

研究種目：基盤研究（C）（一般）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18560028
 研究課題名（和文） 全反射蛍光顕微鏡法の像特性改善：走査型光学系の導入と偏光最適化
 研究課題名（英文） Development of a total internal reflection fluorescence microscope with improved imaging properties by using scanning optics and optimized polarization
 研究代表者
 加野 裕 （KANO HIROSHI）
 室蘭工業大学・工学部・准教授
 研究者番号：80322874

研究成果の概要：これまで生体分子間相互作用を観察する手法として、全反射蛍光顕微鏡法が広く用いられてきた。この方法では、他の測定法では得ることができない低いバックグラウンドを実現するものの、単一分子蛍光の測定などでは信号光が極端に弱いため、バックグラウンドのさらなる低下が期待されていた。本研究では、バックグラウンドの低減に有効な走査型コンフォーカル光学系を導入した際に生じる像特性の劣化を、偏光走査によって改善することに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	450,000	3,250,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎 ・ 応用光学・量子光工学

キーワード：蛍光顕微鏡，放射状偏光，

1. 研究開始当初の背景

生体分子間相互作用を観察する手法として、全反射蛍光顕微鏡法が広く用いられている。この測定法（図1）では、ガラス基板に対して臨界角以上の角度で入射させた励起光が、基板表面に生成するエバネッセント場で、基板表面近傍にある蛍光分子を発光させ、基板表面と結像関係の位置に置いた2次元検出器でその像を得る。分子の励起にエバネッセント場が用いられるため、基板表面から離れた場所に存在する蛍光分子は励起されず、バックグラウンドの低い蛍光像が得られる。全

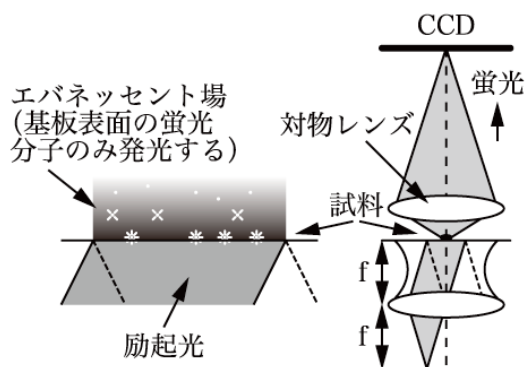


図1

反射蛍光顕微鏡法は、単一分子の運動を追跡するなどの目的に不可欠な測定法となっており、大きな成果を上げている。

全反射蛍光顕微鏡法は、他の測定法では得ることができない低いバックグラウンドを実現するものの、現状では、検出器の熱雑音をはじめさまざまな要因による雑音が像に混入している。特に、単一分子蛍光の測定では信号光が極端に弱いため信号対雑音比が低く、測定には熟練を要する。本研究では、光学系に起因する雑音を低減し、これまで雑音に埋もれていた情報の抽出をより容易にすることを目的として、新規光計測技術の開発を行うこととした。

2. 研究の目的

従来の全反射蛍光顕微鏡法において広く用いられている光学系は、光源にレーザーを用い、ビームを拡大し平面波でガラス基板へ入射させる方式である。そのため、観察像にはスペックルパターンが重畳する。物体を平面波で照明したときに生じるスペックルパターンを除去するには、レーザー光を集束させて試料を照明し、集光スポットを走査する光学系が有用であることが知られている。そこで、走査型光学系を有する全反射蛍光顕微鏡（図2）の開発に取り組んだ。また、走査型光学系は点検出器との組み合わせである、コンフォーカル光学系として導入すると、迷光が低減され、一様照明光学系に比べバックグラウンドのさらなる低下も期待でき、さらに、レーザー光を局所領域に集光すると、集光スポットでは高い光子密度を得ることができるため、2光子励起蛍光法など非線形光学現象も利用することができる。2光子励起蛍光法では、蛍光発光強度が励起光強度の2乗に比例するため、集光スポット以外からの蛍光発光がほとんど生じないため、バックグラウンドのさらなる低下を期待できる。そこで、

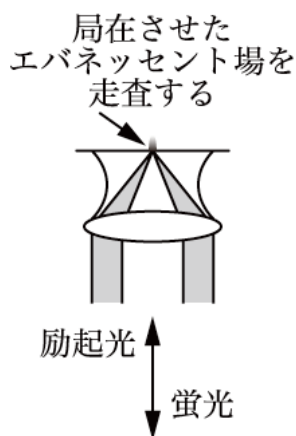


図2

本研究ではバックグラウンド低減の実現を目的として、走査型コンフォーカル全反射蛍光顕微鏡の開発を行った。

3. 研究の方法

本研究では、光学系の開発に当たって、局所領域における表面プラズモンの光励起を実現するために研究代表者が独自に考案した光学系 [H. Kano, S. Mizuguchi, and S. Kawata, "Excitation of surface-plasmon polaritons by a focused laser beam," J. Opt. Soc. Am. B **15**, 4 1381-1386 (1998)] の基本的な原理を全反射蛍光法に展開する方法を用いた。研究代表者の考案した光学系の基本的な原理とは、油浸対物レンズのように開口数の高い対物レンズを用いて低屈折率誘電体に接したカバーガラスの表面に光を集光することにより、顕微領域に限定的にエバネッセント場を生成するというものである。この手法を全反射蛍光法において展開する提案は既に報告されており [J. W. M. Chon and M. Gu, "Scanning total internal reflection fluorescence microscopy under one-photon and two-photon excitation: image formation," Appl. Opt. **43**, 5, 1063-1071 (2004)], この報告では、照明光学系の基本的な原理が踏襲され、さらにエバネッセント場が照射される分子による蛍光発光を検出する系を構築している。本研究における装置開発においても基本的な原理を踏襲しつつ、これをさらに発展させることとした。また、研究代表者は、顕微領域に限定的にエバネッセント場を生成する手法を開発する過程で励起光の偏光状態の制御が重要であることを見出し、その制御方法を開発していた。本研究では、そこで得られた成果を採り入れることとした。一般的な一様媒質中への集光と異なり、全反射のプロセスを含む集光光学系では、透過側媒質中で境界面に垂直な方向に振動する電場成分が増強される作用があるため、光軸方向の振動成分が支配的となる。一様媒質への集光では対物レンズの入射瞳に直線偏光の平面波を入射させると光軸を中心にほぼ回折限界に近いスポットが形成されるのに対し、全反射のプロセスを含む集光光学系では、光軸に到達する波面成分は光軸方向に振動する電場成分が互いに打ち消すように重なり合い（ディストラクティブな干渉）、光軸を対称に2つのピークを形成する（図3）。そして、この2つのピークは回折限界スポットのほぼ2倍の大きさを占める。この結果は顕微鏡の点像分布関数にそのまま反映されるため、光学的空間分解能はおよそ半分程度に低下する。単一分子蛍光の測定を想定すると、この結果は蛍光検出効率が著しく悪化することを意味し、大

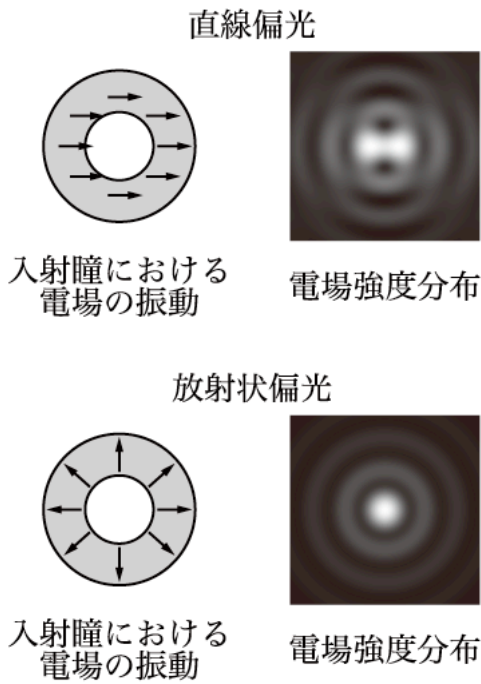


図 3

きな問題になることが予想できた。そこで本研究では、入射偏光の最適化による像特性の改善に取り組んだ。

4. 研究成果

本研究では始めに走査型全反射蛍光顕微鏡装置の試作と性能検証を行った。試作装置では、全反射照明を行う励起光学系に、アキシコンプリズムペアを用いて、透過光の発生を抑制しつつ対物レンズの入射瞳の中心部分に光が入射しないように、円環状の強度分布をもつ光を発生させるよう工夫を行った。これにより、遮蔽板を用いる従来法に比べ、光の利用効率を大幅に高めることができた。その結果、2光子励起蛍光法の利用に十分な光量を確保することができた。この円環状の強度分布をもつ光を対物レンズの入射瞳に導入し、ガラス基板表面にエバネッセント場として局在するスポットを形成させる光学系を構成した。検出系には、迷光を除去する効果を期待し、コンフォーカル系を構成するオプションを用意した。これは、検出器への導入部に設ける光ファイバーのコア径を、いくつかの大きさから選択できるようにすることで実現した。検出器には、微弱蛍光を捉えるために、量子効率の高いアバランシェフォトダイオード (APD) を用い、マルチチャンネルスケラーで光子を計数する系を構成した。

続いて、試作した装置の性能検証として、蛍光ラテックス微小球のイメージングを行った。ノンコンフォーカル系を用いて、集光ス

ポットに比べ十分小さい微小球 (直径 200nm 程度) を測定することにより、装置の点像分布関数を確認したところ、点像分布関数が 2つのピークから形成され、それぞれがおおよそ 400nm 離れていることを確認した。この特徴は、理論計算に一致していた。他に、コンフォーカル系を用いて、同様に理論計算と一致する結果を得た。

引き続き、走査型全反射蛍光顕微鏡の照明系に与える偏光を最適化することで、顕微鏡像特性の改善に取り組んだ。

理論解析より、走査型全反射蛍光顕微鏡では、放射状偏光を照明系に与えると、点像分布関数がシングルピークを形成し、かつその半値全幅が最少化されるので、その実現を図った。放射状偏光を生成するデバイスとして、液晶セルを利用した。この液晶セルは、片側に同心円状の、もう一方に直線状のラビングパターンを施した基板を用いて組み立てられており、これに左右対称偏光を入射させることで放射状偏光を生成することができる。左右対称偏光の生成には、左右で膜厚が異なる誘電体膜をコートしたガラス基板を用いた。膜厚は、励起光の波長 (830nm) において、位相差 π を与えるように設計した。この素子が、近赤外フェムト秒パルスレーザー光に対して適正に動作することを確認した後、顕微鏡照明系に組み込んだ。

試作した顕微鏡装置で、カバーガラス上に分散させた直径 200nm の蛍光ラテックス微小球を観察したところ、シングルピークの像を得ることができた。偏光操作素子を用いない場合 (直線偏光照明)、同じ微小球の像が 2つのピークを持ち、大きさがほぼ 2倍であった。また、像の明るさを比較したところ、放射状偏光を用いる場合の像がおおよそ 4倍明るいことを確認した。

以上より、偏光最適化による像特性改善を

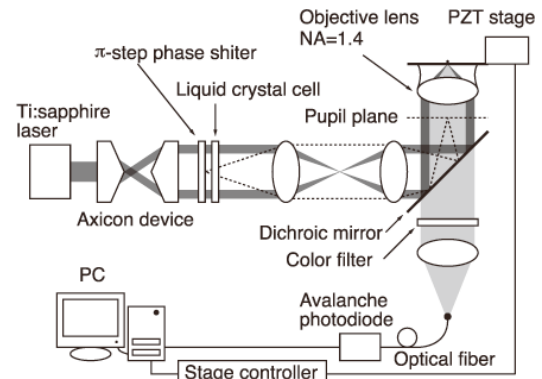


図 4

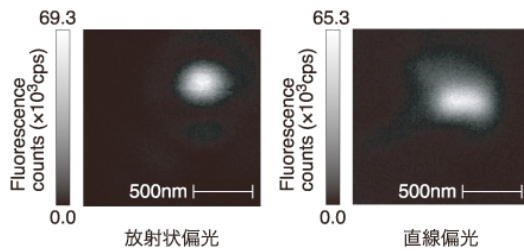


図 5

実験的に確認できた。

さらに、走査型全反射蛍光顕微鏡の照明系にビーム走査方式を導入し、観察領域の拡大と走査速度の向上を試みた。照明光が輪帯状に分布しているため、入射瞳の結像面に走査ミラーを配置する光学系を用いる必要があり、テレセントリック光学系で対物レンズの瞳面を結像し、ここに走査ミラーを配置した。試作した光学系では、 $50\mu\text{m}$ の範囲を走査するために求められるミラーの傾きは ± 0.3 度程度であったため、収差による像特性劣化は無視できる範囲に収まることが、理論計算で確認できた。実際に、2次元走査の速い走査軸には走査ミラーを用い、遅い走査軸には走査ステージを用いて、ラテックス微小球を観察し、両軸とも走査ステージを用いた場合と比較した結果、像特性が劣化しないことを確認した。なお、 128 点 $\times 128$ 点の画像取得に要する時間は2分程度であった。

また、コンフォーカル検出光学系を用いた場合に生じる、検出器の大きさと空間分解能と像の明るさについて、実験的な検証を行った。実験では、励起光スポットと光学的に共役な位置に、コア径の異なる光ファイバーのコアを順次配置して、これらの光ファイバーを通してアバランシェフォトダイオードへ導かれる蛍光を計数した。これにより実効的な検出器の大きさを変化させながら、蛍光微小球（直径 200nm ）を観察した。その結果、検出器の大きさが蛍光波長と対物レンズの開口数で決まるエアリーディスクの直径と同程度になるまでは、蛍光像の大きさはほとんど変化無く、明るさが増し、エアリーディスクの直径の2倍程度までは、明るさはほぼ変わらず、大きさが1.6倍程度までしだいに大きくなり、それ以上ではほとんど変化しないという結果を得た。

さらに、表面プラズモンを利用した蛍光増強についても検討を行い、アキシコン素子とフーリエ変換レンズで生成した輪帯は、増強効果をもたらすのに十分細いことを確認した。

以上、本研究では、従来の全反射蛍光顕微鏡法に比べバックグラウンドノイズを低減す

る光学系の導入に際し、初めて理論限界に相当する空間分解能を実現した。本研究の成果は、生体分子間相互作用観察や生体膜観察などで活用されることが期待される。

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)

- ① Goro Terakado, Kouyou Watanabe, and Hiroshi Kano, Scanning confocal total internal reflection fluorescence microscopy by using radial polarization in the illumination system, Applied Optics, Vol. 48, 1114-1118 (2009), 査読有り

[学会発表] (計5件)

- ① Hiroshi Kano, Simultaneous imaging of refractive index and fluorescent intensity distributions using a localized surface plasmon microscope, Joint Seminar on Environmental Science and Disaster Mitigation Research 2009 (JSED 2009), 10 Mar. 2009, Muroran, Japan.
- ② 加野 裕, 局所励起表面プラズモン顕微鏡による屈折率/蛍光分布の同時イメージング, 第69回応用物理学学会学術講演会, 2008年9月3日, 春日井市
- ③ Hiroshi Kano, Improved Imaging Property of the Scanning Total Internal Reflection Fluorescence Microscope by the use of Optimally Polarized Illumination, Optical Society of America, Topical meeting Biomedical Optics 2008, Mar. 2008, St. Petersburg, Florida, USA.
- ④ Hiroshi Kano, Development of a scanning total internal fluorescence microscope with a confocal detection system, Joint Seminar on Environmental Science and Disaster Mitigation Research 2008 (JSED 2008), 4 Mar. 2008, Muroran, Japan.
- ⑤ 加野 裕, 走査型全反射蛍光顕微鏡法における励起光偏光最適化, 第68回応用物理学学会学術講演会, 2007年9月5日, 札幌市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加野 裕 (KANO HIROSHI)

室蘭工業大学・工学部・准教授

研究者番号: 80322874