

コノスコープ面レーザー走査型照明装置 の開発と応用

研究代表者 上村 慎治 研究員

研究の目的

光吸収の少ない生体試料の観察には、一般に、位相差顕微鏡や微分干渉顕微鏡などの、試料と媒質の間の屈折率の違いを使った手法が用いられる。このような顕微鏡では、コンデンサレンズ焦点面（または、対物レンズ焦点面）に共役な位置（コノスコープ面）での環状照明法が使われている。本研究では、レーザー光を照明光源とすることにより、高い輝度での照明を実現すること、および、環状照明法による高い分解能での生体観察、この両者を可能にする方法として、走査型の環状照明装置を試作・実用化することを目的にしている。

結果と考察

①新照明方法の開発

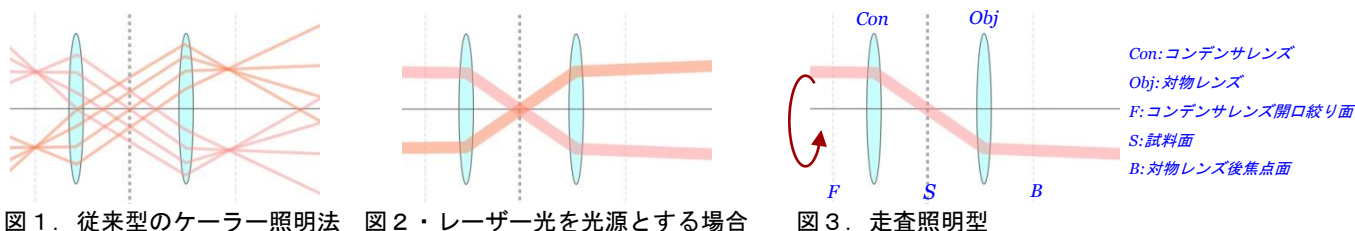


図1. 従来型のケーラー照明法 図2. レーザー光を光源とする場合 図3. 走査照明型

図1～3には、照明方法の模式図を示す。一般に用いられているケーラー照明法は、照明ムラのない優れた方法であるが、試料面で照明光が平行光となり、高い輝度での照明は難しい。環状照明は、コンデンサの開口面に環状に光を集めて照明する方法であるが、位相差顕微鏡法により生体試料を観察する方法として使われる他、暗視野照明法としての応用や分解能の改善に有効であるとの報告がある (Vainrub et al., Opt. Lett., 31:2855-2857, 2006)。しかし、環状照明法では、コンデンサ絞り面を通過する光のロスが大きいため、光源の明るさの問題が生じる。単波長のレーザー光源は、高い集光特性を有し、コンデンサレンズに平行に導入することで、試料面で効率よく集光させ、高い輝度の照明が可能となる。しかし、レーザー光の高い干渉性のため別の問題が生じる。照明光が、互いに干渉し合うために、図2のような照明方法は通常は実現できない。もし、試みたとしても、スペックルノイズと呼ばれる多重の干渉縞が発生するために、観察像と背景ノイズとの区別ができなくなり、実用的ではない。そこで、図3のように、コンデンサの絞り全面を使用するのではなく、常に部分的な照明を行い、環状に照明角度（照明地点）を走査することで、干渉縞の発生を抑える方法を採用する。現在、モーター走査型と圧電素子走査型の2種類の方法を試みている。

②高分解能暗視野照明への応用

上記の走査型環状照明方法は、走査開口径を変えることで様々な種類の光学系、様々な倍率の位相差顕微鏡との組み合わせが可能となる。また、通常、照明輝度が暗い問題点のある暗視野照明法への応用も試みる予定である。ここでは、暗視野照明法の改良と、高分解能の観察像を試みた結果を示す。図4は、開口数1.49の対物レンズを用い (Olympus, UAPON 100xOTIRF) と油浸コンデンサを組み合わせ、ケイ藻細胞のプレパラートを観察したものである。NA1.4の開口角で照明することにより、明視野照明法と同じ照明効果となっているが、約140nmの分解能が得られていることが、右側FFT解析からわかる。これは、アッペやレーリーの定義する分解能 (~166nm)、さらに、ホプキンスが光学伝達関数から予測した分解能 (~152nm) より高い分解能であり、環状照明法が分解能の向上につながることを示唆したVainrubらの実験を裏付けている。今後、生体試料への応用を試みる予定である。

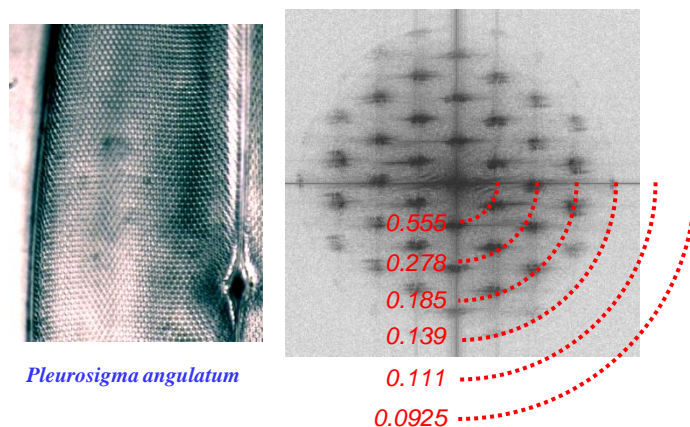


図4. 大開口数の環状照明法による高分解能観察像
および、そのフーリエ変換像 (数値の単位は μm)