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

磯部 圭佑^{1,2}, 戸田 圭亮^{1,3}, 緑川 克美¹

¹理化学研究所 光量子工学研究領域 (〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1)

²科学技術振興機構 さきがけ (〒332-0012 埼玉県川口市本町4-1-8)

³埼玉大学大学院 理工学研究科 (〒338-8570 埼玉県さいたま市桜区下大久保255)

Super-Resolution Deep Imaging by Spatio-Temporal Control of Excitation Pulses

Keisuke ISOBE^{1,2}, Keisuke TODA^{1,3}, and Katsumi MIDORIKAWA¹

¹RIKEN Center for Advanced Photonics, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198

²JST, PRESTO, 4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama, 332-0012

³Graduate School of Science and Engineering, Saitama University, 255 Shimo-Okubo, Sakura, Saitama 338-8570

(Received June 8, 2016)

Super-resolution optical microscopy that operates beyond the diffraction limit has become a powerful tool for investigating biological phenomena. However, it is difficult to achieve super-resolution imaging at deeper penetration depth in biological tissue. Since the in-focus signal intensity in super-resolution microscopy is very low, the in-focus signal is buried easily in the background light generated in out-of-focus regions. Therefore, the background suppression techniques are essential for super-resolution deep imaging. Although nonlinear optical microscopy has the capability to suppress the out-of-focus background, the out-of-focus background generates in the deep imaging of scattering tissue and limits the observable imaging depth. We demonstrated not only the resolution enhancement but also the background suppression in nonlinear optical microscopy by spatio-temporal control of the excitation pulses.

Key Words: Ultrashort pulse, Nonlinear optics, Super-resolution imaging

1. はじめに

近年、光の回折限界を超えた空間分解能をもつ超解像顕微鏡¹⁻⁵⁾は製品化され、生物・医学分野における生命現象解明のための重要な技術となっている。しかし、生体組織などの深部観察においては、超解像イメージングを達成することは困難となっている。空間分解能を N 倍向上させると、信号に寄与する体積は N^3 倍減少する。そのため、信号強度が N^3 倍小さくなり、観察している焦点面以外において発生する背景光に埋もれやすくなる。背景光を抑制するために、全反射顕微鏡が用いられているが、試料表面の観察に制限される。一方、多光子励起蛍光顕微鏡のように、非線形光学過程を利用すれば、背景光の発生を抑制できるため、生体組織の深部イメージングに有用である^{6,7)}。しかし、散乱や吸収の大きな生体組織の深部観察においては、多光子励起蛍光顕微鏡を用いたとしても、背景光が発生するようになり、観察可能な深さが制限されている⁸⁾。また、生体組織の屈折率分布は一様でないため、波面歪みによって、空間分解能が劣化することも問題である。最近、背景光⁹⁻¹⁷⁾や波面歪み^{18,19)}の問題を解決するための技術開発が進んでいる。また、超解像顕微鏡と非線形光学顕微鏡を融合

させ、深部観察において、超解像イメージングを達成する試みも始まりつつある^{17,20-22)}。本論文では、深部イメージングにおける背景光の問題を解決するための技術を紹介するとともに、著者らが開発している深部超解像イメージング技術について解説する。

2. 背景光抑制・除去技術

多光子励起蛍光顕微鏡では、Fig. 1(a)のように、高い開口数の対物レンズを用いて、励起光を空間的にきつく集光する。 n 光子励起蛍光強度は励起光強度の n 乗に比例するため、蛍光強度が高い領域を、励起光強度の高い集光点近傍のみに局所化できる^{6,7)}。しかし、Fig. 1(b)のように、散乱や吸収による試料内における光の減衰係数 α

Fig. 1 (a, b) Excitation intensity distribution (a) without and (b) with scattering and absorption losses; OB: Objective lens. (c) Spatio-temporal modulation.

の大きな試料の深部観察では、集光点近傍以外で発生する蛍光強度を無視できなくなる⁸⁾。侵入長 z が深くなると、試料表面から集光点に到達するまでに、励起光パワーは $\exp(-\alpha z)$ 倍減衰する。そのため、集光点において発生する蛍光強度を維持するためには、入射光パワーを $\exp(\alpha z)$ 倍増加させる必要がある。しかし、試料表面の励起光強度は入射光パワーの増加分だけ増加する。したがって、試料表面近傍で発生する n 光子励起蛍光強度は $\exp(n\alpha z)$ 倍増加する。そのため、試料表面近傍で発生した蛍光強度が集光点近傍で発生する蛍光強度に等しくなると、それ以上の深さは基本的には観察できない。

試料表面近傍における背景蛍光の発生を抑制できれば、観察可能な深さを向上できる。最も簡易的な手法としては、励起光の波長を減衰係数 α の小さな波長にすることである^{9,10)}。生体組織内における吸収損失が最も小さな波長帯域は $1.08\text{ }\mu\text{m}$ であるが、散乱損失と合わせた光損失が最も小さな波長帯域は $1.3\text{ }\mu\text{m}$ や $1.7\text{ }\mu\text{m}$ である。これらの波長帯域を用いた2光子励起蛍光顕微鏡⁹⁾や3光子励起蛍光顕微鏡¹⁰⁾によって、観察可能な深さをマウス脳深部の海馬領域(約 1.5 mm)まで向上させている。また、減衰係数 α は試料の状態にも依存する。生きたままの状態では、イメージングのための開頭手術における出血などもなければ、試料の透明度は高い。そのような場合には、十分なレーザー光パワーがあれば、 $1\text{ }\mu\text{m}$ の波長でも、マウス脳深部の海馬領域まで観察することが可能である^{23,24)}。したがって、深部イメージングでは、試料の透明度を保つ手術技術も必要である。

励起光の強度分布を時空間制御することによって、発生した背景光を積極的に除去する手法も開発されている。Fig. 1(c)のように、試料表面において発生する光強度は変調せず、集光点において発生する光強度のみ変調すると、試料表面で発生する背景光と集光点で発生する信号光を分離することができる。例えば、収差のある励起光と収差のない励起光によって取得した2光子励起蛍光像の差から背景光のない蛍光像が抽出できる¹¹⁾。また、焦点面近傍でのみ空間的に重なる複数のビームを位相変調すると、干渉効果によって、集光点近傍の空間強度分布のみ変調できる¹²⁾。変調された信号成分をロックイン検出すれば、背景光が除去された蛍光像を取得できる。この手法は共焦点顕微鏡で実現された手法であるが、多光子励起蛍光顕微鏡への応用が可能である。また、Fig. 2(a)のような2波長パルスの空間重なり変調(Spatial Overlap Modulation: SPOM)によっても、背景光の除去が可能である¹³⁾。2波長パルスが空間的に重なったときにしか発生しない非線形光学過程を用いれば、集光点近傍で発生する光強度のみ変調できる。この手法では、2波長励起の非縮退2光子励起蛍光、和周波発生、誘導ラマン散乱など様々な非線形光学顕微鏡(Nonlinear Optical Microscopy: NOM)へ応用可能である。SPOM-NOMでは、背景光の除去と同時に空間分解能も向上可能である¹³⁾。SPOM-NOMで発生する非線形信号光強度は、2波長パルスの強度積に比例する。Fig. 2(b)のように、パルス1の集光点を固定し、パルス2の集光位置を $\pm\delta$

Fig. 2 (a) SPOM. (b) Transition of the intensity distributions of the two pulses in SPOM. (c) Variation of intensity product of the two-pulses by SPOM.

だけ周波数 f で変調すると、2波長パルスの強度積の時間変化はFig. 2(c)のように位置によって異なる。このような変調信号の周波数と位相が、集光スポット内の位置に依存することを利用して、SPOM-NOMでは、空間分解能を向上させることが可能である。

広視野多光子励起蛍光顕微鏡における背景光を抑制する技術も開発されている。Fig. 3(a)のように、回折格子などの分散素子によって分光されたフェムト秒パルスを集光すると、パルス幅は光軸方向に沿って変化する。このような時空間集光(Temporal Focusing: TF)技術は、回折限界まできつく空間集光するのではなく、広視野を照明するために用いられる。焦点面では、全ての波長成分が空間的に重なり合うため、フーリエ変換限界のフェムト秒パルスとなる。しかし、焦点面から光軸方向に離れるほど、空間的に重なり合うスペクトル帯域幅が狭くなるため、ピコ秒やナノ秒までパルス幅が伸びる。したがって、高いピーク強度を必要とする多光子励起蛍光の発生を集光点近傍に局所化できる¹⁴⁾。そのため、励起光のレーザー走査を一切行うことなく、蛍光断層像を取得できる。しかし、レーザー走査型の多光子励起蛍光顕微鏡と同様に、観察深さが深くなると、焦点面以外で発生する蛍光が背景光となる。

広視野蛍光顕微鏡では、集光点近傍以外で発生する背景光とは別の背景光の問題もある。広視野顕微鏡では、焦点面を2次元検出器に結像する必要がある。しかし、焦点面で発生した蛍光が試料内部で散乱すると、全てのピクセルに拡がって背景光となる。広視野1光子励起蛍光顕微鏡の焦点外蛍光と散乱蛍光の両方を除去可能な手法として構造化照明法が開発されている¹⁵⁾。構造化照明法では、Fig. 3(b)のように、焦点面近傍でのみ、励起光

Fig. 3 (a) Temporal focusing. (b) Structured illumination.

を重ね合わせ、干渉させる。このとき、干渉縞が発生するのは、焦点面近傍のみであり、Fig. 1(c)のような時空間変調が可能である。また、検出器上に縞を結像できるのは、弾道蛍光のみで、散乱蛍光は、結像できない。そのため、縞成分を抽出すると、焦点外蛍光と散乱蛍光の両方を除去できる。この手法を時空間集光法と組み合わせることによって、広視野2光子励起蛍光顕微鏡の背景光除去に成功している^{16,17)}。構造化照明法は超解像イメージングにも応用可能な手法^{3,4)}である。構造化照明法では、空間周波数 k_0 の強度分布 $I_{\text{ex}}(\mathbf{r}) = I_0 \{1 + \cos(k_0 r)\}$ をもった励起光によって、試料が照明される。試料上における蛍光発光分布は、励起光強度と試料の分布の積で表される。ここで、試料の分布 $S(r)$ は様々な空間周波数成分 k_s の重ね合わせによって表現できる。各空間周波数成分 k_s は、構造化照明法を用いると、 $k_s - k_0$ と $k_s + k_0$ に周波数変換される。空間周波数が下方変換されることによって、光学顕微鏡における光学伝達関数の遮断周波数 k_c より、 k_0 だけ高い試料の空間周波数成分 $k_c + k_0$ まで検出できるようになる。検出後、元の空間周波数 k_s に戻すことによって、超解像が得られる。

3. 深部超解像イメージング技術

2014年にノーベル化学賞を受賞したSTED(Stimulated Emission Depletion)顕微鏡¹⁾やPALM(Photo-Activated Localization Microscopy)²⁾などの超解像技術と、前節で述べた背景光を抑制、または除去する技術を組み合わせた深部超解像イメージング技術が報告されている。焦点面以外で背景蛍光が発生することを抑制するために、STED顕微鏡は、空間集光の2光子励起法と^{20,21)}、広視野顕微鏡であるPALM²²⁾は時空間集光法との融合が実現している。著者らは、背景光の発生を抑制するだけでなく、発生した背景光の除去も積極的に行うために、構造化照明法と時空間集光法を融合させた干渉時空間集光(Interferometric Temporal Focusing: ITF)顕微鏡を開発している¹⁷⁾。また、著者らが提案するSPOM-NOMも、背景光の抑制と除去が可能な超解像イメージング技術である。ここでは、SPOM-NOMとITF顕微鏡を用いたイメージング例について紹介する。

3.1 SPOM-NOM

SPOM-NOMの実験光学系は、一般的な2波長励起の非線形光学顕微鏡に、空間重なり変調のための偏向器を挿入しただけである^{13,25,26)}。Fig. 4(a)に示すように、SPOM-NOMの点像分布関数の半値全幅は、従来の2光子励起蛍光顕微鏡に対して1.6倍狭くなる。従来の和周波発生顕微鏡とSPOM-NOMによって取得したグラニュー糖粉末の和周波発生像をFig. 4(b)と(c)に示す。SPOM-NOMでは、従来の和周波発生顕微鏡では観察できていない小さな構造が可視化されている。グラニュー糖粉末間は空気であり、波面歪みの影響は大きい。しかし、SPOM-NOMでは、光軸に垂直な面内(x)方向だけでなく、光軸(z)方向の空間分解能も向上しているのがわか

Fig. 4 (a) Point spread function of conventional two-photon fluorescence microscopy (square) and SPOM-NOM (triangle).¹³⁾ (b, c) Sum frequency generation (SFG) images of granulated sugar pounded in a mortar obtained by (b) conventional SFG microscopy and (c) SPOM-NOM.²⁵⁾ (d, e) Maximum-intensity y projections of the image stacks of fixed mouse brain tissues, which express a YFP in a subset of neurons, obtained by (d) conventional TPEF microscopy and (e) SPOM-NOM.¹³⁾

る。Fig. 4 (d), (e)にホルマリン固定したマウスの脳組織の2光子励起蛍光像を示す。深部における背景蛍光は、従来の2光子励起蛍光顕微鏡では強い。これは、光の減衰係数が生きているマウスの脳組織に比べると約3倍高い 170 cm^{-1} であったことが原因である。しかし、SPOM-NOMでは背景蛍光が抑制できていることがわかる。また、従来の2光子励起蛍光顕微鏡では、波面歪みによって深部における空間分解能が劣化しているにもかかわらず、SPOM-NOMでは深部でも空間分解能が高いことがわかる。

3.2 ITF顕微鏡

ITF顕微鏡では、時空間集光のための分散素子と、構造化照明のためのビームスプリッターが必要であるため、実験光学系が複雑である¹⁷⁾。しかし、Fig. 5に示すように、デジタルミクロミラーデバイス(DMD)を用いることによって、光学系を簡易化できる。著者らの使用しているDMDは $7.6 \mu\text{m} \times 7.6 \mu\text{m}$ のマイクロミラー100万个以上で構成されている。各ミラーの角度は $\pm 12^\circ$ 傾き、顕微鏡への光路(ON状態)とビームダンパーへの光路(OFF状態)を $230 \mu\text{s}$ で切り替えることが可能である。全てのミラーがON状態のとき、格子定数がミラー間隔、ブレイズ角がミラーの傾きとなる位相型ブレイズド回折格子となる。そのため、ON状態のミラー群は、時空間集光のための分散素子として働き、フェムト秒光パルス分光するために用いることができる。ただし、格子定

Fig. 5 Experimental setup for an ITF microscope using a DMD. OB: Objective lens, DM Dichroic mirror, F: Bandpass filter.

数が波長よりも大きい(約10倍)ため、高次の回折光を用いる必要がある。著者らの構成では、4次の回折光を用いて、回折効率56%が得られた。また、ON状態とOFF状態のミラー群を周期的に配置すると、格子定数がミラー群の周期となる振幅型の回折格子となる。この振幅型回折格子は、格子定数が波長よりも十分大きい(約100倍)ため、構造化照明のためのビームスプリッターとして働き、0次光と±1次光を発生させるために用いることができる。したがって、試料と2次元検出器の共役な位置にDMDを配置することによって、簡単にITF顕微鏡が作製できる。また、DMDを用いた構造化照明では、2光束干渉ではなく、3光束干渉となる。そのため、光軸に垂直な面内方向だけでなく、光軸方向にも干渉縞を発生させることが可能である。したがって、3次元空間分解能の向上が可能である。また、背景光を除去するためには、縞成分のみを抽出して、超解像の画像を再構築する必要がある¹⁷⁾。

ITF顕微鏡では、広視野で同時に多光子励起を行う必要があるため、光源には、高パワーフェムト秒レーザー

が必要である。著者らは、Yb添加ダブルクラッドファイバを用いたチャープパルスファイバ増幅器(波長1060 nm, パルス幅80 fs, 繰返し周波数200 kHz, パルスエネルギー1 μ J)を作製し、光源として用いている。

TF顕微鏡とITF顕微鏡を用いて取得した直径200 nmの蛍光ビーズの2光子励起蛍光像をFig. 6(a), (b)に示す。また、Fig. 6(a), (b)中の矢印で示した位置の強度分布をFig. 6(c)に示す。TF顕微鏡では2つのビーズが分解できていない。一方、ITF顕微鏡では、はっきりと2つに分解でき、ビーズ間距離は約260 nmであることがわかる。また、ローダミンBの溶液とカバーガラスの境界近傍における光軸方向の蛍光強度をFig. 6(d)に示す。Fig. 6(d)の曲線の差分から光軸方向の空間分解能が3次元構造化照明法により約3.5倍改善できていることがわかる。直径200 nmと2 μ mの蛍光ビーズをアガロースゲルに封入した模擬生態組織の2光子励起蛍光像をFig. 6(e), (f)に示す。2 μ mの蛍光ビーズは背景蛍光を発生させるとともに、散乱体としても作用している。また、Fig. 6(e), (f)中の矢印で示した位置の強度分布をFig. 6(g)に示す。背景光の除去と同時に空間分解能が向上していることがわかる。

4. おわりに

本稿では、深部イメージングにおいて問題となる背景光を抑制・除去する技術について紹介した。背景光の抑制・除去技術を超解像技術と融合させることによって、深部超解像イメージングが可能になることも示した。本稿では紹介しなかったが、深部イメージングにおいては、光源であるレーザー技術や蛍光プローブ技術の発展も大きく貢献している。多光子励起蛍光顕微鏡による深部イメージングでは、繰返し周波数80 MHzのフェムト秒発振器を用いた場合、試料表面において数百mWの平均パワーが必要になる。顕微鏡などの透過率を考えると、平均出力パワー数Wのフェムト秒発振器が必要である。0.8 μ m や1 μ mの波長帯域では、チタンサファイアレーザーやYbファイバレーザーなどが市販され、生物・医学の分野でも容易に使用可能になっている。また、試料透過性の高い近赤外領域の蛍光プローブも開発され、深部イメージングに応用され始めている。今後、1.3 μ m や1.7 μ mの波長帯域でも、平均出力数Wのフェムト秒レーザーが市販されるようになるとともに、蛍光プローブ技術も発展すれば、生物・医学の分野での深部イメージングへの応用が広がっていくと期待できる。また、深部イメージングでは、波面歪みによって空間分解能が劣化することも問題であるが、それを補償する技術も進展している^{18,19)}。今後、レーザー技術、蛍光プローブ技術、波面補償技術、超解像技術、背景光抑制・除去技術の相互発展によって、深部超解像イメージングの性能のさらなる向上が期待できる。

Fig. 6 (a, b) Fluorescence images of 200-nm fluorescent beads obtained by (a) TF and (b) ITF microscopies. (c) Intensity profile indicated by arrows in Figs (a) and (b). (d) Signal intensity distribution along the axial direction near the interface between the cover glass and the Rhodamine B solution. (e, f) Fluorescence images of 200-nm fluorescent beads in the tissue-like phantom obtained by (e) TF and (f) ITF microscopies. (g) Intensity profile indicated by arrows in Figs (e) and (f).

謝 辞

本稿で紹介した筆者らの研究成果の一部は、理化学研究所脳科学総合研究センターの河野 弘幸博士、熊谷 安希子博士、宮脇 敦史博士、東京理科大学理工学部物理学科の須田 亮教授、慶應義塾大学理工学部電子工学科の神成 文彦教授との共同研究の成果である。本研究の一部は、公益財団法人住友財団、公益財団法人コニカミノルタ科学技術振興財団、公益財団法人倉田記念日立科学技術財団、公益財団法人サントリー生命科学財団、公益財団法人 光科学技術研究振興財団からの助成を受けて行われた。ここに深く感謝の意を表します。

参考文献

- 1) S. W. Hell and J. Wichmann: *Opt. Lett.* **19** (1994) 780.
- 2) E. Betzig: *Opt. Lett.* **20** (1995) 237.
- 3) M. G. L. Gustafsson, *J. Microsc.* **198** (2000) 82.
- 4) R. Heintzmann, T. M. Jovin, and C. Cremer: *J. Opt. Soc. Am. A* **19** (2002) 1599.
- 5) Diaspro: *Nanoscopy and Multidimensional Optical Fluorescence Microscopy* (Francis and Taylor, 2010).
- 6) W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb: *Science* **248** (1990) 73.
- 7) E. E. Hoover and J. A. Squier: *Nature Photon.* **7** (2013) 93.
- 8) P. Theer and W. Denk: *J. Opt. Soc. Am. A* **23** (2006) 3139.
- 9) D. Kobat, M. E. Durst, N. Nishimura, A. W. Wong, C. B. Schaffer, and C. Xu: *Opt. Express* **17** (2009) 13354.
- 10) N. G. Horton, K. Wang, D. Kobat, C. G. Clark, F. W. Wise, C. B. Schaffer, and C. Xu: *Nature Photon.* **7** (2013) 205.
- 11) A. Leray and J. Mertz: *Opt. Express*, **14** (2006) 10565.
- 12) N. Chen, C.-H. Wong, and C. J. R. Sheppard: *Opt. Express* **16** (2008) 18764.
- 13) K. Isobe, H. Kawano, T. Takeda, A. Suda, A. Kumagai, H. Mizuno, A. Miyawaki, and K. Midorikawa: *Biomed. Opt. Express* **3** (2012) 1594.
- 14) D. Oron, E. Tal, and Y. Silberberg: *Opt. Express* **13** (2005) 1468.
- 15) M. A. A. Neil, R. Juskaitis, and T. Wilson: *Opt. Lett.* **22** (1997) 1905.
- 16) H. Choi, E. Y. S. Yew, B. Hallacoglu, S. Fantini, C. J. R. Sheppard, and P. T. C. So: *Biomed. Opt. Express* **4** (2013) 995.
- 17) K. Isobe, T. Takeda, K. Mochizuki, Q. Song, A. Suda, F. Kannari, H. Kawano, A. Kumagai, A. Miyawaki, and K. Midorikawa: *Biomed. Opt. Express* **4** (2013) 2396.
- 18) N. Ji, D. E. Milkie, and E. Betzig: *Nature Meth.* **7** (2010) 141.
- 19) K. Wang, W. Sun, T. Richie, B. K. Harvey, E. Betzig, and N. Ji: *Nat. Commun.* **6** (2015) 7276.
- 20) G. Moneron and S. W. Hell: *Opt. Express* **17** (2009) 14567.
- 21) J. B. Ding, K. T. Takasaki, and B. L. Sabatini: *Neuron* **63** (2009) 429.
- 22) A. Vaziri, J. Tang, H. Shroff, and C. V. Shank: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105** (2008) 20221.
- 23) R. Kawakami, K. Sawada, A. Sato, T. Hibi, Y. Kozawa, S. Sato, H. Yokoyama, and T. Nemoto: *Sci. Rep.* **3** (2013) 1014.
- 24) R. Kawakami, K. Sawada, Y. Kusama, Y.-C. Fang, S. Kanazawa, Y. Kozawa, S. Sato, H. Yokoyama, and T. Nemoto: *Biomed. Opt. Express* **6** (2015) 891.
- 25) K. Isobe, H. Kawano, A. Kumagai, A. Miyawaki, and K. Midorikawa: *Biomed. Opt. Express* **4** (2013) 1937.
- 26) K. Isobe, H. Kawano, A. Suda, A. Kumagai, A. Miyawaki, and K. Midorikawa: *Biomed. Opt. Express* **4** (2013) 1548.