

デュアル光コム・ビートを用いたスキャンレス・フルフィールド共焦点蛍光顕微鏡の開発

Development of Scan-less Full-field Fluorescence Microscope using Dual Optical Comb Beat

研究代表者 徳島大学大学院社会産業理工学研究部 特任研究員 水野孝彦

Takahiko Mizuno

共同研究者 徳島大学社会産業理工学研究部 教授 安井武史

Takeshi Yasui

We propose scan-less fluorescence imaging performed with a combination of dual-comb optical beating and a 2D spectral disperser (2D-SD). Dual-optical combs with slightly different frequency spacing generate dense optical beats in the RF region (dual-comb beating). The frequency of dual-comb beating is dependent on wavelength, therefore the dual-comb beating gets one to one correspondent relation of a unique beat frequency and a position on the sample by 2D mapping using 2D-SD. The fluorescence excited by 2D-mapped beats is modulated by the same frequency of each beat. Accordingly, 2D fluorescence images can be reconstructed from RF spectrum of frequency multiplexed fluorescence signals. On the sample plane, the dual-comb beating excitation composes spatially discrete excitation spots which are identifiable by beating frequency. Therefore, it is enables us to get a confocal fluorescence image without laser-spot scanning by put a pinhole array on conjugate plane of each excitation spots. In this work, the basis of scan-less fluorescence imaging method using on dual-comb beating excitation was developed. For proof of principle, the imaging set-up was constructed in the wave length ranges are both of 780nm and 520nm region. And fluorescence images of test chart were acquired.

要旨

デュアル光コムの干渉ビートを用いた蛍光顕微鏡法を開発した。繰り返し周波数がわずかに異なる2つの光コムを干渉させることで、RF領域に高密度なデュアル光コム・ビートが得られる。このビート周波数は干渉し合う波長に依存し、2次元波長分散素子で光コムの発振モードを展開することで、ビート周波数と位置が1対1に対応した励起スポット群が得られる。このような励起光を用いると、得られる蛍光も同じ周波数で変調される。したがって、蛍光を点型検出器で一括取得した後に周波数分解することで、画像を再構成することができる。ここで、試料面上には、離散的に分離した励起スポット群が展開される。したがって、各励起スポットの共役面上にピンホールアレイを配置することで、レーザースポット走査なしで共焦点蛍光画像を得ることが可能になると考えられる。本研究では、デュアル光コム・ビート励起を

用いたスキャンレス蛍光イメージング法の基礎を開発し、その原理検証を実験的に行った。

1. 緒言

生物学的試料は通常マイクロメートルオーダーの厚さを有し、深さ方向に構造を有する。このような試料を結像撮像するにあたり、結像面以外からの迷光が無視できず、コントラストが低下する。より明瞭な画像撮像を必要とする場合、結像面のみに限定した撮像を可能とする共焦点蛍光レーザー走査型顕微鏡(CFLM; confocal fluorescence laser scanning microscopy)が広く用いられている。CFLMはレーザーを用いて試料上の一点を励起し、共役な位置に共焦点ピンホールを置くことで、エアリーディスクのサイズによって制限された画像を取得する。しかしながら、CFLMは2次元画像を得るために励起点および観察点の機械的走査が必要であるため、最大フレームレートを制限していた。

共振ガルバノミラーを用いた高速走査や、マイクロレンズアレイとピンホールアレイを用いた多点走査を行うことで高速化が可能になる^(1,2)。しかし、これらの機械的な走査機構は振動などの外乱に弱く、光学定盤等の安定な計測環境が必要であった。このような現状から、機械的走査機構を不要とすることで、高速計測が可能かつ環境外乱にロバストな CFLM が強く望まれている。

近年、CFLM の機械的走査を省略する興味深いアプローチとして、FIRE 法(Fluorescence imaging by radiofrequency-tagged emission)^(3,4)が報告されている。この手法は励起光として、AOM (acousto-optic modulator)を用いた光周波数変調を基礎としたデジタル合成光ビートを用いる。デジタル合成光ビートによって、位置依存の異なる光ビート周波数を有する 1 次元(ライン)照明を形成させ試料に照明する。発生した全蛍光信号はスリットにより共焦点性を付与した後、点型光検出器で取り込み、RF 領域の多重化信号群からラインイメージを再構築する。これにより、機械的走査を必要とすることなくラインイメージの取得が可能になる。しかし、2 次元イメージの取得ではデジタル合成光ビートの多重化密度が不足し、ラインイメージと直交する方向に機械的走査をする必要があった。光ビートの多重化密度を大幅に向上した上で 2 次元展開できれば、2 次元イメージの同時取得(フルフィールドイメージング)が見込めるがまだ実現されていない。

FIRE 法を 2 次元に拡張するためには、周波数多重化密度を 2 次元イメージ画素数レベルまで大幅に増大した上で、焦点群を 2 次元展開する必要がある。そこで本研究では、光周波数コム(光コム)⁽⁵⁾が有する超高密度なマルチ・スペクトル構造の利用に着目した。光コムは、膨大な数の光周波数モード(コム・モード)が櫛歯状(コム)で正確に並んでおり、さらに RF 周波数標準に同期させることができる。この正確性を利用して、従来は周波数標準にトレーサブルな『光周波数の物差し』として分光計測や距離計測に応用されてきた⁽⁶⁾。ここで本研究では視点を変えて、光コムを『圧倒的多数の離散チャンネルを有する光キャリア』として捉え、2 次元蛍光イメージング応用を図った。コム・モードの各々を画素に割り当てることで、2 次元イメージングに十分な数の多重化密度が得られる。

デュアル光コム干渉によってコム・モード毎に固有の RF ビートを付与した後、波長/2 次元空間変換^(7,8)を導入する。これによって、位置依存のビート周波数を有した励起スポット群を 2 次元フルフィールドに展開することが可能になる。得られた全蛍光を一括検出した後、RF 多重化蛍光信号からフルフィールドイメージを再構築する。共焦点性は、ピンホールアレイを蛍光結像面に設置することで付与できる。

以上の手順に基づき、本研究では、デュアル光コム・ビート励起を用いたフルフィールドスキャンレス蛍光イメージング法の原理を開発した。実際に 2 台の Er ファイバー光コムで発生させた 1550 nm 光コムを波長変換し、780nm 帯光コムと 520nm 帯光コムを光源として用い、フルフィールドイメージングの原理検証実験を行った。

2. 測定原理

2.1 デュアル光コム・ビート

図 1 に、典型的な光コムのスペクトル波形を示す。光コムとして、一般的にフェムト秒レーザーが用いられ、特に光周波数安定性と制御性に優れたファイバーレーザーが良く利用される。図 1 に示すように、光コムは多数の安定なコム・モードが繰返し周波数(f_{rep})間隔で規則的に並んだ超離散マルチ・スペクトル構造を示し、位相同期した数万台以上の波長安定化 CW レーザー光が等間隔で並んだ集合体と見なせる。さらに、RF 周波数標準に同期制御することで、 10^6 Hz を切る高い光周波数の正確さを付与することができる。

図 2 に、デュアル光コム・ビートの生成概念を示す。2 台のフェムト秒レーザー(光コム 1、光コム 2)では、光コム 1 の繰返し周波数 f_{rep1} に対して、周波数間隔の僅かに異なる光コム 2(繰返し周波数 f_{rep2})を生成する。これらを空間的に重ねると、両者の多周波ヘテロダイナミクスにより、隣接したモード間で生成されたデュアル光コム・ビート(コム間隔 $\Delta f_{rep} = f_{rep2} - f_{rep1}$)が RF 周波数帯に生成される(図

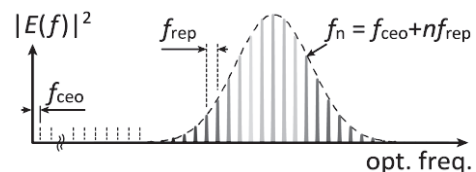


図 1 典型的な光コムのスペクトル波形

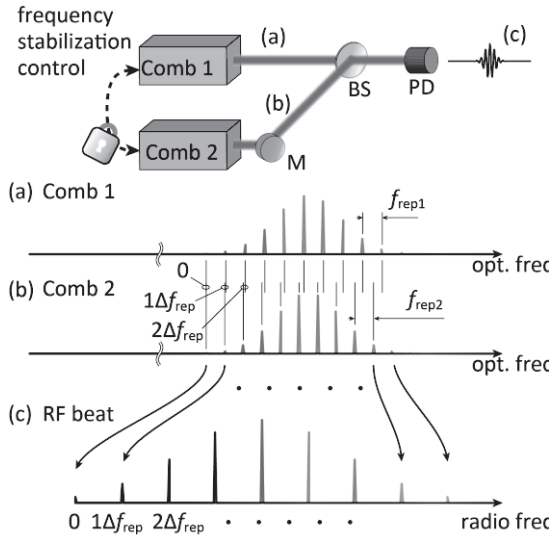


図2 デュアル光コム・ビートの生成法

6). このデュアル光コム・ビートは、コム間隔が f_{rep1} から Δf_{rep} にダウンスケーリングされた光コム 1 のレプリカである。したがって、回折格子などを用いて分光すると、位置毎に異なるビート周波数を持った光源として利用できる。

2.2 2D 波長分散系

イメージング応用のために、光周波数領域においてコム・モード間隔がサブ GHz の光コムを、視野全体に十分な分解能で空間展開できる波長/2次元(2D)空間変換法が必要となる。本研究では、VIPA(virtually imaged phase array)と回折格子を組み合わせた 2D 波長分散系(2D-SD; 2D spectral disperser)^(7,8)を利用した。図 3 に、VIPA 回折格子対を利用した 2D 波長分散系を示す。VIPA はファブリペローエタロンの一種であり、入射光を FSR(free spectral range)周期毎に異なる角度で、サブ GHz の分解能で分散させる。回折格子によってさらに直行する方向に分散させることで、光コムが持つ高い光周波数分解能を有効に利用した波長/2D 空間変換が実現できる。

2.3 デュアル光コム・ビートと 2D-SD を用いた蛍光イメージング法

図 4(a)に、デュアル光コム・ビートと 2D-SD を用いた蛍光イメージング法の概念図を示す。繰返し周波数を僅かにずらした 2 台の光コムを空間的に重ね、図 4(b)に示すようにコム・モード毎に固有のビートを付与する。これを 2D-SD に導入することで、コム・モードを 2D 空間に展開する。これ

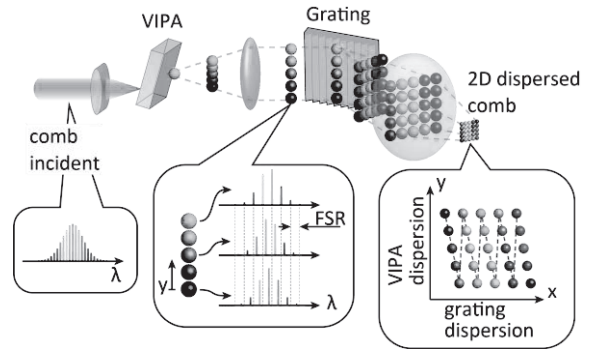


図3 2次元波長分散系によるコム・モード分解

を蛍光顕微鏡によって、試料上に結像投影する。このとき図 4(c)に示すように、各々のコム・モードが形成する励起焦点スポットでは、光コム 1 と光コム 2 がオーバーラップする部分において、位置に対応したビート周波数が得られる。これにより、位置とデュアル光コム・ビート周波数が 1 対 1 に対応する。試料からの蛍光は、励起光と同じ周波数で変調されるため、位置毎に固有の周波数で変調された蛍光が得られる。観察視野全体の蛍光を一括検出し周波数分解することで、フルフィールド蛍光イメージを再構成できる。本手法のフレームレートは、全焦点スポットの変調周波数を分解するための周波数分解能によって決まる。変調周波数は Δf_{rep} 毎に分布している事から、全ピクセルを十分分解する場合、最大フレームレートは Δf_{rep} と等しい。一般的なサブ GHz 光コムを用いてサブメガピクセルの画像取得を行う場合、理想的にはキロフレーム/秒オーダーの高速イメージングが期待できる。

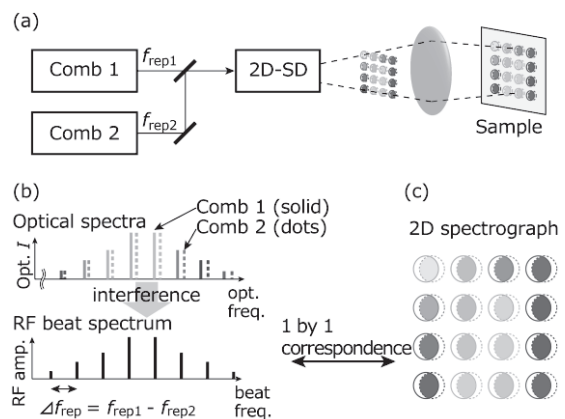


図4 (a)デュアル光コム・ビートと 2D-SD を用いた蛍光イメージングの装置模式図, (b)光コム・モードとビート周波数の対応関係, (c)試料面上における励起スポット群

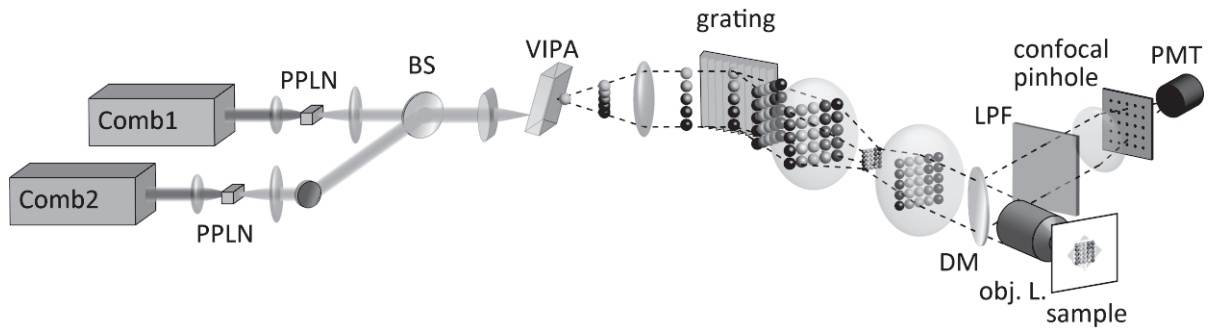


図5 デュアル光コム・ビートと2D-SDを用いた蛍光顕微鏡光学系

3. 装置構成

3.1 イメージング装置の構成

図5に、デュアル光コム・ビートと2D-SDを用いた蛍光顕微鏡の光学系を示す。励起光源として、2台の自作Erファイバー光コム($\lambda_{c1} = \lambda_{c2} = 1560$ nm, $\Delta\lambda_1 = \Delta\lambda_2 = 15$ nm, $P_1 = 132$ mW, $P_2 = 164$ mW, $f_{rep1} = 100.386960$ MHz, $f_{rep2} = 100.385982$ MHz, $\Delta f_{rep} = 978$ Hz, $f_{ceo} = 21.4$ MHz)を使用した。各光コムは、PPLNを用いて波長変換した。波長変換において、光コム1と光コム2の相互相関周波数発生を避けるために、それぞれの光コムを独立して波長変換した後に合波した。PPLNによる発生波長は、1560nm帯のSHGに相当する780nm帯と、THGに相当する520nm帯に変換した。各コムをビームスプリッターで重ね合わせた後、VIPAと回折格子から構成される2次元波長分散系によって2次元空間に展開した。その後、対物レンズによりサンプル上に投影した。サンプルからの蛍光は、ダイクロイックミラーと蛍光フィルターによって波長選択の後に光電子増倍管(H11901-20, 浜松ホトニクス)で検出し、その時間波形を高速デジタル化によってPC上に記録した。記録した波形からデュアル光コム分光法に基づきRFスペクトルを求め、画像を再構成した。最大フレームレートは2台の光コム光源の繰返し周波数 Δf_{rep} となり、したがって $1/\Delta f_{rep} = 0.98$ msまで高速化が可能である。また、蛍光検出系に共焦点ピンホールアレイを設置することで共焦点蛍光イメージングが実現できるが、今回はイメージングの原理検証を行う目的でピンホールアレイは省略している。

3.2 光コム光源の特性評価

光コム光源の特性評価として、光源スペクトルおよびパルス幅を評価した。図6(a)に基本発振波長である1560nm帯光コムのスペクトル、図6(b)

にオートコリレータで取得した自己相関パルスを示す。スペクトルは波長1560nmを中心とし1530nmから1610nmに発振を有し、そのパルス幅は100fs以下に圧縮されている。

図7(a)にPPLNによる波長変換で得られた780nm帯スペクトル、および図7(b)に520nm帯スペクトルを示す。ここで780nm帯と520nm帯の生成において、それぞれで適したPPLN(HC photonics社製、それぞれカスタム品)を選定して利用した。780nm帯光コムの中心波長とスペクトル幅は、光コム1において 781 ± 2.8 nm, 光コム2において 779 ± 3.4 nmであった。また、積分強度は光コム1において1.0 mW, 光コム2において1.2 mWであった。同様に520nm帯光コムにおいては、中心波長とスペクトル幅は 520 ± 2.5 nm, 521 ± 3.7 nm, 積分強度は6.5 mW, および8.3 mWであった。光コム間隔は100.385982 MHzであるので、780nm

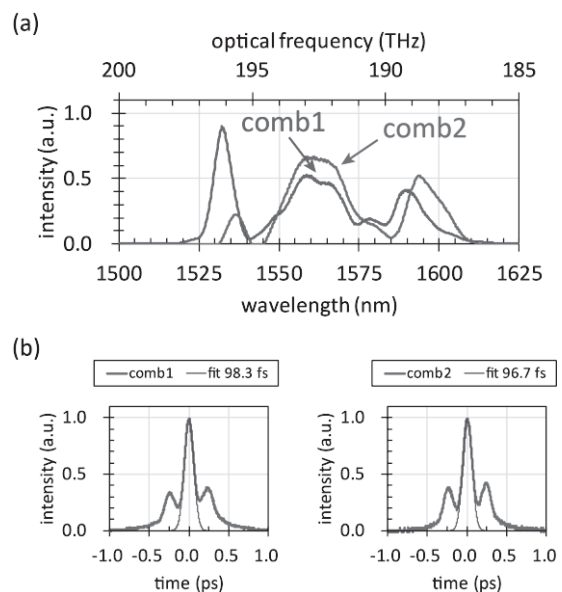


図6 (a)1560nm帯光コムスペクトル, (b)1560nm帯光コムの自己相関パルス波形。

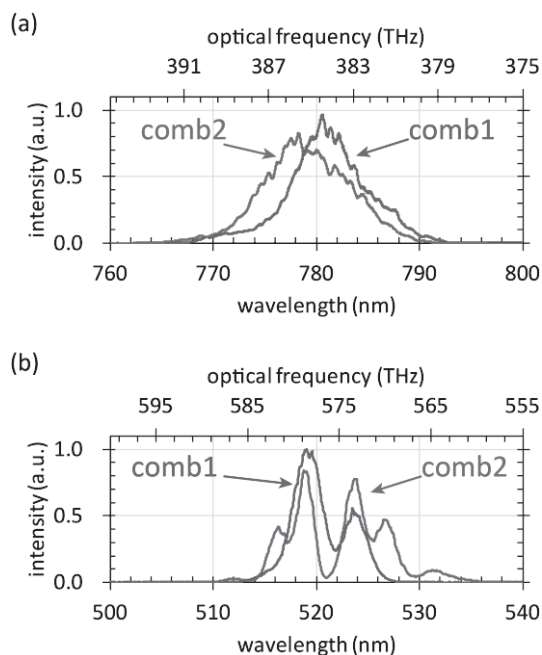


図7 (a)780 nm 帯光コムスペクトル, (b)520 nm 帯光コムスペクトル.

帯では約 20,000 モードが利用でき, また 520 nm 帯では約 50,000 モードが利用できる.

3.3 試料平面上における励起光ビート分布

試料平面上において形成される, 励起光のビート分布の評価を行った. ここでは, 520nm 帯光コムを用いて, 図 8(a)に示すように試料平面上に光ファイバー(SMF-28e, コア径 10 μm , Corning Co.)を設置し, 視野左上部分(i)と視野右下部分(ii)のそれぞれにおける励起光を取得した. 図 8(b)に, 光スペアナによって取得した(i)および(ii)部の光スペクトルを示す. このように, それぞれの位置における中心波長は 519.3 nm, および 522.7 nm が得られた. 図 8(c)に, それぞれの位置において高速光検出器とオシロスコープを用いて得られた光ビートの時間波形を示す. このように, 明確な周波数の差異が得られた. 図 8(d)は, ビート時間波形をフーリエ変換することによって得た振幅スペクトルである. このように, RF 領域において位置に依存したビート周波数が得られていることがわかる.

4. イメージング結果と考察

4.1 励起光による反射イメージング

イメージングの原理検証として, まず励起光による反射イメージングを行った. 光源は 780nm 帯光コムを用い, 波長に最適化した VIPA (FSR =

60GHz, 波長範囲=725nm-875nm, finesse \sim 72, OP-6721-1686-4, Lightmachinery Inc.)と回折格子(1200 lp/mm, プレーズ波長 750 nm, GR25-1208, thorlabs co.)を利用した. 試料は顕微鏡用ネガ型テストターゲット(1951USAF ターゲット, #55-622, Edmund Optics Inc.)を用いた. 反射光を取得するために, 蛍光検出用ダイクロイックミラーはハーフミラーに取り替え, 蛍光フィルターは挿入せずに測定を行った. なお, 画像の信号ノイズ比(SNR)を向上するために, 10 回の信号平均を行った. 図 9(a)に, 測定により得られた時系列干渉波形を示す. このように, VIPA の FSR 周期に一致した微細構造が確認できる. 図 9(b)に, 時系列波形をフーリエ変換することによって得た振幅スペクトルを示す. 試料構造を持ったスペクトルが得られている. 図 9(c)に, 振幅スペクトルを 2 次元に再配置することによって得た反射画像を示す. また図 9(d)に, 同軸に設置した CCD カメラによって得られた画像を示す. このように, 明瞭なテストターゲット構造が得られている. 以上の手順によって, 点型検

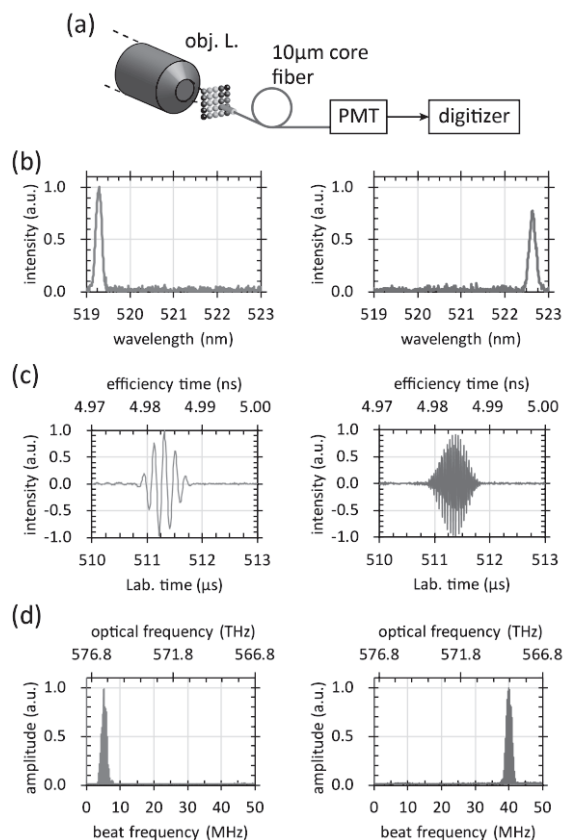


図8 (a)励起光ビート分布観察のセットアップ, (b)視野左上部分(i)および右下部分(ii)における光スペクトル, (c)それぞれの位置における光ビート時間波形, (d)ビート信号の振幅スペクトル.

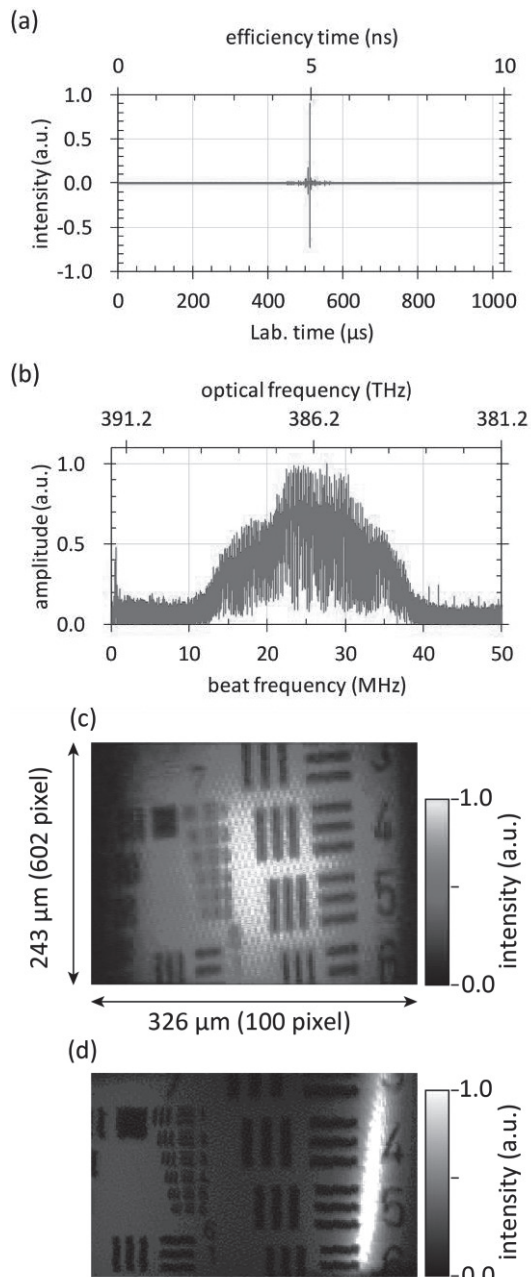


図9 (a)780nm 帯光コムを用いた反射光イメージングにおける時系列干渉波形, (b)反射光 RF 振幅スペクトル波形(c)振幅スペクトルから得た再構成画像, (d)CCD カメラの取得画像.

出器を用いたイメージング法の原理を確認した.

4.2 780nm 帯光コムを用いた近赤外蛍光サンプルの蛍光イメージング

測定試料として, インドシアニンググリーン水溶液と空間マスクを組み合わせたテスト用構造を作成した. インドシアニンググリーン水溶液は, 780 nm 付近に吸収極大を持つ近赤外蛍光試薬であり, 血管造影剤として広く用いられている. 図 10(a)に試

料の空間配置を示す. ネガ型テストターゲットを空間マスクとし, その後方にインドシアニンググリーン水溶液で満たしたチャンバーを設置した. 図 10(b)に時系列蛍光波形, 図 10 (c)に振幅スペクトル, (d)に再配置で得られた蛍光画像を示す. ここでは, 100,000 回の信号平均を行っている. ネガ型テストチャートを用いているため, 構造部分において励起光と蛍光が透過できる. したがって, 図 9(c)と逆のコントラストが得られている. しかし, SNR は良好とは言い難い. 要因として, インドシ

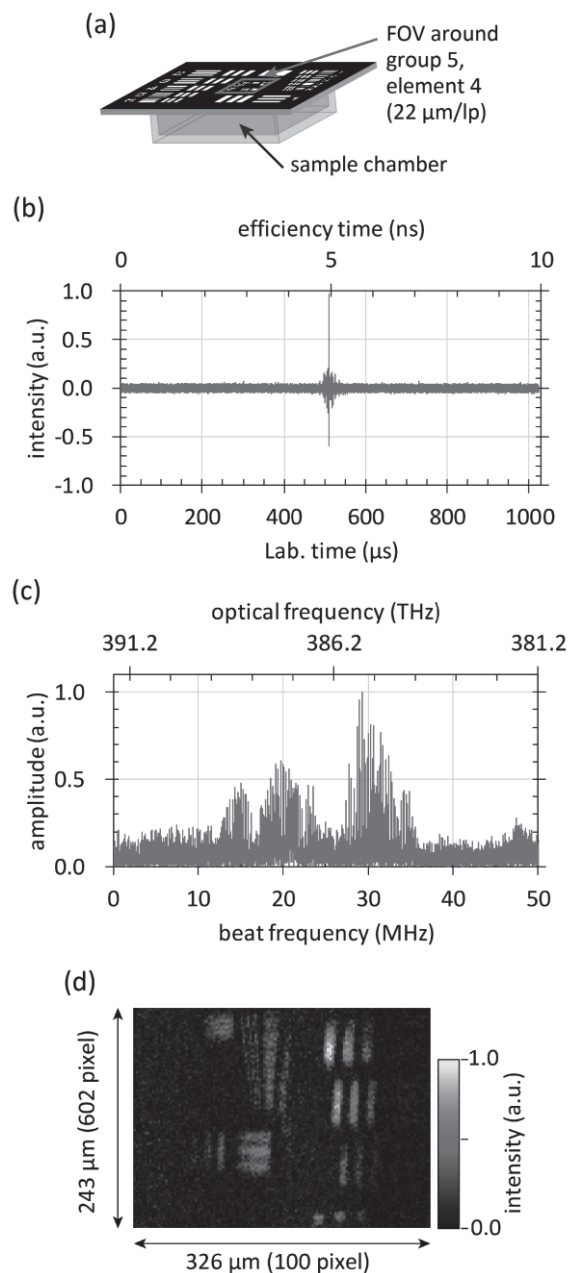


図 10 インドシアニンググリーン蛍光試料のイメージング. (a)試料の空間配置, (b)蛍光時系列波形, (c)蛍光 RF 振幅スペクトル, (d)再構成蛍光画像.

アニングリーン水溶液の蛍光量子収率が低いことと、検出器感度が低いことが挙げられる。SNRは、平均回数を大きくすることで改善できる。

4.3 520nm 帯光コムを用いた可視蛍光サンプルの蛍光イメージング

より高い検出器感度が望める 520 nm 帯において、蛍光イメージングの検証を行った。光源は 520 nm 帯光コムを用い、波長に最適化した VIPA (FSR = 14.8 GHz, 波長範囲=500 nm - 600 nm, finesse~65, OP-6721-6743-2, Lightmachinery Inc.)と回折格子 (1200 lp/mm, ブレーズ波長 500 nm, GR25-1205, thorlabs co.)を用いた。測定試料は、図 10(a)と同様に、300 μ M ローダミン 6G エタノール溶液と空間マスクを組み合わせたテスト用構造を作成した。図 11(a)に時系列蛍光波形、図 11 (b)に RF 振幅スペクトル、図 11(c)に再構成した蛍光画像を示す。蛍光信号は 100,000 回の平均(測定時間 100 秒)を行

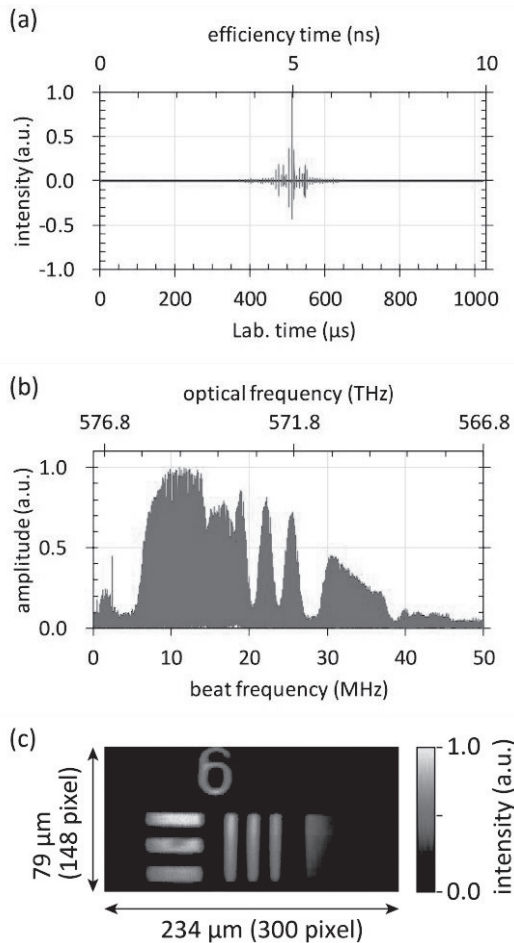


図 11 ローダミン 6G 蛍光試料のイメージング。(a)試料の空間配置、(b)蛍光時系列波形、(c)蛍光 RF 振幅スペクトル、(d)再構成蛍光画像。

った。図 10(d)と比較すると、明瞭なテストターゲット構造が得られている。これは、蛍光検出器として用いた光電子増倍管の感度が可視波長域で高く、かつインドシアニンググリーン水溶液に比べてローダミン 6G エタノール溶液は量子収率が高く、強い蛍光が得られるためである。一方でこの実験では、顕微鏡視野全体で 600 μ W の励起パワーを入力している。したがって、1 ピクセルあたりの励起パワーは 20 nW であり、一般的なレーザー走査型蛍光顕微鏡より大幅に弱い励起パワーで蛍光イメージの取得が行えている。より高い励起パワーを用いることで、画像取得時間を短くでき、高速で広視野の蛍光イメージング取得が望める。

4.4 イメージング SNR の比較

イメージング SNR と平均回数の関係を詳細に評価した。図 12(a)に平均回数毎の取得画像を、図 12(b)に平均回数に対するイメージング SNR の変化を示す。ここで、SNR は代表ピクセルにおける強度を複数回取得し、標準偏差に対する平均強度の比と定義した。図 12(b)から、SNR は平均回数 N に対して \sqrt{N} に比例して向上している。したがって、蛍光が弱いことに起因するショット雑音が支配的であることが示唆される。よりイメージング

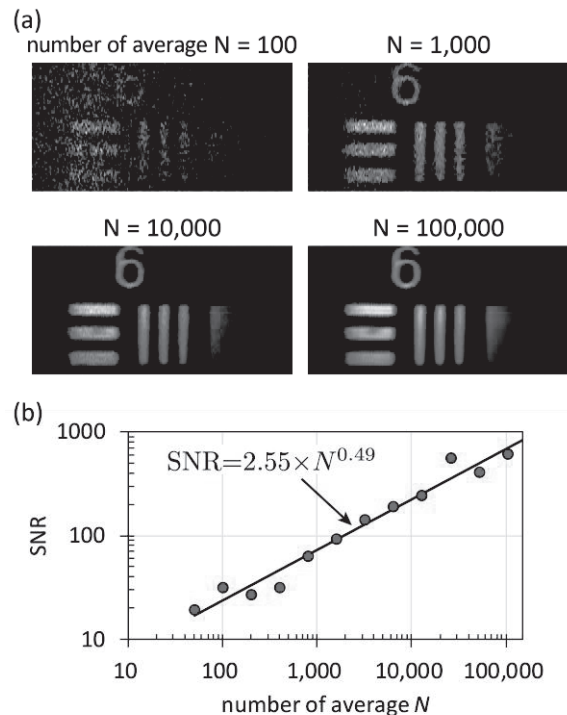


図 12 (a)平均回数毎の蛍光画像、(b)平均回数に対するイメージング SNR の変化。

SNR を向上させるためには、励起パワーを上げて蛍光信号量を増やす事が有効である。

5. 結言

デュアル光コム・ビート励起を用いたフルフィールドスキャンレス蛍光イメージング法の原理を開発した。実際に2台のErファイバー光コムで発生させた1550 nm光コムを波長変換し、780nm帯光コムと520nm帯光コムを光源として用い、イメージングの原理検証実験を行った。将来展望として、共焦点ピンホールアレイを設置することでスキャンレス広視野共焦点蛍光顕微鏡が期待できる。また、本研究では、蛍光RF信号の振幅スペクトルのみから蛍光強度画像を得た。さらに位相スペクトルを画像化することで新たに蛍光寿命画像が得られると考えられる。これにより、従来では長時間分解カメラを必要としていた蛍光寿命顕微鏡に新たな選択肢として期待できる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人マツダ財団より多大な支援を頂きました。ここに感謝の意を表します。

発表論文

- [1] 水野孝彦, 長谷栄治, 南川丈夫, 山本裕紹, 安井武史, 「デュアル光コム顕微鏡によるスキャンレス蛍光イメージング(2) ~520 nm 帯光コムによる蛍光イメージング~」, 第79回応用物理学会秋季学術講演会, 19p-438-11, 2018年9月.
- [2] 水野孝彦, 長谷栄治, 南川丈夫, 山本浩紹, 安井武史, 「デュアル光コム蛍光顕微鏡によるスキャンレス・フルフィールド蛍光イメージング法の開発」, 第41回日本生体医工学会中国四国支部大会, 2-3, 2018年10月.
- [3] ○水野孝彦, 長谷栄治, 南川丈夫, 山本裕紹, 安井武史, 「デュアル光コムビートの2次元周波数多重化ビームを用いた蛍光イメージング法の開発」, Optic & Photonics Japan 2018, 2aA5, 東京, 2018年11月.
- [4] ○T. Mizuno, E. Hase, T. Minamikawa, H. Yamamoto, and T. Yasui, "Scan-less fluorescence microscopy by combination of dual-comb optical beats and 2D spectral disperser", KEIO Symposium on Microresonator Frequency Comb, P2, Tokyo, Japan, December 2018.
- [5] ○T. Mizuno, E. Hase, T. Minamikawa, H. Yamamoto, and T. Yasui, "Scan-less fluorescence imaging using 2D frequency multiplexed illumination by dual-comb optical beat and 2D spectral disperser", BiOS2019 in Photonics West 2019, 10889-4, San Francisco, USA, February 2019.
- [6] ○水野孝彦, 長谷栄治, 南川丈夫, 山本裕紹, 安井武史, 「デュアル光コムビートと2次元周波数多重化によるスキャンレス全視野蛍光イメージング」, LED総合フォーラム2019 in 徳島, P-19, 徳島, 2019年2月.

[7] ○水野孝彦, 長谷栄治, 南川丈夫, 山本裕紹, 安井武史, 「デュアル光コム顕微鏡によるスキャンレス蛍光イメージング(3) ~ 蛍光イメージング SNR の改善 ~」, 第66回応用物理学会春季学術講演会, 11p-W935-4, 東京, 2019年3月.

[8] ○T. Mizuno, E. Hase, T. Minamikawa, H. Yamamoto, T. Yasui, "Scan-less Full-field Fluorescence Microscopy by using 2D Spectral Disperser and Dual-comb Optical Beats", OPTICS & PHOTONICS International Congress 2019, BISC-P-09, Kanagawa, Japan, April 2019.

参考文献

- (1) T. Tanaami, S. Otsuki, N. Tomosada, Y. Kosugi, M. Shimizu, and H. Ishida, "High-speed 1-frame/ms scanning confocal microscope with a microlens and Nipkow disks," Appl. Opt. **41**(22), pp. 4704-4708 (2002).
- (2) J. J. Art and M. B. Goodman, "Rapid Scanning Confocal Microscopy," Methods Cell Biol. **38**, pp. 47-77 (1993).
- (3) E. D. Diebold, B. W. Buckley, D. R. Gossett, and B. Jalali, "Digitally synthesized beat frequency multiplexing for sub-millisecond fluorescence microscopy," Nat. Photonics **7**, pp. 806-810 (2013).
- (4) H. Mikami, J. Harmon, H. Kobayashi, S. Hamad, Y. Wang, O. Iwata, K. Suzuki, T. Ito, Y. Aisaka, N. Kutsuna, K. Nagasawa, H. Watarai, Y. Ozeki, and K. Goda, "Ultrafast confocal fluorescence microscopy beyond the fluorescence lifetime limit," Optica **5**(2), pp. 117-126 (2018).
- (5) Th. Udem, R. Holzwarth, and T. W. Hänsch, "Optical frequency metrology," Nature **416**, pp. 233-237 (2002).
- (6) I. Coddington, N. Newbury, and W. Swann, "Dual-comb spectroscopy," Optica **3**(4), pp. 414-426 (2016).
- (7) S. Xiao, and A. M. Weiner, "2-D wavelength demultiplexer with potential for ≥ 1000 channels in the C-band," Opt. Express **12**(13), pp. 2895-2902 (2004).
- (8) K. Goda, K. K. Tsia, and B. Jalali, "Serial time-encoded amplified imaging for real-time observation of fast dynamic phenomena," Nature **458**, pp. 1145-1149 (2009).