

デジタルマイクロミラーデバイスを用いた多光子励起パターン照明

Multi-photon patterned excitation illumination using a digital micromirror device

石川 智啓 (D2), 稲澤 健太(M1)

Tomohiro Ishikawa, Kenta Inazawa

Abstract

We experimentally demonstrated multi-photon patterned excitation illumination by using a digital micromirror device. We successfully obtained 2-photon fluorescence images same as the pattern on the digital micromirror device. By introducing time-multiplexing effect, we also confirmed spatial resolution improvement of multi-photon excitation patterned illumination.

1. はじめに

神経回路の応答とそれに対応した生体機能を結びつけることで神経回路のメカニズムを明らかにする研究に注目が集まっている。これは蛍光イメージングに光刺激を組み合わせて実現できる。光刺激を神経回路イメージングに応用するには 3次元組織中の特定の細胞や離れた場所に存在する細胞を同時に刺激する必要があり、1細胞レベルの空間分解能と広い視野内で高速に刺激可能な時間分解能が光刺激に求められる。そのため、焦点面に局所化された多光子励起領域内に任意の照射パターンを発生可能な多光子励起パターン照明が有用である。

多光子励起パターン照明として空間光変調器 (SLM)を用いた手法が報告されている[1]。ホログラフィック多光子励起パターン照明ではパターンスポットを大きくすると光軸方向の分解能が著しく低下する。上記の報告では、時空間集光による多光子励起領域の局所化を組み合わせることでこれを解決している。しかし、本手法では 4-f 光学系を介し瞳面と共役な位置に SLM を配置するとともに、

試料面と共役な位置に回折格子を配置する必要があり、照明系が複雑である。加えて、照射パターン数の増加に伴い空間分解能が低下し、ニューロン 1細胞を分解可能な空間分解能(5 μm)は得られていない。また、SLM の位相変調動作は 100 Hz 以下であり、照射パターンを高速に切り替えることができない。

本研究では、デジタルマイクロミラーデバイス (DMD)を用いた多光子励起パターン照明を開発した。DMD は微小なミラーがアレイ状に配置されたデバイスである。各ミラーの角度を電氣的に ON/OFF で制御でき、DMD により生じる強度パターンを試料に結像することでパターン照明が行える。また、微小ミラーが回折格子として機能するためフェムト秒パルスを入射すると回折が生じ、分光される。この分光された回折光を用いることで時空間集光を行える。そのため、本手法は多光子励起パターン照明と時空間集光を 1 台の DMD で行えるというメリットを有する。また、微小ミラーの ON/OFF 動作は 1 kHz 以上であり、SLM と比較し照射パターンを高速に切り替え可能である。本報告では、DMD による多光子励起パターン照明の実験結果および時間分割多重化による光軸方向分解能の向上について報告する。

2. 光源開発

DMD を用いた多光子励起パターン照明用の光源として、Yb ファイバーレーザーの開発を行った。レーザーシステムの構成を Fig. 1 に示す。昨年度の構成では、増幅器 1 段目の後に音響光学変調素子

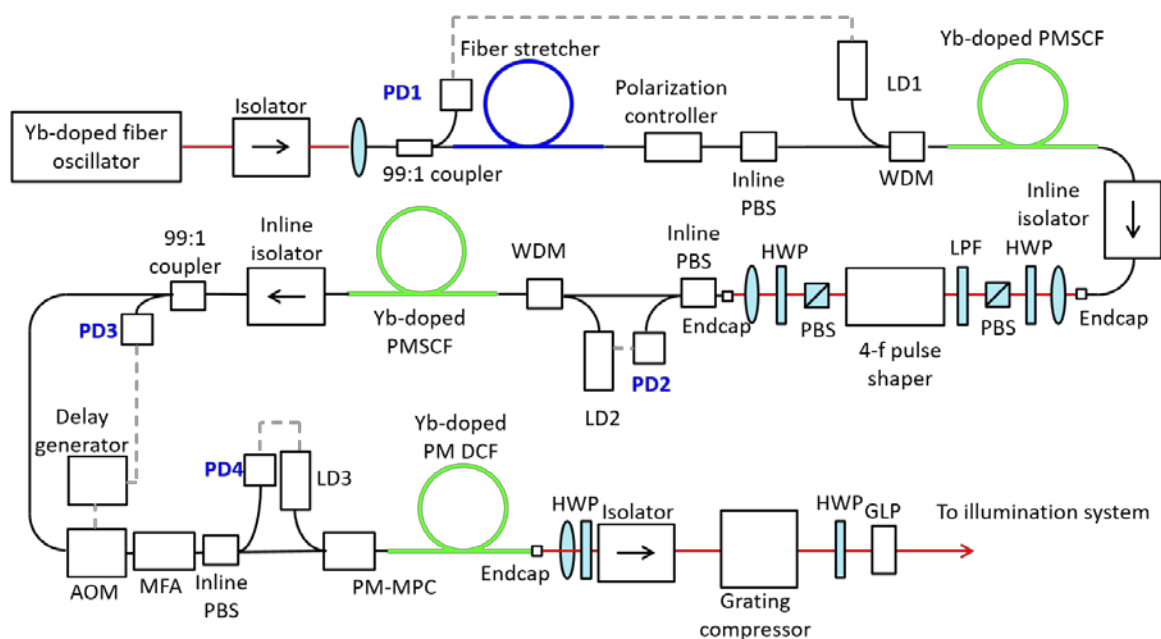


Fig. 1. Configuration of the Yb fiber laser system.

(AOM)を配置し繰り返しを 600 kHz まで落とした上でダブルクラッドゲインファイバーにより増幅していた。しかし、繰り返し低下と AOM の損失により増幅器 2 段目の入射パワーが低く、ASE が生じやすかった。そのため、ダブルクラッドファイバー前にシングルクラッドゲインファイバーによる増幅器を追加した。また、増幅器の追加に伴い増幅器 3 段目からの出力が高くなってしまい、4-f 波形整形器に用いる空間光変調器(SLM)の破損が懸念された。したがって、4-f 波形整形器を増幅器 1 段目と 2 段目の間に配置するよう変更した。これらの変更に加え、ASE のレイジングで増幅器が破損するのを防止するため、増幅器の各段に対してシード光遮断時に励起を停止するインターロックを反映した。今後、増幅器 4 段目としてラージモードエアフォトニック結晶ゲインファイバーを用いた増幅器の構築に取り組む。

3. 実験系と結果

実験系を Fig. 2 に示す。照明光として、上に記載

した増幅器 3 段で構成される Yb ファイバーレーザーシステム(出力: 680 mW, 繰り返し: 4 MHz, パルス幅: 160 fs)を使用した。4-f 光学系において試料面と共役となる位置に DMD を配置した。DMD で回折し、分光されたフェムト秒パルスは $f=375$ mm のレンズでコリメートされ、焦点距離 3 mm, 開口数 1.2 の水浸対物レンズで蛍光試料に集光される。蛍光試料として、アガロースゲルにローダミン溶液を分散させた試料を用いた。蛍光試料で発生した二光子蛍光をダイクロイックミラーで反射し、CMOS カメラに結像させた。また、時間多重化を加えた多光子励起パターン照明の実験では、DMD の前に 4-f 光学系を追加し、試料面、DMD と共役となる位置に自作の時間分割多重化素子[2, 3]を配置した。通常の時空間集光では対物レンズで集光されるのは分光される軸のみであり、分光されない軸では集光作用が得られない。そのため、分光されない軸に対しても集光作用が得られる構成とすることで、空間分解能を向上できる。これは、分光されない軸に対して時間分割多重化を加えることで実現できる。時間遅

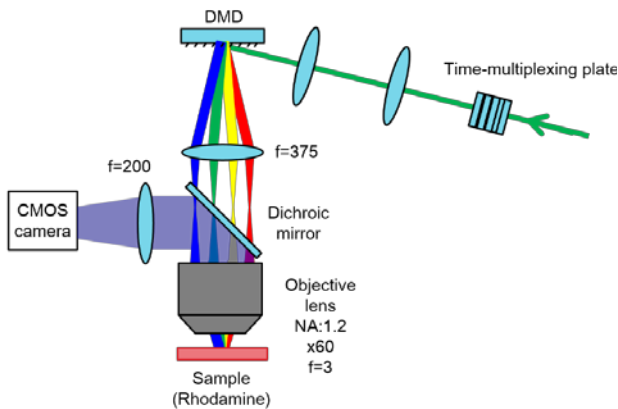


Fig. 2. Experimental setup of 2-photon excitation patterned illumination by using a DMD, combined with a time-multiplexing plate.

延によるマルチビーム化によって空間コヒーレンスが低下しビームが拡散するため、分光されない軸に対しても対物レンズの集光作用が得られる。

実験結果を Fig. 3 に示す。Fig. 3. (a)は DMD の微小ミラーを全て ON にした時の二光子蛍光像である。レーザー光のビームプロファイルと同様の二光子蛍光像が得られている。Fig. 3. (b)は刺激する細胞を模擬した DMD のパターンである。この場合、Fig. 3(c)に示されるように、DMD 上に表示した照射パターンが二光子蛍光像で得られている。厚みのある蛍光試料であっても照射パターンを確認できるのは時空間集光によって光軸方向の励起領域が局所化され、背景光が抑制されているためである。これにより、DMD を用いることで多光子励起パターン照明が行えることを確認した。また、時間分割多重化を加えた場合の結果を Fig. 3.(d)に示す。時間分割多重化による空間分解能の向上により、時空間集光のみの場合と比較しシャープな二光子蛍光像が得られた。

4. まとめ

DMD を用いて多光子励起パターン照明が行えることを確かめた。また、時間分割多重化を組み合わせ

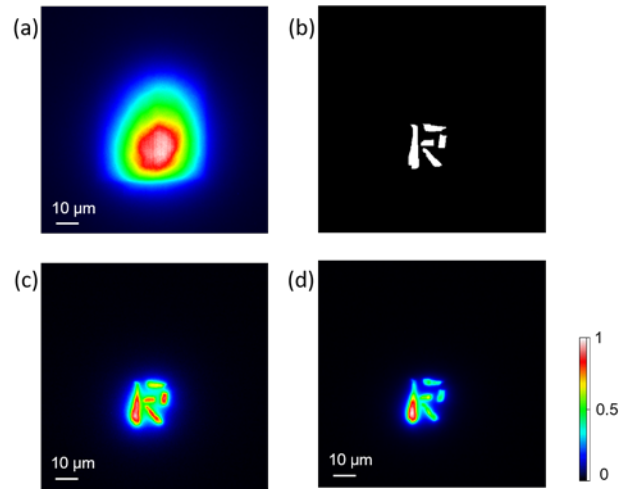


Fig. 3. Obtained 2-photon fluorescence images (a), (c), (d) and pattern on the DMD. (a) Fluorescence image of all micromirror are set ON under temporal focusing. (b) DMD pattern assumed patterned illumination. (c) Fluorescence image of patterned illumination under temporal focusing, (d) that of combined with time-multiplexing effect.

せることで、多光子励起パターン照明の空間分解能が向上できることを確認した。

謝辞

本研究は国立研究開発法人理化学研究所光量子工学研究センターアト秒科学研究チーム主任研究員緑川克美博士に実験環境を提供していただき、磯部圭佑博士の指導を受けて行われました。本研究は、JST CREST Grant Number JPMJCR1851, MEXT/JSPS KAKENHI Grant Number JP18H04750 “Resonance Bio”の支援を受けたものです。また、本研究は理研の大学院生リサーチ・アソシエイト制度の下での成果です。厚くお礼申し上げます。

References

- [1] O. Hernandez, E. Papagiakoumou, D. Tanese, K. Fidelin, C. Wyart, and V. Emiliani, "Three-

dimensional spatiotemporal focusing of holographic patterns," Nat. Commun. **7**, 1–10 (2016).

- [2] 稲澤健太, 磯部圭佑, 石川智啓, 神成文彦, 緑川克美, 時間分割多重多焦点時空間集光顕微鏡による深さ方向の分解能向上, 2019年第80回応用物理学会秋季学術講演会, 21p-E206-7.
- [3] 稲澤健太, 磯部圭佑, 石川智啓, 並木香奈, 道川貴章, 宮脇敦史, 神成文彦, 緑川克美, 時間分割多重化プレートを用いた多光子励起時空間集光顕微鏡の光軸方向の分解能向上, 2020年レーザー学会学術講演会第40回年次大会, I07-22p-VII-03.