

デュアル光コム顕微鏡によるスキャンレス蛍光イメージング

Scan-less Fluorescence Imaging using Dual Optical Comb Microscope

(P) 水野孝彦^{1,2}, 長谷栄治¹⁻³, 南川丈夫^{1,2}, 山本裕紹^{2,4}, 安井武史^{1,2},1. 徳島大学, 2. JST ERATO 美濃島知的光シンセサイザ, 3. 高輝度光科学研究センター, 4. 宇都宮大学
Takahiko Mizuno^{1,2}, Eiji Hase¹⁻³, Takeo Minamikawa^{1,2}, Hirotsugu Yamamoto^{2,4}, Takeshi Yasui^{1,2},
1. Tokushima Univ., 2. JST ERATO MINOSHIMA IOS, 3. JASRI/SPring-8, 4. Utsunomiya Univ.E-mail: mizuno@femto.me.tokushima-u.ac.jp <https://femto.me.tokushima-u.ac.jp>

共焦点レーザ走査型蛍光顕微鏡(CLFM)は、共焦点性を有した3次元イメージング手法であり、バイオイメージング分野で広く利用されている。しかし、レーザ焦点スポットの機械的走査は、画像取得速度の制限や環境外乱に対するロバスト性低下に繋がる。高速化のため共振型ガルバノスキャナやニポウディスクを用いる方法が提案されているが、環境外乱に対するロバスト性低下は依然として克服できていない。近年、スキャンレスによる高速化 FIRE 法(fluorescence imaging using radiofrequency-tagged emission)による蛍光イメージングが提案されている[1]。FIRE 法では、ライン状励起光の長軸方向に異なる周波数で RF ビートを発生させる。これによってサンプルを励起すると、励起ラインにおける蛍光の1次元多重化が達成できる。RF ビート周波数によって1次元多重化しているため、共焦点スリットを設置すると機械的走査を1軸除去した共焦点イメージングが達成できる。 4.4×10^3 フレーム/秒の高速撮像が達成されている。しかし、依然として1次元走査が必要であり、これを省略できれば高速撮像性やロバスト性の向上が期待できる。

機械的走査を完全に除去するために、我々は2次元スペクトルエンコーディング(2D-SE)およびデュアルコム分光法(DCS)を用いたフル・フィールドスキャンレス共焦点蛍光顕微鏡を提案する。基本原理は、無蛍光サンプルを対象とした既報のスキャンレス共焦点デュアル光コム顕微鏡を踏襲し、2D-SE と DCS の手法を用いる[2]。光周波数コムを励起光源として使用する。励起光は2D-SE によって波長-2次元空間展開された後、蛍光サンプルを照明する。2D-SE セットアップに、同軸に2台の光周波数コムを導入することで、サンプル面上に時間的な干渉が生成される。このとき、サンプル面上には位置ごとに独立したビート周波数が与えられる。サンプルからの蛍光は、位置に依存した変調周波数が付与されるため、周波数分解測定を行う事でサンプルの蛍光像が得られる。蛍光検出パスに、励起面と共役な位置に共焦点ピンホールアレイを配置することで、機械走査なく共焦点性を付与できる。

以上の原理検証を目的とし、2D-SE と DCS を組合せたフルフィールド蛍光イメージングを行った。今回は SN 比を確保するために共焦点ピンホールアレイを設置せずに検証を行った。図1にサンプル配置を示す。蛍光サンプルは、30uM インドシアニンググリーン水溶液とし、励起光の一部をネガ型テストチャートによってマスクした。図2に蛍光の RF 周波数領域におけるスペクトルを示す。これを2次元に再配置することで、サンプルの蛍光像を得た。図3に、得られたサンプルの蛍光像を示す。このように、テストチャートの構造観察が達成できている。

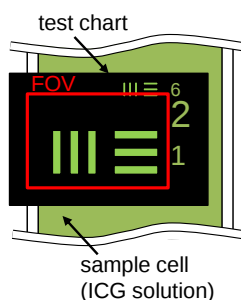


Fig. 1. sample alignment.

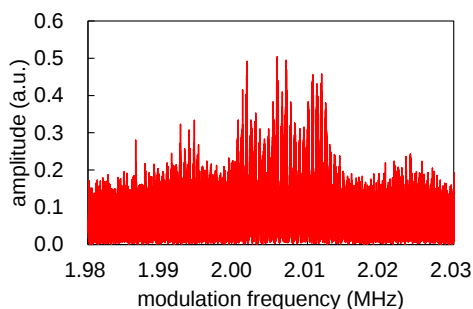


Fig. 2. RF spectrum of sample fluorescence.

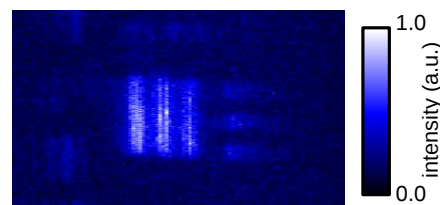


Fig. 3. fluorescence image.

謝辞

本研究は、JST, ERATO 美濃島知的光シンセサイザプロジェクトの助成を受けた。

参考文献

- [1] E. D. Diebold, et. al., Nat. Photonics 7, 806-810 (2013).
- [2] 水野他, 応用物理学会秋季学術講演会, 6p-A414-11, 2017年9月, 福岡.