

<特集「光生体イメージングの進歩と医療」>

無染色組織イメージング

～ラマン散乱分光法を用いて～

南川 丈夫*, 原田 義規, 高松 哲郎

京都府立医科大学大学院医学研究科細胞分子機能病理学

Label-free Histochemical Imaging by Raman Spectroscopy

Takeo Minamikawa, Yoshinori Harada and Tetsuro Takamatsu

*Department of Pathology and Cell Regulation,
Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science*

抄 録

ラマン散乱分光法は、試料の前処理（固定や染色）を必要とせず、組織を構成する分子の分子振動を通して、分子種や分子構造を推定できる手法である。そのため、従来は生体から組織を取り出し染色しなければ細胞や間質といった組織情報が分からなかった状況から、ラマン散乱分光法を用いることにより、非侵襲かつ無標識に組織情報を取得できる可能性を持つ。従来、ラマン散乱光は微弱であるため、撮像に非常に時間が掛かるという問題点があった。しかし、近年の安定なレーザーや高感度検出器の開発、光学系の改良などによりフレッシュな組織のイメージングが可能にまで実用的な撮像速度となってきており、次第にラマン散乱分光法を生体組織イメージングへ応用しようとする試みが行われてきている。本稿では、ラマン散乱分光法を用いた末梢神経の選択的検出の試みおよび虚血性心筋症における心筋組織イメージングを中心に、ラマン散乱分光法の組織イメージングへの応用について概説する。

キーワード：ラマン散乱分光法、無染色イメージング、組織イメージング、末梢神経、心筋組織。

Abstract

Raman spectroscopy gives us the information of molecular species and structures without any preparation such as fixation or staining by observing Raman spectra that reflects molecular vibrations of intrinsic tissue molecules. Although conventional Raman spectroscopy takes long time to obtain an image due to low efficiency of Raman scattering, recent advances of the development of stable light source, high-sensitivity CCD camera, and the improvement of optical setup enables high-speed Raman imaging enough to obtain Raman images of fresh samples. In this review, we introduce recent advances of label-free histochemical imaging by Raman spectroscopy, especially the applications to the selective detection of peripheral nerves and the tissue imaging of ischemic cardiomyopathy.

Key Words: Raman spectroscopy, Label-free imaging, Histochemical imaging, Peripheral nerves, Heart tissue.

平成25年3月18日受付

*連絡先 南川丈夫 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路ル梶井町465番地
tminami@koto.kpu-m.ac.jp

はじめに

Robert Hooke が 17 世紀中頃に世界で初めて光学顕微鏡を用いて細胞を観察して以降、光を用いたイメージング技術は組織の構造や機能を解析する上で欠かせないものとなった¹⁾。特に蛍光色素を用いた組織イメージングは、組織の構造のみならず、特定の分子の空間分布を可視化し、組織を構成する細胞や間質の構造的・機能的関連性を明らかにできることから広く用いられている。しかし、蛍光色素は導入のための前処理（固定や蛍光色素分子の導入など）が必要であり、得られた結果が観察している組織や特定の分子の特徴を正確に示すものか、あるいは蛍光色素の導入に由来する影響なのかを常に考慮する必要がある。また、ヒト *in vivo* 組織イメージングへの応用を見据えた場合、多くの蛍光色素はその毒性のために用いることができない。そこで、組織を構成する分子固有の情報から識別でき、蛍光色素を必要としないイメージング手法の開発が求められている。

本稿では、蛍光色素を必要としない手法として近年注目が集まっているラマン散乱分光法を用いた無染色組織イメージング法について概説する。ラマン散乱分光法は、可視～近赤外域の光を組織に照射し、組織を構成する分子の分子振動に依存した波長シフト（ラマン散乱光）を計測する^{2,5)}。分子振動は、分子を構成する原子

の種類や結合の仕方によって鋭敏に変化するため、分子振動を反映した波長シフトスペクトル（ラマンスペクトル）を解析することで組織中の分子種や分子構造の推定を可能にする（図 1）。また、可視～近赤外光を用いることができるため、水の吸収などの影響を受けにくい。そのため、乾燥環境下にある組織切片のイメージングのみならずウェットな環境下にある *ex vivo* あるいは *in vivo* 組織イメージングも実現可能である。以上のことから、従来は生体から組織を取り出し染色しなければ細胞や間質といった組織情報が分からなかった状況から、ラマン散乱分光法を用いることにより、非侵襲かつ無標識に組織情報を取得できるというのがラマン散乱分光法による組織イメージングの特徴である。次節より、ラマン散乱分光法を利用した組織イメージングの応用例について概説する。

末梢神経への応用

悪性腫瘍は日本人の死因の第一位であり、死因の約 3 割を占める。その治療の柱のひとつとして外科的摘出術が行われるが、その術中に温存すべき末梢神経が摘出や損傷を受けることで、術後に後遺症を残す症例が数多く報告されている^{6,9)}。摘出した組織中の細い末梢神経を可視化するには通常の染色法を用いれば良い。しかし、染色自体がヒトに対して有害であるため、術中観察に使用することはできない。その

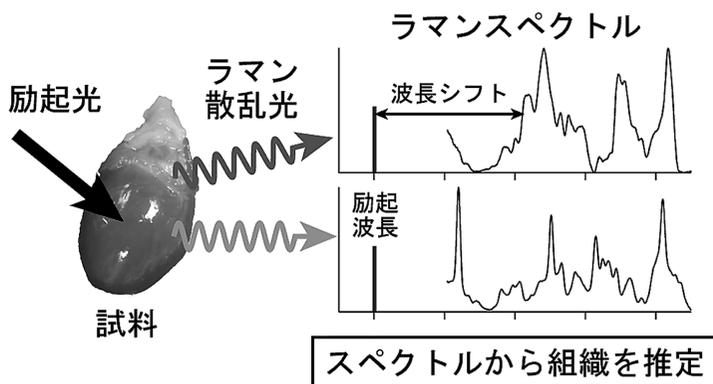


図 1 ラマン散乱分光法

ため、現在術中に細い末梢神経を認識する技術は存在せず、神経の位置は術者の解剖学的知識や経験に頼らざるを得ない状況がある。

我々はラマン散乱分光法を用いれば、光を当てるだけで特別な処理を必要としない新たな末梢神経検出法を実現できると考えた。ラマン散乱分光法により末梢神経を選択的に検出するためには、末梢神経に由来するラマンスペクトルの特徴を抽出し、その特徴を持っていた場合は末梢神経、そうでなければ他の組織であると判断すればよい。

末梢神経は、大きく有髄神経、無髄神経の2種類が存在する。有髄神経は、軸索周囲に脂質を多く含むミエリン鞘が存在する。一方、無髄神経はミエリン鞘が存在しない。図2に末梢神経、およびその周囲組織の典型的なラマンスペクトルを示す¹⁰。ラマンスペクトルの違いは、主に 2850 cm^{-1} 、 2891 cm^{-1} 、 2932 cm^{-1} 付近の強度比の違いとして現れている。 2850 cm^{-1} や 2891 cm^{-1} のラマンバンドは CH_2 伸縮振動という分子振動に帰属され、 CH_2 という分子構造を複数持つ分子を多く含む組織（主に脂質）で強く現れる。一方で、 2932 cm^{-1} は CH_3 伸縮振動

に帰属され、主にタンパク質を多く含む組織で強く現れる。即ち、脂質を多く含むミエリン鞘が存在する有髄神経では CH_2 伸縮振動のバンドが強く現れ、ミエリン鞘を持たず脂質の量が相対的に少ない無髄神経では CH_3 伸縮振動のバンドが相対的に強く現れる。

一方、周囲の脂肪組織では有髄神経と同様に強い CH_2 対称伸縮振動のラマンバンドが見られる。これは、脂肪滴として蓄積されている脂質の一種であるトリグリセリドに由来する。有髄神経と比較した場合、脂肪組織の CH_2 伸縮振動のラマンバンドはやや高波数側にシフトしている。この違いは、有髄神経のミエリン鞘（主に phosphatidylethanolamine や sphingomyelin など）と脂肪組織の脂肪滴（トリグリセリド）に含まれる脂質分子の構造的な違いを反映すると考えられる。また、線維性結合組織は、I型コラーゲンとほぼ一致したスペクトルを示している。このことは、線維性結合組織が主としてI型コラーゲンで構成されていることをラマン分光学的に示す結果である。有髄神経、無髄神経と比較した場合、線維性結合組織の CH_3 伸縮振動のラマンバンドが大きく高波数側にシフトしている。さらに、血管中膜、骨格筋組織、および無髄神経を比較した場合、血管や骨格筋の CH_2 伸縮振動のラマンバンドが非常に弱い事がわかる。これは、無髄神経中に含まれる脂質（軸索膜やシナプス小胞など）の相対量が血管や骨格筋よりも多いことを示している。

このように、ラマンスペクトルを詳細に解析することで、分子構造の違いを元に末梢神経のラマンスペクトルの特徴を抽出することができた。これらのラマンスペクトルの特徴から、各組織の識別を行う。図3に有髄神経、無髄神経、およびそれらの周囲組織を識別した一例を示す。試料はWistarラットの肋間神経（有髄神経）と迷走神経（無髄神経）である。各組織の識別には、スペクトル解析法の一つである最小二乗解析を適用した。これは、組織から得られるラマンスペクトルを主要構成成分（有髄神経、無髄神経、結合組織、脂肪組織、骨格筋組織、血管）のスペクトルの線形和で表せると仮定し、

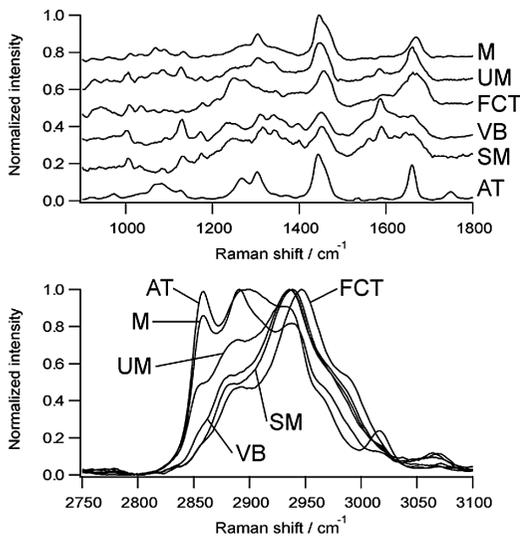


図2 末梢神経およびその周囲組織のラマンスペクトル¹⁰。MN, 有髄神経（肋間神経）；UMN, 無髄神経（迷走神経）；FCT, 線維性結合組織；VB, 血管；M, 骨格筋組織；AT, 脂肪組織。

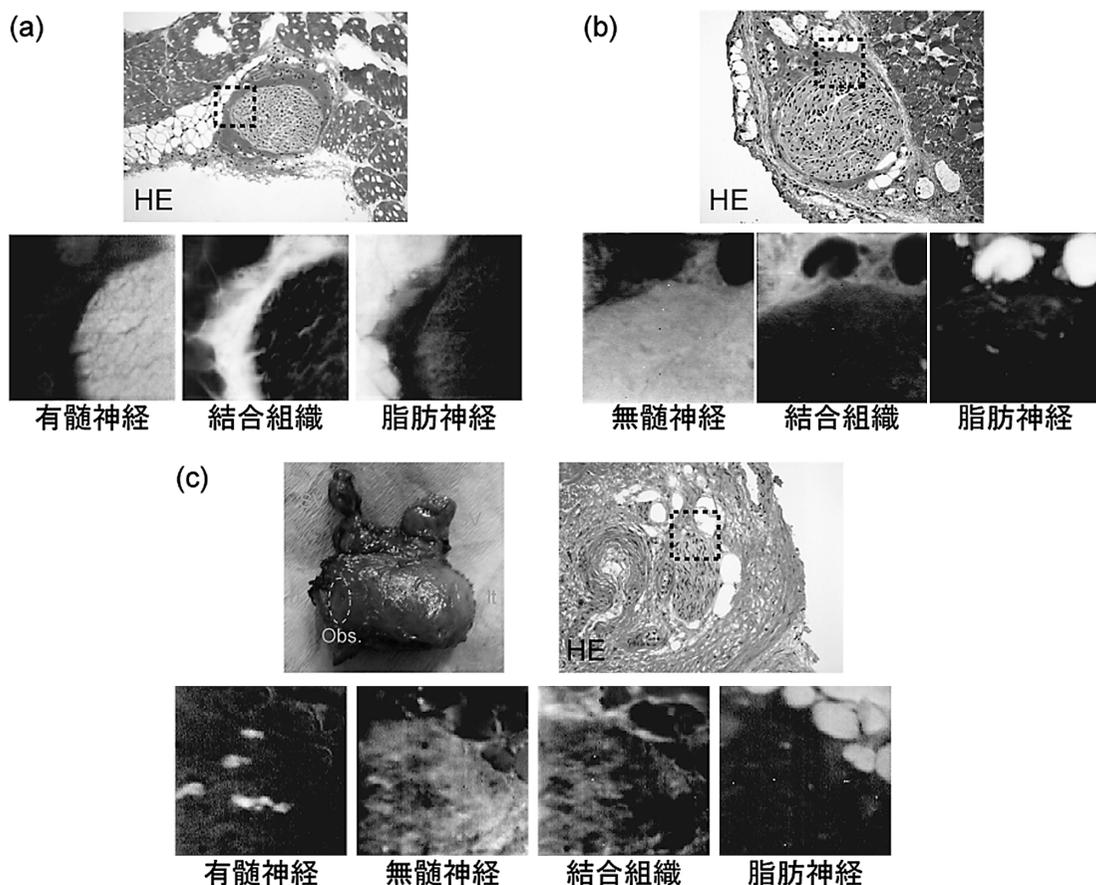


図3 末梢神経および周囲組織のラマンイメージング¹⁰⁾. (a) Wistar ラットの肋間神経, (b) Wistar ラットの迷走神経, (c) ヒト前立腺周囲組織.

最小二乗法により推定した各比例定数から各組織を識別する方法である. 肋間神経および迷走神経ともに, 各組織に対する比例定数プロットと HE 染色像で確認した組織とがよく一致していることがわかる. また, ヒト前立腺周囲組織へ応用した例を図 3c に示す. 例で示している前立腺周囲組織の神経束には, 有髄神経と無髄神経が混在している. そのため, 比例定数プロットでも, 神経束中に有髄神経と無髄神経が混在している様子が見られる. このように, ラマン散乱分光法を用いることで, 組織を構成する分子種を元に末梢神経を選択的に検出することが可能であることがわかる.

また, 計測対象が神経であることがわかって

いる場合, CH_2 伸縮振動のラマンバンドの強度プロットを行うことで, ミエリン鞘を可視化することができる (図 4). Fu らは, 前述のラマン散乱分光法あるいは非線形光学を援用し高速なイメージングを可能とした非線形ラマン散乱分光法を用いて, 脱髄性疾患の計測を行なっている¹¹⁾. さらに, 光の偏光依存性を援用すると, ミエリン鞘中の脂質が正常に整列しているか, あるいは異常な配列をしているかを可視化することができる. 即ち, 物質的な空間分布のみならず, 分子異常による構造的なミエリン鞘の欠陥も視覚化することができることを示している.

以上のように, ラマン散乱分光法を用いるこ

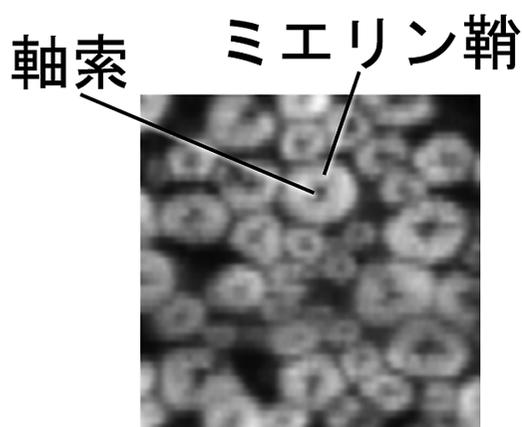


図4 ミエリン鞘のラマンイメージング (2850 cm^{-1} の強度プロット)

とで、有髄・無髄神経を選択的に可視化することができ、今までにない無染色・非侵襲的な新たな末梢神経診断法を提供することができると考えられる。

心筋組織への応用

生活習慣の欧米化等により、近年我が国においても虚血性心疾患が急増しており、虚血性心筋症の治療成績を向上させることは重要な課題となっている。虚血性心筋症の外科治療、特に左室形成術を的確に行い患者の心機能を回復させるためには、心筋バイアビリティ（虚血障害心筋が血行再建によって機能を回復出来る能力）の評価が必須である。しかし、心筋バイアビリティを *in situ* で測定する方法はまだない。臨床において心筋バイアビリティ評価は、核磁気共鳴断層法、心筋シンチグラフィなどを用いて行われている¹²⁾¹³⁾。しかし、これらは術中に *in situ* で測定することが出来ず、外科医はおおまかな切除範囲の全体像を自らの中で再構築し手術に挑まざるをえない。結果として、切除範囲の最終的な決定は外科医の経験に基づいて行われている。

これらを解決するためにも、なんら前処理をすることなく、光を当てただけで分子イメージングが可能なラマン散乱分光法が有効であると考えられる。心筋バイアビリティを診断するた

めには、正常な心筋細胞と心筋梗塞を起こし線維化した組織を判別する必要がある。これは、共鳴ラマン散乱分光法を援用することで、解決することができる¹⁴⁾。図5に正常心筋と線維化した組織のラマンスペクトルを示す。

共鳴ラマン散乱とは、測定物質の吸収波長と同じ励起光を用いることでラマン散乱光強度が著しく増大する現象をいう³⁾¹⁵⁾。共鳴ラマン散乱分光法を用いることで、様々な分子で構成された組織から、特定の光吸収を持つ分子のラマン散乱光のみを強調して取得することが可能となる。心筋組織の場合、 532 nm の励起波長を用いることで、正常な心筋細胞内に豊富に含まれている cytochrome c に由来するラマンバンド (751 cm^{-1} , 1130 cm^{-1} , 1582 cm^{-1}) が非常に強く強調される¹⁶⁾¹⁸⁾。また、線維化した組織は主にI型コラーゲンからなる。これは、前節と同様にI型コラーゲンの純物質のラマンスペクトルとの比較から、線維化組織と判断することができる。これらのスペクトルの特徴をより精度よく抽出するためには、スペクトル解析法がキーポイントとなる。前述のスペクトルの線形和仮定に基づいた最小二乗法による手法のみならず、様々なスペクトル解析法が提案されている¹⁹⁾²¹⁾。スペクトル解析法の一つである主成分分析を用いて正常心筋と線維化組織の識別を行った結果を図5に示す¹⁴⁾。主成分分析では、得られたスペクトルをいくつかの線形独立なスペクトル（主成分スペクトル）へ分解する。これら主成分スペクトルを詳細に解析することで、例えば正常心筋と線維化組織を計測した場合、第2主成分スペクトルの正のラマンバンドは正常心筋中に含まれる cytochrome c、負のラマンバンドは線維化組織中のI型コラーゲンに関連している事がわかる。そのため、主成分スペクトルの係数（主成分スコア）をプロットすることで正常心筋と線維化組織を識別することができる。また、正常心筋と血管を計測すると、第2主成分スコアプロットでは、正値が血管を、負値が正常心筋を表している。さらに、第3主成分スコアは、酸化および還元型ヘモグロビンの分布、即ち動脈と静脈の分布を示して

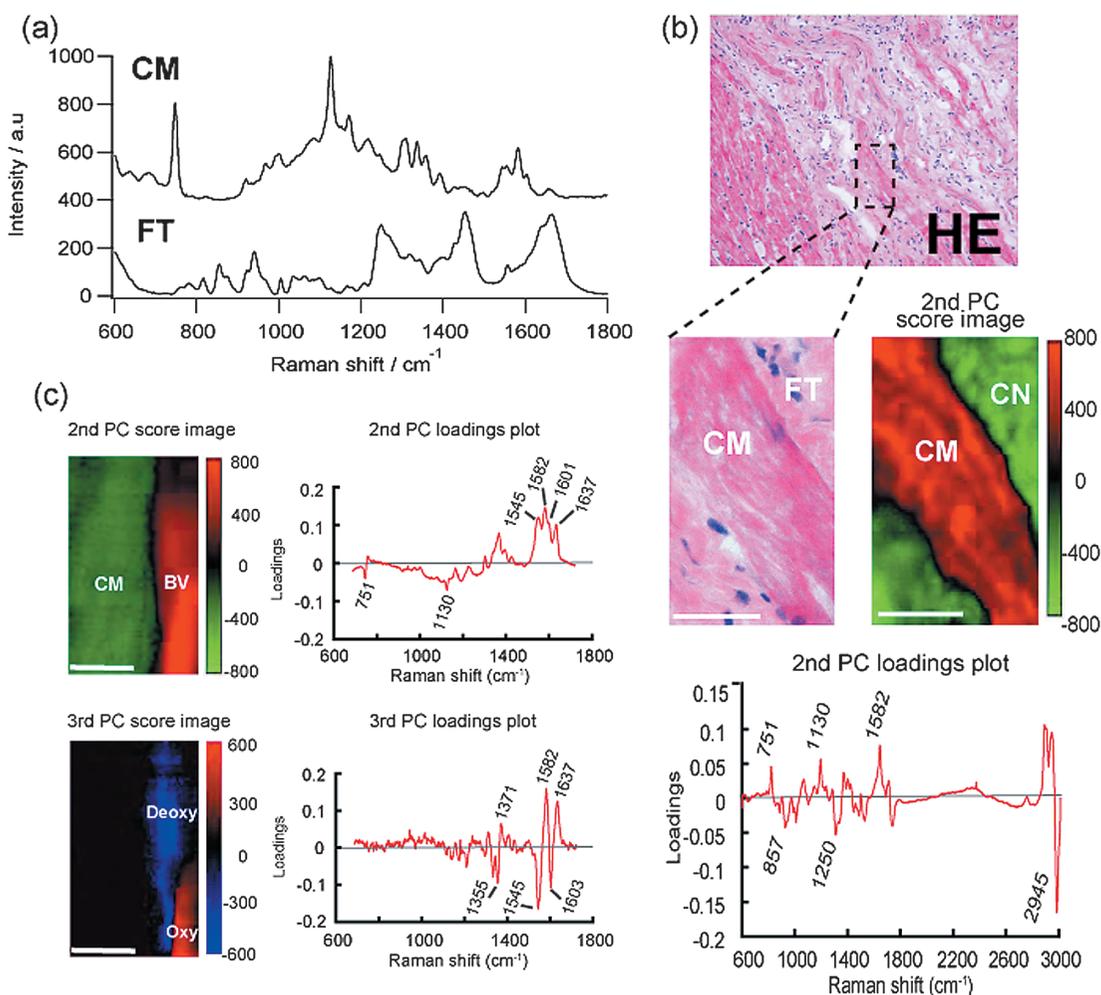


図5 正常心筋組織、梗塞巣および動静脈のラマンイメージング¹⁴⁾.

(a) 正常心筋組織、線維性結合組織のラマンスペクトル。(b) 正常心筋組織と線維性結合組織の主成分分析ラマンイメージング。(c) 正常心筋と動静脈の主成分分析ラマンイメージング。CM, ラット心筋細胞。FT, 線維性結合組織。CN, コラーゲン。BV, 動静脈。Oxy, 動脈。Deoxy, 静脈。

いる。このように、好適なスペクトル解析手法を適用することで、ラマンスペクトルに含まれるより細かな組織の特徴を抽出し、イメージングすることが可能となる。

以上のように、ラマン散乱分光法を用いることで、心筋バイアピリティ評価に重要な正常心筋と線維化組織の分布、さらには動脈や静脈の走行も非侵襲的に可視化することができる。これらは、従来の外科医の経験や勘といった曖昧さを無くし、科学的根拠に基づく心臓外科手術

の標準化、治療成績の飛躍的な向上につながると考えられる。

ま と め

以上、ラマン散乱分光法を用いた無染色組織イメージングの例を示してきた。その他にも、まだ研究レベルではあるが、アテローム性動脈硬化症患者の冠動脈組成診断⁴⁾、乳がん診断²²⁾、脳腫瘍診断²³⁾などへの応用も報告されており、ラマン散乱分光法を用いた組織診断の可能性が

示されている。

10年ほど前までは、非常に微弱なラマン散乱光を高感度に検出するすべがなく、ラマンイメージングにおける撮像速度が実用的ではなかった(従来法では1イメージあたり1時間~24時間ほどかかった)。しかし、2000年代に入り、安定した光源や高感度検出器の登場、検出光学系の工夫により撮像速度が実用的(数分~数十分)となってきた。さらに、非線形光学などの光学技術の発展から、ビデオレート(1イメージあたり33ミリ秒)でラマン散乱光を取得できる技術(コヒーレント反ストークスラマン散乱分光法や誘導ラマン散乱分光法など)も開発されている²⁴⁻²⁷⁾。また、市販のラマン分光システムが簡単に手に入るようになってからは、

癌や皮膚組織も含めて様々な組織のラマンスペクトルのデータベースが少しずつ増えている。

繰り返すが、ラマン散乱分光法は、試料への特別な前処理(固定や染色など)を必要としない、光を用いるため生体組織へのダメージを極小に抑えられる、水を多く含む組織でも観測が可能、分子振動スペクトルを元に分子種や分子構造を推定できるといった特徴を持つ。今後のさらなる技術発展によって、より身近な技術としてラマン散乱分光法が医学・生物学へ応用され、医療診断技術の発展や未知の生命現象の観測へつながることが期待できる。

オリンパスメディカルシステム株式会社、オリンパス株式会社から研究費を受けている。

文 献

- 1) Hooke R. Micrographia: or, Some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses. London: J Martyn and J Allestry, 1665.
- 2) Puppels GJ, de Mul FF, Otto C, Greve J, Robert-Nicoud M, Arndt-Jovin DJ, Jovin TM. Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microspectroscopy. *Nature* 1990; 347: 301-303.
- 3) 濱口宏夫, 平川暁子編. ラマン分光法. 東京: 学会出版センター, 1988.
- 4) Brennan JF, 3rd, Romer TJ, Lees RS, Tercyak AM, Kramer JR, Jr., Feld MS. Determination of human coronary artery composition by Raman spectroscopy. *Circulation* 1997; 96: 99-105.
- 5) Katagiri T, Yamamoto YS, Ozaki Y, Matsuura Y, Sato H. High axial resolution Raman probe made of a single hollow optical fiber. *Appl Spectrosc* 2009; 63: 103-107.
- 6) Shabsigh R. Prevalence of and recent developments in female sexual dysfunction. *Curr Psychiatry Rep* 2001; 3: 188-194.
- 7) Schiefke F, Akdemir M, Weber A, Akdemir D, Singer S, Frerich B. Function, postoperative morbidity, and quality of life after cervical sentinel node biopsy and after selective neck dissection. *Head Neck* 2009; 31: 503-512.
- 8) Pietrangeli A, Pugliese P, Perrone M, Sperduti I, Cosimelli M, Jandolo B. Sexual dysfunction following surgery for rectal cancer - a clinical and neurophysiological study. *J Exp Clin Cancer Res* 2009; 28: 128.
- 9) Dumont P, Denoyer A, Robin P. Long-term results of thoracoscopic sympathectomy for hyperhidrosis. *Ann Thorac Surg* 2004; 78: 1801-1807.
- 10) Minamikawa T, Harada Y, Koizumi N, Okihara K, Kamoi K, Yanagisawa A, Takamatsu T. Label-free detection of peripheral nerve tissues against adjacent tissues by spontaneous Raman microspectroscopy. *Histochemistry and Cell Biology* 2013; 139: 181-193.
- 11) Fu Y, Wang H, Huff TB, Shi R, Cheng JX. Coherent anti-Stokes Raman scattering imaging of myelin degradation reveals a calcium-dependent pathway in lyso-PtdCho-induced demyelination. *J Neurosci Res* 2007; 85: 2870-2881.
- 12) Allman KC, Shaw LJ, Hachamovitch R, Udelson JE. Myocardial viability testing and impact of revascularization on prognosis in patients with coronary artery disease and left ventricular dysfunction: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 1151-1158.
- 13) Ogawa M, Doi K, Yamada Y, Fukumoto A, Okawa K, Kanbara T, Koushi K, Itoh H, Nishimura T, Yaku H. Surgical ventricular restoration based on evaluation of myocardial viability with delayed-enhanced magnetic resonance imaging. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 55: 149-157; discussion 57.
- 14) Ogawa M, Harada Y, Yamaoka Y, Fujita K, Yaku H, Takamatsu T. Label-free biochemical imaging of heart

- tissue with high-speed spontaneous Raman microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 382: 370-374.
- 15) Spiro TG, Stein P. Resonance effects in vibrational scattering from complex molecules. *Annual Review of Physical Chemistry* 1977; 28: 501-521.
- 16) Spiro TG. Resonance Raman spectroscopy as a probe of heme protein structure and dynamics. *Adv Protein Chem* 1985; 37: 111-159.
- 17) Hamada K, Fujita K, Smith NI, Kobayashi M, Inouye Y, Kawata S. Raman microscopy for dynamic molecular imaging of living cells. *J Biomed Opt* 2008; 13: 044027.
- 18) Okada M, Smith NI, Palonpon AF, Endo H, Kawata S, Sodeoka M, Fujita K. Label-free Raman observation of cytochrome c dynamics during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 28-32.
- 19) Peres MB, Silveira L, Jr., Zangaro RA, Pacheco MT, Pasqualucci CA. Classification model based on Raman spectra of selected morphological and biochemical tissue constituents for identification of atherosclerosis in human coronary arteries. *Lasers Med Sci* 2011; 26: 645-655.
- 20) Deinum G, Rodriguez D, Romer TJ, Fitzmaurice M, Kramer JR, Feld MS. Histological classification of Raman spectra of human coronary artery atherosclerosis using principal component analysis. *Appl Spectrosc* 1999; 53: 938-942.
- 21) Beattie JR, Bell SE, Borggaard C, Fearon AM, Moss BW. Classification of adipose tissue species using Raman spectroscopy. *Lipids* 2007; 42: 679-685.
- 22) Haka AS, Volynskaya Z, Gardecki JA, Nazemi J, Lyons J, Hicks D, Fitzmaurice M, Dasari RR, Crowe JP, Feld MS. In vivo margin assessment during partial mastectomy breast surgery using Raman spectroscopy. *Cancer Res* 2006; 66: 3317-3322.
- 23) Beljebbar A, Dukic S, Amharref N, Manfait M. Ex vivo and in vivo diagnosis of C6 glioblastoma development by Raman spectroscopy coupled to a microprobe. *Anal Bioanal Chem* 2010; 398: 477-487.
- 24) Evans CL, Potma EO, Puoris'haag M, Cote D, Lin CP, Xie XS. Chemical imaging of tissue in vivo with video-rate coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 16807-16812.
- 25) Minamikawa T, Hashimoto M, Fujita K, Kawata S, Araki T. Multi-focus excitation coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy and its applications for real-time imaging. *Optics Express* 2009; 17: 9526-9536.
- 26) Freudiger CW, Min W, Saar BG, Lu S, Holtom GR, He C, Tsai JC, Kang JX, Xie XS. Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy. *Science* 2008; 322(5909): 1857-1861.
- 27) Ozeki Y, Umemura W, Otsuka Y, Satoh S, Hashimoto H, Sumimura K, Nishizawa N, Fukui K, Itoh K. High-speed molecular spectral imaging of tissue with stimulated Raman scattering. *Nat Photon* 2012; 6: 845-851.

著者プロフィール



南川 丈夫 Takeo Minamikawa

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科細胞分子機能病理学・
学術振興会特別研究員 (PD)

略歴：2004年3月 茨城工業高等専門学校電子制御工学科卒業
2006年3月 大阪大学基礎工学部システム科学科機械科学コース卒業
2008年3月 大阪大学大学院基礎工学研究科機能創成専攻生体工学領域博
士前期課程修了
2010年9月 大阪大学大学院基礎工学研究科機能創成専攻生体工学領域博
士後期課程修了
2010年9月 博士 (工学)
2009年4月～2011年3月 日本学術振興会特別研究員 (DC1)
2011年4月～現職

専門分野：ラマン分光学, 非線形ラマン分光学, 顕微分光学

最近興味のあること：「見る」ことから始まる科学・医学の大発見を夢見て、日々新しい顕微鏡や観察手法の研究に勤しんでいます。

主な業績：1. Minamikawa T, Harada Y, Koizumi N, Okihara K, Kamoi K, Yanagisawa A, Takamatsu T. Label-free detection of peripheral nerve tissues against adjacent tissues by spontaneous Raman microspectroscopy. *Histochemistry and Cell Biology* 2013; 139: 181-193.
2. Minamikawa T, Niioka H, Araki T, Hashimoto M. Real-time imaging of laser-induced membrane disruption of a living cell observed with multifocus coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Journal of Biomedical Optics* 2011; 16: 021111-021115.
3. Minamikawa T, Hashimoto M, Fujita K, Kawata S, Araki T. Multi-focus excitation coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy and its applications for real-time imaging. *Optics Express* 2009; 17: 9526-9536.
4. Minamikawa T, Tanimoto N, Hashimoto M, Araki T, Kobayashi M, Fujita K, Kawata S. Jitter reduction of two synchronized picosecond mode-locked lasers using balanced cross-correlator with two-photon detectors. *Applied Physics Letters* 2006; 89: 191101.