

生体医用光学顕微鏡の解像限界 ～古典から最先端まで～

Resolution Limit of Biomedical Optical Microscopy ~from classic to cutting edge~

ニコン 〇福武 直樹
Nikon 〇Naoki Fukutake

E-mail: Naoki.Fukutake@nikon.com

生体医用イメージングには長い歴史がある。明視野顕微鏡などの古典的光学顕微鏡から始まり、今ではレーザーを用いた最先端顕微鏡まで様々な種類が存在する。結像の概念が確立された当初から、回折限界(古典的解像限界)により光学分解能が制限を受けることが知られていた。この基礎概念は、解像限界を理解するうえで、今でも非常に重要な指導原理となっている。しかしながら、レーザーの出現から近年に至るまでに、種々多様な相互作用を利用した顕微鏡が開発され、古典的解像限界を超える超解像顕微鏡も多種存在するのも事実である。蛍光はレーザー以前から用いられてきた相互作用であるが、蛍光顕微鏡においても、最近では共焦点顕微鏡や構造化照明顕微鏡のように超解像性をもつイメージング装置が存在する。

回折限界の原理が今なお指導原理となり得る理由は以下のとおりである。古典的光学顕微鏡とは、最低次の相互作用($\chi^{(1)}$ 相互作用)を用いる顕微鏡を指しており、試料内の分子と励起光が相互作用して回折を起こす。そのとき、光学分解能には古典的解像限界(回折限界)が適用される。蛍光($\chi^{(3)}$ 相互作用)のような高次の相互作用には、回折という概念はそのままでは適用されないが、上位概念である疑似位相整合に置き換えることによって、解像限界を扱うことができる。ただし、蛍光のようなインコヒーレント相互作用では、励起場の一つが真空場となるため、真空場を含む疑似位相整合を考えることになる。物体構造のフーリエ成分ごとに疑似位相整合を考慮することになる。このような上位概念の解像限界は、 $\chi^{(1)}$ 相互作用を用いたときの古典的回折限界を包括し、あらゆる $\chi^{(i)}$ 相互作用(i は自然数)に対する解像限界を取り扱うことができる。

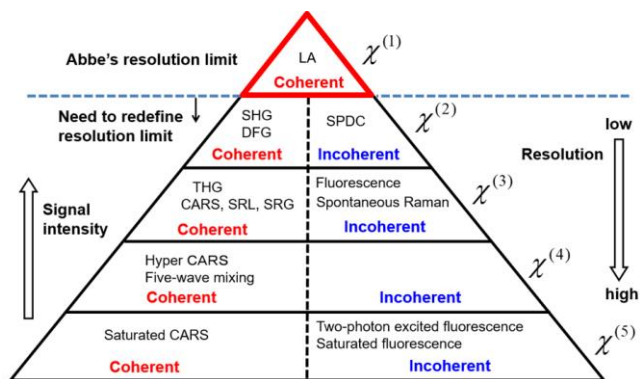


Fig. 1 Classification of interactions. LA: absorption, SHG (THG): second (third) harmonic generation, DFG: difference frequency generation, CARS: coherent anti-Stokes Raman scattering, SRG (SRL): stimulated Raman gain (loss), SPDC:spontaneous parametric down-conversion.

上位概念の解像限界を基礎原理として構築した我々の結像理論は、すべての光学顕微鏡を俯瞰して、同じ土俵で理解するための理論的枠組みを提供する。これにより、これまで個別に扱われていた光学顕微鏡が一つの原理によって統合され、相互作用ごとに解像限界が定義されることを理解することができる。Fig. 1 に相互作用の分類表を示す。一番上の赤枠で囲った相互作用が最低次の相互作用($\chi^{(1)}$ 相互作用)であり、この場合に限って、光学顕微鏡は古典的解像限界に従う。それ以外の相互作用を用いた場合は、我々の結像理論から導出されたルールにより、相互作用ごとに解像限界が計算される。古典的光学顕微鏡に対する結像理論を、最先端顕微鏡も扱える現代版へアップデートしたといつてよい。

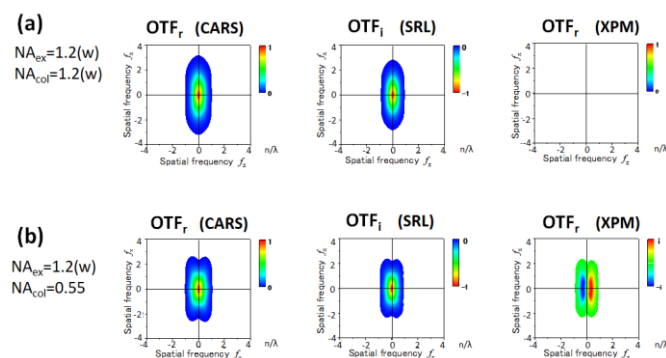


Fig. 2 OTF for CARS, SRL, and XPM. n is the average refractive index in the sample. The wavelengths of the pump and Stokes beams are 800 and 1036 nm, respectively. The vibrational frequency is assumed to be 2850 cm^{-1} . (a) $\text{NA}_{\text{ex}}=1.2$, $\text{NA}_{\text{col}}=1.2$. (b) $\text{NA}_{\text{ex}}=1.2$, $\text{NA}_{\text{col}}=0.55$.

生体医用イメージングにおいては、局部発振光(LO)と呼ばれる試料構造の影響を受けない高強度の光が存在する 경우가多く、このとき LO と信号光とが干渉して像を形成し、信号光同士の干渉が無視される。この場合、 $\text{Re}\{\chi^{(i)}\}$ と $\text{Im}\{\chi^{(i)}\}$ に対する光学伝達関数(OTF_r と OTF_i)が定義される。ただし LO を持たない顕微鏡も数多く存在する。例として、Fig. 2 に CARS/SRL/ 相互位相変調(XPM) 顕微鏡の OTF を示す。ここで、CARS に関しては試料全体から非共鳴信号が発生し LO の役割を担っているとしている。SRL 顕微鏡においては、XPM の寄与が像に重畳することを避けるため、検出 NA (NA_{col})を励起 NA (NA_{ex})と同じかそれ以上にするのが通常である。我々は、LO の有無に関わらず定義される Aperture (光学系ごとに定義される $i+1$ 個の瞳関数から計算される)を分解能指標として用いており、OTF が存在する場合は、Aperture から OTF を計算できる。

文献 N. Fukutake. Sci. Rep. **10**, 17644 (2020).