

生体組織中における二光子励起の  
4次元時空間制御

2022年7月

石川 智啓

学位論文 博士（工学）

生体組織中における二光子励起の  
4次元時空間制御

2022年7月

慶應義塾大学大学院理工学研究科

石川 智啓

## 要旨

集光されたパルスの伝播とともにパルス幅が劇的に変化する時空間集光 (TF) 技術の発明によって、生命現象を解明するために有用な新しい多光子励起技術が開発されてきた。広視野 TF 顕微鏡は、走査型多光子顕微鏡のように集光スポットを走査することなく断層像が得られる高速なイメージング技術であるため、多細胞間相互作用の観察へ応用されている。また、TF 技術をホログラフィック技術と組み合わせたパターン照明顕微鏡は、細胞の活動を光で操作するオプトジェネティクスに応用され、離れて存在する複数の細胞の活動を同時に励起することが可能となっている。しかし、TF 技術にはまだ、いくつかの課題がある。例えば、厚みのある試料内部において歪んだ TF パルスの補償が困難であること、走査型多光子顕微鏡より光軸方向の分解能が低いこと、パターン照明において隣り合うマルチスポット間で生じる干渉縞がスポットの均一性を劣化させることなどである。これらの問題を解決するために、本研究では、生体組織において、TF パルスの歪み補償を行うための時空間ロックイン検出技術、走査型多光子顕微鏡と同等の光軸方向の分解能が得られる時間多重化 (TM) マルチライン (ML) TF 技術、均一なパターン照明が可能なマルチフォーカス (MF) TM-TF 技術の開発に取り組んだ。

第 1 章では、背景および研究目的について述べた。

第 2 章では、本研究の基礎となる理論や技術として、非線形光学、超短パルスレーザー技術、イメージング技術について説明した。

第 3 章では、広視野 TF 顕微鏡において広い視野で同時に多光子励起するために、本研究で構築した Yb ファイバレーザの構成および出力特性について述べた。平均出力 3.9 W、ピーク波長 1059 nm、繰り返し 710 kHz、パルス幅 110 fs を達成した。

第 4 章では、広視野 TF 顕微鏡の補償光学技術として開発した時空間ロックイン検出技術について述べた。従来は、TF 顕微鏡において厚みのある試料を用いると、パルスの時間特性を最適化することは困難であったが、本検出技術により厚みのある試料でもパルスの時間特性の最適化ができることを実証した。

第 5 章では、TM-TF 顕微鏡において、視野と光軸方向の分解能の両立を可能とするためマルチライン化を組み合わせた TM-ML-TF 顕微鏡を提案した。実際に、従来の TM-TF 顕微鏡で達成されている視野を 5 倍に拡大し、TF 顕微鏡に対して光軸方向の分解能を 2.5 倍向上することに成功した。

第 6 章では、均一なパターン照明が可能な技術として開発した MF-TM-TF 技術について述べた。マルチスポットを近接して配置しても、フリッジ・スペckルフリーを実現できるパターン照明技術を確立した。開発した技術を TM-TF 顕微鏡の視野拡大にも応用し、視野を 12 倍にまで拡大することに成功した。

第 7 章は、結論であり、本博士論文で開発してきた技術に関する知見をまとめ、開発した技術の生物学・医科学応用への展望について述べた。

# 目次

第1章	緒言.....	1
1.1.	背景.....	1
1.2.	多細胞相互作用の機能解明に向けた顕微鏡の研究動向.....	2
1.3.	本研究の目的.....	6
第2章	本論文に関連した理論と要素技術.....	7
2.1.	非線形光学.....	7
2.1.1.	非線形光学効果.....	7
2.1.2.	自己位相変調と二光子吸収.....	8
2.2.	超短パルスレーザー技術.....	11
2.2.1.	モード同期.....	11
2.2.2.	分散と分散補償.....	15
2.2.3.	チャープパルス増幅.....	16
2.3.	3次元イメージング技術.....	17
2.3.1.	共焦点顕微鏡.....	17
2.3.2.	構造化照明顕微鏡.....	18
2.3.3.	二光子顕微鏡.....	20
2.3.4.	時空間集光顕微鏡.....	21
2.4.	時空間集光顕微鏡の性能向上.....	24
2.4.1.	補償光学.....	24
2.4.2.	マルチライン化時空間集光顕微鏡.....	25
2.4.3.	時間多重化時空間集光顕微鏡.....	27
2.4.4.	時空間集光パルスを用いたパターン照明.....	29
2.5.	まとめ.....	30
第3章	Yb ファイバレーザの開発.....	31
3.1.	figure 9 モード同期発振器.....	31

3.2.	チャープパルス増幅器.....	34
3.3.	パルス特性の評価.....	36
3.4.	まとめ.....	37
第4章	時空間ロックイン検出による 時空間集光パルスの補償光学.....	39
4.1.	時空間ロックイン検出の原理.....	39
4.1.1.	時間ロックイン検出.....	39
4.1.2.	空間ロックイン検出.....	42
4.2.	実験系.....	43
4.3.	実験結果.....	44
4.3.1.	時空間ロックイン検出の検証.....	44
4.3.2.	補償光学によるイメージング性能の改善.....	47
4.4.	まとめ.....	51
第5章	時間多重化時空間集光顕微鏡における 光軸方向分解能と視野の両立.....	53
5.1.	時間多重化マルチライン時空間集光顕微鏡の原理.....	53
5.2.	実験系.....	54
5.3.	実験結果.....	56
5.4.	まとめ.....	61
第6章	時間多重化時空間集光パルスによる 多光子励起パターン照明.....	62
6.1.	時間多重化によるマルチスポット間の干渉抑制の原理.....	62
6.2.	実験系.....	63
6.3.	実験結果.....	65
6.4.	まとめ.....	70
第7章	結言.....	71
	参考文献.....	73
	謝辞.....	79
	業績目録.....	81

## 略称一覧

AO	補償光学, Adaptive Optics
AOM	音響光学変調器, Acousto-Optic Modulator
ASE	自然放出増幅光, Amplified Spontaneous Emission
CMOS	Complementary Metal-Oxide Semiconductor
CPA	チャープパルス増幅, Chirped Pulse Amplification
DMD	デジタルマイクロミラーデバイス, Digital Micromirror Device
FACED	Free Space Angular-Chirp-Enhanced Delay
FTL	フーリエ変換限界, Fourier Transform Limited
FWHM	半値全幅, Full Width at Half Maximum
GDD	群遅延分散, Group Delay Dispersion
GVD	群速度分散, Group Velocity Dispersion
IAC	干渉自己相関, Interferometric Autocorrelation
LD	半導体レーザ, Laser Diode
LPF	ロングパスフィルタ, Long-Pass Filter
MF	マルチフォーカス化, Multi-Focus
ML	マルチライン化, Multi-Line
NA	開口数, Numerical Aperture
NALM	非線形増幅ループミラー, Nonlinear Amplification Loop Mirror
NOLM	非線形光ループミラー, Nonlinear Optical Loop Mirror
PBS	偏光ビームスプリッタ, Polarization Beam Splitter
PD	フォトダイオード, Photo-Diode
PM	偏波保持, Polarization Maintaining
PMT	光電子増倍管, Photo Multiplier Tube
PSF	点像分布関数, Point Spread Function
SH	第2高調波, Second Harmonic
SIM	構造化照明顕微鏡, Structured Illumination Microscopy
SLM	空間光変調器, Spatial Light Modulator
SM	シングルモード, Single Mode
SPM	自己位相変調, Self-Phase Modulation
TF	時空間集光, Temporal Focusing
TM	時間多重化, Time-Multiplexing
TOD	3次分散, Third Order Dispersion
VIPA	仮想イメージフェーズアレイ, Virtually Imaged Phased Array
WDM	波長分割多重, Wavelength Division Multiplexing

# 第1章 緒言

## 1.1. 背景

生物学・医科学に携わる研究者のイメージとして真っ先に思い浮かぶのは、光学顕微鏡を覗き、切片を観察する姿であるだろう。このように光学顕微鏡が生物学・医科学において代表的なツールとして存在するのは、光を用いることで生体組織のミクロな領域を非接触・非侵襲に観察できるからである。また、生体組織は数十  $\mu\text{m}$  の大きさを持つ多数の細胞が集まって構成されており、その一つひとつの細胞は核、細胞膜、ミトコンドリアといったより小さな器官により構成されている。生命体において様々な役割を担うこれらの細胞や器官は肉眼では見ることができず、その詳細な形状を観察するには顕微鏡を用いる必要がある。そのため、ミクロな世界を覗かせる光学顕微鏡は新たな細胞や病原菌の発見を通し、生物学・医科学において重要な役割を果たしてきた。

17世紀頃に誕生した光学顕微鏡は現在までに400年近くの歴史を有し、常に空間分解能の向上が求められてきた。空間分解能とは、2つの異なる点光源から生じる光を分けて見ることができる能力のことであり、対物レンズの開口数 (numerical aperture : NA) を大きくすることで顕微鏡の空間分解能を向上できる。像面における点光源の広がり是对物レンズで集められる空間周波数の帯域幅で決まり、NAが高いほど広い空間周波数まで集められるため、高い空間分解能を実現できる。一方で、NAを大きくすると収差の影響を受けやすく、像のボケにつながる。また、光軸上で生じた光に対して球面収差を与えるだけでなく、光軸からずれた場所で生じる光にはコマ収差を与え、視野周辺の像を歪ませる。加えて、試料から赤、緑など、波長の異なる光が生じると色収差となる。そのため、NAが高く、収差の小さい対物レンズを実現するため、対物レンズの設計・製造技術の向上が図られてきた。したがって、対物レンズ性能の向上が顕微鏡性能の向上を牽引してきたと言えるだろう。

近年の顕微鏡では、分解能だけでなく蛍光標識技術が重要となっている。蛍光イメージングでは、試料を蛍光色素で染色し、光を照射して蛍光分子を励起することで蛍光を発生させる。この蛍光を受光素子で計測することで、試料の観察を行う。そのため、蛍光色素を特定のタンパク質や生体分子に標識することによって、タンパク質で形作られる構造や生体分子の局在を観察することができる。また、緑色蛍光タンパク質などの蛍光タンパク質の研究 [1]は遺伝子操作によって生きた細胞に蛍光能を発現させる技術 [2]につながり、生体組織における遺伝子発現のような動的な活動の観察が可能となった。

蛍光イメージングでは、新たな蛍光色素・蛍光タンパクの開発だけでなく、照明・観察系を工夫した様々なイメージング技術が開発されている。例えば、走査型蛍光顕微鏡では照明光としてコヒーレントなレーザー光を使用し、対物レンズで回折限界サイズまで集光する。試料で発生した蛍光をシングルピクセルの受光素子で測定すると、集光スポットの位置における標識された物質の存在を計測できる。ゆえに、集光スポットを空間的に走査すると高分解能な2次元蛍光像を得ることができる。また、マルチカラーイメージングでは、対象とす

る複数の細胞・分子をそれぞれ発光波長が異なるように標識する。蛍光色素の吸収帯域は広いいため、それぞれの色素が共通して吸収する波長の照明光を照射すると、全ての色素から発光が得られる。そして、試料で生じた光をダイクロイックミラーで波長ごとに分けて検出することで、複数の細胞・分子を同時にイメージングできる。

これらのイメージング技術に加え、蛍光顕微鏡では 3 次元イメージングを行うことが可能である。現在広く利用されている 3 次元イメージング技術として、共焦点顕微鏡 [3]、多光子顕微鏡 [4-6] が挙げられる。3 次元イメージングにおいて重要となるのは、背景蛍光を抑制・除去することで焦点から発生する蛍光のみを計測することである。共焦点顕微鏡では一光子励起光源を用いるため、光軸方向において焦点から離れた位置でも蛍光が発生する。そのため、共焦点顕微鏡では検出器の前の焦点と共役な位置にピンホールを配置することで焦点以外において発生した蛍光を除去し、焦点において発生した蛍光のみを計測する。ゆえに、信号検出領域を光軸方向に局所化できる。試料に対して焦点を 3 次元的に走査することで 3 次元蛍光像が得られる。また、多光子顕微鏡では励起光源としてフェムト秒レーザーを使用し、多光子吸収を利用して励起を行う。多光子吸収は非線形現象であり、ピーク強度が高いほど多光子吸収が多く生じる。したがって、対物レンズでフェムト秒パルスを集光すると、ビーム径が小さくなるに伴いピーク強度が増加し、多光子励起領域はピーク強度が最大となる焦点近傍に局所化される。試料から発生する蛍光は背景蛍光を含んでいないため、共焦点顕微鏡のようにピンホールで背景蛍光を遮ることなく、焦点で発生した蛍光を検出できる。3 次元蛍光像は、共焦点顕微鏡と同様に集光スポットを試料に対して空間的に走査することで取得できる。

深さ方向に分解能が得られ、3 次元イメージングができるようになると、どの程度の深さまで観察ができるかということが問題となる。生体組織は散乱媒質であり、光を入射させると散乱によって減衰するため、試料の深部まで光を到達させることができなくなる。散乱の影響は波長が短いほど強くなるため、一光子励起光源を用いる共焦点顕微鏡では 100  $\mu\text{m}$  程度の深さまでしか観察することができない。一方で、波長の長い光源を用いる多光子顕微鏡では散乱の影響が緩和されるため、共焦点顕微鏡より深い領域を観察することができる。また、生体組織では散乱による光の減衰だけでなく、水の吸収による減衰も考慮する必要がある。そのため、散乱と水の吸収を合わせて考えた場合、減衰が少ないのは波長 1.3  $\mu\text{m}$  と 1.7  $\mu\text{m}$  の帯域であり、波長 1.7  $\mu\text{m}$  のパルスを用いた三光子顕微鏡によって深さ 1.3 mm に及ぶマウス脳の観察結果が報告されている [7]。

## 1.2. 多細胞相互作用の機能解明に向けた顕微鏡の研究動向

蛍光イメージング技術と多光子顕微鏡は、ニューロンの可塑性 [8] やがんの転移 [9] に関する研究のように、生物学・医学研究において一般的に用いられるようになった。今後の光学顕微鏡へ期待される性能・技術として、高い時空間分解能とパターン照明技術が挙げられる。脳科学研究では、ニューロンなどの多細胞間の相互作用を観察し、生体機能とのつなが



りを明らかにしたいというニーズがある。多細胞間の相互作用と生体機能とのつながりを特定することは、細胞の活動を光で操作するオプトジェネティクスによって細胞の活動を制御し、それに応じた生体機能の変化を観察することで可能となる。このような機能的な観察に必用となるのは、広い範囲に分布した多数の細胞を、細胞の応答速度以上の速さで捉える高速なイメージング技術と特定の生体機能につながる複数のターゲット細胞へ同時に光照射を行うパターン照明技術である。しかし、多光子顕微鏡によってこのような機能的な観察を実現することは難しい。イメージングでは、集光スポットを空間的に走査する必用があるため、広い領域を観察するためには時間を要してしまう。ニューロンの大きさは  $10\ \mu\text{m}$  程度であり、神経細胞の発火には、イオンチャネルが開閉することによる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化が伴う。 $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化は  $10\ \text{ms}$  のオーダーという非常に短い時間で生じるが、応答時間が  $1\ \text{s}$  程度と遅い  $\text{Ca}^{2+}$  センサーを用いた蛍光イメージングによって、神経活動を可視化する取り組みが行われている。例えば、多細胞の応答を観察するため平面方向と光軸方向にともに  $1\ \mu\text{m}$  の空間分解能を有し、1点の計測時間が  $1\ \mu\text{s}$  である多光子顕微鏡を用いて  $500\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$  の平面を観察した場合、1フレームの取得にかかる時間は  $250\ \text{ms}$  である。しかし、光軸方向への  $500\ \mu\text{m}$  の走査も含めると、画像取得時間が長すぎるために、神経活動を捉えることはできない。一方、オプトジェネティクスでは、オプシンが発現した細胞に光を照射して、イオンチャネルの開閉を制御する。イオンチャネルが開き、イオンが流入し、閾値を超えると活動電位が発生する。閾値を超える刺激を行うためには、照射する光パワーを上げるか、細胞体上で集光スポットを走査する必要がある。しかし、パワーを上げると、刺激の光軸方向の分解能が低下し、レーザ走査を行うと、刺激の時間分解能が低下する [10]。

多光子顕微鏡の性能を向上するため、多光子顕微鏡に改良を加えた様々な手法が開発されている。イメージングでは、マイクロレンズアレイや空間光変調器 (spatial light modulator : SLM) を用いてマルチスポットを発生させる多焦点多光子顕微鏡がある [11–14]。多焦点多光子顕微鏡では、スキャナやマイクロレンズアレイの回転を用いてマルチスポットを2次元的に走査しながら、カメラを用いて2次元像を取得する。従来の多光子顕微鏡と比較し、集光スポットが増える分だけ走査時間を短縮できる。多焦点多光子顕微鏡では NA1.2、倍率60倍の水浸対物レンズを用いて  $1\ \mu\text{m}$  の光軸方向分解能を持ち、 $64\ \mu\text{m} \times 64\ \mu\text{m}$  の視野を時間分解能  $640\ \text{Hz}/\text{plane}$  で取得できることが報告されている [14]。しかし、光軸方向において焦点面から離れると集光スポットが大きくなり、隣り合う集光スポットと干渉するため、背景蛍光が強くなってしまいう問題があった。多焦点多光子顕微鏡における背景蛍光の問題を解決するため、時間多重化 (time-multiplexing : TM) 技術が開発された [15,16]。TM化技術は厚みの異なる透明材料を伝播させることで多焦点に分割された各々のパルスに異なる時間遅延を与えるため、焦点面から離れた位置でスポット径が大きくなっても隣り合うスポット同士は干渉しない。そのため、多焦点多光子顕微鏡とTM化技術を組み合わせることで背景蛍光を抑制できる。また、TM化されたマルチスポットを発生する技術として、FACED (free-space angular-chirp-enhanced delay) と呼ばれるデバイスを用いた方法が存在す

る[16,17]. FACED では 2 つの平面ミラーが平行からわずかな角度を持ってハの字型に配置されている. シリンドリカルレンズを用いて FACED へパルスを集光しながら入射させると, FACED 内において入射角ごとに異なる光路を通り, 出射角ごとに異なる遅延時間を持って出射される. FACED の大きな特徴は TM 化において時間遅延の差を大きくできることであり, パルスごとの時間間隔を数 ns 程度になるまで広げると, 高速な光電子増倍管 (photo multiplier tube : PMT) を用いて一つひとつの集光スポットの信号を時間領域で計測できる. FACED を用いた多光子顕微鏡では, 時間遅延のついた集光スポットを一行に並べ, 1 軸だけ走査を行うことで 2 次元像を取得する. FACED を用いた多光子顕微鏡において, NA1.05, 倍率 25 倍の水浸対物レンズを用いて 3  $\mu\text{m}$  程度の光軸方向分解能を達成し, 視野 50  $\mu\text{m}$ ×250  $\mu\text{m}$ , 時間分解能 1 kHz/plane でマウス脳における膜電位の観察へ応用した結果が報告されている [18]. このように, 多焦点多光子顕微鏡, FACED を用いた多光子顕微鏡では複数の集光スポットを発生させ, 計測点を並列化することで時間分解能の向上を図っている. また, オプトジェネティクスでは, パターン照明によって複数の集光スポットを発生させることで, 複数の細胞を同時に活性化する方法が開発されている. 多光子顕微鏡に SLM によるホログラフィックパターン照明を組み合わせる方法では, ホログラフィによって任意の位置に複数の集光スポットを発生し, 複数の細胞を同時に活性化できる [19,20]. しかし, 集光スポットが小さいため, 集光スポットを細胞体上で走査する必要がある.

以上に述べた多光子顕微鏡の欠点は集光スポットが小さいことに起因するため, 集光スポットを大きくする方法が考えられる. 集光スポットが大きくなると多光子励起範囲が広がる. そのため, 焦点面をカメラに結像すると, レーザ走査なしで高速にイメージングを行うことや, オプトジェネティクスにおいて細胞体全体に励起光を照射することで集光スポットの走査を無くすことができる. しかし, この方法が成り立たないのは, 集光スポットを大きくすると光軸方向分解能が著しく低下するからである. その理由は, 平面方向の集光スポットの大きさは対物レンズの NA に比例するのに対し, 光軸方向分解能は対物レンズの NA の 2 乗に比例するためである. また, ホログラフィによって集光スポットを大きくすると, スポット内にスペckルが発生し [21], 光軸方向分解能も低下してしまう [22]. スペckルが発生したスポットを用いてイメージングを行うと蛍光像にスペckルの形状が反映されてしまう. また, オプトジェネティクスでは異なるスポットにおいて異なるスペckルが発生し, 細胞ごとに活性化のタイミングが異なることや, 活性化されない細胞が生じることなど, 細胞の活性化における時空間的なゆらぎにつながる.

光軸方向に局所化された大きな集光スポットを発生させる方法として, 時空間集光 (temporal focusing : TF) 技術がある [23,24]. TF 技術の特徴は分光されたフェムト秒パルスを集光することで得られるパルス幅の変調を利用することである. パルス幅はスペckトル幅に反比例するため, フェムト秒パルスが完全に分光された対物レンズの瞳面ではパルス幅はサブ ns 程度に伸長している. 分光されたパルスが対物レンズで集光されると, 伝播に伴い波長の重なりが増えていく. 波長が重なるにしたがってパルス幅はサブ ns から百 fs 程

度へと劇的に短くなっていく。パルスのピーク強度はビーム径だけでなくパルス幅にも依存する。したがって、多光子励起領域はパルス幅が最も短くなる焦点面近傍に局所化される。この原理を利用することで、TF 技術は多光子励起領域が光軸方向に局所化された大きな集光スポットを発生できる。TF 顕微鏡では、この 2 次元的に広がった多光子励起領域をカメラなどの 2 次元検出器に結像させることで、集光スポットの走査を行うことなく断層像を取得できる。そのため、高い時間分解能を得ることができる。TF 顕微鏡を用いた高速イメージングとして、NA1.0、倍率 40 倍の水浸対物レンズを使用し蛍光ビーズのブラウン運動を光軸方向分解能、時間分解能 100 Hz/plane 観察した事例 [25]が報告されている。また、TF 技術はオプトジェネティクスにおいても有用である。TF 技術によって光軸方向に局所化された大きな集光スポットが得られるため、細胞全体に光を照射するためにホログラフィによってスポット径を大きくする必要がない。ゆえに、パターン照明に TF 技術を組み合わせることで、直径の大きい複数の均一な集光スポットを発生することが可能である [26–29]。また、別の利点として、生体組織のような散乱媒質中を伝播した場合でも、波長ごとに異なるスペckルが足し合わされることで平均化され、スペckルの影響を低減できることがある [30]。したがって、光軸方向に局所化されたスペckルのない複数のスポットを発生でき、直径 10  $\mu\text{m}$ 、光軸方向分解能 5  $\mu\text{m}$  のマルチスポットで複数の離れた細胞を同時に活性化することができる。

このように TF 技術を用いることによって、高速なイメージングやオプトジェネティクスにおける複数の細胞の同時活性化が可能となるが、応用に向けてはまだ問題が存在している。例えば、TF 顕微鏡のイメージング性能は TF パルスの時間・空間集光特性に依存するにも関わらず、厚みのある試料内において TF パルスに生じた歪みを補償することは難しい。TF パルスに歪みが生じると、光軸方向の分解能の低下や蛍光強度の低下、コントラストの劣化を招いてしまう [31,32]。そのため、厚みのある生体組織の内部において、歪みの補償ができないことは問題である。また、走査型多光子顕微鏡と比べ、光軸方向の分解能が低いという問題もある。光軸方向の分解能の半値全幅 (full width at half maximum : FWHM) は、走査型多光子顕微鏡では 1–3  $\mu\text{m}$  以下の分解能が得られるが、TF 顕微鏡では 3–5  $\mu\text{m}$  程度となっている。また、オプトジェネティクスへの応用を考え、光軸方向の分解能を平面方向と同様に  $1/e^2$  のサイズで評価すると、FWHM で評価した 5  $\mu\text{m}$  の分解能は  $1/e^2$  のサイズでは 21  $\mu\text{m}$  に相当する。そのため、 $1/e^2$  分解能 21  $\mu\text{m}$  はニューロン 1 つのサイズである 10  $\mu\text{m}$  を超えており、1 細胞レベルの分解能でオプトジェネティクスを行うことは難しい。そして、ホログラフィックパターン照明において、近接した隣り合うスポット間で生じる干渉縞 [33]も問題である。オプトジェネティクスにおいて、対象とする細胞が常に距離を持って存在するとは限らず、近接して存在する可能性がある。TF パルスを用いて近接した細胞の活性化を制御する時、干渉縞の発生はスペckルの発生と同様にスポットごとに異なる照射パターンを発生させる原因となり、活性化における時空間的なゆらぎにつながるおそれがある。したがって、TF 顕微鏡のさらなる応用の拡大に向けて、以上で述べた問題を解決する必要が

ある.

### 1.3. 本研究の目的

本研究では TF 顕微鏡の性能を向上するため, 1.2 節で提示した 3 つの問題の解決に取り組む. まず, 厚みのある試料において TF パルスの歪みを補償する技術として, 4-f 波形整形器 [34]を用いた局所周波数変調と構造化照明顕微鏡 (structured illumination microscopy : SIM) [35]を組み合わせた時空間ロックイン検出技術を実証する [36]. また, echelle 回折格子による TM 化 [37]とデジタルマイクロミラーデバイス (digital micromirror device : DMD) による空間強度分布のマルチライン化 (multi-line : ML) [38,39]を TF 技術に組み合わせた TM-ML-TF 技術により, TF 顕微鏡あ広い視野とラインスキャン TF 顕微鏡の高い光軸方向分解能が両立できることを示す [40]. そして, ホログラフィックパターン照明においてマルチフォーカス (multi-focus : MF) スポットが近接しても干渉縞が発生しないフリンジ・スペckルフリーなパターン照明技術として, TM 化による干渉抑制効果を MF-TM 技術と組み合わせた MF-TM-TF 技術を実現する [41]. これらに加え, TF 顕微鏡は広い範囲で多光子励起を行うため, 高出力な光源を必要とする. そのため, TF 顕微鏡に用いる光源として, Yb ファイバレーザも開発する.

本論文の構成について述べる. ここまでで述べたように, 第 1 章では本研究の背景および目的について説明した. 第 2 章では本論文に関連した理論と要素技術について説明し, 従来の TF 顕微鏡が有する問題点を明らかにする. 第 3 章では TF 顕微鏡の光源に用いる Yb ファイバレーザの構成とパルス特性の計測結果について述べる. 第 4 章では時空間ロックイン検出の原理や実験系, 厚みのある試料による検証, 歪みが補償されることによるイメージング性能の改善について述べる. 第 5 章では, TM-ML-TF 顕微鏡の原理と実験系, イメージング性能の評価について述べる. 第 6 章では, MF-TM-TF 技術による干渉抑制の原理と実験系, 干渉抑制の検証と MF-TM-TF 技術を TF 顕微鏡の視野の拡大への応用について述べる. 最後に, 第 7 章において本研究で開発してきた技術に関する知見をまとめ, 開発した技術の生物学・医科学応用への展望を述べて, 本博士論文を締めくくる.

## 第2章 本論文に関連した理論と要素技術

第2章では本論文に関連した理論や要素技術について述べる。まず、本研究で開発した技術全般において用いた非線形光学について述べる。光電場の大きさに対して非線形性を持つ物質にピーク強度の高いパルス照射すると非線形現象が生じる。自己位相変調 (self-phase modulation : SPM) や二光子吸収は非線形現象であり、これらの非線形現象はモード同期発振器や二光子顕微鏡に用いられる。次に、本研究で開発した二光子励起の4次元時空間制御技術の光源として必要となる超短パルスレーザ技術について述べる。モード同期は非線形現象を利用することでフェムト秒パルスを発生させる技術である。モード同期発振器から出力されたパルスがフェムト秒領域のパルス幅を持っていても、広帯域なスペクトル特性を有するフェムト秒パルスがガラスのような物質中を伝播すると分散の影響を受け、パルス幅の伸長やピーク強度の低下を招く。そのため、再びパルス幅が短くピーク強度の高いパルスを得るには、分散によって生じた周波数チャープを分散補償によって取り除く必要がある。一方で、短いパルス幅による高いピーク強度は利得媒質のダメージや強い SPM による複雑なスペクトル位相の歪みを引き起こすため、増幅器においてパルスエネルギーの増幅を制限してしまう。チャープパルス増幅 (chirped pulse amplification : CPA) はチャープが与えられピーク強度を抑えたパルスを増幅することで、パルスエネルギーの高い超短パルスを得る技術である。次に、本研究の要素技術となる3次元イメージング技術として、共焦点顕微鏡, SIM, 二光子顕微鏡, TF 顕微鏡を示について述べる。3次元イメージングにおいて重要となるのは光軸方向に分解能を有することである。そのためには焦点面と異なる深さで生じる背景蛍光を除去・抑制する必要がある。これらのイメージング手法における背景蛍光の除去・抑制メカニズムについて説明する。最後に、補償光学 (adaptive optics : AO), TM-TF 顕微鏡, ML-TF 顕微鏡の説明とともに問題点について述べ、本研究で開発した技術がその解決方法と成り得ることを説明する。

### 2.1. 非線形光学

#### 2.1.1. 非線形光学効果

非線形光学効果は物質に強い光が照射された時に生じる光と物質の非線形な相互作用によって得られる [42]。物質に光が照射されると光電場によって電荷が偏り、分極が生じる。分極  $P$  は

$$P = \varepsilon_0 \chi^{(1)} E \quad (2.1)$$

と表せる。式(2.1)において、 $\varepsilon_0$  は真空の誘電率、 $\chi^{(1)}$  は線形感受率、 $E$  は光電場である。分極が生じた物質中において、電束密度  $D$  は

$$D = \varepsilon_0 E + P = \varepsilon_0 \varepsilon E \quad (2.2)$$

となる。式(2.2)において、 $\varepsilon$  は物質の比誘電率である。ここで、式(2.1)を式(2.2)へ代入することで、物質の比誘電率  $\varepsilon$  は線形感受率  $\chi^{(1)}$  を用いて

$$\varepsilon = 1 + \chi^{(1)} \quad (2.3)$$

と表せる．ここで，感受率  $\chi^{(1)}$  は複素成分を有し，

$$\varepsilon = \left( n + i \frac{\alpha c}{2\omega} \right)^2 \quad (2.4)$$

のように，屈折率  $n$  および吸収係数  $\alpha$  と関係している．そのため，線形感受率  $\chi^{(1)}$  を用いて屈折率  $n$  および吸収係数  $\alpha$  を表すと，

$$n = 1 + \frac{1}{2} \operatorname{Re} \left[ \chi^{(1)} \right] \quad (2.5)$$

$$\alpha = \frac{\omega}{nc} \operatorname{Im} \left[ \chi^{(1)} \right] \quad (2.6)$$

のように記述できる．ここで， $\operatorname{Re}$  および  $\operatorname{Im}$  はそれぞれ線形感受率  $\chi^{(1)}$  の実部および虚部を表している．また，式(2.5)において， $\chi^{(1)}$  が微小量であることを用いて近似を行った．物質に強い光が照射され非線形分極が生じた時，分極の大きさは式(2.1)に非線形項を加えることで

$$P = \varepsilon_0 \chi^{(1)} E + \varepsilon_0 \chi^{(2)} E^2 + \varepsilon_0 \chi^{(3)} E^3 + \dots \quad (2.7)$$

と表せる．式(2.7)において，第2項，第3項は2次，3次の非線形分極の大きさを表し， $\chi^{(2)}$ ， $\chi^{(3)}$  はそれぞれ2次，3次の非線形感受率である．非線形感受率は線形感受率と比較し著しく小さな値を持つため，日常においては非線形光学効果による現象は見られない．一方で，レーザーパルスのような強い電場を有する光を用いると非線形項の大きさが指数関数的に大きくなる．このような条件では非線形項に起因する現象が生じ，波長変換や SPM，多光子吸収のような非線形光学現象を得ることが可能となる．

### 2.1.2. 自己位相変調と二光子吸収

SPM は3次の非線形光学現象であり，パルスの強度に依存する非線形な屈折率変化が時間・空間的な位相変調を引き起こすため，スペクトルの広帯域化や Kerr レンズ効果と呼ばれる空間集光作用を得ることができる [42]．式(2.7)において，レーザー光の電場を振幅  $A$ ，角周波数  $\omega$ ，時間  $t$  を用いて  $E = A \cos(\omega t)$  とすると，3次の非線形分極の項は

$$\begin{aligned} \varepsilon_0 \chi^{(3)} E &= \varepsilon_0 \chi^{(3)} A^3 \cos^3(\omega t) \\ &= \varepsilon_0 \chi^{(3)} A^3 \left( \frac{3}{4} \cos(\omega t) + \frac{1}{4} \cos(3\omega t) \right) \end{aligned} \quad (2.8)$$

と変形でき，基本波  $\omega$  の電場を生じる．そのため，3次の非線形分極が基本波の分極に影響するようになる．この時，線形分極と3次の非線形分極のみが分極に関わり，基本波への影響のみを考慮すると，式(2.1)は，

$$P = \varepsilon_0 \left( \chi^{(1)} + \frac{3}{4} \chi^{(3)} I \right) E \quad (2.9)$$

と変形できる．式(2.2)へ式(2.9)を代入すると，

$$\varepsilon = 1 + \chi^{(1)} + \frac{3}{4}\chi^{(3)}I \quad (2.10)$$

と表すことができる。そのため、強度に依存し変化する屈折率と吸収係数を考慮すると、屈折率  $\tilde{n}$  および吸収係数  $\tilde{\alpha}$  は

$$\tilde{n} = n + n_2 I \quad (2.11)$$

$$\tilde{\alpha} = \alpha + \alpha_2 I \quad (2.12)$$

と書くことができる。ここで、 $n_2$  は非線形屈折率係数、 $\alpha_2$  は非線形吸収係数と呼ばれ、 $\alpha_2$  は後述するように2つの光子を吸収するため、二光子吸収係数と呼ばれる。これらの屈折率  $\tilde{n}$  および吸収係数  $\tilde{\alpha}$  においても式(2.4)の関係が成り立つので、非線形屈折率係数  $n_2$  と二光子吸収係数  $\alpha_2$  はそれぞれ

$$n_2 = \frac{3}{8n} \text{Re}[\chi^{(3)}] \quad (2.13)$$

$$\alpha_2 = \frac{3\omega_0}{4nc} \text{Im}[\chi^{(3)}] \quad (2.14)$$

のように求まる。

屈折率の変化は物質を伝播する光の位相に影響を与えるため、3次の非線形分極は強度に応じた位相変調を生じる。この位相変調において、非線形分極を生じた光自身によって引き起こされる位相変調は SPM と呼ばれ、別の光によって生じる位相変調は相互位相変調と呼ばれる。時間領域では、SPM は瞬時角周波数の変調をもたらす、スペクトルの広帯域化につながる。瞬時角周波数は、

$$\omega(t) = \omega_0 - \frac{d\phi}{dt} \quad (2.15)$$

で表される。式(2.15)において、 $\omega_0$  はパルスの搬送波角周波数、 $\phi$  は搬送波角周波数に対する SPM による位相変調を示す。したがって、光電場の強度が変化すると SPM による位相変調量が変化するため、瞬時角周波数が変調され、スペクトルが広帯域化する。一方で、空間領域では、パルスの空間強度分布に応じた波面変調をもたらす、レンズのような集光作用を生じる。これは Kerr レンズ効果と呼ばれる。SPM は3次の非線形光学現象であるため、これらの現象を引き起こすにはフェムト秒パルスのような高いピーク強度を持つ光を用いる必要がある。後に述べるモード同期ではパルスが共振器内に存在する時、つまりパルスによって引き起こされる非線形現象が得られた時に安定化するように共振器を組むことで、高いピーク強度を持つフェムト秒パルスの発振が得られる。

二光子吸収 [43,44] はピーク強度の高いパルスが物質に照射されることで、線形吸収特性を持たない波長帯であっても2つの光子を同時に吸収する3次の非線形光学現象である。線形吸収は1次の分極に基づく吸収であり、光の電場の大きさに比例して吸収が増加する。式(2.1)において線形感受率の虚部について考えると、分極から生じる光は分極を引き起こした光に対して位相遅れを持つ。結果として、2つの光の間の干渉によって光が減衰し、減衰

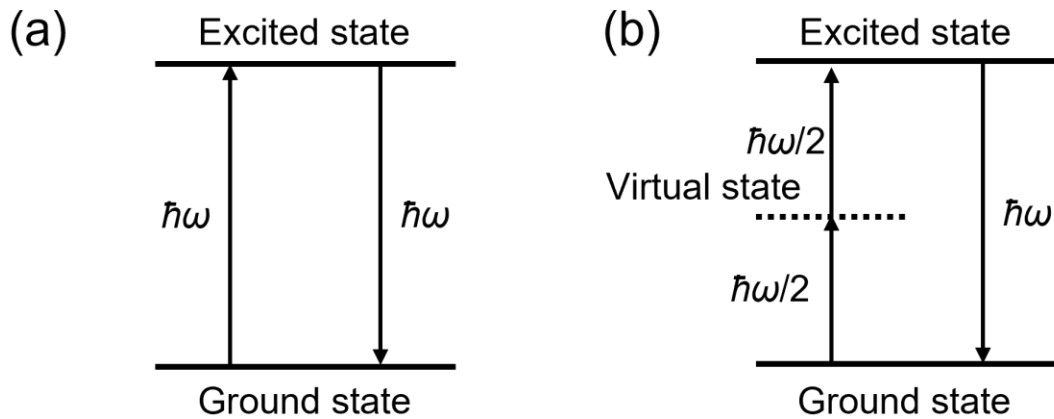


Fig. 2.1 (a) 一光子吸収過程, (b) 二光子吸収過程におけるエネルギー準位図.

した光は物質に吸収されることとなる. 次に, 3 次の非線形感受率の虚部について考えると, 式(2.8)より非線形分極によって生じる基本波には位相遅れが生じるため, 線形分極と同様に基本波の減衰, 吸収が生じる. ゆえに, 線形吸収特性がない波長域においても 3 次の非線形分極によって光を吸収させることができる. エネルギー準位図を用いてこの過程を考えると, 線形吸収では Fig. 2.1(a)のように, 基底準位と励起準位のエネルギー差に対応したエネルギーを持つ光子が物質に入射すると, 1つの光子が吸収され, 原子が励起される. これは光子1つが吸収されるため, 一光子吸収と呼ばれる. 励起された原子が緩和する時, エネルギー準位の差に対応したエネルギーを持つ光子を放出するため, 吸収された光の波長に近い波長の蛍光が生じる. 一方, 3 次の非線形吸収では, Fig. 2.1(b)のように2つの光子が同時に吸収されることで仮想準位を経由し励起準位へ励起されると考えることができる. ゆえに, この過程は二光子吸収と呼ばれる. Fig. 2.1(b)に示すように, 二光子吸収では入射光の2倍のエネルギーを持つ準位へ励起されるため, その蛍光の波長は入射光より短くなる. また, 二光子吸収断面積は  $10^{-49} \text{ cm}^4\text{s}/\text{photon}$  程度であり [45], 強度に比例する, したがって, 二光子吸収確率は強度の2乗に比例することとなる. ここで, したがって, 二光子吸収を発生させるにはフェムト秒パルスのようなピーク強度の高い光源を用いるだけでなく, フェムト秒パルスを対物レンズで集光することで, エネルギーを時間・空間領域において局所化する必要がある. フェムト秒パルスの集光過程では, 焦点に向かって伝播するに伴いビーム径が縮小されていくため, ピーク強度が変調されることとなる. ゆえに, 二光子励起領域はピーク強度が最大となる焦点近傍に3次元的に局所化されることとなる. この原理は, 2.3.3項で述べる二光子顕微鏡で利用されている. 一方で, TF 顕微鏡では広視野照明を行い, 広い範囲で二光子励起を生じる必要があるため, 集光スポットが大きくなる分, 高いパルスエネルギーが必要となる. したがって, 高出力なフェムト秒パルスレーザーが要求される. また, より高次の非線形分極によって三光子吸収, 四光子吸収も可能であり, 二光子吸収も含め,



これらは多光子吸収と呼ばれる。

## 2.2. 超短パルスレーザー技術

### 2.2.1. モード同期

モード同期は共振器内において波長の異なる多数の光の位相を揃えることでレーザーパルスを発生させる技術である [46]. 波長の異なる光が  $N$  個存在する時,  $n$  番目の光の電場は角周波数  $\omega_n$  を用いて,

$$E = E_0 e^{i(\omega_n t + \phi_n)} \quad (2.16)$$

で表すことができる. 式(2.16)において,  $E_0$  は電場の振幅であり, 全ての角周波数における電場の振幅は等しいものとした. また,  $t$  は時間,  $\phi_n$  はその角周波数の位相である. これらの光が重ね合わさると, 合成電場は

$$E_{\text{total}} = E_0 \sum_{n=0}^{N-1} e^{i(\omega_n t + \phi_n)} \quad (2.17)$$

と表すことができる. 式(2.17)において, 共振器内で縦モード間隔は一定であるため, 角周波数の間隔も一定となり,  $n$  番目の光の角周波数  $\omega_n$  は

$$\omega_n = \omega_{N-1} - n\Delta\omega \quad (2.18)$$

と表わせる. また, 式(2.17)において, 全ての各周波数の位相が揃っていると仮定すれば,

$$\phi_n = \phi_0 \quad (2.19)$$

と書ける. したがって, 式(2.17)の合成電場は,

$$E_{\text{total}} = E_0 e^{i\phi_0} \sum_{n=0}^{N-1} e^{i(\omega_{N-1} - n\Delta\omega)t} = E_0 e^{i(\phi_0 + \omega_{N-1}t)} \left[ \frac{1 - e^{-iN\Delta\omega t}}{1 - e^{-i\Delta\omega t}} \right] \quad (2.20)$$

となる. 光の強度は電場の 2 乗に比例するから, 合成電場の強度は,

$$I_{\text{total}} \propto E_0^2 \left[ \frac{1 - e^{-iN\Delta\omega t}}{1 - e^{-i\Delta\omega t}} \right]^2 = E_0^2 \frac{\sin^2(N\Delta\omega t / 2)}{\sin^2(\Delta\omega t / 2)} \quad (2.21)$$

と表せる. 式(2.21)が最大値を取るのは分母が 0 となる時であるから, その条件は,

$$\Delta\omega t / 2 = 0, \pi, 2\pi, \dots, n\pi \quad (2.22)$$

である. つまり, 強度は周期的に最大値を取る. したがって, その時間間隔  $\Delta t_{\text{sep}}$  は,

$$\Delta t_{\text{sep}} = t_{n+1} - t_n = \frac{2(n+1)\pi}{\Delta\omega} - \frac{2n\pi}{\Delta\omega} = \frac{2\pi}{\Delta\omega} \quad (2.23)$$

と求められる. ここで, 共振器内に存在する光の角周波数の間隔は共振器長  $d$  によって決まる縦モード間隔に等しいから,

$$\Delta\omega = \frac{\pi c}{d} \quad (2.24)$$

である. したがって, 式(2.23)に代入すると,

$$\Delta t_{\text{sep}} = \frac{2d}{c} \quad (2.25)$$

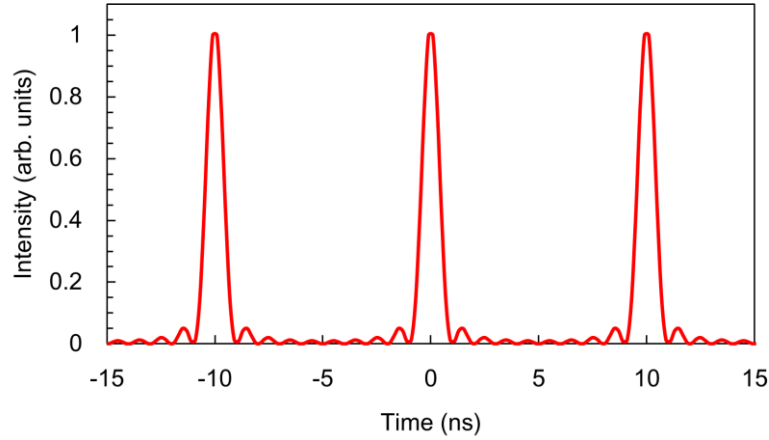


Fig. 2.2 式(2.21)を計算することによって得られたモード同期のパルス列.

と求められる. つまり, パルスの時間間隔  $\Delta t_{\text{sep}}$  はパルスが共振器を一周する時間に等しい. Fig. 2.2 に縦モード数  $N=10$ , 共振器長  $d=1.5$  m とした時の合成電場の強度の振る舞いを示す. パルスが周期的に生じており, その時間間隔は式(2.25)で求められる時間間隔 10 ns に一致する.

モード同期の具体的な方法として, 本研究の発振器で使用した非線形増幅ループミラー (nonlinear amplification loop mirror : NALM) [47]による方法を紹介する. NALM は非線形光ループミラー (nonlinear optical loop mirror : NOLM) [48]を発展させたものであるため, まずは NOLM について説明する. NOLM は Fig. 2.3(a)に示すように,  $2 \times 2$  カプラの一端をループ状にしたデバイスである.  $2 \times 2$  カプラ中では 2 つのファイバのコアが近接しており, 一方のファイバから入力された光が他方のファイバに染み出すことで, 光が分波される. . . NOLM にポート 1 からパルスが入力されると  $2 \times 2$  カプラでパルスが分割され, 時計回りと反時計回りにループ内を伝播する 2 つのパルスが生じる. ここで, 出力比は  $2 \times 2$  カプラで決定され,  $2 \times 2$  カプラで異なるファイバに結合した光には  $\pi/2$  の位相が加わる [48]. 2 つのパルスはループを伝播すると SPM によって位相シフトが生じる. この SPM による位相シフト  $\phi$  は非線形屈折率  $n_2$  を用いて,

$$\phi = \frac{2\pi n_2 |E|^2 L}{\lambda} \quad (2.26)$$

と表せる. ここで,  $E$  はループを伝播するパルスの電場,  $L$  はループの長さ,  $\lambda$  は波長である. 2 つのパルスがループを伝播し, 再び  $2 \times 2$  カプラに戻ってきた時, 2 つのパルスの中で干渉が生じる. ファイバカプラの分岐比が 50:50 であるとすれば, ループを伝播することで SPM によって 2 つのパルスに生じる位相シフトの量は同じである. ここで, 時計回りのパルスと反時計回りのパルスが  $2 \times 2$  カプラにおいて分波されることを考えると, ポート 1 では 2 つのパルスの位相差は 0 となり強め合う干渉が生じ, ポート 2 では 2 つのパルスの位

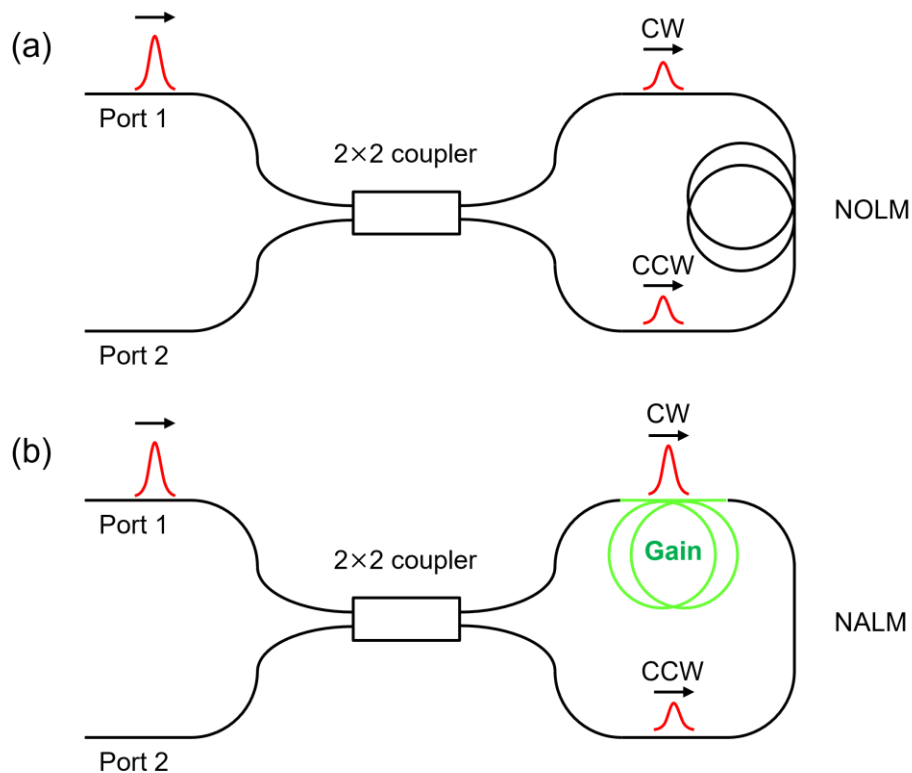


Fig. 2.3 (a)NOLM と(b)NALM の構成. CW : 時計回り, CCW : 反時計回り.

相差は  $\pi$  となり弱め合う干渉が生じる. したがって,  $2 \times 2$  カプラの分岐比が 50:50 の時, ループに入射したパルスはポート 1 から出力されることとなる. 入力したポートからパルスが出力されるため, NOLM はミラーとして機能する. 一方, NALM は Fig. 2.3(b)のように NOLM のループにおいて中心から離れた位置に利得ファイバを接続したデバイスである. Fig. 2.3(b)では, ループを時計回りに伝播するパルスは増幅された後にループの大部分を伝播し, 反時計回りに伝播するパルスはループの大部分を伝播した後に増幅されることとなる. したがって,  $2 \times 2$  カプラの分岐比が 50:50 であっても時計回りと反時計回りで位相シフト量に違いが生じる. この原理を利用し, 例えばループを時計回りに伝播するパルスがループを反時計回りに伝播するパルスに対して  $\pi$  だけ多く位相シフトを受けるようにする. この時,  $2 \times 2$  カプラにおいてポート 1 では弱め合う干渉が生じ, ポート 2 では強め合う干渉が生じるため, 出力はポート 2 から得られる. 2つのパルスの位相差はパルスの強度の差に依存し, 強度はパルスエネルギー, パルス幅に依存する. 利得ファイバによる増幅が一定とすれば, 2つのパルスの位相差はパルス幅で決まることとなる. つまり, ポート 2 からは位相差  $\pi$  が生じるだけ短いパルス幅を有するパルスが得られることとなる. 一方で, ポート 1 からはピーク強度が低く位相差を十分に与えられない CW 光やパルス幅の長いパルスが出力されることとなる. したがって, NALM のポート 1 から出力される光を遮断し, ポート 2

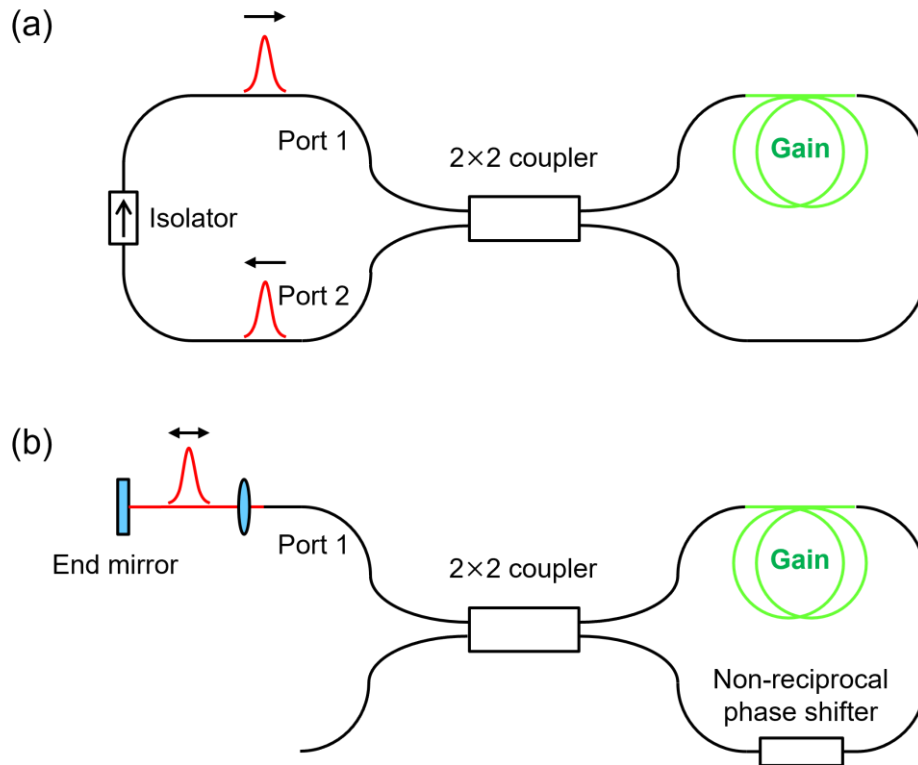


Fig. 2.4 (a)figure8 発振器と(b)figure 9 発振器の構成.

からの出力を再びポート 1 への入力に戻すように共振器を組むと、NALM が過飽和吸収体として機能し、パルス発振が得られる。これが NALM を用いたモード同期発振器である [49]. NALM を用いたモード同期では偏波保持 (polarization maintaining : PM) ファイバを使用できるため、シングルモード (single mode : SM) ファイバ中での偏光の回転を利用する非線形偏波回転方式のモード同期と比べ、温度、湿度の変化や振動の影響を受けづらい。したがって、外部環境の変化に対して安定性が高い。当初、NALM を用いたモード同期発振器は Fig. 2.4(a)のような構成となっており、共振器が 8 字 (figure 8) 型をしていることから、figure 8 発振器と呼ばれた。しかし、NALM 中で位相差  $\pi$  を加えポート 2 からパルスを取り出すためにはピーク強度の高いパルスが必用であり、モード同期のセルフスタートが困難であるという問題があった。figure 8 発振器におけるセルフスタートの問題を解決する構成として、9 字型 (figure 9) 発振器が提案されている [50]. figure 9 発振器は Fig. 2.4(b)のような構成であり、NALM 中に非反転位相シフタ [51] を導入することで、NALM 中で与えなければならない位相差を  $\pi/2$  程度まで低下させることができ、figure 8 発振器に比べ、セルフスタートの閾値を低くできるようになった。この非相反位相シフタはファラデーローテータ、 $\lambda/2$  波長板、 $\lambda/4$  波長板を組み合わせて構成されるもので、入射方向ごとに正反対の位相を与え、与える位相量を波長板の角度で調整できる。

### 2.2.2. 分散と分散補償

物質は光の周波数に対して分散と呼ばれる屈折率分布を有する．分極の感受率は電場の強さに対して非線形性を示すだけでなく，電場の周波数に対して感受率の値が変化する．このことは，異なる周波数に対して異なる屈折率を持つことを意味する．光が物質を伝播した時，物質伝播後の角周波数  $\omega$  における位相  $\phi(\omega)$  は，

$$\phi(\omega) = \phi_0 + \frac{\omega n(\omega)}{c} \Delta l \quad (2.27)$$

と表せる．式(2.27)において， $\phi_0$  は初期位相， $n(\omega)$  は角周波数  $\omega$  における屈折率， $c$  は光速， $\Delta l$  は伝播長である．式(2.18)を中心角周波数  $\omega_0$  において Taylor 展開すると，

$$\phi(\omega) = \phi_0 + \frac{d\phi(\omega)}{d\omega}(\omega - \omega_0) + \frac{1}{2} \frac{d^2\phi(\omega)}{d\omega^2}(\omega - \omega_0)^2 + \frac{1}{6} \frac{d^3\phi(\omega)}{d\omega^3}(\omega - \omega_0)^3 + \dots \quad (2.28)$$

と表現できる．式(2.28)において  $d\phi(\omega)/d\omega$  は群遅延， $d^2\phi(\omega)/d\omega^2$  は 2 次分散または群遅延分散 (group delay dispersion : GDD)， $d^3\phi(\omega)/d\omega^3$  は 3 次分散 (third order dispersion : TOD) と呼ばれる．また，GDD を伝播長  $\Delta l$  で割ったものは群速度分散 (group velocity dispersion : GVD) と呼ばれる．分散はスペクトル位相に歪みを与え，周波数チャープと呼ばれるパルス幅の伸長を招く．

パルスに加わったチャープを補償することでフーリエ変換限界 (Fourier transform limited : FTL) パルスを得ることを分散補償と呼ぶ．二光子顕微鏡に用いられる Ti:Sapphire レーザ [52] や Yb ファイバレーザ [53] の発振波長は近赤外にあり，この波長帯域ではレンズやファイバに用いられる物質は正分散を持つ．そのため，分散補償ではパルスに負分散を与える必要がある．負分散を与える方法として，チャープミラーや回折格子対，プリズム対が用いられる．チャープミラーでは，誘電体多層膜による波長ごとの反射層の違いを利用し，負分散を与える．パルスを反射させるだけで簡単に負分散を与えられるが，回折格子対やプリズム対に比べ，与えられる負分散の量は小さい．また，補償帯域が広い場合は反射層の違いによる影響が現れ分散特性が波打ってしまうため，滑らかな分散特性を得るには複数枚のチャープミラーを組み合わせる必要がある．回折格子対やプリズム対では，分光による波長ごとの光路長の違いを利用し，負分散を与える．負分散の量は素子間の距離で調整することができ，距離を長くすることで大きな負分散を与えることができる．しかし，高次分散や強い SPM で生じる複雑なスペクトル位相歪みを補償することはできない．このような高次分散や複雑な位相歪みは，空間光変調器を用いた 4-f 波形整形器によって補償できる [34]．Fig. 2.5 のように，4-f 波形整形器では 4-f 光学系の両端に回折格子を配置し，4-f 光学系中央のフーリエ面において SLM でスペクトル位相を変調する．SLM は複屈折性を持つ液晶素子の方向を電氣的に制御することで屈折率を変調することができるため，各ピクセルに入射する光に対して任意の位相変調を加えることができる．また，フーリエ面においてパルスは分光され空間的に波長が分布するため，SLM の各ピクセルにはそれぞれ異なる波長の光が入射することとなる．そのため，SLM により位相変調を行うと，波長ごとに異なる位相変

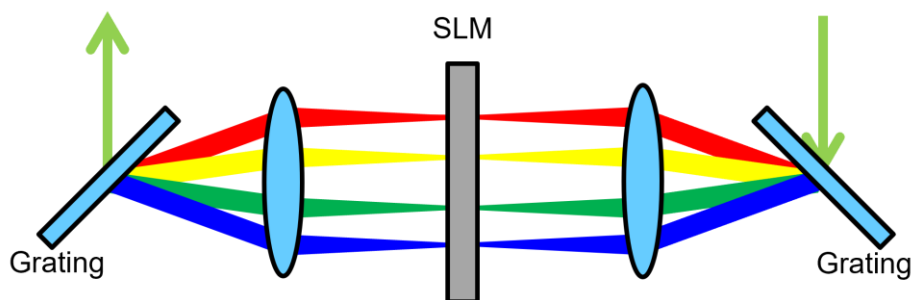


Fig. 2.5 4-f 波形整形器の構成.

調を加えることができる。ゆえに、4-f 波形整形器ではパルスに対して任意のスペクトル位相変調を加えることができ、高次分散や複雑なスペクトル位相歪みを補償することが可能である。一方、4-f 波形整形器で隣り合うピクセル間で $\pi$ 以上となる大きな分散を与えることできない。したがって、大きな分散は、回折格子対やプリズム対で補償し、高次分散や複雑な位相歪みの補償を4-f 波形整形器で補償する必要がある。

### 2.2.3. チャープパルス増幅

CPA の特徴はチャープパルスを増幅することであり、増幅器においてピーク強度を抑えながら増幅できるため、増幅後に圧縮を施すと利得媒質のダメージしきい値を超えるようなピーク強度の高いレーザパルスが得られる [54]。反転分布が形成された媒質に光が入射すると、誘導放出によってレーザ増幅が生じる。発振器ではレーザ増幅された光を共振器によって閉じ込めることでフィードバックを行い、レーザ発振を得る。発振器から出力されるパルスは共振器内に存在する光の一部を取り出したものであるため、パルスエネルギーが低く、しばしば増幅器によって増幅されて用いられる。しかし、パルス幅が短いフェムト秒パルスを増幅すると、ピーク強度が利得媒質のダメージしきい値を超えやすく、利得媒質を破

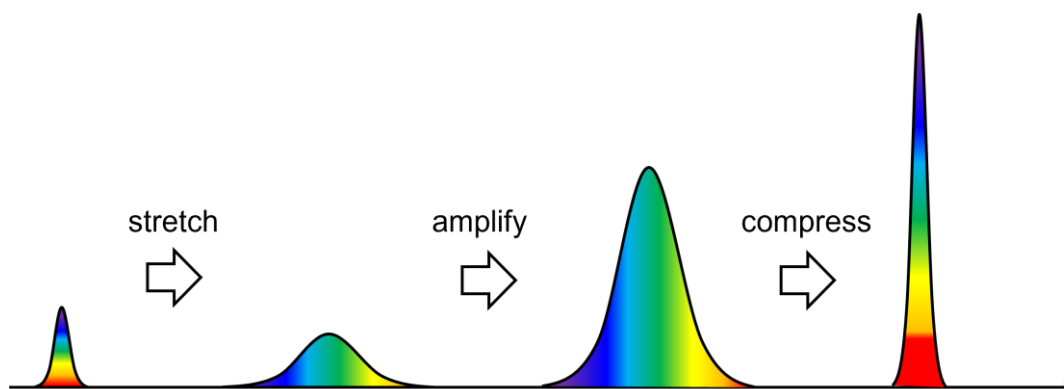


Fig. 2.6 CPA の原理.

損してしまう。また、ピーク強度がダメージしきい値に満たなくても、高いピーク強度によって強い SPM が生じ、スペクトル形状を変化させたり、スペクトル位相を複雑にしたりしてしまう。そのため、パルスエネルギーが利得媒質のダメージしきい値や SPM によって制限される。Fig. 2.6 に示す CPA では、増幅器の前で回折格子対やプリズム対、ファイバストレッチャなどのストレッチャを利用し、パルスにチャープを加える。チャープが加わったパルスはパルス幅が伸長するため、パルスエネルギーを低下させることなくピーク強度を低下できる。このチャープパルスを増幅すると、ピーク強度を抑えたままパルスエネルギーを増幅でき、利得媒質のダメージや強い SPM を抑制できる。増幅器から出力されたチャープパルスをコンプレッサーを用いて圧縮すれば再びチャープ前と同等のパルス幅が得られる。そのため CPA を利用することでパルスエネルギーの大きなフェムト秒パルスを得ることができる。特に、ファイバ増幅器では増幅されたパルスがコア径サイズに閉じ込められながら長距離を伝播するため、 $\mu\text{J}$  以上のパルスエネルギーを得るには CPA だけでなくコア径の大きいラージコアファイバを用いてファイバのダメージや SPM の低減を行う必要がある。

## 2.3. 3次元イメージング技術

### 2.3.1. 共焦点顕微鏡

共焦点顕微鏡は Fig. 2.7 に示すように、対物レンズの焦点と共役な位置にピンホールが配置された、光軸方向に分解能を有する顕微鏡である [3]。励起光には蛍光分子を一光子励起することが可能な点光源を使用し、試料に対して共役な位置に配置する。励起光を対物レンズによって試料に集光することで試料中の蛍光分子が一光子励起され、蛍光が発生する。発生した蛍光を焦点と共役な位置に配置されたピンホールを通過させ、PMT のようなシングルピクセルの受光素子によって計測する。共焦点顕微鏡では一光子励起を用いているため励起光は伝播する経路に分布する蛍光分子に吸収され、励起された蛍光分子が蛍光を生じるようになる。ゆえに、焦点以外で発生する蛍光は背景蛍光となり、焦点で発生した信号が背景蛍光に埋もれ、光軸方向の分解能が得られない。ここで、背景蛍光は対物レンズの焦点と深さが異なる位置で発生するため、受光素子の前で焦点と共役な位置とは異なる場所に焦点を結ぶこととなる。ゆえに、焦点と共役な位置にピンホールを配置することで、焦点で発生した蛍光を通過させながら、焦点以外で発生した蛍光を遮ることができる。したがって、共焦点顕微鏡ではピンホールで背景蛍光が抑制されるため、光軸方向において分解能が得られる。試料の 3 次元像は、試料に対してスポットを 3 次元的に走査することで取得できる。

共焦点顕微鏡を発展させたイメージング手法として、スピニングディスク共焦点顕微鏡がある [55]。従来の共焦点顕微鏡では 1 点に集光されたスポットを走査するため、イメージ取得時間が長いという課題がある。スピニングディスク共焦点顕微鏡では、焦点面と共役な位置に配置された多数のピンホールを有するスピニングディスクを通して励起光を試料に照射することで、焦点面にマルチスポットを発生させる。焦点面で発生した蛍光は励起光と

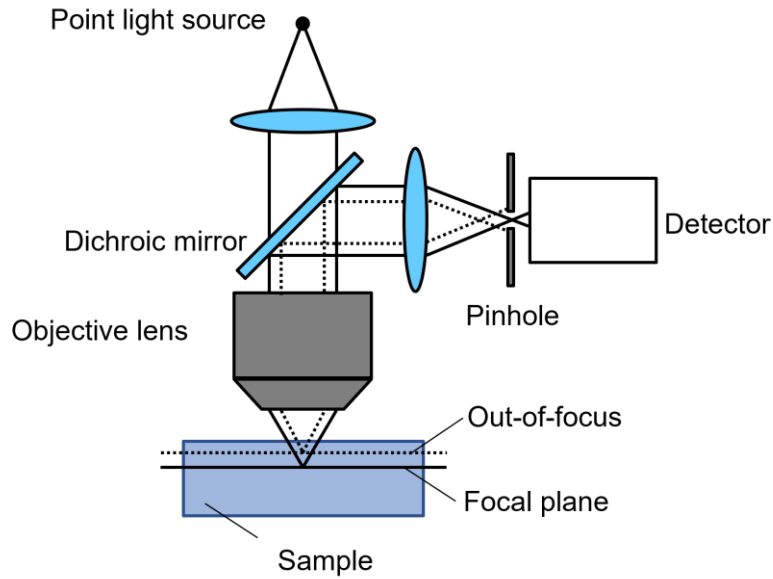


Fig. 2.7 共焦点顕微鏡の原理.

同じ光路を逆に伝播し、スピニングディスクを通過する。スピニングディスクを通過した蛍光を CMOS (complementary metal-oxide semiconductor) カメラのような 2 次元マルチピクセル受光素子に結像させることで、背景蛍光が抑制された信号を取得できる。スピニングディスクのピンホールはディスクが 1 回転すると視野を埋めるように配置されているため、スピニングディスクが回転するごとに焦点面の画像が得られるようになる。したがって、スポット数が増えた分、従来の共焦点顕微鏡と比較しイメージ取得時間を速くできる。

### 2.3.2. 構造化照明顕微鏡

構造化照明顕微鏡 (SIM) は広視野照明顕微鏡において空間強度分布が縞状に整形された光を試料に照射し、断層像を取得するイメージング技術である [35]。2.3.1 節で述べたように、一光子光源を用いた場合、焦点と深さが異なる位置で発生した蛍光は背景蛍光となる。一方で、SIM で用いられる励起光は焦点面近傍のみに縞パターンを形成し、焦点面から離れるにつれて縞パターンが失われていく。したがって、縞パターンの位相変調に伴って変調される信号は、縞パターンが形成された焦点面近傍で発生した信号とみなすことができる。ゆえに、縞パターンの位相変調はロックイン検出として機能し、縞パターンの位相変調で得られた信号を用いて像を再構築することで、光軸方向に分解能を有する蛍光像を取得できる。

SIM による処理は以下のように記述できる [35]。励起光の縞パターンを  $S(t_0, w_0)$ 、一様な励起光を照射した時の蛍光分布を  $\tau(t_1, w_1)$ 、受光素子上の結像面での分布を  $I(t, w)$  とすると、 $I(t, w)$  は、

$$I(t, w) = \iint S(t_0, w_0) \left| \iint h_1(t_0 + t_1, w_0 + w_1) \times \tau(t_1, w_1) h_2(t_1 + t, w_1 + w) dt_1 dw_1 \right|^2 dt_0 dw_0 \quad (2.29)$$



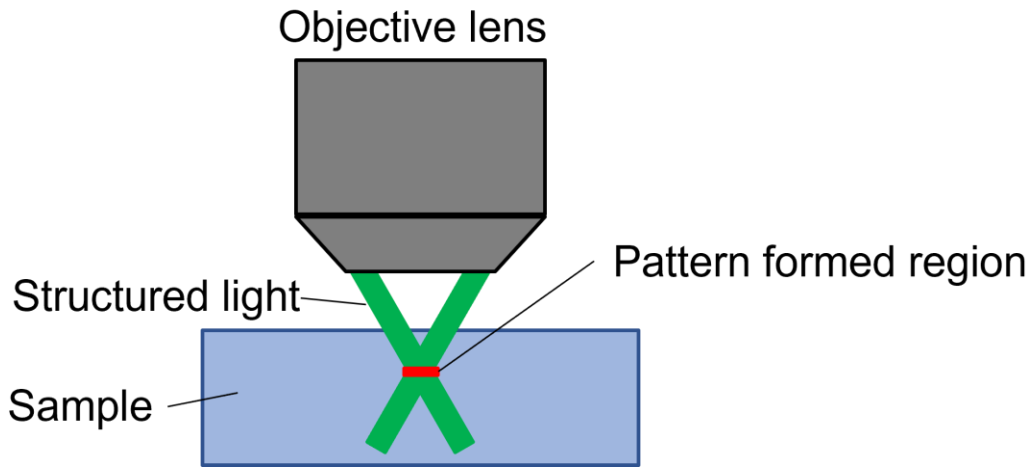


Fig. 2.8 SIM の原理.

のように、一様な励起光を照射した時に得られる蛍光像に対して縞パターンが掛け合わされた蛍光像となる．式(2.29)において、 $h_1$ 、 $h_2$  はそれぞれ対物レンズと結像レンズにおける点像分布関数（point spread function : PSF）である．PSF とは、点光源から生じる光をレンズで集め、結像させた時に生じるスポットの広がりを示す指標である．この広がりの原因は、点光源は無限に小さいスポットであり無限の空間周波数を持つ一方で、レンズの NA は有限でありレンズの NA を超える空間周波数は遮断されてしまうためである．ゆえに、有限の空間周波数幅を持つ光で結像されるスポットは、有限の幅を持つこととなる．そのため、レンズ系を通して得られる蛍光像は、試料で生じる蛍光分布に対してレンズの PSF が畳み込まれたものとなる．また、式(2.29)では簡単のため、変換された座標系を用いており、実空間座標 $(x, y)$ に対しては、

$$I(t, w) = \frac{2\pi}{\lambda}(x, y) n \sin \alpha \quad (2.30)$$

の関係にある．式(2.30)において、 $\lambda$ は波長、 $n \sin \alpha$ はレンズの NA である．式(2.30)において、励起光の縞パターン  $S(t_0, w_0)$ は  $t_0$  方向のみに三角関数で表される 1次元縞パターンを有すると仮定すると、

$$S(t_0, w_0) = 1 + m \cos(\tilde{\nu} t_0 + \phi_0) \quad (2.31)$$

のように表せる．式(2.31)において、 $m$ は変調深度、 $\phi_0$ は縞パターンにおける任意の空間位相である． $\tilde{\nu}$ は規格化された空間周波数であり、

$$\tilde{\nu} = \frac{\beta \lambda \nu}{NA} \quad (2.32)$$

である．式(2.32)において、 $\beta$ は結像倍率、 $\nu$ は対物レンズの焦点面と共役な位置における縞パターンの空間周波数である．式(2.31)を式(2.29)に代入すると、

$$I(t, w) = I_0 + I_c \cos \phi_0 + I_s \sin \phi_0 \quad (2.33)$$

のように、一様に励起光を照射した場合の蛍光像  $I_0$  に対して、縞パターンによって変調さ

れた蛍光像  $I_c$ ,  $I_s$  が足し合わされることとなる。縞パターンで変調された蛍光像  $I_c$ ,  $I_s$  はパターンが結像する焦点面の像であるから、式(2.33)において  $I_0$  を消去することで、焦点面の像が得られる。したがって、励起光の縞パターンの空間位相を  $2/3\pi$  ずつ変調した 3 つの画像  $I_1$ ,  $I_2$ ,  $I_3$  を取得し、

$$I_p = \left[ (I_1 - I_2)^2 + (I_2 - I_3)^2 + (I_3 - I_1)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (2.34)$$

を計算すると、各々の項において  $I_0$  が消去されることで  $I_c$ ,  $I_s$  によって再構築される焦点面の蛍光像  $I_p$  が得られる。

### 2.3.3. 二光子顕微鏡

二光子顕微鏡 [4-6] は、光軸方向に分解能を有し深部観察が可能な顕微鏡である。共焦点顕微鏡では一光子吸収を用いるため、蛍光分子が一樣に分布した試料では Fig. 2.9(a) のように励起光の伝播経路に存在する全ての蛍光分子が励起されてしまい、背景蛍光の発生につながる。ゆえに、一光子励起を用いる場合、光軸方向の分解能を得るには共焦点顕微鏡のようにピンホールによって背景蛍光を遮る必要がある。一方、二光子顕微鏡では励起光の吸収領域が 3 次元的に局所化される二光子吸収を用いるため、Fig. 2.9(b) のように試料で生じる蛍光は焦点のみで発生したものである。したがって、試料で発生した蛍光を単純にシングルピクセルの受光素子で計測するだけで、背景蛍光が抑制された光軸方向に分解能を有する計測が可能である。ゆえに、試料に対して集光スポットを 3 次元的に走査することで、光軸方向分解能  $1\sim 3\ \mu\text{m}$  程度の 3 次元像を取得できる。また、共焦点顕微鏡と同様にマルチスポット化を用いることでイメージ取得時間は高速化できる [11,13,56]。二光子顕微鏡の他の利点として、波長の長い励起光を使用できることが挙げられる。生物試料は散乱媒質であるため、伝播に伴い励起光の光強度が減衰してしまう。散乱の影響は波長が短いほど指数関数的

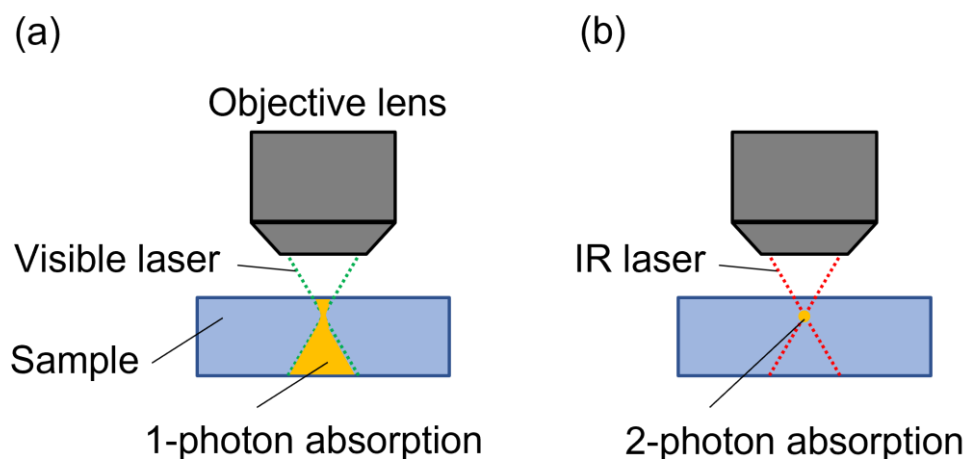


Fig. 2.9 (a)一光子励起蛍光, (b)二光子励起蛍光が発生する領域.

に大きくなるため、励起光に可視光を用いる共焦点顕微鏡は  $100\ \mu\text{m}$  程度の深さまでしか観察できない。一方、二光子顕微鏡では二光子吸収を用いて可視域に吸収を持つ蛍光分子を励起できるため、波長の長い赤外光を使用することができる。したがって、二光子顕微鏡は試料の深部まで光を到達させることができるため、深部観察が可能である。また、生物試料における水の吸収も含めて考慮すると、深部観察に適した波長帯は  $1.3\ \mu\text{m}$  または  $1.7\ \mu\text{m}$  [7] であることが知られている。そのため、近年、これらの波長を有する励起光源を使用した三光子顕微鏡が注目されている。三光子顕微鏡を用いることで、深さ  $1.3\ \text{mm}$  に及ぶマウス脳の深部観察の結果が報告されている [7]。

#### 2.3.4. 時空間集光顕微鏡

時空間集光 (TF) 顕微鏡 [23,24] は分光されたフェムト秒パルスを集光することで得られるパルス幅の変化を利用し、広視野照明でありながら断層像を取得できる多光子顕微鏡である。二光子顕微鏡において断層像を取得するには、集光スポットを走査する必要があり、イメージ取得時間に時間を要する。一方で、断層像を取得するには集光スポットを大きくし、広い範囲で発生した蛍光をカメラで取得する方法も考えられる。しかし、レーザ走査型の二光子顕微鏡の光軸方向の分解能は対物レンズの NA の 2 乗に反比例するため、集光スポットを大きくすると背景蛍光が著しく増加し、十分な分解能が得られなくなってしまう。一方、TF 顕微鏡では伝播に伴うパルス幅の変化を用いるため、大きな集光スポットと光軸方向に局所化された励起領域を両立できる。TF 顕微鏡における光学系の構成と原理を Fig. 2.9 に示す。TF 顕微鏡では、Fig. 2.10(a) のように 4-f 光学系を介して対物レンズの焦点面と共役な位置に回折格子を配置する。Fig. 2.10(b) に示されるようにフェムト秒パルスのパルス幅はスペクトル帯域の広さと反比例するため、回折によって分光され、波長が空間的に分離したフーリエ面ではパルス幅は数百ピコ程度まで伸長している。この分光されパルス幅が伸長したフェムト秒パルスが対物レンズによって試料に集光されると、焦点面に向かって伝播するにつれ、分離された波長が空間的に重なり合うようになる。ゆえに、伝播に伴いパルス幅が短くなり、焦点面においてすべての波長が空間的に重なることで、焦点面において元のパルス幅が再生する。焦点面通過後は波長が分離していくため、再びパルス幅は長くなっていく。したがって、集光強度はパルス幅に依存するため、パルスの伝播に伴う集光強度の変調が可能となり、集光スポットが大きくても光軸方向の励起領域を焦点面近傍に局所化できる。焦点面で発生した蛍光をダイクロイックミラーで励起光と分け、カメラに結像させれば光軸方向分解能  $3\sim 5\ \mu\text{m}$  程度の断層像を取得することができる。この構成は広視野照明となるため、特に広視野 TF 顕微鏡と呼ばれる。

広視野 TF 顕微鏡において、光軸方向応答は次のように表される [57]。Fig. 2.10(a) に示すように、TF パルスの分光方向を x 方向とし、光軸方向を z 方向とする。4-f 光学系を介して試料と共役な位置に配置された回折格子へフェムト秒パルスが入射すると分光され、対物レンズの瞳面では x 方向にスペクトルが分布したライン状のビームプロファイルとなる。

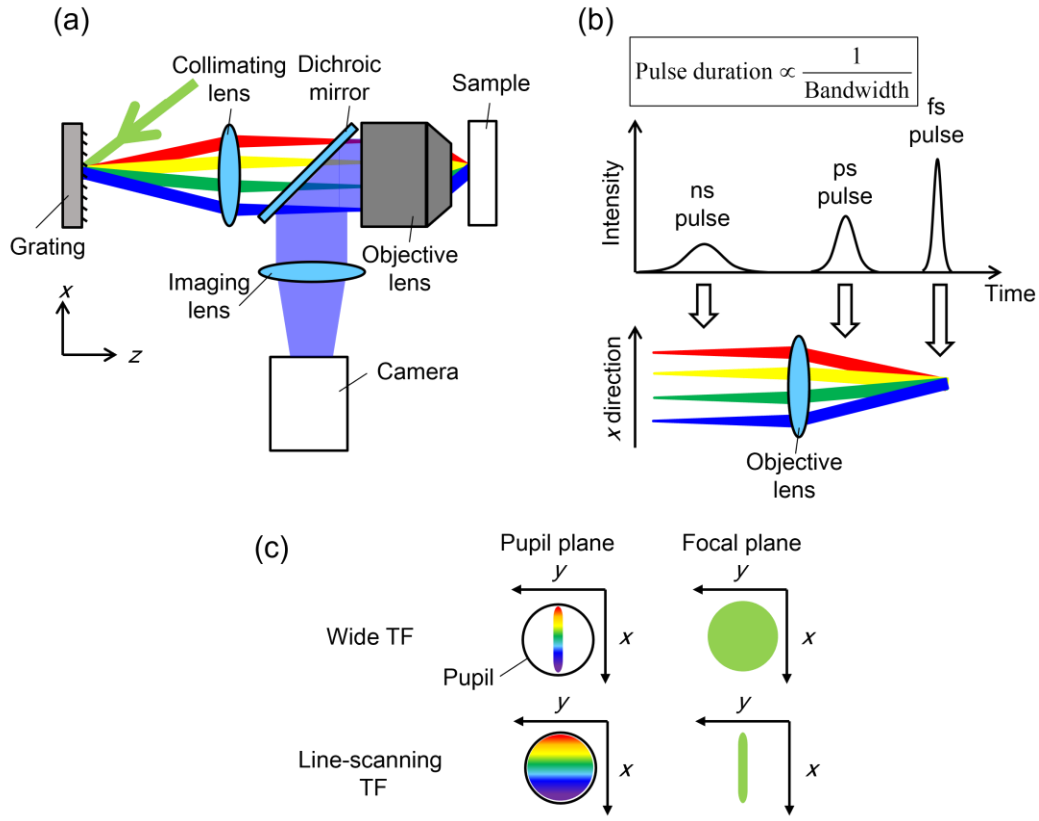


Fig. 2.10 (a)TF顕微鏡の光学系, (b)TF顕微鏡の原理, (c)TF顕微鏡とラインスキャンTF顕微鏡における対物レンズの瞳面および焦点面でのビームプロファイル.

この状況において、スペクトル形状、空間電場形状はガウス型であるとするれば、 $x$ 方向の電場は

$$A_1(x, \omega) = A_0 e^{-\frac{\omega^2}{\Omega^2}} e^{-\frac{(x-\alpha\omega)^2}{s^2}} e^{i\beta\omega} \quad (2.35)$$

と表すことができる. 式(2.35)において、 $A_0$ は規格化定数、 $\sqrt{2\ln 2} \cdot \Omega$ はスペクトルのFWHM、 $\sqrt{2\ln 2} \cdot s$ は単色ビームにおける空間電場のFWHM、 $\alpha$ は回折格子の格子間隔とコリメートレンズの焦点距離で求まり、各スペクトルにおける回折によって生じる空間的な変位に関する比例係数であり、 $\alpha\omega$ が角周波数 $\omega$ における変位に相当する. また、 $2\beta$ はGVDであり、時空間結合によって分光波面がGVDに依存して形成されることを示している. 式(2.35)により表される分光されたパルスが対物レンズによって集光されると、二光子励起の光軸方向応答は、

$$TPE(z) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} I^2(x, z, t) dx dt = \frac{C}{\left[ \left( 1 + \beta\Omega^2 \frac{z-f}{z_M} \right)^2 + \left( \frac{f-z + \beta\Omega^2 z_R}{z_R} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}}} \quad (2.36)$$

と表されることとなる [57]. 式(2.36)において,

$$z_M = \frac{2f^2}{k_0 s^2} \quad (2.37)$$

$$z_R = \frac{2f^2 / k_0}{s^2 + \alpha^2 \Omega^2} \quad (2.38)$$

であり,  $f$ は対物レンズの焦点距離,  $C$ は定数,  $z_M$ は単色光の Rayleigh 長である. また,  $k_0$ は中心角周波数の波数であり, パルスの帯域が広くないことを仮定し, 全ての角周波数の波数は  $k_0$ に等しいとした. 式(2.38)において,  $(s^2 + \alpha^2 \Omega^2)^{1/2}$ は分光され空間チャープしたビームの空間幅であるため,  $z_R$ は空間チャープしたビームの Rayleigh 長であるとみなすことができる. 式(2.36)において,  $\beta^2 \Omega^2$ が小さい時, 二光子励起の光軸方向応答は

$$TPE(z) \approx \frac{C}{\left[1 + \left(\frac{f - z + \beta \Omega^2 z_R}{z_R}\right)^2\right]^{1/2}} \quad (2.39)$$

と近似することができ, 光軸方向分解能は  $2\sqrt{3} \cdot z_R$ と求められる. また, 光軸方向応答がピークを示すのは  $z = f + \beta \Omega^2 z_R$ であり, GVD によって時間焦点面を操作し, 多光子励起領域を光軸方向にシフトできることを示している [57]. この理由は, 次のように説明できる. 分光されたパルスが対物レンズによって集光されると空間的に2次の位相を与えられる. この時, 分光されたパルスは空間的にスペクトルが分離しているため, スペクトルにも同様に2次の位相を与えられることとなる. 分光したパルスが対物レンズの焦点面に向かって伝播すると, 空間位相とスペクトル位相の形状がともに平坦な形状に近づいていき, 対物レンズの焦点面から離れるにつれて再び2次の位相形状となる. したがって, 分光したパルスに予め GVD が与えられていると, 空間位相とスペクトル位相が平坦になる位置が光軸方向にシフトすることとなる. スペクトル位相が平坦な時, パルスは最短となり集光強度が最大となるため, この光軸位置を中心として多光子励起領域が生じることとなる. GVD の値が0である時,  $z$ 方向の原点を対物レンズの焦点面と一致させ, ピークの値を1となるように規格化すると, 二光子励起の光軸方向応答は,

$$TPE(z) \approx \frac{1}{\left[1 + \left(\frac{z}{z_R}\right)^2\right]^{1/2}} \quad (2.40)$$

と表すことができる [58]. 広視野 TF 顕微鏡では通常, 3~5  $\mu\text{m}$  程度の光軸方向分解能が得られる.

また, Fig. 2.10(a)のコリメートレンズをシリンドリカルレンズに変更した構成はラインスキャン TF 顕微鏡と呼ばれる. 広視野 TF 顕微鏡では, 分光方向に対して垂直な  $y$  方向はコ

リメートレンズによって集光され、Fig. 2.10(c)のように瞳面上ではライン状の空間強度分布となるため、 $y$  方向では空間集光特性が得られない。したがって、広視野 TF 顕微鏡の光軸方向分解能は  $x$ ,  $y$  の両方向で空間集光されるレーザ走査型二光子顕微鏡には及ばない。一方、ラインスキャン TF 顕微鏡では、 $y$  方向において、コリメートレンズによって集光されないため、瞳面上では 2 次元に広がった円状の空間強度分布となり、 $y$  方向で空間集光特性が得られる。したがって、広視野 TF 顕微鏡と比較し光軸方向の分解能が向上し、走査型二光子顕微鏡と同等の  $1\sim 3\ \mu\text{m}$  程度の分解能が得られる。ラインスキャン TF における二光子励起の光軸方向応答は、式(2.40)のように表現すると、

$$TPE(z) \approx \frac{1}{1 + \left(\frac{z}{z_R}\right)^2} \quad (2.41)$$

となり、FWHM は  $2 \cdot z_R$  である [58]。ただし、焦点面においてビームプロファイルはライン状となるため、断層像を取得するには 1 次元のラインスキャンが必要である。本博士論文では主に広視野 TF 顕微鏡を対象としているため、広視野 TF 顕微鏡は単純に TF 顕微鏡と表記している。

## 2.4. 時空間集光顕微鏡の性能向上

### 2.4.1. 補償光学

顕微鏡に AO を組み合わせることで、試料で生じる収差の影響を軽減することができる [59,60]。生物試料の内部には、水やタンパク質、脂質など、様々な物質が複雑に散らばって存在している。これらの物質はそれぞれ異なる屈折率を有するため、光が生物試料の内部を伝播すると収差によって波面歪みが生じる。また、対物レンズの浸液と試料の屈折率の差も収差を与え、波面歪みの要因となる。顕微鏡において、励起光や試料で発生した蛍光の波面歪みは分解能や信号強度、コントラストの劣化を招くため、波面歪みを補償しイメージング性能を改善する必要がある。AO は波面歪みを補償する技術であり、デフォーダブルミラーや SLM のような波面補償器を用いて波面を制御することで、試料や光学システムの収差の影響を軽減する。波面補償器を動作させるにあたって必要となるのは波面の計測であり、Shack-Hartman 波面センサーなどの波面計測器が使用される。また、波面歪みが補償されると試料で生じる蛍光が増加し、蛍光像のコントラストが改善するため、これらを指標として波面補償アルゴリズムを動作させることで波面補償器を最適化することも可能である。

レーザ走査型の二光子顕微鏡において、異なる波長は同一の経路を通過して焦点に到達する。ゆえに、試料の分散が無視できるようであれば色収差はなく、試料の空間的な屈折率分布によって生じる単色収差を補償することとなる。一方で、TF 顕微鏡では分光されたパルスが試料を伝播するため、試料の分散が無視できたとしても、試料の空間的な屈折率分布が色収差を生じる。したがって、TF 顕微鏡においては、スペクトル位相を操作することによって分散補償を行うことは、波長ごとの光路差を調整し、色収差を補償することになる。こ

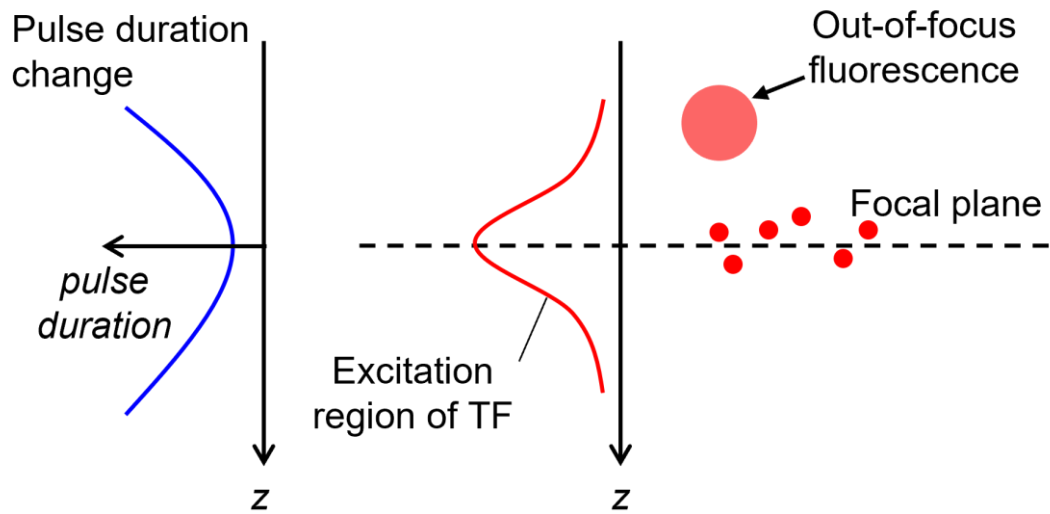


Fig. 2.11 多光子励起領域内における TF パルスのパルス幅変化.

のとき、TF 顕微鏡における集光スポット径が小さければ、スポット内での色収差は一定とみなせる。このような条件では、4-f 波形整形器を用いた分散補償が適用できる [36,61]。しかし、TF 顕微鏡では Fig. 2.11 のように多光子励起領域内でパルス幅が変化するため、アルゴリズムによって補償位相を推定するのが困難となる。そのため、厚みのある試料では分散補償を行うことができず、光軸方向分解能よりも薄い試料を用いることによって、励起領域中でのパルス幅変化を小さくし、分散補償を行っている [61]。

#### 2.4.2. マルチライン化時空間集光顕微鏡

ラインスキャン TF 顕微鏡は多光子顕微鏡と同等の光軸方向分解能を有するが、2次元蛍光像取得のために1次元のラインスキャンが必要であり、イメージング速度の高速化が求められている。ML-TF 顕微鏡では、TF パルスの空間強度パターンを分光方向に沿ったマルチライン状に整形することでラインスキャン TF パルスの多光子励起領域の並列化を行い、イメージング速度の高速化を図っている [38,39]。Fig. 2.12 に DMD を用いた ML-TF 顕微鏡における照明光学系の構成を示す。Fig. 2.12 に示すように、TF パルスの分光方向に対して水平な方向を x 方向、分光方向に対して垂直な方向を y 方向、光軸方向を z 方向とする。DMD は微小ミラーが2次元アレイ状に配置されたデバイスであり、微小ミラーが回折格子として機能する。また、微小ミラーそれぞれの角度を ON/OFF で電氣的に制御できるため、プログラマブルに空間強度パターン変調が行える。そのため、TF 顕微鏡において対物レンズの焦点面に対して共役な位置に DMD を配置することで、空間強度パターンをマルチライン形状にするための空間強度変調 [62]と TF パルス生成のための分光 [63]を同時に行うことができる [39]。DMD 上の空間強度パターンが結像される対物レンズの焦点面では空間強度

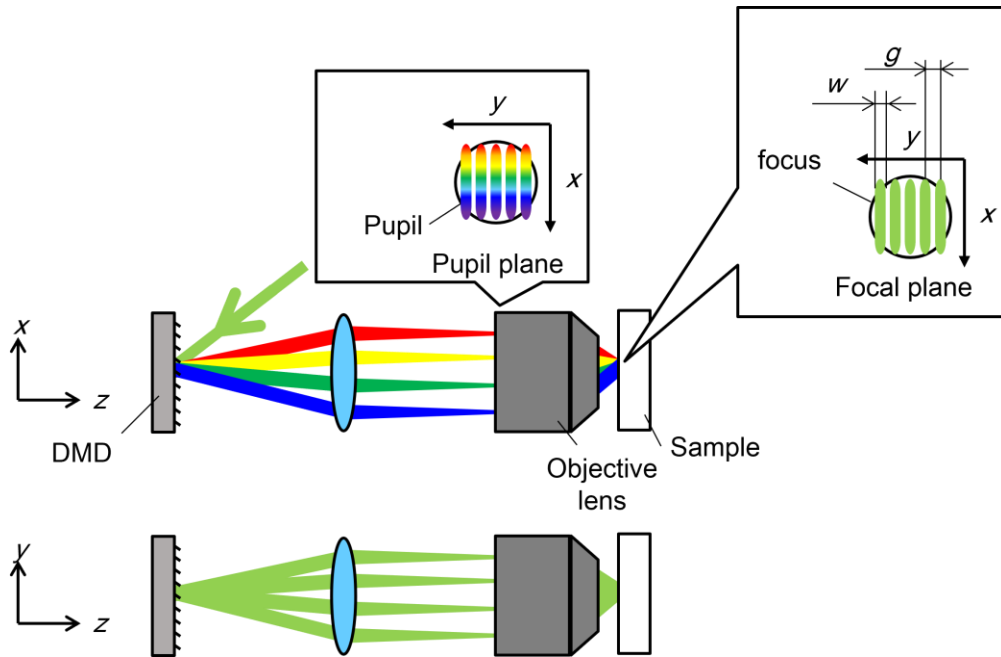


Fig. 2.12 ML-TF 顕微鏡の照明光学系. DMD : デジタルマイクロミラーデバイス.

分布はマルチライン状となるため、2次元蛍光像を得るには、スキャナによるマルチラインのスキャンやDMD上のマルチラインパターン位置のシフトを行い、カメラ上で積算すればよい。

ML-TF 顕微鏡では、マルチライン TF パルスによって励起される面積と光軸方向分解能がトレードオフの関係にあることが問題となる。Fig. 2.12 に示すように、対物レンズの焦点面でのマルチラインのライン幅を  $w_{\text{line}}$ 、マルチラインの間隔を  $g$  とする。まず、ライン幅  $w_{\text{line}}$  について考えると、励起面積を広くするにはライン幅  $w_{\text{line}}$  は大きい方がよい。一方で、ライン幅  $w_{\text{line}}$  が大きくなるとラインは回折限界まで縮小されていないこととなり、光軸方向分解能の向上は最大化されない。次に、マルチラインの間隔  $g$  について考えると、励起面積を広くするにはマルチラインの間隔  $g$  を小さくし、ラインの数を増やした方がよい。しかし、マルチラインの間隔  $g$  を狭くすると、回折光の回折角が大きくなる。ゆえに、高次の回折光が対物レンズから外れてしまい、対物レンズの瞳面上における強度分布は、間隔の大きなマルチラインとなり、瞳を満たすことができない。また、マルチライン TF パルスの干渉による Talbot 効果によって光軸方向において対物レンズの焦点面とは異なる位置に DMD 上のパターンが形成されてしまう [64]。これは、焦点面と異なる位置で背景蛍光が生じることに繋がり、光軸方向応答を劣化させてしまう。Talbot 効果による光軸方向応答の劣化を抑制するにはマルチラインの間隔  $g$  を大きくすればよいが、一方で、励起面積は狭くなってしまふ。したがって、ML-TF 顕微鏡では光軸方向応答の劣化も考慮し、ライン幅  $w_{\text{line}}$ 、ライン間隔  $g$  を最適化する必要がある。



### 2.4.3. 時間多重化時空間集光顕微鏡

TF 顕微鏡に echelle 回折格子による TM 化を組み合わせると、TF パルスの分光方向に対して垂直な方向で対物レンズによる空間集光が得られるため、TF 顕微鏡の光軸方向分解能を向上できる [37]. TM-TF 顕微鏡は仮想イメージフェーズアレイ (virtually imaged phased array : VIPA) を用いても可能である [65]が、ここでは echelle 回折格子を用いた方法について説明する. Fig. 2.13(a)に透過型 echelle 回折格子による TM 化の原理を示す. echelle 回折格子は格子部が階段状になった回折格子である. echelle 回折格子における階段の大きさを Fig. 2.13(a)のように階段の幅が  $w$ , 厚みが  $d$  であるとする. また, TF パルスの分光方向に対して水平な方向を  $x$  方向, 分光方向に対して垂直な方向を  $y$  方向, 光軸方向を  $z$  方向とする. echelle 回折格子へ入射したパルスは  $y$  方向において分割され, 離散的な時間遅延を与えられて echelle 回折格子から出射する. ここで, 隣り合うパルスにおける時間差  $\Delta t$  は空気と echelle 回折格子の材料における屈折率の違い及び階段の厚み  $d$  により求められるから,

$$\Delta t = d \left( \frac{1}{c} - \frac{1}{v_g} \right) \quad (2.42)$$

となる [66]. 式(2.42)において,  $v_g$  は echelle 回折格子の材質中における群速度,  $c$  は光速である. パルスのコヒーレンス時間を  $\Delta t_{\text{coherence}}$  とすると,  $\Delta t \gg \Delta t_{\text{coherence}}$  の時, 隣り合うパルス同士は干渉しなくなり, 個々のラインビームとして振る舞うようになる. この時, ラインビームの  $y$  方向の幅は echelle 回折格子の階段の幅  $w$  となるため, 階段の幅  $w$  が小さければ単一の微小スリットを通過した時のようにラインビームが  $y$  方向に拡散するようになる. したがって, Fig. 2.13(b)のように echelle 回折格子が対物レンズの焦点面に対し, 4-f 光学系を介して共役な位置に配置されていれば, echelle 回折格子で  $y$  方向に拡散したビームは対物レンズによって空間集光されることとなり, echelle 回折格子が焦点面に結像される. ゆえに, ラインスキャン TF 顕微鏡と同様に,  $y$  方向の空間集光が加わる分だけ TM-TF 顕微鏡の光軸方向分解能は向上する. echelle 回折格子では, 格子間隔が広く, 回折角が小さくなるため, 高次の回折光まで用いることができ, 対物レンズの瞳面上の空間強度分布は瞳面を隙間なく埋めることになる. したがって, 対物レンズによる空間集光を最大まで利用でき, 多光子顕微鏡やラインスキャン TF 顕微鏡と同等の  $1 \mu\text{m}$  程度の光軸方向分解能を得ることができる [37].

TM-TF 顕微鏡で光軸方向分解能の向上を最大化するには対物レンズの焦点面において, 個々のラインビームが回折限界以下のサイズまで縮小される必要がある. 光軸方向分解能が最大化される条件は,

$$\frac{w}{M_1 M_2} \leq s \quad (2.43)$$

と表すことができる. 式(2.43)において,  $M_1$ ,  $M_2$  はそれぞれ回折格子に対する echelle 回折格子の結像倍率, 回折格子の試料に対する結像倍率であり,  $s$  は回折限界のスポットサイズを表している. ここで, echelle 回折格子の階段の幅  $w$  を小さくして式(2.43)を満たそうとし

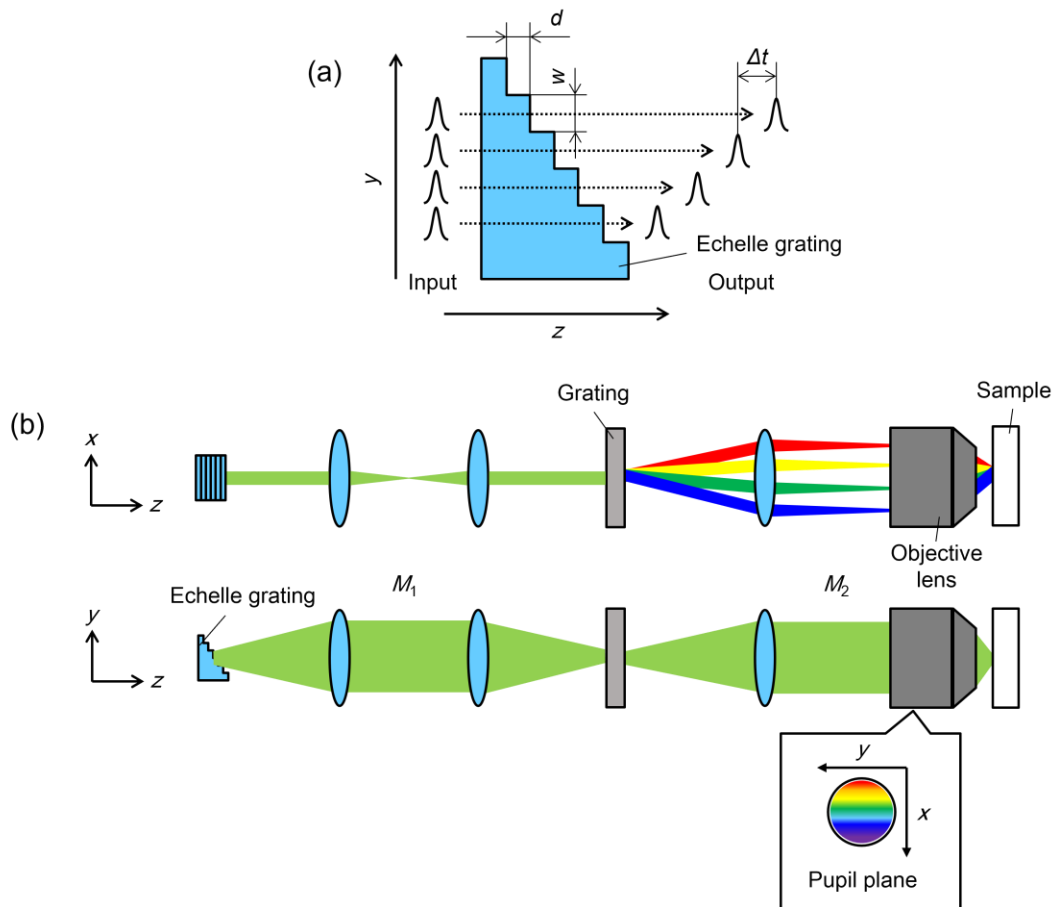


Fig. 2.13 (a)echelle 回折格子による TM 化の原理. (b)TM-TF 顕微鏡における照明光学系の構成.

た場合、echelle 回折格子から出射される回折角が大きくなってしまい、高次の回折光が対物レンズの瞳面から外れてしまう。そのため、階段の幅  $w$  は高次の回折光が対物レンズの瞳面に入射する程度に大きくする必要がある。ゆえに、式(2.43)を満足するには試料に対する echelle 回折格子の結像倍率  $M_1M_2$  を高く設定する必要がある。一方で、試料に対する echelle 回折格子の結像倍率  $M_1M_2$  を高くすることは視野を制限する要因となる。また、TM-TF 顕微鏡の他の問題点として、対物レンズの焦点において多光子励起領域が傾いてしまうことがある。echelle 回折格子で分割されたパルスは光軸方向において異なる位置で回折するため、対物レンズの焦点において光軸方向に異なる位置に集光されることとなり、多光子励起領域に傾きが生じることとなる。ここで、スポットの端から端までに echelle 回折格子の階段が  $n$  段使われることを考えると、スポットの両端の間における光軸方向の位置ずれは  $nd/(M_1M_2)^2$  と表すことができる。階段数  $n$ 、階段の厚み  $d$  が大きくなり、結像倍率  $M_1M_2$  が小さくなると視野内において励起領域が光軸方向に傾き、観察光学系の焦点面から外れ蛍光像の歪みにつながってしまう。ゆえに、光軸方向の位置ずれ  $nd/(M_1M_2)^2$  が Rayleigh 長以内に収まるようにパラメータを設定する必要がある [37]。

#### 2.4.4. 時空間集光パルスを用いたパターン照明

TF パルスを用いてホログラフィックパターン照明を行った場合、分光方向においてマルチスポットのスポットが重なっても干渉縞が生じない [33]. これは、回折光を用いているため、分光方向においてパルスフロントに傾きが生じていることが理由である [67]. 回折素子による分光方向を  $x$  方向、分光方向に対して垂直な方向を  $y$  方向、光軸方向を  $z$  方向とする. ビーム径  $d$  のパルスが回折素子に対して角度  $\theta$  で入射し、 $0$  度で出射される場合、Fig. 2.14 のようにパルスフロントに角度  $\theta$  の傾きを持って出射されるとみなすことができる. ここで、 $x$  方向に沿った過渡的なビーム径  $d_{\text{tran}}$  は、

$$d_{\text{tran}} = \frac{l}{\sin \theta} = \frac{c}{\tau \sin \theta} \quad (2.44)$$

で表せる. この時、 $l$  は光軸方向のビームの厚みであり、光速  $c$  とパルス幅  $\tau$  で求められる. ビーム径  $d=3$  mm, パルス幅  $\tau=100$  fs ( $l=30$   $\mu\text{m}$ ) のパルスが回折素子へ入射角  $\theta=23.1^\circ$  で入

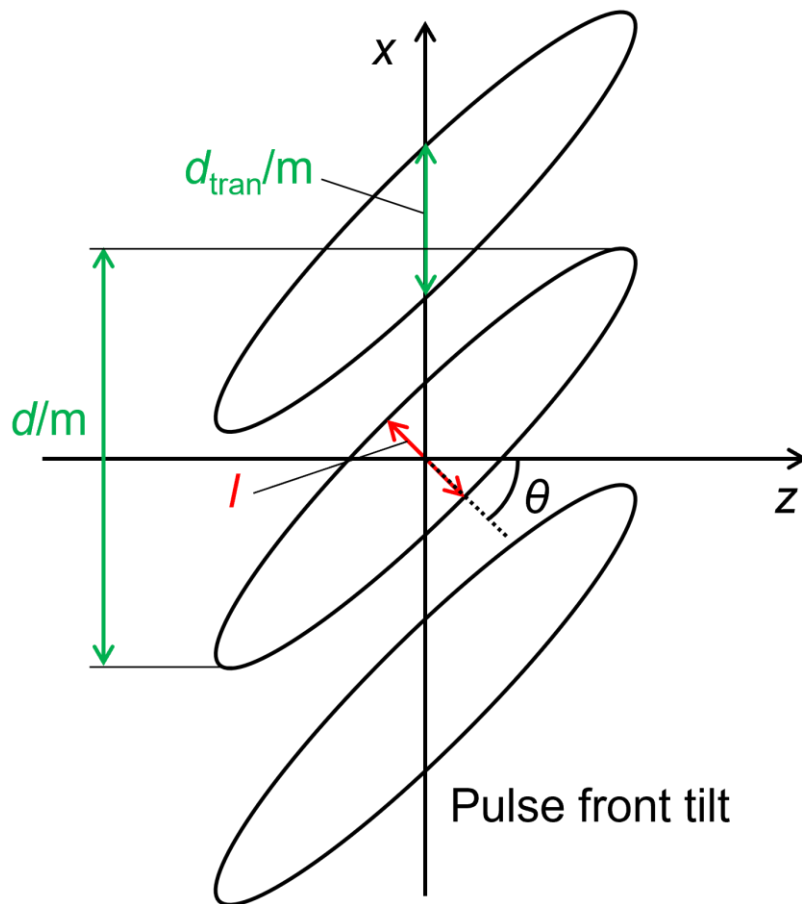


Fig. 2.14 TF パルスを用いたパターン照明におけるパルスフロントの傾きによる干渉抑制の原理.  $d$ : 回折素子上での  $x$  方向のビーム径,  $d_{\text{tran}}$ : 回折素子上での  $x$  方向に沿った過渡的なビーム径,  $l$ : パルスの厚み,  $m$ : 結像倍率.

射する場合、 $d_{\text{tan}}=76.5\ \mu\text{m}$  となる。結像倍率  $m$  が 100 倍の集光光学系でこのパルスが試料に照射されると、焦点面において幅  $0.765\ \mu\text{m}$  のラインが  $x$  方向にスキャンされるように振る舞い、直径  $30\ \mu\text{m}$  のスポットを発生する。そのため、パターン照明においてスポットが空間的に重なっていても、時間的にはパルスは重なっておらず、隣り合うスポットに干渉縞は発生しない。一方で、パルスフロントの傾きは  $x$  方向のみであるため、 $y$  方向においてスポットが重なると、干渉縞が生じてしまう [33].

## 2.5. まとめ

第 2 章では本論文に関連した理論や要素技術について述べ、本論文において解決に取り組む TF 顕微鏡における 3 つの問題がどのような理由で生じているかについて説明した。まず、TF 顕微鏡において厚みのある試料中で分散補償が難しいのは、多光子励起領域内で TF パルスのパルス幅が変化するため、補償アルゴリズムによって補償位相を得ることが困難であるからである。そのため、今までは TF パルスの分散補償は薄い試料を用いることで多光子励起領域を光軸方向に小さくし、多光子励起領域内でのパルス幅の変化が小さくなるようにしていた。次に、多光子顕微鏡と比較し TF 顕微鏡の光軸方向分解能が低いのは、TF 顕微鏡では分光方向に対して垂直な方向において、パルスが対物レンズの瞳を満たしていないからである。TF 顕微鏡を改良した TM-TF 顕微鏡では多光子顕微鏡と同等の光軸方向分解能が得られるが、光軸方向分解能を最大化するためには試料に対して echelle 回折格子を高倍率で結像させる必用があり、視野を制限する要因となる。また、MF-TF パルスによるパターン照明では、分光方向に対して垂直な方向において集光スポットが近接すると隣り合うスポット間で干渉縞が発生し、均一な集光スポットを発生することができない。この理由は、分光方向に対して垂直な方向にはパルスフロントの傾きがないからである。これらの 3 つの問題に加え、TF 顕微鏡では強度の 2 乗に比例して生じる二光子吸収を広い範囲で発生させる必用があるため、高出力な励起光源が要求される。第 3 章以降において、3 つの問題の解決方法として提案する時空間ロックイン検出技術、TM-ML-TF 顕微鏡、MF-TM-TF 顕微鏡および本論文の TF 顕微鏡に用いる光源である Yb ファイバレーザについて述べる。

## 第3章 Yb ファイバレーザの開発

広視野照明を行う TF 顕微鏡では、広い領域で多光子励起を誘起するため高出力な光源が求められる。第 4 章以降で用いる TF 顕微鏡の光源として、高出力なフェムト秒パルスが得られる Yb ファイバレーザを開発した。発振器として温度・湿度の変化や振動に対する安定性が高い figure 9 モード同期発振器を構築した。発振器からの出力をシード光とし、4 段の増幅器で構成される CPA でシード光を増幅した。分散補償には、主に 2 次、3 次の低次分散の補償のために回折格子対を、4 次以上の高次分散の補償のために 4-f 波形整形器を使用した。分散補償後のパルスを干渉自己相関 (interferometric autocorrelation : IAC) 計測によって計測し、パルスの時間特性を確かめた。以下ではこれらのシステムの構成および発生したパルスの特性について述べる。

### 3.1. figure 9 モード同期発振器

figure 9 モード同期発振器の構成を Fig. 3.1 に示す。励起光として、波長 976 nm のファイバ結合半導体レーザ (laser diode : LD) を使用した。波長分割多重 (wavelength division multiplexing : WDM) カプラを使用し、LD から出力された励起光を figure 9 発振器の NALM ループを構成する PM ファイバへ結合した。偏波保持ファイバ中を伝播した励起光によって、Yb 添加ファイバコア内の Yb イオンを励起した。Fig. 3.1 において、各ファイバの長さはそれぞれ(A) 2 m, (B) 1.4 m, (C) 0.20 m, (D) 0.57 m である。ここで、Yb 添加ファイバがループの中心からずれて配置されることで、NALM が構成される。ループの両端には FC/APC コネクタが付属し、ファイバコリメータを接続することでファイバから出射される光をコリメートした。時計回り、反時計回り方向にループを伝播し、出射されるパルスの偏光がそれぞれ s 偏光, p 偏光となるよう、ファイバを回転させた。ループの両端から出射したパルスは偏光ビームスプリッタ (polarization beam splitter : PBS) で合波される。この第 1PBS の後ろに配置されたファラデーローテータ, 1/2 波長板, 1/4 波長板は、非反転位相シフタとして機能し、第 2PBS が偏光ゲートとして機能する。光強度の高いパルス光が p 偏光となることで PBS を透過し、共振器内を伝播するように非反転位相シフタを調整することで、モード同期発振が得られる。モード同期発振が得られる場合でもパルスが s 偏光成分を有する場合は、一部の光が PBS の出力ポート 2 から出射される。ファイバ及び光学素子で加わる分散を補償するため、透過型回折格子を用いた回折格子対を使用した。パルスは回折格子対の後ろの平面ミラーで反射されることで光路を逆に伝播し、NALM ループ手前の第 1 PBS で分割されて再び NALM ループへ入射される。平面ミラー前の 1/4 波長板は光が往復で通過すると 1/2 波長板として機能する。これを使用し、出力ポート 1 から取り出す出力および NALM ループへ戻す出力の割合を調整した。Fig. 3.1 の構成において、出力は出力ポート 1, 2 からそれぞれ得られる。出力ポート 1 から取り出されるパルスは、共振器を周回したパルスのみであるが、出力ポート 2 から取り出される光は共振器を周回したパルスだ

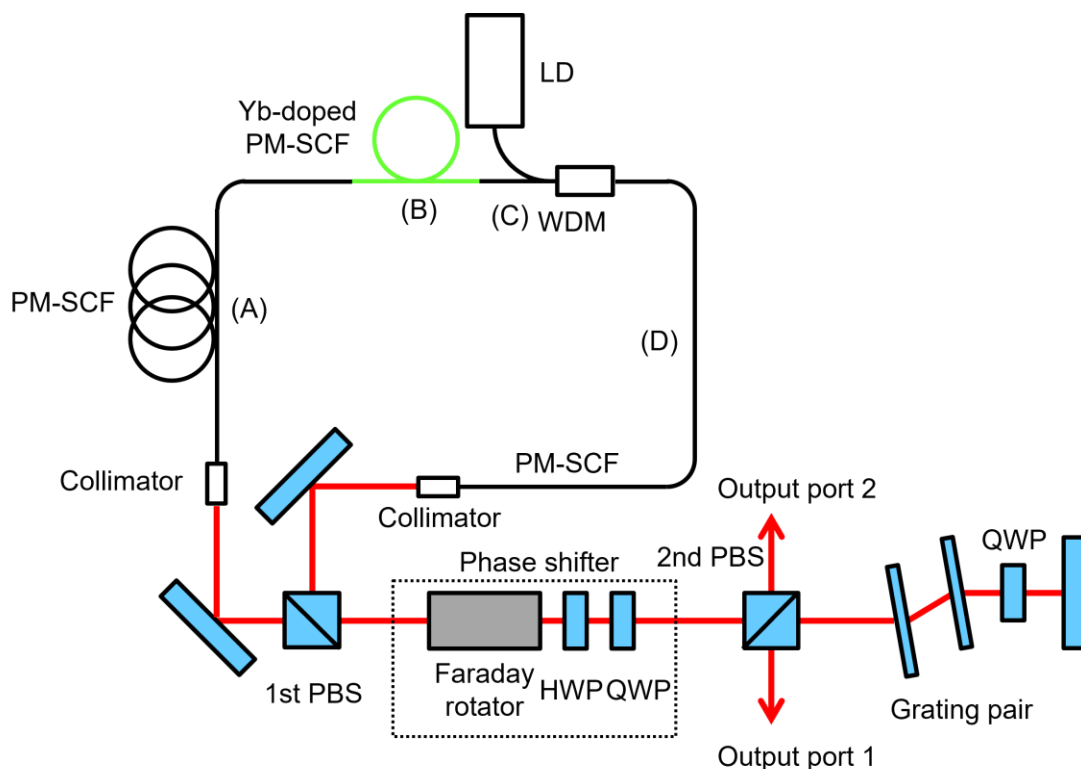


Fig. 3.1 figure 9 モード同期発振器の構成. LD : 半導体レーザ, WDM : 波長分割多重カプラ, PM-SCF : 偏波保持シングルクラッドファイバ, PBS : 偏光ビームスプリッタ, HWP : 1/2 波長板, QWP : 1/4 波長板.

けでなく、光強度が低いために、共振器を周回せずに出た光成分もある。そのため、出力ポート 1 から出力されるパルスを増幅器のシード光とした。

強い非線形性が得られるファイバモード同期発振器では容易にダブルパルス発振が生じてしまう。ダブルパルス発振するとスペクトルへの干渉縞の発生やピーク強度の低下が生じる。そのため、発振器の出力特性を計測し、シングルパルス発振していることを確かめる必要がある。モード同期発振した時の出力特性として、分光器で計測したスペクトルを Fig. 3.2 に示す。励起出力を 130 mW に設定し、非反転位相シフタ内の 1/4 波長板および 1/2 波長板を回転させることでスペクトルの広がりが生じ、モード同期発振を得た。モード同期発振時の平均出力は 8.0 mW であった。スペクトル分解能 0.4 nm の分光器で計測されたスペクトルは 2 つのピークを有し、ピーク波長は 1064 nm であった。また、ダブルパルス発振によるスペクトルの干渉縞は見られない。Fig. 3.3 に高速フォトダイオード (photo-diode : PD) で計測したパルス列を示す。高速 PD として、帯域幅 5 GHz, 立ち上がり時間 70 ps, 立ち下がり時間 110 ps の PD (Thorlabs, DET08CFC) を使用した。Fig. 3.3 より、パルス間の時間間隔は 22.8 ns であり、繰り返し周波数は 43.4 MHz である。平均出力と繰り返し周波数から、パルスエネルギーは 0.17 nJ と求められた。また、モード同期発振器における共振器長

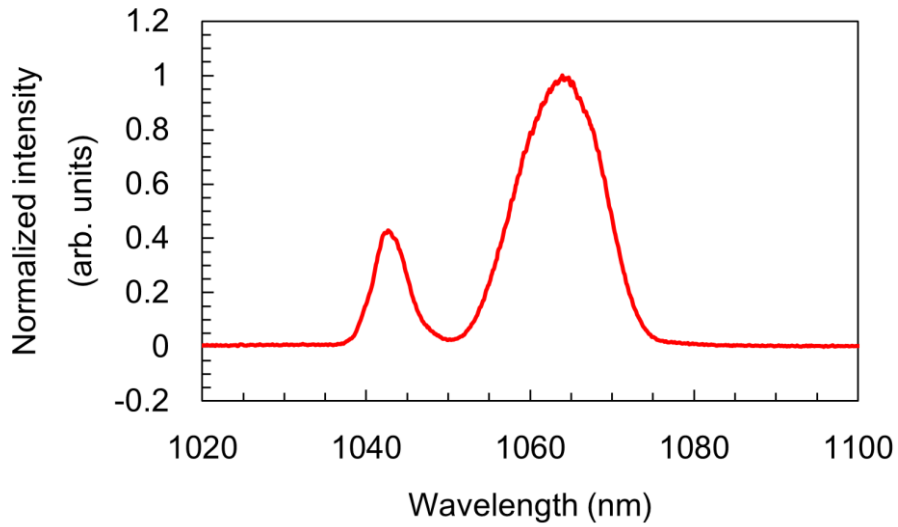


Fig. 3.2 Figure 9 モード同期発振器のスペクトル.

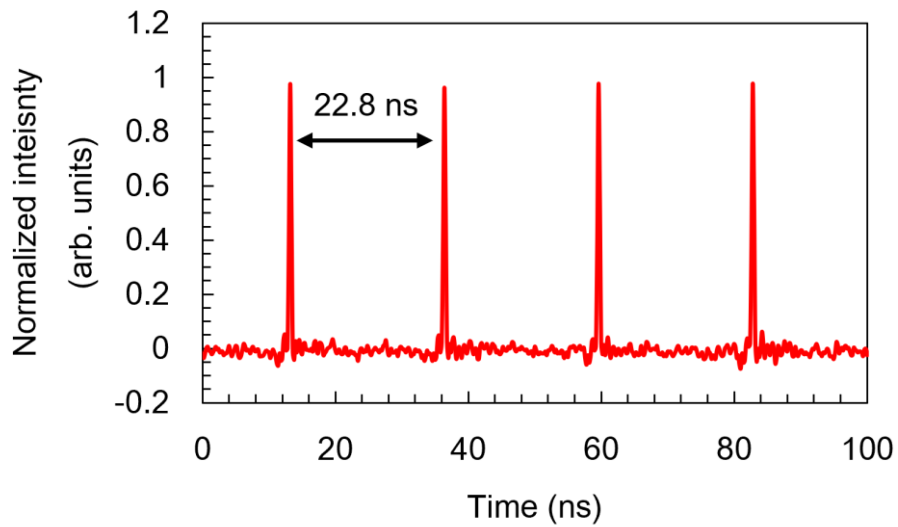


Fig. 3.3 高速 PD で計測したパルス列.

とパルス間隔の関係から、パルス間隔は共振器長 6.8 m に対応しており、ダブルパルス発振の兆候は見られない。しかし、これらの計測だけでダブルパルス発振していないとは言い切れない。ダブルパルス発振している場合、2つのパルス間の距離に応じてスペクトルに干渉縞が現れる。パルス間の距離が  $l$  である場合、波長  $\lambda$  において2つのパルスの位相差  $\Delta\phi$  は、

$$\Delta\phi = \frac{l\Delta\lambda}{\lambda_0^2} = \frac{c\tau\Delta\lambda}{\lambda_0^2} \quad (3.1)$$

で表される。ここで、 $c$  は光速、 $\tau$  はパルスの時間間隔である。そのため、波長ごとに位相

差が異なり、スペクトルに干渉縞が生じる。パルス間の時間間隔  $\tau$  が長くなるとスペクトルの干渉縞の間隔が細くなり、間隔が分光器の分解能より細かい場合、分光器で干渉縞を検出できない。使用した分光器の波長分解能は 0.4 nm であるため、測定可能な最大のパルス間の時間間隔は 29.4 ps である。一方で、Fig. 3.3 のパルス列の計測に用いた高速 PD では 100 ps よりも短い時間間隔のダブルパルスを時間領域で計測することは困難である。したがって、分光器と高速 PD で計測できない領域にダブルパルスが存在しないか確認するため、発振器の出力を回折格子で分光し、分光面の空間強度分布をカメラで取得した。分光器より高分解能な条件でスペクトル形状を計測することで、ダブルパルスに起因するスペクトルの干渉縞がないことを確認した。これらの結果よりシングルパルス発振していることを確かめた。

### 3.2. チャープパルス増幅器

Yb ファイバ CPA システムの構成を Fig. 3.4 に示す。シード光として、前節で述べた Yb ファイバ発振器の出力ポート 1 からの出力を用いた。出力ポート 1 の直後にファラデーアイソレータを配置し、発振器の不安定化を招く戻り光を抑制した。CPA を行うため、ファイバ結合後にファイバストレッチャを伝播させ、 $7.5 \text{ ps}^2$  の 2 次分散、 $-0.087 \text{ ps}^3$  の 3 次分散をシード光に与えた。後段の増幅器では PM ファイバを使用しているが、ファイバストレッチャは PM ファイバではない。そのため、偏波コントローラを用いて増幅器へ導かれる出力が最大となるように偏光を調整した。偏光が調整されたパルスをコア径  $6 \mu\text{m}$ 、長さ 1.2 m の Yb 添加 SM ファイバを使用する増幅器 1 段目へと導き、増幅した。励起には波長 976 nm の LD を使用し、WDM を用いて励起光を結合した。励起パワー 780 mW で前方励起し、平均出力 120 mW (パルスエネルギー 2.7 nJ) が得られた。その後、パルスを空間に取り出し、ロングパスフィルタ (long-pass filter : LPF) を施した上、4-f 波形整形器へ導いた。4-f 波形整形器の後、再びファイバに結合し、増幅器 2 段目へと導いた。増幅器 2 段目ではコア径  $6 \mu\text{m}$ 、長さ 1.0 m の Yb 添加 SM ファイバを使用した。励起には波長 976 nm の LD を 2 台使用し、WDM を用いて結合させた。励起出力 1.6 W で前方励起し、平均出力 790 mW (パルスエネルギー 18 nJ) を得た。後段の増幅器において 1 パルスあたりの利得を増やすため、増幅器 2 段目の後ろにおいて音響光学変調器 (acousto-optic modulator : AOM) でパルスの繰り返しを 710 kHz まで低下させた。この理由は、2.1.2 節で述べたように、二光子吸収確率は強度の 2 乗に比例するため、励起光の平均出力が同じであれば繰り返しを低下させ、1 パルスあたりのパルスエネルギーを高くした方が、励起効率が高くなるためである。AOM の変調信号の発生にはパルス遅延発生器 (Stanford Research Systems, DG645) を使用した。Yb ファイバ発振器の出力ポート 2 からの出力を PD で受光し、パルス遅延発生器のトリガ信号として使用した。増幅器 3 段目ではコア径  $25 \mu\text{m}$ 、長さ 2.5 m のダブルクラッド Yb 添加ファイバを使用した。ファイバを伝播する光のマルチモード化の抑制および高励起による熱の蓄積を軽減するため、ダブルクラッド Yb 添加ファイバを水冷された銅製のリールに



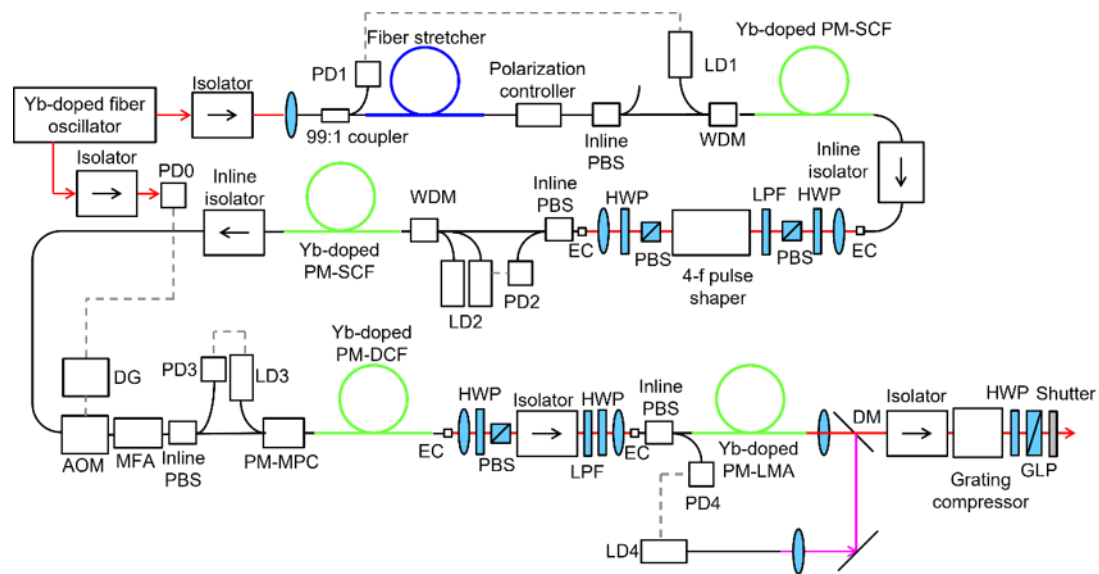


Fig. 3.4 CPAの構成. PD: フォトダイオード, PBS: 偏光ビームスプリッタ, LD: レーザダイオード, WDM: 波長分割多重コプラ, EC: エンドキャップ, HWP: 1/2 波長板, LPF: ロングパスフィルタ, DG: ディレイジェネレータ, AOM: 光音響素子, MFA: モードフィールドアダプタ, PM-MPC: 偏波保持マルチモードパワーコンバイナ, DM: ダイクロイックミラー, GLP: グランレーザ偏光子, PM-SCF: 偏波保持シングルクラッドファイバ, PM-DCF: 偏波保持ダブルクラッドファイバ, PM-LMA: 偏波保持ラージモードエリアファイバ.

巻いた. AOM までのコア径  $6 \mu\text{m}$  のファイバからコア径  $25 \mu\text{m}$  のファイバへパルスを結合するため, モードフィールドアダプタを使用した. また, 励起には波長  $976 \text{ nm}$  の LD を使用し, マルチモードパワーコンバイナを用いて結合させた. 励起パワー  $3.7 \text{ W}$  で前方励起し, 平均出力  $280 \text{ mW}$  (パルスエネルギー  $0.4 \mu\text{J}$ ) を得た. 増幅器 4 段目ではコア径  $40 \mu\text{m}$  のラージモードエリアフォトニック結晶 Yb 添加ファイバモジュール (NKT photonics, aeroGAIN-BASE-1.1) を使用した. 付属の水冷機構によってファイバを冷却した. モジュール入力部のファイバコア径は  $10 \mu\text{m}$  である. そのため, ファイバコア径が  $25 \mu\text{m}$  である増幅器 3 段目の出力を空間に取り出し, 縮小光学系を介してモジュールに入力した. また, 増幅器 1 段目と同様に LPF を施した. このモジュールは後方励起式であるため, 波長  $976 \text{ nm}$  の LD からの光をダイクロイックミラーによってモジュールの出射側から入射させることで後方励起した. 励起パワー  $12.6 \text{ W}$  において平均出力  $3.9 \text{ W}$  (パルスエネルギー  $5.5 \mu\text{J}$ ) を得た. この時のスペクトルを Fig. 3.5 に示す. ピーク波長は  $1059 \text{ nm}$  であった. 増幅器 4 段目から出力されたパルスを圧縮するため, 格子定数  $1600 \text{ 本/mm}$  の透過型回折格子対を用いた. 回折格子対の後ろの 1/2 波長板とグランレーザ偏光子は平均出力の調整に使用し, シャッターは露光時間の調整に使用した.

本システムを構築するにあたり, 4-f 波形整形器の位置, 増幅器破損防止のためのインタ

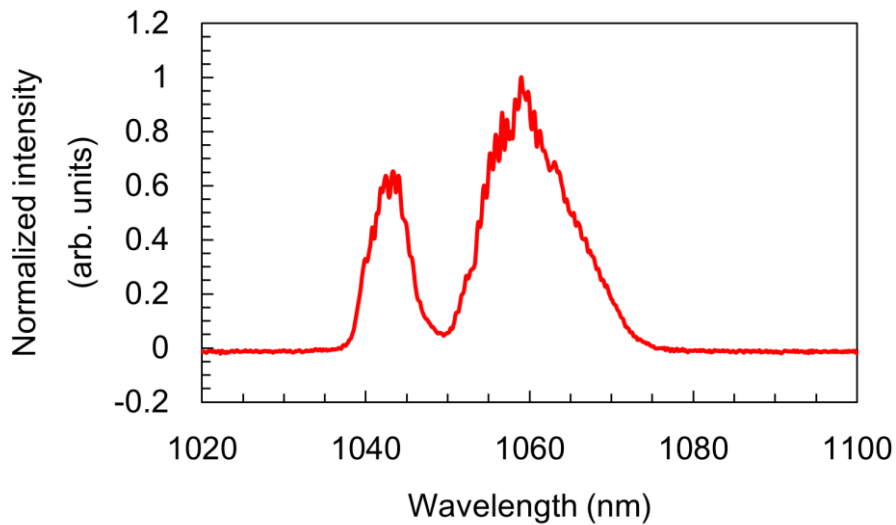


Fig. 3.5 Yb ファイバ CPA から出力されたパルスのスペクトル.

ロックの導入，スペクトル狭帯域化の抑制について検討した．4-f 波形整形器に用いられる SLM は高出力な光を入射させると液晶素子が破損する．そのため，平均出力 1 W 以上のパルスが発生する増幅器最終段の後ろに 4-f 波形整形器を配置すると液晶素子破損の懸念がある．一方，回折格子を用いる 4-f 波形整形器は損失が大きく，増幅前の箇所に配置すると増幅器へ入射するシード光の出力不足を招く．シード光が不足すると自然放出増幅光 (amplified spontaneous emission : ASE) が発生し，ASE に利得が奪われることによる増幅効率の低下や ASE の過剰な増幅によるファイバの破損につながる．これらの理由から，4-f 波形整形器を増幅器 1 段目の後ろに配置した．この増幅器前置き型波形整形手法では，4-f 波形整形器で時空間結合によるビームプロファイルの劣化 [68]が生じても再びファイバに結合されることでビームプロファイルの劣化が緩和される．また，シード光の不足による ASE は，発振器の停止やファイバ破損によってシード光が失われた場合にも問題となる．そのため，増幅器へ入射する光をわずかに切り出して PD でモニターし，シード光が失われ信号がなくなった場合に LD の出力をオフとするインタロックを全ての増幅器に施した．スペクトル狭帯域化の抑制に関して，Yb 添加ファイバの利得のピークは波長 1030 nm にあるため，増幅されるにつれピーク波長が短波長にシフトしていく．加えて，波長 1050~1100 nm の範囲に比べ，波長 1030 nm 付近の利得プロファイルは急峻である．そのため，増幅による短波長側へのシフトはスペクトル帯域の狭帯域化につながる [69]. 本レーザシステムでは増幅器 1 段目と 3 段目の出力に対して LPF を施すことで，スペクトルの短波長シフトおよび狭帯域化を防止した [70].

### 3.3. パルス特性の評価

3.2 節の Yb ファイバレーザシステムを構築後，分散補償を行った．分散補償には回折格

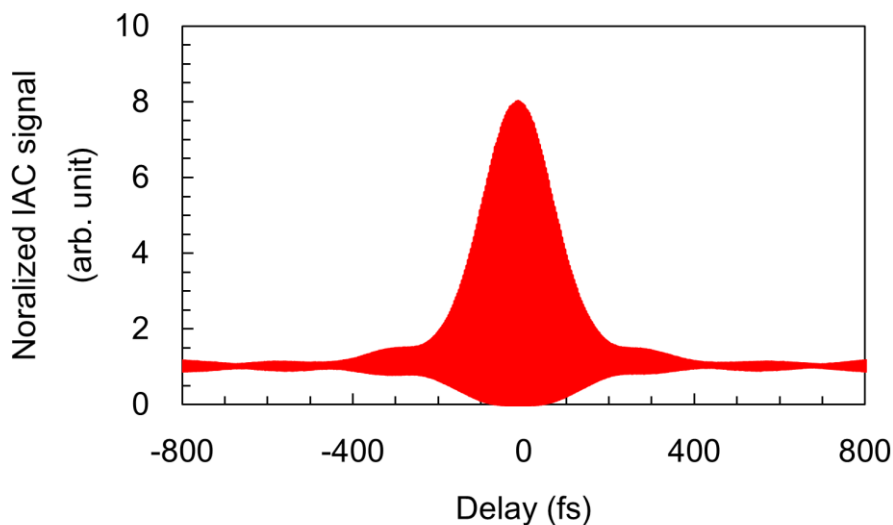


Fig. 3.6 分散補償後の IAC 波形.

子対と 4-f 波形整形器を使用した。レーザシステムからの出射を波長 600 nm 付近の光を吸収する GaAsP-PD (浜松ホトニクス, G1117) へ集光することで二光子吸収させた。二光子吸収信号はパルスの集光強度に依存するため、二光子吸収信号が上昇するように回折格子対、4-f 波形整形器を調整すると分散が補償される。回折格子対の距離と角度を調整して 2 次、3 次分散を補償し、その後、第 4 章で説明する時間ロックイン検出を用いた位相推定アルゴリズムを使用し、4-f 波形整形器によって 4 次以上の高次の分散を補償した。

分散補償後のパルス特性を評価するため、IAC を行った。IAC 系の片腕のミラーはピエゾステージ上に配置されており、このミラーをピエゾステージで移動することで、2 つのパルスの時間間隔を走査した。この 2 つのパルスを分散補償と同様に GaAsP-PD へ集光し、二光子吸収信号を用いて 2 次の IAC 波形を計測した。Fig. 3.6 にピーク値が 8 となるように規格化した自己相関波形を示す。バックグラウンドとピークの比が 1:8 となっており、FTL に近い波形が得られている。強度相関波形を得るため、得られた IAC 波形にローパスフィルタを施して高周波成分を取り除き、包絡線を抽出した。元のパルスが *secant hyperbolic* 関数で表されると仮定することで、パルスの FWHM を 110 fs と求めた。

### 3.4. まとめ

第 4 章以降の TF 顕微鏡へ用いるための光源として、Yb ファイバレーザを構築した。シード光として、振動や温度・湿度変化に対する安定性が高い figure 9 モード同期発振器を作製し、平均出力 8.0 mW、ピーク波長 1064 nm、繰り返し 43.4 MHz のモード同期パルスを得た。figure 9 モード同期発振器の安定性はレーザの使用環境を緩和するだけでなく、発振の停止による増幅器の破損防止にも役立つ。また、4 段の増幅器で構成される Yb ファイバ CPA によってシード光を増幅した。増幅器 4 段目から出力されたチャープパルスの圧縮と分散

補償には回折格子対と 4-f 波形整形器を用いた。圧縮・分散補償されたパルスを計測することで、平均出力 3.9 W, ピーク波長 1059 nm, 繰り返し 710 kHz, パルスエネルギー 5.5  $\mu$ J, パルス幅 110 fs を確認した。CPA の平均出力は増幅器 4 段目の励起 LD の出力で制限されており、より高出力な LD を用いることで出力を向上できる。

## 第4章 時空間ロックイン検出による 時空間集光パルスの補償光学

TF 顕微鏡では焦点面におけるパルスの時空間特性がイメージング性能に影響する。分光されたフェムト秒パルスを集光するため、TF パルスには時空間結合が生じている。そのため、光学素子や試料の収差による空間特性の劣化は時間特性にも影響し、信号強度や分解能の低下を招く [31,32]。これはスペクトル位相を補償することで改善できる。走査型多光子顕微鏡の分散補償では試料中で発生する蛍光を検出し、蛍光強度が強くなるように励起レーザパルス波形を最適化アルゴリズムによって最適化する [71,72]。しかし、TF 顕微鏡では多光子励起領域内でパルス幅が変化するため、アルゴリズムによって補償位相を推定するのが困難となる。光軸方向分解能よりも薄い試料を用いれば、励起領域中でのパルス幅変化を小さくでき分散補償が可能である [61]。しかし、厚みのある試料では分散補償を行えない。

第4章では厚みのある試料にも適用可能な TF パルスの分散補償手法として開発した時空間ロックイン検出技術 [36] について説明する。本技術は SIM による空間ロックイン検出とホモダイン検出による時間ロックイン検出を組み合わせた計測技術である。そのため、時空間ロックイン検出と呼ぶこととした。以下では時空間ロックイン検出による最適位相推定の原理、補償光学システムの構成、時空間ロックイン検出の検証結果および補償によるイメージング性能の改善結果について述べる。なお、時空間集光パルスに対して分散補償を適用すると、スペクトル分散だけでなく色収差による波面歪みも補償できる。ここでは、TF パルスに対する分散補償は AO と記載し、スペクトル分散のみを補償する従来のパルスの分散補償と区別する。

### 4.1. 時空間ロックイン検出の原理

#### 4.1.1. 時間ロックイン検出

Fig. 4.1 に時間ロックイン検出の原理を示す。フェムト秒パルスは多数の波長が干渉することで形成され、全ての波長の位相が揃うことで FTL パルスが得られる。時間ロックイン検出では、パルスを形成する多数の波長の中で、ある帯域に存在する波長群の位相を変調する。この時、パルスと変調された波長群の位相差に応じて強め合う干渉または弱め合う干渉が生じる。分散補償とは、波長ごとの位相を操作して位相歪みを補償し FTL パルスを得ることである。そのため、パルスと位相変調した波長群が最も強め合うような位相を求め、その位相を変調した波長群に与えればよい。変調する帯域が狭く波長群が正弦波として振る舞うと仮定すれば、波長群の位相を変調するとパルスのピーク強度は正弦波的に変調される。時間ロックイン検出ではこの関係を利用する。Fig. 4.1 の左下に示すように波長群の位相を実線、点線、破線のように変調する。そして、変調した位相量と信号値の変化を用いてロックイン検出することで、変調された波長群とパルスとの位相差を推定できる。この位

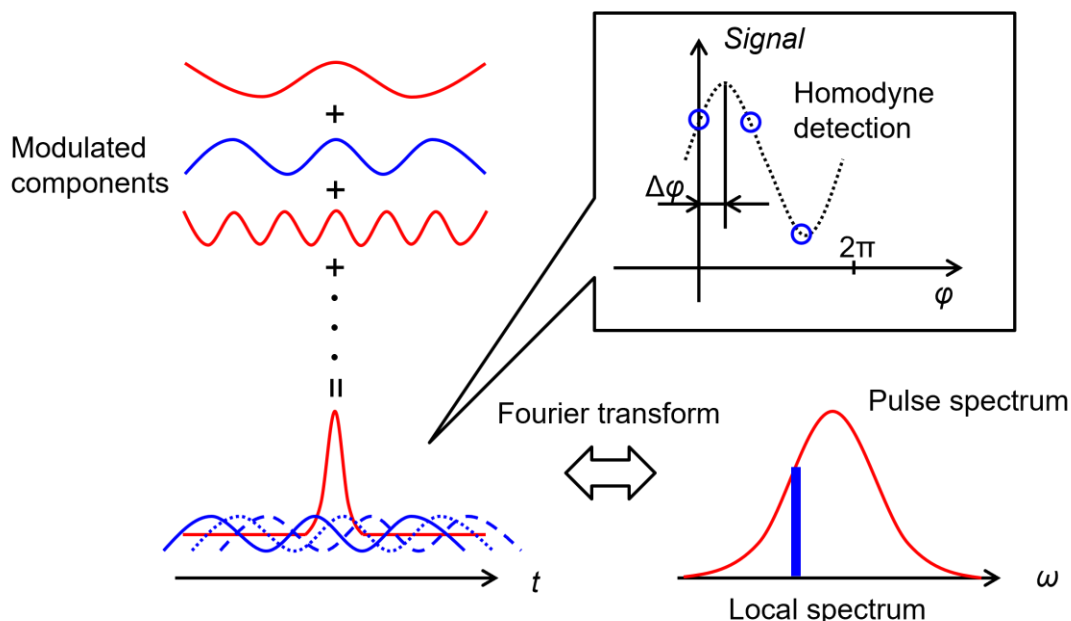


Fig. 4.1 時間ロックイン検出の原理.

相差の逆の位相を変調した波長群に与えれば、波長群とパルスとの位相差が補償される。この処理をパルスを構成する全ての波長群に行うことで、分散補償が行える。実際に波長群の位相を操作するには、4-f 波形整形器を用いて局所的なスペクトル位相を操作することで実現できる。そのため、波長群の位相を変調することを以下では局所周波数変調と表現する。

局所周波数変調による最適位相の推定は以下のように記述できる。局所周波数が変調されたパルスのスペクトル領域における電場  $\tilde{E}_m(\omega)$  は、

$$\begin{aligned}\tilde{E}_m(\omega) &= [\tilde{E}(\omega) - \tilde{E}(\omega)\delta(\omega - \omega_m)] + \tilde{E}(\omega)\delta(\omega - \omega_m)\exp(i\phi_m) \\ &= \tilde{E}(\omega) + \tilde{E}(\omega)\delta(\omega - \omega_m)[\exp(i\phi_m) - 1],\end{aligned}\quad (4.1)$$

で表される。式 (4.1) において、 $\delta(\omega - \omega_m)$  は Dirac のデルタ関数、 $\omega_m$  は位相変調される局所周波数、 $\phi_m$  は局所周波数の位相変調量である。時間領域の電場は式(4.1)を逆フーリエ変換することで以下のように求められる。

$$\begin{aligned}E_m(t) &= \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{E}_m(\omega)\exp(-i\omega t)d\omega \\ &= E(t) + \tilde{E}(\omega_m)[\exp(i\phi_m) - 1]\exp(-i\omega_m t).\end{aligned}\quad (4.2)$$

局所周波数が変調されたパルスの第2高調波 (second harmonic : SH) の電場  $E_m^{(2)}(t)$  を求めると、

$$\begin{aligned}
E_m^{(2)}(t) &= E_m^2(t) \\
&= E^2(t) + 2E(t)\tilde{E}(\omega_m)[\exp(i\phi_m) - 1]\exp(-i\omega_m t) \\
&\quad + \tilde{E}^2(\omega_m)[\exp(i\phi_m) - 1]^2 \exp(-2i\omega_m t) \\
&\approx E^2(t) + 2E(t)\tilde{E}(\omega_m)[\exp(i\phi_m) - 1]\exp(-i\omega_m t),
\end{aligned} \tag{4.3}$$

と計算できる．局所周波数の 2 乗の項は他の項と比べ小さいため，無視した．瞬間的な SH 強度  $I_m^{(SH)}$  は，

$$\begin{aligned}
I_m^{(SH)} &\approx I^2(t) + 2I(t)E^*(t)\tilde{E}(\omega_m)[\exp(i\phi_m) - 1]\exp(-i\omega_m t) \\
&\quad + 2I(t)E(t)\tilde{E}^*(\omega_m)[\exp(-i\phi_m) - 1]\exp(i\omega_m t) \\
&\quad + 4I(t)\tilde{I}(\omega_m)[2 - \exp(i\phi_m) - \exp(-i\phi_m)] \\
&\approx I^2(t) + 2I(t)E^*(t)\tilde{E}(\omega_m)[\exp(i\phi_m) - 1]\exp(-i\omega_m t) \\
&\quad + 2I(t)E(t)\tilde{E}^*(\omega_m)[\exp(-i\phi_m) - 1]\exp(i\omega_m t),
\end{aligned} \tag{4.4}$$

となる．局所周波数の強度を含む項は他の項と比べ小さいため，無視した．SH 強度の時間平均を求めると，

$$\begin{aligned}
\overline{I_m^{(SH)}} &\approx \frac{1}{T} \int_0^T [I_m^{(SH)}] dt \\
&= \langle I^2(t) \rangle \\
&\quad + 2 \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{E}^{(SH)*}(\omega_3 + \omega_m) \tilde{E}(\omega_3) \tilde{E}(\omega_m) [\exp(i\phi_m) - 1] d\omega_3 \\
&\quad + 2 \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{E}^{(SH)}(\omega_3 + \omega_m) \tilde{E}^*(\omega_3) \tilde{E}^*(\omega_m) [\exp(-i\phi_m) - 1] d\omega_3,
\end{aligned} \tag{4.5}$$

となる．ここで， $\tilde{E}^{(SH)}(\omega_3 + \omega_m)$  は， $\omega_3 + \omega_m$  の周波数を生じる全ての周波数の組み合わせを積算したもので，以下のように表現される．

$$\tilde{E}^{(SH)}(\omega_3 + \omega_m) = \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{E}(\omega) \tilde{E}(\omega_3 + \omega_m - \omega) d\omega. \tag{4.6}$$

SH 強度をホモダイン計測すると，

$$\begin{aligned}
H &= \sum_{m=0}^{n-1} \overline{I_m^{(SH)}} \exp(-i\phi_m) \\
&\approx 2n \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{E}^{(SH)*}(\omega_3 + \omega_m) \tilde{E}(\omega_3) \tilde{E}(\omega_m) d\omega_3 \\
&= 2n \left| \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{E}^{(SH)*}(\omega_3 + \omega_m) \tilde{E}(\omega_3) d\omega_3 \right| \\
&\quad \times |\tilde{E}(\omega_m)| \exp[i[\phi(\omega_m) - \phi_0]],
\end{aligned} \tag{4.7}$$

のようにホモダイン信号  $H$  が求まる． $n$  は 3 以上の整数であり，0 から  $2\pi$  にわたる位相変調の回数を表す．また， $\phi_0$  は，

$$\int_{-\infty}^{\infty} \tilde{E}^{(SH)*}(\omega_3 + \omega_m) \tilde{E}(\omega_3) d\omega_3 \tag{4.8}$$

の成分の位相を表す． $\phi_m - \phi_0 = 0$  の時，式(4.5)は最大値を取る．したがって， $\phi_0$  が求める最適位相であり，この位相を変調した局所周波数に与えることで，位相歪みが補償される．こ

の処理を、パルスを構成する全ての局所周波数に対して行うことで分散補償が行われ、最終的に FTL パルスが得られる。

#### 4.1.2. 空間ロックイン検出

次に空間ロックイン検出の原理について、Fig. 4.2 を用いて説明する。TFM では分光されたフェムト秒パルスを集光しパルス幅の変化を利用することで、広視野照明でありながら光軸方向における励起領域の局所化効果が得られる。Fig. 4.2 の青の実線のように、TF パルスは焦点面に近づくにつれてパルス幅が短くなり、焦点面で最短となった後、焦点面から遠ざかるにつれて再びパルス幅が長くなる。これにより、赤の点線で表された領域で多光子励起が生じる。パルス幅の変化が生じる焦点面外では波長は空間的に完全には重なっておらず、また、伝播に伴い波長ごとの位相関係も変化する。発生した蛍光を計測器で取得すると空間的に積算されてしまうため、焦点面外で発生した蛍光は時間ロックイン検出を用いた最適位相推定においてノイズとなる。焦点面で発生する蛍光と比較し焦点面外で発生する蛍光の割合が大きくなると、焦点面と焦点面外で位相変調に対して強め合う位相・弱め合う位相が異なるため、局所周波数変調の信号変化が正弦波的に変調されなくなる。ゆえに、時間ロックイン検出を用いて最適位相推定を行った場合、誤った位相を推定してしまう。そのため、焦点面外で発生した蛍光を除去する必要がある。これは、TFM に SIM [35] を組み合わせ、光軸方向分解能を向上することで実現できる [73–76]。2.3.2 節で述べたように、SIM では励起光を縞パターン状に整形する。縞パターンが形成されるのは結像面である焦点面近傍のみであるため、励起光の縞パターンの空間位相を変調すると、焦点面近傍で生じる信号のみが変調される。一方で、縞パターンが形成されない焦点面外の信号は変調されない。ゆえに、式(2.34)の SIM の処理を施すことで背景蛍光が除去されるとともに、縞パターンの

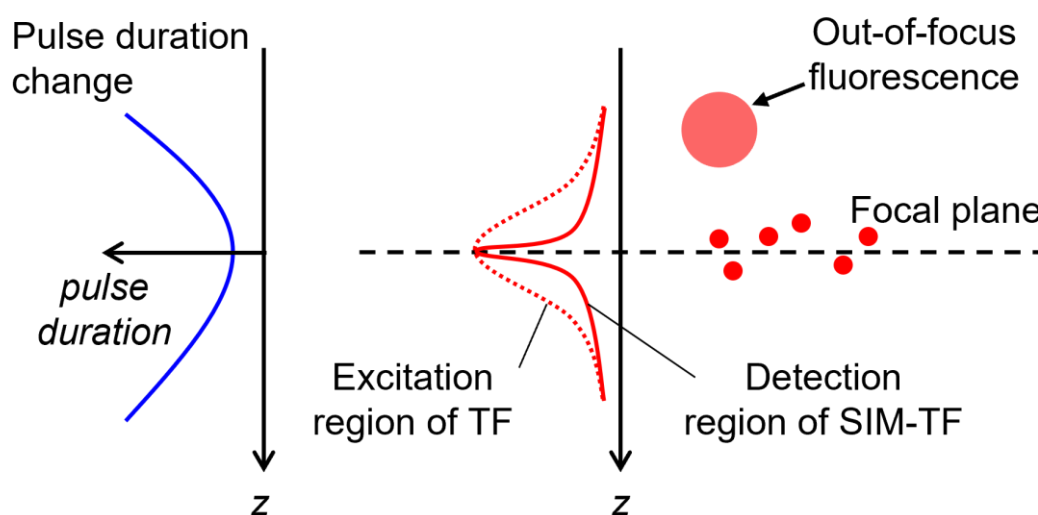


Fig. 4.2 空間ロックイン検出の原理.



空間位相変調にともなって変調される焦点面近傍で発生した信号だけを抽出することができる。そのため、SIMは空間ロックイン検出を行っていると言える。Fig. 4.2のようにTFMにSIMを組み合わせると、TFMの励起領域の中からさらに焦点面に近い領域から信号を抽出することができるため、検出領域中でのパルス幅の変化を小さくできる。したがって、空間ロックイン検出で得られた信号を参照して最適位相推定を行うことで、TFパルスのAOが行える。

## 4.2. 実験系

Fig. 4.3に実験系を示す。光源として第3章で述べたYbファイバレーザシステムを使用した。出力特性は平均出力4.3 W、繰り返し3.3 MHz、パルスエネルギー1.3  $\mu$ J、パルス幅100 fs、ピーク波長1055 nmであった。本章では開発途中のレーザを使用したため、第3章で述べた出力特性と異なっており、繰り返し周波数を高く設定している。この理由は、増幅器内での過剰なASEの発生によって引き起こされる増幅器の破損を防止するためである。出力された光をDMD (Texas Instruments, DLP4500NIR) へ導き、23.1°の角度で入射させた。微小なミラーがアレイ状に配置されるDMDは、微小ミラーのON/OFFによる空間強度パターン整形だけで

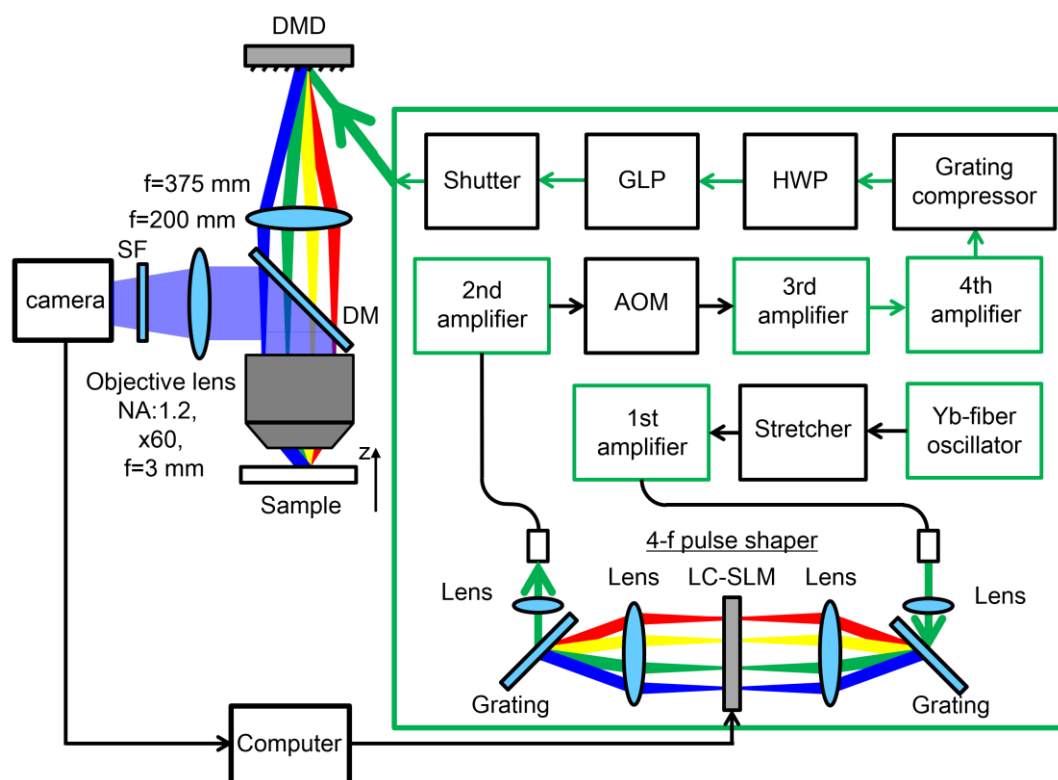


Fig. 4.3 実験系の構成。LC-SLM：液晶空間光変調器，AOM：音響光変調器，HWP：1/2波長板，GLP：グランレーザポラライザ，DMD：デジタルマイクロミラーデバイス，DM：ダイクロイックミラー，SF：ショートパスフィルタ。

なく、ブレード回折格子としても機能する。そのため、SIMのための縞状の空間強度パターン形成 [62]とTFのための回折 [63]を1台のデバイスで同時に行えるという利点を持つ。DMDで回折した光を焦点距離375 mmのレンズと焦点距離3 mm, NA 1.2, 倍率60倍の対物レンズ (Olympus, UPLSAPO60×W) で試料へ導くことで, DMDを試料へ結像した。対物レンズはピエゾステージ (nPoint, nPFocus100HD) にマウントした。焦点距離375 mmのレンズは焦点距離750 mmの2枚のアクロマートダブルレットレンズ (Thorlabs, AC508-750-C) を微小な隙間の両端に配置したものである。これはPlössl eyepiece [77]と呼ばれ, レンズの収差の影響を軽減できる構成である。試料は移動ステージ上に配置した。試料で発生した多光子蛍光は対物レンズを通り, ダイクロイックミラー (Semrock, FF875-Di01) で励起光と分離され, 焦点距離200 mmのアクロマートダブルレットレンズで水冷のCMOSカメラ (Hamamatsu Photonics, ORCA-Fusion C14440-20UP) へ結像される。ダイクロイックミラーで分離しきれなかった励起光がカメラへ入射するのを防ぐため, カメラの前にショートパスフィルタ (Semrock, FF01-890/SP-25) を配置した。時空間ロックイン検出は光源内の4-f波形整形器を用いた時間ロックイン検出とDMDを用いたSIMによる空間ロックイン検出を組み合わせることで行った。4-f波形整形器では128ピクセルを有するLC-SLMを使用し, 1ピクセルごとに $2/3\pi$ ずつの位相変調を合計3回行うことで時間ロックイン検出のための局所周波数変調を行った。また, SIM画像を得るため, 縞パターンの空間位相を $\pi/2$ ずつ変調した4つの画像からSIM画像を再構築した。得られたSIM画像における各ピクセルの強度を足し合わせることで空間ロックイン信号とした。

### 4.3. 実験結果

#### 4.3.1. 時空間ロックイン検出の検証

始めに時間ロックイン検出を用いて分散補償が可能であるか検証した。この検証のため, DMDとCMOSカメラの代わりに, それぞれフラットミラーとPMT (Hamamatsu Photonics, R4220) を用いた。この時, パルスは分光されずに試料へ入射するので, 空間ロックインを用いることなく分散補償が行える。試料としてアガロースゲル中に rhodamine B 溶液を分散させ, 表面にカバーガラスを載せたものを使用した。試料で発生した二光子蛍光はPMTに導いた。4-f波形整形器による高次分散の補償の前に, 試料で生じる二光子蛍光が強くなるように回折格子対を調整し, 2次, 3次分散を補償した。Fig. 4.4に空間ロックイン検出を用いた分散補償の結果を示す。Fig. 4.4(a)はアルゴリズム動作中の信号変化であり, 開始から終了まで5分を要した。信号の初期値が1となるように規格化した。分散補償前には, SLMの各ピクセルの位相は位相変調可能な範囲の中央の値を設定し, 平坦な位相マスクを与えた。そして, 128のピクセルを持つSLMの端から端まで1ピクセルあたり1回ずつ最適位相推定を行い, 合計128回の最適位相推定を行うことを1サイクルとした。次のサイクルは, 前のサイクルを開始した最初のピクセルに戻り, 再び最適位相推定を繰り返した。Fig. 4.4(a)の点線はサイクルの区切りを示している。最適位相推定を2サイクル行うことで, 蛍

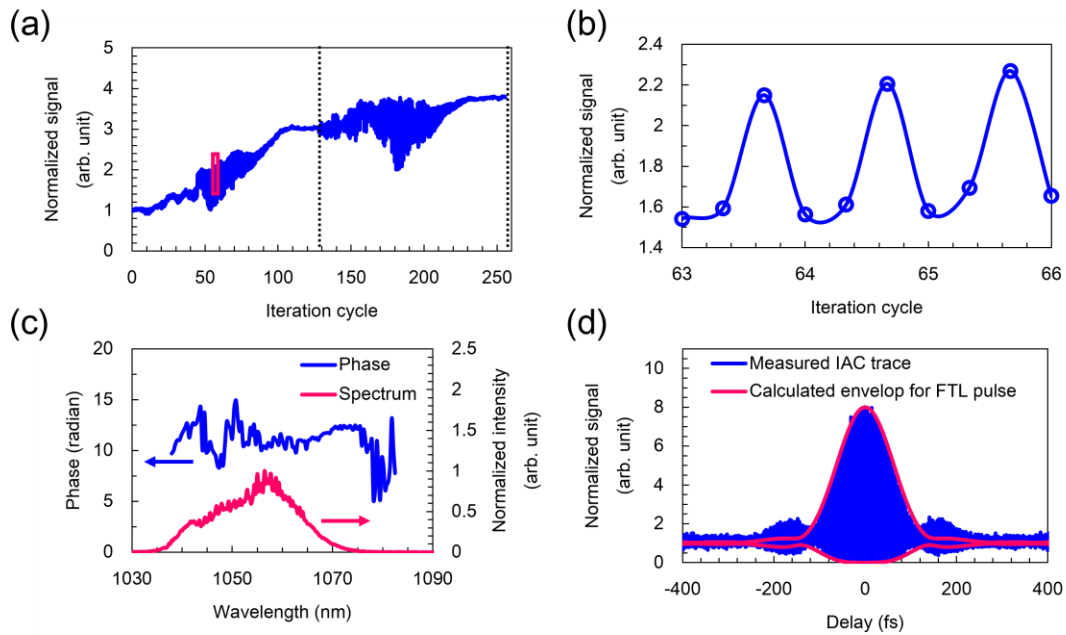


Fig. 4.4 時間ロックイン検出を用いた分散補償の検証結果. (a)アルゴリズム動作中の信号変化. (b)(a)におけるピンクの枠内の拡大図. (c)分散補償後に得られた SLM の位相マスク (青) と光源のスペクトル (ピンク), (d)分散補償後の IAC 波形 (青) とスペクトルから求めた FTL パルスの包絡線波形 (ピンク).

光強度が 3.8 倍に向上した. Fig. 4.4(a)のピンクの枠内を拡大したものが Fig. 4.4(b)である. Fig. 4.4(b)に示されるように, 1 ピクセルあたり  $2/3\pi$  ずつの位相変調を 3 回行い, それぞれ信号を取得し, 最適位相を推定した. 3 回の位相変調回数は式(4.7)のホモダイン検出を行うための最低回数である. 各ピクセルにおいて最適位相推定後に信号値が上昇しており, 位相歪みが補償されていく様子を確認できる. 分散補償後に得られた SLM の位相マスクは Fig. 4.4(c)の通りである. IAC を行うことでパルスの時間特性を評価した結果を Fig. 4.4(d)に示す. ピークの値が 8 となるように規格化した. 青の実線が IAC 波形を示し, ピンクの実線は光源のスペクトルから計算した FTL パルスの包絡線波形である. IAC 波形の包絡線は FTL パルスから求められる包絡線に近く, パルス幅は 100 fs であった. これらの結果から, 時間ロックイン検出を用いることで分散補償が行えることを確かめた.

次に空間ロックイン検出を組み合わせた時空間ロックイン検出を用いることで, 厚みのある試料でも TF パルスの AO が行えることを検証した. まず, 信号検出範囲内でのパルス幅変化を確認するため, TFM と SIM の光軸方向応答および TF パルスのパルス幅変化を計測した. TF 顕微鏡および SIM の光軸方向応答は, 直径 200 nm の単層蛍光ビーズシートを焦点面付近で光軸方向にスキャンし, 試料で発生した二光子蛍光は, SIM を用いた AO の場合は CMOS カメラで, TF 顕微鏡を用いた場合は PMT で計測した. また, TF パルスのパルス幅は, 同じ単層蛍光ビーズシートを使用し, 光軸方向の各位置において IAC によって計

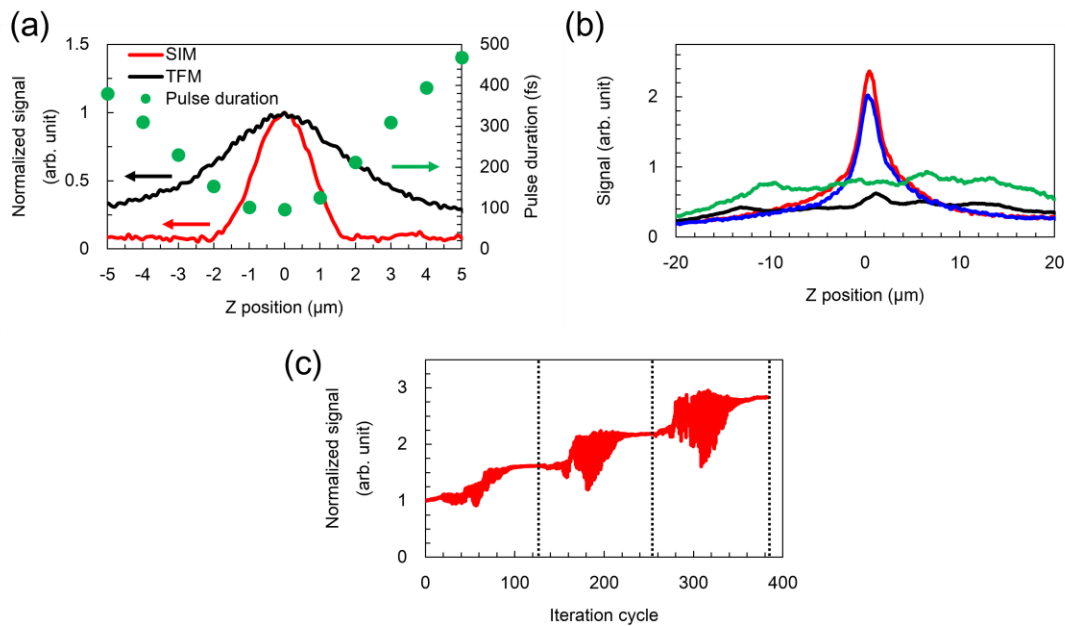


Fig. 4.5 時空間ロックイン検出の検証結果. (a)SIM (赤線) および TF 顕微鏡 (黒線) の光軸方向分解能とパルス幅の変化 (緑丸). (b)光軸方向分解能の比較 (緑) 分散補償前, (青) 分散補償後, (赤) SIM を用いた AO 後, (黒) TF 顕微鏡を用いた AO 後(c)分散補償されていない条件から SIM を用いた AO を開始した時の信号変化.

測した. Fig. 4.5(a)は TF 顕微鏡と SIM の光軸方向応答および TF パルスのパルス幅変化を示す, SIM で得られる応答の範囲内では TF パルスのパルス幅変化は小さく, FWHM において 1.1 倍程度の変化である. 一方で, TF 顕微鏡では 1.5 倍の変化がある. そのため, SIM を用いて信号取得を行うことで, パルス幅一定の領域から信号を抽出でき, AO が可能になると考えた. 次に厚みのある試料において TF 顕微鏡および SIM で信号取得し, AO が可能であるか検証した. 厚みのある試料として分散補償の時と同じアガロースゲル中に rhodamine B 溶液を分散させた試料を使用した. アガロースゲルは水に近い屈折率を有するため, 試料による収差の影響は小さい. そのため, AO を行うことで主に TF 光学系における光学素子またはミスアライメントによって生じる収差が補償されることとなる. 以下では光学素子, ミスアライメントによる収差のみを補償する AO のことをシステムに対する AO と記載する. 焦点は表面から  $200\ \mu\text{m}$  の位置に設定した. また, AO 開始時の SLM の位相マスクは Fig. 4.4 で示した SLM の位相マスクを使用し, 分散が補償された状態から最適位相推定を 2 サイクル行った. その後, SLM の位相マスクを変え, 各条件の光軸方向応答を計測した. 試料として Fig. 4.5(a)と同様に単層蛍光ビーズのシートを使用し, 対物レンズを  $80\ \text{nm}$  間隔で移動することでパルス光を光軸方向にスキャンした. 試料へ入射させたパルスエネルギーは  $4.7\ \text{nJ}$ , 積算時間は  $10\ \text{ms}$  とし, 発生した蛍光を PMT で計測した. 得られた結果を Fig. 4.5(b)に示す. 分散補償後, SIM を用いた AO 後の光軸方向応答は式(2.40)を用いてフィッテ

イングを行い、フィッティングにより得られた式から分解能 (FWHM) を計算した。一方、分散補償前、TF 顕微鏡を用いた AO 後の波形は式(2.40)で表される波形とは異なり、フィッティングを行うことができないため、分解能をデータから読み取った。Fig. 4.5(b)において、分散補償前 (緑) では分解能は  $37.6\mu\text{m}$  であり、焦点面付近にピークは見られなかった。分散補償後 (青) では焦点面付近にピークを持つ応答が得られ、分解能は  $3.5\mu\text{m}$  へ改善した。SIM を用いた AO の後の条件 (赤) では、分解能は分散補償と同じ  $3.5\mu\text{m}$  であるが、ピーク値が 1.2 倍に向上した。これは AO によって収差が補償されたためである。一方で、TF 顕微鏡を用いた AO 後 (黒) では、分散補償された状態から開始したのにも関わらず、光軸方向応答が劣化している。この理由は、4.1 節で述べたように焦点面外で発生する蛍光が最適位相の推定を困難とし、アルゴリズムによって誤った位相が与えられるためである。Fig. 4.5(c)は SLM の位相マスクが平坦な条件から SIM を用いた AO を開始した時の信号変化であり、開始から終了まで 15 分を要した。時間ロックイン検出のみの場合に比べ、時空間ロックイン検出を用いた場合は 1 サイクルあたりに要する時間が長くなっている。この理由は、空間ロックイン検出として機能する SIM を行うには縞パターン of 空間位相を変調した 3 枚の画像が必要となるためである。3 サイクルの最適位相推定を行うことで、信号値は 2.8 倍に上昇した。これにより、AO 開始時における分散補償の有無によらず、AO が行えることがわかった。以上から、時空間ロックイン検出を用いることで厚みのある試料でも TF パルスの AO が行えることを確かめた。

#### 4.3.2. 補償光学によるイメージング性能の改善

まず、システムに対する AO によるパターン照明への効果を確認した。試料には 4.3.1 項で用いたアガロースゲルに rhodamine B 溶液を分散させたものを使用し、DMD で空間強度パターンを縞状に整形した TF パルスを照射した。入射パルスエネルギーは  $16\text{ nJ}$ 、積算時間は  $100\text{ ms}$  とし、焦点を試料の表面から  $200\mu\text{m}$  の位置に設定した。CMOS カメラで取得した AO 前後の二光子蛍光プロファイルを Fig. 4.6 に示す。Fig. 4.6(a), (b)より、システムに対する AO によって縞のコントラストが改善した。また、Fig. 4.6(c)に示すラインプロファイルにおいて、1-1', 2-2', 3-3', 4-4', 5-5' と数字でラベリングした箇所において peak to valley の値を計算し、それぞれ 2.8 倍、1.9 倍、1.6 倍、2.3 倍、2.2 倍となった。

コントラストの改善は次のように説明できる。時空間ロックインによる AO の検証結果を示した Fig. 4.5(c)では、光軸方向の信号検出範囲が焦点面近傍に局所化された SIM によって信号を取得している。AO 後に信号が上昇していることから、AO によって焦点面で発生する蛍光は増加している。これは、スペクトル位相の歪みが補償されることで、焦点面での強め合う干渉と焦点面外での弱め合う干渉がそれぞれ向上し、焦点面の蛍光が強まり焦点面外の背景蛍光が弱まるためである。発生した蛍光を CMOS カメラや PMT のような計測器で取得すると信号が光軸方向に積算されるため、AO において TF 顕微鏡で取得される信号は SIM で取得される信号ほど上昇しない。これは、TF 顕微鏡で信号を取得しアルゴリズム

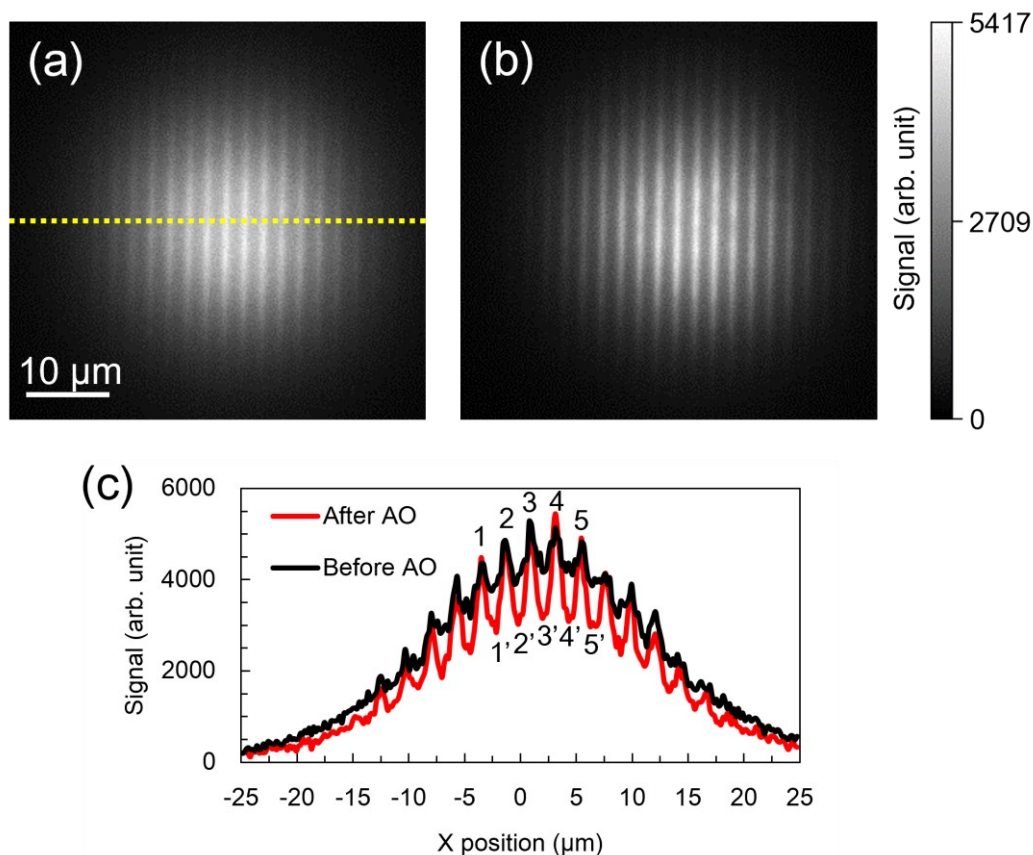


Fig. 4.6 (a,b)アガロースゲルに rhodamine B 溶液を分散させた試料に縞状の空間強度パターンを持つ TF パルス照射時の二光子蛍光プロファイル. (a)分散補償前, (b)システムに対する AO 後. (c)(a)の黄点線に沿ったラインプロファイル. 数字ラベルは縞のコントラストの計算のために参照した peak-to-valley の箇所.

で位相最適化する手法が困難である要因でもある. 一方で, 焦点面付近の信号を抽出する SIM を用いることで, アルゴリズムによる AO が可能となる. したがって, Fig. 4.6 においてシステムに対する AO によりコントラストが改善した理由は, 焦点面で生じる蛍光の増加と焦点面外で生じる背景蛍光の減少のためである.

次にシステムに対する AO の効果について, 生物試料を用いて確認した. Fig. 4.7 にマウス脳スライスに二光子蛍光像を示す. アクチンを可視化するため試料を rhodamine phalloidin で染色し, 4%の paraformaldehyde (PFA) で固定した. 試料表面にはカバーガラスを載せた. 観察深さは表面から 10  $\mu\text{m}$  に設定した. この条件では試料による収差は小さい. 入射パルスエネルギーは 31 nJ, 積算時間は 100 ms として, 分散補償後およびシステムに対する AO 後の 2 つの条件で二光子蛍光像を取得した. Fig. 4.7(a), (b)に示されるように, システムに対する AO によって分散補償後よりも二光子蛍光強度が高くなり, コントラストも改善している. Fig. 4.7(c)は Fig. 4.6(a)の黄点線に沿ったラインプロファイルである. システムに対

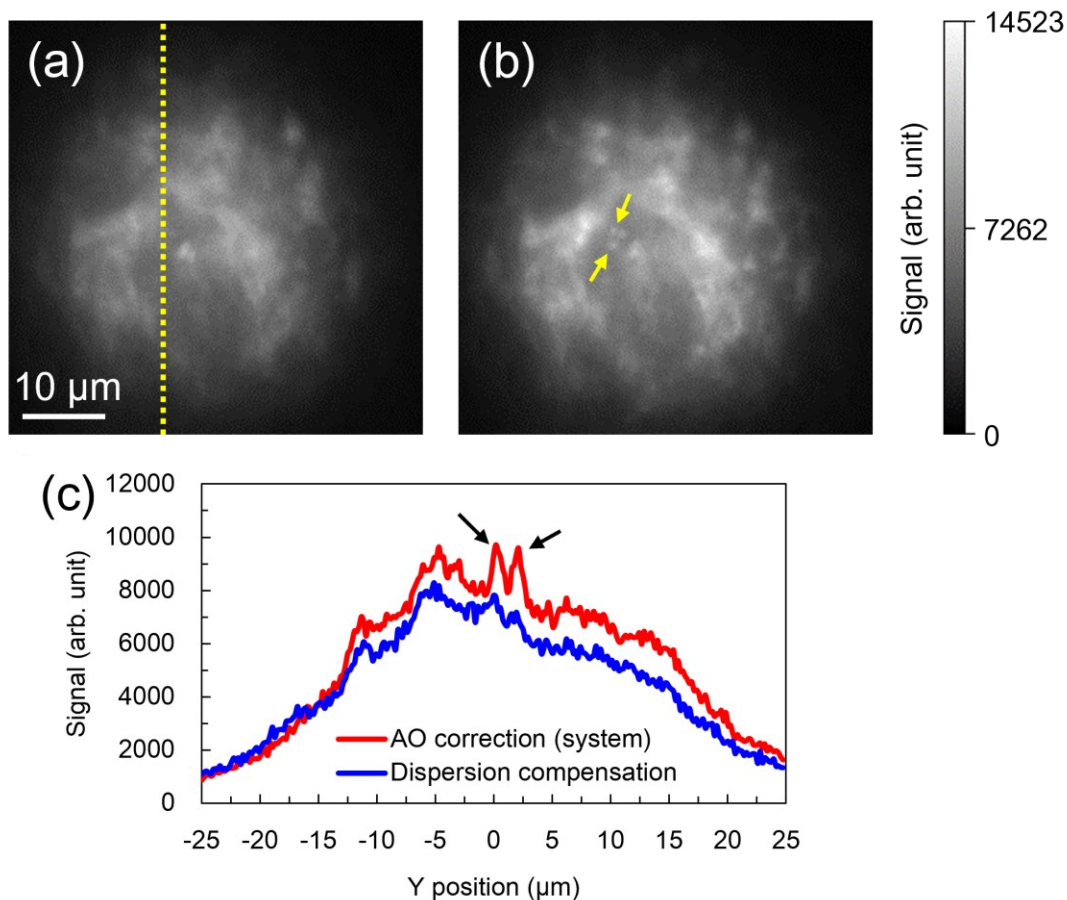


Fig. 4.7 TF 顕微鏡で取得した(a)分散補償後と(b)システムに対する AO 後のマウス脳組織の二光子蛍光像. (c)(a)に示す黄点線に沿ったラインプロファイルの比較. 矢印で示されたピークは(b)中の矢印で示された箇所に対応する.

する AO により, 特に Fig. 4.7(b), (c)において矢印で示した部分の 判別が可能となっているおり, 組織内で繊維状に分布するアクチンをより明確にイメージできた.

最後に, システムだけでなく試料で生じる収差も含めて AO を行った場合におけるイメージングへの AO の効果を確認した. この AO について, 以下ではフル AO と記載する. 試料として, 直径 200 nm (Molecular Probes, F8809) と直径 2  $\mu\text{m}$  (Molecular Probes, F8825) の蛍光ビーズを混合し, アガロースゲル内に分散したものを使用した. 試料の表面にはカバーガラスを載せた. 試料で生じる収差を追加するため, カバーガラス上にマニキュアを塗り, マニキュアをランダムに引っかいた. 焦点位置を深さ 150  $\mu\text{m}$  に設定し, 分散補償された状態から AO を行った. その後, 入射パルスエネルギー 78 nJ, 積算時間 100 ms とし, TF 顕微鏡による二光子蛍光像と SIM 画像を取得した. Fig. 4.8(a)~(e)に得られた二光子蛍光像と SIM 画像を示す. AO によるイメージ性能の改善を確認するため, 分散補償後, システムに対する AO 後, フル AO 後の 3 つの条件で, TF 顕微鏡により二光子蛍光像を取得した (Fig.

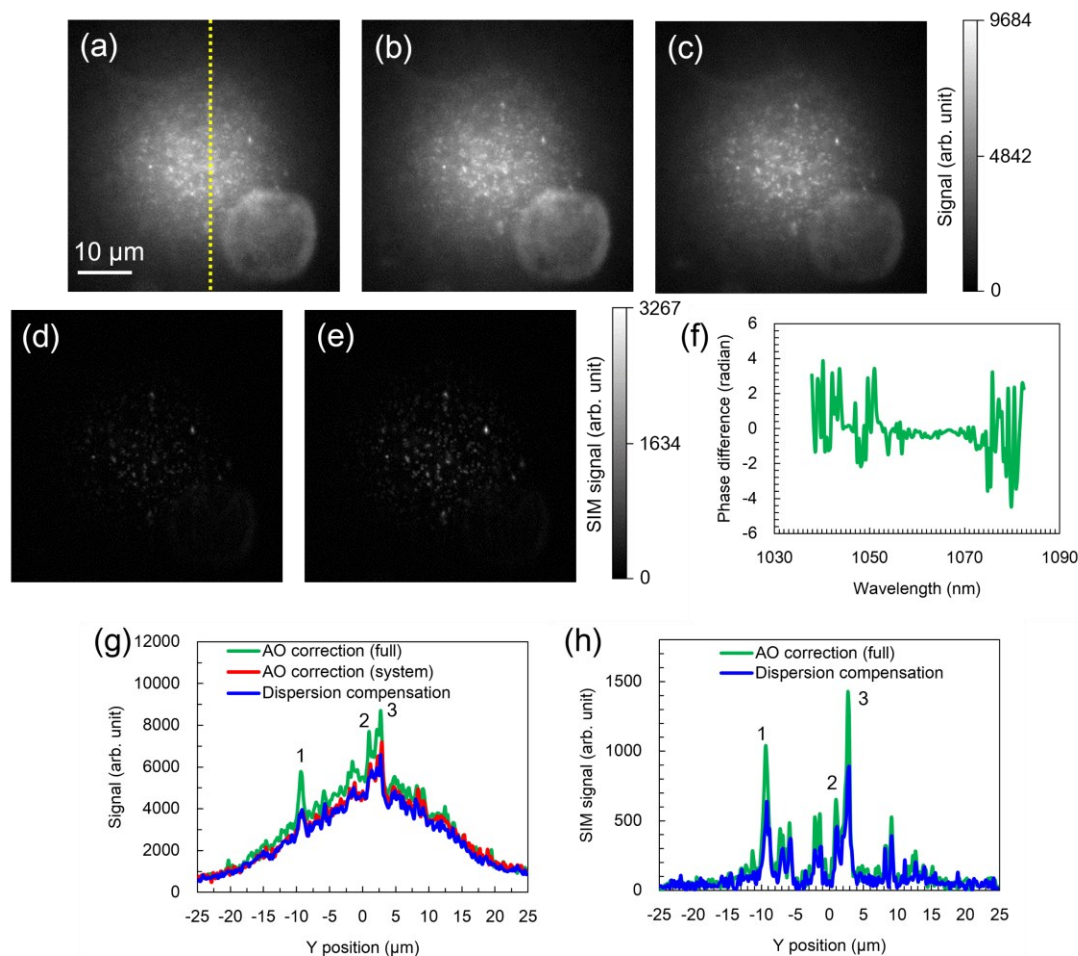


Fig. 4.8 (a)-(c)TF顕微鏡および(d,e)SIMで取得した直径200 nmと直径2 μmの混合蛍光ビーズ試料の二光子蛍光像. (a,d)分散補償後, (b)システムに対するAO後, (c,e)フルAO後. (f)システムに対するAOとフルAOにおけるSLMのマスクの位相差. (g,h)(a)に示す黄点線に沿った(g)TF顕微鏡と(h)SIM画像におけるラインプロファイルの比較. 数字ラベルは信号の増加量の計算のために参照したピークの箇所.

4.8(a)-(c). また, AOによるSIM画像の変化を確認するため, 分散補償後およびAO後のSIM画像を取得した(Fig. 4.8(d, e)). Fig. 4.8(a)では, 中心付近に直径200 nmの蛍光ビーズが見え, 右下に焦点面外に存在する直径2 μmの蛍光ビーズが見える. この直径2 μmの蛍光ビーズは直径200 nmの蛍光ビーズより強い蛍光を発生するため, 焦点面から光軸方向において11 μm離れているにも関わらず, 焦点面付近の蛍光と同程度の蛍光を生じている. また, デフォーカスのため, この直径2 μmの蛍光ビーズは実際よりも大きく見えている. Fig. 4.5(a)で示したように, TFパルスのパルス幅は焦点面と焦点面外で異なり, 焦点面外で強い背景蛍光が観測されるとAOが困難となる. しかし, Fig. 4.8(d)のようにSIMを用いることで背景蛍光が抑制され, 直径2 μmのビーズはSIM画像から消えている. そのため, SIMを



用いることで背景蛍光に影響されず AO が可能である. Fig. 4.8(f)はシステムに対する AO とフル AO で得られた SLM の位相マスクの差を示しており, 試料の収差が補償されることで位相マスクに変化が生じている. Fig. 4.8(g), (h)は Fig. 4.8(a)における黄点線に沿ったラインプロファイルである. 試料で生じる収差が補償されることで, フル AO で得られた二光子蛍光像の信号はシステムに対する AO で得られたものよりも強くなっている. 1, 2, 3 と数字でラベリングした位置のピークにおいて, 分散補償後の条件で得られたものと比べるとそれぞれ 1.06 倍, 1.11 倍, 1.26 倍となっている. さらに, SIM 画像と比較すると, 1.62, 1.49, 1.69 倍となっている. これは Fig. 4.5(b)で示されるシステムに対する AO で得られる 1.2 倍の効果よりも大きい. その理由は, システムの収差だけでなく, カバーガラス表面に塗られたマニキュアによって生じる波面歪みもフル AO で補償できたためである. これらの結果から, 時空間ロックイン検出を用いることでシステムだけでなく試料で生じる収差も補償でき, 二光子蛍光像のコントラストが改善することを確かめた.

#### 4.4. まとめ

TF 顕微鏡において, 厚みのある試料でもアルゴリズムによる AO を可能とするため, 時空間ロックイン検出を用いる手法を開発した. まず, 時間ロックイン検出による分散補償について検証した. 分光されていないパルスに対して分散補償を行い, 補償後には FTL パルスに近いパルスが得られることを IAC で確認した. これにより, 時間ロックイン検出を用いることで分散補償できることを確かめた. 次に TF パルスに対して時空間ロックイン検出による AO を適用した. rhodamine B 溶液を分散させたアガロースゲルにより, 厚みのある試料でも AO ができることを確かめた. 光軸方向応答を計測することで, システムで生じる収差が補償されることにより信号のピーク値が 1.2 倍になることを確認した. また, 上記のアガロースゲルに空間強度パターンを縞状に整形した TF パルスを照射し, 二光子蛍光像を取得することで, システムに対する AO によって縞のコントラストが改善することを確かめた. また, コントラストの改善はマウス脳スライスでも確認できた. 最後に, 強い焦点面外蛍光が存在する条件および試料がランダムな収差を有する条件として, 直径 200 nm と直径 2  $\mu\text{m}$  の蛍光ビーズを混合した試料のカバーガラスにマニキュアを塗り, 表面を引っかいた試料を用いて, フル AO を行った. このような条件でも, SIM を用いた空間ロックイン検出によって焦点面外蛍光が抑制され, 問題なく AO で行えることを確認するとともに, 試料によって与えられる波面歪みも補償できることを確認した. 一方, 本実験ではレーザーの出力不足のため生物試料の表面付近までしか光を到達させることができず, そのため生物試料を用いた AO の検証は行っていない. 実際に生物試料を用いて AO を行った場合, AO のためにレーザーを長時間照射することによる褪色が懸念される. 生物試料で褪色が生じる場合には, できるだけパルスエネルギーを小さくし, 積算時間を長くすることで褪色の影響を軽減できる [78]. また, 空間ロックインとして用いた SIM において, 2 枚の画像だけで SIM 画像を構築できる手法が提案されており [79], この手法を用いて AO に必要となる時間を短縮

することも有効であると考えられる。

## 第5章 時間多重化時空間集光顕微鏡における 光軸方向分解能と視野の両立

2.4.3 項で述べたように、TM-TF 顕微鏡は広視野照明でありながらレーザ走査型多光子顕微鏡、ラインスキャン TF 顕微鏡に匹敵する光軸方向分解能を有する [37]。しかし、echelle 回折格子の階段幅を小さくできないため、光軸方向分解能の向上を最大化するには、試料に対して echelle 回折格子を高倍率で結像させる必要がある。そのため、視野が制限されてしまうという問題がある。

第 5 章では、TM-TF 顕微鏡において光軸方向分解能を最大まで向上しながら視野を拡大することを目的として開発した TM-ML-TF 顕微鏡について述べる。TM-ML-TF 顕微鏡では echelle 回折格子によって分割され、時間遅延を与えられたラインパルスに対して DMD で空間強度パターン変調を行うことで、ライン幅を小さくする。したがって、試料に対する echelle 回折格子の結像倍率が低くても、光軸方向分解能の向上を最大化できる。ゆえに、広い視野と光軸方向分解能向上の最大化を両立できる。以下では TM-ML-TF 顕微鏡の原理、実験系とイメージング性能の評価結果について説明する。

### 5.1. 時間多重化マルチライン時空間集光顕微鏡の原理

Fig. 5.1 に TM-ML-TF 顕微鏡の原理を示す。Fig. 5.1 に示すように、TF パルスの分光方向に対して水平な方向を  $x$  方向、分光方向に対して垂直な方向を  $y$  方向、光軸方向を  $z$  方向とする。echelle 回折格子、DMD は  $4-f$  光学系を介して試料に対して共役な位置に配置されている。TM-TF 顕微鏡と同様に、echelle 回折格子に入射したパルスは空間的に分割され、離散的な時間遅延を与えられるため、小さな回折角で echelle 回折格子から出射する。その後、これらのパルスは DMD へ結像されることとなる。DMD ではマルチラインパターンが表示され、各々のラインビームの空間強度ライン幅をより小さなライン幅へ整形するとともに、微小ミラーアレイによる回折で、TF のための分光が行われる。この分光され、マルチライン状となったビームは対物レンズで集光されながら試料に結像され、対物レンズの焦点面においてマルチラインパターンを形成することとなる。TM-ML-TF 顕微鏡において光軸方向分解能が最大化されるのは、式(2.36)を変形して、

$$\frac{w_{DMD}}{M_2} \leq s \quad (5.1)$$

が満たされる時である。式(5.1)において、 $w_{DMD}$  は DMD へ表示されたラインパターンのライン幅である。Fig. 5.1 に示すように、TM-ML-TF 顕微鏡では DMD で空間強度分布をマルチライン状にしているにも関わらず、パルスは対物レンズの瞳を満たしている。この理由は、TM 化によって隣り合うパルスが干渉しないためである。そのため、ライン間隔が小さくても光軸方向分解能は最大化される。DMD 上でのライン幅  $w_{DMD}$  は DMD の空間分解能で決

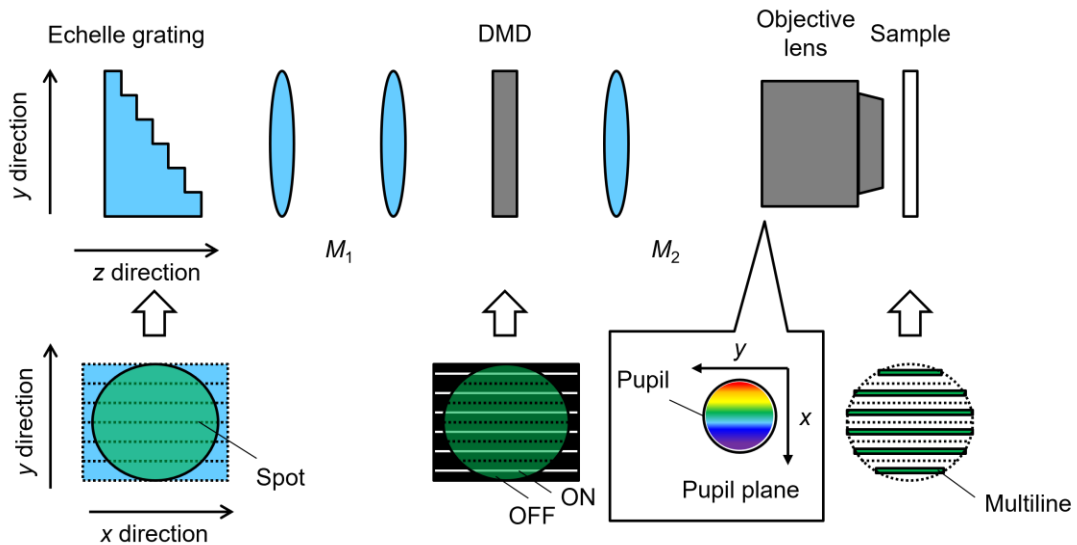


Fig. 5.1 TM-ML-TF 顕微鏡の原理.

まり，最も小さいライン幅で  $10\ \mu\text{m}$  程度にできる．幅  $10\ \mu\text{m}$  であれば，回折限界のサイズを得るための結像倍率は 20 倍でよく，大きなスポットを得ることが可能となる．ML 化によってライン間に隙間が生じるが，これは DMD 上のマルチラインパターンの位置を  $y$  方向にシフトさせ，カメラ上で積算または画像上で足し合わせることで，ライン間の隙間を埋めることができる．

## 5.2. 実験系

Fig. 5.2 に TM-ML-TF 顕微鏡の構成を示す．光源として，平均出力  $4.6\ \text{W}$ ，繰り返し  $3.3\ \text{MHz}$ ，中心周波数  $1055\ \text{nm}$ ，パルス幅  $96\ \text{fs}$  の Yb ファイバレーザを使用した．TM 化のための自作の透過型 echelle 回折格子と TF および ML 化のための DMD を  $4\text{-}f$  光学系を介して試料と共役な位置に配置した．echelle 回折格子の階段の厚み  $d$  は  $0.55\ \text{mm}$ ，階段幅  $w$  は  $1.02\ \text{mm}$  とし，BK7 ガラスを材質とするカバーガラスを重ねて製作した [40]．階段の厚み  $d$  は遅延時間  $820\ \text{fs}$  に相当し，光源のパルス幅  $96\ \text{fs}$  に対して十分な遅延時間を与える．ゆえに，この echelle 回折格子を用いることで TM 化が行える．カバーガラス間にはカバーガラスと同じ屈折率を有するマッチングオイルを塗ることで，カバーガラスの隙間で生じるフレネル反射を低減した．この echelle 回折格子を焦点距離  $200\ \text{mm}$  の無限遠補正チューブレンズ (Thorlabs, TTL200MP) と焦点距離  $50\ \text{mm}$  の走査レンズ (Thorlabs, SL50-2P2) を用いて，echelle 回折格子が  $1/4$  倍に縮小されるように DMD にイメージリレーした．DMD への入射角は  $23.1^\circ$  とし，焦点距離  $375\ \text{mm}$  のレンズと NA1.2，焦点距離  $3\ \text{mm}$ ，倍率 60 倍の対物レンズで試料に結像した．対物レンズはピエゾステージにマウントした．試料面において，DMD で形成される ML パターンのライン幅とライン間隔はそれぞれ  $0.52\ \mu\text{m}$ ， $2.1\ \mu\text{m}$  であり，ラ

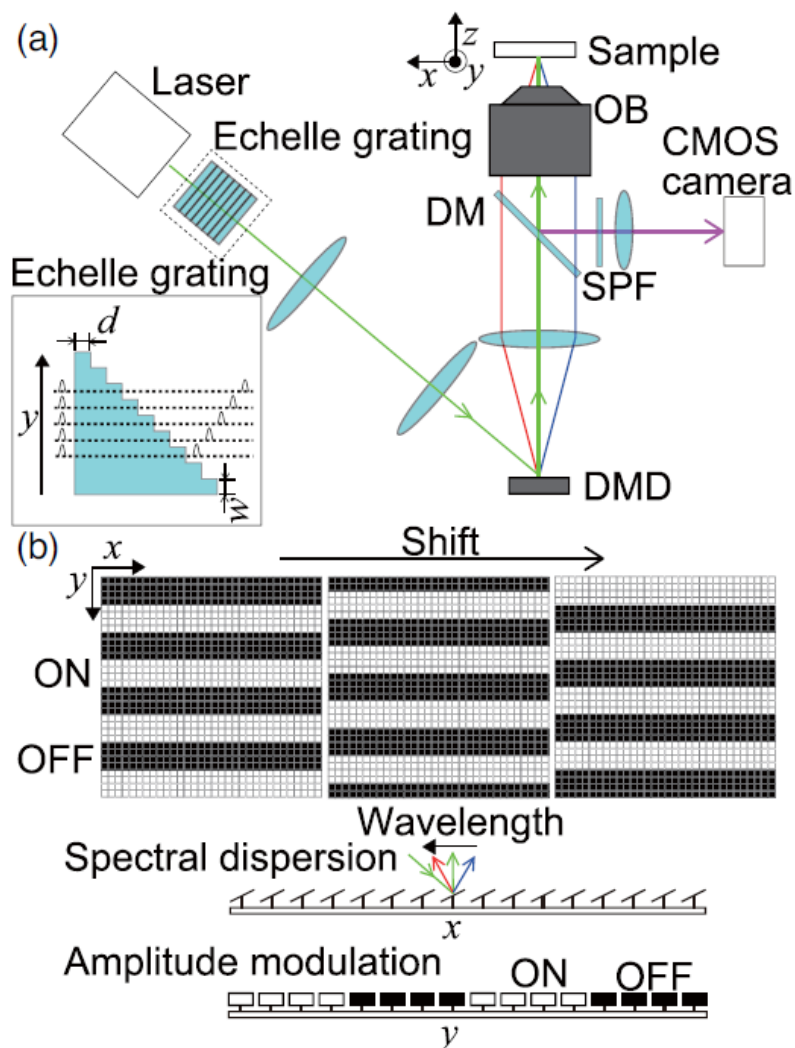


Fig. 5.2 (a)TM-ML-TF 顕微鏡の実験系. (b)DMD によるラインスキャンの動作. DMD : デジタルマイクロミラーデバイス, DM: ダイクロイックミラー, OB: 対物レンズ, SPF: ショートパスフィルタ.

イン幅は回折限界程度の大きさである. ライン幅とライン間隔の大きさは, DMD 上においてそれぞれ  $65 \mu\text{m}$ ,  $260 \mu\text{m}$  に相当する. また, echelle 回折格子においてビームは 20 段に分割されるため, echelle 回折格子は焦点面において光軸方向で  $53 \text{ nm}$  のサイズに縮小され, Rayleigh 長より十分に小さく, 多光子励起領域の傾きは無視できる. 焦点面において echelle 回折格子は光軸方向に  $53 \text{ nm}$  に縮小され, 試料で発生した蛍光はダイクロイックミラー (Semrock, FF875-Di01) によって励起光と分離し, 焦点距離  $200 \text{ mm}$  のレンズで CMOS カメラへ結像した. また, ダイクロイックミラーで分離できなかった励起光を除去するため, ショートパスフィルタ (Semrock, FF01-890/SP-25) を使用した. マルチライン状の励起光を

照射する TM-ML-TF 顕微鏡においてライン間の隙間のない二光子蛍光像を取得するには試料に対して励起光をスキャンする必要がある。そのため、Fig. 5.2(b)のように DMD 上のマルチラインパターンを  $y$  方向にシフトさせてスキャンしながら二光子蛍光像を取得し、カメラ上で積算することでライン間の隙間のない二光子蛍光像を取得した。また、このようにマルチラインのパターンをシフトさせることは SIM において縞の空間位相を変調することに等しい。したがって、各々のパターンにおける二光子蛍光像を取得し、得られた画像に対して 2.3.2 項で述べた SIM の画像処理を加えることで背景蛍光が除去された二光子蛍光像を再構築することができる。以下の実験結果では、この方法によって得られた光軸方向応答および二光子蛍光像は TM-ML-TF-SIM 顕微鏡と表記している。

### 5.3. 実験結果

時間多重化による光軸方向分解能の向上は対物レンズによってパルスが  $y$  方向に空間集光されるためであるから、瞳面のビームプロファイルを確認することで  $y$  方向に空間集光特性を持つか確かめられる。TF パルス、ML-TF パルス、TM-TF パルス、TM-ML-TF パルスの瞳面上でのビームプロファイルを Fig. 5.3 に示す。白線で示された円は対物レンズの瞳の

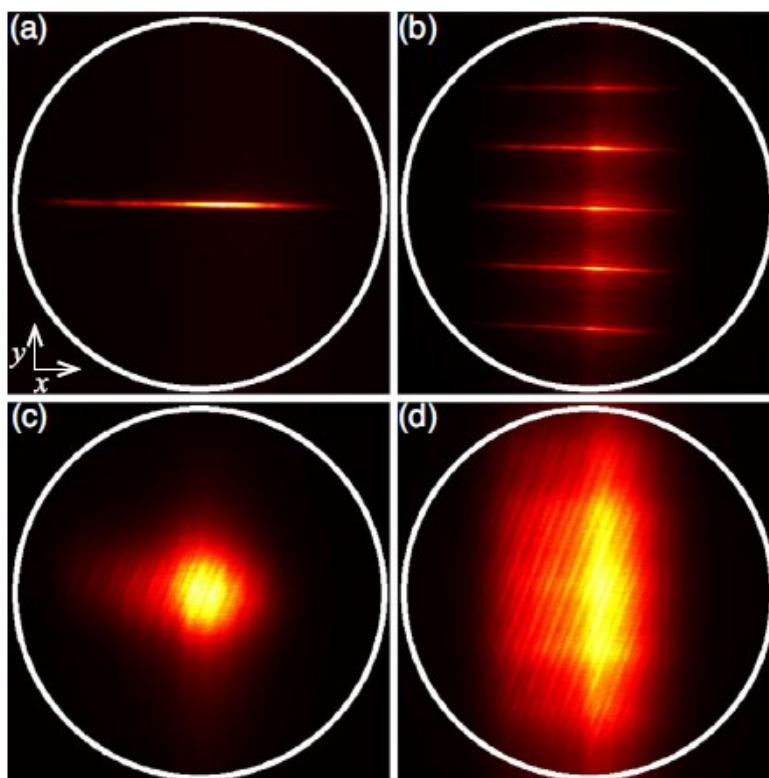


Fig. 5.3 対物レンズの瞳面におけるビームプロファイル。(a)TF パルス、(b)ML-TF パルス、(c)TM-TF パルス、(d)TM-ML-TF パルス。

サイズを示している。TF パルスでは瞳面において  $x$  方向に沿ったライン状のビームプロファイルとなっている。これは、 $x$  方向では DMD によってパルスが分光されており、一方、 $y$  方向では DMD から平行光として出射され瞳面手前のレンズで集光されてしまうためである。ML-TF パルスは DMD で空間強度パターンをマルチライン状に整形したパルスであり、瞳面でのプロファイルはマルチライン状となっている。この理由は、瞳面で得られるプロファイルは DMD 上のプロファイルがフーリエ変換されたものとなるためである。したがって、ML-TF パルスでは  $y$  方向で瞳面を満たすことなく、マルチラインが並ぶこととなる。一方、TM-TF パルスでは、DMD 上での空間強度パターンはマルチライン状であるにも関わらず、瞳面では大きなスポットとなっている。この理由は、echelle 回折格子でラインごとに異なる時間遅延がつくことで、空間コヒーレンスが低下するためである。そのため、パルス間の干渉が抑制されてそれぞれ独立したビームとして振る舞う。ゆえに、それぞれのビームは微小スリットを通過した時のように回折し、瞳面では  $y$  方向に広がったスポット状のプロファイルが得られる。しかし、瞳面の  $y$  方向を完全に満たすまでには至っておらず、各々のラインビームは焦点面において回折限界サイズまで縮小されない。TM-ML-TF パルスでは、DMD によって空間強度分布がマルチラインに整形されることで TM-TF パルスのライン幅を小さくできる。Fig. 5.2 の光学系において、DMD 上へ結像された echelle 回折格子の階段の幅は  $255 \mu\text{m}$  であるが、DMD を整形されるとライン幅  $65 \mu\text{m}$  まで小さくできる。ゆえに、試料面でのライン幅は回折限界サイズとなり、 $y$  方向において瞳が満たされている。したがって、TM-ML-TF パルスでは対物レンズの  $y$  方向の NA が最大まで利用されるため、光軸方向分解能の向上が最大化される。

TM-ML-TFパルスによって光軸方向分解能が向上できることを確かめるため、各イメージング方法における光軸方向応答を計測した。試料として、直径 $200 \text{ nm}$ の単層蛍光ビーズのシートを使用し、ピエゾステージによって対物レンズの位置を変えることで励起光を光軸方向に $200 \text{ nm}$ 間隔でスキャンした。励起光の出力は $55 \text{ mW}$ 、積算時間は $10 \text{ ms}$ とし、試料で発生した二光子蛍光をカメラで取得した。得られた画像の各ピクセルの値を全て足し合わせることで二光子蛍光信号とした。Fig. 5.4はTF顕微鏡、ML-TF顕微鏡、TM-TF顕微鏡、ラインスキャンTF顕微鏡、TM-ML-TF顕微鏡およびTM-ML-TF-SIM顕微鏡における光軸方向応答を示している。TF顕微鏡は式(2.40)で、ラインスキャンTF顕微鏡、TM-ML-TF顕微鏡は式(2.41)でフィッティングを行うことで分解能 (FWHM) を求めた。また、ML-TF顕微鏡、TM-TF顕微鏡、TM-ML-TF-SIM顕微鏡はガウス関数でフィッティングを行うことで分解能を求めた。分解能はそれぞれ $4.06 \mu\text{m}$  (TF顕微鏡) ,  $1.62 \mu\text{m}$  (ML-TF顕微鏡) ,  $3.90 \mu\text{m}$  (TM-TF顕微鏡) ,  $1.57 \mu\text{m}$  (ラインスキャンTF顕微鏡) ,  $1.62 \mu\text{m}$  (TM-ML-TF顕微鏡) ,  $1.36 \mu\text{m}$  (TM-ML-TF-SIM顕微鏡) であった。TM-TF顕微鏡ではechelle回折格子の階段幅 $w$ が大きく、焦点面でライン幅が回折限界サイズまで縮小されないため、TF顕微鏡と比較し大きな改善が見られなかった。一方で、DMDによってライン幅の小さいマルチラインパターンを形成し、焦点面においてライン幅が回折限界サイズまで縮小されるML-TF顕微鏡、TM-ML-TF顕微鏡

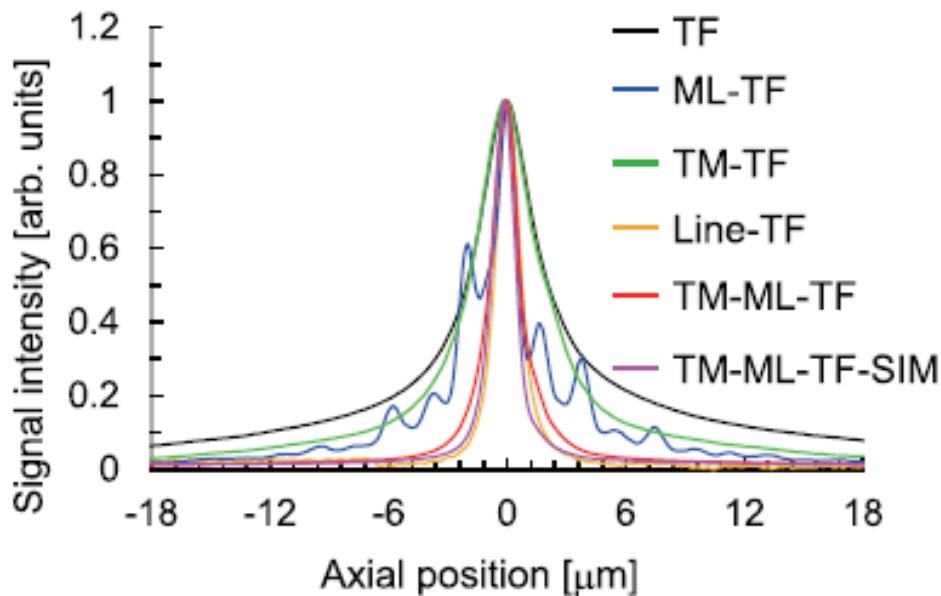


Fig. 5.4 各集光方法における光軸方向応答.

では分解能が2.5倍向上しており、単一ラインを用いるラインスキャンTFパルスに匹敵する。しかし、ML-TF顕微鏡の光軸方向応答には、焦点面から離れた位置にも複数のピークが見られる。これは、焦点面外においてデフォーカスしたマルチライン間で強め合う干渉が生じるためである。TM-ML-TF顕微鏡ではTM化によってラインごとに異なる時間遅延がついている。そのため、焦点面外での干渉は起こらず、スムーズな応答が得られた。また、TM-ML-TF顕微鏡で得られた画像に対してSIMの画像処理を加えた、TM-ML-TF-SIM顕微鏡ではTM-ML-TF顕微鏡に比べ光軸方向分解能が1.2倍向上し、ラインスキャンTF顕微鏡以上の光軸方向分解能を達成した。

TM-ML-TF 顕微鏡によって得られる光子蛍光像を確認するため、生物組織を模擬した試料を用いて二光子蛍光イメージングを行った。直径 200 nm (Molecular Probes, F8809) と直径 2 μm の蛍光ビーズ (Molecular Probes, F8825) をそれぞれ  $1.7 \times 10^{11}$ ,  $4.3 \times 10^7$  の濃度でアガロースゲル内に分散させて試料を作製した。Fig. 5.5(a)~(d)に TF 顕微鏡, ML-TF 顕微鏡, TM-ML-TF 顕微鏡および TM-ML-TF-SIM 顕微鏡の二光子蛍光像を示す。TF 顕微鏡の二光子蛍光像において、白の破線で囲まれた直径 2 μm の蛍光ビーズは強い蛍光能を持つため、焦点面から光軸方向に離れた位置に存在するにも関わらず二光子蛍光像に現れている。また、中央付近に漂う弱い蛍光は直径 200 nm の蛍光ビーズによる背景蛍光である。ML-TF 顕微鏡の二光子蛍光画像では、TF 顕微鏡に比べ光軸方向分解能が改善しているため、直径 200 nm の蛍光ビーズによる背景蛍光が抑制されている。一方で、焦点面外に複数のピークを持つ光軸方向応答のため、焦点面から離れて存在する直径 2 μm の蛍光ビーズは二光子蛍光像に現れたままである。TM-ML-TF 顕微鏡の光軸方向応答では ML-TF 顕微鏡のような焦点面



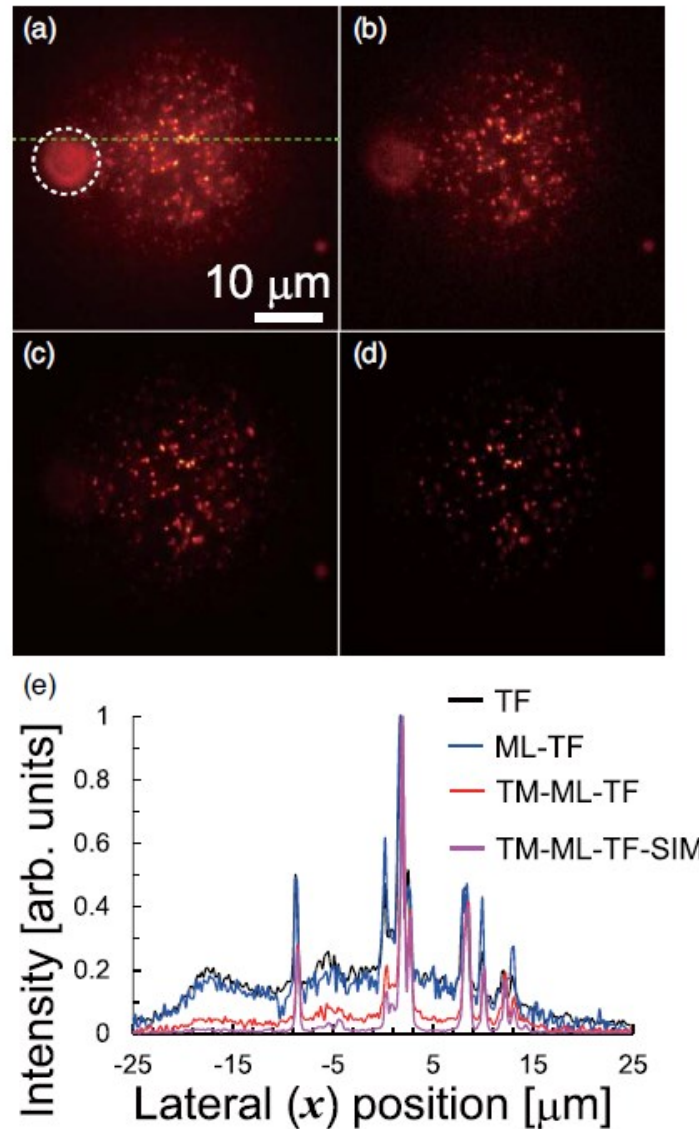


Fig. 5.5 直径 200 nm と直径 2  $\mu\text{m}$  の蛍光ビーズを混合した試料の二光子蛍光像. (a)TF 顕微鏡, (b)ML-TF 顕微鏡, (c)TM-ML-TF 顕微鏡, (d)TM-ML-TF-SIM 顕微鏡, (e)(a)の緑の波線に沿った(a)~(d)のプロファイル.

外のピークはないため, ML-TF 顕微鏡と同じ分解能であっても直径 2  $\mu\text{m}$  の蛍光ビーズで生じる蛍光が抑制されている. さらに, TM-ML-TF-SIM 顕微鏡では光軸方向分解能がさらに向上することで, 直径 2  $\mu\text{m}$  の蛍光ビーズは完全に抑制されている. Fig. 5.5(e)は各顕微鏡で得られた二光子蛍光像の Fig. 5.5(a)の緑の破線に沿ったプロファイルを比較したものであり, 各々の画像のピーク値が 1 となるように規格化を行った.  $-3 \mu\text{m}$  から  $-1 \mu\text{m}$  の範囲の 11 ピクセルの平均を計算し, それぞれ背景蛍光の強度を見積もった. この 2  $\mu\text{m}$  の範囲において, 直径 200 nm の蛍光ビーズによる信号強度と背景蛍光の強度とのコントラスト比は TF 顕微

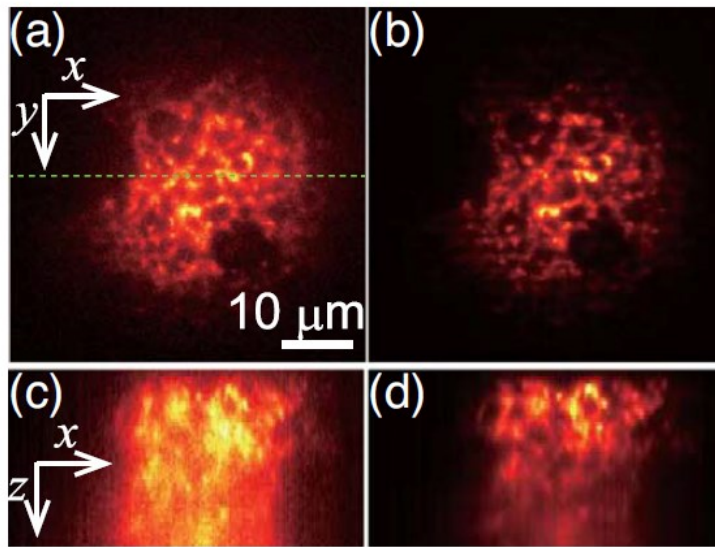


Fig. 5.6 rhodamine phalloidin でアクチンが染色されたマウス脳スライスの一光子蛍光像. (a,b)深さ  $5 \mu\text{m}$  において(a)TF 顕微鏡と(b)TM-ML-TM 顕微鏡で取得した x-y 断面画像. (c,d)(a)内の緑の波線に沿った(c)TF 顕微鏡と(d)TM-ML-TM 顕微鏡の x-z 断面画像.

鏡, ML-TF 顕微鏡, TM-ML-TF 顕微鏡, TM-ML-TF-SIM 顕微鏡においてそれぞれ 5.12, 5.99, 21.4, 99.0 であった. TF 顕微鏡と比較し, ML-TF 顕微鏡のコントラストの改善は小さい. この理由は, 光軸方向分解能の結果で述べたように, 焦点面から離れた位置でのマルチライン間の干渉のためである. 一方で, TM-ML-TF 顕微鏡では TM 化によってマルチライン間の干渉が抑制されることで, コントラスト比が 4.17 倍改善している. 加えて, 画像取得の後に SIM の画像処理を加えることで, コントラスト比をさらに 4.63 倍向上できることを確認した.

最後に, TM-ML-TF 顕微鏡によってマウス脳スライスの一光子蛍光イメージングを行った. マウス脳スライスは, 4%の Paraformaldehyde によって固定し, rhodamine phalloidin でアクチンを染色した. 試料の表面から深さを変え 50 枚の x-y 断層像を取得することで, 3 次元像を得た. Fig. 5.6(a), (b)はそれぞれ深さ  $5 \mu\text{m}$  における TF 顕微鏡, TM-ML-TF 顕微鏡で得られた x-y 断面画像である. また, Fig. 5.6(c), (d)は Fig. 5.6(a)内の緑の破線に沿った x-z 断面画像であり, それぞれ Fig. 5.6(a), (b)に対応する. TF 顕微鏡の x-y 断面画像では背景蛍光のため細かな構造を持つアクチンのコントラストが低く, x-z 断面画像では光軸方向分解能が低いためアクチンの構造を判別することができない. 一方で, TM-ML-TF 顕微鏡では x-y 断面画像において背景蛍光が抑制され, アクチンが網目状に分布していることが明確にわかる. また, y-z 断面でもコントラストが改善することでアクチンの構造を判別可能である.

#### 5.4. まとめ

第 5 章では, TM-TF 顕微鏡の視野の拡大が可能な TM-ML-TF 顕微鏡について述べた. TM-TF 顕微鏡では離散的な時間遅延の付与と回折限界サイズのマルチライン形成という 2 つの役割を *echelle* 回折格子が担っている. ゆえに, 光軸方向分解能の向上を最大化するには試料に対する *echelle* 回折格子の結像倍率を大きくする必要があり, 視野を制限する要因となっていた. 一方で, TM-ML-TF 顕微鏡では, *echelle* 回折格子は離散的な時間遅延の付与だけを担い, 回折限界サイズのマルチライン形成は DMD のような空間強度パターン変調器が担うことで, 役割を分担する. したがって, 試料に対する *echelle* 回折格子の結像倍率を緩和しても, 光軸方向分解能の向上を最大化でき, 視野を拡大することができる. ゆえに, 従来の TM-TF 顕微鏡で達成されている視野  $6\ \mu\text{m}$  を  $30\ \mu\text{m}$  へと 5 倍に拡大しながら, TF 顕微鏡に対して光軸方向分解能および信号強度に対する背景蛍光の強度のコントラストをそれぞれ 2.5 倍, 4.17 倍向上できた. また, DMD によるラインパターンのシフトと SIM の画像処理を組み合わせることで, TM-ML-TF-SIM 顕微鏡では TM-ML-TF 顕微鏡に対して光軸方向分解能とコントラストをそれぞれさらに 1.2 倍, 4.63 倍向上することに成功した.

## 第6章 時間多重化時空間集光パルスによる 多光子励起パターン照明

多光子励起領域が光軸方向に局所化された直径の大きいスポットを発生できる TF 技術は、光照射によって細胞の活動を制御するオプトジェネティクスにおいても重要である。TF 技術をホログラフィックパターン照明へ応用すると、細胞サイズである  $10\ \mu\text{m}$  程度のスペックルのない複数の MF スポットを光軸方向の分解能  $5\ \mu\text{m}$  で発生できる [28]。ゆえに MF-TF 技術は、オプトジェネティクスにおいて、離れて存在する複数のターゲット細胞を同時に活性化することを可能とする。しかし、ホログラフィックパターン照明では、隣り合うスポットが近接するとスポット間に干渉縞が生じる [33]。干渉縞の発生はオプトジェネティクスにおいて近接した細胞を同時に活性化する場合、活性化の時空間的なゆらぎを引き起こすおそれがある。また、オプトジェネティクスへの応用として、光軸方向におけるスポットの大きさも重要となる。顕微鏡の性能指標としては、FWHM の値を用いて光軸方向分解能が評価される。しかし、TF 顕微鏡の光軸方向応答は半値を超えた後、緩やかに低下する特性を有する。したがって、FWHM において  $5\ \mu\text{m}$  の分解能であったとしても、平面方向と同様に  $1/e^2$  サイズで考えると、その大きさは  $21\ \mu\text{m}$  に相当し 1 細胞のサイズである  $10\ \mu\text{m}$  を超えてしまう。

第 6 章では、ホログラフィックパターン照明に TM 化 [15,16] を組み合わせた MF-TM-TF 技術 [41] について述べる。隣り合うスポット間で干渉縞が生じる原因は、パルス同士が時間・空間的に重なるためである。第 2 章で説明したように、TM 技術はパルスを空間的に分割し分割された各々のパルスに異なる時間遅延を与える。そのため、MF-TM-TF 技術を用いることで、スポットが空間的に重なっている場合でもパルスが時間的に重なることを抑制でき、隣り合うスポット間で干渉は起こらない。したがって、MF-TM-TF 技術によってフリンジ・スペックルフリーなホログラフィックパターン照明を実現できる。また、MF-TM-TF 技術では分光方向に対して垂直な方向に空間集光特性が得られるため、MF-TF 技術に比べ、光軸方向のスポットサイズを小さくできる。以下では MF-TM-TF 技術の原理、実験系とフリンジ・スペックルフリーなホログラフィックパターン照明の検証結果について述べ、MF-TM-TF 技術を TM-TF 顕微鏡の視野の拡大へ応用した結果について説明する。

### 6.1. 時間多重化によるマルチスポット間の干渉抑制の原理

MF-TF 技術において、分光方向に対して垂直な方向に TM 化を施すことで干渉縞の発生を抑制できる。回折素子による分光方向を  $x$  方向、分光方向に対して垂直な方向を  $y$  方向、光軸方向を  $z$  方向とする。Fig. 6.1 のように、TM 化によってパルスは分割され、離散的な遅延時間が与えられる。TM 化を行う echelle 回折格子の階段幅  $w$  が  $100\ \mu\text{m}$  であれば、スポット幅  $100\ \mu\text{m}$  のビームに分割されるため、このビームが結像倍率 100 倍の集光光学系を介し

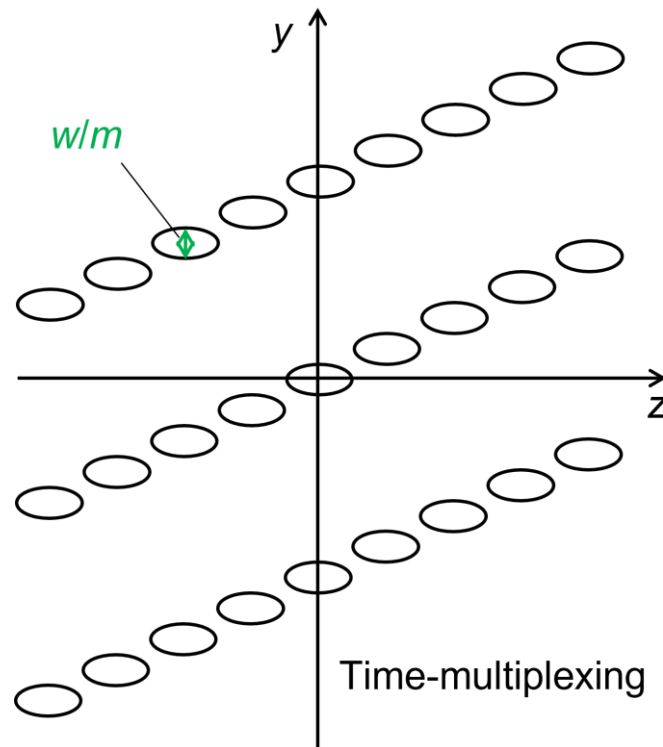


Fig. 6.1 TM-TF パルスによるスポット間の干渉抑制の原理.  $m$ : 結像倍率,  $w$ : echelle 回折格子の階段幅.

て試料に照射されると,焦点面で  $y$  方向において過渡的なスポット幅は  $1\ \mu\text{m}$  に縮小される. TM 化されたパルスではパルスフロントの傾きの場合と同様に, 直径  $30\ \mu\text{m}$  のスポットが空間的に重なっても, 過渡的なスポットは時間的には重なっておらず, 干渉縞は発生しない. したがって, TF パルスに TM 化を組み合わせることで,  $x$ ,  $y$  両方向において隣り合うスポット間で生じる干渉縞の発生を抑制することができる.

## 6.2. 実験系

Fig. 6.2 に MF-TM-ML-TF パルスを用いた多光子励起パターン照明の実験系を示す. 6.1 節に記載したように, 分光方向に沿った方向を  $x$  方向, 分光方向に垂直な方向を  $y$  方向, パルスが伝播する光軸方向を  $z$  方向としている. 光源として, 第 3 章で述べた平均出力  $3.9\ \text{W}$ , 繰り返し  $710\ \text{kHz}$ , パルス幅  $120\ \text{fs}$  のパルスを発生する Yb ファイバレーザシステムを用いた. 光源からの出力に対して自作の透過型 echelle 回折格子を使用し,  $y$  方向において TM 化を行った. echelle 回折格子の構成は 5.2 節で説明したものと同一であり, 階段の厚み  $d$  は  $0.55\ \text{mm}$ , 階段幅  $w$  は  $1.02\ \text{mm}$  とし, BK7 ガラスを材質とするカバーガラスを重ねて製作した [40]. 階段の厚み  $d$  は遅延時間  $820\ \text{fs}$  に相当する. カバーガラス間にはカバーガラスと同じ屈折率を有するマッチングオイルを塗り, カバーガラスの隙間で生じるフレネル反射を抑制した. 焦点距離  $200\ \text{mm}$  と焦点距離  $50\ \text{mm}$  レンズで構成される  $4\text{-}f$  光学系を介して

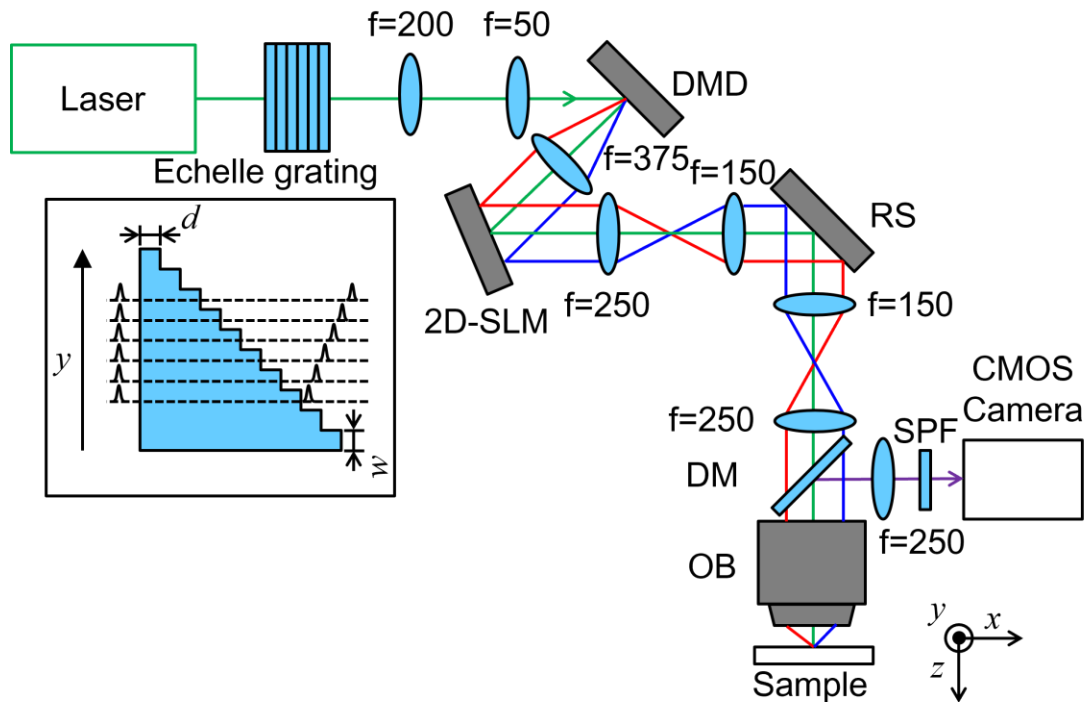


Fig. 6.2 MF-TM-ML-TFによるホログラフィックパターン照明の実験系. DMD: デジタルマイクロミラーデバイス, 2D-SLM: 2次元空間光変調器, RS: レゾナントスキャナ, DM: ダイクロイックミラー, OB: 対物レンズ, SPF: ショートパスフィルタ.

echelle 回折格子を DMD へ結像した. DMD から対物レンズ手前の照明光学系のレンズは 2 枚のレンズを合わせた Plössl eyepiece [77]の構成とした. DMD は TF のための分光および ML 化とラインスキャン TF のためのライン状の空間強度パターン形成を行う. また, DMD への入射角は  $23.1^\circ$  とした. 焦点距離 375 mm と焦点距離 250 mm のレンズで echelle 回折格子と DMD をイメージリレーし, 対物レンズの瞳面と共役な位置に 2D-SLM (Hamamatsu Photonics, X11840-9476) を配置した. この 2D-SLM による位相ホログラムを用いてホログラフィックパターン照明を行った [80]. echelle 回折格子と DMD は焦点距離 150 mm の 2 つのレンズで構成される 4-f 光学系によって再びイメージリレーされる. この焦点距離 150 mm のレンズの間にある瞳面と共役な位置に, y 方向のラインスキャンのためのレゾナントスキャナ (Cambridge Technology, CRS 4 kHz) を配置した. その後, echelle 回折格子と DMD は再びイメージリレーされ, 焦点距離 250 mm のレンズと対物レンズで試料に結像される. 対物レンズの特性は NA1.2, 焦点距離 3 mm, 倍率 60 倍であり, ピエゾステージにマウントした. 試料面での ML パターンのライン幅は,  $0.52 \mu\text{m}$ , ライン中心の間隔は  $2.1 \mu\text{m}$  であり, ライン幅は回折限界程度のサイズである. また, これらのサイズは DMD 上でライン幅が  $65 \mu\text{m}$ , ライン中心の間隔が  $260 \mu\text{m}$  に相当する, 試料で発生した蛍光は対物レンズを通り, ダイクロイックミラーで分離されて焦点距離 250 mm のレンズで CMOS カメラへ結像される.

ダイクロイックミラーで分離しきれなかった照明光が CMOS カメラへ入射するのを防ぐため、2枚のショートパスフィルタ (Semrock, FF01-720/SP-25, FF01-890/SP-25) を用いた。

### 6.3. 実験結果

まず、MF 化による  $xy$  方向への影響を確かめるため、各照明方法の二光子励起プロファイルを取得した。Fig. 6.3 に TF パルス, MF-TF パルス, TM-TF パルス, MF-TM-TF パルスを rhodamine B 溶液へ照射した時の二光子蛍光プロファイルを示す。全ての条件において、DMD のマイクロミラーは全て ON に設定し、単純な回折格子として機能させた。MF-TF パルス, MF-TM-TF パルスの条件では、SLM を使用したホログラフィーによって  $x$  方向または  $y$  方向に直径  $30\ \mu\text{m}$  のスポットを3つ並べ、スポット中心の間隔を  $15\ \mu\text{m}$ ,  $22.5\ \mu\text{m}$ ,  $30\ \mu\text{m}$  に調整した。また、TM-TF パルス, MF-TM-TF パルスの条件では echelle 回折格子の階段部によるケラレで  $y$  方向に縞模様が生じる。そのため、レゾナントスキャナで  $y$  方向に

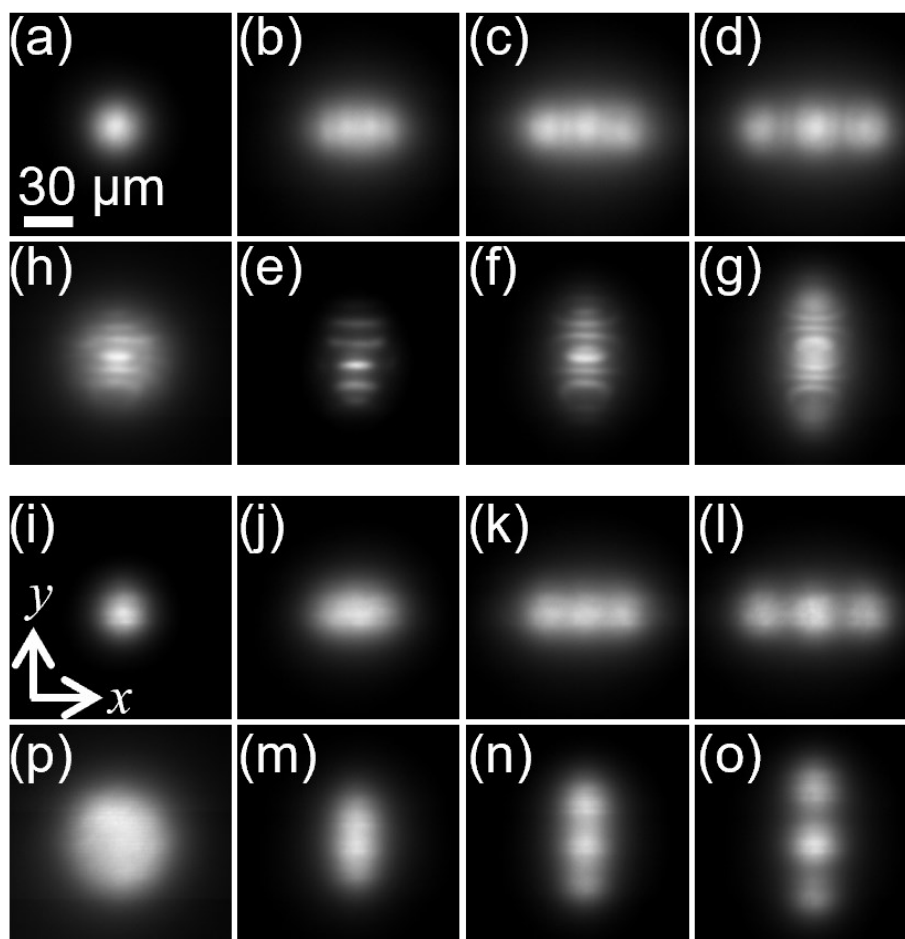


Fig. 6.3 rhodamine B 溶液に(a)TF パルス, (b-h)MF-TF パルス, (i)TM-TF パルス, (j-p)MF-TM-TF パルスを照射することで得られた二光子蛍光プロファイル。

2 $\mu\text{m}$  だけスキャンを行って CMOS カメラ上で積算し、二光子蛍光プロファイルに縞模様が現れないようにした。各照明方法において、蛍光強度が同程度となるように入射パワーをそれぞれ 16 mW (TF パルス), 15 mW (TM-TF パルス), 31 mW (MF-TF パルス), 41 mW (MF-TM-TF パルス) とし、積算時間を 100 ms に設定した。Fig. 6.3(a)は TF パルスを試料に照射した時の二光子蛍光プロファイルであり、スポット1つの直径は30  $\mu\text{m}$  である。Fig. 6.3(b)~(d)はスポットを x 方向に配置し MF-TF パルスを照射した時の二光子励起プロファイルであり、スポットが重なっても干渉縞は見られない。しかし、Fig. 6.3(e)~(g)に示す MF-TF パルスのスポットを y 方向に配置した場合には干渉縞が見られる。この理由は、6.1 節で説明したように、パルスフロントに傾きがある x 方向ではスポットが空間的に重なっても時間的には重ならないためである。ゆえに、x 方向でスポットの重なりがあっても二光子蛍光プロファイルに干渉縞は生じない。しかし、パルスフロントに傾きのない y 方向ではスポットが時間・空間的に重なる。そのため、二光子蛍光プロファイルに干渉縞が生じてしまう。一方で、Fig. 6.3(j)~(l), (m)~(o)に示す MF-TM-TF パルスを試料に照射した時の二光子蛍光プロファイルでは、x, y 両方向において干渉縞は見られない。この理由は、5.1.3 項で述べたように、y 方向において echelle 回折格子による時間多重化が施されることでパルスが時間的に重ならなくなるためである。これらの結果から、TM-TF パルスを用いることでスポットが重なっても干渉縞が発生しない多光子励起パターン照明が実現できることを確かめた。Fig. 6.3(h), (p)は、MF 化による TF 顕微鏡の視野拡大を検証するため、中心のスポットから半径 22.5  $\mu\text{m}$  の同心円上に 8 つのスポットを配置した時の二光子蛍光プロファイルである。MF-TF パルスによる二光子蛍光プロファイルである Fig. 6.3(h)では、Fig. 6.3(e)~(g)と同様に y 方向において干渉縞が発生している。このスポットを用いて得られた二光子蛍光像には干渉縞のパターンが加わるため、得られた二光子蛍光像から試料の形状を読み取ることは困難である。一方で、MF-TM-TF パルスによる二光子蛍光プロファイルは、干渉縞を生じることなく直径 70  $\mu\text{m}$  の均一なスポットを発生できた。スポットの面積は、スポット 1 つの条件と比較し、5 倍に増加した。この均一なスポットであれば、イメージングへの応用に問題はない。

次に、MF 化による z 方向への影響を確かめるため、光軸方向応答を取得した。試料として直径 200 nm の蛍光ビーズシートを使用した。試料に励起光を照射しモーターステージによって試料を光軸方向にスキャンしながら、発生した二光子蛍光を CMOS カメラで取得した。二光子蛍光像における各ピクセルの強度を足し合わせることで、各光軸位置における蛍光強度を求めた。Fig. 6.4 にラインスキャン TF パルス, TM-ML-TF パルス, MF-TM-ML-TF パルスを試料に照射することで得た光軸方向分解能を示す。MF-TM-ML-TF パルスを用いる条件では、スポットの配置は Fig. 6.4(j~l), (m~o)のように、x 方向および y 方向に 3 つのスポットを並べ、スポット中心の間隔が 15  $\mu\text{m}$ , 22.5  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$  となるようにした。また、入射パワーは焦点面における蛍光強度が等しくなるように設定し、それぞれ 1.0 mW (ラインスキャン TF パルス), 5.0 mW (TM-ML-TF パルス), 14 mW (MF-TM-ML-TF パルス) とし、



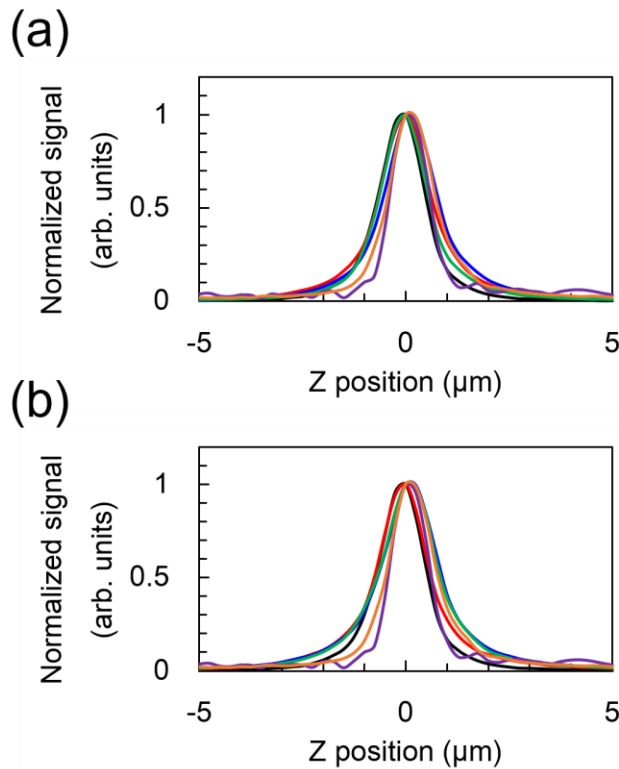


Fig. 6.4 単層蛍光ビーズシートに対してMF-TM-ML-TFパルス照射時の光軸方向応答. (a)MF-TM-ML-TFパルスにおいてx方向にスポットを並べた場合, (b)MF-TM-ML-TFパルスにおいてy方向にスポットを並べた場合. スポット中心の間隔はそれぞれ15 μm (赤), 22.5 μm (青), 30 μm (緑)であり, ラインスキャンTFパルス (紫)とTM-ML-TFパルス (黒), Fig. 6.3(p)のようにスポットを配置したMF-TM-ML-TFパルス (オレンジ)と比較.

積算時間は200 msとした. ラインスキャンTFパルス, TM-ML-TFパルス, MF-TM-ML-TFパルスを試料に照射し得られた光軸方向応答に対し, 式(2.40)を用いてフィッティングすることで分解能 (FWHM) 求めた. 分解能はそれぞれ 0.8 μm (ラインスキャンTF), 1.1 μm (TM-ML-TF), 1.3±0.1 μm (MF-TM-ML-TF)であった. ここで, パターン照明を光刺激へ応用することを考えると, FWHM分解能だけでなく, x-y平面内でのスポットの大きさの定義と同様に, 光軸方向応答においても1/e<sup>2</sup>分解能を評価する必要がある. MF-TM-ML-TFにおいて1/e<sup>2</sup>分解能は6.2 μmであった. ニューロンへパターン照明を行うことを想定すると, 細胞1つのサイズは10 μmであるため, MF-TM-ML-TFパルスによるパターン照明によって細胞レベルのオプトジェネティクスが可能であることが確かめられた.

最後に, MF-TM-ML-TFパルスを用いたパターン照明をTF顕微鏡の視野拡大に応用した結果について説明する. 試料としてアクチンをrhodamine phalloidinで染色したマウス脳ス

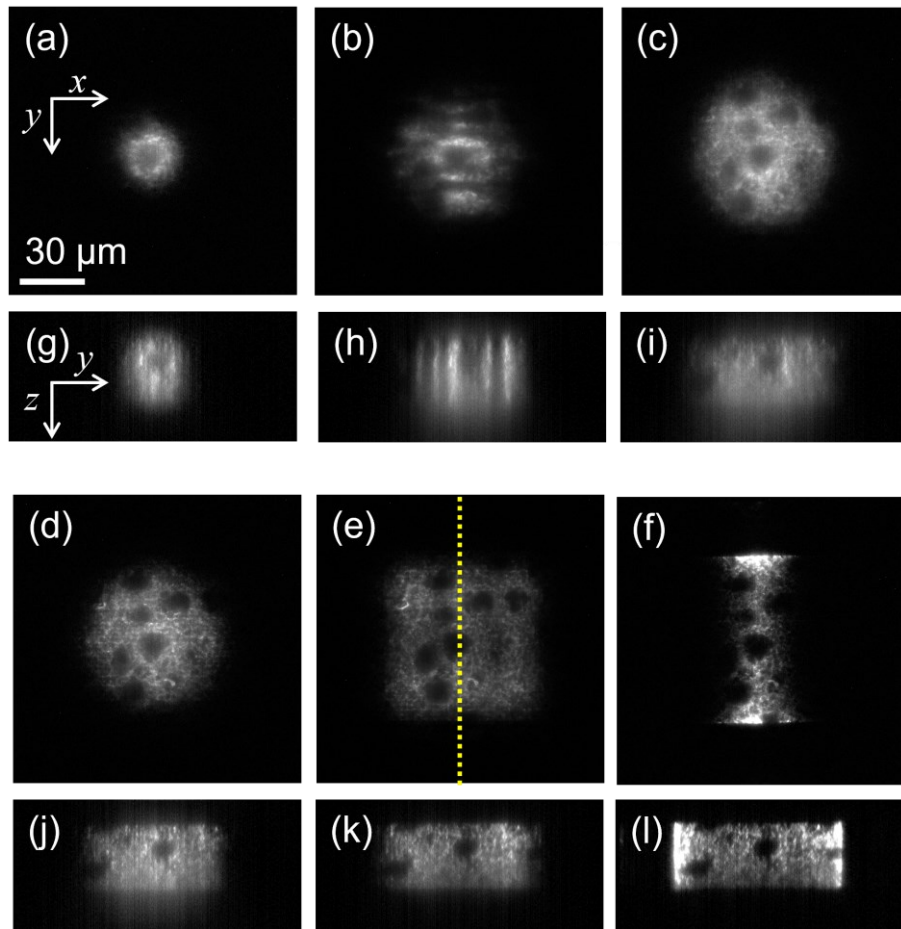


Fig. 6.5 rhodamine phalloidin でアクチンが染色されたマウス脳スライスの二光子蛍光像. (a)TF パルス, (b)MF-TF パルス, (c)MF-TM-TF パルス, (d)MF-TM-ML-TF パルス, (e)MF-TM-ML-TF パルスとスキャンの組み合わせ, (f)ラインスキャン TF パルスの条件で取得したマウス脳スライスの x-y 断面像. (g~l)各集光方法に対応する(e)の黄点線に沿った y-z 断面像.

ライスを使用した. Fig. 6.5(a)~(f)はそれぞれ TF パルス, MF-TF パルス, MF-TM-TF パルス, MF-TM-ML-TF パルス, MF-TM-ML-TF パルスと y 方向のスキャンの組み合わせ, ラインスキャン TF パルスのそれぞれを試料に照射することで取得した二光子蛍光像である. また, Fig. 6.5(g)~(l)は Fig. 6.5(e)内の黄点線に沿った yz 断面であり, それぞれ Fig. 6.5(a)~(f)に対応する. 照射パワーは各二光子蛍光像の蛍光強度が等しくなるように 10 mW (TF パルス), 45 mW (MF-TF パルス), 76 mW (MF-TM-TF パルス), 64 mW (MF-TM-ML-TF パルス), 49 mW (MF-TM-ML-TF パルスとスキャンの組み合わせ), 9.4 mW (ラインスキャン TF パルス) とし, 露光時間は 1 s に設定した. スポットの配置は, TF パルス, ラインスキャン TF パルスの条件では MF 化せず 1 つのスポットまたは 1 つのラインとした. MF-TF パルス, MF-TM-TF パルス, MF-TM-ML-TF パルスの条件では Fig. 6.3(p)のように中心のスポッ

トに対して同心円状に 8 つのスポットを配置した. MF-TM-ML-TF パルスと y 方向のスキヤンの組み合わせの条件では Fig. 6.3(k)のようにスポット中心の間隔  $22.5 \mu\text{m}$  で x 方向に 3 つ配置した. また, DMD によって ML 化を行う MF-TM-ML-TF パルス, MF-TM-ML-TF とスキヤンの組み合わせの条件では, 5.2 節で説明したように試料中でのライン幅が  $0.52 \mu\text{m}$ , ライン中心の間隔が  $2.1 \mu\text{m}$  のマルチラインとなるように空間強度パターンを整形し, ラインスキヤン TF の条件でもライン幅が  $0.52 \mu\text{m}$  となるようにした. 加えて, レゾナントスキヤナによるスキヤンを行う MF-TM-TF パルス, MF-TM-ML-TF パルス, MF-TM-ML-TF パルスと y 方向のスキヤンの組み合わせ, ラインスキヤン TF パルスの条件では, スキヤン範囲はそれぞれ  $2 \mu\text{m}$  (MF-TM-TF パルス),  $4 \mu\text{m}$  (MF-TM-ML-TF パルス),  $50 \mu\text{m}$  (MF-TM-ML-TF パルスと y 方向のスキヤンの組み合わせ),  $70 \mu\text{m}$  (ラインスキヤン TF パルス) とした. Fig. 6.5(a), (g)の TF パルスの条件では, 直径  $30 \mu\text{m}$  の視野において染色されていない核が中央に 1 つあり, アクチンが周囲に分布する様子が見えている. Fig. 6.5(b), (h)の MF-TF パルスの条件では, スポット間の干渉によって y 方向に干渉縞が発生し, 核やアクチンの構造を判別することが不可能である. Fig. 6.5(c), (i)の MF-TM-TF パルスの条件では, TM 化により y 方向の干渉が抑制され核やアクチンの構造の判別が可能になるとともに, 視野が直径  $70 \mu\text{m}$  に拡大されることで, 複数の核の存在を確認できる. しかし, Fig. 6.5(i)の yz 断面では, 光軸方向分解能が低いため核の輪郭がぼやけてしまっている. 光軸方向分解能が低いと背景蛍光が抑制されないため, Fig. 6.5(c)の xy 断面において核のコントラストが低いことの要因にもなっている. Fig. 6.5(d), (j)の MF-TM-ML-TF パルスの条件では, ML 化によって光軸方向分解能が向上されることで, xy 断面における核のコントラストが向上し, また, yz 断面においても核の輪郭が明確になっている. 一方で, スライス上下の境界を超えた範囲でも蛍光が確認されている. この理由は, 焦点面外でのスポット間の干渉により, 背景蛍光が発生しているためである. MF-TM-ML-TF パルスは焦点面から離れるにしたがってビーム径が大きくなり, また, パルス幅も長くなる. そのため, 焦点面ではパルスフロントの傾きや TM 化によって干渉が抑制されていても, 焦点面から離れると隣り合うスポットの間に空間的・時間的な重なりが生じてしまうと考えられる. この干渉の強さはスポット数によるため, スポットの数が 3 つに減らされた Fig. 6.5(e), (k)の MF-TM-ML-TF パルスに y 方向のスキヤンを組み合わせた条件では, 焦点面外の干渉の影響が小さくなり, 核の輪郭やスライス上下の境界がさらに明確になっている. Fig. 6.5(e)では, 3 つのスポットを y 方向に  $50 \mu\text{m}$  スキヤンしているため, 視野は 1 辺  $70 \mu\text{m}$  程度の四角形になっている. Fig. 6.5(f), (l)はラインスキヤン TF パルスの条件で得られた二光子蛍光像である. y 方向の両端部分の強度が強いのはレゾナントスキヤナのスキヤン特性によるもので, スキャナの振動方向が反転する両端でスキヤン速度が低下し, 照射時間が長くなるためである. ゆえに, 両端部分の強度を飽和させて表示することで, 中央部分の像の強度が他の条件の像と等しくなるようにした. 他の条件と比較し, MF-TM-ML-TF パルスで得られた二光子蛍光像はラインスキヤン TF で得られたものに近く, 高い分解能を有している. 以上から, MF-TM-ML-TF パ

ルスを用いたパターン照明を TF 顕微鏡の視野拡大に応用することで、直径  $70\ \mu\text{m}$  の視野で光軸方向分解能  $1.3\ \mu\text{m}$  の二光子蛍光像を取得できることを確認した。また、すべての観察条件において染色した色素の褪色や熱による組織の変性は認められなかった。

#### 6.4. まとめ

本章では TF パルスを用いたホログラフィックパターン照明に TM 化を組み合わせることで、直径  $30\ \mu\text{m}$  のマルチスポットが重なっても干渉縞が発生しない、フリッジ・スペckルフリーなパターン照明技術について述べた。また、MF-TM-TF パルスに ML 化を組み合わせることで光軸方向分解能  $1.3\ \mu\text{m}$ 、 $1/e^2$  サイズで  $6\ \mu\text{m}$  を達成した。本研究では直径  $30\ \mu\text{m}$  のスポットの大きさと光軸方向において 1 細胞以下のスポットの大きさを両立するため TM-TF 技術に ML 化を組み合わせた。一方で、スポットの大きさが  $10\ \mu\text{m}$  程度であれば、ML 化を必要とせずに光軸方向において 1 細胞以下の大きさのスポットを発生することが可能である。また、より NA の高い対物レンズを使用することや、より高次の非線形現象である三光子励起と組み合わせる [70] ことで、光軸方向分解能をさらに向上することができると考えられる。この技術を TM-TF 顕微鏡の視野の拡大に応用することで、視野  $70\ \mu\text{m}$ 、光軸方向分解能  $1.3\ \mu\text{m}$  のイメージング性能により、マウス脳スライスの二光子蛍光像を取得した。視野  $70\ \mu\text{m}$  は従来の TM-TF 顕微鏡の視野の 12 倍に相当する。MF-TM-ML-TF 顕微鏡で取得した二光子蛍光像をラインスキャン TF 顕微鏡のものと比較することで、MF-TM-ML-TF 顕微鏡ではラインスキャン TF 顕微鏡に匹敵する二光子蛍光像が得られることを確かめた。

## 第7章 結言

本研究ではTF顕微鏡における問題点として、以下の3つを挙げ、その改善に取り組んだ。3つの問題点とは、厚みのある試料内部において歪んだTFパルスの補償が困難であること、走査型多光子顕微鏡より光軸方向の分解能が低いこと、パターン照明において隣り合うマルチスポット間で生じる干渉縞がスポットの均一性を劣化させること、である。また、TF顕微鏡では広い範囲で多光子励起を発生させるため、高出力な光源を必要とする。そのため、最初にYbファイバレーザを構築し、平均出力3.9 W、ピーク波長1059 nm、繰り返し710 kHz、パルス幅110 fsを達成した。次に厚みのある試料でもTFパルスの補償を可能とする時空間ロックイン検出技術の開発に取り組んだ。時空間ロックイン検出を用いることで、ローダミン溶液を含むアガロースゲルのような均一な試料だけでなく、アガロースゲル中に直径200 nmと直径2  $\mu\text{m}$ の混合蛍光ビーズを含み、カバーガラス表面にマニキュアが塗られ表面を引っかかれたような不均一な試料でも補償が可能であることを確かめた。そして、TF顕微鏡の光軸方向分解能向上のために、TM-ML-TF顕微鏡の開発に取り組んだ。従来のTM-TF顕微鏡ではTM素子として用いるechelle回折格子を試料に対して高倍率で結像する必要があり、視野を制限する要因となっていた。本研究ではDMDによる空間強度パターンのML化に着目し、TM-TF顕微鏡においてechelle回折格子が担っていた回折限界サイズのマルチラインパターン形成をDMDに担わせ、離散的な時間遅延の付与のみ、echelle回折格子に担わせた。これにより、echelle回折格子の試料に対する結像倍率を低下させ、光軸方向分解能1.62  $\mu\text{m}$ で、TM-TF顕微鏡の視野を30  $\mu\text{m}$ まで拡大することに成功した。視野は従来のTM-TF顕微鏡に対して1.5倍に拡大し、光軸方向分解能はTF顕微鏡に対して2.5倍の改善が得られ、走査型多光子顕微鏡に匹敵する光軸方向分解能を得ることに成功した。さらに、マルチスポットが隣り合い近接する場合でもスポットの均一性を損なわないフリンジ・スペックルフリーなホログラフィックパターン照明技術として、MF-TM-TF技術の開発を行った。従来のMF-TF技術によるホログラフィックパターン照明では、TFパルスの分光方向に対して垂直な方向でスポットが重なるまたは近接すると、時間・空間的な重なりにより干渉縞が発生していた。MF-TM-TF技術では、TFパルスの分光方向に対して垂直な方向に対してTM化を施すことで、スポットが重なっても時間的には重ならなくなり、干渉縞のない均一なスポットの発生に成功した。加えて、MF-TM-TF技術にML化を組み合わせたMF-TM-ML-TF技術によるホログラフィックパターン照明では、光軸方向分解能1.3  $\mu\text{m}$  (FWHM)、6.2  $\mu\text{m}$  ( $1/e^2$ )を達成し、光軸方向において1細胞以下のスポットを発生させることに成功した。そして、MF-TM-ML-TF技術をTM-TF顕微鏡の視野の拡大に応用することで、視野70  $\mu\text{m}$ 、光軸方向分解能1.3  $\mu\text{m}$ でマウス脳スライスの観察を行い、ラインスキャンTFに匹敵する程の分解能で二光子蛍光像の取得に成功した。

本研究で開発した技術の生物学・医科学応用への展望について述べる。TF顕微鏡は高速な3次元イメージング手法としてすでにニューロンなどの多細胞相互作用の観察に用いら

れている。生体組織は厚みがあり、組織ごとに異なる収差を有するため、時空間ロックイン検出による補償は生体組織観察における適応的な TF パルスの補償技術として利用できる。また、広い視野と  $1\ \mu\text{m}$  程度の高い光軸方向分解能を持つ MF-TM-ML-TF 顕微鏡は、複数のニューロン間における膜電位変化の観察に応用できると考えられる。ただし、膜電位観察には  $1\ \text{kHz}$  以上のイメージ速度が必要であり、MF-TM-ML-TF 顕微鏡の時間分解能の向上が必要である。本研究において、MF-TM-ML-TF 顕微鏡の時間分解能を制限する要因は励起光の出力不足であり、光源のパルスエネルギー、echelle 回折格子の透過率の向上、マルチライン形成を強度変調ではなく位相変調に置き換え損失を減らすことで時間分解能を向上できる。また、フリッジ・スペックルフリーなホログラフィックパターン照明の応用として、オプトジェネティクスによる脳機能単位の制御が考えられる。TF パルスを用いたホログラフィックパターン照明によるオプトジェネティクスとして、例えば、 $20\ \mu\text{m}$  から  $30\ \mu\text{m}$  程度離れた複数のニューロンへ直径  $12\ \mu\text{m}$  のスポットを同時に照射し、オプトジェネティクスを行った事例が報告されている [81]。近年、大脳および小脳において、ニューロンは機能ごとにユニットとなり分布し、脳内で情報処理を行っていることがわかってきており [82]、このようなニューロン群をパターン照明によって同時に制御する場合、多数のスポットが近接することは避けられない。ゆえに、従来のパターン照明技術では干渉縞によるスポットの不均一性が活性化に影響してしまう。しかし、スポット間の干渉が抑制された MF-TM-TF 技術はスポットが近接しても均一なスポットを発生できるため、脳機能単位でのオプトジェネティクスに有用であると考えられる。また、MF-TM-TF 技術は、生物学・医科学応用だけでなく、工学応用として精密なレーザ加工への応用も期待される。例えば、スポットを並べて水平方向にスキャンし、平行にラインが並ぶような微小な格子や導波路を形成する場合、ライン間の距離の制限なく構造を形成することが可能である。

## 参考文献

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. M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, and D. C. Prasher, "Green fluorescent protein as a marker for gene expression," *Science* **263**, 802–805 (1994).
3. M. Minsky, "Microscopy Apparatus," U.S. patent 3,013,467 (1961).
4. W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb, "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy," *Science* **248**, 73–76 (1990).
5. W. R. Zipfel, R. M. Williams, and W. W. Webb, "Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences," *Nat. Biotechnol.* **21**, 1369–1377 (2003).
6. E. E. Hoover and J. A. Squier, "Advances in multiphoton microscopy technology," *Nat. Photonics* **7**, 93–101 (2013).
7. N. G. Horton, K. Wang, D. Kobat, C. G. Clark, F. W. Wise, C. B. Schaffer, and C. Xu, "In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain," *Nat. Photonics* **7**, 205–209 (2013).
8. K. Svoboda, D. W. Tank, and W. Denk, "Direct measurement of coupling between dendritic spines and shafts," *Science* **272**, 716–719 (1996).
9. W. Wang, J. B. Wyckoff, V. C. Frohlich, Y. Oleynikov, S. Hüttelmaier, J. Zavadil, L. Cermak, E. P. Bottinger, R. H. Singer, J. G. White, J. E. Segall, and J. S. Condeelis, "Single cell behavior in metastatic primary mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling," *Cancer Res.* **62**, 6278–6288 (2002).
10. J. P. Rickgauer and D. W. Tank, "Two-photon excitation of channelrhodopsin-2 at saturation," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 15025–15030 (2009).
11. J. Bewersdorf, R. Pick, and S. W. Hell, "Multifocal multiphoton microscopy," *Opt. Lett.* **23**, 655–657 (1998).
12. A. H. Buist, M. Müller, J. Squier, and G. J. Brakenhoff, "Real time two-photon absorption microscopy using multi point excitation," *J. Microsc.* **192**, 217–226 (1998).
13. Y. Shao, W. Qin, H. Liu, J. Qu, X. Peng, H. Niu, and B. Z. Gao, "Multifocal multiphoton microscopy based on a spatial light modulator," *Appl. Phys. B Lasers Opt.* **107**, 653–657 (2012).
14. K. Bahlmann, P. T. So, M. Kirber, R. Reich, B. Kosicki, W. McGonagle, and K. Bellve, "Multifocal multiphoton microscopy (MMM) at a frame rate beyond 600 Hz," *Opt. Express* **15**, 10991–10998 (2007).
15. A. Egner and S. W. Hell, "Time multiplexing and parallelization in multifocal multiphoton

- microscopy," *J. Opt. Soc. Am. A* **17**, 1192–1201 (2000).
16. V. Andresen, A. Egner, and S. W. Hell, "Time-multiplexed multifocal multiphoton microscope," *Opt. Lett.* **26**, 75–77 (2001).
  17. J. L. Wu, Y. Q. Xu, J. J. Xu, X. M. Wei, A. C. S. Chan, A. H. L. Tang, A. K. S. Lau, B. M. F. Chung, H. C. Shum, E. Y. Lam, K. K. Y. Wong, and K. K. Tsia, "Ultrafast laser-scanning time-stretch imaging at visible wavelengths," *Light Sci. Appl.* **6**, e16196-10 (2017).
  18. J. Wu, Y. Liang, S. Chen, C. L. Hsu, M. Chavarha, S. W. Evans, D. Shi, M. Z. Lin, K. K. Tsia, and N. Ji, "Kilohertz two-photon fluorescence microscopy imaging of neural activity in vivo," *Nat. Methods* **17**, 287–290 (2020).
  19. A. M. Packer, D. S. Peterka, J. J. Hirtz, R. Prakash, K. Deisseroth, and R. Yuste, "Two-photon optogenetics of dendritic spines and neural circuits," *Nat. Methods* **9**, 1202–1205 (2012).
  20. A. M. Packer, L. E. Russell, H. W. P. Dagleish, and M. Häusser, "Simultaneous all-optical manipulation and recording of neural circuit activity with cellular resolution in vivo," *Nat. Methods* **12**, 140–146 (2015).
  21. C. Lutz, T. S. Otis, V. DeSars, S. Charpak, D. A. DiGregorio, and V. Emiliani, "Holographic photolysis of caged neurotransmitters," *Nat. Methods* **5**, 821–827 (2008).
  22. E. Papagiakoumou, V. de Sars, D. Oron, and V. Emiliani, "Patterned two-photon illumination by spatiotemporal shaping of ultrashort pulses," *Opt. Express* **16**, 22039–22047 (2008).
  23. D. Oron, E. Tal, and Y. Silberberg, "Scanningless depth-resolved microscopy," *Opt. Express* **13**, 1468–1476 (2005).
  24. G. Zhu, J. van Howe, M. Durst, W. Zipfel, and C. Xu, "Simultaneous spatial and temporal focusing of femtosecond pulses," *Opt. Express* **13**, 2153–2159 (2005).
  25. L.-C. Cheng, C.-Y. Chang, C.-Y. Lin, K.-C. Cho, W.-C. Yen, N.-S. Chang, C. Xu, C. Y. Dong, and S.-J. Chen, "Spatiotemporal focusing-based widefield multiphoton microscopy for fast optical sectioning," *Opt. Express* **20**, 8939–8948 (2012).
  26. E. Papagiakoumou, F. Anselmi, A. Bègue, V. De Sars, J. Glückstad, E. Y. Isacoff, and V. Emiliani, "Scanless two-photon excitation of channelrhodopsin-2," *Nat. Methods* **7**, 848–854 (2010).
  27. A. Bègue, E. Papagiakoumou, B. Leshem, R. Conti, L. Enke, D. Oron, and V. Emiliani, "Two-photon excitation in scattering media by spatiotemporally shaped beams and their application in optogenetic stimulation," *Biomed. Opt. Express* **4**, 2869–2879 (2013).
  28. 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).
  29. N. Accanto, C. Molinier, D. Tanese, E. Ronzitti, Z. L. Newman, C. Wyart, E. Isacoff, E. Papagiakoumou, and V. Emiliani, "Multiplexed temporally focused light shaping for high-resolution multi-cell targeting," *Optica* **5**, 1478–1491 (2018).



30. E. Papagiakoumou, A. Bègue, B. Leshem, O. Schwartz, B. M. Stell, J. Bradley, D. Oron, and V. Emiliani, "Functional patterned multiphoton excitation deep inside scattering tissue," *Nat. Photonics* **7**, 274–278 (2013).
31. B. Sun, P. S. Salter, and M. J. Booth, "Effects of aberrations in spatiotemporal focusing of ultrashort laser pulses," *J. Opt. Soc. Am. A* **31**, 765–772 (2014).
32. B. Sun, P. S. Salter, and M. J. Booth, "Effects of sample dispersion on ultrafast laser focusing," *J. Opt. Soc. Am. B* **32**, 1272–1280 (2015).
33. B. Sun, P. S. Salter, C. Roider, A. Jesacher, J. Strauss, J. Heberle, M. Schmidt, and M. J. Booth, "Four-dimensional light shaping: manipulating ultrafast spatiotemporal foci in space and time," *Light Sci. Appl.* **7**, 17117 (2018).
34. A. M. Weiner, "Femtosecond pulse shaping using spatial light modulators," *Rev. Sci. Instrum.* **71**, 1929–1960 (2000).
35. M. A. A. Neil, R. Juškaitis, and T. Wilson, "Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope," *Opt. Lett.* **22**, 1905–1907 (1997).
36. T. Ishikawa, K. Isobe, K. Inazawa, K. Namiki, A. Miyawaki, F. Kannari, and K. Midorikawa, "Adaptive optics with spatio-temporal lock-in detection for temporal focusing microscopy," *Opt. Express* **29**, 29021–29033 (2021).
37. A. Vaziri and C. V. Shank, "Ultrafast widefield optical sectioning microscopy by multifocal temporal focusing," *Opt. Express* **18**, 19645–19655 (2010).
38. J. Park, C. Rowlands, and P. So, "Enhanced Axial Resolution of Wide-Field Two-Photon Excitation Microscopy by Line Scanning Using a Digital Micromirror Device," *Micromachines* **8**, 85 (2017).
39. C.-Y. Chang, C.-Y. Lin, Y. Y. Hu, S.-F. Tsai, F.-C. Hsu, and S.-J. Chen, "Temporal focusing multiphoton microscopy with optimized parallel multiline scanning for fast biotissue imaging," *J. Biomed. Opt.* **26(1)**, 016501 (2021).
40. K. Inazawa, K. Isobe, T. Ishikawa, K. Namiki, A. Miyawaki, F. Kannari, and K. Midorikawa, "Enhancement of optical sectioning capability of temporal focusing microscopy by using time-multiplexed multi-line focusing," *Appl. Phys. Express* **14**, 082008 (2021).
41. T. Ishikawa, K. Isobe, K. Inazawa, T. Michikawa, K. Namiki, A. Miyawaki, F. Kannari, and K. Midorikawa, "Fringe- and speckle-free holographic patterned illumination using time-multiplexed temporal focusing," *Appl. Phys. Express* **15**, 042005 (2022).
42. 黒田和男, 非線形光学 (コロナ社, 2008).
43. M. Göppert-Mayer, "Elementary processes with two quantum transitions," *Ann. der Phys.* **18**, 466–479 (2009).
44. W. Kaiser and C. G. B. Garrett, "Two-photon excitation in  $\text{CaF}_2: \text{Eu}^{2+}$ ," *Phys. Rev. Lett.* **7**, 229–231 (1961).

45. L.-C. Cheng, N. G. Horton, K. Wang, S.-J. Chen, and C. Xu, "Measurements of multiphoton action cross sections for multiphoton microscopy," *Biomed. Opt. Express* **5**, 3427–3433 (2014).
46. W. T. Silfvast, *Laser Fundamentals* (Cambridge University Press, 2004), Vol. 65.
47. M. E. Fermann, F. Haberl, M. Hofer, and H. Hochreiter, "Nonlinear amplifying loop mirror," *Opt. Lett.* **15**, 752–754 (1990).
48. N. J. Doran and D. Wood, "Nonlinear-optical loop mirror," *Opt. Lett.* **13**, 56–58 (1988).
49. I. N. Duling, "All-fiber ring soliton laser mode locked with a nonlinear mirror," *Opt. Lett.* **16**, 539–541 (1991).
50. N. Kuse, J. Jiang, C.-C. Lee, T. R. Schibli, and M. E. Fermann, "All polarization-maintaining Er fiber-based optical frequency combs with nonlinear amplifying loop mirror," *Opt. Express* **24**, 3095–3102 (2016).
51. H. Lin, D. K. Donald, and W. V. Sorin, "Optimizing polarization states in a figure-8 laser using a nonreciprocal phase shifter," *J. Light. Technol.* **12**, 1121–1128 (1994).
52. P. F. Moulton, J. G. Manni, and G. A. Rines, "Spectroscopic and laser characteristics of Ti:Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>," *J. Opt. Soc. Am. B* **3**, 125–133 (1986).
53. H. M. Pask, D. C. Hanna, A. C. Tropper, C. J. Mackechnie, P. R. Barber, J. M. Dawes, and R. J. Carman, "Ytterbium-doped silica fiber lasers: versatile sources for the 1–1.2 μm region," *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **1**, 2–13 (1995).
54. D. Strickland and G. Mourou, "Compression of amplified chirped optical pulses," *Opt. Commun.* **56**, 219–221 (1985).
55. M. Petráň, M. Hadravský, M. D. Egger, and R. Galambos, "Tandem-scanning reflected-light microscope," *J. Opt. Soc. Am.* **58**, 661–664 (1968).
56. N. Matsumoto, A. Konno, Y. Ohbayashi, T. Inoue, A. Matsumoto, K. Uchimura, K. Kadomatsu, and S. Okazaki, "Correction of spherical aberration in multi-focal multiphoton microscopy with spatial light modulator," *Opt. Express* **25**, 7055–7068 (2017).
57. M. E. Durst, G. Zhu, and C. Xu, "Simultaneous spatial and temporal focusing for axial scanning," *Opt. Express* **14**, 12243–12254 (2006).
58. M. E. Durst, G. Zhu, and C. Xu, "Simultaneous spatial and temporal focusing in nonlinear microscopy," *Opt. Commun.* **281**, 1796–1805 (2008).
59. M. J. Booth, "Adaptive optical microscopy: The ongoing quest for a perfect image," *Light Sci. Appl.* **3**, e165 (2014).
60. N. Ji, "Adaptive optical fluorescence microscopy," *Nat. Methods* **14**, 374–380 (2017).
61. C.-Y. Chang, L.-C. Cheng, H.-W. Su, Y. Y. Hu, K.-C. Cho, W.-C. Yen, C. Xu, C. Y. Dong, and S.-J. Chen, "Wavefront sensorless adaptive optics temporal focusing-based multiphoton microscopy," *Biomed. Opt. Express* **5**, 1768–1777 (2014).
62. D. Dan, M. Lei, B. Yao, W. Wang, M. Winterhalder, A. Zumbusch, Y. Qi, L. Xia, S. Yan, Y.

- Yang, P. Gao, T. Ye, and W. Zhao, "DMD-based LED-illumination Super-resolution and optical sectioning microscopy," *Sci. Rep.* **3**, 1116 (2013).
63. J.-N. Yih, Y. Y. Hu, Y. Da Sie, L.-C. Cheng, C.-H. Lien, and S.-J. Chen, "Temporal focusing-based multiphoton excitation microscopy via digital micromirror device," *Opt. Lett.* **39**, 3134–3137 (2014).
64. E. Papagiakoumou, V. de Sars, V. Emiliani, and D. Oron, "Temporal focusing with spatially modulated excitation," *Opt. Express* **17**, 5391–5401 (2009).
65. Q. Song, A. Nakamura, K. Hirosawa, 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).
66. T. Shin, J. W. Wolfson, S. W. Teitelbaum, M. Kandyla, and K. A. Nelson, "Dual echelon femtosecond single-shot spectroscopy," *Rev. Sci. Instrum.* **85**, 083115 (2014).
67. Z. Bor, B. RÁCZ, G. Szabó, M. Hilbert, and H. A. Hazim, "Femtosecond pulse front tilt caused by angular dispersion," *Opt. Eng.* **32**, 2501–2504 (1993).
68. T. Tanabe, F. Kannari, F. Korte, J. Koch, and B. Chichkov, "Influence of spatiotemporal coupling induced by an ultrashort laser pulse shaper on a focused beam profile," *Appl. Opt.* **44**, 1092–1098 (2005).
69. L. Kuznetsova, F. W. Wise, S. Kane, and J. Squier, "Chirped-pulse amplification near the gain-narrowing limit of Yb-doped fiber using a reflection grism compressor," *Appl. Phys. B Lasers Opt.* **88**, 515–518 (2007).
70. K. Toda, K. Isobe, K. Namiki, H. Kawano, A. Miyawaki, and K. Midorikawa, "Temporal focusing microscopy using three-photon excitation fluorescence with a 92-fs Yb-fiber chirped pulse amplifier," *Biomed. Opt. Express* **8**, 2796–2806 (2017).
71. D. Yelin, D. Meshulach, and Y. Silberberg, "Adaptive femtosecond pulse compression," *Opt. Lett.* **22**, 1793–1795 (1997).
72. K. Isobe, A. Suda, M. Tanaka, H. Hashimoto, F. Kannari, H. Kawano, H. Mizuno, A. Miyawaki, and K. Midorikawa, "Nonlinear optical microscopy and spectroscopy employing octave spanning pulses," *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **16**, 767–780 (2010).
73. H. Choi, E. Y. S. Yew, B. Hallacoglu, S. Fantini, C. J. R. Sheppard, and P. T. C. So, "Improvement of axial resolution and contrast in temporally focused widefield two-photon microscopy with structured light illumination," *Biomed. Opt. Express* **4**, 995–1005 (2013).
74. K. Isobe, T. Takeda, K. Mochizuki, Q. Song, A. Suda, F. Kannari, H. Kawano, A. Kumagai, A. Miyawaki, and K. Midorikawa, "Enhancement of lateral resolution and optical sectioning capability of two-photon fluorescence microscopy by combining temporal-focusing with structured illumination," *Biomed. Opt. Express* **4**, 2396–2410 (2013).
75. K. Isobe, K. Toda, Q. Song, F. Kannari, H. Kawano, A. Miyawaki, and K. Midorikawa,

- "Temporal focusing microscopy combined with three-dimensional structured illumination," *Jpn. J. Appl. Phys.* **56**, 052501 (2017).
76. K. Toda, K. Isobe, K. Namiki, H. Kawano, A. Miyawaki, and K. Midorikawa, "Interferometric temporal focusing microscopy using three-photon excitation fluorescence," *Biomed. Opt. Express* **9**, 1510–1519 (2018).
  77. A. Nagler, "Plössl type eyepiece for use in astronomical instruments," U.S. patent 4,482,217 (1984).
  78. G. H. Patterson and D. W. Piston, "Photobleaching in two-photon excitation microscopy," *Biophys. J.* **78**, 2159–2162 (2000).
  79. Y. Meng, W. Lin, C. Li, and S. Chen, "Fast two-snapshot structured illumination for temporal focusing microscopy with enhanced axial resolution," *Opt. Express* **25**, 23109–23121 (2017).
  80. A. Jesacher and M. J. Booth, "Parallel direct laser writing in three dimensions with spatially dependent aberration correction," *Opt. Express* **18**, 21090–21099 (2010).
  81. I. W. Chen, E. Ronzitti, B. R. Lee, T. L. Daigle, D. Dalkara, H. Zeng, V. Emiliani, and E. Papagiakoumou, "In Vivo submillisecond two-photon optogenetics with temporally focused patterned light," *J. Neurosci.* **39**, 3484–3497 (2019).
  82. T. Michikawa, T. Yoshida, S. Kuroki, T. Ishikawa, S. Kakei, R. Kimizuka, A. Saito, H. Yokota, A. Shimizu, S. Itoharu, and A. Miyawaki, "Distributed sensory coding by cerebellar complex spikes in units of cortical segments," *Cell Rep.* **37**, 109966 (2021).

## 謝辞

本研究は慶應義塾大学理工学部電気情報工学科教授 神成文彦博士のご指導の下で行われました。神成文彦博士には学部の卒業研究から修士研究、博士研究まで一貫してご指導いただきました。また、ご指導いただく中で、今後、私が研究者として目指すべき姿をお示しいただきました。神成文彦博士に厚くお礼申し上げます。

本博士論文の作成および学位審査にあたり慶應義塾大学理工学部電気情報工学科教授 齋木敏治博士、同教授 田邊孝純博士、物理学教授 渡邊紳一博士にご指導、ご助言を賜りました。お忙しい中、ご指導のお時間をいただき、お礼申し上げます。

本研究は国立研究開発法人理化学研究所光量子光学研究センターアト秒科学研究チームにおいて行われたものであり、研究室を主宰する同センター長の緑川克美博士にお礼申し上げます。本研究を遂行するにあたり多大なご指導・ご協力をいただいたアト秒科学研究チーム上級研究員および京都大学大学院生命科学研究科先端イメージング学講座光の時空間制御学分野特定教授である磯部圭佑博士に深く感謝いたします。磯部圭佑博士には、顕微鏡技術やファイバレーザについて何も知らない筆者に対し、原理や設計・実験・計測方法を一から教えていただきました。日々の研究活動においては常に自由に組み合わせていただくとともに、行き詰まった時や失敗した時、装置を破損してしまった時には親身に相談に乗っていただきました。また、研究のアイデアや今後の研究方針など、様々に議論させていただきました。共同研究として本研究にご協力いただいた脳科学研究センター細胞機能探索技術研究チームを主宰する宮脇敦史博士、アト秒科学研究チームの道川貴章博士、細胞機能探索技術研究チームの並木香奈博士には、本研究に関して生物学的な見地からのご助言を賜りました。また、脳科学研究に関する最新のトピックのご紹介や、試料として使用した生体組織の作製を行っていただき、感謝申し上げます。また、本研究は、現在シンクサイト株式会社にて研究員をされている戸田圭亮博士の研究を引き継ぐ形で開始されたものです。装置や博士論文の構成など、非常に参考にさせていただき、感謝いたします。また、本研究は慶應義塾大学大学院理工学研究科修士課程に在籍していました稲澤健太修士と共同で取り組んだものです。特に時間多重化時空間集光技術の確立は稲澤健太修士の貢献が大きく、稲澤健太修士に深く感謝いたします。他にも、アト秒科学研究チームでは、専任研究員の永田豊博士よりベテラン研究者の見地からご指導やアドバイスをいただきました。事務職員の若林多起子様には事務手続きのサポートだけでなく、催し物等で研究生活に安らぎを与えていただきました。技術基盤支援チームの皆様には時空間集光顕微鏡システムの構築にあたって設計した機械部品の製作や工作機械の操作方法に関するご指導を賜りました。ここに全ての方のお名前を記載できませんが、理化学研究所では本当に多くの皆様にご指導・ご協力いただき、感謝申し上げます。

本研究とは直接関係しませんが、筆者の後期博士課程在学中には神成文彦博士より慶應義塾大学理工学部矢上キャンパスにおいてタイムストレッチ分光、固体レーザ開発に携わ

る機会および後輩学生の指導の機会を与えていただきました。神成文彦博士に重ねてお礼申し上げますとともに、これらの実験を遂行するために関わることとなった塩谷優太学士，吉澤夢来学士，内田達三学士，佐藤守学士に感謝いたします。

慶應義塾大学大学院理工学研究科に在籍し研究を行うにあたり，奨学金をご支援いただいた一般財団法人慶応工学会および研究のすゝめ奨学金制度に感謝いたします。また，本研究は国立研究開発法人理化学研究所の大学院生リサーチ・アソシエイト制度の下で行われたものであり，本制度に感謝いたします。

最後に，前職を退職し博士課程へ進学することをお許しいただくとともに，様々な形でサポート・応援してくださった家族の皆様感謝します。在学中，特に妻には心配をかけましたが，このように博士論文をまとめることができたのは妻の協力のおかげです。また，博士学位請求論文公聴会の翌週に健やかに生まれた長男に感謝します。

## 業績目録

### 論文発表

1. K. Inazawa, K. Isobe, T. Ishikawa, K. Namiki, A. Miyawaki, F. Kannari, and K. Midorikawa, "Enhancement of optical sectioning capability of temporal focusing microscopy by using time-multiplexed multi-line focusing," *Appl. Phys. Express* **14**, 082008 (2021).
2. T. Ishikawa, K. Isobe, K. Inazawa, K. Namiki, A. Miyawaki, F. Kannari, and K. Midorikawa, "Adaptive optics with spatio-temporal lock-in detection for temporal focusing microscopy," *Opt. Express* **29**, 29021–29033 (2021).
3. T. Ishikawa, K. Isobe, K. Inazawa, T. Michikawa, K. Namiki, A. Miyawaki, F. Kannari, and K. Midorikawa, "Fringe- and speckle-free holographic patterned illumination using time-multiplexed temporal focusing", *Appl. Phys. Express* **15**, 042005, (2022).

### 口頭発表

1. 石川智啓, 磯部圭佑, 稲澤健太, 神成文彦, 緑川克美, “デジタルマイクロミラーデバイスをを用いた多光子パターン照明,” 第 80 会応用物理学会秋季学術講演会, 21p-E206-6, (2019).
2. 稲澤健太, 磯部圭佑, 石川智啓, 神成文彦, 緑川克美, “時間分割多重多焦点時空間集光顕微鏡による深さ方向の分解能向上,” 第 80 会応用物理学会秋季学術講演会, 21p-E206-7, (2019).
3. 石川智啓, 磯部圭佑, 稲澤健太, 並木香奈, 道川貴章, 宮脇敦史, 神成文彦, 緑川克美, “デジタルマイクロミラーデバイスをを用いた多光子励起パターン照明の分解能向上,” レーザー学会学術講演会第 40 回年次大会, I06-22a-VII-04, (2020).
4. 稲澤健太, 磯部圭佑, 石川智啓, 並木香奈, 道川貴章, 宮脇敦史, 神成文彦, 緑川克美, “時間分割多重化プレートを用いた多光子励起時空間集光顕微鏡の光軸方向の分解能向上,” レーザー学会学術講演会第 40 回年次大会, I07-22p-VII-03, (2020).
5. 石川智啓, 磯部圭佑, 稲澤健太, 神成文彦, 緑川克美, “時空間ロックイン検出による時空間集光パルスの補償光学,” レーザー学会学術講演会第 41 回年次大会, B01-18a-II-04, (2021).

6. 稲澤健太, 磯部圭佑, 石川智啓, 並木香奈, 道川貴章, 宮脇敦史, 神成文彦, 緑川克美, “時間分割多重化マルチライン時空間集光による広視野多光子顕微鏡の光軸方向分解能向上,” レーザー学会学術講演会第 41 回年次大会, I01-18a-IX-03, (2021).
7. K. Isobe, K. Inazawa, T. Ishikawa, F. Kannari, K. Namiki, A. Miyawaki, and K. Midorikawa, “Enhancement of axial resolution of temporal focusing microscopy by using programmable time-multiplexed multi-line focusing,” The 10th Advanced Lasers and Photon Sources, ALPS-22-01, (2021).
8. T. Ishikawa, K. Isobe, K. Inazawa, F. Kannari, and K. Midorikawa, “Adaptive optics of wide-field temporal focusing microscopy combined with structured illumination microscopy,” The 10th Advanced Lasers and Photon Sources, ALPS-22-02, (2021).
9. T. Ishikawa, K. Isobe, K. Inazawa, F. Kannari, and K. Midorikawa, “Adaptive optics of temporal focusing microscopy by utilizing structured illumination,” 2021 Conference on Lasers and Electro-Optics/Europe, CH-13.1, (2021).
10. T. Ishikawa, K. Isobe, K. Inazawa, T. Michikawa, K. Namiki, A. Miyawaki, F. Kannari, and K. Midorikawa, “Fringe- and speckle-free holographic patterned illumination using multifocal time-multiplexed temporal focusing pulses,” The 11th Advanced Lasers and Photon Sources ALPS8-02, (2022).