

修士論文

利得スイッチング駆動半導体レーザを用いた
誘導ラマンイメージング

Stimulated Raman Imaging with a Gain-Switched Laser Diode

2016年2月4日提出

指導教官 小関 泰之 准教授

東京大学大学院工学系研究科

電気系工学専攻

学籍番号 37-146465

徳永 京也

内容概観

バイオイメージングは生体内の細胞や組織の形態を直接観察することができる技術である。近年の著しい光学顕微鏡の発展に伴い、よりミクロな生体の解析が可能となり、医学や病理学分野における需要がさらに高まっている。例えば、2014年のノーベル化学賞に選出された超解像蛍光顕微鏡は、生きた細胞の核膜やゴルジ体などの詳細構造の検出が可能であり、光の回折限界を突破したナノメートルオーダーでの観察を可能とした。一方で、このような強力な性能を持つ超解像蛍光顕微鏡を含め、従来の光学顕微鏡は一般的に染色や標識を行う必要があるものが多い。しかし、染色には時間と手間がかかり、生きたままの生体観察への応用が困難である。また、標識は細胞本来の性質の喪失、あるいは細胞への毒性付与の可能性などが懸念されている。

一方で、我々が研究を進めている誘導ラマン散乱(SRS)顕微鏡は、光と分子の相互作用によって生じるSRSを用いることで、無染色、無標識の観察を可能とした光学顕微鏡である。SRS顕微鏡では、分子固有のスペクトル情報を取得できることを利用して、分光イメージングを行うことが可能である。さらに、超短光パルスによって誘起される非線形光学効果を利用しているため、高速かつ3次元のイメージングが行える。このようにSRS顕微鏡は、生きた生体のイメージングに対して様々な利点を有している。

SRS顕微鏡は、上記のような特長がある一方で、2色かつ同期したピコ秒のパルスレーザを必要とするなど、光源に対して多くの要求条件が存在する。そのような条件を満たしたパルス光源として、従来、固体レーザや光パラメトリック発振器が主に用いられてきた。しかし、これらの光源は一般的に大型、高価、そして長期的に不安定であるなど実用化への課題が多く存在していた。近年、これらの課題の対策として小型かつ安価なファイバレーザを光源に用いた応用が進められている。また、さらに小型かつ安価で長期安定性に優れた光源である半導体レーザ(LD)を用いたSRSイメージングの結果も報告されている。しかし、これらの報告例では、要求条件を満たすパルス光を得るために、大型の装置や複雑な機構を必要としている。

本研究において我々は、SRS顕微鏡のための光源として利得スイッチング駆動LD(GS-LD)に着目した。GS-LDは、電気パルスを用いて励起されたLDから直接光パルスを生成することができるレーザである。近年、高速強励起下のGS-LDにおいて、SRS顕微鏡の光源に適した幅の光パルスの生成が示された。GS-LDは究極的には電気パルス発生器しか必要とせず、非常に簡単な構成で安定した光パルスを得ることができる。実際に、GS-LDを非線形光学顕微鏡に用いた例として、多光子顕微鏡によるマウス脳の世界最深部のイメージング結果が報告されている。我々は、総合的な集約性や安定性に優れているGS-LDを用いてSRSイメージングを行うことができれば、SRS顕微鏡の実用性向上の面で大きなインパクトを与えることができると考えた。

本論文では、GS-LDがSRS顕微鏡に適用できる光源であることを示す。その実証実験として、1.06- μm 帯GS-LDとチタンサファイアレーザをパルス光源に用いた生細胞のSRSイメージングを行った結果を示す。そして、GS-LDと波長可変光源を組み合わせた高速分光イメージングを見据えた検討実験の結果を示し、SRS顕微鏡の更なる実用性向上の可能性を示す。

目次

第1章	序論	1
1.1	本研究の背景.....	1
1.2	本研究の目的と成果.....	2
1.3	本論文の構成.....	3
第2章	誘導ラマン散乱(SRS)顕微鏡	4
2.1	超短光パルスと非線形光学効果.....	4
2.1.1	超短光パルス.....	4
2.1.2	非線形光学効果.....	6
2.2	非線形光学顕微鏡.....	7
2.3	ラマン散乱.....	9
2.3.1	自発ラマン散乱.....	9
2.3.2	コヒーレントラマン散乱.....	11
2.4	ラマン散乱顕微法の比較.....	14
2.5	SRS 顕微鏡システム.....	15
2.5.1	基本的な SRS 顕微鏡の構成.....	15
2.5.2	SRS 信号の検出.....	16
2.5.3	高調波同期光源.....	17
第3章	利得スイッチング駆動半導体レーザ(GS-LD)	20
3.1	GS-LD の原理.....	20
3.2	GS-LD パルスの短縮化.....	22
3.3	SRS 顕微鏡用光源としての LD のパルス発振方式の比較.....	24
3.3.1	モード同期方式.....	24
3.3.2	Q スwitching方式.....	25
3.3.3	利得スイッチング駆動方式.....	25
第4章	GS-LDを用いたSRSイメージング	27
4.1	トグルフリップフロップを用いた高調波同期光源.....	27
4.2	1.06- μm 帯 GS-LD の特性評価.....	28
4.2.1	GS-LD ジッタの各種パラメータ依存性.....	28
4.2.2	GS-LD パルス波形とスペクトル.....	30
4.2.3	試料面における GS-LD パルスのジッタ測定.....	33
4.3	GS-LD とチタンサファイアレーザを用いた SRS イメージング.....	34
第5章	GS-LDを用いたSRS顕微鏡の実用性向上のための実験的検討	36
5.1	1.06- μm 帯 GS-LD パルスのジッタ低減実験.....	36
5.1.1	ジッタ低減の原理.....	36
5.1.2	GS-LD パルスのジッタの注入光強度及び波長依存性の評価.....	37

5.1.3	GS-LD パルスのジッタと SRS 信号強度のゆらぎの関係.....	39
5.2	GS-LD の出力タイミング安定化実験.....	41
5.3	1.03- μm 帯 GS-LD と高速波長可変ファイバレーザの同期実験	43
第 6 章	結論.....	46
付録A	ヒト皮膚のSRSイメージング.....	48
付録B	アルキンプローブ修飾細胞のSRSイメージング.....	51
参考文献	53
発表論文リスト	57
謝辞	60

第1章 序論

1.1 本研究の背景

生体を可視化するバイオイメージングの分野で、細胞レベルのミクロなスケールで生体の解析を行うために、光学顕微鏡が盛んに研究されている。光学顕微鏡には、様々な方式がありそれぞれに特長がある。例えば、明視野顕微鏡は最もよく知られている光学顕微鏡の1つで、試料内の物質の光の吸収率の違いを利用して、透過光の像のコントラストを観察するものである。また、蛍光顕微鏡は、生体試料の特定部位に付く蛍光分子を用いることにより、選択的に特定部位の機能などを観察できる。さらに、スペクトルが励起光から離れているため、1分子の発光も観測できるほど信号対雑音比(SNR)が良い[1]。近年では、光の回折限界を上回るナノメートルオーダーの分解能で観察が可能な超解像蛍光顕微鏡が注目を集めている[2,3]。一方で、明視野顕微鏡や蛍光顕微鏡を含めた従来の光学顕微鏡では、染色や蛍光標識を行う必要があるものが多く、この染色や蛍光標識には時間と手間がかかる。さらに、染色は生きたままの生体、特に人間への適用を考えるとほぼ不可能であると考えられる。蛍光標識の場合は生きたままの生体に対する応用が考えられているが、1. 蛍光標識の対象になる分子が既知のものに限定されること、2. 蛍光標識が対象の分子へ辿りつくまでの正確さ、3. 高分子の蛍光標識が対象の生体分子に与える毒性や機能面での影響、などの課題が存在している。

近年、そのような課題を受けて、無染色、無標識観察が可能な、新しい原理に基づいた光学顕微鏡の研究が行われている。その1つとして挙げられるラマン顕微鏡では、化学結合由来の分子固有の振動スペクトルを検出することで試料を可視化することが可能である[4]。さらに、分子は必ずある周波数で振動を行っているため、基本的に全ての試料から信号を検出することが可能である。一方で、ラマン顕微鏡は信号強度が微弱であることから、製品化されているものでさえ、一枚の画像を取得するために数十分という時間を要している。そのため、生きた細胞内のダイナミクスを捉えることが困難であり、無染色、無標識で観察が行えるという特長が生かされていない状況にある。

そこで我々は、分子振動を利用して無染色、無標識観察が行えるラマン顕微鏡の中でも特に、誘導ラマン散乱(SRS)という現象を利用した SRS 顕微鏡の研究を進めている[5-10]。SRS はラマン散乱の一種であり、したがって、SRS 顕微鏡は非線形光学効果を利用したラマン顕微鏡という位置づけにある。そのため、ラマン顕微鏡が持つ試料内の分子振動を選択的に観察できるという特長に加え、高感度かつ3次元的に試料を可視化できるという特長を持つ非常に強力な手法と言える。

一方、SRS と同様の過程で生じるコヒーレントラマン反ストークス散乱(CARS)と呼ばれる現象が存在している。CARS を用いた顕微鏡への応用例は SRS のものよりも早く、1982年に CARS を利用した2次元のイメージング例が報告され[11]、1999年には生きた細胞に対するフェムト秒

パルスを用いた 3 次元イメージングの結果が報告されている[12]。この報告の後、CARS 顕微鏡は盛んに研究されてきた。CARS 顕微鏡も SRS 顕微鏡と同様に、高感度かつ 3 次元的な試料のイメージングが行える。しかし、CARS 顕微鏡では、分子振動由来の共鳴信号に電子応答由来の非共鳴信号が重畳することによって、スペクトル歪みが生じるという課題があった。

SRS は CARS よりも早く 1962 年にその現象が報告された[13]。しかし、信号取得の困難さなどの課題から、2007 年に初めて SRS を用いた 3 次元イメージングの結果が報告された[14]。SRS 顕微鏡は、CARS 顕微鏡で問題となる非共鳴信号に由来したスペクトル歪みが起こらず、また、理論的に CARS 顕微鏡と同等のコントラストのイメージング画像が得られるという特長を持つことから[15]、CARS 顕微鏡に代わる顕微鏡として、近年盛んに研究が行われている。

SRS 顕微鏡は先に述べたように無染色の生体試料から 3 次元的に分光情報を得ることが出来る特長を持っている。一方で、用いる光源が課題であり、2 色であること、同期していること、一方が変調されていること、ピコ秒パルスであることなど、光源に対して多くの要求条件が存在する。そのような条件を満たしたパルス光源として、従来、SRS 顕微鏡にはチタンサファイアレーザ(TSL)や光パラメトリック発振器などの固体レーザが主に使われてきた[5-7]。しかし、これらの固体レーザは一般的に大きく高価で、また不安定であるなど実用化への課題が多く存在している。そのような課題への対策として世界中でファイバレーザ(FL)を光源に用いた応用が進んできた[16-18]。1 つの FL から得られるパルスを 2 つに分けたものを SRS 顕微鏡の光源として用いた例や、同軸平衡検出方式を用いて FL 光源による誘導ラマンイメージングの高感度化を達成した例が挙げられる。また、更に小型かつ安価で長期安定性に優れている光源である半導体レーザ(LD)を用いて、実際に SRS 顕微鏡に関する研究報告が行われている[19-21]。これらの研究報告では CW 発振させた LD 光をそのまま光源として用いる例や、あるいはパルス光に変換させることでイメージングを行った例が報告されている。一方でこれらの手法は、著しい SRS 信号強度の低下や光源の複雑化を伴うというのが現状である。

1.2 本研究の目的と成果

以上の背景を踏まえ、本研究ではより高い実用性が期待できる光源として、利得スイッチング駆動半導体レーザ(GS-LD)[22,23]を光源に用いて SRS イメージングを行うことを目的とする。GS-LD は高い電圧の電気パルスを用いて駆動した LD から光パルスを直接得ることが可能な光源である。そして近年、高速強励起下の GS-LD において、さらなる短パルス化の可能性が示された[24]。すでに、この高速強励起下の 1- μm 帯 GS-LD を用いた光学顕微鏡への応用が報告されており、ピコ秒のパルスを用いた 2 光子吸収によるマウスの脳神経の蛍光像が得られている[25,26]。一方で、GS-LD を SRS 顕微鏡に適用した例は、現在のところ報告されていない。そのため、GS-LD が SRS 顕微鏡に適用できるかを確認することは非常に大きい価値があると考えられる。

本論文では 1.06- μm 帯の GS-LD と TSL を光源に用いた SRS イメージングに成功したことを報告する。はじめに、1.06- μm 帯 GS-LD パルスのスペクトル及びジッタ特性評価の結果を示す。つづいて、トグルフリップフロップ(T-FF)を用いた簡易な高調波同期パルスの発生法の説明を行う。その後、GS-LD と TSL を光源に用いて、ポリマービーズ及び生細胞の SRS イメージングを行った結果を示す。加えて、SRS 顕微鏡用光源としての GS-LD のさらなる実用性向上のために行った、GS-LD パルスのジッタ低減、T-FF を含めた電気回路による GS-LD パルス駆動信号タイミングの TSL 強度依存性抑制、そして 1.03- μm 帯 GS-LD と Er-FL の 2 光源の同期の結果を報告する。

1.3 本論文の構成

本論文の構成と内容を以下に示す。

第 2 章では、SRS 顕微鏡について説明する。まず、SRS 顕微鏡の光源として用いる超短光パルスについて説明し、非線形光学顕微鏡及びラマン散乱現象について説明を行う。次に SRS 顕微鏡を含むラマン散乱を用いた顕微法を比較し、最後に SRS 顕微鏡の原理と構成について示す。

第 3 章では、GS-LD について、その動作原理についての詳細を示す。つづいて、LD を用いた他のパルス発振の方式について説明を行い、SRS 顕微鏡応用の観点から各方式の比較を行う。

第 4 章では、T-FF を用いた高調波同期光源システムについて説明を行う。つづいて、1.06- μm 帯の GS-LD の特性評価を行った結果を示す。その後、TSL と GS-LD を 2 色のパルス光源に用いたポリマービーズと生細胞の SRS イメージングの結果を示し、GS-LD の実用性を実証する。

第 5 章では、GS-LD を誘導ラマンイメージングに応用する際に見込まれる課題の解決手法を提案し、実証まで行った結果を示す。また、それまでに実験を行った GS-LD と異なる波長帯である、1.03- μm 帯の GS-LD と Er-FL の同期を確認した結果を示す。

第 6 章では、本研究の結論を述べ、今後の課題や展望について述べる。

第2章 誘導ラマン散乱(SRS)顕微鏡

誘導ラマン散乱(SRS)顕微鏡は、光と分子における非線形な光学効果によって生じる SRS を用いて、分子固有のスペクトル情報を取得して、無染色、無標識イメージングを行うことができる顕微鏡である。本章ではまず、SRS 顕微鏡の光源として一般的に用いられている超短光パルスの特性について説明する。つづいて、超短光パルスなどの高強度の電場によって誘起される非線形光学効果について説明した後、その効果を用いた非線形光学顕微鏡について述べる。そして、ラマン散乱及びコヒーレントラマン散乱(CRS)についてそれぞれ概要を説明した後、一般的な SRS 顕微鏡の原理及び構成と SRS 信号取得法について述べる。

2.1 超短光パルスと非線形光学効果

超短光パルスは、ピコ秒オーダー以下の短時間の間だけ強度を有する光である。本節では、超短光パルスの持つ性質を示す。つづいて、その超短光パルスと物質の相互作用の結果生じる非線形光学効果について説明する[27]。

2.1.1 超短光パルス

光は電磁波の一種であり、赤外線から X 線まで様々な波長の光が存在している。そして、我々の周りに存在している太陽光などの自然に発生している光を自然光と呼ぶ。一方で、CD やレーザポインタなどで用いられている光をレーザ光と呼ぶ。レーザ光は自然光と異なり、単一の周波数を持ち、また光波の位相や方向が揃ったコヒーレンス性を持つなどの特長がある。

レーザ光を発生させるためには光共振器と呼ばれる機構が必要となる。図 2.1 に光共振器の模式図を示す。ここでは、ファブリーペロー型の光共振器を例に挙げ説明する。この型の光共振器は利得媒質と、向い合せの 2 枚の反射鏡で構成される。まず、光共振器内において、利得媒質に対して外部からエネルギーを与えることで、利得媒質内の電子を基底準位から励起準位へ状態遷移させることができる。この時、与えるエネルギーの量が多くなると、励起準位に存在する電子の数が基底準位に存在する電子の数を上回る状態になる。このようにして、基底準位と励起準位における電子の占有率が反転した状態を、反転分布が形成された状態と呼ぶ。光利得は、反転分布によって光の放出量が吸収量を上回るようになることで得られる。そして、光共振器内の利得が反射鏡などによる損失を上回ることでレーザ発振が起こり、レーザ光を得ることができる。また、反射鏡の一方は反射率 1、他方はレーザ光の射出部とするために反射率が 1 よりわずかに小さいものを用いる。このような過程により得られるレーザ光は、連続的に単一の周波数の光が得られるので CW (continuous wave) 光と呼ぶ。

一方で超短光パルスは、広帯域な周波数をもつ光の重ねあわせによって形成されている。ここで、超短光パルスが発生する様子についてモード同期方式を例に挙げて説明する。超短光パルスも基本は CW 光と同様に光共振器と利得媒質から成る機構によって生成されるが、加えて可飽和吸収体などのパルスを形成するためのモードロッカーとよばれる仕組みが必要となる。まず初めに、CW 発振の時と同様に、光共振器に外部からエネルギーを注入して利得媒質を励起させる。そして、発生した自然放出光は光共振器内を往復し、利得媒質を透過するごとに増幅される。その結果、光の半波長の整数倍と共振器長が一致する多数の縦モードに置いて CW 発振が始まる。ここで、モード同期方式では、モードロッカーを用いてこれらの複数の縦モードの位相が同期した状態になるようにする。その結果として、時間領域においてパルスが形成されている。発生する縦モードの周波数は、利得媒質の帯域幅によって制限される。そのため、時間とスペクトルにおけるフーリエ変換の関係から分かるように、利得媒質の帯域幅が広く、多数の縦モードにより構成されるパルスほどパルス幅が短く、したがってピーク強度の高いパルスが得られる。

超短光パルスとはピコ秒やフェムト秒といった非常に短い時間の間のみ光が強度を持っている状態のことを指す。その利点として、CW 光の持つコヒーレンス性に加え、短い時間スケールの信号応答を得ることができるという点が挙げられる。超短光パルスを用いることで、化学反応の際の分子結合の様子や分子振動などの短いスケールで生じている変化を捉えることができる。近年ではフェムト秒よりもさらに短いアト秒の光パルスの発生が報告されており、この時間スケールにおいては、電子応答そのものの事象が捉えられることが期待されている。

時間的に常に光電場が存在している CW 光と異なり、超短光パルスは CW 光と平均光強度が同じ場合、非常に高強度の光を得ることができる。その関係式を以下に示す。

$$P_{\text{ave}} = P_{\text{peak}} \times \tau_p \times f_p \quad (1-1)$$

ここで、 P_{ave} は平均光強度、 P_{peak} は光パルスのピーク強度、 τ_p は光パルスのパルス幅、 f_p は繰り返し周波数である。この高強度性は次の項で説明する非線形光学効果を考える際に非常に重要となる。

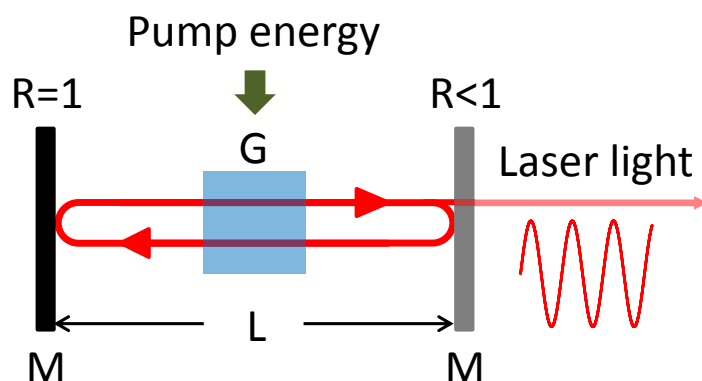


図 2.1 光共振器の模式図。G: 利得媒質、M: 反射鏡、R: 反射率、L: 共振器長。

2.1.2 非線形光学効果

光が物質に入射すると、光の持つ電場が物質内の分子に作用する。そして、分子が揺さぶられて、原子核と電子の位置がお互いに反対方向にずれた結果として、電気双極子モーメント p が発生する。この作用を物質全体で考えた場合、分子密度を N として、

$$P = Np \quad (1-2)$$

で表され、この P を分極と呼ぶ。ここで、入射光電場を E として、さらにその強度が弱いとすると、 p 及び P は、

$$p = \varepsilon_0 \alpha E \quad (1-3)$$

$$P = \varepsilon_0 \alpha N E \quad (1-4)$$

と E に線形な成分として表される。ここで、 ε_0 は真空の誘電率であり、 α は分子の分極率と呼ばれる。そして、物質の持つ電気感受率 χ は、

$$\chi = \alpha N \quad (1-5)$$

と表される。ここで、光電場が振動しているため、その振動に応じて分極も振動する。この分極の振動によって電磁波が放射される。この分極によって生まれた電場と入射光電場が重ね合わせられることで、入射光の位相変化や振幅変化が生じる。前者を屈折と呼び、後者を吸収と呼ぶ。

一方で、原子核の存在や、電子自身の応答の非線形性によって、単なる屈折や吸収では説明ができない現象が起きる。これらを非線形光学効果と呼ぶ[27,28]。この非線形光学効果は、光強度が大きい場合に顕著に現れる。ここでは、その例として第 2 次高調波発生(second harmonic generation、SHG)及び、第 3 次高調波発生(third harmonic generation、THG)について考える。SHG 及び THG は、同じ周波数の光電場に対する非線形光学効果によって、それぞれ入射光電場の 2 倍と 3 倍の周波数の光電場が発生する現象である。

まず、周波数 ω_0 で振動する光電場を、

$$E(t) = E_0 \exp(-i\omega_0 t) + \text{c.c.} \quad (1-6)$$

で表す。ここで、c.c.はそれ以前の全ての項の複素共役を表す。分極が電場に対して瞬時に応答し、かつその応答がわずかな非線形性を有しているとする、分極は以下の式のように表される。

$$\begin{aligned} P(t) &= \varepsilon_0 (\chi^{(1)} E(t) + \chi^{(2)} E^2(t) + \chi^{(3)} E^3(t) + \dots) \\ &= P_1(t) + P_2(t) + P_3(t) + \dots \end{aligned} \quad (1-7)$$

ここで、 $\chi^{(1)}$ を線形感受率、 $P_1(t)$ を線形分極と呼ぶ。そして、 $\chi^{(2)}$ 、 $\chi^{(3)}$ をそれぞれ 2 次と 3 次の非線形感受率、 $P_2(t)$ 、 $P_3(t)$ を 2 次と 3 次の非線形分極と呼ぶ。物質によって一桁程度の差はあるが、 $\chi^{(2)}$ が $\chi^{(1)}$ の 10^{-12} 倍、 $\chi^{(3)}$ では $\chi^{(1)}$ の 10^{-24} 倍の大きさである。したがって、光パルスのような高強度の光電場の領域でのみ非線形な効果が現れることが分かる。ここで、式(1-7)右辺の第 2 項が 2 次の非線形分極に相当し、

$$P_2(t) = \varepsilon_0 \chi^{(2)} E^2(t) = \varepsilon_0 \chi^{(2)} \{2|E_0|^2 + E_0^2 \exp(-2i\omega_0 t) + \text{c.c.}\} \quad (1-8)$$

で表される。第 2 項から、 $\chi^{(2)}$ を係数とした入射光の 2 倍の周波数の光、すなわち SHG が発生することが分かる。また、この式の第 1 項はただの直流成分と考えることができ、振動しない成分であるので光電場の放射にはかかわらない。

つづいて、THG について述べる。THG は 3 次の非線形光学効果であり、3 次の非線形分極に起因する。SHG の例と同様に考えると、式(1-7)右辺の第 3 項が 3 次の非線形分極に相当し、

$$P_3(t) = \epsilon_0 \chi^{(3)} E^3(t) = \epsilon_0 \chi^{(3)} \{E_0^3 \exp(-3i\omega_0 t) + 3|E_0|^2 E_0 \exp(-i\omega_0 t) + \text{c. c.}\} \quad (1-9)$$

で表される。第 1 項から $\chi^{(3)}$ を係数とした入射光の 3 倍波の THG が生じていることが分かる。

ここでは、同じ光電場に対して起こる非線形光学効果である SHG と THG について数式を用いて示した。一方で、異なる光電場同士でも非線形光学効果が生じる。そして、 ω_1 、 ω_2 、 ω_3 の 3 つの光電場によって起こる 3 次の非線形光学現象の結果、 $\omega_1 \pm \omega_2 \pm \omega_3$ の周波数の光が生じる現象を 4 光波混合と呼ぶ。実は THG もこの 4 光波混合過程の一種であり、 $\omega_1 = \omega_2 = \omega_3$ の場合を特に THG と呼んでいる。そして、第 2.3.2 項で詳しく説明する SRS を含む CRS も、この 4 光波混合過程によって生じる現象である。

2.2 非線形光学顕微鏡

非線形光学顕微鏡は、非線形光学効果を利用して得られる信号をもとに観察を行う顕微鏡であり、SRS 顕微鏡もこの非線形光学顕微鏡の 1 つである。一般に非線形光学顕微鏡は、超短光パルスレーザ、レンズ、検出器から構成される。レンズは集光点における非線形光学効果の効率を高めるために用いられ、対物レンズなどの開口数(NA)の高いものが一般的に用いられる。また、検出器には光検出器(PD)や光電子増倍管などが用いられる。

非線形光学顕微鏡の最も大きな特徴は、3 次元的に像のイメージングが行えるという点である。通常の光学顕微鏡では、試料の集光点から得られる信号光に加えて、集光点外の信号成分である背景光が混じることで、像の解像度やコントラストの低下が引き起こされている。一方で、非線形光学顕微鏡では、非線形光学効果が超短光パルスなどの高強度の光電場を持つ光に対して生じることを利用して、対物レンズの集光点からの信号のみを得ることができる。そして、集光点を走査することで高速な 2 次元のイメージングを行うことが可能となる。この集光点の走査には、ピエゾステージによって試料を走査する手法(図 2.2(a))とガルバノミラーあるいはレゾナントミラーを用いてレーザを走査する(図 2.2(b))手法が存在する。そしてさらに、試料面のピエゾステージを z 軸方向に動かすことで、高解像度の 3 次元イメージングが可能となる。非線形光学顕微鏡では、励起光と信号光の波長が異なる場合が多いため、検出器前のフィルタを用いることで、簡単に信号光を分離することが可能である。

また一方で、3 次元のイメージングが可能な顕微鏡として、共焦点顕微鏡が挙げられる[29]。この顕微鏡は検出器の前にピンホールを設置することで、焦点が合った点からの信号光のみを抽出することができる。ただし、共焦点顕微鏡では、集光点以外でも光の吸収による損傷を受けており、高強度の光を用いる際に注意する必要がある。一方で、非線形光学顕微鏡では、集光点で

起こる非線形光学効果は非常に低確率で起こる現象であり、光の吸収の発生を集光点のみに抑えることができる。そのため、集光点以外での試料への損傷が軽減することが見込まれる。

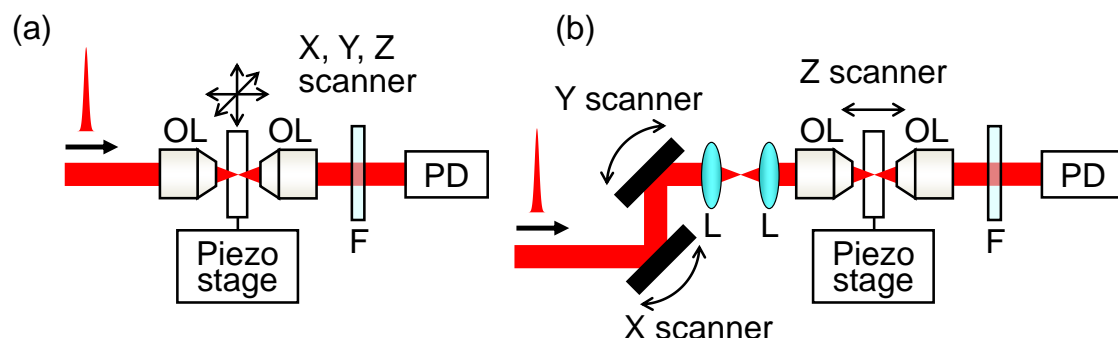


図 2.2 非線形光学顕微鏡の基本構成。(a): ステージ走査、(b): レーザ走査。OL: 対物レンズ、F: フィルタ、L: レンズ。試料を動かす必要がないため、レーザ走査の方が高速スキャンには有利である。レーザ走査ではビームの方向を変化させるので、ミラー位置と対物レンズを結像関係に保つレンズペアが必要である。

ここで、細胞イメージングに用いられる非線形光学顕微鏡の代表例を簡潔に紹介する[30]。第 2.1.2 項で述べた非線形光学効果を利用した顕微鏡として、SHG 顕微鏡と THG 顕微鏡がある。SHG 顕微鏡は SHG 光が 2 次の非線形感受率に由来するため中心対称性のある物質からは発生しないことを利用して、異方性のある物質を可視化することができる。また、THG 顕微鏡は、均質な正常分散媒質からは THG 光が発生しないことを利用して、屈折率の差による構造の分布を可視化することができる。また、物質の電子状態を可視化する手法として 2 光子励起蛍光顕微鏡が挙げられる。この 2 光子励起蛍光顕微鏡では、蛍光の電子励起を超短光パルスによって誘起することで高コントラストの像を得ることができる。

そして、物質の分子振動を可視化することができる顕微鏡として、SRS 顕微鏡やコヒーレント反ストークスラマン散乱(CARS)顕微鏡がある。これらの顕微鏡は、次節で説明するラマン散乱という現象を利用した顕微鏡の一種でもある。

2.3 ラマン散乱

ラマン散乱は、分子固有の振動エネルギー状態を反映した作用が入射光へ与えられた結果として生じる。本節では、このラマン散乱を自発ラマン散乱と、SRS を含むコヒーレントラマン散乱(CRS)の2種類に分けて説明する[10,31-33]。

2.3.1 自発ラマン散乱

単一の周波数を持つ励起光が物質に入射すると、その一部の光が散乱される。その散乱光の大部分は、励起光と同じ周波数で散乱されたレーリー散乱光であるが、それとは別に物質内の分子振動によって変調された、励起光とは異なる周波数を持つ光が含まれる。この散乱光のことを、発見した研究者の名前にちなんでラマン散乱光と呼ぶ。ラマン散乱光は極めて微弱であり、レーリー散乱光と比較してせいぜい 10^{-6} 程度の強度である。一般的に、このような通常のラマン散乱を自発ラマン散乱と呼び、非線形光学効果の結果生じる CRS と区別する。ここでは特に自発ラマン散乱について述べる。

ラマン散乱は分子振動によって分子自身の分極率が変化することが理由で起こる現象である。そこで、分子がある基準振動にしたがって分極率を変化させると考えて、この基準振動における分子の座標の変位を $q(t)$ とする。すると、分子の分極率 $\alpha(t)$ は、テーラー級数を用いて1次の項まで展開して、

$$\alpha(t) = \alpha_0 + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q(t) \quad (1-10)$$

と表される。ここで、右辺第1項の α_0 は平衡位置において物質が持つ一様な分極率成分を意味し、右辺第2項は $q(t)$ に依存した線形な分極率成分であることを意味する。また、 $q(t)$ がある分子振動数 ω_R によって振動していると考え、

$$q(t) = q_0 \exp(-i\omega_R t) + \text{c. c.} \quad (1-11)$$

と表すことができる。したがって、式(1-10)、(1-11)から、分極率が ω_R で振動することが分かる。また、 $(\partial\alpha/\partial q)_0$ の成分をラマン分極率と呼ぶ。ラマン分極率は、分子振動のパターンによって大きく変わり、ラマン分極率が0になるものをラマン不活性、それ以外のものをラマン活性と呼ぶ。

図 2.3 に自発ラマン散乱光の強度スペクトルを模式的に示す。入射光の周波数を ω_0 、ある分子の振動数を ω_R とすると、式(1-3)、(1-6)、(1-10)、(1-11)から、双極子モーメント p_R は、

$$p_R = \varepsilon_0 \alpha_0 E_0 \exp(-i\omega_0 t) + \varepsilon_0 \alpha_1^* E_0 \exp\{-i(\omega_0 - \omega_R)t\} + \varepsilon_0 \alpha_1 E_0 \exp\{-i(\omega_0 + \omega_R)t\} + \text{c. c.} \quad (1-12)$$

と表せる。ここで、

$$\alpha_1 = \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q_0 \quad (1-13)$$

とした。この p_R から放出される電磁波が散乱光に該当する。したがって、式(1-12)の右辺第1項が ω_0 の周波数を持つレーリー散乱光、第2項が $\omega_0 - \omega_R$ の周波数を持つストークス散乱光、第3

項が $\omega_0 + \omega_R$ の成分をアンチストークス散乱光である。このストークス散乱光とアンチストークス散乱光を併せてラマン散乱光と呼ぶ。前者は光子が分子振動数分のエネルギーを分子に与え、後者は逆に光子が分子からエネルギーを吸収した結果生じていると考えることができる。また、一般的にアンチストークス散乱光に比べてストークス散乱光の方が強度は大きい。これは、常温では励起状態の分子よりも基底状態の分子の方が多く存在しているため、光子が分子からエネルギーを受け取る確率よりも分子にエネルギーを与える確率が大きいことに起因している。

分子振動数 ω_R はラマン散乱によってシフトするエネルギー量に対応していることからラマンシフトとも呼ばれる。ラマンシフトは物質に固有であり、物質の種々の振動状態に対応するエネルギー順位に関係づけられる量である。ラマンシフトを横軸とし、ラマン散乱光の強度を縦軸としたものをラマンスペクトルと呼ぶ。図 2.4 に有機物のラマンスペクトルを示す[34]。この図からも、ラマンスペクトルは分子振動を反映していることが分かる。ラマン分光ではこのラマンスペクトルを利用することで、無染色、無標識の生体分子を識別している。

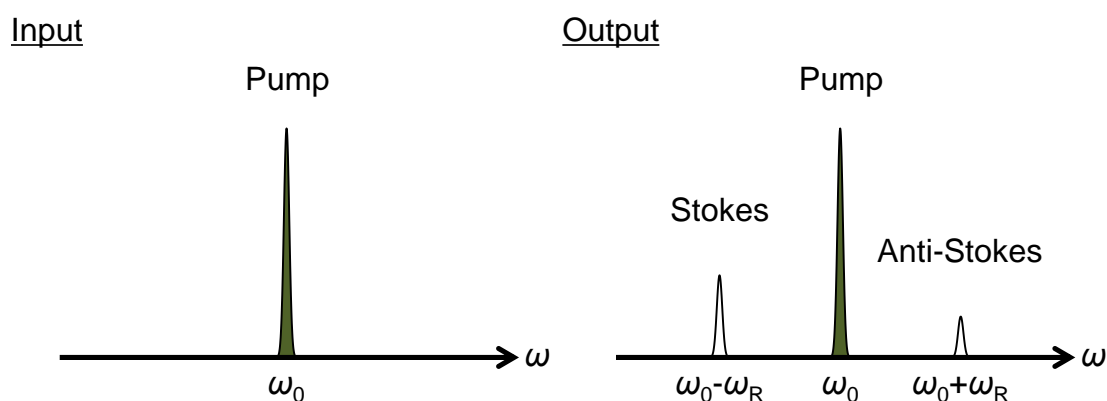


図 2.3 自発ラマン散乱による光周波数のシフト。

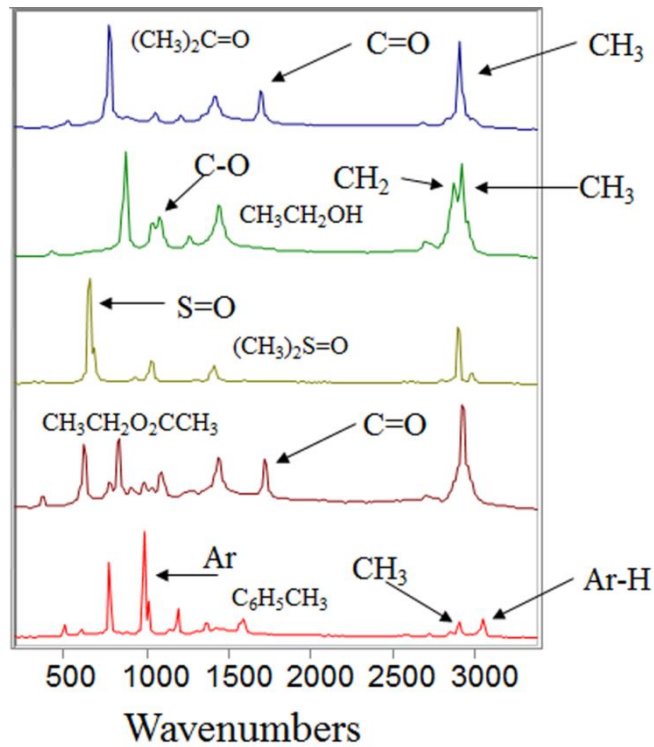


図 2.4.5 種の有機物（上から順に、アセトン、エタノール、ジメチルスルホキシド、エチルアセテート、トルエン）のラマンスペクトル。[34]より引用。

2.3.2 コヒーレントラマン散乱

コヒーレントラマン散乱(CRS)は、3次の非線形光学効果である4光波混合過程の一種であり、自発ラマン散乱と同様に分子振動を反映して発生する。自発ラマン散乱と異なる点は、非線形光学効果を誘起するために超短光パルスを用いる点と、2波長の励起光の差周波によって分子を振動させている点である。自然ラマン散乱では、熱などにより分子振動が生じているため、分子毎の振動の位相が揃わず、結果として、散乱光の位相も揃わないため信号強度が小さい。一方で、CRSでは、2色の励起パルスの差周波を分子振動周波数に一致させて分子を強制的に振動させるため、共鳴現象によって、コヒーレントな非常に強い信号が発生する。

CRSが発生する様子を図 2.5 に示す。CRSへの2色の入射光パルスはポンプ光とストークス光と呼ばれ、それぞれ ω_p と ω_s ($\omega_p > \omega_s$)の周波数で表される。このそれぞれ入射光電場を以下の式で表す。

$$E_p(t) = A_p \exp(-i\omega_p t) + c.c. \quad (1-14)$$

$$E_s(t) = A_s \exp(-i\omega_s t) + c.c. \quad (1-15)$$

この2つの励起光を重ね合わせて分子に入射した結果生じる分極 $P(t)$ は、 $2\omega_p$ 、 $2\omega_s$ 、 0 、 $\omega_p + \omega_s$ 、 $\omega_p - \omega_s$ の周波数成分を持つ。このうち、差周波 $\omega_p - \omega_s$ で振動する光強度成分は、

$$2\text{Re}[A_p A_s \exp\{-i(\omega_p - \omega_s)t\}] \quad (1-16)$$

となる。したがって、差周波を特定の分子振動 ω_R に一致させることで共鳴が生じ、その分極波によって CRS が発生する。コヒーレント反ストークスラマン散乱(CARS)は、 ω_p に ω_R の変調がかかった結果として、 $\omega_p + \omega_R = 2\omega_p - \omega_S$ の周波数で発生する。同様に、コヒーレントストークスラマン散乱(CSRS)は ω_S のパルスに ω_R の変調がかかった結果として、 $\omega_S - \omega_R = 2\omega_S - \omega_p$ の周波数で発生する。また、同様の周波数変調の結果、 ω_p の光強度が小さくなる効果を誘導ラマン損失(SRL)、 ω_S の光強度が大きくなる効果を(SRG)と呼び、この強度変化を併せて誘導ラマン散乱(SRS)と呼ぶ。なお、CARS と CSRS は類似した現象であり、したがって考え方も酷似しているため、今後の説明においては基本的に CARS のみの言及を行う。

つづいて、CRS から得られるスペクトル強度について述べる。先程と同様に、分子の分極率が差周波 $\omega_p - \omega_S$ で変調を受けている場合を考える。ここに、周波数 ω_3 を持つ新たな光電場が入射したとすると、光電場の 3 次に比例する周波数 $\omega_{AS} \equiv \omega_3 + (\omega_p - \omega_S)$ の成分の分極が与えられる。そして、その分極成分から 3 次の非線形感受率 $\chi_m^{(3)}$ は次の式で表される [10]。

$$\chi_m^{(3)} \propto \frac{1}{\omega_R^2 - (\omega_p - \omega_S)^2 - 2i(\omega_p - \omega_S)\Gamma} \quad (1-17)$$

ここで、 Γ は分子振動の減衰定数である。図 2.6 に横軸を差周波とした時の $\chi_m^{(3)}$ の実部と虚部のグラフを示す。また一方で、電子状態の非線形な応答などによって生じる成分も、3 次の非線形感受率に寄与する。この成分を $\chi_e^{(3)}$ とすると、物質全体の 3 次の非線形感受率 $\chi^{(3)}$ は、 $\chi^{(3)} = \chi_m^{(3)} + \chi_e^{(3)}$ となる。ところで、CRS の場合は式(1-17)における分極が、新たな光電場 ω_3 に対してではなく、すでに入射している ω_p や ω_S の光電場に対して生じている。したがって、CARS は $E_p(t)$ 、 $E_p(t)$ 、 $E_S(t)$ 、の 3 つの光電場によって作られた分極によって生じていると考えることができる。また、CRS は $\omega_R = \omega_p - \omega_S$ の場合に起こるので、この時、式(1-17)は、

$$\chi_m^{(3)} \propto \frac{1}{\omega_R - (\omega_p - \omega_S) - i\Gamma} \quad (1-18)$$

と近似できる。そして ω_p と ω_S の周波数を持つ光の光強度をそれぞれ I_p 、 I_S とすると、CARS の信号強度 I_{CARS} は以下の式で表される。

$$I_{CARS} \propto |\chi^{(3)}|^2 I_p^2 I_S \quad (1-19)$$

この式から、CARS 信号が $\chi^{(3)}$ の絶対値の 2 乗に比例するため、CARS 信号には分子振動を反映している $\chi_m^{(3)}$ だけではなく、電子由来の信号である $\chi_e^{(3)}$ も寄与することが分かる。そして、この $\chi_e^{(3)}$ が非共鳴信号として CARS 信号に重畳する。非共鳴信号は、CARS 信号のコントラストを低下させる要因となり、ラマンスペクトルを歪ませる原因にもなる。

一方で、SRS は元の光電場に分極由来の電場が重畳することになる。SRS 信号では元の光強度に対して発生する分極成分が非常に小さい。そして、分極由来の電場の位相は、分極振動の位相に対して 90 度遅れることが知られている。そのため、結果的に $\chi^{(3)}$ の虚部に比例して、光電場の振幅変調が生じる。したがって、SRS の信号強度 I_{SRS} は以下の式で表される。

$$I_{SRS} \propto \text{Im}\chi^{(3)} I_p I_S \quad (1-20)$$

ここで、非共鳴信号である電子応答は $\chi^{(3)}$ の実部にのみ起因するため、 $\chi^{(3)}$ の虚部に比例する SRS 信号は非共鳴信号によるスペクトル歪みの影響を受けない。この非共鳴信号の有無が、CARS 顕微鏡に対して SRS 顕微鏡が有力である理由の 1 つと言える。

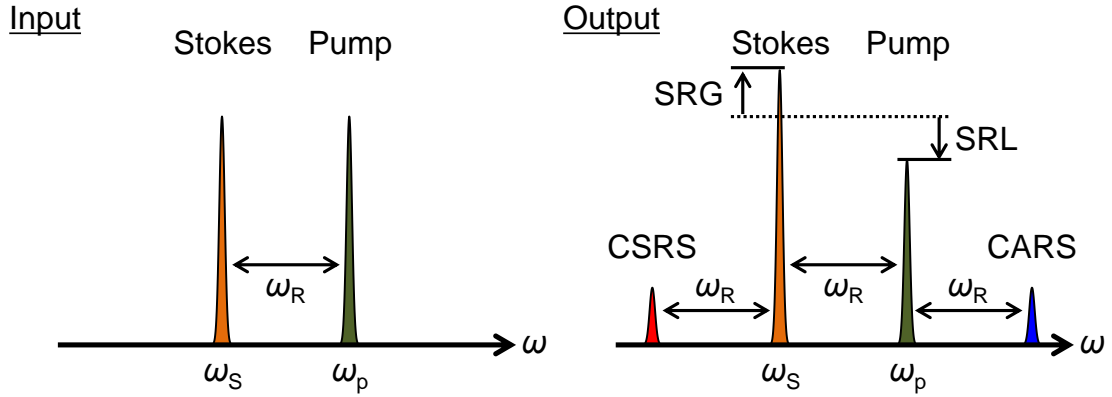


図 2.5 CRS による周波数シフト。CSRS: コヒーレントストークスラマン散乱、CARS: コヒーレント反ストークスラマン散乱、SRG: 誘導ラマン利得、SRL: 誘導ラマン損失。SRG と SRL を併せて誘導ラマン散乱 (SRS) と呼ぶ。

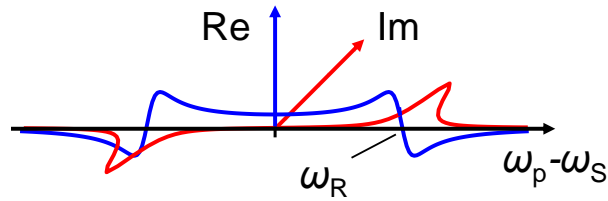


図 2.6 $\chi_m^{(3)}$ の実部と虚部の周波数依存性。

最後に、CRS の発生過程が、入射光に対する屈折率の時間変動による位相変調の結果生じているという考え方から CRS の理解を深める。まず、CRS における核間距離の変位量 $q(t)$ は、

$$q(t) \propto \text{Re}\chi^{(3)} \cos\{(\omega_p - \omega_s)t\} + \text{Im}\chi^{(3)} \sin\{(\omega_p - \omega_s)t\} \quad (1-21)$$

と表される。この式より、分子振動における $\chi^{(3)}$ の実部は同じ位相で変位に寄与し、 $\chi^{(3)}$ の虚部は 90 度ずれた位相で変位に寄与することが分かる。また、式(1-10)より、ラマン散乱では分極率 $\alpha(t)$ が $q(t)$ に対して変化する。そして、分極率 $\alpha(t)$ と屈折率 $n(t)$ との間には、

$$n(t) = \sqrt{1 + N\alpha(t)} \quad (1-22)$$

の関係がある。この式から、分極によって屈折率も時間変動することが分かる。さらに屈折率と光の位相変調量 $\phi(t)$ は、

$$\phi(t) = \frac{2\pi}{\lambda} n(t)L \quad (1-23)$$

の関係式で表される。ここで、 λ は波長、 L は伝搬距離を示す。したがって、分極の時間変動によって位相変調が時間変動することが分かる。位相の時間変化 $\exp\{i\phi(t)\}$ は $\phi(t)$ が小さい時、

$$\exp\{i\phi(t)\} \sim 1 + i\phi(t) \quad (1-24)$$

と近似できる。したがってこの $i\phi(t)$ は、

$$i\phi(t) \propto iq \propto i\text{Re}\chi^{(3)} \cos\{(\omega_p - \omega_s)t\} + i\text{Im}\chi^{(3)} \sin\{(\omega_p - \omega_s)t\} \quad (1-25)$$

と表せる。したがって、励起光が位相変調された結果生じる電場 $E_{\text{out}}(t)$ は、

$$E_{\text{out}}(t) = \{E_p(t) + E_s(t)\} \exp\{i\phi(t)\} \quad (1-26)$$

で与えられる。この式を周波数領域で考えると、

$$\tilde{E}_{\text{out}}(\omega) = \{\tilde{E}_p(\omega) + \tilde{E}_s(\omega)\} \otimes \exp\{i\tilde{\phi}(\omega)\} \quad (1-27)$$

となる。この $\exp\{i\tilde{\phi}(\omega)\}$ が位相変調スペクトルに対応している。図 2.7 に屈折率変調の考え方を示した CRS 発生概念図を示す。励起光が位相変調によって畳み込まれた結果、SRS や CARS が発生していることが分かる。このようにして、分子振動を起源とする位相変調の考え方から CRS が発生する様子を示した。

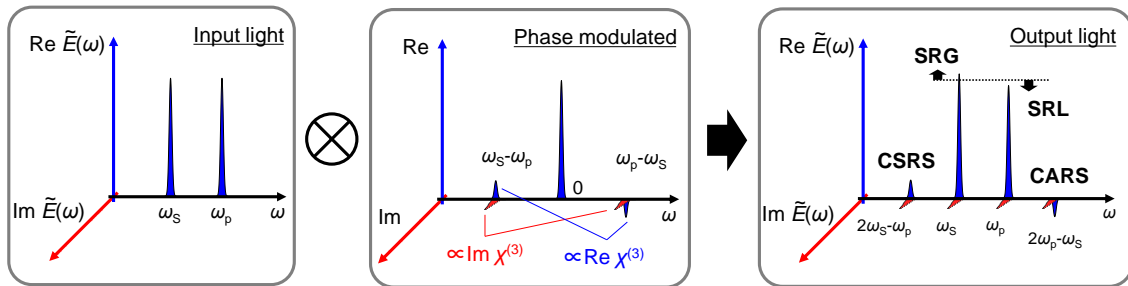


図 2.7 屈折率変調の考え方を示した CRS 発生概念図。入射光のスペクトルと分子振動による位相変調スペクトルの畳み込みの結果、射出光として CRS が発生している。

2.4 ラマン散乱顕微法の比較

本節では、前節において述べたことを踏まえ、ラマン散乱効果を用いた顕微法である自発ラマン散乱顕微法、CARS 顕微法、SRS 顕微法の比較を行う。

表 2.1 に 3 種類のラマン散乱顕微法の比較の表を示す。まず、3 つの手法は全て分子振動由来の信号を検出する方法であり、無染色イメージングが行えるという利点がある。しかし、自発ラマン散乱顕微法は自然放出に由来するインコヒーレントな効果に由来した信号を検出するため、超短光パルスによるコヒーレントな分子振動励起を用いている CARS 顕微法及び SRS 顕微法に比べて信号強度が非常に小さい。そのため、自発ラマン散乱顕微法においては、像の十分な SNR を確保するために長時間の信号取得を行わなければならないという課題を持つ。さらに、蛍光を発生する物質が試料中に含まれている場合、ラマン散乱光を検出することは難しい[33]。

CARS 顕微法では 2 波長の超短光パルスを用いて特定の分子を強制振動させることで、強い CARS 信号を得ることができる。また、蛍光は励起光よりも長波長で発生するため、励起光よりも高周波となる CARS 信号の取得では蛍光の混入も低減することができる。しかし、CARS 信号

には、分子振動に依存しない電子応答由来の非共鳴信号が付随するため、コントラストの低下やスペクトルが歪むという課題も残されている。

これに対して、SRS 信号では非共鳴信号が発生せず、ショット雑音限界においては CARS 顕微鏡と同等の高感性が示されている[7]。SRS 信号は励起光の波長で生じるため、CARS 顕微鏡と同様に蛍光の混入も起こらない。したがって、SRS 顕微鏡は自発ラマン散乱顕微鏡と CARS 顕微鏡の特長を併せ持つ有力な手法と言える。

表 2.1 ラマン散乱顕微鏡の比較。

Microscopy	Sensitivity	Non-resonant signal	Fluorescent interfusion
Spontaneous Raman	△	○	×
CARS	○	×	△
SRS	○	○	○

2.5 SRS 顕微鏡システム

本節では、SRS 顕微鏡を用いてイメージングを行う際のシステムについて説明する。はじめに SRS 顕微鏡の基本的な構成とその検出法について説明する。つづいて、我々のシステムに特徴的な高調波同期光源システムについて述べる。

2.5.1 基本的な SRS 顕微鏡の構成

SRS 顕微鏡は非線形光学効果を利用した顕微鏡である。そのため、光源には短パルスレーザーが不可欠となる。また、SNR 向上のために、パルス幅よりも充分短い時間精度での同期が必要となる。また、分光を行う場合、一方の光源は広帯域あるいは、波長可変性をもつ必要がある。SRS 顕微鏡を用いた高速イメージングと分光イメージングにはトレードオフの関係が存在するため、用途によって使い分ける必要がある。

SRS 顕微鏡の原理模式図を図 2.8 に示す。ここでは 3 次元イメージングを行うためにレーザスキャニングを用いる場合を示している。SRS 信号光は励起光と同じ波長で発生するため、その信号光を励起光と分けるための仕組みが必要となる。そこで、まず光周波数 ω_p 及び ω_s ($\omega_p > \omega_s$) を有する 2 色の光パルス的一方 ω_s に変調周波数 f_m の強度変調をかける。つづいて、ミラーとダイクロイックミラー(DM)を用いて光軸を合わせた後に、対物レンズを通して試料に集光する。試料の分子振動数 ω_R が 2 色の光パルスの差周波に等しい時に SRS が生じる。SRS が生じると、2 色の光パルスの内の高周波側 ω_p のエネルギーが、低周波側 ω_s にシフトする。この SRS により、

ω_s の光の強度変調が ω_p の光に転写される。そして、 ω_s の光を低域通過フィルタで除去した後に、 ω_p の光に転写された強度変調を、 ω_s 側の強度変調に用いた周波数 f_m を参照信号としてロックインアンプ(LIA)で検出することで、各集光点での SRS 信号を取得することができる。

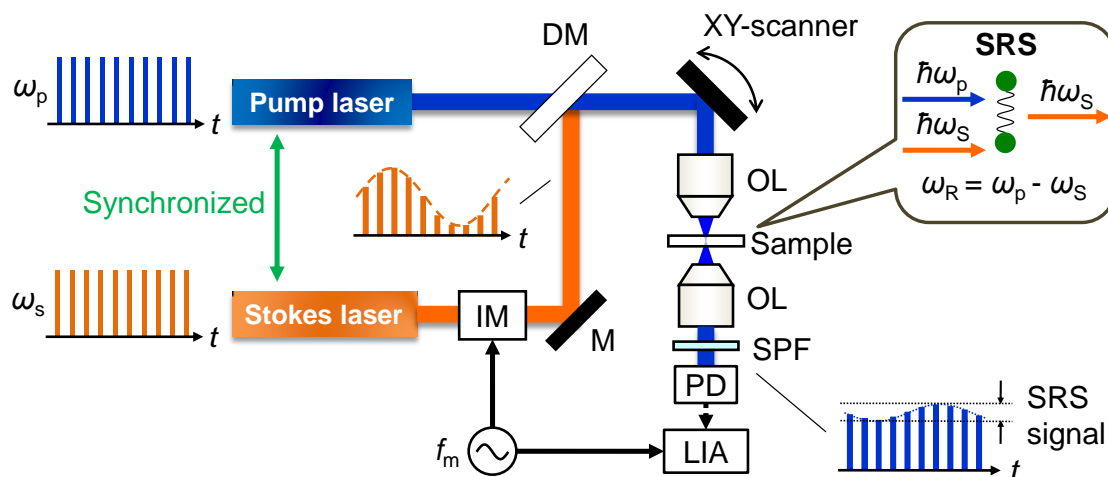


図 2.8 SRS 顕微鏡の原理模式図。IM: 強度変調器、M: ミラー、DM: ダイクロイックミラー、OL: 対物レンズ、SPF: 低域通過フィルタ、PD: 光受光器、LIA: ロックインアンプ。

2.5.2 SRS 信号の検出

SRS 信号を検出する手法として、透過型検出と反射型検出の 2 種類の検出方法がある。透過型検出は図 2.9(a)に示すように、試料に 2 色の光パルスを入射させ、透過してきた光パルスから SRS 信号を検出する方法である。一方の対物レンズを通して試料に集光された 2 色の光パルスは、そのまま直進していき、もう一方の対物レンズを透過する。SRS 信号が転写されたポンプパルスを取得するために、フィルタを通してストークス光の光パルスを遮断する。その後、ポンプパルスは LIA に入力されることで SRS 信号を検出する。透過型検出は試料の厚さが 100 μm 程度でなければならないが、対物レンズへの入射光の大部分が透過光として LIA に入力されるため、SRS の信号強度も高く、したがって得られる像のコントラストが良い。

一方、反射型検出は図 2.9(b)に示すように、2 色の光パルスを試料に入射させた後の後方散乱光から SRS 信号を取得する方法である。試料からの後方散乱光パルスは入射してきた対物レンズを通して反射され、入射してきた光路とほぼ同じ光路を辿って戻っていく。この時、対物レンズの前に偏光ビームスプリッタ(PBS)と 4 分の 1 波長板(QWP)を挿入することで、再び PBS を通過する際の後方散乱光の偏光を入射光と 90 度異なる状態にすることができる。その結果、PBS によって後方散乱光は反射され、入射光と別の光路へと誘導することができる。このようにして光路を分ける機構を用いることで、後方散乱光のみの SRS 信号を検出することができる。反射型検出は、散乱光を信号として取得するため SNR が透過型検出に比べて 10 dB ほど小さく、試料の表面 100 μm 程度しかイメージングできないが、試料の厚さに対する制限がない。対象の厚さに対する制限がないことは生体をそのままの状態を観察する際には非常に重要となる。

このように、SRS 顕微鏡は対象の試料に応じて検出法を使い分けることが可能である。

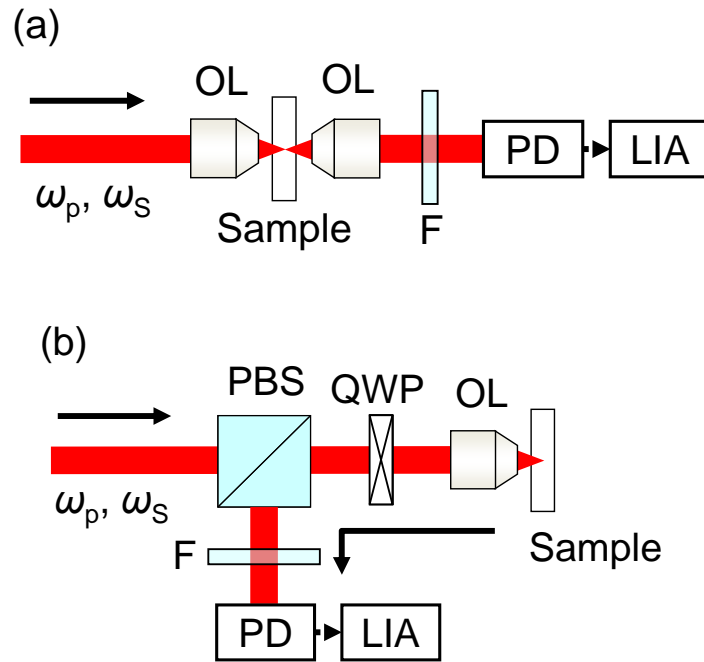


図 2.9 SRS 信号の取得方法。(a): 透過型。(b): 反射型。

2.5.3 高調波同期光源

図 2.10 及び図 2.11 に我々が報告を行った SRS 分光顕微鏡の光学系の概略図及び全体像を示す [35]。2 色のパルス光源には、繰り返し周波数 76 MHz、中心波長 790 nm、パルス幅 4 ps のチタンサファイアレーザ(TSL, Coherent 社, Mira900)と、繰り返し周波数 38 MHz、中心波長 1030 nm、波長帯域約 30 nm の Yb 添加ファイバレーザ(Yb-FL)を用いている。

2 色のレーザーパルスのタイミングを同期させるために、PBS を用いて両光源の一部を 2 光子吸収 PD に入射させる。PD からの光電流によって 2 色のパルスのタイミング差を検出し、これが一定となるように制御回路によるフィードバックを用いて Yb-FL の繰り返し周波数の制御を行っている。また、合波したレーザービームを周波数 8 kHz のレゾナントスキャナで水平方向に、30 Hz のノコギリ波信号で駆動されたガルバノスキャナで垂直方向にスキャンすることで 2 次元のビームスキャンを行っている。スキャンされたビームは 2 枚のレンズペアによって一旦拡大されて、対物レンズに挿入される。対物レンズは 60 倍の倍率で、NA が 1.2 の水浸タイプを使用している。試料を乗せたステージはピエゾステージになっており、集光点でのみ SRS が生じることを利用して、試料位置の精密な制御による 3 次元イメージングが可能となっている。試料内の集光点で高速に走査されることで、30 fps の高速なイメージングを実現しており、同時に、試料の一点に長時間光が当てられることが試料へのダメージを防いでいる。

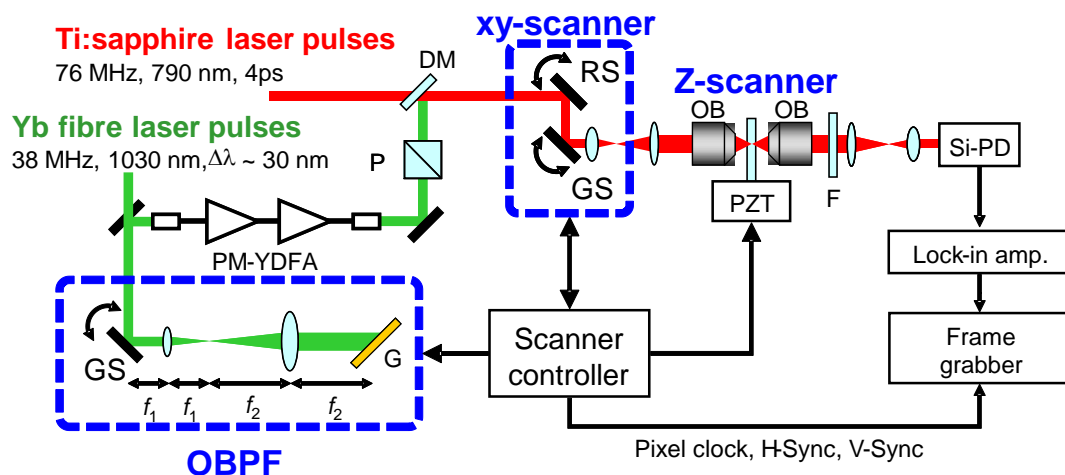


図 2.10 SRS 分光顕微鏡の実験系。G: グレーティング、DM: ダイクロイックミラー、RS: レゾナントスキャナ、GS: ガルバノスキャナ、PZT: ピエゾステージ。

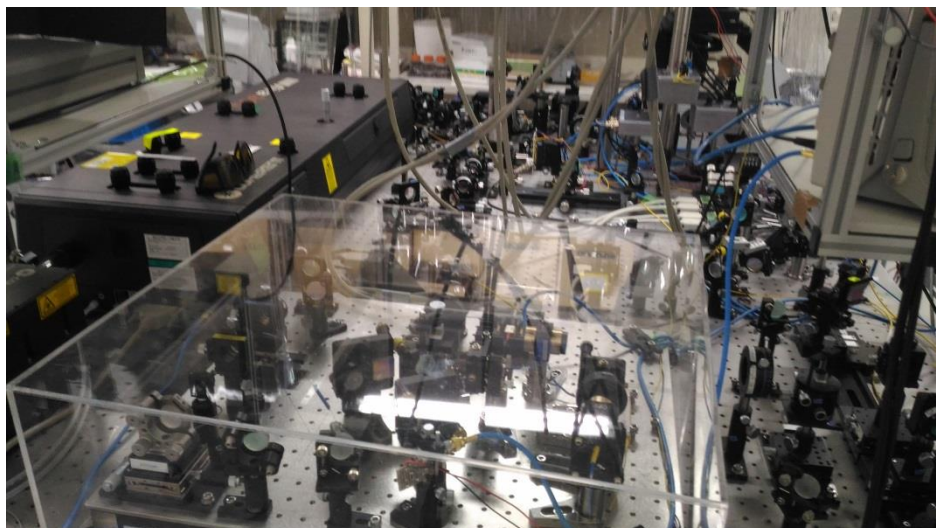


図 2.11 SRS 分光顕微鏡の光源部周辺の画像。画像手前アクリルケース内が Yb-FL、画像左奥が TSL。

つづいて、我々の SRS 顕微鏡システムにおいて特徴的な高調波同期光源について説明を行う [15]。2.5.1 項で示したように、SRS 信号を取得するためには一方の光源に強度変調を行う必要がある。この時、光パルスの繰り返し周波数を f_{rep} とすると、強度変調周波数の上限は繰り返し周波数の半分の $f_{\text{rep}}/2$ であることが分かる(図 2.12(a))。さらにこの強度変調がオンオフ変調である場合に最大効率で SRS 信号を取得できる。これはすなわち $f_{\text{rep}}/2$ の繰り返し周波数の光源を用いることと同義である(図 2.12(b))。このように一方の光源に対して分周された繰り返し周波数を持つ光源で同期された光源を高調波同期光源と呼ぶ。高調波同期光源では変調器を用いずにロックイン検出を最大まで高周波化することができるという大きな利点を持つ。

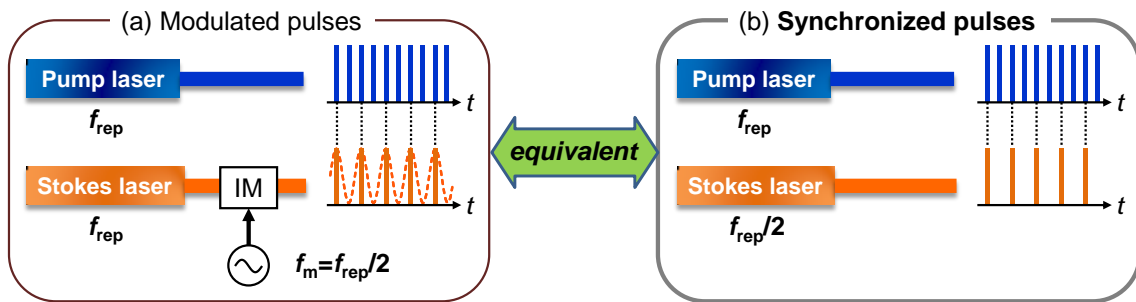


図 2.12 励起光の強度変調の高周波化。(a) $f_{\text{rep}}/2$ の強度変調。(b)高調波同期光源。

本章で述べてきたように、SRS 顕微鏡は生体イメージングにおいて様々な利点を有する一方で、実用化のためには改善の余地があることが分かる。その中でも、図 2.11 にも示されているように、光源の小型化は大きな重要性を占めていることが分かる。次章では、従来の光源に変わる光源として、利得スイッチング駆動半導体レーザを提案し、その説明を行う。

第3章 利得スイッチング駆動半導体レーザー(GS-LD)

利得スイッチング駆動半導体レーザー(GS-LD)は LD 内の活性層にパルス状の電流を注入することで、LD から直接ピコ秒の光パルスを出力する方式を用いたレーザーのことである。本章では GS-LD による超短光パルス生成の原理を示す。つづいて、モード同期方式と Q スwitching 方式による光パルス生成の方式を説明し、SRS 顕微鏡へ適用する際の利点と欠点を比較する。

3.1 GS-LD の原理

図 3.1 に一般的なファブリーペロー型 LD(FP-LD)の構造を示す[36]。電極に外部から電流が流れることで、クラッド層から活性層へキャリアが流入される。活性層は共振器の役割も果たしており、この場合活性層の劈開面によって共振器のミラーが形成される。また、活性層の屈折率をクラッド層よりも高くしておくことで、共振器内に効率よく再結合された光を閉じ込めることができる。そして、キャリア密度が十分たまることでレーザー発振が起こり、CW 光が出力される。この FP-LD から発生する CW 光の発振周波数は、光が共振器を 1 周したときに位相回転が 2π の整数倍となる場合に限定される。これに加えて、レーザー材料が持つ利得スペクトルが存在するので、図 3.2(a)に示すように、利得が損失を上回る有限個のモードでのみ発振が起こる。FP-LD は一定以上の注入電流を与えることで、いくつかのモードで発振するため、高強度の単一周波数のレーザー発振には不向きである。

一方、分布帰還型(distributed feedback、DFB)LD は単一周波数のみで発振することができる LD である。DFB-LD は活性層とクラッド層の間に屈折率の周期的な変動を持たせている。この回折格子によって、図 3.2(b)に示すように、単一の波長で発振させる波長選択性が得られる。

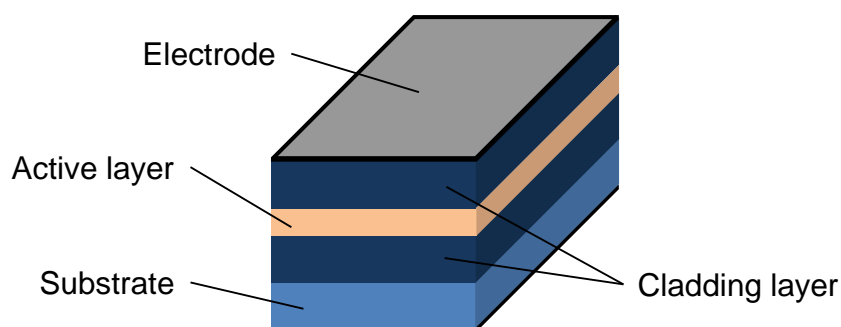


図 3.1 一般的な LD の構造。

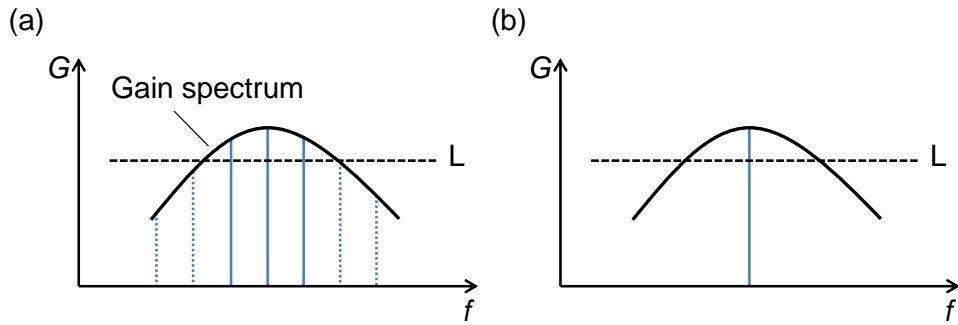


図 3.2 LD 媒質の利得スペクトルと共振モード。(a) FP-LD、(b) DFB-LD。L: 損失。

GS-LD では光パルスを出力させるために、LD に対してパルス状の電流を流す。注入するパルスには電気パルスと光パルスを注入する手法があるが、ここでは一般的な電気パルスを注入する手法について説明を行う。

図 3.3 に利得スイッチング駆動時のキャリア密度と光子密度の時間応答を示す。まず、LD の電極にある程度の幅を持ったパルス状の電流を流す。そうすることで基板内のクラッド層から活性層にキャリアが蓄積されていくが、キャリア密度の発振閾値 n_{th} に到達するまでには一定の時間遅延 τ_d が存在する。また、発振閾値に到達した瞬間にレーザ発振が開始されるわけではなく、自然放出光から立ち上がるまでの時間もわずかに存在する。こうしてキャリアが発振閾値よりも過分に蓄積された状態で誘導放出が起こることで、急峻な立ち上がりの光が得られる。ここで、レーザ発振をキャリアや光子の挙動を記述するレート方程式を用いて、この時間遅延 τ_d を求める[36]。

$$\frac{dn}{dt} = \frac{J}{q} - \frac{n}{\tau_s} - A(N_2 - N_1)s + f_n \quad (3-1)$$

$$\frac{ds}{dt} = A(N_2 - N_1)s + AN_2 - \frac{s}{\tau_p} + f_s \quad (3-2)$$

ここで、 n 、 s はそれぞれキャリア密度及び光子密度、 J は注入電流密度、 q は電荷である。式(3-1) 右辺の第 1 項目が注入電流の強度に対応する。また、 N_1 、 N_2 はそれぞれ基底準位、励起準位に存在している原子数、 A は増幅係数である。式(3-1)右辺第 3 項と下式右辺第 1 項は誘導放出による密度変化を示していることになる。 τ_s 、 τ_p はキャリアと光子の寿命時間であり、式(3-1)右辺第 2 項と式(3-2)右辺第 3 項は寿命時間に応じて再結合及び吸収する過程を表す。また、式(3-2)右辺第 2 項は自然放出に由来する項である。 f_n 及び f_s は雑音項を表す。このレート方程式において、雑音項を無視して、電流が J_1 から J_2 へ変化したと仮定する。すると、キャリア密度が発振閾値 n_{th} に到達するまでの時間遅延 τ_d が以下の様に求められる。

$$\tau_d = \tau_s \ln \left(\frac{J_2 - J_1}{J_2 - J_{th}} \right) \quad (3-3)$$

ここで、 J_{th} は閾値電流である。この時間遅延 τ_d によって、注入した電流パルスの幅よりも短い光パルスを得ることができる。この光パルスはキャリアを一気に消費して立ち上がるが、注入電

流の時間幅が長すぎる場合、残存したキャリアによって立ち下がった後に、再度パルスが立ち上がってしまう。この電流の時間幅を調整することで、光を再び立ち上がらせないようにすることが重要となる。

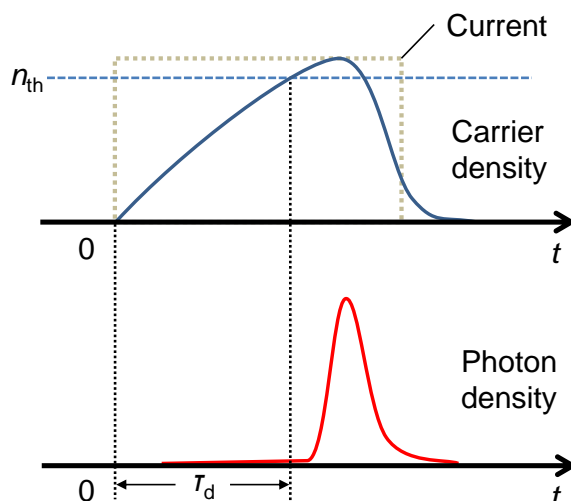


図 3.3 利得スイッチング駆動時のキャリア密度と光子密度の時間応答。 n_{th} :キャリア密度のレーザ発振閾値。

3.2 GS-LD パルスの短縮化

前節において、GS-LD における光パルス生成の原理を説明した。しかし一般的な LD からは、精々 20-100 ps の幅の光パルスしか得られない。近年、多重量子井戸構造の GS-LD に対して、高強度の電気パルス励起を行うことで、ピコ秒オーダーの光パルスを生成できることが報告されている[25]。本節では、LD の多重量子井戸構造及び高速強励起について述べ、GS-LD から超短光パルスが得られる原理を説明する。

GS-LD においては、パルス状の電流を活性層に注入することで、緩和振動周波数で制限される急激なキャリア密度の立ち上がりを実現できる。したがって、この緩和振動周波数が実質的な光のパルス幅を決定すると考えられる。図 3.4(a)に示すように、一般的な LD の活性層は、バルク構造と呼ばれる一様な材料から構成されている。この場合、電子のエネルギー分布を表す状態密度関数 $\rho(\epsilon)$ はエネルギー ϵ の 1/2 乗に比例して増大する。一方、図 3.4(b)に示すように、異なる材料を交互に積層させて得られる構造を量子井戸構造と呼ぶ[37]。この構造における利点は、電子を 1 次元方向に閉じ込めることができるため、状態密度関数が階段状となることである。その結果、バルク構造に比べて、発光特性の改善が見込まれる。その結果の 1 つとして、緩和振動周波数が高くなる効果がある。この緩和振動周波数 f_r は、

$$f_r = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{cgs}{n_r \tau_p}} \quad (3-4)$$

で与えられる[37]。ここで g は微分利得、 n_r は利得媒質の屈折率である。量子井戸構造では、この微分利得がバルク構造に比べて大きくなるため、 f_r が増大することが分かる。また量子井戸構

造を複数重ねた構造を多重量子井戸構造と呼ぶ。この量子井戸の数によっても f_r は影響を受け、 f_r を最大化するような量子井戸の数が存在する。これらのパラメータを最適化することで、緩和振動周波数の高い GS-LD を得ることができる。

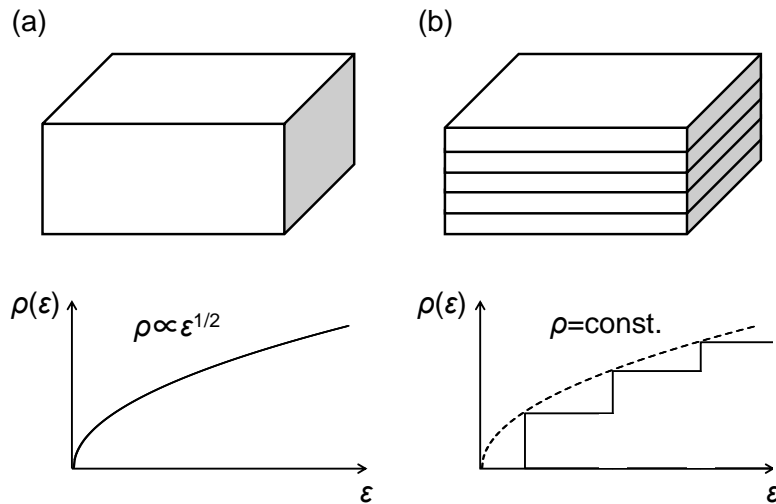


図 3.4 LD の活性層における(a) バルク構造と(b) 量子井戸構造の比較。

つづいて、電気パルス的高速強励起による、GS-LD パルスの短パルス化について述べる[24,38]。高速強励起を行うことで、高密度のキャリアが過渡的に生成される。その結果、図 3.5 に示すように、高速強励起下の GS-LD から出力された光パルスのスペクトルは、広い幅の短波部分と鋭いピークを持つ長波部分で構成される。これは活性層内のキャリア密度の増大に伴って、屈折率が低下して発振波長がシフトする効果に由来している。このことから、短波成分が本質的なパルス発生に寄与し、長波成分は緩和振動に伴う低利得由来の信号を構成していると考えられる。したがって、短波成分を適切な光フィルタなどを用いて抽出して、長波成分を除去することで、GS-LD パルスの短パルス化が達成される。

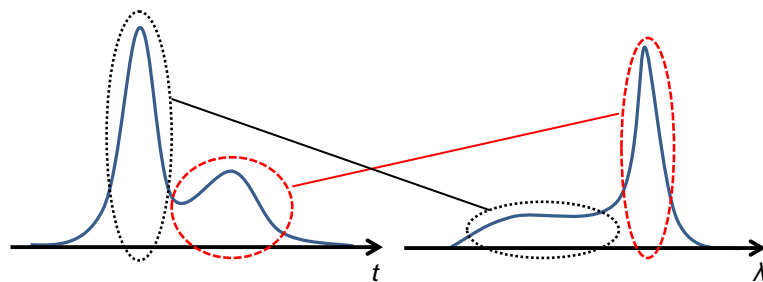


図 3.5 GS-LD パルスの時間波形とスペクトルの関係。

3.3 SRS 顕微鏡用光源としての LD のパルス発振方式の比較

パルス発振の基本的な方式として以下に挙げるモード同期、Q スイッチング、利得スイッチング駆動の 3 種類の方式が存在している。本節では LD を光源に用いた際のこれらの方式の特長を比較することで、LD をパルス光源として SRS 顕微鏡に応用する際の差異を明らかにする。

3.3.1 モード同期方式

図 3.6 に単一周波数(単一モード)の足し合わせによりパルスが生成される様子を示している。第 2.1.1 項でも触れたように、超短光パルスは多数の縦モードの重ね合わせによって表現されるため、これらの縦モード間の位相を揃えなければパルスが生成されない。この縦モード間隔の周波数で光共振器内の光に変調を加えることで縦モード間の位相を揃えることをモード同期と呼ぶ。

モード同期には、能動モード同期と受動モード同期の 2 つの手法がある。能動モード同期は、光共振器内に配置した変調器や、利得媒質への注入電流の直接変調を利用して、光を能動的に変調することでモード同期を行う手法である。一方で受動モード同期は、利得媒質自身の非線形性を利用して、自発的にモード同期を発生させる手法である。物質の持つ非線形性を利用している受動モード同期は、電気信号による変調を用いている能動モード同期に比べて、より短い幅の光パルスを発生させることが可能である。

モード同期レーザはその性質上、共振器長 L に応じて $2L/c$ (c : 光速)の間隔で光パルスが射出される。したがって、繰り返し周波数が $c/2L$ で固定される。SRS 顕微鏡への応用を考えた場合、共振器長で決定される繰り返し周波数は他方のパルス光源に制限を与えることになる。また、高速なイメージングを考えた時に、MHz オーダの繰り返し周波数が望ましい。この場合、少なくとも数メートルの共振器長が必要になるため、実現のためには外部光共振器を構成する必要があり、複雑になりがちである。一方で受動モード同期を用いることで、ピコ秒以下のパルス生成を比較的容易に行うことが可能である。また、パルス間のタイミングの揺らぎ(ジッタ)が小さいため、2 色のパルスの同期が必要な SRS 顕微鏡においては、SNR の面で有利であると考えられる。

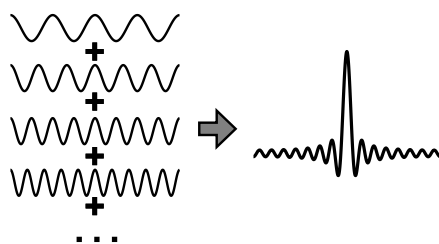


図 3.6 モード同期発振の考え方。

3.3.2 Qスイッチング方式

Qスイッチング方式は、損失を制御してQ値をスイッチすることで高出力のパルスを放出させる方式を指す。このQ値は以下の式で表される。

$$Q = \frac{\omega_0}{\omega_{\text{FWHM}}} \quad (3-5)$$

ここで、 ω_0 は発振スペクトルの中心周波数、 ω_{FWHM} はその ω_0 を含むスペクトルのスペクトル幅である。ここでは、損失を制御する方法として、光共振器を構成している反射鏡を用いる方法を説明する。まず、反射鏡の角度を制御して光共振器内の損失が大きい状態にする。そうすることで、ある程度、利得が大きい状態でもレーザ発振が起こらないようにする。さらに、利得媒質にエネルギーを与え続けて、十分な反転分布が形成されるまで待つ。そして、利得と損失が釣り合った瞬間に、反射鏡の角度を制御して損失が小さい状態にすることで、非常に高強度の光パルスが得られる。このように、光共振器内のQ値を切り替えることでパルス発振を行っているのが、Qスイッチング方式と呼ぶ。

この方式は、高強度の光パルスを得られるという利点があるが、一方でパルス幅は一般的に短いものでナノ秒程度であり、短パルス化の困難さや光共振器の複雑さを考慮するとSRS顕微鏡への応用は難しいと考えられる。また、Qスイッチング方式は反転分布を長時間保つ必要があるため、固体レーザなどに比べて蛍光寿命が短いLDには不利であると考えられる。

3.3.3 利得スイッチング駆動方式

利得スイッチング駆動方式は第3.1節で述べたように、LDにパルス状の電流を流すことで、直接光パルスを出力させる方式のことを指す。瞬間的に電流による利得のオンオフを切り替えることでパルス発振を行っているため利得スイッチングと呼ぶ。

GS-LDの利点としてコンパクトさや利便性が挙げられる。その理由として、パルス状の電流を流すことができる電気パルス発生器(EPG)があるだけで、GS-LDから簡単に安定した光パルスが得られるという点が挙げられる。GS-LDにおいて光パルスが生成される過程は電気パルス毎に独立であるため、電気パルスの繰り返し周波数を変化させることで、光パルスの繰り返し周波数を容易に調整することができる。この特性を利用することで、EPGの出力トリガを他方のレーザに依存させることで、簡便に2台のレーザの同期を達成させることができる。さらに、第3.2節で述べたように、適切なLDを用いることで、ピコ秒オーダーの光パルスの生成が可能となる。

一方、DFB-LDに対して利得スイッチング駆動を試みる場合、LD内の回折格子の間隔で決まる値で波長が固定されてしまい、波長可変性を持たせることが困難である。また、利得スイッチング駆動方式はパルスの立ち上がりのタイミングが異なるため、ジッタが大きくなりがちである(第5.1.1項参照)。ただし、波長可変性については、1.55- μm 帯FP-LDに対して利得スイッチン

グ駆動を行う際に、外部注入 CW 光の波長掃引を行うことで、40 nm 程度の波長可変性を与えられることが報告されている[39]。本研究においては DFB-LD を用いて検証を行ったため、FP-LD に対する実証は確認できていないが、将来的には GS-LD の波長可変性は充分達成できると考えられる。

これらのパルス発振方式の比較をまとめたものを表 3.1 に示す。Q スイッチング方式はそもそも、短パルス化が困難であることから、利得スイッチング駆動方式とモード同期方式について比較を行う。この比較結果から、ジッタに懸念があるものの、同期を含めたコンパクト化を主眼に置いた際には利得スイッチング駆動方式が有効であると結論付けられる。

表 3.1 パルス発振方式の比較。GS: 利得スイッチング駆動方式、ML: モード同期方式。

	Component	Repetition	Tunability	Jitter
GS-LD	Compact	Variable	Good?	Large
ML-LD	Complicated	Depend on cavity length	Good	Low

第4章 GS-LD を用いた SRS イメージング

本章では、利得スイッチング駆動半導体レーザ(GS-LD)を光源に用いて SRS イメージングに成功した結果を示す。はじめに、論理回路を用いた容易な高調波同期光源の構築について説明する。つづいて、1.06- μm 帯 GS-LD から得られる光パルスのジッタやスペクトルの特性を評価する。特にジッタについては、サンプリングオシロスコープによる計測結果に加えて、より信頼できるデータとして、SRS 信号強度の揺らぎをもとに計算して得られた結果も併せて示す。最後に 1.06- μm 帯 GS-LD と TSL を光源に用いて実際にポリマービーズと生細胞の SRS イメージングを行った結果を示し、将来的な SRS 顕微鏡光源としての GS-LD の実用性を示す。

4.1 トグルフリップフロップを用いた高調波同期光源

トグルフリップフロップ(T-FF)はフリップフロップと呼ばれる論理回路の一種である。T-FF の動作自体は非常に明快で、入力端子 C への電気信号の 2 値が 1 周期変化する度に、出力端子 Q からの電気信号の 2 値が反転するというものである。この T-FF と GS-LD を組み合わせることで、第 2.5.3 項で説明した高調波同期光源を非常に簡単に構築することができる。

図 4.1 に原理図を示す。まず、PD に TSL からの光パルスを入力する。この時、TSL パルスの繰り返し周波数は現在のシステムと同様に 76 MHz とする。その結果、PD から出力された繰り返し 76 MHz の光電流が T-FF に入力される。T-FF の動作に従い、光電流の立ち上がりが入力される度に、Q からの出力信号が反転する。その結果、繰り返し周波数が 38 MHz の矩形波が T-FF から出力されることになる。つづいて、電気パルス発生器(EPG)に信号が入力される。ここで、入力信号の立ち上がりに対して電気パルスを出力するような EPG を用いる。そうすることで、T-FF の出力信号に対して EPG から繰り返し 38 MHz の電気パルスを得られる。これを用いて LD の利得スイッチング駆動を行うことで、繰り返し 38 MHz の光パルスが最終的に生成される。このようにして GS-LD から出力される光パルスは、TSL パルスがトリガになっているため自動的に TSL パルスと同期が取れていることになる。さらに、繰り返し周波数もちょうど半分になるため、結果として、高調波同期光源が得られたことになる。また本光源では、2 色のパルスのタイミングを合わせるために可変長同軸ケーブルを用いることができるため、空間系で光軸調整を行う必要が無いという利点もある。

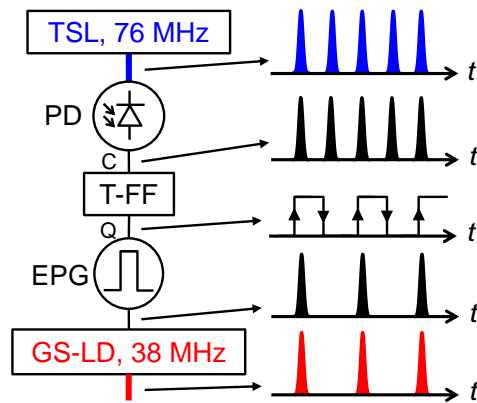


図 4.1 トグルフリップフロップ(T-FF)を用いた高調波同期光源の原理模式図。EPG: 電気パルス発生器。

4.2 1.06- μm 帯 GS-LD の特性評価

本節では GS-LD パルスのジッタ、スペクトル、パルス幅といった SRS 顕微鏡に応用する際に重要となる特性を計測した結果を示す。本研究では、1.06- μm 帯で発振する InGaAs/GaAs 多重量子井戸 LD[25,26]を光源として用いている。

4.2.1 GS-LD ジッタの各種パラメータ依存性

SRS 顕微鏡への応用において、他の光源との組み合わせや異なる波長の GS-LD を用いる際に、1.06 μm 帯の GS-LD の特性を評価しておくことは重要であると考えられる。そこで今回 GS-LD パルスのジッタやスペクトル特性の種々のパラメータ変化に対する依存性の計測実験を行った結果を示し、SRS イメージングに応用する際に最適なパラメータを決定する。

図 4.2 に本研究で用いた 1.06- μm 帯 GS-LD の全体像を示す。入力部は 40 GHz の電気信号まで対応している K コネクタに繋がっており、出力部は光ファイバを通してファイバコネクタに繋がっている。

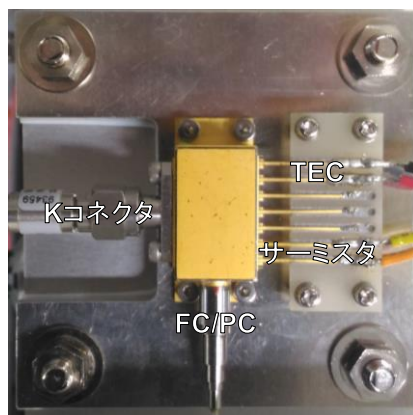


図 4.2 本研究で用いた 1.06- μm 帯 InGaAs/GaAs 多重量子井戸 GS-LD の全体像。

図 4.3 に GS-LD パルス特性評価のための実験系を示す。GS-LD に入力される電気パルス発生器(EPG)からの電気パルスは、TSL パルスの繰り返し周波数の半分の繰り返しの信号をトリガとしている。ジッタはサンプリングオシロスコープ(Agilent Technologies、86100C DCA-J)を用いて計測した。また、このサンプリングオシロスコープが持つトリガジッタは 1 ps 以下であった。また、図 4.3 中には示していないが、GS-LD のスペクトルはスペクトラムアナライザ(ANDO、AQ6317B)を用いて出力を直接計測した。今回、GS-LD パルスのスペクトルとジッタ依存性を調べるためのパラメータとして、以下の 2 つを掃引した。1 つは GS-LD に注入する電気パルスのパルス幅(図 4.3A)で、もう 1 つは GS-LD 内の温度(図 4.3B)である。GS-LD の温度は、温度調整用コントローラの値を調整してサーミスタの抵抗値を調整することで変化させた。パラメータの掃引範囲はそれぞれ、A: 100-250 ps、B: 290-315 K とした。また、それぞれの掃引を行う際、もう一方のパラメータの値は固定しており、A 掃引時、B: 300 K、B 掃引時、A: 200 ps とした。

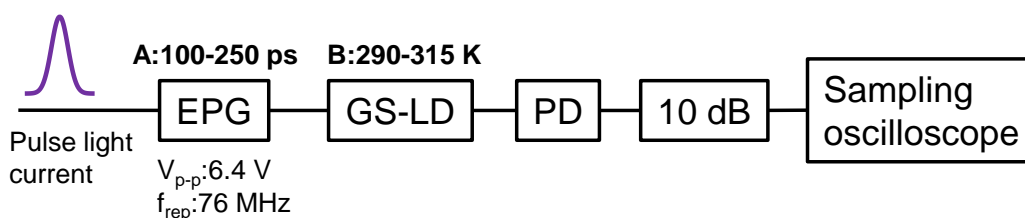


図 4.3 ジッタのパラメータ依存性確認のための実験系。A: EPG のパルス幅、B: GS-LD の温度の 2 つをパラメータとして掃引。

図 4.4 に EPG のパルス幅掃引時の結果を示す。LD に注入する電気パルス幅が長くなるにつれて、スペクトルの長波側にピークが強くなるようになり、ジッタは 5.3 ps から 2.5 ps まで低減している。スペクトルについては光子密度が光パルス形成の必要以上に存在するために、緩和振動の尾が残ることで長波側が強くなっていると考えられる。ジッタはパルスになりきれていない状態の時にジッタが大きく、利得が充分にあることでジッタが小さくなっていると言える。

つづいて、図 4.5 に GS-LD の温度掃引時の結果を示す。LD 内の温度が下がるにつれてスペクトルのピークが強くなり、また中心波長が短くなっており、ジッタも小さくなっている。これは温度が低いほど損失が小さくなる効果や、バンドギャップが大きくなる効果によるものと考えられる。

今回の 2 つの実験結果は、スペクトル、ジッタ共に利得の観点から考えると同じ傾向を示していると考えられる。そして、利得を大きくすることがジッタを低減させることに繋がると考えることができる結論付けられる。

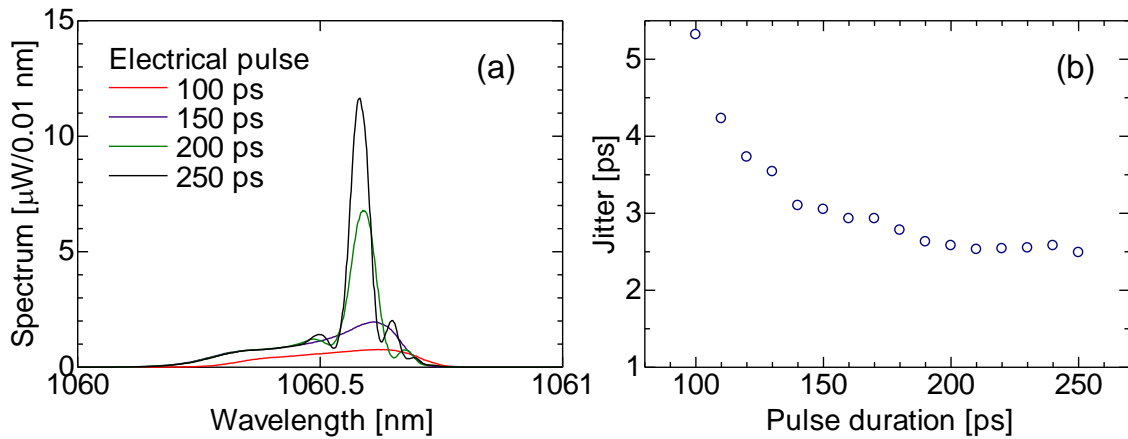


図 4.4 EPG のパルス幅掃引時の GS-LD パルスの(a) スペクトル及び(b) ジッタ。

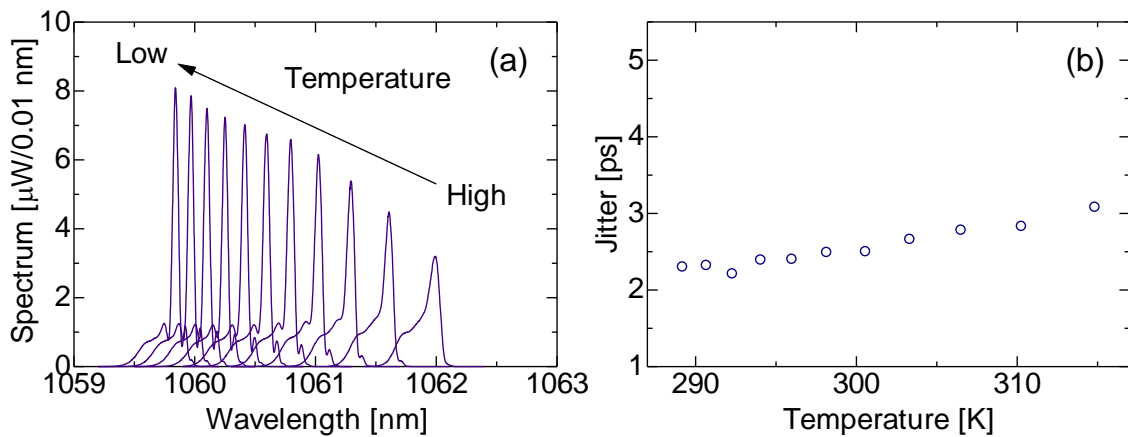


図 4.5 GS-LD の温調パラメータ掃引時の GS-LD パルスの(a) スペクトル及び(b) ジッタ。

本測定では、GS-LD の温度及び注入電流パルス幅それぞれの GS-LD パルスのジッタ及びスペクトル依存性の結果を得た。この結果から、最適な電気パルスのパルス幅は 200 ps、そして、特別な理由がない限り温度は仕様で推奨されている 300 K で十分であることが確認できた。

4.2.2 GS-LD パルス波形とスペクトル

図 4.6 に TSL と GS-LD をそれぞれポンプ光源とストークス光源とした実験系の模式図を示す。様々なラマンシフトに対して計測を行うために、TSL パルスの波長は 780-815 nm 間を手動で変化させた。また、TSL パルスの繰り返し周波数、パルス幅、スペクトル幅はそれぞれ 76 MHz、6 ps、0.10 nm 程度である。TSL パルスの光路を 2 つに分けるために半波長板(HWP)と偏光ビームスプリッタ(PBS)を挿入している。一方は試料へ、もう一方は GS-LD パルス生成のトリガのための光検出器(PD, Kyosemi, KPID020D-H8)へ入射する。ディレイラインは TSL パルスと GS-LD パルスの相対的な時間遅延を制御するために挿入されている。

PD で受光された TSL パルスから得られる光電流をトグルフリップフロップ(T-FF、Hittite、HMC749LC3C)に入力する。T-FF では入力電圧 V_{in} が閾値電圧 V_{th} を超える度に、出力電圧 V_{out} が 2 値間で切り替わる。その結果、繰り返し周波数 38 MHz の矩形波が T-FF から得られる。この T-FF の出力を電気パルス発生器(EPG、Alnair Labs、EPG-200B-0100-S-P-T-A)に入力することで得られる時間幅 200 ps の電気パルスを用いて LD の利得スイッチング駆動を行った。GS-LD から得られる光パルスを、4 段の Yb 添加光ファイバ増幅器(YDFA)により増幅した。ここで YDFA を 4 段にしている理由は、使用した YDF (CorActive、Yb501-PM)の利得のピーク波長が 1030 nm であるため、パルスの波長である 1060 nm 付近では YDFA1 段毎の利得が小さいからである。また、YDFA により発生する自然放出光雑音(ASE)を取り除くための YDFA 間に 2 つの帯域通過フィルタ(BPF)が挿入されている。この BPF は格子定数 1200 /mm (Thorlabs、GR25-1210)の回折格子と、ビーム径 1.2 mm の PM コリメータで構成されている。また、GS-LD パルスと TSL パルスの偏波方向を合わせるために、HWP と PBS が挿入されている。ダイクロイックミラー(DM)を用いて GS-LD パルスと TSL パルスを合波し、SRS 顕微鏡に導入した。DM 後から SPF までの構成は第 2.5.3 項で説明している通りである。その後、Si-PD (Hamamatsu Photonics、S3399)を用いて TSL パルスを検出している。ここでは、ロックインアンプ(LIA)の参照信号を T-FF のインバータ出力から得ている。

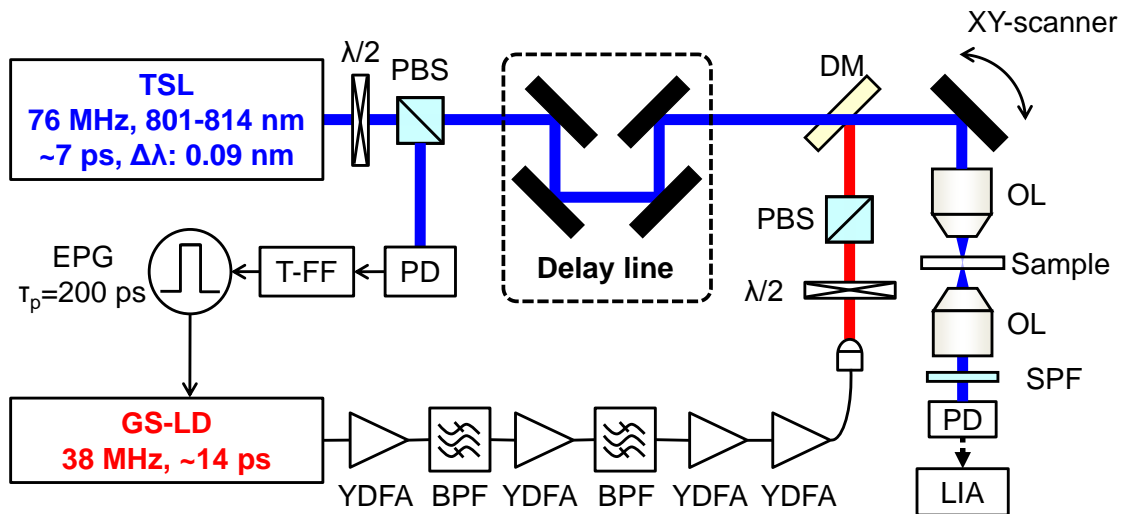


図 4.6 GS-LD と TSL を光源にした SRS 顕微鏡の全体図。HWP: 半波長板、PBS: 偏光ビームスプリッタ、PD: 光受光器、T-FF: トグルフリップフロップ、EPG: 電気パルス生成器、YDFA: Yb 添加光ファイバ増幅器、BPF: 帯域通過フィルタ、DM:ダイクロイックミラー、SPF: 低域通過フィルタ、LIA: ロックインアンプ。

図 4.7(a)にサンプリングオシロスコープを用いて EPG から得られた電気パルスの波形を示す。電気パルスの振幅は 6.4 V で、パルス幅は前項で最適化した 200 ps のものを用いた。また、この電気パルスが持つジッタは、計測の結果、サンプリングオシロスコープが持つトリガジッタである 1 ps より小さかった。図 4.7(a)中に示されているゼロレベルの信号はオシロスコープのトリガ信号を TSL パルスから得ていることに由来している。

図 4.7(b)に YDFA 増幅前の GS-LD パルスのスペクトルを示す。GS-LD パルスのスペクトルは 1060.35 nm を中心とした広いスペクトルと、1060.6 nm にピークを持つ狭いスペクトルで構成されている。前者は利得スイッチング動作により生じたパルス構成成分、後者はパルス後の緩和振動により構成された余計な成分を含有している。このパルス構成成分を BPF を用いて抽出して、YDFA を通して増幅させた後のスペクトルを図 4.7(c)に示す。増幅後の GS-LD パルスの中心波長は 1060.35 nm で、スペクトル幅は 0.20 nm であった。

つづいて、増幅後の GS-LD パルスのパルス幅を得るために行った実験の結果を示す。図 4.7(d) は SRS 信号に対する TSL パルスと GS-LD パルスの相互相関波形を示したものである。本測定ではビームスキニングは行っておらず、水を入れた 10 mm のキューベットにビームを軽く絞ってある固定された視野に対する SRS 信号の計測を行った。また、水の OH 伸縮振動である 3390 cm^{-1} のラマンシフトを見るために TSL パルスの中心波長を 780 nm に調整して、さらに相互相関波形から直接 GS-LD パルスのパルス幅を求めるために TSL パルスのパルス幅を 3 ps に調整した。この相互相関波形を得るために、TSL 側のディレイラインを手動で掃引した。結果として、相互相関波形の強度波形の半値幅が 14 ps であることから、GS-LD のパルス幅も 14 ps であると推定された。なお、本実験に用いた GS-LD は、性能的には充分 10 ps 以下のパルスを生成することが可能なものである。一方で、これが達成されなかった理由は、電気パルスの電圧が 6.4 V までしか出せず、十分な励起が行えなかったことに起因していると考えられる。

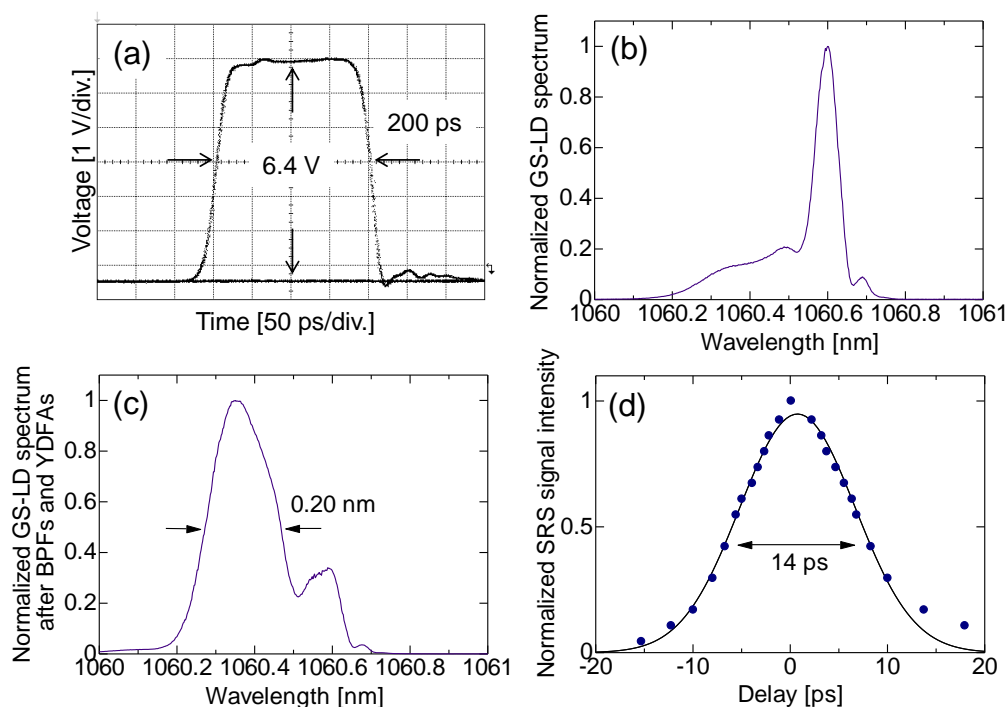


図 4.7 (a) サンプリングオシロスコープで計測した EPG からの出力信号波形。(b) (c) YDFA による増幅前後の GS-LD パルスのスペクトル。(b) 増幅前、(c) 増幅後。(d) SRS 信号に対する GS-LD パルスと TSL パルスの相互相関波形。

4.2.3 試料面における GS-LD パルスのジッタ測定

前節において、サンプリングオシロスコープを用いて GS-LD パルスのジッタの計測を行った。しかし、サンプリングオシロスコープが持つトリガジッタや測定精度を考えるとより詳しくジッタを計測することが望ましいと考えられる。また、試料面における増幅された GS-LD パルスのジッタの値がより本質的なデータであることを考慮して、前項の相互相関波形を利用した、より精度の高いジッタの測定を試みた。

図 4.8 に蒸留水の SRS 信号強度のヒストグラムを示す。サンプル数は各 250,000 ずつである。SRS 信号を最小(青)、最大値の半分(赤)、最大(緑)の 3 つの信号強度レベルで取得するために、ディレイラインを動かして TSL パルスのタイミングを変化させた。それぞれの結果から求められた標準偏差は $\sigma_{\min} = 5.01 \times 10^{-2}$ 、 $\sigma_{\text{half}} = 7.83 \times 10^{-2}$ 、 $\sigma_{\max} = 6.67 \times 10^{-2}$ であった。ここで、 σ_{\min} はショット雑音が支配的であると考えることができて、 σ_{half} はそれに加えて GS-LD パルスのジッタによる SRS 信号の強度ゆらぎが含まれていると考えられる。このショット雑音とジッタ由来の標準偏差はそれぞれ独立であると考えられるので、ジッタ由来の標準偏差は $\sigma_{\text{jitter}} = (\sigma_{\text{half}}^2 - \sigma_{\min}^2)^{1/2} = 6.02 \times 10^{-2}$ と求められる。ここで、 σ_{\max} が σ_{\min} よりも大きい理由はジッタ由来の強度揺らぎが生じているためと考えられる。この結果と前項の図 4.6 (d)の相互相関波形における半分の信号強度での傾き $2.55 \times 10^2 \text{ ps}^{-1}$ から試料面における GS-LD パルスのジッタが 2.36 ps であることが導かれた。この値は GS-LD のパルス幅が 14 ps であることを考慮すると、SRS イメージングには十分応用できる値であると結論づけられる。

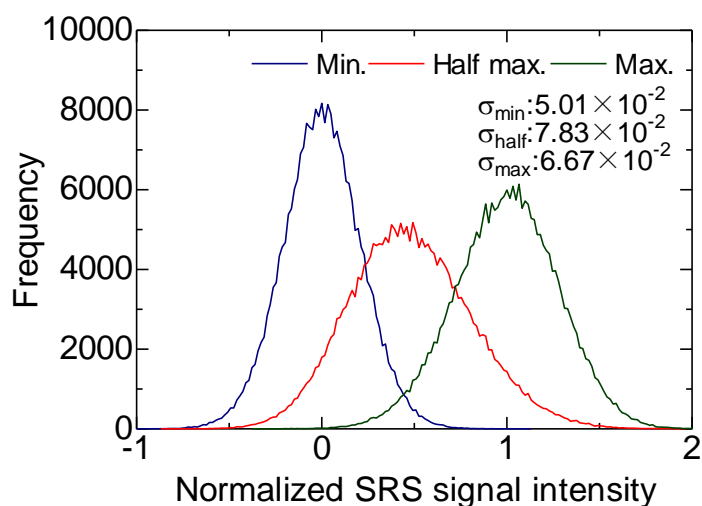


図 4.8 水の SRS 信号強度のヒストグラム。SRS 信号強度: 最小時(青)、半値時(赤)、最大時(緑)。

4.3 GS-LD とチタンサファイアレーザを用いた SRS イメージング

図 4.9(a)-(e)にポリスチレン(PS)とポリメタクリル酸メチル(PMMA)ビーズの SRS 像を示す。フレームレートは 30 fps、視野は $80 \times 80 \mu\text{m}$ である。TSL の波長を手動で変化させてラマンシフトをそれぞれ図 4.9(a) 2850 cm^{-1} 、図 4.9(b) 2900 cm^{-1} 、図 4.9(c) 2950 cm^{-1} 、図 4.9(d) 3000 cm^{-1} 、図 4.9(e) 3050 cm^{-1} に設定して信号取得を行った。それぞれの画像間で、ラマンシフトによって明らかに SRS 信号強度が異なっていることが確認できる。また、図 4.9 (f)に示したスペクトルは、図 4.9(a)内の SRS 像の青(PS)と赤(PMMA)の矢印で示した部分の信号強度をそれぞれのラマンシフトについて抽出したものである。それぞれ 2950 cm^{-1} と 3050 cm^{-1} において PMMA と PS に特有のピークが確認でき、SRS イメージングに成功したことが分かる。また図 4.9(c)において、背景の雑音の分散が 20 程度で、PMMA ビーズのシグナル強度が 190 程度なので SNR は 9.5 程度であると考えられる。

つづいて、図 4.10 に HeLa 細胞の SRS 像を示す。図 4.10(a)、(b)の波数はそれぞれ 2850 cm^{-1} 、 2930 cm^{-1} であり、1 枚あたりの画像取得時間は 3.3 s、視野は $80 \times 80 \mu\text{m}$ である。図 4.10(a)において、脂質由来の粒状の脂肪滴が細胞質の部分に確認できる。また、図 4.10(b)の画像から、脂肪滴に加えて、タンパク質由来の信号が核全体において確認でき、さらに、図 4.10(a)では確認できなかった核小体の形状も明らかに確認できる。

このようにして、GS-LD と TSL を光源に用いたポリマービーズの SRS 分光イメージングに成功し、さらに生細胞に含まれる核や細胞質の SRS 信号の波数依存性を確認することができた。

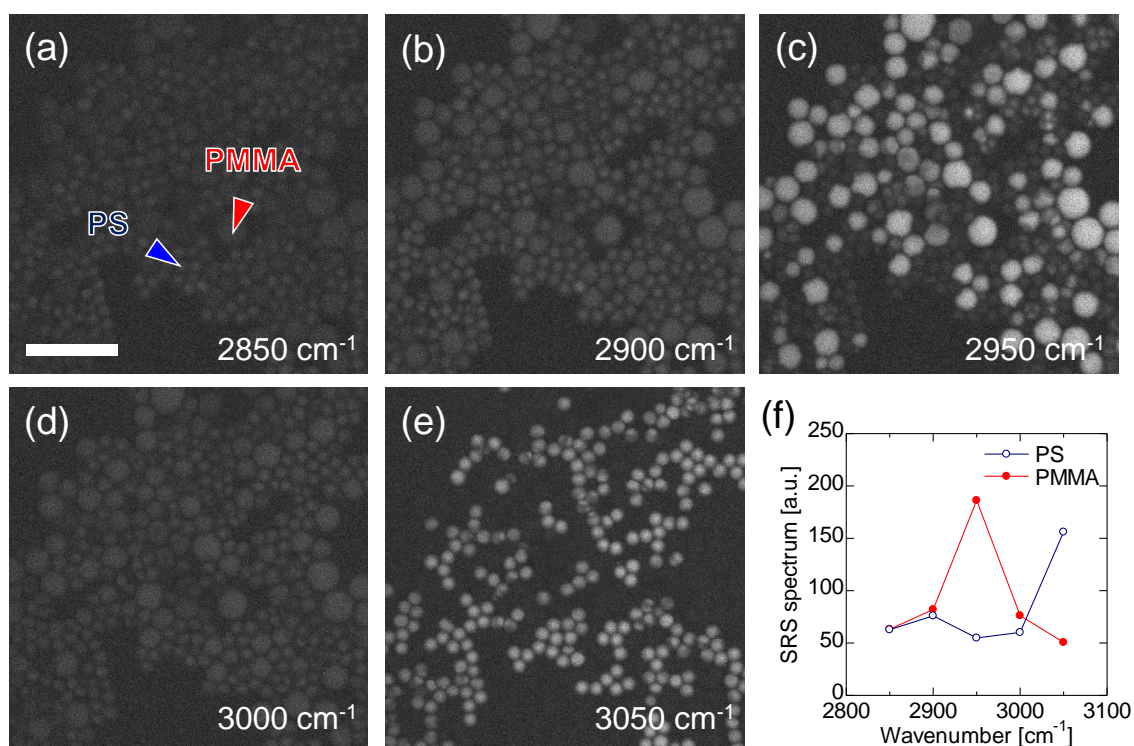


図 4.9 PS と PMMA ビーズの(a)-(e) SRS 像と(f) スペクトル強度。ピクセル数: 500 × 500、フレームレート: 30 fps、スケールバー: 20 μm 。ラマンシフトは(a) 2850 cm^{-1} 、(b) 2900 cm^{-1} 、(c) 2950 cm^{-1} 、(d) 3000 cm^{-1} 、(e) 3050 cm^{-1} 。(f) 赤 PMMA、青 PS。スペクトルの形を明確にするために補助線を引いた。

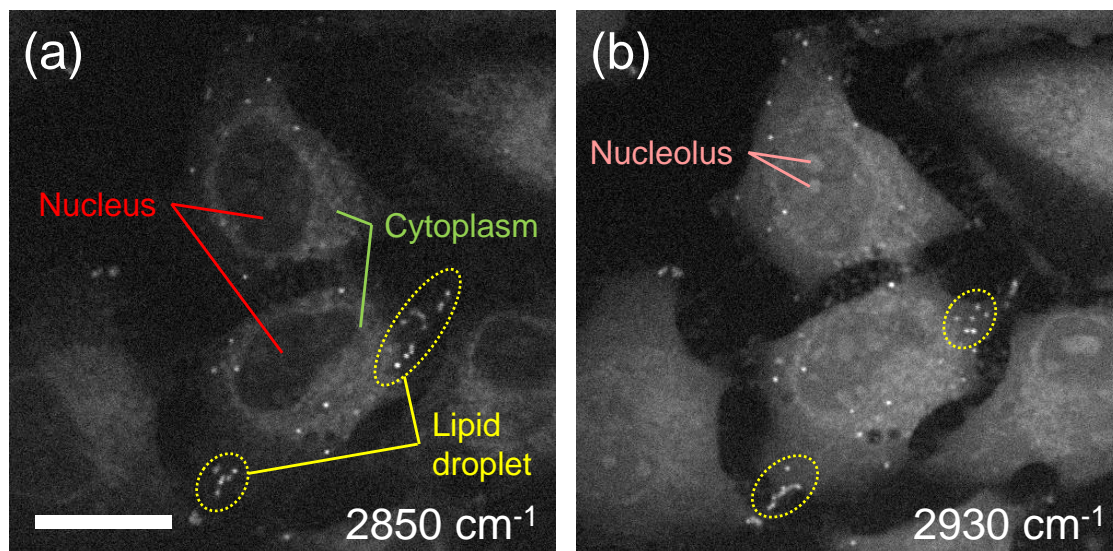


図 4.10 HeLa 細胞の SRS 像。(a) 2850 cm^{-1} 、(b) 2930 cm^{-1} 。ピクセル数: 500 × 500、画像取得時間: 3.3 s、スケールバー: 20 μm 。

第5章 GS-LD を用いた SRS 顕微鏡の実用性向上のための実験的検討

前章では、1.06- μm 帯 GS-LD と TSL を 2 色のパルス光源に用いた SRS イメージングの実証実験の結果を示した。今回の実験において、GS-LD パルスのパルス幅が 14 ps であり、GS-LD パルスの持つジッタに比べて比較的大きいことから、SRS 信号へのジッタの影響が小さいと判断した。しかし将来的には、GS-LD パルスのピーク強度を高めるために、より短い 5 ps 程度のパルス幅を用いることが望ましい。この場合、ジッタの影響が現在のパルス幅に比べて相対的に大きくなるため、ジッタを低減させるための機構が要求されると考えられる。また、TSL の波長掃引を手動で行っていたが、図 4.10 における HeLa 細胞のイメージングにおいて、波長を変更する間に細胞が動いており、全体像や脂肪滴の位置が変わってしまっている。これは細胞のダイナミクスを捉える際には非常に大きな課題と考えられる。したがって、将来的には高速波長可変レーザと組み合わせた SRS 高速分光イメージングを行うことが達成されるべき目標の 1 つと考えられる。

本章では、これらの課題に対して実験的な検討を行った結果を示す。まず GS-LD パルスに対するタイミングジッタ低減の原理について述べる。つづいて、実際に 1.06- μm 帯 GS-LD についてジッタ低減が行えることを確認した結果を示す。さらに、1.03- μm 帯 GS-LD と、本研究室で作製された高速波長可変 Er-FL[40]の 2 つの光源から、同期したパルスが得られた結果を示す。加えて、高速波長可変レーザと組み合わせる際の課題になると考えられる、GS-LD パルスの出力タイミングの他方光パルス強度依存性の解決について提案と実証を行う。

5.1 1.06- μm 帯 GS-LD パルスのジッタ低減実験

5.1.1 ジッタ低減の原理

GS-LD を SRS 顕微鏡に適用する時の課題として、パルスがタイミングジッタを持つ点が挙げられる。今回用いている LD は 1.06 μm 帯の波長域であるが、先行研究において、1.55 μm 帯の GS-LD に対して、外部光を注入することでジッタが低減することが報告されている[41]。本項では、ジッタが生じる原因とその抑制法について述べる。

図 5.1 に対数軸で考えた光子密度の立ち上がりの瞬間を示している。ジッタは光子密度の立ち上がり時間に関係している。LD の活性層内では、注入電流によってキャリアが生成されている間、常に自然放出光が存在している。そして、閾値電流を超えて、十分なキャリアが溜まった状態において、自然放出光由来のレーザ発振が開始される。ここで、レーザ発振は自然放出光の持つ雑音揺らぎの影響を受けてしまい、毎回のパルス生成ごとにタイミングが変化してしまう。その結果、図 5.1(a)に示すように、LD から出力される光パルスは、自然放出光の持つ雑音によって大きなジッタを持つことになる。

ここで、図 5.1(b)に示すように外部から自然放出光の光強度を超えるような CW 光を注入することを考える。その結果、誘導放出に必要な利得が減少することが予想される。また LD 内において CW 光が支配的となるため、立ち上がり時間の自然放出光の持つ雑音揺らぎの影響が相対的に小さくなる。その結果、光パルスのジッタが抑えられることになる。また、立ち上がり時間がわずかに早くなる現象も生じる。

一般的な注入同期現象に近いものがあるが、注入同期ではファブリーペロー型の光源に対して CW 光を注入することで発振スペクトルを安定させるために用いることが多い。

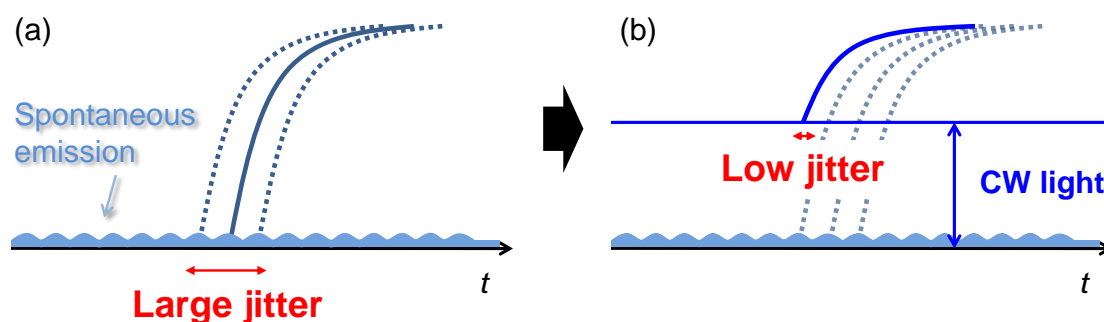


図 5.1 GS-LD パルスの立ち上がりの模式図。(a): 注入 CW 光無し、(b): 注入 CW 光有り。パルスの立ち上がりの自然放出光由来のジッタが、注入 CW 光によって低減される。

5.1.2 GS-LD パルスのジッタの注入光強度及び波長依存性の評価

図 5.2 に実験系を示す。注入同期用の DFB-LD の光強度を掃引するために DFB-LD の出力に可変光減衰器(VOA)を挿入した。またその光強度をモニタするために VOA の後に 1:99 のカプラを挿入して、1 側をパワーメータに、99 側をサーキュレータに接続した。本計測では、GS-LD の温度設定を 315 K にした。これは 300 K における GS-LD の中心波長が 1060 nm 付近である一方、DFB-LD の中心波長が 1064 nm であるため、GS-LD と DFB-LD の中心波長を合わせるためには、キャビティ内の温度変化による共振周波数のシフトを利用してお互いの中心波長を近づける必要があったからである。

図 5.3 に注入 CW 光強度掃引時の GS-LD パルスのスペクトル(図 5.3(a))とジッタ(図 5.3(b))の結果を示す。図 5.3(a)から、注入する光強度が強くなるほどスペクトルのピークが小さくなり、スペクトル幅も狭くなっていることが分かる。また同様に図 5.3(b)から、ジッタも小さくなっていることが確認できる。これは注入光により立ち上がりのジッタが小さくなっていることに起因すると考えられる。また、パワーメータ上で 60 μW 、つまり実際に GS-LD 内に注入されている光強度に換算して、6 mW 以上の光強度でジッタ低減が飽和することが分かる。ただし、ここで GS-LD 内には、仕様書には明示されていない光アイソレータが組み込まれており、一般的な値として 30 dB のタイプが組み込まれていると仮定すると、実際に GS-LD の光共振器内に注入されている光強度は数 μW のオーダーであると考えられる。

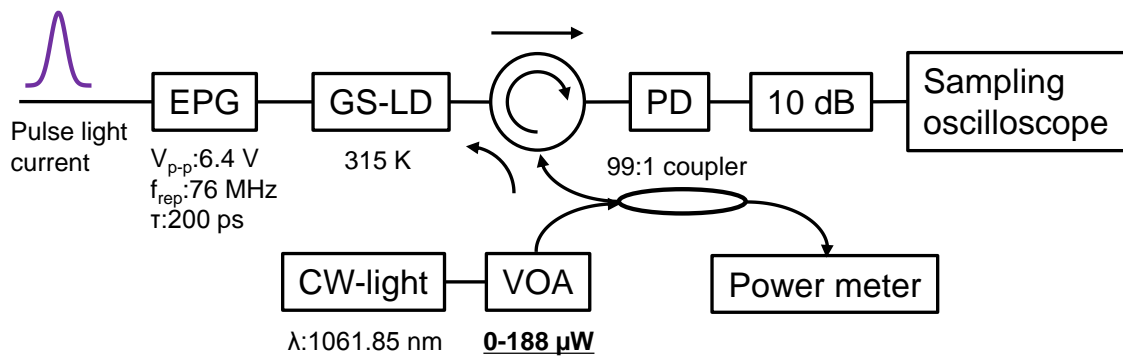


図 5.2 VOA と光サーキュレータを用いた GS-LD パルス特性の注入光強度依存系。

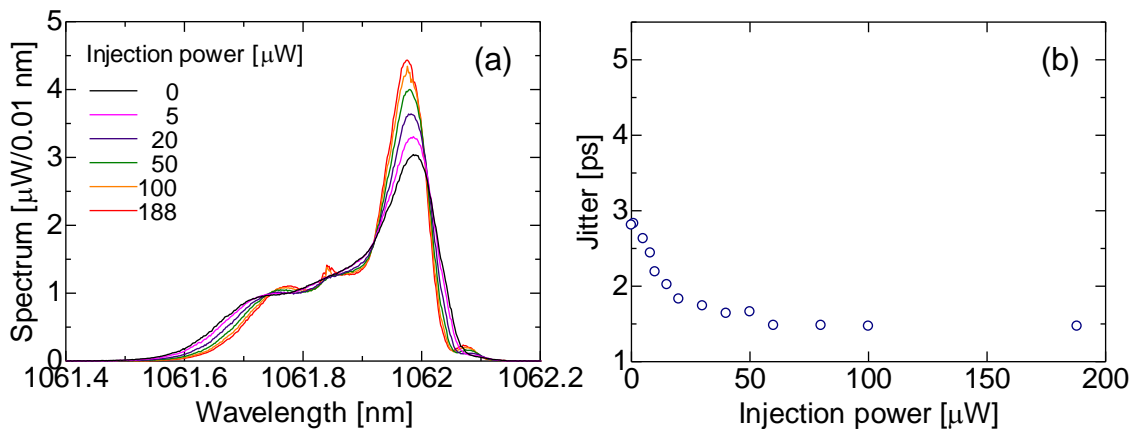


図 5.3 注入 CW 光強度掃引時の GS-LD パルスの (a) スペクトル、(b) ジッタ。

つづいて、図 5.4 に GS-LD のジッタの注入 CW 光波長依存性評価のための実験系を示す。時間幅 200 ps、ピーク電圧 6.4 V、繰り返し周波数 100 MHz の電気パルスを用いて GS-LD を駆動した。GS-LD から得られた光パルスのスペクトルの中心波長と FWHM はそれぞれ 1062.4 nm と 0.3 nm であった。この GS-LD に対し、サーキュレータを介して CW 光の注入を行った。この GS-LD のパルスを周波数帯域 5 GHz の PD で受光して得られた信号をサンプリングオシロスコープで測定し、ジッタを計測した。また、別途手製のオートコリレータを用いてパルス幅の測定が行えるようにした。

図 5.5(a)にジッタの注入 CW 光波長依存性の結果を示す。オシロスコープにより得られた値からトリガジッタである 0.9 ps を差し引いた値を光ジッタとして示している。光ジッタは最小で 1.2 ps の値を取り、注入する光波長が GS-LD の中心波長に近いほどジッタが低減されていることが分かる。また図 5.5(b)に示すように、GS-LD パルスのパルス幅が 13 ps から 16 ps へ広がっていることが確認された。なお、この波形はオートコリレータによって計測された自己相関波形であり、その時間幅は注入同期前で 19 ps、注入同期後で 23 ps である。そこでこの自己相関波形がガウシアンであると仮定することで GS-LD パルスの時間幅を推定した。

これらの結果から、GS-LD から得られる 13 ps の時間幅を持ったパルスが持つジッタは~4 ps 程度であり、2 割程度のパルス幅の広がりを許容することで注入同期によるジッタの低減が行えることが確認できた。なお、本実験においても注入同期を行うために GS-LD の条件がイメージ

ングを行った時と異なる条件になっているため、ジッタについても多少の変化があると考えられる。また、前章において、ジッタ低減を行わない状態で TSL と GS-LD の 2 光源による SRS イメージングに成功している。したがって、パルス幅が広がる影響と光サーキュレータによる損失を考慮すると、パルス幅が広い状態においては光注入によるジッタ低減はマイナスの面があることに注意する必要があると言える。一方で、ジッタがあるということは強度ゆらぎがあるということと同じなので、再現性を高めるために外部光注入によるジッタ低減を行うことは非常に有効であると考えられる。

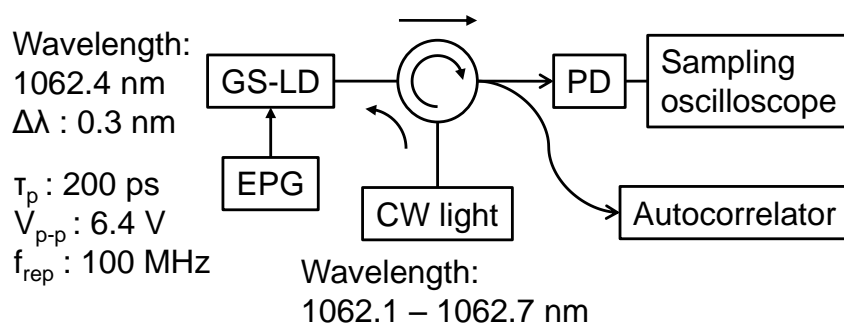


図 5.4 GS-LD のジッタの注入 CW 光波長依存性評価のための実験系。

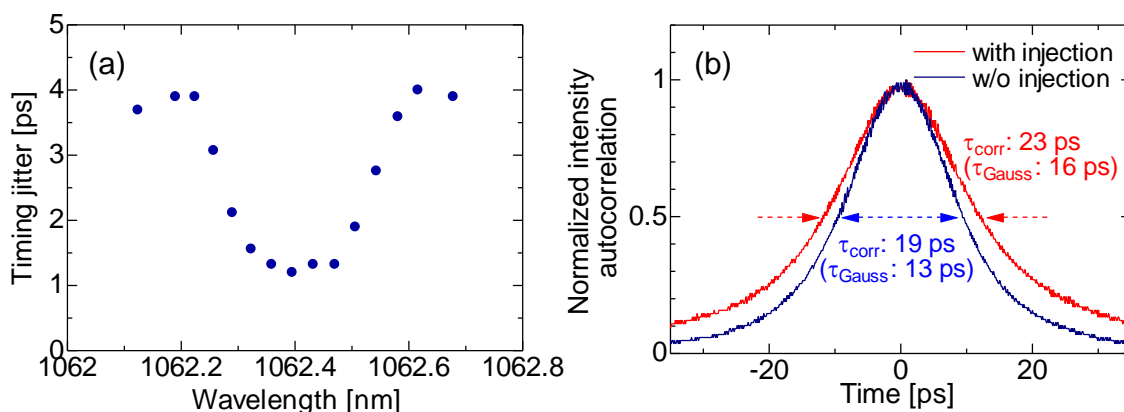


図 5.5 (a) 注入 CW 光波長掃引時の GS-LD パルスのジッタ。(b) GS-LD パルスのオートコリレーション波形。青線: 非注入同期時、赤線: 注入同期時。

5.1.3 GS-LD パルスのジッタと SRS 信号強度のゆらぎの関係

本項では、光パルスが持つタイミングジッタが SRS 信号強度の揺らぎに与える影響を定量的に考える。まず、ポンプ光とストークス光のパルス幅をそれぞれ τ_p 、 τ_s とする。そして、この 2 色のパルスが共にガウシアンパルスであると仮定すると、その光強度はそれぞれ以下の式で表すことができる。

$$I_p(t) = \frac{E_p}{\tau_p} \exp\left\{-\left(\frac{t}{\tau_p}\right)^2\right\}, \quad (5-1)$$

$$I_s(t) = \frac{E_s}{\tau_s} \exp\left\{-\left(\frac{t}{\tau_s}\right)^2\right\}, \quad (5-2)$$

ここで、 E_p と E_s はそれぞれポンプパルスとストークスパルスのパルスエネルギーを表している。この2式をふまえて2色のパルスの相互相関を計算すると、SRS 信号強度 I_{SRS} は次のように計算される。

$$\begin{aligned} I_{SRS}(\Delta t) &= \int_{-\infty}^{+\infty} I_p(t) I_s(t - \Delta t) dt, \\ &= \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{E_p}{\tau_p} \exp\left\{-\left(\frac{t}{\tau_p}\right)^2\right\} \cdot \frac{E_s}{\tau_s} \exp\left\{-\left(\frac{t + \Delta t}{\tau_s}\right)^2\right\} dt, \\ &= E_p E_s \sqrt{\frac{\pi}{\tau_p^2 + \tau_s^2}} \exp\left(-\frac{\Delta t^2}{\tau_p^2 + \tau_s^2}\right), \end{aligned} \quad (5-3)$$

ここで、 Δt はポンプパルスに対するストークスパルスの相対的な遅延量を表す。式(5-3)は2色のパルスの重なる度合いが SRS 信号強度に対して与える影響を表している。したがって、この、パルスの重なる度合いはタイミングジッタによる変化を反映している。この式から明らかに、パルス幅が小さいほど SRS 信号強度が大きくなり、またパルス幅に対する相対的なジッタの大きさが SRS 信号強度の揺らぎに影響を与えることが分かる。加えて、式(1-1)にも示されているように、同じ平均光強度においてはパルス幅が広がることで、信号強度が低下する。したがって、ストークスパルスのパルス幅が 7 ps から 14 ps に広がるということは、SRS 信号強度が約半分になるということである。そのため、パルス幅を狭めることは SNR を確保するためにも重要であると考えられる。

つづいて、実際に GS-LD パルスを用いた SRS システムがどの程度の強度ゆらぎを持つかを確認する。今回、TSL と GS-LD パルスの半値全幅はそれぞれ 7 ps と 14 ps で、GS-LD パルスのジッタについては 2.36 ps と求められた。したがって、 τ_p 、 τ_s はそれぞれ、8.4 ps、4.2 ps である。ここで TSL パルスのジッタは無視できるほど小さいと仮定すると、SRS 信号強度の揺らぎは RMS で 6.1% と求められる。また、5.2.2 項で示した CW 光注入によりジッタが 1.2 ps に低減された場合を考えると、強度揺らぎは 1.6% まで低減し、さらに、GS-LD パルスの半値全幅が TSL と同じ 7 ps まで狭められた場合でも 4.0% であると考えられる。

このようにして、ジッタが与える SRS 信号強度の揺らぎへの影響の定量化を行い、加えて CW 光注入によるジッタ低減の有効性を示した。

5.2 GS-LD の出力タイミング安定化実験

第 4.4 節において、同期させた 2 色のパルス光源として波長 $1.06 \mu\text{m}$ の GS-LD と TSL を用いた SRS イメージングに成功した。将来的には、高速波長可変レーザと GS-LD を組み合わせた SRS 高速分光イメージングの成果が期待される。一方で、高速波長可変レーザは高速性と引き換えに強度の波長依存性を持つ可能性が十分に考えられる。この時、強度の波長依存性が GS-LD パルスのタイミングを変化させてしまうことが懸念される。このような課題への解決策として、CFD (Constant fraction discriminator) と呼ばれる手法が存在している[42]。ところが、この手法は複雑な電気回路を要求するため、光源の小型化という趣旨に反している。そこで本節では、T-FF を効果的に用いた GS-LD パルスのタイミング変化抑制手法の提案、実証を行う。

図 5.6(a)に提案する GS-LD パルスのタイミング安定化回路の周辺模式図を示す。TSL の光強度が変化すると、図 5.6(b)に示すように V_{in} が変化し、結果として V_{in} が V_{th} に到達する時間も変化する。このために、GS-LD パルスのタイミングが変化してしまう。この問題を解決するため、提案手法では TSL の光強度に応じて V_{th} を変化させる。そのために、図 5.6(a)に示すように、PD 出力信号の直流成分を低域通過フィルタ(LPF)により検出し、適切なオフセット電圧を加えた後に増幅し、 V_{th} として用いる。その結果、図 5.6(c)に示すように、TSL パルスの光強度が変化しても、 V_{in} が V_{th} に到達する時間の変動を抑制することができると思われる。

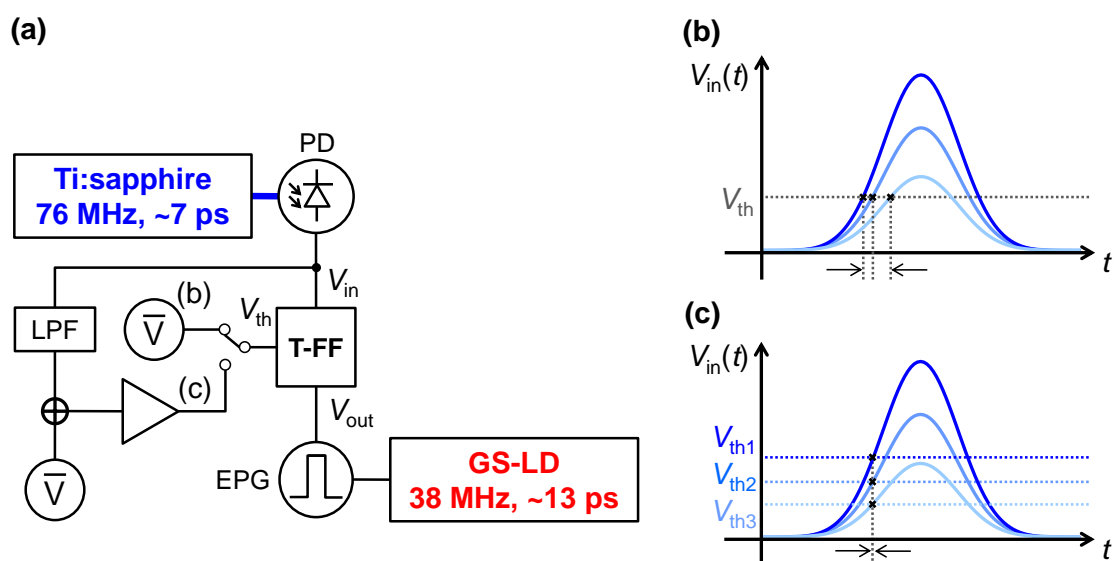


図 5.6 (a) 提案する GS-LD パルスのタイミング安定化回路周辺図。LPF: 低域通過フィルタ。(b) (c) T-FF への入力電圧 V_{in} と T-FF の閾値電圧 V_{th} の関係の説明図。異なる TSL パルス強度に対して V_{in} が変化する。 V_{th} が固定されている場合、 V_{in} が V_{th} を超える時間は V_{in} の変化に応じて変化する (b)。一方で、 V_{th} が V_{in} の変化に応じて適切に変化する場合、 V_{in} の強度に由来した時間変化は小さくなる (c)。

提案手法の実証のために行った T-FF 出力タイミング比較実験の実験系を図 5.7(a)に示す。T-FF 出力のタイミングの計測にはサンプリングオシロスコープを用いた。TSL パルスをビームスプリッタで分けて、一方を T-FF 側の PD へ、もう一方をサンプリングオシロスコープのトリガの

ための PD へ入力した。ここでは、T-FF 側の PD 前に可変光減衰フィルタを挿入して、TSL パルスの光強度を変化させた。

実験結果を図 5.7(b)に示す。 V_{th} が固定されている場合、赤の三角で示されているように、入力 TSL パルス強度を 1.6 mW から 3.4 mW まで変化させた時の T-FF からの出力信号のタイミング差が 27 ps あった。一方で、 V_{th} が制御されている場合、青丸で示されているようにタイミング差が 4 ps にまで低減されていることが分かる。このようにして、提案手法を用いた T-FF 出力信号のタイミングの安定化を確認した。

また、SRS 分光イメージングを行った時の提案手法の有効性の検討を行った。試料にはポリマービーズを用いた。本検討では、TSL パルスの波長を変えた時に、ディレイラインの位置が、SRS 信号強度が最大となるような位置から、どの程度変化しているかを計測して、その値から GS-LD パルスの遅延量を相対的に求めた。実験結果を図 5.8 に示す。 V_{th} を固定した時と制御した時でタイミングの変化量はそれぞれ 3.6 ps と 3.0 ps であった。このように変化量の差が得られなかった理由として、10 nm 程度の TSL パルスの波長の変化では光パルスの強度が大きく変わらなかったことが考えられる。したがって、TSL パルスがより広い波長で変化する場合や、他のより強度の波長依存性をもつレーザを用いた場合に有効性を示すと考えられる。

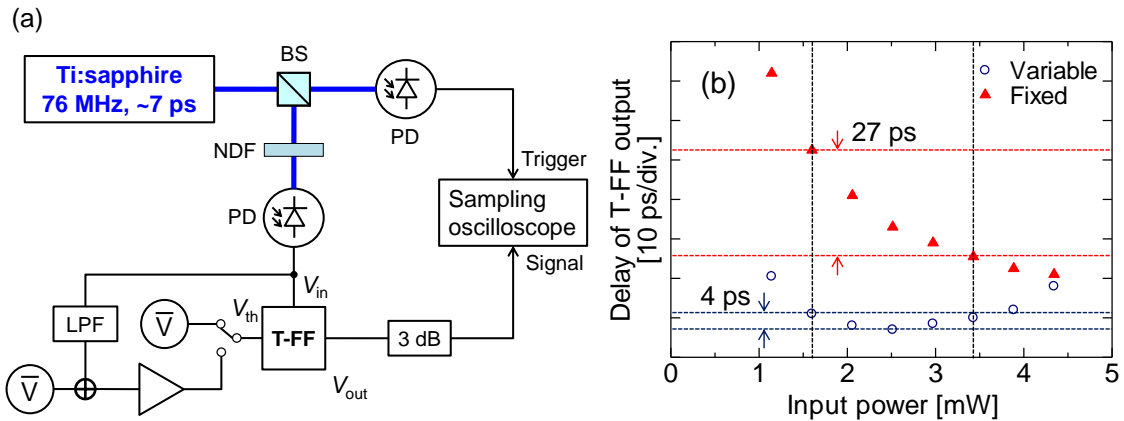


図 5.7 (a) T-FF タイミング比較実験のための実験系。BS: ビームスプリッタ、NDF: 可変光減衰フィルタ。(b) TSL パルス強度掃引時の V_{th} 制御時(青丸)と V_{th} 固定時(赤三角)の T-FF の出力タイミングの比較。

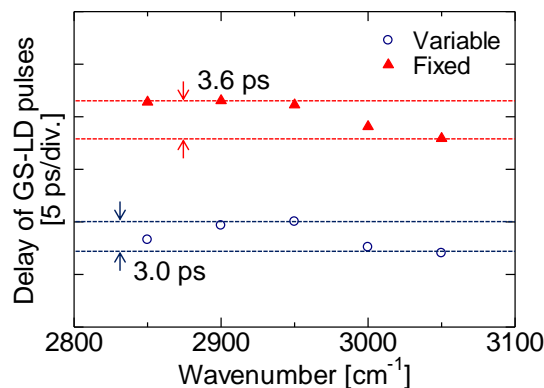


図 5.8 TSL パルス強度掃引時の V_{th} 制御時(青丸)と V_{th} 固定時(赤三角)の GS-LD パルスタイミングの比較。

5.3 1.03- μm 帯 GS-LD と高速波長可変ファイバレーザの同期実験

本研究ではこれまで 1.06- μm 帯 GS-LD を用いて実験を行ってきた。しかし、このレーザに我々は 4 段もの Yb 添加光増幅器(YDFA)を用いていた。これは、一般的な YDF において高利得が得られる波長が 1.03- μm であり、LD の中心波長である 1.06- μm から離れていることに起因している。本節では中心波長が 1030 nm 付近の DFB-LD (QLD106G-3010)を用いて、利得スイッチング駆動を試みた。さらに、我々の研究室で作製された波長可変ファイバレーザ(FL)との同期を確認し、簡易的な構成の YDFA により GS-LD の光パルスを増幅させた結果を確認した。

我々の研究室で作製された高速波長可変 Er-FL の模式図を図 5.9 に示す。この光源ではモードロッカーとして半導体可飽和吸収体ミラー(SESAM)を用いている。また、ガルバノスキャナと 2 枚のレンズペア、回折格子を用いて光パルスの波長の高速掃引を行っており、30 nm 程度の波長間の切り替えを 1 ms 以下の時間で行うことができる。

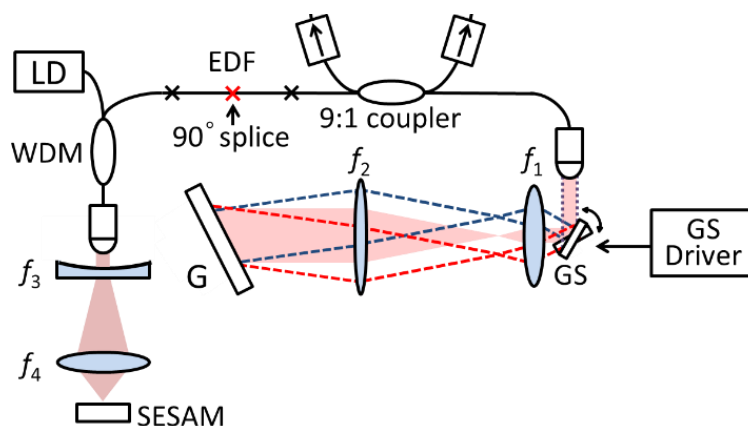


図 5.9 半導体可飽和吸収体ミラー(SESAM)を用いた高速波長可変 Er-FL の模式図。GS: ガルバノスキャナ、G: 回折格子、EDF: Er 添加光ファイバ。

この Er-FL を用いて 1.03- μm 帯 DFB-LD の利得スイッチング駆動を試みた。図 5.10 に 2 光源の模式図を示す。今回、1.03- μm 帯 GS-LD について最適な条件を求めするために、EPG のパルス幅と GS-LD 直前の光減衰器の度合いをパラメータにして計測を行った結果を図 5.11(a)に示す。利得スイッチング駆動に特徴的な長波の鋭いピークが確認できることから、最適な条件は光減衰器が 1 dB、電気パルスのパルス幅が 300 ps の時であると考えられる。また、図 5.11(b)にこの条件の時のサンプリングオシロスコープで計測した波形とジッタの値を示す。今回計測されたジッタは 3.01 ps であった。

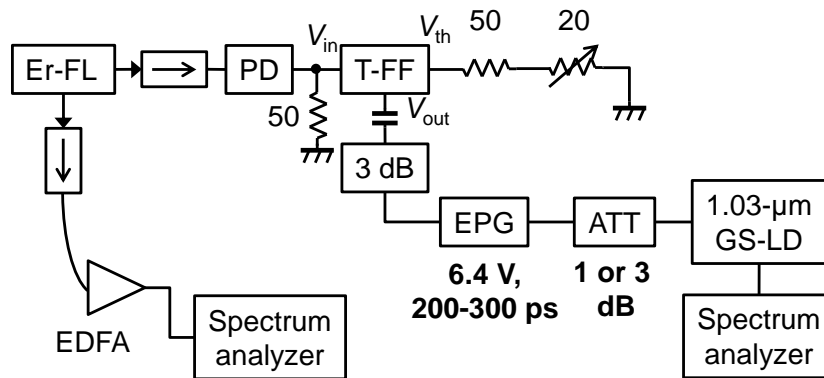


図 5.10 1.03- μm 帯 GS-LD と Er-FL を組み合わせた光源部の模式図。

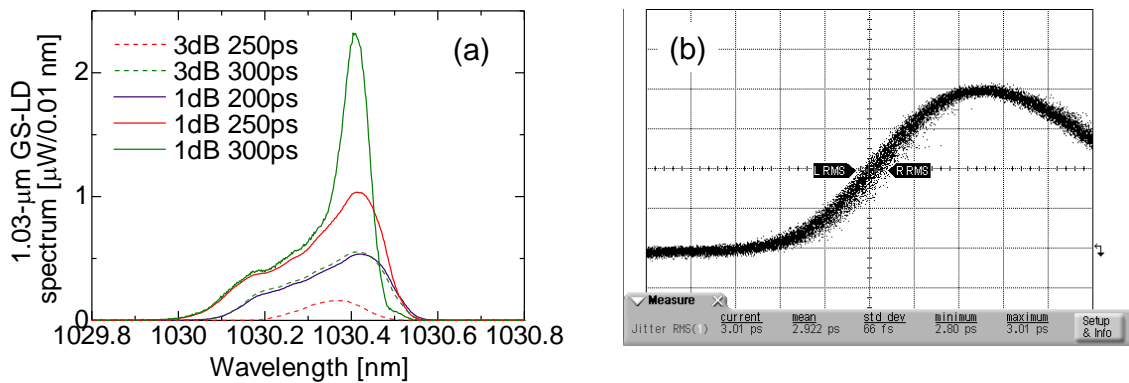


図 5.11 (a) 光減衰器の度合いと EPG のパルス幅をパラメータとした時の 1.03- μm 帯 GS-LD パルスのスペクトル。(b) (a)内緑線スペクトルの時のサンプリングオシロスコープで計測した GS-LD パルスの波形の立ち上がり及びジッタ。

また、図 5.12(a)に 1.03- μm 帯 GS-LD のために作製した YDFA の模式図を示す。この実験系では、光サーキュレータと回折格子を用いることで、1 段の YDFA でパルスを 2 回増幅することができる。この YDFA を用いて前述の GS-LD パルスを増幅した結果を図 5.12(b)に示す。回折格子によって短波側のパルス形成に起因しているスペクトル成分だけを抽出している。結果スペクトル幅は 0.20 nm であった。また回折格子を用いたスペクトルフィルタリングを行ったにもかかわらず、1 段の YDFA で 30 dB 以上の利得を得ることに成功した。

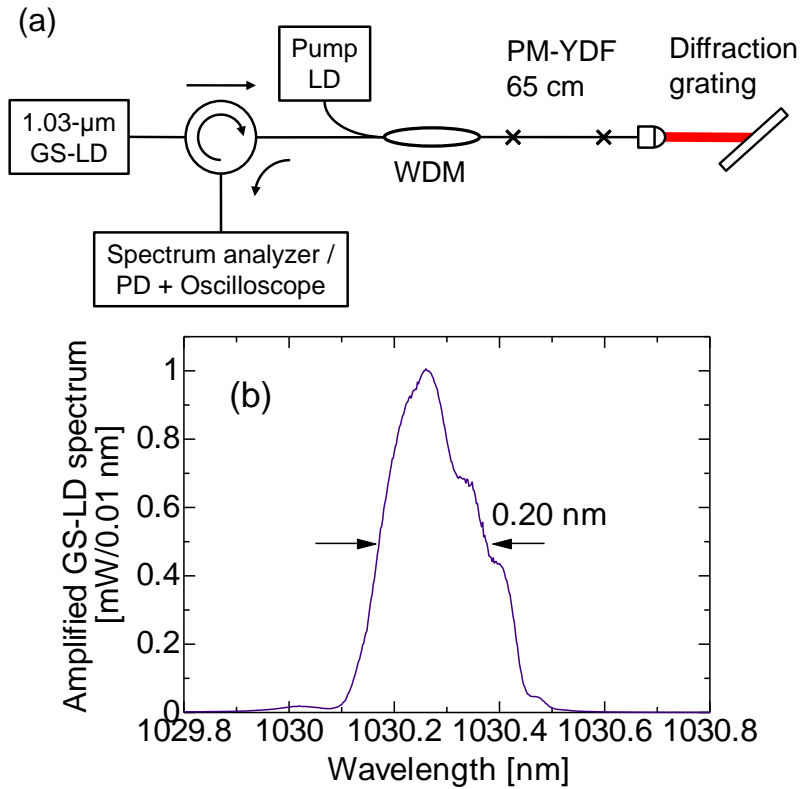


図 5.12 (a) 1.03- μm 帯 GS-LD 用 YDFA の模式図。(b) YDFA 増幅後の GS-LD パルスのスペクトル。

本計測では、TSL の代わりに FL を用いたことで、空間系にビームを出す必要がなくなった。その結果、図 5.13 の写真に示したように、2 光源合わせても非常にコンパクトな構成になっていることが確認できる。このようにして、将来的な波長可変レーザとの同期が確認できた。この光源を用いて高速分光 SRS イメージングを行うことができれば光源のコンパクト化の面では非常に意味のある結果になると考えられる。

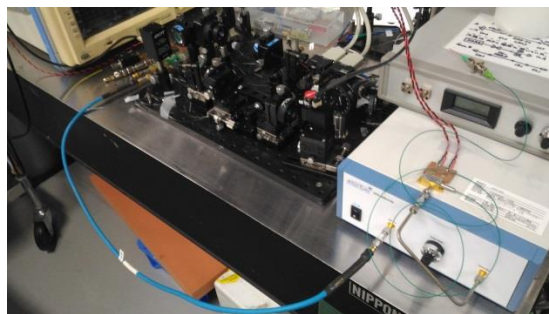


図 5.13 GS-LD+Er-FL の全体写真。

第6章 結論

以下に各章のまとめを記し、本研究を総括する。

第1章では、本研究を行うに至るまでの背景として、バイオイメージングにおける誘導ラマン散乱(SRS)顕微鏡の重要性と、その光源が実用化の大きな課題となっている現状について述べた。その背景をうけて、実用性の高い利得スイッチング駆動半導体レーザ(GS-LD)が、将来のSRS顕微鏡の光源として適用でき得るかを試みることを本研究の目的とした。さらに本研究の成果について簡潔に述べ、本論文の導入とした。

第2章では、SRS顕微鏡の概要について述べた。まず、SRS顕微鏡の光源として重要となる超短光パルスの特性について述べた。そして、超短光パルスと物質の相互作用によって誘起される非線形光学効果と、その効果を利用した非線形光学顕微鏡の特長を説明した。また、非線形光学効果であるSRSを含む各種ラマン散乱について述べ、それぞれの原理を利用した顕微鏡について比較を行うことでSRS顕微鏡に優位性があることを示した。その後、SRS信号の取得方法について述べると共に、我々のSRS顕微鏡光学系の構成について述べた。

第3章では、利得スイッチング駆動半導体レーザ(GS-LD)の概要について述べた。GS-LDによってピコ秒の光パルスが生成される原理を示した。そして、SRS顕微鏡用のコンパクトなパルス光源としてLDを用いることを考えた際に、利得スイッチング駆動方式が他のパルス発振の方式よりも有用性があることを示した。

第4章では、GS-LDとチタンサファイアレーザ(TSL)を光源としたSRSイメージングの結果について報告した。始めにGS-LDとトグルフリップフロップ(T-FF)を利用した小型かつ容易に行える高調波同期光源について説明した。つづいて、本研究で用いた1.06- μm 帯GS-LDパルスのパルス幅、スペクトル、ジッタの評価を行った。その後、その1.06- μm 帯GS-LDとTSLを光源に用いて、ポリマービーズと生細胞のSRSイメージングに成功した結果を示し、GS-LDがSRS顕微鏡へ応用できる光源であることを実証した。

第5章では、GS-LDパルスの性能向上を目指した実験的検討を行った。まず、短パルス化に際して課題となると考えられるGS-LDパルスが持つジッタについて検討を行った。そして実際に、サーキュレータを用いた光注入を行うことで、1.06- μm 帯GS-LDパルスについてジッタが低減することを確認した。つづいて、GS-LDパルスの出力のタイミングが、T-FFに入力されるTSLパルスの強度に依存する課題についてその解決法の提案と実証を行った。その後、異なる波長帯である1.03- μm 帯GS-LDと波長可変ファイバレーザ(FL)の2つのパルス光源から同期したパルスが得られた結果を示した。

本研究では、GS-LDを光源に用いた生細胞のSRSイメージングに世界で初めて成功し、GS-LDが実用的なSRSイメージング用光源として適用できることを実証した。この成果は、SRS顕微鏡の利便性を追求するためにFLを中心とした光源の研究が行われている中で、より集約性、安

定性に優れている **GS-LD** が、**FL** に代わる光源になり得るという可能性を示したという点で非常に大きな価値があると考えられる。

今後は、**GS-LD** と波長可変光源を組み合わせた分光イメージングや、分散補償による短パルス化、そして強度ゆらぎの低減などを行うことで、**SRS** 顕微鏡の実用性がより向上することを期待しながら、結論を締めくくる。

付録 A ヒト皮膚の SRS イメージング

付録 A では、我々が既存の FL と TSL を光源とした SRS システム(2.5.3 項参照)を用いて観察したヒトの表皮のイメージング結果を紹介する。

図 A.1 に示すように、人間の皮膚構造は外界に近い側から表皮、真皮、皮下組織となっている[43]。表皮はその中でさらに4つの層から構成されており、真皮に近い側から基底層、有棘層、顆粒層、角層となっている。基底層に存在する表皮細胞のみが分裂を行い、分化された細胞が徐々に押し上げられていき、最終的に角層へたどり着き、垢となって剥がれ落ちる。表皮全体の厚みは 100-200 μm であり、部位によって厚みが異なる。表皮細胞の大部分はケラチノサイト(KC)と呼ばれる細胞で構成されている。その他にしみの原因となるメラニンを生産するメラノサイト(MC)や皮膚を保護する際に重要な役割を果たすランゲルハンス細胞(LC)と呼ばれる樹状細胞が存在している。MC は基底層に、LC は有棘層に存在することが確認されており、LC は外界からの異物に反応してリンパ球に情報を送るセンサーの役割を果たしている。

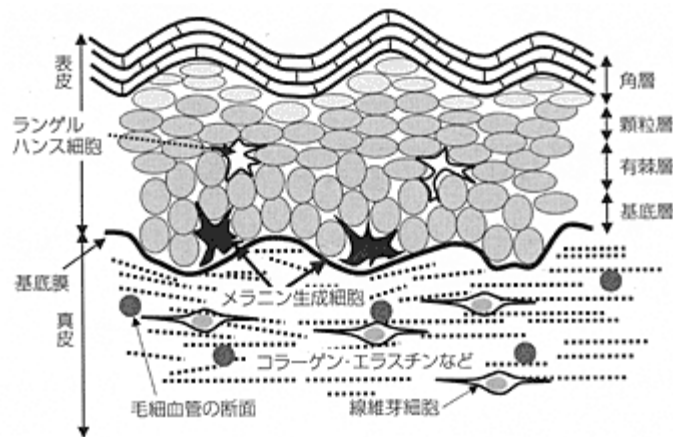


図 A.1 皮膚の基本構造。[43]より引用。

本計測では、表皮の各層における KC の形態、そして有棘層内の LC の形態を確かめるため、無染色の表皮に対する SRS イメージングを試みた。始めにガラスベースディッシュ内の CnT-Prime 培地で 4 日間培養された状態の KC、LC、MC をそれぞれ計測した。培地に CaCl_2 を加えることで KC の分化を促進できることを利用して、KC については未分化細胞と分化細胞の 2 種類の計測を行った。図 A.2 に結果を示す。上から順に未分化 KC、分化 KC \times 2、伸長状 LC、球状 LC、MC である。KC については、分化状態と未分化状態における形態の違いをスペクトルと共に確認できた。また、画像で示したラマンシフトとして、 2820 cm^{-1} は色素を反映した 2 光子吸収由来の蛍光信号、 2850 cm^{-1} は脂質を反映した CH_2 結合由来の SRS 信号、 2930 cm^{-1} はタンパク質を反映した CH_3 結合由来の SRS 信号、 3010 cm^{-1} は不飽和脂肪酸を反映した炭素間二重結合由来の SRS 信号の確認のために示している。それぞれの画像についてラマンシフトによる構造の違いが確認できた。

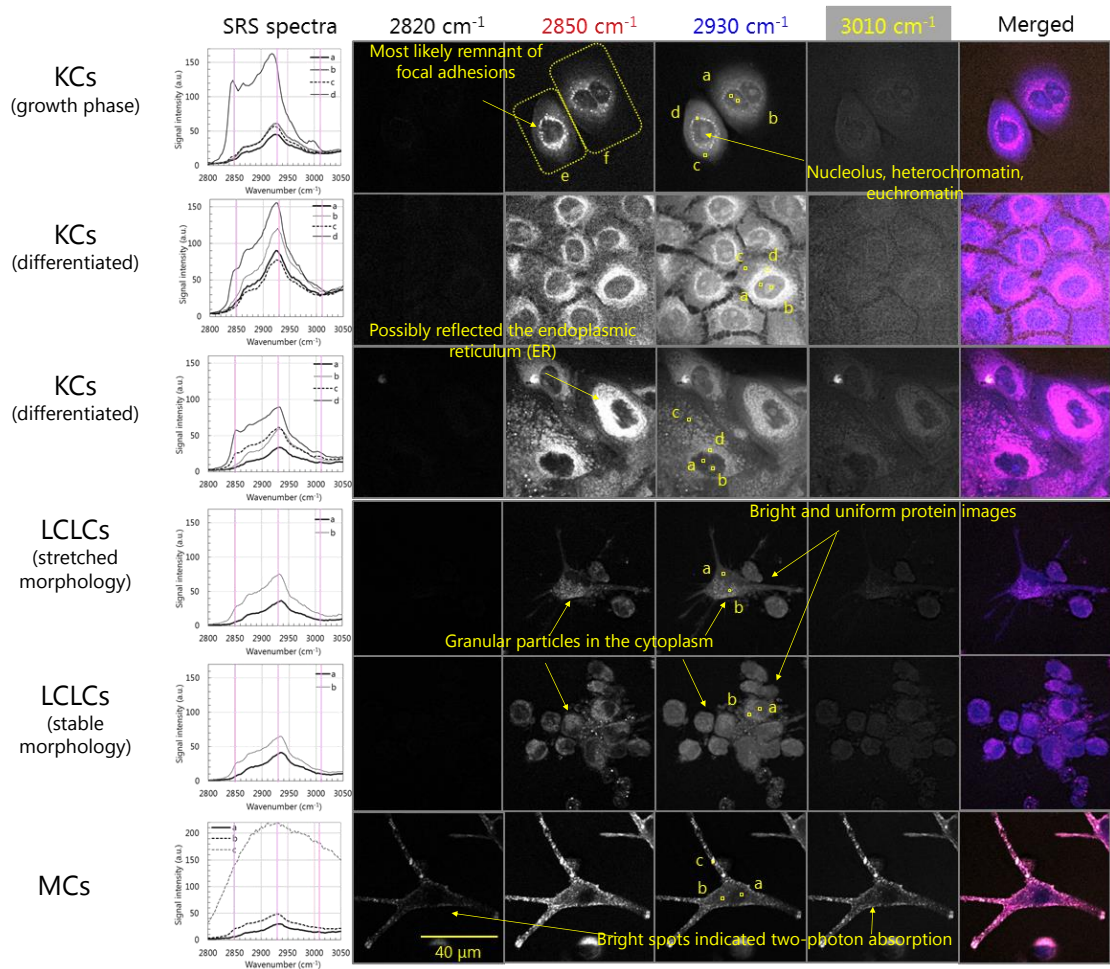


図 A.2 KC、LC、MC の SRS 像とスペクトル。

図 A.3 はヒト皮膚組織の SRS 像である。表皮から 42 μm 付近の深さで確認した有棘層の結果を示している。黄色の矢印で示した部分に LC に特徴的な樹状突起を持った細胞が確認できる。また、図 A.4 ではそれぞれ表皮の顆粒層、有棘層、基底層での SRS 像を示している。このように、KC 内の核や細胞質の形態が存在している層の状態に応じて異なることが確認できる。

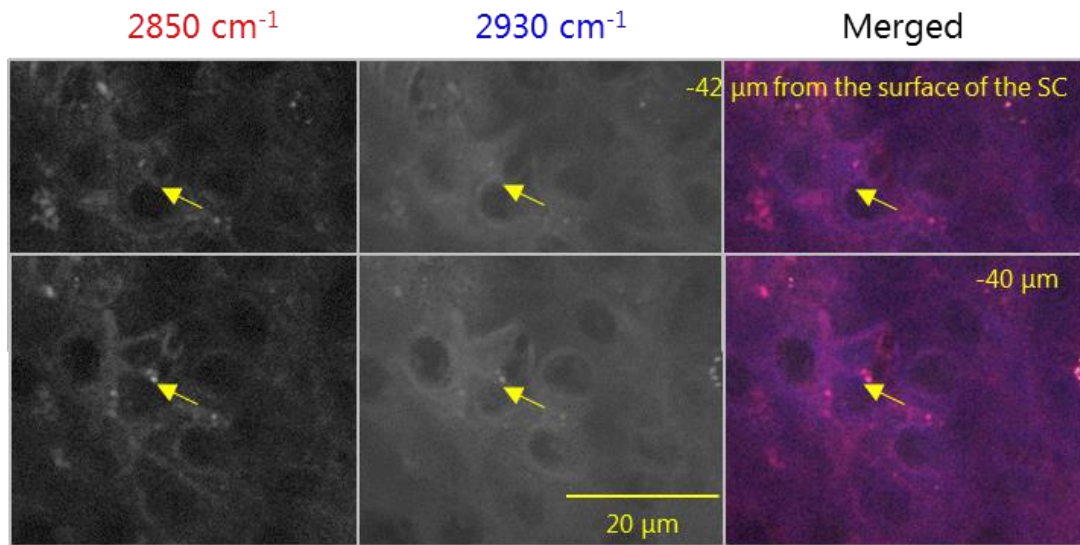


図 A.3 ヒト皮膚組織の SRS 像。矢印で示した部分が LC と見られる細胞。

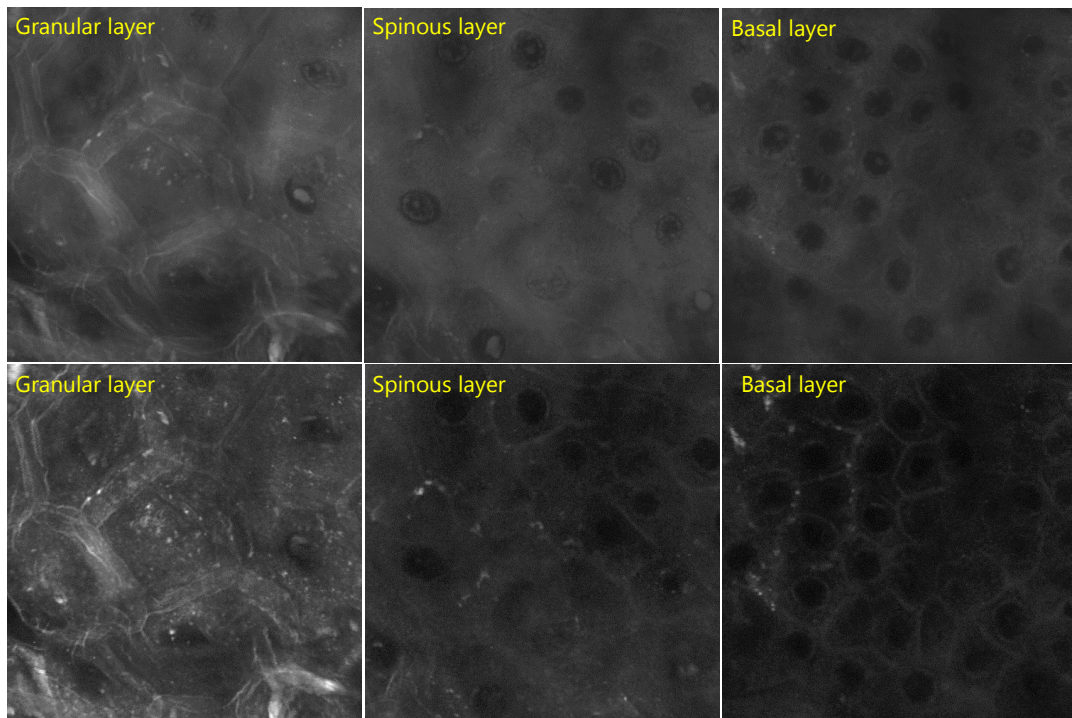


図 A.4 顆粒層、有棘層、基底層におけるヒト皮膚の SRS 像。上部がタンパク質、下部が脂質由来の SRS 像。

このようにして我々は、無染色の表皮細胞及びヒト皮膚の SRS イメージングに成功した。そして、SRS イメージングを用いて有棘層における LC の存在を確認した。また、KC の各層における形態の違いをスペクトルと共に確認した。今後、SRS 顕微鏡が皮膚病学の分野において、表皮細胞の機能の解明やがん細胞の発見につながるような大きな役割を担うことを期待する。

付録 B アルキンプローブ修飾細胞の SRS イメージング

付録 B では、細胞膜に対してアルキンステロイドプローブを付随した生細胞の SRS イメージングの計測結果について紹介する。

生体細胞の細胞膜を構成する必須成分として、脂質 2 重膜の他にコレステロールがある。細胞膜上のコレステロールは、生体内の代謝、細胞内外の情報伝達など生体の活動への大きな役割を担っている。そのため、生化学や生物学の分野において、コレステロールが細胞膜中にどのように局在するかを知ることは重要なテーマとなっている。従来、コレステロールの局在位置を特定するための手段として蛍光染色が用いられてきた。しかし、蛍光分子による電荷の偏りや立体構造によって、細胞膜の持つ本来の性質が阻害される恐れが指摘されてきた。そこで近年、アルキンプローブを用いた手法が注目されている。アルキンプローブは蛍光分子に比べて分子量が非常に小さく、また電荷の偏りも小さい。そして、このアルキンのもつ炭素間三重結合に対して強く鋭いピークを持った SRS 信号が 2100 cm^{-1} 付近で得られる。このアルキンが信号を示す波数域 ($1800\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$) はラマンスペクトルにおける無信号領域と呼ばれ、他の分子結合由来の SRS 信号が少ないため、非常に高コントラストな像を得ることが期待できる。本実験では、細胞膜上のコレステロールが多く存在する領域を可視化するためのプローブとして、アルキンタグが修飾されたアルキンステロイドアナログの合成及び導入が行えたことを確認するために SRS イメージングによる計測を行った。

図 B.1(a) に本実験で計測したアルキンステロイドプローブの構造式を示す。ステロイド核左下部分の六員環が開いてアルキン結合が付随している。付録 A と同様に Yb-FL と TSL を光源としたシステム(2.5.3 項参照)を用いて SRS イメージングを行った。また、アルキンの SRS 信号を取得するために TSL の中心波長を 843.2 nm ヘシフトさせた。図 B.1(b) にアルキンステロイドプローブのみの試料を計測した時の SRS スペクトルを示す。このように、 2110 cm^{-1} 付近においてアルキン特有のピークが確認できた。

つづいて、図 B.2 にこのアルキンステロイドアナログを導入した HeLa 細胞の SRS イメージング結果を示す。細胞は DMEM 濃度 10% の培地で CO_2 濃度 5% のインキュベータ中で培養された。ラマンシフトはそれぞれ 2092 cm^{-1} 、 2112 cm^{-1} 、 2132 cm^{-1} とした。この図から、 2112 cm^{-1} で計測した結果においてのみ、アルキン分子振動由来の粒状の信号が細胞質内に局在していることが確認できた。

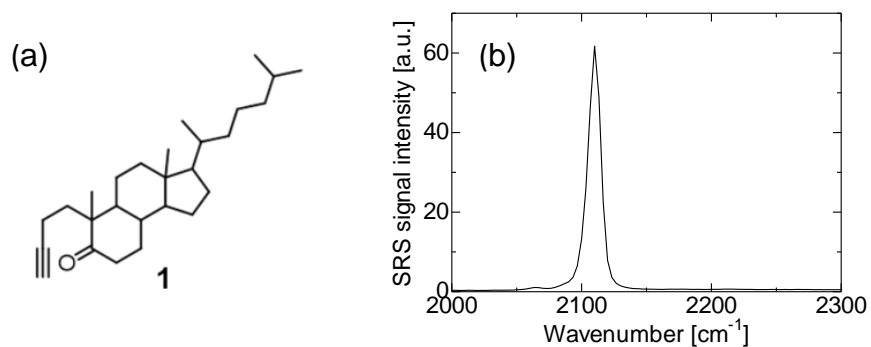


図 B.1 アルキンスteroidプローブの(a)構造式、(b)SRS スペクトル。

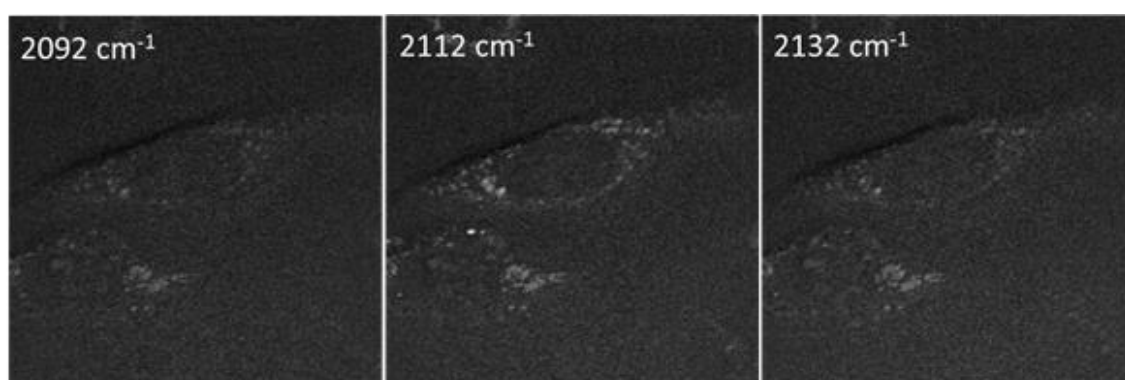


図 B.2 アルキン修飾ステロイドアナログ導入後の HeLa 細胞の SRS 像。ラマンシフトは(左): 2092 cm^{-1} 、(中央): 2112 cm^{-1} 、(右): 2132 cm^{-1} 。

このようにして、生細胞内に導入されたアルキンプローブの SRS イメージングに成功した。今後、このアルキンプローブを用いることで、細胞膜に存在しているコレステロールのダイナミクスが SRS 顕微鏡によって捉えられることが期待できる。

参考文献

- [1] 日本分光学会, "顕微分光法 ナノ・マイクロの世界を見る分光法" (講談社, 2009).
- [2] S. W. Hell and J. Wichmann, "Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy," *Opt. Lett.* **19**, 780-782 (1994).
- [3] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H. F. Hess, "Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution," *Science* **313**, 1642-1645 (2006).
- [4] R. J. Clark, "Raman microscopy: application to the identification of pigments on medieval manuscripts," *Chem. Soc. Rev.* **24**, 187-196 (1995).
- [5] C. W. Freudiger, W. Min, B. G. Saar, S. Lu, G. R. Holtom, C. He, J. C. Tsai, J. X. Kang, and X. S. Xie, "Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy," *Science* **322**, 1857-1861 (2008).
- [6] P. Nandakumar, A. Kovalev, and A. Volkmer, "Vibrational imaging based on stimulated Raman scattering microscopy," *New Journal of Physics* **11**, 033026 (2009).
- [7] Y. Ozeki, F. Dake, S. Kajiyama, K. Fukui, and K. Itoh, "Analysis and experimental assessment of the sensitivity of stimulated Raman scattering microscopy," *Optics express* **17**, 3651-3658 (2009).
- [8] B. G. Saar, C. W. Freudiger, J. Reichman, C. M. Stanley, G. R. Holtom, and X. S. Xie, "Video-rate molecular imaging in vivo with stimulated Raman scattering," *Science* **330**, 1368-1370 (2010).
- [9] W. Min, C. W. Freudiger, S. Lu, and X. S. Xie, "Coherent nonlinear optical imaging: beyond fluorescence microscopy," *Annu. Rev. Phys. Chem.* **62**, 507-530 (2011).
- [10] J. Cheng and X. S. Xie, "Coherent Raman scattering microscopy" (CRC press, 2012).
- [11] M. D. Duncan, J. Reintjes, and T. Manuccia, "Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope," *Opt. Lett.* **7**, 350-352 (1982).
- [12] A. Zumbusch, G. R. Holtom, and X. S. Xie, "Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-Stokes Raman scattering," *Phys. Rev. Lett.* **82**, 4142 (1999).

- [13] G. Eckhardt, R. Hellwarth, F. McClung, S. Schwarz, D. Weiner, and E. Woodbury, "Stimulated Raman scattering from organic liquids," *Phys. Rev. Lett.* **9**, 455 (1962).
- [14] E. Ploetz, S. Laimgruber, S. Berner, W. Zinth, and P. Gilch, "Femtosecond stimulated Raman microscopy," *Applied Physics B* **87**, 389-393 (2007).
- [15] Y. Ozeki, Y. Kitagawa, K. Sumimura, N. Nishizawa, W. Umemura, S. Kajiyama, K. Fukui, and K. Itoh, "Stimulated Raman scattering microscope with shot noise limited sensitivity using subharmonically synchronized laser pulses," *Optics express* **18**, 13708-13719 (2010).
- [16] A. Gambetta, V. Kumar, G. Grancini, D. Polli, R. Ramponi, G. Cerullo, and M. Marangoni, "Fiber-format stimulated-Raman-scattering microscopy from a single laser oscillator," *Opt. Lett.* **35**, 226-228 (2010).
- [17] K. Nose, Y. Ozeki, T. Kishi, K. Sumimura, N. Nishizawa, K. Fukui, Y. Kanematsu, and K. Itoh, "Sensitivity enhancement of fiber-laser-based stimulated Raman scattering microscopy by collinear balanced detection technique," *Optics express* **20**, 13958-13965 (2012).
- [18] C. W. Freudiger, W. Yang, G. R. Holtom, N. Peyghambarian, X. S. Xie, and K. Q. Kieu, "Stimulated Raman scattering microscopy with a robust fibre laser source," *Nature photonics* **8**, 153-159 (2014).
- [19] C. Hu, M. N. Slipchenko, P. Wang, P. Wang, J. D. Lin, G. Simpson, B. Hu, and J. Cheng, "Stimulated Raman scattering imaging by continuous-wave laser excitation," *Opt. Lett.* **38**, 1479-1481 (2013).
- [20] K. Wang, D. Zhang, K. Charan, M. N. Slipchenko, P. Wang, C. Xu, and J. Cheng, "Time - lens based hyperspectral stimulated Raman scattering imaging and quantitative spectral analysis," *Journal of biophotonics* **6**, 815-820 (2013).
- [21] T. Steinle, V. Kumar, A. Steinmann, M. Marangoni, G. Cerullo, and H. Giessen, "Compact, low-noise, all-solid-state laser system for stimulated Raman scattering microscopy," *Opt. Lett.* **40**, 593-596 (2015).
- [22] T. Kobayashi, A. Yoshikawa, A. Morimoto, Y. Aoki, and T. Sueta, "Generation of ultrashort optical pulse by pulse driving of a semiconductor diode laser (A)," *Journal of the Optical Society of America* (1917-1983) **70**, 667 (1980).
- [23] K. Lau, "Gain switching of semiconductor injection lasers," *Appl. Phys. Lett.* **52**, 257-259 (1988).

- [24] H. Yokoyama, H. Guo, T. Yoda, K. Takashima, K. Sato, H. Taniguchi, and H. Ito, "Two-photon bioimaging with picosecond optical pulses from a semiconductor laser," *Optics express* **14**, 3467-3471 (2006).
- [25] Y. Kusama, Y. Tanushi, M. Yokoyama, R. Kawakami, T. Hibi, Y. Kozawa, T. Nemoto, S. Sato, and H. Yokoyama, "7-ps optical pulse generation from a 1064-nm gain-switched laser diode and its application for two-photon microscopy," *Optics express* **22**, 5746-5753 (2014).
- [26] R. Kawakami, K. Sawada, Y. Kusama, Y. Fang, S. Kanazawa, Y. Kozawa, S. Sato, H. Yokoyama, and T. Nemoto, "In vivo two-photon imaging of mouse hippocampal neurons in dentate gyrus using a light source based on a high-peak power gain-switched laser diode," *Biomedical optics express* **6**, 891-901 (2015).
- [27] 服部利明, "非線形光学入門" (裳華房, 2009).
- [28] G. P. Agrawal, "非線形ファイバー光学(原書第2版)" (吉岡書店, 1997).
- [29] T. Wilson, "Confocal microscopy," Academic Press: London, etc **426**, 1-64 (1990).
- [30] B. Master and P. So, "Biomedical nonlinear optical microscopy" (Oxford University Press New York, 2008).
- [31] 北川雄真, "高調波同期光源による高感度誘導ラマン散乱顕微鏡," (2010).
- [32] J. Cheng and X. S. Xie, "Vibrational spectroscopic imaging of living systems: An emerging platform for biology and medicine," *Science* **350**, aaa8870 (2015).
- [33] 濱口宏夫、平川暁子, "ラマン分光法" (学会出版センター, 1988).
- [34] "Raman Spectroscopy Tackles Pharmaceutical Raw Materials,"
<http://www.laboratoryequipment.com/articles/2013/03/raman-spectroscopy-tackles-pharmaceutical-raw-materials>.
- [35] Y. Ozeki, W. Umemura, Y. Otsuka, S. Satoh, H. Hashimoto, K. Sumimura, N. Nishizawa, K. Fukui, and K. Itoh, "High-speed molecular spectral imaging of tissue with stimulated Raman scattering," *Nature photonics* **6**, 845-851 (2012).
- [36] 菊池和朗, "光ファイバ通信の基礎" (昭晃堂, 1997).

- [37] Y. Arakawa and A. Yariv, "Quantum well lasers--Gain, spectra, dynamics," *IEEE J. Quant. Electron.* **22**, 1887-1899 (1986).
- [38] 横山弘之, "半導体レーザによる高機能超短光パルス光源," *電子情報通信学会論文誌 C J97-C*, 1-8 (2014).
- [39] Y. Matsui, S. Kutsuzawa, S. Arahira, and Y. Ogawa, "Generation of wavelength tunable gain-switched pulses from FP MQW lasers with external injection seeding," *Photonics Technology Letters, IEEE* **9**, 1087-1089 (1997).
- [40] Y. Ozeki and D. Tashiro, "Fast wavelength-tunable picosecond pulses from a passively mode-locked Er fiber laser using a galvanometer-driven intracavity filter," *Optics express* **23**, 15186-15194 (2015).
- [41] D. Y. Kim, "Timing jitter reduction of gain-switched DFB laser by external injection-seeding," *Electron. Lett.* **32**, 44-45 (1996).
- [42] D. Gedcke and W. McDonald, "A constant fraction of pulse height trigger for optimum time resolution," *Nucl. Instrum. Methods* **55**, 377-380 (1967).
- [43] "皮膚と毎日のスキンケア," <http://www.jomf.or.jp/report/kaigai/25/9.htm>.

発表論文リスト

1. 主著者論文

学術論文誌

- [A-1] K. Tokunaga, Y. -C. Fang, H. Yokoyama, and Y. Ozeki, “Generation of subharmonically synchronized picosecond pulses by a 1.06- μm gain-switched laser diode for stimulated Raman scattering microscopy,” Opt. Express (投稿中)

国際学会

- [A-2] K. Tokunaga, Y. -C. Fang, Y. Kusama, H. Yokoyama, and Y. Ozeki, “Experimental investigation of timing jitter of a 1.06- μm gain-switched laser diode for stimulated Raman scattering microscopy,” The 11th Conference on Lasers and Electro-Optics Pacific Rim (CLEO-PR 2015), 27H2-3, Busan, Korea, Aug. 2015.
- [A-3] K. Tokunaga, Y. -C. Fang, H. Yokoyama, and Y. Ozeki, “Synchronized and timing-stabilized pulse generation from a gain-switched laser diode for stimulated Raman scattering microscopy,” Society of Photographic Instrumentation Engineers Photonics West (SPIE, PW) BiOS 2016, 9712-20, San Francisco, CA, U.S.A., Feb. 2016.

国内学会・研究会

- [A-4] 徳永京也、小関泰之、“誘導ラマン分光顕微鏡、”第4回先端フォトニクスシンポジウム、48、日本学術会議講堂、2014年8月。
- [A-5] 徳永京也、房宜激、草間裕太、横山弘之、小関泰之、“1.06- μm 帯利得スイッチング駆動 DFB-LD 光パルスのジッタ低減の検討、”第62回応用物理学会春季学術講演会、12a-A15-10、東海大学湘南キャンパス、2015年3月。
- [A-6] 徳永京也、“誘導ラマン分光顕微鏡とそのパルス光源の研究、”国際光年記念シンポジウムプレイベント、103、東京大学工学部2号館フォーラム、2015年4月。
- [A-7] 徳永京也、房宜激、草間裕太、横山弘之、小関泰之、“1.06- μm 帯利得スイッチング駆動 DFB-LD とチタンサファイアレーザーを用いた誘導ラマン分光イメージング、”第76回応用物理学会秋季学術講演会、14p-2N-1、名古屋国際会議場、2015年9月。
- [A-8] 徳永京也、房宜激、横山弘之、小関泰之、“誘導ラマン顕微鏡応用に向けた利得スイッチング LD パルスのタイミング安定化、”日本光学会年次学術講演会 Optics & Photonics Japan 2015、28aC4、筑波大学東京キャンパス、2015年10月。
- [A-9] 徳永京也、房宜激、横山弘之、小関泰之、“SRS 顕微鏡応用に向けた利得スイッチング半導体レーザー光源の検討、”レーザー学会第482回研究会「ファイバレーザー技術」、P5、名古屋大学東山キャンパス、2015年11月。

- [A-10] 徳永京也、房宜激、横山弘之、小関泰之、“利得スイッチング駆動半導体レーザを用いた誘導ラマン顕微鏡による生細胞イメージング、”第 63 回応用物理学会春季学術講演会、21p-S422-9、東京工業大学大岡山キャンパス、2016 年 3 月。

表彰

- [A-11] 徳永京也、小関泰之、第 4 回先端フォトニクスシンポジウム 人気ポスター賞、2014 年 8 月。

2. 共著論文

学術論文誌

- [B-1] M. Egawa, K. Tokunaga, J. Hosoi, S. Iwanaga, and Y. Ozeki, “Label-free visualization of cell components in epidermal keratinocytes at different stages and Langerhans cells using stimulated Raman scattering microscopy,” J. Biomed. Opt.(投稿中).

国際学会

- [B-2] Y. Ozeki, K. Tokunaga, and K. Nose, “Group delay compensation of spectrally-filtered picosecond pulses for stimulated Raman microscopy,” Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO2014), JTh2.30, San Jose, U.S.A., Jun. 2014.
- [B-3] M. Egawa, K. Tokunaga, J. Hosoi, S. Iwanaga, and Y. Ozeki, “*In situ* visualization of keratinocyte differentiation and Langerhans cells in human epidermis using stimulated Raman scattering microscopy,” Biophotonics Japan, 9792-57, Tokyo, Japan, Oct. 2015.
- [B-4] Y. Ozeki, K. Tokunaga, Y. -C. Fang, Y. Kusama, and H. Yokoyama, “Stimulated Raman multispectral imaging with two-color picosecond laser pulses from a gain-switched laser diode and a Ti:sapphire laser,” Biophotonics Japan, 9792-2, Tsukuba Univ. Tokyo Campus, Oct. 2015.
- [B-5] M. Egawa, K. Tokunaga, J. Hosoi, S. Iwanaga, and Y. Ozeki, “Non-staining imaging of epidermal cells with stimulated Raman scattering microscopy targeting keratinocyte in different stages and Langerhans cells,” The 14th International Workshop on Langerhans Cells, 10, Kyoto, Japan, Nov. 2015.

国内学会・研究会

- [B-6] 松下卓、山口哲志、徳永京也、小関泰之、岡本晃充、“ターンオン型コレステロールプローブの脂質二分子膜上でのラマンイメージング、” 日本化学会第 95 春季年会、2J8-35、日本大学船橋キャンパス、2015 年 3 月。
- [B-7] 深津智耀、徳永京也、田代大吾、小関泰之、“誘導ラマン顕微鏡のための高速波長可変ピコ秒モード同期ファイバレーザの研究、” レーザ学会第 482 回研究会「ファイバレーザ技術」、P6、名古屋大学東山キャンパス、2015 年 11 月。
- [B-8] 岩永慎也、江川麻里子、徳永京也、細井純一、小関泰之、“Non-staining imaging of keratinocyte differentiation with stimulated Raman scattering microscopy,” 第 40 回日本研究皮膚科学会、P05-20、岡山コンベンションセンター、2015 年 12 月。

謝辞

本研究を進めるにあたり、非常に多くの方々にお世話になりました。この場をお借りして、深く御礼申し上げる所存です。

指導教官である東京大学工学系研究科電気系工学専攻 小関泰之准教授には、研究の細部にわたり懇切丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました。また、論文作成に際して非常に丁寧にご指導をして頂きました。さらに、研究外においても、社会で通用するような人としての在り方など、数多くのことを学ばせて頂きました。心から深く感謝いたします。

研究の要所にて非常に的確なご助言を頂きました本学工学系研究科電気系工学専攻 菊池和朗教授には厚く御礼申し上げます。

本研究において電子回路の作製、機械工作に関するご助言を始め、有益なご指導を頂きました本学工学系研究科電気系工学専攻 加藤一弘助教に深く感謝いたします。

本研究で用いた半導体レーザを提供して頂いた東北大学未来科学技術共同センター 横山弘之教授、房宜激氏、草間裕太氏に大変深く感謝いたします。

本研究で用いた試料を提供して頂いた資生堂株式会社 江川麻里子氏、細井純一氏、岩永慎也氏、また試料の提供と共に細胞試料に関するご指導を頂きました東京大学工学系研究科化学生命工学専攻 岡本晃充教授、山口哲志講師、松下卓氏、浦愛美氏、高木理沙氏に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、実験に多大な貢献をして頂きましたキヤノン株式会社 大塚洋一氏、眞柄宏司氏、に深く感謝いたします。

また、菊池研究室所属の陸さん（現カリフォルニア大学デービス校）、石村さん（現 KDDI）、理学系研究科科学系専攻合田研究室所属の脇坂さん、そして小関研究室所属の鈴木さん、小林君、深津君、藤脇君には日常的な議論や研究室運営など様々な面でお世話になりました。

最後に、経済的そして精神的にも自分を支えてくれた家族に心から感謝いたします。