

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4448471号  
(P4448471)

(45) 発行日 平成22年4月7日(2010.4.7)

(24) 登録日 平成22年1月29日(2010.1.29)

(51) Int.Cl.		F I		
<b>GO 1 N 21/64</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N	21/64	G
<b>GO 1 N 21/78</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N	21/64	B
<b>GO 2 B 21/00</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N	21/64	E
		GO 1 N	21/78	C
		GO 2 B	21/00	

請求項の数 7 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2005-101764 (P2005-101764)	(73) 特許権者	503360115
(22) 出願日	平成17年3月31日(2005.3.31)		独立行政法人科学技術振興機構
(65) 公開番号	特開2006-284243 (P2006-284243A)		埼玉県川口市本町四丁目1番8号
(43) 公開日	平成18年10月19日(2006.10.19)	(74) 代理人	100130111
審査請求日	平成20年2月5日(2008.2.5)		弁理士 新保 斉
		(72) 発明者	西坂 崇之
			東京都新宿区下落合2-17-2-109
		審査官	横尾 雅一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高時間分解能画像化方法及び装置並びに全反射型蛍光顕微鏡

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

蛍光色素分子にレーザー光を照射し、その蛍光色素分子からの輝点信号を受光することで、蛍光色素分子またはそれに結合した組織を観察する装置において、

照射するレーザー光を直線偏光に変換する偏光変換部材と、

回転可能に設けられ、蛍光色素分子からの輝点信号の進行方向を変える偏向部材とを有し、

その偏向部材の回転により、蛍光色素分子からの輝点信号を受像面上で2次元的にスキャンすることで、1撮像フレームに受光される情報量を増加させることによって時間分解能を上げる

ことを特徴とする高時間分解能画像化装置。

【請求項2】

偏光変換部材が、照射するレーザー光の光軸を回転軸として回転可能に設けられ、

偏向部材と同期して回転される

請求項1に記載の高時間分解能画像化方法装置。

【請求項3】

偏光変換部材が、1/4波長板である

請求項1または2に記載の高時間分解能画像化装置。

【請求項4】

偏向部材が、プリズムである

請求項 1 ないし 3 に記載の高時間分解能画像化装置。

【請求項 5】

蛍光色素分子からの輝点信号を受ける受像面が、  
受光時に光電面で発生した電子を、素子の後方でシリコンに加速衝突させ、2 次電子増倍する CCD 撮像素子を備える

請求項 1 ないし 4 に記載の高時間分解能画像化装置。

【請求項 6】

蛍光色素分子が、エバネッセント場による照明によって蛍光を発生させられる  
請求項 1 ないし 5 に記載の高時間分解能の画像化方法装置による全反射型蛍光顕微鏡。

【請求項 7】

蛍光色素分子にレーザー光を照射し、その蛍光色素分子からの輝点信号を受光することで、  
蛍光色素分子またはそれに結合した組織を観察する装置において、  
偏光変換部材によって、照射レーザー光を直線偏光に変換し、  
偏向部材を回転させて、蛍光色素分子からの輝点信号の進行方向を変え、  
その偏向部材の回転により、蛍光色素分子からの輝点信号を受像面上で 2 次元的にスキャンすることで、  
1 撮像フレームに受光される情報量を増加させることによって時間分解能を上げる  
ことを特徴とする高時間分解能画像化方法。

10

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、蛍光色素分子 1 個の観察等が可能な高時間分解能の画像化方法及び装置、並びに、それを用いた全反射型蛍光顕微鏡に関する。

【背景技術】

【0002】

近年の光学顕微鏡に関する技術の発展はめざましく、現在は水溶液中の 1 個の蛋白質を対象に研究ができる段階にまで到達している。この発展を可能にしたのは、全反射照明など光学系の新技術、様々なタイプの高感度カメラの開発、光学フィルターの特性の向上などである。数多くの実験的手法があみ出され、今や「1 分子生理学」という新しい流れが生まれつつある。

30

例えば、分子モーターや蛋白質分解酵素は、基質の結合によりダイナミックな構造変化を伴い、それが機能に密接に関係すると考えられている。

このような 1 個の生体分子の中で起こる構造変化を、分子レベルで生きたまま顕微鏡下で可視化できるようにする技術が求められている。この大きな流れを、次の新たなステップに進ませるためには、新しい視点に基づいた革新的な手法が必要とされている。

【0003】

1 分子の蛋白質を観察する手法の 1 つとして、蛋白質を蛍光色素で特異的にラベルし、その 1 個の蛍光色素分子からの信号をとらえるという技術がある。

蛍光顕微鏡は、ある特定の波長の光が当たると、その光の波長より長い波長の光を出す色素を利用し、蛍光色素を光らせるための励起光を照射するための光学系と、それにより発生した蛍光を観察する光学顕微鏡とを組み合わせた構成を備える。

40

観察したい細胞内の構造に蛍光色素結合させた試薬を結合させ、所定波長の光をその蛍光色素分子に照射すると、目的の細胞内の構造が暗黒を背景にして蛍光を発する。

【0004】

一般の蛍光顕微鏡で観察可能な蛍光色素分子の数は数十個以上であり、蛍光色素分子 1 個を識別することはできない。

これは、蛍光色素分子 1 個から得られる光信号強度より、ノイズ、すなわち周囲からの光信号強度の方が大きいためである。

それに対し、性能向上のために改良がなされ、フィルターの性質、対物レンズの品質の

50

向上等により、1個の蛍光色素分子を可視化できる蛍光顕微鏡が開発されている。

【0005】

蛍光色素分子1個の観察のためには、エバネッセント場による照明により、蛍光色素分子が蛍光を発することを利用している。

具体的には、対象試料を含む水溶液とガラスとの境界面に対して、ガラス側から全反射角以上の角度でレーザー光を照射（全反射照明）し、境界面近傍に発生する非伝播光であるエバネッセント場によって対象試料を照明することで、蛍光色素分子に蛍光を発生させる。

【0006】

エバネッセント場は、境界面に垂直な方向に対して指数関数的に減衰し、その減衰度合は屈折率とレーザー光の入射角に依存している。そのため、エバネッセント場は、境界面から水溶液中約150nmの深さの局所領域のみを照明することになるので、全反射照明は、通常光による照明と比較して、背景光が極端に少ない利点がある。

【0007】

また、試料水溶液中に多数の蛍光色素分子（濃度 $\sim 50 \times 10^{-9}$ モル/リットル）が存在するような条件下でも、境界面近傍の水溶液側に蛍光色素分子が存在する確率は小さいので、境界面上に固定されている1個の標的蛍光色素分子以外から発せられる蛍光は少ない。そのため、背景光や他の蛍光色素分子の蛍光によるノイズが極端に少ないので、所望の標的蛍光色素分子1個からの蛍光を観察することが可能となる。

【0008】

全反射照明による1分子観察では、例えば、蛍光色素で標的した蛋白質や、DNA、基質であるATPなどの生体分子をガラス面に結合させ、1個1個の分子を独立した輝点として観察する。

蛍光色素分子を励起する場合、色素分子の振動面と励起光の偏光方向が一致していることが必要である。

【0009】

しかし、従来の全反射照明では、色素分子の振動面と励起光の偏光方向が一致した分子は明るくて観察できるが、一致しない分子は暗くて観察できないという問題点があった。

これに対し、本発明者は、1個の生体分子の特定部分の構造変化をリアルタイムで検出するために、全反射型蛍光顕微鏡を作製し観察を行っている。

【0010】

本発明者による特許文献1の「全反射型蛍光顕微鏡」は、その技術の基本概念と光学系に関するものであり、振動面が任意の向きの色素分子を観察できる全反射型蛍光顕微鏡の構成を開示している。

【特許文献1】特許3577514

【0011】

本発明者による特許文献2の「全反射型蛍光顕微鏡および照明光学系」は、蛍光色素分子と結合した試料の振動モーメントの方向によらず、その対象色素分子を観察できる全反射型蛍光顕微鏡を開示している。

【特許文献2】特開2004-138735

【0012】

1分子からの微弱な信号を、2次元の映像として画像化するためには、イメージインテンシファイアーやクールドCCDなどの高感度カメラが用いられる。

これらのカメラは、ビデオ信号、もしくはそれより遅いデジタルの信号を出力するため、データの時間分解能は、100~30ミリ秒（ビデオの時間分解能）を超えることはできない。この時間分解能の上限が、1分子レベルでの研究を進めるうえで障害となっている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

そこで、本発明は、蛍光色素分子1個の観察を、例えば、ビデオの時間分解能以上のミ

10

20

30

40

50

リ秒オーダーなど、高時間分解能で可能にする画像化方法及び装置、並びに、それを用いた全反射型蛍光顕微鏡を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0014】

上記課題を解決するために、本発明の高時間分解能画像化方法は、蛍光色素分子にレーザー光を照射し、その蛍光色素分子からの輝点信号を受光することで、蛍光色素分子またはそれに結合した組織を観察する装置において、偏光変換部材によって、照射レーザー光を直線偏光に変換し、偏向部材を回転させて、蛍光色素分子からの輝点信号の進行方向を変え、その偏向部材の回転により、蛍光色素分子からの輝点信号を受像面上で2次元的にスキャンすることで、1撮像フレームに受光される情報量を増加させることによって時間分解能を上げることを特徴とする。

10

【0015】

また、本発明の高時間分解能画像化装置は、蛍光色素分子にレーザー光を照射し、その蛍光色素分子からの輝点信号を受光することで、蛍光色素分子またはそれに結合した組織を観察する装置において、照射するレーザー光を直線偏光に変換する偏光変換部材と、回転可能に設けられ、蛍光色素分子からの輝点信号の進行方向を変える偏向部材とを有し、その偏向部材の回転により、蛍光色素分子からの輝点信号を受像面上で2次元的にスキャンすることで、1撮像フレームに受光される情報量を増加させることによって時間分解能を上げることを特徴とする。

【0016】

ここで、偏光変換部材を、照射するレーザー光の光軸を回転軸として回転可能に設け、偏向部材と同期して回転されるように構成してもよい。

20

【0017】

また、偏光変換部材を、1/4波長板で構成してもよい。

【0018】

偏向部材を、プリズムで構成してもよい。

【0019】

蛍光色素分子からの輝点信号を受ける受像面に、受光時に光電面で発生した電子を、素子の後方でシリコンに加速衝突させ、2次電子増倍するCCD撮像素子を設けてもよい。

【0020】

このような高時間分解能画像化装置に、蛍光色素分子をエバネッセント場による照明によって蛍光を発生させる手段を付設して、全反射型蛍光顕微鏡を構成してもよい。

30

【発明の効果】

【0021】

本発明によると、蛍光色素分子からの輝点信号の進行方向を変えて、受像面上で2次元的に撮像できる。これによって、1撮像フレームに受光される情報量が増加して時間分解能を上げられる。例えば、1分子観察をビデオの時間分解能を超えたミリ秒の時間分解能で達成でき、従来技術での~100ミリ秒の時間分解能が一気に2ケタ上がる。

従って、蛋白質のより速い動的な特徴を画像化することができ、分子モーターや蛋白質分解酵素などの動作原理の解明に寄与する。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

以下に、図面を基に本発明の実施形態を説明する。

なお、本発明は、本発明者による前記特許文献1及び2の延長上になされたものであり、特許文献1及び2で開示されている内容を適宜利用できる。

本発明は、通常の光学系や顕微鏡・カメラのシステムを生かしたまま、時間分解能を上げることに成功した。例えばミリ秒観察が可能な高感度カメラは、開発に数千万円程度のコストがかかることが予想されるが、本発明では、それを市販の安価な装置に代用させた。

【0023】

50

蛍光色素 1 分子からの信号は 1 個の輝点であるが、カメラの受像面は 2 次元的に広がっている。そこで、本発明は、輝点信号を受像面上でスキャンし、その強度分布を画像解析することで、ビデオの 1 画面に速い時間の情報を記録することを基本原理とした。

これを実施するためには、直線偏光されたレーザー光を試料の蛍光色素分子に照射して得られる輝点信号を、回転する偏向部材によって進行方向を変えることによって、受像面上で 2 次元的にスキャンすることを基本とする。

#### 【 0 0 2 4 】

図 1 は、本発明の好適な一実施例である全反射型蛍光顕微鏡システムの要部を示す説明図であり、図 2 及び 3 は、その別実施例である。図では、要部を模式的に示しているので、集光レンズや対物レンズなどの附属部材は省かれている。

10

蛍光色素を有する対象試料 ( 1 0 ) を含む水溶液とガラス ( 2 0 ) との境界面に対して、ガラス ( 2 0 ) の側から全反射角以上の角度でレーザー光を照射して、エバネッセント場を作るために、レーザー光源から円偏光のレーザー光 ( 3 0 ) を出射する。

#### 【 0 0 2 5 】

その入射レーザー光 ( 3 0 ) は、まず、偏光変換部材 ( 2 1 ) によって直線偏光に変換される。偏光変換部材 ( 2 1 ) には、1 / 4 波長板などが利用される。

その後、入射レーザー光 ( 3 0 ) は、集光レンズ ( 2 2 ) や対物レンズ ( 2 3 ) を介し、全反射面であるガラス ( 2 0 ) に入射する。

#### 【 0 0 2 6 】

試料 ( 1 0 ) からの蛍光による輝点信号 ( 3 1 ) は、ダイクロイックミラー ( 2 4 ) によって分岐される。

20

その後、集光レンズ ( 2 5 ) や偏向部材 ( 2 6 ) を介して、受像面 ( 2 7 ) に達する。

#### 【 0 0 2 7 】

偏向部材 ( 2 6 ) は、輝点信号 ( 3 1 ) の進行方向を変える作用を有するものであり、プリズムなどが利用される。プリズムの代わりに、ミラーや、光の方向を電氣的に制御する素子も利用できる。

この偏向部材 ( 2 6 ) は、輝点信号 ( 3 1 ) の進行方向を回転軸として回転可能に設置され、ステッピングモーター等の駆動手段によって回転制御される。

#### 【 0 0 2 8 】

プリズム等の偏向部材 ( 2 3 ) によって光路の変えられた輝点信号 ( 3 2 ) は、カメラ等の 2 次元的に広がる受像面 ( 2 7 ) に入力される。

30

ここで、偏向部材 ( 2 6 ) が輝点信号 ( 3 1 ) の進行方向を回転軸として回転するので、その回転に従って、信号像も受像面 ( 2 7 ) の上で弧を描いて撮像される。

#### 【 0 0 2 9 】

図 2 及び 3 に示す別実施例では、入射レーザー光 ( 3 0 ) の光路における偏光変換部材 ( 2 1 ) と集光レンズ ( 2 2 ) との間に、偏向部材 ( 2 6 ' ) が付設されている。

この偏向部材 ( 2 6 ' ) も、偏向部材 ( 2 6 ) と同様に、入射レーザー光 ( 3 0 ) の進行方向を回転軸として回転可能に設置され、ステッピングモーター等の駆動手段によって回転制御される。この偏向部材 ( 2 6 ' ) の回転は、偏向部材 ( 2 6 ) の回転と同期して制御される。

40

#### 【 0 0 3 0 】

本実施例では、偏光変換部材 ( 2 1 ) も、偏向部材 ( 2 6 ' ) と同様に、入射レーザー光 ( 3 0 ) の進行方向を回転軸として回転可能に設置され、ステッピングモーター等の駆動手段によって回転制御される。この偏光変換部材 ( 2 1 ) の回転も、偏向部材 ( 2 6 ' ) の回転と同期して制御される。

偏光変換部材 ( 2 1 ) としては、1 / 4 波長板を回転させて入射レーザー光 ( 3 0 ) の偏光方向を変える代わりに、偏光子や、偏光方向を電氣的に制御する素子も利用できる。

#### 【 0 0 3 1 】

これによって、偏向部材 ( 2 6 ' ) の回転に応じて、それを透過する入射レーザー光 ( 3 0 ) は、集光レンズ ( 2 2 ) の円環状部分を回転する。集光レンズ ( 2 2 ) の円環状部

50

分を経た入射レーザー光(30)は、同様に対物レンズ(23)の円環状部分を経た後、ガラス(20)で全反射される。

なお、図2と3の実施例は、受像面(27)の直前において、偏向部材(26)が集光レンズ(25)の前に配置されるか後に配置されるかが異なっている。

#### 【0032】

図4は、受像面(27)で得られる撮像画像の例を示す説明図である。

本発明では、偏光を照射して、蛍光色素分子からの輝点信号を、2次元的に広がっている受像面(27)上でスキャンしながら撮像するので、オシロスコープのように輝点を線として記録することができる。

受像面(27)で得られる信号像(11)は、偏向部材(26)の回転(12)に呼応した円弧として撮像される。

10

#### 【0033】

このとき、試料(10)における蛍光色素分子の振動モーメントの方向(13)や入射レーザー光(30)の振動モーメントの方向が、信号像(11)に反映されるので、信号像(11)の形状や強度分布を解析することによって、蛍光色素分子の振動モーメントの方向(13)を求めることもできる。

すなわち、エバネッセント場内にある複数個の蛍光色素分子において、エバネッセント場の偏光方向と振動モーメントの方向が一致した時に蛍光色素分子が明るくなるので、蛍光色素分子1個ずつの観察が可能であり、その振動モーメントの方向も決定することができる。

20

#### 【0034】

一般には、光の方向とシャッターの制御には数千万円という高価な装置が必要であるが、本発明では、プリズムといった安価な光学素子で光路を曲げ、そのプリズムを回転制御するのみの簡易な構成で、同様の効果を得ることができる。この方法によると、蛍光色素の寿命や明暗を、それぞれ信号像(11)の長さや強度として記録し、高時間分解能の情報を定量的に得ることができる。

#### 【0035】

これによって、例えば、回転分子モーターであるF1-ATPaseをはじめとし、ミオシンやダイニンやプロテアソームなどを蛍光色素結合させ、本発明による全反射型蛍光顕微鏡で観察することによって、多様な機能を持つ蛋白質の複合体である生体超分子が動作するメカニズムを明らかにすることが可能になる。

30

#### 【0036】

一般に、蛍光色素1分子からの輝点信号を高時間分解能でとらえるには、信号強度を高めるために励起光強度を増大する必要があるが、レンズ系に入射できるレーザー光の強度には上限がある。例えば、イメージインテンシファイアーを用いると光電面が急激に劣化する恐れがある。

#### 【0037】

これに対しては、蛍光色素分子からの輝点信号を受ける受像面(27)に、冷却CCDやEM-CCD撮像素子を設けることが好ましい。

EM-CCDでは、受光部で蓄積された電子は、水平転送部の後に電子増倍転送部を経て出力される。電子増倍転送部で多段階転送されることで、受光時の発生電荷に対して1000倍以上の電子を得ることができる反面、受け取った電荷を素子の後ろ側で増幅するため、ミリ秒オーダーで強い信号が加わっても受像面でのダメージが抑えられる。

40

また、受光画素面積を大きくすることなく電子数を増やせる構造なので、光学系を小型化できる利点がある。受光素子内部というS/Nに最も有利な位置で増幅するので、読出しアンプや後段の増幅アンプに起因するノイズの影響を回避し、低ノイズかつ高感度な撮像を実現できる。数kVの増倍電圧を要する光電子増倍管等とは異なり低電圧で駆動し、解像度劣化や、残像、焼きつきがない利点もある。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0038】

50

本発明によると、通常の安価な光学系や顕微鏡やカメラ等のシステムを生かしたまま、時間分解能を2桁以上向上させることができる。これによって、蛋白質のより速い動的な性質を画像化することができ、生体分子の特定部分の構造変化をリアルタイムで検出することに寄与するので、1分子レベルでの蛋白質の研究を進める推進力になり、用途が広く産業上非常に有用である。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】本発明の一実施例である全反射型蛍光顕微鏡システムの要部を示す説明図

【図2】同、別実施例図

【図3】同、別実施例図

10

【図4】受像面で得られる撮像画像の例を示す説明図

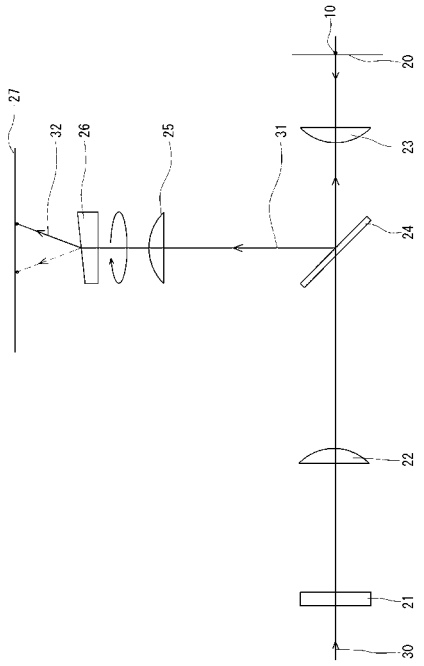
【符号の説明】

【0040】

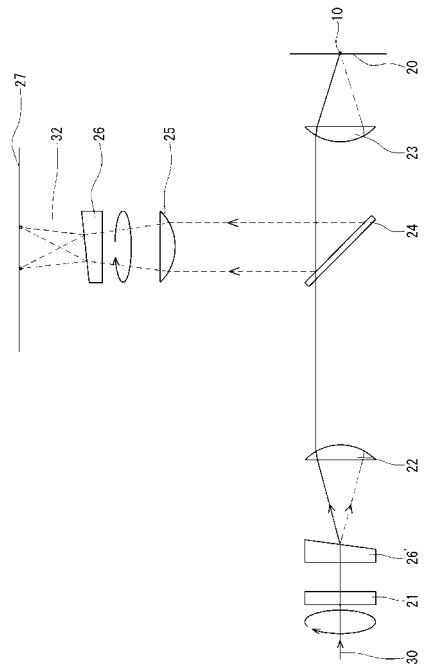
- 10 対象試料
- 11 信号像
- 12 偏光部材の回転方向
- 13 蛍光色素分子の振動モーメントの方向
- 20 ガラス
- 21 偏光変換部材
- 22 集光レンズ
- 23 対物レンズ
- 24 ダイクロイックミラー
- 25 集光レンズ
- 26、26' 偏向部材
- 27 受像面
- 30 入射レーザー光
- 31 蛍光による輝点信号
- 32 光路の変えられた輝点信号

20

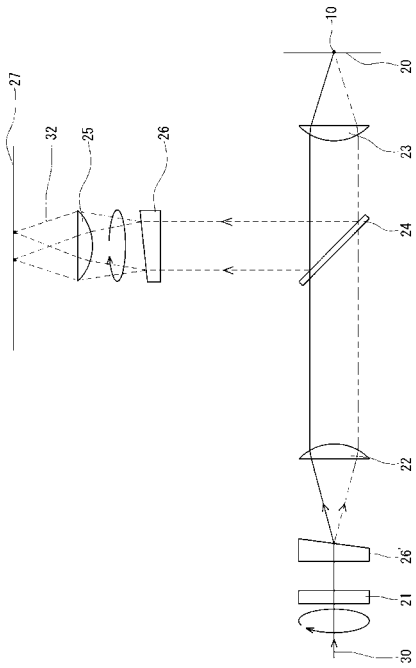
【図 1】



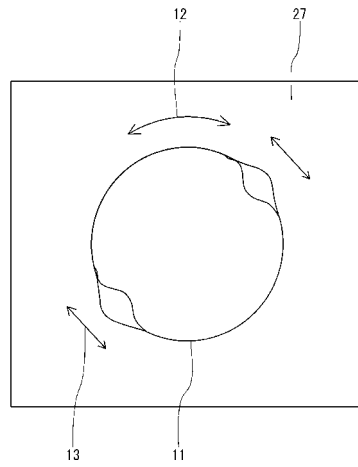
【図 2】



【図 3】



【図 4】





---

フロントページの続き

- (56)参考文献 特許第3577514(JP, B2)  
特開2003-344284(JP, A)  
特開昭56-090233(JP, A)  
特開平11-030583(JP, A)  
特開平06-213813(JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 21/00 - 21/958  
G02B 21/00