

2 波長蛍光Dip分光法を用いた超解像顕微鏡法

3次元空間分析機能に関する理論的考察

(JST「さきがけ：生命現象と計測分析」、オリンパス(株)*)

池滝 慶記, 渡邊 武史*

【序】2波長蛍光Dip分光法と波面制御光学の技術融合は、回折限界を上回る分解能をもつ空間計測法を提供する(超解像顕微鏡法)。本分光法では、第1のレーザー光(ポンプ光)で色素分子を S_1 に励起した後、第2のレーザー光(イレース光)で S_1 分子のポピュレーションを減少させさせ、蛍光を抑制する(蛍光抑制効果)。イレース光により $S_n \rightarrow S_1$ 遷移過程を誘起した場合、 S_n からは様々な無輻射過程が開けるため S_1 からの蛍光は抑制される。例えば、イレース光を中空状のラゲール・ガウシアンビームに波面整形し、ポンプ光と共に色素染色した試料上に集光すれば蛍光抑制効果が起こり、回折限界より微細な蛍光スポットが得られる。我々は、この超解像顕微鏡法が少なくとも100nm以上の空間分解能を有することを確認した[1]。しかし、3次的にはラゲール・ガウシアンビームは「マカロニ」状の形状を持つために、光軸方向では蛍光抑制効果が発現しないので縦分解能は全く向上しない。ところが、例えば、ビーム中央部(内輪部)とその外側の輪帯領域(外輪部)で位相差が $\lambda/2$ (位相角 π)ジャンプする様なビーム波面(輪帯位相変調型ビーム)は、このビームは焦点において電場強度が相殺し、しかも、焦点面の前後で強い集光ピークをもつ[2]。すなわち、焦点において3次的に光の当たらない微小領域(ダークホール)を有するイレース光が生成できる。これを用いることで、3次的に蛍光スポットの収縮が起こり、超解像機能を3次的に拡大できる(図1)。本研究では、この超解像顕微鏡における空間分析機能を理論的に考察する。

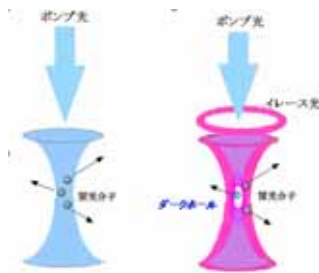


図1 超解像顕微鏡

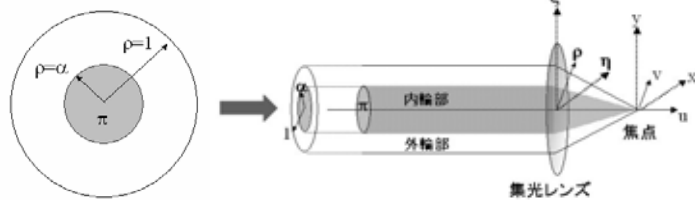


図2 輪帯位相変調型ビームと集光光学系の空間的位置関係

【解析方法】輪帯位相変調型ビームを集光したときの3次的強度分布は、通常のガウシアンビームも含め輪帯開口のフラウンホッフ回折の式を用いて解析的に表現できる[3]。今、想定している集光光学系の開口数を(NA)、波長を(λ)とする。そして、瞳の半径(入射ビーム径)を1に規格したときの内輪部の半径を(α :輪帯比率)とする。このときの、集光されたイレース光の電場($U(\nu, u)$)は式(1)で与えられる。ここで、($C(\rho, \theta)$)は入射光の波面分布関数であり、 $J_0(x)$ はベッセル0次関数を示す。 $C(\rho, \theta)$ が1であれば、通常ポンプ光の集光ビームの強度分布($U_p(\nu, u)$)を与え、もし、 $C(\rho, \theta)$ が輪帯位相変調型ビームの波面分布であれば、これはダークホールを有するイレース光の強度分布($U_e(\nu, u)$)を与える。図2によれば、瞳面の動径方向の長さを

(ρ) 焦点面近傍における光軸上からの動径方向の距離を無次元に換算された(v)、同じく焦点からの相対的な光軸上の距離を (u) で表す。但しこれは、無次元の光学的換算座標である。

$$U(v,u) = \left| \int_0^1 C(\rho,\theta) J_0(v\rho) e^{-i\frac{1}{2}u\rho^2} \rho d\rho \right|^2, \quad \text{但し、} \quad v = \frac{2\pi}{\lambda} (NA)r, \quad u = \frac{2\pi}{\lambda} (NA)^2 z. \quad (1)$$

NA は集光レンズの開口数、 λ は波長、そして r と z は実空間距離を示す。ここで、イレース光に対する分子の蛍光抑制特性関数 ($F(U_e(v,u))$) が与えられていれば、これと $U_p(v,u)$ の積が 3 次元的に収縮した蛍光スポットの強度分布、すなわち、3 次元的な超解像機能が発現したときの点像分布関数 ($I(v,u)$) を与える[4]。

【結果と考察】図 3 と 4 は、蛍光色素として Rhodamine 6G を選定した場合における、焦点面内と光軸断面における点像分布関数のイレース光強度 (I_{\max}) に対する依存性を示す。計算条件として、ポンプ光波長が 532nm、イレース光波長を 600nm とした。各 I は焦点面内におけるイレース光の最大フォトンフラックスを示す。それらによれば、半値幅の収縮の度合いは焦点面内と光軸を含む断面内においては大きく異なる。光軸方向に関して、 I_{\max} が $2 \times 10^{25}/\text{cm}^2/\text{sec}$ まで増加する間で半値幅が著しく収縮し、ポンプ光の半値幅に対して約 10 分の 1 以下に収縮する。すなわち、縦分解能が画期的に向上していることが分かる。それに対して、焦点平面内における半値幅は、 I_{\max} の増加に対して極めて緩慢に減少し、 $10 \times 10^{25}/\text{cm}^2/\text{sec}$ においても半分程度までしか収縮しない。本講演では、超解像顕微鏡における 3 次元空間分析機能を、ベクトル解析モデルで再考察するとともに[5]、蛍光相関法への応用の可能性についても言及する。

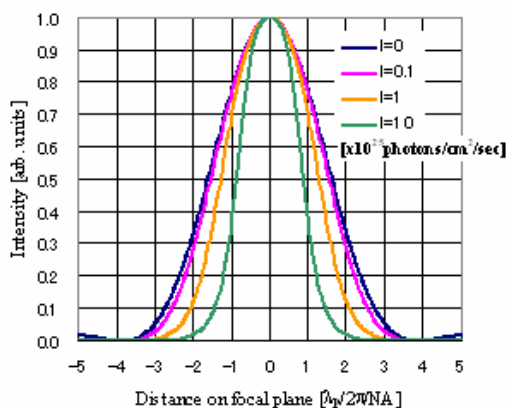


図 3 焦点平面内プロファイル

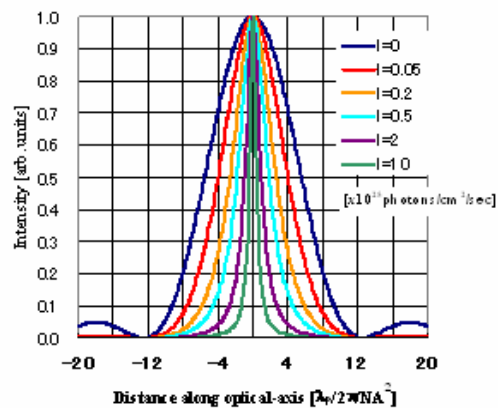


図 4 光軸断面方向プロファイル

[1] Y. Iketaki, T. Watanabe, N. Bokor, T. Omatsu, K. Yamamoto, and M. Fujii, Appl. Spectrosc. **61**,6 (2007).

[2] 池滝他、出願番号：日本国特許特願 2003-355327 (国際出願 PCT/JP2004/014105 号)

[3] Y. Iketaki, T. Watanabe, M. Sakai, S. Ishiuchi, M. Fujii, Opt. Eng., **44**,033602 (2005).

[4] B. Richards, and E. Wolf, Proc. R. Soc. London, Ser. A **253**, 358 (1959).

[5] N. Bokor, Y. Iketaki, T. Watanabe, M. Fujii, Opt. Exp. **13**, 10440 (2005).