

反射型ビームスプリッターを用いた干渉時空間集光顕微鏡

磯部圭佑¹，竹田貴紀^{1,2}，望月恭平^{1,2}，須田 亮²，河野弘幸³，宮脇敦史³，緑川克美¹

¹理研 基幹研究所 緑川レーザー物理工学研究室，²東理大 理工，³理研 脳科学総合研究センター細胞機能探索技術開発チーム

1. はじめに

2光子蛍光顕微鏡は散乱の大きな生体試料の深部を観察するための重要な技術となっている¹⁾。しかしながら、それでもなお、集光点以外で発生する背景光によって観察可能な深さが制限されている。また、時空間集光技術を2光子蛍光顕微鏡へ応用することにより、レーザー走査を行うことなく断層像を2次元検出器で取得することが可能となる²⁾。そのため、画像取得時間を短くすることが可能である。しかし、試料内部で散乱した蛍光が、2次元検出器に結像されずに拡散して背景光となるため、レーザー走査型の2光子蛍光顕微鏡に比べ観察可能な深さは浅くなる。最近我々は集光点以外で発生する背景光を抑制するための技術として、干渉時空間集光技術を提案している。本年度は、干渉信号を安定させるために、マイケルソン干渉計を反射型ビームスプリッターに置き換えた。

2. 干渉時空間集光

時空間集光技術では分光された超短光パルスを対物レンズで試料内部へと集光する。このとき、焦点面に近づくほど空間的に重なっているスペクトル幅が広がり、焦点面でのみ全てのスペクトル成分が空間的に重なる。すなわち、焦点面に近づくほどパルス幅が短くなり、焦点面でパルス幅が最も短く、ピーク強度が高くなる。そのため、2光子蛍光が発生する領域を焦点面近傍に局所化できる。

干渉時空間集光技術では、回折格子により分光された2つの時空間集光ビームを対物レンズの焦点面付近でのみ干渉させる。干渉信号が現れるのは焦点面近傍のみであるため、干渉成分を抽出することによって焦点面以外で発生する背景光を抑制できる。このとき、蛍光像には干渉縞が含まれるため、蛍光像から干渉成分を抽出するだけでなく、縞情報を除去する必要もある。2つの時空間集光ビームの位相差を $2\pi/5$ ずつ変化させ得られる5つの2光子蛍光像から、干渉成分を抽出し、干渉縞を除去した2光子蛍光像を取得する。このとき、ビーム間の位相差が揺らぐと、5つの干渉像から抽出する2光子蛍光像の信号対雑音比が低下する。そのため、安定なビーム間の位相制御が必要となる。

ビーム間の位相差を安定に制御するために、図1に示す反射型ビームスプリッターを用いた干渉時空間集光顕微鏡を構築した。光源には中心波長 1100 nm の光パラメトリック発振器(OPO)を用いた。時空間集光を確認するために、光軸方向におけるパルス幅を2次の干渉自己相関法により測定した。図2(a)に示すように焦点面に近づくほどパルス幅が短く、集光面において最もパルス幅が短くなることを確認した。また、2光子蛍光が発生する領域が焦点面近傍に局所化され、光軸方向の強度分布の半値全幅は 1.2 μm であった。干渉時空間集光顕微鏡における焦点面以外で発生する背景光強度を評価するために、直径 200 nm の蛍光ビーズの光軸方向に対する2光子蛍光強度分布を測定した。図2(b)に示すように、干渉時空間集光技術を用いることによって、焦点面以外で発生している蛍光（背景光）を抑制できていることがわかる。また、反射型ビームス

プリッターにより分割したビーム間距離 d を増加させることによって、背景光をより抑制できていることがわかる。

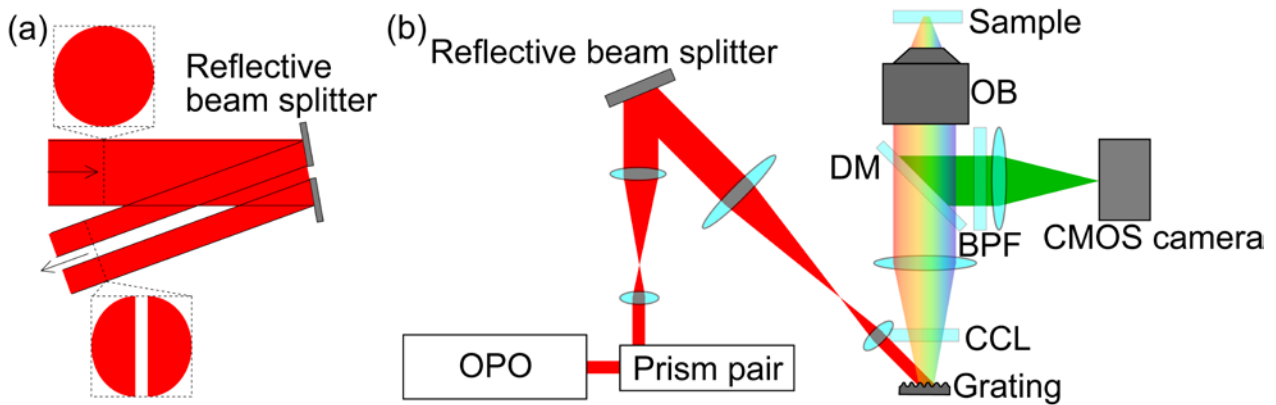


図 1. (a) 反射型ビームスプリッター. (b) 反射型ビームスプリッターを用いた干涉時空間集光顕微鏡. CCL: シリンドリカル凹レンズ, DM: ダイクロイックミラー, OB: 対物レンズ, BPF: バンドパスフィルター.

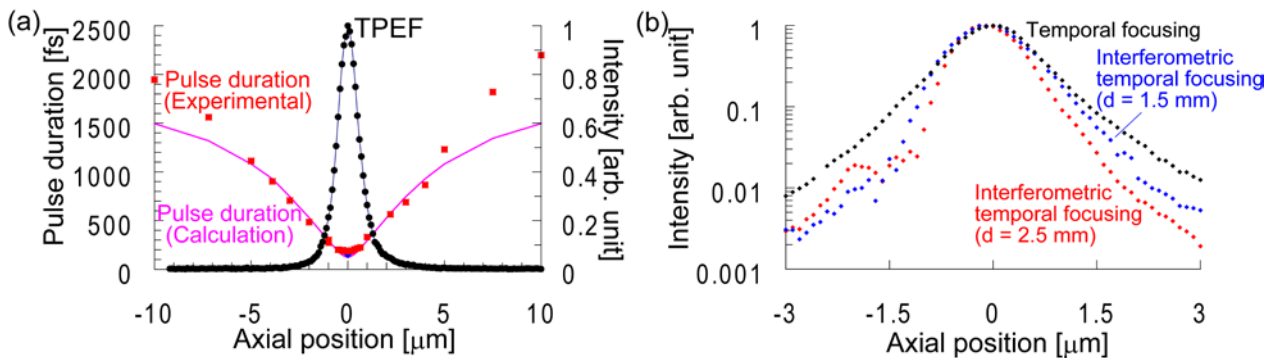


図 2. (a) 光軸方向に対するパルス幅と時空間集光顕微鏡によって測定した直径 200 nm の蛍光ビーズの光軸方向に対する 2 光子蛍光 (TPEF) 強度分布. (b) 干涉時空間集光顕微鏡によって測定した直径 200 nm の蛍光ビーズの光軸方向に対する 2 光子蛍光強度分布.

3. おわりに

干涉時空間集光技術によって、2 光子蛍光顕微鏡の焦点面以外で発生する背景光を抑制することに成功した。また、反射型ビームスプリッターにより分割したビーム間距離を増加させることによって背景光をさらに抑制できることがわかった。今後は、ビーム間距離をさらに増加させ、どこまで背景光を抑制できるか評価する予定である。また、干涉縞の空間周波数成分を利用して、空間分解能を向上できるかどうかにも検討する。

参考文献

1. P. Theer, M. T. Hasan, and W. Denk, Opt. Lett. **28**, 1022-1024 (2003).
2. D. Oron, E. Tal, and Y. Silberberg, Opt. Express **13**, 1468-1476 (2005).