

最近の技術から

ライフサイエンスのための新しい光学顕微鏡とその応用

宮川 厚夫

浜松医科大学光量子医学研究センター 〒431-31 浜松市半田町 3600

1. はじめに

光学顕微鏡は17世紀に発明されて以来、生物学研究に利用されている。現在でも、共焦点光学系など光学系の工夫や、ビデオカメラ、画像処理、蛍光性プローブ試薬等の技術を取り込んで新たな研究機器として発展を続けている。その結果、生きている細胞や組織の様々な生理的、生化学的挙動を見ることができる。これらの中から製品化され、容易に利用できる数種の顕微鏡について測定原理を簡単に述べ、何が測定できるかを紹介する。

2. 走査型レーザー顕微鏡による3次元観察

レーザー顕微鏡はバイオラッドやオリンパス、ツァイスなどで製品化され、おもに蛍光観察に利用される。こ

の顕微鏡の原理を図1に示す^{1,2)}。理論的分解能は焦点面が $\lambda/4$ 、光軸方向が $\lambda/2$ である。従来の顕微鏡は光軸方向の分解能がなく、焦点面で $\lambda/2$ であるから、驚異的な改善である。一方、1回に1点の測光のため、画像構築には走査が必要である。通常は1枚の2次元像を得るのに数秒、3次元像は数分以上かかる。

レーザー顕微鏡の対象は高解像度の立体観察が必要な標本である。特に神経細胞のように複雑な立体構造の標本に威力を発揮する。染色体異常検査の核型分析でも複雑に絡み合った染色体を見分けられる³⁾。

通常のレーザー顕微鏡は1個のピンホールを使用するが、リアルタイムで明るい像を得るためにスリットを用いる機種もある⁴⁾。3次元像が観察できる顕微鏡には、計算処理で3次元像を構築する光学切片顕微鏡⁵⁾や、X線CTと類似な原理の光CT顕微鏡⁶⁾もある。

3. ビデオコントラスト増強法(video enhanced contrast: VEC)による超微細構造観察

光学顕微鏡にビデオカメラと画像処理を組み合わせれば、いわゆる分解能以下の微細構造が観察できる⁷⁾。一般的にビデオ顕微鏡と言えばこの方法を指す。VECの可能な画像処理装置は浜松ホトニクス等の製品がある。

生細胞や生組織はほぼ透明なため、微分干渉光学系でコントラストを付け、撮像面上で約3000倍という通常の数倍~数十倍もの高倍率で撮像する。生のビデオ画像

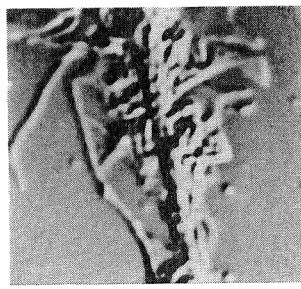
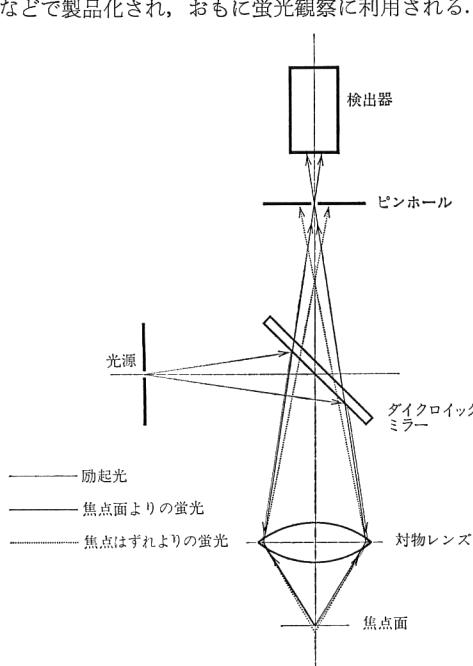
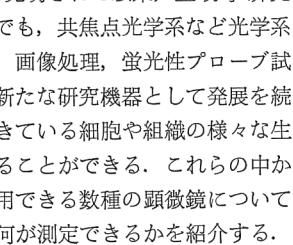


図2 ビデオコントラスト増強法による細胞微細構造
神経系の培養細胞株 NG 108-15 の神経突起の一部分を示す。バーは1 μmに相当する。

図1 走査型レーザー顕微鏡の原理

光源からの励起光は対物レンズにより、標本中の1点に集中する。標本から発した蛍光は対物レンズで集められ検出器に入射するが、共焦点位置にピンホールが置いてあるため、焦点と異なる部分からの光はピンホールに遮られて、ほとんど入射できない。

VECでは電子顕微鏡と異なり、対象の動きが見える。このため細胞内の物質輸送、細胞内小器官の運動、神経伝達物質やホルモン



の分泌、神経細胞の突起の成長、纖毛運動などの観察や解析に利用される⁸⁾。

4. 細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の分布測定

$[Ca^{2+}]_i$ は表 1 に示した蛍光性カルシウム指示薬を利用して測定する^{9,10)}。これらのプローブ試薬を細胞内へ入れるには、細胞膜透過性のアセトキシメチル誘導体(fura-2/AM など)を利用する。Fura-2/AM は細胞内のエステラーゼ酵素により fura-2 へ分解される。正確な定量には 2 波長測光のできる fura-2 (図 3) や indo-1 を用いる。これをレシオ法と、画像の場合はレシオイメージング法¹¹⁾と呼ぶ。 $[Ca^{2+}]_i$ 測定装置は浜松ホトニクスや日本分光など各社が開発している。

$[Ca^{2+}]_i$ はセカンドメッセンジャーとして細胞内情報伝達に重要な役割がある。このため神経細胞での記憶の機序、リンパ球の免疫応答、心筋梗塞時の心筋細胞の障害など様々な研究に利用されている¹²⁾。

カルシウム以外にも表 1 のプローブ試薬が合成され、主要な細胞内イオンが測定できる。レーザー顕微鏡による $[Ca^{2+}]_i$ の 3 次元分布測定も行われるが¹³⁾、紫外光でレシオ測光できるレーザー顕微鏡は普及していない。このため、488 nm で励起できる fluo-3 が多く使用される。

5. ナノメートル計測と光ピンセット

VEC では分解能以下の微細な対象を見ることが可能であるが、重心検出を利用すれば、位置は nm 精度で決定可能である。このナノメートル計測を行うことで、細胞内顆粒の動きを計ったり、また、金コロイド標識した抗体を利用して細胞膜上の 1 個のタンパク質の運動が追跡できる¹⁴⁾。また、2 分割や 4 分割フォトダイオード法でも同様な測定が行われている¹⁵⁾。

強力な光を集めると、焦点に微細な粒子が吸い寄せられ、トラップされる現象を光ピンセットと呼ぶ。生体に対しては吸収の少ない近赤外を利用し、細

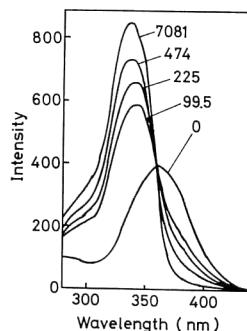


図 3 蛍光性カルシウム指示薬 fura-2 の励起蛍光スペクトル

蛍光は 510 nm で測定した。図中の数字はカルシウムイオン濃度(nM)を示す。等蛍光点(等吸収点)を持つプローブ試薬は 2 波長で測光(例えは 340 nm と 380 nm)を行い、その比(レシオ値)を計算すると、レシオ値はカルシウム濃度だけで決まる。したがって、レシオ測光は細胞内のプローブ試薬濃度の不均一による影響を受けずに濃度が測定できる。

表 1 細胞内イオン濃度測定用の主な蛍光性プローブ試薬

イオン種	試薬名
Ca^{2+}	fura-2, indo-1, fluo-3, rhod-2, Calcium Green, Calcium Orange, Calcium Crimson, Fura Red
Mg^{2+}	mga-fura-2, mag-indo-1
K^+	PBFI
Na^+	SBFI
pH	BCECF, quene-1, SNAFL-1, SNAFL-2, SNARF-1, SNARF-2, SNARF-6, SNARF-X
Cl^-	SPA, SPQ

胞や微細な粒子を捉えられる¹⁶⁾。光ピンセットを用いて、筋肉を構成している分子のミオシンやアクチンの 1 分子の出す力を計ることが行われている¹⁷⁾。

6. むすび

生命科学や医学研究に利用される新しい光学顕微鏡には本特集で取り上げられた機器以外にも枚挙にいとまがないほど多くの種類がある。たとえば、蛍光寿命を計る時間分解蛍光顕微鏡や、ナノ秒の高速現象を観察するパルスレーザー顕微鏡、X 線顕微鏡などが実用化に向けて研究開発されている⁵⁾。また、マルチ計測超高倍顕微鏡のように、電気生理と顕微鏡画像処理を組み合わせることで有用な情報が得られることが多い。300 年以上使われてきた顕微鏡であるが、生きている状態が観察可能という利点を生かして今後も幅広く利用されるであろう。

文献

- 1) T. Wilson and C. Sheppard: *Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy* (Academic Press, 1984).
- 2) D. Shotton and N. White: バイオトレンド, 2, 3 (1990) 54-60.
- 3) 藤下哲也: 科学, 63 (1993) 45-54.
- 4) 藤下まりこ、井野正子、阿部道生、国分拓也: 第 2 回日本バイオイメージング学会学術集会講演要旨集 (1993) pp. 30-31.
- 5) 宝谷紹一、木下一彦編: 限界を超える生物顕微鏡 (学会出版センター, 1991).
- 6) 中村 収、南 茂夫: インターフェース, 14, 10 (1988) 224-234.
- 7) R. D. Allen and N. S. Allen: J. Microsc., 129 (1982) 3-17.
- 8) S. Terakawa, J. Fan, K. Kumakura and M. Ohara-Imazumi: Neurosci. Lett., 123 (1991) 82-86.
- 9) G. Grynkiewicz, M. Poenie and R. Y. Tsien: J. Biol. Chem., 260 (1985) 3440-3450.
- 10) 宮川厚夫、牧野 徹、玉川 彰、尾崎一穂: 分析化学, 38 (1989) 643-649.
- 11) D. A. Williams, K. E. Fogarry, R. Y. Tsien and F. S. Fay: Nature, 318 (1985) 558-561.
- 12) 竹郷忠臣編: 実験医学増刊 情報伝達研究の新しい展開 (羊土社, 1993).
- 13) S.-Y. Hua, M. Nohmi and K. Kuba: J. Physiol., 464 (1993) 245-272.
- 14) 楠見明弘: 蛋白質 核酸 酵素, 39 (1994) 176-189.
- 15) S. Kamimura and R. Kamiya: Nature, 340 (1989) 476-478.
- 16) 鈴木直哉、木下一彦: 生体の科学, 44, 2 (1993) 159-165.
- 17) S. M. Block, L. S. B. Goldstein and B. J. Schnapp: Nature, 348 (1990) 348-352.

(1993年12月29日受理)