非線形光学現象を利用したレーザー顕微鏡

中村 収*

(1996年7月25日 受理)

Laser Scanning Microscope Based on Nonlinear Optics

Osamu NAKAMURA*

(Received July 25, 1996)

We explain why the spatial resolution of a laser scanning microscope (SLM) becomes better with the use of nonlinear optical effects, what kind of nonlinear SLMs exist, and how the nonlinear SLMs will develop in the future.

Key words: Laser scanning microscope, Nonlinear optics, Second harmonic generation
Two-photon absorption, Confocal

1. 回折による空間分解能の限界は、線形仮定の下でのものである

光学における空間分解能の限界は、Abbeによる周波数帯域による定義やRayleigh卿による2点分解能の定義が有名である¹⁾。彼らの主張はもちろん正しい。しかしながら、本稿では、非線形な光学効果(ここでは線形な光学効果の重ね合わせをも含めて広く非線形効果と定義する)を用いることで、RayleighやAbbeが定義した空間分解能の限界を超えた分解能を、エバネッセント・フォトンを用いることなく、実現できることを紹介する。

ここでの超解像は、決してRayleighやAbbeを否定するものではない。ではなぜ両者(古典的定義と非線形光学による超解像)はともに正しいか？

Rayleighの定義では、光を空間的に絞り込んでいったときに、その拡がりの程度がどの程度まで小さくなるかを示しているのであって、そこには光と物質の相互作用の効果が入っていない。あるいはもっと正確に表現すると、絞り込まれた光の強度分布に比例して、物体の各点で反射、蛍光発光、散乱が起こるとの線形性を仮定している。もし、物体が光強度の2乗(3乗)に比例した強度の蛍光を出すなら、その発光強度分布は、Fig. 1のように回折限界スポットの2乗(3乗)となって、中央のピークは細くなり、またサイドローブも小さくなる。この蛍光を結像してやれば、Rayleighの定義より小さい領域からの蛍光を測定でき、すなわち、空間分解能が高い結像を達成できる。(註: このストーリーを通すには、絞り込んだ光によって、物体中の1部分のみ

* 大阪大学大学院工学研究科応用物理学専攻 (〒565 吹田市山田丘 2-1)

* Department of Applied Physics, Osaka University (2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565)

Fig. 1 Localization of fluorescence emission by non-linear effect, (a) beam profile of a focused laser for excitation, intensity spread of the fluorescence excited by the beam in (a) with single photon absorption, (c) intensity spread of the fluorescence excited by the beam in (a) with two photon absorption, and (d) confocal image signal given from the fluorescence in (c).

を励起する必要がある。非走査型顕微鏡のように全領域を一度に照明すると、空間分解能は結像系のみで決まり、Rayleighの定義を抜け出すことができない)

これが非線形効果による超解像の概念である。あとは、この2乗、3乗などの非線形な効果を伴う光と物質の相互作用や光学系及びレーザーをいかに選ぶかによって具体的な結像特性が決まる。後述するが、例えば、第2高調波の発生、2光子/3光子吸収による蛍光励起、共焦点系(これも2乗効果を実現する)、過渡吸収、超解像光ディスク(PSR)、Stimulated Emission Depletion(STED法)、レーザーフィードバック法などが、これまでに、非線形効果による超解像に利用されている。

2. なぜ今まで利用されなかったのか?

これには2つの理由が挙げられる。1つの理由は、近年まで走査型結像系と非走査型結像系の結像特性の違いがはっきりとは認識されず、走査型系の普及が遅れたことが挙げられる。非線形系と似た振る舞いをする共焦点系でさえ、その結像特性が本当に理解されたのは、1980年代の中頃から後半にかけてではないかと思われる。

る。1, 2のチャレンジングな実験例を除き、非線形効果で実際に分解能が上がるとは、予想されていなかったというのが本当のところだろう。

もう一つの理由は、高ピークパワーのパルスレーザーの普及にある。非線形効果を、平均出力(単位時間当たりの光子数)を上げずに発生させるには、高ピークパワーのパルスレーザーが必要であるが、1980年代ぐらいまでは、そのようなレーザーはレーザーの専門の研究者のところにのみで、生物学・医学関係の研究者のもとには普及していなかった。それが、1980年代後半より、比較的安価で使いやすいフェムト秒・ピコ秒レーザーが広く利用できるようになったのである。

3. 3次元分解能のメリット

絞り込まれた光スポットの2乗効果が生じるのだから、非線形光学による超解像は、共焦点系²⁾と同様に高い3次元分解能を持つ。しかし、両者は決定的に違うところがある。それは、たとえ結像系の点像分布関数が等しくても、共焦点系では実際に試料中で蛍光が発生する領域が小さくなっているわけではないのに対し、2光子吸収による蛍光発生では、その光の吸収領域および蛍光の発生領域自体が小さくなっていることである。これは、結像系としては同じ効果に帰結するが、光加工・ファブリケーションの目的に対しては全く違う。非線形効果を用いたときのみ、3次元的に超分解で、試料内の微小領域を反応・変質させることができ、3次元光メモリのビットや光造形の微小部分を書き込み、加工できるのである。

4. 非線形効果による超解像の空間分解能以外のメリット

2光子あるいは3光子吸収による蛍光励起では、励起レーザーの発振波長と蛍光波長の差が大きく、それらの分離測定が容易となり、不要な散乱光を低減することができる。

さらに積極的にこの波長差を用いる場合もあ

る。近赤外レーザーによって可視域の蛍光を発生させれば、生体などの観察においては、試料内のビームがフォーカスされた点以外では、ほとんど光吸収がおきず、試料の損傷や熱発生の問題を避けることができる。また、紫外域には適当な高精度光学材料が少ないが、可視パルスレーザーでの2光子励起を用いると、紫外域の回折限界像を、可視域用の光学系を用いて得ることができる。

5. 非線形光学による超解像の原理：第2高調波の利用

これまでに報告された、非線形光学による超解像技術で用いられた非線形現象の主な例をFig. 2に示す。

Fig. 2(a)は、第2高調波の発生(Second Harmonic Generation: SHG)におけるエネルギー遷移図を示している。振動数 ω_1 (波長 λ_1)の光子2個がコヒーレントに、物質中の電気双極子に作用し、振動数 $\omega_2 = 2\omega_1$ (波長 $\lambda_2 = \lambda_1/2$)の光子1個が発生する。この場合、上位に励起準位はなく、振動数 ω_1 の光と振動数 ω_2 の光はコヒーレントで

Fig. 2 Nonlinear effects used for superresolution technology, (a) second harmonic generation, (b) fluorescence by two photon absorption, and (c) transient absorption.

ありかつ2つの光子が同時に作用しなければならないので、入射電場 E (振動数 ω_1)の2乗に比例して射出電場 E_{SHG} (振動数 ω_2)が発生する。すなわち、

$$E_{\text{SHG}} = tE^2 \quad (1)$$

と表される。ここで、 t は比例定数で2次の非線形光学定数から導かれる。ただし、励起される分子が中心対称性を持つ場合、吸収、発光の過程のいずれかの遷移確率が0になってしまうため、第2高調波は発生しない。

試料中の各点から発生した第2高調波の電場は振幅で重ねられるが、基本波と第2高調波の波長に対する物質の屈折率が異なると伝搬距離に依存して第2高調波の位相がシフトし、必ずしも強め合わない。位相が 2π シフトする距離をコヒーレント長 L_c と呼び、

$$L_c = \lambda_0/2(n_{2\omega} - n_\omega) \quad (2)$$

で定義される。ここで、 λ_0 は基本波の自由空間波長、 n_ω 、 $n_{2\omega}$ はそれぞれ基本波と第2高調波の波長における物質の屈折率である。例えば、 $\lambda_0 = 1\mu\text{m}$ の場合、焦点深度を $5\mu\text{m}$ とすると、 L_c が焦点深度以上になるには、 $n_{2\omega} - n_\omega$ は 10^{-1} より小さいことが必要である。

SheppardとWilsonは、この原理を用いて、実際に非線形レーザー顕微鏡を開発した²⁾。Fig. 3にその実験装置を示す。励起レーザーは発振波長 $1.064\mu\text{m}$ 、出力1WのNd:YAGレーザーである。こ

Fig. 3 The setup of SHG microscope.

Fig. 4 (a) image of KDP crystal given by SHG microscope and (b) enlarged image of (a).

のレーザーを対物レンズによって絞り込み、試料であるKDP結晶中に照射する。このとき集光点において発生する第2高調波(波長532nm)を、光学フィルタによって基本波と分離し光電子増倍管で検出する。レーザー光のパワーが揺らぐと第2高調波の強度はその2乗の揺らぎを持つので、レーザー出力の安定化を行っている。試料はボイスコイルによって2次元的に走査され、第2高調波の像が形成される。Fig. 4は、そのときに得られた像である。境界部や欠陥があるところでは第2高調波が強く発生しているのがわかる。

このように、第2高調波の発生は、非線形光学結晶内の欠陥の画像化への適用に対しては成功であったが、当然ながらそれ以外の応用がほとんどなく³⁾、比較的早い時期に実験が行われたにも拘わらず、その後あまり発展は見られなかった。

6. 2光子吸収の利用

Fig. 2(b)は、2光子吸収による蛍光の励起過程のエネルギー遷移を示している。2個の光子を、原子・分子が同時に吸収することで、電子の固有状態が基底準位 S_0 から $h\omega_1$ の2倍のエネルギーを持つ励起準位へ励起される。励起された電子は、熱振動緩和の後、励起準位 S_1 に落ち、その後、振動数 ω_3 ($\equiv 2\omega_1$)の光子を1個自然放出し、励起準位 S_0 へ戻る。この放出される蛍光光子が発生する確率は、振動数 ω_1 の励起光子の空間的な密度の2乗に比例し(1個の光子を吸収する確率は光子密度に比例する。さらにもう1個吸収する確率は光子密度 $\times$ 光子密度になる)、励起光スポットより

Fig. 5 Two-photon fluorescence image of live cultured pig kidney cells stained with aviable DNA stain (Hoechst 33258).

小さい領域から蛍光が発生する。

この2光子吸収の吸収断面積は、一般に1光子吸収に比べ非常に小さいので、ピークパワーが高い励起レーザーを用いないと蛍光を励起できない。実際に試料を励起する際には、パルスレーザーを用いることにより、平均強度を低く保ちつつ、大きいピーク強度を発生させる手法を採る。

Fig. 5に、最初に試みられたW. Denkらによる実験の結果を示す⁴⁾。試料は豚の腎臓の培養細胞である。細胞分裂期にある染色体の様子が明瞭に観測されている。DNA染色にヘキスト33258を用い、発振波長630nmのモード同期リングレーザーで2光子励起し、380–445nmの蛍光を検出している。レーザーの平均出力は25mW、パルス幅100fs、繰り返し80MHz(ピーク出力約4kW)である。図より、コンフォーカルピンホールなしでの、2光子励起蛍光のコンフォーカリティ(奥行き分解特性)が確認できる。

はじめに、非線形による超解像は、結像系のみでなく、加工・記録にも超解像性を発揮できると書いた。Fig. 6は、Denkらのシステムを用いて、フォトポリマーに3次元的にビットデータを書き込んだ場合に得られた、記録面の縦断断面の画像である⁵⁾。横分解能及び縦分解能は、1 μ mおよび3 μ mであり、2光子吸収によって、従来より高い3次元分解能が実現されているのがわかる。

Fig. 6 Longitudinal image of a three-dimensional bit memory recorded with two-photon absorption.

Fig. 7 (a) Depth response of the confocal Deep UV two-photon fluorescence microscope, (b) that of confocal reflection microscope, (c) the square of (b), (d) the third power of (b), and (e) the fourth power of (b). The specimen is a piece of glass.

これにより、約 3×10^{11} bits/cm³の高密度記録が実現されている。

2光子吸収を用いると可視光と可視光用光学系を用いて、紫外域の回折限界像を得ることができる。Fig. 7は、深紫外域でのDepth Responseの検証実験である⁶⁾。試料は通常の顕微鏡用カバーガラスで、そのガラスが発生する自家蛍光を測定している。光源にはNd:YAGレーザーの第2高調波(波長532nm, パルス幅70ps)を用いている。(a)は2光子励起蛍光のコンフォーカル検出であり、(b)は反射コンフォーカルの検出である。(a)ではガラス内でのみ蛍光が発生し、一方、(b)ではガラスの上下の境界面で反射光が発生してい

るのがわかる。(a)の立ち上がりは、(b)に比べかなり鋭くなっているのがわかる。(c), (d), (e)はそれぞれ、(b)から計算された(b)の2乗, 3乗, 4乗の曲線である。(a)の立ち上がりは(b)の4乗である(e)に匹敵していることがわかる。

Fig. 2(b)のエネルギー遷移図を見てわかるとおり、励起レーザー光と蛍光の波長の差は、1光子励起の場合と比べ、かなり大きい。つまり、2光子励起による蛍光測定では、それら2つの光の分離が容易となり、蛍光画像のバックグラウンド散乱光成分が大幅に低減するという分光学上のメリットもある。

7. 過渡吸収の利用

線形光学効果を多段階に用いることで、非線形性を実現し、超解像結像を行うこともできる。Fig. 2(c)は、過渡吸収を用いた超解像の例である⁷⁾。基底準位 S_0 にある電子は、振動数 ω_1 (波長 λ_1)の光子を吸収し、準位 S_1 に励起される。さらに、この電子に、準位 S_1 での寿命時間内に振動数 ω_2 の光子を照射すると、電子は光子を吸収し励起準位 S_2 に励起される。この2段階目の励起(過渡吸収)の確率は、振動数 ω_1 の光子の密度と振動数 ω_2 の光子の密度の積で与えられる。すなわち、2乗ではないが、積の効果によって2段階目の励起確率が与えられ、超解像が実現される。

第2高調波を発生する場合、および2光子吸収による蛍光発生を利用する場合には、それぞれ、分子に中心対称性がないこと、および1光子吸収の吸収断面積が小さくかつ蛍光発光すること、がそれぞれ必要であるが、過渡吸収の場合には、それらの条件は必要でなく、測定対象はより広範になる。

Fig. 8は、Sasakiらによって初めて実現された、過渡吸収による超解像顕微鏡の構成図である。CWモード同期Nd:YLF励起色素レーザーの第2高調波(波長290nm)のレーザーを第1段階目の励起に、その基本波(580nm)を2段階目の励起に用い、それらからのビームを同軸でかつ同一焦点で重ねる。パルス幅は約10ps、繰返しは3.8MHzである。試料中で、2段階目の励起によって過渡

Fig. 8 The setup of confocal transient absorption microscope.

Fig. 9 Depth response given with the confocal transient absorption microscope. The specimen is p-terphenyl in a cyclohexane liquid layer.

吸収された後、基本波は第2高調波(第1段階励起光)のカットフィルターを通りフォトダイオードで検出される。検出信号は顕微鏡に入る前の基本波の強度とともに差動増幅器にかけられ、さらに第2高調波である励起光をチョッピングしてロックイン検出を行うことにより、微小な吸収が測られている。

Fig. 9は、この過渡吸収顕微鏡を用いて実験的に得られた奥行き応答である。試料はp-ターフェニル色素を含有したシクロヘキサン溶液を2枚の石英カバーガラスではさみ、液膜にしたものである。通常の吸収顕微鏡では例え、共焦点系を用いても、このような横方向に構造がない試料の奥行き分解能力は実現できないが、過渡吸収を測定することによって奥行き方向の超解像が得られているのがわかる。Fig. 10は、この顕微鏡で、2つの励起パルス光に光路差を与えることによって、過渡吸収を時間分解して測定した結果である。

8. Stimulated Emission Depletion (STED) の利用

Stefan Hellは、さらに高分解能な蛍光像の観察を可能とする手法として(彼の見積では35nmの空間分解能を実現できる!), 新たにSTED法を考案した⁸⁾。

Fig. 11にSTEDの原理を示す。通常の1光子励起蛍光の発生において、蛍光波長($S_0 \rightarrow S_1$ の遷移)と一致するSTED用レーザーを同時に照射し、誘導放射により $S_0 \rightarrow S_1$ の遷移による蛍光発生を抑圧する。このSTEDレーザーをFig. 12のように、励起レーザースポットの周りに配置することで、通常の蛍光発生領域の中央部以外からの蛍光発生を強制的に抑える。これにより、回折限界ス

Fig. 10 Time resolved measurement with the confocal transient absorption microscope.

Fig. 11 The principle of Stimulated Emission Depletion (STED).

Fig. 12 Configuration of a stimulated emission depletion (STED) microscope.

Fig. 13 Three types of 4π confocal microscopes, (a) Type A, (b) Type B, and Type C.

ポットより小さな領域からのみ蛍光を発生させ、超解像を実現する。

この時、蛍光とSTEDレーザー光を分離する方法には、時間ゲートをかける方法と、波長で分離する方法がある。さらにSTEDにおける励起に2光子励起を用いることも考えられる。この方法については、現在その有効性を実験的に検証しつつある段階であり、今後詳細にその有効性を確認する必要がある。

9. 4π 共焦点顕微鏡と非線形光学結晶の利用

4π 共焦点顕微鏡は、究極の共焦点顕微鏡として、これもHellによって提案された⁹⁾。これは、通常言われる非線形光学効果を用いたものではないが、これまでに述べた系とよく似た振舞を示すのでここで取り上げることにする。

Fig. 13は、 4π 共焦点顕微鏡の3つの形態を示している。(a), (b), および(c)はそれぞれ、タイプA, タイプB, およびタイプC 4π 共焦点系と言われている。(a)では、励起レーザー光が、同一の焦点を持つ2つの対物レンズによって、上下2方向から試料内にコヒーレントに絞り込まれ、通常の単一の対物レンズを用いた場合より、特に上下方向に小さいスポットを焦点位置に形成する。このとき、NAが1に近い対物レンズを2つ用いると、絞り込まれるビームが張る立体角は 4π srに近くなるので 4π 共焦点系と名付けられた。

Fig. 14 The intensity distribution of a focused laser beam in a specimen, (a) by a type A 4π confocal microscope and (b) by a confocal microscope.

Fig. 15 Type A 4 π confocal microscope with a phase conjugate mirror.

一方、(b)では励起光学系ではなく、蛍光(検出)光学系において、試料内の一点からの光を4 π srの角度でコヒーレントに検出している。これをタイプB4 π 共焦点系と呼ぶ。(c)では、タイプAとタイプBが同時に用いられており、これをタイプC共焦点系と呼ぶ。Fig. 14(a), (b)に、それぞれ、タイプA共焦点系、および従来の共焦点系の3次元点像分布関数を示す。(a)のタイプA共焦点系では、特に奥行き方向の広がり小さくなっているのがわかる。

タイプAについては、励起光がレーザー光である限り、2つの対物レンズからの2光束を干渉させることはそう難しくはない。しかしながら、タイプBについては、検出光学系が白色光の2光束干渉の系になるため、その光路長の調整が困難である。

また、タイプAであっても、試料内でのフォーカス面の移動、試料の交換、あるいは対物レンズの交換などがあると、光路長、および焦点位置の再調整が必要となる。これらの点が障害となって、4 π 共焦点光学系の普及が遅れていると考えられる。

Fig. 15に、このタイプA4 π 共焦点顕微鏡の欠点を克服する位相共役鏡を用いる系を示す^{10,11)}。この場合、対物レンズ2の後ろ側焦点位置に、位相共役波をセルフポンプできるフォトリフラクティブ結晶を置く。このとき、一度試料を透過

Fig. 16 Depth response of the type A 4 π confocal microscope with a phase conjugate mirror.

したフォーワードビームによってセルフポンプされる位相共役波が、バックワードビームとして用いられ、フォーワードビームと干渉する。このような系をとると、バックワードビームは、フォーカス面の移動、試料の交換、あるいは対物レンズの交換などに拘わらず、必ずフォーワードビームの焦点に一致して集光される。しかも、対物レンズ2による収差および試料内の焦点位置より下の部位にて被る位相誤差なども全て自動的に補正されることになる。

Fig. 16に、位相共役鏡を用いるタイプA4 π 共焦点顕微鏡によって得られた奥行き応答を示す。光源には、波長514.5nmのアルゴンイオンレーザーを、位相共役鏡にはCeをドープしたBaTiO₃結晶を用いた。波長の1/2より細い奥行き分解能が達成されているのがわかる。

10. これからの課題

超解像に用いることができる非線形効果としては、ここで述べた光学的な効果に加え、相変化記録膜の温度特性¹²⁾や高温による磁化反転¹³⁾を利用する熱的な効果が挙げられる。これは実際に超解像光ディスク(PSR: Premastered optical disk by su-

per resolution, MSR: Magnetically induced super resolution)として実用化されつつある。これは、非線形顕微鏡であると同時に、ファーフールドから光スポットによって、ニアフィールド(試料中の1点)に微小開口を熱的に開けているニアフィールド顕微鏡といって良いかもしれない。

非線形顕微鏡の近々の課題としては、STED法の実験的検証、3光子吸収顕微鏡の実現、PSR/MSRの実用化、単一分子分光・DNAの励起・検出などの応用分野の開拓、2光子・3光子励起のための色素の開発・探索、高ピークパワーレーザーが生体に与える影響の把握などがある。

さらに、レーザーフィードバック法¹⁴⁾などの、光源であるレーザーの発振制御自体まで含めた系によって、フィードバック型の非線形システムを構成すれば、さらに応用や機能が広がってゆくことだろう。

参 考 文 献

- 1) M. Born and E. Wolf ed.: *Principles of Optics* (Pergamon Press, 1980).
- 2) T. Wilson and C. Sheppard: *Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy* (Academic, London, 1984) Chapter 3, Chapter 10.
- 3) 栗村直, 山本雄一郎, 芦田哲郎, 上江州由晃, レーザー顕微鏡研究会第16回講演会論文集(1995) 6.
- 4) W. Denk, J. Strickler and W. Webb: *Science* **248** (1990) 73.
- 5) J. Strickler and W. Webb: *Opt. Lett.* **16** (1991) 1780.
- 6) O. Nakamura and T. Okada: *Optik* **100** (1995) 167.
- 7) K. Sasaki *et al.*: *J. Opt. Soc. Am.* **A9** (1992) 932.
- 8) S. Hell and J. Wichmann: *Opt. Lett.* **19** (1994) 11.
- 9) S. Hell and E. H. K. Stelzer: *Opt. Comm.* **93** (1992) 277.
- 10) Y. Kawata *et al.*: *Opt. Lett.* **21** (1996) 1415.
- 11) O. Nakamura *et al.*: *Jpn. J. Appl. Phys.* **35** (1996) L852.
- 12) K. Yasuda *et al.*: *Jpn. J. Appl. Phys.* **32** (1993) 5210.
- 13) M. Kaneko *et al.*: *Jpn. J. Appl. Phys.* **31** (1992) 568.
- 14) 藤田克昌, 河田聡: レーザー研究 **24** (1996) No.10.

レーザーワード

ニアフィールド光学 (near field optics)

Maxwellの電磁方程式の解の一つに、エバネッセント場と呼ばれる非放射な電磁場がある。これは虚数の波数成分をもち、誘電体界面での全反射や、波長より短い間隔の回折格子や微小開口による回折において生成される。エバネッセント場は物質から光の波長より近い距離(ニアフィールド)においてのみ存在する場であるから、これを取り扱う光学を「ニアフィールド光学」と呼ぶ。物質表面に吸着した微量な分子膜や微粒子を高感度に検出するセンサ・分析法としての応用や、微小開口や微小散乱体をプローブとして用いた超高解像顕微鏡などの応用が知られる。このような顕微鏡は、ニアフィールド走査光学顕微鏡(NSOM)と呼ばれ、波長を超えてナノメートル的な空間分解能を持つ光学顕微鏡として、あるいは、AMFやSTMなどの走査プローブ顕微鏡(SPM)の光学版として、最近注目されている。(河田 聡)