

平成27年10月9日

報道機関 各位

国立大学法人電気通信大学

国立大学法人電気通信大学先端超高速レーザー研究センターの小林孝嘉特任教授と宮崎淳特任助教は、新たに開発した光熱顕微イメージング法を搭載したポンプ・プローブ顕微鏡により、試料の表面を高解像度で、かつ同時に複数の画像で撮影することに成功しました。

今回の成果により、脳などの生体内の細胞を生きたまま、安定的に観察することが可能となり、認知症やアルツハイマー病の診断などへの応用が期待されます。

なお本研究開発は、科学技術振興機構の戦略的創造研究推進事業 チーム型研究(CREST)「先端光源を駆使した光科学・光技術の融合展開 (平成 23~27 年度)」による支援を受けて行いました。

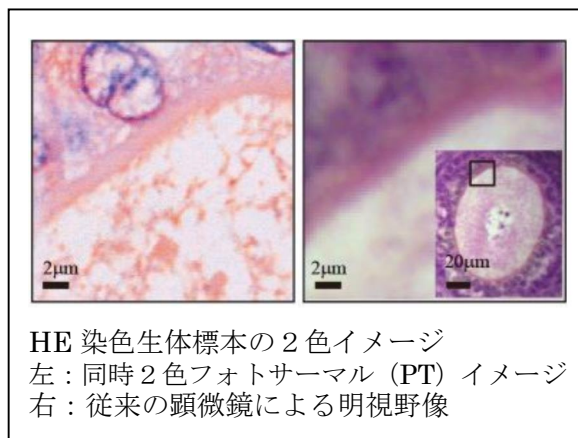
【背景】

細胞などの微小な試料を観察する有力な手段として光熱顕微イメージング法がありますが、これまでの研究では、光源に光パラメトリック増幅器を利用した波長切り替え方式により複数の画像を撮影しているため、撮像に時間を要し、状態が変化する生体の細胞などを適切に計測することは困難でした。

【今回の成果】

今回の開発では、ポンプ・プローブ顕微鏡のポンプ光源として、複数の波長の半導体レーザーを利用し、それぞれの波長を別々の周波数で変調します。検出部ではプローブ光による検出信号の周波数成分を複数チャンネルのロックインアンプで分離することにより、試料の表面を高解像度で、かつ同時に複数の画像で撮影することを実現しました。

この方法を利用して、実際に、病理組織の染色で最も一般的なヘマトキシリン・エオジン染色したマウスの卵巣の切片を観察し、従来の顕微鏡による明視野像に比べて、より鮮明なイメージ像の撮影に成功しました (図1)。



【今後の展開】

脳内における神経細胞 (ニューロン) やグリア細胞などの状態を観察することにより、記憶や忘却に関係する細胞の連携機構などを解明し、認知症やアルツハイマー病の診断、さらには脳出血や脳梗塞などの脳疾患に関する病理解明への応用が期待されます。

【技術解説（参考）】

フォトサーマル顕微鏡は、試料の吸収を高解像度で検出するポンプ・プローブ顕微鏡の一種である。強度変調されたポンプ光と、もうひとつのプローブ光を対物レンズによって集光し、試料に照射する。ポンプ光が試料に吸収されると熱が発生し、試料の温度が上昇する。このとき、屈折率が温度上昇により変化するので、結果としてポンプ光は試料の屈折率を変調する。この屈折率の変化によって試料透過後のプローブ光の発散角が変化する。検出系に絞りを設置すると、このプローブ光の発散角の違いを強度の違いとして検出することができる。したがって、ポンプ光の強度変調周波数でプローブ光の強度変調をロックイン検出することで、ポンプ光強度に対して線形に変調された試料の屈折率を検出することができる。この方法では、信号強度分布関数がポンプ光とプローブ光の共同分布関数の積となるので、通常の蛍光顕微鏡に比べて空間分解能が向上される。さらに、試料の発光ではなく、吸収を観測するので、色素の選択の幅が広いことも特徴である。

本研究は、熱容量と熱伝導率が温度に依存することに着目し、空間分解能をさらに向上させたものである。すなわち、熱容量と熱伝導率の温度依存性により、ポンプ光による試料の温度はポンプ光強度 (I_{pump}) に対して非線形に応答し、結果として、試料の屈折率変化も非線形に応答する。例えば屈折率の 2 次の応答による信号強度は、

$$S \propto I_{\text{pump}} \cdot I_{\text{probe}} \quad (1)$$

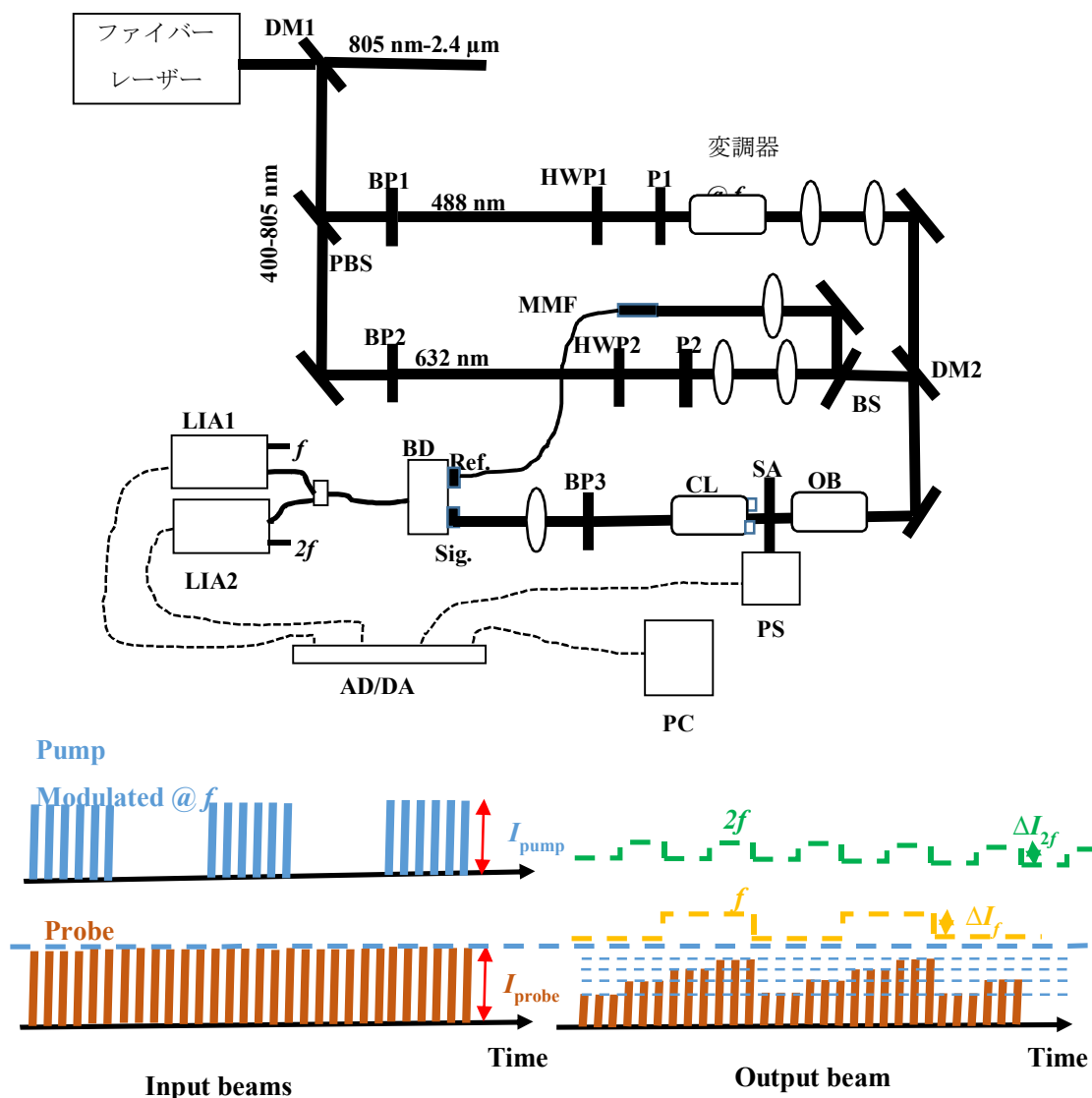
となる (I_{probe} はプローブ光強度である)。この原理により、ポンプ光の集光スポットの強度が大きな中央部分の信号が強調され、点像分布関数はポンプ光の点像分布関数の 2 乗とプローブ光の点像分布関数の積となる。その結果、通常の線形なフォトサーマル顕微鏡と比較して、18%の空間分解能の向上が期待できる。これは、通常の光学顕微鏡と比較すると、42%の空間分解能の向上に相当する。このような 2 次の非線形な信号を検出するためには、ポンプ光の変調周波数に対して、2 倍の周波数でロックイン検出すれば良く、通常のフォトサーマル顕微鏡に光学系を変更することなく、簡便に空間分解能を向上することができる。

非線形フォトサーマル効果を観測する顕微鏡システムのブロック図を図 2 に示す。光源はパルス幅 100ps、パルス繰り返し周波数 40MHz の白色光源ファイバーレーザーである。白色パルス光から、ポンプ光とプローブ光として、それぞれ波長 488、632nm の成分を光フィルタで抽出する。ポンプ光は強度変調を与えられ、プローブ光と重ねられて試料に照射される。本システムでは、プローブ光の強度雑音を抑圧するために、プローブ光の参照光を用意し、参照光とプローブ光の差を検出するバランス検出器を利用している。検出器からの出力信号を 2 台のロックインアンプに入力し、それぞれポンプ光の変調周波数と、その 2 倍の周波数でプローブ光の変調を同時に観測した。

図 3 に、本顕微鏡で観察したマウスのメラノーマ（皮膚がん）のフォトサーマルイメージを示す。図中(a)は、通常の線形信号によるイメージで、同(b)は非線形信号によるイメージである。両図より、(a)に比べて、(b)の解像度が向上していることが分かる。

同(c)は、(a)と(b)中に示した赤線上の信号強度分布で、図中一番左のピーク部に着目すると、線形信号では半値幅は 212nm であるのに対して、非線形信号では 174nm に狭窄されてお

り、半値幅は約 18%狭くなっていることが分かる。この値は、式(1)から予測される空間分解能の向上と一致している。これらの結果により、原理的に、非線形信号の観測により、空間分解能が向上することが実証された。



DM1, 2: dichroic mirrors; PBS: polarization beamsplitter;
 BP1, 2, 3: bandpass filter; HWP1, 2: half-wave plate;
 P1, 2: polarizer; EOM: electro-optic modulator;
 BS: beamsplitter; MMF: multimode fiber; OB: objective lens;
 PS: piezo stage; SA: samples; CL: condenser lens;
 BD: auto-balanced detector; LIA1, 2: lock-in amplifiers.

図2 非線形フォトサーマル顕微鏡のブロック図と主な波形

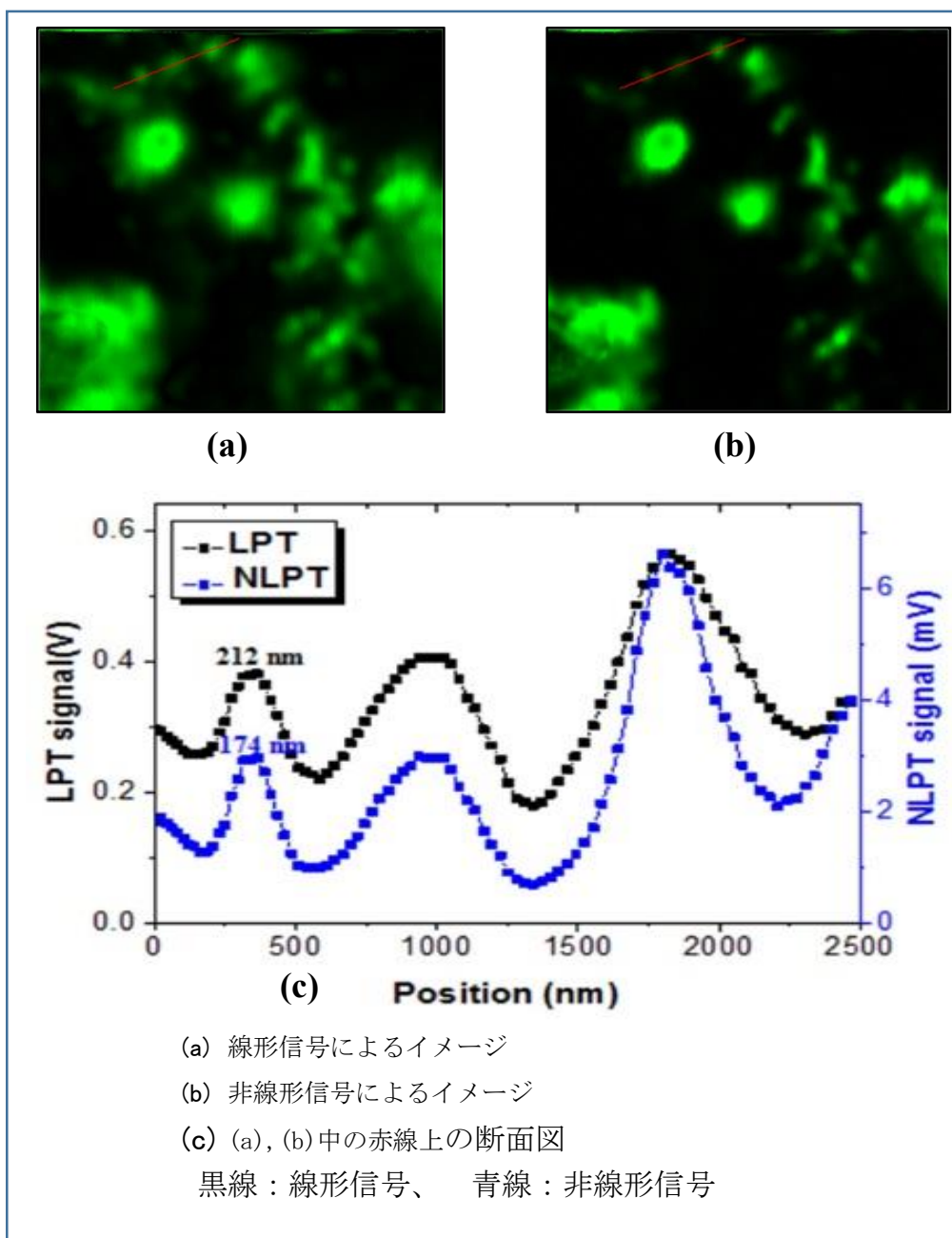


図3 マウスのメラノーマのフォトサーマルイメージ

【用語解説（参考）】

光熱顕微イメージング（Photo Thermal : PT）：観察される試料にポンプ光を照射すると光エネルギーが吸収され、温度がごく僅か（1/1000℃程度）上昇する。その結果、照射された領域で、ごく微小な熱膨張が起き、物質密度が減少して屈折率が減少する。屈折率減少の大きさは、ポンプ光の強さに比例するので照射された領域は凹レンズとなる。この凹レンズ効果により、プローブ光が拡散し、試料の背面に配置された検出器に入る光パワーが変化する。この光パワーの変化を高感度検出器で検出することにより、高解像度で試料表面のイメージ像が得られる。

ロックインアンプ：無線分野で有用なヘテロダイン技術を利用して、被測定信号を直流成分に周波数変換する機能。被測定信号に含まれる各種の信号のうち、参照信号の周波数と同じ成分のみが直流となるので、次段のローパスフィルタで抽出することができる。

グリア細胞：神経膠細胞（しんけいこうさいぼう）とも呼ばれ、ヒトの脳の中で神経細胞よりも数が多く、これまでは単に神経細胞を支える役割をすると考えられていた。ところが、近年このグリア細胞が非常に多くの機能を持っていることが分かってきた。例えば、神経細胞への栄養供給や損傷した神経細胞の除去（貪食）およびその構成成分であるタンパク・糖などの再利用、神経伝達加速などに関わる重要な脳の構成要素であり、最近、多くの研究者が注目し、活発な研究が進められている。

明視野像：試料を照射し、透過光を利用して明るい視野のもとで撮影した像（イメージ）である。これに対し、レーザー顕微鏡は暗い視野の中で試料にレーザー光を投射し、その反応特性（レーザー蛍光顕微鏡では蛍光、本 PT イメージング顕微鏡ではプローブ光）により、撮像を行う。

問い合わせ先

国立大学法人電気通信大学 先端超高速レーザー研究センター

特任教授 小林孝嘉（こばやしたかよし）

電話 : 042-443-5845

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