

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5100461号  
(P5100461)

(45) 発行日 平成24年12月19日(2012.12.19)

(24) 登録日 平成24年10月5日(2012.10.5)

(51) Int.Cl.

G01N 21/65 (2006.01)

F 1

G01N 21/65

請求項の数 7 (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2008-66832 (P2008-66832)  
 (22) 出願日 平成20年3月14日 (2008.3.14)  
 (65) 公開番号 特開2009-222531 (P2009-222531A)  
 (43) 公開日 平成21年10月1日 (2009.10.1)  
 審査請求日 平成23年3月9日 (2011.3.9)

特許法第30条第1項適用 平成19年11月12~14日 社団法人日本分光学会主催の「平成19年度 社団法人日本分光学会 年次講演会」において文書をもつて発表、 平成19年12月21~23日 日本生物物理学会主催の「第45回日本生物物理学会年会」において文書を持って発表(平成19年11月20日 予稿集発行)、 平成20年2月8日 社団法人電気学会主催の「電気学会研究会」において文書をもつて発表

(73) 特許権者 511036783  
 加納 英明  
 千葉県千葉市稻毛区弥生町1-170 東大職員宿舎1-504  
 (74) 代理人 100103137  
 弁理士 稲葉 滋  
 加納 英明  
 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内  
 (72) 発明者 ▲浜▼口 宏夫  
 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内  
 審査官 横井 亜矢子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】非線形分光計測システム用の光源装置、非線形分光計測システム及び方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

0.1~10ナノ秒のパルス幅の光パルスを出射するレーザー光源と、  
 前記光源から出射された光パルスを、第1光パルスと第2光パルスに分割する光学素子と、

前記第1光パルスが入射され、当該第1光パルスを広帯域化してスーパー・コンティニューム光を生成するフォトニック結晶ファイバと、

前記スーパー・コンティニューム光を広帯域のストークス光、前記第2光パルスを狭帯域のポンプ光とし、光学遅延路を用いることなく、これらを重ね合わせて分析対象に集光する手段と、

前記分析対象から発せられるコヒーレントアンチストークスラマン散乱光を検出する検出部と、

からなる非線形分光計測システム。

## 【請求項2】

0.1~10ナノ秒のパルス幅の第1光パルスを出射する第1レーザー光源と、  
 0.1~100ナノ秒のパルス幅の第2光パルスを出射する第2レーザー光源と、  
 前記第1光パルスが入射され、当該第1光パルスを広帯域化してスーパー・コンティニューム光を生成するフォトニック結晶ファイバと、

前記スーパー・コンティニューム光を広帯域のストークス光、前記第2光パルスを狭帯域のポンプ光とし、光学遅延路を用いることなく、これらを重ね合わせて分析対象に集光す

る手段と、

前記分析対象から発せられるコヒーレントアンチストークスラマン散乱光を検出する検出部と、

からなる非線形分光計測システム。

【請求項 3】

前記 0.1 ~ 10 ナノ秒のパルス幅は、1 ナノ秒以下である、請求項 1 または 2 に記載の非線形分光計測システム。

【請求項 4】

前記ポンプ光のスペクトル幅は、 $1 \text{ cm}^{-1}$  以下である、請求項 1 ~ 3 いずれかに記載の非線形分光計測システム。

10

【請求項 5】

前記スーパー・コンティニューム光を、二光子励起の光源として用い、二光子励起によって生じる蛍光が測定可能である、請求項 1 ~ 4 いずれかに記載の非線形分光計測システム。

【請求項 6】

0.1 ~ 10 ナノ秒のパルス幅の光パルスを出射するレーザー光源から出射された光パルスを、第 1 光パルスと第 2 光パルスに分割するステップと、

前記第 1 光パルスをフォトニック結晶ファイバに入射し、当該第 1 光パルスを広帯域化してスーパー・コンティニューム光を生成するステップと、

20

前記スーパー・コンティニューム光を広帯域のストークス光、前記第 2 光パルスを狭帯域のポンプ光として、光学遅延路を用いることなく、これらを重ね合わせて分析対象に集光するステップと、

前記分析対象から発せられるコヒーレントアンチストークスラマン散乱光を検出するステップと、

からなる非線形分光計測方法。

【請求項 7】

0.1 ~ 10 ナノ秒のパルス幅の光パルスを出射する第 1 レーザー光源から第 1 光パルスを、0.1 ~ 100 ナノ秒のパルス幅の光パルスを出射する第 2 レーザー光源から第 2 光パルスを、それぞれ出射するステップと、

前記第 1 光パルスをフォトニック結晶ファイバに入射し、当該第 1 光パルスを広帯域化してスーパー・コンティニューム光を生成するステップと、

30

前記スーパー・コンティニューム光を広帯域のストークス光、前記第 2 光パルスを狭帯域のポンプ光として、光学遅延路を用いることなく、これらを重ね合わせて分析対象に集光するステップと、

前記分析対象から発せられるコヒーレントアンチストークスラマン散乱光を検出するステップと、

からなる非線形分光計測方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

本発明は、非線形分光計測システム用の光源装置に関するものである。本明細書では、非線形分光計測の対象として生細胞を含む生体試料を中心に説明するが、本発明の光源装置が用いられる非線形分光計測の対象は生体試料に限定されない。

【背景技術】

【0002】

生命現象を研究する上で、光を用いた方法は非破壊・非接触で対象にアプローチできるという優れた特徴を有している。このため、生細胞内で機能する分子の動的な振る舞いが、光を用いた様々な方法で研究されている。このうち最も広く使われている手法は、蛍光色素や蛍光タンパク質等による蛍光イメージングである。しかしながら、この手法では試料自身に蛍光物質という異物を予め導入する必要がある。

50

**【 0 0 0 3 】**

これに対して、ラマン分光法は、生きた細胞内の分子分布やそのダイナミクスを非染色で観測することのできる、非常に強力な方法である。ラマンスペクトルは“分子の指紋”とも呼ばれ、分子の個性を鋭敏に反映する特性を持つため、細胞内の分子種、分子構造とそのダイナミクスについての詳細な情報を“ありのまま”的試料から抽出することが可能である。時間と空間を分解し、かつ分子レベルで解析することができるラマン顕微分光法は、生細胞中の各所における分子の分布を時々刻々追跡することができる。したがって、ラマン顕微分光法は、生命科学においても非常に強力な武器となりうる。ラマンスペクトルを“読む”ことで、細胞内の分子種・分子構造の同定のみならず、細胞の生命活性をも選択的にモニタできることが明らかとなってきた。

10

**【 0 0 0 4 】**

ラマン顕微分光法は非常に優れた方法であるが、弱点も存在する。一般に、ラマン散乱の散乱断面積は非常に小さいため、生細胞から良好なラマンスペクトルを得るためにには数秒から数分の露光時間を必要とする。コヒーレントアンチストークスラマン散乱(Coherent anti-Stokes Raman scattering:以下C A R Sと呼ぶ)顕微分光法は、この弱点を克服すべく、微弱なラマン信号を増幅し、ラマンイメージを高速に得ることの出来る方法であり、次世代のラマン顕微分光法として、特に注目を集めている手法の一つである。

**【 0 0 0 5 】**

C A R S過程では、一般に波長の異なる二つの光パルス(ポンプ光とストークス光)を必要とする。この光パルスの振動数差が分子振動と一致したときに、非常に強いC A R S光が発生する。試料に蛍光プローブのタグ付けなどを必要とせず、分子レベルで高速にありのままの対象を可視化できるC A R S顕微鏡の威力は、これまで様々な形で示されている。

20

**【 0 0 0 6 】**

しかしながら、C A R S顕微鏡では一般に特定の振動モードを用いたモノクロ像しか得ることが出来ない。分子振動の豊富な情報を有効に利用するには、分光計測が必須である。C A R Sのスペクトルを得るには、マルチプレックスC A R S過程という方法が一般に用いられている。この過程では、狭帯域のポンプ光と広帯域のストークス光を用いるが、ストークス光の光源として用いるスーパーコンティニューム光の発生には、ピコ秒またはフェムト秒の光パルスが必要であり、ピコ秒レーザーやフェムト秒レーザーは高価であることから、複雑かつ高価な光源システムが必要となっていた。

30

**【 0 0 0 7 】**

これに加えて、狭帯域及び広帯域の2つの光パルスを時間的に重ねるために、百マイクロメートルのスケールの高度な調整が必須であり、高度な専門技術を必要としていた。より具体的には、ポンプ光の光路上に、典型的には2マイクロメートル(往復で40/3フェムト秒)を最小刻みとして、ステージ上のものを並進させることができた移動ステージを配置し、このステージ上に折り返しミラー(90度などの角度で向かい合わせに置いたミラー)を設置し、ステージを移動させてミラーの調整を正確に行うことで、光の伝搬方向を維持しつつ、光路長を調整していた。

**【 0 0 0 8 】**

40

これらの理由のため、生命科学一般へのC A R S顕微分光装置の普及が進んでいない。

**【 0 0 0 9 】**

特許文献1に開示された装置では、フェムト秒からピコ秒の短パルスを生成するレーザー光源を用いており、第1のパルスレーザ光の光源部から分析対象までの光路長を調整する光路長調整部が必須構成要素となっている。特許文献2に開示された装置では、フェムト秒からピコ秒の短パルスを生成するレーザー光源を用いており、また、分割されたパルス光の位相を合わせる位相調整部(これには光路長を調整する光路長調整部が含まれている)が必須構成要素となっている。また、特許文献2に示すように、従来のピコ秒レーザーやフェムト秒レーザーを用いた光学系では、光アイソレータ(比較的高額である)を導入しなければ、ファイバからの戻り光のため、フェムト秒またはピコ秒の発振(モード同期

50

)がストップするという問題があり、その導入が必須であった。

#### 【0010】

非特許文献1では、サブナノ秒マイクロチップレーザー光源が開示されているが、レーザー光源からの出射光を、LBO結晶を通過させて第二高調波を生成させ、基本波と第二高調波をフォトニック結晶ファイバに注入するというダブルポンピング手法を採用してスーパー・コンティニューム光を生成しており、さらに、移動ステージを用いた遅延ラインが備わっている。また、非特許文献2には、サブナノ秒ファイバレーザーが開示されているが、CARSへの適用については一切開示されていない。

【特許文献1】特開2007-278768

【特許文献2】特開2007-271783

10

【非特許文献1】M. Okuno, H. Kano, P. Leproux, V. Conderc, and H. Hamaguchi, "Ultra broadband (>2000cm<sup>-1</sup>) multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering spectroscopy using a subnanosecond supercontinuum light source," Opt. Lett. 32, 3050-3052 (2007).

【非特許文献2】Laroche, M.; Leproux, P.; Couderc, V.; Lesvigne, C.; Gilles, H.; Girard, S., "Compact sub-nanosecond wideband laser source for biological applications", Applied Physics B, Volume 86, Number 4, March 2007, pp. 601-604.

#### 【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

#### 【0011】

20

本発明は、シンプル・コンパクトかつ廉価でありながら、高い性能を有する、非線形分光計測システム用の光源装置を提供することを目的とするものである。

【課題を解決するための手段】

#### 【0012】

かかる課題を解決するために本発明が採用した技術手段は、0.1~10ナノ秒のパルス幅の光パルスを出射するレーザー光源と、前記レーザー光源から出射された光パルスが入射され、当該光パルスを広帯域化してスーパー・コンティニューム光を生成して出射するフォトニック結晶ファイバと、からなり、フォトニック結晶ファイバから出射されたスーパー・コンティニューム光を用いて非線形分光計測を行う、非線形分光計測システム用の光源装置、である。

30

#### 【0013】

パルス幅が0.1ナノ秒より小さいと、"モード同期など特殊で大型複雑かつ高価な発振形式のレーザーを導入する必要がある"という不具合があり、10ナノ秒よりも大きいと、"スーパー・コンティニューム光の発生が起こらない"という不具合がある。1つの態様では、前記パルス幅は、1ナノ秒以下である。後述する実験では、1つの態様では、パルス幅は800psである。1つの態様では、前記光パルスのスペクトル幅は、1cm<sup>-1</sup>以下である。これに対して従来のSC光生成に用いていたフェムト秒レーザー(たとえば、モード同期チタンサファイアレーザー)のパルス幅、スペクトル幅は、例えば、100fs、300cm<sup>-1</sup>のオーダーである。また、ピコ秒レーザーのパルス幅、スペクトル幅は、例えば、3ps、3cm<sup>-1</sup>のオーダーである。

40

#### 【0014】

フェムト秒光パルスをフォトニック結晶ファイバに導入することで非常に広帯域なスペクトルを持つコヒーレントな光源であるスーパー・コンティニューム光が生成されることが知られている。フォトニック結晶ファイバ(PCF)は、多数の空孔が蜂の巣状に配列したクラッドと、ガラスからなる極細のコアという、マイクロストラクチャー構造を持つ。ガラスのコアと空孔によるクラッド間の大きな屈折率差のため、PCFに導入された光はコア中に強く閉じこめられる。また、PCFの波長分散特性は、コアを取り囲む空孔の大きさやその配列の仕方により調整することができる。これらの結果、幅広いスペクトル成分を持つフェムト秒光パルスが、そのパルス幅を広げることなくPCF中を伝搬することが可能となる。このように、PCF中で時間及び空間的に光子数密度の高い状態を実現できるため、P

50

CF中で様々な非線形光学効果を生じさせることが可能である。最近では、サブナノ秒パルスをフォトニック結晶ファイバに注入することでも、スーパー・コンティニューム光が得られることがわかった。サブナノ秒パルス光源とフォトニック結晶ファイバの選択で、所望の波長帯域のスーパー・コンティニューム光を得ることができる。

#### 【0015】

1つの態様では、前記レーザー光源及び前記フォトニック結晶ファイバは、前記フォトニック結晶ファイバから出射されたスーパー・コンティニューム光の波長帯域が1900 nm以下であるように選択され、前記光源装置は、さらに、前記波長帯域を所定の帯域に狭める帯域制限手段を備えている。1つの態様では、前記帯域制限手段は、少なくとも前記レーザー光源の波長より短波長のスペクトル成分を遮断するものである。1つの態様では、前記レーザー光源の波長は、1064 nmであり、この場合、前記フォトニック結晶ファイバから出射されたスーパー・コンティニューム光の波長帯域が1064 nmより短波長のスペクトル成分が遮断され、少なくとも1064 nm以上で、少なくとも1900 nm以下の波長帯域帯、すなわち、1064 nm~1900 nmの波長帯域内のいずれかの帯域のスーパー・コンティニューム光が得られる。これによって、本発明の光源装置をCARSに適用した場合には、波長帯域1064~1900 nmでのCARS測定が可能となる。これは、振動分光で必要なすべての振動モードの検出を可能とするだけではなく、既存の報告に比べ、生体試料への侵入長が長く取れる。従来のCARSにおける波長帯域は、800~1200 nmであったのに対して、本発明の波長帯域は、より近赤外の1064~1900 nm程度となる。

10

#### 【0016】

1つの態様では、前記非線形分光計測システムは、コヒーレントアンチストークスラマン散乱を用いるものであり、前記スーパー・コンティニューム光は、広帯域のストークス光として用いられる。

#### 【0017】

1つの態様では、前記光源装置は、前記レーザー光源から出射された光パルスを第1光パルスと第2光パルスに分割する光学素子(ビームスプリッター)を備えており、前記第1光パルスは、前記フォトニック結晶ファイバに入射されてスーパー・コンティニューム光として出射され、前記第2光パルスは、狭帯域ポンプ光として用いられる。

#### 【0018】

30

1つの態様では、前記光源装置は、ポンプ光を生成する他の0.1~100ナノ秒のパルス幅の光パルスを出射するレーザー光源を備えている。パルス幅が0.1秒より小さいと、“モード同期など特殊で大型複雑かつ高価な発振形式のレーザーを導入する必要がある”という不具合があり、100ナノ秒よりも大きいと、“CARSを発生させるための尖頭出力が足りない”という不具合がある。

#### 【0019】

1つの態様では、前記非線形分光計測システムは、多光子顕微鏡である。1つの態様では、前記多光子顕微鏡は、二光子励起蛍光顕微鏡を含む。本発明に係る光源装置は、CARS以外の非線形光学効果(二光子蛍光や第二高調波など)を発生させる励起光源としても使える。

40

#### 【0020】

1つの好ましい態様では、本発明に係る光源装置は、CARS顕微鏡に適用される。上記従来のCARS顕微鏡の問題を解決するためには、光源部分におけるブレイクスルーが必要となる。この点で、大量生産に向いており、比較的安価で製作可能なサブナノ秒マイクロチップレーザーをCARSの光源として用いてサブナノ秒スーパー・コンティニューム光を生成させることで、シンプル・コンパクトかつ廉価でありながら、高い性能を有する、全く新しいCARS分光法及びイメージング法に関する発明を行った。

#### 【0021】

すなわち、本発明が採用した他の技術手段は、0.1~10ナノ秒のパルス幅の光パルスを出射するレーザー光源と、前記光源から出射された光パルスを、第1光パルスと第2光

50

パルスに分割する光学素子と、前記第1光パルスが入射され、当該第1光パルスを広帯域化してスーパー・コンティニューム光を生成して出射するフォトニック結晶ファイバと、前記スーパー・コンティニューム光を広帯域のストークス光、前記第2光パルスを狭帯域のポンプ光として、これらを重ね合わせて分析対象に集光する手段と、前記分析対象から発せられるコヒーレントアンチストークスラマン散乱光を検出する検出部と、からなる非線形分光計測システム、である。

#### 【0022】

C A R S 顕微鏡を構成するにあたり、ポンプ光、ストークス光のそれぞれを生成するレーザー光源を設けてもよく、この場合、本発明が採用した技術手段は、0.1～10ナノ秒のパルス幅の第1光パルスを出射する第1レーザー光源と、0.1～100ナノ秒のパルス幅の第2光パルスを出射する第2レーザー光源と、前記第1光パルスが入射され、当該第1光パルスを広帯域化してスーパー・コンティニューム光を生成して出射するフォトニック結晶ファイバと、前記スーパー・コンティニューム光を広帯域のストークス光、前記第2光パルスを狭帯域のポンプ光として、これらを重ね合わせて分析対象に集光する手段と、前記分析対象から発せられるコヒーレントアンチストークスラマン散乱光を検出する検出部と、からなる非線形分光計測システム、である。

#### 【0023】

本方法は、複雑なレーザー光源システムを必要とせず、波数帯域幅として、 $> 2000 \text{ cm}^{-1}$ に亘る広帯域なC A R Sスペクトルを一度に得ることができるという長所を併せ持つ。これに加えて、サブナノ秒のパルスの時間幅は、数十センチメートル程度のタイミングのずれに対して堅牢であるという特徴を持つため、2つの光パルスを同期して試料に照射する上で、タイミングジッタの影響を受けにくく、装置の構築も革新的に簡略化され得る。したがって、1つの態様では、ストークス光とポンプ光を重ね合わせて分析対象に集光する手段は、ポンプ光の光路長調整装置を含まない。ここで、ポンプ光の光路長調整装置は、光パルスを分割するビームスプリッターや光パルスの光路を異なる方向に仕向けるミラー等の光学要素とは別の1つあるいは複数の要素からなる装置であり、例えば、既述のような移動ステージとミラーから構成される。本発明では、このような光路長調整装置を用いる必要が無い。すなわち、ポンプ光とストークス光と重ね合わせる手段としては、従来のように光学遅延路を必要としない。重ね合わせ手段としては、エッジフィルタやノッチフィルタ、あるいは、ダイクロイックミラー、ビームスプリッター等の光学素子でもよい。

#### 【0024】

1つの態様では、前記スーパー・コンティニューム光を、二光子励起の光源として用い、二光子励起によって生じる蛍光が測定可能である。C A R S装置の一部を用いることで、近赤外二光子励起による二光子蛍光イメージを得ることが出来る。図11、図12に示すように、本発明に係る光源装置（レーザー光源とフォトニック結晶ファイバを備えている）を用いて、C A R S 顕微鏡、二光子励起蛍光顕微鏡を構築することができる。図11は、C A R S 顕微鏡の概略図であり、レーザー光源から出射された光パルスをビームスプリッターで2つの光パルスに分割し、一方の光パルスをフォトニック結晶ファイバに注入して広帯域化してスーパー・コンティニューム光を生成し、他方の光パルスとスーパー・コンティニューム光を重ね合わせて試料に照射し、試料から発せられるコヒーレントアンチストークスラマン散乱光を顕微鏡の対物レンズで取得し、分光器で分光してC C Dカメラで取得する。図12は、二光子励起蛍光顕微鏡の概略図であり、レーザー光源から出射された光パルスをビームスプリッターで2つの光パルスに分割し、一方の光パルスをフォトニック結晶ファイバに注入して広帯域化してスーパー・コンティニューム光を生成し、ガルバノスキャナを介して試料に照射し、試料から発せられる励起蛍光を顕微鏡の対物レンズで取得し、検出器で取得する。

#### 【0025】

本発明は非線形分光計測方法としても提供され、したがって、本発明が採用した他の技術手段は、0.1～10ナノ秒のパルス幅の光パルスを出射するレーザー光源から出射され

10

20

30

40

50

た光パルスを、第1光パルスと第2光パルスに分割するステップと、前記第1光パルスをフォトニック結晶ファイバに入射し、当該第1光パルスを広帯域化してスーパー・コンティニューム光を生成して出射するステップと、前記スーパー・コンティニューム光を広帯域のストークス光、前記第2光パルスを狭帯域のポンプ光として、光路長調整装置を用いた第1パルス光の光路長調整を行うことなく、これらを重ね合わせて分析対象に集光するステップと、前記分析対象から発せられるコヒーレントアンチストークスラマン散乱光を検出するステップと、からなる非線形分光計測方法、である。

#### 【0026】

また、本発明が採用した他の技術手段は、0.1～10ナノ秒のパルス幅の光パルスを出射する第1レーザー光源から第1光パルスを、0.1～100ナノ秒のパルス幅の光パルスを出射する第2レーザー光源から第2光パルスを、それぞれ出射するステップと、前記第1光パルスをフォトニック結晶ファイバに入射し、当該第1光パルスを広帯域化してスーパー・コンティニューム光を生成して出射するステップと、前記スーパー・コンティニューム光を広帯域のストークス光、前記第2光パルスを狭帯域のポンプ光として、前記第1パルス光の光路長調整装置を用いることなく、これらを重ね合わせて分析対象に集光するステップと、前記分析対象から発せられるコヒーレントアンチストークスラマン散乱光を検出するステップと、からなる非線形分光計測方法、

である。

#### 【発明の効果】

#### 【0027】

本発明では、スーパー・コンティニューム光を生成する光パルスの光源として、0.1～10ナノ秒のパルス幅の光パルスを出射するレーザー光源を用いるものであり、このような光パルスを出射するサブナノ秒マイクロチップレーザーは、大量生産に向いており、比較的安価で製作可能である。

#### 【0028】

光源が小さくコンパクトなので、顕微鏡に簡単に組み込むことができる。

#### 【0029】

C A R Sではポンプ光、ストークス光を時間的かつ空間的（少なくとも試料に照射された時に重なっている）に重ねる必要があるが、本発明に係る光源装置を用いることで、両光パルスの重ね合わせを非常に簡便に行うことができる。本発明は、従前の（ピコ秒あるいはフェムト秒のモード同期レーザー）のようなマイクロメートルスケールの光学調整を必要とせず、簡便にC A R S過程を実現できる。そのため、システムが機械的変動に対してロバストである。従来では、100マイクロメートルの精度でポンプ光、ストークス光を合わせる必要があったが、本発明では、10cmの精度で済むため、従来の装置に必要であったポンプ光を遅延させる移動ステージが不要であり、百マイクロメートルのスケールの高度な調整も高度な専門技術も必要としない。

#### 【0030】

サブナノ秒レーザー光源を用いた本発明では、従来のモード同期型ピコ秒レーザーやフェムト秒レーザーを用いた光学系で必要であった光アイソレータは必要ない。

#### 【0031】

（サブ）ナノ秒の光源を用いると、ポンプレーザーのスペクトル幅（例えば、従来では10cm<sup>-1</sup>程度であるのに対して、本発明の光源装置では<1cm<sup>-1</sup>）が狭いため、スペクトル分解能が格段に向上する。これも一因となって、タンパクの信号などを鮮明に捉えることができ、二次構造についての情報なども得ることが出来る。

#### 【0032】

本発明に係るC A R S顕微鏡では、タンパク質のバンド（1650cm<sup>-1</sup>付近のアミドⅠや、1300cm<sup>-1</sup>付近のアミドⅠⅡ）や、脂質のバンド（1450cm<sup>-1</sup>付近のC-H変角）など、指紋領域（500-1700cm<sup>-1</sup>付近）と呼ばれる、分子の構造により非常に異なるスペクトルパターンを示す信号が、従来のシステムに比べて、鋭く出る。

#### 【0033】

10

20

30

40

50

上記効果が相俟って、サブナノ秒スーパー・コンティニューム光を応用することで、シンプル・コンパクトかつ廉価でありながら、高い性能を有する、全く新しいC A R S 分光法及びイメージング法を提供することができ、生命科学、医学、物質・材料科学を初め様々な分野に普及することが期待できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0034】

[A] 非線形ラマン分光イメージング法

本発明の理解を助けることを主な目的として、本発明の背景技術について説明する。

【0035】

[A - 1] C A R S とは

コヒーレントアンチストークスラマン散乱(Coherent anti-Stokes Raman scattering: C A R S)は、非線形ラマン過程の一つであり、現在最もイメージングの応用が進んでいる手法の一つである。図1(a)に、C A R S過程のスキームを示す。C A R Sでは、一般に波長の異なる二つのレーザー光( $\omega_1$ ,  $\omega_2$ 光、またはポンプ光、ストークス光)を用いる。二つの入射光の角振動数差 $\omega_1 - \omega_2$ が試料分子の持つ振動モードの角振動数 $\omega$ と一致すると、多数の試料分子の振動モードが共鳴的に位相を揃えて(コヒーレントに)励振され、その結果非常に強く、かつ指向性のよいラマン散乱光を得ることができる。

10

【0036】

通常の自発ラマン散乱と比べて、C A R Sには次のような優れた特徴がある。第一に、C A R S光の波長は入射した光の波長より短く、また信号光がビーム状に射出されるため、一光子蛍光による妨害を受けにくい。第二に、C A R S過程は非線形光学過程であるため、レーザー光が強く集光された部分のみから発生する。その結果、共焦点顕微鏡のようにピンホールを導入する必要がなく、高い三次元空間分解能を有する。

20

【0037】

[A - 2] マルチプレックスC A R S過程

様々な振動モードを用いてマルチカラーでイメージを取得することができるC A R S顕微“分光”法を実現するためには、光源部分の改良が必要である。このうち最も直接的な方法の一つは、以下に示すマルチプレックスC A R S過程である。図1(b)にマルチプレックスC A R S過程のエネルギーダイアグラムを示す。マルチプレックスC A R S過程では、ストークス光( $\omega_2$ 光)として広帯域な光源を用いる。従って、狭帯域なポンプ光( $\omega_1$ 光)との角振動数差 $\omega_1 - \omega_2$ に幅広いバリエーションが生じる。その結果、試料分子の持つ複数の振動モードに共鳴しうる組み合わせが発生する。このようにして発生した振動分極を、 $\omega_1$ 光によりプローブすると、最終的に様々な角振動数 $\omega_2 - \omega_1$ を持つC A R S光が発生する。これを分光計測すると、各々の振動共鳴の波数位置に鋭い構造を持つ、マルチプレックスC A R Sスペクトルを得ることが出来る。このようなスキームにより、測定可能波数帯域として $> 3500 \text{ cm}^{-1}$ という、分子振動基音の領域をほぼカバーできる超広帯域なマルチプレックスC A R S顕微分光装置を得ることができる。超広帯域マルチプレックスC A R Sスペクトル測定を可能にしたのは、フォトニック結晶ファイバ(Photonic crystal fiber: PCF)と、それにより得られるスーパー・コンティニューム(Supercontinuum: SC)光である。

30

【0038】

[A - 3] S C 光を用いたマルチプレックスC A R S顕微分光装置

図2に、従来の超広帯域マルチプレックスC A R S顕微鏡の実験装置を示す。光源にはモード同期チタンサファイアレーザー発振器(Coherent社; Vitesse)を用い、出力の一部をPCF(Crystal Fiber社; NL-PM-750)に導入してSC光を発生させた。SC光は可視から近赤外まで、幅広いスペクトルを有するが、そのうち近赤外成分のみを広帯域ストークス光( $\omega_2$ 光)として用いた。一方、発振器からの残りの基本波をバンドパスフィルタにより狭帯域化してポンプ光( $\omega_1$ )とし(波数幅約 $20 \text{ cm}^{-1}$ )、光学遅延路を経由させた後、ノッチフィルタによりストークス光と同軸に顕微鏡へと導入した。二つの光パルスは対物レンズにより試料に集光される。光学遅延路は、ポンプ光の光路上に、典型的には2マイ

40

50

クロメートル（往復で40/3フェムト秒）を最小刻みとして、ステージ上のものを並進させることが可能な移動ステージを配置し、このステージ上に折り返しミラー（90度などの角度で向かい合わせに置いたミラー）を設置することで構成し、ステージを移動させてミラーの調整を正確に行うことで、光の伝搬方向を維持しつつ、光路長を調整している。

#### 【0039】

通常、CARS発生には位相整合条件が満たされる必要があるが、対物レンズの高いNA値のため、この条件は緩和され、幅広い波数領域でCARS光の発生が可能となっている。試料から発生したCARS光を対向させた対物レンズで集め、各種フィルタを経由させた後、分光器(Acton社; SpectraPro 300i)及びCCDカメラ(Roper Scientific社; PIXIS 100B)で分光測定した。試料は三軸ピエゾステージ(MadCity; Nano-LP-100)上に載っており、三次元的なスキャンが可能である。CARS過程は非線形光学過程であるため、レーザー光が強く集光された部分からのみ信号光が発生する。その結果、共焦点顕微鏡のようにピンホールを導入する必要がなく、本質的に高い三次元空間分解能を実現することができる。

#### 【0040】

マルチプレックスCARSスペクトルの測定により、複数の振動共鳴成分を同時に測定することが可能となるが、これに加えてもう一つ重要な利点が挙げられる。CARSには、一般に非共鳴バックグラウンドと呼ばれる信号が重畳する。非共鳴バックグラウンドとは、例えば図1(c)などの経路で生じる、三次の非線形光学過程の一つである。この信号は振動準位に“非共鳴”であるが、特に図1(c)の過程で生じる場合、 $2\omega_1$ が電子準位に近づくと、電子的な共鳴効果を受けて増大する。この非共鳴バックグラウンドは、振動コントラストを低下させるコンタミネーションとしてしばしば扱われるが、我々は、逆にこの信号を利用することで、振動共鳴成分を効率よく取り出す方法を考案し、実現している。これは、振動共鳴したCARS光、非共鳴バックグラウンドとともにコヒーレントである、という性質を利用している。この方法について、以下に述べる。

#### 【0041】

CARS顕微鏡・CARS顕微分光鏡で得られる信号強度は、一般に以下の式で表される。

#### 【数1】

$$I(\omega) = \left| A_{NR} e^{i\phi} + \sum_R \frac{A_R \Gamma_R}{\Gamma_R - i(\omega - \Omega_R)} \right|^2 \quad (1)$$

ここで、 $I(\omega)$ は観測される信号全体の強度スペクトル、 $A_{NR}$ と $\phi$ は非共鳴バックグラウンドの振幅と位相、 $A_R$ は振動共鳴CARS光の振幅、 $\Gamma_R$ は振動共鳴角振動数、 $\Omega_R$ は線幅に比例する係数である。ここで、第一項の非共鳴バックグラウンドと第二項の振動共鳴成分はお互いに干渉するため、両者が共存する波数領域では、波数の高い方が谷、低い方が山、という非対称な“分散型”的スペクトル形状を与える。従って、このスペクトルパターンを解析することで、振動共鳴成分のみを抽出することが可能である。これは、振動共鳴CARS光を、非共鳴バックグラウンドによりヘテロダイン検波することに相当する。この解析では、スペクトル情報のみを用いてコントラストの向上を実現しているため、空間方向についてはまったく処理を行っていない。そのため、測定時の空間分解能は、スペクトル解析後も保たれている。これは、“モノクロ”イメージの測定ではなく、スペクトルというもう一つの次元も測定している、本方法が持つユニークな特徴の一つであると言える。

#### 【0042】

[A-4] 生細胞の非線形ラマン分光イメージング

図3に、分裂酵母(Schizosaccharomyces pombe; S. pombe)生細胞のマルチプレックスCARSイメージングの結果を示す。図3(a)には酵母にレーザー光を照射したときのマ

10

20

30

40

50

ルチプレックスCARSスペクトルが示されている。2850 cm<sup>-1</sup>付近に観測されるピークは、リン脂質、タンパク質、多糖類等に含まれるC-H伸縮振動に由来する信号である。このCARS信号によりイメージを構成した結果を図3(b)に示す。分子振動により、様々な分裂周期にある複数の酵母細胞が明瞭に可視化されている。酵母の内部には、信号強度の強い部分が複数箇所存在するが、これらはリン脂質を豊富に含むミトコンドリア等の膜系オルガネラや、多糖類から構成されている隔壁に由来すると考えられる。

#### 【0043】

SC光は、幅広いラマン励起のための光源として利用可能であるばかりではなく、共鳴二光子励起の光源としても利用可能である。二光子励起によって生じる蛍光がCARSとスペクトル的に分離できる場合には、同じ光学系でCARSと二光子蛍光の同時測定が可能となる。一例として、図4に緑色蛍光タンパク質(Green Fluorescent Protein; GFP)で核を染色した分裂酵母生細胞のCARS・二光子蛍光マルチイメージングの結果を示す。GFPの蛍光は510 nm付近に現れるため、今回検出しているCARS光とスペクトル的に分離可能である。このように、SC光を使うことにより幅広い波長域で二光子励起が可能となるため、二光子許容な電子状態に共鳴した高効率イメージングが可能となることも期待される。露光時間は一点当たり50ms、一枚取得するために必要な時間は3.8分(測定当時)であった。この結果は、酵母の細胞分裂の様子を明瞭に捉えている。CARSイメージである図4(a)を見ると、酵母の内部に、ミトコンドリア等の膜系オルガネラに由来する、信号強度の強いスポットが複数箇所存在し、分裂中に細胞内を移動する様子が観察できる。また、分裂前には、細胞中央付近に多糖類から構成される隔壁が出現することも可視化されている。図4(b)には、GFPで染めた核の二光子蛍光イメージを示す。蛍光像のコントラストは、時間と共に劣化しているが、これはレーザー照射に伴う褪色が原因であると考えられる。これに対して、CARS像は褪色せず、良好なコントラストを保って細胞分裂過程を可視化できている。以上のように、CARSを用いることで生細胞のダイナミクスを高いコントラストで追跡可能であることが示された。

#### 【0044】

##### [B] サブナノ秒レーザーを用いた非線形ラマン分光イメージング法

SC光の発生は、サブナノ秒マイクロチップレーザーとフォトニック結晶ファイバとを組み合わせた光源装置でも得られる。この手法は、低コスト、コンパクト、超広帯域で位相コヒーレントな白色光光源を提供する。SC光は、サナノ秒マイクロチップレーザーから出射された1064nmレーザーパルスのみに基づいて得ることができ、システム全体のコンパクト化が可能となる。

#### 【0045】

以下に述べる態様では、近赤外領域において、超広域マルチプレックスCARS顕微分光法の生物細胞への適用を行った。深近赤外線CARS励起は、生物試料に対する光ダメージを最小にする。また、深近赤外線光は、生物媒質によって吸収あるいは/および散乱されるため可視光に比べて深い光の侵入が可能となる。

#### 【0046】

図5に、近赤外線超広域マルチプレックスCARS顕微鏡の概略図を示す。QスイッチNd:YAGマイクロチップレーザー(JDS Uniphase, NP-10820-GM1; 中心波長1064nm; スペクトル幅<1cm<sup>-1</sup>; パルス幅<1ns; パルスエネルギー8μJ; 繰り返しレート6.6kHz)をレーザー光源として用いた。

#### 【0047】

レーザーの出射光は、1/2波長板を透過した後、ビームスプリッターによって二つの光パルスに分割される。1/2波長板は、レーザー光源とビームスプリッターとの間に代えて、ビームスプリッターとフォトニック結晶ファイバの間に配置してもよい。サブナノ秒レーザー光源を用いた本発明では、従来のモード同期型ピコ秒レーザーやフェムト秒レーザーを用いた光学系で必要であった光アイソレータは必要ない。

#### 【0048】

出射光の約10%は、CARS過程のポンプ光(1)として用いられる。バンドパスフィ

10

20

30

40

50

ルタを導入することで、マイクロチップレーザーからの出射光における望ましくないスペクトル要素を遮断する。

#### 【0049】

出射光の残りの90%は、フォトニック結晶ファイバにおける近赤外SC光の生成に用いられる。光ファイバの長さは1.6mである。SC光は、CARS過程のストークス光(<sub>2</sub>)として用いられる。いくつかのバンドパスフィルタおよび長波長通過フィルタを用いて、SC光における1064nmより短波長のスペクトル成分を遮断する。

#### 【0050】

ポンプ光、スペクトル成分が整形された超広域ストークス光のパルスエネルギーは、それぞれ、800nJ、150nJ、である。<sup>10</sup> 1064nmエッジフィルタを用いて、二つのレーザパルスを、同軸上に重ね合わせ、 $40 \times 0.9$ NAの顕微鏡対物レンズを用いて試料に集光する。この条件下において、大きい角分散及び小さい干渉長によって、CARS位相マッチング条件が大幅に緩和される。前方検出におけるCARS光が、他の $40 \times 0.6$ NAの顕微鏡対物レンズによって集められる。二つの短波長通過フィルタを通した後、CARS光が光ファイバへと導入される。

#### 【0051】

CARS信号は、分光器(Acton, SpectraPro-300i)によって分散され、CCD検出器(Roper Scientific, PIXIS-100B)によって検出される。

#### 【0052】

試料は、CARSイメージングのため、ピエゾステージ(Madcity, Nano-LP-100)でスキャンされる。ピエゾステージでは、ナノメートルスケールの位置制御が可能である。<sup>20</sup>

#### 【0053】

ポリエチレンフィルムの信号強度プロファイルのエッジから、横方向の分解能は、 $0.9 \pm 0.1$ マイクロメートルであると見積もられる。空気 フィルム界面における信号の立ち上がりから、深さ方向の分解能は、 $4.6 \pm 0.3$ マイクロメートルであると見積もられる。

#### 【0054】

図6は、近赤外線領域のSC光の典型的なスペクトルプロファイルである。スペクトルはInGaAs分光器(Ocean Optics, NIR 512)によって測定された。図6に示すように、1100nmから1700nmの範囲で、極めて広いスペクトルプロファイルをもつ超広域SCを得た。CARS信号の歪んだスペクトルプロファイルを補正するため、非共鳴バックグラウンドを用いた。<sup>30</sup>

#### 【0055】

図6(a)は、ポリスチレンビーズの、強度が補正された深近赤外マルチプレックスCARSスペクトルを示す。ビーズの直径は、3マイクロメートルである。露光時間は、1秒である。信号強度の補正は、カバーグラスの非共鳴バックグラウンド信号を用いて行った。 $> 2000 \text{ cm}^{-1}$ のスペクトル範囲で、CARS信号が得られていることが明らかである。図7(a)に示すように、複数のラマン共鳴によって、いくつかのピークが観察される。3052, 2890, 2844, 1595, 1572, 1169, 1141, 1019 そして  $992 \text{ cm}^{-1}$ における強度ピークは、芳香族C-H伸縮、脂肪族C-H伸縮、脂肪族C=C伸縮、芳香族C=C伸縮、芳香族面内C-H変角、芳香族面内C-H変角、環変形、そして、環呼吸振動モードにそれぞれ由来している。<sup>40</sup>

#### 【0056】

図7(b)は、900から $1700 \text{ cm}^{-1}$ のCARS信号の詳細なスペクトルプロファイルを示す。振動共鳴成分が指紋領域で観察されていることがわかる。特に、振動共鳴成分が、ラマンシフト1595, 1572, 1169, 1141, そして、 $1019 \text{ cm}^{-1}$ でスペクトル的に解像されている。非共鳴バックグラウンドとの干渉によって、スペクトルは分散形の形状を示している。

#### 【0057】

CARS信号の同時計測が、1000から $3000 \text{ cm}^{-1}$ のスペクトル範囲で、ポンプ光とストークス光との間の遅延時間を変更すること無く行われたことが注目される。このことは、<sup>50</sup>

フェムト秒、ピコ秒の光パルスに基づくSCに比べて、サブナノ秒光パルスを用いるCARS過程では、群遅延分散が問題とならないことを意味する。

#### 【0058】

図7(c), (d), (e)は、3つの異なるラマンシフト992, 1572 および 1900  $\text{cm}^{-1}$ における3マイクロメートルの径のポリスチレンビードの3つのCARSイメージを示す。露光時間は、各地点で100msである。図7(c)および(d)に示すように、992および1572  $\text{cm}^{-1}$ で振動共鳴CARSイメージが観察された。一方、非共鳴バックグラウンド信号のみが観測される1900  $\text{cm}^{-1}$ では、明瞭な振動コントラストは得られなかった。図7(c)および(d)において、図7(e)に比べて高い振動コントラストが備わっている。

#### 【0059】

図8(a)は、*Nicotiana tabacum L. cv. Bright Yellow 2(BY2)*細胞から得られたCARSスペクトルおよびイメージを示す。実験において、BY2細胞は、水中に拡散され、スライドガラスとカバーガラスの間に挟持させた。全ての計測は室温で行われた。

#### 【0060】

図8(b)は、C-H伸縮モードによるラマンシフト2902  $\text{cm}^{-1}$ でのCARSイメージを示す。各ピクセルの露光時間は、300msである。信号において非共鳴バックグラウンドが支配的ではあるが、スペクトル解析を用いることで、振動コントラストを改善させることができ。図8(b)において、CH伸縮CARS bandの分散形状のポジティブピーク(2860から2870  $\text{cm}^{-1}$ の平均)とネガティブピーク(2960から2970

$\text{cm}^{-1}$ の平均)間の信号強度差をマッピングした。この作業は、CARS顕微鏡における単一の波数検出では行うことができないことが強調される。図8(b)において、BY2細胞は、高い振動コントラストとして視覚化されている。BY2細胞内において、核および細胞壁において強いCARS信号が観察された。細胞質も適度な強度でCARS信号によって視覚化された。液胞の位置では、CARS信号は極めて弱い。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0061】

本発明は、CARS顕微分光法に用いることができる。CARS顕微分光法では、生体試料を構成する様々な分子種を、分子の指紋であるラマンスペクトルに基づいて多彩に”色分け”することが可能である。CARS顕微分光法は、既知の分子を可視化することが得意な蛍光イメージングと比べ、スペクトルを通して、未知の分子をも分析・検出することを可能とするため、生細胞内でこれまで知られていなかった分子や分子構造についても研究対象とすることができます。CARS顕微分光法に代表される非線形ラマン分光イメージング法は、医学、生命科学、物質・材料科学をはじめ、幅広い分野で利用可能性を有している。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0062】

【図1】(a)コヒーレントアンチストークスラマン散乱(CARS)過程のエネルギーダイアグラム、(b)マルチプレックスCARS過程、(c)非共鳴バックグラウンドのエネルギーダイアグラムの一つ、を示す。

【図2】マルチプレックスCARS顕微分光鏡の実験装置図であり；BS：ビームスプリッター；LF：長波長透過フィルタ；NF：800-nm ノッチフィルタ；SF：短波長透過フィルタ、を示す。

【図3】(a)分裂酵母生細胞(*S. pombe*)のCARSスペクトル(強度未補正)、(b)C-H伸縮振動共鳴成分を抽出したCARSイメージである。スケールバーは2マイクロメートルである。

【図4】(a)核に緑色蛍光タンパク質(Green Fluorescentprotein; GFP)を導入した分裂酵母生細胞(*S. pombe*)のC-H伸縮振動共鳴成分を抽出したCARSイメージ及び、(b)GFPの二光子蛍光イメージである。実際のイメージはカラーである。スケールバーは2マイクロメートルである。左上の数字は時間順序を示す。1イメージの測定時間は3.8分である

10

20

30

40

50

。

【図5】本発明に係るマルチプレックスCARS顕微分光鏡である。

【図6】近赤外線領域のSC光の典型的なスペクトルプロファイルである。

【図7】(a)は、ポリスチレンビードの、強度が補正された深近赤外マルチプレックスCARSスペクトルを示す。(b)は、900から $1700\text{ cm}^{-1}$ のCARS信号の詳細なスペクトルプロファイルを示す。(c),(d),(e)は、3つの異なるラマンシフト992, 1572 and 1900  $\text{cm}^{-1}$ における3マイクロメートルの径のポリスチレンビードの3つのCARSイメージを示す。

【図8】(a)は、Nicotiana tabacum L. cv. Bright Yellow 2(BY2) cellsから得られたCARSスペクトルおよびイメージを示す。(b)は、C-H stretch modelによるラマンシフト $2902\text{ cm}^{-1}$ でのCARSイメージを示す。 10

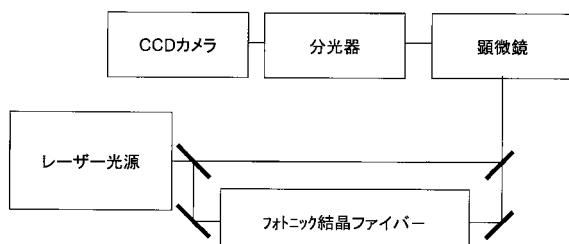
【図9】タンパク質のバンド( $1650\text{ cm}^{-1}$ 付近のアミドIIや、 $1300\text{ cm}^{-1}$ 付近のアミドIII)や、脂質のバンド( $1450\text{ cm}^{-1}$ 付近のC-H変角)など、指紋領域( $500-1700\text{ cm}^{-1}$ 付近)と呼ばれる、分子の構造により非常に異なるスペクトルパターンを示す信号が鋭く出ていることが観測される。

【図10】図9と対比するための従来のスペクトルパターンを示す。

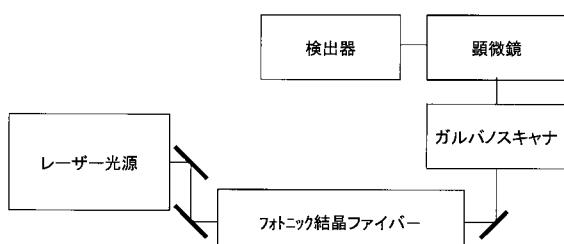
【図11】コヒーレントアンチストークスラマン散乱光を用いた非線形分光計測システムの概略図である。

【図12】二光子蛍光を用いた非線形分光計測システムの概略図である。

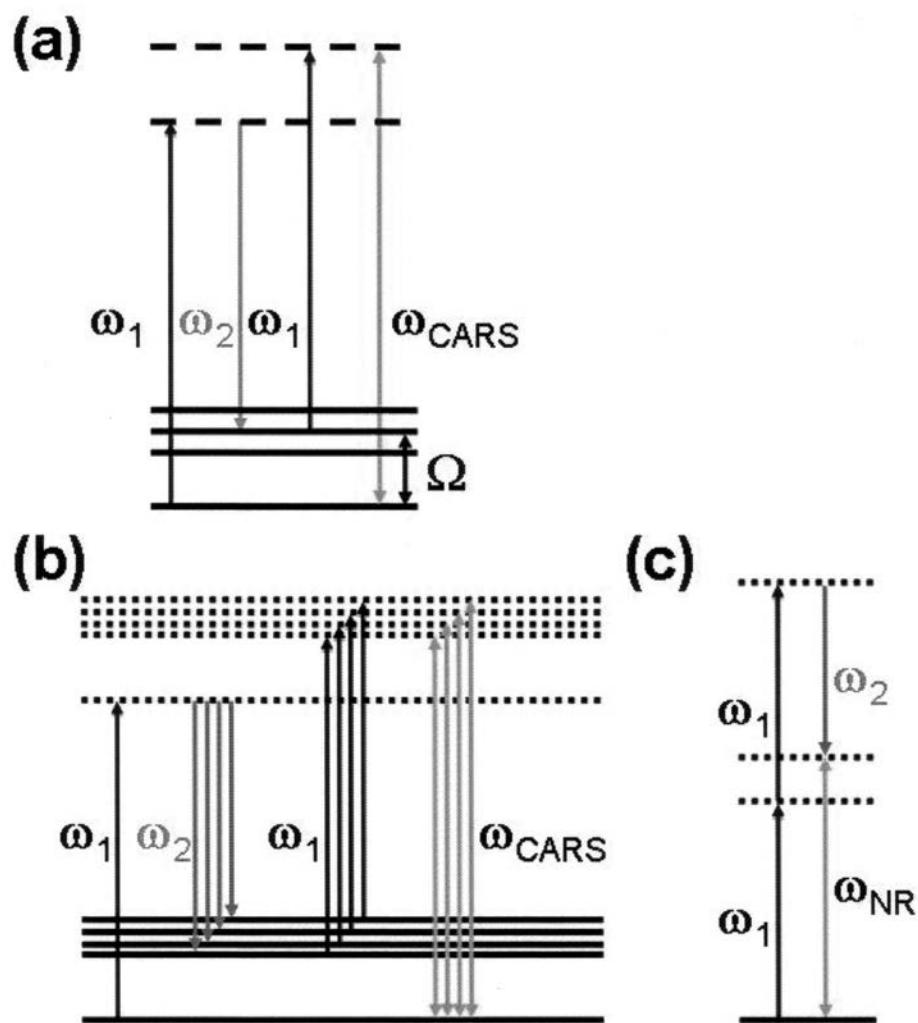
【図11】



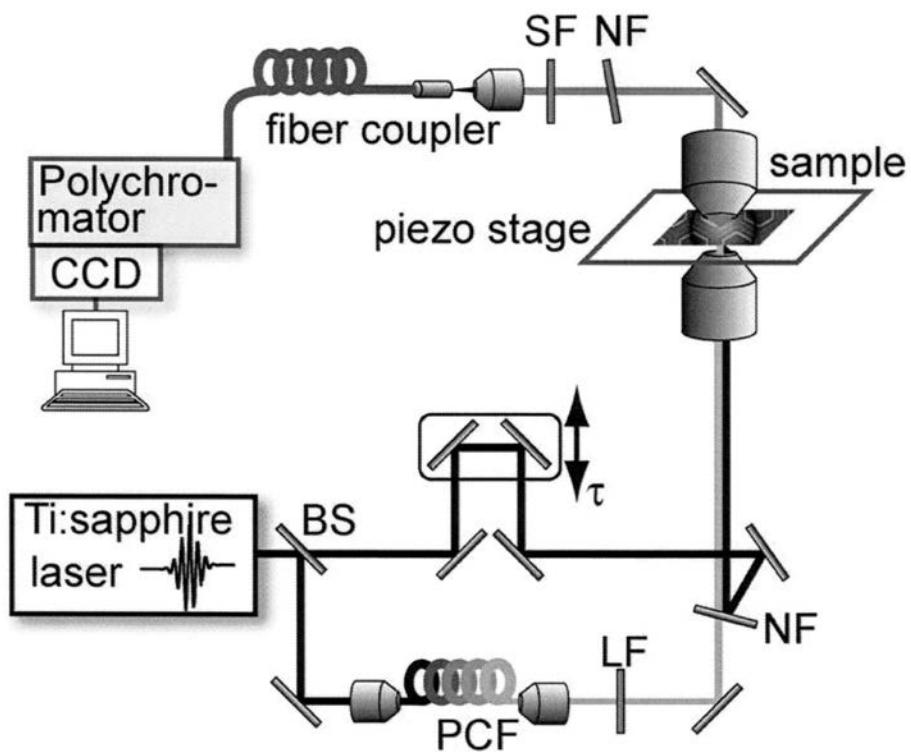
【図12】



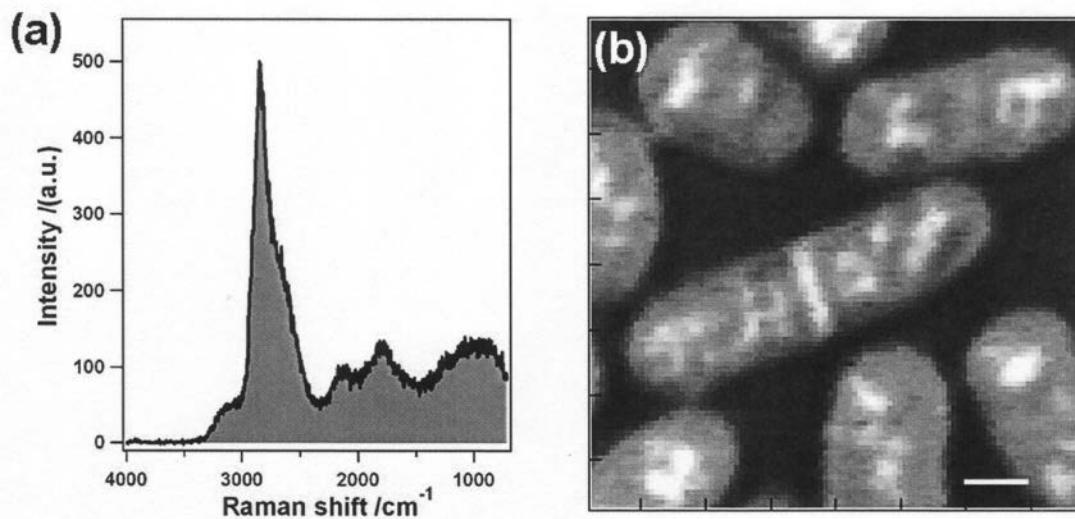
【図1】



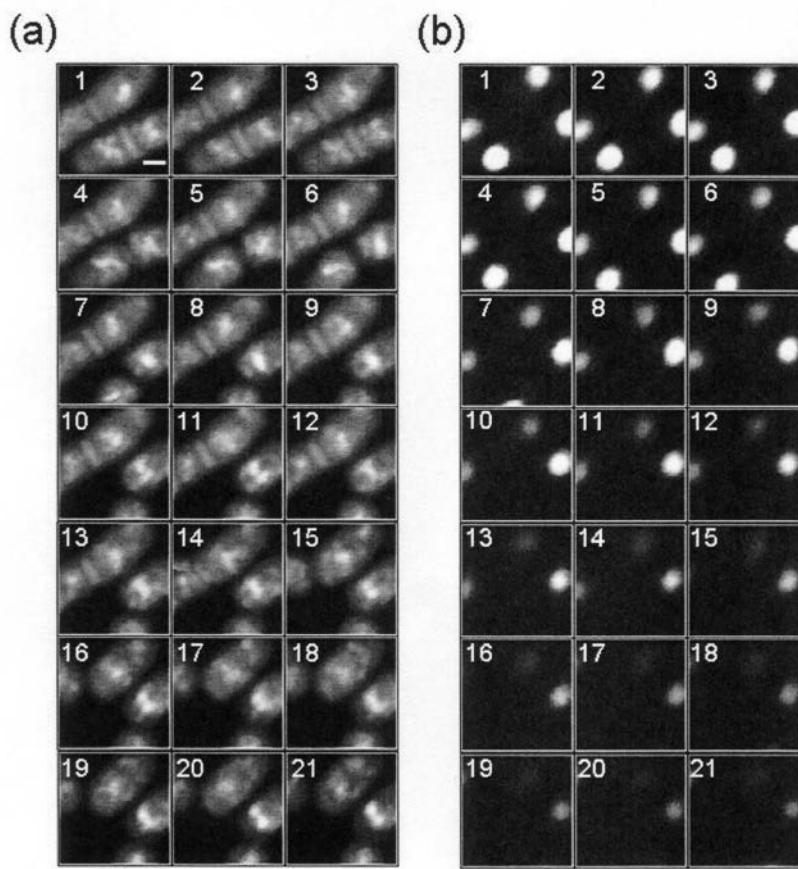
【図2】



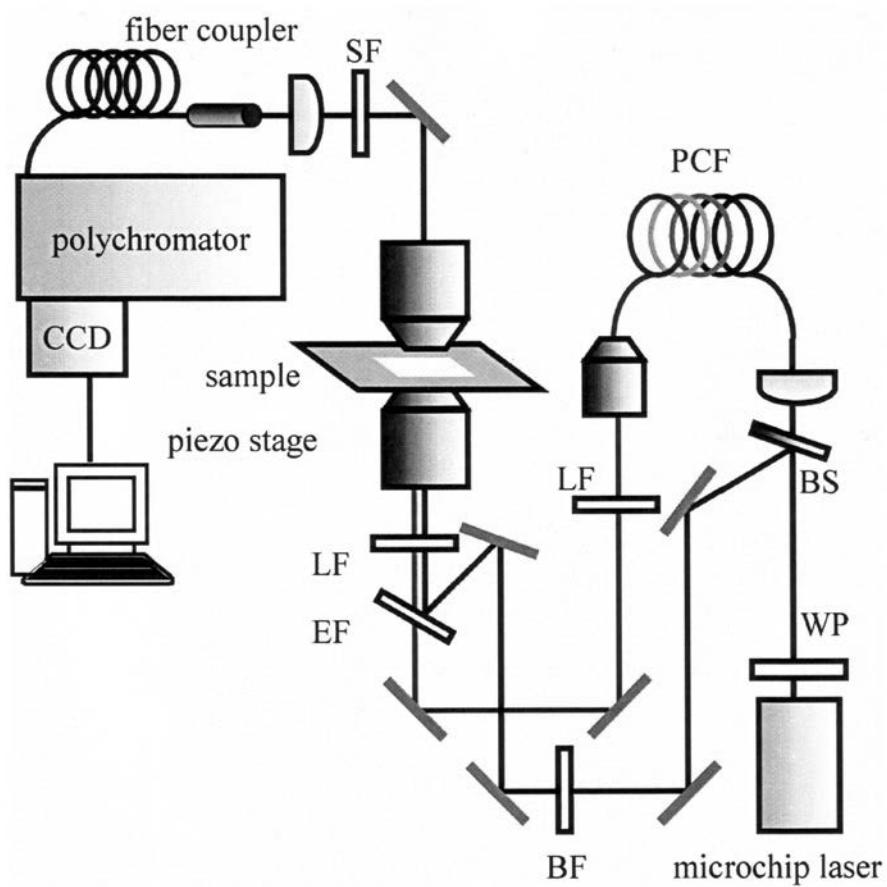
【図3】



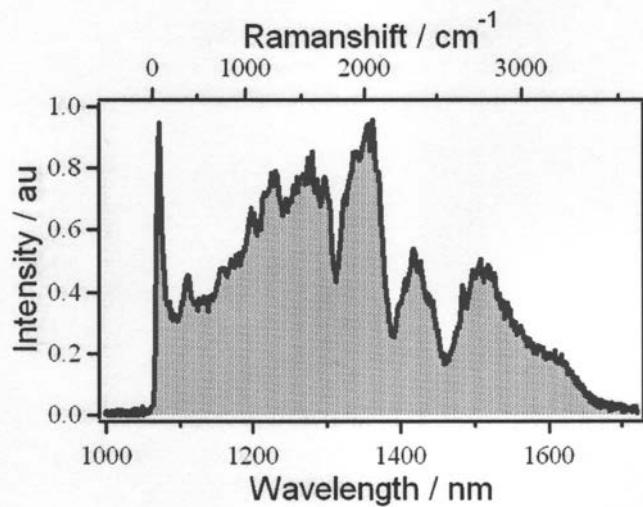
【図4】



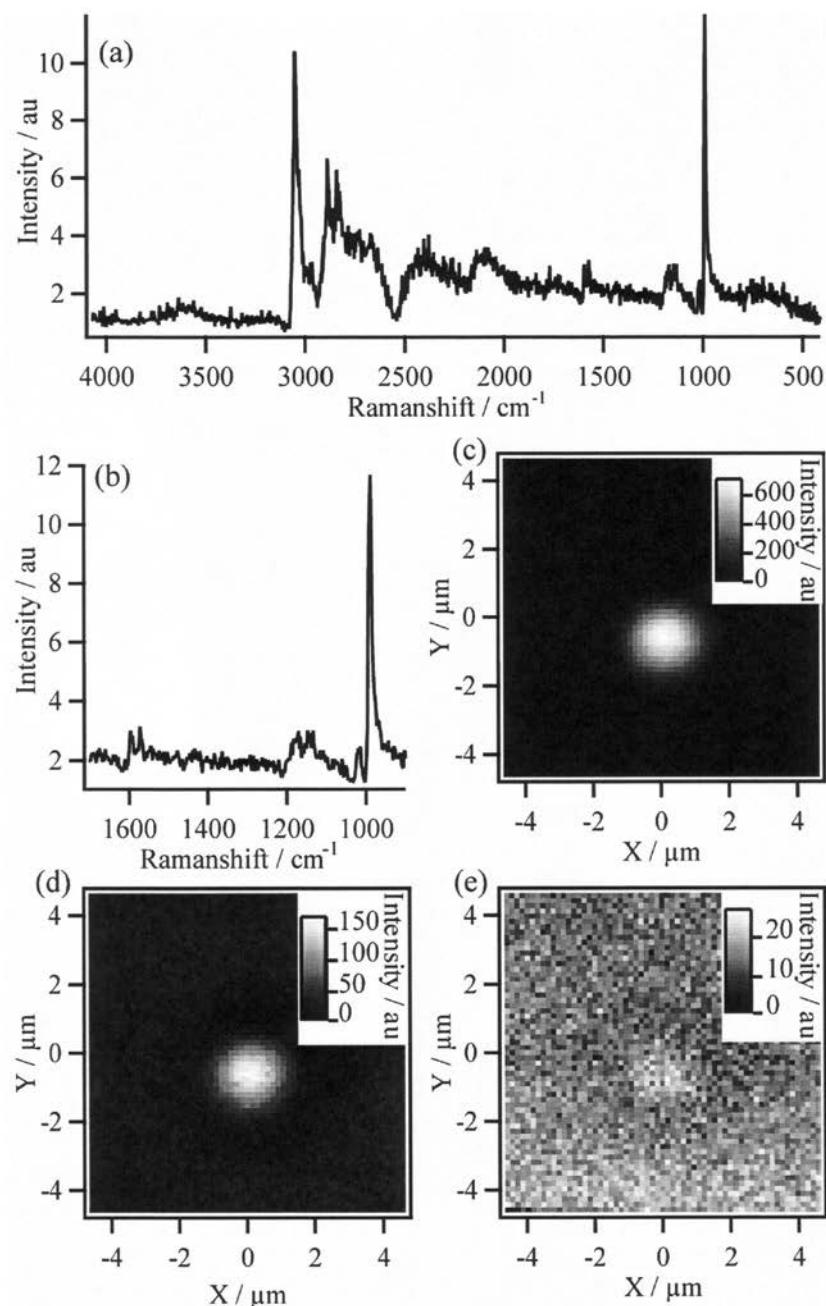
【図5】



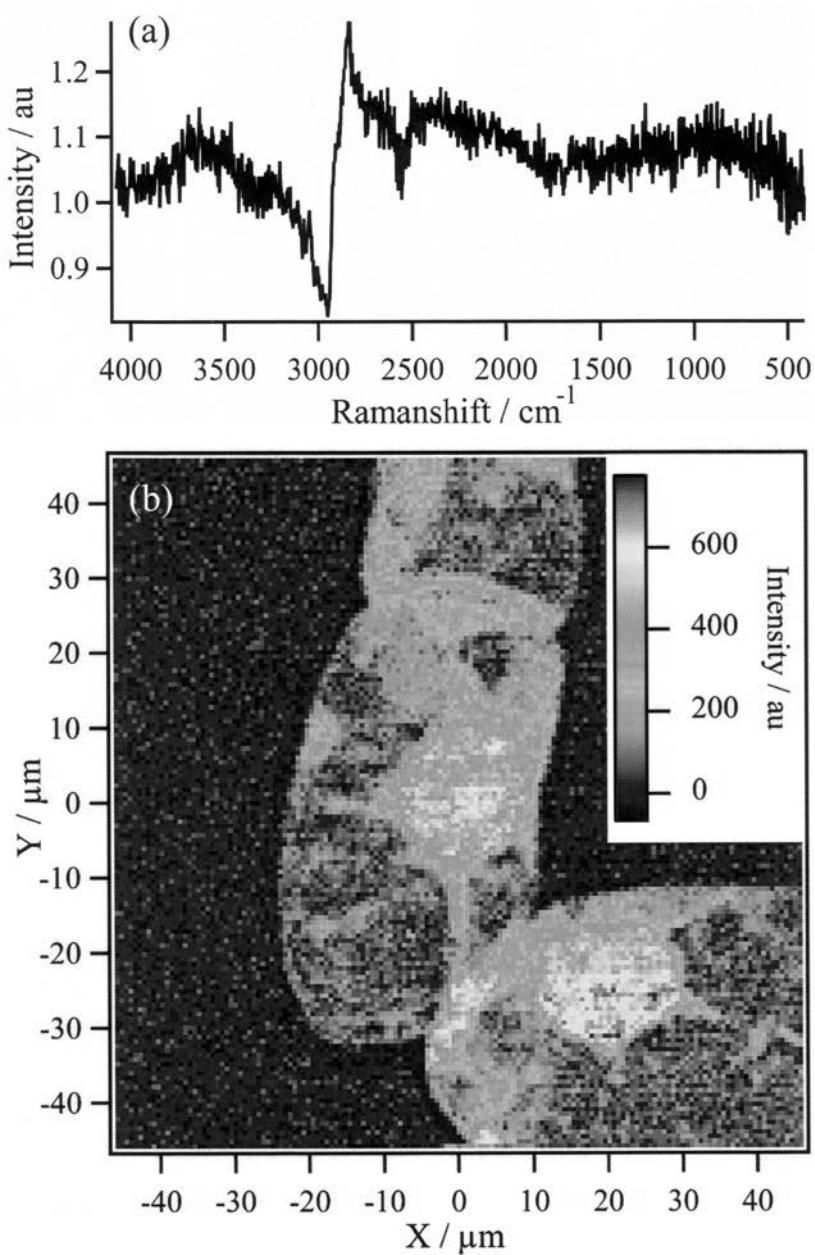
【図6】



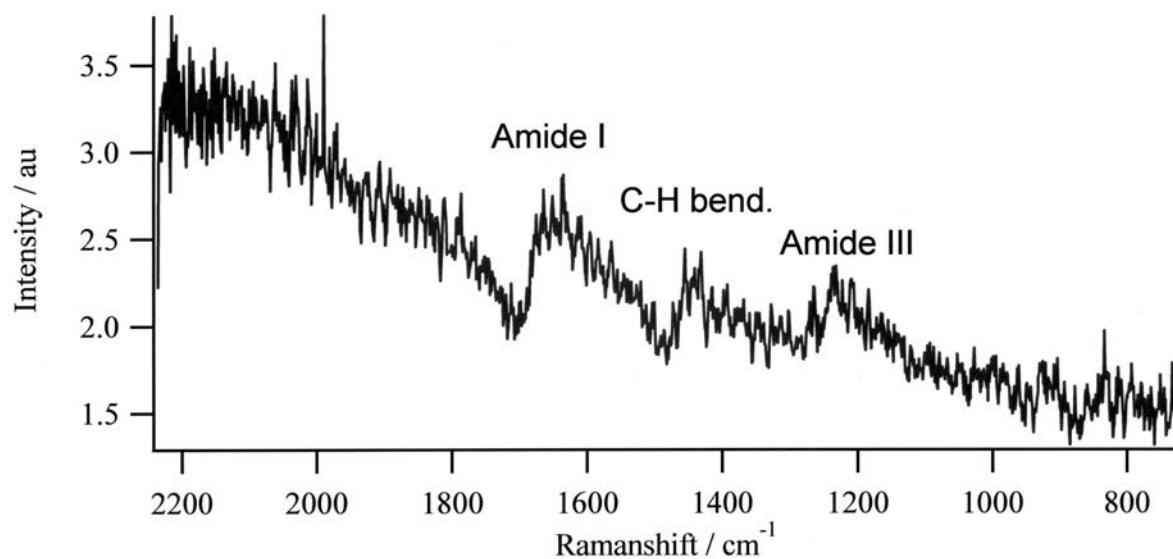
【図7】



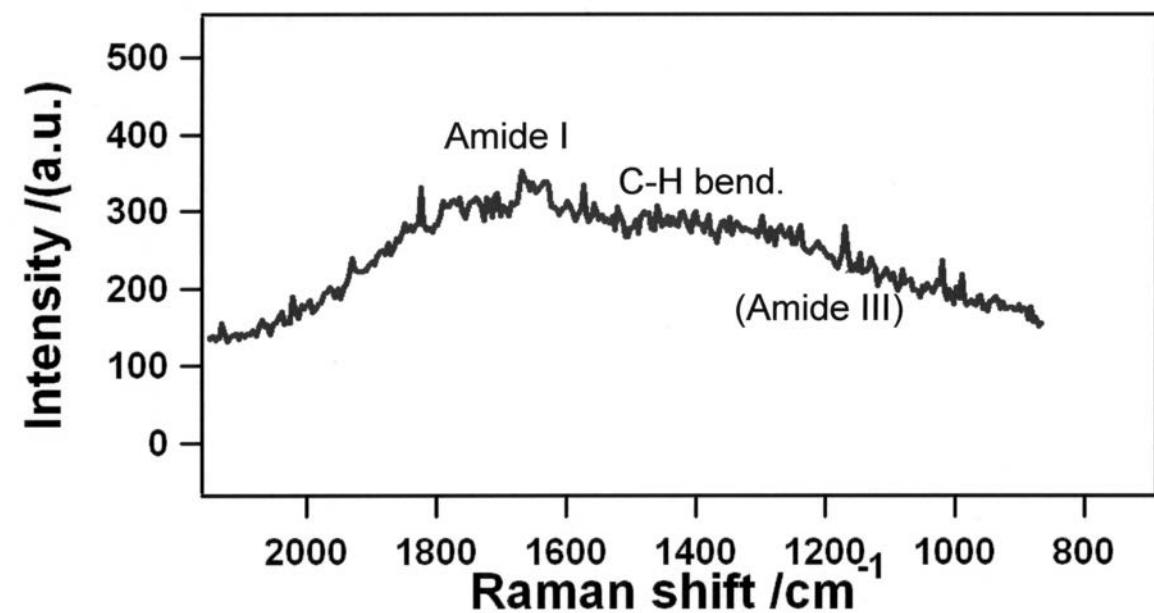
【図8】



【図9】



【図10】



---

フロントページの続き

(56)参考文献 特開2007-278768(JP,A)  
特開2007-271365(JP,A)  
特開平05-288681(JP,A)  
特開平10-160595(JP,A)  
特表2002-520612(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 21/62 - 21/74  
JST Plus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamII)