

2 波長ピコ秒赤外超解像顕微鏡の開発と細胞への応用(2)

(東工大資源研¹・東工大統合研究院^{1,2}・北大電子研³)酒井 誠¹, 大森 努², 金城 政孝³, 太田 信廣³, ○藤井 正明^{1,2}

【序】我々は2波長二重共鳴分光法の1つである過渡蛍光検出赤外分光法をレーザー蛍光顕微鏡に応用することで、従来にない高感度検出と超解像(回折限界の突破)を同時に達成する新規な赤外超解像顕微鏡の開発を行った。過渡蛍光検出赤外分光法は、従来、振動緩和の研究手段¹⁻²として用いられているものであり、第1の赤外レーザー光によって特定の振動に赤外励起した分子のみを第2の可視レーザー光により選択的に電子励起することで生じる S_1 状態からの蛍光(過渡蛍光)を検出する分光法である。この時、赤外光と可視光が重なったところからのみ蛍光が発生する現象を超解像原理に利用する。赤外光および可視光を同軸からレンズに入射した場合、それぞれの光はNAと波長で一意に決まる回折限界以下に集光できない。一方、回折限界は同じNAの場合、波長に比例する。可視光と赤外光では、波長が1桁異なるので必然的に可視光は赤外光の10分の1程度まで焦点径を絞ることが可能となる。重なり部分は、原理上、赤外光の回折限界よりも遥かに小さな可視光の回折限界まで収縮可能である。すなわち、赤外の振動情報を可視光の回折限界に依存する空間分解能で取り出す赤外超解像顕微分光が実現できる(図1)。

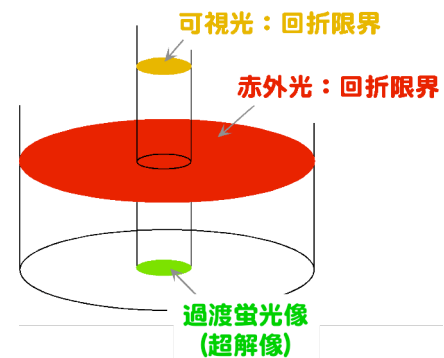


図1: 赤外超解像原理

我々の開発した赤外超解像顕微鏡の最大の特徴は、赤外振動準位を経由する以外は、電子励起された S_1 状態からの蛍光を観測する通常のレーザー蛍光顕微鏡と何ら違いはない点である。空間分解能に関しても、赤外光と可視光との重なり=可視光の回折限界に依存する集光スポットサイズで決まるため、レーザー蛍光顕微鏡と同等レベルまで分解能の向上が見込まれる。従って、蛍光顕微鏡の特徴である、1) in situ の観測が可能、2) 共焦点光学系により、物体内部の断層像を基にした3次元可視化が可能、3) 機械的プローブを用いる必要がないため物質内部の3次元構造の観察が可能、といった利点をそのまま反映する。加えて、赤外の情報も得ることができるため、レーザー蛍光顕微鏡では事実上不可能であった分子構造解析も可能となることが期待される。本研究では、微小試料として蛍光ビーズを取り上げ、赤外超解像顕微鏡法の原理・検証実験を行い、性能の評価を行った。さらに、この分光法を細胞へも適用した結果も併せて報告する。

【実験】我々の開発した赤外超解像顕微鏡法では、振動準位を経由した赤外・可視の二重共鳴信号を蛍光として観測する。赤外光によって振動準位に励起された分子のポピュレーション

ンは振動緩和によりピコ秒の時間領域で減少してしまうため、振動励起分子が振動緩和するよりも前に可視光で S_1 状態に電子励起することがこの赤外顕微鏡法を実現するため

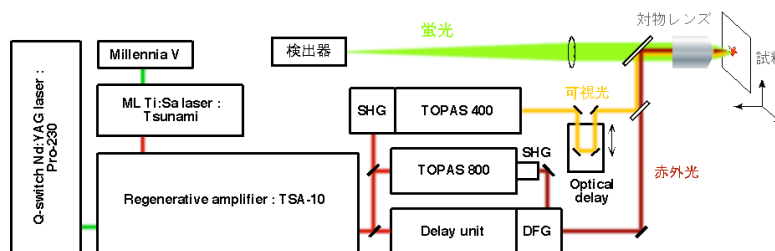


図 2 : 赤外超解像顕微分光装置

には必要不可欠である。従って、光源にはピコ秒波長可変レーザーシステムを用いた。ピコ秒赤外光および可視光をレーザー蛍光顕微鏡に同軸から試料に入射し、発生した蛍光（過渡蛍光）を ICCD 検出器もしくは光電子増倍管で観測した。概略図を図 2 に示す。

【結果と考察】図 3 に蛍光ビーズへ赤外超解像顕微鏡法を適用した結果を示す。(a)に 539 nm の光を用いた 1-color の蛍光像を示す。これは通常のレーザー蛍光顕微鏡と全く同じ測定を行ったものであり、およそ 15 μm 径の蛍光像が観測されている。(b)に赤外超解像法を適用した結果を示す。赤外 (330 nm) と可視 (621 nm) の両方を同時入射した場合、過渡蛍光像が明瞭に観測されている。この過渡蛍光は赤外光のみ、あるいは可視光のみを入射した場合には全く観測されない。また、赤外光の波長を 2810 nm に変えたところ蛍光強度が著しく減少した。これは、蛍光ビーズにおいても赤外吸収に依存して過渡蛍光が観測されることを示している。(c)および(d)は白線部分の蛍光像の強度の実測結果 (赤色) と装置の空間分解能 (6.8 μm) を考慮に入れて蛍光強度をシミュレーションした結果 (青色) を併せて示してある。両者の実測値ともシミュレーションの結果とよく一致しており、1-color の蛍光像と赤外超解像がほぼ同じ分解能で観測されていることが分かる。

これは、赤外超解像の分解能が可視光で決まり、赤外の影響はほとんどないことを意味している。さらに、赤外の回折限界 (16.6 μm) で蛍光強度をシミュレーションした結果 ((d) : 緑色) より実測値は遙かに高分解能である。即ち、赤外の回折限界を突破した赤外超解像であることは明白である。講演では、時間分解測定、波長依存測定、赤外波長の長波長化の結果を示し、赤外超解像顕微鏡法の性能評価を詳細に行うと共に、シロイヌナズナの毛根細胞に赤外超解像顕微鏡法を適用した結果も示す。

【参考文献】

1. A. Seilmeier, W. Kaiser, A. Laubereau, S.F. Fischer, *Chem. Phys. Lett.* **58** (1978) 225.
2. M. Sakai, M. Fujii, *Chem. Phys. Lett.* **396** (2004) 298.

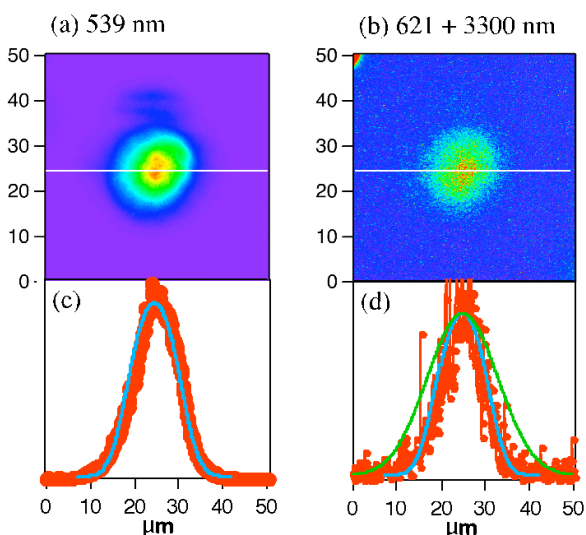


図 3 : 赤外超解像顕微鏡法のビーズへの適用
(c), (d)は実測 (赤色) とシミュレーションの比較
青色 : 装置の分解能 = 6.8 μm
緑色 : 赤外の回折限界 = 16.6 μm