

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03518

研究課題名(和文) 高速構造化照明顕微鏡の開発と動的ソフトナノマテリアルのリアルタイム観察

研究課題名(英文) Construction of a high-speed structured illumination microscope and its application to the observation of dynamic soft materials

研究代表者

梶本 真司 (Kajimoto, Shinji)

東北大学・薬学研究科・講師

研究者番号：80463769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：高繰り返しナノ秒レーザーを光源として、高速度カメラを検出器として用い、照明光パターンの位相を変調させるためにポッケルスセルを導入することにより、電氣的に照明光パターンの位相を変調させながら、それぞれの位相での蛍光画像を高速に連続して取得可能な構造化照明顕微鏡を構築した。これによって、縦横それぞれ位相を変化させながら5枚の画像を連続して取得することによって、合計5ミリ秒に1枚の超解像画像を得ることができる。また、構造化照明光によって得られた3枚の蛍光画像から深さ方向の分解能が高いオプティカルセクションング画像を3ミリ秒ごとに取得することに成功した。

研究成果の概要(英文)：By combining a high-repetition-rate nanosecond pulsed laser as a light source, and a high-speed camera as a detector, we constructed a fast structured illumination microscope. A laser pulse was split into two beam lines by using a grating and the structured illumination pattern was obtained on a sample as the interference pattern of two or three beams. The introduction of two Pockels' cells into the beam line(s) enables us to modulate the phase of the illumination pattern electrically within few hundreds microseconds. By the high-speed camera synchronized with the Pockels' cells, we obtained fluorescence images illuminated with different-phase pattern. As the result, we succeeded in obtaining optical sectioned images of a fluorescent stained living cell every 3 ms, and super-resolution images within 5 ms.

研究分野：物理化学

キーワード：構造化照明顕微鏡 ソフトマテリアル

1. 研究開始当初の背景

2014年のS. Hell, E. Betzig, W. Moernerらのノーベル化学賞受賞がよく表すように、光の回折限界を超える空間分解能を持った様々な超解像顕微鏡が、新しい理論と技術によって可能になってきた。代表的な超解像顕微鏡の例として Stimulated emission depletion microscopy (STED)や Stochastic re-construction microscopy (STORM), 構造化照明顕微鏡 (Structured Illumination microscopy, SIM)などがあげられ、それぞれ多くの分野で応用され始めていた。特に、分子生物学を含む生物分野では100 nm程度、あるいはそれ以下という空間分解能による生細胞内部の可視化によって、生命活動に伴う細胞内の分子や小器官内のダイナミクスの解明が可能となると期待されている。しかし、これらの超解像顕微法の多くは一枚の超解像画像を取得するために長い時間を要し、時間分解能が低いのが一般的である。例えば、STEDやSNOM等の手法では光源の光学系、もしくは試料を走査し、励起光を照射する位置を変えながら画像を取得するため、同時にそれぞれの位置における分光情報を得られるという利点もあるが、1枚の画像の取得に時間がかかり、自由に溶液内を拡散しているソフトマテリアルの超分解能画像を撮るにはむいていない。また、STORMやPALMなどの超解像顕微手法は、10 nm程度と非常に高い空間分解能を達成していたが(S. Hell et al., *Science* 316, 1153 (2007)), 1枚の超分解能画像を取得するために数100から数1000枚の画像を取得する必要がある、1枚の画像取得に長時間の測定時間が必要となり、ナノメートルスケールの時間変化を追跡することは難しかった。この時間分解能の低さのために超解像顕微画像測定の対象は、動きが緩やかな試料に限られており、活発に動く生細胞の内部や溶液中を拡散するナノ構造体等の観測は難しかった。超解像顕微鏡の一つである構造化照明顕微鏡においては、周期的な構造を持った照明光を用いて数枚の画像を取得するのみで超解像画像が取得可能であったが、照明光の位相を変調させるために時間がかかるため、数ms程度の超解像画像取得は難しかった。そこで本申請研究では、高繰り

返しパルスレーザーを光源としてポッケルスセルと組み合わせることで、高速に照明光パターンの位相を変化させながら画像を取得可能な高速超解像画像測定手法を開発することを目的とした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ミリ秒程度の時間分解能で回折限界を超える超解像画像を取得可能な高速超解像顕微鏡を構築することである。高速超解像顕微手法として、M. G. Gustafssonらによって提案された構造化照明法に注目した(*PNAS* 102, 13081 (2005); *Biophys. J.*, 94, 4971 (2008))。構造化照明法は周期的な構造を持った照明光を試料に照射し、試料の蛍光像を取得する手法である。照明光パターンの周期構造の位相を変えながらいくつかの画像を取得し、それらをフーリエ空間で重ね合わせることにより、超解像画像を得る。一般的に時間分解能は数秒から100ミリ秒程度であり、動的な試料の観測は難しい。本研究では、ポッケルス効果を用いることで、電氣的に励起光となるレーザー光の位相を制御し、高速な照明光パターンの位相変調を可能にすることで、連続的に位相を変えながら複数枚の画像を高速に取得し、連続して得られた複数枚の画像をフーリエ空間で結合することにより、高速での超解像画像取得を可能にする。さらに、構築した高速構造化照明顕微鏡を用いて、生細胞内の超解像画像や溶液内に存在する溶液内ナノ柔構造の画像を取得し、そのダイナミクスについて議論することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

高繰り返しナノ秒レーザーを光源として構造化照明顕微鏡を構築する。ナノ秒レーザーパルスを回折格子、および格子縞フィルターを通して2本、あるいは4本のビームラインに分岐し、分岐したビームを対物レンズを通して試料上で再結合することで干渉縞として周期的な照明光パターンを形成した。分岐したビームラインの一方にポッケルスセルを導入し、パルス電圧を用いてポッケルスセルの屈折率を変化させ、一方のビームラインのみ

の位相を電氣的に変調することで、照明光パターンの位相を変化させた。さらに、ポッケルスセルと同期した高速度カメラを用いて連続的に構造化照明光によって励起された蛍光画像を取得することで、照明光パターンの位相を変調させた複数枚の画像を連続かつ高速に取得した。構造化照明顕微鏡では照明光パターンの位相が異なる複数の画像をフーリエ空間で結合することによって超解像画像とする。一次元方向の解像度向上には連続して撮影した3枚の蛍光画像を、二次元方向の解像度向上には5枚の蛍光画像を用いた。さらに、照明光のパターンの位相が $1/3$ 波長ずつ異なる3枚の蛍光画像を用いて、明暗の差の2乗からオプティカルセクション法によって光軸方向の分解能が向上した画像も取得し、広視野照明によって得られた画像と比較し、評価した。試料としては、細胞膜を選択的に染色できる膜染色色素で染色した神経細胞PC12などを用いた。

4. 研究成果

高繰り返しナノ秒レーザー(Ekspla社, Baltic HP532, 532 nm, ~20 ns, 100 kHz)と回折格子、ポッケルスセル(Leysop社)、顕微鏡、高速度カメラ(Photron社, Fastcam mini)を組み合わせ、電氣的に同期して用いることで高速構造化照明顕微鏡を構築した。回折格子を用いて、励起光となるレーザーパルスをもとのビームラインに分割し、それぞれ油浸対物レンズの後焦点面に集光入射することで試料上において再結合し、干渉縞として照明光パターンを得た。ポッケルスセルへの電圧印加と高速度カメラを同期して撮影することで、それぞれの位相の構造化照明光照射に伴う蛍光画像を取得した。まずポッケルスセルに階段状の電圧をかけることで、照明光パターンの位相がどのように変化するかを評価した。照明光パターンの位相の評価には、試料としてペリレン系色素を溶解させたPMMA溶液をスピコートすることによって作製したPDI/PMMA薄膜を用いた。この薄膜中にはほとんど均一に色素が分散しているため、その蛍光画像から照明光のパターンを評価した。Fig.1に実際に構造化照明光を照射することによって得ら

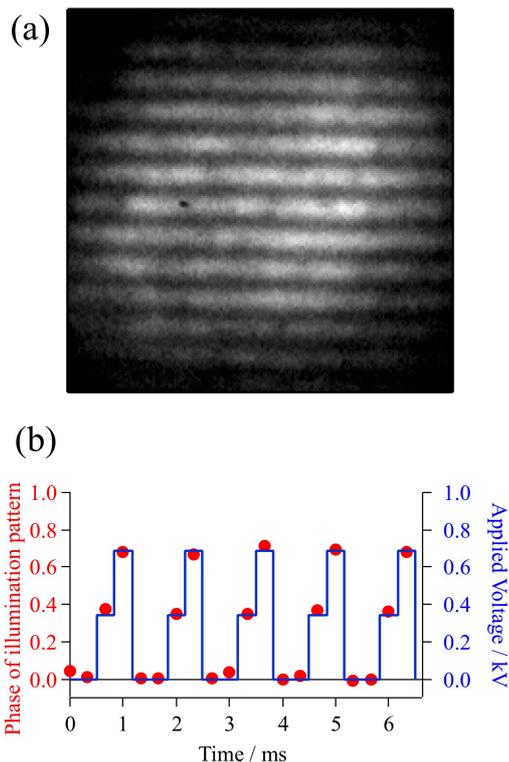


Fig.1 (a)構造化照明を照射することによって得られた PDI/PMMA 薄膜の蛍光画像(b)ポッケルスセルへの印加電圧(青線)と照明光パターンの位相(赤丸)の時間変化

れた PDI/PMMA 薄膜の蛍光画像と、ポッケルスセルに印加した電圧の時間変化、および照明光パターンの位相の時間変化を示した。Fig.1(a)に示したように、干渉縞として、周期的なパターンを持った構造化照明光が得られ、その構造を反映した蛍光画像が得られた。さらにFig.1(b)に示したような250 μ sおきに350 Vごとに階段状に変化する電圧をポッケルスセルに印加することによって、印加電圧の変化にしたがって照明光パターンの位相も階段状に変化させることに成功した。照明光パターンの周期は、光学系に組み込んだ2つのプリズム対の一方の位置をマイクロメータを用いて調整することで、容易に変化させることができ、数100 nm程度から数 μ mまで可変であった。構造化照明顕微鏡は照明光の周期構造と試料が持つ周期構造とのモアレ干渉縞を利用して超解像情報を得るため、照明光パターンの周期は構造化照明顕微鏡における分解能を決定するための重要なパラメータであり、周期が短いほど分解能をあげることがで

きる。しかし、短周期の照明光パターンでは位相の詳細の決定が難しかったため、周期の確認には比較的長周期の照明光パターンを用いた。プリズム対を用いて照明光パターンの周期を変化させて異なる周期でも同様の実験を行なったが、同様の印加電圧によって位相を $1/3$ 波長ずつ変化させることができた。位相はポッケルスセルへの印加電圧に線形に比例して変化し、数 $100 \mu\text{s}$ 程度の電圧変化にも十分に早く応答した。このことから、ポッケルスセルを構造化照明顕微鏡に導入して用いることによって、高速に照明光パターンの位相を変調し、蛍光画像を連続的に取得することが可能であることがわかった。

実際に、構築した構造化照明顕微鏡を用いて、まず生細胞のオプティカルセクションングイメージを得た。試料としては、膜染色色素である DiIC12 で染色した神経細胞 PC12 を用いた。2 本のビームを用いて干渉縞を作成し、照明光パターンの位相を変えながら 3 枚の蛍光画像を連続して取得した。位相は 1 ms ごとに変化させ、それぞれの画像の露光時間も 1 ms とした。照明光パターンの位相の異なる 3 枚の画像 I_0, I_1, I_2 に対して、以下の式のように差の 2 乗和を計算することでオプティカルセクションング像 I_{OS} を得た。

$$I_{OS} = (I_1 - I_2)^2 + (I_2 - I_3)^2 + (I_3 - I_1)^2$$

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($0^\circ, 120^\circ, 240^\circ$)の構造化照明光を照射して取得した 3 枚の画像の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。これは、均一な照明光を用いた広視野照明による蛍光画像に相当する。また、上の式に従い、オプティカルセクションングによって得られた画像を Fig.2(c)に示した。Fig.2(b)と Fig.2(c)の同一座標の蛍光強度の断面図からオプティカルセクションングの計算処理を行うことで DiI によって蛍光染色がされている細胞膜とされていない細胞質の間のコントラストが向上することが明らかになった。この結果はオプティカルセクションングによって深さ方向の分解能が向上したことを示している。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ングは 3 枚の画像からなっていることから、オプティカルセクションングイメージの時間分解能は 3 ミリ秒 であると言える。一方、Fig.2(c)に示したよ

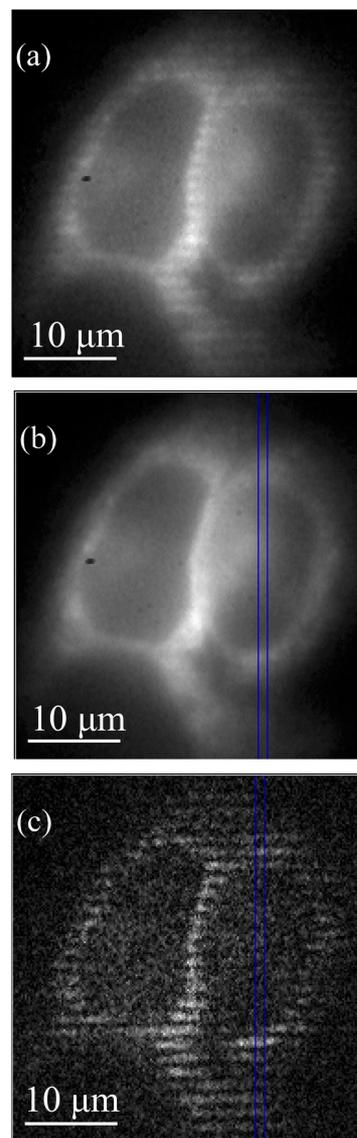


Fig.2 (a) 構造化照明光によって得られた PC12 の蛍光像 (b)広視野照明によって得られた蛍光画像 (c) 3 枚の画像から得られたオプティカルセクションングイメージ

うに得られたオプティカルセクションングイメージには、照明光のパターンに由来する周期的な構造が残っていた。これは、連続して取得した 3 枚の画像の蛍光強度が異なるためと考えられ、用いたレーザーのパルス間のビームパターン、およびレーザー強度の違いによると考えられる。また、照明光パターンの位相差が 120° から数度程度ずれていることも影響していると考えている。画像取得時に強度、位相を揃えるだけでなく、画像取得後にこれらを補正することで、より鮮明な画像が得られると考えている。

さらに、回折格子を格子縞に変え、3 本のビームラインを用いて、干渉縞を作ることにより、格子状に広がる干渉縞を得た。そのうち

2本のビームにポッケルスセルを導入し、それぞれを独立して印加電圧を制御することによって、照明光パターンの周期構造を縦と横、独立に制御できるようにした。縦横の位相を順に変えながら、5枚の画像を連続的に取得し、得られた画像のフーリエ変換像を結合することによって、画像を再構成した。照明光パターンの周期が比較的長い時には、ある程度高いコントラストを持った蛍光画像を取得することができ、ノイズの少ない画像を取得することができた。しかし、500 nm以下の短い周期構造を持った照明光パターンを用いた時には照明光パターンに由来する構造のコントラストが低く、再構成した画像のノイズも大きかった。また色素退色の影響も大きく、得られた画像のコントラストも低かったが、高速に位相を変化させながら取得した画像をフーリエ変換すると照明光パターンに起因する周期を確認することができた。さらに、位相を変えながら得られた5枚のフーリエ変換像からモアレ干渉縞に対応する情報を抜き出し、位相をずらしてフーリエ空間で結合することによって画像が得られることを確認した。それぞれの画像の露光時間を1 msとしたため、1枚の再構築された画像を取得するために5 msの時間を要しており、時間分解能は5msであったと言える。さらに、蛍光の量子収率が高く、輝度が高い蛍光色素を用いることで光退色の影響を小さくし、それぞれの蛍光画像のコントラストをあげることによって、よりノイズの少ない超解像画像が同程度の撮影時間で取得可能になると期待している。

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 7 件)

- (1) Hamza Al Kindi, Ahmed Mohamed, Shinji Kajimoto, Nurbosyn Zhanpeisov, Hideyuki Horino, Yutaka Shibata, Izabela I. Rzeznicka, Hiroshi Fukumura, Single bovine serum albumin molecule can hold plural blue-emissive gold nanoclusters: A quantitative study with two-photon excitation, *J. Photochem. Photobiol. A* (査読有), **357**, 168-174 (2018)
- (2) Umair Yaqub Qazi, Zameer Shervani, Rahat Javaid, Shinji Kajimoto, Hiroshi Fukumura, Formation and Growth of Silver Nanocubes

upon Nanosecond Pulsed Laser Irradiation: Effects of Laser Intensity and Irradiation Time, *Advances in Nanoparticles* (査読有), **6(4)**, 148-157 (2017)

- (3) Mizuki Takeuchi, Shinji Kajimoto, Takakazu Nakabayashi, Experimental Evaluation of Density of Water in a Cell by Raman Microscopy, *J. Phys. Chem. Lett.* (査読有), **8**, 5241-5245 (2017)
 - (4) 梶本真司, レーザー光を用いて金属ナノ粒子を作る, 化学と工業(査読無, 依頼記事), **70**, 884-885 (2017)
 - (5) Shuya Kasai, Shinji Kajimoto, Yuma Ito, Tomo Saito, Ken-ichi Yasumoto, Makio Tokunaga, Kumiko Sakata-Sogawa, Hiroshi Fukumura, Kazuhiro Sogawa, Conformational changes in inhibitory PAS domain protein associated with binding of HIF-1 α and Bcl-x_L in living cells, *J. Biochem.* (査読有), **161(3)**, 291-296 (2017)
 - (6) Masatoshi Toda, Shinji Kajimoto, Shuichi Toyouchi, Toshihiro Kawakatsu, Yohji Akama, Motoko Kotani, Hiroshi Fukumura, Phase behavior of a binary fluid mixture of quadrupolar molecules, *Phys. Rev. E* (査読有), **94**, 052601(16 pages) (2016)
 - (7) Izabela Rzeznicka, Hideyuki Horino, Kazuma Yagyū, Takayuki Suzuki, Shinji Kajimoto, Hiroshi Fukumura, Chlorine adlayer-templated growth of a hybrid inorganic-organic layered structure on Au (111), *Surf. Sci.* (査読有), **652**, 46-50 (2016)
- [学会発表] (計 13 件)
- (1) 梶本真司, 蛍光及びラマン顕微鏡によって観測される細胞内の分子挙動, 日本薬学会東北支部主催 第6回物理・分析系若手研究者セミナー, 11月25日, 東北医科薬科大, 仙台, 2017 (依頼講演)
 - (2) Shinji Kajimoto, Molecular behavior in biological systems studied by various microscopic techniques, 化学系学協会東北大会/Joint Meeting of the Tohoku Area Chemistry Societies,

- September 16th-17th, Morioka, 2017 (依頼講演)
- (3) 竹内瑞貴, 梶本真司, 中林孝和, ラマンイメージングによる生細胞内の水の定量, 第 11 回分子科学討論会, 9 月 15-18 日, 東北大学, 仙台, 2017 (口頭講演)
- (4) 堀井湧介, 平松弘嗣, 梶本真司, 中林孝和, ナノ秒パルス電場の印加による細胞内イオン濃度の変化の計測, 第 11 回分子科学討論会, 9 月 15-18 日, 東北大学, 仙台, 2017 (口頭講演)
- (5) 鈴木斗夢, 梶本真司, 中林孝和, 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, 第 11 回分子科学討論会, 9 月 15-18 日, 東北大学, 仙台, 2017 (ポスター)
- (6) 炭谷双葉, 梶本真司, 中林孝和, 生細胞の細胞膜付近における分子の動態の解明に向けた全反射ラマン/蛍光顕微鏡の構築, 第 11 回分子科学討論会, 9 月 15-18 日, 東北大学, 仙台, 2017 (ポスター)
- (7) 松本季大, 梶本真司, 福村裕史, 橋本修一, 金ナノ粒子の圧力に依存した発光における粒子サイズの効果, 2017 年光化学討論会, 9 月 4-6 日, 東北大学, 仙台, 2017 (ポスター)
- (8) 梶本真司, レーザー誘起相分離過程に現れる溶液内微小構造を基礎とした不斉合成反応場の開拓, 新学術領域「高次複合応答」第 3 回公開シンポジウム, 1 月 20、21 日、シグマホール, 大阪, 2017 (口頭発表)
- (9) 深井隆達, 横須賀巧, 梶本真司, 福村裕史, iso-プトキシエタノール-水混合溶液のナノ秒温度ジャンプ誘起相分離過程, 第 10 回分子科学討論会, 9 月 13-15 日, 神戸, 2016 (口頭発表)
- (10) 松本季大, 梶本真司, 福村裕史, 橋本修一, “金ナノ粒子のナノ秒レーザーパルス励起に伴う発光現象における圧力依存性”, 2016 年光化学討論会, 9 月 6-8 日, 東京, 2016 (ポスター)
- (11) 梶本真司, レーザー誘起相分離過程に現れる溶液内微小構造を基礎とした不斉合成反

応場の開拓, 新学術領域「高次複合応答」第 3 回公開シンポジウム, 1 月 22、23 日、大阪, 2016 (口頭発表)

- (12) Shinji KAJIMOTO, Takashi OKAMOTO, Tomonori TAKAHASHI, Hiroshi FUKUMURA, Plasmon-mediated formation and growth of gold nanoparticles on ITO substrates, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (PacifiChem2015), Honolulu, Hawaii, USA DECEMBER 15 - 20, 2015 (ポスター)
- (13) 梶本真司, 松本季大, 福村裕史, 橋本修一, 金ナノ粒子のナノ秒レーザー励起に伴うパルス幅内ナノバブル発生過程の過渡吸収分光による観測, 2015 年光化学討論会, 9 月 9-11 日, 大阪, 2015 (口頭発表)

[図書] (計 1 件)

- (1) Shinji Kajimoto, Mizuki Takeuchi, Takakazu Nakabayashi, “Raman imaging Microscopy for Quantitative Analysis of Biological Samples”, in Multi-Parametric Live Cell Microscopy of 3D Tissue Models, Edited by Ruslan I. Dmitriev, Springer (2017).

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<https://www.tohoku-biostructchem.com>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
梶本真司 (KAJIMOTO, Shinji)
東北大学・大学院薬学研究科・講師
研究者番号：80463769
- (2) 研究分担者
福村裕史 (FUKUMURA, Hiroshi)
東北大学・大学院理学研究科・客員教授
研究者番号：50208980
- (3) 連携研究者
十川 和博 (SOGAWA, Kazuhiro)