

# サンプリング法を用いた共焦点蛍光寿命イメージング Confocal Fluorescence Lifetime Imaging by Sampling Method

橋本守・稲本浩久・荒木勉

Mamoru Hashimoto, Hirohisa Inamoto, and Tsutomu Araki

大阪大学大学院基礎工学研究科

Graduate School of Engineering Science, Osaka University

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

## Abstract

We have developed a confocal microscope for fluorescence lifetime imaging by sampling method. This system consists of a fast response photomultiplier, a fast sampling module, and a low-pass filter for interpolation to observe the image asynchronous with laser excitation timing. By asynchronous detection, it is possible to attach the detection system to commercial confocal microscopy system. We also observed the relationship between the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  and the fluorescence lifetime of fluo-3, and confirmed that the fluorescence lifetime is sensitive to the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$ .

## 1 はじめに

共焦点蛍光顕微鏡によって、簡易に生体細胞の断層像を非接触に得ることが可能である。光による観測は、生物細胞に対して侵襲が少なく、また比較的高速に観測することが可能なことから、共焦点蛍光顕微鏡は広く生物・医学研究に用いられるようになってきた。特に近年ではカルシウム等の細胞内イオンプローブ [1, 2] が開発され、細胞内の動的なイオンの動きを実時間で観測することで、シグナル伝達等の機構の解明への研究が数多くなされている。しかし、観測される蛍光強度は、細胞内の染色に用いた色素の濃度、観測箇所までに到達する蛍光励起光の強度、観測系における蛍光の集光効率等に左右されるため、単一波長で励起し、単一波長を観測するだけでは、細胞内物質の濃度を定量的に評価することは難しい。

このため、通常2波長励起—1波長測光、あるいは1波長励起—2波長測光法等の比色法によって定量的なデータを得る。これまで、様々なイオンプローブが開発されてきているが、比色法を用いることができる色素は、紫外領域に吸収最大波長を持つものが多い。しかしながら、紫外領域の光は細胞に対して毒性が強いため、可視励起できることが望まれる。

そこで我々は、蛍光色素の蛍光寿命が色素の微環境に敏感であることを利用して、蛍光寿命による定量測定を目指したシステムの開発を行っている。

## 2 蛍光寿命顕微鏡システム

これまでに、蛍光寿命を観測可能な共焦点顕微鏡が数多く開発されている [3, 4, 5, 6]。今回、我々は比較的安価なLD励起受動Qスイッチマイクロチップレーザー [7] を励起光源とし、非同期サンプリング法により市販の共焦点蛍光顕微鏡にも容易に装着可能な時間分解蛍光寿命観測システムの構築を目指した。図1に共焦点蛍光寿命顕微鏡の概略図を示す。高繰り返し短パルスレーザーからの光を、ビームエキスパンダーによって広げ、ダイクロイックミラー、ガルバノスキャナ、リレーレンズを通して顕微鏡へ導入する。

ガルバノスキャナによって、ビームの向きを変え面内方向の走査を行う（図では、1方向のみ

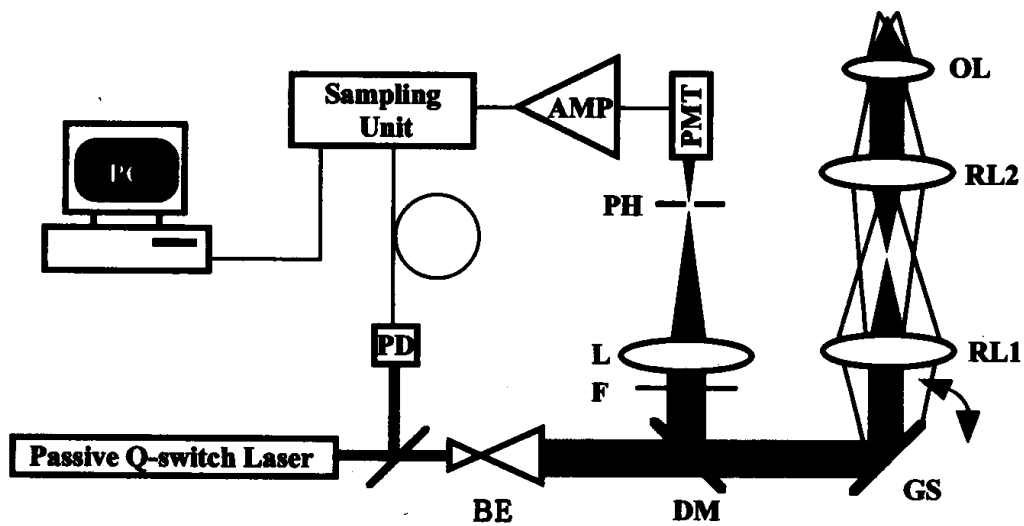


図 1 共焦点蛍光寿命顕微鏡

OL: Objective Lens, RL: Relay Lens, GS: Galvano Scanner, DM Dichroic Mirror, L: Lens, BE: Beam Expander, PH: Pinhole, PD: photodiode

示しているが、実際には2軸すなわち面内を走査できる)。レーザー光励起による蛍光は、対物レンズ、リレーレンズ、ガルバノスキャナを励起光とは逆に進み、デスキャンされダイクロイックミラーで反射した後レンズで集光されピンホールを通して光電子増倍管で検出される。光電子増倍管には高速応答なものを用い、高周波アンプによって増幅した後サンプリングユニットでサンプリングし、PCで解析する。

蛍光減衰波形を単一指数関数であると仮定すると、その時間応答は

$$I(t) = I_0 \exp(-t/\tau) \quad (1)$$

で与えられる。ここで、 $\tau$ は蛍光寿命である。したがって、少なくとも励起から観測までの時間が異なる2つの蛍光強度

$$I(t_1) = I_0 \exp(-t_1/\tau) \quad (2)$$

$$I(t_2) = I_0 \exp(-t_2/\tau) \quad (3)$$

を観測できれば、

$$\tau = \frac{t_2 - t_1}{\ln I(t_1) - \ln I(t_2)} \quad (4)$$

より、蛍光寿命を算出できる。

このようにして、レーザー光の入射に同期して異なる2時刻の蛍光強度を観測することで蛍光寿命マップを得ることができる。

さて、図2(a)に示すように、パルスレーザー光を試料に照射することで、時間的に減衰する蛍光が観測される。このとき、ガルバノスキャナで走査することにより各パルスは試料上の異なる点を照射する。したがって、各パルスから発する蛍光は、異なる場所からの発光を時間的に走査している。励起から $t_1$ だけ遅れた時間の蛍光強度信号をサンプリングユニットで切り出すと、図2(b)に示すようなインパルス列信号が得られる。この、インパルス列信号を周波数領域((b)のフーリエ変換)で表示すると図2(c)に示すように、周期 $1/T$ の繰り返し信号となっている。この信号を $1/2T$ の帯域を持つローパスフィルターでフィルタリングし、高周波成分を除去すると、図2(d)で表されるようなインパルス列の信号をちょうど補間したアナログ的信号が得られる。一度、ローパスフィルターを通すことで補間した信号が得られると、以降の信号の取得タイミングには制限がないため、任意の時間でサンプリング可能である。

このように、ローパスフィルターの補間により蛍光励起&サンプリングのタイミングと、共焦点画像の取得タイミングを同期させる必要がないため、市販の共焦点蛍光顕微鏡へサンプリングユニットを付け加えるだけで動作させることも可能である。また、検出器とサンプリングユニットに高速応答のものが必要とされるが、サンプリングユニットの後には応答の速い電子回路等を必要とせず、市販の共焦点顕微鏡を改造して構築することも容易である。

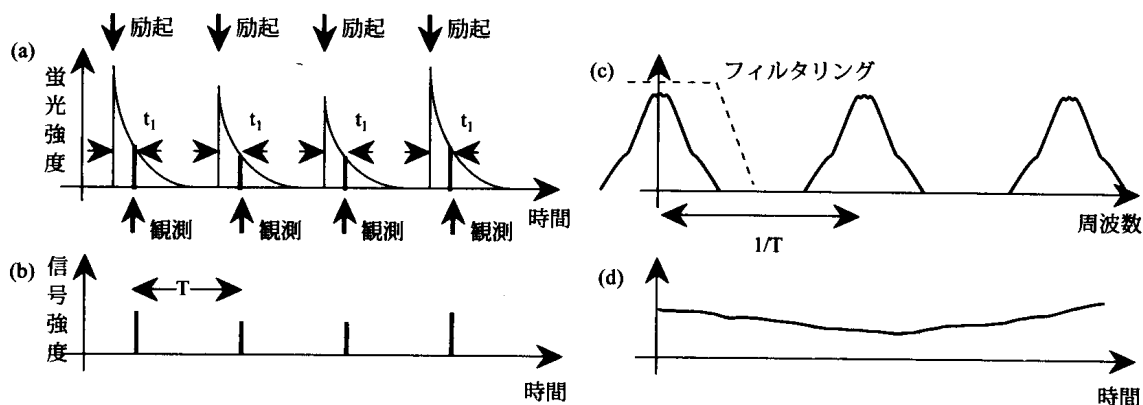


図2 非同期サンプリングの原理図

### 3 Excitation Light Source

時間分解蛍光を観測するためには、蛍光寿命より十分に時間幅の短い短パルスレーザーが必要とされる。また、共焦点光学系で蛍光寿命イメージングを行うためには、1箇所1箇所の蛍光寿命を観測し、それをマッピングする必要があるため高繰り返しレーザーが必要とされる。これまで、蛍光寿命観測には窒素レーザーや、能動的Q-switch YAGレーザー、モードロックレーザー等が用いられているが、これらには一長一短がある。窒素レーザーは、繰り返し周波数が低い(数Hz程度)ため、画像観測には不向きである。能動的QスイッチYAGレーザーは、パルスの時間幅が数ns~数十nsと比較的長く、特に繰り返し周波数が高いものほどこの傾向が高い。モードロックレーザーは、フェムト秒からピコ秒程度の時間幅を持ち、蛍光測定には最適であるが、価格が非常に高く、また長寿命な蛍光色素(通常物質の蛍光寿命は数ns程度)では繰り返し(モード

ロックレーザーの繰り返しは100MHz程度)が高すぎるため、パルスピッカー等を付加して繰り返し周波数を低減する必要がある。

そこで、本システムの光源には、近年開発されたLD 励起受動 Q-switch マイクロチップレーザー (Nanolase 社 005011-000) を用いた。マイクロチップレーザーはレーザー媒質長が1mm以下の固体レーザーであり、コンパクト・堅牢・低価格なレーザーである。本レーザーは、ゲイン物質 ( $\text{Nd}^{3+}:\text{YAG}$ ) と過飽和吸収体 ( $\text{Cr}^{4+}:\text{YAG}$ ) から構成されている。LD 励起により  $\text{Nd}^{3+}:\text{YAG}$  が発光するが、その光は  $\text{Cr}^{4+}:\text{YAG}$  に吸収され、すぐには発振には至らない。その後、次第に  $\text{Cr}^{4+}:\text{YAG}$  が飽和を起こして吸光度が減少し、Q-switch が起こってレーザー発振する [7]。

ポッケルスセル等の能動的 Q-switch を用いる場合、ポッケルスセルを駆動する高電圧短パルスから放射される電磁ノイズによる影響がしばしば問題となる。しかし、受動的 Q-switch はこういったノイズを放射せず、安定なパルス光が得られる。

#### 4 時間分解蛍光画像と蛍光減衰波形

図3に、直径  $1.75\mu\text{m}$  の蛍光ビーズを観測した結果を示す。励起直後の蛍光強度が最大な時間幅  $0.1\text{ ns}$  の信号を切り出した画像である。また、切り出し時間を変化させながら観測した蛍光ビーズの蛍光減衰波形を図4に示す。蛍光ビーズの蛍光寿命は  $5.1\text{ ns}$  であった。本システムの時間分解能は  $2.4\text{ ns}$  であり、これは主に高周波増幅器の帯域によって制限されている。

なお、対物レンズは  $\text{NA}=1.4$  の油浸対物レンズを用いた。また、 $100 \times 100$  の時間分解蛍光画像を1枚観測するのに約1.5秒必要であった。現在のシステムでは単独のサンプリングユニットを用いているため、蛍光寿命画像の算出には、2度のスキャンが必要とされるが、サンプリングユニットを複数用意し並列に動作させることにより、一度に蛍光寿命画像を観測することが可能となる。

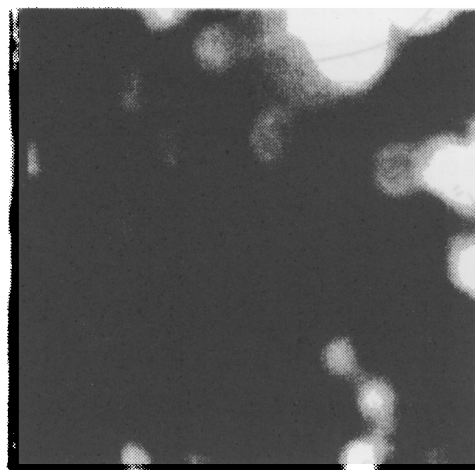


図3 直径  $1.75\mu\text{m}$  の蛍光ビーズの時間分解蛍光イメージ

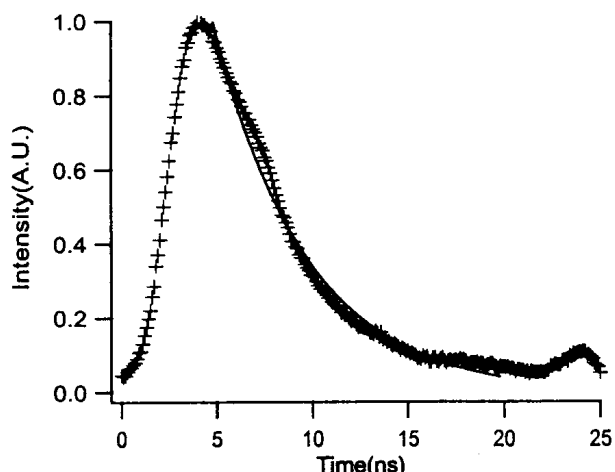


図4 蛍光ビーズの蛍光減衰波形

## 5 カルシウムの蛍光寿命による定量

fluo-3 はカルシウムイオンと結合し、その蛍光強度が増大する [2]。これを用いて、細胞内のカルシウムイオンの濃度変化を可視化することが可能である。しかし、fluo-3 はカルシウムイオン濃度によって、蛍光励起波長や蛍光発光波長が変化しないため、単独では細胞内のカルシウムイオンの定量的取り扱いが難しい。そこで、本研究では蛍光寿命からカルシウムイオンの定量が可能かどうか検証した。図5に各濃度の測定で得られた蛍光減衰波形を、図6にカルシウムイオン濃度と蛍光寿命の関係を示す。なお、この図5はピーク強度で規格化を行っている。

図5を見て分かるように、カルシウムイオン濃度が高いほど、蛍光減衰の傾きすなわち蛍光寿命が短寿命化していることが分かる。図6に、カルシウムイオン濃度と蛍光寿命の関係を示す。一般に蛍光寿命とカルシウム濃度の関係は

$$[Ca^{2+}] = C_0 + \frac{C_1}{\exp\left(\frac{t_2 - t_1}{\tau}\right) - C_2} \quad (5)$$

で与えられることが知られている [8]。ここで、 $C_0$ 、 $C_1$ 、 $C_2$  は定数である。図中の実線は理論式に当てはめたものであり、 $C_0 = 0.055812$ 、 $C_1 = 0.6359$ 、 $C_2 = -34.809$  が得られた。これから、fluo-3 の蛍光寿命観測によりカルシウムイオンの定量観測が可能であることが分かった。

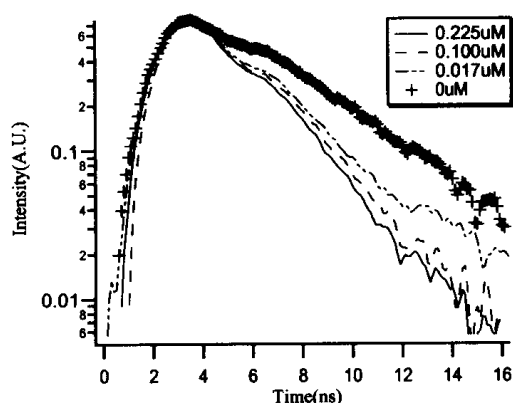


図5 様々なカルシウムイオン濃度とそれに対する fluo-3 の蛍光減衰波形

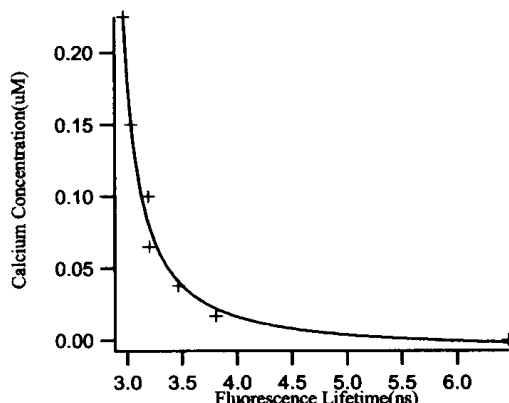


図6 カルシウムイオン濃度と蛍光寿命の値

## 6 おわりに

市販の共焦点蛍光顕微鏡に搭載可能な蛍光寿命イメージングシステムを開発した。今回の  $Ca^{2+}$  の蛍光寿命観測は 355 nm 励起によって行っていたため、可視励起ではない。今後、レーザーの第二高調波 532 nm で励起可能な蛍光指示薬 Calcium Orange を用いることで、可視励起の蛍光寿命によるカルシウム定量を行っていきたい。なお、本研究の一部は科学研究費補助金 (基盤研究 (B) 13558112) によって行われた。

## 参考文献

- [1] G. Grynkiewicz, M. Poenie, and R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440 (1985).
- [2] Akwasi Minta, Joseph P.Y.Kao, Roger Y. Tsien, *J. Bio. Chem.*, **264**, 8171 (1989).

- [3] Gerard Marriott, Robert M. Clegg, Donna J. Arnat-Jovin, and Thomas M. Jovin, *Biophys. J.*, **60**, 1374 (1991).
- [4] Joseph R. Lakowicz, Henryk Szmecinski, Kazimierz Nowaczyk, Klaus W. Berndt, and Michael Johnson, *Anal. Biochem.*, **202**, 316 (1992).
- [5] Ammasi Periasamy, Pawel Wodnicki, Xue F. Wang, Seongwook Kwon, Gerald W. Gordon, and Brian Herman, *Rev. Sci. Instrum.*, **67**, 3722 (1996).
- [6] Andreas Schonle, Markus Glatz, Stefan W. Hell, *Appl. Opt.*, **39**, 6306 (2000).
- [7] "Passively Q-Switched Microchip Lasers and Application", John J. ZAYHOWSKI, *レーザー研究*, (12), 841 (1998).
- [8] Laetitia Schoutten, Patrick Denjean, Gouenael Joliff-Botrel, Christine Bernard, Danielle Pansu and Robert B. Pansu, *Photochem. and Photobio.*, **70**, 701 (1999).