

赤外超解像顕微鏡による細胞観察 -6 μm 領域への拡張-

(東工大・資源研) ○菊地 克也、北次 加奈、藤井 正明、酒井 誠

【序】分子振動は分子の構造を鋭敏に反映するので、分子構造解析において赤外分光法やラマン分光法などの振動分光法を用いた研究が数多くなされてきた。近年では細胞や組織のような微小な生体試料の構造や環境の情報を得る為に、振動分光法を光学顕微鏡技術に適用したラマン顕微鏡や赤外顕微鏡による研究が広く行われている。しかしながら、顕微鏡の空間分解能は波長に比例する回折限界によって制限される為、赤外光を用いる赤外顕微鏡では 10 μm 程度の空間分解能しか得ることができない(ラマン顕微鏡では可視光を用いるのでサブミクロンの空間分解能が得られる)。従って、ラマン顕微鏡では細胞レベルで観察できるが、赤外顕微鏡では組織レベルでの観察しかできず、応用が遅れている。

我々はこの問題を打破する為に、2 波長分光法 (図1(a)過渡蛍光検出赤外(TFD-IR)分光法や図1(b)振動和周波発生(VSFG)法) を顕微鏡に応用した、赤外超解像顕微鏡の開発を行ってきた。例えば TFD-IR 分光法は、赤外

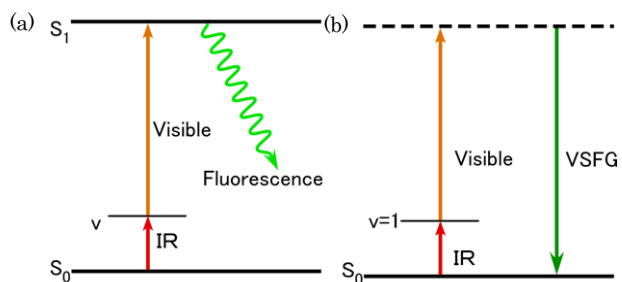


図1 (a)TFD-IR 分光法 (b)VSFG 法のエネルギーダイアグラム

レーザーによって振動励起された分子を可視レーザーによって電子励起させ、発生する可視蛍光を検出する方法である。赤外吸収に関する情報を可視光に変換して検出するため、可視光の空間分解能で赤外情報を得ることができ、赤外光に対して超解像が達成される。この赤外超解像顕微鏡を用いることで、自家蛍光性の細胞や色素染色した細胞に対して通常の赤外顕微鏡では不可能な高い空間分解能での赤外分光イメージングを達成し、細胞内の特定部位における色素の振動緩和も観察可能となった[1]。非蛍光性の細胞に対しては VSFG 赤外超解像顕微鏡を適用し、現在では出芽酵母やガン細胞などの培養細胞を非染色かつ生きたまま観察するに至っている[2]。

しかし、これらは全て 3 μm 帯の赤外レーザーを用いており、この結果、例えばタンパク質の主鎖の二次構造の解析に必須なアミドバンドの様に、中赤外領域に出現する重要な分子振動を用いた超解像イメージングは未だ手つかずである。そこで本研究では、赤外超解像顕微鏡の観察波長範囲を 6 μm 帯の中赤外領域まで拡張し、分子種ごとの赤外吸収の違いが顕著である指紋領域での赤外分光イメージングを目指した。

【実験】励起光源である赤外光と可視光は再生増幅器によって増幅された Ti:Sapphire レーザーのピコ秒パルス波長変換することで得られ、それぞれの波長が 4000-9000 nm ($1111\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$) および 610 nm の光を用いた。強度は、5 $\mu\text{J/pulse}$ および 100 nJ/pulse 程度とした。これらの光をビームコンバイナーで同軸に合わせ、CaF₂ レンズ($f=50$)を用いてサンプル上に照射した。発光は背面から対物レンズ(N.A. = 0.5)を用いて集め、ノッチフィルター、長波長カットフィルター、赤外カットフィルターを通した後に結像レンズにより ICCD カメラ上に結像した。試料は CaF₂ 基板を用いてプレパラートに封入し、分光法には検出感度の高い TFD-IR 分光法を用いた。

【結果と考察】直径 1 μm の蛍光ビーズを用いて空間分解能の検証を行った。図 2 は蛍光ビーズ

に可視光(610 nm)および赤外光(6260 nm(1597 cm^{-1}))を同時に入射した時の過渡蛍光像(赤外像)と、その黒線部分の断面における強度分布をプロットしたものである。顕微鏡の点像分布関数をローレンツ関数と仮定し、ビーズの形状を表す半円の式とコンボリューションしてフィッティングする(図2青線)と空間分解能は約 800 nm と見積もられた。これは 3 μm 帯の赤外

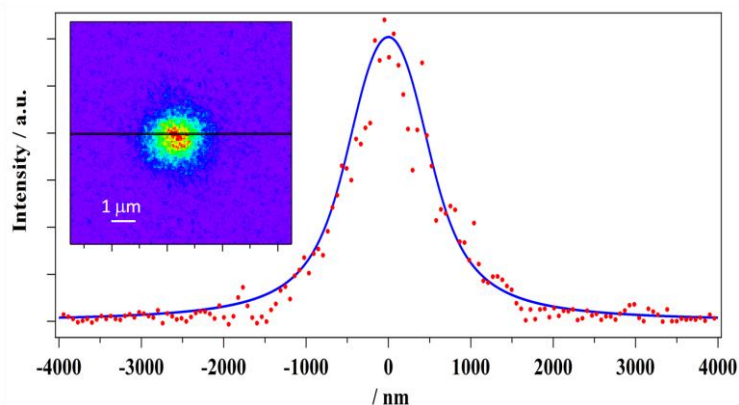


図2 蛍光ビーズを用いた顕微鏡の分解能評価
(赤：強度分布のプロット、青：フィッティング)

波長領域の空間分解能 880 nm[3]と殆ど変わらないため、赤外波長を長波長化しても空間分解能が劣化しないことが確認された。赤外吸収を可視発光に変換して検出していることから、原理上、空間分解能は赤外波長に依存しないためこの結果は妥当である。

図3に Rhodamine-6G(R-6G)で染色したタマネギの根毛細胞に本顕微鏡を適用し、6 μm 帯での赤外分光イメージングを行った結果を示す。(a)可視光(610 nm)のみ、(b)赤外光(1597 cm^{-1})のみでは発光は全く観測されないが、(c)可視光と赤外光を同時に入射すると強い発光が観測され、(d)赤外振動数を 1666 cm^{-1} に変えると発光は消失した。さらに、赤外光の振動数を変化させた時の図3透過像中の青で囲った部分(1 μm 四方)における発光強度をプロットすると図3(e)の TFD-IR スペクトルが得られた。このスペクトルは赤外吸収に相当するものであり、バンド位置は細胞を染色した R-6G 色素の赤外吸収と完全に一致した。これらの結果は、細胞内微小空間における R-6G の赤外吸収を反映したものであり、本手法により 6 μm 帯においてもサブミクロンの高い空間分解能、即ち赤外超解像で赤外分光イメージングが可能であることを示すものである。発表では非蛍光性の試料に対して VSGF 法を適用した結果も議論する。

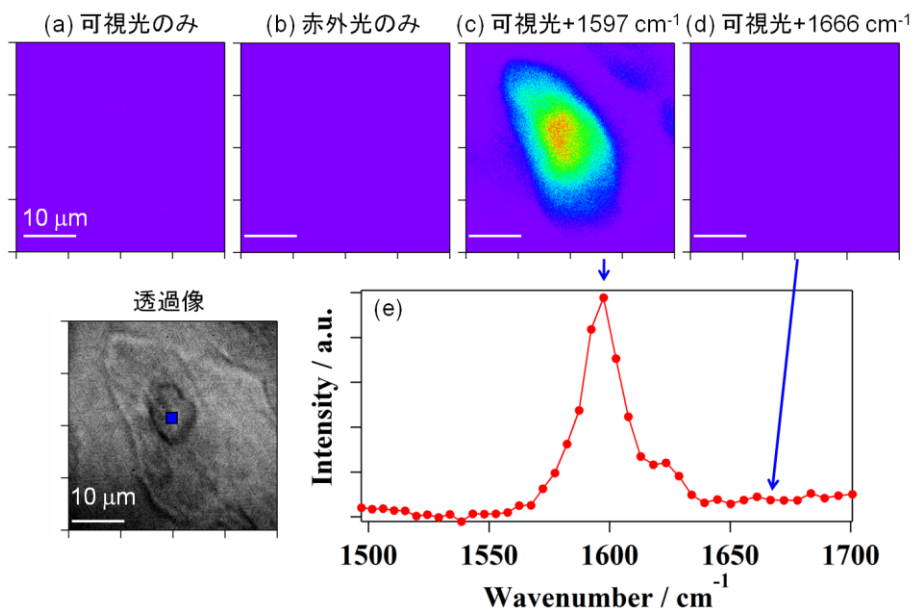


図3 染色タマネギ根毛細胞の赤外分光イメージング
(a)可視光(610 nm)のみ (b)赤外光(1597 cm^{-1})のみ (c)可視光+1597 cm^{-1}
(d)可視光+1666 cm^{-1} (e)TFD-IR スペクトル

[1] Sakai, M.; Ohmori, T.; Kinjo, M.; Ohta, N.; Fujii, M, Chem Lett (2007) **36**, 1380-1381

[2] Kogure, S.; Inoue, K.; Ohmori, T.; Ishihara, M.; Kikuchi, M.; Fujii, M.; Sakai, M, Opt. Express (2010) **18**, 13402-13406

[3] Inoue, K.; Fujii, M.; Sakai, M, Opt. Express (2009) **17**, 12013-12018