

3D optical properties of a new microscope by nonlinear Raman spectroscopy (CARS)

○正 橋本 守 (阪大院基礎工) 井上桂吾 (阪大院基礎工)

正 荒木 勉 (阪大院基礎工)

Mamoru HASHIMOTO, Graduate School of Engineering Science, Osaka University,  
Machikaneyama-cho 1-3, Toyonaka, Osaka

Keigo INOUE, Graduate School of Engineering Science, Osaka University

Tsutomu ARAKI, Graduate School of Engineering Science, Osaka University

The three-dimensional optical properties of non-linear Raman ( Coherent anti-Stokes Raman Scattering; CARS) microscopy was described. The coherent transfer function of CARS microscopy with a confocal configuration was derived theoretically, and the optical transfer functions with and without a pinhole in front of the detector were also derived when the object is weak contrast. It was found that the frequency cutoff of the optical transfer function is independent of the detector size. The spatial resolution in micrometer order along the optical axis was also experimentally demonstrated.

Key Words: CARS Spectroscopy, Microscopy, Three-Dimensional Imaging, Confocal Microscopy

最近、非線形光学効果を用いた顕微鏡が注目を浴びるようになってきた<sup>1)</sup>。現在提案、開発されている主な手法は、2光子あるいは多光子吸収によって蛍光色素を励起し、発光する蛍光を顕微鏡下で観測するものであり、3次元構造が観測可能(共焦点顕微鏡に必要な検出器側のピンホールが必要なく、光学的スループットが大きい)、長波長光励起のため試料にダメージを与えにくい、長波長光励起のため比較的厚い試料を観測できる、観測場所のみを励起できるために観測箇所以外の蛍光色素の退色を回避できる等の特徴を持つ。しかしながら、2光子励起蛍光顕微鏡や、今日広く普及し始めた1光子励起の共焦点蛍光顕微鏡では、蛍光標識色素を通してしか分子構造等に関する情報を得ることができない。また、染色によって細胞自体にダメージを与える可能性を持つ。

細胞を構成するタンパク質分子の分子構造変化が細胞の機能発現の源であるため、生命現象を研究する上では、生体機構、機能と分子構造の関係等を、生体分子が実際に機能している場所で直接観測することが要求される。分子振動を観測するラマン散乱分光は分子構造や分子構造変化に敏感な分光手法である。したがって、細胞を構成する分子の同定や、外部からの刺激による反応に伴う分子構造の変化を、無染色に観測できる。しかしながら、自発ラマン散乱では散乱光の強度が弱く、蛍光性の試料(生体試料観測では、試料自体の蛍光が大きい)では、蛍光に妨害されて観測できないという欠点を持つ。

物質に $\omega_1, \omega_2$ の二つの周波数の光を入射したときに、誘導ラマン散乱によって $2\omega_1 - \omega_2$ の反ストークス光が放出される現象をCARS(コヒーレントアンチストークスラマン散乱)という。CARSでは、二つの光のエネルギー差 $\omega_1 - \omega_2$ が分子の振動エネルギーと共鳴したとき、ピークが現れる。CARS光は入射光に比べて短波長な光が放射されるため、分光すれば試料が蛍光性のものであっても蛍光の妨害無しに観測が可能である。また、自発ラマン散乱より高強度な発光が期待できる<sup>2)</sup>。

非線形ラマン分光であるCARS(コヒーレントアンチストークスラマン散乱)分光を顕微鏡に適用することが、Duncanらによって提案された。彼らの手法では、3次元的な空間分解能は得られないが、励起レーザー光を十分絞って入射すれば非線形光学効果によって3次元分解能が達成されることが予想できる。そこで、我々はどの様な分解能が期待できるかCTF(Coherent Transfer Function; 電場に対する光学系

の空間周波数伝達関数)やOTF(Optical Transfer Function; 光強度に対する空間周波数伝達関数)を理論的に導出し、その3次元結像特性を評価した。

図1に示すような光学配置を考える。 $\omega_1, \omega_2$ 光は対物レンズ1で試料中で集光される。焦点付近では電場強度が著しく高いため、焦点付近のみからCARS光が発生し、このCARS光を対物レンズ2によって検出系へと導いて計測する。

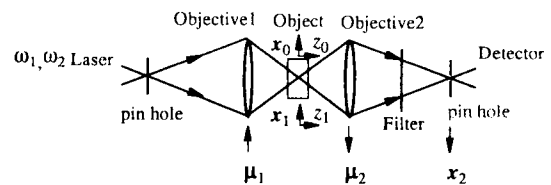


Fig. 1 Optical layout of CARS microscopy

発生するCARS分極 $P_{CARS}$ は、 $\omega_1, \omega_2$ 光の電場をそれぞれ $E_1, E_2$ とすると、 $P_{CARS} = \chi^{(3)} E_1 E_1 E_2^*$ で表される。ここで、 $\chi^{(3)}$ は3次の非線形感受率を表す。ピンホールを通したレーザー光は、試料上で対物レンズによって集光されるが、回折限界によってその電場分布(あるいは強度分布)はぼける。この電場分布はPSF(Point Spread Function; 点像分布関数)で表され、 $\omega_1, \omega_2$ 光に対するPSFをそれぞれ $h_1(x_1, z_1), h_2(x_1, z_1)$ とすると、発生するCARS分極は

$$P_{CARS}(x_1, z_1, x_0, z_0) = \chi^{(3)}(x_1 + x_0, z_1 + z_0) e(x_1, z_1) \quad (1)$$

で与えられる。ここで、 $e(x_1, z_1) = h_1(x_1, z_1) h_2(x_1, z_1) h_2^*(x_1, z_1)$ 、座標 $x=(x, y)$ は面内方向を示す位置ベクトル、 $z$ は光軸方向を表し、添え字0は試料上の、1は空間上の位置を表す。

$e(x_1, z_1)$ の3次元フーリエ変換 $E(\mu, \eta)$ は、CARS励起光学系のCTFを表し、

$$E(\mu, \eta) = H_1(\mu, \eta) \otimes H_1(\mu, \eta) * H_2^*(\mu, \eta) \quad (2)$$

で与えられる。ここで、 $\otimes, *$ は3次元コンボリューション、3次元相互相関を、 $\mu, \eta$ は面内方向、光軸方向の空間周波数を、 $H_{1 \text{ or } 2}(\mu, \eta)$ は $h_{1 \text{ or } 2}(x_1, z_1)$ の3次元フーリエ変換を表す。近軸近似では、 $H_{1 \text{ or } 2}(\mu, \eta) = p_{1 \text{ or } 2}(\mu) \delta(\eta - 1/\lambda_{1 \text{ or } 2} + \lambda_{1 \text{ or } 2} \mu^2/2)$ で与えられる。ここで、 $p(\mu)$ は対物レンズの瞳関数を、 $\lambda$ はCARS励起光の波長を表す。

図2(a)にCARS励起光学系のCTFの帯域( $E(\mu, \eta) \neq 0$ の部分)を示す。CARS顕微鏡は、線形な光学過程ではあり得ない広

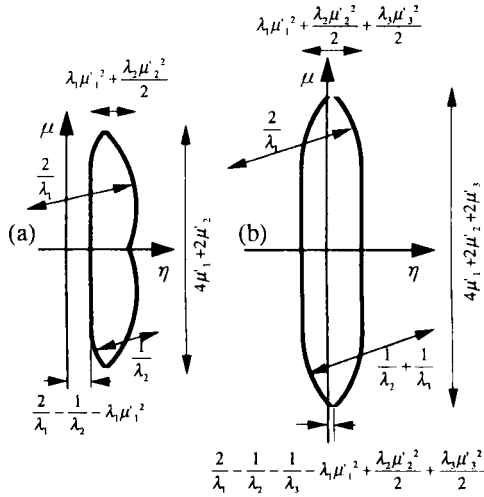


Fig. 2 CTF of CARS excitation system (a) and CARS microscopy system (b)

い空間周波数分布をもつ光で照明していることと等価になる。なお、図中の  $\mu_1, \mu_2$  は瞳関数  $p(\mu)$  が 0 でない最大の  $|\mu_1|, |\mu_2|$  を表し、光学系は光軸に対して回転対称であると仮定している。

対物レンズ 2 の焦点面上  $x_2 = (x_2, y_2)$  での光強度  $i(x_2, x_0, z_0)$  は、

$$i(x_2, x_0, z_0) = \left| \iint \chi^{(3)}(x_1 + x_0, z_1 + z_0) e^{i(x_1, z_1) h_3(x_2 - x_1, -z_1)} d^2 x_1 dz_1 \right|^2 \quad (3)$$

$$= \left| \iint C(x_2, \mu, \eta) X^{(3)}(\mu, \eta) \exp\{-2\pi i(x_0 \mu + z_0 \eta)\} d^2 \mu d\eta \right|^2$$

で与えられる。ここで、

$$C(x_2, \mu, \eta) = \iint H_3(\mu, \eta) E(\mu - \mu, \eta - \eta) \exp\{-2\pi i(x_2 \mu)\} d^2 \mu d\eta$$

$h_3(x, z), H_3(\mu, \eta), X^{(3)}(\mu, \eta)$  は、対物レンズ 2 の CARS 光に対する PSF,  $h_3(x, z)$  の 3 次元フーリエ変換,  $\chi^{(3)}(x, z)$  の 3 次元フーリエ変換をそれぞれ表す。

共焦点配置 ( $x_2 = 0$ ) の時、CARS 顕微鏡システムは電場に対して線形な光学系となり、CTF を定義することができて、

$$CTF(\mu, \eta) = C(0, \mu, \eta) = E(\mu, \eta) * H_3(\mu, \eta) \quad (4)$$

で与えられる。図 2 (b) に CTF の帯域を示す。全方向に対して応答を持つことから、3 次元的な分解能を持つことが分かる。

3 次の非線形感受率の大きさが空間的に変化し、この変化分が全体の平均値に対して小さいとき (弱コントラストの時; 試料全体にある分子が分布して、その濃度が場所によって変化している場合)、3 次の非線形感受率の分布は、

$$\chi^{(3)}(x_1 + x_0, z_1 + z_0) = \overline{\chi^{(3)}}(1 + b(x_1 + x_0, z_1 + z_0)) \quad (5)$$

となる。ここで、 $1 \gg |b(x_1 + x_0, z_1 + z_0)|^2$ 。このとき、観測される光強度は、(5) 式を (3) 式に代入して、

$$i(x_2, x_0, z_0) \propto \left| \overline{\chi^{(3)}} \left\{ |d(x_2)|^2 + f(x_2, x_0, z_0) + f^*(x_2, x_0, z_0) \right\} \right|^2 \quad (6)$$

で与えられる。ここで、

$$d(x_2) = \iint e^{i(x_1, z_1) h_3(x_2 - x_1, -z_1)} d^2 x_1 dz_1 = \iint E(\mu, \eta) H_3(\mu, \eta) \exp\{-2\pi i x_2 \mu\} d^2 \mu d\eta$$

$$f(x_2, x_0, z_0) = d^*(x_2) \iint b(x_1 + x_0, z_1 + z_0) e^{i(x_1, z_1) h_3(x_2 - x_1, -z_1)} d^2 x_1 dz_1$$

$$= \iint G(x_2, \mu, \eta) B(\mu, \eta) \exp\{-2\pi i(x_0 \mu + z_0 \eta)\} d^2 \mu d\eta$$

$$G(x_2, \mu, \eta) = d^*(x_2) C(x_2, \mu, \eta)$$

であり、 $B(\mu, \eta)$  は  $b(x, z)$  の 3 次元フーリエ変換である。

共焦点光学系するとき、OTF が定義できて

$$OTF_{\sigma}(\mu, \eta) = G(0, \mu, \eta) + G^*(0, -\mu, -\eta) \quad (7)$$

$$G(0, \mu, \eta) = \left\{ \iint E^*(\mu, \eta) H_3^*(\mu, \eta) d^2 \mu d\eta \right\} C(0, \mu, \eta) \quad (8)$$

で与えられる。また、検出側にピンホールを置かない場合も、

$$OTF_{\sigma}(\mu, \eta) = \int G(x_2, \mu, \eta) dx_2 + \int G^*(x_2, -\mu, -\eta) dx_2 \quad (9)$$

$$\int G(x_2, \mu, \eta) dx_2 = \left\{ \iint E^*(\mu, \eta) H_3^*(\mu, \eta) d\eta \right\} H_3(\mu, \eta) * E(\mu, \eta) \quad (10)$$

と、OTF が定義できる。いずれの場合も、屈折率分散が異常に大きくなければ、 $G(0, \mu, \eta), \int G(x_2, \mu, \eta) dx_2$  の帯域は (4) 式に等しく、3 次元的な空間分解能を持つことが分かった。

実際に CARS 顕微鏡を構築し、その光軸方向の分解能があることを確認した。10ns のパルス幅の Nd:YAG レーザの 2 倍波 (532nm) を 2 つに分割して一方を  $\omega_1$  光に、もう一方をブロードバンド色素レーザー ( $\omega_2$  光) の励起に用いた。フィルターによって  $\omega_1, \omega_2$  光を除いてから分光器に入射し、CARS 光を観測した。奥行き方向にしか構造がない物体を観測可能であることを示すために、液体ベンゼンをスライドガラス、カバーガラスで挟んで、試料 (ベンゼン) 中に集光している状態から、試料ステージを移動してカバーガラスであるガラス層まで変化させたときのベンゼンの 992cm<sup>-1</sup> の CARS 光の信号変化を観測した。この結果を図 3(a) に示す。図 3(b) には、図 3(a) の差分を計算した結果を  $\circ$  で、差分結果をガウス関数でフィッティングした結果を実線で示している。この結果、ミクロンオーダーの奥行き分解能があることが分かった。

CARS 分光を顕微鏡に適用したときの、3 次元 CTF, OTF を理論的に評価し、3 次元分解能を有することが分かった。また、実際に CARS 顕微鏡を構成し、ミクロンオーダーの分解能を持つことを示し、CARS 顕微鏡の実現性を示した。

1. W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb, Science 248, 73 (1990). W. Denk, K. R. Delaney, A. Gelperin, D. Kleinfeld, B. W. Strowbridge, D. W. Tank, and R. Yuste, J. Neurosci. Methods 54, 151 (1994).
2. M. D. Levenson, and S. Kano, Introduction to Nonlinear Laser Spectroscopy (Academic press, Orlando, 1988). Y. R. Shen, The principles of nonlinear optics (John Wiley & Sons, New York, 1984).
3. M. D. Duncan, J. Reintjes, and T. J. Manuccia, Opt. Lett. 7, 350 (1982). M. D. Duncan, Opt. Commun., 50, 307 (1984). M. D. Duncan, J. Reintjes, and T. J. Manuccia, Opt. Eng., 24, 352 (1985).

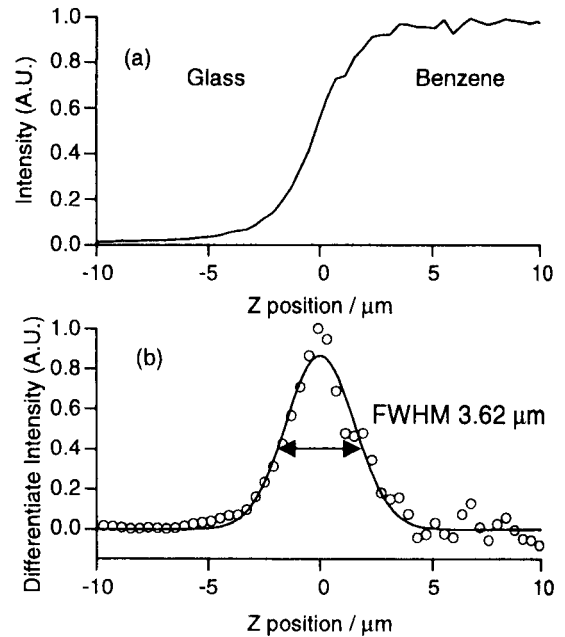


Fig. 3 Evaluation of Z axis resolution