

生細胞内観察に向けた高速構造化照明顕微鏡による 超解像画像の高速取得

東北大院薬

○鈴木斗夢, 梶本真司, 中林孝和

Fast acquisition of super resolution image with the high speed structured illumination microscopy for *in vivo* observation

○Tomu Suzuki, Shinji Kajimoto, Takakazu Nakabayashi

Graduate school of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Japan

【Abstract】 We are aiming at fast acquisition of super resolution images using a high speed structured illumination microscope (SIM). We have previously shown that the phase of structured illumination pattern can be shifted with high-speed operation using a Pockels cell, and the one-axis resolution became higher using the constructed SIM system [1]. In this study, we measured the point spread function (PSF) of the constructed SIM with fast-phase modulation to confirm that the lateral resolution is improved by the SIM with two (X- and Y-axis) Pockels cells. The PSF width of the SIM images were smaller than that of the images obtained with wide-field illumination (WF), indicating that the present SIM has better lateral resolution than the conventional WF. Moreover, it was confirmed that the lateral resolution of the SIM images exceeds the diffraction limit. We therefore conclude that super resolution image can be acquired sequentially by the constructed SIM system. Continuous acquisition of super resolution images of living cells is in progress using our high speed SIM.

【序】 光学顕微鏡は分子生物学などの研究において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困難な生細胞内の観察を可能にする。しかし、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おり、回折限界を超える空間分解能を持つ超解像顕微鏡の開発・応用が、現在盛んに行われている。

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倍まで空間分解能が上昇する。他の超解像顕微鏡と比べて、任意の蛍光分子を用いることができる特徴を持つ。しかし、SIM 測定では、一枚の超解像画像を得るために照明光の構造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。この照明光の制御が時間分解能の律速段階となり、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、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の光学系に導入した。照明光パターンの位相変化を電気的かつ高速に制御することによって、超解像画像の高速動画取得を検討している。昨年度はSIMによって一軸方向の高分解能化に成功したことを報告した[1]。今回の発表では、広視野顕微鏡画像 (WF) とSIM画像での点像分布関数 (PSF) の測定・比較を行い、構築した光学系でのXY平面の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, 20 ns, Ekspla) 光を回折格子に通し、生じた回折光のうち3本を対物レンズ (100x, NA=1.49, oil immersion, Nikon) に導入することで、焦点位置で構造化照明光となる格子状の干渉縞を得た。2本の回折光の光路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縦横、独立に変化させた。蛍光画像はポッケルスセルと同期した高速度カメラ (1 kHz, Photoron) を用いて撮影した。照明光の構造の評価には、ペリレン誘導体

を分散させたポリマー薄膜を用い、PSFの評価には50 nmの蛍光ビーズを用いた。

干渉縞のX軸方向の位相を θ 、Y軸方向の位相を Φ とし、 θ と Φ をそれぞれ独立に0、1/3、2/3周期と変化させて得られた5枚の画像 $I_{\theta,\Phi}$ をフーリエ変換した。以下の式によりX軸方向とY軸方向の超解像画像成分を求め、さらに既知の構造化照明光の周波数成分の情報を用いて計算処理を行うことによって、フーリエ空間内の遮断周波数の拡張を行った [2]。

$$X_{\pm} = \left(\frac{1}{3}\right) * \left[\widetilde{I}_{0,0} + \widetilde{I}_{\frac{1}{3},0} * \exp\left(\pm \frac{2\pi i}{3}\right) + \widetilde{I}_{\frac{2}{3},0} * \exp\left(\mp \frac{2\pi i}{3}\right) \right]$$

$$Y_{\pm} = \left(\frac{1}{3}\right) * \left[\widetilde{I}_{0,0} + \widetilde{I}_{0,\frac{1}{3}} * \exp\left(\pm \frac{2\pi i}{3}\right) + \widetilde{I}_{0,\frac{2}{3}} * \exp\left(\mp \frac{2\pi i}{3}\right) \right]$$

$$M_0 = \left(\frac{1}{6}\right) * \left(\widetilde{I}_{\frac{1}{3},0} + \widetilde{I}_{\frac{2}{3},0} + \widetilde{I}_{0,\frac{1}{3}} + \widetilde{I}_{0,\frac{2}{3}} - \widetilde{I}_{0,0} \right)$$

計算により得られた X_{\pm} 、 Y_{\pm} と M_0 をフーリエ空間内で足し合わせ、逆フーリエ変換を行うことで超解像画像を作成した。

【結果・考察】ポッケルスセルに電圧を加えた時の構造化照明光のX軸、Y軸方向の位相変化をFig. 1に示す。2つのポッケルスセルへの電圧印加によって、照明光の構造の位相をX軸方向とY軸方向、独立に制御できることが確認できた。

Fig. 2には、WFとSIMを用いて粒径50 nmの蛍光ビーズのPSFを測定した結果をそれぞれ示す。PSFは、蛍光画像の輝点の中心から得られる強度断面図をガウス関数でフィッティングすることで取得した。得られたPSFの半値全幅は、WFでは256 nmであったのに対して、照明光の構造の周期が632 nmの時は189 nmであった。この顕微鏡で用いた対物レンズのNA、および蛍光の観測波長から計算されるレイリーの分解能（回折限界）は224 nmである。今回の結果は、ポッケルスセルを導入して構築したSIMによって、分解能が回折限界を超えて向上していることを示しており、超解像画像の取得が可能であることがわかる。

また、構造化照明光の周期をさらに細かくし、432 nmにするとPSFの半値全幅は154 nmとなった。構造化照明光の周期はさらに細かくすることが可能であり、さらなる空間分解能の向上が期待できる。

現在、蛍光染色した細胞の高速SIM観察による生細胞内の超解像画像の連続取得、および蛍光色素で標識したナノ粒子の溶液中のブラウン運動の追跡による時間分解能の評価などを行っている。

【参考文献】

- [1] 鈴木, 梶本, 中林, 第11回分子科学討論会, 1P074 (2017)
 [2] J.-Y. Lin *et al.* *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.* **11**, 015301 (2009)

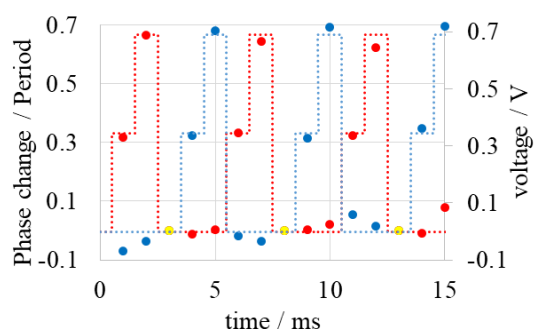


Fig. 1. Phase change of illumination light pattern upon the voltage application to pockels cells with staircase waveforms (dotted lines). Red circle: Phase change of Y-axis pattern. Blue circle: Phase change of X-axis pattern. Yellow circle: The standard of the phase for each set of five images. The color of each dotted line corresponds to that of each circle.

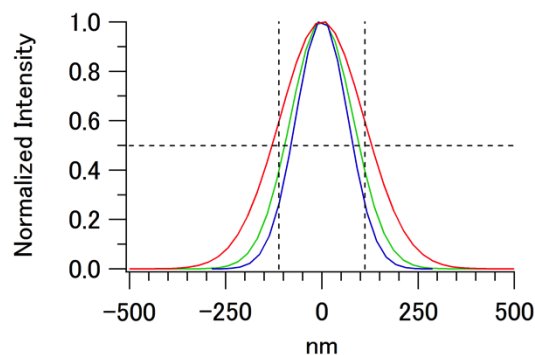


Fig. 2. PSFs of WF (red) and SIM with illumination pattern of 632 nm (green) and 432 nm (blue) periods. Vertical dotted line indicates the diffraction limit with the present objective (NA: 1.49).