

中赤外波長領域での超解像赤外分光イメージング-生体試料観察の試み-

(東工大・資源研) ○菊地 克也、北次 加奈、田島 朋樹、藤井 正明、酒井 誠

【序】赤外分光法は分子の特徴を示す官能基に関する情報を鋭敏に反映するので、分子構造や機能を測定する上で有用であり、生体分子の構造解析にも広く用いられている。この赤外分光法を光学顕微鏡に応用した赤外顕微鏡は、非破壊で微小試料の分子構造に関する情報が得られることから、近年では生体組織観察にも適用されている。一方、通常の赤外顕微鏡では赤外波長とレンズの開口数によって一意に決まる回折限界による制限（回折限界 = $0.61\lambda / NA$: λ は波長、 NA は開口数）のため空間分解能が $10 \mu\text{m}$ 程度となり、大きさが数 μm 程度の細胞内部までは観察できない。もし空間分解能をサブマイクロメートルまで向上できれば、可視光を用いた光学顕微鏡と同等の空間分解能で、細胞の形状や位置の情報だけでなく、細胞内部の構造や機能を分子レベルで観察する事が可能となり、非常に有用である。

我々は、2波長レーザー分光法的一种である過渡蛍光検出赤外分光法 (Fig. 1 (左)) や振動和周波発生 (VSFG) 法 (Fig. 1 (右)) を光学顕微鏡技術に応用し、赤外光の回折限界を突破した高い空間分解能、すなわち赤外超解像を有する赤外超解像顕微鏡の開発に取り組んでいる。

例えば VSFG は、可視光と赤外光を同時に照射するとそのエネルギーの和に相当する VSFG 光が発生するという非線形光学効果の一種である。赤外光が分子の振動状態に一致した時に VSFG 光の強度が著しく増大するため、VSFG 光を観測しながら赤外光の波長を掃引することで、VSFG スペクトルを得ることができる。さらに、VSFG 光は可視領域の波長を持つため、赤外吸収像を可視領域で観察できることになり、赤外光の回折限界を遥かに凌駕した赤外超解像が達成される。実際に $3 \mu\text{m}$ 帯赤外波長領域において、細胞を非染色かつ生きたままでの超解像赤外分光イメージングに既に成功している[1]。

しかしながら、生体試料に対して、中赤外領域に出現する重要な分子振動を用いた超解像赤外分光イメージングは未だ手つかずであり、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イメージングも達成されていない。また、通常の赤外顕微鏡では赤外波長の長波長化に伴い、回折限界の制約から空間分解能が更に低下するが、本手法では原理上空間分解能は可視発光の波長で決まり赤外波長に依存しないため[2]、中赤外波長領域においても $1 \mu\text{m}$ を切る高い空間分解能で超解像赤外分光イメージングが可能であると期待される。

これらを踏まえ、空間分解能の観点から我々の手法の有用性を示すべく、観察可能な赤外波長領域をより長波長である $7-8 \mu\text{m}$ のアミドⅢ領域まで拡張し、生体試料 (毛髪) の超解像赤外分光イメージングを試みた。

【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で波長変換することで得られ、それぞれ赤外光 $5-9 \mu\text{m}$ ($1111-2000 \text{ cm}^{-1}$) および可視光 613 nm の光を用いた。強度は、それぞれ $3 \mu\text{J/pulse}$ および 100 nJ/pulse 程度であった。これ

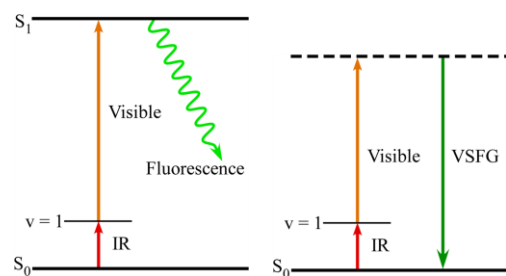


Fig. 1 (左) 過渡蛍光検出赤外分光法 (右) 振動和周波発生法のエネルギーダイアグラム

らの光をビームコンバイナーで同軸に合わせ、CaF₂ レンズ ($f = 100 \text{ mm}$) 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. = 0.4) を用いて集め、ノッチフィルター、赤外カットフィルター、バンドパス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。毛髪試料は、1-5 μm の厚さにカッティングした試料を CaF₂ 基板によりプレパラートに封入し、分光法には非蛍光性試料が測定可能な VSFG 法を用いた。毛髪試料は花王株式会社の伊藤隆司博士、長瀬忍氏に提供して頂いた。

【結果と考察】毛髪に

VSFG 法を適用し、超解像赤外分光イメージングを行った結果を Fig. 2 に示す。(a) は毛髪全体の透過像である。(b)、(c) は透過像中の白点線枠で囲った部分に対して超解像赤外分光イメージングを行った結果である。可視光 (613 nm) のみを入射しても発光は全く観測されないが (Fig. 2b 参照)、可視光とアミド III バンドの振動数に相当する赤外光 (1270 cm^{-1}) を同時に入射すると強い発光像が観測された (Fig. 2c)。そこでこの発光のスペクトルを測定してみた

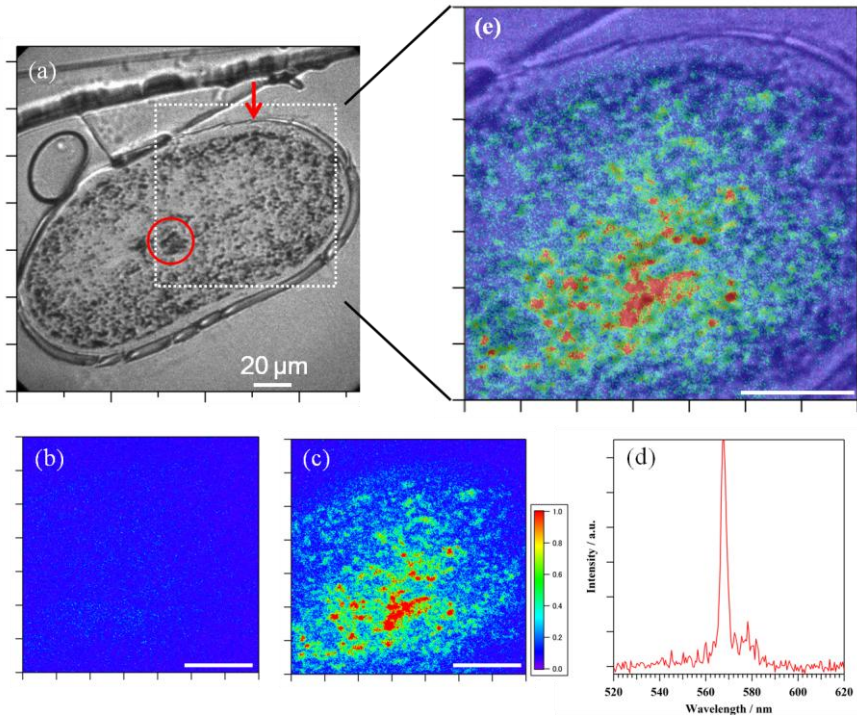


Fig. 2 毛髪断面内部の超解像赤外分光イメージングと発光スペクトル

(a) 全体の透過像 (白点線枠部分が測定部分、b,c,e はこの部分のみ示す)、(b) 可視光 (613 nm) のみを入射、(c) 可視光と赤外光 (1270 cm^{-1}) を同時に入射、(d) 発光スペクトル、(e) 測定部分を拡大し VSFG 像と透過像を重ねたもの、スケールバーは全て 20 μm 、(a) 中の赤丸・矢印部分は (e) で発光しない

ところ、入射した可視光と赤外光のエネルギーの和に相当する 568 nm 付近に VSFG 光による鋭いピークが観測され、この発光像が VSFG 像であることが確認された (Fig. 2d)。最後に、透過像と VSFG 像 (すなわち赤外像) を比較するために Fig. 2a 中の白点線枠で囲った部分に、Fig. 2c を重ねた図を Fig. 2e に示す。図から、毛髪を中心部分 (Fig. 2a の赤丸部分) のような透過像中の黒い部分は VSFG 発光が弱く、一方で透過像中の白い部分に対応して VSFG 発光が強く観測されている事がわかる。また、エッジ部分 (Fig. 2a の赤矢印部分) からは、ほとんど VSFG 発光が観測されない事も明らかとなった。通常の赤外顕微鏡を用いた赤外イメージングでは空間分解能が低いいため、このような毛髪断面内部の濃淡は観察できない。しかし、本顕微鏡による赤外イメージングでは、可視光を利用した透過像とほぼ同等な高い空間分解能で毛髪断面内部の濃淡を明瞭に観察する事ができた。講演では実験結果について、装置構成も含め詳細に報告する。

【参考文献】

- [1] Kogure, S.; Inoue, K.; Ohmori, T.; Ishihara, M.; Kikuchi, M.; Fujii, M.; Sakai, M, *Opt. Express* (2010) **18**, 13402-13406
- [2] Inoue, K.; Fujii, M.; Sakai, M, *Opt. Express* (2009) **17**, 12013-12018