

輪帯状位相板を用いた超解像顕微鏡の分解能評価

(NTT-AT^{*}、北里大学^{**}、ブダペスト工科大学^{***}、オリンパス^{****})

○永井宏明^{*}、奥哲^{*}、小平晃^{*}、熊谷寛^{**}、Nandor Bokor^{***}、池滝慶記^{**、****}

The consideration of the resolution of super-resolution microscopy with annular wave plate

(NTT-AT^{*}、Kitasato Univ.^{**}、Budapest Univ. of Technology and Economics^{***}、Olympus^{****})

○Koumei Nagai^{*}、Satoshi Oku^{*}、Akira Kodaira^{*}、

Hiroshi Kumagai^{**}、Nandor Bokor^{***}、Yoshinori Iketaki^{**、****}

【序】 蛍光抑制と波面制御光学系による超解像顕微鏡法(SRM)では、照明光として波長の異なる2色の光を用いる。第1のレーザー光(ポンプ光)で第1励起電子状態(S₁)へ遷移させた色素分子を第2のレーザー光(イレース光)で照射すると、誘導放出や誘導吸収が生じてS₁分子のポピュレーションが減少するので結果的に分子からの蛍光を抑制することができる¹⁾(図1)。ドーナツ型の消去ビームがガウス分布のポンプ光と共に染色試料上に集束すると試料上の蛍光スポットは焦点面の中心部近傍で回折限界以下に縮小する。このスポットでサンプルを走査することで、超解像顕微鏡蛍光画像を取得することができる。ドーナツ状のイレース光は螺旋状の位相分布を有する位相板(spiral phase plate : SPP)又は輪帯状の位相分布を有する位相板(annular phase plate : APP)を光路上に挿入することで生成する(図2)。

SPPを用いた蛍光抑制は焦点面では極めて小さい蛍光スポットを生成できるので横方向の空間分解能は高いが、光軸方向の空間分解能は高くない。一方、APPでは光軸方向の分解能が高い事は示されていたが、SSPのような横方向の空間分解能を得る事ができないと考えられていた²⁾。本研究では、理論的ベクトル光学モデル³⁾に基づいて高い開口数(NA)を有する対物レンズ系ではAPPによって回折限界以下の空間分解能を得ることができることを示した。

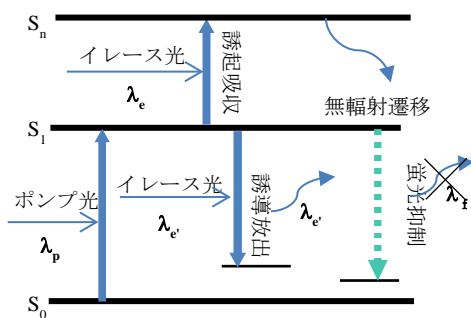


図1. 2波長の光による蛍光抑制

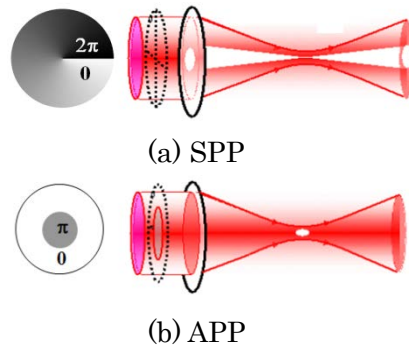


図2. 位相板による位相変調

【解析方法】 APPを透過したイレースを集光したときの3次元強度分布はガウシアンビームを含め、輪帯開口のフラウンホーファー回折の式を用いて解析的に表現できる³⁾。

図3に波長(λ)と集束ビームの位相変調を記述するためのベクトル解析モデルを示す。ここでは焦点距離を単位長としている。高 NA($=\sin \alpha$)の対物レンズによりイレース光が焦点面に集光されたとき、焦点面内の電界ベクトル成分(E_x, E_y)の他に光軸方向(z)に沿った電界ベクトル成分(E_z)が作成される。瞳面($z=0$)上の点 $P(\xi, \eta, 0)$ の $\xi\eta$ 面上の方位角を ϕ 、 P を発して焦点面に向かう光が光軸と成す角を θ として、像平面内の点 (x, y, z) における電界ベクトルは以下で表せる。

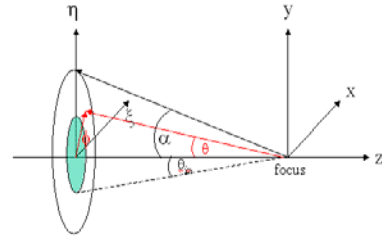


図3. ベクトル解析モデル

$$\vec{E}(\lambda) = \begin{pmatrix} E_x(\lambda) \\ E_y(\lambda) \\ E_z(\lambda) \end{pmatrix} = \int_0^\alpha \int_0^{2\pi} d\phi d\theta H(\theta, \phi) f(x, y, z) \sqrt{\cos \theta} \sin \theta \begin{pmatrix} -\cos \theta \cos^2 \phi - \sin^2 \phi \\ (1 - \cos \phi) \sin \theta \cos \phi \\ \sin \theta \cos \theta \end{pmatrix}, \quad (1)$$

$$f(x, y, z) = e^{-i \left[\frac{2\pi}{\lambda} (x\xi + y\eta) - \frac{1}{2} z (\zeta^2 + \eta^2) \right]}, \quad (2)$$

ここで、 $H(\theta, \phi)$ は位相板によって変調された位相分布を示す。

【結果と考察】図4.にポンプ光(λ_p)の波長 532nm、イレース光(λ_p)の波長 647nm としたときの焦点面上の断面強度プロファイルを示す。NA が小さいレンズ(0.45)の時は APP によって生成されたダークスポットのプロファイルは焦点近傍で鍋底型形状となり SPP によるプロファイルよりも遙かに大きい。一方、NA が大きいレンズ(0.965)の場合は焦点近傍の APP によるプロファイルは SPP のそれと同様の形状となった。次に、蛍光色素として Rhodamine6G を用いた場合の APP による焦点面内の蛍光強度プロファイルを計算した(図.5)。NA=0.45 の時は APP による FWHM はポンプ光の半分程度しか縮小しないが、NA=0.965 の場合は FWHM が 1/3 まで縮小する。この結果は、APP は従来から示されていた深さ方向の高分解能のみならず横方向においても高い空間分解能を提供することができることを示している。

APP は構造がシンプルで作製が容易である事からこれを用いることで非常に実用的な 3次元超解像顕微鏡システムを容易に実現することができると考えている。

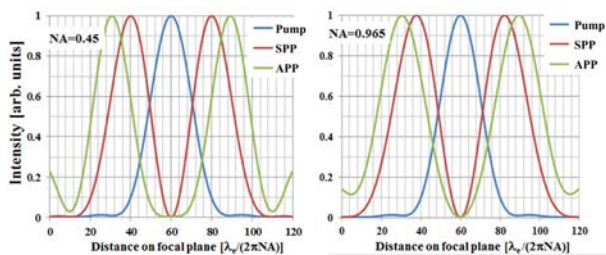


図.4 焦点面上におけるダークスポットの断面強度プロファイル

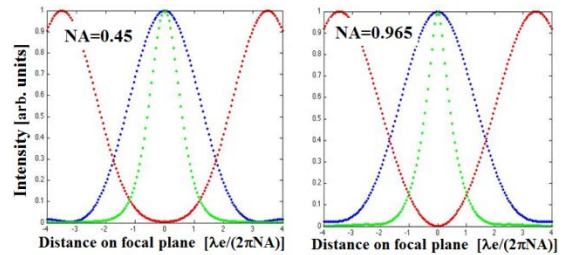


図.5 蛍光スポット強度プロファイル

(・ Erase ・ Pump ・ Cross sectional profile for SRM)

【謝辞】この開発は国立研究開発法人科学技術振興機構の研究成果展開事業（先端計測分析技術・機器開発プログラム）による成果である。

- 1) Iketeki, et al., *CLEO2000*, San Francisco, USA, 7-11 May, 2000, paper CThL5.
- 2) 池滝慶記, 渡邊武史, 第2回分子科学討論会, 福岡, 2008年9月24-27日, 4P046.
- 3) B. Richards, and E. Wolf, *Proc. R. Soc. A*253, 358(1959).