

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02622

研究課題名（和文）空間座標変換に基づく高速3次元レーザー顕微鏡法の確立

研究課題名（英文）Development of rapid three-dimensional laser scanning microscopy based on spatial coordinate transformation

研究代表者

小澤 祐市（Kozawa, Yuichi）

東北大学・多元物質科学研究所・准教授

研究者番号：90509126

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、試料の深さ方向に対して針状に伸びたニードルスポットを走査励起光としたレーザー走査型蛍光顕微鏡法を開発し、観察面を移動することなく試料の3次元構造を高速に可視化することに成功した。試料の深さ方向の情報を検出面での面内方向の情報へと変換する空間座標変換を実現する新たな波面制御法を提案し、従来のレーザー顕微鏡法では困難であったビデオレートでの3次元観察が可能であることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レーザー走査型顕微鏡法は試料の3次元構造を非侵襲かつ簡便に可視化できるツールとして様々な学術・産業界において必須の観察法である。一方で、3次元像を得るためには、観察面を移動しながら2次元の画像取得を繰り返す必要があるため時間がかかるという制約があった。本研究では、光の波面制御に基づく新しいイメージング法の原理を提案し、観察面を移動することなく試料の3次元像を一挙に取得する高速な可視化技術を実現した点に大きな学術的・社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：The present project developed laser scanning microscopy utilizing a light needle spot elongated along the depth direction of sample, enabling rapid visualization of the three-dimensional structure of samples without moving the observation plane. This new method is based on the wavefront manipulation for signals to convert the axial information of samples into the transverse information at the detector plane. By using this method, video-rate acquisition of three-dimensional images, regarded as difficult to realize by conventional laser scanning microscopy, was successfully demonstrated.

研究分野：光工学

キーワード：レーザー顕微鏡 波面制御 3次元イメージング ベッセルビーム エアリービーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

レーザー走査型顕微鏡法は、その非侵襲性、簡便性、迅速性などから特に生命科学の分野においては必須の観察手法である。通常のレーザー顕微鏡法では集光したレーザー光の2次元走査による画像取得を基本とする。そのため、観察試料の3次元的な構造の可視化には、試料あるいは観察面を機械的に動かしながら複数枚の2次元画像を繰り返し取得することが必須であり、通常のレーザー顕微鏡法における3次元での画像取得は極めて長い時間を要するプロセスとなる。しかしながら、生体試料を始めとした多くの観察試料は本質的に複雑な3次元構造を持ち、その動的イベントを高時間分解能で3次元的に可視化することの重要性や必然性は自明であり、高速な3次元での構造可視化技術の開発は生命科学だけでなく学術・産業の様々な分野において強く渴望されている。

本研究は、レーザー走査型顕微鏡の方法論において観察面の移動をすること無く3次元の画像取得を可能とする新たな顕微鏡法を確立し、従来の限界を大きく超えた高速な3次元イメージングを目指すものである。これを実現する方法として、本研究代表者がこれまでに考案した光ニードル走査型のレーザー顕微鏡法に着目した。本イメージング法は、【1】レーザー顕微鏡における励起ビームを光軸方向に伸張した光ニードルスポットとし、【2】試料からの蛍光をエアリービームと呼ばれる特異な光ビームに変換した上で、その発光像を1次元あるいは2次元の検出器で記録することを特徴とする。エアリービームは、伝搬に伴いビームの中心が面内方向にシフトする極めて特異な性質(自己湾曲性)を持つ。この特性により、光ニードルスポットによって深さ方向に一斉に励起された蛍光試料の発光が、その深さ位置に応じて検出面では面内方向に分離され、物体面での深さ情報が検出面での面内情報に『空間座標変換』される。この原理によって観察面を移動せずに深さ方向の情報を一挙に記録することが可能となる。つまり、光ニードルスポットの2次元走査のみから3次元像を構築でき、画像取得の劇的な高速化が期待できる。本イメージング法は、ピエゾステージ走査型のレーザー顕微鏡系での原理実証にこれまで成功しており、本原理に基づくレーザー走査型顕微鏡として実装できれば、真に高速な3次元イメージングが実現する。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、これまで研究代表者が見出した『空間座標変換』の原理を大きく発展・深化させ、さらなる高度化を図ることである。そのための達成目標として、生体試料などの実サンプルを含む蛍光試料に対するビデオレートでの3次元イメージングの実現と、深さ情報・面内情報変換手法の高性能化による検出深度や機能性の向上を目指す。これらによって、従来のレーザー顕微鏡の概念を大きく変える新しいイメージング手法の基盤を確立する。

3. 研究の方法

本研究課題では、これまで研究代表者が構築してきたイメージングシステムについて、レーザー走査に基づく高速な3次元イメージング性能を追求するため装置の改良を進める。具体的には、2軸のガルバノミラーを用いたレーザー走査型の顕微鏡光学系をベースとしてイメージングシステムを完成させ、光ニードル走査および蛍光信号のエアリービーム変換による3次元結像性能を詳細に評価する。一方で、本イメージング法における深さ分解能および深さ方向の観察深度の向上を図るため、蛍光信号に対する波面制御について新たに計算機合成ホログラムの原理を導入する。また、ビデオレートでの3次元イメージングを実現するために、蛍光信号の検出に、1次元のアレイ型検出器を使用し、レーザー走査に同期した高速な信号取得を試みる。これらによって、光ニードルスポットの2次元走査のみから高速な3次元可視化を実現する。高速な3次元イメージングの実証実験として、水中に浮遊する蛍光ビーズのリアルタイムでの可視化を試み、個々の粒子の3次元トラッキングを行う。

4. 研究成果

(1) エアリービーム変換に基づく空間転置検出と生体試料の3次元イメージング

本イメージング法では、近赤外波長のフェムト秒パルスレーザーを励起光とした2光子励起レーザー顕微鏡をベースとする。集光する励起光ビームに対して対物レンズ瞳面において円環状ビームとなるように空間光変調器を用いた強度分布の制御を行った。これによって、焦点には長焦点深度のニードル状スポットを形成した。ニードル状スポットは、ガルバノミラーによって焦点面において2次元に走査し、各走査点からの蛍光信号を取得する。ニードルスポットによって光軸方向に一斉に励起された試料からの蛍光信号は、その深さ情報を全て含んだ信号であるが、通常のレーザー顕微鏡系での光検出では発光点の深さ位置を分離することは不可能である。本イメージング法において提案する空間座標変換法は、検出する蛍光信号について自己湾曲伝

搬特性を持つエアリービームに変換することで、その伝搬特性に従って発光点の深さ位置に応じて像面では異なる面内位置に結像することを原理とする。これを実現するために、検出側光路に設置した別の空間光変調器を用いて、蛍光信号をエアリービームに変換した。ニードルスポットの各走査点において、エアリービームに変換された蛍光像を2次元の高感度カメラにより記録し、その面内シフト方向の強度分布から試料の深さ方向の情報を取得した。

評価実験として、COS-7細胞のアクチンを蛍光染色した固定試料を対象として、本イメージングシステムを用いて3次元イメージングを行った。その結果、図1に示すようにニードルスポットの1回の2次元走査のみから、細胞の厚み方向の構造も含めた3次元像を構築することができた。本イメージング条件では、開口数1.15の対物レンズを用いた観察において、15 μm の焦点深度を持つ光ニードルを走査し、蛍光信号に対するエアリービーム変換によって、深さ方向に10 μm 程度の範囲を可視化することに成功した。本イメージング法での深さ方向に対する空間分解能は、エアリービームが持つ非線形な自己湾曲伝搬特性に起因して深さ位置に応じて変化するものの、数 μm 以下であった。これは、通常のガウスビームを用いたレーザー顕微鏡法と比べても遜色のない結像特性であり、3次元イメージング法として良好な結像特性を持つことがわかった。

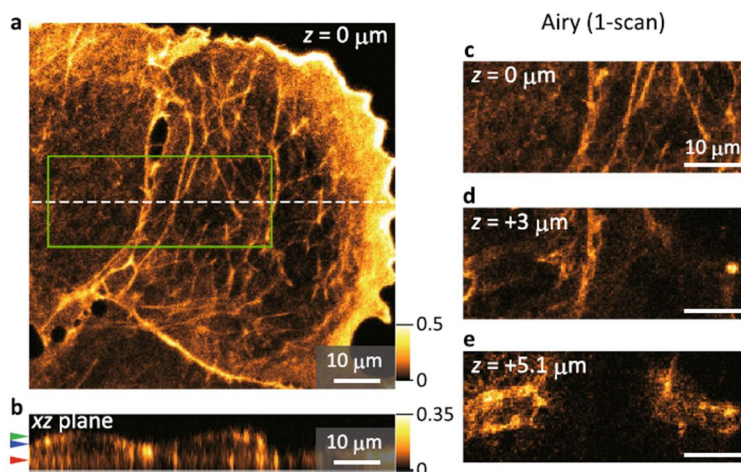


図1. 光ニードル走査の1回の2次元走査のみから構築された生体試料の3次元観察結果

(2) 多重化計算機合成ホログラムの原理による線形シフト特性の実現

エアリービームが持つ自己湾曲性は、伝搬にともなって中心ピークの位置が放物線の軌跡を描きながら面内方向に非線形にシフトする性質である。この特性に起因して、本イメージングにおいて3次元画像構築を行った場合の深さ分解能は深さ位置に応じて変化するという特徴を持ち、また観察深度はエアリービームの伝搬特性に強く依存する。これらを解決する方法として、蛍光信号に対する波面制御の方法として、多重化した計算機合成ホログラム(CGH)の原理を新たに導入した。

本原理では、物体面の深さ位置(z)と像面での面内位置(H)に対して、発光点の像が線形に面内シフトするような波面制御を行う。これを実現するために、深さ方向に等間隔に配置した N 個の発光点について、その深さ位置がそれぞれ z_i である場合に($i=1-N$)、像面での点像の結像位置が $H_i = \alpha z_i$ となる対応関係(α は定数)の要素CGHを設計し、それらを一定の位相条件でコヒーレントに重ね合わせる。要素CGH間の位相差を最適化することで、孤立した発光点は N 個の多重化された点像となり、線形な面内シフト特性が得られる。蛍光信号の取得には、後述するファイバーバンドルを入力端とする16チャンネルの1次元アレイ型検出器を用いることを想定し、開口数1.15の水浸対物レンズの観察条件でオレンジ色蛍光を対象に、 $N=16$ として20 μm の深さ範囲に対応した多重化CGHを設計した。

まず、設計した多重化CGHによる線形シフト特性の評価実験を行った。焦点深度20 μm の光ニードルをカバーガラス面に凝集した蛍光ビーズ試料上に定点照射し、得られた蛍光信号について空間光変調器によって多重化CGHの波面を印加した上で、像面での強度分布を計測した。蛍光試料の深さ位置を変えながら像面での強度分布を計測すると、図2(a)に示すように深さ位置の変化に対して像面では面内方向に移動しながら16多重のビーズ像が設計通り得られることがわかった。本原理では、蛍光信号に対する印加波面を切り替えるだけで所望の深さ範囲に対する面内シフト特性を付与できる。本研究では、さらに10 μm (図2(b))あるいは50 μm の深さ範囲に対して16多重のCGHを設計し、それぞれが設計通りの結像特性を示すことを確認した。

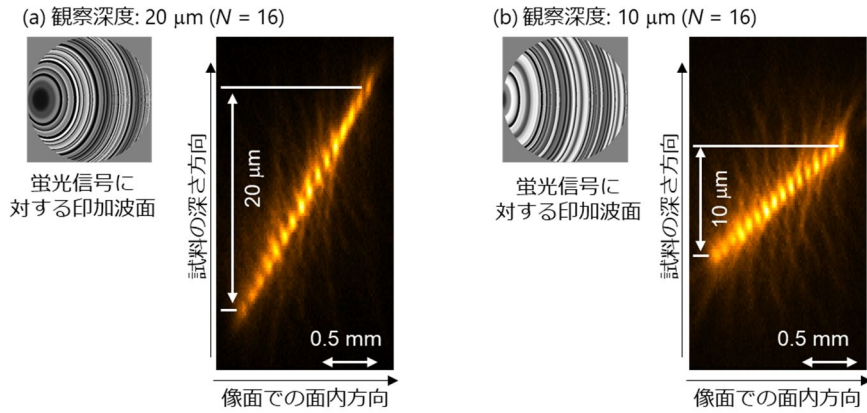


図 2. 多重化 CGH に基づく波面制御を用いた蛍光信号の線形シフト特性

(3) 光ニードルの 2 次元走査のみから実現する高速 3 次元イメージング

これまで構築した顕微鏡システムでは、光ニードルの各走査点において 2 次元の高感度カメラを用いて蛍光信号の強度分布を記録することで画像構築を行っていた。そのため、光ニードルの走査速度はカメラのフレームレートに律速されるため、高速な画像取得は困難であった。そこで、蛍光信号が像面で面内シフトする方向に沿って並べられたファイバーバンドルを入力端としたアレイ型の光検出器を新たに導入し、画像取得の高速化を図った。本システムでは、16 チャンネルのファイバーバンドルを像面に設置し、光ニードルの 2 次元走査に同期して各チャンネルからの光信号を記録することで画像構築を行った。

本システムを用いた高速な 3 次元イメージングの実証例として、水中に浮遊する直径 $1\ \mu\text{m}$ の蛍光ビーズの可視化を試みた。図 3(a)に示すように、可視化深度 $20\ \mu\text{m}$ の多重化 CGH の条件で、光ニードルスポットの 2 次元走査を繰り返すことで、ビデオレートに相当する 1 秒間に 30 回の速度で 3 次元像を動画として記録することに成功した。本測定では、蛍光粒子が水中でブラウン運動する様子が明瞭に可視化されており、図 3(b)に示すように得られたデータから個々の粒子の 3 次元的位置の追跡に成功した。このように、試料面を 2 次元に走査するレーザー走査型の顕微鏡系においても、本イメージング法を適用することで 3 次元的なビデオレート計測が可能であることを初めて実証した。

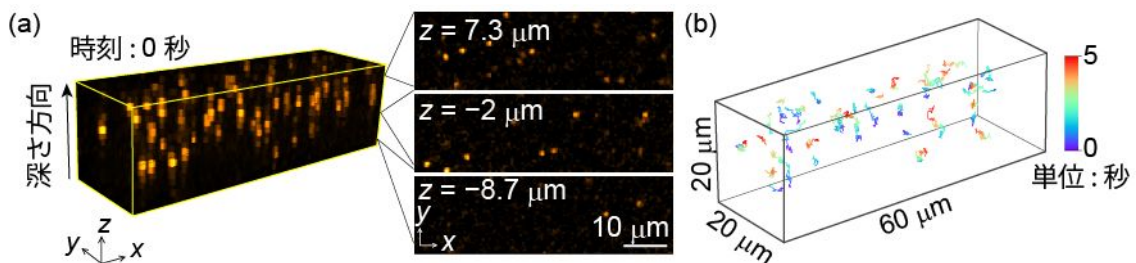


図 3. 光ニードル走査による高速な 3 次元イメージングの例

本研究で構築したシステムは、光ニードルの 1 回の 2 次元走査から深さ $20\ \mu\text{m}$ の範囲を一度に可視化できる性能を有する。一方で、より厚みのある試料に対しても通常のレーザー走査型顕微鏡法とくらべて少ない走査回数で可視化できることが期待できる。実際に、厚み $200\ \mu\text{m}$ 程度の固定したマウス脳スライス標本を対象に、本システムを用いたイメージングを試みたところ、通常のレーザー顕微鏡法では観察面を移動しながら 196 枚の画像スタックが必要であった深さ範囲について、ニードル走査の場合には 13 回の走査のみから同領域の 3 次元画像構築に成功した。本実験条件での画像取得時間は、通常のレーザー顕微鏡法に比べて $1/11$ 程度に短縮化され、光ニードル走査型顕微鏡法によって厚みのある試料に対しても観察速度の大幅な向上が得られることがわかった。

以上の結果が示すように、本研究で提案した新しい 3 次元イメージング法について、当初の目的であるビデオレートでの 3 次元高速可視化を実証することに成功した。本イメージング法における観察可能な深度や視野範囲といったイメージング性能については改善の余地が残されているものの、今後のさらなる性能追及と生体イメージングへの適用を進めることで、従来の光学顕微鏡法では捉えることのできなかった生命現象の可視化といった実応用への展開が十分に期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kozawa Yuichi, Nakamura Tomoya, Uesugi Yuuki, Sato Shunichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Wavefront engineered light needle microscopy for axially resolved rapid volumetric imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedical Optics Express	6. 最初と最後の頁 1702 ~ 1702
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/BOE.449329	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kozawa Yuichi, Sakashita Ryota, Uesugi Yuuki, Sato Shunichi	4. 巻 28
2. 論文標題 Imaging with a longitudinal electric field in confocal laser scanning microscopy to enhance spatial resolution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Optics Express	6. 最初と最後の頁 18418 ~ 18418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/OE.396778	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kozawa Yuichi, Sato Masaki, Uesugi Yuuki, Sato Shunichi	4. 巻 45
2. 論文標題 Laser microprocessing of metal surfaces using a tightly focused radially polarized beam	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Optics Letters	6. 最初と最後の頁 6234 ~ 6234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/OL.405852	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Y. Kozawa and S. Sato	4. 巻 9
2. 論文標題 Light needle microscopy with spatially transposed detection for axially resolved volumetric imaging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 11687
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48265-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 小澤 祐市、上杉 祐貴、佐藤 俊一
2. 発表標題 可視光ベッセルビームを用いた光ニードル走査型蛍光顕微鏡法による3次元イメージング
3. 学会等名 第82回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大野 剛史、小澤 祐市、上杉 祐貴、佐藤 俊一
2. 発表標題 強く集光したベクトルビームを用いた金属表面へのダブルパルスアブレーション加工
3. 学会等名 第82回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大野 剛史、小澤 祐市、上杉 祐貴、佐藤 俊一
2. 発表標題 ベクトルビームを用いたダブルパルスレーザー加工における材料依存性
3. 学会等名 第69回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦 祐樹、土屋 裕祐、小澤 祐市、上杉 祐貴、佐藤 俊一
2. 発表標題 光ニードル顕微鏡法によるワイドバンドギャップ半導体の内血管の高速3次元計測
3. 学会等名 第69回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 S. Nakaya, Y. Kozawa, Y. Uesugi, S. Sato
2. 発表標題 Optical Trapping of Low Refractive Index Particles by Dual Vortex Beams
3. 学会等名 Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO) 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 俊一、小澤 祐市
2. 発表標題 構造化した光による超解像イメージング
3. 学会等名 レーザー学会第42回年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 M. Sato, Y. Kozawa, S. Sato
2. 発表標題 Laser Microfabrication of Metal Surfaces by Tightly Focused Higher-Order Vector Beams
3. 学会等名 Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO) 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Y. Kozawa, T. Nakamura, S. Sato
2. 発表標題 Volumetric Imaging Utilizing Linear-Shift Point-Spread Function Based on Multiplexed Computer-Generated Hologram
3. 学会等名 Focus on Microscopy 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小澤 祐市
2. 発表標題 光の波面や偏光の空間分布を制御した新しい光イメージング技術
3. 学会等名 2020年度高分子・ハイブリッド材料研究センター (PHyM) 若手フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小澤 祐市, 上杉 祐貴, 佐藤 俊一
2. 発表標題 空間構造を持つ光を活用した超解像および3次元レーザー顕微鏡法
3. 学会等名 レーザー学会第41回年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小澤 祐市, 中村 友哉, 土屋 裕祐, 佐藤 俊一
2. 発表標題 多重化計算機合成ホログラムによる線形シフト型点像分布関数の実現
3. 学会等名 第81回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小澤祐市
2. 発表標題 ベクトルビームのスーパーオシレーション集光を用いた超解像イメージング
3. 学会等名 Optics & Photonics Japan 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小澤祐市, 佐藤俊一
2. 発表標題 Three-dimensional imaging in light needle microscopy utilizing non-diffraction and self-bending characteristics
3. 学会等名 第57回生物物理学学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小澤祐市, 佐藤俊一
2. 発表標題 深さ位置分解した3次元光ニードル顕微鏡の開発
3. 学会等名 第80回応用物理学学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土屋裕祐, 小澤祐市, 佐藤俊一
2. 発表標題 ベッセルビームを用いたGaN中の転位観察
3. 学会等名 2019年応用物理学学会東北支部 第74回学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Yoshida, Y. Kozawa, S. Sato
2. 発表標題 Optimization of Higher-Order Transverse Modes of Cylindrical Vector Beams for Enhanced Spatial Resolution in Image Subtraction
3. 学会等名 Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小澤 祐市, 佐藤 俊一
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第67回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yuichi Kozawa, Shunichi Sato	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 56
3. 書名 Progress in Optics Vol 66 (Chapter 2. Small focal spot formation by vector beams)	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 スポット光生成装置、光学情報検知装置及び顕微鏡	発明者 小澤 祐市	権利者 東北大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/031166	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中村 友哉 (Nakamura Tomoya)		
研究協力者	川上 良介 (Kawkami Ryosuke)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	石井 宏和 (Ishii Hirokazu)		
研究協力者	根本 知己 (Nemoto Tomomi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関