

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実験的検証 —

(JST「さきがけ：生命現象と計測分析」、オリンパス(株)*)

○池滝 慶記

【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 $S_n \leftarrow S_1$ 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(図2)。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[1]。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。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2)。本研究では、この超解像顕微鏡における空間分析機能を実験的に検証した。

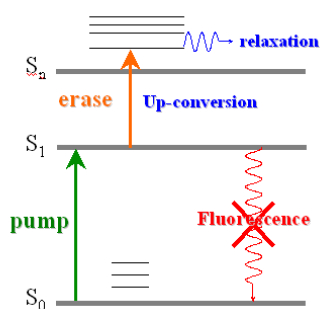


図1 超解像顕微鏡

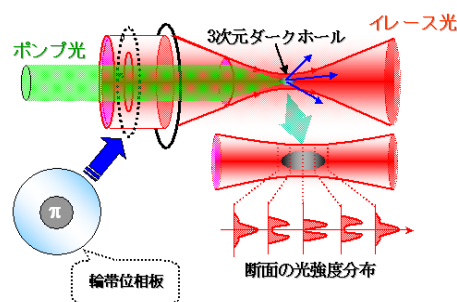


図2 輪帯位相変調型ビームと集光光学系の空間的位置関係

【実験】 評価実験では、Nd:YAGレーザーの2倍波(532nm)をポンプ光とし、同ポンプで励起したKrレーザーより発振した波長:647nmの光をイレース光とした。イレース光の中央部分だけを位相反転させる2波長対応の輪帯位相板により空間変調を行い、3次的な中空構造をもつ様に集光する[2]。これらのビームは同軸に調整され、ナイルレッドを含有する蛍光ビーズを展開したスライドガラス上に顕微鏡対物レンズにより集光される。この顕微鏡対物レンズを搭載したステージとガルバノミラーにより3次元走査することにより、蛍光ビーズの蛍光像を空間計測した。我々は、ポンプ光単独照射の場合とポンプ光・イレース光同時照射の場合の蛍光像を比較することで原理検証を行った。

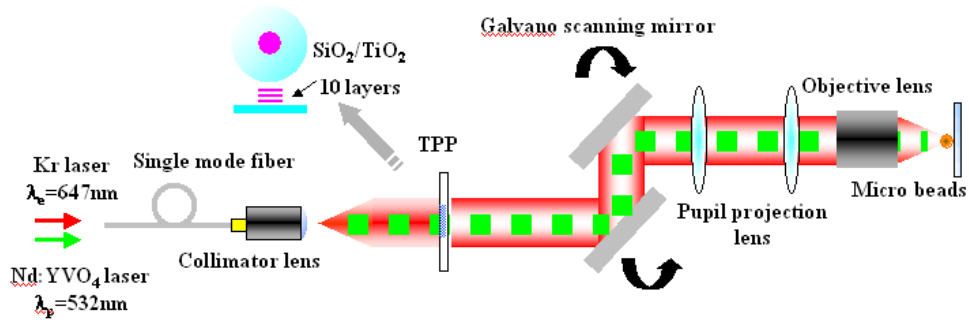
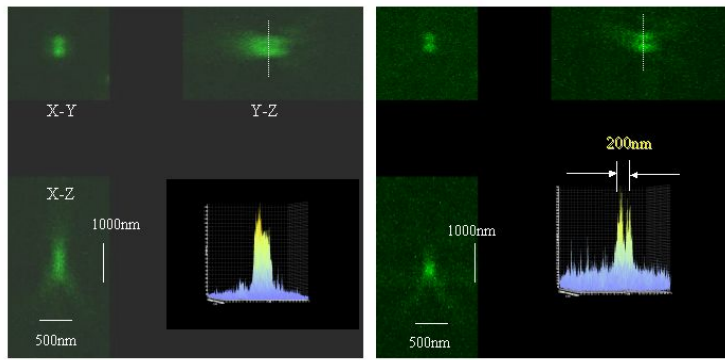


図3 検証実験装置

【結果と考察】図4に、2つの隣接する100 nmφの蛍光ビーズを計測したときの実験結果を示す(図4)。2色の光を同時照射した場合、焦点面内の蛍光像のサイズはポンプ光単独照射の場合と比較すると半分の120nmに縮小し、2点分解能が向上している(図5)。この事実は、蛍光領域が



(a) Normal measurement (b) Super resolution measurement

光の回折限界であるレーザー集光サイズをよりも小さいことを示している。更に、光軸方向にも、蛍光ビーズのサイズが回折限界の1/4の170nmに収縮していることが分かる(図6)。これを空間体積に換算すると約2アトムとなる。すなわち3次元的に超解像計測が実現できたことを示している。

図4 検証実験装置

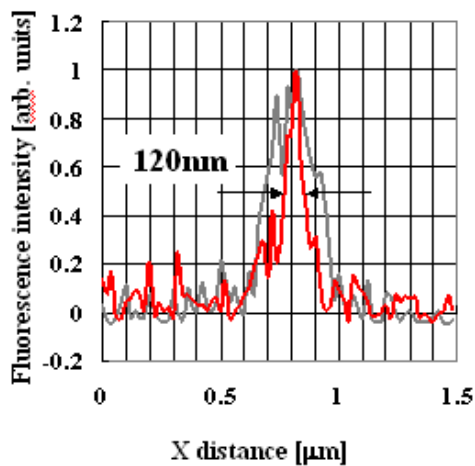


図4 焦点平面内プロファイル

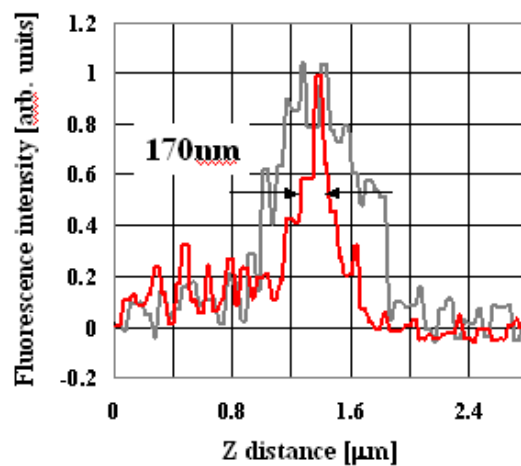


図5 光軸断面方向プロファイル

[1] Y. Iketaki, T. Watanabe, N. Bokor, T. Omatsu, K. Yamamoto, and M. Fujii, Appl. Spectrosc. **61**,6 (2007).
 [2] T. Watanabe, M. Fujii, T. Watanabe, et al., Rev. Sci. Instrum. **75** (2004) 5131-1
 [3] Y. Iketaki, APEX, **3** (2010) 085203.