

令和元年6月5日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05985

研究課題名(和文)光の全パラメータ制御による超解像ダークスポットイメージング法の開発

研究課題名(英文) Development of super-resolution dark-spot imaging by manipulation of all parameters of light

研究代表者

小澤 祐市 (Kozawa, Yuichi)

東北大学・多元物質科学研究所・准教授

研究者番号：90509126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、軸対称な偏光分布を持つベクトルビームと呼ばれるレーザー光を共焦点レーザー走査型顕微鏡に適用し、空間分解能を大きく向上する手法を開発した。本手法では、ベクトルビームの偏光や位相の空間分布を制御することで、焦点に異なる形状の集光スポットを発生させ、その集光スポットの走査により得られた画像の差引演算により空間分解能を向上することを原理とする。本原理に基づいて、実際に可視光を用いたイメージングを実施し、従来の限界を超えた100 nmに迫る空間分解能が達成できることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レーザー顕微鏡法は、多様な学術分野あるいは産業現場において広く普及している必須の観察手法である。一方で、光を用いた顕微鏡法であるため、観察対象として解像可能な最小サイズは使用する光の波長程度であり、可視光を用いた場合の空間分解能の限界は200 nm前後とされている。本研究成果は、このような従来のレーザー顕微鏡法に対して、使用するレーザー光をベクトルビームとするだけで従来の限界を超えた高い空間分解能が容易に得られること実証した点に大きな意義があり、広く様々な分野での活用につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：This research project aimed to develop a new method to enhance the spatial resolution in confocal laser scanning microscopy by exploiting vector beams, which have axially symmetric polarization distribution. In this method, the enhancement of the spatial resolution is achieved by the simple subtraction process for images separately acquired by different vector beams with various focal spot shapes. The focal spot shape is controlled by manipulating the spatial distributions of polarization and phase for vector beams. Based on this principle, the spatial resolution close to 100 nm was experimentally demonstrated in visible light imaging.

研究分野：光工学

キーワード：レーザー顕微鏡 超解像 ベクトルビーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

可視光を用いた従来の光学顕微鏡法の空間分解能は 200 nm 程度が限界であることはよく知られた事実であるが、近年は特に生体イメージング分野において、この限界を超える超解像技術の進展が著しい。例えば誘導放出効果を用いた STED 顕微鏡法や蛍光分子の選択的発光現象を用いた 1 分子計測法、構造化照明顕微鏡法などは、可視光を用いても 100 nm から数十 nm 程度に及び空間分解能が実現する。しかしながら、これらの手法は極めて精密な調整や強いレーザー光による試料の光損傷の問題、特殊な試料条件や長時間計測、多段階の高度な画像処理アルゴリズムが必要であり、各手法の性能を十分に引き出すためには、従来の顕微鏡法と比較して格段に複雑な装置や制約、厳密な実験条件を満たす必要がある。このため、生命科学分野の研究者がこれらの超解像技術を日常的ツールとして広く用いるには、大きなブレークスルーが必要であるといえる。

本研究では、より簡便かつ実用的な超解像イメージング法を開発するために、差引イメージング法と呼ばれる手法に着目する。差引法は、レーザー走査型蛍光顕微鏡において、通常の集光スポットと、中心部に強度を持たないダークスポットの 2 種類の走査ビームを使い、それぞれ得られた画像の差引演算のみによって空間分解能の向上を図る手法である。本手法は、その極めて単純な原理に基づく新しい光イメージング法として、近年急速に技術開発が進展している(例えば H. Dehez *et al.*, *Opt. Express* 21, 15912 (2013))。一方で、これまで報告された手法では、走査ビームにおける両者の強度プロファイルの差異に起因して、差引条件によっては取得画像に負の値のサイドローブによるアーティファクトが発生し、これにより観察試料本来の情報を失うという大きな問題を有していた。

研究代表者らのこれまでの研究から、差引法に対してビーム断面で軸対称な偏光分布を持つベクトルビーム(径偏光と方位偏光ビーム)を用いることで、差引画像におけるアーティファクトの発生を抑制しながら画像の空間分解能を 2-3 割向上可能であることを見出した(S. Segawa *et al.*, *Opt. Lett.*, 39, 4529 (2014))。また、数値計算に基づく検討により、多重リング状強度分布を有する方位偏光ビームでは、可視光を用いた集光においても 100 nm を切るダークスポットサイズが得られる条件を見出した(S. Segawa *et al.*, *Opt. Lett.*, 39, 3118 (2014))。この微小ダークスポットの強度プロファイルに一致するようなフラットトップ状強度分布を設計し、これらを差引イメージングに適用すると、サイドローブの発生を最小限に抑えながら 90 nm オーダーの空間分解能が達成可能であることも示した。

さらに本研究では、レーザー顕微鏡法の空間分解能を大きく向上する手法の一つとして、近年になって指摘された光のスーパーオシレーションと呼ばれる特性(M. Berry *et al.*, *J. Phys. A*, 39, 6965 (2006))にも着目する。これは、光の振幅や位相の分布を綿密に設計することで、光学系における空間周波数の限界を超えて任意の高い空間周波数成分を焦点面で局所的に発生する現象である。研究代表者は、本研究開始前に、ベクトルビームにはこのスーパーオシレーション特性が効果的に発生することを見出し、極めて微小な集光スポット(ブライトスポット)を形成する予備的検討結果を既に得ている。この先駆的な成果に基づけば、スーパーオシレーション特性に基づく究極的な微小ダークスポットの形成も可能であると考えられる。現状では、ベクトルビームにおけるスーパーオシレーション特性については未解明な点もあるものの、本特性の発生機構や生成条件を解明できれば、ベクトルビームを用いた差引手法においてスーパーオシレーション特性の適用も考えられ、従来の常識を遥かに凌駕する空間分解能が実現する可能性もある。

2. 研究の目的

本研究では、ベクトルビームの特異な集光特性に基づき、レーザー走査型蛍光顕微鏡に対する差引イメージング法の適用を基軸として、光の強度や偏光および位相の空間分布を究極的に制御することで、その空間分解能を最大限に向上するイメージング手法の開発を行う。具体的には、高次横モードの方位偏光ビーム集光によるダークスポットの微小化、差引イメージングに用いるベクトルビームの横モードおよび偏光分布を考慮した最適な設計を行う。また、ベクトルビームによる光のスーパーオシレーション特性を用いた超解像イメージング法の可能性についても実験的・理論的な検証を進め、差引イメージング法への適用可能性についても検討する。以上により、光の近接場や非線形応答、特殊な蛍光分子を全く使用せずにレーザー光の集光のみによって 100 nm を切る空間分解能を実現する。

3. 研究の方法

ベクトルビームを差引法に適用した場合の空間分解能の向上効果および画像品質について明らかにするために、ベクトルを強く集光した場合のダークスポット特性やスーパーオシレーション集光を含む微小集光スポット特性に関する数値計算による設計を行う。ブライトスポットおよびダークスポットを用いて取得した画像の差引演算を行った際の空間分解能やサイドローブ発生および信号強度は、集光するビームの横モードや偏光分布の組み合わせに強く依存する。そこで、差引法を適用した共焦点レーザー顕微鏡における空間分解能および画像品質に関して、数値シミュレーションに基づいて体系的な検討を行うことで、差引法に適したベクトルビームの組み合わせを明らかにする。

数値計算に基づく検討結果を踏まえて、共焦点レーザー顕微鏡光学系において、レーザービ

ームの偏光や位相の空間分布を制御した上で集光し、差引法を行うための実験系の構築を進める。具体的には、ピエゾステージ駆動型のレーザー顕微鏡系に対して、反射型空間光変調器と透過型液晶 12 分割波長板素子を導入し、差引法に適したブライトスポットおよびダークスポットを生成する。集光するレーザー光の横モードや偏光分布を切り替えながら、微小蛍光ビーズなどを試料として画像を取得した後、差引演算処理による空間分解能の向上効果について評価する。

4. 研究成果

(1) 数値計算に基づく設計

差引法に適したベクトルビームの横モードを明らかにするために、ベクトルビームを用いた場合の共焦点レーザー顕微鏡の点像分布関数(PSF)を計算した。高次横モードのベクトルビームである径偏光および方位偏光ビームは、横モード次数 p に対して、ビーム断面で $(p+1)$ 重の固有の多重リング状強度分布を持つ。差引で使用するブライトスポットおよびダークスポットを形成するビームの次数をそれぞれ p および p' として PSF を計算した。計算条件として、実験条件に合わせて開口数 1.45 の油浸対物レンズで波長 488 nm のレーザー光を集光し、ピンホール径 0.5 Airy units の共焦点ピンホールを用いて蛍光を検出する光学系を想定した。また、ブライトスポットは次数 p の方位偏光および径偏光ビームを一定の割合で重ね合わせるものとし、その強度プロファイルをダークスポットの強度プロファイル外縁部に近づけるようにした。これにより、差引によるサイドローブ

の発生を抑制した。以上の条件で、次数 p および p' (ただし、 $p' \neq p$) の組み合わせを変えながら、両者の PSF の差引によって得られる差引後 PSF の中心強度、サイズ(半値全幅)、および中心強度に対するサイドローブ強度の割合を評価した。

系統的な検証の結果、差引法に適したベクトルビームの横モード次数について、2 種類の組み合わせを見出した。具体的には、図 1(a)に示すように、ブライトスポットおよびダークスポットがそれぞれ $p=0$ 、 $p'=1$ を用いる場合(Type 1)と、 $p=1$ および $p'=2$ を用いる場合(Type 2)であり、両者の組み合わせについて、差引条件を変化させた場合の PSF サイズとサイドローブ強度の間には図 1(b)に示すような関係があることがわかった。Type 1 の組み合わせでは、差引によって得られる PSF のサイドローブが中心強度に対して 10% 程度発生するものの、PSF のサイズは 98 nm となった。一方で、Type 2 の組み合わせでは、PSF サイズが 110 nm となるが、サイドローブがほとんど発生しない条件があることがわかった。本条件において、通常の間偏光ガウスビームを用いた場合の PSF サイズは 160 nm 程度となるため、差引法によって大幅な空間分解能の向上が期待できることがわかった。

(2) 差引法による空間分解能向上効果の実験的検証

数値計算による検討結果に基づいて、ベクトルビームを用いた共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡光学系を構築し、実証実験を行った。反射型空間光変調器および透過型液晶 12 分割波長板素子を用いて、多重リング状強度分布を持つ高次横モードの径偏光および方位偏光を発生させ、それぞれのモードで共焦点画像を取得した上で画像の差引を行った。孤立した 40 nm の蛍光ビーズ像を取得すると、各ビームを用いた場合の差引によって得られる点像分布関数を計測した。その結果、Type 1 および Type 2 のそれぞれの組み合わせについて、理論計算とほぼ一致する強度プロファイルが得られ、空間分解能の指標である PSF サイズはそれぞれ 96 nm および 112 nm となった。このような差引条件において、直径 200 nm の凝集した蛍光ビーズを観察した。図 2 に示すように、差引法を用いない従来の共焦点レーザー顕微鏡画像では空間分解能が不足するため、個々のビーズを判別することができない一方で、Type 1 および Type 2 の差引法を適用した場合には、個々のビーズを明瞭に区別することができ、空間分解能の向上効果を示すことに成功した。しかしながら、Type

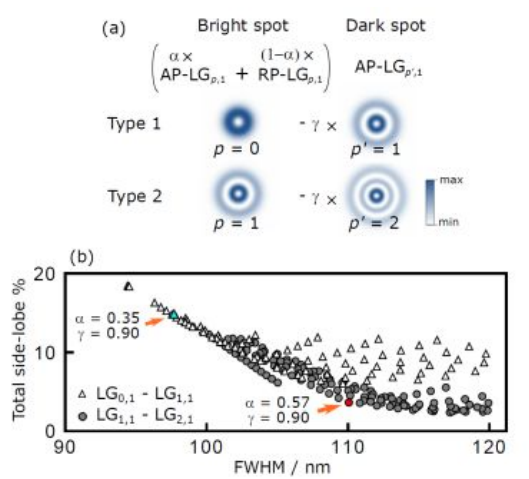


図 1. (a)差引法に適したベクトルビーム(AP:方位偏光, RP:径偏光)モードの組み合わせ。(b)各組み合わせでの差引によって得られる PSF のサイズおよびサイドローブ強度の関係を表す分布図。

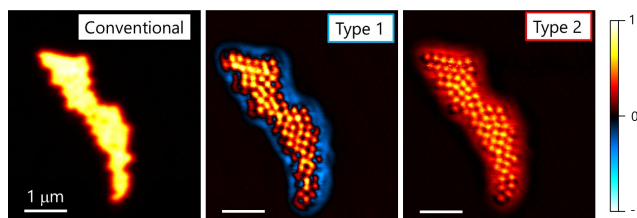


図 2. 凝集した蛍光ビーズ(直径 200 nm)の観察結果。通常の間偏光レーザー顕微鏡像(Conventional)および差引法(Type 1, Type 2)を用いた場合。

1の差引ではPSFに残存する負のサイドローブに起因して、粒子画像の周囲に負の値が強く発生した。また、より複雑な構造を持つ生体試料の観察を試みたところ、Type 1に比べてType 2の差引の方が画像品質の劣化を抑えながら空間分解能の向上が可能となる結果も得られた。この点に関して、数値計算に基づく詳細な検討を進めたところ、複雑な構造や分布を持つ試料の画像に対して差引法を適用する場合には、差引後のPSFに生ずる負のサイドローブを極力低減するような集光スポットの設計が極めて重要であることがわかった。

(3) スーパーオシレーション集光によるさらなる高空間分解能化に関する検討

多重リング状強度分布を持つ高次径偏光ビームは、強く集光した場合の集光スポット(ブライトスポット)が通常の直線偏光や円偏光ビームを集光するよりも小さくなる微小集光スポット特性を有する。さらに、研究代表者らのグループのこれまでの検討から、レンズに入射する高次径偏光ビームのサイズを精密に調整すると、スーパーオシレーションと呼ばれる特異な集光状態が発生し、焦点中央には従来よりも遥かに小さい集光スポットを形成することを見出している。本研究期間内では、この高次径偏光ビームのスーパーオシレーション特性について、実験および数値計算の両面からより詳細に検討し、その発生機構や生成条件を明らかにすると共に、共焦点レーザー顕微鏡へ適用することでスーパーオシレーション特性に基づく空間分解能の向上効果を示すことに初めて成功した。図3の数値シミュレーション結果が示すように、焦点においてスーパーオシレーションによる集光スポットを形成すると、共焦点レーザー顕微鏡でのPSF(ブライトスポット)サイズをさらに小さくすることができる。径偏光ビームによるスーパーオシレーション特性の解明で得られた知見に基づき、本特性を方位偏光ビームに適用することで、ダークスポット状PSFのサイズをさらに微小化することは容易に達成可能であると考えられる。今後のさらなる研究の推進によって、差引法とスーパーオシレーション集光を融合した、ベクトルビーム共焦点レーザー顕微鏡法における空間分解能を極限まで高めたイメージングが実現するものと期待される。

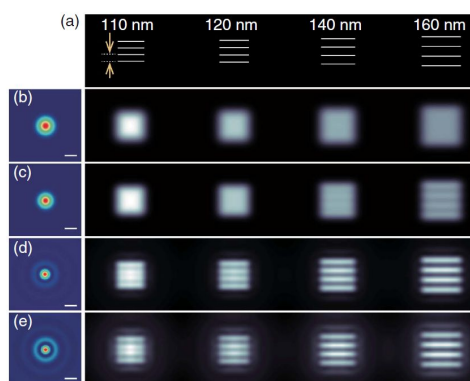


図3. スーパーオシレーション集光に基づく共焦点レーザー顕微鏡PSF(左列)と線物体(1行目)に対するイメージングシミュレーション結果。2行目は通常の円偏光ビームを用いた場合。3-5行目は高次径偏光ビームに対してスーパーオシレーション状態を徐々に発生させた場合。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5件)

- 1) Mio Yoshida, Yuichi Kozawa, Shunichi Sato, "Subtraction imaging by the combination of higher-order vector beams for enhanced spatial resolution," *Optics Letters* 44, 883-886 (2019). (査読有) DOI:10.1364/OL.44.000883
- 2) Yuichi Kozawa, Yuki Nara, Naoto Jikutani, Yasuhiro Higashi, Shunichi Sato, "Vector beam generation from vertical cavity surface emitting lasers," *Optics Letters* 43, 5659-5662 (2018). (査読有) DOI:10.1364/OL.43.005659
- 3) Yuichi Kozawa, Daichi Matsunaga, Shunichi Sato, "Superresolution imaging via superoscillation focusing of a radially polarized beam," *Optica* 5, 86-92 (2018). (査読有) DOI:10.1364/OPTICA.5.000086
- 4) Shugo Matsusaka, Yuichi Kozawa, Shunichi Sato, "Micro-hole drilling by tightly focused vector beams," *Optics Letters* 43, 1542-1545 (2018). (査読有) DOI:10.1364/OL.43.001542
- 5) 小澤 祐市, 阪下 良太, 佐藤 俊一, "高次径偏光ビームの軸方向電場を用いた共焦点イメージング," *光アライアンス* 28, 16-20 (2017). (査読無)

[学会発表](計 29件)

- 1) 小澤 祐市, 佐藤 俊一, "光波の強度・偏光・位相の空間分布制御と光マニピュレーション応用," 第66回応用物理学会春季学術講演会, (2019). (招待講演)
- 2) 吉田 実生, 小澤 祐市, 佐藤 俊一, "高次ベクトルビームを用いた差引イメージングの生体試料への適用," 第66回応用物理学会春季学術講演会, (2019).
- 3) Yuichi Kozawa, Shunichi Sato, "Spatial resolution enhancement in laser scanning microscopy using vector beams," The 4th Biomedical Imaging and Sensing Conference 2018 (BISC2018), (2018). (招待講演)
- 4) 小澤 祐市, 佐藤 俊一, "ベクトルビームにおける振幅・偏光・位相の空間分布制御と光イ

メージング応用,” Optics & Photonics Japan 2017, (2017). (招待講演)

5) Yuichi Kozawa, Daichi Matsunaga, Shunichi Sato, “Enhanced Spatial Resolution by Subtraction Imaging Using Higher-Order Vector Beams,” Focus on Microscopy (FOM2017), (2017).

6) 小澤 祐市, “レーザー光の強度・偏光・位相の空間分布制御と応用,” 日本顕微鏡学会 様々なイメージング技術研究部会 第4回研究会, (2016). (招待講演)

他 23 件

〔図書〕(計 1 件)

1) Kohei Otomo, Terumasa Hibi, Yuichi Kozawa, Sari Ipponjima, Shunichi Sato, Tomomi Nemoto, CRC Press, “Super-Resolution Two-Photon Excitation Microscopy Utilizing Transmissive Liquid Crystal Devices” (Super-Resolution Imaging in Biomedicine, Chapter 10), (2016), 189-217.

〔その他〕

ホームページ等

<http://satolab.tagen.tohoku.ac.jp/>

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：佐藤 俊一

ローマ字氏名：Sato Shunichi

研究協力者氏名：根本 知己

ローマ字氏名：Nemoto Tomomi

研究協力者氏名：石井 宏和

ローマ字氏名：Ishi Hirokazu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。