

4P059 2 波長 Dip 分光法を応用したファーフィールド超解像顕微鏡の開発(VII)
 - 高繰り返し計測システムの構築 -

(東工大資源研¹・オリンパス(株)²) 渡邊 武史¹, 池滝 慶記², 藤井 正明¹

【序】2 波長蛍光 Dip 分光法は、分子の高励起状態を観測する分光法の一つであり、これまで多くの気相分子系に適用され、既に確立している。この分光法の励起スキームを図 1 に示す。第 1 のレーザー光(ポンプ光)を照射し分子を S_1 に励起した後、さらに第 2 のレーザー光(イレース光)を照射することにより高励起状態 S_n に励起する。高励起状態では速い無輻射遷移が起こるため、イレース光照射により S_1 からの蛍光が抑制される。これは気相分子では一般に起こる過程であり、蛍光消光を利用することで高励起状態の観測が可能となる。凝集相における緩和過程においても、 S_n から S_1 への緩和チャンネルだけでなく、 S_n から直接 S_0 へ緩和するチャンネルも存在するため、同様に蛍光消光が観測される。我々は、この蛍光消光過程を利用することにより、光の回折限界で限定されている光学顕微鏡の分解能を凌駕する、超解像顕微鏡が実現されることを示してきた。今回、光源を高繰り返しパルス化することにより、短時間でクリアな画像計測が可能となり、超解像の空間分解能での顕微分光も可能になりつつあるので報告する。

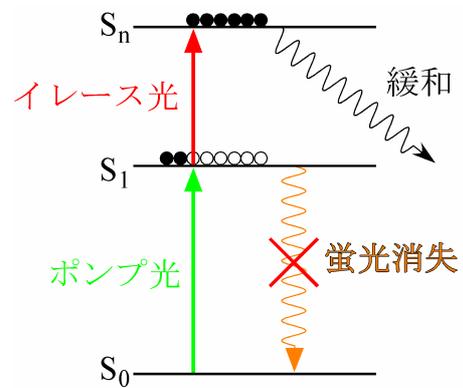


図1. 2波長Dip分光法の原理

【超解像原理】レーザー走査型顕微鏡(LSM)は光学顕微鏡のなかで最も洗練されたものであり、これに 2 波長 Dip 分光法を融合した。LSM はポンプ光を対物レンズで集光し、集光スポットから発生する蛍光をモニターしながら試料走査する。その分解能はスポットサイズで決定されるが、スポットサイズはレンズの NA と波長で一意に決まる回折限界により制限され、回折限界以下に集光することは物理的に不可能である。図 2 に本超解像原理を示す。ポンプ光とドーナツ状に整形したイレース光を同時に照射すると、2 色が重なっているドーナツの周縁部では蛍光が抑制されるため、ドーナツの中心からの蛍光のみが観測される。このため回折限界の蛍光スポットよりも小さい超解像蛍光スポットを形成することが可能となる。この蛍光スポットを用いて試料走査することにより、回折限界以下の像すなわち超解像蛍光像が観測できる。

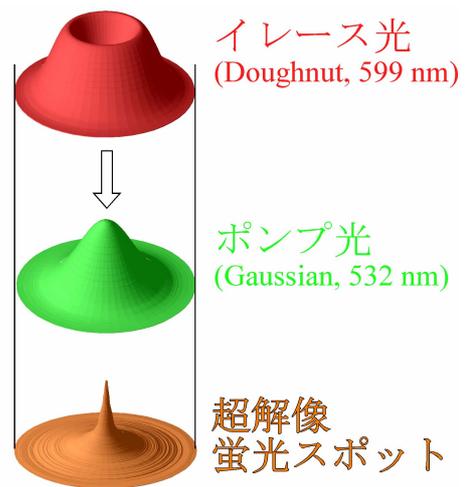


図2. 超解像の原理

【実験】ポンプ光およびイレース光には繰り返し周波数 100kHz で動作するレーザー光源を用いた。Rhodamine 6G をドーブした $\phi 188\text{nm}$ 蛍光ビーズを試料とし、走査ステップ 50 nm で走査型方式の蛍光像を観測した。高繰り返しでデータを取り込むためのインターフェースも新たに開発した。

【結果と考察】図 3a)にポンプ光のみを入射して測定した蛍光像を示す。繰り返し周波数を高めた結果、積算回数を増やしても数分以内で $2\mu\text{m}$ 四方の蛍光像が測定可能となり、S/N の良い画像が得られた。図 3c)は同じ画像を縦軸に蛍光強度をとってプロットした図であり、半値全巾 350 nm で観測された。ここでドーナツ状のイレース光を入射すると (b)および d)) ビーズそのものの大きさである 200 nm まで蛍光像が収縮した。これは回折限界を凌駕しており、2色を用いることでナノメートル領域での超解像を達成することができた。更にビーズが凝集した領域を観測した結果、通常の方法では塊としか見えない近接したビーズを (図 4a)、2色導入により明瞭に分離して観測することができた (図 4b)。このことは顕微鏡の空間分解能を評価する上で重要である 2 点分解能が、本超解像顕微鏡法により向上することを示している。

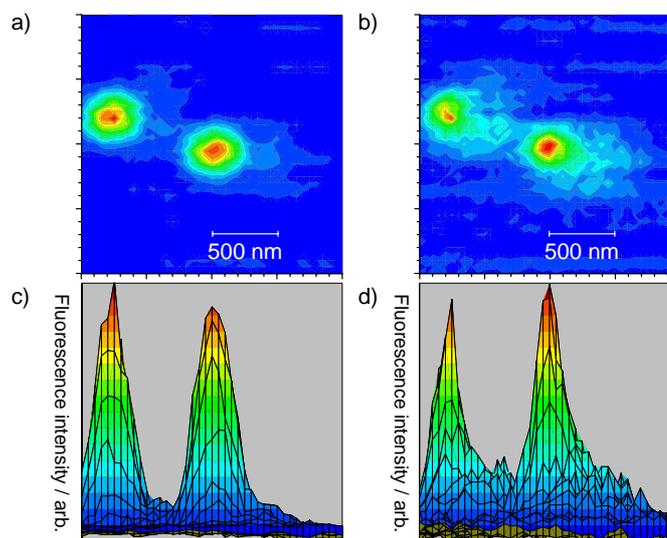


図 3. 走査型方式による $\phi 188\text{ nm}$ ビーズの蛍光像 a), c) **ポンプ光のみ**、b), d) **ポンプ光 + イレース光**

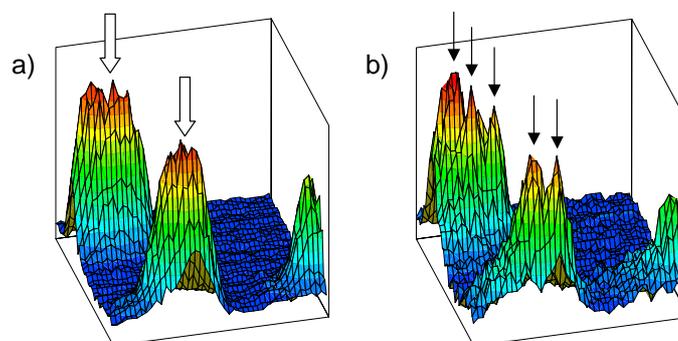


図 4. 2 点分解能の向上 a) **ポンプ光のみ**、b) **ポンプ光 + イレース光**