

(東大院理) ○加納英明, 小野木智加朗, 濱口宏夫

【序】我々は、フォトニック結晶ファイバー (photonic crystal fiber; PCF) からのスーパーコンティニューム (supercontinuum; SC) 光¹を用いて、超広帯域マルチプレックス・コヒーレント・アンチストークス・ラマン (coherent anti-Stokes Raman scattering; CARS) 顕微分光法の開発を行っている。これまで、SC 光の広帯域特性を活かすことで、 $\sim 3500 \text{ cm}^{-1}$ の波数帯域でマルチプレックス CARS スペクトルを測定できるシステムの開発に成功した²。これは、指紋領域から N-H, C-H, O-H 伸縮領域まで、基本音の領域をすべてカバーすることのできる波数帯域に相当する。本発表では、本顕微分光装置をさらに改造し、水浸対物などの利用で培養液中の生細胞を *in vivo*, *in situ* の状態で測定することに成功したので、その結果について報告する。

【実験】本研究では、我々が開発した超広帯域マルチプレックス CARS 顕微分光装置を改良して用いた³。図 1 に実験装置を示す。光源には Ti:sapphire 発振器 (Coherent 社; Vitesse) を用い、出力の一部を PCF (Crystal Fibre 社; NL-PM-750) に導入して SC 光を発生させた。発振器からの基本波を狭帯域化してポンプ光とし(波数幅約 20 cm^{-1}), SC 光の近赤外成分を広帯域ストークス光として、対物レンズを通して同軸に試料に入射した。試料には HeLa 細胞を用いた。ガラスボトムカルチャーディッシュにて培養した HeLa 生細胞を、そのまま測定に用いた。水浸対物レンズを試料上部に配置することで CARS 光を集め、分光器 (Acton 社; Spectra-Pro 300i) 及び CCD カメラ (Roper Scientific 社; PIXIS 100B) で測定した。試料はピエゾステージ上に載せられており、

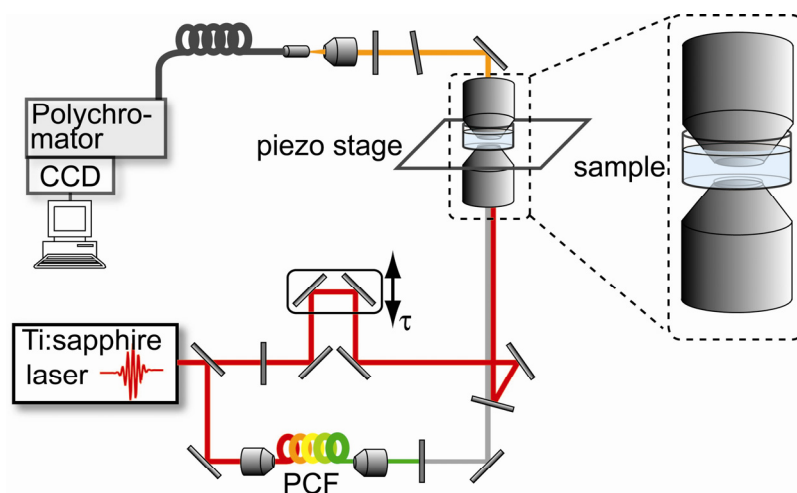


図 1 超広帯域マルチプレックス CARS 顕微分光装置; PCF: photonic crystal fiber. 試料の HeLa 細胞はガラスボトムカルチャーディッシュで培養し、培養中の HeLa 生細胞をそのまま測定に用いた

走査することで CARS スペクトル及びイメージを取得することができる。

【結果・考察】 本装置により HeLa 生細胞を測定した結果を図 2 に示す。露光時間は各点 50 ms である。図 2 (a) のマルチプレックス CARS スペクトルは、図 2 (b) の CARS イメージで印 (×) をつけた位置のものである。2850 cm^{-1} において、非常に強い C-H 伸縮振動由来の CARS 信号が得られていることがわかる。この CARS 信号は、非共鳴バックグラウンドと呼ばれる、振動モードに共鳴しない信号との干渉のため、分散形のスペクトルを与えている (図中点線)。この他、1400 cm^{-1} 付近にも、C-H 変角振動に由来すると考えられる CARS 信号が、微弱ながら分散形のスペクトル形で観測されている。図 2 (b), (c) には、C-H 伸縮振動に共鳴した CARS イメージを示す。これらの CARS イメージは、マルチプレックス CARS スペクトルから C-H 伸縮振動に共鳴した信号のみを抽出して得られたものである⁴。図 2 (b) では、核膜や核小体など、細胞内の各種オルガネラが可視化されている。一方、図 2 (c) では、核膜、核小体に加えて、細胞内にスポット上の輝点がいくつか見られる。これらの輝点は、緑色蛍光タンパク質でラベルしたミトコンドリアの蛍光像と一致しないことから、細胞中の脂肪滴であると考えられる⁵。

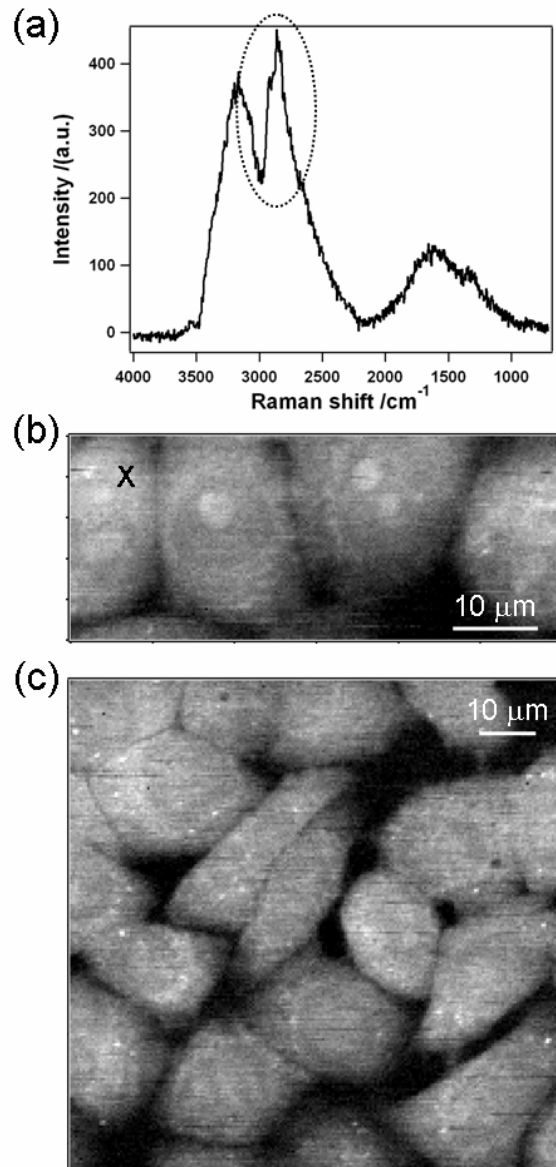


図 2(a) HeLa 生細胞のマルチプレックス CARS スペクトル及び C-H 伸縮振動による CARS イメージ (b) 及び (c)。 (a) は、 (b) で印 (×) をつけた位置におけるマルチプレックス CARS スペクトルである。

[1] J. K. Ranka, R. S. Windeler and A. J. Stentz: *Opt. Lett.* **25**, 25 (2000).

[2] H. Kano and H. Hamaguchi, submitted.

[3] H. Kano and H. Hamaguchi, *Appl. Phys. Lett.* **86**, 121113 (2005).

[4] H. Kano and H. Hamaguchi, *Opt. Express* **13**, 1322 (2005), *Opt. Express* **14**, 2798 (2006).

[5] S. Hayashi, S. Takimoto, and T. Hashimoto, *Proc. of SPIE*, 6442, 644208 (2007).