

効率的な共焦点レーザー顕微鏡用 4波長レーザーエンジン

ティム・バスッチ・コルバーグ、コンステンティン・バーングルバー

FDDLテクノロジーを用いた直接変調561nmレーザーがもたらす優れたパフォーマンス

レーザー光源はバイオフォトニクス分野の測定技術において非常に重要な役割を果たしている。特に最先端の顕微鏡技術においては高度なパフォーマンスがレーザー光源に求められる。ほかの種類的光源と比較して、レーザーは高い輝度、小さな発散角、また単色性が高いため共焦点顕微鏡に理想的な光源と言える。

自由度の高い顕微鏡装置のセットアップは多種類の蛍光標識試薬の励起を実現するためにさまざまな色のレーザー波長を必要とする。従来からアルゴンイオンまたはクリプトンイオンのようなガスレーザー、ならびに色素レーザーは共焦点顕微鏡法において長い期間にわたり広く使用されている。これらのレーザーはアプリケーションが求める波長、ビーム品質、出力レベルを提供することが可能である。

長年にわたりガスレーザーまたは色素

レーザーと類似の仕様をもつ半導体レーザーおよびDPSS(半導体レーザー励起全固体レーザー)が市販されている。これらのレーザーは通常、ガスレーザーまたは色素レーザーと比較して小型で、かつ装置の維持が容易である。加えて低価格であり電力消費が少ない・水冷が不要・長寿命などの優位点をもつ。結果として半導体レーザーおよびDPSSレーザーはガスレーザーまたは色素レーザーのようなクラシックなレーザーシステムからの置き換えが進む傾向にある。

1つの筐体から複数のレーザー波長を得るという要求を満たすためにマルチレーザーエンジン(またはレーザーコンバイナ)が開発され市場に導入されている。これにより1つのデバイスに複数のレーザーカラーを集約し、光源を交換することなく異なる蛍光体を柔軟に励起することが可能となる。いくつかのモデ

ルは6~8波長のレーザーカラーを統合しているがほとんどのケースではマルチレーザーエンジンには4種類のレーザー波長を内蔵している。最適な波長の組合せでこれらの4つの色を選択することで最も一般的な共焦点レーザー顕微鏡アプリケーションと蛍光標識試薬をサポートすることが可能となる。

最も典型的な顕微鏡アプリケーションでは興味深いいくつかの「波長領域」が存在する。これらの領域ではさまざまなポピュラーな蛍光標識試薬がその吸収特性を最大化する。すなわちこれらの特定の波長領域における光は最も一般的な蛍光標識試薬を用いる顕微鏡研究に非常に有効に作用する。可視光領域における最も重要な波長領域は405、488、561、および640nm近傍に存在する。これらの波長領域は偶然に存在したのではなく、主に既存のアルゴンイオンおよびクリプトンイオンレーザーにおいて利用可能な波長に効率的に作用する蛍光標識試薬の開発の歴史の結果である。これらの波長で高品質の光を提供するレーザー光源は多くの多波長レーザー顕微鏡ユーザーにとって非常に有用となる。

近年まで重要な波長の1つである561nmは標準的な半導体レーザー技術によって直接的に入手することができなかった。この波長を実現する実用的な唯一の方法はDPSSレーザーであり、顕微鏡用途にとりいくつかの欠点があった。DPSSレーザーは高速に変調(オン/オフ)することが困難である。走査型の共焦点顕微鏡のようなアプリケーシ



図1 トプティカ社のマルチ波長レーザーエンジンiChrome CLEは波長405、488、561および640nmにおいて各20mWの出力が可能である。

オンを実現するためにDPSSレーザーはAOMまたはAOTF(音響光学変調器または音響光学可変フィルタ)のような外部の変調器を必要とする。これらの追加モジュールは高速な変調を可能にするが大きな欠点は消光比が制限されていることである。すなわちオフ状態は実際には「オフ」ではなく非常に低いパワーが依然点灯している状態となる。いくつかの高度な顕微鏡アプリケーションにおいては完全な消灯、すなわち完全なゼロ光子の状態を必要とする。この完全な消灯は個々のレーザー光源間のクロストークを低減し、不要な光ブリーチングを低減するために必須となる。また他の顕微鏡アプリケーションにおいてはさらに広帯域の変調周波数が必要となり、音響光学素子では技術的に不可能な高速でのレーザーのオン/オフが要求される場面がある。

また高速なスイッチング技術は一般に、ラスタスキャンシステムのパライバック(原点回帰)時間中にレーザーをオフ状態にして光ブリーチングを低減するためにも必要となる。さらにこの機能はFRAP(Fluorescence Recovery After Photo-bleaching)またはCLEM(Controlled Light Exposure Microscopy)のような最先端の顕微鏡技術においても有用であり波長および強度変調の迅速なスイッチングを必要とする技術である。

またレーザーの外部に追加される光学素子は伝搬されるレーザービームの品質に悪影響を及ぼすことがある。これは顕微鏡への光信号を劣化、破損したりまたいくつかの技術を不可能にする可能性がある。上述したようにAOM/AOTFは変調消光比が制限されておりレーザービームが偏光された状態でも漏れ信号の原因となりえる。従ってこの状態では実際には「ゼロ光子の完全消

灯」の条件を満たすことは不可能である。さらに、複雑な顕微鏡セットアップにおけるさまざまな動的部品は故障する可能性があるためサービスとメンテナンスの維持コストだけでなく装置全体的大幅なダウンタイムを発生させる恐れがある。AOM(またはAOTF)が強度変調目的に使用される場合、入射するレーザーは絶え間なく連続的に動作されなければならない。これにより実際に顕微鏡観察を行わない「オフ時間」の間にもレーザー光源が依然として動作している状態となり不必要な作動時間および維持費用を発生させる。またこの不要な連続動作はレーザーエンジンの信頼できる動作のために本来的に除去(冷却)されなければならない不要な熱をもたらす。

独トプティカ社は従来の561nm DPSSレーザーの代替となる信頼性の高い新たなレーザー光源手法を開発した。この手法においては高速変調機能と完全消灯機能も同時に実現している。非線形結晶を用いた第二高調波発生によって561nmの光に変換される1122nmの半導体レーザー光源を用いる手法である。このFDDL(Frequency-Doubled Diode Laser: 第二高調波半導体レーザー)においては基本波である1122nmの半導体レーザーの直接変調が可能であり、外部変調器における複雑で能動的な対応策を回避することができる。

第二高調波発生は非線形結晶を介して行われるため完全に受動的な技術であり、直接変調半導体レーザーとの組合せは従来法におけるDPSSレーザーおよびAOM/AOTFの組合せよりはるかに安定しており高い信頼性の実現が可能となる。またFDDLはオフ状態では光がまったく放射されない完全消灯の状態を保証することが可能である。これは多くの顕微鏡法にとり大きな魅力

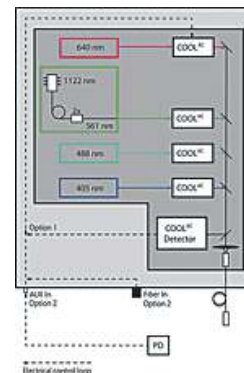


図2 561nmの信号を発生するためにiChrome CLEではFDDL技術(Frequency-Doubled Diode Laser)が用いられている。高速での半導体レーザー直接変調を用いることで発振オフ状態での「ゼロフォトン」を可能とした。従来法のDPSSレーザーおよびAO変調器の組合せに比べ多くの技術的優位点を持ち理想的なレーザー光源である。

となる。半導体レーザーは実際的に完全なオフ状態になっており、単にAOMまたはAOTFを使用して偏光されるだけでなくエネルギー消費量も低く熱負荷も低く抑えられている。その結果、FDDL法ではレーザー全体の運用コストを低減し放熱のための労力を少なくすることが可能となる。

トプティカ社のFDDL法における561nm半導体レーザーはiChrome CLEに搭載されている(図1)。このマルチレーザーエンジンは小型の1つの筐体に4つのレーザー光源を内蔵しており、405nm、488nm、561nmおよび640nmの波長を同時にまた個別に提供することができる。ファイバケーブル出力端から波長毎に最大20mWの出力が可能でありiChrome CLEは各種の顕微鏡アプリケーション、特に共焦点顕微鏡に最適化された優れたレーザー光源と言える。これらの波長の組合せは一般的で最も多用される大部分の蛍光標識試薬の励起を、高度に集約化された単独のハイブリッドレーザー光源として実現することができる。小型の設置面積、低熱負荷、また低消費電力など多くの優位点を持つ。

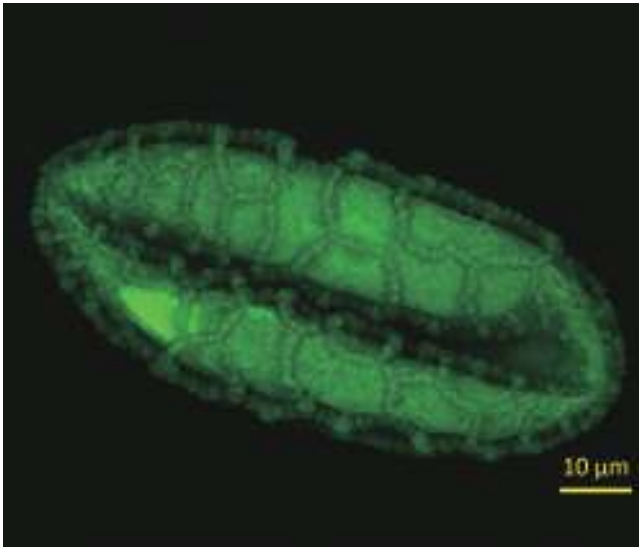


図3 Airyscan法を用いた共焦点レーザー顕微鏡で観察したユリ花粉。(資料提供: Carl Zeiss Microscopy)

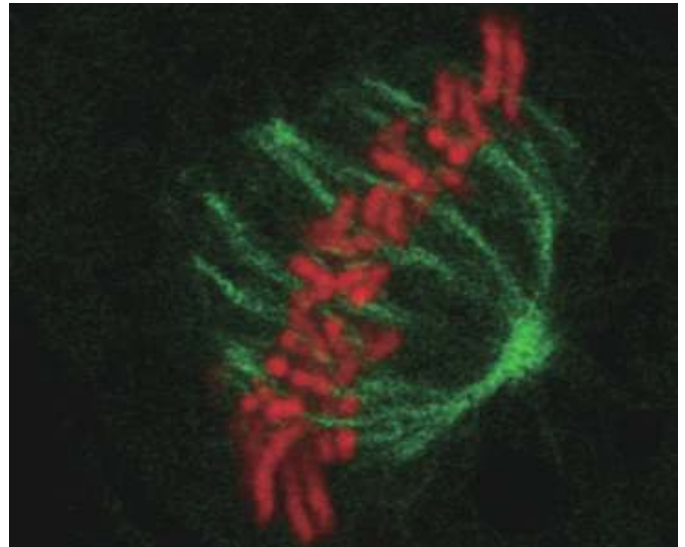


図4 Airyscan法を用いた共焦点レーザー顕微鏡で観察した腎臓細胞。(資料提供: Carl Zeiss Microscopy)

iChrome CLEは非常に経済的に顕微鏡システムへの統合が可能である。

iChrome CLEのすべての波長は、統一されたユーザーインタフェース(アナログおよびデジタル入力、RS232およびイーサネット)を介して制御することができる。直観的な操作ですぐに使用可能なコントロールソフトウェアと完全なOEM統合のための強力なコマンドセットも同時に提供される。また最大1MHzのアナログおよびデジタル変調帯域をもつ変調機能が標準に搭載されている。この高速変調機能は現在市販されている561nmの直接変調用のマルチレーザー光源で利用可能な最大の変調速度であり上述の完全消灯機能もサポートされている。

iChrome CLEにはトプティカ社独自の自動光軸アライメント機能、COOL^{AC}も搭載されている。これはボタンを押すだけで、すべての内蔵レーザーの光軸を数秒で自動的に調整するオプトメカニカルな機構である。この機構により電源プラグをつなぐだけの簡単なインストールと、レーザー光源の全寿命にわたり卓越した安定性を保証することが

可能となる。顕微鏡ユーザーはレーザー光源を手動で調整する必要はなく本来の実験に集中することができる。

iChrome CLEは、半導体レーザーベースの561nm FDDLレーザー光源(図2)を含む最初の「オールダイオード」レーザーコンバイナである。このユニークなデザインはすべてのレーザー波長に対して同じ変調動作および制御スキームを可能とした。本設計におけるもう1つの利点は波長561nmを含むすべてのレーザーが1MHzで変調された状態でも「完全オフ」状態における残留光を放出しないことを保証できる点にある。

図3および4はユリ花粉および腎臓細胞の例示的な観察画像を示す。これらはレーザー光源としてiChrome CLEを使用してAiryscanスキャン機能を備えたレーザー走査型顕微鏡で観察した結果である。トプティカ社のiChrome CLEマルチカラーレーザーエンジンが高度な顕微鏡法を可能にすることを示してい

る。変調速度に関する代替ソリューションによる恩恵を上回る基本的な技術的能力を備えており低消費電力、低熱負荷、柔軟なシステム統合性能、使いやすさという点でも新しいレベルのレーザー光源を確立している。

iChrome CLEはトプティカ社の「iChrome」製品ラインの2番目の製品である。この製品ポートフォリオには4つの波長をデフォルトに内蔵したコンパクトで経済的なiChrome CLEと、ユーザーにより4つの波長が選択可能なiChrome MLEが含まれている。すべてのiChromeシステムには、統一されたユーザーインタフェース、独自の変調機能、自動光軸調整アルゴリズムCOOL^{AC}が内蔵されている。顕微鏡検査のみならずフローサイトメトリー、ハイコンテンツスクリーニングなど、幅広い種類のバイオフォトニクスアプリケーションに理想的な最先端のマルチカラーレーザー光源である。

著者紹介

Dr.ティム・バスッチ・コルバークは独トプティカ社のマーケティングディレクター、コンスタンティン・バングルバーはOEM用半導体レーザーの製品マネージャー。

URL: www.toptica.com