

# 電気光学偏向器を用いた空間重なり変調非線形光学顕微鏡

磯部圭佑<sup>1</sup>, 河野弘幸<sup>2</sup>, 須田 亮<sup>3</sup>, 熊谷安希子<sup>2</sup>, 宮脇敦史<sup>2</sup>, 緑川克美<sup>1</sup>

<sup>1</sup>理研 基幹研究所 緑川レーザー物理工学研究室, <sup>2</sup>理研 脳科学総合研究センター 細胞機能探索技術開発チーム, <sup>3</sup>東理大 理工

## 1. はじめに

近年、非線形光学顕微鏡は劇的に発展し、生命現象を解明するための重要な可視化技術となっている<sup>1)</sup>。特に、近赤外光を用いた2光子蛍光顕微鏡は深部イメージングにおいて非常に有用とされている<sup>1,2)</sup>。しかし、それでもなお、集光点以外で発生する背景光によって観察可能な深さが制限されているため、より深い深部のイメージングを行うためには背景光の抑制が必要不可欠となっている<sup>2)</sup>。また、可視光を用いた1光子蛍光顕微鏡に対して空間分解能が劣っていることが問題となっている<sup>1)</sup>。我々はこれらの問題点を解決する手法として、2波長空間重なり変調技術を提案し、原理を実証してきた。しかし、空間重なり変調のために用いていた装置の応答速度が遅く、測定時間が長いことが問題であった。本年度は、電気光学偏向器を用いて、測定時間を100~1000倍向上させる研究を行った。

## 2. 電気光学偏向器を用いた空間重なり変調非線形光学顕微鏡

空間重なり変調非線形光学顕微鏡(SPOMNOM)では、2波長励起の非線形光学過程を用い、2波長パルスの空間的な重なりに変調を与える。この空間重なり変調によって、発生する非線形信号光強度が変調される。空間重なりの変調深さは集光点が最も大きく、集光点から離れるほど小さくなる。そのため、変調された信号のみをロックイン検出することにより、空間分解能の向上と集光点以外で発生する背景光の抑制を同時に行うことが可能となる。

従来はガルバノスキャナーを用いて、2波長パルスの空間的な重なりに変調を与えていたため、変調周波数が2 kHzと非常に遅かった。ガルバノスキャナーを電気光学偏向器に置き換えることによって変調周波数を400 kHzに向上させた。また、従来は面内の2次元断層像を取得するためにピエゾステージを用いて試料走査を行っていたが、ガルバノスキャナーを用いたレーザー走査に変更し、走査時間を向上させた。その結果、測定時間を100~1000倍短縮することに成功した。

作製したSPOMNOMを用いて、SPOMNOMの利点である背景光抑制と空間分解能の向上を確認した。まず、生体組織を仮想したファントムの深部イメージングを行った(図1(a), (b))。生体組織ファントムは直径2  $\mu\text{m}$ の蛍光ビーズを濃度が $1.0 \times 10^9$  beads/mlとなるようにアガロースゲルとともに封入し、作製した。電気光学偏向器を用いたSPOMNOMでも、従来の2光子蛍光顕微鏡において背景蛍光によってビーズが完全に観察不可能となる深さでさえ、背景蛍光が除去できるためにビーズが観察できていることが確認できる。また、グラニュー糖粉末の和周波発生イメージングも行った(図1(c), (d))。和周波発生イメージングにおいても背景光の抑制と空間分解能の向上が確認できる。さらに、SPOMNOMを用いると、誘導ラマン散乱顕微鏡のような微小な励起光強度変化を測定するイメージングも可能であることを確認した(図1(e), (f))。ポリスチレンビーズは、2波長の周波数差が $2957 \text{ cm}^{-1}$ では可視化されてるが、 $3714 \text{ cm}^{-1}$ では全く可視化されていない。この結果は、コヒーレント反ストークスラマン散乱顕微鏡のような非共鳴信号が混入せず、CH伸縮振動のラマン共鳴信号を測定できたことを示している。

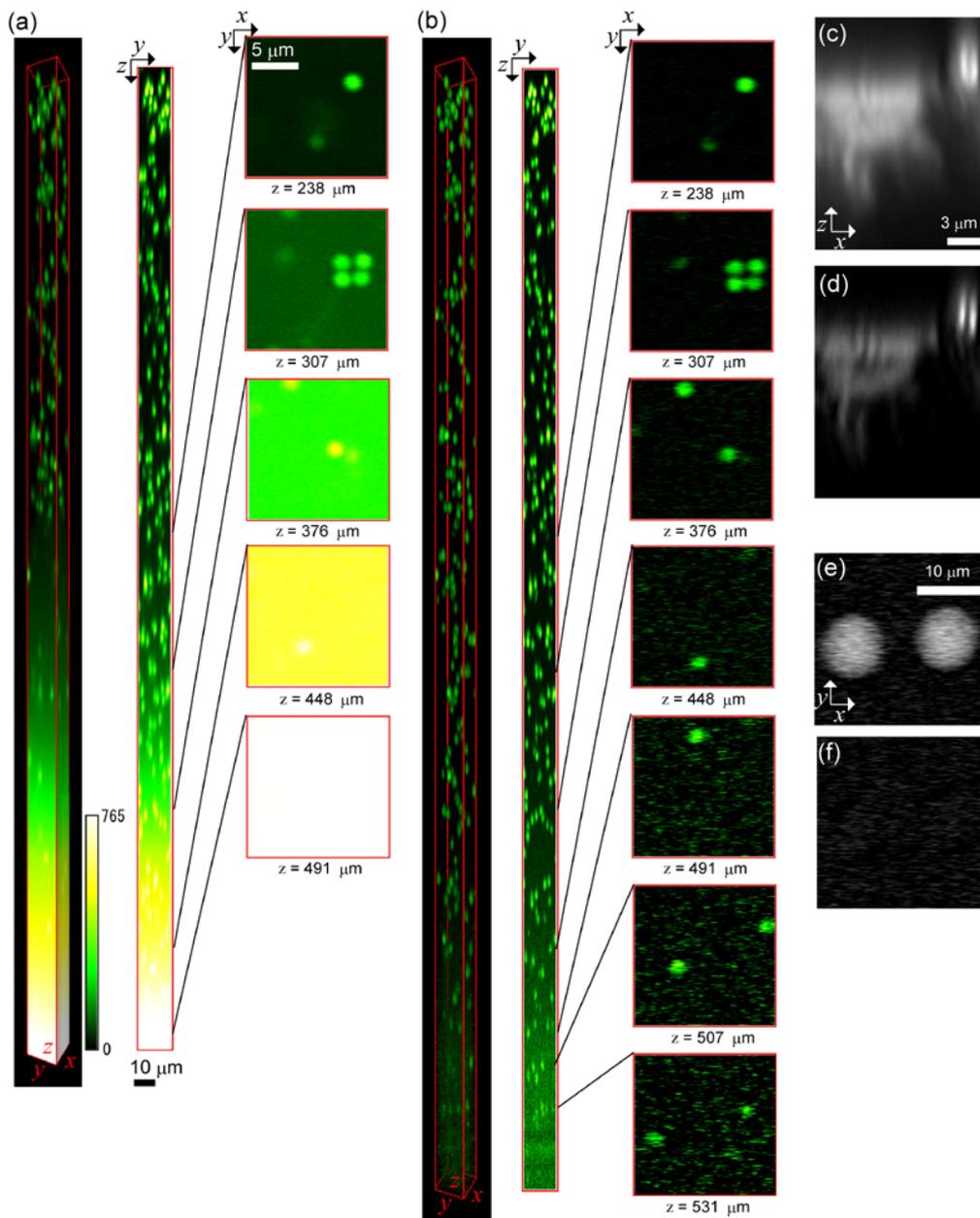


図 1. (a, b) 従来手法(a)と SPOMNOM(b)による生体組織ファントムの2光子蛍光像. (c, d) 従来手法(c)と SPOMNOM(d)によるグラニュー糖粉末の和周波発生像. (c, d) 周波数差が  $2957\text{ cm}^{-1}$ (e)と  $3714\text{ cm}^{-1}$ (f) のときの誘導ラマン散乱像

### 3. おわりに

測定時間を 100～1000 倍短縮するために、ガルバノスキャナーを電気光学偏向器に置き換えた SPOMNOM を作製し、その有用性(背景光除去と空間分解能の向上)を確認した。

### 参考文献

1. J. Squier and M. Müller, Rev. Sci. Inst. **72**, 2855-2867 (2001).
2. P. Theer and W. Denk, J. Opt. Soc. Am. A **23**, 3139-3149 (2006).
3. P. Theer, M. T. Hasan, and W. Denk, Opt. Lett. **28**, 1022–1024 (2003).