



Title	透過型液晶デバイスを用いたレーザー走査型蛍光顕微鏡における波面収差補正に関する研究
Author(s)	田辺, 綾乃
Citation	北海道大学. 博士(工学) 甲第12636号
Issue Date	2017-03-23
DOI	10.14943/doctoral.k12636
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/65689
Type	theses (doctoral)
File Information	Ayano_Tanabe.pdf



[Instructions for use](#)

平成 28 年度 博士論文

透過型液晶デバイスを用いた
レーザー走査型蛍光顕微鏡における
波面収差補正に関する研究

**Study on Correction of Wave-front Aberrations Using
Transmissive Liquid Crystal Devices in Laser Scanning
Fluorescence Microscopy**

北海道大学 大学院情報科学研究科

生命人間情報科学専攻

脳機能工学研究室

田辺 綾乃

(指導教員 根本 知己 教授)

目次

第1章	序論	1
1.1	本研究の背景	1
1.1.1	レーザー走査型顕微鏡と空間分解能	1
1.1.2	2光子励起顕微鏡	9
1.1.3	顕微鏡観察における波面収差	11
1.1.4	光学システムにおける Zernike 収差	12
1.1.5	光学赤外線望遠鏡における補償光学	17
1.1.6	既存の波面収差補正技術	19
1.1.7	透過型液晶セルによる位相変調技術	25
1.2	本研究の目的	29
1.3	本論文の構成	30
第2章	透過型液晶デバイスを用いたレーザー走査型顕微鏡観察における 球面収差補正	31
2.1	緒言	31
2.2	深部観察時に発生する球面収差の数値的解析	33
2.3	材料・方法	39
2.3.1	観察光学系	39
2.3.2	透過型球面収差補正デバイスの機能	41
2.3.3	試料・解析	47
2.3.4	対物レンズシステムを用いた数値計算	49
2.4	実験結果	51
2.4.1	波長 488 nm における点像分布関数の数値計算	51
2.4.2	蛍光ビーズの 1 光子励起顕微鏡観察	53
2.4.3	蛍光ビーズの 2 光子励起顕微鏡観察	57
2.4.4	透明化脳スライスの 2 光子励起顕微鏡観察	59
2.5	考察	69
2.6	結論	73
第3章	透過型液晶デバイスを用いたレーザー走査型顕微鏡観察における 非点収差および 1 次コマ収差補正	75
3.1	緒言	75
3.2	材料・方法	77
3.2.1	透過型非対称性収差補正デバイスの機能	77
3.2.2	観察光学系	80
3.2.3	試料と解析	82

3.2.4	対物レンズシステムを用いた数値計算.....	84
3.3	実験.....	85
3.3.1	波長 488 nm における点像分布関数の数値計算.....	85
3.3.2	蛍光ビーズの 1 光子励起顕微鏡観察.....	87
3.3.3	蛍光ビーズの 2 光子励起顕微鏡観察.....	93
3.3.4	固定全脳の 2 光子励起顕微鏡観察.....	95
3.4	考察.....	97
3.5	結論.....	100
第 4 章	本研究の結論.....	101
4.1	本研究の結語.....	101
4.2	今後の展望.....	104
謝辞	107
研究業績	108
1.	主著学術論文.....	108
2.	講演(学位論文関係).....	109
3.	特許.....	109
4.	報道等.....	109
参考文献	110

第1章 序論

1.1 本研究の背景

1.1.1 レーザー走査型顕微鏡と空間分解能

レーザー走査型顕微鏡は、水銀ランプ等を光源に用いる通常の蛍光顕微鏡と同様に、蛍光分子を利用して観察を行う顕微鏡である。図 1.1 に示すように、ミラー2枚によって対物レンズへの光の入射角度を振ることで、対物レンズで絞った集光点を光軸と直交する面内で走査する。それぞれの集光点で励起された蛍光分子が放出する蛍光をディテクタで取得し、ディテクタで得られた蛍光強度をコンピュータで2次元に再構成することで画像を得る。同様に、走査する集光面を光軸方向に移動させることで、3次元画像を構築することが可能となる。さらに、対物レンズの焦点位置と共役な位置(像位置)に円形の開口をもつピンホールを配置することで焦点位置以外からの蛍光はピンホールでカットされ、焦点位置での蛍光のみを検出することができる。以上のようにして、レーザー走査型顕微鏡では高コントラスト・高分解能な画像を実現している。

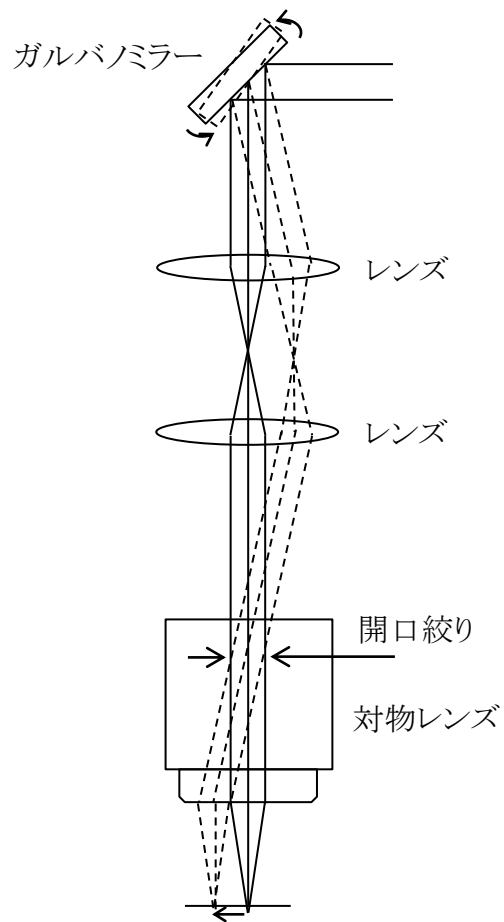


図 1.1, レーザー走査型顕微鏡

次に、対物レンズの焦点面と瞳位置の関係について述べる[1, 2]。図 1.2 に示すように、レンズ前方に l だけ離れた面にある物体 $f(x, y)$ を、レンズの後側焦点面で観察するとき、距離 l の伝搬に対してフレネル近似が成り立つとすると、後側焦点面での光の振幅 $g(x_0, y_0)$ は

$$g(x_0, y_0) = \frac{1}{i\lambda f} \exp \left[i \frac{\pi}{\lambda f} \left(1 - \frac{l}{f} \right) \cdot (x_0^2 + y_0^2) \right] \cdot F \left(\frac{x_0}{\lambda f}, \frac{y_0}{\lambda f} \right) \quad (1.1)$$

と表せる。 $F \left(\frac{x_0}{\lambda f}, \frac{y_0}{\lambda f} \right)$ は $f(x, y)$ のフーリエ変換であり、 (x_0, y_0) はレンズ焦点面の座標、 f はレンズの焦点距離、 λ は光の波長である。式 (1.1) より、 $l = f$ のとき、

$$g(x_0, y_0) = \frac{1}{i\lambda f} \cdot F \left(\frac{x_0}{\lambda f}, \frac{y_0}{\lambda f} \right) \quad (1.2)$$

が成り立つ。式 (1.2) では位相湾曲に相当する 2 次位相因子が消失し、フーリエ変換関係が厳密に成り立つことが分かる。すなわち、物体 $f(x, y)$ がレンズの前側焦点面にあるとき、レンズの後側焦点面では物体 $f(x, y)$ のフーリエ変換 $F \left(\frac{x_0}{\lambda f}, \frac{y_0}{\lambda f} \right)$ に比例した振幅が得られる。

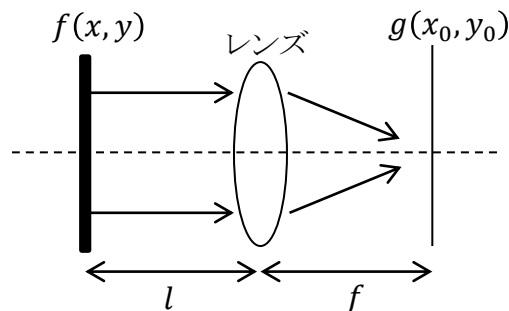


図 1.2, レンズのフーリエ変換作用

本研究では空間分解能の指標として、空間分解能以下の大きさであるターゲットの蛍光強度分布の半値全幅を評価しているため、解像力についても本節で言及する[1, 2]。レーザー走査型顕微鏡では対物レンズの前側焦点面に開口絞りを設けているため、開口絞りと同役である瞳面は、レンズの前側焦点面とも共役関係である(テレセントリック光学系)。すなわち、対物レンズの後側焦点面で得られる振幅 $g(x_0, y_0)$ は、瞳面における振幅(瞳関数 $p(x, y)$)のフーリエ変換となる。瞳面が直径 D の円形開口であるとき、瞳関数のフーリエ変換は1次の第一種ベッセル関数 $J_1(x)$ で表すことができるため、対物レンズ焦点面における強度分布 $I(x_0, y_0)$ は極座標表示($x_0 = w \cos \varphi, y_0 = w \sin \varphi$)で、

$$I(w) = |g(w)|^2 = I_0 \left[\frac{2J_1\left(\frac{\pi D}{\lambda f} w\right)}{\frac{\pi D}{\lambda f} w} \right]^2 \quad (1.3)$$

となる。レーリーの基準では、一つの像の強度最大位置と他の像の強度最小位置とが一致しても両者は区別できるとしている。像の第1暗輪の半径は

$$\Delta w = 1.22 \frac{\lambda f}{D} \quad (1.4)$$

であり(図 1.3)、各々式(1.3)で表される互いにインコヒーレントな2つの点物体が接近したときに、両者が区別できる最小間隔距離は

$$L = \frac{1.22\lambda f}{D} \quad (1.5)$$

となる。この逆数が解像力 R であり、

$$R = \frac{0.82D}{\lambda f} \quad (1.6)$$

である。

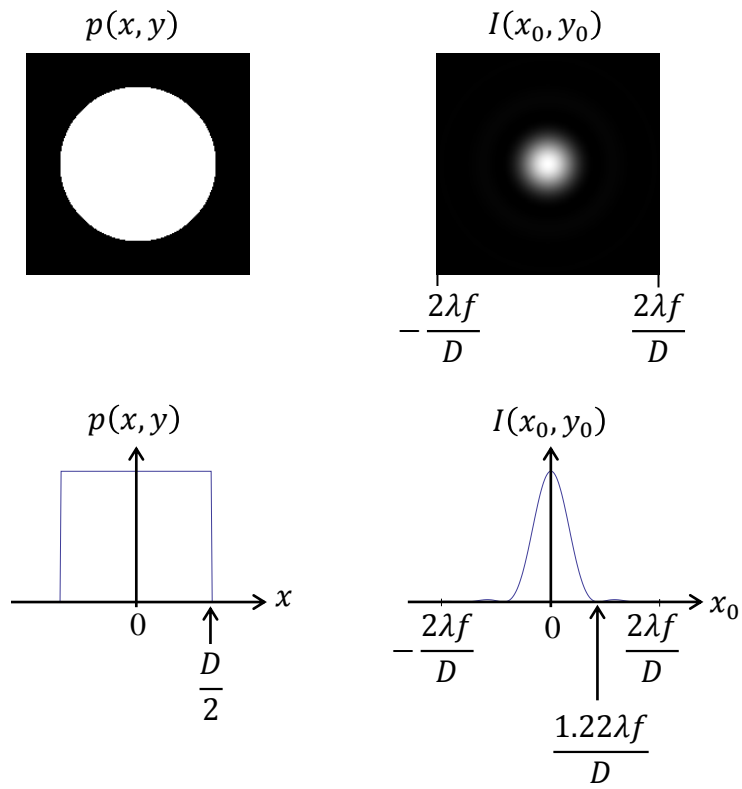


図 1.3, 瞳関数 $p(x, y)$ が直径 D の円形開口であるときに
焦点面で得られる強度分布 $I(x_0, y_0)$

次に、周波数応答関数 (OTF) についても述べる[1, 2]。レーザー走査型顕微鏡のようなコヒーレント結像系では、物体と光学系の点応答関数 (PSF) の振幅に関するコンボリューション積分によって像の振幅が与えられるため、OTF としては、光学系の PSF のフーリエ変換を考えるのが妥当である。すなわち、コヒーレント結像系に対する OTF は瞳関数そのものになる。瞳面が直径 D の円形開口であるときの理想結像系の OTF を図 1.4 に示す。なお、この結像系が透過できる最高の空間周波数(カットオフ周波数)は $D/2\lambda f$ である。一方、水銀ランプ等を光源に用いる通常の蛍光顕微鏡のようなインコヒーレント結像系では、像強度分布は物体強度と PSF の強度分布のコンボリューション積分によって与えられ、OTF は正規化された瞳関数の自己相関関数となる。インコヒーレント結像系における、瞳関数が直径 D の円形であるときの理想結像系の OTF を図 1.4 に示す。このときのカットオフ周波数は $D/\lambda f$ で、コヒーレント結像系におけるカットオフ周波数の 2 倍まで広がっている。また、若干の差異はあるものの、前述した解像力 R とインコヒーレント結像系におけるカットオフ周波数はよく対応している。OTF のみを比較するとインコヒーレント照明はコヒーレント照明よりも平面内での分解能が高いと結論したくなるが、OTF のカットオフは、コヒーレント結像系では像振幅の周波数であるのに対して、インコヒーレント結像系では像強度の周波数であるため、直接的に比較することはできない。また、レーザー走査型顕微鏡の OTF は、照明光学系の OTF とピンホールを含めた蛍光取得光学系の OTF のコンボリューション積分となるため、通常のコヒーレント結像系よりもカットオフ周波数は高くなる。

次に、収差、すなわち瞳面における波面の理想球面からのズレの影響を考える。瞳関数を

$$P(x, y) \cdot \exp[ikW(x, y)] \quad (1.7)$$

と与える。 k は波数、 $kW(x, y)$ は瞳における理想球面からの位相誤差である。コヒーレント結像系では、OTFは瞳関数そのものであるため、

$$H(v_x, v_y) = P(\lambda f v_x, \lambda f v_y) \cdot \exp[ikW(\lambda f v_x, \lambda f v_y)] \quad (1.8)$$

と表せる。ここで、 $v_x = x/\lambda f$ 、 $v_y = y/\lambda f$ である。つまり、OTFの帯域制限は収差の存在に影響されないが、収差は通過帯域内に位相歪みをもたらすため、その結像系の忠実性は大きく損なわれる。

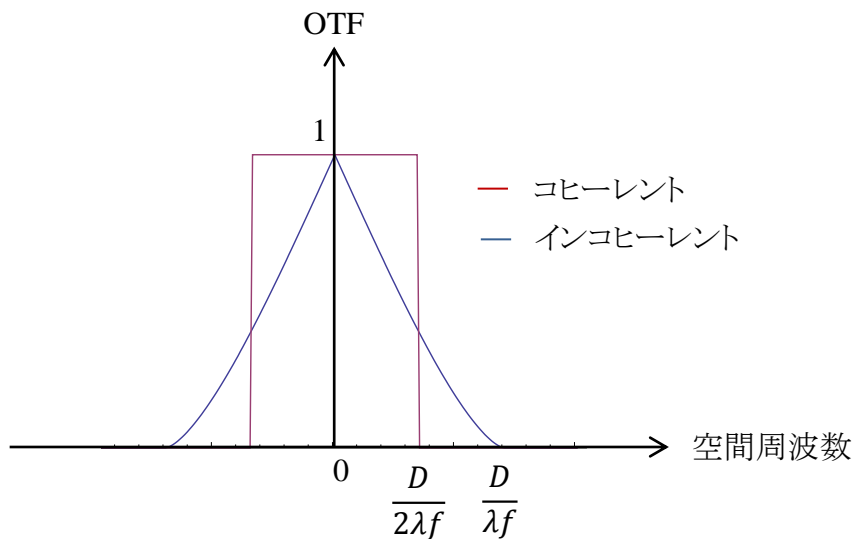


図 1.4, コヒーレント結像系とインコヒーレント結像系の OTF

1.1.2 2光子励起顕微鏡

2光子励起顕微鏡とは2光子励起過程を利用することで蛍光損失の少ない高画質な断層イメージングを実現する顕微鏡である[3]。2光子励起過程とは1つの蛍光分子が2つの光子を同時に吸収し、電子が励起状態へと遷移する非線形光学現象である。2光子励起過程では、その光子の2倍のエネルギーを持った(すなわち波長が1/2である)光子が1光子励起された時と同様のエネルギー準位に励起される(図1.5(a))。図1.5(a)において、 h : プランク定数、 c : 真空における光速、 λ_{ex} : 励起波長、 λ_{em} : 蛍光波長、 S_0 : 基底状態、 S_1 : 第一電子励起準位である。したがって、一般的な蛍光観察に使用される可視域の蛍光物質を2光子励起するためには、可視域波長の約2倍の波長となる近赤外領域の励起光を使用する。一方、2光子励起過程が生じる確率は極めて低いため、2光子励起過程を実験室中で十分に起こすためには時間的・空間的に光子密度を極度に高める必要がある。そのため、2光子励起顕微鏡の励起光源には近赤外波長でパルス幅がフェムト秒オーダー、かつ出力パワーの大きな超短パルスレーザーが主として用いられる。また、焦点以外の光子密度の低い領域で2光子励起過程が発生する可能性は非常に低いため、焦点近傍の微小領域における蛍光分子のみを高い空間分解能で励起することができる(図1.5(b))。すなわちピンホールが不要となり、蛍光損失の少ない高画質な断層イメージングを実現できる。一方、近赤外波長領域の光は生体組織において低吸収かつ低散乱であり(図1.6)、生体深部の蛍光物質へと到達可能である。上記の特性により、2光子励起顕微鏡は生体組織深部の高分解能観察に広く用いられている。

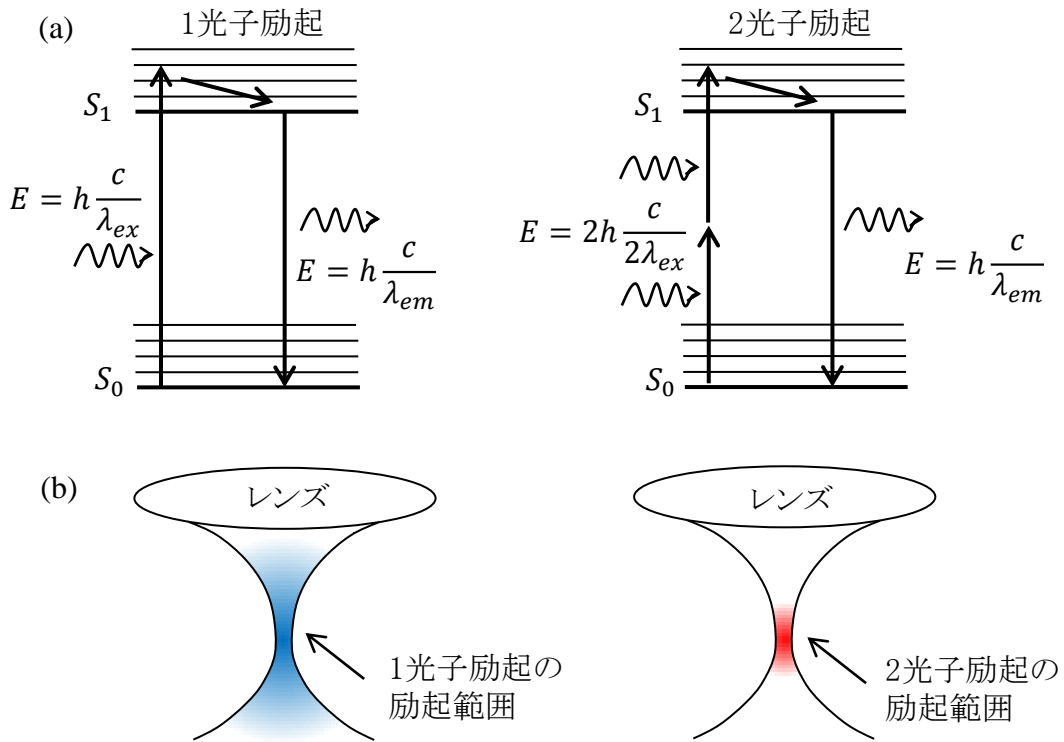


図 1.5, 1 光子励起と 2 光子励起

(a) エネルギー準位の遷移 (b) レンズによる集光。

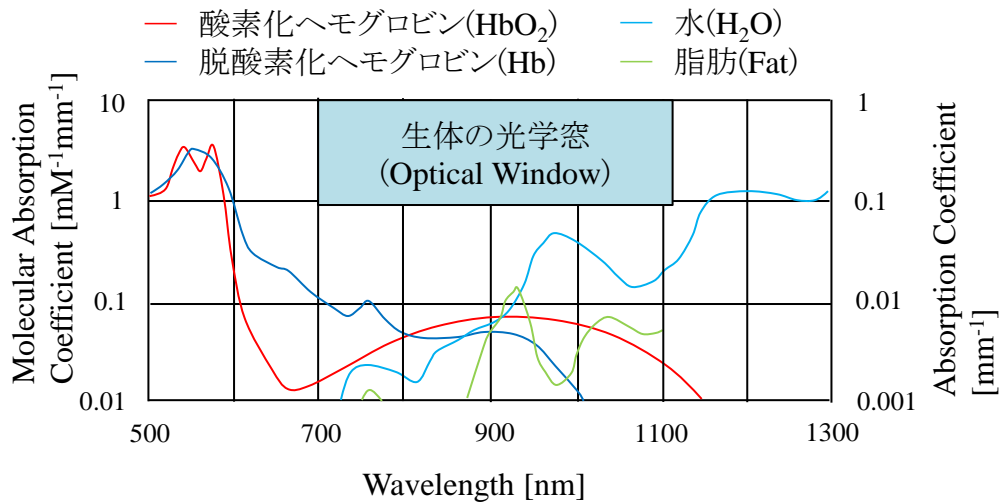


図 1.6, 生体の光学窓。浜松ホトニクス of HP

(<https://www.hamamatsu.com/jp/ja/technology/innovation/trs/index.html>)より改変

1.1.3 顕微鏡観察における波面収差

1.1.1、1.1.2 節で述べたようなレーザー走査型顕微鏡および2光子励起顕微鏡は3Dバイオイメージングの手法として広く使用されている。特に、2光子励起顕微鏡では生体試料深部での3Dイメージングが可能であり、例えばマウス脳のライブイメージングも行なわれており[4-7]、現在では脳表面から1.6 mm近い深部まで到達し、海馬歯状回の神経細胞の *in vivo* 観察も可能である。しかし、生体深部では生体試料と対物レンズ浸液の屈折率の違いや試料の形状、試料中の複雑な屈折率分布など、光路中における屈折率の不整合によって波面収差が発生し、得られる画像の蛍光強度や分解能が低下してしまうという問題がある(図 1.7(a, b))。一方、あらかじめ波面に収差と逆位相の変調を与えることで収差を補正する技術がある(図 1.7(c))。これまでに、多数の先行研究において顕微鏡観察時に発生する収差の数値計算的および実験的な検証が行われおり[8-16]、また、収差補正のための様々な技術が提案・開発されている[10, 12, 14-22]。

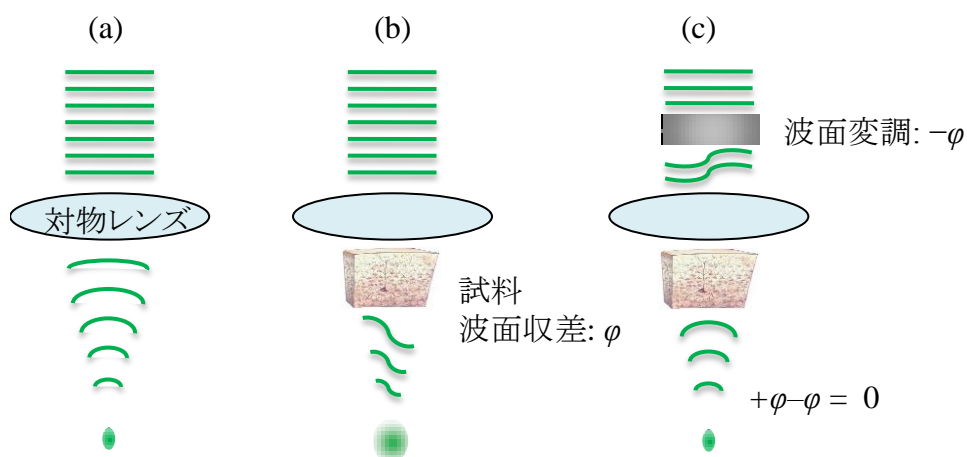


図 1.7, 対物レンズによる集光 (a) 収差のない集光

(b) 試料深部への集光 (c) 波面変調された光の試料深部への集光

1.1.4 光学システムにおける Zernike 収差

波面収差 φ は Zernike 多項式によって冪級数に展開することができる[23, 24]。Zernike 多項式は極座標の正規直交関数系であり、円形の範囲内の数値分布を扱う際に便利のため、光学系ではしばしば用いられている。

Zernike 多項式は極座標($X = \rho \sin \theta$, $Y = \rho \cos \theta$)による表示で、

$$V_n^l(\rho, \theta) = R_n^l(\rho)e^{il\theta} \quad (1.9)$$

と書ける。 l, n は $l \geq 0, n \geq 0$ なる整数で、 $n \geq |l|$ であり、 $n - |l|$ は偶数である。

この関数系の正規直交性は

$$\iint_{X^2+Y^2 \leq 1} V_n^{l*}(X, Y)V_{n'}^{l'}(X, Y)dXdY = \frac{\pi}{n+1} \delta_{ll'} \delta_{nn'} \quad (1.10)$$

で表される。 δ_{ij} はクロネッカーのデルタであり、* は複素共役を表す。動径関数

$R_n^l(\rho)$ は、 ρ に関して $\rho^n, \rho^{n-2}, \dots, \rho^{|l|}$ を含む多項式である。

なお、正規化は許される n, m の全ての値に対し、

$$R_n^l(1) = 1 \quad (1.11)$$

となるように選ばれている。

また、複素多項式 V の代わりに実多項式

$$\left. \begin{aligned} U_n^m(\rho, \theta) &= \frac{1}{2}(V_n^m + V_n^{-m}) = R_n^m(\rho) \cos m\theta \\ U_n^{-m}(\rho, \theta) &= \frac{1}{2i}(V_n^m - V_n^{-m}) = R_n^m(\rho) \sin m\theta \end{aligned} \right\} \quad (1.12)$$

を用いることもできる。

式(1.9), (1.10)より動径方向の多項式は

$$\int_0^1 R_n^l(\rho) R_{n'}^{l'}(\rho) \rho d\rho = \frac{1}{2(n+1)} \delta_{nn'} \quad (1.13)$$

を満足し、 $m = |l|$ とする時、

$$R_n^{\pm m}(\rho) = \sum_{s=0}^{\frac{n-m}{2}} (-1)^s \frac{(n-s)!}{s! \left(\frac{n+m}{2} - s\right)! \left(\frac{n-m}{2} - s\right)!} \rho^{n-2s} \quad (1.14)$$

で表される。いくつかの n 、 m に対する Zernike 多項式を表 1.1 および図 1.8 に示す。

表 1.1, Zernike 多項式

n	m	Zernike 多項式	収差タイプ
0	0	1	ピストン
1	1	$\rho \cos \theta$	チルト(0°の軸)
1	-1	$\rho \sin \theta$	チルト(90°の軸)
2	0	$2\rho^2 - 1$	デフォーカス
2	2	$\rho^2 \cos 2\theta$	非点収差(0°または90°の軸)
2	-2	$\rho^2 \sin 2\theta$	非点収差(±45°の軸)
3	1	$(3\rho^3 - 2\rho) \cos \theta$	1次コマ収差(0°の軸)
3	-1	$(3\rho^3 - 2\rho) \sin \theta$	1次コマ収差(90°の軸)
3	3	$\rho^3 \cos 3\theta$	トレフォイル(0°の軸)
3	-3	$\rho^3 \sin 3\theta$	トレフォイル(90°の軸)
4	0	$6\rho^4 - 6\rho^2 + 1$	3次球面収差
4	4	$\rho^4 \cos 4\theta$	テトラフォイル
4	-4	$\rho^4 \sin 4\theta$	テトラフォイル
4	2	$(4\rho^4 - 3\rho^2) \cos 2\theta$	
4	-2	$(4\rho^4 - 3\rho^2) \sin 2\theta$	

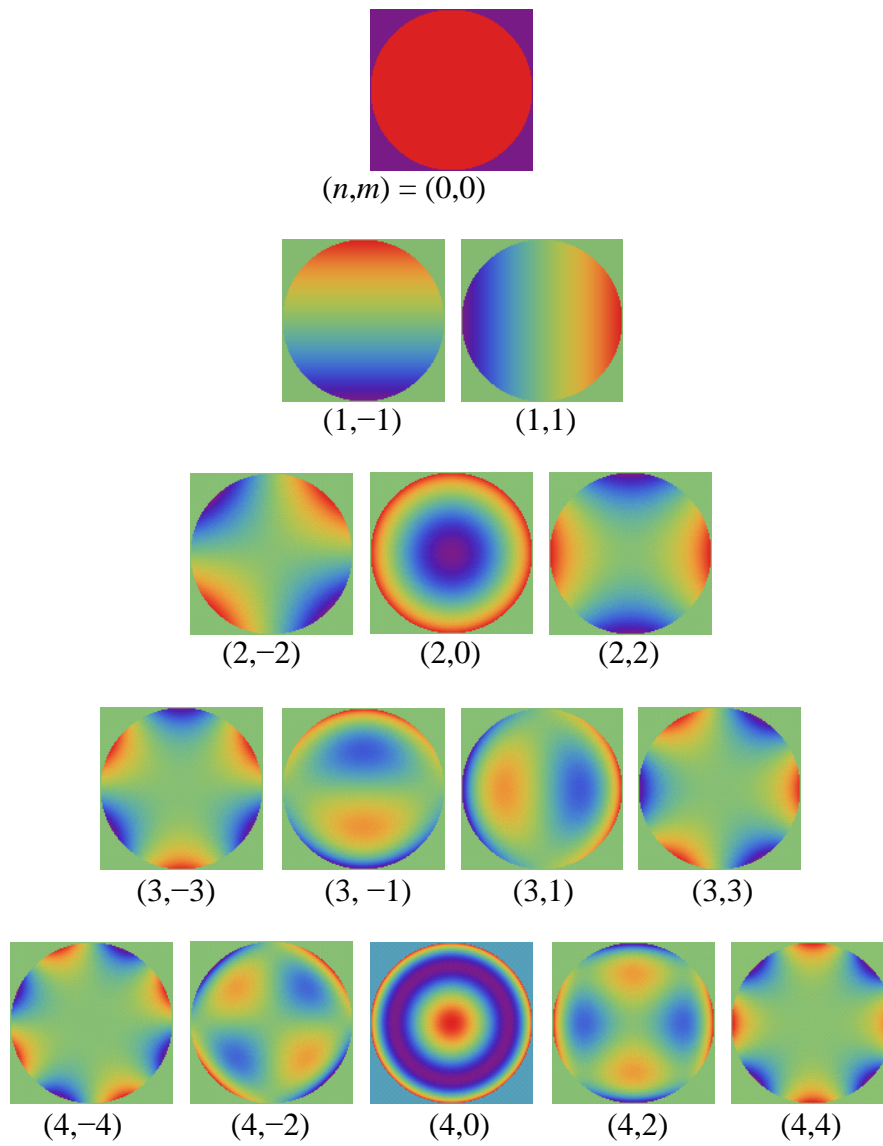


图 1.8, Zernike 多項式

次に、収差 φ を Zernike 多項式に展開する。ここでは、式 (1.12) で示した実多項式を用いる。 $R_n^m(\rho) \cos m\theta$ と $R_n^m(\rho) \sin m\theta$ は回転対称であるので、ここでは $R_n^m(\rho) \cos m\theta$ のみ考えると、収差 φ は以下のように表せる。

$$\varphi(\rho, \theta) = A_{00} + \sum_{n=1}^{\infty} \left[A_{n0} R_n^0(\rho) + \sum_{m=1}^n A_{nm} R_n^m(\rho) \cos m\theta \right] \quad (1.15)$$

最初の A_{00} は波面収差の平均値を表し、 A_{n0} および A_{nm} は各々 $m = 0$ および $m \neq 0$ の場合における各 Zernike 多項式の係数である。このときの RMS 波面収差 σ は

$$\begin{aligned} \sigma^2 &= \overline{[\varphi(\rho, \theta)^2]} - (\overline{\varphi(\rho, \theta)})^2 \\ &= \left[\frac{1}{\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^1 \varphi(\rho, \theta)^2 \rho d\rho d\theta \right] - \frac{1}{\pi^2} \left[\int_0^{2\pi} \int_0^1 \varphi(\rho, \theta) \rho d\rho d\theta \right]^2 \\ &= \sum_{n=1}^{\infty} \left[\left(\frac{A_{n0}}{\sqrt{n+1}} \right)^2 + \left(\frac{A_{nm}}{\sqrt{2(n+1)}} \right)^2 \right] \end{aligned} \quad (1.16)$$

で表される。このとき、光学系のストレーラ比は

$$\begin{aligned} \text{Strehl ratio} &= \frac{1}{\pi^2} \left| \int_0^{2\pi} \int_0^1 e^{i2\pi\varphi(\rho, \theta)} \rho d\rho d\theta \right|^2 \\ &\approx 1 - (2\pi\sigma)^2 \\ &= 1 - 4\pi^2 \sum_{n=1}^m \left[\frac{A_{n0}^2}{n+1} + \frac{A_{nm}^2}{2(n+1)} \right] \end{aligned} \quad (1.17)$$

となる。式 (1.17) より、 $m = 0$ の多項式である球面収差や、非点収差・1次コマ収差のような低次 n 項の多項式は RMS 波面収差 σ を大きくし、ストレーラ比を減少させることが分かる。例えば $m \neq 0$ の非対称性収差の場合、 $n+1$ 次の Zernike

収差によるストレーラ比の低下は、同じ Zernike 係数の n 次の Zernike 収差によるストレーラ比の低下に対して $(n+1)/(n+2)$ 倍となる。

また、式 (1.15) を以下の式で表したとき、

$$\varphi(\rho, \theta) = \sum_{n,m} A_{nm} R_n^m(\rho) \cos m\theta \quad (1.18)$$

各 Zernike 多項式の係数 A_{nm} は、フーリエ級数展開の定義より、

$$A_{nm} = \frac{\int \phi(\rho, \theta) R_n^m(\rho) \cos m\theta \rho d\rho d\theta}{\int (R_n^m(\rho) \cos m\theta)^2 \rho d\rho d\theta} \quad (1.19)$$

と求めることができる。Zernike 多項式の各項は古典的な収差に対応するため、波面収差を扱う場合は非常には便利である。また、Zernike 多項式は直交関数系であるため、各収差成分を独立に扱うことが可能である。

1.1.5 光学赤外線望遠鏡における補償光学

天文学において、観察対象と計測装置との間に存在する大気の揺らぎなどの不均一な媒質によって乱された光の波面を補正し、回折限界に迫る高い分解能を得るという概念が 1953 年に発表された[25]。また、これまで地上の光学赤外線望遠鏡を用いた天体観察において補償光学技術の有効性が示されてきた[26, 27]。一般的に、光学赤外線望遠鏡においては形状可変ミラーの凹凸を制御し機械的に波面を補正する技術が用いられている。図 1.9 に光学赤外線望遠鏡における補償光学系の基本構成の一例を示す。波面制御には波面センサからのフィードバック制御方式が使用されており、波面センサで測定された入射光の波面情報をもとにして、入射光を平面波にするように形状可変ミラーの凹凸を制御することが多い。波面を測定するための星をガイドスターと呼ぶ。波面測定に適

した明るいガイドスターが無い場合は、レーザーを使ってガイドスターを人工的に作成することも可能である。形状可変ミラーは反射型であり、1.1.6 節で後述するような静電アクチュエーターに小さなミラーを貼り付けた素子を多数並べたものや、1枚の金属ミラー膜の裏面に多数の静電アクチュエーターを接着して形状を制御する方式、金属ミラー膜を圧電素子で制御する方式などがある。

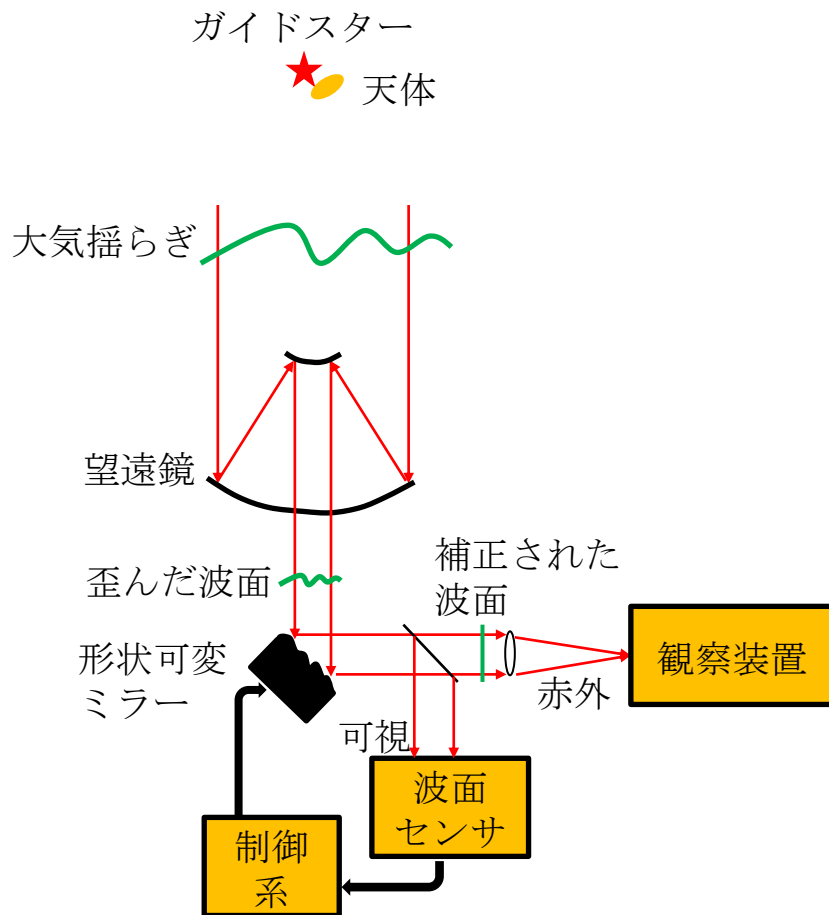


図 1.9, 光学赤外望遠鏡における補償光学の概念図。文献 [26]より改変

1.1.6 既存の波面収差補正技術

従来、顕微鏡観察における波面収差補正手段として、補正環や反射型空間光位相変調器が使用されている。補正環は対物レンズに付いているリング状の金物であり(図 1.10)、補正環を回すことによって対物レンズ中のレンズ群の一部が光軸方向に移動し、発生した球面収差を打ち消す働きをする。補正環は高開口率の対物レンズに備わっていることが多いが、補正環を調整するためには直接対物レンズに触れる必要があり、操作性が非常に悪い。また、試料の深さ方向への励起光の焦点面移動に追従して補正環を調整することは難しく、3D イメージングに対応することができない。その他、励起光のビーム径調整や、対物レンズ浸液の屈折率を調整することで球面収差による画質の劣化を低減する方法が提案されているが[10, 12]、対物レンズ開口率(NA)の減少による分解能の低下や、球面収差を十分に補正できないといった問題がある。また、これらの手法でも 3D イメージング取得時に発生する観察深さに依存的な球面収差に対応することは難しい。さらに、これら補正環等の手法ではコマ収差や非点収差といった非対称性収差の補正はできないという欠点がある。

一方、形状可変ミラーや LCOS(Liquid crystal on silicon)等の反射型空間光位相変調器は多数の先行研究で顕微鏡観察における収差補正に使用されており[14-22, 28, 29]、球面収差だけでなく様々な波面収差を補正することが可能である。また、これらの変調器は電氣的に制御されるため、励起光の焦点面移動に追従することも可能であり、3D イメージングにも対応できる。1.1.5 節で述べたように、形状可変ミラーは光学赤外線望遠鏡における補償光学で使用されている。また、補償光学以外では、プロジェクタにおいて電極毎に光線の出力/非出力を切り替えるために形状可変ミラーや LCOS が使用されている。一方 1.1.1 節で述べたように、瞳面において光の位相が平坦(曲率が無限である球面波)で

あるとき、高い空間分解能が得られる。さらに、開口絞りと瞳面は共役であるため、瞳面における光径とその位置は、瞳面への光の入射角度によらず等しい。上記の理由から波面を瞳位置で変調することが望ましく、先行研究では反射型変調器を対物レンズの瞳面に置き、収差の位相分布に対して逆の位相分布を反射型変調器で形成することで収差を打ち消している。

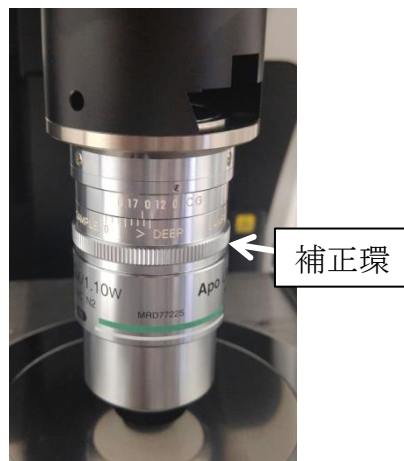


図 1.10, 補正環

先行研究で使用されている形状可変ミラーの多くは、静電アクチュエーターアレイを個別に制御することで、その上のメンブレン状のミラー膜を変形させるものである(図 1.11)。ミラー膜はアクチュエーターアレイ間で滑らかに変形するため、この形状可変ミラーで反射される光に与えられる位相分布は滑らかである。一方、安価な形状可変ミラーのミラー面はメンブレン状ではなくアレイ状であることが多いためミラーアレイ間で回折光が発生することや、アクチュエーターアレイが少ないため滑らかな位相分布が実現できないといった問題があり、顕微鏡観察における収差補正用途ではあまり使用されていない。一方、LCOS では液晶を利用した位相変調を行なっている。液晶による位相変調の原理は 1.1.7 節で後述する。LCOS はアルミ電極アレイが形成されたシリコン基板上に液晶を配置した構造を有しており、電極アレイへの印加電圧を独立に制御することで、波面を変調することができる(図 1.12)。

1.1.5 節で述べた光学赤外線望遠鏡における補償光学と同様に、形状可変ミラーや LCOS を使用して収差補正を行なうとき、波面センサと併用されることが多い。試料中で発生した収差の検出には、試料中の微小領域で励起した蛍光をガイドスターとして利用する手法が提案されている[15, 16]。また、形状可変ミラーのミラー膜の変形はその再現性や正確性が低いこともあり、波面センサとの併用が望ましかった。他に、収差波面を検出する手法として、試料に入射した励起光の後方散乱を利用し、焦点からの戻り光と参照光の干渉像から収差波面を求めるコヒーレンスゲート波面センシング法がある[14]。

一方、波面情報なしで波面収差補正を行なう手法が多数提案されている。例えば、各 Zernike 収差の位相分布を反射型空間変調器で与えたときに得られる複数枚の試料画像から、独自の評価関数を用いた数値計算より波面収差に含まれる各 Zernike 係数を求める手法が提案されている[29-32]。また、確率的勾配降下

法を用いて繰り返しミラー形状を変調し最適化する手法がある[33]。さらに、収差を持った光が対物レンズで集光される時、その瞳面の全体を光が透過するときと、瞳面の一部の開口だけで光が透過するときで、焦点面内での集光点の位置が異なるため、この集光点位置の違いを補正するようなチルトの位相分布を瞳面開口部に形成する。この操作を瞳面における各開口位置で行なうことで、瞳面における収差補正が実現できる[19]。

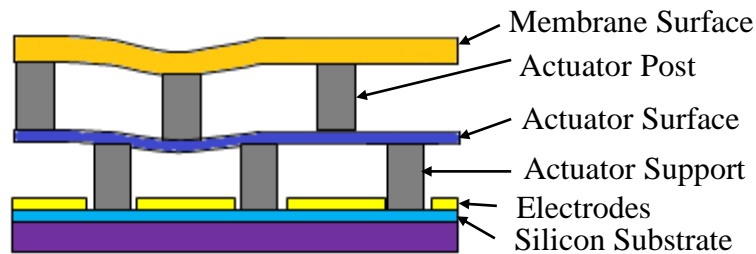


図 1.11, 形状可変ミラーの構造。Tholabs の HP

(https://www.thorlabs.co.jp/newgroupage9.cfm?objectgroup_ID=3258)より改変

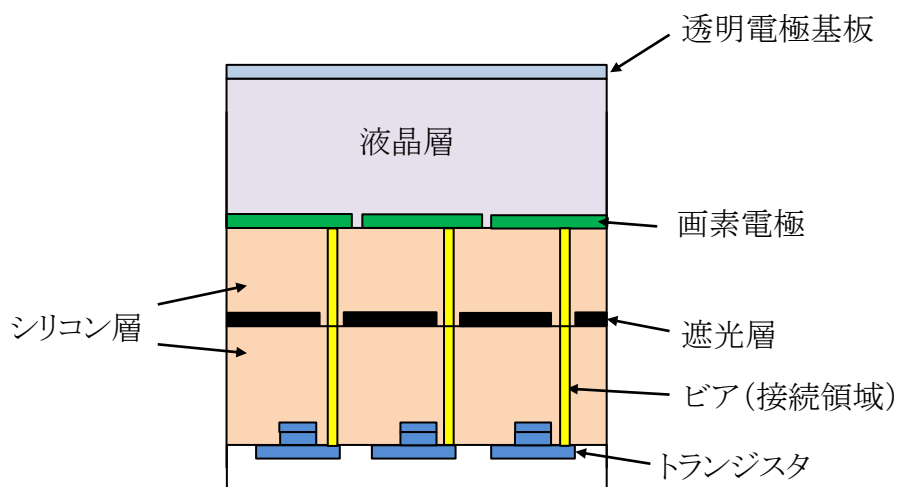


図 1.12, LCOS の構造

上述のように反射型空間変調器は瞳面近傍に置くのが望ましいが、瞳面近傍が顕微鏡の光学系において露出している箇所は無いと言ってよい。さらに、瞳面近傍やその他の光路が露出している場合でも、反射型空間変調器を光学系に組み込むためには光学系の大幅な改造が必須となる。先行研究では従来の顕微鏡光学系にリレー光学系を加え、反射型変調器を対物レンズの瞳面に設置している。しかし、光学に精通していない研究者には顕微鏡光学系の改造は容易ではなく、またリレー光学系を追加することで光学系が大きくなってしまう。また、これら顕微鏡の収差補正に用いられる反射型変調器は非常に高額であることが多い。

以上のように、既存の収差補正技術では収差補正は容易ではない。

1.1.7 透過型液晶セルによる位相変調技術

透過型液晶セルを用いて光の振幅や位相・偏光などの空間的分布を電氣的に制御することができる[34]。本節では、分子短軸方向に比べて分子長軸方向の誘電率が大きいポジ型ネマティック液晶を用いた液晶セルについて説明する[35]。液晶セルは透明電極が形成された 2 枚のガラス基板と、ガラス基板間に挟まれた液晶層で構成される(図 1.13)。液晶分子は透明電極上に塗布された配向膜のラビング方向に沿ってその分子長軸を揃えて並ぶ性質がある。液晶分子はその長軸と短軸方向で屈折率に異方性を持ち、長軸方向の屈折率は異常光線屈折率 n_e 、短軸方向の屈折率は常光線屈折率 n_o と定義される。ポジ型ネマティック液晶は分子長軸の誘電率が大きいいため、透明電極に交流電圧が印加されると、液晶層に発生した電位差に応じて分子長軸が電界方向に対して連続的にその向きを変える。ここで、電圧印加前に液晶分子長軸が y 方向に並んでいた場合、 y 方向の直線偏光に対する液晶層の屈折率は電圧印加によって n_e から最大 n_o まで変化する。

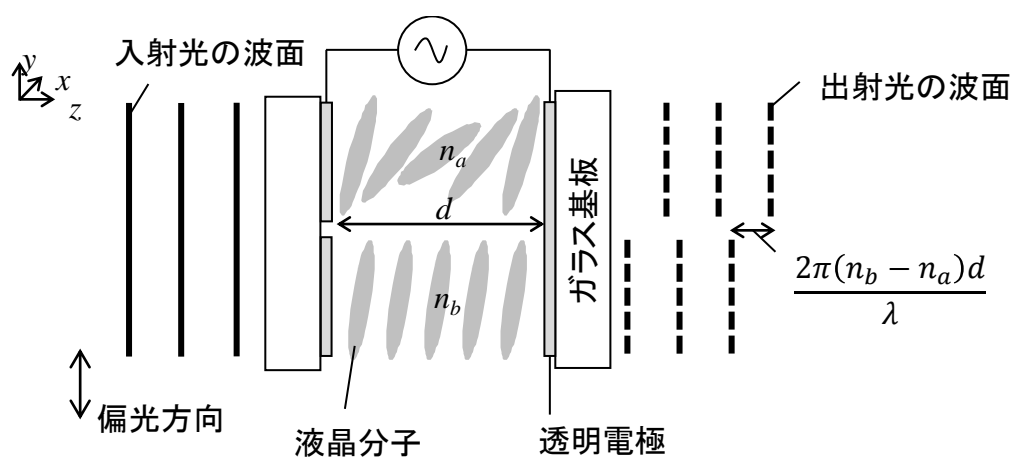


図 1.13, 液晶セルによる位相変調

n_a, n_b : 液晶層の屈折率、 λ : 入射光の波長、 d : 液晶層の厚み

分割された 2 つの透明電極に各々異なる電圧が印加された場合、**図 1.13** に示すように各電極上の液晶層(厚み d)の y 方向の屈折率を n_a および n_b ($n_o \leq n_a \leq n_b \leq n_e$) とすると、2 つの電極上の液晶層を透過した y 方向の直線偏光には $2\pi(n_b - n_a) d/\lambda$ の位相差が生じる(λ は入射直線偏光の波長)。なお、液晶層の厚み d を大きくすると位相変調量は大きくなるが、液晶分子の応答速度は d^2 に比例して遅くなる。以上のように、透明電極パターンや各電極に印加する電圧に応じた位相分布を、液晶セルに入射した直線偏光成分に与えることができる。また、分割された各透明電極への印加電圧によって液晶セル中での位相分布を制御するため、分割電極と液晶層を挟んで対向しているベタ電極にはグラウンドが入力される。通常の液晶セルは液晶層厚が 5–20 μm , n_e が 1.6–1.7, n_o が 1.5 程度であり、液晶分子の応答速度は数十から数百ミリ秒である。

近年、マトリクスあるいはハニカム状の電極パターンを有する液晶セル(透過型 LCOS)が開発されており、各電極に印加する電圧を独立に制御することで、液晶セル中に様々な位相分布を形成することを可能としている[36, 37]。透過型 LCOS は、例えば顕微鏡光学系の中で光路が露出している部分である、顕微鏡のレボルバーと対物レンズの間に挿入して使用することができる[38]。しかし、現状の透過型 LCOS は電極ピクセル数が少ない、または電極のフィルファクターが低いため、滑らかな位相分布が実現できないことや、電極間で発生する回折光による悪影響が大きく、顕微鏡向けの収差補正に使用されることは少ない。

次に、液晶セル中に形成する位相分布形状を限定することで、素子構造と電圧制御方法を単純化した例を紹介する。光ピックアップにおいて、短波長の光源および高 NA の対物レンズが使われるに従い、光ディスク基板の傾きにより発生する低次 n 項の Zernike 多項式である 1 次コマ収差が無視できなくなった。そこで、レンズの瞳位置に液晶セルを配置し、1 次コマ収差の逆位相分布を液

晶セルで与えることでコマ収差を補正した[39, 40]。図 1.14(a)は 1 次コマ収差の位相分布であり、図 1.14(b)は 1 次コマ収差を補正するための位相分布を液晶セル中に形成するための透明電極パターンである。図 1.14(c)に示すように、1 次コマ収差に対して逆の位相分布が液晶セル中に形成され、収差を打ち消すことができる。一方、印加電圧に対して液晶層での位相変調量が線形に変化するとき、隣接する分割電極間の印加電圧差を各分割電極について同一とすると、隣接電極間の位相変調量の差も同一となる。図 1.15 に示すように、位相変調量が最大となる位置及び最小となる位置に対応する電極を決定し、最大位相変調量となる印加電圧 V_{high} と最低位相変調量となる印加電圧 V_{low} を、各々対応する電極に加える。このとき、隣接する電極間を同一の電気抵抗を持つ電極(抵抗器)で接続すると、隣接電極間の電圧差と位相変調量差 Δh は各電極間で同一となる。以上のように印加電圧を制御することで、分割電極に印加する各電圧を独立に制御するよりも、制御系の構成を簡単化できる。

図 1.16 より、傾いた DVD ディスクの RF 信号波形が収差補正後に回復していることが確認できる。以上のように光ピックアップにおいて、単純な電極構成と制御方法で構成される液晶セルを用いた収差補正の効果は既に確認されている。また、光ピックアップ向けの収差補正用液晶セルは 2000 年に量産化されている。同様の単純構成の液晶セルは STED(誘導放出制御)顕微鏡、ホログラフィック顕微鏡、ラジアル偏光の生成等においても使用されている[41-44]。

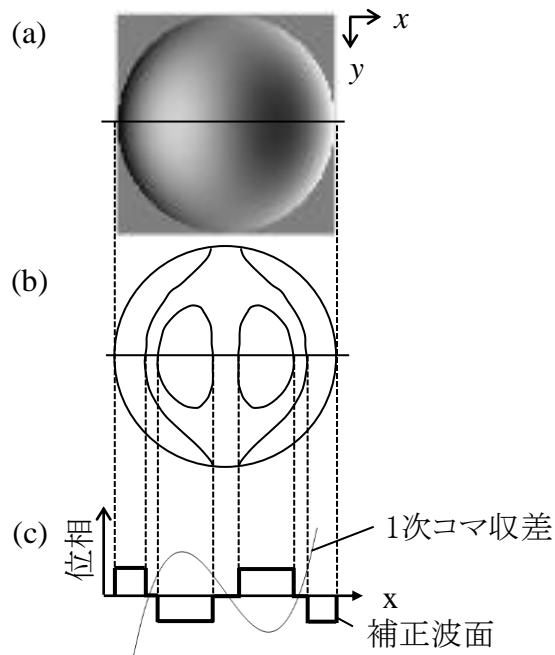


図 1.14, 光ピックアップにおける収差補正。文献[40]より改変
 (a) 1次コマ収差の位相分布 (b) 液晶セル中の分割電極パターン
 (c) 1次コマ収差および液晶セル中の位相分布のプロファイル

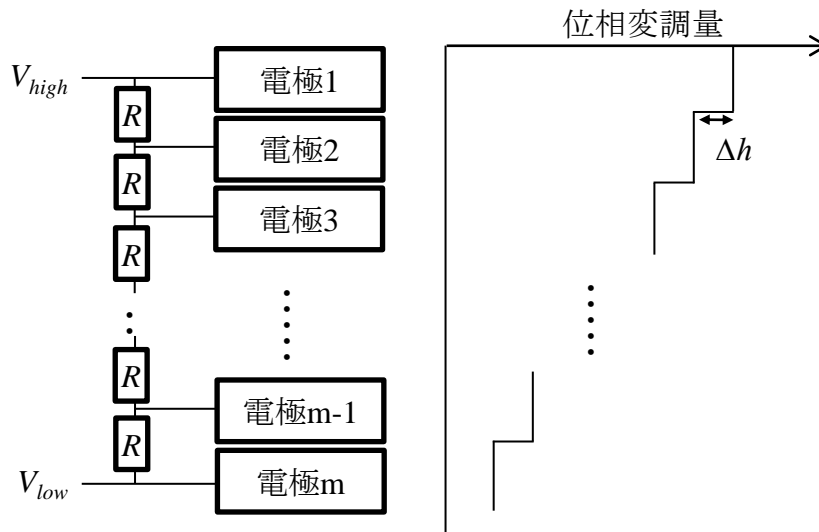
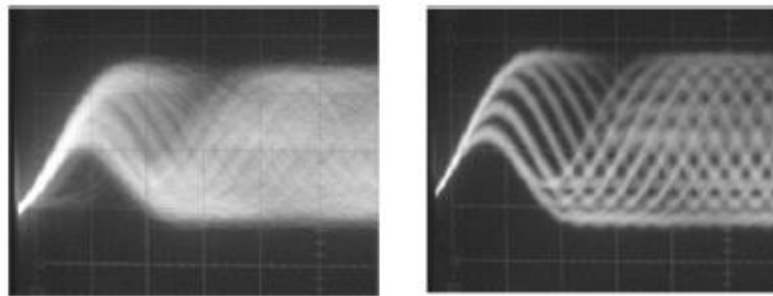


図 1.15, 液晶セルによる位相変調。 V_{high} , V_{low} : 印加電圧、 R : 抵抗器



収差補正前

収差補正後

図 1.16 DVD ディスクの RF 信号波形。文献[40]より改変

1.2 本研究の目的

本研究では、従来光ピックアップ等で利用されていた透過型液晶セルを用いた位相変調技術をレーザー走査型顕微鏡に応用し、光学系の改造を必要としない電氣的な収差補正システムの実現を目指す。光ピックアップに使用される対物レンズは比較的低 NA であるが、レーザー走査型顕微鏡による高分解能観察に使用される対物レンズは高 NA であり、より厳密に波面を制御するため、数値計算により最適なデバイス設計を行なう。本研究では、顕微鏡観察時に発生する波面収差を直交関数系である Zernike 多項式に展開し、透過型デバイスで補正する収差成分を画質への影響が特に大きい球面収差、非点収差、1 次コマ収差に限定することで、光学特性の良好な透過型収差補正デバイスを実現する。本デバイスは球面収差、非点収差、1 次コマ収差を同時かつ独立に補正することが可能であり、また顕微鏡光学系の中で光路が露出している部分である、顕微鏡レボルバーと対物レンズの間に本デバイスを挿入することで簡便な収差補正システムを実現することができる。また、本デバイスは既存の収差補正手段と比較して低コストでの作成が可能であり、産業的な観点からも有用で

あると言える。

1.3 本論文の構成

本論文は4章から構成される。第1章では本研究の背景と研究目的について述べた。初めにレーザー走査型顕微鏡および2光子励起顕微鏡の概略を紹介した。次に、レーザー走査型顕微鏡観察時に発生する波面収差は正規直交関数系であるZernike多項式に展開することが可能であり、球面収差や非点収差・1次コマ収差などの低次Zernike多項式成分が特に光学特性を劣化させることを示した。また、光学赤外望遠鏡への応用から発展した補償光学について述べ、現在レーザー走査型顕微鏡で使用されている既存の収差補正技術を紹介した。さらに、本研究で用いられている透過型液晶セルによる位相変調の原理について述べた。第2章では、試料深部の顕微鏡観察において最も支配的である球面収差を補正する透過型液晶デバイスを設計・作成し、数値計算および蛍光ビーズ試料の1光子・2光子励起顕微鏡観察から、その収差補正効果を原理的に確認したことを示す。またマウスの透明化脳スライスでの2光子顕微鏡観察においても、デバイスによる補正後に空間分解能および蛍光強度の改善が見られたことを述べる。また、励起光の試料深さ方向への焦点面移動にデバイスの電圧制御を追従させることで、3Dイメージングにおいて発生する観察深さに依存的な球面収差を補正することに成功したことを述べる。第3章では低次の非対称収差である非点収差および1次コマ収差を補正する透過型デバイスを設計・作成し、数値計算および蛍光ビーズ試料の1光子・2光子励起顕微鏡観察から、その収差補正効果を原理的に確認したことを示す。またマウスの固定全脳の2光子顕微鏡観察においても、デバイスによる収差補正後に空間分解能および蛍光強度の改善が見られたことを述べる。第4章では、以上の成果を総括して本研究の結論をまとめ、今後の研究課題についても簡単に述べる。

第2章

透過型液晶デバイスを用いた レーザー走査型顕微鏡観察における 球面収差補正

2.1 緒言

1.1 節で述べたように、生体試料の 2 光子励起顕微鏡観察が近年盛んに行われており、生体試料の 3D ライブイメージングも可能となっている[4-7]。一方、固定した生体試料の光透過性を向上させ、より深部に亘る 3D イメージングを可能にする手法として、複数の透徹剤が提案されている[45-47]。しかしながら、多くの生体試料において、その深部を顕微鏡観察するときに、対物レンズ浸液と試料の屈折率差によって波面収差が発生し、画質が劣化してしまうことが多い。試料深部観察時に発生する波面収差についてはこれまで多数の先行研究によって数値的および実験的に検証されており、画質劣化の原因となる波面収差は低次の球面収差が支配的であることが分かっている[8-12]。また、1.1.4 節で述べたように、球面収差が光学系のストレール比に大きく影響することは明らかである。本章において、試料深部観察時に発生する球面収差を数値解析から求め、導出された球面収差を補正するための透過型デバイスを設計・作成したことを述べる。また、透過型デバイスの収差補正効果は数値計算および蛍光ビーズの 1 光子・2 光子励起顕微鏡観察により原理的に確認された。本章での顕微鏡観察において、透過型デバイスを既存のレーザー走査型顕微鏡のレボルバーと対物レンズの間に挿入した。さらに、マウスの透明化脳スライスの 2 光子励起顕

微鏡観察においても、デバイスでの収差補正後に蛍光像の空間分解能および蛍光強度が改善したことを報告する。

2.2 深部観察時に発生する球面収差の数値的解析

球面収差は、対物レンズの浸液と試料の屈折率が異なることで発生することが多い。図2.1(a)は、対物レンズ出射後の光線が無収差の状態のカバーガラス直下の点 O_1 に集光する様子を示す。対物レンズ直下の点 A_1 から出射した光線は浸液層を進み、カバーガラス表面の点 A_2 を通過し、カバーガラス直下の点 O_1 に集光する。次に、図2.1(b)は、試料表面(カバーガラス直下)から z の深さにある点 O_2 に光線が集光する様子を示す。この時、試料の屈折率は一様であり、浸液の屈折率よりも大きいとした。対物レンズ直下の点 A_1 から出射した光は浸液層を進み、カバーガラス表面の点 A_3 および試料表面(カバーガラス直下)の点 A_4 を通過し、試料中の点 A_5 に到達する。なお、点 O_2 と点 A_5 を結ぶ直線と点 A_4 と点 A_5 を結ぶ直線は直交している。ここで、図2.1(b)において点 A_1 から点 A_3 および点 A_4 を通り点 A_5 に至る光路長を $[A_1A_3A_4A_5]$ とし、図2.1(a)において点 A_1 から点 A_2 を通り点 O_1 に至る光路長を $[A_1A_2O_1]$ とする。また、例えば点 A_1 から点 A_3 までの光路長を $[A_1A_3]$ と表記する。試料深部に集光する光線に発生する収差 W は、試料深部に集光する光線の光路長と、カバーガラス直下に集光する光線の光路長の差から得られる[48, 49]。

$$\begin{aligned}
 W &= \frac{2\pi}{\lambda} ([A_1A_3A_4A_5] - [A_1A_2O_1]) \\
 &= \frac{2\pi}{\lambda} \{ ([A_1A_3] - [A_1A_2]) + ([A_3A_4] - [A_2O_1]) + [A_4A_5] \}
 \end{aligned}
 \tag{2.1}$$

対物レンズ直下の点 A_1 を瞳面上における座標に換算し、瞳面を通過する全ての光線に対して収差 W を求める。こうして、試料深部観察時に発生する球面収差の瞳面における位相分布 $W(x, y)$ を求めることができる。このとき、対物レンズの焦点面における光の強度分布 $I(x_0, y_0)$ は式(1.2)より、

$$I(x_0, y_0) = \left| F \left\{ \exp \left(\frac{i2\pi}{\lambda} W(x, y) \right) \right\} \right|^2
 \tag{2.2}$$

となる。ここで、 $F\left\{\exp\left(\frac{i2\pi}{\lambda}W(x,y)\right)\right\}$ は $\exp\left(\frac{i2\pi}{\lambda}W(x,y)\right)$ のフーリエ変換を表す。

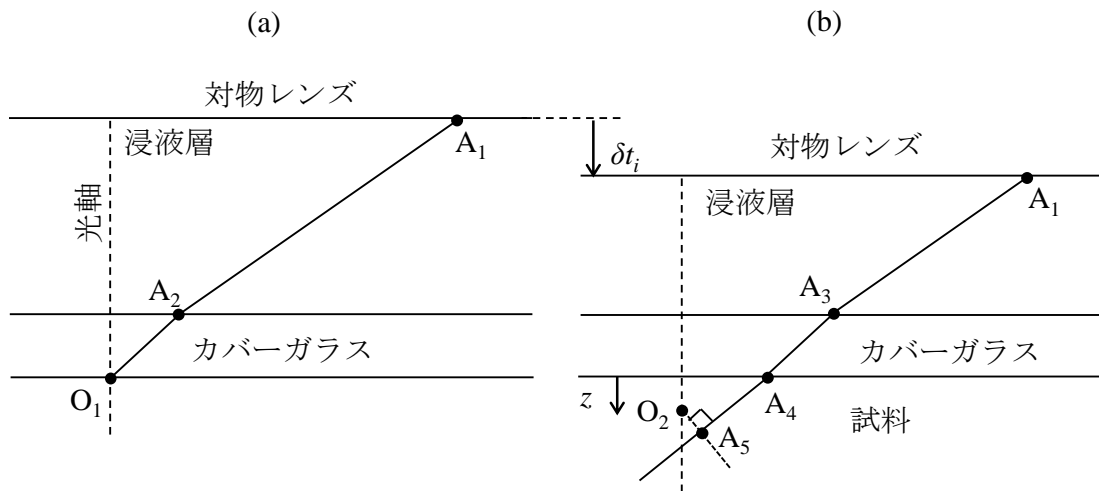


図2.1, 試料中への集光

(a) 試料表面への集光(収差無し) (b) 試料中の深さ z への集光(収差有り)

次に、カバーガラスの厚みや試料中における点 O_2 の深さ z 、カバーガラスと試料および浸液層の各屈折率が決まっている場合を考えた。このとき、点 O_1 に集光するときと点 O_2 に集光するときの浸液層厚みの差(図2.1(b)における δt_i)、すなわち式(2.1)における $[A_1A_3] - [A_1A_2]$ が決定すれば、式(2.1)、(2.2)より、収差の位相分布 $W(x, y)$ および焦点面における光の強度分布 $I(x_0, y_0)$ が求められる。初めに、点 O_2 において $I(x_0, y_0)$ のピーク強度が最大となるような δt_i を求めた。NA1.1の水浸対物レンズで $z = 0.6$ mmに集光する際に発生する球面収差の瞳面における位相分布を図2.2(a)に示す。このとき、試料の屈折率は1.38、波長は488 nm、 δt_i は0.5756 mmとした。また、カバーガラス中での光路差 $[A_3A_4] - [A_2O_1]$ はゼロとして考慮しなかった。次に、点 O_2 に集光するとき、瞳面における球面収差の位相分布 $W(x, y)$ のPV値(Peak to Valley)が最小となるような δt_i を求めた。このときの収差の位相分布 $W(x, y)$ を図2.2(b)に示す。 δt_i は0.5654 mmであり、計算に用いたその他の条件は図2.2(a)と同様とした。

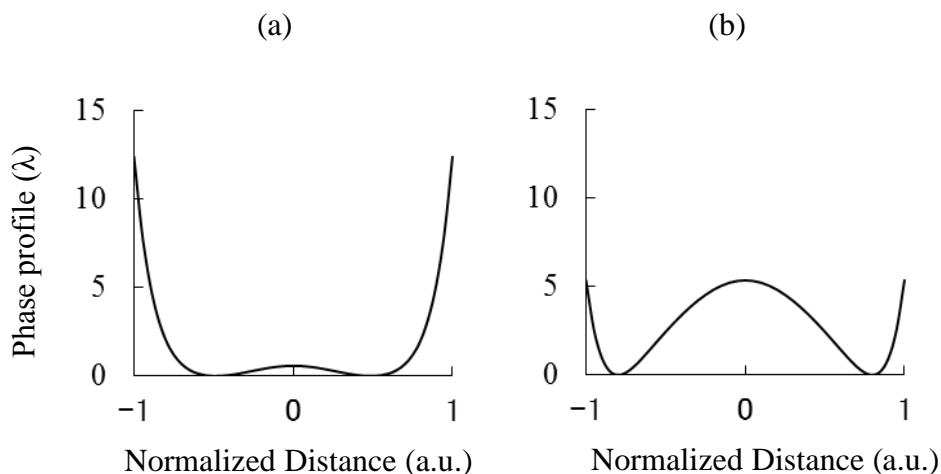


図2.2, $z = 0.6$ mmに集光する際に発生する球面収差。

(a) $I(x_0, y_0)$ のピーク強度が最大となるように δt_i を決めたとき

(b) 収差位相分布 $W(x, y)$ のPV値が最小となるように δt_i を決めたとき

図2.2(a)と図2.2(b)における δt_i の違いを瞳面における波面収差に換算すると、1.1.4節で示したデフォーカス成分の違いに相当すると考えられる。波面収差に含まれる各Zernike多項式の係数を式(1.19)より求めたところ、波面収差のデフォーカス成分が変化しても、デフォーカス以外の各球面収差成分の大きさはほぼ変わらなかった。本研究では、収差の位相分布 $W(x, y)$ のPV値が最も小さくなるように δt_i を設定し、数値計算を行なった。これは、深さ z で $I(x_0, y_0)$ のピーク強度が最大となるように δt_i を決めると、収差の位相分布 $W(x, y)$ のPV値が非常に大きくなり、液晶セルの位相変調量では補正できなくなってしまうためである。

一方、集光深さや試料の屈折率が変化するとき、その変化量にほぼ比例して収差の位相分布のPV値は変化したが、位相分布形状の相対比は変わらなかった。図2.3(a)にNA1.1の水浸対物レンズで $z = 0.2, 0.4, 0.6$ mmに集光するとき発生する球面収差の瞳面における位相分布を示す。このとき、試料の屈折率は1.38、波長は488 nmとした。また、浸液の屈折率よりも低い屈折率を持つ試料の深部に集光するときや、試料深部で収差無く集光する系において、その最適な集光深さよりも浅い位置に集光するときは、図2.3(a)で示した収差に対して上下逆転した位相プロファイルを示した。図2.3(b)は $z = 0.6$ mmで収差無く集光する系において、 $z = 0$ mmに集光するとき発生する球面収差を示す。一方、対物レンズのNAが変化すると、収差の位相分布形状やそのPV値は変化した。図2.4はNA1.1の水浸対物レンズで $z = 0.6$ mmに集光するときと、NA1.27の水浸対物レンズで $z = 0.13$ mmに集光するとき発生する各球面収差を示す。

以上のように、後述するNA1.1の水浸対物レンズで試料深部を観察する際に発生する球面収差を数値計算より求め、得られた結果から球面収差補正デバイスの透明電極パターンを設計した。

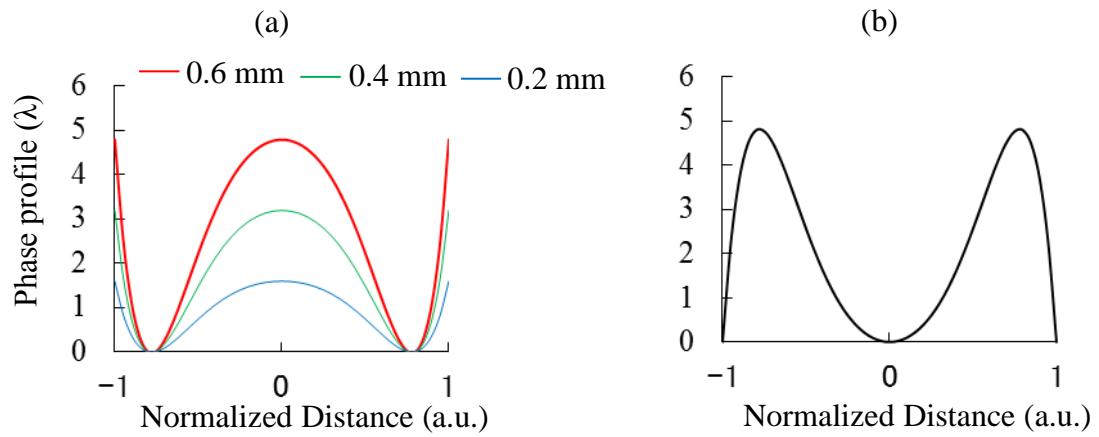


図2.3, 異なる深さに集光する際に発生する球面収差 (a) $z = 0.2, 0.4, 0.6$ mmに集光するときに発生する球面収差 (b) $z = 0.6$ mmに無収差で集光する系において、 $z = 0$ mmに集光するときに発生する球面収差

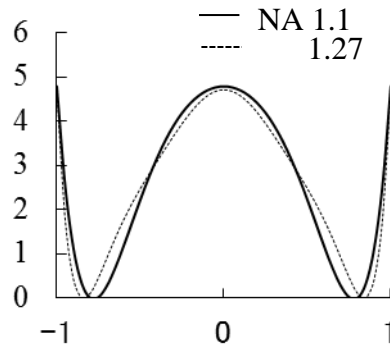


図2.4, NA1.1の水浸対物レンズで $z = 0.6$ mmに集光するときと、NA1.27の水浸対物レンズで $z = 0.13$ mmに集光するときに発生する球面収差

2.3 材料・方法

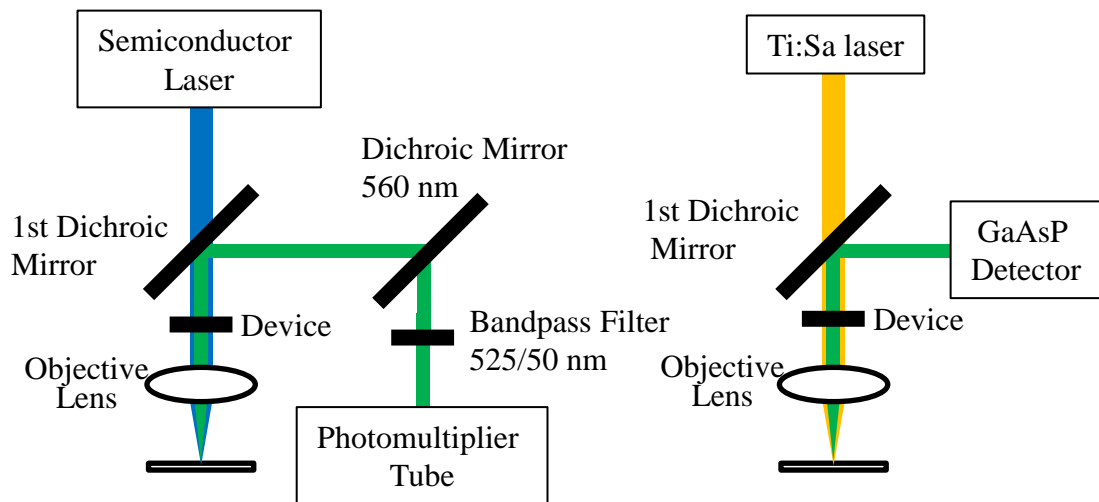
2.3.1 観察光学系

正立顕微鏡 (Eclipse FN1, Nikon Co.)、スキャナー (A1R MP+, Nikon Co.)、励起光として波長 488 nm の半導体レーザー、および 950 nm のフェムト秒チタンサファイアレーザー (Mai tai DeepSee, Spectra-Physics Inc.) を使用した。なお、後述する生体試料は波長 950 nm の励起光で観察したが、透過型デバイスによる収差補正の原理確認として、シミュレーション結果と比較するために、蛍光ビーズを波長 488 nm の励起光でも観察した。波長 488 nm で 1 光子励起された蛍光は、カットイン周波数 560 nm のダイクロイックミラーおよび、中心波長 525 nm、帯域幅 50 nm の蛍光用バンドパスフィルターを介して光電子増倍管 (PMT) 検出器で検出された(図 2.5 (a))。また、波長 950 nm で 2 光子励起された蛍光信号はダイクロイックミラーおよびフィルターを介さず GaAsP 型検出器で検出された。本実験では、ピンホールは全開にしている。

透過型デバイスは顕微鏡レボルバと水浸対物レンズ (CFI Apo LWD 25xW, NA1.1, Nikon Co.) の間に挿入した(図 2.5 (b))。2.3.2 節で後述するように、透過型デバイスは積層された 3 枚の液晶セル (LCC1、LCC2、LCC3) で構成された。1 枚の液晶セルの最大位相変調量は約 1200 nm であり、応答速度は約 200 msec であった。透過型デバイスへの電圧印加は自作の専用ドライバより制御した。専用ドライバには小型プッシュプルコネクタ (HR25A-9S-16P、ヒロセ電機) およびマイクロ USB 端子が備わっており、透過型デバイスのコネクタ (MA212-10p、ヒロセ電機) およびパソコンの USB 端子をそれぞれ接続した。USB ポートを仮想 COM ポートとして、Microsoft Visual Studio (Microsoft Co.) で作成したソフトウェアよりシリアル通信を介して専用ドライバへ信号を出力し、各液晶セル中の透明電極にパルス振幅変調の交流電圧を印可した。

交流電圧は 1kHz、Duty50% の方形波であり、ソフトウェアで設定された電圧値を±(設定が 2.0 V なら、-2.0、+2.0 V)、10bit の分解能で出力した。2.3.2 節で後述するように、透過型デバイスは 10 個の入力電圧によって制御された。また、専用ドライバの電源も USB を介してパソコンより供給された。

(a)



(b)

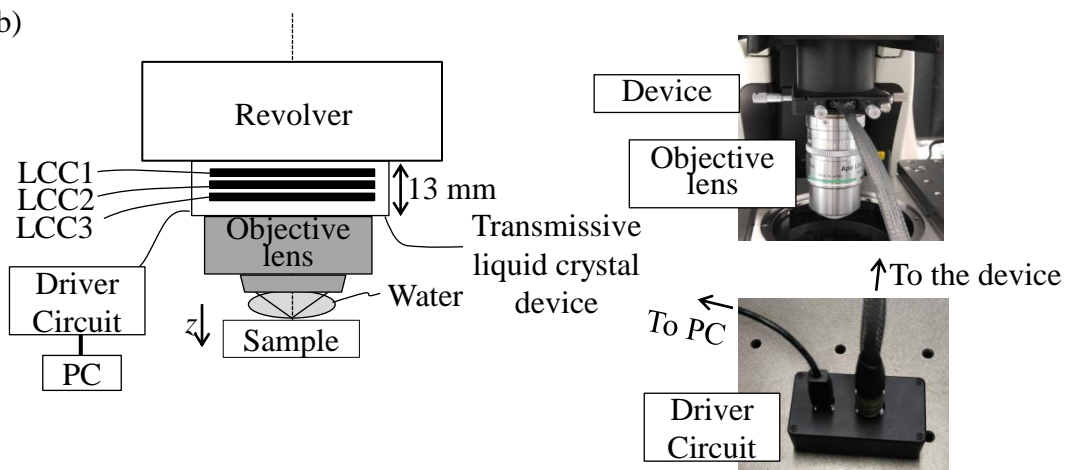


図2.5, 観察光学系の概略図

(a) 顕微鏡光路の概略図 (b) デバイス設置の詳細図および写真

LCC1-3: 液晶セル

2.3.2 透過型球面収差補正デバイスの機能

透過型デバイスによる球面収差補正の原理を図 2.6(a-c)に示す。図 2.6(a)は、式(2.1)より求めた深部観察における球面収差の位相分布の一例である。このとき、試料の屈折率は対物レンズの浸液である水の屈折率よりも高く設定した。図 2.6(b)は液晶セル中の位相分布の概略図である。液晶素子の有効径は 17.6 mm であり、対物レンズの瞳径と等しい。簡単のため、図 2.6(b)では位相分布を 6 階調とした。図 2.6(b)に示した位相分布を液晶セル中に形成するための輪帯電極及び各輪帯電極への接続のための引き出し電極を図 2.6(c)に示す。1.1.7 節で述べたように、液晶セル中の各分割電極は抵抗を介して隣の電極と接続されているため、位相変調量が最大となる位置及び最小となる位置に各々対応する電極へ電圧を印可した。図 2.6(b, c)より、中心電極と最外周の輪帯電極は最小位相変調量となる位置に対応しており、中心電極と最外周の輪帯電極の間に位置するひとつの輪帯電極が最大位相変調量となる位置に対応している。つまり、中心電極と最外周の輪帯電極に V_{low} を、中心電極と最外周の輪帯電極の間に位置するひとつの輪帯電極 V_{high} を印加した。また、分割電極パターンと液晶層を挟んで対向しているベタ電極にはグラウンドが入力された。一方、試料深部において収差無く集光する場合、その最適な集光深さよりも浅い位置に集光するとき、中心電極と最外周の輪帯電極が最大位相変調量となる位置に対応し、その間の輪帯電極が最小位相変調量となる位置に対応した。つまり、中心電極と最外周の輪帯電極に V_{high} を、中心電極と最外周の輪帯電極の間に位置するひとつの輪帯電極 V_{low} を印加した。また、後述するように、本透過型デバイスは 3 枚の積層された液晶セルで構成された。つまり、液晶セル 1 枚につき、分割電極への電圧入力が 3 つであり、各液晶セルのベタ電極に印加するグラウンド電圧は共通としたため、10 個の入力電圧によって透過型デバイスは制御された。な

お、液晶セルへの印加電圧が 1.4–2.6 Vrms のとき、電圧に対して液晶セルの位相変調量が線形に変化したため (1100 nm/Vrms)、この電圧範囲で液晶デバイスを制御した。

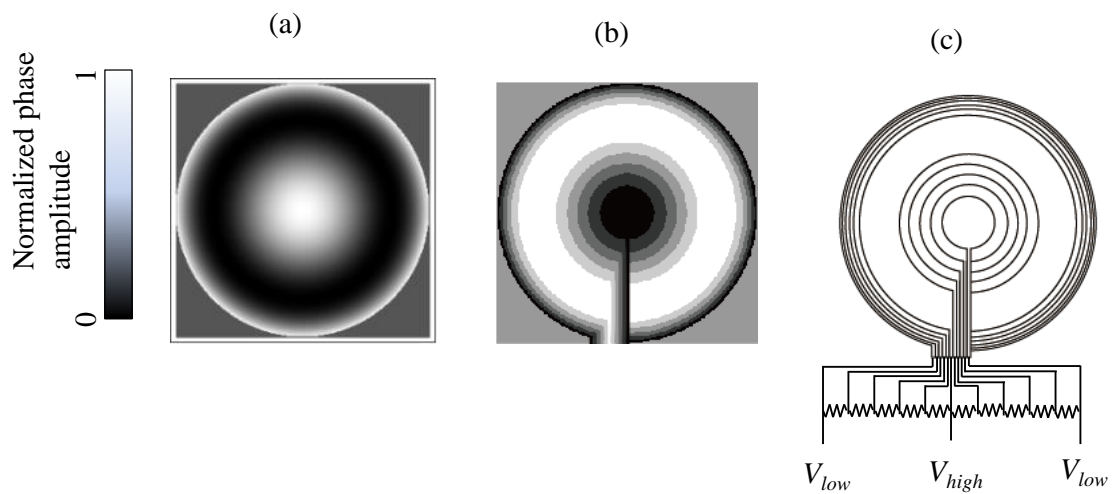


図2.6, 球面収差補正用液晶セルによる位相変調

- (a) 球面収差の位相分布 (b) 液晶セル中の位相分布の概略図
(c) 液晶セルの分割電極パターンの概略図。

液晶セル中の位相分布は量子化されているため、収差補正後の波面には残存収差が発生する。もちろん液晶セル中の輪帯電極を増やすことで位相分布の階調数は増加し、残存収差は低減できるが、輪帯電極数は液晶セルのプロセスによって制限される。なお、位相階調数 k の位相分布を形成するには $2k-1$ 個の輪帯電極数が必要であった。また、輪帯電極の増加とともに引き出し電極も増加するが、引き出し電極部での位相分布は収差補正のための理想的な位相分布とは大きく異なるため、液晶セルによる収差補正効果は低下してしまう。なお、本実験で使用した液晶セルにおいて、引き出し電極の幅は約 $20 \mu\text{m}$ であった。後述するように、本透過型デバイスは積層された 3 枚の液晶セルで構成された。そこで、少ない輪帯電極数および引き出し電極数で多数の位相階調数を実現するため、図 2.7(a) のように、3 枚の液晶セルにおいて隣接する輪帯電極間の境界を各々異なる位置とした[50]。図 2.7(a) では、簡単のため LCC1 の位相プロファイルを 4 階調、LCC2 および LCC3 の位相プロファイルを 5 階調とした。LCC1 における位相階調数を K とすると、液晶セルを 3 枚積層したときの位相階調数は $3K$ (図 2.7(b) 中では 12 階調) となった。なお、このような位相分布を形成するには、LCC1、LCC2 および LCC3 における印加電圧 V_{high} と V_{low} の差を各々 ΔV_{LCC1} 、 ΔV_{LCC2} および ΔV_{LCC3} とすると、 $\Delta V_{LCC2} = \Delta V_{LCC3} = (K+1)\Delta V_{LCC1}/K$ とする必要がある。また、引き出し電極の領域を一致させるように各液晶セルを積層したとき、その引き出し電極が占める面積は 1 枚の液晶セルにおいて引き出し電極が占める面積とほぼ等しくなり、階調数増加にともなう引き出し電極数増加による光学特性への悪影響を低減できる。

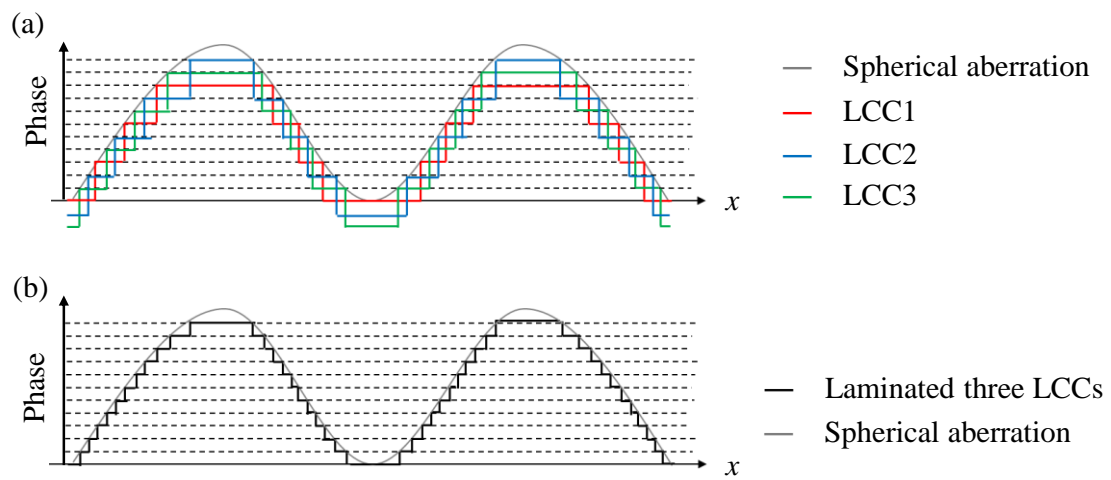


図2.7, 3枚の液晶セルで形成する位相プロファイルの概略図

(a) 3枚の液晶セル中の各位相プロファイル

(b) 積層した3枚の液晶セル中の位相プロファイル

次に、収差補正後の光学系のストレーラ比が良好となるように、最適な位相階調数を数値計算より求めた。初めに、NA1.1の水浸対物レンズで屈折率1.38の試料中の0.7 mm深部を観察する場合、位相分布のPV値が3600 nm程度の球面収差が発生することが式(2.1)より求められた。生体試料の多くが屈折率1.35~1.38程度であり、実験で使用する対物レンズの作動距離が2 mmであることから、補正環と併せてデバイスを使用する場合、デバイスによる最大位相変調量は3600 nm程度で十分であると考えた。ここで、1枚の液晶セルでの最大位相変調量は1200 nm程度であり、3600 nm程度の位相変調量を実現するために液晶セルを3枚積層した。次に、式(1.2)で示したレンズのフーリエ変換作用に基づく数値計算を行なった。瞳面において、量子化された位相分布によって収差補正した後に残存する波面をフーリエ変換し、焦点面での光の振幅を求めた。なお、量子化された位相分布には引き出し電極部における位相分布も含まれ、位相分布の階調数が k のときの引き出し電極数を $(2k-1)/3$ とした。また、位相分布の有効径を17.6 mm、引き出し電極の幅を約20 μm とした。図2.8に示すように、屈折率1.38の試料中の0.7 mm深部において48および60階調の位相分布で収差補正した場合、収差補正後の光学系のストレーラ比は0.96となり最高特性を示した。一方、さらに階調数が増えると徐々にストレーラ比は低下し、階調数が180のときストレーラ比は0.8以下となった。これは引き出し電極部分の位相分布が光学特性に悪影響を及ぼしているためである。これより、本実験では、位相分布が16階調である液晶セル1枚と17階調である液晶セル2枚を積層することで、48階調の位相分布を実現する透過型デバイスを作成した。また、積層した3枚の液晶セルの位相形状をレーザー干渉計(Zygo PTI 250, Zygo Corporation)で測定し、数値計算より求められた球面収差に対する逆位相分布が液晶セル中に形成できていることを確認した(図2.9(a))。一方、本実験

ではデバイスを対物レンズの瞳面には置かなかった。デバイスの光軸方向の位置が光学特性に及ぼす影響は 2.3.4 節で後述する手法で評価し、結果を 2.4.1 節で報告する。

図 2.9(b)に液晶セルの透過率を示す。液晶セル 1 枚の透過率は、2 光子励起波長である 800–1100 nm においては約 95%、1 光子励起波長および蛍光波長である 460–600 nm においては約 92–95%であった。また、デバイス(積層した 3 枚の液晶セル)の透過率は 800–1100 nm においては約 88%、460–600 nm においては約 78–85%であった。

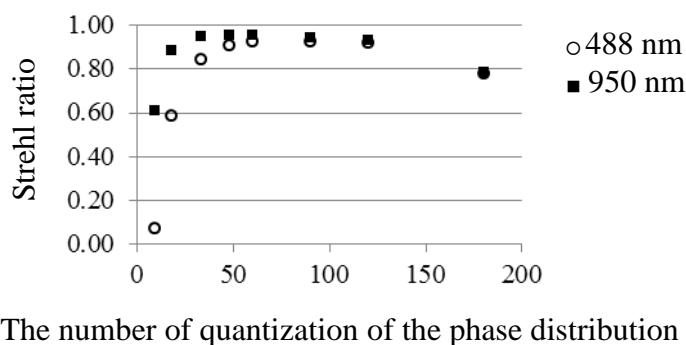


図 2.8, 量子化位相分布で収差を補正したときのストレール比の数値計算結果

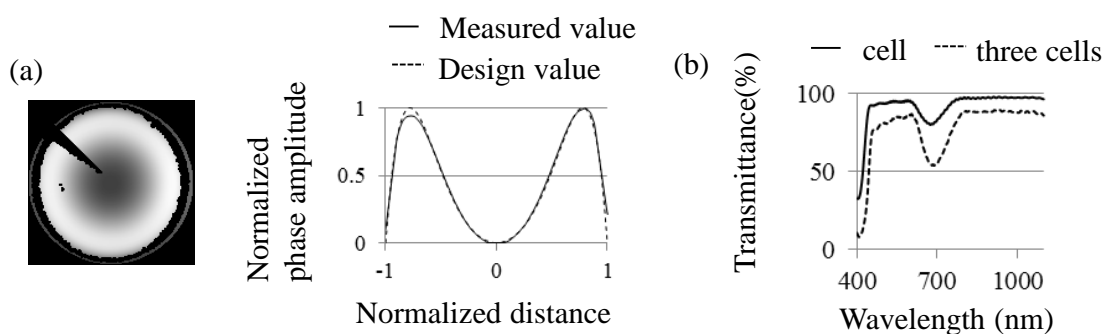


図 2.9, 球面収差補正用液晶デバイスの実測結果

(a) 液晶デバイス中の位相分布と位相プロファイル (b) 液晶セルの透過率

2.3.3 試料・解析

0.2 μm のイエローグリーン蛍光ビーズ (Fluospheres、ライフテクノロジーズジャパン) を屈折率 1.38 のアガロースゲル (Agalose-L、和光純薬工業) 中に分散した。アガロースゲルの屈折率はスクロース (Sucrose、和光純薬工業) で調整した。図 2.10 に蛍光ビーズのスペクトル特性を示す。アガロース・蛍光ビーズ混合液をガラスベースディッシュ (IWAKI Glass Base Dish, ASAHI GLASS Co.) に流し込み、固定した。ガラスベースディッシュのカバーガラス (No. 1s, Matsunami Glass Ind.) の厚みは 0.16–0.19 mm であった。ガラスベースディッシュを上下逆さに顕微鏡ステージに置き、蛍光ビーズをカバーガラス越しに観察した。各観察条件において、視野中心 20 μm^3 中の複数のビーズを観察し、各ビーズの x 軸、 z 軸の強度プロファイルをそれぞれ Gaussian 関数、Breit-Wigner-Fano line shape でフィッティングし、各半値全幅 (FWHM $_x$, FWHM $_z$) から平均の FWHM $_x$, FWHM $_z$ および平均の強度プロファイルを求めた。各関数へのフィッティングには Mathematica (Wolfram Research, Inc.) による最小二乗法を用いた。

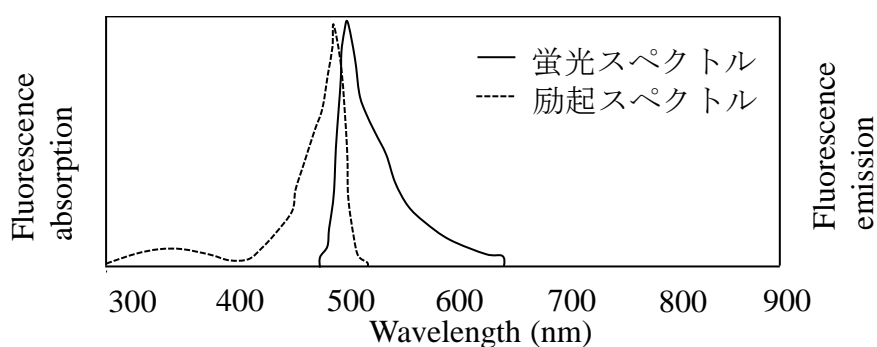


図 2.10, イエローグリーン蛍光ビーズのスペクトル特性

ライフテクノロジーズジャパンの HP

(<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F8811>)より改変

2,2'-thiodiethonal (TDE) 溶液はマウス固定脳における光透過性を向上させる手法として用いられている[45]。TDE 処理された固定脳スライスでは、深部において可視光および近赤外光の高い光到達性を実現し、深部からの強い蛍光信号を取得することが可能である[47]。本実験では、TDE (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) を Milli-Q および、りん酸緩衝生理食塩粉末 (D-PBS (-) 粉末、コージンバイオ) より作成したりん酸緩衝生理食塩水 (PBS) で希釈し 51% の TDE 溶液を作成した。このとき、TDE 溶液の屈折率は 1.42 であった。11 週齢の YFP 発現マウス (Thy1-YFP-H mouse[51]) の固定脳を 0.95 mm 厚にスライスした後、2 時間以上 51% の TDE 溶液に浸漬し、透明化処理を行なった。また、固定脳は、マウスをペントバルビタール Na で麻酔後、PBS、4% Paraformaldehyde (PFA) in PBS の順に心臓還流を行なったのち脱脳し、4% PFA in PBS に浸漬し保存したものを入手した。脳スライスは、51% の TDE 溶液とともにカバーガラス (No. 1s, Matsunami Glass Ind.) とスライドガラスの間に浸漬した。本実験では、空間分解能よりも小さいと考えられる大脳皮質第 5 層神経細胞のスパインの像を空間分解能評価の指標とした。スパインの x 軸、 z 軸の強度プロファイルを、蛍光ビーズと同様の手法で各々 Gaussian 関数、Brei-Wigner-Fano line shape でフィッティングし、 $FWHM_x$ 、 $FWHM_z$ を求めた。

本研究は「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定」に基づき、マウスを用いた動物実験の計画 (承認番号 10-0119) に従って実験を実施した。

2.3.4 対物レンズシステムを用いた数値計算

トップハットの強度分布を持つ 488 nm 平行光の点広がり関数 (PSF) をビームレットに基づいた伝播計算より数値的に求めた (CODEV, Synopsys, Inc.)。平行光は連続的な位相分布の後に 25 倍、NA1.1 の水浸対物レンズ (JP2011-75982A) を通過して集光した。また本数値計算では、対物レンズの像側表面より光軸に沿って 10 mm 離れた面に、式 (2.1) より求めた球面収差 (図 2.6(a)) の逆位相分布である連続的な位相分布を置いた。ここは、本実験で液晶デバイスが置かれた位置である。

2.4 実験結果

2.4.1 波長 488 nm における点像分布関数の数値計算

初めに、デバイスの補正効果を評価するために、屈折率 1.38 の試料において、試料表面より 0 mm、0.3 mm、0.6 mm 深部における PSF を 2.3.4 節に示した数値計算より求めた(図 2.11)。試料中では集光面が深くなるに従い、PSF の FWHM_x および FWHM_z が大きくなるとともにピーク強度が減少しており、空間分解能の低下が確認できた(図 2.11 (a-d, g, h))。表面より 0.3 mm 深部 ($z = 0.3$ mm) では、PSF のピーク強度は、試料表面 ($z = 0$ mm) における PSF のピーク強度 (I_0) の 13% に低下した。また、FWHM_x は 0.22 μm から 0.32 μm に、FWHM_z は 0.77 μm から 2.6 μm に劣化した(図 2.11(k, l))。さらに、表面より 0.6 mm 深部 ($z = 0.6$ mm) ではピーク強度は 7% I_0 となり、FWHM_x と FWHM_z は各々 0.37 μm と 3.9 μm に劣化した(図 2.11(m))。一方、対物レンズ前に置いた連続的な位相分布によって、試料深部で劣化した空間分解能が改善することが確認できた(図 2.11(e, f, i, j))。 $z = 0.3$ mm ではピーク強度は 93% I_0 に回復した(図 2.11(l))。ここで、2.3.2 節で示した手法で数値計算を行なうと、48 階調の位相分布で収差補正したときの PSF のピーク強度は、連続的な位相分布で補正したときのピーク強度の 96% となった。よって、対物レンズ直前に置かれた 48 階調の位相分布で補正された PSF のピーク強度は 89% I_0 と見積もることができた。同様に、 $z = 0.6$ mm では連続的な位相分布で補正した後のピーク強度は 85% I_0 であり(図 2.11(m))、48 階調の位相分布で補正したときの PSF のピーク強度は、連続的な位相分布で補正したときのピーク強度の 90% となった。よって、対物レンズ直前に置かれた 48 階調の位相分布で補正された PSF のピーク強度は 77% I_0 と見積もることができた。一方、 $z = 0.3$ mm および 0.6 mm において、FWHM_z は各々 0.79 μm 、0.81 μm に、FWHM_x

は $0.22 \mu\text{m}$ に改善した。つまり、補正後の FWHM は $z = 0 \text{ mm}$ における FWHM とほぼ同程度まで回復したと言える (図 2.11(k-m))。なお、収差補正に要した位相分布の PV 値は $z = 0.3 \text{ mm}$ 、 0.6 mm において各々 1200 nm 、 2300 nm であった。

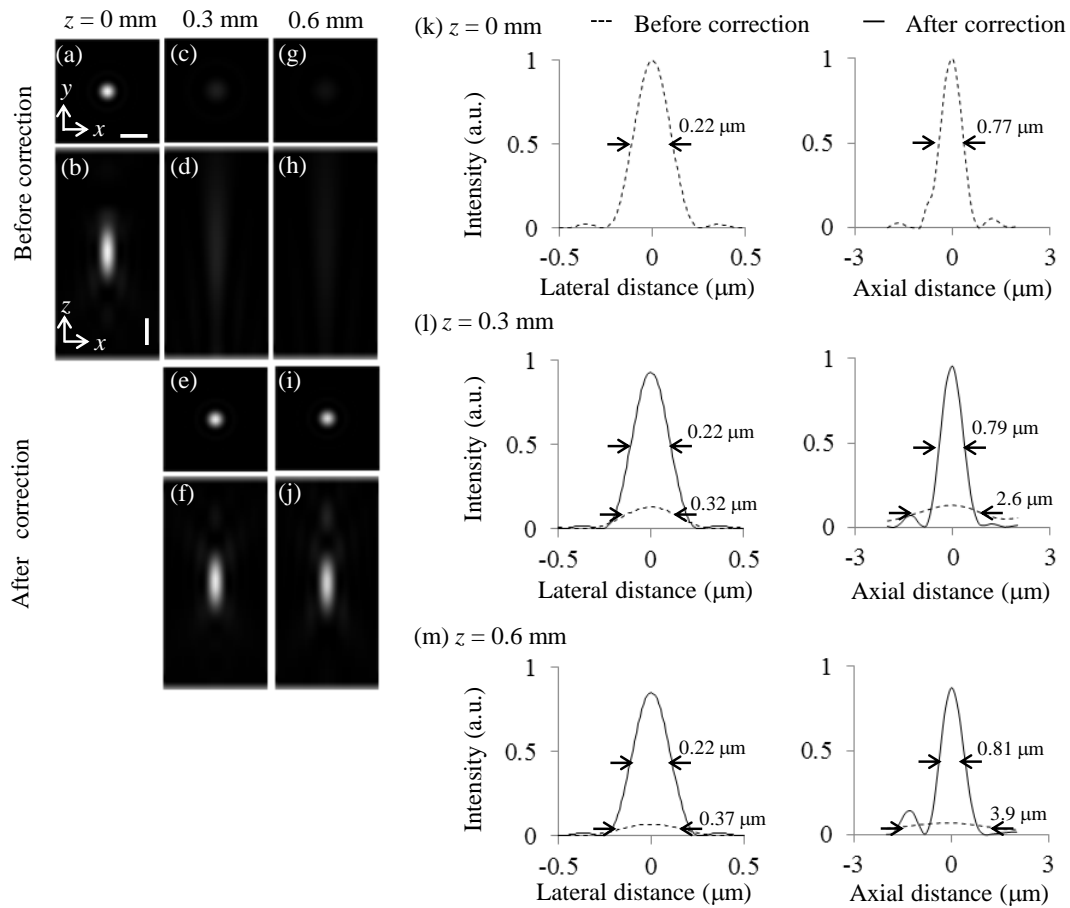


図 2.11, 波長 488 nm における PSF 像の数値計算結果 (a, b) $z = 0 \text{ mm}$ における水平像と断面像 (c-f) $z = 0.3 \text{ mm}$ における収差補正前(c, d)と収差補正後(e, f)の像 (g-j) $z = 0.6 \text{ mm}$ における収差補正前(g, h)と収差補正後(i, j)の像 (k-m) 各深さ z における x 軸および z 軸での強度プロファイル。図中のスケールバーは $0.5 \mu\text{m}$

2.4.2 蛍光ビーズの1光子励起顕微鏡観察

次に、1光子励起顕微鏡観察にデバイスを適用し、その収差補正効果を実験的に評価した。本実験では、アガロースゲル中に分散させた蛍光ビーズを波長488 nmのレーザーを励起光として観察し、ビーズ像の蛍光強度とFWHMを評価した。

初めに、カバーガラス直下($z = 0$ mm)で光学性能が最大となる位置に補正環を調整した。カバーガラス直下より0.3 mm深部($z = 0.3$ mm)では像のピーク強度は $47\%I_0$ に低下し、FWHM_xは0.27 μm から0.38 μm に、FWHM_zは1.6 μm から2.8 μm に劣化した(図 2.12(a-d, k, l))。さらに、0.6 mm深部($z = 0.6$ mm)ではピーク強度は $30\%I_0$ に低下し、FWHM_xとFWHM_zは各々0.42 μm と5.0 μm に劣化した(図 2.12(g, h, m))。次に、液晶セルへの印加電圧を繰り返し変調し、ビーズ像の蛍光強度が最大となる印加電圧を決定した。 $z = 0.3$ mmではデバイスによる補正後に、ピーク強度は $116\%I_0$ 、FWHM_xとFWHM_zは各々0.28 μm と1.2 μm に回復した(図 2.12(e, f, l))。同様に、 $z = 0.6$ mmでは補正後、ピーク強度は $78\%I_0$ 、FWHM_xとFWHM_zは各々0.28 μm と1.5 μm に回復した(図 2.12(i, j, m))。つまり、 $z = 0.3$ mmおよび0.6 mmにおいて、収差補正後のピーク強度は補正前と比べて各々2.5倍と2.6倍に増加した。さらに、補正後のFWHMは $z = 0$ mmでのFWHMと同程度まで回復した。なお、液晶デバイスによる位相変調量のPV値は $z = 0.3$ mm、0.6 mmにおいて各々1550 nm、3300 nmであった。

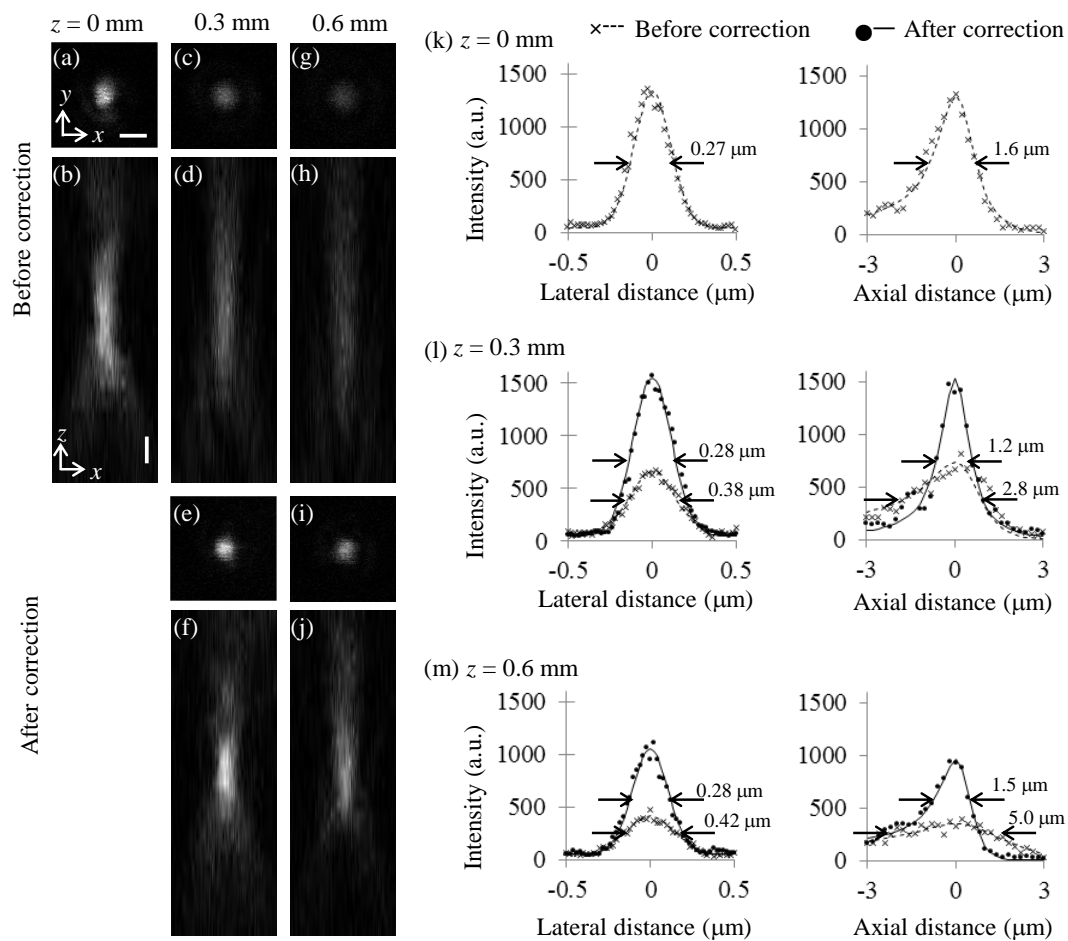


図 2.12, 蛍光ビーズの 1 光子励起顕微鏡観察像(励起波長 488 nm)。 $z = 0$ mm で光学性能が最大となる位置に補正環を調整した (a, b) $z = 0$ mm における水平像と断面像 (c-f) $z = 0.3$ mm における収差補正前(c, d)と収差補正後(e, f)の像 (g-j) $z = 0.6$ mm における収差補正前(g, h)と収差補正後(i, j)の像 (k-m) 各深さ z における x 軸および z 軸での強度プロファイル。図中のスケールバーは $0.5 \mu\text{m}$

次に、 $z = 0.7$ mm で光学性能が最大となる位置に補正環を調整した。 $z = 0.7$ mm より浅い位置である $z = 0.1$ mm では空間分解能の劣化が確認できた(図 2.13(a-d))。 $z = 0.1$ mm でのピーク強度は $z = 0.7$ mm でのピーク強度($I_{0.7}$)の 58%に低下した。また、FWHM_x および FWHM_z は各々 0.29 μm から 0.36 μm、1.8 μm から 3.3 μm に劣化した(図 2.13(g, h))。一方、デバイスによる補正後、 $z = 0.1$ mm でのピーク強度は 94% $I_{0.7}$ に回復した。さらに、FWHM_x と FWHM_z は各々 0.30 μm と 1.5 μm に回復した(図 2.13(h))。つまり、補正後のピーク強度は補正前のピーク強度の 1.6 倍であった。また、補正後の FWHM は $z = 0.7$ mm での FWHM と同程度で回復した。

以上の結果より、試料中の深さ ± 0.6 mm でデバイスによる空間分解能と蛍光強度の回復を確認することができた。

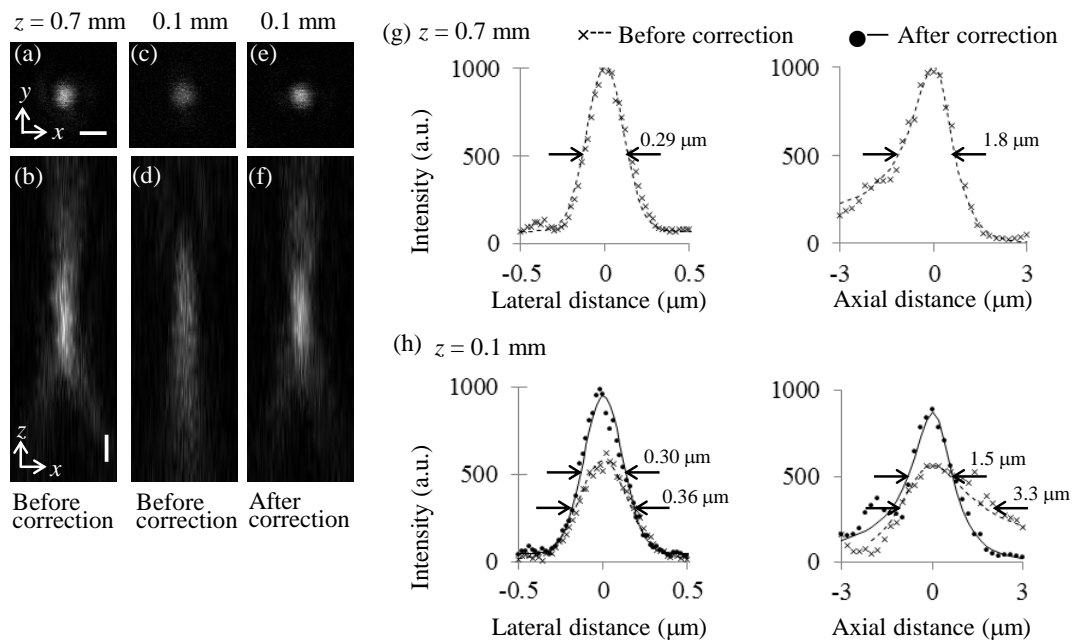


図 2.13, 蛍光ビーズの 1 光子励起顕微鏡観察像(励起波長 488 nm)。 $z = 0.7$ mm で光学性能が最大となる位置に補正環を調整した (a, b) $z = 0.7$ mm における水平像と断面像 (c-f) $z = 0.1$ mm における収差補正前(c, d)と収差補正後(e, f)の像 (g, h) 各深さ z における x 軸および z 軸での強度プロファイル。図中のスケールバーは $0.5 \mu\text{m}$

2.4.3 蛍光ビーズの2光子励起顕微鏡観察

生体試料の2光子励起顕微鏡観察へのデバイス応用の準備として、デバイスを2光子励起顕微鏡に適用し、950 nmの励起光で蛍光ビーズ試料を観察し、そのピーク強度とFWHMを評価した。なお、 $z=0$ mmで光学性能が最大となる位置に補正環を調整した。1光子励起顕微鏡における実験結果と同様に、観察位置が試料中で深くなるに従い蛍光ビーズ像の空間分解能は劣化した(図 2.14(a-d, g, h))。 $z=0.3$ mmではピーク強度が $67\%I_0$ に低下し、FWHM_xとFWHM_zは各々 $0.44\ \mu\text{m}$ から $0.50\ \mu\text{m}$ 、 $2.3\ \mu\text{m}$ から $3.9\ \mu\text{m}$ に劣化した(図 2.14(k, l))。さらに、 $z=0.6$ mmではピーク強度が $45\%I_0$ に低下し、FWHM_xとFWHM_zは各々 $0.55\ \mu\text{m}$ と $4.5\ \mu\text{m}$ に劣化した(図 2.14(m))。一方、 $z=0.3$ mmおよび 0.6 mmではデバイスによる補正後に、ピーク強度は各々 $115\%I_0$ と $98\%I_0$ に回復した。FWHM_zは各々 $1.9\ \mu\text{m}$ と $2.1\ \mu\text{m}$ に向上し、FWHM_xは $0.44\ \mu\text{m}$ に回復した(図 2.14(l, m))。つまり、 $z=0.3$ mmおよび 0.6 mmにおいて、補正後のピーク強度は補正前のピーク強度の各々1.7倍、2.2倍であった。また、補正後のFWHMは $z=0$ mmでのFWHMと同程度まで回復した。なお、 $z=0.3$ mm、 0.6 mmにおいて、液晶デバイスによる位相変調量のPV値は各々 $1550\ \text{nm}$ 、 $3300\ \text{nm}$ であった。以上のように、1光子励起顕微鏡での実験結果と同様に、試料深部での空間分解能と蛍光強度の改善を確認することができた。

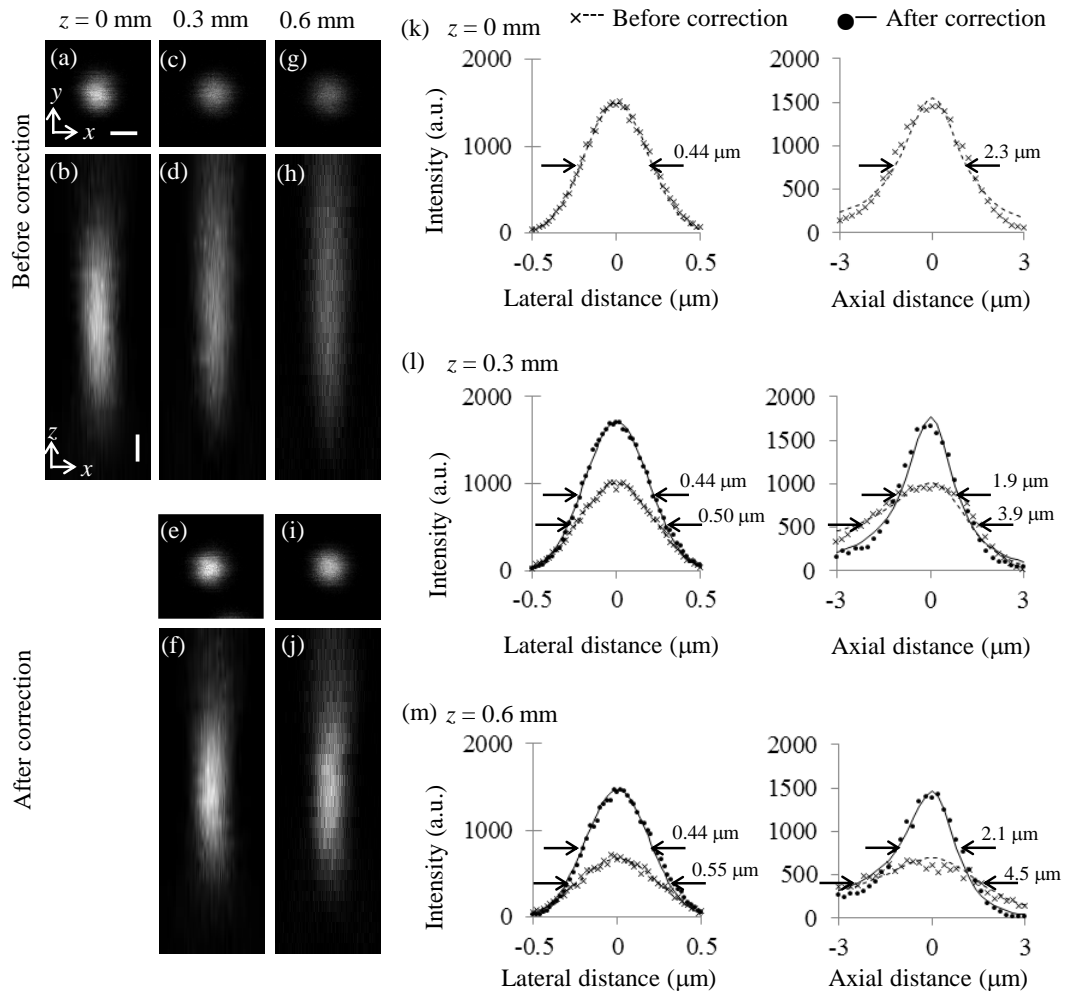


図 2.14, 蛍光ビーズの 2 光子励起顕微鏡観察像(励起波長 950 nm)。 $z = 0$ mm で光学性能が最大となる位置に補正環を調整した (a, b) $z = 0$ mm における水平像と断面像 (c-f) $z = 0.3$ mm における収差補正前(c, d)と収差補正後(e, f)の像 (g-j) $z = 0.6$ mm における収差補正前(g, h)と収差補正後(i, j)の像 (k-m) 各深さ z における x 軸および z 軸での強度プロファイル。図中のスケールバーは $0.5 \mu\text{m}$

2.4.4 透明化脳スライスの2光子励起顕微鏡観察

最後に、2.3.3節で述べた生体試料の2光子顕微鏡観察にデバイスを応用した。

図 2.15–2.18 は TDE 処理したマウスの固定脳スライスの像である。カバーガラス直下の試料表面より 0 mm, 0.19 mm, 0.27 mm, 0.54 mm ($z = 0$ mm, 0.19 mm, 0.27 mm, 0.54 mm)の深さ位置を観察した。各条件に置いて、収差補正前後では同じ領域を観察している。

図 2.15(a, b)は $z = 0$ mm で光学性能が最大となる位置に補正環を調整したときの $z = 0.19$ mm における神経細胞像である。蛍光ビーズ観察と同様に、液晶セルへの印加電圧を繰り返し変調し、像の蛍光強度が最大となる印加電圧を決定した。図 2.15(a, b)より、デバイスでの収差補正後に蛍光強度が向上していることが確認できた。また、図 2.15(c)は $z = 0.19$ mm で光学性能が最大となる位置に補正環を調整したときの $z = 0.19$ mm における神経細胞像であり、デバイスによる補正後と同様に蛍光強度が増大していることが分かる。さらに、細胞中のスパインに着目すると、補正環およびデバイスでの収差補正後に空間分解能が向上していることが明確に確認できた(図 2.15(d–f))。デバイスによる補正後、FWHM_x は 0.65 μ m から 0.48 μ m に、FWHM_z は 3.3 μ m から 1.4 μ m に向上した(図 2.15(g))。さらに、蛍光強度は補正前の 1.8 倍に増加した。このとき、液晶デバイス中の位相分布の PV 値は 2300 nm であった。一方、 $z = 0.19$ mm で光学性能が最大となる位置に補正環を調整したとき、FWHM_x は 0.53 μ m、FWHM_z は 1.8 μ m であり、蛍光強度は補正環を $z = 0$ mm に合わせたときと比べて 2.1 倍に増加した。

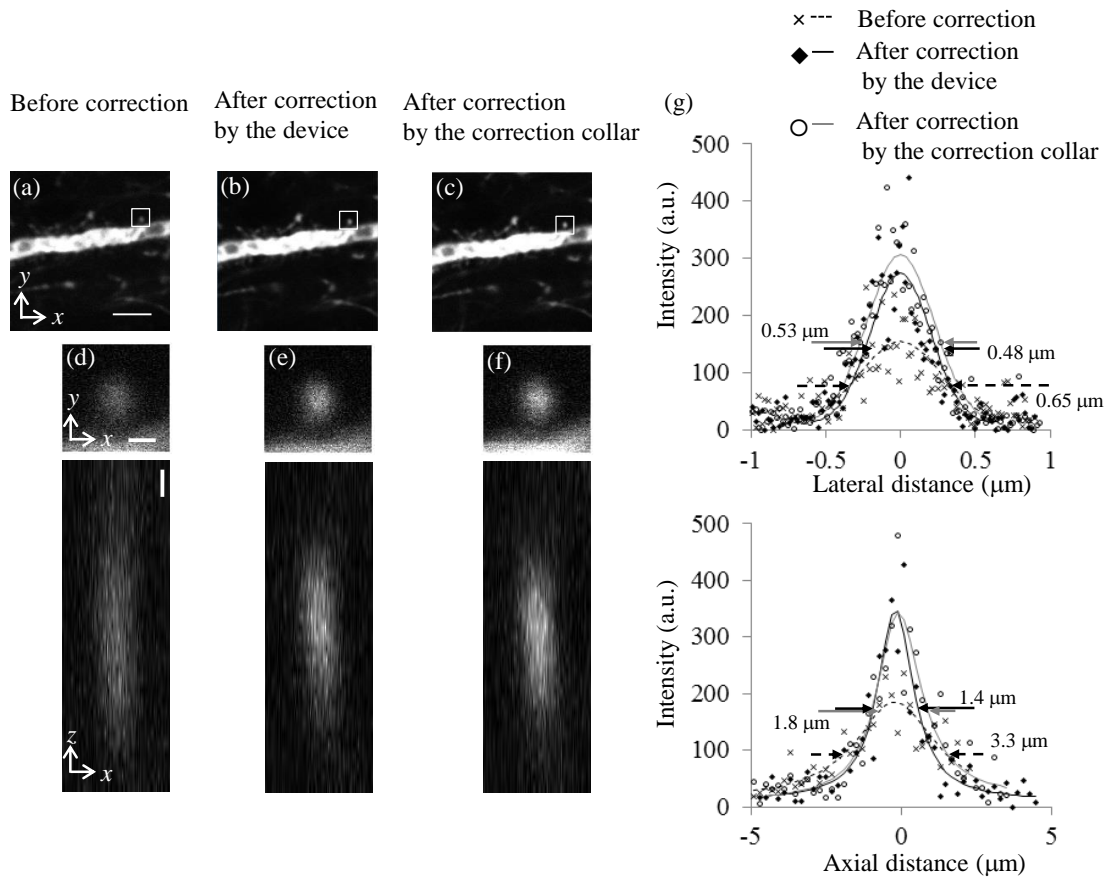


図 2.15, $z = 0.19 \text{ mm}$ における透明化脳スライスの 2 光子励起顕微鏡観察像(励起波長 950 nm) (a, b) 収差補正前(a)とデバイスによる収差補正後(b)の水平像。 $z = 0 \text{ mm}$ で光学性能が最大となる位置に補正環を調整した (c) $z = 0.19 \text{ mm}$ で光学性能が最大となる位置に補正環を調整したときの像 (d-f) 水平像(a-c)中に示した四角領域の像。収差補正前(d)とデバイス(e)および補正環(f)による収差補正後の像 (g) x 軸および z 軸での強度プロファイル。図中のスケールバーは(a) $5 \mu\text{m}$ 、(d) $0.5 \mu\text{m}$

次に、図 2.16(a, b)は $z = 0 \text{ mm}$ で光学性能が最大となる位置に補正環を調整したときの $z = 0.27 \text{ mm}$ における神経細胞像である。また、図 2.16(c)は $z = 0.27 \text{ mm}$ で光学性能が最大となる位置に補正環を調整したときの $z = 0.27 \text{ mm}$ における神経細胞像である。 $z = 0.19 \text{ mm}$ のときと同様に、細胞中のスパインに着目すると、補正環およびデバイスでの収差補正後に空間分解能が向上していることが確認できた(図 2.16(d-f))。補正環およびデバイスによる補正後、FWHM_x は $0.74 \text{ }\mu\text{m}$ から $0.65 \text{ }\mu\text{m}$ に、FWHM_z は各々 $4.0 \text{ }\mu\text{m}$ から $1.5 \text{ }\mu\text{m}$ 、 $1.7 \text{ }\mu\text{m}$ に向上した(図 2.16(g))。さらに、蛍光強度はいずれも補正前の 2.4 倍に増加した。このとき、液晶デバイス中の位相分布の PV 値は 2900 nm であった。蛍光ビーズの 2 光子励起顕微鏡観察では、液晶デバイス中の位相分布の PV 値が 3300 nm のとき、補正前後で蛍光強度が 2.2 倍に向上した。つまり、デバイスは生体試料中においても蛍光ビーズ実験とほぼ同程度の改善を示したと言える。以上の結果より、蛍光ビーズでの実験と同様に、デバイスは生体試料中で劣化した空間分解能を改善し、蛍光信号強度を向上させることが確認できた。さらに、デバイスは補正環と同程度の補正効果を示すことも分かった。

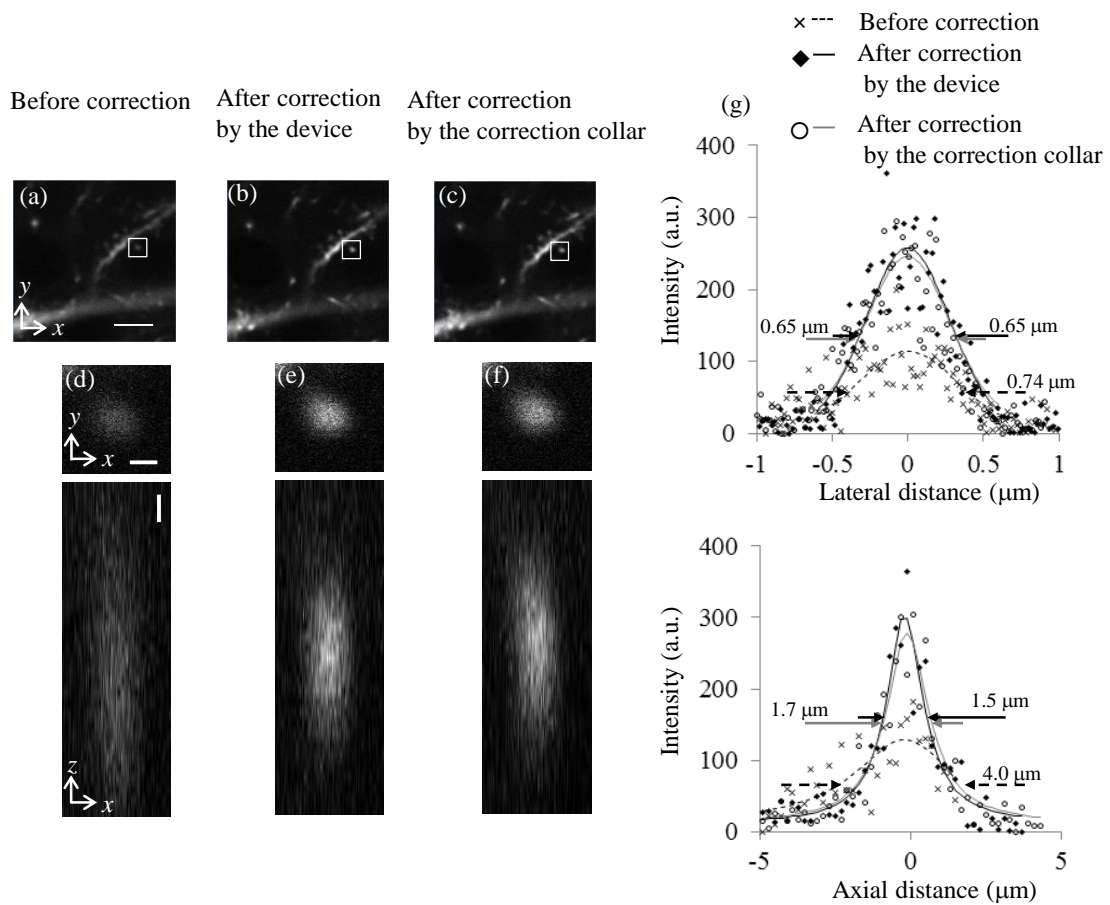


図 2.16, $z = 0.27$ mm における透明化脳スライスの 2 光子励起顕微鏡観察像(励起波長 950 nm) (a, b) 収差補正前(a)とデバイスによる収差補正後(b)の水平像。 $z = 0$ mm で光学性能が最大となる位置に補正環を調整した (c) $z = 0.27$ mm で光学性能が最大となる位置に補正環を調整したときの像 (d-f) 水平像(a-c)中に示した四角領域の像。収差補正前(d)とデバイス(e)および補正環(f)による収差補正後の像 (g) x 軸および z 軸での強度プロファイル。図中のスケールバーは(a) 5 μm 、(d) 0.5 μm

次に、より広い深さ範囲での収差補正効果を確認するために、 $z = 0.27 \text{ mm}$ で光学性能が最大となる位置に補正環を調整した。2.4.2 節で述べたように、デバイスは最大光学性能が得られる試料深さよりもさらに深い位置で発生する球面収差と同様に、浅い位置で発生する球面収差も補正することが可能であった。一方、 $z = 0 \text{ mm}$ で光学性能が最大となる位置に補正環を調整したとき、デバイスは生体試料中では $z = 0-0.27 \text{ mm}$ において収差補正効果を示した。また、補正環の調整によって光学性能を最大とできる最大深さは $z = 0.27 \text{ mm}$ であった。以上の特性を考慮すると、 $z = 0.27 \text{ mm}$ で光学性能が最大となる位置に補正環を調整したとき、デバイスは $z = 0-0.54 \text{ mm}$ の範囲で空間分解能を改善できると予想される。図 2.17(a, b) は $z = 0 \text{ mm}$ での神経細胞像である。図中のスパインに着目すると(図 2.17(c, d)、補正前後で FWHM_x および FWHM_z は各々 $0.66 \mu\text{m}$ から $0.57 \mu\text{m}$ 、 $3.2 \mu\text{m}$ から $2.1 \mu\text{m}$ に改善した(図 2.17(e))。また、補正後のピーク強度は補正前のピーク強度の 1.5 倍であった。

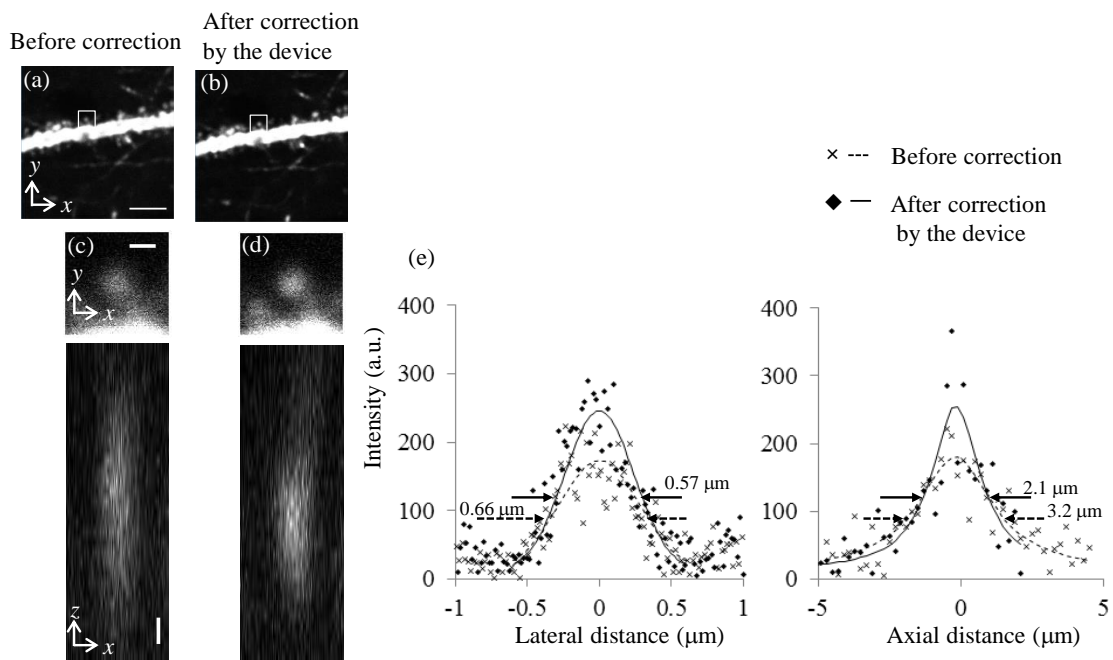


図 2.17, $z = 0 \text{ mm}$ における透明化脳スライスでの 2 光子励起顕微鏡観察像(励起波長 950 nm)。 $z = 0.27 \text{ mm}$ で光学性能が最大となる位置に補正環を調整した (a, b) 収差補正前(a)とデバイスによる収差補正後(b)の水平像 (c, d) 水平像(a, b)中に示した四角領域の像。収差補正前(c)とデバイスによる収差補正後(d)の像 (e) x 軸および z 軸での強度プロファイル。図中のスケールバーは(a) $5 \mu\text{m}$ 、(c) $0.5 \mu\text{m}$

次に、図 2.18(a-d)は $z = 0.54 \text{ mm}$ での神経細胞像である。補正前後で FWHM_x と FWHM_z は各々 $0.70 \text{ }\mu\text{m}$ から $0.60 \text{ }\mu\text{m}$ 、 $4.5 \text{ }\mu\text{m}$ から $2.0 \text{ }\mu\text{m}$ に改善しており、ピーク強度は補正前の 1.9 倍に向上した(図 2.18(e))。以上のように、液晶デバイスを用いることで、補正環で補正できる深さ範囲の 2 倍程度の広い範囲で、高コントラスト、高分解能の生体試料像を取得する事ができた。

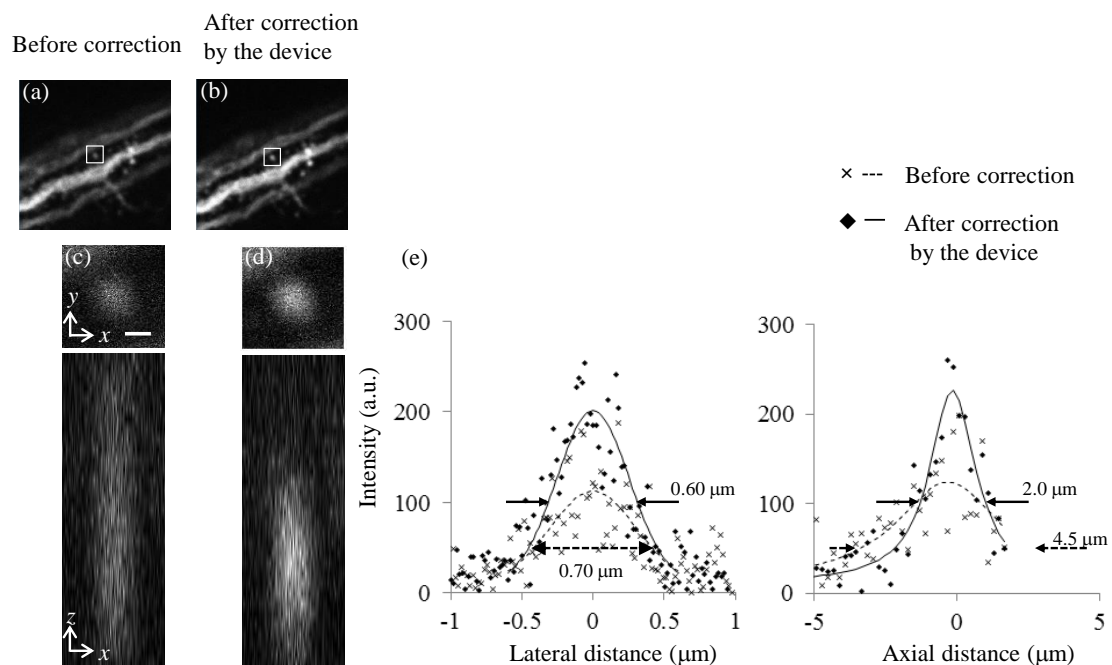


図 2.18, $z = 0.54 \text{ mm}$ における透明化脳スライスでの 2 光子励起顕微鏡観察像(励起波長 950 nm)。 $z = 0.27 \text{ mm}$ で光学性能が最大となる位置に補正環を調整した (a, b) 収差補正前(a)とデバイスによる収差補正後(b)の水平像 (c, d) 水平像(a, b) 中に示した四角領域の像。収差補正前(c)とデバイスによる収差補正後(d)の像 (e) x 軸および z 軸での強度プロファイル。図中のスケールバーは(a) $5 \text{ }\mu\text{m}$ 、(c) $0.5 \text{ }\mu\text{m}$

最後に、励起光の試料深さ方向への焦点面移動にデバイスの電圧制御を追従させ、 $z = 0\text{--}0.6\text{ mm}$ の深さ範囲で動的な収差補正を行なった(図 2.19(a, e))。このとき、 $z = 0, 0.14, 0.4, 0.52\text{ mm}$ で観察像の蛍光強度が最大となる電圧を決定し、深さと印加電圧の線形近似より、各深さ位置間での印加電圧を定めた。 $z = 0.27\text{ mm}$ 付近では元々球面収差が発生しておらず、実質デバイスは駆動していない状態であるので、褪色による蛍光強度の低下は見られるものの、収差補正前後で像はほぼ変わらなかった(図 2.19(c, g))。一方、 $z = 0.27\text{ mm}$ より深い位置および浅い位置では補正後の画質は改善しており(図 2.19(b, d, f, h))、3D イメージング取得時に発生する観察深さに依存的な球面収差が補正されていることが確認できた。

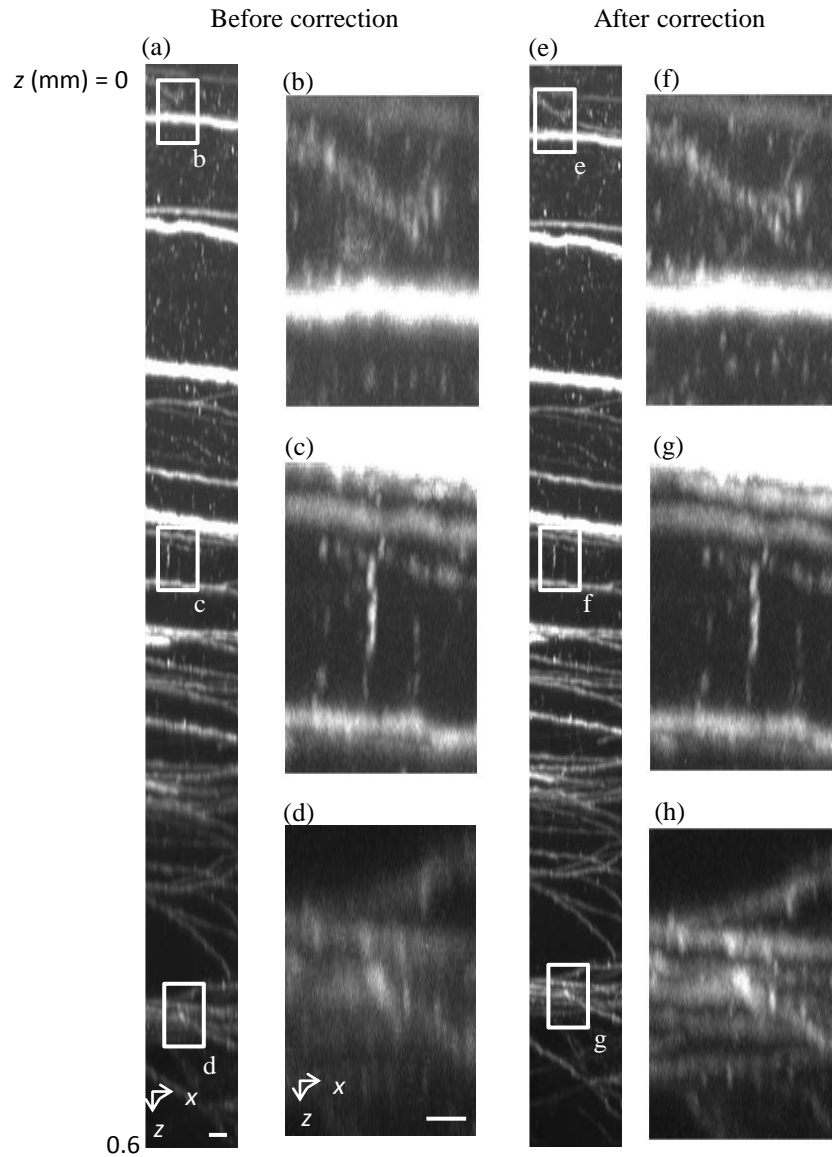



図 2.19, 透明化脳スライスの 2 光子励起顕微鏡観察像(励起波長 950 nm)。励起光の試料深さ方向への焦点面移動に、デバイスの電圧制御を追従させた。 $z = 0.27$ mm で光学性能が最大となる位置に補正環を調整した (a, e) $z = 0-0.6$ mm における収差補正前(a)とデバイスによる収差補正後(e)の最大輝度表示の断面像 (b-d, f-h) 断面像(a, e)中の四角領域の拡大像。図中のスケールバーは(a) 10 μm 、(d) 5 μm

2.5 考察

本章では、球面収差を補正する透過型デバイスを対物レンズと顕微鏡レボルバの間に挿入し、アガロースゲルおよびマウス透明化脳スライスの深部で劣化した空間分解能および蛍光強度を回復させることに成功した。

本章では、深部観察の際に発生する球面収差を数値計算より求め、最適なデバイス設計を行なったことで、光学特性の良好な透過型の収差補正デバイスを実現した。本デバイスでは、位相分布の PV 値は可変であるものの、位相分布形状は電極パターンで固定されてしまう。一方、2.2 節で示した数値計算より、観察する深さや試料屈折率が変化した時、収差の位相分布の PV 値は変わるものの、その位相分布形状は変わらなかった。そのため、固定の位相分布形状で十分な球面収差補正を行なうことができた。もちろん、1.1.6 節で述べたようなマトリックス状の電極を持つ液晶セルは、様々な位相形状を構成することができるため、他の対物レンズに対する球面収差補正も可能となる。しかし、少ない電極数や、低い電極フィルファクターでは滑らかな位相分布は実現できず、補正効果が低下してしまう可能性がある。さらに、電極間ギャップにより発生する回折光も光学性能を低下させ得る。一方、本デバイスでは最適設計により、少ない電極数で滑らかな位相分布を実現した。さらに電極数が少なく、そのパターンが非周期的であるため、回折光を低減する事ができるだろう。

図 2.15、2.16 で示したように、補正環は透過型デバイスと同等以上の収差補正効果を示した。しかし、補正環調整のために対物レンズに触るたびに視野が大きく動いてしまうなど、その正確な調整は困難であった。さらに、二光子励起顕微鏡観察の場合、高 S/N 画像取得のために顕微鏡周囲は遮光されており、補正環調整のために顕微鏡周囲を照明する場合は、GaAsP 型検出器保護のために光路を切り替える必要があり、非常に手間を要した。また、補正環は励起光

の深部方向への焦点面移動に追従することができないため、3D イメージングに対応することはできない。本デバイスは電氣的制御が可能であるため、収差補正の過程に上記のような困難さは無かった。また、 2.19 に示すように、励起光の試料深さ方向への焦点面移動にデバイスの電圧制御を追従させることで、3D イメージングにおいて発生する観察深さに依存的な球面収差を補正することに成功した。さらに、デバイスと補正環を併用することで、試料表面から補正環で補正できる深さの2倍程度の深さに亘る良好な3D イメージングを実現した。一方、補正環を機械的に自動調整する技術（電動補正環）では、操作性が向上し、3D イメージングへの対応も可能である[53]。しかしながら、電動補正環に対応可能な対物レンズは非常に限られており、また機械的振動が問題となることが予想される。

液晶セルに入射した光のうち、液晶分子の配向方向と同方向に振動している直線偏光成分の位相が変調される。本実験では、直線偏光である励起光の収差を補正しており、無偏光である蛍光は完璧には収差補正されていないと考えられる。しかし、2光子励起顕微鏡ではディテクタで蛍光を取得する際にピンホールを通す必要がないため、収差によって乱れた蛍光信号であってもディテクタで検出することができる。つまり、2光子励起顕微鏡観察においては、蛍光信号の収差補正は必ずしも必要ではない。一方、共焦点レーザー走査型顕微鏡観察にデバイスを応用する際は、蛍光信号も補正することが望ましい。このとき、液晶分子の配向方向が各々垂直である2種類の液晶セルを積層することで無偏光の位相変調が可能となり、共焦点レーザー走査型顕微鏡観察における最適な収差補正が実現できるだろう。

試料深部に光線が集光するとき、その最適な深さ位置は実験と数値計算で若干異なった。これは2.2節で述べたように、デバイス中の位相分布は余分なデフ

フォーカス成分を含んでおり、これによってデバイスでの収差補正後に集光深さが若干シフトしてしまった。例えば、 $z = 0.19$ 、 0.27 mm において(図 2.15、2.16)、収差補正後に集光深さは各々 -8.0 μm 、 -10.3 μm シフトした。今後、補正後の集光深さのシフトを自動的に調整する機構が必要となるだろう。

図 2.12、2.14 で、 $z = 0.3$ mm における補正後のビーズ像のピーク強度は $z = 0$ mm におけるピーク強度よりも高かった。これは、デバイスが球面収差補正と同時に対物レンズ固有のコマ収差も補正したためと考えられる。デバイス中の位相分布と対物レンズの光軸がずれているときに球面収差補正を行なうと、デバイスが球面収差を補正すると共に、コマ収差が発生する。この特性により、デバイスと対物レンズの光軸ズレによって発生したコマ収差成分で、対物レンズ固有のコマ収差を球面収差と同時に補正したのだと予想できる。

波長 488 nm において、実験と数値計算は定性的に一致する結果を示した(図 2.11、2.12)。つまり、実験および数値計算において、 $z = 0.3$ mm では、補正後のピーク強度や FWHM は $z = 0$ mm のときとほぼ同程度の値を示した。一方、 $z = 0.6$ mm では、補正後のピーク強度は完璧には回復しなかったものの、FWHM は $z = 0$ mm のときとほぼ同程度の値を示した。ピーク強度値や収差補正に要した位相分布の PV 値などの違いは、アガロースゲルの屈折率や光学系固有の収差、入射光の強度分布など、数値計算における前提条件と実験光学系との差異に起因するものと考えられる。なお、デバイスの補正効果は 2 光子励起顕微鏡観察実験によっても検証された。しかし、950 nm を含む近赤外波長領域において数値計算で用いた対物レンズシステムの光学特性は低く、実験と比較できるような数値計算結果は得られなかった。対物レンズシステムの光学特性の劣化は公開されていない複数の要因によるものと考えられ、対物レンズに関してより詳細な情報が今後公開されることを期待する。

図 2.11、2.12、2.14 で示した、 $z = 0.6 \text{ mm}$ におけるデバイスの補正効果の劣化は以下のように説明できる。デバイスは瞳面に換算した球面収差を補正するように設計されたが、本実験ではデバイスは瞳面に置かれなかった。25 倍の NA1.1 水浸対物レンズに加えて、40 倍 NA1.1 および 60 倍 NA1.1 水浸対物レンズ (JP7889432B、JP4097937B) における補正効果に関して、2.3.4 節で示した数値計算手法より求めた。結果を表 2.1 に示す。特に 40 倍、60 倍の対物レンズでは、集光点が深くなるにつれて、補正効果が大きく低下した。これは、高倍率の対物レンズでは、瞳面とデバイス間の光路長がより長くなることが原因と考えられる。デバイスの補正効果を向上させるためには、実際にデバイスの置かれている位置における球面収差を求める必要があるだろう。

表 2.1, 収差補正後の PSF のピーク強度の数値計算結果。

$z = 0 \text{ mm}$ における PSF のピーク強度を 100% とした。

対物レンズ	$z \text{ (mm)}$	
	0.3	0.6
25x	89%	77%
40x	94%	59%
60x	84%	54%

本デバイスは透過型であり、光学系の改造を必要としないため、光学に精通していない、もしくは従来の顕微鏡の光学系を改造したくない研究者にとって、本デバイスを用いた収差補正システムは有益である。さらに、デバイスは従来の共焦点レーザー走査型顕微鏡や STED 顕微鏡にも応用できる可能性がある。今後は、コマ収差や非点収差といった非対称性収差も含めて、様々な収差を自動的に補正するシステムとしていきたい。今後、本章で開発したデバイスを用いた 2 光子励起顕微鏡システムは生体試料中で高画質像を取得するための簡便な手法となる可能性がある。

2.6 結論

本章では球面収差を補正する透過型デバイスを設計・作成した。次に、対物レンズと顕微鏡レボルバの間にデバイスを挿入し、蛍光ビーズ試料中で劣化した空間分解能と蛍光強度を改善することに成功した。その補正効果は数値計算結果と定性的に一致する結果であった。さらに、マウス透明化脳スライスの 2 光子励起顕微鏡観察においても、空間分解能と蛍光強度を改善することができた。また、励起光の試料深さ方向への焦点面移動にデバイスの電圧制御を追従させることで、3D イメージングにおいて発生する観察深さに依存的な球面収差を補正することに成功した。本デバイスは生体試料の 2 光子励起顕微鏡観察において、高画質な像を取得するための簡便な手法を提供できる。

第3章

透過型液晶デバイスを用いた レーザー走査型顕微鏡観察における 非点収差および1次コマ収差補正

3.1 緒言

第2章では、試料深部の顕微鏡観察の際に空間分解能劣化を招く主な収差である球面収差を補正する透過型デバイスを設計・開発し、蛍光ビーズの1光子・2光子励起顕微鏡観察および透明化したマウス脳スライスの2光子顕微鏡観察において、その収差補正効果を確認した。しかし、試料の形状や試料内部の屈折率分布によっては非対称性収差が発生し、例えば比較的表面付近であっても像が劣化してしまうことがある[13]。また、1.1.4節で述べたように、非点収差やコマ収差といった低次のZernike多項式成分はその波面誤差が大きく、光学系の性能を大きく劣化されることが分かっている。さらに、試料中で発生する非対称性収差やその影響については多数の先行研究で検証されており[14, 16, 52]、生体試料中で発生する収差は低次Zernike収差が支配的であることが実験より明らかになっている。そこで本章では、 $n = 2$ および $n = 3$ である4つの低次非対称Zernike収差： 0° 方向の非点収差、 45° 方向の非点収差、 0° 方向の1次コマ収差、 90° 方向の1次コマ収差(各々、Astig(0)、Astig(45)、Coma(0)、Coma(90)とする)を補正する透過型デバイスを設計・作成したことを述べる。また、デバイスの収差補正効果は数値計算および蛍光ビーズの1光子・2光子励起顕微鏡観察により原理的に確認された。第2章での実験と同様に、本章での顕微鏡観察において

も、デバイスを既存のレーザー走査型顕微鏡のレボルバーと対物レンズの間に挿入した。さらに、マウスの固定全脳の2光子励起顕微鏡観察においても、デバイスでの収差補正後に蛍光像の空間分解能および蛍光強度が改善したことを報告する。

3.2 材料・方法

3.2.1 透過型非対称性収差補正デバイスの機能

デバイスは Astig(0)、Astig(45)、Coma(0)、Coma(90)を各々補正する 4 枚の液晶セル(各々、A0-LCC、A45-LCC、C0-LCC、C90-LCC とする)から構成された。液晶デバイスの有効径は 17.6mm であり、後述する対物レンズの瞳径と等しい。4 枚の液晶セルは、実験で使用する波長領域 488nm および 900–910 nm の範囲では、各々 ± 1.96 、 ± 0.87 の Zernike 係数の範囲で、各収差を補正することができた。以降、Astig(0)、Astig(45)、Coma(0)、Coma(90)成分の Zernike 係数を各々、 a_{astig0} 、 $a_{astig45}$ 、 a_{coma0} 、 a_{coma90} とする。図 3.1 に示すように、Astig(0)を補正するための位相分布を A0-LCC 中に形成するための分割透明電極パターンを、ガラス基板対の片側に形成した。同様に、Astig(45)、Coma(0)、Coma(90)を補正するための分割電極パターンを A45-LCC、C0-LCC、C90-LCC 中に各々形成した。各液晶セルにおいて、分割電極パターンにより 32 階調の位相分布が形成された。簡単のため、図 3.1 では位相分布は 8 階調とした。1.1.7 節および 2.3.2 節で述べたように、液晶セル中の各分割電極は抵抗を介して隣の電極と接続し、位相変調量が最大となる位置及び最小となる位置に対応する各電極へ V_{high} および V_{low} を印可した。また、1 枚の液晶セル中の V_{high} が印加される 2 つの電極を液晶セル外で結線し、同様に V_{low} が印加される 2 つの電極を液晶セル外で結線したため、液晶セル 1 枚につき、分割電極への電圧入力は 2 つとなった。また、各液晶セルのベタ電極へ印加するグラウンド電圧は共通としたため、9 個の入力電圧によって透過型デバイスは制御された。

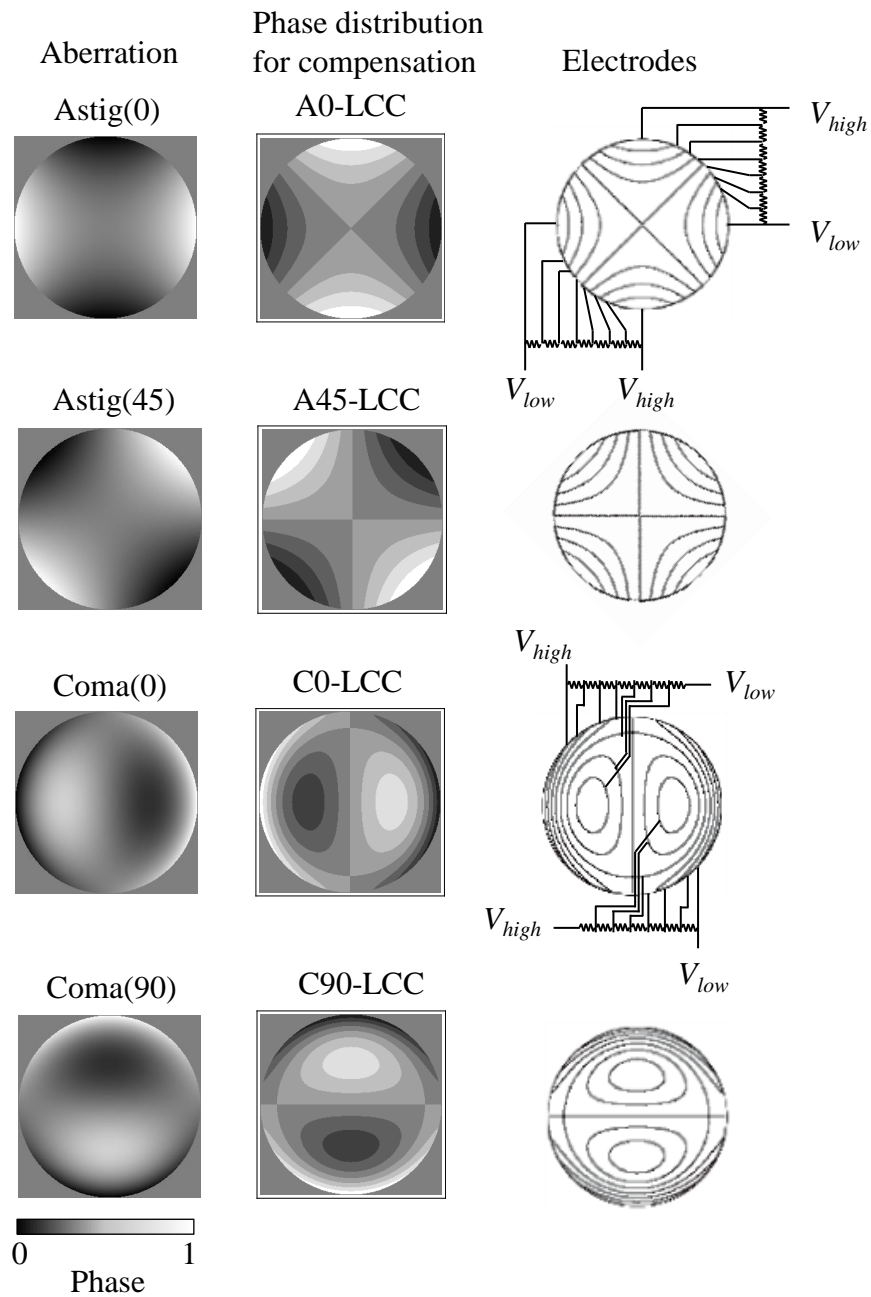


図3.1, 非対称性収差補正用透過型デバイスの機能。Astig(0)、Astig(45)、Coma(0)、Coma(90)の位相分布と、各液晶セル中の位相分布および液晶セルの分割電極パターンの概略図

なお、式(1.2)および2.3.2節で示したレンズのフーリエ変換作用に基づいた数値計算より、波長488nmにおいてZernike係数1.96の非点収差および1次コマ収差を32階調の位相分布で補正したとき、光学系のストレーラ比は0.95以上となり、良好な光学特性が得られることを確認した。一方、本実験ではデバイスを対物レンズの瞳面には置かなかった。デバイスの光軸方向の位置が光学特性に及ぼす影響は3.2.4節で述べる手法で評価し、結果を3.3.1節で報告する。

図3.2に示すZernike係数の位相分布を形成するように、積層された各液晶セルにおのおの電圧を印加し、その位相分布をレーザー干渉計(Zygo PTI250, Zygo Corporation)で測定した。 $a_{astig0} = 0.89$ のAstig(0)成分を形成するような電圧をA0-LCCに印加したとき、デバイス中の位相分布はAstig(0)の位相分布と良く一致した。次に、A45-LCCだけに電圧を印加したとき($a_{astig45} = 0.89$)、デバイス中の位相分布はAstig(45)の位相分布と良く一致した。さらに、A0-LCCおよびA45-LCCに電圧を印加し、その印加電圧比を変えることで、非点収差成分が回転することを確認した。例えば、同じZernike係数の位相分布を各々形成するようにA0-LCCとA45-LCCに電圧を印加したとき($a_{astig0} = a_{astig45} = 0.89$)、デバイス中の位相分布は22.5°方向の非点収差成分を示した。同様に、C0-LCCまたはC90-LCCだけに電圧を印加したとき、デバイス中の位相分布は各々Coma(0)、Coma(90)の位相分布と良く一致した。また、C0-LCCおよびC90-LCCに電圧印加し、 $a_{coma0} = a_{coma90} = 0.64$ としたとき、デバイス中の位相分布は45°方向の1次コマ収差成分を示した。

Zernike coefficients of the phase distributions generated in each LCC

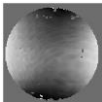
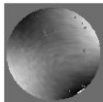
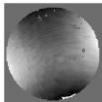
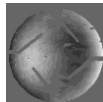
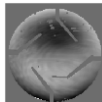
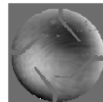

a_{astig0} in A0-LCC	0.89	0	0.64	0	0	0	
$a_{astig45}$ in A45-LCC	0	0.89	0.64	0	0	0	
a_{coma0} in C0-LCC	0	0	0	0.89	0	0.64	
a_{coma90} in C90-LCC	0	0	0	0	0.89	0.64	
Actual phase distribution of the device							

図 3.2, 非対称性収差補正用液晶デバイスの位相分布の測定結果

3.2.2 観察光学系

正立顕微鏡 (Eclipse FN1, Nikon Co.)、スキャナー (A1R MP+, Nikon Co.)、励起光として波長 488 nm の半導体レーザー、および 900 nm、910 nm のフェムト秒チタンサファイアレーザー (Mai tai DeepSee, Spectra-Physics Inc.) を使用した。後述する生体試料は波長 910 nm の励起光で観察したが、透過型デバイスによる収差補正の原理確認として、シミュレーション結果と比較するために、蛍光ビーズを波長 488 nm の励起光でも観察した。観察光学系の概略は 2.3.1 節で述べた図 2.5 と同様であり、波長 488 nm で 1 光子励起された蛍光信号は、カットイン周波数 560 nm のダイクロイックミラーおよび、中心波長 525 nm、帯域幅 50 nm の蛍光用バンドパスフィルターを介して光電子増倍管 (PMT) 検出器で検出された。また、波長 900 nm、910 nm で 2 光子励起された蛍光信号はダイクロイック

ミラーおよびフィルターを介さず GaAsP 型検出器で検出された。本実験では、ピンホールは全開にしている。透過型デバイスは水浸対物レンズ(CFI Apo LWD 25xW, NA1.1, Nikon Co.)の間に挿入した(図 3.3 (a))。3.2.1 節で述べたように、透過型デバイスは積層された 4 枚の液晶セルで構成され、9 個の入力電圧によって制御された。1 枚の液晶セルの最大位相変調量は約 1200 nm であり、応答速度は約 200 msec であった。透過型デバイスへの電圧印加は自作の専用ドライバより制御した。専用ドライバには小型プッシュプルコネクタ(HR25A-9S-16P、ヒロセ電機)およびマイクロ USB 端子が備わっており、透過型デバイスのコネクタ(MA212-10p、ヒロセ電機)およびパソコンの USB 端子をそれぞれ接続した。USB ポートを仮想 COM ポートとして、Microsoft Visual Studio (Microsoft Co.)で作成したソフトよりシリアル通信を介して専用ドライバへ信号を出力し、各液晶セル中の透明電極にパルス振幅変調の交流電圧を印可した。交流電圧は 1kHz、Duty50%の方形波であり、ソフトウェアで設定された電圧値を±(設定が 2.0 V なら、-2.0~+2.0 V)、10bit の分解能で出力した。なお、液晶セルへの印加電圧が 1.4-2.6Vrms のとき、電圧に対して液晶セルの位相変調量が線形に変化したため、この電圧範囲で液晶デバイスを制御した。また、専用ドライバの電源も USB を介してパソコンより供給された。図 3.3 (b)に液晶セルの透過率を示す。液晶セル 1 枚の透過率は、2 光子励起波長である 900-910 nm においては約 97%、1 光子励起波長および蛍光波長である 460-600 nm においては約 92-95%であった。また、デバイス(積層した 4 枚の液晶セル)の透過率は 900-910 nm においては約 88%、460-600 nm においては約 72-81%であった。

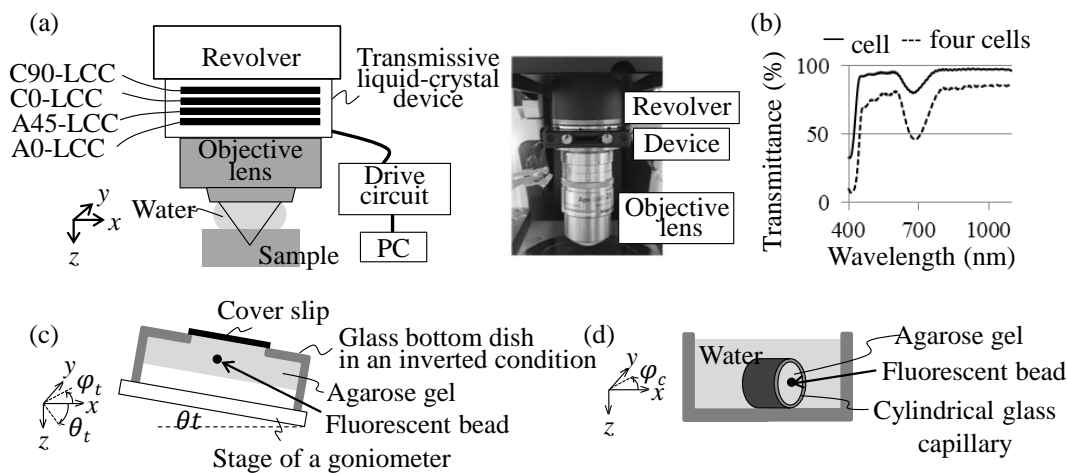


図 3.3, 実験光学系 (a) レーザー走査型顕微鏡と透過型デバイスの概略図および写真 (b) 液晶セルの透過率 (c) tilt-sample の概略図。傾斜角度 θ_t 、傾斜方向 $\varphi_t = 0^\circ$ のカバーガラス下に蛍光ビーズがある (d) cyl-sample の概略図。長軸方向 $\varphi_c = 0^\circ$ のガラス毛細管中に蛍光ビーズがある

3.2.3 試料と解析

0.2 μm のイエローグリーン蛍光ビーズ (Fluospheres, ライフテクノロジーズジャパン) を屈折率 1.333 のアガロースゲル (Agalose-L, 和光純薬工業) 中に分散し、アガロース・蛍光ビーズ混合液をガラスベースディッシュ (IWAKI Glass Base Dish, ASAHI GLASS Co.) に流し込み、固定した。カバーガラス (No. 1s, Matsunami Glass Ind.) の厚みは 0.16–0.19 mm であった。ガラスボトムディッシュを上下逆さにゴニオメーターステージ (B54-40U2, シグマ光機) に置き、蛍光ビーズを傾斜したカバーガラス越しに観察した。カバーガラスの傾斜方向と傾斜角はゴニオメーターステージの傾斜角 θ_t と傾斜方向 φ_t で定義された (図 3.3(c) の tilt-sample)。tilt-sample の観察時には主に 1 次コマ収差とわずかに非点収差の発生が予想される。一方、上述の蛍光ビーズ・アガロース混合液を外形 0.1 mm、ガラス肉厚 0.01

mm のガラス毛細管(Mark-tube made of soda lime glass, Hilgenberg GmbH)中に吸入し、毛細管をプラスチックシャーレの底に固定し、水で浸漬した(図 3.3(d)の cyl-sample)。毛細管中心部を観察した場合、主に非点収差の発生が予想される。各観察条件で視野中心付近に位置する複数のビーズを観察し、各ビーズの x 軸、 y 軸、 z 軸の強度プロファイルをそれぞれ Breit-Wigner-Fano line shape でフィッティングし、各半値全幅(FWHM $_x$ 、FWHM $_y$ 、FWHM $_z$)から平均の FWHM $_x$ 、FWHM $_z$ および平均の強度プロファイルを求めた。各関数へのフィッティングには Mathematica (Wolfram Research, Inc.)による最小二乗法を用いた。

固定全脳をプラスチックシャーレの底面に接着し、その周囲をりん酸緩衝生理食塩粉末 (D-PBS(-)粉末、コージンバイオ)より作成したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)で浸漬した。固定全脳は、YFP発現マウス(Thy 1-YFP-H mouse[51])をペントバルビタールNaで麻酔後、PBS、4% Paraformaldehyde (PFA) in PBSの順に心臓還流を行なったのち脱脳し、4% PFA in PBSに浸漬し保存したものを入手した。実験では左脳の大脳皮質表面の太い血管の下に位置する大脳皮質第5層神経細胞を観察した。脳表面の傾斜形状によって非対称性収差の発生が予想され、また、特に太い血管の下では非点収差の発生が予想できる。実験では、空間分解能よりも小さいと考えられる細胞中のスパインの像を空間分解能評価の指標とした。スパインの x 軸、 y 軸、 z 軸の強度プロファイルを、蛍光ビーズと同様の手法で各々 Breit-Wigner-Fano line shapeでフィッティングし、FWHM $_x$ 、FWHM $_y$ 、FWHM $_z$ を求めた。

本研究は「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定」に基づき、マウスを用いた動物実験の計画(承認番号 15-0021)に従って実験を実施した。

3.2.4 対物レンズシステムを用いた数値計算

トップハットの強度分布を持つ 488 nm 平行光(y 偏光)の点広がり関数(PSF)をビームレットに基づいた伝播計算より数値的に求めた(CODEV, Synopsys, Inc.)。平行光は連続的な位相分布の後に 25 倍、NA1.1 の水浸対物レンズ(JP2011-75982A)を通過して集光した。また、本数値計算では、対物レンズの像側表面より光軸に沿って 10 mm 離れた面に Astig(0)、Astig(45)、Coma(0)および Coma(90)の連続的な位相分布を置いた。ここは、実験で液晶デバイスが置かれた位置である。

3.3 実験

3.3.1 波長 488 nm における点像分布関数の数値計算

デバイスの補正効果を評価するために、傾斜したカバーガラスの下およびガラス管中での PSF を 3.2.4 節で述べた数値計算より求めた。収差がないときの PSF の FWHM_x、FWHM_y および FWHM_z は各々 0.23、0.28、0.79 μm であった(図 3.4(a, b))。FWHM_x と FWHM_y の差は入射光の偏光方向に依るものである。

傾斜方向 $\varphi_t = 90^\circ$ 、傾斜角 $\theta_t = 5^\circ$ のカバーガラスの下に入射光が集光するとき、主な収差は $a_{coma90} = 1.7$ の Coma(0)、 $a_{astig0} = 0.25$ の Astig(0)、およびゼルニケ係数 -0.37 の 0° 方向の 2 次コマ収差であった。このとき、PSF のピーク強度は、収差がないときの PSF のピーク強度($I_{nonaberration}$)の 13%に減少した(図 3.4(c, e))。また、FWHM_y および FWHM_z は各々 0.47、2.4 μm に劣化した。一方、 $a_{coma90} = -1.7$ 、 $a_{astig0} = -0.25$ の位相分布で収差補正した場合、FWHM_y および FWHM_z は各々 0.31、0.88 μm に改善した(図 3.4(d e))。また、PSF のピーク強度は、64% $I_{nonaberration}$ に向上し、補正前後で 4.9 倍の信号強度の向上が見られた。以上より、収差補正による FWHM および信号強度の改善が確認できた。しかし、残留した 2 次コマ収差の影響で、PSF は完全には回復しなかった。

次に、外形 0.1 mm、ガラス肉厚 0.01 mm のガラス管中における PSF を数値計算より求めた。このとき、ガラス管の長軸方向は $\varphi_c = 0^\circ$ であり、主な収差は $a_{astig0} = -0.5$ の Astig(0)であった。一方、 $a_{astig0} = 0.5$ の位相分布で補正したとき、ピーク強度は 25% $I_{nonaberration}$ から 93% $I_{nonaberration}$ に回復した(図 3.4(f-h))。つまり補正前後でピーク強度は 3.8 倍に増大した。また、FWHM_x および FWHM_y は各々 0.37 μm から 0.23 μm 、0.63 μm から 0.28 μm に改善し、FWHM_z は 1.7 μm から 0.82 μm に回復した。補正後の FWHM は収差がない場合の FWHM と同程度であり、ピ

一ク強度もほぼ収差なしの状態まで回復したと言える。

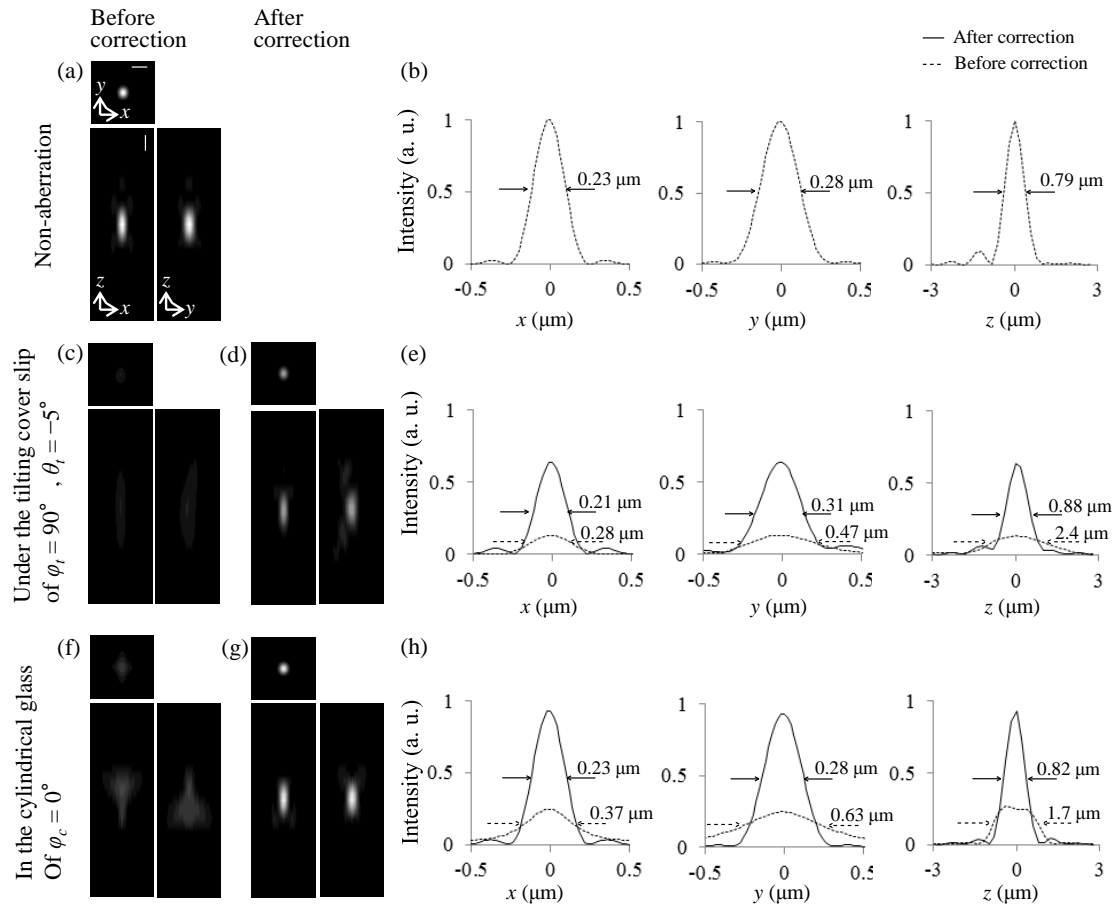


図 3.4, 波長 488nm における PSF 像の数値計算結果 (a) 収差がないときの水平像と断面像 (c, d) 傾斜角度 $\theta_t = -5^\circ$ 、傾斜方向 $\phi_t = 90^\circ$ のカバーガラス下における収差補正前(c)と収差補正後(d)の像 (f, g) 長軸方向 $\phi_c = 0^\circ$ のガラス管中における収差補正前(f)と収差補正後(g)の像 (b, e, h) 各観察条件での像(a)、(c, d)、(f, g)における x 軸、y 軸および z 軸での強度プロファイル。図中のスケールバーは 0.5 μm

3.3.2 蛍光ビーズの1光子励起顕微鏡観察

次に、1光子励起顕微鏡観察より、デバイスの収差補正効果を実験的に評価した。本実験では、波長488 nmのレーザーを励起光として蛍光ビーズを観察し、ビーズ像の蛍光強度とFWHMを評価した。

初めに、コマ収差補正効果の確認のため、tilt-sample(傾斜したカバーガラス下の蛍光ビーズ)の観察を行なった。各観察条件において、視野中心 $20\ \mu\text{m}^3$ 中の複数のビーズを観察し、平均のピーク強度および強度プロファイル、FWHMを求めた。ここで、収差補正前において、観察光学系は固有の $\varphi_t = 90^\circ$ のコマ収差を有しており、そのためカバーガラスが $\varphi_t = 90^\circ$ 、 $\theta_t = 3^\circ$ のときにビーズ像の画質が最高となった。つまり、カバーガラスが $\varphi_t = 90^\circ$ 、 $\theta_t = -2^\circ$ のとき、最高画質が得られる $\theta_t = 3^\circ$ に対して相対的に -5° 傾いていることになる。はじめに、カバーガラスの傾きを $\varphi_t = 90^\circ$ 、 $\theta_t = -2^\circ$ とした。まず、Coma(90)を補正するためにC90-LCCに電圧を印加した。このとき、印加電圧を繰り返し変調し、像の蛍光強度が最大となる最適電圧を決定した。C90-LCCによる補正の後、ビーズ像はAstig(0)が発生したときのPSFに近い形状を示した。そこで次に、Astig(0)を補正するためにA0-LCCに電圧を印加した。このときの各液晶セル内でのZernike係数は $a_{astig0} = 0.56$ 、 $a_{coma90} = 1.4$ であった(表 3.1)。図 3.5(a-c)に示すように、C90-LCCおよびA0-LCCによる補正後、ビーズ像の空間分解能が改善したことが確認できる。FWHM_yは $0.40\ \mu\text{m}$ から $0.26\ \mu\text{m}$ に、FWHM_zは $2.3\ \mu\text{m}$ から $1.7\ \mu\text{m}$ に改善した。また、補正後のピーク強度は補正前の1.7倍であった。さらに、カバーガラスが $\varphi_t = 45^\circ$ 、 $\theta_t = 6.5^\circ$ のとき、C0-LCC、C90-LCC、A0-LCCおよびA45-LCCによって、 $\varphi_t = 45^\circ$ 方向の1次コマ収差および非点収差、観察光学系固有のコマ収差を補正した。図 3.5(d-f)に示すように、補正後に画質が改善しており、補正前後でピーク強度は補正前の1.6倍に増加した。以上のように、デバイスは様々

な傾斜方向、傾斜角度のカバーガラス下において、空間分解能と蛍光強度を改善することが確認できた。

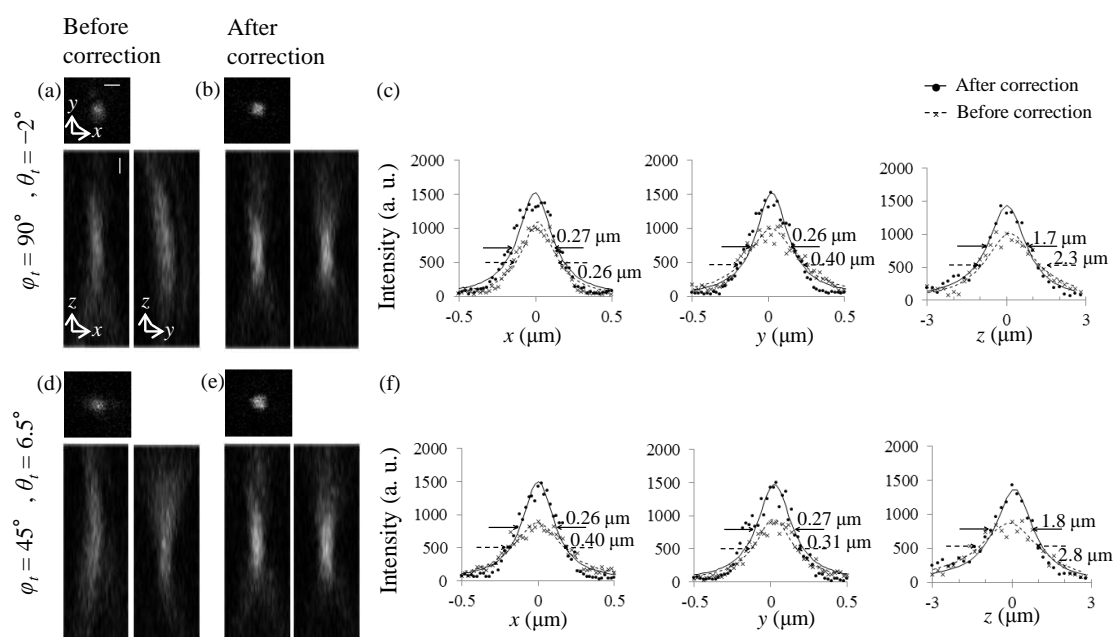


図 3.5, tilt-sample 中の蛍光ビーズの 1 光子励起顕微鏡観察像(励起波長 488 nm)
 (a, b) 傾斜角度 $\theta_t = -2^\circ$ 、傾斜方向 $\phi_t = 90^\circ$ のカバーガラス下における収差補正前(a)と収差補正後(b)の水平像と断面像 (d, e) 傾斜角度 $\theta_t = 6.5^\circ$ 、傾斜方向 $\phi_t = 45^\circ$ のカバーガラス下における収差補正前(d)と収差補正後(e)の像 (c, f) 各観察条件での像(a, b)、(d, e)における x 軸、 y 軸および z 軸での強度プロファイル。図中のスケールバーは $0.5 \mu\text{m}$

表 3.1, tilt-sample 観察時の収差補正における、各液晶セル中の位相分布の

Zernike 係数

Tilting direction	Tilting angle	a_{astig0}	$a_{astig45}$	a_{coma0}	a_{coma90}
φ_t	θ_t	in A0-LCC	in A45-LCC	in C0-LCC	in C90-LCC
90°	-2°	0.56	0.00	0.00	1.40
45°	6.5°	0.28	0.14	0.98	-0.42

次に、非点収差補正効果の確認のため、cyl-sample(ガラス毛細管中の蛍光ビーズ)を観察した。毛細管長軸が $\varphi_c = 0^\circ$ のとき、初めに Astig(0)を補正するために A0-LCC に電圧を印加し、その後、光学系固有のコマ収差を補正するために C90-LCC に電圧を印加した(表 3.2)。各収差を補正するとき、各液晶セルへの印加電圧を繰り返し変調し、像の蛍光強度が最大となるように各素子の最適電圧を決定した。各素子の電圧調整は上述の順番で 1 巡だけ行なった。図 3.6(a-c)に収差補正後の分解能と蛍光強度の改善を示す。補正後、FWHM_x および FWHM_y は 0.32 μm から 0.24 μm 、0.40 μm から 0.21 μm に各々改善した。また、FWHM_z は 3.3 μm から 1.3 μm に回復し、ピーク強度は補正前の 2.2 倍に増大した。次に、毛細管の長軸が $\varphi_c = 67.5^\circ$ のとき、A0-LCC および A45-LCC で $\varphi_c = 67.5^\circ$ 方向の非点収差を補正し、C90-LCC で光学系固有のコマ収差を補正した。なお、各素子の電圧調整は 1 巡だけ行なった。補正後、分解能は向上し、ピーク強度は補正前に対して 3.2 倍増加した(図 3.6(d-f))。以上より、デバイスはその長軸が様々な方向を向いたガラス毛細管中で、空間分解能と蛍光強度を改善することを確認できた。

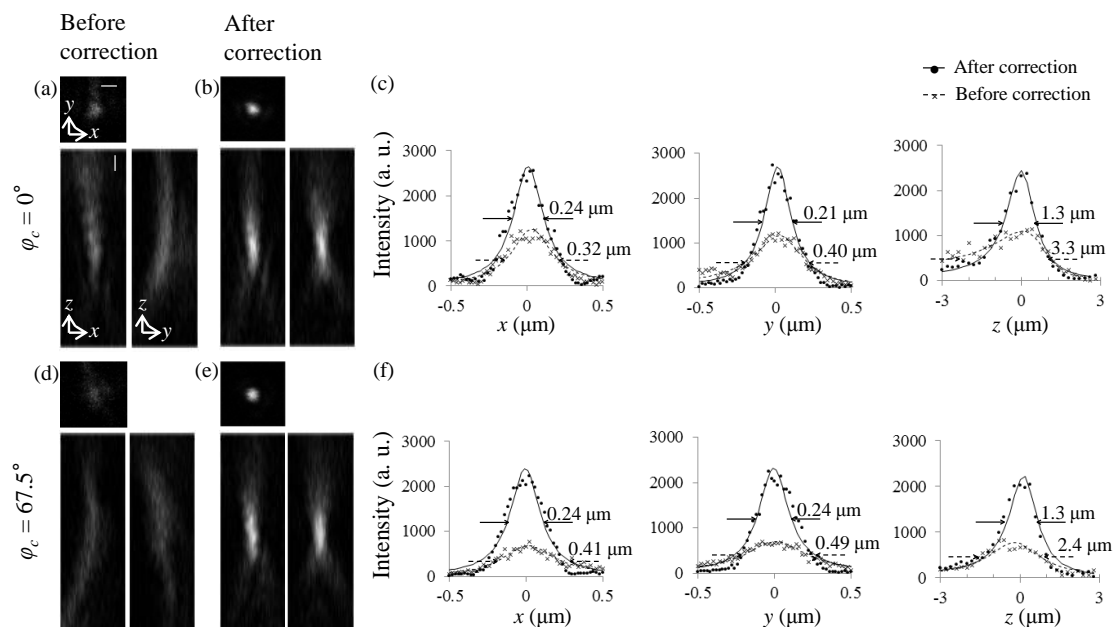


図 3.6, cyl-sample 中の蛍光ビーズの 1 光子励起顕微鏡観察像(励起波長 488 nm)
 (a, b) 長軸方向 $\varphi_c = 0^\circ$ のガラス毛細管中における収差補正前(a)と収差補正後(b)
 の水平像と断面像 (d, e) 長軸方向 $\varphi_c = 67.5^\circ$ のときの収差補正前(d)と収差補正
 後(e)の像 (c, f) 各観察条件での像(a, b)、(d, e)における x 軸、 y 軸および z 軸で
 の強度プロファイル。図中のスケールバーは $0.5 \mu\text{m}$

表 3.2, cyl-sample 観察時の収差補正における、各液晶セル中の位相分布の

Zernike 係数

Longitudinal direction	a_{astig0}	$a_{astig45}$	a_{coma0}	a_{coma90}
φ_c	in A0-LCC	in A45-LCC	in C0-LCC	in C90-LCC
0°	-0.98	0.00	0.00	0.70
67.5°	1.40	0.98	0.00	0.70

3.3.3 蛍光ビーズの2光子励起顕微鏡観察

生体試料の2光子顕微鏡観察へデバイスを応用する準備として、蛍光ビーズ試料を励起波長 900 nm で2光子励起顕微鏡観察し、デバイスの収差補正効果を確認した。

図 3.7(a-c)は $\varphi_t = 90^\circ$ 、 $\theta_t = -2^\circ$ に傾いたカバーガラス下の蛍光ビーズ像である (tilt-sample)。1光子励起顕微鏡と同様に、C90-LCC と A45-LCC を用いて、カバーガラスの傾きにより発生した Coma(90)、Astig(0)および観察光学系固有のコマ収差を補正した。収差補正時に各液晶セル中で形成した Zernike 係数は励起光の波長に反比例しており、 $a_{astig0} = 0.30$ 、 $a_{coma90} = 0.69$ であった。補正後に、FWHM_y および FWHM_z は 0.40 μm から 0.35 μm 、2.4 μm から 2.1 μm に各々改善しており、ピーク強度は補正前の 1.5 倍に増加した。

次に、毛細管長軸方向が $\varphi_c = 67.5^\circ$ の cyl-sample を観察した(図 3.7(d-f))。A0-LCC および A45-LCC を用いて $\varphi_c = 67.5^\circ$ 方向の非点収差を補正し、C90-LCC で光学系固有のコマ収差を補正した。デバイスによる補正後、FWHM_x および FWHM_y は 0.38 μm から 0.32 μm 、0.45 μm から 0.32 μm に各々改善しており、FWHM_z は 2.6 μm から 1.5 μm に改善した。また、ピーク強度は補正前の 3.0 倍に増加した。

以上より、1光子励起顕微鏡観察と同様に、デバイスによる空間分解能の向上が確認できた。

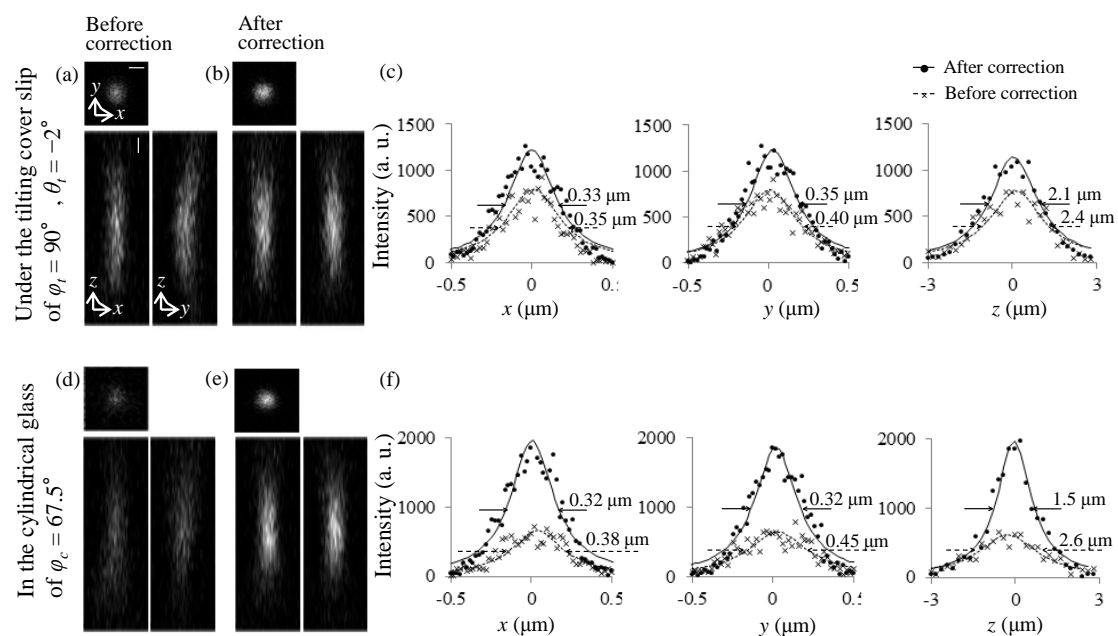


図 3.7, 蛍光ビーズの 2 光子励起顕微鏡観察像(励起波長 900 nm) (a, b) 傾斜角度 $\theta_t = -2^\circ$ 、傾斜方向 $\varphi_t = 90^\circ$ のカバーガラス下における収差補正前(a)と収差補正後(b)の水平像と断面像(tilt-sample) (d, e) 長軸方向 $\varphi_c = 67.5^\circ$ のガラス毛細管中における収差補正前(d)と収差補正後(e)の像(cyl-sample) (c, f) 各観察条件での像(a, b)、(d, e)における x 軸、 y 軸および z 軸での強度プロファイル。図中のスケールバーは $0.5 \mu\text{m}$

3.3.4 固定全脳の2光子励起顕微鏡観察

最後に、マウス固定全脳の2光子励起顕微鏡観察にデバイスを応用した。910 nmの励起光で、左脳の大脳皮質表面の太い血管の下に位置する大脳皮質第5層神経細胞を観察した(図 3.8(a))。図 3.8(b)は試料の広視野像であり、脳表面の太い血管は図 3.8(b)の断面像中で示している。さらに、脳表面から 150 μm 程度、つまり血管より 80 μm 程度深部の視野中心 20 μm^3 範囲を観察した(図 3.8(c, d))。はじめに、Astig(0)および Astig(45)を A0-LCC、A45-LCC を用いて補正した。まず、A0-LCC への印加電圧を繰り返し変調し、像の蛍光強度が最大となるような最適電圧を決定し、次に、A45-LCC への最適電圧を同様に決定した。各素子への印加電圧から求められる素子中の位相分布の Zernike 係数は、 $a_{astig0} = 0.53$ 、 $a_{astig45} = 0.87$ であった。なお、 $a_{astig45} = 0.87$ の位相変調は液晶セルの位相変調量の最大値であった。非点収差の補正後に、 $a_{coma90} = 0.87$ の C90-LCC を用いて Coma(90)を、続いて、 $a_{coma90} = -0.62$ の C0-LCC を用いて Coma(0)を補正した。 $a_{coma90} = 0.87$ の位相変調は液晶セルの位相変調量の最大値であった。各液晶セルへの最適電圧調整は上記の順番で1巡だけ行なった。なお、本実験では、褪色による蛍光強度の減少が3%以下であるような弱い励起光強度で試料を観察した。スパインの像より、デバイスによる収差補正後は明らかに空間分解能が改善したことが分かる(図 3.8(e, f))。FWHM_x および FWHM_y は 0.71 μm から 0.55 μm 、1.12 μm から 0.75 μm に各々改善しており、FWHM_z は 6.8 μm から 2.8 μm に改善した(図 3.8(g))。また、ピーク強度は補正前の 2.4 倍に増加した。以上より、デバイスを用いることで、蛍光ビーズ試料と同様に、生体試料中の劣化した空間分解能を改善し、蛍光強度を増加させることができた。

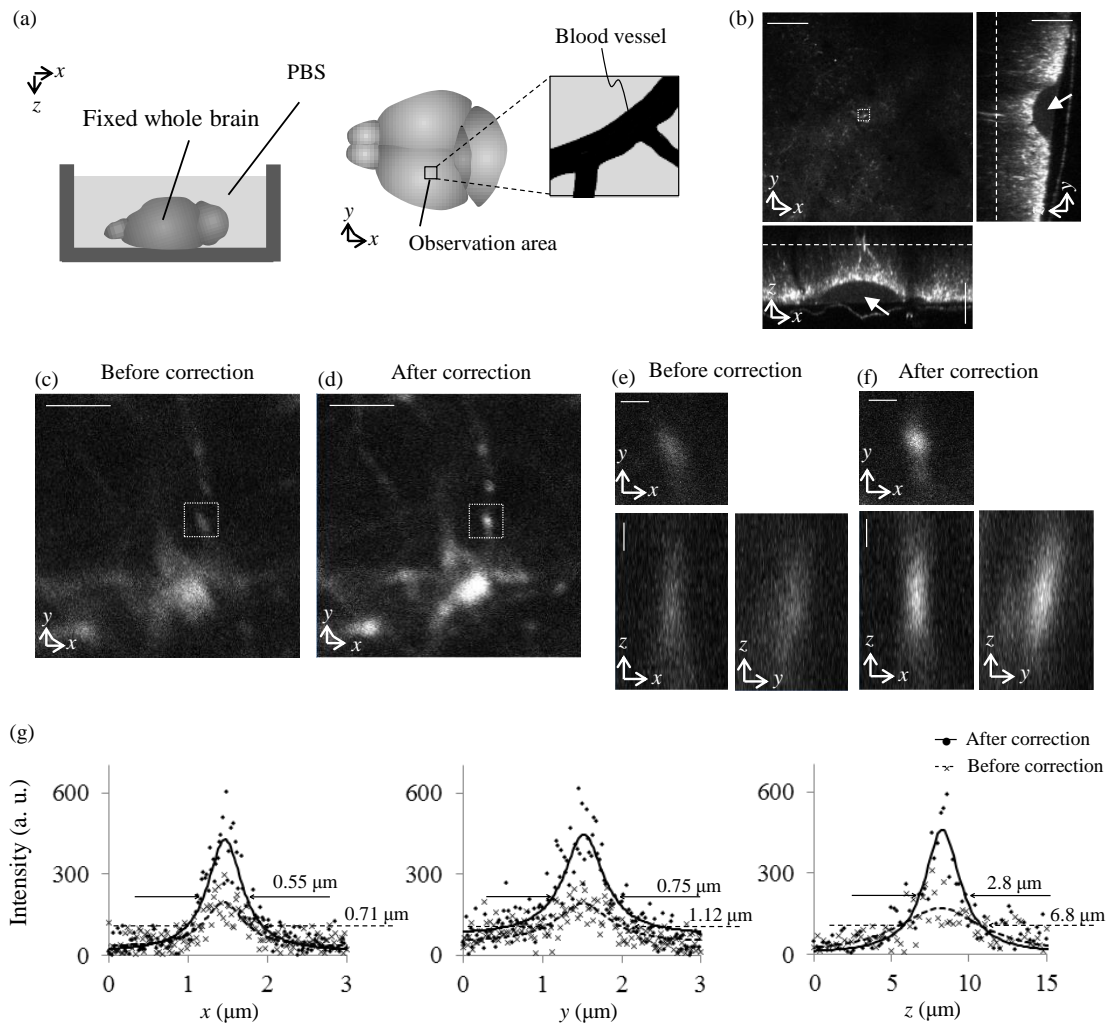


図 3.8, マウス固定全脳での 2 光子励起顕微鏡観察像(励起波長 910 nm) (a, b) マウス固定全脳試料の概略図 (b) 収差補正前の広視野水平像と断面像。断面像中の矢印は血管を示す (c, d) 広視野像(b)中の四角領域における収差補正前(c)と収差補正後(d)の水平像 (e, f) 水平像(c, d)中の四角領域における収差補正前(e)と収差補正後(f)の水平像と断面像 (g) 像(e, f)における x 軸、 y 軸および z 軸での強度プロファイル。図中のスケールバーは(b)100 μm 、(c, d)5 μm 、(e, f)1 μm

3.4 考察

第 2 章では、透過型デバイスを対物レンズと顕微鏡レボルバの間に挿入し球面収差を補正することで、試料深部での画質を改善することが出来た。しかし、試料の形状や試料内部の屈折率分布によっては非対称性収差が発生し、例えば比較的表面付近であっても像が劣化してしまうことがある。本章では、画質への影響が大きい低次の非対称性収差であるコマ収差と非点収差を補正するデバイスを設計・作成した。また、デバイスの収差補正によって、ビーズ試料および生体試料中において、空間分解能と蛍光強度が改善することを確認した。

生体試料の多くが屈折率 1.35~1.38 程度であり、深部観察に使用されることが多い水浸対物レンズの浸液である水よりも高屈折率となるため、試料の形状や屈折率分布に因らず、深部観察の際には球面収差が支配的である。第 2 章では、試料深部における空間分解能が球面収差補正により改善することを実験的にも確認した。一方、式(1.17)より、非点収差($m = \pm 2, n = 2$)と 1 次コマ収差($m = \pm 1, n = 3$)によるストレール比の低下は、同じ Zernike 係数の 3 次球面収差($m = 0, n = 4$)によるストレール比の低下のおおの約 0.8 倍、0.6 倍であり、これら低次の非対称性収差により画質が大きく劣化することがある。例えば 3.3.4 節では、比較的表面付近である 100–200 μm 程度深部を観察した場合でも、固定全脳表面の傾斜形状や血管などにより大きな非対称性収差が発生したため、2.4.4 節で示した球面収差補正と同等の効果が非対称性収差補正についても得られた。このように、試料によっては、球面収差補正とともに非対称性収差補正が必要となるだろう。

1.1.6 節で述べたように、マトリックス状の電極を持つ液晶セルは非点収差やコマ収差を含めた様々な収差を 1 枚の液晶セルで補正することができるため、本章のデバイスのように複数枚の液晶セルを積層させる必要が無く、より高透

過率のデバイスを実現できるだろう。しかし、少ない電極数や、低い電極フィルファクターでは滑らかな位相分布は実現できず、補正効果が低下してしまう可能性がある。さらに、マトリックス電極間ギャップにより発生する回折光も光学性能を低下させ得る。一方、本デバイスの電極構成では、位相分布形状は電極パターンで固定されるものの、少ない電極数で滑らかな位相分布を実現できた。さらに、電極数が少なく、そのパターンが非周期的であるため、回折光を低減する事ができるだろう。

非対称性収差の場合、式(1.17)より、 $n+1$ 次の Zernike 収差によるストレール比の低下は、同じ Zernike 係数の n 次の Zernike 収差によるストレール比の低下に対して $(n+1)/(n+2)$ 倍となる。さらに、生体試料中で発生する収差は低次 Zernike 収差が支配的であることが多いことが実験的にも明らかにされている[14, 16, 52]。本研究結果でも、 $n = 2$ の非点収差と $n = 3$ の 1 次コマ収差を補正することで、画質が大きく改善されることが確認できた。一方、本研究結果より、さらに高次の Zernike 収差に対応する液晶セルを積層することで、これら高次 Zernike 収差を補正し、さらなる高画質を実現することが可能であることが示された。しかし、実際には、液晶セルを多数積層することでデバイスの透過率は低下してしまう。今後、液晶セルの高透過率化が実現されれば、液晶セルをさらに積層することで、デバイスはより多種類の収差に対応できるようになる可能性がある。また、2 種類の異なる収差に各々対応する電極パターンを、液晶セルのガラス基板対にそれぞれ形成したとき、1 枚の液晶セルで 2 種類の収差を補正することが可能となる[39]。

ビーズ試料実験と数値計算は定性的に一致する結果を示した(図 3.4(c-h)、3.5(a-c)、3.6(a-c))。実験と数値計算において、分解能劣化の原因となる支配的な Zernike 収差成分は等しかった。さらに、補正後のビーズ像の FWHM_x および

FWHM_y は、数値計算における補正後の PSF の各 FWHM と近い値を示した。実験結果と数値計算結果における、ピーク強度値や収差補正に要した各収差成分の Zernike 係数などの違いは、ビーズ試料中のガラス厚みや光学系固有の収差、入射光の強度分布など、数値計算における前提条件と実験光学系との差異に起因するものと考えられる。

デバイスの補正効果は 2 光子励起顕微鏡観察においても確認された。ビーズ試料の 2 光子励起顕微鏡観察では、1 光子励起顕微鏡観察と同様の改善率を示した(図 3.5(c)、3.6(f)、3.7(c, f))。2.5 節でも述べたように、近赤外波長領域では対物レンズシステムの光学特性が低いため、実験と比較できるような数値計算結果が得られなかった。しかし、1 光子および 2 光子励起顕微鏡観察における同様な改善率を以下のように説明できる。2 光子励起過程において、蛍光強度は励起光強度の 2 乗に比例して増加する。反対に、波面収差の Zernike 係数は波長に反比例するため、波面収差による励起光強度の減少は長波長になるほど小さくなる。つまり、2 光子励起顕微鏡観察では、励起光強度の改善率が 1 光子励起顕微鏡観察のときより小さくなる。以上の性質より、1 光子励起顕微鏡観察と 2 光子励起顕微鏡観察において同程度の改善率を示すことがありうる。

ビーズ試料中における発生収差は数値計算やビーズ像の形状から予測することが出来た。実際、ビーズ試料観察実験において、主な収差(Tilt-sample におけるコマ収差および cyl-sample における非点収差)は初めに補正された。しかし、特に生体試料においては、収差の正確な予測は困難である。そこで、非点収差補正はコマ収差補正よりも画質に与える影響が大きいため、3.3.4 節で示した生体試料観察実験のように、初めに非点収差、次にコマ収差を補正することを提案する。

固定全脳の観察実験において、デバイスは空間分解能および蛍光強度を十分

に改善し、その改善率はビーズ試料観察実験の結果や数値計算結果とも整合する結果であった。しかし、固定全脳の観察実験においては、デバイスは Astig(45)成分および Coma(90)成分の最大位相変調量を出力した。今後デバイスの位相変調量が増えれば、固定全脳中でさらに画質を改善できる可能性がある。

本章で開発したデバイスは複雑な試料形状や内部屈折率分布を持つ生体試料中で、高画質像を取得するための簡便な手法を提供できる。本手法では試料のスライスや、屈折率分布を一様とするような処理を必要としない。さらに、従来の顕微鏡の光学系を改造する必要がない。よって、本デバイスは臨床研究や病理学など、迅速な準備、観察が必要とされるような分野で有効となるだろう。もちろん、試料を透明化して屈折率を一様にするような処理と併せることで [45-47]、生体試料観察におけるさらなる分解能の改善が期待できる。今後は、デバイスをさらに多くの収差に対応させ、対称性収差、非対称性収差を含めた様々な収差を自動的に補正できるシステムの実現を目指したい。

3.5 結論

本章では非点収差、コマ収差を補正するデバイスを設計・作成した。対物レンズと顕微鏡レボルバの間にデバイスを挿入し、蛍光ビーズ試料中で空間分解能と蛍光強度を改善した。その補正効果は数値計算結果と定性的に一致する結果であった。さらに、固定全脳の2光子励起顕微鏡観察においても、デバイスによる収差補正により、空間分解能と蛍光強度を改善することができた。本デバイスは複雑な試料形状や内部屈折率分布を持つ生体試料中で、高画質像を取得するための簡便な手法を提供できる。

第4章 本研究の結論

4.1 本研究の結語

本論文は透過型液晶収差補正デバイスの設計・作成、および蛍光ビーズ試料・生体試料の1光子・2光子顕微鏡観察におけるデバイスの収差補正効果をまとめたものである。本研究では数値計算によるデバイス設計の最適化を行ない、光ピックアップ等に使用されていた従来の透過型液晶デバイスよりも厳密な波面制御を可能とした。本研究では顕微鏡観察時に発生する波面収差を直交関数系である Zernike 多項式に展開し、透過型デバイスで補正する収差成分を画質への影響が特に大きい球面収差、非点収差、1次コマ収差に限定することで、光学特性の良好な透過型収差補正デバイスを実現した。また、既存のレーザー走査型顕微鏡のレボルバと対物レンズの間にデバイスを挿入し、蛍光ビーズ試料の1光子・2光子励起顕微鏡観察において、デバイスの収差補正による空間分解能および蛍光強度の改善を確認した。蛍光ビーズ試料における収差補正効果は数値計算結果とも定性的に一致する結果であった。さらに、生体試料の2光子励起顕微鏡観察においても、デバイスの収差補正による空間分解能および蛍光強度の改善を確認することができた。

本透過型デバイスは単純な電極構造と制御方法より構成されているため、デバイス中で形成できる位相分布形状は限定される。一方最適なデバイス設計により、顕微鏡観察において支配的である球面収差、非点収差、1次コマ収差を厳密に補正することができる。本研究の結果は、透過型デバイスで球面収差、非点収差、1次コマ収差を厳密に補正することで生体試料中の空間分解能が大きく向上したことを示している。つまり、本デバイスを用いることで、光学系を大

幅に改造することなく固定試料内部で劣化した画質を大幅に回復させることに成功した。以上の結果は、本研究が試料深部イメージングに対する簡便かつ有効な収差補正システムを実現したことを示している。

第 1 章では、本研究の背景と研究目的について述べた。初めにレーザー走査型顕微鏡および 2 光子励起顕微鏡の概略を紹介した。次に、レーザー走査型顕微鏡観察時に発生する波面収差は正規直交関数系である Zernike 多項式に展開することが可能であり、球面収差や非点収差・コマ収差などの低次 Zernike 多項式成分が特に光学特性を劣化させることを示した。また、光学赤外望遠鏡への応用から発展した補償光学について述べ、現在レーザー走査型顕微鏡で使用されている既存の収差補正技術を紹介した。さらに、本研究で用いられている透過型液晶セルによる位相変調の原理について述べた。

第 2 章では、試料深部観察の際に最も影響が大きい球面収差を補正する透過型デバイスを設計・作成し、その補正効果を実験的に確認したことを報告した。実験では既存のレーザー走査型顕微鏡のレボルバと対物レンズの間にデバイスを挿入し、蛍光ビーズ試料の 1 光子・2 光子励起顕微鏡観察において、デバイスの収差補正による空間分解能および蛍光強度の改善を確認した。蛍光ビーズ試料における収差補正効果は数値計算結果とも定性的に一致する結果であった。さらに、マウスの透明化脳スライスの 2 光子励起顕微鏡観察においても、デバイスの収差補正による空間分解能および蛍光強度の改善を確認することができた。また、励起光の試料深さ方向への焦点面移動にデバイスの電圧制御を追従させることで、3D イメージングにおいて発生する観察深さに依存的な球面収差を補正することに成功した。

第 3 章では、非点収差・1 次コマ収差を補正する透過型デバイスを設計・作成し、その補正効果を実験的に確認した。非点収差や 1 次コマ収差などの非対称

性収差は、試料の形状や試料内部の屈折率分布によって発生し、例えば比較的
表面付近であってもこれらの非対称収差によって像が劣化してしまうことがあ
る。第 2 章と同様に、既存のレーザー走査型顕微鏡のレボルバと対物レンズの
間にデバイスを挿入し、蛍光ビーズ試料の 1 光子・2 光子励起顕微鏡観察にお
いて、デバイスの収差補正による空間分解能および蛍光強度の改善を確認した。
蛍光ビーズ試料における収差補正効果は数値計算結果とも定性的に一致する結
果であった。さらに、マウス固定全脳の 2 光子励起顕微鏡観察においても、デ
バイスの収差補正による空間分解能および蛍光強度の改善を確認することがで
きた。

第 2 章では球面収差、第 3 章では低次非対称性収差である非点収差および 1
次コマ収差の補正を行なった。試料の形状や屈折率分布に因らず、深部観察の
際は球面収差が支配的であり、第 2 章では球面収差補正効果を実験的にも確認
した。一方、3.3.4 節で示したように、試料の形状や界面の状況によっては比較
的 surface 付近であっても大きな非対称収差が発生することがあり、球面収差補正
とともに非対称性収差補正が必要となるだろう。

本研究で開発したデバイスは試料深部および複雑な試料形状や内部屈折率分
布を持つ生体試料中で、高画質像を取得するための簡便な手法を提供できる。
本デバイスは透過型であり、光学系の改造を必要としないため、光学に精通し
ていない、もしくは従来の顕微鏡の光学系を改造したくない研究者にとって、
本デバイスを用いた収差補正システムは有益である。また、第 2 章および第 3
章で示したように、本手法によって、試料のスライスや、屈折率分布を一様と
するような処理が省ける可能性があり、臨床研究や病理学など、迅速な準備、
観察が必要とされるような分野で有効となり得る。さらに、本デバイスは比較
的低コストでの作成が可能であり、産業的な観点からも有用であると言える。

4.2 今後の展望

初めに、今後の課題について言及する。本研究では、蛍光像の蛍光強度が最大となるように液晶デバイスに電圧印可を行なったが、その作業は自動化されていない。例えば、電圧を変えるごとに画像を取得し、電圧と蛍光強度の近似曲線を作成し、蛍光強度が最大となる印加電圧を求めるといった工程を自動化し、本デバイスの操作性を改善していきたい。また、液晶セル中では位相分布は量子化されており、これが光学特性を減少させる要因になりうる。また、引き出し電極も光学性能に悪影響を与える。このような問題に対して、分割透明電極と液晶層の間に高抵抗膜を設けて液晶セル中の位相分布を滑らかにする手法が提案されている。また、透明電極の厚みを制御することで透明電極膜中の電気抵抗を制御し、電極を分割せずに液晶層中に電圧分布を発生させることも可能となっており、この手法では引き出し電極も不要となる。他にも、絶縁体層を挟んで透明電極を2層設けることで、引き出し電極の影響を低減する手法がある。次に、液晶セルを透過することで、励起光や蛍光の強度が低減することも問題になるだろう。液晶セルの透過率の低減は主にガラス基板と空気界面で発生している。本デバイスでは液晶セルを複数枚積層しているためガラス基板／空気界面が多く、透過率が低くなってしまふ。例えば、ガラス基板上に形成する反射防止膜の特性を最適化したり、隣接する液晶セルのガラス基板間をガラスと同様の屈折率の媒質で埋めたり、隣接する液晶セルのガラス基板を共通化するなどして、透過率を向上できる可能性がある。また、2種類の異なる収差に各々対応する電極パターンを、液晶セルのガラス基板対にそれぞれ形成したとき、1枚の液晶セルで2種類の収差を補正することが可能となり、液晶セルの積層枚数を減らすことができる。一方、液晶セルの透過率が向上することで積層可能な液晶セルの枚数を増加できれば、低次からさらに高次までの収差を補正

することも可能となる。第 2 章および第 3 章で示したように、球面収差、非点収差および 1 次コマ収差の補正により大きく試料中の画質は向上したが、より高次の収差を補正することで、さらなる画質向上が実現できる可能性がある。また、2.5 節で述べたように、デバイスの補正効果を向上させるためには、実際にデバイスの置かれている位置における発生収差を求め、より最適なデバイス設計を行なう必要があるだろう。

次に、透過型収差補正デバイスの今後の展望について述べる。2.3.3 節で述べたように、神経回路の 3 次元的なつながり(コネクトーム)を明らかにするために、蛍光タンパク質等の蛍光を維持したまま組織を透明化し、大量の連続切片を作成して再構成するという作業を不要とする手法が提案されている。しかし、光の透過率が向上するに従い透徹剤の屈折率は高くなり、収差による深部での画質劣化が大きくなる。2.4.4 節で示したように、透過型収差補正デバイスは透徹剤によって高屈折率になった生体試料の画質を改善しており、コネクトームの進捗に貢献することが期待できる。また、近年、STED、SIM、PALM 顕微鏡などの超解像顕微鏡の発展により、画質の高解像度化は大きく改善している。しかし、これら超解像顕微鏡においても、深部観察の際は生体試料中の屈折率分布によって収差が発生し、画質が劣化することがある。本透過型デバイスはこれら超解像顕微鏡にも応用でき、試料中の観察領域に因らずに高分解能な画質を実現できる可能性がある。次に、光シート顕微鏡はシート状の励起光を試料側面から照射し光学断面像を取得する蛍光顕微鏡であり、低褪色・低光毒性・高速性といった利点を有する。しかし、試料側面から試料中の所望の位置にシート光を形成するとき、収差によってその波面が乱れてしまうことがあり、本透過型デバイスによるシート光への収差補正効果が期待できる。また、光治療や光操作などの物体深部への集光が必要とされる分野で本透過型デバイスの応

用が期待できる。本研究で培った収差補正技術は様々な分野に応用できるだろう。例えば、レーザー走査型顕微鏡と同様の光学系を持つ OCT (optical coherence tomography) やレーザー加工装置においても、今後高分解能化が進むに従い収差補正が必要になることが予想され、本デバイスの応用が期待できる。

本透過型デバイスは、生体試料深部における蛍光イメージングに加え、多様な非線形光学顕微鏡によるマルチモーダルなイメージングにおいても高分解能化を可能とすると考えられる。従って、生体中での新たな生命現象の分子基盤に関する知見や、特定の臓器や部位の構造に関して、より正確な情報を取得することを実現できる。さらに本透過型デバイスを用いた収差補正技術は、生体深部での光操作・光刺激やオプトジェネティクスへの応用も期待できるため、生命科学や基礎医学、光治療、病理検査などの領域に貢献できると考える。今後はデバイスの性能・操作性の向上を目指すと共に、様々な領域・アプリケーションや試料に対してデバイスの有効性を検証したい。

謝辞

本研究は2014年4月より2017年3月にかけて、北海道大学大学院情報科学研究科生命人間情報科学専攻脳機能工学研究室において行われました。

本論文をまとめるにあたり、本研究の全般にわたりご指導、ご教鞭を賜りました根本知己教授に深く感謝いたします。

本論文執筆にあたり、有益なご指導、ご助言を賜りました北海道大学電子科学研究所の日比輝正特任講師に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、貴重な御助言を頂きました東北大学多元物質科学研究所の佐藤俊一教授、小澤祐市准教授、北海道大学電子科学研究所の川上良介助教、飯島光一朗特任助教、大友康平助教に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、様々なご配慮、ご助言を賜りましたシチズン時計株式会社の松本健志氏、横山正史氏、栗原誠氏、橋本信幸博士に厚く御礼申し上げます。

社会人ドクターコース進学への理解と支援を頂いたシチズン時計株式会社に感謝の意を表します。

平素より様々なご配慮とご協力を賜りました脳機能工学研究室の皆様方に厚く御礼申し上げます。

最後に、脳機能工学研究室の皆様、今後の多岐にわたるご活躍をお祈りし、謝辞とさせていただきます。

研究業績

1. 主著学術論文

1.1 論文(学位論文関係)

- [1] [A. Tanabe](#), T. Hibi, S. Ipponjima, K. Matsumoto, M. Yokoyama, M. Kurihara, N. Hashimoto, T. Nemoto, “Correcting spherical aberrations in a biospecimen using a transmissive liquid crystal device in two-photon excitation laser scanning microscopy,” *J. Biomed. Opt.* **20**(10), 101204 (2015) [doi: 10.1117/1.JBO.20.10.101204] (IF: 2.603, TC: 2).
- [2] [A. Tanabe](#), T. Hibi, S. Ipponjima, K. Matsumoto, M. Yokoyama, M. Kurihara, N. Hashimoto, T. Nemoto, “Transmissive liquid-crystal device for correcting primary coma aberration and astigmatism in biospecimen in two-photon excitation laser scanning microscopy” *J. Biomed. Opt.* **21**(12), 121503 (2016) [doi:10.1117/1.JBO.21.12.121503] (IF: 2.603).

1.2 査読付国際会議プロシーディング

- [1] [A. Tanabe](#), T. Hibi, S. Ipponjima, K. Matsumoto, M. Yokoyama, M. Kurihara, N. Hashimoto, T. Nemoto, “Transmissive liquid crystal device correcting the spherical aberrations in laser scanning microscopy,” in Adaptive Optics and Wavefront Control for Biological Systems, T. G. Bifano *et. al.*, Ed., *Proc. SPIE* **9335**, 933502 (2015) [doi: 10.1117/12.2076342].
- [2] [A. Tanabe](#), T. Hibi, S. Ipponjima, K. Matsumoto, M. Yokoyama, M. Kurihara, N. Hashimoto, T. Nemoto, “Transmissive liquid-crystal device correcting primary coma aberration and astigmatism in laser scanning microscopy,” in Adaptive Optics and Wavefront Control for Biological Systems II, T. G. Bifano *et. al.*, Ed., *Proc. SPIE* **9717**, 97171N (2016) [doi: 10.1117/12.2209459].

2. 講演(学位論文関係)

- [1] 田辺綾乃, 日比輝正, 一本嶋佐理, 松本健志, 横山正史, 栗原誠, 橋本信幸, 根本知己, 「透過型液晶収差補正素子の開発と生体組織標本への応用」, 日本光学会年次学術講演会 Optics & Photonics Japan 2015、2015年10月28-30日
- [2] (招待講演) A. Tanabe, T. Hibi, S. Ipponjima, K. Matsumoto, M. Yokoyama, M. Kurihara, N. Hashimoto, T. Nemoto, “Correcting spherical aberration using a transmissive liquid crystal device in two-photon excitation laser scanning microscopy”, 第39回日本神経科学学会大会、パフィシコ横浜(神奈川県横浜市), 2016年7月21日
- [3] (招待講演) A. Tanabe, T. Hibi, S. Ipponjima, K. Matsumoto, M. Yokoyama, M. Kurihara, N. Hashimoto, T. Nemoto, “Correcting wavefront aberration using a transmissive liquid crystal device in two-photon excitation laser scanning microscopy”, The Sixth Japan-Korea workshop on digital holography and information photonics, 2016 Dec. 21

3. 特許

- [1] 田辺綾乃, 松本健志、横山正史、橋本信幸、栗原誠、根本知己、日比輝正、一本嶋佐理、”光変調素子”, シチズンホールディングス株式会社, WO2015093223A1, 2015.

4. 報道等

- [1] SPIE ジャパンニュースに掲載(2016年9月1日)

参考文献

1. Goodman, J.W., "フーリエ光学," 3 ed. 2012, 東京: 森北出版. p. 93-120.
2. 谷田貝豊彦, "光とフーリエ変換," 1992, 東京: 朝倉書店. p. 88-101.
3. Denk, W., J.H. Strickler, and W.W. Webb, "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy," *Science*, 1990. **248**(4951): p. 73-76.
4. Trachtenberg, J.T., *et. al.*, "Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex," *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 788-794.
5. Grutzendler, J., N. Kasthuri, and W.B. Gan, "Long-term dendritic spine stability in the adult cortex," *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 812-816.
6. Kawakami, R., *et. al.*, "Visualizing hippocampal neurons with in vivo two-photon microscopy using a 1030 nm picosecond pulse laser," *Sci. Rep.*, 2013. **3**: p. 1014.
7. Laperchia, C., *et. al.*, "Two-photon microscopy imaging of thy1GFP-M transgenic mice: a novel animal model to investigate brain dendritic cell subsets in vivo," *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e56144.
8. Gibson, S.F. and F. Lanni, "Experimental test of an analytical model of aberration in an oil-immersion objective lens used in three-dimensional light microscopy," *J. Opt. Soc. Am. A*, 1992. **9**(1): p. 154-166.
9. Hell, S., *et. al.*, "Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index," *J. Microsc.*, 1993. **169**(3): p. 391-405.
10. Sheppard, C.J., *et. al.*, "Influence of spherical aberration on axial imaging of confocal reflection microscopy," *Appl. Opt.*, 1994. **33**(4): p. 616-624.
11. Booth, M.J., M.A.A. Neil, and T. Wilson, "Aberration correction for confocal imaging in refractive-index-mismatched media," *J. Microsc.*, 1998. **192**(Pt 2): p. 90-98.
12. Wan, D.S., M. Rajadhyaksha, and R.H. Webb, "Analysis of spherical aberration of a water immersion objective: application to specimens with refractive indices 1.33-1.40," *J. Microsc.*, 2000. **197**(Pt 3): p.

- 274-284.
13. Arimoto, R. and J.M. Murray, "A common aberration with water-immersion objective lenses," *J. Microsc.*, 2004. **216**(Pt 1): p. 49-51.
 14. Rueckel, M., J.A. Mack-Bucher, and W. Denk, "Adaptive wavefront correction in two-photon microscopy using coherence-gated wavefront sensing," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2006. **103**(46): p. 17137-17142.
 15. Aviles-Espinosa, R., *et. al.*, "Measurement and correction of in vivo sample aberrations employing a nonlinear guide-star in two-photon excited fluorescence microscopy," *Biomed. Opt. Express*, 2011. **2**(11): p. 3135-3149.
 16. Tao, X., *et. al.*, "Live imaging using adaptive optics with fluorescent protein guide-stars," *Opt. Express*, 2012. **20**(14): p. 15969-15982.
 17. Sherman, L., *et. al.*, "Adaptive correction of depth-induced aberrations in multiphoton scanning microscopy using a deformable mirror," *J. Microsc.*, 2002. **206**(Pt 1): p. 65-71.
 18. Marsh, P., D. Burns, and J. Girkin, "Practical implementation of adaptive optics in multiphoton microscopy," *Opt. Express*, 2003. **11**(10): p. 1123-1130.
 19. Ji, N., D.E. Milkie, and E. Betzig, "Adaptive optics via pupil segmentation for high-resolution imaging in biological tissues," *Nat. Methods*, 2010. **7**(2): p. 141-147.
 20. Kner, P., *et. al.*, "High-resolution wide-field microscopy with adaptive optics for spherical aberration correction and motionless focusing," *J. Microsc.*, 2010. **237**(2): p. 136-147.
 21. Wang, K., *et. al.*, "Rapid adaptive optical recovery of optimal resolution over large volumes," *Nat. Methods*, 2014. **11**(6): p. 625-628.
 22. Matsumoto, N., *et. al.*, "Correction of depth-induced spherical aberration for deep observation using two-photon excitation fluorescence microscopy with spatial light modulator," *Biomed. Opt. Express*, 2015. **6**(7): p. 2575-2587.
 23. Born, M. and E. Wolf, "光学の原理," 4th ed. 1975, 東京: 東海大学出版会. p. 685-732.
 24. Wyant, J.C. and K. Creath, "Basic Wavefront Aberration Theory for Optical Metrology, in Applied Optics and Optical Engineering," R.R. Shannon and J.C. Wyant, Editors. 1992, Academic Press: New York. p.

- 28-39.
25. Babcock, H., "The possibility of compensating astronomical seeing," *Publ. Astron. Soc. Pac.*, 1953. **65**: p. 229-236.
 26. 早野裕, "天文学をサポートする情報新技術," 『情報処理』, 情報処理学会, 2004. p. 1239-1244.
 27. 一ノ瀬祐治, "補償光学の原理とその応用," 『光学』, 日本光学会, 1995. p. 718-724.
 28. Neil, M.A., *et. al.*, "Adaptive aberration correction in a two-photon microscope", *J. Microsc.*, 2000. **200 (Pt 2)**: p. 105-108.
 29. Girkin, J.M., "Implementation of Adaptive Optics in Nolinear Microscopy for Biological Samples Using Optimization Algorithms, in Adaptive Optics for Biological Imaging", J.A. Kubby, Editor. 2013, CRC Press: Boca Raton. p. 191-207.
 30. Booth, M.J., "Sensorless Adaptive Optics for Microscopy, in Adaptive Optics for Biological Imaging", J.A. Kubby, Editor. 2013, CRC Press: Boca Raton. p. 177-189.
 31. 松爲久美子, *et. al.*, "補償光学素子の設定方法及び顕微鏡", ニコン, 特開 2015-31812.
 32. 佐瀬一郎, *et. al.*, "補償光学素子の設定方法及び顕微鏡", ニコン, 特開 2015-31813.
 33. Zhou, Y., "AO two-photon Fluorescence Microscopy Using Stochastic Parallel Descent Algorithm with Zernike Polynomials Basis, in Adaptive Optics for Biological Imaging," J.A. Kubby, Editor. 2013, CRC Press. p. 209-229.
 34. Hashimoto, N., "Electro holography and active optics", in *Optical applications of liquid crystals*, L. Vicari, Editor. 2003, Institute of Physics Publishing: Bristol.
 35. 佐藤進, "液晶の世界," 4 ed. 1994, 東京: 産業図書株式会社.
 36. Transmissive Spatial Light Modulator. [cited 2016 October 31]; Available from: <http://www.meadowlark.com/transmissive-spatial-light-modulator-p-103?mid=16#.WBK6G9KLQdU>.
 37. Spatial Light Modulator (transmissive). [cited 2016 October 31]; Available from: <http://holoeye.com/spatial-light-modulators/lc-2012-spatial-light-modulator/>.

38. Xiao, P.F., M.Boccara, A. C. "An optical tomography PSF almost insensitive to aberrations: the benefit of a spatial incoherent illumination," in *Proc. SPIE*. 2016, **9717**, 971701.
39. Ohtaki, S., *et. al.*, "The applications of a Liquid Crystal Panel for the 15 Gbyte Optical Disk System," *Jpn. J. Appl. Phys.*, 1999. **38**: p. 1744-1749.
40. 橋本信幸, "液晶による波面補正素子とその応用," 『光学』, 日本光学会, 2007. p. 149-153.
41. Kozawa, Y., *et. al.*, "Lateral resolution enhancement of laser scanning microscopy by a higher-order radially polarized mode beam," *Opt. Express*, 2011. **19**(17): p. 15947-15954.
42. Brooker, G., *et. al.*, "In-line FINCH super resolution digital holographic fluorescence microscopy using a high efficiency transmission liquid crystal GRIN lens". *Opt. Lett.*, 2013. **38**(24): p. 5264-5267.
43. Ipponjima, S., *et. al.*, "Improvement of lateral resolution and extension of depth of field in two-photon microscopy by a higher-order radially polarized beam," *Microscopy (Oxf)*, 2014. **63**(1): p. 23-32.
44. Otomo, K., *et. al.*, "Two-photon excitation STED microscopy by utilizing transmissive liquid crystal devices," *Opt. Express*, 2014. **22**(23): p. 28215-28221.
45. Staudt, T., *et. al.*, "2,2'-thiodiethanol: a new water soluble mounting medium for high resolution optical microscopy," *Microsc. Res. Tech.*, 2007. **70**(1): p. 1-9.
46. Hama, H., *et. al.*, "Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain," *Nat. Neurosci.*, 2011. **14**(11): p. 1481-1488.
47. Aoyagi, Y., *et. al.*, "A rapid optical clearing protocol using 2,2'-thiodiethanol for microscopic observation of fixed mouse brain," *PLoS One*, 2015. **10**(1): p. e0116280.
48. Braat, J., "Analytical expressions for the wave-front aberration coefficients of a tilted plane-parallel plate," *Appl. Opt.*, 1997. **36**(32): p. 8459-8467.
49. Stallanga, S., "Compact description of substrate-related aberrations in high numerical-aperture optical disk readout," *Appl. Opt.*, 2005. **44**(6): p. 849-858.

50. 田辺綾乃, *et. al.*, "光変調素子", シチズンホールディングス株式会社, WO2015093223A1.
51. Feng, G., *et. al.*, "Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP," *Neuron*, 2000. **28**(1): p. 41-51.
52. Schwertner, M., *et. al.*, "Measurement of specimen-induced aberrations of biological samples using phase stepping interferometry," *J. Microsc.*, 2004. **213**(Pt 1): p. 11-19.
53. motCORR Objectives. [cited 2016 October 31]; Available from: <http://www.leica-microsystems.com/products/confocal-microscopes/details/product/leica-motcorr/>.