

研 究 報 告 書

「長波長レーザーによる超深部顕微分光システムの開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月 ~ 2020 年 3 月

研 究 者: 野村 雄高

1. 研究のねらい

生体細胞内で起きる現象を観察し理解するために、様々な顕微分光技術が開発されてきました。特に、超短パルスレーザー光を利用した二光子励起蛍光顕微鏡は、蛍光の発生する領域が3次的に制約されることにより光軸方向の空間分解能が高いことや、長波長の光を用いることにより細胞内での散乱が抑制されるため細胞の深部を観測できるといった利点があり、生体内の細胞のその場観測などに利用されてきました。ただし、それでも従来の二光子顕微鏡で見ることのできる深さは0.5-1 mm程度であり、たとえば脳内でさらに深くにある海馬の活動解明などのために、より深い部位を観察するための技術が待ち望まれています。

生体細胞に光を照射する場合、一般に波長が長い光のほうが散乱の影響を受けにくい、細胞のより深部まで到達させることが可能となります。従来の二光子励起蛍光顕微鏡は1 μm よりも短い波長の光を励起光として用いてきましたが、励起光としてさらに波長の長い光を用いれば、散乱の影響が少なくなりさらに深い部位を観察できる可能性があります。ただし、波長が長くなりすぎると生体細胞内の水分子などによる吸収の影響が大きくなるため、波長2 μm 以上の光はあまり深部まで到達しなくなります。これらの両方のバランスが取れる1.8 μm 近傍の波長の光を利用できれば、生体細胞内で散乱も吸収もされずに深部まで到達でき、従来の二光子顕微鏡よりもさらに数倍深くまで光を送り込むことが可能になると考えられます。

この波長1.8 μm 近傍はレーザー開発が未熟な領域であり、このような波長の超短パルス光を出せる光源はほとんどありません。チタンサファイアレーザーなど、別の波長の超短パルス光を波長変換することでこの波長域の光を発生させることはできますが、非線形過程を利用するために効率や安定性が損なわれるのが問題です。直接この波長域の光を出すのが理想ですが、その有力な候補として、波長2 μm 帯の超短パルス光源として注目を集めているトリウム添加ファイバーレーザーがあります。本研究では、トリウム添加ファイバーレーザーによって、必要な波長域である1.8 μm 近傍において顕微鏡用途として適切なパラメーターを持つ超短パルス光源を開発することで、従来よりも細胞の深い部位まで光を届かせることができるような顕微分光システムの開発を目的とします。

2. 研究成果

(1) 概要

まず、本研究開始前までに開発していたトリウム添加ファイバーレーザーシステムの短パルス化に取り組みました。これまでのシステムは、出力は高いものの、増幅に付随するスペクトルの狭窄化やトリウムイオンの再吸収により、パルス幅が長くなってしまいう問題がありました。これらの問題に対処するために、波長1.6 μm のシングルモード励起光源を用いてコア励起したほか、チャープ・パルス増幅をやめて増幅ファイバー内の非線形効果を利用

することで、スペクトルの広帯域化に成功しました。この結果、非線形効果によってパルス品質が損なわれることもなく、時間幅50フェムト秒以下の超短パルス光を平均出力4.2 Wで得ることができました[研究成果: 論文1]。

上記のレーザーシステムではパルスの強度不足のためか、三光子励起に起因するシグナルを観測することができませんでした。そこで、パルスエネルギーをさらに増強するためにレーザーシステムの改造を行いました。ただし、これ以上のパワーの増強を行うのは難しいほか、単純にパワーを増強してしまうと観察対象の破壊にもつながるため、パルスの繰り返し周波数を一旦減らした上で再増幅することで、平均パワーを変えないままで一パルスあたりのエネルギーを上げることを試みました。この結果、平均出力は1 Wとほぼ同等ながら、パルスエネルギーは1 μJ まで引き上げることができ、細胞への損傷を抑制したまま三光子励起信号が増強されることが期待できます。

上記の、パルスエネルギーを増強した後のパルスを顕微鏡システムに導入し、再度三光子シグナルの観察を試みたところ、シグナルを観測することができ、このシグナルは三光子吸収によって発生した蛍光に由来すると結論づけられました。さらに、顕微鏡の空間構造を観察する能力を確認するために、赤色の蛍光ビーズの観察を試みました。蛍光ビーズを3次元的に観察した画像を解析することにより、この顕微鏡の分解能は $0.8 \times 0.8 \times 1.9 \mu\text{m}$ と見積もることができました。さらに、実際の生体細胞を観察することができるかを確かめるため、赤色蛍光タンパク質をHeLa細胞およびラットの海馬スライスの神経細胞に導入することで、それぞれ細胞の構造を観察することに成功しました。すなわち、今回開発した三光子励起蛍光顕微鏡システムが、実際に生体細胞の観察に利用可能なことを示すことができました。

(2) 詳細

研究テーマ「超短パルスの広帯域増幅」

本研究開始前までに開発していたトリウム添加ファイバーレーザーシステムは、出力は高いものの、増幅に付随するスペクトルの狭窄化やトリウムイオンの再吸収により、パルス幅が長くなってしまいう問題がありました。

トリウムイオンの再吸収による影響で短波長側が増幅できない問題に対しては、一般にファイバーレーザーの増幅でよく用いられるクラッド励起ではなく、コア励起を行うことで解決を試みました。コア励起のためにはビーム品質の良い励起光源が必要ですが、これにはトリウム添加ファイバーレーザーの励起に広く用いられている波長790 nmの光源の代わりに、波長1.6 μm のシングルモード励起光源を用いました。

また、スペクトルの狭窄化に対処するために、増幅ファイバー内の非線形効果を利用することを試みました。一般に、超短パルス光の増幅の際には、増幅器内で制御することが難しい非線形効果を避けるために、チャープ・パルス増幅法が広く利用されています。本研究では、この非線形効果をあえて利用することにより、スペクトルの広帯域化に挑みました。この結果、目論見通り非線形効果によってスペクトル幅を大幅に広げることが成功しました。非線形効果が強いためにパルス品質の劣化が懸念されましたが、パルス形状を解析したところパルス品質の劣化は認められず、時間幅48フェムト秒の超短パルス光を平均出力2.4 W

で得ることができました。また、増幅器に入れる前のパルスを僅かに成型することで平均出力を引き上げることができ、最終的に4.2 Wの出力が得られています。

この結果は、本研究開始前のレーザーシステムに比べて、平均出力を下げずにパルス幅を1/3にまで短縮できたということになり、ピーク強度を3倍に引き上げることができたということを意味します。さらに、このシステムは一般的なチャープ・パルス増幅システムと異なり増幅後のパルス圧縮器が必要ないため、光のロスが少なくなるほか、システムの簡素化による扱いやすさや安定性の向上、廉価化なども見込まれ、本光源の実用化にも重要な位置づけとなっています。

研究テーマ「パルスエネルギーの増強」

上記のレーザーシステムの出力はスペクトル幅が広いですが、波長1.85 μm 以上の光は生体内の水分子などに吸収されて熱となり、生体細胞サンプルの損傷につながるため、実際に励起光として利用する前に除去する必要があります。そのために、4-f光学系と呼ばれるシステムを構築し、その途中にビームブロックを挿入することで、必要なスペクトル領域だけを切り出すことを可能としました。

このレーザーによって実際に三光子励起が可能かどうかを確認するため、クレジルバイオレットと呼ばれる蛍光色素を用いてテストを行いました。この色素は波長600 nm近傍の光を吸収し、620 nmの蛍光を放出するため、波長1800 nmのパルス光を当てた場合に三光子励起されて620 nmの蛍光が観察できることが期待されます。しかし、実際に実験を行ったところ、そのような蛍光は観察されませんでした。この原因としては、パルスの繰り返し周波数が高すぎるためにパルス一個あたりのエネルギーが不足しており、三光子励起に必要な強度を達成できていないということが考えられます。

そこで、パルスエネルギーをさらに増強するためにレーザーシステムの改造を行いました。ただし、これ以上のパワーの増強を行うのは難しいほか、単純にパワーを増強してしまうと観察対象の破壊にもつながるため、平均パワーを変えないままで一パルスあたりのエネルギーを上げることを試みました。具体的には、ポッケルスセルと呼ばれる素子を導入してパルスの繰り返し周波数を一旦67 MHzから1 MHzまで、すなわちパルスの個数を1/67に減らしました。その後、ツリウム添加ファイバーを用いた増幅器を新たに開発しました。この増幅器を用いることで、パルスエネルギーは1 μJ まで引き上げることができました。なお、平均パワーは1 Wであり、ポッケルスセルおよび増幅器の導入前とほとんど変わっておらず、細胞への損傷を抑制したまま三光子励起信号が増強されることが期待できます。

研究テーマ「三光子励起蛍光顕微鏡の開発」

上記の、パルスエネルギーを増強した後のパルスを顕微鏡システムに導入し、再度三光子シグナルの観察を試みました。具体的には、赤色の蛍光色素をジメチルスルホキシドと呼ばれる溶媒に溶かしたものを観察対象とし、顕微鏡を通してレーザーパルスを対象に集光することで発生する光を、光電子増倍管を用いて観察しました。赤色の色素としては、吸収波長が600 nm近傍のものを用いたため、波長1800 nmのレーザー光を用いた場合、強度が十分であれば、三光子吸収によって励起されて蛍光が発生すると期待されます。実際、この

測定によってシグナルを観測することができました。また、このシグナル強度の入射レーザー強度依存性を調べたところ、もとのレーザー光の強度の3乗に比例して強くなることから、このシグナルは三光子過程すなわち三光子吸収によって発生していると推察されます。実際には三光子吸収以外にも三光子過程は存在しますが、発生する蛍光の強度や蛍光が発生する集光点の位置などから、このシグナルは三光子吸収によって発生した蛍光に由来すると結論づけられました。すなわち、三光子シグナルの観察に成功しました。

上記の実験は蛍光色素の溶液、つまり構造のない対象を観察したものです。実際に顕微鏡として用いるためには空間構造を観察する能力が重要です。この顕微鏡の空間分解能を確認するために、赤色の蛍光ビーズの観察を試みました。具体的には、波長600 nm付近の光を吸収する蛍光ビーズのうち、平均直径が500 nm程度のものをアガロースゲルの中に埋め込み、それにレーザーパルスを集光して観察しました。その結果、蛍光ビーズを3次的に観察することができ、画像を解析することにより、この顕微鏡の分解能は $0.8 \times 0.8 \times 1.9 \mu\text{m}$ と見積もることができました。

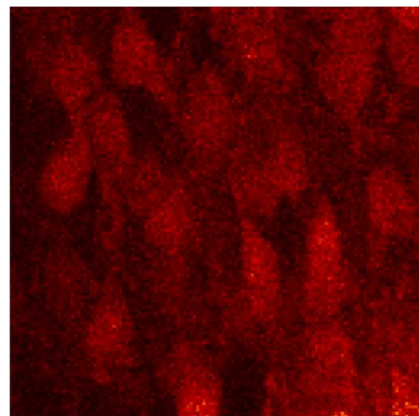
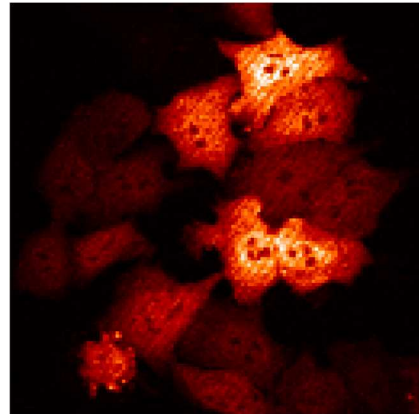


図1: HeLa細胞およびラットの海馬スライスの観察イメージ。

この顕微鏡で実際の生体細胞を観察することができるかを確かめるため、赤色蛍光タンパク質を導入したHeLa細胞をサンプルとして観察し、蛍光タンパク質のスクリーニングを行いました。この結果、図1のように赤色蛍光タンパク質の三光子励起蛍光信号によって、細胞のイメージを鮮明に観測することができました。さらに、生きた細胞においての観察テストとして、ラットの海馬スライスの神経細胞に同じ赤色蛍光タンパク質を発現させたものを観察した結果、図のように神経細胞の構造を観察することに成功しました。すなわち、本光源が実際に三光子励起蛍光顕微鏡の励起光源として使用可能なことを示すことができました。

3. 今後の展開

ここまでの研究で、三光子励起蛍光顕微鏡の励起光源として適したレーザー光源を開発し、そのレーザー光源を顕微鏡システムに適用することで、実際の生体細胞を観察することができています。ただし、これらの観察は、細胞サンプルの制約などもあり、細胞表面の観察にとどまっています。

今後の展開としてはまず、本顕微鏡でどの程度の深さまで観察できるのかを確認し、その情報からフィードバックを受けてレーザー光源のパラメーターを最適化していきます。これにより、細胞イメージの損傷を防ぎつつ観察イメージのS/N比の最大化を図ることで、細胞内部の深い

部位までの観察を実現できると考えています。

将来的には、本顕微鏡システムをプロトタイプとした顕微鏡システムを生物系の研究者が広く利用できるようにすることで、生物学的に意義のある対象の観察や操作などにつながることを期待しています。

4. 自己評価

本研究の研究目的として、三光子励起蛍光顕微鏡のための光源開発および、その光源を用いた顕微鏡の開発は達成できています。ただし、当初の目的の一つであった、細胞深部の観察の実証にはまだ至っていません。今後、適切な細胞サンプルを用いて観察し、その結果からフィードバックを得てレーザーシステムや顕微鏡システムのパラメーターを最適化していくことで、細胞深部の観察の実現につながると考えます。

本研究の成果として、新たな波長域の光源を利用した三光子励起蛍光顕微鏡システムのプロトタイプを開発することができました。今後、このシステムの最適なパラメーターを見つけ、より扱いやすくしたシステムを開発することで、生物学系の研究者が実際に使用可能な顕微鏡システムが実現し、生物学の最先端の研究をさらに発展させることができると期待しています。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Yutaka Nomura and Takao Fuji, Generation of watt-class, sub-50 fs pulses through nonlinear spectral broadening within a thulium-doped fiber amplifier, Optics Express, 2017, No. 12, 13691–13696.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- Yutaka Nomura and Takao Fuji, “Watt-level 50 fs pulse generation from thulium-doped ZBLAN fiber amplifier system,” the Conference on Lasers and Electro-Optics/Europe, ICM Munich, Munich, Germany (2017).
- Yutaka Nomura and Takao Fuji, “Ultrafast thulium-doped ZBLAN fiber amplifier utilizing nonlinear spectral broadening,” OSA Laser Congress/Advanced Solid State Lasers, Nagoya Congress Center, Nagoya, Japan (2017).
- (Invited) Yutaka Nomura, “Femtosecond light source at 2 μm based on thulium-doped ZBLAN fiber,” 11th Asia Pacific Laser Symposium, Sheraton Xi'an North City Hotel, Xi'an, China (2018).
- Yutaka Nomura and Takao Fuji, “Ultrafast thulium-doped fiber laser system at 1.8 μm for multi-photon microscopy,” CLEO: Science and Innovations, San Jose Convention Center, San Jose, CA (2019).
- Yutaka Nomura, Hideji Murakoshi, and Takao Fuji, “Short-wavelength thulium-doped fiber

laser for three-photon microscopy,” Advanced Solid State Lasers Conference, Austria Center Vienna, Vienna, Austria (2019).