

## Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy using near IR excitation and UV excitation

○学 上田 圭 (阪大基礎工) 正 橋本 守 (阪大基礎工, CREST)  
 正 荒木 勉 (阪大基礎工) 河田 聡 (阪大工, CREST, 理研)  
 Kei Ueda, Mamoru Hashimoto, Tsutomu Araki  
 Graduate School of Engineering Science, Osaka University  
 Machikaneyama 1-3, Toyonaka, Osaka, Japan  
 Satoshi Kawata, Graduate School of Engineering, Osaka University  
 Key word: Multiphoton microscopy, Raman spectroscopy

## はじめに

近年、生体試料を観測する手段として共焦点蛍光顕微鏡や多光子励起蛍光顕微鏡が、物質の3次元空間分布した情報を得られる顕微鏡としてさまざまな実験に使用されるようになってきた。しかし、これらの蛍光顕微鏡は測定を行う前に試料を蛍光色素によって染色しなければならず、非染色に生きた細胞内分子の3次元的な物質分布を観測する手法の開発が望まれていた。

ラマン分光法や赤外分光法などの振動分光法は、非染色に分子構造に関する情報を得る事が可能な方法であり、これらを利用した顕微鏡の開発が行われている。しかし、非常に微弱な自発ラマン散乱は生体試料によく見られる自己蛍光などの影響により測定が困難であり、赤外線は水による吸収が大きく生体の測定には赤外分光法は不向きである。

そこで我々は生体試料を染色せずに測定できるコヒーレント・アンチストークス・ラマン散乱 (CARS) を用いた顕微鏡の開発を行ってきた<sup>(1,3)</sup>。CARS とは非線形ラマン散乱の一種で、物質に角振動数  $\omega_1$ 、 $\omega_2$  の光を入射したとき誘導ラマン散乱によって  $\omega_{AS}=2\omega_1-\omega_2$  の反ストークス光が放出される現象である。 $\omega_1-\omega_2$  が分子振動の角振動数  $\omega_r$  と一致したとき、CARS 光強度は最大になる。

CARS 顕微鏡の特長として以下のものが挙げられる。(1)CARS は非線形光学現象であるためレーザー光が強く集光された焦点付近のみから CARS 光が発生するため、ピンホールを検出器側に設けなくても奥行き分解能を持つ。(2)入射レーザー光の波長差によって、得られる CARS 光の波長は決まるので分光器を検出器側に用いる必要がない。(3)CARS 光は自発ラマン散乱光に比べると非常に強い光が得られる。(4)反ストークス域に信号が出るために、蛍光等をフィルタ等を用いることによって除去する事が可能である。

しかし CARS 光は発生時、同時に発生する非共鳴バックグラウンド光がしばしば弱い CARS バンドを覆い隠してしまう。弱いバンドを測定するためには、S/B(signal to background)比を増加させなければならない。そこで我々は電子共鳴効果によって CARS 光強度を増強することを試みた。試料の吸収に一致した波長を持つ  $\omega_1$  光や  $\omega_{AS}$  光を入射したとき、共鳴効果のため CARS 光強度が増大する。これにより S/B 比を改善することが出来る可能性がある。今回励起光源として近赤外励起、紫外 (可視~紫外) 励起の2種類の光源を用いた場合の比較を行った。

## 実験装置

Fig.1 に実験装置の概略図を示す。(a)は近赤外光の光源で、繰り返し周波数 80MHz、パルス幅約 5 ピコ秒の2台のチタンサファイ

アレーザー(Ps-Ti:S)から出た光 (近赤外光) をダイクロイックミラーで同軸上に重ね合わせて顕微鏡部へ入射する。Fig.1(b)は紫外光の光源で、非線形光学結晶に近赤外光を入射して第2高調波光を発生させ、ハーフミラーで重ね合わせたあと顕微鏡部に入射する。本実験では  $\omega_1$  光には 780nm および 395nm を用い、 $\omega_2$  光の波長を走査することで CARS スペクトルの測定を行った。LSC(Lock to Clock system)を用いて電氣的に両レーザーのパルス光を同期させ、時間的に重ね合わせて試料へ入射するように調整した。時間的なパルスの重ね合わせはオートコリレータによる相互相関波形より確認する。Fig.1(c)に顕微鏡部分の構成を示す。マイクロレンズアレイディスクに入射し多焦点化させた光を対物レンズを用いて試料に入射し、各焦点から CARS 光を発生させる。マイクロレンズアレイを用いることでレーザー光のエネルギーが分散されるので試料

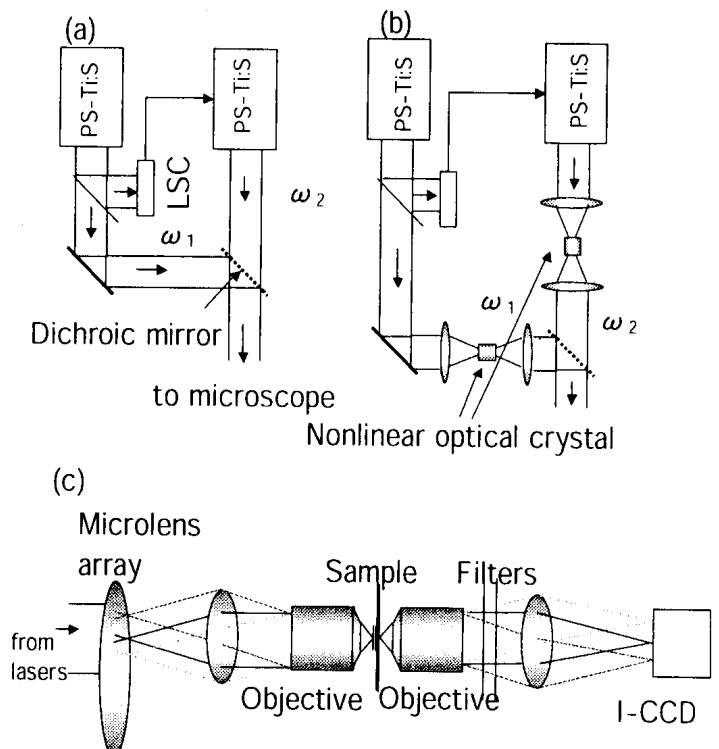


Fig.1 Experimental setup of CARS microscopy

(a):Near IR light source (b):UV light source

(c):Schematic of the configurations for CARS microscopy

に対するダメージが軽減できる。発生する CARS 光は同型の対物レンズによって集められ、フィルタで  $\omega_1$ ,  $\omega_2$  光から分離された後、I-CCD 受光面上に結像される。マイクロレンズアレイを回転させることによって多くの焦点が試料上を高速に走査し一度に CARS 像が得られる。

### 実験結果

Fig.2に直径5  $\mu\text{m}$  のポリスチレンビーズの近赤外CARS画像およびCARSスペクトルを示す。ポリスチレンは  $1000\text{cm}^{-1}$  付近にバンドがあり、(c)のスペクトルにもこれらのバンドが見られる。S/B比 (signal / non resonant background) はこのバンドではおよそ9:1となった。Fig.3に同じバンドを紫外励起CARS顕微鏡で測定した結果を示す。ポリスチレンは紫外域 (400nm 付近) に吸収がないため電子共鳴効果を得ることが出来ず、またレーザー波長と発生するCARS光波長が近いため、フィルタでCARS光も大きくカットされ、明瞭なCARSバンドを検出できなかった。

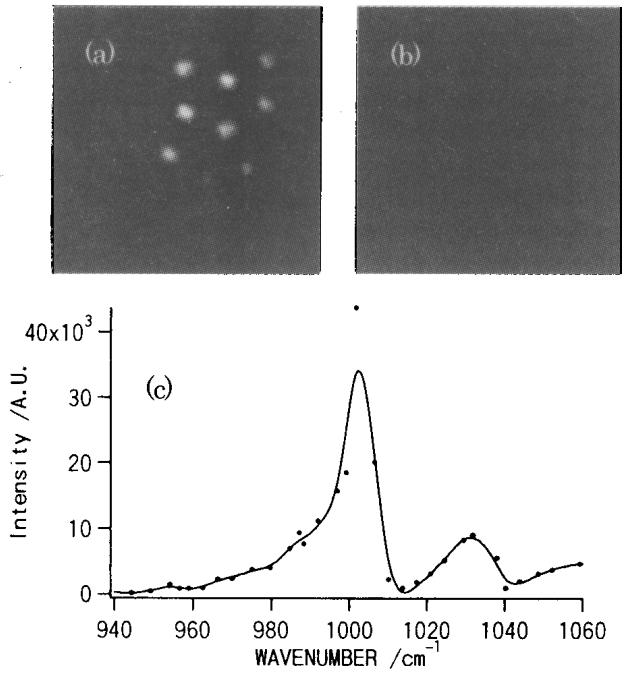


Fig2. CARS image and spectrum of polystyrene using near IR CARS microscopy

(a):  $999\text{cm}^{-1}$  (b):  $1013\text{cm}^{-1}$  (c): CARS spectrum

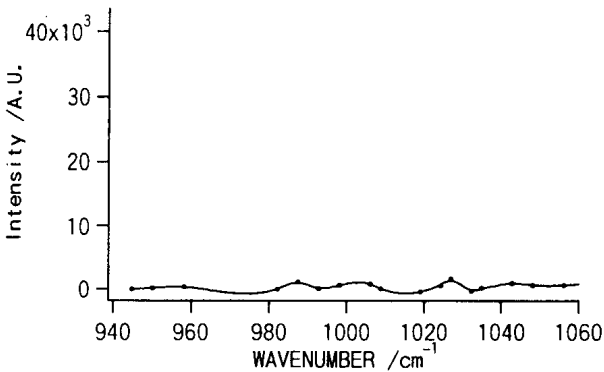


Fig.3. CARS spectrum of polystyrene using UV CARS microscopy

Fig.4にヒト赤血球を紫外(Fig.4(a))、近赤外(Fig.4(b))励起で測定したCARSスペクトルを示す。赤血球は400nm付近にsoret帯と

呼ばれる吸収帯があるため共鳴励起によりCARS光強度が増した。赤血球は酸素を保持しているときと保持していないときでバンドのピークの位置が変化する。脱酸素状態の赤血球のバンドは  $1604\sim 1610$ ,  $1580\sim 1582$ ,  $1547\sim 1549\text{cm}^{-1}$  にあり、Fig.4(a)から判断すると測定した赤血球は酸素を放出した状態(脱酸素状態)であることが分かった<sup>6)</sup>。しかし、Fig.4(b)は非共鳴バックグラウンドの影響で赤血球のバンドが覆い隠されてしまっておりバンドの位置が判定できなかった。

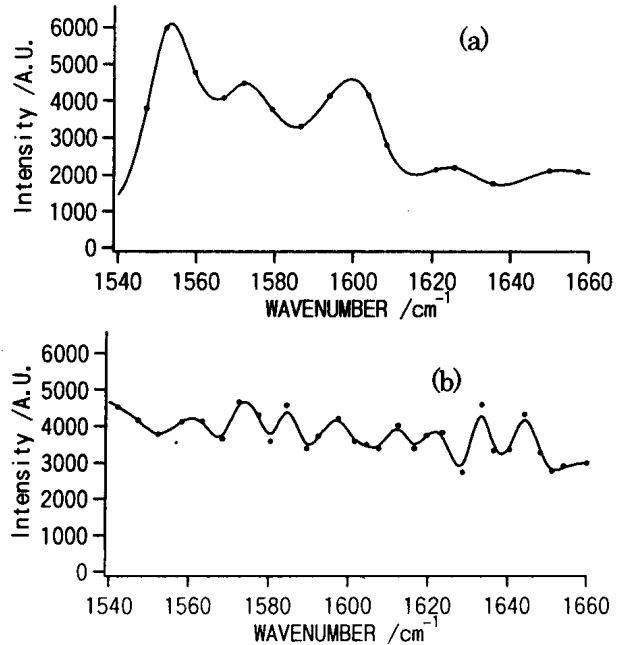


Fig.4 CARS spectrum of human erythrocyte

(a): UV excitation (b): near IR excitation

### 結言

紫外励起CARS顕微鏡と近赤外励起CARS顕微鏡を用いてポリスチレンおよびヒト赤血球を測定しスペクトルを得た。紫外光源は赤外光源の1/20程度の出力しかないにもかかわらず、共鳴効果によって赤血球のスペクトルを得ることができた。共鳴効果を得られない物質は近赤外励起CARS顕微鏡で測定したほうが効率よく試料を励起でき、広範囲を短時間で測定できる。しかし弱いバンドを測定するためには信号強度を増大させる必要があり、共鳴現象利用した紫外励起CARS顕微鏡を用いる必要がある。今後、紫外励起CARS顕微鏡および近赤外CARS顕微鏡の空間分解能を測定し比較を行う予定である。

### 参考文献

- (1) M. Hashimoto, MDM2001, 22-23, 2001
- (2) M. Hashimoto, Acta Histochem. Cytochem. Vol.35 (2), 83-86, 2002
- (3) M. Hashimoto, T. Araki, J.Opt.Soc.Am.A, Vol.18 (4), 771-776, 2001
- (4) P. R. Carey, ラマン分光学, 共立出版, 1984
- (5) Bayden R Wood et al, Biochimica et Biophysica Acta, Vol.1539, 58-70, 2001

### 謝辞

本研究の一部は文部科学省科研費およびCRESTからの助成を得た。また、マイクロレンズアレイを提供していただきました横河電機(株)に感謝いたします。