

ミトコンドリアの観測のための 可視域広視野フォトサーマル顕微鏡の開発

戸倉川研究室 丸山 朋希

1. はじめに

フォトサーマル顕微鏡はポンプ・プローブ顕微鏡の一種でラベルフリーな分子分布の計測などを可能とする。原理は試料内の特定の分子や分子結合のもつ吸収ピークに対応する波長の光をポンプ光として照射すると、ポンプ光が試料に吸収され熱が発生し試料の温度が上昇する(フォトサーマル効果)、この温度上昇の結果として屈折率が変化しこれをプローブ光で検出することができる。

ミトコンドリアは細胞内のエネルギー産生において中心的な役割を担う細胞小器官で、筋肉の活動や発達、維持においても不可欠である。先行研究において、ミトコンドリアを対象とした波長 520 nm 励起のポイントスキャン型フォトサーマル顕微鏡が開発されてきた [1]。ポンプ光とプローブ光がそれぞれ集光されて試料に照射され、信号強度分布関数が 2 つの光の共同分布関数の積となるので高い空間分解能を有するが、試料上をスキャンする必要があることから時間分解能が低いという欠点を有する。そこで我々はスキャンを必要としない可視域広視野フォトサーマル顕微鏡(フォトサーマル定量位相顕微鏡)を開発した。

本論文ではフォトサーマル定量位相顕微鏡を構築するための定量位相イメージングシステムとして回折型定量位相顕微鏡を構築し、その性能の評価を行っている。また、回折型定量位相顕微鏡にフォトサーマル効果を誘起させるための励起光源を導入したフォトサーマル定量位相顕微鏡を構築し、その性能の評価を行っている。

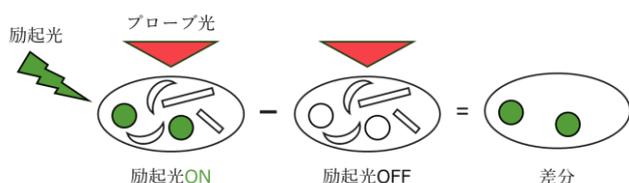


図 1 フォトサーマル定量位相顕微鏡の概念図

2. 原理

2.1 フォトサーマル効果

光照射により一度にたくさんの分子が基底状態から励起状態に励起されるが、励起状態の分子がすべて蛍光を放出して緩和するのではなく、蛍光を出さなかった残りの分子は光を出さずに緩和する。この過程を無輻射遷移という。無輻射遷移では、励起状態と基底状態との差のエネルギーは最終的には分子の並進運動の運動エネルギーとなり、周辺の分子と衝突を繰り返し、集団としては熱エネルギーとして系に放出される。つまり、光エネルギーが熱エネルギーに変換されており、熱膨張にともなう屈折率変化が発生したり、音響波が発生したりする。こうした効果を総称して光熱変換効果(フォトサーマル効果)と呼ぶ。

2.2 ポイントスキャン型フォトサーマル顕微鏡

熱は熱膨張による圧力や応力などの力学的変化だけでなく、圧力が変わることによる密度の変化も引き起こし、それにともない屈折率も変化する。空間的に温度の分布があると、屈折率は温度依存性をもつため屈折率の空間分布も一様でなくなる。この屈折率分布が疑似的な光学レンズ(熱レンズ)として作用し、これを熱レンズ効果と呼ぶ [2]。この熱レンズ効果を用いたポイントスキャン型フォトサーマル顕微鏡(熱レンズ顕微鏡)について述べる。

図 2 に顕微鏡下での熱レンズ効果の概念図を示す。測定対象が吸収を有する波長のレーザー光と試料に吸収のない波長のプローブ光を同軸に入射する。励起光とプローブ光の焦点に差をつけると、プローブ光の光路が熱レンズによって変化し、ピンホールを通過する光量に変化し、励起光による吸収を定量的に分析可能となる。また、励起光に強度変調をかけると、熱レンズ効果によるプローブ光の

光量変化も変調される。したがってこの変調周波数でロックイン検出することによって高感度測定が可能となる。一度の光量検出では一点のみの熱レンズ効果しか検出できないが、試料を二次元方向に走査することで試料全体の分布が得られる。

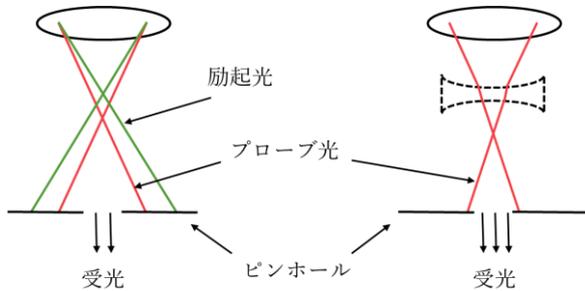


図 2 顕微鏡下での熱レンズ効果の概念図

ポイントスキャン型フォトサーマル顕微鏡は高感度な測定が可能であるが、 $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ (200×200 ピクセル) の測定に 80 s 程度の時間を必要とする [1]。そのためピクセル間の時間的な相関が失われてしまい、動的な観察には向いていない。次節で述べるフォトサーマル定量位相顕微鏡は試料全体の屈折率分布を一度の露光で取得することができ、試料の動的な観察が可能である。

2.3 フォトサーマル定量位相顕微鏡

フォトサーマル効果は局所的な屈折率の変化を引き起こし、ポイントスキャン型フォトサーマル顕微鏡はその屈折率の変化を光の進行方向の変化として観測するものである。一方、屈折率の変化は光路長の変化と言い換えることができ、その光路長の変化を観測するのがフォトサーマル定量位相顕微鏡である。 [3]

フォトサーマル定量位相顕微鏡では、光路長の変化を光の位相変化として検出する。次章で詳しく述べる定量位相イメージング法は 1 枚または複数枚の画像から試料の位相分布を取得する手法であり、励起光によって屈折率の変化が起きているときと起きていないときの差分を取ることでフォトサーマル効果による変化を検出する。(図 3)



図 3 フォトサーマル定量位相顕微鏡の実験系

2.4 off-axis 配置による定量位相イメージング

透過物体を定量位相イメージングする場合、図 4 に示すようなマッハ・ツェンダー型の干渉計がよく用いられる。光源から出力された光をビームスプリッターによって分岐させ、その後分岐させた光を次のビームスプリッターで結合する。すると、撮像素子で干渉縞を観測することができる。この干渉縞を後述のフーリエ変換法を用いて画像解析することによって、試料の位相分布が得られる。

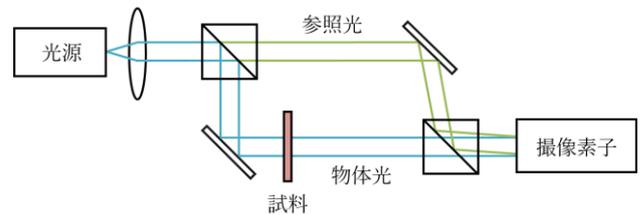


図 4 一般的なマッハ・ツェンダー干渉計による off-axis 配置

図 4 における参照光側のミラーを 90° から少し傾け、イメージセンサーに角度 θ で入射した場合を考える。物体光と参照光の複素振幅 u_o と u_r はそれぞれ次のように表される。

$$u_o = A_1(x, y) \exp(i\phi_1)$$

$$u_r = A_2(x, y) \exp\left[i\left(\phi_2 + \frac{2\pi}{\lambda} \sin \theta \cdot x\right)\right]$$

ここで、 A_1 と A_2 はそれぞれ物体光と参照光の振幅、 ϕ_1 と ϕ_2 はそれぞれ物体光と参照光の位相である。このとき、イメージセンサー上にできる干渉縞 $I(x, y)$ は次のように表すことができる。

$$I(x, y) = |u_1(x, y) + u_2(x, y)|^2$$

u_o と u_r を代入して次の式が得られる。

$$I(x, y) = |A_1(x, y)|^2 + |A_2(x, y)|^2 + 2A_1(x, y)A_2(x, y) \cos\left(\phi_1 - \phi_2 - \frac{2\pi}{\lambda} \sin \theta \cdot x\right)$$

この式の第 3 項のコサインが、光強度が空間的に縞模様を作っていることを表している。

2.5 フーリエ変換法 [4] [5]

図 5 にフーリエ変換法の概念図を示す。全体に f_x と f_y の空間キャリア周波数の縞がかかっている画像に対して空間フーリエ変換すると、空間周波数スペクトル上で中心から x 方向に f_x 、 y 方向に f_y だけシフトした位置に物体像成分が現れ、試料をそのまま通過した背景光成分と物体像に共役な共役像成分と分離される(図 5(a))。その後物体像のみをフィルタリングで切り出し(図 5(b))、物体像成分を f_x と f_y だけ中心に平行移動させて縞(空間キャリア周波数)成分を取り除く(図 5(c))。この物体像成分は複素振幅で強度と位相の情報を含むので、逆空間フーリエ変換を行うことで強度と位相のそれぞれの分布が得られる。

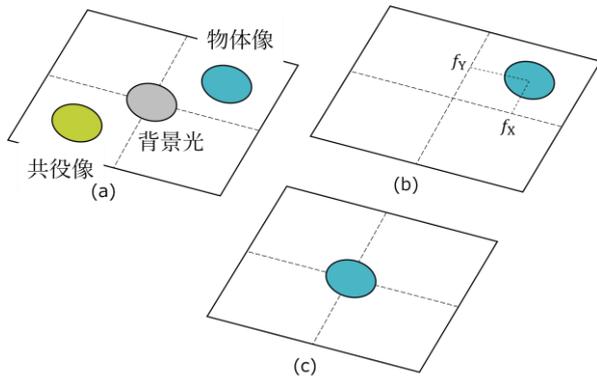


図 5 フーリエ変換法の概念図。
(a)~(c)は空間周波数スペクトル

3. 回折型定量位相顕微鏡の開発

フォトサーマル信号を取得するための定量位相イメージングシステムとして、実験系は回折型位相顕微鏡 [6] [7]を採用し、フーリエ変換法を用いて干渉縞画像の撮影と解析を行い、回折型位相顕微鏡の性能の評価を行った。実験図を図 6 に示す。

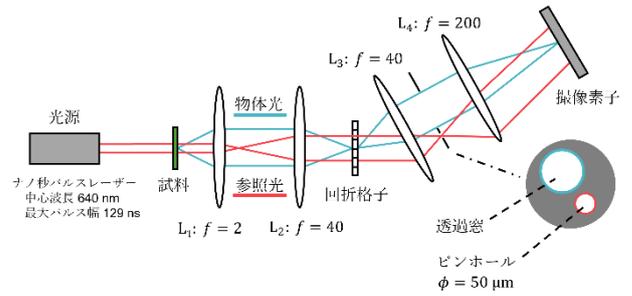


図 6 回折型位相顕微鏡の実験図

光源には中心波長 640 nm、最大パルス幅 129 ns の市販のナノ秒パルスレーザー (NPL64C/Thorlabs) を用いた。試料の一点一点で回折した光は、レンズ対によって回折格子に像転送される。そしてこの回折格子の 1 次回折によって光軸が曲げられ、撮像素子に垂直に入射する。一方、試料をそのまま通過した光は、回折格子もそのまま透過し、撮像素子に入射角をもって入射する。よって、物体光と参照光が角度をつけられて入射するため、撮像素子上で干渉縞が得られる。

この系の利点は、物体光と参照光が共通光路を通るという点である。これによって、外乱により光学素子で発生する位相ノイズの影響を低減することができ、サブ nm の位相分解能を有する系となる。また物体光と参照光の光路差が小さいことからコヒーレンス長の短い光源を使用可能で、これにより望まぬ干渉によるスペックルノイズの影響を低減できる。

拡大倍率は 100 倍、対物レンズの NA は 0.55、視野 $112.5 \times 70.3 \mu\text{m}^2$ の範囲を露光時間 10 ms で撮影した。直径 $2 \mu\text{m}$ のポリスチレンビーズを UV 硬化樹脂で固めて試料を作製し、撮影した位相分布を図 7 に示す。図 7 はビーズのある個所と無い箇所それぞれ位相分布を取得し、位相のバックグラウンドを除去したものである。フォトサーマル顕微鏡を構築した場合、励起光が照射されているときとされていないときの差分を取ることで、図 7 と同様にバックグラウンドを除去した位相分布が取得可能となる。

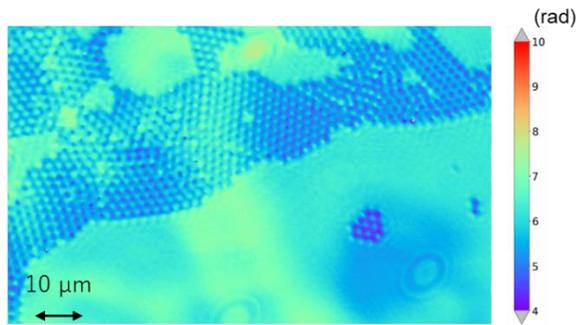


図 7 ビーズの位相分布

図 7 の一部を拡大したものを図 8 に示す。また、図 8 の黒線部での断面方向の位相分布を図 9 に示す。

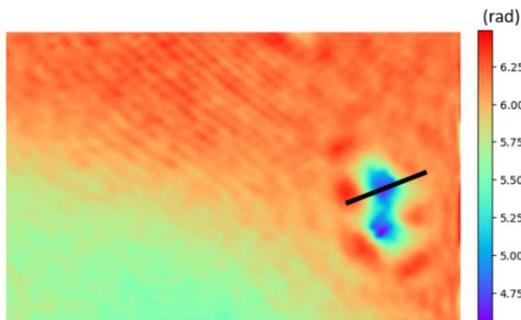


図 8 図 7 の一部を拡大した位相分布

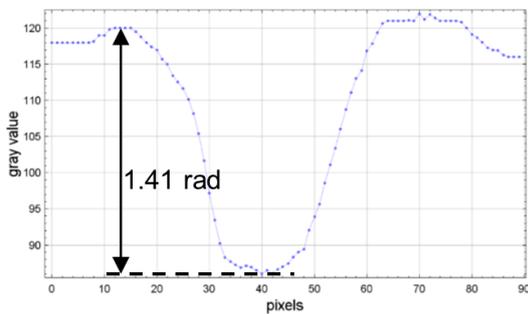


図 9 図 8 の黒線での断面方向の位相分布

図 9 より、ビーズの有無によって位相が 1.41 rad 変化することが分かった。また、ほかの 7 点のビーズについても同様に位相変化を測定した平均値は 1.52 rad であった。これは屈折率差 0.078 に相当する。UV 硬化樹脂の屈折率が 1.50 前後、ポリスチレンの屈折率が 1.580 であることからその差は 0.08 程度となるため、妥当な屈折率変化が検出されたと考えられる。また、8 点の標準偏差は 0.09 rad で、これは平均値 1.52 rad の 6% 程度である。5% のビーズの製造誤差があるため、位相分解能は製造誤差

で制限されてしまうが、製造誤差程度の位相分解能を有していることが分かった。

生体試料(マウス下肢筋の切片, 電通大狩野研提供)についても同様に観察した。バックグラウンドを除去した位相分布を図 10 に示す。また、図 10 の黒枠内の黒線部での断面方向の位相分布を図 11 に示す。細胞膜の組織の半値幅から、横方向分解能は 0.94 μm 以下であることがわかった。

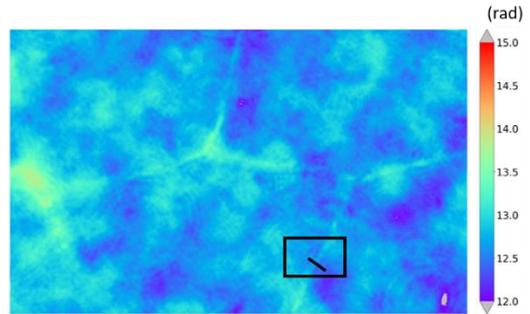


図 10 生体試料の位相分布

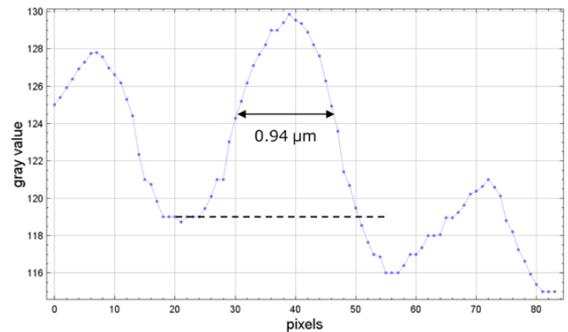


図 11 図 10 の黒線での断面方向の位相分布

4. フォトサーマル定量位相顕微鏡の開発

4.1 実験構成

前節で述べた回折型位相顕微鏡に励起光源を導入し、フォトサーマル定量位相顕微鏡を構築した。図 12 に実験図を示す。

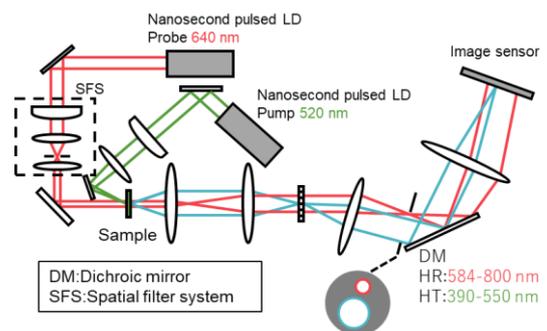


図 12 フォトサーマル定量位相顕微鏡の実験図

ミトコンドリア内部に特徴的に存在するタンパク質であるシトクロム c は、ほかのタンパク質と比較して波長 520 nm 付近に特徴的な吸収極大を有する。そのため波長 520 nm の市販のナノ秒パルスレーザー(NPL52C/Thorlabs)を励起光源とした。プローブ光源は空間フィルタシステムを導入し、横モードの高次成分をフィルタリングしている。また、試料に入射した励起光が直接対物レンズに入射しないように光軸を調整しているが、微小な散乱が検出されてしまうため、波長 640 nm のプローブ光は反射し、波長 520 nm の励起光は透過するダイクロミックミラーを入れている。

プローブ光のパルス、励起光のパルス、カメラの露光のタイミングチャートを図 13 に示す。

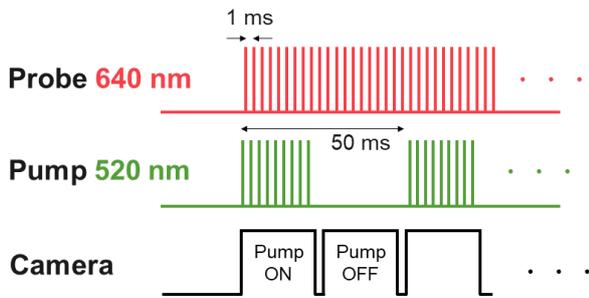


図 13 タイミングチャート

プローブ光と励起光は 1 ms の間隔でパルスが射出される。また、励起光による変化をプローブ光で検出するために、プローブ光は励起光に対して 100 ns 程度の遅延をほどこしてある。励起光は照射されている区間とされていない区間が存在し、それぞれの区間でカメラを露光させる。これらの各画像ペアの差分を取ることでフォトサーマル効果による微小な位相の変化を検出する。各画像ペアの時間差は 50 ms となっており、長期的なドリフトの影響を低減している。また、この差分を数千~10,000 回平均化することでノイズ成分を除去している。

4.2 着色ポリスチレンビーズの撮影

試料は直径 0.8 μm で、励起光の波長 520 nm(緑)の光を吸収する赤い着色のポリスチレンマイクロビーズを用いた。励起光が照射されているときと

されていないときの差分を 5,000 回平均化して取得したフォトサーマル位相分布を図 14 に示す。

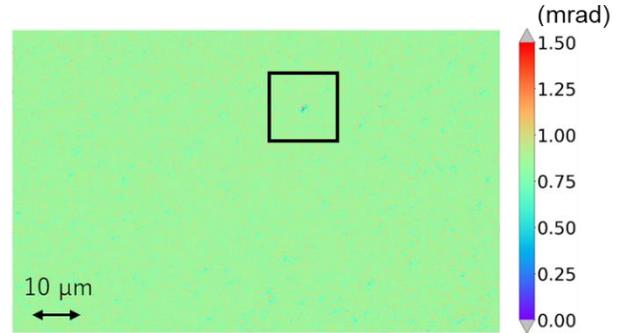


図 14 着色ビーズのフォトサーマル位相分布

図 14 の黒線の枠内を拡大した画像を図 15 に示す。信号が強く出た個所があることが分かった。

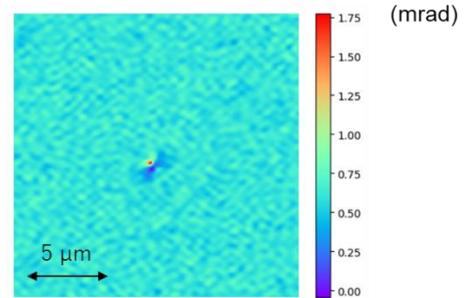


図 15 図 14 の黒線の枠内の拡大図

図 15 の信号が強く出た個所とビーズの強度分布を重ねた画像を図 16 に示す。強度分布でビーズがよく見えている個所とフォトサーマル位相分布で信号が強く出た個所が重なっていることから、フォトサーマル効果による変化を検出したと考えられる。

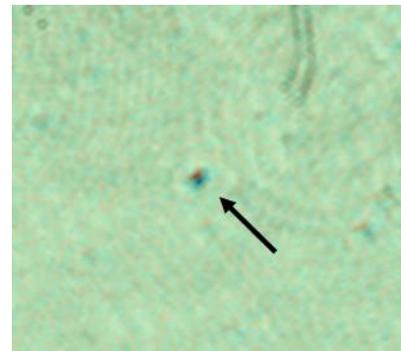


図 16 図 15 の信号が強く出た個所と強度分布を重ねた画像

4.3 生体試料の撮影

マウスの下肢筋の切片に対しても同様にフォトサーマル位相分布を取得した。

一枚の各干渉縞画像から、図 17 のような位相分布が得られた。細胞膜に沿った分布が確認できる。

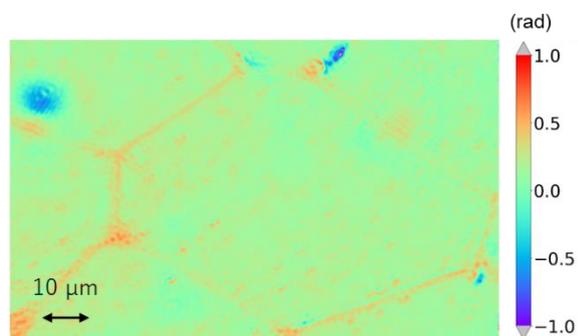


図 17 一枚の干渉縞画像から得られた位相分布

励起光が照射されているときとされていないときの差分を 10,000 回平均化して取得したフォトサーマル位相分布を図 18 に示す。細胞膜と細胞内で位相の違いを検出した。細胞膜にはミトコンドリアおよびそれに付随しているシトクロム c は基本的には存在しないため、フォトサーマル効果による位相の違いが検出されたと考えられる。また位相の変化は 0.4 mrad の範囲に有意な信号が存在しており、これは光路長 0.04 nm の変化に相当する。

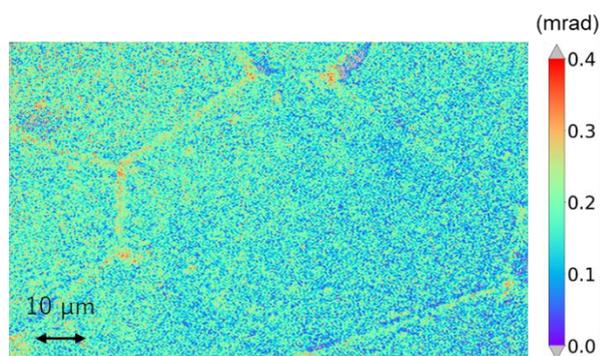


図 18 生体試料のフォトサーマル位相分布

5. まとめ

本研究では、ミトコンドリアの観測のため、全視野可視域フォトサーマル顕微鏡の開発と性能の評価を行った。生体試料に対して、空間分解能 0.94 μm 以下でフォトサーマル効果による光学長 0.04 nm に相当する位相の変化を検出した。

今後の展望として、より高強度な励起光源とプローブ光源を用意し、平均回数を少なくすることでビデオレートでのフォトサーマル分布の取得を目指す。また分子の指紋領域を含む中赤外光を励起光源に使用し、ミトコンドリア以外の様々な分子種に対しての測定を行っていく。

参考文献

- [1] Toru Tomimatsu et. al, “Photothermal imaging of skeletal muscle mitochondria,” *Biomed. Opt. Express*, 8, pp.2965-2975, 2017.
- [2] 馬場和馬 et. al, “熱レンズ顕微鏡,” *光学*, 33, pp.708-714, 2004.
- [3] M. Tamamitsu et al., “Label-free biochemical quantitative phase imaging with mid-infrared photothermal effect,” *Optica* Vol. 7, Issue 4, pp. 359-366, 2020.
- [4] M. Takeda et al., Fourier-transform method of fringe-pattern analysis for computer-based topography and interferometry, *J. Opt. Soc. Am./Vol. 72*, No. 1, pp.156-160, 1982.
- [5] 武田光夫, フーリエ変換による画像解析とその応用, *応用物理* 第 62 巻 第 6 号, 1993.
- [6] Gabriel Popescu et al., “ Diffraction phase microscopy for quantifying cell structure and dynamics,” *Optics Letters* 31, pp.775-777, 2006.
- [7] 早崎芳夫, *光学ライブラリー7 デジタルホログラフィ*, 朝倉書店, 2016.