

【序】フォトニック結晶ファイバー (Photonic crystal fiber, PCF) とモード同期チタンサファイアレーザー発振器との組み合わせによるコヒーレント白色光の発生が報告されて以来¹, この光源は時間分解分光, 光コヒーレンス・トモグラフィー, 周波数標準の研究など広範な分野に応用されている. 我々は, この光源の有用性に早い段階から着目し, これまでコヒーレント逆ラマン分光法², フェムト秒コヒーレント・アンチストークス・ラマン散乱 (coherent anti-Stokes Raman scattering; CARS) 分光法³, そして超広帯域マルチプレックス CARS 顕微分光法^{4,6}と, 様々な装置を開発してきた. 特に, マルチプレックス CARS 分光法では, 既報中最も広帯域な $>2800\text{cm}^{-1}$ という測定可能スペクトル帯域幅を実現している⁵. 本発表では, コヒーレント白色光の広帯域特性を活かした新しい顕微分光システムを, 様々な生体試料へ適用した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 顕微分光装置を用いた⁴. 光源には Ti:sapphire 発振器 (Coherent 社; Vitesse) を用い, 出力の一部を PCF (Crystal Fiber 社; NL-PM-750) に導入してコヒーレント白色光を発生させた. 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}), 白色光の近赤外成分をブロードバンドな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. ピエゾステージにより試料を走査し, CARS・二光子蛍光スペクトル及びイメージを取得した.

【結果・考察】図1にサクラの花

粉を試料とした実験結果を示す.

露光時間は 90 ms である. 自家蛍光等の要因により, 花粉のラマンイメージは取得が困難であったが, 今回初めて CARS で可視化することができた. 図1 (a)に示したマルチプレックス CARS スペクトルは複数のピークから構成されている. 特に $1150, 1520\text{ cm}^{-1}$ 付近のピークはカロテノイドに特徴的な信号であり, それぞれ C-C, C=C 伸縮振動に帰属される. 一方, 2850 cm^{-1} 付近に観測される強い信号は, C-H 伸縮信号に帰属される. 図1 (b-d) には C-H, C=C, C-C 各ラマンシフトでの CARS イメージを示す. こ

れらから, C-C, C=C 伸縮振動のイメージ ((d)及び(c)) は同一であるのに対して, C-H 伸縮振動のイメージ (b) は異なる形状を与えることがわかった. すなわち, C-H 伸縮振動の CARS イ

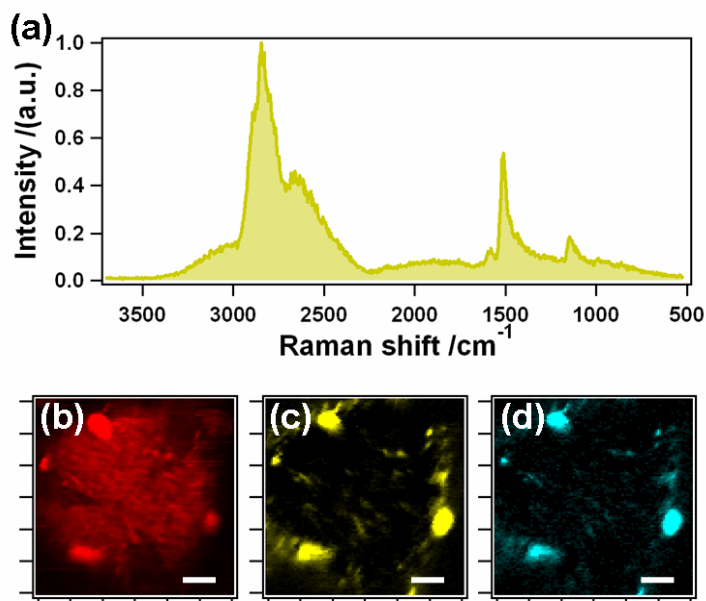


図1 サクラの花粉の CARS スペクトル (a)と 2850 (a), 1520 (b), 1150 (d) cm^{-1} における CARS イメージ. 図の白棒は $5\text{ }\mu\text{m}$ に相当する.

メーは花粉全体の形状を与えたのに対し、C-C, C=C伸縮振動のCARSイメージでは、表面の顆粒状の部分で特に強いコントラストを示した。花粉の外膜には、sporopollenin と呼ばれる、carotenoid または carotenoid ester を構成要素とするポリマーが存在し、花粉内部への化学的または生物学的侵襲を防いでいることが知られている。従って、顆粒状の構造はsporopollenin に由来するものであると考えられる。一方、脂質は長鎖アルキル鎖から構成されており、非常に強い信号をC-H伸縮振動領域に与えることがわかっている。従って図1(b)は脂質を可視化したものと考えられる。花粉の表面に見られる複数の溝は、花粉が雌しべに着床した後、花粉管が形成される部分であると考えられる。また、C-H伸縮振動のCARS信号が顆粒状の部分でも強く見られるということは、sporopollenin がこの部分に存在する脂質に高濃度に溶解していることが推察される。

次にコヒーレント白色光を用いた三次元CARS・二光子蛍光同時イメージングの結果を示す。試料には、核を緑色蛍光タンパク質(Green Fluorescent Protein; GFP)で染めた分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)を用いた。図2(a)にC-H伸縮振動のCARSイメージを、(b)にGFPの二光子蛍光イメージを示す。一点あたりの露光時間は50msである。図2(a)では酵母の全体的な輪郭に加えて、リン脂質豊富なオルガネラであるミトコンドリアが、一方(b)では核が明瞭に可視化されている。三次元測定により立体構成した結果を図2(c)に示す。CARS、二光子蛍光により、分裂酵母を複眼的かつ立体的に可視化することに成功した。コヒーレント白色光により、非常に幅広い波長領域での二光子励起が可能となるため、本装置により二光子許容な電子状態に共鳴した効率の高い蛍光検出が可能となることも期待される。

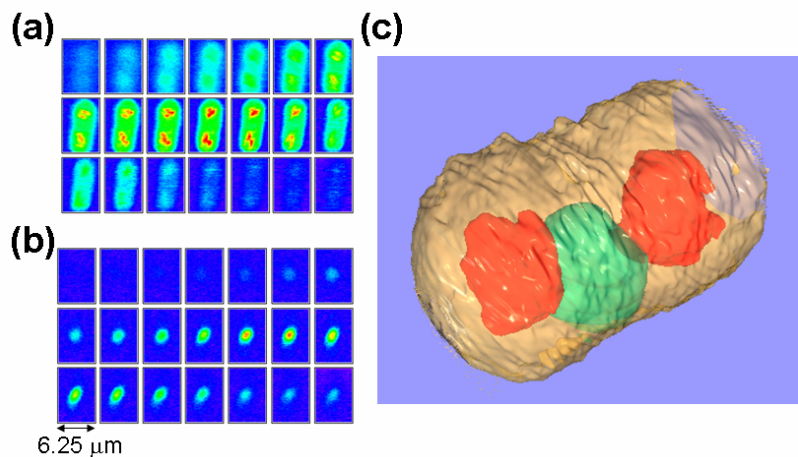


図2 分裂酵母のC-H伸縮振動におけるCARSイメージ(a)及びGFPによる二光子蛍光イメージ(b). 図の左上から右下まで、光軸方向について0.31 μm刻みに測定した; (c) CARS (橙及び赤) と二光子蛍光 (緑) によるマルチイメージ.

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

[2] H. Kano and H. Hamaguchi, *Opt. Lett.* 28, 2860 (2003).

[3] H. Kano and H. Hamaguchi, *Appl. Phys. Lett.* 85, 4298 (2004).

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

[5] H. Kano and H. Hamaguchi, *J. Raman Spectrosc.* 37, 411 (2006).

[6] H. Kano and H. Hamaguchi, *Opt. Express* 14, 2798 (2006).