

深さ位置分解した光ニードル顕微鏡における観察深度の増大

Increasing the Observation Depth in Axially Resolved Light Needle Microscopy

東北大多元研 ○小澤 祐市, 佐藤 俊一

IMRAM, Tohoku Univ., °Yuichi Kozawa, Shunichi Sato

E-mail: y.kozawa@tohoku.ac.jp

はじめに：レーザー走査型顕微鏡法は、共焦点ピンホールを用いた光検出あるいは多光子励起過程により深さ方向に対する分解能が得られ、生体蛍光イメージングにおける3次元観察手法として広く用いられている。一方で、3次元画像の構築には、観察面を深さ方向に移動しながら多数の2次元画像を取得する必要がある、観察深度が大きい場合には高速な画像取得が困難という問題がある。我々は、この課題を解決するため、レーザー顕微鏡において長い焦点深度を持つ光ニードル状の集光スポットを走査励起光とし、さらに蛍光シグナルをエアリービームに変換し、検出する新しいイメージング手法を開発している。エアリービームが持つ自己湾曲性により、発光点の深さ位置に応じて検出面では面内方向に像点がシフトするため、これをアレイ検出器で記録すると、深さ分解された3次元画像を取得できる。これまでに、2光子励起レーザー顕微鏡系において、焦点深度10 μm 程度の光ニードル励起スポットを形成し、その範囲を一走査で可視化することに成功した[1]。今回は、焦点深度をさらに増大する方策について検討した結果を報告する。

実験および結果：本手法において観察深度を増大するためには、(1) 光ニードル励起スポットの焦点深度の伸張、および(2) 異なる深さ位置からの蛍光シグナルを検出面において空間分解するための最適な波面制御が必要である。(1) は、励起レーザー光を対物レンズ瞳面において極めて幅の狭い円環状強度分布とすることで達成できるが、入射ガウスビームに対して単純な円環マスクを用いると、光利用効率が著しく低下するという問題が生ずる。そこで本研究では、励起光であるフェムト秒パルスレーザー光(波長1040 nm)に対して反射型の液晶空間光変調器(SLM)を用いてアキシコンおよびレンズ波面を印加しリング状にビーム整形を行い、その後に円環マスクを作用させることで光利用効率の向上を試みた。リングビーム整形および円環マスクは1台のSLMで行えるように光路設計を行い、円環マスクを投影するSLM面はリレー光学系により対物レンズ(開口数1.15)の瞳面に転送した。

光ニードルの焦点深度が50 μm となるような狭線幅の円環マスクをガウスビームに対して単純に作用させた場合には、光利用効率は約2%に留まるが、本手法を用いると36%に向上した。本円環マスクの設計に基づいて、微小蛍光ビーズを用いた2光子励起イメージングによる点像分布関数(PSF)を測定したところ、通常のPSFではz軸方向の半値全幅が1.4 μm であったのに対し[図1(a)], 狭線幅の円環マスクでは31 μm に伸びることがわかった[図1(b)]。実験結果の詳細および本手法における検出側の波面制御の最適化の検討については当日報告する。

参考文献： [1] Y. Kozawa and S. Sato, *Sci. Rep.* **9**, 11687 (2019).

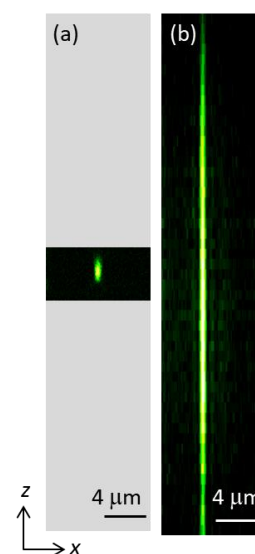


Fig. 1. Measured excitation PSFs for (a) conventional and (b) light needle microscopy.