

時間分割多重化による時空間集光顕微鏡の光軸方向の分解能向上

Improvement in axial resolution of temporal focusing microscopy by time-multiplexed technique.

稲澤 健太 (M1), 石川智啓(D2)

Kenta Inazawa and Tomohiro Ishikawa

Abstract

It is needed to overcome the trade-off which can provide spatial and temporal resolution and wide-field of view, in bio-imaging. Temporal focusing (TF) microscopy that it was shown that high axial resolution can be generated wide-field of view without any mechanical moving parts. However, the achievable axial resolution is not enough because the pupil plane is not fill at the axis perpendicular to the chromatic dispersion axis(y). Here, we demonstrate improvement of axial resolution in TF by degrading spatial coherence at y-axis. We propose Time-multiplexing plate (TMP) to improve axial resolution.

1. はじめに

脳は多数の神経細胞がネットワークを形成しており、我々の行動はこのネットワークが生み出す活動電位に紐づいている。つまり、神経細胞の繋がりを正確に解明することが可能となれば、我々が行動に至るまでの情報処理の原理が明らかになり、パーキンソン病などの神経疾患や記憶障害、うつ病の克服の第一歩となることが期待されている。自家蛍光を発生することが可能である GFP [1]が発見されたことにより、神経回路解明の手法として蛍光顕微鏡が注目されている。しかしながら通常の蛍光顕微鏡は「観察視野」、「時間分解能」、「空間分解能」という観点からトレードオフが生じるため、この観察は非常に困難となっている。このトレードオフの関係を打ち破る技術として、広視野照明を可能としながら光軸方向の分解能を有する時空間集光(TF)顕微鏡 [2,3]が開発された。しかしながら、この TF にも課題が残る。TF は光軸と垂直な面において、回折格子を用いて 1 次元方向(x)にのみ波長分散を与えるが、それと垂直な軸(y)で

は、試料に対し光が平行光で入射される形をとる。そのため、光軸方向の分解能はポイント集光に比べると十分ではない。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]。これらを実現するためには、y 軸において空間コヒーレンスを低下させることで、ビームレットを生成する必要がある。

本研究では、空間コヒーレンスを低下させる素子として、自作可能な透過型エシャロンを作製することで光軸方向の分解能の向上を目指す。同時に、透過型エシャロンの格子定数を変更することで得られる光軸方向の分解能の変化を実験的に検証することで、時間分割多重化技術を確立させる。

2. 時間分割多重化プレート

我々は、Fig.1 に示すように、石英ガラスを階段状に並べることで透過型のエシャロンを作製した。異なる段を通過した y 方向の成分は、離散的な時間遅延が与えられる。与えた遅延時間がパルスの持つコヒーレンス時間よりも長い場合、隣の段を通過したパルスは互いに干渉を起こさなくなり、ビームが時間的に分割される。我々はこの素子を時間分割多重化(TM)プレートと名付けた。TM プレートは、パラメーターとして、階段幅 a を有する。この階段幅 a を変化させると、生成されるビ

ームレットの数が変わるため、光軸方向の分解能に変化が現れる。

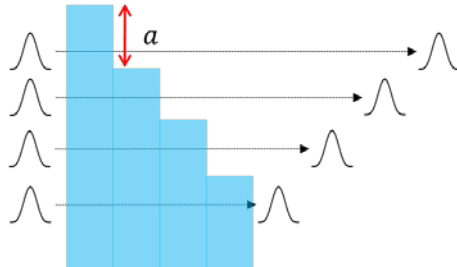


Fig. 1 Scheme of Time-multiplexing plate

3. 実験セットアップ・実験結果

Fig.2 に実験セットアップを示す。

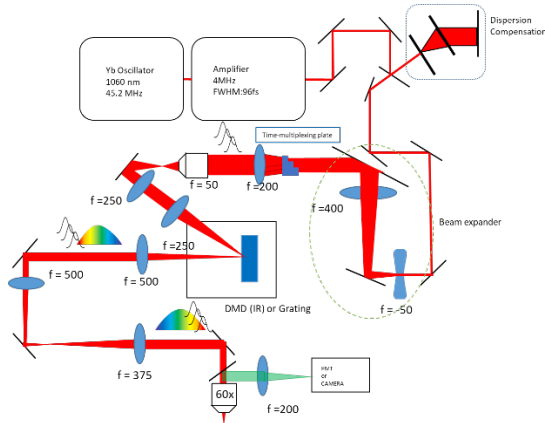


Fig.2 Experimental setup of time-multiplexed multifocal temporal focusing with Time-multiplexing plate.

中心波長 1060nm の Yb ファイバーを用いて実験を行った。時空間集光を実現するための素子として、デジタルマイクロミラーデバイス(DMD)(回折格子定数 10.8 μ m,4 次)を用いた。TM プレートの階段幅 a として、対物レンズ集光点において、2 μ m,1.35 μ m となるような階段幅を有する TMP を使用した。また、TMP による光利用効率を向上させるため、倍率 8 倍のビームエクパンダーを使用したのち、DMD 上で 1/4 倍に縮小した。使用した対物レンズは Olympus 社の 60x(NA1.2,水浸)のレンズを使用した。試料には、200nm の蛍光ビーズを 100 倍希釈したものを 1 層に並べ、光軸方向にスキャンして二光子蛍光強度測定を行った。

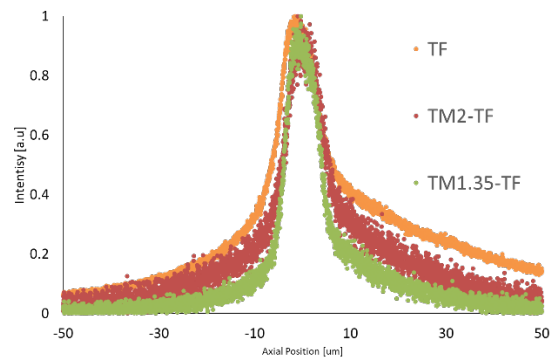


Fig.3 The comparison of Intensity 2-photon excitation with Temporal focusing microscopy (orange) and time-multiplexed multifocal temporal focusing microscopy, which Step width of Time-multiplexing plate has 2 μ m (deep red) and 1.35 μ m (green) at focal plane.

本提案手法である時間分割多重化プレートを用いることで、従来の時空間集光顕微鏡と比べ、光軸方向の分解能は、階段幅 2 μ m で 1.35 倍、階段幅 1.35 μ m で 1.69 倍向上した。

次に、ジェルの中に 2 μ m の蛍光ビーズを入れた試料を観察した(Fig.4)。従来の TF 顕微鏡の場合、深さ 5.5 μ m に存在する蛍光ビーズ(図右上：橙丸、赤丸)に見える蛍光ビーズが、深さ 0 μ m において背景光として観測されてしまうのに対し、本提案手法である TM-TF 顕微鏡では、これを抑制した。

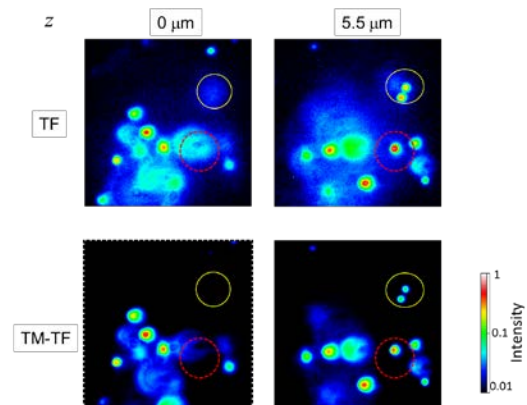


Fig.4 Background light suppression by Time-multiplexing plate.

4. まとめと今後の展望

本研究では、時間分割多重化による時空間集光顕微鏡の光軸方向の分解能向上を実現するために、時間分割多重化プレートの作製に取り組み、これ

の原理実証を行った。今後は、このプレートの確立に向け、解析と実験の比較を行っていく。

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。

Reference

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. D. Oron, E. Tal, and Y. Silberberg, "Scanningless depth-resolved microscopy," *Opt. Express* **13**, 1468 (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. A. Egner and S. W. Hell, "Time multiplexing and parallelization in multifocal multiphoton microscopy," *J. Opt. Soc. Am. A* **17**, 1192 (2000).
5. 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).
6. A. Vaziri and C. V. Shank, "Ultrafast widefield optical sectioning microscopy by multifocal temporal focusing," *Opt. Express* **18**, 19645 (2010).