

【序】生細胞を分子レベルで可視化する手法として、コヒーレント・アンチストークス・ラマン(CARS)顕微鏡は昨今広く注目を集めている手法である。前処理の必要なく、非侵襲に生細胞を *in vivo* 測定できるという特徴のために、CARS 顕微鏡は非常に強力な手法として開発され、発展している。しかし、指紋領域の CARS 信号は、非共鳴バックグラウンドと呼ばれる、CARS 過程に付随する光学過程由来の信号に埋没してしまい、明瞭なスペクトルがほとんど得られていないのが現状である。通常の CARS 顕微鏡では 2 つの単色光により振動共鳴を実現するが、それでは振動共鳴と非共鳴由来の信号を区別不可能である。また、この手法では、単一の振動コヒーレンスしか誘起することができず、単一のイメージのみを得ることとなり、ラマンスペクトルが含む豊富な振動情報を活用することができない。一方、複数の振動コヒーレンスを同時に誘起するマルチプレックス CARS 分光と呼ばれる手法を用いると、スペクトルを得、振動共鳴の信号と非共鳴バックグラウンドを確実に分離することができる。また、複数のバンドについて同時にイメージを得ることが可能である。しかし、マルチプレックス CARS 顕微分光法を用いても、指紋領域の明瞭なスペクトルを得るのは困難であった。そこで本研究では、スペクトル幅が狭いレーザー光を CARS 過程のポンプ光とし、さらにポンプおよびストークス光とともに $1 \mu\text{m}$ を超える近赤外光とすることで、非共鳴バックグラウンドの発生を抑えて振動コントラストを高め、さらに複数のバンドについて CARS イメージを得ることを試みた。

【実験装置】図 1 に本研究で製作した近赤外 CARS 顕微分光装置の模式図を示す。サブナノ秒マイクロチップレーザーを光源として用いた。基本波 (1064 nm) の一部をフォトニック結晶ファイバーへと導入することでスーパーコンティニューム光を発生し、フィルターで短波長成分を除去して CARS 過程のストークス光とした。図 2 にストークス光のスペクトルを示す。 $1.1 \sim 1.7 \mu\text{m}$ に広がる近赤外超広帯域光であり、ラマンシフトとして $300 \sim 3500 \text{ cm}^{-1}$ に対応する。残りの基本波を CARS 過程におけるポンプ光として用いた。光源としてサブナノ秒レーザーを用いているため、ポンプ光のスペクトル幅が 1 cm^{-1} 以下と狭く、高いスペクトル分解能を実現した。レーザーパワーはポンプ光が $\sim 100 \text{ mW}$ 、ストークス光が $\sim 30 \text{ mW}$ である。

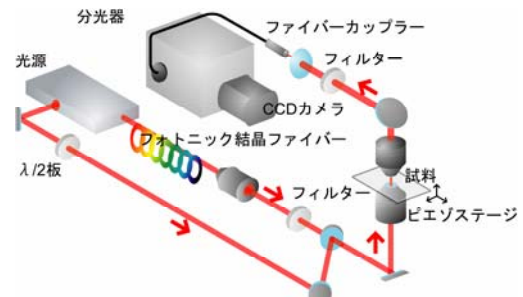


図 1 近赤外超広帯域マルチプレックス CARS 顕微分光装置の模式図。

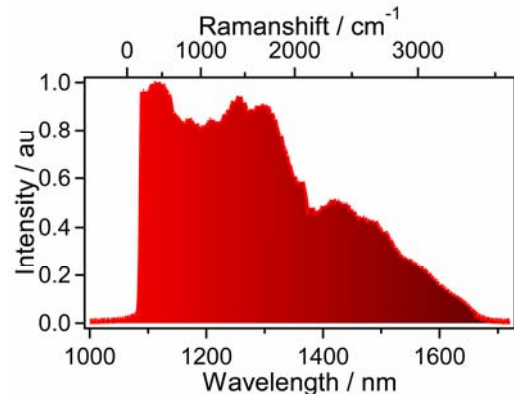


図 2 CARS 過程のストークス光のスペクトル。

【実験結果】図 3(a)および(b)に C-H 伸縮領域および指紋領域での毛髪のマルチプレックス CARS スペクトルを示す。C-H 伸縮領域において二つのバンドが分割されて観測された。これは、脂質のメチレン由来のものと、タンパク質のメチル由来のものであると考えられる。ポンプ光のスペクトル幅が非常に狭いことから、このように、C-H 伸縮領域の近接した二つのバンドを明瞭に分割して観測できたと考えられる。指紋領域では、おもにアミド I、C-H 変角振動およびアミド III のスペクトルが得られた。また、フェニルアラニンに由来すると思われる非常に鋭いピークが 1000 cm^{-1} 付近に観測された。このように、指紋領域において、明瞭な振動コントラストを持ったマルチプレックス CARS スペクトルを得ることに成功した。

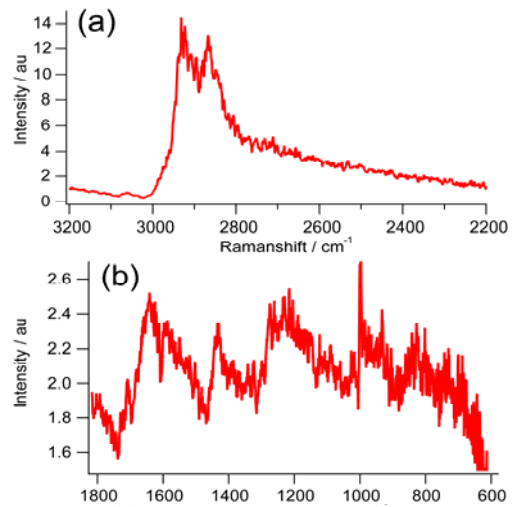


図 3 毛髪(a) C-H 伸縮振動領域、(b) 指紋領域におけるマルチプレックス CARS スペクトル。

図 4 に線虫 *C. elegans* のマルチプレックス CARS スペクトルおよび CARS イメージを示す。図 4(a) および(b)は各々 C-H 伸縮領域および指紋領域におけるスペクトルである。指紋領域における、 1650 cm^{-1} 付近のピークは C=C 伸縮振動に、 1450 cm^{-1} 付近のピークは C-H 変角振動に由来するバンドであると考えている。それぞれこれら 3 つのバンドについて、各点について取った CARS スペクトルを再構成することにより CARS イメージを得た。図 4(c)、(d)、(e)はそれぞれ C-H 伸縮、C=C 伸縮、C-H 変角振動における CARS イメージである。

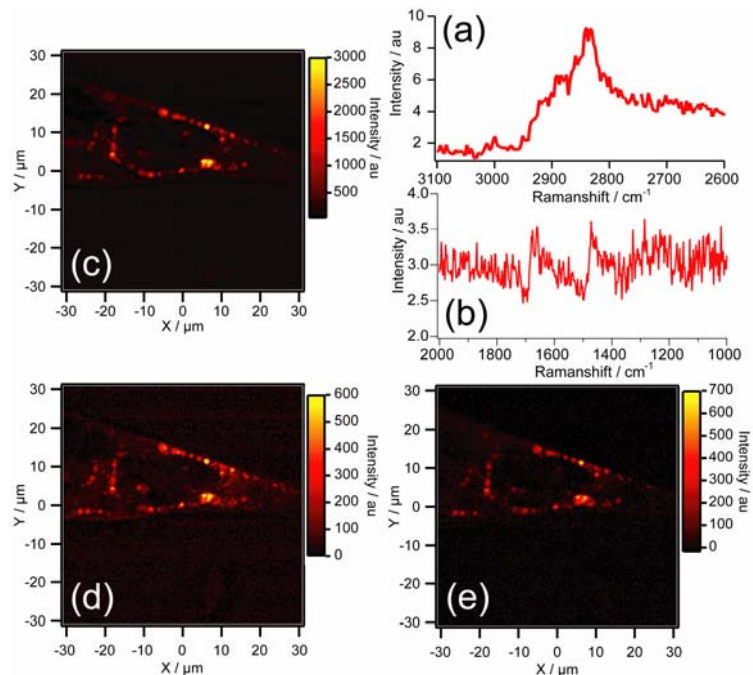


図 3 線虫 *C. elegans* の(a) C-H 伸縮領域、(b) 指紋領域の CARS スペクトルおよび (c) C-H 伸縮振動、(d) C=C 伸縮、(e) C-H 変角における CARS イメージ。

これらを比較すると非常に似通ったイメージとなっており、線虫の中の脂肪滴をイメージしたものであると考えられる。以上のように、生体試料について、C-H 伸縮振動領域のみならず、指紋領域でもスペクトルを得、さらにマルチカラーの CARS イメージを得ることに成功した。

参考文献

- [1] M. Okuno, H. Kano, P. Leproux, V. Couderc and H. Hamaguchi, *Opt. Lett.*, **32**, 3050 (2007).
- [2] M. Okuno, H. Kano, P. Leproux, V. Couderc and H. Hamaguchi, *Opt. Lett.*, **33**, 923 (2008).