

3P086

構造化照明を用いた3次元広域ラマンイメージング顕微鏡の開発

(台湾国立交通大学・応用化学) ○島田林太郎、濱口宏夫

【序】 広域ラマンイメージング顕微鏡は顕微鏡下の試料に対し、広域に同時に励起光を照射し、試料中に発生するラマン信号光分布を直接検出器上で取得する手法である。顕微ラマンイメージング手法として今日一般的である共焦点ラマン顕微分光法に比べ、試料もしくはレーザースポットの掃引が不要であるため、特に広域の画像取得時間の大幅な短縮化が期待できる。しかしながら、試料中の異なる奥行きから発生した信号光を選別すること無く検出してしまうため、奥行き方向の空間分解能が共焦点顕微分光法に比べ格段に劣るという欠点があった。本報告では、広域ラマンイメージング顕微鏡の奥行き方向分解能の向上を目的とし、近年、広域蛍光顕微鏡や広域レーザー散乱顕微鏡などで開発されてきた構造化照明法[1,2]をラマン顕微鏡に応用した結果について議論する。

【原理 [2]】 構造化照明法では焦点面内において構造（例えば縞模様）を持った照明光を励起光として用いる。焦点面近傍で発生する信号光強度は照明光の強度分布を強く反映する一方、焦点面から離れた奥行きから発生する信号は照明光の構造がぼけるため、照明光の構造をほとんど反映しないものとなる。構造化照明法では同一の試料について、縞模様の位置をずらしながら画像を複数枚取得し、それらの画像を比較解析することで焦点面付近からの信号光をそれ以外の奥行きからの信号と区別する。

【実験】 (装置) 図1に装置図を示す。励起光はNd:YVO₄レーザーの第2高調波(532 nm)を用いた。レーザー光線を拡散板に通し、顕微鏡外第2対物レンズの焦点面に設置した格子パターンの照明光とした。格子の像は顕微鏡光学系により試料位置へと伝送され、対物レンズ焦点面において2 μm 周期の正弦波状縞模様として結像された。焦点面において約30 μm 四方の領域が構造化照明によって照射された。試料中で発生したラマン散乱光は対物レンズによって集められ、ノッチフィルタによって励起光と分離された後、音響光学可変波長フィルタ(AOTF)に入力された。AOTFによって特定のラマンシフト信号のみ選別された後、CCD検出器上で画像として検出された。

(測定) ポリスチレンビーズ(直径3 μm)の水懸濁液を試料として用いた。格子パターンを縞

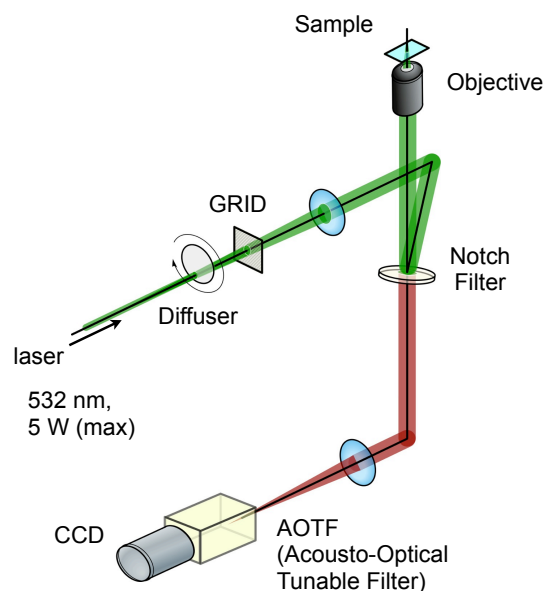


図1 装置図

模様と直行する方向に漸次移動し、各格子位置においてラマン画像を取得した。一連の画像取得には合計で190秒を要した。試料の奥行き方向位置を変えながら同様の測定を繰り返し、ポリスチレンビーズの異なる深さでの断面像を取得した。ポリスチレンビーズの 1001 cm^{-1} バンドを用いラマン画像を取得した。

【結果と考察】 格子パターンを移動しながら得られた一連の画像について、各画素の強度変化を定数成分と正弦波様に変調する成分に分離し画像を再構成した。定数成分は従来の広域ラマン顕微鏡で得られる画像に対応し、正弦波様に変調する成分は焦点面付近からの信号強度のみを抜き出した奥行き方向分解能が向上した画像に対応する。図2に、ポリスチレンビーズの異なる奥行き方向位置の画像から再構成された正弦波成分（上段）および定数成分（下段）の画像を示す。図から明らかなように、変調成分画像では定数成分画像に比べ信号のコントラストが大幅に改善している。ポリスチレンビーズの輪郭がより明確になっているほか、ビーズの内部の信号強度もより均一になっており、3次元断面図を取得できていると考えられる。試料の奥行き位置を大きくずらした場合(-1.5, -2.0 μm)、変調成分画像ではビーズ由来の信号が完全に消失するのに対し定数成分画像では消失せず、奥行き方向の分解能が大きく向上していることがわかる。得られた画像から奥行き方向の分解能を評価し $0.4\pm 0.2\ \mu\text{m}$ という結果が得られた。本結果は、構造化照明を用いることで広域ラマンイメージング顕微鏡でも理想的な共焦点ラマン顕微鏡と同等の奥行き分解能を得ることができていることを示している。

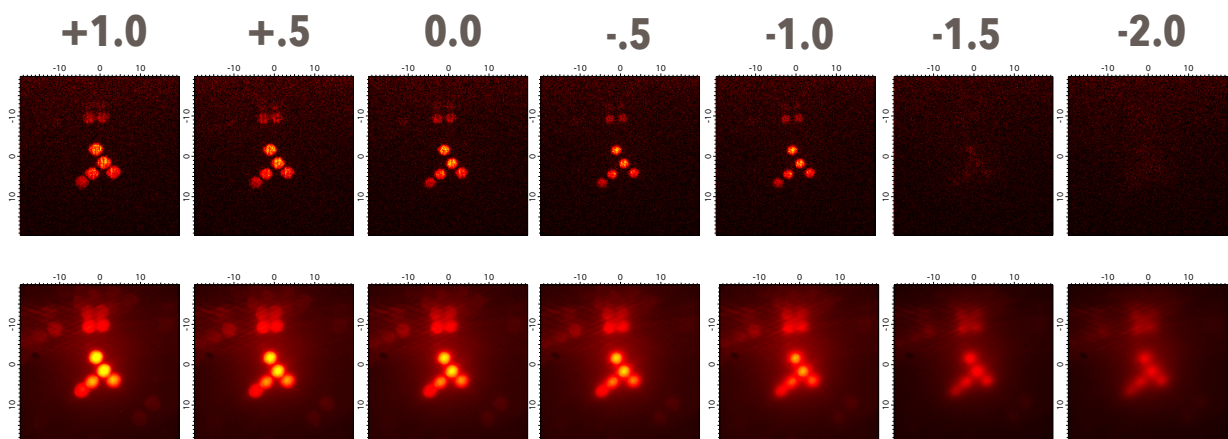


図2 ポリスチレンビーズの異なる深さにおける正弦波様に変調する成分の振幅分布(断面図、上段)、および定数成分の強度分布(従来の広域ラマン画像相当、下段)。各画像の目盛りの単位は μm 。最上段の数字は試料に対する焦点面の奥行き方向相対位置(単位 μm)を示す。

[1] M. Gustafsson, et al., *Biophys. J.*, **94**, 4957 (2008); J. Mertz, *Nat. Methods*, **8**, 811 (2011).

[2] M. Neil, R. Juszkaitis, and T. Wilson, *Opt. Lett.*, **22**, 1905 (1997).