

飽和励起 (SAX) 顕微鏡を用いた多層化細胞群の高解像蛍光イメージング



High-resolution fluorescence imaging of a multi-layer cell cluster by saturated excitation (SAX) microscopy

阪大院工¹, 阪大 iFReC², 理研³ ○(PC) 山中真仁¹, 上垣久美子¹,Nicholas I. Smith², 河田聡^{1,3}, 藤田克昌¹Dept. of Appl. Phys., Osaka Univ.¹, iFReC, Osaka Univ.², RIKEN³ ○(PC) Masahito Yamanaka¹,Kumiko Uegaki¹, Nicholas I. Smith², Satoshi Kawata^{1,3}, Katsumasa Fujita¹E-mail: yamanaka@ap.eng.osaka-u.ac.jp

生体は多くの細胞から構成されており、それらの機能や構造を解明するには個々の細胞を取り出し観察するのではなく、細胞が生体内部にある状態で観察する必要がある。近年、光の回折限界を超えた超解像イメージング法として誘導放出を利用した STED 顕微鏡、蛍光分子の発光/消光のスイッチング現象を利用した PALM、STORM などが報告されているが、多層化した細胞などの厚みのある試料内部における 3 次元超解像の報告例は少ない。

本研究では、我々が開発した飽和励起 (Saturated excitation: SAX) 顕微鏡を用い、厚みのある試料構造の高解像観察を行った。SAX 顕微鏡は、蛍光分子の光吸収の飽和時に現れる非線形な蛍光応答を利用し、光の回折限界を超えた空間分解能を得る技術である [1-4]。この飽和現象は励起光強度の強い集光スポットでのみ顕著に現れるため、SAX 顕微鏡では多光子励起蛍光顕微鏡と同様の原理で背景光を抑制でき、厚みのある試料観察における深さ分解能も向上できる。また、励起波長が可視域で良いため、近赤外域の波長の励起光源を用いる多光子励起蛍光顕微鏡より高い空間分解能が得られる。

図に SAX 顕微鏡および従来の共焦点顕微鏡を用い、3 次元マトリックス中で培養したヒト子宮癌細胞を観察した結果を示す。本実験では、細胞のアクチンフィラメントを ATTO 488 ファロイジンで固定染色した。励起光源には波長 488 nm の CW レーザーを用い、NA1.3 のシリコンオイル対物レンズでレーザー光を試料中に集光した。図に示すように、SAX 顕微鏡では試料の深さ数 10 μm においても像のボケが抑制され、従来の共焦点顕微鏡より高い空間分解能が得られていることを確認した。

Reference: [1] Fujita et al., Phys. Rev. Lett. **99**, 228105 (2007), [2] Yamanaka et al., J. Biomed. Opt. **13**, 050507 (2008), [3] Yamanaka et al., Biomed. Opt. Express **2**, 1946-1954 (2011), [4] Kawano et al., Appl. Phys. Express **4**, 042401 (2011)

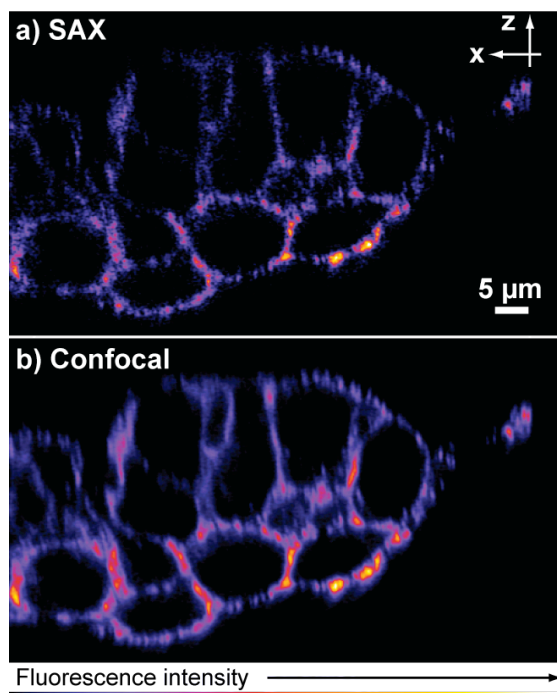


図: 3 次元マトリックス中で培養したヒト子宮癌細胞のアクチンフィラメントの蛍光像