

SAX 顕微鏡を用いた三次元培養細胞の超解像イメージング

Sub-diffraction-limit imaging of 3D cell clusters with saturated excitation (SAX) microscopy

阪大工応物¹, 阪大 IFRc² ◯上垣 久美子¹, 米丸 泰央¹, 山中 真仁¹, Nicholas I. Smith²,
河田 聡¹, 藤田 克昌¹

Department of Applied Physics, Osaka Univ.¹, Immunology Frontier Research Center, Osaka Univ.²,

◯Kumiko Uegaki¹, Yasuo Yonemaru¹, Masahito Yamanaka¹, Nicholas I. Smith²,

Satoshi Kawata¹, and Katsumasa Fujita¹

E-mail: fujita@ap.eng.osaka-u.ac.jp

光学顕微鏡は、生体試料を非破壊かつ生きた状態で観察できる手法である。しかし、光学顕微鏡の空間分解能は、光の波動性により数 100 nm に制限されているため、生体試料の微細な構造体や分子個々の動態を解像して観察できなかつた。飽和励起(SAX)顕微鏡は蛍光分子の飽和励起を利用した蛍光顕微鏡の超解像手法である[1]。蛍光分子の飽和励起をレーザー光の焦点付近でのみ引き起こし、飽和励起で生じた非線形な蛍光応答を取り出すことで、共焦点顕微鏡の空間分解能を向上させる。非線形な蛍光応答は励起光に時間的変調を加えることで、変調周波数の高調波周波数の信号として抽出できる。本研究では、SAX 顕微鏡を用いて三次元培養した細胞を超解像観察し、細胞内部での散乱・屈折による空間分解能の低下を軽減した。SAX 顕微鏡では、レーザー光の焦点付近の非線形な蛍光応答を抜き出すため、生体細胞内部の光の散乱・屈折の影響を抑制できる。ゲル中に散布させた 200 nm の蛍光ビーズを観察し、本手法が共焦点顕微鏡より高い空間分解能を有することを確認した。生体組織試料として、三層の細胞からなる細胞組織を作製し、厚さ 20 μm の細胞組織内部の全体において、細胞内構造の超解像観察に成功した(図 1) [2,3]。

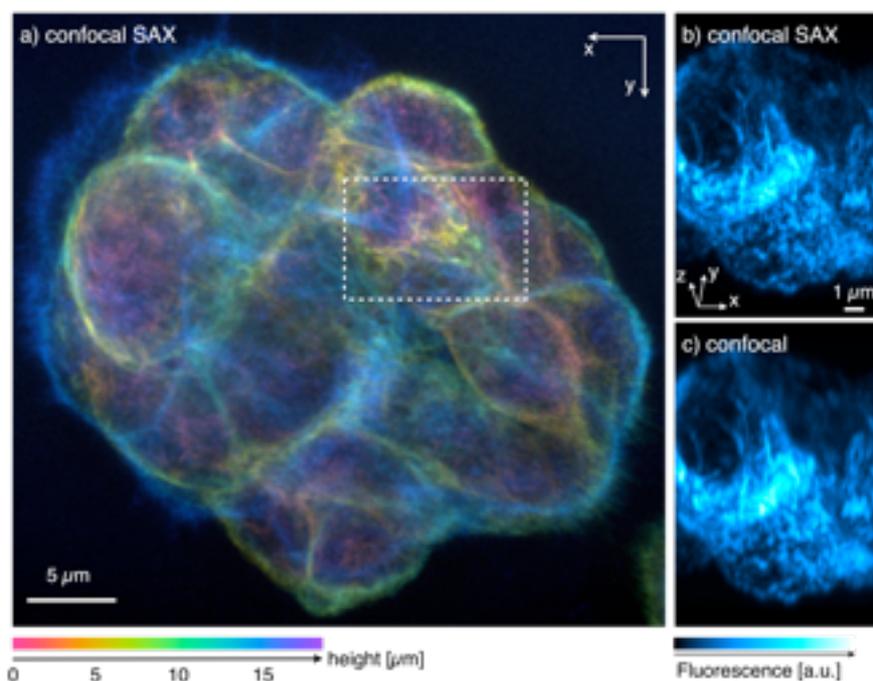


図 1. a) SAX 顕微鏡を用いた三次元培養細胞の蛍光像 (試料: ATTO Rho6G でアクチンを染色した固定 HeLa 細胞)。b), c) は a)内の白枠部分を三次元像として再構築した蛍光像を示す。b)とc)はそれぞれ SAX、共焦点顕微鏡を用いて撮像した。

- [1] K. Fujita, et al. *Phys Rev. Lett.* **2007**, 99, 22810
 [2] M. Yamanak, et al. *J. Biomed. Opt.* **2013**, 18, 126002
 [3] Y. Yonemaru, et al. *ChemPhysChem*, Accepted.