

平成 30 年 7 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14020

研究課題名(和文) 超解像顕微鏡のための多波長周期照明技術の開発

研究課題名(英文) development of multi-wavelength periodic illumination technique for super-resolution microscopy

研究代表者

中田 芳樹 (Yoshiki, Nakata)

大阪大学・レーザーエネルギー学研究中心・准教授

研究者番号：70291523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではSTED超解像顕微鏡と構造化照明顕微鏡を融合する基盤技術を開発する。まず、2波長同軸レーザー(=405nm&488nm)を構築し、透過型回折格子とフーリエ光学系を用いて周期=126.0μmの干渉パターンを形成した。さらに波長分散を利用した2波長干渉パターンの相対位置制御に成功した。次に、顕微鏡下干渉パターンの迷光を排除するために2段構成のFourier光学系を構成した。その上で顕微鏡下の干渉パターン測定、蛍光微粒子の観測を行った。

研究成果の概要(英文)：In this experiment, the base technologies to combine STED super-resolution microscope and SIM microscope were developed. First, co-axial laser (=405nm & 488nm) was composed, then interference patterns at these wavelength with the same period =126.0 micron was formed by a diffractive optical element and a Fourier optics. Second, the relative position of these interference patterns were controlled by means of wavelength dispersion of a glass plane. Third, double stage Fourier transfer systems was composed to avoid stray light. Then, interference patterns and images of fluorescent particles were imaged by the microscope with structured illumination.

研究分野：レーザー工学

キーワード：超解像顕微鏡 STED顕微鏡 構造化照明顕微鏡 干渉 位相 励起 脱励起 レーザー

1. 研究開始当初の背景

①本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ

近年、回折限界を超えた分解能を持つ超解像顕微鏡が注目されている。その一つである STED (Stimulated Emission Depletion) 超解像顕微鏡は[1]、励起光に対してドーナツ状の空間分布を持つ STED 光 (脱励起光) を重ねることで蛍光スポットを縮小し、超解像を達成する。従来は 1 点測定のスキャンで画像を構築するために測定時間が長く、またドーズが大きいために光毒性やフォトブリーチングなどが起こる。一方、構造化照明顕微鏡 (Structured Illumination Microscope : SIM) はパターンニング照明によるモアレを撮像することで高い空間周波数領域の情報を得る手法であり[2]、測定時間が短いという特徴がある。

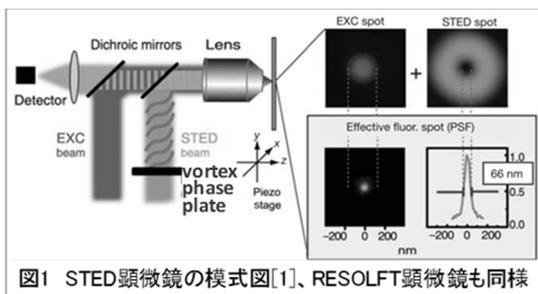


図1 STED顕微鏡の模式図[1]、RESOLF顕微鏡も同様

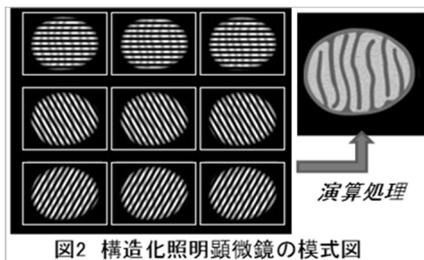


図2 構造化照明顕微鏡の模式図

②これまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯

応募者は 2000 年から独自のレーザー干渉パターン制御に関する研究をおこなった[3]、[4]。透過型回折格子(DOE)と縮小光学系(フーリエ光学系)を組み合わせた干渉光学系を用いると(i)異なる波長であっても同一周期の干渉パターンを持ち、(ii)干渉するビーム間に $\pi$ の位相差を与えると位置が半周期移動し(図 3(a)(b))、さらに強度制御で自在なパターンが形成できる(図 3(c))。これらの原理を利用し、2 波長の干渉パターンを半周期ずらして重複する事で干渉パターン状の STED 測定が可能となり、さらに SIM と同じ画像演算処理をおこなう事で「SIM-STED 顕微鏡」が構築できると着想した。

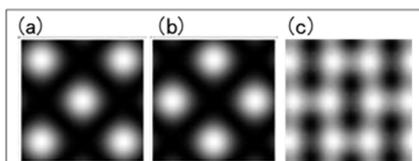


図3 4ビーム干渉パターンの制御例

2. 研究の目的

本研究では STED 超解像顕微鏡と SIM の技術を融合させ、両者の特徴を合わせ持った SIM-STED 超解像顕微鏡の基盤技術を開発する。励起光と STED 光が半周期ずれたパターン照明を構築し、それらの相対位置を制御する技術を開発した。これを用い、顕微鏡下干渉パターン測定及び蛍光微粒子測定を行った。

3. 研究の方法

①これまでに開発した干渉パターン制御技術を活用し、2 波長同時干渉パターン生成装置を開発する。励起レーザーと蛍光オフレーザーからなる 2 波長同軸レーザー発生装置を開発し、2 波長用に設計された透過型回折格子と縮小光学系を用いて干渉パターン生成をおこなう。

②位相シフト板で干渉パターンの位置制御をおこない、2 波長干渉パターンの相対位置が半周期シフトした 2 波長構造化照明技術を開発する。これを用いて蛍光微粒子等の試料を測定する。

4. 研究成果

①干渉パターンの形成実験をおこなった。実験装置の模式図と写真を図 3 に示す。2 波長同軸レーザー ( $\lambda_{pump}=405nm$ ,  $\lambda_{STED}=488nm$ ) を透過型回折格子に入射し、拡大光学系による相関で形成される 2 ビーム干渉パターンを CMOS カメラで撮像した。また光路中に平行平板を挿入し、光路差が波長と入射角の関数であることを利用し、干渉パターンを半周期シフトすることを試みた。図 4 は干渉パターンの顕微鏡外測定例である。周期  $\Delta=126.0\mu m$  の干渉パターンが形成された。

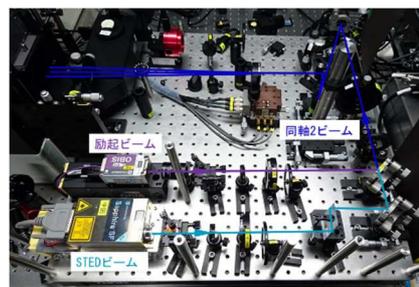
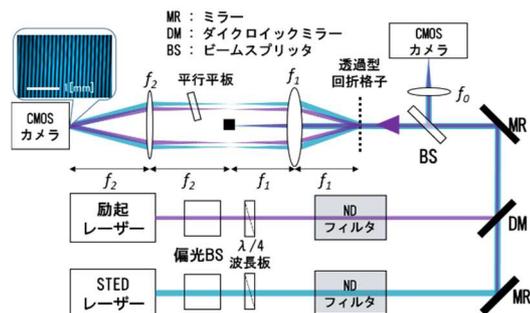


図 3 干渉パターン位置制御装置の模式図及び写真

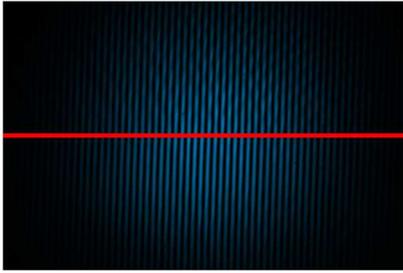


図4 干渉パターンの測定例( $\lambda = 405\text{nm}$ )

②2 波長干渉パターンの相対位置制御実験を行った。平行平板への入射角 $\theta$ による2波長干渉パターンの移動と相対的な位置の差を調べた。まず、干渉パターン画像の中心を通るx方向の光強度分布(図4赤ライン)を波長及び $\theta$ ごとに求めた(例:図5)。グラフからピーク位置の $\theta$ に対する変化を波長ごとに求め、それらを互いに差し引いた値の絶対値を $\Delta\pi$ で割った値をプロットした(図6)。これより、 $\theta = 3.36^\circ$ で干渉パターンを半周期ずらす事に成功した。ここで、平行平板による2波長間の位相差 $\Delta\phi$ は次の2式で計算され、これから計算される理論曲線と実験結果は良く一致した。 $n(\lambda)$ は屈折率である。

$$\phi(\theta, \lambda) = \frac{2\pi}{\lambda} l \left( \sqrt{n(\lambda)^2 - \sin^2(\theta(\lambda))} - \cos(\theta(\lambda)) \right) \quad (1)$$

$$\Delta\phi(\theta) = \phi(405\text{nm}, \theta) - \phi(488\text{nm}, \theta) \quad (2)$$

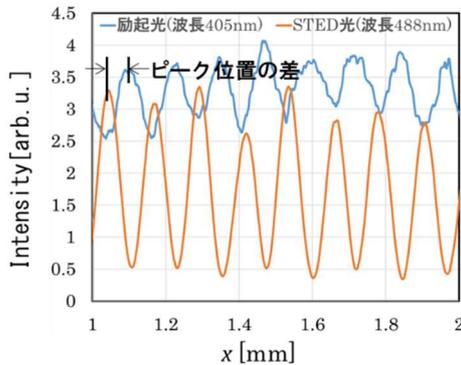


図5 2波長の干渉パターンにおけるx方向の光強度分布の例

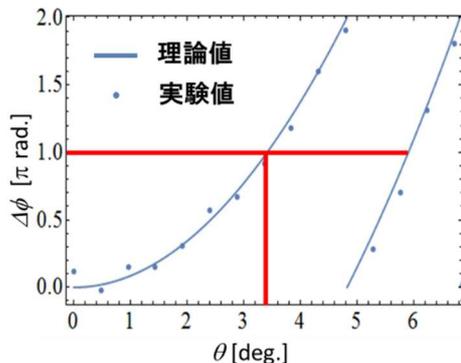


図6 平行平板の挿入角度 $\theta$ に対する2波長間の位相差

## ②像転送光学系の多段構築

図3で対物レンズを使ったフーリエ光学系を構成し、顕微鏡下の観察位置で干渉パターンを形成したところ、不要な回折光の重複及び2次以上の回折光が入る不具合が生じた(迷光)。そこで装置設計を見直した。像転送光学系の2段目を増設することで、1段目のフーリエ面で1次回折光同士の距離が $1.6\text{mm}$ 確保され、明確な分離が可能となった(図7)。

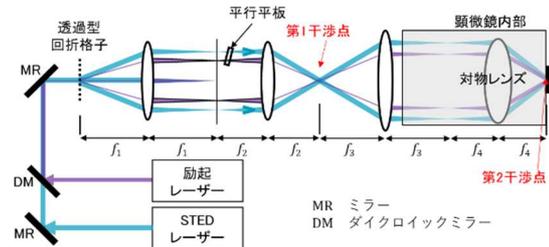


図7 像転送光学系の多段構成

図8は顕微鏡下で撮影した2ビーム干渉パターンの例である。波長 $\lambda = 488\text{nm}$ で0次光と1次回折光を用いており、周期 $\Lambda = 26.9\mu\text{m}$ の干渉パターンが形成された。

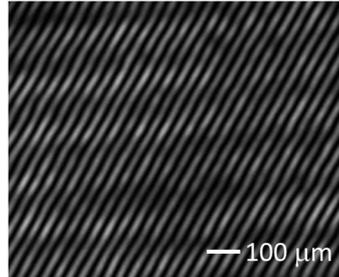


図8 顕微鏡下干渉パターン

図9は $\lambda = 488\text{nm}$ の干渉パターンで励起し、ダイクロイックミラーを通して測定した蛍光微粒子の観測例である。 $D = 200\text{nm}$ の微粒子像が得られた。

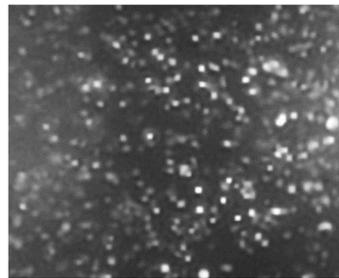


図9 蛍光微粒子測定例

## 5. 主な発表論文等

〔図書〕(計1件)

斎藤哲也、学士学位論文「パターンニング照明を利用したSTED超解像顕微鏡に関する研究」2017年3月

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.ile.osaka-u.ac.jp/research/lcc/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中田 芳樹 (NAKATA, Yoshiki)  
大阪大学・レーザー科学研究所・准教授  
研究者番号：70291523

### (3) 研究協力者

斉藤 哲也 (SAITO, Tetsuya)  
大阪大学・大学院工学研究科・修士課程2年

## 参考論文

- [1] K. I. Willig, S. O. Rizzoli, V. Westphal, R. Jahn, and S. W. Hell, “STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis.,” *Nature*, vol. 440, no. 7086, pp. 935-939, 2006.
- [2] M. G. Gustafsson, “Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy.,” *J. Microsc.*, vol. 198, no. Pt 2, pp. 82-87, 2000.
- [3] Y. Nakata, K. Murakawa, K. Sonoda, K. Momoo, N. Miyanaga, and T. Hiromoto, “Designing of interference pattern in ultra-short pulse laser processing,” *Appl. Phys. A*, vol. 112, pp. 191-196, 2012.
- [4] Y. Nakata, T. Hiromoto, and N. Miyanaga, “Mesoscopic nanomaterials generated by interfering femtosecond laser processing,” *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.*, vol. 101, no. 3, pp. 471-474, 2010.