

# 軸方向走査が不要な 二重検出型共焦点蛍光顕微鏡

生きている組織を最も効率良く観察する方法の1つは共焦点蛍光顕微鏡を使うことである。これは詳細な3D蛍光情報の取得と、それを使った3D画像の再構成を可能にする。しかし、共焦点顕微鏡は通常3次元走査が必要なので、生物学的試料は、多量の光を浴びて、光退色や損傷を起こし、死にいたることさえある。

韓国科学技術院 (KAIST) とハンヤン大学の4人の研究者たちは、3次元(軸、x、y)の全てではなく、2次元(x、y)走査だけが必要な機器を開発して、共焦点蛍光顕微鏡法における光毒性問題を大幅に低減した。イ・ドンリョン (Dong-Ryoung Lee)、キム・ヨンドク (Young-Duk Kim)、グォン・デガン (Dae-Gab Gweon)、ユ・ホンギ (Hongki Yoo) を含む研究者たちは、サイズと軸方向応答の異なる2つのピンホールでカバーされた光検出器を使って、これを達成した。発光点からの軸方向情報は、ピンホールからの強度信号の比率を観察し、それらの軸方向応答を使って、その点の深さ位置を決定することで求まる。

この技術、いわゆる二重検出共焦点蛍光顕微鏡法 (DDCFM) においては、2つのピンホールは一定の軸方向距離だけ離れている。2台の検出器からの信号の比率が測定基準パラメータとなる。したがって、蛍光試料の量子効率などの特徴は計算から除外され、簡単な応答曲線となる。

## 180 $\mu\text{m}$ の深度範囲

実験システムでは30と150 $\mu\text{m}$ のピ

ンホール直径を利用した。光源は488nmを発光するレーザーであった。二次元走査をガルバノ・ミラーと8kHz共振ミラーを使って実施し、1秒あたり15.6フレームを実現した。各フレームは512 $\times$ 512ピクセルからなり、視野は4000 $\times$ 4000 $\mu\text{m}$ であった。

軸応答曲線は、ピンホールサイズに加えて、対物レンズの開口数 (NA) にも依存する。長軸測定は、0.045の低いNAをもつ対物レンズを使って実施した。光電子増倍管 (PMT) を使用して蛍光信号を取得した。

まず、軸方向応答を、圧電ステージ(特性解析にだけ利用)を使って300 $\mu\text{m}$ の軸方向深さ走査を1回追加しながら、xとyの走査を実施して6 $\mu\text{m}$ 離れた蛍光ビーズを観察することによって測定した。これらのデータに5次多項式をあてはめ、較正曲線を作成した。その結果、軸方向測定範囲は180 $\mu\text{m}$ になった。

追加のキャリブレーション測定後に、様々な画像を取得してDDCFMの3Dイメージング能力を実証した。蛍光ビーズを使って準備された試料を150 $\mu\text{m}$ 離れた二つの高さ位置で横方向に広がる2D領域の画像を形成した。測定された平均高差は150.6 $\mu\text{m}$ であった。

研究者たちは、この機器でいかに良好に3D構造を扱えるかを確かめるために、フルオレセインで染色されたニットナイロン繊維を撮像した。この画像バージョンは0.045NAの対物レンズを使って4000 $\times$ 4000 $\mu\text{m}$ の視野を走査することで取得された。その結果、繊維構造の詳細が示された。従来式3D走査型共焦点蛍光顕微鏡で取得さ

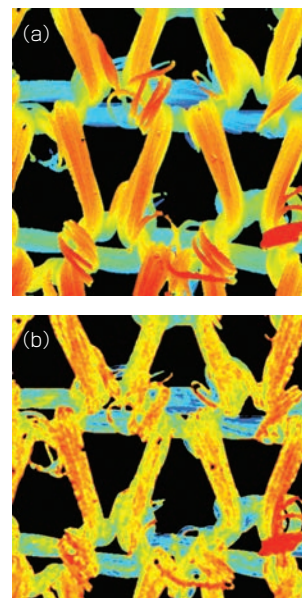


図1 0.16NAの対物レンズをもつ従来式共焦点蛍光顕微鏡で取得されたナイロン繊維の画像(a)とDDCFMで取得された画像(b:4000 $\times$ 4000 $\mu\text{m}$ スキャンの1600 $\times$ 1600 $\mu\text{m}$ 部分)とを比較した。高さは青から赤までの色で区別した。(資料提供:KAIST)

れたスキャンと比較して、遜色のない結果であった(図1)。

DDCFM技術の1つの欠点は、軸方向の線に沿って1つ以上の蛍光点が存在する場合(例えば、試料が部分的に透明な場合)、結果が不正確になることだ。こうした場合は、最も近接する蛍光点を測定点とみなした。研究者たちは、DDCFMをさらに小型化して、前臨床および臨床研究用の光ファイバベースの小型内視鏡3D蛍光イメージングプローブを開発することも夢ではないと確信している。

「われわれは、提案した技術の最も優れた点は高速3Dイメージング能力であると考えているので、まず第一に、蛍光粒子の挙動を示す動画の撮影を試みたい」とKAISTのイ・ドンリョン氏は語った。(John Wallace)

## 参考文献

- (1) D.-R. Lee et al., Opt. Exp., 21, 15, 17839 (July 29, 2013).