

フェムト秒レーザーパルスの時空間集光を用いた二光子蛍光深部イメージング

Deep imaging of two-photon fluorescence by space-time focusing with femtosecond pulse laser

春原易典(M1), 橋本博(M2)

Y. Sunohara, and H. Hashimoto

Abstract

We target deep imaging of laser induced fluorescence at ~2 mm depth within intact or semi-intact tissue. Time lens system can improve S/N in a multiphoton excited fluorescence microscopy. We experimentally examine the capability of the time lens system combined with a CPA femtosecond laser system.

1 はじめに

ヒトゲノムが解読され、細胞内の様子をリアルタイムで観測する事が次の課題になっている。生体細胞を観測するには光学顕微鏡が用いられてきたが、光学顕微鏡の分解能は光の回折限界により約 $0.2 \mu\text{m}$ であり、光の波長より小さい生体分子の観測は困難であった。そこで、分子の領域を観測する為に、 2 nm 程度の蛍光蛋白質分子を遺伝子導入で細胞に発生させ、その蛍光を観測する蛍光顕微鏡が開発された。蛍光顕微鏡は、観測したい分子に蛍光標識(タグ)を遺伝子導入し蛍光蛋白質分子を発現させ、外部から蛍光標識を励起した後、蛍光を観測する事で蛍光蛋白質分子の動きを測定する。

二光子励起蛍光顕微鏡[1]は一光子励起顕微鏡に比べ様々な長所を持っている。二光子励起とは、物質が一度に二つの光子を吸収して、基底状態から励起状態に遷移する非線形過程のことである。例えば二光子励起の場合、一光子励起の励起波長の2倍の波長で励起することになる。二光子蛍光顕微鏡は生体分子を観察する上で、長波長の励起光を使用することから侵襲度が高い顕微鏡として開発されている。侵襲度を更に向上させるためにはピークパワーの高い励起光が必要であり、再生増幅器を使用した例もある[2]。

一般的な二光子蛍光顕微鏡ではレンズによる空間的な集光により焦点におけるスポットサイズは $1 \mu\text{m}$ 以下である。当然、試料の蛍光データを得る時は試料の大きさ

の範囲に励起光を走査して蛍光を発生させる必要がある。発振器レベルの繰り返し周波数であればリアルタイムでイメージングを行うことが出来るが、繰り返し周波数の低い再生増幅器では困難である。時間レンズは回折格子によって光線を各波長毎に空間的に分光し、その分光した光をレンズ等を用いて再度集光する。時間レンズは試料上で面照射となり、二次元イメージを一度に取得出来ることから励起光を走査する必要が無く、このような問題点を解決してくれる[3]。二光子蛍光顕微鏡の侵襲度を制限する要因の一つが背景蛍光であるが、比較的時間レンズは背景蛍光を抑制しやすい。また開口数が大きい対物レンズを使用しなくても深さ方向の分解能は保つことが出来る。つまり時間レンズシステムは、面照射となるので焦点面での二次元イメージを一度に CCD 上に結像させることができ、深さ方向の分解能を維持したままリアルタイムでイメージングが可能である。

本研究では、二光子蛍光顕微鏡に於いて侵襲度の深い部位でのイメージングを行う事を目的としている。CPAシステムからのフェムト秒レーザーパルスを用いて時空間集光による二光子蛍光イメージングを行う。まず、深さ方向の分解能の実証を行った。

2 理論

Fig.1 に時間レンズの装置図を示す。時間レンズの原理は、回折格子によってパルスに空間分散を与えて、一時的にパルスを伸長し、レンズを用いた対称光学系で再度集光した際に、空間分散を補償し、時間的な圧縮を行うものである。

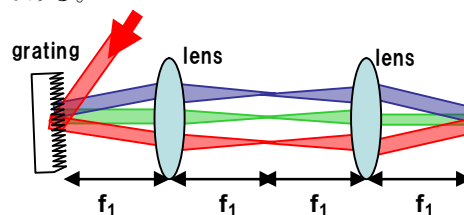


Fig.1 Schematic of time lens system.

次に時間レンズの理論として、ここではビーム径を無視して各周波数に対する波数ベクトルを近似して用いることで時間集光の様子を解析する[4]。周波数 ω に対する波数 $k(\omega)$ は、近軸近似を適用して

$$k(\omega) = k_\omega \cos(\theta_\omega)z + k_\omega \sin(\theta_\omega)x \approx k_\omega \left(1 - \frac{\theta_\omega^2}{2}\right)z + k_\omega \theta_\omega x \quad (1)$$

とする。ここで θ_ω は各周波数の波数ベクトルの中心周波数成分から角度を表し、 $\theta_\omega = P(\omega - \omega_0) = P\delta$ で与える。P は比例係数である。スペクトル振幅 $g(\omega)$ とスペクトル位相をフーリエ変換することで時間領域の電場 $E(x, z, t)$ は、

$$E(x, z, t) = \int d\omega g(\omega) \exp[ik(\omega) \cdot \mathbf{r} - i\omega t] \quad (2)$$

$$= \int d\omega g(\omega) \exp[ik_\omega z (1 - P^2 \delta^2 / 2) + k_\omega x P \delta - i\omega t]$$

で表記できる。 $k_\omega = k_0 + \delta/c$ として搬送周波数も積分の外に取り出すと、

$$E(x, z, t) = g_1 \exp[i(k_0 z - \omega_0 t)] \int d\delta \exp(-\delta^2 / \Delta^2) \quad (3)$$

$$\exp[i(\delta/c - k_0 P^2 \delta^2 / 2 - P^2 \delta^3 / 2c)z + i(k_0 P \delta + P \delta^2 / c)x - i\delta t]$$

となる。 Δ は励起光のスペクトル幅である。ここで $\delta/c \ll k_0$ の近似をすると z と x の係数の最後の項が無視できる。そして $\int d\delta \exp(-A\delta^2) \exp[i\delta(t - t_0)]$ の形で記述でき積分する。

$$A = \frac{1}{\Delta^2} (1 + ik_0 \Delta^2 P^2 z / 2), \quad t_0 = k_0 P x - z/c \quad \text{となるので、}$$

$\xi = k_0 P^2 \Delta^2 z / 2$ とすると $A = 1 + i\xi / \Delta^2$ で表され、フーリエ変換後の時間領域での電場は、

$$E(x, z, t) = \exp[i(k_0 z - \omega_0 t)] \frac{g_1 \Delta \sqrt{\pi}}{\sqrt{1 + i\xi}} \exp\left[-\frac{\Delta^2 (t - t_0)^2}{4(1 + i\xi)}\right] \quad (4)$$

となる。ここで時間積分した SHG の出力は、

$$S(x, z) = \int_{-\infty}^{\infty} dx dt [E(x, z, t)]^2 \quad (5)$$

$$= \frac{g_1^4 \Delta^4 \pi^2}{1 + \xi^2} \sqrt{\frac{\pi(1 + \xi^2)}{\Delta}}$$

$$= \frac{g_1^4 \Delta^3 \pi^{\frac{5}{2}}}{\sqrt{1 + k_0^2 P^4 \Delta^4 z^2 / 4}}$$

で表される。この式から深さ方向の分解能を求めた。

3 実験

フェムト秒パルスレーザーの時間集光を用いた二光子蛍光イメージングの為に、高繰り返し CPA フェムト秒レーザー光源 (IFRIT-BIO) の調整を行った。Fig.2 に実験装置を示す。本実験に使用されたフェムト秒レーザーパルス光源は、seed レーザとしてフェムト秒ファイバーレーザー (イ

ムラアメリカ社製 IMRA Femtolite), 励起レーザーとして Nd:YAG レーザ (サイバーレーザー社製 SIVA), 回折格子とルーフ鏡によるパルス圧縮器が使用されたフェムト秒 CPA レーザシステム (サイバーレーザー社製 IFRIT-BIO) である。IFRIT-BIO によって得られるフェムト秒パルスレーザーの平均出力は 400 mW (繰り返し周波数 20 kHz), パルスエネルギーは 20 μ J/pulse, スペクトル幅は中心波長 790 nm, 20 nm (FWHM) である。本実験で使用した CPA システムは、一般的な CPA システムと異なり、パルス伸長器に石英ファイバーを使用している。種光としてフェムト秒ファイバーレーザー IMRA Femtolite の SHG パルスがファイバーのパルス伸長器を通過し、再生増幅器内で増幅され、その後回折格子パルス圧縮器で二次分散が補償され、パルスが圧縮されるように設計されている。しかしこの場合、石英ファイバーは正の二次分散、三次分散を持っており、回折格子のパルス圧縮器で二次分散を補償すると、回折格子パルス圧縮器による大量の三次分散が残ってしまう問題点がある。このままでは三次分散が大量に残るため、パルスのテールに多くのエネルギーが入る。二光子蛍光イメージングをする際、これはパルスのエネルギーを無駄に消費し、エネルギー不足によるイメージングの侵達度低下というような致命的な影響を及ぼす。また余分なエネルギーによる試料の損傷、褪色に繋がる。そこで、三次分散の補償を行う必要がある。その方法としては、レーザー光源の外部にプリズム対によるパルス圧縮器を設置し、回折格子パルス圧縮器とプリズムパルス圧縮器で二次分散と三次分散の補償を行った。

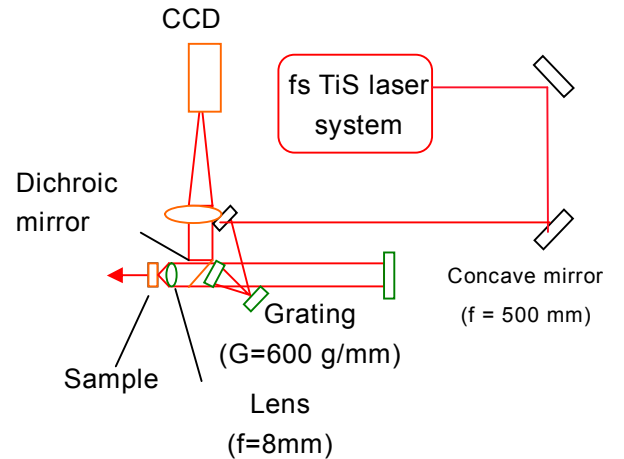


Fig.2 Experimental configuration for deep imaging.

また、光源のスペクトルから、フーリエ変換限界パルス

を計算した。その結果を Fig.3(a),(b)に示す。

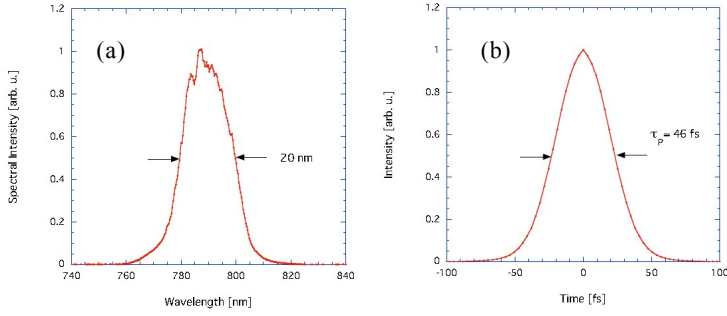


Fig.3 (a)The spectrum of the IFRIT-BIO. (b)The transform limited pulse of the measured spectrum shape.

ここで、時間レンズシステムの設計指針を示す。縮小光学系を用いて時間レンズの焦点のビーム径を 1/60 程度に集光させる為に、 $f_1=500$ mm($R/C=1$ m)の凹面鏡と $f_2=8$ mmの集光レンズ(縮小率 : 0.016 倍)を用いた。また回折格子面上のビームを光の進行方向に垂直に像転送する為に回折角 $\beta=0^\circ$ として

$$\lambda = d(\sin \alpha + \sin \beta) \quad (6)$$

の式と中心波長 $\lambda=790$ nm より、入射光 $\alpha=28.3^\circ$ とした。ここで式(4.2.1)の両辺を回折角 β で微分すると

$$\frac{d\lambda}{d\beta} = d \cos \beta \quad (7)$$

となり、回折角 $\beta=0^\circ$ の場合は、

$$\frac{d\lambda}{d\beta} = d \quad (8)$$

となる。溝本数 N は、

$$\begin{aligned} N &= d^{-1} \\ &= \frac{\Delta\beta}{\Delta\lambda} \\ &= \frac{\omega'}{\Delta\lambda \cdot f_1} \end{aligned} \quad (9)$$

で表されるので、スポットサイズ $\omega'=5$ mm、スペクトル幅 $\Delta\lambda=20$ nm の場合、 $N=500$ g/mm となる。以上より、 $N=600$ g/mm の回折格子を用いた。なお回折格子と凹面鏡の間隔が凹面鏡の焦点距離 f でないと分散がパルスに乗ってしまうことになる。また最初入射する回折格子の角度と最後に空間分散が解消する回折格子の角度がずれると空間分散が残ってしまう。

次に光軸方向の分解能測定を行った。測定方法は、Fig.4のように配置したBBO結晶(10 μ m)を光軸方向に移動させ、発生する第二高調波(SHG)をパワーメーターで測定した。

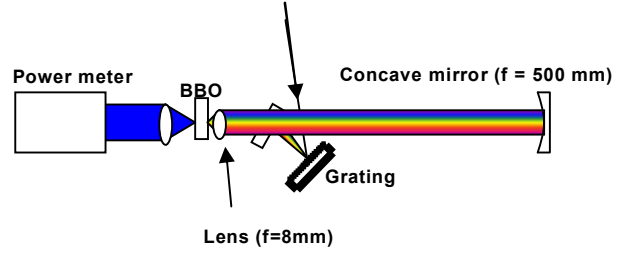


Fig.4 Experimental setup to measure axial resolution.

4 実験結果

まず、回折格子パルス圧縮器とプリズムパルス圧縮器で分散補償を行った。その結果は Fig.5 に示す。ここから回折格子対の間隔を変えた場合に二次分散が補償される点を求めたが、フーリエ限界パルス幅の 1.7 倍程度までしかパルスが圧縮できなかった。考えられる要因は主に 2 つあり、パルスの時間的なビーム質と空間的なビーム質の劣化が考えられる。時間的なビーム質に関しては、三次分散の影響があり得るが、フーリエ限界パルス幅が 50 fs 程度のパルスであるならば、フーリエ限界パルス付近での三次分散の影響は少ないと考えられる。したがって、パルスの空間的なビーム質に問題があると考えられる。その空間的なビーム質劣化の要因としてはパルス圧縮器で生じた空間分散が影響していると考えられる。

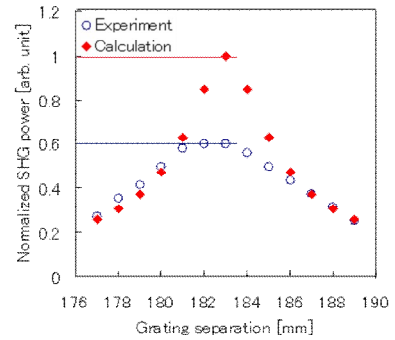


Fig.5 Compensation of the pulse by changing grating separation.

次に、時間レンズシステムの光軸方向の分解能を測定した。その結果は Fig.6 に示す。昨年度は 20 μ m の分解能の測定まで達成した。予備実験として厚さ 10 μ m の BBO 結晶を用いて SHG のパワーを測定した。測定結果として分解能が 30 μ m となったので、明らかにパルス圧縮の劣化が時間レンズシステムの光軸方向分解能劣化に現れた。

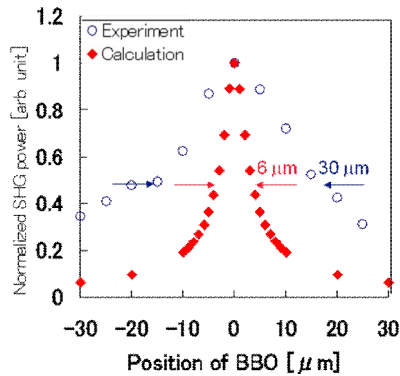


Fig.6 Measurement of axial resolution.

5 結論

分散補償によりパルス圧縮を行ったが、二つのパルス圧縮器で生じる空間分散の為に、パルスがフーリエ限界パルス幅の 1.7 倍程度にしか圧縮されなかった。その結果、光軸方向の分解能も計算値と比べ劣化した。したがって、二つのパルス圧縮器の空間分散除去を再度行う必要がある。

6 謝辞

本研究は理化学研究所緑川レーザー物理工学研究室主任研究員緑川克美博士のもとで実験環境を提供していただき、副主任研究員須田亮博士の指導を受けて行われました。また、共同研究者である基礎特別研究員磯部圭佑博士にも厚く御礼申し上げます。

References

- [1] W. Denk, J. H. Strickler and W. W. Webb, Science 248, 73 (1990).
- [2] P. Theer and W. Denk, J. Opt. Soc. Am. A, 23, 3139(2006).
- [3] M. E. Durst, G. Zhu and C. Xu, Opt. Express 14, 12243 (2006).
- [4] D. Oron and Y. Silberberg, J. Opt. Soc. Am. B 22, 2660(2005).