

ベクトルビームを用いた差引法による 共焦点レーザー顕微鏡の空間分解能向上効果の検証

Demonstration of Spatial Resolution Enhancement in Confocal Laser Microscopy by Subtractive Imaging Using Vector Beams

東北大多元研 [○]瀬川侑, 小澤祐市, 佐藤俊一

IMRAM, Tohoku Univ., [○]Susumu Segawa, Yuichi Kozawa, Shunichi Sato

E-mail: susu_se@mail.tagen.tohoku.ac.jp

はじめに: 共焦点レーザー走査型顕微鏡(CLSM)の空間分解能は光の回折限界により 200 nm 程度が限界とされており, この限界を超える超解像イメージング手法の開発が現在も精力的に行われている. Haeberléらは, 通常の結像系におけるスポット状の点像分布関数(PSF)から, 共焦点光学系におけるドーナツ状(ダークスポット状)のPSFにより得られた画像を差し引くことで空間分解能を向上する手法を提案した[1]. これまで我々は, 数値計算に基づく理論的検討により, 多重リング状強度分布を有する高次方位偏光ビームを用いることで, 焦点でのダークスポットのサイズをさらに小さくすることが可能となり, これを差引法に適用することで可視光域においても 100 nm に迫る空間分解能が期待できることを報告した[2]. 今回は, CLSMにおいて差引法を用いた空間分解能の向上効果を検証するため, 実際にレーザー顕微鏡を構築し, スポット状およびダークスポット状のPSFを用いて取得した画像の差引を行った結果を報告する.

実験結果: 波長 532 nm のレーザー光を励起光とした共焦点レーザー顕微鏡システムを構築し (NA=1.2, 共焦点ピンホール径: ~1 Airy unit), 公称直径 170 nm の孤立した蛍光粒子の像を取得した. 直線偏光ビームを励起光した結果を図 1(a)に示す. この粒子像の水平方向に対する強度プロファイルの半値前幅(FWHM)は約 263nm であった. 一方で, 12 分割波長板素子を用いて入射直線偏光を方位偏光に変換し, 同一粒子の画像を取得した結果を図 1(b)に示す. 図より明らかなように, 中心強度が弱くダークスポット状の強度分布が得られていることが分かる. 図 1(a)で得られた画像から 1(b)で得られた画像を差し引いた結果を図 1(c)に示す. 差引の結果, 図 1(c)に示すスポット状強度分布について水平方向の強度プロファイルの FWHM は 187 nm となり, 実効的な PSF サイズが 3 割程度小さくなっていることがわかる. この結果から, ダークスポット状 PSF によって取得した画像を差し引くことで CLSM における空間分解能が向上可能であることが期待される. 今後は, 差し引かれる画像についてもベクトルビームを使用し, 両者の PSF に対する強度分布の最適化を進めることでさらなる高分解能化を目指す.

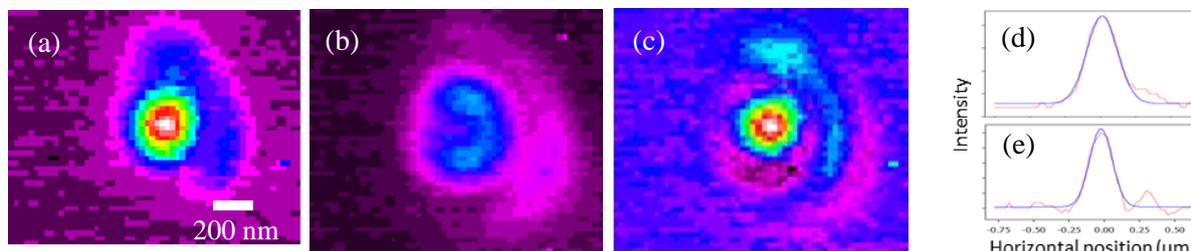


Fig.1 Confocal images of a fluorescent bead acquired by (a) a linearly polarized beam, (b) an azimuthally polarized beam, and (c) the subtracted image using (a) and (b). Horizontal intensity profiles of (a) and (c) are shown by red curves in (d) and (e), respectively. Blue curves are the fitting results.

参考文献:[1] O. Haeberlé and B. Simon, *Opt. Commun.* **282**, 3657 (2009).

[2] 瀬川侑 他: 第 60 回応用物理学会学術講演会, 30a-A1-5 (2013)