

研 究 報 告 書

「非回折と自己湾曲性を駆使した 3 次元高速光イメージング」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 27 年 12 月～平成 31 年 3 月

研 究 者: 小澤 祐市

1. 研究のねらい

現在の生命科学研究において日常的かつ必須の試料観察手法である蛍光レーザー走査型顕微鏡法は、その原理的な制約から 3 次元構造の可視化には長時間の画像取得時間を要するという大きな課題が残されている。生体試料深部での細胞機能の動的な観察と解明を進める上で、3 次元での構造・機能可視化に対して従来の限界を超えた高い空間分解能と高い時間分解能を両立することは、生命科学研究の多くの場面において試料観察や分析手法の劇的な変化とそれに伴う新たな知見をもたらすことが強く期待され、そのための光イメージング技術の新規開発が急務である。

このことを背景に、本研究提案では、【ベッセルビーム】と【エアリービーム】という 2 つの特異な光ビームが有する非回折性や自己湾曲性といった通常の光ビームでは得られない極限的性質を高度に融合した全く新しい原理に基づく 3 次元光イメージング法を提案する。本手法で核となる原理は、ベッセルビームによる微小なニードル状集光スポットを用いた蛍光試料の奥行方向（厚み方向）に対する一斉励起と、励起された蛍光試料全てが同時に発する蛍光シグナルのエアリービームへの変換による自己湾曲伝搬を用いた試料奥行方向の位置情報の一括取得である。この新しい原理に基づき、観察試料の奥行方向の構造情報を検出面において横方向へと座標変換することによって 3 次元での光イメージングを実現する。

本研究課題では、この独自のアイディアに基づく光イメージングの方法論の確立と実証を進めるとともに、本手法を実装したレーザー顕微鏡システムを構築することで、従来のレーザー走査型顕微鏡法における 2 次元画像取得と同程度の時間で 3 次元での画像を得ることを目指す。本研究課題で開発する新しいレーザー顕微鏡システムでは、近赤外での短パルスレーザー光源を用いた 2 光子励起イメージングにおいて、 $10\mu\text{m}$ 以上の焦点深度を持つ光ニードルスポットを形成し、この焦点深度の範囲内において 10 点以上での奥行き方向の位置分解を目指す。これにより、従来の 2 光子励起イメージング手法と同程度の横方向分解能を維持しながら、3 次元イメージングの高速化を図る。

このように本研究構想は、光が本質的に持つ極限的性質を最大限に引き出すことで、生体やソフトマテリアルの内部や深部での非侵襲かつ超高速 in vivo 観察を可能とする革新的光イメージング法の実現につなげるものである。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、独自の蛍光レーザー走査型顕微鏡システムを一から開発し、その原理の検証と 3 次元画像化の実証を進めた。図 1 に示すように、本提案手法は走査励起光を長焦点深

度のニードルスポット状とした上で、試料からの蛍光シグナルをエアリービームに変換し、結像面での強度分布を走査点毎に取得することの特徴とする。エアリービームの自己湾曲性によって、発光試料の深さ位置に応じて、結像面でのエアリービーム像が面内方向にシフトするため、結像面での面内方向の強度分布から、試料の深さ情報を直接取得できる。

この原理に基づく3次元イメージングを実現するために、構築したレーザー顕微鏡システムを用いて次に示す要素項目の実証を進めた。

【1】長焦点深度の2光子励起ニードルスポットの設計と実証：波長1 μm のフェムト秒パルスレーザーを励起光源とした2光子イメージング系をベースとして、通常の15倍の焦点深度(約15 μm)を持つニードルスポットを焦点に形成し、長焦点深度イメージングを可能にした。

【2】蛍光シグナルの波面制御によるエアリービーム変換と深さ情報の抽出：試料からの蛍光シグナルを空間光変調器によってエアリービームに変換すると、当初の想定通り、ビーズの深さ位置に応じて結像面での結像中心位置が面内方向にシフトすることを実証した。

【3】ニードルスポット走査に同期したエアリービーム像の検出と3次元画像化：3次的に分布した微小蛍光ビーズを評価試料として、本イメージング系で用いた実験条件において、約8 μm の深さ範囲で3次元画像構築に初めて成功した。また、空間分解能評価を行ったところ、従来のレーザー走査型顕微鏡法と比較して、光軸方向の空間分解能が1-2倍程度の劣化に留まる一方で、面内方向には空間分解能が向上する予想外の効果を明らかにした。

【4】線形な面内シフト性を持つ結像光学系の開発：本手法のさらなる高精度化についても検討を進めた。その一つとして、計算機合成ホログラムの原理を応用し、観察物体の深さ位置に対して結像面が面内方向に線形にシフトするようなホログラム設計が可能であることを明らかにした(論文1)。

以上の要素項目が実現可能であることを本研究期間内に全て実証し、当初のねらいに従って10 μm 以上の焦点深度を持つニードルスポットの1回の2次元走査のみから、試料の3次元情報を一挙に取得する新しい3次元光イメージングの方法論を確立した。

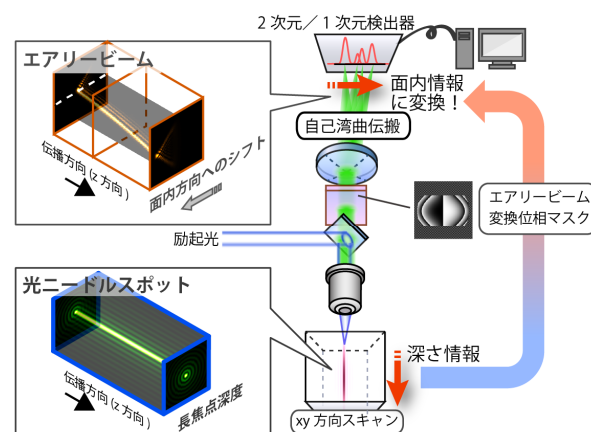


図1. 本研究で提案した新しい3次元イメージング手法の概念図

(2) 詳細

本研究目的の達成に必要な各要素項目の具体的な成果について以下に詳細に述べる。

【1】長焦点深度の2光子励起ニードルスポットの設計と実証：

本手法の重要な要素技術の一つは、レーザー走査型顕微鏡の焦点に焦点深度の長いニ-

ドル状の集光スポットを形成することである。これを
実現するために、波長 $1\ \mu\text{m}$ のフェムト秒パルスレ
ーザーを励起光源とした 2 光子イメージング系に対
して、対物レンズの瞳をリレーした位置において液
晶空間光変調器を導入し、円環状の強度分布とな
るような振幅マスクを形成した。これにより、対物レ
ンズの焦点にニードルスポット状のベッセルビーム
を形成した。ニードルスポットの焦点深度と面内ス
ポットサイズは、円環マスクの幅と直径に依存する
ことを考慮し、本研究で使用する開口数 (NA) 1.15
の水浸レンズに対して通常のレーザー光の集光と同
様の面内スポットサイズを維持しながら、焦点深
度のみ増大するようなニードルスポットを形成する
円環マスクを設計した。本光学系において焦点で
の 2 光子励起ニードルスポットの形状を計測し、図 2
に示すように通常の 15 倍の焦点深度(約
 $15\ \mu\text{m}$)を持つ光ニードルスポットが設計通り十分に
形成できることを確認した。

さらに、円環状の強度分布を持つビームの集光では、
集光するビームの収束角が一定の角度範囲内に制
限されることに着目し、球面収差が生ずる条件にお
いても良好なニードルスポット形状を形成できるこ
とを理論的・実験的に見出した。

【2】蛍光シグナルの波面制御によるエアリービームへの変換と深さ情報の抽出：

物体面での深さ情報を抽出するために、蛍光試料からの
蛍光シグナルを検出側光路に設置した空間光変調器
によってエアリービームに変換した。エアリービーム
変換によって得られる結像面での面内シフト特性を
定量的に評価するために、焦点に形成したニードル
励起スポットの光軸に沿って微小蛍光ビーズを走査
し、各 z 位置で得られる結像面でのエアリービーム
像を 2 次元検出器によって記録した。図 3 に示すよ
うに、通常の検出(図 3、左列)では蛍光ビーズの像
は、対物レンズ焦点($z_s = 0$)以外ではボケとして
検出される。一方で、蛍光シグナルをエアリービー
ムに変換した場合には、エアリービームが持つ非回
折性によって焦点から外れた場合にも結像スポット
を形成し、付加するエアリービーム波面の次数を大
きくすると、像として検出可能な範囲が増大する結
果が得られた(図 3、2 および 3 列目)。さらに、エ
アリービームの自己湾曲性を反映し、蛍光ビーズの
深さ位置に応じて検出面では面内方向(h 軸方向)に
シフトする結像特性が予想通り得られることがわか
った。また、エアリービームを用いた深さ位置検出
の一意性を担保するため

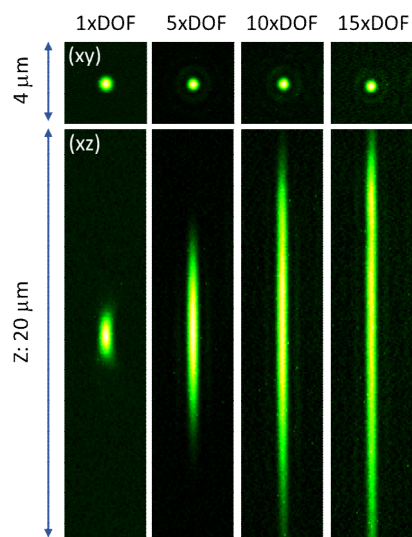


図 2. 焦点に形成されたニードルス
ポットの強度分布

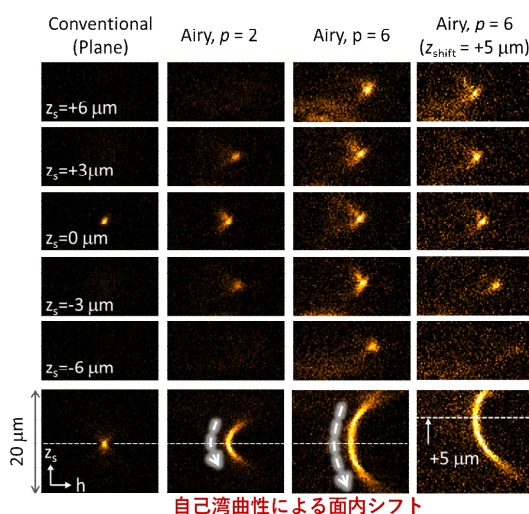


図 3. 蛍光シグナルのエアリービーム変換に
よる面内シフト特性の検証

に、結像位置を光軸方向にシフトするためのレンズ波面を空間光変調器に重畳したところ、発光点の深さ位置に応じて結像面内位置が設計通りシフトすることについても確かめられた(図3、右列)。

【3】2光子励起ニードルスポット走査に同期したエアリービーム像の検出と3次元画像化:

以上の研究項目の結果を踏まえ、本手法による3次元画像化のためのシステム構築を行うと共に3次元結像特性の評価を行った。アガロースゲル中に3次元的に固定した直径200 nmの蛍光ビーズを評価試料として用い、ピエゾステージを用いたニードルスポットの2次元走査に同期して、エアリービームに変換された蛍光シグナルの強度分布を高感度2次元検出器によって測定した。本原理では、検出面における面内の1軸方向が、試料の深さ軸に直接対応することを考慮し、2次元走査によって得られた画像データを元に3次元画像の構築を行った。その結果、図4上段(3次元像のxz面に対する強度分布、図では最大値投影法により表示)に示すように、通常のレーザー顕微鏡法において複数(図では31枚)の2次元画像のスタックにより構築した3次元像と同様の画像を得ることに成功した。このことから、当初の構想通り、従来のレーザー顕微鏡法では深さ位置を変化させながら複数枚の2次元画像を取得する必要のあった3次元画像取得を、1回のニードルスポット走査のみから取得し、本研究で提案した3次元イメージング法が実現可能であることを示した。

また、本手法における空間分解能の評価を行ったところ(図4下段)、従来のレーザー顕微鏡法と比べて1-2倍程度の空間分解能の低下に留まる一方で、面内方向には共焦点効果により空間分解能が向上するという当初想定していなかった効果を有することもわかった。

以上のように、本研究で考案した3次元イメージング法のアイデアが実現可能であることを証明し、レーザー顕微鏡法の新しい方法論として確立することに成功した。現在、本成果をまとめ、論文として投稿準備中である。

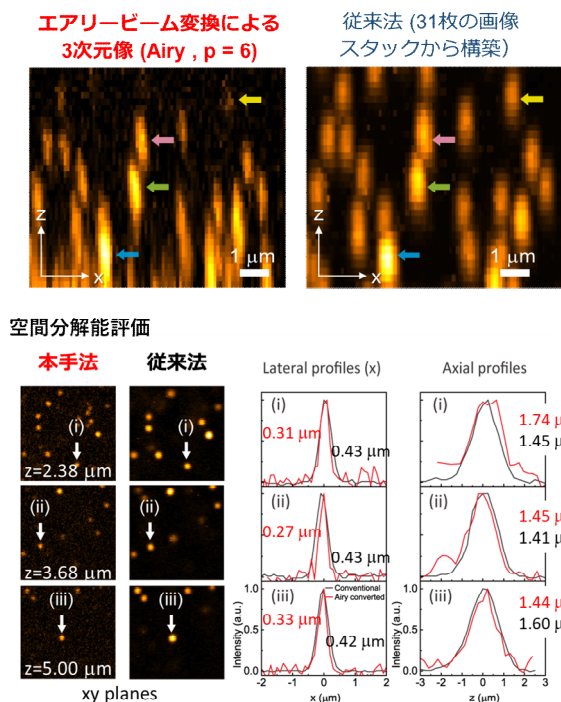


図4. 3次元画像構築結果。上段:本手法および従来法での3次元像のxz面での強度分布。z方向に約8 μm の範囲が可視化できている。下段:孤立粒子を用いた空間分解能の評価。

【4】エアリービームを用いない線形面内シフト特性を持つ結像光学系の検討

エアリービームは放物線の軌跡を示す自己湾曲性を持つことから、深さ方向の情報取得には非線形な面内シフト性の補正プロセスを要する。この点を根本から解決するための新しい取り組みとして、計算機合成ホログラム(CGH)の原理により、発光点の深さ位置に対して結像位置が線形にシフトするホログラムの設計と原理検証をさきがけ情報計測領域の中村友哉

氏(東工大)と共同で行った(論文 1)。これにより、本イメージング手法に適用可能な CGH の設計指針を得ることに成功した。今後は、CGH ベースでの 3 次元イメージング法の開発にも展開していく予定である。

3. 今後の展開

本研究により、ニードルスポットの 1 回の 2 次元走査のみから、試料の深さ情報を一挙に取得できることを実証した。一方で、真に高速な 3 次元イメージングを実現するためには、ニードルスポットの 2 次元走査に同期した高速・高感度な 1 次元あるいは 2 次元の光検出器を用いる必要がある。ただし、今日における最先端の光学機器(例えばレゾナントスキャナ)や検出器(アレイ)を用いれば、原理的にはビデオレートでの 3 次元イメージングは十分可能と考えられる。

本手法の本質は、深さ方向の情報を何らかの方法(波面)で結像面での面内方向の情報に変換することであり、本研究提案ではエアリービームの自己湾曲性および非回折性とその役割を担っていた。しかしながら、CGH の例でも明らかに、このような特性を持つ波面はエアリービームに限るのものではなく、波面制御の最適化や全く異なる光ビーム特性の適用も考えられ、3 次元イメージングにおける観察深度の拡大や高精度化を追求していきたい。さらに、本研究の将来展開として、特に生命科学分野の研究者との密な連携の下で、生きた生体深部での 3 次元可視化と高速な動態観察に基づく生命機能の理解へと発展させていきたいと考えている。

4. 自己評価

蛍光レーザー走査型顕微鏡における 3 次元イメージングを高速に実現する従来には無い方法に着想し、研究者自身にとっても完全に新規の研究テーマとして取り組み、その実証をさきがけ研究期間内に示すことができた。本手法の実現には、独自の 2 光子励起レーザー走査型顕微鏡系を立ち上げ、励起側に加えて検出側光学系のいずれに対しても波面制御機構を導入する必要があったが、これに必要な装置やシステムを全て自ら構築し、研究開始時に期待していたような結果を得ることに成功した。当初の研究計画で設定した 3 次元イメージングを実現するための主要な研究項目について、概ね達成することができたと考えている。

従来のレーザー顕微鏡法での 3 次元イメージングに対して、1 回の 2 次元走査のみで 3 次元画像化が実現でき、3 次元画像化に要する時間の大幅な時間短縮を図ることが可能となった。一方で、絶対値としての高速性という観点では、検出器のフレームレートに依存するという点での装置改良等の余地が残されており、今後の研究によって真に高速な 3 次元イメージングを実証していきたいと考えている。また、本結果を踏まえて、企業との共同研究へ向けた活動も進めており、今後は本手法のさらなる高度化や高速化を目指すことに加えて、実用化への展開も図っていきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Tomoya Nakamura, Shunsuke Igarashi, Yuichi Kozawa, and Masahiro Yamaguchi,

“Non-diffracting linear-shift point-spread function by focus-multiplexed computer-generated hologram,” Opt. Lett. (*In press*).

(2)特許出願

研究期間累積件数:3 件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

1.

発 明 者: 小澤 祐市
発明の名称: 光学情報検知装置及び顕微鏡システム
出 願 人: 東北大学
出 願 日: 2016/6/7
出 願 番 号: 特願 2016-113770

2.

発 明 者: 小澤 祐市
発明の名称: 光学情報検知装置及び顕微鏡システム
出 願 人: 東北大学
出 願 日: 2017/6/7
出 願 番 号: PCT/JP2017/021138

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表:

1. (招待講演) 小澤 祐市、佐藤 俊一、“光波の強度・位相・偏光の空間分布制御と光イメージング応用” 第 19 回情報フォトンクス研究会(秋合宿)、栃木県那須郡那須町、(2018)
2. (招待講演) 小澤 祐市、佐藤 俊一、“レーザー光の偏光・位相の空間分布制御に基づく光イメージングの高度化” 第 3 期第 2 回レーザー学会「レーザーバイオ医療」技術専門委員会、仙台、(2018)
3. (招待講演) Yuichi Kozawa、Shunichi Sato、“Spatial resolution enhancement in laser scanning microscopy using vector beams” The 4th Biomedical Imaging and Sensing Conference 2018 (BISC2018)、Yokoyama、(2018)
4. Yuichi Kozawa、Shunichi Sato、“Extraction of Depth Information using an Airy Beam in Laser Scanning Microscopy with an Optical Needle” Focus on Microscopy 2018、Singapore、(2018)
5. (招待講演) 小澤 祐市、佐藤 俊一 “ベクトルビームにおける振幅・偏光・位相の空間分布制御と光イメージング応用” Optics & Photonics Japan 2017、東京都文京区、(2017)
6. Yuichi Kozawa、Shunichi Sato “Long Depth-of-Focus Imaging by a Non-Diffracting Optical Needle under Strong Aberration” Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO)、San Jose、(2017)