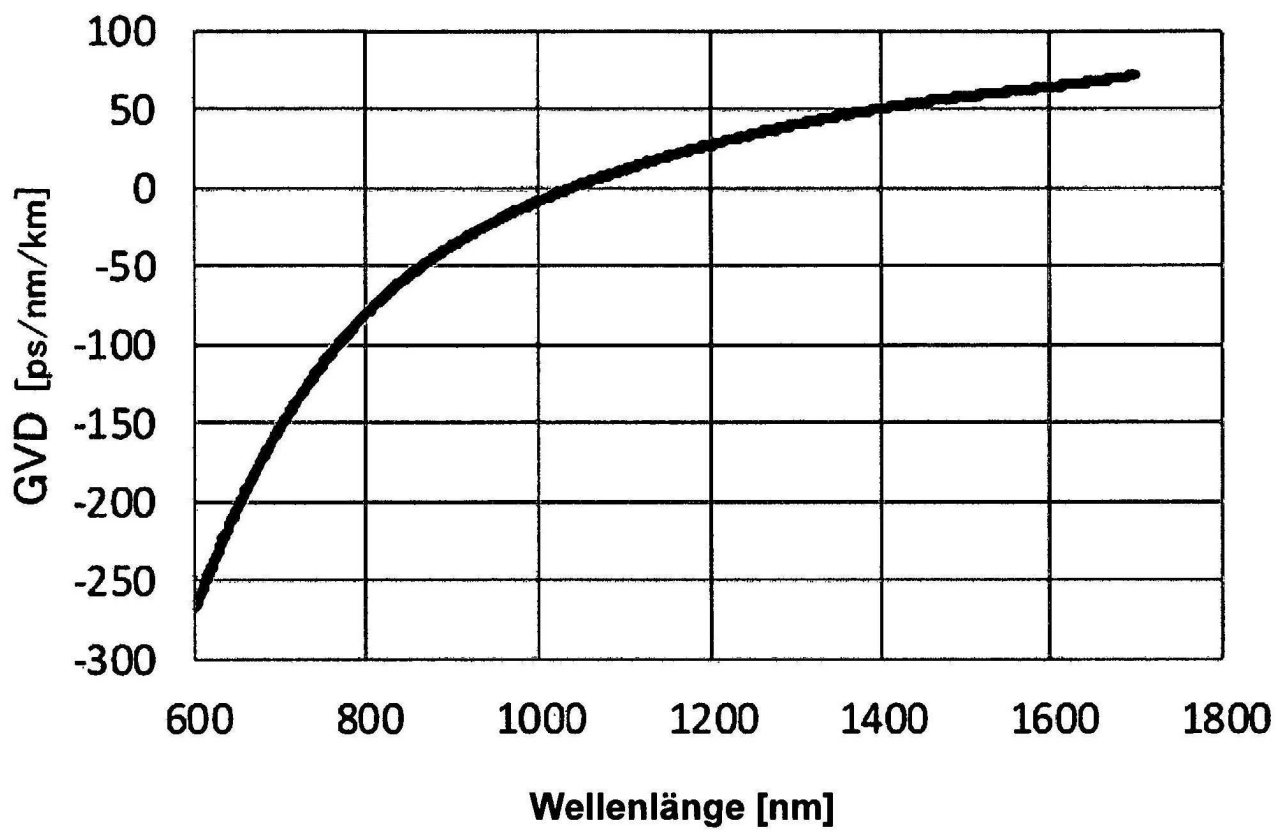


Fig. 5

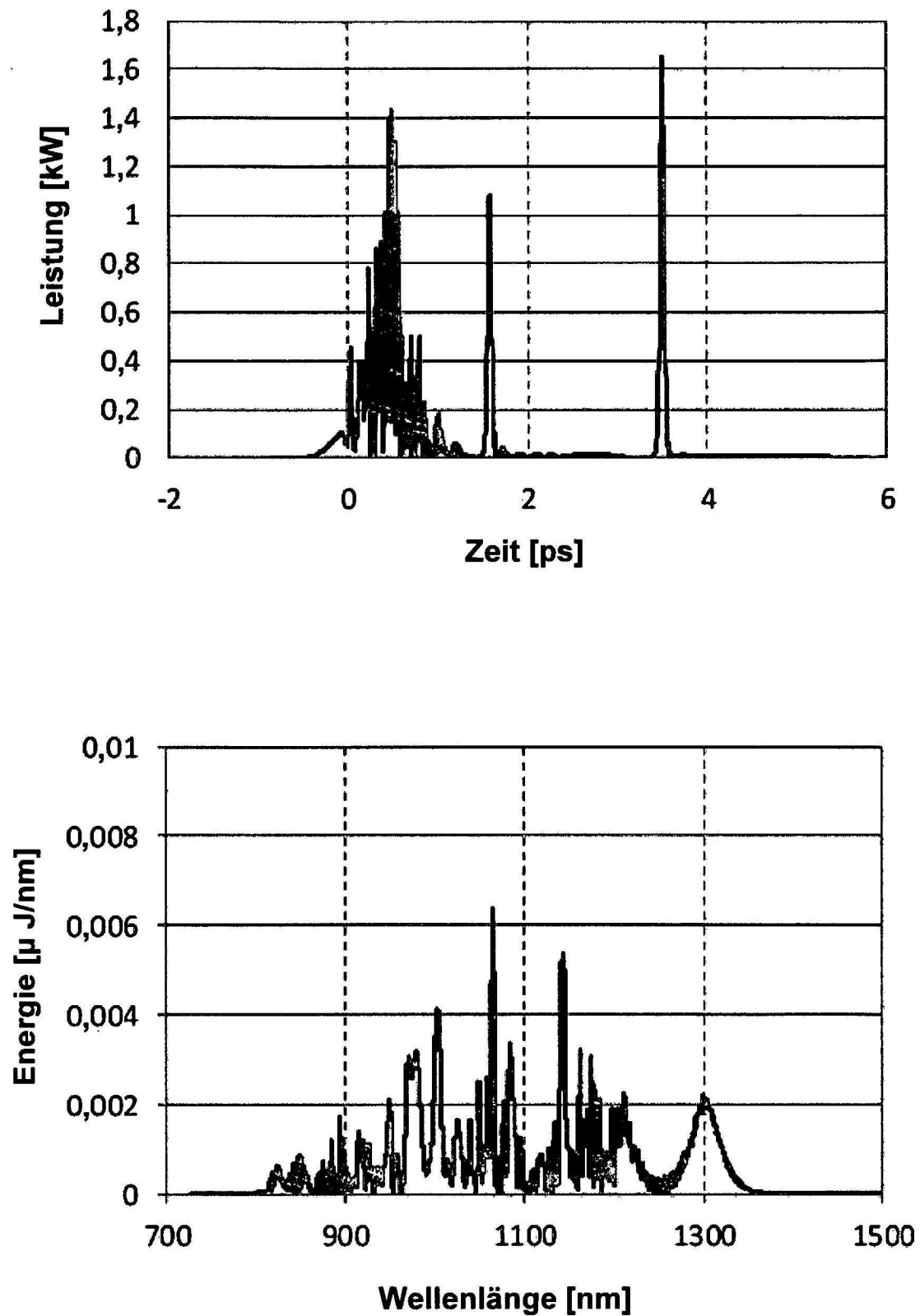


Fig. 6

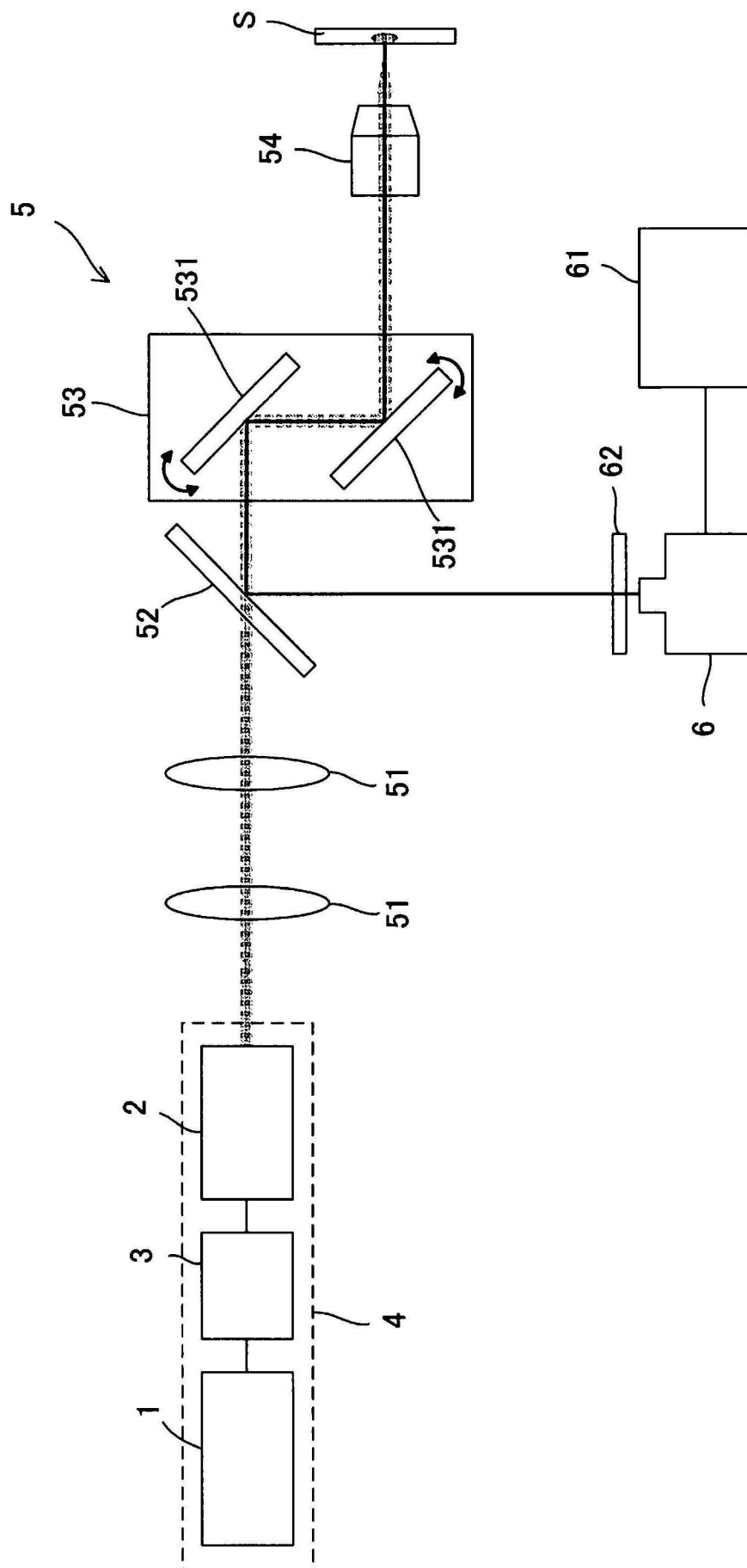


Fig. 7

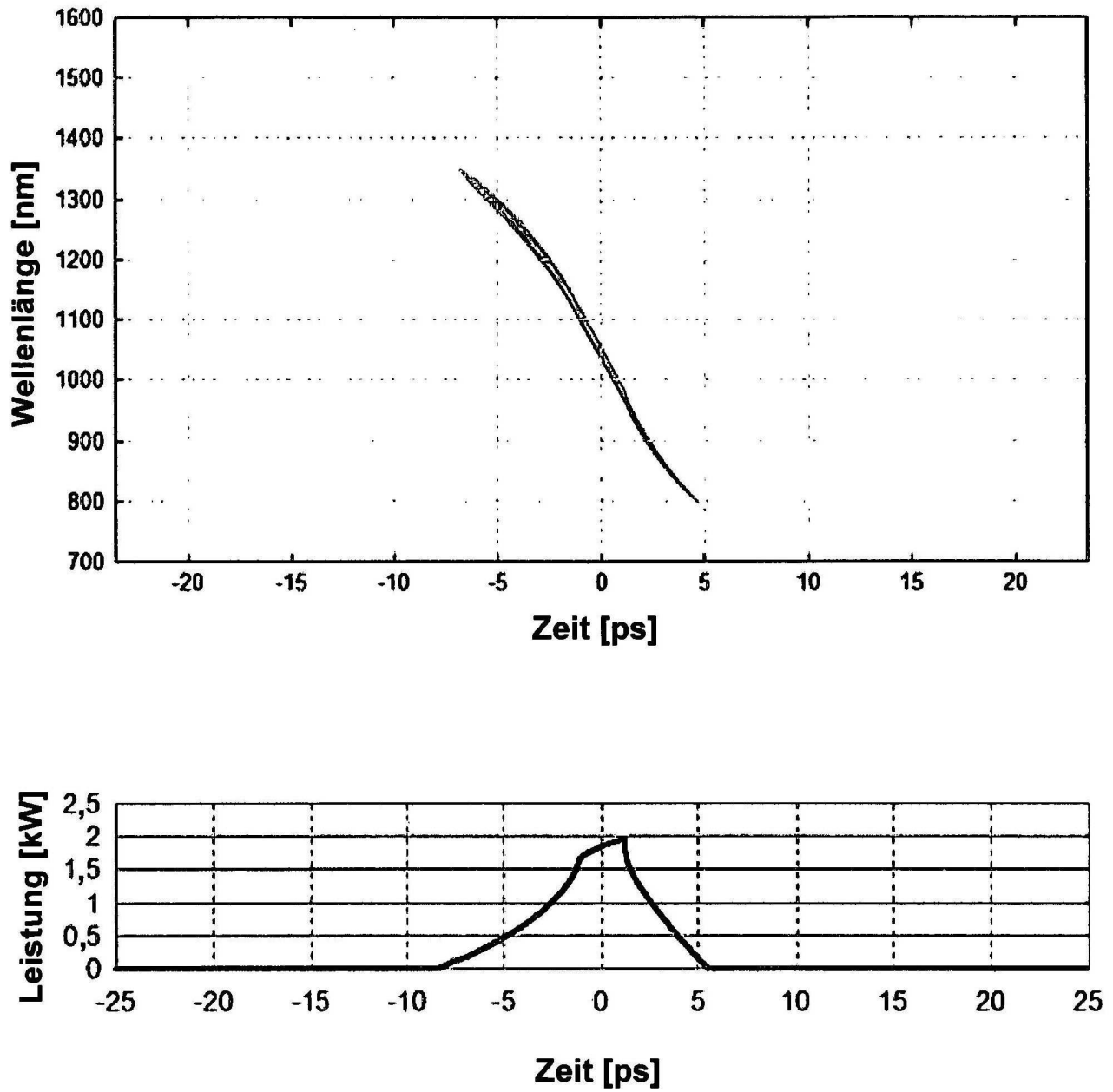


Fig. 8

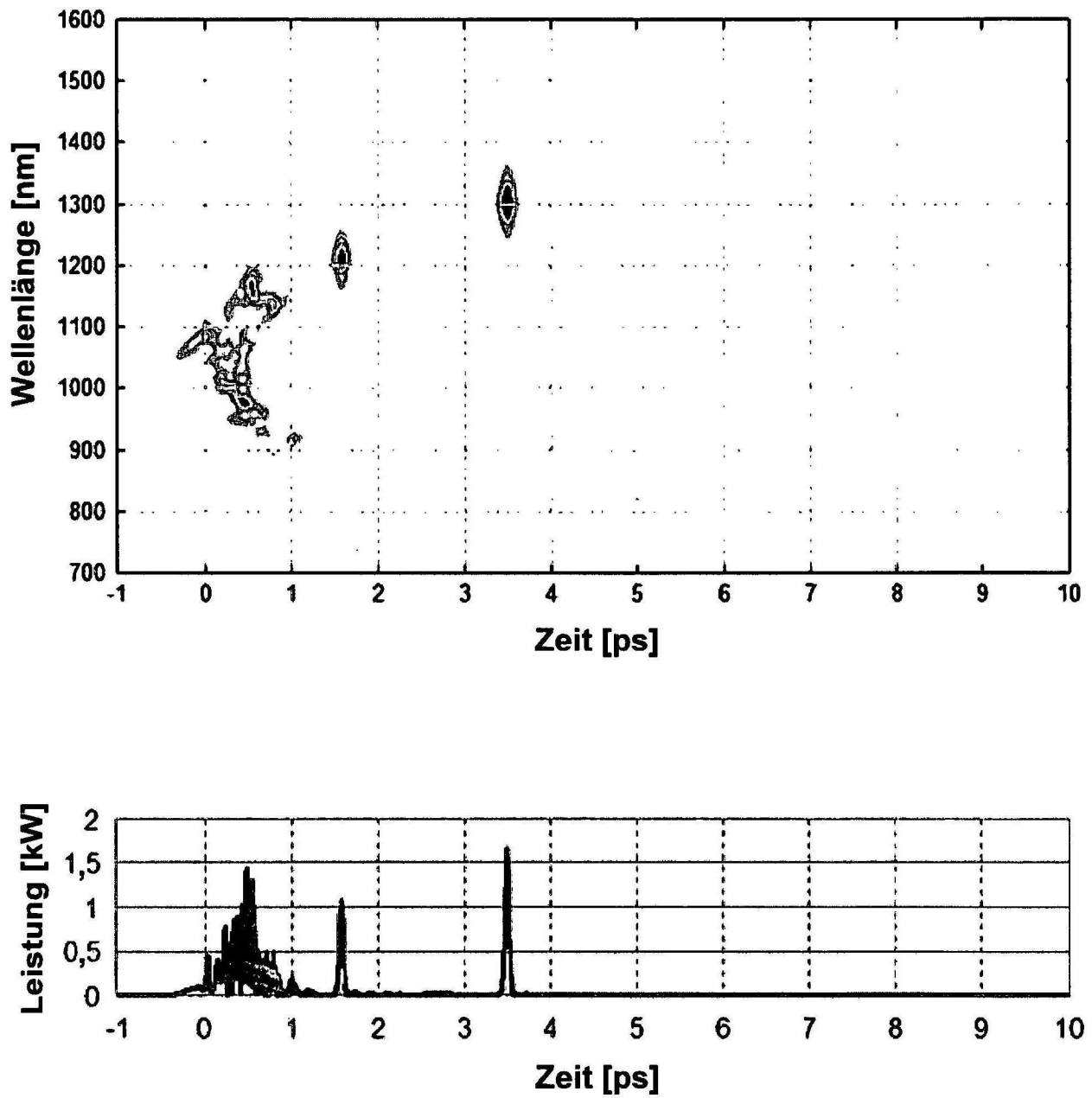


Fig. 9

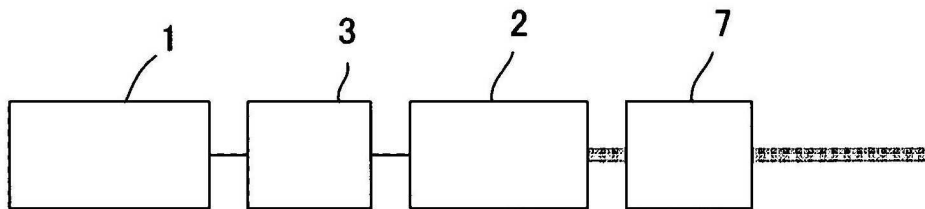


Fig. 10

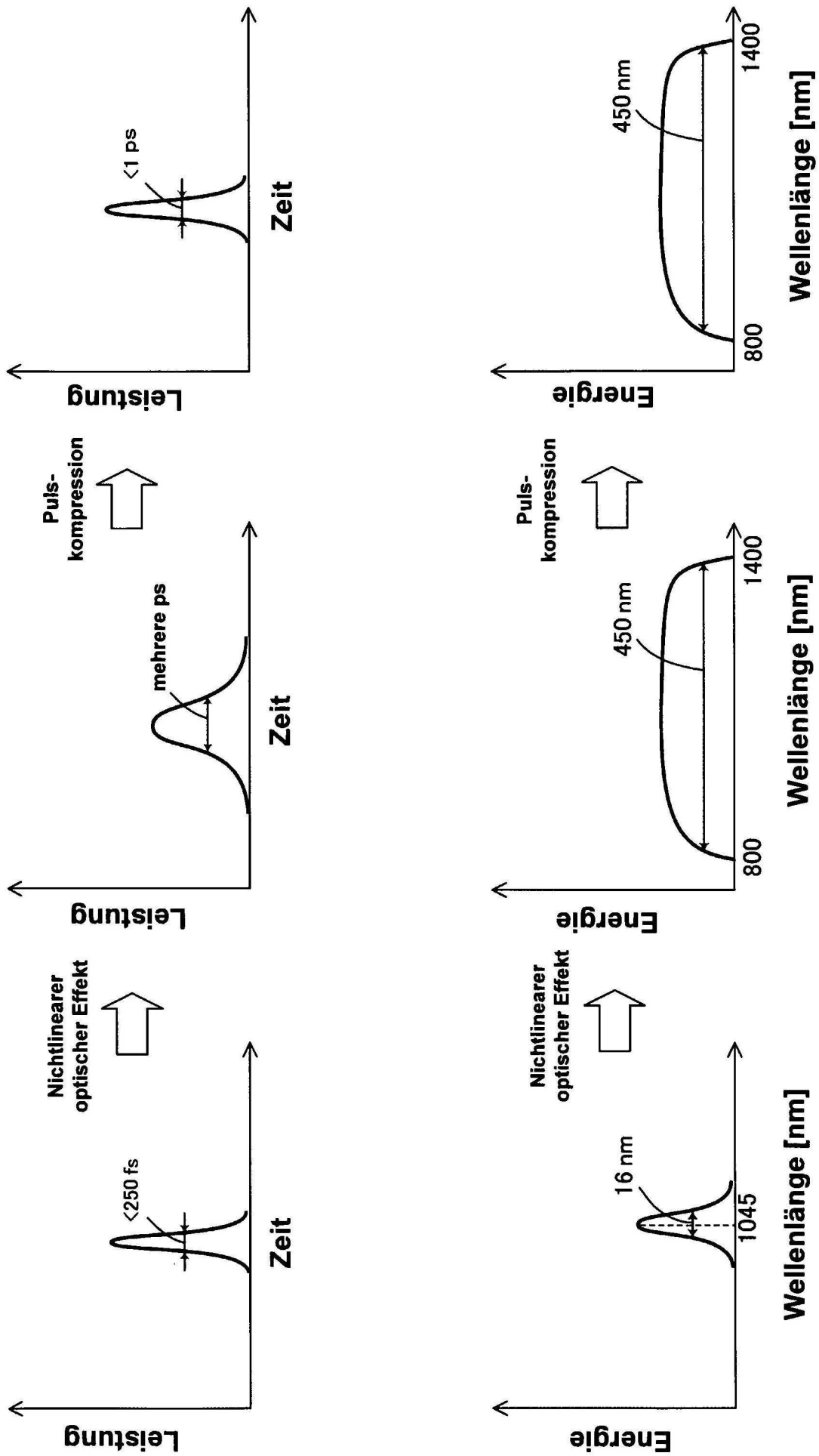


Fig. 11

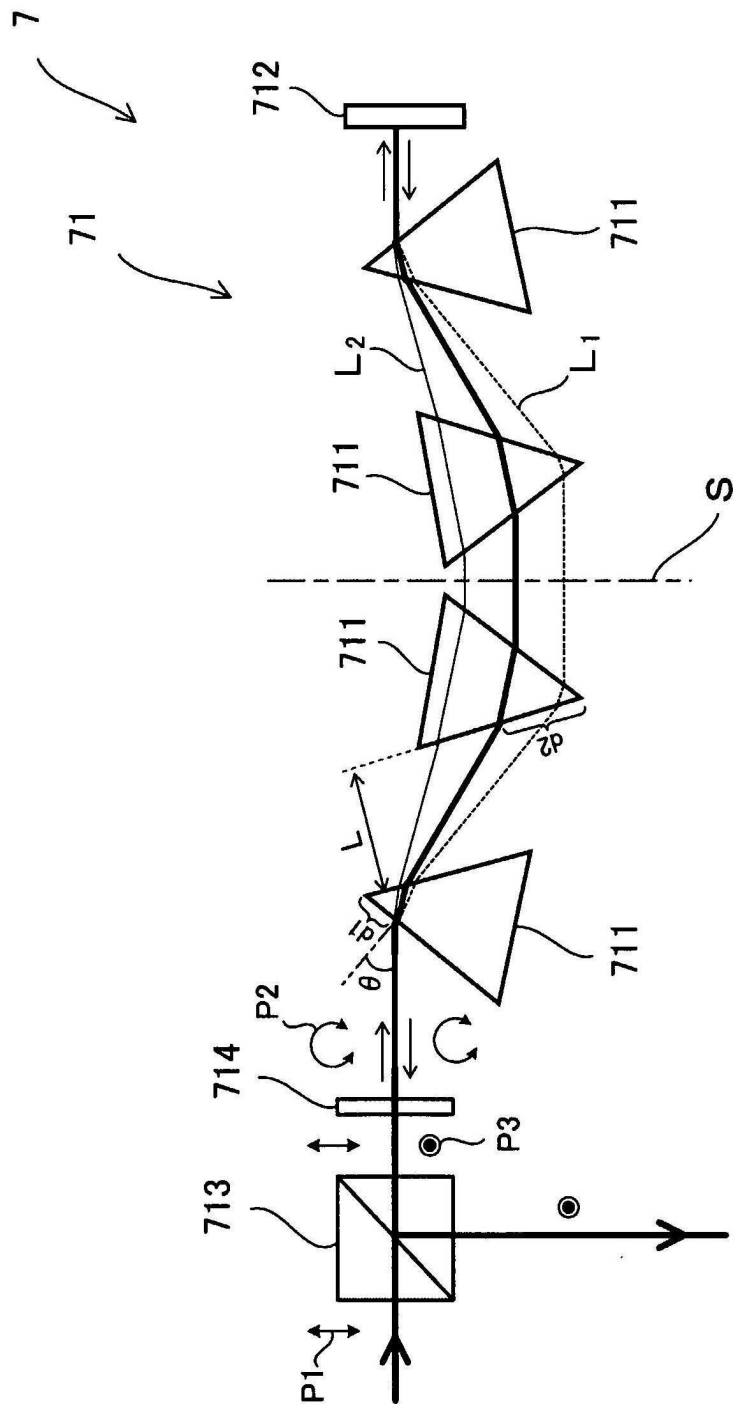


Fig. 12

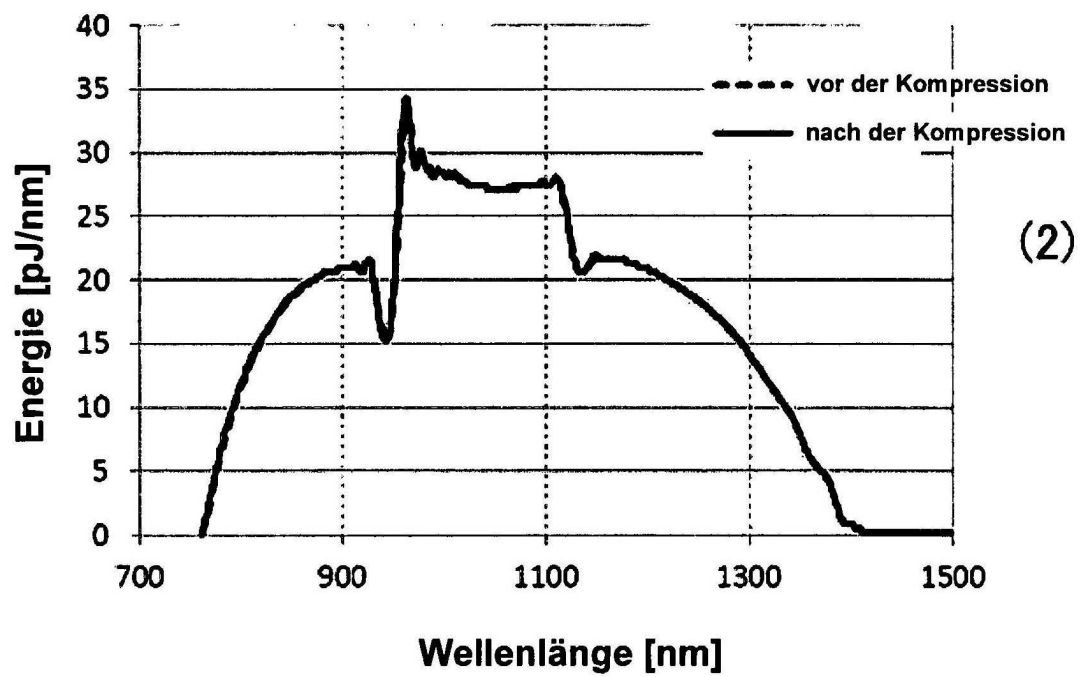
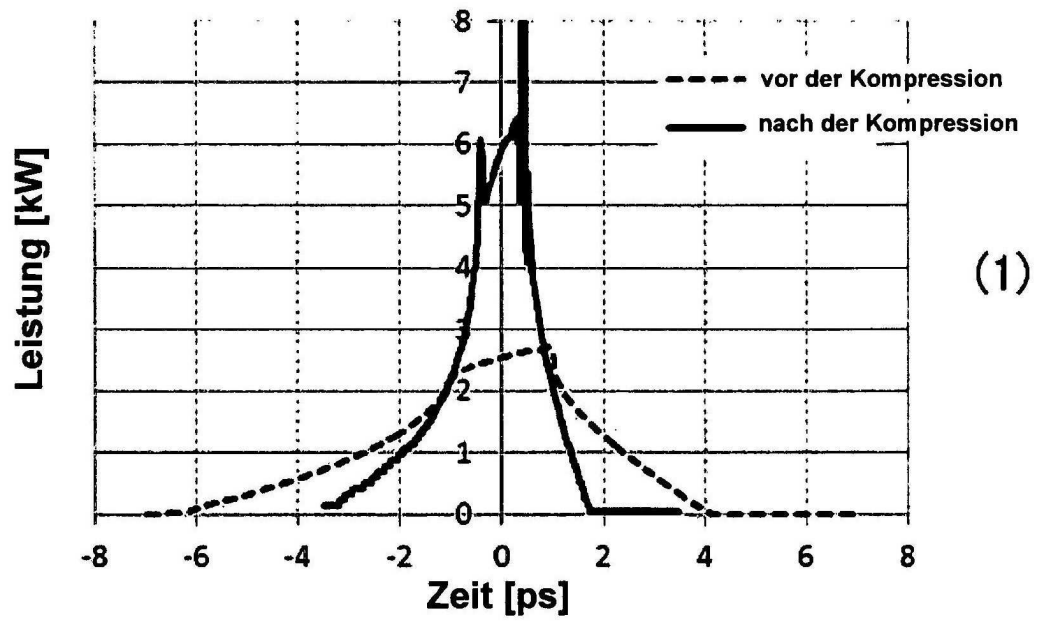
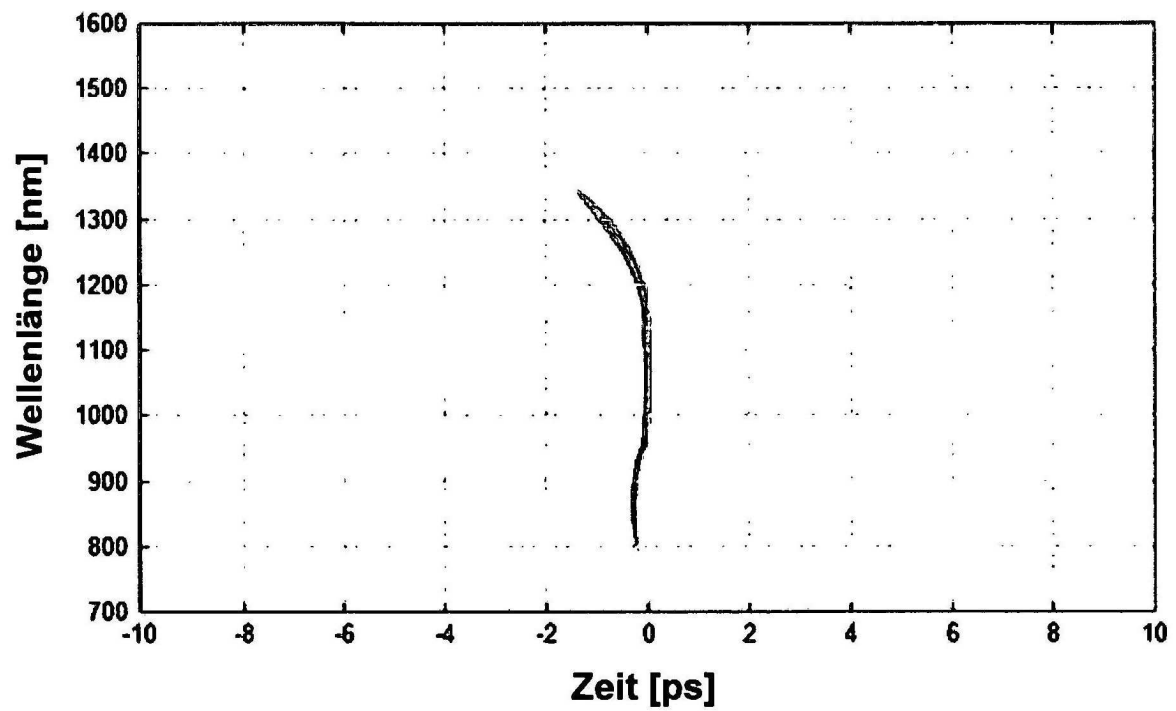
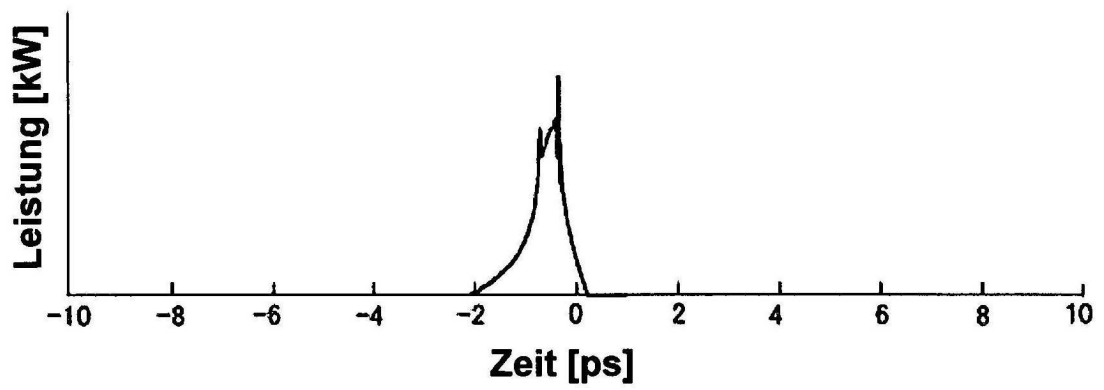


Fig. 13



(1)



(2)

Fig. 14

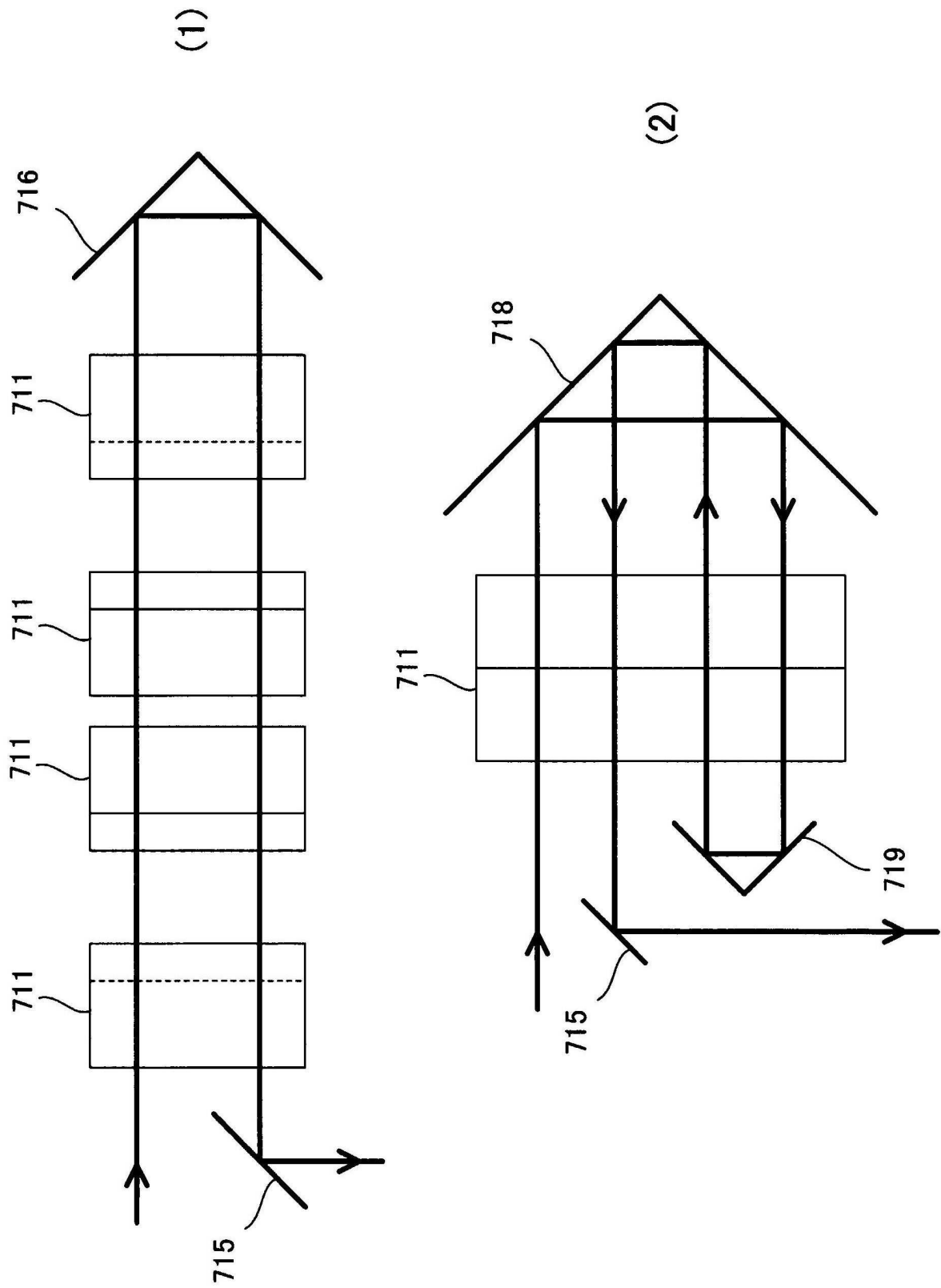


Fig. 15

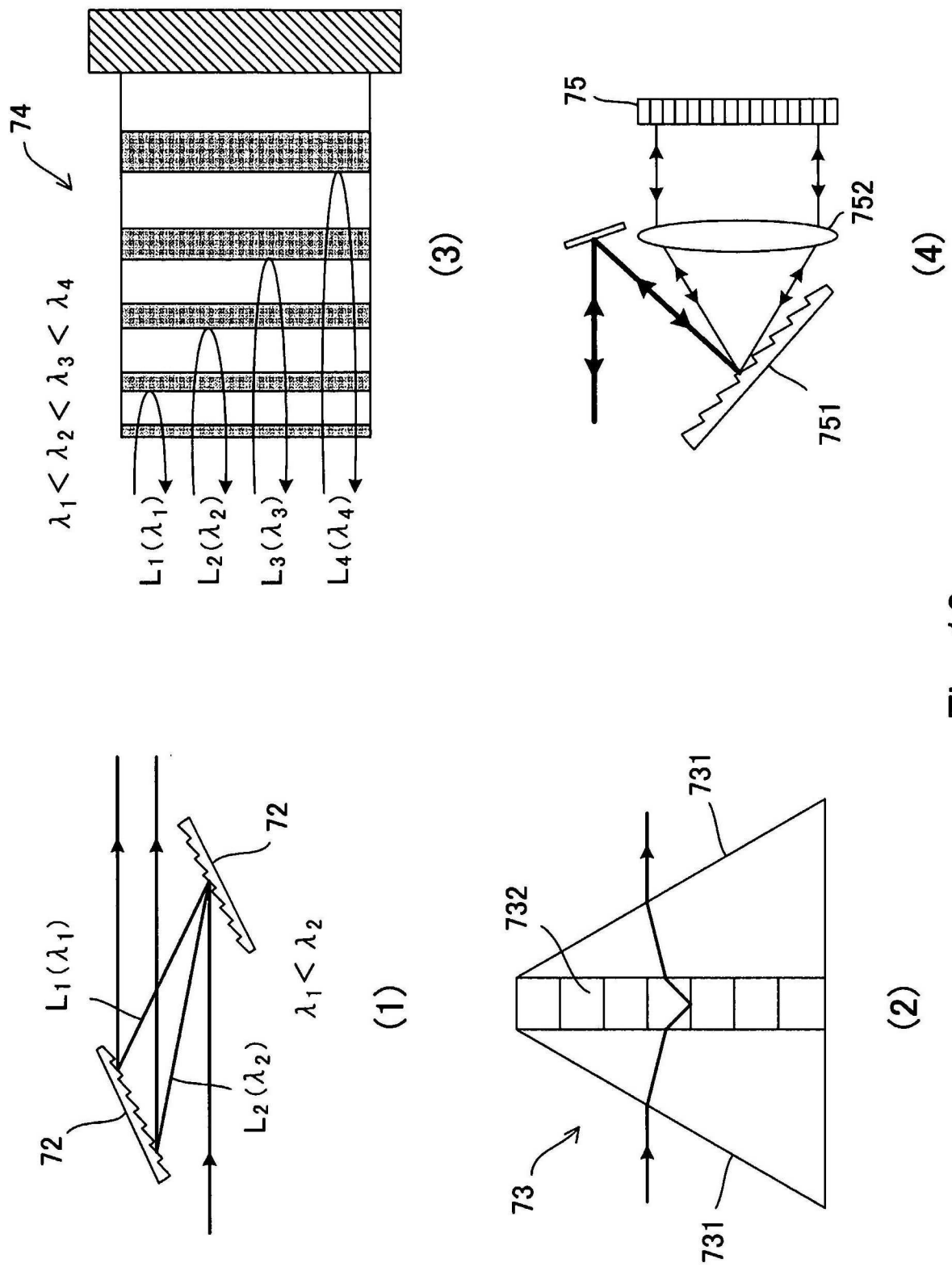


Fig. 16

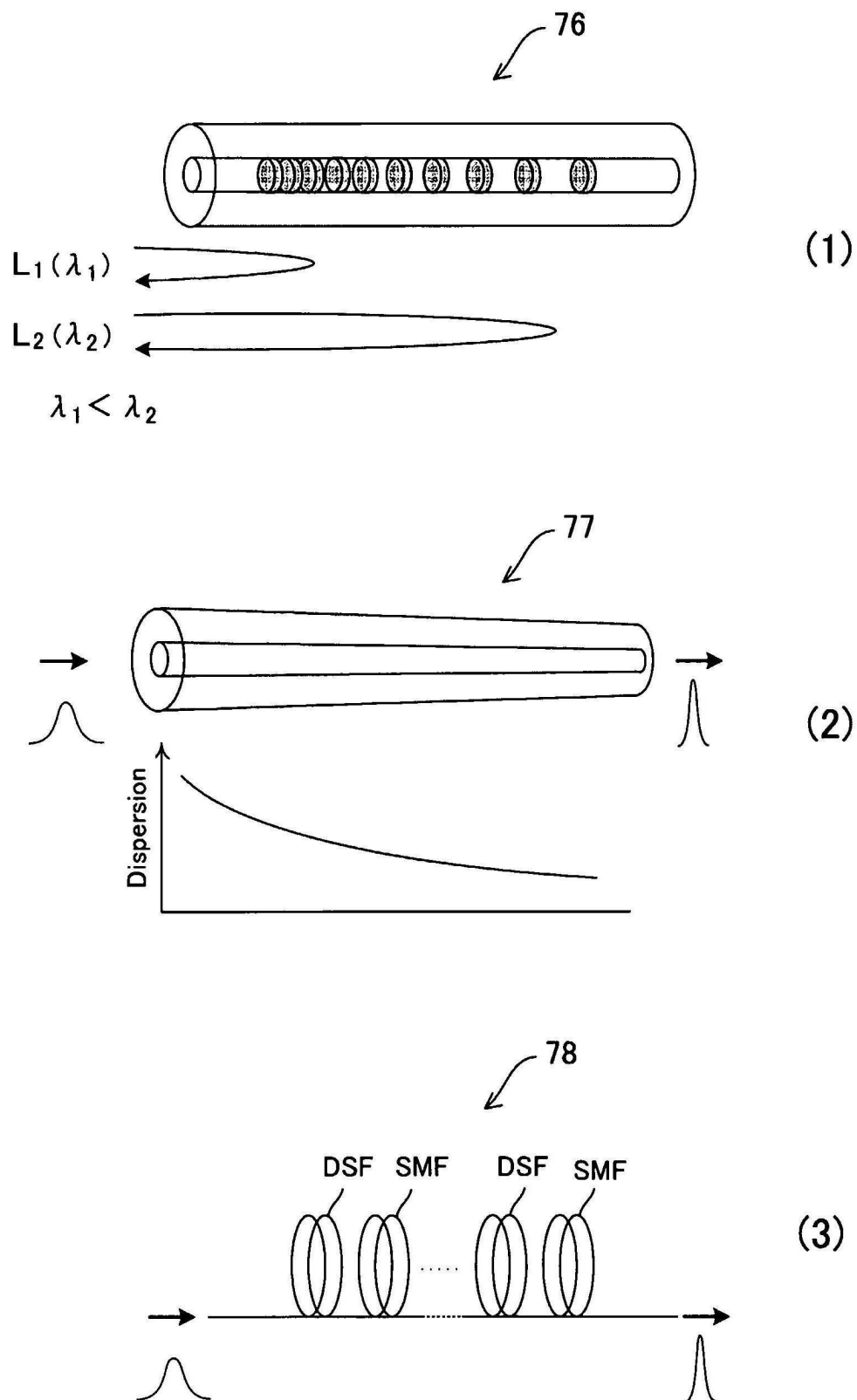


Fig. 17