



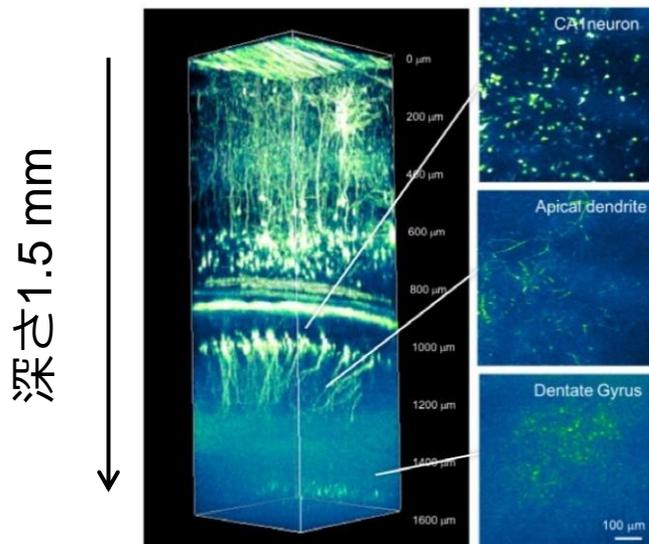
3次元情報を一挙に可視化する レーザー顕微鏡技術

東北大学 多元物質科学研究所
准教授 小澤 祐市

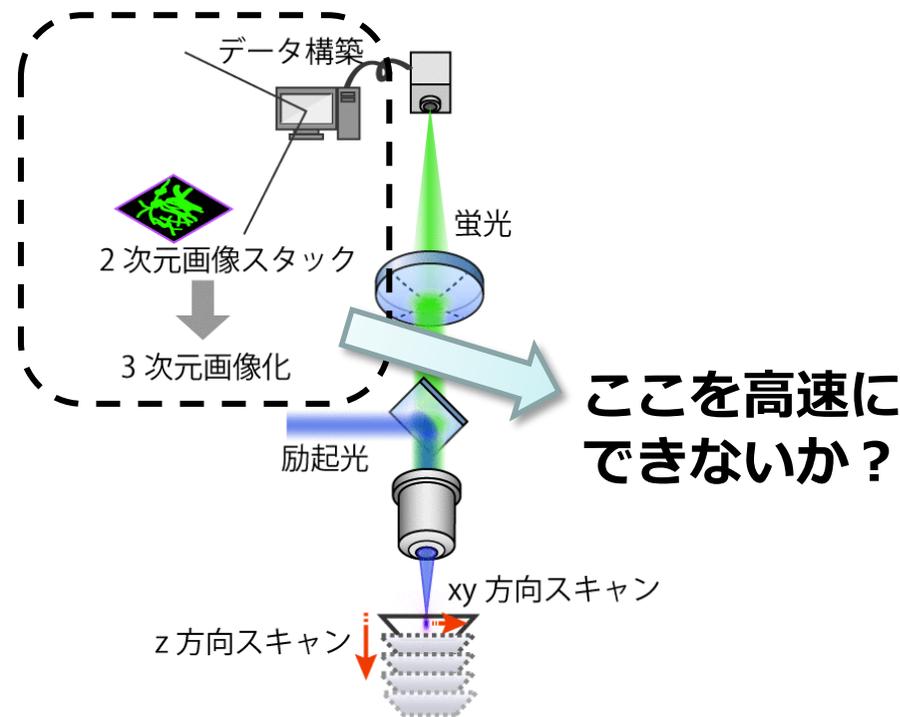
令和2年7月16日

レーザー走査型（蛍光）顕微鏡技術における 3次元画像構築と課題

最先端2光子励起in vivoイメージング
によるマウス脳神経細胞の3次元可視化例



R. Kawakami et al., *Biomed. Opt. Express* 6, 891 (2015).



**>1 mm深さでの3次元イメージング:
数十分 - 時間オーダーでの取得**

実用化された高速レーザー顕微鏡技術例

スピニングディスク型顕微鏡

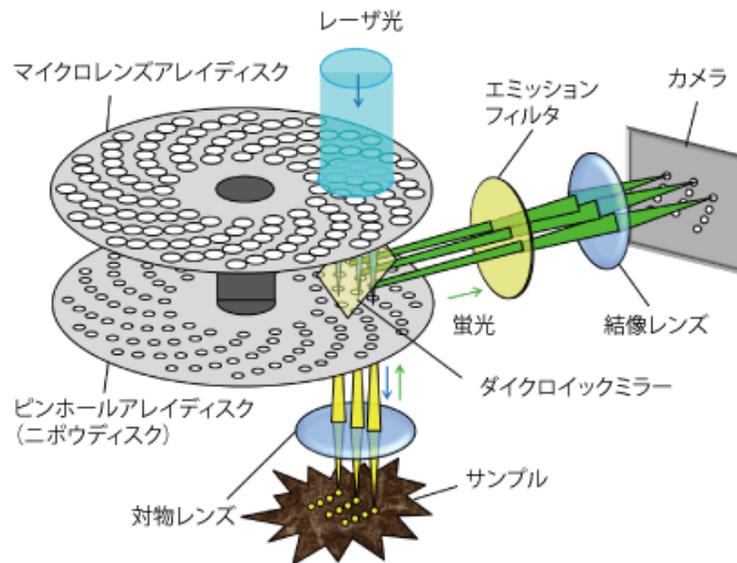
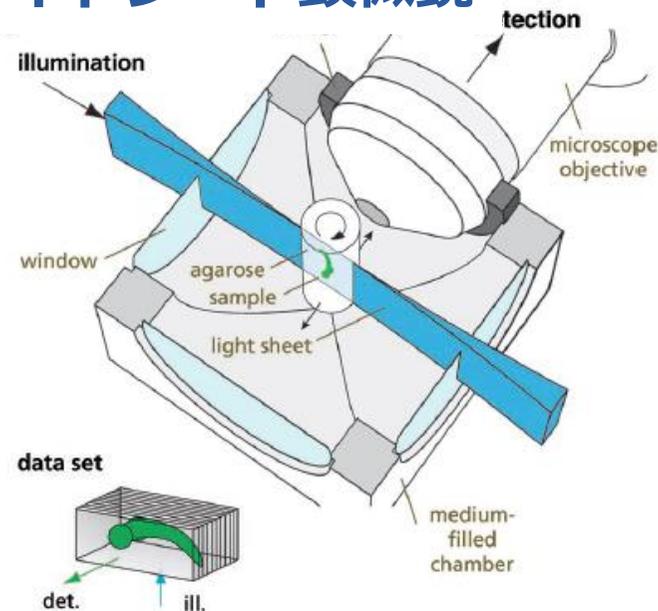


Figure: www.yokogawa.co.jp

- ピンホールアレイによる多点走査
- 2次元画像: 100 - 2000 fps (カタログ値)
- 高出力レーザーが必須

ライトシート顕微鏡



J. Huisken *et al.*, *Science* **305**, 1007 (2004)

- 光のシートによる断層イメージ
- 試料サイズ・配置に制限
- 高NA化が困難

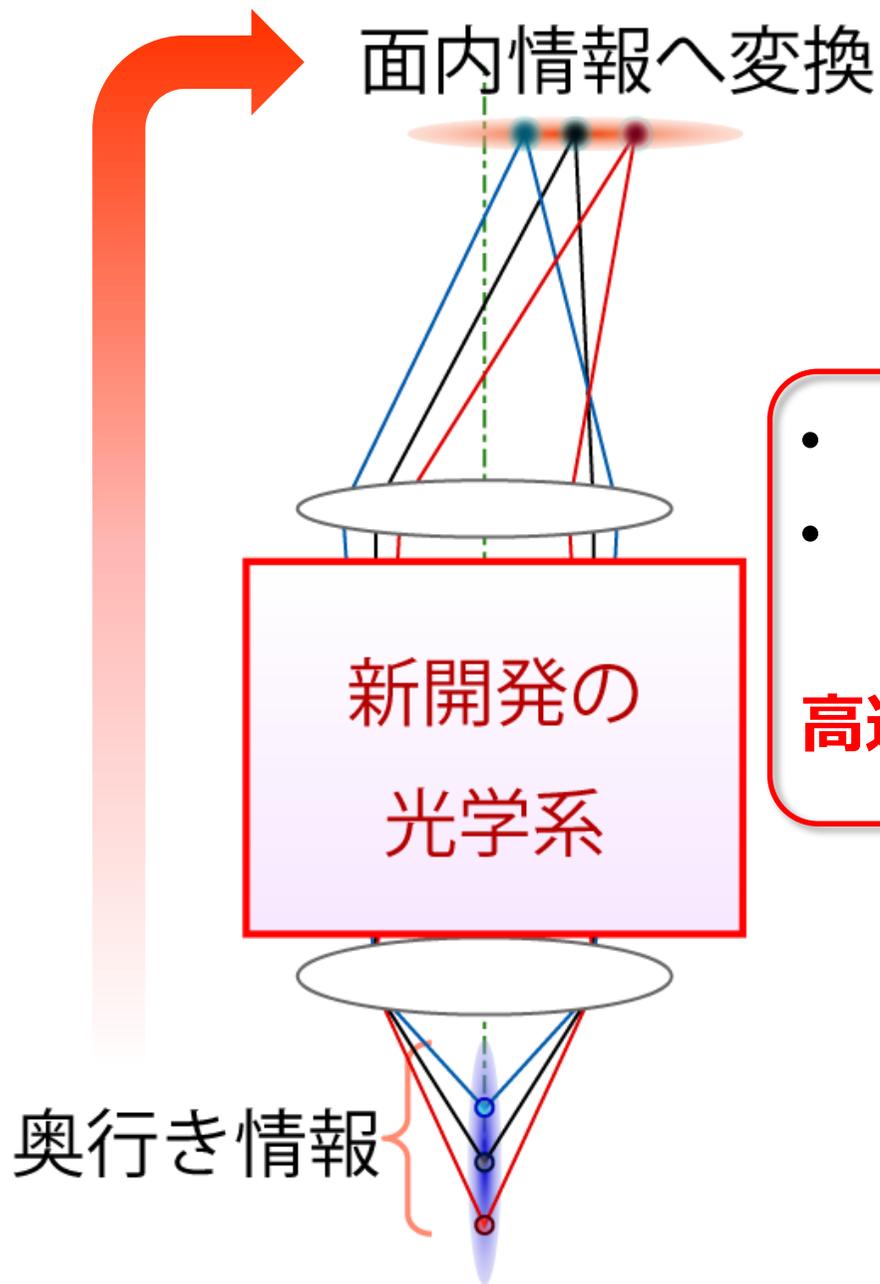
3次元画像化には観察面の移動が必須

従来技術とその問題点

- レーザー走査型顕微鏡法は試料の3次元情報を高空間分解能で可視化できる優れたイメージング手法
- 観察面（2次元情報）を高速に可視化する複数の技術が実用化されている
 - レゾナントスキャナ
 - スピニングディスク
 - ライトシート照明

数百～kHオーダーのフレームレート(FPS)が実現している
- 試料の深さ情報（z情報）を得るには、観察面の（機械的な）移動を伴う逐次取得が必須
 - 3次元の可視加速度を律速（～数VPS程度）

もしこんなことができれば・・・？



- 奥行き情報を面内情報へ変換
- 1回の2次元走査で3次元情報を取得

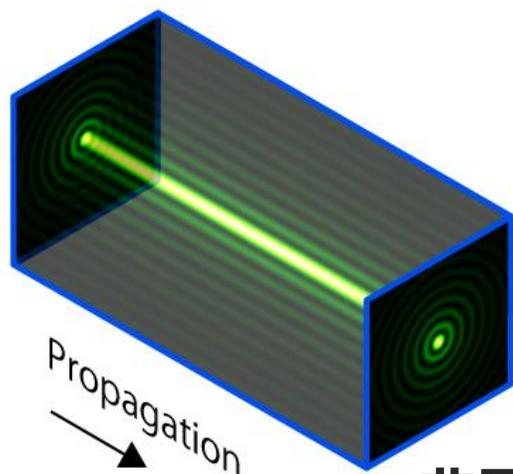


高速な3次元光イメージングが実現！

本手法のコアとなる光学原理

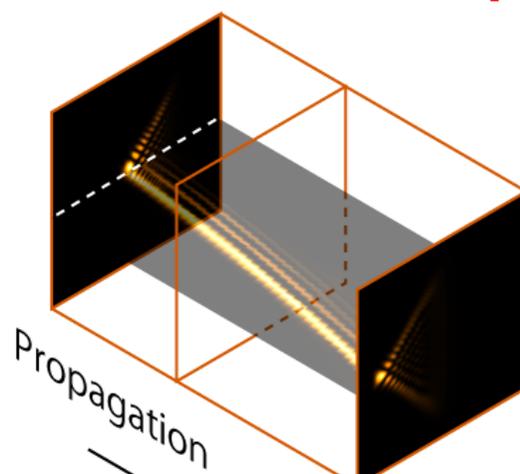
光波の位相分布（波面）制御による特異な光特性の発現

ベッセルビーム(Bessel beam)



非回折性
(ニードル状スポット)

エアリービーム (Airy beam)

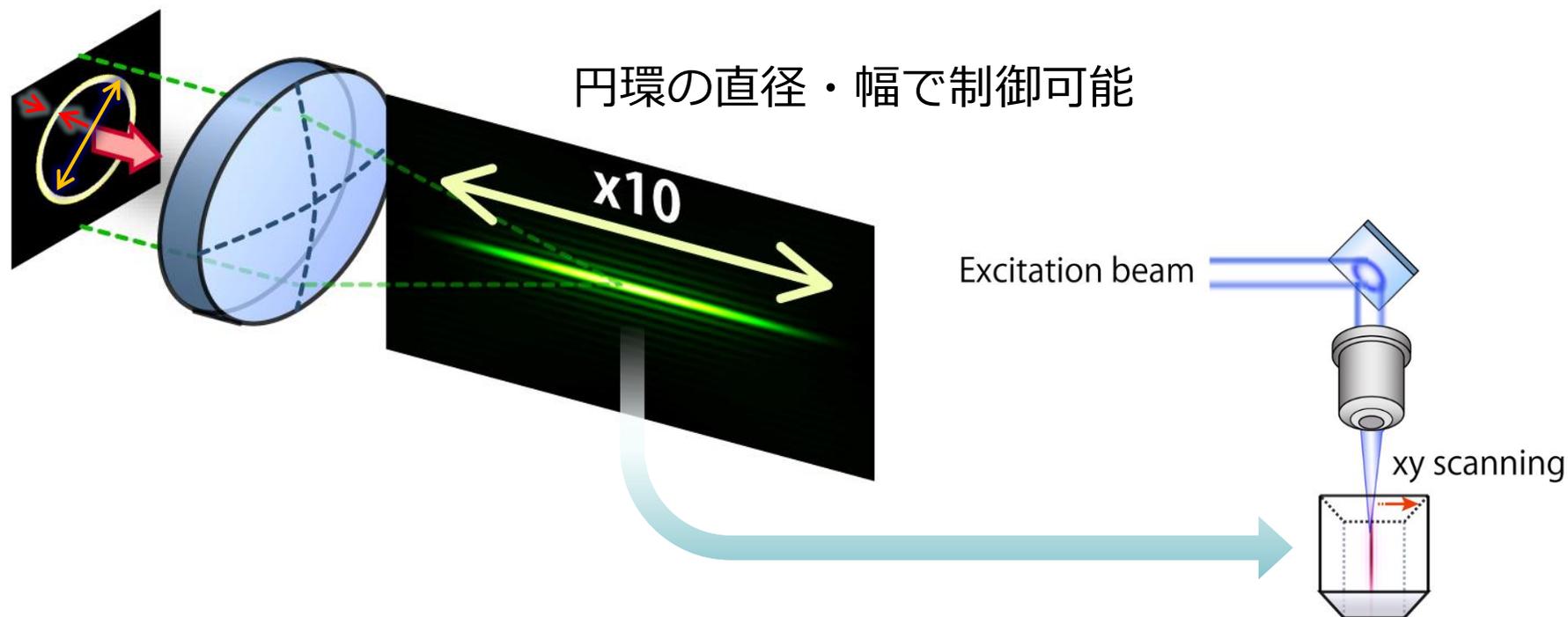


非回折・自己湾曲性

レーザー走査型顕微鏡における**観察面(z位置)**を移動することなく試料の深さ情報を取得，高速な3次元イメージングを実現する新しい顕微鏡法

非回折スポット（ニードル状スポット）走査

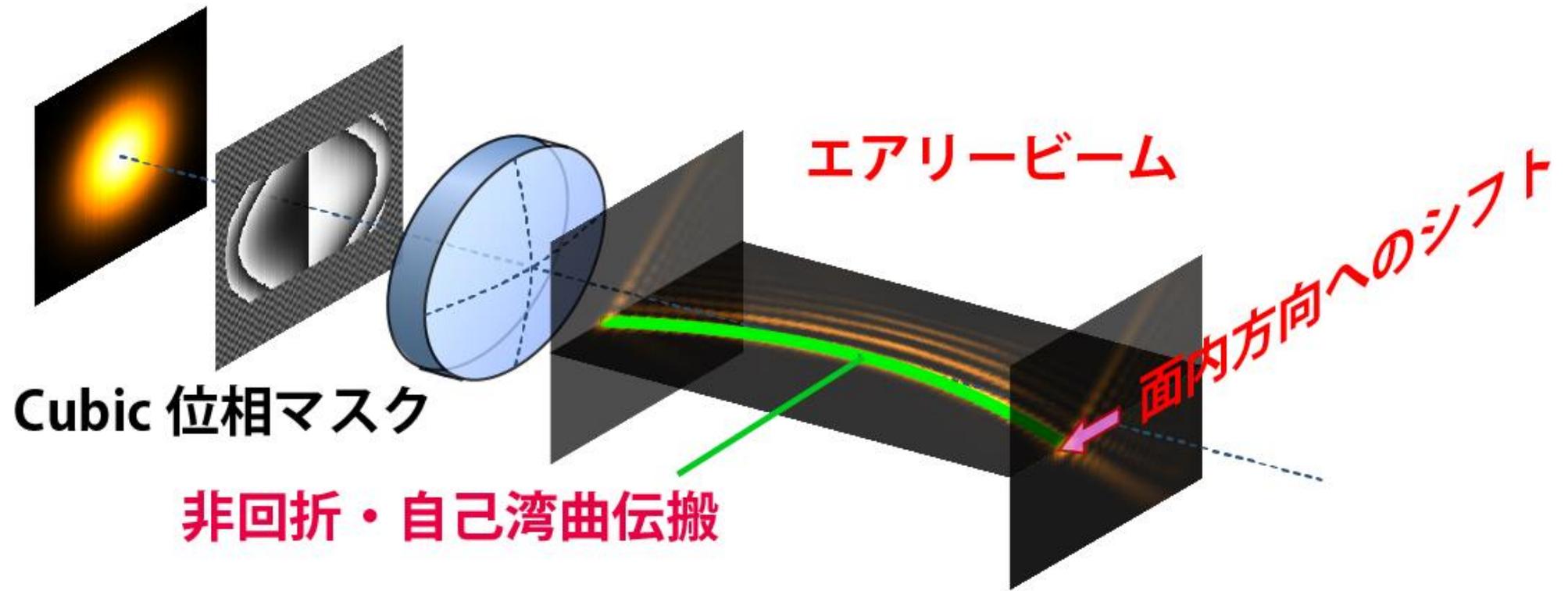
円環状ビーム集光による非回折ニードル状スポット（ベッセルビーム）の形成



Non-diffracting, needle spot excitation

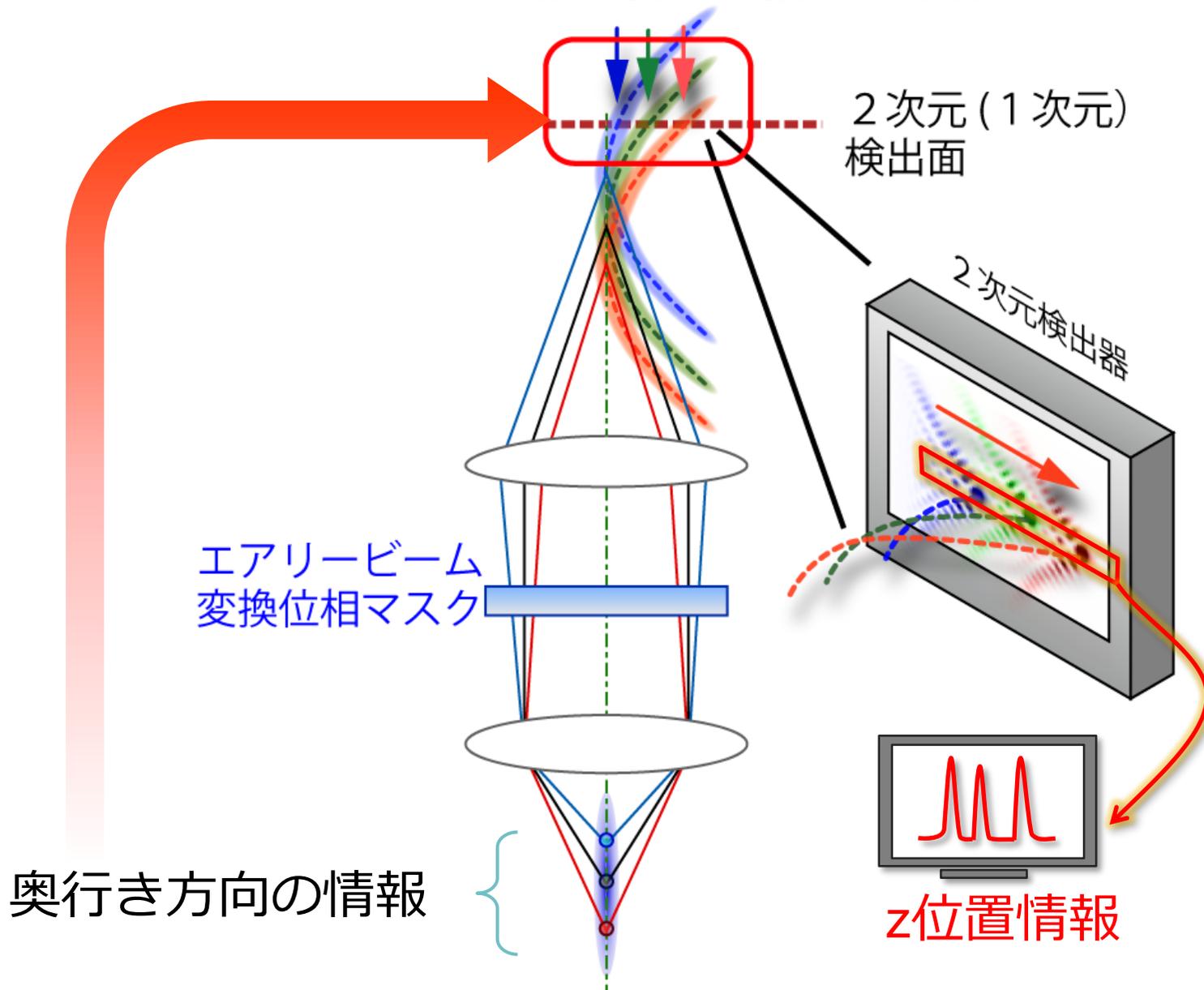
- 光ニードルスポットによる『超』長焦点深度イメージング⇒ただし、深さ情報は消失
- 焦点深度内の全ての深さ(z) 情報が重畳：位置分解するには？

エアリービームの自己湾曲性による深さ情報の抽出



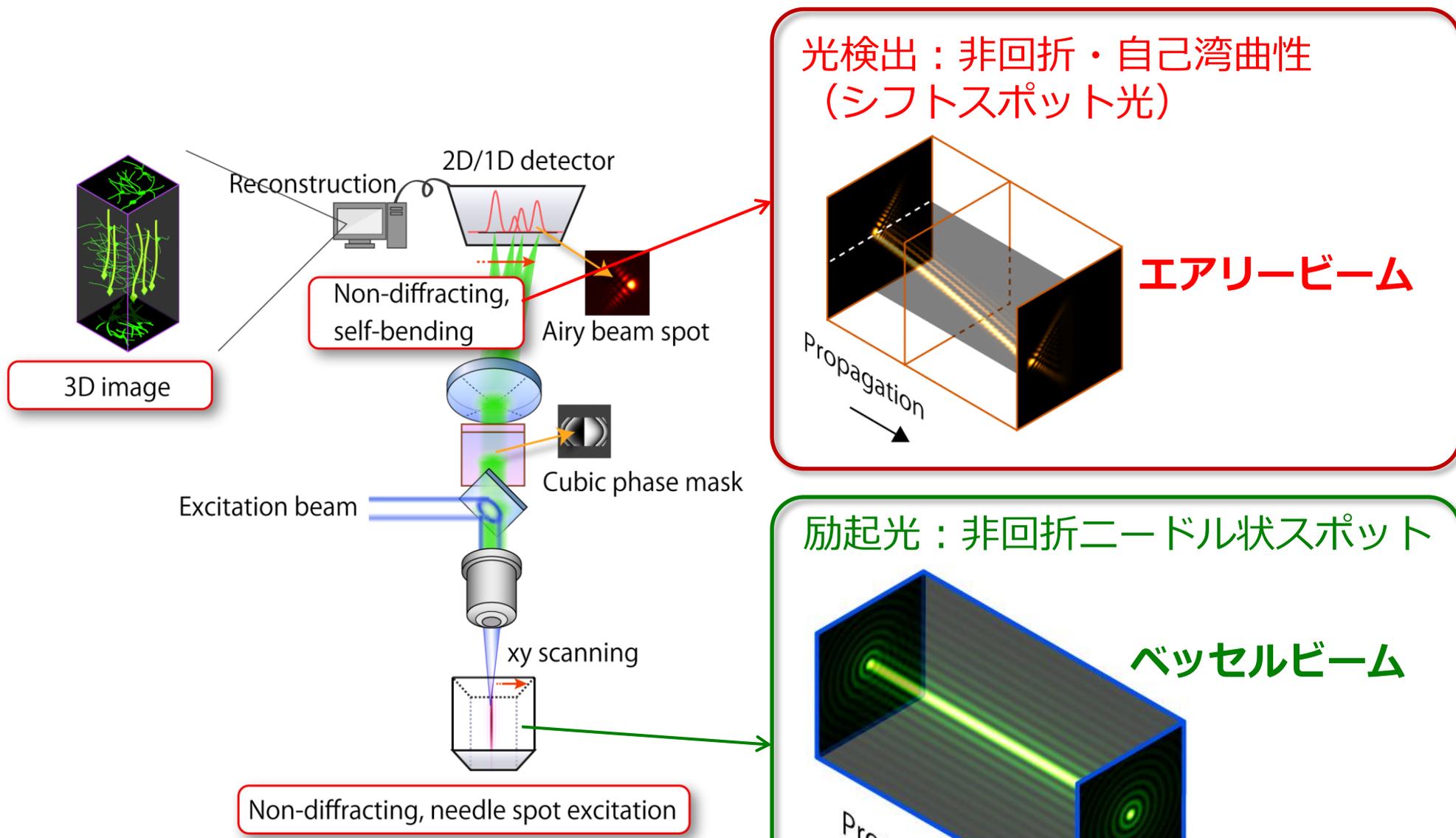
- 焦点スポットは非回折に伝搬
- 伝搬に伴い焦点スポットが湾曲

面内方向の情報に変換



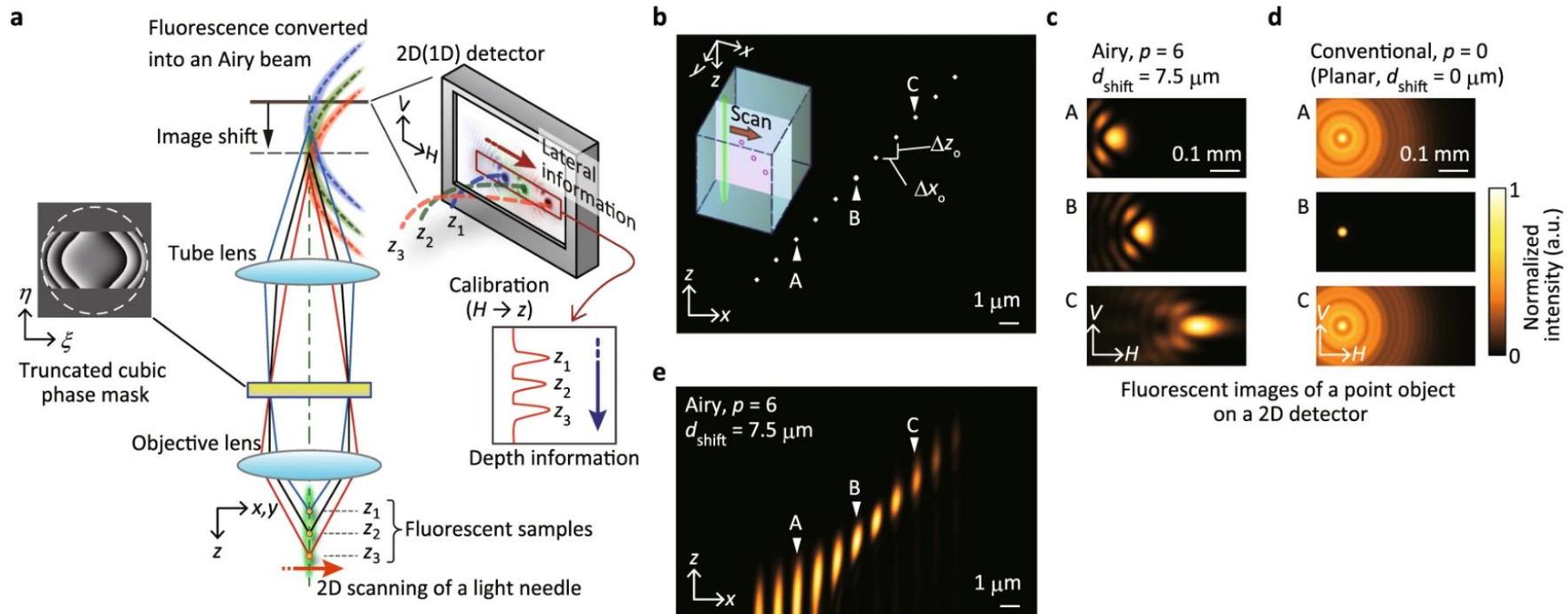
エアリービームを用いることで試料奥行き情報を抽出可能！

本原理を実現するシステム像



ベッセルビームの非回折性とエアリービームの自己湾曲性を用いることで高速な3次元イメージング法が実現

光ニードル走査型 3次元顕微鏡の実施例

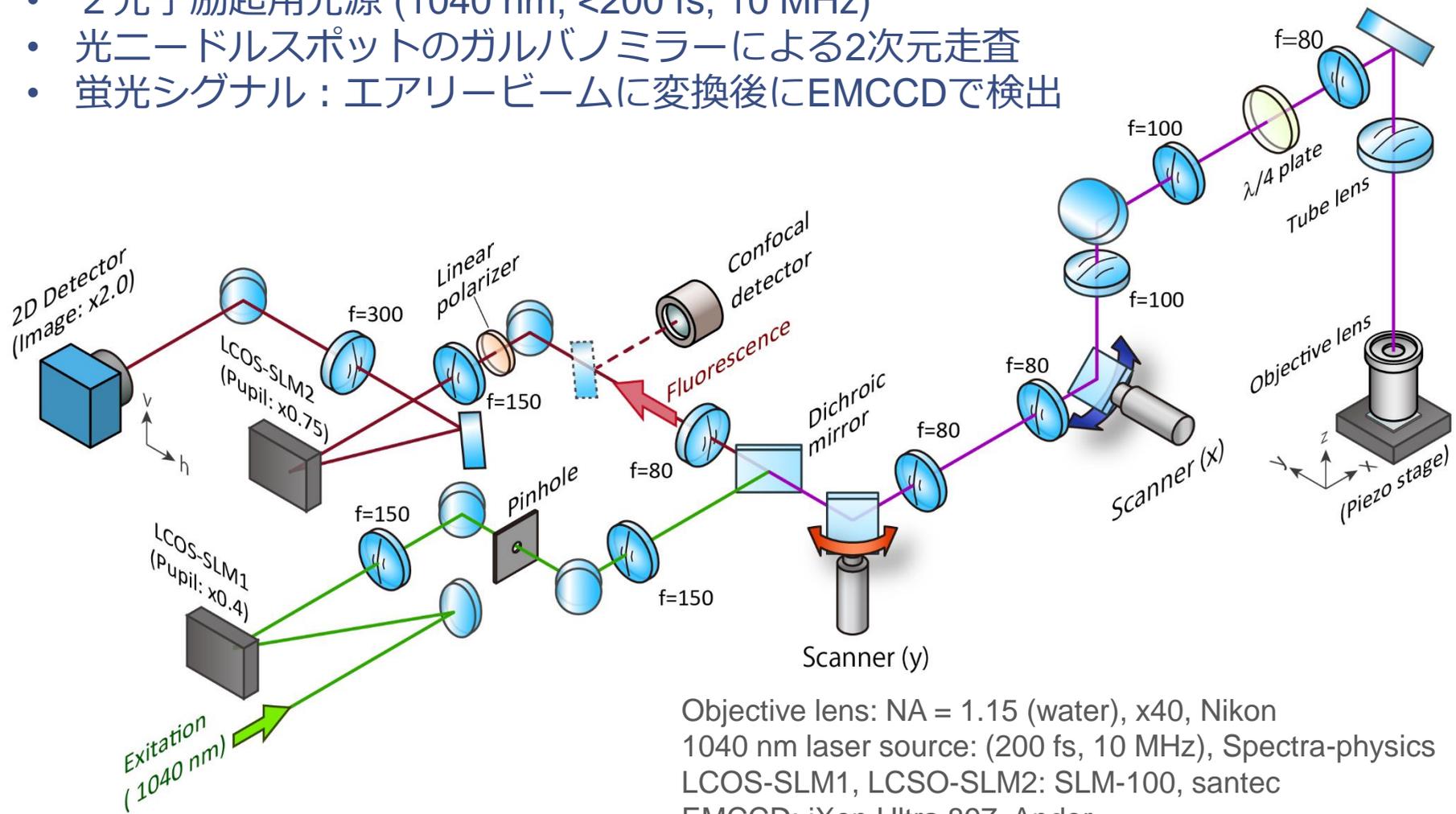


Y. Kozawa and S. Sato, "Light needle microscopy with spatially transposed detection for axially resolved volumetric imaging," Sci Rep 9, 11687 (2019).

- 本原理を独自のレーザー顕微鏡光学系で実装
- 蛍光試料に対するイメージングの試行により3次元可視化を実証
- 結像性能・空間分解能を理論的に検討

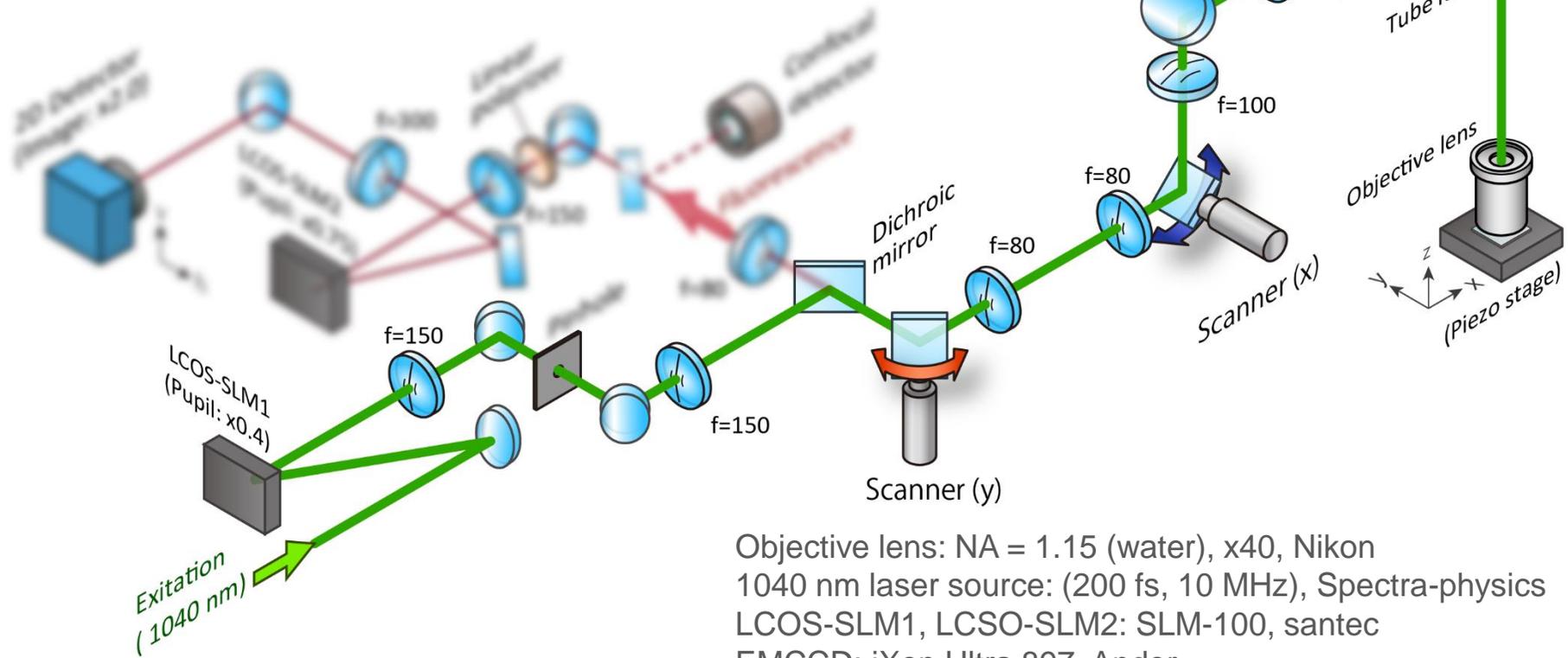
具体的な光学系

- 2光子励起光源 (1040 nm, <200 fs, 10 MHz)
- 光ニードルスポットのガルバノミラーによる2次元走査
- 蛍光シグナル：エアリービームに変換後にEMCCDで検出



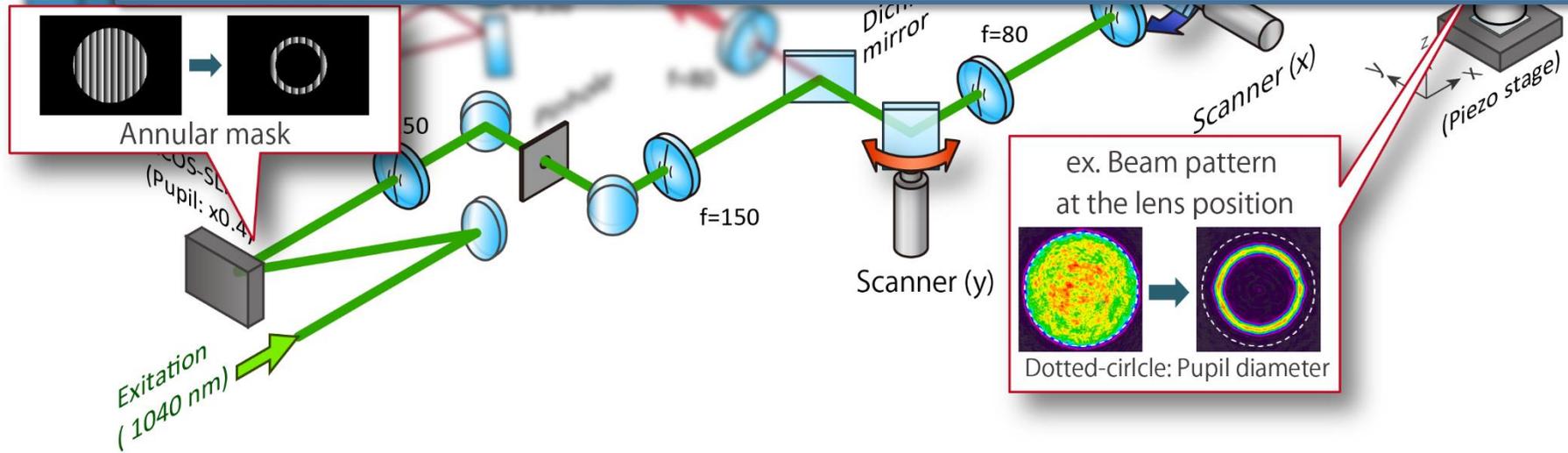
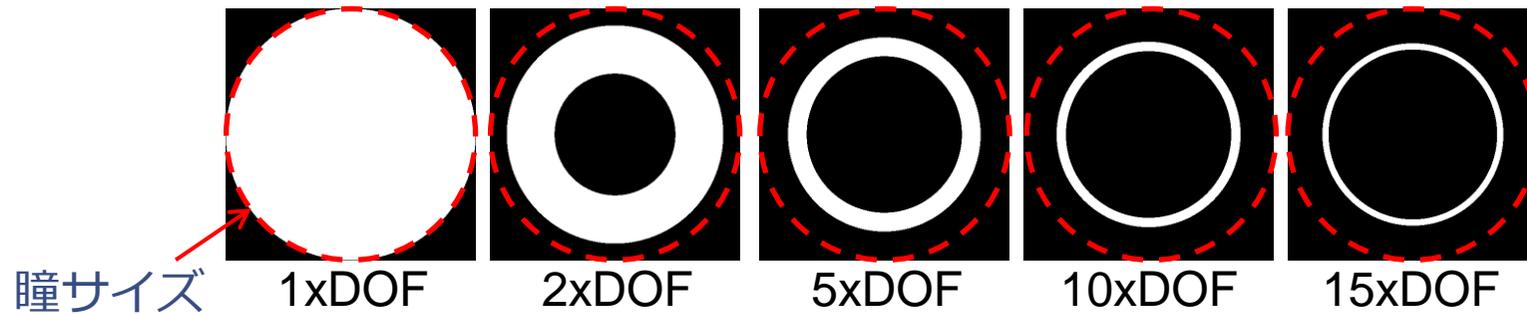
具体的な光学系

- 2光子励起光源 (1040 nm, <200 fs, 10 MHz)
- 光ニードルスポットのガルバノミラーによる2次元走査
- 蛍光シグナル：エアリービームに変換後にEMCCDで検出

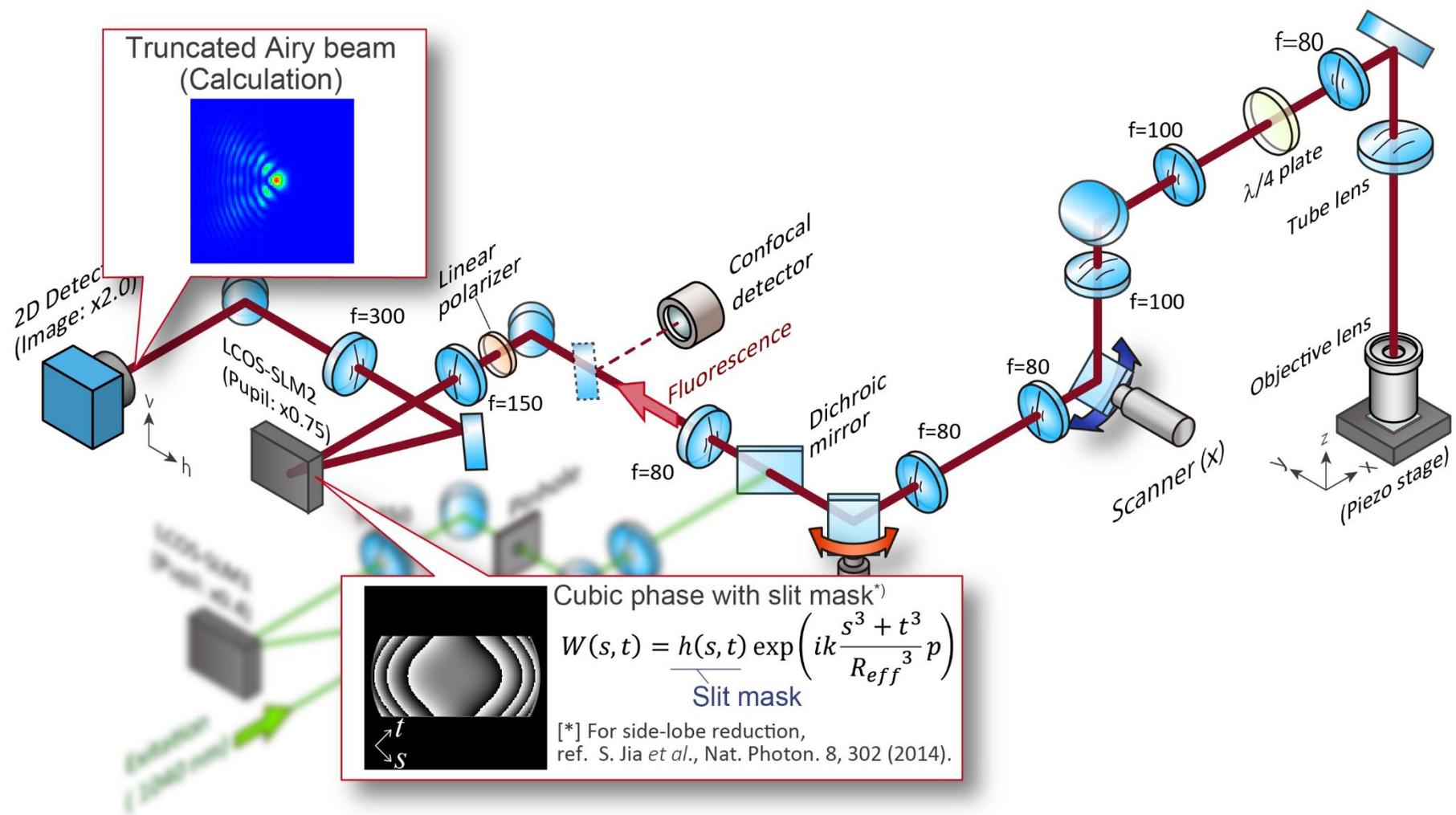


具体的な光学系

励起側SLM：円環マスク⇒焦点にニードルスポットを生成



具体的な光学系

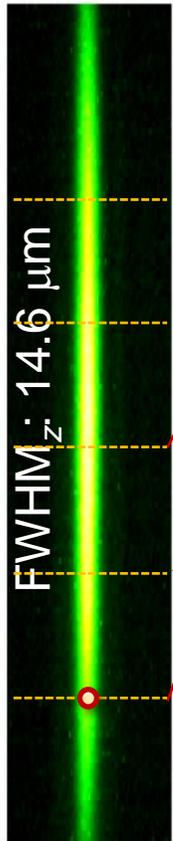
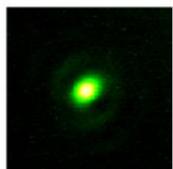
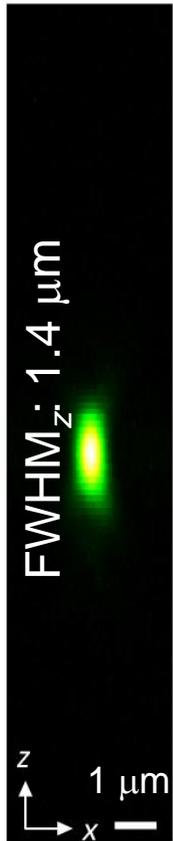
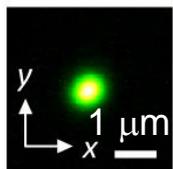


各光ニードル走査点に対して、結像面での強度分布を2次元検出器で計測

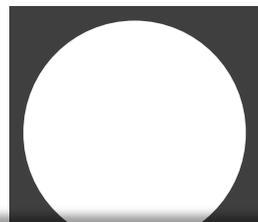
光ニードルの形成とエアリービーム検出

2光子励起PSFの測定

Conventional Needle

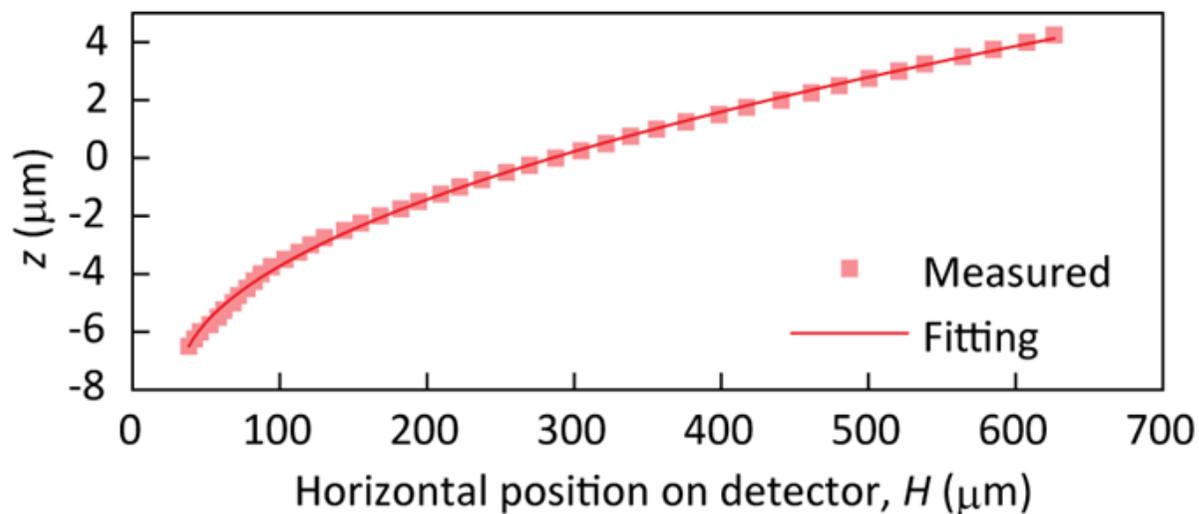


Plane



印加波面
(SLM_{det})

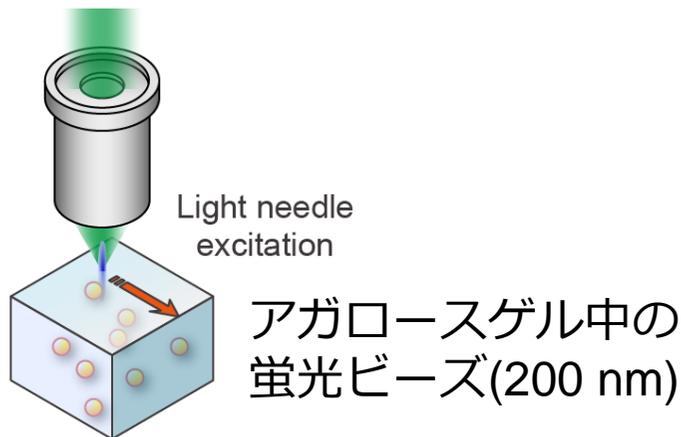
キャリブレーション(面内座標→深さ座標の変換)



深さ情報を面内位置情報から取得できる

試料: オレンジ蛍光ビーズ(200 nm)

3次元イメージングの実証

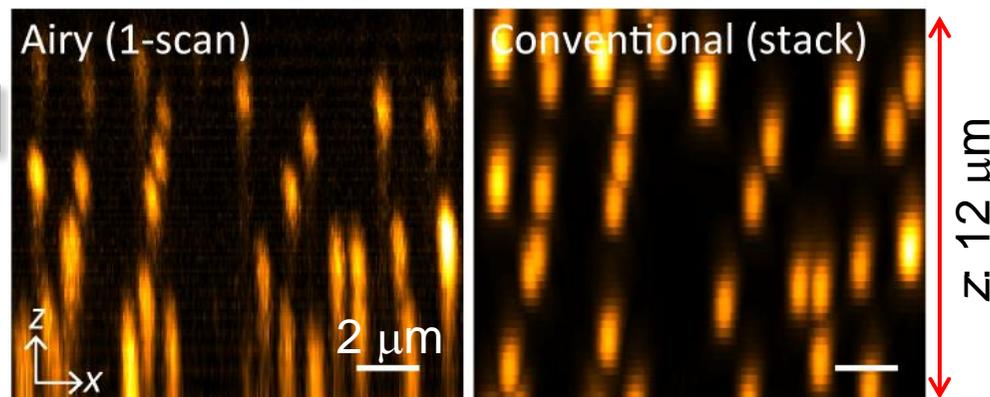
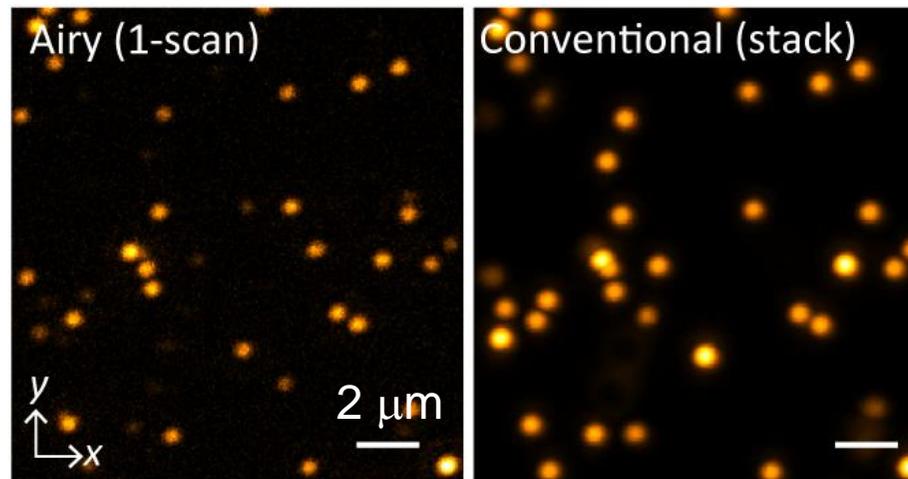


2次元検出器(EMCCD)でエアリービーム変換後の信号強度分布を測定



ROI [WxH]: 70x2 pixels

構築画像の最大値投影(MIP)像

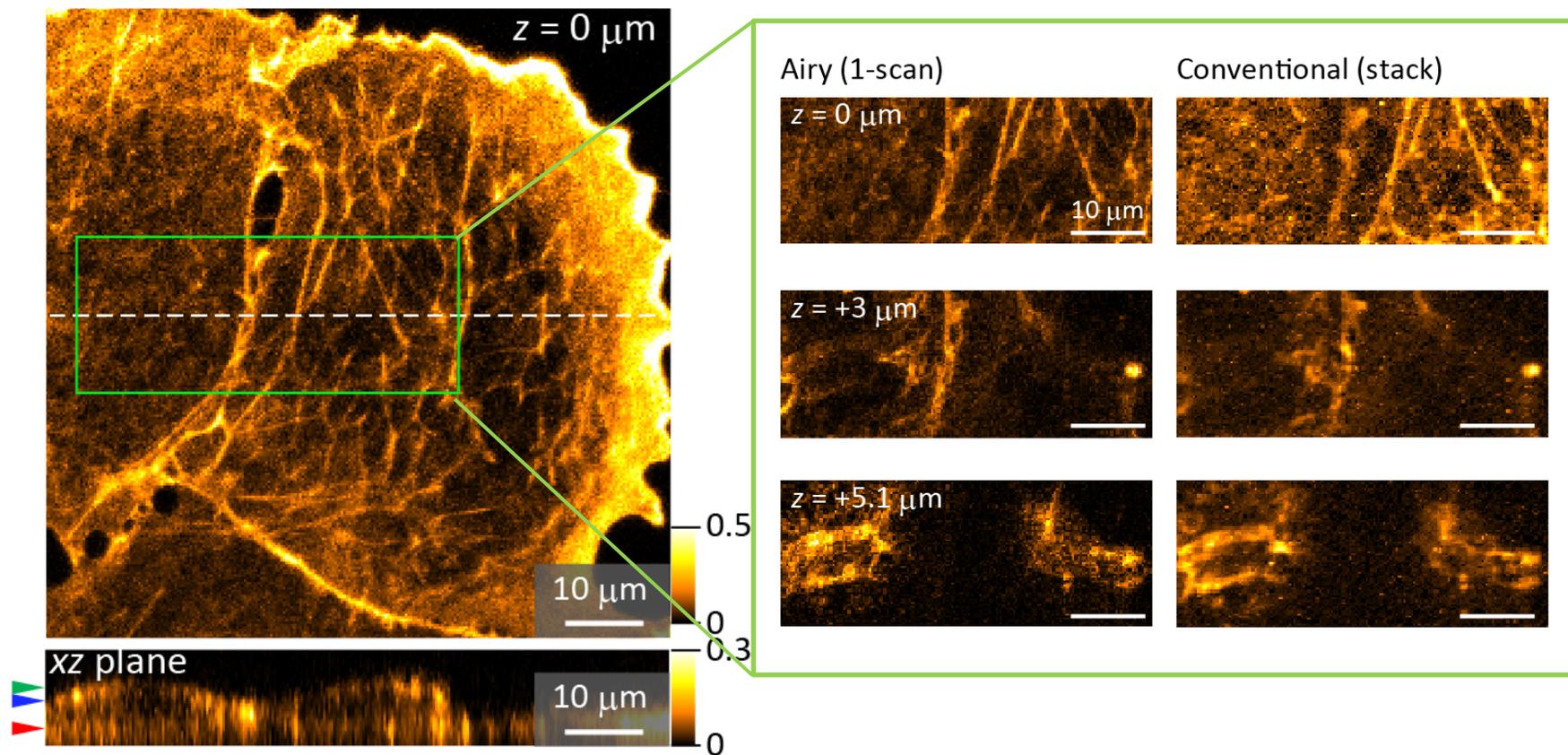


- 光ニードルの1回の2次元走査のみから深さ分解された3次元画像を構築できる!
(深度: ~10 μm)

生体試料に対するイメージング実証例

F-actin in fixed COS-7 cells

Image: 256x256 pixels, Pixel dwell time: 0.5 ms



- 1細胞全体を1回の2次元走査のみから3次元的に可視化
- 本手法の生体試料に対する適用可能性を実証

既存の高速レーザー顕微鏡技術の比較

装置原理	スピニングディスク レーザー顕微鏡	ライトシート顕微鏡法	本手法
照明(励起)法	多点スポットの 試料面上走査	シート状ビームを 試料面内方向から照射	ニードル状スポット の2次元走査
検出法	2次元検出器 (観察面を結像)	2次元検出器 (観察面を結像)	1次元/2次元検出器
出射光変調	無し	無し	エアリービーム
3次元画像化	2次元画像の スタック	2次元画像の スタック	座標変換による取得
観察面の移動	必須	必須	不要 (焦点深度内で)
既存のレーザー顕 微鏡系への実装	○ (後付ユニットとして販売)	△ (励起/検出で直交 する独立光学系が必須)	○ (レーザー走査系を流用可)
空間分解能 (従来レーザー顕微 鏡との比較)	○	△ (高NA化が困難)	○
高速性	◎ (2次元) / △ (3次元)	◎ (2次元) / △ (3次元)	○ (2次元) / ◎ (3次元)
参考文献(例)	特願2002-252426 (横河電機)	特表2014-530387 (カールツァイス)	特願2018-521751 (Sci. Rep. 9, 11687 (2019))

新技術の特徴・従来技術との比較

- 光ニードル励起スポットによる長焦点深度イメージングと、検出光の波面制御によるエアリービーム変換によって、深さ情報を取得
- 観察面を移動することなく2次元のレーザー走査のみから3次元情報の取得が可能
- 原理的には既存のレーザー走査型顕微鏡における2次元走査の速度を維持したまま3次元情報の取得が可能となり、3次元イメージング速度の大幅な高速化につながる

想定される用途

- レーザー走査型顕微鏡システム
 - 蛍光イメージング（多光子励起）
 - 非線形顕微鏡法（SHG, THG）
 - 散乱・反射光：表面計測への応用
- 生物顕微鏡（基礎研究・臨床）への応用，表面検査・半導体内部観察などの工業顕微鏡への産業応用も期待
- 本手法の本質：試料の奥行き情報を検出面で面内方向に空間転置する光学情報検知装置
⇒新しい光計測装置への展開

実用化に向けた課題

- 深さ情報→面内情報への変換波面の設計
 - エアリービームは非線形：分解能は深さ依存
 - 計算機ホログラムの原理による線形シフト波面の適用
(関連：特願2017-250153, 東工大との共同出願)
- 検出光（インコヒーレント光）に対する波面変調
 - 現状では反射型液晶空間光変調器⇒強度が1/2に
 - 偏光無依存な位相変調の必要性
- 最終的な取得速度は検出器の速度・感度に依存
 - 2次元検出器（EMCCD）は不適
 - 1次元ディテクターアレイによるシステム構築が必須
(数十VPSでの3次元イメージングを検証済み)

企業への期待

- ハードおよびソフトを統合したイメージングシステムとしての実装には企業との共同研究が不可欠（ハード／ソフトの開発）
- 高速・高感度な光検出器・信号処理技術
- アクティブ／パッシブな波面制御技術を有する企業との共同研究も希望
- 本技術をベースとした新しい3次元光計測技術、検査装置の開発を一緒に推進いただける企業との共同研究を期待します

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 光学情報検知装置及び顕微鏡システム
- 出願番号 : 特願2018-521751
(特許第6537153号)
(PCT/JP2017/021138)
- 出願人 : 東北大学
- 発明者 : 小澤 祐市

お問い合わせ先

東北大学

産学連携機構 総合連携推進部

TEL 022-795-5274

FAX 022-795-5286

問い合わせ専用URL

<http://www.rpip.tohoku.ac.jp/jp/information/gijutsu/>

e-mail liaison@rpip.tohoku.ac.jp