第2 高調波顕微鏡による生体イメージング

藤田 克昌

大阪大学大学院工学研究科応用物理学専攻 大阪府吹田市山田丘 2-1 (565-0871)

(2004年12月13日 受理)

Optical Second-Harmonic Generation Microscopy for Biological Imaging

Katsumasa FUJITA

Department of Applied Physics, Osaka University 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

(Received December 13, 2004)

Keywords: Laser scanning microscopy, Nonlinear optical effects, Second harmonic generation, Biological imaging

1. はじめに

光学顕微鏡はもっとも手軽に細胞や生体組織の微小構造を観察するツールとして様々な局面で使用されてきた。しかし、微細構造を観察するためのツールとして見ると、光学顕微鏡の空間分解能は電子顕微鏡や AFM, STM 等のプローブ顕微鏡にはとうていかなわない。それでも光学顕微鏡が利用されている理由は、生体を非侵襲かつ非破壊に観察できる点にある。

共焦点顕微鏡の登場以降は、光学顕微鏡の非侵襲性がますます重要になった。共焦点顕微鏡を使えば、試料を物理的に破壊することなく生きたままで 3 次元構造が観察できるからである¹⁾。さらに、蛍光染色法の発達により、生体形態のみでなくその機能の観察が可能になった。蛍光性タンパク質の開発やその生体への遺伝的導入技術、および生体内のイオン濃度や電位感受性の色素の開発等により、細胞や生体組織の機能を生きたまま観察する技術としての光学顕微鏡の重要性がさらに増している²⁾。

近年では、近赤外超短パルスレーザーの開発により、非線形光学現象を生体中で容易に誘起することが可能となり、レーザー顕微鏡の可能性が更に広がっている。非線形光学現象は、物質に入射する光の強度のべき乗に比例して現れるため、レーザー光を対物レンズで集光すると、レーザー集光点付近のサブミクロン領域のみで光物理化学反応を誘起できる。2 光子吸収を例に挙げると、対物レンズでレーザー光を集光した部位のみで光吸収を発生させること

が可能である³⁾。従来の蛍光顕微鏡ではレーザーを照射した部位すべてで光吸収が発生するため、試料に与える褪色や光毒性が懸念されていたが、2 光子吸収によりその可能性を大幅に軽減できる。また、第 2 高調波発生、第 3 高調波発生やコヒーレントアンチストークスラマン散乱を用いると、蛍光染色を行わずに試料の 3 次元構造が得られ、また、分子やタンパクの配列構造の観察や振動分光イメージングも可能となってきた⁴⁻⁶⁾。

このようにレーザー顕微鏡は、空間分解能は電子顕微鏡やプローブ顕微鏡にはかなわないものの、光の持つ非侵襲性を武器に今後も生体イメージングツールとして重要な役割を担いつつ発展していくと考えられる。そこで、本稿では、最新のレーザー顕微鏡技術として第 2 高調波顕微鏡を取り上げ、その原理、特徴、およびいくつかの観察例を紹介する。

2. 第 2 高調波

第 2 高調波発生は、1961年に Franken らにより発見された現象で、物質に入射した光のちょうど半分の波長の光が得られるという、波長変換効果である^{7,8)}。物質に光が入射すると分極が誘起されるが、分極が入射する光の電場に比例しない成分を持つ際に第 2 高調波が得られる。誘起される分極 P は、

$$P = \chi^{(1)}E + \chi^{(2)}EE + \chi^{(3)}EEE + \dots \quad (1)$$

と表され、 $\chi^{(1)}$ は線形感受率、 $\chi^{(2)}$ 、 $\chi^{(3)}$ は非線形感受率で

図1 第2高調波は非対称な構造をもつ物質のみから得られる。対象構造を持つ部位からの電磁波の放射は第2高調波成分を含まない。

ある。この式において、入射電場 E の周波数の倍で振動する成分（波長は $1/2$ ）が第2高調波である。すなわち、第2高調波は、式(1)中において電場の2乗を含む項の寄与により発生し、その大きさは2次の非線形感受率 $\chi^{(2)}$ の大きさに依存する。これを図示したもの図1に示す。図1にあるように光が物質中の分極を誘起し、通常その分極は入射光と同じ振動数を持つ。しかし、入射する電場の振幅が大きすぎる場合には分極の振動にひずみが生じる。その結果、発生した分極がつくる電磁波は、もとの光の波形とは違い、ひずみを持っている。このひずみは、もとの光の周波数 (ω) とその整数倍 ($2\omega, 3\omega, \dots$) の成分を持つ。この整数倍の周波数の成分が高調波であり、その波長は $1/2, 1/3, \dots$ となる。このうち、 $1/2$ の波長をもつものが第2高調波である。

第2高調波は、非線形感受率が大きければどのような物質からでも発生するものではなく、その物質の構造に大きく依存する。図1から分かるように、第2高調波を含む非線形分極により得られる電磁波の波形はひずんでおり、そのひずみは電場の正と負の方向で非対称である。入射する光の位相と第2高調波の位相関係を考慮すると、この非対称のひずみが第2高調波発生のための条件となる。このようなひずみが発生するためには、光が入射する物質の構造が非対称である必要がある。すなわち、このような非対称構造が多く現れる部位（物質界面や分子、タンパク等が配列構造を取る部位）において、第2高調波が強く得られることになる。対称な構造を持つ物質や、非対称構造をもつ物質が非対称性を失わせるように配列している状態（例：非対称性分子のランダムな配向状態）では、第2高調波は発生しない。このため、第2高調波顕微鏡は試料の構造に強く依存した結像特性を示すことになる。

3. 第2高調波顕微鏡

第2高調波顕微鏡では、観察対象となる試料中で発生

図2 一般的な第2高調波顕微鏡の光学系。

する第2高調波を検出し画像化する。すなわち、試料を構成する物質の非線形感受率の分布とそれらの構造とが顕微鏡画像に反映される。生体の観察の際には、結果的に、非線形感受率の大きな分子で、細胞や生体組織中で配列構造をとるものが主な観察対象となる。

第2高調波顕微鏡自体の歴史は古く、最初の提案は、1978年の Sheppard らによるものである⁹⁾。Sheppard らは、光源に Nd:YAG レーザーを用いて、KDP 結晶からの第2高調波発生を用いて画像化した。当時は、超短波パルスレーザーのような非線形光学現象の誘起に適した光源が存在せず、また観察対象も限られたため、この顕微鏡は普及には至らなかった。

図2に第2高調波顕微鏡の代表的な光学系を示す。光源であるレーザーからの光は、1組のガルバノメーターミラーを経た後、対物レンズに入射され、試料中に集光される。試料から発生する第2高調波は、レーザー光、蛍光（試料が蛍光性の場合）と共に、試料の裏面に配置した対物レンズまたはコンデンサーレンズに集光される。レンズにより集光された光は、光学フィルターによりレーザー光、および蛍光（試料が蛍光性の場合）を除去された後、光電子増倍管により検出される。レーザー光で誘起された第2高調波は強い可干渉性を持つため、多くの場合は、その発生方向はレーザーの伝搬方向とほぼ同じになる。しかし、試料の厚みが大きな場合には、試料内部における第2高調波の散乱を照明用対物レンズを用いて集光することも可能となる¹⁰⁾。試料が蛍光性の場合には、照明側の対物レンズにより蛍光を観察すれば、第2高調波と蛍光とを

同時に観察することができる。また、光源～試料間の光学系は、一般的なレーザー共焦点顕微鏡の光学系とはほぼ同じであるため、レーザー共焦点顕微鏡を改造すれば、容易に第2高調波顕微鏡を実現できる。

第2高調波顕微鏡の光源には、フェムト～ピコ秒程度のパルス光を発生させる、いわゆる超短パルスレーザーが用いられる。これは、パルス中の極短い時間に光を閉じこめ、非常に強い光の場を形成し、生体分子のような非線形感受率が小さな物質においても、非線形光学効果を誘起できるためである。近赤外の波長域で発振するモードロックTi: Sapphire レーザー（波長700～1000 nm）やモードロックCr: Forsterite レーザー（波長1150～1350 nm）が多く用いられる。この波長域のレーザーが入手し易いこともあるが、近赤外光を光源とすると、得られる第2高調波の波長は可視光になり、これまでレーザー顕微鏡に使用してきた光学部品、検出器が流用できることも、これらのレーザーが利用される理由である。

試料中で発生する第2高調波の強度は、入射するレーザー光の強度の2乗に比例する。そのため、光強度の高いレーザー焦点内部でのみ強く第2高調波が得られ、得られる画像は断層像となる。また、焦点を3次元的に走査することで、試料の3次元立体構造を得ることができる。

4. 生体イメージング

生体からの第2高調波発生の報告自体は古く、1971年のFineらによるコラーゲン繊維を用いた実験が最初である¹¹⁾。第2高調波を用いた生体試料の画像化の報告は1986年になされ¹²⁾、以降、レーザー技術の発達の助けもあり、多くの研究成果が報告されている。図3に例として、メダカの鱗皮を第2高調波により観察した結果を示す。この図では、繊維状のコラーゲンの発光により像が得られている¹³⁾。コラーゲンは皮膚、骨、血管、腱等の部位に多く見られ、細胞や生体組織を支える重要なタンパク質である。そのため、その分布や配向を第2高調波顕微鏡を用いて測定し、細胞組織や器官の形態や機能特性を把握する研究が行われている¹⁴⁾。

図4は、非染色のマウス心筋細胞を第2高調波顕微鏡により観察した結果である。筋繊維を構成する部位で強い第2高調波の発生が得られていることが分かる。この発光は、筋繊維を構成するミオシンの発光であることが報告されている¹⁵⁾。ミオシンは非対称構造を持つ分子で筋繊維中で配列構造を取るため、強く第2高調波を発生し、高いコントラストの像として現る。このような非染色での生体観察は生きたままでも行え、かつ毒性の高い蛍光色素を用いる必要が無いため、長時間に渡り細胞の変化を観察することを可能とする。

図3 メダカ鱗皮の第2高調波像（非染色）。スケールバー＝10 μm 。

図4 マウス心筋細胞の第2高調波像（非染色）。スケールバー＝10 μm 。

5. 結像特性（蛍光顕微鏡との比較）

図5は第2高調波発生および2光子励起-蛍光発光の際のエネルギー変化を示している。これらの2つの非線形光学現象を比べると、得られる第2高調波および蛍光の強度は入射する光の強度の2乗に比例する点、入射する光のほぼ1/2の波長の光が得られる点の2点において類似点がある。2光子蛍光を利用した顕微鏡は、従来のレーザー共焦点蛍光顕微鏡とはほぼ同じ結像特性をもつことため、この2光子蛍光顕微鏡の結像特性との比較により、

図5 エネルギーダイアグラム。a) 第2高調波発生 (コヒーレント過程)、b) 2光子吸収-蛍光発光 (インコヒーレント過程)。

図6 RH237を用いて染色したHeLa細胞の第2高調波像 a), b), および2光子蛍光像 c), d). 図中の矢印は入射するレーザーの偏光方向を示す。e) 細胞膜付近の蛍光分子の様子。蛍光分子は細胞膜上では配列構造を示すが、内部ではランダムな配置を取る。

第2高調波顕微鏡の結像特性を把握する。

図6は、試料の同じ部位を2光子蛍光顕微鏡と第2高調波顕微鏡とにより観察し、その結像特性を比較した結果である^{16,17)}。試料には、第2高調波と2光子蛍光の両方が強く得られる蛍光分子により染色したHeLa細胞（ヒト子宮頸癌細胞）を用いた。図6c), d)の2光子蛍光像は蛍光分子の分布を示しており、細胞全体に渡って蛍光分子が分布していることが分かる。それに対し、図6a), b)の第2高調波像においては、細胞膜部位に存在する蛍光分子のみを検出している。これは、細胞膜部位にある蛍光分子は細胞膜に垂直な方向に配向しており、非対称な構造をもつため、強い第2高調波が得られていることを示している。

図7 マイクロレンズアレイを用いた高速第2高調波顕微鏡。

それに対し、細胞質内部のランダムな分子においては第2高調波発生はほとんど得られていない。また、図6a), b)を比べると、入射するレーザーの偏光方向に対して平行な配向をもつ分子が強い第2高調波を発生することがわかる。光吸収および蛍光発光も入射光の偏光方向に依存し、その特性も蛍光像に現れている。しかしながら、細胞膜付近でランダムな配向をもつ分子が背景となってしまう、そのコントラストは第2高調波による像に比べて低い。これらの比較から、第2高調波顕微鏡では、分子レベルの配列や構造に強く依存した結像特性が得られることが分かる。

6. 高速第2高調波顕微鏡

我々の研究室では、上記のような第2高調波顕微鏡の特性を生かして、生きた生体をそのまま観察できる高速第2高調波顕微鏡の開発を行った¹⁷⁾。図7は、我々が開発した、マルチビーム走査方式を用いた第2高調波顕微鏡の光学系である。レーザーからの光をマイクロレンズアレイを用いて約100本に分け、それぞれの光を対物レンズに入射させる。それぞれの光は試料内部に同数の焦点を形成し、各点において第2高調波を発生させる。発生した第2高調波は、試料裏面に置かれた対物レンズにより集光され、CCDカメラ上に結像される。このとき、マイクロレンズアレイを高速回転させると、各焦点は一斉に試料内部を走査し、CCDカメラ上に高速に像を形成する。開発したマイクロレンズアレイスキャナーのフレームレートは、1000フレーム/秒であった。

図8に開発した第2高調波顕微鏡で観察したラット培養心筋細胞（細胞膜をRH237で染色）の拍動の様子を示

図8 拍動するラット培養心筋細胞の第2高調波像。ビデオレートで撮像。

す。図8では、ビデオレートで撮像した拍動する心筋細胞の像から、拍動の様子が分かるフレームを抜き出したものである。図6と同様、細胞膜部位にある蛍光分子から強い第2高調波が得られており、高いコントラストの画像が心拍動を捉えるに十分な速度で得られている。

7. おわりに

ここでは近年の短パルスレーザーの普及により比較的容易に得られるようになった非線形光学現象の1つである第2高調波発生を顕微鏡に利用した例を示した。第2高調波顕微鏡においてもっとも面白い点は、観察する部位の結晶や分子の状態を反映したイメージングが行えることにある。光学顕微鏡としての空間分解能は依然として波長で制限されているが、得られる観察像は対象のナノスケールな構造を反映している。また、この他の非線形光学現象である、第3高調波発生を用いたレーザー顕微鏡も提案されている。第3高調波の発生条件には、非中心対象性構造が必要であるといった制約は無いが、位相整合条件を考えると、構造の界面が強く画像として検出される。コヒーレントアンチストークスラマン散乱に関しては、米のグループが高解像度、高コントラストな培養細胞の観察結果を示している。特定のラマンシフトを選択し、細胞の各部位を染色することなく色分けして観察する等、興味深い結果も得られている。今後も、レーザー顕微鏡は、生体を生きたまま、あるがままに観察する唯一の顕微鏡として、発

展していくものと期待する。

参考文献

- 1) 藤田哲也監修, 河田 聡編: 新しい光学顕微鏡〈第1巻〉(学際企画, 1995).
- 2) 藤田哲也監修, 石川春律, 高松哲郎編: 新しい光学顕微鏡〈第2巻〉(学際企画, 1995).
- 3) W. Denk, J. Strickler, and W. W. Webb: *Science* **248**, 73 (1990).
- 4) P. J. Campagnola and L. M. Loew: *Nat. Biotechnol.* **21**, 1356 (2003).
- 5) D. Yelin, D. Oron, E. Korkotian, M. Segal, and Y. Silberberg: *Appl. Phys. B* **74**, S97 (2002).
- 6) J. X. Cheng and X. S. Xie: *J. Phys. Chem. B* **108**, 827 (2004).
- 7) Y. R. Shen: *The Principles of Nonlinear Optics* (John Wiley & Sons, Inc. New York, 1984).
- 8) P. A. Franken, A. E. Hill, C. W. Peters, and G. Weinreich: *Phys. Rev. Lett.* **7**, 118 (1961).
- 9) J. Gannaway and C. J. R. Sheppard: *Opt. Quantum Electron.* **10**, 435 (1978).
- 10) Y. Guo, P. P. Ho, H. Savage, D. Harris, P. Sacks, S. Schantz, F. Liu, N. Zhadin, and R. R. Alfano: *Opt. Lett.* **22**, 1323 (1997).
- 11) S. Fine and W. P. Hansen: *Appl. Opt.* **10**, 2350 (1971).
- 12) I. Freund, M. Deutsch, and A. Sprecher: *Biophys. J.* **50**, 693 (1986).
- 13) P. J. Campagnola, A. C. Millard, M. Terasaki, P. E. Hoppe, C. J. Malone, and W. A. Mohler: *Biophys. J.* **63**, 175 (2004).
- 14) T. Yasui, Y. Tohno, and T. Araki: *Appl. Opt.* **43**, 2861 (2004).
- 15) W. Mohler, A. C. Millard, and P. J. Campagnola: *Methods* **29**, 97 (2003).
- 16) L. Moreaux, O. Sandre, M. Blanchard-Desce, and J. Mertz: *Opt. Lett.* **25**, 320 (2000) 320.
- 17) M. Kobayashi, K. Fujita, T. Kaneko, T. Takamatsu, O. Nakamura, and S. Kawata: *Opt. Lett.* **27**, 1324 (2002).

PROFILE

藤田克昌 大阪大学大学院工学研究科 助手 博士(工学)

〔略歴〕2000年3月大阪大学大学院工学研究科応用物理学専攻博士課程修了, 2002年10月より現職。〔専門〕光計測工学, 顕微鏡学