

可視光ベッセルビームを用いた光ニードル走査型蛍光顕微鏡法 による 3 次元イメージング

Three-Dimensional Imaging by Light Needle Scanning Fluorescence Microscopy Utilizing Visible Bessel Beams

東北大多元研 °小澤 祐市, 上杉 祐貴, 佐藤 俊一

IMRAM, Tohoku Univ., °Yuichi Kozawa, Yuuki Uesugi, Shunichi Sato

E-mail: y.kozawa@tohoku.ac.jp

【はじめに】我々は現在、レーザー走査型蛍光顕微鏡法において深さ方向に伸びたニードル状の集光スポットを励起光とし、さらに蛍光信号に対する波面制御を用いた深さ位置分解によって、観察面を移動することなく高速な 3 次元観察を可能にする新しいイメージング法の開発を進めている[1]。本イメージング法では、非回折伝搬特性を持つベッセルビームを焦点に形成することでニードル状励起スポットを得るが、ベッセルビームは本質的に中央の集光スポット周囲に多数のサイドローブが発生する特徴を持つ。そのため、従来のイメージング法では、このサイドローブによる結像特性の劣化を抑制する必要性から、近赤外域の超短パルスレーザー光を励起光源とした多光子励起イメージング系が必須であった。今回我々は、対物レンズ焦点に形成されるベッセルビームの強度分布を制御することで、ビーム断面における特定の方向に対してサイドローブを抑制できることに着目し、これによって 1 光子励起過程においても長焦点深度のニードル状励起スポットを実現できる可能性を見出した。本講演では、その原理の詳細と実際に可視光を用いたニードル状スポットを 3 次元イメージング法に適用した結果について報告する。

【結果】本イメージング法における 3 次元画像取得は、観察試料からの点発光に対応する像面での結像位置が、その深さ位置に応じて面内方向にシフトするような波面制御[2]を蛍光信号に付与することを原理とする。これにより、像面での面内シフト方向に沿って 1 次元のアレイ型検出器を設置することで、試料の深さ情報を一挙に取得できる。ここで、少なくともこの面内シフト方向に対してのみベッセルビームのサイドローブによる影響を抑制できれば、1 光子励起においても結像特性が劣化すること無く信号取得が可能と考えられる。

この点を踏まえ、波長 532 nm の光ビーム集光において、対物レンズ (開口数 1.15、水浸) の瞳面に対して切り欠きのある円環マスク[図 1(a)]を設計した。この場合、図 1(b)-(d)に示すように焦点中央を通る 1 方向 (y 軸方向) にのみサイドローブが低減され、かつ通常の円環状ビームの集光と比べて同程度の焦点深度と面内スポットサイズを持つニードル状スポットが形成された。このようなニードル状スポットを本イメージング法[1]に適用し、水中に浮遊した直径 1 μm の蛍光ビーズを観察対象としてイメージングを行ったところ、3 次元的なビーズ像の分布をサイドローブの影響なく明瞭に取得できることが分かった[図 1(e)]。

- 【文献】 [1] Y. Kozawa and S. Sato, *Sci. Rep.* **9**, 11687 (2019).
[2] T. Nakamura *et al.*, *Opt. Lett.* **43**, 5949 (2018).

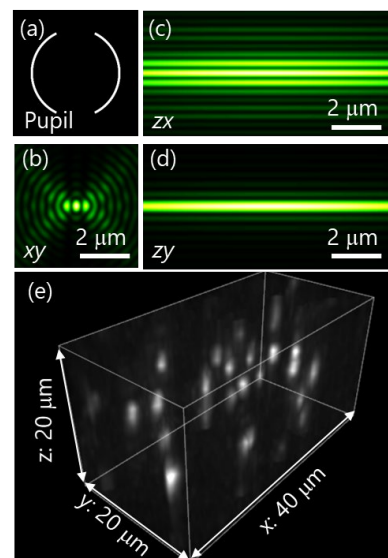


Fig. 1 (a) Truncated annular mask on the pupil. (b)-(d) Calculated focal spot patterns on (b) xy , (c) zy , and (d) zy planes. (e) Acquired 3D images of 1- μm beads in water.