

10 フェムト秒レーザーを用いた第2高調波発生顕微鏡の高感度化

Abstract

SHG microscopy is an interesting new tool for observing living tissue. However, conventional SHG microscopy using 100 fs laser can't ignore thermal damage in tissue. One possible solution to reduce thermal damage is to use short pulses. In this study, I constructed SHG microscopy using 10 fs Ti:S laser for the measurement of skeletal muscle fiber. The results indicate the sensitivity of 10 fs laser with low average power.

1. イントロダクション

非線形光学顕微鏡の1つである第2高調波発生 (SHG: second harmonic generation) 顕微鏡では、非中心対称構造物質と光電場の非線形相互作用により波長変換が起こり、入射レーザー光の半波長となる SHG 光が発生する。この SHG 光を観測することにより、非中心対称構造を有する生体構成物質 (コラーゲン, ミオシン, チューブリンなど) を選択的に可視化できる^[1]。

これまでの SHG 顕微鏡では、パルス幅 100 フェムト秒 (fs) 前後のモード同期チタン・サファイア (Ti:S) レーザーが広く使われてきた。しかし、生体サンプルによっては、レーザー照射による熱ダメージが無視できない場合もある。SHG 光は2次の非線形光学効果であり、SHG 発生強度は入射光のピーク電場の二乗に比例する。したがって、フェムト秒レーザーのパルス幅を狭窄化することによりピーク電場を高く出来れば、SHG 光強度が増大する。その結果、レーザー照射時間を短縮でき、熱ダメージを軽減できると考えられる。そこで本研究では、同じ平均パワーを有しながらもパルス幅が 10 倍狭窄化された 10 fs モード同期 Ti:S レーザーを用いた SHG 顕微鏡を構築し、筋組織の可視化を行った。更に、従来の SHG 顕微鏡 (150 fs レーザーを利用) との比較を行い、その有用性を確認した。

また、10 fs オーダーの極短フェムト秒パルスレーザーを用いる際の問題点として、光学部品を透過時の群速度分散によるパルス拡がりが増げられる。例えば、8 fs パルス光が、厚さ 1 mm のガラス (BK7) を通過すると約 2 倍に拡がる^[2]。今回構築した 10 fs-SHG 顕微鏡でも、対物レンズによってパルス幅が大きく拡がっている可能性があり、10 fs レーザーのスペックをフルには活用できていないと考えられる。このパルス拡がりの影響を完全に補償し、SHG 顕微鏡のさらなる高感度化を達成するため、SHG 強度自己相関計^[2]を構築し、パルス幅の測定を行った。

2. 10 fs-SHG 顕微鏡を用いた筋線維のイメージング

2-1. SHG 光強度とパルス幅

物質に光が入射されると、入射光の電場により分極波が物質中で誘起され、これが源となって新たな光が発生する。通常の光による線形分極 P_L は入射電場強度 E に比例する。

$$P_L = \chi^{(1)} E \quad (1)$$

ここで、 $\chi^{(1)}$ は線形感受率である。上式より、線形分極に由来する屈折等ではその前後において波長が変化しない。一方、超短パルス光のように非常に高いピークパワーを持つ光を入射すると線形性が崩れ、非線形の項が含まれる非線形分極 P_{NL} で表すことが出来る。

$$P_{NL} = \chi^{(1)} E + \chi^{(2)} EE + \chi^{(3)} EEE + \dots \quad (2)$$

ここで、 $\chi^{(2)}$ および $\chi^{(3)}$ は2次及び3次の非線形感受率である。このように分極波に非線形な項が現れると、分極波が歪み、入射電場周波数 ω の高調波成分($2\omega, 3\omega\dots$)が含まれる。SHG光は2次の非線形分極 $\chi^{(2)}EE$ によって非中心対称性物質のみで誘起され、周波数 ω の光を入射したとき、 2ω の光が発生する。

今回の実験において、100 fs レーザーよりも10倍パルス幅狭窄化された10 fs レーザーを用いると、ピーク電場 E が10倍増大し、結果として非線形分極 $\chi^{(2)}EE$ に由来するSHG光強度が100倍向上することになる。

2-2. チャープと群速度分散^[2]

10 fs オーダーの極短フェムト秒パルスレーザーを用いる際の問題点として、チャープによりパルスが広がるということが挙げられる。チャープを生じさせるものとしては、パルスの伝搬する媒質によって与えられる媒質分散、幾何学的な光路差によって生じる角度分散、自己位相変調などの非線形過程によって生じる分散など様々である。ここでは、光学素子の群速度分散によるチャープ、媒質分散について記述する。図.1に示すように、ガラスのような屈折率が正の分散を持つ物質を透過したパルスは、短波長(青)側の成分が長波長(赤)側の成分に対して遅れる。SHG光強度を増大させるためには、ピークパワーの高い(パルス幅が短い)パルスを用いる必要があるため、チャープ補償を行う必要がある。

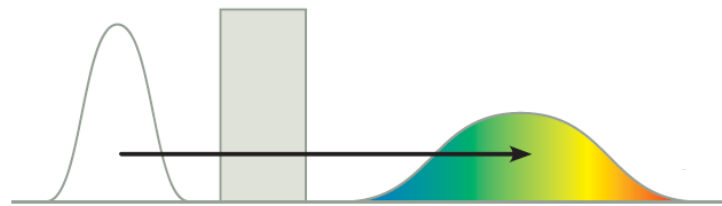


図.1 パルスが物質を透過してパルス幅が広がる様子^[3]

ここで、媒質分散を数学的に記述することを考える。波動は周波数 ω と波数 k によって記述され、 k は ω の関数であり、 $k(\omega)$ と表される。一般に、分散がパルス特性に与える影響を理解する場合 $k(\omega)$ を中心周波数 ω_0 まわりでテイラー展開する。

$$k(\omega) = k(\omega_0) + \left. \frac{dk}{d\omega} \right|_{\omega=\omega_0} (\omega - \omega_0) + \frac{1}{2!} \left. \frac{d^2k}{d\omega^2} \right|_{\omega=\omega_0} (\omega - \omega_0)^2 + \frac{1}{3!} \left. \frac{d^3k}{d\omega^3} \right|_{\omega=\omega_0} (\omega - \omega_0)^3 + \dots \quad (3)$$

ここで、(3)式の2次微分係数を屈折率の周波数依存性または波長依存性で書き換えると、

$$\ddot{k} = \left. \frac{d^2k(\omega)}{d\omega^2} \right|_{\omega=\omega_0} = \frac{\lambda_0^3}{2\pi c^2} \left(\frac{d^2n}{d\lambda^2} \right)_{\lambda=\lambda_0} \quad (4)$$

となり、これを群速度分散 [fs^2/mm] (GVD: group velocity dispersion) と呼ぶ。

また、GVDに物質長 x [mm]をかけると、

$$\Phi = \ddot{k}x \quad (5)$$

が得られ、 Φ'' は群遅延分散 [fs^2] (GDD: group delay dispersion) である。このGDDと入力 t_0 [fs]

および出力パルス幅 t [fs] (フーリエ変換限界パルス幅とする) の関係は,

$$t = t_0 \left[1 + \left(4 \ln 2 \cdot \frac{\ddot{\Phi}}{t_0^2} \right)^2 \right]^{1/2} \quad (6)$$

と表すことが出来るため, 媒質の GDD がわかれば出力パルス幅を予測することができ, 逆に出力パルス幅を測定できれば媒質が持つ GDD を見積もることもできる^[4].

本研究では, 光学素子により正の分散が与えられたパルスのチャープ補償を行うため, チャープミラーを用いる. チャープミラーとは誘電体多層膜ミラーであり, 図.2 に示すように, 多層膜中を波長が長い光ほど到達する距離が長くなるため, 負の分散を与えることができる. 本研究において用いたチャープミラー (Z1107049, Z1107054, LAYERTEC 社製) の GDD と波長の関係の例を図.3 に示す. 1 枚のチャープミラーでは, 波長に対する群遅延分散値が変動する特性があるが, 2 枚のチャープミラーを用いることでこれを打ち消し合い, 1 枚あたりの波長に対する群遅延分散の平均は図 (c) のようになる. ペアで使用しなければならないので, 1 往復 (2 枚のミラー間) で $-55 \text{ fs}^2 @ 787 \text{ nm}$ 程度の負の群遅延分散を与えることが出来る.

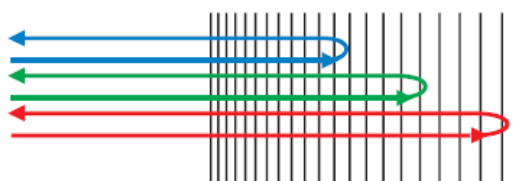


図.2 チャープミラーにおける波長ごとの光路

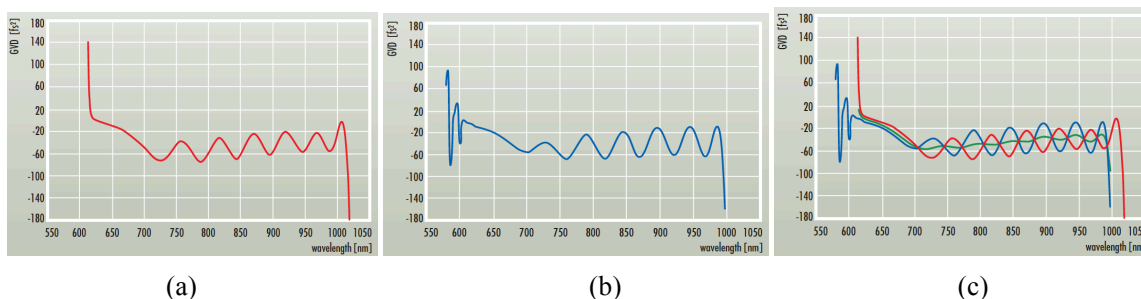


図.3 チャープミラーと群遅延分散の関係 ((a)チャープミラー1, (b)チャープミラー2, (c)二枚のチャープミラーを用いた場合の群遅延分散の平均)^[3]

2-3. 実験装置

図.4 に SHG 顕微鏡のセットアップを示す. 光源にはモード同期 Ti:Sapphire レーザー (パルス幅 10 fs, 中心波長 787 nm, スペクトル幅 103 nm, 繰り返し周波数 81.8 MHz) を用いた. レーザー光は, 対物レンズ等の光学素子を伝搬中に受ける正の分散を相殺するため, 始めにチャープミラーペアで 8 回往復させることで, 可能な限りの負のチャープを与え, ガルバノミラーとリレーレンズを経た後, 対物レンズ (N.A.=0.42, W.D.=17 mm) によってサンプル上に集光される. サンプル上のレーザースポットは, ガルバノミラーとリレーレンズにより, 約 $430 \mu\text{m} \times 430 \mu\text{m}$ の測定領域を 2 次元高速走査できる (測定時間 10 秒/イメージ). サンプルから発生した SHG 光は後方の対物レンズ (N.A.=0.42, W.D.=20 mm) によって受光され, 赤外カットフィルターにより基本波成分を除去した後に, フォトンカウンティング型光電子増倍管によって検出される. また,

レーザー光は ND フィルターによって照射平均パワーの調節を行う． 30 mW 前後の平均パワーでは，時間に伴い SHG カウントの減少が見られたため，本研究ではカウントの減少が起こらない照射平均パワー20 mW でイメージングを行った．

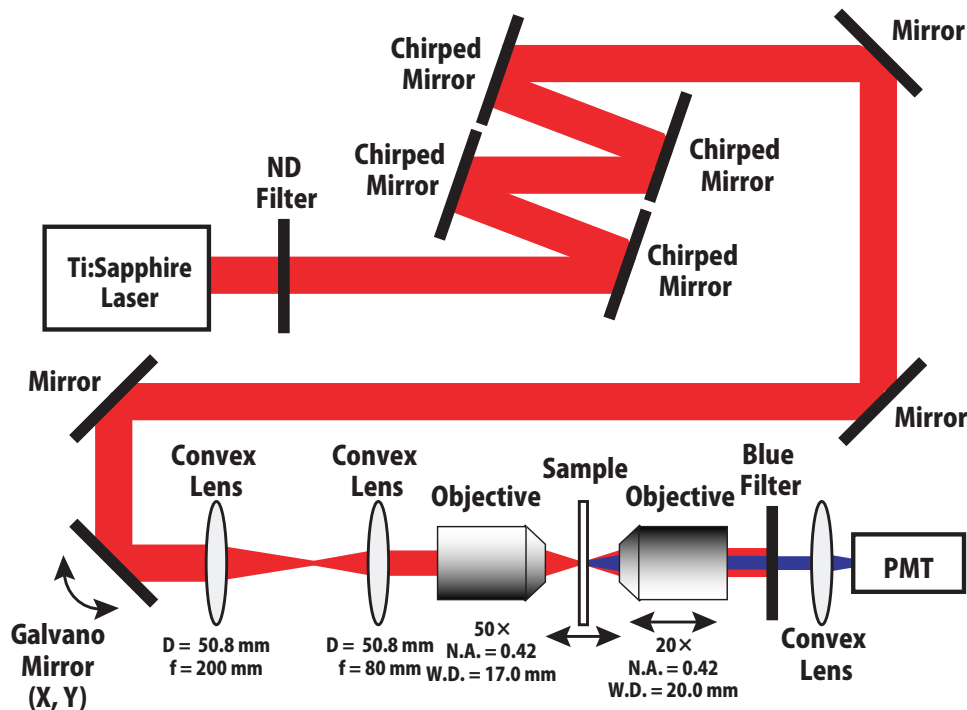


図. 4 10 fs-SHG 顕微鏡

2-4. 測定サンプル

測定サンプルには，兎下腿骨格筋を用いる．心筋や骨格筋は，筋肉，筋線維，筋原線維という階層構造を有している．筋原線維は長軸方向に横紋を示す規則正しい周期構造を持ち，この周期構造の単位をサルコメアという．サルコメアには，ミオシンでできたミオシン線維とアクチンでできたアクチン線維が存在しており，両端は Z 膜で仕切られ，次のサルコメアと連続している．このミオシンは，図. 5 に示されるようなヘッドを持つことによる非中心対称性構造ゆえに，2次の非線形光学特性を有している．

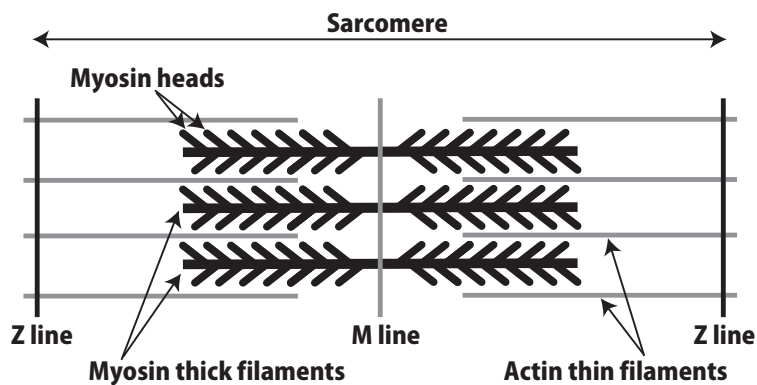


図. 5 サルコメアの概略図

2-5. 実験結果

今回構築した 10 fs-SHG 顕微鏡を用いて、筋線維を長軸方向に沿ってスライスした切片サンプルを観測した結果を図.5 に示す。ミオシンの分布が極めて高コントラスト・高分解なイメージとして可視化できている。特に、このイメージ中において垂直方向に走る線維に直交するようなバンド構造を確認することが出来るが、この構造中の明部はミオシンの、暗部は Z 膜周辺の可視化がされていると考えられる。また、M ライン近傍のミオシンはヘッドが存在せず、本来なら SHG 光は発生しないが、本イメージではその領域は分解出来ていない。さらに、イメージ中高輝度の信号が得られている部分は、筋線維を包む筋膜に存在するコラーゲンの可視化をしている。コラーゲンはミオシンに比べ 2 次の非線形感受率 $\chi^{(2)}$ が高いため、このような高輝度の信号が得られたと考えている。比較のため、従来の 150 fs-SHG 顕微鏡を用いて同じサンプルを計測した結果を図.6 に示す。図.5 と比較すると、イメージ全領域においてコントラストが非常に低く、詳細な構造が確認出来ない。これらの結果から、10 fs レーザーを用いることで SHG イメージのコントラストが上昇し、筋線維におけるサルコメアの周期構造が可視化できた。

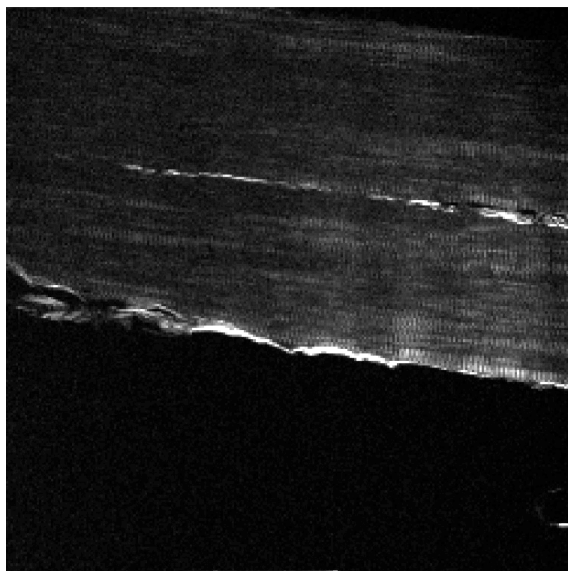


図.5 10 fs-SHG イメージ

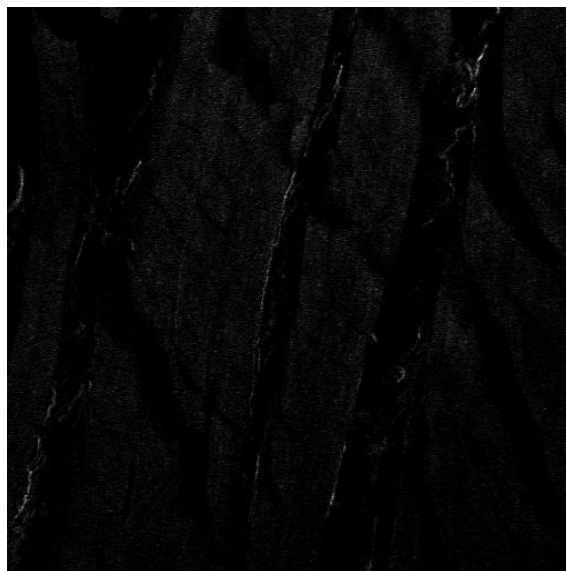


図.6 150 fs-SHG イメージ

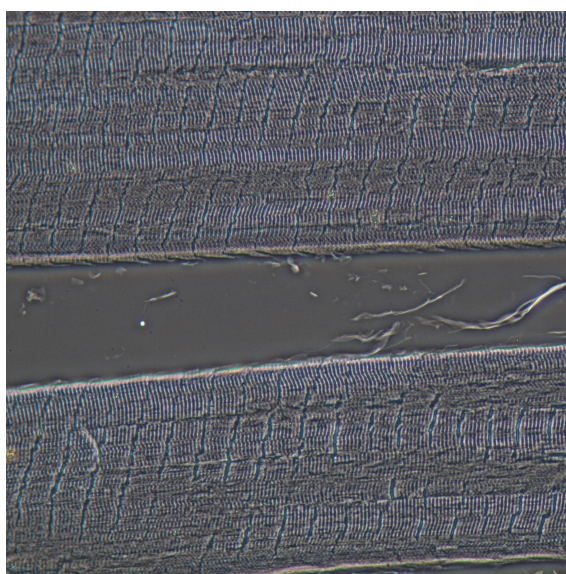


図.7 筋線維の位相差顕微鏡イメージ



図.8 骨延長サンプルの SHG イメージ

これら筋線維の SHG イメージの整合性を確認するため、位相差顕微鏡を用いて同サンプルのイメージングを行った。位相差顕微鏡はサンプルに照射した光の位相差をコントラスト差に変換して観察できる光学顕微鏡のことであり、筋線維の観察に用いると無染色でサルコメアの周期構造が確認できることが知られている。図.5 のサンプルを位相差顕微鏡で観察したイメージを図.7 に示す。図.7 のイメージは、SHG イメージと測定領域 ($430\ \mu\text{m} \times 430\ \mu\text{m}$) が合うように加工している。サルコメアの周期はおよそ $3\ \mu\text{m}$ と報告されており^[5]、両イメージから確認できる周期はこれと一致しているため周期構造のオーダーから SHG イメージの整合性を確認した。

最後に、骨延長サンプルの SHG イメージングを行った。図.8 に示す。この筋線維から採取したサンプルでは、サルコメア長が伸びていることが予想される。図.8 で見られるバンド構造の周期はおよそ $5\ \mu\text{m}$ ほどであり、コントロールサンプル (図.5) に比べてサルコメア長の延長が確認できた。

2-6. 考察

従来の $150\ \text{fs}$ レーザーよりも 10 倍パルス幅狭窄化された $10\ \text{fs}$ レーザーを用いた SHG 顕微鏡による筋線維のイメージングにおいて、SHG イメージのコントラスト向上を確認した。しかし、今回の装置構成では、純粋なパルス幅による影響のみの比較は行えておらず、その他の影響 (配置、照射時間、平均パワーなど) を同一にした上で比較を行わなければならない。

また、チャープミラーにより、対物レンズの分散補償を行ったが、対物レンズの GDD は数百～数千 fs^2 ほどあるため^[4]、チャープミラーのみの分散補償ではパルス幅が大きく広がっている可能性がある。 $10\ \text{fs}$ レーザーのスペックをフルに活用するためには、パルス幅の測定を行い、対物レンズ出射時にパルス幅が最短となるように分散補償する必要がある。

3. パルス幅の測定

3-1. SHG 強度自己相関法^[2]

パルスの時間強度波形を測定する方法として最も多く用いられている方法に SHG 強度自己相関法がある。図.9 に構築した SHG 強度自己相関計のセットアップを示す。光学素子の群速度分散の影響を避けるため、反射光学系およびゼロ分散ビームスプリッターを用いた。相関計は、マイケルソン干渉計と SHG 結晶、光検出器からなる。干渉計内で 2 つのビームに分けられたパルスは、相対時間差 τ を持って軸外し放物面鏡により SHG 結晶内に集光される。位相整合がとれた結晶内の SHG 光の信号強度は、 $\tau=0$ の時に最も強くなり、光検出器で得られる時間積分された信号を、時間遅延により τ の関数として測れば、二次の自己相関関数が得られる。

このセットアップを用いてレーザーをチャープミラーペアで反射させた後、正の群速度分散 ($50.6\ \text{fs}^2/\text{mm}$) を持つ、素材 BK7 のウインドウ基板 (OPB-25C01-P, OPB-25C02-P, OPB-25C03-P, OPB-25C05-P, SIGMA 社製) を追加していき、パルス幅の変化を評価した。図.10 に理論的なパルス幅 (式(6)を使用) と群遅延分散の関係と、ウインドウ基板を追加していき計測したパルス幅と、群遅延分散の関係を示す。群遅延分散は、ウインドウ基板なしで計測した自己相関波形から得られたパルス幅 (ガウス型と仮定) を上式に代入して算出した値を基準とし、ウインドウ基板を追加した分だけ群遅延分散を加えた値とした。図.10 より、パルス幅の実測値は理論曲線とよく一致しており、チャープミラーで与えた負の分散が、正の分散を持つウインドウ基板を透過することで、パルスがネガティブチャープからポジティブチャープに変化していく様子がわかる。ここで、群遅延分散が 0 付近の実測値がフーリエ限界パルスにあまり近づいていない理由として、結晶内での基本波および SHG 光の群速度不整合 (GVM: group velocity mismatch) により、実際の

より、パルス幅の測定限界が 30 fs 程度であるため、分散補償を行い、対物レンズ後に最短パルスとなっているかどうかの確認は不可能である。そのため、GVM の影響を受けない 2 光子検出器を用いた強度自己相関計^[2]を用い、10 fs レーザーのパルス幅測定を行う必要がある。

4. まとめと今後の予定

10 fs モード同期 Ti:S レーザーを用いた SHG 顕微鏡を構築し、筋組織の可視化を行った。今後の予定として、分散補償により対物レンズ後のパルス幅の最短化を行う。これにより、平均パワーの減少、照射時間の短縮が可能となり、生体への熱ダメージを最小限に抑えつつ、高コントラストなイメージが取得可能となる。一方、ピークパワーが高くなると非線形光学効果の一つである多光子吸収が発生する効率も上がる。生体組織は紫外域で吸収帯を持つものが多く、中心波長 800 nm 付近の Ti:S レーザーを用いる場合、注意が必要である。

今回用いた筋線維切片サンプルは、一般的な染色をすればサルコメアの縞模様が容易に観察可能であり、また位相差顕微鏡であれば未染色でも同様にサルコメアが観察可能であった。そのため、現状のサルコメアが観察出来るというだけでは、他手法との優位性は見えない。一方、通常染色で筋間の線維成分は薄く線状にしか出てこず、SHG イメージングにおいて、筋線維を包んでいる線維成分のコラーゲン走行・配向などについて情報を抽出することが出来れば、新規性・優位性を持つと考えられる。

参考文献

- [1] Paul J. Campagnola, Chen-Yuan Dong, *Laser Photonics Rev.* **5**, 13 (2011).
- [2] 小原實, 神成文彦, 佐藤俊一: “レーザ応用光学”. 共立出版株式会社, (1998)
- [3] Femtosecond laser optics catalog 2007, LAYERTEC.
- [4] J.M.Squire, *Curr. Opin. Struct. Boil.* **7**, 247 (1997)
- [5] Jeffrey B. Guild, Chris Xu, and Watt W. Webb, *APPLIED OPTICS* **36**, 397 (1997)