

10fs レーザーを用いた生体コラーゲン SHG 顕微鏡の高感度化

Enhanced sensitivity in collagen-sensitive SHG microscopy using 10 fs laser

徳島大工¹, 徳島大医² ○長谷栄治¹, 佐藤克也¹, 高橋光彦², 安井武史¹Dep. Engg., Univ. Tokushima¹, Dep. Med., Univ. Tokushima² ○E. Hase¹, K. Sato¹, M. Takahashi², and T. Yasui¹

E-mail: hase@femto.me.tokushima-u.ac.jp

URL: http://femto.me.tokushima-u.ac.jp/

SHG (second-harmonic-generation; 第 2 高調波発生光) 顕微鏡は, コラーゲン分子固有の非線形光学特性を用いることにより, 生きたありのままの状態のコラーゲン分子を可視化できる[1]. 従来の SHG 顕微鏡では, パルス幅 100 fs 前後のモード同期 Ti:Sapphire (Ti:S) レーザーが広く使われてきたが, コラーゲンの構造成熟度が低い生体サンプル (例えば, 細胞産生コラーゲンやコラーゲングル) では, 一般に SHG 発生効率が低く, 良好なコントラストのイメージを得ることは困難である. レーザー照射による生体ダメージを考慮すると, レーザー平均パワーを増大するのではなく, 平均パワーを維持したまま, パルス幅を狭窄化することにより, ピーク電場を高くすることが望ましい. その結果, SHG 発生効率の低いサンプルでも, サンプルダメージを引き起こすことなく, SHG 光強度が増大させることが可能になる. 最近では, パルス幅 10 fs 以下の Ti:S レーザーも市販されているが, このようなレーザー光源をそのまま SHG 顕微鏡に用いると, 対物レンズ等の光学素子の分散により, パルス幅が数百 fs まで容易に拡がり, ピークパワーを逆に大きく低下させる. 先行研究では分散補償にプリズムペアが用いられているが[2], 本研究では装置構成がよりコンパクトとなる負分散チャープミラーで分散補償することにより, 対物レンズ焦点位置においてパルス幅を最短化し, SHG 顕微鏡の高感度化を試みた.

まず, マイケルソン干渉計とローダミン 6G を用いた 2 光子蛍光自己相関計を構築し, 対物レンズ焦点位置のパルス幅を計測した. 光源にはモード同期 Ti:S レーザー (パルス幅 10 fs, 中心波長 787 nm, スペクトル幅 103 nm, 繰り返し周波数 81.8 MHz) を用いた. レーザー出射直後の負分散可変チャープミラー (群遅延分散量: $-900 \sim -6270$ fs²) と正分散可変ウエッジプリズム (群遅延分散量: $50.8 \sim 356$ fs²) を用いて最適化することにより, 対物レンズ焦点位置でパルス幅 20 fs が得られた (図 1). 比較のため, レーザー出射直後の自己相関波形を図 1 挿入図に示す. 分散補償後の自己相関波形が, レーザー出射直後のパルス幅 (10 fs) まで戻らず時間波形がいびつになっている理由は, チャープミラーの 3 次分散が原因であると考えられるため, これを補償可能なウエッジプリズム (例えば, SF10 プリズムなど) を用いて詳細な分散補償を行う予定である. 次に, 100 fs レーザーを用いた従来 SHG 顕微鏡では可視化困難であった細胞産生コラーゲンサンプル (骨芽細胞播種, 静置培養 4 ヶ月) のイメージングを行った. 図 2 に骨芽細胞産生コラーゲンの SHG イメージを示す. 今回のパルス幅狭窄による高感度化の結果, 培養骨芽細胞産生コラーゲン分布の可視化に初めて成功した.

本研究は, 挑戦的萌芽研究 25560200 及び徳島大学先端工学教育研究プロジェクトより支援を受けた.

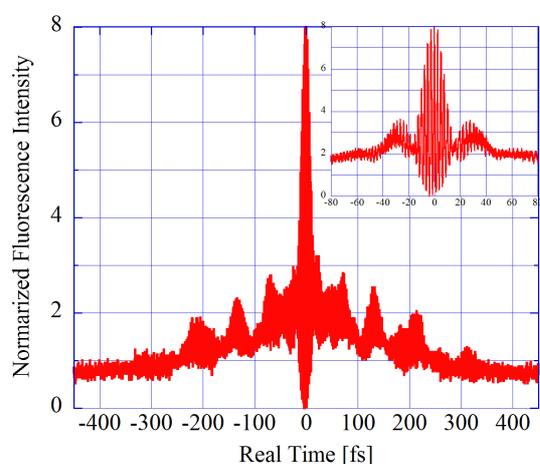


図 1 対物レンズ焦点位置での自己相関波形

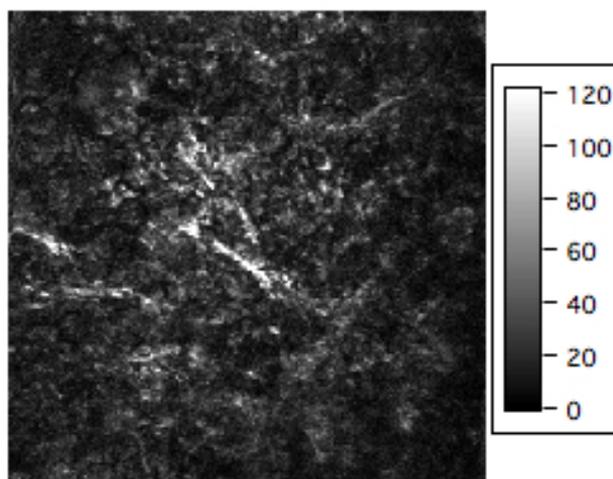


図 2 骨芽細胞産生コラーゲンの SHG イメージ

[1] S. Roth et al., J. Chem. Phys. **70**, 1637 (1979). [2] S. Tang et al., J. Biomed. Opt. **11**, 020501 (2006).