

時空間集光パルスの補償光学システムの開発

Development of an adaptive optics system for a wide-field temporal focusing pulse

石川 智啓 (D3), 稲澤 健太 (M2)

Tomohiro Ishikawa, Kenta Inazawa

Abstract

We developed an adaptive optics (AO) system for a wide-field temporal focusing pulse, which is based on structured illumination microscopy. This scheme allows us to perform AO with a thick sample and/or strong background fluorescence. We confirmed that the AO system works well with an agarose gel containing mixed fluorescent beads. After AO, quality of the two-photon image was improved in contrast enhancement and background fluorescence suppression.

1. はじめに

広視野時空間集光顕微鏡 [1,2]はレーザー光の走査なしに断層像が取得できる多光子顕微鏡であり、高速なイメージング手法として期待されている。通常の多光子励起蛍光顕微鏡では、広視野化のために対物レンズの NA を小さくすると光軸方向分解能が著しく劣化する。時空間集光顕微鏡では角度分散されたフェムト秒パルスを再集光することで、光軸方向分解能の劣化を抑制できる。これは、波長分散素子で角度分散され伸長したパルスが再度空間的に金合わされることで、元のパルス幅が再生する焦点面深度近傍に多光子励起領域が局所化されるという原理に基づく。

時空間集光顕微鏡では、照射パルスの群速度分散を操作することで時間集光面を光軸方向に変位できる [3]。これは角度分散されたフェムト秒パルスには時空間結合が生じ、スペクトル位相が波面に交換されるためである。そのため、パルスの群速度分散を操作することで波面の曲率を操作でき、焦点面の変位が得られる。一方、このことは3次以上の高

次分散によって波面歪みが生じることを示唆する。高次分散は信号の低下や光軸方向分解能の劣化につながるため、光学系や試料に応じて分散を補償する必要がある。走査型多光子顕微鏡では高次の分散を補償するため、波形整形器と位相最適化アルゴリズムを用いて分散補償が行われている。試料内部で発生する多光子励起信号が大きくなるように動作させることで、試料内で分散補償ができる。しかし、時空間集光顕微鏡にこの手法を適応するには、励起領域より薄い試料を使用し、励起領域中でのパルス幅の変化を小さくする必要がある。また、焦点面と比較し焦点面外に強い背景蛍光が存在する条件では背景蛍光が強くなるように動作するため、その抑制する必要がある。線集光走査型時空間集光では分光軸と直交する軸にも空間集光特性が得られ、広視野時空間集光と比較し光軸方向分解能が高いため、これらの要件が緩和される。しかし、断層像取得には空間的1次元走査が必要であり、イメージング速度は広視野時空間集光には及ばない。そのため、広視野時空間集光顕微鏡において上記の条件でも動作可能な分散補償手法が必要である。

本研究では、分散補償による広視野時空間集光パルスの補償光学技術として、構造化照明 (SIM) [4]を組み合わせる手法を開発した。SIMは縞状に整形した照射光を用いる超解像技術であり、SIMによって実際の励起領域より光軸方向において小さい領域から信号を抽出できる。そのため、検出領域内における時空間集光パルスのパルス幅変化を小さくできる。ゆえに、厚い試料でも分散補償が行える。また、SIMにより背景蛍光も抑制されるため、強い

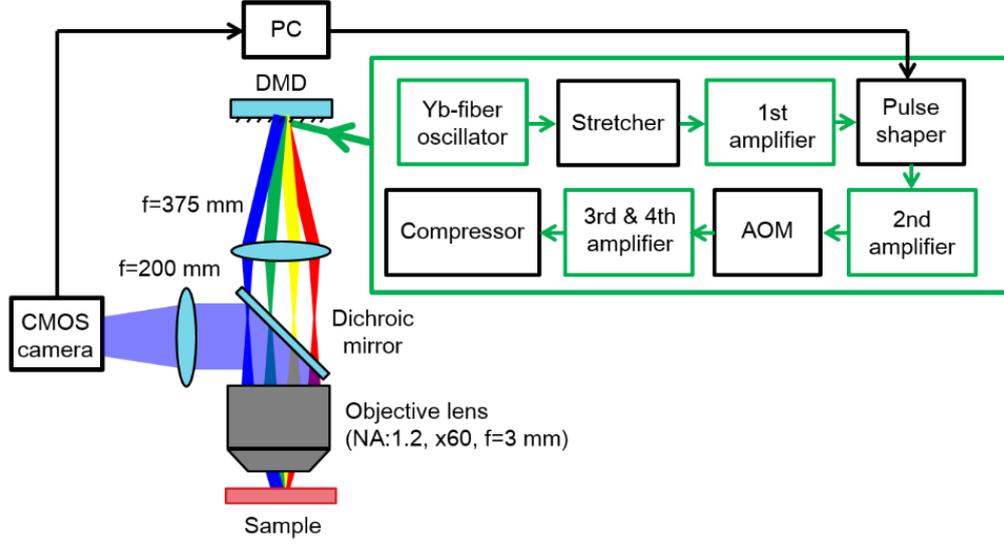


Fig. 1. Configuration of the AO system.

背景蛍光が存在する条件でも分散補償が可能である。以下では、本手法の理論と実験系、実験結果について報告する。

2. 理論と実験系

分散補償を行うため、局所周波数の位相変調によって最適位相を取得する方法を用いた。ある局所周波数における位相が変調されたパルスの電場 $\tilde{E}_m(\omega)$ は周波数領域において、

$$\tilde{E}_m(\omega) = \tilde{E}(\omega) + \tilde{E}(\omega)\delta(\omega - \omega_m)[\exp(i\phi_m) - 1] \quad (1)$$

と表される。ここで、 $\tilde{E}(\omega)$ は変調前のパルス電場、 $\delta(\omega - \omega_m)$ はディラックのデルタ関数、 ω_m は変調する局所周波数、 ϕ_m は変調によって局所周波数に与える位相である。式(1)を時間領域で表現すると、

$$E_m(t) = E(t) + \tilde{E}(\omega_m)[\exp(i\phi_m) - 1] \quad (2)$$

となる。このとき、位相変調によって生じる SH

電場 $\tilde{E}_m^{(2)}(t)$ を考えると、式(2)より

$$\begin{aligned} \tilde{E}_m^{(2)}(t) &= E_m^2(t) \\ &= E^2(t) + 2E(t)\tilde{E}(\omega_m)[\exp(i\phi_m) - 1] \\ &\quad + \tilde{E}^2(\omega_m)[\exp(i\phi_m) - 1]^2 \\ &\approx E^2(t) + 2E(t)\tilde{E}(\omega_m)[\exp(i\phi_m) - 1] \quad (3) \end{aligned}$$

となる。ここで、第3項は第1項、2項と比較し小さいため無視した。強度は電場の2乗に比例するた

め、SH強度 $I_m^{(SH)}$ は

$$\begin{aligned} I_m^{(SH)} &\approx I^2(t) + 2I(t)E^*(t)\tilde{E}(\omega_m)[\exp(i\phi_m) - 1] \\ &\quad + 2I(t)E(t)\tilde{E}^*(\omega_m)[\exp(-i\phi_m) - 1] \\ &\quad + 4I(t)\tilde{I}(\omega_m)[2 - \exp(i\phi_m) - \exp(-i\phi_m)] \quad (4) \end{aligned}$$

となる。ここで、式(4)のSH強度に対してホモダイナ計測を行うと、周波数領域で得られるホモダイナ信号は以下の式(5)のように

$$\begin{aligned} H(\omega) &= \sum_{m=0}^{n-1} I_m^{(SH)} \exp(-i\phi_m) \\ &\approx n[2I(t)E^*(t)\tilde{E}(\omega_m) - 4I(t)\tilde{I}(\omega_m)] \\ &\approx 2nI(t)E^*(t)\tilde{E}(\omega_m) \\ &= 2nI(t)|E(t)||\tilde{E}(\omega_m)|\exp[i\{\phi(\omega_m) \\ &\quad - \phi(t)\}] \quad (5) \end{aligned}$$

と求まる。ここで、 $n \geq 3$ は0から 2π までの局所周波数変調における分割数である。このホモダイナ信号を時間領域で表すと

$$\begin{aligned} H(t) &= 2n[E^2(t)]^* \\ &\quad \otimes [|E(t)||E(\omega_m)|\exp[i\{\phi(t) - \phi(\omega_m)\}]] \quad (6) \end{aligned}$$

となり、パルス電場と変調された局所周波数電場との位相差が求まる。ゆえに、 $\phi(t) - \phi(\omega_m) = 0$ を満たす $\phi(\omega_m)$ を変調した局所周波数に与えることで、その局所周波数における位相歪みを補償できる。こ

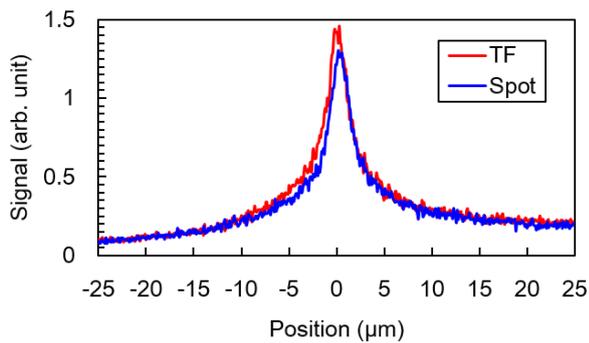


Fig. 2. Comparison of the axial responses.

の処理をパルスを構成する全ての周波数に適用すれば分散が補償される。実験では、波形整形器中の空間光変調器 (SLM) を用いて局所周波数の位相変調を行った。

Fig. 1 に実験系を示す。光源として、Yb ファイバー発振器および4段のYb ファイバー増幅器で構成される自作のレーザーシステムを使用した。発振器からの出力をファイバーストレッチャーによって伸長し、チャープパルス増幅を行った。低次の分散は主に回折格子対で補償し、高次の分散は波形整形器で補償した。また、音響光学素子 (AOM) によってパルスの繰り返しを制御した。出力 4.2 W、繰り返し 3.3 MHz、中心波長 1055 nm、パルス幅 100 fs のパルスが得られた。4-f 光学系を介して試料と共役な位置に配置されたデジタルマイクロミラーデバイス (DMD) に照明光を入射させ、回折光を試料に導いた。DMD は SIM における照射光の縞パターン整形にも使用した。分光された照明光を開口数 1.2、倍率 60 倍、焦点距離 3 mm の水浸対物レンズで試料に集光した。発生した二光子蛍光をダイクロイックミラーで照明光と分離し、CMOS カメラに結像させて蛍光画像を取得した。

3. 実験結果

補償アルゴリズムの検証のため、Fig. 1 中の DMD を平面ミラーに、CMOS カメラを光電子増倍管

(PMT) に置き換え、分散補償を行った。この構成ではパルスは角度分散されないため時空間集光ではなく、走査型多光子顕微鏡と同様に厚い試料でも分散補償が行える。試料にはローダミン B 溶液を分散させたアガロースゲルを使用した。補償開始時の SLM のマスクはフラットとし、末端のピクセルから 1 ピクセルずつ局所周波数の位相変調による分散補償を 2 周施した。補償後には PMT の信号値が 3.0 倍上昇するとともに、干渉自己相関計測でピークとバックグラウンドの比が 8:1 に近い結果が得られた。これにより、補償アルゴリズムによって分散補償ができることを確認した。この条件を Spot と呼ぶこととする。その後、平面ミラーを DMD に、PMT を CMOS カメラに戻し、時空間集光の構成で再度 1 周だけ補償を施した。試料は Spot と同じものを使用した。ここでは補償の信号値として、SIM 画像強度を参照した。補償後の信号値は、補償前と比較し 1.2 倍になった。この時空間集光の条件を TF と呼ぶこととする。Fig. 2 は Spot と TF で得られた 2 つの異なるマスクにおける光軸方向応答の比較である。試料として直径 200 nm の蛍光ビーズの単層シートを使用し、12.9 mW 入射させて PMT で二光子信号を計測した。Fig. 2 より、二光子蛍光信号は TF の方が強くなっている。これは、Spot の条件で補償されるのはチャープのみであり、TF の条件で補償することでチャープに加えて光学系の収差も補償できたためと考える。半値全幅は Spot、TF ともに 3.5 μm であった。

直径 200 nm と 2 μm の蛍光ビーズを混合しアガロースゲル中に固定した試料で補償を行った。意図的に収差を与えるため、対物レンズとゲルの間のカバーガラス表面にマニキュアを塗った。マニキュアの白濁による散乱のため、入射パワーを 257 mW と高めに設定した。補償開始時のマスクは平面ミラーと PMT を使用した補償で得たマスク (Spot) とし、補償を 1 周だけ施した。この結果を Fig. 3 に示す。

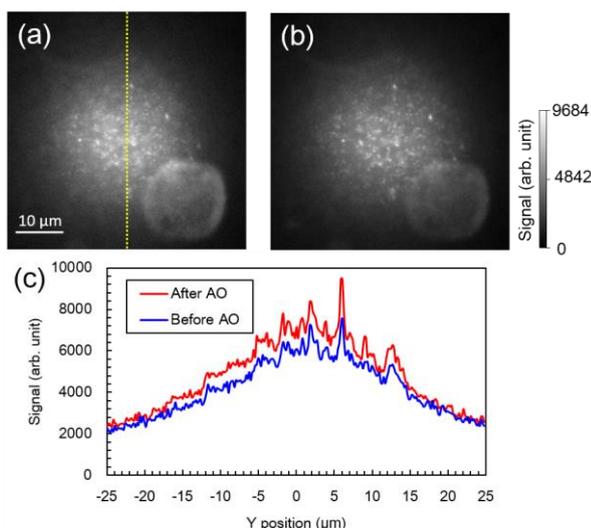


Fig. 3. (a,b) Two-photon fluorescence images: (a) before AO, (b) after AO. (c) Cross sections (yellow dotted line in (a)).

Fig. 3 (a), (b)の二光子蛍光画像の右下には直径 $2\ \mu\text{m}$ の蛍光ビーズによる強い背景蛍光が見えており、この条件でも補償を行うことができた。補償後には焦点面に存在する直径 $200\ \text{nm}$ の蛍光ビーズのコントラストが向上し、直径 $2\ \mu\text{m}$ の蛍光ビーズによる背景蛍光が抑制されることを確認した。Fig. 3(c)の断面プロファイルでは焦点面に存在する直径 $200\ \text{nm}$ の蛍光ビーズの信号が上昇しており、コントラスト向上につながったと考える。

4. まとめ

分散補償による広視野時空間集光パルスの補償光学技術として SIM を組み合わせた手法を開発した。SIM を用いることで厚い試料や強い背景蛍光が存在する条件でも分散補償が可能であることを実験で確かめた。また、補償によって二光子蛍光画像におけるコントラストの向上と背景蛍光の抑制を確認した。

謝辞

本研究は国立研究開発法人理化学研究所光量子工学研究センターアト秒科学研究チーム主任研究員緑川克美博士に実験環境を提供していただき、磯部圭佑博士の指導を受けて行われました。本研究は、JST CREST Grant Number JPMJCR1851, MEXT/JSPS KAKENHI Grant Number JP18H04750 “Resonance Bio”の支援を受けたものです。また、本研究は理研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。厚くお礼申し上げます。

References

1. D. Oron, E. Tal, and Y. Silberberg, "Scanningless depth-resolved microscopy," *Opt. Express* **13**, 1468–1476 (2005).
2. G. Zhu, J. van Howe, M. Durst, W. Zipfel, and C. Xu, "Simultaneous spatial and temporal focusing of femtosecond pulses," *Opt. Express* **13**, 2153 (2005).
3. M. E. Durst, G. Zhu, and C. Xu, "Simultaneous spatial and temporal focusing in nonlinear microscopy," *Opt. Commun.* **281**, 1796–1805 (2008).
4. M. G. L. Gustafsson, "Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy," *J. Microsc.* **198**, 82–87 (2000).