

CARS 顕微鏡における検出器側ピンホールの効果

The effect on the pinhole of the detector side in CARS microscopy

阪大院基礎工 ○橋本守・井上桂吾・荒木勉

Graduate School of Engineering Science, Osaka University,

M. Hashimoto, K. Inoue. and T. Araki

mamoru@me.es.osaka-u.ac.jp

弱コントラスト時におけるCARS顕微鏡の光学伝達関数に対する検出器側ピンホールの効果を、数値計算によって調べた。その結果、励起側対物レンズのNAが観測側対物レンズのNAより等しいかあるいは大きいときには、検出器側ピンホールは結像特性にほとんど影響を与えないことが分かった。

【はじめに】

生命現象を研究する上では、細胞を構成するタンパク質分子の分子構造変化が、細胞の機能発現の源であるため、生体機構、機能と分子構造の関係等を、生体分子が実際に機能している場所で直接観測することが要求される。これまでの光学顕微鏡は像、すなわち形を見ることを主に目的としており、その定性能力（何があるのか、どういう具合に分子あるいはタンパク質は存在しているのか等）は、色素すなわち染色に負っていた。2光子励起蛍光顕微鏡や今日広く普及し始めた共焦点蛍光顕微鏡では、蛍光標識色素を通してでしか観測対象分子に関する情報を得ることができない。染色作業は複雑で時間がかかり、熟練を要する。また、染色自体が細胞に対して有害で、細胞の機能を損なう場合も多々ある。しかも、得られる情報は色素を通じた情報であり、実験環境によって影響を受ける場合がある。したがって、生きたままの細胞をその場で、非染色に、外部からの刺激に対するタンパク質分子の構造変化を観察する手法の開発が望まれる。

我々は、これらを解決できる手法として非線形ラマン散乱であるCARS（コヒーレントアンチストークスラマン散乱）を利用した顕微鏡を提案した[1]。CARSは、ラマン散乱分光の一種であるため、非染色に分子振動情報が得ることができ、分子種の同定、分子構造変化の測定、が可能であり、またアンチストークス分光であるため蛍光性の物質でも観測可能であるという特徴をもつ。これまで我々はその3次元光学特性を3次元OTF（光学伝達関数）および3次元CTF（コヒーレント伝達関数）の帯域を理論的に評価してきた。その結果、CARSは非線形光学現象であるため、CARS顕微鏡は、検出器側にピンホールを配置した場合およびピンホールを配置しない場合のいずれについても3次元分解能を持つことがわかり、また実験的にも奥行き分解能を持つことを示した[1-3]。今回は、弱コントラスト時のOTFについて、ピンホールの影響を数値計算によって検討したのでその結果について報告する。

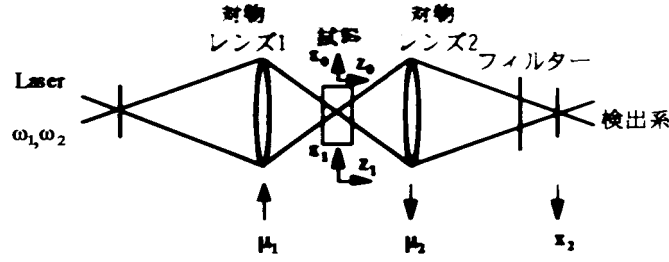


図1 CARS顕微鏡の光学配置

【理論】

ω_1 と ω_2 の二つの周波数の光（以下 ω_1 光、 ω_2 光と呼ぶ）を物質に入射したときに、 ω_1 光、 ω_2 光の周波数差が分子のラマン活性な振動の周波数と一致すると、誘導ラマン散乱によって $2\omega_1 - \omega_2$ のアンチストークス光が放出される現象をCARSと言う。図1にCARS顕微鏡の光学配置を示す。2台のレーザーからの ω_1 、 ω_2 光は同軸上に重ねられ、対物レンズ1で試料中に集光される。誘起されるCARS分極は

$$P_{CARS} = \chi^{(3)} E_1 E_2^* \quad (1)$$

で表され、電場強度が極めて高い対物レンズ1の焦点付近でのみCARS光が発生し、このCARS光を対物レンズ2によって検出器へと導く。ここで、 $\chi^{(3)}$ は3次の非線形感受率、 E_1 、 E_2 は ω_1 光、 ω_2 光の電場を表す。

物質が弱コントラストの場合、すなわち試料全体にわたって観測対象分子が分布しており、その濃度が局所的にわずかに変化している場合、3次の非線形感受率の空間分布 $\chi^{(3)}(\mathbf{x}, z)$ はその平均値 $\overline{\chi^{(3)}}$ を用いて、

$$\chi^{(3)}(\mathbf{x}, z) = \overline{\chi^{(3)}} \{1 + b(\mathbf{x}, z)\} \quad (2)$$

と表すことができる。ここで、 $1 \gg |b(\mathbf{x}, z)|^2$ であり、 \mathbf{x} は面内方向を、 z は奥行き方向を（光軸に平行な方向）を表す。

このとき、検出器側にピンホールを置いた場合のCARS顕微鏡のOTFは、

$$OTF_{CF}(\boldsymbol{\mu}, \eta) = G(0, \boldsymbol{\mu}, \eta) + G^*(0, -\boldsymbol{\mu}, -\eta) \quad (3)$$

で、表される。ここで、

$$\begin{aligned} G(0, \boldsymbol{\mu}, \eta) &= \iint E^*(\boldsymbol{\mu}', \eta') H_3^*(\boldsymbol{\mu}', \eta') d^2 \boldsymbol{\mu}' d\eta' C(0, \boldsymbol{\mu}, \eta) \\ &= \left\{ \iint E^*(\boldsymbol{\mu}', \eta') H_3^*(\boldsymbol{\mu}', \eta') d^2 \boldsymbol{\mu}' d\eta' \right\} \{E(\boldsymbol{\mu}, \eta) * H_3(\boldsymbol{\mu}, \eta)\} \end{aligned} \quad (4)$$

$$E(\boldsymbol{\mu}, \eta) = H_2 * (\boldsymbol{\mu}, \eta) * \{H_1(\boldsymbol{\mu}, \eta) \otimes H_1(\boldsymbol{\mu}, \eta)\} \quad (5)$$

なお、 $H_{i=1,2 \text{ or } 3}(\mu, \eta)$ は、対物レンズ1に対する ω_1 光 ($i=1$) あるいは ω_2 光 ($i=2$) の、または対物レンズ2に対するCARS光 ($i=3$) のCTF (コヒーレント伝達関数) を、 $*$ は3次元相互相関、 \otimes は3次元コンボリューション (たたみ込み積分) を表す。また、 μ 軸は面内方向を、 η 軸は奥行き方向を表す。

ピンホールを置かずに、対物レンズ2を通過した光をすべて検出器で観測する場合、そのOTFは

$$OTF_{NCF}(\mu, \eta) = \int G(x_2, \mu, \eta) dx_2 + \int G^*(x_2, -\mu, -\eta) dx_2 \quad (6)$$

で与えられる。ここで、

$$\int G(x_2, \mu, \eta) dx_2 = E(\mu, \eta) * \left[\int E^*(\mu, \eta) H_3^*(\mu, \eta) d\eta \right] H_3(\mu, \eta) \quad (7)$$

で、与えられる。

【数値計算結果】

検出器側にピンホールを置いたとき (実線) と置かないとき (破線) のOTFを数値計算で求めた結果を図2に示す。図2 (a)は $\eta=0$ での μ 軸方向のOTFを、(b)は $\mu=0$ での η 軸方向のOTFを表す。なお、数値計算において対物レンズ1および2のNAは共に0.9, CARS励起光の波長は $\omega_1=532 \text{ nm}$, $\omega_2=633 \text{ nm}$ (通常ラマン分光で観測されるもっともラマンシフトの大きいC-H伸縮振動 3000 cm^{-1} に相当する) を仮定した。また試料の屈折率分散は生体試料は水の含有率が高いため水の屈折率分散を仮定した。

図を見て分かるように、検出器側ピンホールの効果は小さく、空間分解能にほとんど寄与しないことが分かった。

OTFにおけるピンホールの効果は、(7)式における積分項 ($H_3(\mu, \eta)$ に対するアポダイゼーション項) $\int E^*(\mu, \eta) H_3^*(\mu, \eta) d\eta$ に現れる。積分項が μ に関わらず

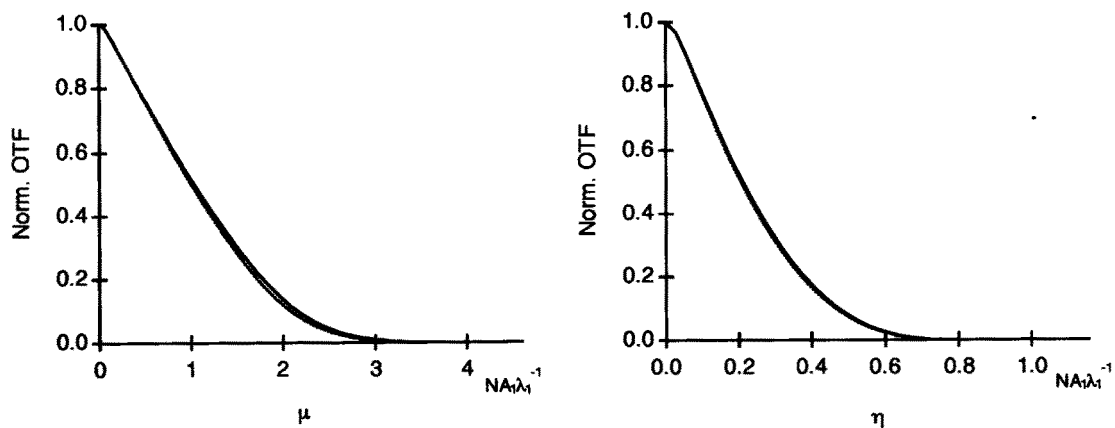


図2 弱コントラスト時のCARS顕微鏡のOTF

一定の値をとれば、分解能はピンホールの影響を受けない。図2を得る条件での積分項は(図3) $\mu=1$ (NA_3/λ_3)では $\mu=0$ に比べて27%までに小さくなるが、 $\mu=0.75$ (NA_3/λ_3)まで $\mu=0$ の80%の値を保っている。このことが、検出器側ピンホールの効果が小さい要因であると考えることができる。また、NAが0.9より小さい場合、例えばNA=0.4のとき、 $\mu=0$ の値に対して95%以上の値を保っているため、ピンホールの影響は無視できるほど小さくなる。すなわち、観測側の対物レンズのNAが、励起側の対物レンズより小さい場合にはピンホールの影響は小さいといえる。これに対し、観測側のNAが励起側のNAより大きい場合、ピンホールを除くことによって分解能が悪化することが予想される。

【おわりに】

励起系および観測系の対物レンズのNAがほぼ等しい時、CARS顕微鏡は検出器の前にピンホールを配置する、しないにかかわらず、同程度の空間分解能をもつことが分かった。現在、励起系および観測系の対物レンズのNAを変えたときのピンホールの影響について数値計算を行っている。また実際にCARS顕微鏡の3次元空間分解能を測定し、検出器側ピンホールの影響を実験的に検証していく予定である。

【参考文献】

- 1) 橋本守、荒木勉: 第59回応用物理学会学術講演会講演予稿集 (1998) 15a-N-4.
- 2) M. Hashimoto, T. Araki: Technical Digest of 18th Congress of the International Commission for Optics, 496 (1999).
- 3) M. Hashimoto and T. Araki, J. Opt. Soc. Am. A, (submitted)

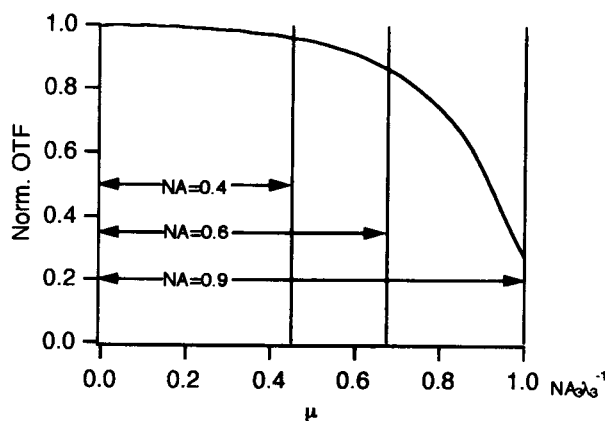


図3 式(7)における積分項 $\int E^*(\mu, \eta) H_3^*(\mu, \eta) d\eta$