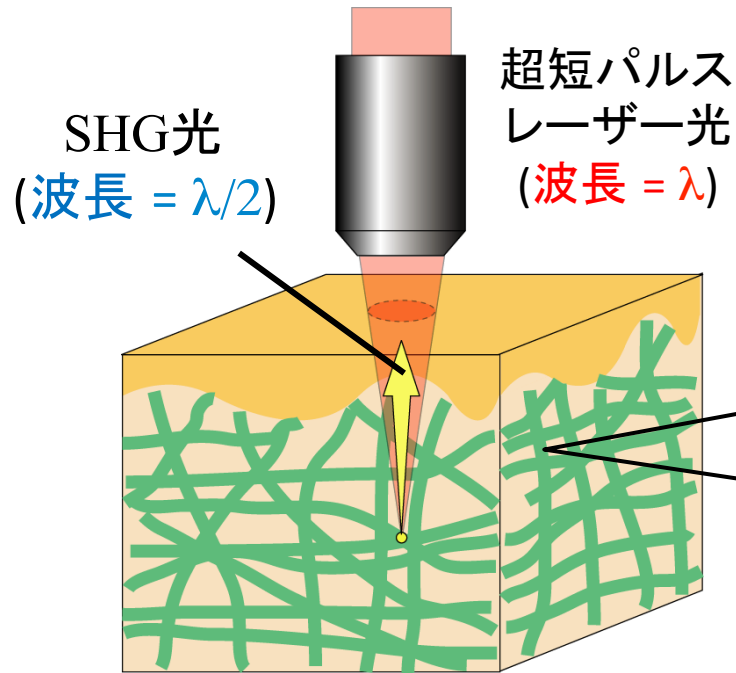


# 研究報告

H.25 3月8日

長谷

# 第2高調波発生(SHG)顕微鏡



## SHGとは

超短パルス光を、非中心対称性の物質に入射した際、半波長(周波数が2倍)の光が発生する現象

## 例

コラーゲン分子



非中心対称性構造



SHG光の  
発生源

## SHG顕微鏡の特徴

- 分子構造に依存した選択性を持つ
- 生体組織の場合、コラーゲン、ミオシン、チューブリンなどが観測可能

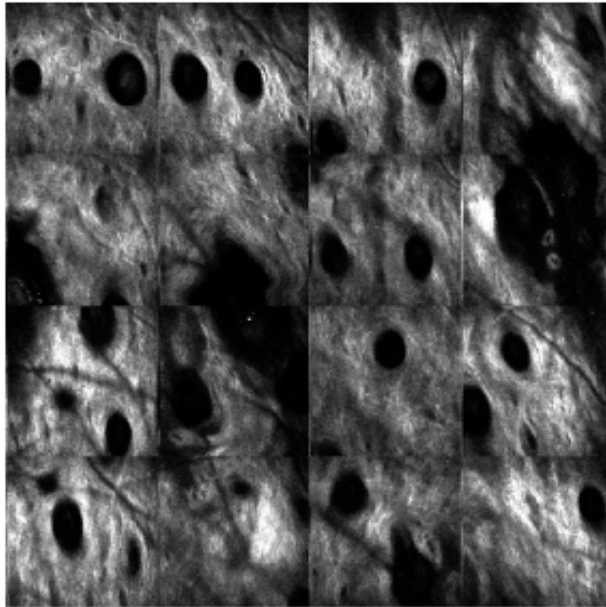
Application



- がん診断
- 再生医療
- リモデリング

# 従来のSHG顕微鏡(100 fsレーザー)

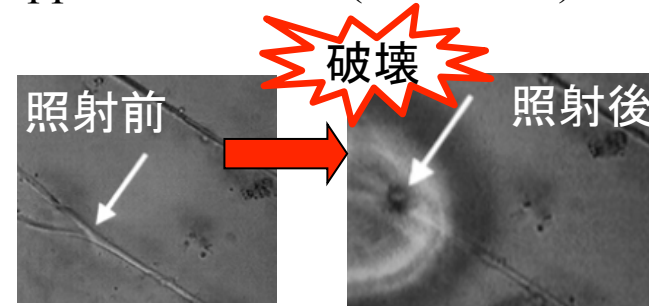
- ・100 fsレーザーを用いた  
コラーゲンSHGイメージング  
@ヒト皮膚真皮層



生体組織のコラーゲンを  
生きたありのままで可視化

- ・生体組織への影響

サンプル: タマネギの細胞壁  
Ti:Sapphireレーザー ( $\lambda=800$  nm)を照射



0.7-0.8秒照射後に細胞壁の破壊が観測

Ref.) Chen *et al.*, Optical and Quantum Electronics  
34, 1251 (2002)

生体サンプルによっては、  
レーザー照射による  
熱的ダメージが無視できない

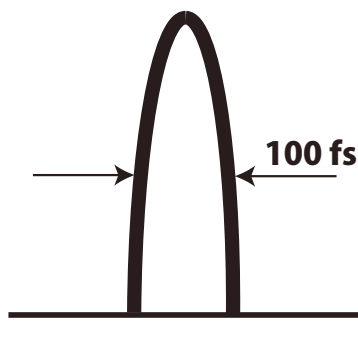
- ・レーザー入射パワーの減少
- ・照射時間の短縮 が必要

# パルス幅の狭窄化

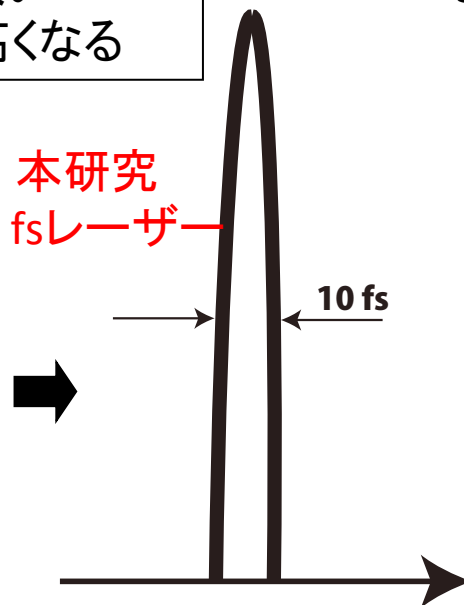
- パルス幅の狭窄化により, **ピークパワー**を増大 → 高感度化

パルス幅が10倍狭い  
ピークパワーが10倍高くなる

従来の光源  
100 fsレーザー



本研究  
10 fsレーザー



SHGは2次の非線形光学効果であるため,

$$P_2 = \chi^{(2)} EE \quad \text{より,}$$

SHG強度はピーク電場の**2乗に比例**

↓  
従来の100 fsレーザーに対して,  
SHG強度は**100倍**となる

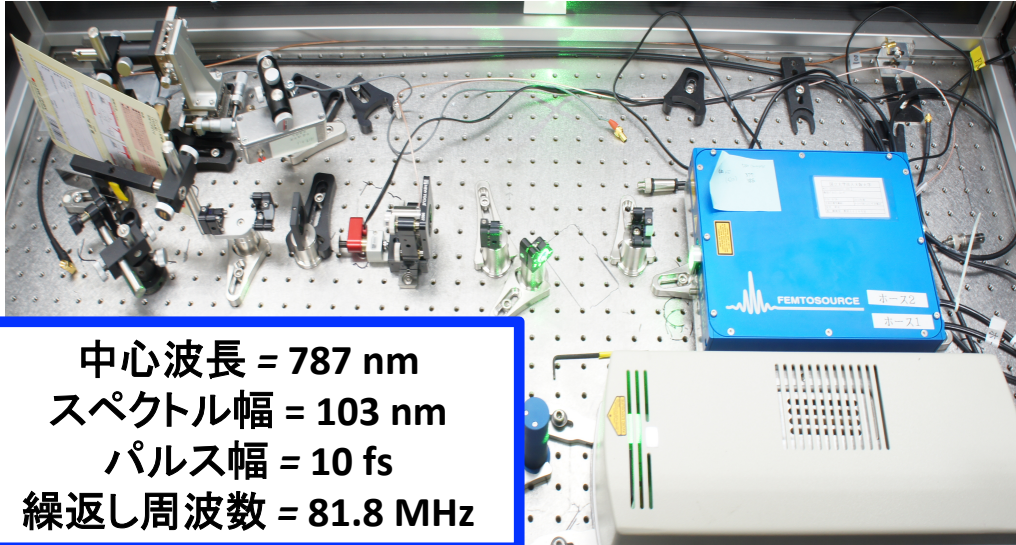
平均パワーを下げても,  
十分な信号強度が得られる

面積 = 平均パワーは等しい  
生体へのダメージ = 面積(時間積分)

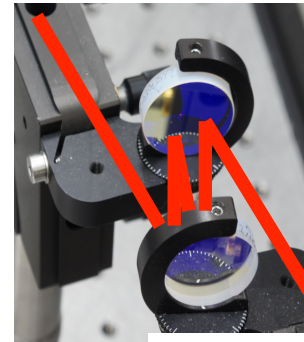
- 入射パワーの減少
- 照射時間の短縮 が達成

**10 fsレーザーを用いることでSHG光強度が増大, 生体へのダメージを軽減可能**

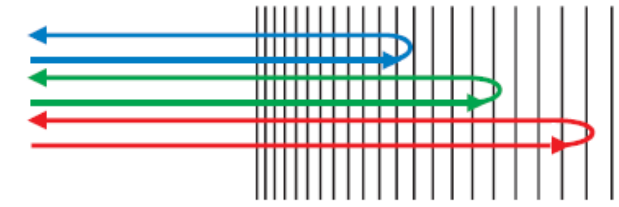
# 10 fsレーザー



中心波長 = 787 nm  
スペクトル幅 = 103 nm  
パルス幅 = 10 fs  
繰返し周波数 = 81.8 MHz

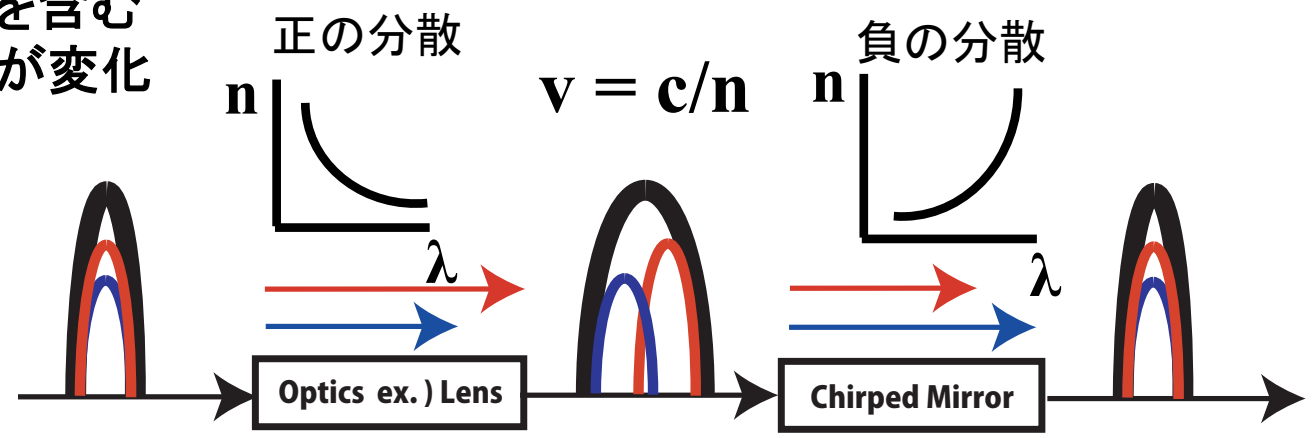


チャープミラー



## 分散補償

- ①パルス波 = 様々な波長を含む
- ②波長( $\lambda$ )により屈折率( $n$ )が変化
- ③伝播速度に差ができる
- ④パルス幅が広がる



# パルス幅と分散

波数を中心周波数 $\omega_0$ まわりでテイラー展開する

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

$$\frac{d^2k(\omega)}{d\omega^2} \Big|_{\omega=\omega_0} = \frac{\lambda_0^3}{2\pi c^2} \left( \frac{d^2n}{d\lambda^2} \right)_{\lambda=\lambda_0} \quad : \text{群速度分散 (GVD)} \quad [\text{fs}^2/\text{mm}]$$

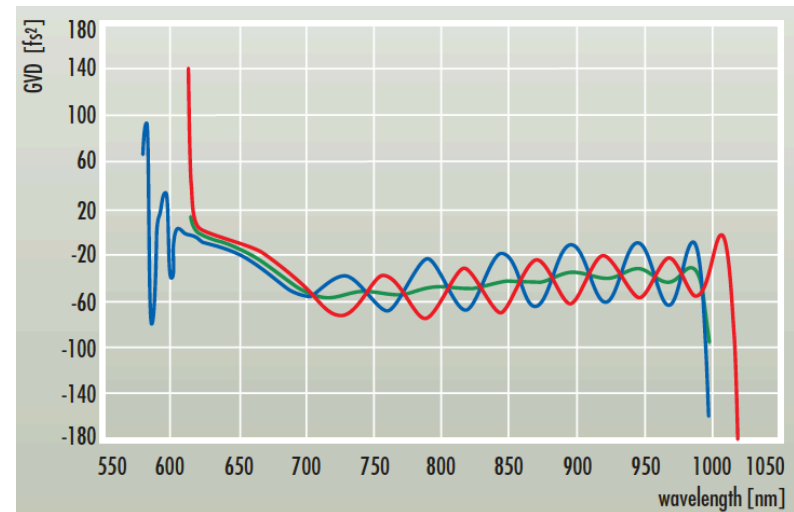
群速度分散に物質長 $x$  [mm]をかけると

$$\Phi'' = k'' x \quad : \text{群遅延分散 (GDD)} [\text{fs}^2]$$

入射パルス幅 $t_0$ の光が、 $\Phi''$ を持つ物質を伝搬したときのパルス幅 $t$ は

$$t = t_0 \left[ 1 + \left( 4 \ln 2 \cdot \frac{\Phi''}{t_0^2} \right)^2 \right]^{1/2}$$

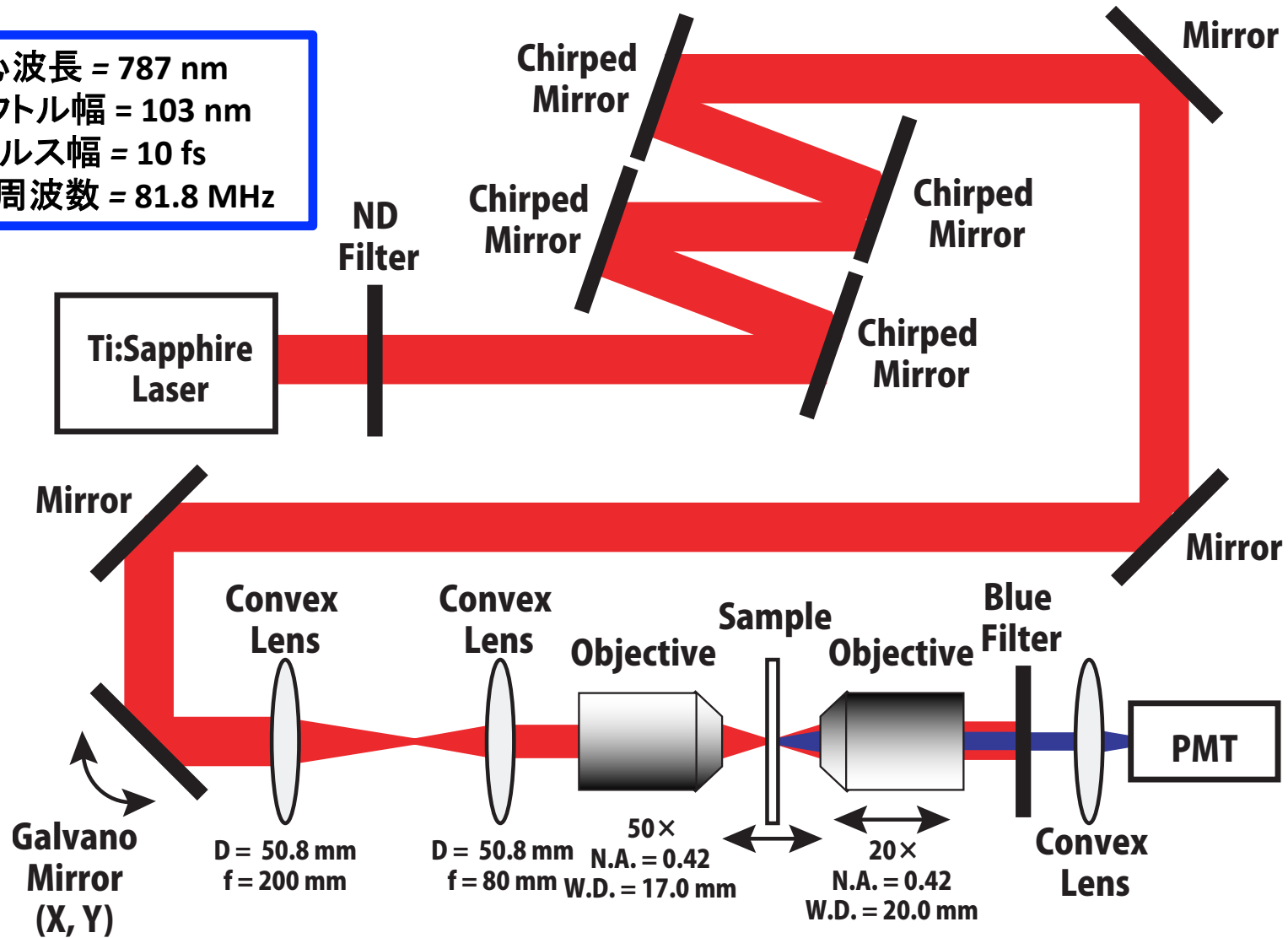
チャープミラーのGDDの波長依存性



**物質の群速度分散がわかれば、パルス幅の制御が可能**

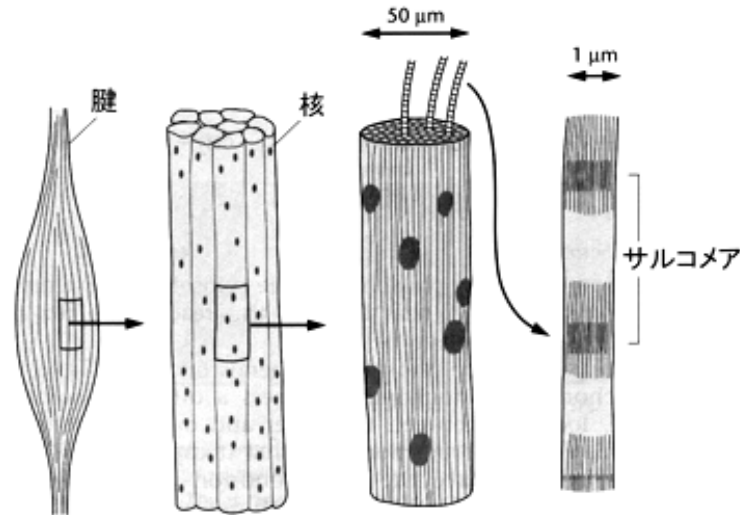
# セットアップ

中心波長 = 787 nm  
スペクトル幅 = 103 nm  
パルス幅 = 10 fs  
繰返し周波数 = 81.8 MHz

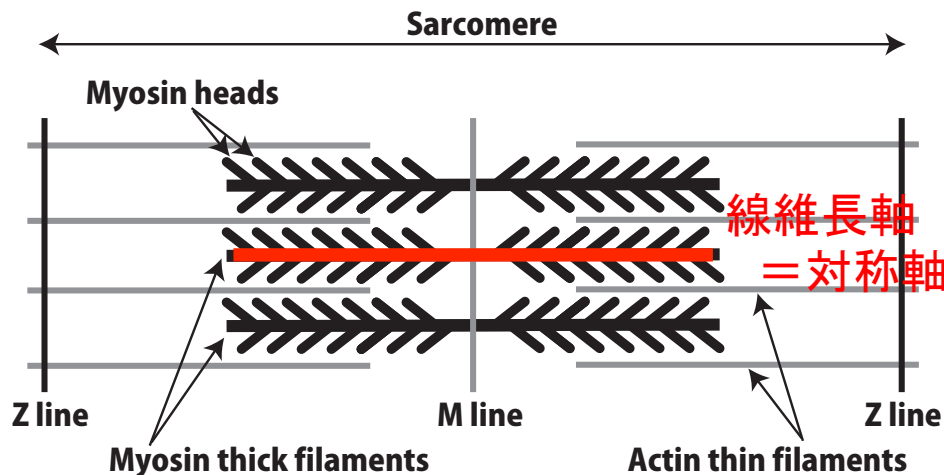


# 測定サンプル (兎下腿骨格筋)

・筋線維切片サンプルは徳島大学医学部高橋光彦先生により提供



筋肉 線維束 筋線維 筋原線維  
<http://khatori.yz.yamagata-u.ac.jp/>より抜粋



## 骨格筋

筋肉 - 線維束 - 筋線維 - 筋原線維

## 筋原線維

サルコメアの規則正しい周期構造

## サルコメア

アクチン+ミオシンで形成

## ミオシン

タンパク質

筋肉の収縮に寄与

ヘッドを持つ



ミオシン = 非中心対称構造

**SHG光の発生源となる**

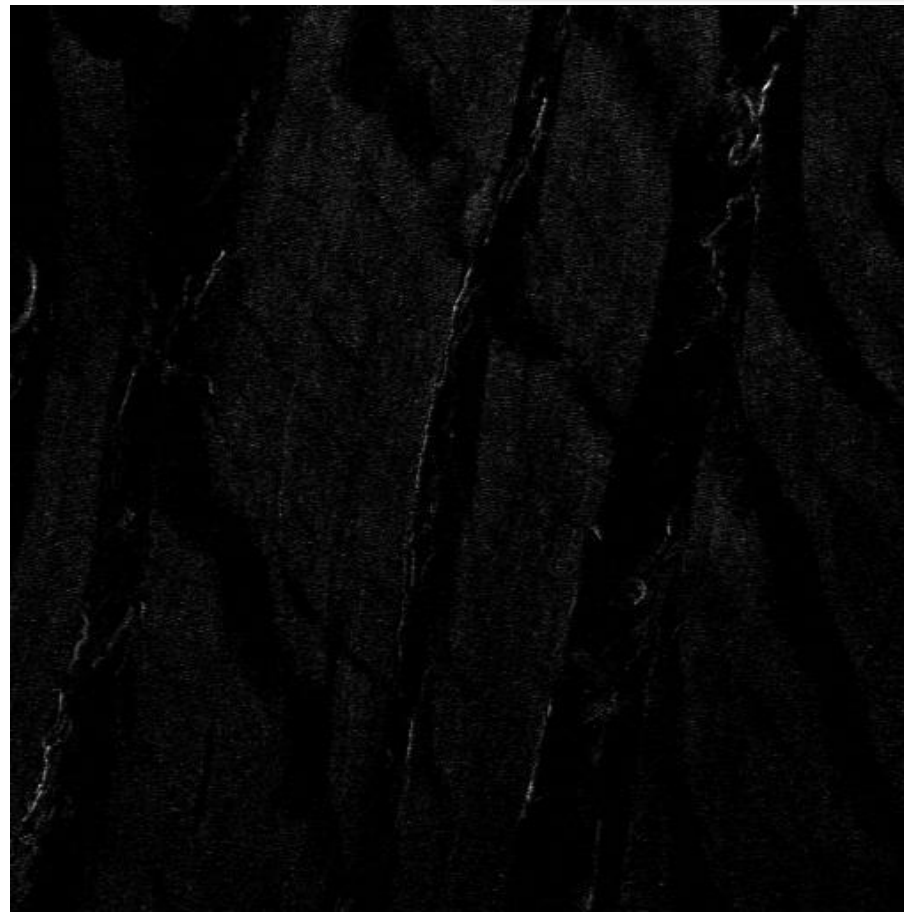


# 従来の150 fs-SHG顕微鏡との比較

10 fs-SHG顕微鏡



150 fs-SHG顕微鏡

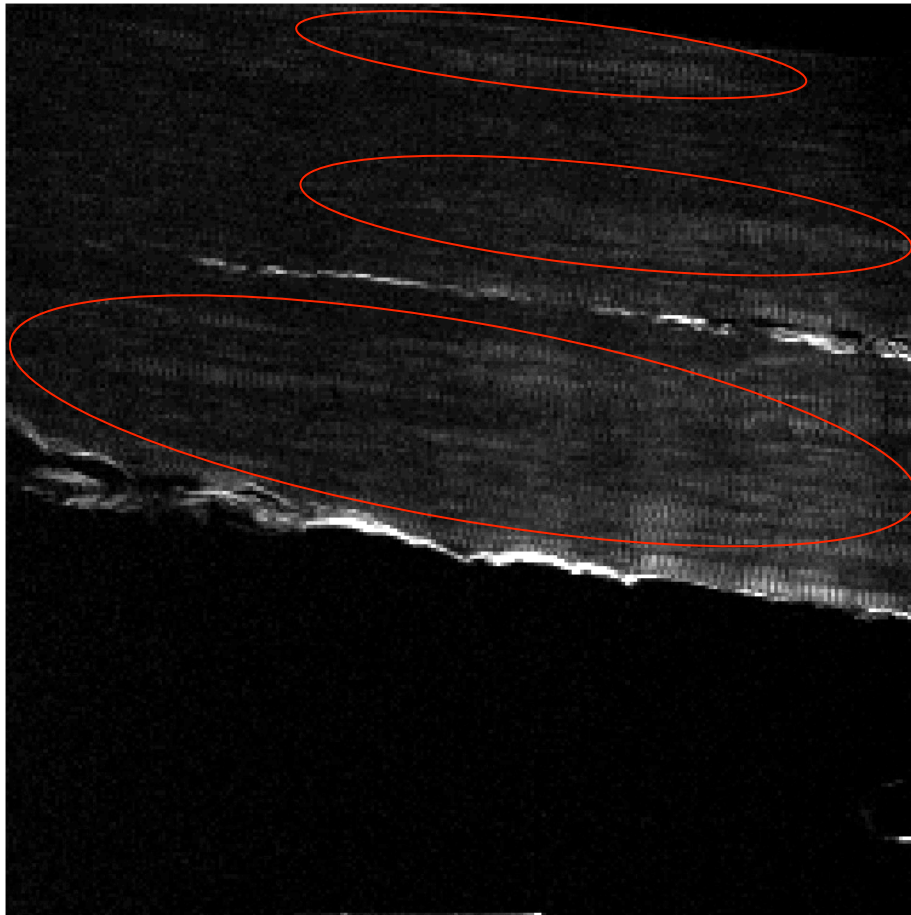


測定領域  
約430  $\mu\text{m}$ \*430  $\mu\text{m}$

SHGイメージのコントラストが向上

# 筋線維のSHGイメージ

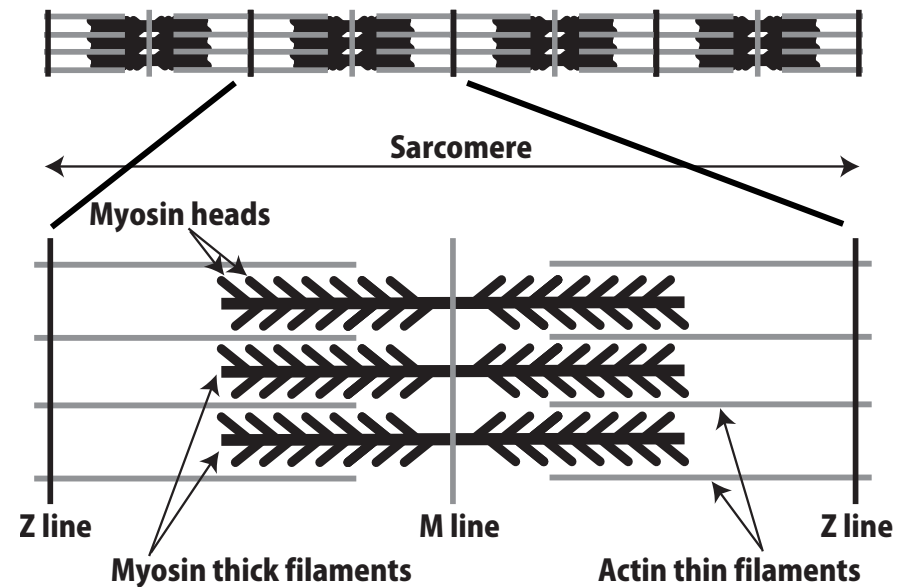
コントロールサンプル@SHG顕微鏡



測定領域  
約430  $\mu\text{m}$ \*430  $\mu\text{m}$

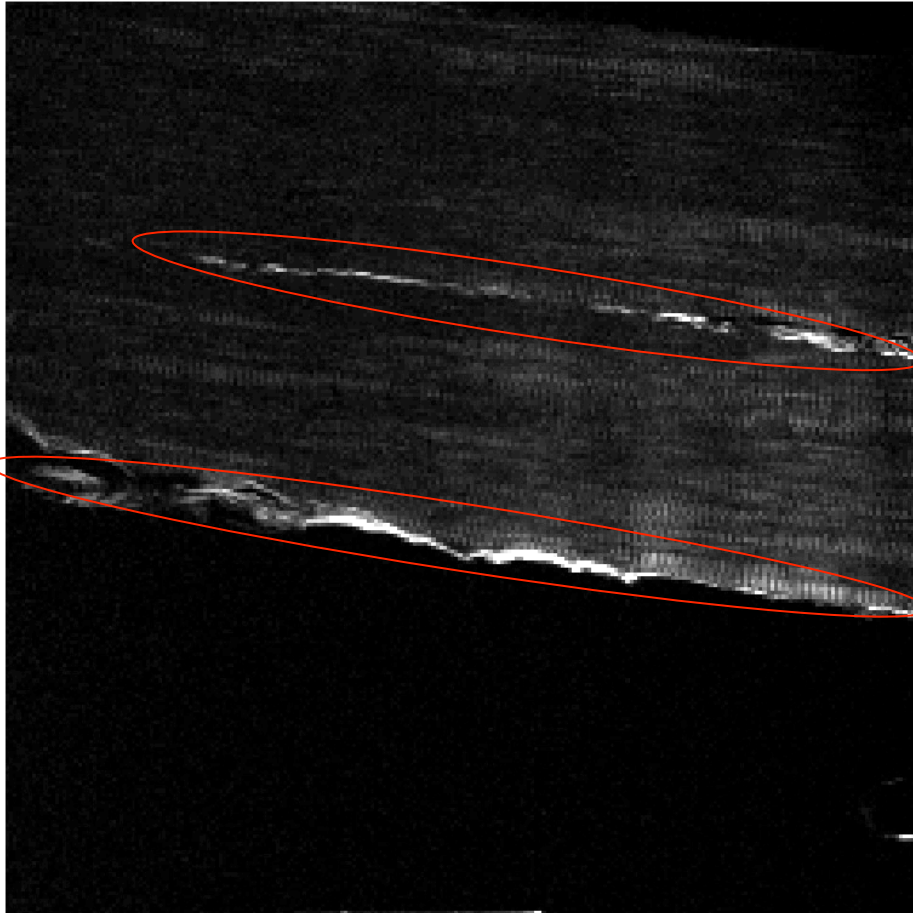
- ・サルコメアの周期構造を可視化
- ・線維を包むコラーゲンの可視化

## 筋原線維の模式図



# 筋線維のSHGイメージ

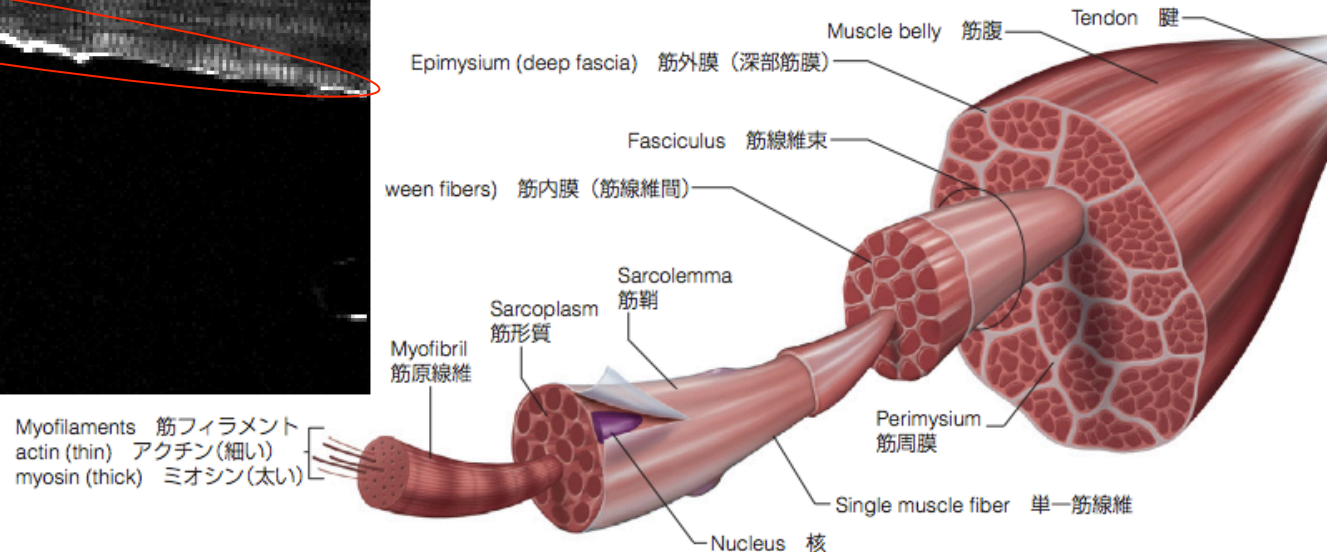
コントロールサンプル@SHG顕微鏡



測定領域  
約430  $\mu\text{m}$ \*430  $\mu\text{m}$

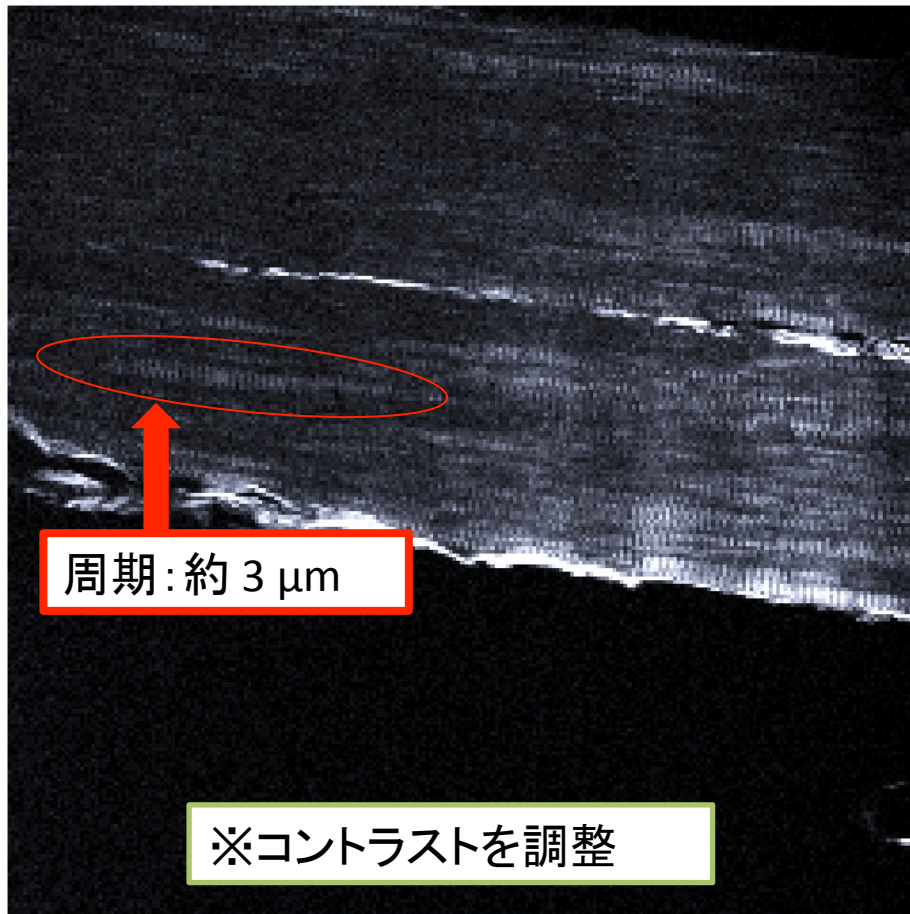
- ・サルコメアの周期構造を可視化
- ・線維を包むコラーゲンの可視化

## 筋の概略図

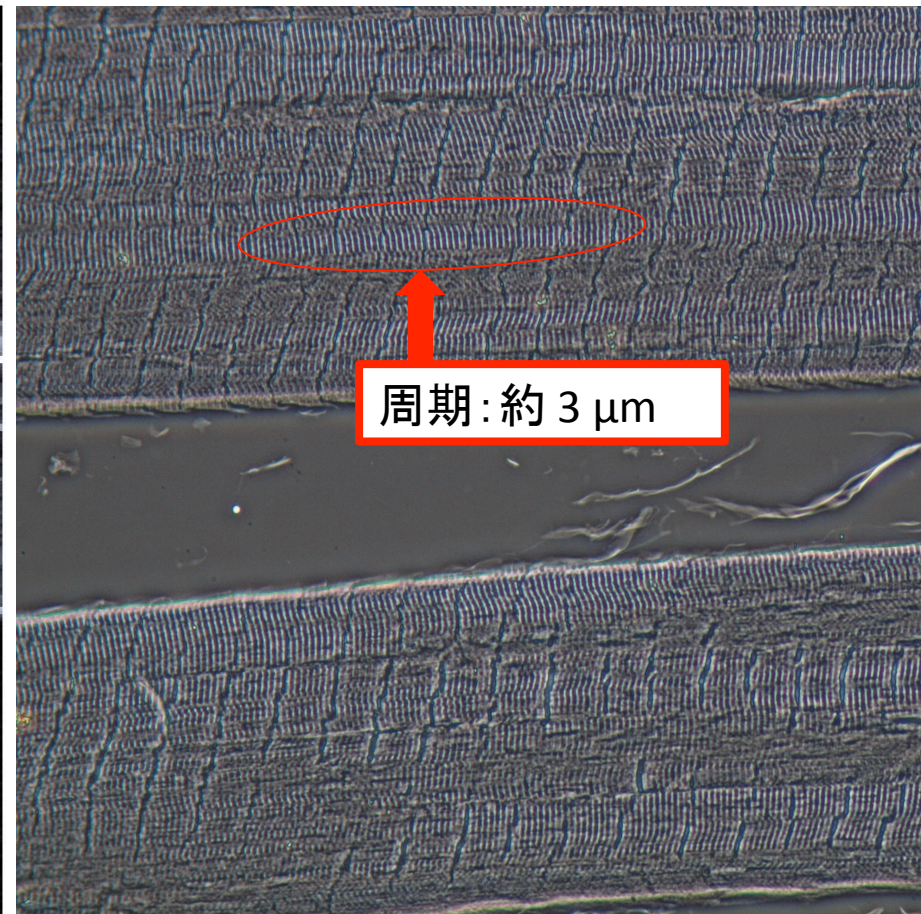


# SHGイメージの整合性の確認

コントロールサンプル@SHG顕微鏡



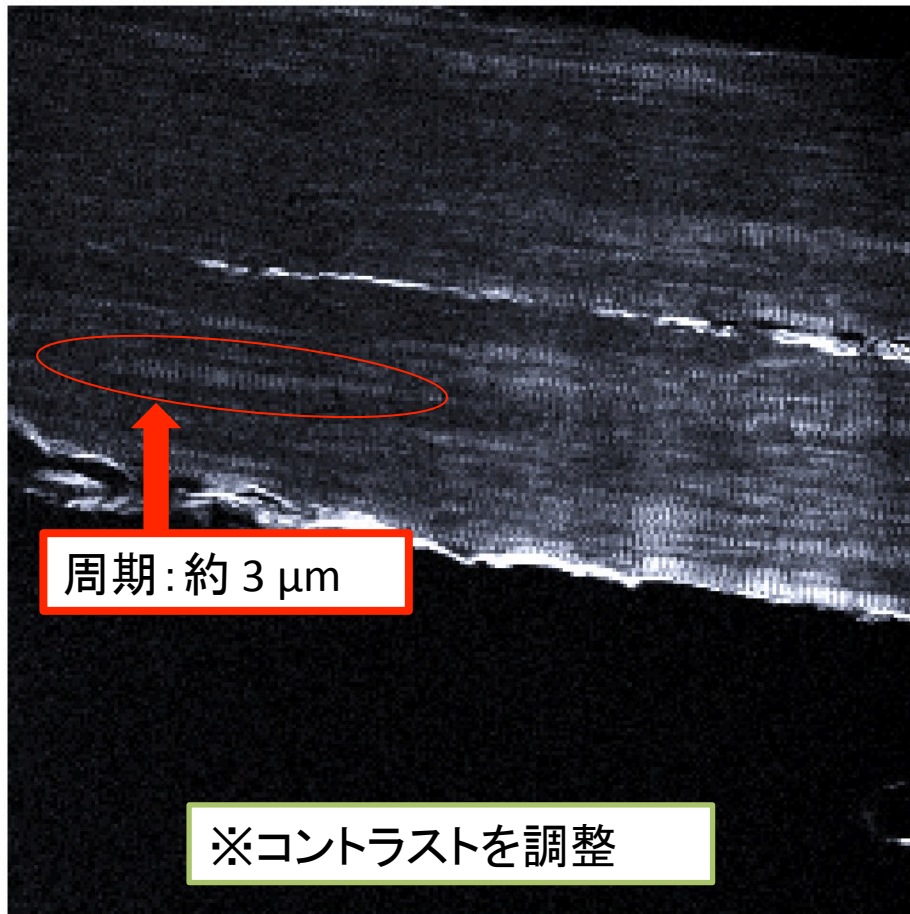
コントロールサンプル@位相差顕微鏡



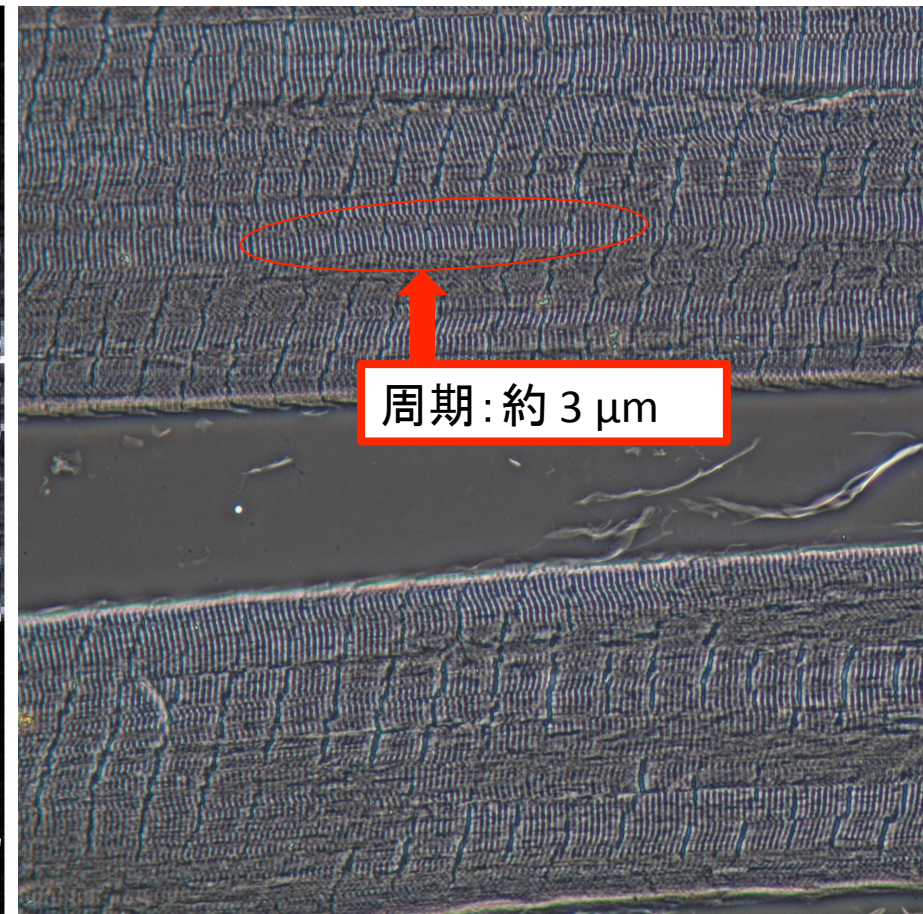
測定領域  
約430 μm\*430 μm

# SHGイメージの整合性の確認

コントロールサンプル@SHG顕微鏡



コントロールサンプル@位相差顕微鏡



周期構造のオーダーの合致から整合性を確認

# 異常筋線維のSHGイメージング

## 骨延長

麻酔下に人工的に骨折させ(骨切り)  
その骨切りした部分が治癒する過程で  
生じる未熟な骨の元(仮骨)を術後に  
ゆっくりと牽引することで  
骨を延長する治療法



骨だけでなく周辺の骨格筋も伸張

骨延長サンプル@SHG

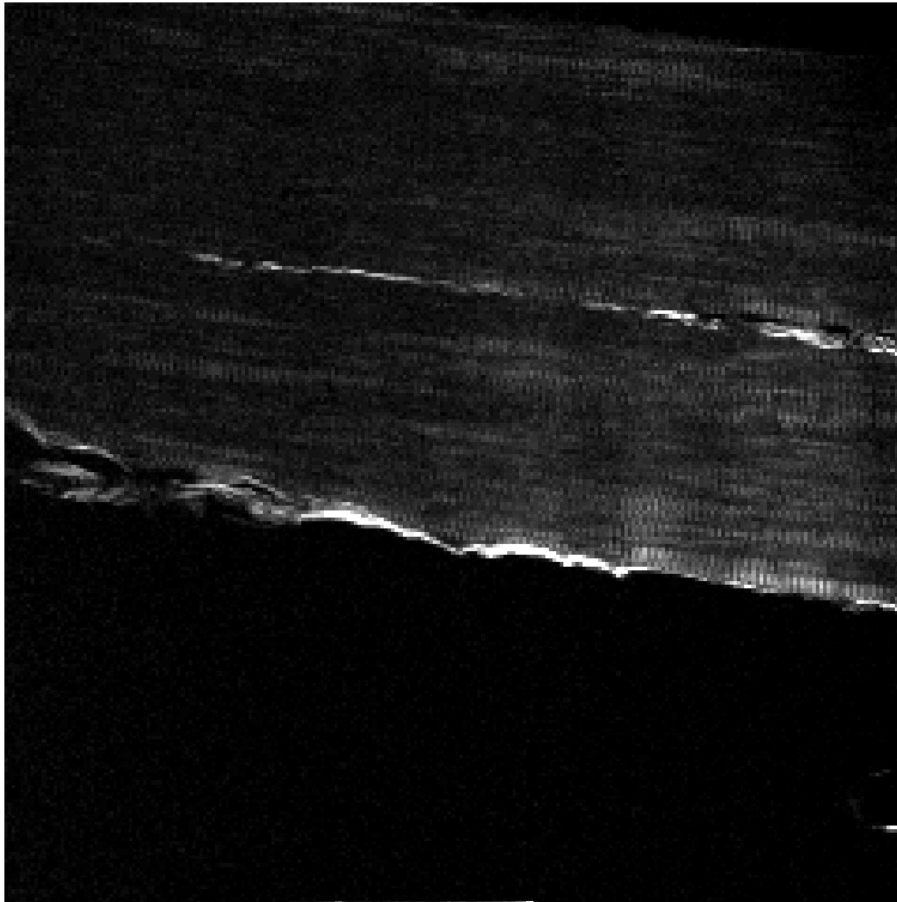
測定領域  
約430  $\mu\text{m}$ \*430  $\mu\text{m}$



異なるサンプルでのミオシン分布の違いを確認

# 異常筋線維のSHGイメージング

コントロールサンプル@SHG



骨延長サンプル@SHG



測定領域  
約430  $\mu\text{m}$ \*430  $\mu\text{m}$

・サルコメア周期の延長を確認

異なるサンプルでのミオシン分布の違いを確認

# パルス幅の最適化

## 今回のセットアップ

・チャープミラーペア×2を用いて可能な限り負のチャープを与える → 顕微鏡へ

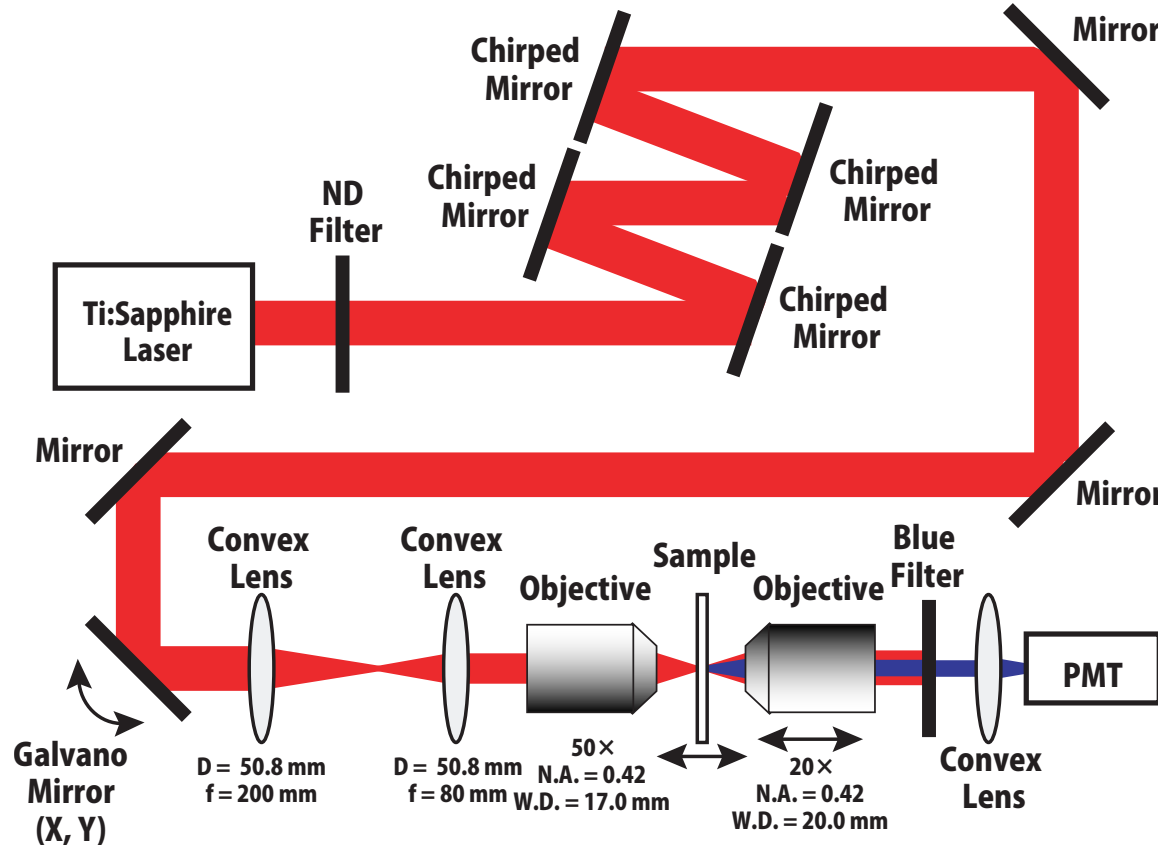


Table 1. Summary of GDD Data on Microscope Lenses as Measured by a Second-Order Interferometric Autocorrelation Function<sup>a</sup>

Optical Element	GDD (fs <sup>2</sup> )		
	700 nm	730 nm	780 nm
NeoFluar 0.3 NA 10×	1000 ± 100	800 ± 100	500 ± 100
NeoFluar 0.9 NA 40×	1600 ± 100	1100 ± 100	950 ± 100
Apochromat 1.2 NA 40×	2400 ± 100	2200 ± 100	1800 ± 100
NeoFluar 1.3 NA 40×	2500 ± 100	2100 ± 100	1700 ± 100
Apochromat 1.4 NA 63×	4300 ± 100	4000 ± 100	3200 ± 100
3× expander	660 ± 30	680 ± 30	580 ± 30
5× expander	580 ± 30	500 ± 30	530 ± 30
MRC-500 eyepiece	2150 ± 90	1350 ± 90	1250 ± 90

<sup>a</sup>All objectives were infinity-corrected Zeiss plan lenses.

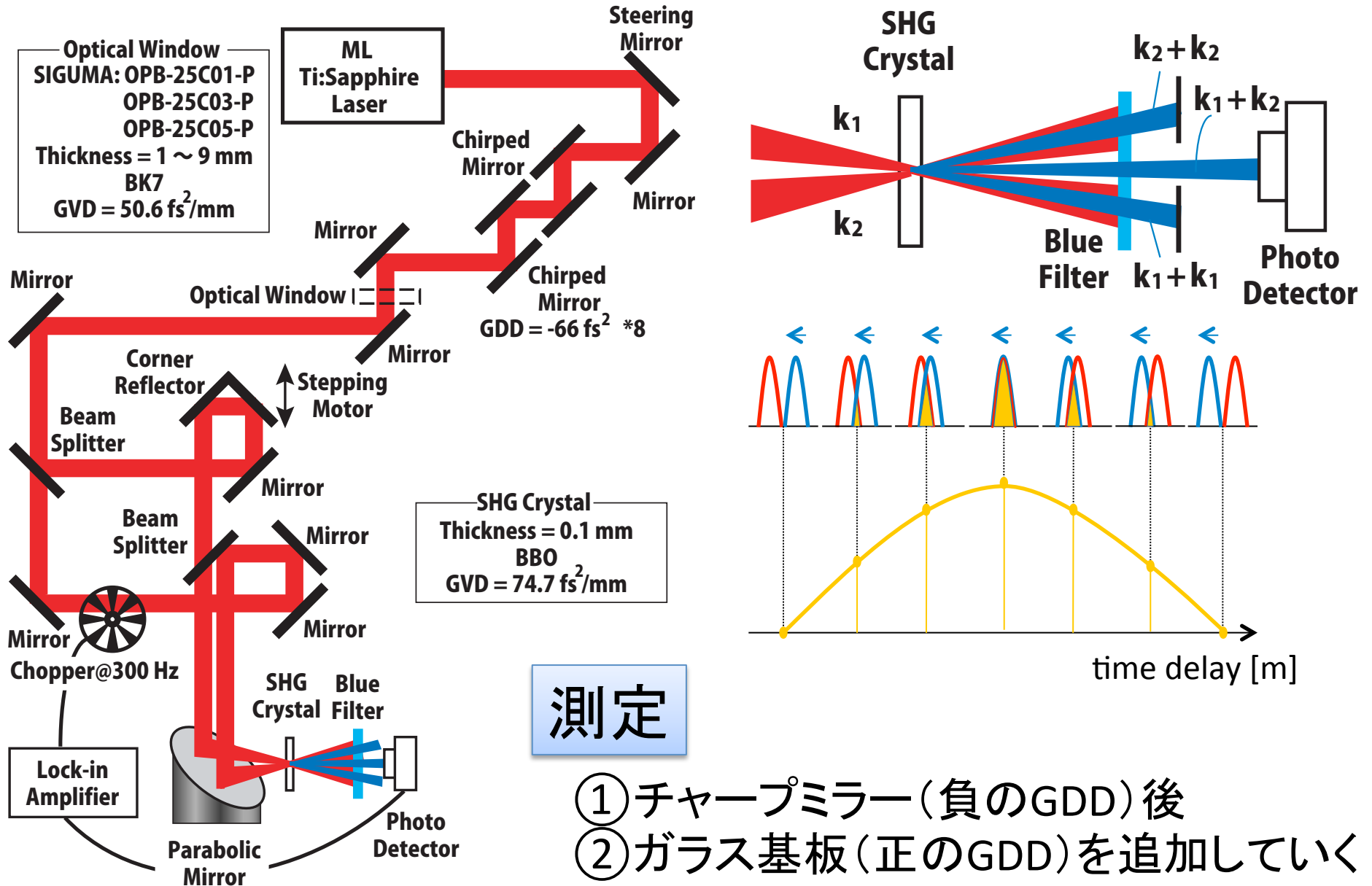
Ref) Jeffrey B. Guild, Chris Xu, and Watt W. Webb, APPLIED OPTICS 36, 397 (1997)

パルス幅が最適化がされていない？

→ パルス幅の測定および設計が必要



# パルス幅の測定: SHG強度自己相関法

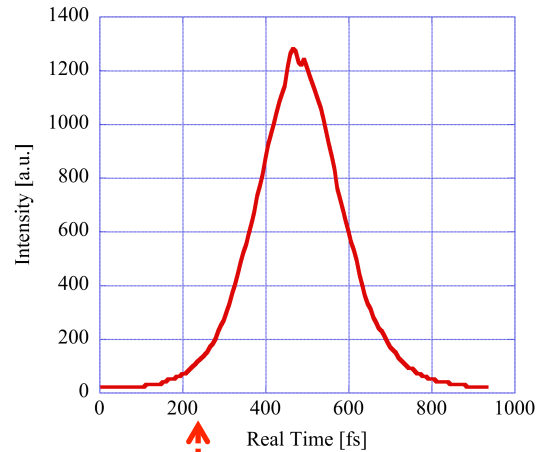


## 測定

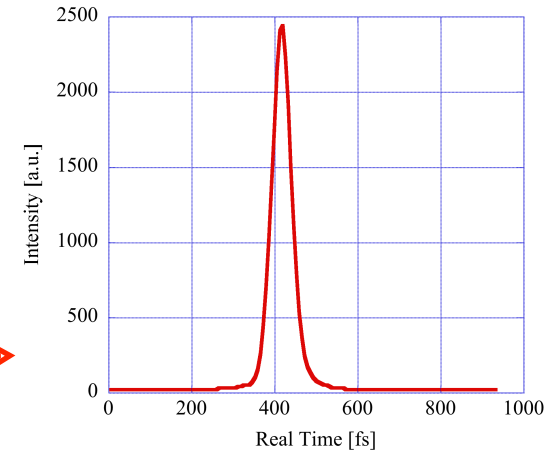
- ① チャープミラー(負のGDD)後
- ② ガラス基板(正のGDD)を追加していく

# パルス幅の測定:SHG強度自己相関法

チャープミラー後の自己相関波形



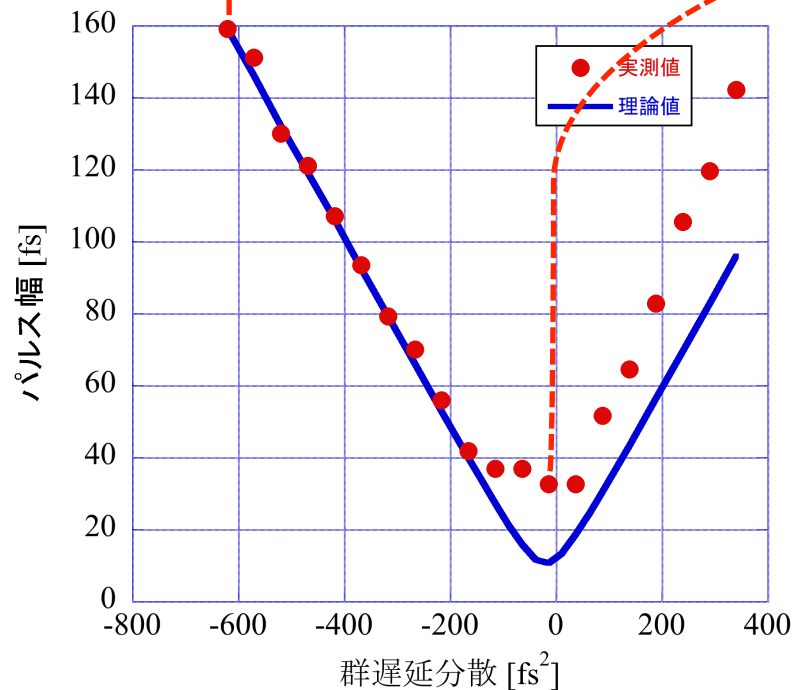
最短パルス幅の自己相関波形



ガラス基板を追加

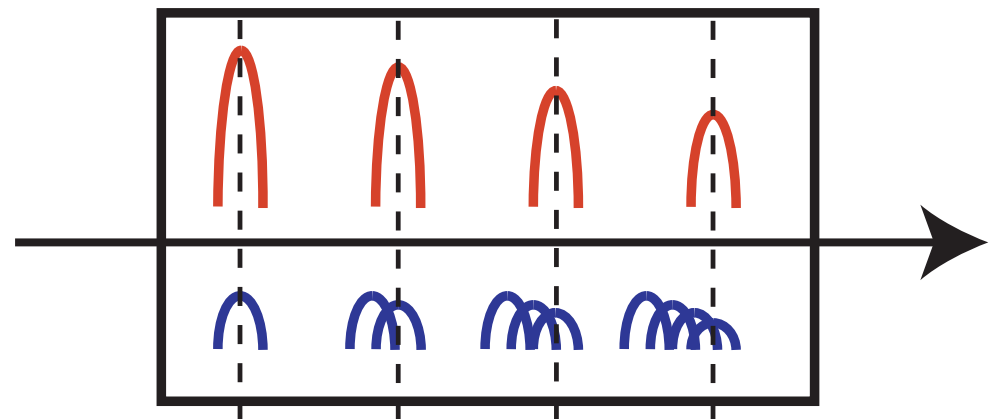


負のチャープが相殺



フーリエ限界付近の測定値と計算値のずれ

- ・基本波とSHG光の群速度不整合 (GVM)



# まとめ

- 10 fs-Ti:Sレーザーを光源に用いて, SHG顕微鏡の高感度化を目指した
- 兎筋肉のミオシン・コラーゲンイメージングにおいて, SHGイメージのコントラストが向上した
- パルス幅の最適化のため, チャープミラー後のパルス幅をSHG強度自己相関法により測定した

# 今後の予定

- 分散を外部的に補償し, パルス幅を最適化することでSHG顕微鏡のさらなる高感度化を目指す