

ハイブリッド輪帯波長板を用いた3次元超解像顕微鏡

(オリンパス (株)¹、北里大学²、ブダペスト経済工科大学³)○池滝 慶記^{1, 2}、熊谷 寛²、ヤン カレル³、ナンドール ボコル³

Three dementional super-resolution microscopy using annular hybrid wave plate

(Olympus1, Kitasato University, Budapest University of Technology and Economics)

○Yoshinori Iketaki, Hiroshi Kumagai, Jahn Kornel, Nandor Bokor

【序】

2波長蛍光分光法と波面制御光学を用いた超解像顕微鏡法では、第1のレーザー光（ポンプ光）で色素分子を S_1 状態に励起した後、更に第2のレーザー光（イレース光）で S_1 分子を照明する。このとき、誘導放出や誘導吸収が起こり、 S_1 分子のポピュレーションが減少するので、結果的に分子からの蛍光を抑制することができる（図1）。もし、タイトな中空形状のスポットもつイレース光をポンプ光と共に試料上に集光すれば、ポンプ光辺縁分で蛍光抑制効果が誘導できるので、ポンプ光の集光サイズよりも微細な蛍光スポットが得られる。このスポットにより試料を空間走査すれば、回折限界を凌駕する空間分解で試料を蛍光観察ができる¹⁾。この考えを拡張すると、蛍光スポットを焦点面内のみならず深さ方向にも微細化できる。この場合には、焦点面近傍において3次的に光の当たらない微小領域、すなわち3次元ダークスポットをもつイレース光を用いる。3次元ダークホールを具体的に生成する方法として、ディストラクティブな干渉法を用いることができる。例えば、輪帯中央領域で位相が反転する波面分布をもつイレース光ビームをすると、焦点とすぐ近傍において、電場を3次的に相殺できる。ガウシアン状のポンプ光と共に調整して集光すれば、蛍光スポットは3次的に回折限界以下のサイズに収縮する。²⁾ 本研究では、これを実現できる3次元超解像顕微鏡用2波長ハイブリッド輪帯波長板を作製した。

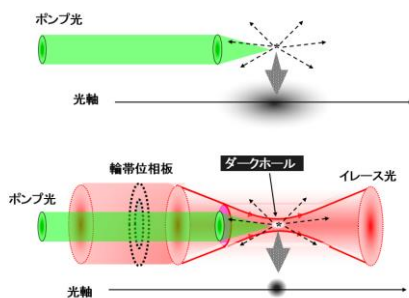


図1：3次元超解像顕微鏡法の原理

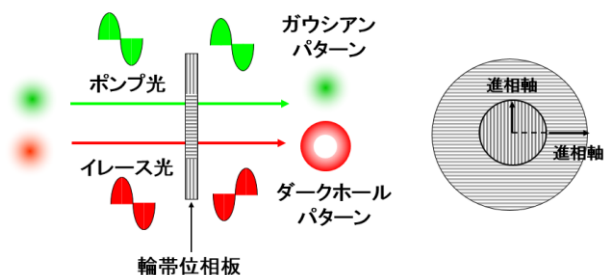


図2：ハイブリッド輪帯波長板の構造と機能

【ハイブリッド輪帯波長板を用いた超解像顕微鏡装置】

ハイブリッド輪帯波長板は、2枚の水晶のマルチオーダーの波長板を組合せて作製する。これを市販のレーザー走査顕微鏡の照明光学系に挿入することで、3次元超解像顕微鏡システムを構築した。この波長板は、図2に示す様に同じ厚みの円柱状と輪帯の水晶板をお互いの進相軸を直交させて紫外線硬化性樹脂により接合したものである。イレース光に対して $\lambda/2$ 波長板として機能し、ポンプ光に対しては λ 波長板として機能する様に、一体で光学研磨してこの基板の厚みを調整する。直線偏光したイレース光が外輪基板を通過すると、内輪基板を通

過したイレース光に対して位相が反転する。それに対して、ポンプ光は基板のどの部分を通過しても波面は全く影響を受けない。その結果として、イレース光のみが焦点近傍でディストラクティブな干渉を起こし、ダークスポットが生成される。我々は、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波長板を作製し、こその超解像機能を確認した。これをレーザー走査顕微鏡 (Fluoview 1000) に挿入し、試料ステージを移動させながら、ポンプ光とイレース光を同軸で空間走査して3次元的な超解像顕微鏡画像を得る。

【評価実験】

作製した波長板のビーム整形機能を確認するために、ポンプ光照射でもイレース光照射でも発光する蛍光ビーズ像を空間計測した。用いた蛍光ビーズ (Molecular Probe: F8806) は回折限界よりも小さいので、得られた蛍光像は焦点近傍領域におけるそれぞれの集光ビームの空間形状に対応する。図3は、開口数 1.3 の対物レンズでこれらのビームの集光したときの空間形状を示す。ポンプ光は通常のガウシアンビームとして集光しているが (a)、イレース光は焦点近傍において3次元的な中空構造を有しており、超解像顕微鏡観察に不可欠なダークホールが生成できていることが分かる (b)。この照明条件下で、波長 647nm のイレース光で蛍光抑制できるナイルレッドを分散した蛍光ビーズ (平均粒径: 60 nm) を3次元的に空間走査して、蛍光ビーズを超解像顕微鏡観察した。図4 (a) は、ポンプ光のみで通常の蛍光顕微鏡観察 (通常観察) を行った時の単一のビーズの蛍光像を示す。蛍光ビーズのサイズはポンプ光の回折限界 (240 nm) よりも十分小さいので、得られた蛍光像は顕微鏡システムが提供できる点像分布関数に対応する。波動光学理論が示す様に、その3次元形状は光軸方向に広がった回折限界サイズの回転楕円体になっている。一方、(b) はピーク強度 30mW のイレース光を同時に照射したときの3次元超解像顕微鏡画像である。それによれば、蛍光像が平面方向のみならず光軸方向にも回折限界以下に収縮していることが分かる。詳細な実験結果は講演にて報告する。

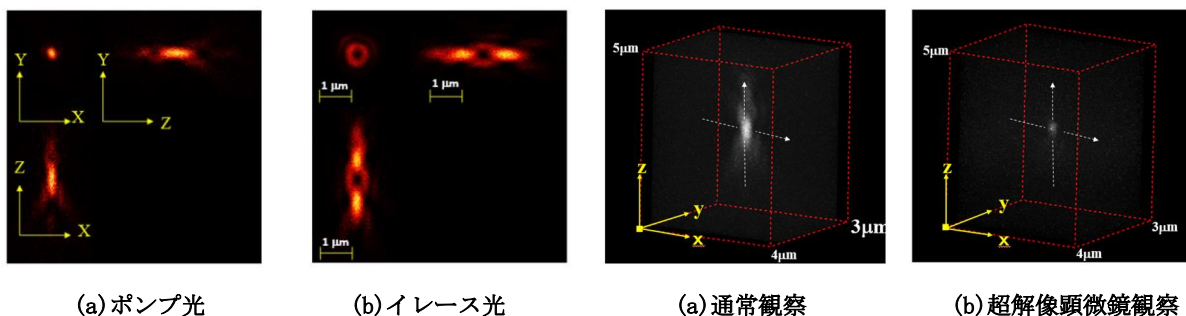


図3 : ハイブリッド輪帯波長板の機能確認

図4 : 3次元超解像顕微鏡観察の実例 (60nm 蛍光ビーズ)

- 1) Y. Iketaki, T. Omatsu, O. Sato, T. Suzuki, M. Fujii, Trends in Optics and Photonics OSA Proceedings Series (TOPS), 39 (2000) 167.
- 2) Y. Iketaki, H. Kumagai, K. Jahn, N. Bokor, Opt. Lett. 40 (2015) 1057.