

電子共鳴三次和周波発生分光法の開発と解釈
(東大院・理¹、ニコン・コアテック²、筑波大・数理³)

○瀬川尋貴¹、福武直樹²、加納英明³、小澤岳昌¹

Development and interpretation of
electronically resonant third-order sum frequency generation spectroscopy

(The Univ. of Tokyo¹, Nikon Corp.², Univ. of Tsukuba³)

○Hiroki Segawa¹, Naoki Fukutake², Hideaki Kano³, Takeaki Ozawa¹

【序】三次和周波発生(third-order sum frequency generation; TSFG)は第三高調波発生類似の三次の非線形光学過程であり、異なる二色以上の励起光を用いて生じる、三光子による和周波発生である。我々はこれまでに白色光を利用したマルチプレックス TSFG を生細胞などへと応用し、コヒーレント・反ストークス・ラマン散乱(coherent anti-Stokes Raman scattering; CARS)を始めとした他の非線形光学過程と同時に信号を取得するマルチモード分光イメージングを行ってきた[1]。本研究では、TSFGにおける電子共鳴効果の有無を検証すると共に、得られた電子共鳴マルチプレックス TSFG スペクトルを解釈し、分子の吸収スペクトルに対応する情報を直接引き出すことに成功したので、報告する[2]。

【実験】図 1 に、製作したマルチプレックス TSFG 分光装置の概略図を示した。光源には Q スイッチ発振 Nd:YAG レーザーを用いた。基本波 1064 nm の光を二分割した後、一方をフォトニック結晶ファイバ(photonic crystal fiber; PCF)へ導入し白色光へ変換した。二つの光を合波した後、正倒立顕微鏡へ導入した。試料はピエゾステージ上に

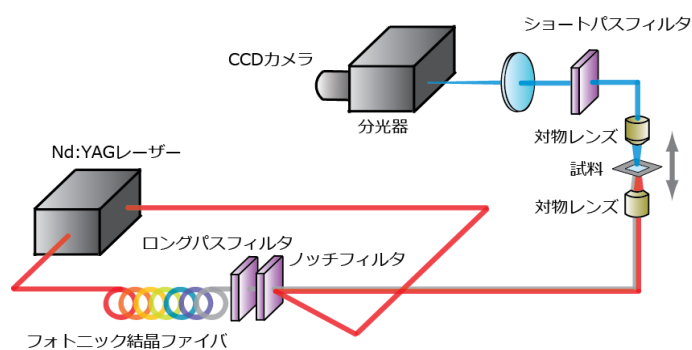


図 1 製作したマルチプレックス TSFG 分光装置の概略図

乗せている。生じた前方方向の TSFG を正立側対物レンズで集光した後、励起光を除去し分光器へ導入した。試料にはシトクロム *c* (cytochrome *c*; Cyt *c*)及び酸化型/還元型ヘモグロビン(hemoglobin; Hb)をリン酸緩衝液(phosphate buffered saline; PBS)に溶解したものをを用いた。対照実験として、可視域に吸収を持たないたんぱく質であるアルブミンの溶液も調製した。これらの溶液を、20 μm 径のビーズをスペーサーとして二枚のカバーガラスで挟んだものを試料とした。試料をピエゾステージで鉛直方向(カバーガラス面に対して垂直)にスキャンしスペクトルを取得した。

【結果と考察】TSFG は第三高調波と同様に、屈折率の界面において強い信号を生じる。鉛直方向へのスキャンの結果、ガラス/溶液界面、及びガラス/空気界面より信号が得られた。その様子を図 2(a)に示す。得られた生データを見比べる段階では、共鳴効果による明瞭なスペク

トル形の変化を検出することは困難であった(図 2b)。得られた TSFG スペクトルから白色光のパワー密度依存性、分光器及び CCD カメラの感度依存性を除去した後に、溶媒のみのスペクトルで溶液のスペクトルを割ると、Cyt c、酸化型 Hb、還元型 Hb の全ての溶液に対し、その吸収スペクトルに対応する波長領域に、アルブミンの溶液では見られない電子共鳴効果によるものと思われる強度増大を確認した(図 2c)。得られた TSFG スペクトルは吸収スペクトルに比べピーク位置が短波長シフトしているように見られたが、これは共鳴 TSFG スペクトルが逆分散型を示すことが原因であると推測された。そこで TSFG 信号の発生機構を光の伝播を考慮して理論的に解析したところ、溶液由来の共鳴項とガラス由来の非共鳴項の間では位相が π 反転していることが分かり、これが逆分散型の起源であることを確認した。位相差 π を与えてスペクトルをフィッティングすることで、吸収スペクトルに対応する共鳴項の情報を直接取得できることが分かった(図 2c)。これは、分子の電子状態を解析するための新たな手法であり、特に既に我々が報告してきたイメージングへの応用によって、生細胞や生体組織中の分子の電子状態を可視化分析する新たな手法となりうると期待される。

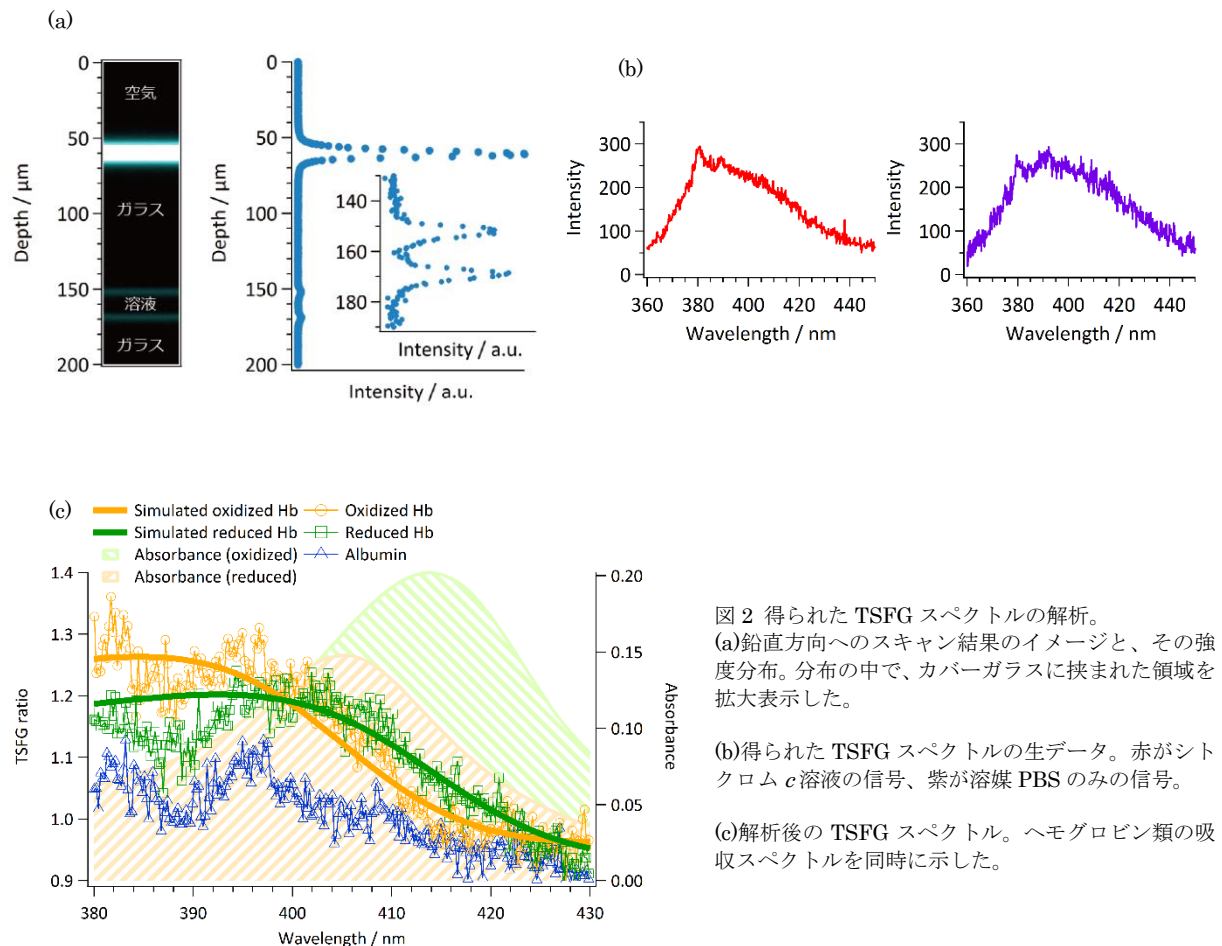


図 2 得られた TSFG スペクトルの解析。
(a)鉛直方向へのスキャン結果のイメージと、その強度分布。分布の中で、カバーガラスに挟まれた領域を拡大表示した。

(b)得られた TSFG スペクトルの生データ。赤がシトクロム *c* 溶液の信号、紫が溶媒 PBS のみの信号。

(c)解析後の TSFG スペクトル。ヘモグロビン類の吸収スペクトルを同時に示した。

[1]H. Segawa et. al., *Opt. Express* **20**, 9551-9557 (2012).

[2]H. Segawa et. al., *Opt. Express* **22**, 10416-10429 (2014).