

研究種目：若手研究 (A)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18685008  
 研究課題名 (和文) 時間分解顕微吸収イメージングシステムによる非蛍光性の生体試料の画像観測  
 研究課題名 (英文) Construction of an imaging system using time-resolved absorption for non-fluorescent biological systems  
 研究代表者  
 中林 孝和 (NAKABAYASHI TAKAKAZU)  
 北海道大学・電子科学研究所・准教授  
 研究者番号：30311195

研究成果の概要：蛍光強度測定に代わる生体試料のイメージングシステムを開発することを目的として、光過渡種の吸収を用いた画像測定のための光学系および顕微分光システムの製作を行った。製作したシステムは、高次高調波などを用いた画像測定にも適用することができる。さらに、試料を固定する基板に半透明金属を蒸着することによって、共焦点反射干渉法による非蛍光性の生体試料の高感度計測が行えることを示した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2007年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
2008年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	19,000,000	5,700,000	24,700,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：生体分析, 時間分解吸収, 細胞, イメージング, 光散乱, 反射干渉, 高調波発生, フェムト秒レーザー

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内の特定の場所について蛍光標識を行い、顕微鏡を用いてその蛍光を観察することは、生物化学の分野において必須の技術である。近年の蛍光指示薬および蛍光タンパク質の発展により、細胞内のイオン濃度や細胞の分化・分裂などに関わる細胞内の様々な事象について、細胞一個一個において観察できるようになった。さらに共焦点レーザー走査顕微鏡の普及によって、高解像度・高コントラストの画像、そして試料の3次元構造を容易に得ることができるようになってきている。

生細胞の蛍光強度観察の最大の問題点は、当然のことではあるが、非蛍光性の試料には使えないことである。非蛍光性の試料についても、蛍光強度観察と同様の情報を得ることができ、さらに汎用性の高い手法を開発することができれば、生物化学のみならずその波及効果が非常に大きいことは言うまでもないであろう。また絶対蛍光強度の定量性が低いことも、顕微鏡による蛍光強度観察の問題点となっている。蛍光強度は、観測している蛍光分子の濃度のみではなく、光退色、励起光強度そして光学系など多くの要因によっても

変化する。そのために、絶対強度による定量評価は相当の注意が必要となる。蛍光強度の不確定性を補償する手法を開発することができれば、単一細胞内のイオン濃度の定量測定などを迅速かつ正確に行うことができる。

## 2. 研究の目的

蛍光強度測定に代わる非蛍光性の生体試料のイメージング手法として、光過渡種の吸収（過渡吸収）を用いたイメージングシステムの製作を行う。

過渡吸収測定はパルスレーザーを使ったポンプ・プローブ時間分解分光法がよく用いられており、本研究においてもポンプ・プローブ法を採用する。ポンプパルス光によって試料を光励起させ光過渡種を作り、ある遅延時間の後に、白色光のプローブパルス光によって光過渡種の吸収を測定する。このときポンプ光に数 kHz の変調を与え、ポンプ光の変調と同期する成分のみをプローブ光から取り出すことによって、プローブ光の微小強度変化（光過渡種の吸収）を検出することができる。しかし、プローブ光となる白色光の強度揺らぎが大きいことなどから、 $10^{-5}$  以下の微小強度変化を検出するような高感度測定は殆ど行われていなかった。しかし、フェムト秒レーザー光をフォトニック結晶ファイバに導入すると白色光パルスが発生し、この白色光が非常に安定であることが報告された。そのため、高安定の固体フェムト秒レーザーとフォトニック結晶による白色光、そして上述の変調法を用いることによって、光過渡種の吸収を高感度に検出できると考えられる。

そこで本研究では、固体フェムト秒レーザーとフォトニック結晶ファイバによる白色光、そして変調法を用いて時間分解吸収ユニットを製作し、共焦点顕微鏡と組み合わせることによって、生細胞に適用可能な時間分解共焦点顕微吸収イメージングシステムを製作することを第一の目標とする。細胞内に存在する可視域に吸収を持つタンパク質または染色色素を光励起し、生成した光過渡種の吸収の強度をイメージングすることを目指す。過渡吸収の吸収波長は光励起させる分子に依存し、過渡吸収の強度は試料濃度に比例する。そのため、非蛍光性の試料についても、過渡吸収を用いることによって、蛍光分析と同様の情報を得ることができる。また、非蛍光性の生体試料のイメージングとして、反射・散乱・高調波発生などを用いた顕微測定についても検討を行う。

## 3. 研究の方法

光源となるフェムト秒モードロックチタンサファイアレーザーは現有の装置を用いた。イメージング測定のための顕微鏡、検出器、そして白色光発生のためのフォトニック結晶フ

ァイバについて本予算を用いて購入した。光学部品類の多くは現有のものを用いてシステムの製作を行った。

## 4. 研究成果

(1) 現有のパルス幅約 80 fs、繰り返し周波数 81 MHz、760 から 990 nm まで連続波長可変のフェムト秒モードロックチタンサファイアレーザー（スペクトラ・フィジックス）を中心に、時間分解共焦点顕微吸収測定システムの製作を行った。BBO 結晶を用いて 2 倍波を発生させた後、ダイクロイックミラーを用いて基本波 ( $\omega$ ) と 2 倍波 ( $2\omega$ ) を分離する。2 倍波は試料を光励起するためのポンプ光に、基本波は白色光を発生させる。光過渡種の吸収を測定するためのプローブ光とする。基本波を自作のファイバカプラを通してフォトニック結晶ファイバ(ニューポート)に導入し、白色光を発生させる。生成した白色光の画像を図 1 に示す。2 枚のレンズにて白色光のビーム径を調整した後、ノッチフィルターを用いて白色光に含まれる基本波を取り除く。ポンプ光となる 2 倍波は自動ステージを通し、ポンプ光とプローブ光との遅延時間の調整を行なう。現有のオプティカルチョッパーによって数 kHz の AC 変調をポンプ光に与え、ダイクロイックミラーを用いてポンプ光とプローブ光となる白色光を同軸にする。対物レンズ(10×または 40×)によってポンプ光とプローブ光を試料に入射する。

顕微鏡システムは新たに倒立型顕微鏡(ニコン)を購入し、専用システムとして改良した。顕微鏡内のミラー類をできる限り少なくすることによって、励起および観測の波長域を広域化することができる。そこで、画像を得るためのスキャニングについて、スキャニングミラーを用いてレーザー光の光軸を移動させる方式ではなく、ピエゾステージ(ナノコントロール)を購入して、試料ステージを連続的に移動させるステージスキャン型を採用した。ステージスキャン型は、ミリ秒以下の高速測定は難しくなるが、光学系が大幅に簡略化され、光の損失および光軸調製の煩雑さを大きく減少させることができる。さらに、対物レンズによってレーザー光を集光し、試料からの信号光を別の対物レンズによって集

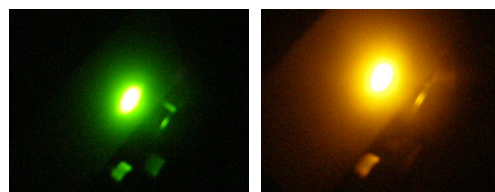


図 1. フォトニック結晶ファイバによる白色光。励起レーザー光の波長およびファイバへの集光位置を調整することによって、緑色(左)および黄色(右)の波長の光が高安定に生じるようにしている。

める配置を設計・導入した。この配置によって、透過光を容易に捕集できるだけでなく、高次高調波発生測定などにも用いることができる。微調 XYZ 軸ステージを導入し、入射側の対物レンズの位置を微調製できるように製作した。通常の石英レンズを用いて励起光を試料に入射し、試料からの信号光を対物レンズによって捕集することもできる。対物レンズではなく、通常の石英レンズを集光に用いることによって、励起波長範囲を紫外から近赤外域にまで非常に広くすることができる。空間分解能は、信号光を捕集する対物レンズによって行うことになる。製作した集光光学部分について図 2 (左) に示す。

試料からの透過光は、自作のフィルターボックスに導入され、透過光のビーム径の調整と散乱光を取り除く。その後、シングルの分光器を用いて分光された後、光電子増倍管モジュール (浜松ホトニクス) によって検出される。検出された信号光は 2 つにわけられ、片方はロックインアンプ (スタンフォードリサーチ) に入力され、チョッパー (ポンプ光の変調) と同期した成分のみを取り出す (AC 信号となる)。もう片方は AD 変換ボードにそのまま入力され、DC 信号となる。制御プログラムは、既成のプログラムを一部改良して用いている。製作した分光・測定部分について図 2 (右) に示している。

顕微分光システムについては、申請書の記載に近い形で製作することができた。過渡吸収を用いた画像測定のためのシステムの最適化を現在行っている。過渡吸収測定最大の問題点は、過渡吸収以外の変調成分が透過光に観測されることである。特に光励起された分子の無輻射緩和過程によって生じた熱による効果が、透過光に重複し、大きな変調成分を与えている。熱レンズ効果による透過光の光軸の変化が、熱による変調の主原因であると考えられる。試料の集光位置において、ポンプ光よりもプローブ光のサイズを大きくすることによって解消できるのではないかと考え、現在検討している。フォトニック結晶による白色光の揺らぎも、信号雑音比を低下させていたが、ファイバケーブルを自作することによって大きく改善した。申請書に記載していたように、白色光の一部をフォトダイオードなどで検出し、白色光の強度揺らぎを補正することを計画している。当初の目的では

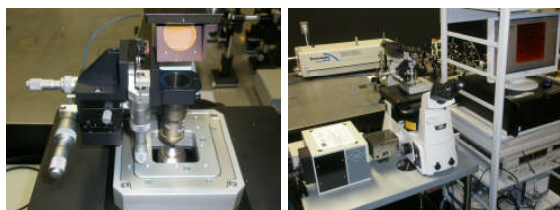


図 2. 顕微分光システムの集光光学部分 (左) と分光・測定部分 (右)。

必ずしも高い時間分解能を必要としなかったために、レーザー光パルスの分散補償を行わなかった。しかし、白色光の安定性において、短パルス化がきわめて重要であることがわかった。プリズムペアなどを用いて、光パルスの分散補償を今後行う必要があると考えている。

製作した顕微分光システムは、高次高調波発生を用いた非蛍光性の生体試料の画像観測にも応用することができる。高次高調波発生法は、基本波 ( $\omega$ ) を試料に入射し、試料から生じる第 2 高調波 ( $2\omega$ ) または第 3 高調波 ( $3\omega$ ) を観測する非線形分光法である。非反転対称性または位相整合条件から、表面・界面のみを選択的にプローブすることができる。検出器に光子計数検出用の光電子増倍管を用いて、信号光を光子計数検出することによって、高次高調波を検出することができる。高調波による細胞の画像測定を行うために、検出光学系の改良を行っている。

(2) 製作した過渡吸収のための光学系および検出システムは、顕微鏡を用いないマクロの時間分解吸収にも用いることができる。本研究期間内では、ポルフィリン分子などの溶液中の生体関連分子のフェムト秒時間分解吸収スペクトルの測定を行った (分子科学研究所との共同研究)。今後は、蛍光タンパク質の時間分解吸収スペクトルの測定を行い、蛍光タンパク質の光安定性に重要な役割を果たす非発光性過渡状態の直接検出を目指す。

(3) 過渡吸収のみではなく、励起レーザー光の散乱光や反射光によっても非蛍光性試料の高感度画像計測を行うことができる。申請者らは、試料を固定する基板に半透明金属を蒸着させることによって、コントラストの非常に高い反射光画像が得られることを示した。さらに共焦点レーザー顕微鏡と組み合わせることより、反射光および散乱光画像の Z 軸分解能を持たせることができた。

半透明アルミニウムをフッ化カルシウム基板に真空蒸着させ、タマネギのリン片細胞からの散乱光・反射光を観測した結果を図 3 に示す。励起光にレーザー光を用い、共焦点配置で測定している。実験配置は、フッ化カルシウム基板の右半分に半透明アルミニウムが蒸着されている。基板はリン片細胞の上にある。Z 軸の位置によって、散乱・反射光画像が大きく異なることがわかる。基板の界面付近では、アルミニウムが蒸着された領域においてのみ、強い信号が観測されるのに対し (図 3 a)、界面から  $15\ \mu\text{m}$  離れた位置では、アルミニウムのある領域とない領域の両方から強い信号が観測され、両領域を区別することができない (図 3 b)。図 3 c に焦点の位置を系統的に変化させて得られた XZ 面の断層画像を示す。観測光強度が Z 軸方向に大きく依存していることがわかる。特にアルミニウム

が蒸着された領域において、基板付近に強い信号が観測されている。

金属基板の領域においてのみに現れる界面選択的な画像は、反射干渉によるものであると考えられる。試料表面からの反射光と試料を透過した光が金属基板によって反射される反射光は干渉を示す。生成した反射干渉光の強度は、試料の屈折率および試料の厚みによって変化するために、試料の界面付近における形態像を高感度に検出することができる。このような反射干渉による界面構造は、他の植物細胞や人の口腔上皮細胞でも容易に観測することができ、汎用性の高い方法であることがわかった。他の金属基板においても同様の画像を観測している。半透明金属基板を用いることによって、試料は基板の上下のどちらにあっても反射干渉光を得ることができる。Z軸分解能について現在検討している。

図3bのように界面以外で観測されている信号光は、試料からの散乱光であると考えられる。共焦点顕微鏡と組み合わせることによって、Z軸分解測定を行えることがわかる。散乱光画像についても、Z軸分解能について検討を行っている。

共焦点反射・散乱顕微分光法は、非蛍光性の生体試料をZ軸分解で観測する有力な手法になると考えられる。特に半透明金属基板を用いることによって、試料の界面構造を無染色で選択的に観測することができる。光電場増強を示す金属基板を用いることによって、散乱強度が増大し、感度および界面選択性がさらに向上することが期待される。光電場増強を示す基板の作製と反射・散乱分光法への応用を現在行っている。

(4) 申請者らが製作した時間ゲート法による蛍光寿命イメージングシステム(分光研究、54(2006)256)と共焦点反射・散

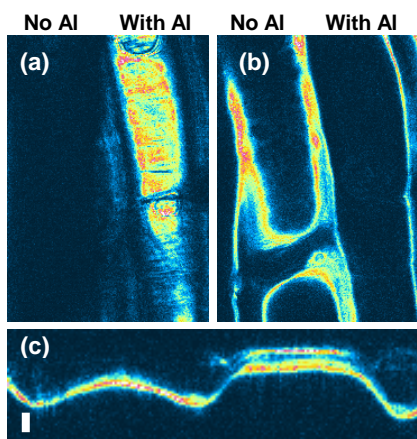


図3. タマネギのりん片細胞の共焦点反射・散乱光画像。半透明アルミニウム(Al)が右半分に蒸着されている。(a) 基板界面近傍、(b) 基板から15  $\mu\text{m}$ 離れた領域、(c) XZ(断層)画像。Alが蒸着された領域においてのみ、基板界面付近で強い信号が観測されている。スケールバー 10  $\mu\text{m}$ 。励起波長、488 nm。

乱顕微分光法を組み合わせることによって、共焦点反射・散乱光画像と蛍光強度画像の同時計測が行えることも示した。時間ゲート法は、蛍光減衰曲線を0-2、2-4、4-6、6-8 nsと4つのwindowに分け、各windowの積分強度を時間に対してプロットし、単一の指数関数の減衰を仮定して寿命を求める方法である。時間ゲート法によって、0-2 nsの領域では、反射または散乱光を、2-8 nsの領域では、蛍光のみを捉えることができ、同時計測を行うことができる。試料の形態像と蛍光画像との関係を迅速に調べる有力な手法になると思われる。

(5) 製作したレーザー顕微鏡システムは、スキャニングミラーを用いた顕微鏡システムよりも光学系が非常に簡便である。そのために、蛍光寿命画像測定などの他の様々な蛍光強度測定に代わるイメージング手法にも応用することができる。申請者らは、蛍光強度ではなく蛍光寿命をイメージングすることにより、蛍光強度測定では定量性が低く困難であった細胞内の蛍光分子の微少環境変化などを高感度に検出できることを示している。蛍光強度測定に代わる手法として、単一細胞内のpHの定量測定や細胞ストレスの高感度検出などを行っている(Chem. Phys. Lett. 442(2007)441, Photochem. Photobiol. Sci., 7(2008)668, Ibid 7(2008)671など)。今までのシステムでは、スキャニングミラーシステム内のミラー類などによって多光子励起や広い波長範囲での蛍光測定などを行うことができなかった。今回製作した顕微システムを用いることによって、紫外光励起、2光子励起、および近赤外蛍光検出などについても光学系を殆ど変更することなく測定を行うことができる。蛍光寿命イメージングを蛍光強度測定と相補的となる新たな測定手法として広く提供することができ、様々な系について検討している。

## 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3件)

- ① 中林孝和、太田信廣、蛍光寿命イメージングを用いた単一細胞内計測の展開、分析化学、査読有、印刷中
- ② M. Inamo, C. Okabe, T. Nakabayashi, N. Nishi, M. Hoshino, Femtosecond Time-Resolved Photo-Absorption Studies on the Excitation Dynamics of Chromium(III) Porphyrin Complexes in Solution, Chemical Physics Letters, 査読有、445(4-6), 167-172, (2007)

- ③ 中林孝和、太田信廣、蛍光寿命を用いた生体試料の画像観測、  
ぶんせき、査読無、597-600、  
(2007)。

[学会発表] (計10件)

- ① T. Nakabayashi, Studies on Microenvironment in a Single Cell using Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, Recent Advances in Fluorescence Spectroscopic Methods for Biological and Chemical Systems, 2009.2.27, Sapporo (Hokkaido Univ.)
- ② 中林孝和、凝縮相の高速ダイナミクスの解明と細胞内現象への展開、  
化学系学協会北海道支部2009年冬季研究発表会、2009.2.3、札幌  
(北海道大学)
- ③ N. Ohta, T. Nakabayashi, T. Imori, T. Ito, Photoinduced Functions and Properties in Molecular Systems and Biological Systems, The 10th RIES-Hokudai International Symposium on "AYA", 2008.12.8, Sapporo (Hokkaido Univ.)
- ④ T. Nakabayashi, N. Ohta, Effects of Semitransparent Metal Substrates on Confocal Reflection Interference Contrast Images of Non-Fluorescent Bio-Systems and Polymers, Annual Meeting of the Spectroscopical Society of Japan, 2008.11.19, Sendai (Tohoku Univ.)
- ⑤ T. Nakabayashi, Application of fluorescence lifetime imaging to the investigation of cellular microenvironments, Annual Meeting of the Spectroscopical Society of Japan, 2008.11.19, Sendai (Tohoku Univ.)
- ⑥ 中林孝和、ポリマー中における色素分子発光スペクトルへの電場効果と光励起ダイナミクス、  
有機エレクトロニクスに関する北大-名大合同研究会、2008.10.31、札幌  
(北海道大学)
- ⑦ T. Nakabayashi, N. Ohta, In Vivo Measurements of Intracellular Environments by Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, Joint Symposium on Dhaka University and

Hokkaido University, 2007.11.4, Dhaka (Bangladesh)

- ⑧ T. Nakabayashi, Studies of Microenvironment in a Single Cell Using Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, 12th Korea-Japan Joint Symposium on Frontiers of Molecular Science "Leading-Edge and the Future of Photo-Molecular Science", 2007.6.6, Jeju (Korea)
- ⑨ 中林孝和、太田信廣、蛍光寿命イメージングを用いた細胞内の環境変化の In Vivo 計測、  
分子研研究会「生細胞の分子科学」、  
2007.5.22、岡崎 (分子科学研究所)
- ⑩ 中林孝和、蛍光寿命イメージングを用いた細胞内の微視的環境変化の計測、  
第68回分析化学討論会、2007.5.19、宇都宮 (宇都宮大学)

[図書] (計1件)

- ① 中林孝和・太田信廣、エヌ・ティー・エス、ナノイメージング、2008、  
245-254

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：発光寿命測定装置およびその測定方法

発明者：太田信廣、中林孝和

権利者：同上

種類：特願

番号：2006-203816

出願年月日：平成18年7月26日

国内外の別：国内

[その他] (計3件)

- ① 国際シンポジウム Recent Advances in Fluorescence Spectroscopic Methods for Biological and Chemical Systems を主催、2009年2月27日、札幌  
(北海道大学)
- ② 平成20年度日本化学会北海道支部奨励賞を受賞  
「凝縮相の高速ダイナミクスの解明と細胞内現象への展開」  
日本化学会北海道支部、2009年2月
- ③ 分子科学研究奨励森野基金を受賞

「凝縮相分子の微視的構造と高速ダイナミクスに関する実験的・理論的研究」  
分子科学研究奨励森野基金運営委員会、  
2007年8月

6. 研究組織

(1)研究代表者

中林 孝和 (NAKABAYASHI TAKAKAZU)  
北海道大学・電子科学研究所・准教授  
研究者番号：30311195

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし