

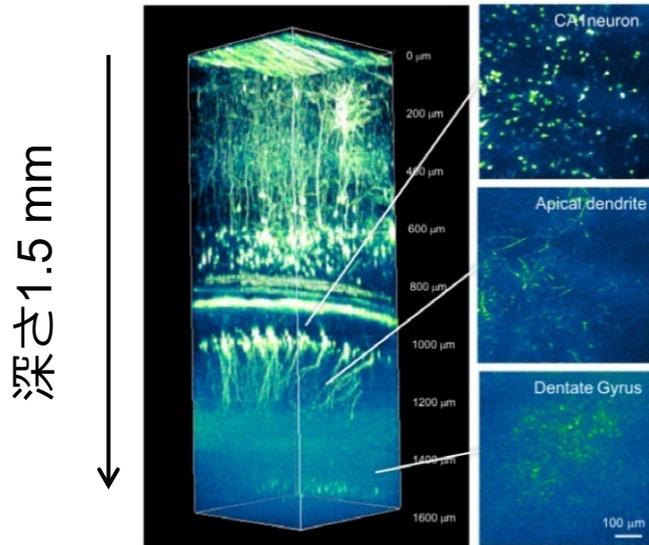
非線形過程を用いない 可視光二ードルスポット顕微鏡技術

東北大学 多元物質科学研究所
准教授 小澤 祐市

2022年7月14日

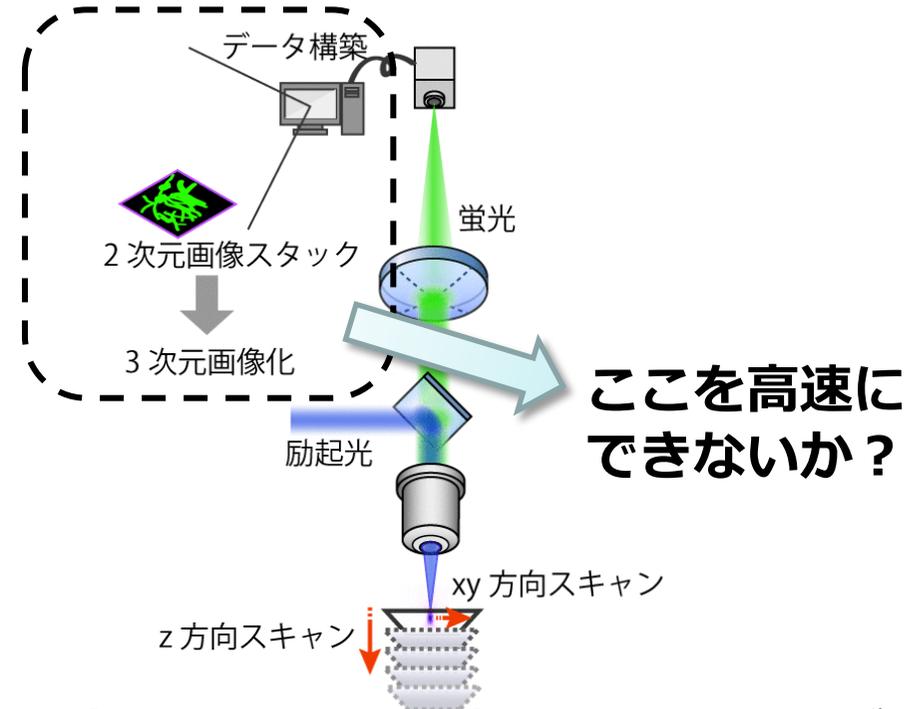
レーザー走査型（蛍光）顕微鏡技術における 3次元画像構築と課題

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**



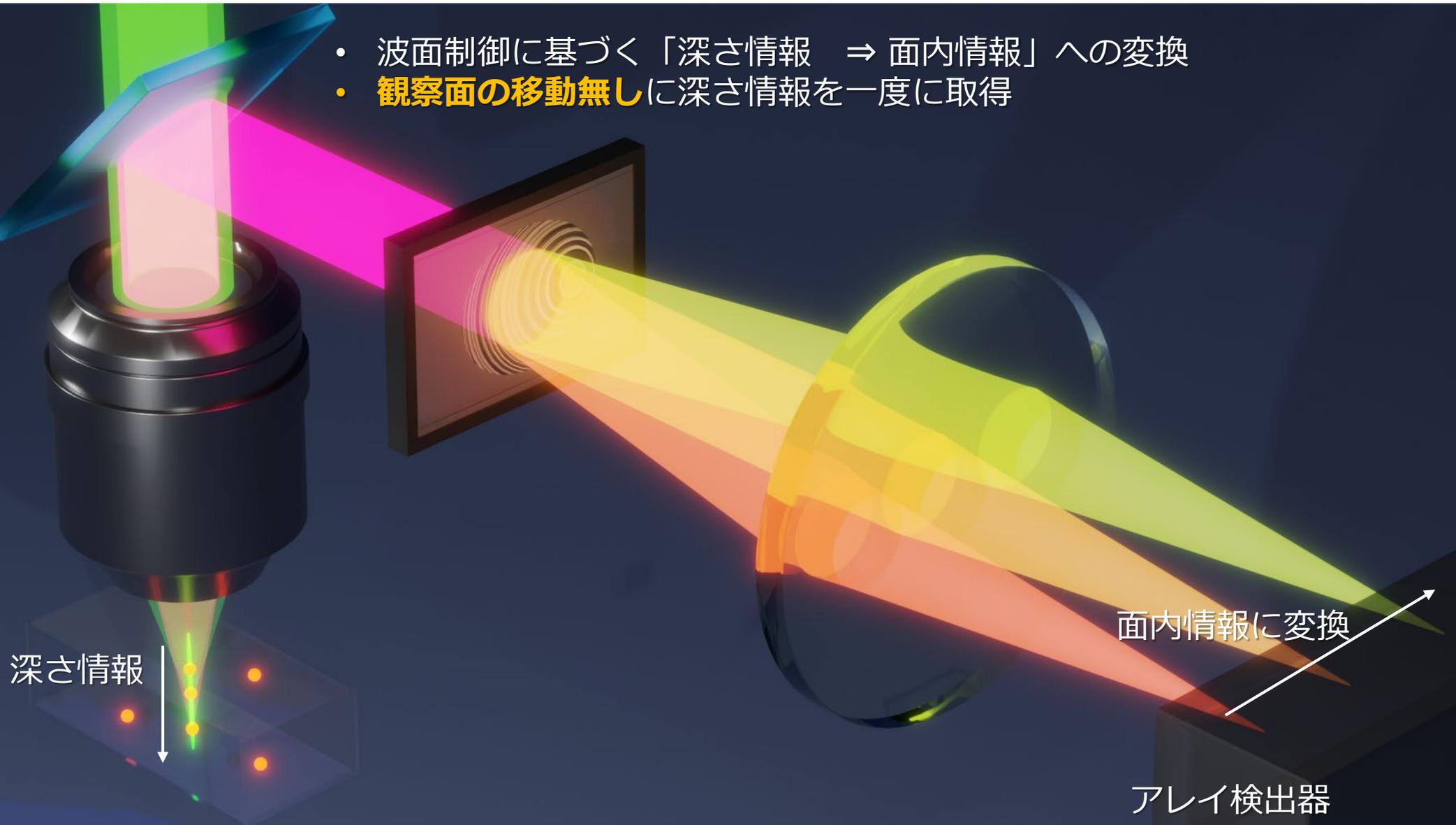
実用化されている高速なイメージング法
✓ スピニングディスク型レーザー顕微鏡法
✓ ライトシート型顕微鏡法

☺ 2次元像取得の高速化

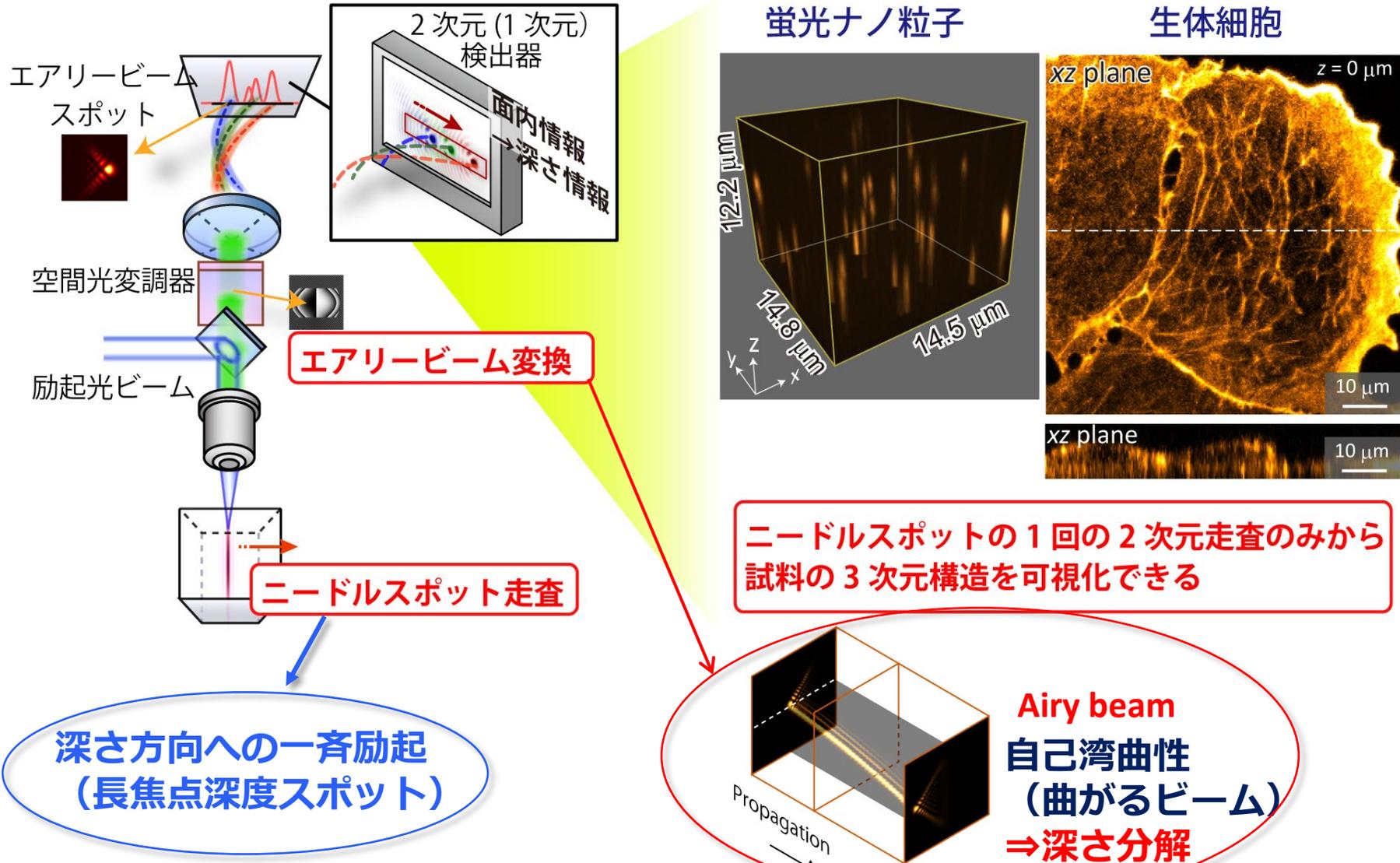
☹ 3次元像を得るには「観察面の移動」が必須

深さ情報を面内方向に変換する： ～光の波面制御に基づく高速3次元イメージング法

- 波面制御に基づく「深さ情報 ⇒ 面内情報」への変換
- **観察面の移動無し**に深さ情報を一度に取得



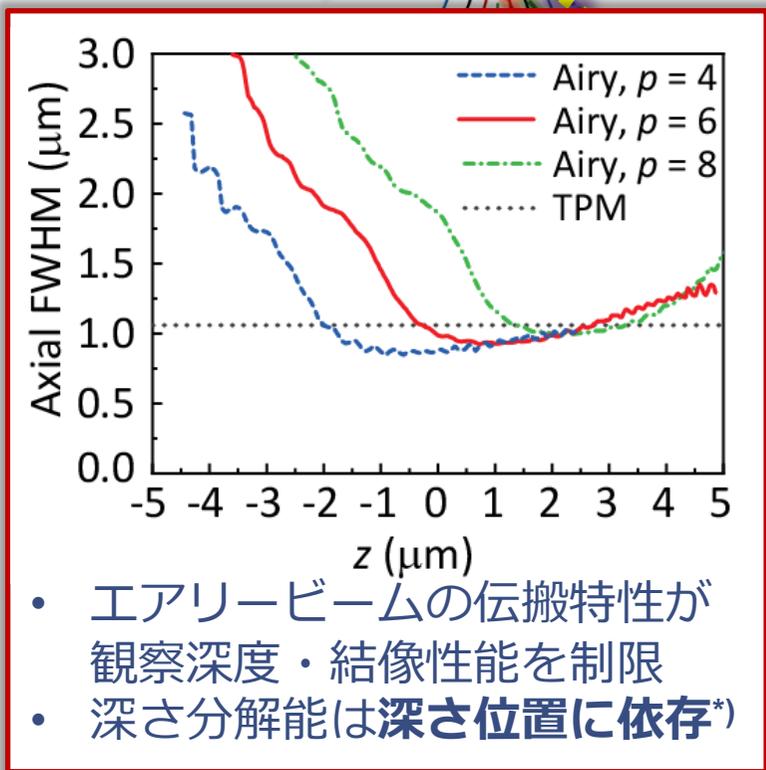
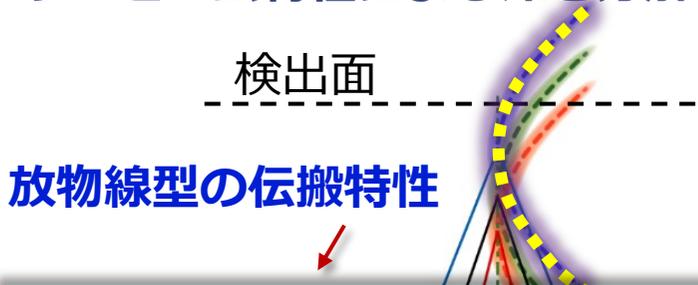
エアリービームを用いた空間転置検出に基づく 光ニードル走査型3次元レーザー顕微鏡法



- 特許第6537153号, Sci. Rep. 9, 11687 (2019)
- 2020年度新技術説明会(7/16)

波面制御技術を駆使した検出深度・深さ分解能のさらなる向上

エアリービーム特性による深さ分解

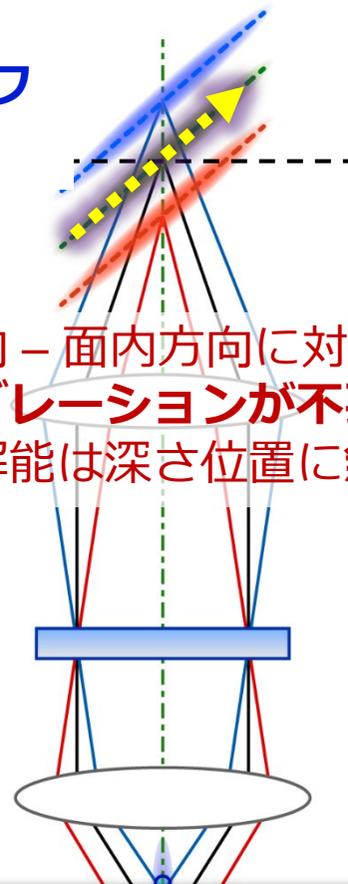


より理想的な検出光の伝搬特性

線形な面内シフト伝搬特性

- 深さ方向 - 面内方向に対する **キャリブレーションが不要**
- 深さ分解能は深さ位置に **無依存**

蛍光に対する
波面制御



多重化計算機合成ホログラム(CGH)による線形シフト特性を持つ点像分布関数 (PSF)の実現

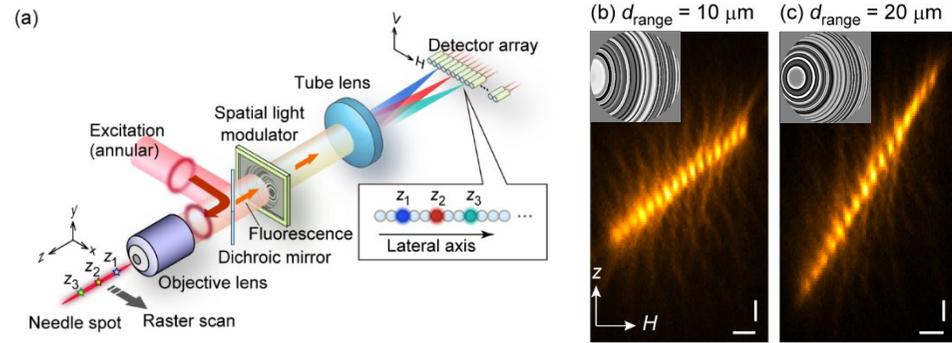
[*] Y. Kozawa and S. Sato, *Sci. Rep.* **9**, 11687 (2019).

特許第7021772, T. Nakamura et al., *Opt. Lett.* **43**, 5940 (2018)

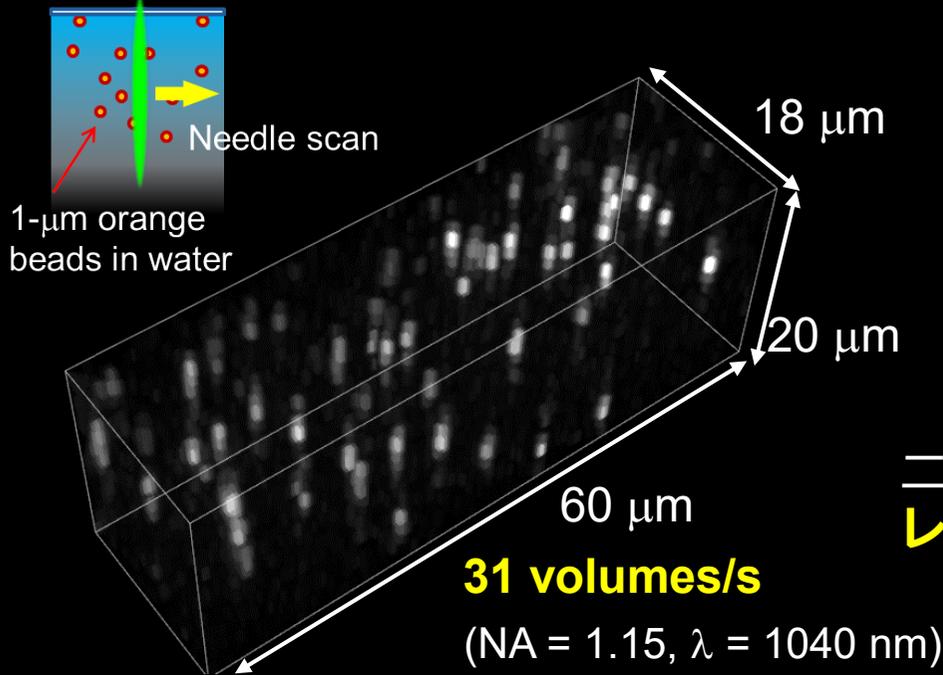
多重化計算機合成ホログラフィ(CGH)の原理に基づく波面制御



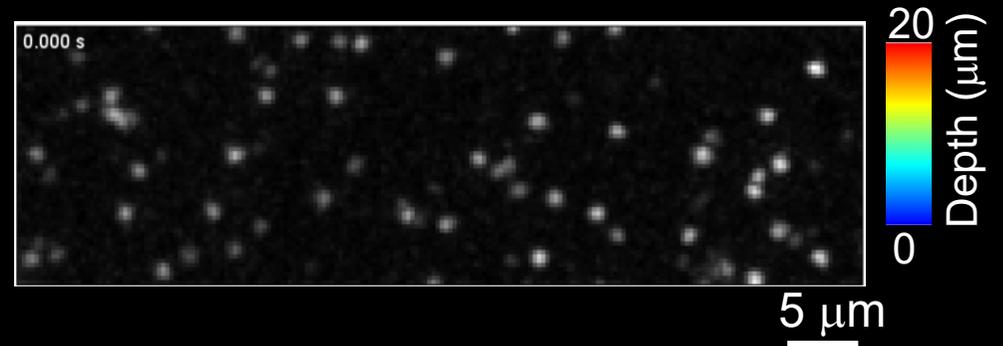
- ✓ 設計した深さ範囲が検出面での1次元方向に展開（深さ分解分解）できる



水中に浮遊する1-μm蛍光ビーズ



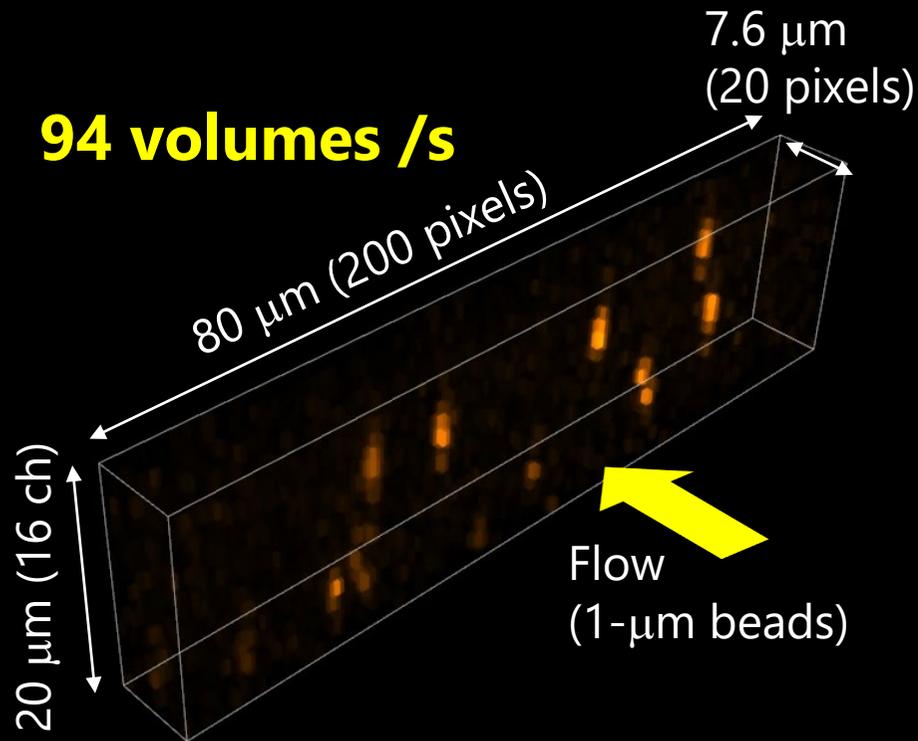
XY (MIP, Projected along z)



ニードルスポットの2次元連続走査による **ビデオレート・リアルタイム**での3次元画像取得

本イメージング法の特徴

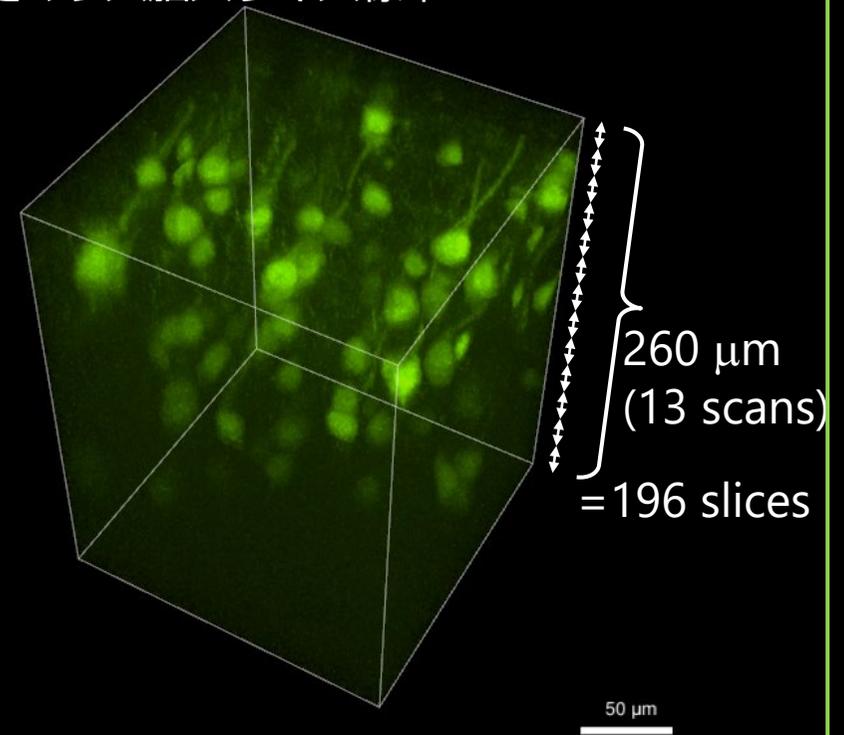
リアルタイム3次元イメージング



2次元レーザー走査のフレームレートで試料の3次元像を高速に取得できる
(ニードル深度内)

厚みのある試料の迅速な3次元観察

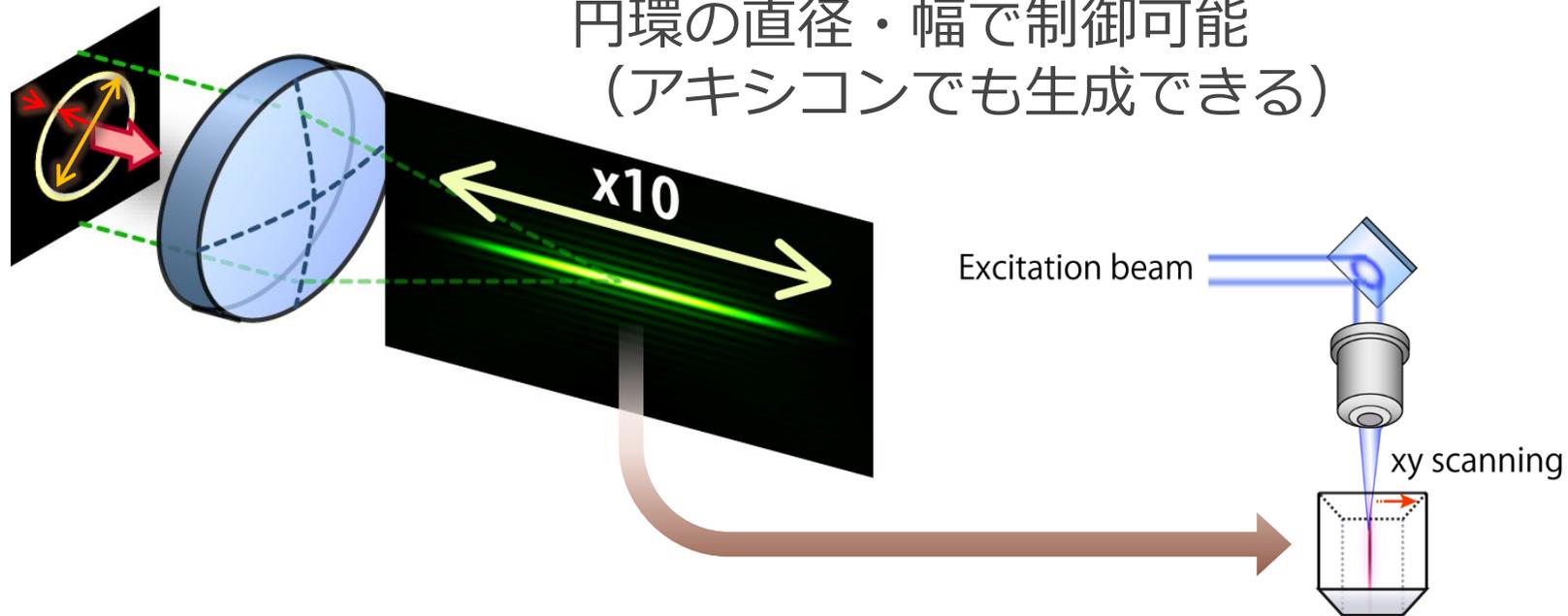
固定マウス脳スライス標本



100 μm 以上の厚みのあるサンプルに対しても少ない2次元走査回数で画像取得が可能
(従来法に比べて10倍以上高速化)

3次元情報を得るための励起（照明）側のキーコンセプト： 長焦点深度ニードルスポット走査

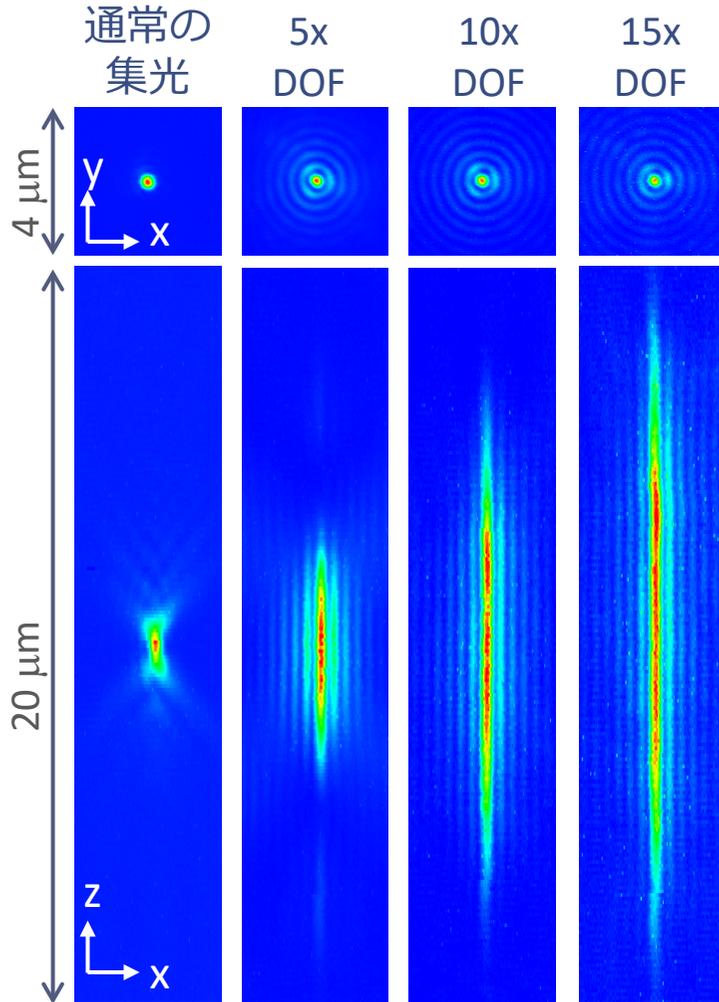
円環状ビーム集光による非回折ニードル状スポット
（ベッセルビーム）の形成



Non-diffracting, needle spot excitation

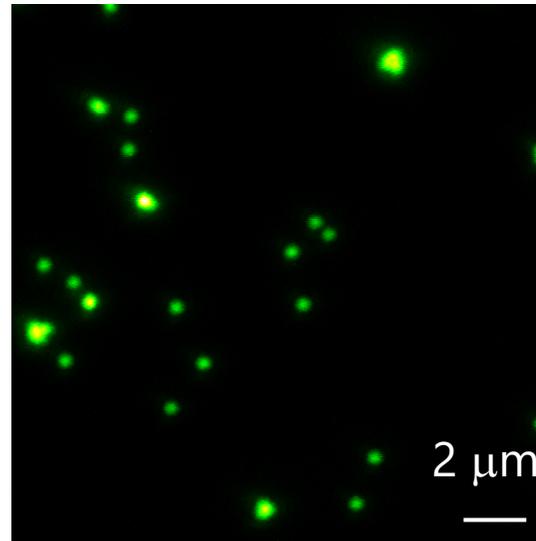
- 光ニードルスポットによる『超』長焦点深度イメージング
- 焦点深度内の全ての深さ(z位置) 情報が重畳

長焦点深度ベッセルビームのサイドローブ

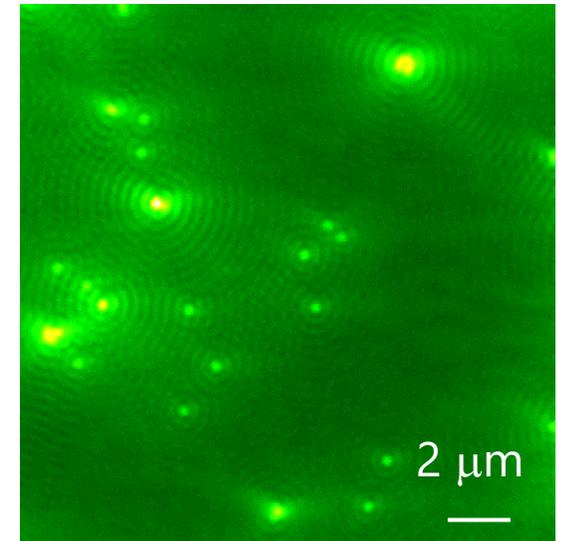


(例) 通常のレーザー走査型蛍光顕微鏡に可視光ベッセルビームを用いた場合@532 nm

通常の蛍光ビーズ像



ベッセルビームを用いた場合



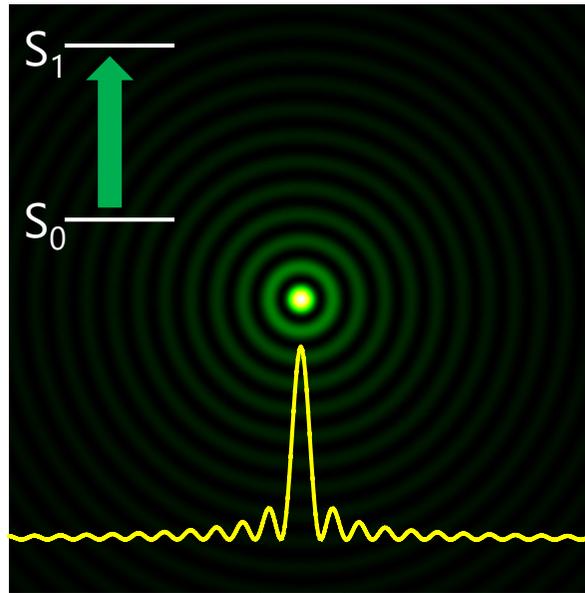
焦点深度を伸ばすほど、サイドローブも広がる (トレードオフの関係)

⇒このような強度分布を直接3次元イメージングの走査励起光として適用するとアーティファクトが発生する

フェムト秒レーザーを用いた多光子励起過程によるサイドローブの抑制

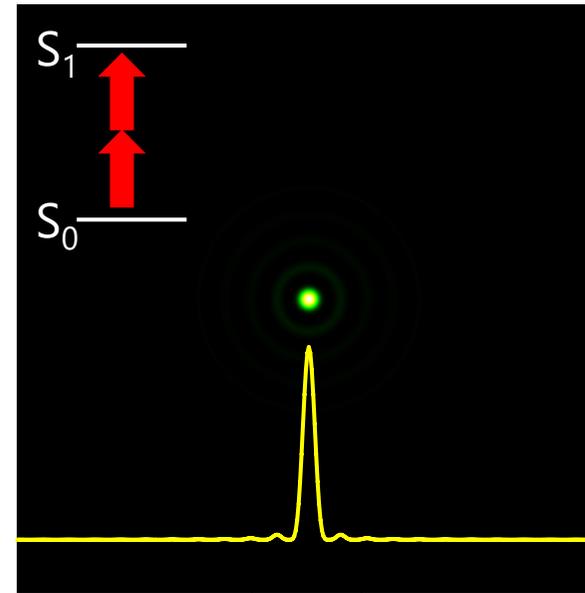
2光子励起顕微鏡PSF = (励起光スポットの強度分布)²

ベッセルビーム1光子励起



ベッセルビームに特有の
サイドローブ

ベッセルビーム2光子励起

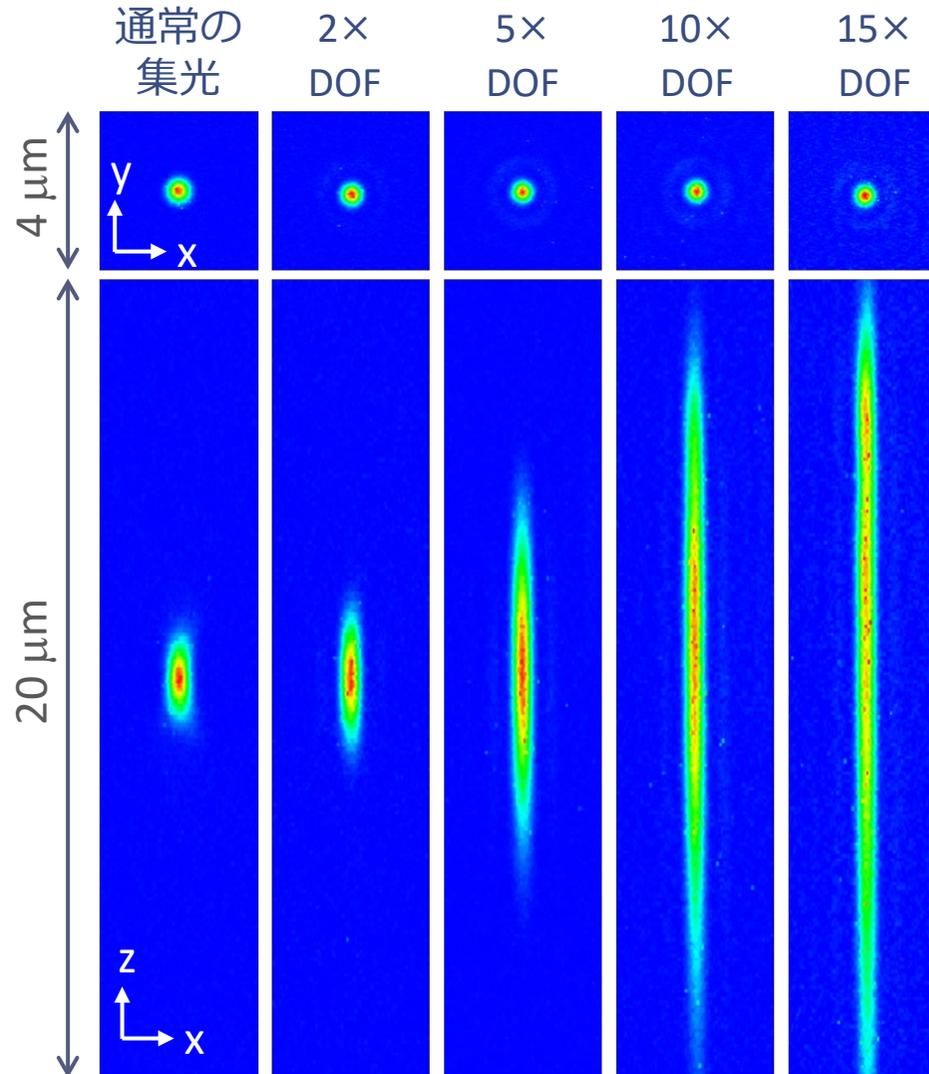


サイドローブが抑制
中心スポットのみで励起

非線形光学効果に基づく多光子励起過程（多くは2光子励起過程）を利用すると、**ベッセルビームのサイドローブの影響を低減**できる

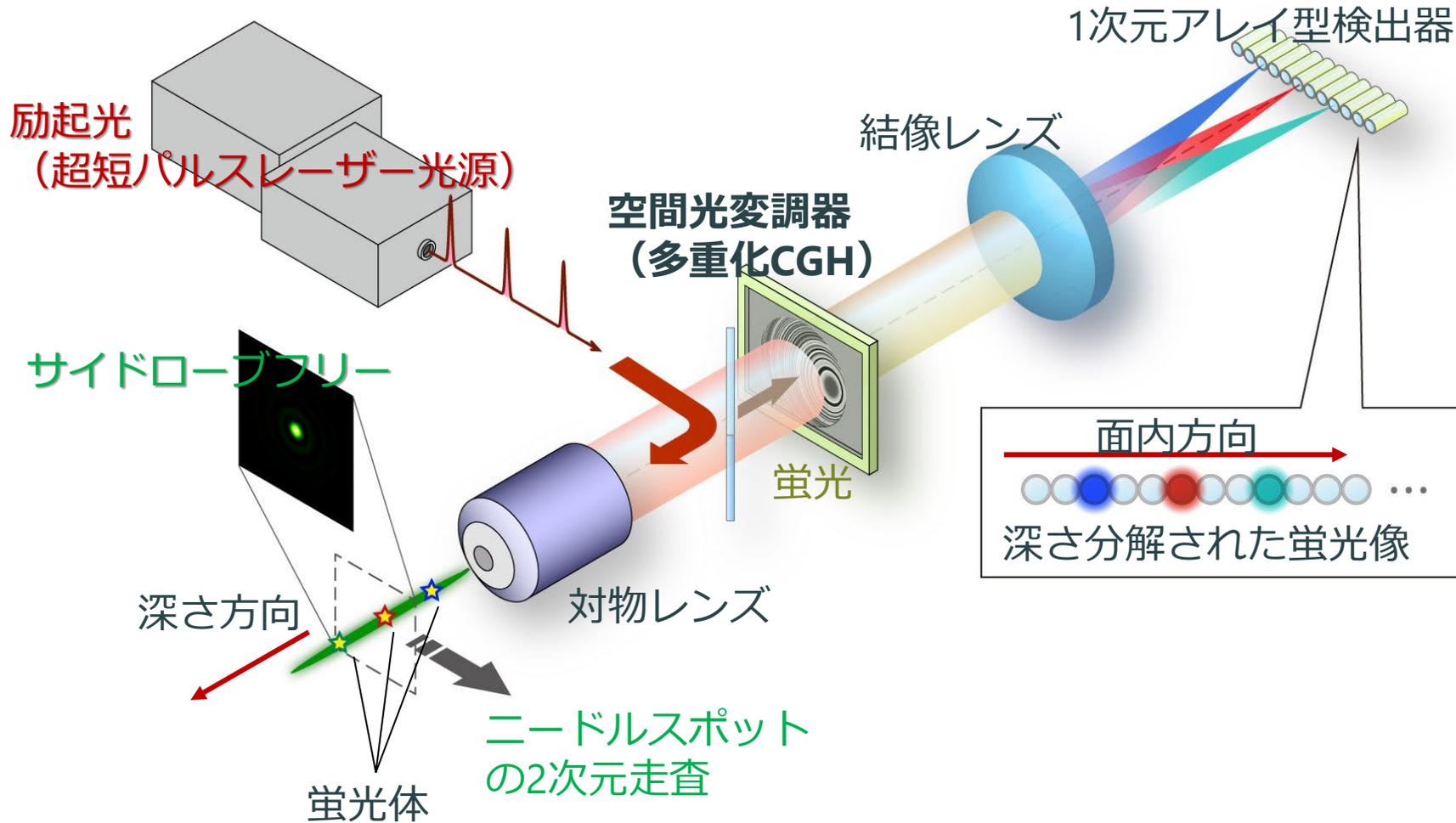
2光子励起光ニードル形成の例（従来の技術）

励起波長：1040 nm
パルス幅：~200 fs (10 MHz)
オレンジ蛍光ビーズ(200 nm)
の像を取得



フェムト秒パルスレーザー光による2光子励起イメージングでは、サイドローブが抑制された**ニードル状のPSF**を形成できる

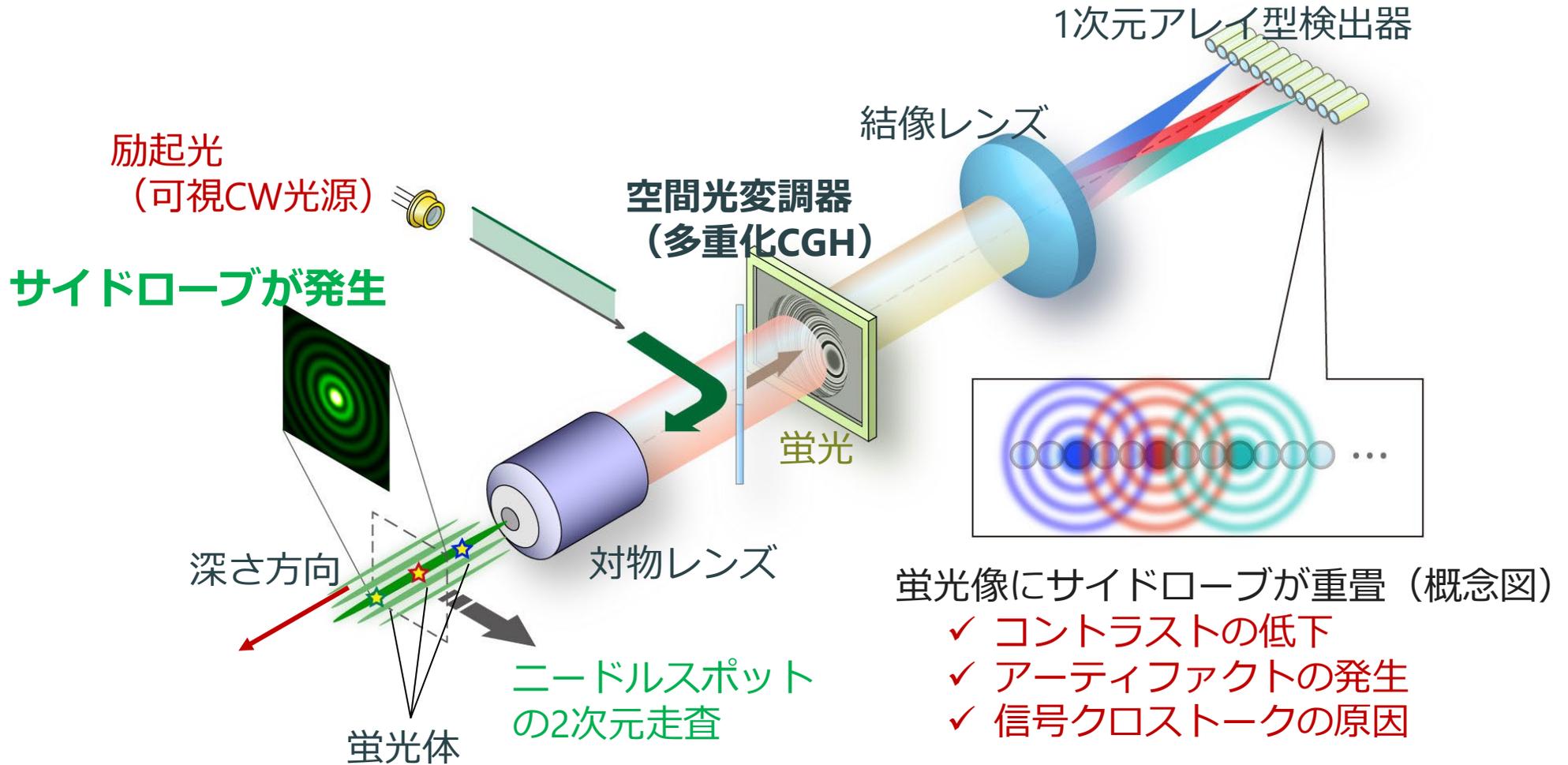
従来技術とその問題点（3次元ニードル顕微鏡法に関して）



本イメージング法の課題

- 2光子励起を得るには超短パルスレーザー光（フェムト秒レーザー）が必須
- 高コスト、要メンテナンス、システムの大型化
- 多光子励起が可能な蛍光イメージング系に限定される

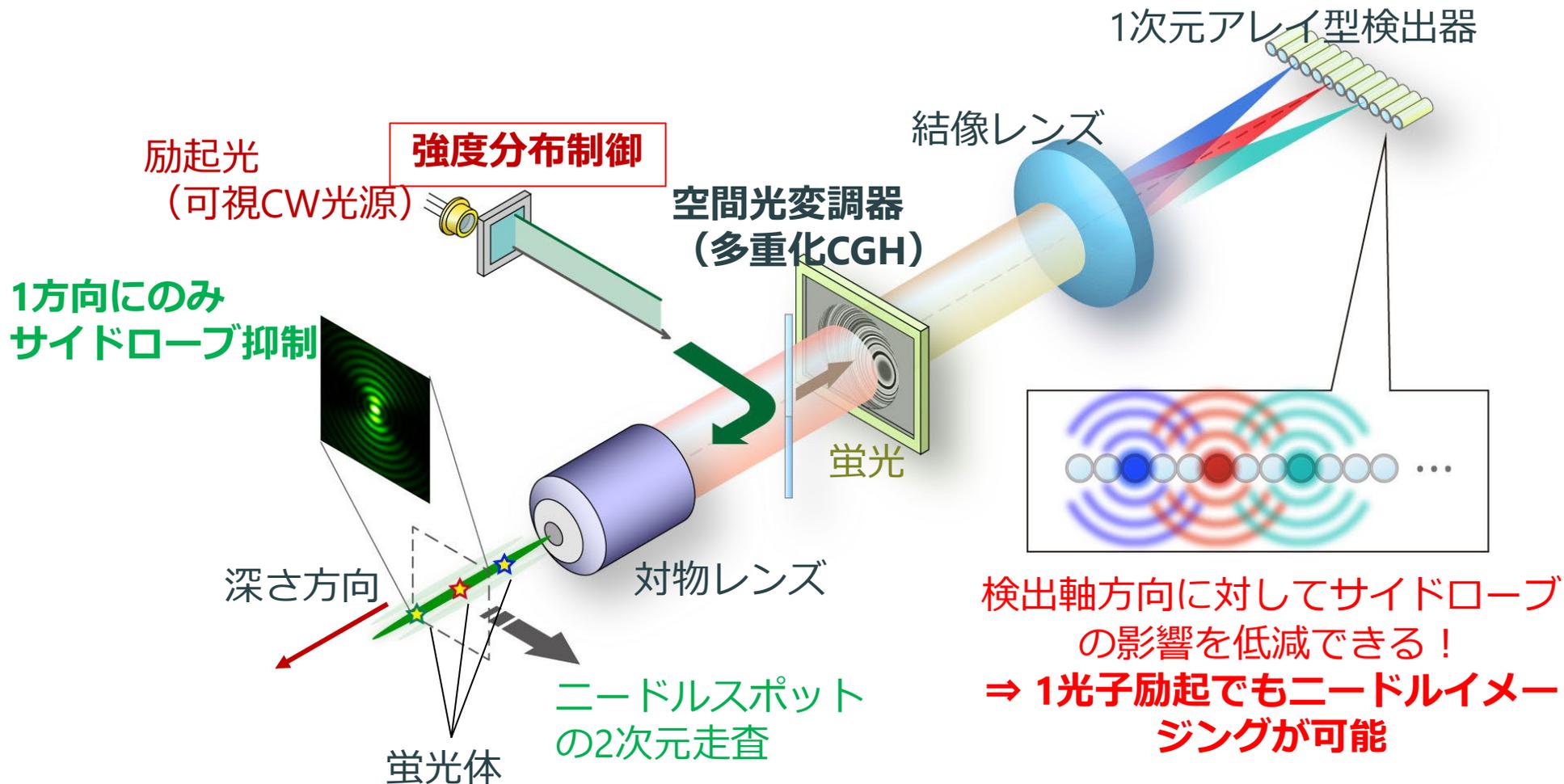
可視光（CW光）を用いると：サイドローブが問題



- 1光子励起による蛍光イメージングにはサイドローブが問題となり適用不可

本技術：

(非線形過程を用いない) 可視光ベッセルビームでも サイドローブの影響を抑制した3次元イメージングを実現

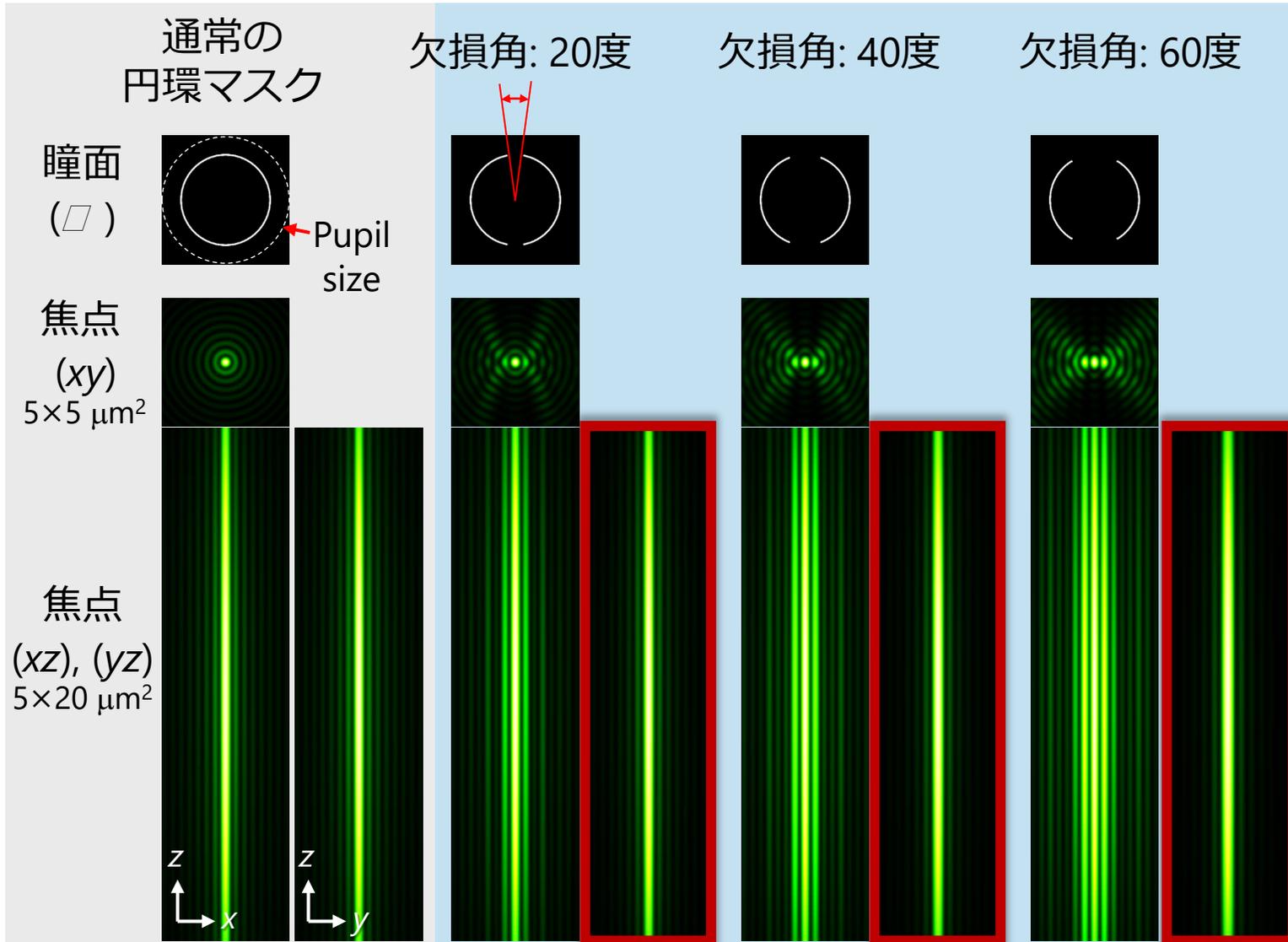


新技術のポイント

- ベッセルビームのサイドローブをすべて抑制する必要は無い
- 像面での検出軸方向に対してサイドローブを抑制できれば良い
- 照射レーザー光に対する強度分布制御によって実現可能

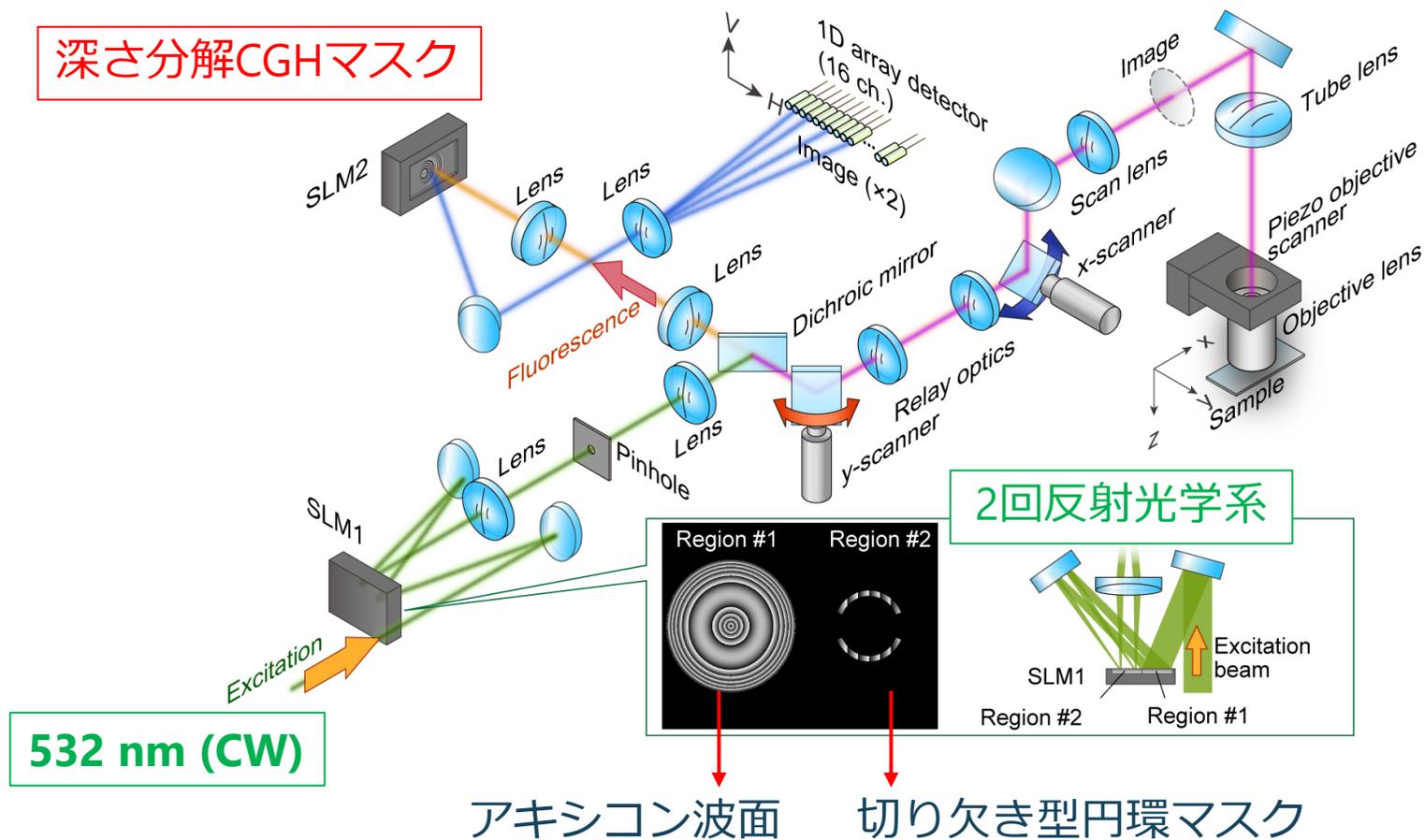
本技術を実現する例：欠損部を持つ円環状ビーム

NA = 1.15, $\lambda = 532 \text{ nm}$ を仮定した数値計算結果



非回折性を維持したまま欠損部を持つ方向にサイドローブを抑制
⇒1方向にのみサイドローブが抑制されたニードル状分布を形成

可視光ニードルに基づくレーザー顕微鏡光学系



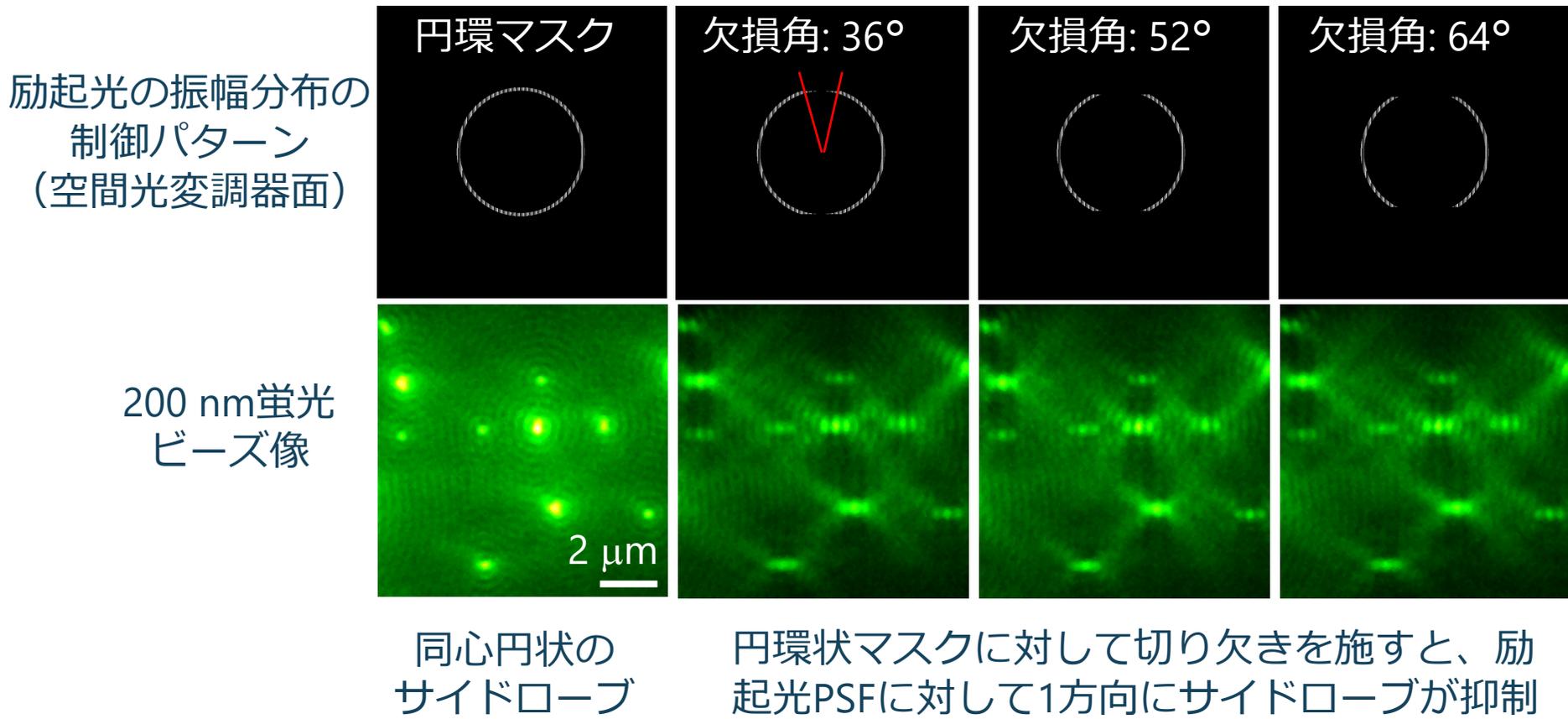
- ✓ 液晶型空間光変調器(SLM1)による励起光強度分布の整形
- ✓ 蛍光信号に対する波面制御(SLM2)とアレイ検出器による深さ位置検出

Objective lens: NA = 1.15 (water), $\times 40$, Nikon; SLM1/SLM2: SLM-100, santec

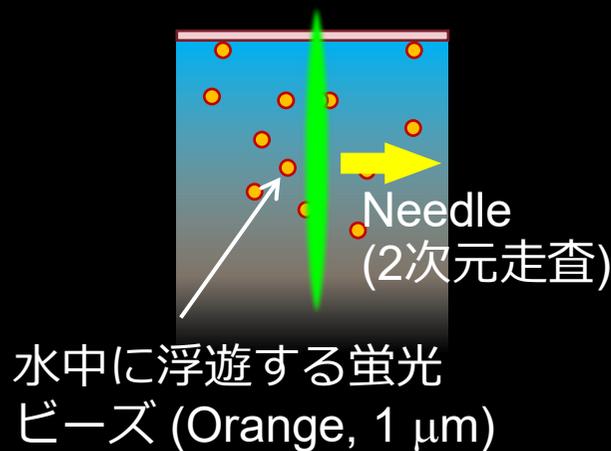
欠損部を持つニードルスポット生成の効果

NA = 1.15 (water), $\lambda = 532$ nm

通常のレーザー走査型顕微鏡で蛍光ビーズを観察 \Rightarrow 励起光PSFに対応

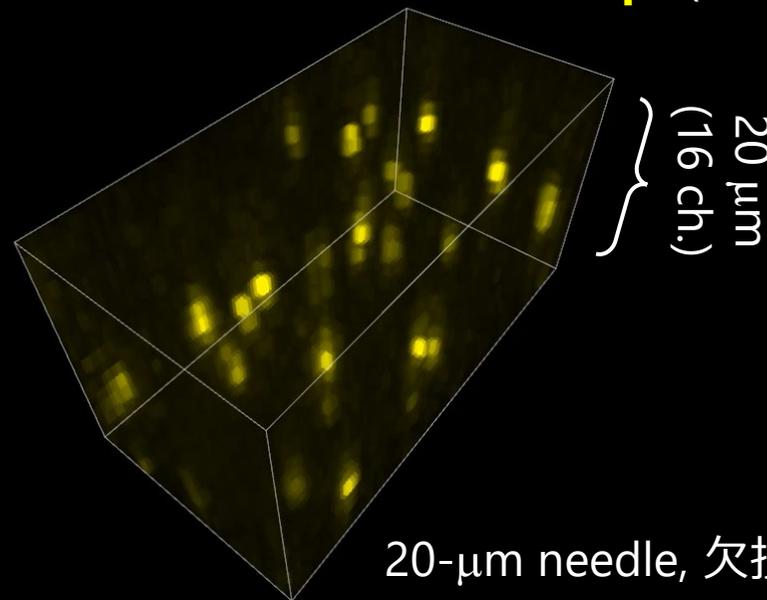


3次元イメージングのデモンストレーション



00:00

NA = 1.15 (water), $\lambda = 532 \text{ nm}$
40 \times 20 \times 20 μm (z: 16 ch)
30 vps (Scan: 1.5 μs / pixels)



可視光を用いた1光子励起によるベッセルビームの連続2次元走査から、ビデオレートかつリアルタイムで3次元イメージングできる

新技術の特徴・従来技術との比較

- ベッセルビームに固有のサイドローブを焦点面で1方向にのみ抑制する方法およびそのようなニードル状集光スポットに基づくレーザー顕微鏡法
- 可視光を照明光とする1光子励起蛍光イメージングにおいて、ニードルスポット走査による3次元画像取得が可能
- ニードルスポットの2次元走査のみから3次元画像を取得でき、3次元画像取得の大幅な高速化につながる
- **非線形過程が不要**
 - ⇒安価な可視CW光源（ex. 半導体LD）が利用できる
 - ⇒蛍光に加えて、反射・散乱光、ラマンなどの線形応答信号に対する3次元イメージングへの適用可能性

想定される用途

- 3次元レーザー走査型顕微鏡システム
 - 蛍光イメージング
 - 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，表面検査などの工業顕微鏡への産業応用も期待

実用化へ向けた課題

- 様々な検出信号に対する適用可能性の検討
 - インコヒーレント／コヒーレントイメージング
 - 観察可能深度の増大（現状は高NA条件下で数十 μm ）
 - 高速性の追求
- 励起光・検出光に対する波面制御技術の開発
 - 現状は液晶型の空間光変調器が少なくとも2台必要（励起側・検出側）
 - より安価／簡便／堅牢な波面制御技術の必要性（振幅・位相）
⇒回折光学素子
- 計測システムとしての実装
 - 検出系⇒多チャンネル同時計測
 - 通常のレーザー顕微鏡システムに対するアドオンが可能か？

企業への期待

- 企業の研究開発の現場で3次元（立体）的な観察・検査対象を高速・迅速に可視化したいニーズがあればぜひご相談ください。
⇒本イメージング法が適用できるか？といったご相談も歓迎します。
- 新規波面制御技術、検出光学系・システムの開発、高速データ処理技術の統合へ向けてご協力いただける企業
- 独自の顕微鏡装置・検査装置開発への適用可能性の検討（ライセンス／共同研究のいずれでも対応可能）
⇒本技術の実用化へ向けたパートナーを募集

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : スポット光生成装置、光学情報検知装置及び顕微鏡
- 出願番号 : PCT/JP2021/031166
- 出願人 : 東北大学
- 発明者 : 小澤祐市

関連特許: 特許第6537153号, 特許第7021772号

お問い合わせ先

東北大学

産学連携機構 総合連携推進部

ウェブサイト

<https://www.rpip.tohoku.ac.jp/jp/>

TEL 0 2 2 – 7 9 5 – 5 2 7 5

FAX 0 2 2 – 7 9 5 – 5 2 8 6

E-mail souren@grp.tohoku.ac.jp