

北里大学大学院理学研究科

2022年度博士論文

3次元超解像顕微鏡法の開発と生物学への応用

**Development of three-dimensional Super-resolution Microscopy
and its Application to Biology**

池滝 慶記

指導教授 医療衛生学部 熊谷 寛

目次

論文概要	-----1
第1章 : 「研究の背景と目的」	-----3
第2章 : 「スカラー電場モデルを用いた3次元超解像顕微鏡法のイメージング理論」	-----17
第3章 : 「ベクトル電場モデルの導入」	-----38
第4章 : 「3次元超解像顕微鏡法のベクトル電場モデルによる数値解析」	-----54
第5章 : 「超解像位相板の設計法」	-----76
第6章 : 「蛍光抑制特性のデータベース化」	-----111
第7章 : 「3次元超解像装置の構築と機能確認」	-----129
第8章 : 「3次元超解像顕微鏡法による生物試料の観察」	-----160
第9章 : 「3次元超解像顕微鏡法による1分子計測」	-----183
第10章 : 「蛍光抑制効果誘導時におけるイレース光照射による副次発光過程に関する考察とその応用」	-----199
第11章 : 「3次元超解像顕微鏡法における空間分解能の理論的上限の探索と技術課題」	-----213
第12章 : 「総括と今後の展望」	-----231
謝辞	-----239

3次元超解像顕微鏡法の開発と生物学への応用

池滝 慶記

邦文要旨

顕微鏡分野において、高い深さ分解能が得られないことが歴史的な技術課題として存在する。本研究では、この技術課題に対して3次元超解像顕微鏡法を提案し、それを実証すると共に生物試料への観察評価に応用した。

本顕微鏡法は、ポンプ光で蛍光色素分子を励起し、波長の異なるイレース光を同時照射することで蛍光を人為的に抑制できる蛍光抑制効果に着目したものである。特に、誘導放出により蛍光抑制効果を起こす方式は、STED (Stimulated depletion emission) と呼ばれる。もし、3次元的に光が当たらない微細空間領域を持つようにイレース光を集光し、これをポンプ光と同時に集光すると回折限界より微細な3次元的な蛍光スポットが生成できる。このスポットで蛍光染色した試料を空間走査すると、回折限界を上回る3次元分解能で試料観察ができる。本論文では、波動光学と2波長分光学を基礎に、スカラー電場モデルにより新規に3次元超解像顕微鏡法の基礎結像理論を構築した。そして、より精密なベクトル電場モデルを導入した数値解析を行い、3次元超解像顕微鏡法の結像性能を探索したところ、本顕微鏡法は少なくとも $(100\text{nm})^3$ を上回る3次元分解能が得られることが判明した。そして、検証実験を行う為に、構築した結像理論を用いて実用的な顕微鏡照明光学系を設計し、各種蛍光色素分子の蛍光抑制効果に関する分光データを実測した。これらの知見を基に、原理検証用の3次元超解像顕微鏡装置を組み上げ、提案する顕微鏡法の空間分解能を実測した。その結果、理論予測に見合う $(100\text{nm})^3$ を上回る3次元分解能が得られることを確認した。本装置を用い、蛍光タンパクが発現した神経細胞をはじめとする生物試料を観察したところ、通常の光学顕微鏡法では観察不可能な微細で複雑な立体構造を空間分解できることが分かった。特に、生物分野でニーズが高い、E-GFPが発現したライブ試料に対しても3次元超解像顕微鏡観察ができることが確認できた。提案する3次元超解像顕微鏡法は構造が単純な位相板を対物レンズと一体で市販のレーザー走査型顕微鏡に取り付けるだけで実施できるので、本顕微鏡法の優れた汎用性と実用性を示すことができた。また、蛍光抑制効果に関して分光学的に精査したところ、STEDの概念とは相反する照明波長領域でも蛍光抑制効果を誘導することが可能であり、より広い照明波長領域で3次元超解像顕微鏡法が適用できることを新たに発見した。本論文では、3次元超解像顕微鏡法において残された解決すべき技術課題に関して論議をしつつ、更なる機能拡大に向けての提言を行った。

Development of three-dimensional Super-resolution Microscopy and its Application to Biology

Yoshinori Iketaki

Abstract

To obtain high depth resolution has been a historically technical issue. In this study, we proposed three-dimensional super-resolution microscopy (3D-SRM) based on fluorescence depletion (FD), and we demonstrated 3D-SRM for observing biological samples. In DF, the first laser (pump beam) excites dye molecules from the ground state to an S_1 state, where fluorescence light can be emitted. Next, the second laser (erase beam) prevents fluorescence emission by quenching the S_1 molecules. When FD is caused by stimulated emission, this process is called STED (stimulated depletion emission). If the erase beam with a three-dimensional minute dark spot is focused onto the dyed sample together with the gaussian pump beam, a fluorescent spot becomes finer than the diffraction limit owing to FD. Scanning the sample with this spot, we can perform 3D-SRM observation. In this study, we newly constructed the imaging theory for 3D-SRM based on the scalar diffraction theory and optical data given by two-color spectroscopy. Furthermore, performing numerical analysis using the more precise vector electric field model, the image properties of 3D-SRM were then investigated, and it was found that 3D-SRM can provide three-dimensional resolution finer than $(100\text{nm})^3$. To verify 3D-SRM, we designed a practical illumination optics for 3D-SRM system, and experimentally investigated spectroscopic properties of fluorescence dye molecules for introducing FD. Based on the obtained insight, we constructed a 3D-SRM system and evaluated spatial resolution given by 3D-SRM. As a result, we confirmed that 3D resolution of $(100\text{nm})^3$ at least, which is consistent with the theoretical prediction, can be obtained. Using this system, we observed neurons expressing fluorescent protein and other dyed biological samples. It was found that fine and complex three-dimensional structures of the samples can be resolved with spatial resolution overcoming the diffraction limit. Above all, we confirmed that 3D-SRM can be applied to observing live samples expressing E-GFP, which are in high demand in the biological field. The proposed 3D-SRM can be implemented by attaching a simple phase plate to a commercial laser scanning microscope together with an objective lens. Thus, 3D-SRM has excellent versatility and practicality. Furthermore, we spectroscopically investigated FD in detail and found that FD can be induced even in the illumination wavelength region contrary to the concept of STED, and that 3D-SRM can be applied in wider wavelength regions than originally envisioned. Discussing the remained technical issues in 3D-SRM, further expanding capabilities of 3D-SRM were investigated.

第1章 本研究の背景と目的

要旨

本研究では蛍光抑制効果を用いた3次元超解像顕微鏡法を新規に提案し、そして、これを実験的に原理検証の上、生物試料の観察に応用できることを実証した。本章では、ライフサイエンスの分野における基盤計測技術としての光学顕微鏡技術を俯瞰した。そして、本顕微鏡法を発案に至った経緯とその必要性について述べ、本論文の全体構成に関して紹介を行う。

【緒言】

今日の生命現象に関する研究は専門化のみならず他分野の研究領域と融合し、従来の生物学の枠組みを超えて深化した学問に発展しつつある。例えば、専門化の代表例としては、遺伝子レベルで発現する生命現象を解明するバイオインフォマティクスが挙げられる[1-1]。また、融合化の代表例としては、多種多様な細胞に共通する基本構造とその能動機能を解明し、システムエンジニアリングの観点から細胞の分化・分裂・運動の制御を目指す細胞工学が挙げられる[1-2]。何れの研究領域においても、細胞間及び細胞内で繰り広げられる分子レベルの相互作用の解明が基礎となっている[1-3]。具体的には、様々な生命機能の仕組みが生体分子の空間構造とその変容、並びにこれらの生体分子群間の相互動態に基づいている[1-4]。そして、これら分子群を集積することで組織・器官を形成し、細胞はシステムとしての高次生命機能を発現する[1-5]。細胞から組織・個体に至る生命現象のあらゆる階層において、この様な多要素が多元的に相互に関連する複雑なシステムの動態を観察・計測して定量的に把握することは不可欠となっている[1-6]。

この様な背景のもと、ヤンセン親子により発明された光学顕微鏡は生命科学の研究現場で何時でも簡単に生物試料の評価ができるので、今日に至るまでライフサイエンスにおける必要不可欠な基本計測ツールであり続けている[1-7]。そして、その時代の先端技術を取り入れ、日進月歩で機能を進化させ続け、その重要性は日々高まっている。特に、光学顕微鏡は生物試料にダメージを与えず生きた状態で観察ができるので、生命科学のすべての領域における研究開発で重要な貢献をしている。光学顕微鏡の空間分解能は、所謂、回折限界によりサブ μm とどまり、他の計測法、例えば電子顕微鏡や原子間力顕微鏡などと比較すると見劣りをしていた[1-8]。しかし、近年、様々な手法により、この限界は突破されて、空間分解能はナノメートル台に突入し、その弱点も克服されつつある[1-9,1-10,1-11]。また、超高感度カメラを導入することで、ビデオレートを上回る超高速で生物試料のライブ観察が可能になり、ますますその存在感を増している。更に、最先端の分光計測技術を併用することで分子レベルでの化学反応過程も追跡できる様になり、オルガネラレベルで発現する生体組

織の構造変化や生命活動を詳細に解析ができるようになった。今後、光学顕微鏡は、生命科学はもちろん、物理学、化学、電子工学、ナノエンジニアリングなどのあらゆる分野の手法を取り入れることで、生命現象を多角的に分析可能な統合的なイメージング技術として、今後更に、発展していくことが期待されている[1-12,1-12,1-14,1-15]。

【生物顕微鏡分野における課題】

一般に生命現象は立体構造をもつ細胞の内部で展開する。例えば、100nm 以下のサイズをもつ小胞体は細胞内におけるオルガネラのひとつであり、細胞内で代謝を通して巧妙なネットワークを形成しており、各種タンパク質及び脂質の合成、カルシウムの取り込みなど細胞維持に関わる基本的な役割を果たしている[1-16]。この小胞体は幾つかのサブドメインからなる微細構造をもつ。特に、局在化したサブドメインである小胞体膜に存在するリン脂質合成酵素はオートファゴソームの形成に関わり、このサブドメインの近傍でその形成が行われる[1-17]。また、神経系の情報伝達機能においては、複雑な立体構造をもつ神経網中の神経シナプス前後の細胞膜に局在するシグナル伝達分子と神経伝達物質受容体が重要な役割を担う[1-18]。以上の例が示す様に、生命科学の研究では3次元的に複雑に構造が集積した細胞内における生命現象をリアルタイムで可視化し、構造と機能を解析する作業が不可欠となっている[1-19]。

顕微鏡分野においては、それぞれの計測方式の長所を用いて、その主機能である「分解能」を競ってきた。例えば、原子間力顕微鏡を用いれば数 nm の分解能が得られる[1-20]。高圧の透過型電子顕微鏡に至っては、オングストロームの分解能が得られる[1-21]。光学顕微鏡においても各種超解像顕微鏡の出現により 10 nm より微細な分解能が得られている[1-22]。しかし、いずれも、所謂、「横分解能」と呼ばれているものである。電子顕微鏡においては、集束した電子ビームの散乱による分解能の低下の防止をするため、試料を凍結してサブ μm の厚みで切断して観察するので、得られた画像はこの厚みを透過した吸収像に対応する[1-23]。すなわち、通常の電子顕微鏡では試料の深さ方向の分解能は試料の厚みで決定される。また、原子間力顕微鏡の場合には、あくまでも試料表面の分子とカンチレバー（計測プローブ）の間で発生する原子間力をイメージングしているので、試料表面の情報しか得られない。すなわち、深さ方向の分解能力は全くない[1-24]。光学顕微鏡においても状況は同様で、深さ方向の分解能は回折限界で制限された点像分布関数で決まり、せいぜい 700 nm-500 nm に止まっている。この様に、既存の顕微鏡技術では、細胞内で展開される詳細な生命現象を立体的、かつ高解像で可視化することは困難を極めている。

【光学式の3次元顕微鏡法の現状】

生物系ユーザーの3次元イメージングに関する強い要望に対して、様々な取り組みがなされている。電子顕微鏡法においては、回転ステージ上に置かれた生物試料の凍結切片を様々な角度からの透過画像を撮影し、数値処理により3次元画像に構成するトモグラフィ

一法が有名である。これにより nm オーダーの分解能の立体画像を得ている。また、X線顕微鏡法においても同様な手法で、nm オーダーの分解能の立体画像を得ている。これらの方法は高解像の構造解析に適している[1-25]。しかし、ウェット状態の生物試料の撮影が困難であり、化学反応を伴う生体構造と動態変化を可視化することができないので、非侵襲的な計測法である光学顕微鏡をベースにした様々な3次元観察法の開発が進行している。

1) 共焦点レーザー走査型顕微鏡

図1-1は検出系に共焦点光学系を導入したレーザー走査型顕微鏡システムを示す（以下、共焦点レーザー走査型顕微鏡）。このシステムでは、蛍光染色した試料に対物レンズにより回折限界でレーザー光を集光する。そして、この集光点から発光した蛍光をコレクターレンズで回折限界以下のサイズのピンホール（以下、共焦点ピンホール）に集光し、これを通過した蛍光のみを計測する。この様な照明系と検出光学系を組み合わせる場合、システムとしての点像分布関数（Point spread function : PSF）は[1-26]、照明側と検出側の PSF のコンボリューションで与えられるので、この PSF の強度半値（full width at half maximum : FWHM）は回折限界と比較して約 0.7 倍程度に狭くなる。この共焦点光学系により深さ分解能を向上させることが出来るので、従来の光学顕微鏡よりも鮮明な3次元画像を取得することができる[1-27]。

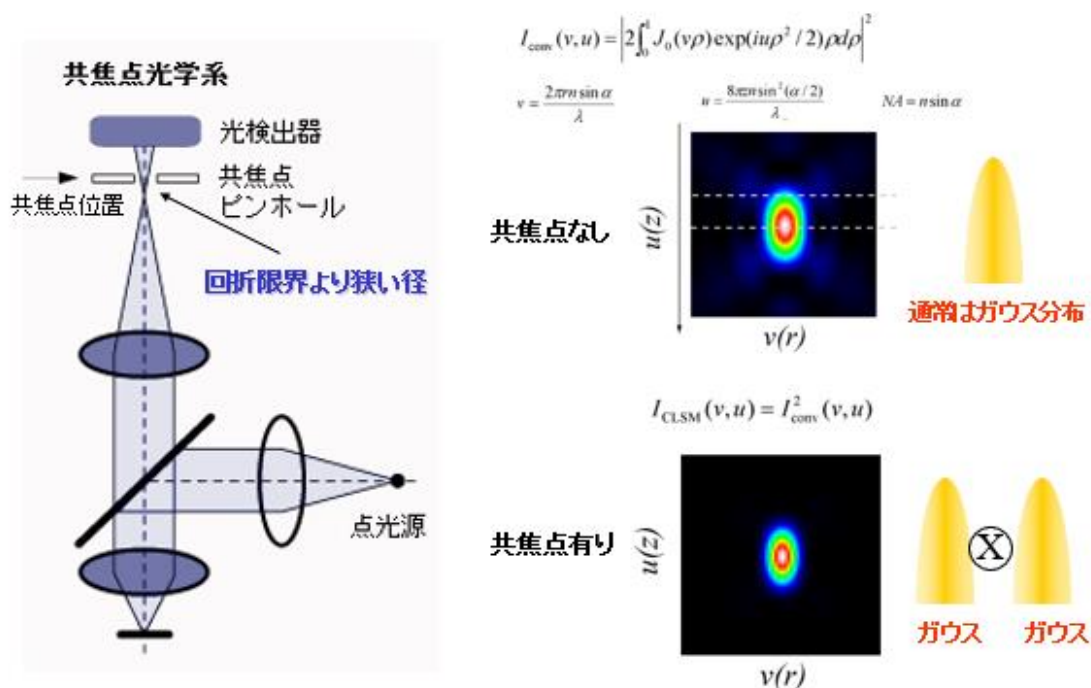


図1-1：共焦点顕微鏡の原理。

2) ライトシート顕微鏡

図1-2はライトシート顕微鏡の原理を示す。この方法では、それに示す様に、通常の顕微鏡の照明方式と異なり、観察用の対物レンズの光軸に対して直交する方向から染色した試料に照明する。照明の際の工夫として、アキシコン光学系を用いて、試料焦点面方向には広い面積をもちつつ、深さ方向には回折限界サイズの幅しかないシート状の照明領域を形成する。このシート状に照明された試料の領域面を一挙に対物レンズでイメージングを行う[1-28]。そして、試料面を光軸に対して移動しながらイメージングすることで、試料の任意の深さ位置の画像を取得できる。ライトシート顕微鏡は、平面方向及び深さ方向の分解能が回折限界で限定されるが、高速で3次元イメージングが可能なので、生命現象のダイナミクスをリアルタイムで観察できる利点をもつ[1-29]。

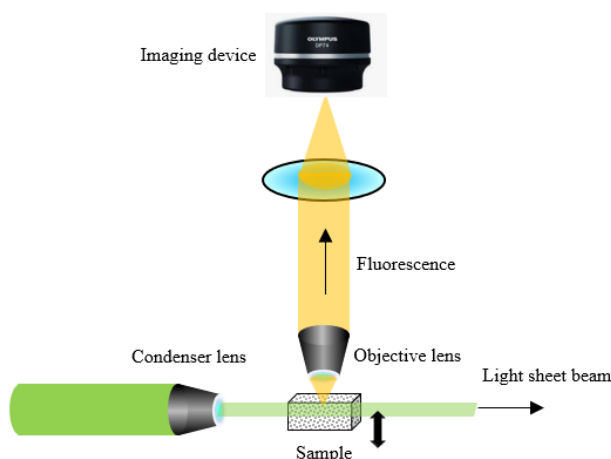


図1-2：ライトシート顕微鏡の原理。

3) ホログラフィック顕微鏡

この顕微鏡は、ホログラム技術にトモグラフィー技術を導入したものである。すなわち、試料にホログラム照明を行い、内部で屈折率の分布に応じて位相変調された透過光の干渉像を各照明角度で測定し、3次元画像を数値的に構成する[1-30]。この方法の優れた点は、弱い強度の照明光を用い、かつ、無染色で試料内部における吸収現象を誘起することなく画像計測が出来るので、生物試料に対するダメージが極めて少ない点にある。近年では、照明光に生物試料に対して吸収の少ない波長帯域の軟X線を用いて、高解像度化が進められている[1-31,1-32,1-33]。

【本研究の目的】

電子顕微鏡を含め現存する顕微鏡法の共通の技術課題として、原理的に深さ方向の分解能が不十分なことにある。平面分解能に関しては、光学顕微鏡であっても各種超解像顕微鏡法を用いれば、100 nm より高い分解能で画像計測が可能である[1-34,1-35,1-36,1-37]。しか

し、現状ではその高い分解能を活用しきれていない。図1－3は、共焦点顕微鏡法を用いた場合とそうでない場合で観察した時のラットの肝細胞のアクチンフィラメント（試料の厚みは200 μm ）のレーザー走査型顕微鏡画像の例である。図1－3によれば、共焦点顕微鏡法を用いない場合には、像がボケており、かつ、背景光の多い不鮮明な画像となっている。対象的に共焦点顕微鏡法を用いると、背景光が除去されアクチンフィラメントの微細構造が明瞭に空間分解できている[1-38]。なぜなら、通常、レーザー照明光を集光するとそのスポットの形状は光軸に沿った回転体となり、試料が深さ方向に空間構造を持つ場合にはスポット内に含まれるすべての構造体から発光する蛍光をすべて検出することになる。しかし、共焦点顕微鏡法を用いると、深さ分解能が向上するために焦点面以外の構造からの蛍光を低減できるので、本来の設計分解能で劣化することなく画像化ができる。このことは、生物顕微鏡の開発において極めて重要な技術課題を提示している。すなわち、深さ分解能を同時に向上させないと平面分解能も低下してしまうことを示している。実際、透過型電子顕微鏡では試料切断して薄膜化しないと高分解能で画像化が出来ないし、既存の超解像顕微鏡でも微小管やアクチンリングなど平面展開した試料においてのみしかチャンピオンデータが得られていない。この様に、細胞内の生命現象を3次元でイメージング行おうという生物系研究者のニーズに応えることは、細胞内の構造やダイナミクスを観察できるべく平面方向のみならず深さ方向にも高い分解能をもつ顕微鏡法を確立することと同義語である。すなわち、空間計測において広く共通する新規基盤計測技術を創成することに他ならない。この様な背景のもと、各種超解像顕微鏡法においては深さ方向の分解能の向上が求められており、そのための研究開発が展開され始めている[1-39,1-40]。本研究ではこの課題を解決するために、蛍光抑制効果を用いた3次元超解像顕微鏡法を新規に提案する。そして、この手法を実証し、かつその生物分野における有用性を示すことにある。

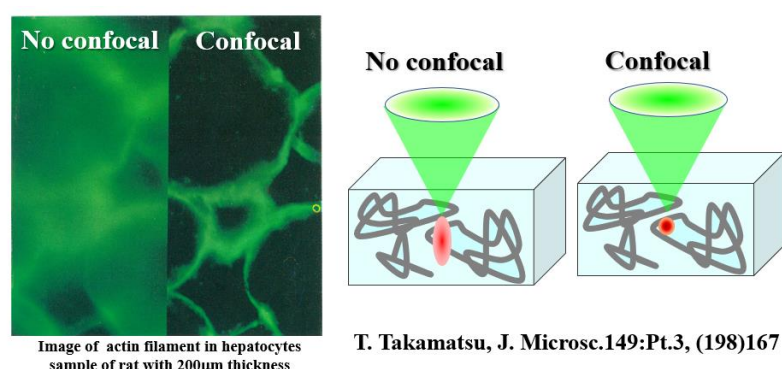


図1－3：共焦点顕微鏡法による画像の鮮明化。

【蛍光抑制効果を用いた3次元超解像顕微鏡法の提案】

近年、2波長蛍光分光法と最新の顕微鏡光学技術の融合により、原理的に不可能と思われた回折限界を上回る平面分解能を提供できる超解像顕微鏡法が開発され、バイオサイエン

スの発展を支える次世代の先端機器計測技術として期待されている[1-41,1-42]。この2波長蛍光分法においては、第1のレーザー光（ポンプ光）で基底状態（ S_0 ）の色素分子を第1電子励起状態の S_1 状態に励起した後、更により長波長の第2のレーザー光（イレース光）で S_1 状態の分子を照明する。このとき、誘導放出やより高い電子励起状態（ S_n ）への誘導吸収が起こり、 S_1 分子のポピュレーションが減少するので、結果的に分子からの蛍光が抑制される（蛍光抑制効果（図1-4））[1-43]。物理化学の分野では、この蛍光強度の変化を観測することにより、古くから高い励起状態の分子の量子状態の解析や光化学反応の追跡を行ってきた[1-44,1-46]。この分光過程に着目すると、超解像顕微鏡観察が可能となる。もし、タイトな中空形状のスポットをもつイレース光をポンプ光と共に色素染色した試料上に集光すれば、ポンプ光の集光スポットの辺縁部において蛍光抑制効果が誘導できるので、ポンプ光の回折限界よりも微細な蛍光スポットが集光面で得られる。このスポットにより試料を走査すれば、回折限界を突破した高い空間分解能で試料の蛍光観察ができる。特に、誘導放出により蛍光抑制する過程を用いる方法は、Stimulated emission depletion microscopy、所謂、STED として広く知られている[1-42]。蛍光抑制効果を用いた超解像顕微鏡法の最大の特徴は、数値的な画像処理に基づいた蛍光局在化法や構造化照明法といった他の超解像顕微鏡法とは異なり、一切の人為的な数値演算処理を用いることなく信頼性の高い超解像顕微鏡観察画像を提供できることにある。

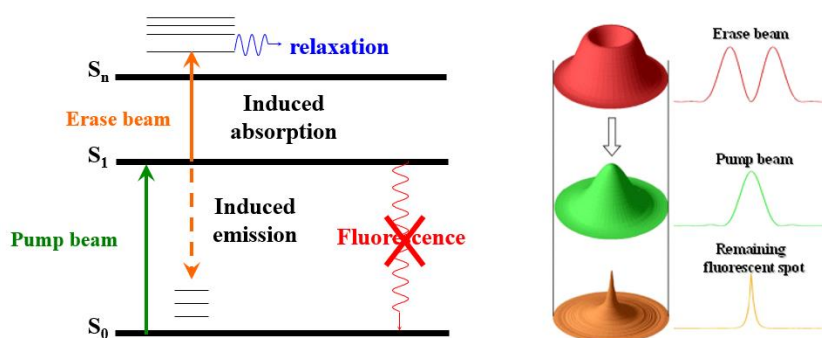


図1-4：蛍光抑制効果を用いた超解像顕微鏡法の原理。

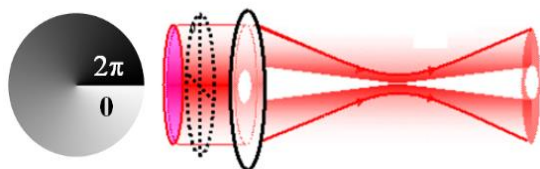


図1-5：ラゲール・ガウシアンビーム。

イレース光を中空状の空間形状に変換する方法としては、波面制御技術を用いることで実現できる。具体的には、イレース光のビーム面内において、光軸中心に位相が 360° 回転する様に位相変調する。図1-5に示す様に、ビーム面内では光軸に関する点対称の位置で常に位相が反転するので、電場は光軸上でキャンセルする。従って、電場は光軸上でゼロとなり、ビームは中空状の空間形状をもつ。これはラゲール・ガウシアンビームと呼ばれるものである[1-47]。特に、円偏光のラゲール・

ガウシアンビームを高開口数の対物レンズで集光すると、非常にタイトなドーナツ状の集光スポットが得られるため、非常に高い平面分解能が得られる。例えば、図 1-6 は、蛍光色素分子を分散したフォトリソスト面にナノインプリントした微細グレーティングパターンを超解像顕微鏡観察した例であるが、通常のレーザー走査型顕微鏡では不可能な回折限界以下の細線構造が空間分解できている[1-48]。また、図 1-7 はスティックレンズを用いた超解像顕微鏡法の応用例である。スティックレンズは内視鏡の細口径対物光学系とリレー光学系を組合わせたものであり、スティックレンズを生体試料に直接刺して深部観察ができる。しかし、構造上、開口数が高い光学系が設計できないので、分解能が低くなるという問題点があった。図 1-8 は NA が 0.7 のスティック対物レンズで 200 nmφ の蛍光ビーズを超解像顕微鏡観察した例である（ポンプ光波長：532 nm、イレース光波長：647 nm）[1-49,1-50]。それによれば、回折限界である 460 nm より狭い 300 nm の間隔で隣接した蛍光ビーズを空間分解することが出来ている。長波長の照明光や低 NA 対物レンズを用いた悪条件下で、分解能の低下を補う補償機能も提供できることを示している。

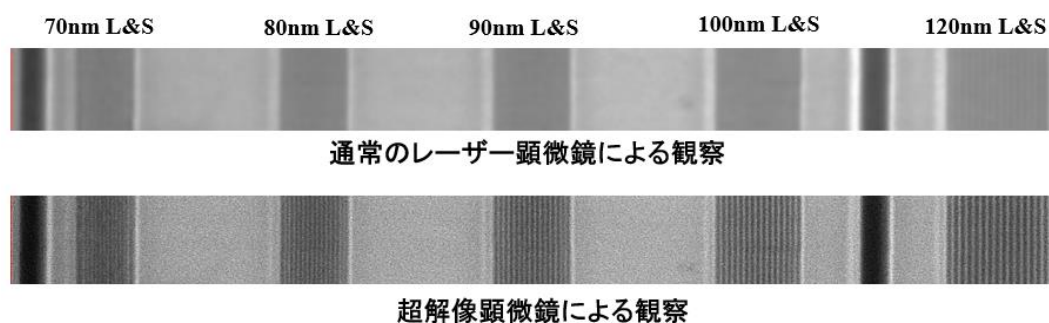


図 1-6： 蛍光色素分子を分散したフォトリソスト面の微細グレーティングパターンの超解像顕微鏡観察例。

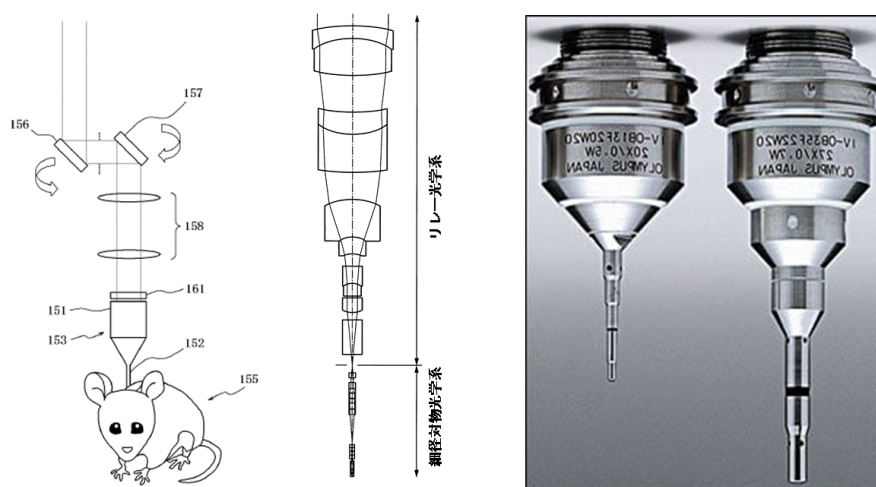


図 1-7：内視鏡細口径対物光学系とリレー光学系を組み合わせたスティック対物レンズ。

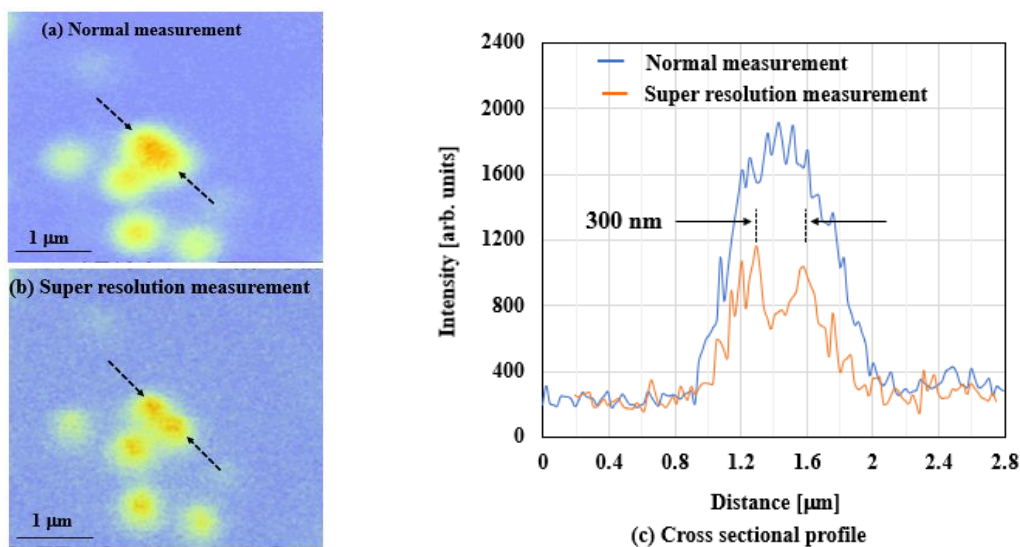


図 1－8：NA が 0.7 のスティック対物レンズを用いた 200 nm ϕ 蛍光ビーズの超解像顕微鏡観察例。(a) 通常のレーザー走査型顕微鏡による観察 (b) 超解像顕微鏡による観察 (c) 破線部に沿った断面強度分布。

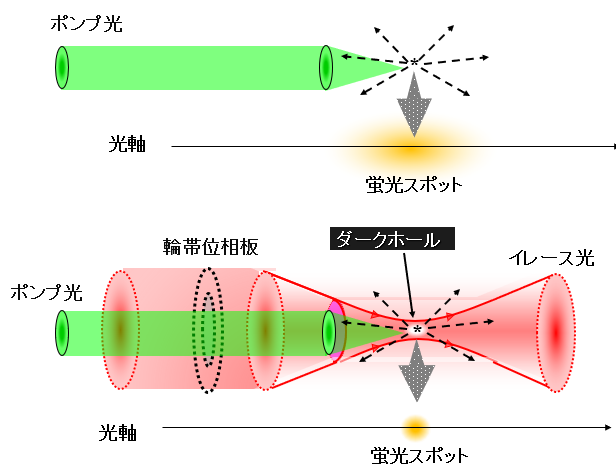


図 1－9：3次元超解像顕微鏡法の原理。

この超解像顕微鏡法はイレース光の照明方法を工夫すれば、目標とする3次元顕微鏡法が実現する。すなわち、ディストラクティブな干渉をイレース光に適用することで簡単に深さ方向の分解能を向上させることができる。具体的には、輪帯中央領域で位相が反転する波面分布をもつイレース光を集光して、焦点とそのごく近傍においてのみ電場を3次的に相殺する。その結果として、イレース光の焦点近傍に光の当たらない微小な3次元空間領域、すなわちダークホールが生成できる。そして、この様なダークホールをもつイレース光を通常のガウシアン型のポンプ光と共に同軸で試料に集光すれば、蛍光抑制効果を光軸方向に

も誘導できる。その結果として、蛍光スポットは光軸方向にも回折限界サイズ以下に収縮し、深さ分解能が向上する（図 1-9）[1-51]。加えて、平面方向にも蛍光抑制効果が誘導できる。従って、原理的に蛍光スポットのサイズは 3 次元的に回折限界以下のサイズに収縮するので、高度な光学技術を必要とすることなく 3 次元的に超解像顕微鏡観察が可能となる。各種超解像顕微鏡法においても 3 次元空間での高解像度化の努力が進行しているが、この顕微鏡法は本論文で述べる様に極めてシンプルな手段で実現可能である。本研究では上述の空間分解機能をもつ 3 次元超解像顕微鏡法を開発したので、本論文においてその詳細を述べる。

【本論文の構成】

本論文では、波動光学及び分光学の知見をベースに発案した 3 次元超解像顕微鏡の原理から実証に至る過程を述べ、生物分野の応用例を示す。そして、本顕微鏡の有用性と更なる技術発展に必要な今後の技術課題について論じる。本論文は以下の様に全 12 章からなる。

第 1 章：「研究の背景と目的」

生物顕微鏡分野における課題について俯瞰し、3 次元超解像顕微鏡の必要性に関して論じる。そして、それを実現するための原理提案を行った。

第 2 章：「スカラー電場モデルを用いた 3 次元超解像顕微鏡法のイメージング理論」

波動光学と分光学の知見を基に、提案する 3 次元超解像顕微鏡法により深さ方向の分解能が飛躍的に向上できることを解析的に証明する。そして、同時に、既存の顕微鏡では不可能な 3 次元超解像顕微鏡機能について論じる。

第 3 章：「ベクトル電場モデルの導入」

高 NA 対物レンズを用いる場合、焦点近傍で照明光は光軸方向と平行な電場ベクトルが発生する。この場合にも対応できる様に、ベクトル電場モデルを導入し、第 2 章において導出したイメージング理論を拡張した。

第 4 章：「3 次元超解像顕微鏡法のベクトル電場モデルによる数値解析」

正確なベクトル電場モデルを用いてシミュレーションを行い、3 次元超解像顕微鏡法の分解能について考察した。この際、分解能をより向上させる為のイレース光の生成法についても検討した。

第 5 章：「超解像位相板の設計法」

第 3 章で判明した空間分解能を得るために、ポンプ光とイレース光の照明条件をシミュレーションにより詳細に検討した。具体的には、実証実験を念頭にイレース光を整形する際

に不可欠な超解像位相板の加工精度及びアライメント精度に関して論じる。さらに、3次元超解像顕微鏡法を容易に実現するための2波長対応の超解像位相板の設計法を提案した。

第6章：「蛍光抑制特性のデータベース化」

提案する顕微鏡法を運用するために不可欠な蛍光色素分子の蛍光抑制特性を実験的に調査した。ナノ秒のレーザースystemを用いた2波長蛍光分光計測システムを組上げて、主要蛍光色素分子に関してデータベース化を行った。

第7章：「3次元超解像装置の構築と機能確認」

提案する3次元超解像顕微鏡法を実証するために、2章から6章で得た知見を基礎とし市販のレーザ走査型顕微鏡を母体機とした検証実験システムを構築した。本章では本システムの設計思想及び具体的な装置構成について述べる。そして、構築した3次元超解像装置の基本性能について論じる。作製した超解像位相板のビーム変調機能と3次元空間分解機能について確認した。

第8章：「3次元超解像顕微鏡法による生物試料の観察」

3次元超解像顕微鏡法を生物試料の観察に応用した。蛍光顕微鏡の較正確認に最も良く用いられる微小管及び代表的な生体試料である HeLa 細胞について3次元顕微鏡観察を行った。更に、近年、生命現象の解明に広く用いられている蛍光タンパク発現試料の3次元観察の結果についても報告する。

第9章：「3次元超解像顕微鏡法による1分子計測」

3次元超解像顕微鏡法を導入した蛍光相関法、すなわち3次元超解像蛍光相関法を提案した。本顕微鏡法を用いるとアトリッターオーダーの蛍光スポットが得られる、このスポット用いると、高濃度の分子の拡散運動を1分子レベルで解析することを可能にする。本章では、提案する蛍光相関法の検証実験について報告する。

第10章：「蛍光抑制効果誘導時におけるイレース光照射による副次発光過程に関する考察とその応用」

蛍光抑制効果を誘導する際に、イレース光照射により2光子吸収過程とアンチストークス蛍光過程が競合して発生し、これらの副次過程により3次元超解像顕微鏡法の結像特性機能が毀損されることを見出した。本章では、この技術課題を提起するとともに、これらの副次光を利用した照明法を新規に提案した。

第11章：「3次元超解像顕微鏡法における空間分解能の理論的上限の探索と技術課題」

STED Star 照明法は光学原理的に最小の3次元ダークホールを生成することができる。こ

の照明法を導入することを仮定して、3次元超解像顕微鏡法における上限空間分解能をベクトル電場モデルにより見積もった。そして、これを実現するための光学技術上の限界と技術課題を提起した。

第12章：「総括と今後の展望」

最終章である本章では、一連の研究開発結果を総括する。それと共に、3次元超解像顕微鏡法において解決すべき残存する技術課題と3次元超解像顕微鏡法の更なる機能拡大に向けての提言を行う。

【第1章：参考文献】

- 1-1) J. Gauthier, A. T. Vincent, S. J. Charette, and N. Derome, *Briefings in Bioinformatics* **20**, 1981(2019) ; <https://doi.org/10.1093/bib/bby063>.
- 1-2) D. C. Cameron, and I-Teh Tong, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **38**, 105 (1993) ; <https://doi.org/10.1007/BF02916416>.
- 1-3) R. Iizuka, T. Funatsu, and S. Uemura, *Methods. Mol. Biol.* **778**, 215 (2011) ; https://doi.org/10.1007/978-1-61779-261-8_14.
- 1-4) R. Morita, N. Sanzen, H. Sasaki, T. Hayashi, M. Umeda, M. Yoshimura, T. Yamamoto, T. Shibata, T. Abe, H. Kiyonari, Y. Furuta, I. Nikaido, and H. Fujiwara, *Nature* **594**, 547 (2021) ; <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03638-5>.
- 1-5) A. Kawamoto, T. Miyata, F. Makino, M. Kinoshita, T. Minamino, K. Imada, T. Kato, and Namba, *Nat. Commun.* **12**, **4223**(2021) ; <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24507-9>.
- 1-6) T. K. Sato, R. G. Yamada, H. Ukai, J. E. Baggs, L. J. Miraglia, T. J. Kobayashi, D. K. Welsh, S.A. Kay, H. R. Ueda, and J. B. Hogenesch, *Nature Genetics* **38**, 312 (2006) ; J. B. Hogenesch, *Nature Genetics* **38**, 312 (2006).
- 1-7) <https://www.olympus-lifescience.com/ja/support/learn/06/023/>.
- 1-8) E. Abbe, *Arch. für Mikroskopische Anat.* **9**, 413 (1873).
- 1-9) 廣島 通夫、日本化学会情報化学部会誌 **38** 巻、p12 (2020) ; <https://doi.org/10.11546/cicsj.38.12>.
- 1-10) M. Baumgartl, M. Chemnitz, C. Jauregui, T. Meyer, B. Dietzek, J. Popp, J. Limpert, and A. Tünnermann, *Optics Express* **20**, 4484(2012) ; <https://doi.org/10.1364/OE.20.004484>.
- 1-11) M. R. Ayres, and R. R. McLeod, *Applied Optics* **45**, 8410 (2006) ; <https://doi.org/10.1364/AO.45.008410>.
- 1-12) L. Gomez, R. Bachelot, A. Bouhelier, G. P. Wiederrecht, S. Chang, S. K. Gray, F. Hua, S. Jeon, J. A. Rogers, M. E. Castro, S. Blaize, I. Stefanon, G. Lerondel, and P. Royer, *Journal of the Optical Society of America B* **23**, 82 (2006) ; <https://doi.org/10.1364/JOSAB.23.000823>.
- 1-13) B. C.Gregório da Silva, R. Tam, and R J.Ferraria, *Computers in Biology and Medicine* **129**, 1(2021) ; <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2020.104133>.
- 1-14) K. Ishitsuka, M. Koide, M. Yoshida, H. Segawa, P. Leproux, V. Couderc, M. M. Watanabe, and H. Kano ; *Journal of Raman Spectroscopy* **48**, 8 (2017) ; <https://doi.org/10.1002/jrs.4979>.
- 1-15) S. Bakas, D. Uttamchandani, H. Toshiyoshi and R. Bauer, *Sci. Rep.* **11**, 14100 (2021) ; <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93454-8>.
- 1-16) M. E. G. de Araujo, G. Liebscher, M. W. Hess, and L. A. Huber, *Traffic* **21**, 60 (2020) ; <https://doi.org/10.1111/tra.12714>.
- 1-17) D. S. Schwarz, and M. D. Blower, *Cellular and Molecular Life Sciences* **73**, 79 (2016) ; <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2052-6>.

- 1-18) A. V. Leopold, D. M. Shcherbakova, and V. V. Verkhusha, *Cell. Neurosci.* **23**,1 (2019) ;
<https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00474>.
- 1-19) H. Schneckenburger, and V. Richter, *Photonics* **8**, 275(2021) ;
<https://doi.org/10.3390/photonics8070275>.
- 1-20) V. V. Korolkov, A. Summerfield, A. Murphy, D. B. Amabilino, K. Watanabe, T. Taniguchi, and P. H. Beton, *Nat Commun* **10**, 1537 (2019) ; <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09571-6>.
- 1-21) N. Jonge, L. Houben, R. E. Dunin-Borkowski, and F. M. Ross, *Nature Reviews Materials* **4**, 6 (2019) ; <https://doi.org/10.1038/s41578-018-0071-2>.
- 1-22) L. Schermelleh, R. Heintzmann, and H. Leonhardt, *J Cell Biol* **190**,165 (2010);
<https://doi.org/10.1083/jcb.201002018>.
- 1-23) R. Ramachandra, H. Demers, and N. Jonge, *Microscopy and Microanalysis* **19**,1(2013) ;
<https://doi.org/10.1017/S143192761201392X>.
- 1-24) H. Barnard, B. Drake, C. Randall, and P. K. Hansma, *Rev Sci Instrum.* **84**, 123701 (2013) ;
<https://doi.org/10.1063/1.4821145>.
- 1-25) E. Fogelqvist, M. Kördel, V. Carannante, Björn Önfelt & Hans M. Hertz, *Sci Rep* **7**, 13433 (2017) ; <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13538-2>.
- 1-26) C. Sheppard, *Journal of Microscopy* **149**,73(1988).
- 1-27) C. Sheppard, *Optic* **80**,53(1988).
- 1-28) E. H. K. Stelzer, F. Strobl, B. Chang, F. Preusser, S. Preibisch, and K. McDole, *Nat Rev Methods Primers* **1**, 73 (2021) ; <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00069-4>.
- 1-29) P. A. Santi, *J Histochem Cytochem.* **59**,129 (2011) ;
<https://doi.org/10.1369/0022155410394857>.
- 1-30) F. Dubois, C. Yourassowsky, O. Monnom, J.-C. Legros, O. Debeir, P. V. Ham, R. Kiss, and C. Decaestecker, *J. Biomedical Optics* **11**, 054032 (2006) ; <https://doi.org/10.1117/1.2357174>.
- 1-31) N. Watanabe, and S. Aokia, *Journal of Synchrotron Radiation* **5**, 1088 (1998) ;
<https://doi.org/10.1107/S0909049597018943>.
- 1-32) M. Krenkel, M. Toepperwien, F. Alves, and T. Salditt, *Acta Cryst. A* **73**, 282 (2017) ;
<https://doi.org/10.1107/S2053273317007902>.
- 1-33) N. Bokor, and Y. Iketaki, *Optics. Express* **17**, 5533 (2009) ;
<https://doi.org/10.1364/OE.17.005533>.
- 1-34) E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M.W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H. F. Hess, *Science* **313**, 1642 (2006);
<https://doi.org/10.1126/science.1127344>.
- 1-35) R. Heintzmann, and Thomas Huser, *Chem. Rev.* **117**, 13890 (2017) ;
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00218>.
- 1-36) T. Klar, and S. Hell, *Opt. Lett.* **24**, 954 (1999) ; <https://doi.org/10.1364/OL.24.000954>.

- 1-37) T. Watanabe, Y. Iketaki, T. Omatsu, K. Yamamoto, S. Ishiuchia, M. Sakaia, and M. Fujii, Chemical Physics Letters **371**, 634(2003) ; [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(03\)00315-4](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(03)00315-4).
- 1-38) T. Takamatsu, and S. Fujita, Denshi kenbikyo **28**, 68(1993) ;
<https://doi.org/10.11410/kenbikyo1950.28.68>.
- 1-39) F. Ströhl, and C. F. Kaminski, Optica **3**, 667-677 (2016) ;
<https://doi.org/10.1364/OPTICA.3.000667>.
- 1-40) P. Tinnefeld et al. (eds.), “Far-Field Optical Nanoscopy”, Springer Ser Fluoresc, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013 ; https://doi.org/10.1007/4243_2013.
- 1-41)池滝慶記、藤井正明、特願平 6-329165 (1994)。
- 1-42) S. W. Hell, and J. Wichmann, Opt. Lett. **19**, 780 (1994) ;
<https://doi.org/10.1364/OL.19.000780>.
- 1-43)M. Ito and M. Fujii: Two-Color Double Resonance Spectroscopy for the Study of High Excited States of Molecules, Advances in Multiphoton Processes and Spectroscopy, Vol.4, edited by S. H. Lin (World Scientific, Singapore, 1988).
- 1-44) C. E. Hamilton, J. L. Kinsey, and R. W. Field, Ann. Rev. Phys. Chem. **37**, 493 (1986).
- 1-45) M. Fujii, T. Ebata, N. Mikami, and M. Ito, J. Phys. Chem., **88**, 4265 (1984).
- 1-46) T. Watanabe T, M. Miyata M, Y. Iketaki, M. Fujii, and A. Yagishita, J. Korean Phys. Soc. **32**,388(1998).
- 1-47) L. Allen, M. W. Beijersbergen, R. J. C. Spreeuw, and J. P. Woerdman, Phys. Rev. A **45**, 8185 (1992) ; <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.45.8185>.
- 1-48)池滝慶記、特願 2018-510015 (2016).
- 1-49) <https://www.labbulletin.com/articles/olympus-microprobe-objective-lenses-for-studying-biological-processes-in-living-animals-with-minimal-surgery>.
- 1-50) <https://www.janelia.org/sites/default/files/Support%20Teams/Light%20Microscopy/Olympus%20Objectives.pdf>.
- 1-51) Y. Iketaki, Jpn. J. Appl. Phys. **49** , 048003 (2010).

第2章 スカラー電場モデルを用いた3次元超解像

顕微鏡法のイメージング理論

要旨

スカラー電場モデルを用いて3次元超解像顕微鏡の点像分布関数、すなわち、point-spread-function (PSF) を解析的かつ定量的に導いた。中央輪帶領域で位相が反転するビーム光を集光すると、ディストラクティブな干渉により焦点近傍で電場強度が相殺されて光の当たらない3次元微小空間、すなわちダークホールが生成できる。本章では、蛍光抑制効果を定式化し、ダークホールをもつイレース光を用いたときの蛍光スポット、すなわち、PSF を理論解析した。3次元超解像顕微鏡機能について考察したところ、3次元的に回折限界よりも遥かに微細な PSF が得られることを確認した。

【緒言】

3次元超解像顕微鏡法においては、第1章に述べた様に、イレース光を集光して焦点近傍において光が当たらない3次元ダークホールを生成する。このような集光したイレース光ビームをポンプ光と重ね合わせて蛍光染色した試料に照明することにより、焦点以外の領域の蛍光領域を消去できる。既存の蛍光抑制効果を用いた超解像顕微鏡法では、ラゲール・ガウシアンビームを用いることで、平面分解能を向上させることが出来る。ラゲール・ガウシアンビームの波面分布は光軸に関して周回すると1波長分の位相差が螺旋状に変化するので、このビームを集光すると光軸上で電場が相殺する(図1-5)。従って、3次元的には「マカロニ状」の中空形状を持つ[2-1,2-2]。同様に、動径方向に位相差が変化する波面を持つビームを集光しても、焦点面上に中空構造をもつ集光パターンが得られる。だが、この場合には光軸方向にも空間的に電場の強度変調を与えることができ、光軸方向にもビームプロファイルを変調できる。その代表的な例が、ビーム中央部(内輪部)とその外側の輪帶領域(外輪部)で位相差が $\lambda/2$ (或いは位相角 π)ジャンプする波面を持つ様な、輪帯位相変調型ビームが挙げられる(図2-1)[2-3]。外輪部を通過した光と内輪部を通過した光は振動電場の位相がお互い符号が反対なので、ラゲール・ガウシアンビームと同様に、これらの光を重複して集光すると焦点において電場強度が相殺される。このビームは、焦点を境に光軸方向にも位相が反転するので、焦点前後で強い集光スポットが発生する。すなわち、この場合には、焦点面内のみならず、光軸方向を含む断面でも中空状のビームプロファイルをもつ。その結果、焦点が特異点となり、それ以外の立体空間でビーム強度が存在する3次元ダークホールが生成できる。加えて、このビームはラゲール・ガウシアンビームと比較するとビーム整形が容易なので実用性も高い。本章では蛍光抑制効果の定式化を行った上で、輪帯位相

変調型ビームの空間形状をスカラー電場モデルにより精査を行い、3次元超解像顕微鏡法の空間分解能に関して考察する[2-4]。

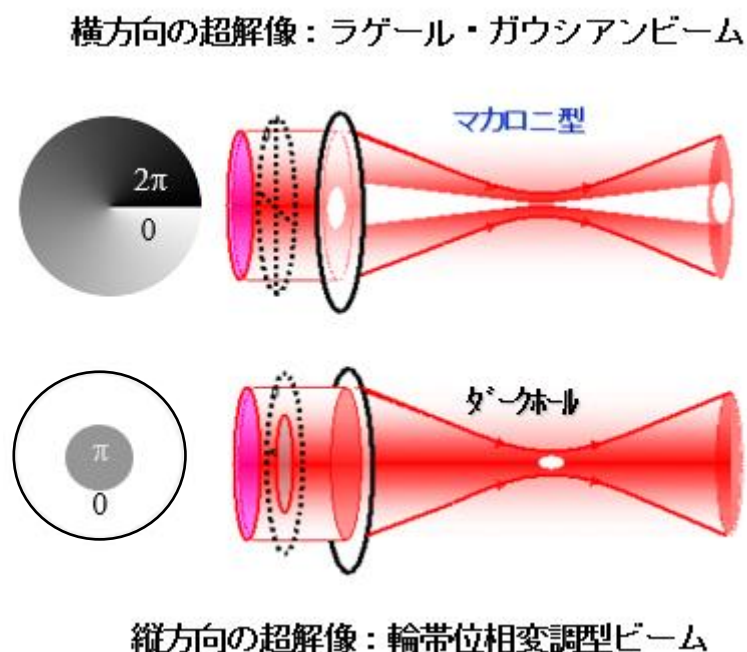


図 2-1：輪帯位相変調型ビームの生成とラゲール・ガウシアンビームの生成。

【蛍光抑制効果の解析的な表現】

図 2-2 は、波長 (λ_p) のポンプ光と波長 (λ_e) のイレース光を凝集相中の分子に照射したときの反応過程を示したものであり、蛍光抑制効果は 3 準位モデルにより定量的に記述できる。図 2-2 に示す様に、フォトンフラックス (I_p) のポンプ光により S_0 の分子は S_1 へ励起された後に、引き続きフォトンフラックス (I_e) のイレース光により高位の電子励起状態 S_n に励起され、一部は三重項状態 T_n に項間交差する。 S_n の分子はピコ秒のオーダーで S_1 に緩和するが (Kasha の法則) [2-5]、イレース光の照射が続く限り S_n への再励起が繰返され、その間に内部転換や項間交差、更には溶媒分子の衝突により無輻射緩和の速度が増大し、 S_1 からの蛍光が抑制される。また、 λ_e が蛍光波長帯域にあれば誘導放出によって S_1 分子は強制的に S_0 の振動励起状態に遷移するので、この過程によっても蛍光緩和が抑制される。分子の蛍光寿命を (τ) とすると、イレース光照明時の S_0 、 S_1 、 S_n の各状態に対応する占有確率 (N_0)、(N_1)、(N_n) は式 (2-1) で示す 3 準位のレート方程式で与えられる。分子の蛍光強度は S_1 の占有確率に比例するので、 N_1 は蛍光抑制効果により減衰した蛍光強度を示す。

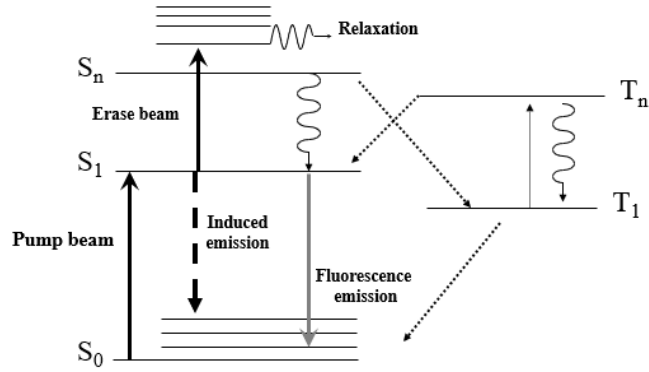


図 2-2 蛍光抑制効果における励起及び緩和ダイアグラム。

$$\begin{aligned}
 \frac{dN_0}{dt} &= -\sigma_{01}I_p N_0 + \left(\frac{1}{\tau} + \sigma_f I_e\right) N_1 + k_{n0} N_n, \\
 \frac{dN_1}{dt} &= \sigma_{01}I_p N_0 - \left(\frac{1}{\tau} + \sigma_f I_e\right) N_1 + k_{n1} N_n, \\
 \frac{dN_n}{dt} &= \sigma_{1n}I_e N_1 - (k_{n0} + k_{n1}) N_n,
 \end{aligned} \quad (2-1)$$

ここで、 (σ_{01}) は $S_1 \leftarrow S_0$ 吸収断面積、 (σ_{1n}) は $S_n \leftarrow S_1$ 吸収断面積、そして (σ_f) は誘導放出断面積を表す。また、 (k_{n0}) と (k_{n1}) は S_n から S_0 及び S_1 への無輻射による緩和速度をそれぞれ示す。もし、照射時間が十分長いときには式 (2-1) は定常解となり、特に注目する S_1 の占有確率 N_1 は I_e の関数として、

$$N_1(I_e) = \frac{\sigma_{01}I_p}{\sigma_{01}I_p + \frac{1}{\tau} + \sigma_{dip}I_e}, \quad (2-2)$$

$$\sigma_{dip} = \sigma_f + \sigma_{1n} \frac{k_{n0}}{k_{n0} + k_{n1}}, \quad (2-3)$$

で与えられる。ここで、式 (2-2) に示す σ_{dip} は、イレース光が S_1 の分子を消失させる断面積を示している (蛍光抑制断面積)。式 (2-2) で、 $N_1(0)$ はポンプ光単独照明時の蛍光強度を示すが、 $N_1(I_e)$ と $N_1(0)$ に対する比率 $(P(I_e))$ はイレース光強度に対する蛍光強度の依存性を示す (以下、蛍光抑制特性)。式 (2-3) において、右辺の第 1 項の σ_f は蛍光抑制効果における誘導放出による寄与を示し、第 2 項は $S_n \leftarrow S_1$ 吸収による寄与を示す。ポンプ光の照明強度が十分弱いときには近似的に式 (2-4) で与えられる。

$$P(I_e) = \frac{N(I_e)}{N(0)} \cong \frac{1}{1+\tau\sigma_{\text{dip}}I_e} = \frac{1}{1+KI_e}. \quad (2-4)$$

式(2-4)によれば、 τ と σ_{dip} の積、すなわち反応速度(K)が大きい値をもつ分子に対しては、弱い強度のイレース光で蛍光を抑制できることを示している。多くの蛍光色素分子はナノ秒台の蛍光寿命をもち、また、 10^{-17} cm^2 のオーダーの蛍光抑制断面積をもつ(厳密には σ_{dip} は付録6で述べる様にポンプ光とイレース光の偏光状態に依存する)。従って、 $10^{26} / \text{cm}^2 / \text{sec}$ 前後のフォトンフラックスで蛍光強度の低下が起きる。凝集相中では、一般に $S_n \leftarrow S_1$ 吸収帯域は可視領域から近赤外領域まで広く展開している。一部の帯域では蛍光波長帯域と重複し、この領域では誘導放出と $S_n \leftarrow S_1$ 吸収は競合しながら、蛍光の抑制に寄与する。特に、誘導放出過程を積極的に用いて蛍光を抑制する方式はSTED(Stimulated Emission Depletion)に対応する[2-6,2-7]。

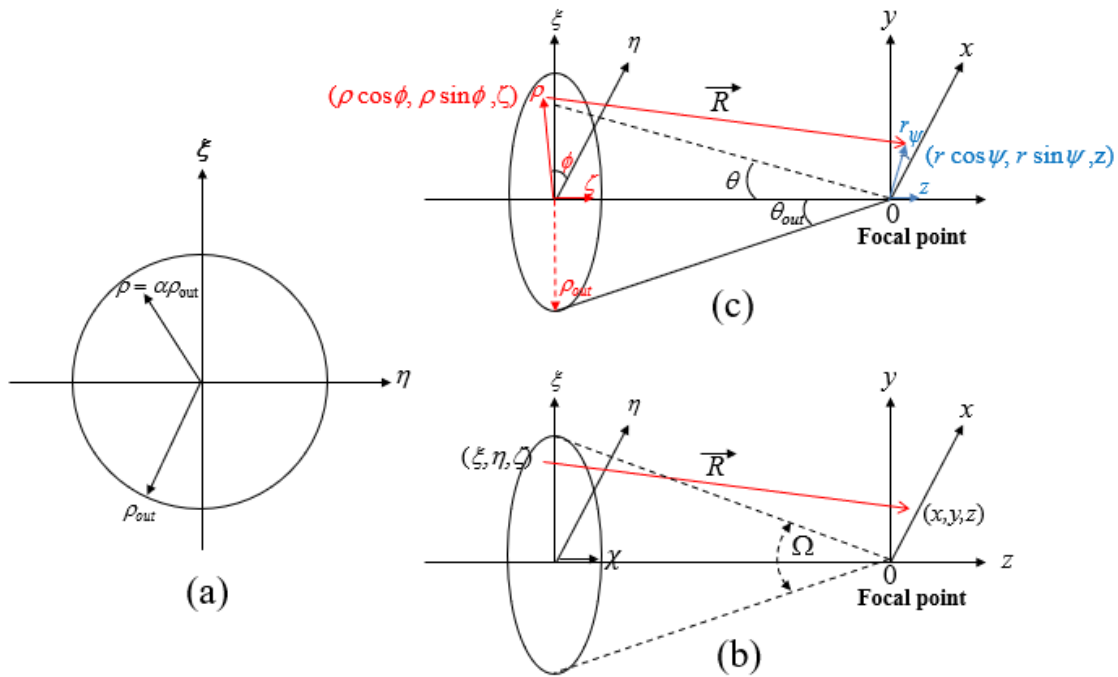


図2-3：平面波をもつビームと集光光学系の空間的位置関係。

【3次元ダークホールの解析的な表現】

本解析では、照明光の電場ベクトルは瞳面内に一定方向をもつものと仮定するスカラー電場モデルを用いた。3次元的なダークホールを解析的に考察するにあたり、半径 ρ_m のビーム中央部(内輪部)とその外側の半径 ρ_{out} の輪帶領域(外輪部)でお互い位相差が $\lambda/2$ (或いは位相角 π)ジャンプする波面を持つ様な簡単なビーム波面を考える(図2-1)。ここで、もし均一波面をもつビームを開口数(NA)の対物レンズで集光したときの3次元強度分布

$(U_0(x,y,z))$ は (図 2-3 (a))、円形開口のフラウンホッフ回折の式を用いて、図 2-3 (b)に示す座標系を用いて式 (2-5) の様にする。

$$U_0(x,y,z) \propto \iint_{\Omega} \frac{e^{-i\vec{k}\cdot\vec{R}}}{R} d\Omega, \quad (2-5)$$

ただし、 \vec{k} は入射光の波数ベクトルであり、開口が焦点に対して張る立体角 Ω に対して積分を行うものとする。今、瞳径から決定される開口数を(NA)、イレーヌ光の波長を(λ_e)とすると、解析モデルとして図 2-3 (c)で示す簡潔な円筒座標系を用いることができるので、式 (2-5) の角度部分の積分は解析的に出来て、式 (2-6) の様に変換することができる[2-8]。

$$U_{all}(v_e, u_e) = C \int_0^{\alpha} J_0(v_e \rho) e^{-i\frac{1}{2}u_e \rho^2} \rho d\rho, \quad (2-6).$$

ここで、(C) は入射光強度等で決まる比例係数であり、 $J_0(x)$ はベッセル 0 次関数を示す。また、図 2-3 によれば、瞳面の動径方向の長さを(ρ)、(v_e) は焦点面内における光軸からの距離を示し、同じく焦点からの光軸上の距離を(u_e) で表す (光学単位による換算座標)。そして、パラメータである輪帯比 (α) は ρ の積分範囲を示す。特に、 α が1のときは全瞳面、すなわち、 ρ_{out} の全領域を積分したことに対応する。具体的には、対物レンズの口径を全部利用して集光した場合に対応する。このとき、 u_e と v_e は下記の様に実際の距離 (r) 及び (z) で関係付けられている。

$$v_e = \frac{2\pi}{\lambda} (NA) \rho \quad u_e = \frac{2\pi}{\lambda} (NA)^2 z. \quad (2-7)$$

結像面と集光光学系の間に空気以外の光学媒質が存在する場合には、その屈折率 (n) を用いて、式 (2-7) を書き直す必要がある。

$$v_e = \frac{2\pi n}{\lambda} (NA) \rho \quad u_e = \frac{2\pi n}{\lambda} (NA)^2 z. \quad (2-8)$$

今改めて、図 2-3 に示す座標系を用いて、輪帯位相変調型ビームを集光したときの電場強度分布 ($U_{all}(v_e, u_e)$) を求める。式 (2-6) において、 $\alpha = \rho_{in}/\rho_{out}$ と置くと位相が反転した内輪帯領域通過後の光を集光したときの電場強度分布 ($U_{in}(v_e, u_e)$) と書ける。

$$U_{in}(v_e, u_e) = -C \int_0^{\alpha} J_0(v_e \rho) e^{-i\frac{1}{2}u_e \rho^2} \rho d\rho = -\alpha^2 C \int_0^1 J_0(\alpha v_e \rho) e^{-i\frac{1}{2}u_e \alpha^2 \rho^2} \rho d\rho$$

ここで、マイナス符号が全体に掛かっているのは通過した光の位相が反転していることを示している。一方、外輪部の瞳のみを集光した場合の電場振幅強度 ($U_{out}(v_e, u_e)$) は式 (2-9) で与えられる。

$$U_{out}(v_e, u_e) = C \left[\int_0^1 J_0(v_e \rho) e^{-i\frac{1}{2}u_e \rho^2} \rho d\rho - \alpha^2 \int_0^1 J_0(\alpha v_e \rho) e^{-i\frac{1}{2}u_e \alpha^2 \rho^2} \rho d\rho \right]. \quad (2-9)$$

輪帯位相変調型ビームが集光する場合は、お互い位相が反転した $U_{out}(v_e, u_e)$ と $U_{in}(v_e, u_e)$ が像面上で重なり合うので、輪帯位相変調型ビーム全体が集光する場合の $U(v_e, u_e)$ は、

$$U_{all}(v, u) = U_{out}(v, u) - U_{in}(v, u) = C \left[\int_0^1 J_0(v \rho) e^{-i\frac{1}{2}u \rho^2} \rho d\rho - 2\alpha^2 \int_0^1 J_0(\alpha v \rho) e^{-i\frac{1}{2}u \alpha^2 \rho^2} \rho d\rho \right], \quad (2-10)$$

で与えられる。外輪部と内輪部を通過する光は位相が反転しているので、それぞれの光量が同じならば、焦点では電場強度が完全に相殺する。均一の振幅の光が瞳面に入射した場合、外輪部と内輪部の面積が同じとなる輪帯比率 $\alpha=1/\sqrt{2}$ の場合に限られる。すなわち、式 (2-11) が、目的とするダークホールを持つように変調されたビームの3次元のエネルギー強度プロファイル ($I(v_e, u_e)$) となる (付録1 参照のこと)。

$$\begin{aligned} I(v_e, u_e) &= U_{all}(v_e, u_e)^2 \\ &= C^2 \left[\int_0^1 J_0(v_e \rho) e^{-i\frac{1}{2}u_e \rho^2} \rho d\rho - \int_0^1 J_0\left(\frac{v_e \rho}{\sqrt{2}}\right) e^{-i\frac{1}{4}u_e \rho^2} \rho d\rho \right]^2. \end{aligned} \quad (2-11)$$

ここで、 $u_e=0$ と置けば、式 (2-12) として焦点面における断面強度分布 $I(v_e, 0)$ を得る。また、 $v_e=0$ と置けば、式 (4-13) として光軸を含む断面の面強度分布 $I(0, u_e)$ を得る。

$$I(v_e, 0) = C^2 \left[\int_0^1 J_0(v_e \rho) \rho d\rho - \int_0^1 J_0\left(\frac{v_e \rho}{\sqrt{2}}\right) \rho d\rho \right]^2, \quad (2-12)$$

$$I(0, u_e) = C^2 \left[\int_0^1 e^{-i\frac{1}{2}u_e \rho^2} \rho d\rho - \int_0^1 e^{-i\frac{1}{4}u_e \rho^2} \rho d\rho \right]^2, \quad (2-13)$$

となる。更に、これらの式は、ベッセル関数の性質を用いれば、解析的に積分ができる (本章の付録1 参照のこと)。

$$I(v_e, 0) = C^2 \left[\frac{J_1(v_e)}{v_e} - \sqrt{2} \frac{J_1\left(\frac{v_e}{\sqrt{2}}\right)}{v_e} \right]^2 \quad (2-14)$$

$$I(0, u_e) = C^2 \left[\frac{16}{u_e^2} \sin^4\left(\frac{u_e}{8}\right) \right] \quad (2-15)$$

以上の式 (2-14) と (2-15) が輪帯位相変調型ビームで得られる3次元ダークホールの焦点面内及び光軸面内における外形形状、すなわち、断面強度分布である。式 (2-14) によれば、 $I(v_e, 0)$ は焦点面内で $v_e=3.5$ で最大値を取る所以、この値を用いて規格化する

ことにより C を決定すると、式 (2-16) と (2-17) を得る。例えば、NA と λ_e を単位ユニットと置くと、 u_e と v_e は同じ無次元のスケールとなるので、図 2-4 に焦点を原点としてプロファイルと比較した。ここで、 $J_1(x)$ は 1 次のベッセル関数を表す。図 2-4 において、黒のラインは $I(v_e, 0)$ を示し、灰色ラインは $I(0, u_e)$ を示している。それによれば、光軸方向の断面強度分布 ($I(0, u_e)$) は焦点面のそれ ($I(v_e, 0)$) と比較して、ピーク強度が 5 倍程あり、しかも焦点から第 1 ピークの位置までの距離 ($u_e=9.3$) も 3 倍程長い。ホール サイズとしては、光軸方向に長く、しかも強度比率もアンバランスなことが分かる。ピークからピークまでの距離をホール径と定義して、波長を 600 nm、NA を 1 と仮定すると、おおよそ焦点面内で 666 nm であり、光軸方向で 1980 nm となる。

$$I(v_e, 0) = 37 \left[\frac{J_1(v_e)}{v_e} - \sqrt{2} \frac{J_1\left(\frac{v_e}{\sqrt{2}}\right)}{v_e} \right]^2 \quad (2-16)$$

$$I(0, u_e) = 37 \left[\frac{16}{u_e^2} \sin^4\left(\frac{u_e}{8}\right) \right] \quad (2-17)$$

もし、光軸面における最大ピークで規格化を行うと、そのときの焦点面及び光軸面の集光パターンの断面強度分布 $Q(v_e, 0)$ と $Q(0, u_e)$ は式 (2-18) と (3-19) で与えられる。

$$Q(v_e, 0) = 7.6 \left[\frac{J_1(v_e)}{v_e} - \sqrt{2} \frac{J_1\left(\frac{v_e}{\sqrt{2}}\right)}{v_e} \right]^2 \quad (2-18)$$

$$Q(0, u_e) = 7.6 \left[\frac{16}{u_e^2} \sin^4\left(\frac{u_e}{8}\right) \right] \quad (2-19)$$

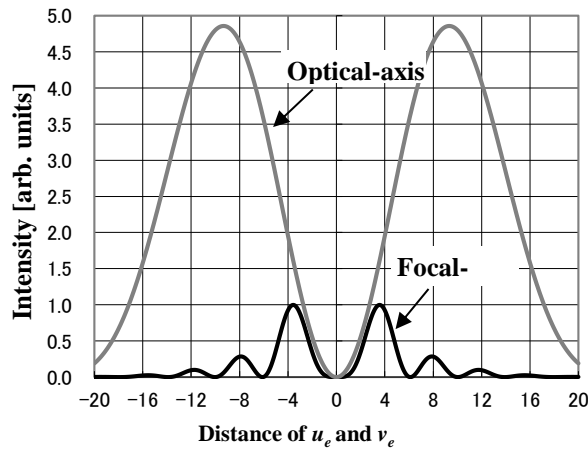


図 2-4：焦点面の最大強度で規格化したときの 3 次元ダークホールの焦点近傍の断面強度分布（—：焦点面内プロファイル、—：光軸方向断面プロファイル）。

【3次元超解像顕微鏡機能の解析的表現】

通常のレーザー走査型顕微鏡の観察では、均一波面をもつポンプ光を顕微鏡対物レンズで集光する。一般に、蛍光強度はポンプ光の集光強度に比例するので、その3次元的な集光スポットの強度分布が空間分解能を決定する。定量的には、強度分布は式(2-6)に示す円形開口の場合におけるフラウンホッフ回折の式で与えられる。図2-3と同じ座標系を用いると、その3次元の強度プロファイル($I_p(v_p, u_p)$)は式(2-20)で与えられる。

$$I_p(v_p, u_p) = U_p(v_p, u_p)U_p(v_p, u_p)^* = C^2 \left[\int_0^1 J_0(v_p \rho) e^{-i\frac{1}{2}u_p \rho^2} \rho d\rho \right]^2. \quad (2-20)$$

ここで、 v_p 、 u_p はポンプ光波長(λ_p)に対して与えられた光学単位による換算座標である。 $I_p(v_p, u_p)$ はPSFに対応し、光学系の結像性能を評価するための最も基本的な物理量である。これが判明すると、2点分解能や画質を総合評価するために不可欠な光学伝達関数等を算出することができる。式(2-20)に関しては、焦点面内と光軸を含む断面内の強度分布、すなわち、規格化した $I_p(v_p, 0)$ と $I_p(0, u_p)$ をそれぞれ解析的に書き表すことが出来る。3次元ダークホールの形状を計算した時と同じ様に積分計算を行えば、

$$I_p(v_p, 0) = \left[\frac{2J_1(v_p)}{v_p} \right]^2, \quad (2-21)$$

$$I_p(0, u_p) = \left[\frac{\sin(\frac{u_p}{4})}{\frac{u_p}{4}} \right]^2, \quad (2-22)$$

を得る。式(2-21)と(2-22)で与えられる形状を図2-5に示す。

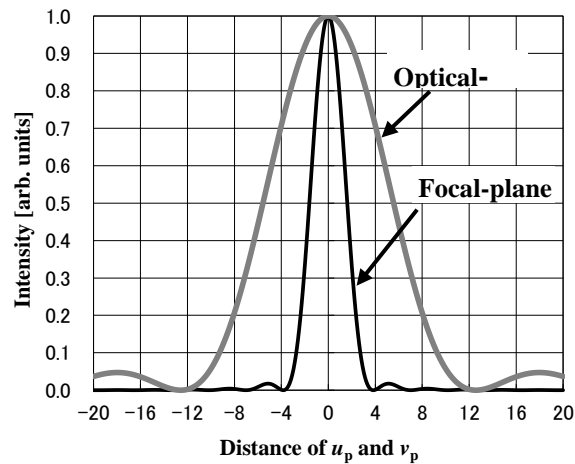


図2-5：ポンプ光の焦点近傍の点像分布関数。

(—：焦点面内プロファイル、---：光軸方向断面プロファイル)

図 2-5 によれば、焦点面内の断面強度分布は $v_p=3.83$ でゼロとなり、空間分解能の目安であるエアリーディスクの半径となる。例えば、波長を 532 nm、NA を 1 と仮定すると、おおよそ焦点面内で 324 nm となる。一方、光軸方向断面プロファイルについても考察すると、形状は焦点面内のそれと比較すると幅が 3 倍ほど広い。同じように、第 1 ゼロ点を求めると $u_p=12.6$ となる。同様に、波長を 532 nm とし換算すると、光軸方向の実座標で 1067 nm となる。これらの値が、おおよそその蛍光顕微鏡がもつ空間分解能の回折限界時の PSF の空間サイズである。これが、既存の顕微鏡法における結像性能の物理的限界となっている。この計算例からも分かるように特に光軸方向の PSF は平面方向に対して 3 倍以上も広がり大きい。しかし、提案する超解像顕微鏡法を用いると PSF を 3 次元的に微細化できる。

蛍光抑制効果を定量的に表現する式 (2-4) とポンプ光とイレース光のビーム形状を表現する式 (2-16)、(2-17)、(2-21) および (2-22) を用いると単純な解析的形式で超解像顕微鏡法の PSF を記述でき、これを微細化できることを定量的に示すことができる。今、 v_e 、 u_e はイレース光波長 (λ_e) に対して与えられた換算座標として、イレース光の強度分布を $I_e(v_e, u_e)$ と書く。そして、イレース光の強度分布関数と蛍光色素の光学特性で決まる蛍光抑制特性を ($P[I_e(v_e, u_e)]$) と書く。 $P(I_e(v_e, u_e))$ は与えられた空間点における蛍光強度の抑制比率であるので、これと同じ空間点におけるポンプ光強度との積 ($F(v_p, u_p)$)、が求める PSF として得られる。PSF の形状を考察するのが目的なので、 $I_p(v_p, u_p)$ のピーク強度は予め規格化されているものとする。

$$F_p(v_p, u_p) = P[I_e(v_e, u_e)] I_p(v_p, u_p), \quad (2-23)$$

蛍光抑制特性は式 (2-4) で与えられるので、 σ_{dip} と τ を用いて定量化できる。式 (2-23) に式 (2-4)、(2-16)、(2-17)、(2-21)、(2-22) を代入すれば、PSF の焦点面と光軸を含む断面における強度分布、 $F(v_p, 0)$ と $F(0, u_p)$ が得られる[2-9]。

$$F(v_p, 0) = \frac{1}{1+37\sigma_{dip}\tau I_{xmax} \left[\frac{J_1(v_e)}{v_e} - \sqrt{2} \frac{J_1\left(\frac{v_e}{\sqrt{2}}\right)}{v_e} \right]^2} \left[\frac{2J_1(v_p)}{v_p} \right]^2, \quad (2-24)$$

$$F(0, u_p) = \frac{1}{1+37\sigma_{dip}\tau I_{xmax} \left[\frac{16}{u_e^2 \sin^4\left(\frac{u_e}{8}\right)} \right]^2} \left[\frac{\sin\left(\frac{u_p}{4}\right)}{\frac{u_p}{4}} \right]^2, \quad (2-25)$$

ここで、 I_{xmax} は焦点面内におけるイレース光のプロファイルの最大強度値を示す。或いは、光軸面内におけるイレース光のプロファイルの最大強度値を I_{zmax} と書くと、式 (2-26) と (2-27) で表現することもできる。

$$F(v_p, 0) = \frac{1}{1 + 7.6\sigma_{dip}\tau I_{zmax} \left[\frac{J_1(v_2)}{v_e} - \sqrt{2} \frac{J_1\left(\frac{v_e}{\sqrt{2}}\right)}{v_e} \right]^2} \left[\frac{2J_1(v_p)}{v_p} \right]^2, \quad (2-26)$$

$$F(0, u_p) = \frac{1}{1 + 7.6\sigma_{dip}\tau I_{zmax} \left[\frac{16}{u_e^2 \sin^4\left(\frac{u_e}{8}\right)} \right]^2} \left[\frac{\sin\left(\frac{u_p}{4}\right)}{\frac{u_p}{4}} \right]^2, \quad (2-27)$$

何れの場合も、単純な分数関数でポンプ光の断面強度分布を変調したものであることが分かる。一見、式(2-24)、(2-25)、(2-26)、(2-27)は複雑な形をしている。しかし、蛍光抑制効果が起きるのは焦点近傍の領域なので、これらを v_e と u_e に関して原点近傍で級数展開をすると、焦点面内におけるイレース光のプロファイルの最大強度値 I_{xmax} を用いて、焦点面及び光軸面における3次元超解像顕微鏡法の断面強度分布の近似式を得る。

$$F(v_p, 0) \approx \frac{1}{1 + 0.040\sigma_{dip}\tau I_{xmax} v_e^4} \left[\frac{2J_1(v_p)}{v_p} \right]^2, \quad (2-28)$$

$$F(0, u_p) \approx \frac{1}{1 + 0.15\sigma_{dip}\tau I_{xmax} u_e^2} \left[\frac{\sin\left(\frac{u_p}{4}\right)}{\frac{u_p}{4}} \right]^2. \quad (2-29)$$

或いは、光軸面内におけるイレース光のプロファイルの最大強度値を I_{zmax} とすれば、

$$F(v_p, 0) \approx \frac{1}{1 + 0.0083\sigma_{dip}\tau I_{zmax} v_e^4} \left[\frac{2J_1(v_p)}{v_p} \right]^2, \quad (2-30)$$

$$F(0, u_p) \approx \frac{1}{1 + 0.030\sigma_{dip}\tau I_{zmax} u_e^2} \left[\frac{\sin\left(\frac{u_p}{4}\right)}{\frac{u_p}{4}} \right]^2. \quad (2-31)$$

で PSF の断面強度分布を表現することもできる。

【3次元空間分解能に関する考察】

3次元的な超解像顕微鏡機能は、具体的な蛍光色素分子とポンプ光とイレース光の波長が確定し、対物レンズの開口数が決まれば、式(2-24)から(2-31)を用いてシミュレーション予測ができる。本セクションでは、蛍光抑制効果について定量的に調べられている代表的な蛍光色素分子であるローダミン6Gを想定し[2-6]、そのPSFについて考察する。表2-1に、シミュレーション予測に必要な分光学的なパラメータを整理する(蛍光抑制効果の詳細は改めて第6章で述べる)。また、輪帯位相板の輪帯比率は最適値である $\alpha = 1/\sqrt{2}$ と仮定した。

表 2-1 : ローダミン 6 G に関する蛍光抑制特性[2-6]

λ_p	ポンプ光波長	532 nm
σ_p	$S_0 \rightarrow S_1$ 吸収断面積	$4.0 \times 10^{-16} \text{ cm}^2 @ 532 \text{ nm}$
λ_e	イレーズ光波長	599 nm
σ_{dip}	蛍光抑制断面積	$1.2 \times 10^{-16} \text{ cm}^2 @ 599 \text{ nm}$
τ	蛍光寿命	3.75 nsec in PMMA

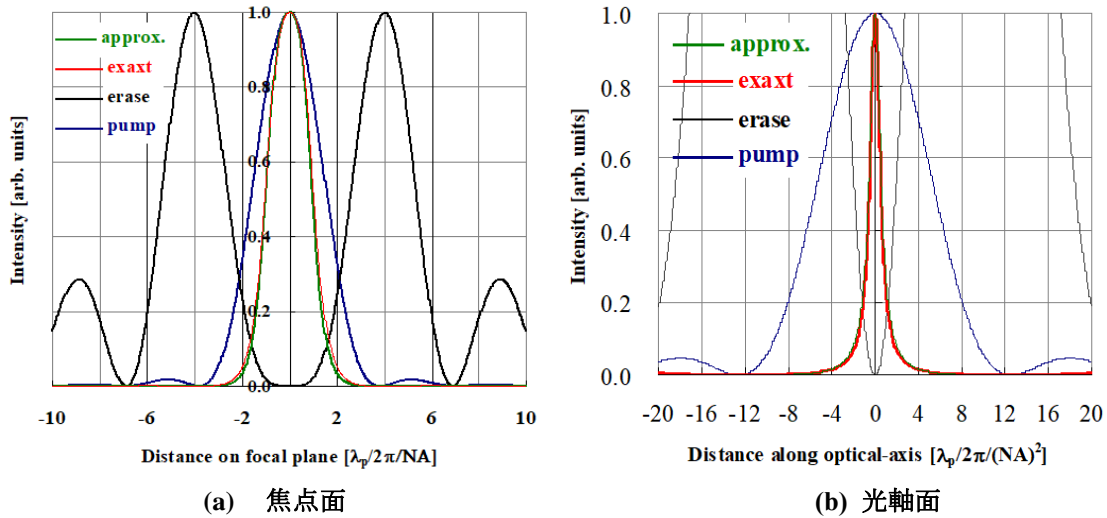


図 2-6 : 表 2-1 に示す条件において計算した場合における 3 次元超解像顕微鏡法の焦点面 (a) 及び光軸面 (b) における点像分布関数の断面強度分布。NA が 1 の対物レンズで 86mW のイレーズ光で集光すると $I_{x\text{max}}$ が $5.0 \times 10^{25} \text{ photon/cm}^2/\text{sec}$ ($I_{z\text{max}}$ が $2.4 \times 10^{26} \text{ photon/cm}^2/\text{sec}$) のピークが得られ、そのときの断面強度分布に対応する。ただし、イレーズ光の断面強度分布: —ポンプ光の断面強度分布: —超解像顕微鏡観察時の厳密解: —超解像顕微鏡観察時の近似解。

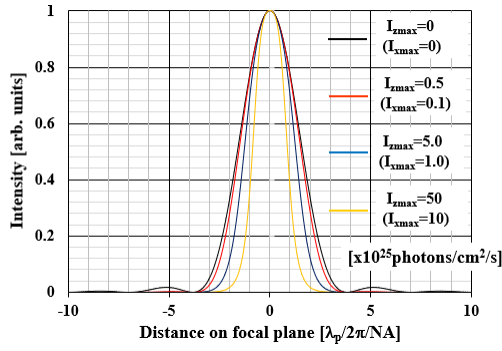
図 2-6 は、表 2-1 の条件において、焦点面におけるピークフォトンフラックス $I_{x\text{max}}$ を $5.0 \times 10^{25} \text{ photon/cm}^2/\text{sec}$ 、或いは、光軸面におけるピークフォトンフラックス $I_{z\text{max}}$ を $2.4 \times 10^{26} \text{ photon/cm}^2/\text{sec}$ と仮定した時の焦点面 (図 2-6 (a)) 及び光軸面 (図 2-6 (b)) における PSF の断面強度分布である。例えば、NA が 1 の対物レンズで集光した場合、この時のフォトンフラックスは 86mW のイレーズ光を集光した場合に相当する (付録 2)。それらによれば、式 (2-28) から (2-31) の近似解は、厳密解である式 (2-24) から (2-27) が与える結果と殆ど同じであり、波動光学的に結像性能を論議する評価式として十分であることが分かる。焦点平面内の PSF について着目すると、超解像顕微鏡観察をすると分布 (赤、或いは緑のライン) の強度半値幅 (Full width at half maximum: FWHM) は光学単位で 2 前後の値をもつ。それに対して、ポンプ光 (イレーズ光照射なしの時の PSF) のそれは 3.3 である。従って、回折限界の 6 割程度に収縮している。一方、光軸方向における FWHM の縮小の程度は顕著である。ダークホール自体の形状は光軸方向に広がっているが、この方向のピーク強度は平面内のそれと比較して強いので、蛍光抑制効果が顕著に誘導されていることによる。ポンプ光の半値幅が 11 であるのに対して、超解像顕微鏡観察時の PSF

は、1.1 までは収縮している。これを、例えば開口数 1 として実空間座標に変換すると、焦点面内の FWHM は 169 nm であり、光軸方向では 101 nm となる。その時は光軸方向に押し潰された楕円体に近くなる。FWHM で評価したときの蛍光領域体積を回転楕円体として見積もると、 $1.35 \times 10^{-17} l$ (18 at l) となる。通常のポンプ光のみの観察時では、 $7.1 \times 10^{-16} l$ (710 at l) となるので、立体的な分解能としては 42 倍程度も向上している。 $F(v_p, u_p)$ は、イレース光の I_{zmax} に強く依存する。図 (2-7) には、 I_{zmax} を変化させたときの焦点面内と光軸を含む断面内における断面強度分布 $F(v_p, 0)$ (図 (2-7(a))) と $F(0, u_p)$ (図 (2-7(b))) を示す。それらによれば、それぞれイレース光強度が増加するにしたがい、それぞれの FWHM が収縮して行くことが分かる。以上の振る舞いを定量的に考察するために、FWHM のイレース光強度に対する依存性を考察した (図 2-8)。図 2-8 によれば、FWHM の収縮の度合いが焦点面内と光軸を含む断面内においては大きく異なる。図 2-8(b) によれば、光軸方向に関して、 I_{zmax} が $10 \times 10^{25} / \text{cm}^2 / \text{sec}$ まで増加する間で FWHM が著しく収縮し、それ以後は緩やかに収縮する。最終的には、ポンプ光の FWHM の 10 分の 1 以下までに収縮する。この時に対物レンズに投入するイレース光の総量 (Φ) は 77 mW に相当する (付録 2 を参照のこと)。それに対して、焦点平面内における FWHM は、 I_{zmax} の増加に対して極めて緩慢に減少し、 $50 \times 10^{25} / \text{cm}^2 / \text{sec}$ においてでも半分程度までしか収縮しない (図 2-8(a))。これはダークホールの内径の強度分布の関数形に原因がある。焦点近傍に着目したとき、式 (2-14) と (2-15) を級数展開すると、光軸方向に対しては、イレース光強度は距離 u_e の 2 乗に増加する。

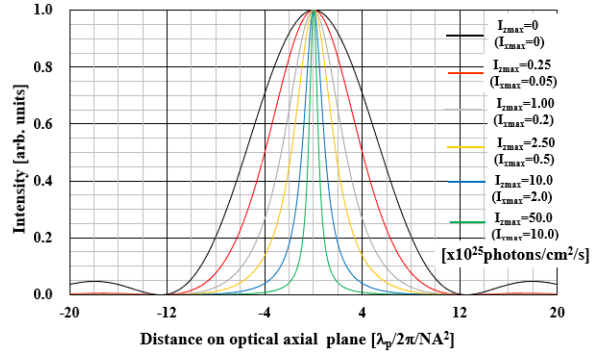
$$I_e(v_e, 0) \propto v_e^4 \quad (2-32)$$

$$I_e(0, u_e) \propto u_e^2 \quad (2-33)$$

一方、焦点面内では v_e の 4 乗に比例するので、焦点面内においては、図 2-6(a) が示す様にポンプ光が存在する $v_e < 1$ となる焦点近傍ではイレース光強度がほぼゼロとなるフラットで広い領域が存在する。従って、この領域では幾らイレース光の強度を増加させても、効率的に蛍光抑制効果を誘導することが出来ない。一方、光軸方向に関しては、イレース光強度は u_e の 2 乗に比例するので、焦点近傍でも外れた領域でもイレース光強度が存在する。従って、焦点近傍でも蛍光抑制効果を誘導できる。その結果として、 I_{zmax} が増加するに従い光軸方向の FWHM の減少が焦点面内よりも急激に起こり、PSF の形状は光軸方向に押し潰された楕円体となる。すなわち、スカラー電場モデルの解析では横方向よりも深さ方向の到達分解能が高いことが分かる。

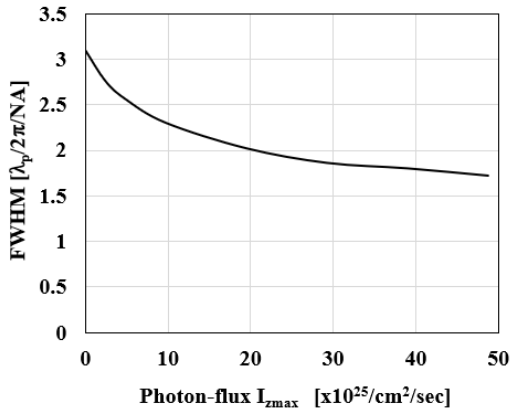


(a) 焦点面内

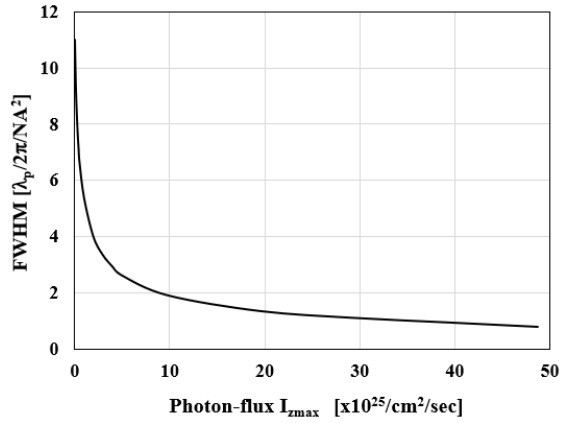


(b) 光軸を含む断面内

図（2－7）： 焦点面のイレース光ピークフォトンフラックス I_{zmax} を変化させたときの焦点面内(a)と光軸を含む断面内(b)における PSF の $F(v_p, 0)$ と $F(0, u_p)$ の変化。



(a) 焦点面内



(b) 光軸を含む断面内

図 2－8： 光軸面内のイレース光のピークフォトンフラックス I_{zmax} を変化させたときの焦点面内(a)と光軸を含む断面内(b)における PSF の FWHM の変化。

【結論】

3次元超解像顕微鏡法の空間分解能を考察するために、光学的及び分光学的な知見を基にスカラー電場モデルを用いて3次元超解像顕微鏡法の結像理論を新規に確立した。本理論を用いて PSF を解析的かつ定量的に考察したところ、PSF のサイズは3次的に回折限界よりも小さくできることが判明した。特に、イレース光の集光強度の増加とともに PSF は著しく光軸方向に収縮し、3次元超解像顕微鏡法が回折限界をはるかに上回る深さ分解能を提供できることを確認した。すなわち、生物試料の内部観察に資する立体分解能を有していることを示している。本解析では、照明光の電場ベクトルは瞳面に一定方向をもつものと仮定するスカラー電場モデルを用いた。しかし、高 NA 対物レンズを用いてイレース光を照明すると、焦点面近傍で光軸と平行に振動する電場が発生する。この効果は、本顕微鏡の平面分解能に大きな影響を与える。3次元超解像顕微鏡法の結像性能を厳密に記述する為に

は、照明光の電場の振動方向が3次元的に配向するものとして取り扱える3次元ベクトル電場モデルを用いる必要がある[2-10]。3次元ベクトル電場モデルを用いた解析は、次の第3章で論じる。

【付録 1】

全開口領域を用いる場合の 3 次元電場分布は、

$$U_{all}(v_e, u_e) = -A \frac{2\pi i}{\lambda} e^{\frac{i u_e}{N A^2}} \int_0^1 J_0(v_e \rho) e^{-i \frac{1}{2} u_e \rho^2} \rho d\rho. \quad (2-A1)$$

ここで、

$$C = -A \frac{2\pi i}{\lambda} e^{\frac{i u_e}{N A^2}},$$

と置き、開口比率 α の輪帯瞳を仮定すると、その時の電場分布は、

$$U_{in}(v_e, u_e) = C \int_0^\alpha J_0(v_e \rho) e^{-i \frac{1}{2} u_e \rho^2} \rho d\rho, \quad (2-A2)$$

で与えられる。ここで、 $\xi = \rho/\alpha$ と変数を置き換える。

$$U_{in}(v_e, u_e) = C \int_0^1 J_0(\alpha v_e \rho) e^{-i \frac{1}{2} u_e \alpha^2 \rho^2} \rho d\rho. \quad (2-A3)$$

従って、式 (2-A 3) を用いれば、集光した輪帯位相変調型ビームの 3 次元的な電場分布 $U(v_e, u_e)$ は式 (2-A 4) で与えられる。

$$\begin{aligned} U_{all}(v_e, u_e) &= U_{out}(v_e, u_e) - U_{in}(v_e, u_e) = U_{all}(v_e, u_e) - 2U_{in}(v_e, u_e) \\ U_{all}(v_e, u_e) &= C \int_0^1 J_0(v_e \rho) e^{-i \frac{1}{2} u_e \rho^2} \rho d\rho - 2\alpha^2 C \int_0^1 J_0(\alpha v_e \rho) e^{-i \frac{1}{2} u_e \alpha^2 \rho^2} \rho d\rho \\ &= C \left[\int_0^1 J_0(v_e \rho) e^{-i \frac{1}{2} u_e \rho^2} \rho d\rho - 2\alpha^2 \int_0^1 J_0(\alpha v_e \rho) e^{-i \frac{1}{2} u_e \alpha^2 \rho^2} \rho d\rho \right] \\ &= C \left[\int_0^1 \left(J_0(v_e \rho) e^{-i \frac{1}{2} u_e \rho^2} - 2\alpha^2 J_0(\alpha v_e \rho) e^{-i \frac{1}{2} u_e \alpha^2 \rho^2} \right) \rho d\rho \right]. \quad (2-A4) \end{aligned}$$

もし、 $u_e=0$ と置くと、焦点面内における輪帯位相変調型ビームの電場分布得る。

$$U_{all}(v_e, 0) = C \left[\int_0^1 (J_0(v_e \rho) - 2\alpha^2 J_0(\alpha v_e \rho)) \rho d\rho \right]. \quad (2-A5)$$

ここで、第 1 項の積分に関して、 $X = v_e \rho$ と変数の置き換えを行う。

$$\int_0^1 J_0(v_e \rho) \rho d\rho = \frac{1}{v_e^2} \int_0^{v_e} J_0(X) X dX$$

一方、第 2 項の積分に関しても、同様の変数の置き換えを行う。

$$2\alpha^2 \int_0^1 J_0(\alpha v_e \rho) \rho d\rho = 2\alpha^2 \int_0^{\alpha v_e} \frac{J_0(X)}{(\alpha v_e)^2} X dX = 2 \int_0^{\alpha v_e} \frac{J_0(X)}{v_e^2} X dX$$

そして、下記のベッセル関数に関する積分公式を利用すると、

$$\int_0^\xi J_0(x) x dx = J_1(\xi) \xi$$

$U(v_e, 0)$ に関する具体的な式(2-A 6)を得る。

$$\begin{aligned} U_{all}(v_e, 0) &= C \left[\frac{1}{v_e^2} \int_0^{v_e} J_0(X) X dX - 2 \int_0^{\alpha v_e} \frac{J_0(X)}{v_e^2} X dX \right] \\ &= C \left[\frac{J_1(v_e)}{v_e} - 2 \frac{J_1(\alpha v_e)}{v_e^2} \alpha v_e \right] = C \left[\frac{J_1(v_e)}{v_e} - 2\alpha \frac{J_1(\alpha v_e)}{v_e} \right]. \end{aligned} \quad (2-A6)$$

もし、もし、ダークホールの出来る $\alpha^2=0.5$ ($\alpha=1/\sqrt{2}$) の条件を選ぶと、

$$U_{all}(v_e, 0) = -C \left[\frac{J_1(v_e)}{v_e} - \sqrt{2} \frac{J_1(\frac{v_e}{\sqrt{2}})}{v_e} \right].$$

従って、これを用いて、エネルギー強度分布関で表現される下記の式で示す PSF を得る。

$$I(v_e, 0) = U_{all}(v_e, 0) \cdot U_{all}(v_e, 0)^* = C^2 \left[\frac{J_1(v_e)}{v_e} - \sqrt{2} \frac{J_1(\frac{v_e}{\sqrt{2}})}{v_e} \right]^2.$$

このときの、ダークホールの第1極大値、すなわち焦点面内における輪帯ピークの位置を求める。すなわち、

$$\frac{d}{dv_e} \left[\frac{J_1(v_e)}{v_e} - \sqrt{2} \frac{J_1(\frac{v_e}{\sqrt{2}})}{v_e} \right] = 0$$

ここで、

$$\frac{d}{dx} [x^{-n} J_n(x)] = -x^{-n} J_{n+1}(x)$$

というベッセル関数の微分の公式を用いると、

$$\frac{d}{dv_e} \left[\frac{J_1(v_e)}{v_e} - \frac{J_1(\frac{v_e}{\sqrt{2}})}{\frac{v_e}{\sqrt{2}}} \right] = \frac{J_2(v_e)}{v_e} - \frac{J_2(\frac{v_e}{\sqrt{2}})}{\frac{v_e}{\sqrt{2}}} \frac{1}{\sqrt{2}} = 0$$

すなわち、これより、

$$J_2(v_e) = J_2(\frac{v_e}{\sqrt{2}}),$$

の極値条件を得るので、3次元ダークホールは $v_{e, \max} = \pm 3.5$ の点で第1極大値もつ。

もし、今度は、光軸上だけを問題するのであれば、式(2-A 4)において $v_e=0$ として

$$U_{all}(0, u_e) = C \left[\int_0^1 (e^{-i\frac{1}{2}u_e\rho^2} - 2\alpha^2 e^{-i\frac{1}{2}u_e\alpha^2\rho^2}) \rho d\rho \right]$$

とすれば、3次元ダークホールの光軸方向の電場強度を計算できる。

ここで、 $\zeta = \rho^2$ と積分変数を置き換えると、

$$\begin{aligned} U_{all}(0, u_e) &= C \left[\int_0^1 (e^{-i\frac{1}{2}u_e\zeta} - e^{-i\frac{1}{4}u_e\zeta}) d\zeta \right] \\ &= C \left[-\frac{2}{iu_e} e^{-i\frac{1}{2}u_e\zeta} + \frac{4}{iu_e} e^{-i\frac{1}{4}u_e\zeta} \right]_0^1 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
&= C \left[\left(-\frac{2}{iu_e} e^{-i\frac{1}{2}u_e} + \frac{2}{iu_e} \right) + \left(\frac{4}{iu_e} e^{-i\frac{1}{4}u_e} - \frac{4}{iu_e} \right) \right] \\
&= \frac{C}{u_e} \left[(-2e^{-i\frac{1}{2}u_e} + 2) + (4e^{-i\frac{1}{4}u_e} - 4) \right] \\
&= \frac{C}{u_e} (2e^{-i\frac{1}{2}u_e} + 2 - 4e^{-i\frac{1}{4}u_e}) \\
&= \frac{2C}{u_e} (e^{-i\frac{1}{2}u_e} - 2e^{-i\frac{1}{4}u_e} + 1) \\
&= \frac{2C}{u_e} (1 - e^{-i\frac{1}{4}u_e})^2
\end{aligned}$$

これを用いて、エネルギー強度分布関で表現されるダークホールの光軸方向に対するプロファイルを得る。すなわち、

$$I(0, u_e) = U_{all}(0, u_e) \times U_{all}(0, u_e)^* = \frac{2C}{u_e} (1 - e^{-i\frac{1}{4}u_e})^2 * \frac{2C^*}{u_e} (1 - e^{i\frac{1}{4}u_e})^2.$$

そして、この式を整理すると、式（2-A 7）を導出できる。

$$I(0, u_e) = C^2 \left[\frac{16}{u_e^2} \sin^4 \frac{u_e}{8} \right]. \quad (2-A7)$$

この式において、 $u_{e, \max} = \pm 9.5$ において第1極大値をとる。

【付録 2】 輪帯位相変調型ビームの焦点面を横切る総光量の解析的導出

3次元超解像顕微鏡法においては、ダークホールの輪帯部のピーク強度、すなわち、 I_{zmax} 又は I_{xmax} が分解能を決定する。3次元超解像顕微鏡観察を行うためには、顕微鏡対物レンズに投入するイレース光強度 (W_e) を適切に制御しなくてはならない。従って、 I_{zmax} 又は I_{xmax} と W_e の間の定量的な関係式を把握する必要がある。今、単位時間内に焦点面を横切る輪帯位相変調型ビームの総光量、すなわち、対物レンズに投入する総フォトン量を (Φ_e) とする。焦点面におけるピークフォトンフラックスを I_{xmax} 強度として、 Φ_e は式 (2-16) を用いて 図 2-3 に示す様に極座標系で焦点面内の全領域で積分することで与えられる。

$$\begin{aligned}\Phi_e &= 37I_{xmax} \int_0^{2\pi} d\theta \int_0^\infty \left[\frac{J_1(v_e)}{v_e} - \sqrt{2} \frac{J_1(\frac{v_e}{\sqrt{2}})}{v_e} \right]^2 v_e dv_e \\ &= 2\pi \cdot 37 \cdot I_{xmax} \int_0^\infty \left[\frac{J_1(v_e)}{v_e} - \sqrt{2} \frac{J_1(\frac{v_e}{\sqrt{2}})}{v_e} \right]^2 v_e dv_e \\ &= 74I_{xmax} \int_0^\infty \left[\frac{J_1^2(v_e)}{v_e} - 2\sqrt{2} \frac{J_1(v_e)J_1(\frac{v_e}{\sqrt{2}})}{v_e} + 2 \frac{J_1^2(\frac{v_e}{\sqrt{2}})}{v_e} \right] dv_e\end{aligned}$$

ここで、下記のベッセル関数の積分公式を用いる。

$$\int_0^\infty \frac{J_n(ax)J_n(bx)}{x} dx = \frac{1}{2n} \left(\frac{a}{b}\right)^n.$$

ただし、 $a < b$ として、 b を分母に用いた。具体的には

$$\begin{aligned}\int_0^\infty \frac{J_1(v_e)J_1(v_e)}{v_e} dv_e &= \frac{1}{2} \\ \int_0^\infty \frac{J_1(v_e)J_1(\frac{v_e}{\sqrt{2}})}{v_e} dv_e &= \frac{1}{2\sqrt{2}} \\ \int_0^\infty \frac{J_1(\frac{v_e}{\sqrt{2}})J_1(\frac{v_e}{\sqrt{2}})}{v_e} dv_e &= \frac{1}{2}\end{aligned}$$

これらを代入すると

$$\Phi_e = 37\pi I_{xmax}. \quad (2-48)$$

もし、イレース光の光子エネルギーを ε と書くと、焦点面を通過する全エネルギー強度 (W) は

$$W_e = \varepsilon \Phi_e = 37\pi \varepsilon I_{xmax}. \quad (2-49)$$

もし、光軸面におけるピークフォトンフラックス I_{zmax} を用いて表記すると、

$$W_e = \varepsilon \Phi_e = 7.7\pi \varepsilon I_{zmax}. \quad (2-A10)$$

例えば、 $\lambda_e=599 \text{ nm}$ のイレース光を $\text{NA}=1$ の対物レンズで集光した時に焦点面において $I_{xmax}=2.0 \times 10^{25} \text{ /s/cm}^2$ のピークフォトンフラックス（光軸面では、 $I_{zmax} = 9.7 \times 10^{25} \text{ /s/cm}^2$ のピークフォトンフラックス）をもつダークホールパターンが得られた場合を仮定する。式（2-7）と（2-A9）を用いると、すなわち、対物レンズに投入するイレース光強度 W_e は 77 mW となる。

【付録3】 ガウシアン型ビームの焦点面を横切る総光量の解析的導出

イレース光と同様にガウシアン型のポンプ光においても、対物レンズに投入するポンプ光の総光子数 (Φ_p) と集光点におけるピーク光子フラックス (I_{Gauss}) の定量的な関係式を把握し、超解像顕微鏡観察実験を行う必要がある。また、この関係式はガウシアン型のイレース光を集光して蛍光抑制特性を計測する際にも利用できる不可欠な関係式でもある。

今、ポンプ光の波長を λ_p とし、その焦点面における集光スポットの強度分布($g(\mathbf{r})$)をガウス関数として近似すると、その強度半値幅 (FWHM) は、

$$FWHM = 0.52 \frac{\lambda}{NA} \quad (2-A11)$$

で与えられ、 $g(\mathbf{r})$ はこれを用いて

$$g(r) = I_{Gauss} e^{-ar^2} \quad (2-A12)$$

$$a = \frac{4 \log 2}{FWHM^2}$$

と書ける。ただし、図2-3に示す様に極座標系において、 $r^2 = x^2 + y^2$ の関係がある。顕微鏡対物レンズに投入するポンプ光強度 (W_p) をもつガウシアンビームを集光したとき I_{Gauss} の関係は、(ε) を光子エネルギーとして

$$\Phi_p = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} I_{Gauss} g(x^2 + y^2) dx dy$$

$$W_p = \varepsilon I_{Gauss} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-a(x^2+y^2)} dx dy$$

$$W_p = \varepsilon I_{Gauss} \frac{\pi}{a}$$

$$W_p = \frac{\varepsilon I_{Gauss} \pi \cdot FWHM^2}{4 \log 2}$$

$$I_{Gauss} = \frac{4 \log 2}{\pi \cdot \varepsilon \cdot FWHM^2} W_p \quad (2-A12)$$

例えば $W_p = 4 \mu W$ 、 $\lambda_p = 515 \text{ nm}$ のポンプ光を $NA=1$ の対物レンズで集光する場合を考える。 $FWHM = 0.52 \times 5.15 \times 10^{-5} / 1.0 \text{ cm} = 2.68 \times 10^{-5} \text{ cm}$ であるので、(2-A12) より、

$$I_{Gauss} = \frac{4 \log 2}{\pi \cdot (2.68 \times 10^{-5})^2 \cdot 3.86 \times 10^{-19} \text{ J}} \cdot 4.0 \cdot 10^{-6} \text{ W/cm}^2 = 1.3 \times 10^{22} \text{ photons/s/cm}^2$$

となる。

【第2章：参考文献】

- 2-1) Z. Ren, S. Qian, C. Tu, Y. Li, and H. Wanga, Opt. Commun. **334**, 156(2015) ;
<https://doi.org/10.1016/j.optcom.2014.08.036>.
- 2-2) N. Davidson, and N. Bokor, Opt. Lett. **29**, 1318 (2004) ; <https://doi.org/10.1364/OL.29.001318>.
- 2-3) N. Bokor, and N. Davidson, Opt. Commun. **270**, 145 (2007) ;
<https://doi.org/10.1016/j.optcom.2006.09.022>.
- 2-4) C. J. Daly, and N. A. H. K. Rao, “Scalar Diffraction from a Circular Aperture” (Springer Nature, Switzerland, 2000).
- 2-5) M. Kasha, Discussions of the Faraday Society **9**,14(1950).
- 2-6) Y. Iketaki, T. Watanabe, M. Sakai, S. Ishiuchi, M. Fujii, and T. Watanabe, Opt. Eng. **44**, 033602(2005) ; <https://doi.org/10.1117/1.1871512>.
- 2-7) Y. Horikawa, S. Mochimaru, Y. Iketaki, K. Nagai, K. Okawa; S. Iura, Proc. SPIE 1720, Intl Symp. on Optical Fabrication, Testing, and Surface Evaluation, (20) October 1992) ; <https://doi.org/10.1117/12.132128>.
- 2-8) Y. Horikawa, Journal of the Optical Society of America A **11**, 1985 (1994) ;
<https://doi.org/10.1364/JOSAA.11.001985>.
- 2-9) Y. Iketaki, T. Watanabe, S. Ishiuchi, M. Sakai, T. Omatsu, K. Yamamoto, and M. Fujii, Applied Spectroscopy **57**, 1312 (2003).
- 2-10) 池滝慶記、熊谷 寛、大野智哉、ボコル ナンドール、光学 **39** 巻、p168 (2017 年)。

第3章 ベクトル電場モデルの導入

要旨

スカラー電場モデルを用いることで3次元超解像顕微鏡法において深さ分解能が著しく向上することを定量的に示すことができた。しかし、照明光の集光学系の開口数が高くなると焦点近傍で電場の振動方向が3次的に分布する。この効果を厳密に考察するために、焦点近傍の電場配向分布を考慮した3次元ベクトル電場モデルを用いて本顕微鏡法の PSF を再考した。その結果、集光学系の開口数 (NA) が高くなると、焦点面内における PSF の広がり狭くなり、実際には、スカラー電場モデルで予測される横分解能よりも高いことが判明した。

【緒言】

前章において、スカラー電場モデルを用いることで3次元超解像顕微鏡法の PSF が表現できる式 (2-24) と (2-25) を得た。これらの式は、単純で明快な物理的モデルを提供するが、しかしながら厳密にはベクトル電場モデルを用いた波動光学的解析を行う必要がある。特に、集光学系として高 NA 対物レンズを用いた場合には、直線偏光したポンプ光とイレース光が入射しても焦点近傍では空間的に3次的に色々な入射角をもった光が集光する[3-1]。この場合、光軸方向の z 軸成分も考慮して、図 (3-1) が示す様に、光の電場の振動ベクトルを x - y - z 空間において成分分解して、それぞれの成分に対して波動光学的解析手法を施さなければならない。すなわち、スカラー電場モデルでは高 NA 対物レンズを用いたときの結像性能を正確に記述できない[3-2]。例えば第5章で後述する輪帯位相板の設計においては、詳細な評価と検討が不可欠である。そこで、本章では、ベクトル電場モデルを用いて集光したポンプ光及びイレース光の形状についてシミュレーションを行い (図 3-1 と図 3-2)、得られた結果について考察する。

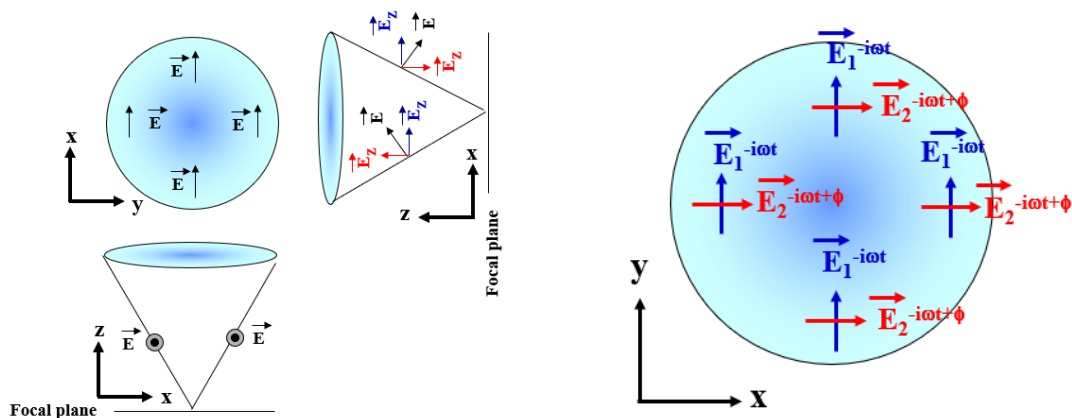


図 3-1：焦点面近傍における電場ベクトル。 図 3-2：偏光を取り入れた解析モデル。

【3次元ベクトル電場モデル】

一般に、集光点近傍における直線偏光した電場の x - y - z の 3 次元成分 (E_{1x}, E_{1y}, E_{1z}) は、は Debye の積分方程式により、瞳面動径方向 (θ) と光軸を中心に周回する方向 (φ) の角度成分を含む式で表現できる (図 3-1)。もし、 x 軸方向に直線偏光した光の場合には、

$$\vec{E}_1 = \begin{pmatrix} E_{1x} \\ E_{1y} \\ E_{1z} \end{pmatrix} = \int_0^\alpha \int_0^{2\pi} d\varphi d\theta H(\theta, \varphi) f(x, y, z) \sqrt{\cos \theta} \sin \theta \begin{pmatrix} -\cos \theta \cos^2 \varphi - \sin^2 \varphi \\ (1 - \cos \theta) \sin \varphi \cos \varphi \\ \sin \theta \cos \varphi \end{pmatrix}. \quad (3-1)$$

ここで、 θ_{out} を焦点から見た集光光学系の最大瞳径の見込み角とすると、開口数：NA は $\theta_{out} = \sin^{-1}(NA)$ の関係にある (図 2-3)。また、 $H(\theta, \varphi)$ は瞳面の位相分布関数 (瞳関数) を示し、輪帯位相変調型ビームの場合には φ に拠らない θ のみの関数になる。ダークホールをもつイレース光の場合には、 $H(\theta, \varphi)$ と $f(x, y, z)$ は式 (3-2) と式 (3-3) の様に見える [3-3]。

$$H(\theta, \varphi) = \begin{cases} 1 & (\theta > \theta_{in}) \\ -1 & (\theta \leq \theta_{in}) \end{cases} \quad (3-2)$$

$$f(x, y, z) = e^{-i \left[\frac{2\pi}{\lambda} (x\xi + y\eta) - \frac{1}{2} z (\xi^2 + \eta^2) \right]}. \quad (3-3)$$

θ_m は、焦点から見込む位相の飛びがおきる外輪部と内輪部の境界面の角度を示す。また、 $f(x, y, z)$ は式 (3-3) が示す様に収差関数を表す。 $H(\theta, \varphi) = 0$ と置けば、位相変調が施されない通常の円形開口の場合のガウシアンビームの集光パターンとなる。

ベクトル電場モデルでは入射光の任意の偏光状態も表現する必要があるので、式 (3-1) に直交した y 軸方向に直線偏光した光も考慮しなくてはならない。そこで、図 2-3 の座標を用いて、あらゆる偏光状態を想定し、 \vec{E}_1 と \vec{E}_2 の位相差を (δ) として任意の偏光状態に関して電場強度 \vec{E} を求める。

$$\vec{E}_2 = \begin{pmatrix} E_{2x} \\ E_{2y} \\ E_{2z} \end{pmatrix} = \int_0^\alpha \int_0^{2\pi} d\varphi d\theta H(\theta, \varphi) f(x, y, z) \sqrt{\cos \theta} \sin \theta \begin{pmatrix} (1 - \cos \theta) \sin \varphi \cos \varphi \\ -\cos \theta \sin^2 \varphi - \cos^2 \varphi \\ \sin \theta \sin \varphi \end{pmatrix}. \quad (3-4)$$

式 (3-1) と (3-4) を用いて任意の偏光状態に関して電場強度 \vec{E} を求めることができる。

$$\vec{E} = \vec{E}_1 + e^{-i\delta} \vec{E}_2 \quad (3-5)$$

特に、 $\delta = 0$ では直線偏光を、 $\delta = \mp\pi/4$ の場合には円偏光を表す [3-4]。

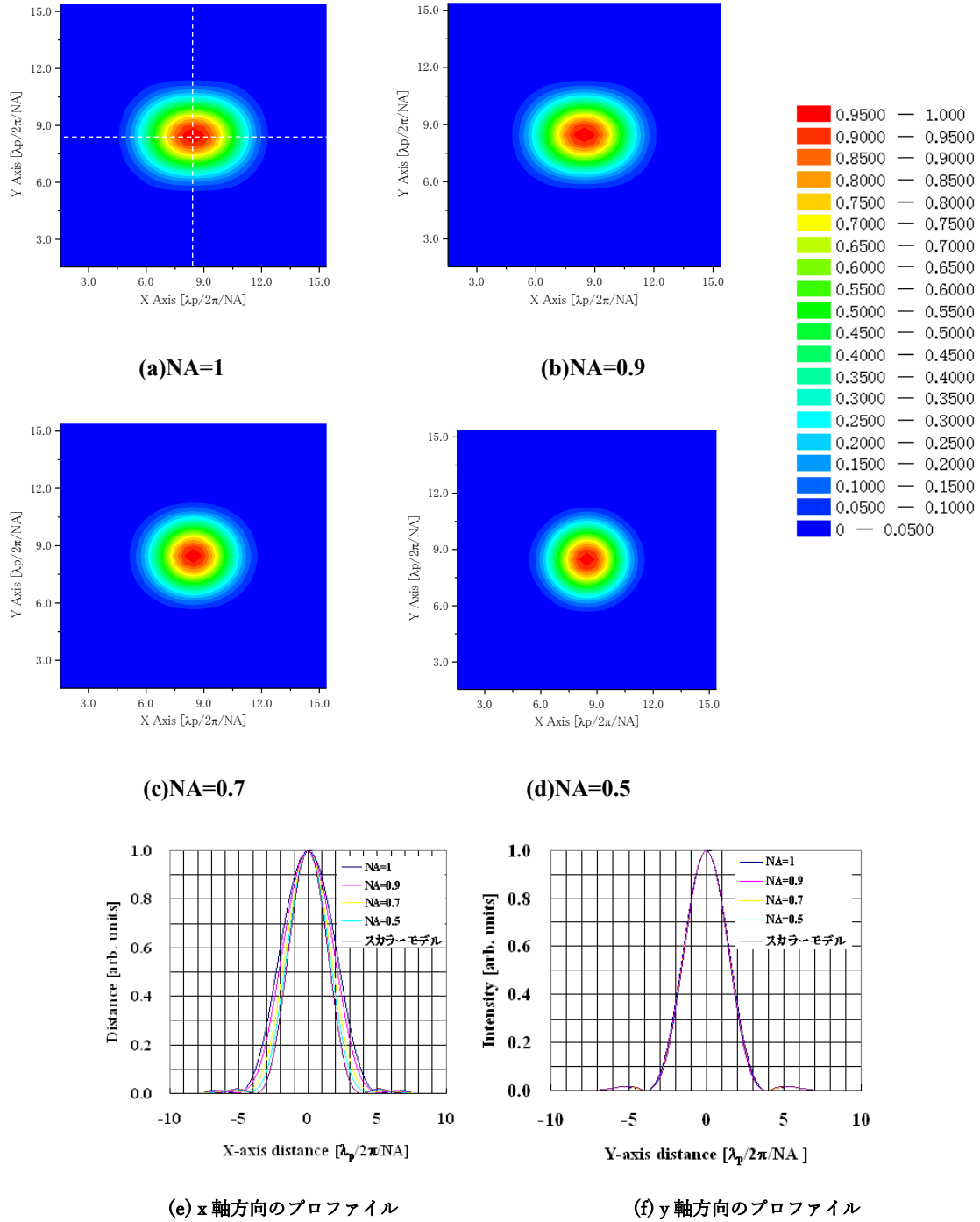


図 3-3 : 焦点面においてベクトル電場モデルにより計算した様々な NA に対するポンプ光の集光プロファイル。(a)、(b)、(c)、(d)はそれぞれの NA において光学単位による換算座標を用いて計算した強度分布。x 軸方向(e)及び y 軸方向(f)は、(a)中の破線部に示す方向の断面強度分布の比較。(e)と(f)においては、スカラー電場モデルによる計算もベクトル電場モデルと共に比較した。

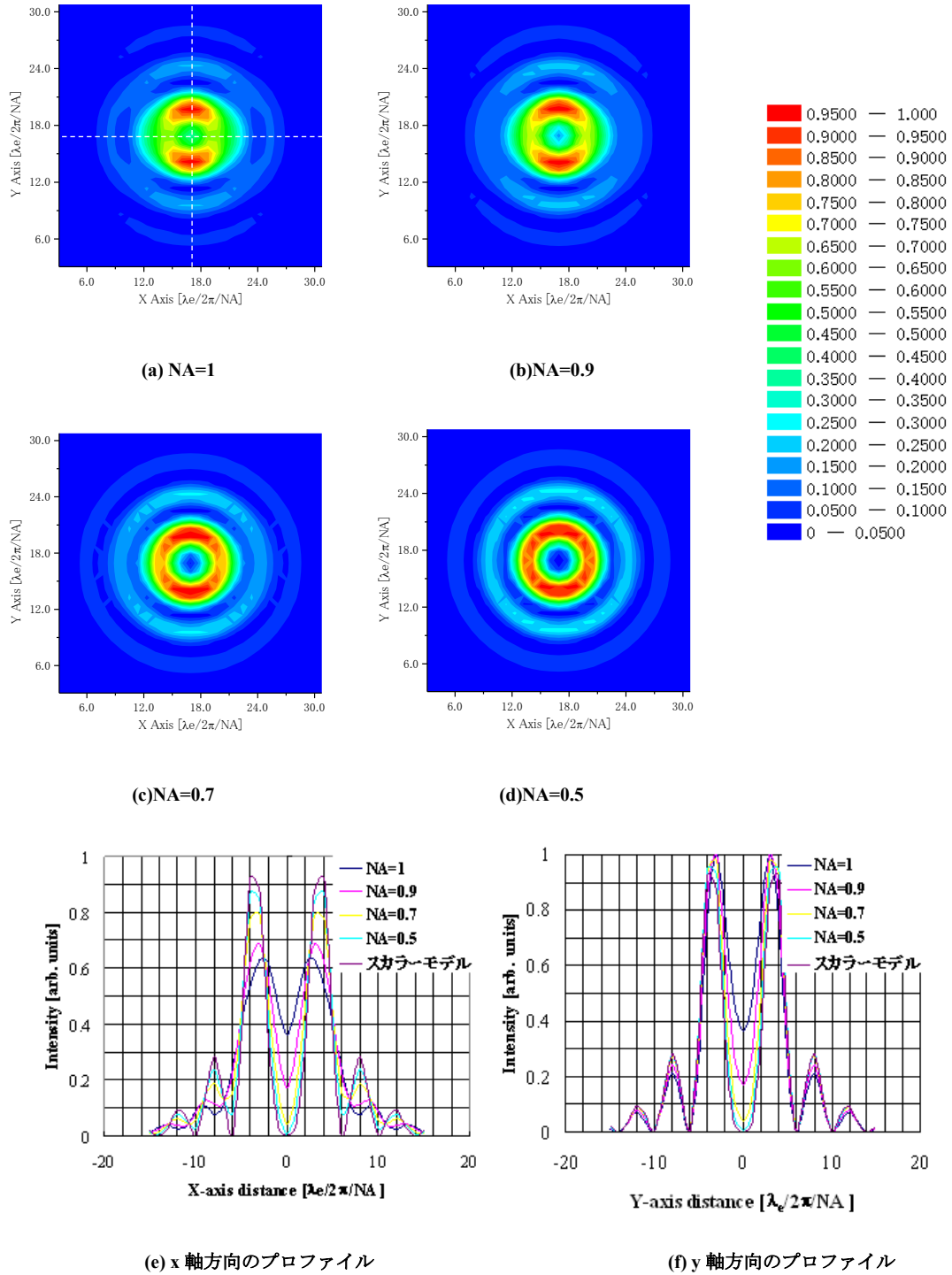
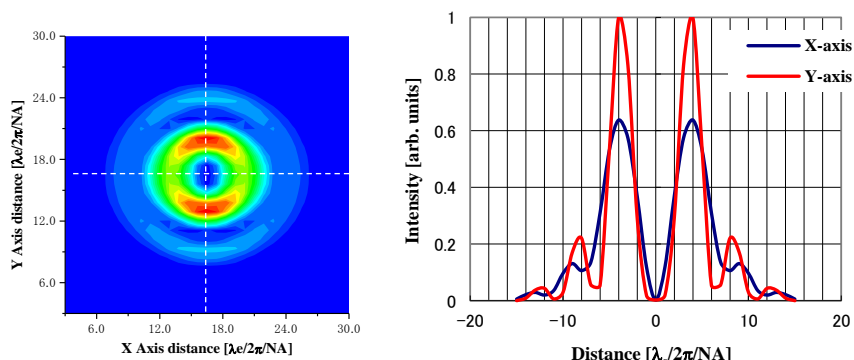


図 3-4：焦点面においてベクトル電場モデルにより計算した様々な NA に対してイレース光の集光プロファイル。(a)、(b)、(c)、(d)はそれぞれの NA において光学単位による換算座標を用いて計算した強度分布。x 軸方向(e)及び y 軸方向(f)は、図(a)中の破線部に示す方向の断面強度分布の比較。(e)と(f)においては、スカラー電場モデルによる計算もベクトル電場モデルと共に比較した。

【3次元ベクトル電場モデルで得られるポンプ光とイレース光の形状】

本解析では、式（3－1）を用いて、x 方向に直線偏光した場合の平面波をもつポンプ光（波長： λ_p ）と輪帯変調型のイレース光（波長： λ_e ）の焦点面における集光パターンを計算した。光学単位による換算座標（式（2－6））を用い、NA を変えた時のポンプ光とイレース光のパターンを図 3－3 (a)、(b)、(c)、(d)と図 3－4 (a)、(b)、(c)、(d)に示す。これらは、集光レンズの開口数を 1、0.9、0.7、0.5 とし、輪帯比率 α はスカラーモデルにおける最適値である $1/\sqrt{2}$ として比較計算をしたものである。また、図 3－3 (e)、(f)と図 3－4 (e)、(f)には、破線部に示す位置の断面強度分布を比較した。このとき、スカラー電場モデルによる断面形状の結果も同時に比較した。まず、図 3－3 によればポンプ光は、NA が増加すると、偏光方向に平行な x 軸方向に伸びた楕円体に変形していくことが分かる。一方、イレース光に関しては、図 3－4 によれば、NA が増加すると中央の中空構造が円形から x 軸方向に伸びた楕円体に変形して行く。そして、偏光方向と直交する y 軸方向の辺縁部の強度が相対的に増加していく。更に、それと同時に、焦点における強度が増加し、中空構造が消失して行く様子が分かる。この現象は、光軸と平行の方向に発生する電場成分（ E_z ）の発生により定性的に説明ができる。すなわち、高 NA 対物で集光すると、瞳面の外側から集光する光は角度 θ が大きくなるので z 軸方向（光軸方向）の射影成分が発生する。この射影成分は θ に応じて異なるので、 E_z の発生量は x 軸と y 軸方向で異なる。図（3－1）に示す様に、偏光方向と直交して y-z 面内で屈折する場合には E_z 成分が全く発生しないので、入射光の面内成分の電場強度は損失することなく集光する。このことを裏付ける事実として、y 軸方向の断面強度分布の外輪郭はベクトル電場モデルもスカラーモデルでも、ほぼ、NA に依らず一致している（図 3－4 (f)）。一方、x-z 平面内で屈折する場合には、瞳面の外側を通過した入射光に関しては、 E_z が発生するので x-y 面内の電場強度が損失して集光するので、高 NA になるとベクトル電場モデルとスカラーモデルは異なった形状を与える（図 3－4 (e)）。



(a)焦点面における集光パターン (b) x 軸と y 軸の断面強度分布

図 3－5：輪帯比率 0.62：NA=1 におけるベクトル電場モデルにより計算した焦点面上のイレース光の集光パターン(a)と破線部に沿った断面強度分布(b)。

このような電場強度分布の空間的非等方性は、図 3-4 が示す様に集光したイレース光のダークホールの中心強度にも影響を与える。具体的には、高 NA 対物レンズを用いた場合、スカラー電場モデルで決定した輪帯比率 $\alpha=1/\sqrt{2}$ を用いると、図 3-4 に示す用にディストラクティブな干渉が不完全になる。その結果として、ダークホールの中心強度がゼロでなくなる。しかし、高 NA の場合にも、第 5 章で述べる様に式 (3-4) 用いて最適化作業を行えばゼロ強度中心をもつダークホールを生成することができる。その例として、図 3-5 (a) は、幾何学的開口数が最大となる $NA=1$ の場合に最適化を行い、 $\alpha=0.62$ に選定したときのイレース光の焦点面における集光パターンを示す。図 3-5 (b) は、図 3-5 (a) の破線部に示す x 軸方向と y 軸方向の断面強度分布を示す。図 3-5 に示す様に、x 軸方向と y 軸方向で強度分布が異なるものの焦点で電場強度がゼロとなっている。

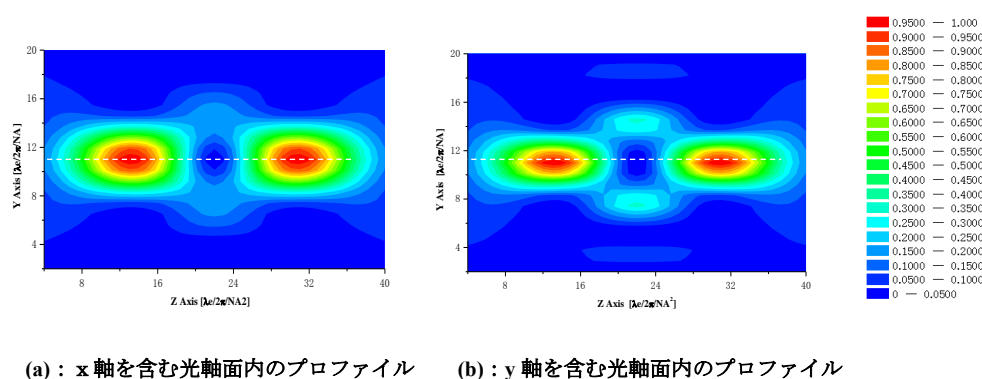


図 3-6 : 輪帯比率 0.62、 $NA=1$ におけるベクトル電場モデルによる光軸面内のイレース光の強度プロファイル。

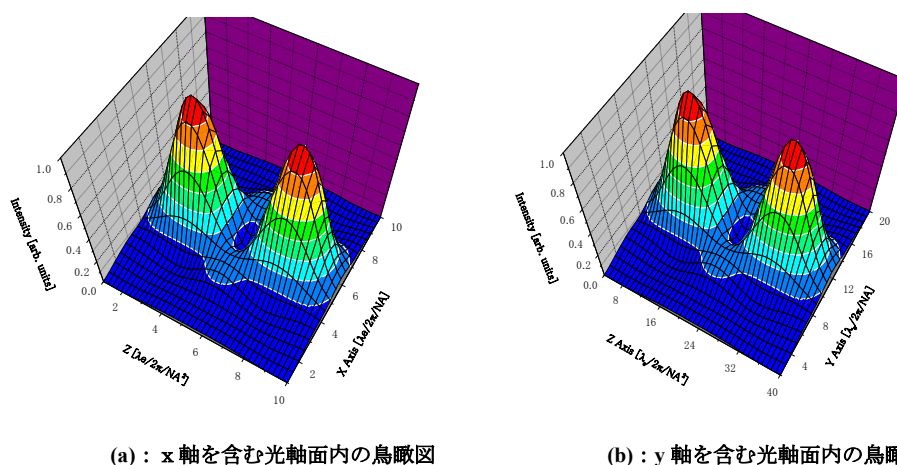


図 3-7 : 輪帯比率 0.62、 $NA=1$ におけるベクトル電場モデルによる光軸面内のイレース光強度プロファイルの鳥瞰図。

図 3-6 は同じ条件で計算したときの z 軸を含む x 軸方向(a)と y 軸方向(b)を含む光軸面内のイレース光の強度プロファイルを示す。そして、図 3-7 は、それぞれに対応する立体鳥瞰図である。それらによれば、x 軸を含む光軸面の強度プロファイルのリングパターンと (a) と y 軸を含む光軸面の強度プロファイルのリングパターン(b)の形状が異なるが、焦点近傍で強度がゼロとなるダークホールが光軸方向にも明瞭に確認できる。一方、図 3-8 に

において、図 3-6 の破線部の z 軸方向を含む断面強度分布に関してベクトル電場モデルと $\alpha = 1/\sqrt{2}$ として計算したスカラー電場モデルの結果を比較した。それによれば、焦点から離れたところで多少差異が見られるが、殆どプロファイルは一致している。これらの事実は、高 NA 対物レンズを用いても、 z 方向に対するプロファイルはスカラー電場モデルで記述できると同時に、偏光の影響を受けにくいことを示している。

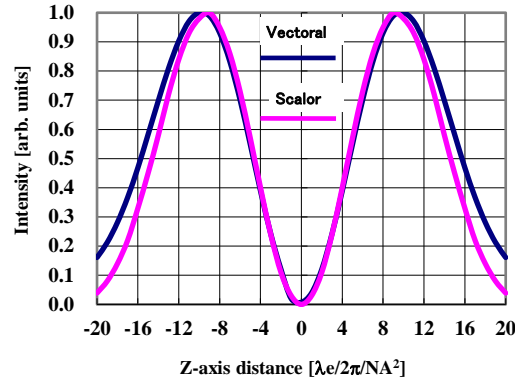


図 3-8：輪帯比率 0.62、NA=1 におけるベクトル電場モデルにより計算した光軸上のイレース光の強度プロファイル

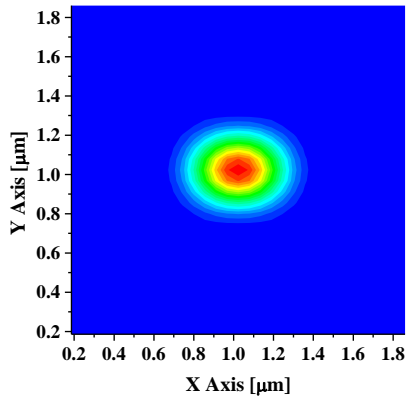
— はベクトル電場モデルによる計算結果であり、— はスカラー電場モデルによる結果。

【3次元ベクトル電場モデルによる超解像顕微鏡法の PSF の解析】

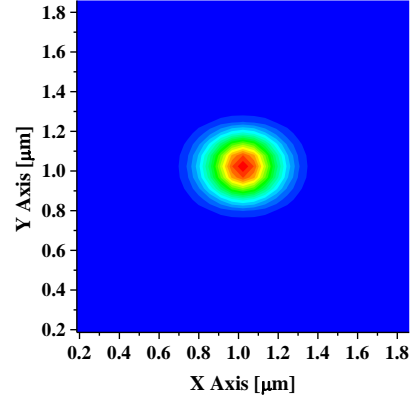
3次元ベクトル電場モデルにおいても、超解像顕微鏡法における PSF ($F(x,y,z)$) は、スカラー電場モデルと同様に、蛍光抑制特性 $P(I_e)$ と円形開口の回折式を用いて計算することができる。式 (3-1) から (3-5) を用いてポンプ光の電場の複素振幅分布 ($I_p(x,y,z,\lambda_p)$) とイレース光の複素振幅分布の ($I_e(x,y,z,\lambda_e)$) を計算すれば、PSF は式 (3-6) で与えられる。

$$F(x,y,z) = P[\{I_e(x,y,z,\lambda_e)\}^2] \cdot \{I_p(x,y,z,\lambda_p)\}^2. \quad (3-6)$$

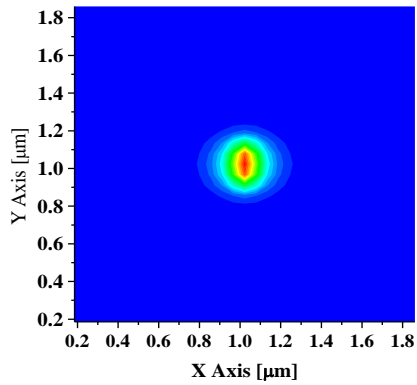
3次元超解像顕微鏡法を運用する際、出来るだけ高い分解能を得るためには高 NA 対物レンズを利用することが実用的である。そこで、顕微鏡で頻繁に用いられる幾何学的な開口数が高い NA が 0.9 の対物レンズをピックアップし、式 (3-6) を用いて、蛍光色素分子としてローダミン 6 G を想定してベクトル電場モデルにより 3 次元的分解能について数値解析を行った。この場合、最適な輪帯比 α は 0.65 となる。その他の計算条件は表 2-1 に設定し、 x 軸方向に直線偏光したポンプ光とイレース光を同時集光したときの 3 次元超解像顕微鏡法の PSF を計算した。この際、集光したイレース光の強度 $[I_e(x,y,z,\lambda_e)]^2$ は、光軸面においてピークフォトンフラックスが I_{zmax} を持つ。



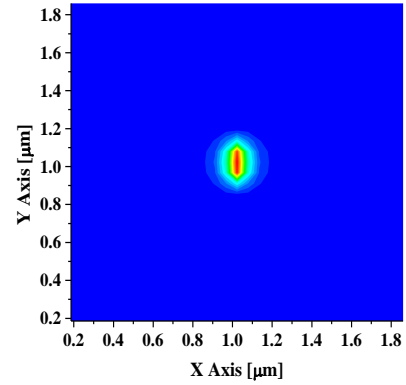
(a) $I_{z\max}=0$ photons/cm²/sec



(b) $I_{z\max}=0.25 \times 10^{25}$ photons/cm²/sec

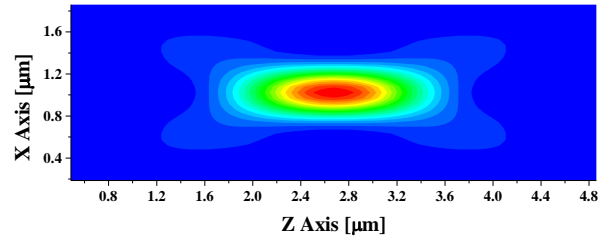


(c) $I_{z\max}=2.5 \times 10^{25}$ photons/cm²/sec

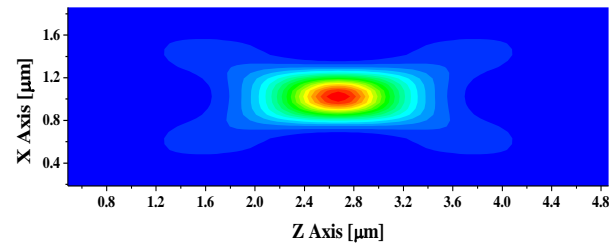


(d) $I_{z\max}=10 \times 10^{25}$ photons/cm²/sec

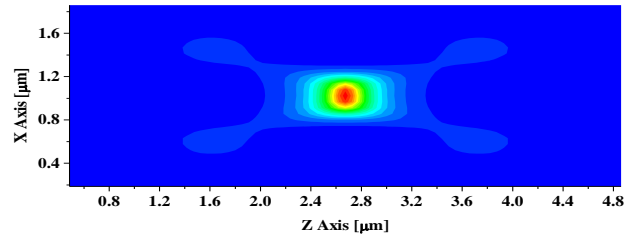
図 3-9 : NA=0.9 の対物レンズ使用時 x-y 平面におけるイレース光強度に対する PSF の変化。



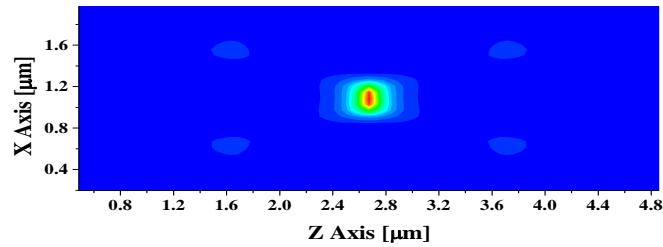
(a) $I_{z\max}=0$ photons/cm²/sec



(b) $I_{z\max}=0.25 \times 10^{25}$ photons/cm²/sec

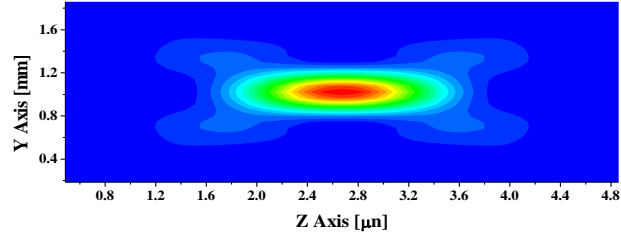


(c) $I_{z\max}=2.5 \times 10^{25}$ photons/cm²/sec

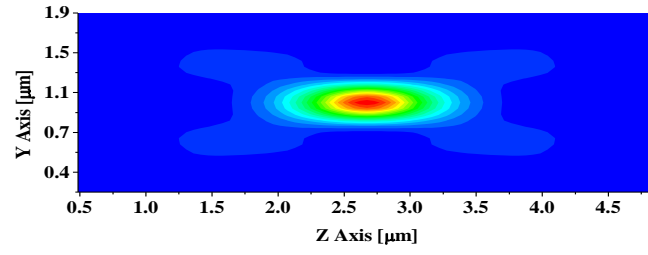


(d) $I_{z\max}=10 \times 10^{25}$ photons/cm²/sec

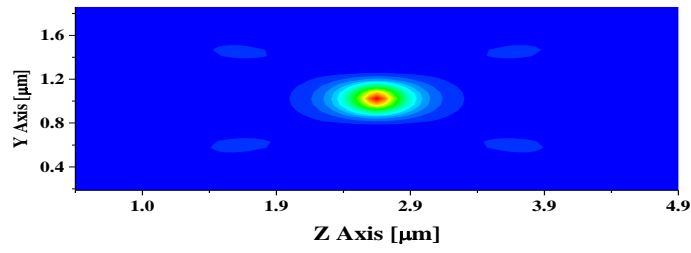
図 3-10 : NA=0.9 の対物レンズ使用時の x-z 平面におけるイレーズ光強度に対する PSF の変化。



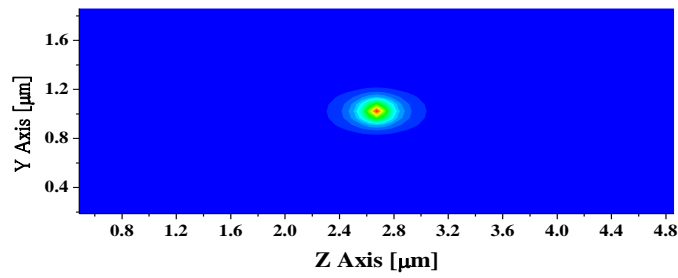
(a) $I_{z\max} = 0$ photons/cm²/sec



(b) $I_{z\max} = 0.25 \times 10^{25}$ photons/cm²/sec

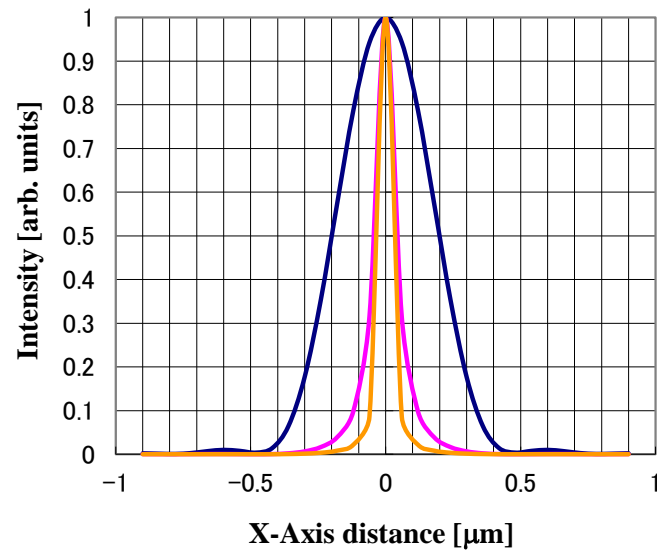


(c) $I_{z\max} = 2.5 \times 10^{25}$ photons/cm²/sec



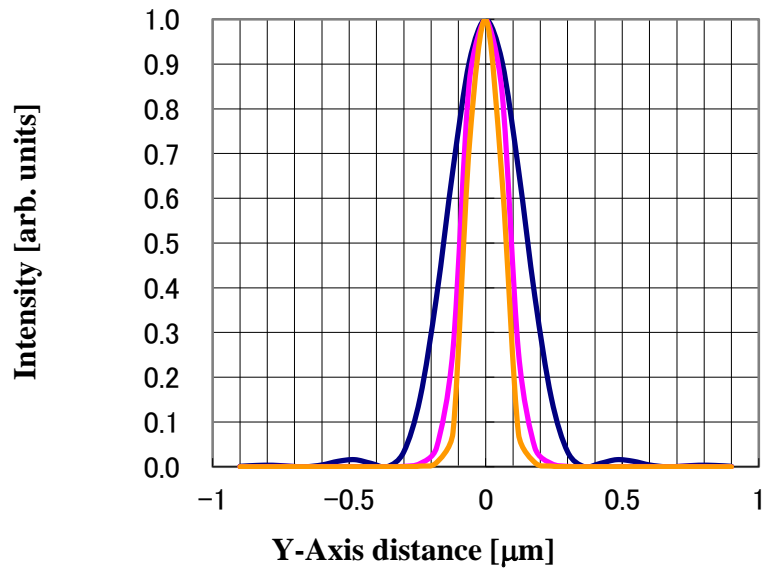
(d) $I_{z\max} = 10 \times 10^{25}$ photons/cm²/sec

図 3-11 : NA=0.9 の対物レンズ使用時の y-z 平面におけるイレーヌ光強度に対する PSF の変化。



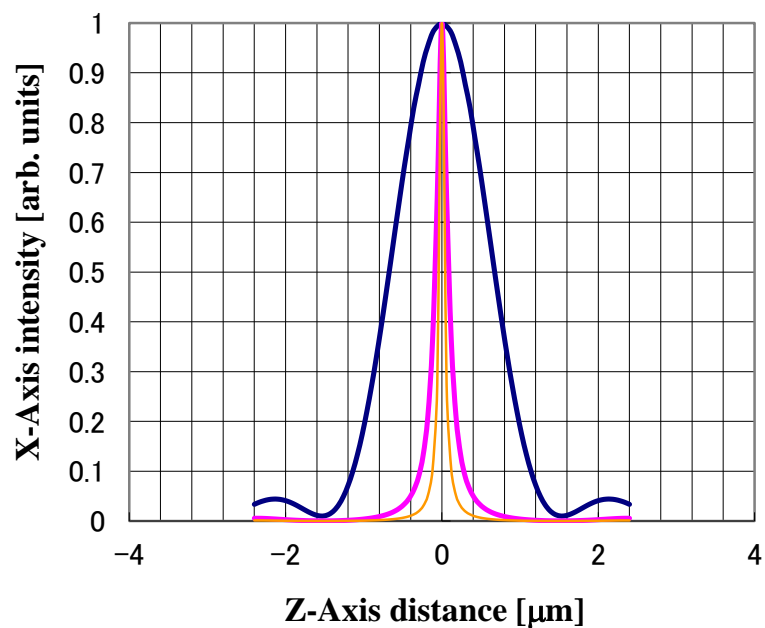
イレース光最大フォトンフラックス：— $I_{z\max}=0$ — $I_{z\max}=10 \times 10^{25}$ photons/cm²/sec — $I_{z\max}=50 \times 10^{25}$ photons/cm²/sec

図 3－1 2：焦点面内における x 軸方向の PSF の断面強度分布の変化。



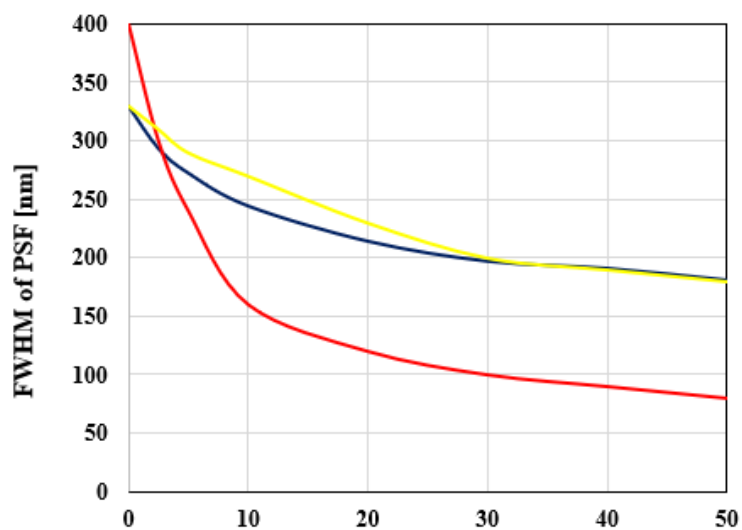
イレース光最大フォトンフラックス：— $I_{z\max}=0$ — $I_{z\max}=10 \times 10^{25}$ photons/cm²/sec — $I_{z\max}=50 \times 10^{25}$ photons/cm²/sec

図 3－1 3：焦点面内における y 軸方向の PSF の断面強度分布の変化。



イレース光最大フォトンフラックス：— $I_{z\max}=0$ — $I_{z\max}=10 \times 10^{25}$ photons/cm²/sec — $I_{z\max}=50 \times 10^{25}$ photons/cm²/sec

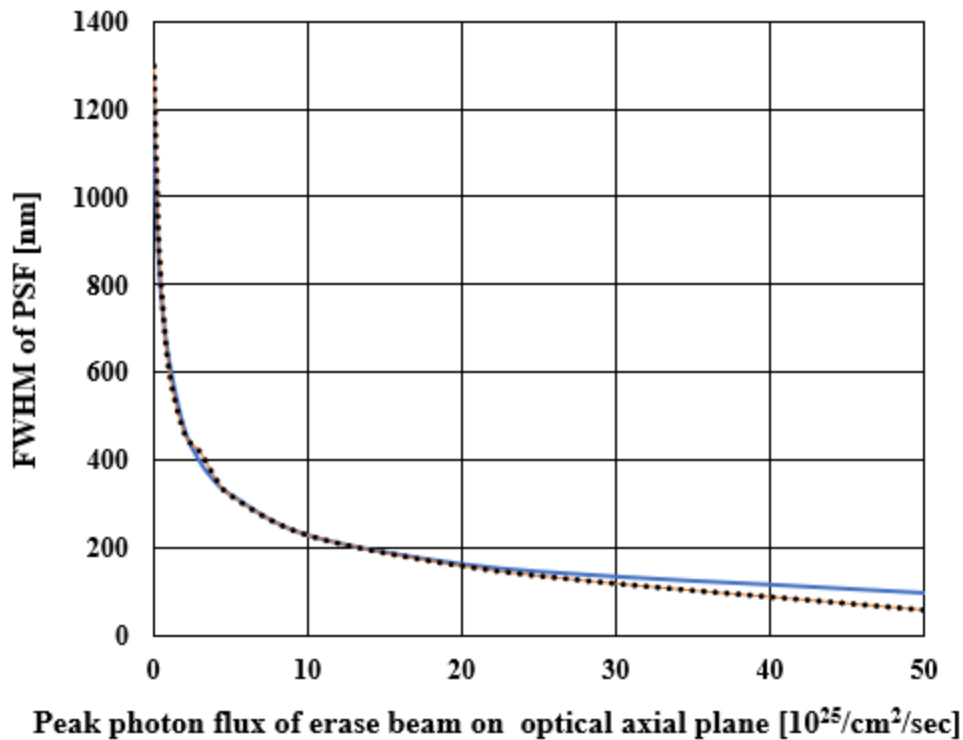
図 3-14：x-z 断面内における PSF のプロファイル変化。



Peak photon flux of erase beam on optical axial plane [10^{25} /cm²/sec]

— スカラー電場モデル、— ベクトル電場モデル x 軸（偏光方向）、— ベクトル電場モデル y 軸

図 3-15：焦点面における PSF の FWHM の変化。



—スカラー電場モデル、・ベクトル電場モデルx 軸（偏光方向）、—ベクトル電場モデルy 軸

図 3－1 6：z 軸（光軸）を含む断面における PSF の FWHM の変化。

図（3－9）は、光軸面におけるピークフォトンフラックス $I_{z\max}$ を変化させて集光したときの焦点面における PSF を示す。それによれば、イレース光強度の増加とともに、PSF が微細化していくことが分かる。特徴的なことは、ポンプ光の単独照射時の PSF は、偏光方向である x 軸方向に広がった楕円状のスポットになっているが（図 3－9 (a)）、イレース光の照射強度を増加させるとこの x 軸方向に著しく収縮する。この振る舞いは、図 3－5 はより説明できる。イレース光の y 軸方向の断面強度分布は、焦点の周りに回折限界サイズの平坦なゼロ強度領域をもつので、蛍光抑制領域はこのゼロ強度領域以外のポンプ光の集光スポットの辺縁に限られる。その結果として、イレース光強度をいくら増加させても飽和して、PSF はこのゼロ強度領域よりは小さくならない。これに対して、x 軸方向のイレース光の断面強度分布は焦点の極近傍以外にも強度成分が存在し、焦点以外のごく近傍領域でも蛍光抑制効果を誘導できることを示している。その結果として、図（3－9 (d)）が示す様に、イレース光強度が増加するに従い PSF は y 軸方向よりも x 軸方向のサイズが小さくなる。一方、図 3－8 が示す様に z 軸方向のイレース光の断面強度分布に着目すると、x 軸方向と同様にイレース光の断面強度分布は焦点の極近傍以外にも強度成分が存在する。従って、図 3－1 0 と図 3－1 1 が示す様に、イレース光強度が増加するに従い PSF は漸次的に縮小していく。図 3－1 2、図 3－1 3 及び図 3－1 4 は、 $I_{z\max}=0 \times 10^{25}/\text{cm}^2/\text{sec}$ 、 $10 \times 10^{25}/\text{cm}^2/\text{sec}$ 、

$50 \times 10^{25} / \text{cm}^2 / \text{sec}$ のときの PSF の x 軸、y 軸、z 軸に沿った断面強度分布を夫々に示す。イレース光照射無しの場合の 3 次元超解像顕微鏡を用いない場合は、x 軸方向の FWHM が 400 nm であったが、 $I_{\text{zmax}} = 50 \times 10^{25} / \text{cm}^2 / \text{sec}$ のイレース光を同時照射すると 80 nm までに収縮している。それに対して、y 軸方向に関しては、180 nm と半分程度までしか収縮しない (図 3-15)。一方、z 軸方向は、FWHM が 1400 nm から 80 nm まで減少しており、ベクトル電場モデルにおいても深さ分解能の向上が著しいことが分かる (図 3-16)。尚、図 3-15 と図 3-16 にはスカラー電場モデルによる計算結果も併記した。

【考察】

提案する超解像顕微鏡法は、 $\text{NA}=0.7$ を目安にしてそれ以上の高い NA 対物レンズを用いた場合、照明光の偏光状態を考慮しないと PSF を正確にシミュレーションできないことを確認した。特に、偏光方向に対して直交する方向の FWHM は、いくら入イレース光強度を上げてても小さくならない。この場合、PSF は全体として微小化するが、空間形状が極端に非対称になる。生物試料など、微小領域での空間配向をもつ構造体を観察対象にする場合、疑似パターン、すなわちアーキファクトが現れる危険性があり、学術的な解釈を誤らせる可能性がある [3-5]。これを解決して顕微鏡画像の画質を向上させるためには、PSF の等方的な微細化を行わなければならない。この技術課題に対しては、円偏光したポンプ光とイレース光を照明光として用いることで対応できる。円偏光のときのイレース光の場合には、式 (3-5) で $\delta = \pi/2$ とおいて、式 (3-7) によりその集光パターンは得られる。

$$\vec{E} = \vec{E}_1 + e^{-i\frac{\pi}{2}} \vec{E}_2 \quad . \quad (3-7)$$

図 3-17 は、波長 599 nm の光を $\text{NA}=1$ の対物レンズで集光したときの焦点面におけるパターンを示す。図 3-17 に示す様に、x 軸方向と y 軸方向に扁平したスポットが同じ強度で加算されるので、全体として光軸対象に強度が平均化される。円偏光のイレース光を用いた場合における PSF の特性に関しては詳細に第 4 章で述べる。

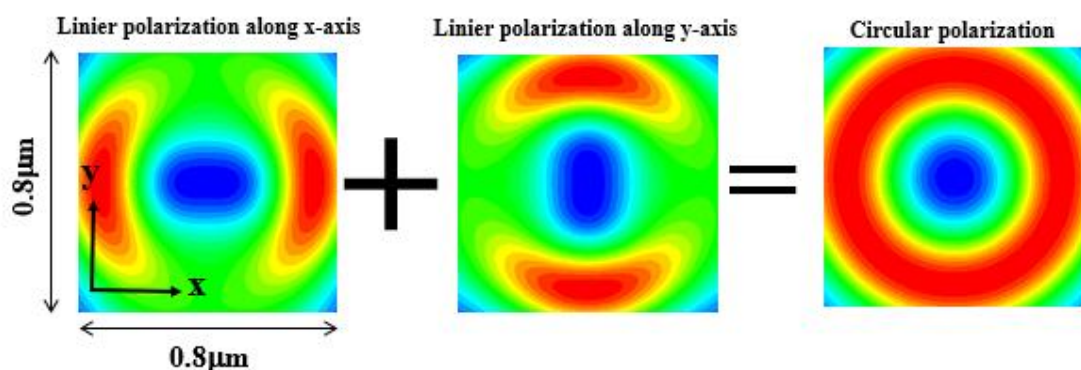


図 3-17： 円偏光のイレース光の焦点面における集光パターン (波長：599nm、 $\text{NA}=1$)。

【結論】

照明光の集光学系の開口数が高い場合には、スカラー電場モデルを用いることで3次元超解像顕微鏡法のPSFを定量的に記述できる。しかし、開口数が0.7を目安にそれよりも高くなると焦点近傍で光軸方向の電場成分が発生するので、電場の空間配向分布を考慮した3次元ベクトル電場モデルを用いた解析が必要となる。具体的には、直線偏光したイレース光を集光すると、焦点面内において偏光方向と並行な方向と直交する方向で強度分布が異なるダークホールが形成される。この様なイレース光を用いると、並行な方向と直交する方向でPSFの収縮の程度が異なり、PSFは空間形状が極端に非対称になる。良質な顕微鏡画像と提供するためには空間的に等方的なPSFが必要であるが、これは円偏光のイレース光を用いることで解決できる。

【第3章：参考文献】

- 3-1) N. Davidson, and N. Bokor, Opt. Lett. **29**, 1318 (2004);
<https://doi.org/10.1364/OL.29.001318>.
- 3-2) Y. Hu, Z. Wang, X. Wang, S. Ji, C. Zhang, J. Li, W. Zhu, D. Wu, and J. Chu, Light Sci Appl. **9**, 119 (2020);<https://doi.org/10.1038/s41377-020-00362-z>.
- 3-3) B. Richards, and E. Wolf, Proc. R. Soc. London Ser. A **253**, 358 (1959);
<https://doi.org/10.1098/rspa.1959.0200>.
- 3-4) Y. Iketaki, T. Watanabe, N. Bokor, and M. Fujii, Opt. Lett. **32**, 2357 (2007);
<https://doi.org/10.1364/OL.32.002357>.
- 3-5) P. Ricciab, V. Gavryusevab, C. Müllenbroichc, L. Turrinia, G. Vito, L. Silvestri, G. Sancataldo, and F. S. Pavone, Progress in Biophysics and Molecular Biology **168**, 52(2022);
<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2021.07.003>.

第4章 3次元超解像顕微鏡法のベクトル電場モデル による数値解析

— 他のイレース光パターンを用いた場合との分解能の比較 —

要旨

3次元超解像顕微鏡法において、円偏光をした輪帯位相変調型のイレース光を用いると平面方向及び深さ方向にバランスが取れた高い分解能が得られる。ベクトル電場モデルを用いて3次元超解像顕微鏡法のPSFに関してシミュレーションを行い、本顕微鏡法が提供する到達分解能の上限を探った。その結果、本顕微鏡法は少なくとも100 nmの3次元分解能が得られることを確認した。本章では、更に、ラゲール・ガウシアン型のイレース光をはじめとする他の変調型のイレース光についても解析を行った。その結果、円偏光をした輪帯位相変調型のイレース光は、ラゲール・ガウシアン型の変調方式と比較して平面分解能は劣るものの、最も高い深さ分解能が得られることが分かった。

【緒言】

第3章では、高NA対物レンズを用いて3次元超解像顕微鏡法により観察する場合には、ベクトル電場モデルを用いる必要性を述べた。そして、良質な画質で高解像度の顕微鏡画像を得るために、等方的なPSFが得られる円偏光のイレース光の利

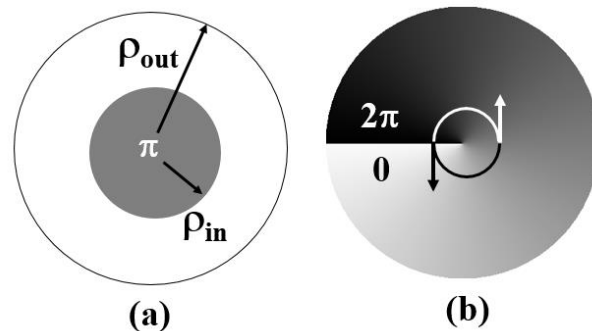


図4-1：イレース光の2種類の位相分。

用を提案した。本章では、ベクトル電場モデルを用いて3次元超解像顕微鏡法のPSFに関してシミュレーションを行い、本顕微鏡法が提供する到達分解能の上限を探る。図4-1には、中空状のイレース光を生成する為の2種類のビーム波面を示す。図4-1(a)は、これまで第2章と3章で論議した3次元超解像顕微鏡法で用いる輪帯位相変調型のビームである。一方、図4-1(b)は、既存の超解像顕微鏡法で用いるスパイラル型の波面をもつラゲール・ガウシアン型ビームである[4-1,4-2]。このビームは面内では光軸に関する点対称の位置で常に位相が反転するので、電場は光軸上でキャンセルする。これを集光すると、電場は常に光軸上でゼロとなり、ビームはマカロニ状の空間形状をもつ。特に、円偏光のラゲール・ガウシアン型ビームを高開口数の対物レンズで集光すると、非常にタイトなドーナツの

集光スポットが得られるので、非常に高い平面分解能が得られる。本章では、スパイラル型の波面をもつイレース光を用いた従来型の超解像顕微鏡法の結像性能と比較しつつ、ベクトル電場モデルを用いて3次元超解像顕微鏡法のPSFに関してシミュレーションを行い、本顕微鏡法が提供する到達分解能の上限を探った。

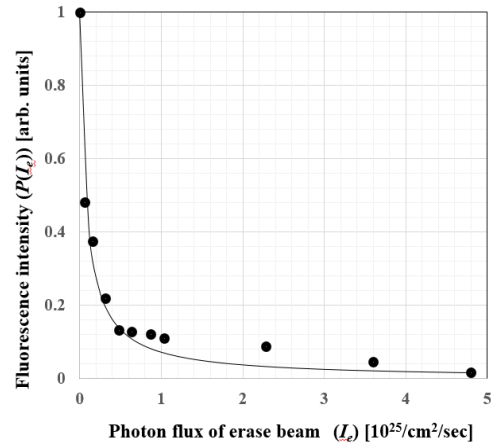


図4-2：ナイルレッドの蛍光抑制特。

【シミュレーションの方法と条件】

本章では、既存の光学顕微鏡で用いることができる最大開口数 $\text{NA}=1.5$ をもつ油浸対物レンズを想定する。照明光として、市販の固体レーザーで生成できる $\lambda_p=515 \text{ nm}$ のポンプ光と $\lambda_e=670 \text{ nm}$ のイレース光を用いることを仮定する。そして、偏光状態は何れに対しても第3章で述べた様に集光パターンの空間対称性が良い円偏光を仮定する（イレース光が直線偏光した場合に関しては、付録3を参照のこと）。蛍光色素分子に関しては第7章で報告する様に $\lambda_e=670 \text{ nm}$ において優れた蛍光抑制特性を示すナイルレッドを仮定し、図4-2に示すポリスチレン中の蛍光抑制特性の実測値を用いる（第7章を参照のこと）。また、輪帯比 α を最適値である 0.62 とする。本章（4章）と次章（5章）では、一貫してこの実測した蛍光抑制特性をシミュレーションにおいて利用する。式（3-1）において式（4-1）に示す様な光軸に関して 2π 回転させる位相分布を導入すれば、ラゲール・ガウシアン型ビームの集光プロファイルが得られる。基本的に $H(\theta, \varphi)$ に位相分布関数を選ぶことで、様々な集光プロファイルが得られる。

$$H(\theta, \varphi) = e^{-i\varphi}. \quad (4-1)$$

本シミュレーションでは、PSF を集光したイレース光のピークフォトンフラックスの関数として求め、それらの形状を比較と考察を行う。輪帯位相変調型のイレース光を集光すると光軸面において最大強度 I_{zmaz} をもつので、PSF は I_{zmaz} の関数となる。一方、スパイラル型においては焦点面において最大強度 I_{xmax} をもつので、PSF は I_{xmax} の関数となる。また、後述するハイブリッド型位相分布の場合も、焦点面において最大強度 I_{xmax} をもつので、PSF は I_{xmax} の関数となる。

【ポンプ光の偏光状態が3次元超解像顕微鏡のPSFに与える影響】

第3章において、イレース光の集光プロファイルは偏光状態に応じて光軸周りの強度分布が変化することを述べた。同様に、ポンプ光も偏光状態に依存し、空間形状が変化する。図4-3に、式（3-5）を用いて計算した焦点面における円偏光と直線偏光（x軸方向）

のポンプ光 ($\lambda_p=515$ nm) の集光パターンを示す。それによれば、円偏光の場合には光軸対象の円形スポットが得られ、直線偏光の場合には x 軸方向に広がった楕円となっている。図 4-4 に白線に示す位置の断面強度分布の形状を、円偏光のイレース ($\lambda_e=670$ nm) のスポットの断面強度分布と共に示す。図 4-4 が示す様に、円偏光と直線偏光では x 軸方向と y 軸方向では広がり方が異なり、ポンプ光の偏光状態も 3 次元超解像顕微鏡法の PSF に影響を与えることが懸念される。そこで、円偏光と直線偏光のポンプ光を用いた時の 3 次元超解像顕微鏡法の PSF の形状を計算し、それらの差異を調べた。本計算では、イレース光のピークフォトンフラックス I_{zmax} を 2×10^{25} photons/cm²/sec として PSF を求めた。

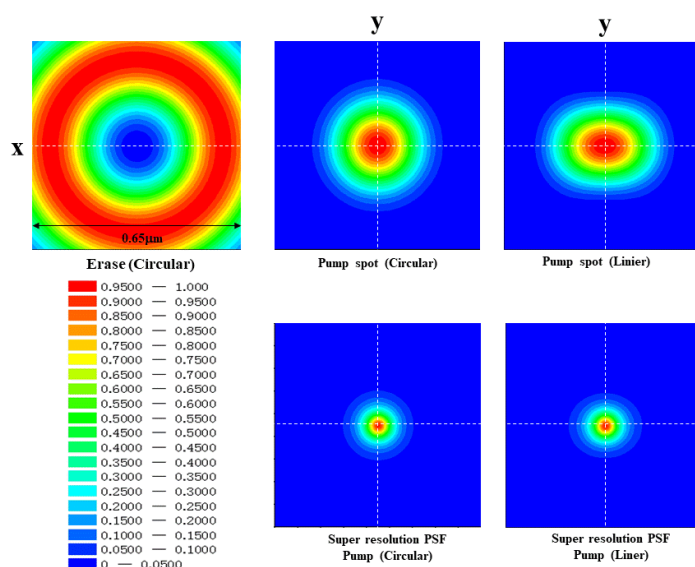


図 4-3 : 円偏光のイレース光 ($\lambda_e=670$ nm) を用い、円偏光と直線偏光のポンプ光をそれぞれ同時集光したときの 3 次元超解像顕微鏡法における PSF の頂点面におけるパターンの変化。

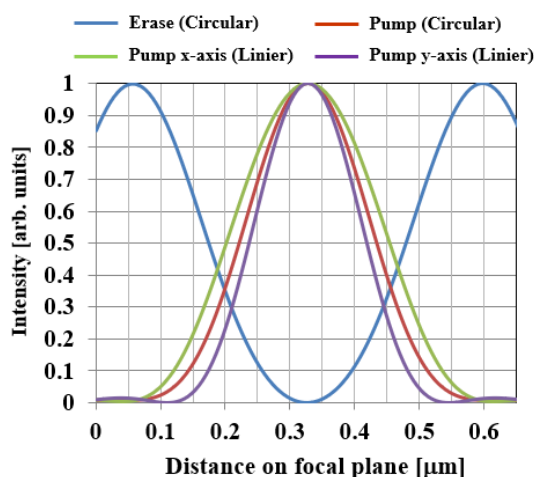


図 4-4 : 円偏光及び直線偏光状態に対する図 4-3 に示す破線部 x 軸と y 軸方向のポンプ光の断面強度分布の比較。

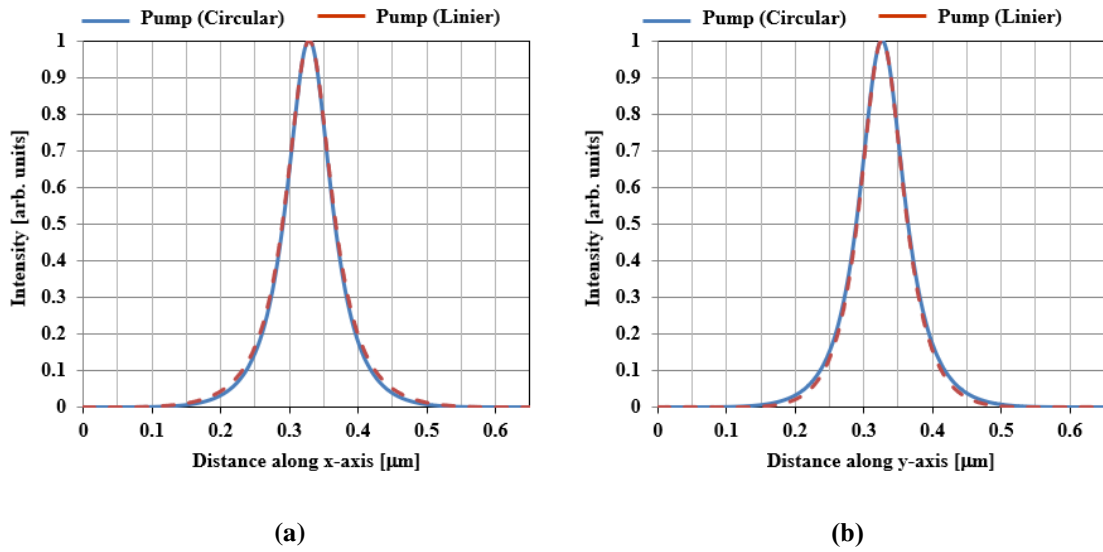


図 4－5： 円偏光(a)及び直線偏光状態(b)に対する図 4－3 に示す破線部 x 軸と y 軸方向の 3 次元超解像顕微鏡法の PSF の断面強度分布の比較。

図 4－3 に、円偏光及び直線偏光のポンプ光を用いたときの焦点面における 3 次元超解像顕微鏡法の PSF を示す。それによれば、PSF は偏光状態によらず形状とサイズは同じであることが分かる。これを確認するために、図 4－3 に示す破線部 x 軸と y 軸方向の PSF の断面強度分布を図 4－5 に比較した。図 4－5 が示す様に、ポンプ光の偏光状態によらず x 軸方向（図 4－5 (a)）及び y 軸方向（図 4－5 (b)）の断面強度分布は一致しており、PSF はイレース光の形状で決定される。従って、以後、4 章と 5 章ではポンプ光の偏光状態は円偏光としてシミュレーションを行う。

【輪帯位相変調型のイレース光を用いた超解像顕微鏡法の到達分解能の予測】

第 2 章及び第 3 章では、図 4－1 (a)で示す輪帯位相変調型の位相分布をもつイレース光を集光したときのダークホール特性を定量的に解析し、提案手法により 3 次元的に回折限界を突破した分解能が得られることを確認した。ラゲール・ガウシアン型のイレース光を用いると、高い平面分解能を提供できる（図 4－1 (b)）。本章では、この既存の手法で得られる分解能特性と比較しつつ、ベクトル電場モデルを用いて数値シミュレーションを行い、3 次元超解像顕微鏡法が提供しうる到達分解能の上限を探った。

1) イレース光の集光パターン

図 4－6 は、ポンプ光の 3 次元プロファイル、ラゲール・ガウシアン型のイレース光のプロファイル、そして輪帯位相変調型のイレース光のプロファイルを示す。一方、図 4－7 はそれらの焦点面内及び光軸面内におけるプロファイルの断面強度分布を示す（両プロファイルとも I_{zmax} で規格化した）。図 4－6 と図 4－7 によれば、スパイラル型波面分布をもつ

イレース光を集光すると光軸上で電場が相殺し、焦点面において非常にタイトな中空スポットが得られることが分かる。従って、高い横分解能が期待できる。しかし、光軸方向の電場強度は常にゼロとなるために光軸方向には蛍光抑制効果は全く誘導できない。すなわち、深さ分解能は全く向上しない。一方、輪帯型位相分布を用いると、焦点と近傍で電場強度が相殺し、3次元的に光の当たらない等方的な微小領域が生成されていることが分かる。この場合、光軸方向に高いピーク強度をもつ中空パターンが生成し、その方向に強い蛍光抑制効果が誘導され、蛍光スポットは光軸方向に収縮することが期待できる。すなわち、深さ分解能が向上する。加えて、ラゲール・ガウシアン型位相分布を用いた場合と比較すると、ブロードで強度が弱いながらも焦点面においても中空スポットが形成されるためにスパイラル型の波面分布と同様に横分解能も向上することが期待できる。

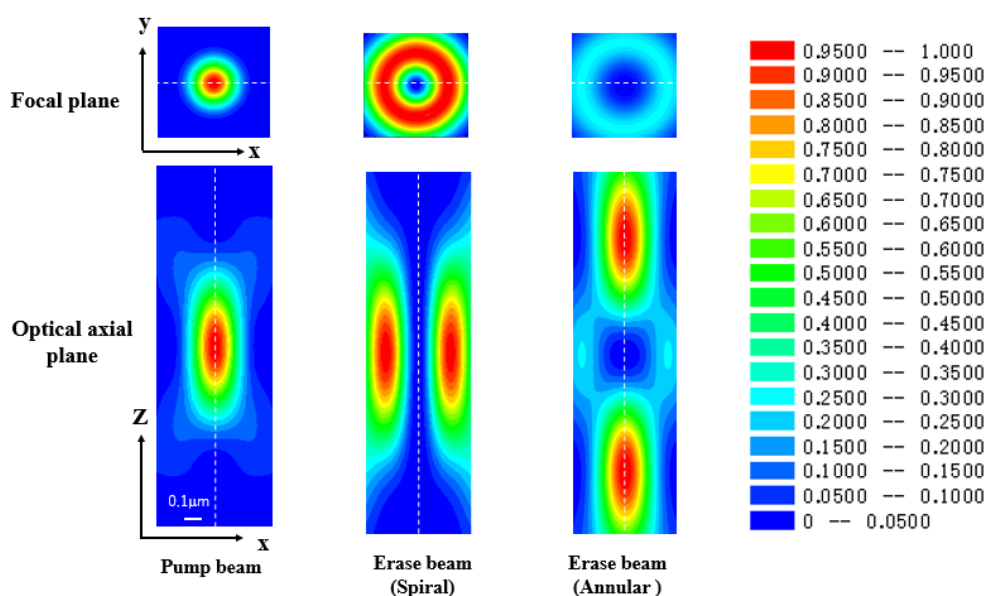


図 4-6 : ポンプ光とイレース光の焦点近傍の 3 次元集光プロファイル。

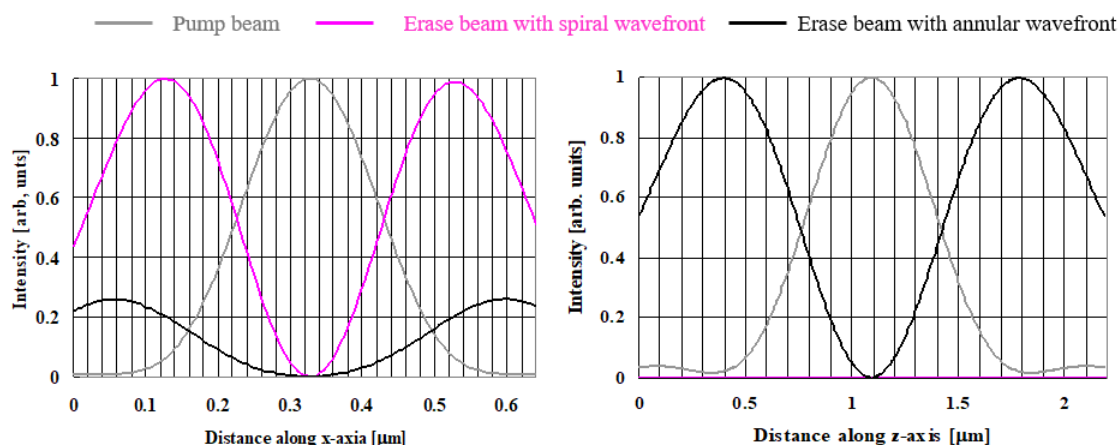


図 4-7 : 焦点面内及び光軸面内における点像分布関数の断面強度分布（図 4-6 における破線部の断面強度分布）。

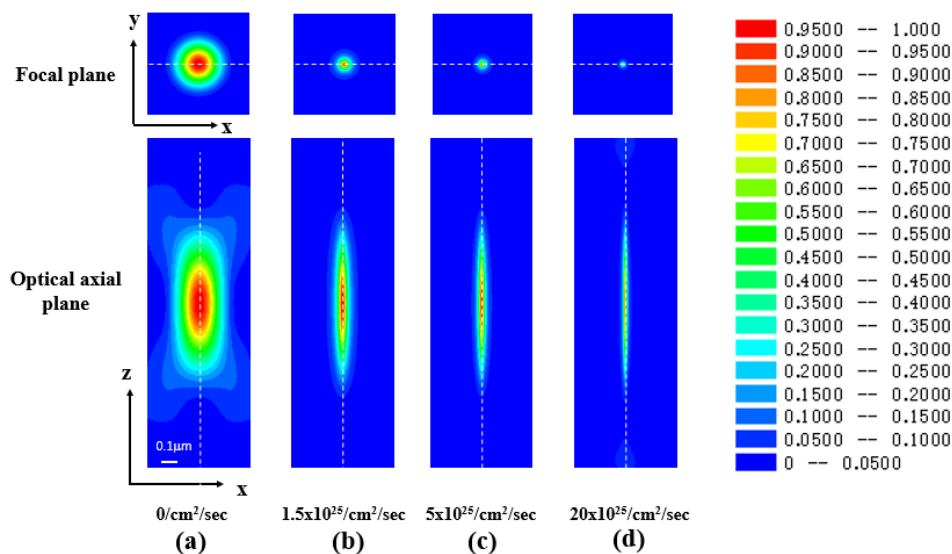


図 4－8：スパイラル型位相分布を用いた超解像顕微鏡法を適用したときの PSF。

2) 超解像顕微鏡法を適用したときの PSF のシミュレーション

図 4－8 は、ラゲール・ガウシアン型ビームを用いた超解像顕微鏡法を適用したときの 3 次元の蛍光スポットのプロファイルを示し、2 次元タイプの超解像顕微鏡法が提供する PSF に対応する。図 4－8 において、集光したイレース光の焦点面におけるピークフォトンフラックスが、(a) $0/\text{cm}^2/\text{sec}$ 、(b) $1.5 \times 10^{25}/\text{cm}^2/\text{sec}$ 、(c) $5 \times 10^{25}/\text{cm}^2/\text{sec}$ 、(d) $20 \times 10^{25}/\text{cm}^2/\text{sec}$ の場合について PSF を比較した。図 4－8 (a) はポンプ光そのもの PSF であり、回折限界サイズの光軸方向に伸びた楕円体として集光している。また、図 4－9 は、図 4－8 に示す破線が示す蛍光スポットの焦点面の断面強度分布を示す。図 4－8 と図 4－9 によれば、イレース光強度が増加すると、急激に焦点面における蛍光スポットが収縮していることが分かる。すなわち、平面分解能が劇的に向上することを示している。半面、深さ方向は全く収縮していない。

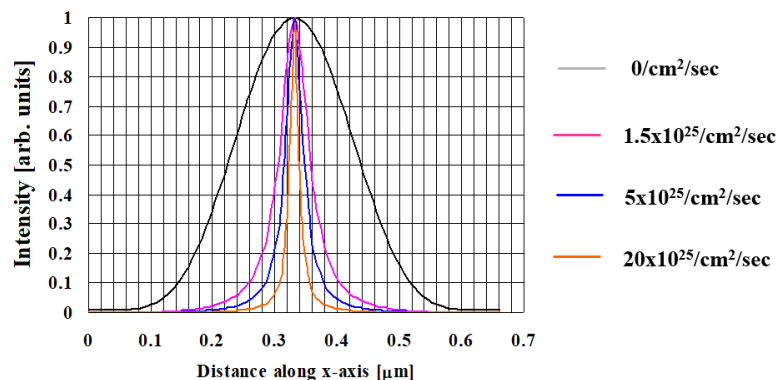


図 4－9： 図 4－8 に示す破線が示す PSF の焦点面における断面強度分布。

一方、図 4-10 は輪帯位相変調型のイレース光を用いた超解像顕微鏡法を適用したときの 3 次元の蛍光スポット、すなわち、PSF を示す。また、図 4-11 は、図 4-10 の破線が示す蛍光スポットの焦点面及び光軸面の断面強度分布を示す。図 4-10 と図 4-11 によれば、輪帯型位相分布の場合には、イレース光が 3 次元的な中空スポット持つように集光するために、焦点面内及び光軸面内で同時に急激に PSF が収縮し、最終的には楕円体から球体になる。断面強度分布に関しては、イレース光の強度が増加するに従い焦点面内及び光軸面内でガウシアン型の分布からローレンチアン型に変化し、細くなって行くことが分かる。

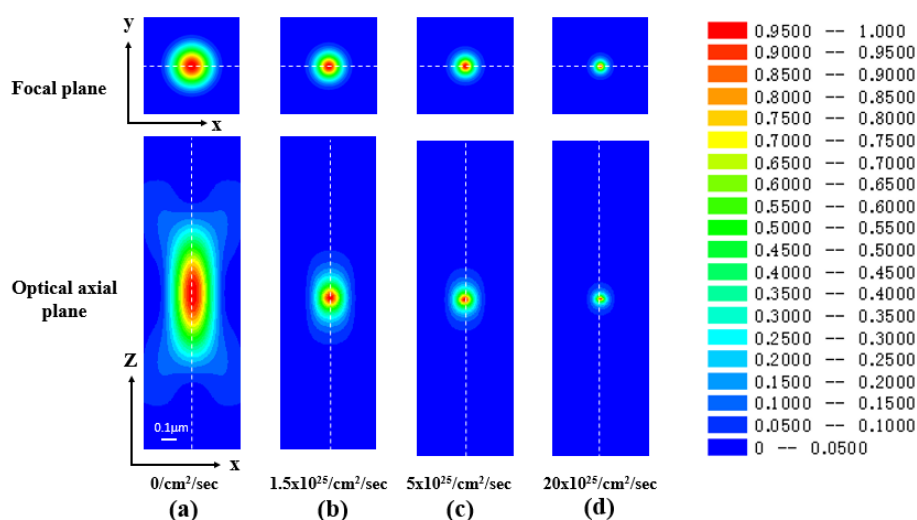


図 4-10 輪帯位相変調型の位相分布を用いた超解像顕微鏡法を適用したときの PSF。

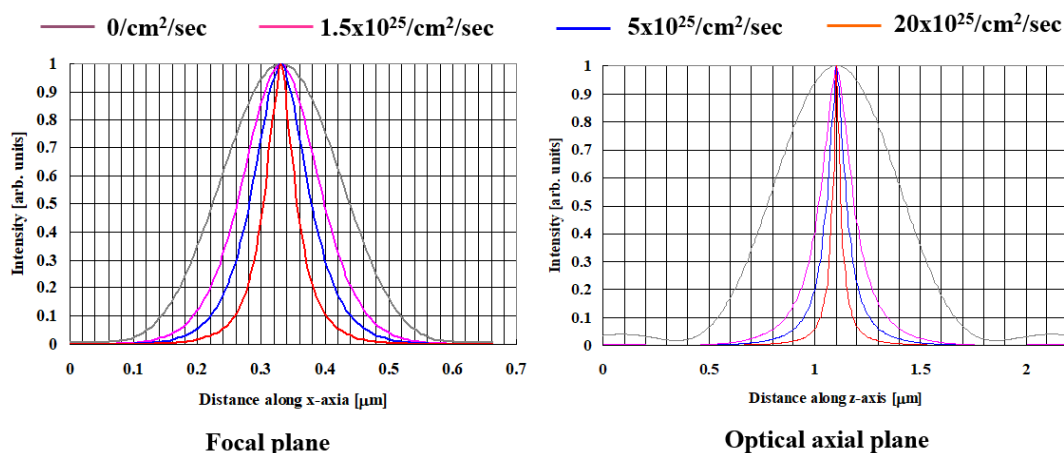


図 4-11 : 図 1 4-10 に示す破線が示す PSF の焦点面及び光軸面及の断面強度分。

PSF の FWHM は顕微鏡法における基本的な分解能の指標である。図 4-12 (a) はラゲール・ガウシアン型のイレース光を用いた場合の FWHM の焦点軸面上におけるピークフォトンフラックスに対する依存性を示す。それによれば、このイレース光を用いると光軸上には蛍光抑制効果が誘導できないので、深さ方向の FWHM は 620 nm のままで留まっていることを示している。それに対して、焦点面における FWHM はイレース光強度が 5×10^{25} /cm²/sec になるまでは急激に減少し、50 nm よりも微細になる。それ以上のイレース光強度に対しては、FWHM は穏やかに減少し、最終的には 10 nm 近くまで減少する。この振る舞いは、蛍光抑制特性により説明できる。式 (2-4) によれば、蛍光強度はイレース光強度の分数関数として表現され、イレース光の強度が弱い領域では急激に蛍光強度が減少するが、イレース光の強度が強い領域では蛍光強度は漸近的に緩やかにゼロに近づく。実際、図 4-2 に示す蛍光抑制特性と、FWHM のイレース光強度の依存性は一致した挙動を示している。

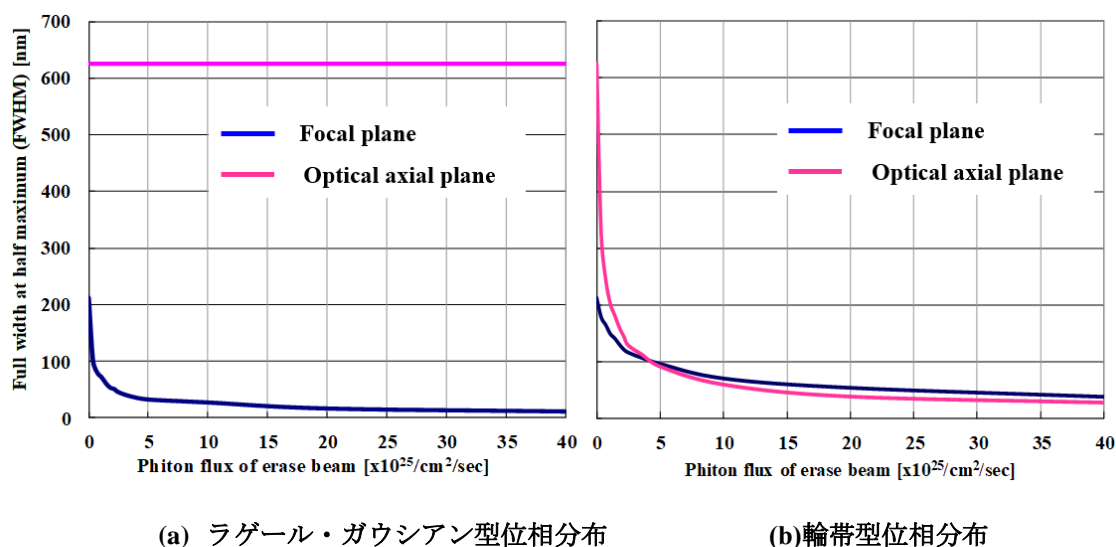


図 4-12: PSF の強度半値幅 FWHM のイレース光強度依存性。

この傾向は輪帯位相変調型のイレース光を用いても同じであり、FWHM はイレース光の強度が 5×10^{25} /cm²/sec になるまでは急激に FWHM が減少し、焦点面内及び光軸面内において 100 nm になり、最終的には共に 50 nm を切る。注目すべきことは、光軸面内における FWHM の減少量の大きさが顕著である (図 4-12 (b))。これは、図 4-11 が示す様に、光軸方向に強い尖頭値強度を持つ中空状のイレース光スポットが形成されていることに起因する。半面、焦点面においては中空スポットの尖頭値が低く、中空スポットのサイズも大きいので、焦点面内の FWHM はラゲール・ガウシアン型のイレース光のそれよりも大きい値となる。

【超解像顕微鏡法における更なる分解能の改善】

前節では、超解像顕微鏡法で最も基本的なスパイラル型位相波面と輪帯位相変調型波面に関して、PSF に関してシミュレーションを行い、その特性と FWHM を考察した。超解像顕微鏡法では、位相波面の工夫を行うことで、PSF の更なる微細化が可能となる。蛍光色素分子をナイルレッドと仮定し、照明波長及び対物レンズの開口径も同じ条件で統一してシミュレーションを行った。

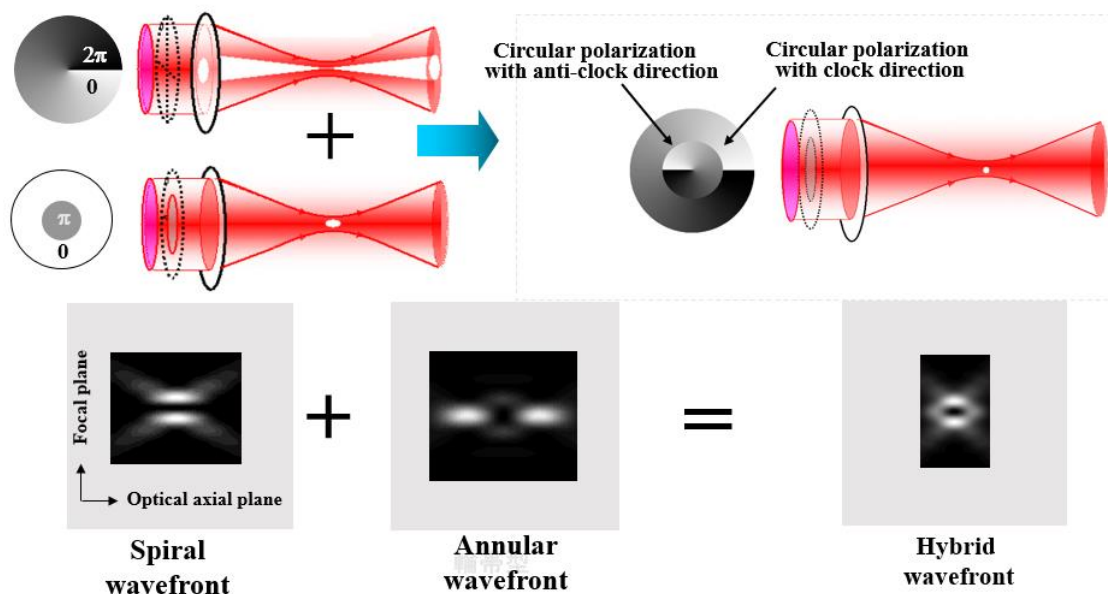


図 4-13： ハイブリッド型位相分布をもつイレース光により生成した中空スポット。

1) ハイブリッド型位相分布の応用

ラゲール・ガウシアン型のイレース光を用いると、nm に迫る横分解能が得られるが深さ分解能は全く向上しない。一方、輪帯位相変調型のイレース光を用いると深さ分解能は劇的に向上するが、横分解能は回折限界の半分程度にしかない。そこで、以上の技術課題を解消するために、これらの位相分布の長所を取り入れたハイブリッド型位相分布をもつイレース光の利用をシミュレーションした。図 4-13 によれば、ハイブリッド型位相分布は輪帯 2 重構造を持ち、そしてお互いの領域で反対方向に光軸を中心に 2π 回転する位相シフトをイレース光に与える。位相変調されたイレース光の振幅強度を動径方向に対して足し合わせても電場は相殺するので、同時に輪帯位相変調型の位相分布と等価になっている。更に、瞳面の外側の輪帯領域と内側の円形領域において、イレース光がお互い反対の方向に回転する円偏光を持つように偏光を制御する。これにより、光軸方向に発生する電場成分も相殺させることができる。図 4-14 において、ハイブリッド型位相分布をもつイレース光を集光したときのパターンを、ラゲール・ガウシアン型位相分布及び輪帯位相変調型分布をもつときのパターンと比較した。図 4-14 が示す焦点面における断面強度分布によれば、ハイブリッド型位相分布を用いるとラゲール・ガウシアン型位相分布の場合と同様のタイト

な中空スポットが焦点面に集光する。また、光軸面においても中空状のスポットが集光していることが分かる。すなわち、ラゲール・ガウシアン型位相分布と輪帯位相変調型分布の両方の性質をもつ3次元的な中空スポットが集光していることが分かる[4-3,4-4]。より詳しく考察するために、図4-14に示す破線における断面強度分布を図4-15に比較した。図4-15によれば、ハイブリッド型位相分布をもつイレース光は、ラゲール・ガウシアン型位相分布のそれと全く同じプロファイルをもつことが分かり、同様に高い横分解能が得られることが期待できる。一方、光軸面においては輪帯位相変調型分布と比較すると同じサイズの中空スポットが得られるが、ピーク強度を比較すると4割程低下している。ハイブリッド型位相分布をもつイレース光を用いた超解像顕微鏡法においては、対物レンズに同じ透過総量をもつイレース光を投入すると、光軸方向の蛍光スポットの収縮は緩慢であるが、深さ分解能の改善も確認できる。

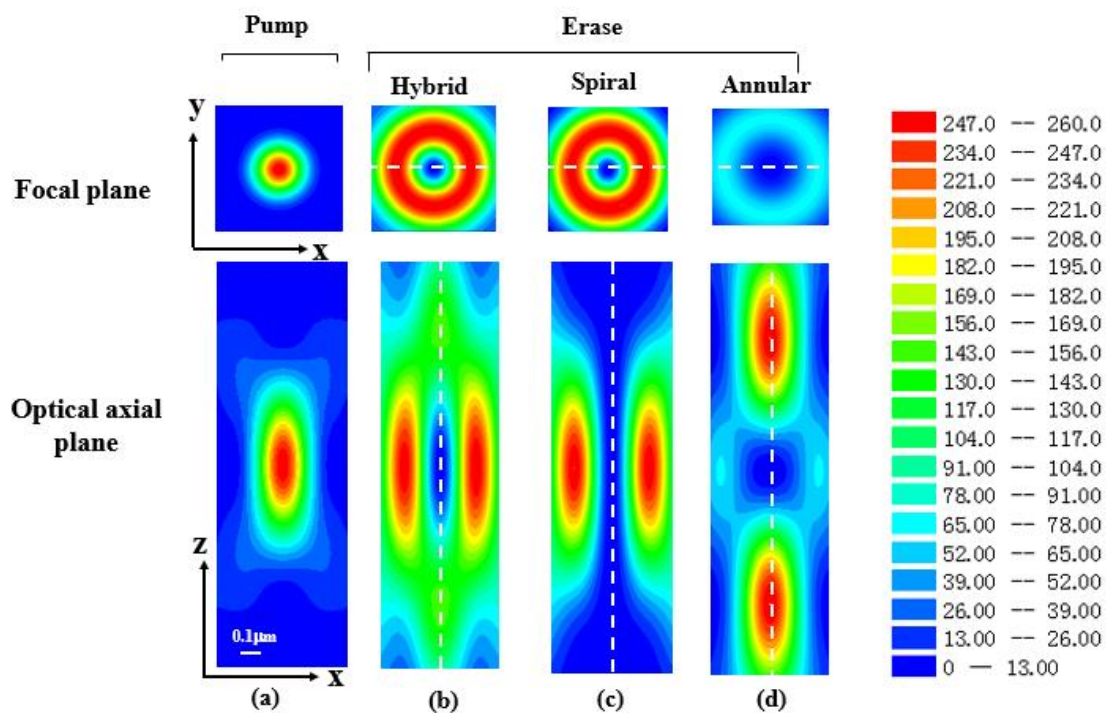


図4-14： ポンプ光とイレース光の焦点近傍の点像分布関数の3次元プロファイル。

(a) ポンプ光 (b) ハイブリッド型位相波面 (c) ラゲール・ガウシアン型位相波面
(d) 輪帯位相変調型波面。

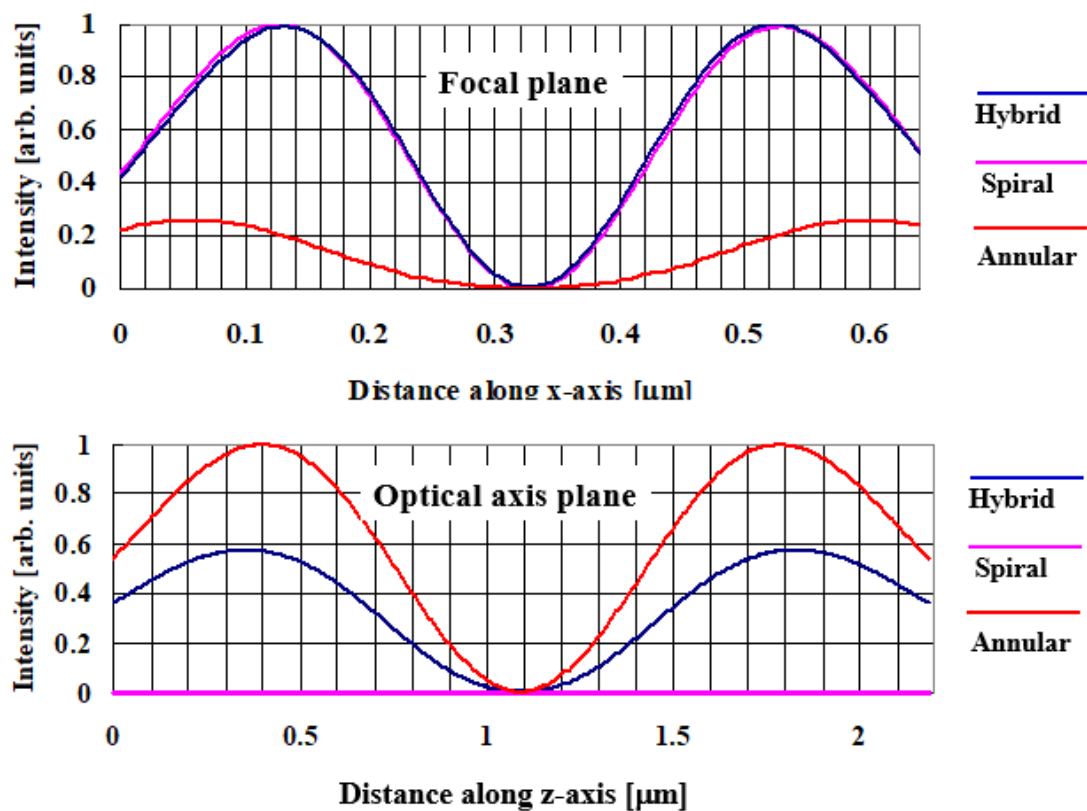


図 4－1 5：図 4－1 4 に示す焦点面及び光軸において破線部に沿った断面強度分布の比較。

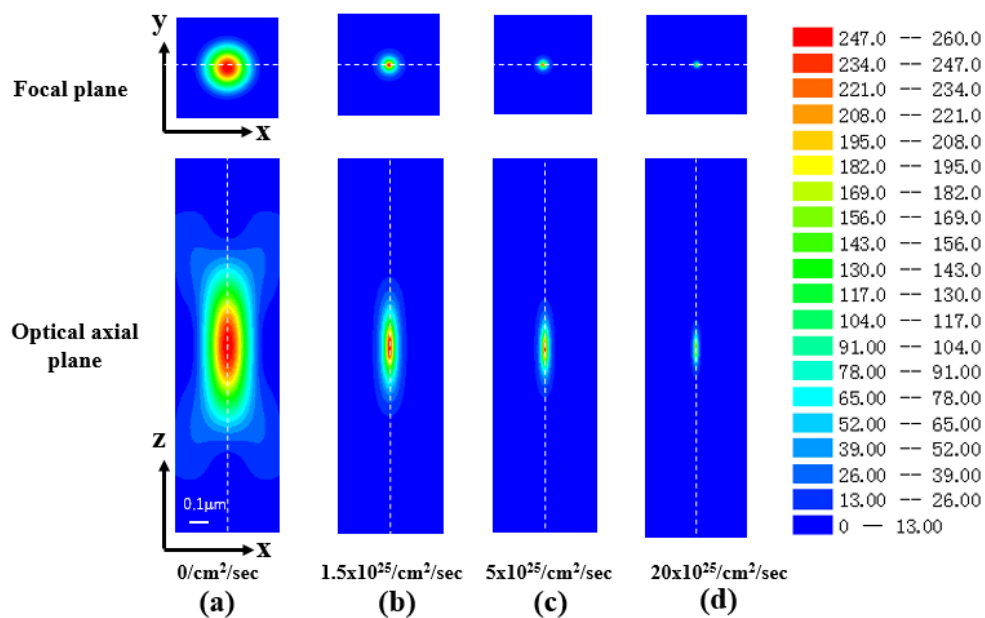


図 4－1 6：ハイブリッド型位相分布を用いた超解像顕微鏡法を適用したときの PSF。

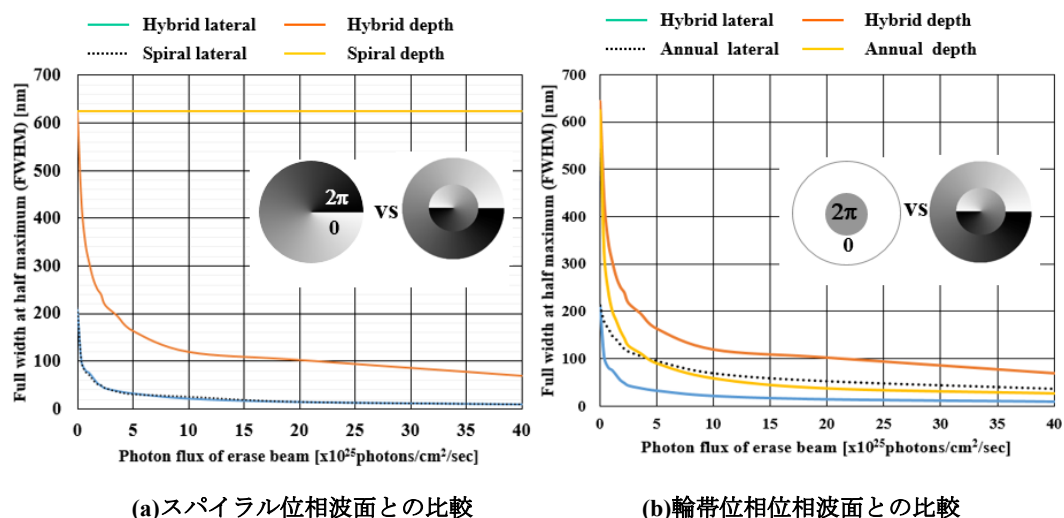


図 4-17: ハイブリッド位相分布を用いた時の PSF の FWHM のイレース光強度に対する依存性。

図 4-16 は、図 4-14 で示すイレース光を用いて計算したときの焦点面近傍の超解像顕微鏡の 3 次元の PSF である。輪帯位相変調型分布のイレース光を用いた場合の PSF はイレース光強度の増加と共に球体状に収縮したが、ハイブリッド型位相分布の場合には焦点面内におけるプロファイルのサイズの収縮が急速であり、最終的には形状は光軸方向に伸びた針状のスポットとなる。図 4-17 はハイブリッド型位相分布をもつイレース光を用いて得られる PSF の FWHM に関して、ラゲール・ガウシアン型の位相分布(a)と輪帯位相変調型分布 (b)を用いた場合の結果と比較した。図 4-17 (a)によれば、ハイブリッド位相板はスパイラル型位相分布と全く同じ横分解能特性をもち、例えばイレース光のピークフォトンフラックス (ハイブリッド型位相分布では、焦点面でイレース光は最大強度をもつ) が $5 \times 10^{25} / \text{cm}^2 / \text{sec}$ において 30 nm 程度の FWHM が提供できる。一方、図 4-17 (b)によれば、深さ分解能に関しては輪帯位相変調型分布の場合には及ばないものの 160 nm の FWHM を提供することができる。すなわち、ハイブリッド型位相分布をもつイレース光を用いると、ラゲール・ガウシアン型位相分布が持ちえない深さ方向の超解像顕微鏡機能を提供できることが分かる。

2) イレース光に対するアポタイゼーション操作の応用

古くから光学分野では、横分解能を改善するための手法としてアポタイゼーションが用いられている。アポタイゼーションとは、照明光の瞳中央部を遮蔽する操作である。これを用いると焦点面で照明強度が低下するものの干渉性が強くなり高い空間周波数のエッジの立った回折パターンが得られる。図 4-18 に示す様に、このアポタイゼーションをラゲール・ガウシアン型の位相分布をもつイレース光に適用すると、集光した中空ビームの内径が更に小さくなる[4-5]。従って、焦点面内で効率的に蛍光抑制効果が誘導でき、蛍光スポットが更に微細化できる。その結果として、横分解能が更に向上することが期待できる。そこで、超解像顕微鏡法へのアポタイゼーション技術の導入を検討した。



図 4－18： ラゲール・ガウシアン型位相分布をもつイレース光にアポタイゼーションを施した時のシミュレーションモデル。(a)通常のラゲール・ガウシアン型位相分布。(b) 瞳半径 R において半径 r のアポタイゼーションを行ったときの位相分布。

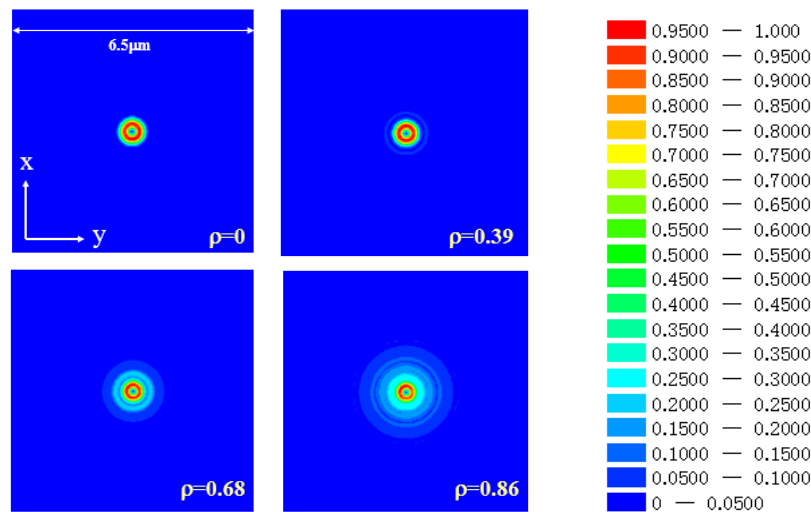


図 4－19： 遮蔽率 ρ が 0、0.39、0.68、0.86 に対して最大値強度を規格化したときの焦点面におけるイレース光のパターン。

図 4－19 は、焦点面におけるアポタイゼーションを施したイレース光の集光パターンを示す。パターンは式 (3－1) を用い、遮蔽部以外のイレース光の透過領域に関して積分を行った。図 4－19 において、瞳径の外径を R 、遮蔽径を r としたときの瞳遮蔽率 $\rho = r/R$ が 0、0.39、0.68、0.86 の場合を比較した。それによれば、 ρ が増加するに従い、焦点面におけるイレース光のパターンはマルチリング構造を持ち、サイドローブが広がっている。しかし、中央部の第 1 リングは常に最大強度を保っている。図 4－20 は ρ が 0 と 0.86 の場合の中心部の断面強度分布を示す。特に、図 4－21 において、リング構造を考察するために中央部近傍の強度分布を詳しく比較した。それによれば、 ρ が 0.86 の場合には、 ρ が 0 の場合、すなわち、図 4－18 (a) の通常のラゲール・ガウシアン型位相分布と比較して中央部のホールの立下りが急峻になり、かつ、ホールのサイズが小さくなっていることが分かる。

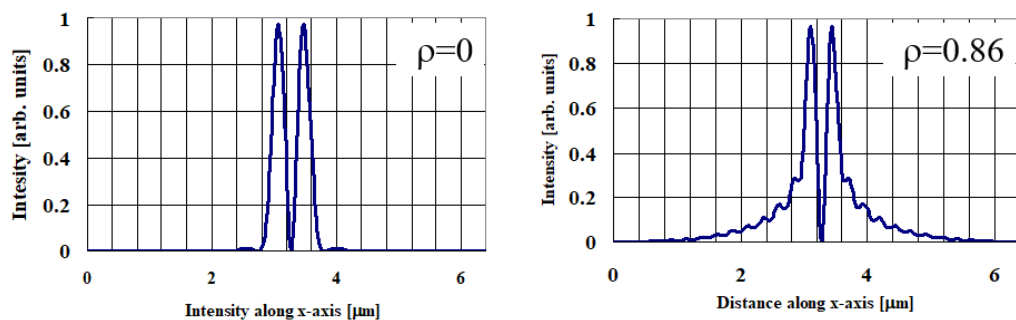


図 4-20 遮蔽率 ρ : 0と0.86のイレース光スポットの断面強度分布。

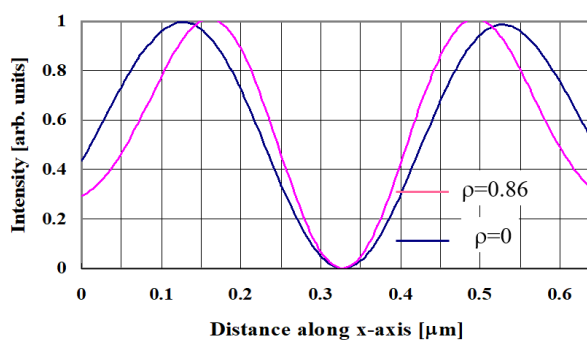


図 4-21 遮蔽率 ρ : 0と0.86のイレース光スポットの断面強度分布
(図 4-20 における中央部拡大図)。

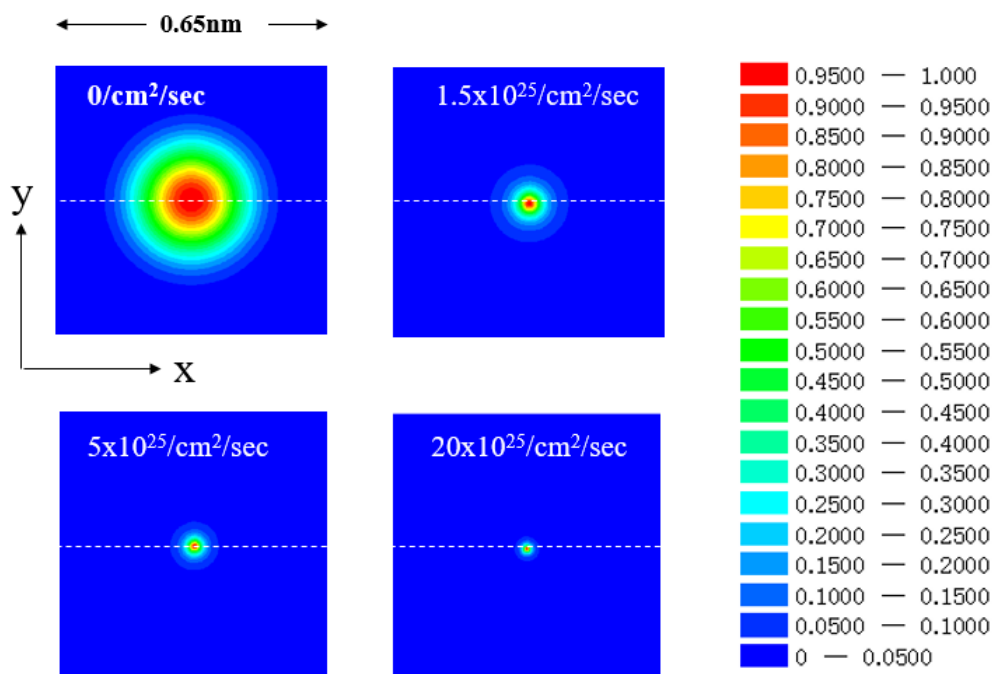


図 4-22 遮蔽率 ρ : 0.86における超解像顕微鏡の蛍光スポット (PSF) の
イレース光強度に対する依存性。

図4-22は、遮蔽率 ρ が0.86であるときの焦点面におけるPSFの形状である。図4-22によれば、これまでのケースと同様に、イレース光のピークフォトンフラックスが増加するに従い、PSFは急激に収縮することが分かる。図4-23は、アポタイゼーション有り無しの場合のFWHMの焦点面におけるイレース光尖頭値強度に対する依存性を示す（図4-22の破線部の断面強度分布の強度半値幅）。アポタイゼーションが有る場合には無しの場合と比較して、イレース光のホールのサイズが小さいために全体的にFWHMは小さくなり、横分解能の向上が確認できる。イレース光の強度が $20 \times 10^{25} \text{ cm}^2/\text{sec}$ を超えるとFWHMが10 nmを下回る。特に注目すべき点として、イレース光強度が大きい領域でもイレース光強度の増加に対してFWHMの減少量は飽和せず、イレース光強度を上げれば、更にFWHMは小さくなることを示している。

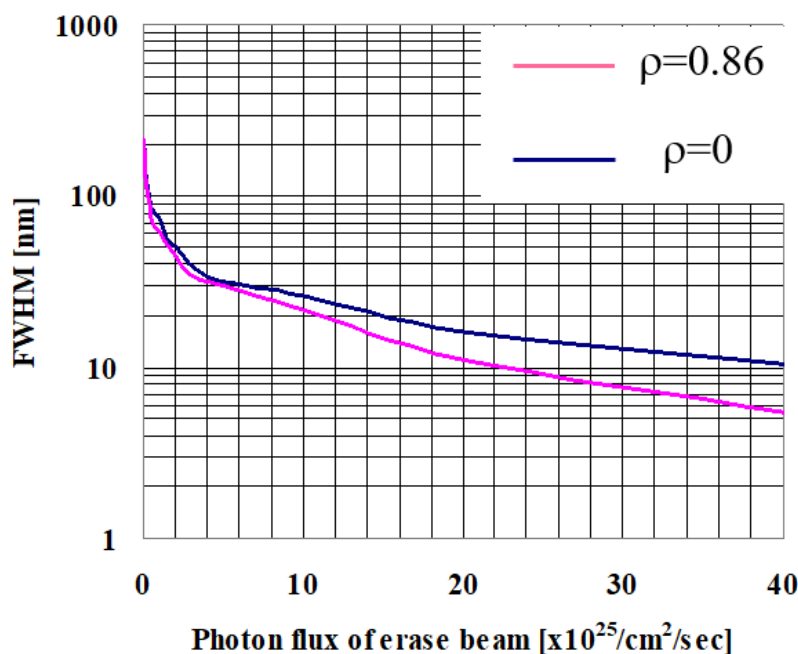


図4-23 アポタイゼーション有無のそれぞれの場合におけるイレース光の焦点面におけるピークフォトンフラックスに対するPSFのFWHMの依存性。

【結論と考察】

表4-1に、ラゲール・ガウシアン型、輪帯位相変調型、ハイブリッド型の3種類の位相分布をもつイレース光を用いたときの超解像顕微鏡法におけるPSFのFWHMと有効蛍光発光体積を比較した。この体積を各軸のFWHMを半径とする回転楕円体として算出し、各方式の3次元的な空間分解能力を評価した。比較においては、蛍光色素分子をナイルレッドと仮定し、照明光波長を $\lambda_p=515 \text{ nm}$ 、 $\lambda_e=670 \text{ nm}$ に設定した。そして、イレース光を開口数 $\text{NA}=1.5$ の対物レンズで集光したときに、それぞれのイレース光の位相変調においてピークフォトンフラックスが $10 \times 10^{25} \text{ cm}^2/\text{sec}$ となる条件で、シミュレーションを行った。尚、こ

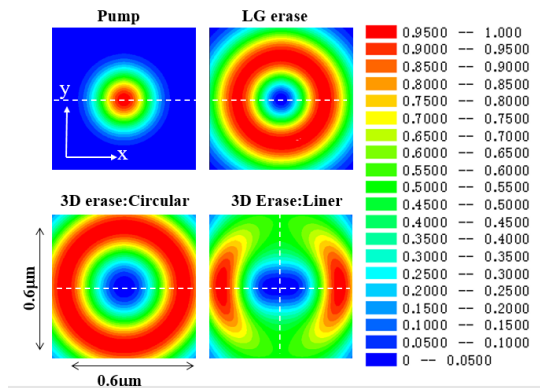
のイレース光強度は、これまでの実験研究では、ナイルレッドで分子破壊や2次発光が起きないことが確認されている。表4-1によれば、各位相板とも異なった分解能特性を示している。ラゲール・ガウシアン型位相波面を用いると極めて高い横分解能が得られる。もし、アポタイゼーション照明法を導入し、十分高い強度でイレース光を照明すると nm に迫る分解能が得られる。しかし、全く縦分解能が向上しないので、厚みの無い試料にしか適用できない。一方、輪帯型位相分布の場合には、縦及び横方向の分解能が 70 nm 程度であり、バランスの取れた球体の蛍光スポットが得られるので厚みのある試料観察に適している。ハイブリッド型位相分布に関しては、ラゲール・ガウシアン型位相分布が提供できる高い横分解能を棄損することなく深さ分解能が付加できるので、蛍光スポットの体積は最も微小であり、zeptolitter (10^{-21}m^3) オーダーの立体分解能で試料の内部の空間構造を分析することができる。しかし、数値的には深さ分解能は輪帯型位相波面の場合と比較すると見劣りする。これは、図4-15が示す様に光軸方向の中空パターンの尖頭値強度が相対的に低いために、光軸方向の蛍光抑制効果の誘導が弱くなることに起因する。イレース光を強くすれば、どの場合も、理論上、FWHM は小さくなるが、分光学的な蛍光色素分子の褪色など副次効果を鑑みると実用的でない。何れにしろ、使用する蛍光色素分子にもよるが表4-1に示す数値が超解像顕微鏡法における実用的な分解能であり、観察試料の特性と観察目的を明確にしてこれら3種類のイレース光を使い分ける工夫が必要である。現在、更なる分解能の向上を目指して、Max-Planck のグループは2色のイレース光を同時照明する STED*法を提唱しているが、照明光学系が複雑になるので装置開発やメンテナンスの観点から製造側及びユーザー側の負荷が共に大きい。今後、超解像顕微鏡法のパフォーマンスを向上させる開発指針としては、より効率的な新たな分光過程の発見とシンプルな照明法及び計測法の開発が不可欠となる。特に、ポンプ光とイレース光の集光状態は光学原理で限定されるので、超解像顕微鏡法の分解能においても「回折限界」の壁に遭遇していると言える。その意味でも、この新たな「回折限界」を突破できるブレイクスルー技術の開発が求められている。この技術課題に対しては、第11章で論議する。

表4-1 各位位相分布を用いたときの FWHM の比較

	ラゲール・ガウシアン	ラゲール・ガウシアン (アポタイゼーション)	輪帯位 相変調	ハイブリッド
焦点面(nm)	26	22	70	26
光軸面(nm)	625	625	60	120
蛍光体積($\times 10^{-24}\text{nm}^3$)	1779	1231	377	340

【付録４】 直線偏光したイレース光と円偏光したイレース光を用いた場合の比較

第３章で述べた様に、直線偏光したイレース光を $NA=1.5$ の高 NA 対物レンズにより集光すると、直線偏光方向とそれに直交する方向で非対称となる強度分布をもつ中空ビームが得られる[4-6]。その結果として、焦点面内において偏光方向とそれと直交する方向で PSF の FWHM の値が異なる。改めて、円偏光のイレース光を用いた場合の分解能特性と比較した。輪帯位相変調された直線偏光のイレース光を集光したときのプロファイルは、式（３－５）において、 $\delta=0$ と置くことで得られる。図４－２４において、ラゲール・ガウシアン型（LG 型）、円偏光の輪帯位相変調型、そして直線偏光の輪帯位相変調型のイレース光（ $\lambda_e=670\text{ nm}$ ）の焦点面における集光パターンをポンプ光の集光パターン（ $\lambda_p=515\text{ nm}$ ）と共に比較した。図２－２４によれば、高い平面分解能が提供できるラゲール・ガウシアン型ビームは最もタイトな中空ホールをもつ。それに比較して円偏光の３次元ダークホールは広い中空ホールを持つ。しかし、 y 軸方向に直線偏光したイレース光が入射すると３次元ダークホールは対称性が崩れたパターンとなる。図２－２４によれば、偏光方向と直交する x 軸方向に広がったホール形状をもつが、 y 軸方向にはピーク強度が弱いもののラゲール・ガウシアンビームに匹敵するタイトなダークホールになる。これを確認するために、図４－２５には、各ビームの焦点面のピーク強度で規格化した断面強度分布を比較した（図４－２４の破線部）。一方、図４－２６には、円偏光と直線偏光の場合について輪帯位相変調型のイレース光の x - y 、 x - z 、 y - z 面におけるプロファイルと比較した。それぞれに対して、光軸面におけるピーク強度で規格化を行っている。また、図４－２７にはそのときの各面の断面強度分布を比較した（図４－２６の破線部）それらによれば、直線偏光の場合も円偏光の場合も、光軸方向（ z 軸方向）に関しては同じサイズのダークホールを形成している。



図：４－２４ 焦点面の集光形状。

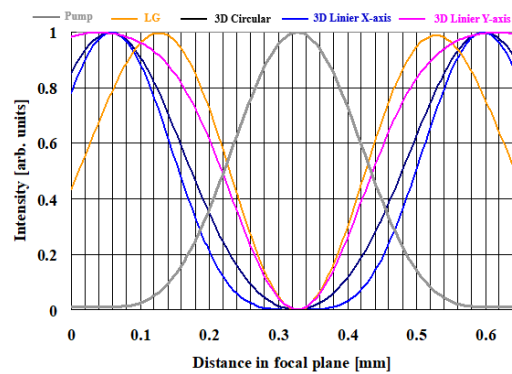
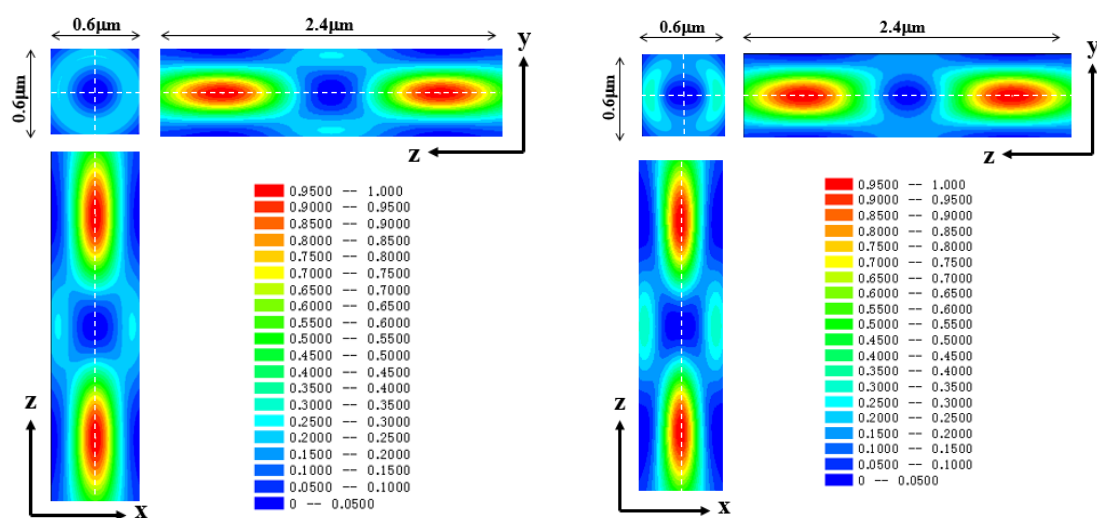


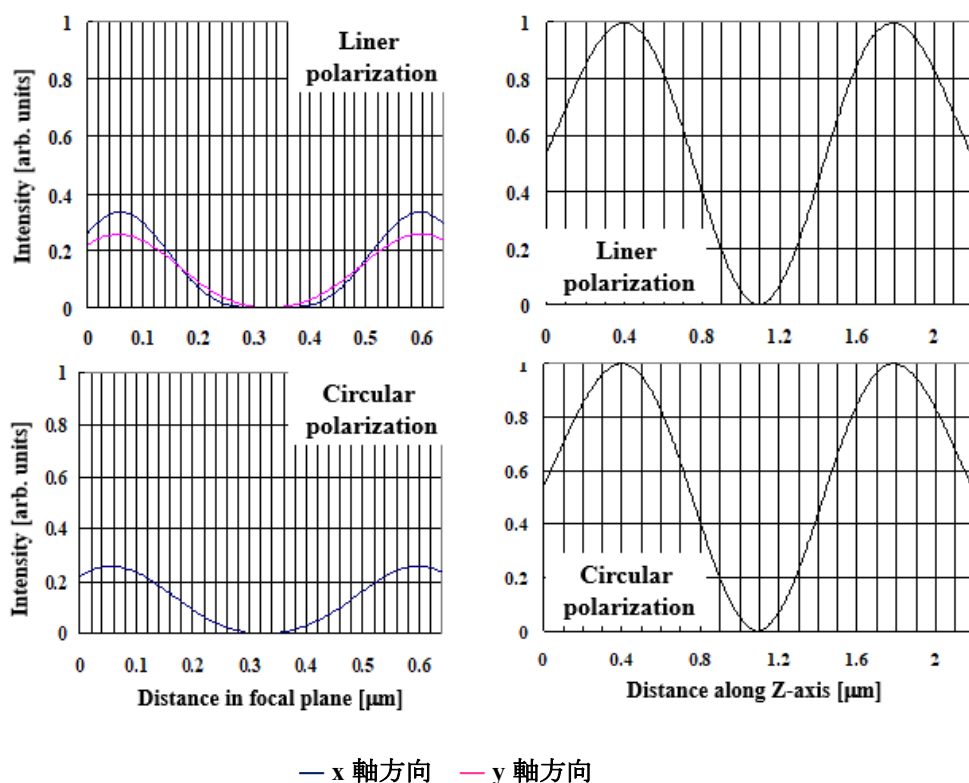
図４－２５ 焦点面内における断面強度分布
（図４－２４の破線部）。



円偏光

y 軸方向の直線偏光

図 4-26 : 円偏光と直線偏光の場合の 3 次元ダークホールの x-y、x-z、y-z 面における強度プロファイル。



— x 軸方向 — y 軸方向

図 4-27 : 円偏光と直線偏光の場合の断面強度分布の比較 (図 4-24 の破線部)。

図4-28は、直線偏光したイレース光を用いた場合の3次元超解像顕微鏡法におけるPSFを示す。それによれば、光軸面におけるイレース光のピークフォトンフラックス I_{zmax} が増加するに従いPSFが収縮している様子が分かる。しかし、第3章で述べた様に、円偏光のイレース光の場合とは異なり、偏光方向であるy軸方向の収縮が顕著である。イレース光強度が強くなると最終的にはx軸方向に伸びた極端な楕円体となる。図4-29は、x-y、x-z、y-z平面のPSFの断面強度分布のプロファイルを示す(図4-28の破線部)。図4-29によれば、y軸とz軸方向に関してはイレース光強度が増加するに従いFWHMが狭いローレンチアン型の関数に変化していくことが分かる。しかし、x軸方向に関しては、PSFの収縮は顕著でなくガウシアン型の形状を保っている。図4-25が示すイレース光のx軸方向の断面強度分布に着目すると、焦点近傍領域で強度がほぼゼロとなる領域が広く、いくらイレース光強度が増加してもポンプ光ビーム辺縁部で効率的に蛍光抑制ができていないことに対応している。

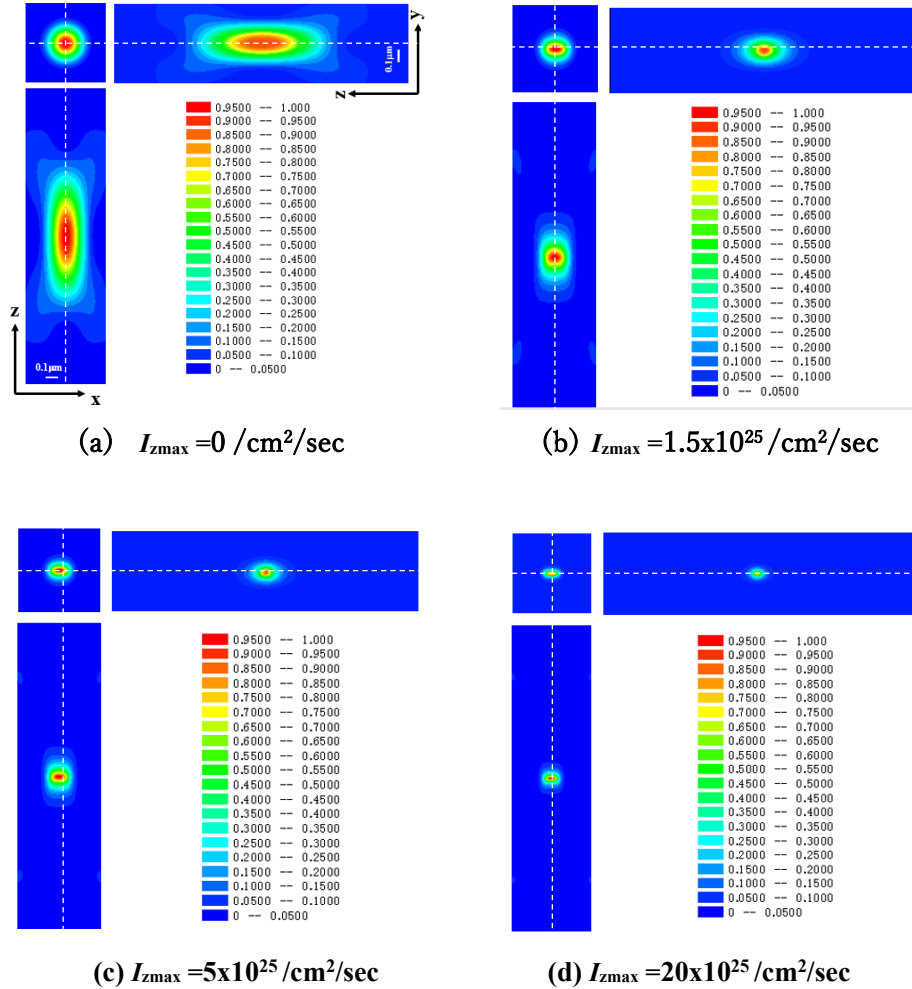


図4-28：直線偏光したイレース光を用いた時のx-y、x-z、y-z面における3次元超解像顕微鏡法のPSFの強度プロファイル。

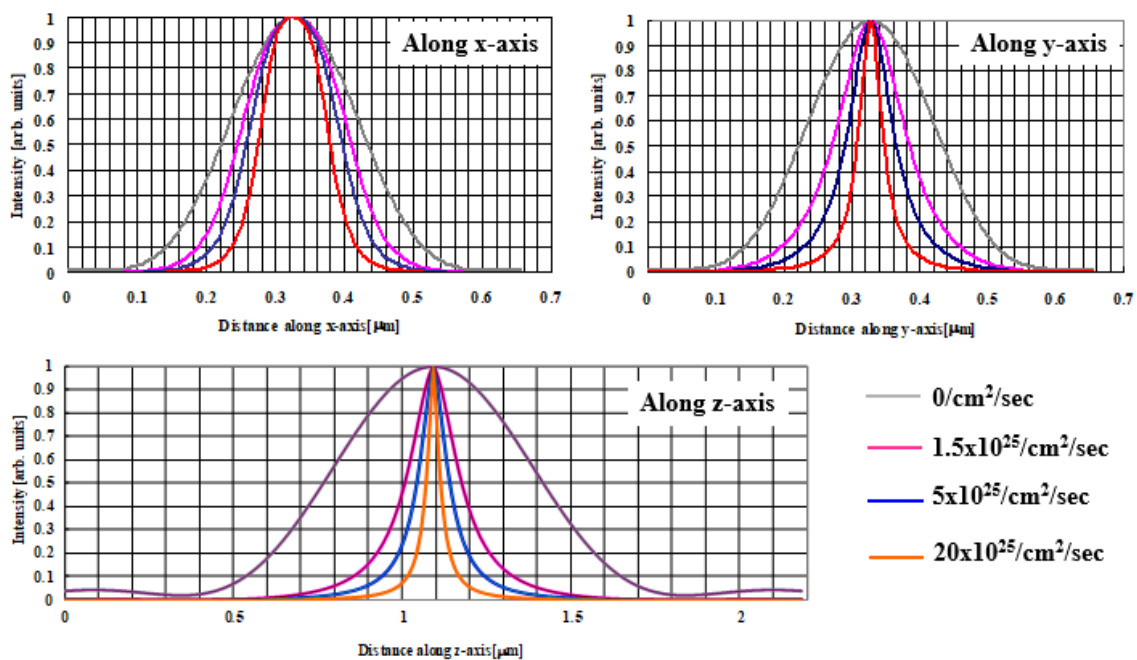
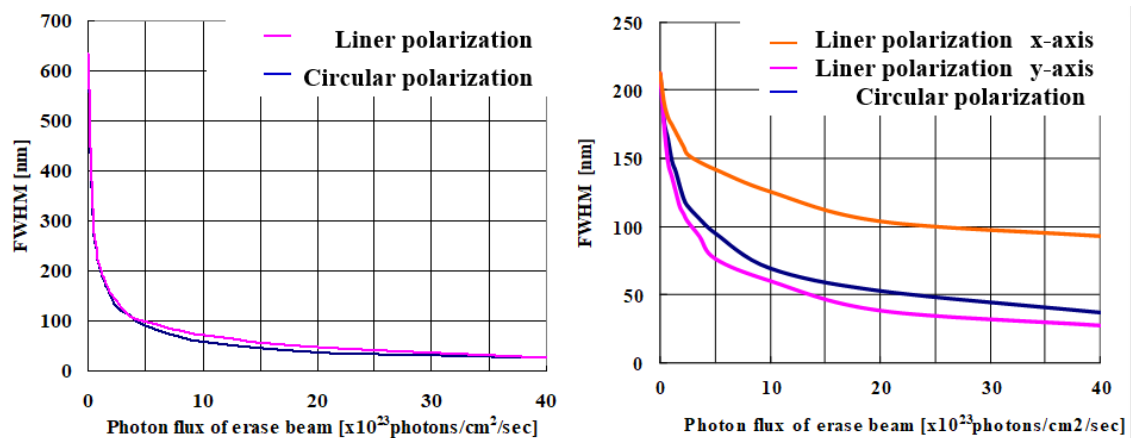


図4-29 x 軸、y 軸、z 軸方向の PSF の強度断面のプロファイル。



光軸方向の FWHM

焦点面内の FWHM

図4-30：円偏光と直線偏光のイレース光の使用時の3次元超解像顕微鏡の FWHM の比較。

図4-30に円偏光と直線偏光のイレース光を用いた時の3次元超解像顕微鏡の PSF の FWHM を比較した。すなわち、FWHM のイレース光のピーク強度の依存性を示す。図4-30によれば、光軸方向（z 軸方向）に関しては偏光状態によらず FWHM は同じであることが分かる。しかし、焦点面内においては興味深い特性を示す。偏光方向と同じ y 軸方向の FWHM は円偏光の場合よりも狭く、その方向の横分解能は高い。PSF の形状は顕微鏡の結像特性としては好ましくないが、ラゲール・ガウシアンビームの場合には及ばないが、x 軸方向と z 軸方向の分解能は優に 100 nm を切るのので（図4-31）、例えばアクチンリングのような平面内で1次元構造を持つような試料の観察に適している。

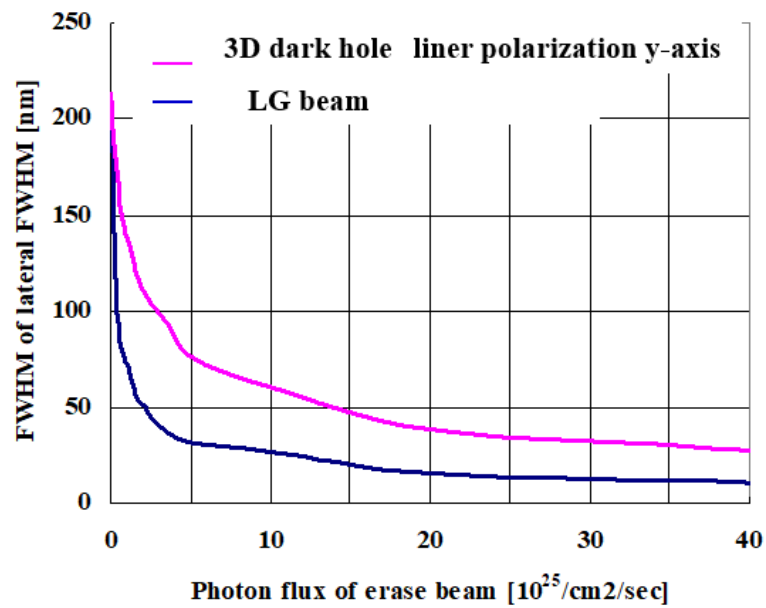


図4-3-1 ラゲール・ガウシアン型のイレースを用い場合の焦点面における断面強度分布の FWHM と y 軸方向に直線偏光した 3 次元ダークホールを用いた時の 3 次元超解像顕微鏡の FWHM の比較。

【第4章：参考文献】

- 4-1) Y. Iketaki, T. Watanabe, N. Bokor, M. Fujii, and T. Watanabe, *Topologica* **2**,9 (2009);
<https://doi.org/10.3731/topologica.2.009>.
- 4-2) T. Watanabe, Y. Igasaki, N. Fukuchi, M. Sakai, S. Ishiuchi, M. Fujii, T. Omatsu, K. Yamamoto,
and Y. Iketaki, *Opt. Eng.* **43**, 1136 (2004); <https://doi.org/10.1117/1.1690767>.
- 4-3) Y. Iketaki, and Kano, US10,558,028 B2(2018).
- 4-4) Y. Iketaki, US 6507135B2 (2014).
- 4-5) Y. Iketaki, and H. Kano, US 8747658 (2012).
- 4-6) N. Bokor, Y. Iketaki, T. Watanabe, and M. Fujii, *Opt. Exp.* **13**, 10440 (2005);
<https://doi.org/10.1364/OPEX.13.010440>.

第5章 超解像位相板の設計法

要旨

3次元超解像顕微鏡法において、輪帯位相板はイレース光を3次元的な中空を持つように整形する為のキーパーツである。本章では、この超解像位相板の設計法に関して考察した。この超解像位相板の構造は極めて単純であり、既存の加工技術の精度で理論分解能を提供することができる。この分解能を実現するためにはポンプ光とイレース光を正確に同軸に光学調整を行い、これを保持することが不可欠である。この技術課題に対して、ポンプ光とイレース光を独立にビーム整形できる様な2波長対応の超解像位相板を新規に考案した。これを市販のレーザー走査型顕微鏡の照明光学系に挿入するだけで簡単に超解像顕微鏡機能を搭載することができる。

【緒言】

第4章において、3次元超解像顕微鏡法が少なくとも回折限界を超える $(70\text{ nm})^3$ の立体分解能を提供できることを理論的に確認した。その際、イレース光の3次元的に光の当たらない中空領域、すなわち、できるだけ微細なダークホールをもつ集光スポットを生成する必要がある。その方法としてイレース光ビームの中央輪帯部で位相を反転させ、そして集光することでディストラクティブな干渉を起こさせることにより焦点近傍でダークホールを生成できることを述べた。その具体的な光学素子として、イレース光の位相変調の制御を行うための超解像位相板の作製が不可欠である。その為には内輪帯領域の最適な径を決定する必要があるが、それとともに、光軸中心に対する偏芯誤差、位相制御で発生する位相誤差、ポンプ光とイレース光の光学軸調整誤差が空間分解能に与える影響を正しく評価する必要がある[5-1]。本章では、3次元的なベクトル電場モデルを用いて、本顕微鏡法の結像性能を考察した。

本章で述べるシミュレーションでは、表5-1に示す様に第4章の解析結果と統一を図るために蛍光色素分子をナイルレッドと仮定し、円偏光のポンプ光（波長：515 nm）と輪帯位相板でビーム整形した円偏光のイレース光（波長：670 nm）を開口数：1.5の対物レンズで集光する場合を想定した。そして、イレース光を集光したときの光軸面におけるピークフォトンフラックス I_{zmax} は $10 \times 10^{25}/\text{cm}^2/\text{sec}$ と仮定した。第4章と同様に、3次元ベクトル解析モデルを用い、集光したポンプ光とイレース光の強度分布を計算する。そして、ナイルレッドの蛍光抑制特性（図4-2）の実測値を用いて本超解像顕微鏡法における蛍光スポット、すなわち PSF を求めた。そのために、焦点面内及び光軸面内においてポンプ光がイレース光を重ね合わせて集光したときの蛍光スポットのプロファイルを求めた。以後、本章では一貫してこの条件で設計と解析を行った。

表 5-1 : PSF のシミュレーション条件

ポンプ光波長 : λ_p	515nm (円偏光)
イレース光波長 : λ_e	670nm (円偏光)
光軸面におけるイレース光のピークフォトンフラックス : I_{zmax}	$10 \times 10^{25}/\text{cm}^2/\text{sec}$
対物レンズの開口数 : NA	1.5
輪帯比 : α	0.62 (最適値)
蛍光色素分子	ナイルレッド

【輪帯型位相板の内輪径の最適化】

3次元超解像顕微鏡法では、輪帯型位相板を用いることで、外輪帯部を通ったイレース光を中央内輪帯部で位相を反転させたイレース光と干渉させ、焦点面においてダークホールを生成する(図5-1)。その際、外輪帯部と内輪帯部を通過したイレース光の光量を注意深く調整し、焦点において電場強度を完全に相殺する必要がある。すなわち、内輪帯(ρ_m)と外輪帯(ρ_{out})の半径(α)の比(輪帯比)を最適化する必要がある[5-2]。図5-2(a)が示す様に低開口数の対物レンズでイレース光を集光する場合には、常に電場の振幅方向は焦点面内に存在すると仮定するので、スカラー電場モデルは極めて良い近似となる。その場合、イレース光ビームが均一強度であるならば、単純に内輪帯と外輪帯の面積が同じであれば良く、 α は $1/\sqrt{2}=0.71$ となる。しかし、開口数(NA)が高くなると、図5-2(b)が示す様に焦点面近傍で光軸に沿った方向に振動する電場成分が発生するのでスカラー電場モデルとは異なった結果を与える。すなわち、3次元空間における電場方向を考慮したベクトル電場モデルにより、 α の最適値を決定する必要がある。超解像顕微鏡法では、高分解能を得るため出来るだけ高いNAをもつ対物レンズを用いる。そこで、本章ではベクトル電場モデルを用いたシミュレーションにより、 α の最適値を求める。それと共に、この最適値からずれた値を用いた時の超解像顕微鏡法におけるPSFへの影響を考察した。

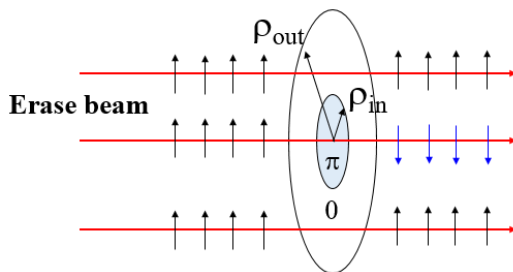


図 5-1 : 輪帯型位相板のイレース光変調機能。

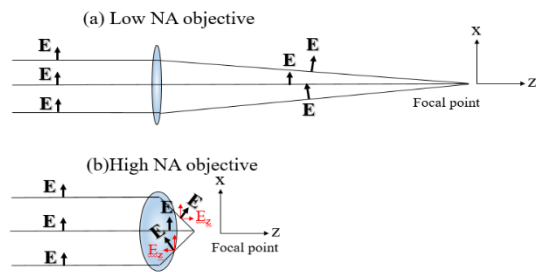


図 5-2 : スカラー電場モデル (a)とベクトル電場モデル(b)。

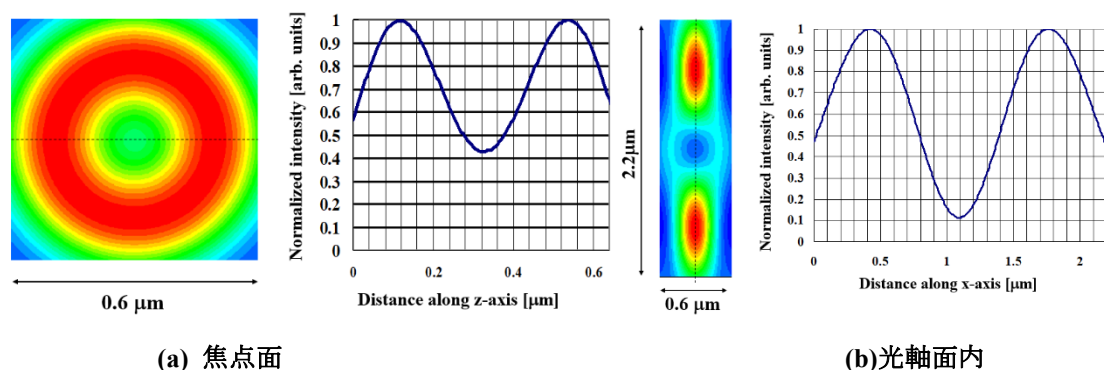


図 5-3: スカラーモデルで計算した焦点面と光軸面におけるイレース光の集光パターンと破線部の断面強度分布（焦点面及び光軸面のそれぞれの最大値強度で全体強度を規格化した）。

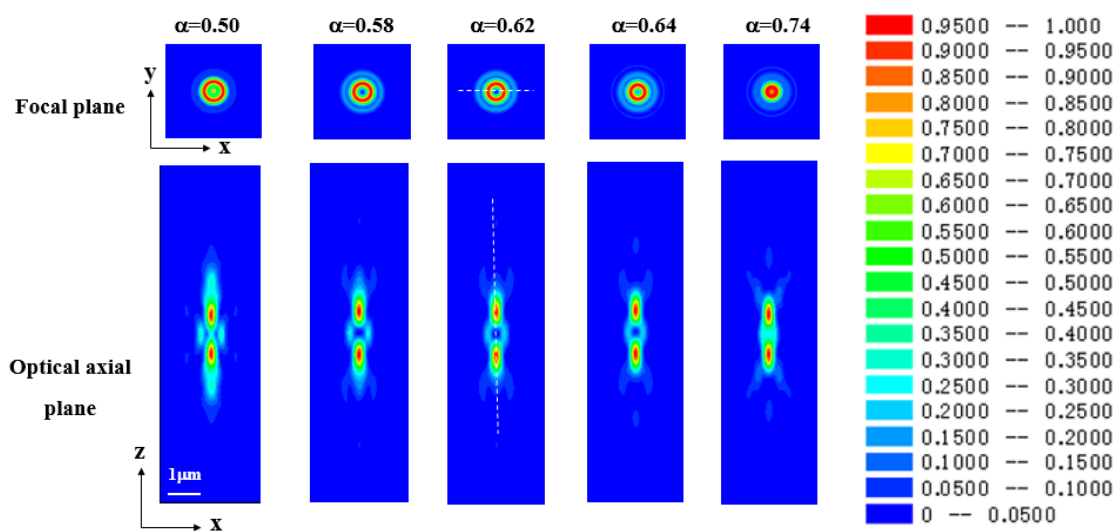


図 5-4: 輪帯比 α をパラメータとした時の焦点面と光軸面におけるイレース光の集光パターン（焦点面及び光軸面のそれぞれの最大値強度で全体強度を規格化した）。

1) 輪帯比がイレース光プロファイルに与える影響

スカラー電場モデルでは輪帯比 $\alpha=0.71$ が最適値であった。しかし、正確なベクトルモデルにより計算すると異なった結果を得る（図 5-3）。図 5-3(a)は焦点面におけるイレース光の集光パターンと破線部の断面強度分布を示し、図 5-3(b)は光軸面におけるイレース光の集光パターンと破線部の断面強度分布を示す。ただし、焦点面及び光軸面のそれぞれの最大値強度で全体強度を規格化した。図 5-3(a)、(b)によれば中央部で最小値をもつ中空プロファイルが形成されているが、中央部の強度はゼロでなく、残留強度をもつ。この様なプロファイルをもつイレース光を超解像顕微鏡観察に用いるとポンプ光の中央部の蛍光を抑制する。その結果として、分解能が向上することは無く、むしろ S/N が低下して画質が悪くなることを示している。すなわち、このことは、高 NA 対物レンズに対してスカラー電場モデルが実際の設計では適用でき

ないことが分かる。そこで、輪帯比 α をパラメータとして、イレース光の集光パターンを計算した。図5-4は、 α をパラメータとしたときの焦点面と光軸面におけるイレース光の集光パターンを示す（強度分布は焦点面及び光軸面のそれぞれの最大値強度で全体強度を規格化した）。また、図5-5と図5-6は、焦点面及び光軸面における図5-4中の破線方向の各 α に対する断面強度分布を示す。図5-5と5-6によれば、 $\alpha=0.62$ において、イレース光集光パターンの中心強度がほぼゼロとなる。この時の α はスカラー電場モデルのそれよりも13%ほど小さい。定性的には、輪帯位相板の外側を通過したイレース光ほど、対物レンズにより角度が付いて入射するために光軸方向の電場ベクトル成分を持つようになり、その分、焦点面で振動する電場ベクトルの成分が減少する。このことにより、外輪帯を通る単位面積当たりのイレース光の強度が弱くなるので、内輪帯を通る光と干渉・相殺させるためには、スカラーモデルの場合と比較して透過有効面積が広い外輪帯が必要となる。すなわち、 α は0.71よりも小さい輪帯比を持つ場合に焦点における電場強度がゼロとなる。図5-7は、図5-5に示す中心強度を α に対してプロットしたものである。図5-7によれば、最適値 $\alpha=0.62$ から外れると急激に中心強度が発生することが分かる。

2) 輪帯比がPSFに与える影響

イレース光の中空中心に強度が発生するとポンプ光のピーク強度が抑制されるので、これが超解像顕微鏡法における蛍光スポットすなわちPSFの形状に影響を与える。これに関して、蛍光色素分子としてナイルレッドを仮定したときの超解像顕微鏡法におけるPSFを計算した。図5-8は輪帯比 α をパラメータとしたときの焦点面及び光軸面におけるPSFの変化を示す。また、図5-9は、 α に対するPSFの中心強度（図5-9(a)）と強度半値幅：FWHM（図5-9(b)）を示す。図5-8及び図5-9によれば、最適値を挟んで α が0.60から0.63の間では、焦点におけるイレース光の残留強度によりPSFのピーク強度は3割程低下する。しかし、焦点面及び光軸面におけるFWHMはそれほど広がらず、100 nm以下の値を保っている。 α がこの範囲にあれば、実用的に利用できる輪帯型位相板といえる。図5-9によれば、最適値から ± 0.06 以上ずれると空間分解能には深刻な影響を与える。すなわち、イレース光の中空中央部で電場が相殺しない残留強度成分が発生し、超解像顕微鏡法で得られる蛍光スポットのピーク強度が減少し、PSFの形状が劣化する。市販の高NA対物レンズの口径は7 mm程度であるが、その場合の内輪帯径は4.34 mmとなるが、その時の位相板の作製誤差としては0.26 mmとなる。この値は、最新の加工技術を鑑みると決して厳しい値ではない。しかし、入射するイレース光のビーム面内で強度分布を持つ場合には、最適 α 値はシフトするので注意を要する。

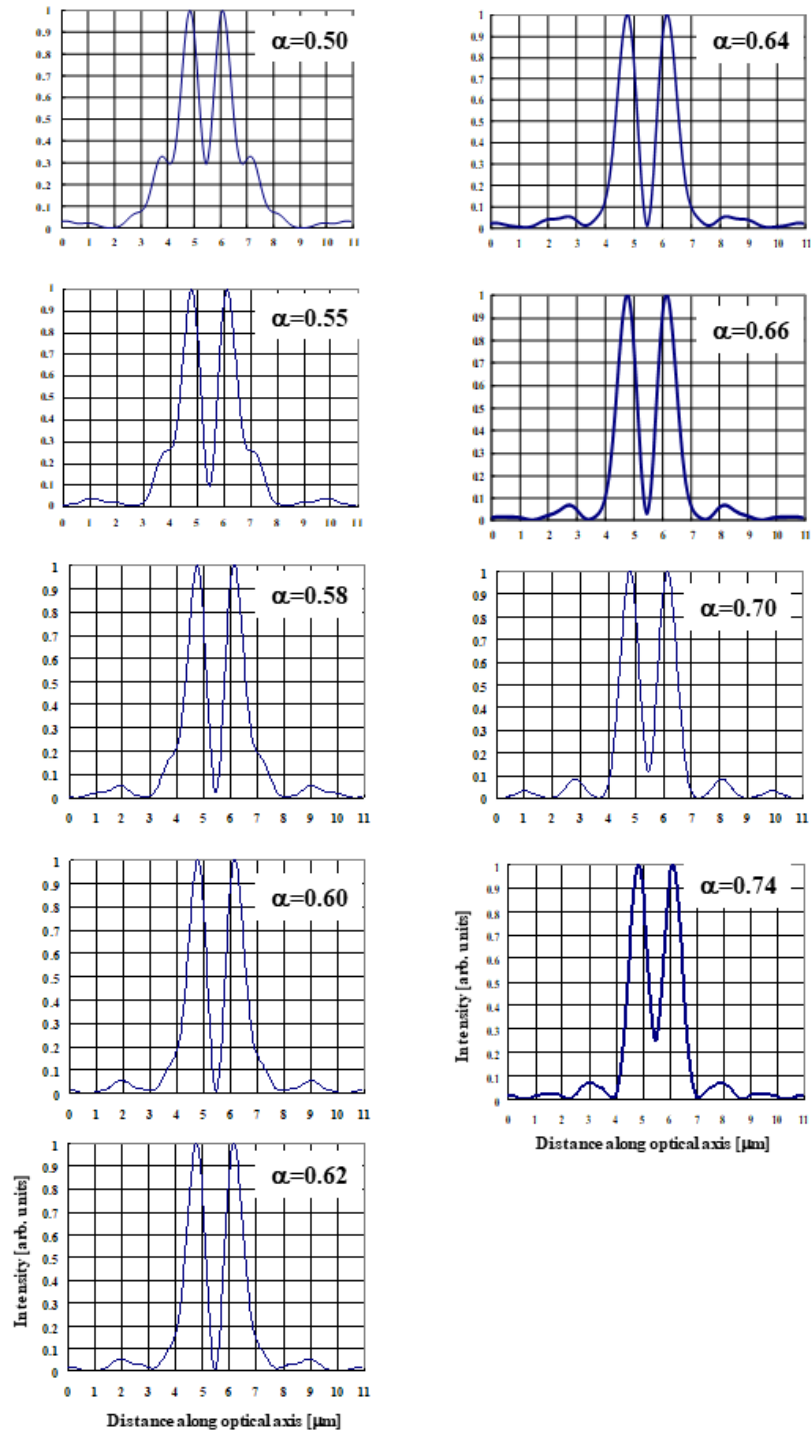


図 5－5：輪帯比 α をパラメータとしたときの光軸面内における図 5－4 に示す破線部のイレース光の断面強度分布（光軸面の最大値強度で全体強度を規格化した）。

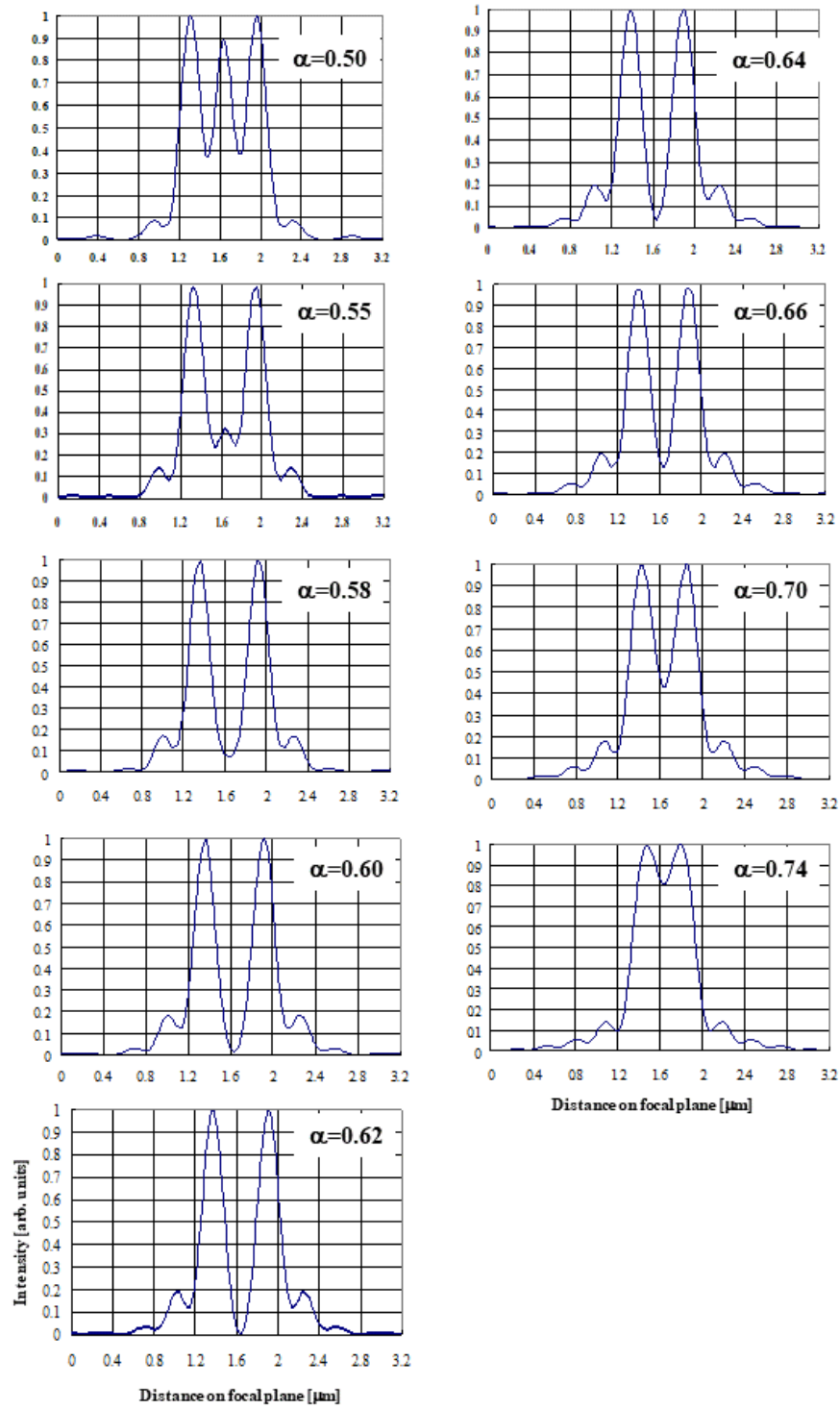


図 5－6：輪帯比 α をパラメータとしたときの焦点面内における図 5－4 に示す破線部のイレース光の断面強度分布（焦点面及の最大値強度で全体強度を規格化した）。

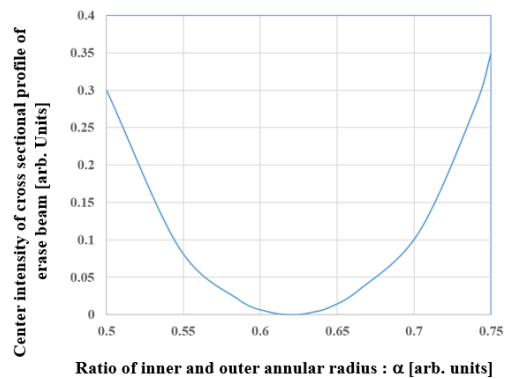


図 5－7： 輪帯比 α をパラメータとしたときの焦点面内における図 5－4 に示す破線部の PSF の断面強度分布の中心強度（焦点面及び全体強度を規格化をした）。

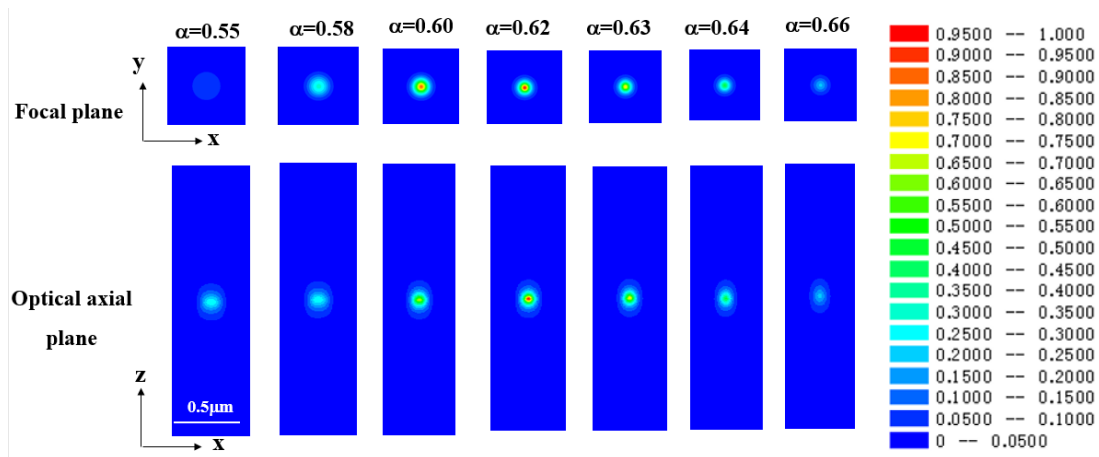


図 5－8： 輪帯比 α をパラメータとしたときの焦点面及び光軸面における PSF の変化。

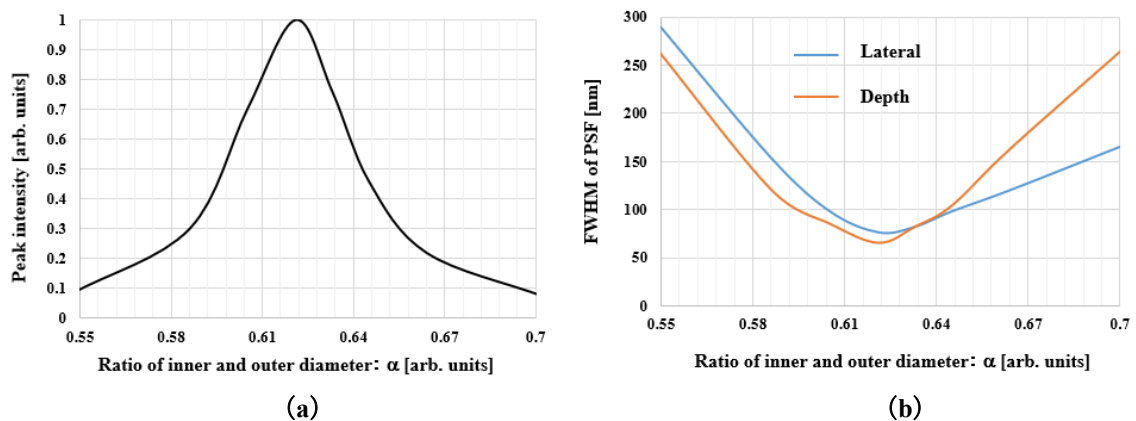


図 5－9： 輪帯比 α をパラメータとしたときの PSF のピーク強度 (a) と焦点面及び光軸面 (b) における断面強度分布の FWHM。

【内輪帯領域で発生する位相誤差が結像性能に与える影響】

図5-10に示す様に、輪帯位相板においては、中央内輪帯部の内径が最適化されたとしても、この輪帯部で正確に位相を π 反転させることができないと、ゼロ強度中心をもつダークホールが生成できない。従って、期待される超解像顕微鏡機能を提供することが出来ない。多くの場合、位相板の加工誤差により設計値と異なる位相差が発生する。その際、イレース光の中空ホールの空間形状は設計予想と異なったものになる。超解像顕微鏡法においてはポンプ光とイレース光が重複して蛍光が抑制された後の蛍光スポットがPSFとなるので、イレース光の空間形状が分解能に強い影響を与える。そこで、表5-1のパラメータを用いて位相ずれが発生したときのPSFを計算し、3次元超解像顕微鏡法における結像性能に与える影響を考察した。

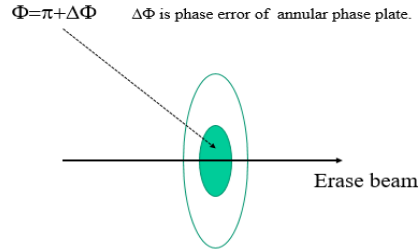


図5-10： 超解像位相板の輪帯中央におけるイレース光位相ずれの発生。

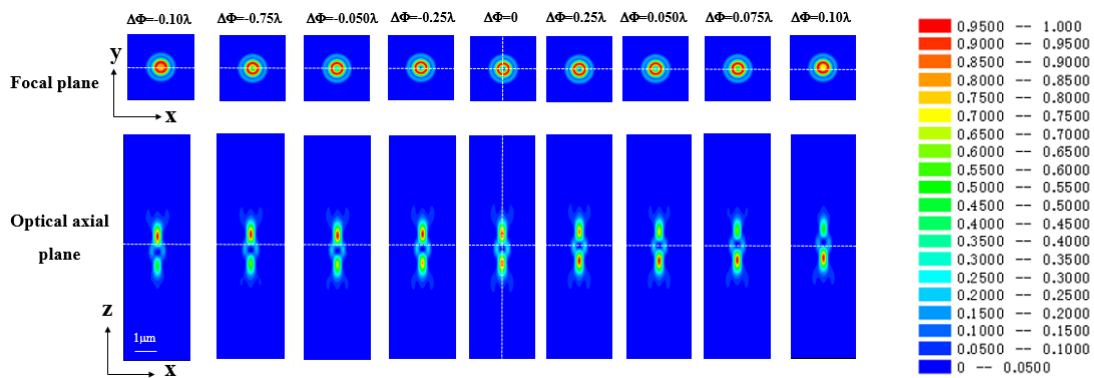


図5-11： 中央輪帯部でイレース光に位相ずれ $\Delta\Phi$ がある時のイレース光の形状。

1) 内輪帯で発生する位相ずれがイレース光プロファイルに与える影響

図5-11は、輪帯位相板の輪帯中央においてイレース光に位相ずれが発生した時のイレース光の形状を示す。また、図5-12及び図5-13は、図5-11に示す破線部に沿った焦点面及び光軸面における断面強度分布を示す。シミュレーションにおいては、焦点面及び光軸面においてそれぞれの最大ピーク強度値を用いて規格化した。図5-11によれば、 $\Delta\Phi$ が $\pm 0.1\lambda$ ずれても3次元的な中空ホールを保持している(λ はイレース光波長を示す)。しかし、光軸面内を考察すると、 $\Delta\Phi$ が増加に伴い輪帯強度が非対称になり、かつ、中空中心位置が光軸に沿ってシフトしていることが分かる。実際、焦点面のみの光束形状に注目

すると、対称性のある中空形状を保っているが、光軸上に中空中心が移動しているために焦点位置の強度が大幅に増加している。上記の挙動は図 5 - 1 2 及び図 5 - 1 3 の断面強度分布よりも確認できる。

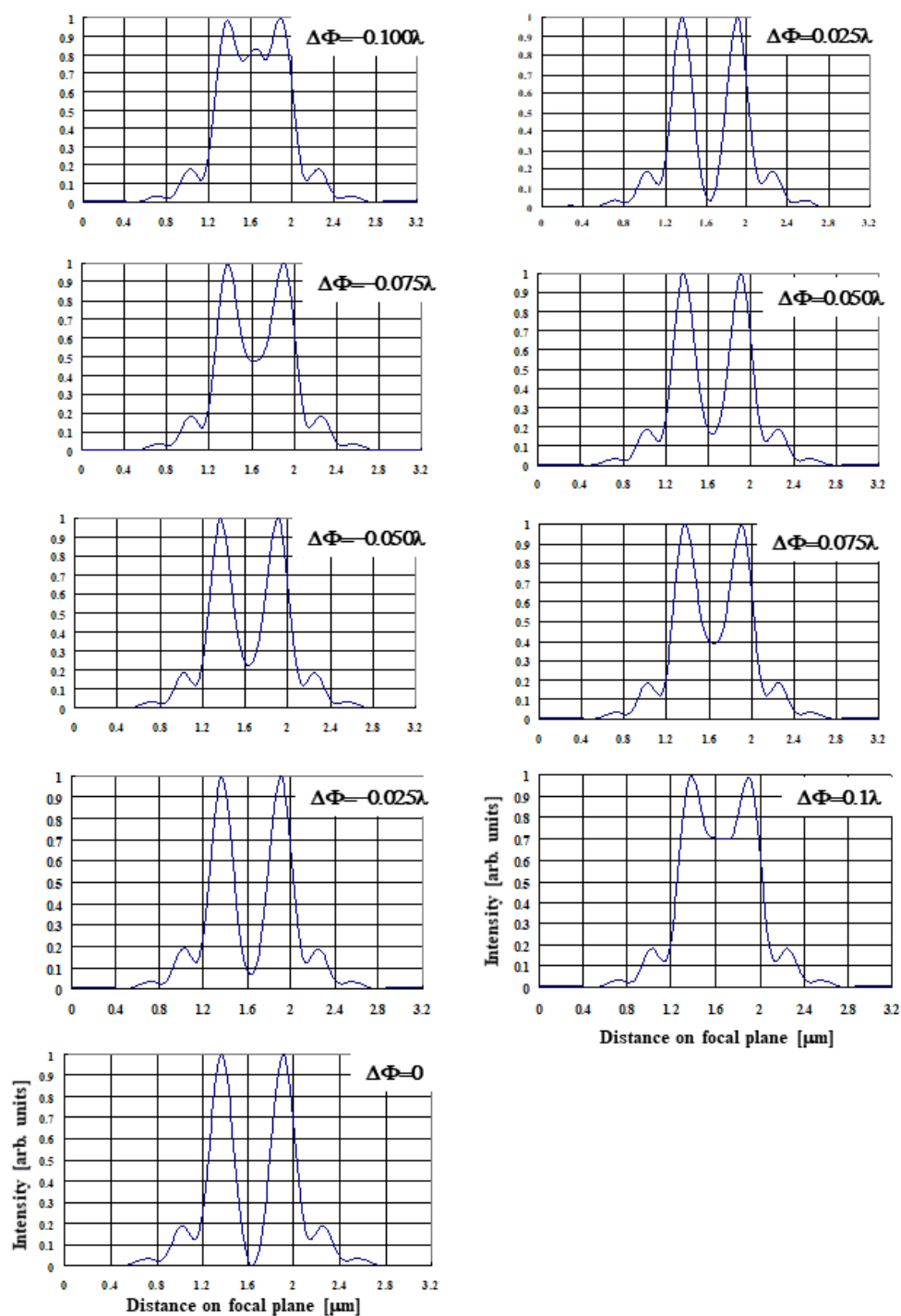


図 5 - 1 2： 図 5 - 1 1 に示す破線部に沿った焦点面におけるイレース光の断面強度分布。

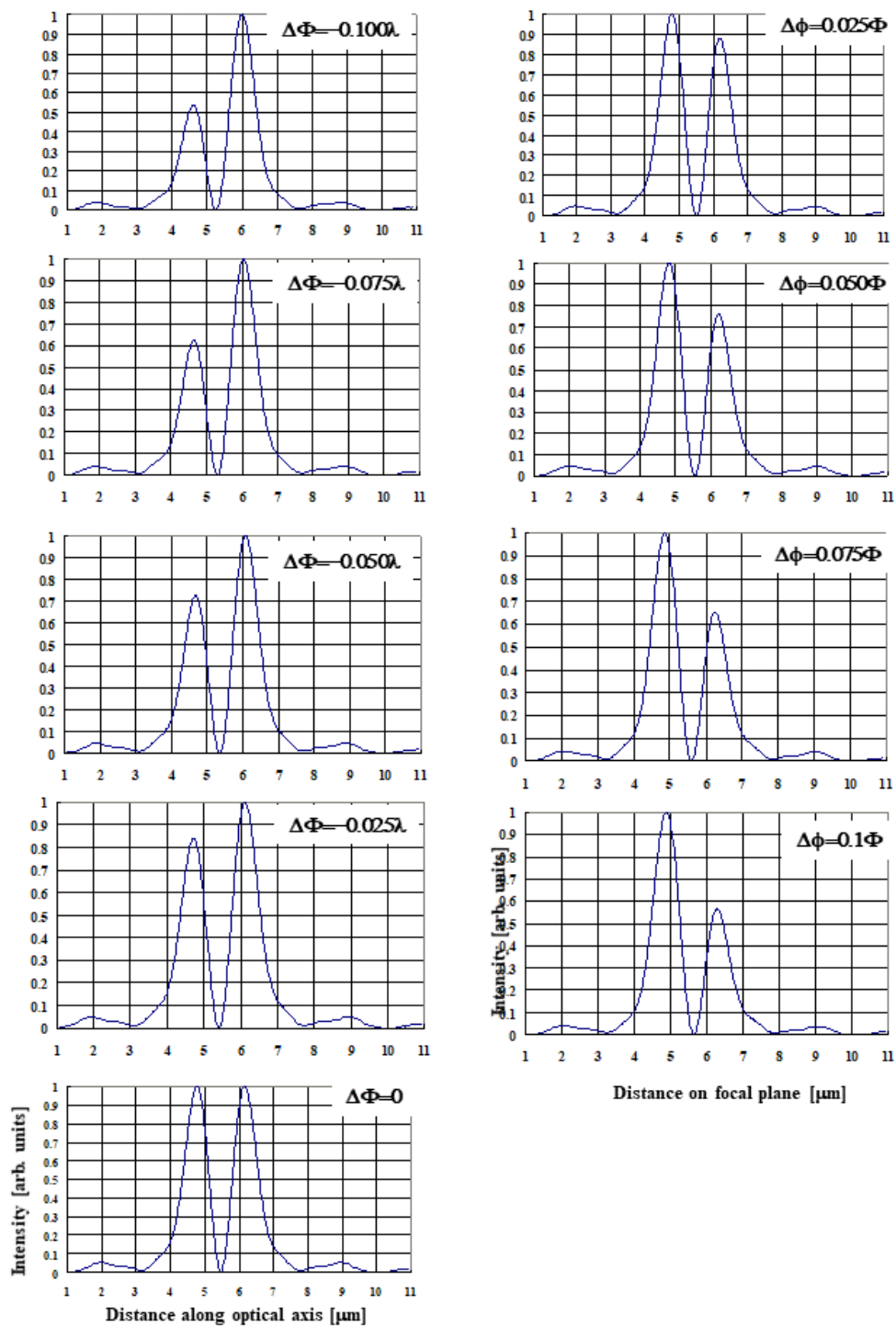


図 5－1 3： 図 5－1 1 に示す破線部に沿った光軸面におけるイレース光の断面強度分布。

2) 内輪帯で発生する位相ずれが3次元超解像顕微鏡法のPSFに与える影響

図5-14は、位相ずれの無いときのポンプ光単独照射時の3次元のPSFとイレース光を同時照射した超解像顕微鏡観察時のPSFを示す。それによれば、3次元超解像顕微鏡法のPSFは3次的に等方的にFWHMが70nmの球体となっている。一方、図5-15は輪帯位相板の輪帯中央でイレース光に位相ずれ $\Delta\phi$ がある時のPSFを示す。それによれば、図5-11が示す様にイレース光の中空中心が光軸上にシフトするためにPSFのピーク位置もこれに応じて光軸上でシフトしている。そして、シフト量が増加するにつれてピーク強度も緩やかに低下する。一方、焦点面におけるPSFに着目すると、 $\Delta\phi$ が増加するに従いピーク強度が急激に減少している。これは、イレース光の中空中心がシフトするため、焦点位置でイレース光強度が増加する為に蛍光スポットが焦点面で全体的に抑制されることによる。図5-16は、図5-15に示す破線部(白)に沿った焦点面におけるPSFの断面強度分布を示す。そして、図5-17は図5-15に示す破線部(白)に沿った光軸面におけるPSFの断面強度分布を示す。一方、図5-18は図5-15に示す様に黄色い破線部に沿った光軸面のPSFのピーク強度位置に対する焦点面における断面強度分布を示す。図5-16、5-17、5-18によれば $\Delta\phi$ の増加に対応してピーク強度が低下し、ピーク位置が光軸上を移動している様子が明瞭に見て取れる。

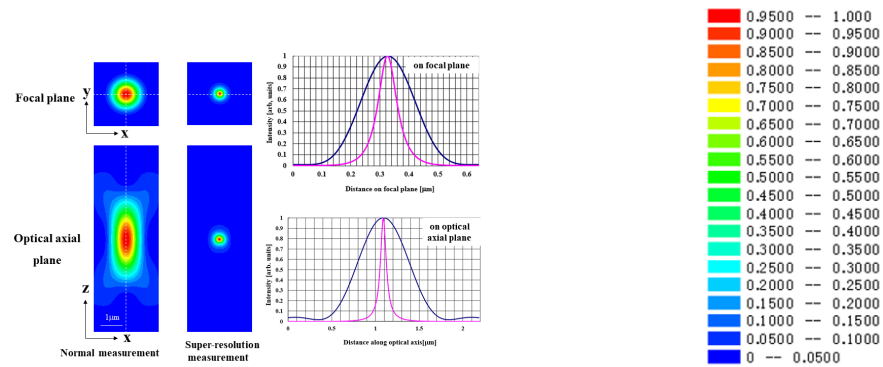


図5-14：輪帯位相板の輪帯中央におけるイレース光に位相ずれが無いときのPSF。

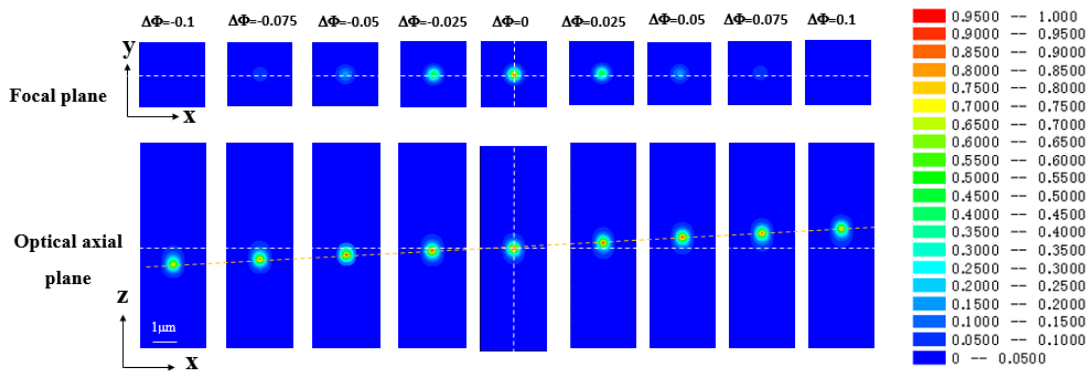


図5-15：輪帯位相板の輪帯中央におけるイレース光に位相ずれ $\Delta\phi$ がある時のPSF。

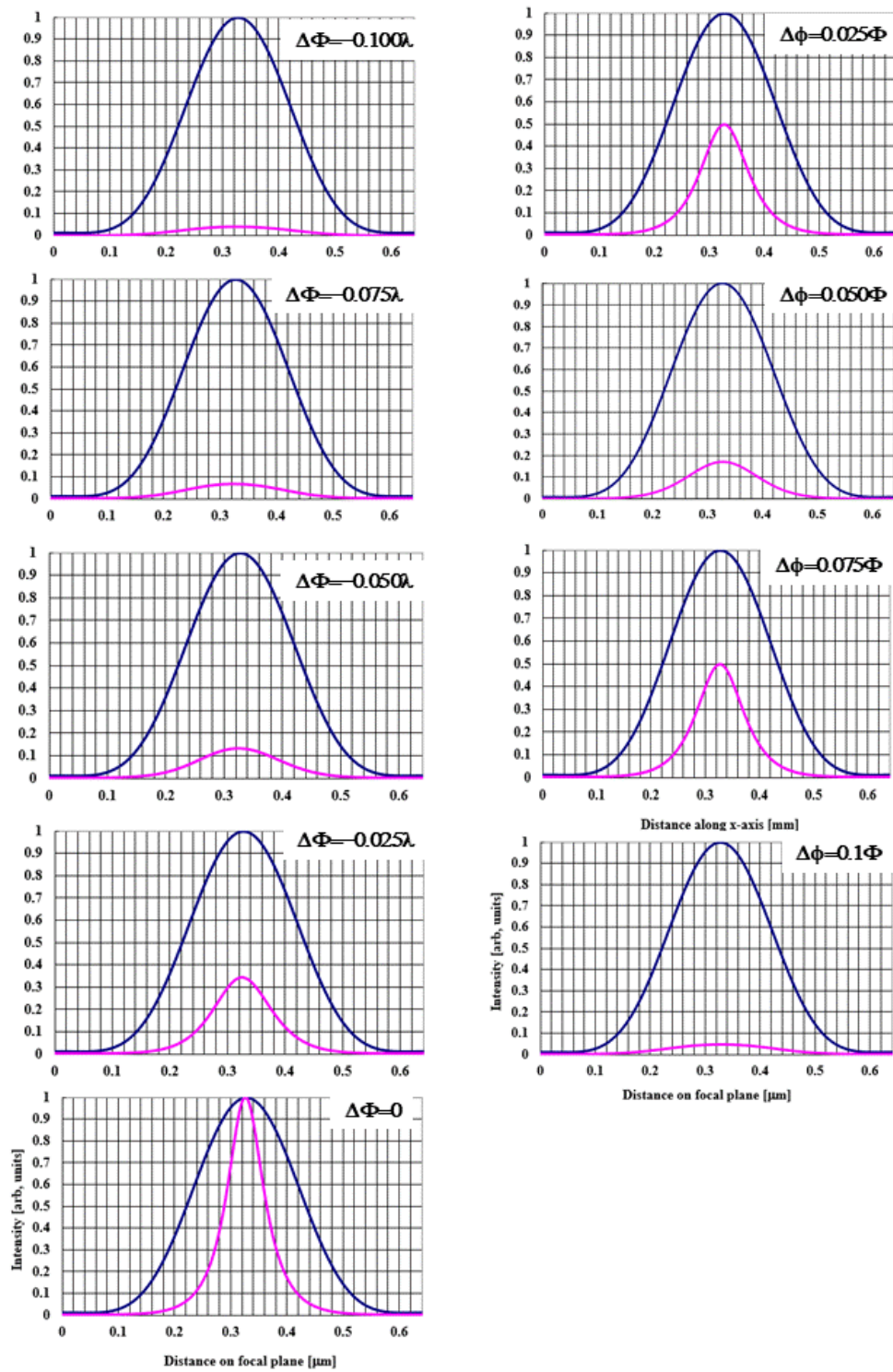


図 5-16 : 図 5-15 に示す白い破線部に沿った焦点面における PSF の断面強度分布。

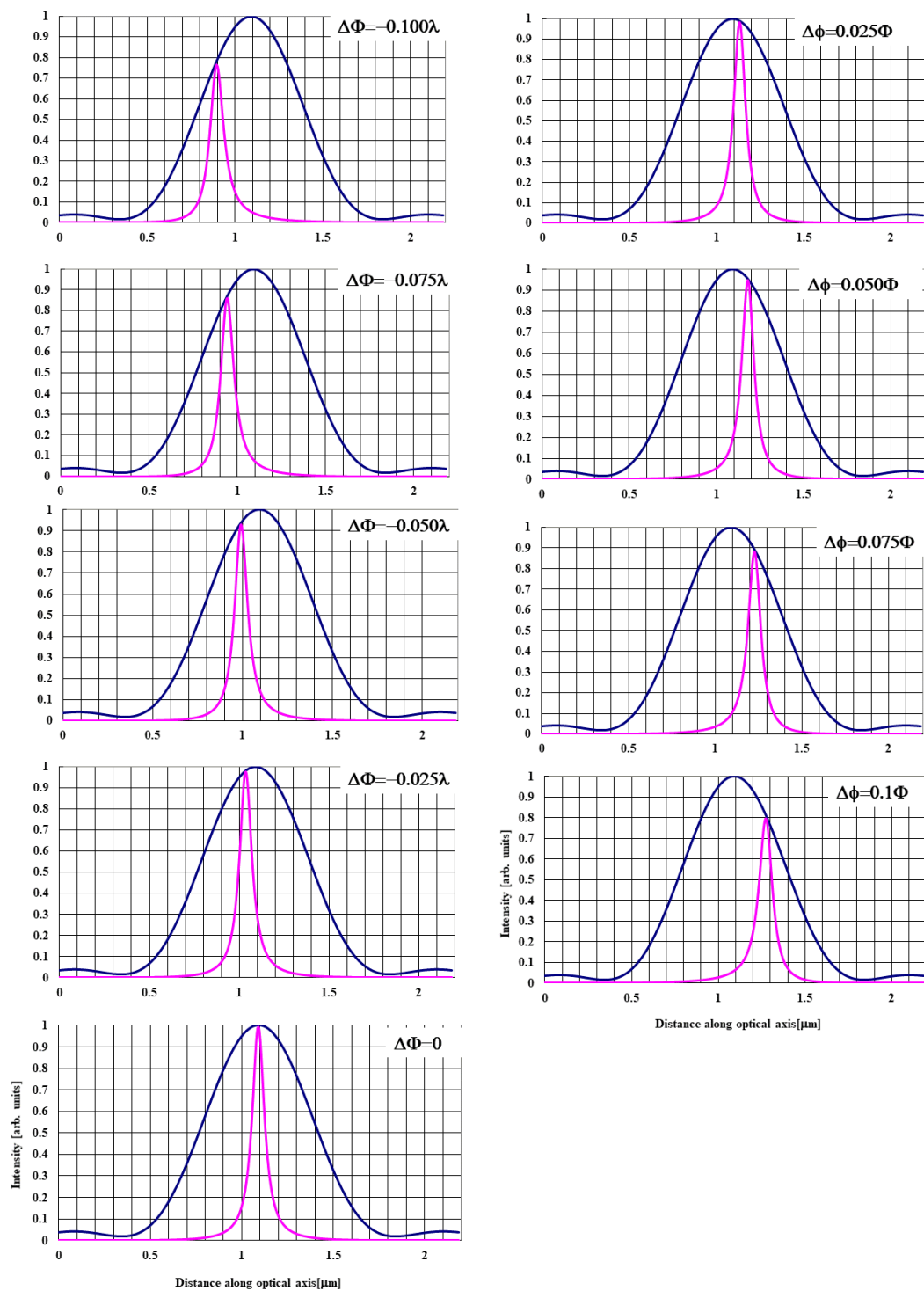


図 5-17 : 図 5-15 に示す白い破線部に沿った光軸面における PSF の断面強度分布。

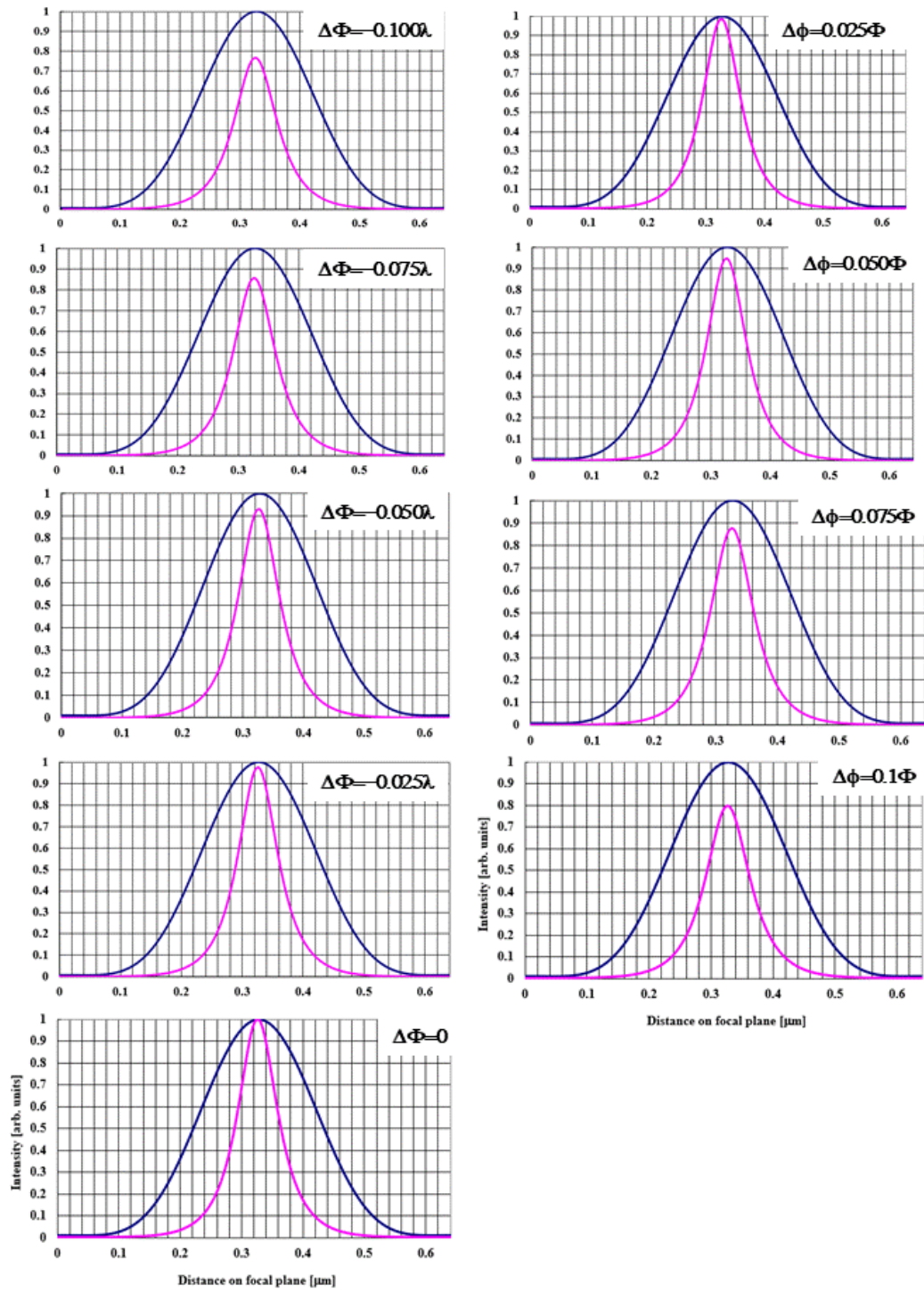


図 5-18 : 図 5-15 示す黄色い破線部に沿った光軸面の PSF のピーク強度位置における焦点面方向の断面強度分布。

図 5-19 から図 5-22 には前述の内輪帯部の位相ずれ $\Delta\phi$ が生じたときの PSF の挙動を定量的に示したものである。図 5-19 によれば、PSF のピーク位置の光軸上における移動距離は、 $\Delta\phi$ の変化に対してほぼ線形に変化していることが分かる。例えば、 $\pm\lambda/10$ ずれるとピーク位置は $\pm 200\text{ nm}$ ずれる。また、その時のピーク強度は 2 割程度低下する（図 5-20）。これは、図 5-15 に示す様に PSF のピーク強度は、丁度、イレース光の中空中心が集光したポンプ光のサイドローブに重なったときの、その位置でのポンプ光強度に対応する。一方、図 5-21 と図 5-22 によれば、焦点面及び光軸面において PSF の FWHM の広がりは少なく、意外なほど分解能には影響しないことが分かる。また、図 5-18 に示す様に、光軸面における PSF のピーク強度位置が移動しても焦点面方向の断面強度分布の形状が大きく変化しないことを裏付けている。

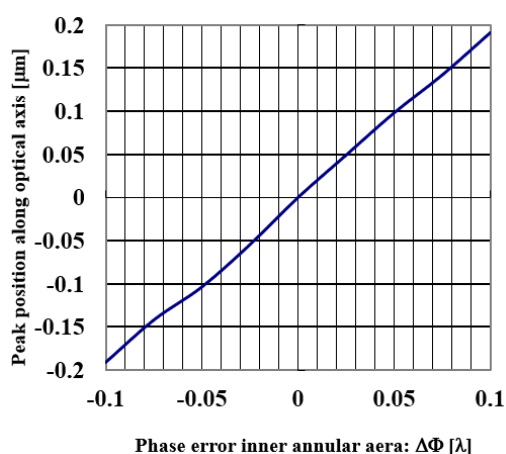


図 5-19 : 位相ずれ $\Delta\phi$ に対する光軸上の PSF のピーク位置の変化。

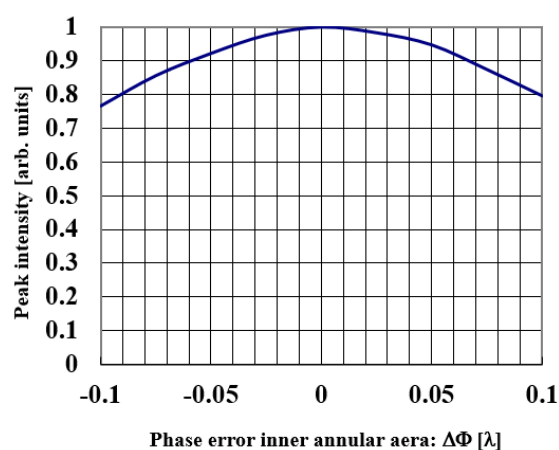


図 5-20 : 位相ずれ $\Delta\phi$ に対する PSF のピーク強度の変化。

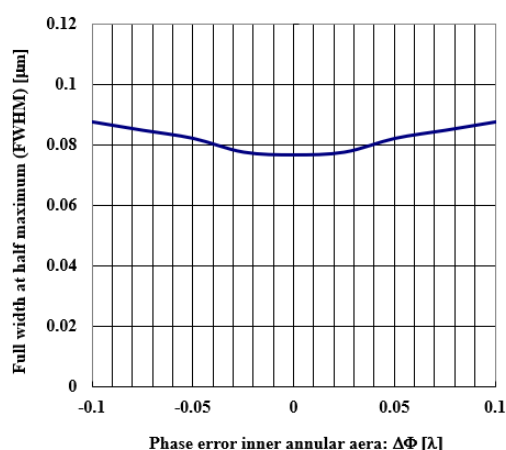


図 5-21 : 位相ずれ $\Delta\phi$ に対する焦点面における PSF の FWHM の変化。

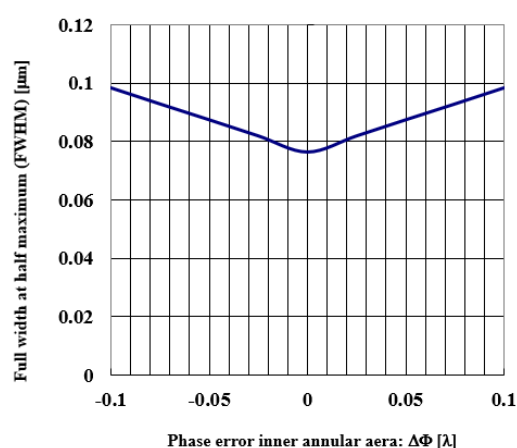


図 5-22 位相ずれ $\Delta\phi$ に対する光軸面における PSF の FWHM の変化。

【内輪帯領域で発生する偏芯誤差が結像性能に与える影響】

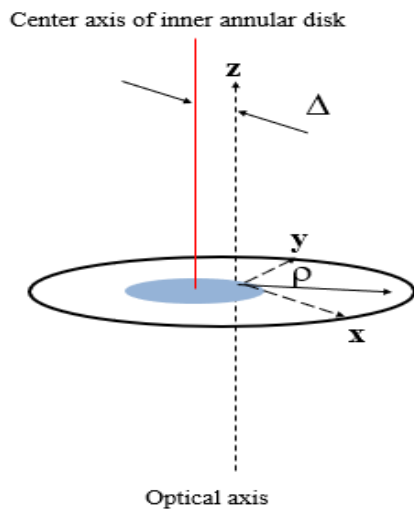


図 5-23 : 輪帯位相板の偏芯。

輪帯位相板の内輪帯径の製作誤差及びそこで発生する位相ずれ誤差が、超解像顕微鏡法の結像性能に影響を与えることが明らかになった。このとき、輪帯位相板の内輪帯部の中心位置が位相板の中央に位置し、そしてポンプ光及びイレース光の光軸中心と一致していることを前提にしている[5-3]。しかし、位相板の加工誤差や設置誤差により中央輪帯部の中心は光軸に対して必ずしも一致しない。このような偏芯による誤差も結像性能に影響を与える。そこで、イレース光の空間形状を理論的にシミュレーションし、超解像顕微鏡法の PSF を求めて結像性能に与える影響に関して考察をした。本シミュレーションでは、図 5-23 が示す様に半径 (ρ) の輪帯中央部が光軸に対して (Δ) だけずれたときのイレース光の集光プロファイルを求める。そして、求めたイレース光プロファイルを用いて PSF を表 5-1 の条件で計算する。

1) 偏芯時のイレース光の集光プロファイルの変化

図 5-24 と図 5-25 は、輪帯位相板の内輪帯の中心が光軸中心から x 軸方向に Δ だけ平行移動したときのイレース光の集光スポット形状を示す。図 5-24 は焦点面と z - x 光軸面における形状であり、図 5-25 は焦点面と z - y 光軸面における形状を示す。尚、図 5-24 と 5-25 において、プロファイル強度は、焦点面及び光軸面におけるピーク強度でそれぞれ規格化した。図 5-24 によれば、内輪帯の中心が光軸中心より離れても、 z - x 光軸面のスポットパターンは中空構造を保持している。しかし、離れるにつれ中空構造は崩れ、ビーム輪郭が光軸に対して傾いていく。それに対して、 z - y 光軸面においてダークホールの形状は多少歪むが全体輪郭を含め著しい変化を示していない (図 5-25)。一方、図 5-26 は、図 5-24 の白線で示す x - y 焦点面及び z - x 光軸面における断面強度分布である。特に、 $\Delta/\rho=0.156$ の場合にはビーム形状の変形が著しいが、理想設計時の $\Delta/\rho=0$ の場合の x - y 焦点面及び z - x 光軸面における断面強度分布を比較すると、ピーク強度が多少低下するものの形状自体は大差ないことが分かる。

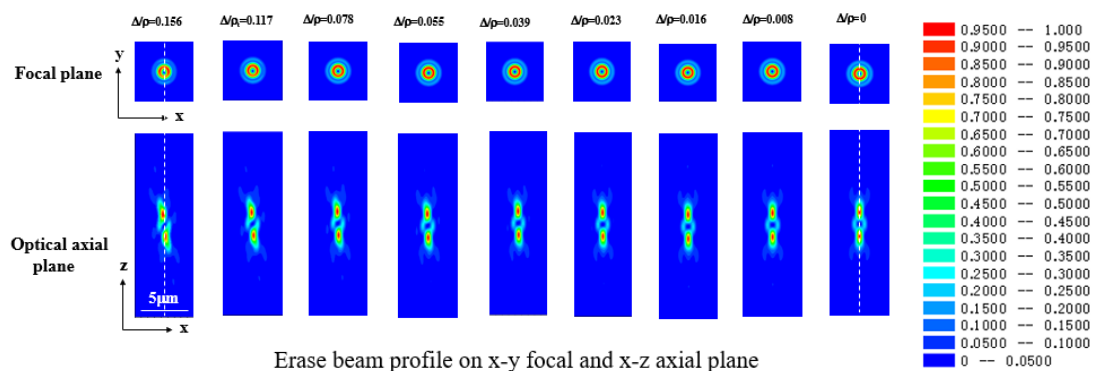


図 5-24 : x-y 焦点面と z-x 光軸面における偏芯時のイレース光の集光プロファイルの形状。

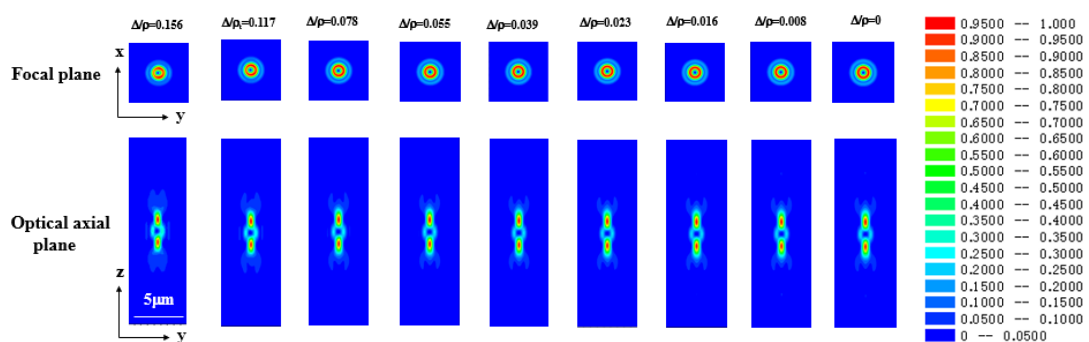


図 5-25 : x-y 焦点面と z-y 光軸面における偏芯時のイレース光の集光プロファイルの形状。

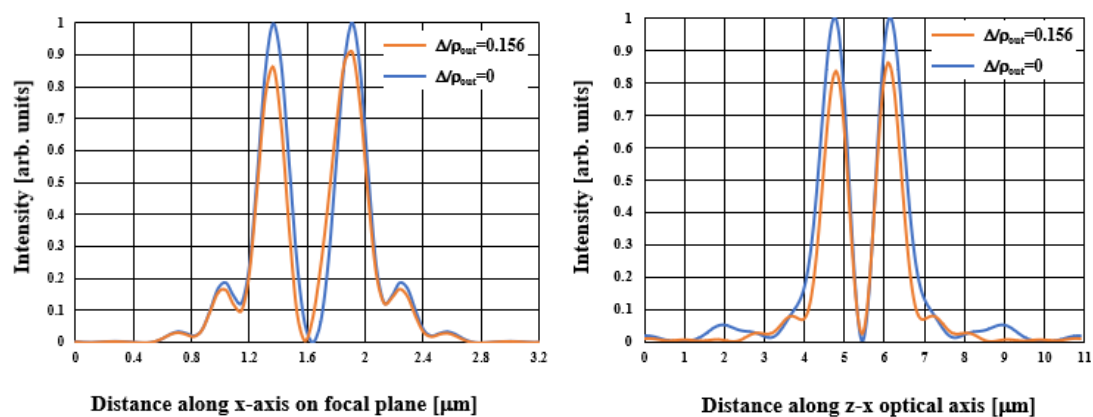


図 5-26 : $\Delta\rho=0.156$ と $\Delta\rho=0$ の場合の x-y 焦点面及び z-x 光軸面における断面強度分布の比較 (図 5-24 の白線)。

2) 内輪帯の偏芯が超解像顕微鏡法における PSF に対する影響

図 5-27 と図 5-28 は、輪帯位相板の内輪帯の中心が光軸中心から x 軸方向に Δ だけ平行移動したときの超解像顕微鏡法の PSF を示す。図 5-27 は焦点面と z - x 光軸面における PSF の形状であり、図 5-28 は焦点面と z - y 光軸面における形状を示す。それらによれば、偏芯が $\Delta/\rho=0.039$ 以内であれば PSF の形状はあまり変化が無いことが分かる。しかし、 $\Delta/\rho=0.039$ 以上であると、 x - y 焦点面及び z - x 光軸面においてピーク強度が低下することが分かる (図 5-27)。そして、 z - x 光軸面の形状に着目すると、光軸に対して傾きながら円形から楕円体に変形していく。一方、図 5-28 によれば、 z - y 光軸面における PSF の形状自体は変化せず、光軸に対して傾きも発生しないが、ピーク強度が低下している。図 5-27 と 5-28 に示す x - y 焦点面、 z - x 光軸面、 y - z 光軸面の破線における断面強度分布をそれぞれ図 5-29 に示す。図 5-29 (a)、(b) は焦点面における破線で示す x 軸方向と y 軸方向の強度分布を示す。そして、図 5-29 (c) は光軸面における z 軸方向の分布を示す。それらによれば、図 5-27 と 5-28 に示す様に偏芯が $\Delta/\rho=0.039$ では、ピーク強度が低下するが、ほとんど PSF の形状は大差ない。しかし、 0.156 になると焦点面で強度ピークが低下し、その位置がシフトしていることが分かる。標準的な市販の対物レンズの口径、すなわち瞳径を 7 mm と仮定すると Δ は $136\text{ }\mu\text{m}$ となる。すなわち、通常の機械加工精度で位相板の加工及びアライメント調整が可能なことを示している。しかし、図 5-27 によれば $\Delta/\rho=0.039$ であっても PSF が z - x 面において光軸に対して若干の傾きが発生する。例えば、生物試料において 3 次元的な構造をもつ部位を超解像顕微鏡観察した場合、本来の構造と異なる 3 次元画像、すなわちアーキファクトをもつ画像が得られる可能性がある。従って、偏芯をできるだけ少なくする努力とともに、単に空間分解能のみにとどまらず、これが超解像顕微鏡画像の画質に与える影響を評価していく必要がある。

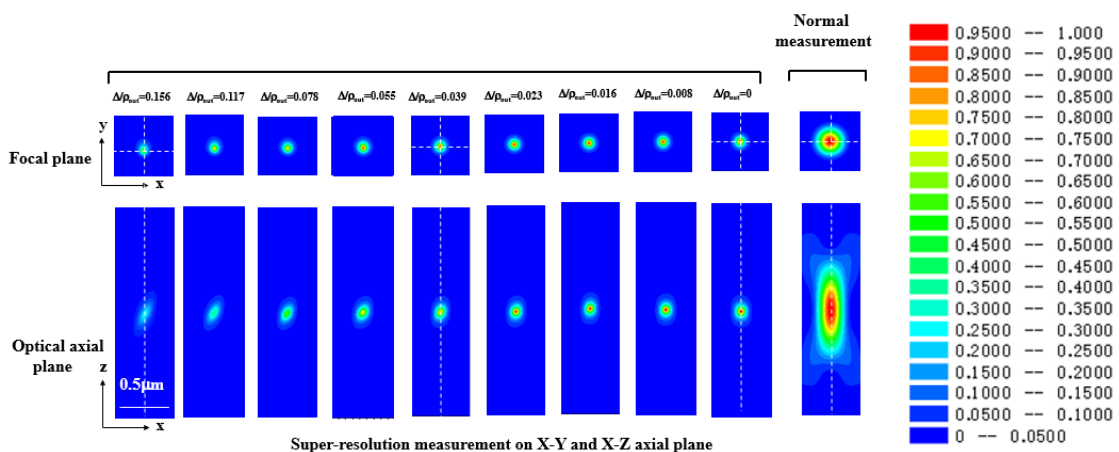


図 5-27: 超解像位相板の内輪帯の中心が光軸中心から x 軸方向に Δ だけ平行移動したときの x - y 焦点面と z - x 光軸面における超解像顕微鏡法の PSF。

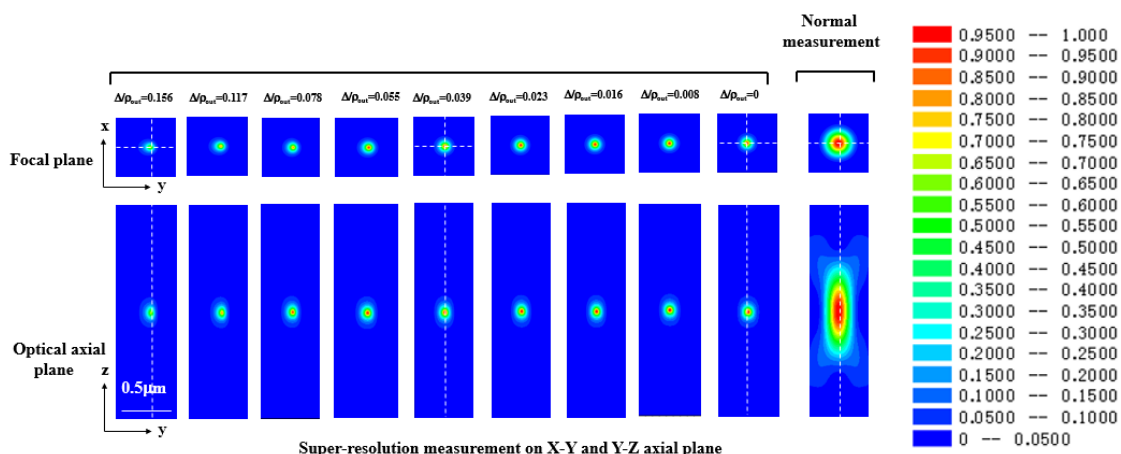


図 2 8： 超解像位相板の内輪帯の中心が光軸中心から x 軸方向に Δ だけ平行移動したときの x - y 焦点面と z - y 光軸面における超解像顕微鏡法の PSF。

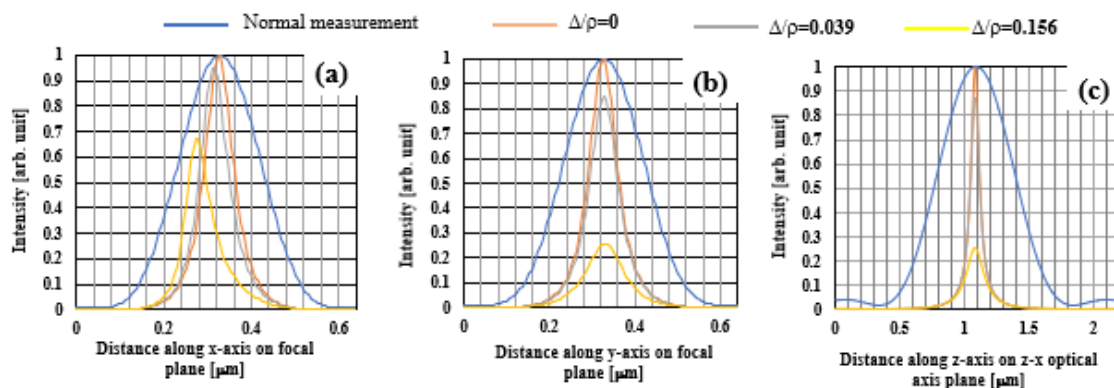


図 5-29： 図 5-27 と 5-28 に示す x - y 焦点面 (a)、 z - x 光軸面 (b)、 y - z 光軸面 (c) の破線における断面強度分布。

【2 波長対応超解像位相板の設計】

1) 超解像顕微鏡法における技術課題

超解像顕微鏡法においてポンプ光の中心部を残して辺縁部の蛍光領域を消去して蛍光スポットを微細化する。その際、いかに正確にイレース光の中空部にポンプ光を集光するかが実用上の技術課題として存在する。これらのビームの調整が不完全であると、ポンプ光の中心部の蛍光も抑制してしまい、分解能が低下する (図 5-30)。そこで、表 5-1 の条件で分解能に対する影響をシミュレーションした。図 5-31 (a) は、焦点面においてポンプ光の集光スポットがイレース光の中空中心に対して平行にずれた時の断面強度分布の様子を示す。そして、その時の焦点面における 3 次元超解像顕微鏡法の PSF

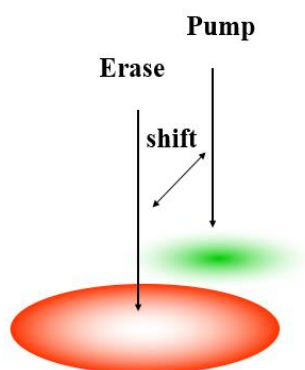


図 5-30： ポンプ光とイレース光のビームずれ。

の断面強度分布を図 5-3 1 (b) に示す。図 5-3 1 (b) によれば、ずれが増大するに従い、PSF の形状は非対称になり、そのピーク光強度が著しく低下する。図 5-3 2 (a) が示す様に 100 nm ずれると、PSF のピーク値は半分以下に低下する。最終的には、集光したポンプ光の断面強度分布の FWHM に対応する 200 nm ずれるとポンプ光の集光領域全体がイレース光の輪帯照明領域とオーバーラップするので、PSF 自体がほとんど消失する。一方、図 5-3 2 (b) に注目すると、ずれが 100 nm 程度であれば FWHM は殆ど変化しない。しかし、それ以上ずれると FWHM は急激に増加し、3 次元超解像顕微鏡としての機能は消失する。

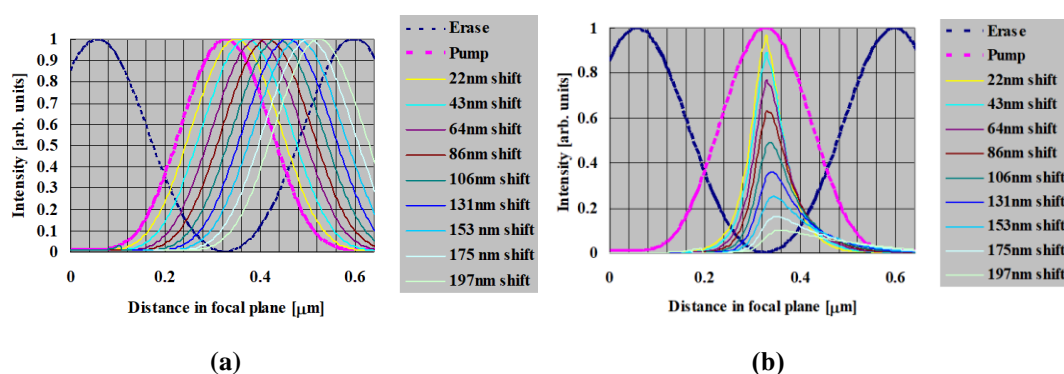


図 5-3 1：焦点面におけるポンプ光とイレース光の位置ずれが 3 次元超解像顕微鏡法の PSF の断面強度分布に与える影響。(a)ポンプ光のピーク位置とイレース光の中空中心の位置関係。(b) ポンプ光のピーク位置とイレース光の中空中心のずれ量に対する PSF の断面強度分布の形状変化。

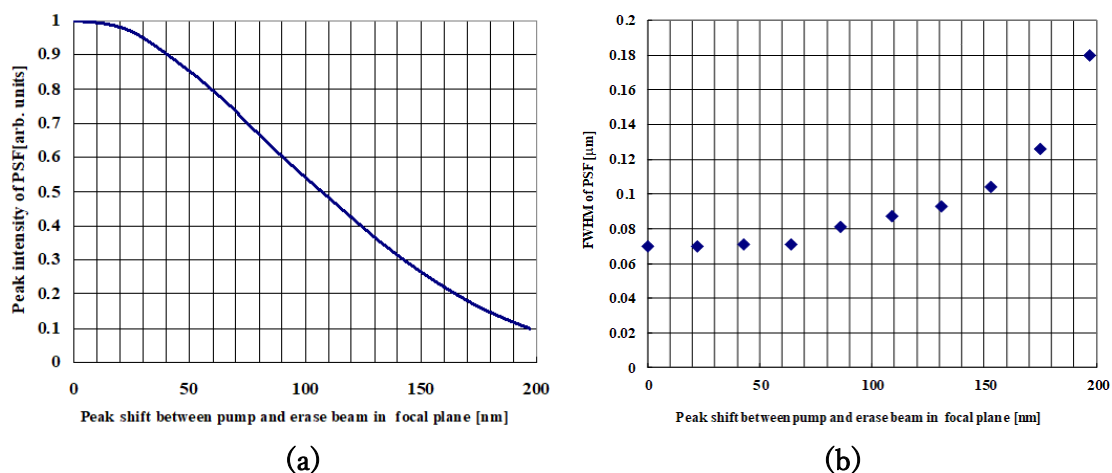


図 5-3 2：焦点面におけるポンプ光とイレース光の位置ずれ量と PSF の断面強度のピーク強度 (a) 及び FWHM (b) の関係。

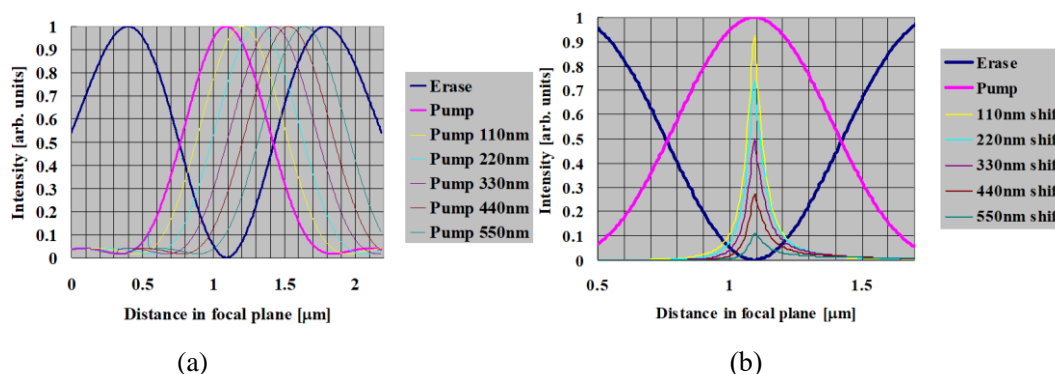


図 5-33 : 光軸面におけるポンプ光とイレース光の位置ずれが 3 次元超解像顕微鏡法の PSF の断面強度分布に与える影響。(a)ポンプ光のピーク位置とイレース光の中空中心の位置関係。(b) ポンプ光のピーク位置とイレース光の中空中心のずれ量に対する PSF の断面強度分布の形状変化。

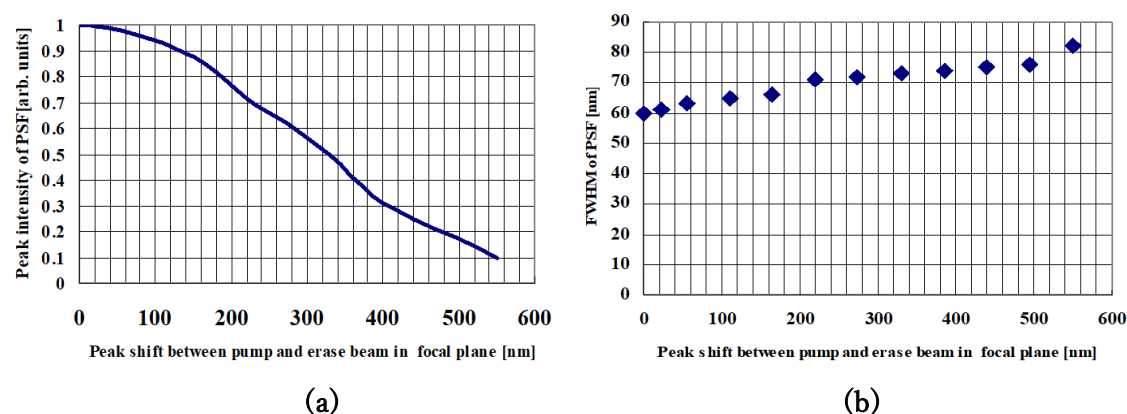


図 5-34 : 光軸面におけるポンプ光とイレース光の位置ずれ量と PSF 断面強度のピーク強度 (a) 及び FWHM (b) の関係。

一方、光軸方向のみポンプ光とイレース光の集光点位置がずれた場合に対しては状況を異にする。図 5-33 (a) は、同じく光軸面におけるポンプ光とイレース光の位置関係を示す。そして図 5-33 (b) は、その時の PSF の断面強度分布を示す。やはり、ポンプ光のピーク位置とイレース光の中空中心のずれが増大するに従い、PSF のピーク値の強度が低下し、かつ、形が非対称になる。しかし、300 nm ずれてもピーク値の半分の強度を保持している (図 5-34 (a))。また、PSF の FWHM は殆ど変化しない (図 5-34 (b))。焦点面の場合と異なり、深さ方向に関しては、ポンプ光とイレース光のアライメント精度は緩いことが分かる。このような振る舞いは、ポンプ光の PSF の広がり起因している。すなわち、ポンプ光の集光径は深さ方向に長いため、対物レンズの色収差等により多少位置関係がずれても、イレース光の中空中心とのオーバーラップが容易なことに起因している。上述の様に、焦点面内のポンプ光とイレース光の位置ずれが、主に PSF に大きな影響を与えること

を示している。すなわち、少しでもずれると試料からの蛍光信号が低下する。このことは、計測法として S/N が悪くなることを意味する。元来、超解像顕微鏡法においては、PSF が微細になるため蛍光信号の総量が小さくなり、その影響は更に深刻になる。このことは、微細な構造の評価に関しては信頼性が担保できないことを意味する。従って、ポンプ光とイレース光のアライメントを出来るだけ正確に行い、明るい画像を取得し、信頼性の高い画像を提供出来るようにする必要がある。そのためには、回折限界よりも微細な精度でポンプ光とイレース光をアライメントし、かつ、それを安定して維持する照明光学系が不可欠である。このことが本顕微鏡の装置化と技術普及の最大の障害となっていた（図 5－3 5）。

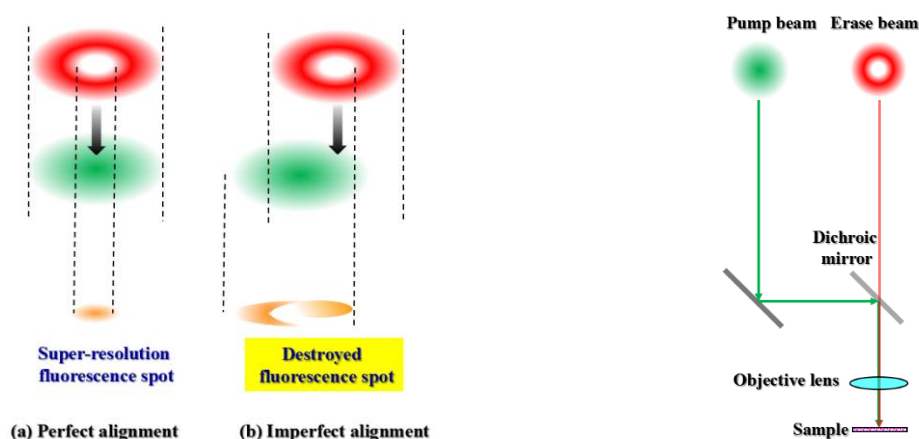


図 5－3 5：超解像顕微鏡法にける照明光学とその技術課題。

2) 2 波長対応の超解像位相板の原理と設計法

この課題に対して、2 波長対応の超解像位相板を考案した。この位相板は構造が極めて単純であり、これを対物レンズに取り付けるだけで簡単に 3 次元超解像顕微鏡機能を市販のレーザー走査顕微鏡に技術搭載ができる。レーザー走査型顕微鏡においては、多色のレーザー光を 1 本のシングルモードファイバーで伝送し。ポンプ光とイレース光は点光源と見なせるファイバーの射出口より出力されるので、これら 2 色の光は完全に同軸となり、共に焦点位置に結像する。キープーツである超解像位相板は、市販のレーザー走査型顕微鏡の構造と特長に着目して開発したものである[5-4]。本位相板は光学基板に光学膜又はエッチングを施し、中央輪帯部を透過したポンプ光及びイレース光に対して独立に位相制御が出来る様に設計されたものである。すなわち、イレース光に対しては輪帯中央部では位相を反転させることにより、焦点で電場強度を相殺させて集光する機能をもつ。その一方で、この位相板は独立にポンプ光ビームには影響を与えず通常のガウスビームとして集光できる機能をもつ（図 5－3 6）。この機能は、光学単層膜の厚みやエッチングの深さを最適化することで極めて簡単に上記の位相制御を実現できる。図 5－3 6 に示す様に光学単層膜の厚み又はエッチングする深さを (d) とすると、中央輪帯部を通過した波長 (λ_0) のイレース光の位相に対して外輪帯を通過したイレース光の位相が反転する条件は、任意の整数を (m) とし

て、式（５－１）を満たす。

$$\frac{2\pi}{\lambda_e}(n_e - 1)d = \pi + 2m\pi. \quad (5-1)$$

ここで、 (n_e) は光学膜層又はエッチング基板のイレース光に対する屈折率を示す。この時に輪帯中央部で発生する波長 (λ_p) のポンプ光の位相遅れ (Φ) は式（５－２）で与えられる。

$$\Phi = \pi(2m + 1) \frac{(n_p - 1) \lambda_e}{(n_e - 1) \lambda_p}. \quad (5-2)$$

この時、整数 (j) として、

$$\Delta\Phi = \Phi - 2j\pi, \quad (5-3)$$

と書くと、 $\Delta\Phi$ は位相板輪帯中央部で発生する位相誤差に対応する。２波長対応の超解像位相板の設計においては、平面波のポンプ光の位相が乱れることが無いように $\Delta\Phi$ を出来るだけゼロに近い様に m 選定する。すなわち、この時の最適値を (M) として、式（５－４）に示す d を選べば良い[5-4]。

$$d = \frac{(2M + 1)}{2(n_e - 1)} \lambda_e. \quad (5-4)$$

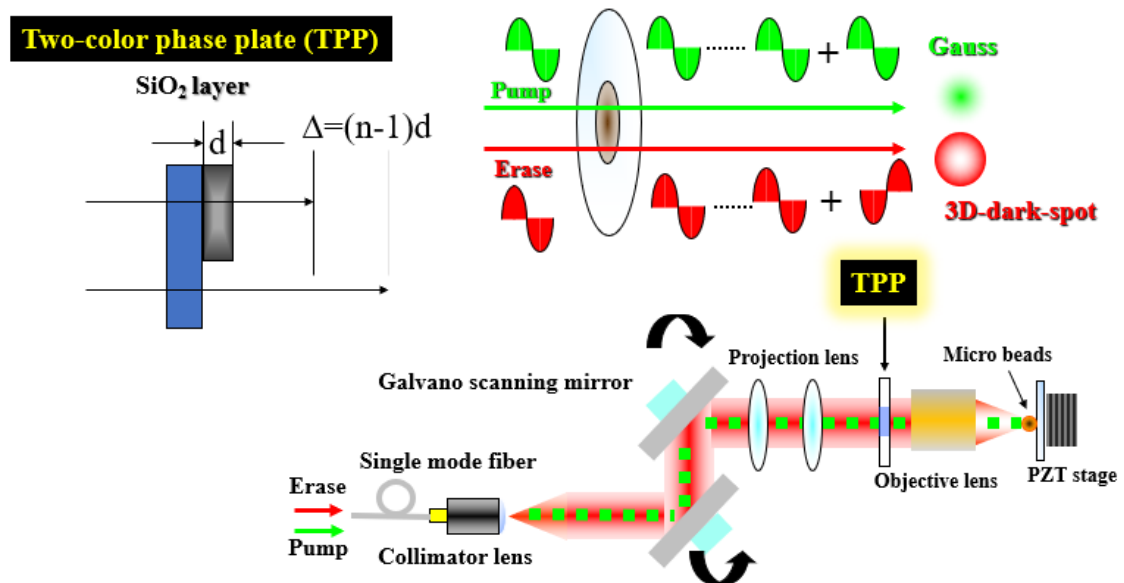


図５－３６：レーザー走査型顕微鏡の照明光学系と２波長対応の超解像位相板。

3) 2波長対応の超解像位相板の設計例

表5-2には、固体レーザーの代表的な発振波長の出力光でポンプ光とイレース光の組み合わせを想定した場合の設計の例を示す。位相差は石英基板をエッチングすることで輪帯中央部において発生させるものと仮定する。本設計法では、イレース光の波長に相当する光路差の任意の整数倍を選ぶ自由度に着目したものであるが、多くの場合には完全には $\Delta\Phi$ をゼロに出来ない。例えば、表2-5によれば、設計例3の様に $0.16\lambda_p$ のポンプ光の位相誤差が発生する[5-5]。

表5-2：2波長対応の超解像位相板の設計例

設計例	λ_p [nm]	λ_c [nm]	n_p	n_c	M	d [nm]	$\Delta\Phi$ [rad]	$\Delta\Phi$ [λ_p]
1	473 nm	560 nm	1.4640	1.4595	2	3047	-0.07	-0.01
2	473 nm	647nm	1.4640	1.4566	1	2091	0.12	0.02
3	473 nm	670nm	1.4640	1.4560	2	2015	1.02	0.16
4	515 nm	647nm	1.4615	1.4566	1	2125	-0.52	-0.08
5	515 nm	670nm	1.4615	1.4560	1	2204	-0.16	-0.03

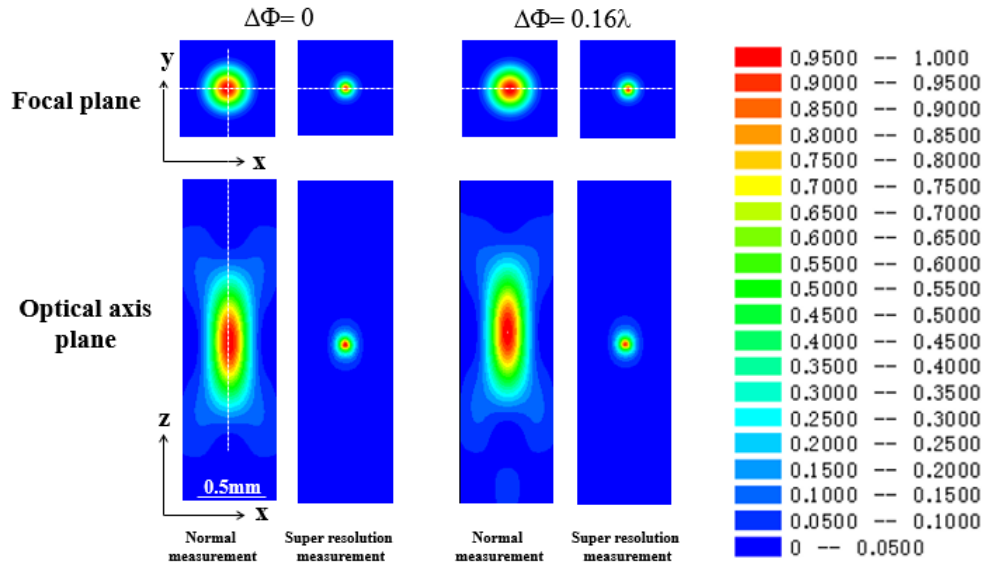


図5-37：超解像位相板で発生したポンプ光を用いた場合の超解像顕微鏡法のPSF。

図5-37は、パラメータを表5-1の条件の中でも最もポンプ光の位相誤差が大きい設計3を想定して、PSFをシミュレーション計算した結果を示す。図5-37によれば、ポンプ光に位相誤差が発生した場合の3次元集光パターンは、多少、蛍光スポットは光軸面においてわずかに広がっている。しかし、超解像顕微鏡法のPSFは、位相誤差がない場合と遜色ない微細なものとなっていることが分かる。このことを定量的に考察するために、図5

図 5-38 に位相誤差 $\Delta\phi=0$ と最大誤差をもつ $\Delta\phi=0.16\lambda_p$ の場合のポンプ光の断面強度分布をイレース光の断面図と共に比較した（図 5-37 における破線方向の断面強度分布）。図 5-38 によれば、焦点面において両者は全く差が見られない。一方、光軸面においても、多少、サイドローブが非対称になり、強度ピーク位置が 100nm 弱シフトしているが、主ピークのブロードニングは起こっていない。そして、 $\Delta\phi=0.16\lambda_p$ の場合の超解像顕微鏡法の PSF に注目すると、ポンプ光に位相誤差があっても全く影響を受けないことが分かる（図 5-39）。すなわち、ポンプ光よりもイレース光のビーム形状が PSF の特性を支配していることを示している。

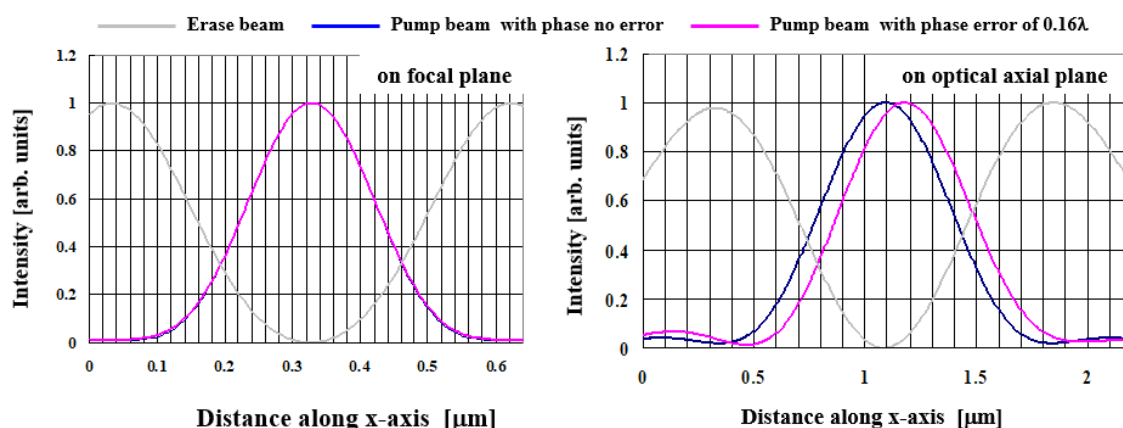


図 5-38：位相誤差 $\Delta\phi$ がゼロの場合と $0.16\lambda_p$ の場合のポンプ光の PSF の焦点面と光軸面における断面強度分布を比較（図 5-37 における破線方向の断面強度分布）。

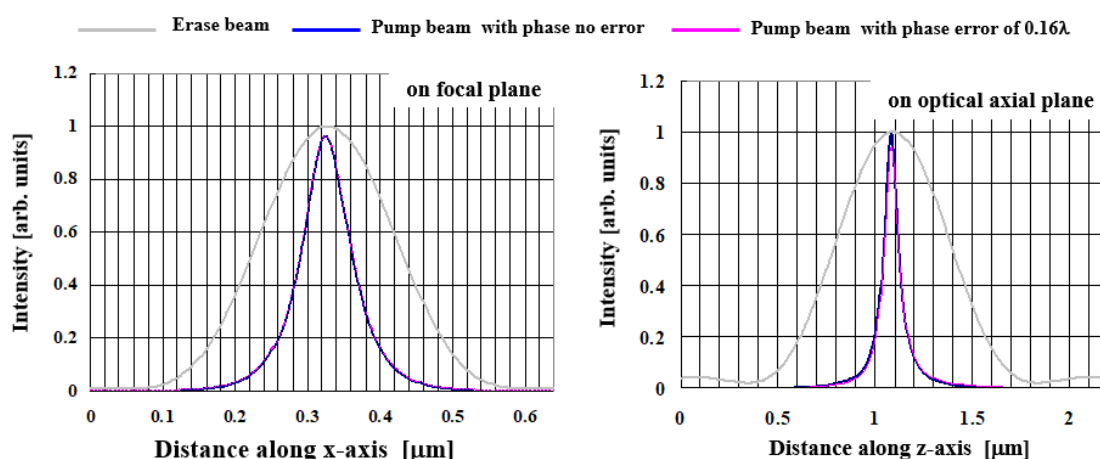


図 5-39：ポンプ光の波面に位相誤差が無いときと $0.16\lambda_p$ が発生した場合の超解像顕微鏡法における焦点面と光軸面の PSF の断面強度分布を比較。

【光学多層膜を用いた2波長対応の超解像位相板の設計例】

前節では、単一の光学硝材を用いた超解像位相板の設計法について述べた。この方法は、構造が単純で作製がし易い利点がある。この方法では、イレース光波長の光路差の任意の整数倍を加える自由度があり、これに着目して光学硝材の厚みを最適化した。この作業により、ポンプ光の波面を出来るだけ平面波に近づける様にする。しかし、イレース光波長の光路差の単位でしか厚みを調整できない。その為に、ポンプ光とイレース光の波長の組み合わせによっては $\Delta\phi$ が無視できない量になる場合が発生し、ポンプ光の集光パターンが著しく歪む可能性がある。最悪の場合には、輪帯中央部で位相が反転して中空状になる。しかし、そのような場合には、輪帯中央部において2波長対応の光学多層膜をコートする方法が適用できる[5-6]。図5-40に2波長対応の光学多層膜のモデルを示す。改めて、ポンプ光の波長を (λ_p) とイレース光の波長を (λ_e) とする。光学多層膜は (m) 層からなり、ポンプ光とイレース光に対する (i) 番目の層の屈折率をそれぞれ (n_{ip}) 及び (n_{ie}) とする。 i 番目の層の物理膜厚を (d_i) と書く。このとき、基板の製膜領域と非製膜領域を通過する際に発生するポンプ光とイレース光の位相差は、 (ϕ) と (ψ) で与えられる。

$$\frac{2\pi}{\lambda_p} [\sum_{i=1}^m (n_{ip} - 1)d_i] + \alpha = \phi + 2j\pi, \quad (5-5)$$

$$\frac{2\pi}{\lambda_e} [\sum_{i=1}^m (n_{ie} - 1)d_i] + \beta = \psi + 2k\pi \quad (5-6)$$

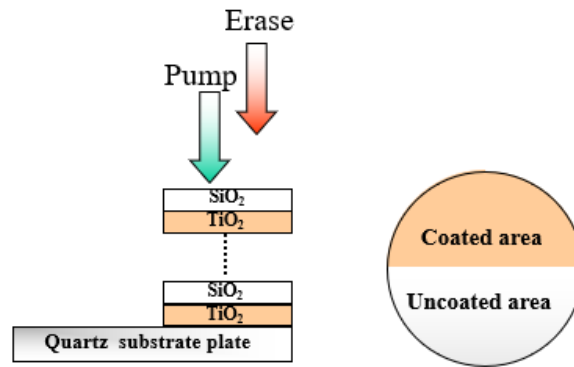


図5-40：光学多層膜を用いた2波長対応の超解像位相板。

ただし、 α と β は多層膜内の多重干渉により発生する位相遅れである。ここで (j) と (k) は任意の整数である。また、製膜領域と非製膜領域を通過したときの光路差に関しては、 (2π) の任意の整数倍の値を加えても同等なので、 $2j\pi$ と $2k\pi$ を式(5-5)と(5-6)の右辺に付加した。設計においては指定した ψ と ϕ を得るために、式(5-5)と(5-6)を満たす様な設計パラメータ、すなわち、 m 、 d_i 、 j 、 k の組み合わせを選定することに対応する。

超解像位相板の設計においては、ポンプ光に対しては位相変調を施さず、イレーズ光のみ π 位相反転を施す光学多層膜を対象とするので、 $\Psi=\pi$ と $\Phi=0$ となる条件を式（５－５）と（５－６）より探す。現実的には、 $\Psi=\pi$ となるイレーズ光に対する条件を優先し、ポンプ光に対しては出来るだけ $\Delta\Phi=0$ に近づける様に設計パラメータの組み合わせを選ぶ[5-6]。

$$\frac{2\pi}{\lambda_p} \left[\sum_{i=1}^m (n_{ip} - 1) d_i \right] + \alpha = \Delta\Phi + 2j\pi, \quad (5-7)$$

$$\frac{2\pi}{\lambda_e} \left[\sum_{i=1}^m (n_{ie} - 1) d_i \right] + \beta = \pi + 2k\pi \quad (5-8)$$

表５－３：光学多層膜の硝材の屈折率

第１層 屈折率 (TiO ₂) :	2.416@ $\lambda_p=532$ nm	2.347@ $\lambda_e=647$ nm
第２層 屈折率 (SiO ₂) :	1.478@ $\lambda_p=532$ nm	1.472@ $\lambda_e=647$ nm
基板 石英	: 1.478@ $\lambda_p=532$ nm	1.472@ $\lambda_e=647$ nm

表５－４：光学多層膜を用いた２波長対応の超解像位相板の設計例

No.	Thickness/nm		Phase/deg		Transmittance/%	
	TiO ₂ (d_1)	SiO ₂ (d_2)	$\Delta\Phi@ \lambda_p=532$ nm	$\Psi@ \lambda_e=647$ nm	$\lambda_p=532$ nm	$\lambda_e=647$ nm
Initial	730	0	-0.075	0.519	66	74
1	720	20	-0.086	0.492	66	79
2	710	50	-0.086	0.497	74	85
3	700	80	-0.081	0.500	86	91
4	690	110	-0.067	0.500	93	93
5	680	140	-0.067	0.500	93	89
6	670	170	-0.072	0.503	91	82
7	660	200	-0.083	0.508	92	76
8	650	230	-0.089	0.511	95	74

式（５－７）と（５－８）を用いれば、製膜が容易な膜厚ができるだけ薄くかつ層数の少ない条件において実用的な条件で設計が可能となる。その一例として、汎用性の高い Nd:YVO₄ レーザー ($\lambda_p=532$ nm) と Kr レーザー ($\lambda_e=647$ nm) の波長を仮定し、フレネルの反射・透過公式を用いて設計を行った。本例では、光学多層膜の材料は最も標準的な TiO₂ と SiO₂ を用い (表５－３)、光学平面精度が PV 値で $\lambda/10$ をもつ標準的な市販の石英基板上に蒸着することを仮定した。この条件で、 α と β をフレネルの漸化式を用いて数値計算を行い、

$\Delta\phi$ が最小となるパラメータの組み合わせを探索した。表5-4において、 $m=2$ 、すなわち TiO_2 と SiO_2 の2層で様々な膜厚の組み合わせを計算した Ψ 、 $\Delta\phi$ の結果を示す。表5-4によれば、 $d_1=690\text{ nm}$ 、 $d_2=90\text{ nm}$ のとき $\Delta\phi$ が最小の $\lambda/15$ となり、ポンプ光の波面精度は基板面精度よりも十分に高いことが分かる。また、この時はポンプ光とイレース光に対して 90%以上の透過率を有しており、高精度の2波長対応の超解像位相板として正確に機能することが分かる。

【結果と考察】

3次元超解像顕微鏡法においては、イレース光を3次元的な中空を持つように整形する超解像輪帯位相板はキーパーツである。この超解像位相板の設計法及びその性能に関して考察した。超解像位相板の内輪帯における径の誤差と偏芯、そして、そこで発生する位相誤差はイレース光の形状変化をもたらす。その結果として、超解像顕微鏡法で得られる PSF の形状変化を発生させる。具体的には、PSF の非対称化やブロードニングを引き起し、更にはピーク強度の低下も引き起こす。また、同様に、照明光学系で発生するポンプ光とイレース光のミスアライメントも超解像顕微鏡画像の画質を低下させる。しかし、ポンプ光とイレース光を独立にビーム整形ができる2波長対応の超解像位相板を新規に用いることで、これらの問題点を解消することができる。この位相板の構造は極めて単純であり、研磨、成膜、エッチングといった既存の加工技術と光学調整技術の精度で理論分解能を提供することが可能である。例えば、この超解像位相板を対物レンズに組み込んで、市販のレーザー走査型顕微鏡の対物レンズの回転ターレットに取り付けるだけで、極めて簡単に3次元超解像顕微鏡機能を搭載することができる。結論として、本位相板を用いることで、3次元超解像顕微鏡機能をメンテナンスフリーで安定的に誰にでも提供できることを示している。

【付録 5】

2次元超解像顕微鏡法においてはスパイラル位相板を用いる。スパイラル位相板はイレース光の波面を光軸に関して 2π 回転する様に渦状に変換する。しかし、このような機能を提供できる位相板は構造が複雑となり、製作の為に高精度な加工技術が不可欠となる。しかし、図 5-4 1 が示す様に渦状波面を大胆に量子化することで、超解像顕微鏡機能を損なうことなくスパイラル位相板を実用化レベルまで構造を簡略化できる。そして、2 波長対応のラゲール・ガウシアンビームを生成するスパイラル型位相板の設計も可能とする。

図 5-4 2 は、ベクトル電場モデルを用いて計算した NA が 1.5 における各 Step 数に対する焦点面と光軸面におけるイレース光の集光パターンを示す。それによれば、Step 数がたった 6 でも 256 の場合でも、焦点面及び光軸面において形状が同じであることが分かる。また、最も分割数が少ない Step4 については、多少、輪郭が角張るが明瞭な中空ホールが確認できる。図 5-4 3 に Step:256 と Step:4 の場合の断面強度分布を比較した。図 5-4 3 によれば、Step:4 の場合において、破線部が示す 45° 方向の断面強度分布が 17% ほど全体的に低下する。しかし、Step:256 と同程度にタイトな中空ホールが形成できていることが確認できる。

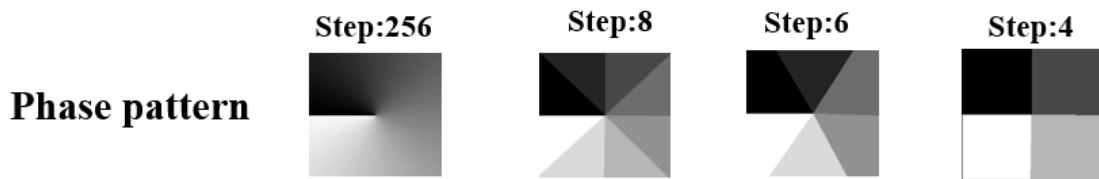


図 5-4 1 : 量子化したときの LG ビームの波面構造。

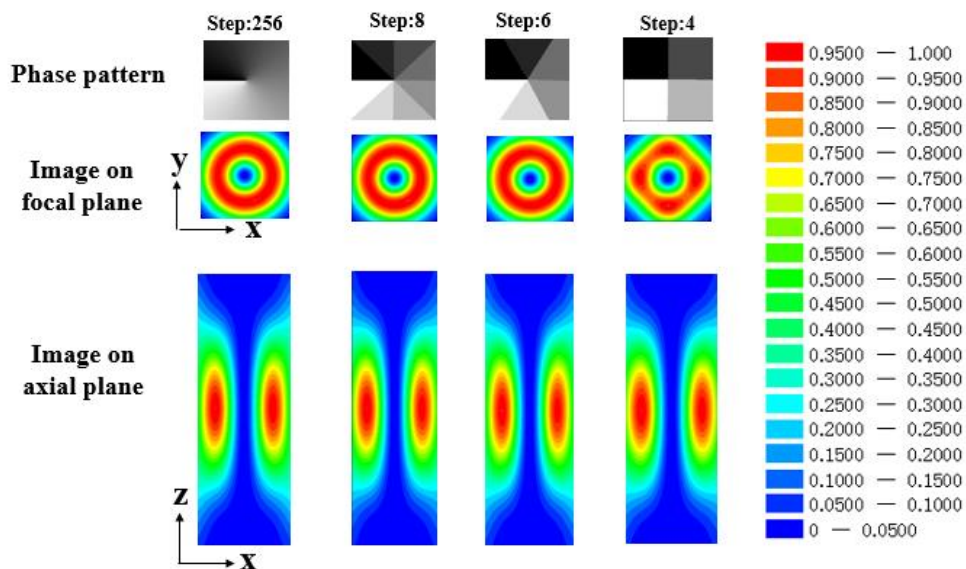


図 5-4 2 : Step:256、Step:8、Step:6、Step:4 のパターンの波面分布をもつイレース光の集光パターン。

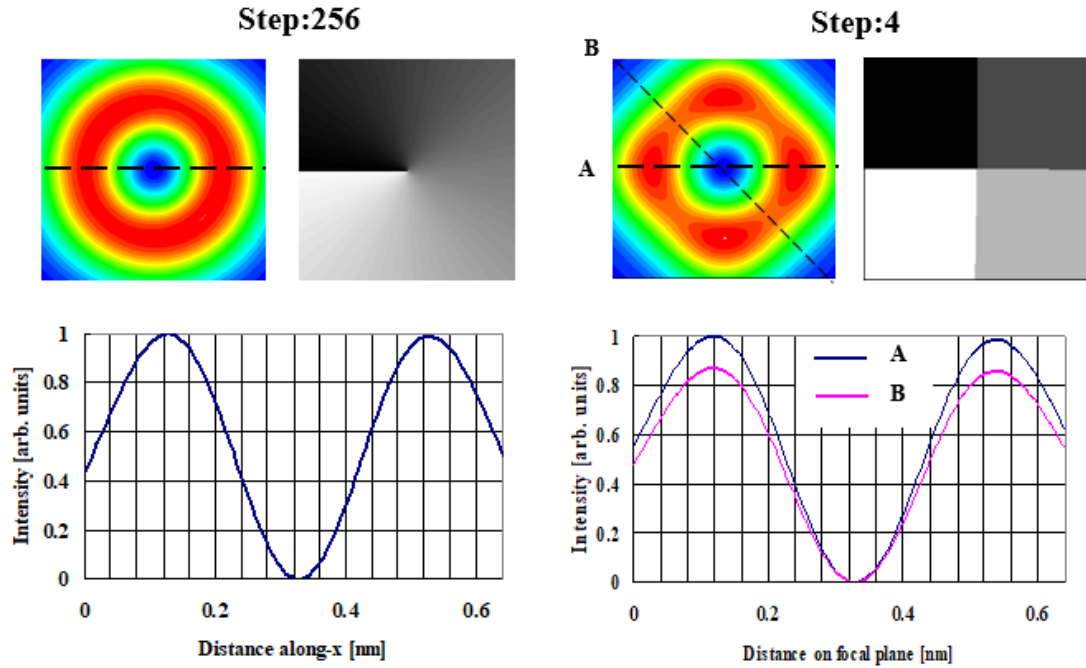


図 5－4 3：Step:256 と Step:4 のパターンの波面分布をもつイレース光の集光パターンの断面強度分布の比較。

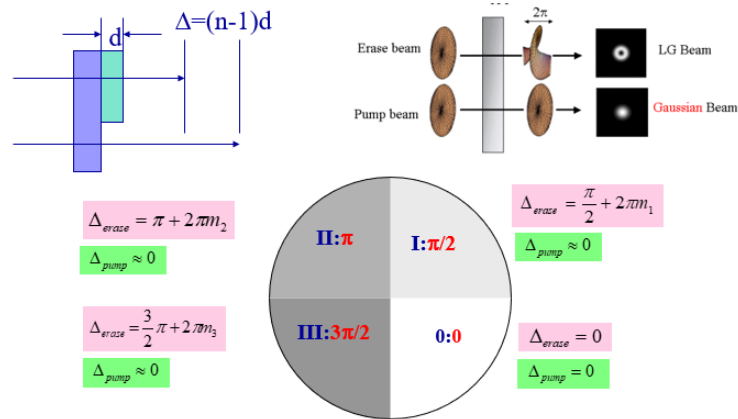


図 5－4 4： ラゲール・ガウシアンビーム生成用の 2 波長対応の超解像位相板の概念図。

Step4 については、構造が単純なためポンプ光とイレース光を独立にビーム整形ができる 2 波長対応の超解像位相板の設計が可能となる。図 5－4 4 には、ラゲール・ガウシアンビーム生成用の 2 波長対応の超解像位相板の概念図を示す。すなわち、輪帯型位相板と同様に、位相板は独立にポンプ光ビームには影響を与えず通常のガウシアンビームとして集光できる機能をもつ（図 5－3 6）。4 分割した各領域において、イレース光に対しては最適化した位相差を与え、一方、ポンプ光に対しては出来るだけ位相差をゼロに近づける様に設計する。その際の設計パラメータとして、イレース光に対して 2π の整数倍 (m) の位相差与えて

も位相を変化しないことに着目して、ポンプ光の位相変化がゼロに近づける様に m を選ぶ。
すなわち、イレース光は式、(5-A1) から (5-A4) を満たす[5-7]。

$$\frac{2\pi}{\lambda_e}(n_e - 1)d_0 = 2m_0\pi, \quad (5-A1)$$

$$\frac{2\pi}{\lambda_e}(n_e - 1)d_1 = \frac{\pi}{2} + 2m_1\pi, \quad (5-A2)$$

$$\frac{2\pi}{\lambda_e}(n_e - 1)d_2 = \pi + 2m_2\pi, \quad (5-A3)$$

$$\frac{2\pi}{\lambda_e}(n_e - 1)d_3 = \frac{3\pi}{2} + 2m_3\pi, \quad (5-A4)$$

一方、ポンプ光に対しては、(5-A5) から (5-A8) を満たし、 Δ_0 、 Δ_1 、 Δ_2 、 Δ_3 を出来るだけ
ゼロに近づける様に最適化を行う。

$$\frac{2\pi}{\lambda_p}(n_p - 1)d_0 = \Delta_0 + 2l_0\pi, \quad (5-A5)$$

$$\frac{2\pi}{\lambda_p}(n_p - 1)d_1 = \Delta_1 + 2l_1\pi, \quad (5-A6)$$

$$\frac{2\pi}{\lambda_p}(n_p - 1)d_2 = \Delta_2 + 2l_2\pi, \quad (5-A7)$$

$$\frac{2\pi}{\lambda_p}(n_p - 1)d_3 = \Delta_3 + 2l_3\pi, \quad (5-A8)$$

たとえば、ポンプ光： $\lambda_p=515 \text{ nm}$ ($n_p=1.4615$)、イレース光： $\lambda_e=670 \text{ nm}$ ($n_e=1.456$) の条件で、
最適化設計を行った例を表 5－5 に示す。表 5－5 によれば、ポンプ光の位相ずれは最大で
も $0.04\lambda_p$ であり、精密光学基板の平面度： $\lambda_p/20$ より上回っている。図 5－4 5 に、設計し
た位相板を通過して位相誤差をもつポンプ光と完全な平面波をもつポンプ光を $\text{NA}=1.5$ の
対物レンズで集光したときの焦点面におけるパターンを比較した。それによれば、殆ど、形
状も大きさも区別がつかない。そして、図 5－4 5 に示す破線部の断面強度分布を比較して
もほぼ一致している (図 5－4 6)。また、蛍光色素分子をナイルレッドとし、イレース光
のピークフォトンフラックスを $10 \times 10^{25} / \text{cm}^2 / \text{sec}$ と仮定して超解像顕微鏡法のスポット像 (図
5－4 7) 及び断面強分布 (図 5－4 8) を比較しても、全く同じ結果を与える。すなわち、
輪帯型位相板と同様に実用的な設計が可能となる。

表 5－5：スパイラル位相型の超解像位相板の設計例

j	次数： m_j	膜厚： d_j [nm]	イレース光位相： ϕ_j [rad]	ポンプ光絶対位相： ψ_j [rad]	ポンプ光相対位相： ψ_j [rad]	ポンプ光相対位相： ψ_j [2 π]
領域 0	0	0	0	0	0	0
領域 I	2	3306	$1/2\pi$	18.61	-0.24	-0.04
領域 II	1	2204	π	12.41	-0.16	-0.02
領域 III	0	1102	$3/2\pi$	6.20	-0.08	-0.01

ポンプ光： $\lambda_p=515\text{nm}$ ($n_p=1.4615$)、イレース光： $\lambda_e=670\text{nm}$ ($n_e=1.456$)

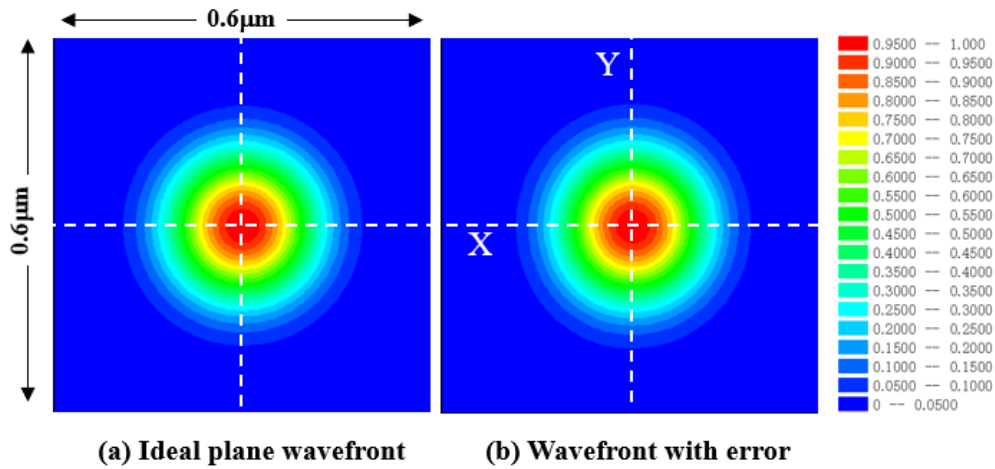


図 5－4 5： 完全な平面波をもつポンプ光と設計した位相板を通過して位相が乱れたポンプ光を集光したときの焦点面におけるビーム形状。

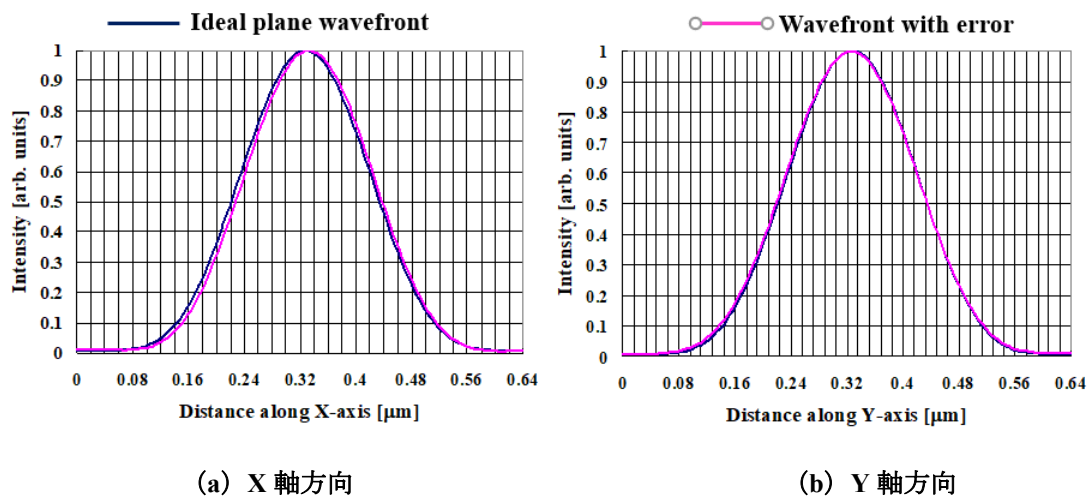


図 5－4 6： 図 5－4 5 に示す破線部の断面強度分布の比較。— 平面波の位相面をもつポンプ光の集光パターン。— 4 分割型 2 波長超解像位相板を通過した位相誤差をもつポンプ光の集光パターン。

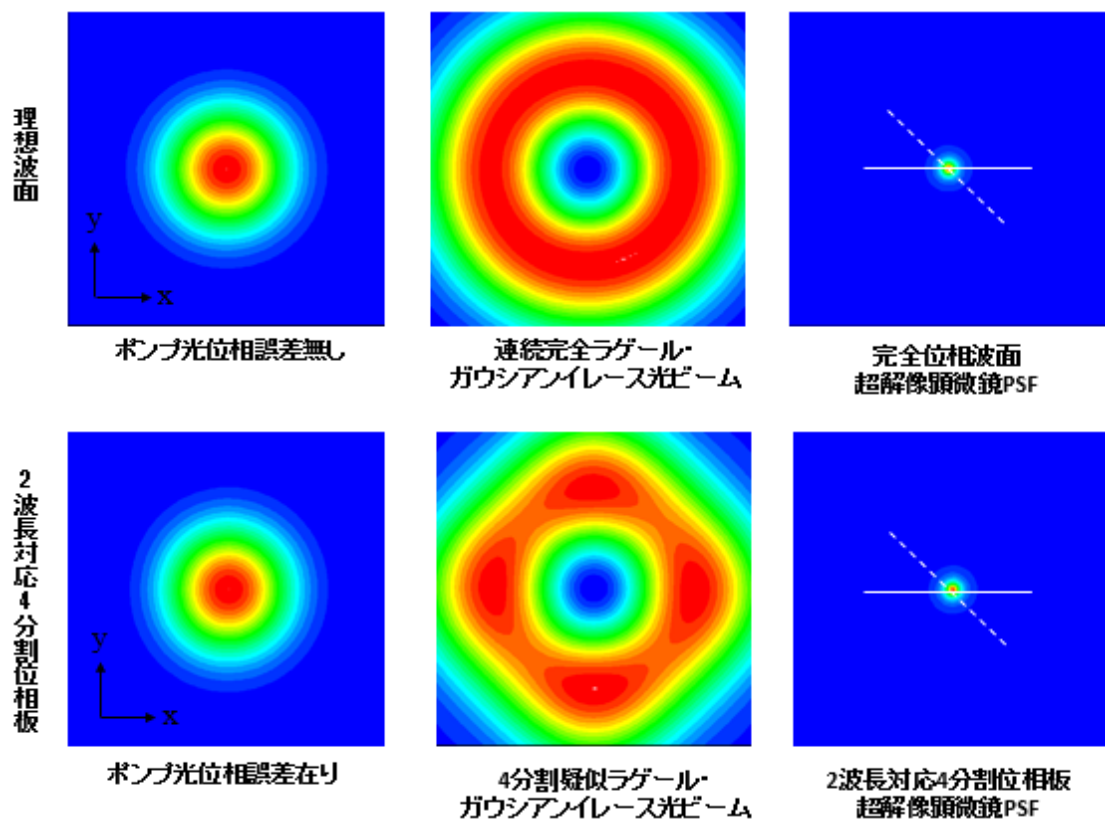


図5－47：理想波面も過程したときの焦点面における超解像顕微鏡法のPSFスポットと4分割2波長対応超解像位相板を用いた時のPSFスポットの比較。

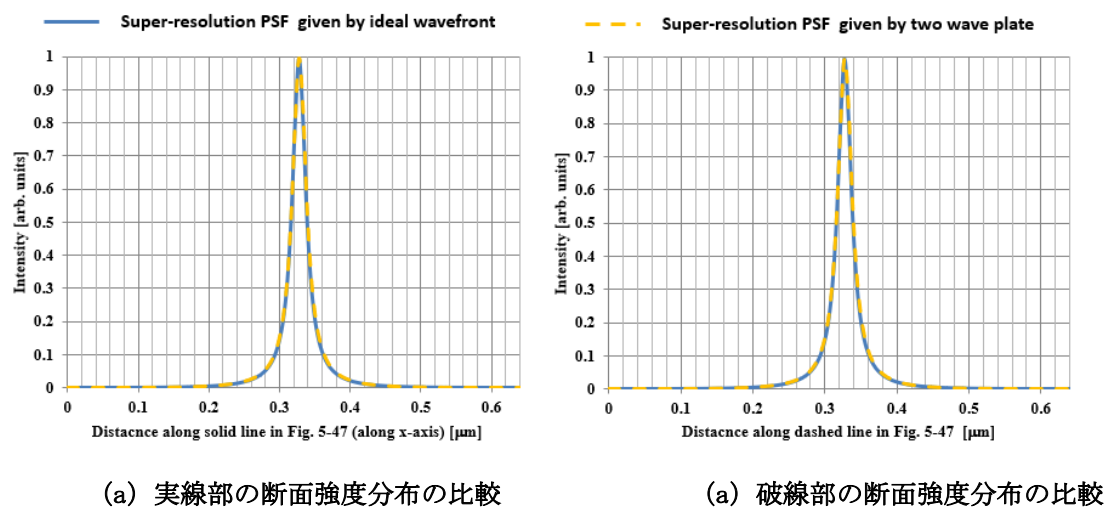


図5－48：図5－47における実線部と破線部における断面強度分布の比較。

この考え方はスーパーダークホールを生成するハイブリッド位相板の設計においても応用が可能である。図 4-13 によれば、スーパーダークホールを生成するための位相分布は複雑な構造をしている。しかし、外輪帯部と内輪体部において 4 段階で $\pi/2$ ずつ不連続に変化する簡略化された位相分布であっても、連続的に変化する位相分布をもつ場合であっても、ほとんど同じ結像性能を与える。図 5-49 において、連続変化する位相波面と簡略化された位相波面をもつイレース光の集光パターンと焦点面(a)及び光軸面(b)における断面強度分布を比較した。本結果によれば、両者の形状は殆ど一致しており、実用的には簡略化された波面を用いても遜色がないことが分かる。簡略化された位相波面を生成するハイブリッド位相板に関しては、第 11 章で再び取り上げて論議を行う。

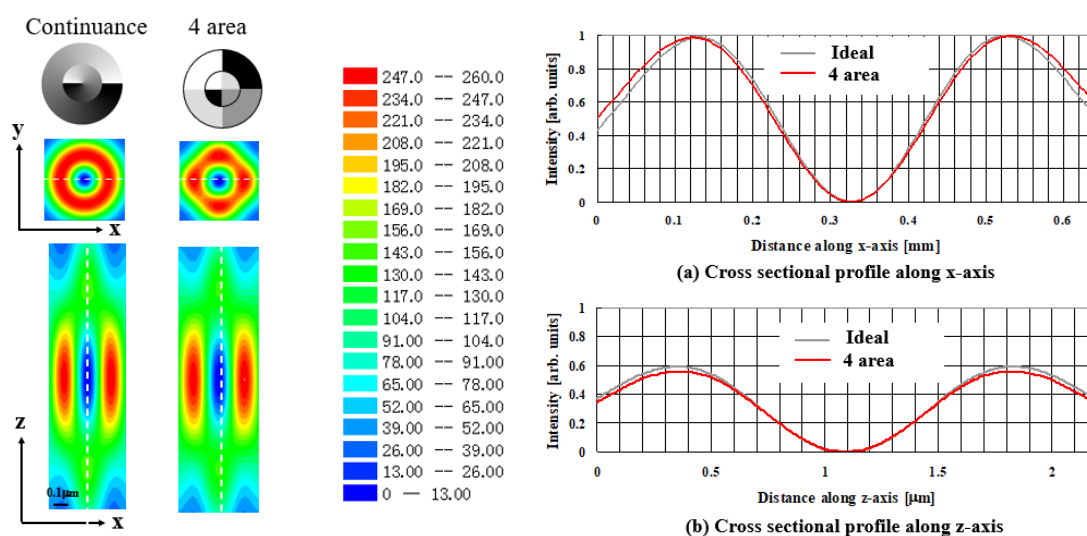


図 5-49：連続変化と Step 数 4 のハイブリッド位相板を用いたときのイレース光の集光パターンと焦点面(a)及び光軸面(b)における断面強度分布の比較。

【第 5 章：参考文献】

- 5-1) Y. Iketaki, T. Watanabe, N. Bokor, and M. Fujii, e-Journal of Surface Science and Nanotechnology, **6**, 175(2008) ; <https://doi.org/10.1380/ejsnt.2008.175>.
- 5-2) N. Bokor, and N. Davidson, Opt. Commun. **279**, 229(2007);
<https://doi.org/10.1016/j.optcom.2007.07.014>.
- 5-3) N. Bokor, Y. Iketaki, T. Watanabe, and M. Fujii, Opt. Commun. **281**, 1850(2008) ;
<https://doi.org/10.1016/j.optcom.2007.05.069>.
- 5-4) Y. Iketaki, Appl. Phys. Express **3**, 085203 (2010); <https://doi.org/10.1143/APEX.3.085203>.
- 5-5) https://jp.optosigma.com/ja_jp/category_opt_d_opt_d01.
- 5-6) Y. Iketaki, K. Kitagawa, K. Hidaka, N. Kato, A. Hirabayashi, and N. Bokor, Rev. Sci. Instrum. **85**, 073701 (2014) ; <https://doi.org/10.1063/1.4885465>.
- 5-7) N. Bokor, and Y. Iketaki, Appl. Spectroscopy **68**, 353 (2014); <https://doi.org/10.1366/13-07249>.

第6章 蛍光抑制特性のデータベース化

要旨

3次元超解像顕微鏡法の実用化においては、イレース光のビーム整形制御技術と並んで、蛍光色素分子の分光特性も結像特性を決定する。なぜなら、各分子における独自の蛍光抑制効果の誘導の様式と程度が、直接、超解像機能に影響を及ぼす。そこで、ナノ秒：Ti サファイアレーザーを主体とし、その他各種レーザー光源を用いて近赤外領域から可視領域のイレース光を生成し、蛍光タンパクを含め各種蛍光性分子の蛍光抑制特性を調査し総括を行った。結論として、評価した全ての分子において、蛍光抑制効果を誘導できることが確認できた。

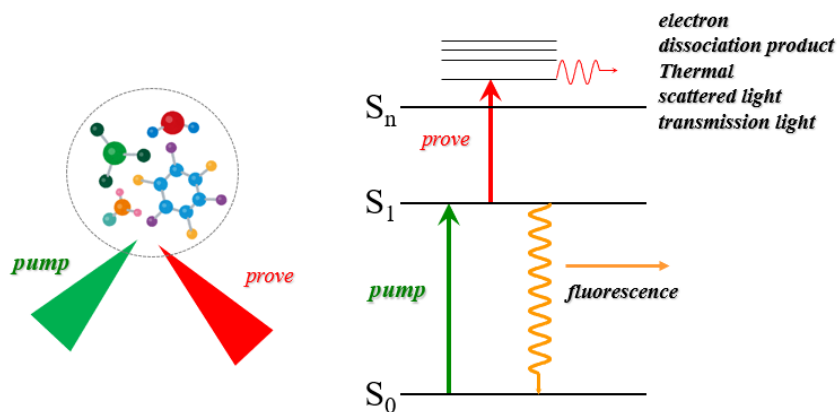


図6－1：2波長蛍光分光法。

【緒言】

3次元超解像顕微鏡法は波面制御技術と蛍光分光技術の融合技術であり、特に後者におけるポンプ光とイレース光で誘導される蛍光抑制効果を基礎にしている。第1章で述べた様に、蛍光抑制効果の存在は気相分子を分析対象とする物理化学の研究者の間で広く知られ、これを用いたレーザー分光法は2波長分光法として確立されている（図6－1）。この方法では、まず第1番目のレーザー光（ポンプ光）で分子を S_1 状態へ励起し、次に第2番目のレーザー光（プローブ光）を照射して S_1 状態から更に高位の S_n 状態へ励起する。この時の分子から放出される発光や反応生成物を観測することで励起分子の構造解析や光反応過程の追跡を行う[6-1,6-2]。特に、プローブ光照射による蛍光量の減少量の変化を観測する手法は2波長蛍光分光法として知られている。この2波長蛍光分光法により分子の蛍光を人為的に抑制できることに着目し[6-33,6-4]、この現象と波面制御光学を導入した融合技術が3次元超解像顕微鏡法に外ならない。この蛍光抑制効果の誘導の様式と程度が直接的に結像性能に影響を及ぼす。従って、提案する超解像顕微鏡技術の実用性と汎用性を見極め

るためには、各種蛍光性分子の蛍光抑制特性に関してデータベース化を行うことが不可欠である。特に、蛍光抑制特性は、光源やフィルターの仕様を規定するので、装置設計を行う際の重要な知見となる。しかし、蛍光抑制特性に関する実験的な報告は、第2章の表2-1で示すローダミン6Gなどの一部の分子に限られていた[6-5,6-6]。そこで、ナノ秒：Ti サファイアレーザーを主体とし、その他各種レーザー光源を用いて近赤外領域から可視領域のイレーズ光を生成し、蛍光タンパクを含め各種蛍光性分子の蛍光抑制特性を調査し総括を行った。

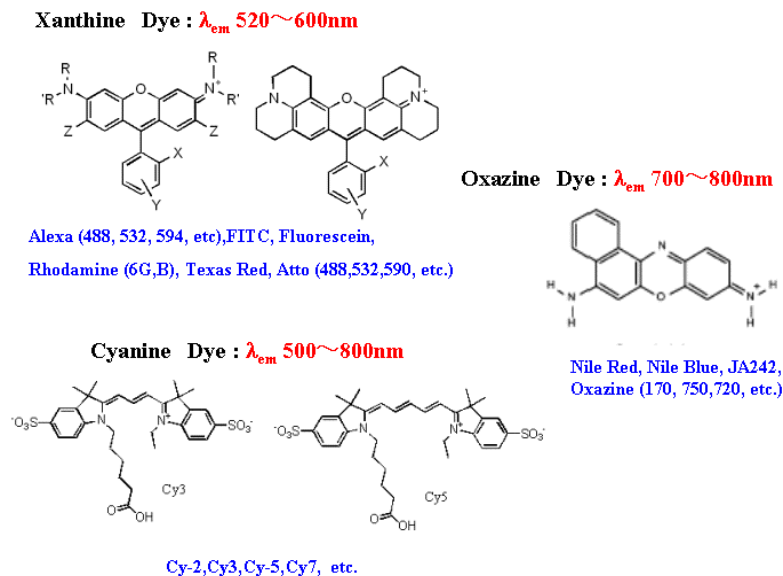


図6-2：代表的な蛍光色素分子の分子骨格。

表6-1：生物標本で用いられる蛍光色素分子の分類

系統	特徴	代表的な蛍光色素
キサテン系	フルオレセインを基本骨格とする。波長：520~680nm の黄色から赤領域で蛍光発光する。光化学的な安定性は良い。	FIT、ローダミン6G、ローダミンB、テキサスレッド、Alexa532、Atto532 など
オキサジン系	610~800nm の赤色から近赤外領域で蛍光発光する。光化学的な安定性は極めて良い。	ナイルブルー、クレシルバイオレット、オキサジン など
シアニン系	540~1200nm の緑から赤外までの極めて広い波長領域で蛍光を出す。メチレン鎖が長くなるほど、長波長になるが、光化学的な安定性は良くない。	DOCT、HITC、Cy2、Cy3、Cy5、Cy7 など

【調査対象となった蛍光色素分子】

生物標本で用いられる蛍光色素分子は、主に次の3種類の分子骨格をもつ分子群に分類される。すなわち、1) キサンテン系 (Xanthine)、2) オキサジン系 (Oxazine)、3) シアニン系 (Cyanine) である。図6-2に、上記の3系統の代表的な分子の構造を示す[6-7]。

キサンテン系には、ローダミン6Gをはじめとしてフルオレセインを基本骨格とする分子が属する。波長: 520~680 nm の黄色から赤領域で蛍光発光する。光化学的な安定性は良い。特に、吸収断面積及び蛍光断面積が大きく、弱い励起光で明るい蛍光発光を起すことができるので、生物試料の染色のみならず、色素レーザーの媒質にも利用される。

オキサジン系には、ナイルブルー、クレシルバイオレット、オキサジンなどの分子が属し、610~800 nm の赤色から近赤外領域で蛍光発光する。キサンテン系と比較して、蛍光波長及び吸収波長が 100 nm 程、長波長側にシフトしている。光化学的な安定性は極めて良く、一般的にキサンテン系よりも優れている。

シアニン系は、長いメチレン鎖:-(CH=CH)_n-を含んだ化合物である。メチレン鎖の n が1ずつ増加することにより、蛍光波長が 100 nm ずつ長波長側にシフトするので、540~1200 nm の緑から赤外までの極めて広い波長領域で蛍光を出す分子を自在に合成することができる。しかし、反面、メチレン鎖が長くなるにつれて、光化学的な安定性が悪くなるという欠点がある。シアニン系には、DOCT、HITC、Cy2、Cy3、Cy5、Cy7 などが分類される。

現在では、これらの3系統の蛍光色素分子をベースに様々な誘導体が合成され、生物への適合性に優れた商用の蛍光色素分子が発売されている。それらの代表的なものとして、Alexa シリーズ (米: Molecular Probe Inc.) と Atto シリーズ (独: ATTO-TEC GmbH) が発売されており (図6-3を参照のこと)、これらは生物用蛍光顕微鏡のスタンダードとなっている[6-8,6-9]。本評価実験では、表6-2の様に1) キサンテン系 (Xanthine)、2) オキサジン系 (Oxazine)、3) シアニン系 (Cyanine) の分子をピックアップし、各蛍光色素分子における蛍光抑制効果を評価した。特に、生物観察で多用されるキサンテン系分子に関しては、Alexa シリーズと Atto シリーズの商用色素分子を含め13種類の分子を評価した。また、近年、遺伝子発現型の蛍光標識である蛍光タンパク、すなわち、E-GFP、YFP、Ds-Red の3種類についても評価した[6-10]。

表6-2: 蛍光抑制効果に関する評価の対象となった蛍光色素分子

系統	蛍光色素分子
キサンテン系	ローダミン6G、ローダミン B、テキサスレッド、Alexa532、Alexa546、Alexa568、Alexa594、Atto532、Atto550、Atto590、Atto590、Atto620、Atto647
オキサジン系	ナイルブルー
シアニン系	Cy5
蛍光タンパク	E-GFP、YFP、Ds-Red

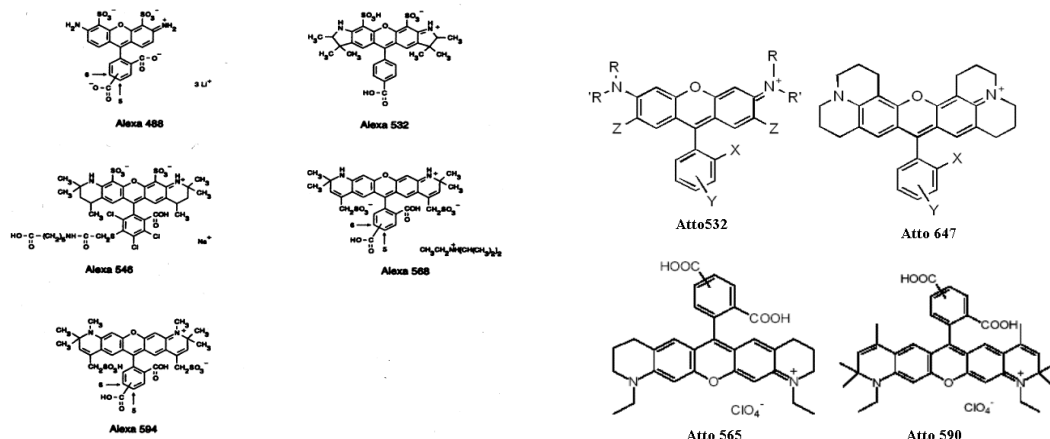


図 6-3 : Alexa シリーズと Atto シリーズの分子構造の例。

【実験方法及び装置】

図 6-4 と図 6-5 に、蛍光抑制効果を評価するための 2 波長蛍光分光計測装置の構成と概観写真を示す。Nd:YVO₄ レーザー光源 (Spectra Physics Inc. : Mirennia X) の 2 倍高波である 532 nm をポンプ光として用い、電気光学素子 (EOM) により 7nsec@10Hz (Conoptics.Inc) のパルス列に変調する。本実験では、E-GFP の評価実験が含まれるが、波長 532 nm のポンプ光では、蛍光励起できないので、この場合、半導体パルスレーザー (Toptica Inc.:I-pulse) : 波長 473 nm を用いた。イレース光にはパルス Nd:YAG レーザー (2 倍高波) 励起の Ti:サファイアレーザー (LOTIS TII 社 : LT-2212) を用いた。本レーザーは、690 nm~1000 nm の波長可変で発振でき、波長 800 nm において最大 30 mJ で時間幅 10 nsec のパルス列を発振できる。本実験では、外部パルス発振器により、EOM と Ti:サファイアレーザーの外部トリガー制御を行った。これにより、ポンプ光パルスとイレース光パルスの同期を取ることができる。評価法としては、同期の取れた上記パルス光をコンバインして、NA:0.7 の対物レンズで試料に集光し、走査ステージ上に設置した試料から発光する蛍光信号を分光器システムで計測する。蛍光抑制効果の観測では、ポンプ光単独照射時とイレース光とポンプ光の同時照射時における蛍光スペクトルの変化を計測する。尚、分光器システムは分光器と ICCD カメラから構成され、回折格子をミラーに交換することで 2 次元の蛍光像を直接見ることもできる。測定では、ND フィルターによりイレース光のパワーを変化させて、蛍光抑制効果の誘導時の挙動変化を調べる。また、ポンプ光とイレース光の散乱光を分光器の手前でカットするために、ノッチフィルターとハイパスフィルターを設置した。測定対象となる蛍光色素分子は、次の 3 種類の方法でスライドガラス上に薄膜化した (図 6-6)。

- ・ ローダミン 6 G、ローダミン B、テキサスレッド、Atto シリーズ及びナイルブルーはエタノールで溶解できるので、PMMA 樹脂に分散して薄膜化した。製法としては、PMMA 粒塊 2.6 g を酢酸エチル 10 ml に溶解させ、そこに 0.6 mmol/l で溶解したメタノール溶

液 10 ml を加えることで混合液を作製する。これを、攪拌棒でスライドガラス上に滴下させ、カバーガラスで覆う。そして、2 日間放置して乾燥凝固させる。この様にすると、約 10 μm 厚程度の薄膜サンプルが作製できる。

- Alexa532、Alexa546、Alexa568、Alexa594、及び Cy5 は、媒質が水溶液中で使用する事が前提なので、これらの分子を 0.6 mmol/l で水溶液に溶解させ、それを加熱溶解させたアガロース中に分散させた。そして、攪拌棒でスライドガラス上に滴下させ、カバーガラスで覆う。しかし、この場合は PMMA と異なり、均一には分散できず、濃度斑が発生するので、本測定結果においては定量性に劣ることを記しておく。
- 蛍光タンパク E-GFP、YFP、Ds-Red については（図 6－7）、抽出した原液をスライドガラス上に滴下し、カバーガラスでシールする。この状態で、放置・乾燥させると、カバーガラスとスライドガラス間で、凝固して薄膜化する。尚、蛍光タンパクの抽出に関しては、オリンパス株式会社の細胞解析グループの協力を得た。

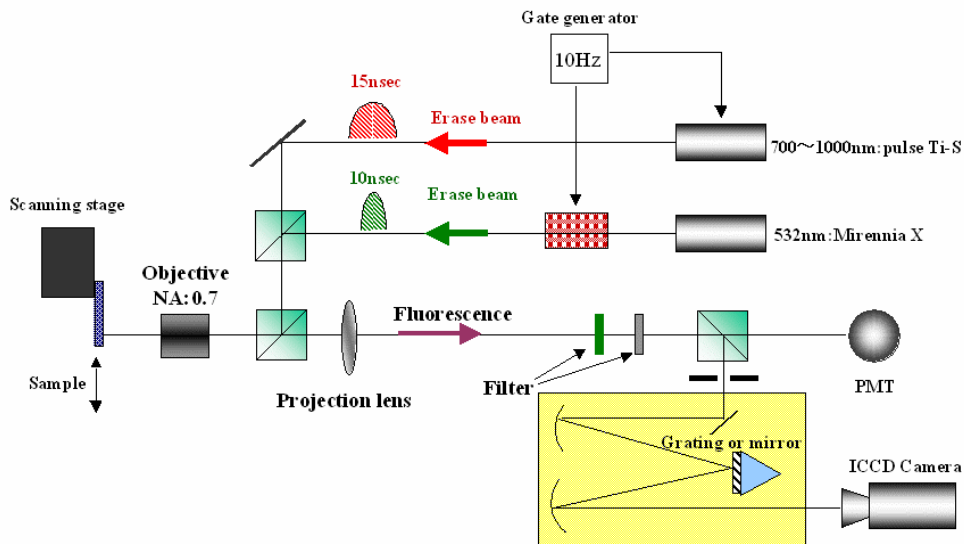


図 6－4：2 波長蛍光分光計測装置。

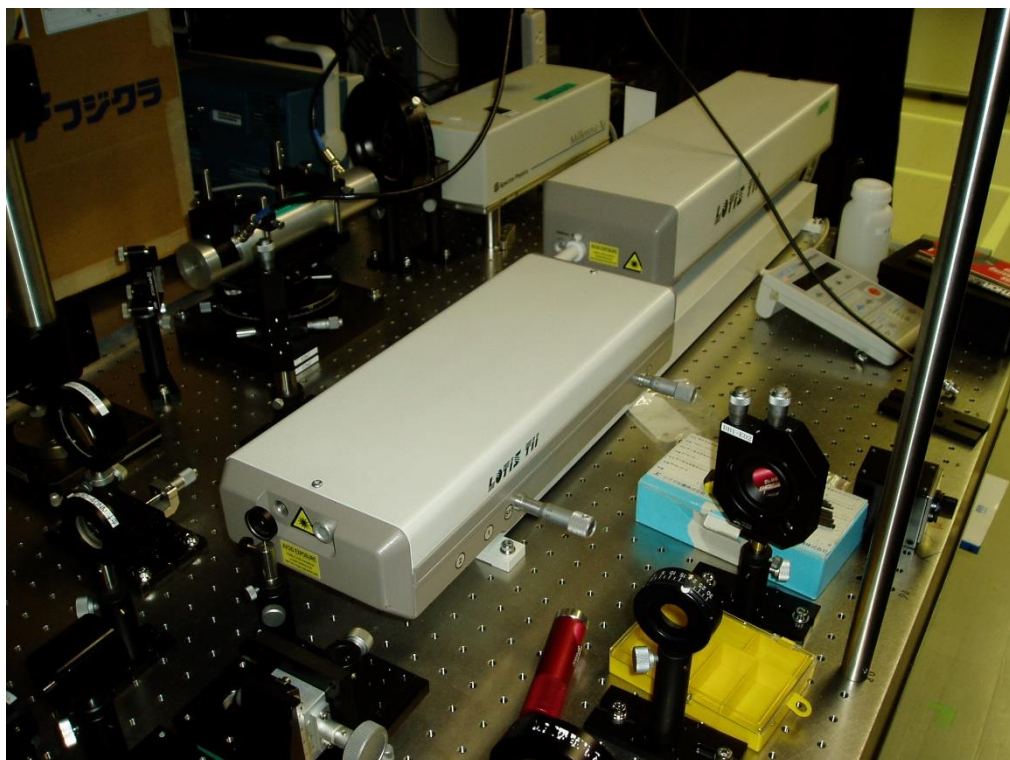


図 6－5：2 波長蛍光分光計測装置の概観写真図。

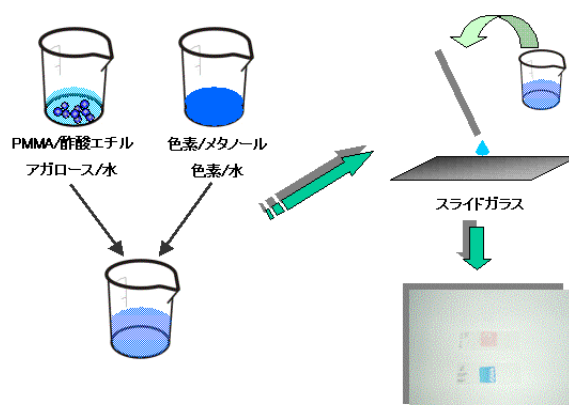


図 6－6：蛍光色素分子調製法の概念図。

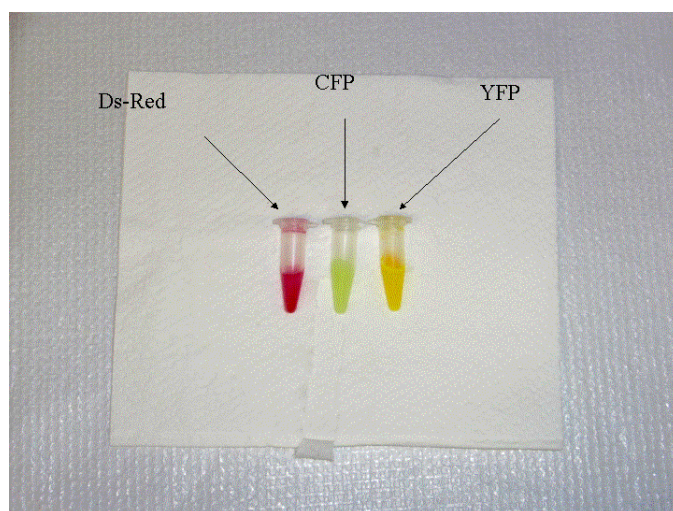


図 6－7：抽出した蛍光タンパク。

蛍光抑制効果の計測は、以下に述べる手順で行った。すなわち、イレース光の波長設定を行い、そして、スライドガラスに製膜した試料を走査型の試料ステージに搭載する。その後、1) 焦点位置あわせを行った上、ポンプ光の単独照射を行い、試料からの発光する蛍光スポットと蛍光スペクトルを観測する。次に、2) ポンプ光とイレース光を同時照射して、同様の方法で蛍光信号を観測する。再び、3) ポンプ光単独照射を行い、試料が褪色しているか否かを確認する。最後に、4) イレース光の単独照射を行い、イレース光により発光現象が起きているか否かを確認する。5) 褪色の影響を排除する為に試料ステージを移動して、新しい試料面に照明できる様にする。ND フィルターを交換して、イレース光強度を変えて、以上の1) から5) の作業を繰り返す。

【測定結果】

1) オキサジン系 (ナイルブルー)

図 6－8 はナイルブルーの蛍光スペクトルであり、それによれば、蛍光スペクトルは 550 nm から 750 nm の間に広く分布している[6-11]。本調査では、イレース光波長 (λ_e) を 750 nm と 832 nm に設定し、蛍光抑制効果に関して調べた。図 6－9 は、その蛍光抑制効果の誘導時における代表的な蛍光スペクトルを示す。イレース光の励起エネルギーは、それぞれ、 $2n$ J/pulse から $7 \mu\text{J/pulse}$ に対応する。計測の手続きに従って、最初に、ポンプ光単独照射のリファレンススペクトルを測定する (赤ー)。続いて、ポンプ光とイレース光を同時照射したときの蛍光抑制

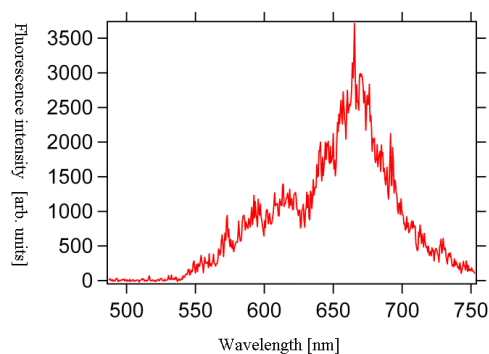


図 6－8：ナイルブルー:532nm 励起の
蛍光スペクトル。

効果誘導時のスペクトルを測定する（黄—）。次に、イレース光単独照射時のスペクトルを計測し、イレース光によるバックグラウンド信号を確認する（緑—）。最後に、再びポンプ光単独照射時の蛍光スペクトル（青—）を計測し、一連の作業でナイルブルーの褪色が無いかどうかを確認した。また、図 6-10 は、イレース光波長が 832 nm であるときの、蛍光スポットの変化を示す。図 6-9 によれば、現象の誘導の様式と程度は波長によって異なるが、何れの場合も蛍光抑制効果が確認できる。注目すべき点として、蛍光抑制効果誘導後のポンプ光単独照射によるスペクトルによれば、全ての場合において褪色は全く確認されず、期待通り光化学的に安定な蛍光色素分子であることが分かる。しかし、イレース光波長が異なると図 6-9 (a)、(b) が示す様に、イレース光単独照射でも強い蛍光スペクトルが観測されている。これらの点については、第 10 章で考察する。

図 6-11 はナイルブルーの蛍光抑制特性であり、集光点におけるイレース光（波長： $\lambda_e=832$ nm）の強度、すなわち、集光点におけるピークフォトンフラックスを変化させた時の蛍光抑制効果の変化を示している。尚、この時、イレース光の照射強度からピークフォトンフラックスの変換には、式（2-A12）を用いた。図 6-11 によれば、イレース光の強度の増加とともに蛍光強度が減少していることが分かる。図 6-10 から、明らかな様に、ポンプ光とイレース光の同時集光時にはほぼ蛍光スポットが消失しており、空間的にも蛍光が良く抑制されていることが確認できる。尚、同じオキサジン系のナイルレッドの蛍光抑制特性に関しては改めて第 7 章で述べる。

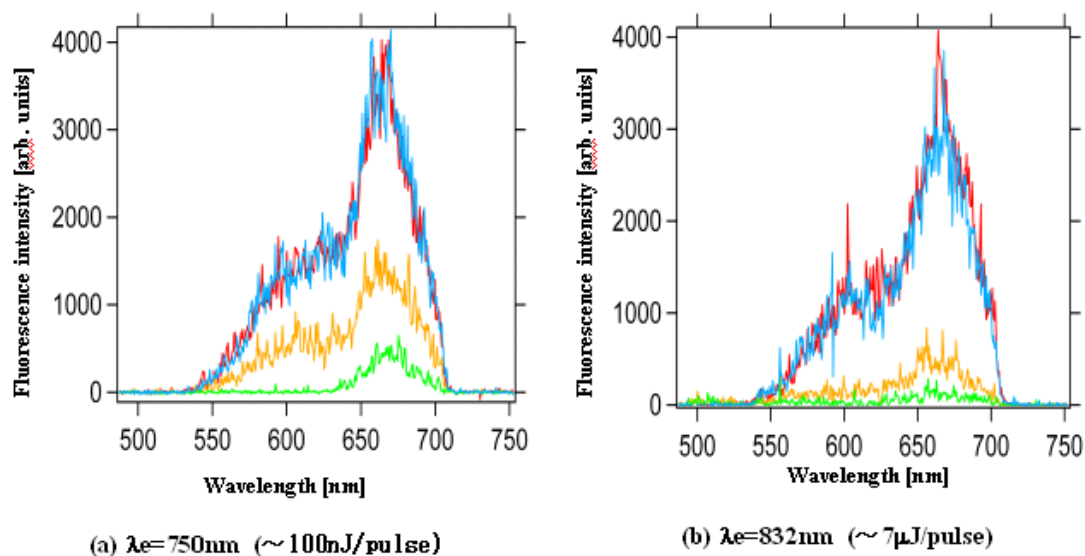
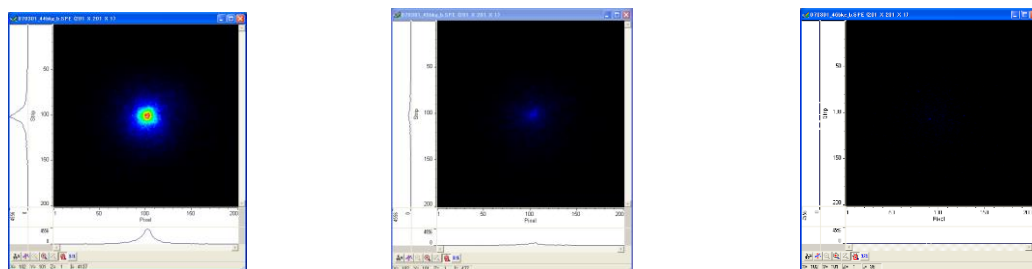


図 6-9：ナイルブルーにおける蛍光抑制効果誘導時の蛍光スペクトルの変化。



(a) ポンプ光単独照射

(b) ポンプ光・イレース光同時照射

(c) イレース光単独照射

図 6-10：波長：832 nm のイレース光を照射したときの蛍光スポット像の変化。

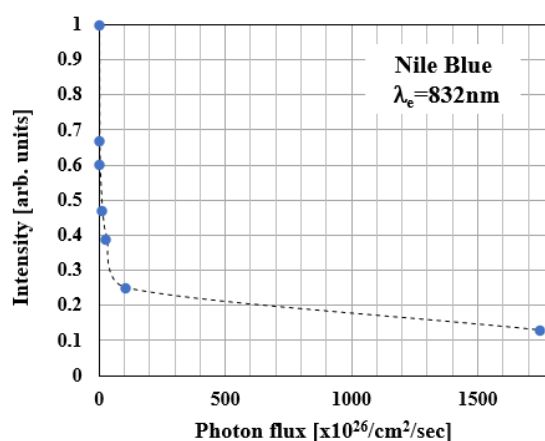


図 6-11：ナイルブルーの蛍光抑制特性 ($\lambda_e=832\text{ nm}$)。

2) キサンテン系 (ローダミン B、テキサスレッド、Alexa532、Alexa546、Alexa568、Alexa594、Atto532、Atto590、Atto620、Atto647)

図 6-12 と 6-13 に代表的なキサンテン系色素分子に関する蛍光抑制特性を示す。すなわち、ローダミン B、テキサスレッドを用いた時の、集光点におけるイレース光 (波長： $\lambda_e=730\text{ nm}$) の強度を変化させた時の蛍光ピークの強度変化を示している。測定手順は、全くナイルブルーと同じである。やはり、イレース光の強度の増加とともに蛍光強度が減少している。図 6-12 と 6-13 において、**青—**はポンプ光とイレース光の同時照射時の蛍光強度を示す。**赤—**は蛍光抑制効果誘導後にポンプ光を単独照射したときの蛍光強度であり、褪色の程度を示す。また、**緑—**はイレース光単独照射したときの蛍光強度を示す。測定で用いたイレース光の強度においては、顕著な褪色やイレース光照射による発光は観測されていない。尚、キサンテン系の蛍光色素分子で最も代表的なローダミン 6 G に関しては第 10 章において、イレース光照射による副次発光過程を含め詳しく後述する。

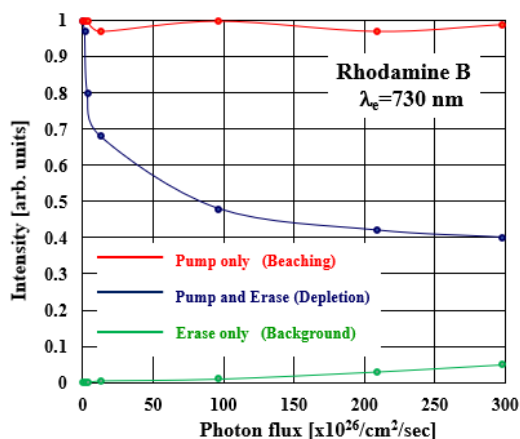


図 6 - 1 2 : ローダミン B の蛍光抑制特性。

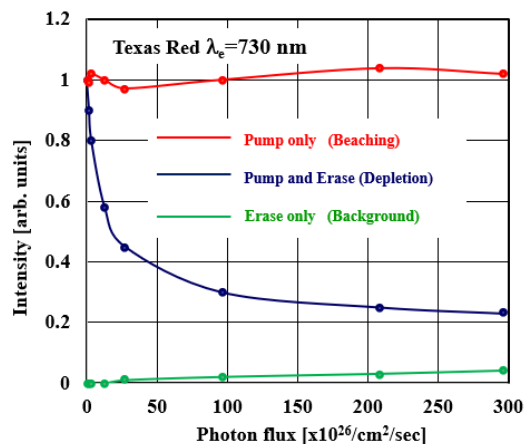


図 6 - 1 3 : テキサスレッドの蛍光抑制特性。

一方、図 6 - 1 4 と 6 - 1 5 は、イレーズ光波長： $\lambda_e=730\text{ nm}$ における商用色素 Alexa と Atto の各蛍光色素分子の蛍光抑制特性を、代表的な蛍光色素分子であるローダミン 6G のそれと共に示す。基本的には、ローダミン B、テキサスレッドと同様に、イレーズ光の集光点のピークフォトンフラックスの増加とともに蛍光強度が減少している。同じイレーズ光のピークフォトンフラックスに対して、蛍光抑制効果の発現の強さが異なるが、キサンテン系の蛍光色素分子に関しては、大体、集光点で $10^{28}/\text{cm}^2/\text{sec}$ 程度のイレーズ光を照射すると、蛍光強度は 3 分の 1 程度まで抑制できる。Alexa532 と Atto532 はローダミン 6G の誘導体であり、同じく、Alexa549 と Atto590 はテキサスレッドの誘導体であることが知られている。図 6 - 1 4 と 6 - 1 5 において、Alexa532 と Atto532、Alexa549 と Atto590 は、同じ分子骨格をもつために、ほぼ同じような、蛍光抑制特性を示している。

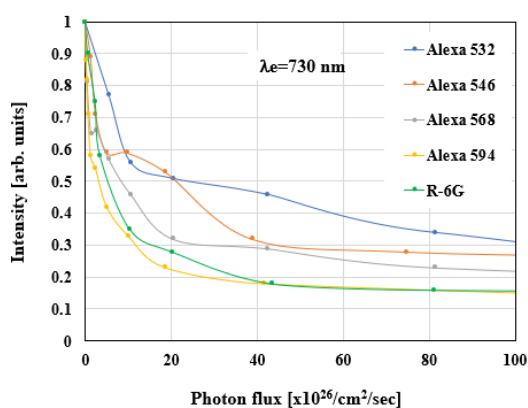


図 6 - 1 4 : Alexa の蛍光抑制特性。

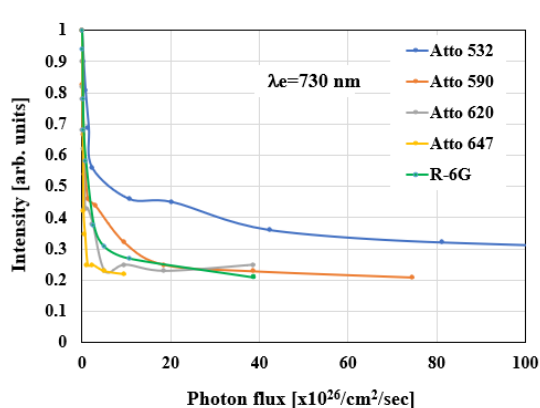


図 6 - 1 5 : Atto の蛍光抑制特性。

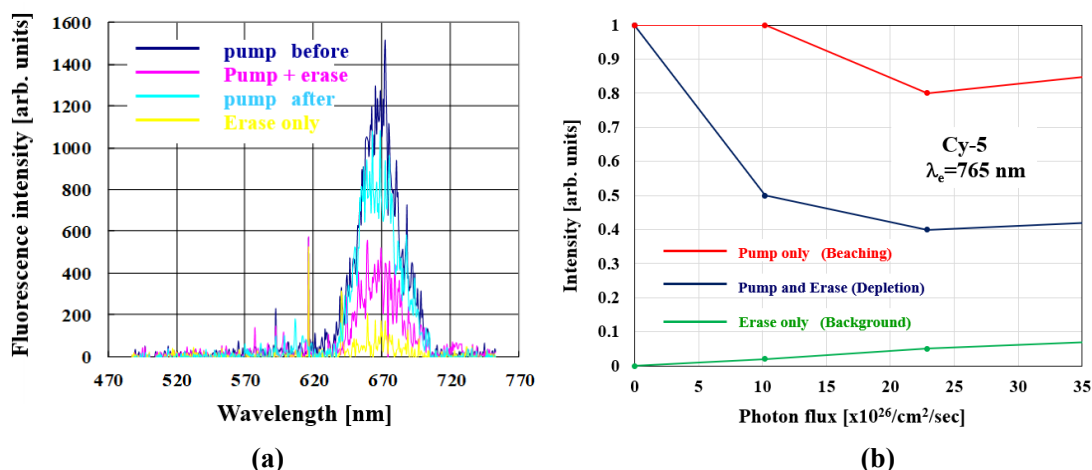


図 6－1 6： Cy-5 の蛍光抑制効果による蛍光スペクトルの変化と蛍光抑制特性。

3) シアンニン系 (Cy-5)

図 6－1 6 (a)、(b)は、イレース光波長：765 nm のイレース光を同時照射したときの Cy-5 における蛍光スペクトルの変化と蛍光抑制特性を示す。図 6－1 6 (a)において、**青**は新しい試料面においてポンプ光を照射したときの蛍光スペクトルを示す。**ピンク**はポンプ光とイレース光を同時集光した時の蛍光スペクトルである。そして、**水色**は蛍光抑制効果を誘導した後に、再び、ポンプ光を照射したときの蛍光スペクトルを示す。一方、**黄色**はイレース光単独照射時の蛍光スペクトルを示す。図 6－1 6 (a)に示すように、イレース光照射により蛍光強度が著しく減少していることが見て取れる。しかしながら、図 6－1 6 (a)から分かる様に、Cy-5 の場合には蛍光抑制効果を誘導すると、その後のポンプ光単独照射では蛍光強度が減少し、最初の蛍光強度に復活していない。すなわち、褪色が起きていることを示している。Cy-5 の光化学的安定性に大きく起因していることを示唆している。また、イレース光単独照射でも、微弱な蛍光も確認できる。

4) 蛍光タンパク (E-GFP、YFP、Ds-Red)

図 6－1 7、6－1 8、6－1 9は、それぞれ、E-GFP、YFP、Ds-Red に関する蛍光抑制効果による蛍光スペクトルの変化と蛍光抑制特性を示す。天然の蛍光タンパクも、化学合成をした蛍光色素分子と同様に、何れも顕著な蛍光抑制効果を示す。尚、イレース光波長は 730nm に設定した。E-GFP、YFP に関しては、Nd:YVO₄ の 2 倍高波 532 nm では蛍光励起ができないため、より短波長の半導体パルスレーザー：波長 473 nm を用いた。本実験条件では、各蛍光タンパクは褪色せず、しかも、イレース光照射による蛍光発光は無かった。このうち、Ds-Red は E-GFP や YFP と比較すると、一桁程度低いイレース光強度で、十分な蛍光抑制効果が誘導できていることが分かる。赤色領域で発光する Ds-Red と同じファミリーの蛍光タンパク pTagRFP に関しては、第 8 章で応用例を含め後述する。

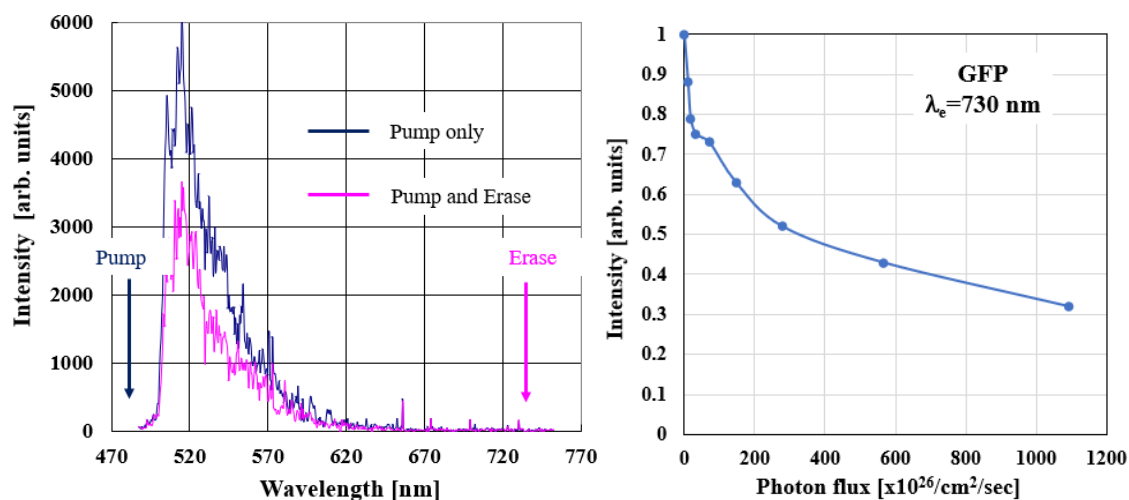


図 6－17： E-GFP の蛍光抑制効果による蛍光スペクトルの変化と蛍光抑制特性。

* 蛍光スペクトルにおいて 500nm より短波長側は、ポンプ光カット用のローパスフィルターが入っている。

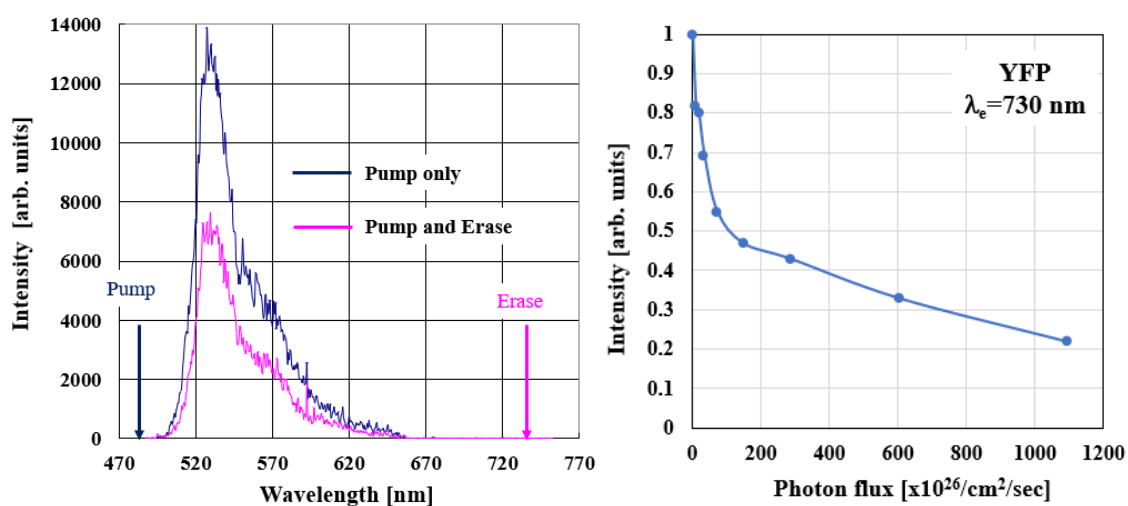


図 6－18： YFP の蛍光抑制効果による蛍光スペクトルの変化と蛍光抑制特性。

* 蛍光スペクトルにおいて 500nm より短波長側は、ポンプ光カット用のローパスフィルターが入っている。

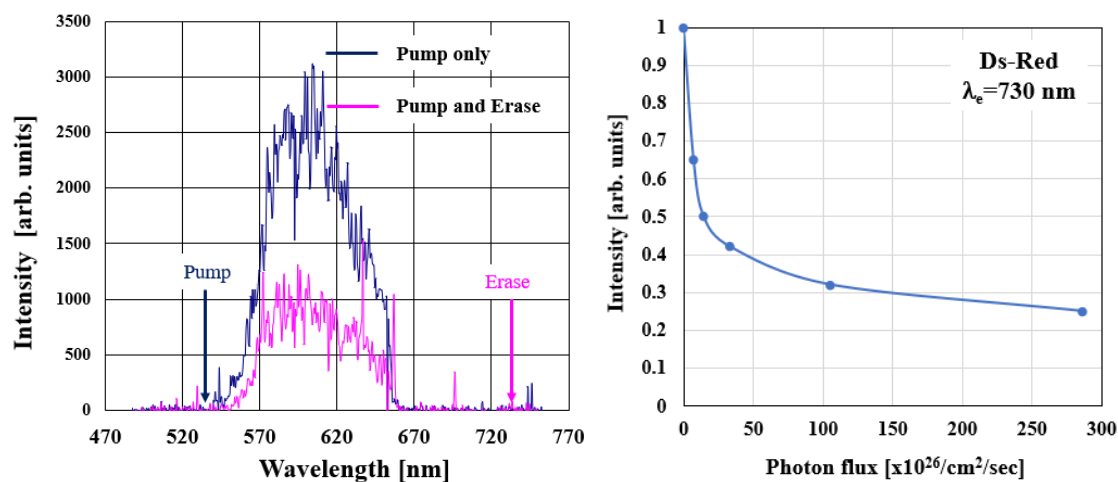


図 19 : Ds-Red の蛍光抑制効果による蛍光スペクトルの変化と蛍光抑制特性。

* 蛍光スペクトルにおいて 660 nm より短波長側は、イレース光カット用のハイパスフィルターが入っている。

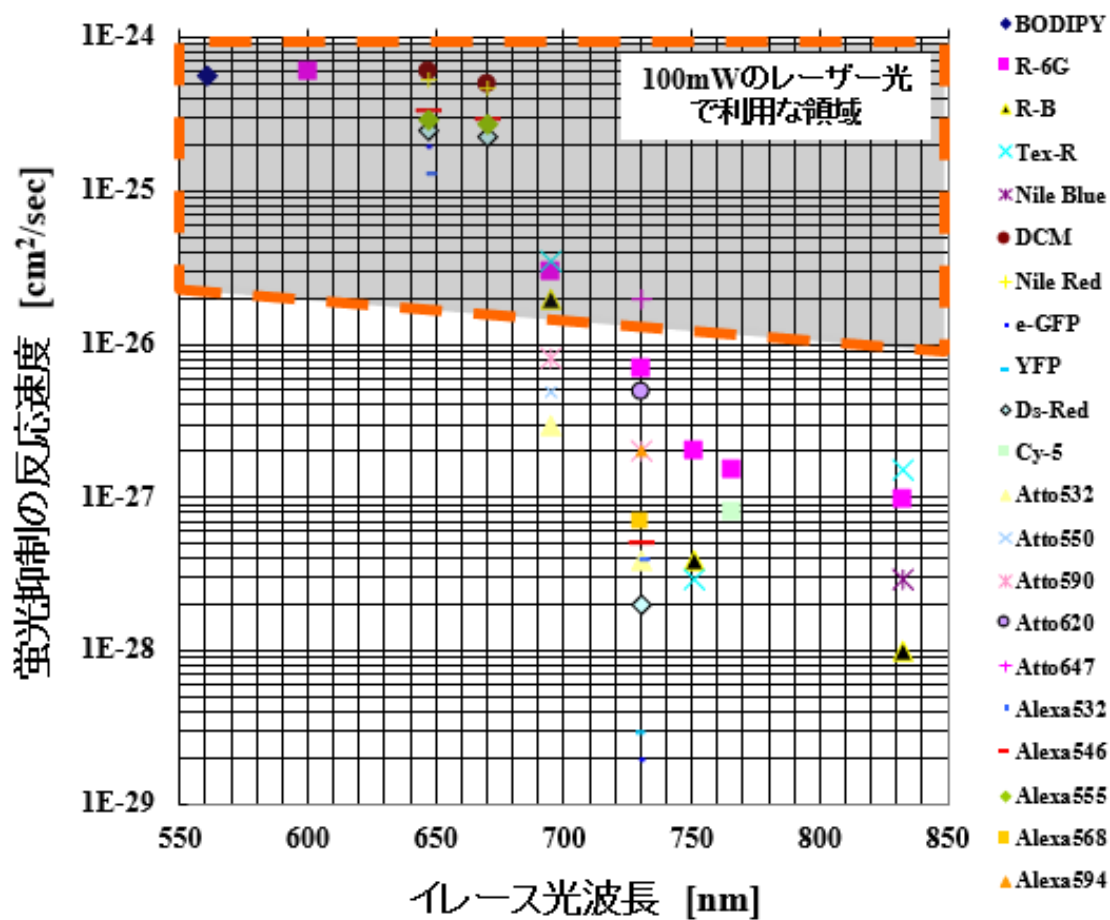


図 6 - 20 : 超解像顕微鏡用蛍光色素分子の蛍光抑制特性に関する評価マップ。

【結果と考察】

第2章で導出した式(2-4)に示す様に、 $\tau\sigma_{\text{dip}}$ すなわち反応速度 K が与えられれば各蛍光色素分子に対して誘導できる蛍光抑制効果の程度を定量的に示すことができる。

$$P(I_e) = \frac{1}{1+\tau\sigma_{\text{dip}}I_e} = \frac{1}{1+KI_e}. \quad (6-1)$$

式(6-1)において、 $P(I_e)$ はフォトンフラック I_e のイレース光を同時照射したときの蛍光量であるので、実測した蛍光抑制特性より K を実験的に決定することができる。具体的には、各蛍光色素分子に対して測定した蛍光抑制特性をフィッティング計算することで K を求めることができる。図6-20には、イレース光波長に対して K をプロットした各蛍光色素分子に関する蛍光抑制特性の評価マップを示す。尚、第7章、8章、10章において後述するローダミン6G、ナイルレッド、Bodipy、DCM の各蛍光色素分子に関してもマップ化した。それによれば、 K は $10^{-29} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}$ から $10^{-24} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}$ と広がりのある値を示す。選定した分子のうち特にキサンテン分子は 700 nm のより短波長のイレース光を用いると、 K が大きくなり、強度の弱いイレース光で顕著な蛍光抑制効果を誘導できる傾向がある。

本実験では、商用色素分子及び蛍光タンパクにおいて蛍光抑制効果が誘導できることが確認できた。図6-20中の破線部で囲まれた領域は、NA=1.4 を用いて 100 mW の尖頭値のイレース光を集光したときに（ピークフォトンフラックスに変換すると、 $10^{25} / \text{cm}^2 / \text{sec}$ のオーダーに対応する）、蛍光強度が 1/4 まで抑制できる蛍光色素分子の使用条件を示す。100 mW クラスの出力のレーザー光源は、可視から近赤外領域の製品が市販されているので、破線部内は超解像顕微鏡で使用する蛍光色素分子の実用使用条件範囲と見なせる。しかし、ナイルブルーの例の様にイレース光単独照射でも副次的な発光の存在が確認できる。この現象は、超解像顕微鏡機能の利用を阻害する。これに関しては、第10章において、今後の3次元超解像顕微鏡における技術課題として改めて論議する。

【付録6】

蛍光抑制効果に寄与する誘導放出過程は、蛍光色素分子の分極方向と照明光の偏光状態に依存する。図6-21は蛍光色素分子の配向とポンプ光とイレース光の偏光方向の位置関係を示すが、分子は、その位置関係に応じて以下の3つの代表的な光応答を示す[6-11]。

- 1) 「①」の緑の矢印が示す様に、ポンプ光の偏光方向が分子の分極方向が一致する場合は高い確率で S_1 状態の分子が生成する。そして、赤い実線の矢印が示す様に分極軸と平行に直線偏光したイレース光が入射すると高い確率で誘導放出が起きるので、強い蛍光抑制効果が誘導できる。一方、破線の矢印の様に、分極軸と直交する方向に直線偏光したイレース光は誘導放出を誘起出来ないので、蛍光抑制効果の誘導は困難となる。
- 2) 「②」の場合の様にポンプ光の偏光方向が分極軸と直交する場合は、そもそも $S_1 \leftarrow S_0$ 吸収が起きにくいので、超解像顕微鏡法において蛍光抑制効果自体を考慮する必要性は無い。
- 3) 「③」の場合において、分極軸に対して傾いた方向に偏光したポンプ光とイレース光が入射すると、 $S_1 \leftarrow S_0$ 吸収と誘導放出は分極方向の射影成分の電場強度に応じた確立で発生する。従って、分子の配向方向に応じた強さの蛍光抑制効果が誘導される。

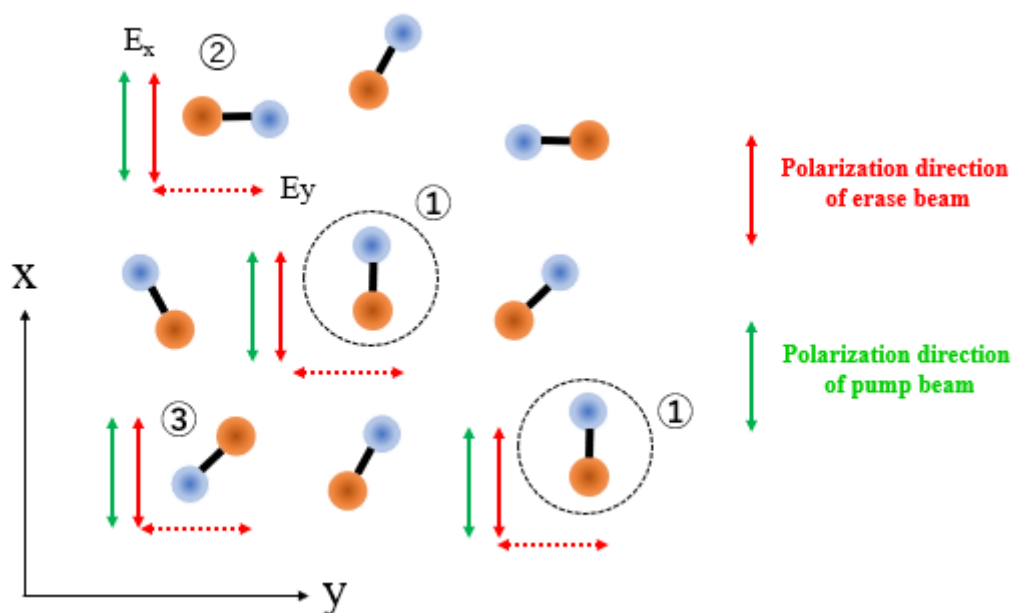


図6-21：蛍光色素分子の配向とポンプ光とイレース光の偏光方向の位置関係。

一般に、蛍光色素分子は試料内でランダムに配向しているので、「①」「②」「③」の統計的に平均した現象として蛍光抑制効果は誘導される。しかし、分子がランダムに配向しても、蛍光抑制効果の誘導の程度は、ポンプ光の偏光方向に対するイレース光の偏光方向の傾きに依存する。図 6-21 は、PMMA 薄膜に分散したローダミン 6 G における実験例を示す。本実験例では、波長： $\lambda_p=532\text{ nm}$ のポンプ光 (Nd:YVO₄ レーザー) と波長： $\lambda_e=599\text{ nm}$ のイレース光 (色素レーザー：ローダミン 6 G/エタノール) を用い、偏光子でイレース光の偏光方向の角度 (以下、偏光角度) をポンプ光の偏光方向に対して相対的に回転させながら、PMMA 薄膜中のローダミン 6 G の蛍光抑制特性を誘導した。ポンプ光とイレース光は NA が小さい 0.4 の対物レンズを用いて、蛍光抑制効果誘導時の蛍光強度を分光して光電子増倍管で計測した。この場合、ポンプ光とイレース光は試料に対する最大入射角 (23°) は小さいので、照明光の大部分は焦点面内で偏波していると見なせる。図 6-22 は、集光点におけるピークフォトンフラックスが $0.83 \times 10^{25} / \text{cm}^2 / \text{sec}$ となる様にイレース光を同時集光したときの蛍光強度の偏光角に対する依存性である。図 6-22 によれば、ポンプ光とイレース光の偏光方向が平行となる偏光角ゼロでは蛍光量が最小となり、直交する 90° では最大になっている。図 6-22 においてポンプ光単独照射時の蛍光強度を 1 とすると、イレース光の偏光角に応じて強度は 0.22 から 0.55 まで変化している。この変化量が主に誘導放出による蛍光抑制効果への寄与を示す。

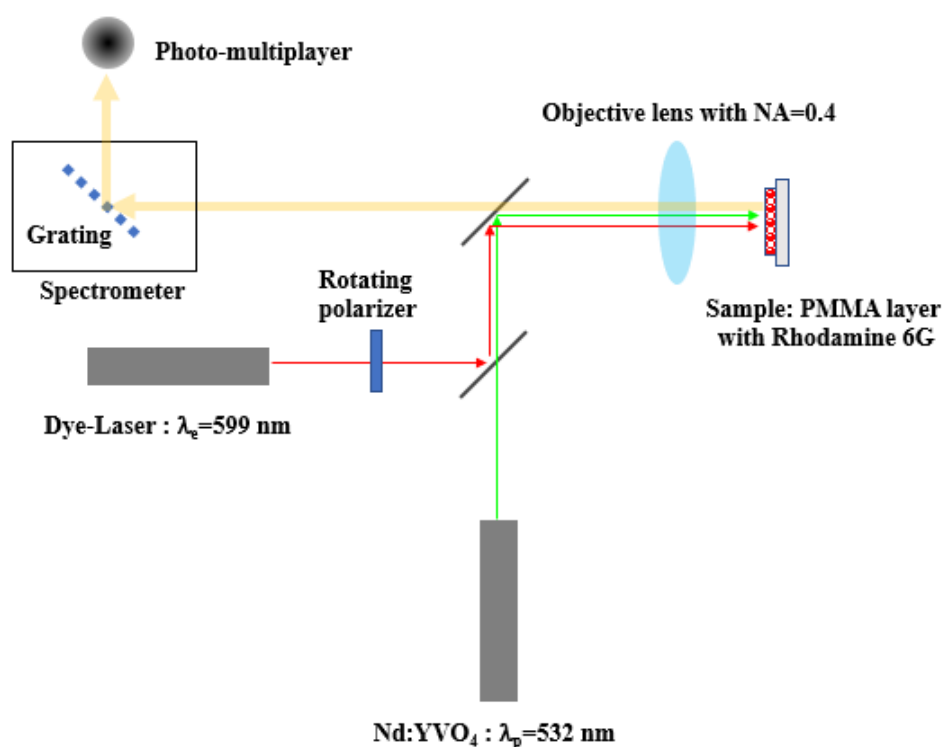


図 6-21 : PMMA 薄膜中のローダミン 6 G における蛍光抑制特性のイレース光偏光角度に対する依存性を測定するためのセットアップ

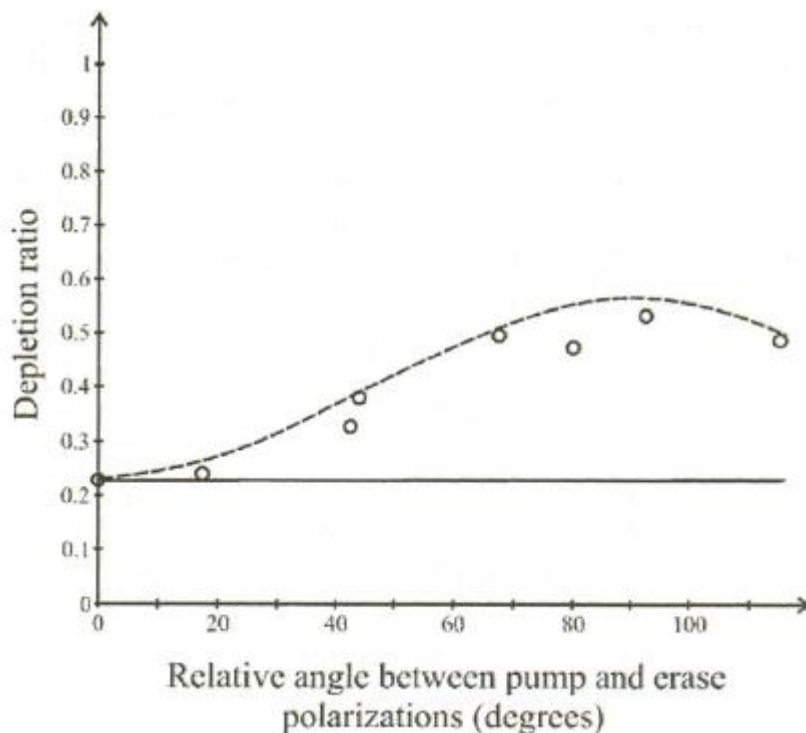


図 6-22 :、PMMA 薄膜中のローダミン 6 G における蛍光強度の偏光角に対する依存性。

図 6-22 によれば、イレース光とポンプ光の偏光方向が直交する 90° でも蛍光強度が半減していることが分かる。このときの蛍光量の減少は、誘導吸収によるものと焦点近傍領域における Z 偏光成分が発生することによる。誘導吸収に関しては、一般に基底状態の S_0 分子の分極軸と励起状態の S_1 分子の分極軸の方向が異なる為に「③」の状態が実現し、蛍光抑制過程が誘導される。この時、対物レンズの NA が 0.4 と低いので瞳面の外側を通過したポンプ光とイレース光はほぼ焦点面で偏波していると見なせるので、誘導吸収が主体となって蛍光抑制効果が起きていることが分かる。3次元超解像顕微鏡法においては、円偏光のポンプ光とイレース光を用いるので、これらの照明光の偏光方向は蛍光色素分子の分極方向に対して様々な向きを取る。従って、分子の分極方向に関係なく、どの空間領域においても平均化された蛍光抑制効果が誘導される。更に、高 NA 対物を用いるので Z 偏光成分の電場ベクトルも増加し、電場ベクトルが 3 次的に平均化された状態で蛍光抑制効果が誘導される。

【第6章：参考文献】

- 6-1) S. Morgan, J. E. Jackson, and M. S. Platz, Journal of the American Chemical Society **113**, (2782)1991; <https://doi.org/10.1021/ja00007a079>.
- 6-2) H. Miyasaka, H. Masuhara, and N. Mataga, Laser Chemistry **1**, 30(1983); <https://doi.org/10.1155/LC.1.357>.
- 6-3) M. Takayanagi, and I. Hanazaki, Journal of the Optical Society of America **B7**, 1898 (1990); <https://doi.org/10.1364/JOSAB.7.001898>.
- 6-4) M. Fujii, N. Mikami, and M. Ito, **99**, 193 (1985); [https://doi.org/10.1016/0301-0104\(85\)80118-X](https://doi.org/10.1016/0301-0104(85)80118-X).
- 6-5) N. Satoh, T. Watanabe, Y. Iketaki, M. Fujii and K. Yamamoto, Polymers for Advanced Technology **15**, 159 (2004); <https://doi.org/10.1002/pat.378>.
- 6-6) T. Watanabe, Y. Iketaki, M. Sakai, T. Ohmori, T. Ueda, T. Yamanaka, S. Ishiuchi and M. Fujii, Chem. Phys. Lett. **420**, 410 (2006); <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2005.12.020>.
- 6-7) <https://www.chem.ucla.edu/~craigim/pdfmanuals/catalogs/LamdaChrome-laser-dyes.pdf>.
- 6-8) <https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/brands/molecular-probes/key-molecular-probes-products/alexa-fluor/alexa-fluor-dyes-across-the-spectrum.html>.
- 6-9) <https://www.sigmaaldrich.com/JP/ja/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-labeling-and-modification/atto-dyes-for-superior-fluorescent-imaging>.
- 6-10) E. L. Snapp, Trends Cell Biol. **19**, 649 (2009); <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.08.002>.
- 6-11) N. Bokor, Y. Iketaki, T. Watanabe, K. Daigoku, N. Davidson and M. Fujii, Opt. Comm. **272** 263 (2007); <https://doi.org/10.1016/j.optcom.2006.11.002>.

第 7 章 3 次元超解像顕微鏡装置の構築と機能確認

要旨

第 2 章から 6 章において述べた光学シミュレーションと第 7 章で判明した蛍光抑制特性に関する知見に基づき、3 次元超解像顕微鏡法の原理検証装置を構築した。本装置は、蛍光抑制効果を誘導するための光源ユニット、ポンプ光とイレース光を整形できる照明光学系、そしてレーザー走査型顕微鏡ユニットからなる。基本的に、本装置は構造が単純な位相板を対物レンズと一体で市販のレーザー走査型顕微鏡に取り付けるだけ組み上げることができるので、汎用性と実用性に優れている。この装置の 3 次元的な空間分解能を実測したところ、理論予測に見合った少なくとも $(100 \text{ nm})^3$ 上回る立体分解能が得られることを確認した。

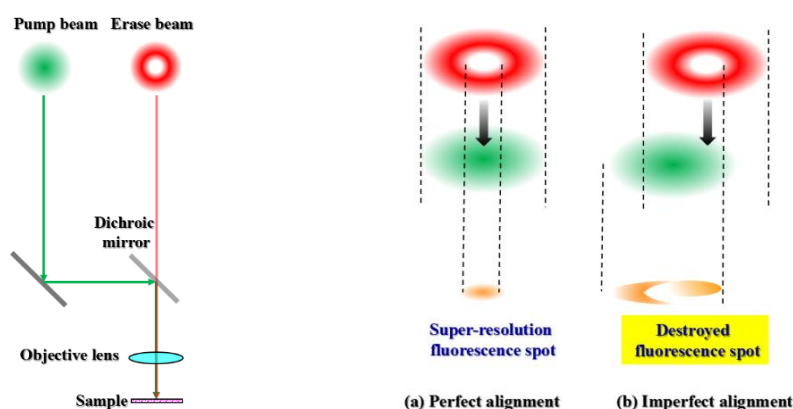


図 7-1 : 複合光路を用いた場合の技術課題。

【緒言】

3 次元超解像顕微鏡法は、2 波長の照明光を試料面の同じ空間点に同時照射するタイプの顕微鏡法の一形態である。例えば、波長が異なる 2 色の近赤外光を集光して非線形光学過程を誘導する SRS 顕微鏡や CARS 顕微鏡はその代表例である[7-1,7-2]。3 次元超解像顕微鏡の前身となる STED もそのカテゴリに属する。何れも、図 7-1 (a) に示す様に異なる波長が発振できる 2 台のレーザー光源を用い、これらの光源から発振したレーザー光を正確に同軸に調整し、安定して保持する必要がある（複合光路照明法）。図 7-1 (b) に示す様にこれが実現できないと、空間領域で蛍光抑制効果の誘導が不完全となり、第 5 章に述べた様に蛍光スポットの形状が崩れ、しかも暗くなるので良質な顕微鏡画像を形成できなくなる。特に、STED を含む超解像顕微鏡法の場合には、特殊な光学系によりイレース光を生成して、このイレース光の中空中心にポンプ光を集光する必要がある。これに加えて、回折限界を上回る高い精度でポンプ光とイレース光をアライメントしなくてはなら

ない。多くの場合、複合光路照明法を用いた超高精度な装置を構築する必要があった（図 7-2）[7-3]。実はこの照明法が、2 波長照明を用いる顕微鏡法の技術普及を行う際の根本的な障害となっている。特に、提案する 3 次元超解像顕微鏡法は、ポンプ光とイレース光の集光位置を焦点面内においてのみならず光軸方向にも正確に一致させる必要がある。すなわち、堅牢でしかも簡単な照明法の開発が、3 次元超解像顕微鏡法の装置化における最大の技術課題であった。本研究では 3 次元超解像顕微鏡法を検証するために、統合光路照明法を新規導入し、汎用性と普及性に優れた 3 次元超解像顕微鏡装置を構築した。

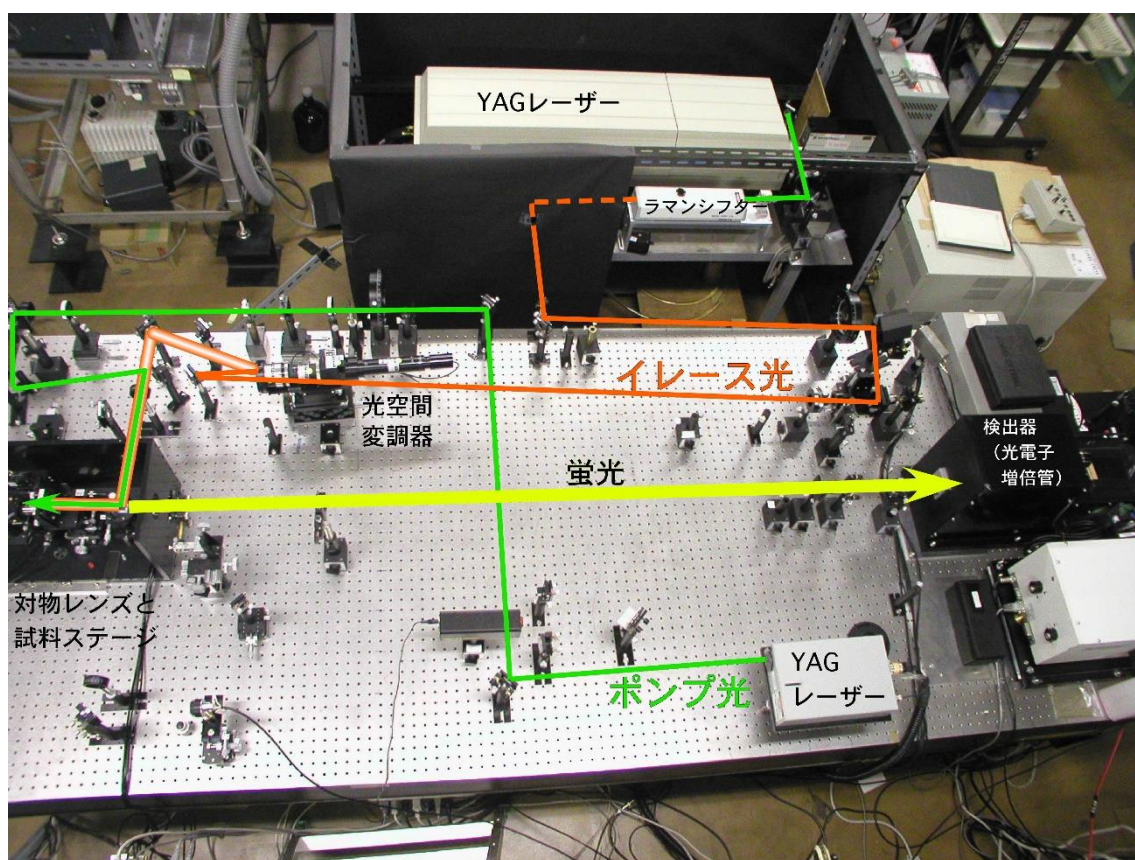


図 7-2： 複合光路を用いた超解像顕微鏡のブラック装置の例。

【統合光路照明法】

統合光路照明は、第 5 章で述べた 2 波長対応の超解像位相板と市販のレーザー走査型顕微鏡の装置構成に着目して発案されたものである。市販のレーザー走査型顕微鏡は、様々な発光波長の蛍光色素分子に対応するために、多色のレーザー光を 1 本のシングルモードファイバーで伝送できる照明光学系を有している。従って、ポンプ光とイレース光をこのシングルモードファイバーに入力し、点光源と見なせるファイバーの射出口から取り出せば完全に同軸かつ球面波で取り出すことができる。そして、市販のレーザー走査型顕微鏡はアクロマートの照明光学系を有し、コリメートしたこれらの光を試料に集光すれば、共に焦点位置に結像する。従って、この 2 波長対応の超解像位相板を照明光学系に挿入し、これら 2 色

のビームをアクロマートな対物レンズと一緒に絞れば、ポンプ光のピーク中心はイレース光の中空中心に自動的に集光する（図 7-3）。この状態で、ガルバノミラーと試料ステージによりポンプ光とイレース光を重ねて試料面上を空間走査すれば、超解像顕微鏡観察の照明条件が実現できる。つまり、たった 1 枚の位相板を市販のレーザー走査型顕微鏡に挿入するだけで超解像顕微鏡観察をすることができる。レーザー走査型顕微鏡は様々な企業から販売されているが、基本的に照明光学系の構造は同じであるので、3 次元超解像顕微鏡法を実施できる。後述する様に、超解像位相板はユーザーが簡単に取り付けることができる[7-4]。そして各製品にインストールされた標準ソフトウェアを用いれば誰でもが超解像顕微鏡観察ができるので、統合光路照明を導入した 3 次元超解像顕微鏡法は汎用性と普及性に優れている。

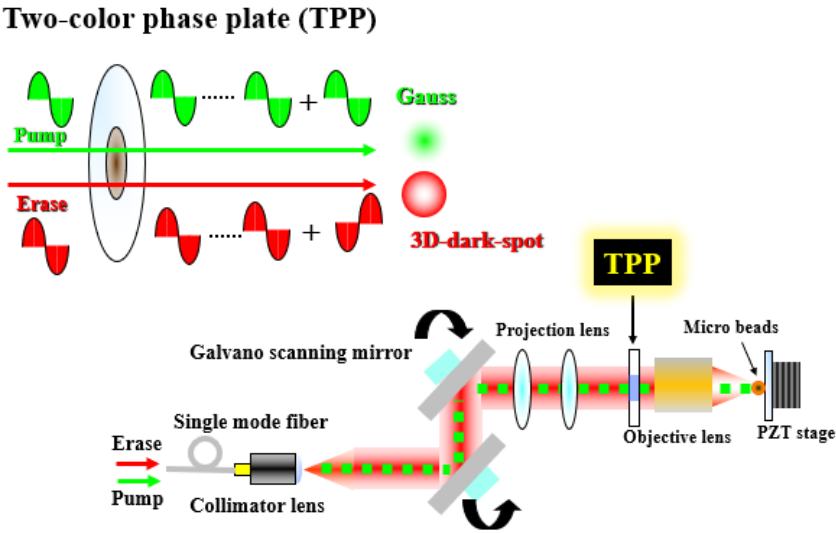


図 7-3：2 波長対応の超解像位相板と統合光路照明法のコンセプト。

表 7-1：検証実験装置の基本仕様

*倒立型顕微鏡観察方式
*統合光路照明法
*適用可能蛍光波長領域：470 nm～670 nm
*平面分解能=100 nm 以上 深さ分解能=100 nm 以上 （立体分解能）
*平面分解能=50 nm 以上

【3 次元超解像顕微鏡装置の基本構成】

構築した 3 次元超解像顕微鏡装置は、1) ポンプ光とイレース光を生成する多波長光源システム、2) 母体機である市販のレーザー走査型顕微鏡、3) 超解像位相板を格納した専用アダプター（以下、超解像顕微鏡アダプター）からなる。第 2 章から 5 章で行ったシミュレーション結果を基に、本装置は表 7-1 に示す仕様をもつ様に設計を行った。主なユーザー

を広範な生物系の研究者として想定し、設計構想を行った。具体的には、生物試料のライブ観察が不可欠なので、倒立型の顕微鏡法方式を採用した。そして、利便性と汎用性を重視して、一般ユーザーが3次元超解像顕微鏡観察機能を簡単に搭載できる様に、標準的な商用のレーザー走査型顕微鏡であるオリンパス Fluoview1200（以下 FV1200）を母体機として採用した（図7-4）。



図7-4：3次元超解像顕微鏡装置の概観写真。

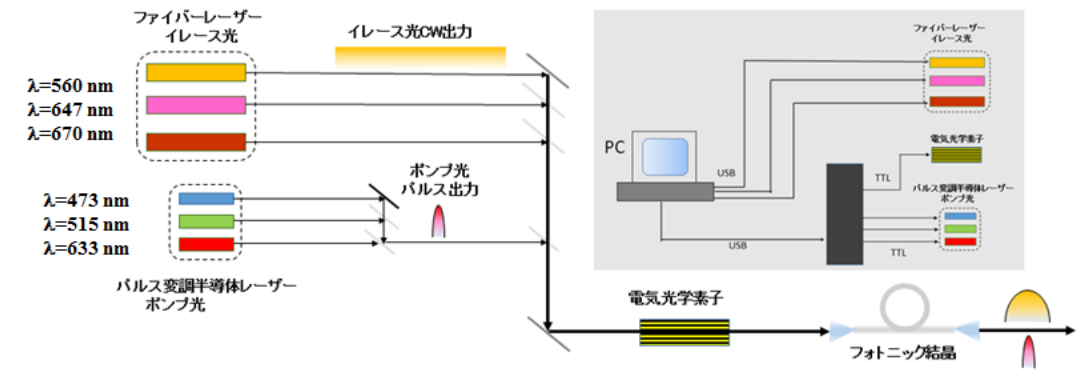


図7-5：3次元超解像顕微鏡装置の構成。

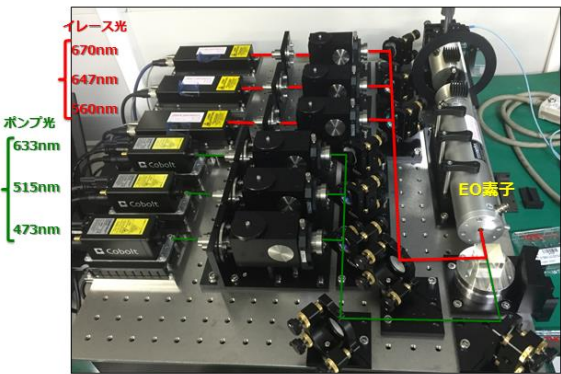


図7-6：多波長光源システムの内部。



図7-7：パルス幅10ns:周波数10MHzでの発振例。

① 多色光源システムの組み上げ

図7-5と図7-6が示す様に、本システムはMPB社製の3台のファイバーレーザー（出力波長： $\lambda_e=670\text{ nm}$ 、 647 nm 、 560 nm ）からなるイレース光光源群と、Cobort社の3台の小型個体レーザー（出力波長： $\lambda_p=633\text{ nm}$ 、 515 nm 、 473 nm ）からなるポンプ光光源群から構成され、これらの6波長の中から2色のレーザー光を組合せることで $470\text{ nm}\sim 670\text{ nm}$ の可視光領域で効果的に蛍光抑制効果を誘導できる。また、照明条件を調節できる電装制御システムも搭載し、最適な照明条件で超解像顕微鏡観察ができる様に配慮した。この制御システムと可変NDフィルターを用いて、強度変調のみならず最大繰り返し周波数 50 MHz ：パルス幅 10 ns のパルス照明から完全な連続時間照明まできめ細かく照明条件を設定できる。この変調機能は高速の電気光学変調素子とパルスジェネレーターを用いて実現したものであり（図7-7）、表7-1の仕様を満足する[7-5]。これらレーザー光源群と電装制御システムを一体でワンボックス化し、かつ、1台のパーソナルコンピュータで操作できる様にする事で利便性を確保した（図7-5）。6色のポンプとイレース光は、広い波長領域で伝播可能なフォトリソニック結晶ファイバーを通して、広帯域で完全球面波として共通に出力される。そして、アクロマートのコリメータレンズで平面波に変換されてFV1200の入力ポートに導かれる。以上の様に、多波長光源システムは超解像顕微鏡装置に適用可能な6波合波レーザーシステムとして完成した。

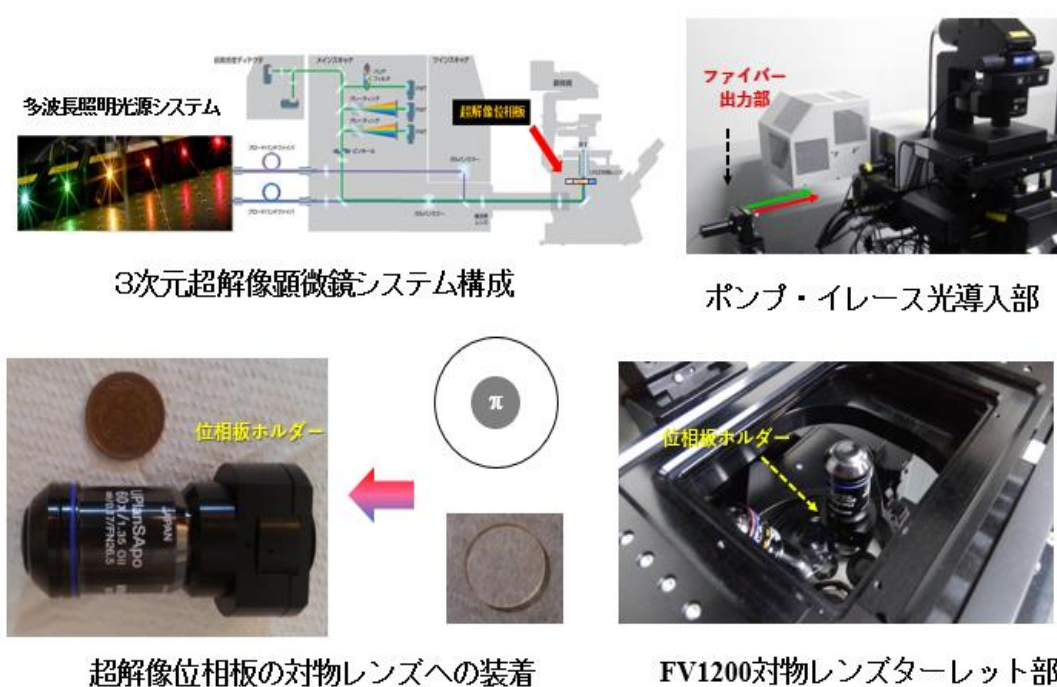


図7-8： 3次元超解像顕微鏡のシステム構成と主要構成部の外観写真。

② 3次元超解像顕微鏡装置母体機部

長多波長光源システムから供給されるポンプ光とイレース光はフォトニック結晶ファイバーを介してFV1200に導入され、FV1200と共に3次元超解像顕微鏡システムとしての全体統合を行った。具体的には光源制御シーケンスを含め全体調整を行い、倒立型の超解像顕微鏡として機能することを確認した。そして、超解像顕微鏡観察が出来る様に、FV1200の分光特性を最適化するための分光ミラーを追加搭載した。FV1200のガルバノミラーは、照明光の集光スポットの位置を5 nm/pixelの精度で平面内において制御可能であり、対物レンズの焦点と試料面の間隔も光軸方向に10 nm/pixelの精度で位置制御することが可能である。すなわち、顕微鏡システムとしての機械的な位置分解性能は遥かに光学的回折限界を上回る。図7-8に示す様に超解像位相板は専用のホルダーに収納され、顕微鏡対物レンズに直接装着できる。そして、倒立型顕微鏡の回転ターレットに一体で搭載できる。回転ターレットには6種類の顕微鏡対物レンズを搭載することができ、システムコンピューターにより全自動で対物レンズをセットできる。導入したFV1200は集光ビームで試料の狙った箇所を光刺激できる専用光学系を有し、光褪色や褪色後の蛍光回復現象など生命現象をトレースできる機能をもつ。更に、ユーザーの利便性を図るために、ナノメータの精度で試料位置を制御できる電動ステージを搭載した。加えて、1分子レベルで蛍光分析ができる蛍光相関解析や高度なフィルターリング機能をもつ画像解析ソフトウェアを導入した。

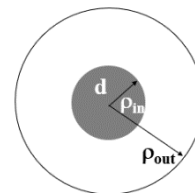
③ 2波長対応の超解像位相板

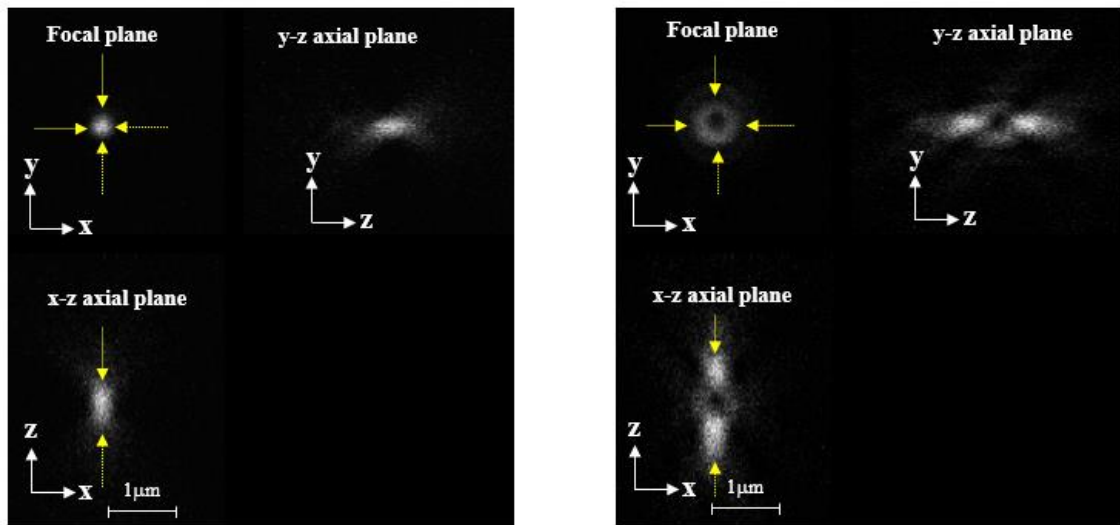
本顕微鏡装置においては、長多波長光源システムの発振波長の組み合わせに対応して3種類のタイプの2波長対応の超解像輪帯位相板を作製した。それらの仕様を表7-2に示す。これらの位相板はオリンパスの倍率60倍、NA=1.3のシリコン油対物レンズ（有効瞳径： $\rho_{out}=7.6\text{ mm}$ ）に対応できる様に最適化した。表7-2における中央輪帯部の位相差は厚み d の SiO_2 単層膜を蒸着して生成した。位相板に関して、内輪径が $2.3 \leq \rho_{in} \leq 2.7$ の範囲において100 μm 刻みで異なる位相板を作製した。これらの位相板により生成したイレース光の形状を次節で述べる方法で実測し、集光ビームの強度中心がゼロとなる $\rho_{in}=2.5\text{ mm}$ の位相板を検証実験で用いた。本顕微鏡装置の設計条件においては、輪体帯比： $\alpha=\rho_{in}/\rho_{out}$ は0.66となる。

表7-2：2波長対応の超解像位相板

タイプ	λ_p [nm]	λ_e [nm]	n_p	n_e	r_{in} [mm]	d [nm]	$\Delta\phi$ [λ_p]
①	473 nm	560 nm	1.4640	1.4595	2.5	3047	-0.01
②	515 nm	647nm	1.4615	1.4566	2.5	2125	-0.08
③	515 nm	670nm	1.4615	1.4560	2.5	2204	-0.03

* n_p :ポンプ光の屈折率 n_e :ポンプ光の屈折率 $\Delta\phi$:ポンプ光の位相誤差。





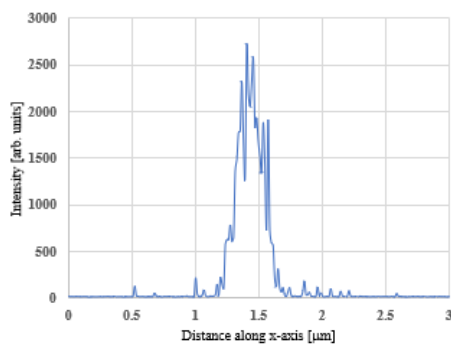
(a) ポンプ光

(b) イレース光

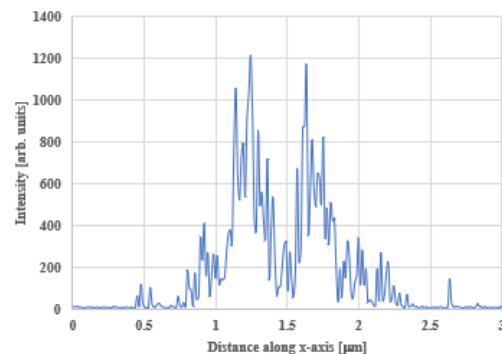
図 7-9 : ポンプ 光 : $\lambda_p=473 \text{ nm}$ とイレース光 : $\lambda_e=560 \text{ nm}$ の 3 次元集光パターン形状。

【3次元超解像顕微鏡装置の基本光学性能の評価】

構築した 3 次元超解像顕微鏡装置の分解能の評価を行った。本評価では、照明光源として、タイプ①のポンプ光 : $\lambda_p=473 \text{ nm}$ とイレース光 : $\lambda_e=560 \text{ nm}$ の組み合わせと、タイプ③のポンプ光 : $\lambda_p=515 \text{ nm}$ とイレース光 : $\lambda_e=670 \text{ nm}$ の組み合わせについて、3 次元の点像分布関数を計測した。タイプ①は、主に GFP (緑色蛍光タンパク) や Alexa473 等の波長 500 nm 前後の緑や青色で発光する蛍光ラベラーの観察に適しており、タイプ②は RFP (赤色蛍光タンパク) や Alexa560 等の $550 \text{ nm} \sim 700 \text{ nm}$ 前後の赤色で発光する蛍光ラベラーの観察に適している。いずれも生物試料観察で多用される蛍光波長帯域である。分解能の評価においては、蛍光抑制効果を示す回折限界より微細な蛍光ビーズを空間走査することで行うことで、3 次元の PSF を測定した[7-6]。

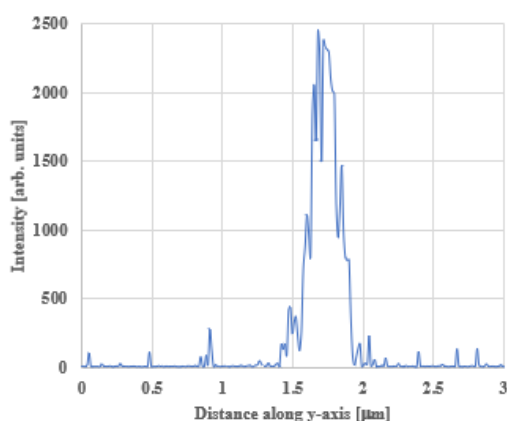


(a) ポンプ光

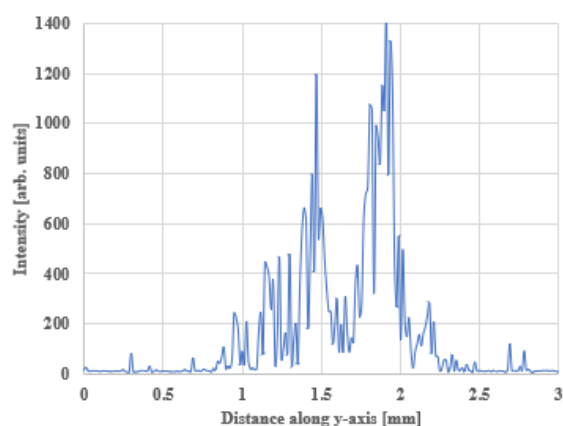


(b) イレース光

図 7-10 : 図 7-9 におけるポンプ光 : $\lambda_p=473 \text{ nm}$ (a) とイレース光 : $\lambda_e=560 \text{ nm}$ (b) の集光パターン形状の焦点面内 x 軸方向の断面強度分布。

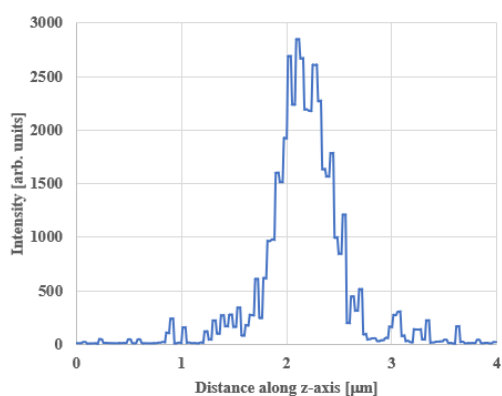


(a) ポンプ光

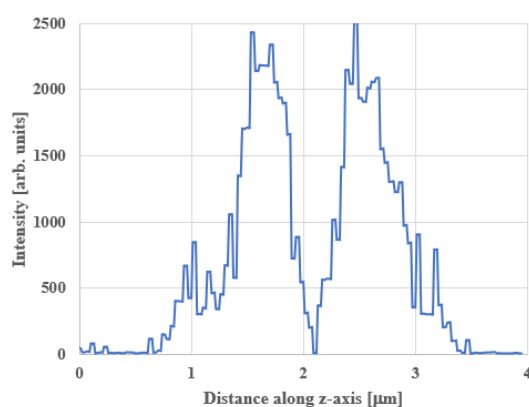


(b) イレース光

図 7-11 : 図 7-9 におけるポンプ光 : $\lambda_p=473 \text{ nm}$ (a) とイレース光 : $\lambda_e=560 \text{ nm}$ (b) の集光パターン形状の焦点面内のy軸方向の断面強度分布。



(a) ポンプ光



(b) イレース光

図 7-12 : 図 7-9 におけるポンプ光 : $\lambda_p=473 \text{ nm}$ (a) とイレース光 : $\lambda_e=560 \text{ nm}$ (b) の集光パターン形状の光軸面内のz軸方向の断面強度分布。

1) ポンプ光 : $\lambda_p=473 \text{ nm}$ とイレース光 : $\lambda_e=560 \text{ nm}$ を用いた超解像顕微鏡機能の評価

3次元超解像顕微鏡のPSFの測定に先立って、 $\lambda_e=473 \text{ nm}$ のポンプ光と $\lambda_p=560 \text{ nm}$ のイレース光に対応したタイプ①の超解像輪帯位相板をFV1200の照明光学系に挿入して、超解像位相板により整形されたポンプ光とイレース光の3次元の集光プロファイルを確認した。具体的には、ポンプ光照射でもイレース光照射でも蛍光する回折限界サイズの $200 \text{ nm}\phi$ の蛍光ビーズ (Molecular probe 社 : F8806) を3次元空間走査することで集光プロファイルを空間計測する。図 7-9 は、そのときのポンプ光とイレース光の3次元空間形状を示す。図 7-9 によれば、ポンプ光はほぼ、回折限界サイズの回転楕円体のガウシアンビームとして集光している。一方、イレース光も理論計算結果に近い対称性の良い3次元ダークホールを有す

る中空ビームとして集光していることが分かる。一方、図7-10、図7-11、図7-12は、図7-9に示す破線矢印方向のポンプ光及びイレース光の断面強度分布を示す。それらによれば、ポンプ光は予想通りがガウシアンビームとして集光しており、その一方でイレース光は焦点面内及び光軸面内において中心位置で強度がゼロとなる様に集光していることが分かる。すなわち、使用した超解像位相板は、ポンプ光： $\lambda_p=473\text{ nm}$ とイレース光： $\lambda_e=560\text{ nm}$ に対して独立にビーム整形制御が目論通り出来ていることが確認できる。

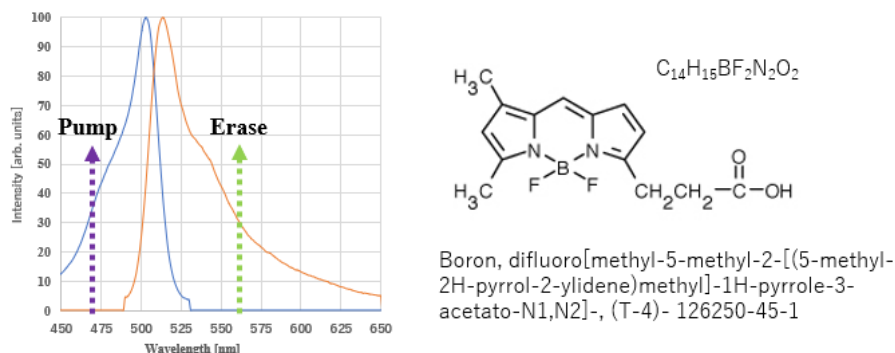


図7-13：Bodipyの分子構造とポリスチレン中の吸収・蛍光スペクトル。

3次元超解像顕微鏡機能を評価するために、このポンプ光及びイレース光の波長で蛍光抑制効果を誘導出来る蛍光色素分子としてBodipy ($\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_2$)を選定した。その蛍光抑制特性を評価するために、Bodipyを分散した $100\text{ nm}\phi$ のポリスチレン蛍光ビーズ(Thermo Fisher Scientific社： $75\text{ nm}\phi$ のG75)を用いて蛍光抑制特性を測定した[8]。図7-13に、Bodipyの吸収及び蛍光スペクトルを示し、図中にポンプ光とイレース光の波長位置を示した。蛍光抑制特性を測定するために、3次元超解像顕微鏡装置から超解像位相板を取り外して、共にガウシアン型のポンプ光とイレース光を $\text{NA}=1.3$ のシリコン油浸対物レンズ(オリンパス：UPLSAPO60XW)で蛍光ビーズに同時集光して蛍光強度の変化を測定した。表7-3に測定条件を示す。図7-14に、蛍光抑制効果誘導時のビーズの蛍光スポット像を示す。図7-14(a)はポンプ光単独集光時(焦点面におけるピークフォトンフラックスが $6\times 10^{22}\text{ /cm}^2\text{ /sec}$)のビーズ像である。しかし、ピークフォトンフラックスの強度が $2.3\times 10^{25}\text{ /cm}^2\text{ /sec}$ (式(2-A12)により換算すると対物レンズによりピーク強度が 30 mW のイレース光を集光した場合に対応する)のイレース光を同時集光すると、蛍光スポットの蛍光強度が著しく低下する(図7-14(b))。図7-14(c)よれば、イレース光単独集光時の副次過程による蛍光ビーズの発光像は確認できない。図7-15は、図7-16の破線部の断面強度分布を示すが、蛍光抑制効果誘導時にはピーク蛍光強度が10分の1程度まで減少している。図7-16は、焦点面におけるイレース光のピークフォトンフラックスに対する蛍光強度の依存性、すなわち、Bodipyの蛍光抑制特性を示す。この結果は、構築した多波長光源システムは、Bodipyを染色した試料に対して超解像顕微鏡観察に資する強度を有するイレース光を供給できることを示している。

表 7-3 : Bodipy の蛍光抑制効果の誘導実験の測定条件

ポンプ光波長	: 473 nm
ポンプ光パルス幅	: 10 ns @ 5MHz
イレーズ光波長	: 560 nm
イレーズ光パルス幅	: 15 ns @ 5MHz
対物レンズ開口数	: 1.3 (60 倍) シリコンオイル
蛍光ビーズ	: 75 nm ϕ Bodipy (ポリスチレン)

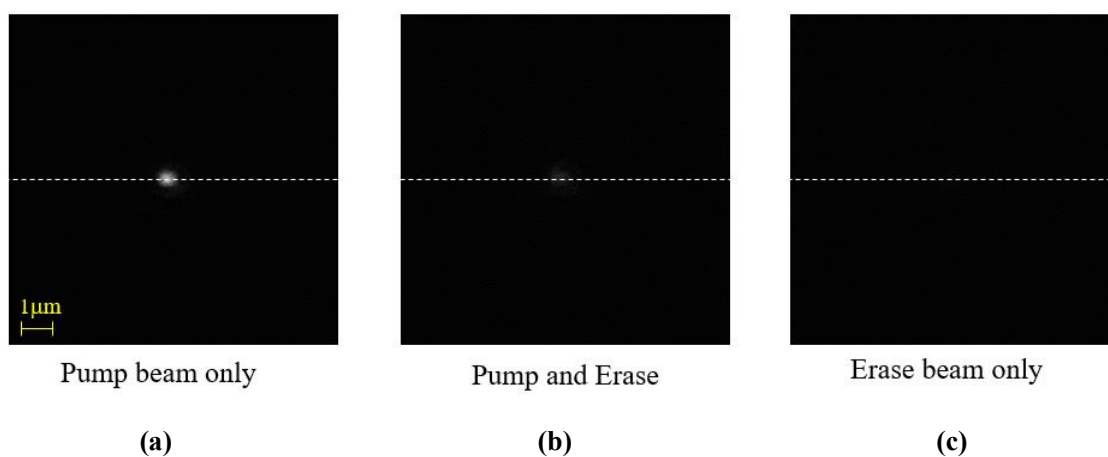


図 7-14 : 蛍光抑制効果誘導時のBodipyを分散した100 nm ϕ 蛍光ビーズの蛍光像の変化。

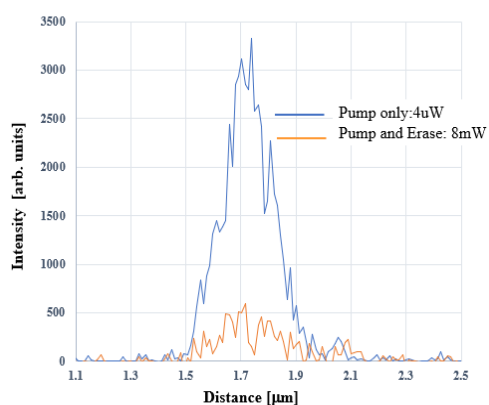


図 7-15 : 図 7-14 の破線部における蛍光抑制時の断面強度分布。

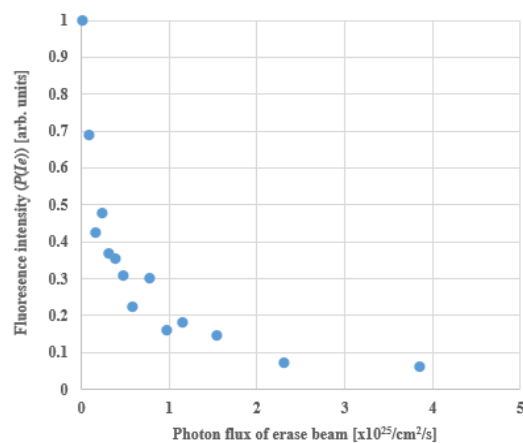
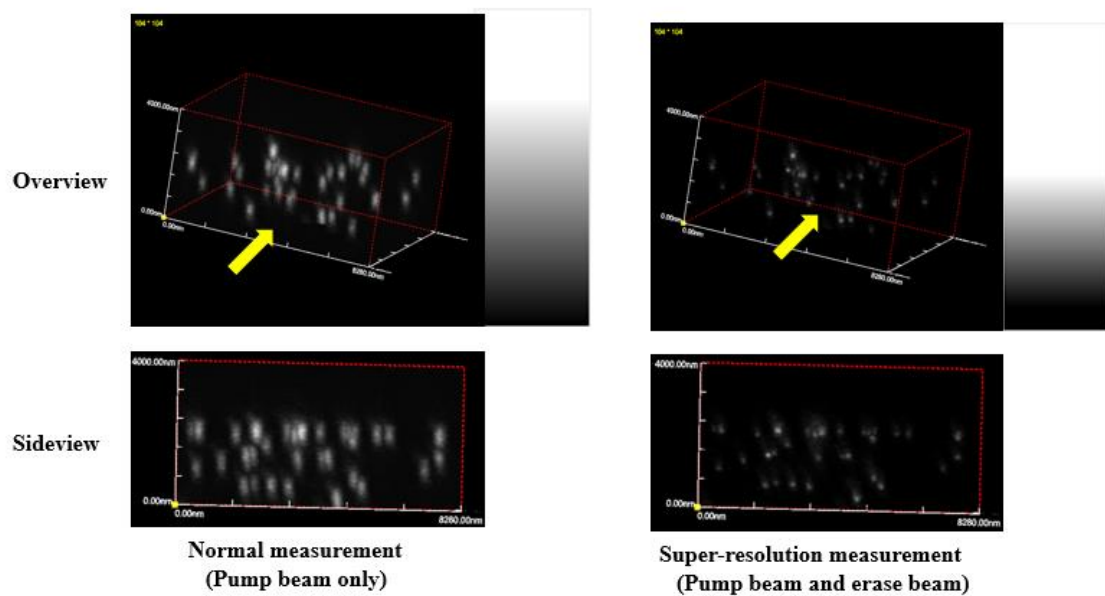


図 7-16 : Bodipy の蛍光抑制特。



(a) 通常観察（ポンプ光単独照射） (b) 3次元超解像顕微鏡観察（イレース光同時照射）

図7-17：波長473 nmのポンプ光と波長560 nmの照明光を用いたときの複数個ビーズが分散した包埋した試料の3次元超解像顕微鏡画像。

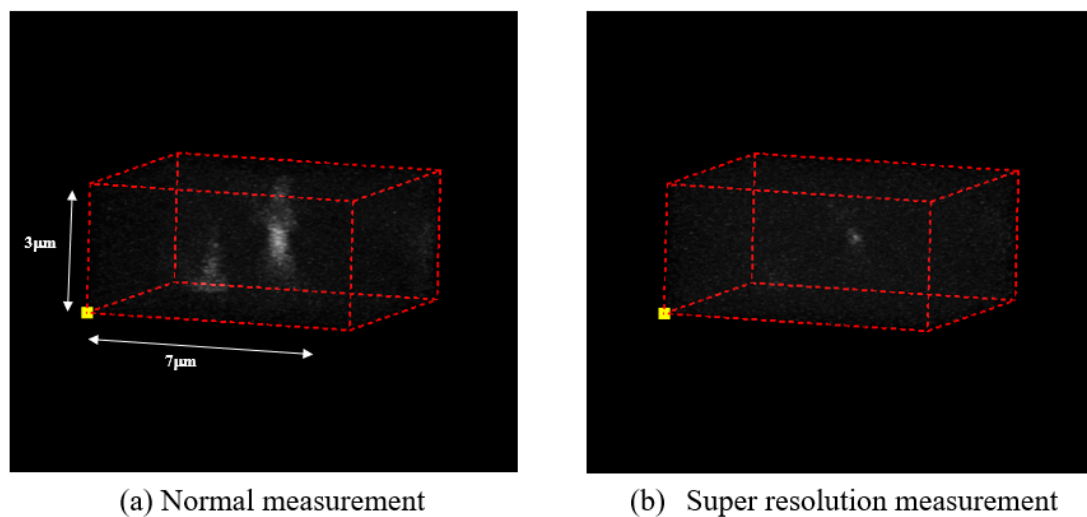
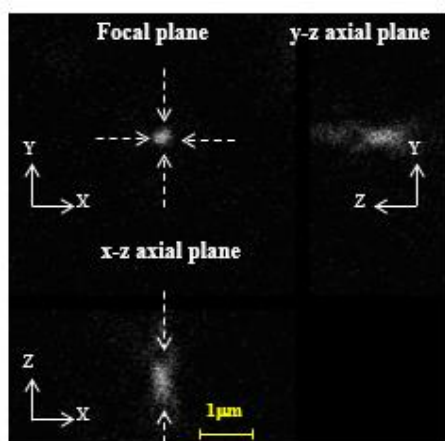
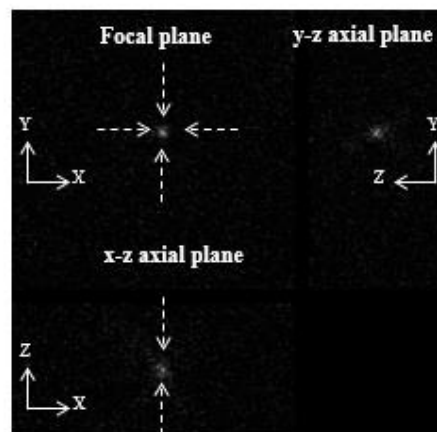


図7-18：波長473nmのポンプ光と波長560 nmの照明光を用いたときの孤立ビーズの3次元超解像顕微鏡画像。

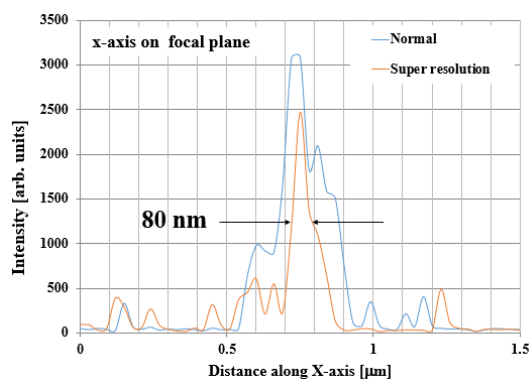


(a) Normal measurement

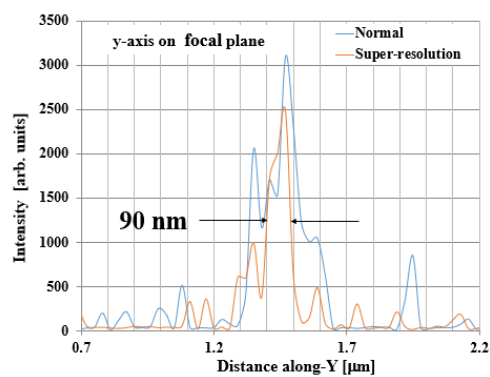


(b) Super resolution measurement

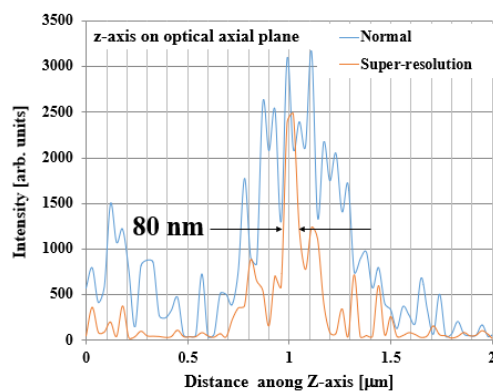
図 7-19： 図 7-18 に示す蛍光スポット像の焦点面及び光軸面上への展開図。



(a) x-axis on focal plane



(b) y-axis on focal plane



(c) z-axis on optical axial plane

図 7-20： 図 7-19 に示す破線方向の蛍光スポットの断面強度分布。

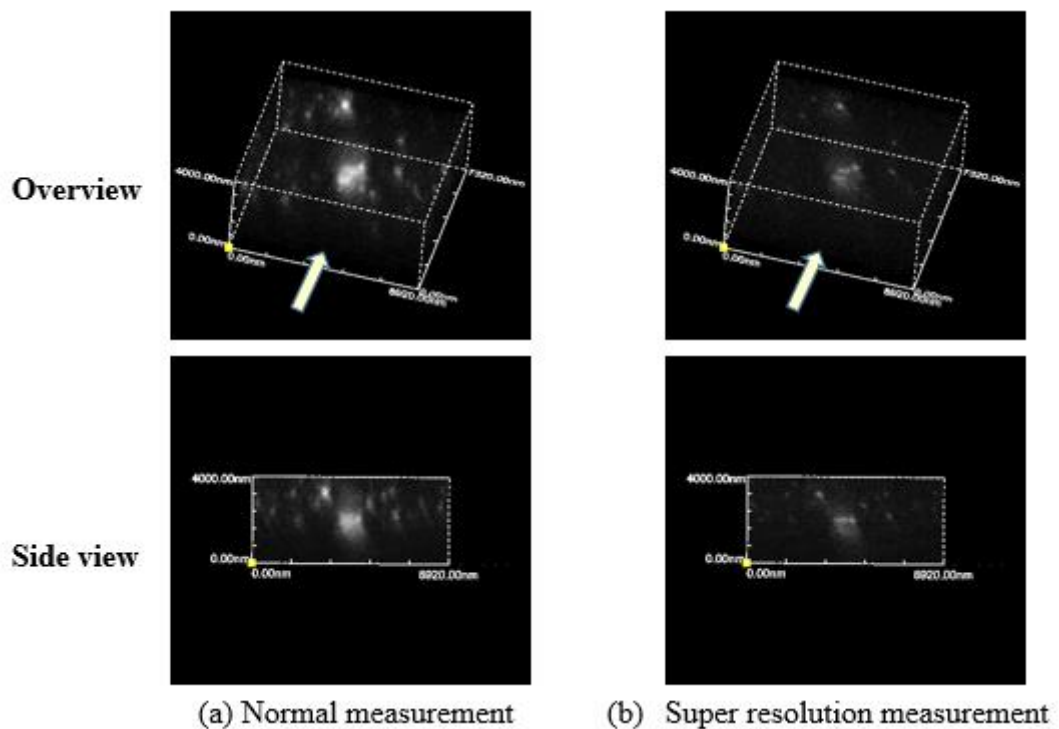


図 7-21：凝集した蛍光ビーズの 3 次元超解像顕微鏡画像。

上記のBodipyに対する照明条件において、再びタイプ①の超解像輪帯位相板をのFV1200の照明光学系に挿入して、3次元超解像顕微鏡観察を行った。具体的には、回折限界より十分に微細な平均粒径75nmφの蛍光ビーズを用いて、超解像顕微鏡観察時の3次元PSFを空間計測した。蛍光ビーズはインディクスマッチングを行う為にスライドガラス及びカバーガラスの屈折率に近い透明シリコン接着剤に包埋し、試料層内で収差が発生しないよう配慮した。また、対物レンズもインディクスマッチングを考慮してNA=1.3のシリコンオイル対物レンズを用いた。図 7-17 に、複数個ビーズが分散された包埋試料の3次元超解像顕微鏡画像を示す。その時の測定条件は表 7-3 と同じである。図 7-17 によれば、ポンプ光単独照射の通常観察時には楕円体の密集した蛍光ビーズ像が確認できるが、光軸面でピークフォトンフラックスが 20×10^{25} photons/cm²/sec（焦点面において 4.2×10^{25} photons/cm²/sec）のイレース光、すなわち式 2-A10 により換算した90 mWの強度で位相変調して同時集光すると、各ビーズ像は等方的な球体に収縮していることが分かる。特に、側面図に注目すると、著しく深さ方向にスポット像が小さくなり、深さ分解能が向上していることが分かる。このことを確認するために、孤立したビーズの3次元蛍光スポット像、すなわち3次元PSFを計測した（図 7-18）。3次元超解像顕微鏡法で得られるPSFを考察するために得られた蛍光スポット像の焦点面及び光軸面上への展開図を図 7-19 に示す。それによれば、超解像顕微鏡観察は、焦点面及び光軸面で微小な輝点に収縮していることが分かる。図 7-2

0 は、図 7-19 に示す破線方向の蛍光スポットの断面強度分布を示す。蛍光スポットは PSF に対応するので、その強度半値幅、すなわち、FWHM は顕微鏡の分解能に相当する。図 7-20 によれば、FWHM は蛍光ビーズの平均サイズに近い 80 nm まで減少しており、少なくとも 100 nm を上回る空間的に等方的な 3 次元分解能を有していることが分かる。図 7-21 は、凝集した蛍光ビーズの 3 次元超解像顕微鏡観察例を示す。通常観察（図 7-21 (a)）ではビーズが凝集した発光空間領域が、超解像顕微鏡観察を行うと複数の発光輝点に空間分解できていることが分かる（図 7-21 (b)）。すなわち、3 次元的な 2 点分解能が向上している様子が確認できる。

2) ポンプ光： $\lambda_p=515\text{ nm}$ とイレース光： $\lambda_e=670\text{ nm}$ を用いた超解像顕微鏡機能の評価

ポンプ光： $\lambda_p=473\text{ nm}$ とイレース光： $\lambda_e=560\text{ nm}$ の場合と同様の手法で、ポンプ光： $\lambda_p=515\text{ nm}$ とイレース光： $\lambda_e=670\text{ nm}$ の照明光の組み合わせで 3 次元超解像顕微鏡機能を確認した。タイプ③の超解像輪帯位相板を FV1200 の照明光学系に挿入して、超解像位相板により整形されたポンプ光とイレース光の 3 次元の集光プロファイルを生じた。Molecular probe 社：F8806（平均粒径：200 ϕ nm）の蛍光ビーズはこれらの照明光でも蛍光発光するので、これを用いて焦点面近傍における 3 次元集光ビームのプロファイルを確認した。図 7-22 は、ポンプ光とイレース光の 3 次元空間形状を示す。図 7-22 によれば、タイプ①の超解像位相板と同様にタイプ③の位相板もポンプ光はガウシアンビームとして集光し、イレース光は対称性の良い 3 次元ダークホールを有する中空ビームとして集光していることが分かる。図 7-23、図 7-24、図 7-25 は、図 7-22 の矢印が示すポンプ光及びイレース光の x 軸、y 軸、z 軸の断面強度分布であるが、焦点面においてポンプ光はほぼイレース光の中空中心に集光している。しかし、光軸方向には、色収差により約 100 nm 程ずれていることが分かる。

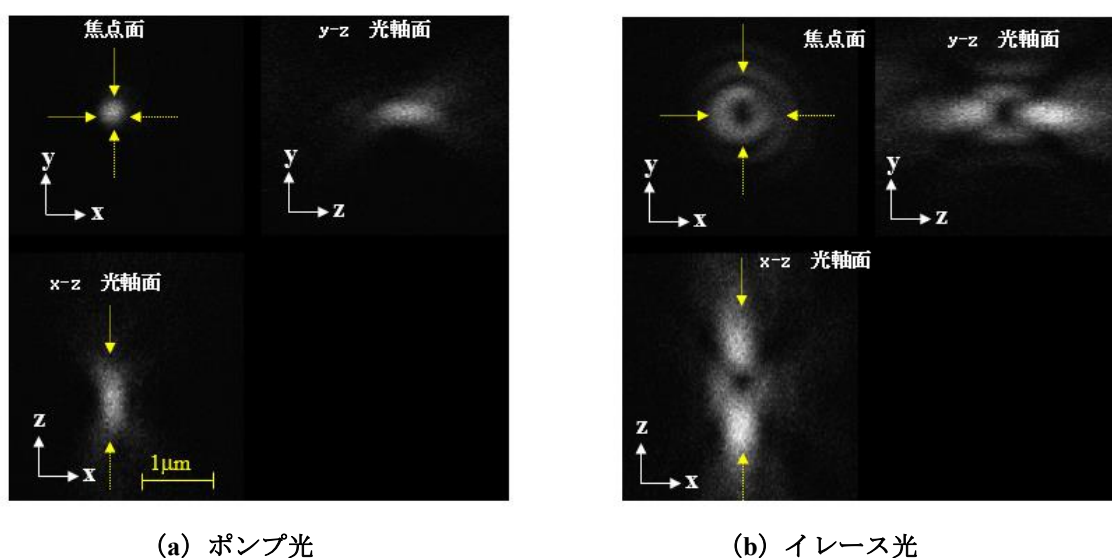
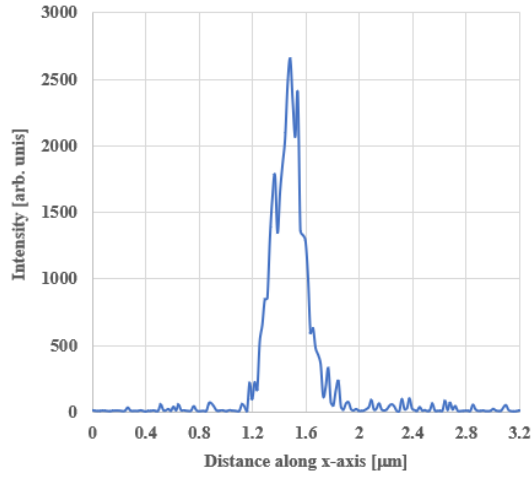
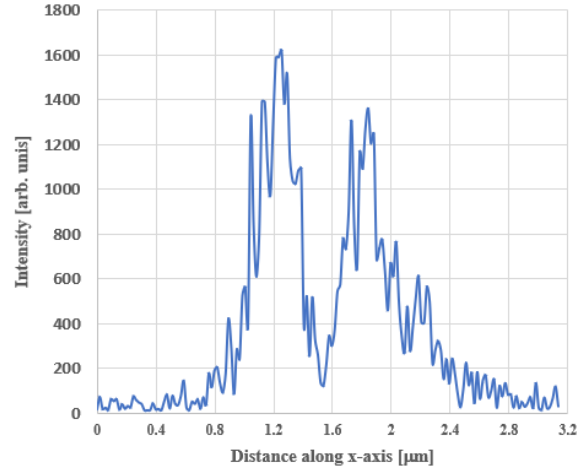


図 7-22： ポンプ光： $\lambda_p=515\text{ nm}$ とイレース光： $\lambda_e=670\text{ nm}$ の 3 次元集光パターンの形状。

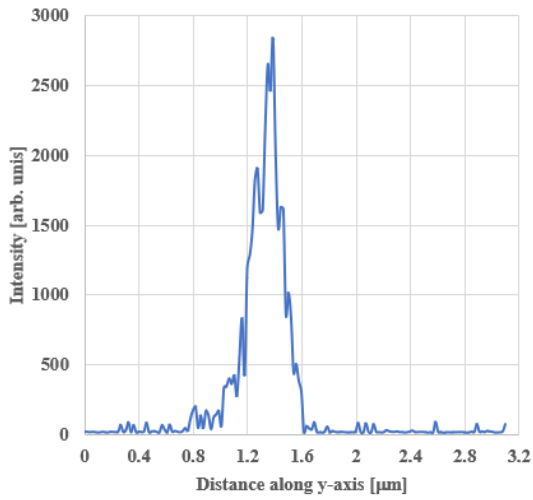


(a)

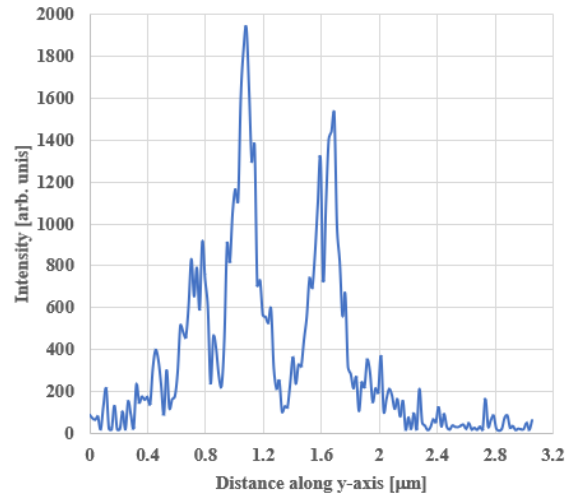


(b)

図 7-23 : 図 7-22 におけるポンプ光 : $\lambda_p=515 \text{ nm}$ (a) とイレース光 : $\lambda_e=670 \text{ nm}$ (b) の集光パターン形状の焦点面内x軸方向の断面強度分布。



(a)



(b)

図 7-24 : 図 7-22 におけるポンプ光 : $\lambda_p=515 \text{ nm}$ (a) とイレース光 : $\lambda_e=670 \text{ nm}$ (b) の集光パターン形状の焦点面内y軸方向の断面強度分布。

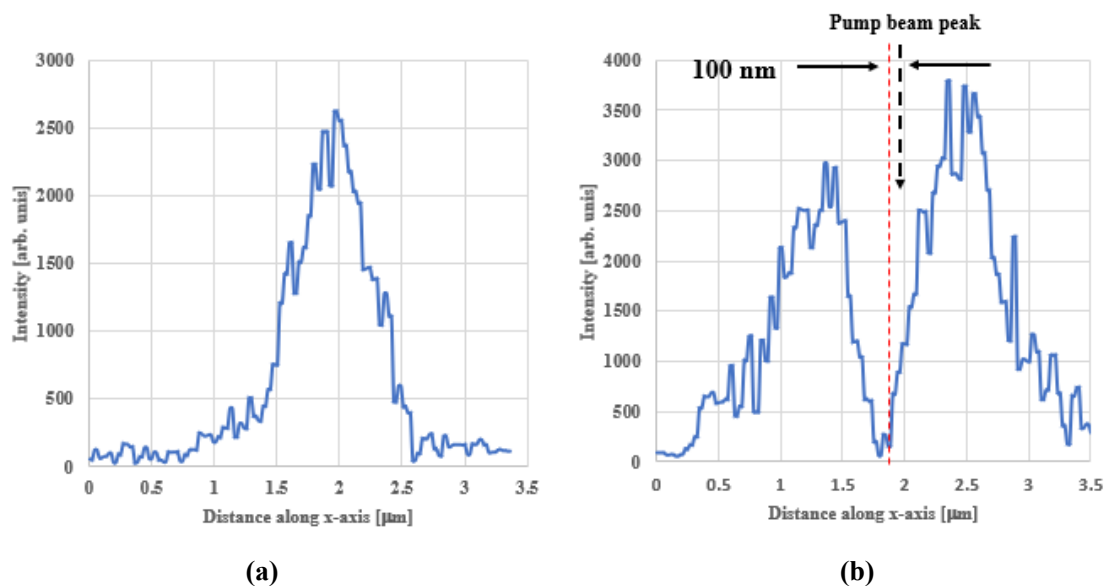


図 7-25 : 図 7-22 におけるポンプ光 : $\lambda_p=515 \text{ nm}$ (a) とイレース光 : $\lambda_e=670 \text{ nm}$ (b) の集光パターン形状の光軸面内の z 軸方向の断面強度分布。

これらの波長の照明光を用いた場合の 3 次元超解像顕微鏡機能を検証するために、Nile red ($\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$) を含浸した $60 \text{ nm}\phi$ のポリスチレンビーズ (Thermo Fisher Scientific 社 : R60) を選定した[7-8]。図 7-26 に、ビーズの吸収・蛍光スペクトルを示す。図 7-26 によれば、ポンプ光は $S_1 \leftarrow S_0$ 吸収帯域に属し、イレース光は誘導放出可能な蛍光発光帯域に属している。まず、ビーズが超解像顕微鏡観察に資する蛍光抑制特性を示すかどうか確認を行った。3 次元超解像顕微鏡機能から超解像位相板を取り外して蛍光抑制特性の測定を行った。表 7-4 に測定条件を示す。図 7-27 に、蛍光抑制効果誘導時のビーズの蛍光スポットの変化を示す。図 7-27 (a) はポンプ光単独集光時 (焦点面におけるピークフォトンフラックスの強度が $4.2 \times 10^{22} / \text{cm}^2 / \text{sec}$) のビーズ画像を示す。しかし、焦点面におけるピークフォトンフラックスの強度が $4.8 \times 10^{25} / \text{cm}^2 / \text{sec}$ (対物レンズからの出力時のピーク強度が 35 mW に対応する) のイレース光を同時集光すると、蛍光スポットの蛍光強度がほとんど確認できない (図 7-27 (b))。また、イレース光単独集光時にも蛍光ビーズからの副次的な発光が存在しないので、バックグラウンドが無い S/N が良い条件で超解像顕微鏡観察ができることが確認できる (図 7-27 (c))。図 7-28 に図 7-27 の破線部の断面強度分布を示し、そして、蛍光抑制特性を図 7-29 に示す。それによれば、図 7-17 の Bodipy の蛍光抑制特性と比較すると、ポリスチレン中の Nile Red は低いイレース光で顕著な蛍光抑制効果を誘導できることを示しており、超解像顕微鏡法のデモンストレーションに適した蛍光色素分子であることが分かる。

表 7-4 : Nile Red の蛍光抑制効果の誘導実験の測定条件

ポンプ光波長 (λ_p) :	515 nm
ポンプ光パルス幅 :	10 ns @ 5MHz
イレース光波長 (λ_e) :	670 nm @ 5MHz
イレース光パルス幅 :	20 ns @ 5MHz
対物レンズ開口数 :	1.3 (60 倍) シリコンオイル
蛍光ビーズ包埋材料 :	シリコン接着剤
蛍光ビーズ :	60 nm ϕ Nile Red (ポリスチレン)

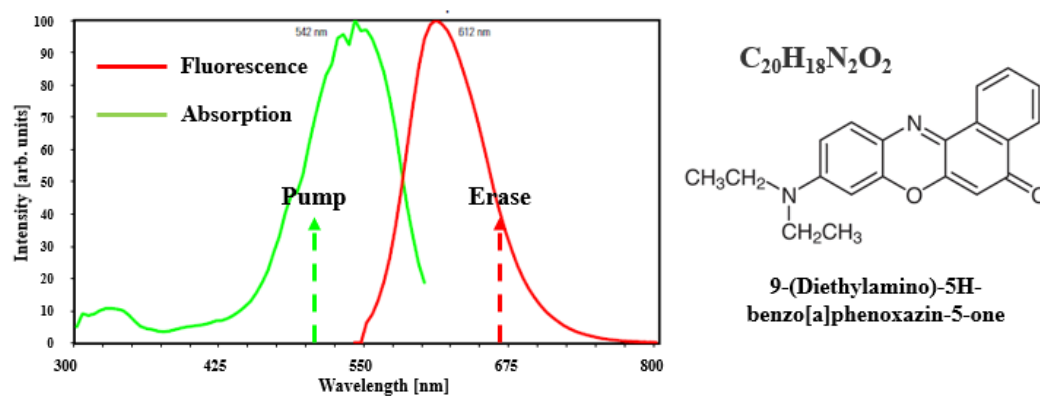


図 7-26 : Nile-redの分子構造とポリスチレン中の吸収・蛍光スペクトル。

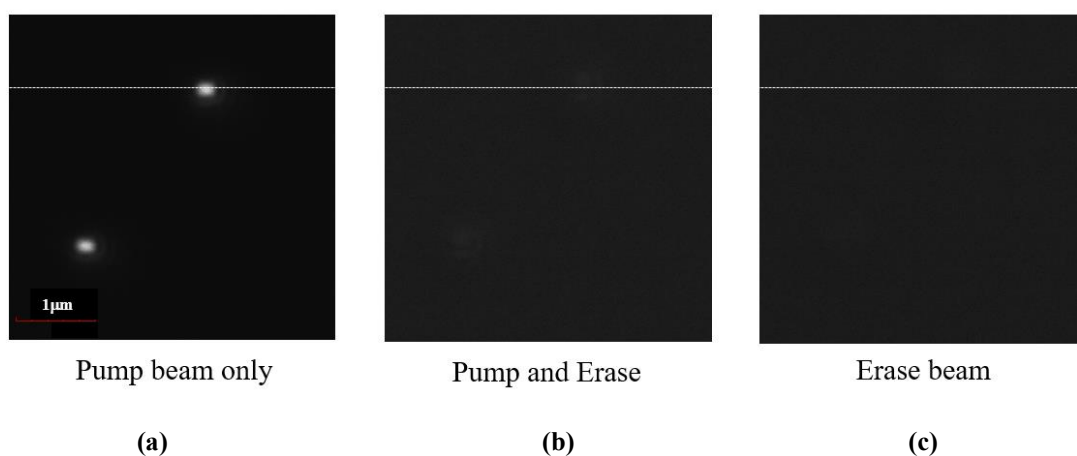


図 7-27 : 蛍光抑制効果誘導時のNile-redを分散した100 nm ϕ 蛍光ビーズの蛍光像の変化。

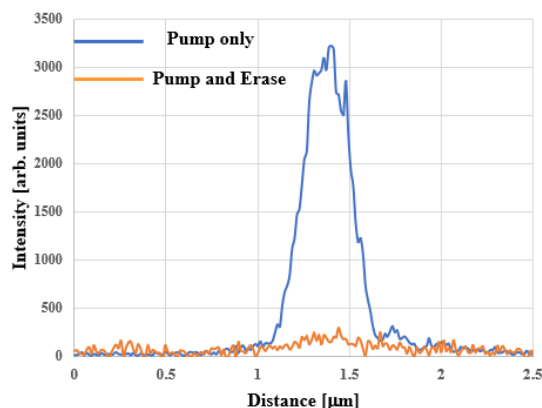


図 7-28 : 図 7-27 の破線部における蛍光抑制時の断面強度分布。

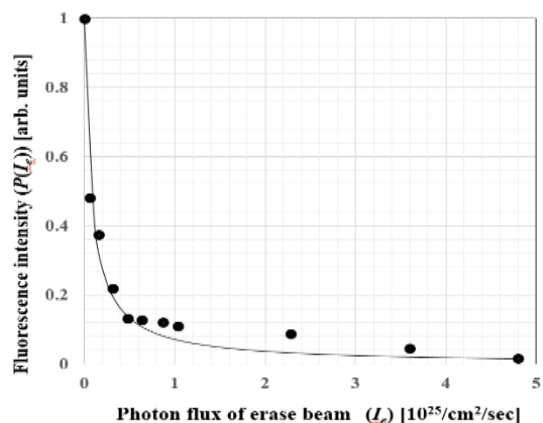
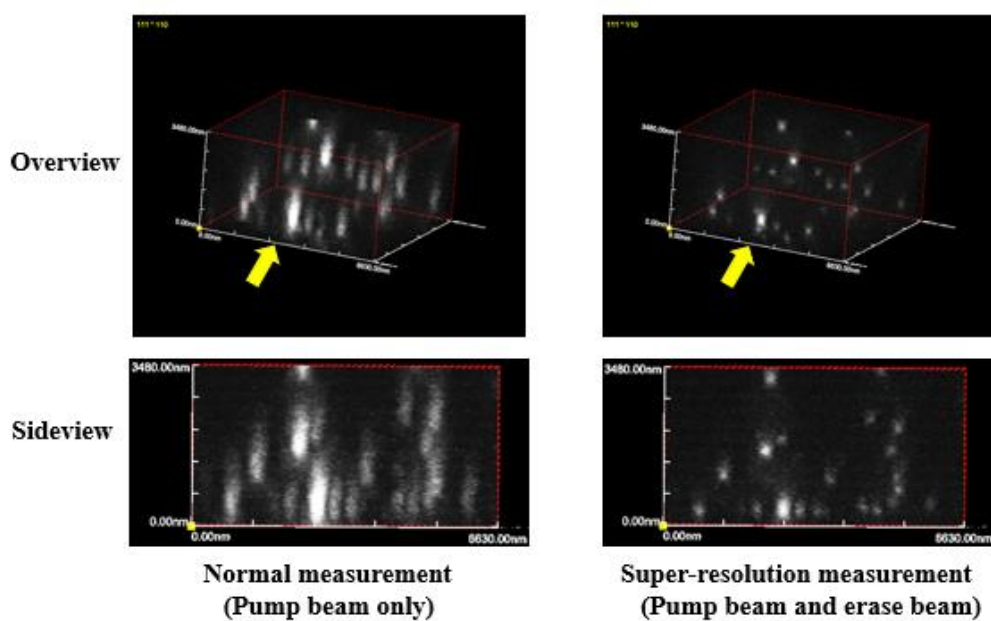


図 7-29 : の蛍 Nile red 光抑制特



(a) 通常観察（ポンプ光単独照射） (b) 3次元超解像顕微鏡観察（イレース光同時照射）

図 7-30 : 波長515 nmのポンプ光と波長670 nmの照明光を用いたときの複数のビーズが分散した包埋量領域の3次元超解像顕微鏡画像。

表 7-4 に示す測定条件において、再びタイプ③の超解像輪帯位相板をFV1200の照明光学系に挿入して、3次元超解像顕微鏡観察を行って、3次元のPSFを空間計測した。図 7-30 において密集した蛍光ビーズ像が確認できるが、光軸面でピークフォトンフラックスが 1.9×10^{26} photons/cm²/sec（焦点面において 4×10^{25} photons/cm²/sec）、すなわち式 2-A 10 に

より換算した97 mWのイレース光を位相変調して同時照射すると、Bodipyを分散したビーズの場合の観察例と同様に各ビーズが空間分離して存在している様子が分かる。また孤立したビーズについて注目すると、深さ分解能が向上してビーズ像は等方的な球体に収縮していることが分かる（図7-3-1）。図7-3-2に示す蛍光スポット像、すなわちPSFの焦点面及び光軸面上への展開図に着目すると、各面における断面強度分布のFWFMは90 nmであり（図7-3-3）、第4章の図4-1-2に示すシミュレーション結果とほぼ一致している。タイプ③の超解像位相板の計測では、光軸方向にポンプ光のピーク位置とイレース光の中空中心が100 nmずれているが、第5章で述べた様に、超解像顕微鏡機能を損なわない許容範囲であることが分かる。次に、2点分解能の向上を確認するためにNile Redと同じ蛍光抑制特性をもつDCM（図7-3-4）を分散した100 nmのフォトレジスト層にナノイプリントしたグレーティングパターン（付録7）を3次元超解像顕微鏡観察した[7-9,7-10]。図7-3-5は、回折限界サイズよりも微細な空間周期が180 nm（細線幅：90 nm）ライン&スペースパターンの観察例である。図7-3-5によれば、3次元超解像顕微鏡観察を行うと3次元的な櫛状の微細空間構造の存在が確認できる。すなわち、3次元的に2点分解能が向上して、回折限界を凌駕していることが確認できる。

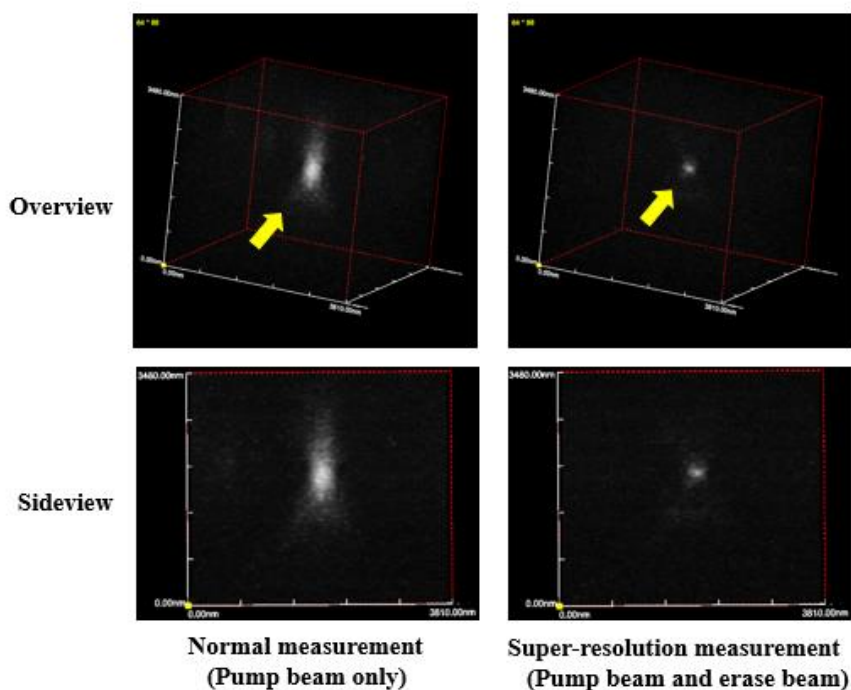
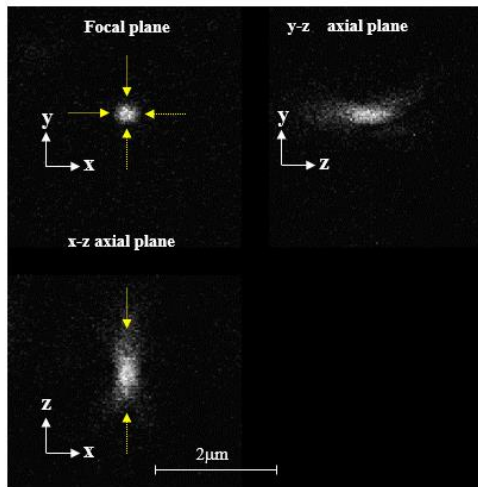
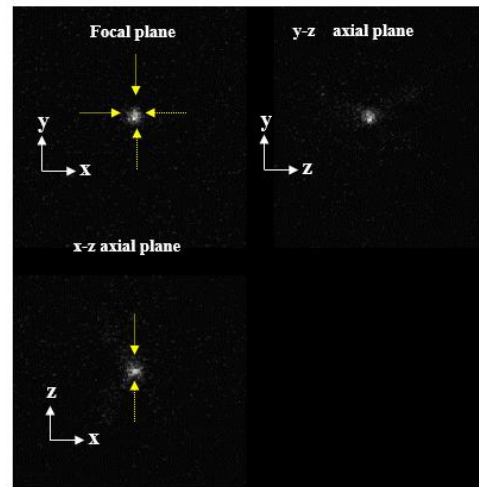


図7-3-1：波長515 nmのポンプ光と波長670 nmの照明光を用いたときの孤立ビーズの3次元超解像顕微鏡画像。

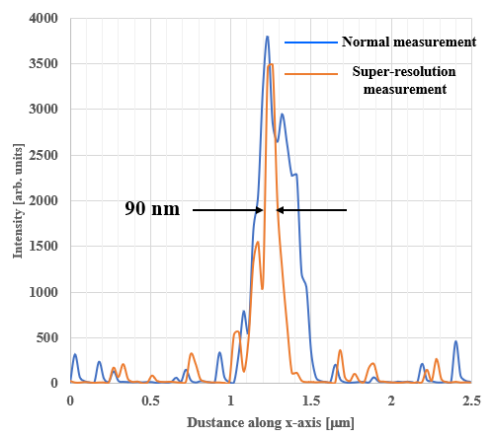


(a) Normal measurement

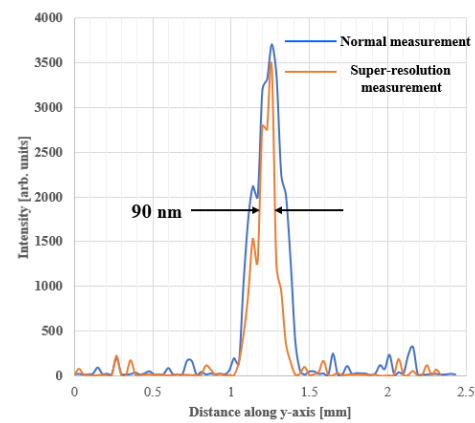


(b) Super-resolution measurement

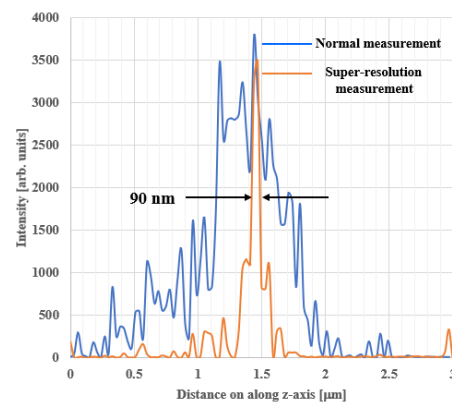
図 7-3-2 : 図 7-3-1 に示す蛍光スポット像の焦点面及び光軸面上への展開図。



(a) x-axis on focal plane



(b) y-axis on focal plane



(c) z-axis on focal plane

図 7-3-3 : 図 7-3-2 に示す破線方向の蛍光スポットの断面強度分布。

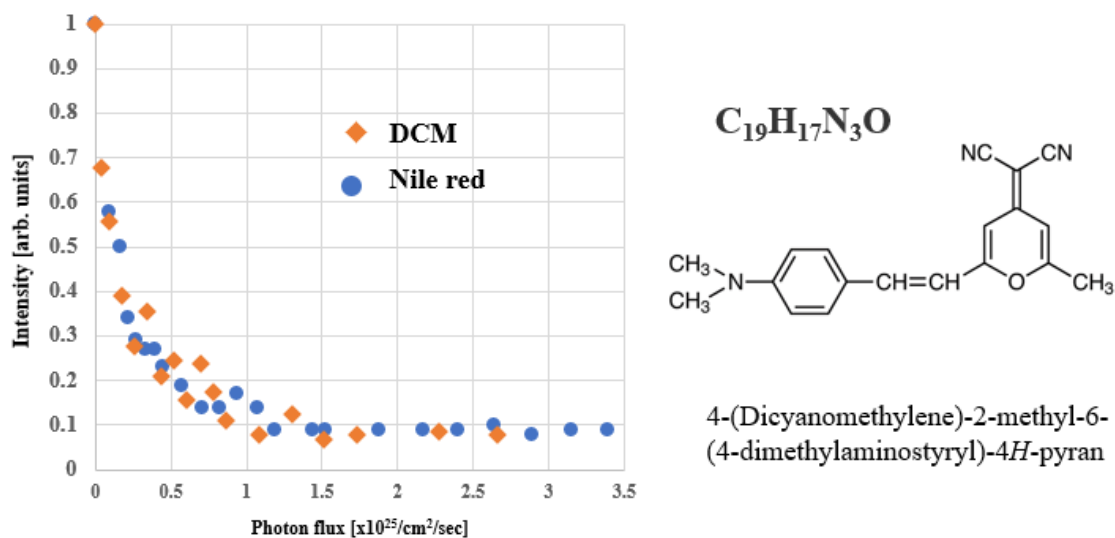


図 7-34： フォトレジスト中のDCMとポリスチレン中のNile Redの蛍光抑制特性。

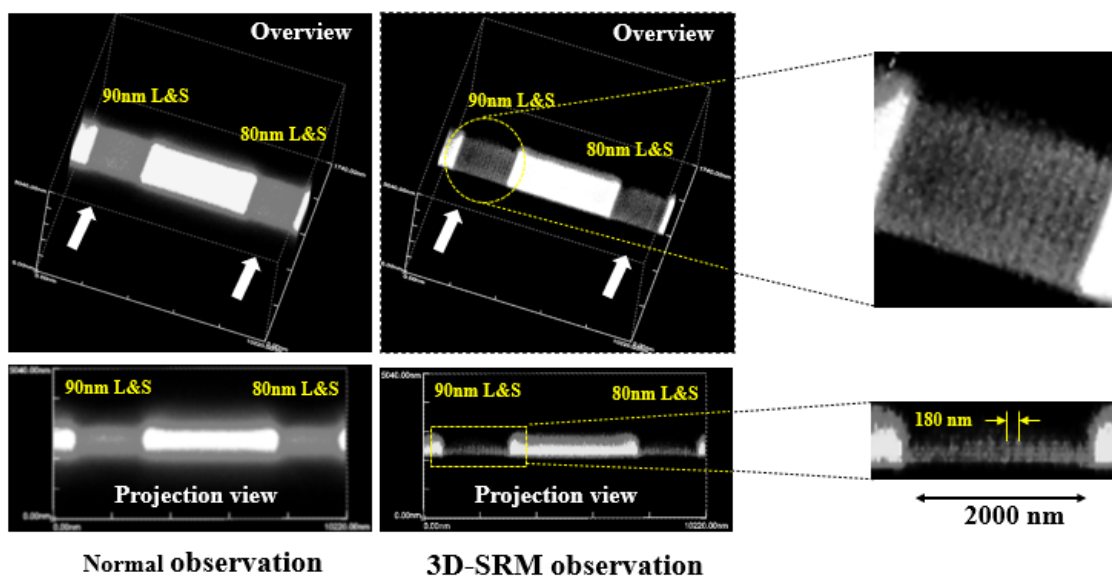


図 7-35： DCMを分散したフォトレジスト層に転写したグレーティングパターンの3次元超解像顕微鏡観察例。

【結論】

第2章から6章において述べたベクトル電場モデルによる光学シミュレーションの結果と7章で判明した蛍光抑制特性に関する知見に基づき、3次元超解像顕微鏡法の原理検証装置を構築した。本装置は、蛍光抑制効果を誘導するための外付けの光源ユニット、ポンプ光とイレース光を整形できる照明光学系、そしてレーザー走査型顕微鏡ユニットからなる。

特に、本装置において、第5章で提案した2波長対応の超解像輪帯位相板を作製し、堅牢で構造が単純な統合光路照明法を採用した。この照明法を用いることで、作製が容易な位相板を専用のホルダーに格納し、対物レンズに取り付けるだけで市販のレーザー走査型顕微鏡に3次元超解像顕微鏡機能を搭載できる様になった。本装置を用いることで、焦点面内における横方向の分解能だけでなく、深さ方向についても回折限界を遥かに上回る空間分解能が得られた。定量的な3次元的空间分解能を実測したところ、理論予測に見合った少なくとも $(100\text{ nm})^3$ 上回る立体分解能が得られることを確認した。本顕微鏡装置は、一切の数値演算処理を施すことがなく、リアルタイムで実分解能を向上させることができるので、信頼性の高い顕微鏡画像をリアルタイムで提供ができる。この様に3次元超解像顕微鏡法は、汎用性と実用性に優れた生物科学における新規な空間計測技術として期待できる。

【付録 7】

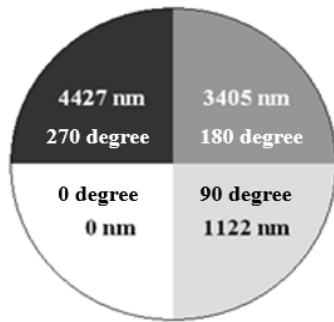
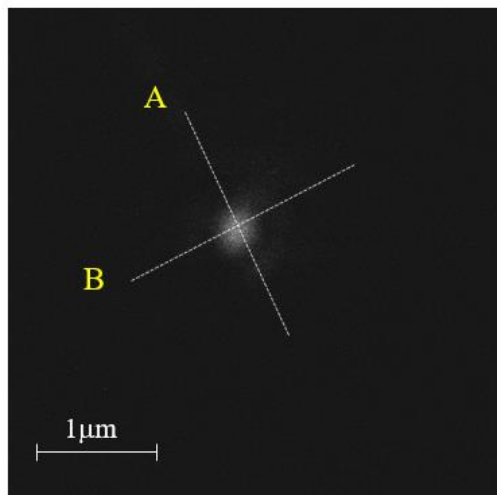


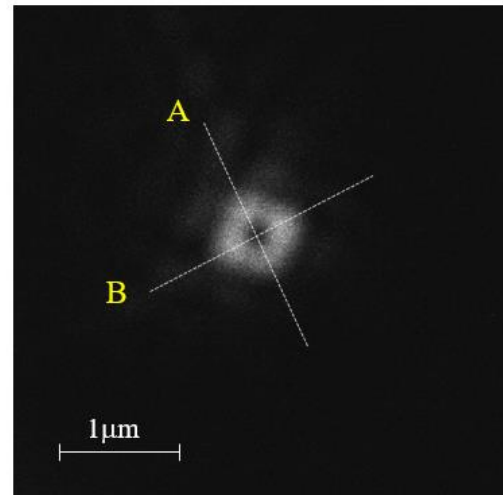
図 7-36： 疑似ラゲール・ガウシアンビーム生成用の 2 波長対応の超解像位相板

今回作製した 3 次元超解像顕微鏡装置は、第 5 章の付録 4 で述べた様に、疑似ラゲール・ガウシアン生成用の 2 波長対応の超解像位相板を用いれば、既存の 2 次元超解像顕微鏡法による観察が可能となる。図 7-36 は、波長： $\lambda_p=515$ nm のポンプ光と波長： $\lambda_e=647$ nm のイレーズ光に対する 2 波長対応の超解像位相板の設計例を示す。図 7-36 に示す様に、光学基板上の各 4 分割領域に第 5 章で述べた手法で最適化された厚みの SiO₂ 膜がコートされたものである。実際の作製では、 $\lambda/4$ ずつ 4 段階で変化するように厚みを調整した SiO₂ 膜を水晶基板に蒸着することで超解像位相板を作製できる。図 7-37 は、作製した位相板を通過したポンプ光とイレーズ光の集光

パターンを示す。パターン測定では、この超解像位相板を専用ホルダーに格納し、NA=1.4 の油浸対物レンズに取り付け、集光スポットをポンプ光でもイレーズ光でも発光する回折限界サイズの 200 nm ϕ の蛍光ビーズ（Molecular probe 社：F8806）を 2 次元空間走査した。得られた蛍光像はポンプ光とイレーズ光の集光パターンである。図 7-37 に示す様に、ポンプ光はほぼガウシアンビームとして集光している。一方、イレーズ光は、シミュレーション結果に近い中空状の疑似ラゲール・ガウシアンビームとして集光している。図 7-38 に、図 7-37 に示す破線方向のポンプ光とイレーズ光の断面強度分布を比較した。それによれば、イレーズ光はゼロ強度中心をもち、そして、ポンプ光のピーク位置とほぼ一致していることが分かる。

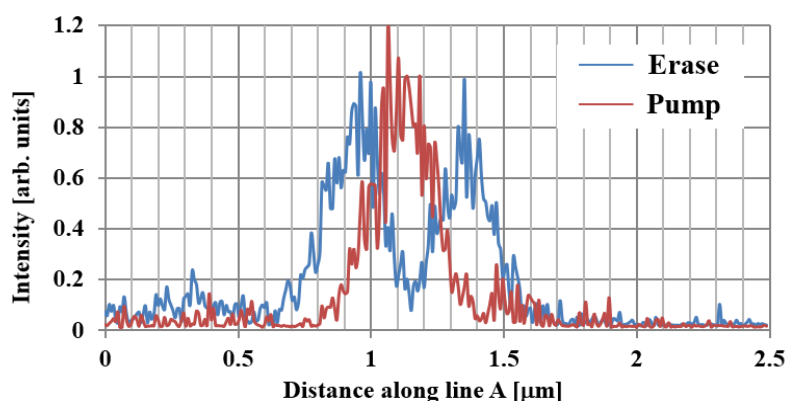


(a) ポンプ光 ($\lambda_p=515$ nm)

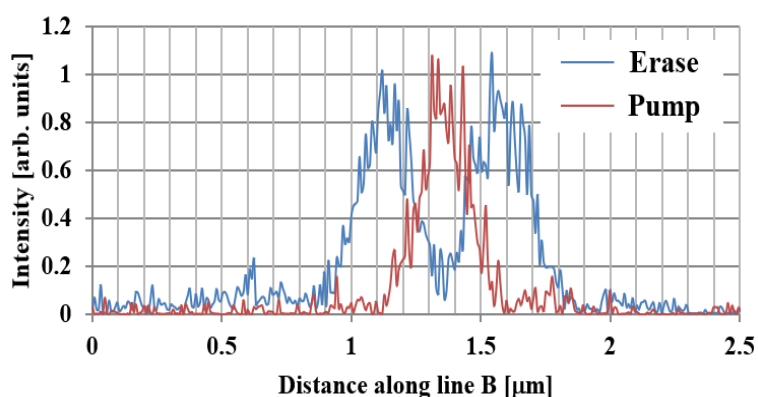


(b) イレーズ光 ($\lambda_e=647$ nm)

図 7-37： 疑似ラゲール・ガウシアンビーム生成用の 2 波長対応の超解像位相板を透過したポンプ光 (a) とイレーズ光 (b) の集光パターン。



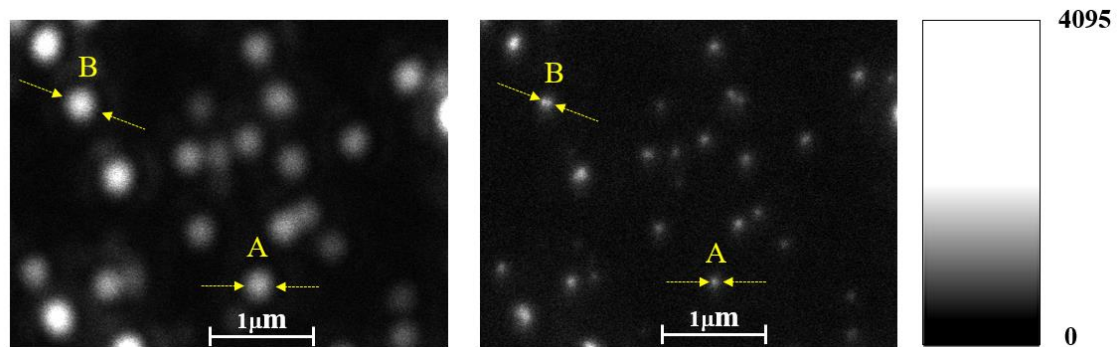
(a) 図 7-37 の A の破線部の断面強度分布



(b) 図 7-37 の B の破線部の断面強度分布

図 7-38: 図 7-37 に示す破線方向のポンプ光とイレース光の断面強度分布の比較。

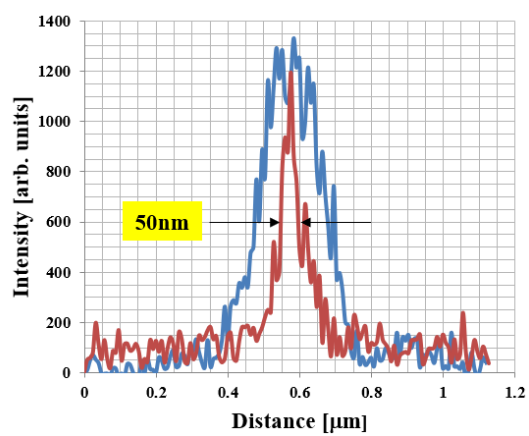
蛍光抑制効果を示す Nile Red を含浸した $50\text{ nm}\phi$ の蛍光ビーズをスライドガラスに分散し、この照明条件でビーズを 2 次元超解像顕微鏡法により観察した。図 7-39 (a) は、ポンプ光で単独照明したときの蛍光像であり、回折限界サイズのスポット蛍光像が重なりあって展開している。一方、図 7-39 (b) は焦点面でピークフォトンフラックス $10 \times 10^{25}/\text{cm}^2/\text{sec}$ をもつイレース光を同時照射したときの超解像顕微鏡画像を示す。図 7-39 (a) 中の「A」で記されたビーズ像に着目すると、超解像顕微鏡観察 (図 7-39 (b)) においてはスポット像のサイズは著しく収縮していることが分かる。また、図 7-39 (a) において、明るい蛍光スポット「B」の存在が確認できる。ところが、図 7-39 (b) に示す様に、蛍光スポット「B」は小さな 2 つの輝点に分解できていることが分かる。蛍光スポット「A」と「B」に関して、矢印で示す方向の断面強度分布を図 7-40 に比較した。図 7-40 (a) は、スポット「A」は孤立したシングルビーズの断面強度分布を示すが、それによれば FWHM はビーズサイズの 50 nm であることが分かり、2 次元超解像顕微鏡法は少なくとも 50 nm の分解能を有していることが分かる。また、図 7-40 (b) によれば 50 nm の以上の 2 点分解能も有していることを示している。



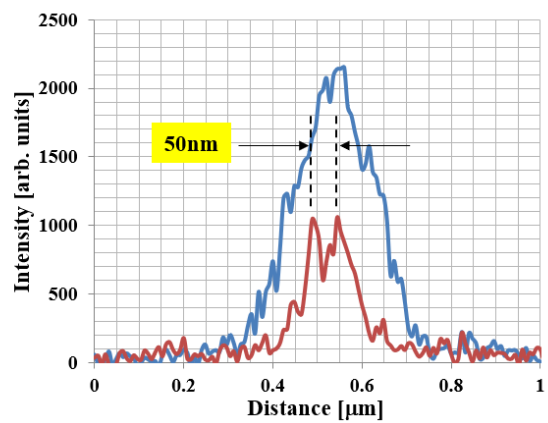
(a) 通常観察

(b) 超解像顕微鏡観察

図 7-39 : 50 nm 蛍光ビーズ (蛍光色素分子 : ナイルレッド) の 2 次元超解像顕微鏡観察例。



(a) 蛍光スポット「A」



(b) 蛍光スポット「B」

図 7-40 : 図 7-39 における「A」と「B」の蛍光スポットの断面強度分布の比較。

【付録8】 ナノインプリントを用いた超解像顕微鏡法用解像度評価スケールの作製

各種超解像顕微鏡法の確立により、光学顕微鏡でも回折限界を上回る空間分解能で試料観察が出来るようになった。特に、蛍光抑制効果を用いた超解像顕微鏡法の発展は著しく、その空間分解能は100 nmを上回っている。一般の透過型光学顕微鏡の評価においては、蒸着法により微細かつ高精度なテストスケール、所謂リチャードソンパターンが用いられ、MTF (Modulation Transfer Function) やCTF (Contrast Transfer Function) などの評価物理量が定量的かつ多角的に測定できる。ところが、超解像顕微鏡法の結像性能を確認する方法として、回折限界より小さい蛍光ビーズを観察することで点像分布関数を測定することが主流である。しかし、この方法は定量的に結像性能を評価することが出来ない。蛍光ビーズの場合、遠心分離機で粒径サイズを選別するが、市販の蛍光ビーズでは、少なくとも標準偏差で20%程度のばらつきがある。しかも、径が小さくなるにつれてそのバラつきの幅が大きくなる。従って、空間分解能が向上するにつれ、ビーズの蛍光像は径のバラつきに影響され易くなるので、必ずしも蛍光像は点像分布関数に対応しない。また、顕微鏡の結像性能において重要視される2点分解能も評価する必要がある。超解像顕微鏡法においては、回折限界以下の領域で隣接したビーズ像が空間分解できるか否かで判断するが、実際のビーズの空間配置が不明なので2点分解能が正確に評価できない。以上の様に、超解像顕微鏡法の結像性能を定量的に評価できるスケールの開発が急務となっている。すなわち、空間形状が既知の微細な蛍光構造パターンを有するスケールを用いて、倍率や視野の広さといった基本的な性能や、CTFといった光学特性から厳密な画質の評価を行う必要性に迫られている。この様な要請に対して、超解像顕微鏡法の結像性能を定量的に評価できるナノインプリント法を用いた超解像顕微鏡法用の解像度評価スケールを作製した。

ナノインプリント法は従来の半導体露光装置を使わずに微細加工パターンを形成する技術であり、光学部品の加工等に応用が始まっている。この方法では、基板表面にレジストを塗布し、モールドを押し付け、紫外光を照射し硬化させる。モールドを離型すると、モールドのパターンが基板上に形成される。この方法は基板の材質を選ばず、大面積のパターン形成ができると言った特長を有している。我々は、この特性に着目した解像度評価スケールを開発した。本スケールは蛍光色素を分散したフォトレジストを顕微鏡用のカバーガラスに塗布し、光学的回折限界に相当する空間周期200 nmより微細な細線構造体をインプリントしたものである。特に、生物顕微鏡の結像光学系においてはカバーガラスの存在も加味して、顕微鏡画質の評価を行うのが一般であるので、作製したスケールは生物用蛍光顕微鏡の結像性能の評価に適している。今回、回折限界よりも微細な細線構造体をインプリントするために、電子ビームリソグラフィ法に作製した市販の高解像度のSiO₂モールドを用いた。このモールドは160 nm～3000 nmの空間周期のライン&スペースパターンを有している。本モールドは、空間周期160 nmより長いライン&スペースパターンの形状に関してはメーカーによりスペック保証がされている。一般に、母材がSiO₂である場合、リソグラフィ加工により高解像度のパターンを形成し易い。しかし、機械的な耐久性が弱く、インプリント時

に微細なモールドパターンの破損が発生する。更に、レジスト層とモールドの離型が不完全となり易い。これらの理由で、正確な転写が出来ない危険性がある。この問題を解決するために、耐久性が高く、しかも離型に優れたNi母材とするレプリカをSiO₂モールドより電鍍法で作製し、これをナノインプリント用のモールドとして使用した。図7-41には、デューティ比1:2、高さ180 nm、空間周期160 nmのライン&スペースのレプリカモールドのSEM写真を示す。また、表7-5にナノインプリントの転写条件を示す。転写基板には、BK7を材質とする市販の生物顕微鏡用のカバーガラスを用いた。今回、フォトリソにアクリルオリゴマー誘導体を用い、そして分散性の良い蛍光色素:DCM(4-Dicyanomethylene-2-methyl-6-p-dimethyl amino styryl-4H-pyran) を添加したレジストをカバーガラス表面にスピコートした。

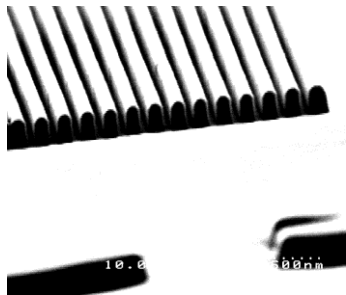


表7-5：作製条件

カバーガラス基板	BK7 40 x 40 x 0.17
レジスト層の厚み	500nm (Acrylate oligome)
色素濃度	0.1 mM/l (DCM)
スピコート速度	5000rpm
モールドパターン	140nm~6000nm 空間周期
硬化時照射強度	200mJ/cm ² (λ=375nm)
転写時圧力	0.1MPa

図7-41：レプリカモールドのSEM像。

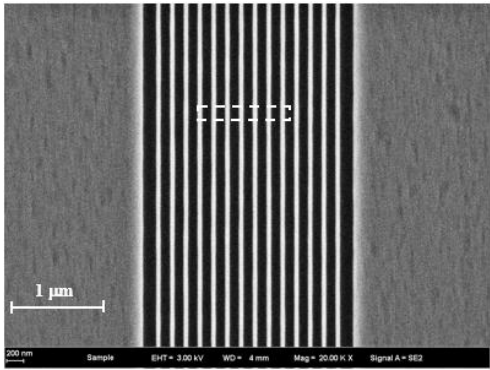


図7-42：空間周期160nmの細線パターンのSEM像。

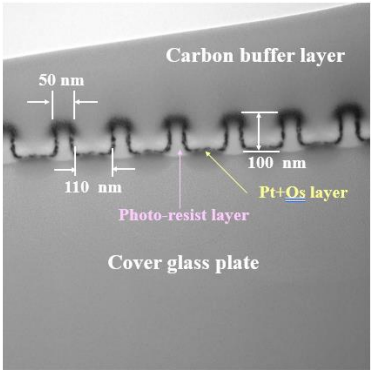


図7-43：転写部のTEM像。

図7-42は、回折限界より短い空間周期160 nmのライン&スペースパターンの転写部のSEM写真を示す。それによれば、何れの空間周波数の場合も、フォトリソ上に明瞭なライン&スペースパターンが形成できている。更に、解像度評価スケールの深さ方向の構造を確認するために、図7-42に示す四角枠のインプリント領域において切片サンプルを切り出し、そのTEM像を観察した。切片サンプルの作製においては、まず、フォトリソ

表面にPtとOsの合金薄膜を蒸着し、さらに保護層としてカーボン層をコートした。そして、これらの多層膜からなる構造体をカバーガラスと共にイオンビーム法により切り出した。図7-43に、そのTEM写真像を示す。それによれば、モールドのネガ像に対応する、空間周期がほぼ160 nm、厚み100 nm、デューティ比1:2の細線パターンがカバーガラス上に転写されていることが分かる。図7-43によれば、凹部においてフォトレジスト層が殆ど存在せず、アスペクト比が高い構造になっていることが分かる。

デモンストレーションとして、作製したスケールを用いて、2次元超解像顕微鏡の2点分解能を評価した。具体的には、付録7で述べた4分割型の疑似ラゲール・ガウシアン型のイレース光を生成する4分割型の2波長対応位相板を検証実験装置に取り付けて、回折限界以下のサイズの細線構造が分解できるか検証した。この位相板は、波長515 nmのポンプ光と波長647 nmイレース光に対して最適化されており、図7-36に示す設計仕様で各領域にSiO₂膜をコートした。まず、最初に作製したスケールの全体の状態を確認するために、Nd:YVO₄レーザー（波長：532 nm）の照明光を用い、通常のレーザー走査型顕微鏡法により7μm x 60μmの領域を蛍光観察した（図7-44）。尚、観察には開口数1.4の油浸レンズを用いた。この領域には、空間周期が160 nm ~ 1000 nmの細線パターン群が含まれている。スケールは生物試料と同様にスライドガラスに被せてセットした。それによれば、全観察領域において、斑の無い蛍光像が得られており、DCMが均一に分散したレジストへ細線パターンが良好に転写されていることが分かる。また、この領域全体において、各細線像は真直ぐであり、使用したレーザー走査型顕微鏡は歪曲収差が発生していないことが確認できる。図7-44によれば、空間周期が300 nmより長い細線パターンの構造は、明瞭に空間分解できていることが分かる。照明光の波長と対物レンズの開口数を勘案すると、回折限界における空間周期は260 nmであり、ほぼレーザー走査型顕微鏡は回折限界の解像度を有していることが分かる。

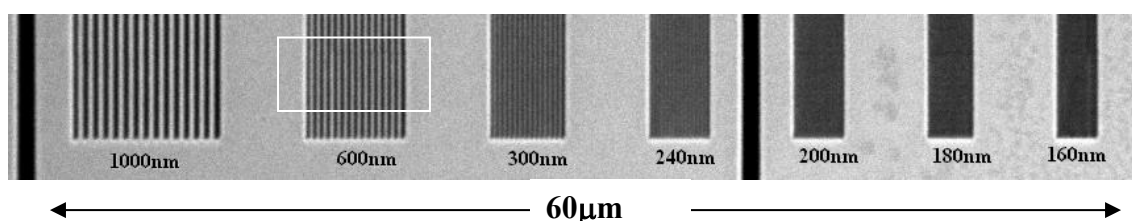
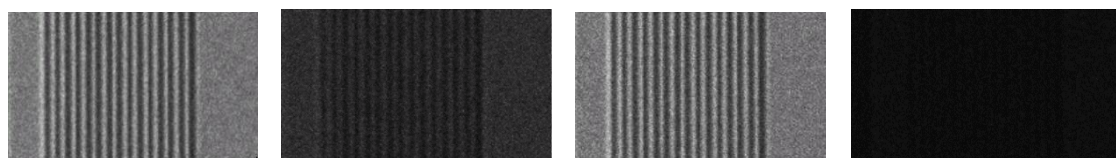


図7-44：作製したスケールの蛍光顕微鏡像。

超解像顕微鏡観察を行う為には、使用する蛍光色素分子に対してレーザー光源により蛍光抑制効果が誘導できることが不可欠である。そこで、作製したスケールに位相変調を施さないガウシアン型のポンプ光とイレース光を同時に集光して、図7-44の四角枠で囲まれた領域の蛍光画像の強度変化を確認した（図7-45）。図7-44(a)は、ポンプ光単独照射時の画像である。一方、図7-45(b)は、焦点面でピークフotonフラックス 7×10^{25}

/cm²/secのイレース光を同時照射したときの画像である。それによれば、全測定領域において著しく蛍光強度が低下しており、蛍光抑制効果が誘導できていることを示している。イレース光の照射を止め、再びポンプ光単独照射時の画像を計測すると、ほぼ初期の蛍光強度に復帰している（図7-45(c)）。更にイレース光単独照射による副次的発光も確認できない（図7-45(d)）。すなわち、超解像顕微鏡観察を可能とする蛍光抑制効果が誘導できている。



(a) ポンプ光単独照射 (b) ポンプ光・イレース光同時照射 (c) ポンプ光単独照射 (d) イレース光単独照射

図7-45：蛍光抑制効果の誘導実験。

この光学調整状態において、作製したスケールの超解像顕微鏡観察を行った。図7-46は、最も空間周期が短い160 nmと180 nmの細線構造体の計測画像を示す。測定に際し、母体機のレーザー走査型顕微鏡のガルバノミラーは10 nm/pixelで空間走査した。図7-46(a)が示す様に、通常観察ではこれら回折限界より短い周期のパターンは全く空間分解できていない。しかし、超解像顕微鏡観察時（イレース光のピークフォトンフラックスが10x10²⁵/cm²/sec）には明瞭に構造が空間分解できていることが分かる（図7-46(b)）。図7-47は、測定した160 nmの細線構造体についてその断面強度分布、すなわちCTFを示す。統計変動を減らすために、図7-46中の四角枠内の30走査ライン分の平均値を示す。図7-47(a)によれば、通常観察時には全く構造が確認できないが、図7-47(b)に示す様に超解像顕微鏡観察時には160 nmの構造が確認できる。定量的考察するために、式7-A1よりコントラスト（C）を算出すると、その値は0.23となる。

$$C = (I_{max} - I_{min}) / (I_{max} + I_{min}), \quad (7-A1)$$

ここで、式7-A1において、C_{max}は変調パターンの最大強度を示し、C_{min}は最小値を示す。すなわち、測定したパターンは160 nmの周期を有しており、同時にガルバノミラーは回折限界より微細な構造体を計測できる空間走査精度を有していることが確認できる。

以上、まとめると、蛍光抑制効果をベースにした超解像顕微鏡法の結像性能を定量的に評価できる超解像顕微鏡法用解像度評価スケールを作製した。このスケールを用いたところ、開発した超解像顕微鏡装置は少なくとも空間周期200 nmより短い構造体を空間分解できるとともに、その結像性能を評価できることを確認した。本スケールは、超解像顕微鏡法のみならず一般の蛍光顕微鏡法の結像性能の評価に広く応用できる。

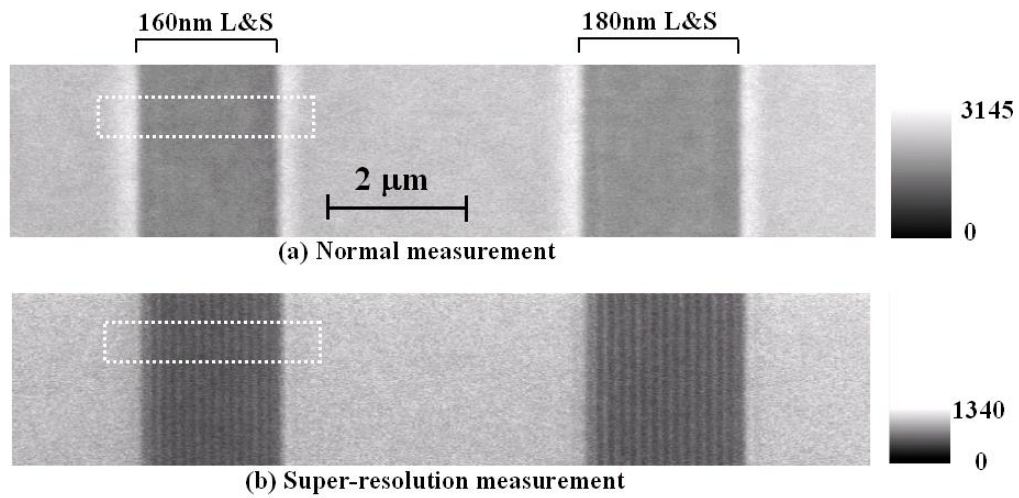


図 7-46：空間周期 160 nm と 180 nm の細線構造体の通常観察と超解像顕微鏡観察

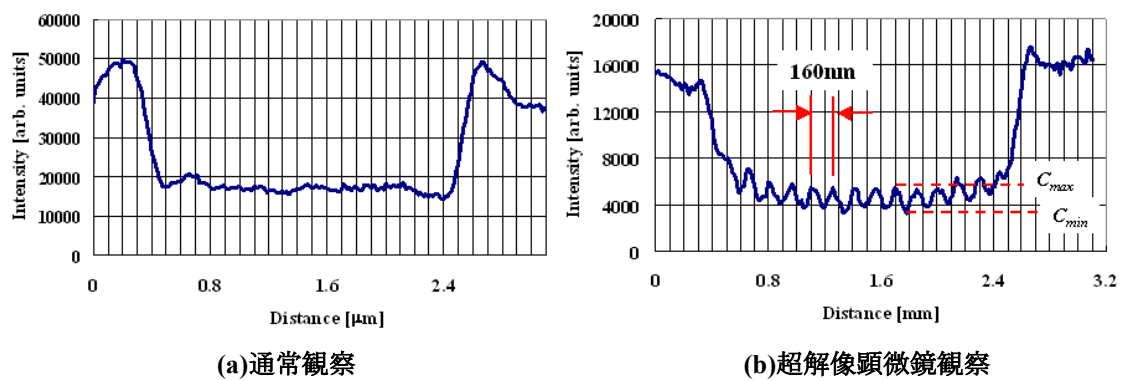


図 7-47：空間周期 160 nm のコントラスト伝達関数 (CTF)。

【第 7 章：参考文献】

- 1-1) M. Okuno, H. Kano, P. Leproux, V. Couderc, and H. Hamaguchi, *Opt. Lett.* **33**, 923 (2008);
<https://doi.org/10.1364/OL.33.000923>.
- 1-2) Y. Ozeki, Y. Kitagawa, K. Sumimura, N. Nishizawa, W. Umemura, S. Kajiyama, K. Fukui, and K. Itoh, *Opt. Lett.* **33**, 923(2008); <https://doi.org/10.1364/OL.33.000923>.
- 1-3) T. Watanabe, Y. Iketaki, T. Omatsu, K. Yamamoto, and M. Fujii, *Appl. Spectroscopy* **59**, 868 (2005); <https://doi.org/10.1366/0003702054411562>.
- 1-4) 池滝慶記、特許第 1771422 号 (2011)。
- 1-5) 池滝慶記、渡邊武史、寄林豊、梶原定文、井上登、藤井正明 *電気学会論文誌 C* **127**, 1344 (2007)。
- 1-6) Y. Iketaki, N. Bokor, T. Watanabe, and M. Fujii, *Rev. Sci. Instrum.* **77**, 063112 (2006) ;
<https://doi.org/10.1063/1.2213213>.
- 1-7) J. M. Franke, B. K. Raliski, S. C. Boggess, D. V. Natesan, E. T. Koretsky, P. Zhang, R. U. Kulkarni, P. E. Deal, and E. W. Miller, *Am. Chem. Soc.* **141**, 12824 (2019);
<https://doi.org/10.1021/jacs.9b05912>.
- 1-8) A. Yadigarli, Q. Song, S. I. Druzhinin, and H. Schönher, *Beilstein J. Org. Chem.* **15**,2552(2019); <https://doi.org/10.3762/bjoc.15.248>.
- 1-9) W. Zhou, G. Min, J. Zhang, Y. Liu, J. Wang, Y. Zhang, and F. Sun, *Nano-Micro Lett.* **3**, 135 (2011); <http://dx.doi.org/10.3786/nml.v3i2.p135-140>.
- 1-10) Y. Iketaki, H. Oi, N. Bokor, and H. Kumagai, *Rev. Sci. Instrum.* **86**, 086109 (2015);
<https://doi.org/10.1063/1.49297>.

第8章 3次元超解像顕微鏡法による生物試料の観察

要旨

代表的な生物試料である微小管と HeLa 細胞を 3 次元超解像顕微鏡法で観察した。これらの試料は、複雑で稠密な立体的な厚みのある繊維構造をもつため、既存の 2 次元の超解像顕微鏡ではその構造を空間分解することができない。しかし、3 次元超解像顕微鏡法を用いて観察したところ $(100\text{ nm})^3$ の立体分解能でその稠密な繊維構造が観察できた。更に、生物分野で広く用いられている蛍光タンパクが発現したミトコンドリア及び神経細胞を観察したところ、細胞本体及びこれに立体的に展開しているミトコンドリアの像が回折限界を上回る空間分解能で 3 次元的に観察できた。

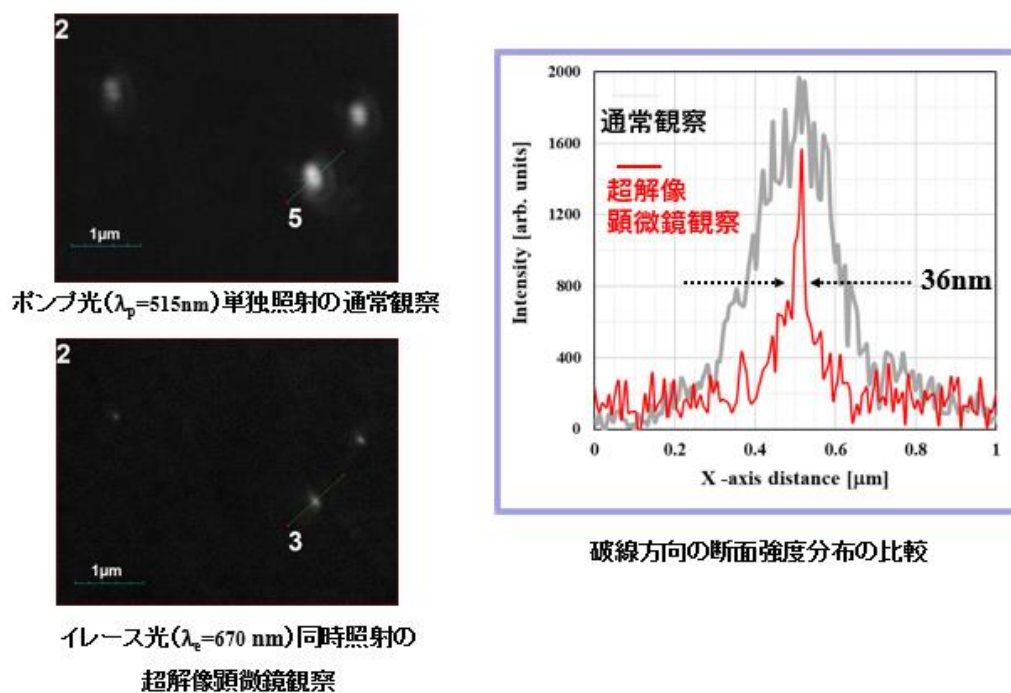


図 8-1: ラゲールガウシアン型イレース光を用いた蛍光ビーズ（平均粒径：35nm、蛍光色素分子：Nile Red）の超解像顕微鏡観察例。

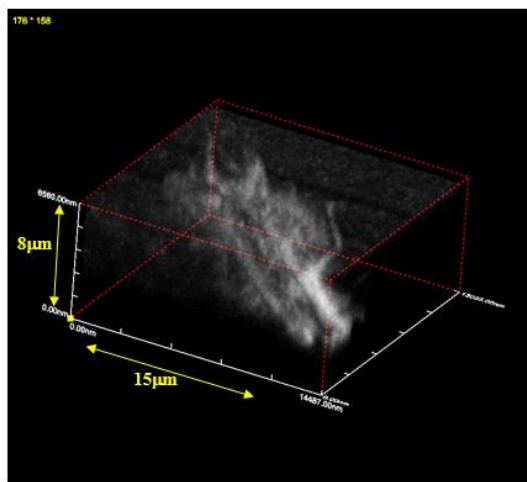
【緒言】

ライフサイエンスにおいては、細胞の分化、運動、分裂、代謝などの様々な生命現象に関して、細胞の振る舞いを出来るだけ自然な状態で観察し記録するという計測手法が強く求められている。これらの現象は、小胞体、ゴルジ体、リボゾーム、核、膜構造といったサブミクロン以下のサイズのオルガネラが協奏的に活動することによって機能する[8-1]。例

例えば、マクロファージによるミトコンドリアの分裂や細胞外の刺激に対するカルシウムイオンの時間応答など、様々な生命現象に関わるダイナミクスが挙げられる[8-1]。このようなオルガネラレベルで発現する細胞の活動に関する解明は、専ら透過型電子顕微鏡観察による構造解析が担ってきた。透過型電子顕微鏡は、光学顕微鏡では不可能なナノメータオーダーの平面分解能を誇っており、ウィルスの膜構造やミトコンドリアの内部構造の鮮明な画像を提供することができる。しかし、平面分解能と比較して焦点深度が極端に長いという欠点があるため、ウルトラマイクロームにより薄膜化された試料を包埋化する必要がある。さもないと、厚い試料を直接観察すると、深さ方向の構造が空間分解できないと同時に散乱電子のために平面分解能も著しく劣化する[8-2,8-3]。

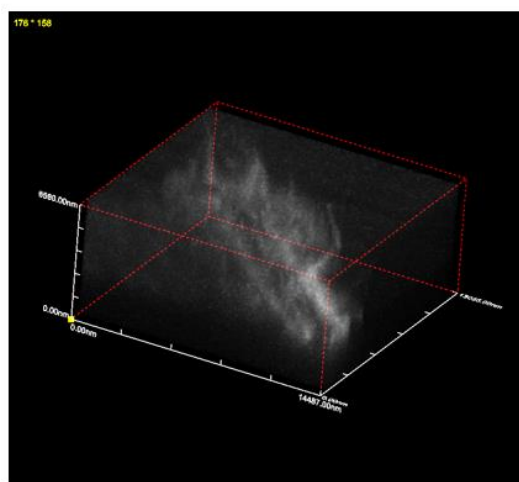
この問題点は既存の超解像顕微鏡法でも当てはまる。例えば、第4章で述べたラゲール・ガウシアンビームを用いた2次元超解像顕微鏡法を用いれば、50 nmを上回る平面分解能が得られる。図8-1は、第7章で述べた検証実験装置を用いて測定した35 nmの粒径の蛍光ビーズ（蛍光色素分子：Nile Red）の2次元超解像顕微鏡画像の例である。観察では、波長：515 nmのポンプ光と波長：670 nmのイレース光をNA=1.4の対物レンズで集光した。図8-1によれば、焦点面で最大照射強度が $5 \times 10^{25} \text{ cm}^2/\text{sec}$ でイレース光を同時照射すると蛍光スポットのFWHMがほぼ40 nmまで収縮する。

この測定条件で、Nile Redとほぼ同じ蛍光抑制特性を示すCF555で蛍光染色をしたHela細胞（厚み：3 μm ）を、試料ステージを光軸方向に走査しながら3次的に超解像顕微鏡観察を行った。図8-2は、ポンプ光単独照射の通常計測時の3次元鳥瞰図（図8-2(a)）とイレース光を同時照射したときの超解像顕微鏡観察時の3次元鳥瞰図を示す（図8-2(b)）。図8-2によれば、超解像顕微鏡観察をしても全く画像の解像度は向上していない。むしろ、全体の蛍光像が暗くなり、S/Nの劣化が際立っている。また、図8-3は、x-y焦点面、x-z光軸面、y-z光軸面の断面展開図である。図8-3(a)は通常計測時、図8-3(b)は超解像顕微鏡観察時の展開図をそれぞれ示す。これらの画像を比較すると、超解像顕微鏡画像は、確かに、x-y焦点面において空間周波数の高周波数成分が増えている様にみえる。しかし、これらを比較すると焦点面においても超解像顕微鏡法による分解能の向上は確認できない。この理由は、2次元超解像顕微鏡法における光軸方向の蛍光スポットは平面方向よりも一桁大きい回折限界サイズのFWHMをもつことによる。図8-4は光軸方向に試料ステージを走査しながら計測した蛍光ビーズのスポットの3次元超解像顕微鏡画像を示す。図8-4(b)の超解像顕微鏡観察画像が示す様に平面方向には蛍光スポット像は著しく収縮しているが、深さ方向には600 nm以上も伸びたライン状になることが分かる。従って、この様に極端に焦点深度が深い光プローブで空間計測をすると深さ方向から発光する蛍光をすべて計測してしまうので、実質的に空間分解能が向上しない。



ポンプ光($\lambda_p=515\text{nm}$)単独照射の通常観察

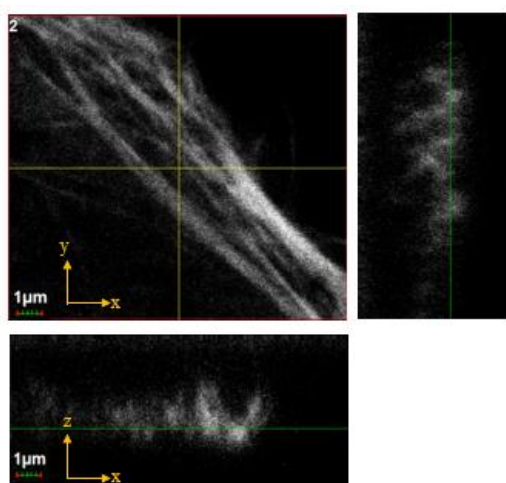
(a)



イレース光($\lambda_e=670\text{nm}$)同時照射の超解像顕微鏡観察

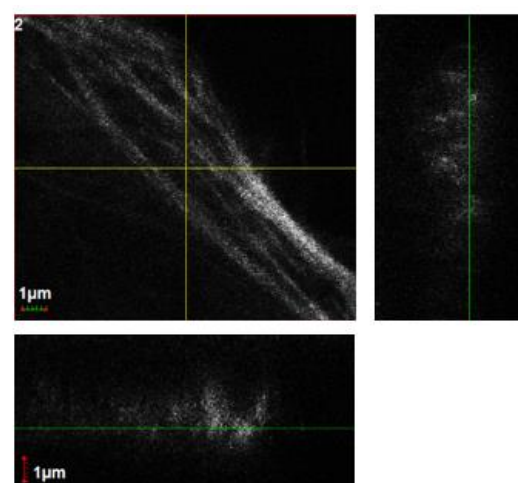
(b)

図 8-2: ラゲール・ガウシアン型のイレース光を用いた HeLa 細胞（蛍光色素分子：CF555）の超解像顕微鏡観察例（3次元鳥瞰画像）。



ポンプ光($\lambda_p=515\text{nm}$)単独照射の通常観察

(a)



イレース光($\lambda_e=670\text{nm}$)同時照射の超解像顕微鏡観察

(b)

図 8-3: ラゲール・ガウシアン型イレース光を用いたときの HeLa 細胞（蛍光色素分子：CF555）の超解像顕微鏡観察例（3次元展開画像）。

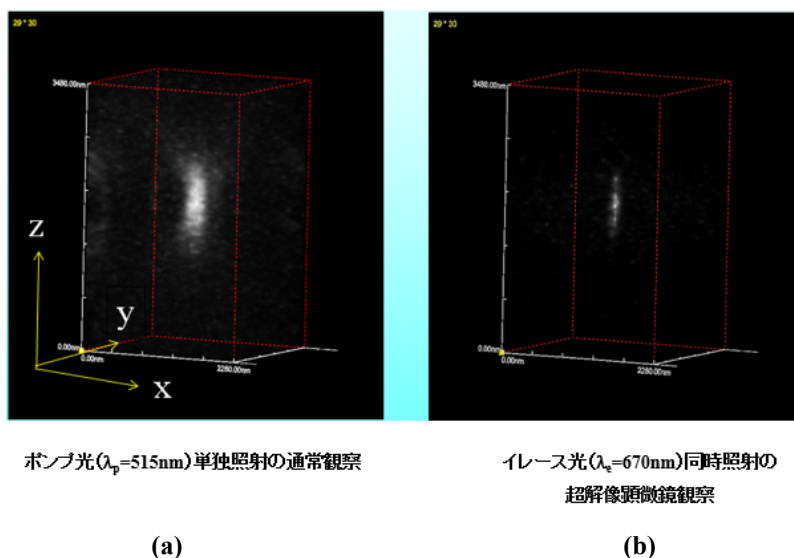


図 8－4: ラゲール・ガウシアン型のイレース光を用いた場合における蛍光ビーズ（平均粒径：60 nm、蛍光色素分子：Nile Red）の蛍光スポットの超解像顕微鏡観察時の空間形状。

【3次元超解像顕微鏡法による微小管とアクチンフィラメントの観察例】

上記の様に立体構造をもつ生物試料に対しては、平面分解能のみをいくら向上させても顕微鏡画像の解像度は必ずしも改善されないことが確認できた。そこで、本章では、3次元超解像顕微鏡法を用い、深さ分解能を向上させることにより生物画像の解像度を改善できるかどうかの検証を行った。まず、最初に回折限界サイズ以下の太さをもつ微小管の観察を行った。試料には商用色素 Alexa546 で抗体染色したラットの PtK2 腎細胞の微小管（径：25 nm）を用いて検証を行った。次に、CF555 で蛍光染色した HeLa 細胞のアクチンフィラメント（径：8 nm）についても検証を行った。

i) Alexa546 で抗体染色したラットの PtK2 腎細胞の微小管の 3 次元超解像顕微鏡観察

図 8－5 は、Alexa546 で抗体染色したラットの PtK2 腎細胞の微小管における蛍光抑制効果の誘導実験結果を示す。この時のポンプ光とイレース光の照明条件を表 8－1 に示す。図 8－5 (a) は、蛍光抑制効果誘導前のポンプ光単独照射時の微小管の焦点面における蛍光像を示す。そして、図 8－5 (b) はポンプ光とビーム整形無しのカウシアン型のイレース光を同時照射して蛍光抑制効果を誘導したときの蛍光像の変化を示すが、蛍光強度が著しく弱くなっていることが分かる[5-4]。図 8－5 (c) に示す様に、蛍光抑制効果誘導後に再びポンプ光単独照射により微小管の蛍光像の計測を行うと、ほとんど Alexa546 が褪色していないことが確認される。図 8－6 は、図 8－5 の破線部が示す微小管像の断面強度分布を比較したものである。図 8－6 によれば、ポンプ光とイレース光同時照射時には、蛍光強度が 1/6 までに低下していることが分かる。図 8－6 の破線のグラフに着目しても、やはり蛍光抑制効果の誘導に伴う褪色は殆ど無いことが定量的に分かる。

表 8－1：Alexa546 における蛍光抑制効果の誘導条件

対物レンズ：NA	1.3
ポンプ光波長： λ_p	515 nm
集光したポンプ光のピークフォトンフラックス： I_p	$8 \times 10^{21} / \text{cm}^2 / \text{sec}$ （焦点面）
イレース光波長： λ_e	670 nm
集光したイレースのピークフォトンフラックス： I_e	$5 \times 10^{25} / \text{cm}^2 / \text{sec}$ （焦点面）

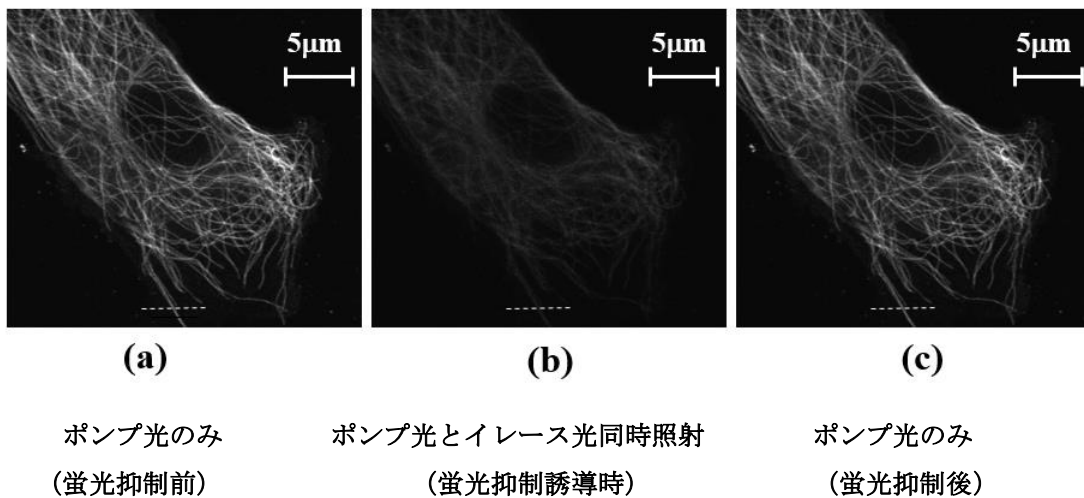


図 8－5：Alexa546 で抗体染色したラットの PtK2 腎細胞の微小管の蛍光抑制効果
(a) 蛍光抑制効果誘導前のポンプ光単独照射時の蛍光像、(b) ポンプ光とビーム整形無しの高ウシアン型のイレース光を同時照射して蛍光抑制効果を誘導したときの蛍光像、(c) 蛍光抑制効果誘導後のポンプ光単独照射時の蛍光像。

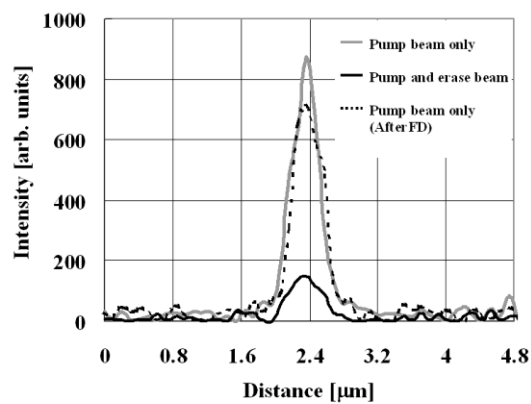


図 8－6：図 8－5 に破線部が示す微小管の断面強度分布の比較。

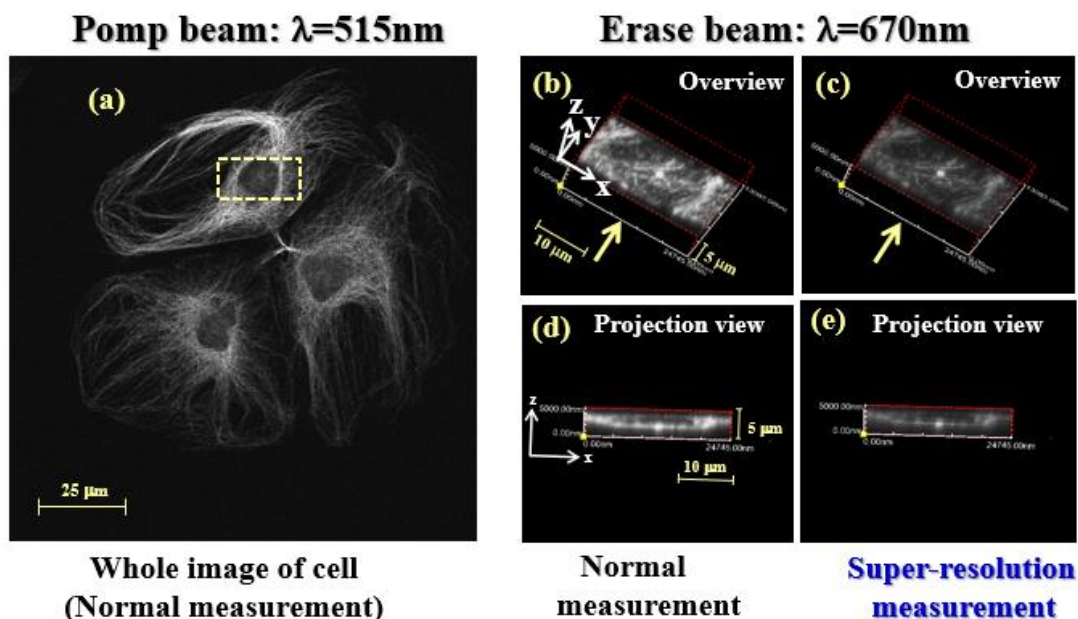


図 8－7: Alexa546 で抗体染色したラットの PtK 腎細胞の微小管の 3 次元超解像顕微鏡観察例。
 (a) 微小管の全体像 (通常のポンプ光照明のみでの通常の顕微鏡観察)。(b) 通常の顕微鏡観察時の画像 (a) の破線内に示す 3 次元顕微鏡像。(c) 3 次元超解像顕微鏡観察時の画像 (a) の破線内に示す 3 次元顕微鏡像。(c) 通常の顕微鏡観察時の画像 (b) の矢印方向からの側面図。(e) 3 次元超解像顕微鏡観察時の画像 (c) の矢印方向からの側面図。

表 8－1 の調整下で、光軸面でピークフォトンフラックスが $5 \times 10^{25} / \text{cm}^2 / \text{sec}$ となる様にイレース光を照射したときの (式 (2-A10) により換算すると対物レンズに投入するレーザー強度は 30 mW に対応する) PtK2 腎細胞の微小管の 3 次元超解像顕微鏡観察例を図 8－7 に示す。図 8－7 (a)、はポンプ光照明のみで通常の共焦点顕微鏡観察をしたときの PtK2 細胞の全体像である。図中の破線で囲んだ核を含む領域を、光軸方向に試料をステージ走査して 3 次元超解像顕微鏡観察をした。図 8－7 (b)と(d)は、通常観察時の 3 次元鳥瞰図と側面図を示す。一方、図 8－7 (c) と (e) は、超解像顕微鏡観察時の 3 次元鳥瞰図と側面図を示す。鳥瞰図を比較すると、超解像観察時には各微小管の像が細くなり透明感のある 3 次元画像になっている。そして、側面図を比較すると、微小管の輪郭像が光軸方向にシャープになり深さ分解能が向上していることが分かる。より詳しく考察するために、細胞核を含む領域の 3 次元空間計測を行った。図 8－8 (a)は通常観察時、図 8－8 (b)は超解像顕微鏡観察時の展開画像を示す。図 8－8 (a)と図 8－8 (b)において、x-y 焦点面における画像と破線に沿った深さ方向の断面像 (x-z 及び y-z 断面) を比較した。これらの図画示す様に、超解像観察時には焦点深度が極めて浅くなり、かつ、特に微小管の深さ方向の断面像は著しく細くなっていることが確認できる。すなわち、3 次元超解像顕微鏡観察を行うと深さ方向の分解能が著しく向上していることを示している[8-5,8-6]。実際に、得られた画像において 3 次

元的に分解能が向上していることを確認するためにカバーガラスに平面的に張り付いた微小管を空間計測した（図8－9）。図8－9によれば、各微小管の断面像は焦点面内及び深さ方向に均等に細くなっていることが分かる。図8－10は、焦点面及び光軸面における微小管像の断面強度分布を示すが、それらの FWHM は共に 100 nm であり、第7章で述べた検証実験装置の結像性能と矛盾しないことが分かる。図8－11は、図8－9を3次元に再構成した鳥瞰図と側面図であり、通常観察時には微小管像は深さ方向に広まったベルト状になっているが、3次元超解像顕微鏡観察行くと著しく縦分解能が向上し、微小管本来の形である繊維状になっていることが分かる。

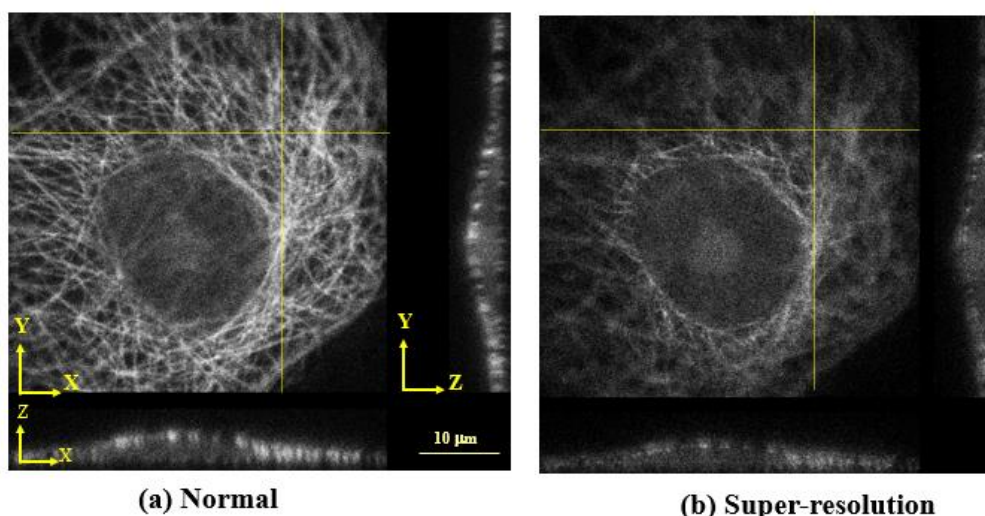


図8－8： PtK2 腎細胞の細胞核の含む領域の通常観察時 (a) と3次元超解像顕微鏡観察時 (b) の3次元展開画像。

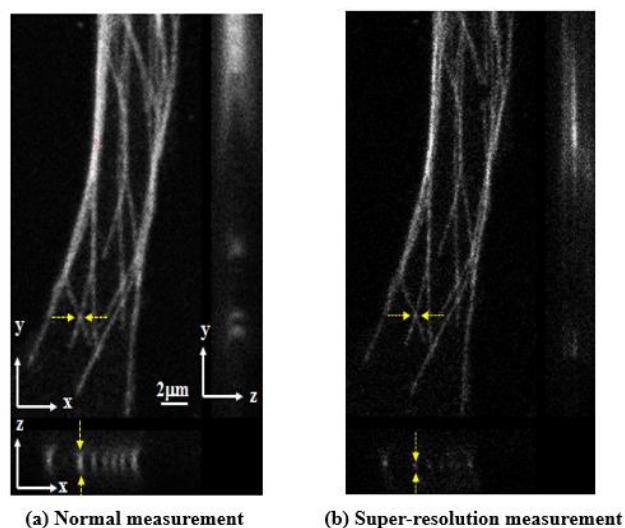
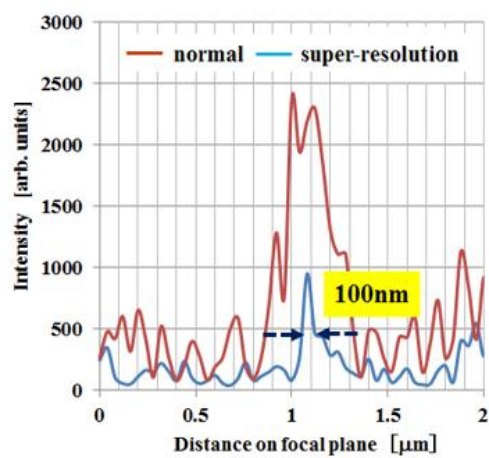
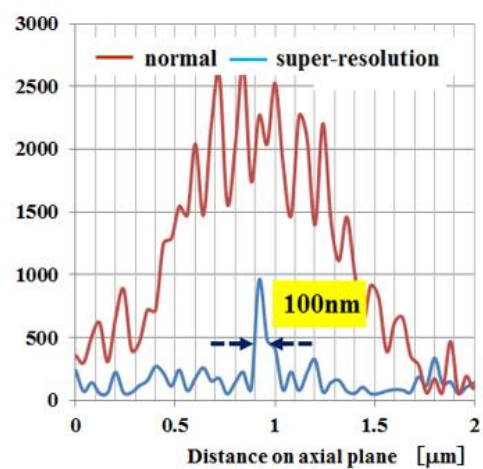


図8－9： PtK2 腎細胞の細胞核の含む領域の通常観察時 (a) と3次元超解像顕微鏡観察時 (b) の3次元展開画像。

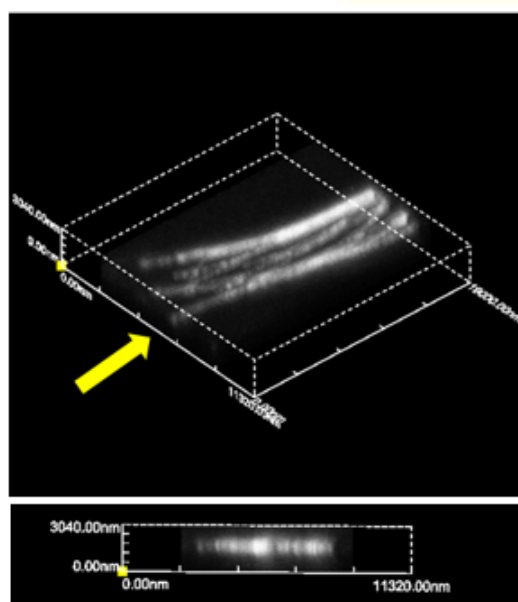


(a) x-direction on focal plane

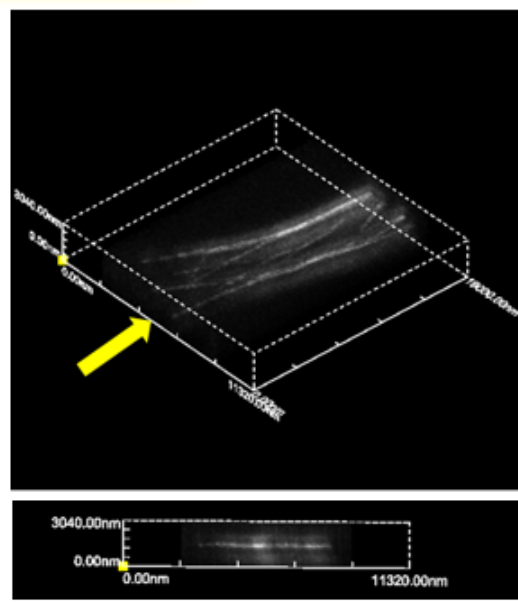


(b) z-direction on optical axial plane

図 8－10：焦点面及 (a) び光軸面における微小管像 (b) の断面強度分布。



(a) Normal measurement



(b) Super-resolution measurement

図 8－11：図 8－9 に示す PtK2 腎細胞の微小管の通常観察時 (a) と 3 次元超解像顕微鏡観察時 (b) の 3 次元の鳥観図とその側面図。

ii) CF555 で蛍光染色した HeLa 細胞のアクチンフィラメントの 3 次元超解像顕微鏡観察
 微小管に引き続き、蛍光色素分子 CF555 で蛍光染色したより細い繊維構造をもつ HeLa 細胞のアクチンフィラメントの 3 次元超解像顕微鏡観察を行った。この蛍光色素分子も波長：515 nm のポンプ光と波長：670 nm のイレース光で蛍光抑制効果の誘導が可能なので、表 8-1 の条件で観察を行った。図 8-1 2 は、微小管の評価と同様な方法により CF555 で蛍光染色した HeLa 細胞のアクチンフィラメントに対する蛍光抑制効果の誘導の様子を示す [2-10]。図 8-1 2 によれば、整形無しのカウシアン型のイレース光をポンプ光により同時照射を行うと、Hela 細胞のアクチンフィラメントの蛍光像の明るさが著しく低下していることが分かる。図 8-1 3 によれば、図 8-1 2 における細線部の断面強度分布を比較すると蛍光強度が 1/5 以下に減少していることが分かる。また、イレース光単独照射時には散乱光など副次光が検出されず、良好な分光計測条件で超解像顕微鏡観察が出来ることが分かる。

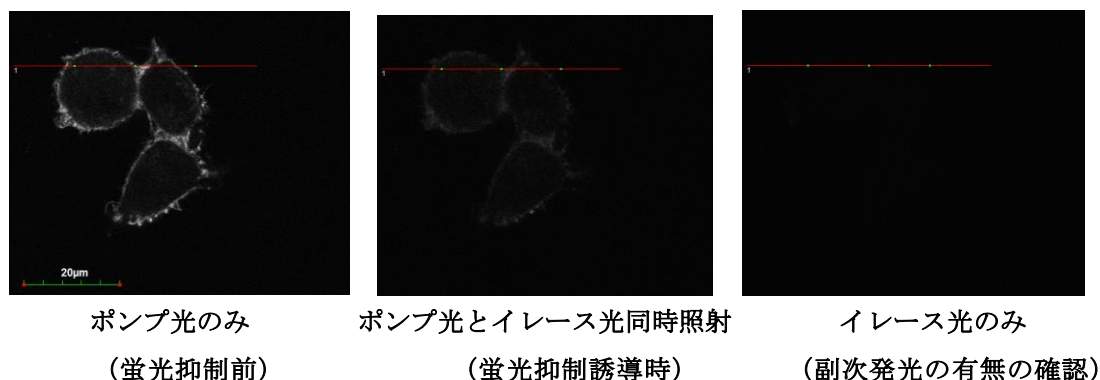


図 8-1 2 : CF555 で蛍光染色した HeLa 細胞のアクチンフィラメントの蛍光抑制効果の誘導。

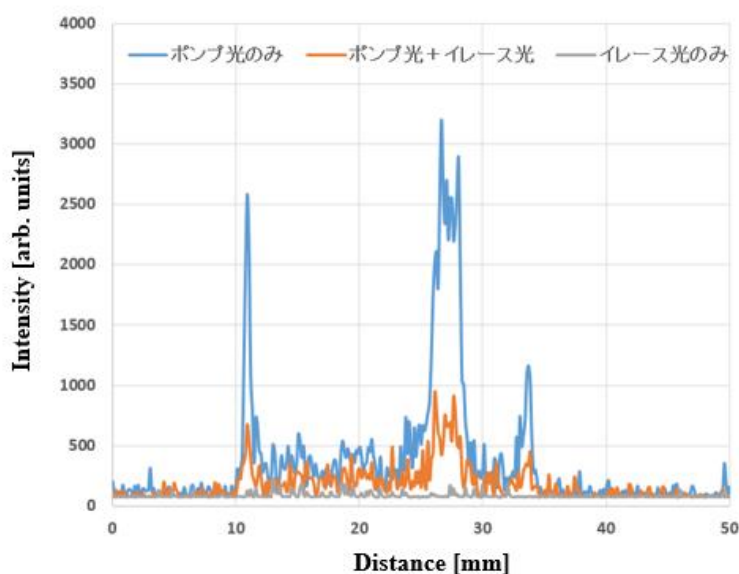


図 8-1 3 : 図 8-1 2 に示す細線部の断面強度分布。

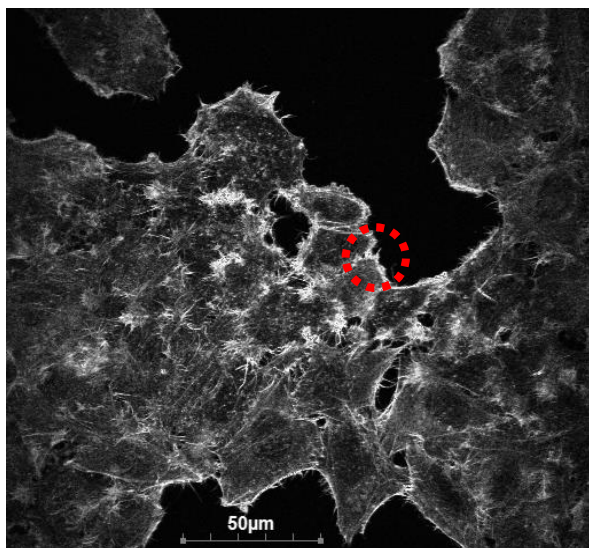


図 8－1 4：Hela 細胞の全体蛍光顕微鏡画像。

図 8－1 4 は、HeLa 細胞が密集した領域のポンプ光を単独照射したときのレーザー走査型顕微鏡画像を示す。特に、丸で囲んだアクチンフィラメントの繊維束が成長しつつある先端領域の 3 次元超解像顕微鏡観察を行った。図 8－1 5 (a) はポンプ光照射のみの通常の 3 次元のレーザー走査型顕微鏡観察像であり、図 8－1 5 (b) は 3 次元超解像顕微鏡画像を示す。図 8－1 5 が示す様に、超解像顕微鏡観察を行うと各アクチンフィラメントの像が精細になり、3 次元のかつ複雑に折り重なって伸びている様子が分かる。

特に側面図では通常観察では全く空間分離できなかった深さ方向の繊維構造が明瞭に分離できている。3 次元超解像顕微鏡法では空間的等方性をもつ微細な蛍光スポットにより試料を空間計測することができるので、稠密な立体構造をもつ生物試料の観察に適している。

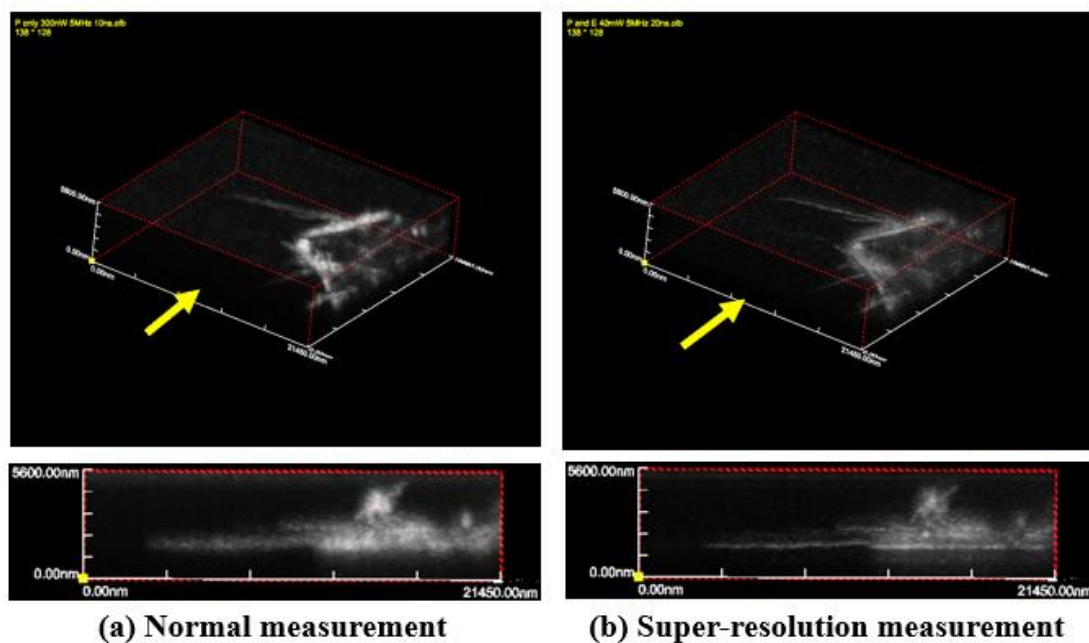


図 8－1 5：図 8－1 4 に示す円内の空間領域を 3 次元超解像顕微鏡観察したときの画像。
(a) はポンプ光照射のみの通常観察像。(b) 3 次元超解像顕微鏡画像。

【3次元超解像顕微鏡法による蛍光タンパク発現試料の観察】

細胞内の標的タンパク質と蛍光タンパク質との融合遺伝子を細胞に発現させる手法は、元来の標的タンパク質の性質や局在を変えずに標識できるため、従来の低分子蛍光ラベル化合物による標識法に比べてシグナルの評価が容易となるので繁用される。一方で、イメージングの研究対象はますます高解像度の観察を必要としており、細胞膜と細胞内小器官や、シナプス前後細胞膜などの生体膜の近接した 10~20 nm 程度の部分における 3 次元的な分子局在などますます高解像度の観察が必要とされるものになっており、従来の光学顕微鏡の回折限界を上まわる空間分解能を持った様々な超解像顕微鏡法の適用が始まっている。特に、ブリンキングをする特殊な蛍光団をもつ蛍光タンパクを用いた PALM/STORM 法によるイメージング、所謂、光局在化法を用いた新発見の報告も相次いでいる[8-7]。既存の蛍光抑制効果を用いる STED などの手法は解像度の改善幅が原理的に最も見込める。しかし、いずれの手法も平面分解能の改善にとどまり、3 次元的な空間分解能の向上は見込めない。さらに、光局在化法を適用する前提として蛍光団が孤立してスパースに分布していることが前提であるが、蛍光タンパクの空間的な発現量はコントロールできないので観察の際の障害となっている。また、蛍光抑制効果を用いる手法においては、試料内で発現した蛍光タンパクの蛍光抑制特性が未知のため、生物学への適用は PALM/STORM 法などに対して導入が進んでいない。本章で明らかにしたように、3 次元超解像顕微鏡法用いればアクチンフィラメントなど稠密で複雑な立体構造をもつ生物試料であっても、3 次元的な空間分解能の向上ができることを明らかにした。そこで、試料内で発現した蛍光タンパクの蛍光抑制特性を分光学的に明らかにして、蛍光タンパク発現試料の 3 次元超解像顕微鏡観察を試みた。

1) 蛍光タンパク pTagRFP-mito 発現試料の調製

観察試料として、以下の 2 つの理由により、発現試料として神経細胞上に展開するミトコンドリアを用いた。1) ミトコンドリアは細胞全体に存在するので神経細胞の大まかな構造を反映した形体を持つため通常観察でも見つけやすいこと、2) 神経細胞の多数の突起に輸送されるので、輸送中のミトコンドリアの大きさ、形、構造が確認しやすい。この試料に関して、蛍光抑制特性評価用の試料と超解像顕微鏡観察用の pTagRFP-mito 発現試料を調製した[8-8,8-9]。

i) 蛍光抑制特性評価用の試料調整

pTagRFP-mito プラスミド (Evrogen) を template として、BamHI/XhoI サイトを両端に持つ RFP 遺伝子である KOD-one を用いて PCR 法で作成した (プライマー fwd: AAA GGA TCC ATG GTG TCT AAG GGC GAA GA、rev: AAA CTC GAG TCA ATT AAG TTT GTG CCC CAG TTT G) [8-10]。PCR 産物を pGEX-6P-1 プラスミドの multi cloning site に挿入し、大腸菌株 DH5 α に導入し、コロニー PCR によって pTagRFP-mito の挿入があったクローンの DNA 配列を確認した。このクローンのプラスミドを用いて大腸菌株 BL21 Gold を形質転換し、得ら

れた単一コロニーを LB 培地中、37℃で OD600=0.5 まで培養した。氷冷下で 50 μ M IPTG (isopropyl β -D-thiogalactopyranoside)を加えて 20℃で一晩培養した。菌体を PBS 中で超音波破碎した。遠心上清に Glutathione Sepharose ビーズを加え 4℃で一晩回転攪拌、PBS でビーズを 3 回洗浄の後、50 mM TrisHCl at pH 7.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol 溶液中で PreScission Protease (Sigma) により RFP を切断分離し、遠心により上清の pTagRFP-mito を回収した。タンパク質濃度は BCA 法により測定した結果 2.2 mg/ml で、SDS-PAGE により単一タンパク質であることを確認した。吸収極大は 556 nm に認められ、Evrogen 社の資料や既報とほぼ一致した (図 8-16) [8-11]。菌体で発現させる際に 37℃などで行うと pTagRFP-mito の凝集が著しい。これを防ぐために IPTG による発現誘導は低温で行なった。発色団形成後の低温 (4℃) 保存状態では濃度が高いと凝集が起こりやすい傾向が認められた。蛍光タンパク質の発色団はタンパク質合成後のしばらくの間をおいて形成される。発現は低温で控えめに、熟成は室温 (25℃) ~37℃で行うと比較的速やかにピンク色が目立って増加し、可溶性を保った。

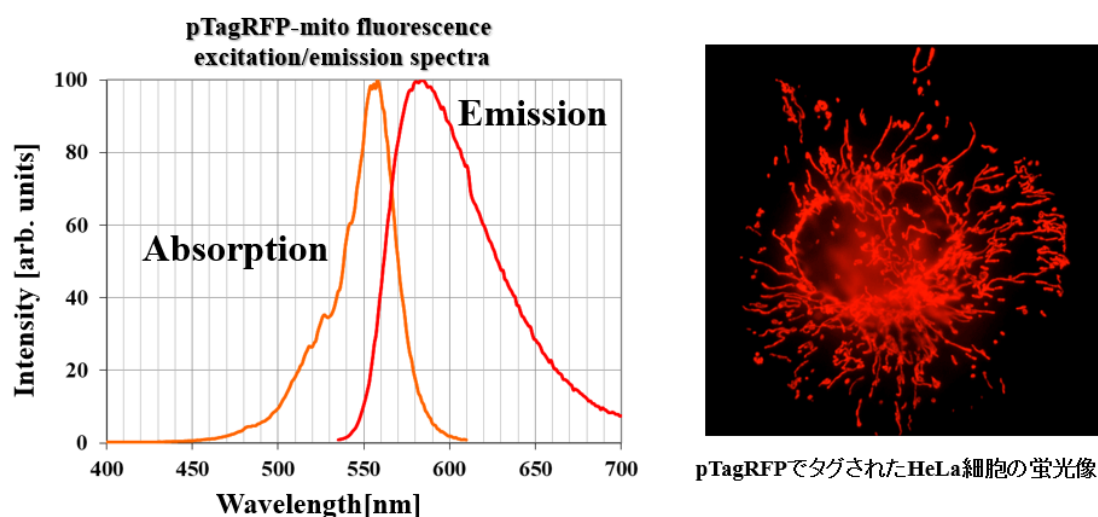


図 8-16 : 発現した pTagRFP-mito の吸収・蛍光スペクトル。

ii) 超解像顕微鏡観察用のラット海馬初代培養神経細胞における pTagRFP の発現

Wistar ラット (日本クレア) E17 日の胎仔から海馬を摘出し、細断後神経細胞分散液セット (DS ファーマ) を用いて神経細胞および主要グリア細胞を単離した (図 8-17)。Poly-L-Lysine コートしたカバーガラス上の Flexiperm Disc (Greiner) 一穴に 1×10^5 細胞を撒き、MEM (Sigma M7278、グルタミン、B27Electro supplement、aminophosphonovalerate を添加) で培養した。DIV (Days in vitro) 7 日目に pTagRFP-mito プラスミド (Evrogen) を Lipofectamine 2000 を用いて transfection した。DIV20 で培地を温 PBS で洗浄した後、4 % paraformaldehyde を含む PBS pH7.4 で室温 30 分固定後、PBS で 3 回洗浄した後に風乾し、光酸化防止封緘剤 prolong diamond (Molecular Probes) でスライドガラスに封緘し冷蔵保存した。使用した

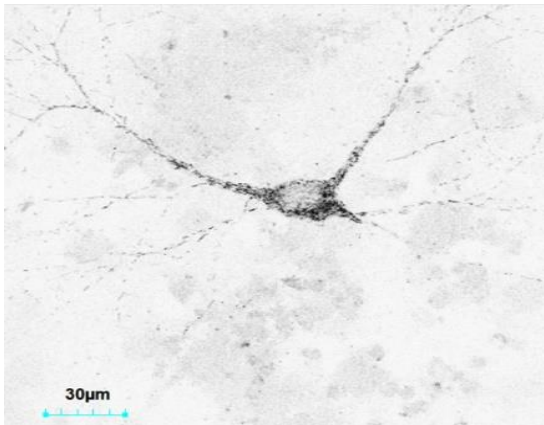


図 8-17 : TagRFP が発現した神経細胞および主要グリア細胞の蛍光像。

pTagRFP-mito は、Tag-RFP の N 末側に cytochrome-c oxidase subunit 8 の mitochondria targeting sequence を融合させたもので、これにより RFP たんぱく質がミトコンドリア内膜に結合して発現する。通常の解像度の蛍光顕微鏡による観察では、神経細胞特異的に発現する Homer1 プロモータに組み込んだ DsRed2-mito プラスミドを transfection した際と同様の像が観察されたので、今回用いたプラスミドによる CMV プロモータで駆動される pTagRFP-mito の発現は主に神経細胞に局限している。

2) 蛍光タンパク pTagRFP-mito の蛍光抑制効果の誘導

3次元超解像顕微鏡観察に先立って、まず pTagRFP-mito の過渡吸収スペクトル（誘導吸収スペクトル）を測定し、蛍光抑制効果を誘導するために最適な波長のポンプ光とイレース光の組合せを決定した（図 8-18）。

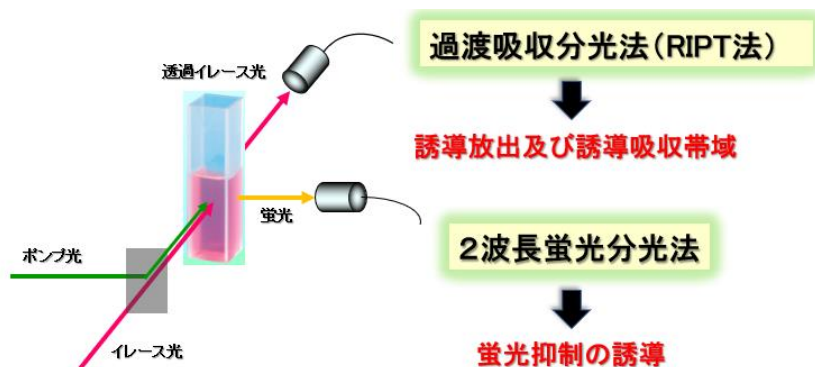


図 8-18 : 蛍光抑制効果を誘導するための蛍光発色団の分光特性の把握。

i) RIPT 法による pTagRFP-mito の過渡吸収スペクトル（誘導吸収スペクトル）の測定

RIPT 法（Randomly Interleaved Pulse Train Method）は、付録 9 で述べる様に、ポンプ光で分子を S_0 から S_1 へ励起後、白色光を照射して S_1 から S_n へ励起する際の吸収スペクトル、すなわち過渡吸収スペクトルの時間応答を計測する分光法である（図 8-19）[1-12]。pTagRFP の溶液試料は 2 mm 長の石英セルに吸光度 0.7 で調製を行った。本測定では、波長可変の OPO レーザーを用いて、この $S_1 \leftarrow S_0$ 吸収ピーク波長である 550 nm の繰り返し周波数 1KHz のパルス列をセルに照射した。パルス幅は 200 ps であり、パルス当たり 3 μ J の照射強度でオペレートした。一方、プローブ光はパルス幅：200 ps、周波数：20 MHz のスーパーコンティニューム光源を用いた。これらのポンプ光とイレース光を非同期でセルに同軸

で照明し、透過したプローブ光の強度を分光して計測する。そして、波長毎にポンプ光照明時からの透過光の強度の時間応答関数を求める（図 8－20）。それによれば、ポンプ光が入射してから 4 ns の時間帯において応答関数がマイナスからプラスに振れている。すなわち、この時間帯に S_1 状態からの誘導放出や誘導吸収が起こっていることが分かる。図 8－21 にはプローブ光に反応するポンプ光が入射してから 3.4 ns の間の各波長の透過率の変化、すなわち、過渡吸収スペクトルを示す。それによれば、波長 510～750 nm の間はスペクトル値がマイナスとなり、誘導放出による増幅が優勢に起こっており、STED タイプの超解像顕微鏡のイレース光として利用できる可能性のある波長帯域であることを示している[8-13]。

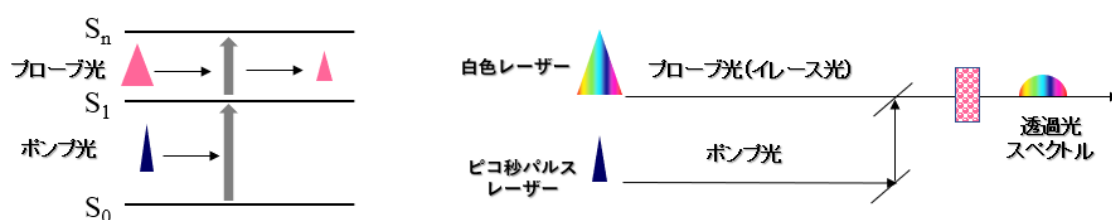


図 8－19：RIPT 法による過渡吸収スペクトルの測定原理。

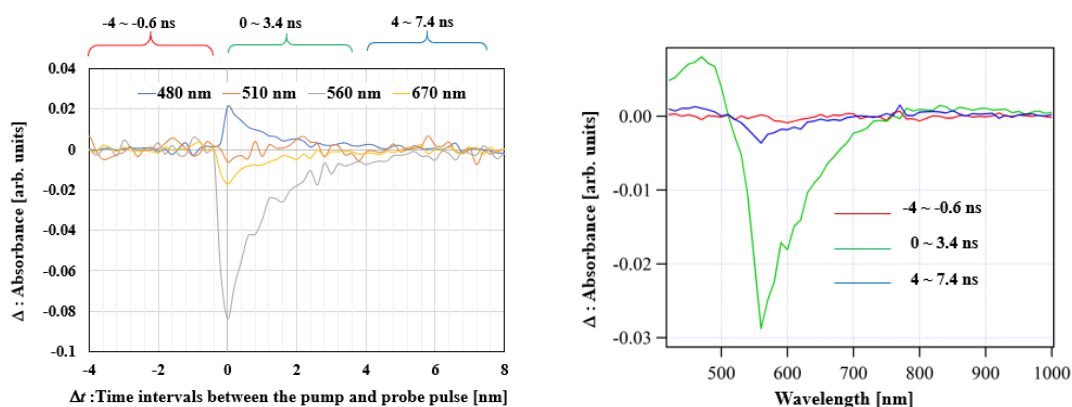


図 8－20：波長毎にポンプ光照明時からの各波長の透過光の強度の時間応答関数。

図 8－21：ポンプ光が入射してから 3.4 ns の間の過渡吸収スペクトル。

ii)pTagRFP の蛍光抑制特性の測定

図 8－21 が示す様に、pTagRFP の誘導放出帯域に属し、3 次元超解像顕微鏡の検証実験装置で装備されている波長 670 nm のファイバーレーザーをイレース光源として選定した。また、図 8－16 の吸収スペクトルを参照して波長を 515nm を生成できる Nd:YVO₄ レーザーをポンプ光源とした。これらの光源を用いて、ラット海馬初代培養神経細胞において pTagRFP が発現したミトコンドリアに対して蛍光抑制効果の誘導を試みた。具体的には、表 8－1 の条件において、ビーム整形しないガウシアン型のイレース光ビームとポンプ光ビームを同軸で集光する。図 8－22 は、ラット海馬初代培養神経細胞に蛍光抑制効果を誘導

した例を示す。図 8-22(a)は蛍光抑制効果誘導前のポンプ光単独照射時の蛍光像を示す。それによれば、イレース光と同時照射を行うと一部ミトコンドリアが密に凝集した強度飽和した輝点を残し、蛍光像の強度が著しく低下していることが分かる (図 8-22(b))。しかし、イレース光の照射を止めると蛍光像が再び現れる (図 8-22(c))。そして、イレース光単独照射時には、それによる副次発光やバックグラウンド光が発生していないことが分かる (図 8-22(d))。図 8-23は、図 8-22に示す発光部の破線部の断面強度分布を示し、それによれば、イレース光照射によるバックグラウンド信号も少なく、かつ、退色による顕著な蛍光信号の低下も無いことが分かる。図 8-24は、この発光部の蛍光量のイレース光強度に対する依存性、すなわち、蛍光抑制特性を示す。それによれば、28 mW (ピークフォトンフラックス: 2.4×10^{26} /cm²/sec) のイレース光を集光すると蛍光強度は 1/5 近くまで低下している。

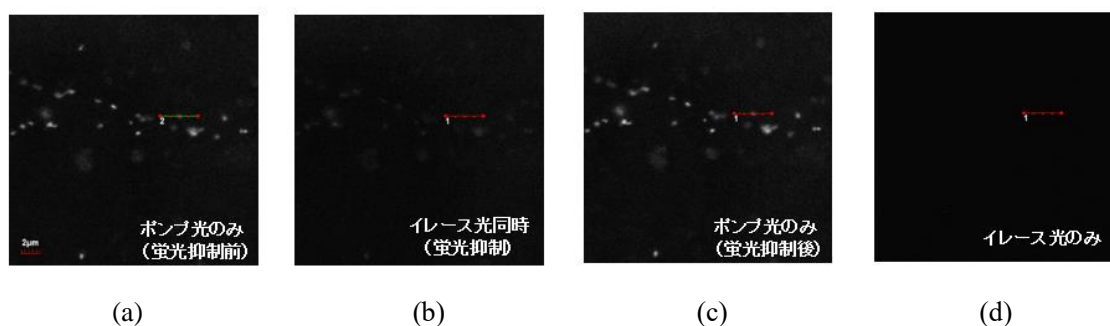


図 8-22 : ラット海馬初代培養神経細胞に展開したミトコンドリアに発現した pTagRFP の蛍光抑制効果の誘導例。

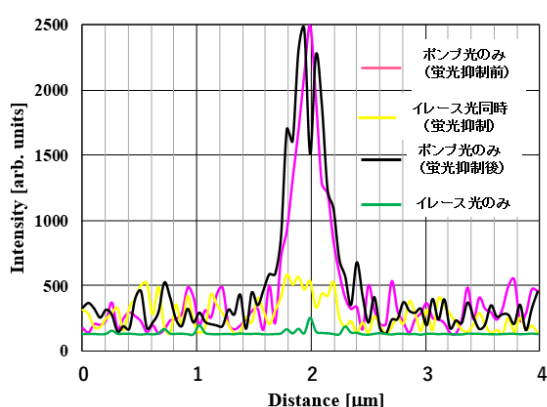


図 8-23 : 図 8-20 の破線部の断面強度分布の比較。

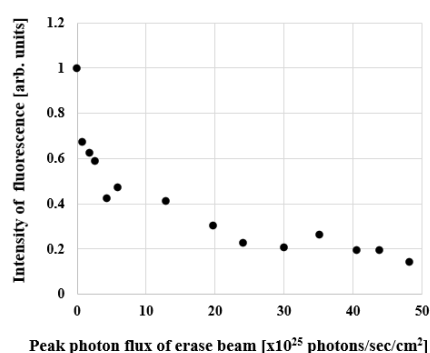


図 8-24 : pTagRFP-mito の蛍光抑制特性

図 8-24 によれば、イレーズ光の照射条件は誘導放出が主体で効果的に蛍光抑制効果を誘導でき、STED タイプの超解像顕微鏡法の運用に資することが分かる。そこで、超解像位相板を実験装置に取り付けて、表 8-1 の照明条件で pTagRFP が発現したミトコンドリアの 3 次元超解像顕微鏡観察を行った。ミトコンドリアは、ラット海馬初代培養神経細胞において細胞体のみならず、樹状突起、および軸索に輸送されており、各所で観察される。この様な照明条件で、ラット海馬初代培養神経細胞に展開したミトコンドリアを観察した。図 8-25 は立体的に交差する軸索の観察像を示す。それによれば、軸索に沿って斑状にミトコンドリアが分布している様子が分かる。鳥瞰図に着目すると、表 8-1 に示す照明条件で、光軸上でのピークフォトンフラックス: $2.4 \times 10^{26} / \text{cm}^2 / \text{sec}$ のイレーズ光を用いて超解像顕微鏡観察をすると、得られた画像において空間周期が短い成分が明瞭となり、微細なミトコンドリアの粒状構造が明確になっている。特に、矢印の方向からみた側面図を見ると、2 本の軸索が異なった深さ位置で交差していることが分かり (図 8-25 中の赤の矢印)、3 次元的に空間分解能が向上していることが分かる。一方、図 8-26 は、赤い破線で示した細胞体の断面像である。それによれば、ミトコンドリアが核を除く細胞質に密集して存在していることが分かる。深さ方向に集積して点在するミトコンドリアの様子が空間分解できており、深さ方向の空間分別能力が向上していることが確認できる。今回はミトコンドリア内膜の持つ複雑な構造まで描写できなかったが、これは CMV プロモータを用いたために発現量が多いのが原因である。より低発現のプロモータを使えばより精緻な構造も描写できる可能性がある。

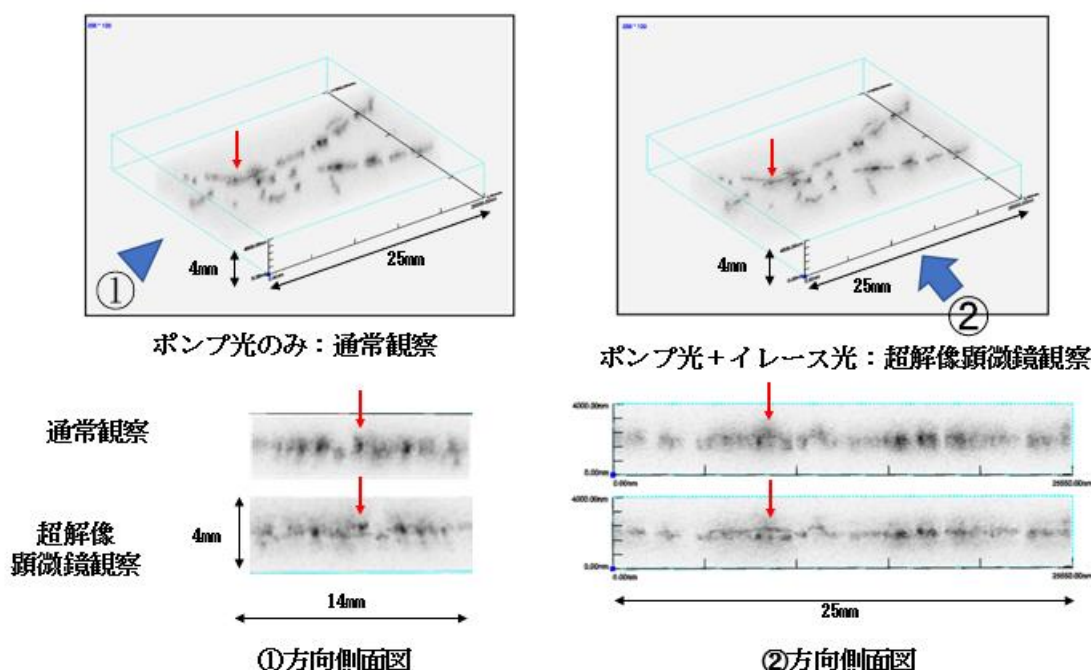


図 8-25: 立体的に交差するラット海馬初代培養神経細胞の軸索上に展開する pTagRFP-mito が発現したミトコンドリアの 3 次元超解像顕微鏡像。

【結論】

構築した 3 次元超解像顕微鏡装置を用いて、代表的な生物試料である微小管と HeLa 細胞のアクチンフィラメントの 3 次元顕微鏡観察を行った。これらの試料は厚みを持ち、しかも複雑で稠密で立体な繊維構造をもつ。既存の 2 次元の超解像顕微鏡法は平面方向と比較して深さ方向の分解能が極端に悪いので、これら試料の深さ方向の構造を空間分解できない。加えて、深さ方向の焦点ボケした像が重なりあう為に、結果的に平面分解能も劣化する。しかし、3 次元超解像顕微鏡法を用いて生物試料を観察したところ 100 nm の 3 次元空間分解能で繊維構造の空間分解ができた。更に、生物分野で広く用いられている蛍光タンパクが発現したミトコンドリアの観察にも試みた。過渡吸収分光により蛍光抑制効果の誘導条件を明らかにし、3 次元超解像顕微鏡法を適用したところ、ラット海馬初代培養神経細胞に展開したミトコンドリアが立体的に展開している様子が回折限界を上回る空間分解能で観察できた。特に本研究では、各種変異体が開発され一般に使用しやすい pTagRFP を用いて、波長と強度の設定により画像改善を判定する手法を確立した。本手法は、pTagRFP はもとより多くの蛍光たんぱく質に適用可能であり、3 次元超解像顕微鏡法による生物試料観察の普及・拡大に貢献できるものと期待できる。

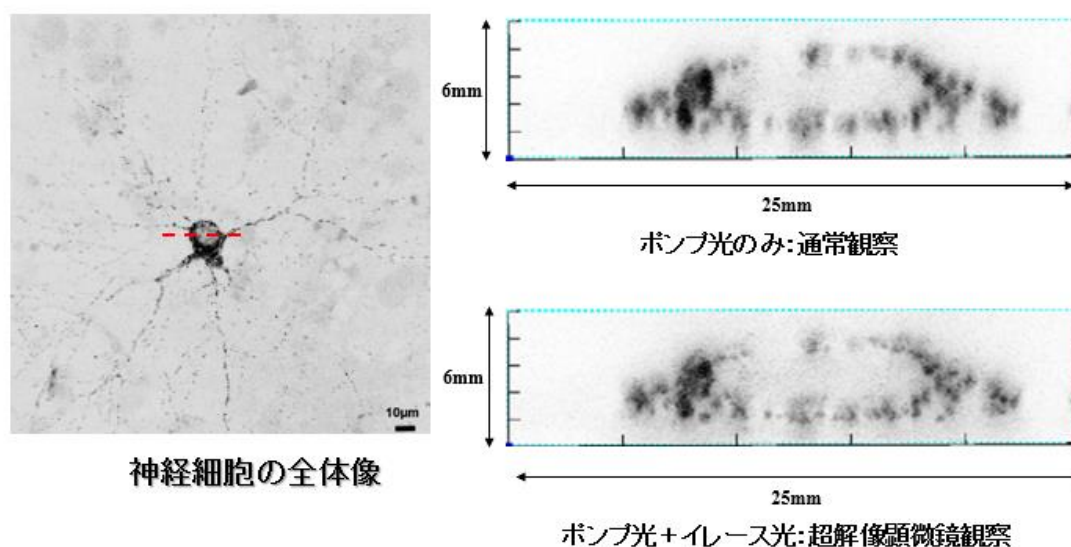


図 8 - 2 6 : 細胞体像における破線部の深さ方向の断面図の 3 次元超解像顕微鏡画像。

【付録9】 RIPT 法 (Randomly Interleaved Pulse Train Method)

RIPT 法 (Randomly Interleaved Pulse Train Method) は、 $S_n \leftarrow S_1$ 過渡吸収スペクトルを測定する手法の一つである。既存の測定方法としては、1) レーザーフォトリシス法と 2) フェムト秒レーザーを用いた方法が存在する。1) は色素レーザーで $S_1 \leftarrow S_0$ 励起を行い、そして白色の放電ランプで分子を照明し、 S_1 状態の分子の吸収スペクトルを計測する。この方法では、放電ランプの発光時間がマイクロ秒オーダーなので、これよりも長い時間の光化学反応の追跡に適している。一方、2) の手法では、高繰り返しのフェムト秒パルスを用いるので、フェムト秒からピコ秒の光化学反応の追跡に適している。しかし、超解像顕微鏡法の基礎となる蛍光抑制効果の応答時間は、蛍光寿命に相当するサブナノからナノ秒オーダーの現象であり、1) と 2) の既存の手法ではその光化学反応過程を追跡することができない。この様な、隙間の時間領域における励起状態の分子の光化学反応を追跡する目的で RIPT 法が開発された。この方法の特徴は、ピコ秒のポンプ光とプローブ光 (イレース光) のパルス列を非同期で重複して試料に照射することにある。図 8-27 は、RIPT 法の概念図を示す。具体的には、周波数の異なるポンプ光とイレース光を数 100ps のパルス幅で照射する。このとき、各パルスのナンバリングを行う。ポンプ光とイレース光は非同期なので、図 8-27 に示す様に、ポンプ光に対して様々な時間間隔で発振するイレース光パルスの組み合わせが生じる。全てのパルスにはナンバリングされているので、コンピュータ上で情報処理によりパルス列の並べ替えを行い、ポンプ光照射時を基準にした過渡吸収スペクトルの時間応答を得ることが出来る (図 8-21 を参照のこと)。通常、ポンプ光にはピコ秒半導体パルスレーザーを用い、イレース光には繰り返し周波数が数 10 MHz 程度のスーパーコンティニウム光源を用いる。

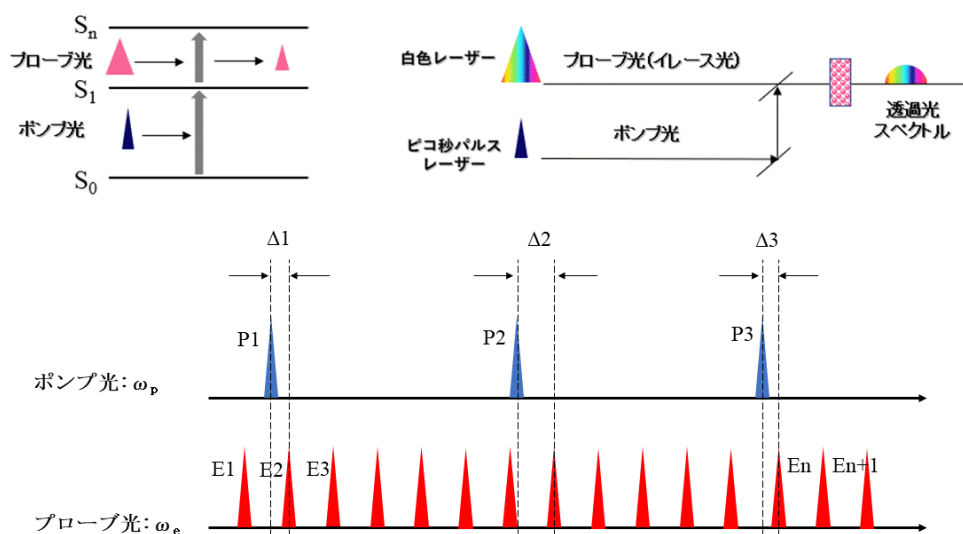


図 8-27 : RIPT 法によるおける時間分解計測原理。

【付録 10】 E-GFP が発現した神経細胞の 3 次元超解像顕微鏡観察例

pTagRFP-mito と同様に、3 次元超解像顕微鏡法は E-GFP が発現した試料でも適用可能である。3 次元超解像顕微鏡観察に先立ち、E-GFP が発現したラット海馬初代培養神経細胞における蛍光抑制効果の誘導例を示す。図 8-28 には E-GFP が発現したラット神経細胞の共焦点レーザー走査型顕微鏡法による全体蛍光像（励起波長： $\lambda_p=473\text{ nm}$ ）と、吸収及び蛍光スペクトルを示す。図 8-28 に示す様に、本誘導実験ではポンプ光波長は、ほぼ吸収ピークである $\lambda_p=473\text{ nm}$ に設定し、レース光波長は蛍光ピークの長波長側の裾野の $\lambda_e=560\text{ nm}$ に設定した。超解像位相板を取り外して 3 次元超解像顕微鏡装置により図 8-28 に示す破線内の領域に蛍光抑制効果を誘導した。図 8-29 (a)によれば、NA=1.3 の対物レンズでポンプ光を単独照射するとスパインを有する樹状突起の蛍光像が確認できる（焦点面におけるピークフォトンフラックスが $7.4 \times 10^{22}\text{ photons/cm}^2/\text{sec}$ ）。しかし、焦点面におけるピークフォトンフラックスが $7.8 \times 10^{25}\text{ photons/cm}^2/\text{sec}$ （式（2-A12）により換算すると対物レンズを透過するピーク強度は 15mW）のイレース光を同時照射すると蛍光像は殆ど確認できない（b）。そして、イレース光単独照射時には副次発光が確認できない（c）。更に、蛍光抑制効果誘導後に、ポンプ光を単独で照射すると再び蛍光像が確認できる（d）。

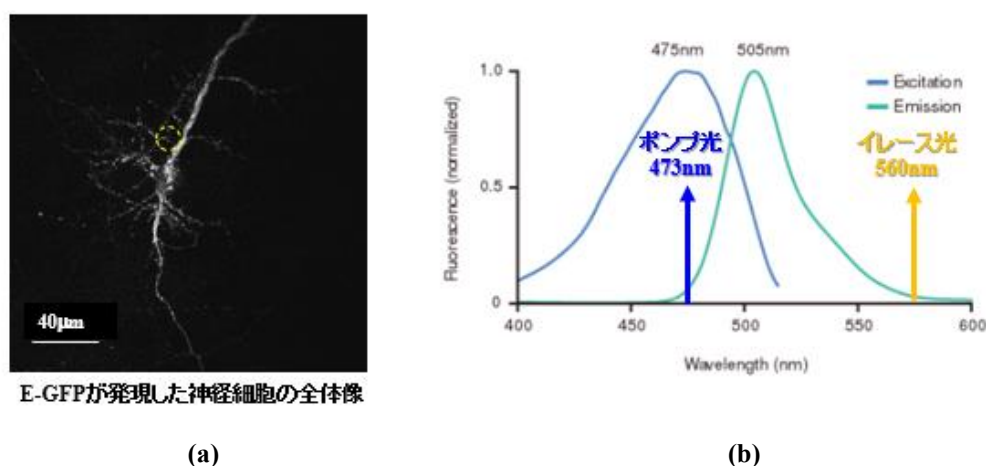


図 8-28： E-GFP が発現したラット神経細胞 (a) と蛍光・吸収スペクトル (b)。

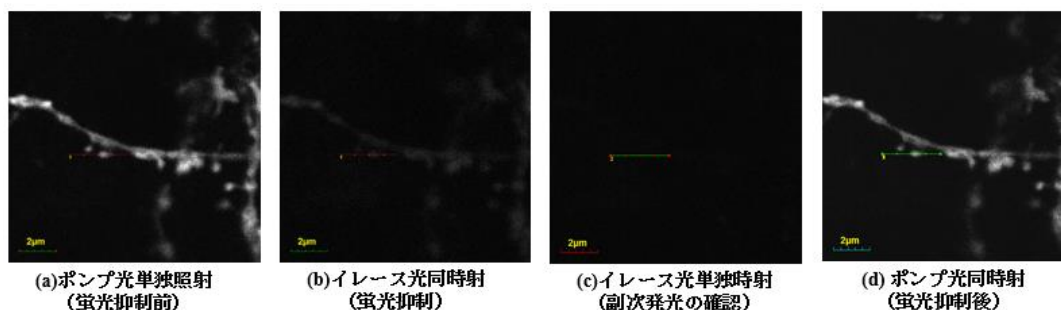


図 8-29： 図 8-28 の円形領域内の細胞における蛍光抑制効果誘導時の蛍光画像の変化。
(a) ポンプ光単独照射。(b) ポンプ光とイレース光同時照射（蛍光抑制効果誘導）。(c) イレース光単独照射。(d) 蛍光抑制効果誘導後にポンプ光単独照射。

図 8-30 (a) は、図 8-29 における破線部の断面強度分布の変化を示している。イレース光を同時集光すると、ポンプ光単独照射により蛍光強度が $1/4$ 以下に抑制できている。そして、蛍光抑制誘導後にポンプ光を照射したところ蛍光強度の低下も確認できず、褪色が生じてないことが分かる。図 8-30 (b) にイレース光強度を変化させて測定した蛍光抑制特性を示す。すなわち、3次元超解像顕微鏡観察に資する蛍光抑制効果が誘導できていることを示している。

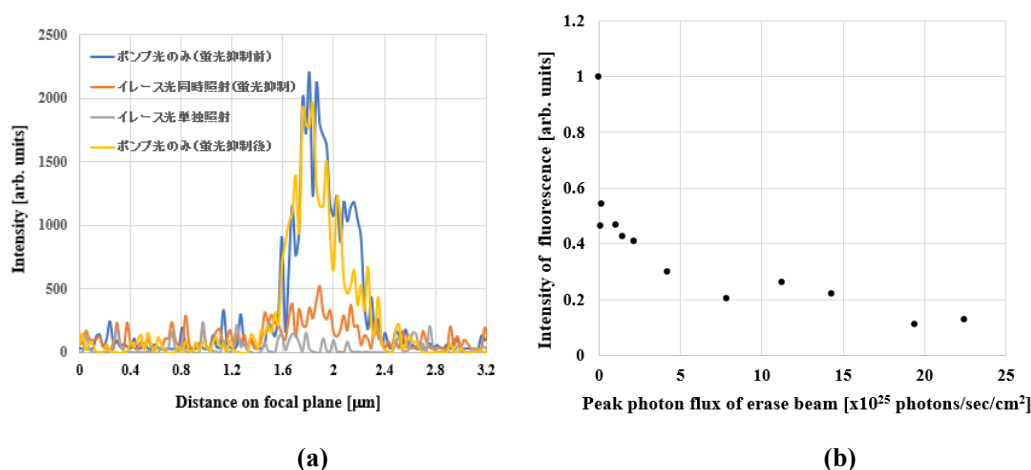


図 8-30 : 図 8-29 における破線部の断面強度分布の変化 (a) と蛍光抑制特性 (b)。

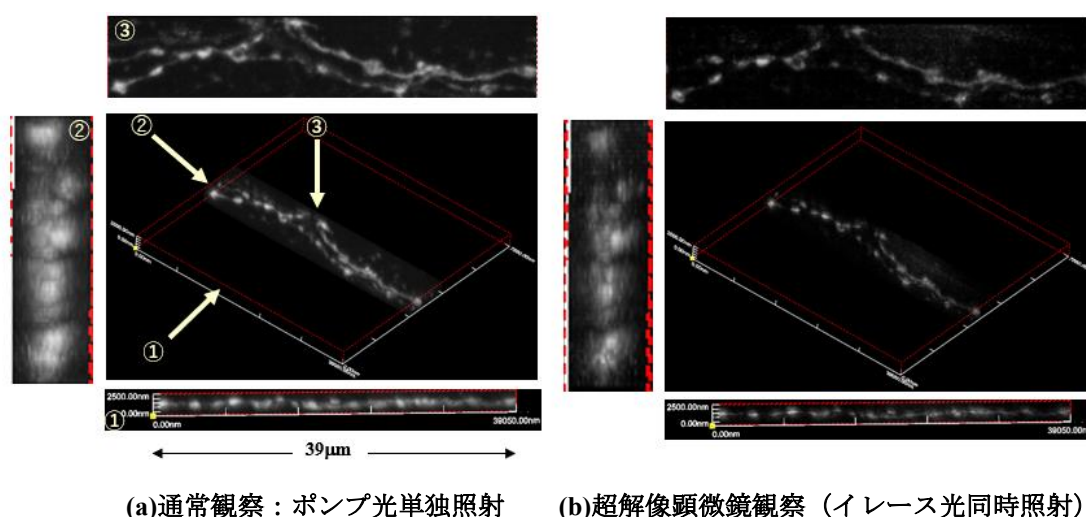
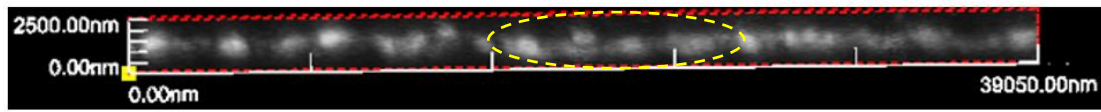
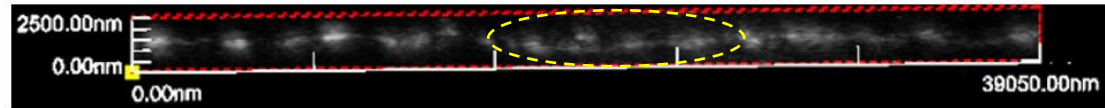


図 8-31 : E-GFP が発現した 2 本の絡まりながら交差するラット神経細胞の軸索の 3 次元超解像顕微鏡観察例。焦点面におけるポンプ光のピークフォトンフラックス : 7.4×10^{22} photons/cm²/sec (対物レンズを透過するピーク強度 : 15 μW)。光軸面におけるイレース光のダークホールピークフォトンフラックス : 1.4×10^{26} photons/cm²/sec (対物レンズを透過するピーク強度 : 72 mW)。①の方向から側面画像。②の方向からの側面画像。③天頂図。



(a) 通常観察



(b) 3次元超解像顕微鏡観察

図 8－3 2：図 3－3 1 における ①の方向から見た側面図の通常観察画像と超解像顕微鏡画像の比較。

図 8－3 0 (b) に示す様に蛍光抑制特性を確認した後、超解像位相板を実験装置に取り付けて、E-GFP が発現したラット神経細胞の 3 次元超解像顕微鏡観察を行った。このとき、ポンプ光は、焦点面においてピークフォトンフラックスが $7.4 \times 10^{22} \text{photons/cm}^2/\text{sec}$ (対物レンズを透過するピーク強度：15 μW) になるように集光した。一方、イレース光は、ダークホールの光軸面におけるピークフォトンフラックスが $1.4 \times 10^{26} \text{photons/cm}^2/\text{sec}$ (式 (2－A10) より換算して対物レンズを透過するピーク強度が 72 mW) となる様に集光した。図 8－3 1 は 2 本の絡まりながら交差するラット神経細胞の軸索の 3 次元超解像顕微鏡観察の例を示す。図 8－3 1 (a) は、ポンプ光単独照射時の像 (通常観察) を示す。一方、図 8－3 1 (b) はイレース光同時照射による 3 次元超解像顕微鏡画像を示す。①②③のどの方向から側面図を比較しても、軸索の太さが細くなっており解像度の向上が見て取れる。特に、①の方向からの側面画像を図 8－3 2 に拡大して比較した。楕円の破線内の領域を比較すると、3 次元超解像顕微鏡画像 (図 8－3 2 (b)) では明瞭に夫々の軸索が異なる深さに存在していることが分ると同時に、通常観察では分からない微細構造が空間分解できていることも分かる。

【付録 1 1】 E-GFP が発現したライブ神経細胞における蛍光抑制効果の誘導実験

これまで、本章では蛍光タンパクが発現した固定生物試料に関する 3 次元超解像顕微鏡観察の例を紹介した。しかし、ライフサイエンスの現場では、生きた細胞の観察により、生命現象の解明と構造変化の解析が最大の関心事となっている。そこで、E-GFP が発現した生きたラットの神経細胞を用いて蛍光抑制効果の誘導実験を試みた。図 8-33 はピークフォトンフラックスが焦点面において 7.4×10^{22} photons/cm²/sec (式 (2-A12) により換算した対物レンズを透過したピーク強度で 15 μ W) をもつ $\lambda_p=473$ nm のポンプ光と光軸面におけるピークフォトンフラックス 7.4×10^{25} photons/cm²/sec (式 (2-A12) により換算した対物レンズを透過したピーク強度で 48 mW) をもつ波長: $\lambda_e=560$ nm のイレース光を集光して蛍光抑制効果を誘導した時の結果を示す。図 8-33 (a) は、蛍光抑制効果誘導時における神経細胞の蛍光像の変化の様子を示す。それによれば、イレース光を同時照射すると、図 8-27 に示す固定試料の神経細胞の場合と同様に蛍光強度が著しく減少し、蛍光抑制効果が誘導できたことが確認できる。図 8-33 (b) は、図 8-33 (a) における軸索の破線部の断面強度分布を示す。それによれば、イレース光の単独照射時では副次過程による発光は存在せず、そして、蛍光抑制効果誘導後にポンプ光を単独照射しても断面強度分布の変化は殆ど認められない。すなわち、蛍光タンパクが発現した生きたラットの神経細胞においても超解像顕微鏡観察に資する蛍光抑制効果が誘導出来ることが分かる。特に、E-GFP は生命現象の解明の為に多用される蛍光ラベラーであり、本結果は開発した 3 次元超解像顕微鏡法が広く生物学において貢献できることを示している。

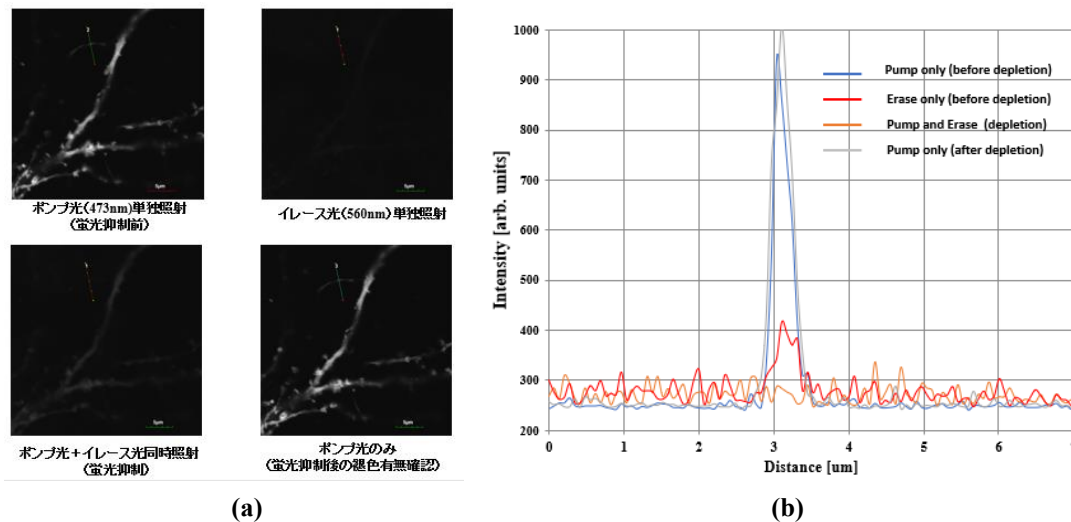


図 8-33 : 蛍光抑制効果誘導時における神経細胞の蛍光像の変化の様子 (a) と (a) における軸索の破線部の断面強度分布 (b)。

【第8章：参考文献】

- 8-1) Y. Kakimoto, S. Tashiro, R. Kojima, Y. Morozumi, T. Endo, and Y. Tamura, Scientific Reports **8**, 6175 (2018); <https://www.nature.com/articles/s41598-018-24466-02>,
- 8-2) 川田 善正、分光研究 **52** 巻、p126(2003); <https://doi.org/10.5111/bunkou.52.178>.
- 8-3) 生田 孝、顕微鏡 **44** 巻、p178(2009).
- 8-4) Y. Iketaki, and N. Bokor, Opt. Commun. **285**,3798(2012);
<https://doi.org/10.1016/j.optcom.2012.04.028>.
- 8-5) Y. Iketaki, N. Bokor, D. Okada, and H. Kumagai, Proceedings Volume **10712**, Optical Manipulation Conference; 1071203 (2018) <https://doi.org/10.1117/12.2319154>.
- 8-6) 池滝 慶記、熊谷 寛、ボコル ナンドール、O plus E 39 巻、p1(2017)。
- 8-7) R. Ando, H. Mizuno, and A. Miyawaki, Science **306**, 1370 (2004);
<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1102506>.
- 8-8) 13. E. Merzlyak, J. Goedhart, D. Shcherbo, M. Bulina, A. Shcheglov, A. Fradkov, A. Gaintzeva, K. Lukyanov, S. Lukyanov, T. Gadella, and D. Chudakov, Nat Methods **4**, 555 (2007);
<https://doi.org/10.1038/nmeth1062>.
- 8-9) L. Ligon, and O. Steward, J. Comparative Neurology **427**, 340 (2000);
[https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20001120\)427:3<340::AID-CNE2>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20001120)427:3<340::AID-CNE2>3.0.CO;2-Y).
- 8-10) <https://evrogen.com/products/vectors/pTagRFP-mito/pTagRFP-mito.shtml>.
- 8-11) https://evrogen.com/products/TagRFP/TagRFP_Detailed_description.shtml.
- 8-12) T. Nakagawa, K. Okamoto, H. Hanada, and R. Katoh, Opt. Lett. **41**, 1498 (2016);
<https://doi.org/10.1364/OL.41.001498>.

第9章 3次元超解像顕微鏡法による1分子計測

- 蛍光相関分光法への応用 -

要旨

3次元超解像顕微鏡法を用いると、100nmを上回る立体分解能をもつ蛍光分析法が可能となることが実証された。この顕微鏡法を蛍光相関法と組み合わせ超解像蛍光相関分光法を提案した。理論解析及び検証実験を行ったところ、アト $1(10^{-18}l)$ という超微小空間内でおきる分子の相互作用が解析できることを確認した。この超解像蛍光相関分光法は通常の蛍光相関法とは異なり、一桁高い濃度の蛍光色素分子の存在下でも適応可能であることが分かった。

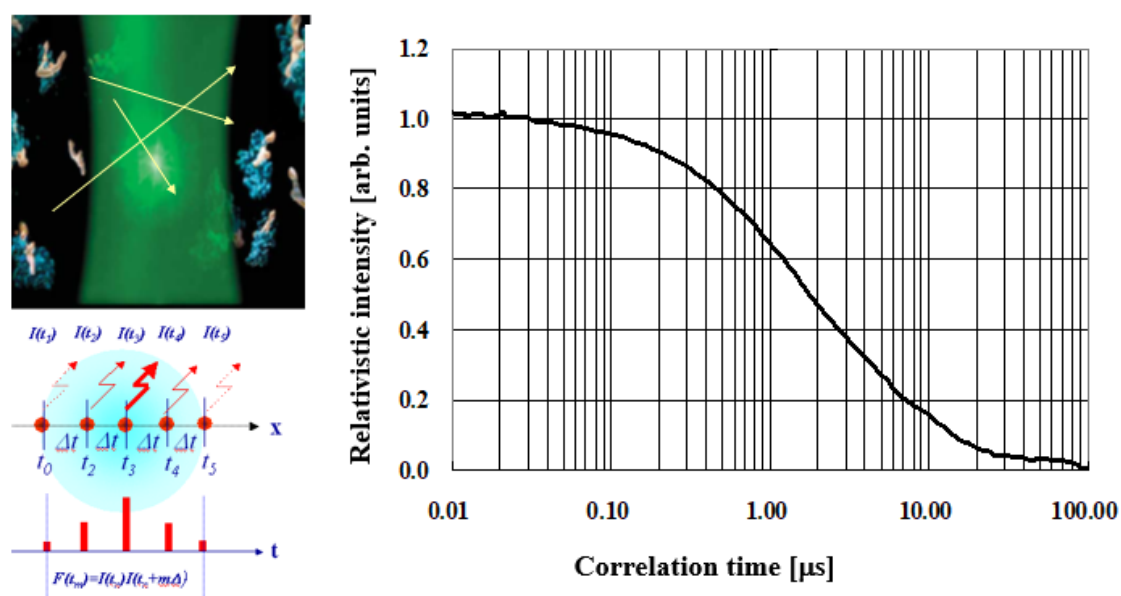


図9-1：蛍光相関法の概念図。

【緒言】

蛍光相関法とは、励起光集光領域を通過する溶液中の分子から発光する蛍光強度を時系列で測定し、得られた結果より時間領域における相関関数を求める分析法である（図9-1）。この相関関数の形状を解析することで、溶液中の微小な計測領域における、分子のブラウン運動に由来する蛍光揺らぎの変化を観測できる[9-1,9-2]。この分析法により、対象分子の分子量のほか拡散係数、媒質粘度、化学反応速度といった分子及びそれが置かれた環境に関する情報が得られる。近年では、生きた細胞内における生体分子と生体組織の分子間相互作用を解明するための有力な手段となっている[9-3,9-4,9-5]。

しかし、蛍光相関法においては原理的な制約がある。ひとつは、蛍光揺らぎを検出するた

めに、高濃度に蛍光分子を含む試料の計測はできない。図 9-2 が示す様に、計測領域に存在する蛍光分子の数が数個程度と、極めて低濃度に試料を調整する必要がある。計測領域は回折限界で集光した励起光（ポンプ光）の強度分布で決定されるので、フェムトリットオーダー ($1\ \mu\text{m}$)³ となる。従って、計測領域より蛍光強度の揺らぎが検出できる濃度の上限の目安は nM/l となる。例えば、細胞内の代謝活動により、対象分子が細胞膜などの特定の部位に高濃度で集積してしまい、蛍光相関法が適用できない。更に、細胞内の生命機能を詳細に解析するためには、アトリットオーダー ($100\ \text{nm}$)³ の細胞内小器官を空間分離して計測する必要があるが、回折限界のため不可能である。すなわち、従来の蛍光相関法では回折限界以下の微小空間が解析できないことが原因となっている。また、高 NA 対物レンズを用いて励起集光領域を形成しても、原理的に集光領域の強度分布は光軸方向に伸びた空間的対称性の無い回転楕円体となる。例えば、可視光を $\text{NA}=1.5$ の対物レンズで集光すると、平面方向の径が $\sim 400\ \text{nm}$ 、深さ方向で $\sim 1200\ \text{nm}$ 程度のスポットが得られる。蛍光相関法における機能として拡散係数の算出が重要視されているが、一般に拡散係数を算出する際、観測対象の拡散源は点状であることを大前提としているので、このような極端な異方性のあるスポットを用いる限り正確な値が得られない。従って、蛍光相関法においては、如何にできるだけ微小かつ等方的な空間を計測できる照明法を開発するかが大きな技術課題となっている[9-6]。そこで、これを解決する為に、回折限界よりも微細な有効計測領域をもつ 3 次元超解像顕微鏡法を導入した 3 次元超解像蛍光相関法を提案し、そして、実験的な原理検証を行った。

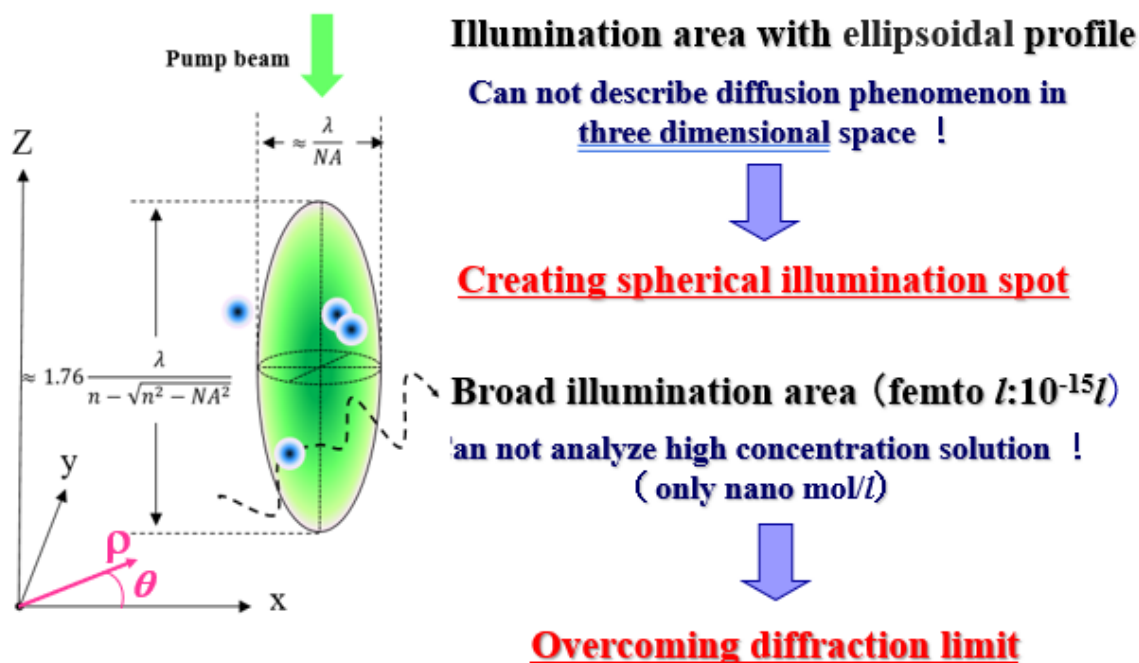


図 9-2 : 既存の蛍光相関法における励起光集光領域の形状と技術課題。

【蛍光相関法における有効観測領域】

強度分布関数($\phi(\vec{r})$)を有する集光したポンプ光ビームを用いて蛍光相関法を実施する場合には、蛍光相関関数($G(\tau)$)は下記の位置座標 (\vec{r}) に関する積分式で与えられる[9-7]。

$$G(\tau) = \frac{\int_{\vec{r}} d\vec{r} \int_{\vec{r}'} d\vec{r}' \phi(\vec{r}) \left\langle \delta C(\vec{r}, t + \tau) \delta C(\vec{r}', t) \right\rangle \phi(\vec{r}')}{\left[\langle C \rangle \int_{\vec{r}} d\vec{r} \phi(\vec{r}) \right]^2}. \quad (9-1)$$

分子の散逸がブラウン運動に従うときは、 $\langle \delta C(\vec{r}, t + \tau) \delta C(\vec{r}', t) \rangle$ は拡散源を点源 ($\delta(\vec{r})\delta(t)$) としたときの3次元の拡散方程式の解に相当する。物理的には、時刻 t を基準としたときの時間 τ 後における蛍光分子の空間的な存在確率の重なり積分である (図 9-3)。

$$\langle \delta C(\vec{r}, t + \tau) \delta C(\vec{r}', t) \rangle = \frac{\langle C \rangle}{(4\pi D\tau)^{\frac{3}{2}}} \exp\left[-\frac{(\vec{r}-\vec{r}')^2}{4D\tau}\right], \quad (9-2)$$

ここで、(D) は計測対象になる分子の拡散係数であり、そして、($\langle C \rangle$) は、蛍光を発する分子の有効濃度を示す。具体的には、観測対象領域の分子濃度に蛍光収率を乗じたものである。通常の平面波面ビームを集光する通常の蛍光相関法では、式 9-3 が示す様に、集光ビームの強度プロファイルは x, y, z 各座標軸を含む断面形状がガウス関数に近い形状をもつ。すなわち、中心強度を (I_0) とすると、3次元的なガウス関数として表現できる。

$$\phi(\vec{r}) = \phi(x, y, z) = I_0 \exp\left[-\left(\frac{2x^2}{\omega_x^2} + \frac{2y^2}{\omega_y^2} + \frac{2z^2}{\omega_z^2}\right)\right], \quad (9-3)$$

ここで、 $\omega_x, \omega_y, \omega_z$ は x, y, z 軸方向に対するビーム広がりサイズを示す量であり、各座標が $\omega_x, \omega_y, \omega_z$ をとるときは中心強度に対して e^{-2} に比例して減衰する。この場合には、式 (9-1) は解析的に計算できて、式 (9-4) が示す様な簡潔な解が得られる (付録 9 のこと)。

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \frac{1}{\sqrt{1+\frac{\tau}{\tau_{Dx}}} \sqrt{1+\frac{\tau}{\tau_{Dy}}} \sqrt{1+\frac{\tau}{\tau_{Dz}}}}. \quad (9-4)$$

ここで、 $\tau_{Dx}, \tau_{Dy}, \tau_{Dz}$ は、分子固有の係数であり、 $\tau_{Dx}=\omega_x^2/4D$ 、 $\tau_{Dy}=\omega_y^2/4D$ 、 $\tau_{Dz}=\omega_z^2/4D$ で定義される。これらは有効拡散時間と呼ばれ、 x, y, z 軸方向に対する分子固有の拡散の速さの程度を示す。更に、 $\langle N \rangle$ は有効観測領域に存在する蛍光分子の時間平均した絶対数であり、式

(9-5) で定義される。

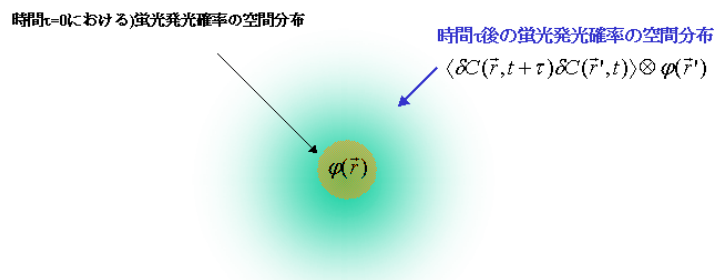
$$\langle N \rangle = \langle C \rangle \cdot V_{eff}. \quad (9-5)$$

ここで、 V_{eff} は有効観測体積と呼ばれ、式 (9-6) で与えられる。

$$V_{eff} = \frac{[\int \phi(\vec{r}) d\vec{r}]^2}{\int [\phi(\vec{r})]^2 d\vec{r}}. \quad (9-6)$$

特に、式 (9-3) の様なガウス関数の場合には、 $V_{eff} = \pi^{\frac{3}{2}} \omega_x \omega_y \omega_z$ となり、ほぼ半径 ω_x 、 ω_y 、 ω_z とする回転楕円体の体積、すなわち、集光したポンプ光のスポット体積にほぼ等しい。

蛍光相関関数 $G(\tau)$ の物理的意味



物理的には、初期時間と時間 τ 後の蛍光
発光空間分布の空間的重なり積分

図 9-3 : 蛍光相関関数の物理的意味。

【3次元超解像蛍光相関法の提案】

第4章で述べた様に、円偏光のイレース光を用いた3次元超解像顕微鏡法におけるPSFは回折限界よりも微細で等方的であることが示された。従って、3次元超解像顕微鏡法を蛍光相関法に導入できれば(3次元超解像蛍光相関法)、既存の蛍光相関計測法よりも微細な空間領域の拡散現象を正確に観察できる。蛍光相関法においては、有効観測体積 V_{eff} が重要な物理量である。これがこの分析法の空間分解能を規定するものであり、そのみならず観測対象の分子の上限濃度をも決定する。蛍光相関法においては、揺らぎを的確に捉えるために、時間平均で有効観測体積に存在する分子の数 $\langle N \rangle$ が出来るだけ少ない方が有利である。高い濃度で分子が存在する場合、得られる蛍光相関スペクトルは白色になっ

てしまい、分子の運動や化学反応に関する情報は消失する。特に、生体内では代謝等によって、特定の部位に蛍光色素分子が堆積してしまうことがある。このような場合に、提案する方法は強力な計測ツールとなる。

1) 体積効果

ポンプ光を集光したときの強度半値幅で表現した空間強度分布 ($\phi(\vec{r})$) を、ガウス関数と近似する (式 (9-7))。

$$\phi(\vec{r}) = \phi(x, y, z) = \exp\left[-\left(\frac{4\log_e 2 \cdot x^2}{\Gamma_x^2} + \frac{4\log_e 2 \cdot y^2}{\Gamma_y^2} + \frac{4\log_e 2 \cdot z^2}{\Gamma_z^2}\right)\right], \quad (9-7)$$

ここで、 Γ_x 、 Γ_y 、 Γ_z は、それぞれ、x 軸、y 軸、z 軸方向の強度半値幅を示す。このときの有効観測体積： V_{normal} は、式 (9-6) に代入すると、式 (9-8) の様に解析的な形で得られる。

$$V_{normal} = \left(\frac{\pi}{2\log_e 2}\right)^{\frac{3}{2}} \Gamma_x \Gamma_y \Gamma_z. \quad (9-8)$$

一方、3次元超解像顕微鏡法を適用すると実行的な有効観測領域は、第4章で述べた様に正確な空間強度分布 ($\psi(\vec{r})$) は数値計算により求める必要がある。3次元超解像顕微鏡法においては PSF が光軸に関して軸対称になることに着目すると、 $\psi(\vec{r})$ は図 9-2 の円筒座標表を用いて、式 (9-9) の様に表現できる。

$$\psi(\vec{r}) = \psi(x, y, z) = \xi(\rho) \cdot \varphi(z), \quad (9-9)$$

ここで、 ρ は焦点面内における光軸からの距離を示す。 $\xi(\rho)$ と $\varphi(z)$ は第4章で記載したベクトル電場モデルにより、直接、数値計算が出来るので、式 (9-9) を式 (9-6) に代入すれば3次元超解像蛍光相関法における有効観測体積 (V_{super}) が得られる。ただし、 θ は光軸周りを周回する動径の角度を示す。

$$V_{super} = \frac{[\iiint \xi(\rho) \cdot \varphi(z) d\rho d\theta dz]^2}{\iiint [\xi(\rho) \cdot \varphi(z)]^2 d\rho d\theta dz} = \frac{[\iint \xi(\rho) d\rho d\theta]^2 [\int \varphi(z) dz]^2}{\iint [\xi(\rho)]^2 d\rho d\theta \int [\varphi(z)]^2 dz}. \quad (9-10)$$

表 9-1 : シミュレーションの条件 [2-6]

ポンプ光波長 (λ_p)	532 nm
イレーズ光波長 (λ_e)	599 nm
光軸面におけるイレーズ光のピークフォトンフラックス (I_{zmax})	ケース 1 : 3×10^{25} /cm ² /sec ケース 2 : 15×10^{25} /cm ² /sec
水浸対物レンズの開口数 (NA)	1.2
水の屈折率 (n)	1.33
ローダミン 6G S ₁ 状態の寿命 (τ)	3.75 ns
ローダミン 6G S ₁ 蛍光抑制断面積 (σ_{dip})	1.2×10^{-16} cm ² /sec
ローダミン 6G 拡散係数 (D)	280 μ m ² /sec [9-8]
ポンプ光 (通常計測時) の PSF の強度半値幅	
• x 軸方向 (Γ_x)	280 nm
• y 軸方向 (Γ_y)	280 nm
• z 軸方向 (Γ_z)	900 nm
3 次元超解像計測時の PSF の強度半値幅	
• x 軸方向 (A_x)	120 nm
• y 軸方向 (A_y)	120 nm
• z 軸方向 (A_z)	120 nm

ここで、蛍光色素分子を水溶液中のローダミン 6 G と仮定して、第 4 章で述べたベクトル電場モデルにより 3 次元超解像蛍光相関法のシミュレーションを行った。シミュレーションの条件を表 9-1 に示す。ローダミン 6 G の蛍光抑制特性は第 2 章の表 2-1 に従った。まず、既存の蛍光相関法におけるポンプ光単独照明の PSF と 3 次元超解像顕微鏡法適用時の PSF を計算した。尚、シミュレーションにおいては、蛍光相関法で多用される水浸型の対物レンズ (NA:1.2) の利用を仮定した。集光領域におけるイレーズ光のピークフォトンフラックス (I_{zmax}) が 3×10^{25} photons/cm²/sec (ケース 1) と 15×10^{25} photons/cm²/sec (ケース 2) のときの焦点面及び光軸面における PSF の強度分布を図 9-4 に比較した。そして図 9-5 では、図 9-4 の破線における焦点面及び光軸面の断面強度分布を比較した。それによれば、通常の蛍光相関計測時の PSF の強度半値幅 Γ_x 、 Γ_y は光軸面内で 280 nm、光軸面で Γ_z が 900 nm となる。一方、 I_{zmax} が 15×10^{25} photons/cm²/sec のときの焦点面及び光軸面内で半値幅は A_x 、 A_y 、 A_z がどれも 120 nm となり、ローレンチアン関数で囲まれた当方的な球体となる。通常のポンプ光単独照明を用いた既存の蛍光相関法において、この時の有効観測体積を式 (9-8) により計算すると、 V_{normal} が 0.24 フェムトリットル

($0.24 \times 10^{-18} \text{ m}^3$) となる。これに対して、式 (9-10) を用いて、3次元超解像蛍光相関法における V_{super} を計算すると、 0.017 フェムトリットル ($0.017 \times 10^{-18} \text{ m}^3$) となる。すなわち、3次元超解像蛍光相関法は既存の方式よりも1桁以上狭い空間領域を解析できることを示している。図9-6に V_{super} の I_e に対する依存性を示す。例えば、通常計測法においては有効観測体積に存在する平均分子数 $\langle N \rangle$ が1になる濃度は 7 nmol/l となるのに対して、3次元超解像蛍光相関法では 97 nmol/l となるので14倍ほど高い濃度の空間領域を分析することができる。

2) 既存の蛍光相関計測法と3次元超解像蛍光相関法における相関関数の比較

以上結果を踏まえ、時間領域でローダミン6G（水溶液）の蛍光相関関数が I_e に対してどのように変化するかどうかがシミュレーションを行った。シミュレーションは、表9-1示す条件において、式 (9-1) に通常計測時と3次元超解像顕微鏡計測時のPSF、すなわち (9-7) と式 (9-9) を代入して、それぞれの相関関数 $G(t)$ を計算した。また、測定想定時のローダミン6Gの濃度は、前述の平均分子数 $\langle N \rangle$ が1になる条件で計算した。図9-7にその結果を示す。相関関数の変曲点となる時刻は、蛍光色素分子が有効観測領域を通過するおおよその平均時間に対応する。図9-7によれば、変曲点は相関関数の値がほぼ1/2となる時刻となるが、それによれば3次元超解像蛍光相関法の場合の相関関数は既存の蛍光相関法と比較すると変曲点の時刻が短い方にシフトしていることが分かる。すなわち、このことは3次元超解像顕微鏡を併用することで有効観測領域の空間的サイズが収縮していることが確認できる。

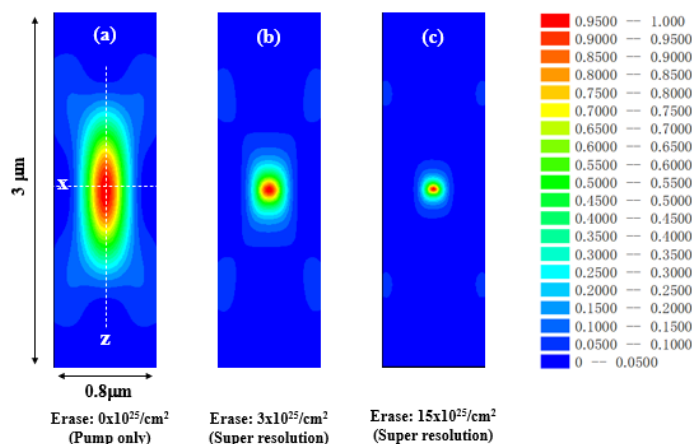


図9-4：ローダミン6G（水溶液）の焦点面と光軸面における観測領域（PSF）のシミュレーション比較（NA=1.2の水浸対物レンズを使用して $\lambda_p=532\text{nm}$ のポンプ光と $\lambda_e=599\text{nm}$ を集光）。(a)イレース光先頭値強度：0 photons/cm²/sec（ポンプ光プロファイル）、(b)イレース光 s 尖頭値強度：3x10²⁵ photons/cm²/sec、(b)イレース光尖頭値強度：15x10²⁵ photons/cm²/sec。

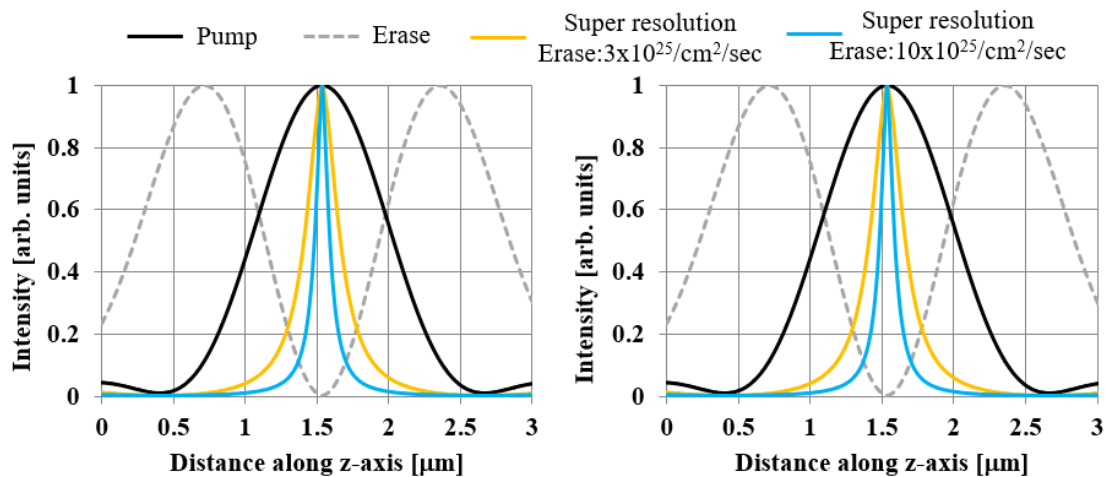


図 9-5 : 図 9-4 に示す破線部方向における PSF の断面強度分布の比較。

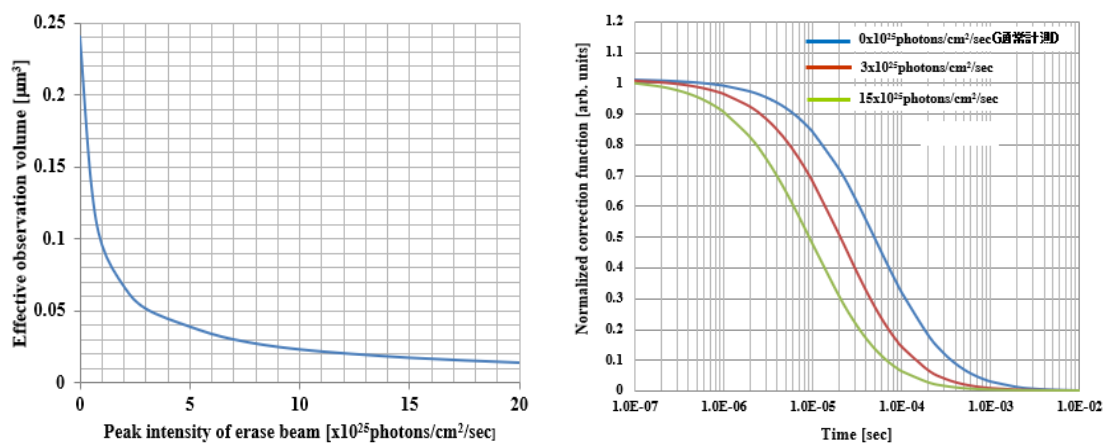


図 9-6 : 有効観測体積 V_{super} のイレース光の尖頭値強度 I_{zmax} に対する依存性。

図 9-7 : 表 9-1 を用いて計算したときの既存の蛍光相関計測と 3 次元超解像蛍光相関法の相関関数の比較。

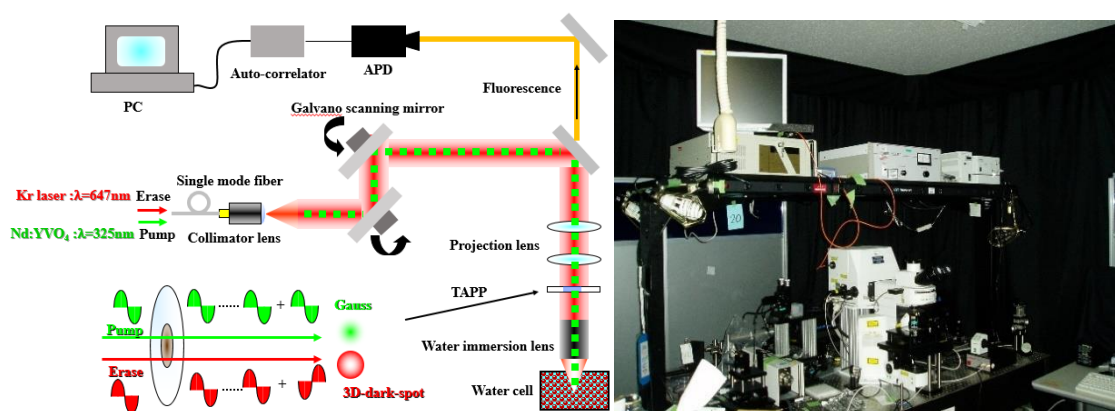


図 9-8 : 3 次元超解像蛍光相関法の原理検証装置のシステム図と外観図。

表 9 - 2 : 検証実験の条件

Wavelength of pump beam	$\lambda_p=532\text{ nm}$
Peak intensity of pump beam	10 μW
Wavelength of erase beam	$\lambda_e=647\text{ nm}$
Peak photon flux on optical axial plane (Peak intensity of erase beam through objective	5.3x10 ²⁵ photons/cm ² /sec 40 mW)
NA of water immersion lens	1.2
Size of microbeads with Nile Red	60 nm ϕ
Density of microbeads	0.6/femto liter
Laser scanning microscope	Olympus Fluoview1000

【3次元超解像蛍光相関法の原理検証】

図 9 - 8 に、検証実験方法と実験装置の外観図を示す。3次元超解像蛍光相関法を実証するために、商用のレーザー走査型顕微鏡を母体機として装置をセットアップした。このセットアップは、超解像位相板を市販の正立型のレーザー走査型顕微鏡 (Olympus Fluoview 1000) の照明光学システムに挿入したものである[9-9]。ポンプ光 ($\lambda_p=532\text{ nm}$) は Nd : YVO₄ レーザーより生成し、イレース光 ($\lambda_e=647\text{ nm}$) は Kr レーザーによって生成される。2波長対応の超解像位相板は、光学基板上に最適化された厚さの SiO₂ 層 (2125 nm) を内輪帯部に蒸着することによって作製した。位相板は専用のホルダーに格納され、NA=1.2 の水浸対物レンズと一体で専用の顕微鏡ターレットに取り付けた。そして、対物レンズの先端を、ナイルレッドを含浸した蛍光ビーズ (60 nm ϕ) を 1 nmol/l で分散した水溶液で満たされた石英セル中に浸した。この溶液の濃度は、フェムトリットルあたり 0.6 個のビーズが存在する粒子密度に相当する。この濃度は、既存の蛍光相関法でも計測できる値である。同一のシングルモードから射出されるポンプ光と 3次元ダークホールを有するイレース光を集光して、水溶液中の 1 点を照明する。マイクロビーズからの蛍光発光は、アバランシェフォトダイオード (APD) によって検出される。検出された蛍光信号は、自動相関器 (ALV-7004 : ALV-Laser Vertriebsgesellschaft m.b.H.) によって時系列に計測され、相関関数に変換される[9-10]。表 9 - 2 に、実験条件を示す。

【検証実験結果】

3次元超解像蛍光相関法の観察領域を確認するために、まず、カバーガラス上のシリコン接着剤に埋め込まれた蛍光ビーズの蛍光サイズを測定した。図 9 - 9 (a) は、ポンプ光のみの照射によって得られた蛍光スポットの 3次元展開像を示す。スポットプロファイルが楕円体であると仮定すると、測定した FWHM より観測領域の体積は 0.24x10⁻¹⁵ l と見積もられる。一方、40mW のイレース光 (式 (2-A10) に換算して光軸面におけるピークフォトンフラックスが 5.3 x10²⁵ cm²/sec) をポンプ光と一緒に照射して 3次元超解像顕微鏡法を適

用すると、スポットは球形状に収縮する（図 9－9（b））。図 9－10 によれば、3次元超解像蛍光相関法のスポットの断面強度分布、すなわち、PSF の FWHM は、焦点面内と光軸面内ともに 120 nm であることが分かる。従って、有効観測体積は理論式（9－6）に従えば 0.017 フェムトリットルまで収縮したことを示している。図 9－11 は、ポンプ光単独照射時の既存の蛍光相関法で測定したときの APD からの測定出力信号を示し、図 9－12 は強度規格化した相関関数に変換した結果である。そこで、これらの蛍光イレース光のビーム強度を変えながら 3次元超解像蛍光相関法による相関関数を測定した。図 9－13 によれば、得られた相関関数の変曲点は、イレース光の強度が増加するにつれて短い相関時間領域にシフトしていることが分かる。変曲点の位置は蛍光ビーズが蛍光スポットを通過する平均時間を示しており、この平均時間が減少していることが分かる。イレース光ビーム強度 40 mW での変曲点の時刻に着目すると、既存の蛍光相関法の場合と比較して半分になっていることが分かる。すなわち、提案方法の有効観測領域のサイズは半分になっており、提案原理が実証されていることを示している。

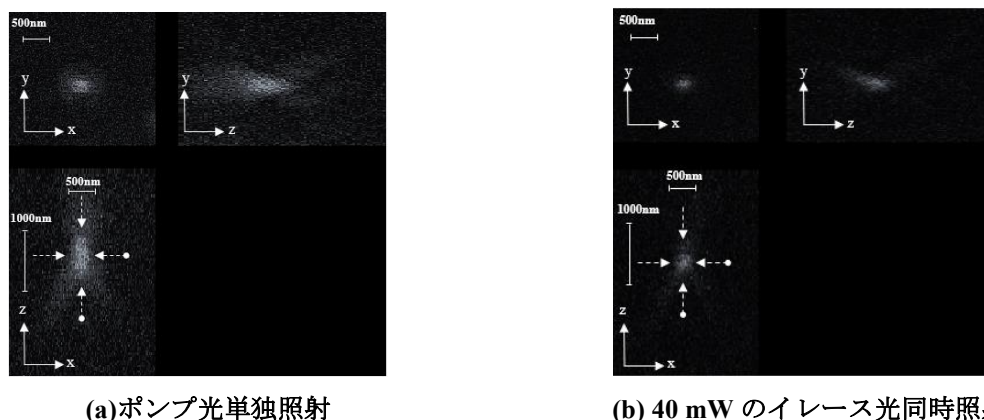


図 9－9：水浸対物レンズ（NA=1.2）を用いて測定した 60 nm ϕ 蛍光ビーズ（蛍光色素：ナイルレッド）の 3次元超解像顕微鏡画像。(a) ポンプ光単独照射（通常のレーザー走査型顕微鏡観察） (b) 40 mW のイレース光同時照射。

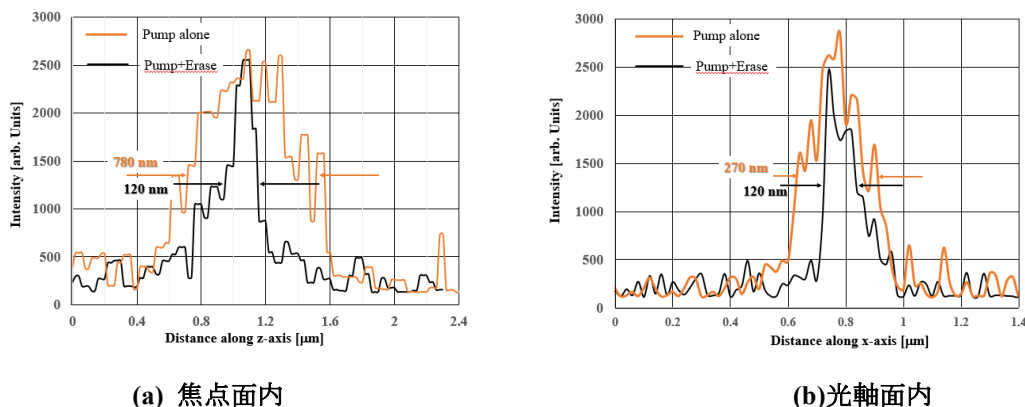


図 9－10：図 9－9 に示す蛍光スポットの焦点面内(a)及び光軸面内(b)の断面強度分布。

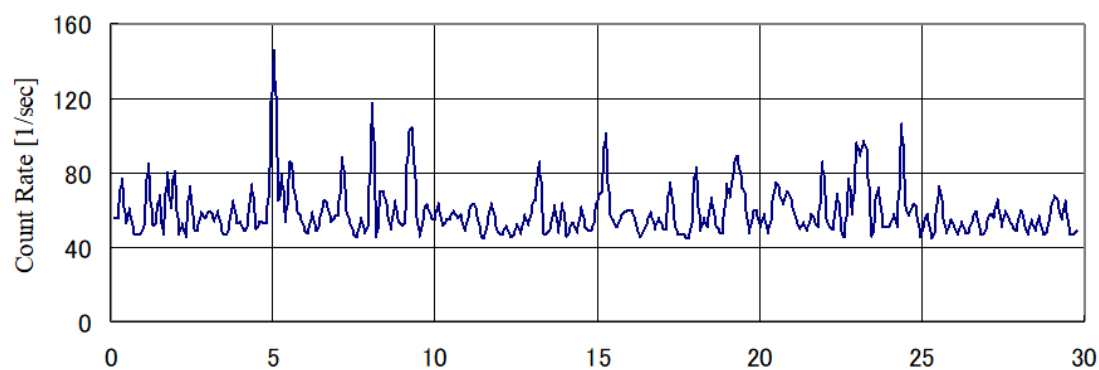


図 9 - 1 1 : 既存の蛍光相関計測における APD からの時系列出力信号。

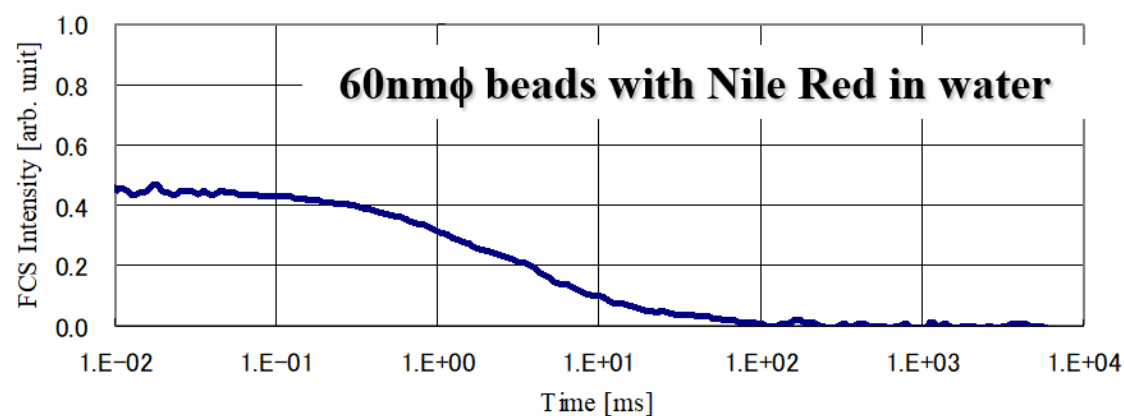


図 9 - 1 2 : 既存の蛍光相関法で計測した相関関数。

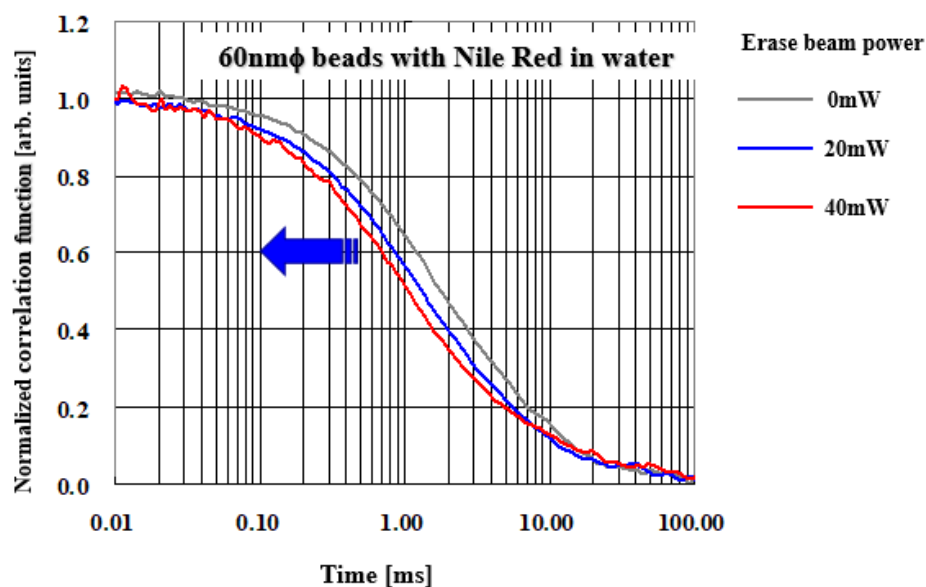


図 9 - 1 3 : 3次元超解像蛍光相関法で計測した蛍光ビーズ水溶液の相関関数。

【結論】

3次元超解像顕微鏡法を蛍光相関法に適用した。ベクトル電場モデルによれば、この提案方法は、既存の蛍光相関法よりもはるかに小さい体積の球状の蛍光スポットを提供することができる。検証実験の結果によれば、提案法で得られた相関関数の変曲点は、既存の方法と比較して短い相関時間領域にシフトしている。すなわち、3次元超解像顕微鏡法により生成した有効計測領域が縮小したことを意味している。粒子や分子の正確な拡散係数を得るには、できるだけ小さい球形の観測領域が必要である。既存の蛍光相関法は楕円形の広い有効計測領域しか解析できないが、本提案法で得られたスポットは高濃度分子の拡散運動を解析できることを示している。この意味で、提案する3次元超解像蛍光相関法は細胞内の微小領域での代謝をはじめとする生命現象の解明のみならず、化学合成の現場における1分子レベルでの反応生成過程の解析に応用できることが期待できる。本実験によれば、3次元超解像顕微鏡法は 10^{-20} m^3 オーダーの立体分解能を提供できる。丁度、10 zepto 立方メートル、すなわち、10 アトリットルに対応する。有効観測体積は既存の蛍光相関法と比較して1桁も小さくなる。この事実は、提案方法は従来法と比較して1桁も濃い濃度の分子溶液を蛍光相関分析ができることを意味する。10 アトリットルという立体分解能は細胞内のオルガネラのサイズであり、個々のオルガネラに関わる代謝現象の分析と解明ができることを意味する。

【付録 1 2】 ガウス分布を有する集光ビームを用いたときの蛍光相関関数

ガウス分布($\phi(\vec{r})$)を有する集光ビームを用いた場合には、 $\delta G(t)$ は非常に簡潔な解析的な関数で与えられる。

$$\delta G(\tau) = \frac{\int_{\vec{r}} d\vec{r} \int_{\vec{r}'} d\vec{r}' \phi(\vec{r}) \left\langle \delta C(\vec{r}, t + \tau) \delta C(\vec{r}', t) \right\rangle \phi(\vec{r}')}{[\langle C \rangle \int_{\vec{r}} d\vec{r} \phi(\vec{r})]^2}. \quad (9 - A1)$$

分子の散逸がブラウン運動に従うときは、 $\langle \delta C(\vec{r}, t + \tau) \delta C(\vec{r}', t) \rangle$ は拡散源が点源である($\delta(\vec{r})\delta(t)$)としたときの拡散方程式の解に相当する(第1種の Green 関数)。

$$\langle \delta C(\vec{r}, t + \tau) \delta C(\vec{r}', t) \rangle = \frac{\langle C \rangle}{(4\pi D\tau)^{\frac{3}{2}}} \exp\left[-\frac{(\vec{r} - \vec{r}')^2}{4D\tau}\right], \quad (9 - A2)$$

例えば、通常のレーザー光を集光すると、図 9-2 が示す様に、 x 、 y 、 z の各座標軸を含むビームプロファイルの断面形状はガウス関数として近似できる。

$$\phi(\vec{r}) = \phi(x, y, z) = I_0 \exp\left[-\left(\frac{2x^2}{\omega_x^2} + \frac{2y^2}{\omega_y^2} + \frac{2z^2}{\omega_z^2}\right)\right], \quad (9 - A3)$$

式(9-A3)は全体の3次元的なビーム形状を示す。ここで、 ω_x 、 ω_y 、 ω_z は x 、 y 、 z 軸方向に対するビームの広がりサイズを示す量であり、各座標軸において ω_x 、 ω_y 、 ω_z をとるときは中心強度に対して e^{-2} に減衰する。式(9-A2)と式(9-A3)の様に全ての被積分関数が指数関数をとるときは、式(9-A1)は非常に簡潔な解析解を与える。式(9-A1)に式(9-A2)と(9-A3)を代入すれば、

$$\begin{aligned} S(\tau) &= \langle C \rangle \int_{\vec{r}} d\vec{r} \int_{\vec{r}'} d\vec{r}' \phi(\vec{r}) \langle \delta C(\vec{r}, t + \tau) \delta C(\vec{r}', t) \rangle \phi(\vec{r}') \\ &= \langle C \rangle \frac{I_0^2}{(4\pi D\tau)^{\frac{3}{2}}} \int_{\vec{r}} d\vec{r} \int_{\vec{r}'} d\vec{r}' \exp\left[-\left(\frac{2x^2}{\omega_x^2} + \frac{2y^2}{\omega_y^2} + \frac{2z^2}{\omega_z^2}\right)\right] \exp\left[-\frac{(x-x')^2 + (y-y')^2 + (z-z')^2}{4D\tau}\right] \exp\left[-\left(\frac{2x'^2}{\omega_x^2} + \frac{2y'^2}{\omega_y^2} + \frac{2z'^2}{\omega_z^2}\right)\right]. \end{aligned} \quad (9 - A4)$$

式(9-A4)は、(9-A5)の様に x 、 y 、 z に対して変数分離して積分が出来る。

$$S(\tau) = \langle C \rangle \frac{I_0^2}{(4\pi D\tau)^{\frac{3}{2}}} J(x, x') J(y, y') J(z, z'). \quad (9 - A5)$$

ここで、 J_{xi} は、以下の積分を表す。

$$\begin{aligned} J_{x_i} &= \int_{x_i} dx_i \int_{x_i'} dx_i' J(x_i, x_i') \\ &= \int_{x_i} dx_i \int_{x_i'} dx_i' \exp\left(-\frac{2x_i'^2}{\omega_{x_i}^2}\right) \exp\left[-\frac{(x_i - x_i')^2}{4D\tau}\right] \exp\left(-\frac{2x_i'^2}{\omega_{x_i}^2}\right). \end{aligned} \quad (9-A6)$$

まず、式（9-A 6）に関して、 x_i 座標について積分を行う。

$$\begin{aligned} J_{x_i} &= \int_{-\infty}^{\infty} \exp\left(-\frac{2x_i'^2}{\omega_{x_i}^2}\right) K(x_i') dx_i'. \\ K(x_i') &= \int_{-\infty}^{\infty} \exp\left(-\frac{2x_i'^2}{\omega_{x_i}^2} - \frac{(x_i - x_i')^2}{4D\tau}\right) dx_i, \end{aligned} \quad (9-A7)$$

式（9-A 7）の計算に際しては、これはコンボリューションに関するフーリエ変換公式（9-A 8）を用いることで見通しが良くなる。

$$\begin{aligned} f_1(x) * f_2(x) &= \int_{-\infty}^{\infty} f_1(x') f_2(x' - x) dx' \\ \tilde{F}[f_1(x) * f_2(x)] &= F_1(v) \cdot F_2(v), \end{aligned} \quad (9-A8)$$

$$f_1(x_i) = \exp\left(-\frac{2x_i'^2}{\omega_{x_i}^2}\right), \quad f_2(x_i) = \exp\left(-\frac{x_i'^2}{4D\tau}\right), \quad (9-A9)$$

ここで演算操作「*」はコンボリューションを示し、 \tilde{F} はフーリエ変換を示す。そして、 $F_1(v)$ と $F_2(v)$ は $f_1(x)$ と $f_2(x)$ に対するそれぞれのフーリエ変換関数を示す。式（9-A 7）において、公式（9-A 8）を適用すると、

$$\begin{aligned} K(x_i') &= \tilde{F}^{-1}(F_1(v) \cdot F_2(v)), \\ K(x_i') &= 4\omega_{x_i} \sqrt{\frac{\pi D\tau}{8D\tau + \omega_{x_i}^2}} \exp\left(-\frac{2}{8D\tau + \omega_{x_i}^2} x_i'^2\right) \end{aligned} \quad (9-A10)$$

最後に積分 J_{xi} を計算して、

$$\begin{aligned} J_{x_i} &= 4\omega_{x_i} \sqrt{\frac{\pi D\tau}{8D\tau + \omega_{x_i}^2}} \int_{-\infty}^{\infty} \exp\left[-\left(\frac{2}{\omega_{x_i}^2} + \frac{2}{8D\tau + \omega_{x_i}^2}\right) x_i'^2\right] dx_i'. \\ &= 2\pi\omega_{x_i} \sqrt{\frac{D\tau}{1 + \frac{\tau}{\tau_{Dx_i}}}}. \end{aligned} \quad (9-A11)$$

ただし、 $\tau_{Dxi} = \omega_{xi}^2/4D$ を表す。従って、 x_i は任意の x 、 y 、 z 座標を表すので、

$$S(\tau) = \pi^{\frac{3}{2}} \omega_x \omega_y \omega_z \langle C \rangle \frac{1}{\sqrt{1+\frac{\tau}{\tau_{Dx}}} \sqrt{1+\frac{\tau}{\tau_{Dy}}} \sqrt{1+\frac{\tau}{\tau_{Dz}}}}. \quad (9-A12)$$

ここで、 $V_{eff} = \pi^{\frac{3}{2}} \omega_x \omega_y \omega_z$ と書くと、式 (9-A 12) に代入して、

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle C \rangle V_{eff}} \frac{1}{\sqrt{1+\frac{\tau}{\tau_{Dx}}} \sqrt{1+\frac{\tau}{\tau_{Dy}}} \sqrt{1+\frac{\tau}{\tau_{Dz}}}}. \quad (9-A13)$$

もし、 V_{eff} を有効観測領域と定義すると、 $\langle C \rangle V_{eff}$ は有効観測領域に存在する蛍光分子の時間平均した絶対数 $\langle N \rangle$ であり、下記の様な蛍光相関関数を得る。

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \frac{1}{\sqrt{1+\frac{\tau}{\tau_{Dx}}} \sqrt{1+\frac{\tau}{\tau_{Dy}}} \sqrt{1+\frac{\tau}{\tau_{Dz}}}}. \quad (9-A14)$$

【第9章：参考文献】

- 9-1) D. Magde, E. Elson, and W. Webb, Phys. Rev. Lett. **29**, 705 (1972);
<https://journals.aps.org/prl/abstract/10.1103/PhysRevLett.29.705>.
- 9-2) Z. Földes-Papp, Experimental and Molecular Pathology, **80**, 209 (2006);
<https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2006.01.001>.
- 9-3) W. Webb, Fluorescence correlation spectroscopy, App. Opt. **40**, 3969 (2001);
<https://doi.org/10.1364/AO.40.003969>.
- 9-4) J. Unsay, F. Murad, and E. Hermann, J. Ries, A. García-Sáez, ChemPhysChem, **19**, 3273 (2018); 3273-3278; <https://doi.org/10.1002/cphc.201800705>.
- 9-5) E. Sherman, and G. Haran, , ChemPhysChem, **12**, 696 (2011);
<https://doi.org/10.1002/cphc.201000722>.
- 9-6) H. Qian, and E. Elson, Appl. Opt. **30**, 1185 (1991); <https://doi.org/10.1364/AO.30.001185>.
- 9-7) M. Marrocco, Appl. Opt. **43**, 5251 (2004) 5251-5262; <https://doi.org/10.1364/AO.43.005251>.
- 9-8) C. Xie, C. Dong, and J. Ren, Front. Chem. China **4**, 191 (2009).
<https://doi.org/10.1007/s11458-009-0036-5>.
- 9-9) 池滝慶記、藤井正明、渡邊武史、尾松孝茂、山本公寿、鈴木智雄、特許第 3993553 号 (2003)。
- 9-10) Y. Iketaki, Proc. SPIE 11522, Optical Manipulation and Structured Materials Conference 2020, 115221E (2020); <https://doi.org/10.1117/12.2573793>.

第 10 章 蛍光抑制効果誘導時におけるイレース光照射

による副次発光過程に関する考察とその応用

要旨

蛍光抑制効果誘導時のイレース光照射による副次発光過程に関して考察した。2 光子吸収過程と熱励起した S_0 状態からの S_1 状態への励起は副次発光の原因となる。2 光子吸収過程と蛍光抑制効果が競合する場合のダイナミクスの定式化を行い、この過程における副次発光過程の定量的な記述を行った。また、熱励起した S_0 状態からの S_1 状態への励起を利用することで、STED と全く異なる照明条件で蛍光抑制効果を誘導できる。この分光過程を基礎にした超解像顕微鏡法の実証に成功した。この副次発光過程は超解像顕微鏡法における結像機能を毀損するが、反面、これを積極的に利用することで超解像顕微鏡法の機能拡大を図れることも発見をした。

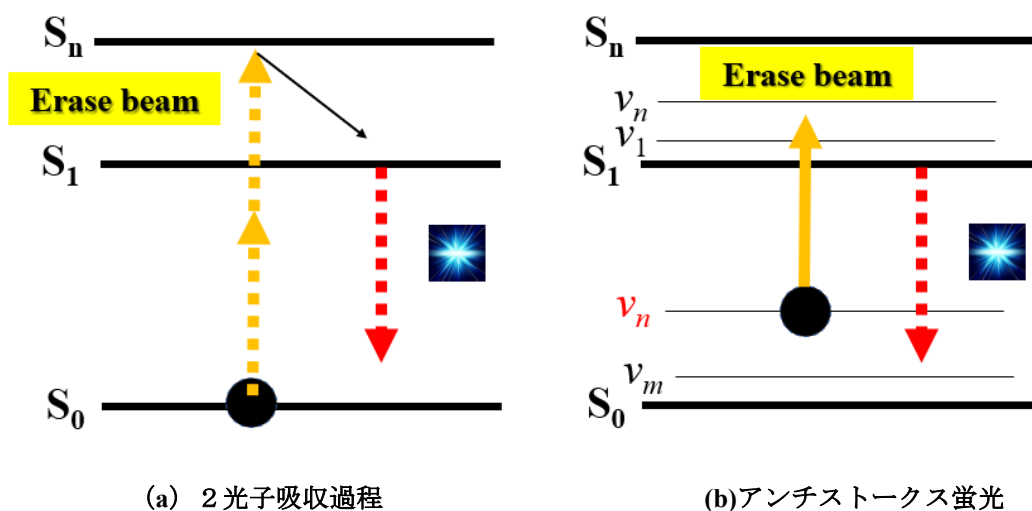


図 10-1 : イレース光照明による副次発光過程。

【緒言】

凝集相中の蛍光色素分子に高強度の照明光を集光すると、通常の基底状態の S_0 状態から S_1 状態への励起後の蛍光緩和過程の他に副次過程による発光現象が起きる。代表的な分光過程が非線形 2 光子吸収過程である。生物試料観察用に開発された、Alexa や Atto シリーズの蛍光色素分子は褪色に強いキサテン系の分子骨格をもったものが多用されている。これらの分子は、700 nm から 900 nm の波長帯域には 2 光子吸収過程により $S_n \leftarrow S_0$ 励起が可能であり、その後の緩和からの蛍光が確認されている (図 10-1 (a)) [10-1,]. この過程は、照明光として尖頭地強度が高いフェムト秒の短パルスレーザーを用いると簡単に誘導でき

る。ところで、第6章で述べた様に、700 nm から 900 nm の波長帯域ではピークフトンフラックスが $10^{24}/\text{cm}^2/\text{sec} \sim 10^{29}/\text{cm}^2/\text{sec}$ を有するイレース光の照明により、ほとんどの分子で蛍光抑制効果を誘導できることを確認している[10-1]。この事実は、蛍光抑制過程と2光子吸収過程という蛍光緩和に関して相反する分光過程が競合していることを示している。前者は、誘導放出や誘導吸収などリアルな電子状態間で起きるので遷移確率が大きく、低いフトンフラックスで誘導できる。それに対して、後者はバーチャルな中間状態が介在する非線形過程なので遷移確率が小さい。従って、これらの過程は高い強度の照明光でないと起きない。通常、超解像顕微鏡観察の際には、副次的な発光が起きないイレース光強度であることを確認する。しかし、第2章に述べた様に高い分解能を得るために、尖頭値強度が高いイレース光を利用することが求められる。この場合、副次的な発光により超解像顕微鏡法の分解能の上限が限定されるだけでなく、顕微鏡画像の画質の劣化を招く可能性がある。また、2光子吸収過程以外にもアンチストーク蛍光の発生も超解像顕微鏡法の機能を阻害する（(図10-1(b))）。この蛍光過程は、凝集相中で振動熱励起した S_0 状態の分子が存在することに由来する。すなわち、振動熱励起状態のエネルギー分だけ低い光子エネルギーでも S_1 状態へ励起可能となり、励起光より短波長の蛍光発光が起きる[10-3]。これらの事実は、超解像顕微鏡観察を行う場合には、イレース光の強度と共に波長の設定にも注意を払わなくてはならないことを示している。そこで、本章では、代表的なキサンテン系分子であるローダミン6 G の副次発光過程に関して実験調査を行った。

【2光子吸収過程の考察】

図10-2は、エタノール中で S_1 状態に励起したローダミン6 G の過渡吸収スペクトルの例である。図10-2によれば、誘導放出帯域、入射光（過渡吸収分光法におけるプローブ光）は増幅されるので、蛍光帯域が存在する波長600 nm 近傍では透過したプローブ光の吸光度変化 ΔA はマイナス値をとる。しかし、長波長領域になるに従い $S_n \leftarrow S_1$ 誘導吸収が強くなり、 ΔA はプラスに転じて増加を続ける。波長750 nm付近で誘導放出と $S_n \leftarrow S_1$ 誘導吸収が拮抗し、 ΔA が見かけ上

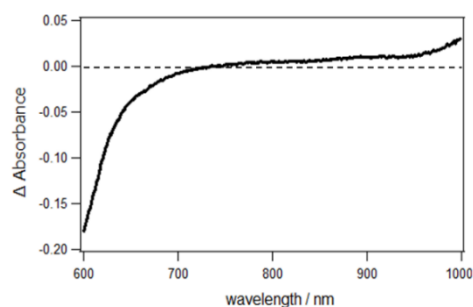


図10-2：エタノール中のローダミン 6 G の過渡吸収スペクトル

ゼロとなる[10-4]。この波長領域のイレース光により蛍光抑制効果のデモンストレーションを行った。測定方法は第6章で述べた2波長分光計測装置を用い、 $\lambda_p=532\text{ nm}$ のポンプ光（パルス幅：7 ns）で S_1 状態への励起を行い、 $\lambda_e=765\text{ nm}$ のイレース光（パルス幅：10 ns）で蛍光抑制を行った。図10-3には、PMMAポリマー中のローダミン6 G に対して各イレース光強度で誘導した時の蛍光スペクトルを示す。図中の太い黒線の曲線はポンプ光単独照射時の蛍光スペクトルを示し、灰色の曲線はイレース光同時照射時のスペクトルを示す。そして、

黒の細線カーブはイレース光単独照射時のスペクトルを示す。図 10-3 (b) によれば、イレース光のピークフォトンフラックスが $2.4 \times 10^{26} \text{ /cm}^2\text{/sec}$ の場合には、蛍光抑制効果により蛍光強度の低下が確認できる。しかし、図 10-3 (c) と (d) によれば、蛍光スペクトルのピーク値は $6.5 \times 10^{26} \text{ /cm}^2\text{/sec}$ を境に増加に転じていることが分かる。注目すべきことは、イレース光単独照射でも発光が確認できることである。図 10-4 は蛍光抑制効果誘導時のイレース光強度に対する蛍光スペクトルのピーク強度の依存性を示すが、この事実を定量的に示している。その一方で、図 10-5 はイレース光単独照射時のイレース光強度に対する蛍光スペクトルのピーク強度の依存性を示すが、イレース光強度の増加に伴い、副次的発光成分が増加している。波長 700 nm より長波長領域には 2 光子吸収過程により $S_n \leftarrow S_0$ 吸収帯の存在が確認されているので、イレース光単独照射による発光は 2 光子吸収過程による蛍光であることを示唆している [10-5]。

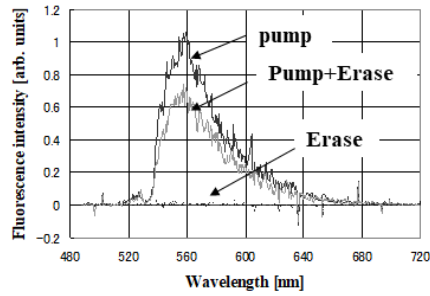
この仮説を確かめる為に、レート方程式を用いて、解析を行った。図 10-6 に、2 光子吸収過程を含む蛍光抑制効果の光反応ダイアグラム及び個別の反応断面積と反応速度を示す。図 10-6 によれば、フォトンフラックス I_p のイレース光により、吸収断面積 σ_{01} で S_0 から S_1 に励起され、フォトンフラックス I_e のイレース光の照射により σ_{1n} で S_1 から S_n で誘導吸収と σ_f で誘導放出が起こる。同時に、2 光子吸収断面積 δ で S_0 から S_n の励起が平行しておきる。 S_n からは、緩和速度 k_{n1} と k_{n0} で無輻射過程により S_1 又は S_0 に緩和する。ここで、 τ は蛍光寿命を示す。また、 (N_0) を S_0 状態の存在確率、 (N_1) を S_1 状態の存在確率、そして (N_n) を S_n 状態の存在確率とすると、2 光子吸収過程を含むレート方程式は式 (10-1) で与えられる。ポンプ光とイレース光の照射時間はナノ秒オーダーなので、各状態の占有確率は定常解として得られる (式 (10-2))。特に、 S_1 状態の存在確率は蛍光強度に比例するので、 N_1 は蛍光抑制効果の時の蛍光量を示す。 N_1 を規格化した関数 $(F(I_p, I_e, \sigma_{dep}))$ は、式 (10-3) と式 (10-4) に示す様に、 I_p 、 I_e 、及び第 2 章で導入した蛍光抑制断面 σ_{dip} に依存する物理量となる。ここで、 (C) は規格化のための比例係数を示す。

$$\begin{bmatrix} \frac{dN_0}{dt} \\ \frac{dN_1}{dt} \\ \frac{dN_n}{dt} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -\sigma_{01}I_p - \delta I_e^2 & \frac{1}{\tau} + \sigma_f I_e & k_{n0} \\ \sigma_{01}I_p + \delta I_e^2 & -\frac{1}{\tau} - \sigma_f I_e - \sigma_{1n}I_e & k_{n1} \\ 0 & \sigma_{1n}I_e & -k_{n0} - k_{n1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} N_0 \\ N_1 \\ N_n \end{bmatrix}. \quad (10-1)$$

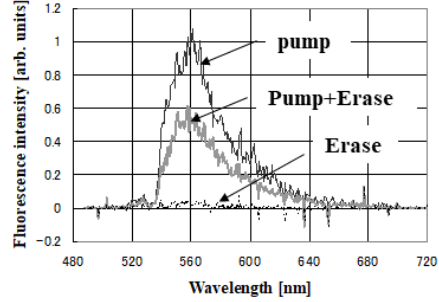
$$N_1(I_p, I_e, \sigma_{dep}) = \frac{\sigma_{01}I_p + \delta I_e^2}{\sigma_{01}I_p + \delta I_e^2 + \frac{1}{\tau} + \sigma_{dep}I_e}, \quad (10-2)$$

$$F(I_p, I_e, \sigma_{dep}) = C N_1(I_p, I_e, \sigma_{dep}), \quad (10-3)$$

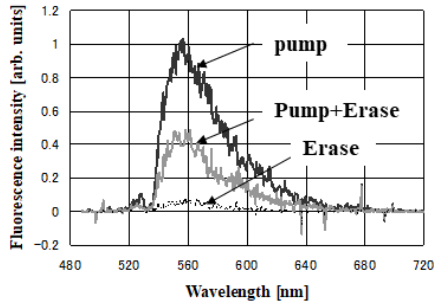
$$\sigma_{dep} = \sigma_f + \sigma_{1n} \frac{k_{n0}}{k_{n0} + k_{n1}}. \quad (10-4)$$



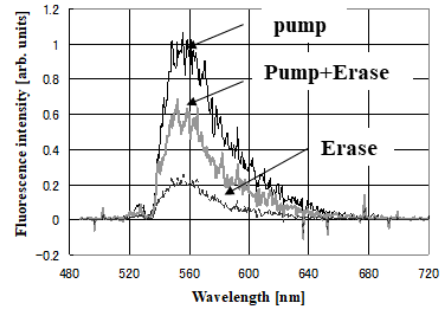
(a): $I_e = 9.8 \times 10^{25} / \text{cm}^2 / \text{sec}$



(b): $I_e = 2.4 \times 10^{26} / \text{cm}^2 / \text{sec}$



(c): $I_e = 6.5 \times 10^{26} / \text{cm}^2 / \text{sec}$



(d): $I_e = 14.5 \times 10^{26} / \text{cm}^2 / \text{sec}$

図 10-3 : PMMA ポリマー中のローダミン 6 G に対して各イレース光強度 ($\lambda_e = 765 \text{nm}$) で誘導した時の蛍光スペクトル。

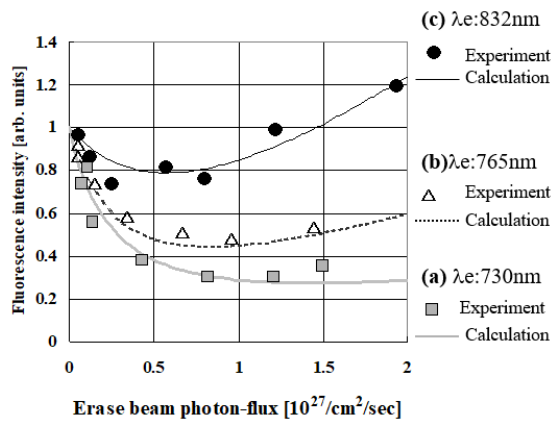


図 10-4 : 蛍光抑制効果誘導時のイレース光強度に対する蛍光スペクトルのピーク強度の依存性。

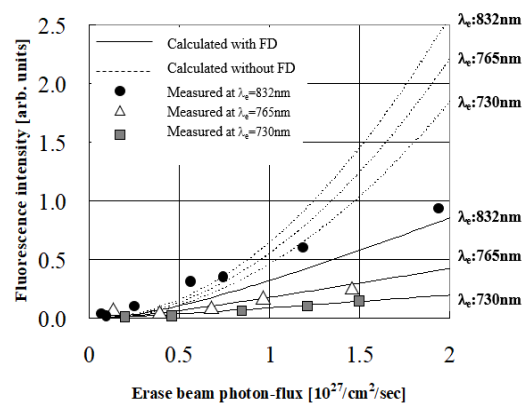


図 10-5 : イレース光単独照射時のイレース光強度に対する蛍光スペクトルのピーク強度の依存性。

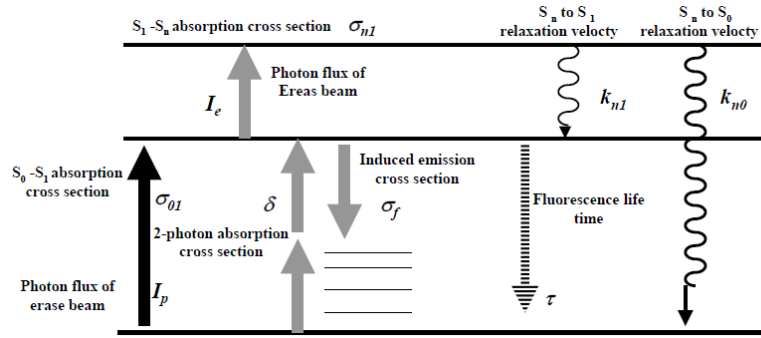


図 1 0 - 6 : 2 光子吸収過程を含む蛍光抑制効果の励起・緩和ダイアグラム。

式 (1 0 - 2) によれば、図 1 0 - 4 と対応する様に、 I_e に対して極小値をもつことが分かる。式 (1 0 - 3) を式 (1 0 - 5) に示す様に I_e に関して微分を行うと、式 (1 0 - 6) で与られるイレース光のフォトンフラックスで蛍光強度が最小値をとる。すなわち、このレート方程式の解は、蛍光抑制効果による蛍光強度の減少量と 2 光子吸収過程による蛍光発光量が釣り合っている状態であることを示している。特に、式 (1 0 - 6) において $I_p=0$ と置くと、式 (1 0 - 7) を得る。これは、図 1 0 - 5 に示すイレース光単独照射時における蛍光発光特性に対応する (式 (1 0 - 8))。特に、近赤外のフェムト秒の尖頭値の高いショートパルス光を用いる場合、誘導放出や $S_n \leftarrow S_1$ のサイクリックな誘導吸収が起きないために蛍光抑制過程が起きない。その結果として、良く知られた 2 光子吸収過程の蛍光発光の関係式を得る (式 (1 0 - 9))。

$$\frac{\partial F(I_p, I_e, \sigma_{dep})}{\partial I_e} = 0, \quad (10 - 5)$$

$$I_e = -\frac{1}{\tau \sigma_{dep}} + \sqrt{\left(\frac{1}{\tau \sigma_{dep}}\right)^2 + \frac{\sigma_{01} I_p}{\delta}}. \quad (10 - 6)$$

$$F(0, I_e, \sigma_{dep}) = \frac{\delta I_e^2}{\delta I_e^2 + \frac{1}{\tau} + \sigma_{dep} I_e}. \quad (10 - 7)$$

$$F(0, I_e, 0) = \frac{\delta I_e^2}{\delta I_e^2 + \frac{1}{\tau}}. \quad (10 - 8)$$

$$F(0, I_e, 0) \cong \tau \delta I_e^2. \quad (10 - 9)$$

図10-7には、Makalov等がフェムト秒レーザー光で測定したメタノール中のローダミン6Gの近赤外領域における2光子吸収断面積を示す[10-6]。それによれば、波長700 nmから840 nmの帯域にローダミン6Gは $1 \times 10^{-49} \text{ cm}^4 \cdot \text{sec}$ オーダーの2光子吸収断面積をもっている。これらの断面積を含め、表10-1には、ローダミン6Gの分光定数と実験条件を示す。また、式(10-2)を用いて σ_{dip} をパラメータとしてフィッティング計算を行った。その結果、表10-2の σ_{dip} を用いると、図10-4中のシミュレーションカーブと図10-5の実線カーブで示す結果を矛盾なく再現できることが分かる。特に図10-5の結果に着目すると、式(10-9)により蛍光抑制効果を考慮しないと計算は実験結果を再現出来ない(図10-5中の破線)。本実験の様に、ナノ秒パルスのイレース光を用いると $S_n \leftarrow S_1$ のサイクリックな誘導吸収が促進され、蛍光抑制効果が2光子吸収過程による蛍光を阻害していることが分かる。本解析は、超解像顕微鏡法で用いるイレース光が蛍光抑制効果と共に競合して2光子吸収過程を誘起していることを示している。

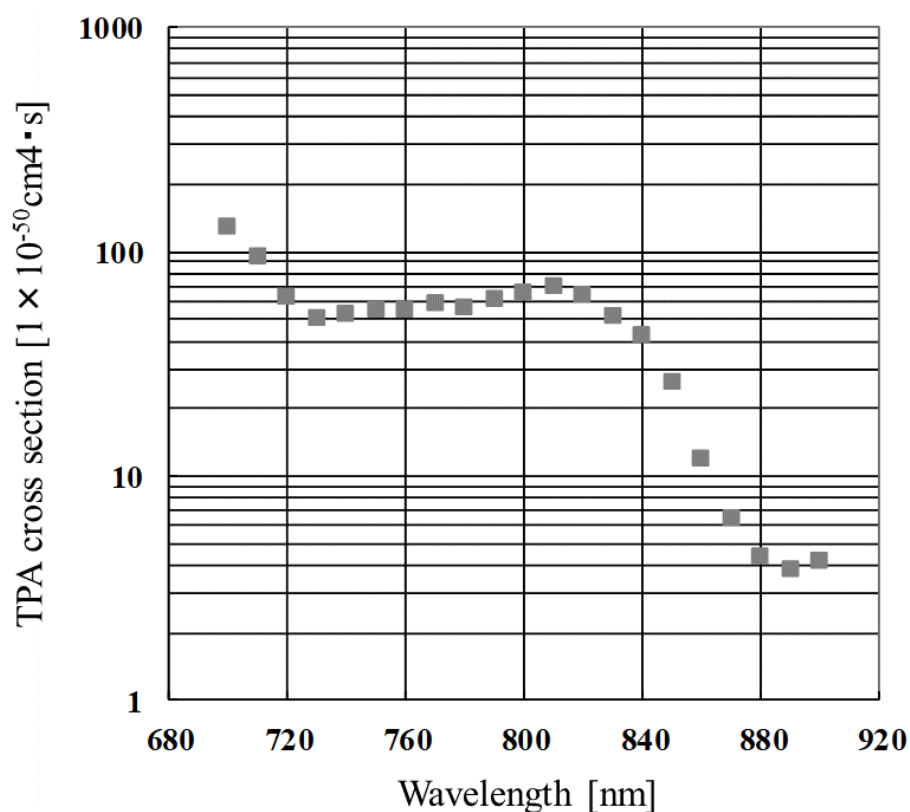


図10-7：エタノール中のローダミン6Gの2光子吸収断面積。

表 1 0 - 1 : ローダミン 6 G の分光定数と実験条件

S_0 - S_1 absorption cross section (σ_0)	$4.0 \times 10^{-16} \text{ cm}^2 @ \lambda_p=532 \text{ nm}$
S_0 - S_1 two photon absorption cross section (δ)	$6.0 \times 10^{-49} \text{ cm}^4 \text{ s} @ \lambda_e=832 \text{ nm}$ $6.0 \times 10^{-49} \text{ cm}^4 \text{ s} @ \lambda_e=765 \text{ nm}$ $5.0 \times 10^{-49} \text{ cm}^4 \text{ s} @ \lambda_e=730 \text{ nm}$
S_1 life-time (τ) in PMMA	3.75 ns [2-6]
Pump beam photon-flux (I_p)	$2.7 \times 10^{21} \text{ photons/cm}^2/\text{sec}$
Erase beam photon-flux (I_e)	$1.9 \times 10^{27} \text{ photons/cm}^2/\text{sec}$

表 1 0 - 2 : フィッティング計算で得られた蛍光抑制断面積

λ_e	σ_{dep}
730 nm	$1.1 \times 10^{-18} \text{ cm}^2$
765 nm	$5.6 \times 10^{-19} \text{ cm}^2$
832 nm	$2.7 \times 10^{-19} \text{ cm}^2$

【アンチストークス蛍光過程の考察】

物理化学の研究領域では、分子の構造解析や光化学反応を追跡する手法として、赤外・可視 2 重共鳴分光法が確立している。この分光法では、赤外光により基底状態の分子を選択的に振動励起し、さらに可視光で S_1 状態に励起する (図 1 0 - 8)。この分光法の特徴は、図 1 0 - 8 に示す様に、赤外光と可視光が 2 重に共鳴した重なり部分でのみ発生する過渡蛍光を検出する。近年では、この分光過程を用いた顕微鏡法、すなわち赤外超解像顕微鏡法の実験研究が進展している。蛍光発生領域を解析することで分子の振動状態の情報を得ることができる

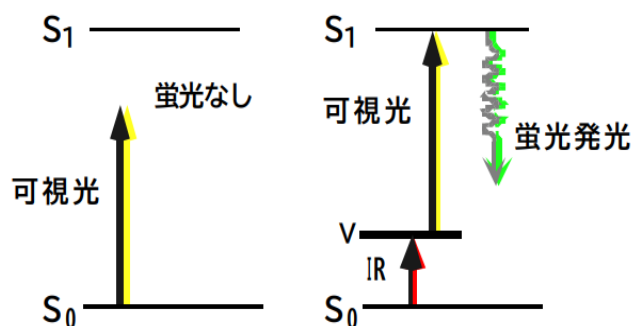


図 1 0 - 8 : 赤外・可視 2 重共鳴分光法。

ことに加え、既存の赤外吸収法では得られない高い空間分解能機能を併せ持つ[10-7]。図 1 0 - 9 は石英セルにローダミン 6 G / 重クロロホルム溶液の過渡蛍光像を測定した報告例を示す。2 色の可視光 : 621 nm と赤外光 : 3400 nm (波数 :

2941 cm^{-1}) をピコ秒レーザーで発生させ、反射型対物レンズで集光した。(a)赤外光のみ、あるいは(b)可視光のみを入射した場合では蛍光は全く観測されないが、(c)両者を同時入射した場合では蛍光像が明瞭に観測されている。以上の事実から、観測された蛍光像は赤外振動励起準位を経由する赤外-可視の二重共鳴信号であることを示している。

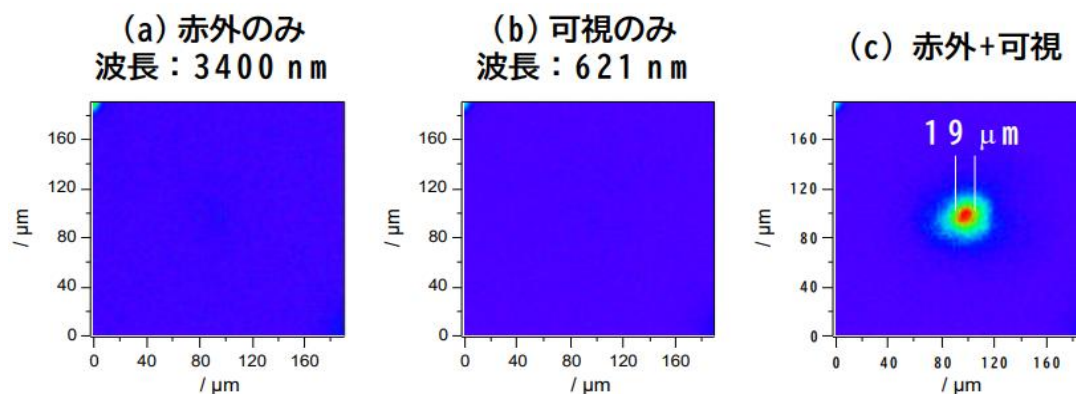


図 10-9：重クロホルム中のローダミン 6 G 溶液における赤外・可視 2 重共鳴分光法で誘導した過渡蛍光例。

赤外・可視 2 重共鳴分光法で注目すべきことは、図 10-8 に示す様に S 振動励起準位の S_0 の分子を励起するので、 $S_n \leftarrow S_1$ 吸収帯よりも長波長の励起光で蛍光過程を誘導できることである[10-8]。しかし、この分光法のダイナミクスに注目すると、赤外光照射のアシストがなくても、室温で分子が熱励起している場合には $S_1 \leftarrow S_0$ 吸収帯よりも長波長の照明光を用いても過渡蛍光を検出することができる。図 10-10 は、メタノール中のローダミン 6 G の吸収及び蛍光スペクトルを示す。また、図 10-11 は、第 6 章で紹介した 2 波長分光計測装置を用いて測定したメタノール中のローダミン 6 G の蛍光抑制効果誘導時の蛍光スペクトルである。ポンプ光としてパルス Nd:YVO₄ レーザー： $\lambda_p=532 \text{ nm}@7 \text{ nsec}$ 、イレース光としてパルス色素レーザー（ローダミン B）： $\lambda_p=578 \text{ nm}@7 \text{ nsec}$ を用いた。図 10-11 によれば、尖頭値強度 $5 \times 10^{25} / \text{cm}^2 / \text{photons}$ のイレース光をポンプ光と同時照射すると、ポンプ光単独照射時と比較して蛍光強度が 4 割程度減少する。しかし、注目すべきことはイレース光単独照射でも蛍光発光がおきることである。この現象は、照明光よりも短波長側で検出されるアンチストークス蛍光と呼ばれる。凝集相中の最低電子状態の S_0 状態の分子は室温でも分子の熱励起状態にある。図 10-12 はローダミン 6 G の表面増強ラマンスペクトルの例である。それによれば、室温で $1650 / \text{cm}^{-1}$ より低振動領域に様々な化学基に由来する振動準位が展開をしている。例えば、 $1630 / \text{cm}^{-1}$ のピークに着目すると、この準位の状態エネルギーは 0.202 eV に対応する。一方、イレース光の波長 587 nm は 2.112 eV に対応する。図 10-12 に示す様に、もし、 $1630 / \text{cm}^{-1}$ の振動準位にある熱励起分子をイレース光で励起すると、基底状態から $0.202 \text{ eV} + 2.112 \text{ eV} = 2.314 \text{ eV}$ の S_1 準位の励起量子状態へ遷移させることができる（このエネルギーは、励起波長に換算すると 536 nm に相当する）[10-9]。すな

わち、この波長でも $S_1 \leftarrow S_0$ の励起が可能であり蛍光過程を誘導できることを示している。冷却した分子の遷移確率は低いものの、連続照射により $S_1 \leftarrow S_0$ の励起及び緩和が始まると、熱励起した分子が生成されて $S_1 \leftarrow S_0$ の励起がイレース光照射により促進される。この事実は、図 10-13 に示す様に、蛍光抑制効果は 2 光子吸収過程のみならずアンチストークス蛍光過程とも競合することを示している。

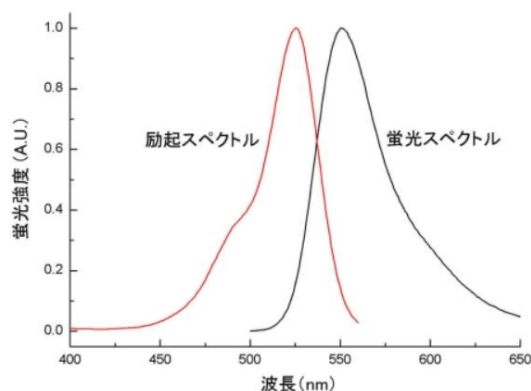


図 10-10：メタノール中のローダミン 6 G の吸収及び蛍光スペクトル。

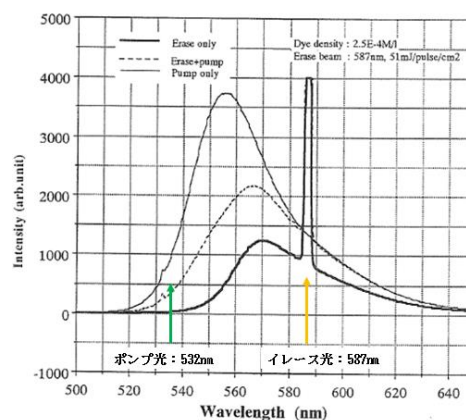


図 10-11：メタノール中のローダミン 6 G の蛍光抑制効果。

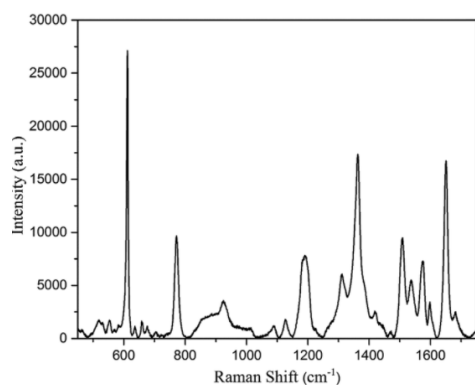


図 10-12：ローダミン 6 G の表面増強ラマンスペクトル。

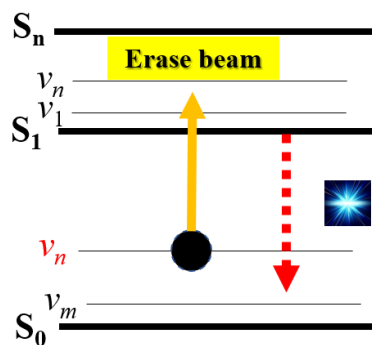


図 10-13：熱励起した分子の $S_1 \leftarrow S_0$ 励起過程。

【オフ STED 波長領域を用いた超解像顕微鏡法の実証】

アンチストークス蛍光に着目すると、ポンプ光を敢えて蛍光帯域より長波長側に設定し、さらにそれよりも長波長のイレース光を用いることで誘導吸収により蛍光抑制過程を誘導することが期待できる。すなわち、既存技術である STED と異なる分光条件で超解像顕微鏡観察ができることを示している。この発案の検証実験を行うため、ターゲットサンプルとして、図 10-14 に示す分子構造をもつ蛍光色素分子 C-Naphox を選定した[10-10]。図 10-15 に示すスキームにおいて、 $S_1 \leftarrow S_0$ 吸収帯よりも長波長のポンプ光照明法により蛍光

抑制効果を誘導できるかどうかを検証した。この分子は褪色に強く、STED をはじめとする超解像顕微鏡観察で実績がある。C-Naphox をフォトレジスト溶液 (D5204 : 東京化成株式会社) に 0.1mM / ℓ の濃度で分散させ、このフォトレジスト溶液をカバーガラスに 200 nm の厚みでスピコートした。図 1 0 - 1 6 にこの C-Naphox を分散した薄膜試料の分光特性を示す。図 1 0 - 1 6 (a) によれば、波長 450 nm の紫外領域に $S_1 \leftarrow S_0$ の吸収帯が存在し、波長 515 nm の近傍に蛍光ピークが存在する。一方、図 1 0 - 1 6 (b) は第 8 章で述べた過渡吸収測定装置で計測した RIPT 法による過渡吸収スペクトルである。ポンプ光を入射後 2.8 nsec 後にプローブ光を入射して測定したものである。それによれば、蛍光ピークの近傍でプローブ光の変化が負になっており、誘導放出が支配的な波長領域であることが分かる。そして、注目すべきは 550 nm より長波長側に、強い $S_n \leftarrow S_1$ 誘導吸収帯の存在が確認できる。この波長領域にイレース光を設定すると、図 1 0 - 1 5 が示す様に、誘導放出を用いる STED とは異なり、誘導吸収による S_n からの非輻射緩和により蛍光が抑制できることを示している。従って、C-Naphox の分光特性に着目すると、波長 515 nm をポンプ光とし、例えば誘導吸収が支配的な波長 670 nm をイレース光とすることで、STED とは全く異なる波長帯域、すなわち、オフ STED 波長領域で超解像顕微鏡法が利用できることを示している。

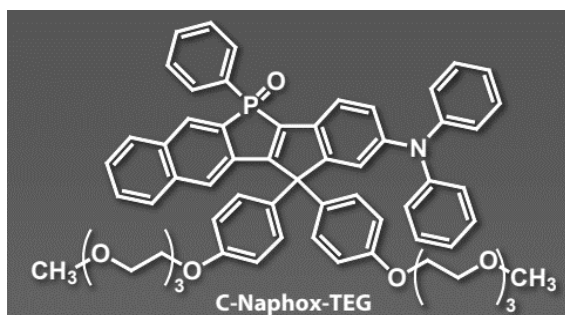


図 1 0 - 1 4 : C-Naphox の分子構造。

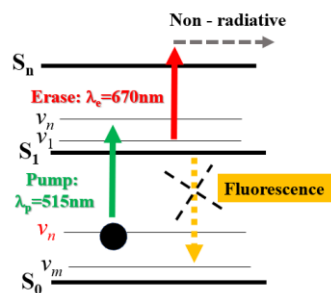
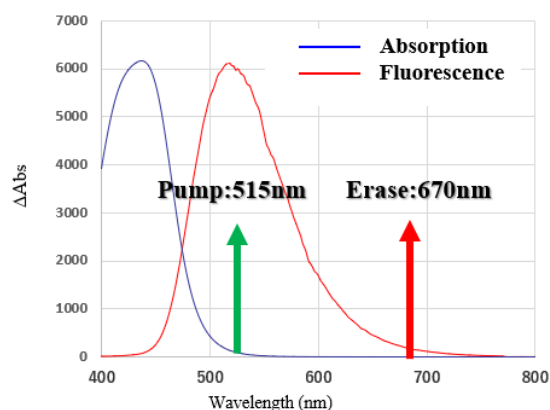
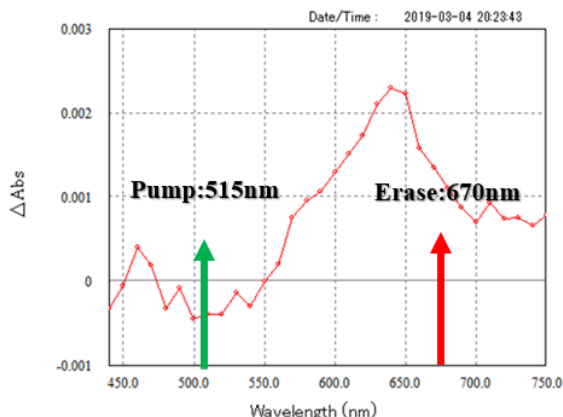


図 1 0 - 1 5 : C-Naphox の蛍光抑制過程。



(a)



(b)

図 1 0 - 1 6 : C-Naphox の吸収・蛍光スペクトル (a) と過渡吸収スペクトル (b)。

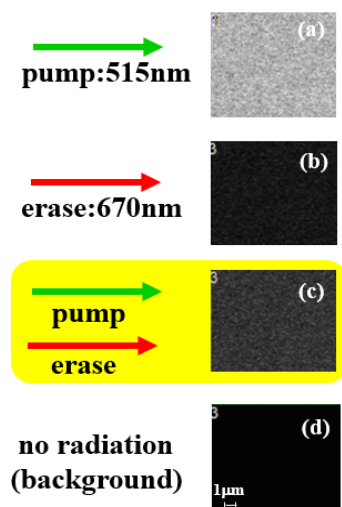


図 10-17：蛍光抑制効果誘導時の C-Naphox を分散したフォトレジスト薄膜の蛍光像の変化。

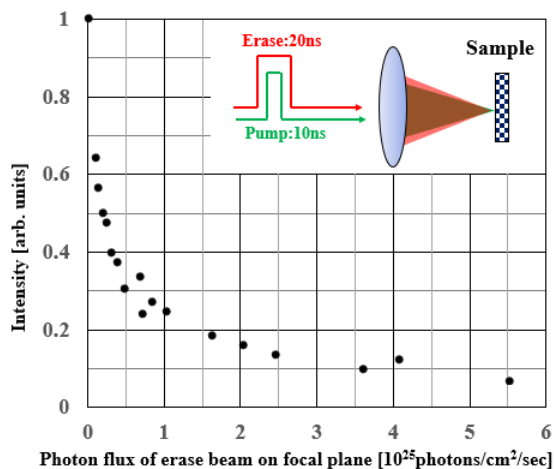


図 10-18：フォトレジスト中の C-Naphox の蛍光抑制特性。

C-Naphox の分光特性を基に、構築した超解像顕微鏡装置を活用してオフ STED 波長領域において蛍光抑制効果を誘導できるかどうかを確認した。図 7-5 に示す多色レーザー光源システムより、波長 515 nm の Nd:YVO₄ の固体レーザーと波長 670 nm のファイバーレーザーを選定し、ポンプ光とイレース光とした。NA=1.4 の油浸対物レンズより、ビーム整形をしないガウシアン型のポンプ光とイレース光を C-Naphox 薄膜試料に同時集光し、イレース光の強度（ピークフォトンフラックス）を変化させて薄膜試料の蛍光像を計測する。この際、バンドパスフィルターを挿入し 515 nm～670 nm の波長帯域の蛍光を計測した。図 10-17 (a) によれば、仮説のとおり $S_1 \leftarrow S_0$ の吸収帯から長波長側にずれた波長のポンプ光（焦点面におけるピークフォトンフラックス： 2.2×10^{22} photons/cm²/sec）でも蛍光発光が誘導できることを示している。すなわち、アンチストークス蛍光が誘導放出よりも勝っていることが分かる。そして、イレース光（焦点面におけるピークフォトンフラックス： 7.2×10^{24} /cm²/sec）を同時照射すると蛍光が抑制されて暗い画像が得られている（図 10-19 (c)）。また、イレース光単独照射では発光が無く、イレース光照射による副次発光過程が起きていないことが分かる（図 10-17 (b)）。図 10-18 は、イレース光強度を変化させたときの計測画像領域の蛍光信号量の平均値、すなわち蛍光抑制特性を示す。図 10-18 によれば、C-Naphox は超解像顕微鏡用の蛍光色素分子として実績のあるナイルレッドと同等な顕著な蛍光抑制特性を示している。

この結果を基に、オフ STED 波長領域で超解像顕微鏡法が適用可能かどうかを検証するために、第 7 章で述べた蛍光顕微鏡用解像度評価スケールを観察した（図 10-19）。このスケールは、上記の C-Naphox 薄膜層に最小線幅 70 nm ライン＆スペースのグレーティン

グパターンをインプリントしたものである。超解像顕微鏡観察においては、2次元超解像顕微鏡法用のスパイラル型の超解像位相板を $NA=1.4$ の対物レンズに装着して空間計測を行った。図10-19(a)はポンプ光単独照射（焦点面におけるピークフォトンフラックス： $5.5 \times 10^{22} / \text{cm}^2 / \text{sec}$ ）の通常のレーザー走査型顕微鏡画像であり、図10-19(b)はイレース光（焦点面におけるピークフォトンフラックス： $4.0 \times 10^{25} / \text{cm}^2 / \text{sec}$ ）を同時照射したときの2次元超解像顕微鏡画像を示す。それによれば、回折限界より微細な70 nm ライン&スペースパターンが空間分解できていることが分かる。すなわち、既存技術であるSTEDのポンプ光及びイレース光の波長と全く異なる照明光により、超解像顕微鏡観察ができることを示している。

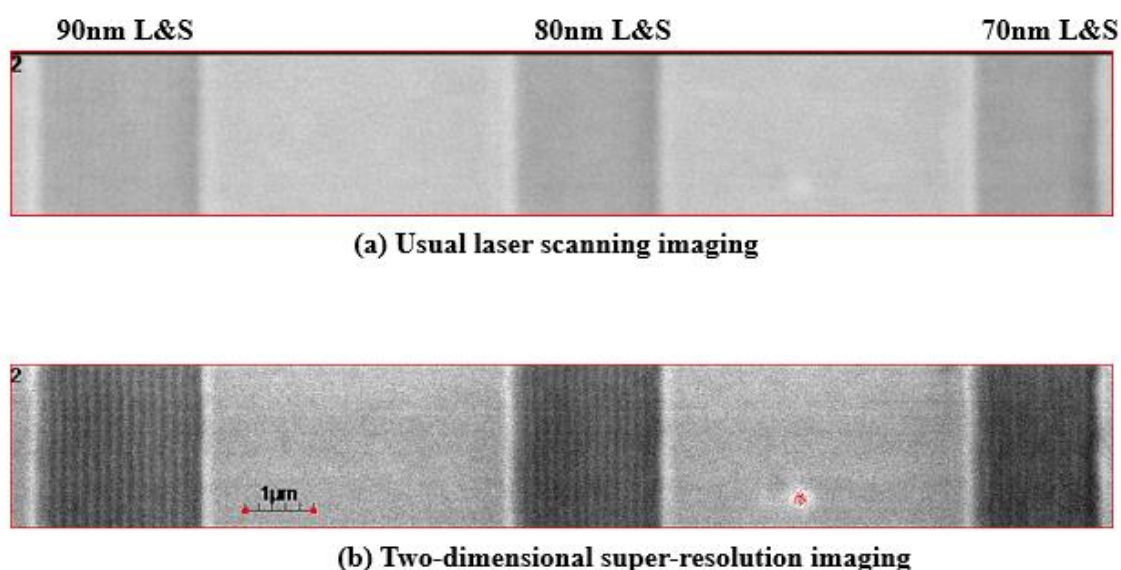


図10-19：C-Naphoxを分散したフォトレジストにナノインプリント細線パターンの2次元超解像顕微鏡画像。通常のレーザー走査型顕微鏡画像（a）と超解像顕微鏡画像（b）。

【結論】

第6章で述べた様に、超解像顕微鏡法の抛り所とする蛍光抑制効果は殆どの蛍光色素分子で誘導できることを述べた。しかし、本章で明らかにしたように、イレース光を投入し蛍光抑制効果を誘導する際、2光子吸収過程とアンチストークス蛍光過程も誘起することを示した。これらの副次過程による発光現象は、蛍光抑制効果の誘導を不完全にする。その結果として、超解像顕微鏡法の理論分解能を提供することができない。また、場合によってはPSFの形状を著しく変形させ顕微鏡画像の画質を低下させることが懸念される。強い蛍光抑制効果を誘導しようとイレース光強度を上げると、2光子吸収過程の他にもラマン散乱などの副次過程を引き起こす可能性があるため、イレース光の波長と強度の調整は慎重に行う必要がある。しかし、一方、本章で実証した様に、これまでのSTEDを含め既

存の方法では不可能と思われた照明光の波長帯域でも超解像顕微鏡観察ができることを新規の知見として見出した。その意味でも、ポンプ光とイレース光の照明条件の最適化を図るために第6章で論議した蛍光抑制効果のデータベースを充実させると同時に詳細な光化学反応過程の解明が不可欠である。

【第10章：参考文献】

- 10-1) A. Fischer, C. Cremer, and E. H. K. Stelzer, Appl. Opt. **34**, 1989 (1995);
<https://doi.org/10.1364/AO.34.001989>.
- 10-2) C. Xu, and W. W. Webb, Journal of the Optical Society of America **13**, 481 (1996);
<https://doi.org/10.1364/JOSAB.13.000481>.
- 10-3) L. Chiu, T. Ichimura, T. Sekiya, H. Machiyama, T. Watanabe, H. Fujita, T. Ozawa, and K. Fujita, Scientific Reports **7**, 43569(2017); <https://www.nature.com/articles/srep43569.pdf>.
- 10-4) 大野智哉: 修士論文「超解像イメージングのための色素分子非線形光学応答の研究」, 筑波大学 (2017)。
- 10-5) Y. Iketaki, and T. Watanabe, Appl. Spectroscopy **64**, 396(2010);
<https://doi.org/10.1366/000370210791114275>.
- 10-6) N. S. Makarov, M. Drobizhev, and A. Rebane, Opt. Exp. **16**, 4029 (2008);
<https://doi.org/10.1364/OE.16.004029>.
- 10-7) K. Inoue, N. Bokor, S. Kogure, M. Fujii, and Makoto Sakai, Opt. Exp. **17**, 12013(2009);
<https://doi.org/10.1364/OE.17.012013>.
- 10-8) 酒井 誠、大森 努、川島安武、武田朗宏、渡邊武史、池滝慶記*、藤井正明、「過渡蛍光検出赤外分光法を応用したファーフールド赤外超解像顕微分光」、分子構造総合討論会 2004、日時：2004 年 9 月 27 日～30 日、場所：広島国際会議場
http://molsci.center.ims.ac.jp/discussion_past/2004/BK2004/Abs/1P/1P052.pdf.
- 10-9) S. Kumar, D. K. Lodhi, and J. P. Singh, RSC Advances **6**, 45120(2016);
<https://doi.org/10.1039/C6RA06163J>.
- 10-10) C. Wang, M. Taki, Y. Sato, Y. Tamura, H. Yaginuma, Y. Okada, and S. Yamaguchi, PNAS **116** 15817 (2019); <https://doi.org/10.1073/pnas.1905924116>.

第 1 1 章 3 次元超解像顕微鏡法における空間分解能

の理論的上限の探索と技術課題

要旨

ラゲール・ガウシアン型のイレース光ビームと輪帯位相変調型のイレース光ビームをインコヒーレントに重ね合わせて集光すると、光学原理的に最小の 3 次元ダークホールを生成することができる。これらのビームに加え通常のガウシアン型のポンプ光を重ね合わせる照明法について考察した (STED Star 照明法)。この照明法を用いて得られる 3 次元超解像顕微鏡法の空間分解能の原理的な上限を見積もった。ベクトル電場モデルにより STED Star 照明法で得られる空間分解能を計算したところ、ラゲール・ガウシアン型イレース光を用いる 2 次元超解像顕微鏡法の平面分解能と 3 次元超解像顕微鏡法の深さ分解能が同時に得られることが判明した。ナイルレッドをターゲット蛍光色素分子として検討すると、実用使用を想定した場合、少なくとも横分解能 : 30 nm、深さ分解能 : 70 nm の立体分解能が得られることが予測される。本章では、蛍光抑制効果を基礎とする超解像顕微鏡法における空間分解能の限界と技術課題に関して述べる。

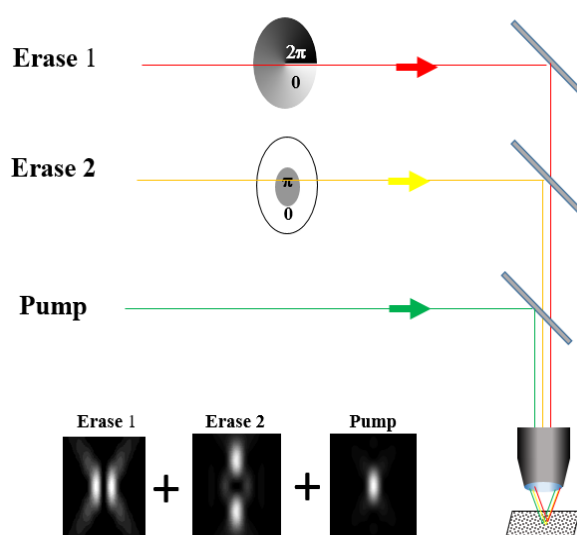


図 1 1 - 1 : STED Star 法。

【緒言】

第 2 章から第 7 章までにおいて、イレース光の整形法として、1) スパイラル位相板によるラゲール・ガウシアンビーム (LG ビーム) の生成、2) 輪帯位相板による 3 次元ダークホールの生成、3) ハイブリッド位相板によるスーパーダークホールの生成に関して理論的及び実験的に考察を行い、超解像顕微鏡法における分解能に関して論議した。そして 2 波長対応の超解像位相板を用いることで、単純かつ光学調整が簡単な実用的な超解像顕微鏡法が実現できること

ことが判明した。しかし、異なる中空形状をもつ 2 種類のイレース光を用いることで、横方向と深さ方向の分解能を同時に極限值に導くことができる。この様な照明法は、マックスプランク研究所の Hell 教授により STED Star 照明法として提案されている (図 1 1 - 1) [11-1]。

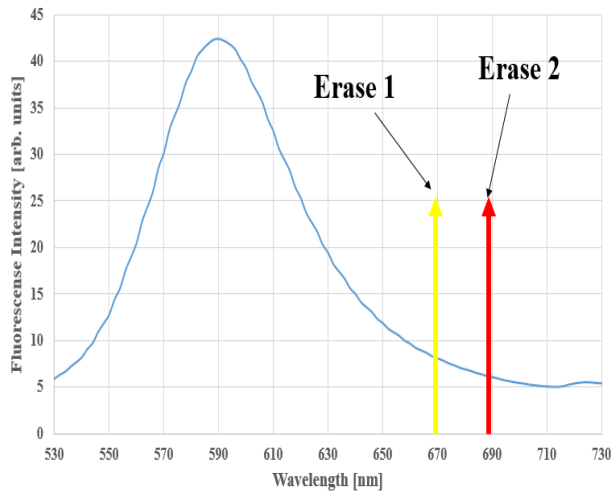


図 1.1-2 : STED Star 法のイレース光波長選。

具体的には、お互いインコヒーレントになる様に波長の異なる 2 色のイレース光を同時に導入する (図 1.1-2)。1 色目のイレース光 (Erase1) はスパイラル位相板によりラゲール・ガウシアンビームに整形し、2 色目のイレース光 (Erase2) は輪帯位相板により焦点近傍でダークホールを持つように整形する。そして、これらの整形したイレース光をガウシアン状のポンプ光とインコヒーレントに集光して重ね合わせる。すなわち、Erase1 と Erase2 の出力強度を独立に調節できる

ので、Erase1 により横分解能を制御し、Erase2 により縦分解能を制御することができる。この STED Star 照明法は光学原理的に横方向及び深さ方向において最小の 3 次元的に光の当たらない微小空間領域 (STED Star ダークホール) を生成できるので、蛍光抑制効果を基礎とする超解像顕微鏡法の空間分解能の原理的な上限値を提供できる。本章では、STED Star ダークホールを用いた場合の超解像顕微鏡機能について 3 次元ベクトル電場モデルを用いてシミュレーションを行い、3 次元超解像顕微鏡法における分解能の限界及びそれに関わる技術課題について述べる。

【シミュレーション方法】

シミュレーションは、第 3 章で述べた 3 次元的な電場分布を考慮したベクトル電場モデルを基本とする。超解像顕微鏡法における PSF ($F(x,y,z)$) は、蛍光抑制特性 $P(I_e)$ と円形開口の回折式を用いて計算することができる。集光点近傍 (x,y,z) におけるガウシアン状のポンプ光の電場の複素振幅分布を ($H(x,y,z,\lambda_p)$)、同じくイレース光の複素振幅分布を ($G(x,y,z,\lambda_e)$) と書くと、PSF は式 (1.1-1) で与えられる。ただし、 λ_p と λ_e はポンプ光とイレース光の波長を示す。

$$F(x,y,z) = P[\{G(x,y,z,\lambda_e)\}^2] \cdot \{H(x,y,z,\lambda_p)\}^2 \quad (11-1)$$

ここで、 $P[\{G(x,y,z,\lambda_e)\}^2]$ は (x,y,z) における蛍光抑制特性である。STED Star 照明法における蛍光抑制過程においては、お互い波長の異なる LG ビームのイレース光と 3 次元ダークホールをもつイレース光を 2 重に重ねる。すなわち、STED Star 照明法における PSF は式 (1.1-2) で与えられる。

$$F(x, y, z) = P[\{AG_1(x, y, z, \lambda_{e1}) + BG_2(x, y, z, \lambda_{e2})\}^2] \cdot \{H(x, y, z, \lambda_p)\}^2 \quad (11-12)$$

ただし、 $G_1(x, y, z, \lambda_{e1})$ は波長 λ_{e1} をもつ LG ビームのイレース光の電場振幅であり、 $G_2(x, y, z, \lambda_{e2})$ は波長 λ_{e2} の 3 次元ダークホールをもつイレース光の電場振幅である。A、B はそれぞれの振幅強度を示す。もし、 λ_{e1} と λ_{e2} が異なればインコヒーレント光として重ね合わすことができるので、式 (11-2) は式 (11-13) の様に簡略化できる。

$$F(x, y, z) = P[\{AG_1(x, y, z, \lambda_{e1})\}^2 + \{BG_2(x, y, z, \lambda_{e2})\}^2] \cdot \{H(x, y, z, \lambda_p)\}^2 \quad (11-13)$$

尚、分光学的条件は第 4 章の結果と比較検討を行うために蛍光色素分子をナイルレッドに選定した。そして本シミュレーションでは、 λ_p は 515 nm として、LG 型イレース光波長： λ_{e1} を 670 nm とする。そして、第 2 のイレース光の波長： λ_{e2} は第 1 のイレース光波長： λ_{e1} に対してインコヒーレントと見なせる 20 nm だけ長波長側にシフトした 690 nm とする。蛍光抑制特性はイレース光の波長シフトが少ないので、インセンシティブと仮定して、蛍光抑制特性を λ_{e1} と λ_{e2} に対して同一に適用した (図 11-2)。また、対物レンズの開口数も 1.5 とし、第 4 章のシミュレーションの集光条件と一致させた。シミュレーションにおいて、振幅強度 A と B の比率を変えて PSF を計算した。

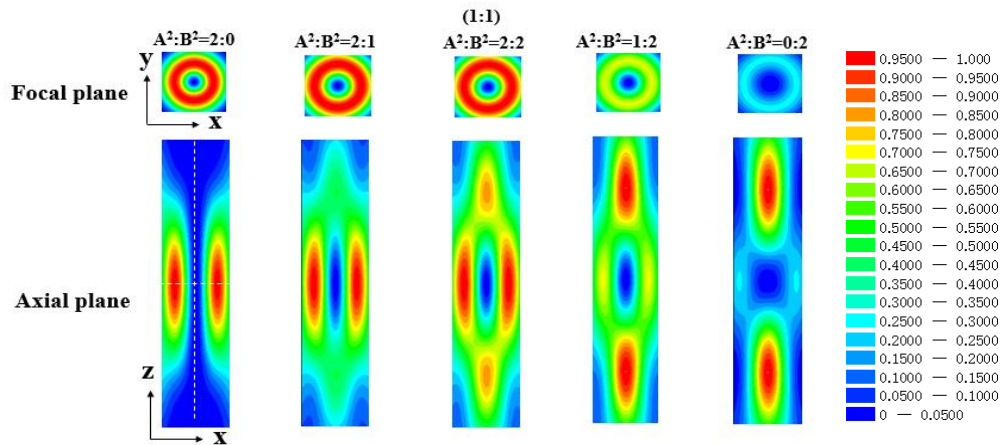


図 11-3 : STED Star ダークホールをもつイレース光の形状。

【STED Star ダークホールの空間形状】

振幅強度の二乗比すなわち照射強度比である $A^2:B^2$ を変化させたときのイレース光の集光パターン、すなわち STED Star ダークホールの空間形状の計算結果を図 11-3 に示す。 $A^2:B^2=2:0$ はスパイラル位相板で生成した LG ビームの場合に対応し、 $A^2:B^2=0:2$ の場合は輪帯位相板で生成した 3 次元ダークホールに対応する。計算した各パターンは重ね合わせた集光スポット (STED Star ダークホール) の焦点面及び光軸面において最大ピーク値において強度を規格化した。図 11-4 は、図 11-3 に示す破線部に沿った焦点面と光軸面にお

ける断面強度分布を示す。図 1 1－4 によれば、例えば $A^2:B^2=2:2$ すなわち同じ比率で λ_{e1} と λ_{e2} のイレース光を重ね合わせると焦点面内及び光軸面内で強度の対称性が取れた 3 次的に光の当たらない領域が生成できている。それと同時に、図 1 1－3 と図 1 1－4 によれば、 λ_{e1} と λ_{e2} のイレース光の強度比を変えることで焦点面と光軸面で自在にダークホールの強度分布を人為的に自在に調整でき、様々な形の中空パターンが生成できることを示している。

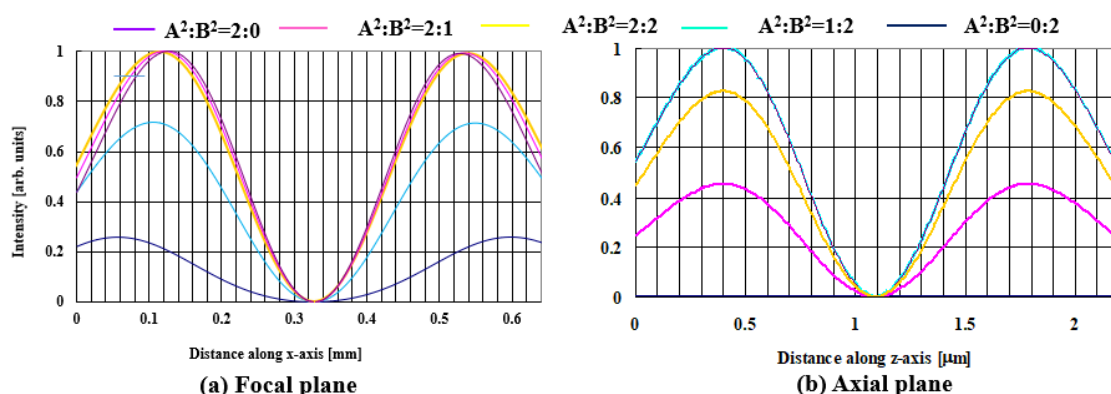


図 1 1－4： 焦点面(a)及び光軸面(b)における STED Star ダークホールをもつイレース光の集光パターンの断面強度分。

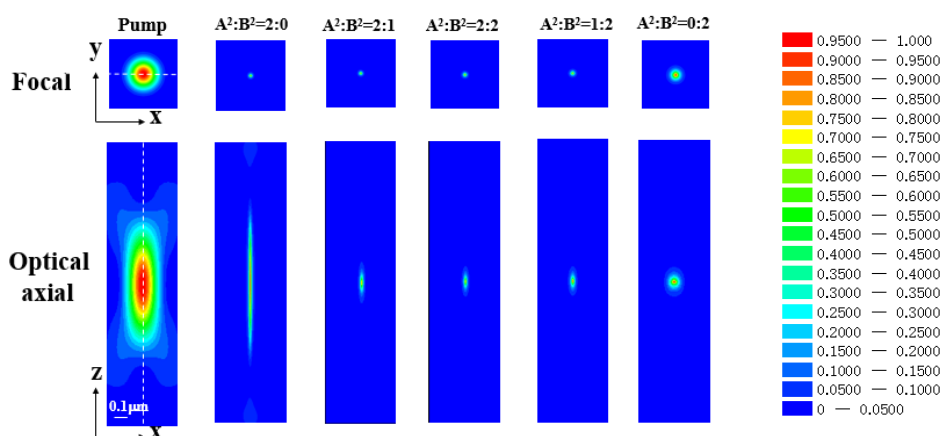
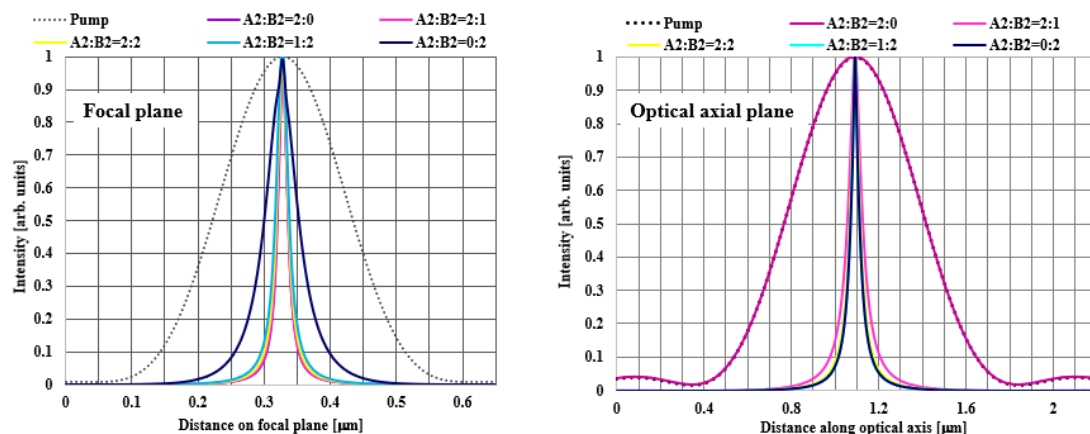


図 1 1－5： 強度比 A^2/B^2 を変化させたときの、焦点面及び光軸面における STED Star 照明法における PSF の変化 (イレース光強度 20×10^{25} photons/cm²/sec)。 $A^2:B^2=2:0$ は LG ビームを用いた 2 次元超解像顕微鏡、 $A^2:B^2=0:2$ は 3 次元ダークホールをもったイレース光を用いた 3 次元超解像顕微鏡法に対応する。



(a) 焦点面

(b) 光軸面

図 1 1 - 6 : STED Star 照明法において強度比 $A^2:B^2$ を変化させたときの焦点面及 (a) び光軸面 (b) における PSF の断面強度分布の変化 (図 1 1 - 5 の破線部)。

【STED Star 照明法における PSF】

図 1 1 - 5 は、強度比率 $A^2:B^2$ を変化させたときの STED Star 照明法における PSF の計算結果を示す。計算では重ね合わせたイレース光のピークフォトンフラックスが 20×10^{25} photons/cm²/sec になるように設定した。図 1 1 - 5 によれば、強度が弱いながらも LG ビームを重ね合わせると急激に平面分解能が向上することが分かる。一方、図 1 1 - 6 は図 1 1 - 5 における破線方向の PSF の断面強度分布を示す。それによれば、これを裏付ける様に LG ビームと 3 次元ダークホールビームのエネルギー強度比が $A^2/B^2=1/2$ 以上であれば、PSF の横方向の FWHM の減少の程度が飽和し、20 nm を切る値になる。更に、図 1 1 - 6 によれば、 $A^2/B^2=1/2$ の時の光軸方向の PSF の FWHM を調べてみると 50 nm になる。この値は、ラゲール・ガウシアン型イレース光と輪帯変調型のイレース光を単独で照明したときに達成できる夫々の軸方向における最高分解能に近い。このことは、輪帯位相変調型のイレース光を用いた 3 次元超解像顕微鏡法の弱点である平面分解能を、STED Star 照明法が改善したことを示している。図 1 1 - 7 (a) は、LG 型イレース光ビームと 3 次元ダークホール型イレースビームのエネルギー強度比が $A^2:B^2=1:2$ 場合において、イレース光照射強度を変えた時の PSF の変化を示す。図 1 1 - 7 (b) は、焦点面及び光軸面における図 1 1 - 7 (a) に示す破線部の断面強度分布の依存を示す。輪帯位相変調型のイレース光を用いた 3 次元超解像顕微鏡法の場合とは異なり、原理的に STED Star ダークホールの径が光軸面よりも焦点面の方が微細なので、等方的に PSF が収縮しない。すなわち、図 1 1 - 7 によれば、イレース光強度が増加するにしたがい光軸面よりも平面内の PSF の収縮が急激に起こり、光軸方向に伸びた回転楕円体となる。このことは、STED Star 法の唯一の弱点として、測定画像においてアーキファクトを発生させる可能性を示している。

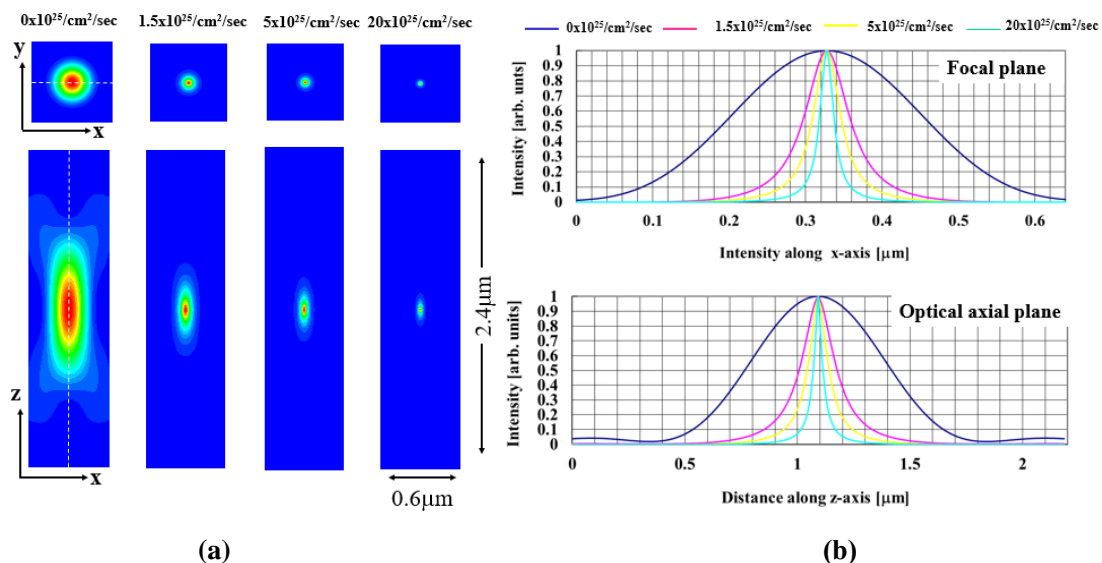


図 1 1－7： LG 型イレース光ビームと 3 次元ダークホール型イレースビームのエネルギー強度比が $A^2:B^2=1:2$ 場合において、イレース光照射強度を変えた時の PSF の変化。

(a) 3 次元 PSF のイレース光強度に対する依存性、(b) 焦点面及び光軸面における (a) に示す破線部の断面強度分布のイレース光強度に対する依存性。

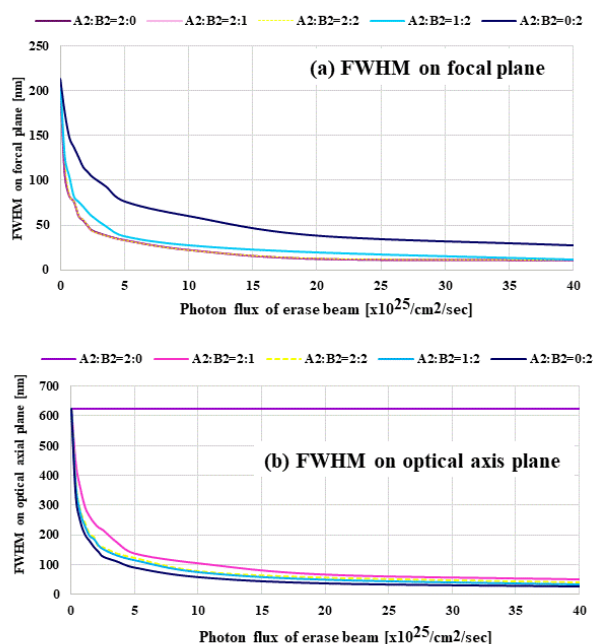


図 1 1－8： エネルギー強度比 $A^2:B^2$ を変えた時のイレース光強度に対する焦点面及び光軸面における PSF の FWHM の依存性。

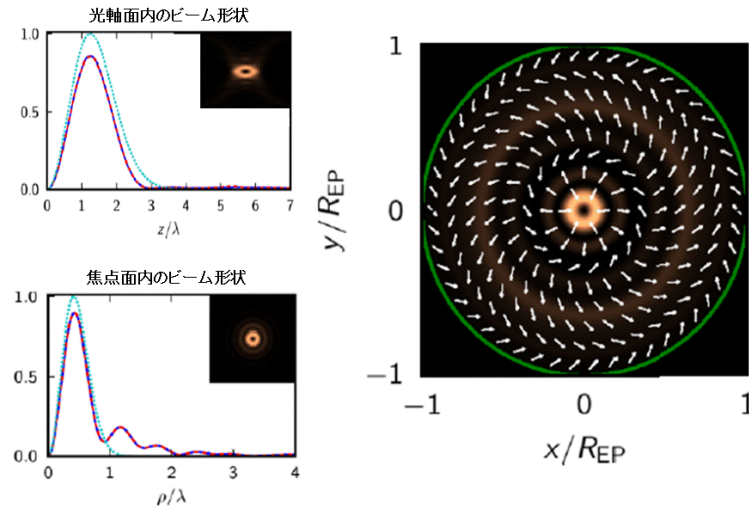


図 1 1－9：多重輪帯化した超解像位相板による微細な中空ホールの生成。

【考察とまとめ】

図 1 1－8 は、強度比 $A^2:B^2$ を変化させたときの焦点面及び光軸面における PSF の FWHM のイレース光照射強度の依存性を示す。それによれば、STED Star 法の最大の特長は、3次元ダークホール型イレースビームに弱い強度の LG 型イレース光ビームを重ね合わせるだけで、イレース光のトータル照明強度を低く抑えつつ平面方向の FWHM の縮小を効率良く飽和させることができることにある。仮定した蛍光色素分子であるナイルレッドに関しては、これまでの検証実験ではピークフォトンフラックス $10 \times 10^{25} / \text{cm}^2 / \text{sec}$ をもつイレース光照射では分子破壊や 2 次発光が確認されていない。このイレース光強度が実用使用時の上限と考えられるが、この値と $A^2:B^2=1:2$ の強度比を用いてシミュレーションを行うと横方向：30 nm、縦方向：70 nm の FWHM が得られる。これらの値は、第 4 章において表 4－1 で示した LG 型イレース光ビームと 3次元ダークホール型イレースビームが提供できる平面及び深さ方向の最高分解能に対応する。すなわち、STED Star 照明法においては、蛍光抑制効果を基礎とする超解像顕微鏡法の原理的な上限分解能を提供できる。図 1 1－9 によれば、もし分子破壊が無く $40 \times 10^{25} / \text{cm}^2 / \text{sec}$ までイレース光強度を上げることができれば、理論上、焦点面内の FWHM は 10 nm、深さ方向も 10 nm まで微細化できる。更に、短波長領域で蛍光抑制効果を誘導出来る蛍光色素分子を用いることができれば、nm オーダー台まで微細化できることも期待できる。

しかし、これを実現するためには、集光したポンプ光とイレース光の重ね合わせを、理論限界を上回る精度で行う必要がある。例えば、低色収差対物レンズを用いても色収差により空間的に数 10 nm ずれてポンプ光とイレース光が集光するので、焦点近傍で不完全な蛍光抑制効果が誘導され、分解能は向上しない[11-2]。むしろ、PSF の形状の崩れにより、分解

能の低下と顕微鏡画像の画質の劣化を招く。特に、STED Star 法は 3 色のビームを光学調整するために、超高精度かつ複雑な照明光学系を必要とするので、実用性においては極めて厳しい困難が予想される[11-3]。超解像顕微鏡法において 3 次元分解能を向上させる別の方法としては、第 4 章と 5 章で述べたハイブリッド超解像位相板の設計を工夫・発展させることで中空ホールを微細化する手法も考えられる（付録 1 3）。すなわち、位相板の設計を図 1 1－9 の様に多重輪帯化すると、3 次元的に空間対称性に優れた微細な中空ホールが形成できる。この様なホールを生成できる超解像位相板の利用が可能であれば、STED Star 照明法に匹敵する分解能が得られる[11-4]。しかし、多重輪帯化した超解像位相板を作製するためには、各輪帯領域で独立に位相変調制御をする必要があるので[11-5]、極限の加工精度が要求される。以上の述べた様に、現実的には光学原理と加工技術の限界により 3 次元超解像顕微鏡法の分解能が数 nm 台に到達することは困難と思われる。すなわち、再び、光学顕微鏡は回折限界の壁に直面した。今ここに、これを乗り越える新たなブレークスルー技術の発案が求められている。

【付録 1 3】製膜によるハイブリッド型位相板の作製と評価

3次元超解像顕微鏡法において、集光したイレース光の空間形状が蛍光スポットのサイズ、すなわち、空間分解能を決定する。第4章において、ラゲール・ガウシアン型の位相波面をもつイレース光を用いると高い平面分解能が得られ、輪帯位相変調された位相波面をもつイレース光を用いると高い深さ分解能が得られることを述べた。そして、これらの位相波面を組合わせたハイブリッド型位相波面をもつイレース光を用いると平面及び深さ方向において同時に高い分解能が得られることを定量的に示した。

図11-10に示す様に、ハイブリッド型位相波面は輪帯2重構造を持ち、外と内の瞳領域において光軸に関して 2π 位相シフトし、回転方向は光軸に関してお互い反対となる。このハイブリッド型位相波面をもつイレース光は振幅強度を動径方向に対して足し合わせても電場は相殺するので、焦点内のみならず光軸面内においても超微細な光の当たらない干渉領域（スーパーダークホール）を生成できる。更に、瞳面の外側と内側の輪帯領域において、イレース光がお互い反対の方向に回転する円偏光を持つ様に偏光の制御を行う工夫を加える。これにより、高NAの顕微鏡対物レンズで集光しても、スーパーダークホール中心部の残留電場強度を相殺することができる。具体的に、図11-11においてハイブリッド位相板の作製法を示す。位相板の基板は、イレースに対して異なる円偏光特性を示す2枚の水晶板を接合した輪帯2重構造をもつ。図11-11に示す様に、石英の原板より結晶軸に対するカット方向を調整し、右と左の円偏光子となる様に厚みを調整して石英基板をカットする。これらの基板を輪帯状と円柱状に切削加工し、これらを嵌め合せ、一体で光学研磨をする[11-5]。そして、輪帯構造をなす「内側」と「外側」の領域を通ったイレース光がお互い反対方向に位相が回転するラゲール・ガウシアンビームとなる様に光学膜を独立にコートする。本研究では、この様な変調機能をもつハイブリッド型位相板の作製を試みた。

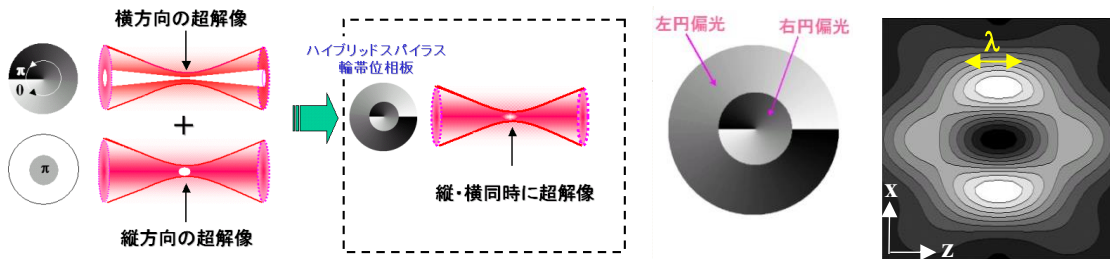


図11-10：ハイブリッド位相板の原理と機能とスーパーダークホールの理論形状。

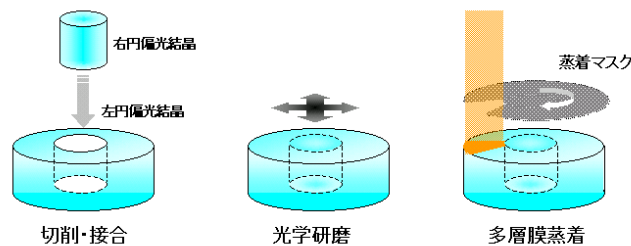


図11-11：ハイブリッド位相板作製工程。

作製したハイブリッド型位相板は、波長： $\lambda_c=647\text{ nm}$ のイレース光と波長： $\lambda_p=532\text{ nm}$ のポンプ光に対して最適化設計を行った。具体的には、内側と外側の水晶基板に関して、お互い相進軸が直交するように接合されており、かつイレース光とポンプ光に対して $\lambda/4$ 板として作用する様に基板の厚みを調整する（図 1 1－1 2）。直線偏光したイレース光が基板に入射すると、外側と内側ではお互い反対方向をもつ円偏光状態に変換される。理想的には、この位相板を通過したイレース光は外と内で位相が 360° 逆方向に回転する様に変化することが望ましいが、第 5 章で示した様に位相変化は連続的でなく、内径と外径においてそれぞれ $\lambda/4$ おきに 4 段階で変化する位相板でも遜色ない超解像機能が得られることが明らかになっている（図 1 1－1 3）。そして、同じく第 5 章で述べた 2 波長対応の超解像位相板の設計法を適用することで、位相板 1 枚でポンプ光をガウシアンビームに保ちつつ、イレース光のみをスーパーダークホールを持つ様に独立に変調できる（図 1 1－1 4）。図 1 1－1 4 に、 SiO_2 単層膜を用いたときの各領域の最適化された膜厚の設計例を示す。

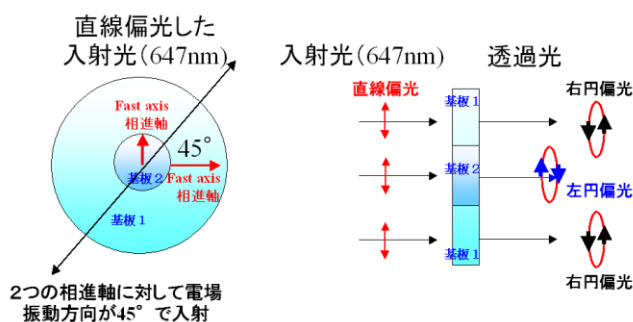


図 1 1－1 2：ハイブリッド位相板における偏光及び位相制御特性。

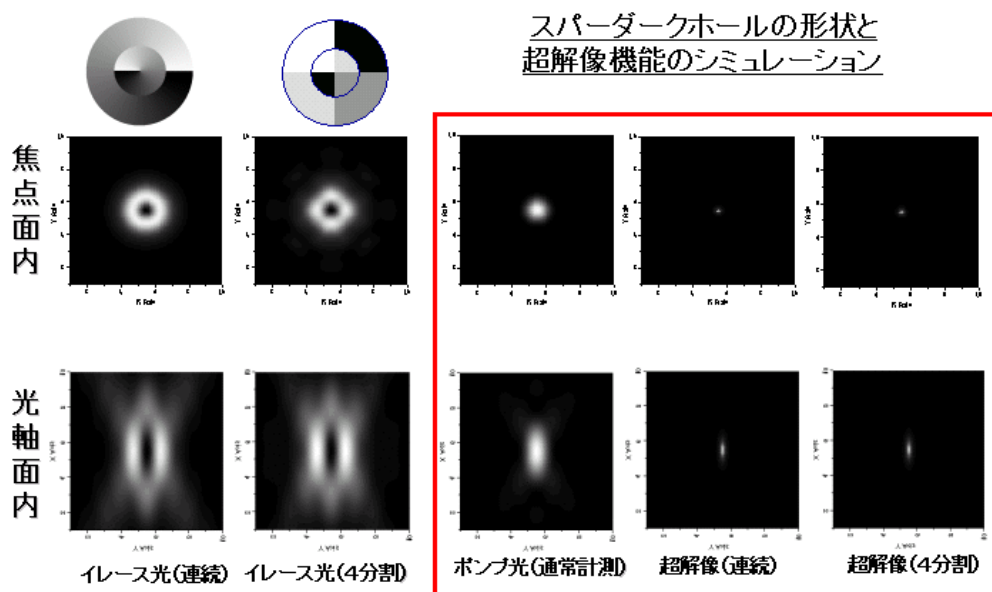


図 1 1－1 3：位相が 4 段階で変化するハイブリッド位相板を用いたときの PSF。

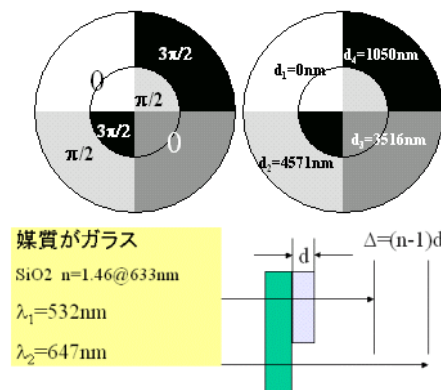


図 11-14：2 波長対応のハイブリッド位相板の製膜設計例。

位相板の基板の作製工程においては、水晶基板を切り出し（図 11-11）、そして、お互いの相進軸が直交するように、円柱状と輪帯状の基板を接合して 1 次研磨を行う。その後の 2 次研磨工程で、偏光計測装置（ポラリメータ）で偏光状態をモニターしつつ、目標とする偏光状態が得られるまで、繰り返し研磨を行う。この間の最大の問題点として、水晶基板を切削する際に相進軸方向と遅延軸方向の屈折率差が最大になる様に水晶基板を切削する。具体的には、結晶軸に対して確実に所定の角度で基板を切り出す必要があるが、実際には現場での作業で誤差が発生する。また、水晶の原石ごとに不純物の濃度が異なり、光学定数はバラつきをもつ。そこで、分光ポラリメータ（東京インスツルメンツ）により屈折率を較正し、所定の偏光特性を持つように厚みを決定した。その結果、図 11-15 に示す様な複屈折率特性が得られた。波長：532 nm（ポンプ光）において $\Delta n=0.009205$ 、波長：647 nm（イレース光）において $\Delta n=0.009045$ であることが判明した。この屈折率差を用いて研磨により追い込む基板の厚みを 1.446 mm とした。この厚みでは、ポンプ光に対しては λ 板として機能し、イレース光に対しては $\lambda/4$ として機能する。そして、輪帯中央部の基板と外輪部の基板を相進軸に対して直交するように接合・研磨する。このとき外輪部の径は 30 mm であり、様々な口径の対物レンズに対応できる様に内径は 3 mm、4 mm、5 mm、6 mm の 4 種類の接合基板を作成した。この基板に、直線偏光したイレース光が相進軸に対して 45 度で入射すると、基板の中央と外側を通ったイレース光は反対方向に回転する円偏光々となる。一方、ポンプ光に対しては偏光状態が変化しないので基板のどの領域でも直線光々となる。図 11-16 は、設計した厚みで研磨した接合基板の偏光特性を示す。測定は同じく分光ポラリメータを用いた。図 11-16 が示す様にポンプ光波長に対して、直線偏光でありしかも同じ方向に電場が振動しているエリプソ特性が得られた。一方、イレース光に関しては、基板の外側と内側でほぼ円形の軌跡を描き、回転が反対であることが分かる。すなわち、直線偏光したイレース光が入射するとお互い反対の円偏光となることが分かる。さらに図 11-17 はそのときの干渉計で計測した面精度を示す。それによれば、接合面付近での面粗さは悪くなるが、それ以外の領域では $\lambda/20$ の範囲で収まっている。すなわち、十分な光学精度が達成さ

れたことを示している。図11-14に示す成膜パターンに従い、作製した接合基板上に電子ビーム蒸着法によりSiO₂単層膜を成膜した。製膜レートは水晶振動子でモニターし、膜厚の管理を行った。尚、このときのSiO₂膜の屈折率は、 $\lambda=532\text{ nm}$ において1.495、 $\lambda=647\text{ nm}$ において1.453であった。これらは、接合基板上に製膜したときの基板界面から分光反射率をフィッティング計算することで決定したものである。図11-14の各領域の膜厚は、この屈折率を基に設計したものである。また、図11-18において、図11-14に示すパターンを製膜する際に利用したマスクを示す。内径が3 mm、4 mm、5 mm、6 mmに対応できるものであるが、上下の2種類のマスクを組み合わせ、そして90度ずつ回転させ各領域に応じた膜厚で蒸着を行った。

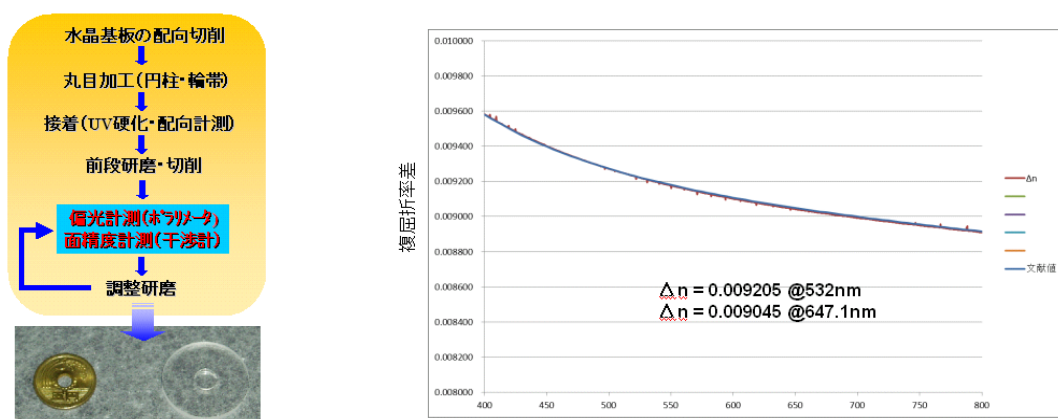
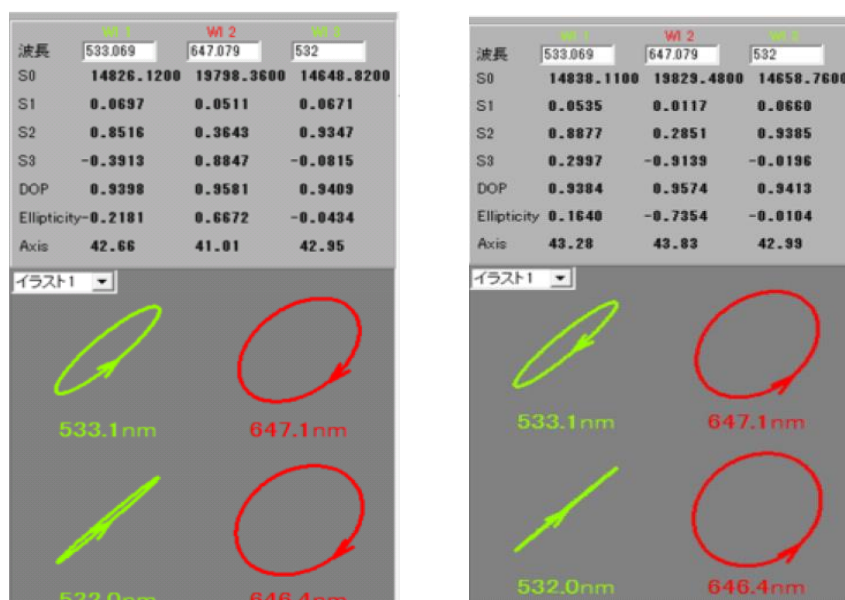


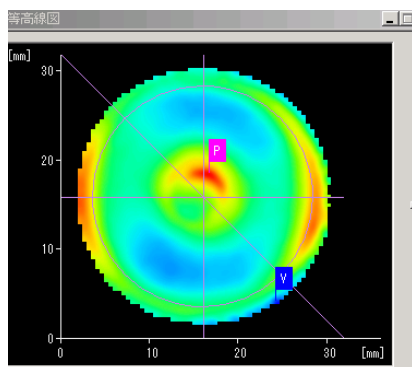
図11-15：ハイブッド位相板の接合基板の作製工程と屈折率特性。



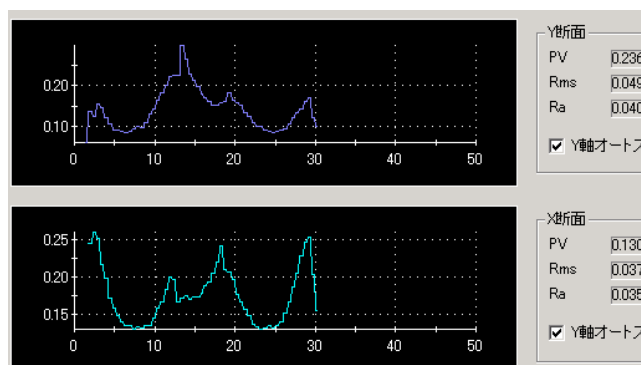
(a) 内側基板

(b) 外側基板

図11-16：ハイブッド位相板の接合基板の偏光特性。



鳥瞰図



断面方向の粗さ

図 11-17 : ハイブリッド位相板の接合基板研磨後の面精度。

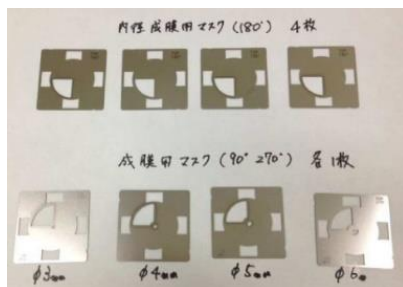


図 11-18 : ハイブリッド位相板用の製膜マスク。

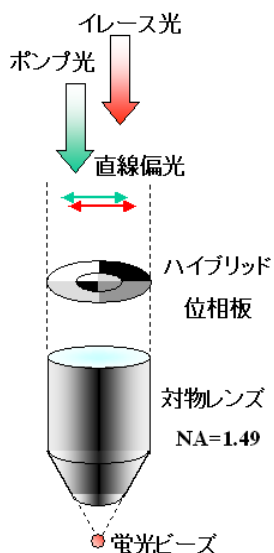
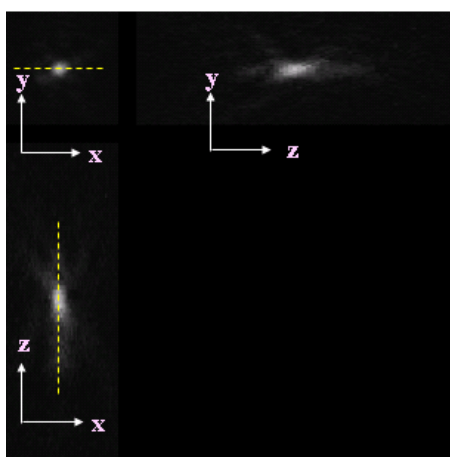
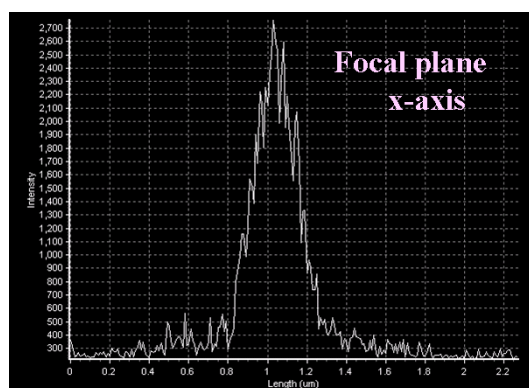


図 11-19 : ハイブリッド位相板の集光機能の評価法。

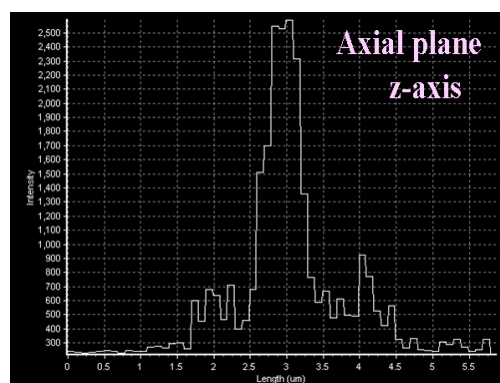
図 9-8 に示す正立型の FV1000 を母体機とした超解像顕微鏡装置を用いて、作製したハイブリッド位相板の評価を行った。図 11-19 に示す様に位相板を対物レンズに装着し、これを通過したポンプ光 ($\lambda_p=532\text{ nm}$) とイレーズ光 ($\lambda_e=647\text{ nm}$) の 3 次元の集光ビーム形状を蛍光ビーズで計測した。蛍光ビーズにはポンプ光でもイレーズ光でも発光する Molecular Probe 社の F8806 を用いた。また、対物レンズには油浸タイプ : $\text{NA}=1.49$ のものを用いた。図 11-20 はポンプ光のビーム形状 (図 11-20 (a)) 及び、焦点面内における断面強度分布 (図 11-20 (b)) と光軸方向の断面強度分布 (図 11-20 (c)) を示す。それによれば、図 11-14 に示すような複雑な SiO_2 の製膜パターンであったとしても、理想的なガウスビームとして集光している。ビームサイズも回折限界にほぼ一致している。従って、ポンプ光に対しては、位相及び偏光がほぼ完全に制御ができていることが分かる。



(a) ポンプ光の3次元プロファイル。



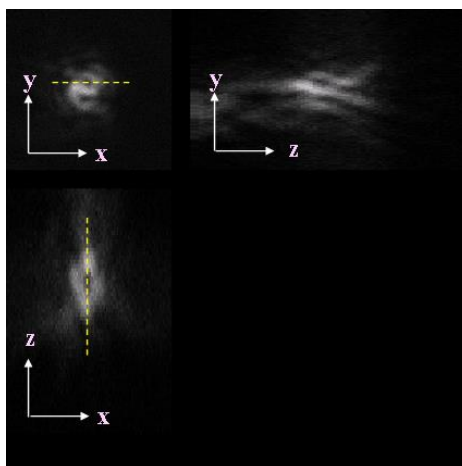
(b) 焦点面における断面強度分布



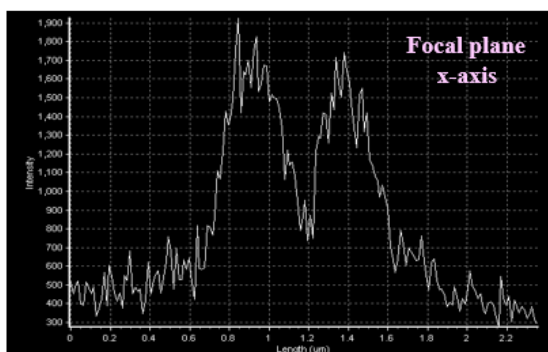
(c) 光軸面における断面強度分布

図 11-20 : ハイブリッド位相板を用いたときのポンプ光のビームプロファイル。

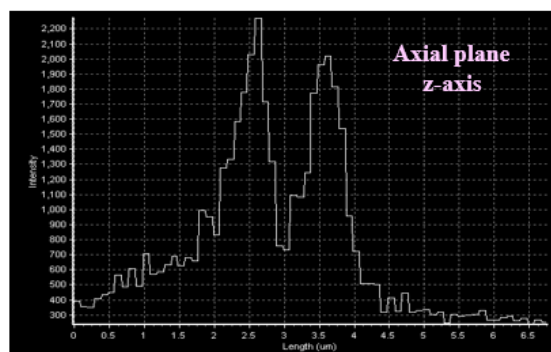
一方、図 11-21 はイレース光の集光ビームの形状を示す。図 11-21 (a) が示す様に、確かに焦点面及び光軸面内で中空状の光の当たらない領域が現れている。しかしながら、焦点面内における断面強度分布図 (11-21 (b)) と光軸方向の断面強度分布 (図 11-21 (c)) を見ると、中空部中央における光強度がかなり残留し、完全な中空となっていない。また、図 11-21 (a) における y-z 光軸面内のパターンに注目すると、一部ゴーストの様な影が確認できる。引き続きこの状態で蛍光抑制効果を示すナイルレッドを分散した 60 nm 径の蛍光ビーズを用いて 3 次元超解像顕微鏡観察を行った (この時の顕微鏡対物を通過するイレース光の強度は 40 mW)。図 11-22 は 3 次元超解像顕微鏡観察の結果を示す。それによれば、超解像顕微鏡観察時 (図 11-22 (a)) の蛍光スポットを通常観察時 (図 11-22 (b)) と比較すると、中心部の残留イレース光強度による蛍光強度の低下の方が目立つ。実際、焦点面内及び光軸面内における断面強度分布の変化に注目すると、ピーク蛍光強度が著しく減少するだけで、断面強度分布の FWHM はあまり収縮していないことが分かる (図 11-23)。



(a) イレース光の3次元プロファイル。

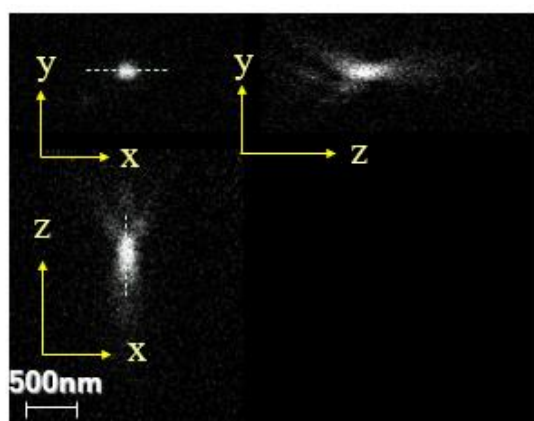


(b) 焦点面における断面強度分布

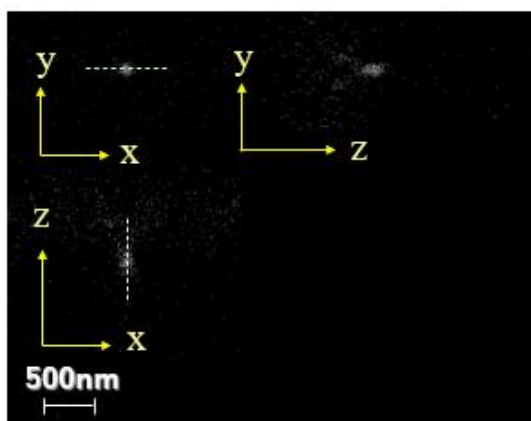


(c) 光軸面における断面強度分布

図 1 1 - 2 1 : ハイブリッド位相板を用いたときのイレース光のビームプロファイル。



(a) 通常観察



(b) 3次元超解像顕微鏡観察

図 1 1 - 2 2 : ハイブリッド位相板を用いたナイルレッドを分散した 60nm 径の蛍光ビーズの 3次元超解像顕微鏡観察例。

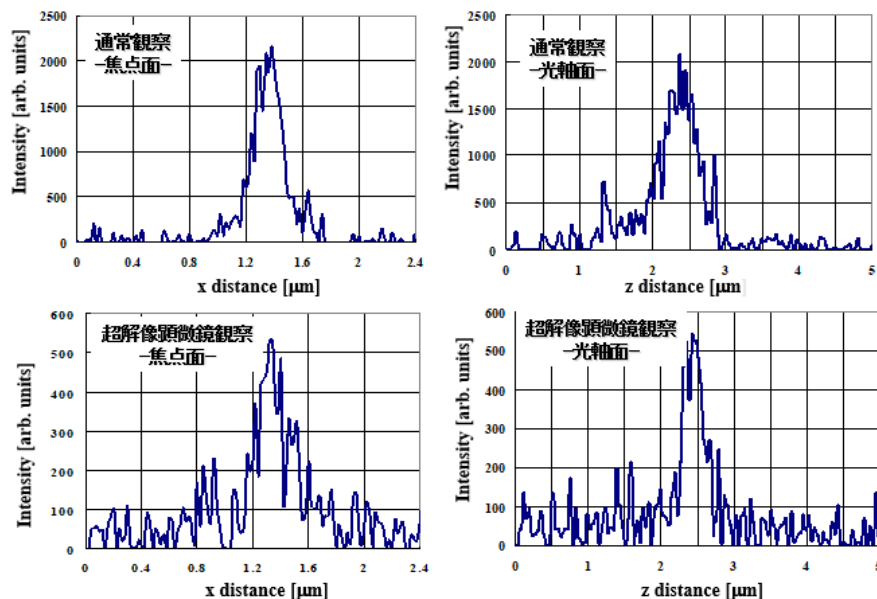


図 1 1 - 2 3 : 図 1 1 - 2 2 における破線部断面強度分布。

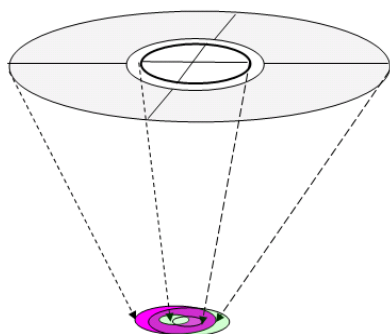


図 1 1 - 2 4 : ハイブリッド型位相板の内輪と外輪部の中心ずれてイレース光が結像した場合。

ハイブリッド型位相板によるビーム整形が不完全となった原因として、 SiO_2 の製膜の際のマスク合わせが考えられる。特に、中心の位置出し精度が不十分であることが注視される。図 1 1 - 2 4 に示す様にハイブリッド位相板を利用する場合、外側の輪帯部と内側の輪帯分部の独立なスパイラル型位相板により、イレース光がビーム整形されているのと等価である。すなわち、外側と内側を通過したイレース光が焦点面内においてドーナツパターンとして重複して集光する。完全な 3 次元スーパーダークホールを生成するためには、これらドーナツパターンを同軸で結像し、電場強度を相殺する必要がある。しかし、

図 1 1 - 2 1 によれば、マスク合わせの際の誤差によると思われる原因により、中空パターンが y 軸方向にシフトして被って結像し、イレース光の中空中心部に残留強度を発生させている。これを確かめるために、故意にマスク合わせの精度を落としたハイブリッド位相板を作製し、同様の実験を行った。図 1 1 - 2 5 によれば、外側と内側の輪帯領域が生成するスパイラル位相波面が作るマカロニ状の中空ビーム 2 本が光軸に沿って一部重複して集光していることが分かる。焦点面内におけるずれ量を断面強度分布から見積もると 375 nm となる。対物レンズの倍率 (60 倍) を勘案すると、外輪と内輪部に対応するマスクの中心が 60 μm 程度ずれていることを示している。

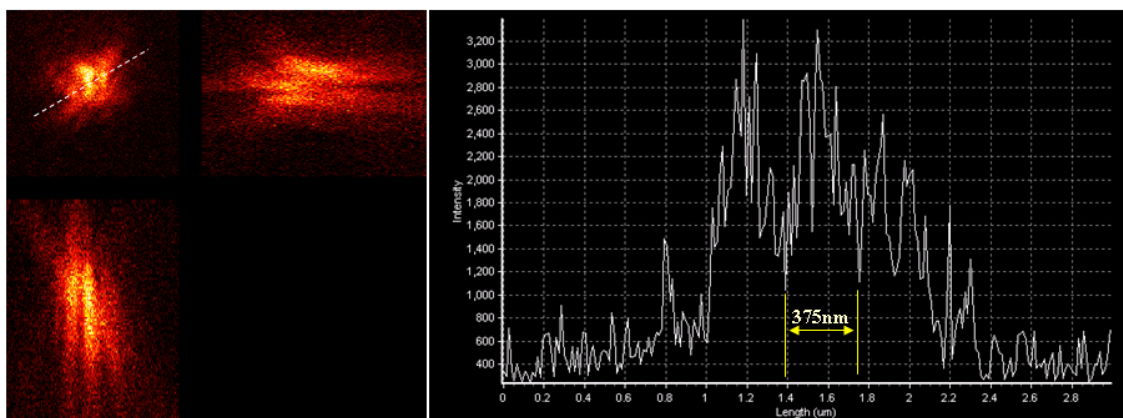


図 1 1 - 2 5 : 製膜マスクの位置合わせが甘いときのイレーズ光のビームプロファイル。

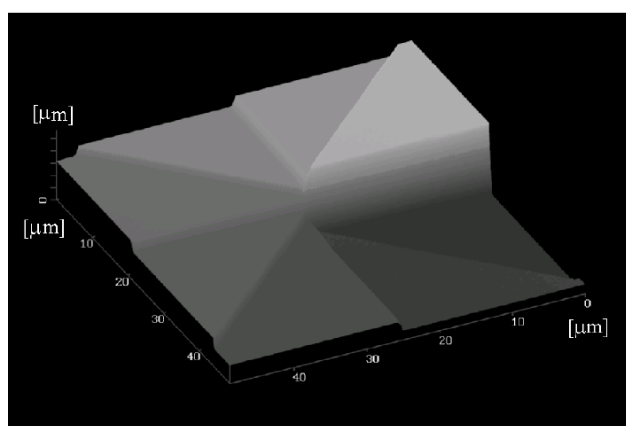


図 1 1 - 2 6 : ケミカルエッチングで作製した 8 段階変化のスパイラル位相板中心部の AFM 像。

超解像顕微鏡法において理論分解能を出そうとすると、マスクの中心を少なくとも μm オーダーの精度で位置合わせをする必要がある。蒸着の際の技術課題として、高い蒸着圧により移動しないようにマスクを重くする必要がある。そのため、機械精度の問題や蒸着界面における蒸着物質の回り込み等により中心位置の決定が曖昧になる。加えて、図 1 1 - 1 4 に示す各領域を製膜する毎に、マスクを 90

度ずつ移動させて基板と位置合わせをするので、その際に位置ずれが発生する可能性も極めて高い。以上の点を勘案すると、ハイブリッド位相板の位相制御は光学薄膜で行うことは不利であるが、この点に着目すると、直接ガラス基板をケミカルエッチングする方法が期待できる。ケミカルエッチングのマスクの厚みは非常に薄く、しかも、半導体技術をベースにしたエッチング装置を用いるので、高精度の位置合わせが可能である。以前、8 段階変化のスパイラル型位相板を作製した実績があるが、中心軸の位置合わせが $3\mu\text{m}$ の精度で可能であることを確認している（図 1 1 - 2 6 に、その際に作製した位相板中央部の AFM 像を示す）[\[11-6\]](#)。上記の事実は、最新の高精密な半導体加工技術を駆使することで、ハイブリッド型位相板の作製に止まらず、超解像顕微鏡法の高解像度化に繋がる新規のビーム整形光学素子の創生が期待できる。

【第 1 1 章：参考文献】

- 11-1) C. Osseforth, J. R. Moffitt, L. Schermelleh, and J. Michaelis, *Opt. Exp.* **22**, 7028 (2014);
<https://doi.org/10.1364/OE.22.007028>.
- 11-2) K. Nagai, T. Maruyama, A. Kodaira, H. Kumagai, N. Bokor, and Y. Iketaki, *Proceedings Volume 11245, Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing XXVII*; 1124518 (2020) ; <https://doi.org/10.1117/12.2545877>.
- 11-3) N. Bokor, and N. Davidson, *Opt. Lett.* **31**, 149 (2006); <https://doi.org/10.1364/OL.31.000149>.
- 11-4) K. Jahn, and N. Bokor, *Opt. Commun.* **283**, 4859(2010);
<https://doi.org/10.1016/j.optcom.2010.07.030>.
- 11-5) Y. Iketaki, H. Kumagai, K. Jahn, and N. Bokor, *Opt. Lett.* **40**, 1057 (2015);
<https://doi.org/10.1364/OL.40.001057>.
- 11-6) T. Watanabe, M. Fujii, Y. Watanabe, N. Toyama and Y. Iketaki, *Rev. Sci. Instrum.* **75**, 5132 (2004); <https://doi.org/10.1063/1.4885465>.

△

第 1 2 章 総括と今後の展望

全体総括

顕微鏡分野において、高い深さ分解能が得られないことが歴史的な技術課題として存在する。本研究では、この技術課題に対して波動光学と分光学の知見を基に新規に 3 次元超解像顕微鏡法の理論を提案した。この理論を基に原理検証装置を構築し、理論予測に見合った $(100\text{nm})^3$ を上回る 3 次元分解能が得られることを実証した。本装置を用い、蛍光タンパクが発現した神経細胞をはじめとする生物試料を観察したところ、通常の光学顕微鏡法では観察不可能な微細な立体構造を空間分解できることが分かった。3 次元超解像顕微鏡法は、構造が単純な位相板を対物レンズと一体で市販のレーザー走査型顕微鏡に取り付けるだけで実施でき、汎用性と実用性に優れていることを実証した。本最終章では、各章で得られた成果と知見を総括し、残された 3 次元超解像顕微鏡法の技術課題と共に発展的応用例についても提示した。

【本研究で得られた成果と知見の要約】

・第 1 章

生物顕微鏡技術における技術課題であった回折限界を上回る分解能を有する 3 次元超解像顕微鏡法を提案した。本提案では、ポンプ光で蛍光色素分子を励起し、波長の異なるイレース光を同時照射することで蛍光を人為的に抑制できる蛍光抑制効果に着目した。3 次元的に光が当たらない微細空間領域を持つようにイレース光を集光し、これをポンプ光と同時に集光すると回折限界より微細な 3 次元的な蛍光スポットを生成できる。このスポットで蛍光染色した試料を空間走査すると、回折限界を上回る 3 次元分解能で試料観察ができる。本章では、この顕微鏡法の提案にいたる背景と目的を述べた。

・第 2 章

本章では、新規に確立した 3 次元超解像顕微鏡法の基礎結像理論について述べた。蛍光抑制効果においては、イレース光の照射強度に対して蛍光色素分子からの発光する蛍光強度は非線形的に変化する。この非線形特性、すなわち蛍光抑制特性を利用して、蛍光発光領域を 3 次元的に微小化できる輪帯位相変調型のイレース光の整形法を波動光学的に検討した。本検討により、提案する顕微鏡法の点像分布関数 (PSF) の定式化を行い、本顕微鏡が平面方向のみならず深さ方向にも分解能を飛躍的に向上できることを解析的かつ定量的に確認した。

・第3章

3次元超解像顕微鏡法において分解能を向上させるためには、ポンプ光とイレース光を高NAの対物レンズで集光する必要がある。その際、焦点面近傍において照明光は光軸と平行な電場成分が発生するので、第2章で展開したイメージング理論では結像性能を正確に記述できない。この場合、照明光が3次的に配向した偏光状態をもつことを考慮したイメージング理論が求められる。本章では、ベクトル電場モデルを導入した3次元超解像顕微鏡理論を基に、改めて精密に3次元超解像顕微鏡法におけるPSFを定量的に考察した。その結果、PSFは焦点面内で非対称になることが判明し、空間的に対称的なPSFを得るためには円偏光状態のイレース光を用いる必要性を見出した。

・第4章

精密かつ正確なベクトル電場モデルを用いて数値解析によりシミュレーションを行った。具体的には、ラゲール・ガウシアン型位相面、輪帯位相変調型位相面、ハイブリッド型位相面の3種類の位相分布をもつイレース光を用いたときの超解像顕微鏡法におけるPSFのFWHMと有効蛍光発光体積を定量的に比較した。その結果、ラゲール・ガウシアン型のイレース光は優れた平面分解能が提供でき、少なくとも30 nmのFWHMが得られることが分かった。しかし、深さ分解能は回折限界の600 nmよりは微細化できない。また、ハイブリッド型はラゲール・ガウシアン型と同じ30 nmのFWHMが焦点面内で得られ、深さ方向も120 nmまで微細化できる。その結果、体積分解能としてはハイブリッド型が最小となる。一方、輪帯型位相分布を用いると縦及び横方向のFWHMを同時にバランス良く70 nm程度まで微細化できる。PSFの空間形状は3次的に等方的に微細であるので、厚みのある複雑な立体構造をもつ試料観察に適している。

・第5章

第4章で、輪帯型位相分布をもつイレース光が3次元超解像顕微鏡法において実用性が高い照明法であることを見出した。本章では、このイレース光を生成するための超解像位相板の設計法と光学性能に関してシミュレーション計算により定量的に考察した。超解像位相板の加工誤差及びアライメント誤差に関して評価したところ、既存の光学加工技術で理論的な空間分解能が得られることを確認した。一方、ポンプ光とイレース光のアライメントに関しては、回折限界以下の高い精度で安定的に保つ必要があることが判明した。この技術課題を解決するために、ポンプ光とイレース光を独立にビーム整形できる2波長対応の超解像位相板を新規に考案した。この位相板の構造は極めて単純であり、しかも、これを対物レンズに一体で市販のレーザー走査型顕微鏡に取り付けるだけで3次元超解像顕微鏡機能が実現できるので、ユーザーに卓越した利便性を提供できる。

・第6章

近赤外領域（700 nm～850 nm）で発振可能な、ナノ秒：Ti サファイアレーザー及び既存の可視光固体レーザーをイレーズ光源として用い、商用の蛍光色素分子及び蛍光タンパクに関して3次元超解像顕微鏡法の基礎となる蛍光抑制効果が誘導できることを実験的に確認した。この波長領域において、キサンテン系、オキサジン系、シアニン系、蛍光タンパクの各種代表的な分子、または蛍光団において蛍光抑制特性を測定し、その反応速度についてマップ化を行った。反応速度は $10^{-29} \text{cm}^2 \cdot \text{sec}$ から $10^{-24} \text{cm}^2 \cdot \text{sec}$ と広がりのある値を示す。選定した分子のうち特にキサンテンの分子は 700 nm より短波長のイレーズ光を用いると、反応速度が大きくなり、弱い強度のイレーズ光で顕著な蛍光抑制効果が誘導できることを見出した。

・第7章

3次元超解像顕微鏡装置を作製し、その機能評価を行った。本装置は市販のレーザー走査型顕微鏡を母体機とし、これに2波長対応の超解像位相板を用いた照明光学系を導入した。本装置は、異なる波長の6種類の固体レーザーからなる光源システムを有し、可視領域で発光する蛍光色素分子に対して蛍光抑制効果を誘導することができる。蛍光ビーズを用いてPSFを測定したところ、理論分解能に近い80 nmの3次元分解能が得られた。また、蛍光色素分子を分散させたグレーティングパターンを観察したところ、回折限界より狭い空間周期の細線パターンを3次元的に空間分解することに成功した。3次元超解像顕微鏡法は、2波長対応位相板を対物レンズと一体で市販のレーザー走査型顕微鏡に取り付けるだけで実現できるので、高い利便性を有している。

・第8章

作製した3次元超解像顕微鏡装置により、生物試料の観察を行った。本装置により、100 nmの3次元分解能で抗体染色したラットの腎細胞の微小管を観察することができた。また、稠密で複雑な立体構造をもつ HeLa 細胞のアクチンフィラメントの鮮明な3次元画像の取得にも成功した。更に、ライフサイエンスでニーズの高い蛍光タンパクが発現した試料に関して、過渡吸収分光法により蛍光抑制効果の誘導条件を明らかにし、超解像顕微鏡観察も試みた。Tag-RFPが発現したミトコンドリアの観察を行ったところ、神経細胞上にミトコンドリアが立体的に展開している様子が回折限界を上回る空間分解能で観察ができた。本顕微鏡法は他の多くの蛍光タンパク質に適用可能であり、3次元超解像顕微鏡法による生物試料観察技術の普及・拡大に貢献できるものと期待できる。

・第9章

3次元超解像顕微鏡法において、回折限界より微細な球体状の蛍光スポットが生成できる。この計測機能に着目し、3次元超解像顕微鏡法を蛍光相関法に導入した3次元超解像

蛍光相関法を考案した。水溶液中の蛍光ビーズの蛍光相関スペクトルを測定したところ、得られた相関関数の変曲点は既存の蛍光相関法よりも短い相関時間領域にシフトしていることが判明した。この事実は有効計測領域が縮小したことを示しており、オルガネルレベルの微小領域において展開される代謝や生化学反応生成などの生命現象の解明に貢献できるものと期待できる。

・第10章

蛍光抑制効果を誘導する際に、イレース光照射により2光子吸収過程とアンチストークス蛍光過程も誘起することが判明した。これらの副次過程は、蛍光抑制効果の誘導を阻害するので、超解像顕微鏡法の結像性能を毀損する。半面、これらの副次光の発生に着目することで、既存のSTEDでは不可能と思われた照明光の波長帯域でも超解像顕微鏡観察ができることを新規に見出した。本章では、イレース光の波長、強度、照射タイミングの調整が超解像顕微鏡法のパフォーマンスを担保するために必要不可欠な作業であることを示した。そして、各蛍光色素分子に対して蛍光抑制効果を効率的に誘導するために、同効果に関する分光学的データベースをアップデートしていく必要性を提唱した。

・第11章

ラゲール・ガウシアン型のイレース光ビームと輪帯位相変調型のイレース光ビームをインコヒーレントに重ね合わせて集光するSTED Star 照明法は光学原理的に最小の3次元ダークホールを生成することができる。この照明法の導入を仮定して、超解像顕微鏡法における空間分解能の上限をベクトル電場モデルにより見積もった。その結果、ナイルレッドをターゲット蛍光色素分子として検討すると、少なくとも、横分解能：30 nm、深さ分解能：70 nmの立体分解能が得られることが判明した。そして、これを実現するための光学技術上の限界と技術課題を提起した。

【残された技術課題と今後の展望】

上記の成果と共に、本研究で残された3次元超解像顕微鏡法の技術課題と更なる発展的応用例についても以下に示す。

1) 多色照明時の凝集相中における分子の光応答特性の解明

第10章で述べた様に、単色の光照射によってさえも蛍光過程と蛍光抑制過程が競合する光応答反応が誘起される。分子に多色の光を照明すると更に多様で複雑な光応答反応が誘起され、超解像顕微鏡機能を阻害するような副次発光過程や褪色が発生する可能性がある。しかも、蛍光色素分子は、溶媒中の環境条件により分光特性を変化させる。従って、本顕微鏡の普及と拡大を促進させるためには、多色照明時の凝集相中における各種分子の光応答特性の解明と基礎データの蓄積が不可欠である[12-1,12-2,12-3]。しかし、その反面、これ

らの光応答特性は物理化学における最先端の研究対象になっている。例えば、フोटクロミック反応がその代表例である。この反応において、2色の光照明により可逆的な光異性化を人的に誘導し、分子の吸収波長帯と蛍光波長帯域を変化させることができる。この様な反応に対して、3次元超解像顕微鏡法を用いれば、回折限界より微細な空間領域に存在する分子の構造や機能を選択的に制御ができるので、空間分解能で差別化された顕微分光法や加工法を新規に創成できる可能性がある。また異なる波長の複数の近赤外光を分子に照明することで、分子の振動準位に対応した誘導ラマン散乱光やアンチストークス散乱光の発生を人為的に制御できる。従って、無染色、かつ、高解像度でライブ生物試料の生命活動を3次元で可視化することができる。その意味でも、多色照明時の凝集相中における分子の光応答特性の解明作業は、3次元超解像顕微鏡法の信頼性と機能向上のために不可欠な作業であるが、同時に、生命科学及び物質科学の発展に貢献できる計測法を新規に創成できる可能性がある。

2) 分光計測システムの深化

3次元超解像顕微鏡法における空間分解能が向上すると、それに応じて蛍光スポットの空間サイズが小さくなる。その結果として、1測定領域からの蛍光量は減少し、極端な場合には1分子からの蛍光信号を計測することになる[12-4]。しかも、強度の高い散乱イレース光や副次過程による発光が存在する悪条件下でイメージングを行うことが必要である。このことは、結像性能の向上と共に検出感度の向上も平行して行う必要がある。市販のレーザー走査型顕微鏡の基礎パフォーマンスの向上を兼ねて、以下の3項目の技術対応が求められる。

・検出デバイスの高感度化

本研究において、検出器としてガリウム砒素電極材料を搭載した冷却型の光電子増倍管を用いた。しかし、その量子効率 η は0.6程度に留まっている。もし、半導体型のアバランシェフォトダイオードを用いれば量子効率 η は1に近い[12-5]。市販のレーザー走査型顕微鏡の検出器は光電子増倍管が主流であるが、高い量子効率の検出器の導入は観察画像の画質向上のみならず、微細な暗い部位の観察や照明光のドーズ量の低減に威力を示す。

・波長可変レーザー光源と可変分光デバイスの導入

第10章で示した様に、最適化した波長をもつポンプ光とイレース光により効率的に蛍光抑制効果を誘導する必要がある。そして、この時発生するこれら照明光の散乱光と副次過程による発光を分光デバイスで除去し、蛍光色素分子からの本来の蛍光のみを検出する必要がある。その為に、ポンプ光とイレース光の光源が波長可変であることが望まれる。これら照明光波長の変化に追従して、蛍光検出波長領域も最適化する必要がある。光源に関しては、市販のスーパーコンティニュウム光源を用いることができる[12-6]。スーパーコンティ

ニュアム光源は任意の可視光・近赤外領域で蛍光抑制効果を誘導できる十分な尖頭値出力強度を有している。一方、分光デバイスに関しては、スループットが高い透過型の分光グレーティングを市販のレーザー走査型顕微鏡に導入する必要がある。これにより、高効率で所望する波長帯域の蛍光を検出できるので、様々な蛍光色素分子に対して柔軟に対応ができる。この技術対応は、市販のレーザー走査型顕微鏡の操作性の向上にも繋がるので、3次元超解像顕微鏡の汎用普及に向け急ぐ作業である。

・信号処理

例えば、照明光源としてスーパーコンティニュアム光源を用いれば、パルス照明となる。その際、ロックインアンプを用いて超解像顕微鏡計測と時間領域で相関のある信号のみを取り出せば、著しく優れた S/N で、超解像顕微鏡観察ができる。この手法は、ソフトウェアによる信号処理と異なり、取得画像においてアーキファクトを生み出さないので、超解像顕微装置の母体機である市販のレーザー走査型顕微鏡へのこの信号処理技術の導入を強く期待する。



図 12-1：3次元超解像顕微鏡法のスキャンディスク型のレーザー走査型顕微鏡への応用。

3) 時間分解能の向上

本研究では、空間領域の分解能の向上を主眼としたテーマに取り組んだ。しかし、ライフサイエンスの現場では、時間領域で絶えず変化する生命活動のダイナミクスを可視化したいという強い要望が存在する。もし、可視化における計測時間が長いと、ライブ試料の場合、その間に観察対象の位置変化が常に起きる。すなわち、顕微鏡の空間分解能が幾ら高くても、所謂、位置ぶれが発生することにより実質的に分解能が劣化する。本研究の様に既存のレーザー走査型顕微鏡を母体機として用いた場合、ワンビームによる試料走査となり、長時間計

測となる課題が残存する。その一方で、現在、高速計測に特化したスキャンディスク型のレーザー走査型顕微鏡（通称：ニポウ顕微鏡）の販売が開始されている（図 1 2-1）。この方式は高密度で穿孔したディスクをレーザー光で照明して回転させることにより、高速でマルチスポットスキャンが可能である[12-7]。このタイプのレーザー走査型顕微鏡は生物試料のライブ観察で実績を上げている。STED をはじめとする既存の超解像顕微鏡法においては、予めビーム整形したイレース光とポンプ光に対して独立な 2 系統の光路を設け、その後に同軸に重ね合わす照明光学系を採用している。ニポウ顕微鏡において各マルチビームに対して 2 系統の光路を独立に設けることは技術的に困難であるが、本研究で開発した 2 波長対応の超解像位相板を対物レンズと一体でニポウ顕微鏡に取り付ければ、全てのマルチビームに対して 3 次元超解像顕微鏡法の照明法を適用することができる[12-8]。すなわち、空間及び時間領域においてバランス良く高分解能化された新規な超解像顕微鏡法が期待できる。

4) 更なる限界を突破する超解像顕微鏡法の創成の必要性

第 1 1 章によれば、3 次元超解像顕微鏡法の空間分解能の上限はイレース光のダークホールの空間形状によって決定される。この事実を勘案し、ダークホールの空間形状の改善による空間分解能の向上を検討した。そして、装置構成の改善と光学素子の高精度化の必要性について述べつつ、STED*照明法や多重輪帯化した超解像位相板の活用を提唱した。しかし、ダークホールの空間形状は依然として光学的回折限界で決定されるので、改めて「回折限界」の壁に遭遇していると言える。光学顕微鏡をマイクロスコープからナノスコープへとブレークスルーさせるためには、光学計測の基盤となる物理現象の基礎に立ち戻り、再考する必要がある。

【結び】

開発した 3 次元超解像顕微鏡法の機能を総括すれば、1) 空間的等方性をもつ微細な蛍光スポットにより試料を三次元的に高い分解能で空間計測することができる、2) 点像分布関数自体を物理的に微細化できるので、計測データに一切の数値演算操作を施すことなくリアルタイムで信頼性の高い顕微鏡画像を提供できる、3) 市販のレーザー走査型顕微鏡に簡単な位相板を取り付けるだけで超解像顕微鏡機能を簡単に搭載できる。これらは他方式の超解像顕微鏡法では持ち合わせていない優れた機能であり、本方式が機能性・信頼性・利便性において際立っていることがわかる。そして、本顕微鏡法は、蛍光タンパク発現試料を始め生物試料の観察に適用できることが分かった。本研究では、光学原理に関わる技術課題も明らかになったが、多くの生物系の研究者に 3 次元超解像顕微鏡観察を可能にし、次世代のライフサイエンスの発展に大きく寄与するものと確信する。

【第 1 2 章：参考文献】

- 13-1) M, Irie, T. Fukaminato, K. Matsuda, and S. Kobatake, Chem. Rev. **114**, 12174(2014);
<https://doi.org/10.1021/cr500249p>.
- 13-2) K. Hatanaka, M. Kawao, Y. Tsuboi, H. Fukumura, and H. Masuhara, Chem. Rev. **114**,12174
(2014); <https://doi.org/10.1021/cr500249p>.
- 13-3) W. Kiefer, Journal of Raman Spectroscopy **38**,1538(2007); <https://doi.org/10.1002/jrs.1902>.
- 13-4) E. Lomonte, M. A. Wolff, F. Beutel, S. Ferrari, C. Schuck, W. H. P. Pernice, and F. Lenzini,
Nature Communications **12**, 6847 (2021); <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27205-8>.
- 13-5) D. Liu, T. Li,Bo Tang, Peng Zhang, Wenwu Wang, M. Liu, and Z. Li, Micromachines
13,47(2022); <https://doi.org/10.3390/mi13010047>.
- 13-6) F. Lange 1, L. Giannoni, and I.Tachtsidis, Appl. Sci. **11**,4616(2021);
<https://doi.org/10.3390/app11104616>.
- 13-7) J. Oreopoulos, R. Berman, and M. Browne, Methods in Cell Biology **123**, 153(2014);
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420138-5.00009-4>.
- 13-8) Y. Iketaki, D. Okada and H. Kumagai, WO2016JP083399W (2016).

謝辞

本研究は、1991年に新技術事業団（現：科学技術振興機構）において発足いたしました研究推進制度である「さきがけ21：光と物質」に参画したことが発端となりました。私は、放射光光源とレーザー光源のポンプ・プローブ法を用いた軟X線顕微鏡法の開発に従事していました。本研究制度は、故本多健一先生の総括のもと、物理、化学、生物の専門領域の枠を超えて様々な研究者の方が結集し、当時としては先鋭的な領域融合型の研究課題について活発に論議されておりました。このような背景のなか、当時、同じく「さきがけ21：光と物質」に参画されていた早稲田大学の藤井正明先生（現：東京工業大学：科学技術創成研究院教授）が、赤外光と紫外光を用いたポンプ・プローブ法を用いた気相分子の分光分析に関して研究をされていました。計測手法が類似していることもあって、藤井先生とは「何かポンプ・プローブ法を用いた新規な光学顕微鏡法ができないか？」と、生体分子における過渡吸収を用いた顕微分光法を探索しておりました。その際、藤井先生が探索実験の最中に目視で、「水溶液中のトリプトファンにおいて過渡吸収が起きると著しく蛍光強度が低下する」ことを発見いたしました（T. Watanabe, M. Miyata, Y. Iketaki, M. Fujii, and A. Yagishita, *J. Korean Physical Society*, **32**,388(1998).）。この現象に着目し、蛍光抑制効果を用いた超解像顕微鏡法に関する基本特許である特許第3350442号（出願日：1994年12月28日）を取得し、探索を開始いたしました。奇しくも特許出願の年にドイツのマックスプランク研究所のStefan Hell教授が、ほとんど同じ手法の誘導放出をベースにしたSTED に関する理論（S. W. Hell, and J. Wichmann, *Opt. Lett.* **19**, 780 (1994)）を発表しました。それに対して、千葉大学の尾松孝茂先生を加え、藤井先生と共同でSTEDも包含する中空状のイレース光を用いた現在の形の本格的な超解像顕微鏡の特許を1998年にドイツで成立させました（DE 199 80 759 B3）。これを機に、科学技術振興機構及び私が所属するオリンパス株式会社のご支援のもと超解像顕微鏡法の本格的な技術開発を開始し、2次元型の超解像顕微鏡法の原理検証に成功しました（Y. Iketaki, T. Omatsu, O. Sato, Suzuki and M. Fujii: *Trends in Optics and Photonics OSA Proceedings Series (TOPS)*, **39**, 167 (2000)）。更には、今回の学位論文のテーマとなった3次元超解像顕微鏡法の基本特許を米国（US6,844,963 B2, Mar. 23, 2000.）で取得するに至りました。幸いにも、2007年には、本テーマが再び科学技術振興機構の「さきがけ：生命現象と計測分析」に採択され、森嶋績先生の総括のもと、光学顕微鏡分野において歴史的な技術課題であった深さ分解能の超解像化に成功いたしました。その後、確立した3次元超解像顕微鏡法に関して、最もニーズの高いライフサイエンスへの実用展開を目指し、北里大学医療衛生学部の熊谷寛先生のご尽力を賜り、伏見譲先生の総括のもと科学技術振興機構の先端機器計測プログラムにおいて北里大学を開発拠点とした産学連携チームを結成することが出来ました。その結果として、本学位審査に繋がる成果を得ることが出来ました。また、海外からはブタペスト工科経済大学のNándor Bokor教授とワイツマン科学研究所のNir Davidson 教授には超解像顕微鏡法の結像理論の構築に長年にわたり、ご尽力を賜りました。

本学位審査に際し、これまで多大なるご支援を頂いた科学技術振興機構、オリンパス株式会社の方々、そして本研究を実用化段階までに導いて頂いた北里大学の諸先生には心より御礼を申し上げます。これに加えて、以下のリストに示す各技術課題に関しては、多くの方々のご協力を賜りました。

1) 第3章におけるベクトル電場モデルによる3次元超解像顕微鏡法の結像理論の構築

- ・ワイツマン科学研究所 レーザー原子冷却物理グループ：Nir Davidson 教授
- ・ブタペスト工科経済大学 物理学科：Nándor Bokor 教授、Kornél Jahn 博士

2) 第5章における2波長対応の超解像位相板の作製と評価

- ・セラテックジャパン会社：平林 明 社長、日高 孝次郎 リーダー、
：加藤 直起 光学薄膜 技術・設計担当 様
- ・東レエンジニアリング株式会社：北川 克一 博士
- ・オリンパス株式会社 ：平田 唯史 課長

3) 6章及び11章における蛍光抑制過程に関する実験と解析、サンプル調製

- ・オリンパス株式会社 ：渡邊 武史 博士 小江 克典 博士
- ・北里大学 理学部 ：大極 光太 講師
- ・九州大学 理学院：加納 英明 教授

4) 第7章における超解像顕微鏡装置の構築と機能評価

- ・北里大学 医療衛生学部：熊谷 寛 教授
- ・株式会社共同インターナショナル：大井 秀雄 課長

5) 第8章における生物試料観察の試料調製

- ・北里大学 医学部：岡田 大助 準教授、藤谷 和子 博士
- ・東京医科歯科大学 医学：寺田 純雄 教授、佐藤 啓介 助教

6) 第10章におけるRIPT法による蛍光標識の分光学的評価実験

- ・株式会社ユニソク：中川 達夫 取締役

7) 第11章におけるハイブリッド位相板の設計と加工

- ・NTTアドバンスドテクノロジー：永井 宏明 博士

以上にご紹介した皆様以外にも多くの方々より厚いご支援とご指導を頂きました。本論文を纏め上げるのに際し、改めまして、これらの方々に深く御礼を申し上げます。

本研究に関わる査読付ありの原著論文リスト

- 1) N. Bokor, Y. Iketaki, T. Watanabe, and M. Fujii, Opt. Exp. **13**, 10440 (2005);
<https://doi.org/10.1364/OPEX.13.010440>.
- 2) Y. Iketaki, T. Watanabe, N. Bokor, and M. Fujii, Opt. Lett. **32**, 2357 (2007);
<https://doi.org/10.1364/OL.32.002357>.
- 3) N. Bokor, Y. Iketaki, T. Watanabe, K. Daigoku, N. Davidson, and M. Fujii, Opt. Comm. **272**
263(2007); <https://doi.org/10.1016/j.optcom.2006.11.002>.
- 4) Y. Iketaki, T. Watanabe, N. Bokor, M. Fujii, e-Journal of Surface Science and Nanotechnology **6**,
175(2008) ; <https://doi.org/10.1380/ejssnt.2008.175>.
- 5) N. Bokor, Y. Iketaki, T. Watanabe, and M. Fujii, Opt. Commun. **281**, 1850(2008) ;
<https://doi.org/10.1016/j.optcom.2007.05.069>.
- 6) Y. Iketaki, T. Watanabe, N. Bokor, M. Fujii, and T. Watanabe, Topologica **2**,9 (2009);
<https://doi.org/10.3731/topologica.2.009>.
- 7) Y. Iketaki, Appl. Phys. Express **3**, 085203 (2010); <https://doi.org/10.1143/APEX.3.085203>.
- 8) N. Bokor, and Y. Iketaki, Opt. Exp. **17**, 5533 (2009); <https://doi.org/10.1364/OE.17.005533>.
- 9) Y. Iketaki, Jpn. J. Appl. Phys. **49**, 048003 (2010).
- 10) Y. Iketaki, and T. Watanabe, Appl. Spectroscopy **64**, 396(2010);
<https://doi.org/10.1366/000370210791114275>.
- 11) Y. Iketaki, and N. Bokor, Opt. Commun. **285**,3798(2012);
<https://doi.org/10.1016/j.optcom.2012.04.028>.
- 12) N. Bokor, and Y. Iketaki, Appl. Spectroscopy **68**, 353 (2014); <https://doi.org/10.1366/13-07249>.
- 13) Y. Iketaki, K. Kitagawa, K. Hidaka, N. Kato, A. Hirabayashi, and N. Bokor, Rev. Sci. Instrum.
85, 073701 (2014) ; <https://doi.org/10.1063/1.4885465>.
- 14) Y. Iketaki, H. Kumagai, K. Jahn, and N. Bokor, Opt. Lett. **40**, 1057 (2015);
<https://doi.org/10.1364/OL.40.001057>.
- 15) Y. Iketaki, H. Oi, N. Bokor, and H. Kumagai, Rev. Sci. Instrum. **86**, 086109 (2015);
<https://doi.org/10.1063/1.49297>.

業績目録

【査読あり英文原著論文】

- 1) Y. Iketaki, T. Takayanagi, K. Wakiya, H. Suzuki¹, and F. Koike, J. Phys. Soc. Jpn. **57**, 391 (1988).
- 2) H. Ishii, Y. Iketaki, T. Watanabe, T. Takayanagi, K. Wakiya, H. Suzuki, and F. Koike, Phys. Rev. A. **43**, 134-142 (1991).
- 3) Y. Horikawa, K. Nagai, S. Mochimaru, and Y. Iketaki, J. Microscopy **172**, 189 (1993).
- 4) Y. Iketaki, Y. Horikawa, K. Nagai, S. Mochimaru, Y. Ohta, H. Kamijo, and M. Shibuya, Jpn. J. Appl. Phys. **32**, 1837 (1993).
- 5) Y. Horikawa, K. Nagai, and Y. Iketaki, Opt. Eng. **33**, 1721 (1994).
- 6) Y. Iketaki, and T. Watanabe, Rev. Sci. Instrum. **66**, 982 (1995).
- 7) Y. Iketaki, and T. Watanabe, Rev. Sci. Instrum. **66**, 1376 (1995).
- 8) Y. Iketaki, Y. Horikawa, S. Mochimaru, K. Nagai, M. Atsumi, H. Kamijou, and M. Shibuya, Opt. Lett. **19**, 1804 (1994).
- 9) I. Takayanagi, K. Nagai, H. Tetsuka, Y. Inoue, S. Araki, S. Mochimaru, Y. Iketaki, Y. Horikawa, and K. Matsumoto, IEEE Transactions on Electron Devices **42**, 1425 (1995).
- 10) Y. Iketaki, Y. Horikawa, S. Mochimaru, and K. Nagai, Jpn. J. Appl. Phys. **35**, 4585 (1996).
- 11) Y. Iketaki, and T. Watanabe, Opt. Eng. **35**, 2418 (1996).
- 12) Y. Iketaki, Y. Horikawa, S. Mochimaru, K. Nagai, T. Kiyokura, M. Oshima, and A. Yagishita, J. Electron Spectroscopy and Related Phenomena **80**, 353 (1996).
- 13) T. Watanabe, M. Miyata, Y. Iketaki, M. Fujii, and A. Yagishita, J. Korean Physical Society **32**, 388 (1998).
- 14) T. Kiyokura, F. Maeda, Y. Watanabe, Y. Kadota, Y. Iketaki, H. Horikawa, M. Oshima, E. Shigemasa, and A. Yagishita, J. Vac. Sci. Technol. **A16**, 1086 (1996).
- 15) T. Kiyokura, F. Maeda, Y. Watanabe, E. Shigemasa, A. Yagishita, M. Oshima, E. Shigemasa, Y. Iketaki, and H. Horikawa, J. synchrotron rad. **5**, 1111 (1998).
- 16) T. Kiyokura, F. Maeda, Y. Watanabe, Y. Iketaki, K. Nagai, Y. Horikawa, M. Oshima, E. Shigemasa, and A. Yagishita, Opt. Rev. **7**, 576 (2000).
- 17) Y. Iketaki, T. Omatsu, O. Sato, Suzuki and M. Fujii: Trends in Optics and Photonics OSA Proceedings Series (TOPS) **39**, 167 (2000).
- 18) Y. Iketaki, K. Ohtsuki, and T. Watanabe, J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys. **34**, 1889 (2001).
- 19) T. Watanabe, Y. Iketaki, T. Omatsu, K. Yamamoto, S. Ishiuchi, M. Sakai, and M. Fujii, Chem. Phys. Lett. **371**, 643 (2003).
- 20) Y. Iketaki, T. Watanabe, S. Ishiuchi, M. Sakai, T. Omatsu, K. Yamamoto, M. Fujii, and T. Watanabe, Chem. Phys. Lett. **372**, 773 (2003).

- 21) Y. Iketaki, T. Watanabe, S. Ishiuchi, M. Sakai, T. Omatsu, K. Yamamoto, and M. Fujii, Appl. Spectrosc. **57**,1312 (2003).
- 22) T. Watanabe, Y. Iketaki, T. Omatsu, K. Yamamoto, M. Sakai, and M. Fujii, Opt. Exp. **11**, 3271 (2003).
- 23) N. Satoh, T. Watanabe, Y. Iketaki, M. Fujii, and K. Yamamoto, Polymers for Advanced Technology **15**, 159 (2004).
- 24) T. Watanabe, Y. Igasaki, N. Fukuchi, M. Sakai, S. Ishiuchi, M. Fujii, T. Omatsu, K. Yamamoto, and Y. Iketaki, Opt. Eng. **43**, 1136 (2004).
- 25) T. Watanabe, M. Fujii, Y. Watanabe, N. Toyama and Y. Iketaki, Rev. Sci. Instrum. **75**, 5132 (2004).
- 26) Y. Iketaki, T. Watanabe, M. Sakai, S. Ishiuchi, M. Fujii, and T. Watanabe, Opt. Eng. **43**, 033602 (2005).
- 27) N. Bokor, Y. Iketaki, T. Watanabe and M. Fujii, Opt. Exp. **13**, 10440 (2005).
- 28) T. Hiraga, Y. Iketaki, T. Watanabe, H. Ohyi, K. Kobayashi, N. Yamamoto, T. Mizokuro, and Masaaki Fujii, Rev. Sci. Instrum. **76**, 073701 (2005).
- 29) T. Watanabe, Y. Iketaki, T. Omatsu, K. Yamamoto, and M. Fujii, Appl. Spectroscopy, **59**,868(2005).
- 30) T. Watanabe, Y. Iketaki, M. Sakai, T. Ohmori, T. Ueda, T. Yamanaka, S. Ishiuchi, and M. Fujii, Chem. Phys. Lett. **420**,410(2005).
- 31) Y. Iketaki, N. Bokor, T. Watanabe, and M. Fujii, Rev. Sci. Instrum. **77**, 063112 (2006).
- 32) A. Hamano, Akihhide, S. Pleasants, M. Okida, M. Itoh, T. Yatagai, T. Watanabe, M. Fujii, Y. Iketaki, K. Yamamoto, and T. Omatsu, Takashige, Opt. Commun. **260**, 675(2006).
- 33) N. Bokor, Y. Iketaki, T. Watanabe, K. Daigoku, N. Davidson and M. Fujii, Opt. Comm. **272** 263(2007).
- 34) Y. Iketaki, T. Watanabe, N. Bokor and M. Fujii, Opt. Lett. **32**, 2357 (2007).
- 35) Y. Iketaki, T. Watanabe, N. Bokor, T. Omatsu, T. Hiraga, K. Yamamoto, and M. Fujii, Appl. Spectrosc. **61**,6 (2007).
- 36) N. Bokor, Y. Iketaki, T. Watanabe, and M. Fujii, Opt. Commun., **281**, 1850(2008).
- 37) A. Domondon, Y. Iketaki, K. Nagai, Y. Sato, and T. Watanabe: IEEJ Trans. EIS. **127**, 1340(2007).
- 38) K. Nagai, Y. Iketaki, A. Domondon, Y. Sato, and T. Watanabe: IEEJ Trans. EIS. **127**, 1304(2007).
- 39) Y. Iketaki, T. Watanabe, N. Bokor, M. Fujii, e-Journal of Surface Science and Nanotechnology **6**, 175(2008).
- 40) N. Bokor, Y. Iketaki, T. Watanabe, and M. Fujii, Opt. Commun. **281**, 1850(2008).
- 41) Y. Iketaki, T. Watanabe, N. Bokor, M. Fujii, and T. Watanabe, Topologica **2**,9 (2009).
- 42) N. Bokor, and Y. Iketaki, Opt. Exp. **17**, 5533 (2009).
- 43) Y. Iketaki, Jpn. Appl. Phys. **49**,048003(2010).
- 44) N. Bokor, A. Domondon, and Y. Iketaki, Opt. Rev. **17**,79(2010).
- 45) Y. Iketaki, and T. Watanabe, Appl. Spectroscopy **64**,396(2010).

- 46) Y. Iketaki, Appl. Phys. Express **3**, 085203 (2010).
- 47) Y. Iketaki, and N. Bokor, Opt. Commun. **285**, 3798(2012).
- 48) A. Domondon, Y. Iketaki, and N. Bokor, IEEJ Trans. EIS.**134**, 5210(2014).
- 49) A. Domondon, Y. Iketaki, and N. Bokor, IEEJ Trans. EIS.**134**,ES4_1-ES4_17(2014).
- 50) N. Bokor, and Y. Iketaki, Appl. Spectroscopy **68**, 353 (2014).
- 51) Y. Iketaki, K. Kitagawa, K. Hidaka, N. Kato, A. Hirabayashi, and N. Bokor, Rev. Sci. Instrum. **85**, 073701 (2014).
- 52) Y. Iketaki, H. Kumagai, K. Jahn, and N. Bokor, Opt. Lett. **40**, 1057 (2015).
- 53) Y. Iketaki, H. Oi, N. Bokor, and H. Kumagai, Rev. Sci. Instrum. **86**, 086109 (2015).

【査読あり邦文原著論文】

- 1) 尾松孝茂、池滝慶記、酒井 了、西川正治、電子情報通信学会論文誌 D **Vol.J69-D**、p1639(1986)。
- 2) 池滝慶記、永井宏明、持丸象一郎、堀川嘉明、表面科学 **18** 巻、p19(1997)。
- 3) 池滝慶記、永井宏明、持丸象一郎、堀川嘉明、表面科学 **19** 巻、p7(1998)。
- 4) 渡邊武史、藤井正明、池滝慶記、分光研究、**52** 巻 p7(2003)。
- 5) 池滝慶記、渡邊武史、酒井 誠、尾松孝茂、山元公寿、藤井正明、表面科学 **24** 巻、p2(2003)。
- 6) 渡邊武史、池滝慶記、酒井 誠、尾松孝茂、山元公寿、藤井正明、表面科学 **25** 巻、p10(2004)。
- 7) 池滝慶記、渡邊武史、寄林 豊、梶原定文、井上登、藤井正明、 IEEJ Trans. EIS.**127**, 1334(2007)。

【査読あり総説】

- 1) 永井宏明、持丸象一郎、池滝慶記、堀川嘉明、光学、**12** 巻、p664(1999)。
- 2) 渡邊武史、池滝慶記、尾松孝茂、山元公寿、藤井正明、分光研究、**52** 巻、p2(2004)。
- 3) 池滝慶記、大野智哉、ナンドール ボコル、熊谷 寛。光学、**49** 巻、p73 (2020)。

【解説記事】

- 1) 池滝慶記、O plus E **20** 巻, p767(1998)。
- 2) 池滝慶記、OPTRONICS、No.**8**, p107 (1998)。
- 2) 池滝慶記、熊谷 寛、ナンドール ボコル、OPTRONICS、No.**8**, p64(2016)。
- 3) 池滝慶記、熊谷 寛、ナンドール ボコル、O plus E、**39** 巻, p168(2017)。

【プロシーディングス】

- 1) Y. Horikawa, S. Mochimaru, Y. Iketaki, K. Nagai, K. Okawa, and S. Iura, Proc. SPIE **1720**, Intl Symp on Optical Fabrication, Testing, and Surface Evaluation, (20 October 1992); <https://doi.org/10.1117/12.132128>.
- 2) Y. Horikawa, K. Nagai, S. Mochimaru, and Y. Iketaki, X-ray Microscopy IV., (Proceedings on the 4 th international Conference on X-Ray Microscopy), (Bogorodic Pechatinik, 1995).
- 3) T. Kiyokura, F. Maeda, M. Oshima, Y. Iketaki, H. Horikawa, E. Shigemasa, A. Yagishita, and Y. Watanabe, JSPE proceedings of the Second U.S.-Japan Workshop on Soft X-Ray Optics: Technical Challenges, 421(1997).
- 4) Y. Sato, A. Domondon, T. Watanabe, K. Nagai, and Y. Iketaki, Proc. SPIE 3448, Proceedings Volume 3448, Crystal and Multilayer Optics; (1998) <https://doi.org/10.1117/12.332519>.
- 5) Y. Iketaki, T. Watanabe, N. Bokor, and M. Fujii, Proceedings Volume **6443**, Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing XIV; 644307 (2007) <https://doi.org/10.1117/12.698451>.
- 6) H. Kumagai, Y. Iketaki, Kornel Jahn, and N. Bokor, Proceedings Volume **9713**, Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing XXIII; 971311 (2016) <https://doi.org/10.1117/12.2211871>.
- 7) H. Kumagai, Y. Iketaki, K. Nagai, and Nador Bokor, Proceedings Volume **10070**, Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing XXIV; 100701L (2017) <https://doi.org/10.1117/12.2250814>.
- 8) Y. Iketaki, N. Bokor, D. Okada, and H. Kumagai, Proceedings Volume **10712**, Optical Manipulation Conference; 1071203 (2018) <https://doi.org/10.1117/12.2319154>.
- 9) K. Nagai, T. Maruyama, A. Kodaira, H. Kumagai, N. Bokor, and Y. Iketaki, Proceedings Volume **11245**, Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing XXVII; 1124518 (2020) <https://doi.org/10.1117/12.2545877>.
- 10) Y. Iketaki, Proceedings Volume **11522**, Optical Manipulation and Structured Materials Conference 2020; 115221E (2020) <https://doi.org/10.1117/12.2573793>.

【新聞発表】

- 1) 日経産業新聞、「原子レベルの精度に-NTT など放射光利用」1998 年 1 月 28 日。
- 2) 日刊工業新聞、「極短紫外光絞り込める集光レンズを開発」、1998 年 6 月 18 日。
- 3) New Technology Japan, “Focusing Lens for Extreme Ultraviolet Rays”, 1998 年 8 月 2 日。
- 4) 日刊工業新聞、「生きた細胞を 3 次元観察」、2001 年 11 月 16 日。
- 5) 日本経済新聞、「細胞生をきたまま観察」、2003 年 4 月 18 日。
- 6) 日経産業新聞、「東工大とオリンパスが解像度を 3 倍以上に」、2003 年 11 月 30 日。
- 7) 日本経済新聞、「ナノの可能性-新素材開発の切り札」、2004 年 11 月 6 日。

【招待講演】

- 1) 池滝 慶記、「極端紫外光を用いた超分解能光学顕微鏡とその周辺」、生物物理学会第 37 回年会講演会、日時、日時：1999 年 10 月 2 日～5 日、和光市市民文化センター/理化学研究所。
- 2) 池滝 慶記、「レーザープラズマ光源」、照明学会研究会、1999 年 10 月 15 日、早稲田大学。
- 3) 池滝 慶記、「極紫外光用集光光学系」、光設計研究グループ第 17 回研究会、1999 年 11 月 2 日～12 日、東京大学生産技術研究所。
- 4) 池滝 慶記、「2 色レーザービームを用いた超解像顕微鏡-光の回折限界を超える顕微鏡法-」、日本電子顕微鏡学会、2000 年 11 月 21 日～22 日、岡崎国立共同研究機構コンファレンスセンター。
- 5) Y. Iketaki, and N. Bokor “Three-dimensional super-resolution measurement based on fusion technique using spectroscopy and optics”, Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Development Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, May 28 – May 31(2012), Kobe International Center.
- 6) 池滝 慶記、「2 波長蛍光分光法を用いた超解像顕微鏡法—3 次元空間への拡張—」、日本顕微鏡学会第 68 回学術講演会、日時：2012 年 5 月 14 日～16 日、筑波国際会議場。
- 7) 池滝 慶記、平井 政彦、安達 昌城、「超解像顕微鏡による蛍光標識化したリポソームの観察」、第 15 回 医用分光学研究会、2017 年 11 月 29 日～ 30 日、筑波大学。
- 8) 池滝 慶記、ナンドール ボコル、「3 次元超解像顕微鏡法の開発と応用」、2019 年度分光学会生細胞分光部会研究会、2019 年 12 月 12 日、筑波大学。

【展示会】

- 1) 「超解像観察用の顕微鏡光学アダプター」JASIS2019、2019 年 9 月 4 日～ 6 日、幕張メッセ。

【研究代表として獲得した研究助成金】

- 1) 「紫外線による紫外線の制御を目指して」：さがけ 2 1 「光と物質」、新技術事業団（現：科学技術振興機構）、1993 年 10 月 1 日～1996 年 3 月 31 日。
- 2) 「1 分子超解像空間分析法の開発」：戦略的研究推進事業さがけ、科学技術振興機構、2008 年 10 月 1 日～2011 年 3 月 31 日。
- 3) 「3 次元超解像顕微鏡用照明光学系の開発」：研究成果展開事業（先端計測分析技術・機器開発プログラム：要素タイプ）、科学技術振興機構、2011 年 10 月 1 日～2013 年 3 月 31 日。

- 4) 「汎用・普及型超解像顕微鏡の開発」：研究成果展開事業（先端計測分析技術・機器開発プログラム：機器タイプ）、科学技術振興機構、2015 年 12 月 1 日～2018 年 3 月 31 日。

【本研究に関係する海外工業所有権（査定済みの特許）】

＊ 米国特許

- 1) Y. Iketaki, and H. Kano, US10,558,028 B2, Dec. 26, 2017.
- 2) Y. Iketaki, US9,507,125 B2, Aug. 5, 2013.
- 3) Y. Iketaki, and N. Bokor, US 9,310,595 B2, Mar. 20, 2013.
- 4) Y. Iketaki, and H. Kano, US8,947,658,B2, Sep. 29, 2011.
- 5) Y. Iketaki,US8,699,123 B2, Jun. 17, 2010.
- 6) Y. Iketaki, US8,536,543 B2, Dec. 11, 2019.
- 7) E. Yokoi, and Y. Iketaki, US8,487,271 B2, Sep. 12, 2008.
- 8) Y. Iketaki, US7,812,967 B2, Dec. 26, 2006.
- 9) Y. Iketaki, T. Watanabe, and M. Fujii, US7,551,350 B2, Dec. 20, 2007.
- 10) Y. Iketaki, M. Fujii , T. Watanabe, T. Omatsu, K. Yamamoto, and T. Suzuki, US7,304,315 B2, Oct. 15, 2003.
- 11) Y. Iketaki, T. Watanabe, M. Fujii, T. Omatsu, Y. Igasaki, and T. Suzuki, US7,095,556 B2, Feb. 4, 2003.
- 12) Y. Iketaki, M. Fujii, T. Watanabe, T. Omatsu, K. Yamamoto, and T. Suzuki, US6,859,313 B2, Mar. 23, 2001.
- 13) Y. Iketaki, M. Fujii, T. Omatsu, O. Sato, and K. Yamamoto, US6,844,963 B2, Mar. 23, 2000.
- 14) Y. Iketaki, M. Fujii, and T. Omatsu, US6,667,830 B2, Apr. 9, 1998.
- 15) Y. Iketaki, US6,633,432 B2, Aug. 21, 2000.
- 16) S. Kashima, and Y. Iketaki, US6,184,535 B2, Sep. 19, 1997.
- 17) Y. Iketaki, and M. Fujii, US5,835,262 B2, Dec. 19, 1994.

＊ ドイツ特許

- 1) Y. Iketaki, M. Fujii, and T. Omatsu, DE 199 80 759 B3, Apr. 9, 1998.

＊ 中国特許

- 1) 池瀧 慶記 CN 102096180 B, Dec. 11, 2009.

【本研究に関係する日本国内工業所有権（査定済みの特許）】

- 1) 池瀧 慶記、特許第 6714689 号、2016 年 4 月 7 日。
- 2) 池瀧 慶記、特許第 6289156 号、2014 年 2 月 20 日。

- 3) 池滝 慶記、ナンドール ボコル、特許第 6253830 号、2013 年 3 月 19 日。
- 4) 池滝 慶記、特許第 6234105 号、2013 年 8 月 5 日。
- 5) 池滝 慶記、特許第 5771422 号、2010 年 6 月 17 日。
- 6) 池滝 慶記、特許第 5484879 号、2009 年 12 月 11 日。
- 7) 池滝 慶記、特許第 5208825 号、2009 年 3 月 19 日。
- 8) 池滝 慶記、平 健二、渡邊 武史、特許第 5086765 号、2007 年 10 月 17 日。
- 9) 池滝 慶記、特許第 5065668 号、2006 年 12 月 16 日。
- 1 0) 池滝 慶記、平賀 隆、溝黒 登志子、山本 典孝、藤井 正明、渡邊 武史、小林 一雅、特許第 4896378 号、2004 年 3 月 12 日。
- 1 1) 池滝 慶記、尾松 孝茂、藤井 正明、鈴木 智雄、特許第 4659952 号、2000 年 8 月 19 日。
- 1 2) 池滝 慶記、尾松 孝茂、藤井 正明、佐藤 卓、特許第 4614495 号、2000 年 3 月 23 日。
- 1 3) 池滝 慶記、尾松 孝茂、藤井 正明、佐藤 卓、山本 公寿、特許第 4551528 号、2000 年 3 月 23 日。
- 1 4) 池滝 慶記、尾松 孝茂、藤井 正明、鈴木 智雄、特許第 4545337 号、2001 年 3 月 23 日。
- 1 5) 池滝 慶記、尾松 孝茂、藤井 正明、鈴木 智雄、特許第 4408523 号、2000 年 3 月 24 日。
- 1 6) 池滝 慶記、渡邊武史、尾松 孝茂、藤井 正明、山本 公寿、鈴木 智雄、特許第 4334835 号、2002 年 8 月 28 日。
- 1 7) 池滝 慶記、渡邊武史、尾松 孝茂、藤井 正明、山本 公寿、鈴木 智雄、特許第 4236435 号、2002 年 9 月 17 日。
- 1 8) 池滝 慶記、渡邊武史、尾松 孝茂、藤井 正明、山本 公寿、鈴木 智雄、特許第 4017472 号、2002 年 8 月 12 日。
- 1 9) 池滝 慶記、渡邊武史、尾松 孝茂、藤井 正明、山本 公寿、鈴木 智雄、特許第 3993553 号、2003 年 10 月 15 日。
- 2 0) 池滝 慶記、尾松 孝茂、藤井 正明、特許第 3350442 号、1998 年 4 月 9 日。
- 2 1) 池滝 慶記、藤井 正明、特許第 3350442 号、1994 年 12 月 28 日。
- 2 2) 池滝 慶記、藤井 正明、特許第 3020453 号、1996 年 11 月 13 日。
- 2 3) 池滝 慶記、特許第 3011633 号、1995 年 3 月 15 日。