

光渦を用いた STED 顕微鏡による蛍光観測と多点走査の検討

Fluorescence observation and investigation of multi-point scanning using STED microscopy with optical vortices

柳田 瑞季 (光制御・ネットワーク研究室)

(指導教員 小林 弘和 教授)

1. 研究背景・目的

従来の光学顕微鏡の空間分解能は光の回折限界のために光波の波長程度が限界であった。その限界を超える分解能を持つ光学顕微鏡を超解像顕微鏡といい、その1つに STED 顕微鏡がある。STED 顕微鏡とは、蛍光分子を付着させた観察対象に回折限界まで集光した励起光と脱蛍光用光渦ビーム (STED 光) を同時に照射して、円環状の強度分布の中心にある暗点部のみを発光させることで回折限界を破る顕微鏡である。従来の STED 顕微鏡では観察点を走査することで2次元像を得ていた。本研究では対象物に複数の励起光と STED 光を照射し、一度に多点を観察することで測定を高速化することを目指す。本稿では実験的に生成した光渦アレイの走査と蛍光分子で標識された微粒子の蛍光を観測した結果を報告する。

2. 光渦のアレイ化の原理

光渦のアレイ化には独立に傾きを on/off する微小ミラーが格子状に配列した DMD (Digital Micromirror Device) とレンズを用いた。まず Mathematica を用いて一次元的な DMD パターンと光渦の分布を掛け算してレンズによるフーリエ変換を計算し、2 点の光渦が等強度で生成されて平行移動できるように DMD パターンを最適化した。その DMD パターンとそれを用いて生成した光渦強度分布を CMOS カメラで観測した結果を図 1 に示す。観測面では 2 点の光渦強度が並行移動する様子が観測された。

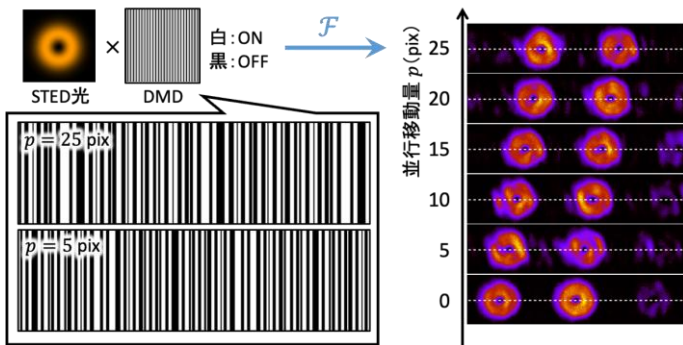


図 1 光渦アレイの生成とその平行移動

3. 蛍光の観測と照射光の多点化

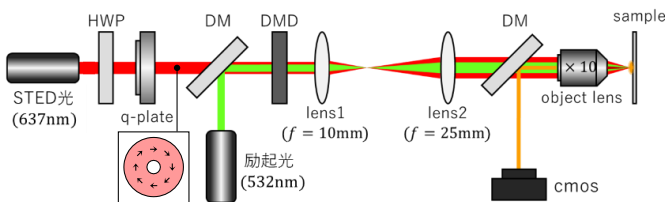


図 2 蛍光観測の実験系

蛍光観測のための実験系を図 2 に示す。STED 光には波長 637 nm、励起光には波長 532 nm のレーザーを使用した。HWP と q-plate を用いて STED 光を方位角偏光に変換した。DMD により入射光を多点化し、レンズ 1、2 の 4f 系でビーム径を拡大した後、10 倍率の対物レンズで縮小した入射光を試料に

照射して蛍光を観測した。

試料への入射光とそれによって生じた蛍光をそれぞれ図 3、図 4 に示す。図 3 (a) は基本ガウシアンビームの励起光の強度分布、図 3 (b) は STED 光となる光渦ビームの円環状強度分布、図 3 (c) は二つを重ねた強度分布である。観察する試料として蛍光色素で標識された直径 0.1, 0.2, 0.5 μm の微小球群を用いた。波長 532 nm の励起光で励起された試料は図 4 に示すようにオレンジ色の蛍光を発した。図 4 (a), (b), (c) に示すように試料の直径が大きくなると蛍光強度は低下した。

また、STED 光と励起光を同時に多点化した際の微小球群への入射光を図 5 に示す。波長により反射角が異なるため観測点ごとの STED 光と励起光の中心位置が一致せず、蛍光は観測されなかった。改善案として、励起光の DMD への入射角を増加させて反射角を補正する方法が考えられる。

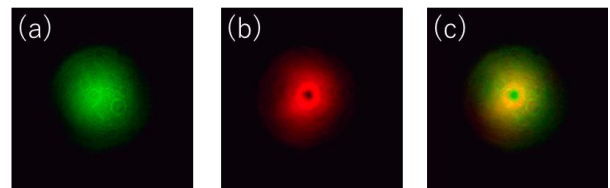


図 3 入射光 (a)励起光 (b)STED 光 (c)励起光と STED 光

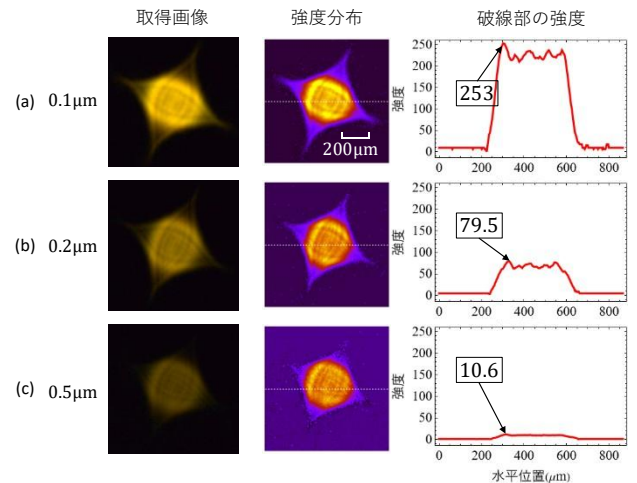


図 4 観測結果 (a)ビーズサイズ0.1 μm (b)0.2 μm (c)0.5 μm

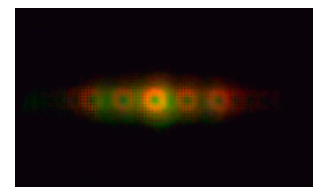


図 5 照射光の多点化

4. まとめ

本研究では STED 顕微鏡の測定速度の向上のために励起光と STED 光を多点化することを検討し、さらに STED 顕微鏡の光学系を自作して、微小球からの蛍光を観察することに成功した。