

2 波長蛍光Dip分光法を用いた超解像顕微鏡法

レーザー走査型への超解像機能の技術搭載

(オリンパス (株)*、ブダペスト経済工科大学**) ○池滝 慶記*、ナンドール ボコル**

Super-resolution microscopy using two-color fluorescence dip spectroscopy
(Olympus*, Budapest University of Technology and Economics**), ○Yoshinori Iketaki*, Nandor Bokor**

【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、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。例えば、イレース光として光軸を中心に位相が 360° 回転するラゲール・ガウシアンビームを用いれば非常にタイトな中空ビームが得られる。これをポンプ光と共に色素染色した試料上にポンプ光を集光すれば蛍光抑制効果が起こり、ポンプ光の回折限界より微細な蛍光スポットが得られる（図1）。超解像顕微鏡法の技術課題として、超精度良くポンプ光とイレース光を同軸で試料面に集光する必要がある[1]。この課題を解決するために、本研究では光学多層膜を用い2色対応の位相板を提案する。光学材質、総数及び膜厚を最適化することで、光学多層膜はポンプ光とイレース光に対して独立した位相差を与えることができる。すなわち、この性質に着目するとポンプ光をガウスビームに保ったまま、イレース光のみをラゲール・ガウシアンビームに整形できる（図2）。本研究では、上記の2色対応の位相板を作製し、商用のレーザー走査型顕微鏡に挿入することで超解像機能を検証した。

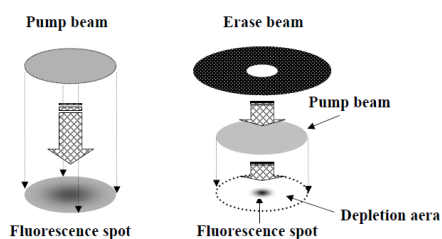


図1 超解像顕微鏡法

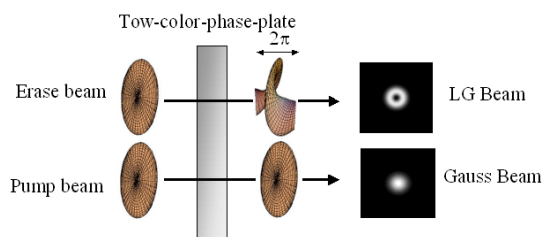


図2 2波長対応位相板の原理

【実験法】 検証実験では、Nd:YAG レーザーの2倍波(532nm)をポンプ光とし、Kr レーザーより発振した波長：647 nm の光をイレース光として用いた。これら波長に対して最適化した4層の光学多層膜 (SiO₂/TiO₂) を4領域に分割された水晶基板にコートした（図3）。各領域を通過したイレース光は 90° ずつ段階的に位相が遅れる。一方、ポンプ光に対しては 360° の整数倍の位相遅れが発生するので、位相変調は受けない[2]。図4に示す様に、この位相板をレーザー走査型顕微鏡 (Olympus:Flouview1000) の照明光学系に挿入する。ポンプ光とイレース光は共通のシングルモードファイバーよりデリバリーされるので、超解像顕微鏡法の照明条件を満たしつつ、自動的にこれらの光は軸ずれすることなく試料面に NA:1.4 の対物レンズで集光される。

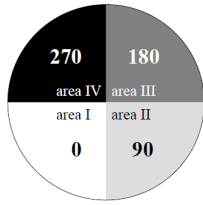


図3 4分割位相板

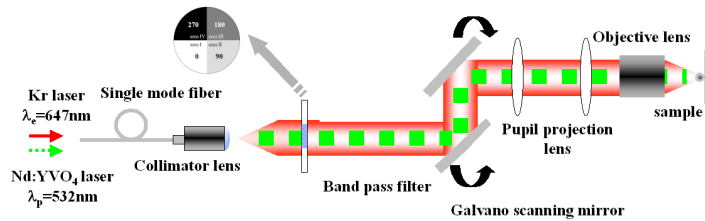


図4 超解像顕微鏡装置

【結果と考察】 図5は、ポンプ光又はイレース光の照明で発光する蛍光ビーズ（径：200nm）を空間走査して計測した両ビームの形状である。それによれば、ポンプ光は通常のガウスビームとて集光されているが、イレース光は中央で強度が無いドーナツビームとして集光されていることが分かる（図5）。この条件で、蛍光抑制効果を誘導できるナイルレッドを分散した蛍光ビーズ（径：60nm）を空間走査した。図5が示す様に、ポンプ光単独照射時のビーズ蛍光像の半値幅は回折限界サイズであったが、超解像計測時にはビーズサイズの70nmまで狭くなっている（図6）。更にナイルレッドで染色したフォトレジストにナノインプリントした100nmの細線パターンを超解像観察したところ[3]、その構造が明瞭に空間分解できていることを確認した。すなわち、超解像顕微鏡法は、回折限界を突破した2点分解能をもつことを示している（図7）。本実験が示す様に、たった1枚の位相板を市販のレーザー走査型顕微鏡に挿入するだけで、極めて簡単に超解像顕微鏡観察ができるので、今回開発した技術は生物学及び材料開発分野で広く普及するものと期待できる。尚、本研究は、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おいて実施された。

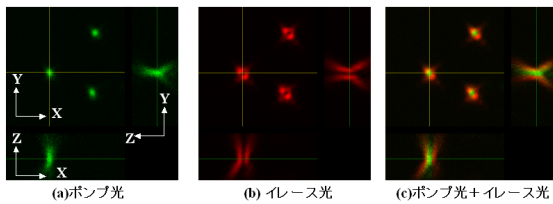


図5 位相板通過後の集光ビーム形状

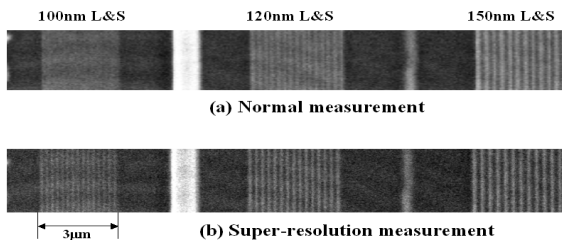


図7 100nm L&S パターンの超解像計測

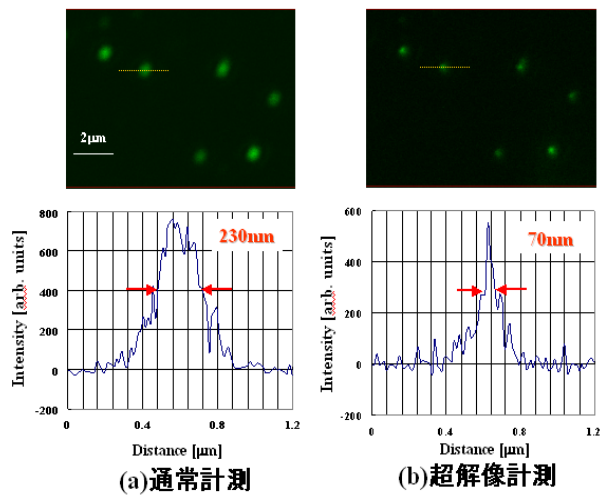


図6 60nm 蛍光ビーズの超解像計測

- [1] Y. Iketaki, T. Watanabe, N. Bokor, T. Omatsu, K. Yamamoto, and M. Fujii, Appl. Spectrosc. **61** (2007)6.
- [2] Y. Iketaki, APEX, **3** (2010) 085203.
- [3] Y. Iketaki, and N. Bokor, Opt. Commun. **285** (2012) 3798.