

平成22年 6月 4日現在

研究種目： 基盤研究(B)
 研究期間： 2007～2009
 課題番号： 19360113
 研究課題名（和文） 光波混合非線形レーザ顕微鏡によるナノバイオイメージング
 研究課題名（英文） Nano bio-imaging with wave-mixing nonlinear confocal microscopy
 研究代表者
 江上 力 (EGAMI CHIKARA)
 静岡大学・工学部・教授
 研究者番号： 70262798

研究成果の概要（和文）：位相整合を利用した光波混合型の非線形レーザ顕微鏡を開発し、被測定生体細胞として池や川など自然界に生息する緑藻細胞中に含まれる葉緑体細胞の高コントラスト・高分解能断層影像化に成功した。

研究成果の概要（英文）： We have developed nonlinear confocal microscopy with wave mixing geometry. We have succeeded in high contrast and resolution CT imaging of chlorophyll tissue in green alga.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2008年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・知能機械学・機械システム・精密機械システム

キーワード：顕微鏡，非線形光学

1. 研究開始当初の背景

蛍光発光を利用する従来型の生物用レーザ顕微鏡は、細胞たんぱく質内への蛍光色素（プローブ）染色を行う。同プローブを利用することで、非常に高い空間分解能で特定細胞の分光計測が可能となる。ところが利用されるRhodamine-FTIC系やATTO系等の蛍光標識色素試薬のほとんどが非常に強い毒性ものによっては発癌性を示すため、観測者が試薬を実際に扱う測定時は言

うまでもなく、これを使用するバイオチップも製造、流通から最終処分段階まで環境問題となる危険を孕んでいる。ナノバイオイメージングに対してのニーズが益々強まる一方、蛍光反応を利用した測定法以外に特定細胞の分光を行える手法がごくわずかしか提案されていないのが実情である。

2. 研究の目的

本研究は毒性・発癌性物質である蛍光

色素による染色を全く必要としない、人体に安心・安全なナノバイオイメージング技術を提供するものである。特に人工光合成等でも注目されている葉緑体クロロフィルの内部構造を新規提案顕微鏡により3次元分光計測する技術の確立を目指す。

通常の多光子蛍光顕微鏡を用いたクロロフィル細胞の計測画像例では蛍光発光の空間的分布はある程度判別できるが、あくまでも大まかな分布状態のみで、内部チラコイド細胞壁の状態までは計測することはできない。そのため、通常は電子顕微鏡を用いた *in vitro* 計測を併用して活性領域と細胞構造を別々に計測する。

ここでは水等の溶媒雰囲気中において細胞の組織欠陥や活性状態等の *in vivo* 分光計測を可能とする上記欠点を克服する全く新しい概念の顕微計測法を開発する。

3. 研究の方法

π 電子共役系で形成される生体はコヒーレント光に対しマイクロには有機物特有の3次の非線形光学特性を示し、各細胞の組織形状または活性状態に応じた非線形感受率テンソル $\chi^{(3)}$ 成分を形成する。この91にも及ぶテンソル成分を何らかの方法で検出できれば分子レベルでの分光が可能となる。本研究ではこの発想のもとに観測細胞自体の非線形性を利用してベクトリアル光波混合型偏光干渉計を形成し、その散乱共役光電界に反映される感受率成分を3次元スキャンするレーザ顕微システムを開発する。

具体的には共焦点光学系に4光波混合系を組み込んだ、偏光干渉レーザ顕微鏡システムを構築する。対向励起光と共焦点プローブ光を生体細胞 (Cell) に入射させるため、光軸近傍では自動的に位相整合を満たす光学系となる。その際、ナノピエゾステージを使ってプローブ光をスキャンし、 $\chi^{(3)}$ テンソル成分 ($\chi_{xyyx}^{(3)}$) による多波長3次元分光を試みる。

完全なレゾナンス領域での集光照射では内部細胞への熱的ダメージを与

えてしまう恐れがあるため、オフレゾナンス領域での僅かな吸収を利用する。共焦点顕微計測法は元来焦点面付近の僅かな散乱信号を計測可能な手法であり、位相共役波としての散乱信号にもそれほど大きな光強度は要求されない。即ち位相共役波の発生効率に対する条件は非常にルーズである。あくまでもビームがサンプルを透過する際に被る位相歪み・回折等を散乱信号から除去し、散乱光波の波数ベクトルを強制的に補正することが目的である。散乱信号中に特徴量として現れるルジャンドル関数 P_n 内の入力光波と散乱光波間の波数ベクトル差 γ_k を極力小さくし、ファーフールド電界強度 $U(X, Y, Z)$ 及び空間分解能を飛躍的に向上させることが狙いである。

同提案顕微鏡を使ってチラコイドーストロマチラコイドを観測すれば結果内部細胞壁の状態や活性物質の分布状態 (即ち $\chi^{(3)}$) までを比較的鮮明に捕らえることができるものと予想される。

4. 研究成果

(1) 非線形レーザ顕微光学系の研究成果

実験で作製した非線形レーザ顕微鏡の写真を図1に示す。

本研究では、分光計測による波長特性評価を行うために、レーザ光源に波長532nm, 660nmの2つのCWレーザを用いた。当初申請時は405nmを加えた3波長分光を提案したが、近紫外域での光学系の調整がうまくいかず、十分にS/N比の高い画像が得られなかった。そのため、上記2波長に対して非線形散乱分光計測を行った。通常の四光波混合系では、フェムト秒パルスレーザのような大きなパワーを有するコヒーレント光源が必要となるが、本方式では、

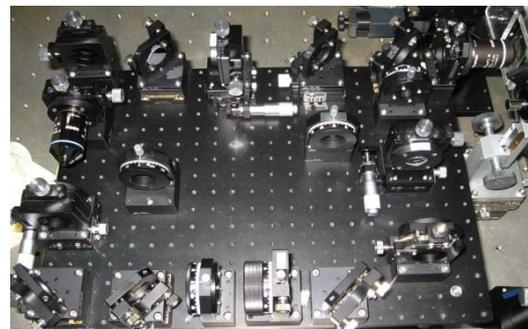


図1 非線形レーザ顕微鏡の光学系

位相整合を利用した 4 光波混合系を用いることで、CW レーザによる散乱計測が可能である。

光学系の詳細は以下の通りである。2 つのレーザから出た P 偏光のビームを一旦ダイクロイックミラーにより同じ光軸状に乗せる。このビームは対物レンズと平凸レンズにより、ビームエキスパンドされ、直径約 1.2cm のビームになる。次に、ミラーで反射されたビームは、ビームスプリッタにより二分され、一方のビームは 1/2 波長板と偏光子により S 偏光に変換され、もう一方は、偏光子により P 偏光が整えられ、ビームスプリッタを通過し、サンプルに入射する。

S 偏光のビームは、対物レンズ (NA=0.9) により集光され、およそ 721nm のスポットサイズでサンプルに高強度で入射する。対物レンズの焦点面とサンプルの表面や裏面などの界面が一致すると、ピンホールの位置が焦点となり、像が結像するため、共焦点散乱信号が強くなる。

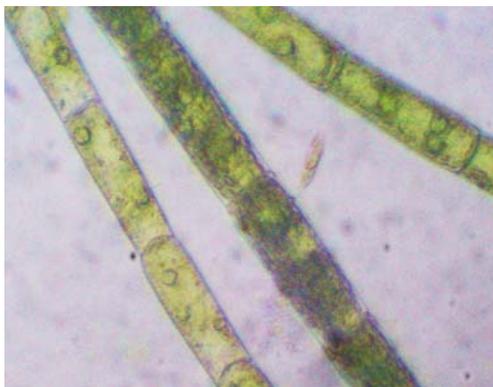


図 2 緑藻の光学顕微鏡写真

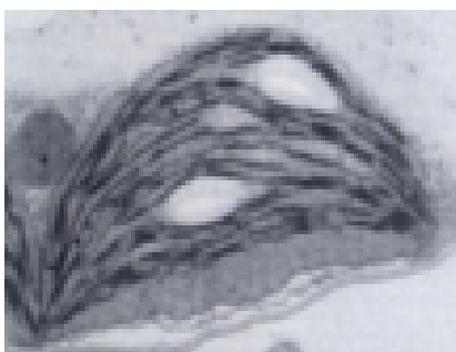


図 3 緑藻の電子顕微鏡写真

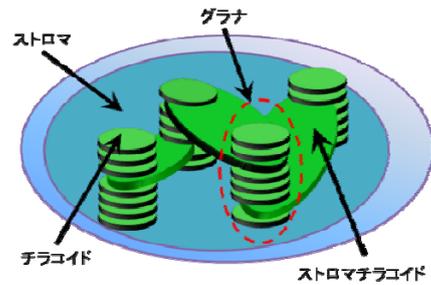


図 4 緑藻のストロマ-チラコイド構造

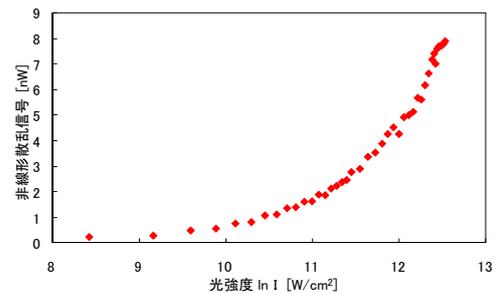


図 5(a) 非線形散乱信号の入射光強度依存性 ($\lambda = 660 \text{ nm}$)

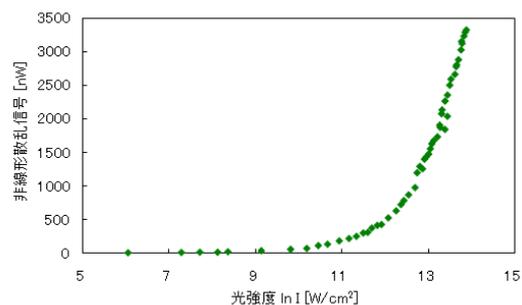


図 5(b) 非線形散乱信号の入射光強度依存性 ($\lambda = 532 \text{ nm}$)

P 偏光のビームは、 $f = 200 \text{ mm}$ の平凸レンズと対物レンズ (NA=0.9) により一旦コリメートし、平行光としてサンプルに入射する。このコリメートによって、サンプル透過後の P 偏光のビームは、回折による空間フィルタリングにより、ノイズカットが成される。そのため、ビームの波数はずれることなく、サンプルの後方にあるミラー (M3) によって反射され、再びサンプルに入射する。ここで、サンプルからミラーまでの往復の光路長は、レーザのコヒーレンス長以内に設定されている。平面波である S 偏光入射光は、一旦測定サンプルを透過するが、同物体の空間周波数が十分大きいことから、それによる散乱光がミラーとの往復伝搬で拡散するために、物体への再入射

で与える影響は十分小さいものと考えられる。

このS偏光とP偏光により4光波混合系が構成され、位相整合条件が満たされたサンプル領域には非線形感受率 $\chi^{(3)}_{xyyx}$ 成分が誘起される。そして、 $\chi^{(3)}_{xyyx}$ の散乱信号の含まれたS偏光のみを検光子で検出し、サンプルの自動ステージによるシーケンス制御を行い、数十nmステップで光軸方向に移動させ、フォトディテクタで非線形散乱信号を計測し、断層画像を観察した。

(2) 緑藻サンプルの断層画像計測成果

図2はサンプルとして用いた川や池などに生息する緑藻の一種の光学顕微

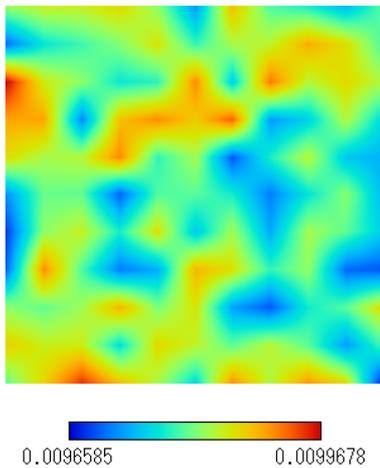


図6(a) 共焦点非線形レーザ顕微鏡画像 ($\lambda=660$ nm)

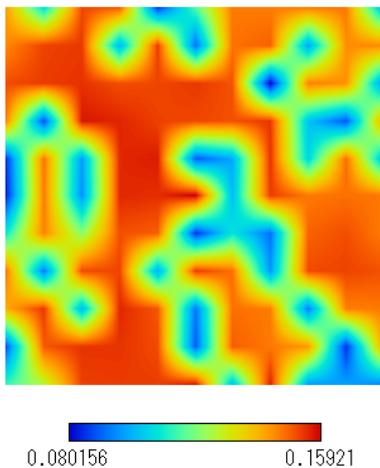


図6(b) 共焦点非線形レーザ顕微鏡画像 ($\lambda=532$ nm)

鏡写真である。また、図3はその内部に含まれる葉緑体内部構造の電子顕微鏡画像である。葉緑体細胞をスライスした *in vitro* での平面画像であるため、細い線上構造をしているように見えるが、実際には袋状の微細胞が含まれ、これが葉緑体クロロフィルとなっている。その構造概念図を図4に示す。葉緑体クロロフィルは円盤状のチラコイド細胞と棒状のストロマチラコイド細胞が橋桁状に結合された構造を持ち、電子顕微鏡の分析等ではこのサイズが数百nmから数ミクロンと言われている。本研究ではこの内部構造を水雰囲気中で細胞を破壊することなく、完全に *in vivo* における断層影像を観測した。

その前に実際に同顕微鏡を使って緑藻細胞中に非線形分極を誘起し、それからの散乱信号を計測するために、どの程度の入射光強度で葉緑体クロロフィル中に非線形分極が誘起できるのかを測定する必要がある。図5(a)は波長660nmにおける葉緑体サンプルの非線形散乱信号—入射高強度依存性を表す。図5(b)は波長532nmにおける葉緑体サンプルの非線形散乱信号—入射高強度依存性を表す。532nmではクロロフィルbの吸収から若干外れた波長領域にあるため、サンプルの吸収が比較的低い。測定値から描かれた曲線は、非線形散乱信号の理論曲線に近い飽和吸収特性が観測されている。しかし、660nmではほぼ吸収が飽和しかかっているが、532nmでは飽和特性を観測するにはより大きな光強度が必要と見られる。このデータから波長660nmでの飽和強度を約 1.559×10^5 (W/cm²)と設定し、532nmでの飽和強度を約 6.758×10^5 (W/cm²)と設定した。同条件下で非線形分極 $\chi^{(3)}_{xyyx}$ を誘起し、それからの共焦点散乱信号を提案顕微システムにより検出し、断層影像化した。但し、注意しなければならないことは、3次の非線形分極は電気感受率のテンソル対称性の性質から等方性媒質でのみ誘起される成分であるという点である。本顕微鏡はこれを逆に利用し、励起集光光のエアリディスク内でのビーム横モードに対する細胞の対称性、非対称性が重要となる。即ち、細胞内の大まかな領域(ストロマ構造)と細胞壁等の細かな領域(チラコイド—ストロマチラコイド)の対称性に注目をした。

大まかな領域は細かな領域より、より等方性媒質に近い性質を有しているものと想定する。この結果大まかな細胞領域かでは大きな非線形分極が誘起され、大きな散乱光が得られ、細かな細胞領域かでは非線形分極がそれほど誘起されないため、散乱光がほとんど得られない結果となる。

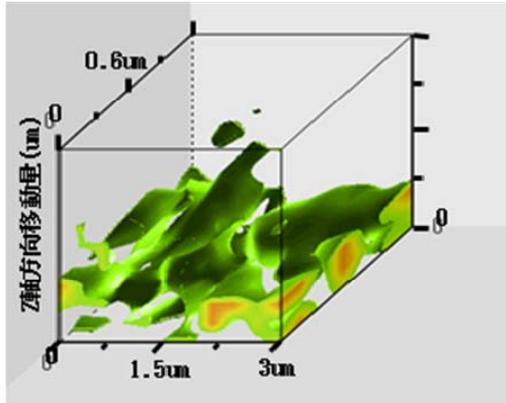


図 7(a) 緑藻の 3 次元画像計測
($\lambda = 660 \text{ nm}$)

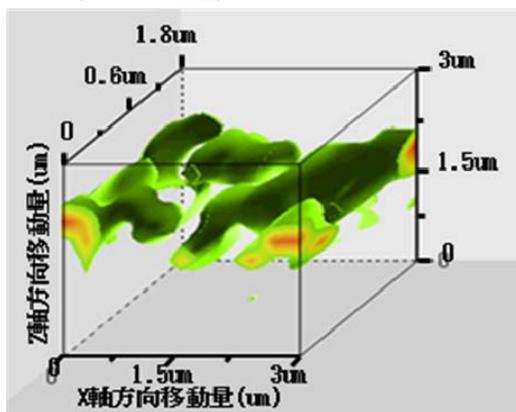


図 7(b) 緑藻の 3 次元画像計測
($\lambda = 532 \text{ nm}$)

図 6(a) は 660nm における断層画像計測結果である。また、図 6(b) は 532nm における光波混合型非線形レーザー顕微鏡を利用した断層画像計測結果である。上段の理由から得られた画像は色温度が逆になって表現されることとなる。即ち散乱高強度の大きい等方性媒質領域からは大きな非線形散乱信号が得られるため、色温度はより赤に近い画像となり、非等方性媒質領域では僅かな非線形散乱信号しか得られないため、色温度はより青に近い画像となっている。クロロフィル b の吸収ピークに近い、660nm ではグラナ細胞内部の組織分布が計測されていることが分かる。ま

た屈折率分散が大きい 532nm では円盤状チラコイド細胞と棒状ストロマ細胞がはっきりと観測されていることも分かる。これは図 7 を上から観測した画像に相当する。

サンプルを 3 次元に走査し、平面画像のスキヤニングをレーザにより行った。図 6-3(a), (b) は波長 532nm と 660nm で、サンプルを 0.3nm ステップで走査し、クロロフィル細胞の立体映像化を試みた。

(3) 緑藻サンプルの立体画像計測成果

得られた葉緑体の断層画像データを 3 次元立体画像図化したものを図 7(a), (b) に示す。

以上の 3 次元データはごく最近になって漸く観測できたものであり、この成果について成果報告が間に合わず以下の雑誌論文データには掲載されていない。現在、同成果について海外有名雑誌への投稿論文を執筆中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① N. Nishimura and C. Egami, Jitter-free nano-spheres data storage system, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 査読有, Vol. 505, 2009, pp. 44-50

② C. Moriguchi, C. Egami, Y. Kawata et. al., Stroboscopic near-field imaging for the analysis of contraction of muscle cells, *J. Microscopy*, 査読有, Vol. 233, 2009, pp. 44-50

③ C. Egami, A. Ito, T. Itoh, Y. Liu, Nonlinear confocal microscopy for high-resolution Measurement, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 査読有, Vol. 47, 2008, pp. 6826-6829

その他、現在執筆中

[学会発表] (計 3 件)

① C. Egami, H. Tanaka, H. Murakami, S. Ota, Polarization-interferometric nonlinear confocal microscopy for measuring nano-sized objects, *ICEM 2009*, 2009/11/18, Singapore

② A. Ito, C. Egami, High-resolution measurement of absorptive object by confocal microscopy, *Frontiers in optics 2008*, 2008/10/22, Rochester, NY

③ Y. Liu and C. Egami, Nonlinear confocal microscopy for high resolution Measurement, *MOC' 07*, 2007/7/30, Takamatsu

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江上 力 (EGAMI CHIKARA)

静岡大学・工学部・教授

研究者番号：70262798

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：