

2 波長蛍光Dip分光法を用いた超解像顕微鏡法

超解像顕微鏡用位相板の実用設計法の提案

(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

(Olympus1, 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可能にした (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)。例えば、イレース光としてラゲール・ガウシアンビーム (LG ビーム) 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)。超解像顕微鏡法の実用化においては、如何に超精度良くかつ安定してこれらのビームを同軸で試料面に集光することが最大の技術課題であるが、我々は多層膜を用い 2 色対応の位相板を開発することで克服した。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ので、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 LG ビームに整形できる。我々は、光学基板を 4 領域に分割し、各領域に独立に最適化した多層膜コートした 2 色対応の位相板を作製した[1]。これを、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実証した (図 2)。多層膜を用いると各領域において正確な位相変調が可能となるが、反面、その一方で各領域で透過率が不均一となり、イレース光のビーム形状が歪む問題点が発生した。また、蛍光検出する波長帯域において透過率も低下するのとより、検出効率の低下といった不具合も発生した。そこで、透過率がほぼ 100% の SiO_2 単層膜のみからなる極めて実用的な超解像位相板の設計法を開発した。

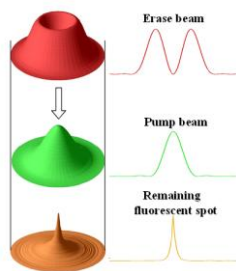


図 1 超解像顕微鏡法の原理

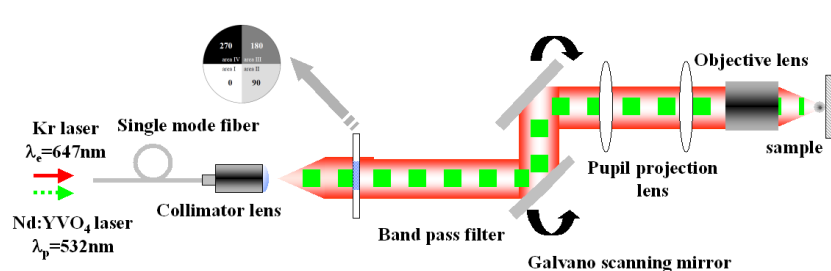


図 2 : 2 波長対応位相板を用いた超解像顕微鏡システム

【設計法】 図 3 に示す様に波長の整数倍の自由度に着目することで、 SiO_2 単層膜を用いて、ポンプ光とイレース光に対して 2 色対応の位相板となる様に最適化設計を行なう。超解像顕微鏡法の特徴として、得られる蛍光スポットの形状、すなわち点像分布関数はイレース光の形状によって決定される。このことは、ポンプ光に関しては収差を多少犠牲にして、イレース光は理想結像が出来るように位相板を設計すれば超解像顕微鏡法が実現できることを示している。単純な製膜法により理想結果に近い超解像機能が得られることを意味する。図 4 に、イレース光は完全な LG

ビームとして理想結像し、一方、ポンプ波面において $\lambda/5$ が発生したシミュレーション例を示す。それによれば、ポンプ光は収差により回折限界より広がるが、十分な超解像機能が誘導出来ていることを示している。

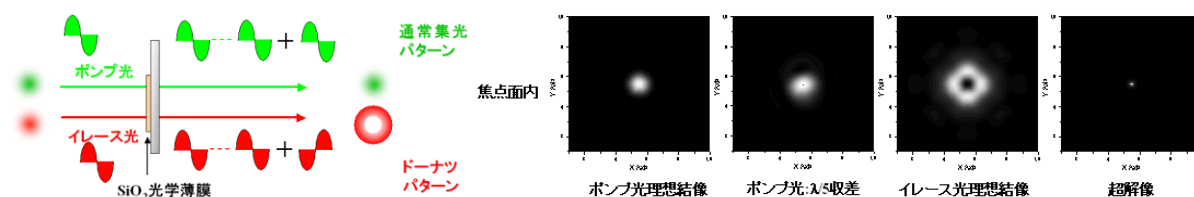


図3 単層膜を用いた2波長対応位相板の原理

図4 2超解像機能のシミュレーション結果

【実証実験】 Nd:YAG レーザーの2倍波($\lambda=532\text{nm}$)をポンプ光とし、Kr レーザー ($\lambda=647\text{ nm}$) をイレース光とした場合の位相板を作製し、その超解像機能を確認した。光学基板を4領域に分割し、夫々の領域において最適化設計した膜厚の SiO₂ 層をコートした (図5)。各領域を通過したイレース光は 90° づつ段階的に位相が遅れる。一方、ポンプ光に対しては最大 $\lambda/11$ 波面収差を持つが、ほぼガウスビームを保つ設計となっている。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し、ポンプ光又はイレース光の照明で発光する 200ϕ の蛍光ビーズ (Molecular Probe:F880) を用いて、それらの集光パターンを確認した (対物レンズ: NA=1.4)。図5によれば、位相板を通過したポンプ光は、ほぼ回折限界のガウスビームとして集光し、イレース光は綺麗な LG ビームとして結像していることが分かる。その構造が明瞭に空間分解できていることを確認した。以上の集光ビームのパターンを確認後、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 90nm の細線パターンを超解像観察したところ、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、作製した位相板は回折限界を突破した2点分解能を提供できることを示している (図6)。以上の結果は、従来の多層膜を用いた場合と比較して全く遜色が無い。提案する位相板は多層膜の透過率に関する欠点を解決しただけにとどまらない。本位相板の設計と製作は非常に簡単であるので、市販レーザー顕微鏡に導入することで、多くの顕微鏡ユーザーは手軽に超解像機能を利用することができる。詳細な実験結果は、本講演で詳細に報告する。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。

[1] Y. Iketaki, and N. Bokor, Opt. Commun. **285** (2012) 3798.

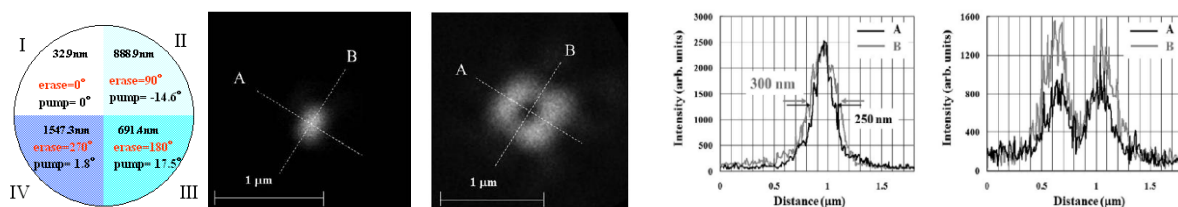


図5 最適化設計した単層膜を用いた2波長位相板によるビーム変調機能の確認

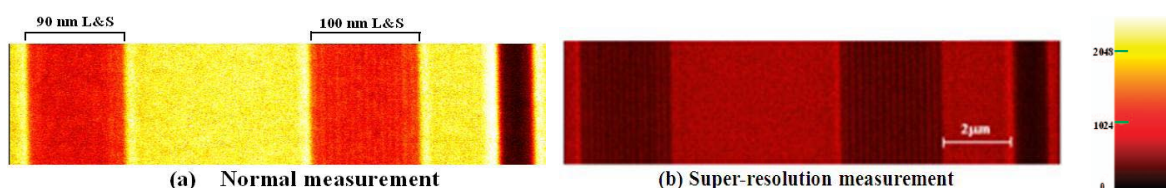


図6 90nm L&S スケールパターンの超解像計測