

○井上桂吾、橋本 守、荒木 勉

Keigo Inoue, Mamoru Hashimoto, Tsutomu Araki

大阪大学大学院基礎工学研究科

Graduate School of Engineering Science, Osaka University

The effect of the detector side pinhole (which corresponds to detector size) on 3D optical properties of CARS microscopy was discussed with the numerical calculation of the point spread functions for CARS microscopy with the pinhole and without the pinhole. These results show that the axial resolution of CARS microscopy without the pinhole is much the same as that of CARS microscopy with the pinhole.

### 1. はじめに

我々は、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、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)の帯域を用いて理論的に評価した<sup>1)</sup>。その結果、CARS は非線形光学現象であるため、CARS 顕微鏡(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)は 3 次元分解能を持つことがわかった。また最近、Zumbusch らによって CARS 顕微鏡による 3 次元画像の取得が報告された<sup>2)</sup>。しかしながら、CARS のようなコヒーレントな多光子過程を利用した顕微鏡に対する分解能の定量的取り扱いは未だなされていない。

そこで、今回我々は検出器の前にピンホールを配置する場合と、配置しない場合(検出器面積の違いに対応)の CARS 顕微鏡の光強度に対する PSF(点像分布関数)を数値計算により求め、ピンホール(あるいは検出器面積)の影響を考察した。

### 2. PSF の導出

CARS 顕微鏡の光学配置を Fig.1 に示す。 $\omega_1, \omega_2$  光は対物レンズ 1 で試料中に集光され、焦点付近のみから CARS 光が発生する。この CARS 光を対物レンズ 2 によって検出器へと導く。対物レンズ 2 の焦点面上  $\mathbf{x}_2=(x_2, y_2)$  での CARS 光強度  $i(\mathbf{x}_2, \mathbf{x}_0, z_0)$  は、

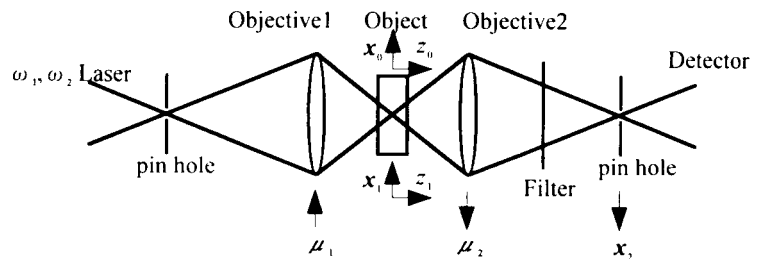


Fig.1 Optical layout of CARS microscopy

$$i(\mathbf{x}_2, \mathbf{x}_0, z_0) \propto \left| \iint \chi^{(3)}(\mathbf{x}_1 + \mathbf{x}_0, z_1 + z_0) e(\mathbf{x}_1, z_1) h_1(\mathbf{x}_2 - \mathbf{x}_1, -z_1) d^2 \mathbf{x}_1 dz_1 \right|^2 \quad (1)$$

で与えられる。ここで、 $e(\mathbf{x}_1, z_1) = h_1(\mathbf{x}_1, z_1) h_2(\mathbf{x}_1, z_1) h_3^*(\mathbf{x}_1, z_1)$ 、 $\chi^{(3)}(\mathbf{x}, z)$  は 3 次の非線形感受率、 $h_1(\mathbf{x}_1, z_1)$ 、 $h_2(\mathbf{x}_1, z_1)$  はそれぞれ対物レンズ 1 の  $\omega_1, \omega_2$  光に対する振幅(光強度ではなく複素振幅に対する)PSF、 $h_3(\mathbf{x}_2, z_2)$  は対物レンズ 2 の CARS 光に対する振幅 PSF を表す。また、座標  $\mathbf{x}=(x, y)$  は面内方向を示す位置ベクトル、 $z$  は光軸方向を示す位置ベクトル、添え字 0 は試料上の、1 は空間上の位置を表す。

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、 $\chi^{(3)}(\mathbf{x}, z) = \overline{\chi^{(3)}} \{1 + b(\mathbf{x}, z)\}$  と表すことができる。このとき(1)式は、

$$i(x_2, x_0, z_0) \propto |\overline{\chi^{(3)}}|^2 \left\{ \left| \iint e(x_1, z_1) h_3(x_2 - x_1, -z_1) d^2x_1 dz_1 \right|^2 + f(x_2, x_0, z_0) + f^*(x_2, x_0, z_0) \right\} \quad (2)$$

で近似することができる。ここで、

$$f(x_2, x_0, z_0) = \iint e^*(x_1, z_1) h_3^*(x_2 - x_1, -z_1) d^2x_1 dz_1 \iint b(x_1 + x_0, z_1 + z_0) e(x_1, z_1) h_3(x_2 - x_1, -z_1) d^2x_1 dz_1$$

検出器の前にピンホールを配置した場合( $x_2=0$ )、光強度に対する PSF は、

$$\text{PSF}_{\text{cf}}(x, z) = 2\text{Re}[e(-x, -z) h_3(x, z)] \quad (3)$$

と表すことができ、検出器の前にピンホールを配置しない場合、光強度に対する PSF は、

$$\text{PSF}_{\text{ncf}}(x, z) = 2\text{Re}[\iiint e(-x, -z) e^*(x_1 - x_2, z_1) h_3^*(x_2, -z_1) h_3(x_1 + x, z) d^2x_1 dz_1 d^2x_2] \quad (4)$$

で得られ、CARS 顕微鏡の光強度に対する PSF が導出された。

### 3. 計算結果

CARS 顕微鏡の  $x, z$  方向の PSF を(3)、(4)式により数値計算により導出した結果を Fig.2 に示す。CARS では位相整合のために試料の屈折率分散を考慮する必要がある。生体試料の観察を想定して水の屈折率分散を用い、屈折率分散の影響が大きい  $3000\text{cm}^{-1}$  のラマンシフトを観察することを仮定した。また、対物レンズ 1、2 の N.A. (開口数)はいずれも 0.9 であると仮定した。CARS 顕微鏡の PSF の半値全幅は、検出器の前にピンホールを配置した場合、面内( $x$ )方向が  $216.6\text{nm}$ 、奥行き( $z$ )方向が  $1.111\ \mu\text{m}$  であり、ピンホールを配置しない場合、面内方向が  $225.5\text{nm}$ 、奥行き方向が  $1.117\ \mu\text{m}$  であった。

### 4. おわりに

計算結果より、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、同程度の光軸方向の分解能をもつことがわかった。また、面内方向の分解能はピンホールを配置した方がわずかに高いが、大きな差は見られず、検出器側ピンホールの空間分解能に対する影響は小さいことがわかった。

今後、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する。

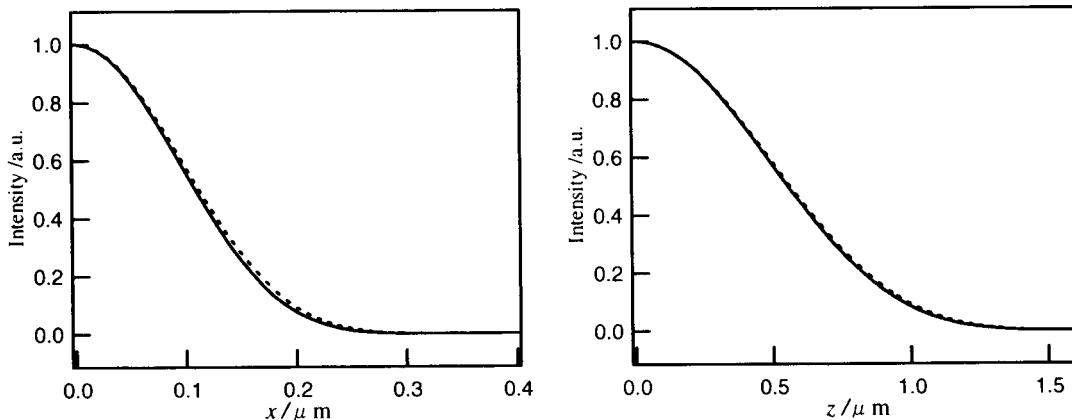


Fig.2 Point spread function of CARS microscopy with the pinhole (solid line) and without the pinhole (dashed line)

### 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. Mamoru Hashimoto, Tsutomu Araki: Technical Digest of 18<sup>th</sup> Congress of the International Commission for Optics (1999) 496.
- 2) A. Zumbusch, G.R. Holtom and X.S. Xie: Phys. Rev. Lett. **82** (1999) 4142.