

超解像での生細胞観察に向けた高速構造化照明顕微鏡の構築

¹東北大院薬

○鈴木斗夢¹, 梶本真司¹, 中林孝和¹

Construction of the high speed structured illumination microscopy for observation of living cells with super resolution

○Tomu Suzuki¹, Shinji Kajimoto¹, Takakazu Nakabayashi¹

¹ Graduate school of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Japan

【Abstract】 We aim to construct a high speed structured illumination microscope (SIM) for observing dynamic changes inside living cells with super resolution. We introduced a Pockels cell into the SIM to shift the phase of structured illumination pattern at high speed (up to 20 kHz). We confirmed that the phase of a structured illumination pattern is proportional to the voltage applied to the Pockels cell. By applying stepped wave voltage to the Pockels cell, the phase shifted to 120 degree within 1 ms. As for the demonstration, we obtained three images of fluorescent-stained PC12 cells consecutively with different phases of an illumination pattern (0°, 120° or 240°), and calculated a single optical sectioned image using these three images. The calculation process improved the contrast between the cell membrane and the cytoplasm, indicating that the calculated image had better axial resolution. Construction of SIM having high lateral resolution is in progress with introducing the second Pockels cell.

【序】 分子生物学などの研究において光学顕微鏡は非常に強力な観測手法であり、原子間力顕微鏡や電子顕微鏡では観測が困難な生細胞の内部の観察を可能にする。その空間分解能は回折限界により最大でも波長の半分程度に制限されてきたが、近年、従来の光学顕微鏡の空間分解能を超える STED や PALM/STORM などの超解像顕微鏡が開発され、様々な応用が行われている。

超解像顕微鏡の一つに構造化照明顕微鏡 (SIM) がある。SIM では周期的な構造を持つ照明光と試料とのモアレ縞を利用することで、従来の空間分解能の 2 倍の約 100 nm まで空間分解能が上昇する。また、STED や PALM/STORM とは異なり、用いる蛍光色素に制限がないことも利点の一つである。しかし、SIM では一枚の超解像画像を得るために周期的な構造パターンを持った照明光の位相や方向を変えながら複数枚の画像を取得する必要がある。この照明光パターンの位相制御が時間分解能の律速段階であり、従来の SIM の時間分解能は数 10 ミリ秒程度であった。

本研究では、SIM を用いて細胞内部の動的変化を高い空間分解能・時間分解能で観察することを目的として、ポッケルスセルを SIM の光学系に導入し、照明光パターンの位相変化を電気的かつ高速に制御した。ポッケルスセルの導入により、時間分解能はミリ秒程度に達することが期待される。今回の発表では照明光パターンの位相を一軸方向のみに動かし、ポッケルスセルによる位相制御の性能評価およびオプティカルセクションングによる蛍光画像の Z 軸空間分解能の向上について報告する。

【方法 (実験・理論)】 532 nm のナノ秒パルスレーザー (100 kHz, Ekspla) 光を回折格子に通し、生じた 1 次光と -1 次光を対物レンズに平行に入れることで、対物レンズの焦点位置で構造化照明光となる干渉縞を得た。二つの回折光の光路の一方にポッケルスセルを入れ、電圧をかけることで干渉縞の位相を変化させた。蛍光画像はポッケ

ルスセルと同期した高速度カメラを用いて撮影した。測定試料としてはキャスト法により作製した PDI/PMMA 膜と、膜染色色素 DiIC12 で染色された PC12 細胞を用い、蛍光観察、撮影を行った。

また、オプティカルセクションニングでは干渉縞の位相 θ を 0° , 120° , 240° 動かした 3 枚の画像 I_θ を以下の式を用いて計算処理を行うことによって蛍光画像の Z 軸空間分解能の向上を図った[1].

$$I = [(I_{0^\circ} - I_{120^\circ})^2 + (I_{120^\circ} - I_{240^\circ})^2 + (I_{240^\circ} - I_{0^\circ})^2]^{1/2} \quad (1)$$

【結果・考察】 Fig. 1(a)に PDI/PMMA 膜に照明光を照射したときの蛍光画像を示す。また、ポッケルスセルに加える電圧を Fig. 1(b)に示すように階段状に変化させながら蛍光像を連続的に取得し、それぞれの像から得られた位相変化を Fig. 1(c)に示す。試料上において 2 本のレーザービームを干渉させることで、 $2 \mu\text{m}$ 程度の周期構造を持った照明光が得られた。2 本のレーザービームの間隔を変更することにより、最小で 300 nm 程度の周期構造まで自由に干渉縞の間隔を変えることが可能であった。また、ポッケルスセルに電圧を加え、一方の光路の位相を遅らせることで、構造化照明光である干渉縞の位相を $333 \mu\text{s}$ 毎に変化させ、ポッケルスセルと同期された高速度カメラにより 3000 fps での撮影することに成功した。

Fig. 2 に式(1)のオプティカルセクションニングによって得られた DiIC12 によって染色した PC12 細胞の蛍光画像を示す。Fig. 2(a)は構造化照明光を照射し、観察された DiIC12 染色 PC12 細胞の蛍光画像である。異なる位相(0° , 120° , 240°)の構造化照明光を照射して取得した 3 枚の画像について、単純な合計により再構成された蛍光画像を Fig. 2(b)に示す。また、式(1)に従いオプティカルセクションニングによって得られた画像が Fig. 2(c)である。Fig. 2(b)と Fig. 3(c)の同一座標の蛍光強度の断面図(Fig. 2(d))から、オプティカルセクションニングの計算処理を行うことで色素染色されている細胞膜とされていない細胞質との間のコントラストが大きく向上していることがわかった。現在 Fig. 2(a)の画像を取得するのに 1 ミリ秒を要し、オプティカルセクションニングは 3 枚の画像からなっていることから時間分解能は 3 ミリ秒である。

さらに現在の構造化照明光に対し垂直な構造を加えて照明光パターンを格子縞にし、二方向別々に位相を変化させ、平面内の空間分解能の向上に取り組む予定である。

【参考文献】

[1] M. Neil *et al.* *Opt. Lett.* **22**, 24 (1997).

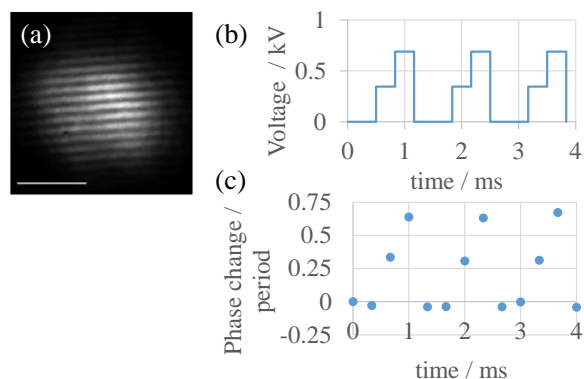


Fig. 1. Evaluation of Pockels cell. (a) A fluorescence image of PDI/PMMA film with structured illumination. Scale bar is $10 \mu\text{m}$. (b) Time evolution of voltage with staircase waveform applied to the Pockels cell. (c) Corresponding phase change of illumination light pattern with the voltage of staircase waveform.

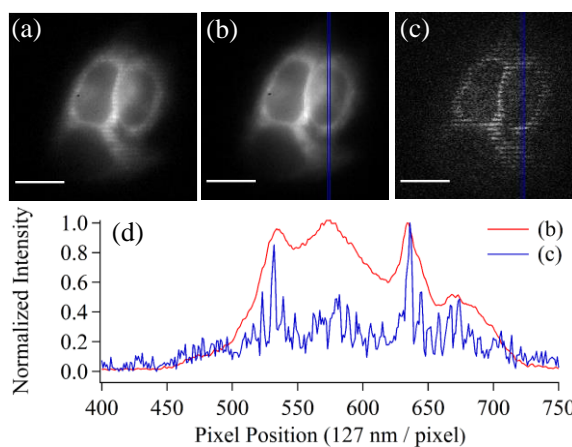


Fig. 2. Improvement of z-axis resolution by optical sectioning. (a) A raw image of a PC12 cell stained by DiIC12 with structured illumination. (b) Simple sum of three images with different phase (0° , 120° , or 240°). (c) An image created by calculation of optical sectioning Eq. (1). (d) Comparison of line profiles of (b) and (c). All scale bar is $10 \mu\text{m}$.