

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650046

研究課題名(和文) 光学顕微鏡の照射・結像システムを空間光位相変調器により自在に操る

研究課題名(英文) Manipulating illumination and imaging systems of an optical microscope using a spatial light modulator

研究代表者

船津 高志 (Funatsu, Takashi)

東京大学・薬学系研究科・教授

研究者番号：00190124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、空間光位相変調器を用いることにより、レンズの交換や移動などの機械的な駆動を伴うことなく、電子制御によって像の倍率や焦点位置などを自在に操ることのできる光学顕微鏡システムを構築することを目的とした。その効果を実証するため、STED顕微鏡のSTEDビームに最適なパターンを、空間光位相変調器を用いて作製した。具体的には、 x, y 方向については、ラゲール・ガウシアンビームを作製するためのパターンを用いた。また、 z 方向については、中央部を通過する光と周辺部を通過する光の位相がずれるパターンを用いた。また、 z 方向の結像位置を、空間光位相変調器を用いて任意に変更できることを示した。

研究成果の概要(英文)：A spatial light modulator (SLM) is an instrument that imposes some form of spatially varying modulation on a beam of light. SLM was installed to an optical microscope to change the magnification without changing an objective lens and to change the position of focus without mechanical manipulation.

As an application of the microscope with SLM, STED beam of a STED microscope was optimized by SLM. In order to improve the resolution in x, y direction, a pattern to generate Laguerre-Gaussian beam was input to the SLM. To improve the resolution of in z direction, the phases of the light passing through the center and the peripheral were changed at .

As another application, we used Fresnel lens pattern to change the position of the focus. These results indicate that SLM is a useful tool to modulate a beam of light.

研究分野：生物物理学

キーワード：空間光位相変調 光学顕微鏡 バイオイメージング

1. 研究開始当初の背景

光学顕微鏡は、試料からの光を対物レンズによって集め、結像レンズによってカメラ上に像を投影する仕組みになっている。光の屈折などの位相変調は専らレンズが行なっている。そのため、結像性能を決めるのは対物レンズであり、顕微鏡メーカーは競って対物レンズを開発してきた。そのため、最高の性能を求めるためには、観察対象ごとに専用の対物レンズを使用しなければならない。さらに、倍率を変える場合には対物レンズを交換する必要があった。また、位相差顕微鏡で観察を行う場合に、生体試料の厚みに応じて位相リングを選択肢し、それに合った位相差顕微鏡観察専用の対物レンズを使用する必要があった。これらの事例は、現在の顕微鏡システムは操作が煩雑で拡張性に乏しいことを示している。しかし、空間光位相変調器を導入すれば、1つの対物レンズで様々な手法で生体試料を観察する場合でも、常に球面収差の補正された回折限界像を得ることができ、対物レンズに選択の幅が広がる。さらに、1つの対物レンズで蛍光顕微鏡観察、超解像イメージングや位相差顕微鏡観察も自在にできるようになる。また、機械的な駆動を伴うことなく、電子制御によって像の倍率や焦点位置などを自在に、しかも高速に変更することができる。そのため、顕微鏡システムの操作性と拡張性が飛躍的に改善されると期待される。

本研究課題は、最先端の天体観察技術を顕微鏡に活用することにより、球面収差の補正された回折限界像を提供する。光の波面の乱れを補正する波面補償光学装置を搭載した光学顕微鏡は数例報告されているが、その目的は美しい像を撮影することである。本研究課題は、単に回折限界像を得ることを目的とするのではなく、レンズや位相板などの従来の光学部品を空間光位相変調器に置き換え、顕微鏡システムの操作性と拡張性を飛躍的に増すことを目的としている。例えば、STED顕微鏡法の場合、試料にドーナツ状のSTEDビームを照射するため、瞳の位置に特殊な位相板を挿入する。この位相板を最適化するため、従来は位相板を様々な仕様で作製する必要があったが、空間光位相変調器ならばコンピュータで自在にパターンを変化させることができる。現在市販されているSTED顕微鏡のSTEDビームは単純なドーナツ型なので深さ方向にはdepletionできず、深さ方向の分解能が改善されていない。しかし、空間光位相変調器で最適化することにより、3次元的にdepletion可能な照明法を種々検討できる。また、構造化照明顕微鏡法に必要な縞模様の励起光を高速に回転させたり、対物レンズの倍率を変えても最適化できるなどの利点がある。また、空間光位相変調器を結像系に組み込んだ場合、機械的な駆動を伴うことなく、電子制御によって像の倍率や焦点位置などを自在に、しかも高速に変更すること

ができる。そのため、顕微鏡システムの操作性と拡張性が飛躍的に増し、バイオイメージング技術に革新をもたらし、生命科学研究に大いに貢献するだろう。

2. 研究の目的

光学顕微鏡は、結像に必要な光の位相変調を専らレンズに頼っており、大雑把に言えば対物レンズと結像レンズで構成されている。焦点距離の異なる対物レンズと交換することにより倍率を変え、対物レンズの位置を移動することにより焦点位置の調整を行う。本研究は、空間光位相変調器を用いることにより、レンズの交換や移動などの機械的な駆動を伴うことなく、電子制御によって像の倍率や焦点位置などを自在に操ることのできる光学顕微鏡システムを構築することを目的とする。これらの制御を電子的に高速に行うので、光学顕微鏡によるイメージングに新たな可能性を開拓するものである。

3. 研究の方法

照射系に空間光位相変調器(X10468-01(浜松ホトニクス社製))を組み込み、以下の実証試験を行った。

(1) STED顕微鏡のSTEDビームの作製
空間光位相変調器が最も有効に働く例として、超解像蛍光顕微鏡法であるSTED顕微鏡法(K. I. Willing et al., Nature, 440, 935 (2006))のSTEDビームの作製を挙げることができる。この方式では、共焦点顕微鏡の光学系に観察用励起光のレーザー光と誘導放出用のレーザー光(STEDビーム)を同時に照射する。STEDビームは通常ドーナツ状になっていて蛍光の発生を抑制して真ん中の蛍光だけが検出されるためスポットは小さくなる。第一段階としては、x,y平面上にドーナツ状になるようにレーザー照射する。このために、STEDビームがラゲール・ガウシアンビームの形状になるように、図1のパターンを空間光位相変調器に入力した。

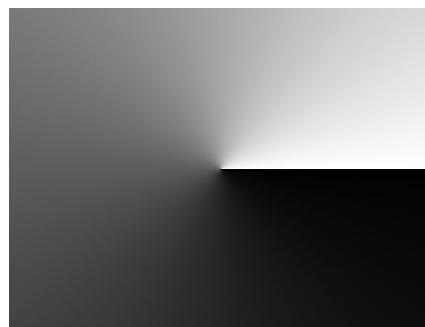


図1 ラゲール・ガウシアンビームを作製するためのパターン(白は位相が0、黒は位相が2遅れる)

第二段階として、z方向に分解能を上げるためのSTEDビームを照射するパターンを空間光位相変調器に入力した(図2)

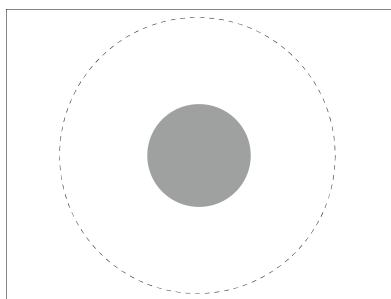


図2 z軸方向にSTEDビームを
作製するためのパターン(白は位相が
0、灰色は位相が遅れる。破線は
レーザーの照射領域。)

(2) 結像面のz軸方向の位置と倍率の変更
像のz軸方向の位置を変えるために、フレ
ネルレンズのパターンを空間光位相変調器
に入力した(図3)。



図3 フレネルレンズパターン

その結果、空間光位相変調器を焦点距離 $f = 400 \sim 600 \text{ mm}$ のレンズとして使用できるよ
うになった。

4. 研究成果

(1) STED顕微鏡のSTEDビームの作製
x,y方向の分解能の向上

図1に示すパターンを空間光位相変調器
に入力しレーザー光を像面に集光させた。そ
の際、0次の回折光(直接光)が像面で焦点
を結ぶことが問題となった。これを回避す
るため、図3のフレネルレンズのパターンを重
ね合わせた図4の光渦パターンを入力する
ことにより結像面をずらし、直接光が焦点を
結ばないようにした。

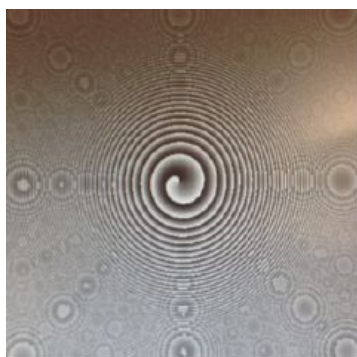


図4 光渦パターン

以上の工夫により、試料面にドーナツの形

状をしたSTEDビームを生成することが出来
た(図5)。これにより、中心部の蛍光を残
し、x,y方向に、周囲の蛍光を除くことが可
能である。



図5 試料面でのSTEDビーム

z軸方向の分解能の向上

次に、焦点のZ方向の分解能を上げるため
のSTEDビームの最適化を行った。図2に示
すように、中央部を通過する光と周辺部を通
過する光の位相がずれるパターンを作成し、
空間光位相変調器に入力した。その結果、
焦点面では電場の強度が0になった(図6A)。
一方、焦点からZ軸方向にわずかにずれた地
点ではSTEDビームが観察できた(図6B)。
これにより、中心部の蛍光を残し、z方向の
周囲の蛍光を除くことが可能であることが
示された。

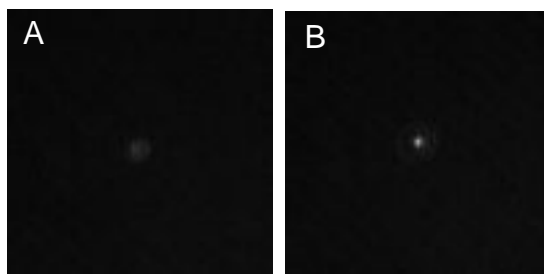


図6 STEDビームのZ軸方向の強度(A)
焦点面、(B)焦点から $0.4 \mu\text{m}$ ずれた位置

(2) 結像面の位置の変更

レーザーの焦点と観察面のZ方向の位置を、
任意に変えることを試みた。従来は、結像系
のレンズを移動することにより画像の焦点
面を変えていた。しかし、100倍の対物レン
ズで焦点面を $10 \mu\text{m}$ 移動するためには、結
像レンズを 10 cm も移動しなければならず操
作性が極めて悪かった。空間光位相変調器を
光路に組み込むことによりこの問題を解決
した。まず、空間光位相変調器を結像系に組
み込み、焦点距離が $400 \sim 600 \text{ mm}$ のフレ
ネルレンズのパターンを空間光位相変調器に入
力した(図2)。位相変調を加えた。これに
より、レンズの移動のような物理的な操作を
行うことなく $\pm 20 \mu\text{m}$ 焦点面をずらすこと
ができた。ただし、横倍率が変わってしまう
ため、それを補正する必要がある。

以上の結果は、空間光位相変調器の有効性

を示すものであり、光学顕微鏡によるイメージングに新たな可能性をもたらすものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Zhuohao Yang, Ryo Iizuka, Takashi Funatsu. Nascent secM chain outside the ribosome reinforces translation arrest. PLoS ONE 10(3):e0122017 (2015). 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0122017

〔学会発表〕(計 7 件)

Kohki Okabe, Takashi Funatsu “Imaging of thermogenesis in living cells using fluorescent polymeric thermometer” the 59th Annual Meeting of the Biophysical Society, February 7-11, 2015, Convention center, Baltimore, Maryland, USA

Haruka Okada, Ayaka Iguchi, Ryo Iizuka, Dong H. Yoon, Tetsushi Sekiguchi, Shuichi Shoji, Takashi Funatsu “Sensitive fluorescence-activated sorting of microdroplets containing subcellular structures by thermoreversible gelation polymer” 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, October 26-30, 2014, San Antonio, Texas, USA

Kohki Okabe, Takashi Funatsu “Imaging of thermogenesis in living cells using fluorescent polymeric thermometer” 第52回生物物理学会年会、2014年9月25日~27日、札幌コンベンションセンター、札幌、北海道

Zhuohao Yang, Ryo Iizuka, Takashi Funatsu “N-terminal region of SecM is essential for its stable translation arrest” 第52回生物物理学会年会、2014年9月25日~27日、札幌コンベンションセンター、札幌、北海道

Takashi Funatsu “Analyzing the functions and interactions of protein molecules by micro- and nano-devices” 31st International Conference of Photopolymer Science and Technology (ICPST-31), July 8-11, 2014, University Convention Hall, Chiba University, Chibashi, Japan

船津高志「マイクロドロップレットの生命科学研究への応用」第86回日本生化学会大会、2013年9月11日~13日、パシフィコ

横浜、横浜市、神奈川県

船津高志「マイクロ・ナノデバイスを用いた生体分子の機能と相互作用の解析」第48回構造生物応用研究会、2013年5月18日~19日、アークホテル仙台青葉通り、仙台市、宮城県

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~funatsu/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

船津 高志 (FUNATSU, Takashi)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：00190124

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし