

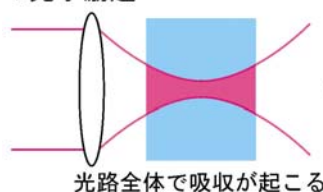
ディビジョン番号	1
ディビジョン名	物理化学

大項目	1. 分子分光学および分子集合体の構造
中項目	1-3. 空間分解分光
小項目	1-3-7. 多光子顕微分光・イメージング

概要（200字以内）

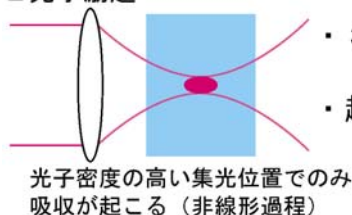
焦平面上の2次元方向にのみ分解能を持つ一般的な蛍光顕微鏡に対し、共焦点レーザー顕微鏡は3次元空間分解能を有する。特に励起光源としてパルス幅100 fs程度以下の超短パルスを用いる多光子励起型の共焦点レーザー顕微鏡は、高分解能の3次元光学像取得、分光分析が可能である。近年、従来の共焦点顕微鏡の欠点であった像取得時間の長さも短縮され、また非線形過程を用いた超解像多光子顕微イメージング等も報告されている。

1光子励起



・ 2次元空間分解能

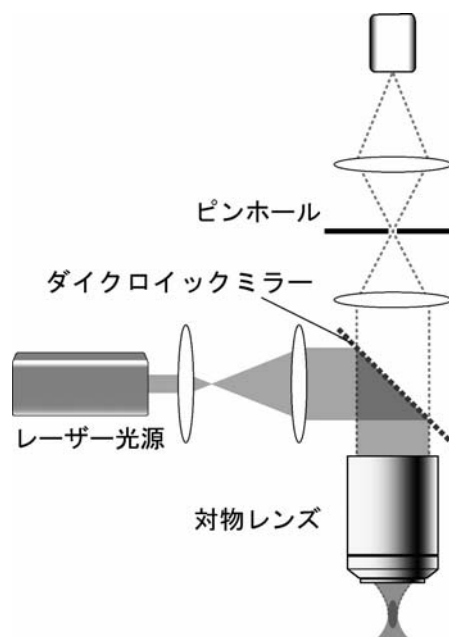
2光子励起



・ 3次元空間分解能
・ 超解像

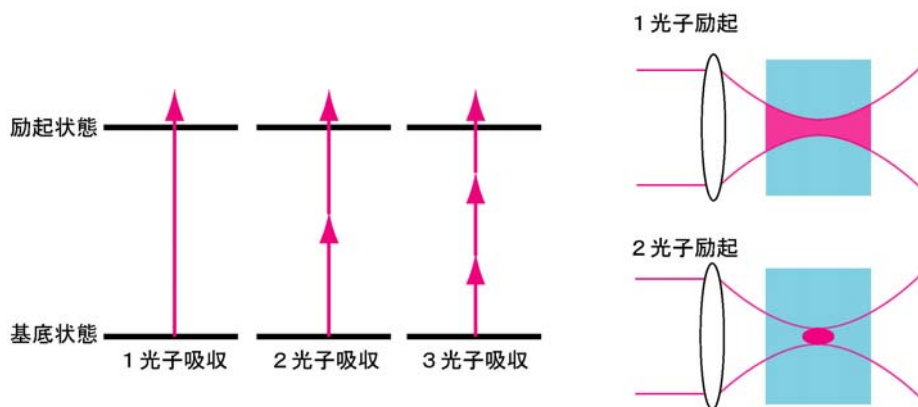
現状と最前線

共焦点レーザー顕微鏡では、回折限界程度まで集光したレーザー光を試料にスポット照射し、試料からの蛍光、ラマン散乱光、第二高調波などを検出する。対物レンズの一次像面にピンホールを置くことで励起光集光スポットのみからの信号光が検出器に導かれ、これにより3次元分解能が達成される（右図）。ただ、このままでは試料の一点からの信号光が検出されるのみであるため、ステージ送引或いは励起光の走査により三次元的なイメージを得る構成となっている。特に励起光源として連続発振レーザー光ではなく超短パルス光を用い、多光子吸収を介して試料を励起するのが多光子レーザー顕微鏡である。



共焦点顕微鏡の構成

多光子励起の特徴としては、1) 1光子励起に対応するエネルギーの半分(2光子励起の場合)かそれ以下(3光子、4光子励起ではそれぞれ1/3、1/4)の光子エネルギーで励起できるため光の散乱が少なくなり、また、2) 多光子吸収は非線形光学過程であるため光子密度が高くなる集光スポットのみで吸収が起こり、これにより高い3次元空間分解能で局所的に試料を励起できる。等が挙げられ、従来の1光子吸収によるレーザー顕微鏡に比べより高い空間分解能が達成できる。



多光子励起の特徴

共焦点多光子顕微鏡は走査によりイメージを得る構造であるため、一般にステージ走査型の場合はイメージを得るために数秒以上の時間を要する。この問題点を解決するため、近年レンズアレイとピンホールアレイによる多焦点型や、ガルバノスキャナによる高速光軸走査型の共焦点多光子レーザー顕微鏡が提案されており、ビデオレートでのイメージ取得が実現されている。イメージ取得時間の短縮化に加えて、さらなる空間分解能の向上を目指したアプローチも提案されており、空間選択的な誘導放出抑制(STED)を利用して実効的な発光スポットを制限し、100 nm以下の空間分解能を有する超解像レーザー顕微鏡も報告され始めている。また上記のアプローチはそのまま顕微分光分析に応用でき、多光子励起により1光子励起に比べより高い空間分解能での蛍光分光、ラマン分光、蛍光相関分光などが実現されている。

将来予測と方向性

- ・ 5年後までに解決・実現が望まれる課題
 - 数十 nm の3次元空間分解能を有する多光子レーザー顕微鏡
 - 時間分解顕微分光技術の高空間分解能化
- ・ 10年後までに解決・実現が望まれる課題
 - 超高速時間分解単分子分光計測
 - 励起光エネルギーのブロードバンド化

キーワード

共焦点顕微鏡、多光子顕微鏡、多光子吸収

(執筆: 宮坂 博 、 伊都 将司)