

超解像顕微鏡法における複合型位相板による3次元ダークホールの形成

¹NTT-AT、²北里大学、³ブダペスト工科大学、^{2,4}オリンパス

○永井宏明¹、小平晃¹、丸山隆志¹、奥哲¹、熊谷寛²、Nándor Bokor³、池滝慶記^{2,4}

Formation of three-dimensional dark hole by composite phase plate in super-resolution microscopy

○Koumei Nagai¹, Akira Kodaira¹, Takashi Maruyama¹, Satoshi Oku¹, Hiroshi Kumagai², Bokor Nándor³, Yoshinori Iketaki^{2,4}

¹NTT Advanced Technology Corporation, Japan

²Kitasato University, Japan

³Budapest University of Technology and Economics, Hungary

⁴OLYMPUS Corporation, Japan

【Abstract】 The two-color phase plates (TPP) are demonstrated used in super resolution microscopy (SRM) based on the two-color fluorescence depletion. On the focal plane of the SRM, TPP modulates the erase beam to a donut shape having a dark spot at the center and maintains the pump beam in the initial Gaussian shape. The hybrid type phase-plate (HPP) is designed so as to have both structure of annular phase plate and spiral phase plate and is expected to realize the improvement of depth and breadth resolution simultaneously. The HPP is fabricated by photolithography and etching process technology, where their processing accuracy is improved compared with the previous one. The plate can be applied to a commercial microscope without modification. We confirmed the formation of a dark hole which suppresses fluorescence in three-dimensions by mounting the HPP in the SRM. Further, the three-dimensional dark hole formed was evaluated by comparison with the simulation.

【序】 色素分子の蛍光抑制と波面制御光学系を利用する超解像顕微鏡法(Super-Resolution Microscopy : SRM) (Fig. 1)では励起光(ポンプ光)と蛍光抑制光(イレース光)の2波長の位相を同時に制御する機能性位相板が用いられる。本開発においては横分解能に優れた螺旋型位相板と縦分解能に優れた輪帯状位相板を組み合わせた複合型位相板の設計・製作を新たに行い、超解像顕微鏡において3次元で蛍光を抑制するダークホールを形成した(Fig. 2)。

【位相板の作製】

位相板は石英基板を半導体プロセス加工により作製した。すなわち、フォトリソグラフィ技術により加工領域を決定し、エッチング技術により石英基板を深さ方向に加工した。各領域に対応した加工量はポンプ光とイレース光に用いる光源の波長によって決定できる^[3]。本開発ではポンプ光に波長 532 nm、イレース光に波長 670 nm のレーザーを用いた場合に、ポンプ光

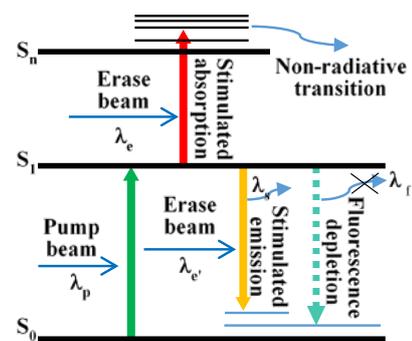


Fig. 1. Excitation scheme of a fluorescence suppression technique^{[1][2]}

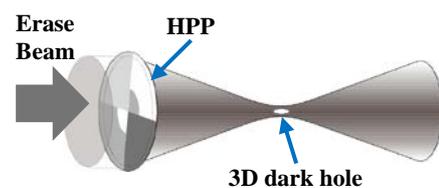


Fig. 2. Schematic of a hybrid phase-plate and a 3D dark hole

の位相分布は変わらずイレース光に位相差が生ずる位相板を設計した。Fig. 3, Table 1 に設計した位相板のエッチング量と生じる位相差を示す。フォトリソグラフィは縮小投影型露光装置 (ステッパー) を用いた。ステッパーの位置合わせ精度はサブミクロンレベルと極めて高精度であるため、従来法と比較して高い位置合わせ精度での位相板の作製が可能である。石英基板の加工には CF 系ガスによる反応性イオンエッチング (Reactive Ion Etching : RIE) を用いた。

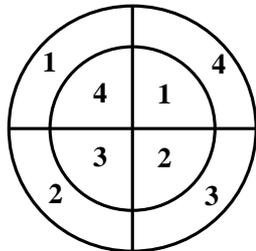


Fig. 3. Schematic diagram of the HPP plate consisting of multiple.

Table 1. Design thicknesses of the segments of the HPP

| Number of segment | Etching Depth (nm) | Phase delay at λ_e (deg.) | Phase delay at λ_p (deg.) |
|-------------------|--------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 4605 | 90 | -45.7 |
| 3 | 2125 | 180 | 34.29 |
| 4 | 1063 | 270 | 17.15 |

【結果・考察】

作製した位相板のエッチング深さを触針式段差計で測定した。その結果、セグメント2 = 4545 nm, セグメント3 = 2078 nm, セグメント4 = 1065 nm と 2% 以内の誤差で加工できている事を確認した。またこの位相板を Fig. 4 に概略を示す超解像顕微鏡 (Olympus Fluoview 1000, 対物レンズ UPLSAPO60XS NA1.3) に実装し、イレース光で発光する蛍光ビーズ (Molecular : F8806) を 3次元計測した。得られた蛍光像と波動光学理論に基づく計算結果を Fig. 5 に示す。イレース光が焦点近傍において3次元ダークホールを形成している事がわかる。また、焦点面上のダークホールの径および光軸方向のダークホールの長さが計算結果と良く一致しており、位相板が精度良く加工できていることがわかる。

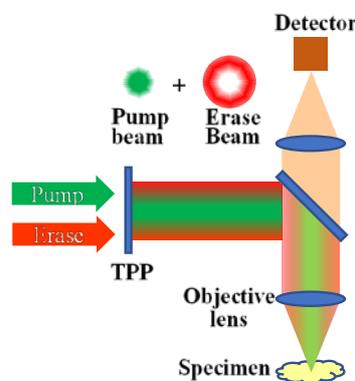


Fig. 4. Principle of a super resolution microscopy.

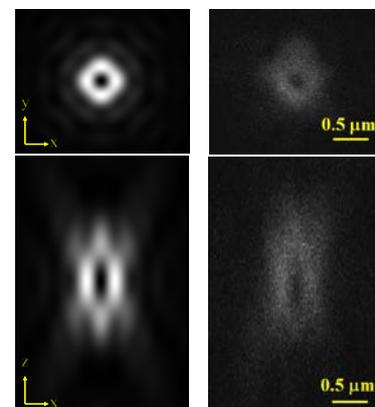


Fig. 5. Experimental Data.

【謝辞】 この開発は国立研究開発法人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) による成果である。

【参考文献】

- [1] S. W. Hell and J. Wichmann, *Opt. Lett.* 1994, 19(11), 780.
- [2] Y. Iketaki, T. Omatsu, O. Sato, T. Suzuki, and M. Fujii, *Trends in Optics and Photonics OSA Proceedings Series (TOPS)*. 2000, 39, 167.
- [3] N. Bokor, and Y. Iketaki, *Appl. Spectrosc.* 2014, 18(3), 353.