

生態組織解明に向けた広視野且つ高時空間分解能獲得のための
時間多重化時空間集光技術の解析

Calculation of the time-multiplexing temporal focusing technique for acquiring wide-field
and high spatiotemporal resolution in order to investigate the biomedical tissue.

稲澤 健太 (B4), 石川智啓(D1)
Kenta Inazawa, Tomohiro Ishikawa

Abstract

Temporal focusing (TF) technique is often used for wide-field microscopy because it can provide the optical sectioning capability. However, the axial resolution, where only one spatial dimension is temporally focused, is lower than the conventional point focusing. Therefore, we propose a time-multiplexing multi-focal temporal focusing (TMTF) scheme which can acquire the axial confinement that is almost equal to that of the point focusing.

1 はじめに

我々が生体の脳の活動を解明するためには、細胞レベルでの応答を観測しなくてはならない。任意の細胞に発現できるロドプシン [1]が発見されたことにより、光刺激によって強制的に信号の伝達を観測することが可能となった。生体への光刺激を実現する手法のひとつとして、時空間集光 (TF)技術 [2]が上げられる。時空間集光は、パルス幅が伝播と共に変化し、焦点面において最も短いパルスとなるため、広視野照明を可能としながら、二光子励起範囲を光軸方向に局所化することが可能となる技術である [3]。ところが、通常の 1 次元時空間集光は、4-f 光学系において、1 次元方向 (x 軸) にのみ波長分散を与え、二つ目の対物レンズで試料内部に集光する形をとるため、光軸方向の分解能は、レーザー走査型のポイント集光に比

べると低い。この問題を解決するために、マイクロレンズアレイを用いた多焦点多光子顕微鏡における光軸方向の分解能を向上させる時間分割多重化技術 [4]を時空間集光顕微鏡に応用し、分解能を改善することに成功している [5,6]。この技術は、回折格子で分光する軸(x 軸)と垂直な軸(y 軸)において、離散的な時間遅延を与え、相対的に空間コヒーレンスを低下させることで実現できる。相対的空間コヒーレンスが落とされたレーザーは、干渉を起こさなくなり、回折しながら伝播するため、回折格子上の各点が試料内部に集光される。これにより、本来 1 次元時空間集光だけでは集光されることの無かった y 軸方向の光は、対物レンズで集光されることとなり、ポイント集光と同等の光軸方向の分解能を獲得することができる。

時間分割多重化を実現する方法として、Virtually Imaged Phased Array (VIPA) [7] や反射型 Echelle gratig が用いられている [5,6]。VIPA の場合、集光入射が必要となるため、光強度が VIPA の損傷閾値に制限されてしまう。これにより 1 度で照射できる視野が光強度によって決められてしまう。

そこで、我々は、視野拡大の際、高強度光照射可能な透過型 Echelle grating の使用を視野に、時間多重化時空間集光におけるパルス光による二光子励起蛍光強度の計算を定量的に得ると同時に、透過型 Echelle grating の最適設計値を解析した。

2 時間多重化時空間集光の概念

Fig1 上図に示すように、1次元時空間集光の場合、波長分散を与えないy軸方向の光は、試料面で平行光で照射されるため、高い光軸方向の分解能を獲得できない。一方で、Fig1 下図のように、相対的空間コヒーレンスを低下させてあげることによって、回折格子上の各点が試料内部に集光されるような形を取る。空間コヒーレンスを低下させるためには、Fig2 のように空間的に離散的な時間遅延を与える必要がある。このとき、与える時間遅延が、コヒーレンス時間(パルス幅)より長ければ、空間コヒーレンスは低下し、干渉は起きない。また、離散的に与える時間遅延の数に応じて、ビームが時間的に分割される。従って、時間遅延量と、ビーム分割数を変更することによって、得られる光軸方向の分解能への影響を解析する。

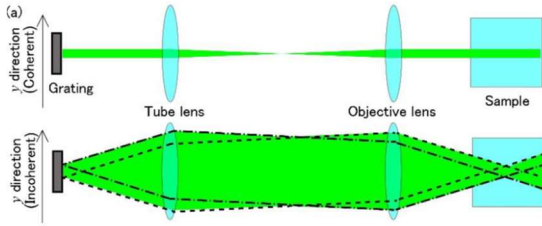


Fig1. Degradation of spatial coherence in temporal focusing.

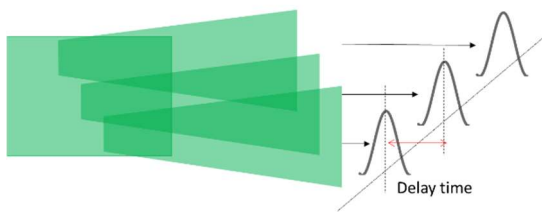


Fig.2 Schematic of time multiplexed pulses

3 時間分割多重化時空間集光における理論

上述したように、時間分割多重化時空間集光による効果を最大に引き出すためには、時間遅延量とビーム分割数を決定する必要がある。そのため

我々は、時間分割多重化時空間集光を励起光とした2光子蛍光強度を電場分布から計算によって取得し、そこから遅延時間量と、ビーム分割数の最適値を解析した。

光軸方向の分解能を定量化するために、[2]より時空間集光の励起光による光軸方向のm光子励起蛍光強度 $R_{TF}(z)$ と、時間分割多重化時空間集光の励起光によるm光子励起蛍光強度 $R_{TMTF}(z)$ は次の(1),(2)式のように書ける。

$$R_{TF}^{(m)}(z) \propto \left\{ 1 + \left(\frac{\Delta z}{z_R} \right)^m \right\}^{-\frac{1}{2}} \quad (1)$$

$$R_{TMTF}^{(m)}(z) \propto \left\{ 1 + \left(\frac{\Delta z}{z_R} \right)^m \right\}^{-1} \quad (2)$$

ここで、 z_R はレイリー長を表し、 Δz は焦点面からの距離である。

上記の原理で具体的に設計できるパラメータとして、Fig. 3に示すようにビームの分割数nと、時間遅延 τ が想定できる。このパラメータをもとに、光軸方向における二光子励起蛍光強度の計算を行った。

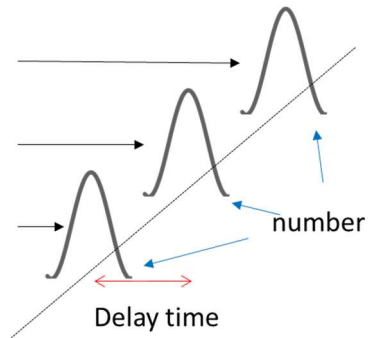


Fig. 3 Schematic of time multiplexed pulses

i. 分割数による影響

ビームの分割数を変えることで深さ方向の分解

能の比較を行った。 Fig. 4 に示すように、ただの時空間集光に比べ、分割数が増えていくにつれて深さ方向の分解能が向上しており、分割数が 30 程度になると、ポイント集光と同程度の分解能が得られていることが確認できた。このことより、分割数が増えることによって、実質的な NA が向上しているということがわかる。従って、使用する対物レンズの NA に合わせて分割数を決定することにより、時間多重化時空間集光の効率を最も引き出すことができる。

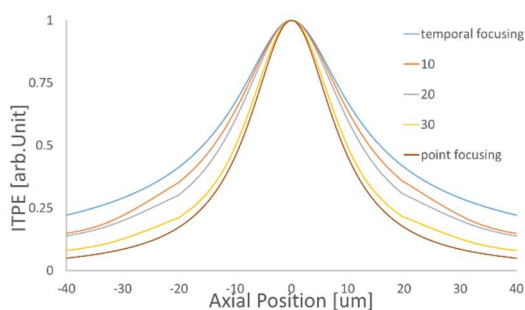


Fig. 4 The comparison of Intensity two-photon excitation by the difference of the number of the beam.

ii. 遅延時間による影響

遅延時間を 260 fs と 850 fs 変化させることで、深さ方向の分解能の比較を計算した結果を Fig. 3 に示す。比較のため、時間多重化において干渉が起きない場合(Extreme)を用意した。 Fig. 3 に示すように干渉が起きない場合に比べても、時間遅延 260 fs, 850fs の深さ方向の分解能(半値幅)はいずれも 8.9 μm と変化せず、時空間集光のみの半値幅に比べると 4.38 倍ほど向上している。焦点外から離れた位置での蛍光強度を比較すると、干渉なしに比べ、遅延時間 260 fs, 850 fs, の蛍光強度が上昇している。このことにより、干渉が起き焦点面外での励起が発生していることが予想できる。実際に、干渉が起き始めたと予想できる位置におけるパルス幅を計算したところ、遅延時

間 $\Delta t = 260$ fs の時では、270 fs, 遅延時間 $\Delta t = 850$ fs の時では 885 fs と概ね対応していることがわかった。

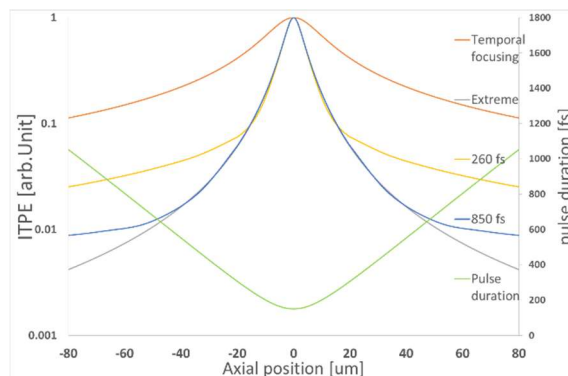


Fig. 5 The comparison of Intensity two-photon excitation by the difference of delay time.

4. まとめ

時間多重化時空間集光によるパルス光が励起する二光子励起蛍光強度を計算し、その評価を行った。分割数が増えると、広がり角は大きくなり、実効的 NA が大きくなる。そのため、実際に使用する対物レンズの NA を考慮し、光損失のないよう分割数を設計する必要がある。

例えば、中心波長 1060 nm, 時間多重化プレート時でのビーム径 3 mm、倍率 50 倍で NA が 0.65 である対物レンズを使用する場合、分割数は 60 が最適である。60 より少なければ、対物レンズの瞳最大限まで励起光は通過しないため、深さ方向の分解能は低下する。また、60 よりも多ければ対物レンズの瞳の外を励起光は通過し、光損失が出てしまう。そのため、分割数を最適化する必要がある。

時空間集光による二光子蛍光強度の深さ方向の分解能は 39 μm であったのに対し、時間多重化時空間集光技術を用いることで深さ方向の分解能は 8.8 μm と 4.38 倍向上した。時間多重化時空間集光を用いると、時空間集光によって変化するパルス幅が、与えた遅延時間よりも長くなったとき

に、干渉が起きることを確認できた。この干渉が起きない領域はパルス幅に依存し、対象に応じて遅延時間を変える必要がある。

これらの定量的解析により、時間多重化時空間集光の効果を最大限利用することが可能と考えられる。

5. 謝辞

この研究は、国立研究開発法人理化学研究所、に 光量子光学研究領域・アト秒科学研究チーム 緑川克美チームリーダーのもとで行われました。深く感謝いたします。

また、直接の指導をして下さった 磯部圭佑 研究員 に心より感謝申し上げます。

6. Reference

1. A. Pushkarev, K. Inoue, S. Larom, J. Flores-uribe, M. Singh, M. Konno, S. Tomida, A. Philosofof, I. Sharon, N. Yutin, and V. Eugene, "discovered using functional metagenomics," (2018).
2. M. E. Durst, G. Zhu, and C. Xu, "Simultaneous spatial and temporal focusing in nonlinear microscopy," *Opt. Commun.* **281**, 1796–1805 (2008).
3. O. Hernandez, E. Papagiakoumou, D. Tanese, K. Fidelin, C. Wyart, and V. Emiliani, "Three-dimensional spatiotemporal focusing of holographic patterns," *Nat. Commun.* **7**, 11928 (2016).
4. a Egner and S. W. Hell, "Time multiplexing and parallelization in multifocal multiphoton microscopy," *J. Opt. Soc. Am. A. Opt. Image Sci. Vis.* **17**, 1192–201 (2000).
5. Q. Song, A. Nakamura, K. Hirofawa, 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).
6. A. Vaziri and C. V. Shank, "Ultrafast widefield optical sectioning microscopy by multifocal temporal focusing," *Opt. Express* **18**, 19645 (2010).
7. B. Spectroscopy and V. P. Array, "Virtually Imaged Phased Array (VIPA) を用いたブリルアン散乱分光法," **1486**, 2018 (2018).