

クライオ蛍光顕微観察における界面屈折に由来する収差の 光学シミュレーションによる研究

東京工業大学 理学院 物理学系
○石田啓太, 藤芳暁, 松下道雄

Optical simulation of an aberration from interfacial refraction in cryogenic fluorescence microscopy

○Keita Ishida, Satoru Fujiyoshi, Michio Matsushita
Department of Physics, Tokyo Institute of Technology, Japan

【Abstract】 A main component in cells is water. When whole cells is observed by an optical microscope, the light will refract at an air/water (or oil/water) interface. Thus, an optical image of whole cells is often distorted and its resolution is deteriorated. Here we show optical simulation of the refraction effect of the focal spot at the inside of water. The simulation indicated that the interface refraction seriously affected to the optical image obtained by our reflecting microscope. The effect is remarkable in that the high numerical aperture of the objective (>0.6 in dry) is used.

【序】 生命現象を理解するためには細胞を構成する分子同士の相互作用を知る必要がある。そのためには細胞内にある1個の分子をそのサイズの分解能でイメージできる顕微鏡が必要である。我々はその透過性と非破壊な性質から可視光を用いて、一分子測定が可能な蛍光顕微鏡の開発に取り組んでいる。顕微鏡の分解能は集光されてできるスポットの大きさで決まり、それは波動光学の計算により求められる。波動光学に基づき式変形のみで厳密に計算を行うには簡単な系であっても複雑な積分計算を要するため、現実の光学系に対しより簡単に適用できる計算方法が必要となる。そこで我々は Huygens-Fresnel の原理における波面を有限要素に分割し、各要素から輻射される素元波の重ねあわせを数値計算することでこれを実現した。

生体内部の顕微観察を行う際、多くの場合、試料表面には平らな界面が存在する。光線がこの界面で屈折することで、試料内部で画像が崩れ、分解能が低下することが指摘されている[1]。我々が扱っている系におけるこの影響を調べるために、Fig. 1.のように空気中から水中に光を集光させる光学シミュレーションを上記の計算方法により行った。講演では、作成した計算方法について報告し、光学シミュレーションの結果を示しながら顕微観察における界面屈折の影響とその対策について議論する。

解析する際に用いる記号について説明する。収差の無い理想的な反射対物鏡を用いて集光するとし、半開口角を θ_{\max} 、半遮蔽角を θ_{\min} とする。界面屈折がない場合に集光される点 O の界面からの深さを L_1 とする。界面屈折がある場合に集光される点の深さを L_2 とする。

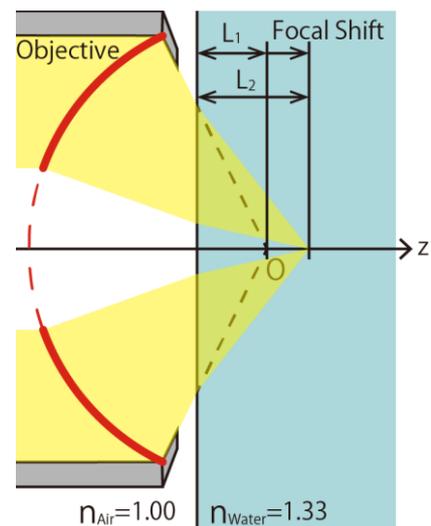


Fig. 1. Layout of focusing inside of the air-water flat interface

【光学シミュレーション】収差の無い理想的なレンズは平面波を球面波に変換する。Huygens-Fresnel の原理によれば、波面上の各点からは素元波が発生している。球面波面上の強度分布と一致するように、素元波源として有限個の電気双極子を配置した。Fig.2. (a)では焦点を中心とした球面上に青色の点で双極子が配置されている。

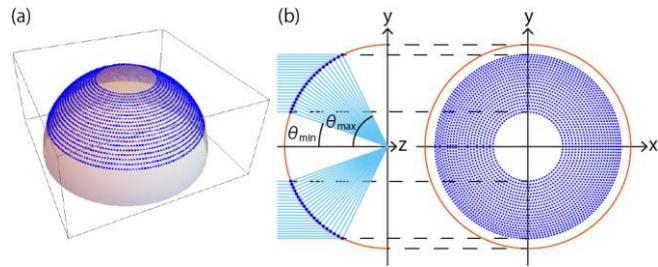


Fig. 2. Dipoles' coordinates

Fig.2. (b)は(a)の投影図であり、水色の線は遮蔽の存在する対物レンズにより集光される様子を表している。球面波面上で電場のノルムは θ_{\min} から θ_{\max} の範囲で $\sqrt{\cos\theta}$ に比例する。(b)の yz 断面において各双極子の間に入射する電場のノルムの総量が一定となるように複数の同心円を設け、そこに等間隔に双極子を配置した。この各双極子が輻射する光電場の重ね合わせから点像分布関数(PSF)を計算した。Fig.2.では見やすいように双極子の数を約 3,000 個としているが、実際の計算では約 35,000 個とした。構築した計算方法により空气中で集光する系の計算を行った結果、積分計算による結果[2]とよく一致することが確かめられた。

界面が存在する系では、各双極子から輻射される光電場が界面上で屈折されるとして同様の計算を行った。屈折の影響は輻射される光電場の経路に対し Fermat の原理(最小時間の原理)を用いることで取り入れた。

【結果】見かけの深さ L_1 を $5 \mu\text{m}$ として界面屈折の影響を調べた結果が Fig.3. である。対物レンズの開口角 $\sin\theta_{\max}$ は 0.9 とした。(A)が空气中、(C)が水中の PSF を等高線で表している。(B)(D)はそれぞれの PSF の光軸上の断面である。水中では PSF の形状が崩れ、光軸方向の半値全幅 FWHM は空气中の $0.80 \mu\text{m}$ から $2.01 \mu\text{m}$ に引き伸ばされ分解能が低下している。ピーク強度は空气中の 8 割まで落ちている。また、水中で実際に集光される深さ L_2 は $8 \mu\text{m}$ となり、本来目的とした観察位置から移動している。これらの影響は界面から深くなるほど大きくなる。開口角を変化させ計算を行うと、界面屈折により像が崩れる影響は $\sin\theta_{\max}=0.6$ を超える高開口数レンズを使用した場合で見られることが分かった。このことから高い分解能を得るために使用される大きな開口角を有する対物レンズが、必ずしも分解能をよくするわけではないという結論を得た。

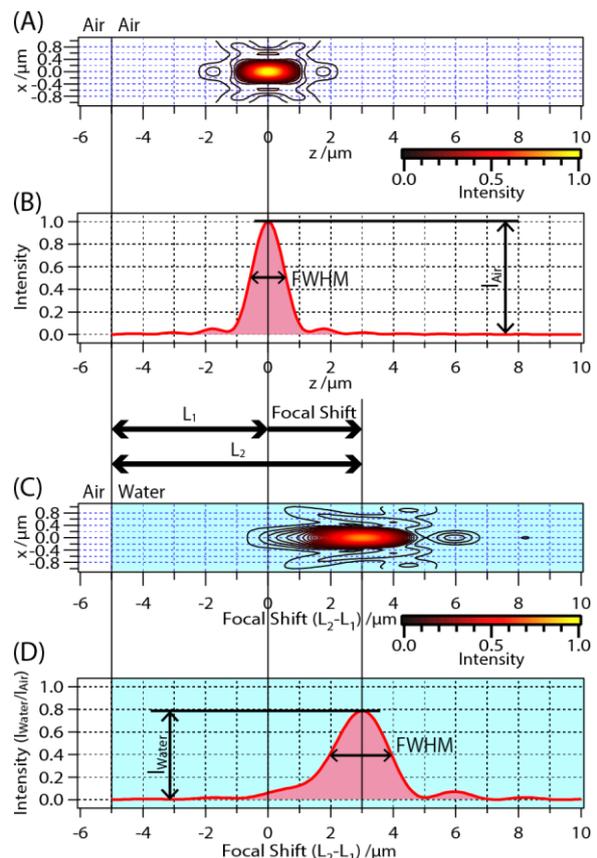


Fig. 3. PSFs in the air ($n_{\text{Air}}=1.00$) and the water ($n_{\text{water}}=1.33$, the nominal focus depth $L_1=5 \mu\text{m}$). The objective's NA is 0.90 ($\theta_{\max} = 64^\circ$, $\theta_{\min} = 20^\circ$). Light is 640 nm in wavelength and circular polarization.

【参考文献】

- [1] S. Hell et al. *Journal of Microscopy* Vol. 169, Pt 3, 391 (1993)
- [2] E. Wolf *Proc. Roy. Soc.* Vol.253, 349 (1959)