

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の向上

Resolution Enhancement in Confocal Laser Scanning 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: レーザー走査型顕微鏡の空間分解能は光の回折限界によって実効的には 200 nm 程度が限界とされている。この限界を超える超解像技術(STED 顕微鏡法、構造化照明顕微鏡法など)が今日多数報告されているものの、高精度のアライメントや画像取得に長時間を要する、観察条件に制限が生じるなどの欠点があり、より簡便かつ高速なイメージング技術が求められる。一方で、一般的な共焦点レーザー顕微鏡を用いて 2 種類の異なる共焦点ピンホールサイズで取得した共焦点画像の差を取ることで空間分解能を向上する Subtractive imaging と呼ばれる手法が提案されている^{1,2}。最近、通常の蛍光顕微鏡画像からドーナツ状強度分布を有する方位偏光ビームで得られたレーザー顕微鏡画像を差し引くことにより空間分解能が向上可能であることが報告された³。しかしながら、通常の点像分布関数(PSF)と差し引くドーナツ状 PSF の強度プロファイルの差異が大きく、差し引く割合を大きくするとマイナス値のサイドローブが強く現れ、取得画像のコントラストが低下するといった問題があり、本手法の効果については明らかになっていない点も多い。

本研究では軸対称な偏光分布を有するベクトルビームの特異な集光特性に着目し、偏光及び強度分布を制御したベクトルビームによる差引法を共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)へ適用した場合の分解能向上の可能性を数値計算により検討した。

計算結果: 放射状および方位角方向に偏光分布した径偏光ビームと方位偏光ビームを適当な割合で重ね合わせると、焦点における強度プロファイルが Flattop 形状となる⁴。この強度プロファイルからドーナツ状 PSF を差し引くことで、サイドローブの発生を抑制できることがわかった。特に、差し引く光ビームを高次方位偏光ビームにした場合⁵、差し引いた結果として得られる PSF のサイズ(半値全幅)は 93 nm となり (NA = 1.45 油浸, 波長 488 nm, 共焦点ピンホール径 0.5 AU の場合)、サイドローブの発生もガウス状 PSF を用いた場合に比べて大きく低減できた。また、本手法を用いて共焦点イメージングシミュレーションを行った結果、従来の CLSM 画像に比べて大幅な空間分解能の向上が可能であることがわかった (Fig. 1)。

参考文献: 1. S.J. Hewlett and T. Wilson, Vis. Appl. 4, 233 (1991).

2. E. Sánchez-Ortiga et al., Opt. Lett. 37, 1280 (2012).

3. O. Haeberle and B. Simon, Opt. Commun. 282, 3657 (2009).

4. Q. Zhan and James R. Leger, Opt. Express 10, 325 (2002).

5. Y. Kozawa et al., Opt. Express 19, 15947 (2011).

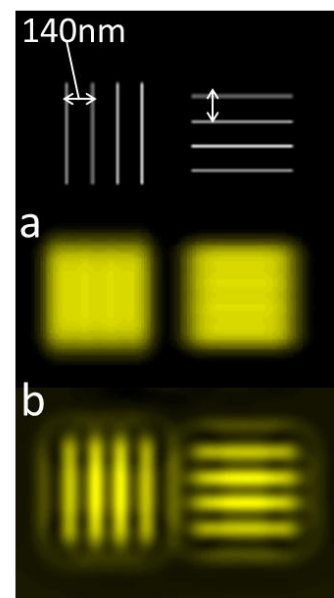


Fig.1 Results of imaging simulation by (a) conventional CLSM and (b) subtractive imaging using a flattop PSF and a high-order azimuthally polarized beam.