

開口数 0.9 を有する極低温顕微分光システムの開発

(名大院・理¹、東北大院・理²) ○加藤 渉¹, 柴田 穰^{1,2}

【序論】光学顕微鏡技術と分光法を組み合わせた顕微分光法では、サンプル内部での色素分布を位置情報を維持したまま蛍光分布画像として得ることができる。顕微分光法を低温で行うことの利点として、蛍光強度が増大する、スペクトルがシャープになる、褪色が抑えられる、などが挙げられる。この利点を活かし、我々はこれまで植物細胞の極低温での蛍光イメージングを行ってきた。特に、生きた葉のような光照射により状態が変化してしまうようなサンプルは、極低温にして状態変化を止めることで、その内部を長時間にわたって詳細に観察することが可能となる。このことは、ピコ秒時間分解蛍光測定などを適用する場合にも、本質的に重要となる。これまで、室温では高い空間分解能を有した顕微分光システムで生きた葉の蛍光測定が既に行われている[1]。しかし、極低温では以下の2つの要因により室温での測定に匹敵するような高い空間分解能は実現されていない。1つ目はクライオスタットの外に対物レンズを設置する場合、サンプルとの距離が長くなり、高い開口数の対物レンズが使用できないという問題である。2つ目は、クライオスタットを使用した極低温測定を行う場合、冷媒を流すのに使用するポンプの振動により空間分解能が低下してしまうという問題である。これら2つの要因により、開口数が0.6程度の対物レンズが上限であり、空間分解能はXY方向が640 nm、Z軸方向の空間分解能は4.4 μm 程度となる。

本研究では、サンプルホルダと対物レンズの距離を小さくするために、真空対応の対物レンズをクライオスタット内部に設置する顕微鏡の開発を着想した(図1)。また、低温にする際の問題点であったポンプから生ずるサンプルの振動

を軽減させるために、サンプルホルダと冷却部分を銅メッシュで結合するなどの工夫を施した。今まで、開口数0.6の反射型の対物レンズをクライオスタット内部に設置した顕微鏡を開発したという論文が報告されているが[2]、本研究では開口数0.9の対物レンズでの実現を目指す。

【結果と考察】励起光にはパルス幅150 fsのTi:Sapphireレーザーを使い、2光子励起レーザー走査型顕微鏡にした。対物レンズを光軸方向に粗動できるように、ベローズ(蛇腹)を使った構造

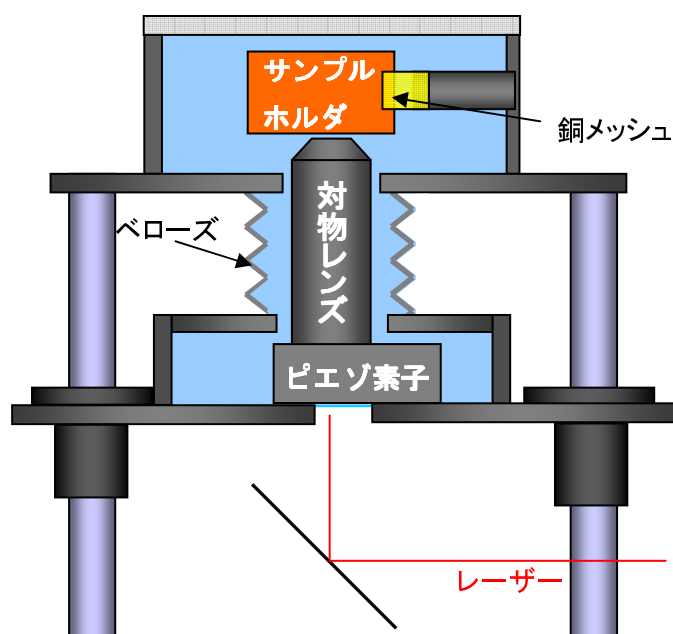


図1 真横からみた顕微鏡断面図

図中の水色は真空であることを示す

にした。この場合、サンプルルームを減圧したときに対物レンズを固定している板が上向きに引っ張られる力が数百 N に達し、逆に常圧のときは下向きにベローズのバネによる力がかかる。対物レンズを固定する板の粗動には、これらの力に耐えうる精密ボールねじを採用し、測定系が水平を保ったまま光軸方向に滑らかに動くことを可能にした。光軸方向の微動はピエゾ素子で制御しており、最小ステップ長は 1 nm である。XY 方向の粗動は、自作のテフロン製ステージを XY 方向に平行移動可能なレール上に固定し、外部から直線導入機により位置制御できるようにした。レーザー焦点のスキャンにはクライオスタット外部のガルバノミラーを使っており、本研究の光学系では最小ステップは 10 nm 程度である。本研究で用いた対物レンズは、倍率 100 倍、開口数 0.9 のミットヨの真空対応特注レンズで可視光領域の広い波長範囲で色収差も補正されている。測定時には 0.3 mm のカバーガラス越しにサンプルを観察するため、真空中に直接設置できない生体試料の観測も可能となっている。

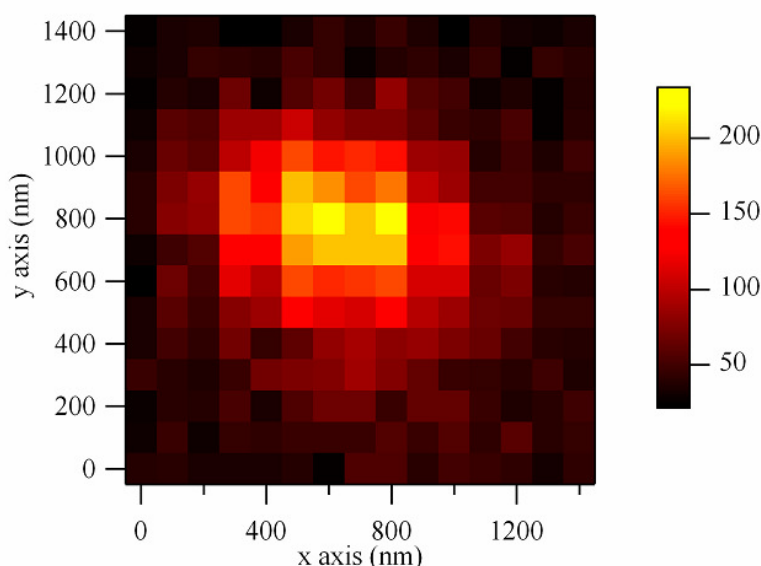


図 2 蛍光ビーズ F8811 の蛍光イメージ

実際に直径 200 nm 蛍光ビーズを測定したデータが図 2 である。測定条件は、温度 100 K、レーザー光強度 20 mW、励起波長 800 nm、検出波長 515 nm、ステップ長 100 nm である。蛍光強度分布を 2 次元のガウス関数でフィッティングしたところ、その半値幅は XY 方向で 600 nm となった。蛍光強度分布の Z 軸方向の半値幅は 1.8 μm であった。

冷媒を流すポンプの影響を考察するため、ポンプを停止できる室温での測定も行った。室温での測定でもほぼ同程度の蛍光ビーズイメージが得られた。このことから、ポンプ振動の影響は今回開発した顕微鏡ではうまく抑制できている事がわかる。現在、サンプルホルダは樹脂製の棒で放射状に四方から支えて固定しており、その棒はテフロン製のステージに設置している。温度を下げることで、このテフロンのステージがわずかに縮んでおり、サンプル位置が一方向に動くという問題がある。この問題を克服するため、線膨張係数がテフロン ($10^{-5} / \text{K}$) よりも低い石英 ($4 \times 10^{-7} / \text{K}$) を使用する予定である。講演では、生きた葉の蛍光分布画像も報告する。

【参考文献】

- [1] M. Hasegawa, T. Shiina, M. Terazima and S. Kumazaki, *Plant Cell Physiol* **51**, 225-238 (2010)
- [2] S. Fujiyoshi, M. Fujiwara, and M. Matsushita, *Phys. Rev. Lett.* **100**, 168101 (2008).