

# デジタルマイクロミラーデバイスを用いた蛍光顕微鏡

深野 天・宮脇 敦史

## Fluorescence Microscope with a Digital-Micromirror Device

Takashi FUKANO and Atsushi MIYAWAKI

We have developed a whole-field fluorescence microscope equipped with a digital-micromirror device to acquire optically sectioned images by using the fringe-projection technique and the phase-shift method. This system allows free control of optical sectioning strength through computer-controlled alteration of the fringe period projected onto a sample. We have employed this system to image viable cells expressing fluorescent proteins and discussed its possible biological applications.

**Key words:** biomedical imaging, fluorescence microscope, digital-micromirror device, fringe projection, phase-shift method

近年の細胞生物学では、形態の観察から、機能の解明へと研究の重点が移行している。このためのツールとして、蛍光プローブと蛍光顕微鏡が用いられる。10年ほど前より、従来の化合物の蛍光プローブに加え、オワンクラゲからクローニングされた蛍光タンパク質が使われるようになった。蛍光タンパク質を遺伝子工学的手法を用いて細胞内の特定の部位で発現させることにより、細胞内の物質の輸送、イオン濃度の変化、タンパク質間相互作用などを生きのまま観察できる<sup>1)</sup>。

蛍光顕微鏡として、レーザー走査共焦点蛍光顕微鏡が使われている。共焦点顕微鏡は、焦点が合った部分の画像(合焦点像、セクショニング像)のみが得られる、いわゆる光セクショニングが可能である。この機能により、従来の顕微鏡ではわからなかった現象が数多く解明されてきた。最近では、複数の蛍光プローブを細胞内に導入し、複数の現象を同時に解析する、いわゆるマルチカラーイメージングが盛んになってきた。このような需要に対応して、複数のレーザーラインを音響光学可変フィルター(AOTF)で切り替えるタイプの共焦点顕微鏡も市販されている。しかし、固定波長の光では、必ずしも用いる蛍光プローブを最適に励起できるわけではない。

そこで筆者らは、白色光源をベースにした従来の顕微鏡

にデジタルマイクロミラーデバイス(DMD)を搭載することにより、きわめてシンプルな装置構成で、共焦点顕微鏡と同様にセクショニングが可能で、かつマルチカラーイメージングに対応可能な顕微鏡を開発してきた。本稿では、その顕微鏡システムについて概説する。

### 1. DMDを用いた蛍光顕微鏡

図1に、DMDを用いた蛍光顕微鏡を示す。倒立蛍光顕微鏡(Olympus, IX70)の視野絞りの位置にDMDを配置した。光源からの光は、励起フィルターで波長を選択された後、DMDに入射する。マイクロミラーがオン(+10度)のとき、反射光は顕微鏡に導入され、オフ(-10度)のときは顕微鏡外へ逃げていく。顕微鏡に導入された光は、ダイクロイックミラーで反射後、対物レンズを通して試料に照射される。試料から発した蛍光は、CCDカメラに結像する。

DMDは、市販のプロジェクター(PLUS, U3-1080)を分解して取り出した。1024×768個のマイクロミラーから成り、各ミラーは1辺が16μmの正方形である。励起および蛍光フィルターは、複数枚がホイールに装着されており、必要な波長の選択ができる。DMDは、自作ソフトウェアで制御され、マウス操作により簡単に任意のパターンを描くことができる。DMDと試料面は対物レンズに関して

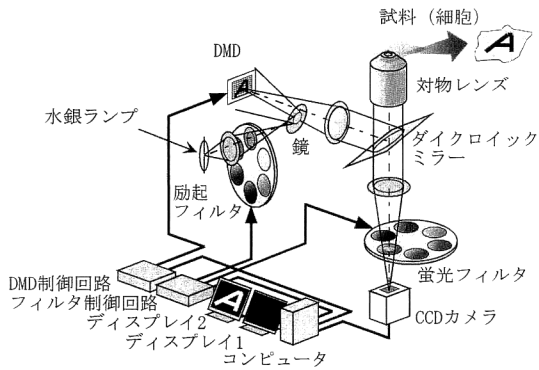


図1 DMDを用いた蛍光顕微鏡システムの構成図。

共役なので、DMD上のパターンは、試料に縮小投影される。DMDの各ミラーは、パルス幅変調法により256階調で調光できる。

## 2. 縞投影による光セクションング

通常の顕微鏡の像（コンベンショナル像）は、合焦点像に、焦点がはずれた部分のボケた像が重畳する。共焦点顕微鏡では、このボケた像をピンホールで除去し、合焦点像を得る。これに対して、縞投影法では、縞を投影し焦点が合っている部分に空間的な強度変調をかけて目印をつけ、画像演算により合焦点像を抽出する<sup>2)</sup>。なお、蛍光物質を縞状の光強度分布で励起しているのので、厳密には「縞励起法」と呼ぶべきであるが、表面形状計測など<sup>3)</sup>にならない「縞投影法」と呼んでいる。

縞投影法によるセクションング原理について述べる（図2）。DMDで一次元の正弦波の強度分布をつくり、対物レンズを通して試料に照射する。励起光は、合焦点位置では周期的な強度分布をもつが、焦点がはずれると一様になる。合焦点位置にある蛍光物質の分布によって、一定振幅の正弦波状の強度分布が、変調されると同時に蛍光に変換される。これに対して、焦点がはずれた部分では、蛍光物質の分布がそのまま蛍光に変換される。カメラでは、これら2つの強度の和が撮像される。

次に、位相シフトを用い、画像演算により合焦点像を抽出する（図3）。位相シフト法は通常、対象の位相分布の算出に使われるが、ここでは振幅分布を求めるために用いる。縞パターンの位相を連続的に変化させると、画像では縞が横方向へ移動するが、画像のある1点での強度は正弦波で変化する。この場合、振幅の分布がセクションング像に相当し、バイアスの分布がコンベンショナル像に相当する。正弦波は、振幅/波長/初期位相の3つのパラメーターで決定できるので、最低限、位相が異なる3枚の画像があればパラメーターは一意に決定できる。そこで、位相を90度ずつ変えた3つの位相シフト像から、図中の計算式によ

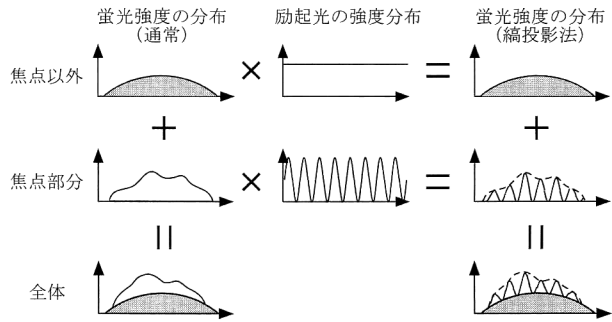


図2 縞投影法におけるセクションングの原理。

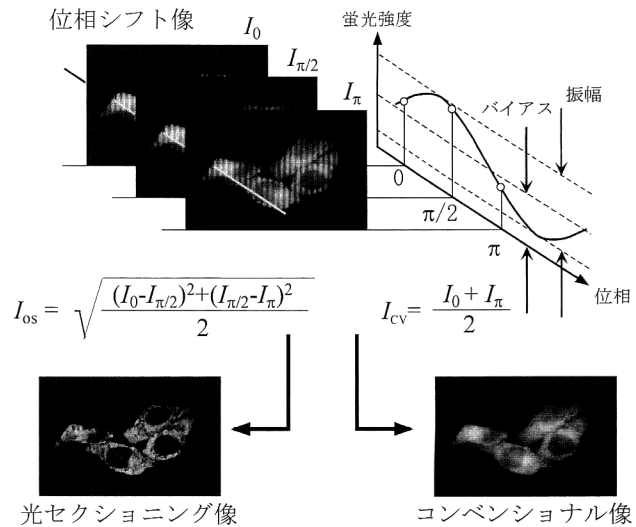


図3 振幅に関する位相シフト法。

り、セクションング像とコンベンショナル像とが同時に得られる。

蛍光プローブを用いてイオン濃度の測定などの定量的な解析を行う場合、蛍光の褪色は致命的である。特に共焦点顕微鏡は、微小領域に強い光を当てるので、より褪色しやすい。そこで通常、セクションング能力がある程度低下してしまうが、できるだけ弱い励起光照射によって十分な蛍光量を得るために、ピンホール径を広げて観察することが行われている。同様に、縞投影法でも縞間隔を調整することにより、セクションングの厚さを自由に変えられる。

蛍光薄膜（ローダミン6G）を対物レンズ（Olympus, UApo340/40X, NA=1.35）の焦点前後で移動させ、縞周期とセクションングの厚さの関係を調べた（図4）。セクションングの厚さと縞周期は比例関係にある。DMDはコンピュータ制御により容易に縞間隔を調節できるので、試料観察中に光学系の再調節なしに、セクションングの厚さを最適化できる<sup>4)</sup>。

また、DMDは各ミラーを独立に制御できるので、視野を縞と直交する方向に分け、異なる縞周期（セクション

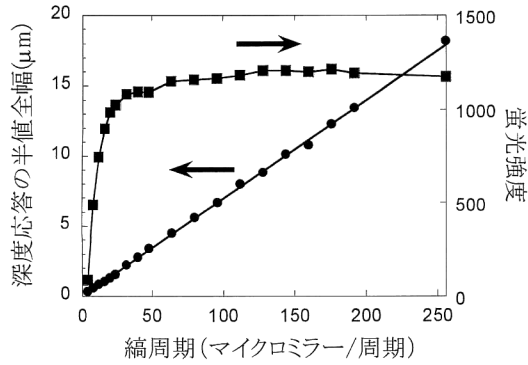


図4 深度応答測定例.

グ厚さ)で観察が可能である。例えば、図5では、画像の右半分は細かい縞(8マイクロミラー/周期)で、左半分は粗い縞(32マイクロミラー/周期)で励起している。このような柔軟性は、神経細胞のような複雑な試料を観察する際に威力を発揮する。すなわち、細胞体の部分は薄く観察し、上下方向に分布している樹状突起の部分は厚く観察し、その時系列変化を追跡することができる。

DMDを用いた蛍光顕微鏡について概説した。応用例として、縞投影法を用いた光セクションングについて述べた。誌面の都合上、他の応用例は割愛したが、本顕微鏡は照明パターンを自由に変えられるため、FRAP(fluorescent recovery after photobleaching)やケイジド解除などにも応用できる(文献5,6参照)。

## 文 献

- 1) 宮脇敦史: 実験医学別冊 ポストゲノム時代の実験口座③ GFPとバイオイメージング蛍光タンパク質の発現と検出の基本から生体機能の可視化まで(羊土社, 2000)。
- 2) M. A. A. Neil, R. Juškaitis and T. Wilson: "Method of

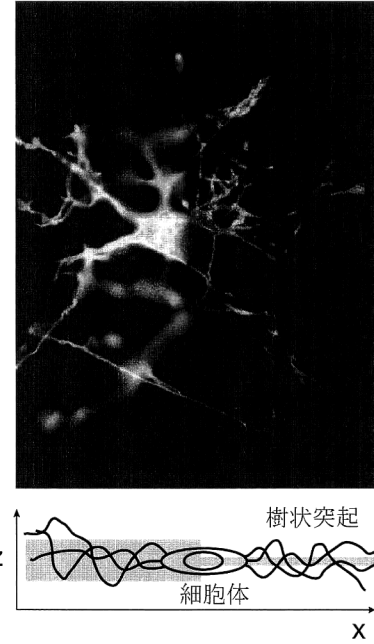


図5 測定例(神経細胞).

- obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope," *Opt. Lett.*, **22** (1997) 1905-1907.
- 3) 吉沢 徹: 三次元工学1-光三次元計測(新技術コミュニケーションズ, 1993)。
  - 4) T. Fukano and A. Miyawaki: "Whole-field fluorescence microscope with digital micromirror device: Imaging of biological samples," *Appl. Opt.*, **42** (2003) 4119-4124.
  - 5) T. Fukano, H. Hama and A. Miyawaki: "Similar diffusibility of membrane proteins across the axon-soma and dendrite-soma boundaries revealed by a novel FRAP technique," *J. Struct. Biol.*, **147** (2004) 12-18.
  - 6) 深野 天, 宮脇敦史: "細胞機能解明のための新しい顕微鏡システム", 精密工学会画像応用技術専門委員会研究会報告, **17** (2003) 11-22.

(2004年6月7日受理)