

2 波長蛍光Dip分光法を用いた超解像顕微鏡法

(オリンパス(株)*・ブタペスト経済工科大学**・東工大資源研**)

池滝 慶記*, 渡邊 武史*, ボコル ナンドール**, 藤井 正明**

【序】分子の高励起状態を観測する手段として2波長蛍光Dip分光法が挙げられる。この分光法では、分子を第1のレーザー光(ポンプ光)で S_1 に励起した後、さらに第2のレーザー光(イレース光)を照射することにより高励起状態 S_n に励起する(図1)。このとき、高励起状態からは系間交差や内部転換等の無輻射遷移が起るため、イレース光の照射によって S_1 からの蛍光が抑制される。この蛍光抑制過程は気相分子では一般的であるが、凝集相においても同様の現象が観測される[1]。この蛍光抑制過程を利用することにより、回折限界で制限されない高い空間分解能をもつ光学顕微鏡法が可能となる(超解像顕微鏡法)[2]。今回、我々は本顕微鏡法の空間分解能を定量的に評価した。

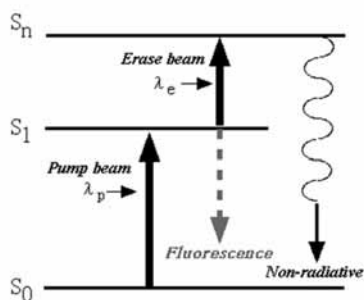


図1. 2波長蛍光Dip分光法

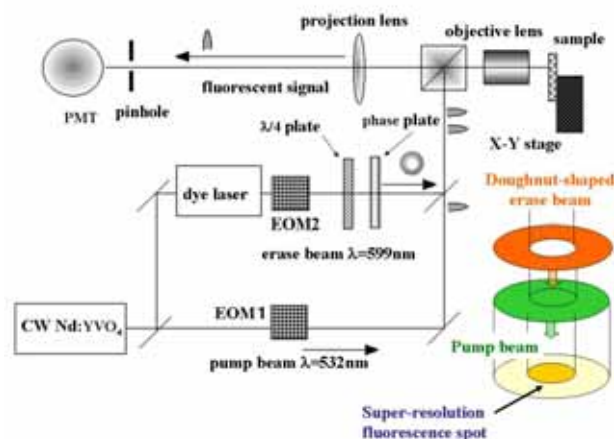


図2. 超解像顕微鏡法の原理及び検証実験法

【超解像原理】レーザー走査型顕微鏡はポンプ光を対物レンズで集光し、集光スポットから発生する蛍光をモニターしながら試料走査する。分解能はスポットの大きさで決定されるが、その大きさはレンズのNAと波長で一意に決まる回折限界により制限され、このサイズ以下に集光することは物理的に不可能である。図2に本顕微鏡法原理を示す。ポンプ光と合わせてドーナツ状に整形したイレース光を同時に照射すると、2色が重なった所では蛍光が抑制されるため、ドーナツの中心からの蛍光のみが観測される。従って蛍光スポットは回折限界以下に収縮する。この蛍光スポットと試料を相対的に空間走査することで、試料の蛍光像を回折限界よりも高い空間分解能で観測できる。

【実験】図2に実験装置の概略を示す。今回、試料として色素分子：Rhodamine 6Gを含浸した蛍光スケールを用いた。このRhodamine 6Gを用いると、市販のレーザーシステムでも容易に蛍光抑制過程を誘導できる。このスケールは、同色素分子で染色したPMMAを表面コート

したシリコンチップであり、表面には電子線描画された細線パターンをもつ[3]。これを試料として用いることで、回折限界より高い空間分解能も定量的に評価できる。ポンプ光には CW-Nd:YVO₄ 固体レーザーの 2 倍波 (532nm) を用いた。また、同固体レーザーで励起した連続発振型の色素レーザー (599 nm) をイレース光源として用いた。これらポンプ光とイレース光は、電気光学変調素子により返し周波数 200KHz のパルス列 (半値幅:15ns) に変調される。イレース光は、更に、スパイラル位相板によりドーナツ状の強度分布をもつ 1 次のラゲール・ガウシアンビームに整形される[4]。そして、これら光を同じ光軸上にコンバインして、開口数 0.9 の顕微鏡対物で試料上に集光し、試料ステージを空間走査しながら試料から発光した蛍光を空間計測する。本評価では、ポンプ光単独照射のみの計測する (通常計測) とイレース光も同時照射した (超解像計測) で試料像を観測し、その画質を比較する。

【結果と考察】図 3 に、250nm-L&S と 100nm-L&S のスケールパターンを観測したときの蛍光像を示す。(a)は通常計測時における 250nm-L&S パターンの蛍光像である。細線周期 (500nm) が回折限界 (360nm) よりも広いので、その細線構造が確認できる。しかしながら、回折限界より狭い 100nm-L&S パターンにおいては、全くその構造が全く見えない(b)。一方、超解像計測時には 250nm-L&S パターンの振幅が大きくなっている (c)。更に、100nm-L&S パターンに注目すると、従来の光学顕微鏡では観測不可能であった 100nm の構造が現れている(d)。この結果は、提案する超解像顕微鏡法は蛍光画像のコントラストを向上させるのみではなく、回折限界よりも微細な空間構造を 2 点分解できることも示している。本講演では、2 波長蛍光 Dip 分光法を用いた超解像顕微鏡法で得られる結像性能について光学理論に基づき定量的に議論する。

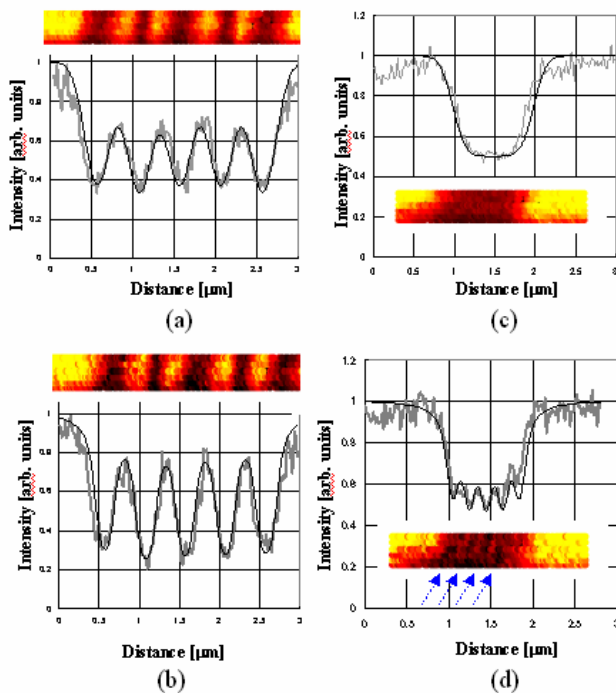


図 3. 250nm-L&S と 100nm-L&S のスケールパターン像

【参考文献】

- [1] T. Watanabe, Y. Iketaki, M. Sakai, T. Ohmori, T. Ueda, T. Yamanaka, S. Ishiuchi, M. Fujii Chem., Phys. Lett. **420**, 410 (2006).
- [2] Y. Iketaki, T. Omatsu, O. Sato, T. Suzuki, M. Fujii, Trends in Optics and Photonics Series **39**, 167 (2000).
- [3] T. Hiraga, Y. Iketaki, T. Watanabe, H. Ohyi, K. Kobayashi, N. Yamamoto, T. Mizokuro, M. Fujii, Rev. Sci. Instrum. **76**, 073701 (2005).
- [4] N. Bokor, Y. Iketaki, T. Watanabe, M. Fujii, Opt. Exp. **13**, 10440 (2005).