

Coherent anti-Stokes Raman microscopy using spectral focusing with glass dispersion

1. 概要

CARS 顕微鏡で、群速度分散で知られたガラス素子を用いることで強度の大きな低下をすることなくフェムト秒パルスチャーブすることでピコ秒パルスにし、高スペクトル解像度の実施を実現する。ポンプ光とストークス光のチャーブはチャーブされたパルス幅のフーリエ限界によって決められて得られるスペクトル解像度に合わせる。今回は、ラマンのコヒーレンス時間や時間順序による様々な条件に付いて考えた。

2. CARS の原理

CARS 顕微鏡は

- ・ 生体細胞の非侵襲、非染色のイメージング技術
- ・ 3次元能
- ・ 化学特定性

のなどの特徴を持つ非線形光学顕微鏡である。

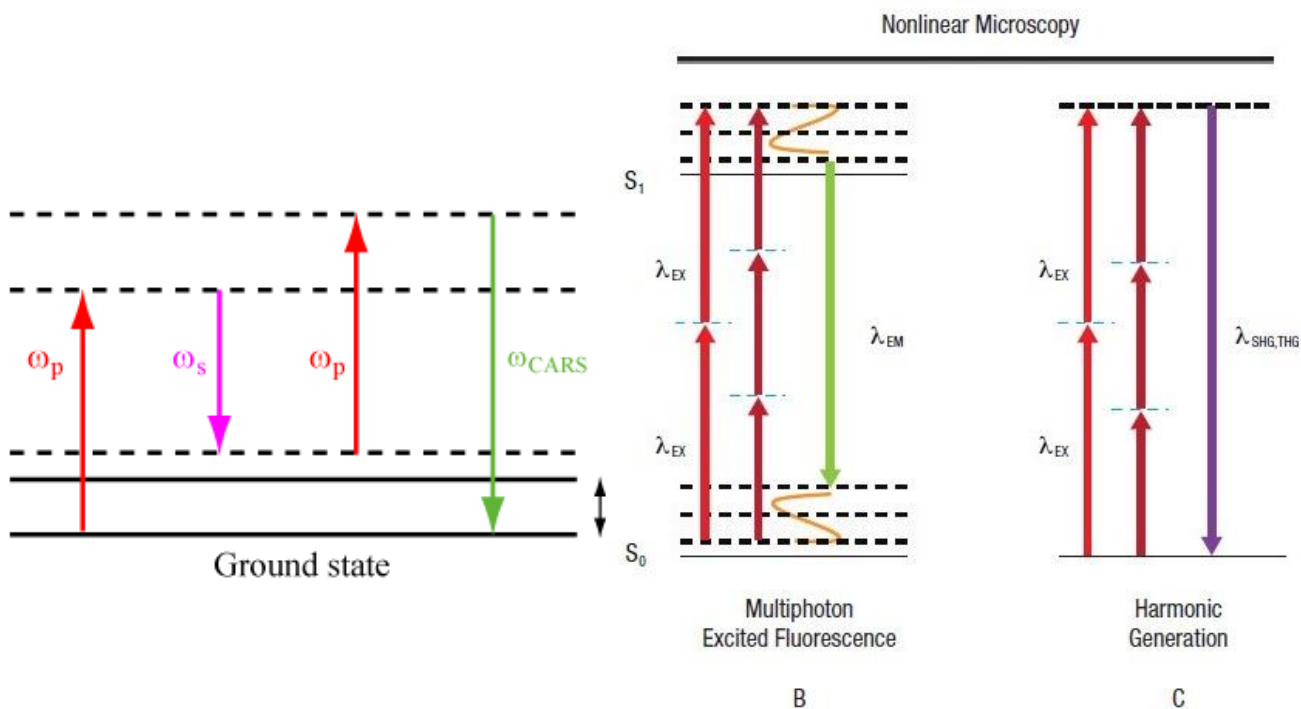
強い光（フェムト秒パルスなど）を試料に照射すると非線形作用が引き起こされる。

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

χ : 非線形感受率

非線形光学顕微鏡にはほかにも SHG 顕微鏡や、2光子励起顕微鏡(TPF)などがある。

振動の励起はポンプ光 E_p ストークス光 E_s の各電場の干渉項 $E_p E_s$ によって決まる。



ラマン共振が起きる状態では、ピコ秒範囲でコヒーレンス時間をもつので、コヒーレントな励起はピコ秒パルスを用いたスペクトル選択制の状態が最適になる。

しかし、そのようなチューナブルピコ秒レーザーは、二光子蛍光 (TPF) または第二高調波発生 (SHG) のよく知られた同じようなイメージング手段より非効率である。

また、スペクトル分解能は、このように個々の励起パルスのスペクトルではなく、それらの時間的な干渉のスペクトルによって決定される。なので、フェムト秒パルスを使用して、パルスエネルギーを失うことなく、それらのスペクトル位相を制御することで、高スペクトル分解能を得ることが可能です。励起によるスペクトル選択性を達成することは、共焦点蛍光、TPF、または SHG 顕微鏡検査のために使用されるものと同様の高速で効率的な単一チャンネル検出器によって CARS の検出を可能にします。フェムト秒パルスを用いた広帯域の励起およびスペクトル分解検出のための手法とは対照的である。

3. 原理

スペクトル焦点 Spectral focusing

今回の論文では Hellerer による「スペクトル焦点 (spectral focusing)」という方法を用いることによって高解像度の達成している。この方式では、ポンプおよびストークスパルスの両方の同じ線形時間的チャープはパルス間に一定の瞬時周波数差 (IFD) を作成します。IFD を中心として EPES* の得られるスペクトル幅は、フーリエ限界によってパルスの時間包絡線が与えられます。そしてこれは多くのピコ秒に線形チャープの適用によって伸長することができる。

この方法は、さらに、単にレーザー光源を調整することなく、CARS 分光法を実行することができ、それらの相対的な時間遅延を調整することにより、パルスのスペクトル幅内同調 IFD を可能にします。

また、フォーカススペクトルのために必要な一定の IFD は空間光変調器または回折格子を用いた IFD を得るシステムと比較して、パルス整形器の設計を簡素化し、高屈折率ガラス要素のばらつきを用いて得られることを実証しています。

チャープを行う前の中心周波数 ω_0 のガウス型パルスの電場とパルス幅は半値全幅 (FWHM) を用いてそれぞれ

$$E \propto \exp\left(-\frac{t^2}{\tau_{G0}^2} + i\omega_0 t\right)$$
$$\tau = \tau_{G0} \sqrt{2 \ln 2}$$

である。

また長さ z の分散物質を通して得られる瞬時周波数 $\omega(t)$ と幅 $\tau(z)$ は

$$\omega(t) = \omega_0 + 2\beta t$$

$$\tau(z) = \tau_0 \sqrt{1 + \left(\frac{4 \ln 2 |k''| z}{\tau_0^2} \right)^2}$$

ここで k'' は物質の群速度分散のパラメーターであり、 β は線形チャープパラメーターである。これらはそれぞれ

$$k'' = \frac{\lambda^3}{2\pi c} \frac{d^2 n}{d\lambda^2}$$

$$\beta(z) = 8(\ln 2)^2 |k''| z \tau_0^{-2} \tau^2$$

c : 光速

n : 波長 λ における物質の屈折率

屈折率は Sellmeier equation によって

$$n^2(\lambda) = 1 + \sum_{m=1}^3 A_m \lambda^2 / (\lambda^2 - B_m)$$

で表わされる。今回用いる SF57 では A,B はそれぞれ

$$(A_1, A_2, A_3) = (1.8165, 0.4289, 1.072) \quad (B_1, B_2, B_3) = (0.01437, 0.05928, 121.42) [\mu\text{m}]$$

$\beta(z)$ と $\tau(z)$ は以下のグラフのようになった。

図 1 は光学系と $\beta(z)$ と $\tau(z)$

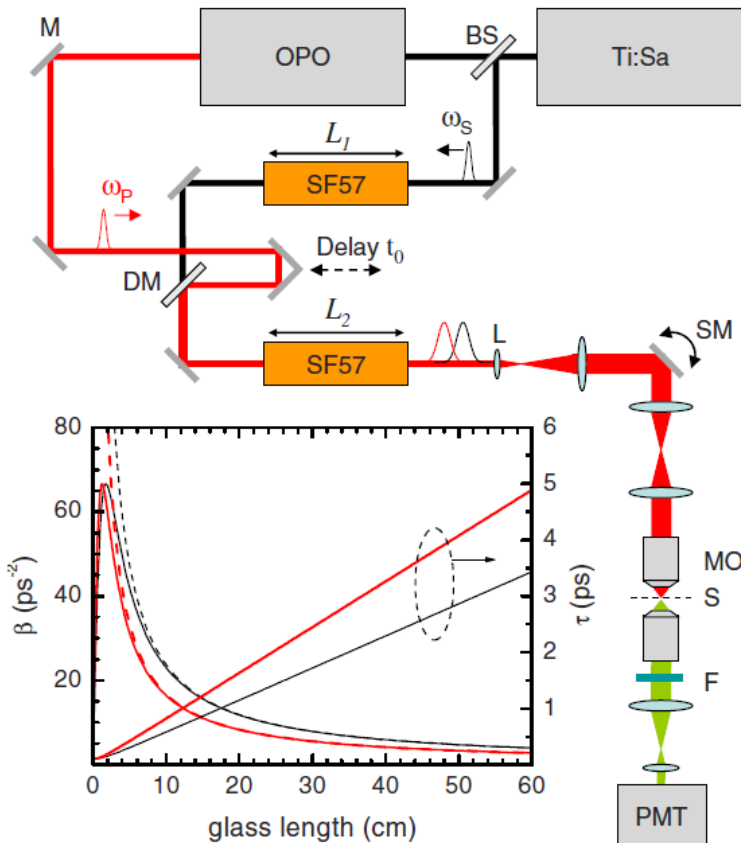


FIG. 1. (Color online) Sketch of the experimental setup. BS: beam splitter; M: mirror; SF57: glass blocks; DM: dichroic mirror; L: lens; SM: scanning mirror; MO: objective; S: sample; F: filter; PMT: photomultiplier tube. Graph: calculated $\beta(z)$ parameter and $\tau(z)$ for the pump (bold) and Stokes (thin) beams. Dashed traces are approximations for $\beta(z)$ (see text).

ポンプ光とストークス光の中心のパルス幅は $\tau_0 = 102[\text{fs}]$ (スペクトル幅 144cm^{-1} の FWHM)であった。ここで、 $z \gg \tau_0^2/|k|$ で、 $\tau \gg \tau_0$ ならば初期パルス幅 τ_0 にかかわらずチャープパラメーターは $\beta^{-1} \approx 2z|k|$ と近似できる。この場合、同じ量の線形チャープを与えること($\beta_s = \beta_p$)はストークス光とポンプ光のガラス素子の長さの比を一定比率で用いることによって達成でき、

$$L_s/L_p = k_p/k_s \approx 1.42$$

$$k_p = k(662.5\text{nm}), k_s = k(832.5\text{nm})$$

今回の装置の場合は

$$L_s = L1 + L2 + L_{MO}$$

$$L_s = L_{OP0} + L2 + L_{MO}$$

$$L_{OP0} \approx 2[\text{cm}], L_{MO} \approx 5[\text{cm}]$$

高次分散素子によって導入された非線形チャープは、パルスのパラメーターではパルス幅の中での 0.1cm^{-1} を下回る IFD の変化量で、典型的なラマン線幅と比べて無視できる値という結果になった。さらに、パルス整形器は、一般的に 50%未満の透過率を有しながら、今回使用するガラス素子の最大長さのために 70%以上の伝送を可能にする、 0.8m^{-1} 未満の SF57 の吸光係数を測定しました。

スペクトル焦点を使うのは、効率、再現性共に効果的ある。

チャープされたことによって起きた励起のスペクトル選択性は振動を引き起こしている強度変調によってきまり

$$E_p E_s^* \propto \exp\left[-\frac{t_0^2}{2\tau_G^2} - \frac{2(t+t_0)^2}{\tau_G^2} + i(\omega_p - \omega_s + 2\beta t_0)t\right]$$

それは、パワースペクトル

$$\exp\left[-\frac{(\omega - \omega_D)^2 \tau_G^2}{4} - \frac{t_0^2}{2\tau_G^2}\right]$$

を持ちそれは IFD(瞬時周波数差) $\omega_D(t_0)$ を中心に幅 σ_D で置かれ ω_D 、 σ_D は

$$\omega_D(t_0) = \omega_p - \omega_s + 2\beta t_0$$

$$\sigma_D = 4\sqrt{\ln 2}/\tau_G$$

(数値系 : $\sigma_D = 20.8[\text{cm}^{-1}]$ ($\tau = 1[\text{ps}]$), $\tau = \tau_G \sqrt{2 \ln 2}$)

よってこれらの式で高解像度の達成が示された。

このパワースペクトルの中心は ω_D でありこれはタイムディレイ t_0 を変化させることで変調できる。

しかし、スペクトルチューニングと同時にポンプ光による振動の読出しにも t_0 は影響してしまう。 ω_r におけるラマン共振は有限なコヒーレント時間 T2 に応答します。なので、時間順序は CARS の最大信号の読出しのあとに、先ほどのポンプ光による読出しが起きる

4. 実験

試料：ポリスチレンビーズ

ラマン共振周波数 $\omega_r = 3054[\text{cm}^{-1}]$

直径 $d=3[\mu\text{m}]$

これらを 2% のアグロース、98% の水からできたゲルに浸漬する。

芳香族 C-H のラマン共振を見る。

5. 実験結果

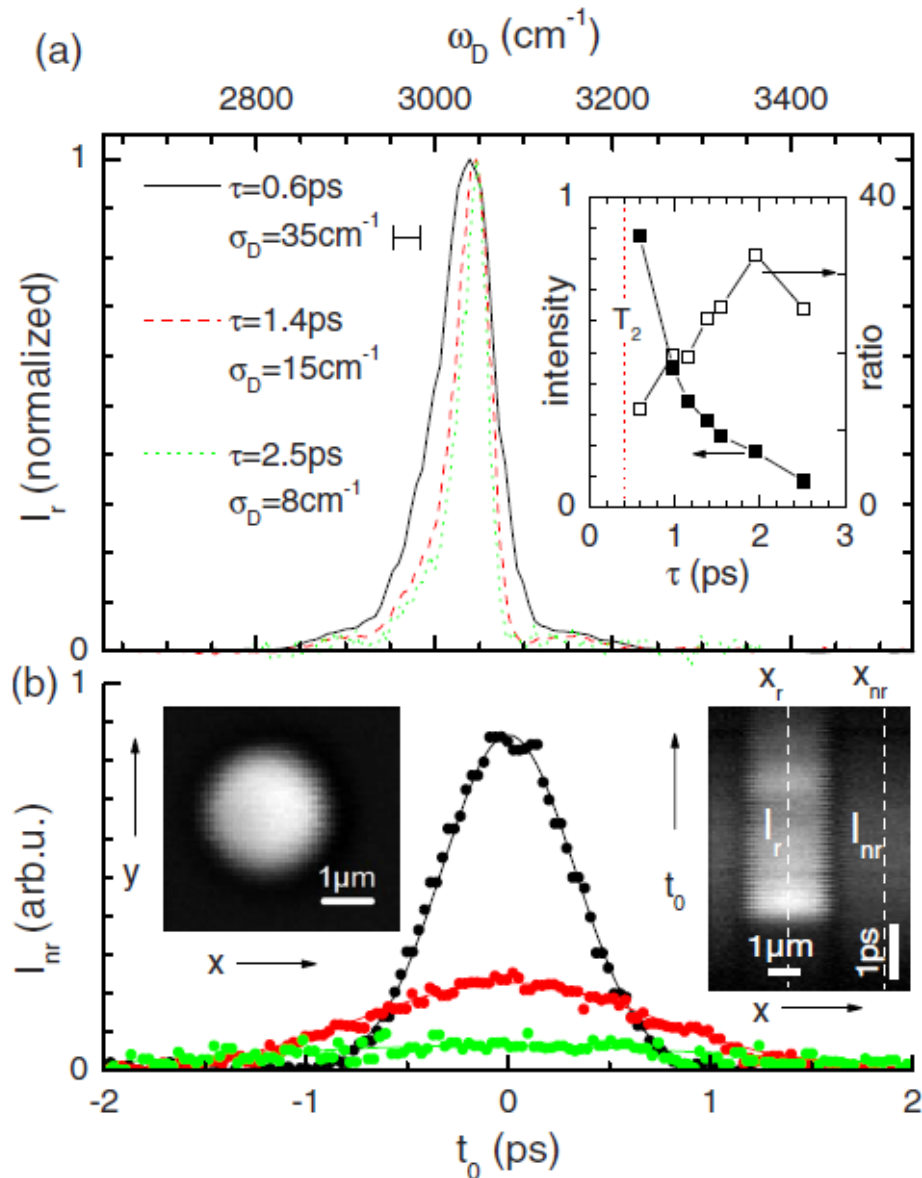


FIG. 2. (Color online) CARS spectra for $\omega_p - \omega_S = 3082\ \text{cm}^{-1}$ as a function of t_0 or $\omega_D(t_0)$ for different chirped pulse durations τ corresponding to different spectral resolutions as indicated. (a) Resonant CARS from a polystyrene bead (normalized to its maximum). (b) Nonresonant CARS in 2% agarose gel. Inset in (a): Resonant CARS peak intensity, (left) absolute and (right) relative to the nonresonant CARS intensity vs τ . Insets in (b): (left) resonant CARS image of a $3\ \mu\text{m}$ polystyrene bead and (right) line scan vs delay t_0 , from which CARS spectra inside and outside the bead are measured (dashed lines).

FIG2 の(b)の左の画像

ビーズを中央におき CARS イメージを取得したものである。

この画像からこの方法での横方向の分解能は $\sim 0.3[\mu\text{m}]$ であると推測される。

FIG2 の(b)の右の画像

ビーズをおいた状態でディレイタイム t_0 ごとにラインスキャンし、CARS スペクトルを得たものである。非共鳴 CARS(I_{nr}, x_{nr})とポリスチレンから共振 CARS(I_r, x_r)の両方のゲルから一つを走査できたことを示している。

FIG2 の図

これはチャープにより異なるパルス幅にされた CARS スペクトルを見たものである。

選択する範囲スペクトル幅を絞るによって共振 CARS の強度を落とさずに非共振 CARS を拾う事を抑えている。

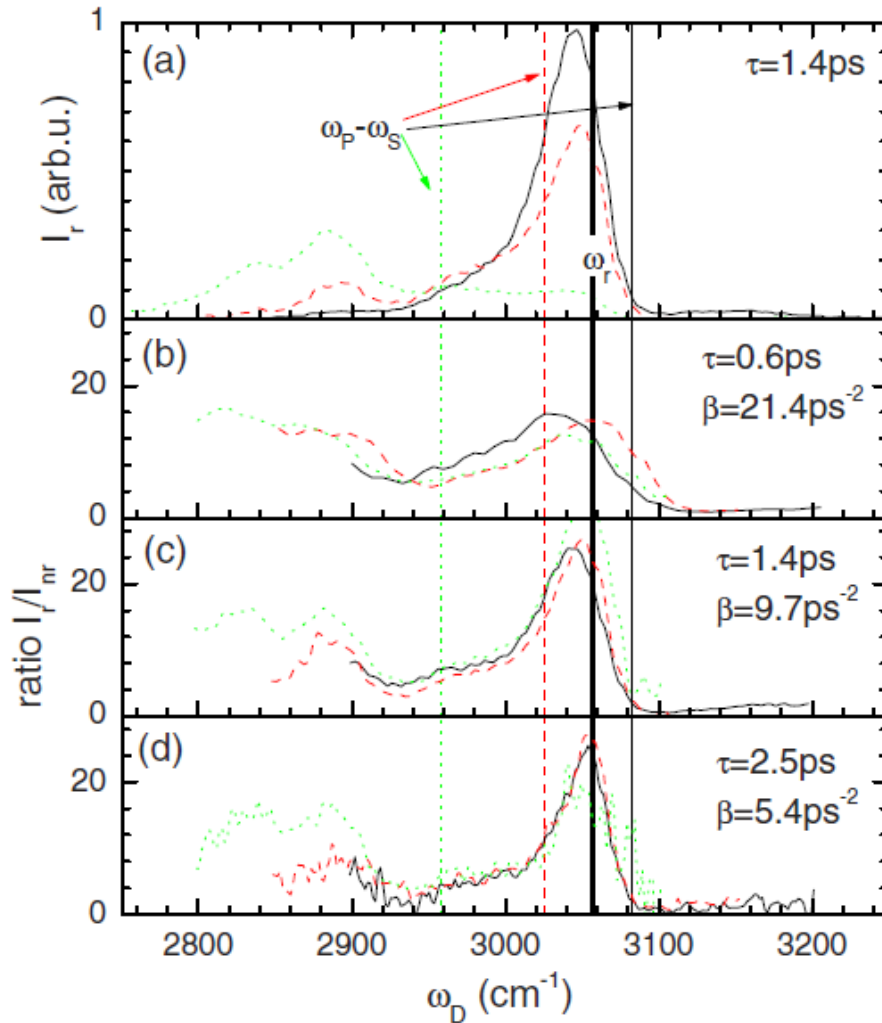


FIG. 3. (Color online) CARS in polystyrene vs $\omega_D(t_0)$ for different $\omega_P - \omega_S$ as indicated by the vertical lines. (a) I_r for $\tau=1.4$ ps. [(b)–(d)] ratio I_r/I_{nr} for τ as labeled.

FIG3 (a)

芳香族 C-H は脂肪族の振動帯域 $2851 - 2901[\text{cm}^{-1}]$ を持っている。なので、加えてその範囲が観察可能にした。

FIG3 (b) (c) (d)

ここではスペクトル範囲を FIG 2 と同じく変化させ共鳴ラマンと非共振ラマンの強度の比をとった。これにより、計測するスペクトルの範囲を絞っているので(d)では高い比率が得られている。

$\tau = 0.6[\text{ps}]$ ではスペクトルがシフトしていることが観察された。これは励起共鳴と時間順序の間の相互作用に起因している。しかし、この時間順序はスペクトル応答関数では無視できるが、強いチャープパルスのみには影響する。

6. 結論

ガラスの二次分散を使用して、スペクトル的に非感受性で高効率、楽な位置合わせ、および費用対効果の高い方法で高スペクトル分解能を有する単一周波数全帯域 100 フェムト秒パルスで出来ることを実証した。さらに、時間的なパルスの重なりを最適化するために、ポンプおよびストークスの差周波数を制御することによって、CARS の発生の時間順序の影響が原因していたが、共鳴 CARS 信号を増加させることができることを示した。

重要なことは、提案された高速かつ広帯域波長可変性の周波数選択の CARS システムチャープニング方法は、SHG や TPF などのフェムト秒の単一のサブ 10-FS ソースを用いる技術と互換性があり、その結果、サブ 10-FS ソースを用いる技術での使用に適している。