

生体深部を観察可能な
超解像リアルタイムイメージング技術
に関する研究

2018年3月

埼玉大学大学院 理工学研究科（博士後期課程）
理工学専攻 連携先端研究コース（主指導教員 緑川克美）

戸田圭亮

要旨

顕微鏡は、肉眼では見ることのできない細かな構造を可視化することにより、自然科学や工学の分野において様々な知見をもたらしてきた。特に、生体試料を対象とした観察において、顕微鏡の果たしてきた役割はあまりにも大きい。その中でも、蛍光顕微鏡は、試料の構造を単に拡大するのではなく、生体機能をも可視化することのできる顕微鏡として、現在の生体研究において非常に強力なツールとなっている。蛍光顕微鏡は、励起光の照射により試料中の蛍光分子を励起し、発生した蛍光を観察する顕微鏡であるが、生体内の特定機能を担う分子に対して蛍光タンパク質のような蛍光分子を紐付けすると、蛍光の観察からその特定の分子の局在や動態を知ることができるという特徴を持つ。また、回折限界を超えるような分解能を達成する超解像顕微鏡や、生体深部観察が可能な二光子蛍光顕微鏡といった新たな蛍光顕微鏡の開発も成され、生体研究はますます発展することとなった。

しかし、これらの顕微鏡には弱点もあった。例えば、超解像顕微鏡は観察可能な深さが浅く、一方で二光子励起蛍光顕微鏡は、空間分解能が高くない。また、レーザー走査型の顕微鏡は、走査速度の制限があるために視野を広げると時間分解能が低減してしまう。このようなトレードオフの関係が、空間分解能と観察可能な深さ、視野の広さ、時間分解能の間にあり、このために脳のような分厚い生体組織の活動をリアルタイムで観察することは困難であった。本研究では、このトレードオフの関係を打破するために、超解像顕微鏡である構造化照明顕微鏡と、多光子励起蛍光顕微鏡である時空間集光顕微鏡とを組み合わせ、さらに三光子励起蛍光を用いることで空間分解能を向上させた、干渉時空間集光顕微鏡を開発した。

本研究の出発点となる顕微鏡である時空間集光顕微鏡は、他の多光子励起蛍光顕微鏡とは異なり、走査をせず、広視野による照明を行う。走査を伴わないため、視野を広げても時間分解能を下げずにすむという利点を持つ顕微鏡である。しかし、発生した蛍光が試料中で散乱されて背景光となることや、走査型の多光子励起蛍光顕微鏡と比べて深さ方向の分解能が低い、つまり焦点面外において発生する蛍光が多いという欠点がある。本研究においては、二光子励起蛍光ではなく三光子励起蛍光を用いることによって深さ方向の分解能を向上させ、また、構造化照明の技術と組み合わせることによって発生した背景光を除去しながら空間分解能の向上も行なった。

三光子励起蛍光を発生させるためには、ピーク強度の高い励起光源が必要であった。そこでまず、Yb ファイバーを利得媒質としたチャープパルス増幅器を作製し、中心波長 1060 nm、パルス幅 92 fs、パルスエネルギー 9 μ J、繰り返し周波数 200 kHz の出力

を得た。次に、三光子励起蛍光を用いた時空間集光顕微鏡の開発を行なった。深さ方向の分解能は、二光子励起蛍光を用いた場合は $2.1 \mu\text{m}$ であったのに対し、三光子励起蛍光を用いた場合は $1.6 \mu\text{m}$ であり、二光子励起蛍光を用いた場合と比べて1.3倍向上した。また、焦点面外において発生する蛍光を5.9倍抑制することに成功した。また、二光子励起蛍光を用いることの可能な状況であれば、二光子励起と三光子励起により異なる蛍光色素を同時に励起した二色イメージングを行うことが可能であることが示された。最後に、三光子励起蛍光を用いた時空間集光顕微鏡を構造化照明顕微鏡と組み合わせた、干渉時空間集光顕微鏡を開発した。構造化照明の効果により、発生した背景光は除去され、深さ方向の分解能は 860 nm 、面内方向の分解能は深さ約 $100 \mu\text{m}$ において 106 nm に達した。つまり、深さ方向の分解能は励起光の波長 1060 nm を下回っており、面内方向に至っては、1/10の大きさに相当する分解能を達成したことになる。また、時空間集光顕微鏡、干渉時空間集光顕微鏡のどちらにおいても、生体試料を用いたイメージングに成功しており、この顕微鏡が生体観察に極めて有効であることを示すことができた。

本研究において開発した、三光子励起蛍光を用いた干渉時空間集光顕微鏡は、将来、脳組織の活動のような生体現象を観察する強力なツールとなりうる。例えば神経科学の分野において、この顕微鏡はシナプスの可塑化や樹状突起スパインの減少といった現象の観察に応用が可能であると考えられる。ニューロン同士のコミュニケーションを観察するためには視野を広げる必要があるが、視野面積の増加分だけ励起光の入射強度を増加させるだけで、時間分解能を下げることなく対応が可能である。試料に照射される全体としての平均強度が高くなることから熱による試料の損傷を招く可能性も考えられるが、励起光の繰り返し周波数を下げることによってこの問題は回避できる。

目次

第 1 章 緒言	1
1.1 背景	1
1.2 本研究の目的と意義	4
参考文献	6
第 2 章 本研究に関する理論及び実験方法	9
2.1 はじめに	9
2.2 非線形光学現象	10
2.2.1 光と媒質（物質）の相互作用	10
2.2.2 自己位相変調と相互位相変調	11
2.2.3 多光子吸収	11
2.3 超短パルス発生と分散補償	12
2.3.1 波の重ね合わせ	12
2.3.2 モード同期	13
2.3.3 分散	15
2.3.4 分散補償	16
2.3.5 チャープパルス増幅	18
2.4 蛍光顕微鏡	19
2.4.1 蛍光顕微鏡	19
2.4.2 超解像顕微鏡	20
2.4.3 多光子励起蛍光顕微鏡	23
参考文献	28
第 3 章 Yb ファイバーチャープパルスレーザーの作製	31
3.1 はじめに	31
3.2 Yb ファイバー発振器の作製	32
3.3 チャープパルス増幅器の作製	35
3.4 分散補償とパルス幅の評価	37
3.5 まとめ	39
参考文献	40

第 4 章 三光子励起蛍光を用いた時空間集光顕微鏡の開発.....	41
4.1 はじめに	41
4.2 原理	41
4.3 装置の作製	42
4.4 測定結果	43
4.4.1 光軸方向分解能の評価	43
4.4.2 背景蛍光の発生抑制	44
4.4.3 二色イメージング	46
4.4.4 生体試料を用いた観察	47
4.5 ノイズへの対処	49
4.5.1 ノイズの由来	49
4.5.2 アダプティブなノイズ除去法	49
4.5.3 フーリエ空間におけるフィルタリング	51
4.6 まとめ	54
参考文献	55
第 5 章 三光子励起蛍光を用いた干渉時空間集光顕微鏡の開発.....	56
5.1 はじめに	56
5.2 干渉時空間集光顕微鏡の原理	56
5.3 装置の作製	58
5.4 測定結果	60
5.4.1 光軸方向分解能の評価	60
5.4.2 面内方向分解能の評価	61
5.4.3 生体試料を用いた観察	62
5.5 まとめ	65
参考文献	66
第 6 章 結言	67
謝辞	68
業績目録	69

第1章 緒言

1.1 背景

自然科学の探求において、現象を観測する手段の開発は、極めて重要な過程であると言える。何故ならば、新しい観測手段が開発されることで、現象に対する新たな知見が得られ、より深くにある現象へと研究対象を移してゆくことができるからである。様々な観測手段が開発されてきたが、中でも、17世紀にその原型が開発された光学顕微鏡は、肉眼では見ることのできない細かな構造を可視化することによって、自然科学に関する極めてたくさんの知見を人類にもたらした。特に生物に関しては、生物の基本単位と言える細胞やその機能など、現在では常識となっている知見の多くが、顕微鏡なしには得られなかったものであると言える。今日、様々な顕微鏡が、自然科学から工学に至るまでの様々な研究に利用されている。自然科学の中でも生物学、特に生体機能の観察においては、蛍光タンパク質の発見と蛍光顕微鏡の開発により始まった蛍光イメージングが、大きなブレークスルーを生み出した。蛍光顕微鏡は、励起光の照射により試料中の蛍光分子を励起し、発生した蛍光を観察する顕微鏡であるが、生体内の特定機能を担う分子に対して蛍光タンパク質のような蛍光分子を紐付けすると、蛍光の観察からその特定の分子の局在や動態を知ることができるという特徴を持つ。蛍光タンパク質は、生体内において合成可能でありながら、蛍光を発する性質を持つタンパク質の総称であり、下村らによって発見された緑色蛍光タンパク質 (Green fluorescent protein: GFP) [1]をはじめとして、様々な色の蛍光を発するものが報告されている[2,3]。蛍光タンパク質は、遺伝子的に発現可能であることから、特定のタンパク質に結合させた蛍光マーカーとしての利用が可能である。すなわち、特定の機能を担うタンパク質等に蛍光タンパク質を遺伝子的に紐付けしておくことにより、対象分子の局在や移動の様子から、対象分子の生体内における機能や、生体现象に関する新たな知見を得ることができるようになる。さらに近年、特定の波長の光を照射することで蛍光波長を変える蛍光タンパク質[4,5]や、蛍光を発する状態と発しない状態とを切り替えることのできる蛍光タンパク質[6]が発見されたほか、複数のタンパク質を組み合わせることによって、周囲の環境に応じて蛍光波長を変えることのできるセンサー[7]の開発も行われ、生体分子の単なる局在や動態だけではなく、特定の個を識別することや、温度やカルシウムイオン濃度といった環境の変化を観測することさえも可能となってきている。このように、蛍光イメージングによって可視化することのできる情報は極めて多様である。

一方で、蛍光イメージングを生物学における強力なツールたらしめた要因は、蛍光マ

一カーの開発だけではない。観察の手法もまた、大きな発展を遂げてきた。初期の蛍光顕微鏡は、水銀ランプのような短波長の光源を視野全体に照射し、発生した蛍光を目やカメラを用いて観察する、広視野の顕微鏡であった。この顕微鏡は空間分解能が高くなく、また観察可能な深さも極めて浅かった。この時、観察可能な深さを制限していた主要な原因は、背景光と呼ばれるものであり、その発生メカニズムは2つある。1つ目は、焦点面外から発生する蛍光である。この顕微鏡では、一光子励起により蛍光分子を励起していたため、励起光を厚みのある試料の視野全体に照射すると、観察したい焦点面だけでなく、励起光が届く全ての領域にある蛍光分子が蛍光を発する。信号として目やカメラに結像されるのは、対物レンズの焦点面より発生した蛍光であり、焦点面外から発生した蛍光は結像されず、背景光（背景蛍光）となってしまう。2つ目は、試料内部で散乱された蛍光である。焦点面において発生した蛍光も、試料内部において散乱されてしまった場合、結像することができず、これも背景光となってしまう。これらの背景光が信号に対して相対的に大きくなりすぎると、信号として取り出せる情報は少なくなる。加えて、この場合に用いていた励起光は可視光から紫外光領域の、比較的短波長の光であったため、生体内の透過率も低かった。これに対し、今日の生体研究で最も広く使われている顕微鏡の1つである共焦点顕微鏡[8]は、およそ 200 nm の空間分解能を持ち、観察可能な深さも数十 μm 程度を達成するレーザー走査型の顕微鏡である。レーザー光は空間コヒーレンスが高いため、対物レンズなどを用いると、極めて小さな点に集光することができる。その集光点を空間的に走査しながら、発生した蛍光を検出し、集光点の位置と蛍光の強度から試料の断層像を再構築するのがレーザー走査型の顕微鏡の特徴である。共焦点顕微鏡の場合、対物レンズの焦点位置と共役な位置にピンホールを置くことによって、集光点以外から発生した背景蛍光を取り除き、観察可能な深さをも向上させている。

観察可能な深さをさらに向上させるために、非線形光学現象の1つである二光子励起（吸収）を利用した、二光子励起蛍光顕微鏡も開発されている[9-11]。二光子励起は、励起に必要なエネルギーの半分のエネルギーを持つ光子2つが、同時に1つの蛍光分子と相互作用することによって蛍光分子を励起する過程である。光子密度、すなわち光強度が極めて高くなければ蛍光が発生しないため、レーザー走査型の顕微鏡を用いている場合、光強度の高くなる集光点近傍に蛍光の発生する領域を限定することができる。つまり、ピンホールを使うことなく、三次元的に高い分解能を得ることができる。また、使用する波長は近赤外光領域となるため、生体組織の透過率も高く、より深部まで励起光が到達する。この顕微鏡は高い強度を持つ励起光を必要とするが、蛍光強度が励起光強度に対して非線形に増大することから、平均強度が同じでも瞬間的に光強度が増大す

るパルスレーザーの方が、時間平均した蛍光強度は大きくなる特徴がある。つまり、パルスレーザーを用いれば、平均強度を一定とした時、パルスの時間幅あるいはパルスの繰り返し周波数を小さくすることによって、蛍光強度を増大させることができる。パルスを作り出すためには、周波数の少しずつ異なる多数の発振モードを、位相を合わせて重ねる必要がある。それを可能にしたモード同期と呼ばれる技術や、そのパルスを増幅、整形する技術の発達により、現在では二光子励起蛍光顕微鏡の励起光源としてそのようなパルスレーザーが市販されるようになってきている。そのような経緯もあり、二光子励起蛍光顕微鏡は、生体深部観察によく利用されるようになってきた。

一方で、空間分解能の向上を目指した顕微鏡も開発されてきた。Hell らが 2014 年にノーベル化学賞を受賞する理由ともなった、超解像顕微鏡[12-20]である。超解像顕微鏡は、励起の方法や信号取得の方法などに様々な工夫を凝らすことで、回折限界を超える分解能を達成する顕微鏡である。レーザー走査型の超解像顕微鏡としては STED (Stimulated emission depletion) 顕微鏡[13]、広視野照明の超解像顕微鏡としては PALM (Photo-activated localization microscopy) [14,15]、STORM (Stochastic optical reconstruction microscopy) [17]、構造化照明顕微鏡 (Structured illumination microscopy: SIM) [18-20]などが挙げられる。それまでは電子顕微鏡を用いなければ見ることのできなかった、100 nm を切るような細かな構造を、蛍光イメージングにおいて可視化することができるようになったため、生体研究においては極めて画期的な発明であった。こういった顕微鏡を用いることで、他の方法では困難であった生体機能観察が可能となってきた。

こうして生体機能の可視化ができるようになったことから、例えば脳のような、高度な細胞間ネットワークによって構成された生体組織の観察に対する需要が高まった。特に、人間の思考を司っている脳機能の解明は、研究者のみならず、多くの人々を惹きつける課題であると言える。しかし、このような試料の観察は、蛍光顕微鏡にとっても、困難を極める課題であった。その理由は、空間分解能と観察可能な深さ、視野の広さ、時間分解能の間にあるトレードオフの関係である。前述した顕微鏡を例に挙げると、極めて高い分解能を達成する超解像顕微鏡は、微弱な信号を用いているために、生体深部にゆくほど増大する背景光によって信号光は容易に埋もれてしまい、観察可能な深さが極めて浅い。一方で、深部観察に有用な二光子励起蛍光顕微鏡は、励起光の波長が長いために集光点の大きさが小さくならず、空間分解能は 1 μm を切る程度となってしまう。また、レーザー走査型の顕微鏡の場合、視野を広げようとすると、走査する距離が伸びるため、必然的に時間分解能が低下する。しかし、単純に走査速度を上げてしまうと信号強度が低下してしまう。十分な信号を得られるように励起光の平均強度を上げた場合、試料に熱などによる損傷を与える恐れがある。また、パルスレーザーを用いている二光

二光子励起蛍光顕微鏡などの場合、平均強度を変えずに蛍光強度を増大させるためには、繰り返し周波数を下げるか、あるいはパルス幅を狭くする必要があるが、走査速度に対して繰り返し周波数を下げ過ぎれば、焦点面を隙間なく励起して観察しているという前提が崩れてしまう。また、パルス幅はスペクトル幅、すなわち使用する周波数帯域の広さと反比例の関係にあるため、パルス幅を短くするためにはスペクトル幅を広くする必要があるが、スペクトル幅が広がると、全ての周波数に渡って位相を揃えることが困難となる。位相を揃えることができなければ、パルスの形状は崩れ、ピーク強度は低減してしまう。つまり蛍光強度を増大させることができなくなる。レーザー走査を用いない、広視野照明の二光子励起蛍光顕微鏡として、時空間集光[21,22]という技術を用いた顕微鏡も開発されてきた。視野を広げても時間分解能を低下させずに観察ができる特徴を持ち、ビデオレートにおいて極めて広い領域(5000–20000 μm^2)を観察した例もある[23,24]。しかし、広視野照明を利用しているために、空間分解能は結像光学系により決まる回折限界を超えることができず、また光軸方向の分解能はレーザー走査型の二光子励起蛍光顕微鏡よりも低いという問題があった。以上のような問題に阻まれ、脳のような生体組織の活動の観察は困難であった。近年になって、このトレードオフの関係を打ち破るために、複数の技術を融合した顕微鏡が作られるようになってきた。例えば、レーザー走査型の STED 顕微鏡[13]と二光子励起蛍光顕微鏡とを組み合わせた二光子 STED 顕微鏡[25-27]などが挙げられる。この顕微鏡は、背景光に強い二光子励起蛍光顕微鏡の特徴と、超解像を達成する STED 顕微鏡の利点が合わさり、超解像による深部観察を可能とした。しかし、用いられたのがレーザー走査型の顕微鏡であったため、時間分解能を保ちながら視野を広げることは困難である。

1.2 本研究の目的と意義

本研究においては、空間分解能と観察可能な深さ、視野の広さ、時間分解能の間にあるトレードオフの関係を打破するために、広視野の超解像顕微鏡である構造化照明顕微鏡[18-20]と、広視野照明の多光子励起蛍光顕微鏡である時空間集光顕微鏡[21,22]とを組み合わせた干渉時空間集光顕微鏡の開発を目的とした。三光子励起蛍光を用いることによって、蛍光の発生する領域を、二光子励起蛍光を用いた場合よりも光軸方向に局所化し、焦点面外からの背景蛍光発生を抑え、観察可能な深さを向上させる。さらに、構造化照明法を用いることによって、散乱蛍光の除去と空間分解能の向上も行う。この技術によって、空間分解能と観察可能な深さのトレードオフを打破する。また、走査を必要としない顕微鏡であるため、時間分解能を下げることなく視野を拡大させることが可能

である。視野の拡大によって低減した蛍光強度は、励起光の平均パワーを維持したまま、繰り返し周波数を下げることによって回復させることができるため、熱による試料の損傷も回避できる。このような、空間分解能と観察可能な深さ、視野の広さ、時間分解能の間にあるトレードオフの関係を打破可能な顕微鏡の開発は、将来、脳組織の活動のような生体现象を観察する強力なツールとなりうる。例えば神経科学の分野において、この顕微鏡はシナプスの可塑化や樹状突起スパインの減少といった現象の観察に応用が可能であると考えられる。視野を広げることによって、ニューロン同士のコミュニケーションも観察できると考えられる。

参考文献

- [1] O. Shimomura, F. H. Johnson, and Y. Saiga, "Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, aequorea," *J. Cell Comp. Physiol.* **59**, 223-239 (1962).
- [2] M. Matz, A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaraisky, M. L. Markelov, and S. A. Lukyanov, "Fluorescent proteins from nonbioluminescent anthozoa species," *Nature Biotech.* **17**, 969-973 (1999).
- [3] R. Y. Tsien, "The green fluorescent protein," *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509-544 (1998).
- [4] R. Ando, H. Hama, M. Yamamoto-Hino, H. Mizuno, and A. Miyawaki, "An optical marker based on the UV-induced green- to-red photoconversion of a fluorescent protein," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 12651-12656 (2002).
- [5] H. Tsutsui, S. Karasawa, H. Shimizu, N. Nukina, and A. Miyawaki, "Semi-rational engineering of a coral fluorescent protein into an efficient highlighter," *EMBO* **6**, 233-238 (2005).
- [6] R. Ando, H. Mizuno, and A. Miyawaki, "Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting," *Science* **306**, 1370-1373 (2004).
- [7] A. Miyawaki, J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura, and R. Y. Tsien, "Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin," *Nature* **388**, 882-887 (1997).
- [8] T. Wilson and C. Sheppard, *Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy* (Academic Press, New York, 1984).
- [9] W. Denk, J. H. Strickler and W. W. Webb, "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy," *Science* **248**, 73-76 (1990).
- [10] E. E. Hoover and J. A. Squier, "Advances in multiphoton microscopy technology," *Nat. Photon.* **7**, 93-101 (2013).

- [11] W. R. Zipfel, R. M. Williams and W. W. Webb, "Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences," *Nature Biotech.* **21**, 1369-1377 (2003).
- [12] S. Hell, "Far-field optical nanoscopy," *Science* **316**, 1153-1158 (2007).
- [13] S. Hell and J. Wichmann, "Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy," *Opt. Lett.* **19**, 780-782 (1994).
- [14] E. Betzig, "Proposed method for molecular optical imaging," *Opt. Lett.* **20**, 237-239 (1995).
- [15] 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 (2006).
- [16] S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, and M. D. Mason, "Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy," *Biophys. J.* **91**, 4258 (2006).
- [17] M. J. Rust, M. Bates, and X. Zhauang, "Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)," *Nat. Methods* **3**, 793 (2006).
- [18] M. G. L. Gustafsson, "Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy," *J. Microsc.* **198**(2), 82–87 (2000).
- [19] J. T. Frohn, H. F. Knapp, and A. Stemmer, "True optical resolution beyond the Rayleigh limit achieved by standing wave illumination," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**(13), 7232–7236 (2000).
- [20] R. Heintzmann, T. M. Jovin, and C. Cremer, "Saturated patterned excitation microscopy--a concept for optical resolution improvement," *J. Opt. Soc. Am. A* **19**(8), 1599–1609 (2002).
- [21] D. Oron, E. Tal, and Y. Silberberg, "Scanningless depth-resolved microscopy," *Opt. Express* **13**, 1468–1476 (2005).

- [22] G. Zhu, J. van Howe, M. Durst, W. Zipfel, and C. Xu, "Simultaneous spatial and temporal focusing of femtosecond pulses," *Opt. Express* **13**, 2153–2159 (2005).
- [23] O. D. Therrien, B. Aubé, S. Pagès, P. De Koninck, and D. Côté, "Wide-field multiphoton imaging of cellular dynamics in thick tissue by temporal focusing and patterned illumination," *Biomed. Opt. Express* **2**, 696–704 (2011).
- [24] L. -C. Cheng, C. -Y. Chang, C. -Y. Lin, K. -C. Cho, W. -C. Yen, N. -S. Chang, C. Xu, C. Y. Dong, and S. -J. Chen, "Spatiotemporal focusing-based widefield multiphoton microscopy for fast optical sectioning," *Opt. Express* **20**, 8939–8948 (2012).
- [25] G. Moneron and S. Hell, "Two-photon excitation STED microscopy," *Opt. Express* **17**, 14567-14573 (2009).
- [26] J. B. Ding, K. T. Takasaki, and B. L. Sabatini, "Supraresolution imaging in brain slices using stimulated-emission depletion 2-photon laser scanning microscopy," *Neuron* **63**, 429 (2009).
- [27] K. Otomo, T. Hibi, Y. Kozawa, M. Kurihara, N. Hashimoto, H. Yokoyama, S. Sato, and T. Nemoto, "Two-photon excitation STED microscopy by utilizing transmissive liquid crystal devices," *Opt. Express* **22**, 28215-28221 (2014).

第2章 本研究に関する理論及び実験方法

2.1 はじめに

本研究においては、非線形光学現象の1つである多光子励起を利用した蛍光顕微鏡を観察に用いるため、高い強度の励起光が必要となる。パルスレーザーを励起光源として用いると、平均強度が低くてもピーク強度は高い光パルスにより、多光子励起蛍光の強度は増加する。レーザーパルスを作り出すためには、周波数の異なる複数の成分を適切に重ね合わせて発振させる、モード同期を行なう必要がある。また、媒質中において感じる屈折率の周波数依存性である分散によって、作り出されたパルスを構成する各周波数成分の位相は、媒質中を伝搬するうちにずれる。そのため、パルスはチャープされ、ピーク強度が下がる。よって、多光子励起蛍光を発生させたい場所においては全ての周波数成分の位相が揃うようにする、分散補償を行なうことが必要である。また、本研究においては非常に高いピーク強度を必要とする三光子励起蛍光を用いる必要があったため、それを引き起こすのに十分な強度までレーザーを増幅する必要があった。しかし、増幅器内部において、ピーク強度が高くなりすぎると、様々な非線形光学現象によって、スペクトル位相が変調され、分散補償が困難になる可能性や、利得媒質に損傷を与えたりするなどの恐れがあった。そのため、あらかじめパルスをチャープさせることによって、パルス幅を伸ばし、ピーク強度を下げたパルスを増幅した。増幅後に、分散補償を行い、高いピーク強度のパルスを得る。この手法をチャープパルス増幅と呼ぶ。本章の前半、2.2 節においては非線形光学現象について、そして 2.3 節ではパルスレーザーの発振や分散などについて述べる。

観察したい分子に蛍光分子を標識した試料に、適切な波長の励起光を照射し、発生した蛍光を観察すると、蛍光分子の分布から間接的に標的分子の分布を知ることができる。このようなイメージング手法を蛍光イメージングと呼ぶ。蛍光分子は、特定のタンパク質や生体内の構造に結合させることができるため、蛍光顕微鏡は近年の生体研究には欠かせない技術となっている。蛍光イメージングを行なう顕微鏡には様々なものがあるが、それらを総称として蛍光顕微鏡と呼び、励起光の照射や観察の仕方により 2 種類に大別されている。一方は、水銀ランプなどを励起光源として視野全体に照射し、発生した蛍光を目やカメラにより観察する広視野型の顕微鏡であり、他方は、レーザー光を励起光源として視野の一点に集光し、集光点の位置を視野上で走査しながら発生した蛍光の強

度を記録して画像を構築するレーザー走査型の顕微鏡である。現在までに、様々な蛍光顕微鏡が開発されてきたが、それぞれに特徴が異なり、得手不得手がある。例えば、現在の生体研究で最もよく用いられている蛍光顕微鏡の 1 つである共焦点顕微鏡[1]は、空間分解能 200 nm による観察を可能とするレーザー走査型の顕微鏡であるが、観察可能な深さは 50 μm 程度である。観察可能な深さが 1 mm を超える二光子励起蛍光顕微鏡は[2-4]、分解能が 1 μm を切る程度と、それほど高くない。また走査型の顕微鏡であるため、時間分解能を落とすことなく視野を広げるのは難しい。極めて高い分解能を達成する超解像顕微鏡[5-13]は、観察可能な深さが極めて浅い。本研究においては、時空間集光顕微鏡と呼ばれる、広視野照明を用いる多光子励起蛍光顕微鏡を、超解像顕微鏡の 1 つである構造化照明顕微鏡と組み合わせた干渉時空間集光顕微鏡を作製した。本章の後半、2.4 節においては、超解像顕微鏡である構造化照明顕微鏡、多光子励起蛍光顕微鏡である時空間集光顕微鏡についての基本的な原理について説明する。

2.2 非線形光学現象

2.2.1 光と媒質（物質）の相互作用

光が媒質に入射するとき、媒質を構成する原子や分子は、光電場によって分極する。これは、原子や分子の電子雲が、光電場に引きずられるためである。この分極が、その媒質や光の状態を変化させ、屈折や吸収などの様々な光学現象を引き起こす。

光電場によって分極が発生したとき、その大きさ P は、光電場の大きさが小さければ次のように書くことができる。

$$P = \chi E \quad (2.1)$$

ここで、 E は光電場の大きさであり、 χ は媒質の電場に対する感受率である。このような線形応答を示す分極は、光の屈折や、媒質による光子の吸収、あるいは誘導放出をもたらす分極である。これに対し、光強度が大きくなってくると、非線形な分極 $P_{\text{nonlinear}}$ が現れ、

$$P = \chi E + P_{\text{nonlinear}} \quad (2.2)$$

のようになる。この $P_{\text{nonlinear}}$ もまた光電場に依存した分極であるため、先の、光電場に比例した分極に関わる感受率を 1 次の感受率 $\chi^{(1)}$ とし、光電場の 2 乗より大きな次数に対する応答を示す項の感受率を $\chi^{(2)}$, $\chi^{(3)}$, \dots のように置くと、分極の大きさは次の式のように表すことができる。

$$P = \chi^{(1)}E + \chi^{(2)}EE + \chi^{(3)}EEE + \chi^{(4)}EEEE + \dots \quad (2.3)$$

この式の各項は、応答の次数によって 1 次の分極、2 次の分極のように呼ばれる。いわ

ゆる非線形光学現象は、この式の2次以上の分極によってもたらされる現象である。例えば、和周波発生や差周波発生は2次の分極に基づく現象であり、二光子吸収、自己位相変調や相互位相変調などは3次の分極に基づく現象である。本研究においては、自己位相変調、相互位相変調、そして多光子吸収という非線形光学現象が重要なキーとなるため、以下にて概説する。

2.2.2 自己位相変調と相互位相変調

自己位相変調と相互位相変調は共に、非線形光学現象である光カー効果によって引き起こされる現象である。光カー効果とは、屈折率が光強度に依存する現象であり、3次の感受率を持つ媒質に高強度の光を入射した際に生じる、3次の分極に基づいて引き起こされる。光カー効果による屈折率の変化の大きさは、光強度に比例する。そのため、光強度 $I(t)=|E(t)|^2$ の光が3次の感受率を持つ媒質に入射した時の屈折率 $n(t)$ は次のように表される。

$$\begin{aligned} n(t) &= n_0 + n_2 |E(t)|^2 \\ &= n_0 + n_2 I(t) \end{aligned} \tag{2.4}$$

ここで、 n_0 は媒質の持つ線形の屈折率であり、 n_2 は光カー効果によってもたらされる非線形屈折率の係数である。媒質中の屈折率が光強度に依存して変化することから、伝搬する光はその影響を受け、位相が変調される。ここで、光カー効果を誘起した光自身が位相変調される現象を自己位相変調、他の光が誘起した光カー効果によって位相変調される現象を相互位相変調と呼ぶ。

2.2.3 多光子吸収

1次の分極に基づいて発生する吸収は、原子や分子が光子を1つ吸収して、現在の状態からよりエネルギーの高い状態へと遷移する現象である (Fig.2.1(a))。この時、光子のエネルギーは状態間のエネルギー差に対応している必要がある。光子の、粒子としての性質に基づけば、遷移に必要なエネルギーの半分のエネルギーを持つ光子2つが同時に分子等と相互作用することによって2つの光子による励起が引き起こされるものと考えることができる。これは二光子吸収と呼ばれる、3次の分極に基づく非線形光学現象であり、光強度の2乗に比例した応答を示す (Fig.2.1(b))。同様に、相互作用する光子の数が3つの三光子吸収、4つの四光子吸収のような非線形光学現象が存在する。そのような現象をまとめて多光子吸収と呼ぶ。また、吸収を起こした分子は励起状態へと遷移していることから、多光子励起と呼ぶ。吸収断面積は、典型的な蛍光分子におい

ては二光子吸収の場合 $10^{-49} \text{ cm}^4/\text{s}/\text{photon}$ と低く，三光子吸収の場合に至っては $10^{-83} \text{ cm}^4(\text{s}/\text{photon})^2$ と，極めて小さい[14]. そのため，多光子吸収を引き起こすためには，きわめて高い強度の光電場を作り出さなければならない。

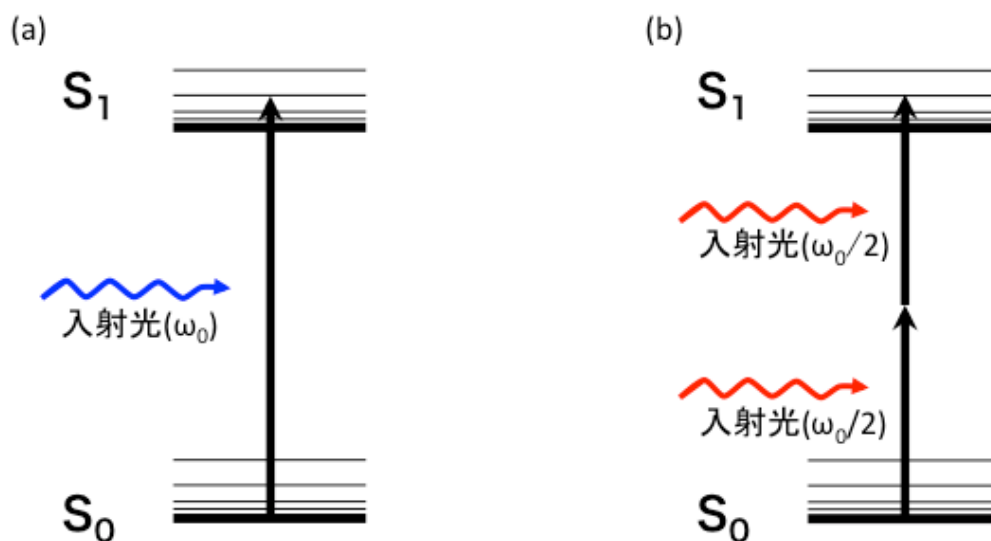


Fig.2.1 分子のエネルギーダイアグラム

2.3 超短パルス発生と分散補償

2.3.1 波の重ね合わせ

光は，粒子であると同時に，時空間的な電磁場の変異が伝搬する波である．よって，波の性質の1つである，重ね合わせの性質を持つ．レーザーのような，時空間コヒーレンス（可干渉性）の高い光を用いると，重ね合わせの効果により，極めて高い強度の光電場を生成することが可能である．空間的には，レンズなどによってレーザー光を集光すると，レーザー光の波は重ねあわさり，極めて高強度の電場を作り出すことができる．これは，光子密度が上がったと捉えることもできる．一方で，時間的には，周波数の異なる光を重ね合わせてパルスを生じさせることによって，瞬間的に電場強度の高くなる光を作り出すことができる．したがって，パルスレーザーは，高い励起光強度を必要とする非線形光学現象を引き起こすのに有利であると言える．しかし，時間に対して強度の変化しない連続波のレーザー光から，パルスを作り出すためには工夫が必要となる．

ここで，連続波として発振している光を用いてパルスを作り出すために，波の重ね合わせの原理を利用する．一般に，CW（連続波）レーザーの光電場は，一定の周波数で，振幅が変化することなく振動している．この振動に僅かに周波数の異なる光電場を加えると，波の重ね合わせにより強め合う領域と弱め合う領域が生まれる．この様子がビー

トと呼ばれており、2つの振動の周波数差で定義されるビート周波数でビートの振幅、つまり包絡線の形状が変化する。多くの成分を、位相を揃えて加えていくと、周期的に非常に強い振幅を持ったパルスの列となる。つまり、基準となる周波数から等間隔な周波数差を持つ振動を、初期位相が揃うように重ね合わせることで超短パルスが生成できるのである。これを数学的に表現すると、以下のようなになる。レーザー共振器の縦モード次数を m 、共振器長により決定されるモード間隔を $\Delta\omega$ 、中心周波数を ω_0 、各周波数の振動の振幅を E_m 、各周波数の位相定数を ϕ_m とし、多モードの光電場を

$$E(t) = \sum_m E_m \exp\{-i[(\omega_0 + m\Delta\omega)t + \phi_m]\}, \quad (2.5)$$

と表す。各モードが同期されているものとし、 $\phi_m=0$ とする、また簡単のために各周波数の振動の振幅を $E_m=1$ とおくと、

$$E(t) = \sum_m \exp[-i(\omega_0 + m\Delta\omega)t]. \quad (2.6)$$

m が $\pm(N-1)/2$ となるまでこの式を足し合わせると、

$$E(t) = \frac{\sin(N\Delta\omega t/2)}{\sin(\Delta\omega t/2)} \exp(-i\omega_0 t), \quad (2.7)$$

となる。この式より、分母が限りなく0に近づく点 ($\Delta\omega t/2 = n\pi$; n は整数) で電場 $E(t)$ は鋭いピークを持つことになることがわかる。この繰り返し周期を T とおくと、

$$T = \frac{2\pi}{\Delta\omega}, \quad (2.8)$$

であり、ピークの電場は1つのモードの振幅を N 倍したものとなる。また光電場のパルス幅を Δt_p とおくと、これは T/N に近似できる。つまり、パルス幅を狭くするためには繰り返し周波数を高くするか、重ね合わせるモードを増やすということになる。一般に、重ね合わせるモード数 N を 10^4 から 10^6 とすることでピコ秒からフェムト秒のパルスとなる。このように超短パルスを発生させるためには、広い周波数成分を持つ光を用意し、かつ各周波数成分の位相を揃える必要があることになる。そのような光電場を持つレーザーを作り出すのが、モード同期と呼ばれる技術である。

2.3.2 モード同期

パルスレーザーを作り出すためには、特定のパルス以外が共振器内に発振しないような条件を作り出さなければならない。そのような条件を作り出し、パルス発振を引き起こすのが、モード同期と呼ばれる技術である。モード同期にもいくつかの手法があり、外部から共振器内の損失や利得の大きさを周期的に変調してパルスを作り出す能動モ

ード同期, 光強度に対して非線形な応答をする過飽和吸収体などを共振器内に設置してレーザー光自身により内部変調をかけてパルス発振を有利にする受動モード同期などがある. 本研究では, 光ファイバー中を伝搬する光が, 非線形光学効果である自己位相変調と相互位相変調を受けて, その偏光が変化することを利用した, 非線形偏波回転 [15]と呼ばれる手法を利用したモード同期を行なった.

高い強度の光を光ファイバー中に伝搬させると, 非線形光学効果である光カー効果が発生する. 伝搬している光が直線偏光であれば, 光カー効果によって自己位相変調のみが引き起こされる. 一方で, 楕円偏光の光が伝搬している場合は, 光カー効果を主に引き起こした偏光とは垂直の成分も存在しているために, 直交する偏光間での相互位相変調も引き起こされることとなる. したがって, 偏光方向によって光の受ける位相変調量が代わり, 偏光が回転することになる. このようにして偏光の変化する現象を非線形偏波回転と呼ぶ. 非線形偏波回転の量は, パルスのピーク強度に依存する. そのため, 波長板や偏光子を用いると, ピーク強度の高いパルス光が非線形偏波回転をした時だけ光が共振器内を伝搬するように調整でき, それ以外の光強度での発振を抑制することができる. これが, 非線形偏波回転を用いたモード同期である (Fig.2.2). 一般に, ファイバーレーザーにおいては, 半導体過飽和吸収体を用いたモード同期がよく用いられるが, この素子は損傷を受けやすく, 定期的なメンテナンスが必要となる. 一方, 非線形偏波回転によるモード同期では光ファイバーと波長板, 偏光子を用いているだけであるため損傷を受けることは少ない. よって, 一度適切な条件を出すことができれば, 以降はほとんどメンテナンスフリーの系として使用することが可能である. ただし, 偏波は光ファイバーの温度によっても回転の様子が変わるため, 温度の制御が重要となる.

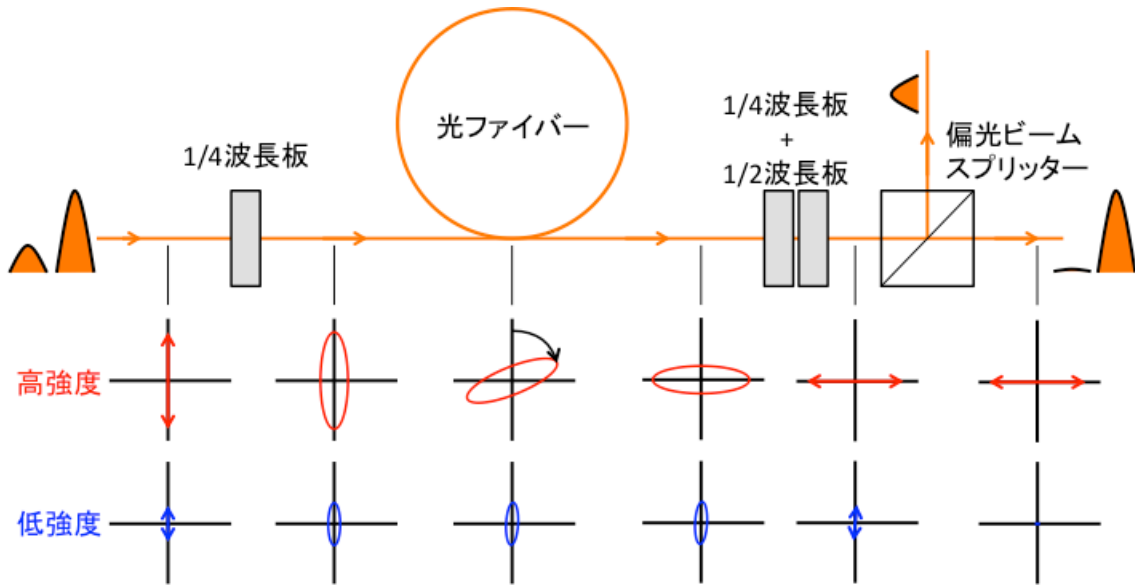


Fig.2.2 非線形偏波回転を用いたモード同期レーザーの概念図. 1/4 波長板によって楕円偏光となった入射パルスは, 光ファイバー中においては強度に依存して偏波が回転し, その後 1/4 波長板および 1/2 波長板によって直線偏光に戻る. 偏光ビームスプリッターを用いて, 非線形偏波回転により偏波の回転した高強度のパルス以外を減衰させ, 透過したパルスは再び共振器へと戻る.

2.3.3 分散

二光子励起や三光子励起と言った非線形光学過程を引き起こすためには, 高いピーク強度を持つパルス光が有用である. ピーク強度を最大にするためには, 発振している全ての波長について, 位相が揃っている必要がある. しかし, 発振器から出力された後, 光は伝搬する間に通過する媒質の分散の影響を受け, 周波数 (波長) ごとの位相がずれていく. 角周波数 ω の光が媒質から受ける屈折率は, $n(\omega)$ のように関数で表されるため, 初期位相を ϕ_0 とし, 距離 Δl 進んだ時に角周波数 ω の光の位相は

$$\phi(\omega) = \phi_0 + \omega n(\omega) \Delta l / c \quad (2.9)$$

となる. この $\phi(\omega)$ は中心角周波数 ω_0 について Taylor 展開すると次式のように表せる.

$$\phi(\omega) = \phi_0 + \left. \frac{d\phi(\omega)}{d\omega} \right|_{\omega=\omega_0} (\omega - \omega_0) + \left. \frac{d^2\phi(\omega)}{d\omega^2} \right|_{\omega=\omega_0} \frac{(\omega - \omega_0)^2}{2} + \left. \frac{d^3\phi(\omega)}{d\omega^3} \right|_{\omega=\omega_0} \frac{(\omega - \omega_0)^3}{6} + \dots \quad (2.10)$$

ここで, 位相の角周波数による二階微分 $d^2\phi/d\omega^2$ を二次分散, あるいは群遅延分散 (Group delay dispersion: GDD) と呼び, 三階微分 $d^3\phi/d\omega^3$ を三次分散 (Third order dispersion: TOD) と呼ぶ. さらに高い次数の係数は四次分散, 五次分散のように呼ばれる. 光路中の所要の位置でパルスのピーク強度を最大とし, パルス幅を最小とするためには, そのパルスが光路中の媒質などから与えられた分散の合計と同じ大きさで, 逆符号の分散を, 何ら

かの光学系により与える必要がある。このように、媒質中を伝搬する間に与えられる分散を逆符号の分散で相殺することを分散補償と呼ぶ。

2.3.4 分散補償

パルスのピーク強度（パルス幅）に対する影響が大きいのは低次の分散であるため、分散補償の対象となるのは、多くの場合は二次分散や三次分散といった低次の分散であり、特に二次の分散を重要視することが多い。レンズ等の透過光学素子の媒質は、可視光領域や、近赤外光領域においては正常分散媒質であり、二次分散と三次分散は必ず正となる。そのため、分散補償を行う光学系は、少なくとも二次分散は負となるように設計される。具体的には、回折格子対を用いたもの、プリズム対を用いたもの、特殊な多層膜ミラーを用いたものがよく使用される。回折格子対とプリズム対では、幾何学的に波長ごとの光路長を変え、負の二次分散を与える。三次分散は、回折格子対では正となり、プリズム対では負となる。補償可能な二次分散は回折格子対よりプリズム対の方が小さいものの、プリズム対では、負の三次分散を与えることができる特徴を持つ。3つ目は、チャープミラーと呼ばれる特殊な多層膜ミラーを用いる方法であり、多層膜を用いて、波長ごとに異なる深さから反射するようにすることで、原理的には任意の分散を与えることができるものである。その代わりに、1回反射あたりの補償量は極めて小さい、または使用可能な波長帯域幅が狭い。以上に挙げた手法は、いずれも低次の分散を補償するために使われる光学系であるが、高次の分散も、十分に大きな値であれば、パルスのピーク強度低減を引き起こす。そのため、高次の分散補償も必要となる場合がある。そのような時によく使われる装置が、4-f パルス整形器である。パルスのスペクトル位相、すなわち周波数成分ごとの位相に対して、任意の変調を与えることができるため、高次の分散まで補償することが可能である。しかし、二次分散や三次分散といった低次の分散を補償するのはそれほど得意としていない欠点もある。本研究においては、低次の分散を回折格子対によって、そして高次の分散を 4-f パルス整形器によって補償した。

2.3.4.a 回折格子対による分散補償

回折格子対は、非常に大きな負の二次分散を与えることのできる分散補償光学系である。その模式図を、Fig.2.3 に示した。対となった回折格子は互いに平行となるように設置されている。最初の回折格子により角度分散を与えられた入射光は、色ごとに異なる光路を通過して、2つ目の回折格子により全ての波長成分が平行となる。ルーフミラーにより高さを変えて折り返し、今度は高さを変えて同様な光路を逆に辿り、最初の回折

格子によって再び全ての波長成分の揃った光パルスとして出射される。この時、出力パルスには巨大な負の二次分散が与えられる事となる。与えることのできる二次分散が極めて大きい為、様々なパルスレーザーの分散補償に利用されている。ただし、この光学系が与える三次分散は媒質の三次分散と同じ正であるため、三次分散の影響は大きくなる。三次分散の影響によって、パルスのピーク強度が著しく低下する場合は、別の素子を利用して、負の三次分散を与えておく必要がある。

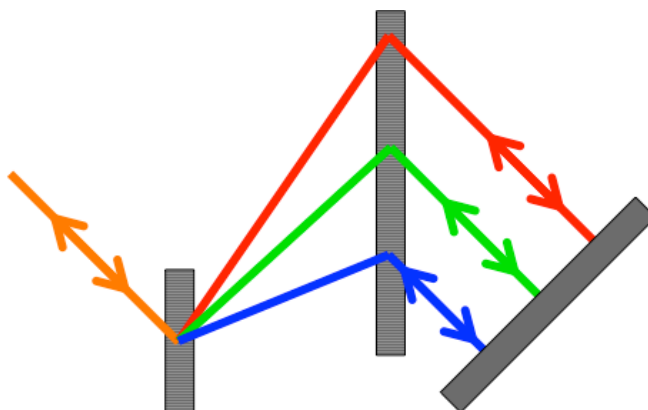


Fig.2.3 回折格子対

2.3.4.b 4-f パルス整形器による分散補償

4-f パルス整形器とは、4-f 光学系と位相変調器から成るパルス整形器である。その概略を Fig.2.4 に示す。4-f 結像光学系の物体面および像面にあたる位置に回折格子を置くと、フーリエ面に当たる位置においては、回折格子により分散させた軸方向の空間位相が、入射光のスペクトル位相と等価となる。つまり、この位置において空間位相を変調すれば、スペクトル位相の変調を行うことができる。一般に 4-f パルス整形器においては、このフーリエ面に液晶の空間光変調器 (Liquid crystal - spatial light modulator: LC-SLM) を設置して、任意の位相変調を行う。液晶素子 1 画素に、1 つの縦モード (1 波長) が入射し、 2π rad 分の位相変調を任意に与えることができれば、原理的にはどのような分散をも補償することが可能である。しかし、スペクトル分解能を縦モードの周波数間隔より小さくすることは困難であるため、補償可能な分散が制限される。よって、低次の分散は回折格子対やプリズム対などによって補償しておくことが望ましい。

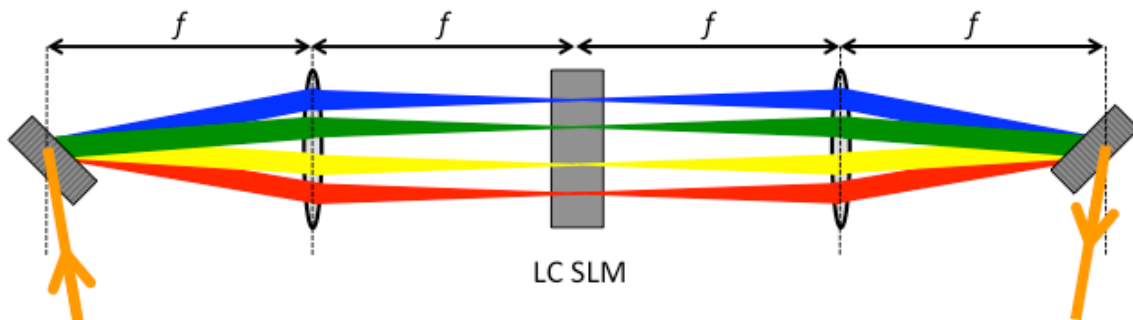


Fig.2.4 4-f パルス整形器

2.3.5 チャープパルス増幅

ピーク強度の高いレーザーパルスを作り出すためには、レーザー発振器より出力されたパルスを、外部で増幅する必要がある。しかし、増幅器内において、ピーク強度が極端に大きくなれば、利得媒質内における自己位相変調などの非線形光学現象によって、位相が非線形に変調され、増幅後のパルスの扱いが難しくなる。また、媒質に光損傷を与える場合もある。そのような問題を解決するために作り出された手法が、チャープパルス増幅である。

チャープパルス増幅の概念図を Fig.2.5 に示した。この手法の鍵となるのは、あらかじめパルスに大きな分散を与えて、周波数チャープさせておくということである。すなわち、パルス幅を十分に引き伸ばした後に増幅を行えば、ピーク強度を抑えたまま、パルスエネルギーを目標となる大きさになるまで増幅できるということである。増幅されたパルスは、利得媒質から出力された後、最後に分散補償によって、元のパルス幅に戻す。本研究においては、光ファイバーを用いて作られたストレッチャーを用いて分散を与え、回折格子対を用いてその分散を補償した。

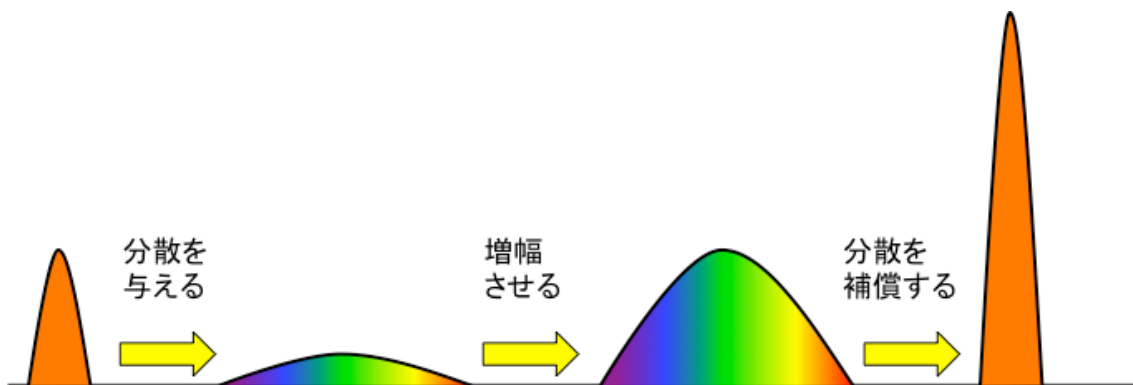


Fig.2.5 チャープパルス増幅の概念図

2.4 蛍光顕微鏡

2.4.1 蛍光顕微鏡

17世紀に光学顕微鏡が発明されて以来、人類は様々な方法を使って、目に見えないほど小さな世界を見えるようにしようと努力してきた。しかし、可視光領域の光を用いた観察においては、その分解能は回折限界に制限されていた。より細かい構造を調べることのできる技術としては、電子顕微鏡と呼ばれるものがある。真空中に置いた試料の表面について、非常に細かい構造を調べることのできる顕微鏡であるが、試料を真空中に置かねばならず、また観察する領域が表面となるように試料の必要な部分をスライスする必要があった。つまり、生体組織などの生きたままでの観察は不可能であった。生きたままの生体試料を超解像で可視化できるようになったのは、蛍光イメージングの手法が開発されてからである。蛍光イメージングでは、試料に対し、あらかじめマーカーとなる蛍光分子を特定の機能に関わるタンパク質などの生体分子に紐付けしておき、特定の波長の光をあてることによって発生した蛍光を光学顕微鏡により観察する。生体内で合成可能な蛍光分子である蛍光タンパク質[16]を蛍光マーカーとして使えるようになったこともあり、蛍光イメージング、つまり蛍光顕微鏡を用いた生体観察は急速に発展してきた。当初は、可視光から紫外線に至る短波長領域の光を出すことのできる水銀ランプなどを励起光源とした、いわゆる広視野照明の顕微鏡であったが、レーザー技術の発展に伴い、レーザー走査型の顕微鏡が作られるようになってきた。ここでレーザー走査型顕微鏡とは、励起光を集光した集光点を、試料の面内方向に動かし、各位置から発生した蛍光の強度をプロットして蛍光マーカーの分布の画像を得る顕微鏡である。中でも、焦点に共役な位置にピンホールを置いて焦点以外から発生した蛍光、すなわち背景蛍光を遮断する共焦点顕微鏡[1]は、空間分解能が200 nm程度と高い上に、光軸方向、すなわち深さ方向にも分解能を持つため、現在も非常によく用いられている。しかし、共焦点顕微鏡は、深さが100 μm を超えるような領域の観察には不向きであった。それは、励起光の波長が短いために試料からの散乱の影響を受けやすく、十分な蛍光を得ることのできる深さに限りがあったためである。この問題を打破したのが、二光子励起蛍光顕微鏡[2-4]である。二光子励起蛍光顕微鏡は、非線形光学効果である二光子吸収を用いて蛍光分子を励起状態へと遷移させて蛍光を発生させる。蛍光強度が励起光強度の二乗に比例するため、蛍光の発生する領域を集光点の近傍に限定することができる。すなわち、背景蛍光の発生自体を劇的に抑えることが可能となる。そして励起波長は共焦点顕微鏡で用いられていた波長の約2倍となる近赤外光であり、より生体内を透過しやすい特徴がある[17]。この顕微鏡の開発により、1 mmを超える深部観察が可能となった。

また、励起されている領域が集光点のみであるため、発生した蛍光が試料中で散乱されても、広い受光面積の検出器で空間積分すれば、全て信号とすることができる利点もあった。しかし、この顕微鏡にも問題があった。それは、蛍光の発生する領域が集光点の大きさに依存してしまうために、空間分解能が $1\ \mu\text{m}$ を切る程度となってしまうことであつた。励起光の波長がおよそ $1\ \mu\text{m}$ であるため、どのように高い光学的開口数 NA を持つ対物レンズを用いても、回折限界により焦点の大きさは $1\ \mu\text{m}$ 程度となってしまうのである。

一方で、回折限界を超える分解能を持つ、超解像顕微鏡も開発された[5-13]。それまで、光学的に分解できない大きさの構造を調べるには、電子顕微鏡のような、試料を真空中に置く顕微鏡を使わねばならなかつた。すなわち、生きた生体試料の観察はできなかつた。STED (Stimulated emission depletion) 顕微鏡[6]をはじめとする超解像顕微鏡の登場により、生きた生体試料の観察において、 $100\ \text{nm}$ を切るような大きさの構造を識別できるようになった。しかし、超解像顕微鏡は、観察可能な深さについてはデメリットが大きい。分解能を向上させた結果、信号に寄与する分子数がその体積減少分だけ低下し、信号が微弱となってしまったためである。このような微弱な信号は、容易に背景光に埋もれてしまうため、超解像顕微鏡の使うことのできる領域は、試料表面近傍に限られていた。このように、空間分解能と観察可能な深さの間にはトレードオフの関係があつた。本研究においては、この関係を打破するために、広視野の超解像顕微鏡である構造化照明顕微鏡[11-13]と、広視野の多光子励起蛍光顕微鏡である時空間集光顕微鏡[18,19]とを組み合わせた、干渉時空間集光顕微鏡を開発した。この節においては、まず超解像技術である構造化照明顕微鏡の基本的な原理について説明し、その後、広視野の多光子励起蛍光顕微鏡である時空間集光顕微鏡について説明する。

2.4.2 超解像顕微鏡

回折限界を超えるような分解能を持つ顕微鏡のことを、超解像顕微鏡と呼ぶ。STED 顕微鏡[6]や、PALM (Photo-activated localization microscopy) [7-9]、構造化照明顕微鏡[11-13]など、様々な超解像顕微鏡が開発され、今日の生体研究においても広く使われるようになってきた。使用している光の波長からは本来達成できないような分解能を発揮するために、超解像顕微鏡はいずれも、情報の取得方法や処理方法に工夫が凝らされている。例えば、STED 顕微鏡では、誘導放出の原理を利用し、誘導放出を引き起こす光を励起光の焦点の周りにドーナツ型の強度分布で照射することにより、蛍光を発する領域を最小で数 nm まで制限することに成功している。PALM や STORM (Stochastic optical reconstruction microscopy) [10]の場合、蛍光分子が 1 分子ずつ光るようにすることによ

って、取得画像に映った輝点からその蛍光分子の位置を精度よく計算し、回折限界より高い分解能を達成する。構造化照明顕微鏡は、励起光強度の焦点面における空間分布を構造化し、撮影した蛍光画像の中から構造に依存した応答成分を抽出することで、回折限界よりも細かい試料の構造を調べる。本研究においては、構造化照明を用いた。

2.4.2.a 構造化照明顕微鏡

構造化照明の原理を理解するために、まず、観察しようとしている試料の構造が、様々な空間周波数を持つ空間構造、すなわち回折格子の重ね合わせであると考え (Fig.2.3)。そのため、試料からの出力光は、その空間周波数と波長に応じた回折角を持って出力されるものと考えられる。この試料を、レンズを用いて結像しようとする時、回折角の極端に大きな成分はレンズを外れてしまい、結像されなくなってしまう。これが回折限界である。結像された像は、高い空間周波数成分が存在しないために、本来の構造よりもぼけたものとなる。この様子を空間領域で表現したものが点像分布関数 (Point spread function: PSF) である。PSF をフーリエ変換すると、空間周波数軸上での表現を導くことができる。それが、レンズによって結像される空間周波数応答、すなわち光学伝達関数 (Optical transfer function: OTF) である (Fig.2.7)。この OTF の遮断周波数よりも高周波成分は、像を結ぶことができない。構造化照明においては、このような成分を検出するために、励起光に空間構造を与えて照射する。その様子を Fig.2.8 に示した。まず、試料が様々な空間周波数の構造の重ね合わせであることを踏まえると、試料の構造 $S(r)$ は次式のように表される。

$$S(r) = \sum a_s \cos(k_s r). \quad (2.11)$$

ここで、 a_s は各項の周波数成分の大きさを表し、 k_s はその項の空間周波数を表す。このうち、OTF のすぐ外側にあるような、空間周波数 k_s の成分のみを抜き出すと、Fig.2.8(a) に示したように、単純なコサイン関数で表すことができる。

$$S(r) = a_s \cos(k_s r). \quad (2.12)$$

ここに、空間周波数 k_0 で空間変調された励起光が照射された場合、図中にも示したように、発生する蛍光の分布 $S_f(r)$ は試料と励起光の構造を掛け合わせたものである。コサイン型の関数同士の掛け算であるため、これは次のように書き換えることができる。

$$\begin{aligned} S_f(r) &= a_s \cos(k_s r) \cos(k_0 r) \\ &\propto \cos[(k_s + k_0)r] + \cos[(k_s - k_0)r]. \end{aligned} \quad (2.13)$$

この第二項を見れば、空間周波数 k_s が空間周波数 $k_s - k_0$ に周波数下方変換されることになる。下方変換された周波数が OTF の遮断周波数より低ければ、これまで見ることはできなかった高周波成分の情報を含んだ像を観察することができる (Fig.2.8(b))。構

造化照明によって撮影した後，下方変換された高周波の情報をデータ処理によって，元の空間周波数 k_s に戻すと回折限界を超えた分解能を達成することができる．ここで，空間周波数 k_0 で変調された励起光を用いて試料を励起した時，検出される蛍光像 $D(r)$ は次のように表すことができる．

$$D(r) = \{S(r)I_0[1 + \cos(k_0r + \phi)]\} \otimes h(r). \quad (2.14)$$

ここで， $S(r)$ は試料の構造であり， I_0 は励起光の平均強度， ϕ は励起光に与えた縞構造の位相であり， $h(r)$ は点像分布関数を表す．なお， \otimes は畳み込み積分を表す記号である．

この式に対し，データ処理後の再構築された画像は次のような式で表される．

$$R(r) = I_0S(r) \otimes \{h(r)[a_0 + a_1 \cos(k_0r)]\}. \quad (2.15)$$

ここで， a_1 は励起光の構造に依存して変化した成分であり， a_0 は変化しなかった成分である．ここで， a_0 を無視し， a_1 のみを用いて画像を再構築すると，背景光を除去することができる．その理由について次に述べる．

広視野の顕微鏡を使っている場合，焦点面外において発生した蛍光，及び，試料中において散乱された蛍光の2種類が背景光となって現れる．造化照明を行った場合，焦点面外では励起光の縞構造はない．また，焦点面で発生した蛍光が試料内部で散乱されると，像がぼけて縞構造が失われる．そのため，背景光は，縞構造の情報を持っていない．よって，背景光は，ホモダイン検出を用いると，構造の変化に依存せずに存在していた DC 成分，つまり(2.15)式の a_0 に全て入ることとなる．したがって， a_0 を0にすると，背景光をデータ処理によって除去することが可能であると言える．ただし，背景光が強くなりすぎると，検出器のダイナミックレンジを狭めてしまうため， a_1 に残るべき試料の情報がなくなってしまう．

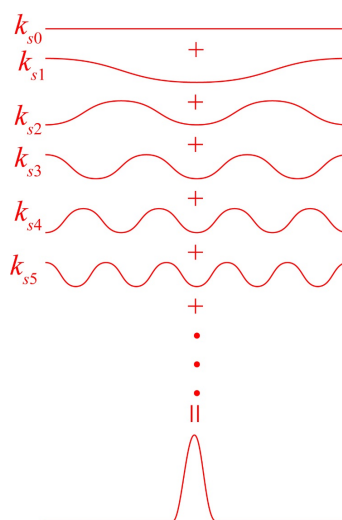


Fig.2.6 試料の構造

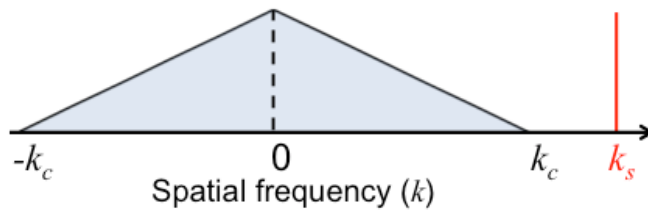


Fig.2.7 光学伝達関数

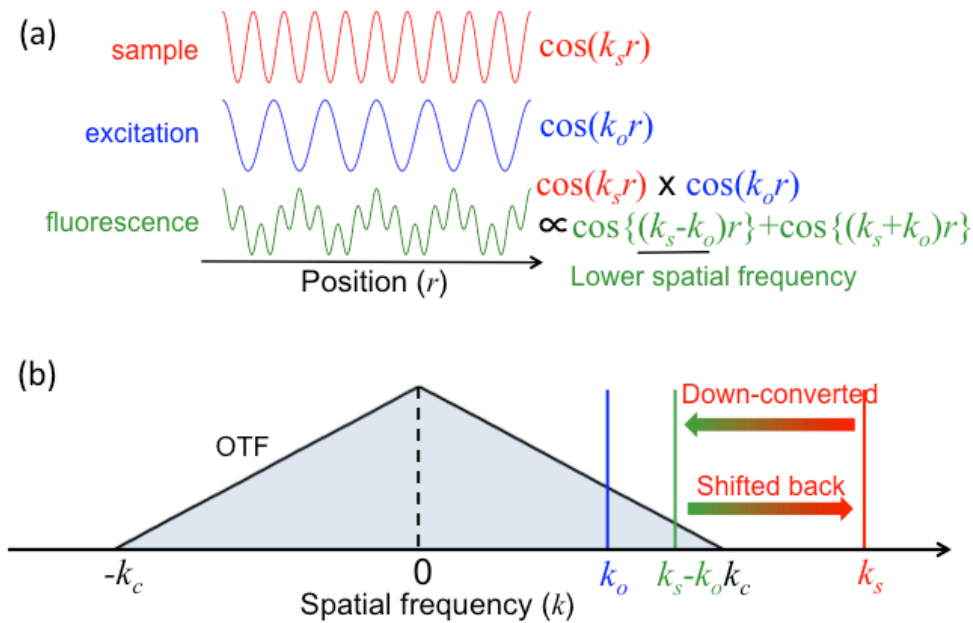


Fig.2.8 構造化照明の原理

2.4.3 多光子励起蛍光顕微鏡

レーザーの開発とともに、様々な非線形現象が引き起こせるようになってきた。レーザー光は時空間コヒーレンスが高いため、レンズなどによってその波長の回折限界まで比較的容易に集光することが可能であり、高強度の光電場を生み出すことができる。つまり、高い光電場強度を必要とする非線形光学効果を引き起こすには好都合であったと言える。様々な非線形光学現象が報告され、生体イメージング技術に応用されたものもある。その中でも現在最もよく使われている技術が、二光子励起蛍光を用いた二光子励起蛍光顕微鏡[2-4]であろう。

2.2.3 節で述べたような多光子吸収を起こして励起された分子から発せられる蛍光に対しては、吸収した光子の数が2つならば二光子励起蛍光、3つならば三光子励起蛍光などと呼ぶ。つまり二光子励起蛍光顕微鏡とは、二光子吸収（励起）によって励起状態へと遷移した分子が発する蛍光を用いた顕微鏡である。

蛍光分子が n 光子励起された時に発生する蛍光の強度 I_n は、励起光強度 I に対して以

下のような依存性を持つ。

$$I_{fl} \propto \sigma_n \int I^n(t) dt. \quad (2.16)$$

ここで、 σ_n は n 光子吸収断面積である。 $N \geq 2$ ，すなわち二光子以上の吸収断面積の値は極めて小さい[14]ため，連続波レーザーを用いた場合は極めて高い平均強度が必要となる。一方で，パルスレーザーを光源に用いた場合は，蛍光強度が非線形な応答を示すことから平均強度を抑えたまま蛍光強度を高めることができる。平均強度 I_{ave} ，パルス幅 τ ，繰り返し周波数 f_{rep} のパルスレーザーを光源とした場合，この式は以下のように書き換えることができる。

$$\begin{aligned} I_{fl} &\propto \sigma_n \left(\frac{I_{ave}}{\tau f_{rep}} \right) \tau f_{rep} \\ &= \frac{\sigma_n I_{ave}^n}{(\tau f_{rep})^{n-1}}. \end{aligned} \quad (2.17)$$

平均強度を一定とした時，パルス幅を短くする，あるいは，繰り返し周波数を下げることによって，得られる蛍光信号の大きさは増加することとなる。また， n 光子励起蛍光の強度は，励起光強度の n 乗に比例するため，励起光を試料中に集光した場合，発生する蛍光の強度は集光点から離れるほど急速に下がる。つまり，適切な励起光強度を選ぶことによって，焦点近傍の蛍光だけを取得することが可能となる。Fig.2.9 に蛍光溶液を一光子励起あるいは二光子励起した時の蛍光分布の写真を示した[4]。一光子励起蛍光は，励起光の通過した全ての領域から発生しているのに対し，二光子励起蛍光の発生する領域は焦点近傍に局所化していることがわかる。すなわち，焦点以外から発生する背景蛍光が，二光子励起蛍光を用いることによって劇的に抑制されていると言える。これが，二光子励起蛍光顕微鏡が生体深部観察に有利である理由の1つである。加えて，可視光領域において蛍光を発する分子を励起するためには近赤外領域の波長を持つ励起光が必要であるが，この波長帯は生体内を透過しやすいため，深部まで到達しやすい。これもまた，二光子励起蛍光顕微鏡が生体深部観察において有利な点である。この集光点を面内方向に走査することによって，試料の断層像が取得可能である。また，蛍光の発生する場所が焦点近傍のみであるため，共焦点顕微鏡のようにピンホールを用いる必要がないことも特徴である。光源さえあれば比較的簡単に導入できる二光子励起蛍光顕微鏡は，生体試料の深部観察を行なう研究において欠かせない技術となった。しかし，一般に二光子励起蛍光顕微鏡はレーザー走査型の顕微鏡であるために，さらなる応用には問題もあった。それは，観察の時間分解能を保ったまま視野を拡大することが困難であるということである。

脳のように，複数の細胞が複雑なネットワークを形成している組織を観察するには，

観察可能な深さが十分であるだけでなく、観察視野の広さと高い時間分解能が必要となる。走査型の蛍光顕微鏡の場合、画像構築に必要な蛍光強度を確保できなければ観察ができない。しかし、走査速度を増加させれば、試料上の各点に励起光が照射される時間は短くなり、そのぶん蛍光は少なくなる。焦点において発生する蛍光の強度を上げるために、励起光の平均強度を上げると、熱などによる生体試料への損傷が発生するため、これも望ましくない。加えて、二光子励起蛍光を観察している際に発生する光褪色[20]は、蛍光分子の三重項励起状態からの励起状態吸収であることが示唆されており[21,22]、少なくとも数マイクロ秒程度のパルス間隔を持つ、つまり繰り返し周波数が1 MHzを下回るようなパルスレーザーを使用することが望ましいが、走査型の顕微鏡では焦点が高速で動くため、繰り返し周波数を下げることができない。以上の理由から、走査型の二光子励起蛍光顕微鏡を用いて、時間分解能を保ちつつ広い視野における観察をするのは困難である。一方で、走査を必要としない二光子励起蛍光顕微鏡も開発されている。本研究においては、そのような顕微鏡の1つである、時空間集光顕微鏡を用いて研究を行なった。

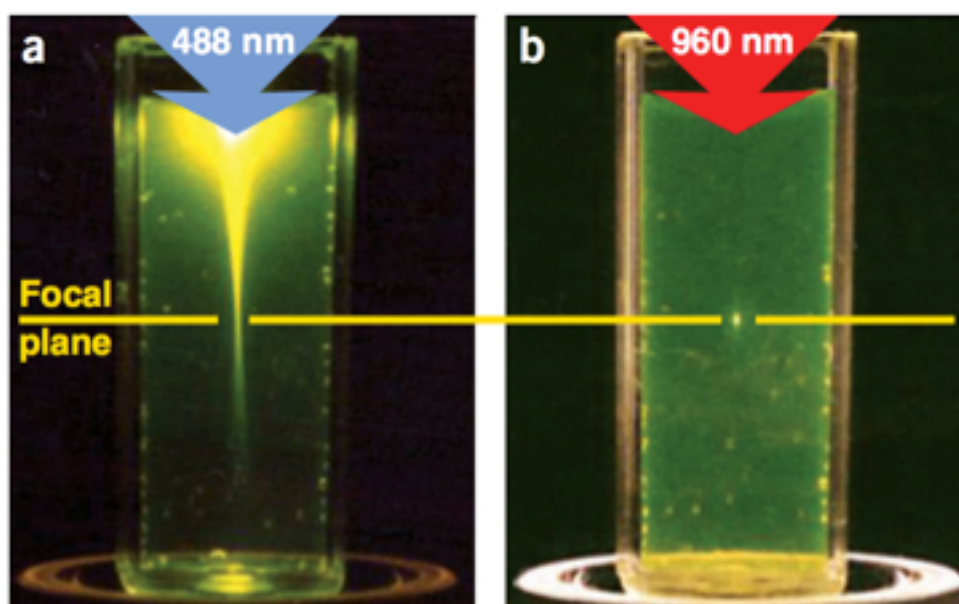


Fig.2.9 一光子励起蛍光と二光子励起蛍光[4]

2.4.3.a 時空間集光顕微鏡

時空間集光顕微鏡は、広視野照明を行いながらも深さ方向の分解能を持つ二光子励起蛍光顕微鏡である[18,19]。走査を必要としないため、視野を広げても時間分解能を下げずに観察ができる特徴があり、実際に、ビデオレートにおいて極めて広い領域（5000-

20000 μm^2) を観察した例もある[23,24]. 時空間集光顕微鏡の模式図を, Fig.2.10(a)に示した. 時空間集光顕微鏡は, 非対称な 4-f の結像光学系であり, 回折格子の表面が試料中に結像されるような構成となっている. 励起光には百フェムト秒以下のパルス幅を持つパルスレーザーを用いることが望ましい. 回折格子によって波長ごとに分散された励起光は, イメージングレンズ, 対物レンズを通して試料中にある像面に結像され, 分散された光はその面においてのみすべての波長が空間的に重なる. Fig.2.10(b)に示すように, 照射される光は, 波長ごとには平行光であるが, 対物レンズの焦点面以外においては, 波長が重なっておらず, 実効的なバンド幅は非常に狭い. すなわち, パルス幅は元のパルス幅より極めて長くなっている. 元のフェムト秒パルスに戻るのは焦点面のみであるため, 二光子励起蛍光を発生させるために十分な強度となる領域は焦点面のみとなる. つまり, 蛍光は対物レンズの焦点面のみから発生し, 焦点面外から発生する蛍光, すなわち背景蛍光の発生を抑えることができる. 蛍光は同じ対物レンズを通過して, ダイクロイックミラーにより反射した励起光と分けられる. 焦点面において発生した蛍光は, イメージングレンズを通してカメラのような二次元素子の表面に結像され, 試料の断層像として取得される. 1つの断層像を取る際に走査を必要としないことが特徴である. 広視野照明のため, 走査型の顕微鏡とは異なり, 平均強度を抑えたまま視野を広げることができるという特徴もある. 励起光の照射される領域, すなわち観察可能な視野は, イメージングレンズと対物レンズの焦点距離の比と元の励起光のビーム径によって決まる. 単純に視野を広げれば, 対物レンズの焦点面上の各点における励起光強度が下がってしまい, 二光子励起蛍光の強度は低減してしまう. (2.17)式より, n 光子励起蛍光の強度は, パルス幅を短くする, あるいはレーザーの繰り返し周波数を下げることによって, 励起光が同じ平均強度であっても増大することがわかる. ここで, パルス幅を短くすると, スペクトル幅が広くなることから分散の影響を受けやすくなり, 顕微鏡の運用は難しくなる. 時空間集光顕微鏡の場合, 蛍光は, 一度のパルス入射により視野全体から発生するため, 原理的にはシングルショットでの撮影を可能とする顕微鏡である. つまり, 繰り返し周波数を下げても運用には支障がない. したがって, 時空間集光顕微鏡を用いれば, 視野を広げても, 時間分解能を落とさずに観察をすることが可能であると言える. しかし, 時空間集光顕微鏡には主に2つのデメリットがある. 1つ目は, 蛍光像をカメラによって結像して取得しているために, 発生した蛍光が試料中で散乱されると正しく結像されずに背景光となってしまうということ, 2つ目は, 深さ方向の分解能が走査型の顕微鏡よりも悪く, 背景蛍光が発生しやすいということである.

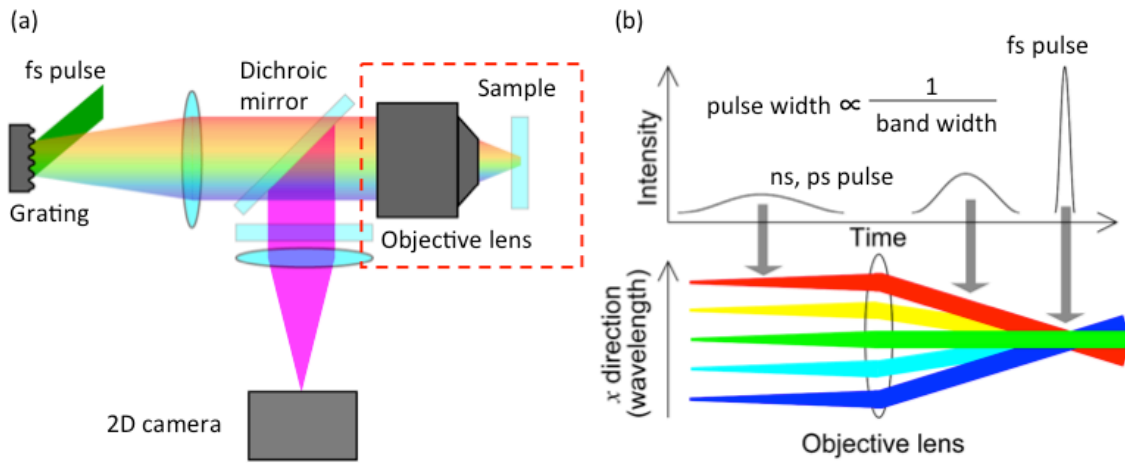


Fig.2.10 (a)時空間集光顕微鏡の模式図, (b)時空間集光法の概念図

参考文献

- [1] T. Wilson and C. Sheppard, *Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy* (Academic Press, New York, 1984).
- [2] W. Denk, J. H. Strickler and W. W. Webb, "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy," *Science* **248**, 73-76 (1990).
- [3] E. E. Hoover and J. A. Squier, "Advances in multiphoton microscopy technology," *Nat. Photon.* **7**, 93–101 (2013).
- [4] W. R. Zipfel, R. M. Williams and W. W. Webb, "Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences," *Nature Biotech.* **21**, 1369-1377 (2003).
- [5] S. Hell, "Far-field optical nanoscopy," *Science* **316**, 1153-1158 (2007).
- [6] S. Hell and J. Wichmann, "Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy," *Opt. Lett.* **19**, 780-782 (1994).
- [7] E. Betzig, "Proposed method for molecular optical imaging," *Opt. Lett.* **20**, 237-239 (1995).
- [8] 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 (2006).
- [9] S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, and M. D. Mason, "Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy," *Biophys. J.* **91**, 4258 (2006).
- [10] M. J. Rust, M. Bates, and X. Zhauang, "Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)," *Nat. Methods* **3**, 793 (2006).
- [11] M. G. L. Gustafsson, "Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy," *J. Microsc.* **198**(2), 82–87 (2000).

- [12] J. T. Frohn, H. F. Knapp, and A. Stemmer, "True optical resolution beyond the Rayleigh limit achieved by standing wave illumination," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**(13), 7232–7236 (2000).
- [13] R. Heintzmann, T. M. Jovin, and C. Cremer, "Saturated patterned excitation microscopy--a concept for optical resolution improvement," *J. Opt. Soc. Am. A* **19**(8), 1599–1609 (2002).
- [14] L.-C. Cheng, N. G. Horton, K. Wang, S.-J. Chen, and C. Xu, "Measurements of multiphoton action cross sections for multiphoton microscopy," *Biomed. Opt. Express* **5**, 3427-3433 (2014).
- [15] X. Zhou, D. Yoshitomi, Y. Kobayashi, and K. Torizuka, "Generation of 28-fs pulses from a mode-locked ytterbium fiber oscillator," *Opt. Express* **16**, 7055-7059 (2008).
- [16] M. Matz, A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zraisky, M. L. Markelov, and S. A. Lukyanov, "Fluorescent proteins from nonbioluminescent anthozoa species," *Nature Biotech.* **17**, 969-973 (1999).
- [17] J. -P. Ritz, A. Roggan, C. Isbert, G. Müller, H. J. Buhr, C. -T. Germer, "Optical properties of native and coagulated porcine liver tissue between 400 and 2400 nm," *Lasers Surg. Med.* **29**, 205-212 (2001).
- [18] D. Oron, E. Tal, and Y. Silberberg, "Scanningless depth-resolved microscopy," *Opt. Express* **13**, 1468–1476 (2005).
- [19] G. Zhu, J. van Howe, M. Durst, W. Zipfel, and C. Xu, "Simultaneous spatial and temporal focusing of femtosecond pulses," *Opt. Express* **13**, 2153–2159 (2005).
- [20] L. Song, E. J. Hennink, T. Young, and H. J. Tanke, "Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy," *Biophys. J.* **68**, 2588-2600 (1995).
- [21] G. Donnert, C. Eggeling and S. W. Hell, "Major signal increase in fluorescence microscopy through dark-state relaxation," *Nat. Methods* **4**, 81-86 (2007).
- [22] J. Widengren, U. Mets, and R. Rigler, "Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: a theoretical and experimental study," *J. Phys. Chem.* **99**, 13368-13379

(1995).

- [23] D. Therrien, B. Aubé, S. Pagès, P. De Koninck, and D. Côté, “Wide-field multiphoton imaging of cellular dynamics in thick tissue by temporal focusing and patterned illumination,” *Biomed. Opt. Express* **2**, 696–704 (2011).
- [24] L. -C. Cheng, C. -Y. Chang, C. -Y. Lin, K. -C. Cho, W. -C. Yen, N. -S. Chang, C. Xu, C. Y. Dong, and S. -J. Chen, “Spatiotemporal focusing-based widefield multiphoton microscopy for fast optical sectioning,” *Opt. Express* **20**, 8939–8948 (2012).

第3章 Yb ファイバーチャープパルスレーザーの作製

3.1 はじめに

多光子励起蛍光を観測するためには、まず、蛍光分子に対して多光子吸収（多光子励起）を引き起こさなければならない。しかし、多光子吸収は極めて起こりにくい現象であり、その吸収断面積の大きさは、二光子吸収の場合は典型的には $10^{-49} \text{ cm}^4/\text{s/photon}$ と低く、三光子吸収の場合に至っては $10^{-83} \text{ cm}^4(\text{s/photon})^2$ と、極端に小さい[1]。まして、広視野照明を行なう時空間集光顕微鏡を用いて、三光子励起蛍光を発生させるためには、ピーク強度の極めて高い励起光が必要である。加えて、時空間集光を用いるためにパルス幅は 100 fs 程度まで短くなるようにしなければならない。一般に、このような高ピーク強度の超短パルスレーザーとしては、チタンサファイアレーザーが用いられることが多かった。しかし、チタンサファイアレーザーの中心波長はおよそ 800 nm であり、三光子励起を引き起こす場合はこれが波長およそ 270 nm の励起光による一光子励起に相当する。この波長域は、デオキシリボ核酸に吸収されやすく、殺菌用の波長域として注目されているほど、生体への毒性が強い。よって、チタンサファイアレーザーを光源に採用することは好ましくない。一方で、Yb ファイバーを利得媒質とした Yb ファイバーレーザー[2]は、利得の最大となる波長が 1030 nm 付近であり、三光子励起に用いてもデオキシリボ核酸に吸収されやすい波長を回避できる。利得が最大となる波長域において増幅すると、スペクトルが狭まり、パルス幅が伸びてしまう問題はあるが、これはレーザーの中心波長を利得帯域幅が広い 1060 nm に設定し、短波長側、すなわち 1030 nm 付近をロングパスフィルターによって抑制するようにすれば、避けることができる。本研究においては、中心波長 1060 nm、パルス幅 92 fs、パルスエネルギー 9.0 μJ 、繰り返し周波数 200 kHz の出力を持つ Yb ファイバーチャープパルス増幅器を開発し、時空間集光顕微鏡および干渉時空間集光顕微鏡の光源に用いた。そのシード光には、モード同期の Yb ファイバー発振器を用いた。本章では、3.2 節と 3.3 節において、開発した Yb ファイバー発振器とチャープパルス増幅器についてそれぞれ説明する。3.4 節では出力光の分散補償とパルス幅の評価について説明し、3.5 節にてまとめを行う。

3.2 Yb ファイバー発振器の作製

シード光となる Yb ファイバー発振器の作製とその性能に関して説明する。Fig.3.1 に、作製した Yb ファイバー発振器の模式図を示す。非線形偏波回転を利用したモード同期 Yb ファイバー発振器であり、励起光には 976 nm で発振するレーザーダイオードを用いた。レーザーダイオードの出力光を波長分割多重コプラ (Wavelength division multiplexer: WDM) により利得媒質である Yb ファイバーに入射させるようにした。Yb ファイバーはアルミ製のリールに巻かれており、温度が大きく変化しないようにした。スリットを図中に示したミラー M1 の直前に設置することにより、1060 nm で連続発振するように分散された光から 1060 nm より短波長をカットした。このスリットにより 1030 nm を中心とした、利得のピークを避けるようにすることができた。共振器の内部で発生する分散は、格子定数 600 本/mm の回折格子対により補償した。回折格子対の入射角と間隔は中心波長 1065 nm でモード同期発振するように調整した。ミラー M1 はあおり方向をやや傾けて設置してあるため、回折格子対を通って戻ってきた光の高さは入射光とは異なっている。それを利用し、D 型のミラー M2 によって戻ってきた光は入射光と分けられる。M2 にて反射した光は、光アイソレータを通過して、Yb ファイバーへと通じるシングルモードファイバーにカップルされる。この光アイソレータを設置することにより、パルスの進行方向を限定するようにした。パルス光は、その強度に依存して偏波が回転する。Yb ファイバーにおいて増幅されたパルスは、1/4 波長板 (Quarter wave plate: QWP) と 1/2 波長板 (Half wave plate: HWP) HWP1 によって偏光を制御し、偏光ビームスプリッター (Polarizing beam splitter: PBS) PBS1 によりピーク強度の高い成分のみ透過させる。透過成分は、続く HWP2 と PBS2 によって、出力パルスと共振器に戻るパルスとに分けられる比率を制御した。

この発振器の作り出したパルス列の様子を、Fig.3.2 に示す。この測定は、高速フォトダイオードの信号をオシロスコープにより観察することで行なった。パルスの間隔は 22.19 ns であり、ここから繰り返し周波数は 45.07 MHz と求められた。発振器内で発生したパルスのスペクトルを Fig.3.3 に示す。スリットにより短波長側が切り落とされているため、1040 nm 以下の波長域には出力がない。1010 nm 付近などに見られるスペクトルの成分は、自然放出光 (Amplified spontaneous emission : ASE) の成分である。この時、出力光の強度は 18 mW であった。

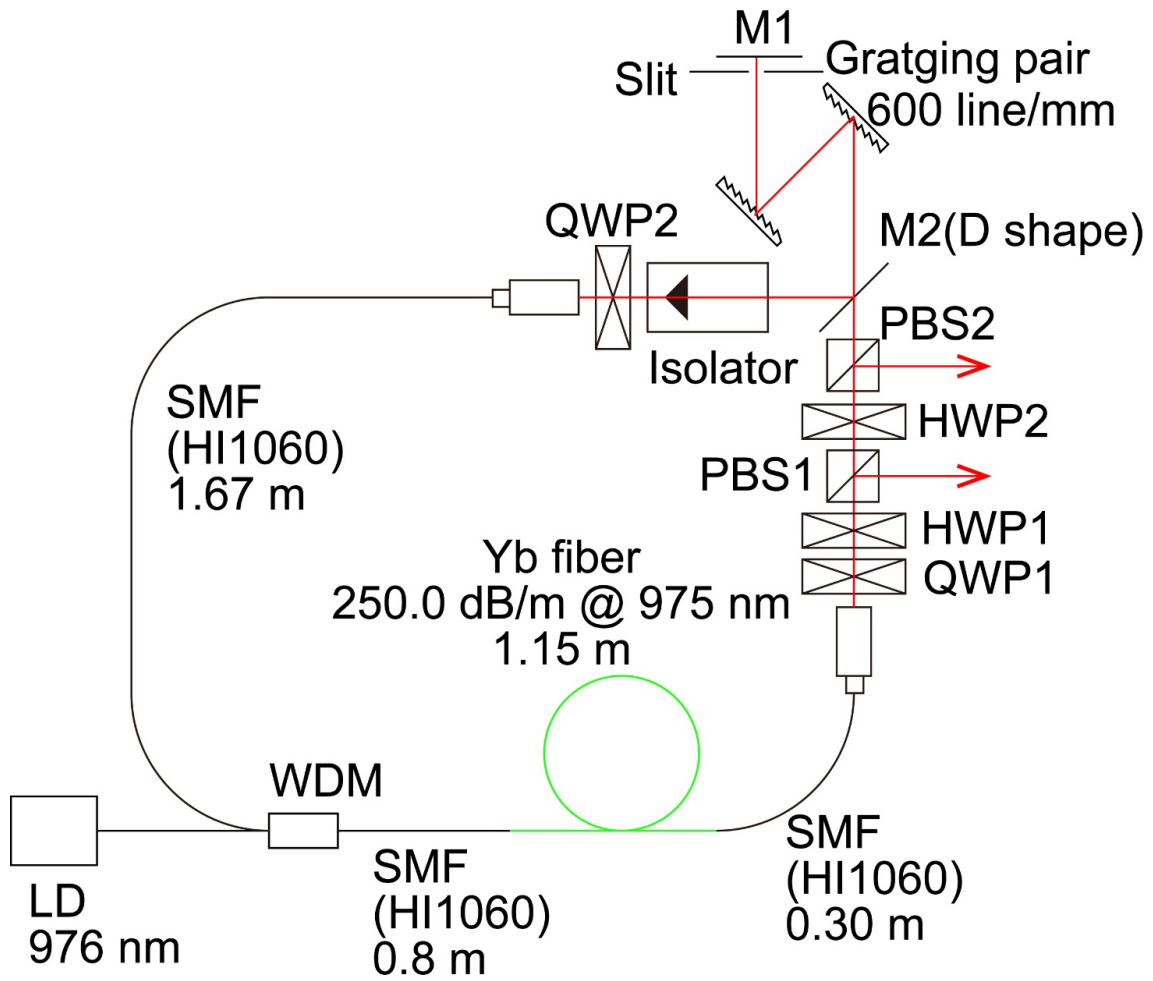


Fig.3.1 Yb ファイバー発振器の模式図. SMF: シングルモードファイバー, QWP: 1/4 波長板, HWP: 1/2 波長板, PBS: 偏光ビームスプリッター, LD: レーザーダイオード, WDM: 波長分割多重コプラ

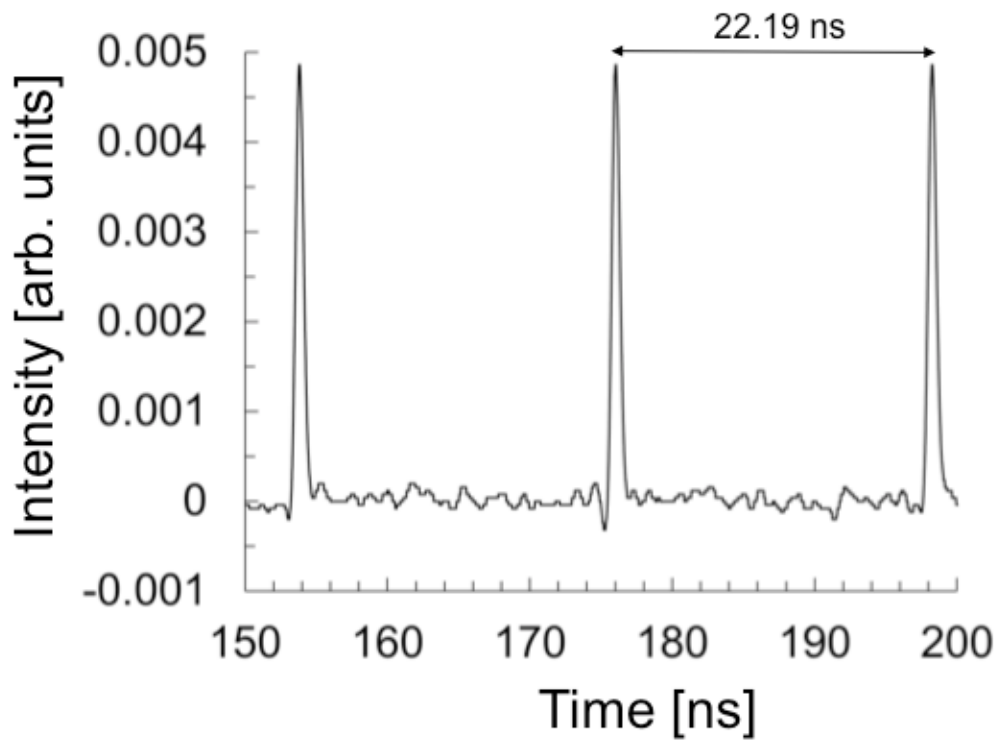


Fig.3.2 出力パルス列

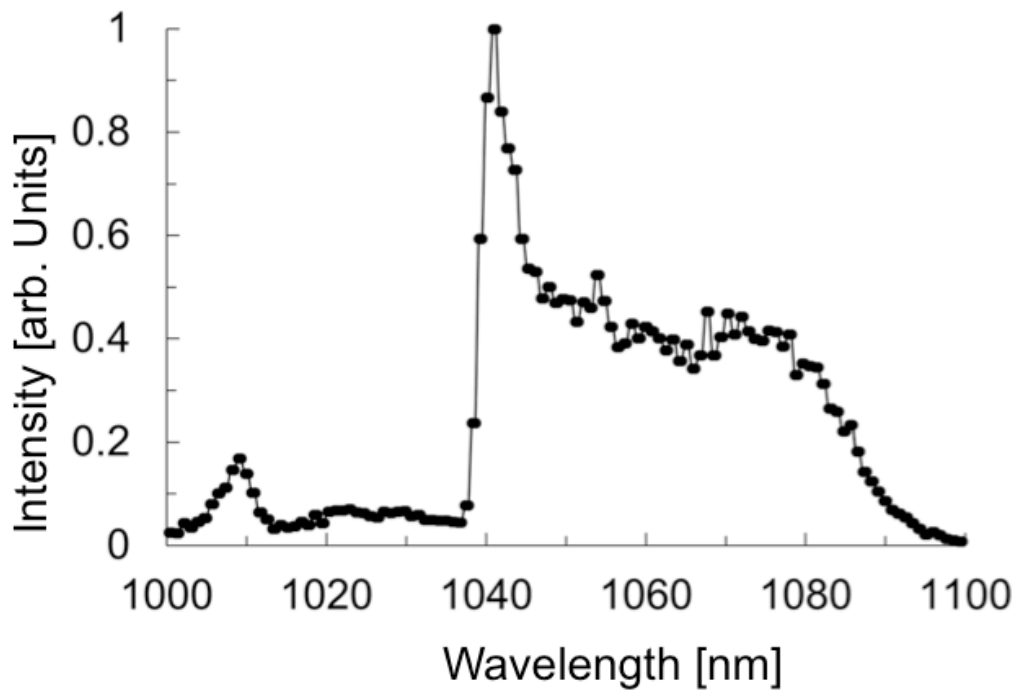


Fig.3.3 出力スペクトル

3.3 チャープパルス増幅器の作製

前節にて紹介した繰り返し周波数 45 MHz, 中心波長 1065 nm のモード同期 Yb ファイバー発振器の出力を, シード光源として, チャープパルス増幅器を作製した. Fig.3.4 に, 作製したチャープパルス増幅器の模式図を示す. シード光として入力したパルスのパルスエネルギーは 0.24 nJ であり, 平均パワーは 11 mW であった. 入力されたパルスは, ファイバーストレッチャーにより 7.5 ps^2 の二次分散 (群速度分散), そして -0.087 ps^3 の三次分散を与えられ, 時間方向に引き伸ばされる. ストレッチャーにより引き伸ばされたパルスは, コア径 $6 \mu\text{m}$, 長さ 75 cm のシングルモード Yb ファイバー増幅器により, パルスエネルギー 4.2 nJ (平均パワー 185 mW) まで増幅される. ポンプ光は波長 976 nm で波長が安定化されたレーザーダイオードであり, WDM によりカップリングさせることによって前方励起によりシード光を増幅させた. その出力の約 1% を取り出し, これを高速フォトダイオードにより検出した. フォトダイオードからの出力をパルス遅延発生器 (Stanford Research Systems 社製, DG645) に入力し, この 45 MHz の信号をダウンカウントして 200 kHz まで落とした. これを増幅器の直後に設置された音響光学変調器 (Acousto-optic modulator : AOM) の変調信号として用い, 出力パルスの繰り返し周波数を 200 kHz になるようにした. AOM を最初の増幅器の後に設置したのは, 増幅器内で発生する ASE を抑制するためである. シード光の平均パワーが少ない場合, 増幅器内の利得が余った状態となることから ASE の強度が増加する. 従って, レーザーの繰り返し周波数を下げる素子は最初の増幅器以降に設置する必要がある. AOM を通過した出力パルスは, コア径 $10 \mu\text{m}$, クラッド径 $125 \mu\text{m}$, 長さ 1.5 m のダブルクラッドファイバーにより, パルスエネルギー 600 nJ (平均パワー 120 mW) まで増幅された. この増幅器の出力パルスは, 一度光ファイバーから取り出してコリメート光とし, フーリエ面に 128 ピクセルの液晶空間光変調器 (Liquid crystal spatial light modulator : LC-SLM) を設置した 4-f パルス整形器を通過して, 再び光ファイバーにカップルされ, 最後の増幅器へと入力される. 4-f パルス整形器を最後の増幅器の手前に設置したのは, 増幅後の最終的なレーザー出力が LC-SLM のダメージ閾値を上回る恐れがあったためである.

最終段の増幅器は, コア径 $40 \mu\text{m}$, クラッド径 $200 \mu\text{m}$, 長さ 1.8 m の Yb 添加ラージモードエリアフォトリック結晶ファイバー (Large-mode-area photonic crystal fiber : LMA-PCF) を用いた増幅器である. ポンプ光には中心波長 976 nm の波長安定化レーザーダイオードの出力を用い, 4-f パルス整形器からの入力光をシードとして後方励起した. 励起する方向を前方, 後方と使い分けたのは, 前方励起の場合, 利得は低い, ASE ノイズが小さく, 後方励起の場合, 利得は高い, ASE ノイズを発生させやすい

という特徴があったためである[3]. ポンプ光のパワーを 10 W に設定した時, 増幅された出力パルスのパルスエネルギーは 13.5 nJ (平均パワー2.7 W) となった. 出力されたパルスは, 格子定数 1600 本/mm の透過型回折格子対により圧縮した. 二次と三次の分散の補償に回折格子対を用い, 高次の分散補償に 4-f パルス整形器を用いた. 時空間集光顕微鏡では, 三次以上の高次の分散は収差となり, 光軸方向の空間分解能が劣化するために, このような方法で分散補償を行なった. 三段ある増幅器の手前には波長特性の緩やかなロングパスフィルター (Long-pass filters : LPFs) を設置した. このフィルターは 1050 nm 付近にカットオン波長を持ち, 透過特性は短波長側に向かって緩やかに低下する. このフィルターによって, Yb ファイバーにおいて利得の最も高い 1030 nm 付近のシード光を抑え, 増幅時に発生する利得の狭帯域化を抑制した (Fig.3.5).

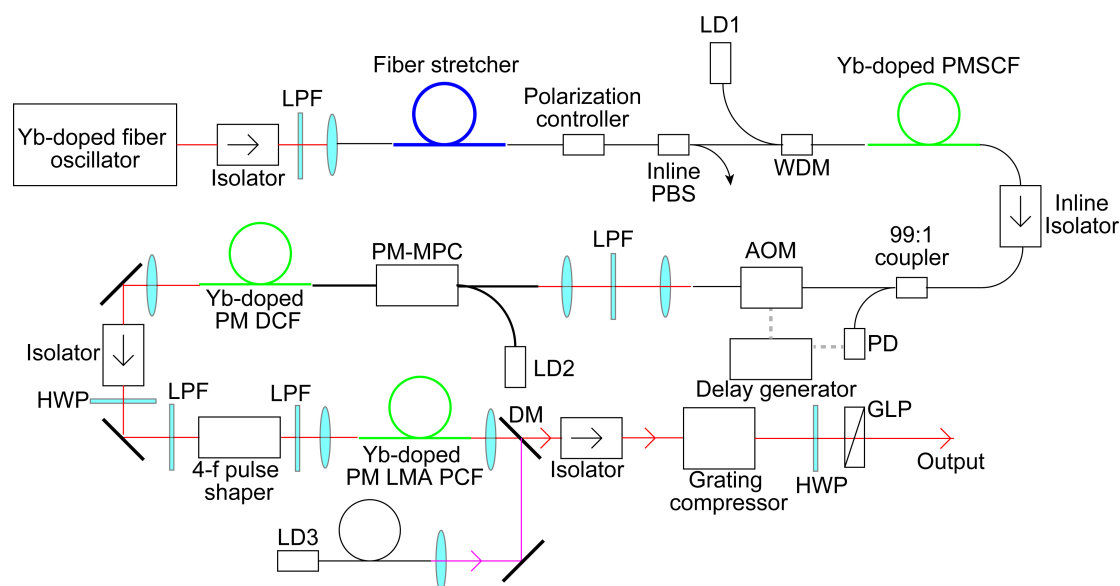


Fig.3.4 Yb ファイバーチャープパルス増幅器の模式図. LPF: ロングパスフィルター, PBS: 偏光ビームスプリッター, PMSCF: 偏波保持シングルクラッドファイバー, PM-DCF: 偏波保持ダブルクラッドファイバー, DM: ダイクロイックミラー, LD: レーザーダイオード, WDM: 波長分割多重カップラ, PD: フォトダイオード, GLP: グランレーザー偏光子, AOM: 音響光学変調器. HWP: 1/2 波長板, PM-MPC: 偏波保持マルチモードパワーコンバイナー, PM LMA PCF: 偏波保持ラージモードエリアフォトニック結晶ファイバー.

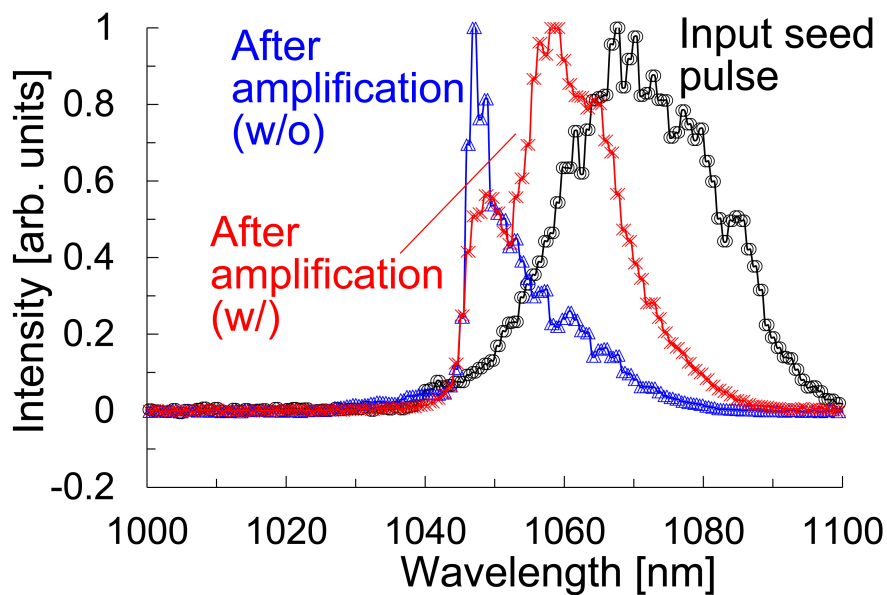


Fig.3.5 ロングパスフィルターの有無による Yb ファイバーチャープパルス増幅器の出力スペクトルの変化

3.4 分散補償とパルス幅の評価

分散補償とパルス幅の評価について述べる．増幅器からの出力パルスは，時空間集光顕微鏡で用いるものと同じ対物レンズを用いて，蛍光色素 rhodamin B のエタノール溶液の中に集光された．rhodamin B から発生した二光子励起蛍光は，同じ対物レンズを通過した後，ダイクロイックミラーによって励起光と分けられ，光電子増倍管によって取得された．蛍光強度ができる限り高くなるように回折格子対への入射角と回折格子間の距離を合わせた後，4-f パルス整形器のフーリエ面に設置されている SLM によって調整されるスペクトル位相は，擬似焼きなまし（SA）と呼ばれるアルゴリズムを採用した適応制御によって最適化した．このとき，励起光強度の揺らぎを補正するために，蛍光強度を励起光強度の二乗で割ったものを目的関数とした．最適化した後に得られた位相マスクを Fig.3.6 に示す．マイケルソン干渉計を用いることによって得た，第二高調波発生に基づく二次の干渉自己相関波形を Fig.3.7 に示す．第二高調波は，BBO 結晶を用いて発生させた．図中の実線は，出力スペクトルから計算した，フーリエ変換限界パルスを仮定した場合に得られる自己相関波形の包絡線を描いたものであり，実測された自己相関波形はこの包絡線と極めて近い形状をしていることがわかる．つまり，分散はほぼ完全に補償された状態であると言える．干渉自己相関波形から，強度相関の自己相関波形を計算したのが Fig.3.8 である．この波形の半値全幅は 142 fs であり，パルスの

形状を secant hyperbolic 関数型であると仮定して、パルス幅は 92 fs と計算された。

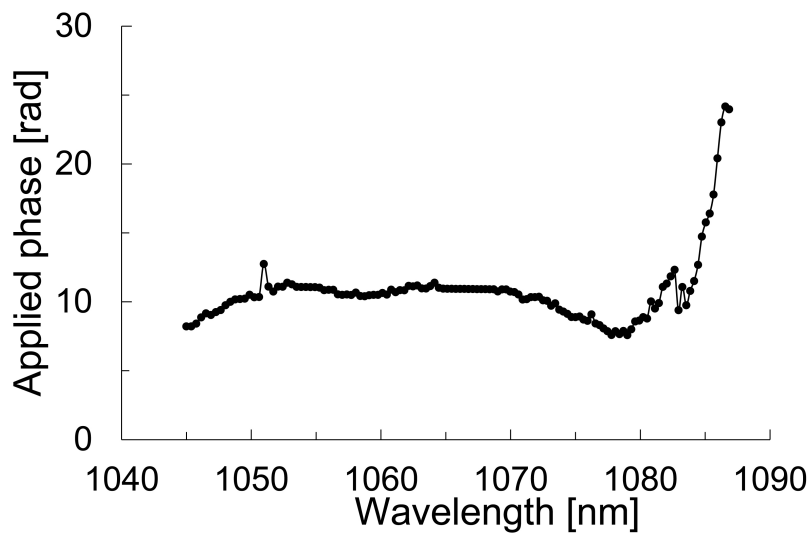


Fig.3.6 適応制御の結果得られた、SLM の位相マスク

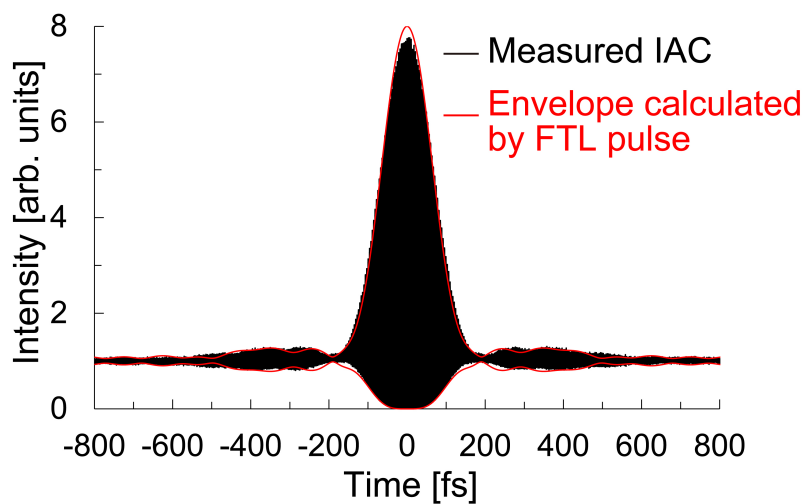


Fig.3.7 マイケルソン干渉計を用いて得た二次の干渉自己相関波形

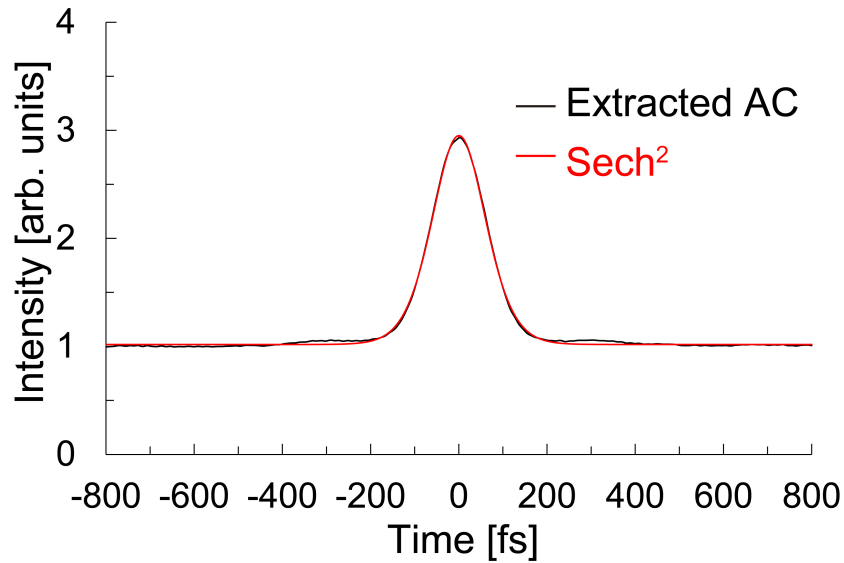


Fig.3.8 強度自己相関波形

3.5 まとめ

三光子励起蛍光を観測できるような高ピーク強度，低繰り返し周波数，かつ中心波長が 1060 nm 程度となるようなレーザー光源を作るために，Yb ファイバーチャープパルス増幅器を作製した．シード光源には非線形偏波回転を用いたモード同期によりパルス発振する Yb ファイバー発振器の出力を用いた．発振器の出力パルスは，ストレッチャーにて引き伸ばされた後，繰り返し周波数を 200 kHz まで落とされながら Yb ファイバーを利得媒質とした増幅器により増幅された．スペクトルの狭帯域化を避けるためにローパスフィルターを増幅器の前に挿入した．ストレッチャーにより与えた分散や，光路中で与えられたそのほかの分散は，増幅器の出力後に設置した回折格子対と，増幅器の途中に設置した 4-f パルス整形器を用いて補償され，最終的な出力パルスは，1060 nm を中心波長とし，パルスエネルギー 9.0 μJ ，パルス幅 92 fs となった．

参考文献

- [1] L.-C. Cheng, N. G. Horton, K. Wang, S.-J. Chen, and C. Xu, "Measurements of multiphoton action cross sections for multiphoton microscopy," *Biomed. Opt. Express* **5**, 3427-3433 (2014).
- [2] H. M. Pask, R. J. Carman, D. C. Hanna, A. C. Tropper, C. J. Mackechnie, P. R. Barber, and J. M. Dawes, "Ytterbium-doped silica fiber lasers: versatile sources for the 1-1.2 μm region," *IEEE J. Sel. Top. Quant. Electron.* **1**, 2-13(1995).
- [3] E. Desurvire, "Analysis of gain difference between forward- and backward-pumped erbium-doped fiber amplifiers in the saturation regime," *IEEE Photonics Technol. Lett.* **4**, 711 (1992).

第4章 三光子励起蛍光を用いた時空間集光顕微鏡の開発

4.1 はじめに

時空間集光顕微鏡は、広視野照明を用いながらも光軸方向に分解能を持ち、視野を広げる際に時間分解能を維持できる特徴を持った顕微鏡である。しかし、第2章の2.4.3.a節で述べたように、深さ方向の分解能が走査型の顕微鏡よりも低く、背景蛍光が発生しやすい。本研究では、二光子励起蛍光ではなく三光子励起蛍光を用いることによって焦点面外からの背景蛍光発生を抑えた。焦点面外からの背景蛍光発生を抑える方法として、時間的多重化[1,2]と呼ばれる方法を用いることも考えられたが、この手法は光学系が非常に複雑になる[3,4]という欠点がある。

本章では、三光子励起蛍光を用いることによる深さ方向の分解能向上の原理について4.2節で述べた後、4.3節にて装置の作製について述べ、4.4節にて実験結果、4.5節にてノイズへの対処に関して述べ、4.6節においてまとめる。なお、光源には、第3章において述べた Yb ファイバーチャープパルスレーザーを用いた。

4.2 原理

三光子励起蛍光を用いることによる深さ方向の分解能向上について説明する。時空間集光顕微鏡の発生させる二光子励起蛍光の強度分布 $R^{(2)}(z)$ は、深さ方向について次のように表される[5]

$$R^{(2)}(z) \propto \frac{1}{\tau(z)} \propto \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_R}\right)^2}}. \quad (4.1)$$

ここで、 $\tau(z)$ は時空間集光される励起光のパルス幅であり、 Z_R は対物レンズの NA や使用している波長によって決まるレイリー長である。一方、三光子励起蛍光の強度分布は、

$$R^{(3)}(z) \propto \frac{1}{\tau^2(z)} \propto \frac{1}{1 + \left(\frac{z}{z_R}\right)^2}. \quad (4.2)$$

となる[6]。ここで、この式に書かれている Z_R は、光学系や励起光の波長が同じであれば、二光子励起蛍光を用いた場合と同じ値となる。これらの式より、三光子励起蛍光を

用いることによって深さ方向の応答がより鋭くなることがわかる。すなわち、焦点面外から発生する蛍光、つまり背景蛍光を抑制できるということである。加えて、三光子励起蛍光を用いることは構造化照明に対してもメリットがある。すなわち、観察する蛍光が励起光強度の3乗に依存するようになるため、二光子励起蛍光を用いるよりも高次の応答を使用でき、その分高い空間分解能を達成しうるようになるというメリットである。

4.3 装置の作製

Fig.4.1 三光子励起蛍光を用いた時空間集光顕微鏡の模式図を示す。Yb ファイバーチャープパルス増幅器からの出力光を、格子定数 830 本/mm の回折格子により分散させた。時空間集光された面が傾くことを避けるために、回折格子への入射角は 62° とした。これは、励起光の中心波長の回折角が 0° となる条件である。回折格子表面における、励起光のビーム直径は 5.0 mm であった。ここで、励起光のビーム直径とは、強度が最大値の $1/e^2$ となる直径とした。励起光は焦点距離 375 mm の結像レンズと、焦点距離 3 mm、開口数 1.2 である水浸の対物レンズ (Olympus 社製, UPLSAPO60×W) を通過して、回折格子表面の像を共役な位置である試料中に結像する。対物レンズの色収差は可視光から近赤外線領域に渡って最適化されている。また、分散された励起光は、対物レンズの入射口をはみ出す程度の大きさまで広がっていた。これは、対物レンズの NA を最大まで利用した時空間集光を行えていることを示しており、深さ方向の分解能がこの対物レンズを用いた系としては最も高くなっていたといえることができる。結像レンズは、色収差補正された焦点距離 750 mm のレンズ (Thorlabs 社製, AC508-750-C) 二枚を隙間ができる限り小さくなるよう対称に設置して作成した。この配置は、Plössl eyepiece [7]. と呼ばれている。発生した蛍光は、励起光の集光に用いたものと同じ対物レンズを通過して、ダイクロイックミラー (Dichroic mirror: DM, Thorlabs 社製, DMLP900) により励起光パルスと分離された。残った励起光を取り除くため、ショートパスフィルター (Short-pass filter: SPF, Semrock 社製, FF01-890/SP-25) とバンドパスフィルター (Band-pass filter: BPF) を使用した。ここで、バンドパスフィルターは、二光子励起蛍光の取得用には 550 nm 付近を透過するもの (Semrock 社製, FF01-550/88-25), 三光子励起蛍光の取得用には 435 nm 付近を透過するもの (Semrock 社製, FF02-435/40-25) を、それぞれ用いた。蛍光は、可視光領域において色収差を補正された、焦点距離 1 m の結像レンズ (Thorlabs 社製, AC508-1000-A) により、イメージインテンシファイア (Image intensifier: II, Hamamatsu Photonics 社製, C9546) の素子上に結像された。ここで、結像レンズは色収差補正の施されたものであり、焦点距離も十分に長いので、収差は無視

できると考えられる。また、イメージンテンシファイアは Yb ファイバーチャープパルスレーザーに同期させ、200 kHz にて動作させた。加えて、幅 40 ns のゲートをかけることによって暗電流等に基づくノイズを低減させた。200 kHz もの高速動作を可能とすることが、イメージンテンシファイアを微弱な三光子励起蛍光の取得に用いた理由である。イメージンテンシファイアによって増幅された像は、CMOS カメラ (Hamamatsu Photonics 社製, ORCA-Flash4.0) によって取得した。試料をステッピングモーターステージによって光軸 (z) 方向にステップ間隔 100 nm で動かしながら試料の断層像の撮影を繰り返し、三次元画像を得た。なお、実験における装置制御やデータ解析には、制御ソフトウェア、及び解析ソフトウェアをそれぞれ作成して用いた。ソフトウェア作成に用いたプログラミング言語は C++ である。

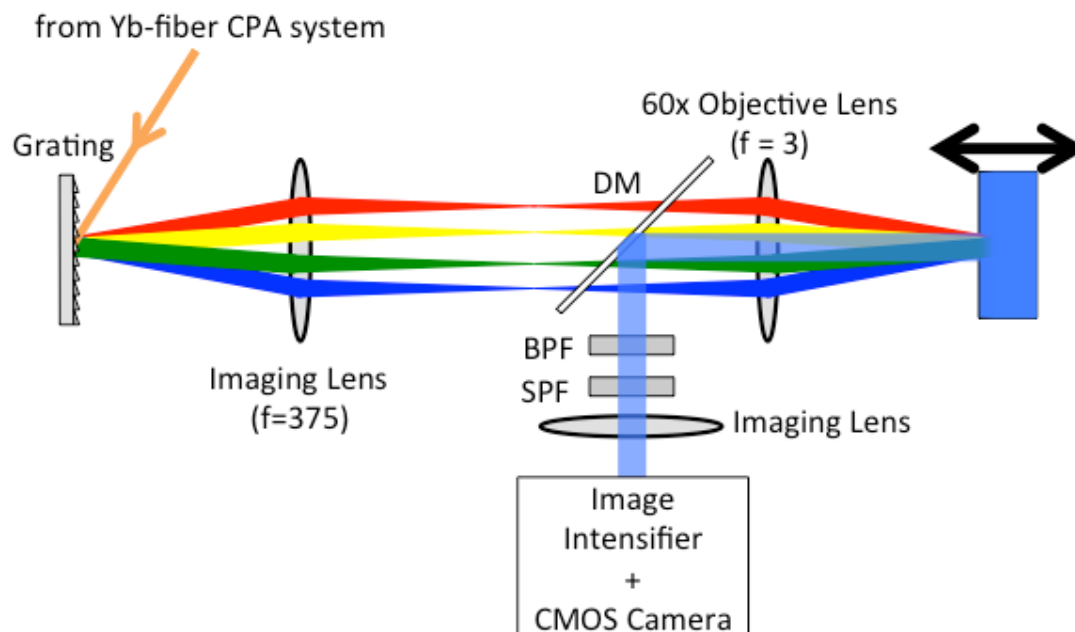


Fig.4.1 三光子励起蛍光を用いた時空間集光顕微鏡の模式図。BPF: バンドパスフィルター, SPF: ショートパスフィルター, DM: ダイクロイックミラー。

4.4 測定結果

4.4.1 光軸方向分解能の評価

励起されている領域の光軸方向の大きさを調べるため、試料には直径 200 nm の蛍光ビーズ (二光子励起用に Molecular Probes 社製, F8809, 三光子励起用に Molecular Probes 社製, F8805) をカバーガラス上に敷き詰めたものを準備し、これを光軸方向に走査し

ながら蛍光強度分布を測定した。Fig.4.2 に、測定された二光子励起蛍光及び三光子励起蛍光の光軸方向強度分布を示す。蛍光の取得には、前述のイメージインテンシファイアと CMOS カメラではなく、光電子増倍管 (PMT) を用いた。ただし、照射した励起光の平均パワーは、二光子励起の場合 5.5 mW、三光子励起の場合 55 mW であり、照射時間は 100 ms とした。分布の半値全幅は、二光子励起の場合 2.1 μm であり、三光子励起の場合 1.6 μm であった。この結果から、三光子励起蛍光を用いた時空間集光顕微鏡の光軸方向分解能は、二光子励起蛍光を用いた場合と比べて 1.3 倍となっていることがわかった。また、焦点面外より発生する背景蛍光の大きさを推定するため、分布のピークに対して 1/100 の強度となる位置までの全幅を調べたところ、二光子励起の場合は 69.2 μm 、三光子励起の場合は 11.8 μm であった。つまり、焦点面外において励起される領域が、三光子励起蛍光を用いることによって 5.9 倍少なくなっていたことがわかった。この結果が原理と一致しているかを調べるために、二光子励起蛍光の光軸方向における分布の半値全幅より(4.1)式中のレイリー長 R_z を計算し、得られた R_z を代入して(4.1)式及び(4.2)式をプロットし、測定されたデータと比較した。Fig.4.2 中に示した実線が、(4.1)式及び(4.2)式をプロットしたものである。この結果より、どちらの分布もこの原理式と概ね一致した形状をしていることがわかる。

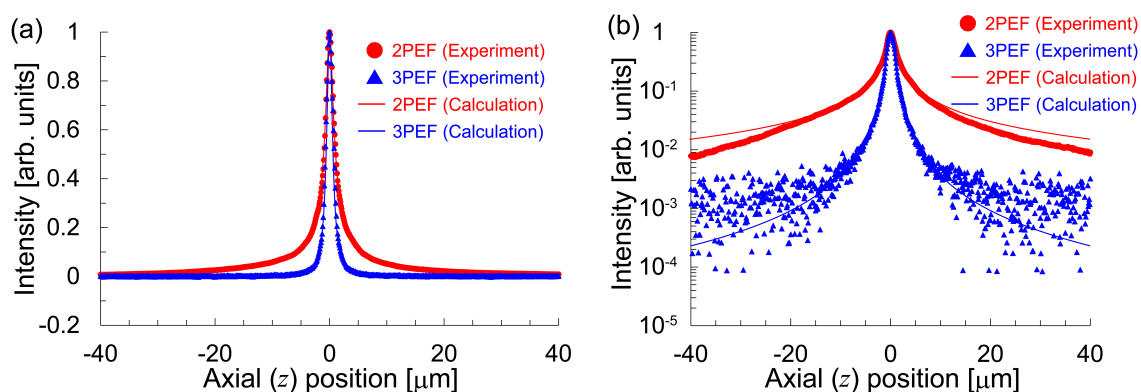


Fig.4.2 直径 200 nm の蛍光ビーズを一層だけ敷き詰めた試料に関する、(a)線形軸、(b) 片対数軸にて表示した、光軸方向の信号強度分布。

4.4.2 背景蛍光の発生抑制

三光子励起蛍光を使うことで焦点面外から発生する背景蛍光の抑制ができていることを確かめるため、蛍光色素の溶液を封入した試料を作成し、カバーガラスと溶液の界面付近で測定される蛍光強度の光軸方向の分布を調べた。蛍光色素は、二光子励起蛍光発生には rhodamine B を、三光子励起蛍光発生には coumarin 1 を使用した。溶液試料と

するため、rhodamine B, coumarin 共に、濃度が 1 mM となるようにエタノールに溶かした後、グリセリンと 1:1 の体積比で混ぜ合わせた。Fig.4.3(a)と(b)は、得られた蛍光強度分布の x-z 断面の様子である。照射した励起光の平均パワーは、二光子励起蛍光観測には 5.5 mW, 三光子励起蛍光観測には 110 mW であった。また、照射時間は 50 ms とした。Fig.4.3(c)は、カメラにより取得された画像 (Fig.4.3(a), (b)) の中央部 1024 ピクセル (32×32 ピクセル) を平均して深さに対してプロットしたものである。Fig.4.3 (d) は、Fig.4.3 (c)の信号強度を対数表示にした片対数グラフである。三光子励起蛍光を用いることによって、二光子励起蛍光を用いた場合と比べて背景蛍光が著しく減少していることが、これらから見て取れる。また、三光子励起蛍光を用いた場合、カバーガラスと蛍光溶液の界面より蛍光溶液側に進んだ位置においては蛍光強度の減少が見られる。この蛍光強度の減少は、発生した蛍光の再吸収や、球面収差の発生に基づく波面歪みのどちらか、あるいは両方に基づいたものである可能性がある。球面収差は、対物レンズの想定した設定に合わせた試料であれば抑えられるが、本実験にて用いた試料の溶液はエタノールとグリセリンの混合溶液であり、対物レンズの想定している水の屈折率とは異なるため、試料表面から離れると発生してしまう。三光子励起蛍光は球面収差などによるパルスの時間幅の変化に対して、より敏感であるため、二光子励起蛍光と比べて信号の減少は大きくなると考えられる。

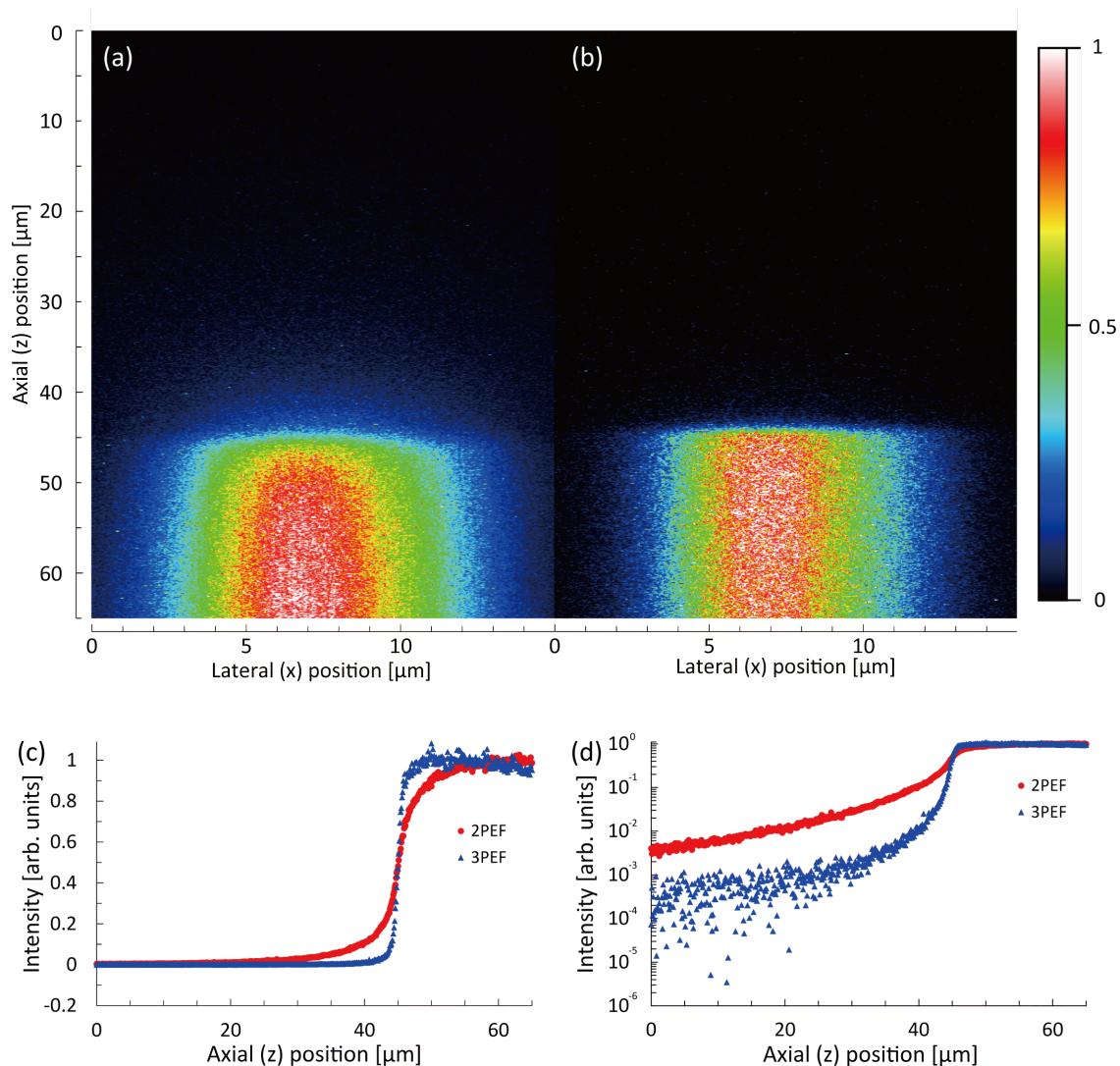


Fig.4.3 時空間集光顕微鏡を用いて撮影した、カバーガラスと蛍光溶液の境界付近についての信号強度分布。(a, b) (a)二光子励起蛍光と(b)三光子励起蛍光を用いた時空間集光顕微鏡により撮影された x-z 断層像。(c, d)(c)線形軸と(d)片対数軸にて表示した光軸方向の信号強度分布。

4.4.3 二色イメージング

異なる波長の蛍光を発する蛍光分子を一度に励起することができれば、二色イメージングを行うことができる。本研究において開発した時空間集光顕微鏡は、三光子励起蛍光と二光子励起を同時に引き起こすことの可能な顕微鏡であり、蛍光分子の励起・蛍光スペクトルを適切に選ぶことによって、異なる種類の蛍光分子をそれぞれ同時に励起することが可能となる。すなわち、二色イメージングが可能となる。二色イメージングは、直径 $1 \mu\text{m}$ の蛍光ビーズを 2 種類使用して行なった。使用したビーズは、波長 560 nm 付

近の蛍光を発するもの (Molecular Probes 社製, F8820) と, 440 nm 付近の蛍光を発するもの (Molecular Probes 社製, F8815) である. 以降本節においては前者を橙ビーズ, 後者を青ビーズと呼ぶこととする. 作製した時空間集光顕微鏡においては, 橙ビーズが二光子励起, 青ビーズが三光子励起されて, それぞれ蛍光を発する. 発生した蛍光はバンドパスフィルター (Semrock 社製, FF01-550/88-25, Semrock 社製, FF02-435/40-25) によって橙ビーズからの蛍光のみ, または青ビーズからの蛍光のみを取得できるようにした. 試料は, 橙ビーズと青ビーズの混合したものをカバーガラス上に敷き詰めて作成した. Fig.4.4 に, 二色イメージングの結果を示した. 照射した励起光の平均パワーは, 二光子励起の場合は 5.5 mW, 三光子励起の場合は 83 mW であり, 照射時間は 100 ms であった.

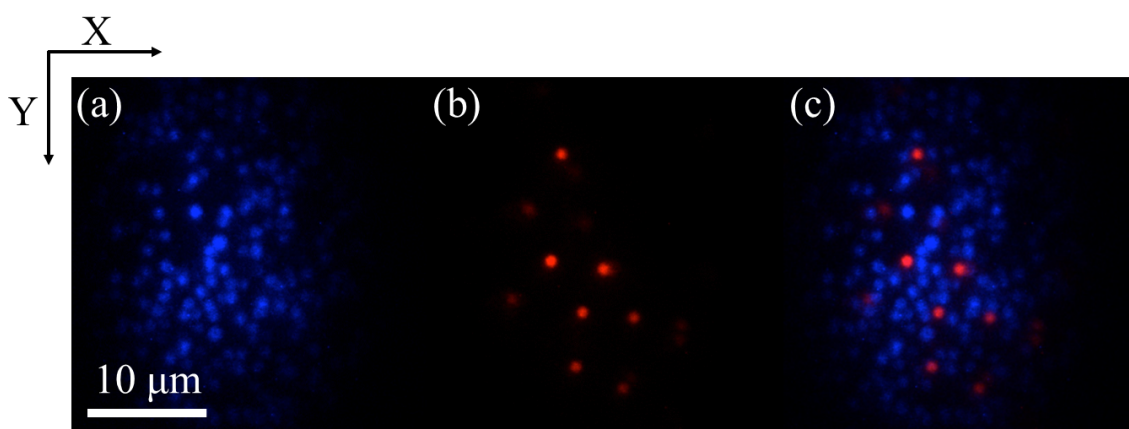


Fig.4.4 時空間集光顕微鏡を用いて撮影した, 直径 1 μm の蛍光ビーズの x-y 断層像. (a) は三光子励起蛍光を用いて撮影した青ビーズ, (b)は二光子励起蛍光を用いて撮影した橙ビーズを示し, (c)は画像(a)と(b)を重ねて表示した画像である.

4.4.4 生体試料を用いた観察

三光子励起蛍光による時空間集光顕微鏡を用いて生体試料の観察を行なった. 用いた試料は, ホルマリン固定されたマウスの脳組織であり, DAPI と SYTO83 により染色されたものである. DAPI と SYTO83 は共に核酸と結合する蛍光色素である. Fig.4.5 は, 二光子励起蛍光または三光子励起蛍光を観測することによって得た, DAPI または SYTO83 に染色された核酸の分布を示す蛍光画像である. ここで, DAPI により染色された核酸は三光子励起によって青色の蛍光を発し, SYTO83 に染色された核酸は二光子励起により橙色の蛍光を発する.

また, 励起光の照射時間は 30 ms であり, 平均パワーは, 二光子励起の場合 83 mW,

三光子励起の場合 275 mW であった. ここで, DAPI と SYTO83 はともに, DNA だけでなく RNA (リボ核酸) にも結合するが, DAPI と RNA が結合した場合, 発生する蛍光は極めて弱くなる事が報告されている[8]. つまり Fig.4.5 の三光子励起または二光子励起蛍光の分布を単純に比較することはできないが, 三光子励起蛍光を用いた方が, 光軸方向の構造識別ができていて, すなわち背景光が少なくなっていることが示唆される.

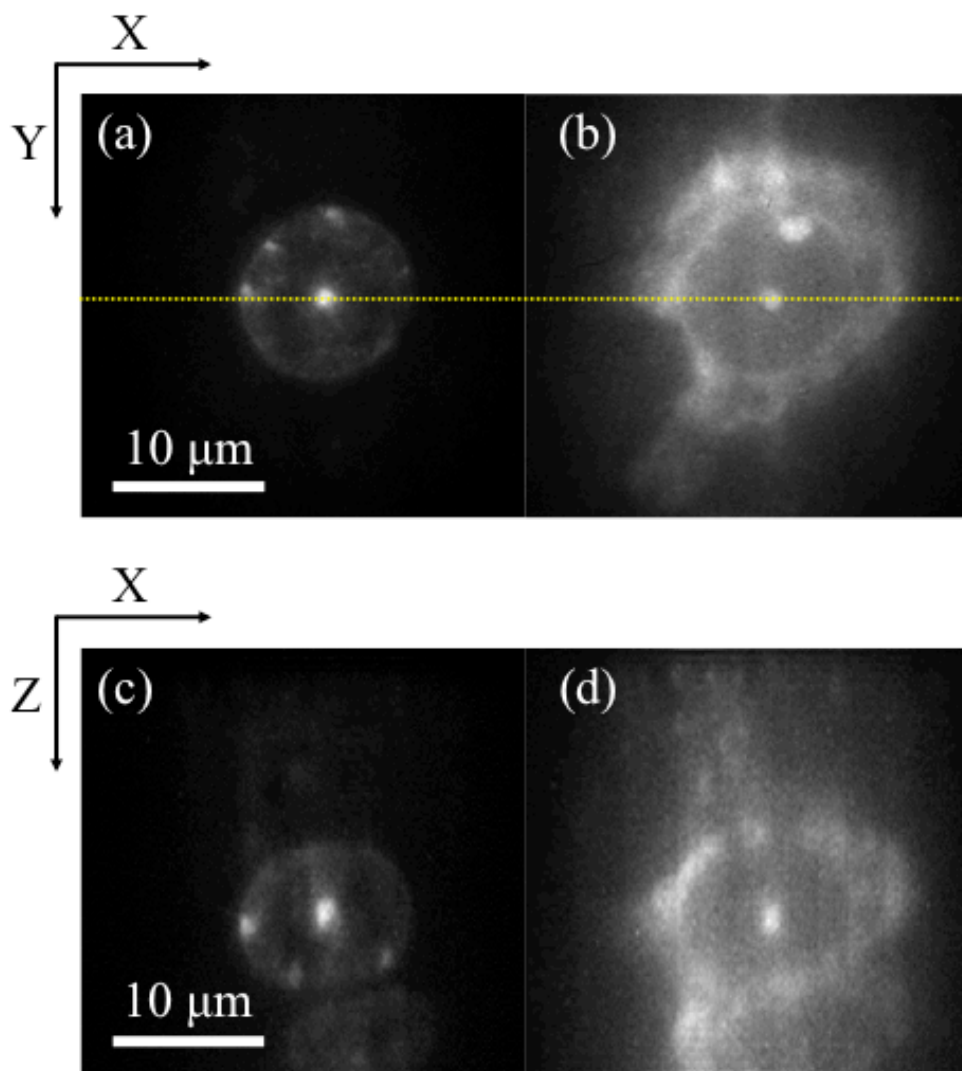


Fig.4.5 DAPI と SYTO83 により染色し, ホルマリン固定したマウスの脳を時空間集光顕微鏡により撮影して得た断層像. (a, b)は表面よりおよそ $30 \mu\text{m}$ の深さにおける x-y 断層像であり, (a)は DAPI の三光子励起蛍光, (b)は SYTO83 の二光子励起蛍光を観察したものである. (c, d)は, (a)及び(b)の黄色い破線に沿って x-z 断層像を得たものである. (c)が(a)に, (d)が(b)にそれぞれ対応する.

4.5 ノイズへの対処

4.5.1 ノイズの由来

本顕微鏡を用いて測定をしている際、得られた画像には大量のノイズが含まれていた。この顕微鏡を応用しようとしている構造化照明顕微鏡は、微弱な変化を取り出し、増強することによって高分解能を達成する顕微鏡である。したがって、ノイズはできる限り発生を抑制する、または影響を抑えられるようにしなければならない。その方法を検討した。

本研究において対処しなければならないノイズは、ショットノイズとイオンノイズである。ショットノイズは、使用している蛍光の強度が極めて微弱であるために発生している。つまり、イメージインテンシファイアにとってもフォトンカウンティングレベルの信号であることから発生してしまうノイズである。一方、イオンノイズは、イメージインテンシファイア固有のノイズである。イメージインテンシファイアは、いわば光電子増倍管を二次元的に配列させて作ったような素子であり、電子を加速させる領域は真空となっているが、完全な真空ではないために、内部に封じられている物質由来の原子や分子などが残っている。このような分子などに加速された電子が衝突してイオン化されると、これもまた加速されて擬似信号となって現れる。これがイオンノイズと呼ばれるノイズである。これは特に、ゲインを高くしている場合に発生しやすい特徴がある。ゲインを下げることでイオンノイズの発生を抑制することは可能であるが、微弱な三光子励起蛍光を観察する本研究においては、ゲインを下げることはできない。よって、ノイズの発生抑制ではなく、データ処理によるノイズの影響低減をはかる必要があった。

光学系の持つ理論的な光軸方向の分解能より十分に高いステップで深さ方向にオーバーサンプリングしてイメージングを行うと、イオンノイズとショットノイズは、光軸方向についてみればデルタ関数のような分布であると言えることができる。すなわち、光軸方向の応答からノイズを信号から区別することが可能となる。具体的には、本研究においては2つの方法を用いた。1つ目は、深さ方向の前後の画像と比較して、アダプティブにノイズの位置と大きさを判定して取り除く方法、2つ目は、フーリエ空間における深さ方向のフィルタリングを用いる方法である。

4.5.2 アダプティブなノイズ除去法

イオンノイズの中でも強度の高いものは、深さ方向に前後の画像と比較することによって見つけることができる。のちに述べるフーリエ変換を利用した手法では強度の高いイオンノイズの影響を消すことはできないため、強度の高いイオンノイズはアダプティ

ブな方法で除去することにした。手順は、以下の通りである。

1. 三次元データの信号強度に対する二値化を行う。
2. 画像の中で、極大となっている位置を探す。探す領域は、手順 1 において行なった二値化により残った領域である。
3. 極大となっている位置に対して、深さ方向について上下の画像と比較して、デルタ関数のような応答を示しているかどうかで、それがノイズでないかどうかを判定する
4. ノイズである可能性がある時、その点の周りで二次元のガウシアンフィッティングを行う。
5. フィッティングの結果、幅が想定されるノイズの大きさより大きすぎる、強度が負の値をとる、x 方向と y 方向の強度に差がありすぎるといった成分は、ノイズの候補から省く。
6. ノイズ候補のフィッティング結果から計算した二次元のガウス関数をその位置から引く。

まず、三次元のデータについて二値化を行い、各画像の中で極大となっている位置で、かつ先の二値化により残った領域に入っているものを探す。この結果、例えば Fig.4.6(a) の赤い矢印で示したような点がノイズ候補として抽出される。次に、深さ方向の前後の画像と比較して、その点のみが極端に高い蛍光強度を持っていないのかを調べる。Fig.4.6(b)は、Fig.4.6(a)の 1 ステップ手前で撮影された画像であるが、こちらには Fig.4.6(a)において映っていた点のうちの片方が全く見当たらない。すなわち、この点こそがイオンノイズであると考えることができる (Fig.4.6(c))。その後、抽出された点の周囲について二次元のガウシアンフィッティングを行なってノイズの形状を推定し、それが不自然な形状でなければ、フィッティング結果より得られたノイズの形状を元の画像から引き、取り除く (Fig.4.6(d))。このようにして、試料中の信号や背景のゆらぎよりもずっと大きなイオンノイズについてはアダプティブに除去した。

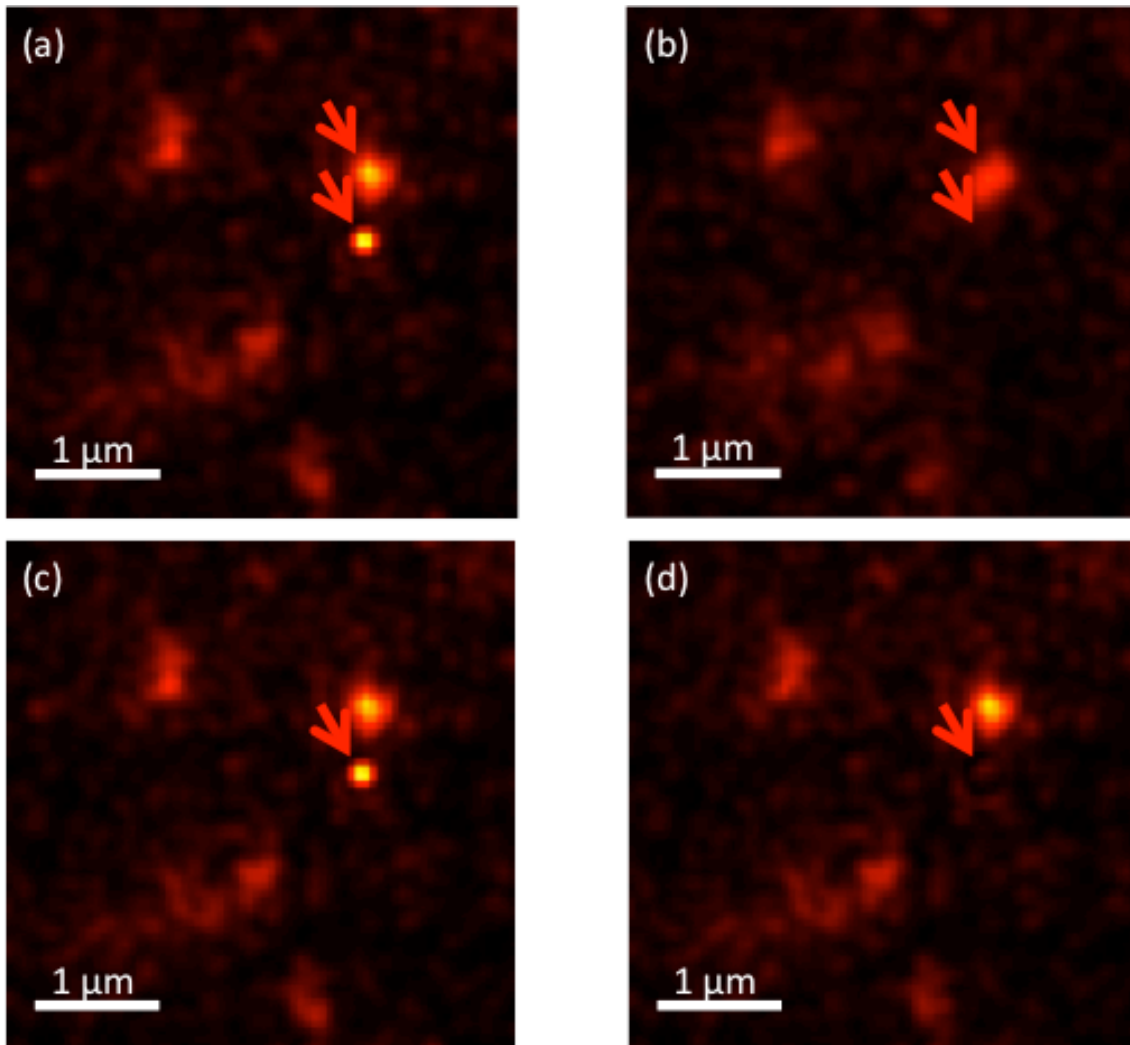


Fig.4.6 アダプティブなノイズ除去の例 (イオンノイズと試料からの信号が混ざった画像に対する処理の様子). (a)画像中の極大となっている点を抽出. (b)z 軸方向に(a)より一つ手前の画像 (矢印は(a)で抽出した点の位置). (c) z 軸方向について(a)の前後にあたる画像と比較して, イオンノイズであると判定された点. (d)イオンノイズの形状に対するフィッティング結果を画像(a)より引き算した画像

4.5.3 フーリエ空間におけるフィルタリング

強度の弱いイオンノイズや, ショットノイズは, 本来の信号と強度の上で区別することが難しい. そこで, フーリエ変換を利用したフィルタリングを用いてノイズの影響を軽減することにした. Fig.4.7 に, 本手法の概念図を示した. フーリエ変換したデルタ関数は, 軸の方向に対して 0 以外の一定値を示す分布となる (Fig.4.7(a)). 一方で信号は, フーリエ変換するとある有限な幅を持った分布となる (Fig.4.7(b)). 信号とノイズの混じったデータの場合, 測定した点のステップが光軸方向の分解能より高ければ, フーリ

エ変換すると、Fig.4.7(c)のようにノイズ由来の一定値の分布の上に、信号に基づく有限な幅を持つ分布が乗った状態となる。ここで、ノイズ由来の一定値を全体から引いてフーリエ逆変換すると、デルタ関数的な応答であるノイズが抑えられ、相対的に信号が強くなるようにすることができる。これを、三次元データに対して適用した。撮影した画像を深さ方向に重ねて三次元画像とした時、三次元フーリエ変換を行なうと、ノイズに由来した成分は光軸方向に一定値の分布を持つことになる。実際に行なった測定において得られた三次元画像について、三次元フーリエ変換を行なったものを示したのがFig.4.8(a)である。光軸方向の分解能よりも高い周波数領域を、光軸方向について平均すると、Fig.4.8(b)のようになった。さらに、Fig.4.8(b)を Fig.4.8(a)から引くと、Fig.4.8(c)のようになる。これを逆フーリエ変換することによって、デルタ関数的な応答を示すノイズを抑えた画像が得られる。Fig.4.9(a)に、と同じ条件で得たマウスの脳のイメージング結果を示した。ノイズが除去されていない Fig.4.9(a)に対し、フーリエ空間におけるフィルタリングを行うと、Fig.4.9(b)のようになり、ショットノイズによる揺らぎが抑えられた画像となった。

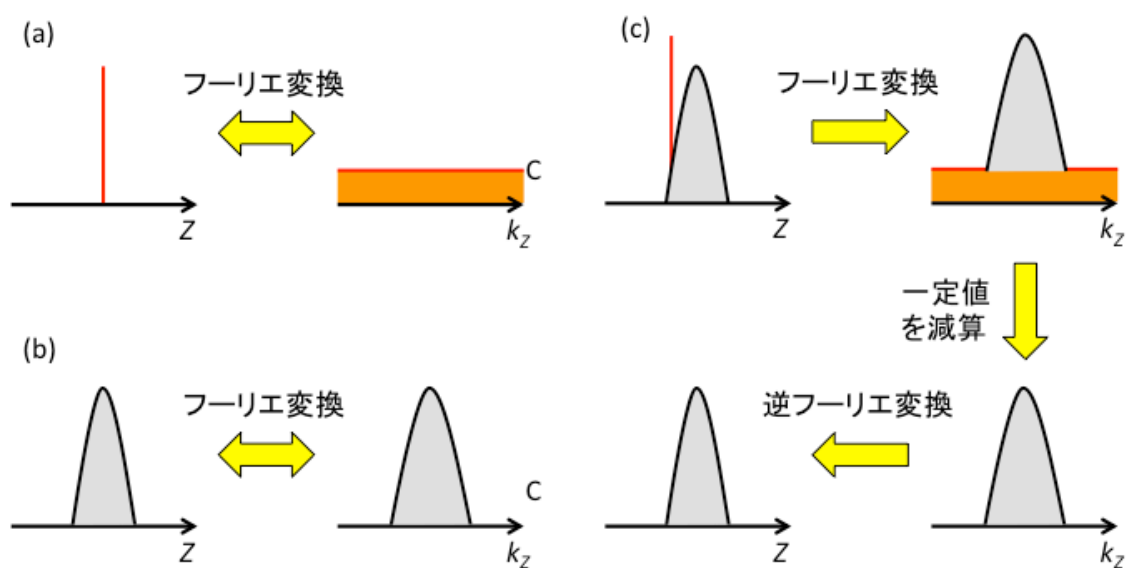


Fig.4.7 (a)デルタ関数型の分布とそのフーリエ変換. (b)ある有限な大きさを持つ分布とそのフーリエ変換. (c)フーリエ変換を用いたノイズ低減方法の概念図.

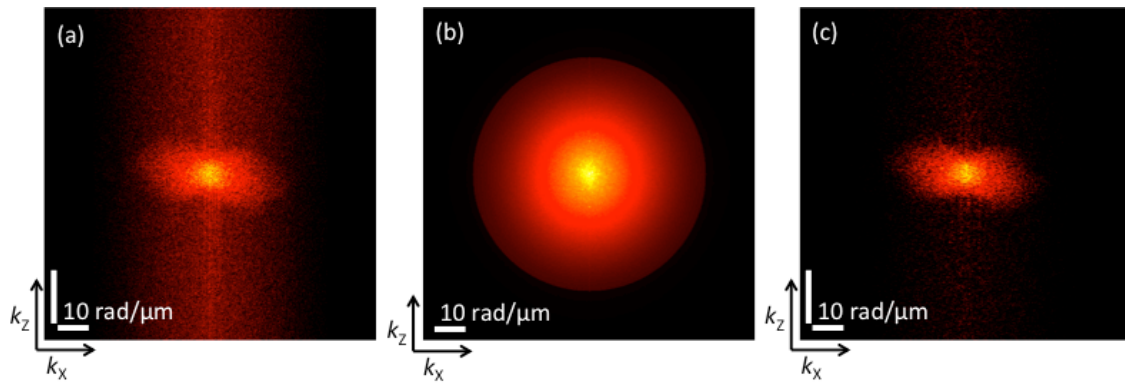


Fig.4.8 フーリエ空間におけるフィルタリング. (a)実際に測定されたデータの三次元フーリエ変換 (k_x - k_z 断面), (b) 光軸方向の分解能よりも高い周波数領域についての平均 (k_x - k_y), (c)測定されたデータの三次元フーリエ変換(a)から(b)を引いた結果

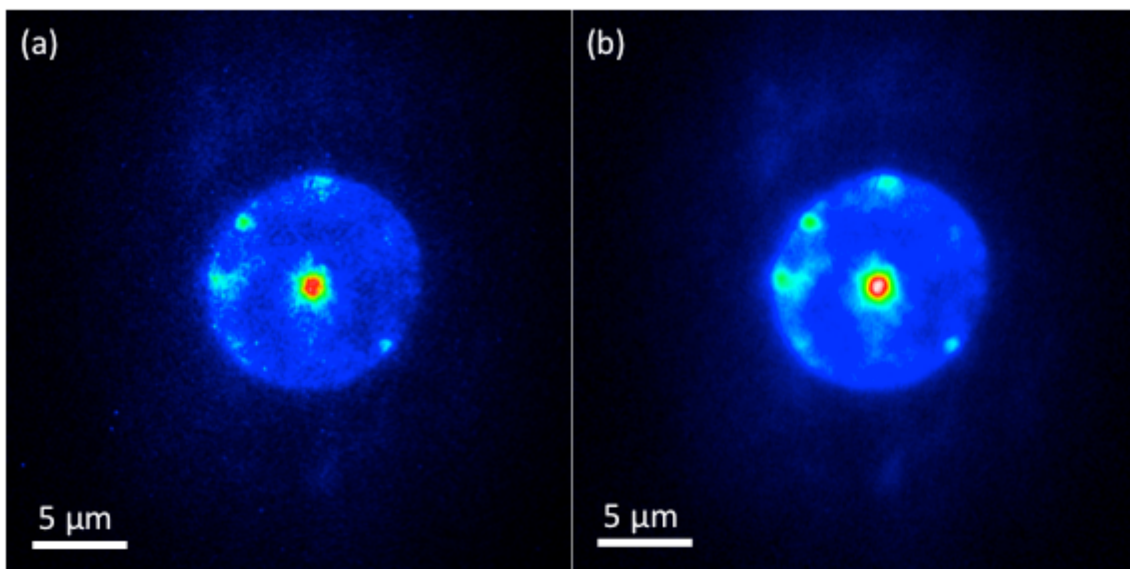


Fig.4.9 ノイズの除去・低減の結果. (a)ノイズ除去前と (b)除去後の DAPI により染色し, ホルマリン固定したマウスの脳を時空間集光顕微鏡により撮影した画像.

4.6 まとめ

三光子励起蛍光を用いた時空間集光顕微鏡を作製し、その性能を評価した。極めて薄い蛍光試料を光軸方向に動かしながら得た光軸方向の信号強度分布より、まず分解能の評価を行なった。分布の半値全幅は、三光子励起蛍光を用いた場合は $1.6 \mu\text{m}$ 、二光子励起蛍光を用いた場合は $2.1 \mu\text{m}$ であった。よって、三光子励起蛍光を用いることによって、二光子励起と比べて光軸方向分解能は 1.3 倍向上したといえることができる。また、光軸方向の焦点面外から発生する蛍光の大きさは、分布のピークに対して $1/100$ となる幅を使って評価すると、三光子励起の場合 $11.8 \mu\text{m}$ であったのに対し、二光子励起では $69.2 \mu\text{m}$ であったため、およそ 5.9 倍少なくなっていたことが確かめられた。またその分布の様子は、理論的に得た原理式の振る舞いとよく一致していた。さらに、蛍光ビーズ及び生体試料を用いて、二光子励起蛍光と三光子励起蛍光を同時に発生させて観察する二色イメージングに成功した。ノイズの除去および抑制の方法についても検討を行ない、データ解析によってノイズの影響を少なくする手法の開発に成功した。

参考文献

- [1] A. Egner and S.W. Hell, "Time multiplexing and parallelization in multifocal multiphoton microscopy," *J. Opt. Soc. Am. A* **17**, 1192–1201 (2000).
- [2] D. N. Fittinghoff, P. W. Wiseman, and J. A. Squier, "Widefield multiphoton and temporally decorrelated multifocal multiphoton microscopy," *Opt. Express* **7**, 273-279 (2000).
- [3] A. Vaziri and C. V. Shank, "Ultrafast widefield optical sectioning microscopy by multifocal temporal focusing," *Opt. Express* **18**, 19645–19655(2010).
- [4] Q. Song, A. Nakamura, K. Hirose, K. Isobe, K. Midorikawa and F. Kannari, "Two-dimensional spatiotemporal focusing of femtosecond pulses and its applications in microscopy," *Rev. Sci. Instrum.* **86**, 083701 (2015).
- [5] M. E. Durst, G. Zhu, and Chris Xu, "Simultaneous spatial and temporal focusing for axial scanning," *Opt. Express* **14**, 12243-12254 (2006).
- [6] K. Toda, K. Isobe, K. Namiki, H. Kawano, A. Miyawaki, and K. Midorikawa, "Temporal focusing microscopy using three-photon excitation fluorescence with a 92-fs Yb-fiber chirped pulse amplifier," *Biomed. Opt. Express* **8**, 2796-2806 (2017).
- [7] A. Nagler, "Plossl type eyepiece for use in astronomical instruments," US Patent 4,482,217 (1984).
- [8] J. Kapuscinski, and K. Yanagi, "Selective staining by 4'-6-diamidino-2-phenylindole of nano-gram quantities of DNA in the presence of RNA on gels," *Nucleic Acids Res.* **6**, 3535-3542 (1979).

第5章 三光子励起蛍光を用いた干渉 時空間集光顕微鏡の開発

5.1 はじめに

本章では、三光子励起蛍光を用いた干渉時空間集光顕微鏡の原理、開発と性能評価について述べる。5.2 節にて、構造化照明を用いる本顕微鏡の原理について説明した後、5.3 節において装置の作製、5.4 節において実験結果と考察を行い、まとめを 5.5 節にて行なう。

5.2 干渉時空間集光顕微鏡の原理

干渉時空間集光顕微鏡の原理を、時空間集光顕微鏡の原理より導く[1]。第 4 章にて示したように、時空間集光顕微鏡においては、回折格子によって分散された励起光のスペクトル成分は、対物レンズの焦点面のみにおいて再び空間的に重なる。このため、パルスの時間幅は、焦点面からの距離に依存した関数で表すことができる[2,3]。その結果として、広視野照明であるにもかかわらず、焦点面外における三光子励起蛍光、すなわち背景蛍光の発生を抑えることができる。発生した蛍光は、焦点面と共役な位置に設置したカメラなどの二次元の素子に結像され、二次元の画像として取得されるが、このとき検出された画像 $D(x, y, z)$ は次のように表すことができる。

$$D(x, y, z) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} S(x', y', z') I_{ex}^3(x', y', z - z') \times R^{(3)}(z - z') h(x - x', y - y', z - z') dx' dy' dz', \quad (5.1)$$

ここで、 $S(x, y, z)$ は試料の蛍光分子密度分布であり、 $I_{ex}(x, y, z)$ は時空間集光により照射された励起光の強度の時間平均、そして $h(x, y, z)$ は蛍光検出に用いた光学系によって決まる点像分布関数 (Point spread function: PSF) である。また、 $R^{(3)}(z - z')$ は、第 4 章にて示した、時空間集光の効果によって発生する三光子励起蛍光の光軸方向の応答である。こうして画像を取得しながら試料を光軸方向に走査することにより、試料の三次元画像を取得することができる。ここで、励起光の縞構造が 3 本の時空間集光パルスの干渉によって生じるものとする、光電場強度の時間平均は次のように表すことができる[1]。

$$E_{ex}(x, y, z) = E_0 \left[e^{ik_0 z} + \alpha e^{i\{k_0(y \sin \theta + z \cos \theta) + \phi_m\}} + \alpha e^{i\{k_0(-y \sin \theta + z \cos \theta) + \phi_m\}} \right], \quad (5.2)$$

ここで、 k_0 は中心波長の波数ベクトルであり、 α は変調の深さ、 θ は中央のビームと外

側のビームとのなす角，そして ϕ_m は縞構造の位相シフトの大きさを示している．この時間平均された光電場強度の 3 乗は，

$$I_{ex}^3(x, y, z) = \left(|E_0|^2\right)^3 \sum_{j=-6}^6 A_j^{(3)}(z) e^{i\{j(k_{y0} + z \cos \theta)\}}, \quad (5.3)$$

と表される．ただし，

$$\begin{aligned} A_0^{(3)}(z) &= 1 + 3\{7 + 4 \cos(2k_{z0}z)\}\alpha^2 + 3\{11 + 8 \cos(2k_{z0}z)\}\alpha^4 + \alpha^6 \\ A_{\pm 1}^{(3)}(z) &= 6 \cos(k_{z0}z)\alpha + 2\{15 \cos(k_{z0}z) + \cos(3k_{z0}z)\}\alpha^3 + 30 \cos(k_{z0}z)\alpha^5 \\ A_{\pm 2}^{(3)}(z) &= 3\{3 + 2 \cos(2k_{z0}z)\}\alpha^2 + 6\{4 + 3 \cos(2k_{z0}z)\}\alpha^4 + 6\alpha^6 \\ A_{\pm 3}^{(3)}(z) &= 2\{9 \cos(k_{z0}z) + \cos(3k_{z0}z)\}\alpha^3 + 18 \cos(k_{z0}z)\alpha^5 \\ A_{\pm 4}^{(3)}(z) &= 3\{3 + 2 \cos(2k_{z0}z)\}\alpha^4 + 3\alpha^6 \\ A_{\pm 5}^{(3)}(z) &= 6 \cos(k_{z0}z)\alpha^5 \\ A_{\pm 6}^{(3)}(z) &= \alpha^6 \\ k_{y0} &= k_0 \sin \theta \\ k_{z0} &= k_0 (1 - \cos \theta). \end{aligned} \quad (5.4)$$

である．ここで，式(5.2)と式(5.4)を用いると検出された画像は，

$$D_m(x, y, z) = \left(|E_0|^2\right)^3 \sum_{j=-6}^6 S(x', y', z') e^{i\{j(k_{y0} + \phi_m)\}} \otimes [R^{(3)}(z) A_j^{(3)}(z) h(x, y, z)], \quad (5.5)$$

のように書き直すことができる．ここで， \otimes は畳み込み積分を表す記号である．検出された画像を空間についてフーリエ変換すると，次のように表される．

$$\begin{aligned} \tilde{D}_m(k_x, k_y, k_z) &= \left(|E_0|^2\right)^3 \sum_{j=-6}^6 \tilde{S}(k_x, k_y - jk_{y0}, k_z) e^{ij\phi_m} \times [\tilde{R}^{(3)}(k_z) \otimes \tilde{A}_j^{(3)}(k_z) \otimes \tilde{h}(k_x, k_y, k_z)] \\ &= \sum_{j=-6}^6 \tilde{F}_j(k_x, k_y, k_z) e^{ij\phi_m}, \end{aligned} \quad (5.6)$$

ここで，

$$\tilde{F}_j(k_x, k_y, k_z) = \left(|E_0|^2\right)^3 \tilde{S}(k_x, k_y - jk_{y0}, k_z) e^{ij\phi_m} \times [\tilde{R}^{(3)}(k_z) \otimes \tilde{A}_j^{(3)}(k_z) \otimes \tilde{h}(k_x, k_y, k_z)]. \quad (5.7)$$

である．検出された画像には，空間周波数 jk_{y0} ($j = -6, -5, \dots, 0, \dots, +5, +6$) の周辺の情報を持つ，フーリエ変換された 13 個の成分， $\tilde{F}_j(k_x, k_y, k_z)$ が含まれている．式(5.7)において示されているように，試料の構造に関する情報は，縞構造の作られた軸のフーリエ変換，この場合 k_y 方向に下方変換されており，各項は回折限界によって決まる光学伝達関数 (Optical transfer function : OTF) の範囲の情報を持っている．フーリエ空間において下方変換された情報を元の空間周波数の情報まで戻すためには，フーリエ変換された各成分がホモダイン検出の原理に基づき，次のように分離されなければならない．

$$\begin{aligned}
H_j(k_x, k_y, k_z) &= \frac{1}{13} \sum_{m=0}^{12} \tilde{D}_m(k_x, k_y, k_z) e^{-ijm\phi_s} \\
&= \tilde{F}_j(k_x, k_y, k_z) e^{-ij\phi_{offset}},
\end{aligned} \tag{5.8}$$

ここで、ホモダイン検出に用いる画像は 13 枚であり、各画像は位相ステップ $\phi_s = 2\pi/13$ で縞構造が変調された時のものである。位相シフトの大きさは、 $\phi_m = \phi_{offset} + m\phi_s$ で表される。ここで、 m は 0 から 12 の整数であり、 ϕ_{offset} はオフセット位相である。分離された各項について元の空間周波数までシフトさせた後、オフセット位相を求めた。オフセット位相は、各深さ(z)ごとに、求めた $H_2(k_x, k_y - 2k_{y0}, z)$, $H_1(k_x, k_y - k_{y0}, z)$ の重なった領域における H_2 , H_1 の位相差として求めた。元の空間周波数までシフトさせた各項を足し合わせることによって、OTF の遮断周波数は、光軸方向 k_z には $k_{zd} + k_{TF} + 3k_{z0}$ 、光軸に垂直な面内方向 k_y には $k_{yd} + 6k_{y0}$ だけ拡張される。ここで、 k_{yd} と k_{zd} は検出光学系の OTF の遮断空間周波数であり、 k_{TF} は時空間集光の効果の遮断空間周波数である。空間分解能を三次元的に向上させるためには、縞構造を作り出す方向は 1 つだけでなく、面内方向について回転させた、つまり別の角度を向いたものが必要となる。本研究においては、直行する 2 方向について、縞構造を作り出して構造化照明を行なった。背景蛍光は、カメラ上に縞構造を結像しないため、分離された項のうち、空間周波数が 0 周辺、すなわち H_0 の項を無視することによって取り除くことができる[4]。

5.3 装置の作製

Fig.5.1 に、本研究で作成した、三光子励起蛍光を用いた干渉時空間集光顕微鏡の模式図を示す。第 4 章にて示した時空間集光顕微鏡の回折格子をデジタルマイクロミラーデバイス (Digital micromirror device: DMD, Texas Instruments 社製, DLP4500NIR) に置き換えた。DMD は、Fig.5.2(a) のように多数の微小ミラーが配列した素子であり、Fig.5.2(b) のように光を入射させると、DMD は位相型回折格子として働き、回折光を時空間集光に用いることができる。微小ミラーは各々その向きを切り替えられるようになっており、全て反転させれば、Fig.5.2(c) のように、回折光の出射される向きは大きく変わり、顕微鏡には入射されなくなる。ここで、顕微鏡に光が入射される向きのミラーを ON 状態、入射されない向きのミラーを OFF 状態のミラーと呼称することとする。ON 状態のミラーと OFF 状態のミラーが一定周期で交互に並んでいた場合、Fig.5.2(d) のように、DMD は振幅型の回折格子としても扱うことができる。本研究において用いた DMD の微小ミラーの傾きは $\pm 12^\circ$ であり、ミラーの間隔は $10.8 \mu\text{m}$ であった。位相型回折格子としての回折効率を高め、また DMD より垂直な方向に回折光が出射するようにするため、

DMD への入射角は、 23.1° とした。この角度は、マイクロミラーのミラー間隔より計算される 4 次の回折角に相当し、マイクロミラーの傾きがブレイズ角に最も近くなるように設定したものである。DMD により、Fig.5.1 における x 軸方向について入射光は分散され、時空間集光パルスとなる[1]。DMD 上に描画された縞構造は、0 次および ± 1 次の回折光を y 軸方向に発生させる。こうして作り出された 3 本の時空間集光パルス（ビーム）は、NA1.2 の水浸の対物レンズ（Olympus 社製，UPLSAPO60 \times W）により試料中に照射され、対物レンズの焦点面近傍に干渉縞を発生させた。視野は $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ であり、縞構造の空間周波数は $4.2 \text{ rad}/\mu\text{m}$ であった。発生した蛍光は同じ対物レンズを通過してダイクロイックミラーにより励起光と分けられ、さらにショートパスフィルター（Short-pass filter: SPF, Semrock 社製，FF01-890/SP-25）およびバンドパスフィルター（Band-pass filter: BPF, Semrock 社製，FF02-435/40-25）により残った励起光も取り除かれた。蛍光像はイメージインテンシファイア（Image intensifier: II, Hamamatsu Photonics 社製，C9546）により増幅され、CMOS カメラ（Hamamatsu Photonics 社製，ORCA-Flash4.0）により取得された。三次元画像は、ステッピングモーターにより駆動された自動ステージにより、試料を光軸方向に動かしながら撮影を繰り返すことによって得た。第 4 章の実験と同様に、本実験においても、実験装置の制御やデータ解析には自作のソフトウェアを用いた。

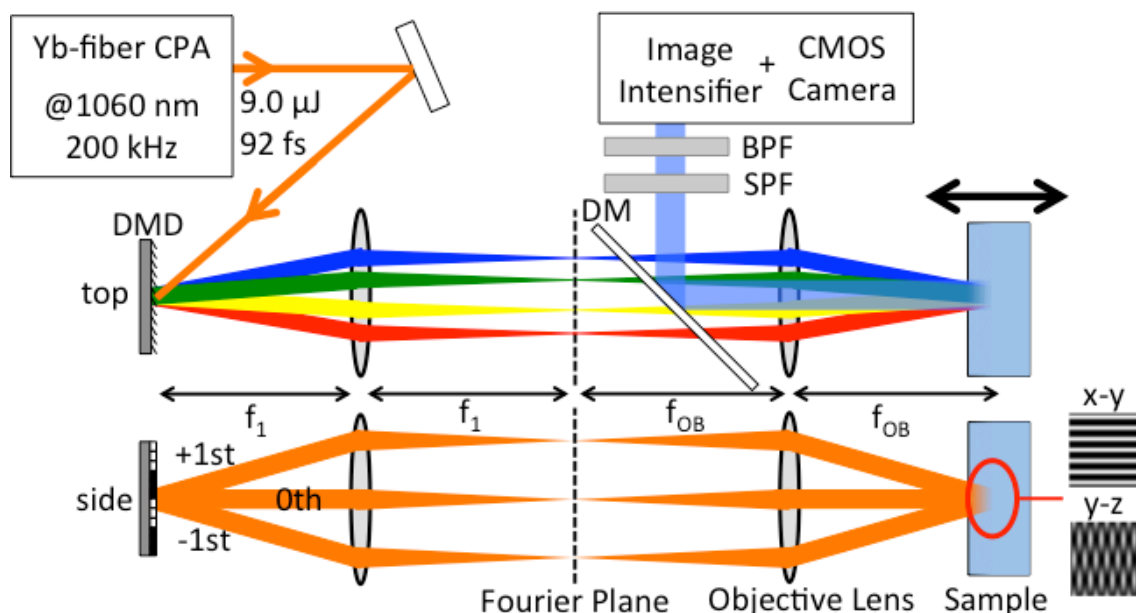


Fig.5.1 三光子励起蛍光を用いた干渉時空間集光顕微鏡の模式図。三本の励起光が干渉するため、干渉縞は、面内方向(x-y 方向)だけではなく光軸方向(z 方向)にも発生する。

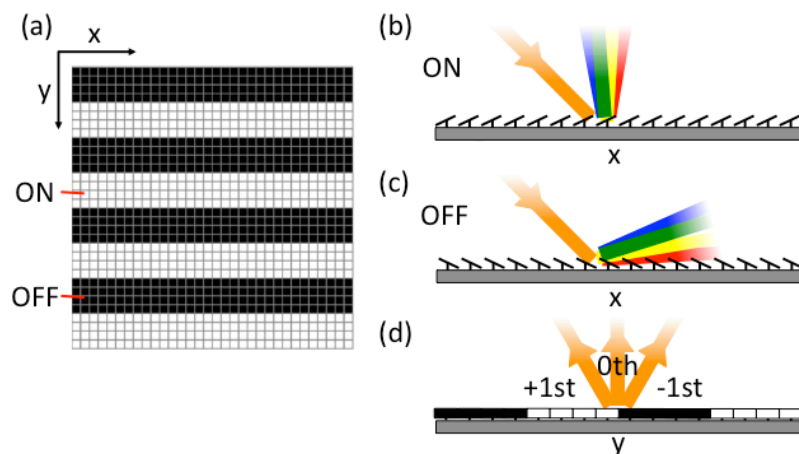


Fig.5.2 (a) 縞構造を描画したデジタルマイクロミラーデバイス(DMD)の模式図。(b)x 軸方向について見た DMD のミラー配列と回折光の様子。DMD は位相型回折格子として機能し、回折光は DMD と垂直な方向に出射される(ON 状態)。(c)DMD のミラーの傾きを反転させた場合における回折光の様子。回折光は DMD と垂直な方向には出射されない(OFF 状態)。(d)y 軸方向について見た DMD のミラー配列と、回折光の様子。ON, OFF 状態のミラーを一定間隔で交互に並べることで、DMD は振幅型回折格子としても機能する。

5.4 測定結果

5.4.1 光軸方向分解能の評価

光軸方向分解能は、直径 100 nm の蛍光ビーズ (Molecular Probes,社製, F8797) をカバーガラス上に一層だけ敷き詰めた試料の光軸方向の信号強度分布を取得することによって評価した。ここで、入射させた励起光の平均パワーは 69 mW であり、励起光の照射時間は 50 ms とした。また、蛍光ビーズの発光波長は 440 nm である。Fig.5.3 は、時空間集光顕微鏡(TF)または干渉時空間集光顕微鏡(ITF)を用いて取得された光軸方向の信号強度分布である。分布の半値全幅は、時空間集光顕微鏡では 2.60 μm 、干渉時空間集光顕微鏡は 0.86 μm となった。構造化照明を用いることにより、光軸方向の分解能はおよそ 3 倍向上した。この分解能は励起光波長の 0.75 倍である。

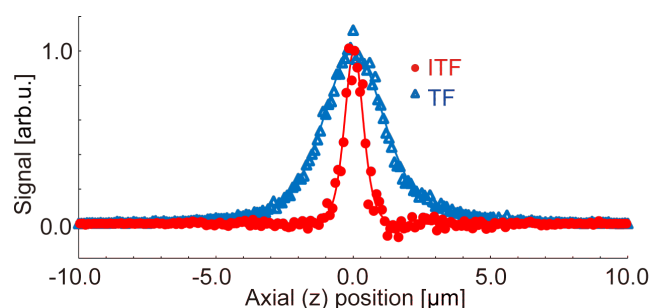


Fig.5.3 直径 100 nm の蛍光ビーズを一層だけ敷き詰めた試料に関する，光軸方向の信号強度分布．

5.4.2 面内方向分解能の評価

光軸方向に垂直な面内方向の分解能は，アガロースゲル中に散りばめた直径 100 nm の蛍光ビーズを撮影することによって評価した．Fig.5.4(a)は，時空間集光顕微鏡あるいは干渉時空間集光顕微鏡によって撮影された同じ蛍光ビーズの画像から，面内方向の信号強度分布を取得したものである．入射した励起光の平均パワーは 138 mW であり，照射時間は 200 ms である．ガウス関数によってフィッティングした結果，半値全幅は，時空間集光顕微鏡の場合 255 nm，干渉時空間集光顕微鏡の場合 106 nm となった．同様に撮影された 7 つの蛍光ビーズについて，信号強度分布の半値全幅を平均すると，時空間集光顕微鏡の場合 295 nm，干渉時空間集光顕微鏡の場合 130 nm となった．

Fig.5.4 (b)，Fig.5.4 (c)は，試料中の同じ位置を，時空間集光顕微鏡あるいは干渉時空間集光顕微鏡を用いて撮影したものである．また Fig.5.4 (d)は，Fig.5.4 (b)，Fig.5.4 (c)中の黄色い実線に沿って信号強度分布を描いたものである．時空間集光顕微鏡により撮影された画像においては確認することのできない近接した 2 つのビーズの間のギャップを，干渉時空間集光顕微鏡によって撮影された画像においては確認できることがわかった．

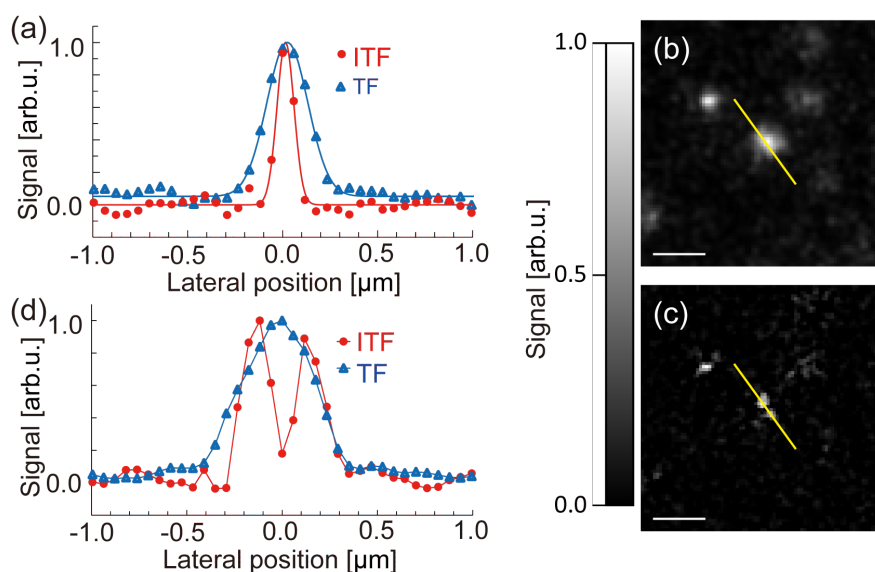


Fig.5.4 三光子励起蛍光を用いた時空間集光顕微鏡及び干渉時空間集光顕微鏡の面内方向分解能評価. (a)深さ 100 μm における直径 100 nm の蛍光ビーズの面内方向信号強度分布. (b, c)表面からの深さ約 33.4 μm において撮影した蛍光ビーズの画像. ただし, (b)は時空間集光顕微鏡, (c)は干渉時空間集光顕微鏡により得た. また, 図中のスケールバーは 1 μm を示す. (d)画像(b)及び(c)の黄色い実線に沿った信号強度分布.

5.4.3 生体試料を用いた観察

最後に, 生体試料について二色イメージングを行なった結果について示す. 試料は, 4%のパラホルムアルデヒド(Paraformaldehyde: PFA)によって固定されたマウスの大脳皮質であり, 厚さは 100 μm の冠状断面であった. DAPI 及び SYTO83 により染色されており, 三光子励起により DAPI, 二光子励起により SYTO83 の蛍光をそれぞれ観察できた. Fig.5.5 は, 時空間集光または干渉時空間集光顕微鏡を用いた二色イメージングにより得られた, 試料の断層像である. 入射光の平均パワーは, 三光子励起の場合は 275 mW, 二光子励起の場合は 83 mW, 照射時間はともに 30 ms である. Fig.5.5(a-d)は, 表面からの深さ約 30 μm において時空間集光顕微鏡(a, c), 干渉時空間集光顕微鏡 Fig.5.5(b, d)を用いて撮影された画像である. ただし, (a, b)は三光子励起された DAPI の蛍光, Fig.5.5(c, d)は二光子励起された SYTO83 の蛍光である. DAPI と SYTO83 はともに, DNA と RNA に結合されるが, DAPI と RNA が結合した場合の蛍光強度は, DAPI と DNA が結合した場合の蛍光より非常に弱くなるため[5], 厳密に Fig.5.5(a, b)と Fig.5.5(c, d)を比較することはできない. しかし, Fig.5.5(a)と Fig.5.5(c)より, 三光子励起蛍光を用いた方が二光子励起蛍光を用いた場合よりも背景蛍光の発生が抑えられているとすることができる. 検出器のダイナミックレンジは, 背景蛍光によって制限されてしまうため,

背景蛍光の少ない三光子励起蛍光を使った方が、信号としては弱い高周波の情報を得るには有利だと言える。ただし、背景蛍光の強度が、検出器のダイナミックレンジを大きく制限していない場合は、Fig.5.5(b, d)のように、二光子励起蛍光、三光子励起蛍光どちらについても背景光を除去することができるため、二色イメージングが可能となる。Fig.5.5(e)と Fig.5.5(f)を見ると、干渉時空間集光顕微鏡を使って得た画像中にはギャップが見えることがわかる。Fig.5.5(g)に示した信号強度分布においても、このギャップは干渉時空間集光顕微鏡でなければ識別することができない。これは、焦点面外において発生した背景光を除去した結果であると考えられる。また、Fig.5.5(h)と Fig.5.5(i)より、空間分解能の向上によって、非常に細い繊維状の構造が見えるようになっていることがわかる。Fig.5.5(j)に示した信号強度分布より、繊維の太さは 200 nm 以下であることが推測される。Fig.5.5(k,l)は、Fig.5.5(a-d)とは異なる位置における、三光子励起蛍光を用いた時空間集光顕微鏡、干渉時空間集光顕微鏡による観察結果である。干渉時空間集光顕微鏡により取得した Fig.5.5(l)には、核膜に沿って高密度のクロマチンが分布している様子がはっきりと写っている。ここで、クロマチンとは、DNA とタンパク質の複合体のことを示す語である。一方で時空間集光顕微鏡により取得された Fig.5.5(k)においてはぼやけていることがわかる。この結果は、超解像顕微鏡の 1 つである SMLM (Single molecule localization microscopy) と広視野の蛍光顕微鏡を用いた培養細胞のクロマチン分布を調べた先行研究[6]と同様なものであるが、本研究においては、培養細胞ではなく厚みのある脳組織を用いており、観察を行なった深さも SMLM の場合より深いことが特徴である。

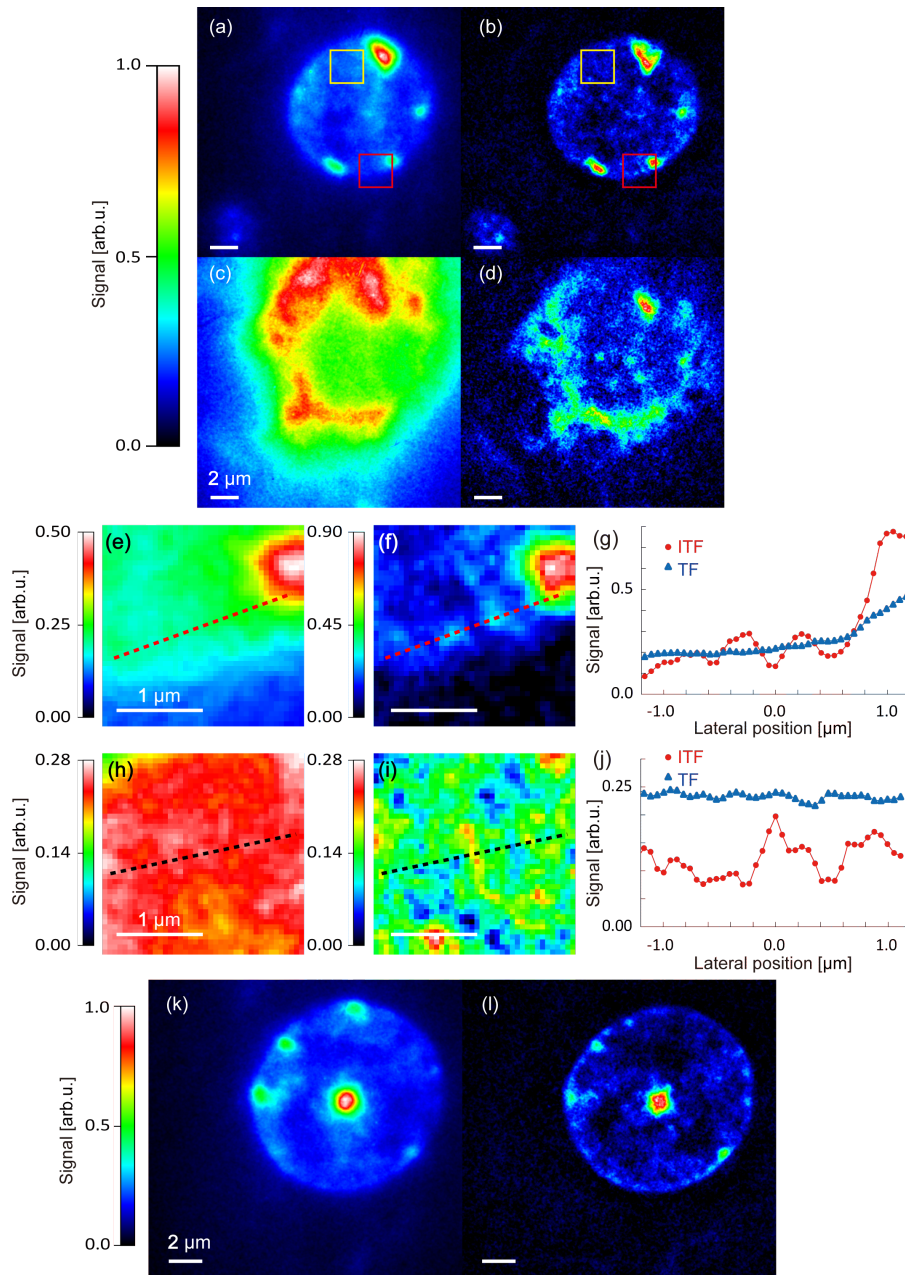


Fig.5.5 (a-d) DAPI と SYTO83 により染色し、ホルマリン固定したマウスの脳を(a, c)時空間集光顕微鏡, (b, d)干渉時空間集光顕微鏡により撮影して得た x-y 断層像. ただし, (a, b)は DAPI の発する三光子励起蛍光, (c, d)は SYTO83 の発する二光子励起蛍光を撮影したものである. (e, f)画像(a)及び(b)の赤い枠線に囲まれた領域の拡大図, ただし(e)が画像(a), (f)が画像(b)に対応する. (g)画像(e)及び(f)の破線に沿って抽出した信号強度分布. (h, i)画像(a)及び(b)の黄色い枠線に囲まれた領域の拡大図, ただし(h)が画像(a), (i)が画像(b)に対応する. (j)画像(h)及び(i)の破線に沿って抽出した信号強度分布. (k, l) DAPI により染色し、ホルマリン固定したマウスの脳を、三光子励起蛍光を用いた(k)時空間集光顕微鏡, (l)干渉時空間集光顕微鏡によって撮影した x-y 断層像.

5.5 まとめ

三光子励起蛍光を用いた干渉時空間集光顕微鏡を作製し，その性能評価を行なった．構造化照明の効果により，光軸方向分解能は，カバーガラス上に一層だけ敷き詰めた直径 100 nm の蛍光ビーズを観察した際の光軸方向信号強度分布の半値全幅から評価し，2.60 μm であったものが構造化照明の効果により 0.83 μm まで向上したことを確かめた．面内方向分解能は，直径 100 nm の蛍光ビーズを観察した際の信号強度分布の半値全幅から評価し，構造化照明を用いないときは 295 nm であったものが 130 nm まで向上した．また，生体試料の観察も試験し，構造化照明を用いた分解能向上及び背景光除去によって試料中のより細かい構造が識別できるようになったことを確かめた．

参考文献

- [1] K. Isobe, K. Toda, Q. Song, F. Kannari, H. Kawano, A. Miyawaki, and K. Midorikawa, “Temporal focusing microscopy combined with three-dimensional structured illumination,” *Jpn. J. Appl. Phys.* **56**(5), 052501 (2017).
- [2] D. Oron, E. Tal, and Y. Silberberg, “Scanningless depth-resolved microscopy,” *Opt. Express* **13**, 1468–1476 (2005).
- [3] G. Zhu, J. van Howe, M. Durst, W. Zipfel, and C. Xu, “Simultaneous spatial and temporal focusing of femtosecond pulses,” *Opt. Express* **13**, 2153–2159 (2005).
- [4] K. Isobe, T. Takeda, K. Mochizuki, Q. Song, A. Suda, F. Kannari, H. Kawano, A. Kumagai, A. Miyawaki, and K. Midorikawa, “Enhancement of lateral resolution and optical sectioning capability of two-photon fluorescence microscopy by combining temporal-focusing with structured illumination,” *Biomed. Opt. Express* **4**, 2396–2410 (2013).
- [5] J. Kapuscinski, and K. Yanagi, “Selective staining by 4'-6-diamidino-2-phenylindole of nano-gram quantities of DNA in the presence of RNA on gels,” *Nucleic Acids Res.* **6**, 3535-3542 (1979).
- [6] A. T. Szczurek, K. Prakash, H.-K. Lee, D. J. Żurek-Biesiada, G. Best, M. Hagmann, J. W. Dobrucki, C. Cremer, and U. Birk, “Single molecule localization microscopy of the distribution of chromatin using Hoechst and DAPI fluorescent probes,” *Nucleus*. **5**, 331-340 (2014).

第6章 結言

本研究では、超解像顕微鏡である構造化照明顕微鏡と、多光子励起蛍光顕微鏡である時空間集光顕微鏡とを組み合わせ、干渉時空間集光顕微鏡を開発し、その性能評価を行った。

はじめに、レーザー光源の開発を行った。三光子励起蛍光を発生させるためには、ピーク強度の高い励起光源が必要であったため、Yb ファイバーを利得媒質としたチャープパルス増幅器を作製し、中心波長 1060 nm, パルス幅 92 fs, パルスエネルギー 9 μ J, 繰り返し周波数 200 kHz の出力パルスを得た。

次に、三光子励起蛍光を用いた時空間集光顕微鏡の開発を行った。深さ方向の分解能は、二光子励起蛍光を用いた場合は 2.1 μ m であったのに対し、三光子励起蛍光を用いた場合は 1.6 μ m であり、二光子励起蛍光を用いた場合と比べて 1.3 倍向上した。また、焦点面外において発生する蛍光を 5.9 倍抑制することに成功した。また、二光子励起蛍光を用いることの可能な状況であれば、二光子励起と三光子励起により異なる蛍光色素を同時に励起した二色イメージングを行うことが可能であることが示された。

最後に、三光子励起蛍光を用いた時空間集光顕微鏡を構造化照明顕微鏡と組み合わせた、干渉時空間集光顕微鏡を開発した。構造化照明の効果により、発生した背景光は除去され、深さ方向の分解能は 860 nm, 面内方向の分解能は深さ 100 μ m において 106 nm に達した。つまり、深さ方向の分解能は励起光の波長 1060 nm を下回っており、面内方向に至っては、1/10 の大きさに相当する分解能を達成したことになる。また時空間集光顕微鏡、干渉時空間集光顕微鏡のどちらにおいても、生体試料を用いたイメージングに成功しており、この顕微鏡が生体観察に極めて有効であることを示すことができた。

本研究において開発した、三光子励起蛍光を用いた干渉時空間集光顕微鏡は、将来、脳組織の活動のような生体现象を観察する強力なツールとなりうる。例えば神経科学の分野において、この顕微鏡はシナプスの可塑化や樹状突起スパインの減少といった現象の観察に応用が可能であると考えられる。ニューロン同士のコミュニケーションを観察するためには視野を広げる必要があるが、視野面積の増加分だけ励起光の入射パワーを増加させるだけで、時間分解能を下げることなく対応が可能である。試料に照射される全体としての平均パワーが高くなることから熱による試料の損傷を招く可能性も考えられるが、励起光の繰り返し周波数を下げることによってこの問題は回避できる。また、励起光パルスの繰り返し周波数が 1 MHz を切ると、三重項励起状態を経由した励起状態吸収に基づく光褪色を抑えることができるという利点もある。本研究において得られた知見と技術が、今後の生体研究の発展に貢献することを期待する。

謝辞

本研究は、埼玉大学大学院理工学研究科理工学専攻において緑川克美教授のご指導のもとで行われました。本研究を遂行するにあたり、数々の適切なご指導、ご助言を賜り、そして理化学研究所という極めて恵まれた研究環境をお与えくださりました、緑川克美教授に心より感謝御礼を申し上げます。

本論文をまとめるにあたり、貴重なご指導、ご助言を賜りました、埼玉大学大学院・理工学研究科 矢口裕之教授、同 平山秀樹教授、同 田原太平教授に心より感謝申し上げます。

理化学研究所・脳科学総合研究センター・細胞機能探索技術開発チーム 宮脇敦史チームリーダー、河野弘幸博士、並木香奈博士には、生体試料の準備や、実験方法の検討の際、そして得られた実験結果の考察において、多くのご協力、そしてご助言を賜りました。深く、感謝申し上げます。

直接のご指導を賜りました、理化学研究所・光量子工学研究領域・アト秒科学研究チーム 磯部圭佑研究員には、様々なご指導、ご鞭撻、ご助言を賜り、また研究者としてのあるべき姿お教えいただきましたこと、感謝の念に耐えません。

学部、及び修士課程に在籍中、ご指導ご鞭撻に加え、研究の楽しさと厳しさをお教えくださり、そして理化学研究所に導いてくださりました、東京理科大学大学院・理工学研究科 須田亮教授に、深く感謝申し上げます。

また、本研究の一部は光科学技術研究振興財団の助成を受けたものであり、理化学研究所の大学院生リサーチ・アソシエイト制度の下での成果です。

終わりに、研究を行うにあたって献身的な援助、協力をいただいた、父 戸田義継、母 典子、妹 詠里、弟 耕佑、祖母 美津子、祖父 佐々木健の皆様に、深甚なる感謝を捧げます。

業績目録

・論文発表

1. 磯部圭佑, 戸田圭亮, 緑川克美, “励起光パルスの時空間制御による深部超解像イメージング技術,”レーザ研究, **44**, 653-657(2016).
2. K. Isobe, K. Toda, Q. Song, F. Kannari, H. Kawano, A. Miyawaki and K. Midorikawa, “Temporal focusing microscopy combined with three-dimensional structured illumination,” Jpn. J. Appl. Phys, **56**, 052501(2017).
3. K. Toda, K. Isobe, K. Namiki, H. Kawano, A. Miyawaki and K. Midorikawa, “Temporal focusing microscopy using three-photon excitation fluorescence with 92-fs Yb-fiber laser,” Biomed. Opt. Express, **8**, 2796-2806 (2017).
4. K. Toda, K. Isobe, K. Namiki, H. Kawano, A. Miyawaki and K. Midorikawa, “Interferometric temporal focusing microscopy using three-photon excitation fluorescence,” Biomed. Opt. Express, **9**, 1510-1519 (2018).

・口頭発表

1. 戸田圭亮, 磯部圭佑, 河野弘幸, 宮脇敦史, 緑川克美, “時空間集光顕微鏡における波面歪み補正,” レーザー学会学術講演会第 36 回年次大会, I209pVIII06(2016).
2. 戸田圭亮, “多光子三次元構造化照明顕微鏡,” 第 3 回 4D 細胞計測プロジェクト若手の会, No.4(2016).
3. 戸田圭亮, 磯部圭佑, 河野弘幸, 宮脇敦史, 緑川克美, “三光子励起蛍光を用いた干渉時空間集光顕微鏡,” 2015 年 第 77 回応用物理学会秋季学術講演会, 14p-C42-19(2016).
4. 戸田圭亮, 磯部圭佑, 並木香奈, 河野弘幸, 宮脇敦史, 緑川克美, “多光子構造化照明による深部超解像イメージング,” レーザー学会学術講演会第 37 回年次大会, I307pVII10(2017)(優秀論文発表賞 受賞).
5. K. Toda, K. Isobe, K. Namiki, H. Kawano, A. Miyawaki and K. Midorikawa, “Three-photon temporal focusing microscopy combined with structured illumination microscopy,” ECBO 2017, EW2B.4(2017).
6. 戸田圭亮, 磯部圭佑, 並木香奈, 河野弘幸, 宮脇敦史, 緑川克美, “多光子構造化照明顕微鏡のデータ処理方法改善による分解能向上,” レーザー学会学術講演会第 38 回年次大会, 25pII3(2018).

・ポスター発表

1. 戸田圭亮, 磯部圭佑, 河野弘幸, 宮脇敦史, 緑川克美, “時空間集光法における波面歪みの補正,” 2015年 第76回応用物理学会秋季学術講演会, 14a-PB1-7(2015).
2. 戸田圭亮, 磯部圭佑, 河野弘幸, 宮脇敦史, 緑川克美, “時空間集光法におけるスペクトル位相変調による波面歪みの補正,” 理研シンポジウム第3回「光量子工学研究」, PS-41(2015).
3. 戸田圭亮, 磯部圭佑, 河野弘幸, 宮脇敦史, 緑川克美, “時空間集光顕微鏡における波面歪みの補正,” 4D細胞計測プロジェクト全体会議, No.2(2016).
4. 戸田圭亮, 磯部圭佑, 河野弘幸, 宮脇敦史, 緑川克美, “多光子三次元構造化照明顕微鏡,” 2016年 第63回応用物理学会春季学術講演会, 20p-P2-14(2016).
5. K. Toda, K. Isobe and K. Midorikawa, “Super-resolution, deep-tissue observable microscopy,” RIKEN Summer School 2016, No.43(2016)(Poster award - engineering prize - 受賞).
6. 戸田圭亮, 磯部圭佑, 並木香奈, 河野弘幸, 宮脇敦史, 緑川克美, “三光子励起蛍光を用いた三次元構造化照明顕微鏡,” 理研シンポジウム第4回「光量子工学研究」, PS-07(2016)(第4回RAPシンポジウムポスター賞 受賞).
7. K. Toda, K. Isobe, K. Namiki, H. Kawano, A. Miyawaki and K. Midorikawa, “Multi-photon microscopy using interferometric temporal focusing,” 第9回光拠点シンポジウム, E87(2017).
8. K. Toda, K. Isobe, K. Namiki, H. Kawano, A. Miyawaki and K. Midorikawa, “Multi-photon microscopy using interferometric temporal focusing,” 4D細胞計測プロジェクト全体会議, No.2(2017).
9. 戸田圭亮, 磯部圭佑, 並木香奈, 河野弘幸, 宮脇敦史, 緑川克美, “干渉時空間集光顕微鏡を用いた二色イメージング,” 第17回レーザー学会東京支部研究会, No.27(2017).
10. K. Toda, K. Isobe, K. Namiki, H. Kawano, A. Miyawaki and K. Midorikawa, “3-photon interferometric temporal focusing microscopy,” ISIF 2017, P45E(2017).

11. K. Toda, K. Isobe, K. Namiki, H. Kawano, A. Miyawaki and K. Midorikawa, “Super-resolution, deep-tissue observable microscopy,” RIKEN Summer School 2017, No.48(2017).
12. K. Toda, K. Isobe, K. Namiki, H. Kawano, A. Miyawaki and K. Midorikawa, “Interferometric temporal focusing microscopy using three-photon excitation fluorescence,” 理研シンポジウム第5回「光量子工学研究」, PS-09(2017).