

時空間集光 2 光子励起顕微鏡の動作解析

Numerical analysis of Simultaneous Spatial and Temporal Two-photon Excitation

Fluorescence Microscopy

中村葵(B4)、宋啓原(M2)

Aoi Nakamura and Song Qiyuan

Abstract

We report the numerical analysis of SSTF (simultaneous spatial and temporal focusing) in two photon excitation fluorescence microscopy. The characteristics of SSTF are visualized by simulation and compared with our experimental results.

1. はじめに

多光子励起蛍光顕微鏡は励起光強度の 2 乗に比例した蛍光励起が起こることを利用し、光軸方向に高い分解能を有する顕微鏡である。さらに、長波長の光を用いて蛍光体を励起できるので、1 光子波長に大きな吸収をもつ材料でも深部まで光を伝達させることができ、1 mm 以上の厚さのサンプルの観察が可能である[1]。

時間集光ではパルスが焦点面でのみ最も短くなるという性質をもつことから、背景光を抑制することができる。さらに、通常の 2 光子顕微鏡ではサンプルを光軸方向にシフトさせて走査するが、時間集光を用いると、GDD を変化させることで光軸方向のシフトが可能になる。その原理を Fig.1 示す。回

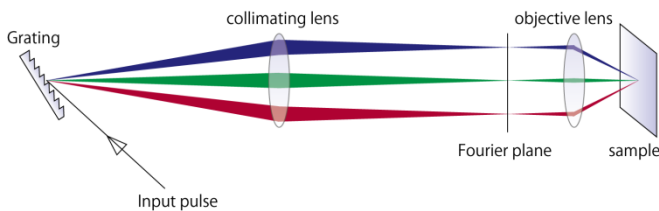


Fig.1. SSTF setup

折格子によって各波長は空間的に角度分散をもって回折し、それぞれの波長は円筒レンズによってコリメートされ、対物レンズの後ろ焦点面で再び重なる。対物レンズの焦点面においてのみ各波長成分が再び重なることで、パルス幅が焦点面で最も短くなる。時間集光の最大の特徴は画像の取得時間が短縮可能である点であり、5 μm の z 軸分解能で 140 μm^2 のイメージを 30 sec で取得されることが報告されている[2]。また、2 次の分散を入力波形に与えることで、焦点面を z 軸方向に移動させることも可能である [3]。

本研究では、時間集光 2 光子励起顕微鏡の特性を数値解析によって可視化し、さらに実験との比較を行った。

2. 数値解析

数値解析には Fourier 光学系におけるビーム回折解析の方法[4]を利用した。パラメータは Table 1 に示すように設定した。ただし、入力パルスは周波数域と空間領域においてガウス型とした。セットアップは Fig.1 に示した。

入力波形は式(1)のように設定した。

$$e_{in}(x, \omega) = \exp(-\omega^2/a^2) \cdot \exp(-x^2/A^2) \cdot \exp(i\varphi(\omega)) \quad (1)$$

回折格子の入射直前の電界包絡線が $E_{in}(\beta x, \Omega)$ で表される場合、回折直後の複素光電界は式(2)で表される。ただし $\Omega = \omega - \omega_0$ であり、 d は溝間隔、 θ_i は入射角、 θ_d は回折角である。焦点距離 f のレンズの

前焦点面における複素光電界を $E(x, -f, \omega)$ と表したときに、レンズの後ろ焦点面 $z = f$ における複素光電界は式(3)で表される。以上の式から 2 光子励起スペクトルを得るため、資料面での SH(Second Harmonic) 光の電界の計算を行った。

さらに、 $z = z_0$ での複素光電界を $e(k, z_0, t)$ で表したとき、 $z = z_1$ まで z 方向に伝搬した複素光電界を式(4)で定め、資料面を z 軸方向に前後させた時の SH 光の電界も同様に計算した。

$$E(x, \omega) = \sqrt{\beta} \cdot E_{in}(\beta x, \Omega) \exp(i\gamma\Omega x) \quad (2)$$

$$[\beta = \cos(\theta_i) / \cos(\theta_d), \quad \gamma = 2\pi/\omega_c d \cos(\theta_d)]$$

$$E(x, f, \omega) = \sqrt{\frac{2\pi}{\lambda f}} \tilde{E}\left(\frac{2\pi x}{\lambda f}, -f, \omega\right) \quad (3)$$

$$[\tilde{E}(k) = F_x\{E(x)\}]$$

$$\tilde{e}(k, z_1, t) = \tilde{e}(k, z_0, t) \exp\left\{-\frac{i(z_1 - z_0)\lambda k^2}{4\pi}\right\} \quad (4)$$

Table 1. The Parameter of SSTF

(a) Input pulse

| | |
|--------------------|--------|
| Center frequency | 830 nm |
| Bandwidth | 80 nm |
| Beam diameter(1/e) | 3 mm |

(b) Grating

| | |
|---|-------------|
| Groove number | 150 /mm |
| Angular dispersion coefficient α | 0.055 |
| γ parameter | 0.417 ps/mm |

(c) Lens

| | |
|--------------------------|--------|
| Focal length (col. lens) | 400 mm |
| Focal length (obj. lens) | 9 mm |

3. 数値解析結果

A. 時間集光特性

時間集光における z 軸方向分解能は $13.2 \mu\text{m}$ (FWHM)となった。さらに、 z 軸方向に観察面をシフトさせたときの周波数に対する x 軸(光軸に垂直

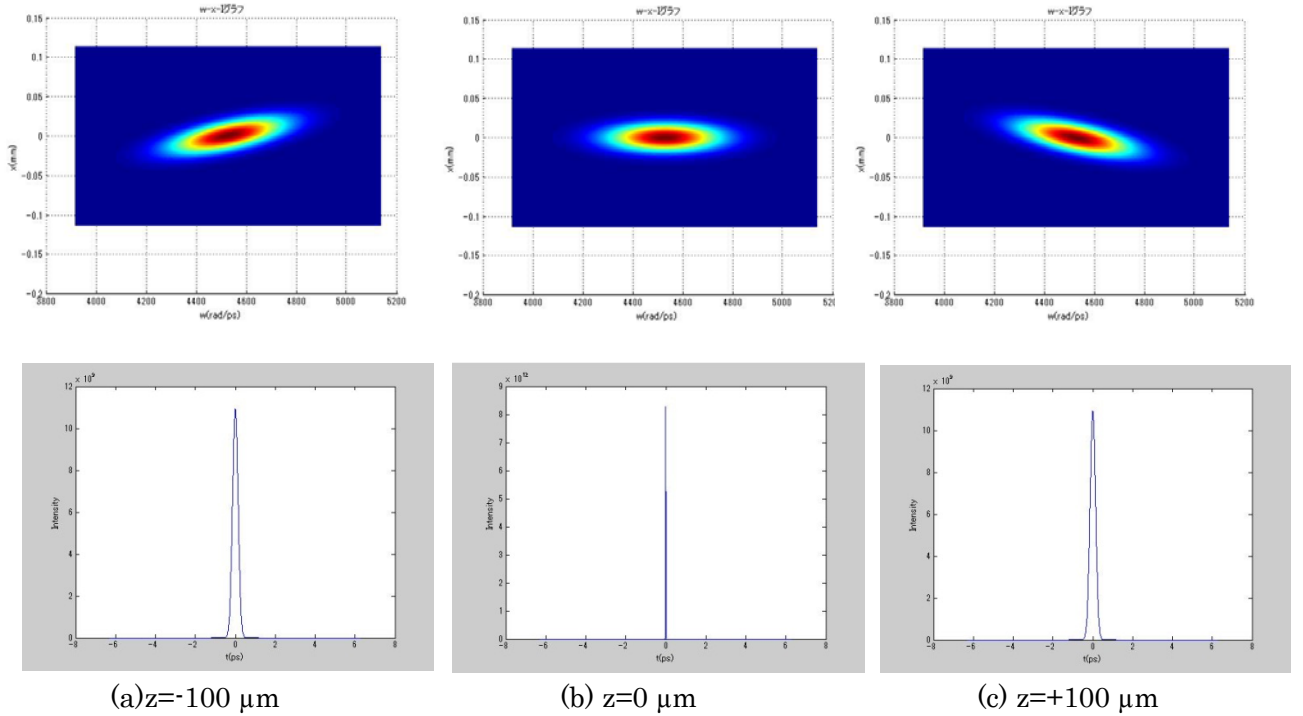


Fig.2. Variations of $t - \omega$ profile and intensity in the TPF along z -direction near the temporal focus.

な軸)の様子と時間軸に対する SH 強度($x=0$ の面)の様子を Fig.2 に示した。この結果から焦点面で角周波数成分が重なり合い、パルス幅は最も短く、強度が強くなっているのに対し、焦点面前後では各周波数成分の重なりが悪くなり、パルス幅は広がり、強度が低下していることがわかる。続いて、入力波形に 2 次の分散を与え、焦点面を前後させたときの z 軸方向に対する SH 強度を示したものが Fig.3 である。これより 2 次の分散を与えることによって焦点面の z 軸方向シフトが可能であることがわかる。単位シフト量当たりの GVD の変化は $45 \text{ fs}^2/\mu\text{m}$ となった。

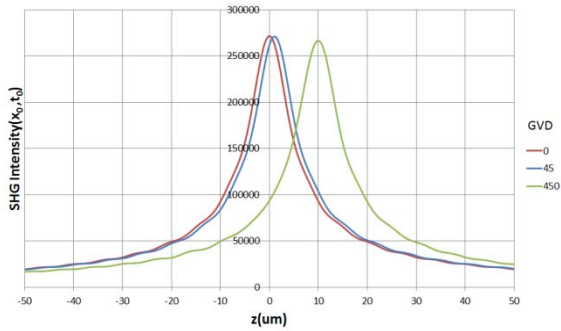
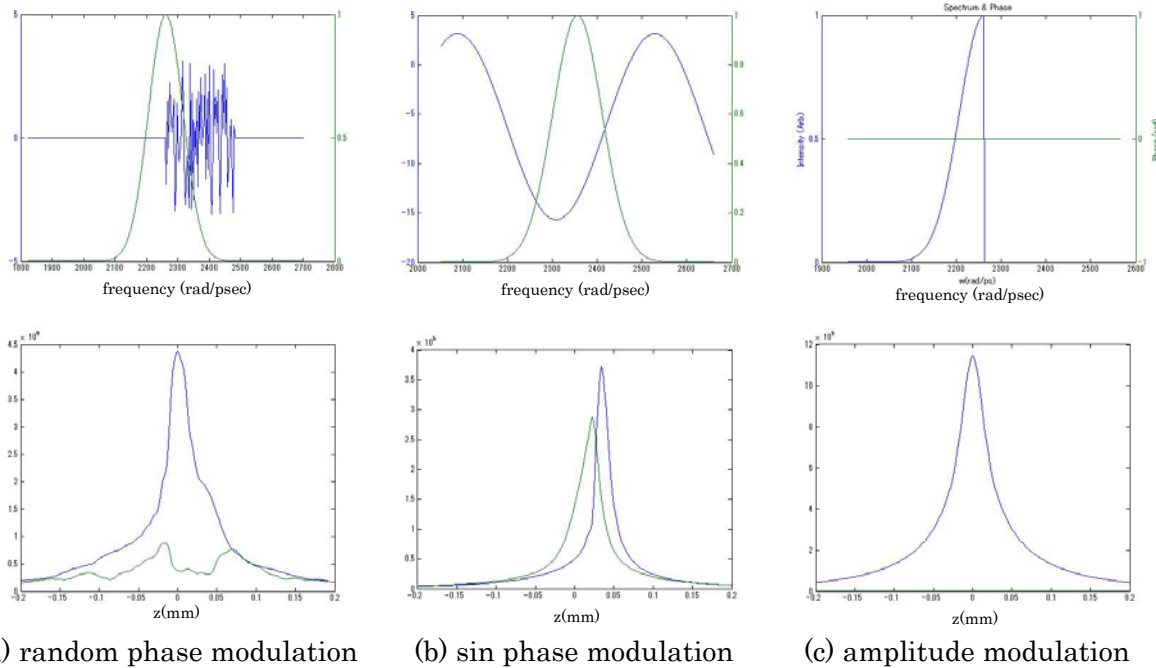


Fig.3. The shift of focal plane by GVD

B. 選択的 2 光子励起

広帯域フェムト秒レーザーパルスのスペクトル位相を制御し 2 倍高調波スペクトルを整形することで、異なる蛍光タンパク質を選択的に 2 光子励起できることが実験的に示されている [5]。このアイデアを時間集光に導入したときの z 軸方向での選択励起特性を数値解析によって確かめた。Fig.4 に結果を示す。上段は周波数に対する入力波形と位相のグラフであり、下段はそのときの z 軸方向に対する SH 光強度のグラフである。ただし青線は中心周波数以下の SH 光強度を時間積分したグラフ、緑線は中心周波数以下の SH 光強度を時間積分したグラフである。(a)は SH 光強度を低下させるように SA 法によって作り出したランダムな位相変調を 高周波側に加えた時のグラフであり、そのときの SH 光強度は高周波側が抑制されており、選択励起が実現されていることがわかる。続いて正弦型位相変調を与えた時のグラフが (b) である。周波数 2430 rad/sec について点对称になるように位相変調をかけ、SH



(a) random phase modulation (b) sin phase modulation (c) amplitude modulation

Fig.4. The spectral phase profiles and corresponding two-photon excitation rates for selective excitation intensity of the Selective excitation by phase modulation.

光強度が高くなるように設定してあるが、低周波部分で発生する SH 光が抑制されなかったため、選択的な励起は達成できなかった。(c)では高周波側に振幅変調をかけ、SH 光を抑制することで選択的な励起を達成した。

しかし、位相変調をかけることによって FTL が崩れてしまい、位相をかけない場合と比較してランダムな位相変調では SH 光強度の z 軸解像度は 4~5 倍劣化した。また、振幅変調では励起光のスペクトル帯域が狭くなってしまったために z 軸解像度は 4 倍程度になった。

したがって、位相変調・振幅変調をかけることによって選択的な 2 光子励起は可能になるが、z 軸解像度が著しく低下してしまうことがわかった。

C.和周波発生を利用した背景光の抑制

ここでは時間集光においてパルスの長波長帯と短波長帯の間での和周波(SF)混合のみを利用し、中心波長帯での SH を除くことで背景 SH 成分を抑制し、z 軸方向の分解能が改善できることを示す。方法は論文[5]を参考にした。ガウス型波形の中心周波数部分をブロックすることで二つの周波数帯域を作り出す。(Fig.5)ブロックする周波数の範囲は 0 rad/psec から 200 rad/psec(中心周波数±100 rad/psec)まで変化させて、そのときの SH 光の半値全幅を求めた。この方法では Fig.6 のように和周波発生による SF 光の両側に長波長帯、短波長帯の SH 光が発生してしまうため、SF 光のみを透過させるフィルターを用いた。この結果、ブロックする周波数が 130 rad/sec であるときに最も SF 光の半値全幅が狭くなることがわかった。Fig.7 は時間方向に積分した x=0 の位置での z 軸に対する SFG 強度のグラフである。(a)がブロックをしないときであり、(b)が 130 rad/sec の周波数の範囲でブロックをかけたときである。この二つを比較すると、z 軸解像度は 13.2 μm から 10.3 μm まで向上し、背景

光も抑制されていることがわかる。

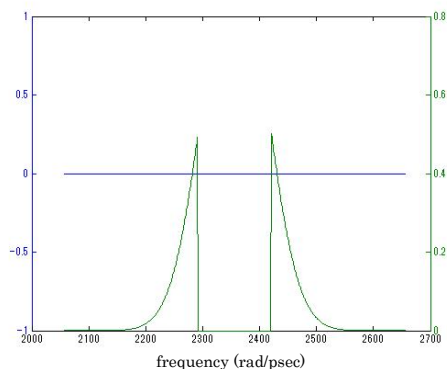
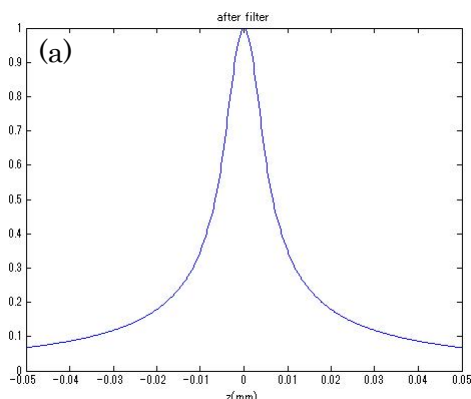


Fig.5. Input laser spectrum.(the blocked region is 130 rad/psec.)



Fig.6. SFG and SHG intensity distributions.



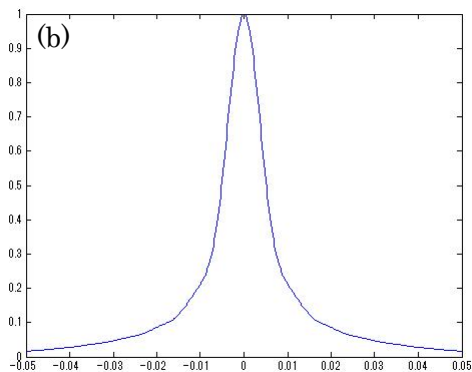


Fig.7. (a) SHG intensity without beam block and (b) SFG intensity with beam block.

4. 実験

チタンサファイアフェムト秒レーザー（中心周波数 835 nm、スペクトル幅 70 nm、平均パワー130 mW、繰り返し周波数 150 MHz）を用いた実験セットアップを Fig.9 に示す。回折格子の溝本数は 150 本/mm、コリメートレンズの焦点距離は 400 mm、対物レンズの焦点距離は 9 mm、NA は 0.4 のものを用いた。中心周波数 850 nm のフェムト秒パルスレーザーは SLM を含む波形整形器に入射し、光学系で生じる分散補償を行う。二光子蛍光の z 軸解像度を評価するために、BBO 結晶(厚さ 300 μm)を用いて SHG を発生させて評価した。BBO 結晶を z 軸方向にシフトさせ、各点での SH 光を光電子増倍管で検出した値を深さ方向に微分した結果を Fig.10 に示す。これより、SHG の z 軸解像度は 15 μm であった。シミュレーションの結果と比較して、分解能が低いのは、結晶において SHG 発生以外に自己位相変調等の非線形効果が発生しているか、散乱光が原因だと考えられる。

5. まとめ

シミュレーションを用いて時間集光特性を可視化し、 z 軸方向の分解能について実験との比較を行

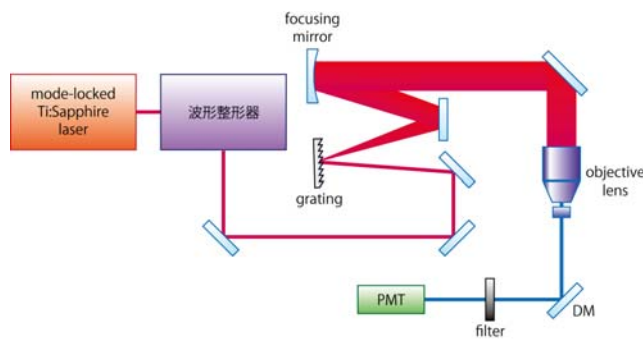


Fig.9. Experimental setup of our SSTF.

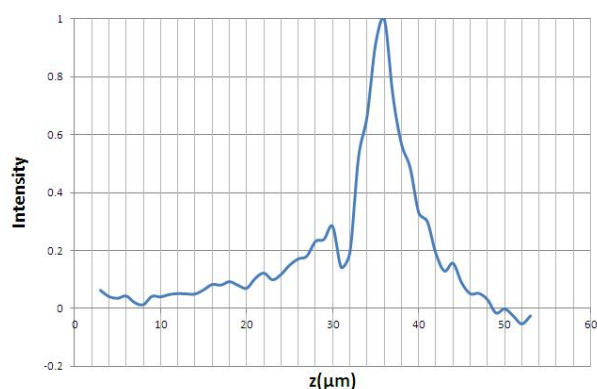


Fig.10. SHG intensity distribution.

なった。また、時間集光における選択的 2 光子励起では選択的な励起は出来るが、 z 軸解像度は劣化する。和周波発生を用いた方法では背景光の低下による z 軸分解能の向上が確かめられた。

References

- [1] Helmchen, F. & Denk, W. Nat. Methods **2**, 932-940. (2005)
- [2] E. Tal, D. Oron, and Y. Silberberg, Opt. Lett. **13**, 1468-1476 (2005).
- [3] M. E. Durst, G. Zhu, and C. Xu, Opt. Express **14**(25), 12243-12254 (2006).
- [4] M. M. Welfers and K. A. Nelson, IEEE J. Quantum Electron. **32**, 161, (1996)
- [5] Durst, Michael E; Straub, Adam A; Xu, Chris, Opt. Lett. **34**, 12, 1786-1788 (2009)