

第二高調波顕微鏡

藤田 克昌

Second-Harmonic Generation Microscopy

Katsumasa FUJITA

Recent development of ultra-short pulsed lasers has enabled us to use nonlinear optical phenomena for various applications, such as sensing, processing, and fabrication. Second-harmonic generation microscopy is one of the applications using nonlinear optical phenomena which allows us to observe three-dimensional structure of biological cells and tissues without staining. The principle, imaging property, and applications of second-harmonic generation microscopy are given with results of observation of biological samples.

Key words: second-harmonic generation, laser microscope, nonlinear optics, ultra-short pulse laser

1. 非線形光学現象の利用

超短パルスレーザーの普及が進み、光計測・加工・造形技術の幅広い分野で、非線形光学現象の利用が有効であることが示されてきた。光学顕微鏡（レーザー顕微鏡）の分野でも同様であり、1990年の二光子蛍光顕微鏡の発表以降、非線形光学現象を積極的に利用した顕微鏡が多く開発されている¹⁾。これらの顕微鏡は従来の顕微鏡にはみられないユニークな結像特性をもっており、レーザー顕微鏡の応用分野をさらに拡大している。

第二高調波顕微鏡も非線形光学現象を利用しており、さらに二光子蛍光顕微鏡の光学系と多くの部分を共有できるため、今後普及が期待されている顕微鏡のひとつである。生体の非染色三次元観察や生体分子配向観察、細胞シグナリングの可視化など、第二高調波を利用することではじめて可能となる技術も多い。本稿では、第二高調波顕微鏡の原理、結像特性、および近年特に注目されている生体観察への応用までを紹介する。

2. 第二高調波顕微鏡

第二高調波発生は二次の非線形光学現象であり、ある波長(λ)の光が物質に入射した際に、ちょうどその半分の波長($\lambda/2$)の光が放出される現象である²⁾。この第二高調波は、コヒーレンスの高い光であること、中心対称性の構造をもつ物質からは発生しないという特徴をもっている。

第二高調波発生のはじめての報告は1961年で³⁾、これを利用した第二高調波顕微鏡の提案は1978年であり⁴⁾、第二高調波顕微鏡は比較的長い歴史をもっている。しかしながら、当時は超短パルスレーザーの入手が不可能であったため、観察対象が非線形光学結晶などの非線形感受率の非常に大きな物質のみに限られており、広い分野で利用されるには至らなかった。

第二高調波顕微鏡では、光源であるレーザーからの光を対物レンズにより試料中に集光して、その集光部位において第二高調波を発生させる。レーザー焦点を走査して、試料中の各点から発生する第二高調波の強度を光検出器で測定することで、試料の第二高調波像を得る。図1は、一般的な第二高調波顕微鏡の光学系である。第二高調波の高いコヒーレンスのため、その伝搬方向はおもにレーザーの伝搬方向と同じになる。そのため、一般的には、光検出器は透過側に設置される。ただし、厚みの大きな試料の場合には、試料内部での第二高調波の後方散乱により、反射側に光検出器を置くことも可能になる⁵⁾。光源には、高強度の光をパルス状に放出できるモードロックTi:sapphireレーザー（波長700~1000 nm）、モードロックCr:forsteriteレーザー（波長1150~1350 nm）が用いられる。これらのレーザーを用いることにより、試料に対する光照射量を低く保ったまま、瞬間的に高い強度の光を試料に照射できる

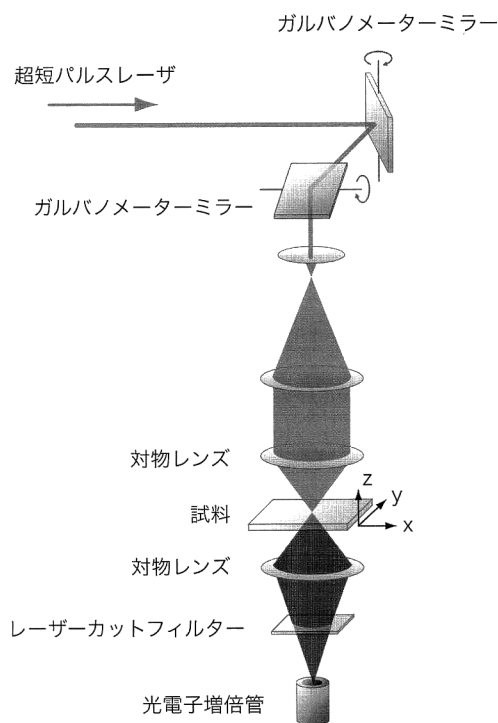


図1 一般的な第二高調波顕微鏡の光学系。検出器前面のフィルターやダイクロイックミラーを変更することで、二光子蛍光顕微鏡としても使用可能である。

ため、有機分子や生体分子などの非線形感受率の小さな物質からも第二高調波発生を得ることができる。

発生する第二高調波の強度は、入射するレーザー光の強度の2乗に比例する。そのため、光強度の高いレーザー焦点内部で強い第二高調波の発生が得られ、焦点部位以外ではほとんど得られない。すなわち、第二高調波は焦点内部でのみ発生するため、得られる画像は断層像となる。また、焦点を三次元的に走査することで、試料の三次元立体構造を得ることができる。

第二高調波のもつ高いコヒーレンスは、ユニークな結像特性を生む。図2は、試料の同じ部位を二光子蛍光顕微鏡と第二高調波顕微鏡とにより観察し、その結像特性を比較した結果である^{6,7)}。試料には、HeLa細胞(ヒト子宮頸癌細胞)を用い、第二高調波と二光子蛍光の両方が強く得られる蛍光分子(RH237)により染色した。図2(c)、(d)の二光子蛍光像は蛍光分子の分布を示しており、細胞全体にわたって蛍光分子が分布していることがわかる。それに対し、図2(a)、(b)の第二高調波像においては、細胞膜部位に存在する蛍光分子のみを検出している。これは、細胞膜部位にある蛍光分子は細胞膜に垂直な方向に配向しており、細胞内部の分子はランダムな配向をとるためである。細胞膜を構成する脂質二重膜構造により配列された蛍光分子は非対称な構造をもつため、強い第二高調波を発生す

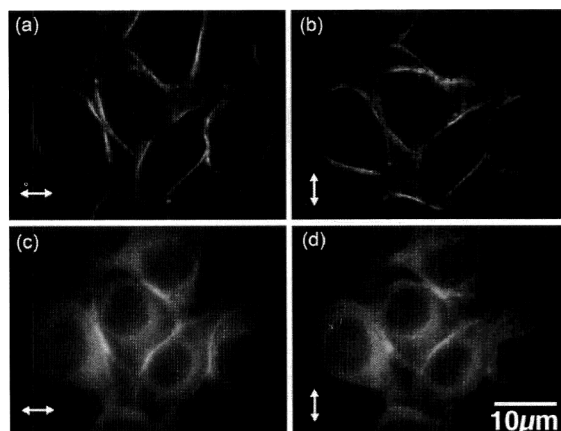


図2 (a)(b) RH237を用いて染色したHeLa細胞の第二高調波像、(c)(d)二光子蛍光像。図中の矢印は入射するレーザーの偏光方向を示す。

る。それに対し、細胞内部のランダムな分子は、平均的には中心対称の構造をとり、第二高調波の発生効率は著しく低下する。この結果から、第二高調波発生強度は、レーザー集光点部位の分子の配列に大きく依存することがわかる。また、図2(a)と図2(b)とを比べると、入射するレーザー光の偏光により観察される部位が異なることがわかる。一般に、物質の非線形感受率はテンソルで与えられる。ここで用いた蛍光分子の場合は、分子配向と平行な方向に非線形感受率が大きいことが知られており、偏光方向に対して平行な配向をもつ分子が強い第二高調波を発生している。

3. 生体観察への応用

図2では、蛍光顕微鏡との比較のため蛍光試料の観察像を示したが、十分大きな非線形感受率をもつ生体分子であれば、染色することなく第二高調波が得られ、観察も可能となる。生体組織については、1971年にFineらによりコラーゲン繊維からの第二高調波の発生がはじめて確認され⁸⁾、1986年にFreundらのがはじめて画像化を行った⁹⁾。一例として、第二高調波顕微鏡によるメダカ鱗皮の観察結果を図3に示す¹⁰⁾。この図では、繊維状のコラーゲンからの第二高調波発生により観察像が得られている¹⁰⁾。コラーゲンは、他の生体分子に対して比較的大きな非線形感受率をもつことが知られており、このほかにも歯、皮膚などの観察が行われている。また、コラーゲンは生体組織内部で細胞を支える重要なタンパク質であるため、その配向測定を第二高調波顕微鏡を用いて行うことで、細胞組織や器官の形態や機能特性を把握し、医学分野での応用を目指す研究も行われている¹¹⁾。図4は、非染色のマウス心筋細胞を第二高調波顕微鏡により観察した結果である。筋繊維を構成する部位で、強い第二高調波の発生が得られていることが

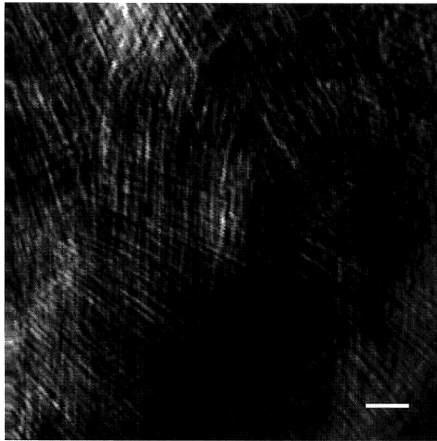


図3 メダカ鱗皮の第二高調波像 (非染色). スケールバー = 10 μm .

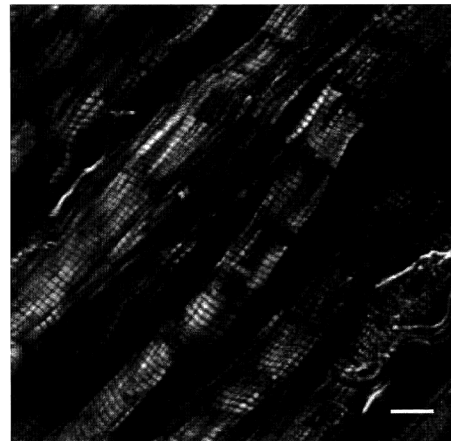


図4 マウス心筋細胞の第二高調波像 (非染色). スケールバー = 10 μm .

わかる。この第二高調波発生は、筋繊維を構成するミオシンからのものであることが報告されている¹²⁾。このような非染色での生体観察では、毒性の高い蛍光色素を用いる必要がないため、長時間にわたって生きた細胞の変化を追跡することが可能となる。

また、神経細胞や心筋細胞での細胞間シグナルである細胞膜電位（細胞膜内部と外部での電位差）の測定に関しても、第二高調波顕微鏡は大きな注目を集めている¹³⁾。細胞膜電位の測定には、細胞膜電位感受性をもつプローブ分子を細胞膜に挿入する必要があるが、従来から用いられてきた蛍光法に比べ1~2桁ほど感度が高い。そのため、光を用いて高速に神経などのシグナルをマッピングできる技術として、神経・脳科学分野で特に注目されている。

非線形光学顕微鏡のひとつである第二高調波顕微鏡の原理、結像特性、応用について簡単に解説を行った。非線形光学現象を利用した顕微鏡としては、このほかに、コヒーレントアンチストークスラマン散乱 (CARS) 顕微鏡、第三高調波顕微鏡が提案されている。これらの顕微鏡も、第二高調波顕微鏡と同様、非染色での生体観察が行える。特に CARS 顕微鏡においては、振動分光も同時に行える画期的な顕微鏡として注目を集めている。これからの顕微鏡技術には、試料の「形」のみを観察するのではなく、そこにある分子や原子の特性の把握も求められるであろう。

文 献

- 1) W. Denk, J. Strickler and W. W. Webb: "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy," *Science*, **248** (1990) 73-76.
- 2) Y. R. Shen: *The Principles of Nonlinear Optics* (John Wiley & Sons, Inc., New York, 1984).

- 3) P. A. Franken, A. E. Hill, C. W. Peters and G. Weinreich: "Generation of optical harmonics," *Phys. Rev. Lett.*, **7** (1961) 118-119.
- 4) J. Gannaway and C. J. R. Sheppard: "Second harmonic imaging in the scanning optical microscope," *Opt. Quantum Electron.*, **10** (1978) 435-439.
- 5) Y. Guo, P. P. Ho, H. Savage, D. Harris, P. Sacks, S. Schantz, F. Liu, N. Zhadin and R. R. Alfano: "Second-harmonic tomography of tissues," *Opt. Lett.*, **22** (1997) 1323-1325.
- 6) L. Moreaux, O. Sandre, M. Blanchard-Desce and J. Mertz: "Membrane imaging by simultaneous second-harmonic generation and two-photon microscopy," *Opt. Lett.*, **25** (2000) 320-322.
- 7) M. Kobayashi, K. Fujita, T. Kaneko, T. Takamatsu, O. Nakamura and S. Kawata: "Second harmonic generation microscopy with a microlens array scanner," *Opt. Lett.*, **27** (2002) 1324-1326.
- 8) S. Fine and W. P. Hansen: "Optical second harmonic generation in biological systems," *Appl. Opt.*, **10** (1971) 2350-2353.
- 9) I. Freund, M. Deutsch and A. Sprecher: "Connective tissue polarity: Optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation, and small-angle scattering in rat-tail tendon," *Biophys. J.*, **50** (1986) 693-712.
- 10) P. J. Campagnola, A. C. Millard, M. Terasaki, P. E. Hoppe, C. J. Malone and W. A. Mohler: "Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues," *Biophys. J.*, **81** (2002) 493-508.
- 11) T. Yasui, Y. Tohno and T. Araki: "Determination of collagen fiber orientation in human tissue by use of polarization measurement of molecular second-harmonic-generation light," *Appl. Opt.*, **43** (2004) 2861-2867.
- 12) W. Mohler, A. C. Millard and P. J. Campagnola: "Second harmonic generation imaging of endogenous structural proteins," *Methods*, **29** (2003) 97-109.
- 13) D. A. Dombeck, M. Blanchard-Desce and W. W. Webb: "Optical recording of action potentials with second-harmonic generation microscopy," *J. Neurosci.*, **24** (2004) 999-1003.

(2004年7月26日受理)