高感度・高解像フォトサーマル顕微鏡による生体組織の３次元イメージグ

High-sensitive and high-resolution imaging of biological tissue with 3D photothermal microscopy

電通大先端レーザー　　宮崎淳、川角洸史、小林孝嘉

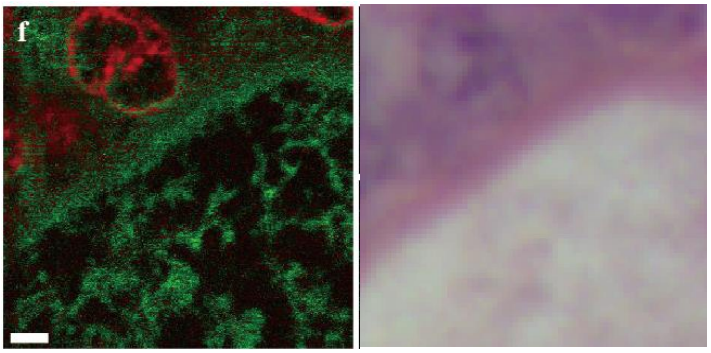
Jun Miyazaki, Koshi Kawasumi, Takayoshi Kobayashi

E-mail: miyazaki@ils.uec.ac.jp

蛍光を出さない無蛍光性分子は、光励起状態の寿命が短く化学的に安定で光褪色の影響がない（あるいは少ない）ため、光学顕微鏡での観察に有用である。蛍光分子に加え無蛍光性分子の分布を１分子レベルで観察可能な光学顕微法がフォトサーマル顕微鏡(PTM)である。PTM は試料の光励起にともなう微小な屈折率変化を検出するレーザー顕微イメージング法で、有機分子や金属ナノ粒子、カーボンナノチューブをプローブ分子に用いた生体組織の測定ができる。また、生体内に存在するミオグロビン、ヘモグロビンなど代謝を司る分子やメラニン色素などの無蛍光性生体分子を標識することなく超解像で３次元観察できる利点がある。一方で、PTM では検出光の微弱な相対強度変化を検出するため、蛍光顕微鏡と同等の高速測定を実現するには、信号対雑音比(SNR)を向上させることが何よりも重要である。

本講演ではフォトサーマル信号の角度依存性を利用した SNR の向上法を中心に発表する。フォトサーマル効果により屈折率変化が起きている媒質中を伝搬する平面波は、進行方向とは別の方向へ偏向（散乱）される。その振舞いは量子力学的な散乱と同等の式で理論的に記述することができ、伝搬する光は湯川ポテンシャル型の散乱を受ける[1]。対物レンズを介して入射する光は試料を透過後、フォトサーマル効果により光強度が強くなる領域（透過光の中心部）と、弱くなる領域（辺縁部）に分けられる。従って透過光の中心部と辺縁部を空間的に分けて別々に検出し、その後、二つの差分を計算することで、信号強度を２倍向上させ、同時にプローブ光のノイズを除去することができる[2]。半導体レーザーを用いた PTM では通常の方法と比べて信号光強度は１．７倍向上し、一方、プローブ光の強度ノイズを３１dB 削減できることを確認し、高感度なイメージングが可能となった。

また PTM は一種のポンプ-プローブ分光法であり、アポダイゼーション法に基づいて解像度を向上させることができる。具体的には瞳面で環状の強度分布をもつポンプ光とプローブ光を入射することで、焦点面でのサイドローブを抑制し、同時に解像度を回折限界値と比べ２倍向上できる[3]。講演では製作した高感度 PTM で測定した、生体組織の多色イメージ（図）やマウスの皮膚ガンのラベルフリーイメージについても紹介する。



左 : H&E 染色したウサギ卵巣の PTM による２色イメージ。赤が Haematoxylin、緑が Eosin に対応。通常の光学顕微鏡の明視野イメージ（右）と比べて解像度が向上し、多重染色した組織でも正確なアンミキシング像が得られる

参考文献
[1] J. Miyazaki, H. Tsurui, K. Kawasumi, and T. Kobayashi, Optics Express **22**, 18833-18842 (2014).
[2] J. Miyazaki, H. Tsurui, K. Kawasumi, and T. Kobayashi, Optics Letters, in press.
[3] J. Miyazaki, K. Kawasumi, and T. Kobayashi, Optics Letters **39**, 4219-4222 (2014).

© 2015年 応用物理学会