

CARS 顕微鏡による細胞の観測

Observation of the living cell by CARS microscopy

¹橋本守、¹荒木勉、²河田聡

¹Mamoru Hashimoto, ¹Tsutomu Araki, and ²Satoshi Kawata

¹大阪大学大学院基礎工学研究科

¹Graduate School of Engineering Science, Osaka University

²大阪大学大学院工学研究科

³Graduate School of Engineering, Osaka University

A new CARS microscopy system in the fingerprint region was developed. The system consists of the picosecond laser system and transmission type laser scanning microscope without a pin-hole in front of the detector. The observable Raman shift region is 900 to 1800 cm^{-1} with the spectral resolution of 26 cm^{-1} , and the spatial resolution is smaller than 1 μm in lateral and 2.9 μm in depth direction with the NA=0.65 objectives. The CARS imaging of polystyrene beads and living cell yeast was demonstrated.

1. まえがき

細胞を構成するタンパク質分子の構造変化によって生体の機能は発現される。このため、生命現象を研究する上では、生体の機構・機能とタンパク質分子構造の関係を生体分子が実際に機能している場所で直接観測することが要求される。したがって、生きたままの細胞をその場で、非染色にタンパク質分子の構造変化を観察することが望まれている。

従来の光学顕微鏡は、像すなわち物体の形を見ることを主な目的として発達してきており、細胞内にはどのような分子が存在するのか、またどのような環境下に分子、イオン等は存在しているのか等の定性能力は染色に負っている。染色作業は複雑で時間がかかり熟練を要する。また、染色自体が細胞に対して有害で細胞の機能を損なう場合も多々あり、得られる情報は色素を介した間接的なものである。

2. CARS 顕微鏡

最近、CARS（コヒーレントアンチストークスラマン散乱）を用いた顕微鏡が開発された^{1,2}。CARS 分光はラマン分光の一種であるため、非染色に分子の同定が可能である。また、非線形光学現象であるため、多光子励起蛍光顕微鏡と同様に検出器側にピンホールを設け

なくても 3次元分解能を持ち、入射するレーザー光の波長差によってラマンスペクトルを得ることができるために分光器を必要とせず明るい光学系を構成できる。さらに、CARS 光は入射レーザー光より短波長であるため蛍光と分離可能であるという特徴を持つ。

今回、指紋領域を観測可能なCARS顕微鏡を開発した。図1にCARS顕微鏡の構成図を示す。モード同期チタンサファイアレーザー光をピコ秒再生増幅器（RGA）で増幅した光を、光パラメトリック発信器（OPA）の励起光に用い、

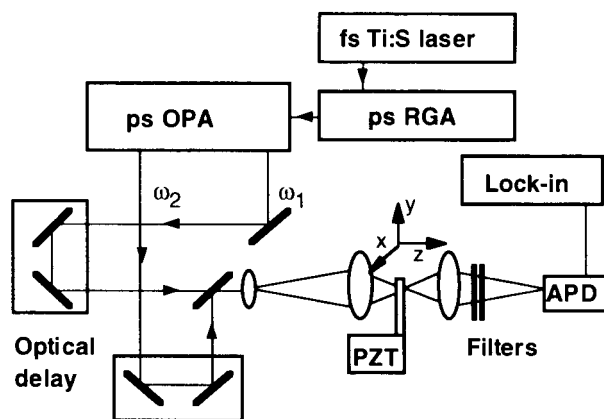


図1. CARS 顕微鏡の構成図

Fig1. The schematic layout of the developed CARS microscopy system.

連絡先 橋本守 M. Hashimoto 〒560-8531 豊中市待兼山町 1-3

大阪大学大学院基礎工学研究科システム人間系専攻 TEL 06-6850-6216 FAX 06-6850-6212

e-mail: mamoru@me.es.osaka-u.ac.jp

発生する波長可変なアイドラー光の第二高調波を ω_2 光に用いた。また、OPA励起光の一部を ω_1 光に用いた。この2つの光を同軸上に重ね合わせ、さらに光学遅延によって時間的に重ねて透過型顕微鏡に導入する。発生するCARS光をフィルタによって ω_1 光、 ω_2 光から分離し、APDによって検出する。観測可能領域はフィルタによって決まり、900-1800 cm^{-1} の指紋領域での観測が可能である。CARSは非線形光学現象であるため、ピーク強度が高く平均パワーが小さい超高速レーザの使用が望まれるが、フェムト秒レーザでは波長幅がラマンバンドより著しく大きいためラマン分光には適さない。そこで、波長幅が狭くかつピーク強度の大きいピコ秒レーザを用いた。

3. 実験結果

図2に、発生する信号の励起光強度依存性を示す。試料は直径4.5 μm のポリスチレンビーズで、レーザ光の波長は $\omega_1 - \omega_2 = 1001 \text{ cm}^{-1}$ で測定を行った。CARS光の強度は、 ω_1 光の2乗、 ω_2 光の1乗に比例する。図を見て分かるように、観測信号は ω_1 光の2乗に良く比例した。また、 ω_2 光の強度に対しては1.25乗に比例する結果となったが、強度が大きいところ(5 μW 以上)では良く1次に比例している(破線)。したがって、観測信号はCARSであると確認できた。

図3に、開発したCARS顕微鏡の奥行き分解能を検証するために、液体ベンゼンを2枚のカバーガラスで挟み込んだものを観測した結果を示す。レーザ光の集光スポットをベンゼン層からガラス層へ移動させたときの、ベンゼンのCARS光($\omega_1 - \omega_2 = 992 \text{ cm}^{-1}$)を観測した。数値計算との比較により、ほぼ回折限界に達しており、奥行き分解能は2.9 μm であるこ

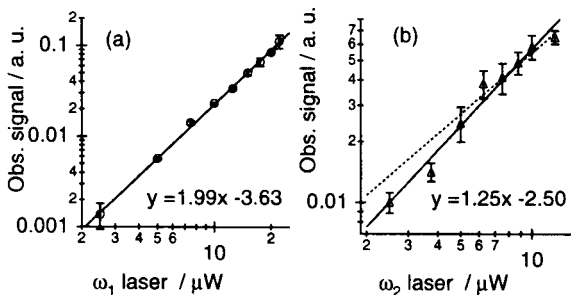


図2 観測された信号の励起光強度依存性 (a): 観測信号 vs ω_1 レーザ (b): 観測信号 vs ω_2 レーザ
Fig. 2 The dependence of the observed signal on the intensity of excitation beams. (a): relation between the observed signal and ω_1 laser intensity, (b) relation between the observed signal and ω_2 laser.

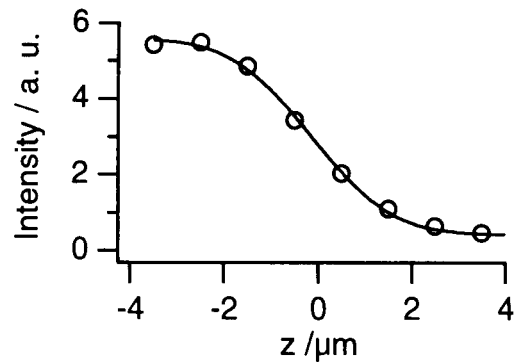


図3 CARS顕微鏡の奥行き分解能の検証
Fig. 3 Z-axis resolution estimation of the CARS microscopy system. The z-axis step response was measured around the boundary between the two layers of pure liquid benzene and glass plate.

とが分かった。

図4に、開発した装置によるCARS像を示す。図4(a)では、直径1 μm のポリスチレン球を $\omega_1 - \omega_2 = 1001 \text{ cm}^{-1}$ で観測した。各ポリスチレン球が分離して観測できていることから、面内分解能が1 μm 以下で有ることが分かる。図4(b)に酵母菌を $\omega_1 - \omega_2 = 1215 \text{ cm}^{-1}$ (アミドI)において観測した結果を示す。この波長は、アミドIはタンパク質に固有のバンドで、細胞内のタンパク質の濃度分布が観測されているものと考えられる。

謝辞 本研究は日本学術振興会未来開拓学術研究推進事業「フォトリック生体情報計測制御プロジェクト」の一環として行われた。

参考文献

1. 橋本守・荒木勉, 第59回応用物理学会学術講演会講演予稿集 No.3 15a-N-4 p. 876 (1998). M. Hashimoto, T. Araki, and S. Kawata. Focus on Microscopy 2000, 4 (2000). M. Hashimoto, T. Araki, and S. Kawata, Opt. Lett. submitted.
2. A. Zumbusch, G.R. Holtom and X.S. Xie: Phys. Rev. Lett. 82 (1999) 4142.

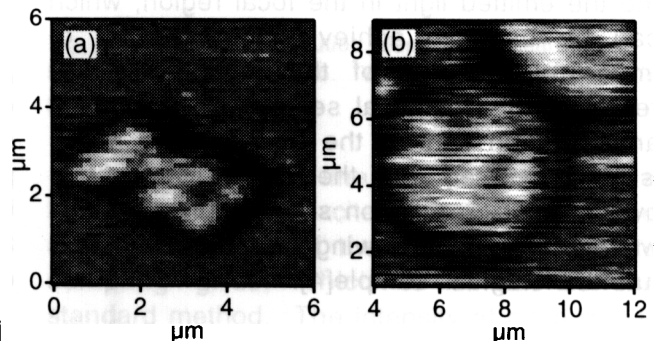


図4 CARS顕微鏡像 (a)直径1 μm のポリスチレン球 (b)イースト菌
Fig. 4 The CARS images in the fingerprint region. (a): polystyrene beads (diam. = 1 μm) in water ($\omega_1 - \omega_2 = 1001 \text{ cm}^{-1}$) (b): yeast in water ($\omega_1 - \omega_2 = 1215 \text{ cm}^{-1}$)