

連載講座

新しい光学系を使って広がる顕微鏡の世界-2

広視野多光子照明と光操作 多光子パターン照明

磯部 圭佑

Key words : 多光子励起, 光操作, パターン照明

近年, 三次元分解能を有する光学顕微鏡を用いた三次元組織のタイムラプスイメージングによって, 複雑な生命現象における多細胞の相互作用を観察できるようになってきている。また, 観察するだけではなく, 細胞間における入出力応答を調べるための光操作技術も近年注目されている。特に, 光操作技術としては, チャネルロドプシンを神経細胞に発現させ, 光照射で神経発火を操作するようなオプトジェネティクス¹⁾と, 励起光をパターン照射する光制御技術²⁾が重要になっている。本稿では, 読者にとってあまり馴染みがないと思われるパターン照明技術について紹介する。

蛍光イメージングでは, 空間分解能は励起と検出の両方で決定され, 共焦点顕微鏡³⁾や構造化顕微鏡⁴⁾のように, 焦点面以外で発生する蛍光の除去や画像処理によって, 深さ方向の分解能を得る顕微鏡技術がある。しかし, 光操作では, 励起における深さ方向の分解能がなければ, 深さの異なる非標的細胞を意図せず操作することにつながり, アーティファクトとなる。そのため, 非標的細胞を励起しないパターン照明技術が必要である。光操作におけるパターン照明には, 光信号処理で培われてきたホログラフィー技術⁵⁾が用いられている。ホログラフィー技術では, 光の位相を制御することによってパターン照明を行う。しかし, 散乱のきつい組織のような試料内部にパター

ン照明を行うには, ホログラフィー技術だけでは実用化が難しい。実用化するために, ホログラフィー技術に前回の連載講座(71 巻 2 号 pp169-173)⁶⁾で紹介した時空間集光技術⁷⁾を組み合わせる試み⁸⁾が行われているので紹介する。

I ホログラフィックパターン照明

ホログラフィーは光の強度情報だけでなく, 位相情報も記録することによって物体を三次元表示する技術である。従来のホログラムは, 物体から反射した物体光と参照光の干渉縞パターンを写真乾板に記録することによって作製されていた。作製されたホログラムに参照光を照射すると, 干渉縞の強度情報だけでなく位相情報も付加され, 観察者にはあたかもそこに三次元の物体が存在しているように見える。現在では, 写真乾板に代わるホログラムの記録・再生を可能にするデジタル技術が開発されている。干渉パターンは, CCD カメラなどで撮像することによって, 位相情報を算出することができる。また, ホログラムの再生には, 空間光変調器(spatial light modulator; SLM)と呼ばれる二次元の液晶デバイスが用いられる。参照光を SLM へ入射させると, 参照光の空間位相分布を変調することが可能である。SLM を用いて参照光の位相分布を算出した位相分布へ変調すると, 三次元物体の像を再生できる。また, 実

Wide-field multiphoton illumination and optical control: patterned multiphoton illumination

Isobe Keisuke : 理化学研究所光量子工学研究センター (〒 351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1), 京都大学大学院生命科学科学研究科先端イメージング学講座

0370-9531/12/¥500/ 論文/JCOPY

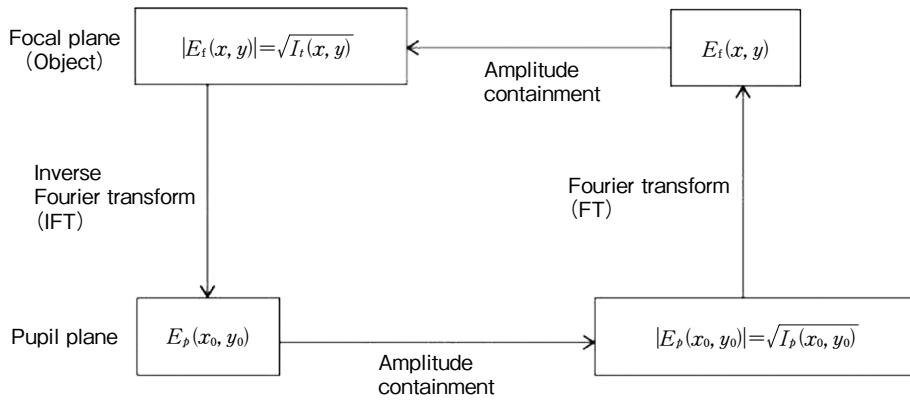


図 1 Gerchberg-Saxton アルゴリズム

際に干渉パターンをカメラで撮像することなく、再生したい三次元物体像と参照光の強度分布を仮定すると、物体から回折されてくる光の強度分布と位相分布は、回折理論によりコンピューター上で計算できる。コンピューターの数値計算によって合成されるホログラムは、計算機ホログラム (computer-generated hologram; CGH) と呼ばれ、そのデータを用いれば、SLM によって所望の三次元物体像を再生することができる。この CGH 技術を用いれば、細胞の三次元配置がわかる蛍光画像から光刺激などの標的となる細胞を選択し、パターン照明を行うことが可能である。

二次元のパターン照明を行う手法として、図 1 に示す Gerchberg-Saxton アルゴリズム⁵⁾ と呼ばれる CGH を合成する一般的な手順について述べる。CGH 技術を用いる場合、SLM は対物レンズの瞳面と共役な位置に配置され、対物レンズの焦点面が物体面となる。そこで、

- A. まず、発生させたいパターン照明の強度分布 $I_t(x, y)$ から対物レンズの焦点 (物体) 面における電場を構築する。

$$E_t(x, y) = \sqrt{I_t(x, y)} \exp[i\phi_0(x, y)], \quad (1)$$

ここで、 $\phi_0(x, y)$ は初期位相であり、ランダム位相を選択する。

- B. 次に、対物レンズの焦点 (物体) 面から瞳 (ホログラム) 面への光の逆伝播を計算する。対物レンズの瞳面から焦点面への光の伝播は、フーリエ変換を用いて表される。したがって、対物レンズの焦点面から瞳面への光の逆

伝播は、逆フーリエ変換で表され、瞳面の電場は次式を用いて計算できる。

$$E_p(x_0, y_0) = \iint E_t(x, y) \exp\left\{\frac{ik}{f}(x_0x + y_0y)\right\} dx dy \quad (2)$$

$$= |E_p(x_0, y_0)| \exp[i\phi_p(x_0, y_0)].$$

ここで、 f は対物レンズの焦点距離であり、 k は波数である。

- C. 次に、次式で示すように、式 (2) で表される瞳面における電場の振幅を、実際の瞳面における強度分布の 2 乗根 $\sqrt{I_p(x_0, y_0)}$ で置き換える。

$$E_p'(x_0, y_0) = \sqrt{I_p(x_0, y_0)} \exp[i\phi_p(x_0, y_0)]. \quad (3)$$

- D. その後、フーリエ変換を用いて、瞳面から焦点面の電場を計算する。

$$E_f'(x, y) = \iint E_p'(x_0, y_0) \exp\left\{-\frac{ik}{f}(x_0x + y_0y)\right\} dx_0 dy_0 \quad (4)$$

$$= |E_f'(x, y)| \exp[i\phi_f(x, y)].$$

- E. ここで、発生させたいパターン照明の強度分布 $I_t(x, y)$ と計算された焦点面の強度分布 $|E_f'(x, y)|^2$ を比較して、誤差を評価する。

$$RMS = \sqrt{\frac{\iint (I_t(x, y) - |E_f'(x, y)|^2)^2 dx dy}{\iint I_t^2(x, y) dx dy}}. \quad (5)$$

式 (5) で計算される RMS が大きければ、式 (6) で示すように、焦点面の電場の振幅を発生させたいパターン照明の強度分布 $I_t(x, y)$ の 2 乗根で置き換え、手順 B～E を繰り返す。

$$E_f(x, y) = \sqrt{I_t(x, y)} \exp[i\phi_f(x, y)]. \quad (6)$$

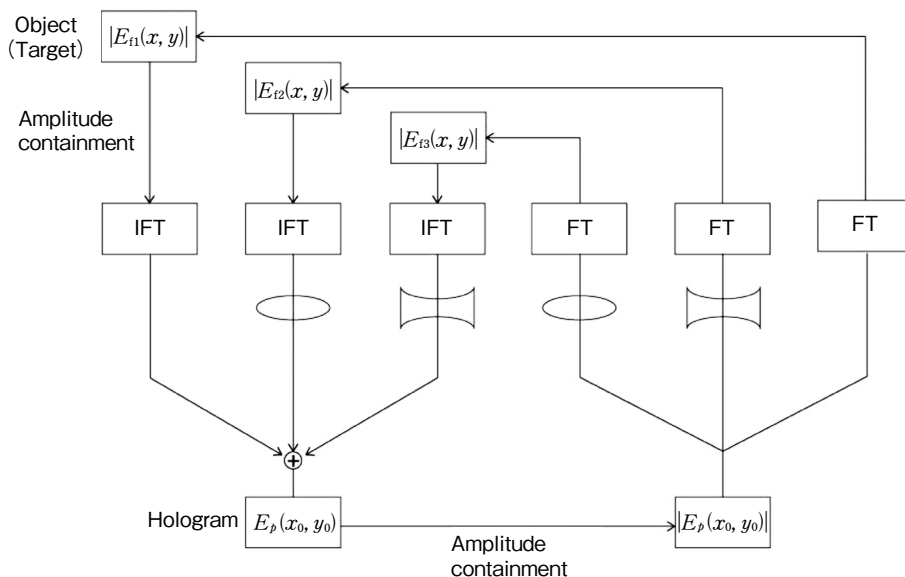


図 2 三次元 Gerchberg-Saxton アルゴリズム

RMS が小さければ、式 (2) の位相分布 $\phi_p(x_0, y_0)$ を SLM で与える位相分布とする。

三次元のパターン照明を行う手法として、図 2 に示す三次元 Gerchberg-Saxton アルゴリズム⁹⁾を述べる。まず、発生させたい二次元のパターン照明を異なる深さの層数だけ準備する。各深さの物体面から瞳面への光の逆伝播の計算は、二次元の CGH 合成のときと同様に、逆フーリエ変換を用いて計算できる。ただし、各深さの物体面から瞳面への計算では、次式の焦点面からの深さシフト量 z に対応するレンズ効果の位相変調を導入する。

$$\phi_L(x, y, z) = \exp\left[-i \frac{kz}{2f^2} (x^2 + y^2)\right]. \quad (7)$$

また、瞳面の全電場は、各深さの物体面から計算した瞳面の電場の重ね合わせによって、計算される。瞳面から各深さの物体面への光の伝播も、フーリエ変換を用いて計算するが、ここでも、式 (7) の焦点面からの深さシフト量 z に対応するレンズ効果の位相変調を導入する。ただし、瞳面の電場を計算するために、式 (7) でシフト量を z とした場合、物体面における電場の計算では、 $-z$ として符号を反転させる必要がある。あとは二次元の CGH 合成と同様に、計算された物体面の強

度分布が、発生させたいパターン照明の強度分布と同等になるまで繰り返し計算する。

図 3 に CGH 合成の例を示す。図 3A 上段に示すように、3つの深さにおける発生させたい二次元のパターンを設定し、三次元 Gerchberg-Saxton アルゴリズムを用いると、図 3A 下段に示す物体面の光強度分布となる CGH が得られる。図 3B に合成された CGH を示す。この CGH を SLM に描画すると、計算結果のようなパターン照明を実現できる。しかし、三次元組織において、1細胞レベルの空間分解能で三次元パターン照明を実用化するには、幾つかの問題がある。その1つは組織内部における励起光の散乱である。散乱がきつい組織サンプルでは、スペックルと呼ばれるランダムな散乱光による干渉の影響が大きく、設計したパターン照明を実現できない¹⁰⁾。また、別の問題として0次光と呼ばれるSLMで位相変調されなかった光の影響がある。SLMでは、すべての光が位相変調されるのではなく、5%程度が位相変調されずに、対物レンズによって単純に集光され、残りの95%程度がパターン照明となる。0次光の励起光パワーは、パターン照明される励起光パワーに比べて無視できるほど低い。しかし、0次光は対物レンズできつく集光されているのに対

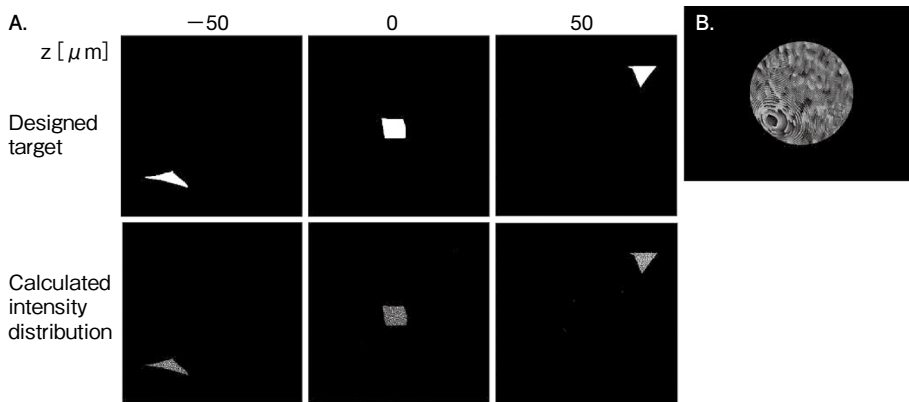


図 3 CGH 合成

- A. 設定したターゲットパターン (上図) と計算された物体面の光強度分布。
B. 合成された CGH。

して、パターン照明は空間的に広がっている、すなわち、総面積が広いと単位面積当たりのパワーである励起光強度で考えると、0 次光の励起光強度のほうが高くなる、もしくは無視できないほど高くなることもある。そのため、0 次光の影響を除去する手法が開発されてきた。その 1 つとして、対物レンズの焦点面と共役な位置において、0 次光を空間フィルタリングする方法がある¹¹⁾。この場合、本来 0 次光が照明される位置にパターン照明を行うことはできない。

また、シリンドリカルレンズを用いて、0 次光は別の深さに集光するように調整し、パターン照明光にはそのシリンドリカルレンズ分を補償する位相変調を SLM により付加する方法もある¹²⁾。この手法では、試料が厚いと 0 次光が標的外の深さに集光され、アーティファクトを発生させる場合がある。ほかにも様々な 0 次光対策手法¹³⁾が開発されているが、万能な手法はまだない。

CGH 技術による三次元パターン照明には、深さ方向の分解能が低いことも実用化の問題となっている。CGH 技術によって焦点面におけるパターン照明のスポットサイズを大きくした場合、深さ方向のスポットサイズが大きくなる。そのため、1 細胞レベルである 10 μm の三次元分解能を達成することはできない。この問題は、CGH 技術の光源に近赤外光を用いて、多光子励起を行うだけでは解決されない。 n 光子励起顕微鏡では、励起確率が励起光強度の n 乗に比例するた

め、高い励起光強度となる焦点面近傍のみに励起領域が局所化される¹⁴⁾。これは、レーザー光を高い開口数の対物レンズできつく集光することによって、深さ方向に対してビームスポット径を劇的に変化させている、すなわち、励起光強度を大きく変化させているから得られる性質である。しかし、CGH 技術では高い開口数の対物レンズを用いた場合でも、焦点面におけるパターン照明のスポットサイズを大きくすると、対物レンズの実効開口数を低下させたかのように深さ方向に対してビームスポット径があまり変化しない。したがって、深さ方向に対して励起光強度が変化しないため、励起領域は深さ方向に局所化されない⁸⁾。この問題と散乱によるスペックルの問題については、前回の連載講座⁶⁾で紹介した時空間集光法⁷⁾を用いると改善できるため、次項で述べる。

II パターン照明への 時空間集光法の応用

前回の連載講座⁶⁾で紹介した時空間集光技術⁷⁾は、CGH 技術と組み合わせることでパターン照明の性能を向上させることが可能である。時空間集光技術を用いたパターン照明光学系の例⁸⁾を図 4A に示す。SLM を対物レンズの瞳面と共役な位置に配置し、回折格子を試料と共役な位置に配置する。時空間集光のための回折格子上に SLM1 によるパターン照明を行い、そのパターンを試料へ像転送する。このとき、パターンのスポットサイ

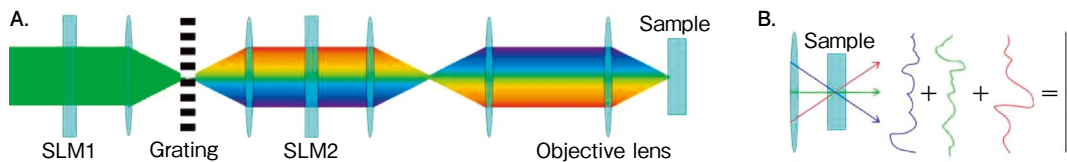


図 4 時空間集光を用いたパターン照明光学系 (A) およびスペックルパターンの平滑化 (B)

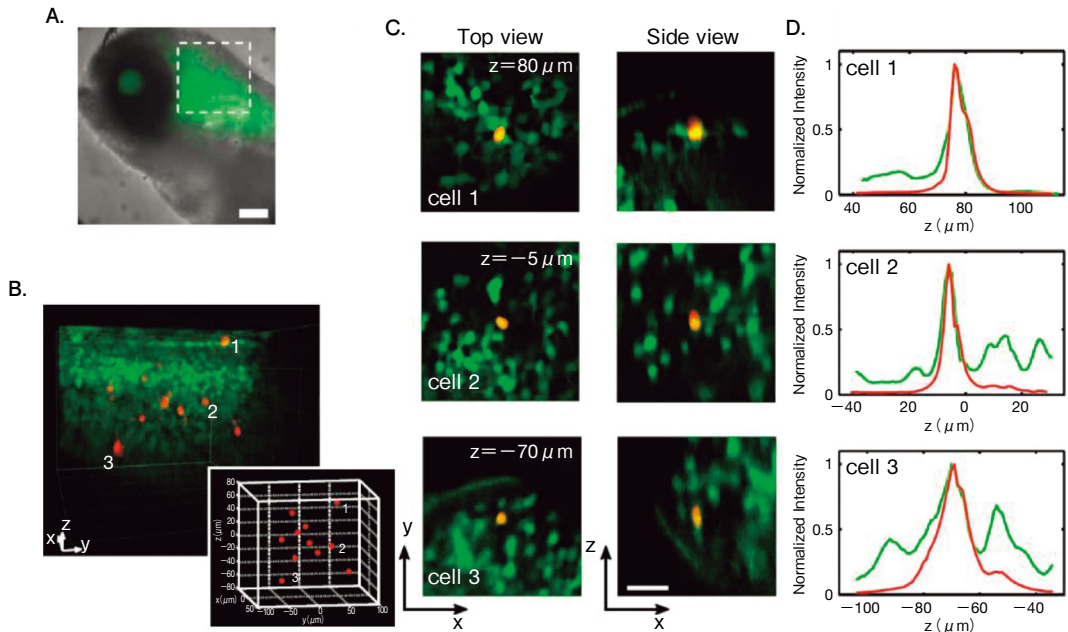


図 5 三次元パターン照明

Reprinted with permission from [Optica 5, 1478 (2018)] © The Optical Society.

ズが大きかったとしても、時空間集光によって多光子励起領域を焦点面近傍に局所化できる。そのため、パターン照明の深さ方向の分解能は1細胞レベル以下に改善できる。また、図4Bに示すように、回折格子によって分光された光は試料内部の異なる経路を透過し、焦点面において再び重なる。光路が異なれば生じるスペックルのパターンも異なることから、分光された全波長成分のスペックルが重ね合わさると、平滑化される¹⁰⁾。そのため、散乱の大きな組織中においても、設計したパターン照明を実現しやすい。

また、二次元ではなく三次元のパターン照明を行う場合は、SLM2によってレンズ効果の位相変調を行い、パターンが結像される深さを制御する。このとき、SLM1, 2は深さの層数分だけ空

間分割して独立に制御すれば、各深さに異なるパターンの照明を行うことが可能である。ただし、分割した数だけ空間分解能は低下する。また、SLM1で発生させたパターンを、SLM2を用いて三次元的に任意の位置に複製して配置することも可能である¹⁵⁾。この場合、空間分解能の低下は無視できる程度であるが、三次元的に複数配置したパターンがすべて同じ形状になる。時空間集光技術を用いたとしても、パターン形状と分解能のように、パターン性能のトレードオフの関係を完全に打破することはまだできていないが、時空間集光技術を用いることによって、従来のCGH技術で問題となるスペックルと深さ方向の分解能低下の問題は改善可能である。図5にAccantoら¹⁵⁾によって行われたゼブラフィッシュへの三次元パ

ターン照明の結果を示す。Kaede を神経細胞に発現させ、パターン照明によって、緑から赤へ光変換されている様子を示している。異なる深さの標的の細胞のみ光変換されていることから、1 細胞レベルでの三次元パターン照明が実現できていることがわかる。

おわりに

本稿で紹介した時空間集光技術と CGH 技術を組み合わせたパターン照明技術は、今後の光操作技術として非常に有用なツールになると考えられ、海外では製品として販売されており、実用化されている。時空間集光の性能を十分に引き出すためには、市販の二光子顕微鏡で用いられているフェムト秒レーザーではなく、パルス波形が高品質な高出力のフェムト秒レーザーが必要であるため、現状では非常に高価な装置となっている。高品質なファイバーレーザーや波長変換装置が安価で入手できるようになれば、こういった技術も普及するため、安価なレーザー開発も望まれている。また、低い励起光強度で応答する蛍光タンパク質やチャネルロドプシンなどが開発されれば、市販の二光子顕微鏡で用いられているフェムト秒レーザーでも十分に応用可能になると期待できる。

●文 献

- 1) Kim CK, Adhikari A, Deisseroth K : *Nat Rev Neurosci.* **18** : 222-235, 2017
- 2) Ronzitti E, Ventalon C, Canepari M et al : *J Opt.* **19** : 113001, 2017
- 3) Pawley JB : *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Springer Science and Business Media, New York, 2006
- 4) Neil MA, Juškaitis R, Wilson T : *Opt Lett.* **22** : 1905-1907, 1997
- 5) Gerchberg RW, Saxton WO : *Optik.* **35** : 237-246, 1972
- 6) 磯部圭佑 : *生体の科学.* **71** : 169-173, 2020
- 7) Oron D, Tal E, Silberberg Y : *Opt Express.* **13** : 1468-1476, 2005
- 8) Hernandez O, Papagiakoumou E, Tanese D et al : *Nat Commun.* **7** : 11928, 2016
- 9) Haist T, Schonleber M, Tiziani HJ : *Opt Commun.* **140** : 299-308, 1997
- 10) Papagiakoumou E, Bègue A, Leshem B et al : *Nat Photonics.* **7** : 274-278, 2013
- 11) Matsumoto N, Okazaki S, Fukushi Y et al : *Opt Express.* **22** : 633-645, 2014
- 12) Hernandez O, Guillon M, Papagiakoumou E, Emiliani V : *Opt Lett.* **39** : 5953-5956, 2014
- 13) Ronzitti E, Guillon M, de Sars V, Emiliani V : *Opt Express.* **20** : 17843-17855, 2012
- 14) Hoover EE, Squier JA : *Nat Photonics.* **7** : 93-101, 2013
- 15) Accanto N, Molinier C, Tanese D et al : *Optica.* **5** : 1478-1491, 2018