

## 生体内1分子イメージングのための三次元カメラの開発

東工大院・物理

○松田剛, 藤芳暁, 松下道雄

### Development of 3D camera for 3D imaging of an individual molecule in biological sample

○Tsuyoshi Matsuda, Satoru Fujiyoshi, Michio Matsushita

*Department of Physics, Tokyo Tech, Japan*

**【Abstract】** To visualize 3D molecular arrangements of individual molecules in biological sample, it is necessary to minimize blinking and background noises at the same time. We are developing 3D camera in order to remove these noises. 3D camera observes simultaneously the axial sections of fluorescence image, and the blinking noise from an individual emitter becomes zero. For axial localization, we used the axial sections in the airy disk, consequently, background emission was suppressed, like a confocal microscope. The optical simulation of 3D camera showed that the 3D localization precision is achieved 1 nm when the number of collected photons reaches  $7 \times 10^6$  counts.

**【序】** 細胞内にある生体分子の三次元位置を1分子観察する場合、背景光と明滅現象に由来する雑音(明滅雑音)を同時に除去する事が大切である。共焦点顕微鏡は優れた背景光除去能があるため細胞内の観察は可能だが、明滅雑音が大きく分子レベルの測定ができない。一方、CCDカメラを用いた off-focus 法を用いると、明滅雑音がゼロになるので、細胞外であれば色素1分子の三次元位置を1 nmの精度でイメージングできるが[1]、背景光が除去できないため生体内の測定への応用が難しい。本研究では、Multifocal Plane Microscopy[2]という明滅雑音が除去可能な三次元の測定法に着目した。光学シミュレーション上は、共焦点顕微鏡と同様の背景光除去能がありつつ、明滅雑音がゼロになるので1 nmの精度で1分子の位置を決定できる事が分かった。本講演では、CCDカメラ一台で、三次元点像分布関数の任意の断面を同時に測定可能な光学系(三次元カメラ)の設計と光学シミュレーションについて報告する。

**【光学シミュレーション】** 光学シミュレーションに用いた三次元カメラの光学配置を Fig. 1(A)に示す。座標系は図のように光軸方向をZ軸、焦平面方向をXY平面とした。ターゲット分子からの蛍光を焦点距離が  $f=2.52$  mm、 $NA=0.90$  の反射対物レンズで集めビームスプリッターを用いて光線を複数に分割し、光線を焦点距離が750 mmの凹面鏡で一台のCCDカメラに結像させる。このとき、対物レンズと各凹面鏡の間の距離が両者の焦点距離の和になるようにしつつ、カメラに対する結像位置がZ軸方向にずれるように凹面鏡を配置する。Fig. 1(B)に光学シミュレーションの結果を示す。これは結像側の三次元点像分布関数の断面図を表している。ターゲット分子のXY方向の位置は、得られた断面図のうち焦点付近の像の重心位置を求めることで決定する。また、Z方向の位置は、Fig. 1(B)のように得られた像の第一暗環の外側をマスクし、第一暗環中にある光子数を縦軸、横軸にカメラに対する焦点位置のずれとした強度分布をつくり、この重心位置を求めることで決定する。Z軸方向の位置決めの際に各断面図の第一暗環内の光子のみを取り出して使うことで、ピンホールを使い背景光を除去する共焦点顕微鏡と同様のノイズ除去効果がある。シミュレーションでは、光学計算ソフト Zemax を用いて Fig. 1(A)の光学系で光子数がN個のときに得られる画像を取得し、画像にショット雑音を乗せて三次元の位置決定を1000回繰り返し、光子数

Nに対する三次元位置決定のときの誤差を計算した。また、Fig. 2のように対物レンズの焦点位置にターゲット分子を置き、さらに座標(0, Y, Z)に背景光となる分子を置いたときにターゲット分子のZ方向の位置が原点からどれだけずれるかを計算することで背景光による誤差を求めた。

**【結果】**1分子の三次元位置決定における誤差の結果を Fig. 3(A)に示す。横軸がカメラに集まった全光子数Nであり、縦軸が位置決定の誤差である。黒丸がシミュレーション結果で実線が結果を  $1/\sqrt{N}$  でフィッティングしたものである。結果より  $7 \times 10^6$  個の光子を測定すれば三次元で1 nmの精度で位置決定できる事が明らかになった。この光子数は、超流動ヘリウム下の低温で実験をすることにより色素の光退色が抑えられるので十分測定可能だと考えている。

次に、背景光雑音の除去能の比較を Fig. 3(B)に示す。横軸は、背景光を発する分子のY座標であり、縦軸は背景光分子がいることによるターゲット分子のZ座標のずれである。シミュレーションでは背景光となる分子のZ座標を  $Z=1 \mu\text{m}$  に固定しY座標を動かした。黒丸が Off-focus イメージング、赤丸が三次元カメラ、青丸が共焦点顕微鏡の結果である。励起波長は685 nm、蛍光波長は800 nmとしている。赤丸と青丸の結果から3Dカメラは共焦点顕微鏡と同等の背景光除去能があるという事が明らかになった。CCDカメラに写る像の第一暗環半径を顕微鏡の倍率で割り、物体側の値に換算するとおおよそ  $0.5 \mu\text{m}$  となる。したがって、2つの分子がこの値より近接すると像を分離する事が出来なくなる。このため、横軸が  $0.5 \mu\text{m}$  以下では誤差が大きくなってしまおうと考えている。

#### 【参考文献】

- [1] T. Furubayashi *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* 2017 **139** (26), 8990-8994  
 [2] S. Ram *et al.* *Biophys J.* 2012 **103** 1594-1603

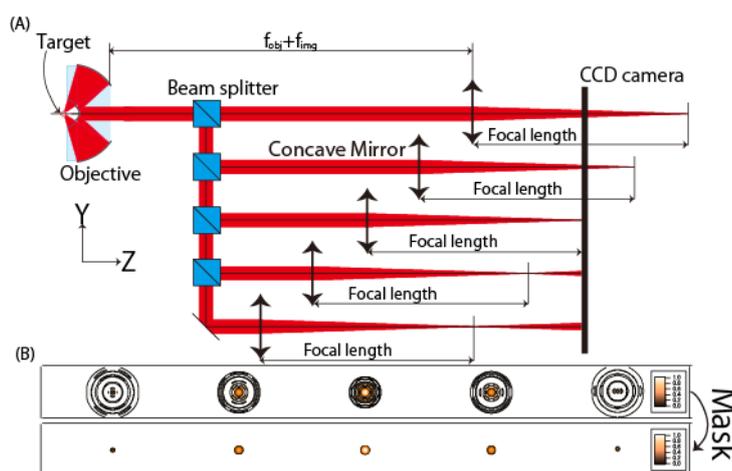


Fig. 1. Schematic diagram of the 3D camera.

(A) Optical system of the 3D camera, (B) cross sections of the 3D psf.

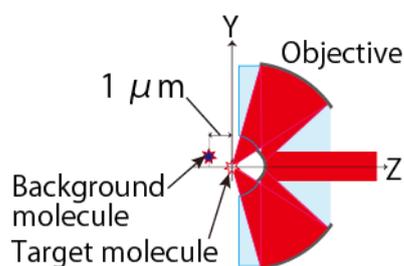


Fig. 2. Positional relationship of the target molecule and background molecule.

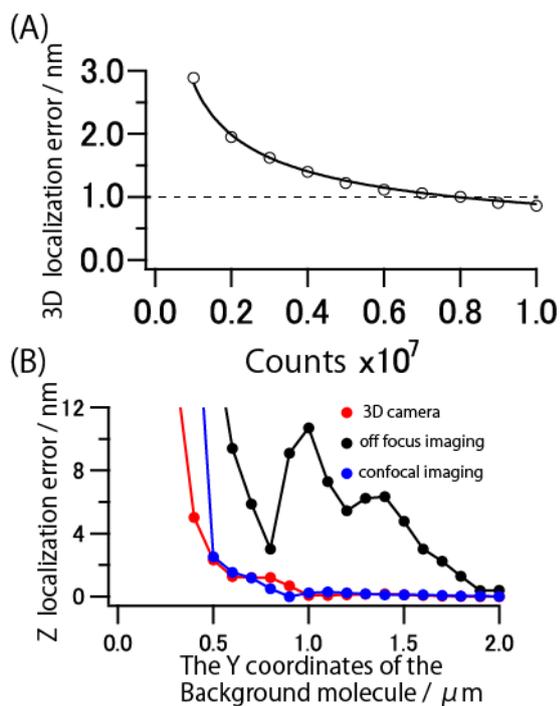


Fig. 3. Localization errors.

(A) 3D localization error as a function of N.  
 (B) Axial (Z) localization errors as a function of the Y coordinates of the background molecule.