サブ回折限界スポット照明による バイオイメージング

Bioimaging by subdiffraction-limit spot illumination

阪大院情 [1]，阪大院工 [2]，基生研 [3] ○新川 大生 [1]，西村 隆宏 [2]，小倉 裕介 [1]，
玉田 洋介 [3]，谷田 純 [1]

Grad. Sch. IST, Osaka Univ.[1], Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.[2], NIBB.[3],
Daiki Shinkawa[1], Takahiro Nishimura[2], Yusuke Ogura[1], Yosuke Tamada[3], and Jun Tanida[1]
E-mail: d-shinkawa@ist.osaka-u.ac.jp

通常の蛍光顕微鏡では光の回折限界によって空間分解能が制限され，波長以下のスケールの構造を鮮明に観察することができない．そのようなスケールの対象を観察するために，光スポットの走査により超解像を実現するレーザ走査型蛍光顕微鏡が利用されている．その一方式として我々は,回折限界よりも細かいサブ回折限界スポットを励起光として用いる超解像イメージングについて検討してきた[1]．この手法では，他のレーザ走査型蛍光顕微鏡に比べ，蛍光励起領域が縮小され空間分解能が向上するだけでなく,多数の微小光スポットを生成し並列に走査することで画像取得のフレームレートの向上も期待できる．これまでに，高い空間分解能を実現する高倍率の対物レンズを用いた系により,基板上に二次元配置した量子ドット等の蛍光ナノ粒子を観察し，手法の有効性を示している[2]．しかし，超解像顕微鏡の主な観察対象となるバイオ試料は，基板上の蛍光ナノ粒子とは異なり三次元構造を有し，また，光の散乱等も生じるため，観察の条件はより厳しくなる．そこで，多くの生命機能に関係し，他の超解像手法の検証にもよく用いられるチューブリンを観察対象とし，バイオ試料に対する本手法の有効性を検証した．

観察に用いる励起光には，多数のスポットアレイを利用する．実験では，光量効率等を考慮して 3×3 のサブ回折限界スポットを生成し，最もサイズの小さい中心のスポットのみを用いて観察を行った．波長 488nm のレーザ光 (Coherent, Inc., OBIS 488NM LS)を空間光変調器 (SLM;HOLOEYE, LC2012)で変調し，100 倍の油浸対物レンズ (NA=1.4)を通して光パターンを生成した．SLM 上の位相変調分布は独自の拘束条件を適用した反復フーリエ法を用いて設計した．生成したスポットの観察像を Fig. 1(a)に示す．チューブリンは蛍光分子の低密度化のために 3 色で標識した．今回はそのうち，緑色蛍光タンパク質 (mTagBFP2)を観察した．Fig. 1(b) に広域一様照明により得られたチューブリンの蛍光像を示す．サンプルの走査はピエゾステージを制御することにより行った．サンプルの走査間隔は約 65 nm とし，31×31 点で撮影した．得られた画像群において，各画像の励起光位置の蛍光強度を取得し，再構成した画像を Fig. 1(c) (d) に示す．図中の黄色枠内の強度プロファイルをガウス関数でフィッティングし，半値全幅の平均を求めたところ，回折限界スポット走査の場合は 322nm，サブ回折限界スポット走査の場合は 301 nm であった．この結果は，本手法がバイオ試料に対しても有効であることを示唆している．

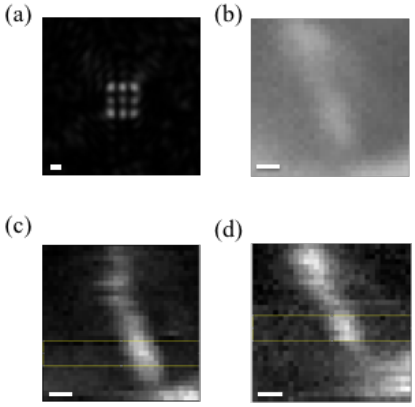

Fig. 1 Experimental results. (a) The generated subdiffraction-limit spots. (b) Fluorescence image of Tubulin obtained by wide-field imaging. (c) Fluorescence image of Tubulin obtained using a diffraction-limit spot and (d) using a subdiffraction-limit spot. Scale bar indicates 300 nm.

本研究の一部は，大学共同利用機関法人自然科学研究機構分野融合型共同研究事業(01111702)および光科学技術研究振興財団の助成を受けたものである．

[1] 小倉 裕介 他，第 65 回応用物理学会春季学術講演会，19p-B201-3 (2018).
[2] 新川 大生 他，第 79 回応用物理学会秋季学術講演会，20p-431B-8 (2018).