

平成22年5月10日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20760036
 研究課題名 (和文) 数サイクル光パルスによる非線形顕微分光イメージング
 研究課題名 (英文) Nonlinear microspectroscopic imaging by use of few-cycle optical pulses
 研究代表者
 小関 泰之 (OZEKI YASUYUKI)
 大阪大学・工学研究科・助教
 研究者番号：60437374

研究成果の概要 (和文)：

サブ 8 fs の時間幅を有する超短光パルスを用いた光学顕微鏡を開発した。チャープミラーと空間光変調器を用いて群速度分散補償を行い、誘導パラメトリック発光(SPE)顕微鏡の感度を 28 dB 以上高めることに成功した。更に、この顕微鏡を用いて様々な生体観察を行い、赤血球や花卉組織などにおいて、強い SPE 信号が得られることを見出した。また、誘導ラマン散乱(SRS)顕微法のアイデアに至り、その原理確認を行うとともに、ロックイン周波数の高周波化による高感度化に成功した。以上を通じて、超短光パルスの応用による強力な生体可視化手法を開発できたと考えている。

研究成果の概要 (英文)：

We have developed nonlinear optical microscopy by use of ultra-short laser pulses with a duration of <8 fs. Specifically, we succeeded in the group-velocity dispersion compensation with chirp-mirrors and a spatial light modulator to enhance the sensitivity of stimulated parametric emission (SPE) microscopy by 28 dB. We observed various samples with this system, and found that red blood cells and petal cells exhibit strong SPE contrast. Furthermore, we came up to the idea of stimulated Raman scattering (SRS) microscopy, confirmed its principle, and improved its sensitivity. These results suggest successful development of powerful biological imaging tools by use of ultra-short laser pulses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：応用光学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎、応用光学・量子光工学

キーワード：光計測、超短光パルス、非線形光学、光学顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

バイオ工学分野において、細胞内のシグナ

ル伝達メカニズムを解明する研究が盛んに進められている。そこでは、生細胞内部の小器官やタンパク質・核酸等の生体分子を低侵襲な条件下で長時間追跡観察する手法が不可欠である。現在、細胞内部の観察手法の主流は蛍光顕微鏡であるが、染色によるアーティファクトや蛍光褪色の問題がある。そこで、蛍光染色の不要な非線形光学顕微鏡が注目されている。これまでに、第2高調波、第3高調波、コヒーレント反ストークスラマン散乱(CARS)など、様々な非線形光学効果を用いた方式が実証されてきた。いずれの方式においても無染色細胞の3次元イメージングが可能である。また、研究代表者らは、非線形光学顕微鏡の一方式として、電子由来の4光波混合過程を利用した誘導パラメトリック発光(stimulated parametric emission: SPE)顕微鏡を提案している。SPE顕微鏡の特長の一つに、励起光パルスの時間幅が短いほど信号強度が増大し、高感度化する点が挙げられる。一方、レーザー技術の進展に伴い、現在では、サブ10 fs領域のパルスレーザーが入手可能である。このような極短光パルスは、光学素子の分散が招く波長ごとの時間ずれによって、パルス時間幅広がりが生じやすく、その扱いが困難である。しかしながら、上記のようなSPE顕微鏡の特長を鑑みると、SPE顕微鏡に極短光パルスを適用できれば、極めて魅力的である。

2. 研究の目的

本課題では、非線形顕微分光イメージングにおいて、数サイクル領域への極短パルス化と超広帯域光パルス制御を導入し、感度及び分子認識能力を向上させ、無染色小器官の長時間追跡観察を狙うことを当初の目的とした。また、研究を進めるうちに、誘導ラマン散乱(stimulated Raman scattering, SRS)を用いた新しい非線形光学顕微鏡のアイデアに至り、その原理確認を進めた。

3. 研究の方法

3.1 顕微鏡下における極短光パルス発生

顕微鏡下において極短光パルスを発生させるためには、対物レンズが有する群速度分散を補償する必要がある。そこで、2次分散をチャープミラーで補償し、チャープミラーで補償しきれなかった残存分散は空間光変調器(spatial light modulator: SLM)を含む4f光学系で補償した。時間幅8 fsの超短光パルスを群速度分散補償系に導入し、出力光を対物レンズでカバーガラスに集光し、SPE信号を発生させる。透過光をもう一つの対物レンズでコリメートした後、光フィルターによって励起光を除去した後に、光電子増倍管によってSPE信号を得た。SPE信号強度をモニターしながらSLM上の各ピクセルの位相を順次

変化させ、SPE信号強度が最大になるようにフィードバック制御をすることによって、分散補償を行った。

3.2 超短光パルスを用いたSPE顕微鏡による生体観察

上記の群速度分散系を導入したSPE顕微鏡を用いて、様々な生体試料の観察を進めた。試料として、赤血球や花卉組織など、可視・紫外に強い吸収を有するものを選んだ。

3.3 SRS顕微鏡の原理確認

SRSは2色の光パルスと分子振動の相互作用によって、光のエネルギーが移動する現象である。SRSを顕微鏡に応用することで、高コントラストかつ高感度な非線形顕微イメージングが可能になることを実証するために、SRS顕微鏡の開発を進めた。具体的には、2色の光パルスの一方に対して音響光学変調器を用いて強度変調を施した後合波して試料に集光し、試料透過光をロックイン検出した。特に、SRSの感度を高めるために、ロックイン周波数の高周波化を行った。

4. 研究成果

4.1 顕微鏡下における超短光パルス発生

Second harmonic generation (SHG)強度自己相関法を用いてパルス幅を測定した結果、集光点で7.6 fsのパルスの発生に成功した。一方、補償前の光パルスの時間幅は100 fs以上であった。分散補償前後で約28 dBの飛躍的な信号強度増大を達成し、SPE顕微鏡におけるサブ10 fsパルスの有効性を確認できた。

4.2 超短光パルスを用いたSPE顕微鏡による生体観察

SPE顕微鏡により鶏の赤血球を観察したところ、赤血球内部において強いSPE信号が観察された。これはヘモグロビンが有する400 nm帯の吸収を反映したものと考えられる。従来のヘモグロビン可視化手法として、エタノール固定後、紫外線照射によって発生する蛍光を検出する方式が知られているが、SPE顕微鏡を用いることで、このような固定操作を行うことなく、ヘモグロビンを可視化できる。また、SPE顕微鏡を用いてエタノール固定前後の赤血球を観察したところ、赤血球の様態が大きく変化してしまうこともわかった。このような様態変化を生じさせない上でも、SPE顕微鏡による無染色観察は有効であるといえる。

また、花卉組織の観察したところ、細胞質のみが強く光ることがわかった。コントラスト源を探るため、花卉から色素を抽出し、紫外・可視吸収スペクトルを測定した。その結果、400 nm付近から短波長側に強い紫外吸収があることがわかり、これがSPE像のコント

ラストを生んだと考えられる。

4.3 SRS 顕微鏡の原理確認

ロックイン周波数を 100 kHz としてポリマーからの SRS 信号検出に成功した。その後、ロックイン周波数を 2 MHz まで高め、培養細胞のイメージングに成功した。この結果を 2008 年 11 月に国内学会で発表するとともに、2008 年 12 月上旬に米国の学会へ投稿した。しかし、2008 年 12 月中旬に同方式がハーバード大学から Science 誌に報告された。我々はロックイン周波数を 10 MHz に高めた結果と、SRS 顕微法の高感度性の理論検討を併せて 2009 年 1 月に Optics Express 誌に投稿し、2009 年 2 月に掲載された。その後、シュツットガルト大学のグループも 2009 年 3 月に SRS 顕微法を New J. Phys. 誌に発表した。その後、2009 年 6 月には上記 3 論文が Nature 誌の News Feature に紹介された。その後、ロックイン周波数を上限である 38 MHz まで高めるため、高調波同期型 SRS 顕微鏡の開発を進めた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- [1] Y. Ozeki and K. Itoh, "Stimulated Raman scattering microscopy for live cell imaging with high contrast and high sensitivity," Laser Phys., vol. 20, no. 5, pp. 1114-1118, 2010. (査読有)
- [2] Y. Ozeki, T. Kawasumi and K. Itoh, "Depth-resolved observation of photoelastic effect by four-wave mixing microscopy," Opt. Rev., vol. 16, no. 2, pp. 167-169, 2009. (査読有)
- [3] Y. Ozeki, F. Dake, S. Kajiyama, K. Fukui, and K. Itoh, "Analysis and experimental assessment of the sensitivity of stimulated Raman scattering microscopy," Opt. Express, vol. 17, pp. 3651-3658, 2009. (査読有)
- [4] M. Yamagiwa, G. Omura, Y. Ozeki, M. Ishii, H. M. Dang, S. Kajiyama, T. Suzuki, K. Fukui, and K. Itoh, "Dual-band stimulated parametric emission microscopy," Jpn. J. Appl. Phys., vol. 49, p. 016603, 2010. (査読有)
- [5] H. M. Dang, T. Kawasumi, G. Omura, T. Umamo, S. Kajiyama, Y. Ozeki, K. Itoh, and K. Fukui, "Three-dimensional unstained live-cell imaging using stimulated parametric emission microscopy," Jpn. J. Appl. Phys., vol. 48, p. 097003, 2009. (査読有)
- [6] H. M. Dang, G. Omura, T. Umamo, M. Yamagiwa, S. Kajiyama, Y. Ozeki, K. Itoh, and K. Fukui, "Label-free imaging by stimulated parametric emission microscopy reveals a

difference in hemoglobin distribution between live and fixed erythrocytes," J. Biomed. Opt., vol. 14, p. 040506, 2009. (査読有)

[7] M. Yamagiwa, Y. Ozeki, G. Omura, T. Suzuki, S. Kajiyama, K. Fukui, and K. Itoh, "Nonlinear phase imaging using two-beam interferometry in stimulated parametric emission microscopy," Jpn. J. Appl. Phys., vol. 48, p. 062501, 2009. (査読有)

[8] K. Itoh, W. Watanabe and Y. Ozeki, "Nonlinear Ultrafast Focal-Point Optics for Microscopic Imaging, Manipulation, and Machining," Proc. IEEE, vol. 97, no. 6, pp. 1011-1030, 2009. (査読有)

[学会発表] (計 12 件)

[9] 小関泰之, 北川雄真, 住村和彦, 西澤典彦, 梅村航, 石井万紀子, 梶山慎一郎, 福井希一, 伊東一良「2 波長パルス光源の高精度な高調波同期による誘導ラマン散乱顕微鏡」第 57 回応用物理学関連連合講演会、19p-F-11、2010 年 3 月 19 日 (査読有)

[10] 山際将具、小関泰之、石井万紀子、尾村玄、梶山慎一郎、福井希一、伊東一良、「2 バンド誘導パラメトリック発光顕微鏡を用いた生きた花卉組織の無染色 3 次元観察」OPJ2009、25pB9、2009 年 11 月 25 日

[11] 北川雄真, 小関泰之, 住村和彦, 西澤典彦, 伊東一良、「高調波同期した 2 波長光源による誘導ラマン散乱顕微鏡」OPJ2009、25pB10、2009 年 11 月 25 日

[12] Y. Ozeki and K. Itoh, "Stimulated Raman scattering microscopy for live-cell imaging with high contrast and high sensitivity," 18th International Laser Physics Workshop (LPHYS'09), paper 5.6.3 (Barcelona, Spain), July 16th (2009)

[13] Y. Ozeki and K. Itoh, "Stimulated Raman scattering (SRS) microscopy: toward highly sensitive vibrational imaging in the terahertz regime," 2nd Topical Problems of Biophotonics 2009 (Nizhny Novgorod, Russia), 23rd July (2009)

[14] S. Kajiyama, Y. Ozeki, K. Fukui, and K. Itoh, "Biological applications of novel nonlinear optical microscopy," The 2009 Euro American Workshop on Information Optics Paris, France, July 20-24, (2009)

[15] Y. Ozeki, F. Dake, S. Kajiyama, K. Fukui and K. Itoh, "Background-free, 3-D vibrational imaging by stimulated Raman scattering microscopy," Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO2009), paper CFL2, Baltimore, USA, June 5th (2009)

[16] F. Dake, Y. Ozeki, S. Kajiyama, K. Fukui, and K. Itoh, "Experimental assessment of the sensitivity of stimulated Raman scattering

microscopy," the 4th Asian Pacific Symposium on Biophotonics (APBP2009), paper MIC-08, Jeju, Korea, May 29th (2009)

[17] 嶽文宏, 小関泰之, 梶山慎一郎, 福井希一, 伊東一良「誘導ラマン散乱顕微鏡の感度の実験検討」応用物理学会, 31a-ZW-9, 2009年3月31日

[18] 北川雄真, 嶽文宏, 馬野俊幸, 小関泰之, 梶山慎一郎, 福井希一, 伊東一良「多波長型誘導パラメトリック発光顕微鏡」応用物理学会, 31a-ZW-10, 2009年3月31日

[19] 嶽文宏, 小関泰之, 伊東一良「誘導ラマン散乱顕微法の原理確認」Optics & Photonics Japan 2008, 5pC12, 2008年11月5日. (ベストプレゼンテーション賞受賞)

[20] 山際将具, 小関泰之, 梶山慎一郎, 福井希一, 伊東一良「二光束干渉型誘導パラメトリック発光顕微法を用いた非線形位相イメージング」2008年秋季 第69回応用物理学会学術講演会, 2p-ZH-14, 中部大学, 2008年9月2日

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

[1] 名称: 光学顕微鏡

発明者: 小関泰之、伊東一良、嶽文宏、福井希一、梶山慎一郎

権利者: 大阪大学

種類: 特許

番号: 特願 2009-134364

出願年月日: 2009年6月3日

国内外の別: 国内

[2] 名称: 光学顕微鏡

発明者: 小関泰之、伊東一良、嶽文宏、福井希一、梶山慎一郎、北川雄真、西澤典彦、住村和彦

権利者: 大阪大学

種類: 特許 (国内優先権主張)

番号: 特願 2009-265514

出願年月日: 2009年11月20日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://sites.google.com/sites/ysozeki>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小関 泰之 (OZEKI YASUYUKI)

大阪大学・工学研究科・助教

研究者番号: 60437374