

# コヒーレントアンチストークスラマン散乱顕微鏡の現状

## Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy

阪大院基礎工 橋本守

Graduate School of Engineering Science, Osaka University,

M. Hashimoto

mamoru@me.es.osaka-u.ac.jp

非線形ラマン分光の1種である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したCARS顕微鏡は、非染色に分子構造に関する情報が得られる、3次元分解能を持つといった特徴から注目されている。これまで、著者らは、観測波数領域の低波数化、マイクロレンズアレイを用いた多点励起・計測による計測時間の短縮化を行っている。CARS顕微鏡の現状および問題点について講演する。

### 【はじめに】

これまでの光学顕微鏡は、像すなわち物体の形を見ることを主な目的として発達してきており、その定性能力（細胞内にはどのような分子が存在するのか、またどのような環境下に分子、イオン等は存在しているのか）は染色に負っていたといっても過言ではない。しかし、染色作業は複雑で時間がかかり、熟練を要する。また、染色自体が細胞に対して有害で、細胞の機能を損なう場合も多々あり、実験条件によって大きく影響を受ける場合がある。近年開発された多光子励起蛍光顕微鏡は、長波長励起によって細胞毒性が少ない、散乱が少ないため比較的厚い試料を観測することができる、共焦点光学配置を取らなくても3次元分解能を持つため明るい光学系となる、等のメリットを持つが、やはり染色によって像を得るという点では、従来の蛍光顕微鏡と同じである。

細胞を構成するタンパク質分子の構造変化によって生体の機能は発現される。このため、生命現象を研究する上では、生体の機構・機能とタンパク質分子構造の関係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。したがって、生きたままの細胞をその場で、非染色に、外部からの刺激に対するタンパク質分子の構造変化を観察することが望まれている。

分子の指紋と呼ばれる分子振動を観測する振動分光（赤外分光やラマン散乱分光）は、分子構造や分子構造変化に敏感な分光手法で、分子種の同定や分子構造解析に広く用いられている。しかしながら、ラマン顕微鏡の生物試料測定への応用は、まだ一般的であるとは言いがたい。これは、通常行われる自発ラマン散乱測定ではラマン散乱光の強度が弱く、蛍光性の試料（生体試料観測では、しばしば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問題が要因となっている。また、顕微赤外分光の生物試料への応用は、生体組織がもつ水の吸収のため難しい。

物質に $\omega_1$ と $\omega_2$ の角振動数を持つ光（以降 $\omega_1$ 光、 $\omega_2$ 光と呼ぶ）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という。図1にCARSにおける光子と分子振動のエネルギー関係を示す。CARSでは、二つの光の角振動数の差 $\omega_1 - \omega_2$ がラマン活性な分

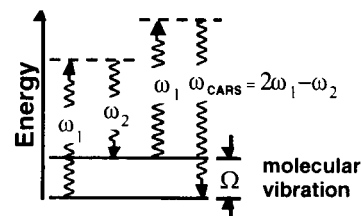


図1 CARS過程における光と分子振動のエネルギー関係

子振動の角振動数 $\Omega$ と一致したとき、ピークが現れる。したがって、CARS分光を顕微鏡へと適用することで、生体試料の非染色な分子種の同定、分子構造変化の追跡等が期待できる。また、非線形光学現象であるため、多光子励起蛍光顕微鏡と同様に検出器側にピンホールを設けなくても3次元分解能を持ち、入射するレーザー光の波長差によってラマンスペクトルを得ることができるために分光器を必要とせず明るい光学系を構成できる。さらに、CARS光は入射レーザー光より短波長であるため蛍光と分離可能であるという特徴を持つ。

CARS分光と顕微鏡の組み合わせは1982年にDuncanらによって初めて行われた<sup>1</sup>。彼らはそれまで行われていたマクロな観測系をそのまま適用し、観測側に対物レンズを用いて顕微鏡観測したために、3次元分解能は持ち合わせてはいなかった。我々は、CARS励起光を対物レンズで強く絞れば、多光子励起蛍光顕微鏡と同様に3次元分解能を持つと考え、その3次元分解能についての理論的、基礎実験を行った<sup>2,3</sup>。また、Xieらは、我々とは独立に同様な手法で実験を行い、セクショニングイメージやの取得や細胞観測に成功した<sup>4</sup>。

これまで観測されたRamanシフト領域は $2000\text{ cm}^{-1}$ 以上の高波数領域であった。これらの領域で観測できる主な分子振動はCH, NH, OH等の伸縮振動であり、これらの分子振動はほとんどどのような生体組織に存在するため、これらから分子種を特定することは難しい。そこで我々は、より分子識別能力の高い指紋領域で観測可能なシステムを構築した<sup>5,6</sup>。

### 【観測領域の指紋領域への拡張】

CARSは非線形光学現象であるため、レーザー光のピーク強度が高いほどその発生効率が高い。したがって高強度なレーザーの使用が有効であるが、CWレーザーを用いると試料が容易に損傷するため、高いピーク強度と低い平均パワーを持つ、長短パルスレーザーをCARS顕微鏡の励起光源に用いた方が有利である。しかし、フェムト秒レーザーは、その波長幅がRamanバンドの波長幅に比べて著しく広いため、波数(波長)分解能が低下し個々のラマンバンドを識別することができない。そこで、我々は高いピークパワーと高い波数分解能の両方を満たすために、ピコ秒レーザーをCARS顕微鏡の励起光源に用いた。図2に、CARS顕微鏡の構成図を示す。フェムト秒チタンサファイアレーザーからの光(波長775 nm)を、再生増幅器(RGA)で増幅する。この時、再生増幅器内部のパルスストレッチャーに配置したスペクトル幅制限マスク(ピコマスク)によってパルス幅をピコ秒(約2ピコ秒)にまで引き延ばす。この再生増幅器の出力を2つに分け、一方を $\omega_1$ 光に、もう一方を励起光として用いた光パラメトリック増幅器(OPA)の出力(アイドラー光の第2高調波)を $\omega_2$ 光に用いた。これら2つの光をビームスプリッターを用いて同軸上、すなわち空間的に重ね合わせ、さらに光学遅延によって時間的に重ね合わせ(時間的に重ね合わさったかどうかは、非線形光学結晶BBOを用いて2光波の和周波を発生させて確認した)、透過型顕微鏡へ導入する。発生したCARS光は、フィルターセットによって $\omega_1$ 光、 $\omega_2$ 光から分離された後APD(アバランシェフォトダイオード)によって検出される。観測可能領域はフィルタによって決まり、 $900\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ の指紋領域での観測が可能である。

指紋領域を観測する場合、発生するCARS光と $\omega_1$ 光は接近している。例えば、 $\omega_1$ の波長を775nm ( $12903\text{ cm}^{-1}$ ) とすると $900\text{ cm}^{-1}$ のラマンシフトに対応するCARS光の波長は724.47 nm ( $13803\text{ cm}^{-1}$ ) である。単一のフィルターでは十分に $\omega_1$ 光をカットすることができないため、数枚のフィルター(ノッチフィルター1枚、ハイパスフィルター1枚、バンドパスフィルター2枚)を組み合わせ用いた。ノッチフィルターは、 $\omega_1$ 光のみを鋭く取り除くために(OD6以上)、ハイパスフィルター(短波長透過フィルタ)は、主に $\omega_2$ 光を取り除くために用いた。バンドパスフィルターは、前述のフィルターを使っても、まだ透過する $\omega_1$ 光や $\omega_2$ 光を取り除く

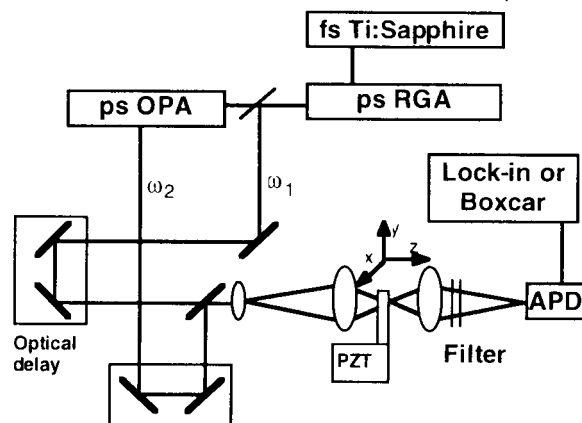


図2 CARS顕微鏡の構成図

ために用いた。4枚のフィルターによって、CARS光に対する $OD=0.4$ 、 $\omega_1$ 、 $\omega_2$ 光に対する $OD > 9$ を達成した。また、CARSスペクトルを観測するためには、 $\omega_2$ 光の波長走査が必要となるが、BBO結晶（OPAを発生）および回折格子（発生したIdler光を分別）にステップモータを取り付け、コンピュータから制御できるようにした。さらに、 $\omega_1$ 光や $\omega_2$ 光の強度をモニタし、CARS光の強度を補正した。

図3に、直径 $4.5\ \mu\text{m}$ のポリスチレンビーズを開発したCARS顕微鏡で観測した結果を示す（点線）。実線は、比較のために同一試料を通常のラマン顕微鏡（日本分光：ラマン分光光度計NRS-2100型）で観測した結果である。CARSスペクトルには、非共鳴バックグラウンドのためバイアス成分が観測されている。また、フェニル骨格の振動モードが約 $15\ \text{cm}^{-1}$ 低波数側にシフトして現れている。このシフトは、非共鳴バックグラウンドとラマンバンドとの干渉による結果だと思われる。CARSバンドの半値全幅は約 $30\ \text{cm}^{-1}$ で、現在の装置の波数分解能は $30\ \text{cm}^{-1}$ であると評価した。

図4に、発生する信号の励起光強度依存性を示す。試料は直径 $4.5\ \mu\text{m}$ のポリスチレンビーズで、レーザー光の波長は $\omega_1 - \omega_2 = 1001\ \text{cm}^{-1}$ で測定を行った。CARS光の強度は、 $\omega_1$ 光の2乗、 $\omega_2$ 光の1乗に比例する。図を見て分かるように、観測信号は $\omega_1$ 光の2乗に良く比例した。また、 $\omega_2$ 光の強度に対しては1.25乗に比例する結果となったが、強度が大きいところ（ $5\ \mu\text{W}$ 以上）では良く1次に比例している（破線は $\omega_2$ 光の1乗に比例する直線を示す）。

図5に、開発したCARS顕微鏡の奥行き分解能を検証するために、液体ベンゼンを2枚のカバーガラスで挟み込んだものを観測した結果を示す。レーザー光の集光スポットをベンゼン層からガラス層へ移動させたときの、ベンゼンのCARS光（ $\omega_1 - \omega_2 = 992\ \text{cm}^{-1}$ ）を観測した（図中○）。実線は、観測結果をカーブフィッティングした結果を表しており、また破線は実線の微分を表しており、その半値全幅は $3.2\ \mu\text{m}$ であった。数値計算の結果と比較するとほぼ回折限界に達していることが分かった。

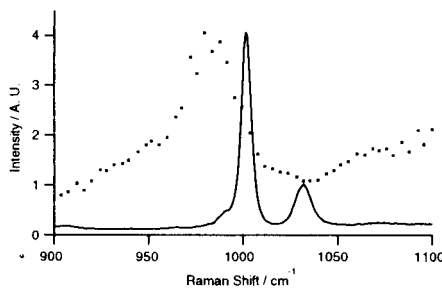


図3 CARS顕微鏡で観測したポリスチレンビーズのCARSスペクトル（点線）と通常のラマン顕微鏡で観測したスペクト（実線）

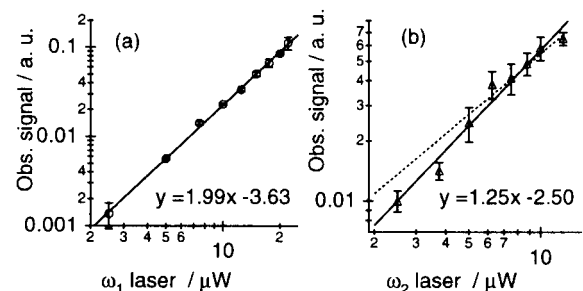


図4 観測された信号の励起光強度依存性  
(a): 観測信号 vs  $\omega_1$  レーザ  
(b): 観測信号 vs  $\omega_2$  レーザ

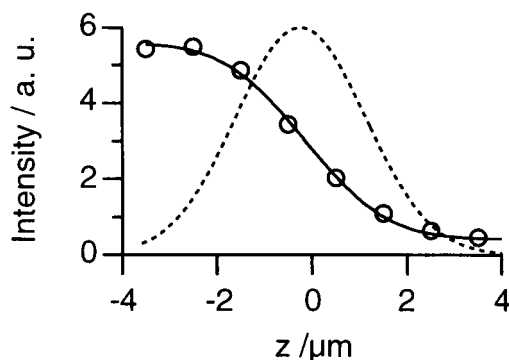


図5 CARS顕微鏡の奥行き分解能

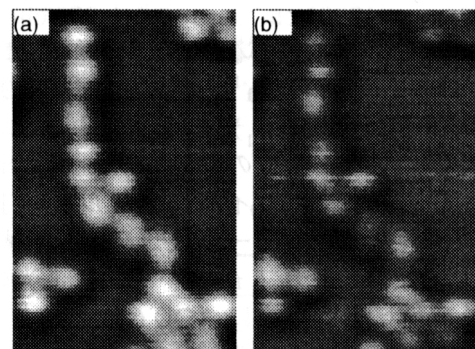


図6 直径1ミクロンのポリスチレンビーズのCARS像。(a) ラマンシフト $980\ \text{cm}^{-1}$ 、(b)  $1030\ \text{cm}^{-1}$

図6に、開発したCARS顕微鏡で、異なるラマンシフトで観測した例を示す。試料は直径1  $\mu\text{m}$ のポリスチレンビーズで、(a)は $\omega_1 - \omega_2 = 980 \text{ cm}^{-1}$ の(b)は $1030 \text{ cm}^{-1}$ のラマンシフトで観測した。開発した装置によるCARS像を示す。直径1 $\mu\text{m}$ の各ポリスチレン球が明瞭に分離して観測できていることから、面内分解能が1 $\mu\text{m}$ 以下で有ることが分かる。また、CARSバンドのピークに一致した図6 (a)では高コントラストに観測されているのに対して、主に非共鳴バックグラウンド成分に対応する図6 (b)ではコントラストが低くなっていることが示されている。

#### 【マイクロレンズアレイを用いた観測時間の短縮】

CARS顕微鏡は、画像とスペクトルを観測刷る必要があるため、長い観測時間を要するという問題点を持っている。これまで単一の検出器を用いて1点1点のCARS光を観測していたため、1画像を測定するために数十分を要していた。そこで、マイクロレンズアレイを用いて、観測時間の短縮化をはかった<sup>7</sup>。通常のラマン散乱顕微鏡では、ラマンスペクトルの観測には必ず分光器を用いて分光する必要があったが、CARSでは励起光の振動数差を操作することによってスペクトルを得ることができるため、観測側にはCARS励起光を除去するためフィルターは必要であるが、分光器を必要とはしない。このため、容易にマイクロレンズアレイを用いた観測の並列化を可能とする。図7に回転マイクロレンズアレイを用いて、イメージインテンシファイア付きCCDで観測したポリスチレンビーズのCARS像を示す。観測時間約1.3秒で、従来の観測時間を約100分の1秒に短縮することができた。



図7 多焦点CARS顕微鏡によるポリスチレン球（直径4.5  $\mu\text{m}$ ）像  
 $\omega_1 - \omega_2 = 1001 \text{ cm}^{-1}$

#### 【まとめ】

著者らは、CARS顕微鏡の観測波長領域の低波数化、および多焦点励起による観測時間の短縮化を行ってきた。生体組織観察という点では、未だ十分なCARSスペクトルを得ることに成功していない。これは、非共鳴バックグラウンドの妨害、および密集したラマンバンドによる影響等が考えられる。これらを打開するために、現在より高波数分解能化、および最適励起波長の選択等に取り組んでいる。

最後に、本研究にあたり、ご助言、ご議論頂いた大阪大学大学院基礎工学研究科荒木勉教授、井上桂吾氏、大阪大学大学院工学研究科、藤田克昌博士、中村收助教授、河田聡教授に感謝する。

#### 【参考文献】

1. M. D. Duncan, J. Reintjes, and T. J. Manuccia, *Opt. Lett.* **7**, 350 (1982).
2. 橋本守・荒木勉, 第59回応用物理学会学術講演会講演予稿集 No.3 15a-N-4 p. 876 (1998).
3. 橋本守, "コヒーレントアンチストークスラマン散乱を用いた顕微鏡", *分光研究*, **40**, 51-61 (2000).
4. A. Zumbusch, G.R. Holtom and X.S. Xie: *Phys. Rev. Lett.* **82** (1999) 4142.
5. M. Hashimoto, T. Araki, and S. Kawata. *Focus on Microscopy* 2000, **4** (2000).
6. M. Hashimoto, T. Araki, and S. Kawata, *Opt. Lett.* (Accepted for publication).
7. 橋本守・井上桂吾・藤田克昌・中村收・河田聡・荒木勉, 第61回応用物理学会学術講演会講演予稿集 No.3 3a-A-3 p.888 (2000).