

## ●光近接場顕微鏡

名古屋大学大学院 医学研究科イメージング生理学 辰巳 仁史

2001年の生理学会では、全反射型の近接場蛍光顕微鏡の構成の具体例を解説し、実際の実験に応用するときの注意点について述べた。また、観察例として、神経細胞の膜が神経興奮にともなってダイナミックに基質との間の距離を変化させたり、伝達物質をエクソサイトーシスをしている例、細胞の接着をになう蛋白分子の集合の過程とその仕組みの研究を紹介した。ここでは、全反射型の近接場蛍光顕微鏡の構成と、接着をになう蛋白分子の集合の過程の観察の例について述べる。

### 1. はじめに：生命科学における近接場光を用いることの重要性。

生命現象を成り立たせている生体分子の大きさはおおむね数 $n$ メートルである。しかも、それぞれの分子は液中で常温常圧の環境の中でのみその機能発現を行っている。電子顕微鏡は高い空間分解能をもつが、電子顕微鏡は真空中で動作するため、機能する生体分子を直接観察することはできない。近接場光顕微鏡は、基本的には光を用いているため水溶液中で機能する生体高分子を観察するのに適している。また、光のエネルギーの分布が狭い空間領域に限られるため、高い空間分解能で細胞内で働く分子（群）を観察することを可能とする。

### 2. 近接場光による細胞内分子の観察概要

光は粒子であると同時に波動である。この波の性質があるので、光は自由空間を伝播する。しかし、屈折率が変化する境界面に大きな角度で入射される場合や、波長より小さい微小開口に遭遇した時、光は伝播できずに減衰が起きる。この減衰の起きる空間は光の波長よりも小さくニアフィールド光（近接場光）の存在する領域と呼ばれる。全反射面における近接場光の強度は全反射面から

の距離に対してほぼ指数関数で減衰する。この減衰は100nmほどでおこる。この急峻な光の減衰は、光が極めて狭い領域に存在することを意味している。この性質を巧みに応用することで、生きている細胞の中の微細な構造や生体高分子の働く姿を観察することができる。

まずニアフィールド光を用いた顕微鏡観察について簡単に原理を解説する。ガラスの内部にある光源から出た光が、ガラスと空気の境界に入射している様子を考えると、光線が境界に入射した場合は光の反射と屈折がおこる。一部の光子は屈折し、残りの光子は反射する。ここで光線の傾きを大きくしていくと、ある限界の角度（臨界角と呼ばれる）よりも大きな入射角で光線が入ってくる場合には、屈折光はなくなり、光線はすべて反射される。全反射は入射光を全部反射するが、反射面の向こう側に光の粒子の侵入あるいは“しみだし”が存在する。この“しみだした”光は近接場（エバネセント）光と呼ばれる。

### 3. 生命科学において使われる光近接場顕微鏡の構成

生命科学において使われる光近接場顕微鏡は大きく分けて二つのタイプがある。一つは全反射面のできるエバネセント光を用いて対象をイメージングするものである（全反射蛍光顕微鏡）。この方式は、構成が簡便なため広く使われている。もう一つは、先端の尖ったグラスファイバーを用いて対象の表面を走査して画像を得るタイプのもの（走査型光近接場顕微鏡）である。全反射型の光近接場顕微鏡の具体的な構成やその応用については文献を挙げておく（文献1から5）。

ここでは、生命科学によく使われる対物レンズエバネセント法とプリズムエバネセント法の特徴を以下で述べる。われわれの経験では、広い範囲

を観察する必要がある場合や、多重蛍光観察や、共焦点レーザー顕微鏡による観察と同時(または、時分割で)観察することが必要な場合は、プリズムエバネセント法が適していた(図3を参照)。一方で、対物エバネセント法は、観察面での照明を強くできるため、結果として明るい蛍光イメージング可能である。すなわち暗い蛍光や少数の分子からの蛍光を観察する場合に適している。以下では、われわれが研究に使用している構成の具体例を紹介する。

プリズムエバネセントの全反射顕微鏡は、構成が簡単なこと、また、比較的安価に導入できることが特徴である。光学的に性能が高く、また同時に細胞を取り扱いやすくするための工夫を行ったのでそれを紹介する。チャンバーの構成は、図1Cに示すように小さいプリズムを厚めのカバーガラス(No. 2あるいは3)に接着して(光学特性がガラスと同じ接着剤オプトダインを用いている)使用している。厚めのカバーガラスは、薄いものよりも全反射を構成しやすいので採用している。オリンパス社の水浸レンズ(60倍NA1.2)では、厚いカバーガラスでもピントを結ぶことができ、その大きな開口数(NA1.2)を生かして、明るく高い空間分解能で観察を行える。この光路の例を図2Aに示す。もしレーザー光が使える環境であれば、比較的安価(プリズム、ミラーの購入のみ)にシステムを構成できる。また、既存の顕微鏡に併設する形で、取り付けることができるので、蛍光や微分干渉、共焦点顕微鏡による観察が同時または切り替えて同じ標本に対して行うことができる。また、レーザービームの幅(300ミクロン~数ミリ)が観察野になるので、通常観察に必要な観察野を全反射照明することができる。この装置の問題点は、全反射の起こる場所が図1Cにあるようにとびとびに存在するので、全反射点(面)を観察点を選ばなければならないことである。また、レーザービームを小さく絞ることができないので、同じレーザー出力の照明では対物エバネセントにくらべると暗くなる。培養を

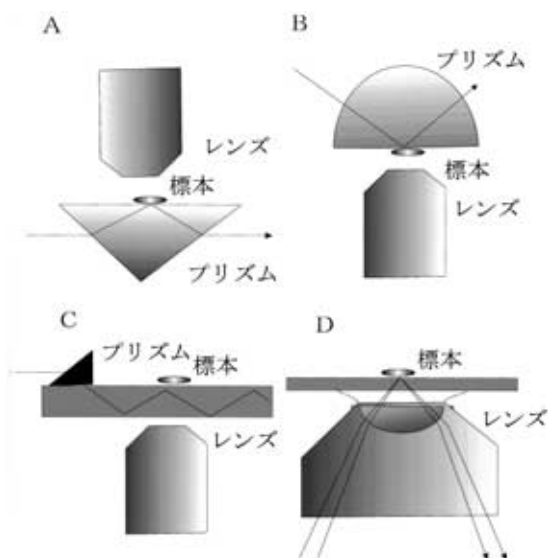


図1. 全反射蛍光顕微鏡のさまざまな構成例。A, プリズムを用いる場合。B, シリンドリカルプリズムを用いる場合。C, 試料台につけたプリズムにレーザー光を照射し全反射面をつくる場合。D, 対物レンズをつかって全反射を構成する例。

する場合に、このプリズム付きのチャンバーで培養を行うことになるので、培養するディッシュの数だけこの特殊なチャンバーをつくる必要がある。

対物エバネセントの全反射顕微鏡の光学構成を図2Bにしめす。この方法の良い所は、レーザーの照明を小さい領域に集めることができるので、明るい近接場照明ができることである。また、一度光路をセットすると、光路の調整や設定なしに繰り返し観察が行える。実際の構成では、われわれは、倒立顕微鏡の背面の落射蛍光の光路から、レーザーを導入している。全反射の起こる観察面を大きく取るために、レーザーのビームの直径を予めビームエキスパンダーで広げて(約10mmΦ)から、レンズの瞳面(だいたいレンズの取り付け位置の少し上の面)に集光する(われわれは、 $f = 200\text{mm}$ で集光している)。これによって、レ

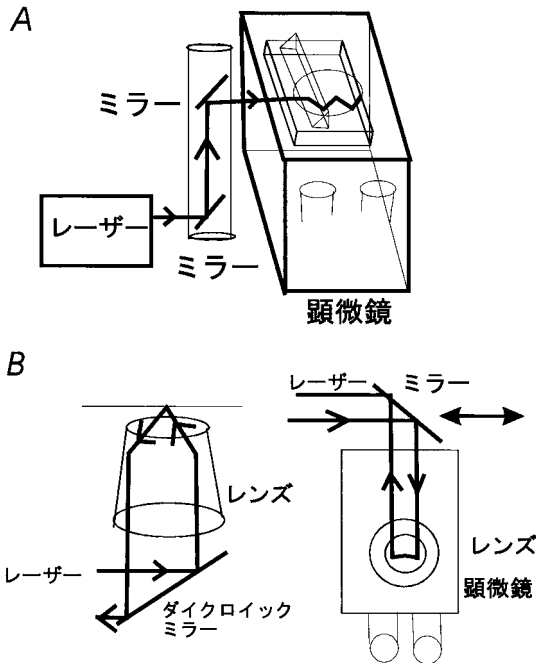


図2. プリズムエバネセント法と対物エバネセント法の光路の概要。A プリズムエバネセント法，B 対物エバネセント法。対物エバネセントでは，レーザーはダイクロイックミラーで反射して，レンズの瞳面に集光する。それにより，標本面で平行光線が得られる。このレーザー光の照射位置をずらしていくことで，全反射を形成する。

レンズを出た光は，ほぼ平行光束となる。（これを確かめるために，天井にこのビームをあててその平行性を確かめる）その後で，レンズの瞳でのレーザーの集光点を中心からずらしていく（図2B右の図のミラーの位置を矢印方向に移動することで行う）。それによって，レーザーのガラス面での入射角が大きくなって，全反射が始る。この全反射が始る角は，通常の油浸レンズ系（開口1.4）を使った場合に65.63度である（文献，6）。この角度から，対物レンズのNAで決まる限界角（67.53度）までが全反射の許される角度となる。この角度のみに余裕を持たせると，レーザーの照射の設定が楽に行えるようになり，全反射角を変え

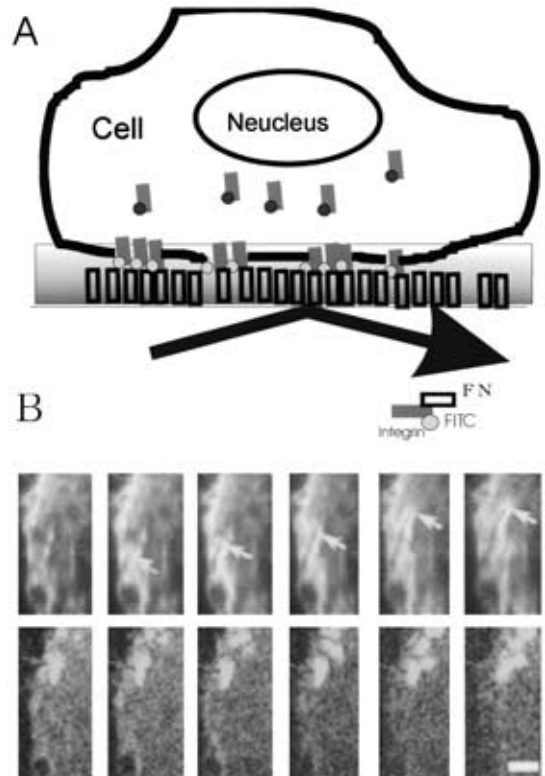


図3. 上図，研究の概念図。インテグリンの $\beta 1$ 鎖を認識する蛍光抗体で染色し，プリズムエバネセント全反射蛍光顕微鏡で観察した。B，上列：全反射蛍光顕微鏡によるインテグリン集合のタイムラプスイメージング。インテグリンの集合は画面の左側（細胞の周辺部）から中心部（右側）にむかって伸びている。この同じ視野を共焦点レーザー顕微鏡で観察すると，インテグリン分子の伸長端の近くの細胞内（底面から $1\mu\text{m}$ のところ）に，細胞内のインテグリンの分子が集合していることが観察される。タイムラプスは3分おきの記録である。バーは $5\mu\text{m}$ 。（河上敬介氏撮影（名古屋大学医学部））

て近接場光のしみ込み深さを調整することもできる。オリンパス社の高開口数対物レンズ100倍（ $\text{NA} = 1.65$ ）はこの目的に最も適したレンズである。このレンズの場合には，この角度の余裕が大きい（50.83度から67.97度）ので，比較的簡単にレーザーを全反射させることができる（文献，6）。上記の装置の場合には，約50ミクロン直径

のエリアで全反射を作ることができた（オリンパスの市販の装置では160ミクロンの直径の全反射領域があるという）。開口数の大きいこと（NA = 1.65）は、蛍光の観察においても、光を無駄なく拾い集めることができるので、明るい蛍光イメージングを行うことができる。このレンズを使用する場合の注意点は、カバーガラスもオイルもすべて屈折率の高い物（Optical Index 1.78）を使う必要があり、培養細胞の場合では、この屈折率の高いガラスの細胞への毒性を予め評価する必要がある。観察野が限られてしまうので、それに合わせた研究の組み立てが必要である。落射蛍光や共焦点顕微鏡観察などの組み合わせの使用は可能であるが、工夫が必要である。最近オリンパスから、開口数1.45の対物レンズが発売された。このレンズでは、上記の対物エバネセントを簡単に構成することができ、また、特殊なガラスやオイルを用いなくても観察ができる。

近接場蛍光顕微鏡で、蛍光励起をうけるのはガラス面から約100nmの領域に限られるため標本の一部の領域からの蛍光のみがカメラに到達する。このわずかな光による観察を行うため、冷却CCDカメラや冷却イメージインテンシファイアーつきの高感度カメラが用いられる。これらの観測装置の時間分解能は毎秒30コマ（冷却イメージインテンシファイアーつきの高感度カメラ）あるいは数秒（冷却CCDカメラ）である。冷却CCDカメラでは、転送速度を上げて（実際にはピンングや映像の部分転送なども組み合わせて高速化することで）毎秒30コマ以上の画像取得を可能にしているものもある（フォトメトリックス社、クールススナップなど）。これらの装置のレーザーの光源としては、2倍波ヤグレーザー（473nm：20mW 島津や532nm：50mW コヒーレント）を使っている。レーザーの照射や撮影などのコントロールは画像取得処理ソフト：メタモルフ（Universal Imaging, 日本ローパー）を用いておこなっている。

#### 4. 分子の集合を近接場光と共焦点レーザー顕微鏡で分析する例.

血管内皮細胞の基質への接着は、血管内皮細胞が血流に抗して血管内壁に整然と並んでいること、そしてこの接着が血液成分を血管外に流出しないことにとって重要である。この接着をになっている分子はインテグリンである。このインテグリンの $\beta 1$ 鎖を認識する蛍光抗体で染色し、プリズムエバネセント全反射蛍光顕微鏡で接着面におけるインテグリンの動態を観察した。図3のAでは観察システムの概念をしめす。インテグリンの動態は細胞にエバネセント光をあてて、底面のインテグリンを標識する抗体につけたFITC（あるいはアレクサ）の蛍光を観察することで調べることができる。この方法では、細胞内にあるインテグリン（アレクサ）からの蛍光は全く観察されず、細胞表面のインテグリンのみを観察することができる。この実験では共焦点レーザー顕微鏡による観察を同時に行なっている。図3B, 上列では全反射蛍光顕微鏡によるインテグリン集合のタイムラプスイメージングを示す。インテグリンの集合は画面の左側（細胞の周辺部）から中心部（右側）にむかって伸びている。この同じ視野を共焦点レーザー顕微鏡で同時に同じ細胞で観察すると、インテグリン分子の伸展端の近くの細胞内（底面から $1\mu\text{m}$ のところ）に、細胞内のインテグリンの分子が集合していることが観察される。このインテグリンの集合はこの底面での接着形成にとって重要なインテグリンの供給場所であることがわれわれの研究から明らかになりつつある。このように近接場光観察と同時に細胞のマクロな構造あるいは生理機能を同時に観察すること（マルチイメージング）が、分子レベルでの観察を細胞の生理機能に結び付けるのに重要であると考えられる。

#### Reference List

1. Axelrod, D., Total internal reflection fluorescence microscopy. [Review], *Methods in Cell Biology.*, 30 (1989)

- 245–270.
2. 辰巳仁史, 光近接場顕微鏡—分子レベルに迫る高分解能 バイオイメージング 曾我部正博, 臼倉治郎 編 共立出版社. 1998, pp. 75–92.
  3. 辰巳仁史, 光近接場顕微鏡. 光生物学会編: 光が拓く生命科学7巻 “生命科学を拓く新しい光技術”, 共立出版社, 1999.
  4. Tatsumi, H., Katayama, Y. and Sokabe, M., Attachment of growth cone on substrate observed by multi-mode light microdcope, *Neuroscience Research*, 35 197–206 (1999).
  5. Uma Maheswari, R., Mononobe, S., Tatsumi, H., Katayama, Y. and Ohtsu, M., Observation of subcellular structures of neurons by an illumination mode nea-field optical microscope under an optical feedback control, *Optical Review*, 3 (1996) 463–467.
  6. 河野芳弘, 寺川 進, 阿部勝行, 金田 徹 対物レンズ方式全反射顕微鏡の性能向レーザー顕微鏡研究会第26回講演会論文集, page 40–47, 2000年.