

## 可視波長域 2 光子励起を用いた蛍光分光顕微鏡の開発

### Visible-wavelength two-photon excitation microscopy with spectral detection

阪大応物<sup>1</sup>, 阪大産研<sup>2</sup>, 阪大 iFReC<sup>3</sup> ○久保俊貴<sup>1</sup>, 望月健太郎<sup>1</sup>, 渡辺梢<sup>1</sup>, 藤井俊輔<sup>1</sup>,

新井由之<sup>2</sup>, 畔堂一樹<sup>1</sup>, Nicholas I. Smith<sup>3</sup>, 河田聡<sup>1</sup>, 永井健治<sup>2</sup>, 藤田克昌<sup>1</sup>

Appl. Phys., Osaka Univ.<sup>1</sup> Sanken, Osaka Univ.<sup>2</sup> iFReC, Osaka Univ.<sup>3</sup> ○Toshiki Kubo<sup>1</sup>,

Kentaro Mochizuki<sup>1</sup>, Kozue Watanabe<sup>1</sup>, Shunsuke Fujii<sup>1</sup>, Yoshiyuki Arai<sup>2</sup>, Kazuki Bando<sup>1</sup>,

Nicholas I. Smith<sup>3</sup>, Satoshi Kawata<sup>1</sup>, Takeharu Nagai<sup>2</sup>, Katsumasa Fujita<sup>1</sup>

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

蛍光タンパク質は、細胞内の特定の部位に発現、発光させることができるため、生体細胞内の分子を生きのまま顕微観察することに利用できる。我々はこれまで、可視波長域による 2 光子励起を用いることにより、単波長で複数種の蛍光タンパク質の同時観察が可能な顕微鏡を開発した[1]。

本研究では、蛍光信号を分光測定することが可能な可視波長域 2 光子励起顕微鏡を開発した。計測される蛍光スペクトルにより、蛍光タンパク質を分離して観察することができる。実際に設計した光学系を Fig.1 に示す。2 光子励起に十分な励起光強度を与えるため、パルスレーザーを試料上でライン状に集光させた。ライン照明上で発生した蛍光はスリット上に結像され、分光される。同一ライン照明上のスペクトルが同時検出されるので、スポット照明と比べて高速な測定が可能となる。励起光を試料上でスキャンすることで、試料上各点における蛍光スペクトルを測定できる。Fig.2 に蛍光ビーズを測定した結果を示す。ビーズの空間分布とスペクトルの取得に成功した。

[1] M. Yamanaka, K. Saito, N. I. Smith, Y. Arai, K. Uegaki, Y. Yonemaru, K. Mochizuki, S. Kawata, T. Nagai, and K. Fujita, "Visible-wavelength two-photon excitation microscopy for fluorescent

protein imaging," J. Biomed. Opt **20**(10) 101202 (2015).

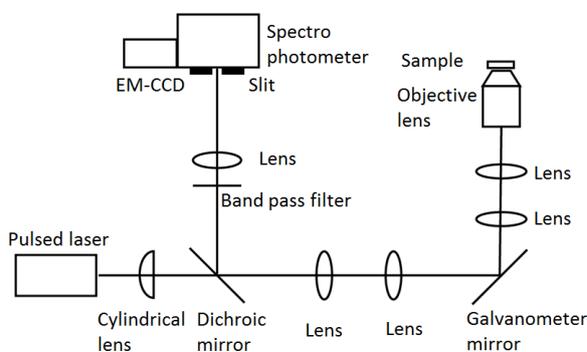


Figure 1 Optical setup for two-photon excitation microscopy with spectral detection. A pulsed laser (High-Q, Spectra physics) with a wavelength of 521 nm was used for the light source. The range of the detection wave length was 420-550 nm by the combination of a dichroic mirror and a bandpass filter.

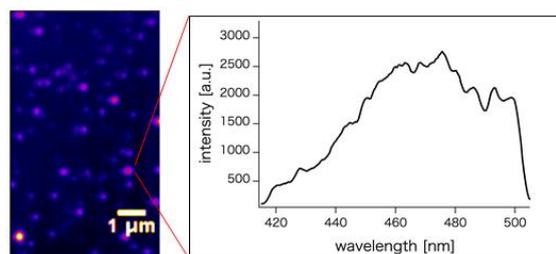


Figure 2 Fluorescence image of fluorescent beads (Life Technologies, F-8797) with a diameter of 100nm and a spectrum. Excitation wavelength was 521 nm. Oil-immersion objective length with a NA of 1.42 was used for the observation. The laser power at the focus was 17.5 mW. The pixel dwell time was 0.2 s. EM gain was 300.