

コヒーレントラマン計測に好適な ピコ秒波長可変レーザーの開発

＝バイオイメージング技術の高性能化と普及に向けて＝

スペクトラ・クエスト・ラボ(株) 福岡 大輔・室 清文

1. はじめに

生体組織を分子レベルで可視化するバイオイメージングは生命科学の研究においてなくてはならないものとなっている。しかし、現在主流となっている蛍光バイオイメージングはターゲット分子に蛍光標識をつける面倒な前処理を必要とするばかりか、蛍光標識の付加によってターゲット分子の自由な動きが妨げられることや、蛍光退色等の問題がある。他方、外科手術等の臨床現場では、病理検査による患部組織の迅速な判断が求められており、手間のかかる染色を必要としないバイオイメージングの導入が囑望されている。

分子共鳴を測定するラマン散乱計測は無染色での分子イメージングを可能にする唯一の計測法であるが、感度が低く1点の測定に秒単位の時間を要するため、イメージングや動態観察には馴染まない。この問題を解決するため、感度を何万倍も増強するCARS (Coherent Anti-stokes Raman Scattering) やSRS (Stimulated Raman Scattering) などのコヒーレントラマン計測によるイメージングが開発された⁽¹⁾⁽²⁾。

しかしながら、コヒーレントラマン計測には複数の波長で同時に発振し、広帯域に波長可変な高い尖頭出力 (~100 W) を有するピコ秒レーザーが不可欠である。モードロックレーザーは比較的容易に高出力パルス列を発生することができるが、別のモードロックレーザーとの間で同期をとることが著しく困難である。その結果、コヒーレントラマン計測にはモードロックレーザーを励起光源にする光パラメトリック発振器が主に使用されている。しかし、大型・複雑な装置になっており高価で、恒温・クリーンな設置環境を必要とするなど、使い勝手がわるい。このため、コヒーレン

トラマン計測を用いた生体分子イメージングはごく限られた研究機関で活用されているに過ぎず、広範な応用に向けての障害となっている。

スペクトラ・クエスト・ラボ(株)は2013年の設立以来、近赤外域において、ASE-Freeで広帯域にモードホップフリー同調可能な波長可変レーザーや、1 Wレベルの出力の半導体光増幅器、更には、70 dBの消光比を持つナノ秒パルス光増幅器、市販されていない波長域で光増幅可能な光ファイバーアンプの製品化を進めてきた⁽³⁾。

更に最近では上記の一連の製品群をベースに、最新の光エレクトロニクス技術を駆使する新しいピコ秒波長可変レーザー光源を開発した⁽⁴⁾。このレーザーは1 kWレベルのフーリエ限界のピコ秒パルスの発生が可能であると同時に、従来のレーザーには無い高い波長同調性とパルス同期性を具備しており、コヒーレントラマンバイオイメージングや光による量子操作等の多光子分光計測に好適なレーザー光源となっている。

2. 新しい高出力ピコ秒波長可変レーザーの開発

開発したピコ秒光パルス発生システムの構成を図1に示す。まず、波長可変半導体レーザーからの狭線幅のCW光は10 GHz LN位相変調器により変調されチャープ光(光コム)に変換される。次いで、半導体光増幅器により10 MHz程度の繰り返し周波数の1ナノ秒の光パルスが切り出される。この光増幅器は消光比が70dB以上あり、光出力も1 W程度あるため、後段の光ファイバーアンプで高尖頭出力を得るのに極めて好都合である。図1上部に示すように、この1ナノ秒パ

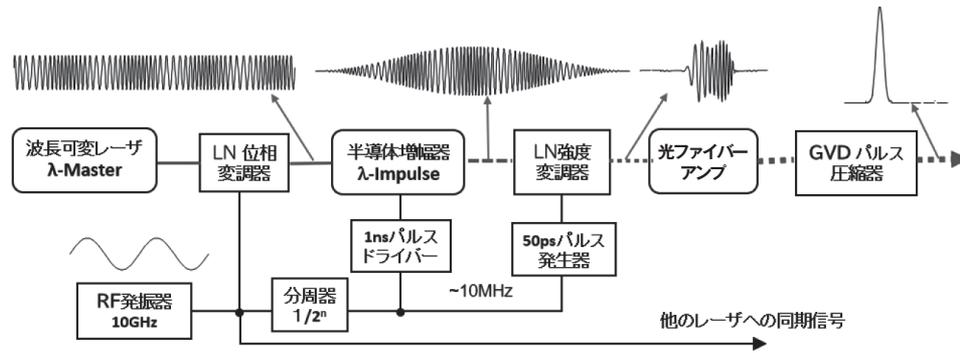


図1 開発したピコ秒光パルス発生システムの構成

ルスには約10周期分のチャープが含まれるため、次段のLN強度変調器で半周期分（50ピコ秒）のアップチャープ部分を切り出す。切り出された光はファイバーアンプで増幅された後、群速度分散パルス圧縮器によりパルス幅約5ピコ秒のパルス列に変換される。その結果、尖頭出力は1 kWに達する。このパルス圧縮器は弊社独自（特許取得済み）の構成により通常は困難である広帯域の波長変化に対応することができ、波長可変半導体レーザーの発振波長に連動して最適なパルス圧縮が得られる⁽⁵⁾。上記のパルス発生、切り出しは10 GHzの高周波信号に同期して行われるため、この基準信号を用いて別の類似のピコ秒レーザーと光パルスの同期が可能である。

図2に位相変調後にパルス幅50ピコ秒で切り出したアップチャープ部分の光スペクトルを示す。約20本の周波数間隔10 GHzの光コムを構成していることがわかる。図3に自己相関法により測定した光パルスのオートコリレータ信号を示す。赤色のチャートは位相変調をOFFした時の相関チャートで、青色のチャートは

位相変調をONした時の相関チャートである。光コムの生成によりほぼフーリエ限界の4.2ピコ秒の光パルスに圧縮されている。

図4に繰り返し周波数を変えて測定した、光ファイ

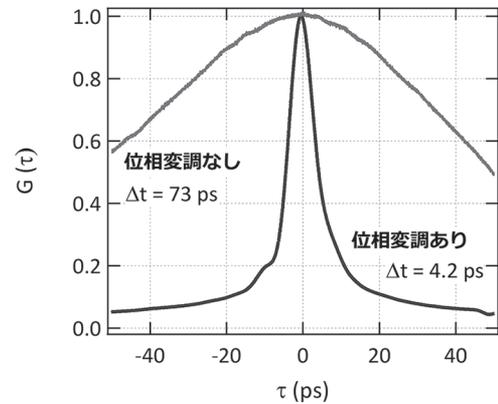


図3 光パルスのオートコリレーションチャート

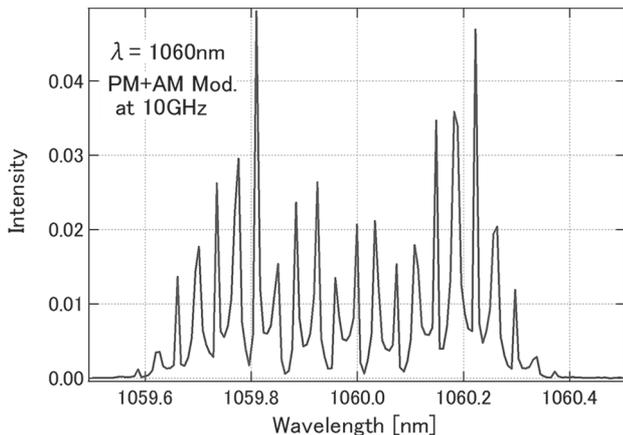


図2 50ピコ秒アップチャープパルスのスペクトル

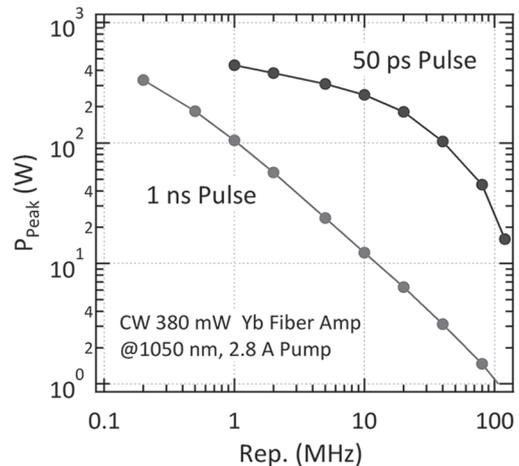


図4 ピーク出力の繰り返し周波数依存性

バー増幅後の1ナノ秒パルス、及び50ピコ秒パルスのピーク強度を示す。実験にはCW飽和出力380 mWのYbファイバーアンプを用いた。発振波長は1,050 nmである。1ナノ秒のパルスでは100 kHz程度の繰り返しでは数百Wのピーク出力が得られるものの、ピーク出力は周波数に反比例して低下し、100 MHzではピーク出力は1 W程度になってしまう。一方、50ピコ秒パルスにおいては40 MHzまで100 W以上のピーク出力を得られている。図には示していないがこの光パルスを5ピコ秒まで圧縮した場合には数十MHzまで1 kWレベルのパルス出力が得られる。

3. 光ファイバーアンプの広帯域化

光ファイバーアンプを用いれば小型・高効率に1 kWレベルの尖頭出力の光パルスを発生することができる。しかしながら、生体のラマン共鳴線の分子指紋域は500~1,800 cm^{-1} の広いスペクトル域に分布しており、コヒーレントラマン計測においてこれらの共鳴線をカバーするためには1,000 cm^{-1} を超える波長可変性が求められる。外部共振器型半導体レーザーは既に近赤外域全域をカバーしており、弊社においても1,000 cm^{-1} の波長域をモードホップフリーに同調可能な一連の波長可変レーザーを製品化している。しかしながらファイバーアンプの光増幅帯域には大きな制限がある。

適切な長さのNdドープファイバー、及びYbドープファイバーのASEスペクトルを図5に示す。両方ともシングルコアのPMファイバーを用い、Ndドープファイバーは波長805 nmで250 mW、Ybドープファイバーは波長915 nmで300 mWのポンプLD光で励起した。光ファイバーアンプの利得スペクトルはNdやYb、Erなどの限られた希土類元素の原子スペクトルに帰属

し、利得域は半導体レーザーに比べてかなり狭く、また強いスペクトル依存性を呈する。このため、現在、製品化されている光ファイバーアンプはそれぞれの媒体の利得ピーク近傍の波長に限られている。

本開発においては小型・堅牢で高効率なコヒーレントラマン計測用のレーザー光源の実現に向けて、光ファイバーアンプの広帯域化を進めた。特に、生体への透過性に優れ、コヒーレントラマン計測に使用するフォトマルやCCD、高感度光検知器などの相性が良好な近赤外短波長領域の光ファイバーアンプの開発を進めた。具体的には900 nm帯Ndファイバーアンプの開発と1 μm 帯Ybファイバーアンプの広帯域化である。NdやYbファイバーアンプはゲインピーク近傍では30 dBを越える光学利得を有しているものの、ピークから離れると利得は急激に減少する。また、Ndドープファイバーの900 nm帯に置ける利得は1,060 nm帯に比べて2桁ほど小さい。

利得が小さくても、多段の光増幅を行うことにより全体の光学利得を増大することができる。ここで問題となるのはゲインピーク域での光増幅である。多段の光増幅器では利得中心のゲインは天文学的な大きくなり寄生発振を起こしてしまう。また、寄生発振を起こさなくとも利得中心でのASE強度が大きくなると、誘導放射により反転分布が食われてしまうため、効率的なパルス増幅は起こらなくなってしまう。

私たちは各増幅ステージ間に光学フィルタを挿入することによりこの問題に対応した。Ndファイバーアンプにおいては優勢な1,060 nm帯のASEを光学フィルタによりブロックし、900 nm帯の光増幅器を構成した。また、高効率な透過型グレーティングで構成される光パルス圧縮器を光ファイバー増幅器間に挿入した⁶⁾。パルス圧縮器は狭帯域のチューナブルフィルターとしても機能する。図6左側に4段構成のNdファイバーアンプの、CW 0.1 mW注入時の各波長における出力スペクトルを示す。900~925 nmの波長域で200 mWを越える光出力を得ている。線スペクトルの周りの幅2 nmの肩はパルス圧縮器を透過したASE光で、ブロードなバックグラウンドはパルスコンプレッサーの後段の光増幅器で発生したASE光である。

図6右側には4段構成のYbファイバーアンプの各波長での出力スペクトルを示す。Ybファイバーアンプでは980 nmや1,030 nmにあるゲインピークのASEを抑制するために、各増幅段間に小型簡便なチューナブルフィルターを挿入した。線幅5 nm程度のスペクトルの肩はパルス圧縮器を透過してきたASEである。Ybファイバーアンプが975 nm~1,080 nmの広いスペクトル領域において光増幅器として有効に機能すること

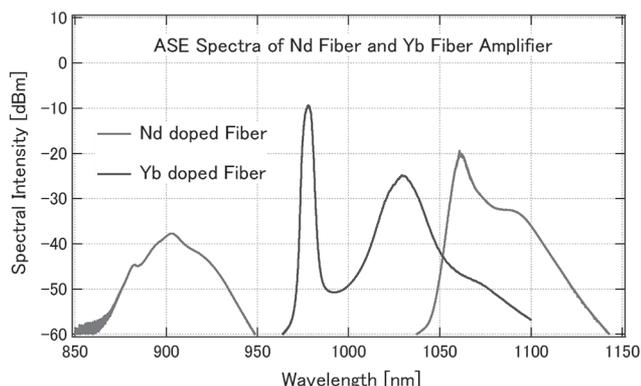


図5 Ndファイバー、YbファイバーのASEスペクトル

が確認できた。尚、各チューナブルフィルターや光パルス圧縮器は波長可変レーザーに連動してコンピュータにより自動で制御される。

これらのNdファイバーアンプ、Ybファイバーアンプを用いる本開発のピコ秒波長可変レーザーを用いれば500 cm⁻¹から1,850 cm⁻¹の分子指紋領域のほぼ全域において、コヒーレントラマン計測に必要な100 Wを越えるピーク出力を実現できる。

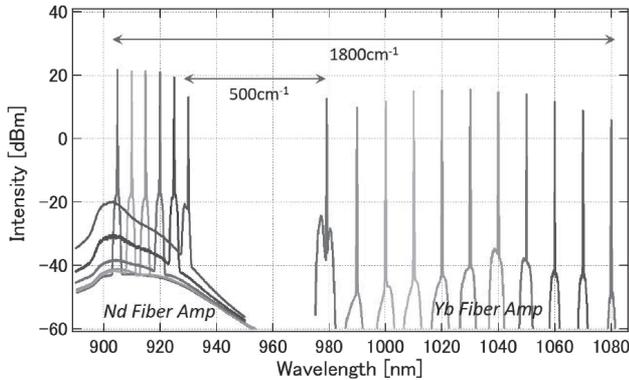


図6 Ndファイバーアンプ、Ybファイバーアンプの出力スペクトル

4. マルチカラーCARS/SRS顕微イメージングシステムの開発

当社は市村清新技術開発財団の第97回開発助成を受けピコ秒波長可変レーザーの開発を行い、続けて、第103回開発助成ではそれを用いたコヒーレントラマン

顕微イメージングシステムの開発を進めた。図7に開発した装置の構成図を示す。上記の900 nm帯、1,000 nm帯のピコ秒波長可変レーザーに加えて、1.5 μm帯の半導体レーザーとErファイバーアンプを用いる1.5 μm帯ピコ秒波長可変レーザーを用いている。これら3台のピコ秒レーザーは共通の10 GHz発振器からの基準信号に同期されており、任意の分周比の同期パルスが発生することが可能である。900 nm帯と1,000 nm帯のレーザーを用いて500~1,800 cm⁻¹に位置する分子指紋領域全域のラマン共鳴線のコヒーレントラマン計測ができる。一方、1,000 nm帯と1.5 μm帯レーザーの差周波は3,000 cm⁻¹近傍に位置する水素関連の各種のラマン共鳴線をカバーしている。これにより、生体分子のほぼすべてのコヒーレントラマン計測が可能となるばかりか、2本のラマン共鳴線での同時イメージングも可能となる。

顕微イメージング装置ではこれらのレーザーからの光はダイクロイックミラーを用いて共軸に揃えられ、ガルバノミラーを用いる走査光学系を経由した後、対物レンズでサンプル面に集光される。サンプルから後進するアンチストークス発光は走査光学系を再度通過した後、ショートパスフィルターを経由してマルチチャンネル分光器、あるいは、CARS信号測定系に導かれる。マルチチャンネル分光器でポンプ波長やCARS信号状態を確認したのち、分子指紋域と水素関連のCARS信号はワンタッチで切り替えられ、チューナブルフィルターを通して、別々の高速のフォトマルに導かれる。こうして、2本のラマン共鳴線での同時イメージングが可能となる。

一方、サンプルを透過したポンプ光はチューナブルフィルターを経由して分離され、高速・高ダイナミッ

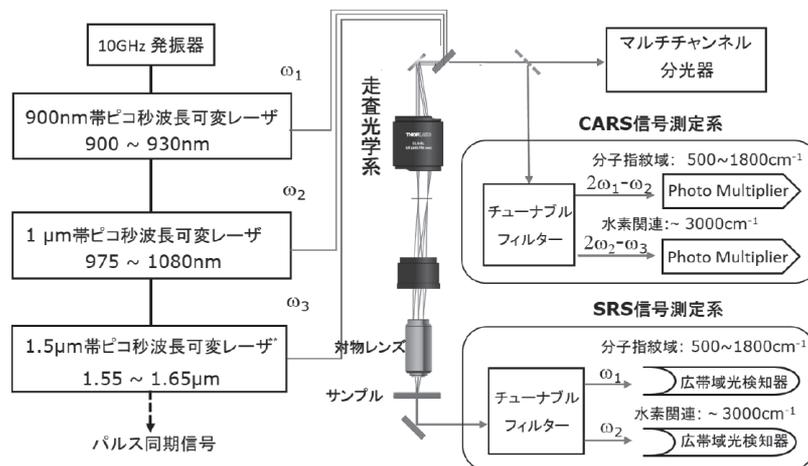


図7 CARS/SRS顕微イメージングシステム

クレンジの半導体光検知器によるSRS信号としてロックイン検波される。SRSイメージングはCARSイメージングと異なり、バックグラウンド信号との干渉によるラマンスペクトルの乱れがなく、信号強度が分子密度に比例するため、新しい分子イメージング法として注目されている⁽²⁾。一方、ストークス光の変調に伴うポンプ光の極めて微弱な透過率の変化を計測するため、レーザー光の高速変調やレーザー光源自体の低ノイズ性が重要となる。ここで開発したレーザーはエレクトロニクスを通して、レーザーパルス間引きが自由に行えるため高速変調には極めて好都合である。また、CWコヒーレント光を出発点に変調、増幅を行う本光源は低ノイズ性においても大いに期待できるものと考えている。

5. おわりに

新しいピコ秒波長可変レーザーがCARS、SRSイメージングの小型・簡便化やマルチカラー化に貢献し、新しい応用展開を拓くものと考え開発を進めてきた。概ね主要な技術的課題は克服できたと考えますが、まだ、最終目標の生体での分子イメージングやマルチカラーイメージング、SRS計測の実証などには至っていない。

当社は外部共振器型半導体レーザーをはじめ、半導体光増幅器や光ファイバーアンプなどのレーザー光源事業を展開しているが、現状の少人数メンバーではとても顕微イメージング装置などの計測システムの開発まで手が回らないのが実情である。ここに述べたコヒーレントラマン顕微イメージング装置は当社のオープンラボにおいて、大学や企業の研究者に開放したいと

考えている。分光計測システム会社との協業ができればさらに喜ばしい。読者からの連絡をいただければ幸いである。

<参考文献>

- (1) Chi Zhang and Jesus A Aldana-Mendoza : Coherent Raman scattering microscopy for chemical imaging of biological systems, J. Phys. Photonics, **3**, 032002 (2021)
- (2) 小関泰之：誘導ラマン散乱を用いた生体イメージング、生物物理、**54** (6)、pp.311-314 (2014)
- (3) 福岡大輔・室清文：高スペクトル純度で広帯域に波長同調可能な半導体レーザーの開発、レーザ研究、**48** (7)、pp.376-380 (2020)
- (4) 諸橋功・坂本高秀・外林秀之・関根徳彦・川西哲也・実迫巖：位相変調器を用いた高繰り返し短パルスファイバーレーザー、光学、**42** (9)、pp.453-458 (2013)
- (5) 福岡大輔・室清文：特許6893039「光学装置」スペクトラ・クエスト・ラボ㈱、令和3年6月2日登録

【筆者紹介】

福岡 大輔

スペクトラ・クエスト・ラボ㈱ 研究開発部 研究開発部長

<主なる業務歴及び資格>

千葉大学 理学研究科 物理博士課程 (理学博士)

㈱ジェネシア 研究員

スペクトラ・クエスト・ラボ㈱ 研究部長

室 清文

スペクトラ・クエスト・ラボ㈱ 代表取締役

<主なる業務歴及び資格>

大阪大学 基礎工学研究科 物性物理博士課程 (工学博士)

大阪大学 基礎工学部 助手

三井化学㈱ (旧・三井石油化学) グループリーダー

千葉大学 理学研究科 物理 教授