

単一細胞分解能を有する 2 光子光刺激技術と
刺激応答観察のための 2 光子顕微鏡システムの開発

稲澤 健太

要旨

光作動性タンパク質の遺伝子を細胞に発現させ、その活性を光制御することで細胞機能を人為的に操作する技術は、光遺伝学と呼ばれている。光遺伝学の技術開発は、神経細胞の膜電位操作から初まったが、現在は、細胞内分子局在、酵素活性、遺伝子発現、オルガネラ機能など、様々な細胞機能へとその操作対象を拡張し、神経科学や細胞生物学をはじめとする生命科学研究にとって、必須の研究手法のひとつとなっている。このような光遺伝学技術のさらなる発展には、光作動性タンパク質の分子開発に加えて、狙った細胞特異的に光を照射する光学技術の開発や、その応答観察における光学技術も同時に必要である。

多光子光刺激技術は、細胞群から細胞個々への操作を可能とする技術として注目されている。計算機合成ホログラム (CGH) と時空間集光法を組み合わせた 3 次元非走査型光刺激システムは、細胞体サイズのスポットを有しながら 3 次元の空間局所化性能を有するが、光軸方向の分解能が回折限界スポット時の分解能に比べて低いだけでなく、複数のスポット間で干渉が起きるため、光照射パターンが設計通りに生成されず、標的細胞以外も活性化を行ってしまう可能性がある。また、CGH を発生させるための液晶型空間位相変調器 (LCOS-SLM) への熱の影響が著しく、スポット数を増やした刺激は困難であった。2 光子光刺激システムの導入に伴い、刺激応答を観測する方法も重要である。従来の 2 光子顕微鏡では、高繰り返し率の市販品レーザーを用いるため、ピーク強度が低く、高信号対雑音 (S/N) 比の画像を取得するためには、平均パワーを上げて測定するほかない。しかし、平均パワーを上げての測定は、イメージング光によってオプシンへの意図しない光刺激が行われてしまう可能性が高い。それだけでなく、光刺激によって 2 光子蛍光も発生してしまうため、光刺激と同タイミングで取得した刺激応答データに刺激光による蛍光が重なってしまい、信頼性が低くなったり、背景光が生じたりする。本研究では、これらの 3 次元パターン 2 光子光刺激技術における課題の解決を試みるとともに、光刺激応答観察に適したイメージングシステムの開発に取り組んだ。

はじめに、2 光子光刺激と 2 光子イメージングシステムの同時利用における光学装置開発の最適化に取り組んだ。光刺激及びイメージングにおける励起光の構成と出力特性を述べた。また、イメージング光による光作動性イオンチャネルへの予期せぬ光刺激を避けるため、低い平均パワーでの高 S/N 化を行うための検出器構成を開発した。加えて、刺激光起因の蛍光除去を容易にする 2 光子光刺激と 2 光子イメージングを統合した全体のセットアップについての詳細を述べた。また、本手法で用いた光刺激のアルゴリズムについて解説した。

次に、3 次元パターン 2 光子光刺激技術における課題解決のため、時空間集光法に時間多重化マルチライン集光技術を組み込んだ時間多重化マルチライン時空間集光法を、CGH 法と組み合わせ、完全非走査 3 次元 2 光子光刺激技術の開発に取り組んだ。その結果、光軸方向の分解能が向上し、光軸方向と垂直な面内方向におけるスポット間の干渉抑制、LCOS-SLM の熱問題の抑制が可能であることを確認した。生体応用のため、3 次元光刺激範囲と

各分解能についても言及した．3次元パターン照明をスフェロイドへ応用し，単一細胞解像度で複数の標的細胞のみを光刺激することに成功した．

最後に，光刺激システムとイメージングシステムの最適化を試みた．刺激光によって発生する蛍光を除去するため，イメージング光にタイミング同期した刺激光に遅延を与え，各パルスによって発生する蛍光を時間的に分離した．加えて，検出器を介して得られる蛍光信号をイメージング光に同期して検出することで，刺激光起因の蛍光を除去することを可能とした．また，この同期検出に用いたピーク点のみをサンプリングするシングルサンプリング法をタイムゲートサンプリング法と比較し，シングルサンプリング法の優位性を述べた．最後に，この手法を，光作動性タンパク質と神経活動プローブが共発現している *in vivo* マウスを利用し，光刺激とカルシウムイメージングを同時に適用し，生体イメージング下においても背景光起因の背景光を除去できていることを確認した．

今後，本研究で開発したシステムにより，精密な神経活動の模倣とその応答を観察，検証することが可能となることが期待される．

目次

第 1 章	序論	7
1.1	背景	7
1.2	光遺伝学に向けた光刺激ツール	8
1.3	光刺激のための観測ツール動向	10
1.4	本研究の目的	11
1.5	本論文の構成	12
第 2 章	本研究の基盤となる理論	13
2.1	光遺伝学生体ツール	13
2.1.1	Genetically encoded indicators	13
2.1.2	多光子光遺伝学用オプシン	15
2.2	超短パルスレーザーの基礎	16
2.2.1	モード同期による超短パルスレーザーの生成	17
2.2.2	分散と分散補償	19
2.2.3	チャープパルス増幅	21
2.3	多光子励起技術	22
2.3.1	一般的な多光子励起	22
2.3.2	広視野多光子励起：時空間集光法	24
2.3.3	広視野多光子励起：時間多重化マルチライン時空間集光法	26
2.3.4	各手法の比較	28
2.4	多光子光刺激技術	29
2.4.1	レーザー走査型光刺激技術	29
2.4.2	レーザー非走査型多光子光刺激技術	31
2.5	多光子顕微鏡における信号対雑音比の向上	34
2.5.1	蛍光励起効率の最大化	34
2.5.2	AD サンプリング条件の最適化	35
2.5.3	蛍光収集効率の最大化	37
2.5.4	信号対雑音 (S/N) 比	37
第 3 章	本研究に用いる光学ツール装置	40
3.1	光刺激システムに適したレーザー装置	40
3.2	検出ユニット	43
3.3	多光子顕微鏡 & 多光子光刺激セットアップ	44

3.4 LCOS-SLM による CGH 生成理論と高均一性の獲得	46
第 4 章 単一細胞同時制御のための時間多重化マルチライン時空間集光三次元光刺激技術.....	50
4.1 エッシェル回折格子の理論.....	50
4.1.1 自作エッシェル回折格子の最適パラメーターの決定.....	50
4.1.2 時間多重化マルチライン時空間集光法による二次元分光.....	53
4.2 光刺激範囲.....	55
4.2.1 面内方向における照射範囲と回折効率.....	55
4.2.2 光軸方向における照射範囲と回折効率.....	56
4.3 時空間集光ホログラフィにおける残留分散の影響.....	57
4.4 実験内容.....	61
4.4.1 LCOS-SLM の熱問題評価	62
4.4.2 二光子パターン照明評価.....	62
4.4.3 スポットシフト変位量と回折効率/分解能の関係評価.....	63
4.4.4 波長スケーリングによる残留分散補償評価.....	63
4.4.5 3次元培養細胞スフェロイドを用いた3次元光変換.....	63
4.5 実験結果.....	64
4.5.1 LCOS-SLM の熱問題.....	64
4.5.2 シングルスポット照明における評価.....	66
4.5.3 面内方向におけるマルチスポットパターン照明評価.....	67
4.5.4 軸方向におけるマルチスポットパターン照明.....	68
4.5.5 3次元マルチスポットパターン照明.....	71
4.5.6 光刺激範囲.....	71
4.5.7 波長スケーリングによる分散補償.....	73
4.5.8 3次元培養細胞スフェロイドを用いた3次元光変換.....	74
4.6 議論・まとめ.....	76
第 5 章 刺激応答観察手法の開発.....	78
5.1 励起パルスに同期した検出方式.....	78
5.1.1 検出タイミング合わせ.....	78
5.1.2 検出回路帯域幅.....	79
5.2 シングルサンプリング法の評価.....	81
5.2.1 実験手法.....	81
5.2.2 SS 法と TGS 法の S/N 比結果	82

5.3	光刺激光の蛍光信号除去.....	84
5.4	Ex vivo 切片を用いた検出方式比較.....	85
5.4.1	2光子イメージング結果.....	86
5.4.2	3光子イメージング結果.....	87
5.5	光刺激と応答観察結果.....	88
5.6	まとめ.....	89
結言		91
参考文献.....		93
謝辞		107
業績目録.....		109

第 1 章 序論

1.1 背景

生命現象の解明は、人類が長きにわたり追いつけてきた知の探究の原点である。細胞が活動し、組織が応答し、生体が秩序ある振る舞いをする背景には、精密な分子機構と細胞間の複雑な相互作用が存在する。その構造と機能を理解するために、生理学的な計測・観察・操作技術は様々開発されてきた。20 世紀後半、特に神経生理学の発展を支えたのは、電極による神経活動計測技術である。パッチクランプ法や電極アレイなどの技術は、細胞膜電位の変化を直接捉えることを可能として、神経活動の実態を定量的に理解するうえで極めて重要な役割を果たしてきた。しかし電極の空間的制約はより複雑な細胞集団の中から特定の細胞の応答を個別に可視化する潮流に必ずしも十分に応えられるものではなかった。この状況を大きく変えたのが何といても下村脩博士による緑色蛍光タンパク質 (GFP) [1] の発見だろう。GFP は生体内で遺伝子内の情報をもとに発現できる蛍光タンパク質であり、有機色素などによる染色を必要とせず光によって細胞や組織を可視化できる画期的な分子ツールであった。この発見を皮切りに様々な色の蛍光を放出するタンパク質や、蛍光波長を切り替え可能な蛍光タンパク質、蛍光発生状態を変える蛍光タンパク質などが報告され [2–6]、生体内での細胞構造や分子動態をリアルタイムで観察する新たな研究手法が広く普及し始めた。神経活動を可視化するためには、神経活動に伴う現象の観測が必要不可欠であり、レポーターが求められた。神経活動を可視化するために、最も広く用いられているのがカルシウムイメージングである。活動電位の伝播に伴って生じる一過性の Ca^{2+} の流入を検出することで、神経活動を可視化する。 Ca^{2+} に反応するレポーターであるカルシウム指示薬は、Fluo-3 や、Fura-2 などの有機化合物も存在するが、いずれも生体への毒性があったり、長期的に使用が難しかったりなどの課題があった。一方、生体内で遺伝子発現できる遺伝子コード型カルシウム指示薬 GCaMP [7] は、複雑な細胞集団の中から特定の細胞のみ標識可能であったり、一時的に褪色しても生体内で発現可能なため長期観察が可能となったりなど、様々な利点を有する。近年では、より長波長側の蛍光を発生する RCaMP [8] などとも開発され、2 光子励起を組み合わせた深部への観察が進められている。

神経活動の理解には、神経活動の観測だけでなく、細胞個々のレベルで神経活動を制御することも重要である。光依存の現象は細菌や藻類から植物、動物に至る多様な生物で自然界に存在する。光受容体などのタンパク質を、本来光感受性のない細胞へ発現するようになったのは、2002 年にショウジョウバエのロドプシンとそれに関連する信号伝達タンパク質が神経細胞で発現したことがきっかけである [9]。同年、藻類 *Chlamydomonas* でチャネルロドプシン-2 (Channel rhodopsin-2, ChR2) [10–12] が発見され、2005 年に Boyden 等によって ChR2 を使用してミリ秒スケールで神経活動を操作する光遺伝学が初めて報告された [13]。ChR2 は光制御陽イオンチャネルであり、オールトランスレチナールの存在下で、青色光 (約

470 nm) を照射すると 50 ミリ秒以内に開口し陽イオンを透過させる．ほとんどの細胞や生物においてほぼ普遍的に色素分子であるオールトランスレチナールが細胞内で利用可能であることが ChR2 の重要な特性として見出された．この性質を利用し，ChR2 を神経細胞に発現させることで，光パルスによって時間的に正確かつ精密に再現性高く活動電位を誘発できることが示された．これにより，未知の神経細胞の機能を解明したり，神経回路を発見したり，神経疾患の治療などが期待される．実際に，マウスにおける脳卒中の治療や [14]，記憶の除去と再活性化 [15]，失明の治療 [16]などの例がある．更に，光遺伝学ツール（オプシン）の多様化と改良も進んだ．活性化制御に用いられる ChR2 だけでなくハロロドプシン (Halorhodopsin, HR)のような抑制性オプシンや，吸収波長，活性化寿命，温度依存性などが異なる様々な変異体が開発されてきた [17]．特に，ChR2 の活性化寿命を短縮した ChETA や Chronos [18,19]といった高速応答型オプシンの登場は，神経活動の高速ダイナミクスをより正確に捉えるうえで重要な進展となった．

1.2 光遺伝学に向けた光刺激ツール

光遺伝学は神経科学における応用光学の役割と展望に劇的な影響を与え，同時にオプシンを発現した神経細胞への光刺激戦略の開発を促進させた．神経細胞を光刺激する典型的な実現例は，オプシン発現神経細胞を LED やハロゲンなどによる広視野照明 [9,13,20]かファイバーデリバリーシステム [21,22]によるものである．これらの成果としては特定の行動に関連する神経回路のマッピングや病理学のおよび治療の状態に関与する神経回路の解明などがあげられる．これらの研究では，細胞特異性はオプシンを特定の細胞タイプで発現させる遺伝子標的方法に完全に依存している．しかし，同じ細胞群や脳領域に属する神経細胞でも多様な応答パターンを示す可能性がある [23,24]ため，このアプローチでは，脳機能の理解に限界が生じる．例えば，「特定の行動を引き起こすために必要な神経細胞数」や「神経回路内の特定の節点（ノード）が他のノードを支配するか」というような疑問は，光を用いた解析の空間範囲を神経細胞群から個々の細胞へと縮小する必要がある．これを実現するために，2光子励起 [25,26]によって標的細胞のみを選択的に光刺激する技術が開発された．この挑戦的な選択的光刺激による戦略は複数の課題が存在する．1つは散乱媒体である組織深部の神経細胞に照射光を届かせる必要があること．2つ目は神経細胞への光刺激の時空間分解能や視野が，神経活動を模倣するために十分であること．第3に，オプシンの光学特性に照射光が適応していることである．代表的なオプシンである ChR2 のチャンネルコンダクタンスは一般的に 40 fS~90 fS と低い [27]ため，イオンの通過量が少ない．そのため，神経細胞が発火する活動電位に達するには ChR2 の活性化寿命以内に単一細胞内に多数存在する ChR2 をより多く励起する必要がある．これらを実現するための多光子光刺激システムは大きく二つに分類でき，走査型とパターン照明型に分かれる．

2光子励起では、励起ビームを回折限界の小さなスポットに空間集光することで、光刺激の空間局所性を達成できる。回折限界スポット拡がり Δw_x は、励起波長 λ 、励起システムの開口数 NA と媒質の屈折率 n で決まり、光軸に垂直な面内方向で $\Delta w_x \sim \lambda/2NA$ 、光軸方向で $\Delta w_z \sim 2\lambda n/NA^2$ となる。したがって、細胞サイズ(10 μm)まで面内方向のスポットを広げようと NA を下げると、光軸方向のスポットサイズが NA の2乗で拡がるため、単一細胞分解能の光刺激が難しい。そのため、単一細胞内のオブシンを多数励起するためには、2軸のガルバノミラー[28,29]や音響光学偏向素子(AOD)を使用し[30,31]、回折限界スポットを細胞上でスパイラル上に走査する必要がある[32]。また、複数の細胞を活性化させるためには、単一細胞上のレーザー走査を終了した後、逐次的に次の標的細胞へスポットを移動させ、同様に細胞上での走査を繰り返す。よって、最終的に全ての標的細胞を刺激するまでの時間分解能が低下する。このように、走査型の光刺激における刺激可能な細胞数は、時間的制約で限られる。一方で、レーザー走査を不要とするパターン照明による光刺激技術も開発されている。パターン照明法では、デジタルマイクロミラーデバイス(DMD)などを用いた空間強度変調[33,34]や、液晶光学位相変調素子(LCOS-SLM)などを用いた空間位相変調[35–37]が存在する。これらは、複数の励起スポットを生成し、複数の標的細胞を同時に刺激する手法であるため、時間分解能が標的細胞の数に依存しない。完全な非走査型にするためには、低 NA の対物レンズを用いて各励起スポット径を細胞サイズまで広げる必要があるが、走査型同様に光軸方向の分解能が低下してしまう。そのため、完全な非走査型ではなく、各スポット径を小さくして、対応する細胞上で各スポットを同時に螺旋状にレーザー走査し、高い空間分解能で比較的高速(<数ミリ秒)に活動電位の発火を誘起することが行われている[38]。ただ、発火のタイミングのジッターは大きく、走査速度やレーザーパワー、走査位置などの制御パラメーターが多いため、発火タイミングの制御は困難である。

各励起スポット径を、LCOS-SLMを用いた計算機合成ホログラム(CGH)によって単一細胞サイズまで拡大することも可能である。光軸方向の励起局所性は拡大スポット径に比例して変化するため[35]、光軸方向における空間局所性の極端な悪化は抑制できる。しかし、高 NA の回折限界スポット時の空間局所化性能と比較すると依然として劣ってしまう。それだけでなく、干渉を利用する性質上、スペックルノイズが不可避免的に発生し、ビーム品質の低下を招く。このように、細胞上での走査が必要か、空間局所性が劣化した状態で限られた点への刺激しか行えないという課題がある。一方で、時間分解能を向上するための技術として光軸方向に2光子励起領域を局所化しながら大きな集光スポットを実現できる技術として時空間集光(temporal focusing : TF)技術[39,40]が注目されている。フェムト秒パルス一度分光し焦点面に再び集光することでパルス幅が時空間的に変調されるため、2光子励起領域を焦点面近傍に局所化することができる。この技術は、光軸に垂直な面内方向に拡がった励起領域を2次元検出器に結像させることで、集光スポットをレーザー走査せずに高時間分解能で断層像を取得できる技術として多光子顕微鏡として広く利用されてきた。近年、時空間集光におけるスポット径を細胞サイズの10 μm 程度に調整し、レーザー走査型

顕微鏡と組み合わせて細胞解像度の高速なイメージングを行ったり [41], CGH と組み合わせて一切の走査をせず複数の神経細胞へ光刺激を行ったりなど, 時空間集光技術が様々応用されてきている [42–49].

時空間集光技術を用いることで, 高速なイメージングや複数の神経細胞への光刺激が可能となっているが, CGH と組み合わせる場合, パターン生成において以下の複数の課題が存在する. 第 1 の課題は, 光軸方向のスポット間干渉におけるクロストークアーティファクトが大きくなってしまうことである. 時空間集光法では, 2 軸の空間集光特性を持つ通常のレーザー走査型多光子光刺激に比べると, 光軸方向の分解能が低下してしまう. 半値全幅 (FWHM) における空間分解能はそれぞれ, レイリー長が同じと仮定した時, 時空間集光法がレーザー走査型に比べて $\sqrt{3}$ 倍悪くなる [50]. 特に, 光刺激においては半値幅だけでなく励起領域そのものが重要になるため, スポット径の評価と同様に $1/e^2$ 値で評価をするのが合理的である. その場合, FWHM で分解能 $5\text{ }\mu\text{m}$ としたとき, $1/e^2$ 値幅は $20\text{ }\mu\text{m}$ に相当する. そのため, 光軸方向に $20\text{ }\mu\text{m}$ よりも近い平面に多点を生成した場合, スポット間での干渉が顕著になり, 設計通りのパターン生成が困難となる. 第 2 の課題として, 刺激対象である細胞が分光方向と垂直な方向に隣接している場合, 隣接するスポット間で干渉を起こしてしまう点である. そのため, 平面方向においても正確なパターン照明が困難となってしまう. 第 3 に, CGH 発生のための LCOS–SLM 上に, 線集光をする関係上, 局所的な熱の影響によって, 位相変調不良が発生してしまう点が挙げられる. LCOS–SLM は, 液晶分子が駆動周波数に微小に追随しているため, 位相変調量が微量に変化している. この変化量は液晶分子中の温度が高いほど大きくなる. LCOS–SLM 上で線集光されて入射した光は, LCOS–SLM 上で局所的に熱を上昇させるため, 光の振幅の変動量が上昇する. また, 位相変調されなかった成分は 0 次光として残るため, パターンの歪みになる. 最後に, CGH では変調位相量を中心波長の単一波長で計算する関係上, 複数の波長を含む超短パルスの各波長における理想的位相と僅かに位相ずれが生じる点である. 特に, 時空間集光法では, LCOS–SLM 上の 1 軸方向に周波数が掃引されているため, 中心周波数との位相差がそのままパルスの歪み (残留分散) となる.

1.3 光刺激のための観測ツール動向

多光子光刺激技術を使用した場合, その結果を観測する必要がある. 細胞個々を 3 次的に刺激可能な多光子光刺激の特徴を考えると, 多光子顕微鏡によって刺激していない細胞も含め, 細胞個々の応答を確認する必要がある. 多光子顕微鏡で *in vivo* マウスの神経細胞活動を観測する場合, 920 nm の範囲に 2 光子吸収ピークを持つカルシウム感受性蛍光タンパク質 GCaMP が最も一般的に使用されている. また, 光刺激における励起光は, 高出力化が容易な 1030 nm 付近の光源を用いることが多い. 刺激光における GCaMP の吸収感度は極僅かであるが, 刺激光はイメージング光に比べて比較的強い強度での刺激を行う傾向にあ

るため、刺激光によってカルシウム感受性蛍光タンパク質が励起されてしまう。これにより、イメージングデータの信頼性の欠如や、背景光増加による信号対雑音 (S/N) 比の低下が懸念される。また、最も広く使われている光遺伝学ツールであるオプシンはイメージング光の波長帯域でも励起されてしまう [51]ため、イメージング用の励起光で意図せずに活性化してしまう可能性もある。このように、分子ツール間にクロストークが生じてしまう [52]。加えて、オプシン発現を確認するため、mCherry や mScarlet などの蛍光マーカーなどが付いていれば、刺激光によって赤色蛍光が発生してしまうため、蛍光分離フィルタが必要になり、収集できる蛍光信号量が減衰してしまう。イメージング光によるオプシンの活性化を解決するため最も取り組まれているのは、同一空間上あたりに照射されるパワーを低下させる手法である [47,53,54]。これらは、S/N 比を犠牲にする手法であるため、蛍光励起・収集方法や、検出方法、また検出器自身の性能がより重要になってくる。また、別の手法としては、Kv2.1 などの標的配列を利用して、オプシンの局所化などを行う手法 [55–57]や、青色シフトしたオプシンと赤色シフトカルシウム感受性蛍光タンパク質を使用して、オプシンの波長感度をイメージング光の波長と大きく分離する手法 [58]などが取り組まれている。しかし、前者では、共発現しているカルシウム感受性タンパク質も同様に局所化されるため、軸索や樹状突起、スパインなどの信号伝達を観測が不可能になってしまう。後者の場合は、2光子で青色の活性化ができる市販のレーザーはパワー制限があったり、刺激光によるカルシウム感受性タンパク質の励起がより行われてしまうためデータの信頼性が損なわれたり [59]と、課題はまだ多い。多光子による光刺激とイメージングは、神経活動を正確に制御する比類のない可能性を提供するにも関わらず、依然として克服すべき重要な課題がいくつかある。

1.4 本研究の目的

1.2 節で提示した、CGH と時空間集光技術を組み合わせた、時空間集光ホログラフィを使用した多光子光刺激における課題の解決について取り組み、単一細胞分解能を有する3次元多光子光刺激技術の確立を行う。本研究では、時空間集光ホログラフィでは困難であった設計通りのパターン生成を実現するため、時空間集光技術に時間多重化マルチライン技術 [60,61]を組み合わせた、時間多重化マルチライン時空間集光技術を光刺激技術へ応用する [62]。時間多重化マルチライン時空間集光技術における透過型エッシェル回折格子を適切に設計し、光軸方向に局在するスポット間の干渉だけでなく、光軸方向に垂直な面内スポット間の干渉も抑制する。それだけでなく、LCOS-SLM 上でのビームを拡げ、局所的な熱による位相変調不良も抑制する。加えて、単一波長計算位相誤差によるパターン歪みの補正方法についても報告する。そして、光刺激応答を最大限観察するための2光子顕微鏡システムを開発する。イメージング光によるオプシンの活性化を防ぐためには、現状レーザーパワーを落としてのイメージングを行うほかないが、その S/N 比の低下が問題となる。そこで、2光子励起蛍光の最大化のため、レーザーパルスの繰り返し周波数を低下させ、イメージング

光と同期した検出を行い、刺激光によって発生する背景光を除去する。また、同期検出において蛍光パルスのピーク点のみをサンプリングすることによって、S/N 比の高い計測を行う。

1.5 本論文の構成

第2章では、本論文に関連した理論について述べる。主に、生体組織解明に用いられてきた蛍光分子ツールの種類と性能について説明し、それらを最大に活用するための技術として、多光子励起技術の各手法の理論について説明する。さらに、それらを元に多光子光刺激技術の種類と課題について説明する。最後に、顕微鏡において重要となる蛍光収集効率の最大化の理論について説明する。

第3章では、第4章と第5章で用いるためのレーザー装置について説明する。光刺激を行うためには、高出力なレーザー装置が必要である。加えてイメージング光と刺激光を1つのレーザーから分離することで、制御が容易になる。また、S/N 比を向上するための検出器ユニットについての説明を行い、イメージングと光刺激のセットアップについて紹介する。加えて、光刺激に採用した CGH の説明を行う。

第4章では、時空間集光ホログラフィの課題を解決するための、時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィについて述べる。光刺激に最適なエッセル回折格子のパラメータについての原理と本手法で用いた設計値や、光刺激において重要となってくる光照射範囲についての理論について説明し、時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィの性能や実験結果について議論する。加えて、時空間集光ホログラフィにおける残留分散の問題についても評価する。

第5章では、多光子イメージングと光刺激における同時制御を行うための同期検出法に必要な時間分離量や、最適な検出帯域を議論、調査する。また、同期検出法におけるシングルサンプリング法の優位性について報告する。加えて、蛍光収集効率の最大化による効果について、*ex vivo* を用いたイメージング結果を示す。最後に、*in vivo* マウスを用いた多光子イメージングと光刺激の同時制御結果について議論する。

最後に、第6章において本研究で開発してきた技術に関する知見と、光遺伝学についての今後の展望を述べ、本論文を締めくくる。

第2章 本研究の基盤となる理論

2.1 光遺伝学生体ツール

2.1.1 Genetically encoded indicators

遺伝子コード型指示薬 (Genetically encoded indicators; GEIs) には、神経活動に伴う生理変化—小胞放出、神経伝達物質濃度、膜電位、細胞内カルシウム動態—を可視化するための蛍光タンパク質がある。これらの指示薬は、特定のニューロンサブタイプや回路構造に基づく選択的な細胞集団の標識が可能である点で有効であるため [63,64]、電極計測や機能的磁気共鳴画像法 (fMRI) では得られない細胞レベルでの時空間的情報を提供できる点で優れている。例えば、特定の遺伝子プロモータを用いた発現制御により、特定の神経伝達物質系、軸索経路、またはシナプス結合をもつ細胞群を選択的に標識・観察できる。この GEIs を安定的に細胞に発現させることで、学習、記憶、脳の発達、あるいは疾患の進行過程において、神経活動のダイナミクスを個体レベルで長期的に追跡することが可能となる [65–67]。

GEIs は、細胞の生理的状态変化を蛍光シグナルとして読みだすためのタンパク質であり、その性能に応じていくつか分類される。代表的なものとして、神経伝達物質指示薬 (Genetically encoded neurotransmitter indicators; GENIs)、pH 指示薬 (Genetically encoded pH indicators; GEPIs)、膜電位指示薬 (Genetically encoded voltage indicators; GEVIs)、およびカルシウム指示薬 (Genetically encoded calcium indicators; GECIs) が挙げられる [68]。

GEPIs は、特定の波長で pH 依存的に輝度を示す蛍光タンパク質である。GEPIs を小胞内に局在させることで、シナプス小胞の放出が高い感度で検出できる [69]。小胞内部は通常 pH~5.5 と酸性であるが、細胞外環境は pH が 7~7.5 程度と中性である。このため、小胞が膜融合を起こすと、小胞内腔が急速に中性化される。この酸性から中性への変化を GEPIs の蛍光変化で捉えられるため、1 回の小胞放出イベントを直接検出できる。典型例として、ecliptic pHluorin [70] や、supercliptic pHluorin (SEP) [71] があり、pH~6.0 以下で蛍光が暗く、中性 pH 付近で明るくなるため、シナプス小胞の融合を ON/OFF のように検出が可能である。しかし、GEPIs を使用した活性化電位の観察では、1 回の活性化で励起できる GEPI 分子が少なすぎるため、自家蛍光 (autofluorescence) に埋もれてしまい、S/N が極端に低い傾向にある。

GENIs は、神経伝達物質を蛍光で感知するセンサーである [72]。最初にグルタミン酸を可視化した GENIs は FILIPE であり、細菌性グルタミン酸トランスポーター GltI のグルタミン酸結合ドメインに CFP と YFP を融合させたものである [73]。代表例は iGluSnFR であり、SEP とメカニズムが似ているが、発色団は環境 pH ではなく、pKa 依存する [74]。一般的に、iGluSnFR は神経活動における検出感度は GEPI よりも高い。グルタミン酸以外にもアセチルコリン、GABA、グリシンなどの神経伝達物質に対する指示薬を設計できる。

GENIs によって神経伝達物質を可視化することは可能であるが、神経伝達物質が伝達されることによって起きる主な作用は膜電位を変化させることである。膜電位は、シナプス入力統合の際のミリ秒スケールでの計算単位であると同時に、軸索を通じて長距離へ情報を伝達する際の基本的なコードでもある。したがって、神経活動を膜電位そのものとして光学的に記録することは、神経情報処理のダイナミクスをより直接的に捉える手段となる。膜電位は興奮性／抑制性シナプス入力による脱分極・過分極によって連続的に変化するだけでなく、イオンチャネルの生化学的調節や膜電位依存的チャネルの状態変化にも影響を受ける [75]。さらに、多数の神経細胞が同期して活動すると、膜電位は神経細胞集団においてシータ波やガンマ波といった協調的に振動活動を起こすこともある。シナプス活動は、スパイク発火を伴わない脱分極を引き起こすこともある。イオンチャネルの活性化とスパイク発火を引き起こすこともある。この活動電位の形状は神経細胞の種類によって異なるが、短いスパイク時間幅を持つ細胞では、一般的に高速スパイク挙動を示し、その速度は 100Hz を超える [76,77]。このような高速な膜電位応答特性を持つ自然由来のタンパク質センサーを実現するため、様々な構造の GEVIs が開発されてきた。代表例としては、VSFP2 族、Butterfly 族、ElectricPk、ArcLight 族、加速型活動電位センサー (ASAP) 族、および電位イメージング用蛍光指示薬レッド 1 (FlicR1)、またオプシンベースのタンパク質などがある [78]。これらの GEVIs はいずれも、神経細胞の電気信号を蛍光変化として読みだすが、その制度は応答キネティクスと膜電位依存性 (線形性) に大きく依存する。活動電位の持続時間は $< 2 \text{ ms}$ と非常に短い時間スケールで発生するため、長い活性化・不活性化キネティクスを持つ GEVIs は、活動電位に対して感度が低くなり、得られる信号にもなまりが生じることで単一のスパイクの正確な検出は困難となる。GEVIs の高速化によって単一活動電位の検出することが可能となる一方、その電位応答持続時間は 2 ms 未満の極めて短い変化となるため、 300 Hz 以上のフレームレートを持つ高速な蛍光顕微鏡が必要となる。また、活動電位は瞬時的であるだけでなく、膜局在しているため得られる蛍光量は非常に小さい。そのため、顕微鏡を高速化しても、膜電位の変化を蛍光で捉えることは容易ではない。このように GEVIs の性能は、センサーの分子特性だけでなく、計測系の高速化能力の両者に制約される。

神経活動を可視化する方法の中で、最も広く利用されているのがカルシウムイメージングである。カルシウムイオン (Ca^{2+}) は、神経伝達物質の放出や膜の脱分極に伴う主要なセカンドメッセンジャーとして働き、NMDA 受容体などの興奮性イオンチャネル受容体では Ca^{2+} を通過させる。また、電位依存性カルシウムチャネルは活動電位伝搬に伴い一過性の Ca^{2+} の流入を引き起こす。そのため、シナプス応答と活動電位の発火をカルシウムイメージングによって検出することが可能である [79]。 Ca^{2+} の流入イベントは、神経伝達物質受容体の開放や活動電位の発生といった瞬時的かつ膜局在のイベントを、より広い体積で、より長い時間持続する化学変化に変換する特徴がある。したがって、検出できる蛍光量は大きくなり、膜電位検出よりもはるかに容易になる。活動電位の持続時間に対して、カルシウムの浸

透速度は非常に遅くその持続時間は 45-100 ms 程度である [79]. そのため、レーザー走査型顕微鏡では、10~30 Hz のフレームレートで観測が可能である. 最初に開発された GECIs は Cameleon であり、2 種類の蛍光体 ECFP と EYFP の間にカルモジュリン (CaM) と M13 ドメインで構成されるカルシウムイオンを認識するリンカーを有している [80]. カルシウムイオンが CaM に結合すると、伸張していたリンカー部分の構造が屈曲するため、ECFP と EYFP が近接し、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) が生じる. FRET における基底輝度は高いため、蛍光強度比の変化量を大きくするためには、より明るい蛍光体が必要となる. FRET ベースではなく、分子内に YFP のみの単一蛍光体を有する GECIs として、Camgaroo が初めて報告されている [81]. Camgaroo は、 Ca^{2+} 結合によって脱プロトン化が起こり、 Ca^{2+} 結合前後で励起スペクトルが変化する. そのため、蛍光強度の変化量として、 Ca^{2+} 濃度の変化量を測定できる. 単一蛍光体を有する GECIs は FRET ベースの GECIs と比べ、大きな応答を示す傾向がある. その後、単一蛍光体の構造変化を利用して開発された GCaMP 族は、最も広く利用され、様々な改良がされてきた. 現在では、GCaMP6 シリーズが一般的に使用され、 Ca^{2+} 濃度変化に対する蛍光強度変化量が有機色素よりも高いため、単一活動電位レベルの応答でも計測が可能となる. 中でも、GCaMP6f は減衰時定数が高速であるため、カルシウムイオンの動態を限りなくリアルタイムで計測できるようになってきている. また、緑色 GECIs だけでなく、非緑色 GECIs (GECO) を用いることで複雑な神経回路の同時記録を多色イメージングによって可能とすることが実証された [82]. 特に、赤色シフト GECIs は、脳組織における吸収と散乱が短波長の GECIs に比べて少なく、深部到達を可能とする. R-GECO は更に最適化され、GCaMP と同様に、R-CaMP2, XCaMP-R など、様々な赤色 GECI の改良がされた [65,83,84]. これらの発展により、多色イメージングだけでなく、光遺伝学オプシンとの共発現、例えば、赤色シフト GECI (R-CaMP2, jRGECO1) と青色シフトオプシン (ChR2, CoChR, and eTsChR) を可能とした.

2.1.2 多光子光遺伝学用オプシン

光遺伝学実験の計画立案において、光遺伝学的アクチュエータの選択は重要である. ほとんどのアクチュエータは天然由来の光受容性もしくは光感受性モジュールであるが、光スイッチング可能な合成有機化合物などが使用されることもある. 本論文では、天然由来の光受容性タンパク質であるオプシンベースのアクチュエータに焦点を当て説明する.

光遺伝学分野において、光受容体のうち、藻類の *Chlamydomonas reinhardtii* 由来からなる ChR2 (channelrhodopsin-2) やその変異体 ChR2-H134R など [10,85] が最も広く利用されている. 図 2.1 のように、微生物型ロドプシンは 7 回膜貫通タンパク質で、レチナールと呼ばれる発色団を内部に持っている. 光子を吸収するとレチナールが all-trans から 13-cis へと異性化し、その構造変化がチャネル開口を引き起こす. これにより、細胞外から陽イオンが細胞内へ流入し、神経細胞膜を脱分極させるため、活動電位の発火が誘起される. 自然界においては、ChR2 によって藻類の遊泳方向を制御するなど、光センサーの役割として存在し

ている．ChR2 を神経細胞に発現させることで，光で神経活動を意図的に活性化させることが報告されている [13]．ChRs は興奮性に働く陽イオン選択的チャネルロドプシン（Cation channelrhodopsins, CCRs）と抑制性に働く陰イオン選択的チャネルロドプシン（Anion channelrhodopsins, ACRs）の 2 種類に分類される．CCRs は Na^+ や H^+ などの複数の陽イオンを伝導するが， Ca^{2+} は通過させない．そのため，CCRs の光励起によって，脱分極した神経細胞が発火し，電位依存性 Ca^{2+} チャネルが開く様子を， Ca^{2+} 濃度変化として測定することで刺激応答の観察が可能となる．

ChR2 はイオンを通過させることで，膜電位を脱分極させるが，単一のチャネルコンダクタンスは 40 fS 程度 [27] しかないため，単一の ChR2 を通過するイオン数は極めて小さい．そのため，単一チャネルの開閉だけで活動電位を誘発することができない．したがって，光誘導スパイクの生成には，十分な数のチャネルが細胞膜上に発現していることが不可欠である．また，スパイクの生成は，単一チャネルの開閉寿命に時間的に制限され，その寿命は一般的に 10 ms 程度と比較的長い．近年，光感受性をそのままにしながら，ChR を改変した変異体である Chronos や ChETA [18,19,51] は，光依存性チャネルの動態を大幅に改善され，サブミリ秒での制御が可能となった [37]．一方で，サブミリ秒で選択的に複数の神経細胞の制御を実現するためには，サブミリ秒以下の時間精度で複数のオプシンを光刺激可能な光刺激技術が必要になる．

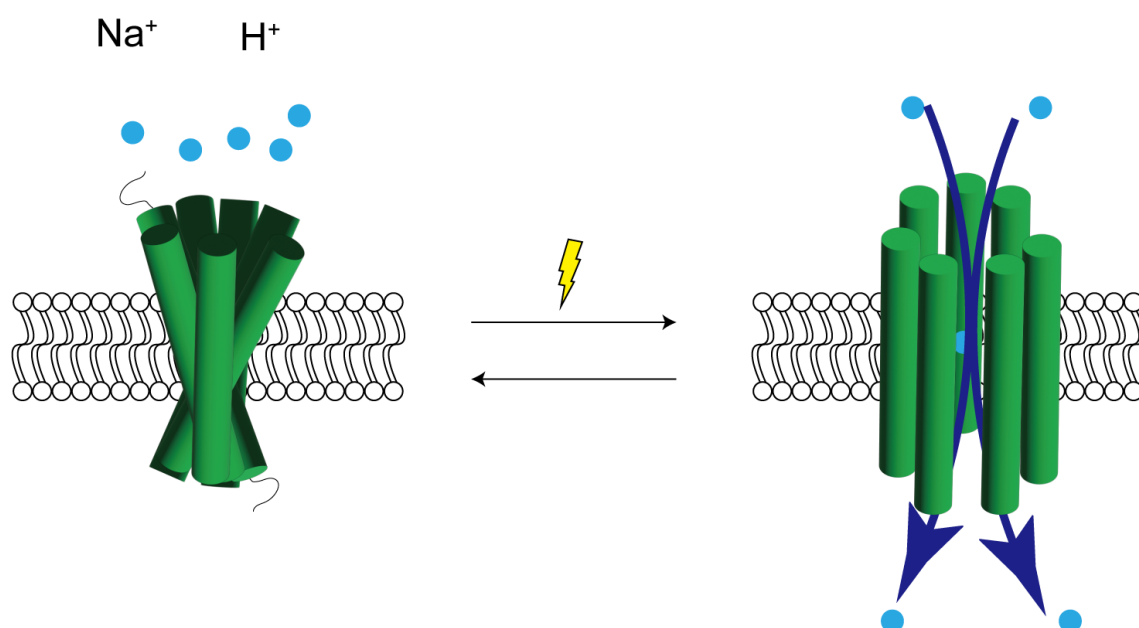


図 2.1. チャネルロドプシン模式図．（左）：光活性化前，（右）：光活性化後

2.2 超短パルスレーザーの基礎

多光子励起のような非線形光学現象を誘起するためには，極めて高い光子密度，すなわち高い光強度を有する励起光が必要となる．光は粒子性を持つと同時に，時空間的な電磁場の

変位が伝播する波動性を兼ね備えており、重ね合わせの性質を示す。可干渉性の高い光、たとえばレーザー光では、この波動の重ね合わせによる干渉効果が顕著になる。図 2.2 (a) のように、連続波 (CW) レーザーなどをレンズなどで空間的に集光すると、異なる空間周波数成分を持つ光波が重ね合わさり、極小のスポットが形成される。このスポットでは光子密度が空間的に集中し、電場強度が非常に高くなる。しかし、時間的にはレーザーの光子密度は常に一定である。一方、パルスレーザーは時間周波数 (スペクトル成分) の異なる光を重ね合わせることで生成でき、時間的にも光子密度を増大させられる。これにより、図 2.2 (b) のように、空間だけでなく時間的にも光子密度が増大させることができ、瞬間的に電場強度が高くなる光が得られる。また、パルス幅が短いほど光子密度は増大する。このことから、超短パルス光の利用は非線形光学現象を引き起こすのに極めて有利である。

フェムト秒レーザーのような極めて短いパルス光を発生させるためには、一般的に受動モード同期法 [86,87] が用いられる。モード同期では、レーザー共振器内の複数の縦モードを位相的に同期させることで、時間的に短いパルス列が生成される。パルス幅は、このとき同期されるモードの本数、すなわちレーザーの利得帯域幅に依存する。時間領域と周波数領域の電場は、互いにフーリエ変換の関係にあるため、フーリエ変換限界パルスの半値全幅 (FWHM) (Δt) とスペクトル幅 (FWHM) ($\Delta \nu$) には(2.2.1) 式の不確定性関係がある。

$$\Delta t \Delta \nu \geq k \text{ (constant)} \quad (2.2.1)$$

ここで、 k はパルス波形に依存した 1 に近い定数であり、ガウス形パルスでは $k = 0.441$ である。このことから、短パルス化には広いスペクトル広がりをもつことが必要であることを示している。

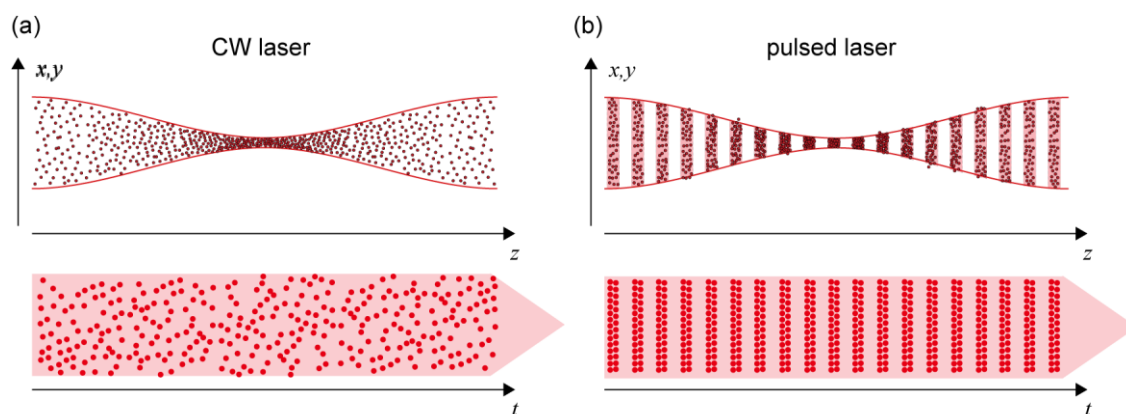


図 2.2. 連続波 (CW) レーザーとパルスレーザーによる (上) 空間的光子密度, (下) 時間的光子密度

2.2.1 モード同期による超短パルスレーザーの生成

超短パルスレーザーは、異なる周波数の波がある特定のタイミングにおいて同位相になるように重ね合わせることで生成される。この時、特定のタイミングで同位相になる周波数

成分が多いほど、強め合いのピークは鋭くなり、パルス幅は短くなる（図 2.3）。したがって、フェムト秒レーザーなどの超短パルスレーザーは広いスペクトル成分を有する。広いスペクトルにわたる各周波数成分は縦モードと呼ばれ、一定の間隔で生成される。これらの複数の縦モード間の相対位相を制御し、同位相にすることをモード同期 [87–89] と呼ぶ。受動モード同期の具体的な例は様々あるが、ファイバーレーザーによる受動モード同期は、全てファイバーからなる非線形効果を利用して超短パルスを発生する方法である。可飽和吸収体を用いたモード同期や非線形偏波回転によるモード同期 [90], 非線形ファイバーループミラーによるモード同期 [91], 非線形増幅ループミラー [92–94] などがある。

ここで、レーザー共振器の縦モード数を N 、縦モード次数を m 、モード間隔を $\Delta\omega$ 、中心角周波数を ω_0 、角周波数の振動の振幅を E_m 、角周波数の初期位相を ϕ_m とすると、多モードの光電場を次のように表すことが出来る。

$$E(t) = \sum_{m=-(N-1)/2}^{(N-1)/2} E_m e^{-i\{(\omega_0+m\Delta\omega)t+\phi_m\}} \quad (2.2.2)$$

ここで、簡単化のため各振動の振幅を E_0 とし、モード同期によって初期位相 $\phi_m = 0$ となるように調整したときのことを考えると、(2.2.2) 式の複素電場は、

$$\begin{aligned} E(t) &= \sum_{m=-(N-1)/2}^{(N-1)/2} E_0 e^{-i\{(\omega_0+m\Delta\omega)t\}} \\ &= E_0 e^{-i\omega_0 t} \sum_{m=-(N-1)/2}^{(N-1)/2} e^{-im\Delta\omega t} \\ &= E_0 e^{-i\omega_0 t} \frac{e^{i\frac{N\Delta\omega}{2}t} - e^{-i\frac{N\Delta\omega}{2}t}}{e^{i\frac{\Delta\omega}{2}t} - e^{-i\frac{\Delta\omega}{2}t}} \\ &= E_0 \frac{\sin(N\Delta\omega t/2)}{\sin(\Delta\omega t/2)} e^{-i\omega_0 t} \end{aligned} \quad (2.2.3)$$

となる。(2.2.3) 式より、周期 $T=2\pi/\Delta\omega$ (n は整数) において最大値を取り、ピークにおける振幅は単一モードの N 倍になることが分かる。各パルスのパルス幅 Δt は、周期 T の $1/N$ 倍であるから、

$$\begin{aligned} \Delta t &= \frac{T}{N} = \frac{2\pi}{N\Delta\omega} = \frac{1}{\Delta\nu} \\ \therefore \Delta\omega &= 2\pi\Delta\nu \end{aligned} \quad (2.2.4)$$

ここで、 $\Delta\nu$ は縦モード間の周波数間隔である。したがって、(2.2.1) 式と一致する。

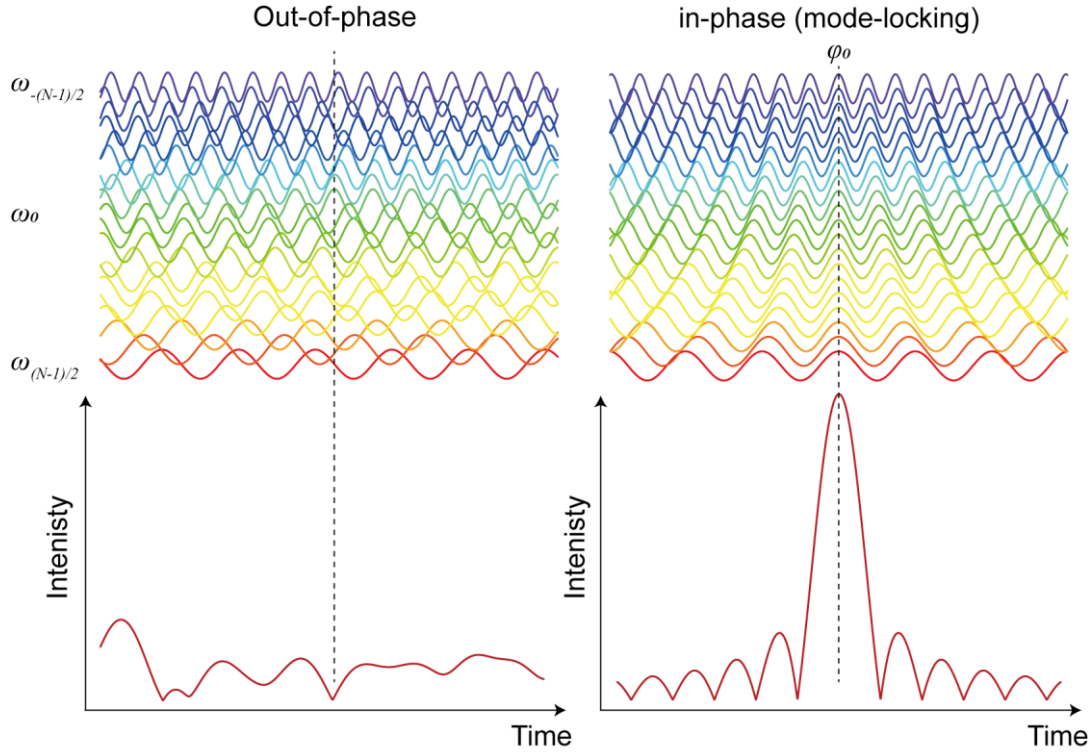


図 2.3. 周波数領域におけるモード同期の概要図. (上) 各モードにおける電場の振幅. (下) 全モードを足した電場振幅. ((左): 各モードの位相が揃っていない場合. (右): 各モードの位相が揃った場合 (モード同期))

2.2.2 分散と分散補償

物質は各周波数に依存した屈折率を有しており, これを分散と呼ぶ. 光は通過する媒質の分散の影響を受け, 各周波数成分において位相がずれていく.

ここで, 媒質の屈折率を $n(\omega)$, 初期位相を ϕ_0 としたとき角周波数 ω の光が距離 Δl 進んだとき, 光が物質を伝播したとき, 物質伝播後の角周波数 ω における光の位相 $\phi(\omega)$ は,

$$\phi(\omega) = \phi_0 + \omega n(\omega) \frac{\Delta l}{c} \quad (2.2.5)$$

となる. (2.2.5) 式を中心角周波数 ω_0 において, Taylor 展開すると次式のように表せる.

$$\phi(\omega) = \phi_0 + \frac{d\phi(\omega)}{d\omega}(\omega - \omega_0) + \frac{d^2\phi(\omega)}{d\omega^2}(\omega - \omega_0)^2 + \frac{d^3\phi(\omega)}{d\omega^3}(\omega - \omega_0)^3 + \dots \quad (2.2.6)$$

ここで, 位相の角周波数による 2 階微分 $d^2\phi/d\omega^2$ を 2 次分散, あるいは群遅延分散(Group delay dispersion : GDD) と呼び, 3 階微分 $d^3\phi/d\omega^3$ を 3 次分散(Third order dispersion : TOD) と呼ぶ. さらに高い次数の係数は 4 次, 5 次分散などのように呼ばれる. 試料内の所望の位置でパルスのピーク強度を最大にするためには, そのパルスが光路中の媒質などから与え

られた分散の合計と同じ大きさの逆の符号の分散を与える必要がある．このように，任意に逆符号の分散を与えることを分散補償と呼ぶ．

パルスのピーク強度に対する影響が大きいのは低次の分散であるため，分散補償の対象となるのは多くの場合は GDD, TOD といった低次の分散である．レンズ等の透過光学素子の媒質は，可視光領域や近赤外光領域においては正常分散媒質であり，GDD と TOD は必ず正となる．従って，負の分散を与えられるような光学系を組む必要がある．負の分散を与えられる光学素子の例として，回折格子，プリズム，特殊な多層膜ミラーを用いたものがよく使用される．プリズムを用いる場合，図 2.4 (a) のように，2つのプリズムを対応する面が平行になるように配置し，波長ごとの光路長を変えることで，GDD と TOD を与える [95]．プリズム間距離によっては材料分散の寄与によって正の GDD を与えることが可能であるが，基本的には GDD と TOD は負の分散を与えることができ，パルス圧縮が可能である．しかし，角度分散は材料で決まるので与えられる負分散の量は小さくなってしまう．回折格子を使用した分散補償の方法は大きく分けて Martinez 型 [96], Öffner 型 [97], Treacy 型 [98] 光学系の 3 種類存在する (図 2.4 (b))．Martinez 型は 2つの回折格子と 2つのレンズ，折り返し用の反射鏡で構成され，1つ目の回折格子と共役な位置から前後させることで，(I) 正の GDD と負の TOD，あるいは (II) 負の GDD と正の TOD を与えることができる．ただし，レンズを使用するため，材料分散とレンズ収差による空間分散が生じる可能性がある．Öffner 型では凹面鏡と凸面鏡を用いるため，収差が小さく，一般的な配置では GDD は正，TOD は負となる．この特性から，主にパルス伸長器として用いられる．Treacy 型は 2枚の回折格子対によって負の GDD が与えられ，パルス圧縮器として用いられるが，正の TOD が与えられることに注意する必要がある．また，像転送用の光学系が不要であり，高エネルギーのパルスに適している特徴がある．補償可能な 2 次分散量は，プリズム対よりも回折格子対の方が大きい．そのため，用途によって使い分けが必要となる．3つ目の特殊な多層膜ミラーは，チャープミラーと呼ばれ波長ごとに反射される深さを変えることで，原理的には任意の分散を与えることができるものである．その代わり，1回の反射によって与えられる分散量は極めて小さく，且つ使用可能な波長帯域が狭い．

以上に上げた光学素子は，どれも低次の分散の補償を行うためのものである．一方で，光路を伝播したパルスには高次の分散も与えられる．この高次の分散量が小さい場合，パルスに与える影響は無視できるほどだが，大きい場合はこれらは無視できなくなる．また，後述するチャープパルス増幅 (CPA) によって，自己位相変調 (SPM) が発生する，もしくは意図的に発生させるときがある．SPM によって生じる複雑なスペクトル位相歪みは，これらの素子では補償ができない．そこで補償に用いられる装置として広く使用されているのが 4-f 波形成形器 [99]である．パルスが持つスペクトル位相に対して，任意の変調を加えることで高次の分散を補償することができる．

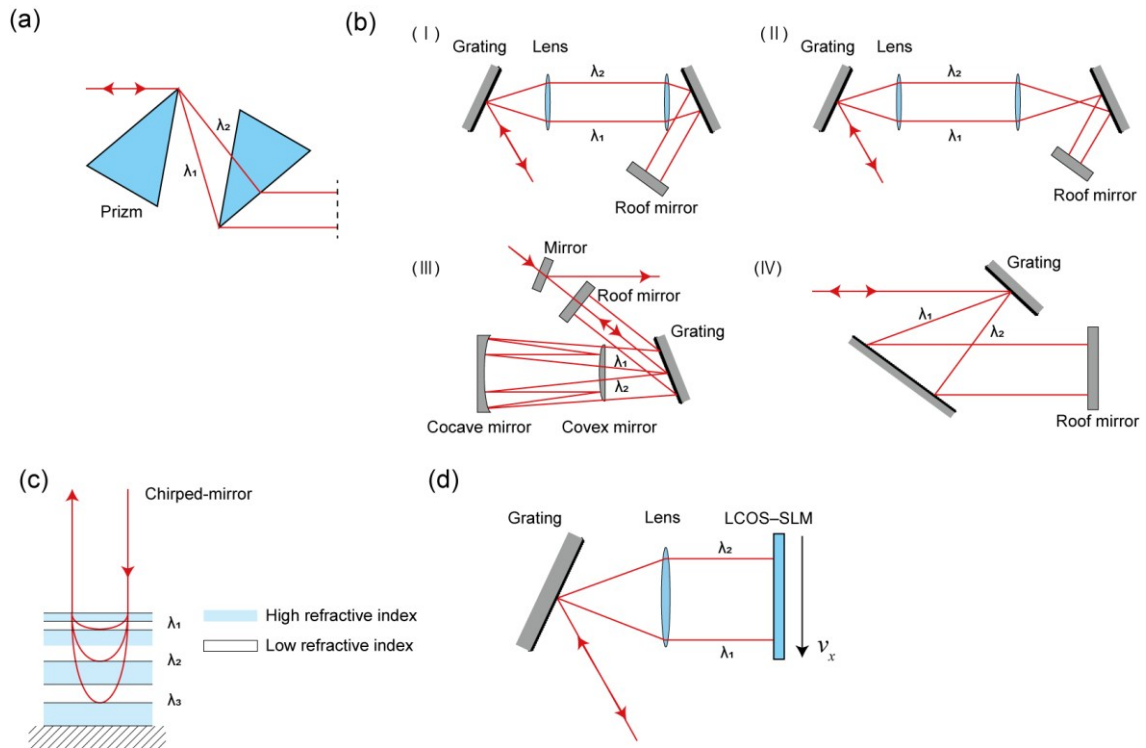


図 2.4. 分散補償の模式図. (a) プリズムを用いた分散補償. 点線は鏡面对称軸.

(b) 回折格子を用いた分散補償. I : Martinez パルス伸長型, II : Martinez パルス圧縮型, III : Öffner 型, IV : Treacy 型. (c) チャープミラーを用いた分散補償. (d) 4-f 波形成形器を用いた分散補償.

2.2.3 チャープパルス増幅

ピーク強度が高いレーザーを獲得するためには、発振器から出力された光を外部で増幅をすることが多い。しかしながら、外部増幅器内において、ピーク強度が極端に高くなると、利得媒質内で自己位相変調などの非線形光学現象を引き起こしてしまう。これを防ぐため、増幅できるレーザーパワーは制限されてしまう。この問題を解決するために作り出された手法が、チャープパルス増幅 (CPA) [100]である。CPA の概念図を図 2.5 に示す。この手法では、発振器から出力されたパルスに予め大きな分散を与え周波数チャープさせる。それにより、パルス幅が引き延ばされるため、ピーク強度を抑えることができ、増幅器内における閾値を超えずにパルスエネルギーを増幅することができる。CPA では、利得の大きな周波数成分が優先的に増幅されるため、スペクトルの狭窄化が起こり元のパルス幅に戻らないことがある。そこで、CPA 後に SPM 等でスペクトルを広げてから、パルス圧縮することで、元のパルス幅を短くする手法を取る [101,102]。これによって目標となる光ピーク強度をもつパルスを獲得できる。

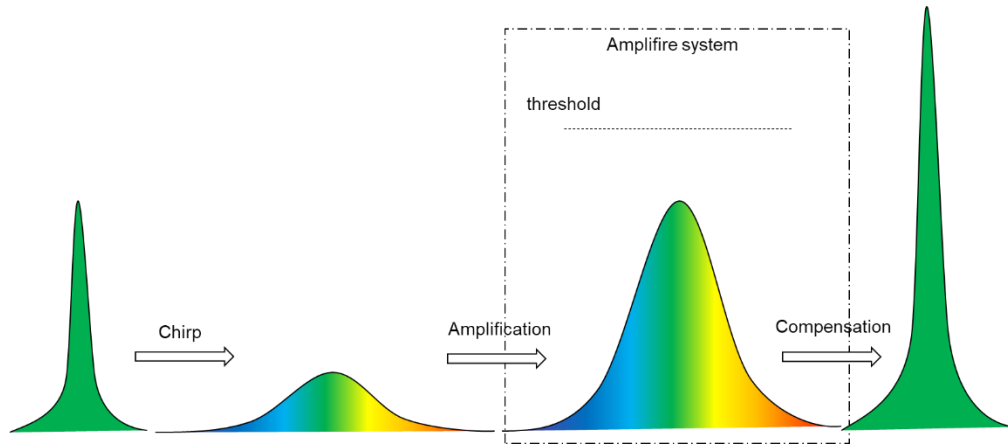


図 2.5. チャープパルス増幅 (CPA) の概要図

2.3 多光子励起技術

2.3.1 一般的な多光子励起

一般的に、原子や分子を構成している電子のエネルギーレベルは飛び飛びの値を取っており、分子が光を吸収する前の状態では電子は基底準位 S_0 にある。励起準位 S_0 と基底準位 S_1 とのエネルギー差に対応したエネルギーを持つ光子が物質に入射することで、電子が励起準位 S_1 に遷移する確率が生じる。この励起された電子は、緩和する際にエネルギー準位の差に対応したエネルギーを持つ光子を放出する (図 2.6 (a))。一方、図 2.6 (b) に示すように、2光子励起法では蛍光分子の励起に必要なエネルギーを、二つの低エネルギー光子の同時吸収によって達成する。したがって吸収される波長と、放射される波長の関係が約2倍になる。ここで、瞬時の照射強度 $I_0(t)$ における、分子当たり単位時間当たりの吸収光子数は以下の式より得られる [103–105]。

$$n_a^{2p}(t) = \left[\frac{\lambda}{\hbar c} \right]^2 \delta_{2p} g I_0(t)^2 \quad (2.3.1)$$

ここで、 δ_{2p} は波長 λ における蛍光発色団の二光子吸収断面積、 $\hbar$ はプランク定数、 c は光速である。また、 g は照射源における二次の時間コヒーレンスであり、レーザーのパルス幅 τ を用いて以下の関係が成り立つ。

$$g = \tau \frac{I_0^2(t)}{I_0(t)^2} \quad (2.3.2)$$

従って CW レーザーの場合、 $g = 1$ 、パルスレーザーの場合は $g = g_p / \tau f$ となる。また、このとき g_p はパルス形状を考慮した無次元量比であり [106]、以下のように書ける。

$$g_p = \tau \frac{\int_{-T/2}^{T/2} I_0^2(t) dt}{\left[\int_{-T/2}^{T/2} I_0(t) dt \right]^2}, \quad (2.3.3)$$

ここで、 $T = 1/f$ はパルスの周期である．ガウシアンパルスの場合、 $g_p = 0.66$ と与えられている．(2.3.1)–(2.3.3)式より、分子当たり単位時間当たりの吸収光子数は、「2光子吸収断面積 δ_{2p} 」と「瞬時光強度 $I(t)$ の2乗」に比例する．従って、励起効率を高めるためには、吸収断面積の大きい蛍光分子を使用するか、ピーク強度を高くすることが有効である．広く使用されている蛍光体や蛍光たんぱく質固有の2光子吸収断面積は様々なところで調査されており [103,107–110], おおむね $10^{-50} \text{cm}^4 \text{s/photon}$ 付近で、前後2桁ほどの違いがある．一方、二光子励起信号は、(2.3.3)式で示した二次コヒーレンス g に強く依存し、フェムト秒レーザーのようなパルス光では CW 光に比べて 10^5 倍ほど大きくなる．このことから、CW レーザーで同等の蛍光強度を得るためには、桁違いに大きな平均出力が必要となる．

2光子吸収過程はピーク強度に非線形に依存する特性上、レーザー光を空間的に集光することによって、3次元的に2光子励起分布を局所化することが可能である．(2.3.1)式から、2光子励起による信号 S_e は瞬時照射強度 $I_0(r, z, t)$ より以下のように表される [105].

$$S_e(r, z, t) \propto \frac{1}{\tau f} I_0^2(r, z, t) \quad (2.3.4)$$

ここで、 $r = \sqrt{x^2 + y^2}$, とおいた．対物レンズの開口よりも小さいビームウェイストを持つコリメート入射ガウスビームの場合、対物レンズの焦点面近傍における強度分布は以下のように近似ができる

$$S_e(r, z, t) \propto \frac{1}{\tau f} \left[\frac{P(t)}{\pi w^2(z)} e^{-\frac{2r^2}{w^2(z)}} \right]^2 \quad (2.3.5)$$

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{\Delta z}{z_R} \right)^2} \quad (2.3.6)$$

$$z_R = \frac{\pi w_0^2}{\lambda} \quad (2.3.7)$$

ここで、 P は入射パワー、 $w_0 \approx \lambda/2NA$ は焦点面におけるビームウェイスト、 z_R は集光ビームにおけるレイリー長を示している．半値幅で定義する光軸方向の分解能は通常 $\Delta z = 2z_R$ で得られる．また、光学断層性能 [111] (オプティカルセクションング：焦点面から光軸方向に離れた各平面における光強度の積算値の z 依存性) は $1/\pi w^2(z)$ に比例し、 $\Delta z > z_R$ の範囲では $\sim 1/\Delta z^2$ で減衰していく．このように、2光子励起の性能を顕微鏡へ応用すれば、光学断層像を撮影可能となったり、光刺激へ応用すれば単一細胞への刺激も可能となったりと、様々な利点がある．このことから、光学断層性能はビームウェイストの2乗に反比例、つまり NA の2乗に比例する．時間分解能向上や、照射範囲を拡大のために、低 NA の対物

レンズを用いて面内方向のスポット径を大きくすると、同時に二光子光学断層撮影性能は低下してしまうという問題が生じる。

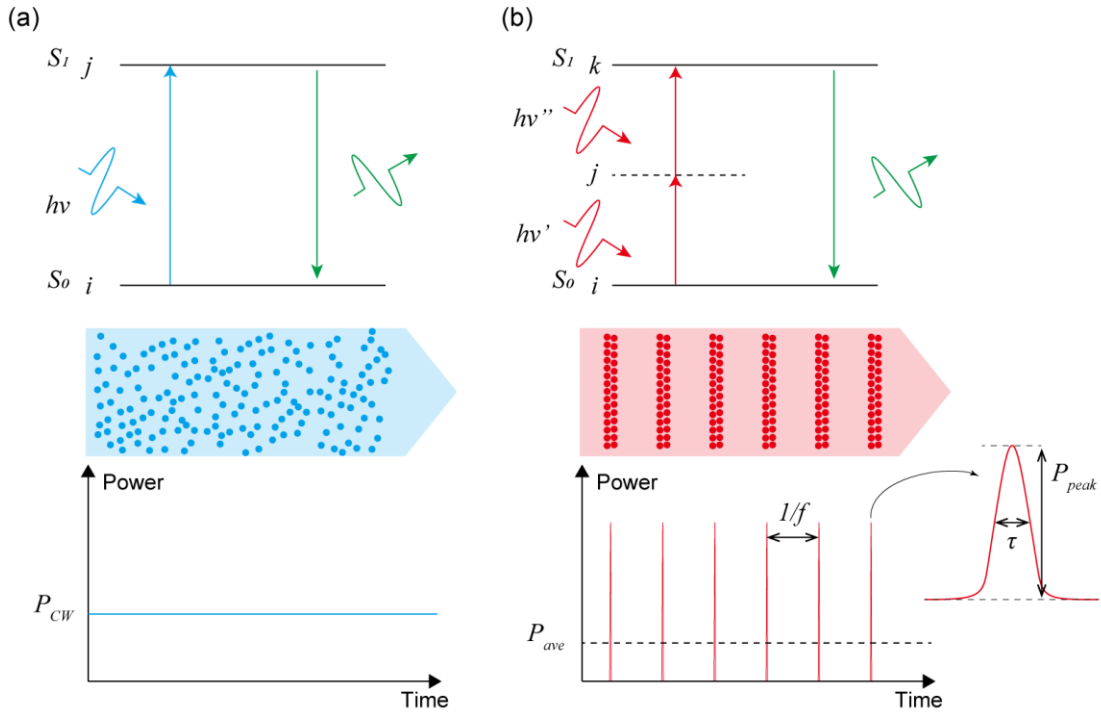


図 2.6. CW 光による 1 光子吸収過程 (a) と超短パルスレーザーによる 2 光子吸収過程 (b) の模式図. パルス幅 τ , 繰り返し周波数 f , ピークパワー $P_{peak} = E/\tau$, パルスエネルギー E , 平均パワー $P_{ave} = Ef$.

2.3.2 広視野多光子励起：時空間集光法

(2.3.5) 式に示したように、2 光子励起信号はパルス幅 τ に反比例する。この原理を応用し、伝播と共にパルス幅を変化させることで、スポット径を拡大したまま光軸方向の分解能を確保する方法が時空間集光法である [39,40]。図 2.7 に示すように、時空間集光法は、試料面と共役な位置に回折格子が配置された $4f$ 光学系によって構成される。フェムト秒パルスが回折格子に入射すると角度分散が与えられフェムト秒パルス構成する各スペクトルが空間的に分離する。これにより、局所的なバンド幅は伝播とともに狭くなり、対物レンズの瞳面において最小になる。これらのスペクトルは対物レンズによって再び集光され、焦点面でのみ全てのスペクトルが重なり、元のフェムト秒パルスが再生される。スポット径は単色光のビーム径によって決まり、集光点近傍において変化しない。したがって、2 光子励起信号はパルス幅にのみ依存し、焦点面近傍に局所化される。この単色光のビーム径は、回折格子への入射ビーム径と回折格子から焦点面までの倍率で決定される。この関係から焦点面のビーム径を拡げることで、広視野でありながら光学断層性能を有した広視野励起が可能となる。

このような構成で得られるパルス幅は以下のように表すことができる [50,105,112]。

$$\tau(z) = \frac{2\sqrt{2\ln 2}}{\Omega} \sqrt{1 + \frac{z_M}{z_B(\Delta z^2 + z_M z_R)} \left\{ \Delta z^2 - \frac{2z_M z_R \Delta z \beta \Omega^2}{(z_M^2 + \Delta z^2)} + \frac{z_M z_R}{z_B} \frac{(\beta \Omega^2)^2}{(z_M^2 + \Delta z^2)} \right\}} \quad (2.3.8)$$

ここで, $z_M = \frac{2f_{OB}^2}{k_0 s^2}$, $z_R = \frac{2f_{OB}^2}{k_0(s^2 + \alpha^2 \Omega^2)}$, $z_B = \frac{2f_{OB}^2}{k_0 \alpha^2 \Omega^2}$ と置いており, それぞれ空間のレイリー長, 時空間レイリー長, ビームの空間チャープレイリー長を示している. また, $\sqrt{2\ln 2}s$ は瞳面における単一色ビームの FWHM であり, k_0 は中心周波数における波数, α は回折格子の格子定数とコリメートレンズの焦点距離の比例定数, f_{OB} は対物レンズの焦点距離, Ω はバンド幅の FWHM, 2β は系における GDD を表した. $\alpha\Omega$ は対物レンズ後方焦点面における空間チャープを表現している. 通常, 瞳面における単一色ビーム径 s は十分に小さく, 瞳面における空間チャープ $\alpha^2 \Omega^2$ に比べて十分小さい $s \ll \alpha^2 \Omega^2$ の条件が成り立つので, $z_R \approx z_B$, $z_M \gg z_R$ の関係が成り立ち, (2.3.8)式は以下のように書き直せる.

$$\tau(z) = \frac{2\sqrt{2\ln 2}}{\Omega} \sqrt{\left(1 + \frac{\beta \Omega^2 \Delta z}{z_M}\right)^2 + \left(\frac{\Delta z + \beta \Omega^2 z_R}{z_R}\right)^2} \quad (2.3.9)$$

従って, (2.3.4)式のパルス幅と 2 光子励起分布の関係式より, 時空間集光法における焦点面近傍の 2 光子励起分布は

$$S_e(r, z, t) \propto \frac{1}{\tau_0 f} \left[\left(1 + \frac{\beta \Omega^2 \Delta z}{z_M}\right)^2 + \left(\frac{\Delta z + \beta \Omega^2 z_R}{z_R}\right)^2 \right]^{-\frac{1}{2}} P(t)^2 \quad (2.3.10)$$

となる. ここで, $\tau_0 = 2\sqrt{2\ln 2}/\Omega$ は $\Delta z + \beta \Omega^2 z_R = 0$ 次のパルス幅である. この関係から, 系に GDD が加えられると, 最短パルス幅の光軸位置がシフトすることを示している. また, 焦点面近傍においてスポット径 w は常に一定であり 2 光子励起分布は z に依存しないことに注目したい. また, 系における GDD が 0 のとき, (2.3.10) 式は以下のように表すことができる.

$$S_e(r, z, t) \propto \frac{1}{\tau_0 f} \left[1 + \frac{\Delta z^2}{z_R^2} \right]^{-\frac{1}{2}} P(t)^2 \quad (2.3.11)$$

したがって, 光軸方向の分解能は, FWHM で $\Delta z = 2\sqrt{3}z_R$ と得られ, 光学断層性能は $1/\tau(z)$ に比例し, $\Delta z > z_R$ の範囲では $\sim 1/\Delta z$ で減衰していく. よって, 時空間集光法における光学断層性能の最大性能 ($f_{OB}^2/\alpha^2 \Omega^2$ の比が最小になるとき) は, 2.3 節で示した, 空間集光における光学断層性能の最大性能時 (回折限界スポット時: $w_0 \approx \lambda/2NA$) と比べると悪く, ライン集光時における光学断層性能と等しくなる [113].

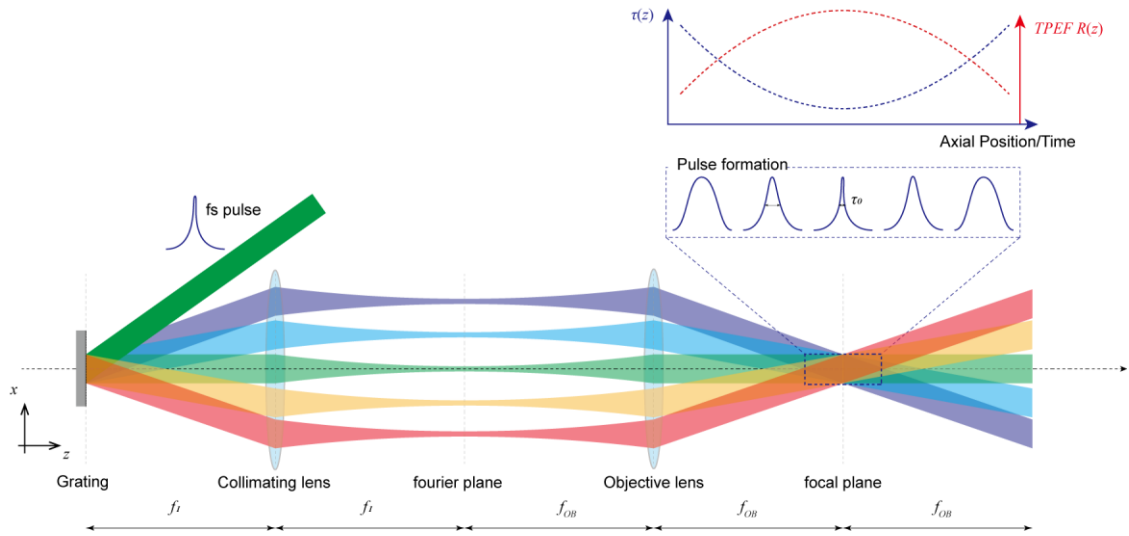


図 2.7. 時空間集光法における模式図. 焦点面においてのみ最短パルスが再生される.

2.3.3 広視野多光子励起：時間多重化マルチライン時空間集光法

時空間集光の分解能を向上させるためには、分光方向 (x) と垂直な y 方向において空間集光を行うライン時空間集光が有効であるが、得られるスポット径は楕円であり、時空間集光と同じスポットを得るには1軸方向にレーザー走査が必要となる. また、同スポット内でライン数を複数個作成するマルチライン時空間集光 [114]を用いれば、ライン数分の時間分解能が向上できるが、焦点面外でのライン間の干渉によって光学断層性能が低下する. 時間分解能を低下させず、焦点面外の干渉を抑制させる技術として、時間多重化マルチライン集光法がある [60,61]. 時間多重化マルチライン集光法は、エシャロンやエッシェル回折格子、カスケードビームスプリッタアレイや仮想イメージフェーズアレイ (VIPA) 等の時間遅延素子などを用いることで実現できるが、ここでは透過型エッシェル回折格子を用いた時間多重化ライン集光法について説明する. 図 2.8 (a) に時間多重化マルチライン法の模式図を示す. エッシェル回折格子の階段幅を a 、一段当たりの厚みを d としたとき、エッシェル回折格子に入射したフェムト秒パルスは、 y 方向において離散的な時間遅延が与えられる. 隣の段を通過したパルスとの時間差 Δt は、

$$\Delta t = \frac{d(n-1)}{c} \quad (2.3.12)$$

と得られる. このとき、エッシェル回折格子の媒質が持つ屈折率を n とした. このようにして与えられた時間遅延量がパルス幅よりも大きい場合、隣の段を通過したパルスは空間コヒーレンスが低下し、パルスが y 方向に分割される. 分割された各パルスが有する y 方向のビーム幅は階段幅 a と等しくなる. このとき、階段幅 a が元のビームよりも十分小さければ、スリットを通過したとき同様に拡がりながら回折する. この拡散したパルスは $4f$ 光学系を介して最終的に対物レンズによってライン集光され、結像倍率 M で焦点面にラインが

結像される．このとき，焦点面における幅は a/M となる．ライン集光による光学断層性能を最大にするためには，以下の条件を満たす階段幅 a が必要となる．

$$\frac{a}{M} \leq 2s \quad (2.3.13)$$

ここで，回折限界のスポット径を s とした．分割された各パルスは，焦点面で隙間を作ることなく隣のパルスに並ぶため，レーザー走査をする必要がなく，時間分解能の低下が起きない．

この時間多重化マルチライン集光技術を時空間集光法に応用した時間多重化マルチライン時空間集光顕微鏡 [115–117] が開発されている．図 2.8 (b) のように，時空間集光法の系に $4f$ 光学系を追加し，エッシエル回折格子をブレード回折格子と焦点面に共役な位置に配置する．ブレード回折格子とエッシエル回折格子の溝方向は垂直になっており，ブレード回折格子の溝方向を x 方向，エッシエル回折格子の溝方向を y 方向としている． x 方向では，ブレード回折格子による時空間集光が行われ， y 方向では時間多重化マルチライン集光が行われる．これにより時空間集光の欠点である光学断層性能の低さを，時間分解能を低下させることなく時間多重化マルチライン集光で補える．時空間集光ではパルス幅が伝播とともに変化するため，エッシエル回折格子の階段幅 a 厚み d のパラメータは (2.3.12), (2.3.13) 式で単純に求めることができないが，パラメータ制御については 4.1 節で後述する．条件を満たした状態における 2 光子励起信号は，ライン時空間集光法と同等になるため以下のように与えられる [116]，

$$S_e(r, z, t) \propto \frac{1}{\tau_0 f} \left[1 + \frac{\Delta z^2}{z_{Rx}^2} \right]^{-\frac{1}{2}} \left[1 + \frac{\Delta z^2}{z_{Ry}^2} \right]^{-\frac{1}{2}} P(t)^2 \quad (2.3.14)$$

ここで， z_{Rx}, z_{Ry} はそれぞれ x 方向， y 方向におけるレイリー長であり，時空間集光法による分光の性能と時間多重マルチライン化によるライン集光の性能で決定される．図 2.8 (b) のように， x, y 両方向において対物レンズの瞳を等しく満たしているとき， $z_{Rx} = z_{Ry} = z_R$ が成り立つから (2.3.14) 式は

$$S_e(r, z, t) \propto \frac{1}{\tau_0 f} \frac{1}{1 + (\Delta z/z_R)^2} P(t)^2 \quad (2.3.15)$$

と求められる．このとき，光軸方向の分解能は，FWMH で $\Delta z = 2z_R$ となり，時空間集光法と比べて $\sqrt{3}$ 倍向上する．また光学断層性能は空間集光と同様で， $\Delta z > z_R$ の範囲では $\sim 1/\Delta z^2$ で減衰していく．

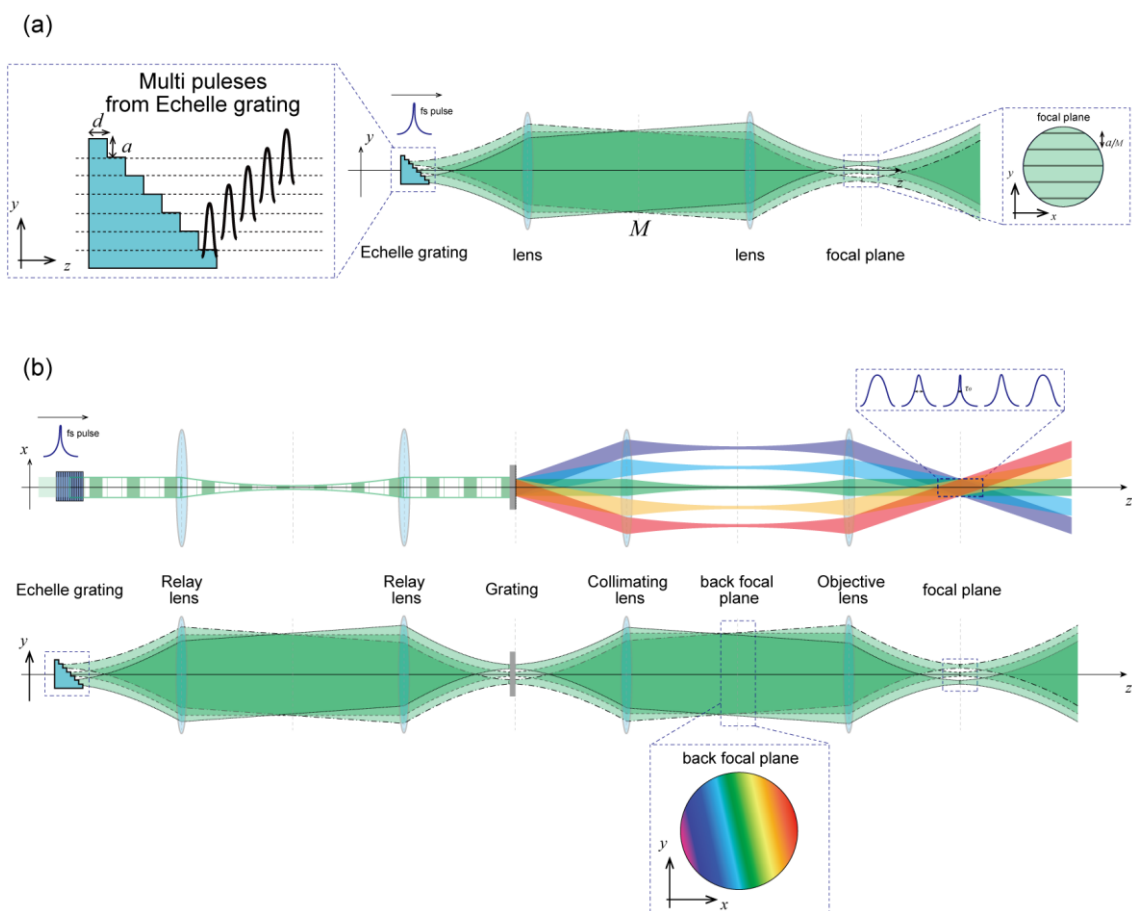


図 2.8. (a) 時間多重化マルチライン法の原理と模式図. a :エッセル回折格子の階段幅, d :厚み, M :焦点面からエッセル回折格子までの結像倍率. (b) 時間多重化マルチライン時空間集光法の模式図. x 方向で回折格子による分光, y 方向でエッセル回折格子による時間多重化を実現. (y 方向におけるビームは連続する各段からのビームのうち一部のみを間引いて描画)

2.3.4 各手法の比較

2.3.1~2.3.3 項において3つの多光子励起手法を述べた. 図 2.9 に各手法の概要図をまとめた. 通常的空間集光では, 対物レンズの後方焦点面において瞳径を満たし, 対物レンズの焦点面において空間的にきつく集光されるため, スポット径は $1/NA$ に比例, 光軸方向分解能は $1/NA^2$ に比例する. スポット径を大きくするために低 NA を使用すれば, 光軸方向の分解能は極端に悪くなるため高 NA の対物レンズを用いて, 焦点面上での走査が必要である. 時空間集光の場合, スポット径は回折格子上のビーム径と対物レンズ焦点面からの倍率で決まる. スポット径が NA に依存しないため, 走査不要の広視野照明が可能となる. しかし, 対物レンズの後方焦点面において, 角度分散方向のみ瞳径を満たす状態であるため, 光軸方向の分解能は $1/NA$ に比例に留まる. したがってその光学断層性能は空間集光に劣る. 一方で, 時間多重化マルチライン時空間集光では, スポット径はエッセル回折格子のビー

ム径と対物レンズの焦点面からの倍率で決まる．光軸方向の分解能は，対物レンズ後方焦点面において x, y 方向共に瞳径を満たすため， $1/NA^2$ で決まる．したがって，広視野照明で空間集光と同等の光学断層性能が得られる．

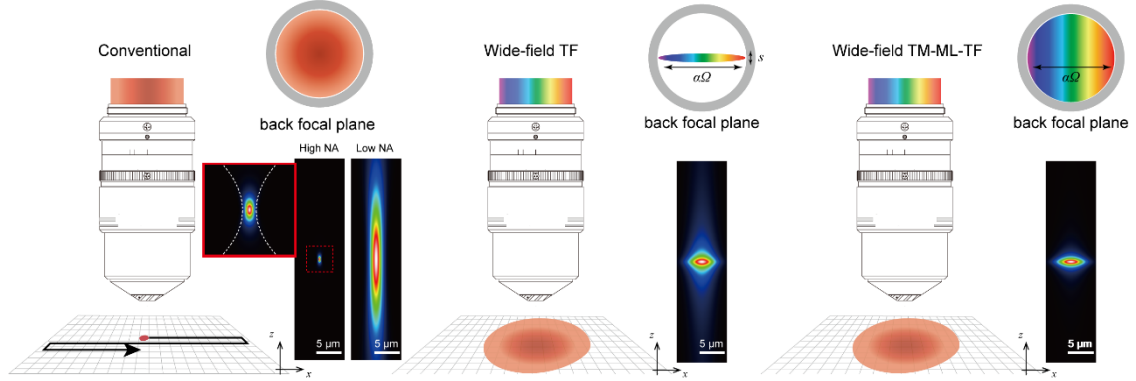


図 2.9．多光子励起法．左：空間集光法，画像左：High-NA による 2 光子励起分布 ($w = 0.48 \mu\text{m}$)，画像右：Low-NA による 2 光子励起分布 ($w = 2.5 \mu\text{m}$)，中：時空間集光法 ($w = 2.5 \mu\text{m}$)，右：時間多重化マルチライン時空間集光法 ($w = 2.5 \mu\text{m}$)

2.4 多光子光刺激技術

2.4.1 レーザー走査型光刺激技術

レーザー走査型多光子光刺激は，高 NA の対物レンズを使用した小さい回折限界スポットによって光軸方向の分解能獲得する．小さい回折限界スポットは局所的な光活性化が行えるが，その活性化範囲は細胞上の局所的な範囲に限られる．空間的に複数の細胞，複数のオプシンを活性化するため，レーザースポットを移動することで，刺激可能範囲内における多数の細胞，多数のオプシンを順次励起することが可能となる．面内方向におけるレーザースポットの移動には，スキャニングユニットが使用される．ビームを走査しても収差などが無ければスポットサイズは変化せず，空間分解能は一定に保たれる．スキャニングユニットによる全体的な時間分解能 T は，光刺激対象の細胞個数を N 個としたとき，以下の式で与えられる．

$$T = T_{dw} \cdot N + T_i \cdot (N - 1) \quad (2.4.1)$$

ここで T_{dw} は一細胞あたりの滞在時間 (dwell time) であり，細胞を光活性化するために必要なレーザー走査時間である．また， T_i はスポットが細胞間を移動するためにかかる時間 (inter-location time) である (図 2.10)．よって，時間分解能を向上するためには，滞在時間と細胞間の移動時間の減少が必要不可欠である．滞在時間は細胞内での走査速度や，オプシンのチャネルコンダクタンス，活性化寿命，二光子吸収断面積，またレーザーの照射範囲や照射強度に依存する．滞在時間を最小化するためには多数のパラメーターが存在するが，大きな活性化電位を発生させるためには，スポットを活性化寿命内に多数の分子にわたって走

査するのが良く、より早く広い範囲を走査できるスパイラルスキャンが最も効率的である [32]. 細胞間の移動時間はスキャニングユニットのスキャンレートで決まる. スキャニングユニットは一般的にスキャンレンズとチューブレンズの $4f$ 系で構成され、対物レンズの後方焦点面と共役な位置に配置される. 二軸のスキャニングユニットによってビームの角度が変更され、対物レンズ焦点面におけるスポットの面内位置が変更される機構である. 光刺激におけるスキャニングユニットは基本的にはガルバノミラーペア [28,29] や、AOD ペア [30,31] などが使用されることが多い. ガルバノメトリックミラーは通常のレーザー走査型顕微鏡で広く使用されており、高光利用効率であり、市販品が利用でき導入が簡単であるメリットがある. しかし、数十マイクロメートルの距離を 1 ステップ動くために必要な時間は約 100 マイクロ秒程度かかってしまう [118]. また、その速度は移動距離によって異ってくる. AOD は、音響波によって結晶内に位相格子を生成し、結晶に入射したビームを任意の角度に回折させる素子である. 音響波で制御するため、1 スポットあたりの移動速度は AOD 開口径に依存するが、15 マイクロ秒程度 [119] とかなり高速であり、スポットの移動距離に依存しない. しかしながら、回折を利用する関係上、出射ビームのほとんどは 1 次回折角に出射するものの、多次の回折光が発生するのは避けられず光利用効率が低くなる傾向がある. また、その効率も回折角によって異なるという性質がある. 加えて、AOD 結晶を通過する際に分散が加わるため、2 光子励起信号が低下してしまう. この分散の影響をなくすために、プリズム対や AOD などによって補償光学素子 [31] を用意する必要がある. また、いずれのスキャニングユニットにおいても、面内方向におけるスポットシフトであり、3 次元で走査をするためには、光軸方向におけるピエゾスキャナーや可変焦点レンズ (electrically tunable lens : ETL [120], tunable acoustic gradient-index: (TAG) lens [121]) などのスキャニングユニットが必要となり、更に時間分解能は低下する. そのため、in vivo を対象とした光遺伝学において走査型光刺激は現実的でない.

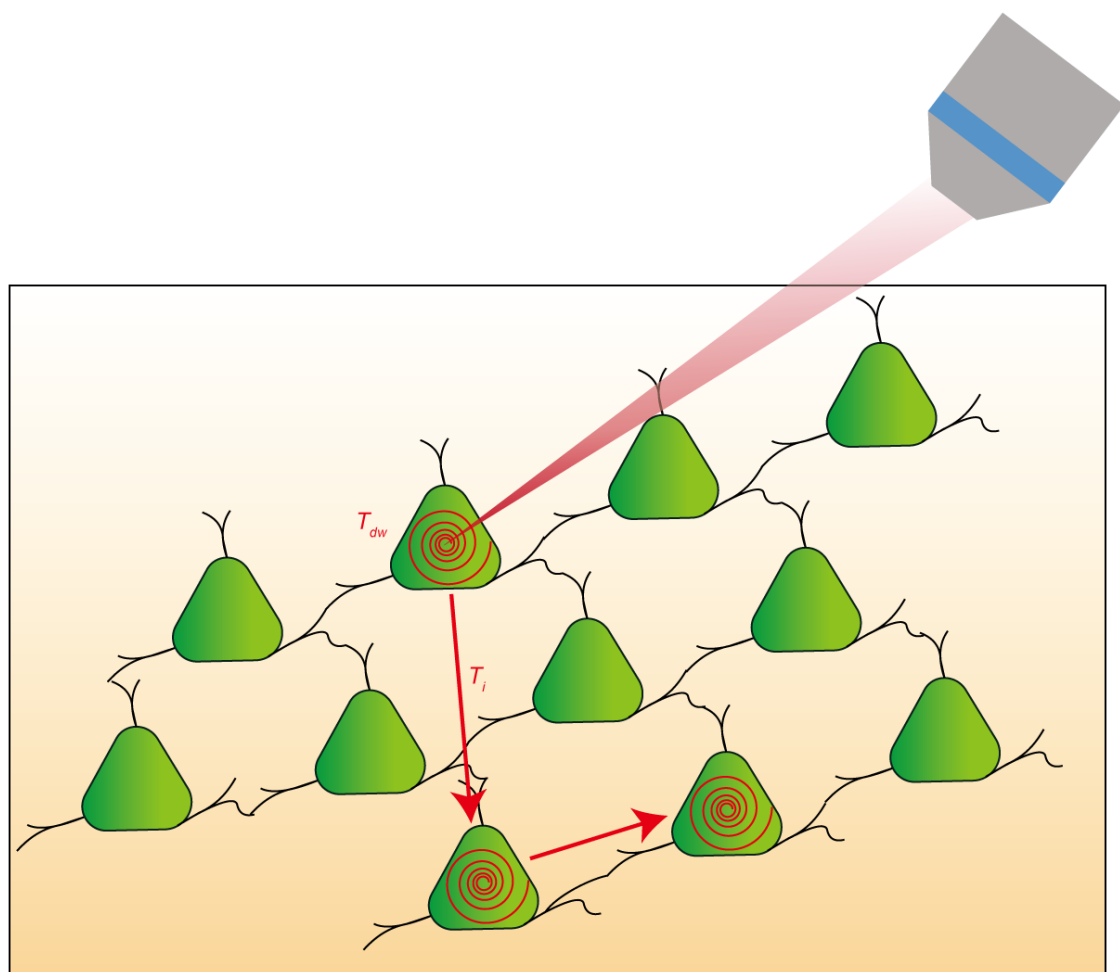


図 2.10. 走査型多光子光刺激メソッドの概要図

2.4.2 レーザー非走査型多光子光刺激技術

レーザー非走査多光子光刺激のコンセプトを図 2.11 に示した. 複数の標的細胞に対して, 細胞サイズまで広げた複数のスポットを用意し同時に励起を行う. そのため, 時間分解能はレーザーの滞在時間 T_{dw} で決定される. 同時に細胞を励起するための戦略としてパターン照明が用いられる. スポット径と光軸方向の空間局所性の関係上, 拡大スポットにおけるパターン照明によって, 単一細胞分解能で2光子励起を起こすことは困難であったが, CGH を利用したホログラムビーム整形 (ホログラムによってスポットを拡大する技術) によって, 2光子励起の光軸方向の分解能が向上した [35]. 通常, 空間集光によって得られる光軸方向の2光子励起領域は NA の二乗に比例して悪化するため, スポット径を広げようとすれば, 対物レンズの NA もしくは実効 NA が低下し, 空間局所性が著しく低下する. しかし, ホログラムによってスポット径を拡大する場合, 2光子励起領域は NA の2乗ではなく, ホログラムスポット径に比例する. これはホログラムビーム整形で生成される拡大スポットはラ

ランダムな位相の電場の干渉によって生成されるため、インコヒーレントに近い振る舞いを見せる。よって、照明パターンの分布は強度の足し合わせになることから説明が付く。そのため、通常の空間集光でスポット径を拡大するよりも、ホログラムビーム整形によってスポット径を広げることで、空間局所化性能が向上する。ただ、依然として空間局所化性能は低く、ホログラムビーム整形によって $4.5\text{ }\mu\text{m}$ の拡大スポット径を作成した場合、光軸方向の分解能は $18\text{ }\mu\text{m}$ 程である。加えて、干渉を利用する性質上、拡大スポットにスペックルが表れビーム品質は低下するといった課題が残る。

時空間集光ホログラフィは、2.3.2 項で説明した時空間集光法に CGH 技術を組み合わせた方法である。光軸方向の光学断層性能がスポット径に依存しないのを活用し、拡大スポット径で多数の標的細胞を同時に励起する完全な非走査光刺激を達成した [42–49]。時空間集光ホログラフィの概要図を図 2.11 に示す。通常の時空間集光同様に、対物レンズ焦点面と共役な位置に回折格子を配置する。また、LCOS-SLM が対物レンズ後方焦点面と共役な位置に配置され、ビーム整形もしくはビーム分岐する。LCOS-SLM でビーム整形する場合 [42,44]、LCOS-SLM を回折格子の前方フーリエ面に配置し、回折格子上に 2 次元パターンを生成する。ただし、回折格子上にパターンを投影するため、3 次元パターンの生成はできない。また先ほど同様、スペックルが発生する課題が残る。位相コントラスト法 [43] を使用すればスペックルは回避可能であるが、2 次元パターン照明しかできないことは変わらない。LCOS-SLM でビーム分岐をする場合、LCOS-SLM を回折格子の後方フーリエ面に配置することで 3 次元に時空間集光のスポットを複製することが可能である。またガウシアンビームを複製するため、スペックルは出ない。ただし、スポットを複製するため、ビーム形状はただ 1 つに限られる。複数のビーム形状を得る場合は、回折格子前方と後方に LCOS-SLM をそれぞれ配置し、ビーム整形とビーム分岐をそれぞれで行うことも可能である [48,49]。

時空間集光ホログラフィには以下に示す複数の問題によって、3 次元空間における複数の標的細胞への正確な光刺激は困難である。第一に、2.3.2 項で示したように、光刺激における $10\text{ }\mu\text{m}$ の単一細胞分解能を達成するためには光軸方向の空間局所性が不十分であるということである。FWHM で評価した光軸方向の分解能が $5\text{ }\mu\text{m}$ であっても、(2.3.9) 式で示した励起分布を用いて計算すると、 $1/e^2$ 値幅は約 $20\text{ }\mu\text{m}$ となってしまう。第二に、分光方向と直交方向においてマルチスポットを互いに近接させたまま保持するように設計されたパターンを正確に生成することはスポットの干渉により困難である [45]。第三に LCOS-SLM 上で線集光する構成となっているため、LCOS-SLM の局所的範囲で温度が上昇しホログラムの質が低下する。LCOS-SLM は交流駆動しているため、常に周期的に液晶分子が振動し、変調される光の位相が周期的に変動する [122]。この位相変調ゆらぎは通常ほとんど現れないが、温度が上昇すると大きくなることが知られている [123]。この問題を回避するために、球面レンズを回折格子の前に挿入して LCOS-SLM 上のスポットサイズを広げる方法も提案されているが [46]、時間集光点と空間集光点がずれるため励起分布は悪化する。第四に、単

一波長計算で求められた位相変調量は、各周波数成分で僅かに位相誤差を生じ、残留分散を生じる点である。CGHによって生成する多点生成位相マスクは、中心波長で計算するため、僅かに位相誤差が生じる。時空間集光ホログラフィでは、LCOS-SLM上に各周波数が掃引されているため、この位相誤差は空間位相に加えて周波數位相としても転写され、結果として時間領域における残留分散を引き起こす。このように、正確な非走査の3次元光刺激を実現するには課題が残っている。

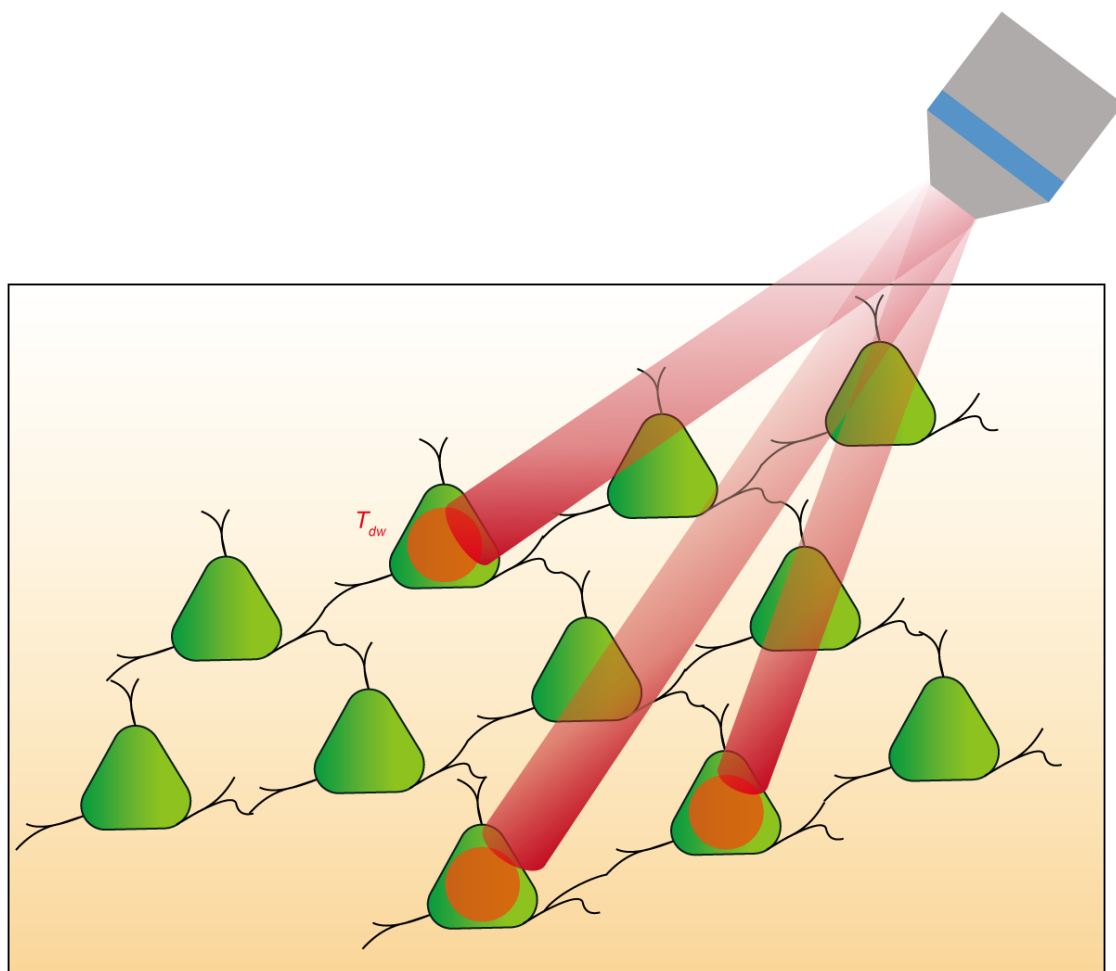


図 2.1 1. 非走査型多光子光刺激メソッドの概要図

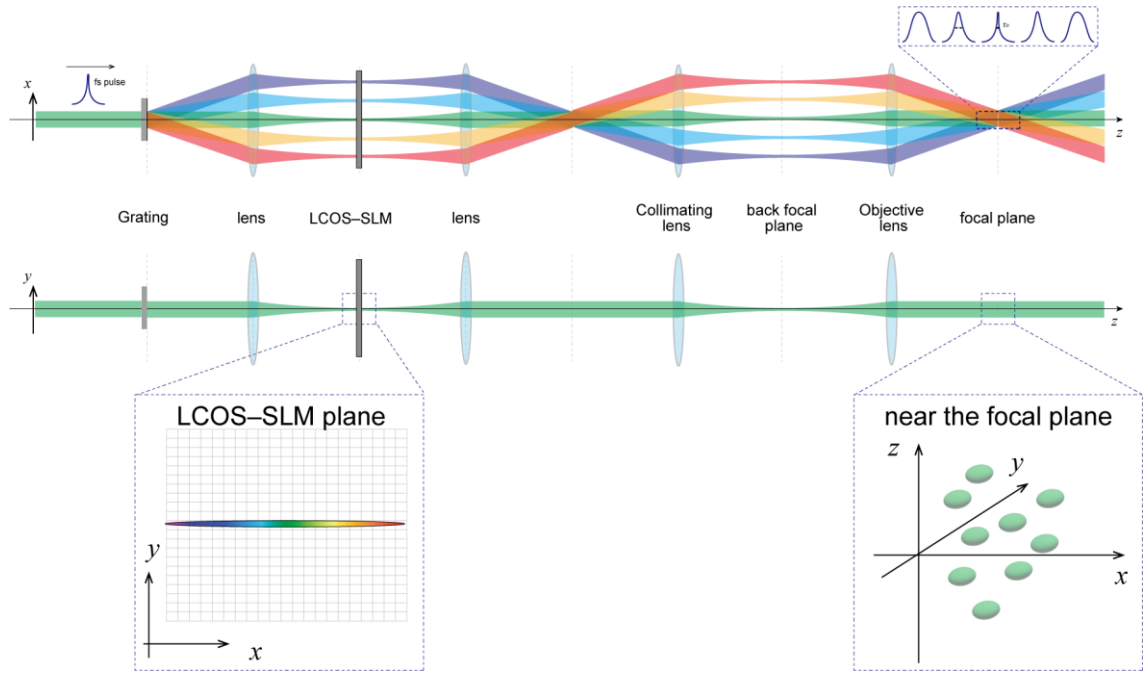


図 2.1 2時空間集光ホログラフィの概要図，図はビーム分岐用途における構成。

2.5 多光子顕微鏡における信号対雑音比の向上

2.5.1 蛍光励起効率の最大化

信号対雑音比を向上させるために，蛍光励起効率を最大化するパラメーターを考える．

(2.3.1) 式よりスポット面積を A としたとき，1秒当たりの当たりの平均蛍光発生確率は

$$\begin{aligned}\langle n_a^{2p} \rangle &= \left[\frac{\lambda}{\hbar c} \right]^2 \delta_{2p} \tau f \left(\frac{P_{avg}}{\tau f A} \right)^2 \\ \langle n_a^{2p} \rangle &= \left[\frac{\lambda}{\hbar c} \right]^2 \delta_{2p} \frac{P_{avg}^2}{\tau f A^2} \\ &= \frac{\delta_{2p}}{\tau f} \left[\frac{4(NA)^2}{\pi \hbar c \lambda} \right]^2 P_{avg}^2\end{aligned}\tag{2.5.1}$$

である．ここで， $\langle \cdot \rangle$ は時間平均を表し， $\langle I_0(t) \rangle = P_{avg}/\tau f A$ ， $A = \pi \omega_0^2 \approx \lambda^2/4NA^2$ の関係から求めた．1ピクセル当たりのパルス数を m パルスとしたとき，1ピクセル当たりの時間は

$$t = \frac{m}{f}\tag{2.5.2}$$

と求められる．ここで，議論の簡単化のため，機械的な走査速度に制限はないことを仮定している．したがって，ピクセル当たりの蛍光発生確率は以下のように書ける．

$$n_a^{2p}{}_{pixel} = m \frac{\delta_{2p}}{\tau f^2 A^2} \left[\frac{\lambda}{\hbar c} \right]^2 P_{avg}^2\tag{2.5.3}$$

したがって、1 ピクセル当たりの蛍光量を最大化させるためには、ピクセル当たりのパルス数増加、分子の2光子断面積増加、短パルス化、繰り返し周波数の抑制、平均パワーの上昇などが考えられる。ここでは、2光子断面積、パルス幅は重要であるが、イメージングシステムの最適化ではないので無視し、ピクセル当たりのパルス数、繰り返し周波数、平均パワーについて考察する。平均パワーを上昇させることは、最も簡単な取り組みであり、よく行われているが、生体の観察において気を付けなくてはならないのは、侵襲性である。熱によるダメージを回避するために生きたマウスに入射してよい平均パワーはおおよそ 250 mW 程度といわれており [124], 上限値が決まっている。水冷するなどして最大入射パワーを上げる方法もあるが、系が複雑になることや、対物レンズが限定されるなど制約が多い。これを加味すると、平均パワーは固定で考える必要がある。したがって、ピクセル当たりのパルス数を増やすか、繰り返し周波数を下げることが必要となる。(2.5.2) 式の関係から、同じフレームレートを維持するためには、パルス数 m に比例して繰り返し周波数 f を変化させる必要がある。パルス数を増やす選択肢を取った場合、(2.5.3) 式から蛍光発生確率は $1/f^2$ に比例するため、得られる蛍光量は低下してしまう。したがって、パルス数と繰り返し周波数を下げることが合理的である。最近ではこのような理由で繰り返し周波数を低減させた2光子顕微鏡が開発されてきている [125–127]。パルス数 m の最小は1であるから、ピクセル当たり1発のパルスによるデータ取得が最大となる。ただし、ここで気を付けたいのは機械的な走査速度に制限がないことを仮定していることである。実際には機械的な走査速度はガルバノメトリックミラーやレゾナントスキャナなどの速度に律速されるため、得たい視野 (FOV) との関係から最小の f が決まるはずである。多くの2光子励起に使用されているレーザーは、高繰り返しのレーザーであり、パルス数 m を大きくしていたが、このような原理でピクセル当たりに1パルスを励起する方法が取り入れられるようになり信号対雑音比 (SNR) の改善が報告されている [128,41,129,130]。

2.5.2 AD サンプリング条件の最適化

信号対雑音比を向上させるためには、検出器の電気信号を AD サンプリングする条件を最適化する必要もある。AD サンプリングに至る物理的な流れについて説明する (図 2.13 (a))。

フェムト秒レーザーによって分子が励起されると、蛍光を放出する。この蛍光の放射寿命は一般にナノ秒 (ns) オーダーであり、励起パルス幅 (100 fs 程度) に比べてはるかに長い。そのため、発生する蛍光パルスの時間波形は励起光強度と蛍光寿命の畳み込みとして表されるが、実際には蛍光寿命で決まる時間波形にほぼ等しい。発生した蛍光光子は、光電子増倍管 (PMT) などの検出器に入射し、フォトカソードで光電子に変換される。放出された光電子は一連のダイノードを通過して増倍され、アノードに到達して電流信号として出力される。この電子過程は非常に高速であり、PMT 自体の応答時間は数 ns 以下と短い。一方、PMT の電流出力はそのままでは扱いにくいいため、負荷抵抗やトランスインピーダンスアン

プを介して電圧信号に変換して観測される。電圧信号 $S(t)$ は PMT によって増幅された蛍光信号 $f(t)$ と RC 回路や増幅回路の帯域幅によって決まる機器応答関数 (IRF, 図 2.1 3 (b)) $h(t)$ の畳み込み積分で表されるから,

$$S(t) = \int_{-\infty}^{\infty} f(\tau)h(t-\tau)d\tau \quad (2.5.4)$$

となる。回路の帯域幅で決まる時定数が蛍光寿命や PMT 自体の応答時間よりも十分に長い場合、蛍光信号は平滑化される。このように帯域制限を受けた蛍光信号は、A/D コンバーター (ADC) によってサンプリングされ、デジタル値として離散化されて取得される。基本的な 2 光子顕微鏡では、図 2.1 3 (c) のように、高い繰り返し周波数で 1 ピクセルあたり複数の励起パルスが照射され、それぞれの平滑化された蛍光応答が時間的に重なり合う。それらが ADC によってサンプリングされる。一方、繰り返しを下げた場合、図 2.1 3 (d) のように、平滑化された (畳みこまれた) 蛍光応答は重ならず、波形が現れる。これを通常のように AD サンプリングすると、サンプリング点のほとんどがデッドタイムになったり、内部 CLK のタイミングによってはピーク点をサンプリングできなったりするため、波高値がばらついてしまう。これを防ぐためには、ピークを確実にサンプリングするような高速の ADC で波形を正確に測定し、タイムゲート処理が必要になる [127]。この手法を用いることで、繰り返し周波数を下げたことによる高い蛍光量を、高い SN で取得することができる。しかしこの手法では、高価な高速 ADC が必要になるのに加え、広帯域化による ADC による雑音も増加するといった課題が残る。

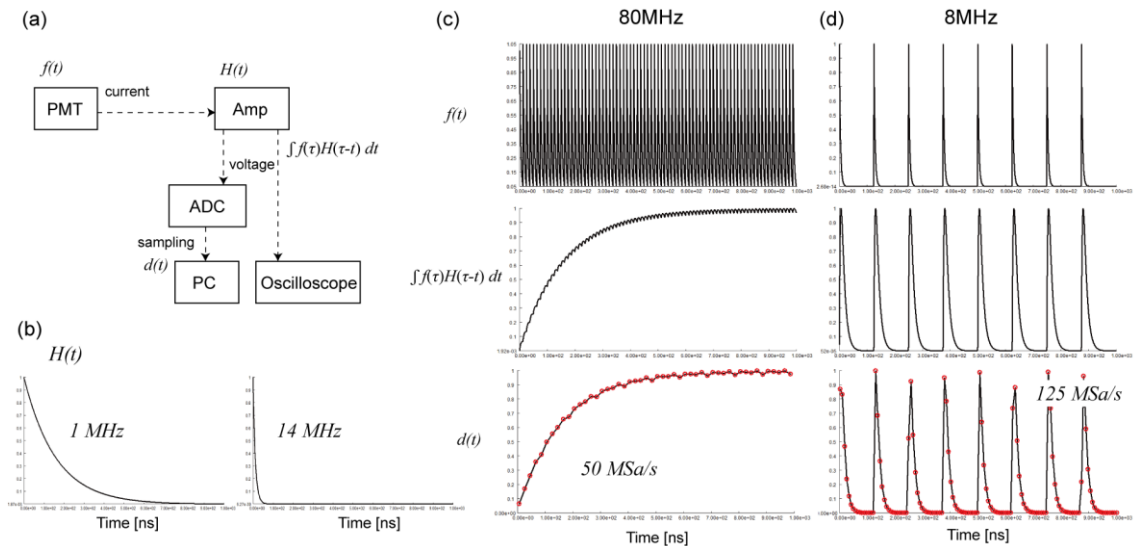


図 2.1 3 (a) 測定時の流れ. (b) アンプの機器応答関数 (1 MHz, 14 MHz). (c, d) 1 ピクセル 250 ns としたときの (上): 蛍光信号, (中央): ADC への入力される平滑化信号, (下): ADC でサンプリング取得した信号. 赤点はサンプリング点. (c) 80 MHz 励起, 検出帯域 1 MHz (d) 8 MHz 励起, 検出帯域 14 MHz.

2.5.3 蛍光収集効率の最大化

最後に、発生した蛍光を検出器まで収集する効率の最大化も必要である。2光子顕微鏡では、共焦点顕微鏡と異なり励起領域の空間局所性によってピンホールを不要とする。通常、焦点で発生した蛍光は対物レンズによって収集されるが、収集可能な最大効率 Φ_{∞} は対物レンズの NA で決定されている。図 2.1 4 (a) のように、散乱媒質によって、蛍光が散乱した場合、対物レンズの軸中心に対して θ_f の角度成分を持つこととなる。このとき、集光点で発生した蛍光の対物レンズにおける収集効率 Φ は以下のような関係で表される [131].

$$\frac{\Phi}{\Phi_{\infty}} \rightarrow \frac{\theta_f^2}{\theta_{NA}^2} \quad (2.5.5)$$

ここで、 θ_{NA} は対物レンズの NA で決まる集光角であり、 Φ_{∞} が最大の収集効率となる。したがって、最大まで効率を上げるには、 NA の高い対物レンズを用いることが良い。また、対物レンズで収集された蛍光は、図 2.1 4 (b) で示すように対物レンズ後方焦点面を通過し、ダイクロイックミラーなどで励起光と分けられてから、レンズによって検出器の小さい口径に集められる。このとき、理想的には対物レンズで収集され、後方焦点面から出射される蛍光は、平行光で出射される。しかし、散乱した蛍光は図 2.1 4 (c) のように θ_f の角度成分をもって対物レンズ後方焦点面から出射される。したがって、角度 θ_f で出射される蛍光を検出器までできるかぎり損失無く伝播させるよう検出器ユニットの設計を行うことも重要である。

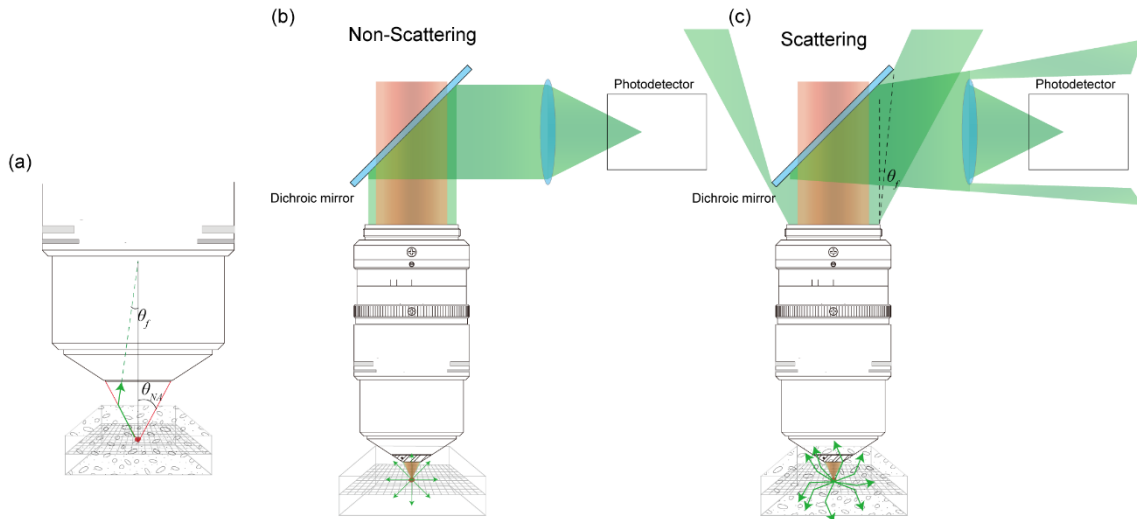


図 2.1 4. (a) 対物レンズ前方における蛍光収集の概要図. 対物レンズ後方の蛍光収集の概要図. (b) : 散乱無し, (c) : 散乱あり

2.5.4 信号対雑音 (S/N) 比

本項では、S/N 比を評価する指標について説明する。一般的に S/N 比は一般的に、平均信号値と信号値の揺らぎ（標準偏差）の比として、以下のように定義される [132].

$$S/N = \frac{\bar{S} - \bar{B}}{\sigma} \quad (2.5.6)$$

ここで、 $\bar{S}$ 、 $\bar{B}$ はそれぞれ検出信号と背景の時間平均を表す。 σ は信号値の標準偏差値であり、以下の関係式で表される。

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{m=0}^N [(S_m - \bar{B}) - \langle (S_m - \bar{B}) \rangle]^2} \quad (2.5.7)$$

このとき、 $\langle \cdot \rangle$ は平均を表しており、データ点数を N とした。(2.5.6)式の指標は実際の計測で観測される全雑音を分母に含み、測定系が発生させる S/N 比をより正確に反映する。(2.5.7)式で示した揺らぎは様々な雑音によって構成されており、以下のように表せる。

$$\sigma = \sqrt{\sigma_{shot}^2 + \sigma_l^2 + \sigma_{mp}^2 + \sigma_{white}^2 + \sigma_R^2 + \sigma_{stray}^2} \quad (2.5.8)$$

ここで、 σ_{shot} 、 σ_l 、 σ_{mp} 、 σ_{white} 、 σ_R 、 σ_{stray} はそれぞれ、ショット雑音、レーザーパワーの揺らぎ雑音、検出器の増倍揺らぎ雑音、熱（ジョンソン）雑音を含む白色雑音、読み出し雑音、迷光雑音である。ショット雑音は荷電キャリア放出のランダム性によって発生する雑音であり、信号に必ず付随する。ショット雑音は、キャリア放出のランダム性がポアソン分布に従うことから、検出器で検出された光子数 N に対して $\sqrt{N}$ で比例する。レーザーパワーの揺らぎは、温度変動や音響振動、人為的原因などの外的要因や、自然放出光がレーザーの発振モードに入り込むことによって生じる揺らぎなどが影響する。増倍揺らぎ雑音は、ダイノードにおける 2 次電子放出過程のランダム性や陰極に接続される出力抵抗に付随する熱雑音が含まれる。白色雑音は、抵抗性の回路素子における電圧の揺らぎによって生じる雑音であり、そのスペクトル密度は周波数に依存しない。読み出し雑音では、ADC や後段アンプの入力段で生じる電子的な不確かさである。迷光雑音は、光学系内部での反射や散乱、外部光源などによって生じる定常的な背景光の揺らぎであり、主に光学系や遮光設計に依存する。

光子数が十分に高く検出できる場合、レーザーの揺らぎは十分に小さいと仮定すると、ショット雑音は信号量が増加するほど増えていくため、他の雑音をほぼ無視できるほど大きくなる ($\sigma_{shot} \gg \sigma_{others}$)。したがって、高光子数の測定ににおける S/N 比は、検出された光子数を N としたとき、以下のようになる。

$$S/N \text{ 比} = \frac{N}{\sqrt{N}} = \sqrt{N} \quad (2.5.9)$$

よって、S/N 比は検出光子数の平方根に比例することが分かる。2.5.1 項で示したように繰り返し周波数を下げて蛍光信号量を増加させることで S/N 比を向上させることができる。本来、光子数は検出時間（積分時間）にも影響するため、検出器の帯域も大事になるが、蛍光パルスの総光子数以上に積分時間を伸ばしたところで S/N 比は向上しないため、適切な検出器帯域を選択することが必要である。一方で、低光量時はほかの雑音を無視できない。

(2.5.8)式で挙げた雑音のうち、ユーザーが可能な対策としては、迷光が入らないように遮光を十分にすること程度であり、他の雑音はそれぞれデバイス固有のものになってしまう。ADC の読み出し雑音を小さくするため、検出帯域の小さいものを利用したり、熱雑音や増倍揺らぎ雑音が小さい検出器を使用したりする対策が考えられる。

第3章 本研究に用いる光学ツール装置

生体機能を解明するためのツール開発として重要であるのが、性能を最大限引き出すため、光操作と観察ツールを一貫して開発することが求められる。本論文で、時間多重化マルチライン時空間集光法に CGH を組み合わせ、非走査型 3 次元多光子光刺激システムを構築し、光刺激応答をイメージングするシステムの開発も同時に行った。第 1 節に光刺激とイメージングを行うための、高出力レーザー装置について解説する。また、第 2 節で信号比を上げるための検出器ユニットについて説明する。第 3 節で光刺激システムとイメージングシステムの機構について紹介する。最後に、第 4 節で今回取り入れた光刺激のための位相変調パターンについて説明する。

3.1 光刺激システムに適したレーザー装置

本実験では、自作のイッテルビウム (Yb) ベースのファイバーレーザーを使用した。本論文において使用したレーザー装置の詳細は参照の論文 [133,134] に譲るが、本節では、本実験において作製、また調整した機構について説明する。

レーザーは、Yb 添加ファイバーを用いて、Figure 9 型の非線形増幅ループミラーによるモード同期レーザーを共振器として用いた。繰り返し周波数は約 42MHz となっており、図 3.1 に示したようなスペクトルが得られた。このとき、後段の CPA での狭帯域化を抑制するため、Figure 9 における分散補償光学素子の補償量を調整することで、長波長側 (1064nm 付近) に中心波長をシフトさせた [135]。Yb ファイバーの利得が最も高い発振帯域 [136,137] は 1030 nm 付近であるが、高利得帯域が狭いためである。利得レベルは下がるが、利得帯域幅の広い 1060nm 付近を利用することで狭帯域化を抑制でき、短いパルス幅の獲得を見込める。

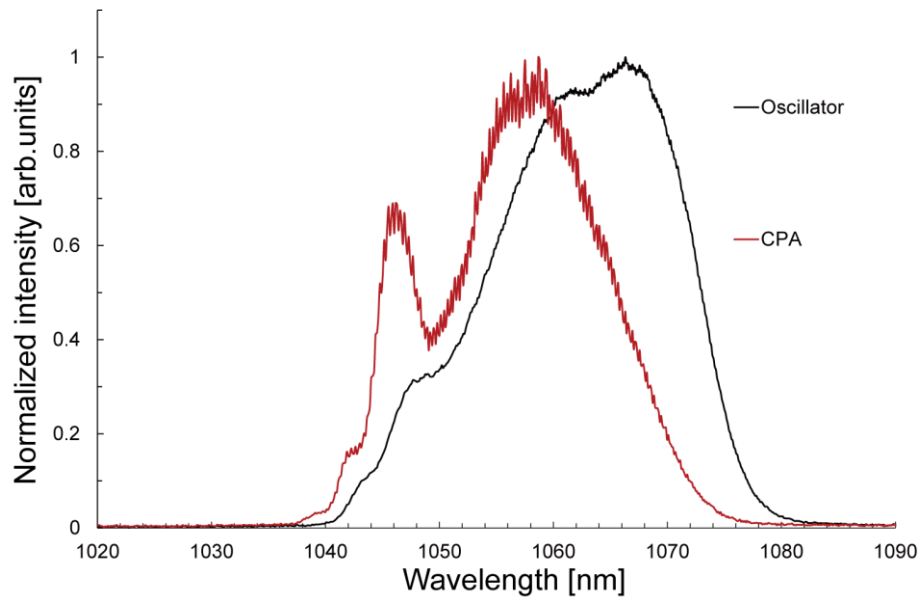


図 3.1 レーザースペクトル，（黒）共振器から出力されたスペクトル，（濃赤）Yb ファイバーCPA から出力されたパルス

図 3.2 にレーザーシステムの概要図を示す．2 光子励起を効率的に発生させるためには，自己位相変調などによるパルス歪みを抑える必要があるため，高ピークパワーとなる 3 段目，4 段目ではファイバコア径が 10, 40 μm とそれぞれ大モード面積のファイバーを用いて，自己位相変調を可能な限り抑制している．また，1 段目と 2 段目の間に 4-f パルス整形器を導入し，自己位相変調などによって生じる高次の位相歪みを取り除く．2 段目の出力後，音響光学変調素子（AOM）を用いてパルスの繰り返し周波数を 42 MHz から 7 MHz まで間引いた．増幅器の間で間引くことで，後段で得られるパルス当たりにおける利得が増加し，ピークパワーを上昇させることができる．また，2.5 節で説明したようにレーザーの繰り返し周波数を間引くことでパルス当たりにおける蛍光強度を増加させ，励起パルスに同期した検出を可能とする．共振器から出力されるレーザーパルス列をフォトダイオードで電気信号に変換し，AOM の変調信号を発生させるためのデジタル遅延パルス発生器（TOKYO INSTRUMENTS, DG645）のトリガーとして用いた．4 段目の増幅器から出力されたチャープパルスは回折格子対によって圧縮され，顕微鏡（光刺激）システムに導入される．励起パルスに同期したイメージング信号の検出を達成するために，DG645 から AOM と同じ繰り返し周波数の信号が信号遅延ユニットを介して検出器ユニットに送られる．この構成によって得られたレーザーのスペクトルを図 3.3（a）に示した．スペクトル波形から， $1/e^2$ 値幅を考慮すると，中心波長は 1056 nm，スペクトル帯域は 1042-1072 nm と得られた．また，今回使用したレーザーの出力平均パワーは，回折格子対後で 28 W であり，パルスエネルギーは 4 μJ と見積もられた．回折格子対と 4-f パルス整形器による分散補償後のパルス評価のため，干渉自己相関波形を計測した．自己相関波形によるパルス評価はパルス波形の仮

定が必要となるため、FROG [138]や SPIDER [139]などが用いられることが多いが、ファイバー共振器によるモードロックはダブルパルスが発生する確率が高く、これらの手法はその存在に気づけない可能性が高くなってしまうため、干渉自己相関波形による評価を導入している。得られた干渉自己相関波形より、元のパルスが *sech* 型と仮定し、パルス幅を FWHM で 108 fs と推定した。

このように、蛍光分子の励起効率を最大化し、励起パルスに同期したイメージング信号の検出を達成するためには、レーザー装置の開発、制御は重要である。

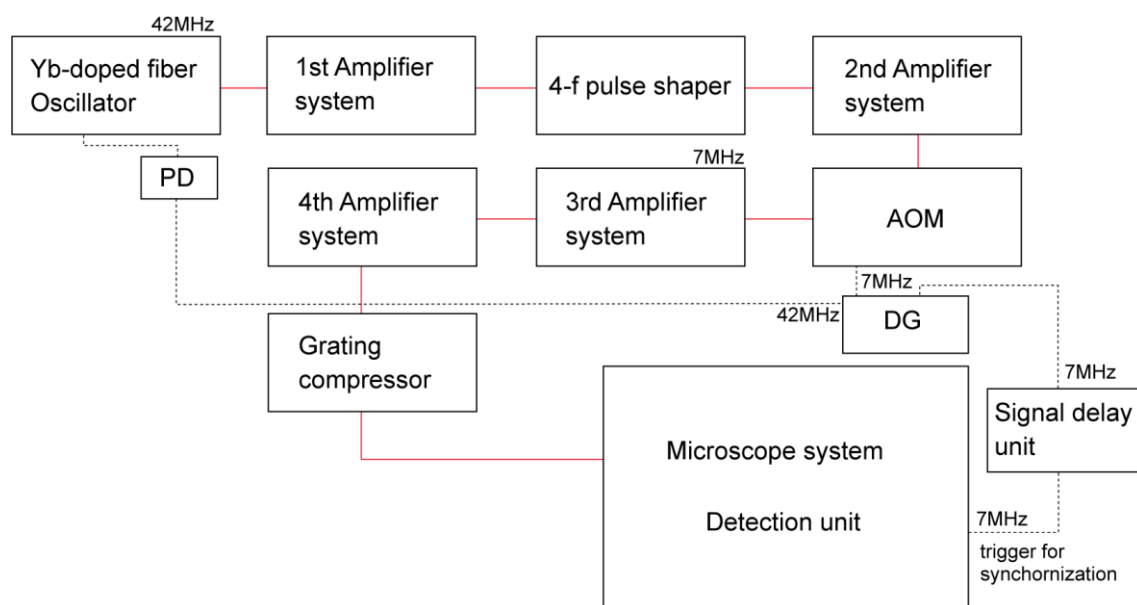


図 3.2 レーザーシステム概要図

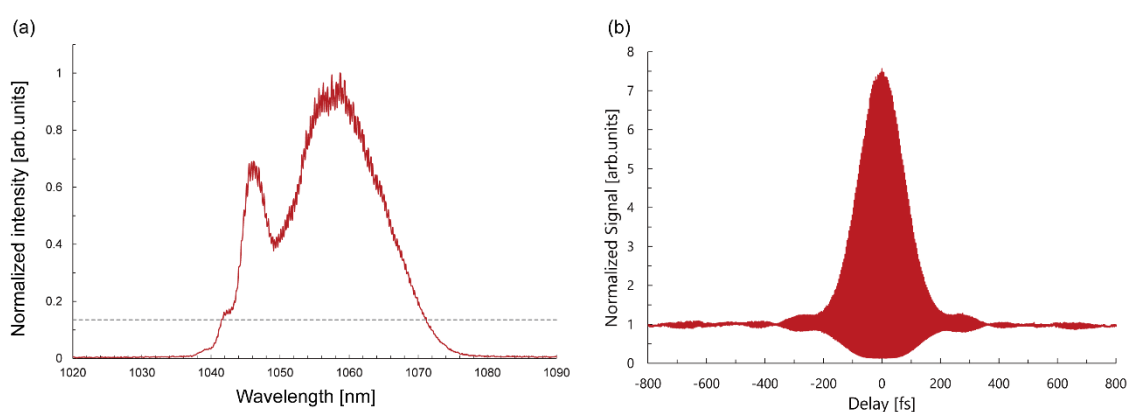


図 3.3 (a) CPA から出力されたパルスのスペクトル。(b) 分散補償後の干渉自己相関波形。

3.2 検出ユニット

蛍光の検出効率を向上させるため、検出ユニットを自作した。2.5.3 項で説明したように、試料内で散乱した蛍光を可能な限り収集するため、対物レンズは高 NA ($=1.1$) の水浸レンズ (Nikon, MRD77225, 25 $\times$) を用いた。この対物レンズは NA が高いが、倍率は 25 $\times$ と小さく実効的な焦点距離 $f_{OB} = 8 \text{ mm}$ であるため、視野も広くとれる。本実験では、検出器の受光面内における感度ムラによる信号強度の変化が生じないように、レーザー走査を行っても検出器上で蛍光照射位置が固定されるように、対物レンズの瞳面を検出器に結像するような構成を取った。検出器は実験の都合上で入れ替える可能性があったため、すべてに対応できるように最小が $\Phi = 5 \text{ mm}$ の検出窓を想定して設計した。対物レンズの後方焦点面からの出射角 θ_f を最大化するため、口径の大きい (51 $\times$ 72 mm) ダイクロイックミラー (DM; Sigma Koki, DIMNQ-5172R03-P-R785-R565-T1325) を用いた。また、収集レンズは口径が大きく、焦点距離が短いレンズを用いて可能な限り DM に近づけることで、 θ_f を最大化した。また、対物レンズの瞳径と検出窓径を考慮し、結像倍率を考えると、収集レンズとその後のレンズは焦点距離がそれぞれ $f=165 \text{ mm}$ (Thorlabs, TTL165-A), $f=35 \text{ mm}$ (Thorlabs, LB1811-A) を用いた。また、励起光との分離に、励起光カットフィルタ (Sigma Koki, FF01-790) と蛍光波長の分離を可能とするためのバンドパスフィルタを取り付けるための機構を用意した。このような条件における設計図と、実際に加工し組み立てた写真をそれぞれ図 3.4, 図 3.5 に示す。迷光の取り込みを最大限減らすために、全て黒アルマイト加工を行った。また、明視野顕微鏡のために、照射光取り付け部と、カメラ、スイッチャーを取り付けた。

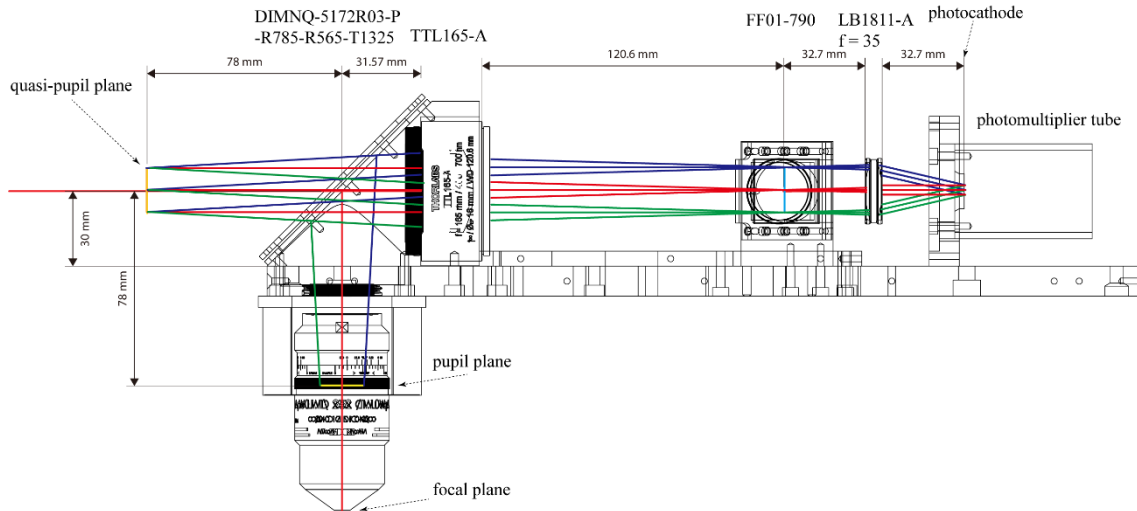


図 3.4 検出器ユニット設計図。黄色線：瞳，擬似瞳面。赤線：弾道光，青線：角度 3.15° で出射される光線，緑線：角度-3.15°で出射される光線。

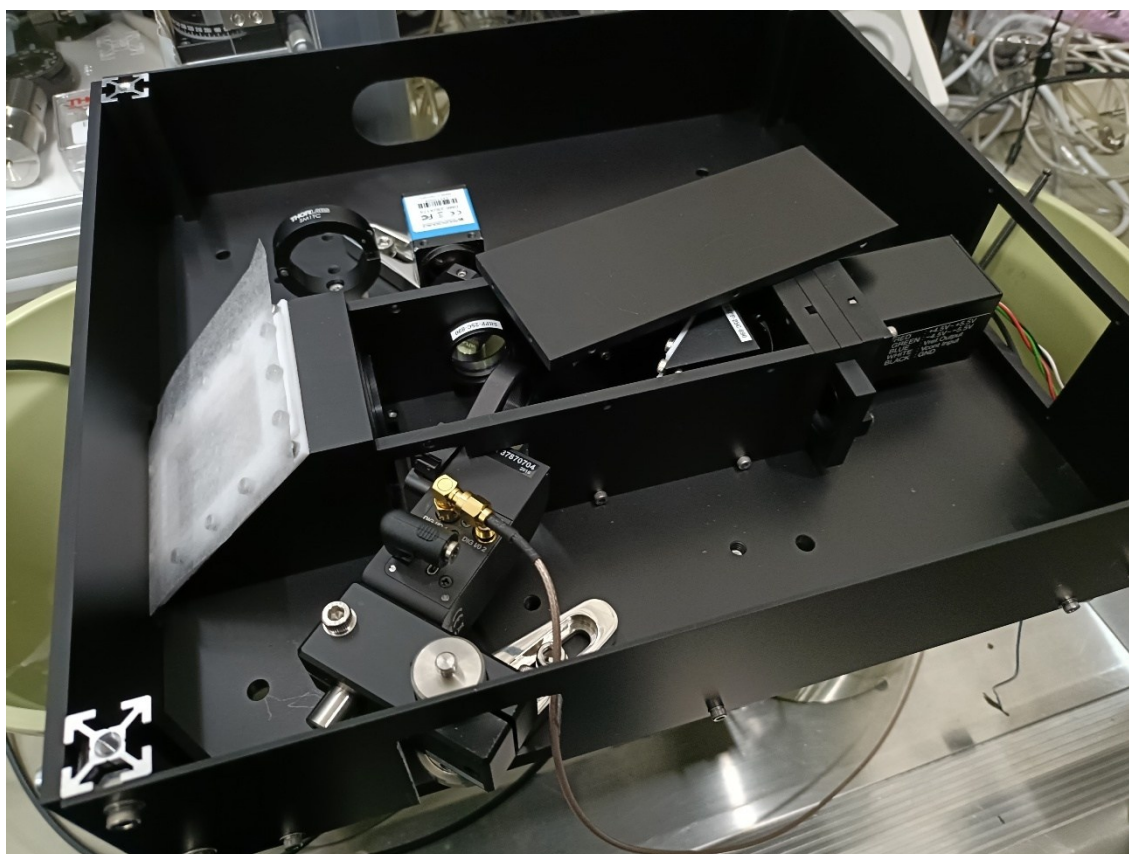


図 3.5 検出器ユニット.

3.3 多光子顕微鏡&多光子光刺激セットアップ

構築した顕微鏡の実験系を図 3.6 に示す. 光源には 3.1 節で示した Yb レーザーシステムを使用した. 平均出力は 28 W まで出力可能であることを確認しているが, 本実験で使用した出力は, グレーティングコンプレッサー後で 2 W 程度になるように 4 段目の出力を調整した. 2 W の出力のうち, イメージング用に 180 mW, 刺激用に 1820 mW となるように 1/2 波長板 (HWP) と偏光ビームスプリッター (PBS) を用いて分岐比を調整した. このように, 1 つのレーザーからイメージング光と刺激光を分岐することで, 繰り返し周波数が同じで同期しているため, イメージングパルスに同期して信号検出する手法を適用し, 刺激光によって発生した蛍光を除去できる (5.1 節で説明). イメージング光は, 3 倍にビームを拡大して, 7.5 mm まで広げ, 顕微鏡システムに導入した. この時, 自動回転ステージに取り付けられた HWP と PBS を用いてレーザーパワーを調整した. また, 光刺激用に分岐した励起光は, 同期検出において, 刺激光によって発生した蛍光を除去するために 40 ~ 50 nsec 程イメージング光に対して遅延させる必要がある (5.1 節で説明). 空間を長距離伝搬させた場合ビームウェイト w_0 のビームは距離 z 進むと, $w(z) \sim \lambda z / \pi w_0$ で広がってってしまう. また, 定盤上のスペース上の制限もある. そこで, 中空ファイバー (GLOphotonics; HCPCF-1030-1064-60) を使用して, 33 ns の遅延時間を刺激光に意図的に与えた. 通常の光ファイバ

一の場合、ガラスによる材料分散が加わってしまうが、中空ファイバーでは、光が伝播する部分が空気であるため分散が無視できる。ファイバーへのカップリング損失がなるべく小さくなるように、中空ファイバー前のビーム径を調整することで、86%程度の高いカップリング効率を得た。中空ファイバー後は、7.5 mm で出力されるようにコリメータレンズを設置した。

多光子イメージングと多光子光刺激の実験セットアップは、青点線内に示されている機構になっている。イメージングにおいては、 x 方向をレゾナントスキャナ (RS; Cambridge Technology, CRS 4 KHz) と y 方向をガルバノスキャナ (GS; Cambridge Technology, 6230H) を用いて 2 軸走査を行った。各スキャナは $4f$ 系を通して対物レンズ (Nikon, MRD77225, 25 $\times$) の後方焦点面と共役な位置に配置されている。光刺激においては、自作の透過型エッセル回折格子と DMD (Texas Instruments, DLP4500NIR) が、サンプル面と共役な位置に配置され、時間多重化マルチライン時空間集光が行われる。

2 光子蛍光信号は同じ対物レンズによって収集され、3.2 節で示した検出器ユニットに入射される。イメージング用の励起光パルスによって発生した蛍光パルスのピーク位置と AD サンプリングのタイミングを合わせるため、AD サンプリングのクロック信号を 65 m の BNC ケーブルを用いて遅延させ、タイミングを合わせた (5.1 節で説明)。

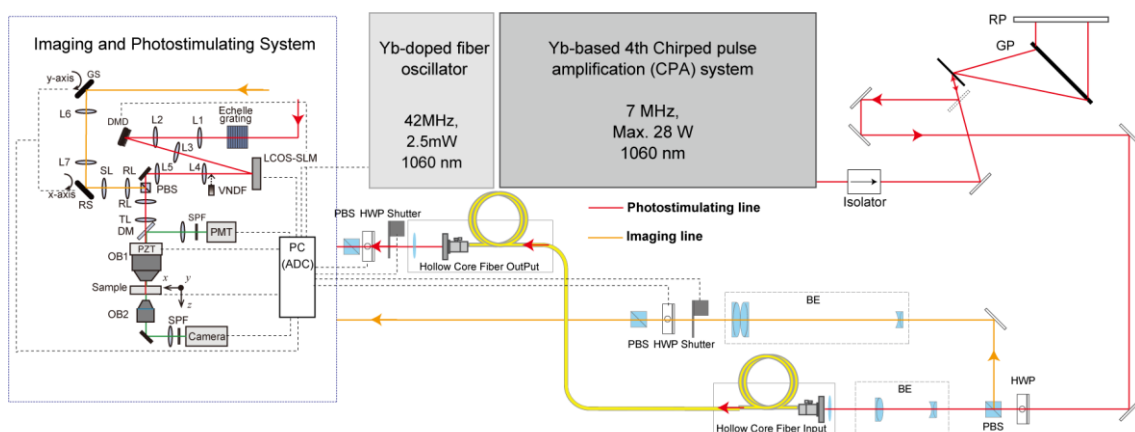


図 3.6 同時多光子顕微鏡と多光子光刺激の光学実験系。RP : ルーフプリズム, GP : グレーティングペア, HWP : 1/2 波長板, PBS : 偏光ビームスプリッタ, BE : ビームエクspander, L : レンズ, GS : ガルバノメトリックスキャナ, RS : レゾナントスキャナ, SL : スキャンレンズ, RL : リレーレンズ, TL : チューブレンズ, DMD : デジタルマイクロミラーデバイス, LCOS-SLM : 液晶空間位相変調素子, VDF : 可変減光フィルタ, DM : ダイクロイックミラー, PZT : ピエゾ圧電素子, OB : 対物レンズ, SPF : ショートパスフィルタ, PMT : 光電子増倍管, ADC : アナログデジタル変換器

3.4 LCOS-SLM による CGH 生成理論と高均一性の獲得

LCOS-SLM は、2 次元上に画素電極が配置されており、画素ごとの電圧に応じた傾きを有する液晶分子によって屈折率が変化し、光の位相成分を変調することが可能である素子である。LCOS-SLM を使用することで、光の空間位相分布を制御し、光学系が持つ空間周波数帯域の範囲内における焦点面近傍に複数のスポットを生成することができる。LCOS-SLM 上の位相分布は、焦点面近傍の各スポットにおける電場から LCOS-SLM 上の電場を逆伝搬して求める反復型アルゴリズムによって計算される。これらのマルチスポット生成アルゴリズム [140–143] は、Gerchberg-Saxton algorithm (GSA) [144,145] がもっとも広く利用されている。マルチスポットアルゴリズムには、様々なアルゴリズムが開発されてきているが、それぞれのアルゴリズムは生成したマルチスポットの光利用効率、スポット強度の均一性、またスポットの標準偏差などが評価され、これらが [143] によくまとまっている。中でも強度に重み係数を与えて各スポットの均一性を更に高めた weighted Gerchberg-Saxton (WGS) algorithm は現在一般的に使用されている。近年では、圧縮センシングを利用して計算の高速化を行う手法 [146] や、実スポットからフィードバックを適用する手法 [45] が用いられる。

本手法では、CGH 手法として、WGSA に回折効率を組み込み、更に得られた実スポットからフィードバックを行う手法 (adaptive weighted Gerchberg-Saxton Algorithm with Diffraction Efficiency, AWGS-DE) を採用した。図 3 に、本手法のアルゴリズムを示す。合計 N 点のスポットからなる LCOS-SLM 面 (瞳面) における複素振幅電場 $E_p(x_p, y_p)$ は、焦点面における電場のフーリエ変換の関係であることから、 m 番目のスポットにおける重み係数 w_m 、求めたいスポット強度 I_m 、回折効率 η_m 、位相シフト量 ϕ_m とすると、LCOS-SLM に入射するビームの振幅を $A_p(x_p, y_p)$ と仮定することで、対物レンズ後方焦点面は各スポットの合成電場として以下のように表せる。

$$E_p(x_p, y_p) = A_p(x_p, y_p) \sum_{m=1}^N \left(\frac{I_m}{\eta_m} \right)^\alpha w_k(m) \exp[i\{\phi_m(x_p, y_p)\}] \quad (3.4.1)$$

本手法では、計算の発散を抑制し、高速化するための $0.0 \sim 0.5$ の値を取る α パラメータを導入した。通常、強度と振幅の関係から α は 0.5 であるが、以下の繰り返しフィードバック計算によって重み係数等の発散が起きてしまう可能性がある。繰り返し計算によって値が収束しない場合は α を小さくすることで、高速に収束が可能となる。 $\phi_m(x_p, y_p)$ は瞳面における各スポットの位相で以下のように表せられる。

$$\begin{aligned} \phi_m(x_p, y_p) &= \phi_{xyz}(x_0, y_0)(m) + \phi_0(m) \\ &= \int \int \frac{\pi z_m}{\lambda f^2} (x_0^2 + y_0^2) + \frac{2\pi}{\lambda f} (x_0 x_m + y_0 y_m) dx_0 dy_0 + rand \end{aligned} \quad (3.4.2)$$

この時、 x_0, y_0 は SLM 面 (x_p, y_p) 上の座標を表す。 $\phi_{xyz}(x_0, y_0)(m)$ は波長 λ , 結像レンズの焦点距離を f としたときの各スポットにおける位相シフト量であり、 Grating (prism) and Lenses algorithm [147]より求めた。 $\phi_0(m)$ は各スポットにおけるオフセット位相であり、スポット間における干渉を抑制するため、初期位相としてランダム位相を採用した。焦点面における電場は、瞳面における電場をフーリエ変換することで求められるが、焦点面近傍の3次元電場を計算できない。焦点面近傍の3次元電場を計算するため、Debye 理論に基づいた3次元フーリエ変換 [141]によって計算することができる。Debye 理論は高 NA 集光による偏向依存を考慮することができ、焦点面近傍に置ける精密な電場を求めることができる計算である。このようにして得られた焦点面近傍の電場における強度分布 $|E_f(x, y)|^2$ をターゲット強度分布 $I_t(x, y)$ と比較し、(3.4.3),(3.4.4) 式で評価する。

$$\sigma = 100 \frac{\sqrt{(I_t - \langle I_m \rangle)^2}}{\langle I_m \rangle} \quad (3.4.3)$$

$$u = 1 - \frac{\max[I_m] - \min[I_m]}{\max[I_m] + \min[I_m]} \quad (3.4.4)$$

このとき、 σ はターゲット強度分布と生成スポットにおける標準偏差、 u は各スポットの均一性である。 I は空間全積分を表しており、 $\langle .. \rangle$ は各スポットにおける平均値を示している。標準偏差もしくは均一性が所望の数値を満たさない場合、瞳面の位相を以下のように更新して、同様に繰り返す。

$$\phi_p^{k+1} = \arg \left[\sum_m e^{i\phi_m} \frac{w_m^k E_p^k}{|E_p^k|} \right] \quad (3.4.5)$$

また、重み係数を以下のように更新する。

$$w_k = w_{k-1} \left\{ \frac{\sum_{i=1}^N \{\eta_i I_i^k(x_i, y_i, z_i)\} / n}{\eta_m I_m^k(x_m, y_m, z_m)} \right\}^\alpha \quad (3.4.6)$$

本手法では、評価の条件として、 $u > 0.99$ を用いた。本来は標準偏差の評価も必要になるが、各スポット位置に一致する強度を均一性評価に使用することで、標準偏差が異なれば均一性が満たされないことから、均一性のみを評価している。 k 回目の繰り返しで (3.4.4) 式が満たされた場合、 ϕ_p^k を採用し、ホログラムを再生する。

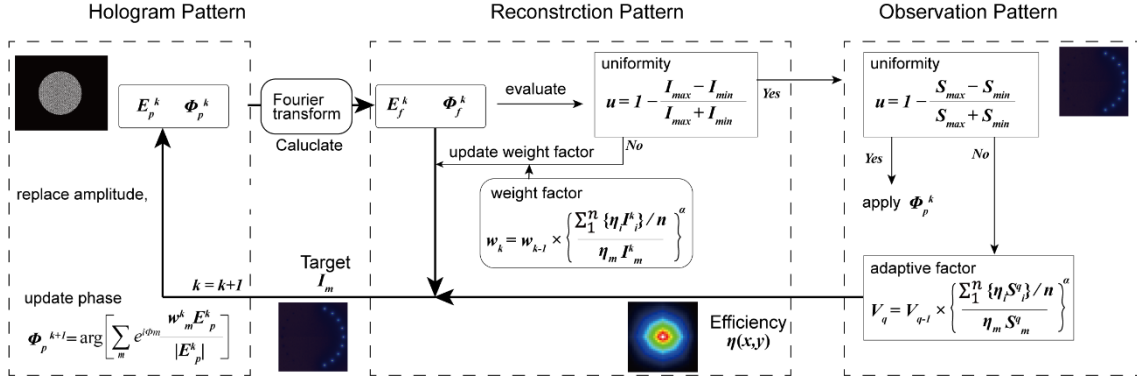


図 3.7 adaptive weighted Gerchberg-Saxton Algorithm with Diffraction Efficiency のブロック

図

この手法では、計算上で十分な均一性を担保しているが、実際の SLM に入射するレーザー情報が異なる場合、実際に得られる像の均一性が悪化する。実際に、Rhodamine B 溶液を用いて、円弧上に 9 点の多点スポットを生成したときに得られた二光子蛍光画像の結果を図 3.8 (a) に示した。計算上の均一性は 0.99 を超えているが、実測すると拡大画像からわかるように、スポットの強度のばらつきが多く、その均一性は 0.92 程度である。この均一性は二光子蛍光像から励起光強度に変換して計算している。この均一性を向上するため、図 3.7 に示したように、観察画像を考慮して、(3.4.1) 式を再構築する。

$$E_q(x_p, y_p) = A_p(x_p, y_p) \sum_{m=1}^N \left(\frac{1}{\eta_m} \right)^\alpha w_k(m) V_q(m) \exp[i\{\phi_m(x_p, y_p)\}] \quad (3.4.7)$$

$$V_q(m) = V_{q-1}(m) \left\{ \frac{\sum_{i=1}^N \{\eta_i S_i^q(x_i, y_i, z_i)\} / n}{\eta_m I_m^q(x_m, y_m, z_m)} \right\}^\alpha \quad (3.4.8)$$

ここで、 S は観察結果より測定した強度である。この手法を取り入れた結果を図 3.8 のように、7 回目のフィードバックによって均一性 0.996 となった。このように、実験結果をフィードバックすることで、さらに均一性を向上することができる。この手法は、事前にパターンが既知の場合や、対象が再現性のある場合に大きく有効である。

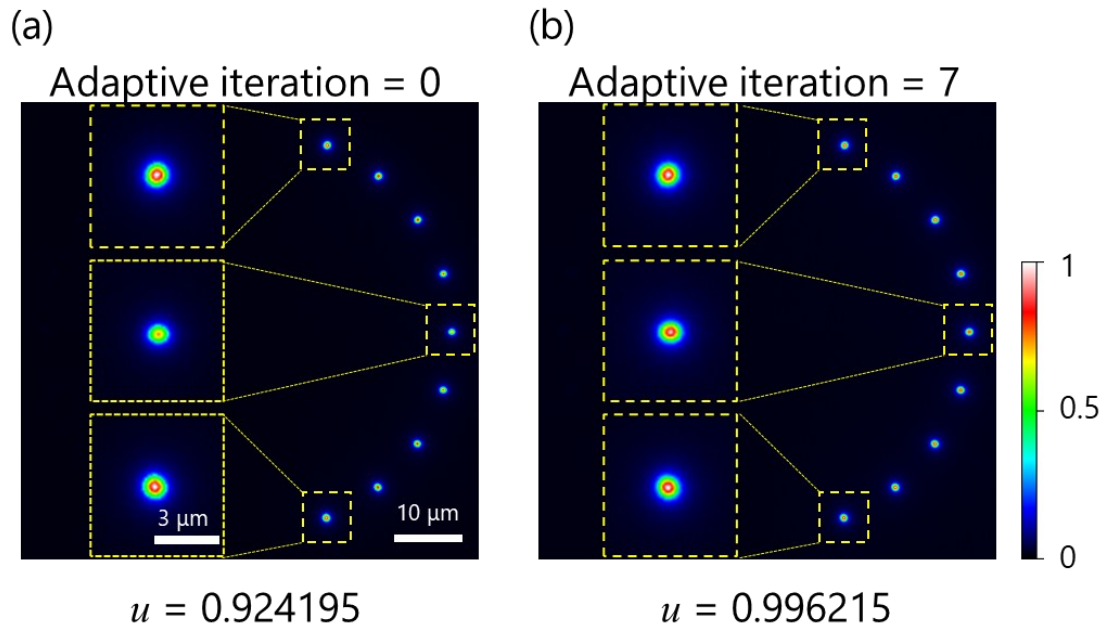


図 3.8 Rhodamine B 溶液を用いた多点スポットパターンにおける 2 光子蛍光画像.
 (a) アダプティブ制御無し. 均一性 : 0.924195. (b) アダプティブ制御繰り返し数 7.
 均一性 : 0.996215.

第4章 単一細胞同時制御のための時間多重化マルチライン時空間集光三次元光刺激技術

2.1.2 項で述べたように、高速に応答するオプシンの開発に伴い、高い時間分解能で多くのオプシン分子を活性化させる光刺激技術が求められている。同時に刺激する細胞の数が増えるほど、時間分解能が低下してしまう走査型光刺激技術に比べ、非走査型である時空間集光ホログラフィはパターン照明によって複数の細胞を同時に刺激できる。しかしながら、刺激対象である細胞が隣接している場合、分光方向と垂直な方向において複数のスポットが干渉を起こすため、空間的に精密なパターン生成が困難となる。加えて、時空間集光の励起分布の半値幅は $5\text{ }\mu\text{m}$ 程度であるが、 $1/e^2$ 値幅では $20\text{ }\mu\text{m}$ を超えてしまうため、光軸方向での干渉も大きく、単一細胞分解能での刺激は困難である。我々は、2.3.3 項で説明した時間多重化マルチライン時空間集光技術と CGH を組み合わせ、多光子光刺激技術に応用した。これにより、パターン照明時においても面内、光軸方向ともに単一細胞サイズに合った多光子光刺激技術を開発した。

第4章では、時間多重化マルチライン時空間集光を用いた光刺激セットアップにあった自作エッシェル回折格子の最適条件出しや刺激可能範囲について説明を行う。また、時間多重化マルチライン時空間集光法の効果と性能評価を既存技術である時空間集光法と比較をしながら行った。4.4 節と 4.5 節でその評価方法と評価結果について報告する。最後に、3次元細胞培養したスフェロイドへの光刺激結果について報告する。

4.1 エッシェル回折格子の理論

4.1.1 自作エッシェル回折格子の最適パラメーターの決定

時空間集光法と組み合わせた時間多重化マルチライン集光では、パルス幅が伝播とともに変化するため、エッシェル回折格子の階段幅を a 、階段の厚みを d の決定は 2.3.3 項で説明したような単純な考え方だけでは不十分である。エッシェル回折格子のパラメーター最適化のため、図 4.1 に時間多重化マルチライン時空間集光法の概念図を示す。時間多重化されたパルスがブレード回折からエッシェル回折格子に対する結像倍率 M_1 でブレード回折格子へ入射するときを考える。分割された各パルスは、時間多重化方向(y)のビーム径 a/M_1 を持ってブレード回折格子へそれぞれ到達する。また、時間多重化方向と垂直な方向(x)では、角度 α で入射されるため、瞬時的には同一パルスのビーム内で回折格子上に到達するタイミングがずれる。このとき、パルス幅 τ のパルスが伝播しているとする、回折格子上における瞬時的な x 方向のビーム径は $c\tau/\cos\alpha$ を持ち、回折格子上でビームレットとなる。この回折格子上におけるビームが結像倍率 M_2 の $4f$ 系によってサンプル上に結像されるため、最終的には以下のビーム径を有する。

$$w_x = \frac{c\tau/2}{M_2 \cos \alpha} \quad (4.1.1)$$

$$w_y = \frac{a/2}{M_1 M_2} \quad (4.1.2)$$

瞬時的な回折格子上的のビームレット間における空間距離は

$$L = \sqrt{\left\{ \frac{d(n-1)}{M_2 \cos \alpha} \right\}^2 + \left\{ \frac{a}{M_1 M_2} \right\}^2} \quad (4.1.3)$$

となる。

ここで、回折格子上で同時に存在するビームレットは、見方を変えると周期的に存在する格子（スリット）から発生する光としてとらえることができる。周期的な格子を通過した平面波は、格子面から格子の像を一定の周期で繰り返すタルボット効果をもたらす。従って、焦点面外での励起を局所化するためには最初にタルボットサブイメージが現れる光軸長（サブタルボット長）をレイリー長よりも十分に短くする必要がある。参考文献 [114]では、サブタルボット長をレイリー長の 2 倍まで大きくすることで、十分に焦点面外での励起を抑制できることが示されている。

タルボット効果によって得られるサブタルボット長とレイリー長は以下のように定義できる。

$$z_{talbot} = n_{im} \frac{2L^2}{\lambda} \quad (4.1.4)$$

$$z_R = \frac{\pi w_0^2}{\lambda} \quad (4.1.5)$$

ここで w_0 は焦点面におけるビームウェイト、 λ は真空におけるレーザーの中心波長、 n_{im} は集光点における屈折率を表している。ビームウェイトは(4.1.1),(4.1.2)式より、長い方のレイリー長を考慮して求めればよい。よって、レイリー長とサブタルボットの長の関係は x 方向の場合、

$$\begin{aligned} 2z_{Rx} &\leq z_{talbot} \\ \frac{2\pi}{\lambda} \left(\frac{c\tau/2}{M_2 \cos \alpha} \right)^2 &\leq \frac{2}{\lambda} n_{im} \left[\left\{ \frac{d(n-1)}{M_2 \cos \alpha} \right\}^2 + \left\{ \frac{a}{M_1 M_2} \right\}^2 \right] \\ \pi \frac{c^2 \tau^2}{4 \cos^2 \alpha} &\leq n_{im} \left(\frac{d^2 (n-1)^2}{\cos^2 \alpha} + \frac{a^2}{M_1^2} \right) \end{aligned} \quad (4.1.6)$$

y 方向の場合は

$$\begin{aligned}
2z_{Ry} &\leq z_{talbot} \\
\frac{2\pi}{\lambda} \left(\frac{a/2}{M_1 M_2} \right)^2 &\leq \frac{2}{\lambda} n_{im} \left[\left\{ \frac{d(n-1)}{M_2 \cos \alpha} \right\}^2 + \left\{ \frac{a}{M_1 M_2} \right\}^2 \right] \\
\pi \frac{a^2}{4M_1^2} &\leq n_{im} \left(\frac{d^2(n-1)^2}{\cos^2 \alpha} + \frac{a^2}{M_1^2} \right)
\end{aligned} \tag{4.1.7}$$

となり、タルボット効果による焦点面外の励起抑制には、 M_2 が関係しないことが分かる。ここで、(4.1.1)式は回折格子への入射角とパルス幅、倍率 M_2 で決まってしまうため、エッシェル回折格子のパラメーターによる影響はほとんどない。従って、(4.1.6)式が成り立つ条件 ($M_2 = \text{const}$) のもとで、(4.1.7)式の条件を満たすような a, d, M_1 の最適化が必要である。時間多重化マルチライン集光によって最大の分解能を獲得するためには、ビームウェイストが回折限界と一致する場合であるから、次の関係式が成り立つ

$$\begin{aligned}
w_{Ry} &= \frac{\lambda}{2NA} \\
\frac{a}{2M_1 M_2} &= \frac{\lambda}{2NA} (=s)
\end{aligned} \tag{4.1.8}$$

ここで NA は対物レンズの開口数である。階段幅 a 倍率 M_1 は常に次の関係である。

$$\frac{a}{M_1} = 2sM_2 \tag{4.1.9}$$

従って、(4.1.4),(4.1.5)式に(4.1.9)式を代入すると

$$z_{talbot} = n_{im} \frac{\left\{ \frac{d(n-1)}{M_2 \cos \alpha} \right\}^2 + \left\{ \frac{a}{M_1 M_2} \right\}^2}{\lambda} \tag{4.1.10}$$

$$\begin{aligned}
&= \frac{n}{\lambda} \left[\frac{d(n-1)}{M_2 \cos \alpha} + 4s^2 \right] \\
z_{Ry} &= \frac{\pi}{\lambda} \left(\frac{a}{2M_1 M_2} \right)^2 \\
&= \frac{\pi}{\lambda} s^2
\end{aligned} \tag{4.1.11}$$

となる。 M_2 は定数とみなせるから、タルボット長を長くするためには、 d を大きくするか、 n を大きくするほかない。

本実験では、二種類の階段幅を持つエッシェル回折格子 $a = 750 \text{ } \mu\text{m}$, $1020 \text{ } \mu\text{m}$, 厚み $d = 550 \text{ } \mu\text{m}$ を用意した。 $a = 750 \text{ } \mu\text{m}$, $d = 550 \text{ } \mu\text{m}$, $\lambda = 1.06 \text{ } \mu\text{m}$, $\tau = 108 \text{ fs}$, $\alpha = 23.1^\circ$, $M_1 = 4.0$, $M_2 = 187.5$, $n_{im} = 1.333$ としたとき、各方向のレイリー長は $z_{Rx} = 0.188 \text{ } \mu\text{m}$, $z_{Ry} = 0.988 \text{ } \mu\text{m}$, であり、タルボット長 $z_{talbot} = 2.291 \text{ } \mu\text{m}$ と得られ、2倍のレイリー長 ($= 2 \times 0.988 = 1.98 \text{ } \mu\text{m}$) 以上のサブタルボット長となる。

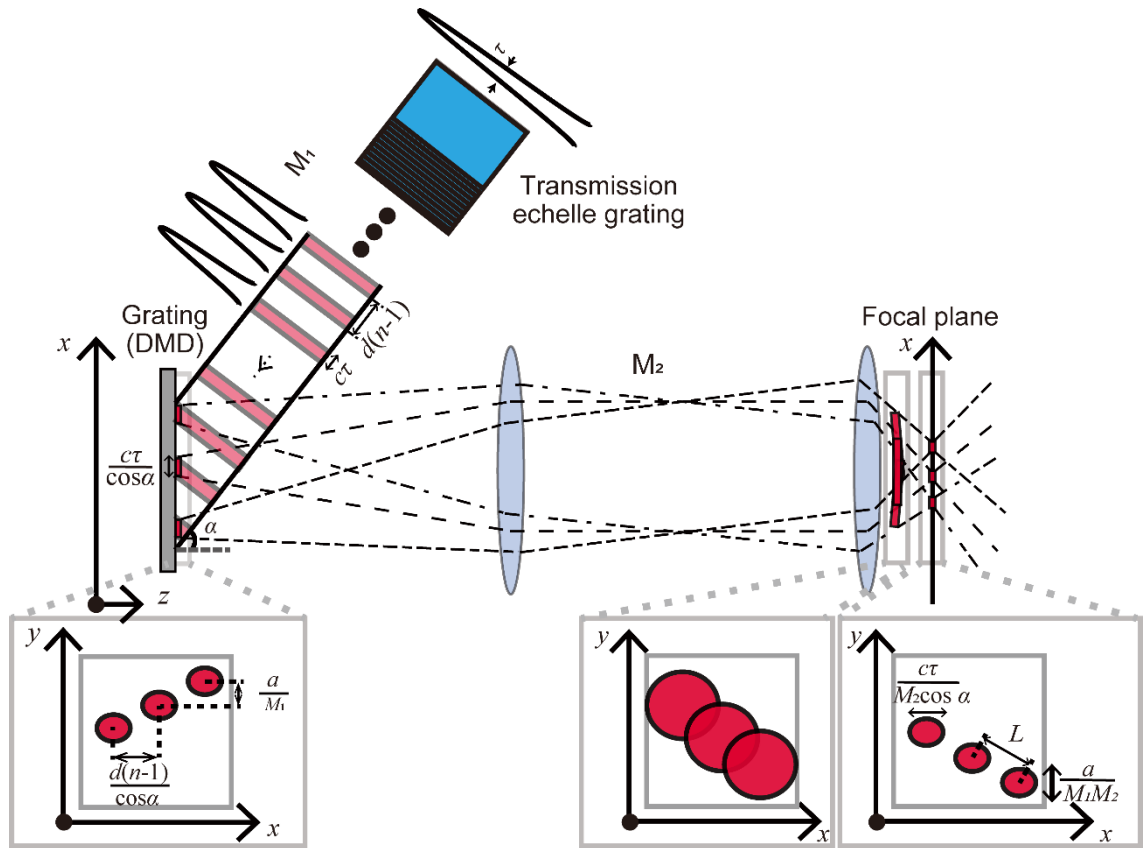


図 4.1 エッシェル回折格子とブレード回折格子組み合わせによる複数瞬時ビームの伝播.

4.1.2 時間多重化マルチライン時空間集光法による二次元分光

4.1.1 項で、時間的観点から焦点面近傍における挙動を考慮し、エッシェル回折格子の最適化を行った。本項では、周波数的観点から瞳面における挙動を解説する。

本実験で用いたエッシェル回折格子は、カバーガラスを階段状に組み上げることで作製している。カバーガラスには、AR コーティングが施されているため、カバーガラス間にシムプレートを挟むことで透過率を高めている。図 4.2 (a) で示しているように、カバーガラスに垂直に入射した光は、回折角を θ としたとき、以下の回折条件が発生する。

$$nd + s - \sqrt{a^2 + (d + s)^2} \sin \theta = m\lambda \quad (4.1.12)$$

ここで d と n はそれぞれカバーガラスの厚みと屈折率であり、 a はエッシェル回折格子の階段幅をまた s はシムプレートの厚みを表している。回折効率を最大化するためには、ブレード角として回折角が 0° であるべきである。よって、(4.1.2)式から、ブレード波長は

$$\lambda_{blazed} = \frac{nd + s}{m} \quad (4.1.13)$$

となる．各パラメーター条件 $n = 1.51$, $d = 550 \text{ } \mu\text{m}$, $s = 50 \text{ } \mu\text{m}$, and $a = 750 \text{ } \mu\text{m}$, $\lambda_0 = 1060 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = \pm 20 \text{ nm}$ としたときの各波長における回折次数の計算結果を図 4.2 (b) に示した．このように，エッシェル回折格子によって 815~846 次の y 方向において複数の高次回折光が発生する．

また，エッシェル回折格子から出射した複数の高次回折光は，ブレード回折からエッシェル回折格子までの結像倍率 $M_I (= 1/4)$ でブレード回折格子に入射し，焦点距離 1000 mm のレンズで LCOS-SLM 面上に入射する．その後，結像倍率 1.5 倍で対物レンズ (Nikon, MRD77225, 25x) の瞳に入射する．対物瞳径が 17.6 mm であることから，エッシェル回折格子から瞳に入射可能な回折角は 0.08° と計算できる．ここで，3.1 節で示したレーザーのスペクトル帯域は $1042 \text{ nm} \sim 1072 \text{ nm}$ であることから，820~845 次の複数の高次回折光がサンプルに照射されることになる．これらの複数の高次回折光は，ブレード回折格子によって x 方向にも回折が起きるため，2次元方向に周波数が分布する (図 4.2 (c))．この時，単一波長でのスポット径が隣接する回折光のオーダー間の間隔よりも小さい場合、瞳面上に傾斜したストライプパターンが現れることとなる．このように，周波数の観点からも，瞳面において二次元に周波数掃引が行われ，対物レンズの瞳を満たすため，深さ方向の分解能が向上することが説明できる．

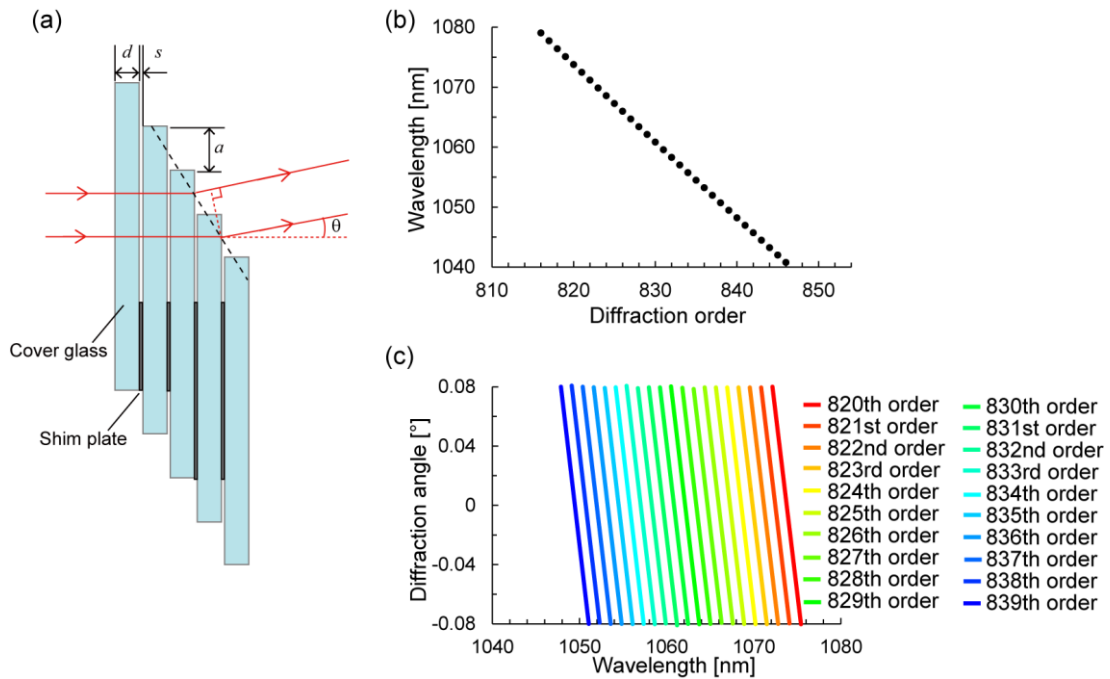


図 4.2 (a) 自作エッシェル回折格子の模式図． d :エッシェル回折格子厚み, s :シムプレート厚み, a :エッシェル回折格子階段幅． θ :エッシェル回折格子通過後の回折光角度． $n = 1.51$, $d = 550 \text{ } \mu\text{m}$, $s = 50 \text{ } \mu\text{m}$, and $a = 750 \text{ } \mu\text{m}$,.としたときの (b) ブレード波長と回折次数の関係と (c) 回折角とブレード波長の関係．

4.2 光刺激範囲

LCOS-SLM による光刺激において、時間/空間分解能以外に重要になってくるのが、光刺激照射範囲になる。パターン照明による光刺激の最大シフト量は、以下で説明する LCOS-SLM の性能と、その光学系で決定される。また、光刺激範囲を定義するためには、最大シフト量だけでなく、その回折効率も重要となる。

4.2.1 面内方向における照射範囲と回折効率

面内方向におけるスポットシフトを行うためには、回折格子と同等の位相を LCOS-SLM に描いてあげればよい。従って、LCOS-SLM 面上における位相分布は

$$\phi_{xy}(x, y) = \frac{2\pi}{\Lambda_x}x + \frac{2\pi}{\Lambda_y}y, \quad (4.2.1)$$

となる。ここで、ここで、 Λ_x, Λ_y は SLM 上に仮想的に設定される回折格子の格子間隔であり、焦点面上でのシフト量を $\Delta x, \Delta y$ と置けば、次式の関係が成り立つ。

$$\begin{aligned} \phi_{xy}(x, y) &= \frac{Mk_0}{f_{OB}}(\Delta x x + \Delta y y), \\ \therefore \Delta x &= \frac{\lambda f_{OB}}{M\Lambda_x}, \Delta y = \frac{\lambda f_{OB}}{M\Lambda_y}, \end{aligned} \quad (4.2.2)$$

このとき、このとき、 λ は波長、 k_0 は真空における波数、 f_{OB} は対物レンズの焦点距離、 M は SLM から瞳面までの倍率である。SLM のピクセルサイズ a は有限であるため、最小の格子間隔は、 $\Lambda_{min} = a$ となる。しかし実際は SLM が離散的なピクセル素子であるため、サンプリング周波数 $1/a$ に等しく、エイリアシングが発生しないためには、使用可能な最小の格子間隔は $2a$ となる。従って、最大のシフト量は

$$|\Delta x|_{max} = \frac{\lambda f_{OB}}{2aM}, \quad (4.2.3)$$

である。

面内方向における回折効率は、以下のような式で表すことができる [148].

$$\begin{aligned} P &= \left[\frac{\sin\left(\frac{\pi Ma\Delta x}{\lambda f_{OB}}\right)}{\frac{\pi Ma\Delta x}{\lambda f_{OB}}} \right]^2 \left[\frac{\sin\left(\frac{\pi Ma\Delta y}{\lambda f_{OB}}\right)}{\frac{\pi Ma\Delta y}{\lambda f_{OB}}} \right]^2 \\ &= \left[\frac{\sin(\pi v_x a)}{\pi v_x a} \right]^2 \left[\frac{\sin(\pi v_y a)}{\pi v_y a} \right]^2 \end{aligned} \quad (4.2.4)$$

ここで、 v_x, v_y は x, y 方向における LCOS-SLM 上の空間周波数である。

4.2.2 光軸方向における照射範囲と回折効率

光軸方向における焦点面上でのシフト量を Δz とすると、近軸近似のもとで、以下の関係が成り立つ。

$$\phi_z(x, y; r) = -\frac{Mk_0\Delta z}{f_{OB}} \left(\sqrt{\frac{f_{OB}^2 n_{im}^2}{M^2} - r^2} \right), \quad (4.2.5)$$

$$\therefore \Delta z = \frac{f_{OB}}{2Mf_{SLM}} \frac{r^2}{\sqrt{\frac{f_{OB}^2 n_{im}^2}{M^2} - r^2}},$$

ここで、 $r^2 = (x^2 + y^2)$, f_{OB} は対物レンズの焦点距離、 n_{im} は媒質の屈折率、 M は瞳面から LCOS-SLM までの倍率である。このとき、 $\Delta z > 0$ の場合は焦点が対物レンズの後方に、 $\Delta z < 0$ の場合は前方にシフトする。よって LCOS-SLM 上に投影される空間周波数は、

$$\frac{1}{2\pi} \frac{\partial}{\partial r} \phi_z(r) = \frac{Mk_0\Delta z}{f_{OB}} r \frac{1}{\sqrt{\frac{f_{OB}^2 n_{im}^2}{M^2} - r^2}} \quad (4.2.6)$$

と与えられる。先ほど同様、ナイキスト周波数は $1/2a$ であるから、エイリアシングが発生しないためには、

$$\frac{Mk_0\Delta z}{f_{OB}} r \frac{1}{\sqrt{\frac{f_{OB}^2 n_{im}^2}{M^2} - r^2}} \leq \frac{\pi}{a}, \quad (4.2.7)$$

との関係が成り立つときである。LCOS-SLM 上に投影される空間周波数は二次位相であり、 r が最大の時最も大きいことを考慮すると、LCOS-SLM の有効径を最大限使用する場合、 $r_{\max}$ は NA と焦点距離 f_{OB} から $r_{\max} = NA f_{OB} / M$ と定義できるので、(4.2.7)式より

$$|\Delta z_{\max}| = \frac{\lambda_0 f_{OB} \sqrt{n_{im}^2 - NA^2}}{2aMNA}, \quad (4.2.8)$$

とえられる。

光軸方向における回折効率を考えるためには、面内方向における回折効率同様、空間周波数 v_x, v_y を(4.2.4)式に当てはめればよい。光軸方向シフトにおける空間周波数は(4.2.6)式より一定ではなく、LCOS-SLM 面上の空間位置 r に依存していることが分かる。つまり、 r が大きくなるほど、空間周波数が大きくなり、回折効率が低下する。従って、ビーム径の端によるほどレーザー強度が低下することになる。また LCOS-SLM 面は対物レンズの瞳と共役な位置に配置されているので、実効的な NA が低下してしまうこととなる。従って、光軸

方向へ大きなシフトを与えると、回折効率による蛍光強度の減少だけでなく、分解能の低下にも繋がる。

4.3 時空間集光ホログラフィにおける残留分散の影響

LCOS-SLM では、基本的に単一波長における位相変調を前提として考えられている。LCOS-SLM と時空間集光法を組み合わせる場合、波長が LCOS-SLM 上の一軸方向に掃引されるため、設計波長と各ピクセルの波長差による位相変調誤差がパルスのスペクトル位相歪み（残留分散）となって時間波形に影響する。そのため、分光方向に沿って各波長に対応した補正位相マスクを適用することが望ましい。

例として、LCOS-SLM 上にブレード回折格子の位相を与え、集光スポットを x 方向にシフトする際にかかる残留分散を計算する。図 4.3 のように、中心波長 λ_0 が LCOS-SLM 上の点 x_0 上に来たとして、波長が空間一軸方向に掃引されている場合、空間座標 x_i と波長 λ_x の関係は一意に決まるため

$$\lambda_x = \alpha(x_i - x_0) + \lambda_0, \quad (4.3.1)$$

$$x_i - x_0 = \frac{\lambda_x - \lambda_0}{\alpha} \quad (4.3.2)$$

と表すことができる。このとき、 α は回折格子の格子定数 d と入射角 θ_i 、フーリエレンズの焦点距離 f で決まる空間当たりの波長シフト量である。したがって、

$$\alpha = \frac{d\lambda}{dx} = -\frac{d \cos \theta_d}{mf} \quad (4.3.3)$$

と求められる。このとき、正確には $\cos \theta_d$ が波長依存性を持つが、 $\Delta\lambda \ll \lambda_0$ であることから中心波長で近似した。

集光スポットの位置が x であるときの LCOS-SLM の x_i の位相は (4.2.1) 式より、

$$\phi(x_i) = \frac{2\pi}{\lambda_x M f_{OB}} x x_i \quad (4.3.4)$$

ここで、 $x \sim f_{OB} \sin \theta_d$ の関係から求めた。このとき、 f_{OB} は対物レンズの焦点距離、 M は対物レンズ後方焦点面から SLM 面までの結像倍率、 θ_d は回折角である。よって、波長 λ_x における中心波長 λ_0 との位相差は以下のように求められる。

$$\begin{aligned}
\Delta\phi &= \phi(x_i) - \phi(x_0) \\
&= \frac{2\pi x}{\lambda_x M f_{OB}} x_i - \frac{2\pi x}{\lambda_0 M f_{OB}} x_0 \\
&= \frac{x}{M f_{OB}} \left(\frac{1}{\lambda_x} - \frac{1}{\lambda_0} \right) (x_i - x_0) \\
&= \frac{x}{c M f_{OB}} (\omega_x - \omega_0) (x_i - x_0)
\end{aligned} \tag{4.3.5}$$

ここで, ω は角周波数, c は光速であり $\omega = 2\pi c/\lambda$ より求めた. (4.3.2) 式を代入すると,

$$\begin{aligned}
\Delta\phi &= \frac{x}{c M f_{OB}} (\omega_x - \omega_0) \left\{ -\frac{2\pi c}{\alpha \omega_x \omega_0} (\omega_x - \omega_0) \right\} \\
&= -\frac{2\pi x}{\alpha M f_{OB} \omega_x \omega_0} (\omega_x - \omega_0)^2
\end{aligned} \tag{4.3.6}$$

と得られる. つまり, 中心波長 λ_0 に基づいた計算位相マスクを適用したときに発生する各周波数における LCOS-SLM 上の位相誤差 $\Delta\phi(\omega_x)$ を表している. したがって, $A \equiv 2\pi x/\alpha M f_{OB} \omega_0$ と置いて ω_x で微分することで, 群遅延 (GD) 及び群遅延分散 (GDD), 3 次分散 (TOD) を評価できる.

$$\begin{aligned}
GD(\omega_x)|_{\omega_0} &= \frac{d}{d\omega_x} \left(-\frac{A}{\omega_x} (\omega_x - \omega_0)^2 \right) \\
&= -A \left[\frac{d}{d\omega_x} \left(\frac{1}{\omega_x} \right) (\omega_x - \omega_0)^2 + \frac{1}{\omega_x} \frac{d}{d\omega_x} (\omega_x - \omega_0)^2 \right] \\
&= -A \left[-\frac{1}{\omega_x^2} (\omega_x - \omega_0)^2 + \frac{1}{\omega_x} 2(\omega_x - \omega_0) \right] \\
&= \frac{A}{\omega_x^2} (\omega_x - \omega_0)^2 - \frac{2A}{\omega_x} (\omega_x - \omega_0) \\
&= 0
\end{aligned} \tag{4.3.7}$$

$$\begin{aligned}
GDD(\omega_x)|_{\omega_0} &= \frac{d^2}{d\omega_x^2} \left(-\frac{A}{\omega_x} (\omega_x - \omega_0)^2 \right) \\
&= \frac{d}{d\omega_x} \left[\frac{A}{\omega_x^2} (\omega_x - \omega_0)^2 - \frac{2A}{\omega_x} (\omega_x - \omega_0) \right] \\
&= -\frac{2A}{\omega_x^3} (\omega_x - \omega_0)^2 + \frac{2A}{\omega_x^2} (\omega_x - \omega_0) + \frac{2A}{\omega_x^2} (\omega_x - \omega_0) - \frac{2A}{\omega_x} \\
&= 2A \left[-\frac{1}{\omega_x^3} (\omega_x - \omega_0)^2 + \frac{2}{\omega_x^2} (\omega_x - \omega_0) - \frac{1}{\omega_x} \right] \\
&= -\frac{2A}{\omega_0}
\end{aligned} \tag{4.3.8}$$

$$\begin{aligned}
TOD(\omega_x)|_{\omega_0} &= \frac{d}{d\omega_x} \left[2A \left(-\frac{1}{\omega_x^3} (\omega_x - \omega_0)^2 + \frac{2}{\omega_x^2} (\omega_x - \omega_0) - \frac{1}{\omega_x} \right) \right] \\
&= \frac{6A}{\omega_x^4} (\omega_x - \omega_0)^2 - \frac{12A}{\omega_x^3} (\omega_x - \omega_0) + \frac{6A}{\omega_x^2} \\
&= \frac{6A}{\omega_0^2}
\end{aligned} \tag{4.3.9}$$

この結果から、スポットシフト量 x が大きく、空間当たりの波長シフト量 α と対物レンズの焦点距離が小さいほど、GDD と TOD が大きくなることが分かる。

また、同様に z 方向シフトにおける位相差による分散量を求めると、

$$GD(\omega_x)|_{\omega_0} = B \cdot C \tag{4.3.10}$$

$$GDD|_{\omega_0} = \frac{2B \cdot D}{\omega_0} \tag{4.3.11}$$

$$TOD|_{\omega_0} = -\frac{6B \cdot D}{\omega_0^2} \tag{4.3.12}$$

$$\therefore B \equiv \frac{z}{2cM^2f_{OB}^2}, C \equiv x_0^2 + \frac{4\pi cx_0}{\alpha\omega_0}, D \equiv \left(\frac{2\pi c}{\alpha} \right)^2 \frac{1}{\omega_0^2} \tag{4.3.13}$$

と求められる。2.3.2 項で説明したように、時空間集光では、GDD は z 方向にスポットシフトをさせる。したがって、GDD によるスポットのずれ量を測定して、補正する必要がある、

スポットのずれ量を測定せずに、この問題を解決するため、本手法では、波長スケールリングを導入した。中心波長 λ_0 における LCOS-SLM が与える位相変調量を $\Delta\phi(\lambda_0)$ とすると、以下のように表せる。

$$\Delta\phi_0(\lambda_0) = \frac{2\pi}{\lambda_0} \cdot \Delta n(\lambda_0) \cdot d \tag{4.3.14}$$

ここで、 Δn は液晶の屈折率変化量、 d は液晶層の厚みである。したがって、(4.3.14) 式に波長スケールリング係数 λ/λ_0 を導入することで λ の中心波長との位相誤差を修正できる。

$$\Delta\phi(\lambda) = \frac{\lambda_0}{\lambda} \Delta\phi_0(\lambda_0) \tag{4.3.15}$$

また、このとき、屈折率変化量 Δn も同様に波長に依存する点に注意が必要である。波長 λ において 2π の位相変調を与えるのに必要な印可電圧 V としたとき、屈折率変化量 Δn は以下の関係式で表すことができる。

$$\Delta n(\lambda) = \frac{\Delta n_0(\lambda_0)}{V_0(\lambda_0)} V(\lambda) \quad (4.3.16)$$

ここで、 $\Delta n_0(\lambda_0), V_0(\lambda_0)$ は中心波長 λ_0 における屈折率変化量と 2π の位相変調を与えるのに必要な基準電圧である。(4.3.14) - (4.3.16) 式より中心波長における位相と、各波長の 2π だけ位相変調するために必要な印可電圧を得られることさえできれば、波長スケーリング係数と電圧スケーリング係数をかけることで各波長の正確な位相を取得できる。通常、電圧は LCOS-SLM メーカーによって用意されており、 $V(\lambda)$ を得ることは容易である。位相マスク $\phi_0(\lambda_0)$ も同様にメーカーによって用意されているが LCOS-SLM で与えられる位相変調量は制限があり $0 \sim 2\pi$ の範囲で表現するラッピング処理がされるため、(4.3.14) 式は次のように表される：

$$\begin{aligned} \Delta\phi_0^{Wr} &= \Delta\phi_0 \bmod 2\pi \\ &= \Delta\phi_0 - 2\pi \left\lfloor \frac{\Delta\phi_0}{2\pi} \right\rfloor \\ &= \Delta\phi_0 - \theta_{offset} \end{aligned} \quad (4.3.17)$$

ここで $\lfloor \cdot \rfloor$ は floor function であり、 $\theta_{offset} = 2\pi \left\lfloor \frac{\Delta\phi_0}{2\pi} \right\rfloor$ と置いた。またメーカーから得られる情報はこのラッピング処理後の画像情報であるため オフセット位相 θ_{offset} の情報は失われてしまう。オフセット位相がない状態で $\Delta\phi_0 = \Delta\phi_0^{Wr}$ とみなし、(4.3.15) 式を適用すると、以下のように本来の位相変調量と誤差が生じる：

$$\Delta\phi^{Wr} = \frac{\lambda_0}{\lambda} (\Delta\phi_0 - \theta_{offset}) \quad (4.3.18)$$

このように、 θ_{offset} 分の波長スケーリングした誤差になるため中心波長との差が大きいほど影響が大きくなる。従って、用意された単一波長マスクを用いるだけでは不十分であり、オフセット位相を求める必要がある。メーカーによって用意された位相マスクは図 1 のように各波長によってそれぞれ準備されているため、各位相成分の差をとることでオフセット位相を測定することができる。ある波長 λ_1 における画像から得られる補正マスク位相は

$$\Delta\phi_1^{Wr} = \Delta\phi_1 - \theta_{offset} \quad (4.3.19)$$

であるから、補正マスク位相は

$$\Delta\phi_1 = \Delta\phi_1^{Wr} + \theta_{offset} \quad (4.3.20)$$

となる。このとき、 θ_{offset} は未知の数値である。同様に、別の波長 λ_2 の補正位相から波長 λ_1 における補正位相は下のよう求められる。

$$\Delta\phi_1 = \frac{\lambda_2}{\lambda_1} \Delta\phi_2 \quad (4.3.21)$$

従って、(5)式,(6)式と(7)式を用いることで

$$\begin{aligned} \Delta\phi_1^{Wr} + \theta_{offset} &= \frac{\lambda_2}{\lambda_1} (\Delta\phi_2^{Wr} + \theta_{offset}) \\ (\lambda_1 - \lambda_2)\theta_{offset} &= \lambda_2 \Delta\phi_2^{Wr} - \lambda_1 \Delta\phi_1^{Wr} \\ \therefore \theta_{offset} &= \frac{\lambda_2 \Delta\phi_2^{Wr} - \lambda_1 \Delta\phi_1^{Wr}}{\lambda_1 - \lambda_2} \end{aligned} \quad (4.3.22)$$

とオフセット位相を求めることができる。ただし、実際波長によっては θ_{offset} が異なる場合がある。本来補正マスクは、中心の位相量が最大になるが、固定オフセット量で波長が異なると、中心のラップされた位相は波長スケーリング分シフトする。このシフトによって、中心の位相よりも周辺の位相のほうが、値が大きくなることがあり、それを防ぐために特定のオフセット量を与えている場合がある。この点に注意しておけば、(4.3.22)式を適用するだけでよい。

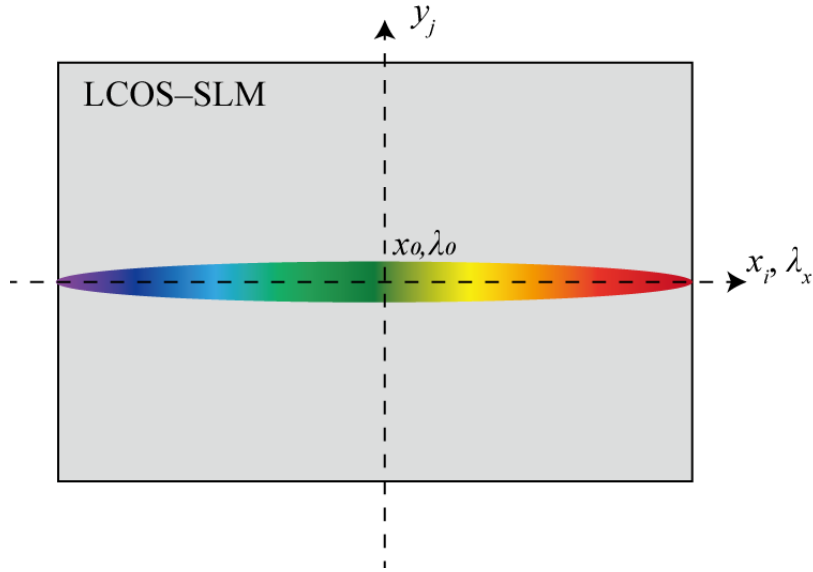


図 4.3. 時空間集光ホログラフィにおける LCOS-SLM 上のビームプロファイル概要図，ブレード回折格子によって周波数が一軸方向に掃引される． λ : 波長．

4.4 実験内容

我々は時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィにおける性能評価を行った．実験セットアップは図 3.6 で示した通りである．実験内容を以下に示す．

- LCOS-SLM の熱問題評価
- 二光子パターン照明評価
- スポットシフト変位量と回折効率/分解能の関係評価

- 時空間集光の波長スケーリング補正による分散補償
- 3次元培養細胞スフェロイドを用いた3次元光変換

4.4.1 LCOS-SLM の熱問題評価

LCOS-SLM は通常、セル内の電極表面にイオンが蓄積してしまい応答速度が低下してしまうのを避けるために、交流で駆動する。この交流駆動の速度はメーカーによって異なるが、本実験で用いた浜松ホトニクス製 LCOS-SLM は 120 Hz 駆動と遅めに設定されているため、液晶分子がこの駆動周波数に追従し、位相変調される光の位相が周期的に変動する。特にこの時間的な振動量は、LCOS-SLM の温度によって変化することが知られている。そのため時空間集光ホログラフィでは 4.3 節で述べたように、LCOS-SLM 上で一次元的方向に分光されるため、局所的な強度が高くなり、LCOS-SLM の熱を局所的に上昇させてしまう。これによってパターン照明における強度パターンが時間的に振動する。時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィでは、4.1.2 項で示したように、二次元分光が行われるため、局所的な熱の上昇を抑制できる。

これを評価するため、LCOS-SLM によってスポットシフトした光を生成し、位相変調時の二光子蛍光強度の時間変化を CMOS カメラで測定した。熱によって、位相変調量が変動すると、スポットシフトした 1 次光だけでなく、スポットシフトしていない 0 次光が現れる。この熱による 120 Hz の揺らぎを測定するため、CMOS カメラの露光時間を 80 μ s と短くし、フレームレートを 1.59 kHz と設定した。また、LCOS-SLM はレーザーが十分に照射された熱平衡の状態での測定を開始した。また、時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィでは、異なる二つの階段幅(1.02 mm, 0.75 mm)におけるエッシェル回折格子を用いて、LCOS-SLM 上でのビーム径を測定し、ビーム径の小さい方でも、熱の影響を十分小さくできることを確認した。二光子蛍光には流動性の高い Rhodamine B 溶液を用いたが、褪色や飽和を防ぐため LCOS-SLM 直後に可変減光フィルタを入れ、発生する蛍光強度を抑制し、蛍光強度が等しい条件で比較実験を行った。

4.4.2 二光子パターン照明評価

2 光子パターン照明の特性を評価するために、厚みが無視できるほどの薄い Rhodamine B 溶液を NA 1.1 の対物レンズで励起した。発生した二光子蛍光を対面に設置している NA 0.3 の対物レンズで収集し、カメラに結像することで面内 (x - y) 方向二光子断層像を得た。励起用対物レンズをピエゾステージによって光軸方向に走査し、異なる x - y 二光子断層像を積層することで、3次元の2光子励起分布を獲得した。光軸 (z) 方向における励起分布を測定するため、3次元の2光子励起分布のうち、ビーム周辺の有効エリアにおいて x - y 方向積算することで、 z 方向の励起分布を取得した。これにより、蛍光強度のばらつきを抑えることができる。時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィでは、最大の光軸分解能を獲得するためエッシェル回折格子の階段幅は 0.75 mm のものを使用した。

シングルスポットの評価には、LCOS-SLM に 0 次の位相を与えて評価した。また、パターン照明の評価を光軸方向と垂直な面内方向、光軸方向と分けて評価し、最後に 3 次元パターン生成評価を行った。CGH 位相マスクの生成には、生体サンプルへの刺激を想定し、実験結果フィードバック (Adaptive) は採用しなかった。LCOS-SLM への高入射パワーによるホログラムの劣化を防ぐため、露光時間は 100 ms と長めに設定し、LCOS-SLM への入射パワーは 200 mW 以下で行った。

4.4.3 スポットシフト変位量と回折効率/分解能の関係評価

LCOS-SLM による最大スポットシフト量はエイリアシングからくる照射範囲を各スポットにおいて回折効率と軸分解能から決定した。4.4.2 項同様に、薄い Rhodamine B 溶液と CMOS カメラを用いて、3 次元の二光子励起分布を取得した。平面方向における回折効率を取得するため、焦点面 ($z = 0$) において LCOS-SLM によるシフト方向における強度分布を取得し、最も強い点における強度を採用した。このとき、シフト方向とはとは垂直な方向に積算することで蛍光強度のばらつきを抑えた。また、 z 分解能においては 4.4.2 項同様に取得した。

4.4.4 波長スケーリングによる残留分散補償評価

波長スケーリングによるスポットのずれ抑制を実証するために、各ピクセルと波長の強度の関係を測定した。LCOS-SLM の x 方向における指定の 20 ピクセルにだけ回折格子位相を描き、1 次光のみが分光器に入射されるようにし、その他の光は入射されないようにした。これにより、各ピクセルに対応する波長のみが測定されるようになり、そのピーク値から各ピクセルに対応する波長を得た。これにより得られた波長スケーリングマスクと通常のマスクを用いて、薄い Rhodamine B 溶液と CMOS カメラを用いて、3 次元の二光子励起分布を取得した。

4.4.5 3 次元培養細胞スフェロイドを用いた 3 次元光変換

精密パターン照明を実証すべく、3 次元細胞培養であるスフェロイドを用いて光刺激実験を行った。スフェロイドは PSmOrange2 [149] が発現するように改変された生体マウス乳腺上皮細胞株である EpH4 細胞 [150] から培養された。Eph4 細胞はマトリゲル (Corning, #356237) を用いて約 8~12 日間、三次元的に球状に培養された。Eph4 細胞 (American Type Culture Collection) は、10% ウシ胎児血清 (Thermo Fisher Scientific, Hyclone)、ペニシリン 100 units/mL、ストレプトマイシン 100 mg/mL (Nacalai Tesque) を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (Nacalai Tesque) 中で 37°C、5% CO₂ で培養した [151]。PSmOrange2 はオレンジ色から赤色の蛍光に光変換可能な単量体蛍光タンパク質である。核局在 PSmOrange2 cDNA は、pH2B-PSmOrange2 プラスミド (Addgene, #34960) から PCR により増幅し、発現ベクターに複製した。パターン照明の前に、2 光子レーザー顕微鏡システムを用いて、励起波長 1060 nm で PSmOrange2 のオレンジ色体を用いてスフェロイドの 3 次元蛍光画像を取得し

た．PSmOrange2 は 1060 nm の 2 光子励起波長で光変換するため、イメージング時に PSmOrange2 が光変換してしまうのを避けるように、十分に低いレーザー出力 (3.3 mW) で画像取得を行った。xy 断面 2 光子蛍光画像は、15 Hz の速度で取得した 20 枚の蛍光画像を平均化することで取得した。z 堆積画像は、z 方向ステップ 1 μm で取得した。複数の標的細胞は、3 次元蛍光画像より選択され、時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィによってパターン照明された。刺激の際にサンプルに入力したレーザーパワーは 55.1 mW である。パターン照明によってオレンジ蛍光が赤色蛍光に変換され、オレンジ蛍光が減少していく様子を COMS カメラで確認し、オレンジ蛍光が十分弱くなったところで刺激を終了した。その時の光照射時間は 383 秒であった。パターン照明後、再び 3 次元蛍光画像を同条件で取得し、光刺激前後における蛍光画像を比較し、オレンジ蛍光が褪色した領域が赤色蛍光に光変換していると評価した。

4.5 実験結果

4.5.1 LCOS-SLM の熱問題

LCOS-SLM の熱の影響を評価するため、LCOS-SLM 面におけるビーム径の測定を行った結果を図 4.4 に示す。(a) が示すように、時空間集光法では LCOS-SLM 上でビームが線集光されていることが分かる。この時、ビーム幅は x 方向が 8.27 mm, y 方向が 0.69 mm となっていた。時間多重化マルチライン時空間集光法におけるビームプロファイルを(b),(c)に示した。それぞれ階段幅の異なるエッシェル回折格子を導入し、1.02 mm, 0.75 mm であった。時間多重化マルチライン時空間集光法では、LCOS-SLM 面上で二次元分光が起きるため、y 方向においてもビームが広がっている。その直径はそれぞれ 5.8 mm と 10.4 mm となっており、これは階段幅が細くなるほど大きくなる。これは、(4.1.12)式より階段幅が小さくなると波長間における回折角の差が大きくなることから説明ができる。また、4.1.2 項で説明したように縞のパターンが見られる。

次に、時空間集光法、時間多重化マルチライン時空間集光法（階段幅は 1.02 mm を採用）による LCOS-SLM の熱の影響を二光子蛍光強度で測定した結果を図 4.5 に示す。(a) は SLM に回折格子マスクを適用し、平均パワー 250 mW のレーザーを入射させたときの二光子蛍光画像である。(a) に示すように、時空間集光法では、局所的な熱の影響で位相変調不良が生じ 1 次回折光だけでなく位相変調がかからない 0 次回折光が生成されていることが確認される。一方で、時間多重化マルチライン時空間集光法では、熱の影響を抑制し、0 次光は確認されない。加えて、これらの回折光の時間変化を (b) にプロットした。時空間集光法では、1 次回折光の蛍光強度が 0.8~1.2 と大きく揺らいでおり、その周波数は LCOS-SLM の駆動周波数と同じ 120 Hz で振動している。また、0 次光も同様に振動しているが、緑点線で示した同一時間上ではピークが逆転しており、逆位相で振動している。このことから、1 次光の変調不良分が 0 次光に変換されていることが分かる。一方で、時間多重化マルチラ

イン時空間集光法では、1 次光の時間振動はかなり抑制され、0 次光の上昇がみられない。次に、(c) に入射パワーに対する位相変調寄与率を示す。1 次光の蛍光強度を 1 次光と 0 次光の合計で除算することで求めた。時空間集光法では、低平均パワー時ではほとんどが 1 次光に変調されるが、200 mW を超えると、急激に変調割合が低下する。一方で、時間多重化マルチライン時空間集光法では、測定した 500 mW まで、変調寄与率が変化しなかった。また、(d) に入射パワーに対する時間振動の変調量の二乗平均平方根(Root Mean Square, RMS)を測定した。この結果も、時空間集光法では 200 mW を超えると RMS が 10%を超え始める一方で、時間多重化マルチライン時空間集光法ではほとんど変化が見られなかった。

これらの結果から、LCOS-SLM 面におけるビームサイズは熱において重要であることが示された。パターン照明により、多数の細胞を刺激する際、標的細胞が増えるほど必要な入射パワーが増える。従って、時間多重化マルチライン時空間集光法では、実質的に刺激可能な細胞数が増えたことを意味する。また、時間振動の RMS の小ささは、同一標的細胞をより均一な強度で刺激可能とする。

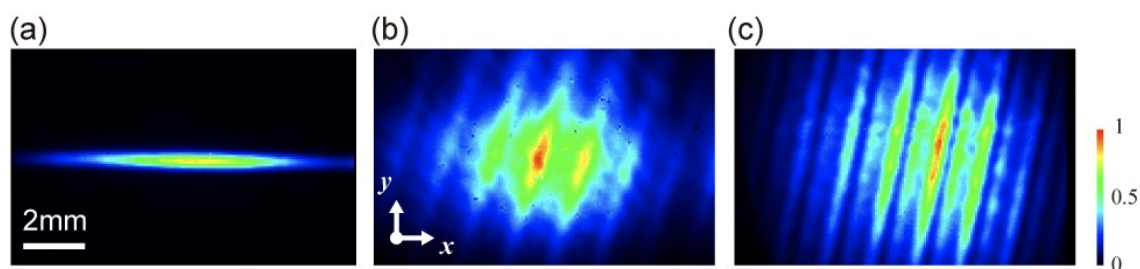


図 4.4. LCOS-SLM 面におけるビームプロファイル, (a) 時空間集光法, (b) 時間多重化マルチライン時空間集光法, エッシエル回折格子階段幅 1.02 mm, (c) 時間多重化マルチライン時空間集光法, エッシエル回折格子 0.75 mm.

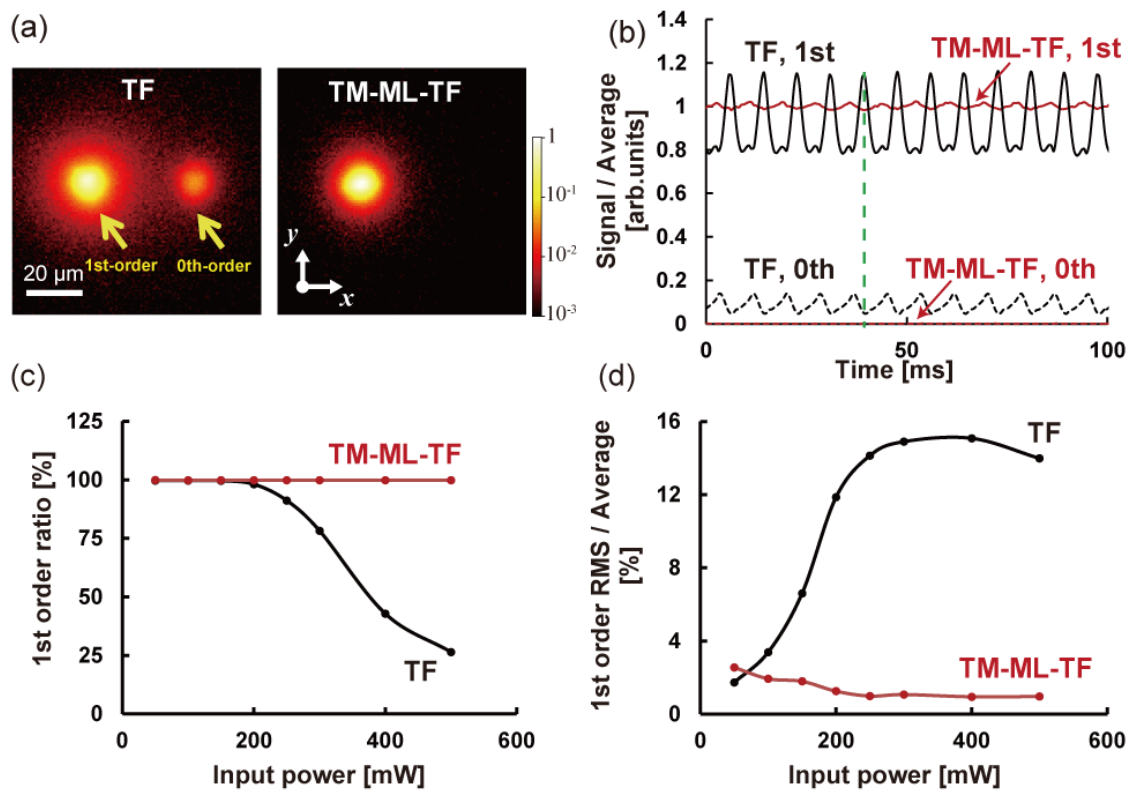


図 4.5. (a) LCOS-SLM に 250 mW 入射したときの 1 次回折光と 0 次回折光による二光子蛍光画像，ログスケール表示．左：時空間集光ホログラフィ (TF)，右：時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィ (TM-ML-TF，階段幅 1.02 mm)．(b) 各手法における 1 次光，0 次光の二光子蛍光強度の時間振動．(c) 各手法における入射平均パワーと 1 次光／1 次光＋0 次光 割合の関係．(d) 各手法における入射平均パワーと時間振動の RMS の関係．

4.5.2 シングルスポット照明における評価

時空間集光法と階段幅 0.75 mm を用いた時間多重化マルチライン時空間集光のシングルスポットにおける二光子励起の特性評価の結果を図 4.6 に示す．図 4.6 (a), (b) は時空間集光法，時間多重化マルチライン時空間集光法における焦点面の x - y プロファイルである．得られた $1/e^2$ 幅におけるスポット径はそれぞれ x 方向が 10.9, 10.5 μm であり， y 方向は 9.2, 9.4 μm であった．この結果のように， x - y におけるビームプロファイルはほぼ同一のものが得られる．一方で図 4.6 (c),(d) に示すように y - z 平面におけるビームプロファイルは各手法で大きく異なってくる．図 4.6 (e) は軸方向における時空間集光法，時間多重化マルチライン時空間集光法における励起分布の応答であり，その半値幅はそれぞれ 2.99, 2.02 μm となっている．また， $1/e^2$ 幅では，より違いは顕著であり，時空間集光法で 12.4 μm ，時間多重化マルチライン時空間集光法で 5.13 μm となっている．このように，時間多重化マルチライ

ン時空間集光法を用いると、 $1/e^2$ 幅であっても細胞分解能である $10\text{ }\mu\text{m}$ よりも小さい軸分解能を獲得することができた。

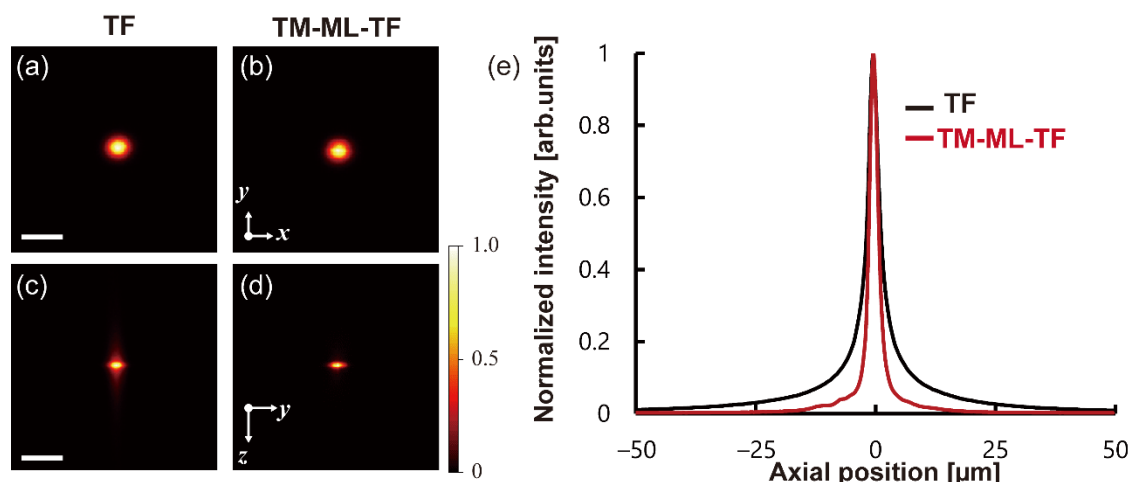


図 4.6. 二光子蛍光励起蛍光画像. 焦点面 x - y 断層像：(a) 時空間集光法 (TF), (b) 時間多重化マルチライン時空間集光法. ビーム中心 y - z 断層像：(c) 時空間集光法, (d) 時間多重化マルチライン時空間集光法 (TM-ML-TF). (e) 光軸方向の二光子蛍光励起分布.

4.5.3 面内方向におけるマルチスポットパターン照明評価

スポット間による抑制の最小化を実演するため、近傍の点においてマルチスポットパターン照明を行った。励起用対物レンズの焦点面において8点のスポットで矩形を構成するように位相マスクを LCOS-SLM 上に生成した。サンプル上の平均パワーは 38 mW で実験を行った。図 4.7 に各スポット間の距離が $7, 10, 15\text{ }\mu\text{m}$ としたときの時空間集光ホログラフィ、時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィによる実験結果を示す。時空間集光ホログラフィでは、スポット間の距離が $7\text{ }\mu\text{m}$ の場合、分光方向と垂直な方向にて時間と空間でスポットに重なりが生じ干渉を起こすため、矩形パターンを正確に生成できていない。この干渉パターンは、GSA によって初期ランダム位相をもとに収束したスポット間の位相差によってパターンが変化することを確認した。(図 4.7 (a) 左, 右)。従って、干渉パターンの制御なども極めて難しい。スポット間の距離を $10\text{ }\mu\text{m}$ 離れた場合、矩形のパターンは現れるが、各スポットの強度は初期ランダム位相に大きく依存してしまう。スポット間の距離を $15\text{ }\mu\text{m}$ 離すとスポット間の干渉はなくなり、初期ランダム位相に関係なくほぼ同じパターンを獲得できる。対照的に時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィ(図 4.7 (b))では、スポットの両端が重なるスポット間距離 $7\text{ }\mu\text{m}$ でも、矩形パターンを生成することができ、またその強度分布は初期ランダム位相に依存しない結果が得られた。これは、エッセル回折格子による時間遅延によって、空間的に重なっていても、時間的には重なりが抑制されているためである。図 4.7 (c) に、(a), (b) の x - y 画像を積算したときの

z 応答分布を示した．このように，スポット間距離が近いほど，焦点面外における蛍光強度が上昇するが，時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィは，その上昇量が小さく抑えられている．

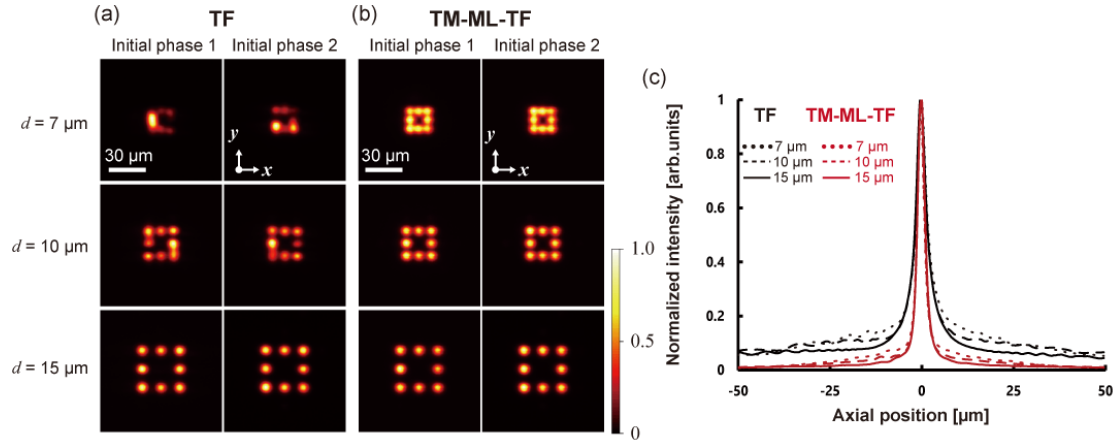


図 4.7. 面内マルチスポットパターン照明における二光子蛍光像 (a) 時空間集光法ホログラフィ (TF), (b) 時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィ (TM-ML-TF). 左: 初期位相 1, 右: 初期位相 2, 上段: $d = 7 \mu\text{m}$, 中段: $d = 10 \mu\text{m}$, 下段: $d = 15 \mu\text{m}$, (c) 二光子蛍光軸応答.

4.5.4 光軸方向におけるマルチスポットパターン照明

次に，深さ方向に二つのスポットを生成し，光軸方向におけるスポット間干渉の抑制を実証した．図 4.8 に時空間集光ホログラフィと時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィによって取得した二つのスポット間の距離を 10, 20, 30 μm と変えていったときの x - z , y - z 平面の二光子断層画像とその光軸方向の励起分布を示す．今回も 4.5.3 項同様に，初期ランダム位相を変えて測定を行い，その内の時空間集光ホログラフィのベストデータを表示している．時空間集光ホログラフィでは，スポット間距離が 10 μm の時，スポット間の干渉によってスポットは一つになり分解ができない．スポット間距離が 20 μm では，各シフト位置でスポットが形成されるが，光軸方向における干渉の影響でスポットの中心においても強い励起分布が発生していることが確認できる．30 μm 離れたとき，干渉は起きず，分解されたスポットが初めて形成される．このように，時空間集光ホログラフィでは，光軸方向にかなり広い範囲で干渉の影響が現れる．特に，シングルスポットの FWHM の光軸分解能 ($= 2.99 \mu\text{m}$) よりも十分に離れているスポット間距離 20 μm は干渉が見られ，30 μm で干渉の影響が消えることから，半値幅ではなく， $1/e^2$ 幅が重要であることが分かる．顕微鏡などの空間分解能は，二つのスポットが分解できる半値幅で評価をされる傾向にあるが，刺激においては励起分布そのものが重要になるため，このような干渉による励起は望ましくない．一方で，時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィでは，スポット間距離が 10 μm であってもスポットが分解でき，干渉がかなり抑制されていることが確認できる．図 4.

8 (d) に、時空間集光ホログラフィ、時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィにおけるスポット間距離とスポット中心における強度割合をプロットした。中心の強度は、2 点の強度の平均から算出した。また誤差範囲はランダム位相を変えて 3 回測定し、それぞれ最大と最小をプロットしている。スポット間距離 10, 20, 30 μm における中心強度は、時空間集光ホログラフィが 97 %, 81 %, 28 % であり、時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィが 43 %, 15 %, 6 % と得られた。このように、時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィでは圧倒的に干渉を抑制し、加えてランダム位相による強度のばらつきもかなり小さく抑えることができる。

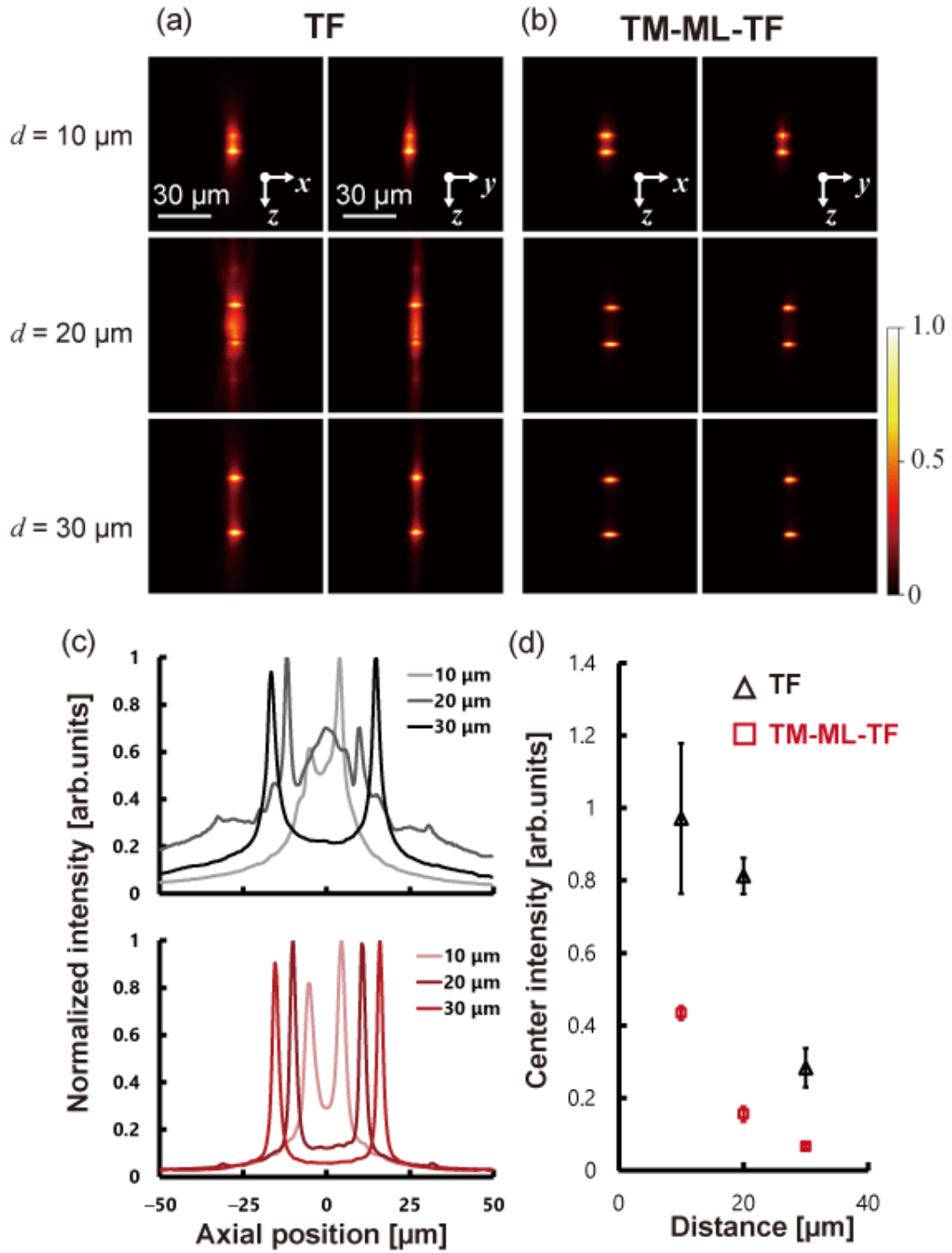


図 4.8. 光軸方向のマルチスポットパターン照明における二光子断層像. 左: x - z 平面, 右: y - z 平面二光子断層像. (a) 時空間集光ホログラフィ (TF), (b) 時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィ (TM-ML-TF). (c) 各手法における光軸方向における二光子励起分布. (d) 各手法におけるスポット間距離に対するスポット中心の強度. 誤差範囲は初期ランダム位相を変更して取得したときの最大最小値.

4.5.5 3次元マルチスポットパターン照明

最後の評価として、3次元にマルチスポットパターンを生成し評価した。異なる x - y 平面 ($z = \pm 10 \mu\text{m}$) の中心 ($x = y = 0$) の2つのスポットを生成し、同一平面上 ($z = 0$) の異なる座標 ($x, y = \pm 10 \mu\text{m}$) に4つのスポット、計6スポットを生成した (図 4.9 (a))。時空間集光ホログラフィと時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィによる3次元の2光子励起分布を取得しそれぞれ x - y 平面, y - z 平面における2光子蛍光画像を図 4.9 (b), (c) に示す。また、図 4.9 (d), (e) にそれぞれ黄点線上の強度分布をプロットした。これらの結果からわかるように、時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィでは正確なパターン照明によってスポット間にダークスポットが生成されている。この結果は細胞多数存在していても特定の細胞のみを意図的に刺激しないことも可能であることを示している。

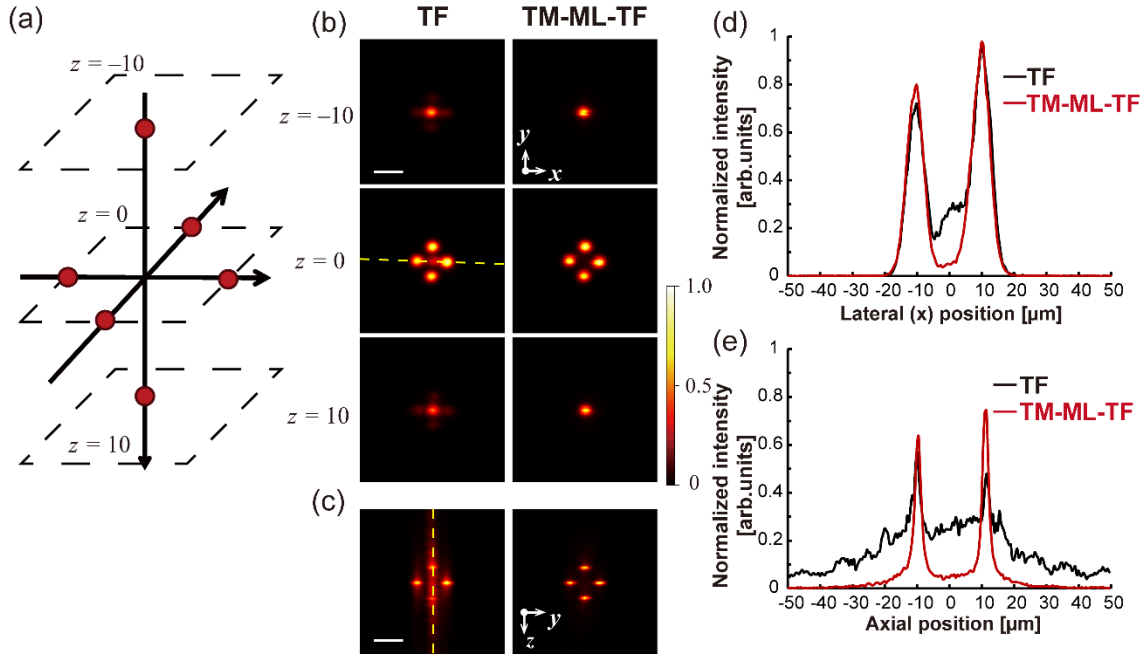


図 4.9 (a) マルチスポットパターンイメージ図. (b) x - y 二光子断層像. 上段: $z = -10 \mu\text{m}$, 中段: $z = 0 \mu\text{m}$, 下段: $z = +10 \mu\text{m}$. (c) y - z 二光子断層像. 左: 時空間集光ホログラフィ (TF), 右: 時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィ (TM-ML-TF).

(d) x - y 2光子断層像 ((b) 内点線) における各手法の強度分布. (e) y - z 2光子断層像 ((c) 内点線) における各手法の強度分布

4.5.6 光刺激範囲

(4.2.3)式より面内方向における最大シフト量は、 $226 \mu\text{m}$ と求められ、このことから最大の光刺激範囲は $452 \mu\text{m}$ と定義できる。この範囲において、時空間集光ホログラフィと時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィにおけるスポットシフト量に対する回折効率計

算値と実測値を評価した。図 4.10 に回折効率の結果と得られる光軸方向の分解能の結果を示す。(4.2.4)式より得た計算値を図 4.10 (a) に実線で示し、対物レンズ手前の集光点におけるビーム強度を測定した結果を(+)で、二光子強度との関係を確認するため、その2乗を取ったものを(●)で示した。また、得られた蛍光比率を(●:時空間集光ホログラフィ), (●:時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィ)でそれぞれプロットした。

この結果より、実測で得られた回折効率は理論値よりもかなり低い結果となった。これは、メーカーが公表している LCOS-SLM の回折効率も同様の結果であり、恐らく LCOS-SLM のフィルファクターや、電圧印可の不均一性など、製品上の限界である可能性が高い。回折効率の数値上はメーカーが示している値に近い値が取れており、今回の実験に問題はないことが予想できる。次に、各手法において蛍光の効率を比較すると、シフト量が大きくなるほど実測の回折効率よりも悪い結果が得られた。これは、光学上の収差や光学上のロスが起因している。また、時間多重化マルチライン時空間集光法による回折効率は時空間集光法による回折効率よりも悪くなっており、分光方向と垂直な方向において集光しているため、収差の影響が出やすいためであると考えられる。この結果から、226 μm 地点における回折効率は、時空間集光ホログラフィ、時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィ共に 0 に等しい。(2.3.1)式で示した WGSA は、回折効率を考慮し、重みを計算することでスポット間の強度差を一定に近づけることができるが、マルチスポット内における回折効率が最も低い値になるよう重みを均一化する。つまり、回折効率が 75%と 50%の点で重みを均一化する場合、元のロス 32.5%($=(25+50)\times 0.5$)に加えて、均一化によるロス 12.5%が加わることで、ロス是最も低いスポットの効率と同じになる。よって 226 μm 地点を刺激範囲とすると、得られる回折効率は 0.4%となってしまう。レーザーのパワーが際限なく存在すれば、問題ないように思えるが、4.4.1 項で示したように、LCOS-SLM に高パワーを入射すると、位相変調不良が発生するため現実的ではない。そこで、我々は、2光子蛍光強度の $1/e^2$ 値幅を考慮して視野を決定することとした。この条件における光刺激範囲は、時空間集光ホログラフィで 200 μm 、時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィで、140 μm が視野範囲と決定された。

図 4.10 (b) に FWHM の光軸方向分解能と、集光スポット位置の結果を示す。時間多重化マルチライン時空間集光法では、スポットシフト量が増えるほど、分解能がおおきく低下していく様子が確認できる。また、時空間集光では分散の影響により z 方向にスポットがシフトしていくが、時間多重化では分光方向と垂直な軸における空間集光の効果があるため、 z 方向の移動量が減っていることが確認できる。

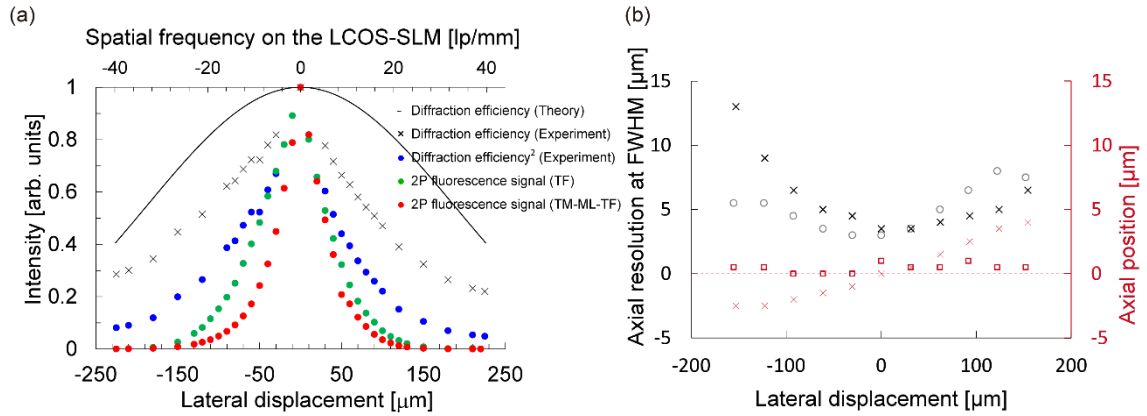


図 4.10. (a) 面内方向スポットシフトにおける回折効率. —理論値, $\times$ 実測値, $\bullet$ 実測値の2乗, $\bullet$ 時空間集光ホログラフィ (TF) による2光子蛍光強度, $\bullet$ 時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィ (TM-ML-TF) による2光子蛍光強度. (b) 面内方向スポットシフトにおける光軸方向分解能 (FWHM). $\times$ TF, $\circ$ TM-ML-TF. 面内方向スポットシフト時の z 方向スポットシフト量. $\times$ TF, $\square$ TM-ML-TF.

4.5.7 波長スケーリングによる分散補償

スポットシフトによる時空間集光法への分散の影響と波長スケーリングによる分散補償の結果を図 4.11に示す. 図 4.11 (a) に各ピクセルに対応する波長を示す. この結果より, (4.3.2) 式における α は 2.47 と得られた. x 方向に $180 \mu\text{m}$ シフトさせたときの, 通常の手法と波長スケーリング補正による xz 面における励起分布とその z 応答を図 4.11 (b) (c) に示す. 通常手法の場合, x シフトによって与えられた GDD が大きく, 焦点面からスポットが $-z$ 方向に移動することが分かる. その大きさは, $6 \mu\text{m}$ もある. 一方で, 波長スケーリング補正を行うことでそのような z シフトはなくなり, 正確なホログラムの生成が可能となる.

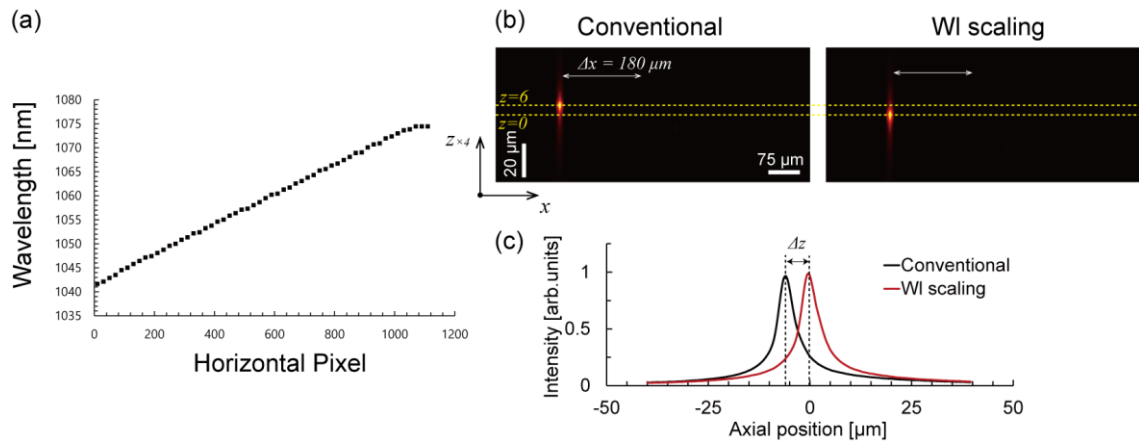


図 4.11. (a) 波長と LCOS-SLM のピクセル関係. (b) x 方向に $180\ \mu\text{m}$ スポットシフトしたときの 2 光子励起分布 xz 面断層像. z 方向は 4 倍に拡大. 黄色線は焦点面を示している. (c) xz 面断層像 ((b)) における z 応答分布. 黒: 通常手法, 赤: 波長スケールリング補正手法. $\Delta z = 6\ \mu\text{m}$.

4.5.8 3次元培養細胞スフェロイドを用いた3次元光変換

最後に, 時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィを使用し, 3次元培養スフェロイドのうち, 標的細胞のみに光刺激を行った. 図 4.12 (a) に, 異なる光軸位置における xy 平面の 2 光子蛍光画像を, 光刺激前後とそれらの併合画像をそれぞれ示す. 黄色点線円で示した 8 つの細胞を標的とし, 光刺激を行った. 光刺激前には確認できた細胞が光刺激後には確認されることが分かる. 図 4.12 (b) に青点線上で示した光軸 (z) 方向における蛍光画像を示す. この結果より, 光刺激は xy 平面だけでなく, z 方向においても標的細胞のみを刺激できていることが確認できた. また, 非刺激領域における細胞の 2 光子励起強度は, 光刺激前後で, 変わっておらず, 完全に刺激を回避できていることが確認できた (図 4.12 (c)). 時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィの光軸方向の励起領域は $1/e^2$ 値で $5.13\ \mu\text{m}$ とおおよそ $10\ \mu\text{m}$ であるスフェロイドの細胞質よりも狭いが, 細胞質の全領域が光変換されているのは細胞質が常に分子運動をしているためである. このことから, 細胞の端で少しでも励起されてしまえば, 細胞全体が光変換される可能性がある. これらの結果より, 生体細胞を用いても, 単一細胞分解能での光刺激が正確に行えることが実証できた. スフェロイドの細胞質はおおよそ $10\ \mu\text{m}$ であることから, 神経細胞への応用も同様に行えると考えられる.

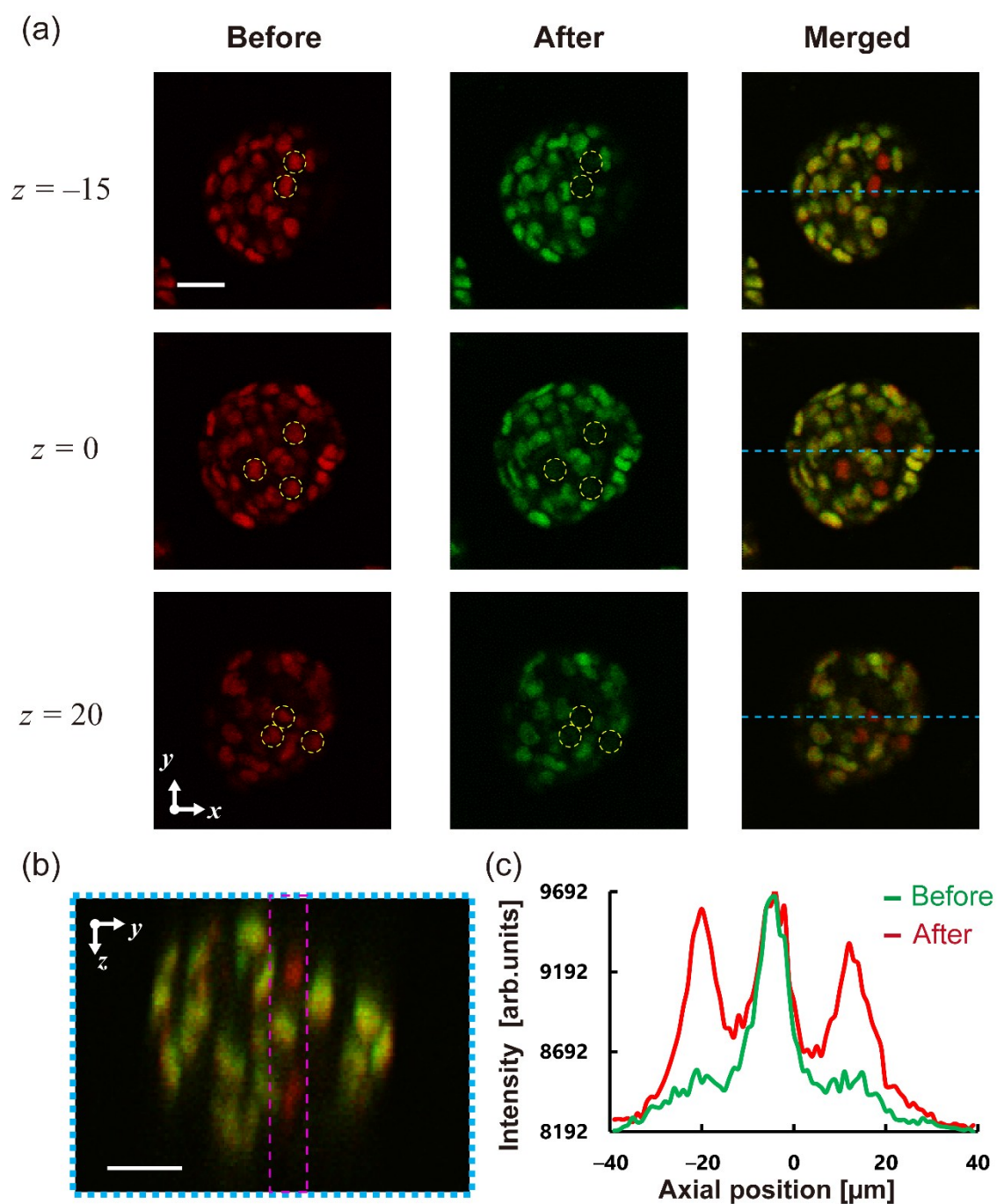


図 4.1.2. (a) 核局在 PSmOrange2 を発現するように設計された EpH4 スフェロイドの各 xy 平面における蛍光断層像. (左): 光刺激前, (中心): 光刺激後, (右): マージ画像. 黄色点線円は, 標的細胞を示している. (b) xz 平面における蛍光断層像 ((a) 内の水色点線上). (c) 光軸方向における 2 光子蛍光強度分布 ((b) ピンク点線内). スケールバー $20 \mu\text{m}$.

4.6 議論・まとめ

第4章では、単一細胞分解能を有する3次元多光子光刺激の実現に時間多重化時空間時空間集光ホログラフィが有用であることを述べた。エッセル回折格子のパラメーターは、サブタルボット長とレイリー長の関係から求めて決定されたが、焦点面外での干渉を更に抑制するためには、よりサブタルボット長くなるようなエッセル回折格子の最適化が求められる。階段のエッジがビームの一部をブロックしてしまい、ロスやビームプロファイルの悪化につながる可能性もあるが、厚みを大きくする方法は一つの手だろう。また、石英ガラスよりも屈折率が高く、透過率の高い媒質を使用することも考えられる。

LCOS-SLM 上での局所的な熱の影響は、光刺激において重要なファクターになる。なぜなら、多数の細胞を同時に刺激する場合、平均パワーは細胞の数だけ比例して増える。回折効率のロスも考慮すると、より高出力なパワーが必要となるだろう。熱による0次光の増加は、0次をブロックすることで、避けられる。しかし、0次を遮断しても10%以上の光強度の揺らぎの影響は消せないうえに、変調効率も格段に低下する。このところからも熱の問題を解消することは重要である。LCOS-SLM をアルミミラータイプではなく、多層膜ミラータイプにすることでこの問題は解決できるが、回折効率がアルミミラータイプよりも低い。ため、光刺激範囲が減少するのに加え、0次ブロックが必須になる。また、多層膜ミラータイプは使用可能な周波数帯域(X15213-03B; 1000 to 1100 nm)がアルミミラータイプ(X15213-08; 1000–1550 nm) に比べ圧倒的に狭い。時空間集光の性質上、使用する波長が変更されるとアライメントが必須になるが、最近では時空間集光顕微鏡における多波長化 [152]なども取り組まれているため、波長帯域は広く使用できる LCOS-SLM の方が良いだろう。時間多重化マルチライン時空間集光法を用いることで、LCOS-SLM のタイプを変えることなく熱問題は大きく改善し、光強度の揺らぎは15%から1%まで減少できた。また、0次光強度を1/4まで減少できた。

また、光刺激技術は近傍ターゲットへの同時照射や狙っていないターゲットを確実に刺激しないことも必要であろう。時空間集光は分光方向と垂直な方向においてマルチスポットパターンの干渉の影響が表れるため、WGS アルゴリズムにおける初期ランダム位相によって干渉パターンが変化し、狙った位置へのスポットパターンの生成が困難となってしまう。4.5.2 項で示したように本論文で得られた時空間集光法における光軸方向の分解能はFWHM で 2.99 μm と決して低くなく、1スポットだけで見れば、十分に単一細胞分解能であると言える。しかしながら、マルチスポットパターンを近傍に配置すると二光子励起領域は単一細胞分解能とは言えないものとなってしまう。スポット間の距離が 20 μm 程離れていても、つまり細胞体が存在できる距離離れていても、中心で励起されてしまう。これは二光子励起分布が半値幅ではなく、 $1/e^2$ 値に当たる分布の裾まで重要であることを示唆している。我々が提案した時間多重化マルチライン時空間集光法はシングルスロット内の時間遅延によって干渉を大幅に抑制でき、近傍マルチスポットパターンであっても狙った位置へ

の照射を可能とした。加えて、光軸方向の分解能は FWHM で $2.02\text{ }\mu\text{m}$, $1/e^2$ 値幅であっても $5.13\text{ }\mu\text{m}$ とシングルセルレゾリューションを達成している。そのため、光軸方向でのマルチスポットパターンでも狙った位置のみへの照射を可能とした。

また、この技術を生体の行動を制御するために応用するには 3 次元だけでなく、時間を含めた 4 次元での制御が必要になる。本論文の構成では、パターン照明における切り替え速度は 60 ms 程度で限定されてしまう。Faini 等 [153] は LCOS-SLM 上に複数のパターンをタイリングし、パターン上で線集光スポットを走査することでパターン切り替えを行い、速度を向上させている。時間多重化マルチライン時空間集光では LCOS-SLM 上で広がったスポットを利用するため、簡単に応用はできないが、より広い LCOS-SLM の開発やより高速な LCOS-SLM の登場に近い将来期待できる。時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィでは、スポットの形が一樣であるという欠点が存在するが、スポットパターンの非干渉性からスポットを重ねてパターンを生成することができるため、スポットの形を複数用意する必要がない。これは時空間集光ホログラフィでは達成できない利点である。

また、時空間集光ホログラフィにおけるスポットシフトによる分散の影響についても議論した。時空間集光で GDD が加わっても、焦点面がシフトするだけで分解能はほとんど低下しないため、LCOS-SLM で GDD による光軸シフト量分だけ z シフトすることで修正が可能である。ただ、GDD によるスポットシフト量はパルスの帯域にも依存するため、GDD を予め補正するに越したことはない。本論文において、残留分散補正の有用性が示せた。

まとめとして、本章では、新しい多光子光刺激技術である、時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィの実用性について評価、検証した。この技術は光軸方向の空間局所性を向上させるだけでなく、マルチスポット間の干渉を抑制し、加えて熱の影響の抑制が行えた。これらより、この構成が複数標的細胞の光刺激のための有力なツールになる潜在能力を秘めていることは間違いなく、光刺激研究の将来に新しい可能性をもたらすだろう。

第 5 章 刺激応答観察手法の開発

5.1 励起パルスに同期した検出方式

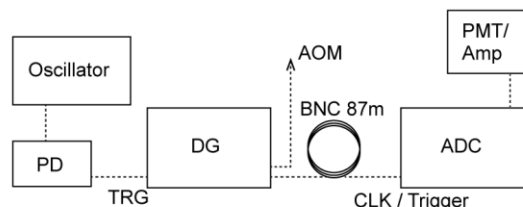
高 SN によるイメージングを行うためには、2.5 節で述べたように、励起パルスに同期した検出方式を取り入れ、高い蛍光励起を検出する方法が良い。また、本実験では、同期検出法において、ピークの 1 点のみをサンプリングするシングルサンプリング法を提案する。

5.1.1 検出タイミング合わせ

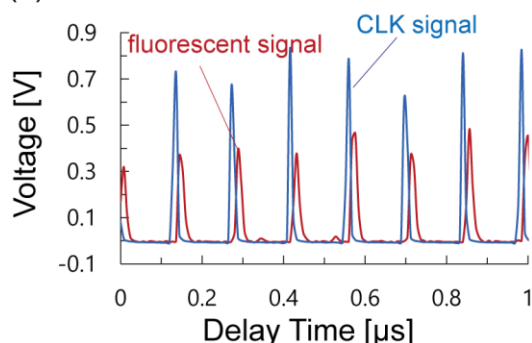
PMT から出力された信号はアンプ等を通して ADC へ入力される。本手法では、ADC でサンプリングするときの手法として、蛍光信号のピーク点の 1 点のみをサンプリングする同期検出するシングルサンプリング (SS) 法を採用した。図 5.1 (a) に同期検出法の概要図を示す。共振器からの繰り返し周波数 42MHz の信号光をフォトダイオードで受け取り、ディレイジェネレータのトリガーに入れる。そのトリガーを受け、DG で 7MHz まで間引き、AOM 動作に用いる。このとき、同じ繰り返し周波数であるが位相の異なる信号を別の CH から出力し、ADC の CLK に入力する。ここで、イメージング用の励起光によって発生した蛍光パルスとタイミングが同じになるように、DG から ADC の CLK 入力ポートまでの BNC ケーブル長を調整する必要がある。具体的に BNC ケーブルの長さを決定するためには、以下のような手順を取る。CLK 信号を PMT 信号とは別の AD の CH に入れて、図 5.1 (b) のように CLK 信号と 2 光子蛍光信号を測定する。得られた結果から、CLK 信号と Rhodamine B 溶液を用いた蛍光信号の時間差を測定する。共振器から CLK 信号を取っている場合、DG から AOM に出力したパルスと同じ励起パルスによる蛍光信号は、その後の CPA や顕微鏡内での光路長によってかなりの時間遅延が付いている。そのため、CLK 信号に最も近い蛍光信号は何個か前に発生した励起パルスによる信号である可能性があるため、気を付ける必要がある。励起パルスによる蛍光信号と同じ CLK 信号を探索するためには、DG の繰り返しを変更しても 2 つの信号の時間遅延量が変わらない信号を探す必要がある。この結果、CLK 信号に対して、蛍光信号が 438 ns 程度遅延していることが分かった。したがって、87 m 程度の BNC ケーブル介して CLK 信号を ADC へ入力することで、CLK 信号に遅延を与える。また、長い距離伝搬した際に、電気信号の高周波成分の減衰を防ぐため、高周波保持ケーブルを使用した。このようにしておおよその時間を合わせたのち、CLK 信号を AD の元の入力に戻し、同期検出を行う。この時点では完全に同期タイミングが合っていないため、DG で遅延量を調整しながら、図 5.1 (c) のように測定を行い、最も蛍光信号が高くなるタイミングに調整する。図 5.1 (c) の結果を見ると、同期検出時に少しばらつきがみられる。要因としては、2.5.4 項で記した様々な雑音と、CLK 信号出力及び ADC 入力のジッターが考えられる。パルス/シングルピクセル方式では、1 サンプリングがそのまま 1 画素になってしまうため、この揺らぎは SN の低下につながる可能性がある。したがって、な

るべく増倍揺らぎの小さい検出器や揺らぎの小さいレーザー、読み出し雑音の小さいADC、ジッターの小さいパルス発生器などを使うことが望ましい。

(a)



(b)



(c)

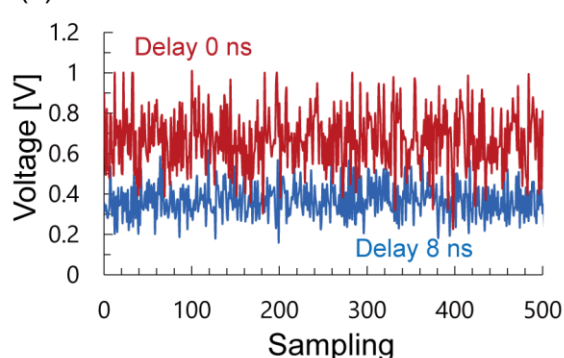


図 5.1 (a) 同期検出ダイアグラム. PD: フォトダイオード, DG:遅延パルス発生器, ADC:A/Dコンバーター. PMT: 光電子増倍管. (b) 検出信号波形. (濃赤): 2光子蛍光信号, (青): DGからのCLK信号. (c) 同期検出信号波形. (濃赤): 遅延0 ns (ピーク値)における波形, (青): 遅延8 nsにおける波形.

5.1.2 検出回路帯域幅

同期検出を行う場合、電圧信号の取得においてアンプ等の増幅回路における帯域幅に気を付ける必要がある。増幅回路から出力される電圧信号は、(2.5.4) 式で表されるように、蛍光信号が時間領域全体にわたり IRF と畳み込み積分された結果として得られる。この信号はADCによって離散化されるため、最終的に得られる離散信号は、図 5.2 (a) で示すように、有限の時間窓 ($t_0 \sim t_6$) 及び有限のサンプリング時間間隔 ($dt = t_l - t_0$) に対して実行された畳み込み積分と等価となる。そのため、帯域幅が広い検出器を使う場合、蛍光信号を適切に取得するためには、蛍光寿命を十分に覆うような時間領域を、IRF が十分に重なるように細かいサンプリング間隔でサンプリングするのが一般的である。一方で SS 法の場合、出力信号のピーク点でのみ検出するため、得られる離散信号は、特定の時刻における畳み込み積分値に限定される。したがって、検出回路の帯域幅が広い場合には、検出される離散信号は、蛍光信号の極僅かな短時間成分しか反映されず、結果として検出される蛍光信号量が著しく制限される (図 5.2 (b))。SS 法において、蛍光信号量を最大化するためには、蛍光寿命よりも IRF の FWHM が十分長くなるような帯域幅の狭い検出回路を使う必要がある。IRF 信号の FWHM が十分長いと、図 5.2 (c) のように、検出蛍光寿命を覆うような

時間領域を確保できピーク点のみの検出で十分に蛍光信号量を獲得できる。ただし、帯域幅が狭すぎる場合、畳み込み信号が次のパルスと重なる可能性があるため、レーザーの繰り返し周波数も考慮する必要がある。IRF の特性は通常 FWHM で定義され、その測定方法は様々である。例えば、蛍光寿命が数十 ps 程度の短い Erythrosine B, pinacyanol iodide, or Allura Red などの蛍光色素サンプルを使用する手法 [154–157] や fs レーザーの第 2 高調波発生信号を直接測定する方法 [158,159], シングルフォトン検出による測定法などある。検出器の選定として、簡易的に 1 次フィルタの RC 回路における FWHM で考えることも有効であるが、理論値であるが故に IRF が短く見積もられる過ぎることに注意する必要がある。本実験で用いる検出器の帯域は、蛍光寿命 ($\sim$ ns) 以上の FWHM を持つような検出器帯域 ($7\text{MHz} < f_c < 22\text{MHz}$) 付近で選定した結果、本実験では、電流出力型 (Hamamatsu; H16241) と電圧出力型 (Hamamatsu; H15460-40) の 2 種類の検出器を比較しながら使用することにした。H16241 は電流出力型であるため TIA (FEMTO; DHP-CA-100) を後段につけ TIA の帯域制限を 14MHz に設定した。H15460-40 は電圧出力型で 30MHz の帯域幅を有する。各検出器における IRF を測定するため、オシロスコープ (RHODE&SCHWARZ; RTB2004, 1 GHz, 2.5 GSa/s) を用いて出力波形を測定した。図 5.2 (d) — (e) にシングルフォトン検出時のパルス波形を示す。シングルフォトンとは、暗室環境での迷光やダークカウントに由来する単一光子を検出し、そのときに得られたパルス波形をシングルフォトン応答として取得した。これらの結果から、H16241 と外部 TIA の 14 MHz と H15460-40 の 30 MHz それぞれにおける IRF の FWHM は 24.5 ns, 11.5 ns と見積もられ、蛍光寿命より十分に長いことを確認した。

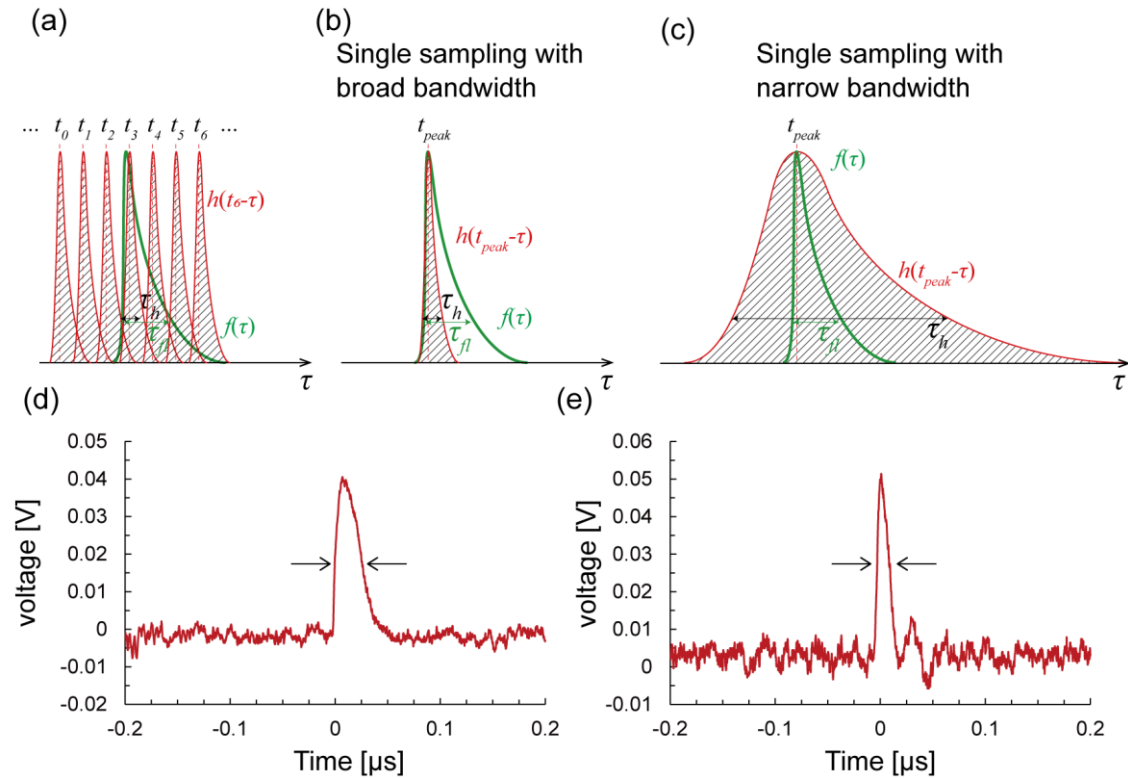


図 5.2. 蛍光寿命（緑）と機器応答関数（赤）の畳み込み積分の AD サンプリグ概要図（a）広帯域検出器使用時に高速サンプリングする場合．蛍光信号のほとんどが畳み込まれる．（b）広帯域検出器使用時にピーク点でのみサンプリング場合．蛍光信号の一部のみが畳み込まれる．（c）狭帯域検出器使用時にピーク点でのみサンプリングする場合．ほとんどの蛍光信号が畳み込まれる。

5.2 シングルサンプリング法の評価

本節では、SS 法とタイムゲートサンプリング (TGS) 法における S/N 比の評価を行った。TGS 法は、高速の ADC を用いてオーバーサンプリングを行い、ピーク値付近のサンプリングデータのみを時間窓で抜き出し、その積算をピクセル値として扱う手法である [127]。5.1.2 項で述べたように、IRF の長い検出器を用いてシングルサンプリングすることで、発生した蛍光パルス信号のほとんどを取り込めることが期待される。しかしながら、蛍光分布は長い裾をもつため、全てのフォトンを取得しきれない。そこで、サンプリング点を増やして、蛍光信号の大半を畳み込み積分した TGS 法と比較することで、SS 法を評価した。

5.2.1 実験手法

同期検出では通常、CLK 信号を生成する DG のジッターや ADC の入力時のジッターの影響で、蛍光信号と取得タイミングに揺らぎが生じる。これらのジッターは使用するデバイスによって変わるため、これらのジッターが無視できるほど小さいと仮定し、オシロスコープ

で取得したパルス波形のピーク値を同期タイミングとして SS 法を行った。一方、タイムゲート方式については、ADC のサンプリングが十分高速でピーク点を確実にサンプリングできると仮定した。

図 5.3 に 14 MHz と 30 MHz の検出器をそれぞれ用いて、Rhodamine B 溶液の 2 光子蛍光信号波形をオシロスコープで 52 μ s 間取得した波形の一例を示す。オシロスコープは 2.5 GSa/s と波形を再構成するには十分であり、PMT のコントロール電圧を 0.60 V に設定して各 6 回ずつ測定を行った。また、ショット雑音との影響を確認するため、レーザー強度を変更しながら測定を行った。図 5.3 (a) は 14 MHz, (b) は 30 MHz である。検出された蛍光は、励起レーザーの繰り返し周波数に同期したパルス列として得られた。SS 法では、赤 $\times$ で示すように各パルスの最大値のみを抽出し、その値をピクセル値として採用する。一方 TSG 法では、ピーク点から $\pm$ タイムゲート幅 / 2 に相当するサンプリング点 $\square$ を全て抽出し、これらを積算した値をピクセル値として採用する。

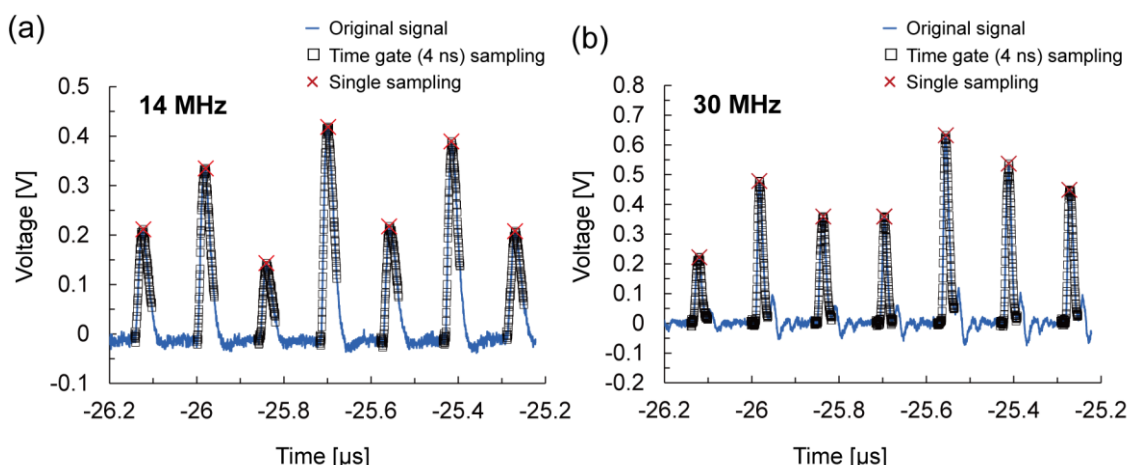


図 5.3. オシロスコープによる 2 光子蛍光信号波形とサンプリング。青線：信号波形
2.5G サンプリングによるオリジナル波形。黒 $\square$ ：タイムゲートサンプリング（ピーク点 $\pm$
2 ns）。赤線：ピーク点サンプリング。(a)：PMT (H16241) + TIA 増幅回路 (14MHz)。
(b)：PMT (H15460-40) + 内蔵増幅回路 (30MHz)。

5.2.2 SS 法と TGS 法の S/N 比結果

各手法で得られたピクセル値からばらつき（標準偏差）と平均値を算出し、S/N 比を計算した。図 5.4 に、425, 196 μ W の各入射光パワー条件において、SS 法と TGS 法（タイムゲート幅 10 ns, 20 ns, 40 ns）において取得した S/N 比（SSDR）を示す。

入射強度が高い場合（425 μ W）、S/N 比は 14 MHz, 30 MHz 検出器それぞれで、SS 法では 2.61, 2.31 であり、TGS 法では各タイムゲート幅（10 ns, 20 ns, 40 ns）のとき（14 MHz）2.51, 2.50, 2.51, (30 MHz) 2.15, 2.16, 2.17 と得られた。この結果が示すように、両検出器において、TSG 法におけるタイムゲート幅を増やしても S/N 比が向上せず、それどころか SS 法が TGS 法に比べて僅かに高い結果が得られた。この理由として考えられるのは、

2.5.4 項で説明したように、高光子量時におけるショット雑音が支配的となっており、両検出器とも IRF が蛍光寿命に対して十分に長く、SS 法で取得した信号情報に大半の蛍光信号が畳み込まれているということが分かる。一方、低光子量時 (196 μ W) では、SS 法は 14MHz, 30MHz 検出器それぞれで S/N 比が 2.21, 1.55 であり、各 TGS 法 (10 ns, 20 ns, 40 ns) では、14 MHz 検出器で 1.77, 1.73, 1.75, 30 MHz 検出器で 1.04, 1.03, 1.00 と、SS 法が TGS 法に比べて高い結果が得られた。低光子量になると蛍光信号が小さくなるため、S/N 比がショット雑音だけでなく、読み出し雑音やジョンソン雑音など他の雑音の影響も加わる。TGS 法によって、蛍光パルス信号の大部分を取得し、蛍光信号量を増加させても、雑音が信号以上に増加するため SS 法よりも S/N 比が悪くなっていることが考えられる。今回の結果は十分な暗室環境での実験であったため、タイムゲート幅の広さが S/N 比に影響を与えていないが、モニター観察など、迷光などが多い環境で測定する場合、タイムゲート幅が長い方が雑音を拾う可能性も高くなる。この点を踏まえると、タイムゲート幅を広げて全蛍光パルス信号を取得する利点はかなり小さい。また、14 MHz 検出器の方が S/N 比が高くなった理由としては、増倍揺らぎ量や、有効径の違いによるジョンソン雑音、読み出し雑音の影響のせいであると考えられる。特に、読み出し雑音やジョンソン雑音は帯域幅が高い方が、雑音量が增える。また、30 MHz 検出器は有効径が 14 $\times$ 14 mm と大きいため、その影響も大きいと考えられる。いずれにせよ、どの検出器においても SS 法が同期検出において最適な手法であることが証明できた。

表 1. SS 法及び TSG 法 (ゲート幅 10 ns, 20 ns, 40 ns) における各 PMT の SSDR 値。

S/N	14MHz		30MHz	
	196 μ W	425 μ W	196 μ W	425 μ W
Single	2.21	2.61	1.55	2.31
10 ns	1.77	2.51	1.04	2.15
20 ns	1.73	2.50	1.03	2.16
40 ns	1.75	2.51	1.00	2.17

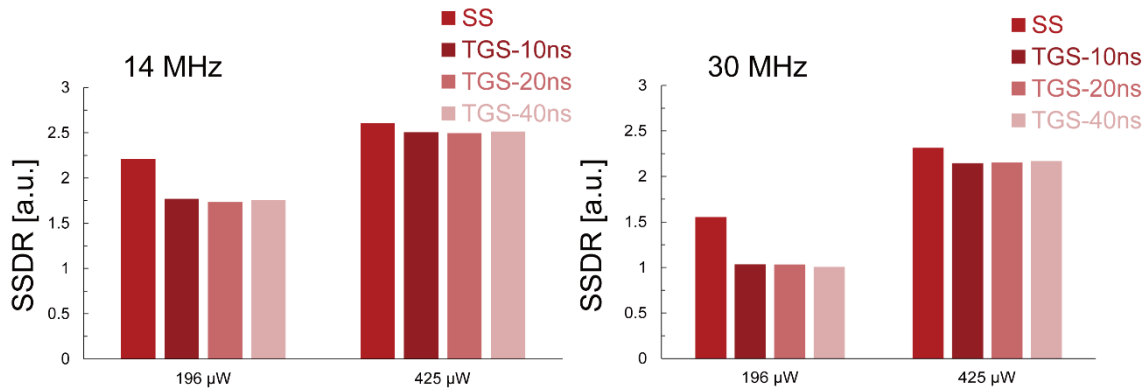


図 5.4. 入射光パワー条件 196 μW , 425 μW におけるシングルサンプリング (SS) 法とタイムゲート (TG) サンプリング法の S/N 比. (左) PMT (H16241) + TIA 増幅回路 (14MHz). (右) PMT (H15460-40) + 内蔵増幅回路 (30MHz). 左から SS 法, TGS 法 タイムゲート幅 10 ns, 20 ns, 40 ns.

5.3 光刺激光の蛍光信号除去

本手法では、イメージング光と刺激光が同一のレーザーから生成されているため、イメージング光と刺激光の繰り返し周波数が同じである。そのため、2つの励起光の光路長が異なれば、イメージング光と刺激光のパルス列が時間的に重なることがない。SS 法によってイメージング光によって生成される蛍光のみを取得することで、刺激光の蛍光信号を除去することが可能となる。図 5.5 (a) に帯域幅の異なる2種類の PMT を使用し DG の遅延量を変更しながら 100 倍希釈の Rhodamine B 溶液の2光子蛍光信号の平均値をプロットした結果を示した。この結果から、14 MHz, 30 MHz それぞれで FWHM が 26 ns, 22 ns 程度あることが分かった。この値は蛍光分子の蛍光寿命が長いほど長くなる。エタノール 100 倍希釈の Rhodamine B 溶液は一般的に 2 ns 以下の蛍光寿命である [160]。様々な蛍光分子があるが、代表的な生体分子の蛍光寿命は長くても 4 ns 程度 [161] であることを考慮し、本実験ではイメージング光と刺激光を 48 ns 離れた。イメージング光のみ、刺激光のみ、2つの励起光を同時に入射した時の2光子蛍光信号波形を内部 CLK, 同期検出で測定した結果をそれぞれ図 5.5 (b) に示す。使用した PMT は H16241 で TIA を 14 MHz に設定した。ADC (AlazerTech; ATS9440) は 125MS/s のサンプリングレートである。図 5.5 (b) の結果より、内部 CLK で測定した場合、イメージング光のみ、刺激光のみいずれの場合でも、レーザーの繰り返し周波数に対応して、Rhodamine B 溶液の蛍光信号が観測される。ピーク値にばらつきはあるが、ピーク値はおおよそイメージング光で 0.4 V, 刺激光で 0.7 V 程度であることが確認できる。SS 法で同期検出を行うとイメージング光では、おおよそ 0.4 V 付近で一定している。一方で、刺激光による信号は、ほとんど検出されず、0 V 付近であることが確認できた。また、2種類の励起光を同時に入射した場合、内部 CLK 測定では、48 ns 程離れた点で2つの異なるピークが観測されるが、同期検出時の信号値はイメージング光のみ

の励起時と同じ信号強度であることが分かる．このことから，48 ns 刺激光をイメージング光から離すことで，完全に刺激光による蛍光信号を除去できることが確認できた．

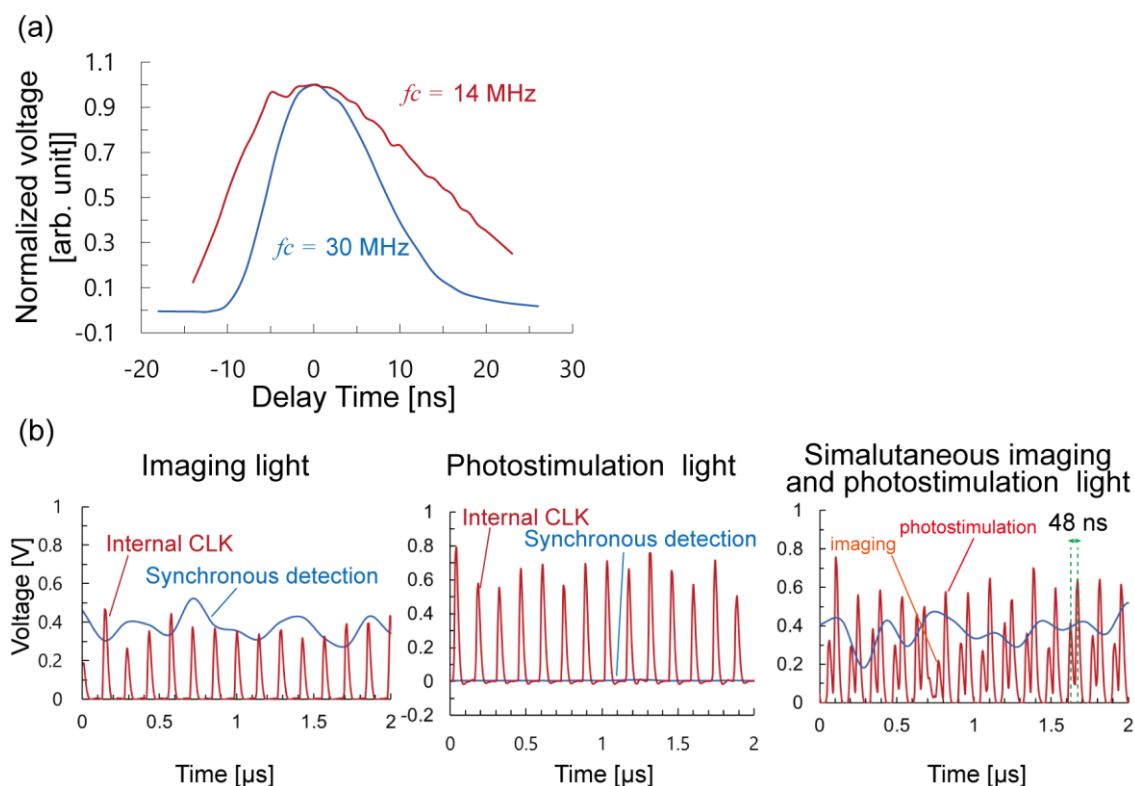


図 5.5. (a) CLK タイミングによる同期検出信号量の関係. (b) Rhodamine B 溶液の 2 光子蛍光信号. (濃赤): 内部 CLK 検出, (青): 同期検出による (左): イメージング光のみ, (中央): 刺激光のみ, (右): イメージング光, 刺激光同時入射

5.4 Ex vivo 切片を用いた検出方式比較

SS 法による検出を評価するため，Alexa Fluor 568 ファロイジンおよび DAPI で染色されたマウス腎臓の生体試料 (Thermo Fisher SCIENTIFIC; FluoCells™ Prepared Slide #3) を用いたイメージングを行った．SS 法との比較対象として，通常のレーザー走査顕微鏡で取り入れられる内部クロックサンプリングを用いた．通常手法，SS 法それぞれで用いたレーザーの繰り返しは，42 MHz，7 MHz と設定した．使用した PMT は両手法ともに H16241 で TIA を 14 MHz に設定した．走査速度，観察視野，ピクセル数は両手法で同じである．したがって，通常手法では 1 ピクセル当たりの励起パルスが 6 発分に相当する．励起された蛍光信号は増幅器で平滑化され，高速 ADC で離散化されるが，通常手法では，6 点のサンプリングデータを積算し，その結果を 1 ピクセルのデータとしている．イメージング視野は， $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ で約 15 Hz のフレームレートで 512 回測定を行った．また，用いたレーザーの波長は 1060 nm であるため，Alexa Fluor 568 ファロイジンが 2 光子励起，DAPI が 3 光子励起で観

察可能である．そこで，フィルタを用いて各蛍光を順番に取り込み，同一領域で蛍光観察を行った．

5.4.1 2光子イメージング結果

まず初めに，2光子励起によって得られる Alexa Fluor 568 ファロイジンの蛍光観察を行った．図 5.6 (a) に2光子蛍光画像を512回測定し平均化することで得られたサンプルの参照画像と，S/N比測定のための関心領域 (ROI) を示した．対物レンズ直下における入射平均パワー1.8 mW, 4.2 mW に設定したときの時の通常手法と，平均パワー1.8 mW 入射時の SS 法測定によって得られた2光子蛍光画像を図 5.6 (b) ~ (d) に示す．画像はそれぞれ正規化している．平均パワーを1.8 mW における通常手法では，得られる蛍光信号が低く，蛍光強度の高い試料のエッジは確認できるものの，周りの細胞や，格を取り囲むアクチンの細かい構造一つ一つを確認することは困難となっている．入射平均パワーを4.2 mW まで向上させると，図 5.6 (c) のように，参照画像で確認できるような一つ一つの構造を確認することができる．一方で，SS 法による2光子蛍光画像は，入射平均パワーを1.8 mW に設定しても， $\sqrt{6}$ 倍の入射平均パワーに当たる通常手法の4.2 mW 入射時と同等のイメージング結果が得られた (図 5.6 (d))．また，得られる蛍光信号量もほとんど同様であることを確認した．この結果は，同じ蛍光量を得るためには，繰り返し周波数の比の二乗根の平均入射平均パワーが必要になることを示す (2.5.3) 式と一致した．定量評価のため，各手法の各 ROI における S/N 比を図 5.6 (e) に示した．S/N 比は，512 枚の蛍光画像から各 ROI で空間積分された蛍光信号量の平均と標準偏差を取得し算出している．通常手法では，入射平均パワーを上げることで S/N 比が向上した．通常手法4.2 mW と SS 法を比較すると，SS 法がどの細胞が存在しない ROI#4 を除いたどの領域においても S/N 比が高い結果が得られた．この要因として考えられるのは2点ある．1つ目は内部サンプリングによる影響である．5.2 節で説明したように，サンプリング数が増えることで，迷光などの混入の可能性が増える．また，内部クロックによるサンプリングレートはレーザーの繰り返しと一致していないため，各ピクセルにおけるサンプリング点がずれる．検出される蛍光パルスは検出器によって平滑化されるため，影響は小さいが，14 MHz 検出器では若干のパルス波形が残っている可能性もあるため，完全に無視はできない．2つ目は，蛍光分子状態の影響である．繰り返し周波数が高い場合，三重項状態に入った分子が基底状態に戻る前に次のパルスが到着するため，見かけの蛍光信号量が低下する可能性がある．SS 法では，同一ピクセルに入射されるパルスは1発のみで，次に入射されるのは次の画像取得時，つまり15 Hz 後であるため，三重項状態の分子はほぼ全て基底状態に戻っている．これら2点の影響がこの S/N 比の結果に表れていると考えられ，SS 法の有効性を示せた．

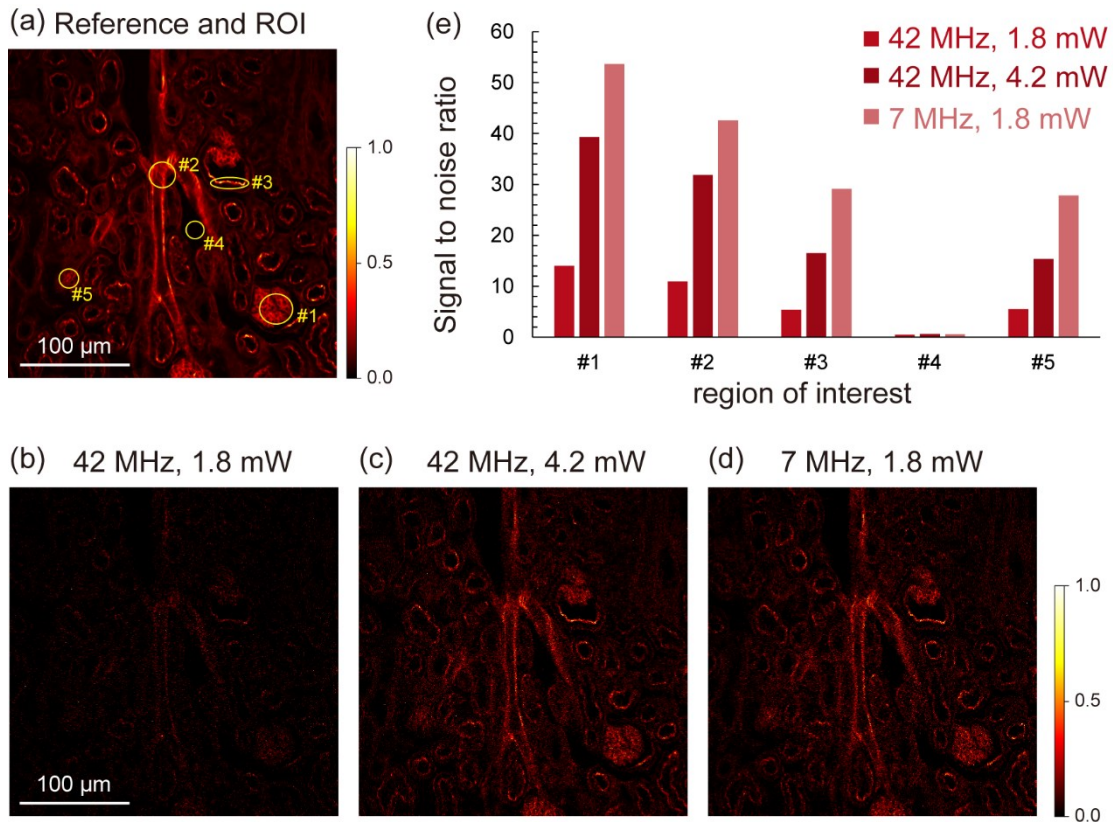


図 5.6. Alexa Fluor 568 ファロイジンがアクチン染色されたマウス腎臓切片画像。(a) 参照と ROI 画像. 高繰り返し 42 MHz 通常手法, (b): 平均パワー1.8 mW, (c): 平均パワー4.2 mW, (d): 低繰り返し 7 MHz による SS 法 1.8 mW. (e) 各手法における各 ROI の S/N 比.

5.4.2 3光子イメージング結果

次に、フィルタを切り替え、3光子励起によって得られる DAPI の蛍光観察を行った。2光子観察同様に、図 5.7 (a) に3光子蛍光画像を 512 回測定し平均化することで得られたサンプルの参照画像と、S/N 比測定のための ROI を示した。対物レンズ直下における入射平均パワー8.0 mW, 20.2 mW, 27.2 mW に設定したときの時の通常手法と、平均パワー8.0 mW 入射時の SS 法測定によって得られた3光子蛍光画像を図 5.7 (b) ~ (e) に示す。画像はそれぞれ正規化している。同様に、各手法の各 ROI における S/N 比を図 5.7 (f) に示した。この結果から、3光子イメージング時では、通常手法において、入射平均パワーを SS 法の $\sqrt{6}$ 倍上げても、SS 法と同等の S/N 比を得ることができない。SS 法と同等の S/N 比を得るためには、 $\sqrt[3]{6^2}$ 倍まで上げる必要があり、図 5.7 (d), (e) また図 5.7 (f) の結果から、ほぼ同等の結果が得られている。したがって、繰り返し周波数を低下させる影響は、2光子イメージングよりも3光子イメージングの方が、寄与が大きいというこ

とが分かる．SS 法を用いることで，3 光子励起のための入射平均パワーが低くなるため，2 光子イメージングと同時に発生させることも可能となってくる．

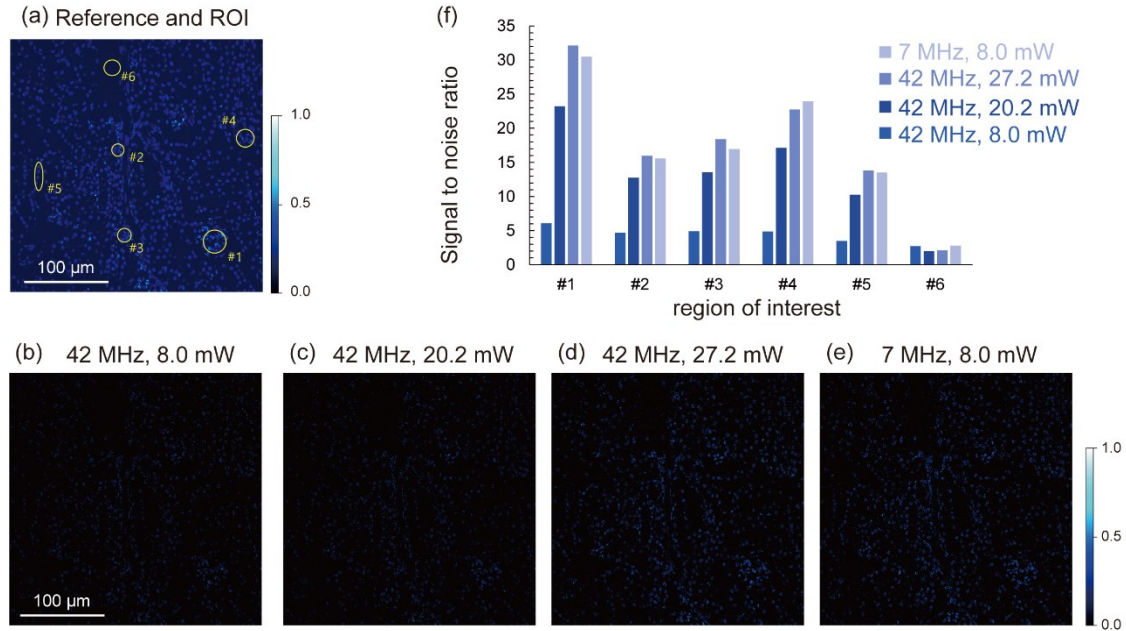


図 5.7. DAPI が染色のマウス腎臓切片画像．(a) 参照と ROI 画像．高繰り返し 42 MHz 通常手法，(b)：平均パワー 8.0 mW，(c)：平均パワー 20.2 mW，(d)：平均パワー 27.2 mW (e)：低繰り返し 7 MHz による SS 法 8.0 mW．(f) 各手法における各 ROI の S/N 比．

5.5 光刺激と応答観察結果

SS 法の適用によって，刺激光による蛍光の影響が抑制できているかを確認するため *in-vivo* マウスを使用して，光刺激の応答観察を 2 光子カルシウムイメージングで行った．光刺激によって確実に蛍光が発生する条件を作り出すため，カルシウム感受性蛍光タンパク質とオプシンの最大吸収波長帯域が同程度である RCaMP3-ChRmine をコードする AAV を月齢 4 週目のマウスに注入し，発現されたマウスを観察対象とした．ウイルス注入から 4 週間後のマウスを用いて，大脳皮質 2/3 層における 2 光子カルシウムイメージングを行った．観察深さは，表皮からおおよそ 195 μm の地点であった．イメージング条件は，フレームレート 15 Hz，観察視野 500×500 μm²，計 3000 フレーム，入射平均パワーはイメージング光が 15.3 mW，刺激光が 1.5 mW で測定を行った．また，任意のタイミングで DMD を ON/OFF し，ON 時にのみ光刺激が実行されるようにした．第 4 章で示した光刺激技術は開発途中であったため，時空間集光ホログラフィを用いた光刺激にとどまっている．また，SS 法の効果を確実に確かめるため，パターン照明による複数の細胞への光刺激は行わず，イメージング領域中心に存在する 1 個の神経細胞の細胞体を光刺激した．標的細胞は 2 光子カルシウムイメージングによって得られた画像から選定し，ステージによってイメージング中心に

配置した．図 5.8（左）のように ROI を 4 点抽出し，3000 フレーム，およそ 200 秒の観測データから ROI 内の積算蛍光信号を取得した（図 5.8（右））．光刺激のタイミング観測のために，PD を利用して，DMD の OFF 時に光を検出し，その逆数をプロットした．この結果から，光刺激対象である ROI（#1）では，光刺激したタイミングに同期して蛍光変化量（ $\Delta F/F$ ）が急激に上昇し，時間とともに減衰しており，光刺激が行えていることが確認できる．一方で，その他の ROI（#2~4）では，細胞の自然発火は観測できるものの，その他の細胞が光刺激によって活性化されていないことが分かる．特に注目したいのは，刺激タイミングにおける非刺激対象における蛍光変化量である．レーザーの繰り返しは 7 MHz とイメージング光と同じであるため，DMD が ON の時は，1 ピクセルデータを取得するごとに光刺激が実行され，その時発生した蛍光は収集されてしまう．本実験では，DMD を数フレーム分 ON にしていたため，光刺激の影響を抑制できていなければ，ROI #2 などの細胞のない領域においても蛍光変化量が増加するはずである．しかし，SS 法を適用することで光刺激による蛍光が抑制できていることが確認できる．

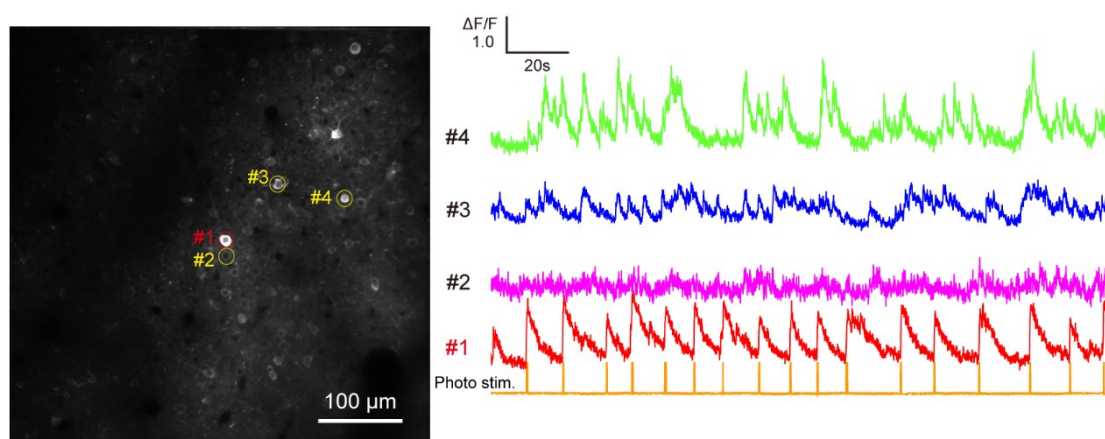


図 5.8．RCaMP3-ChRmine 発現バレル皮質内における錐体神経細胞の in-vivo マウス 2 光子カルシウムイメージング．（左）：2 光子蛍光イメージ画像．光刺激関心領域（ROI，#1）とその他の非光刺激 ROI（#2~#4）．（右）： $\Delta F/F$ の蛍光信号変化量（ $\Delta F/F$ ），赤：ROI #1，桃：ROI #2，青：ROI #3，黄緑：ROI #4，橙：光刺激タイミング観測用 PD 信号．

5.6 まとめ

本節では，刺激応答観察のための観察手法のため，レーザーの繰り返し周波数を下げた同期検出法を採用した．これにより，同一平均パワーにおける蛍光信号量を向上させることができ，低光量時でも高い S/N 比を維持したまま観察することが可能となった．また，同期検出に SS 法を適用することで，低光量時におけるショット雑音以外の雑音の除去が可能となり，タイムゲート法よりも高い S/N 比での計測を可能とした．また，イメージング光と刺激光の間に時間遅延を与え，SS 法で検出することで，刺激光による蛍光を除去することが可

能となることを実演した。これにより、光遺伝学用オプシンに蛍光マーカーなどが付随したり、青色シフトオプシンを使用した時も、信号の信頼性を担保できる。

また、*in-vivo* マウスを用いて実験も行った。最大吸収波長が同程度である RCaMP3 と ChRmine を共発現することで、カルシウム流入時では光刺激による蛍光も確実に発生している。しかし、SS 法による検出を用いることで、刺激光による蛍光の影響を抑制できていることが確認できた。また、深さ 195 μm の領域において、わずか 15.3 mW と低光量でカルシウムイメージングが行えるている。この低光量での観察を可能としたことにより、イメージング光によるオプシンの活性化が起きていないことも同時に観察できた。また、本実験では、1.5 mW と非常に低い刺激光のパワーで発火を誘発できている。これは、イメージング光によって光作動性チャネルの開口率が閾値直前まで引き上げられ、低パワーでの追加刺激光でも発火を誘発できている可能性が考えられる。この手法を応用すれば、イメージングと光刺激の同時実験において、使用するレーザーの統一化や、出力不足の懸念点が解消される。このように、本手法は、光遺伝学実験の発展に貢献でき、より高精度の光遺伝学を可能にすることが期待できる。

結言

本研究では、光による生命現象の解明や操作を促進させるため、多光子光刺激ツールと光刺激応答観察ツールの開発を行った。

多光子光刺激ツールにおいては、完全非走査型多光子光刺激技術である、時空間集光ホログラフィ技術における以下の4つの問題点を挙げ、その改善を行った。4つの問題点は、光軸方向のスポット間干渉によるクロストークアーティファクトが発生すること、分光方向と垂直な方向でスポットが隣接している場合にスポット間で干渉が発生すること、LCOS-SLM 上へ線集光されることによる局所的な熱の影響で位相変調不良が発生すること、単一波長位相計算における残留分散の影響で、スポット位置が光軸方向にシフトすることである。本研究では、時間多重化マルチライン時空間集光技術を CGH と組み合わせることでこれらの問題を解決した。光軸方向の励起分布における $1/e^2$ 幅を $12.4\ \mu\text{m}$ から $5.13\ \mu\text{m}$ まで向上させることで、光軸方向のスポット間干渉を大幅に抑制するとともに、 $1/e^2$ 幅でさえ単一細胞分解能を達成した。深さの異なる平面にスポットを1点ずつ生成し、スポット間の距離を $10, 20, 30\ \mu\text{m}$ と変化させたときのスポット間中心における強度は、2点のスポットに対して、時空間集光ホログラフィでは $97\%, 81\%, 28\%$ であった。一方で、時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィを用いることで、これらのクロストークアーティファクトは $43\%, 15\%, 6\%$ まで減少する。また、時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィでは、スポット径 $10\ \mu\text{m}$ のスポットを、分光方向と垂直な方向においてスポット間距離 $7\ \mu\text{m}$ の位置に隣接させても干渉が発生せず、設計パターン通りのパターン照明を行えることを確認した。また、時間多重化マルチライン時空間集光ホログラフィでは、LCOS-SLM 上で2次元分光されるため、局所的に強度が上昇しないため、熱による位相変調不良の影響を抑制できた。加えて、時空間集光ホログラフィでは、各波長が LCOS-SLM 上分光されることを考慮し、各ピクセルで波長補正を行うことで単一波長計算による残留分散の補償を行った。その結果、 $180\ \mu\text{m}$ の面内方向スポットシフトしたときに与えられる残留分散によって発生する、 $6\ \mu\text{m}$ の光軸位置シフトを完全に修正することに成功した。本研究の多光子光刺激ツールの開発によって、完全非走査型の4つの問題点を解決し、設計通りのパターン照明を可能となる技術を確立した。

また、本研究では、光刺激応答観察のため、多光子顕微鏡の開発も行った。光刺激の応答を観察するためには、以下の課題がある。第1に、オプシンとカルシウム感受性タンパク質などの分子ツールの共発現が前提となるため、イメージング光によるオプシンの励起を抑制しなくてはならない点である。そのため、レーザーの入射パワーを制限する必要があるが、通常の高繰り返しレーザーを用いた観察法では、S/N 比の劣化が激しく、応答観察は難しい。第2は、刺激光による蛍光信号が混入する可能性があることであり、イメージングデータの信頼性を失いかねない。これら2点を改善すべく、本研究ではイメージング光の繰り返し周波数を低下させ、蛍光ピークの1点のみを励起パルスに同期してサンプリングするシ

シングルサンプリング (SS) 法を提案した。2 光子励起の場合、1 ピクセルあたり、同じ蛍光光子数を発生させると仮定すると、レーザーの繰り返しを下げた分、同じ蛍光量を得るのに繰り返しの低下率の二乗根だけ入射平均パワーを下げる事が可能となる。実際には、レーザーの繰り返しが高いと、蛍光分子の励起状態が三重項状態に留まる可能性があるため、本手法の方が、得られる蛍光量が増える可能性もある。また、検出される光子量が少ない場合、同じ同期検出法であるピーク付近の複数点をサンプリングするタイムゲートサンプリング法よりも、本手法で提案した SS 法の方が良いことを証明した。読み出し雑音や、ジョンソン雑音、迷光雑音など、低光子量時に無視できなくなるショット雑音以外の雑音を限りなく除去できる点が有効であることを示した。また、同一レーザーからなるイメージング光と刺激光を時間的に 48 ns 分離し、SS 法による検出によって、刺激光によるカルシウムセンサーの励起の影響を除去することに成功した。

本論文では、生命現象における神経細胞活動の光操作と応答観察に向けて、光操作ツールと応答観察ツールの開発を行った。正確なパターン生成可能な完全非走査での光刺激によって、より精密な光操作と低パワーでの応答観察が可能となり、長期間における生命現象の解明を可能とする。より大規模な神経活動の光操作と応答観察には、脳全体に及ぶ光刺激範囲とイメージング視野が必要となってくる。この実現には、収差のないレンズの適用や、より高速なイメージング手法の適用も必要となるだろう。高速化の例としては、イメージング光を時間的に多重化し、各イメージングパルスを検出する方法 [128,130,162,163] や、空間的に多重化し、マルチ CH 各検出器に入射する方法 [164] など様々な高速化が考えられる。時間多重化パルスによるイメージングは、本論文でも採用した同期検出手法との相性が良く、パルス間のデッドタイム間に時間多重化を行うことで、各パルスを同一検出器で検出可能である。時間多重化パルスによるクロストークも時間多重化パルス間に適切な遅延量を設けることで抑制できる。また、空間多重化では、本論文で採用した LCOS-SLM による多点化をそのまま採用できる。信号伝達の授受を行う樹状突起やスパインといったサブセラー構造の微細な活動を観察することは依然として重要であるが、最近はこの細胞体が神経活動しているかを細胞体スケールの空間分解能で観察するだけでも、神経回路の動作理解に十分な価値があると考えられている。本論文で採用した時間多重化マルチライン時空間集光技術を走査型顕微鏡と組み合わせれば、スポット径を回折限界スポットサイズから細胞体サイズまで広げて光軸方向の空間局所化性能が高いイメージングが行える。スポット径がおおよそ 10 倍広がれば、同じフレームレートで 100 倍の視野のイメージングが可能となることから、5 mm 程度の全脳に近い視野でのライブイメージングが期待できる。このように、本論文で採用した技術は様々な応用が期待できる。最後に、この研究が、光遺伝学の発展に寄与できることを期待し、本論文の締めくくりとしたい。

参考文献

1. O. Shimomura, F. H. Johnson, and Y. Saiga, "Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*," *J. Cell. Comp. Physiol.* **59**, 223–239 (1962).
2. M. V. Matz, A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaraisky, M. L. Markelov, and S. A. Lukyanov, "Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species," *Nat. Biotechnol.* **17**, 969–973 (1999).
3. R. Y. Tsien, "THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN," *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509–544 (1998).
4. R. Ando, H. Hama, M. Yamamoto-Hino, H. Mizuno, and A. Miyawaki, "An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein," *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 12651–12656 (2002).
5. R. Ando, H. Mizuno, and A. Miyawaki, "Regulated Fast Nucleocytoplasmic Shuttling Observed by Reversible Protein Highlighting," *Science* **306**, 1370–1373 (2004).
6. H. Tsutsui, S. Karasawa, H. Shimizu, N. Nukina, and A. Miyawaki, "Semi-rational engineering of a coral fluorescent protein into an efficient highlighter," *EMBO Rep.* **6**, 233–238 (2005).
7. J. Nakai, M. Ohkura, and K. Imoto, "A high signal-to-noise Ca^{2+} probe composed of a single green fluorescent protein," *Nat. Biotechnol.* **19**, 137–141 (2001).
8. J. Akerboom, N. Carreras Calderón, L. Tian, S. Wabnig, M. Prigge, J. Tolö, A. Gordus, M. B. Orger, K. E. Severi, J. J. Macklin, R. Patel, S. R. Pulver, T. J. Wardill, E. Fischer, C. Schüller, T.-W. Chen, K. S. Sarkisyan, J. S. Marvin, C. I. Bargmann, D. S. Kim, S. Kügler, L. Lagnado, P. Hegemann, A. Gottschalk, E. R. Schreiter, and L. L. Looger, "Genetically encoded calcium indicators for multi-color neural activity imaging and combination with optogenetics," *Front. Mol. Neurosci.* **6**, (2013).
9. B. V. Zemelman, G. A. Lee, M. Ng, and G. Miesenböck, "Selective Photostimulation of Genetically ChARGed Neurons," *Neuron* **33**, 15–22 (2002).
10. G. Nagel, T. Szellas, W. Huhn, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Berthold, D. Ollig, P. Hegemann, and E. Bamberg, "Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel," *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 13940–13945 (2003).
11. O. A. Sineshchekov, K.-H. Jung, and J. L. Spudich, "Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*," *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 8689–8694 (2002).

12. T. Suzuki, K. Yamasaki, S. Fujita, K. Oda, M. Iseki, K. Yoshida, M. Watanabe, H. Daiyasu, H. Toh, E. Asamizu, S. Tabata, K. Miura, H. Fukuzawa, S. Nakamura, and T. Takahashi, "Archaeal-type rhodopsins in *Chlamydomonas*: model structure and intracellular localization," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**, 711–717 (2003).
13. E. S. Boyden, F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel, and K. Deisseroth, "Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity," *Nat. Neurosci.* **8**, 1263–1268 (2005).
14. S. P. Yu, J. K. Tung, Z. Z. Wei, D. Chen, K. Berglund, W. Zhong, J. Y. Zhang, X. Gu, M. Song, R. E. Gross, S. Z. Lin, and L. Wei, "Optochemogenetic Stimulation of Transplanted iPS-NPCs Enhances Neuronal Repair and Functional Recovery after Ischemic Stroke," *J. Neurosci.* **39**, 6571–6594 (2019).
15. S. Nabavi, R. Fox, C. D. Proulx, J. Y. Lin, R. Y. Tsien, and R. Malinow, "Engineering a memory with LTD and LTP," *Nature* **511**, 348–352 (2014).
16. A. Yu. Rotov and M. L. Firsov, "Optogenetic Prosthetization of Retinal Bipolar Cells," *J. Evol. Biochem. Physiol.* **58**, 1675–1686 (2022).
17. V. Emiliani, E. Entcheva, R. Hedrich, P. Hegemann, K. R. Konrad, C. Lüscher, M. Mahn, Z.-H. Pan, R. R. Sims, J. Vierock, and O. Yizhar, "Optogenetics for light control of biological systems," *Nat. Rev. Methods Primer* **2**, 55 (2022).
20. S. Q. Lima and G. Miesenböck, "Remote Control of Behavior through Genetically Targeted Photostimulation of Neurons," *Cell* **121**, 141–152 (2005).
21. A. M. Aravanis, L.-P. Wang, F. Zhang, L. A. Meltzer, M. Z. Mogri, M. B. Schneider, and K. Deisseroth, "An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology," *J. Neural Eng.* **4**, S143 (2007).
22. A. R. Adamantidis, F. Zhang, A. M. Aravanis, K. Deisseroth, and L. de Lecea, "Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons," *Nature* **450**, 420–424 (2007).
23. K. Ohki, S. Chung, Y. H. Ch'ng, P. Kara, and R. C. Reid, "Functional imaging with cellular resolution reveals precise micro-architecture in visual cortex," *Nature* **433**, 597–603 (2005).
24. J. C. Curtis and D. Kleinfeld, "Phase-to-rate transformations encode touch in cortical neurons of a scanning sensorimotor system," *Nat. Neurosci.* **12**, 492–501 (2009).
25. W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb, "Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy," *Science* **248**, 73–76 (1990).
26. W. R. Zipfel, R. M. Williams, and W. W. Webb, "Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences," *Nat. Biotechnol.* **21**, 1369–1377 (2003).

27. K. Feldbauer, D. Zimmermann, V. Pintschovius, J. Spitz, C. Bamann, and E. Bamberg, "Channelrhodopsin-2 is a leaky proton pump," *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 12317–12322 (2009).
28. V. Nikolenko, K. E. Poskanzer, and R. Yuste, "Two-photon photostimulation and imaging of neural circuits," *Nat. Methods* **4**, 943–950 (2007).
29. K. P. Lillis, A. Eng, J. A. White, and J. Mertz, "Two-photon imaging of spatially extended neuronal network dynamics with high temporal resolution," *J. Neurosci. Methods* **172**, 178–184 (2008).
30. A. Bullen, S. S. Patel, and P. Saggau, "High-speed, random-access fluorescence microscopy: I. High-resolution optical recording with voltage-sensitive dyes and ion indicators," *Biophys. J.* **73**, 477–491 (1997).
31. R. Salomé, Y. Kremer, S. Dieudonné, J.-F. Léger, O. Krichevsky, C. Wyart, D. Chatenay, and L. Bourdieu, "Ultrafast random-access scanning in two-photon microscopy using acousto-optic deflectors," *J. Neurosci. Methods* **154**, 161–174 (2006).
32. J. P. Rickgauer and D. W. Tank, "Two-photon excitation of channelrhodopsin-2 at saturation," *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 15025–15030 (2009).
33. S. Wang, S. Szobota, Y. Wang, M. Volgraf, Z. Liu, C. Sun, D. Trauner, E. Y. Isacoff, and X. Zhang, "All Optical Interface for Parallel, Remote, and Spatiotemporal Control of Neuronal Activity," *Nano Lett.* **7**, 3859–3863 (2007).
34. J. N. Stirman, M. M. Crane, S. J. Husson, A. Gottschalk, and H. Lu, "A multispectral optical illumination system with precise spatiotemporal control for the manipulation of optogenetic reagents," *Nat. Protoc.* **7**, 207–220 (2012).
35. C. Lutz, T. S. Otis, V. DeSars, S. Chrapak, D. A. DiGregorio, and V. Emiliani, "Holographic photolysis of caged neurotransmitters," *Nat. Methods* **5**, 821–827 (2008).
36. V. Nikolenko, B. O. Watson, R. Araya, A. Woodruff, D. S. Peterka, and R. Yuste, "SLM microscopy: scanless two-photon imaging and photostimulation using spatial light modulators," *Front. Neural Circuits* **2**, (2008).
37. E. Ronzitti, R. Conti, V. Zampini, D. Tanese, A. J. Foust, N. Klapoetke, E. S. Boyden, E. Papagiakoumou, and V. Emiliani, "Submillisecond Optogenetic Control of Neuronal Firing with Two-Photon Holographic Photoactivation of Chronos," *J. Neurosci.* **37**, 10679–10689 (2017).
38. W. Yang, L. Carrillo-Reid, Y. Bando, D. S. Peterka, and R. Yuste, "Simultaneous two-photon imaging and two-photon optogenetics of cortical circuits in three dimensions," *eLife* **7**, e32671 (2018).

39. D. Oron, E. Tal, and Y. Silberberg, "Scanningless depth-resolved microscopy," *Opt. Express* **13**, 1468–1476 (2005).
40. G. Zhu, J. van Howe, M. Durst, W. Zipfel, and C. Xu, "Simultaneous spatial and temporal focusing of femtosecond pulses," *Opt. Express* **13**, 2153–2159 (2005).
41. S. Weisenburger, F. Tejera, J. Demas, B. Chen, J. Manley, F. T. Sparks, F. Martínez Traub, T. Daigle, H. Zeng, A. Losonczy, and A. Vaziri, "Volumetric Ca²⁺ Imaging in the Mouse Brain Using Hybrid Multiplexed Sculpted Light Microscopy," *Cell* **177**, 1050-1066.e14 (2019).
42. E. Papagiakoumou, V. de Sars, D. Oron, and V. Emiliani, "Patterned two-photon illumination by spatiotemporal shaping of ultrashort pulses," *Opt. Express* **16**, 22039–22047 (2008).
43. E. Papagiakoumou, F. Anselmi, A. Bègue, V. de Sars, J. Glückstad, E. Y. Isacoff, and V. Emiliani, "Scanless two-photon excitation of channelrhodopsin-2," *Nat. Methods* **7**, 848–854 (2010).
44. O. D. Therrien, B. Aubé, S. Pagès, P. D. Koninck, and D. Côté, "Wide-field multiphoton imaging of cellular dynamics in thick tissue by temporal focusing and patterned illumination," *Biomed. Opt. Express* **2**, 696–704 (2011).
45. B. Sun, P. S. Salter, C. Roider, A. Jesacher, J. Strauss, J. Heberle, M. Schmidt, and M. J. Booth, "Four-dimensional light shaping: manipulating ultrafast spatiotemporal foci in space and time," *Light Sci. Appl.* **7**, 17117–17117 (2018).
46. N. C. Pégard, A. R. Mardinly, I. A. Oldenburg, S. Sridharan, L. Waller, and H. Adesnik, "Three-dimensional scanless holographic optogenetics with temporal focusing (3D-SHOT)," *Nat. Commun.* **8**, 1228 (2017).
47. A. R. Mardinly, I. A. Oldenburg, N. C. Pégard, S. Sridharan, E. H. Lyall, K. Chesnov, S. G. Brohawn, L. Waller, and H. Adesnik, "Precise multimodal optical control of neural ensemble activity," *Nat. Neurosci.* **21**, 881–893 (2018).
48. O. Hernandez, E. Papagiakoumou, D. Tanese, K. Fidelin, C. Wyart, and V. Emiliani, "Three-dimensional spatiotemporal focusing of holographic patterns," *Nat. Commun.* **7**, 11928 (2016).
49. N. Accanto, C. Molinier, D. Tanese, E. Ronzitti, Z. L. Newman, C. Wyart, E. Isacoff, E. Papagiakoumou, and V. Emiliani, "Multiplexed temporally focused light shaping for high-resolution multi-cell targeting," *Optica* **5**, 1478–1491 (2018).
50. M. E. Durst, G. Zhu, and C. Xu, "Simultaneous spatial and temporal focusing in nonlinear microscopy," *Opt. Commun.* **281**, 1796–1805 (2008).
51. S. Sridharan, M. A. Gajowa, M. B. Ogando, U. K. Jagadisan, L. Abdeladim, M. Sadahiro, H. A. Bounds, W. D. Hendricks, T. S. Turney, I. Tayler, K. Gopakumar,

- I. A. Oldenburg, S. G. Brohawn, and H. Adesnik, "High-performance microbial opsins for spatially and temporally precise perturbations of large neuronal networks," *Neuron* **110**, 1139-1155.e6 (2022).
52. J. Vierock, S. Rodriguez-Rozada, A. Dieter, F. Pieper, R. Sims, F. Tenedini, A. C. F. Bergs, I. Bendifallah, F. Zhou, N. Zeitzschel, J. Ahlbeck, S. Augustin, K. Sauter, E. Papagiakoumou, A. Gottschalk, P. Soba, V. Emiliani, A. K. Engel, P. Hegemann, and J. S. Wiegert, "BiPOLES is an optogenetic tool developed for bidirectional dual-color control of neurons," *Nat. Commun.* **12**, 4527 (2021).
 53. J. H. Marshel, Y. S. Kim, T. A. Machado, S. Quirin, B. Benson, J. Kadmon, C. Raja, A. Chibukhchyan, C. Ramakrishnan, M. Inoue, J. C. Shane, D. J. McKnight, S. Yoshizawa, H. E. Kato, S. Ganguli, and K. Deisseroth, "Cortical layer-specific critical dynamics triggering perception," *Science* **365**, eaaw5202 (2019).
 54. A. M. Packer, L. E. Russell, H. W. P. Dagleish, and M. Häusser, "Simultaneous all-optical manipulation and recording of neural circuit activity with cellular resolution in vivo," *Nat. Methods* **12**, 140–146 (2015).
 55. S. T. Lim, D. E. Antonucci, R. H. Scannevin, and J. S. Trimmer, "A novel targeting signal for proximal clustering of the Kv2.1 K⁺ channel in hippocampal neurons," *Neuron* **25**, 385–397 (2000).
 56. C. A. Baker, Y. M. Elyada, A. Parra, and M. M. Bolton, "Cellular resolution circuit mapping with temporal-focused excitation of soma-targeted channelrhodopsin," *eLife* **5**, e14193 (2016).
 57. C. Wu, E. Ivanova, Y. Zhang, and Z.-H. Pan, "rAAV-Mediated Subcellular Targeting of Optogenetic Tools in Retinal Ganglion Cells In Vivo," *PLOS ONE* **8**, e66332 (2013).
 58. A. Forli, M. Pisoni, Y. Printz, O. Yizhar, and T. Fellin, "Optogenetic strategies for high-efficiency all-optical interrogation using blue-light-sensitive opsins," *eLife* **10**, e63359 (2021).
 59. A. Forli, D. Vecchia, N. Binini, F. Succol, S. Bovetti, C. Moretti, F. Nespoli, M. Mahn, C. A. Baker, M. M. Bolton, O. Yizhar, and T. Fellin, "Two-Photon Bidirectional Control and Imaging of Neuronal Excitability with High Spatial Resolution *In Vivo*," *Cell Rep.* **22**, 3087–3098 (2018).
 60. D. N. Fittinghoff, P. W. Wiseman, and J. A. Squier, "Widefield multiphoton and temporally decorrelated multifocal multiphoton microscopy," *Opt. Express* **7**, 273–279 (2000).
 61. A. Egner and S. W. Hell, "Time multiplexing and parallelization in multifocal multiphoton microscopy," *JOSA A* **17**, 1192–1201 (2000).

62. K. Inazawa, M. Yamada, T. Michikawa, K. Namiki, A. Miyawaki, I. Imayoshi, K. Midorikawa, and K. Isobe, "Three-dimensional scanless patterned illumination using time-multiplexed multiline temporal focusing for multicell manipulation with single-cell resolution," *J. Biomed. Opt.* **30**, 075003 (2025).
63. F. Osakada, T. Mori, A. H. Cetin, J. H. Marshel, B. Virgen, and E. M. Callaway, "New Rabies Virus Variants for Monitoring and Manipulating Activity and Gene Expression in Defined Neural Circuits," *Neuron* **71**, 617–631 (2011).
64. Y. Gong, C. Huang, J. Z. Li, B. F. Grewe, Y. Zhang, S. Eismann, and M. J. Schnitzer, "High-speed recording of neural spikes in awake mice and flies with a fluorescent voltage sensor," *Science* **350**, 1361–1366 (2015).
65. H. Dana, B. Mohar, Y. Sun, S. Narayan, A. Gordus, J. P. Hasseman, G. Tsegaye, G. T. Holt, A. Hu, D. Walpita, R. Patel, J. J. Macklin, C. I. Bargmann, M. B. Ahrens, E. R. Schreiter, V. Jayaraman, L. L. Looger, K. Svoboda, and D. S. Kim, "Sensitive red protein calcium indicators for imaging neural activity," *eLife* **5**, e12727 (2016).
66. A. J. Peters, S. X. Chen, and T. Komiyama, "Emergence of reproducible spatiotemporal activity during motor learning," *Nature* **510**, 263–267 (2014).
67. Y. Ziv, L. D. Burns, E. D. Cocker, E. O. Hamel, K. K. Ghosh, L. J. Kitch, A. E. Gamal, and M. J. Schnitzer, "Long-term dynamics of CA1 hippocampal place codes," *Nat. Neurosci.* **16**, 264–266 (2013).
68. M. Z. Lin and M. J. Schnitzer, "Genetically encoded indicators of neuronal activity," *Nat. Neurosci.* **19**, 1142–1153 (2016).
69. E. T. Kavalali and E. M. Jorgensen, "Visualizing presynaptic function," *Nat. Neurosci.* **17**, 10–16 (2014).
70. G. Miesenböck, D. A. De Angelis, and J. E. Rothman, "Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins," *Nature* **394**, 192–195 (1998).
71. S. Sankaranarayanan, D. De Angelis, J. E. Rothman, and T. A. Ryan, "The Use of pHluorins for Optical Measurements of Presynaptic Activity," *Biophys. J.* **79**, 2199–2208 (2000).
72. R. Liang, G. J. Broussard, and L. Tian, "Imaging Chemical Neurotransmission with Genetically Encoded Fluorescent Sensors," *ACS Chem. Neurosci.* **6**, 84–93 (2015).
73. S. Okumoto, L. L. Looger, K. D. Micheva, R. J. Reimer, S. J. Smith, and W. B. Frommer, "Detection of glutamate release from neurons by genetically encoded surface-displayed FRET nanosensors," *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 8740–8745 (2005).

74. J. S. Marvin, B. G. Borghuis, L. Tian, J. Cichon, M. T. Harnett, J. Akerboom, A. Gordus, S. L. Renninger, T.-W. Chen, C. I. Bargmann, M. B. Orger, E. R. Schreiter, J. B. Demb, W.-B. Gan, S. A. Hires, and L. L. Looger, "An optimized fluorescent probe for visualizing glutamate neurotransmission," *Nat. Methods* **10**, 162–170 (2013).
75. B. L. Sabatini and W. G. Regehr, "TIMING OF SYNAPTIC TRANSMISSION," *Annu. Rev. Physiol.* **61**, 521–542 (1999).
76. B. P. Bean, "The action potential in mammalian central neurons," *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 451–465 (2007).
77. A. Erisir, D. Lau, B. Rudy, and C. S. Leonard, "Function of Specific K⁺ Channels in Sustained High-Frequency Firing of Fast-Spiking Neocortical Interneurons," *J. Neurophysiol.* **82**, 2476–2489 (1999).
78. H. H. Yang and F. St-Pierre, "Genetically Encoded Voltage Indicators: Opportunities and Challenges," *J. Neurosci.* **36**, 9977–9989 (2016).
79. F. Helmchen, J. G. Borst, and B. Sakmann, "Calcium dynamics associated with a single action potential in a CNS presynaptic terminal," *Biophys. J.* **72**, 1458–1471 (1997).
80. A. Miyawaki, J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura, and R. Y. Tsien, "Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin," *Nature* **388**, 882–887 (1997).
81. G. S. Baird, D. A. Zacharias, and R. Y. Tsien, "Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins," *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 11241–11246 (1999).
82. Y. Zhao, S. Araki, J. Wu, T. Teramoto, Y.-F. Chang, M. Nakano, A. S. Abdelfattah, M. Fujiwara, T. Ishihara, T. Nagai, and R. E. Campbell, "An Expanded Palette of Genetically Encoded Ca²⁺ Indicators," *Science* **333**, 1888–1891 (2011).
83. M. Inoue, A. Takeuchi, S. Manita, S. Horigane, M. Sakamoto, R. Kawakami, K. Yamaguchi, K. Otomo, H. Yokoyama, R. Kim, T. Yokoyama, S. Takemoto-Kimura, M. Abe, M. Okamura, Y. Kondo, S. Quirin, C. Ramakrishnan, T. Imamura, K. Sakimura, T. Nemoto, M. Kano, H. Fujii, K. Deisseroth, K. Kitamura, and H. Bito, "Rational Engineering of XCaMPs, a Multicolor GECI Suite for *In Vivo* Imaging of Complex Brain Circuit Dynamics," *Cell* **177**, 1346–1360.e24 (2019).
84. M. Ohkura, T. Sasaki, C. Kobayashi, Y. Ikegaya, and J. Nakai, "An Improved Genetically Encoded Red Fluorescent Ca²⁺ Indicator for Detecting Optically Evoked Action Potentials," *PLOS ONE* **7**, e39933 (2012).

85. G. Nagel, M. Brauner, J. F. Liewald, N. Adeishvili, E. Bamberg, and A. Gottschalk, "Light Activation of Channelrhodopsin-2 in Excitable Cells of *Caenorhabditis elegans* Triggers Rapid Behavioral Responses," *Curr. Biol.* **15**, 2279–2284 (2005).
86. D. E. Spence, J. M. Evans, W. E. Sleat, and W. Sibbett, "Regeneratively initiated self-mode-locked Ti:sapphire laser," *Opt. Lett.* **16**, 1762–1764 (1991).
87. H. A. Haus, "Mode-locking of lasers," *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **6**, 1173–1185 (2000).
88. A. Monmayrant, S. Weber, and B. Chatel, "A newcomer's guide to ultrashort pulse shaping and characterization," *J. Phys. B At. Mol. Opt. Phys.* **43**, 103001 (2010).
89. I. Walmsley, L. Waxer, and C. Dorrer, "The role of dispersion in ultrafast optics," *Rev. Sci. Instrum.* **72**, 1–29 (2001).
90. X. Zhou, D. Yoshitomi, Y. Kobayashi, and K. Torizuka, "Generation of 28-fs pulses from a mode-locked ytterbium fiber oscillator," *Opt. Express* **16**, 7055–7059 (2008).
91. N. J. Doran and D. Wood, "Nonlinear-optical loop mirror," *Opt. Lett.* **13**, 56–58 (1988).
92. M. E. Fermann, F. Haberl, M. Hofer, and H. Hochreiter, "Nonlinear amplifying loop mirror," *Opt. Lett.* **15**, 752–754 (1990).
93. I. N. Duling, "All-fiber ring soliton laser mode locked with a nonlinear mirror," *Opt. Lett.* **16**, 539–541 (1991).
94. N. Kuse, J. Jiang, C.-C. Lee, T. R. Schibli, and M. E. Fermann, "All polarization-maintaining Er fiber-based optical frequency combs with nonlinear amplifying loop mirror," *Opt. Express* **24**, 3095–3102 (2016).
95. R. L. Fork, O. E. Martinez, and J. P. Gordon, "Negative dispersion using pairs of prisms," *Opt. Lett.* **9**, 150–152 (1984).
96. O. E. Martinez, J. P. Gordon, and R. L. Fork, "Negative group-velocity dispersion using refraction," *JOSA A* **1**, 1003–1006 (1984).
97. G. Cheriaux, P. Rousseau, F. Salin, J. P. Chambaret, B. Walker, and L. F. Dimauro, "Aberration-free stretcher design for ultrashort-pulse amplification," *Opt. Lett.* **21**, 414–416 (1996).
98. E. Treacy, "Optical pulse compression with diffraction gratings," *IEEE J. Quantum Electron.* **5**, 454–458 (1969).
99. A. M. Weiner, "Femtosecond pulse shaping using spatial light modulators," *Rev. Sci. Instrum.* **71**, 1929–1960 (2000).
100. D. Strickland and G. Mourou, "Compression of amplified chirped optical pulses," *Opt. Commun.* **56**, 219–221 (1985).

101. J. Mark, L. Y. Liu, K. L. Hall, H. A. Haus, and E. P. Ippen, "Femtosecond pulse generation in a laser with a nonlinear external resonator," *Opt. Lett.* **14**, 48–50 (1989).
102. C. P. Yakymyshyn, J. F. Pinto, and C. R. Pollock, "Additive-pulse mode-locked NaCl:OH(-) laser," *Opt. Lett.* **14**, 621–623 (1989).
103. C. Xu, W. Zipfel, J. B. Shear, R. M. Williams, and W. W. Webb, "Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy.," *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 10763–10768 (1996).
104. I. Farouki, A. Farooq, and B. Dally, "Measurement of high-temperature absorption cross-sections using an optical cell with a non-uniform temperature distribution," *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* **330**, 109243 (2025).
105. E. Papagiakoumou, E. Ronzitti, and V. Emiliani, "Scanless two-photon excitation with temporal focusing," *Nat. Methods* **17**, 571–581 (2020).
106. L.-C. Cheng, N. G. Horton, K. Wang, S.-J. Chen, and C. Xu, "Measurements of multiphoton action cross sections for multiphoton microscopy," *Biomed. Opt. Express* **5**, 3427–3433 (2014).
107. C. Xu and W. W. Webb, "Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm," *JOSA B* **13**, 481–491 (1996).
108. M. A. Albota, C. Xu, and W. W. Webb, "Two-photon fluorescence excitation cross sections of biomolecular probes from 690 to 960 nm," *Appl. Opt.* **37**, 7352–7356 (1998).
109. N. S. Makarov, M. Drobizhev, and A. Rebane, "Two-photon absorption standards in the 550–1600 nm excitation wavelength range," *Opt. Express* **16**, 4029–4047 (2008).
110. M. Drobizhev, N. S. Makarov, S. E. Tillo, T. E. Hughes, and A. Rebane, "Two-photon absorption properties of fluorescent proteins," *Nat. Methods* **8**, 393–399 (2011).
111. T. Wilson, "Resolution and optical sectioning in the confocal microscope," *J. Microsc.* **244**, 113–121 (2011).
112. M. E. Durst, G. Zhu, and C. Xu, "Simultaneous spatial and temporal focusing for axial scanning," *Opt. Express* **14**, 12243–12254 (2006).
113. E. Tal, D. Oron, and Y. Silberberg, "Improved depth resolution in video-rate line-scanning multiphoton microscopy using temporal focusing," *Opt. Lett.* **30**, 1686–1688 (2005).
114. E. Papagiakoumou, V. de Sars, V. Emiliani, and D. Oronb, "Temporal focusing with spatially modulated excitation," *Opt. Express* **17**, 5391–5401 (2009).

115. A. Vaziri and C. V. Shank, "Ultrafast widefield optical sectioning microscopy by multifocal temporal focusing," *Opt. Express* **18**, 19645–19655 (2010).
116. Q. Song, A. Nakamura, K. Hirose, K. Isobe, K. Midorikawa, and F. Kannari, "Two-dimensional spatiotemporal focusing of femtosecond pulses and its applications in microscopy," *Rev. Sci. Instrum.* **86**, 083701 (2015).
117. K. Inazawa, K. Isobe, T. Ishikawa, K. Namiki, A. Miyawaki, F. Kannari, and K. Midorikawa, "Enhancement of optical sectioning capability of temporal focusing microscopy by using time-multiplexed multi-line focusing," *Appl. Phys. Express* **14**, 082008 (2021).
118. S. Gasparini and J. C. Magee, "State-Dependent Dendritic Computation in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons," *J. Neurosci.* **26**, 2088–2100 (2006).
119. B. E. Losavio, V. Iyer, and P. Saggau, "Two-photon microscope for multisite microphotolysis of caged neurotransmitters in acute brain slices," *J. Biomed. Opt.* **14**, 064033 (2009).
120. B. F. Grewe, F. F. Voigt, M. van 't Hoff, and F. Helmchen, "Fast two-layer two-photon imaging of neuronal cell populations using an electrically tunable lens," *Biomed. Opt. Express* **2**, 2035–2046 (2011).
121. L. Kong, J. Tang, J. P. Little, Y. Yu, T. Lämmermann, C. P. Lin, R. N. Germain, and M. Cui, "Continuous volumetric imaging via an optical phase-locked ultrasound lens," *Nat. Methods* **12**, 759–762 (2015).
122. A. Lizana, I. Moreno, A. Márquez, C. Iemmi, E. Fernández, J. Campos, and M. J. Yzuel, "Time fluctuations of the phase modulation in a liquid crystal on silicon display: characterization and effects in diffractive optics," *Opt. Express* **16**, 16711–16722 (2008).
123. J. García-Márquez, V. López, A. González-Vega, and E. Noé, "Flicker minimization in an LCoS spatial light modulator," *Opt. Express* **20**, 8431–8441 (2012).
124. K. Podgorski and G. Ranganathan, "Brain heating induced by near-infrared lasers during multiphoton microscopy," *J. Neurophysiol.* **116**, 1012–1023 (2016).
125. Á. Krolopp, L. Fésűs, G. Szipőcs, N. Wikonkál, and R. Szipőcs, "A 20 MHz Repetition Rate, Sub-Picosecond Ti-Sapphire Laser for Fiber Delivery in Nonlinear Microscopy of the Skin," *Life* **14**, 231 (2024).
126. K. Charan, B. Li, M. Wang, C. P. Lin, and C. Xu, "Fiber-based tunable repetition rate source for deep tissue two-photon fluorescence microscopy," *Biomed. Opt. Express* **9**, 2304–2311 (2018).

127. J. Song, J. Kang, U. Kang, H. S. Nam, H. J. Kim, R. H. Kim, J. W. Kim, and H. Yoo, "SNR enhanced high-speed two-photon microscopy using a pulse picker and time gating detection," *Sci. Rep.* **13**, 14244 (2023).
128. R. Prevedel, A. J. Verhoef, A. J. Pernía-Andrade, S. Weisenburger, B. S. Huang, T. Nöbauer, A. Fernández, J. E. Delcour, P. Golshani, A. Baltuska, and A. Vaziri, "Fast volumetric calcium imaging across multiple cortical layers using sculpted light," *Nat. Methods* **13**, 1021–1028 (2016).
129. J. Demas, J. Manley, F. Tejera, K. Barber, H. Kim, F. M. Traub, B. Chen, and A. Vaziri, "High-speed, cortex-wide volumetric recording of neuroactivity at cellular resolution using light beads microscopy," *Nat. Methods* **18**, 1103–1111 (2021).
130. D. R. Beaulieu, I. G. Davison, K. Kılıç, T. G. Bifano, and J. Mertz, "Simultaneous multiplane imaging with reverberation two-photon microscopy," *Nat. Methods* **17**, 283–286 (2020).
131. M. Oheim, E. Beaurepaire, E. Chaigneau, J. Mertz, and S. Charpak, "Two-photon microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth," *J. Neurosci. Methods* **111**, 29–37 (2001).
132. Z. He and J. Zhou, "Empirical Evaluation of a New Method for Calculating Signal-to-Noise Ratio for Microarray Data Analysis," *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 2957–2966 (2008).
133. 戸田圭亮, "生体深部を観察可能な超解像リアルタイムイメージング技術に関する研究," 博士論文（埼玉大学大学院理工学研究科（博士後期課程）） (2018).
134. 石川智啓, "生体組織中における二光子励起の4次元時空間制御 (本文)," 慶應義塾大学大学院理工学研究科 (2022).
135. L. Kuznetsova, F. W. Wise, S. Kane, and J. Squier, "Chirped-pulse amplification near the gain-narrowing limit of Yb-doped fiber using a reflection grism compressor," *Appl. Phys. B* **88**, 515–518 (2007).
136. C. J. Mackechnie, P. R. Barber, R. J. Carman, H. M. Pask, and D. C. Hanna, "Ytterbium fiber lasers: versatile sources for the 1–1.2- μm region," in *Conference on Lasers and Electro-Optics (1993), Paper CFJ5* (Optica Publishing Group, 1993), p. CFJ5.
137. D. N. Schimpf, J. Limpert, and A. Tünnermann, "Optimization of high performance ultrafast fiber laser systems to >10 GW peak power," *JOSA B* **27**, 2051–2060 (2010).
138. R. Trebino, K. W. DeLong, D. N. Fittinghoff, J. N. Sweetser, M. A. Krumbügel, B. A. Richman, and D. J. Kane, "Measuring ultrashort laser pulses in the time-

- frequency domain using frequency-resolved optical gating," *Rev. Sci. Instrum.* **68**, 3277–3295 (1997).
139. C. Iaconis and I. A. Walmsley, "Self-referencing spectral interferometry for measuring ultrashort optical pulses," *IEEE J. Quantum Electron.* **35**, 501–509 (1999).
 140. H. Lin, B. Jia, and M. Gu, "Dynamic generation of Debye diffraction-limited multifocal arrays for direct laser printing nanofabrication," *Opt. Lett.* **36**, 406–408 (2011).
 141. H. Ren, H. Lin, X. Li, and M. Gu, "Three-dimensional parallel recording with a Debye diffraction-limited and aberration-free volumetric multifocal array," *Opt. Lett.* **39**, 1621–1624 (2014).
 142. J. E. Curtis, B. A. Koss, and D. G. Grier, "Dynamic holographic optical tweezers," *Opt. Commun.* **207**, 169–175 (2002).
 143. R. D. Leonardo, F. Ianni, and G. Ruocco, "Computer generation of optimal holograms for optical trap arrays," *Opt. Express* **15**, 1913–1922 (2007).
 144. G. R. W, "A practical algorithm for the determination of phase from image and diffraction plane pictures," *Optik* **35**, 237 (1972).
 145. J. R. Fienup, "Phase retrieval algorithms: a comparison," *Appl. Opt.* **21**, 2758–2769 (1982).
 146. P. Pozzi, L. Maddalena, N. Ceffa, O. Soloviev, G. Vdovin, E. Carroll, and M. Verhaegen, "Fast Calculation of Computer Generated Holograms for 3D Photostimulation through Compressive-Sensing Gerchberg–Saxton Algorithm," *Methods Protoc.* **2**, 2 (2019).
 147. J. Leach, K. Wulff, G. Sinclair, P. Jordan, J. Courtial, L. Thomson, G. Gibson, K. Karunwi, J. Cooper, Z. J. Laczik, and M. Padgett, "Interactive approach to optical tweezers control," *Appl. Opt.* **45**, 897–903 (2006).
 148. S. Yang, E. Papagiakoumou, M. Guillon, V. de Sars, C.-M. Tang, and V. Emiliani, "Three-dimensional holographic photostimulation of the dendritic arbor," *J. Neural Eng.* **8**, 046002 (2011).
 149. O. M. Subach, D. Entenberg, J. S. Condeelis, and V. V. Verkhusha, "A FRET-Facilitated Photoswitching Using an Orange Fluorescent Protein with the Fast Photoconversion Kinetics," *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 14789–14799 (2012).
 150. I. Fialka, H. Schwarz, E. Reichmann, M. Oft, M. Busslinger, and H. Beug, "The estrogen-dependent c-JunER protein causes a reversible loss of mammary epithelial cell polarity involving a destabilization of adherens junctions.," *J. Cell Biol.* **132**, 1115–1132 (1996).

151. S. Yonemura, "Differential Sensitivity of Epithelial Cells to Extracellular Matrix in Polarity Establishment," *PLOS ONE* **9**, e112922 (2014).
152. C.-H. Lien, G. Abrigo, P.-H. Chen, and F.-C. Chien, "Two-color temporal focusing multiphoton excitation imaging with tunable-wavelength excitation," *J. Biomed. Opt.* **22**, 026008 (2017).
153. G. Faini, D. Tanese, C. Molinier, C. Telliez, M. Hamdani, F. Blot, C. Tourain, V. de Sars, F. Del Bene, B. C. Forget, E. Ronzitti, and V. Emiliani, "Ultrafast light targeting for high-throughput precise control of neuronal networks," *Nat. Commun.* **14**, 1888 (2023).
154. R. Chib, S. Shah, Z. Gryczynski, R. Fudala, J. Borejdo, B. Zelent, M. G. Corradini, R. D. Ludescher, and I. Gryczynski, "Standard reference for instrument response function in fluorescence lifetime measurements in visible and near infrared," *Meas. Sci. Technol.* **27**, 027001 (2015).
155. M. Szabelski, D. Ilijev, P. Sarkar, R. Luchowski, Z. Gryczynski, P. Kapusta, R. Erdmann, and I. Gryczynski, "Collisional Quenching of Erythrosine B as a Potential Reference Dye for Impulse Response Function Evaluation," *Appl. Spectrosc.* **63**, 363–368 (2009).
156. M. Szabelski, R. Luchowski, Z. Gryczynski, P. Kapusta, U. Ortmann, and I. Gryczynski, "Evaluation of instrument response functions for lifetime imaging detectors using quenched Rose Bengal solutions," *Chem. Phys. Lett.* **471**, 153–159 (2009).
157. B. van Oort, A. Amunts, J. W. Borst, A. van Hoek, N. Nelson, H. van Amerongen, and R. Croce, "Picosecond Fluorescence of Intact and Dissolved PSI-LHCI Crystals," *Biophys. J.* **95**, 5851–5861 (2008).
158. A. Habenicht, J. Hjelm, E. Mukhtar, F. Bergström, and L. B.-Å. Johansson, "Two-photon excitation and time-resolved fluorescence: I. The proper response function for analysing single-photon counting experiments," *Chem. Phys. Lett.* **354**, 367–375 (2002).
159. C. B. Talbot, R. Patalay, I. Munro, S. Warren, F. Ratto, P. Matteini, R. Pini, H. G. Breunig, K. König, A. C. Chu, G. W. Stamp, M. A. A. Neil, P. M. W. French, and C. Dunsby, "Application of ultrafast gold luminescence to measuring the instrument response function for multispectral multiphoton fluorescence lifetime imaging," *Opt. Express* **19**, 13848–13861 (2011).
160. A. S. Kristoffersen, S. R. Erga, B. Hamre, and Ø. Frette, "Testing Fluorescence Lifetime Standards using Two-Photon Excitation and Time-Domain

- Instrumentation: Rhodamine B, Coumarin 6 and Lucifer Yellow," *J. Fluoresc.* **24**, 1015–1024 (2014).
161. B. T. Bajar, E. S. Wang, S. Zhang, M. Z. Lin, and J. Chu, "A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs," *Sensors* **16**, 1488 (2016).
 162. J.-L. Wu, Y.-Q. Xu, J.-J. Xu, X.-M. Wei, A. C. Chan, A. H. Tang, A. K. Lau, B. M. Chung, H. Cheung Shum, E. Y. Lam, K. K. Wong, and K. K. Tsia, "Ultrafast laser-scanning time-stretch imaging at visible wavelengths," *Light Sci. Appl.* **6**, e16196–e16196 (2017).
 163. O. I. Rumyantsev, J. A. Lecoq, O. Hernandez, Y. Zhang, J. Savall, R. Chrapkiewicz, J. Li, H. Zeng, S. Ganguli, and M. J. Schnitzer, "Fundamental bounds on the fidelity of sensory cortical coding," *Nature* **580**, 100–105 (2020).
 164. K. H. Kim, C. Buehler, K. Bahlmann, T. Ragan, W.-C. A. Lee, E. Nedivi, E. L. Heffer, S. Fantini, and P. T. C. So, "Multifocal multiphoton microscopy based on multianode photomultiplier tubes," *Opt. Express* **15**, 11658–11678 (2007).

謝辞

本研究は、京都大学生命科学研究科 高次生命科学専攻 脳機能発達再生制御 今吉格教授のご指導の下で行われました。今吉格教授には、数々の助言、知見をご指導いただきました。また、筆者の研究生活において極めて恵まれた環境を与えてくださった今吉格教授に厚くお礼申し上げます。

本論文をまとめるにあたり、貴重なご指導、ご助言を賜りました、京都大学生命科学研究科 青木一洋教授、安達泰治教授、角野 歩准教授にご指導、ご助言を賜りました。お忙しい中、ご指導のお時間を頂き、感謝申し上げます。

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/テラヘルツ・赤外量子フォトンクス研究チームにおいて行われたものです。筆者の博士課程2年まで、アト秒科学研究チームを主宰した同センター 緑川克美特別顧問（旧：同センター長）に深く感謝します。また、テラヘルツ・赤外量子フォトンクス研究チームを主宰した 田中耕一郎 センター長 は筆者の博士課程3年時における研究生活を受け入れてくださったことを心より感謝申し上げます。理化学研究所の日本を代表する研究機関での研究環境を提供してくださったこと、改めて感謝申し上げます。直接のご指導を賜りました、理化学研究所光量子工学研究センター テラヘルツ・赤外量子フォトンクス研究チーム（旧：同センターアト秒科学研究チーム及び京都大学大学院生命科学研究科 特定教授） 磯部圭佑上級研究員には、レーザーから顕微鏡技術など、研究のあらゆることをご指導いただきました。特に、筆者の会社員から博士課程進学への転向に際して、決断に多大なるご助言と環境を整えてくださいました。日々の研究を常に自由に取り組ませていただくとともに、様々なアイデアや胸が高鳴る今後の研究方針など数々の議論を重ねていただきましたこと、感謝の念に耐えません。また、理化学研究所での研究生活において光量子制御技術開発チーム 永田豊専任研究員や、未踏レーザー科学研究チーム 西宮海人基礎科学特別研究員には、研究や日常生活におけるご助言やアドバイスをいただきました。また、旧アト秒科学研究チーム 若林多起子特別嘱託職員、センター長室 小幡孝太郎高度研究支援専門職員、センター長室 事務職員の松下美由紀様には、事務手続きのサポートだけでなく、様々な相談にも親身にご対応いただきました。技術基盤支援チームの皆様には、100件を超える工作依頼、設計相談を受けていただき、大変お世話になりました。ここに全ての方のお名前を記載することはできませんが、理化学研究所では多くの皆様にご指導・ご協力いただきましたこと、心より感謝いたします。

また、本論文とは直接関係ないですが、アト秒科学研究チーム/テラヘルツ・赤外量子フォトンクス研究チームにおいて衝撃波制御の研究も取り組ませていただきました。皆様に重ねて感謝いたします。

本研究は、浜松ホトニクス株式会社の社員として留学制度によって行われたものです。本研究が行えたのは、同会社電子管事業部企画部の支援とご理解があつてこそです。武宮考嗣

グループ長，鈴木那津輝チームリーダーをはじめとした社員の皆様に深く感謝申し上げます。

最後に，博士課程へ進学することを理解してくださった妻，長男，家族の皆様に感謝します。特に，在学中，様々な壁にぶつかり意気消沈している筆者に，叱咤激励の言葉を常にかける鼓舞してくれた妻には，心よりお礼申し上げます。

本学位論文は，以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

論文題目 (the title of the paper) Three-dimensional scanless patterned illumination using time-multiplexed multiline temporal focusing for multicell manipulation with single-cell resolution

著者 (authors) Kenta Inazawa, Mayumi Yamada, Takayuki Michikawa, Kana Namiki, Atsushi Miyawaki, Itaru Imayoshi, Katsumi Midorikawa and Keisuke Isobe

雑誌名 (journal name)

Journal of Biomedical Optics, 巻 (volume) 30, 号 (issue) 7, ページ (pages) 075003, 年 (year) 2025,

業績目録

論文発表

1. K. Inazawa, K. Isobe, T. Ishikawa, K. Namiki, A. Miyawaki, F. Kannari, and K. Midorikawa, "Enhancement of optical sectioning capability of temporal focusing microscopy by using timemultiplexed multi-line focusing," Appl. Phys. Express **14**, 082008 (2021).
2. T. Ishikawa, K. Isobe, K. Inazawa, K. Namiki, A. Miyawaki, F. Kannari, and K. Midorikawa, "Adaptive optics with spatio-temporal lock-in detection for temporal focusing microscopy," Opt. Express **29**, 29021–29033 (2021).
3. T. Ishikawa, K. Isobe, K. Inazawa, T. Michikawa, K. Namiki, A. Miyawaki, F. Kannari, and K. Midorikawa, "Fringe- and speckle-free holographic patterned illumination using timemultiplexed temporal focusing", Appl. Phys. Express **15**, 042005, 2022.
4. Kenta Inazawa, Mayumi Yamada, Takayuki Michikawa, Kana Namiki, Atsushi Miyawaki, Itaru Imayoshi, Katsumi Midorikawa, and Keisuke Isobe "Three-dimensional scanless patterned illumination using time-multiplexed multiline temporal focusing for multicell manipulation with single-cell resolution," Journal of Biomedical Optics **30**(7), 075003 2025.

国際学会

1. K. Isobe, K. Inazawa, T. Ishikawa, F. Kannari, K. Namiki, A. Miyawaki, and K. Midorikawa, "Enhancement of axial resolution of temporal focusing microscopy by using programmable time-multiplexed multi-line focusing," The 10th Advanced Lasers and Photon Sources, ALPS-22-01, Yokohama, Japan, 2021.
2. T. Ishikawa, K. Isobe, K. Inazawa, F. Kannari, and K. Midorikawa, "Adaptive optics of widefield temporal focusing microscopy combined with structured illumination microscopy," The 10th Advanced Lasers and Photon Sources, ALPS-22-02, Yokohama, Japan, 2021.
3. T. Ishikawa, K. Isobe, K. Inazawa, F. Kannari, and K. Midorikawa, "Adaptive optics of temporal focusing microscopy by utilizing structured illumination," 2021 Conference on Lasers and Electro-Optics/Europe, Hannover, Germany, CH-13.1, 2021.
4. T. Ishikawa, K. Isobe, K. Inazawa, T. Michikawa, K. Namiki, A. Miyawaki, F. Kannari, and K. Midorikawa, "Fringe- and speckle-free holographic patterned illumination using multifocal

timemultiplexed temporal focusing pulses,” The 11th Advanced Lasers and Photon Sources Yokohama, Japan, ALPS8- 02, 2022.

5. Kenta Inazawa, Keisuke Isobe, Takayuki Michikawa, Kana Namiki, Atsushi Miyawaki, Katsumi Midorikawa, “Scanless two-photon patterned illumination with high axial resolution,” The 12th Asia-Pacific Laser Symposium (APLS2023), GTu2-03 Hakodate, Japan, 4-7 September 2023.
6. Kenta Inazawa, Keisuke Isobe, Takayuki Michikawa, Kana Namiki, Atsushi Miyawaki, Katsumi Midorikawa, “Scanless three-dimensional photostimulation with single cell resolution using time-multiplexed multi-line temporal focusing,” The 10th Biomedical Imaging and Sensing Conference (BISC2024), BISCp-01, PACIFIKO Yokohama, Japan, 21-25 April 2024.
7. Kenta Inazawa, Mayumi Yamada, Takayuki Michikawa, Kana Namiki, Atsushi Miyawaki, Itaru Imayoshi, Katsumi Midorikawa, and Keisuke Isobe, “Three-dimensional scanless patterned illumination with single-cell resolution applying time-multiplexed multi-line temporal focusing,” SPIE Photonics West 2025, BIOS Conferences, 13304-10, San Francisco, California, United State, 23-31 January 2025.

国内学会

1. 石川智啓, 磯部圭佑, 稲澤健太, 神成文彦, 緑川克美, “デジタルマイクロミラーデバイスを用いた多光子パターン照明,”第 80 会応用物理学会秋季学術講演会, 21p-E206-6, 北海道大学 札幌キャンパス, 北海道, 2019 年 9 月 18 日～21 日.
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,”第 80 会応用物理学会秋季学術講演会, 21pE206-7, 札幌, 北海道, 2019 年 9 月 18 日～21 日.
3. 石川智啓, 磯部圭佑, 稲澤健太, 並木香奈, 道川貴章, 宮脇敦史, 神成文彦, 緑川克美, “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の分解能向上,”レーザー学会学術講演会第 40 回年次大会, 106-22a-VII-04, 仙台国際センター, 宮城 2020 年 1 月 20 日～22 日.
4. 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,”レーザー学会学術講演会第 40 回年次大会, 107-22p-VII-03, 仙台国際センター, 宮城, 2020 年 1 月 20 日～22 日.

5. 石川智啓, 磯部圭佑, 稲澤健太, 神成文彦, 緑川克美, “時空間ロックイン検出による時空間集光パルスの補償光学,” レーザー学会学術講演会第 41 回年次大会, B01-18a-II04, オンライン, 2021 年.
6. 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, “時間分割多重化マルチライン時空間集光による広視野多光子顕微鏡の光軸方向分解能向上,” レーザー学会学術講演会第 41 回年次大会, オンライン, I01-18a-IX-03, 2021 年
7. 稲澤 健太, 磯部 圭佑, 道川 貴章, 並木 香奈, 宮脇 敦史, 緑川 克美, “時間多重化マルチライン時空間集光法を用いた多細胞同時多光子光刺激”, レーザー学会学術講演会第 44 回年次大会, I10-19p-II-03, 日本科学未来館, 東京, 2024 年 1 月 16 日~19 日
8. 稲澤 健太, 磯部 圭佑, 道川 貴章, 並木 香奈, 宮脇 敦史, 緑川 克美, “単一細胞分解能を有する非走査 3 次元多光子光刺激”, 第 72 回応用物理学会春季学術講演会, 23p-12C-1, 東京都市大学 世田谷キャンパス&オンライン, 東京, 2024 年 3 月 22 日~25 日
9. 磯部 圭佑, 稲澤 健太, 道川 貴章, 宮脇 敦史, 緑川 克美, “光刺激中の多光子イメージング技術,” 第 85 回応用物理学会秋季学術講演会, 朱鷺メッセほか 2 会場&オンライン, 19p-C32-7, 2024 年 9 月 16 日~20 日.
10. 稲澤 健太, 山田 真弓, 道川 貴章, 並木 香奈, 宮脇 敦史, 今吉 格, 緑川 克美, 磯部 圭佑, “単一細胞分解能を有する三次元非走査 多光子パターン照明技術の開発”
11. 第 24 回 (2024 年度) レーザー学会東京支部研究会 日本大学理工学部 駿河台キャンパス, 東京, 2025 年 3 月 10 日.
12. 稲澤 健太, 今吉 格, 田中 耕一郎, 磯部 圭佑, “多点励起によるレーザー誘起衝撃波のコヒーレント制御,” 第 86 回応用物理学会秋季学術講演会, 名城大学, 天白キャンパス&オンライン, 2025 年 9 月 7 日~10 日.

その他

1. 受賞：2021 年 レーザー学会学術講演会第 41 回年次大会
優秀論文発表賞
2. 受賞：2021 年 The Japan Society of Applied Physics.
The spotlight article Award
3. 受賞：2025 年 第 24 回（2024 年度）レーザー学会東京支部研究会
発表奨励賞受賞