

# 先端融合科学特論

1回、2回

## 先端バイオ計測基礎

情報科学研究科 杉浦忠男

複数の異なる研究分野にまたがる学際的な研究領域について講義を行う。

### 先端融合科学特論I (10/7, 14, 21, 28)

「生命を測る技術」と題して、先端バイオ関連計測に焦点を当て、その基礎原理から実現方法、適用分野までの講義を行う。

杉浦(情報)、駒井(バイオ)、徳田(物質)、佐甲靖志(理化学研究所)

### 先端融合科学特論II (11/4, 11, 18, 25)

バイオインスパイアードサイエンス・シンセティックバイオロジー・システムバイオロジーに関して講義を行う。

作村(情報)、別所(バイオ)、駒井(バイオ)、菊池(物質)、伊藤隆司(東京大学)

2008/10/7

# 先端融合科学特論

10月7日(火) 1回 先端バイオ計測基礎(杉浦)

細胞レベルから生体組織にいたるバイオイメージング、分子計測技術についてその技術的基礎を解説する。

2回 先端バイオ計測基礎(杉浦)

一分子イメージング、一分子計測について技術的基礎から適用例について解説する。

10月14日(火) 3回、4回 脳神経科学計測(駒井)

10月21日(火) 5回、6回 バイオ計測デバイス基礎(徳田)

10月28日(火) 7回、8回 先端バイオ計測(外部講師)

佐甲 靖志(理化学研究所、佐甲細胞情報研究室)

出席状況(30%)とレポート(70%)により評価

# 先端バイオ計測の関連分野



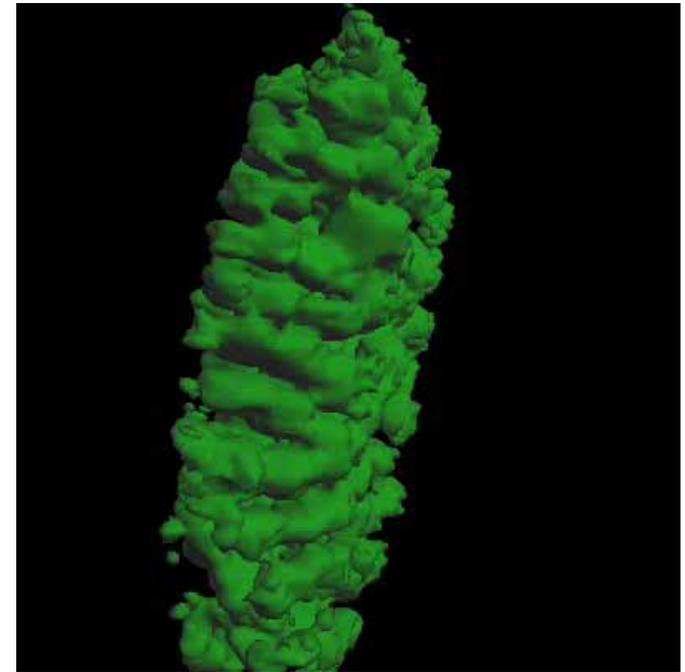
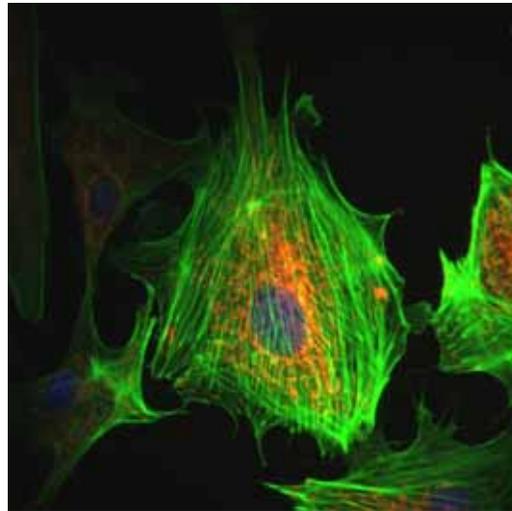
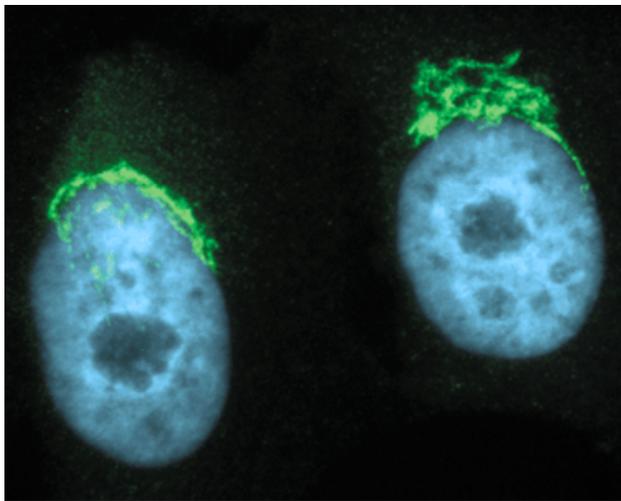
10月7日(火)

1回 先端バイオ計測基礎(杉浦、情報)

細胞レベルから生体組織にいたるバイオイメージング、分子計測技術についてその技術的基礎を解説する。

2回 先端バイオ計測基礎(杉浦、情報)

一分子イメージング、一分子計測について技術的基礎から適用例について解説する。



10月14日(火)

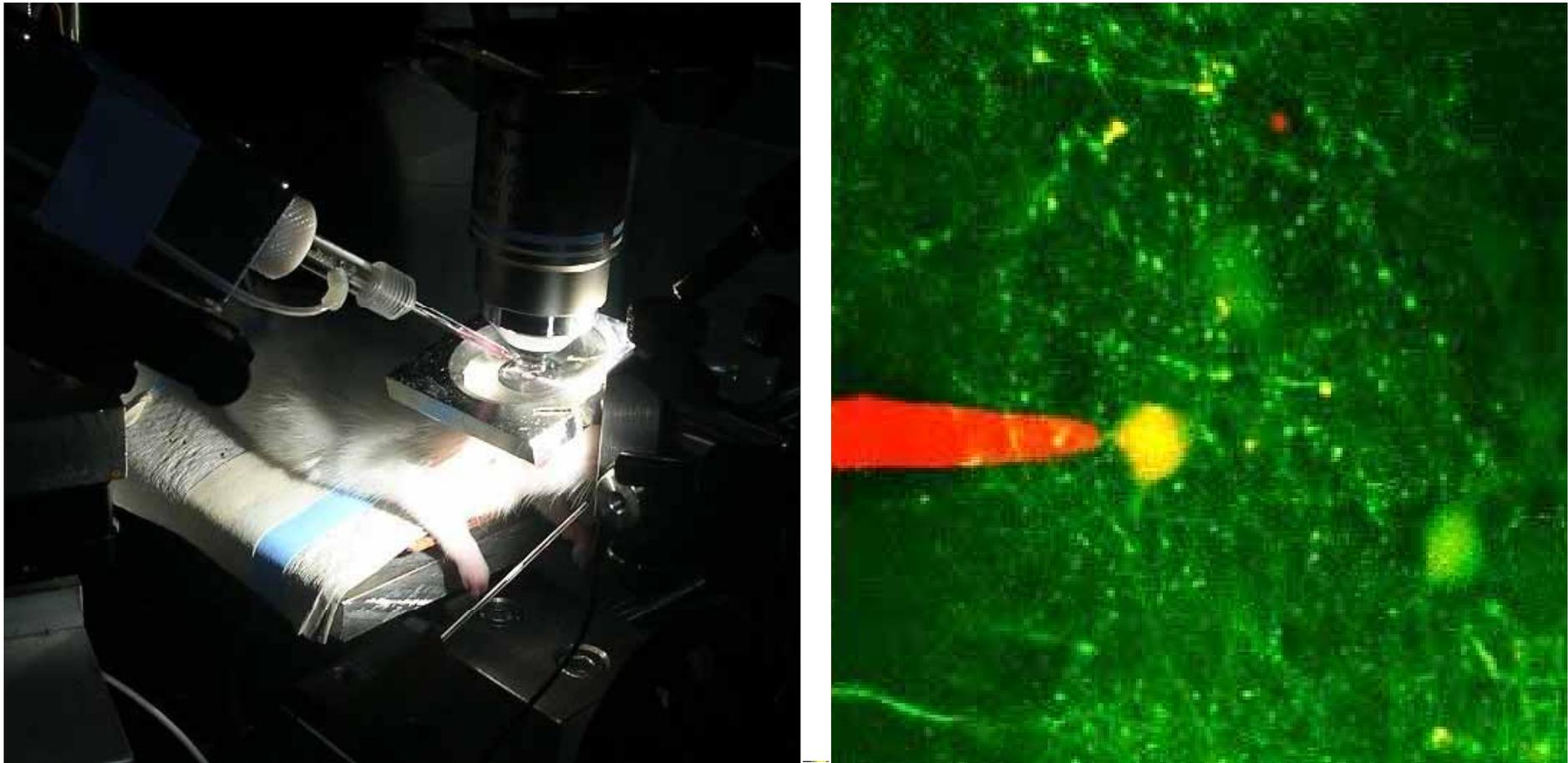
3回 脳神経科学計測(駒井、バイオ)

脳や神経の解剖、生理学的特長を広い意味での「行動」との関連性を交えながら概説する。

4回 脳神経科学計測(駒井、バイオ)

我々や動物の行動を支配している**脳機能**を計測する技術の紹介と適用例について解説する。

## 細胞選択的個体脳記録



Komai et al, *Nature Neuroscience & Nature Protocols* (2006)

二光子レーザー走査顕微鏡でラットの脳内を観察している様子。緑色はウイルス感染によりGFPを発現している大脳皮質の神経細胞。赤いものは電気生理記録に用いるガラス電極で、Alexa594が充填されている

10月21日(火)

5回 バイオ計測デバイス基礎(徳田、物質)

**バイオ計測デバイス、特にバイオセンサ**について技術的基礎を解説する。

6回 バイオ計測デバイス応用(徳田、物質)

**バイオ計測デバイスの応用例**について、実例を交えて解説する。

# 背景:世界のバイオメディカルデバイス研究

- バイオメディカル分野への微細加工技術の適用
  - DNAアレイチップ
  - $\mu$ -TAS, LOC (Lab on Chip)
- 現状:MEMS技術の寄与
  - ガラス,高分子基板上の微細加工
- 今後はSi-LSI技術適用が発展の鍵
  - 分子イメージング
    - マウス脳深部へのLSIデバイス埋植により細胞活動の空間分布をリアルタイム計測可能に
  - 医療分野
    - 脳深部刺激,人工視覚



# バイオメディカルフォトリックデバイスの技術体系(1)

脳・神経

機能デバイス

代謝物質等  
(血糖・尿酸・脂肪 etc.)

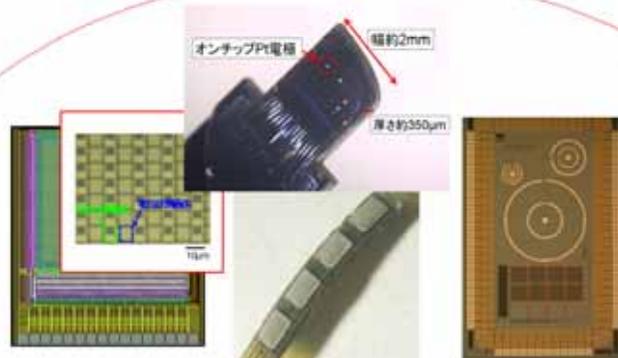
ターゲット

光

電気

神経伝達物質:薬物  
(ドーパミン等)

メディア

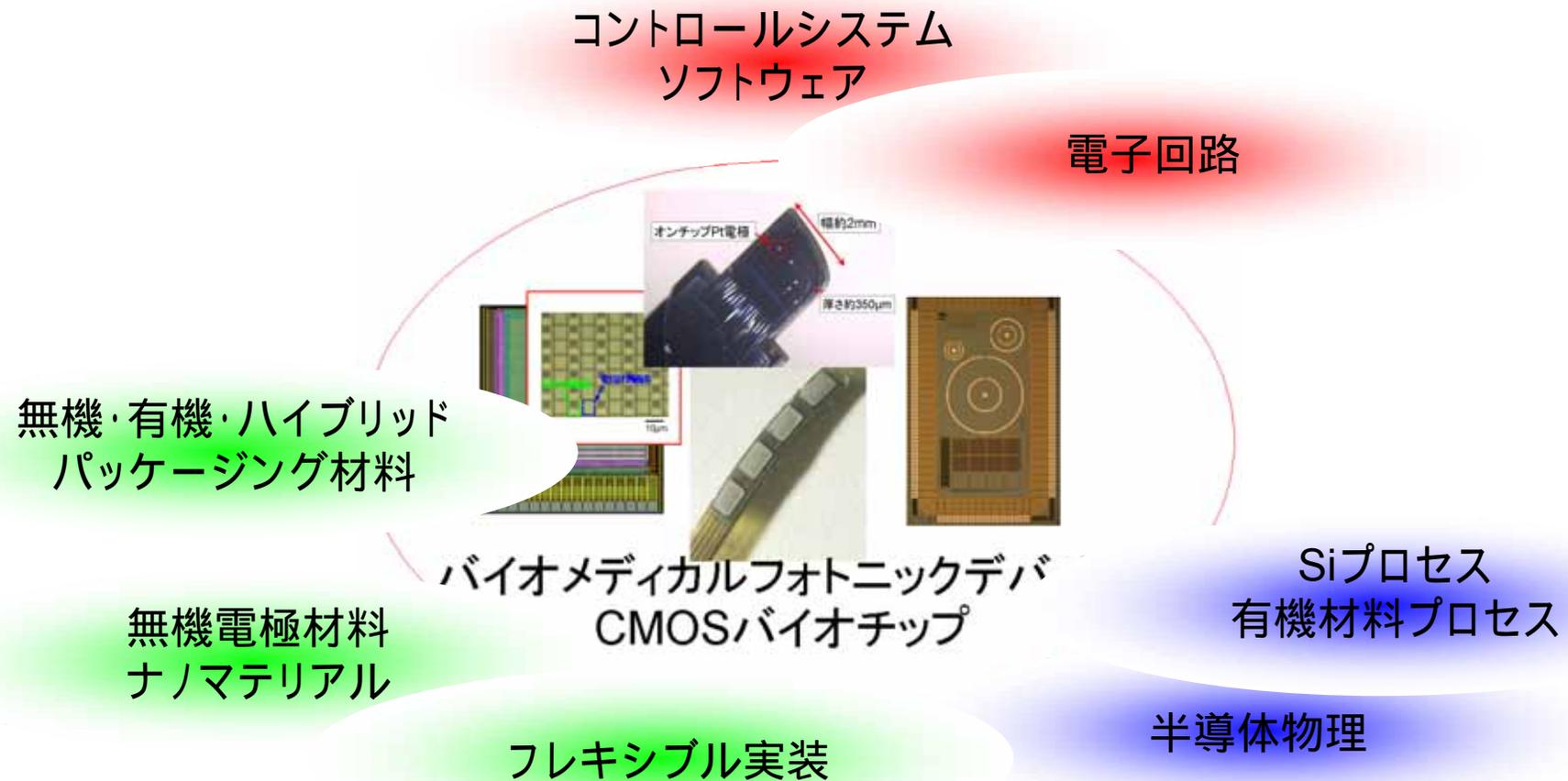


バイオメディカルフォトリックデバイス  
CMOSバイオチップ

デバイス

システム

# バイオメディカルフォトリックデバイスの技術体系(2)

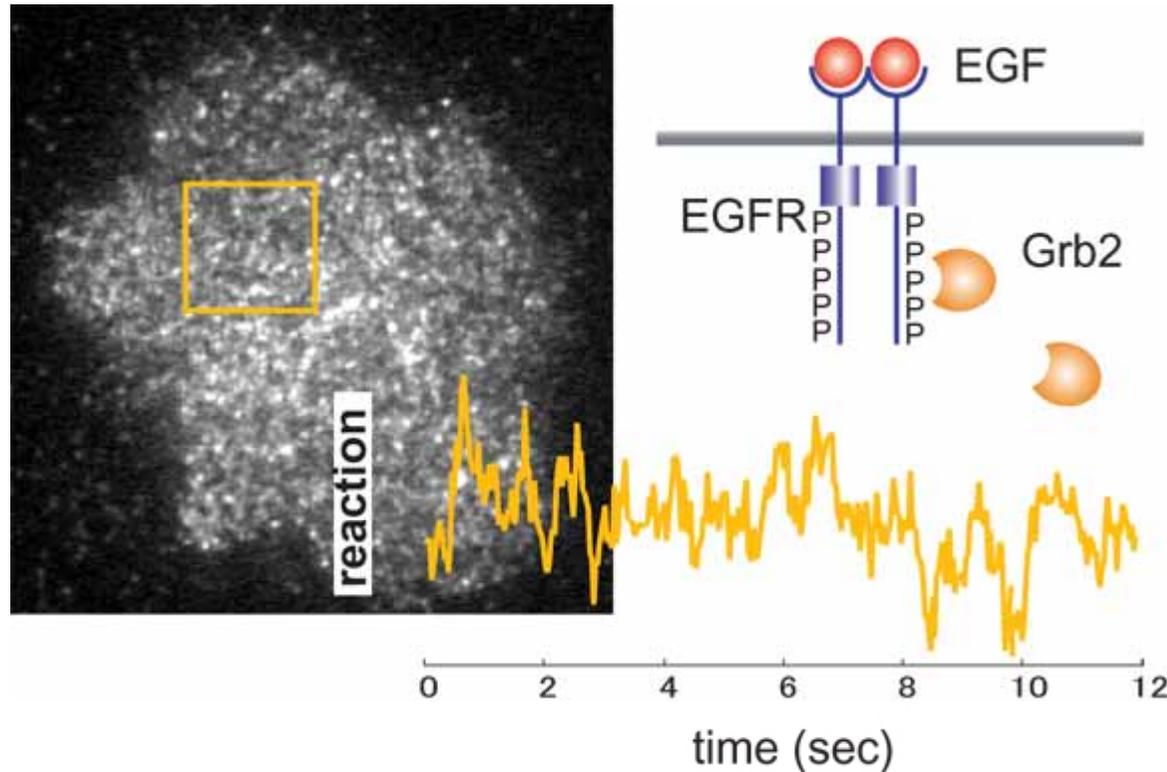


7回、8回 先端バイオ計測(外部講師)

10月28日(火)

7回、8回 先端バイオ計測(外部講師)

脳神経科学やナノバイオをキーワードに先端分野で活躍する外部講師を招き講義する。



佐甲 靖志先生  
理化学研究所  
佐甲細胞情報研究室

細胞内反応のゆらぎ

EGF受容体が細胞外で受け取った情報は、細胞質のアダプター蛋白質Grb2によって認識されます。1個の細胞中の枠で囲った範囲で、蛍光標識したGrb2の膜結合量の時間変化を1分子計測しました。情報伝達反応はつねにゆらいでいます。

# 先端バイオ計測基礎(杉浦忠男、情報)

## 1回 先端バイオ計測基礎(杉浦)

細胞レベルから生体組織にいたるバイオイメージング、分子計測技術についてその**技術的基礎**を解説する。

- ・ バイオ計測とは
- ・ バイオイメージング
  - 光学顕微鏡、蛍光
  - 共焦点顕微鏡、二光子顕微鏡
- ・ マイクロマニピュレーション(光ピンセット)

## 2回 先端バイオ計測基礎(杉浦)

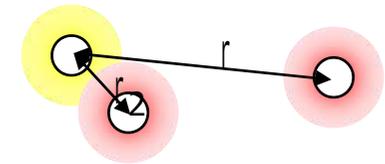
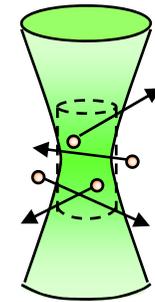
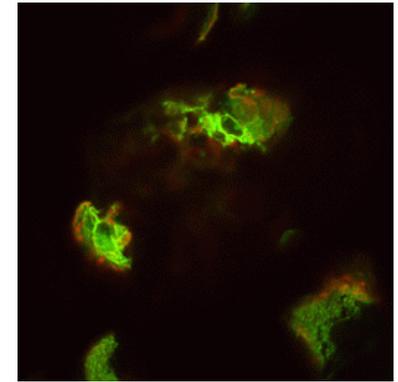
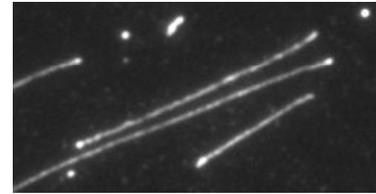
**一分子イメージング、一分子計測**について技術的基礎から適用例について解説する。

- ・ 一分子計測
  - 一分子イメージング
- ・ 蛍光イメージングを用いた計測
  - 蛍光共鳴エネルギー移動
  - 蛍光相関分光法
- ・ 一分子マニピュレーション、力計測

# 先端バイオ計測基礎(杉浦忠男、情報)

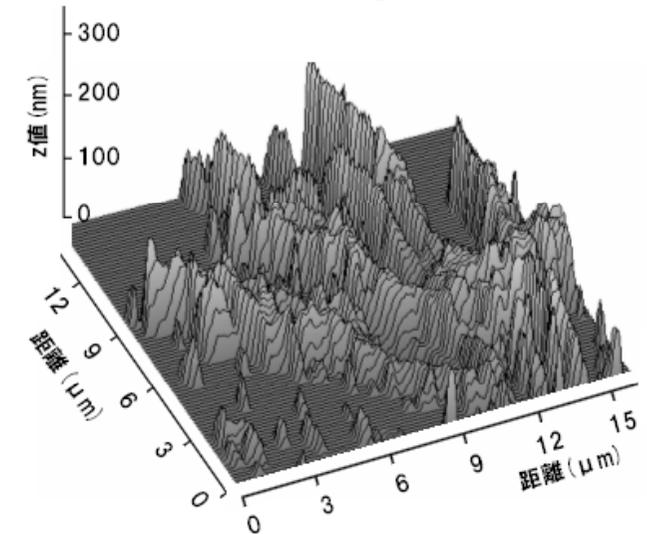
## 1) 先端バイオ計測 - 基礎 -

- ・ バイオ計測とは
- ・ バイオイメージング  
バイオイメージングの基礎  
光学顕微鏡、蛍光  
共焦点顕微鏡、二光子顕微鏡
- ・ マイクロマニピュレーション(光ピンセット)  
光ピンセットの基礎

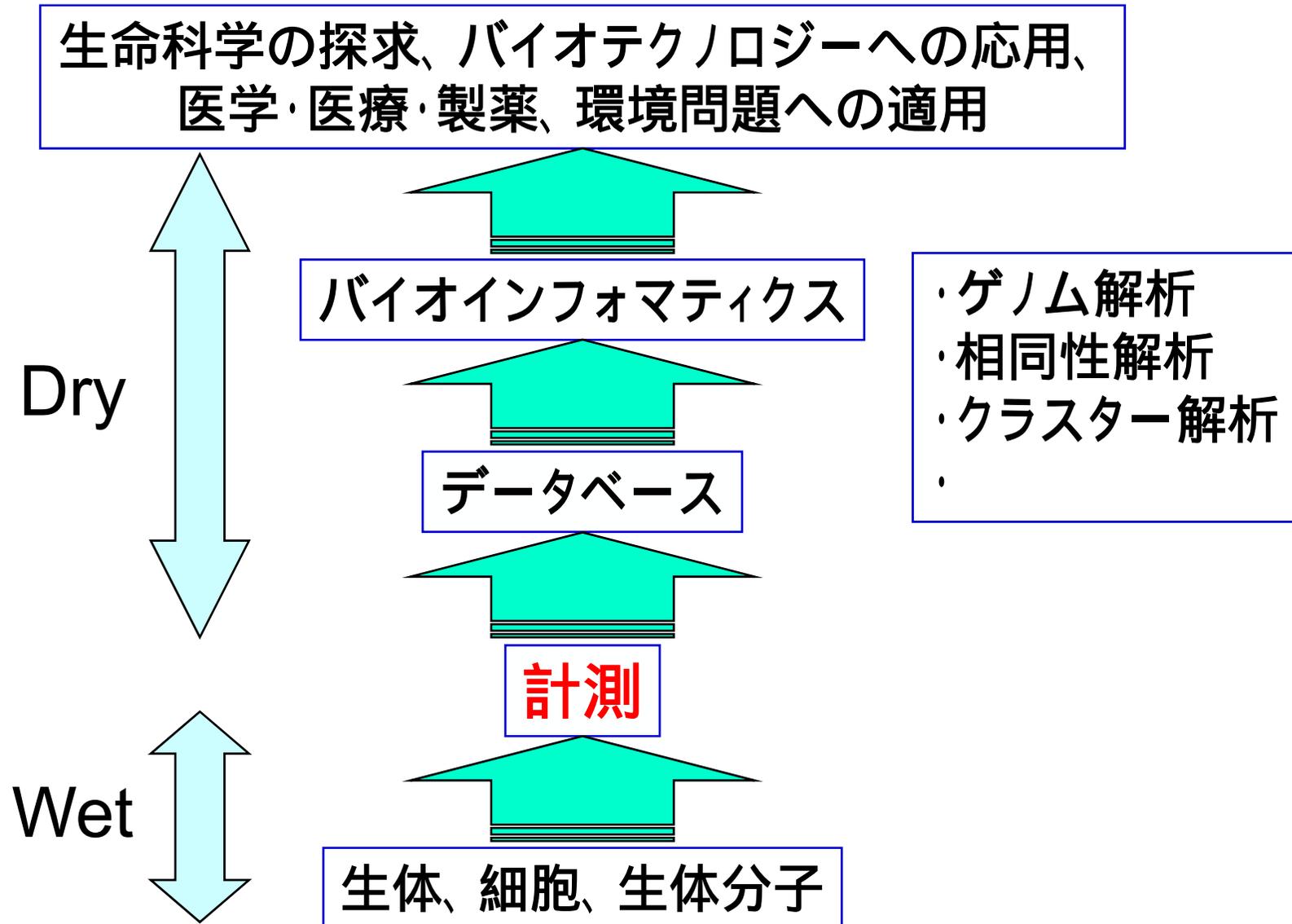


## 2) 先端バイオ計測 - 応用 -

- ・ 一分子計測  
一分子計測の基礎  
一分子イメージング
- ・ 蛍光イメージングを用いた計測  
蛍光共鳴エネルギー移動  
蛍光相関分光法
- ・ 一分子マニピュレーション、力計測



## 計測は境界(バイオインフォマティクスの場合)



# 計測は境界 — バイオイメージングでは —

生命科学の探求、バイオテクノロジーへの応用、  
医学・医療・製薬、環境問題への適用

生物学的知見

分子メカニズム、分子間相互作用、  
細胞内構造

画像処理、信号処理

信号強度解析、画像計測(粒子解析、  
測長、重心解析)、タイムラプス

イメージング、計測

位相差顕微鏡法、蛍光イメージング、  
蛍光共鳴エネルギー移動、蛍光相関分光、  
蛍光寿命イメージング

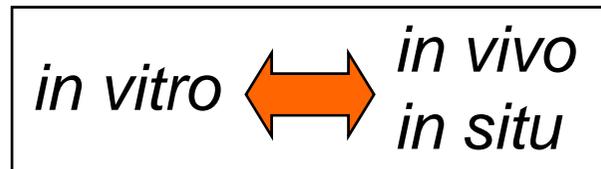
ターゲッティング

実験設計：  
遺伝子ノックアウト、RNAi  
蛍光プローブ、レポーター分子

生体、細胞、生体分子

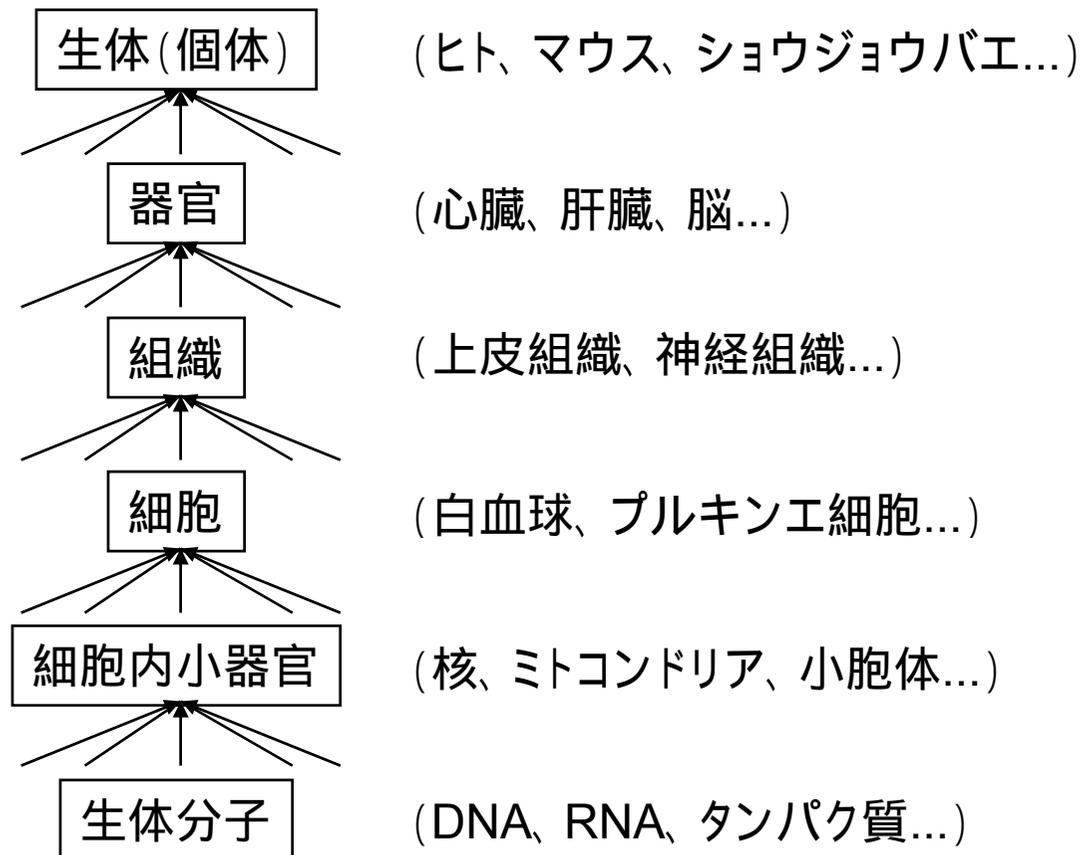
## バイオ計測の特徴

- 生物、組織、細胞 の中には分子がいっぱい
  - DNA、RNA、蛋白質、糖質、脂質、小分子、
  - 種類が多い - > 網羅的
  - 複雑な相互作用 - > 相互作用計測
- 分子によっては少ないけれど、重要な働きをするものがある
  - 高感度検出、一分子計測
- 条件が変わると働きが変化するものが多い
  - 水
  - pH、イオン強度



# 生体計測の特徴 ー生体の階層構造ー

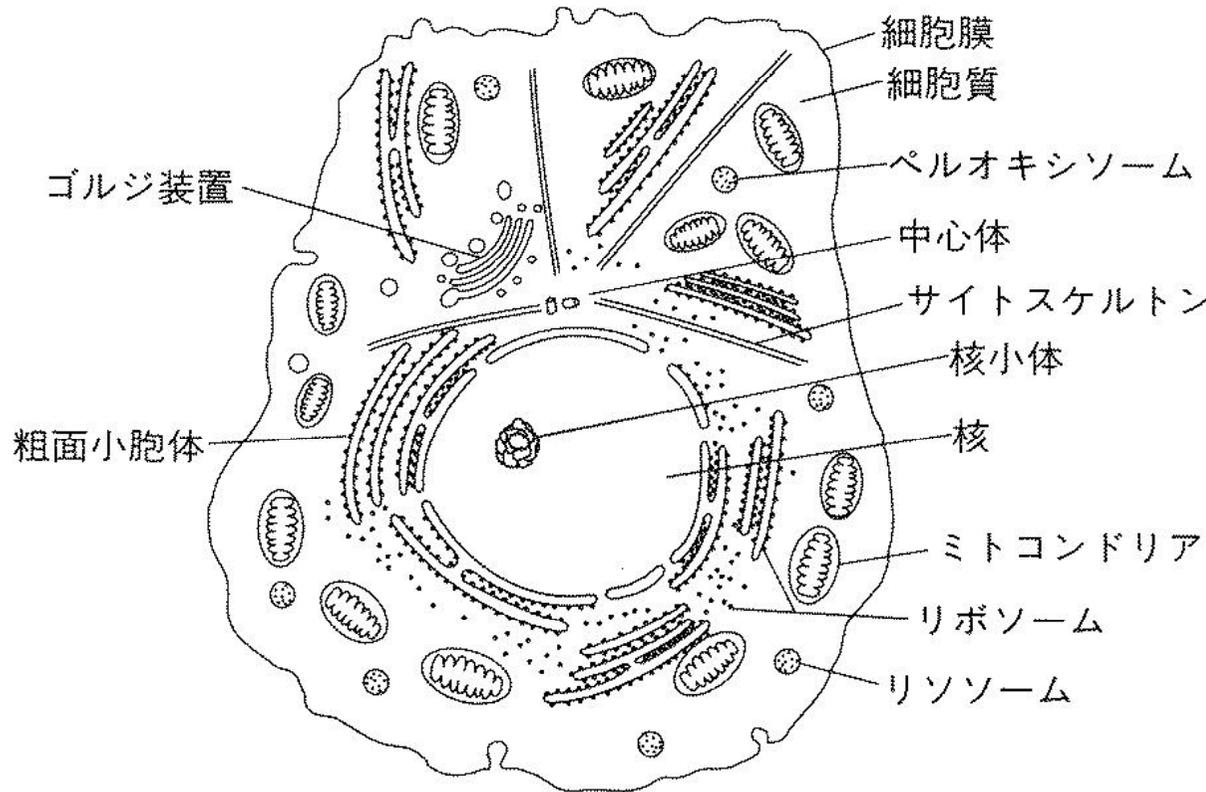
生体はいくつもの階層から成り立つ



どの階層の構造を計測するかで計測方法が異なる！

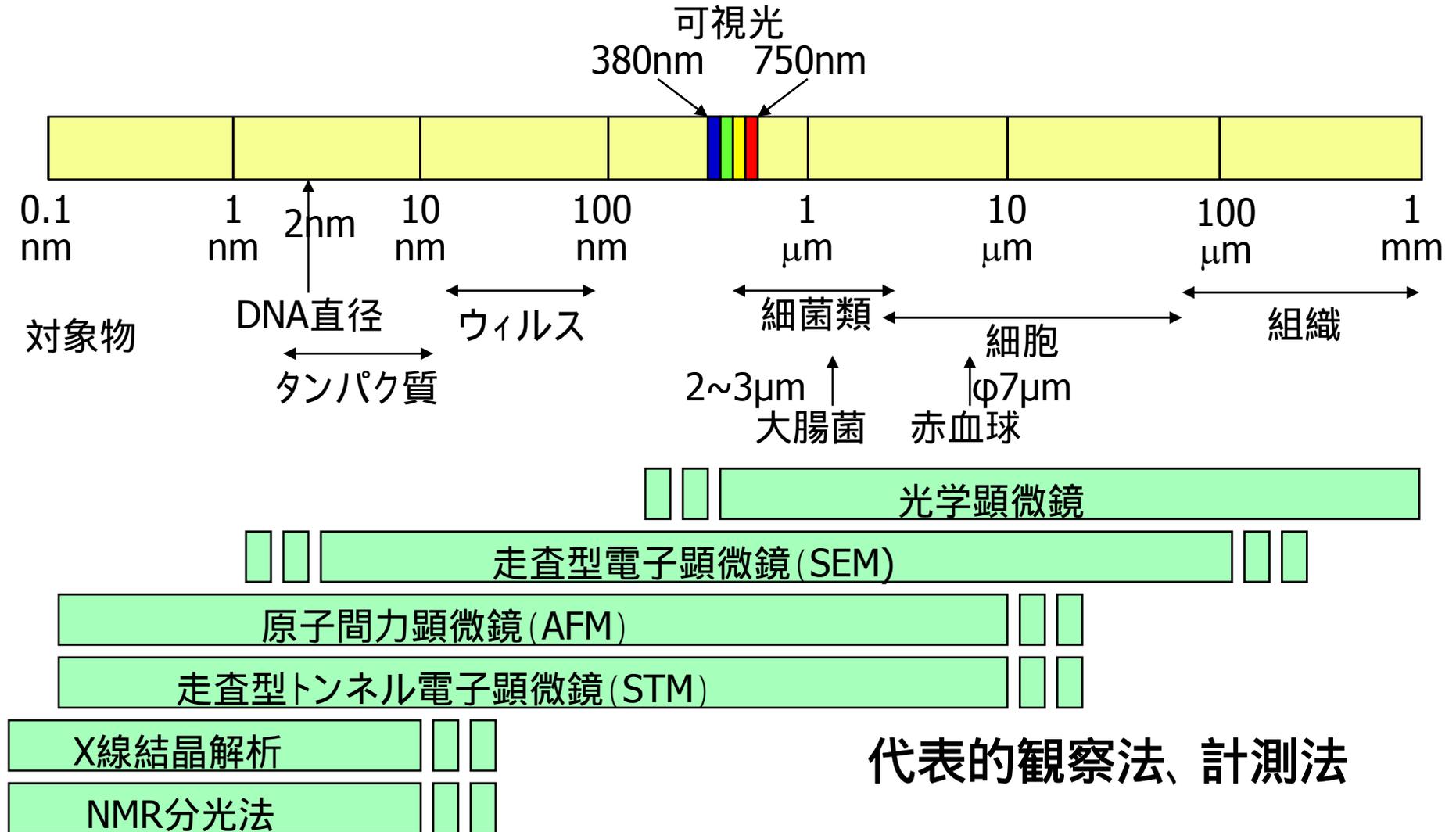
# 細胞の構造

細胞の中だけを見てもさまざまな構造がある



核 DNAがある  
リボソーム タンパク質を合成する  
粗面小胞体 細胞膜やタンパク質を合成する。  
ゴルジ体 合成されたタンパク質はここを通過して細胞内の各所へ運ばれる  
サイトスケルトン(細胞骨格) 細胞の形を保持する  
ミトコンドリア ATPを産生する  
細胞膜 細胞を包む膜。様々な受容体やチャネルがある

# 対象物の大きさと計測方法

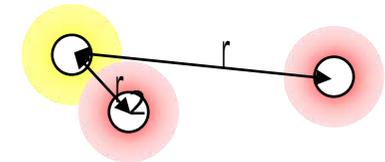
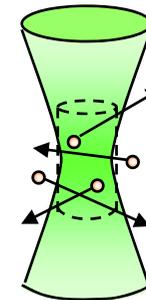
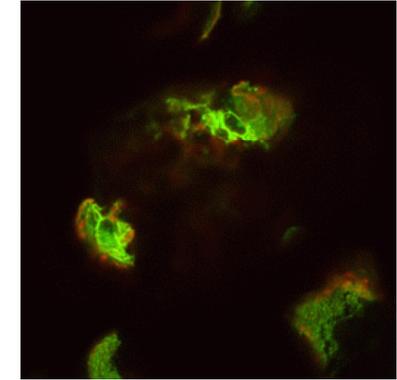
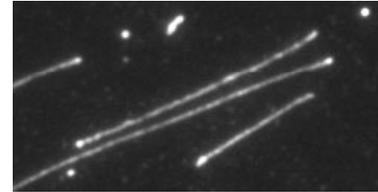


計測対象によって計測方法(計測装置)が異なる

# 先端バイオ計測基礎(杉浦忠男、情報)

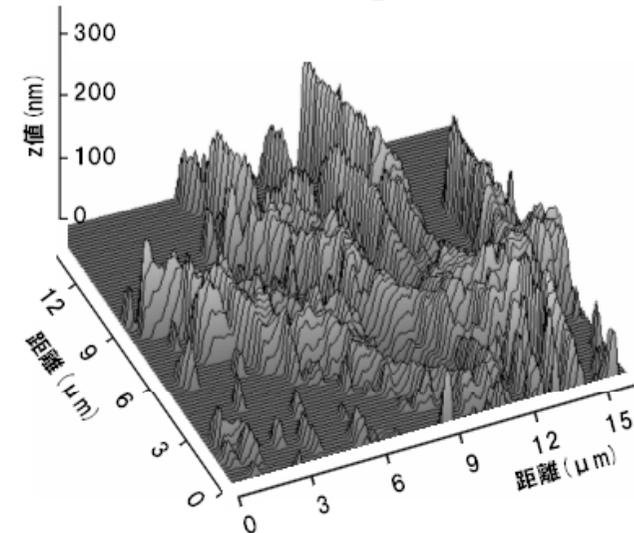
## 1) 先端バイオ計測 - 基礎 -

- ・ バイオ計測とは
- ・ **バイオイメージング**  
**バイオイメージングの基礎**  
光学顕微鏡、蛍光  
共焦点顕微鏡、二光子顕微鏡
- ・ マイクロマニピュレーション(光ピンセット)  
光ピンセットの基礎



## 2) 先端バイオ計測 - 応用 -

- ・ 一分子計測  
一分子計測の基礎  
一分子イメージング
- ・ 蛍光イメージングを用いた計測  
蛍光共鳴エネルギー移動  
蛍光相関分光法
- ・ 一分子マニピュレーション、力計測



# バイオイメージングの流れ

実験計画、前準備

## 蛍光染色

- ・ 蛍光分子
- ・ 蛍光性タンパク質 (GFP等)
- ・ 多色染色、蛍光共鳴エネルギー移動

## 蛍光イメージング、観察

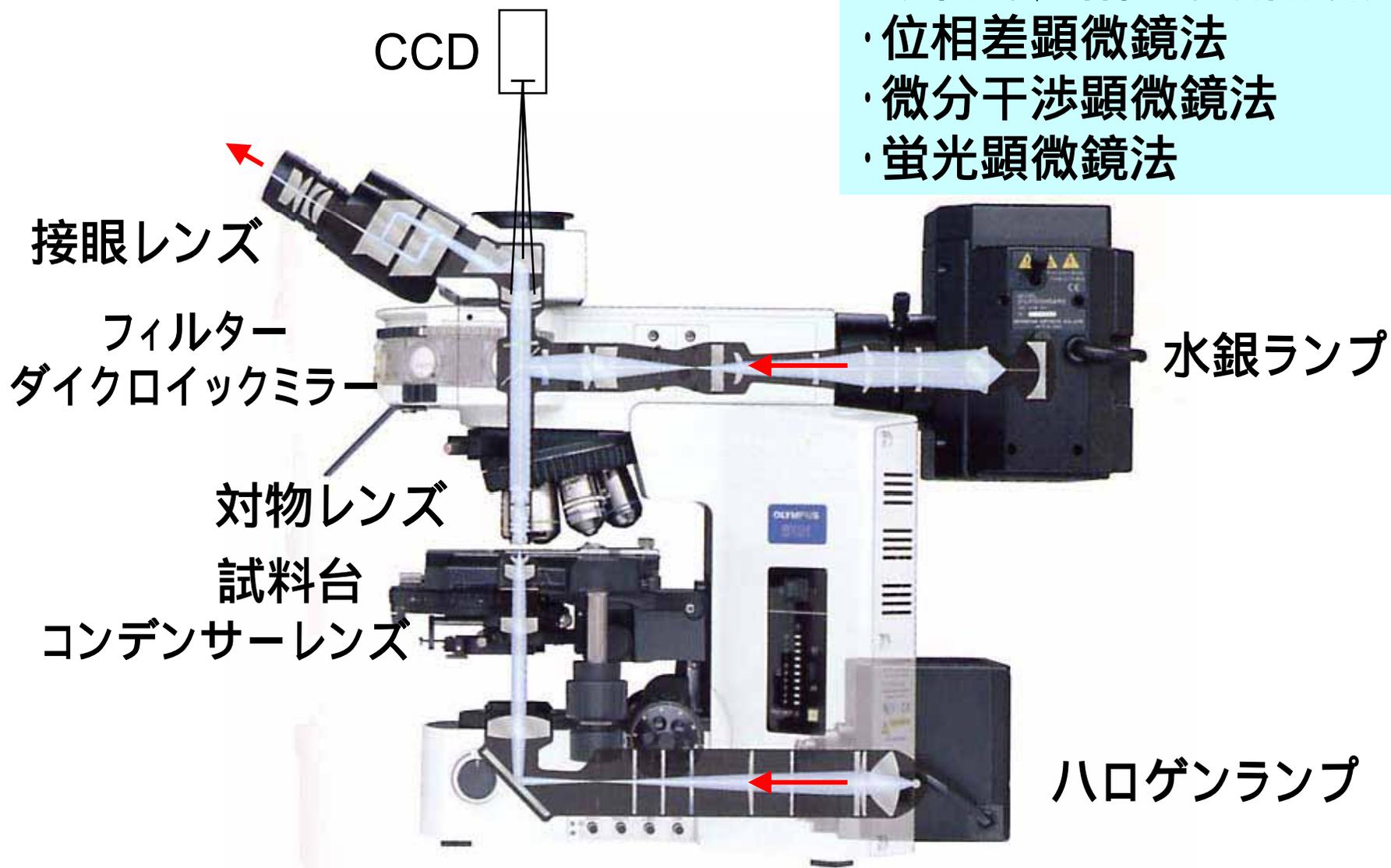
- ・ 顕微鏡技術
- ・ 微弱光検出技術
- ・ 後処理

## 撮影、画像処理

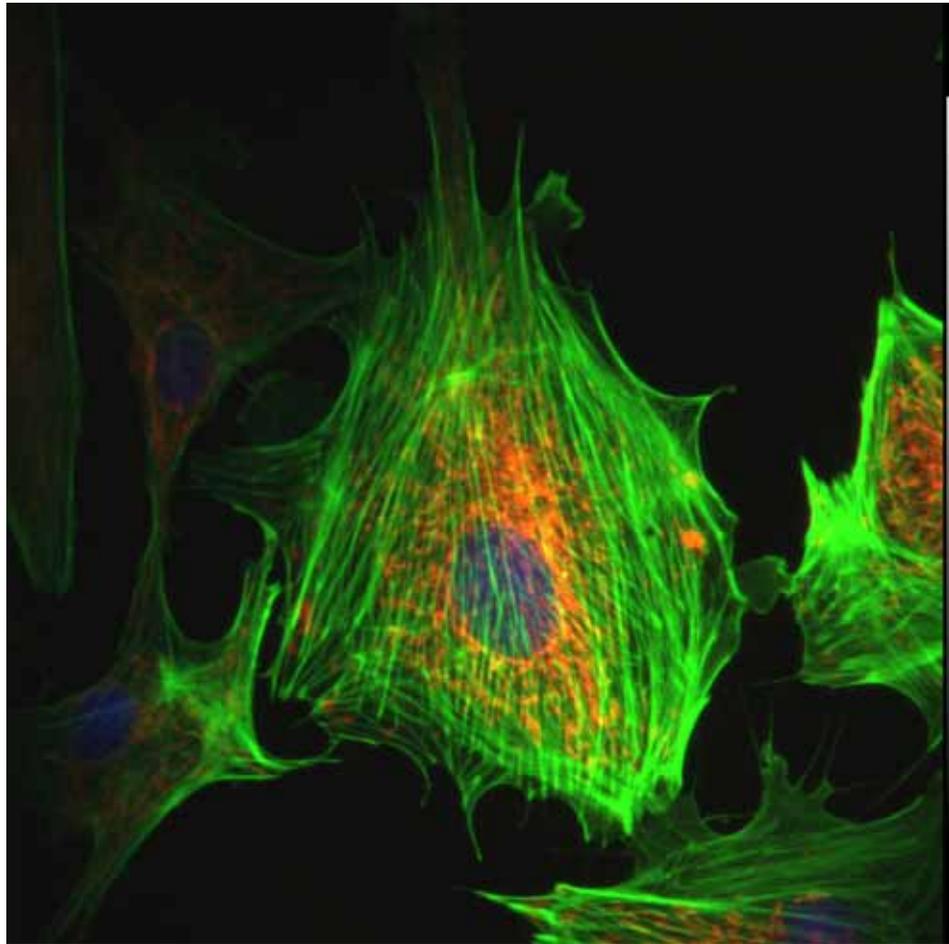
- ・ 画像取り込み
- ・ タイムラプス計測
- ・ ビデオ顕微鏡法

後処理、実験報告

# 光学顕微鏡



# 光学顕微鏡



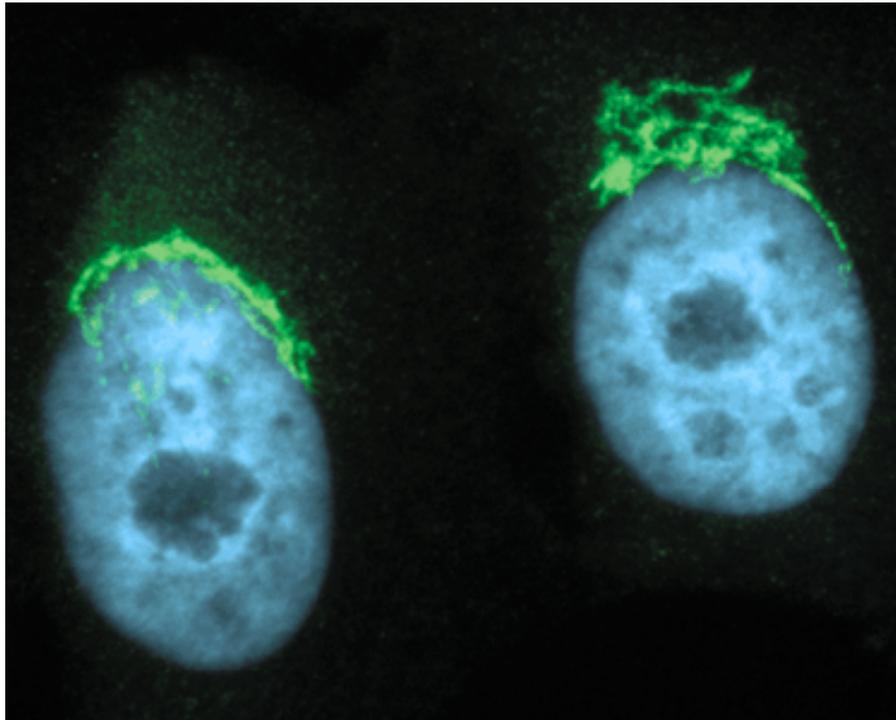
- ・拡大して観察
- ・形
- ・色

# 光学顕微鏡の特徴

---

- 拡大して観察 - > 形、分布 (形態情報)
- 色の情報、分光情報 (物質情報)
  - 蛍光なら 蛍光プローブを識別できる
  - スペクトル 原子、分子の電子準位の情報
- 非接触
  - 光を当てるだけで測定できる
- 非破壊
  - 光が透過すれば対象物を壊さなくても観察できる

## 抗原-抗体反応による蛍光染色

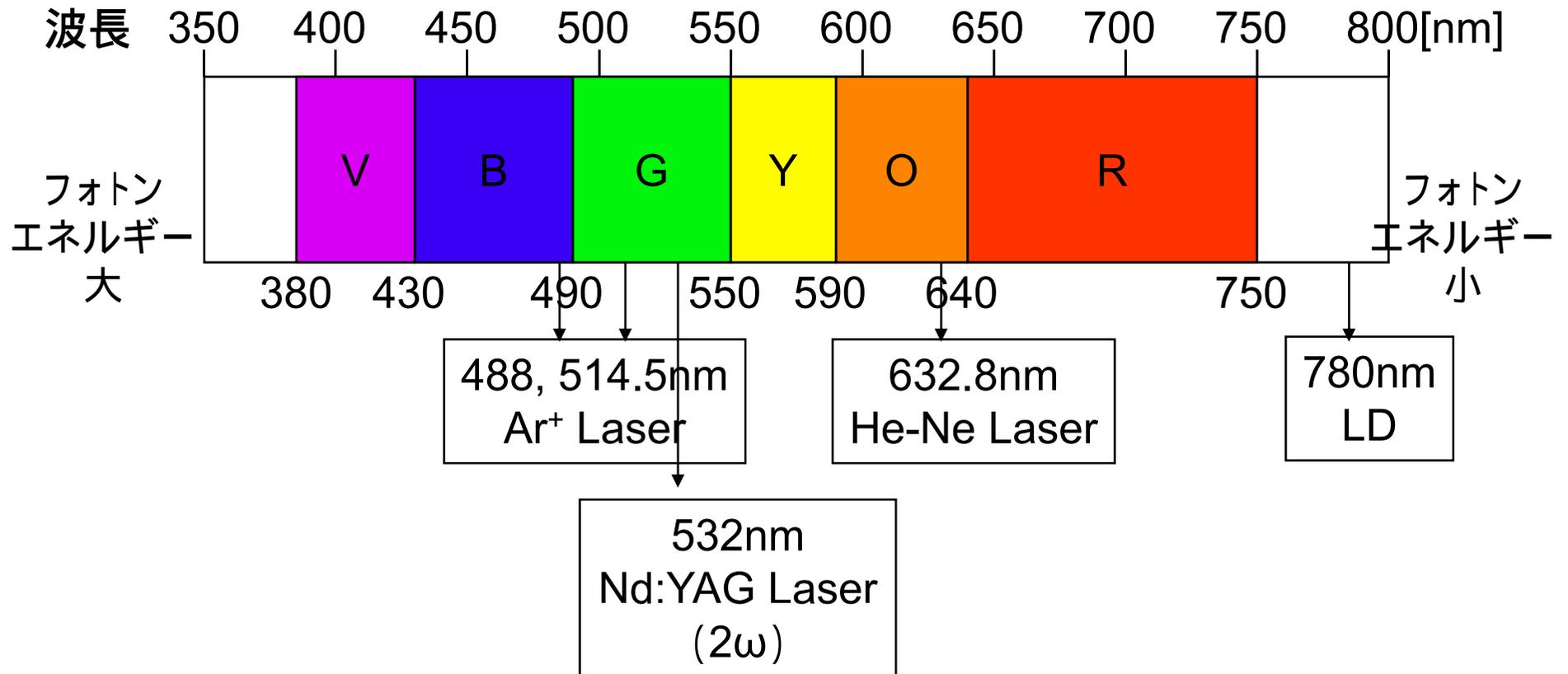


Hela Cell  
ゴルジ体をIgGにて染色、  
核はDAPIで染色している。

Alexa Fluor 488	緑
DAPI	青紫

HeLa cells were labeled with anti-golgin-97 and detected using Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG. The cells were counterstained with DAPI

# 波長と色との関係 (可視域)



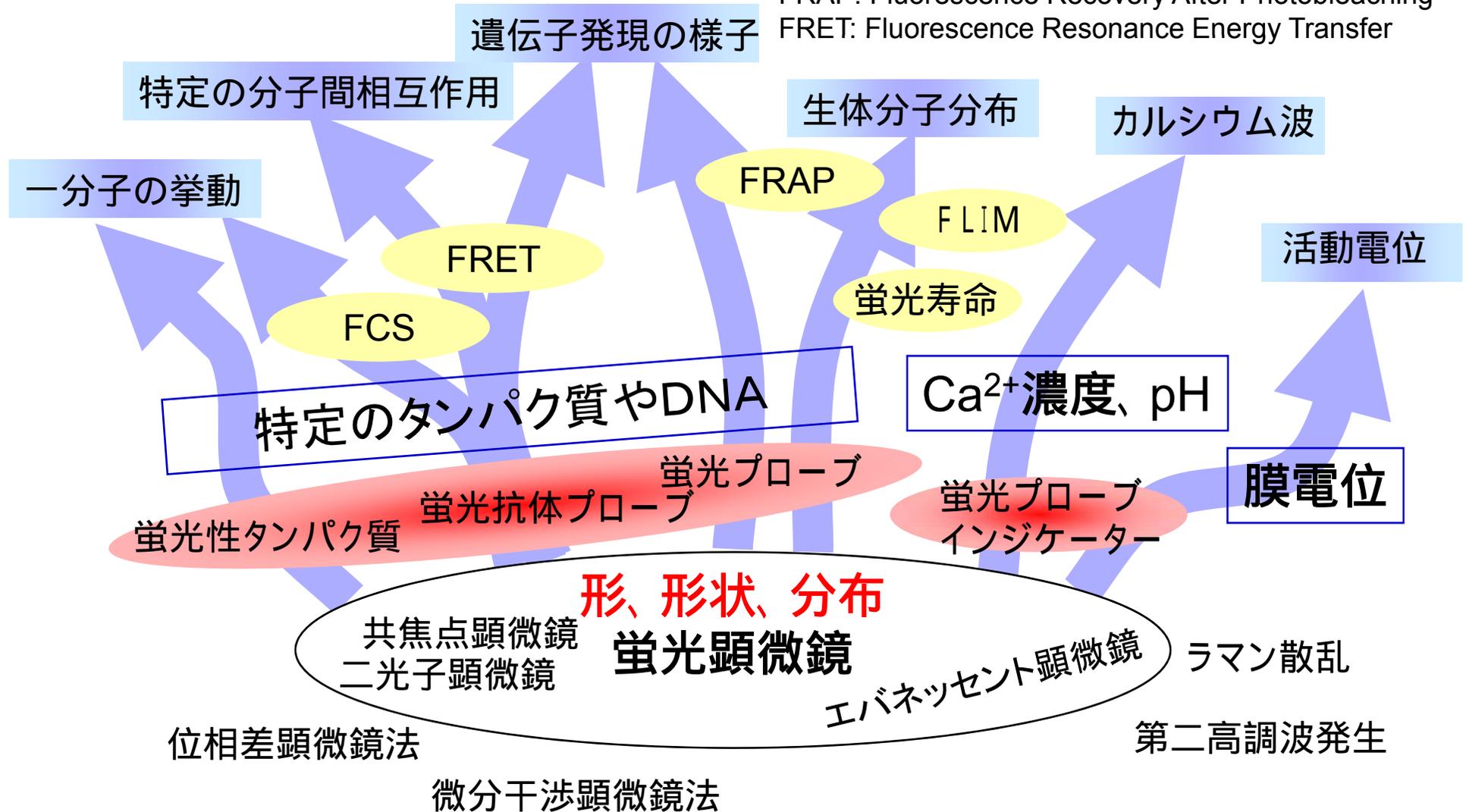
# 何が見えるのか？

---

- ・ 形、形状
  - 二次元分布、三次元形状
- ・ 蛍光分子の分布
  - Cy3, Cy5, FITCなど
- ・ 特定のタンパク質やDNAなどの分布
  - 蛍光抗体法、YOYO1
- ・ 遺伝子発現の様子、分布
  - 蛍光性タンパク質、など
- ・ カルシウム濃度、pHなどの分布
  - カルシウムインジケーター、Cameroon
- ・ 一分子の挙動
  - 一分子イメージング
- ・ 分子間相互作用
  - FRET, FCSなど

# 何が見えるのか？

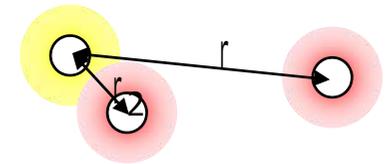
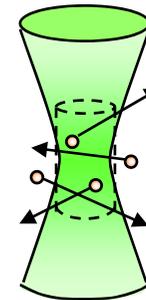
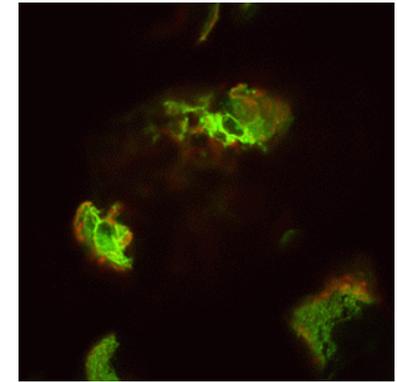
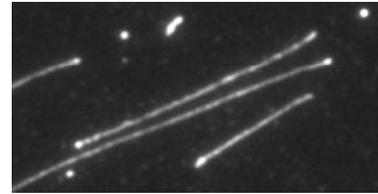
FCS: Fluorescence Correlation Spectroscopy  
FLIM: Fluorescence Life-time Imaging Microscopy  
FRAP: Fluorescence Recovery After Photobleaching  
FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer



# 先端バイオ計測基礎(杉浦忠男、情報)

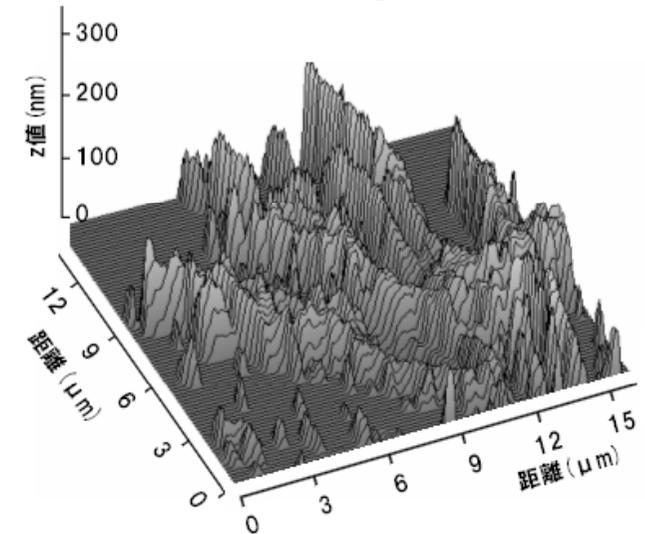
## 1) 先端バイオ計測 - 基礎 -

- ・ バイオ計測とは
- ・ バイオイメージング  
バイオイメージングの基礎  
**光学顕微鏡、蛍光**  
共焦点顕微鏡、二光子顕微鏡
- ・ マイクロマニピュレーション(光ピンセット)  
光ピンセットの基礎

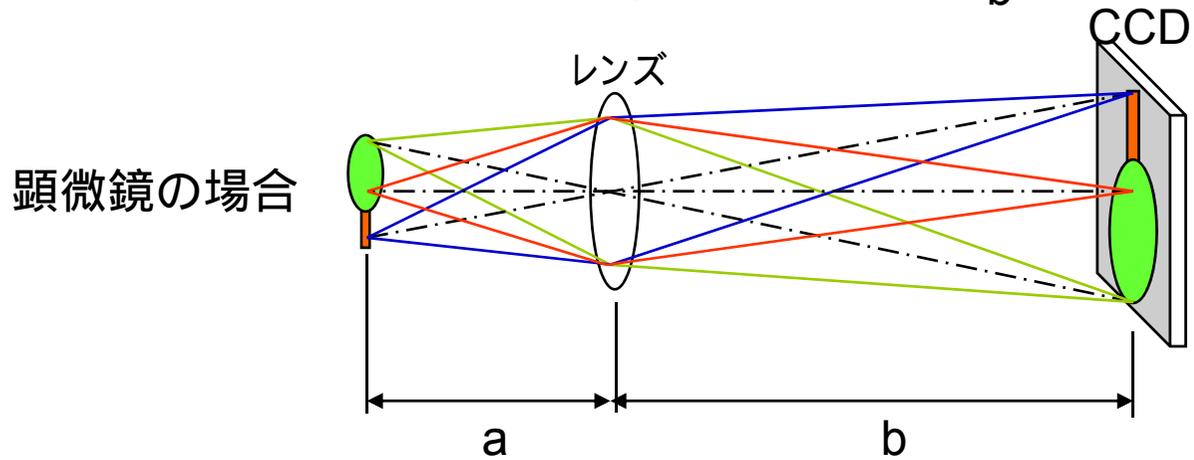
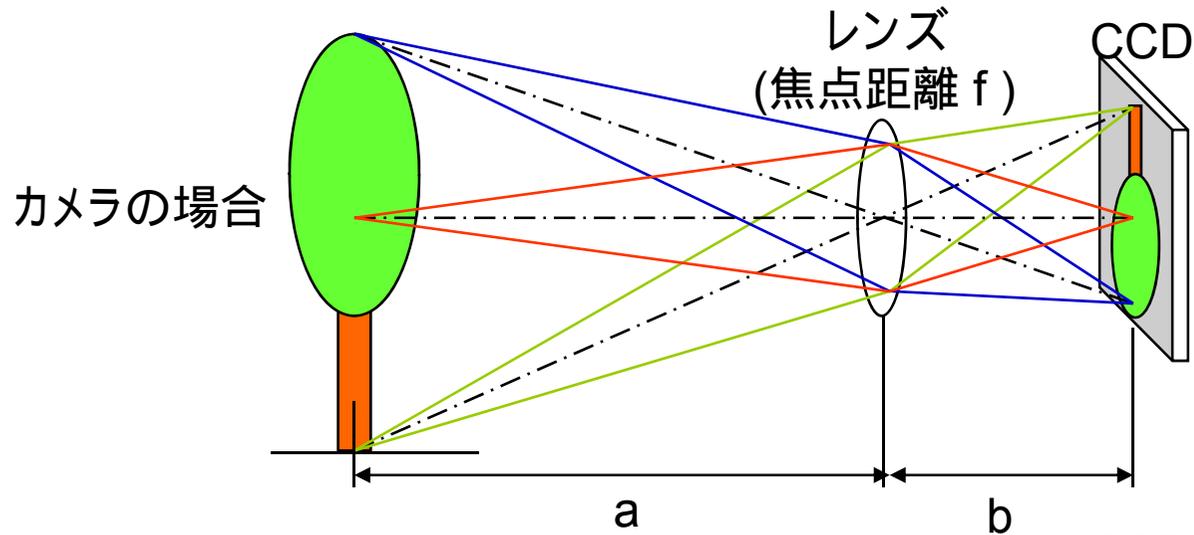


## 2) 先端バイオ計測 - 応用 -

- ・ 一分子計測  
一分子計測の基礎  
一分子イメージング
- ・ 蛍光イメージングを用いた計測  
蛍光共鳴エネルギー移動  
蛍光相関分光法
- ・ 一分子マニピュレーション、力計測



# レンズによる結像



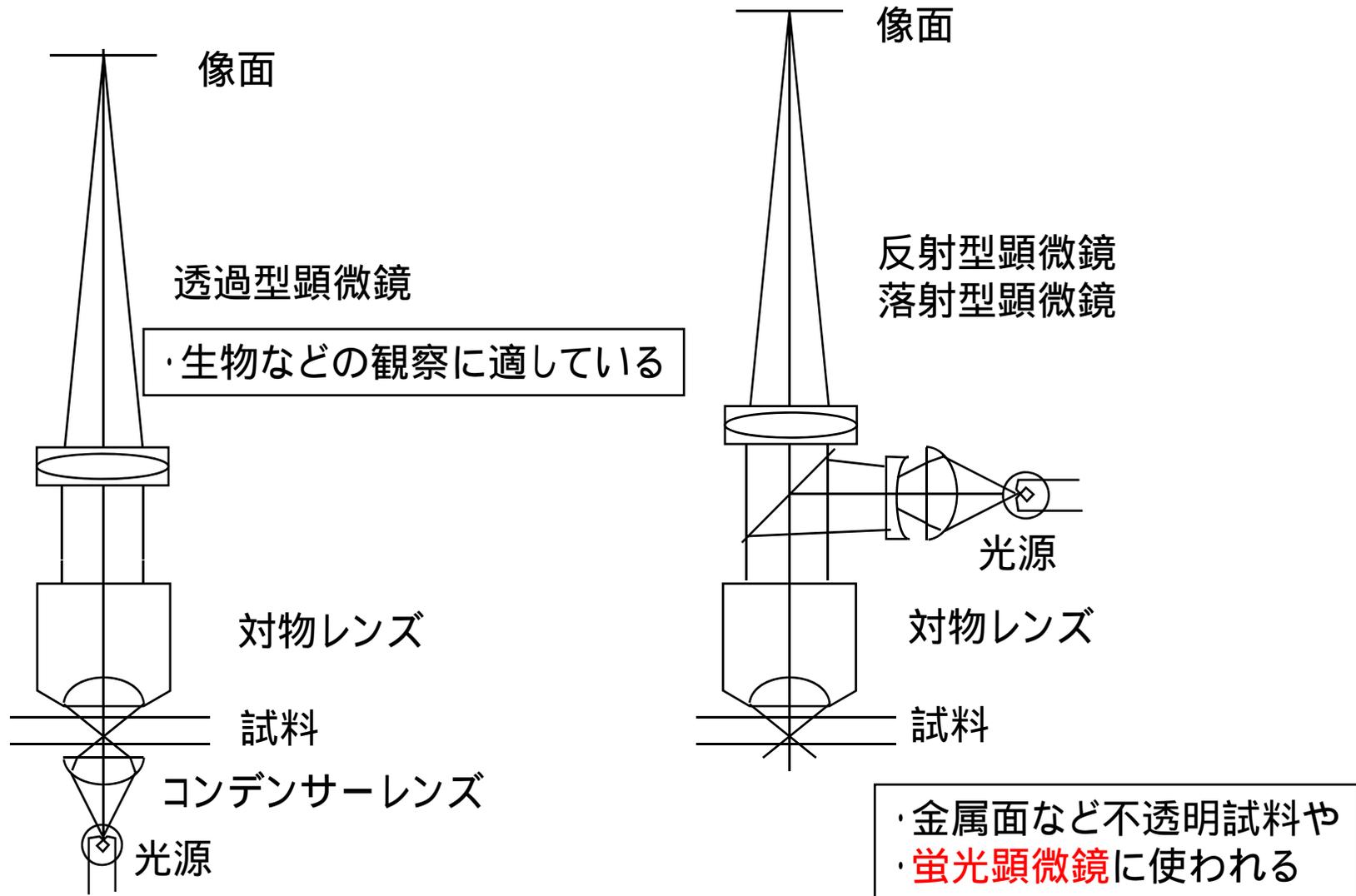
レンズで結像すると、

$$\frac{1}{a} + \frac{1}{b} = \frac{1}{f}$$

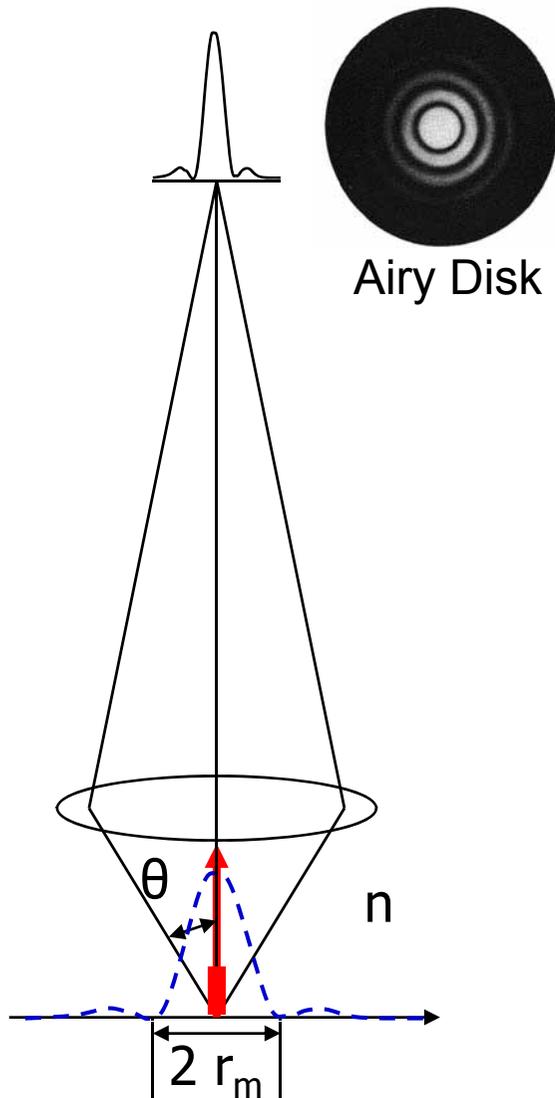
が成り立つ。

倍率:  $\frac{b}{a}$

# 光学顕微鏡



# 回折限界 - 光学顕微鏡の分解能 -



光は波の性質があるので、レンズを通して観察すると一点として見えない。  
=> 回折限界 (Rayleighの分解能限界)

$$r_m = 0.61 \frac{\lambda}{NA}$$

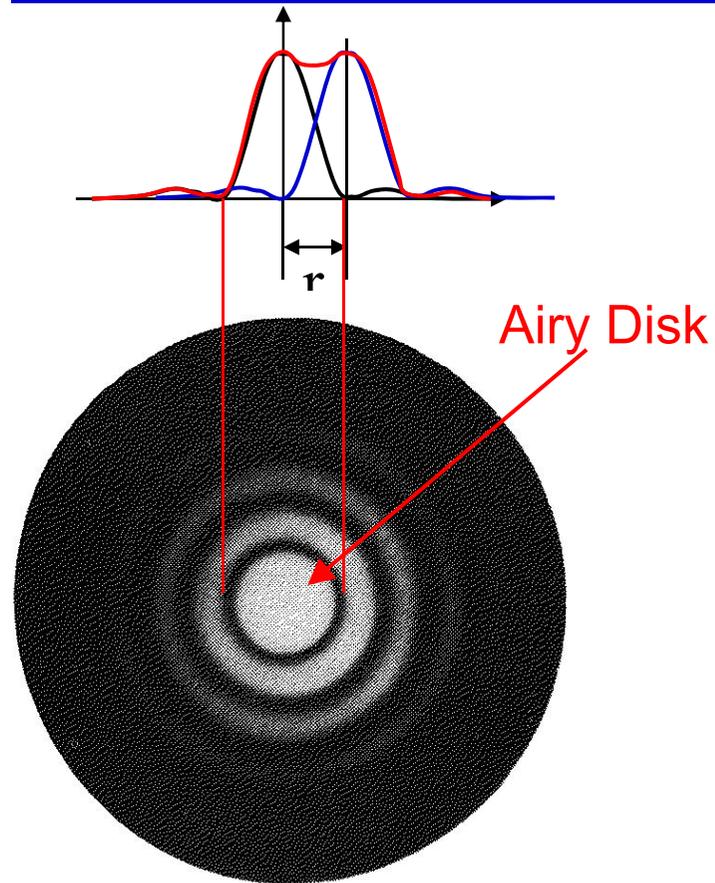
NA: 開口数 (Numerical Aperture)

$$NA = n \sin\theta$$

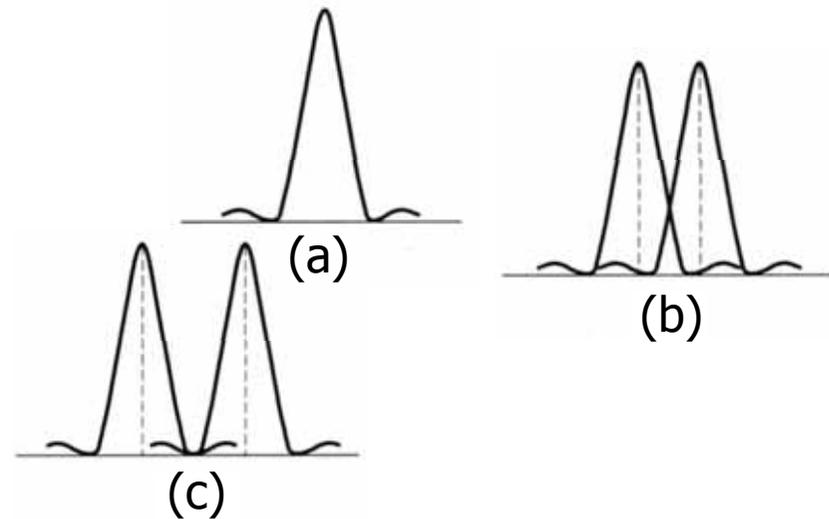
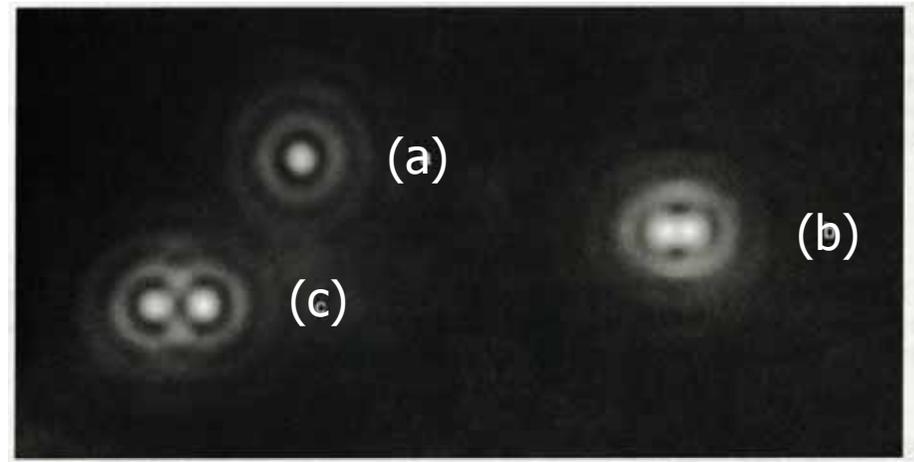
倍率	開口数
x100,	0.95
x60,	1.30

顕微鏡の分解能は、レンズの開口数で決まる。  
対物レンズの倍率ではない！！

# 回折限界近傍でのイメージング



・点を観察したとき  
・レーザー光を集光したとき  
これらはどちらもAiry Diskになる。

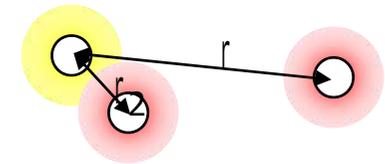
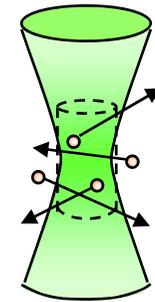
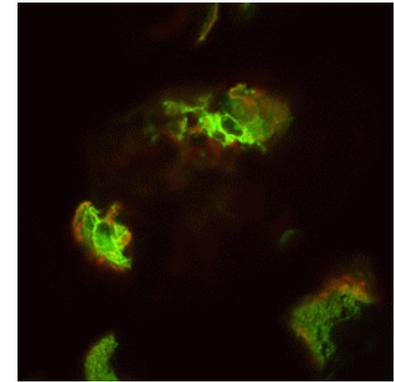
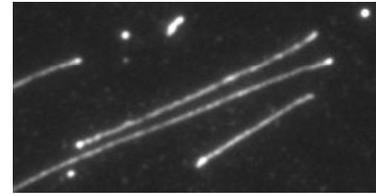


**rは波長500nm、NA=1.2で 250nm になる**

# 先端バイオ計測基礎(杉浦忠男、情報)

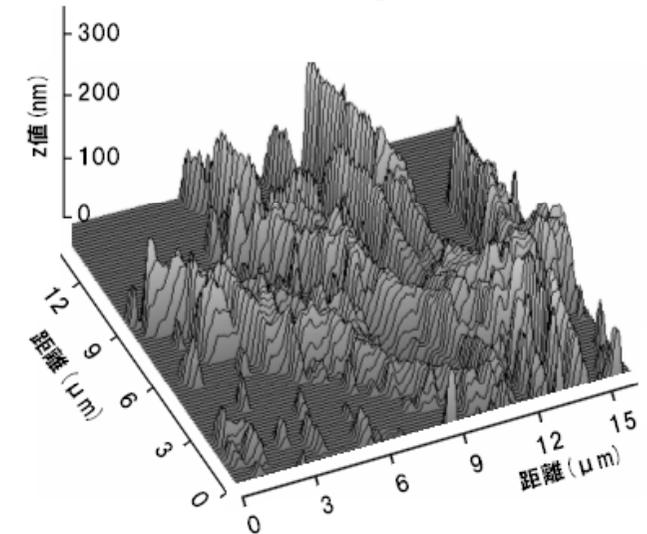
## 1) 先端バイオ計測 - 基礎 -

- ・ バイオ計測とは
- ・ バイオイメージング  
バイオイメージングの基礎  
光学顕微鏡、**蛍光**  
共焦点顕微鏡、二光子顕微鏡
- ・ マイクロマニピュレーション(光ピンセット)  
光ピンセットの基礎

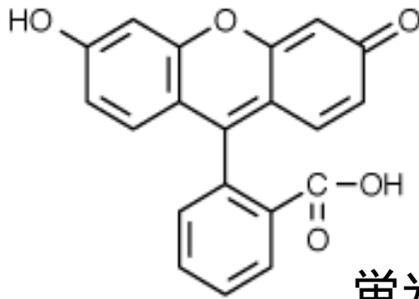


## 2) 先端バイオ計測 - 応用 -

- ・ 一分子計測  
一分子計測の基礎  
一分子イメージング
- ・ 蛍光イメージングを用いた計測  
蛍光共鳴エネルギー移動  
蛍光相関分光法
- ・ 一分子マニピュレーション、力計測



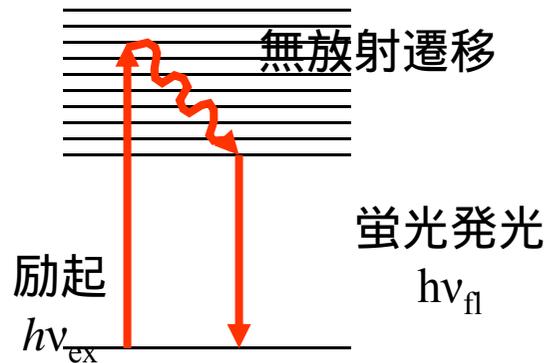
# 蛍光発光の原理



蛍光分子の例

蛍光発光では、

- 1) 蛍光分子が励起光のエネルギーを吸収して、
- 2) 無放射遷移によってエネルギーを失った後、
- 3) 蛍光発光が起こる。



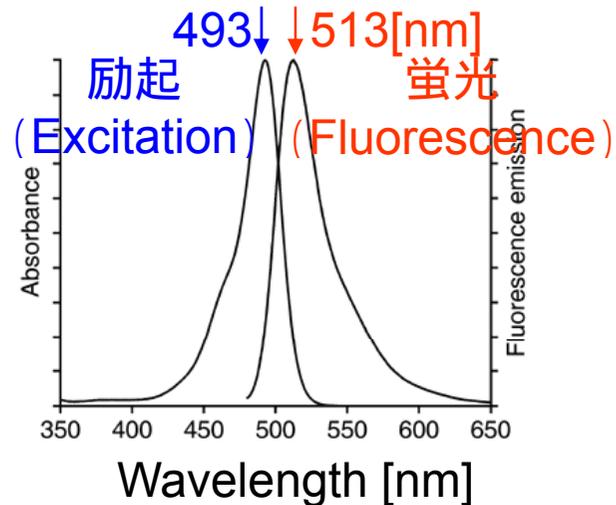
$$\text{励起波長} \lambda_{em} < \text{蛍光波長} \lambda_{ex}$$

$$\text{励起光子} E_{ex} > \text{蛍光光子} E_{fl}$$

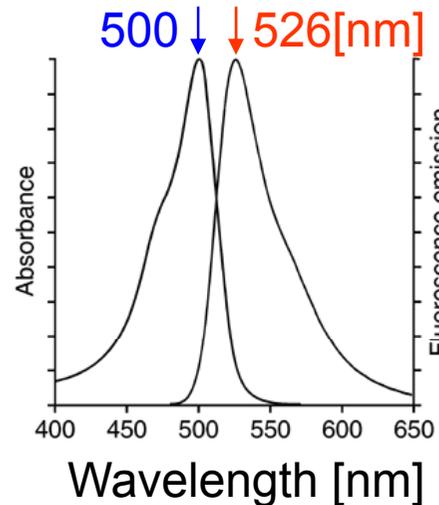
$$h\nu_{ex} > h\nu_{fl}$$

Excitation	励起
Emission	発光
Fluorescence	蛍光

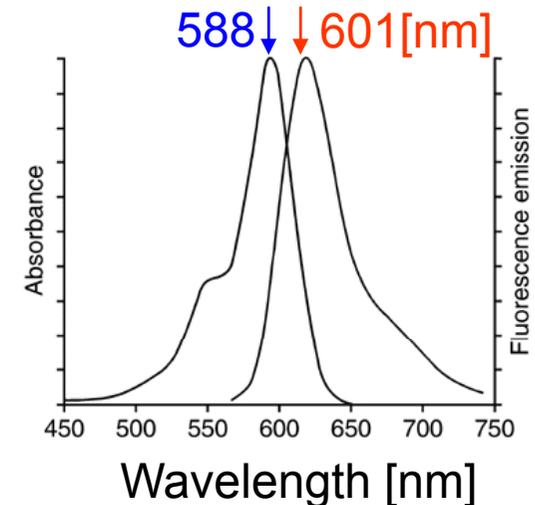
# 蛍光励起と蛍光発光



Fluorescein



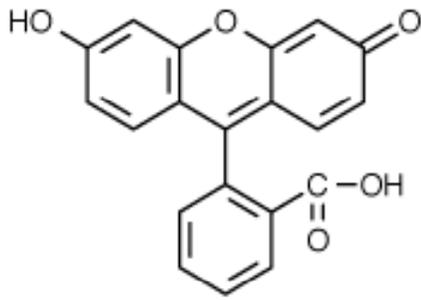
Acridine Orange



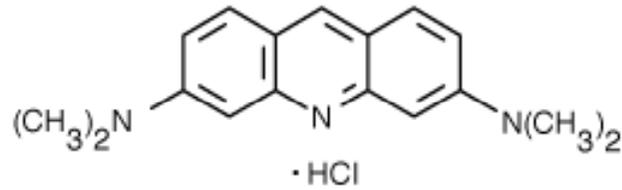
Texas Red

蛍光励起スペクトル、蛍光発光スペクトルは分子ごとに異なる。  
→ 励起スペクトル、蛍光スペクトルから蛍光分子の種類がわかる。

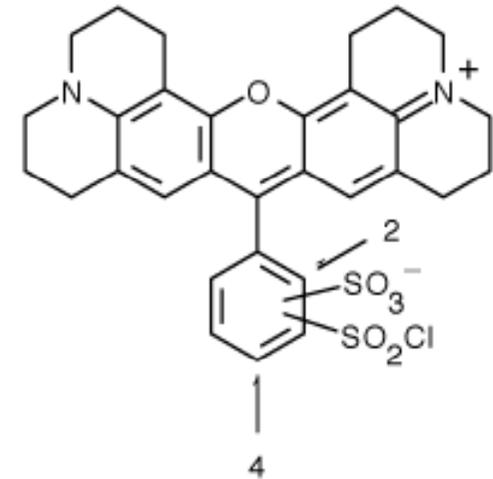
# 蛍光分子の構造



Fluorescein



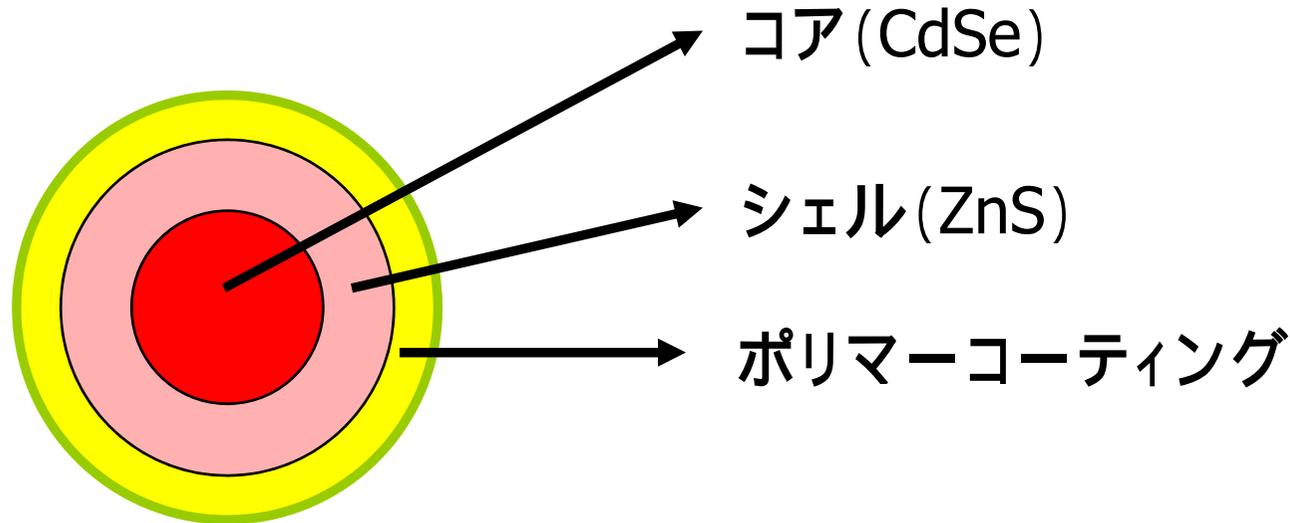
Acridine Orange



Texas Red



## 半導体ナノクリスタル、ナノパーティクル、Qdot



- 直径数nmの半導体素材のコア (CdSe) からなる蛍光プローブ
- 外殻は半導体ZnSがコーティングされている
- **量子サイズ効果**を利用した光学特性
- 表面にアミン基が存在しており、DNAとそこで結合する

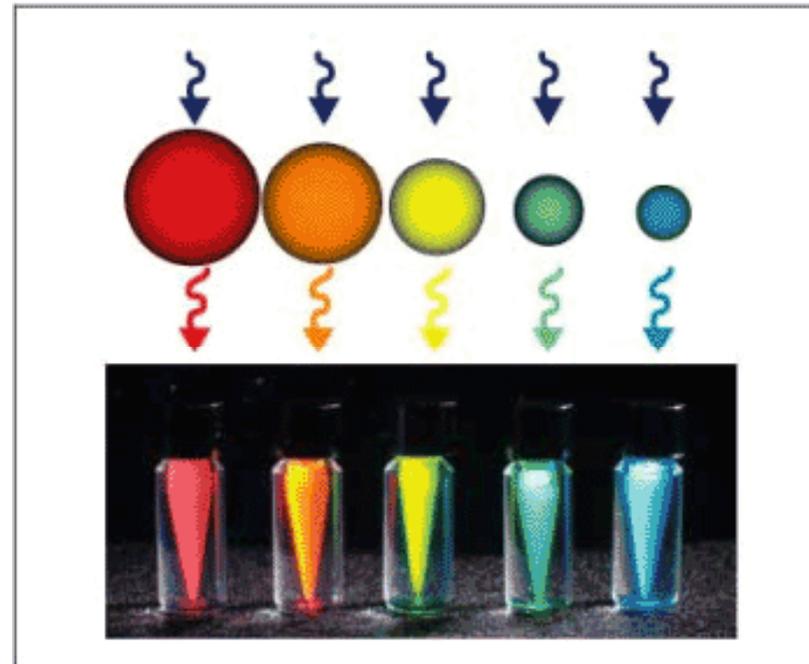
# ナノクリスタルの長所と短所

## 長所

- ・ 従来の蛍光物質と異なり退色が無い
- ・ 粒子の大きさにより発光蛍光スペクトルが異なる
- ・ 生細胞にも用いることができる
- ・ 検出波長がシャープであり、量子効率が高い

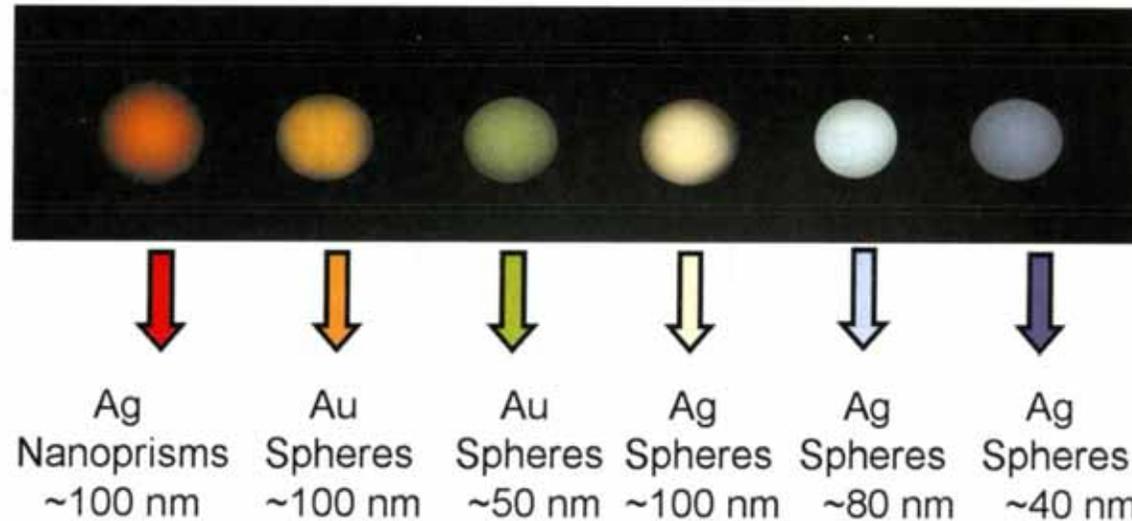
## 短所

- ・ 重金属が含まれている
- ・ 実験機器が有機蛍光分子に対して最適化されている



# ナノ粒子(金属粒子)

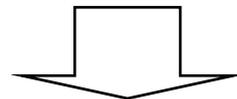
ナノメートルサイズの金属粒子では吸収波長の違いによって色が付く



- ・ミー散乱
- ・レーリー散乱

Fig. 8.8. Scatter of metal nanoparticle, based on particle size, shape and composition of matter. All particles were aqueous suspensions. (Reprinted with permission from [85]. Copyright 2001 American Association for the Advancement of Science)

これらをプローブに用いると色の違いからそれぞれを識別できる



蛍光プローブの代用

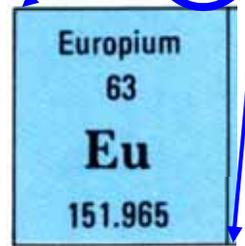
特徴: 蛍光退色が起こらないので、光を照射し続けても大丈夫

# ランタノイド錯体 蛍光分子

Group IA											VIIA	VIII					
Hydrogen 1 H 1.0079											Hydrogen 1 H 1.0079	Helium 2 He 4.0026					
Lithium 3 Li 6.941	Beryllium 4 Be 9.0122											Boron 5 B 10.811	Carbon 6 C 12.011	Nitrogen 7 N 14.0067	Oxygen 8 O 15.9994	Fluorine 9 F 18.9984	Neon 10 Ne 20.1797
Sodium 11 Na 22.9898	Magnesium 12 Mg 24.3050											Aluminum 13 Al 26.9815	Silicon 14 Si 28.0855	Phosphorus 15 P 30.9738	Sulfur 16 S 32.066	Chlorine 17 Cl 35.4527	Argon 18 Ar 39.948
Potassium 19 K 39.0983	Calcium 20 Ca 40.078	Scandium 21 Sc 44.9558	Titanium 22 Ti 47.88	Vanadium 23 V 50.9415	Chromium 24 Cr 51.9961	Manganese 25 Mn 54.9380	Iron 26 Fe 55.847	Cobalt 27 Co 58.9332	Nickel 28 Ni 58.69	Copper 29 Cu 63.546	Zinc 30 Zn 65.39	Gallium 31 Ga 69.723	Germanium 32 Ge 72.61	Arsenic 33 As 74.9216	Selenium 34 Se 78.96	Bromine 35 Br 79.904	Krypton 36 Kr 83.80
Rubidium 37 Rb 85.4678	Strontium 38 Sr 87.62	Yttrium 39 Y 88.9058	Zirconium 40 Zr 91.224	Niobium 41 Nb 92.9064	Molybdenum 42 Mo 95.94	Technetium 43 Tc (98)	Ruthenium 44 Ru 101.07	Rhodium 45 Rh 102.9055	Palladium 46 Pd 106.42	Silver 47 Ag 107.8682	Cadmium 48 Cd 112.411	Indium 49 In 114.82	Tin 50 Sn 118.710	Antimony 51 Sb 121.75	Tellurium 52 Te 127.60	Iodine 53 I 126.9045	Xenon 54 Xe 131.29
Cesium 55 Cs 132.9054	Barium 56 Ba 137.327	Lanthanum 57 *La 138.9055	Hafnium 72 Hf 178.49	Tantalum 73 Ta 180.9478	Tungsten 74 W 183.85	Rhenium 75 Re 186.207	Osmium 76 Os 190.2	Iridium 77 Ir 192.22	Platinum 78 Pt 195.08	Gold 79 Au 196.9665	Mercury 80 Hg 200.59	Thallium 81 Tl 204.3833	Lead 82 Pb 207.2	Bismuth 83 Bi 208.9804	Polonium 84 Po (209)	Astatine 85 At (210)	Radon 86 Rn (222)
Francium 87 Fr (223)	Radium 88 Ra (226)	Lanthanide Series															
		Cerium 58 Ce 140.115	Praseodymium 59 Pr 140.9078	Neodymium 60 Nd 144.24	Promethium 61 Pm (145)	Samarium 62 Sm 150.36	Europium 63 Eu 151.965	Gadolinium 64 Gd 157.25	Terbium 65 Tb 158.9253	Dysprosium 66 Dy 162.50	Holmium 67 Ho 164.9303	Erbium 68 Er 167.26	Thulium 69 Tm 168.9342	Ytterbium 70 Yb 173.04	Lutetium 71 Lu 174.967		

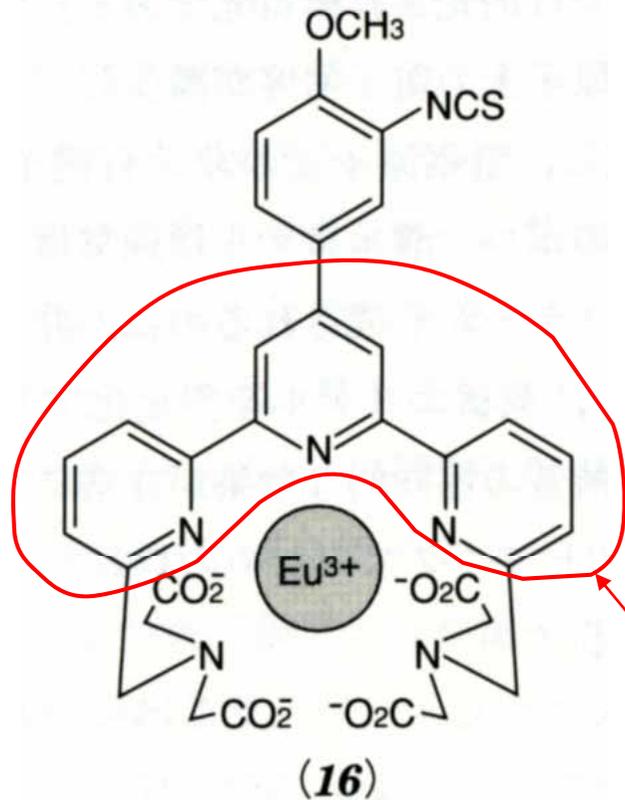
ランタノイド族

ランタノイド族は蛍光を発する原子が多種存在  
 ・テレビのブラウン管の蛍光体  
 ・Nd (ネオジウム)はNd:YAGレーザーの媒質



ユーロピウム

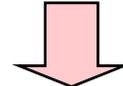
# ランタノイド錯体



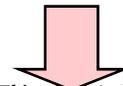
キレート化合物： 金属イオンと配位結合する物質  
配位結合で形成された分子 - > 錯体

- ・ 蛍光寿命がミリ秒オーダーと非常に長い  
- > 励起とタイミングをずらせて検出可能
- ・ 半値幅10nm以下のスパイク状発光スペクトル  
- > 分子識別能を持たせられる
- ・ 150nm以上のストークスシフト  
- > 励起光との分離が容易
- ・ 量子収率 ~ 1 > 高い発光効率
- ・ 優れた溶解性

この部分で光を受ける (感光部位)



吸収された光エネルギーは $\text{Eu}^{3+}$ に速やかに渡される



蛍光発光が起こる

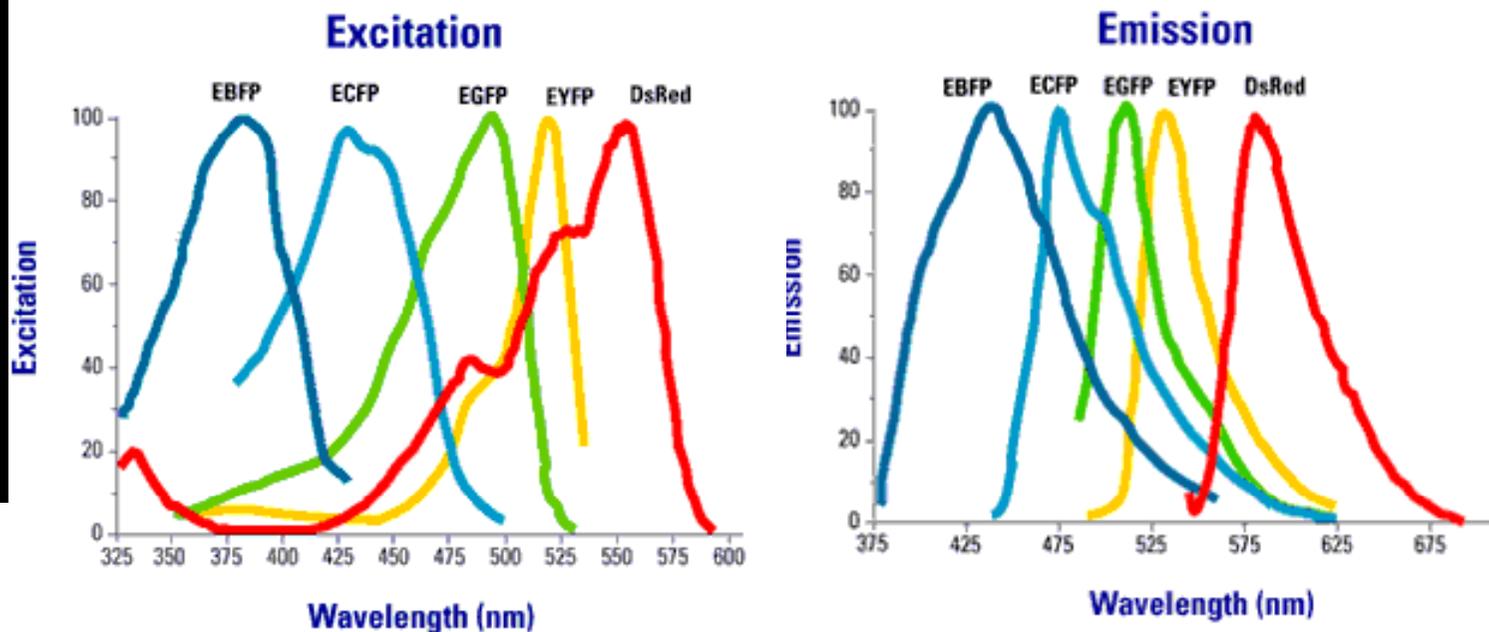
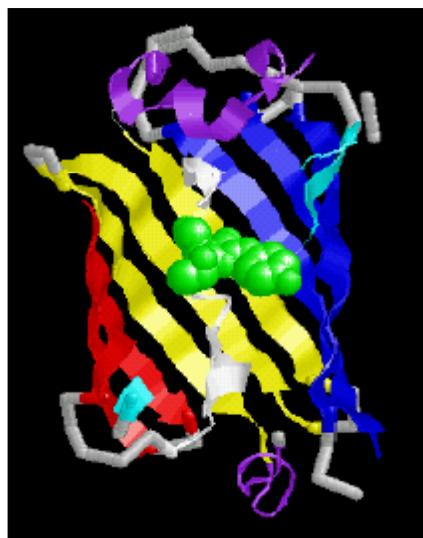
# 蛍光性タンパク質

## GFP (Green Fluorescent Protein)

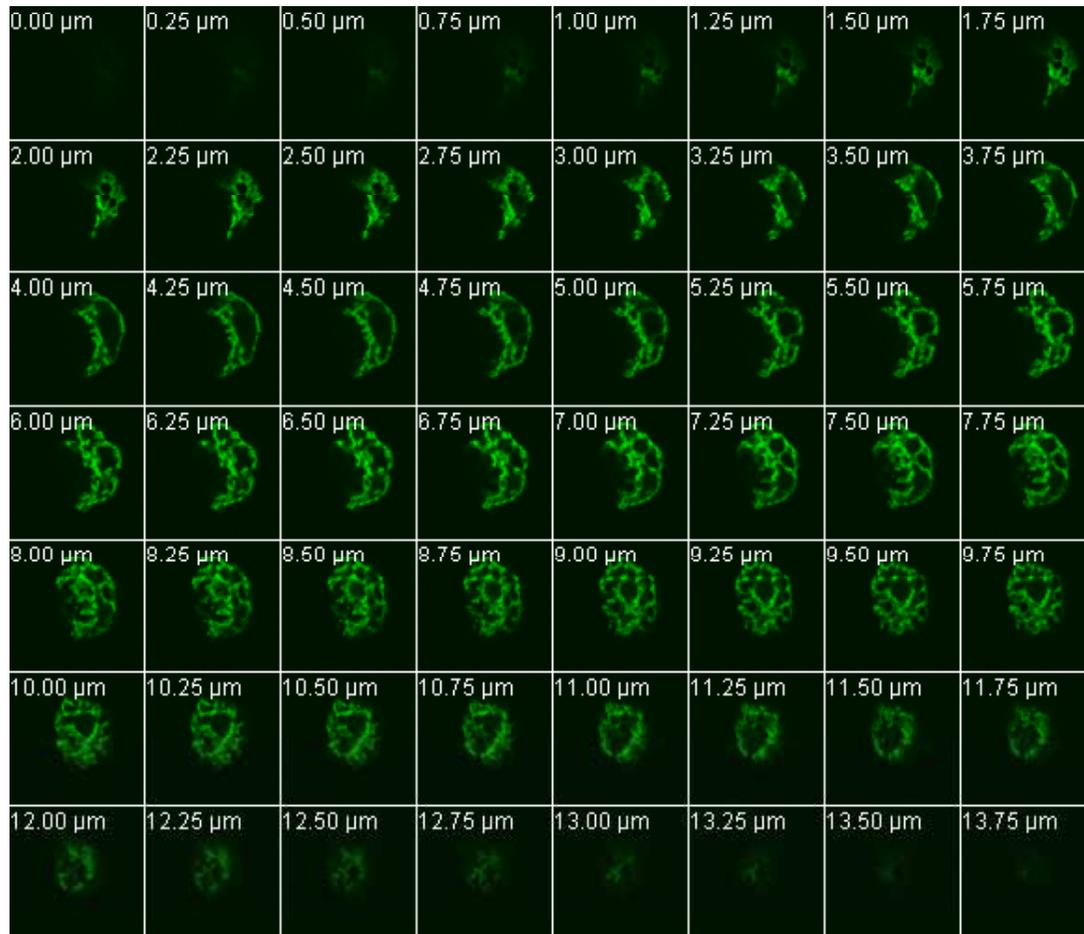
GFPは238個のアミノ酸から構成されるタンパク質

1	MSKGEELFTG	VVPILVELDG	DVNGHKFSVS	GELEGDATYG	KLTLKFICTT
51	GKLPVPWPTL	VTFFSYGVQC	FSRYPDHMKQ	HDFFKSAMPE	GYVQERTIFY
101	KDDGNYKSRA	EVKFEGDTLV	NRIELKGIDF	KEDGNILGHK	MEYNYNSHNV
151	YIMADKQKNG	IKVNFKIRHN	IEDGSVQLAD	HYQQNTPIGD	GPVLLPDNHY
201	LSTQSALSKD	PNEKRDHMIL	LEFVTAAGIT	HGMDELYK*	

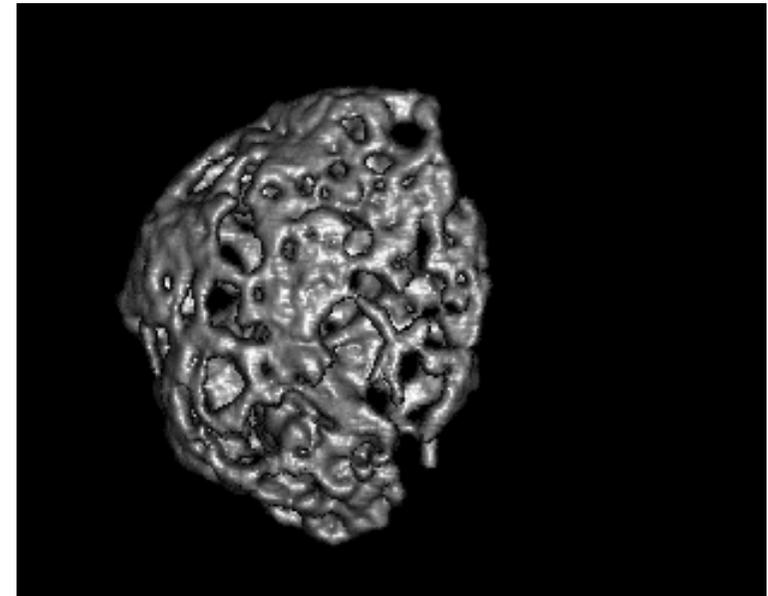
Clontech, Inc.



## Optical Sectioning の例



Apoptotic nucleus from an HT1080 cell expressing H2B Histone-GFP fusion protein

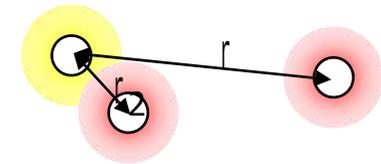
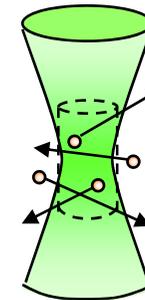
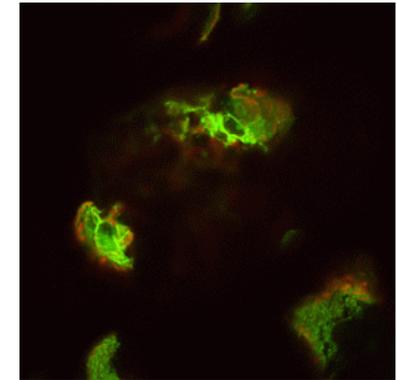
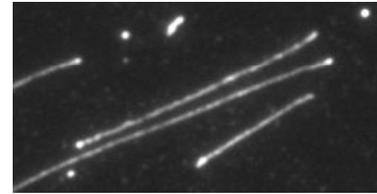


← 0.25μm間隔のスライス

# 先端バイオ計測基礎(杉浦忠男、情報)

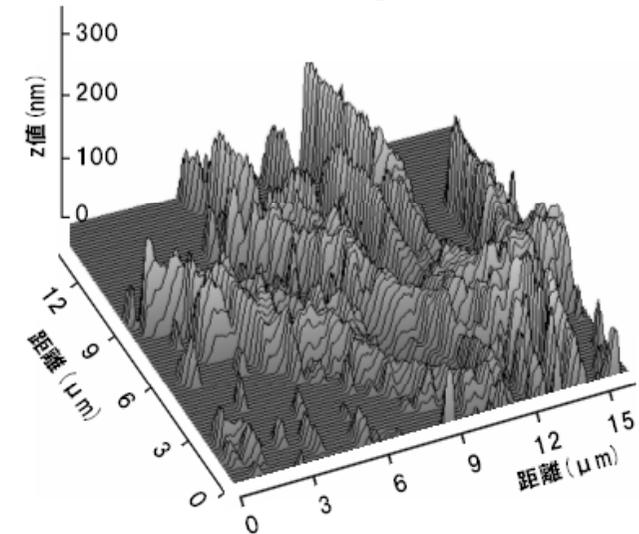
## 1) 先端バイオ計測 - 基礎 -

- ・ バイオ計測とは
- ・ バイオイメージング  
バイオイメージングの基礎  
光学顕微鏡、蛍光  
**共焦点顕微鏡、二光子顕微鏡**
- ・ マイクロマニピュレーション(光ピンセット)  
光ピンセットの基礎

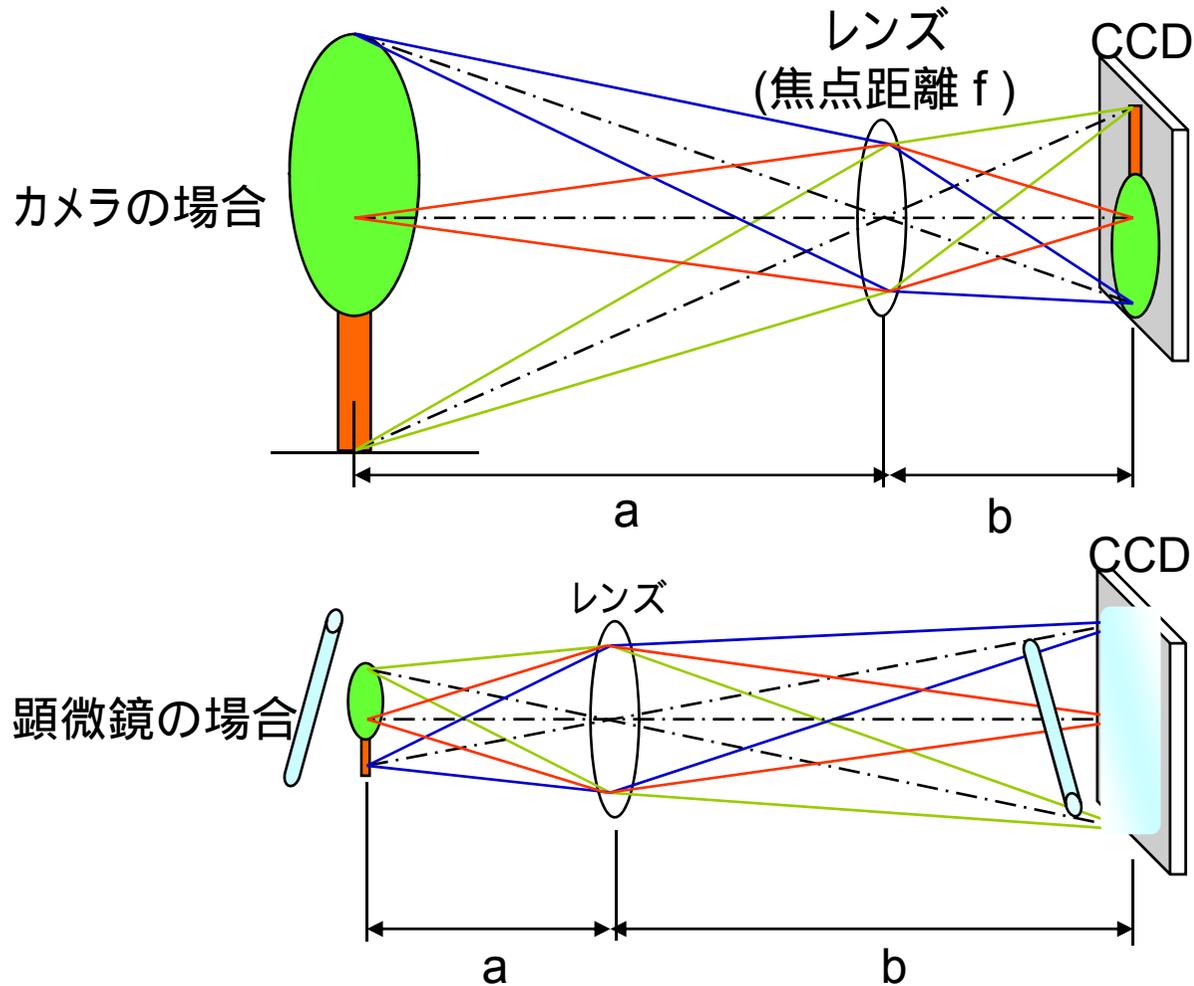


## 2) 先端バイオ計測 - 応用 -

- ・ 一分子計測  
一分子計測の基礎  
一分子イメージング
- ・ 蛍光イメージングを用いた計測  
蛍光共鳴エネルギー移動  
蛍光相関分光法
- ・ 一分子マニピュレーション、力計測



# レンズによる結像 ボケ画像の重なり



レンズで結像すると、

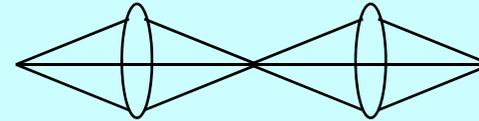
$$\frac{1}{a} + \frac{1}{b} = \frac{1}{f}$$

が成り立つ。

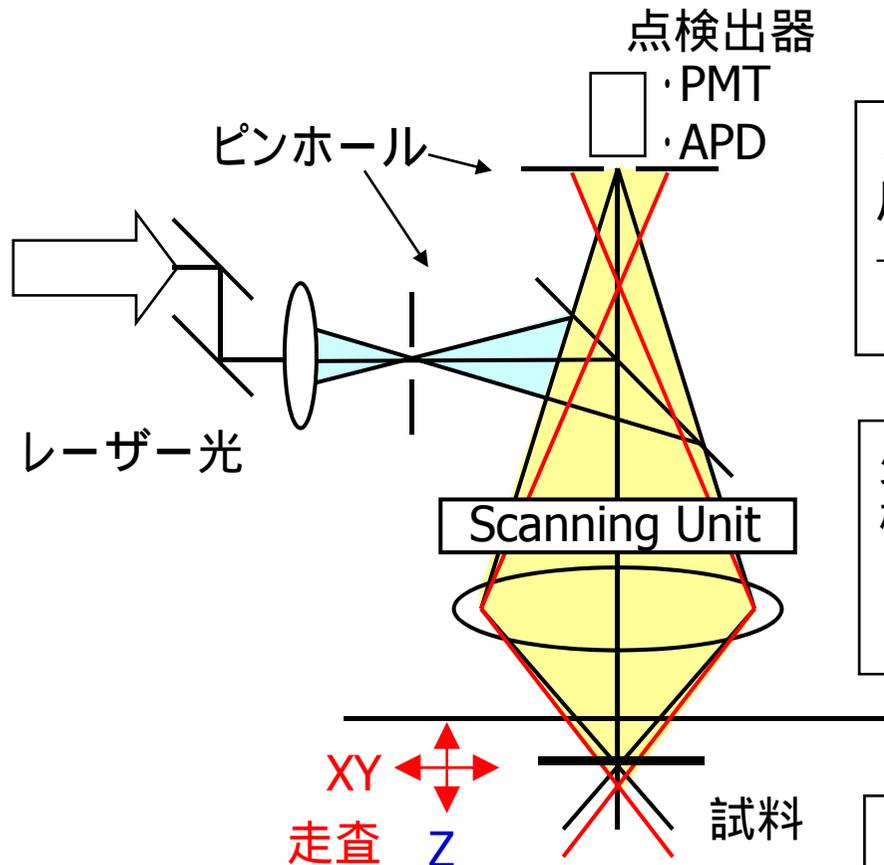
倍率:  $\frac{b}{a}$

# 共焦点レーザー走査顕微鏡

Confocal Laser Scanning Microscope



共焦点光学系 (Confocal Optics)



レーザー光を一点に集光して試料を照明し、戻ってきた光をピンホールを通して検出する。  
→ 画像を得るには測定場所を移動させる (走査型)

少しピントが外れたところから戻ってきた光は検出器に入らない  
→ スライス像を取得可能  
→ ピンぼけしない、奥行き分解能

微弱光検出器  
PMT: 光電子増倍管 (Photo Multiplier Tube)  
APD: Avalanche Photo Diode

# スポット付近の光強度分布

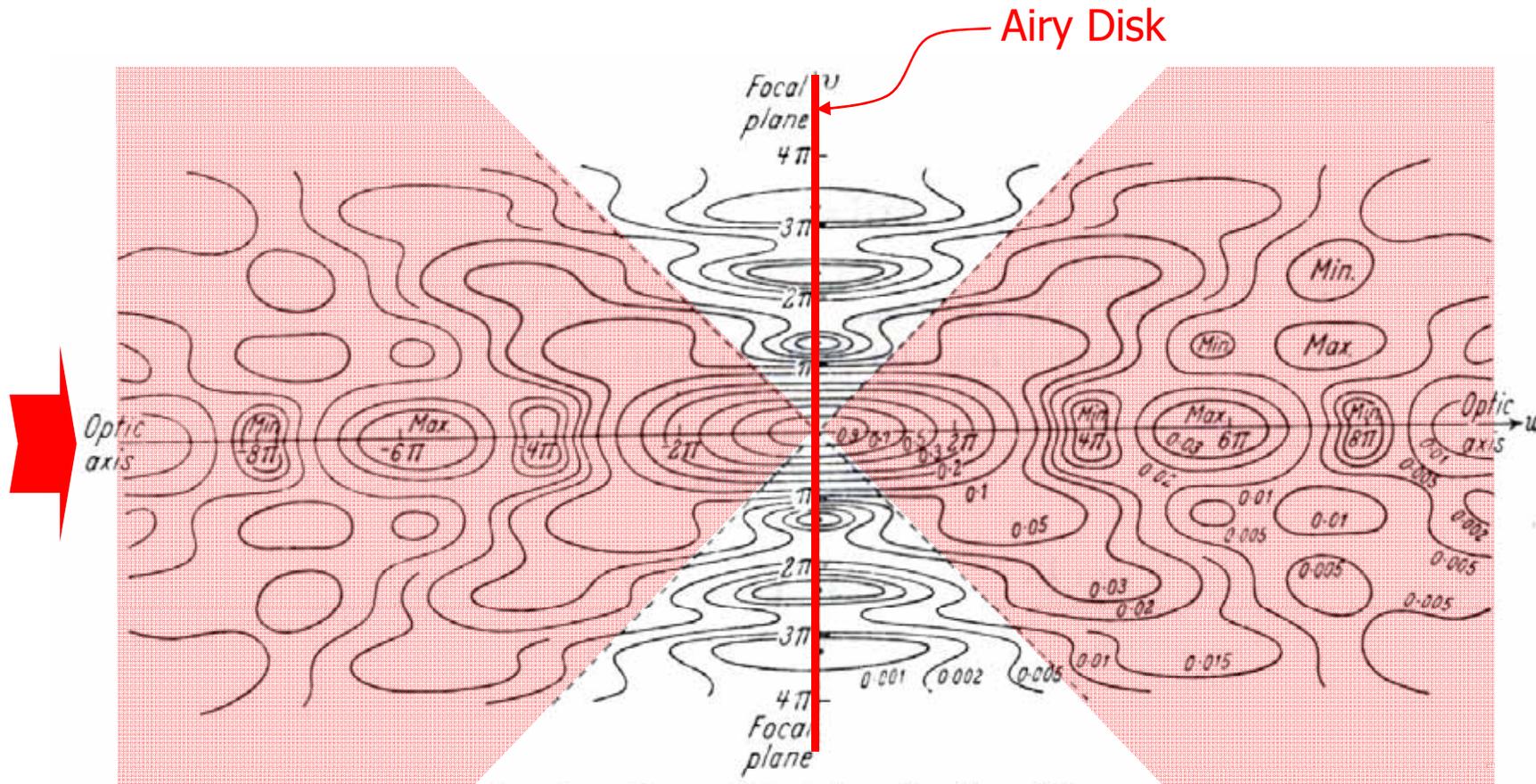


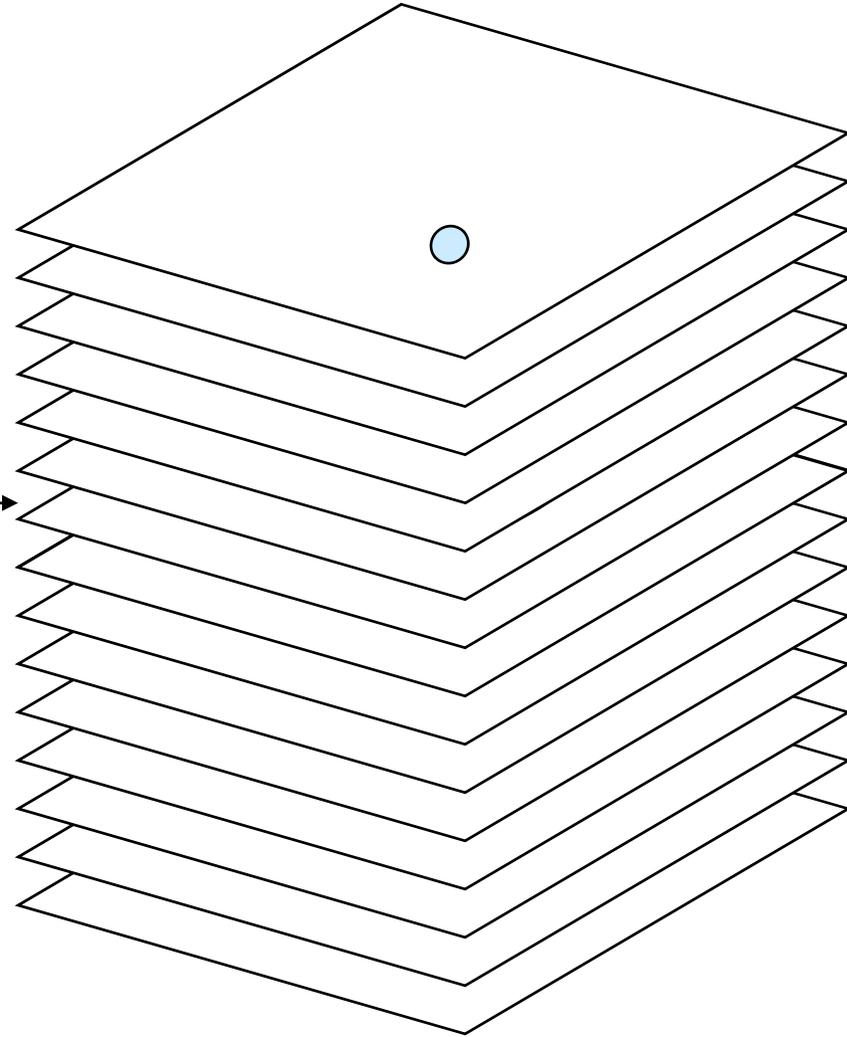
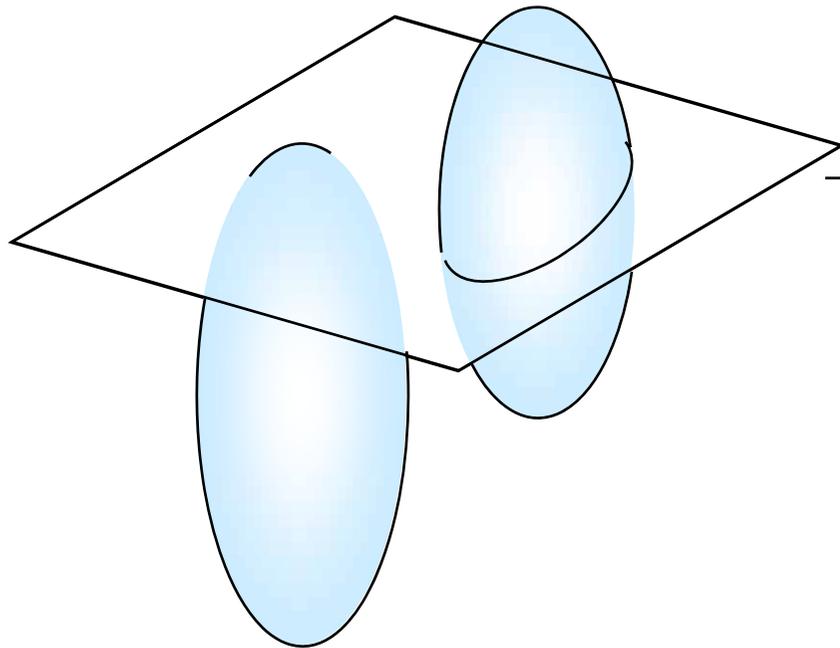
Fig. 8.41. Isophotes [contour lines of the intensity  $I(u, v)$ ] in a meridional plane near focus of a converging spherical wave diffracted at a circular aperture. The intensity is normalized to unity at focus. The dotted lines represent the boundary of the geometrical shadow. When the figure is rotated about the  $u$ -axis, the minima on the  $v$ -axis generate the AIRY dark rings.

(Adapted from E. H. LINFOOT and E. WOLF, *Proc. Phys. Soc.*, B, **69** (1956), 823.)

# 3次元画像

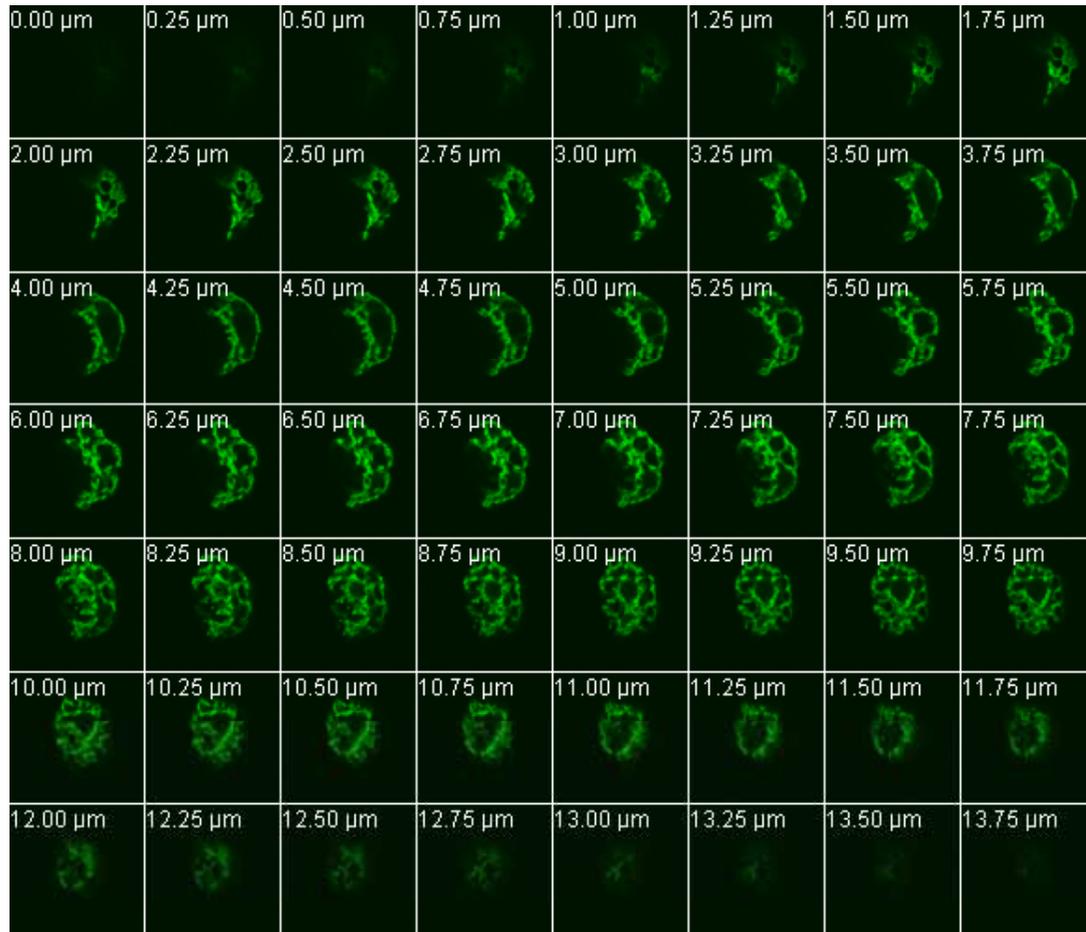
共焦点顕微鏡ではスライス像が取得できるので、それをスタック(積み重ね)すれば物体の3次元形状が分かる。

1枚のスライス像

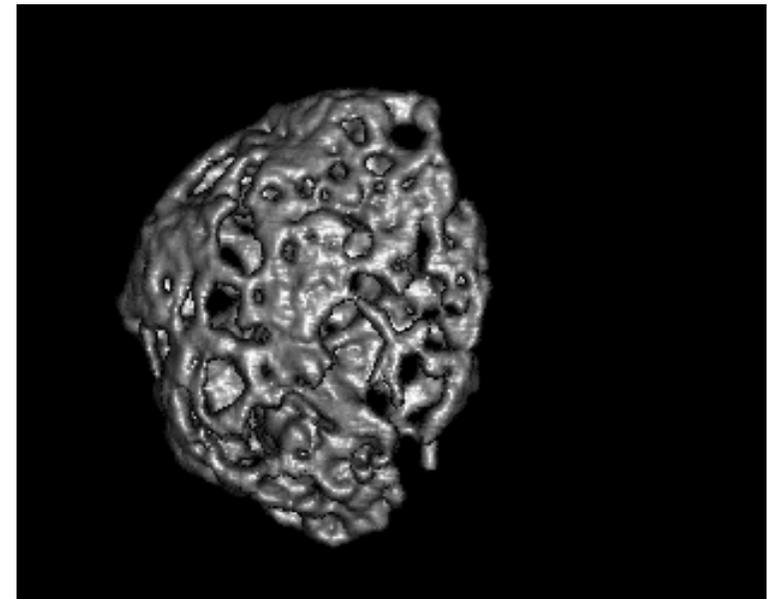


画像のスタックで3次元形状が分かる

# Optical Sectioning の例



Apoptotic nucleus from an HT1080 cell expressing H2B Histone-GFP fusion protein



← 0.25μm間隔のスライス

## 共焦点顕微鏡と通常の顕微鏡の比較

### ・共焦点顕微鏡

ある面のみをスライスして観察できる。

→ 他の面の情報が像に重なってこない

断層像や三次元形状を再構築できる。

× 走査するのに時間が掛かる

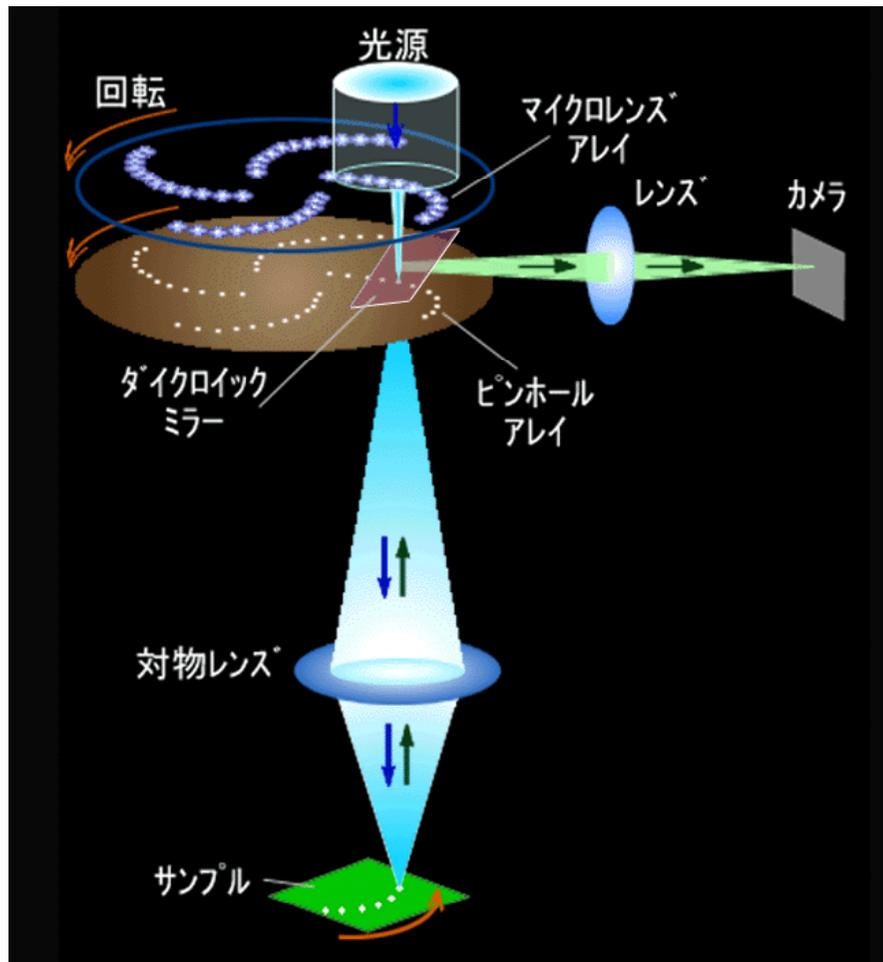
### ・通常の顕微鏡

一度に画像が取れる → 高速での観察が可能

× 見ている面と違う面にある構造がボケとなって像にのる

面内の分解能は基本的に変わらない  
(観測波長と対物レンズの開口数で決まる)

# 高速走査可能な共焦点レーザー走査顕微鏡

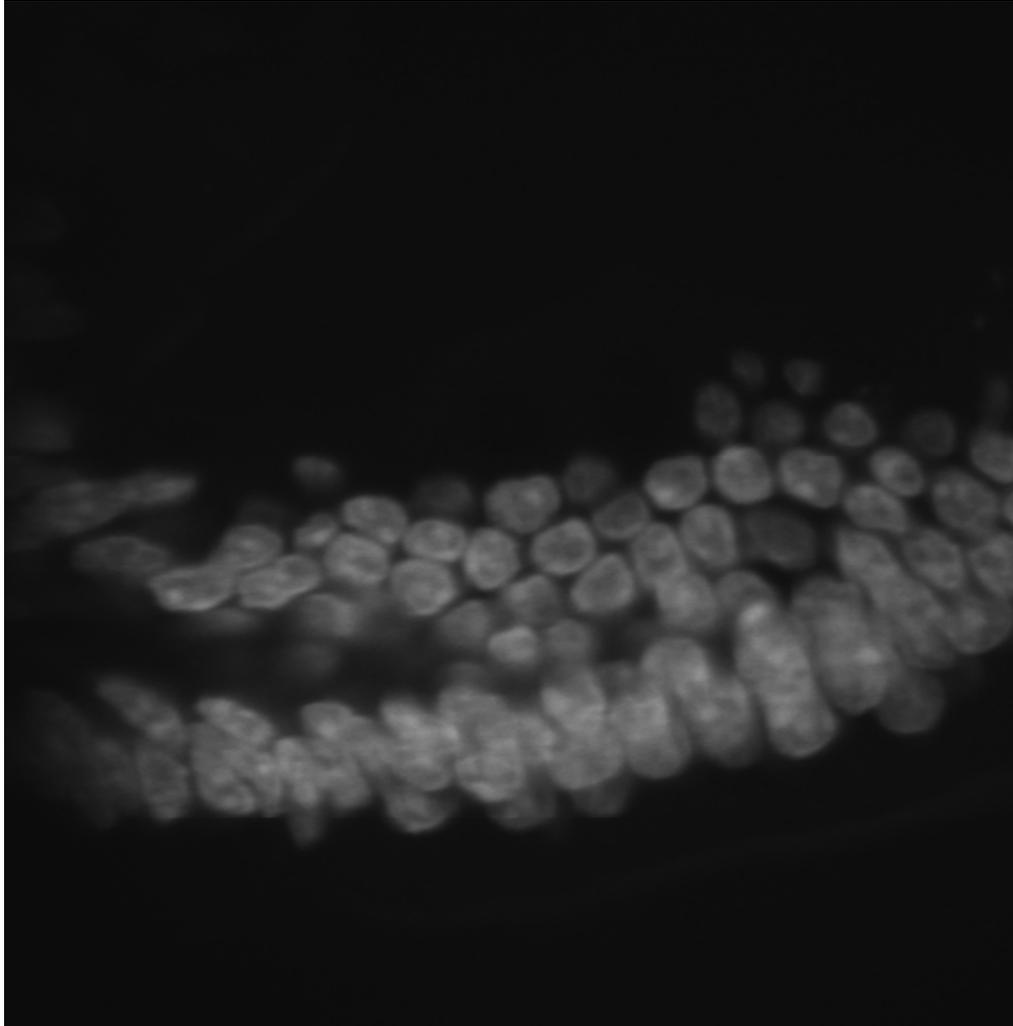


光源からの光をピンホールアレイ(ニポウディスク)に通してサンプルを照明し、戻り光をピンホールを通して検出する。

- ・走査速度 大
- ・同時に複数の点を観察できる
- ・肉眼でも共焦点像が観察可能

実時間観察(フレームレート30分の1秒)で観察可能

# 共焦点顕微鏡によるマルチスライス像



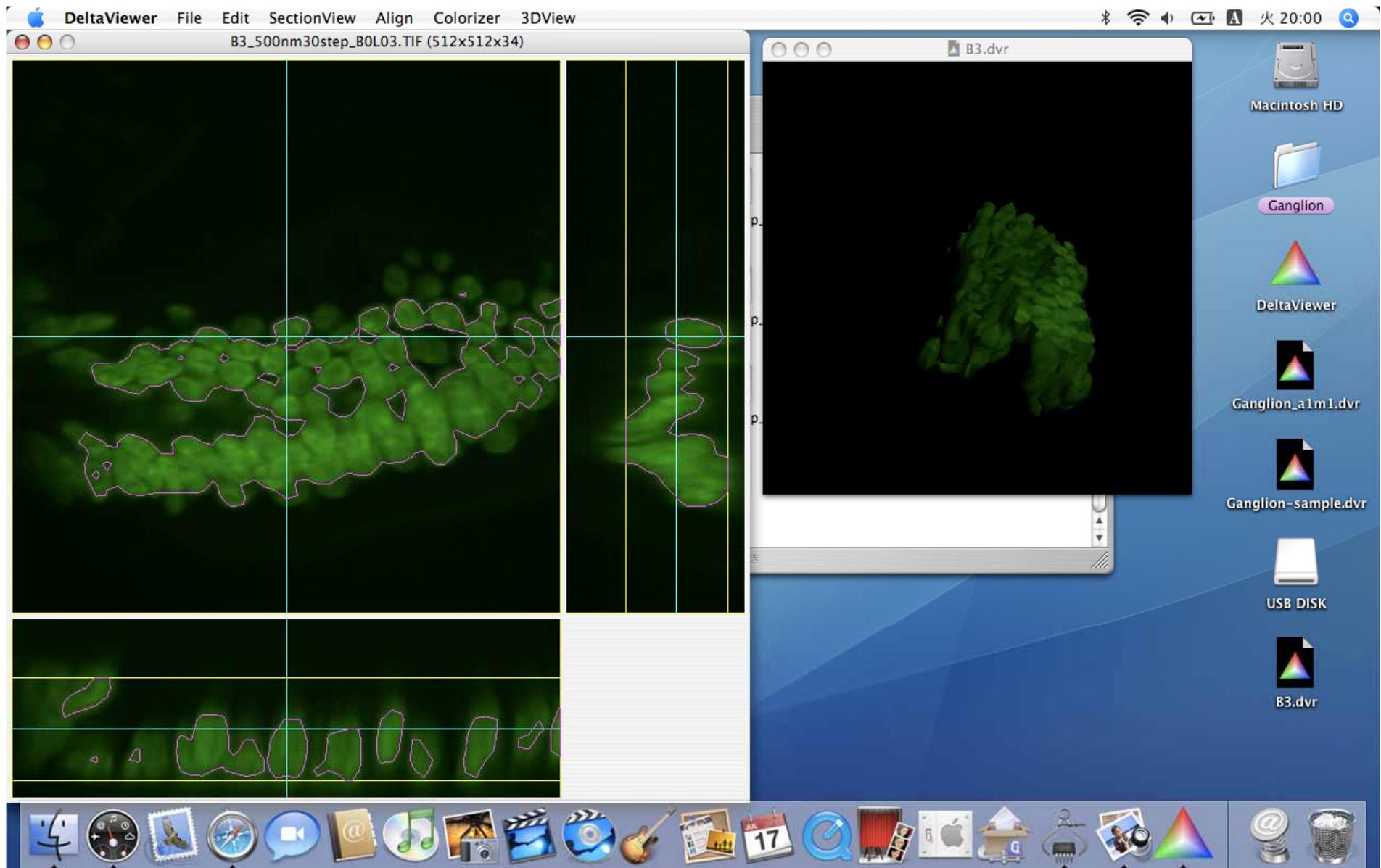
サンプル: マウス小腸スライス

スライス間隔 $0.5\mu\text{m}$ で撮影

細胞中のDNAが蛍光発光

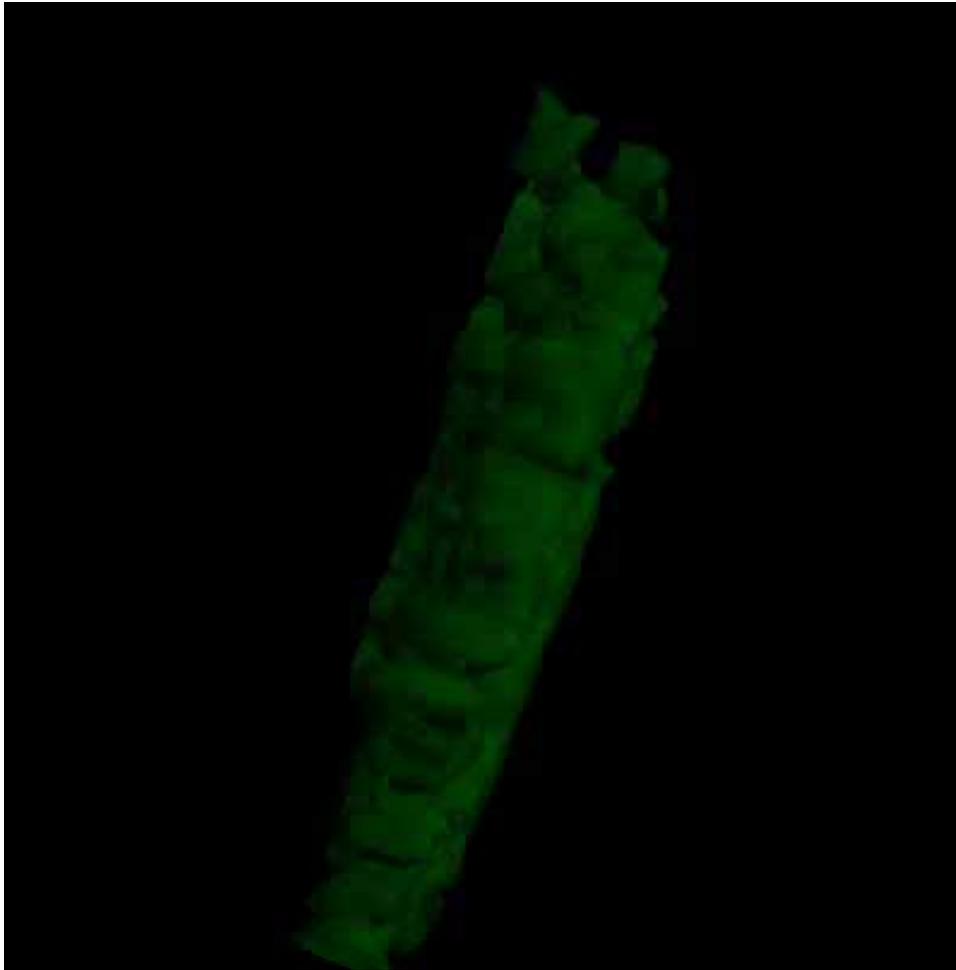
$75\times 75\mu\text{m}$

# DeltaViewerによるレンダリング



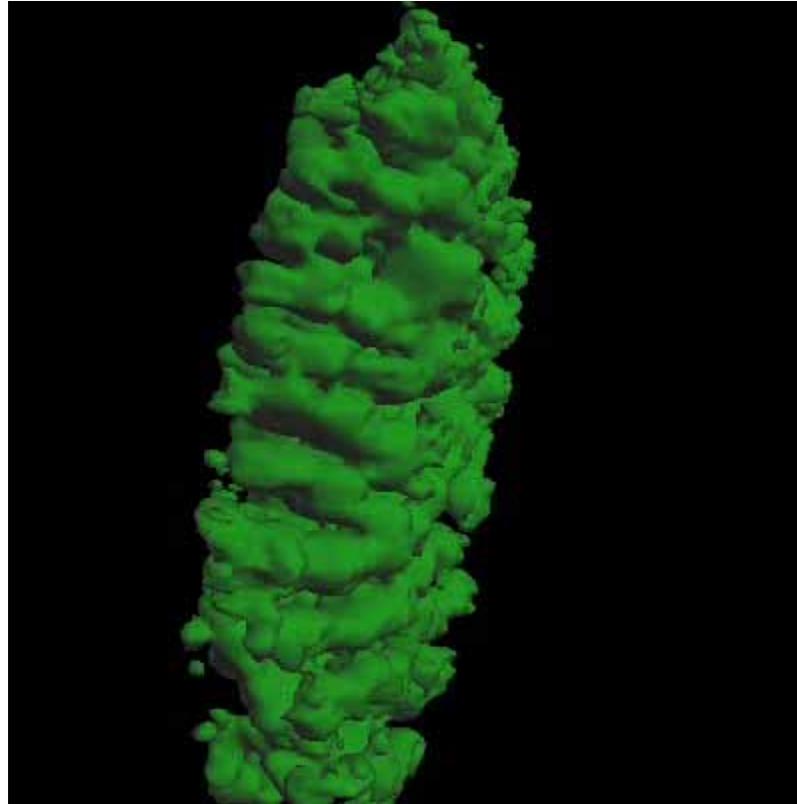
## 三次元再構成結果の一例

サンプル: マウス小腸スライス



75x75 $\mu$ m

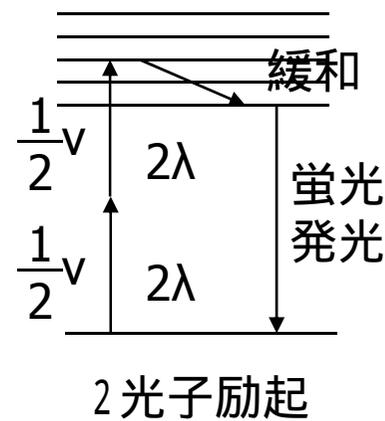
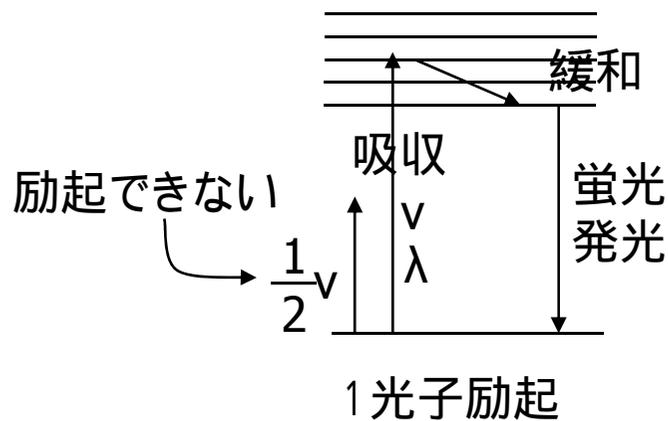
## 三次元再構成結果(マウス小腸)



75x75 $\mu$ m

## 2光子励起共焦点蛍光顕微鏡

- エネルギーの高いレーザー光を用いると蛍光分子が同時に2個の光子を吸収する現象が起きる
  - > 2光子吸収、2光子励起



$$\nu: \text{振動数} \quad \lambda = \frac{c}{\nu}$$

$$\lambda_2 = 2\lambda$$

非線形光学効果

1光子励起では、

- ・励起波長は吸収波長
- ・弱くても蛍光励起可能
- ・発光強度は強度に比例

P I

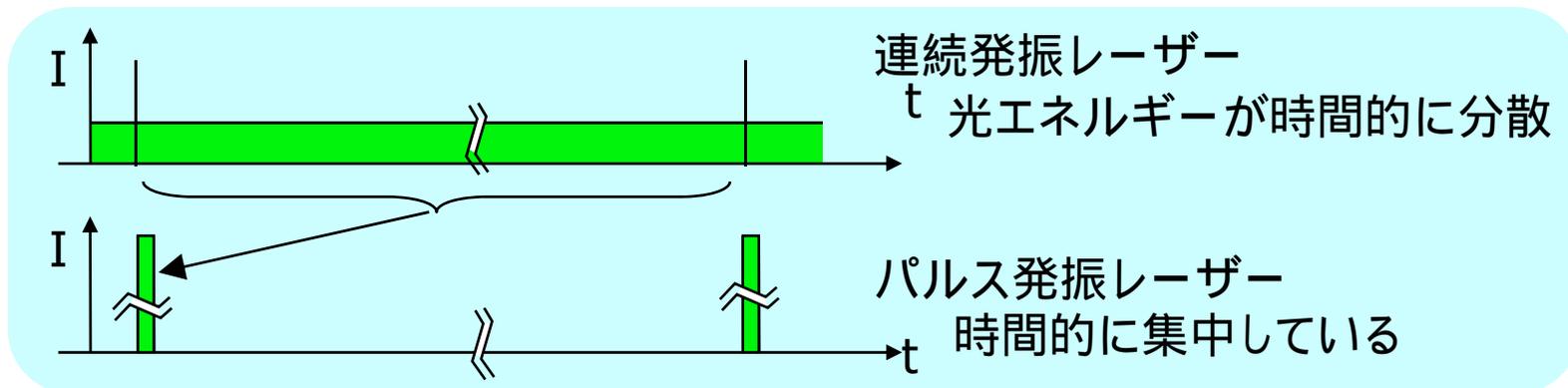
2光子励起では、

- ・励起波長は吸収波長の2倍(振動数1/2)
- ・瞬間的エネルギー密度 大 でのみ起こる
- ・蛍光励起確率がエネルギー密度の2乗に比例

P I<sup>2</sup>

## レーザーの特徴 - エネルギー密度が高い

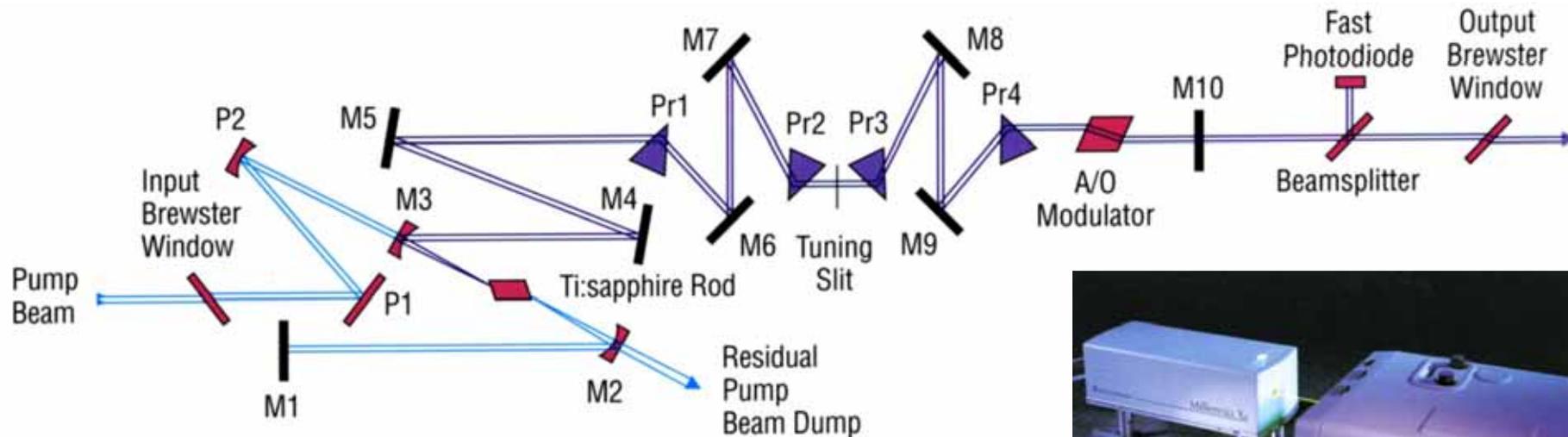
- 小さいスポットにまで集光できる (指向性が高いことに対応)
  - 回折限界まで集光できる
- 短いパルスの光を作ることができる
  - 最短は 4 fs。 1 fs =  $10^{-15}$ s
  - ns, ps オーダーのレーザーなら容易に入手可能。10 fsも市販。
- 短いパルスの瞬間的なエネルギー密度は大きい



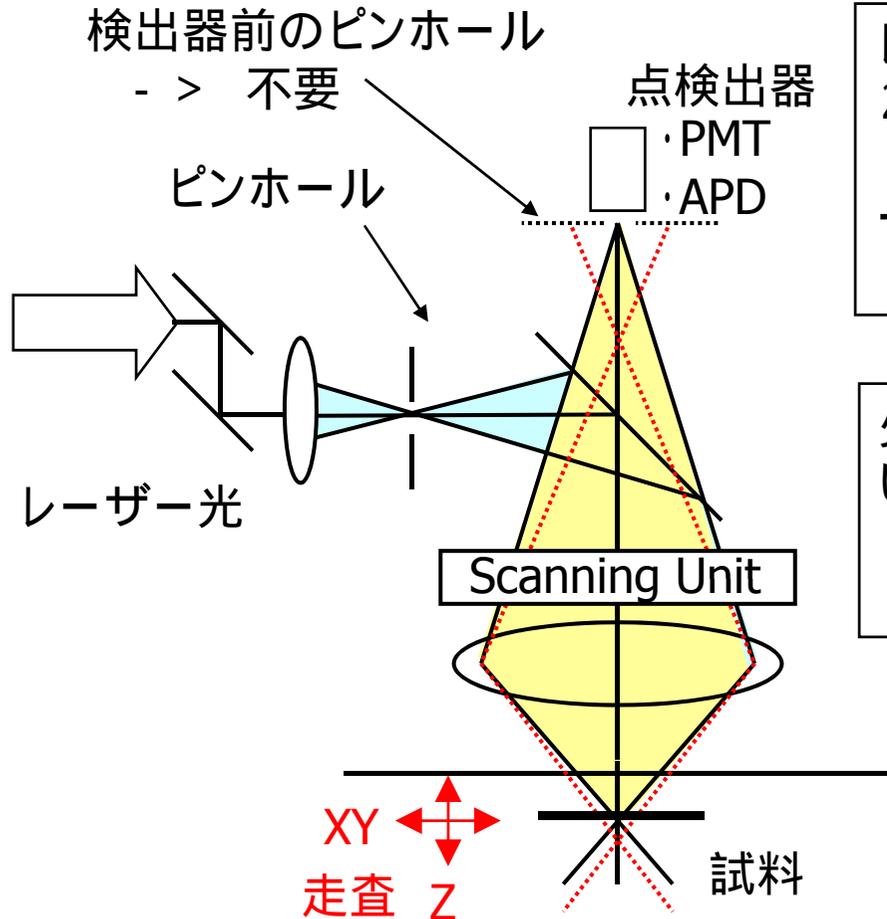
- 高いエネルギー密度を使った応用もある  
レーザー誘起ブレイクダウン、レーザーアブレーション

# Ti: Sapphire レーザー

- fs オーダーのパルス光を発生するレーザー
  - Typical: パルス幅 80fs、繰り返し周波数: 80MHz  
平均出力 ~1W
- レーザーでレーザーを励起して発振させる
- 波長可変 可変域680nm ~ 950nm(参考値)



## 2 光子励起共焦点蛍光顕微鏡の構成



レーザー光を一点に集光して試料を照明し、  
2光子励起で蛍光を発光させ、検出器で受光

-> レーザー光が照射されたところのみ蛍光  
励起されて発光が起こる ( $P \propto I^2$ )

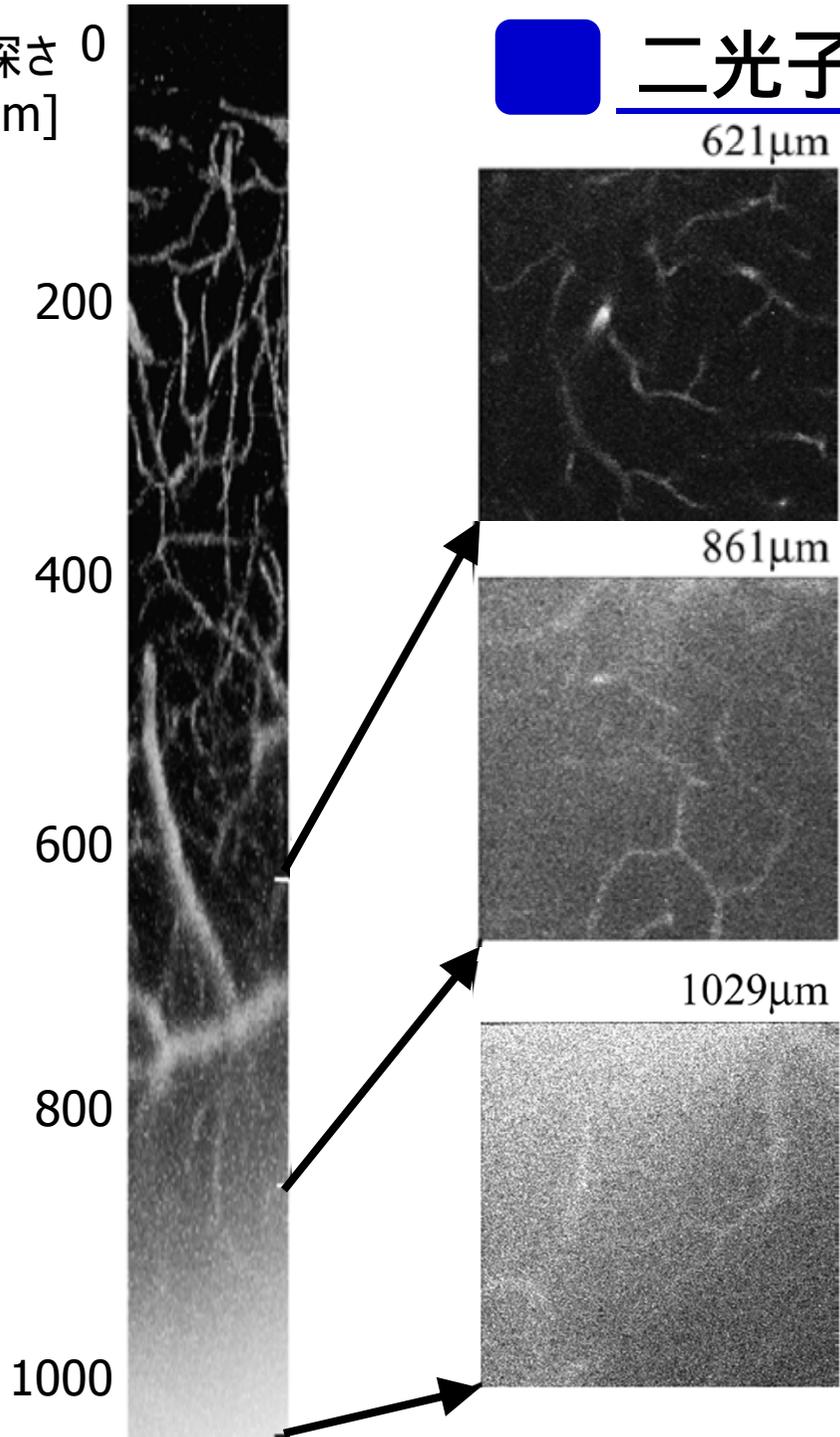
少しピントが外れたところでは蛍光励起されな  
い

スライス像を取得可能  
ピンぼけしない、奥行き分解能

長い波長の光を使うので、組織など  
強散乱性試料中も観察可能になる  
-> 脳神経回路網の観察に使用

ピンホールが不要なので検出面積を大きくできる -> SN比大幅改善

表面からの深さ 0  
[ $\mu\text{m}$ ]



## 二光子顕微鏡による観察結果

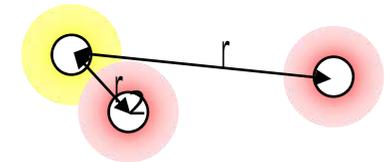
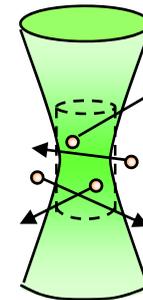
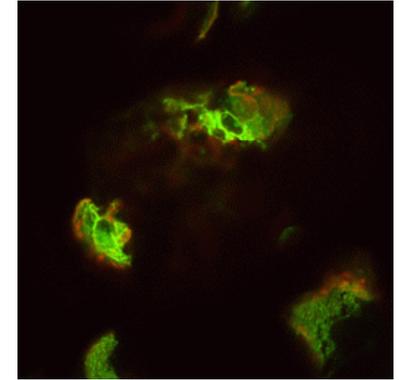
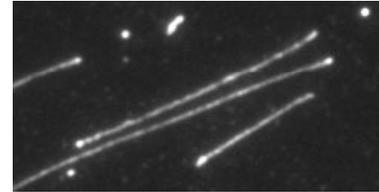
Denk, Opt. Lett. (2003).

マウスの脳組織中の血管を  
イメージングした結果

# 先端バイオ計測基礎(杉浦忠男、情報)

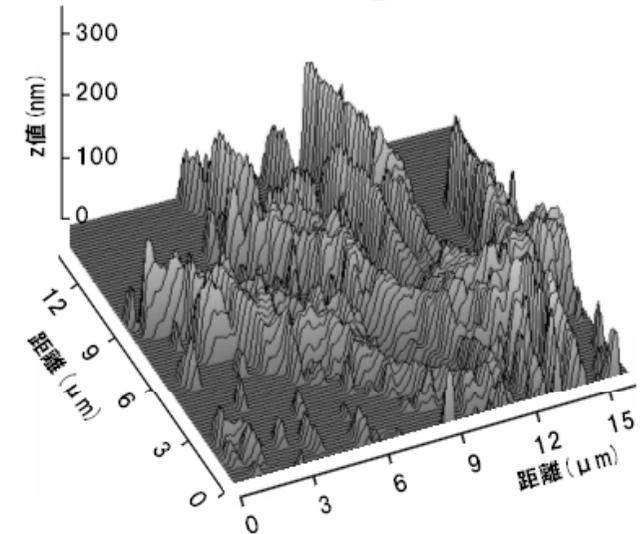
## 1) 先端バイオ計測 - 基礎 -

- ・ バイオ計測とは
- ・ バイオイメージング  
バイオイメージングの基礎
- ・ **マイクロマニピュレーション(光ピンセット)**  
**光ピンセットの基礎**  
**放射圧の発生**  
**Optical Levitation**  
**Laser Trapping**



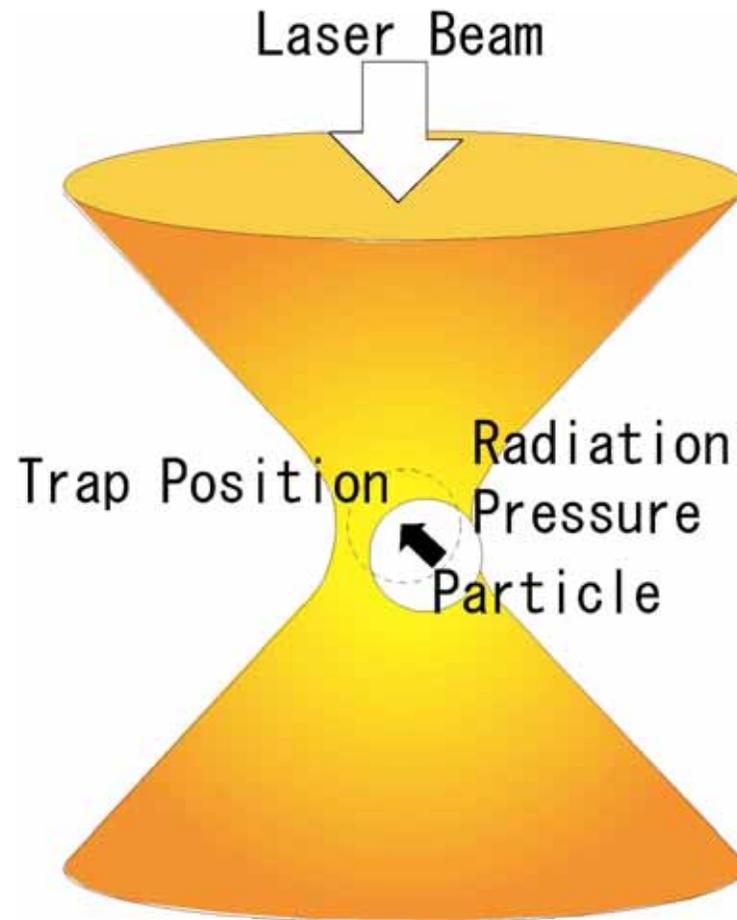
## 2) 先端バイオ計測 - 応用 -

- ・ 一分子計測  
一分子計測の基礎  
一分子イメージング
- ・ 蛍光イメージングを用いた計測  
蛍光共鳴エネルギー移動  
蛍光相関分光法
- ・ 一分子マニピュレーション、力計測



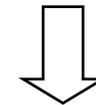
# レーザートラッピング、光ピンセット (Optical Tweezers)

光の放射圧で微粒子を捕捉して操作する技術

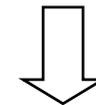


Particle: 40nm to 10 $\mu$ m)

Radiation Pressure by Laser

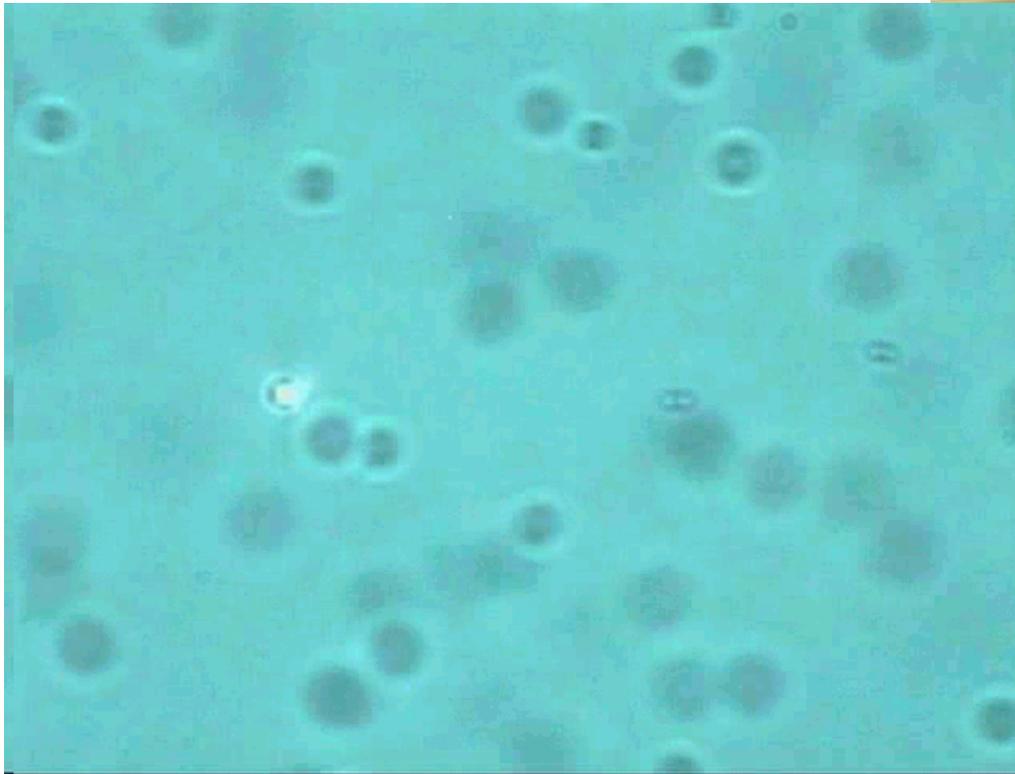


Trapped at Beam Spot  
(Optical Tweezers)



Manipulation of a Cell etc.  
under Microscope

# 光ピンセットによる操作



粒子: ポリスチレンラテックス  
水中に分散  
粒径:  $1\mu\text{m}$

# 放射圧の発生

$$\vec{p} = \hbar \vec{k} \quad p: \text{フォトンの運動量}$$

$$\text{運動量保存則} \\ \Delta \vec{p} = \vec{p}' - \vec{p} = -\vec{F}$$

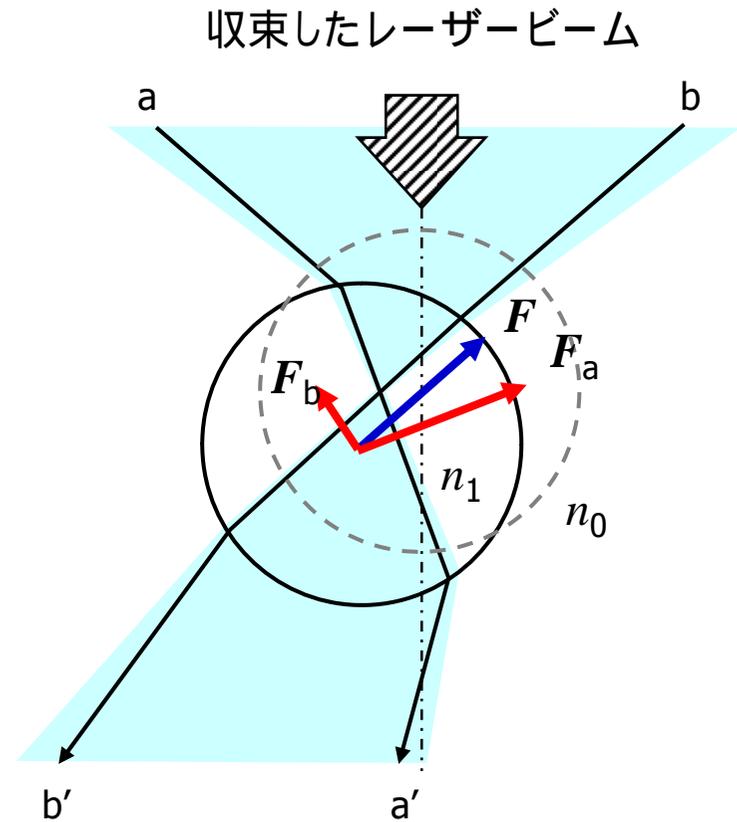
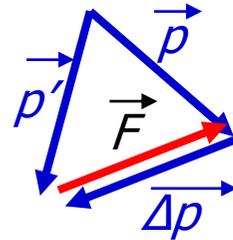
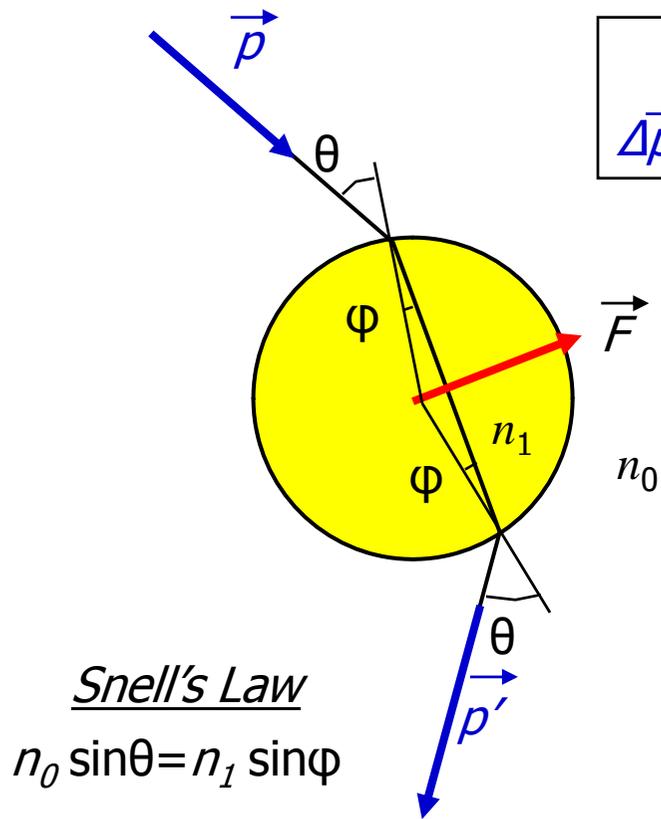
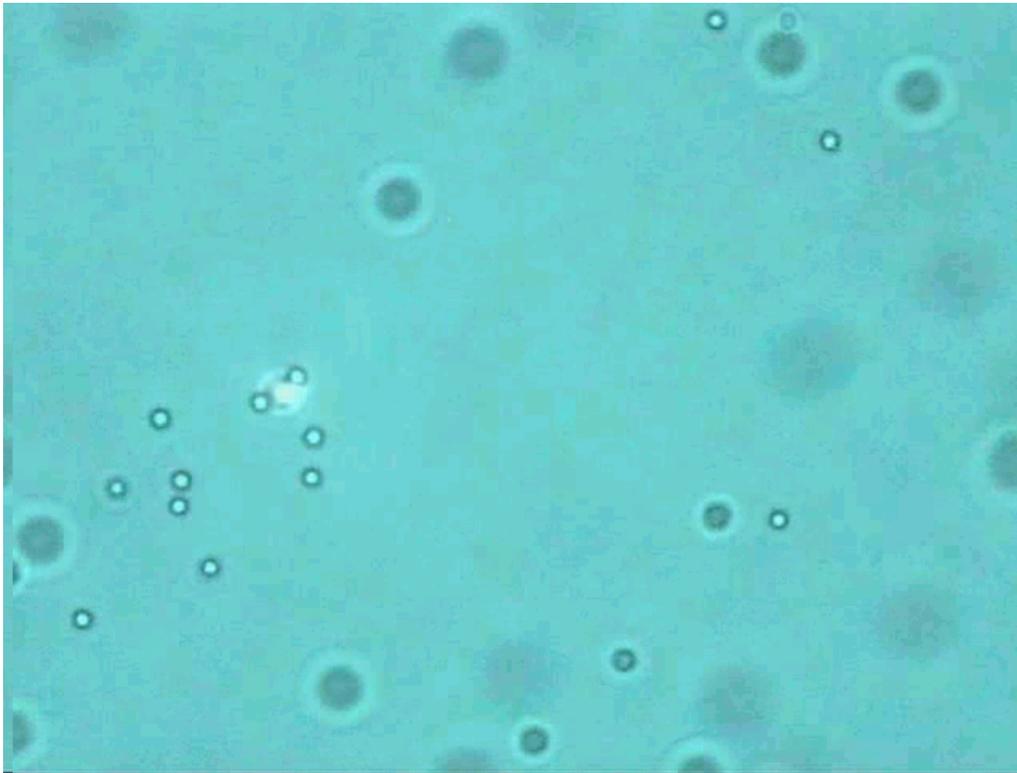


図1 光トラップの原理図

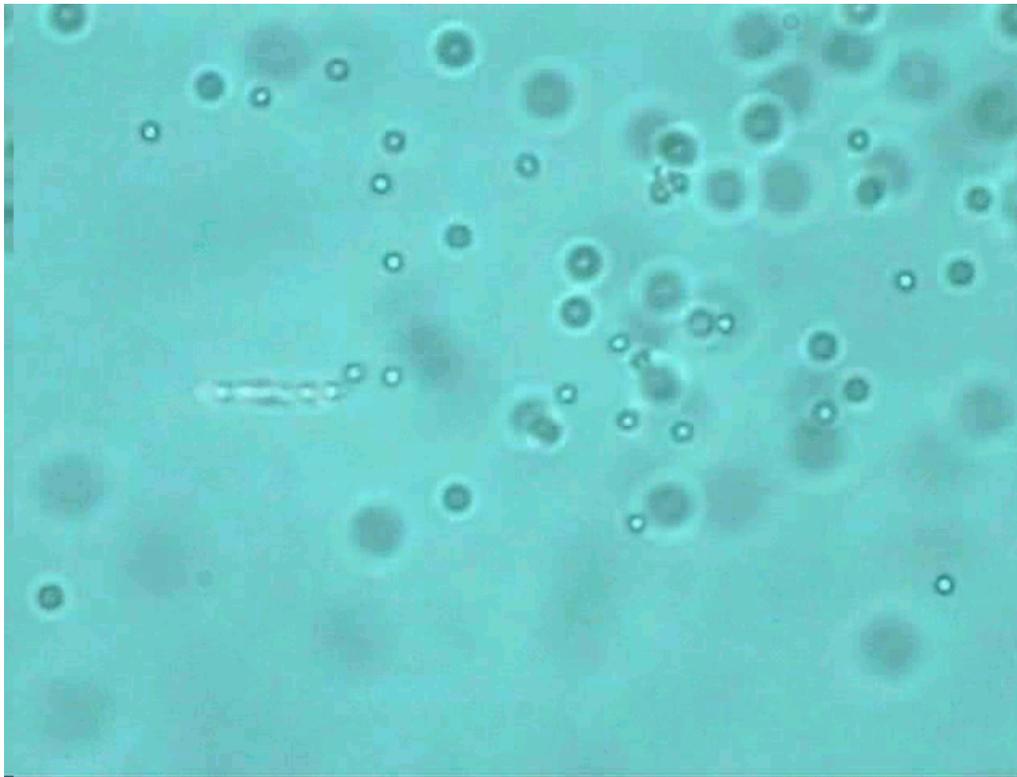
# 光ピンセットによる操作



粒子: ポリスチレン  
水中に分散  
粒径:  $1\mu\text{m}$

ビームをすばやく動かして  
粒子を配列させている

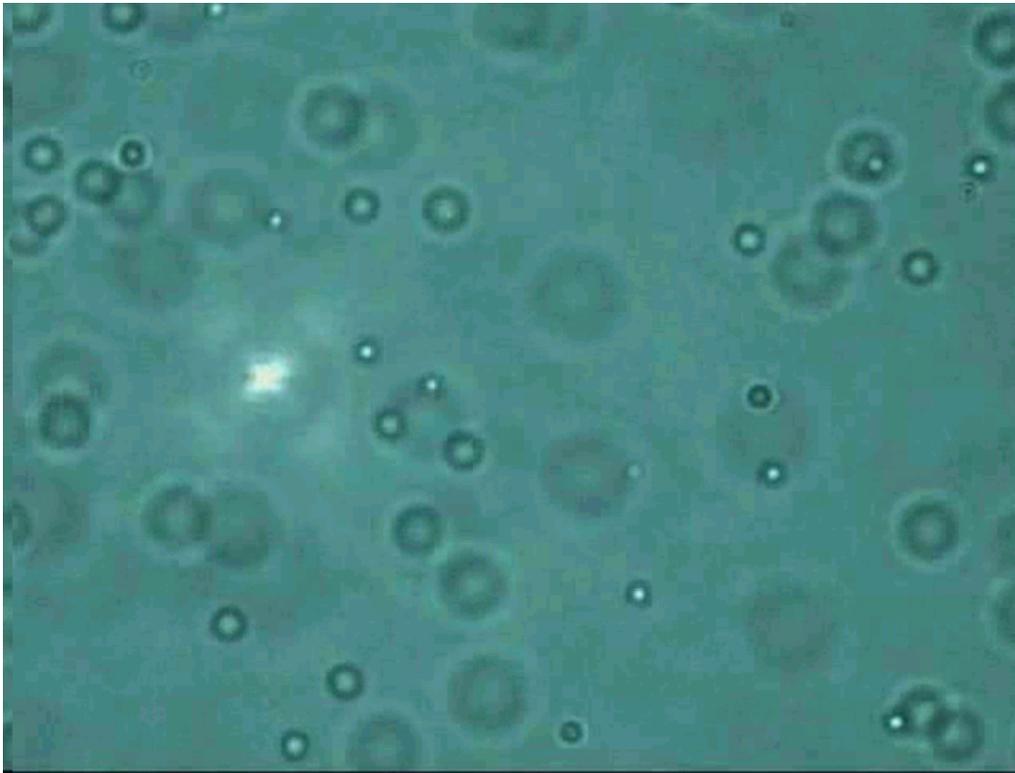
# 光ピンセットによる操作



粒子: ポリスチレン  
水中に分散  
粒径:  $1\mu\text{m}$

ビームをX方向にすばやく動かして粒子を1次元に配列させている

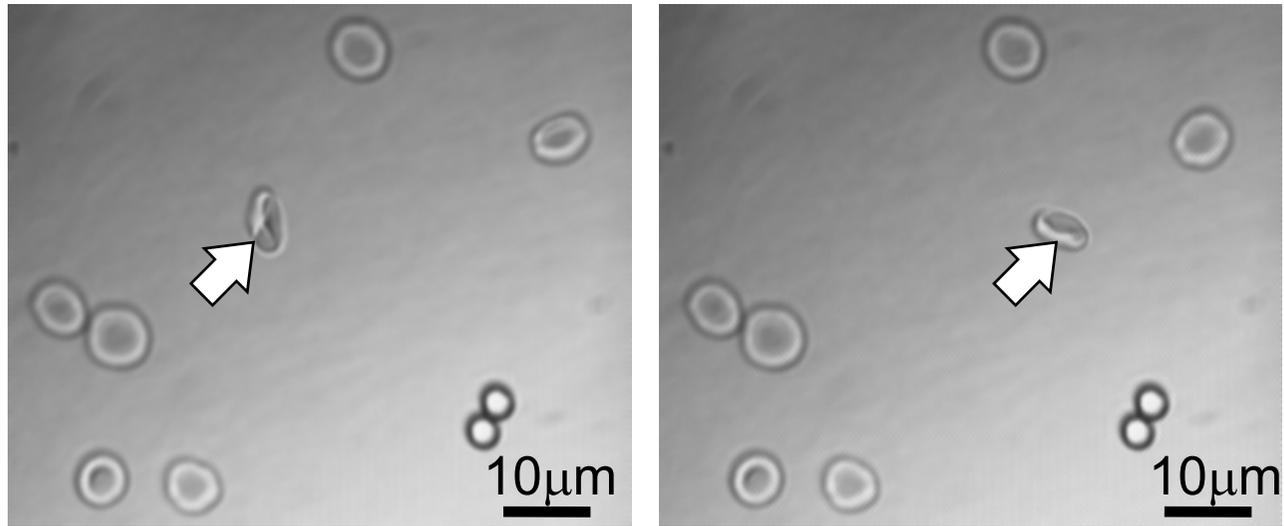
# 光ピンセットによる操作



粒子: ポリスチレン  
水中に分散  
粒径:  $1\mu\text{m}$

ビームをX方向にすばやく動かして粒子を振動させている

# Manipulation by Optical Tweezers

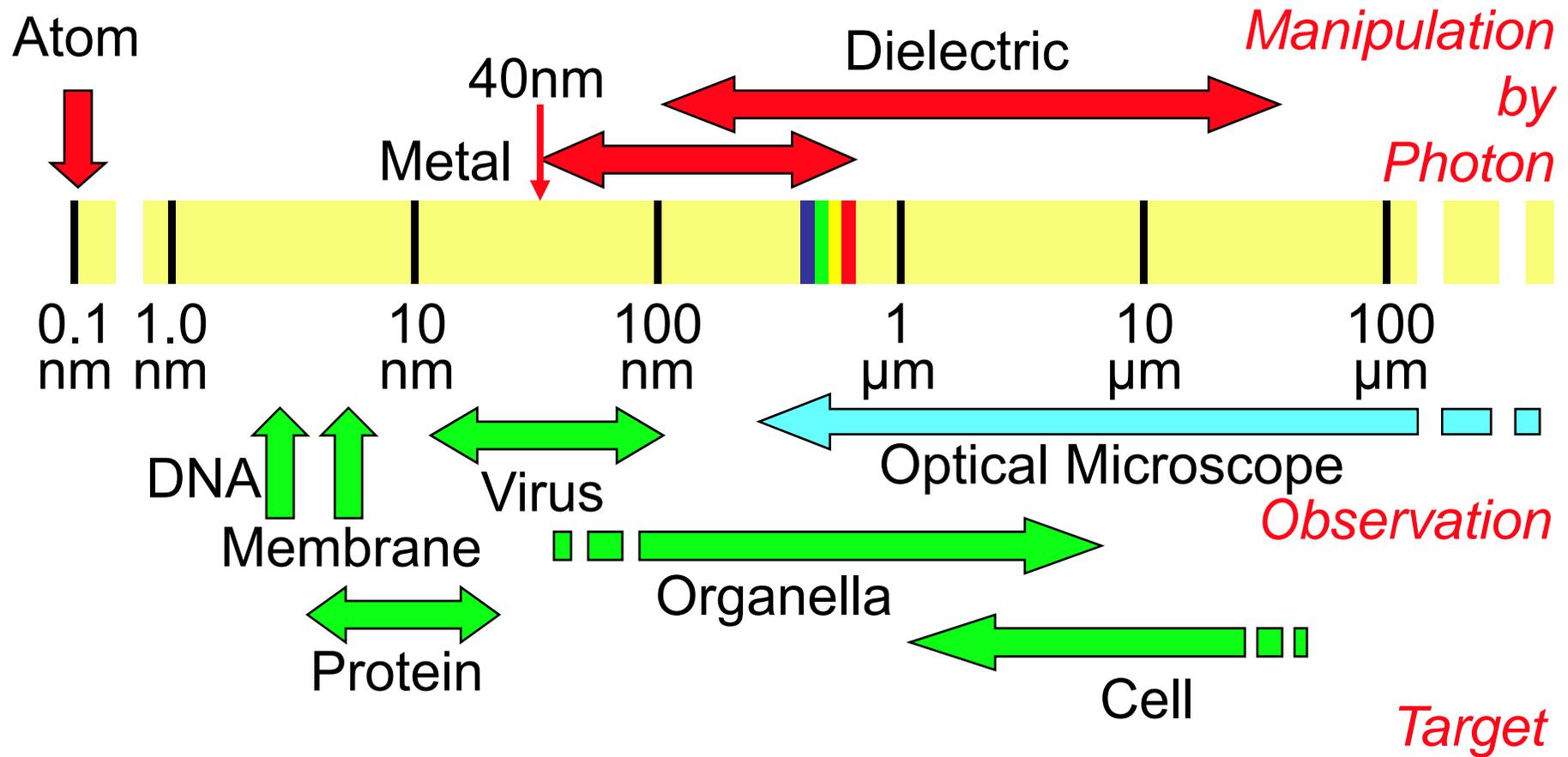


(a)

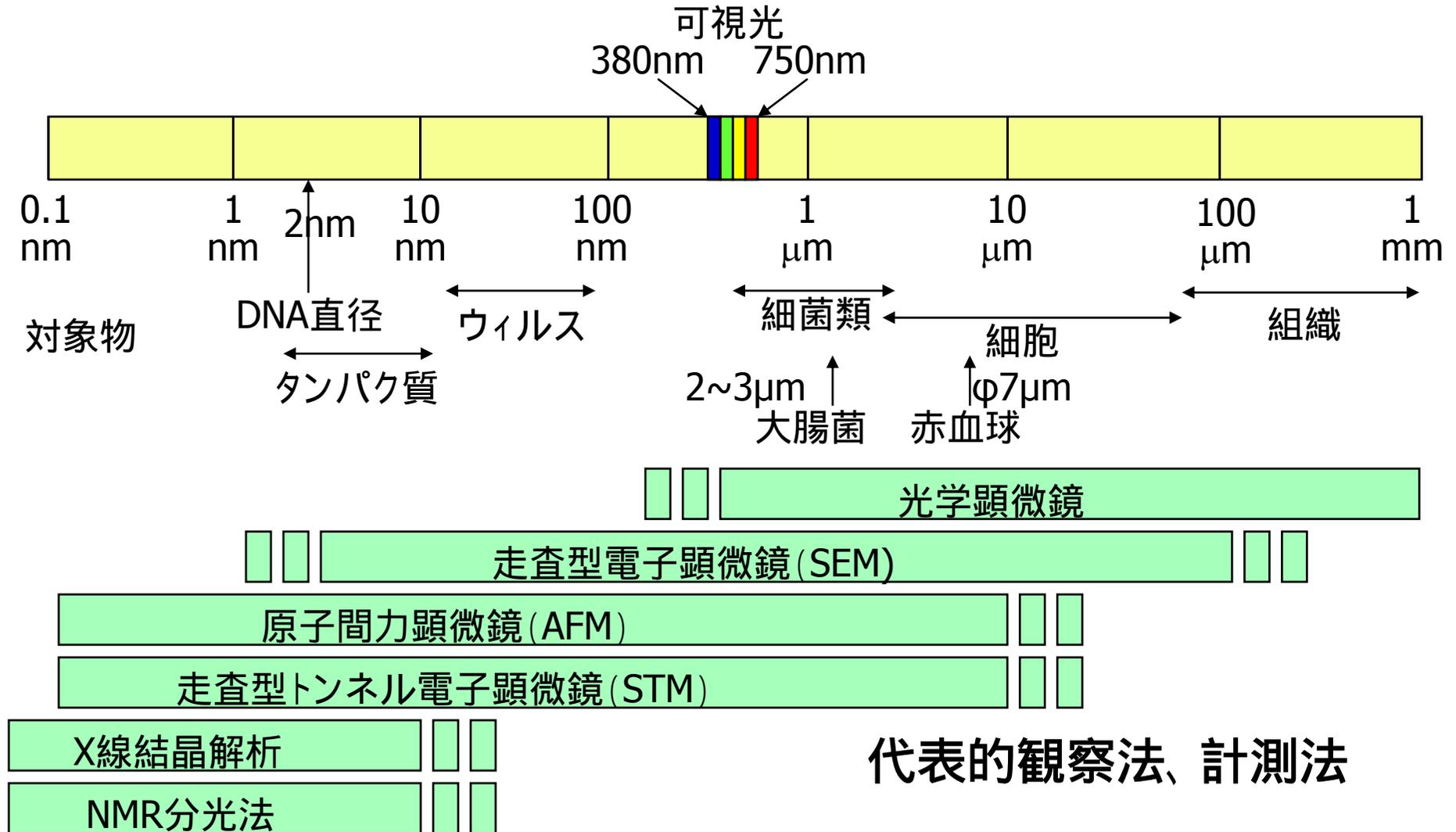
(b)

Manipulation of Red Blood Cell

# 光による粒子操作



# 対象物の大きさと計測方法



計測対象によって計測方法(計測装置)が異なる

# 先端バイオ計測基礎(杉浦忠男、情報)

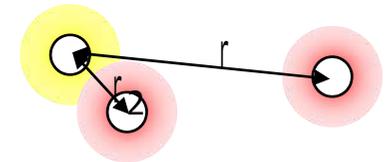
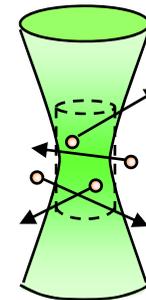
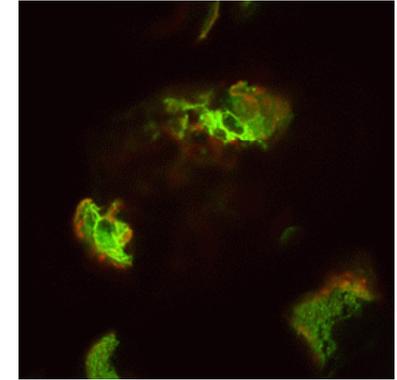
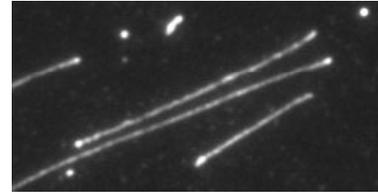
## 1) 先端バイオ計測 - 基礎 -

- ・ バイオ計測とは
- ・ バイオイメージング  
バイオイメージングの基礎
- ・ マイクロマニピュレーション(光ピンセット)  
光ピンセットの基礎

放射圧の発生

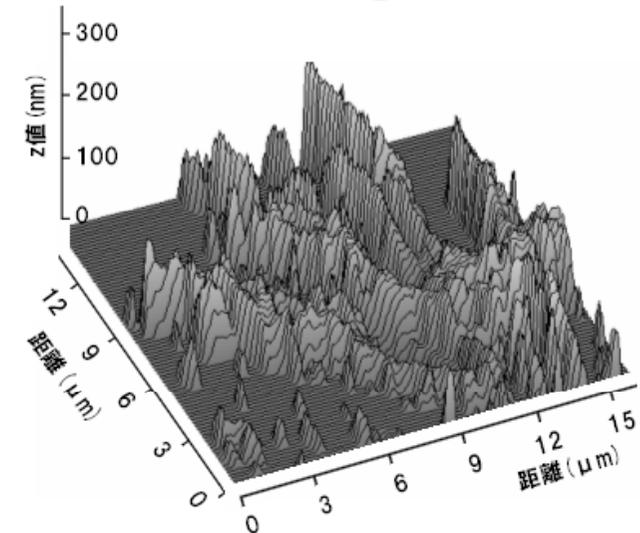
Optical Levitation

Laser Trapping



## 2) 先端バイオ計測 - 応用 -

- ・ 一分子計測  
一分子計測の基礎  
一分子イメージング
- ・ 蛍光イメージングを用いた計測  
蛍光共鳴エネルギー移動  
蛍光相関分光法
- ・ 一分子マニピュレーション、力計測



# 光の運動量

- フォトンの運動量

$$p = \frac{h k}{2\pi}$$

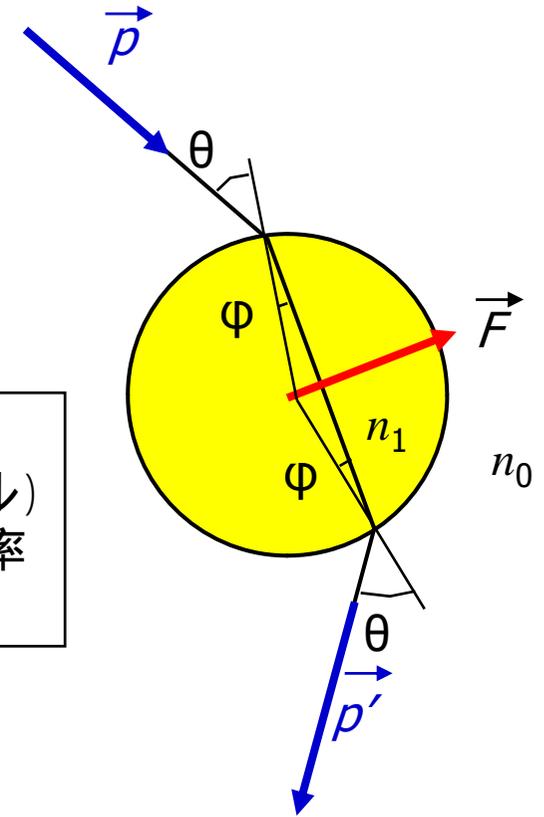
光子1個

h: プランク定数  
k: 波数(ベクトル)  
n: 媒質の屈折率  
c: 光速

- 光束の運動量(単位時間当り)

$$P = n \frac{I}{c}$$

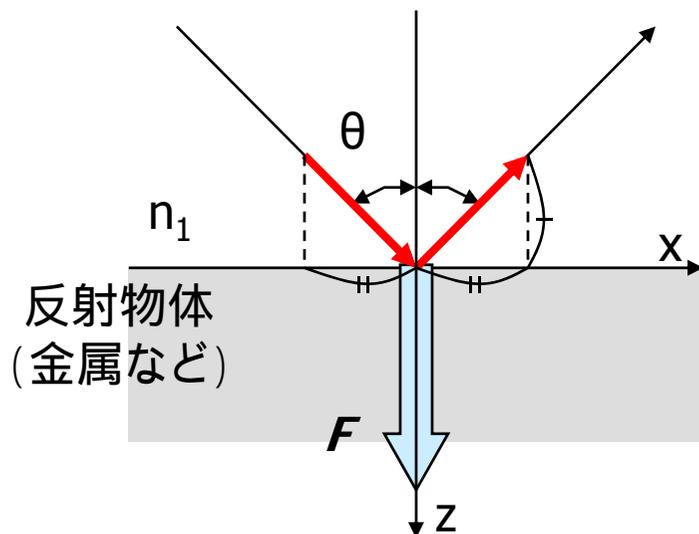
強度  $I$  [W = J/s]の光束



屈折率 $n_1$ の媒質から $n_2$ の媒質に光が入射すると運動量は  $n_2 / n_1$  倍になる。

## 境界面での放射圧の発生(反射物体表面)

- 境界面に光が入射すると放射圧が発生する



垂直入射では、  
入射光の運動量  $P$

$$P = n_1 \frac{I}{c}$$

反射光の運動量  $P' = -P$

よって発生する力  $F$  は

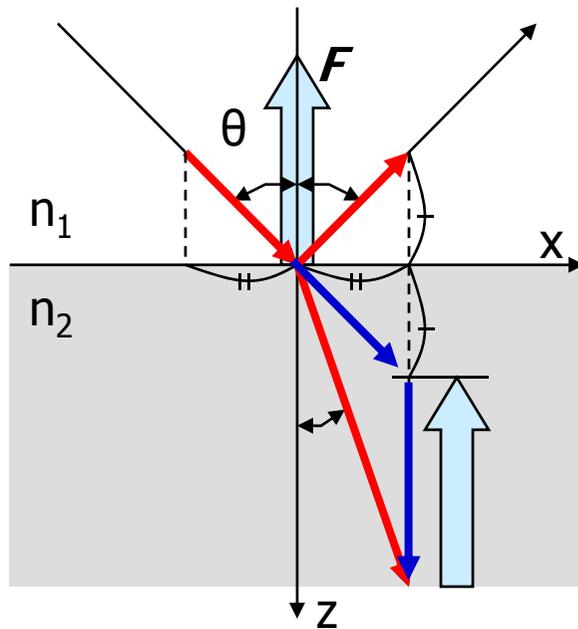
$$F = 2P$$

空気中で  $1W$  の光が反射物体で反射した  
とすると、そのときの力の大きさは

$$|F| = 2 |P| = 2 \times 1 / 3.0 \times 10^8 = 6.6 \text{ nN}$$

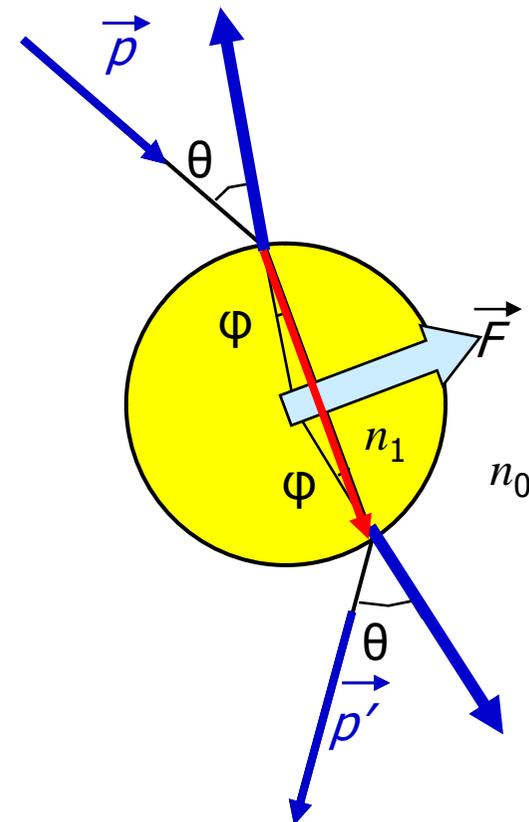
# 境界面での放射圧の発生 (誘電体表面)

- 境界面に光が入射すると放射圧が発生する



$$k_x = k_x' \quad (n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2)$$

スネルの法則



# 放射圧の発生

$$\vec{p} = \hbar \vec{k} \quad p: \text{フォトンの運動量}$$

$$\text{運動量保存則} \\ \Delta \vec{p} = \vec{p}' - \vec{p} = -\vec{F}$$

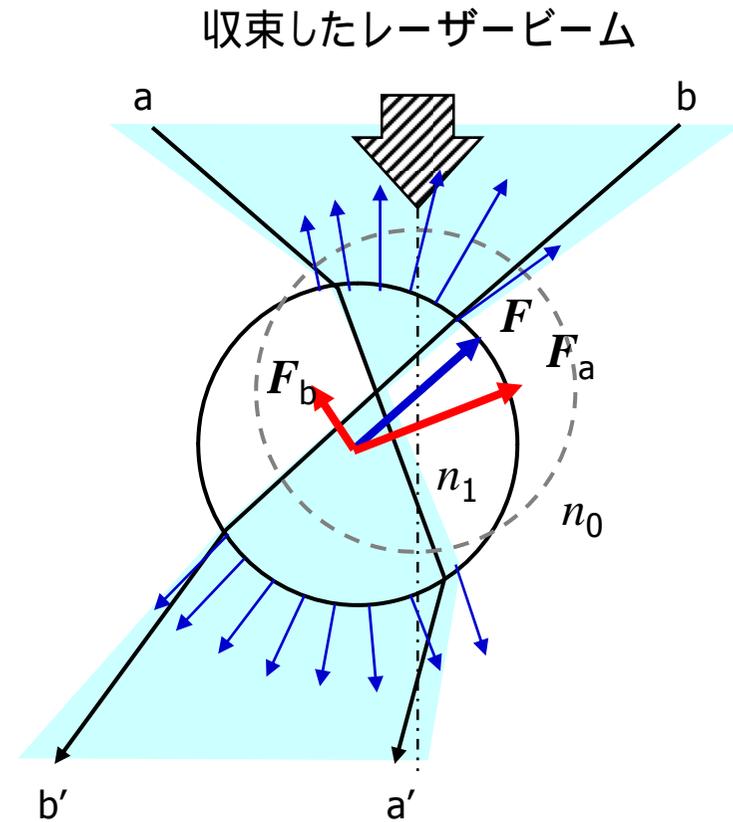
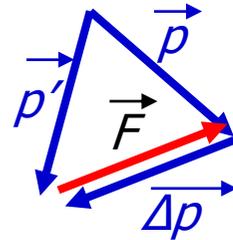
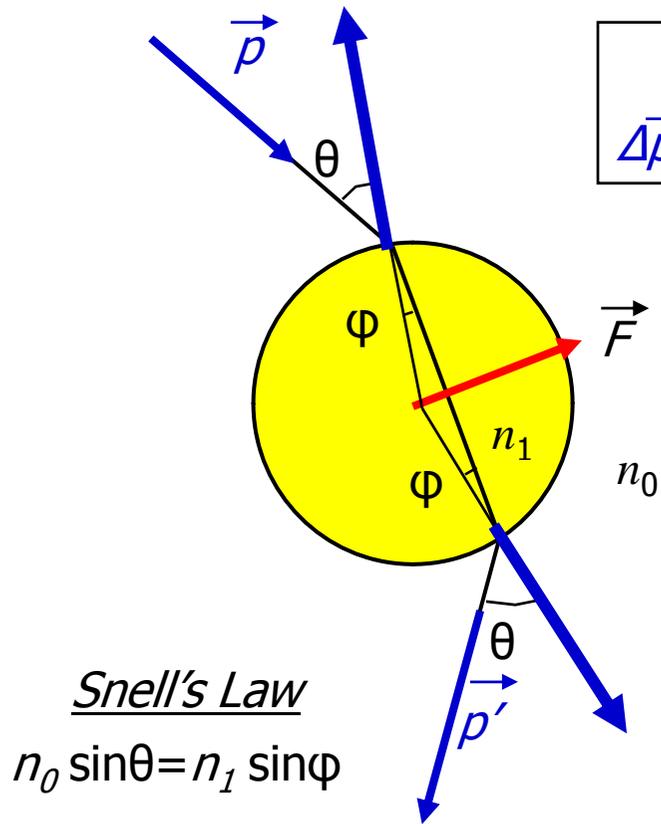
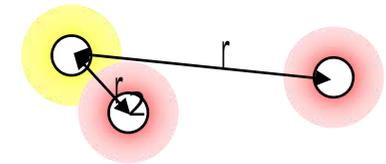
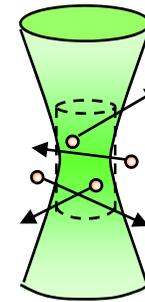
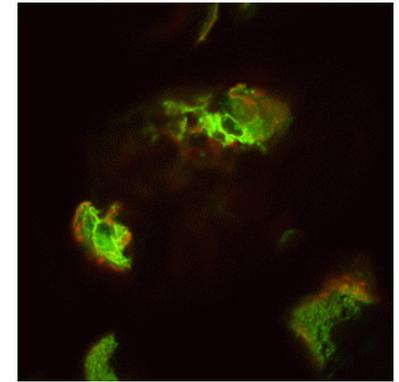
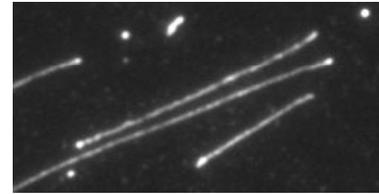


図1 光トラップの原理図

# 先端バイオ計測基礎(杉浦忠男、情報)

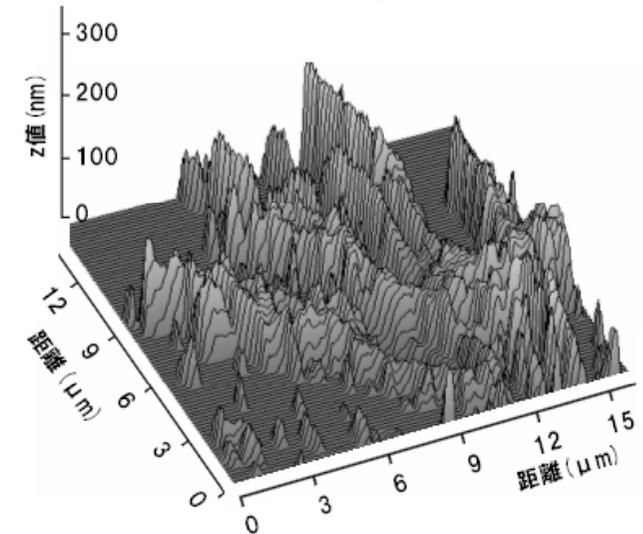
## 1) 先端バイオ計測 - 基礎 -

- ・ バイオ計測とは
- ・ バイオイメージング  
バイオイメージングの基礎
- ・ マイクロマニピュレーション(光ピンセット)  
光ピンセットの基礎  
放射圧の発生  
Optical Levitation  
Laser Trapping



## 2) 先端バイオ計測 - 応用 -

- ・ 一分子計測  
一分子計測の基礎  
一分子イメージング
- ・ 蛍光イメージングを用いた計測  
蛍光共鳴エネルギー移動  
蛍光相関分光法
- ・ 一分子マニピュレーション、力計測



# Optical Levitation

VOLUME 24, NUMBER 4

PHYSICAL REVIEW LETTERS

26 JANUARY 1970

## ACCELERATION AND TRAPPING OF PARTICLES BY RADIATION PRESSURE

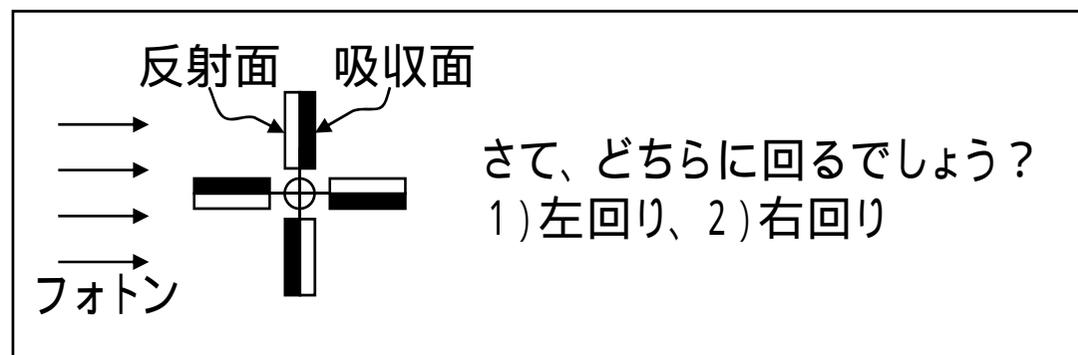
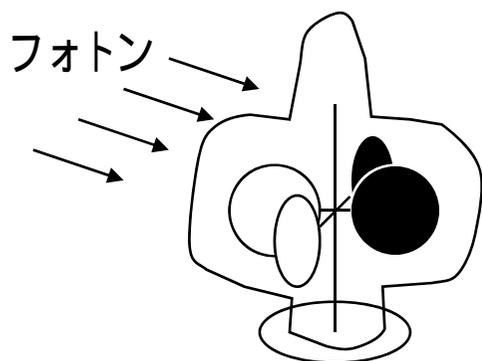
A. Ashkin

Bell Telephone Laboratories, Holmdel, New Jersey 07733

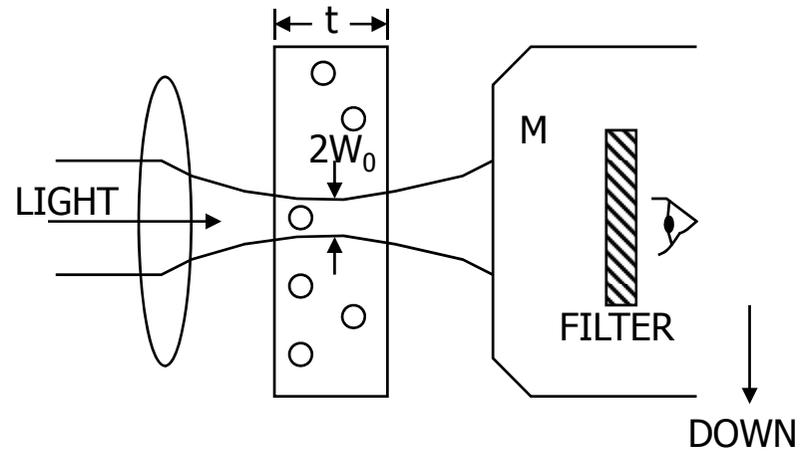
(Received 3 December 1969)

Micron-sized particles have been accelerated and trapped in stable optical potential wells using only the force of radiation pressure from a continuous laser. It is hypothesized that similar accelerations and trapping are possible with atoms and molecules using laser light tuned to specific optical transitions. The implications for isotope separation and other applications of physical interest are discussed.

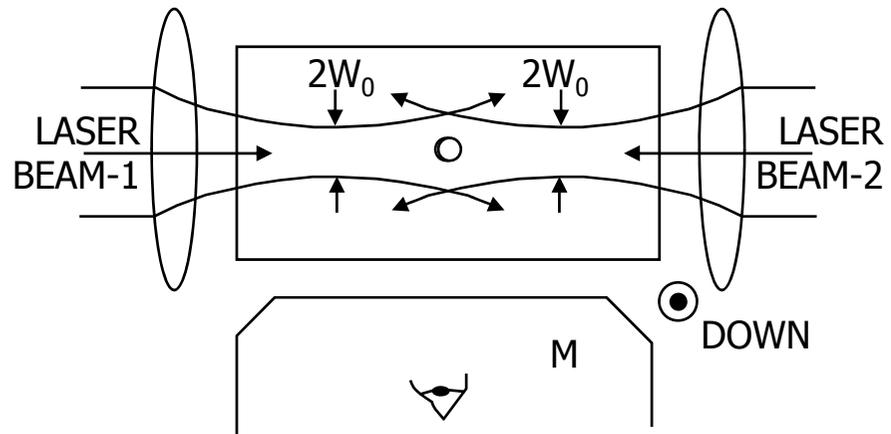
すべてはこの論文から始まっている



# Optical Levitation

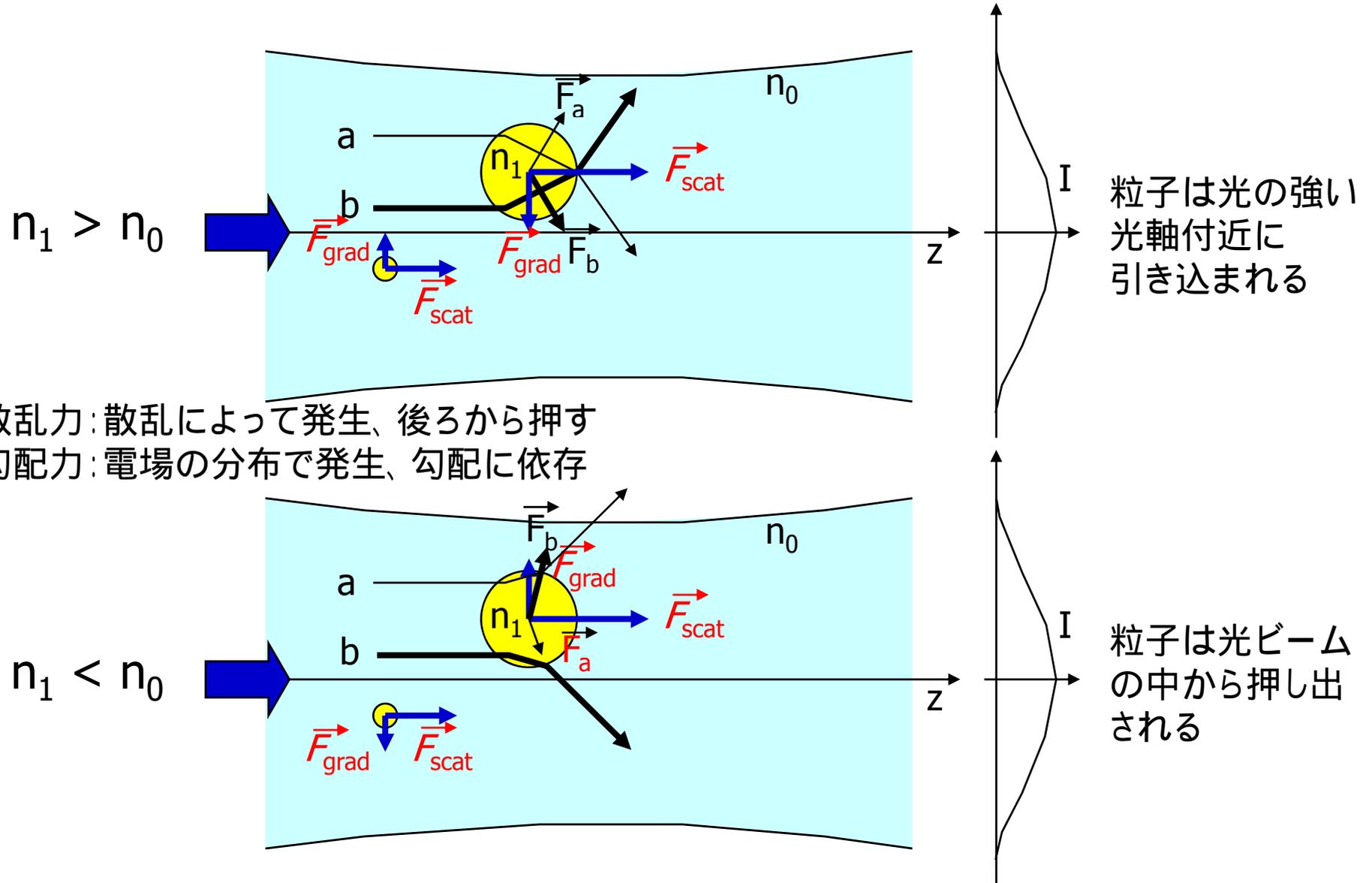


(a)



(b)

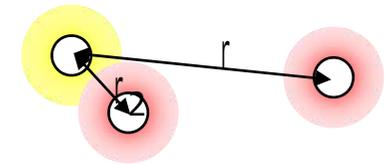
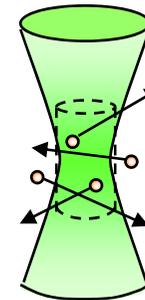
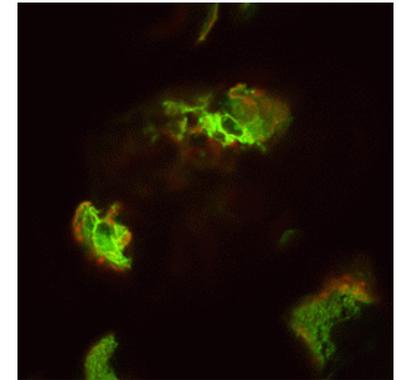
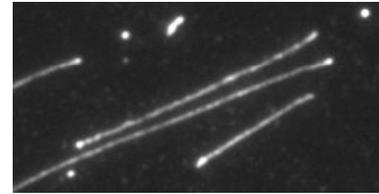
# 光束中の粒子に働く力



# 先端バイオ計測基礎(杉浦忠男、情報)

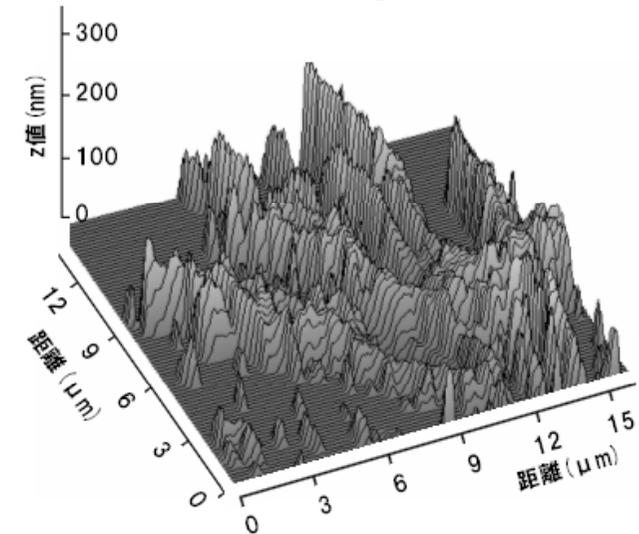
## 1) 先端バイオ計測 - 基礎 -

- ・ バイオ計測とは
- ・ バイオイメージング  
バイオイメージングの基礎
- ・ マイクロマニピュレーション(光ピンセット)  
光ピンセットの基礎  
放射圧の発生  
Optical Levitation  
**Laser Trapping**



## 2) 先端バイオ計測 - 応用 -

- ・ 一分子計測  
一分子計測の基礎  
一分子イメージング
- ・ 蛍光イメージングを用いた計測  
蛍光共鳴エネルギー移動  
蛍光相関分光法
- ・ 一分子マニピュレーション、力計測



# Laser Trapping

288 OPTICS LETTERS / Vol. 11, No. 5 / May 1986

## Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles

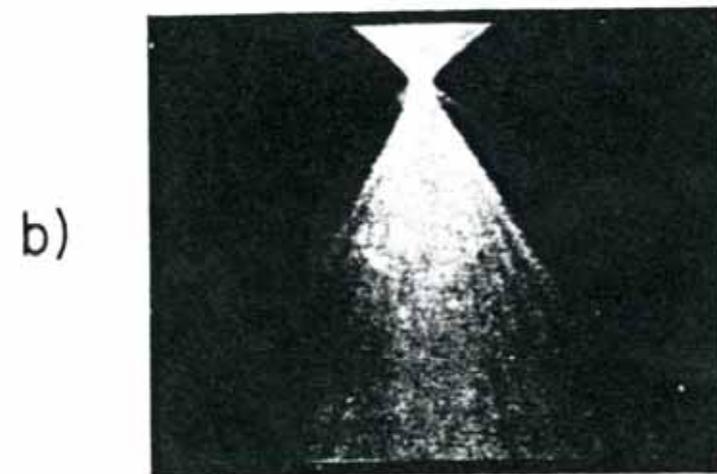
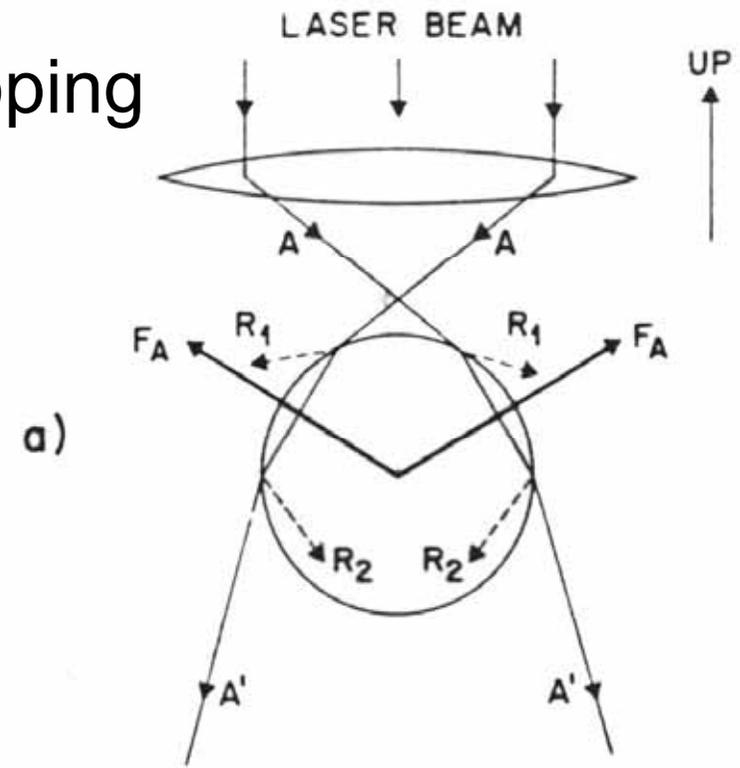
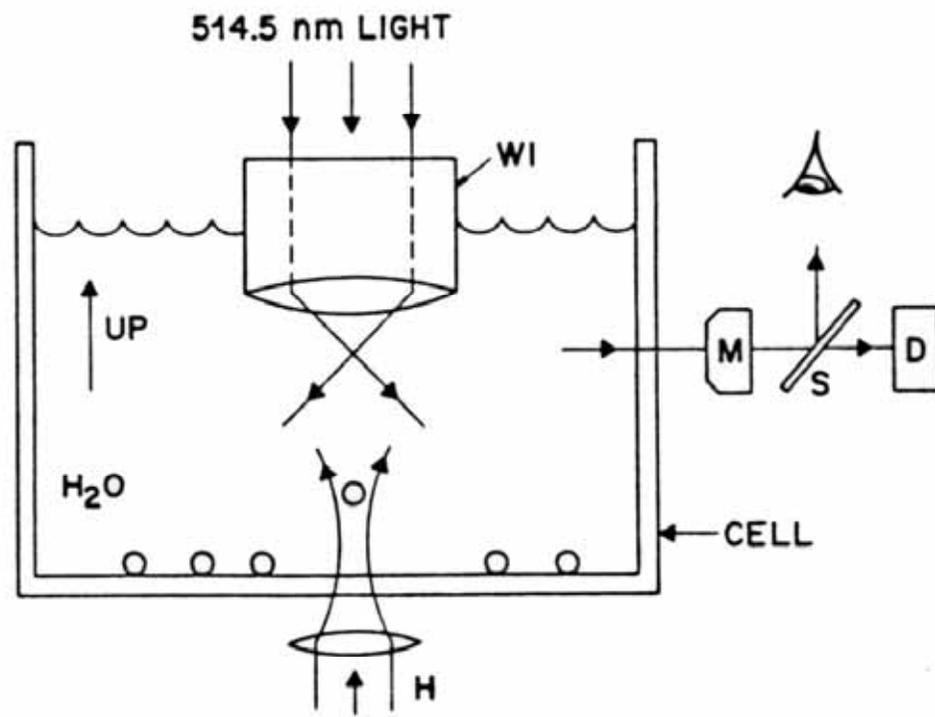
A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and Steven Chu

*AT&T Bell Laboratories, Holmdel, New Jersey 07733*

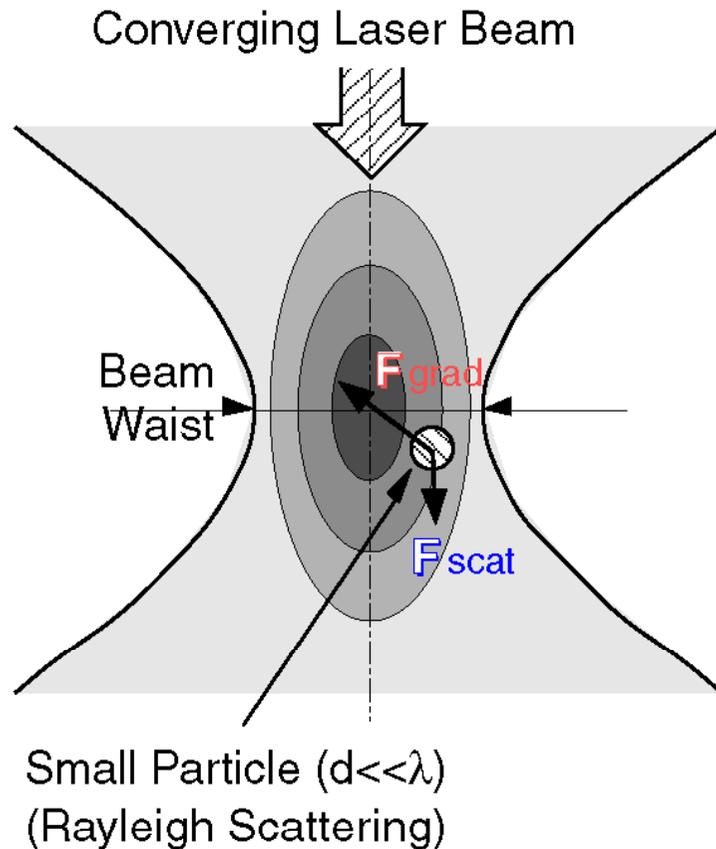
Received December 23, 1985; accepted March 4, 1986

Optical trapping of dielectric particles by a single-beam gradient force trap was demonstrated for the first reported time. This confirms the concept of negative light pressure due to the gradient force. Trapping was observed over the entire range of particle size from **10  $\mu\text{m}$  to  $\sim 25$  nm in water.** Use of the new trap extends the size range of macroscopic particles accessible to optical trapping and manipulation well into **the Rayleigh size regime.** Application of this trapping principle to atom trapping is considered.

# Laser Trapping



# Laser Trapping of Gold Colloidal Particle ( $r \ll \lambda$ )



## Radiation Force on a Particle

$$\mathbb{F} = \mathbb{F}_{grad} + \mathbb{F}_{scat}$$

$\mathbb{F}_{grad}$ : Gradient Force

$\mathbb{F}_{scat}$ : Scattering Force

## Gradient Force $\mathbb{F}_{grad}$

$$\mathbb{F}_{grad} = \frac{1}{4} n_1 \alpha \text{grad}(|\mathbb{E}|^2)$$

(Polarizability)

ex)  $\lambda = 1047 \text{ nm}$ , in Water

$$\alpha_{PS} = 4\pi\epsilon\epsilon_0 (0.125) r^3$$

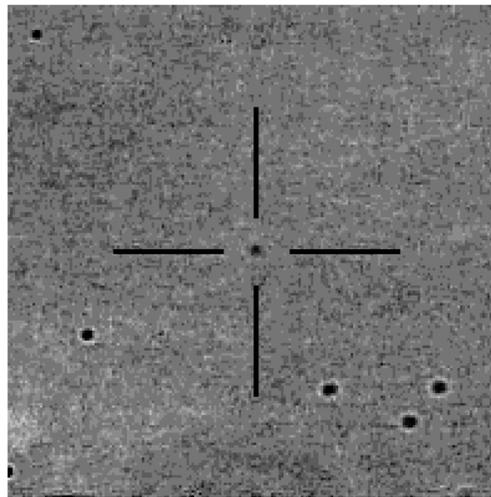
$$\alpha_{Au} = 4\pi\epsilon\epsilon_0 (1.114 - 0.00943i) r^3$$

## Scattering Force $\mathbb{F}_{scat}$

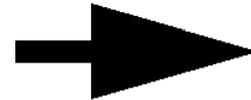
(~Force by Absorption  $\mathbb{F}_{abs}$ )

$$F_{abs} = \frac{8\pi^2 r^3 n_{12}}{c \lambda} \text{Im} \left( \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) I$$

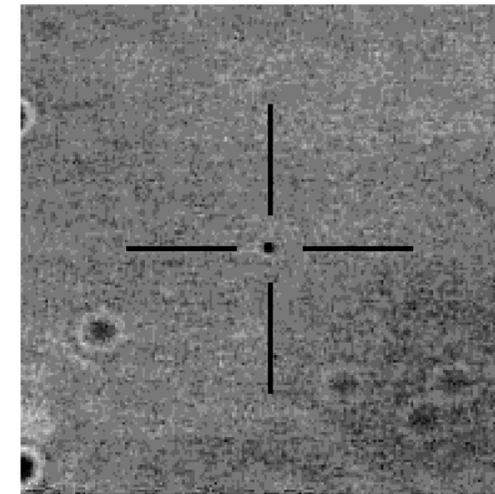
# 3-D Laser Trapping of Gold Colloidal Particle



Particle: Gold Particle  
in Water ( $\phi = 40\text{nm}$ )



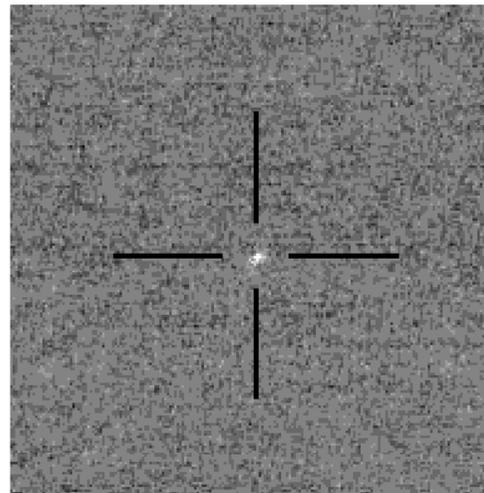
Sample stage was  
moved in Z direction



(1)

(2)

Illumination Laser ON



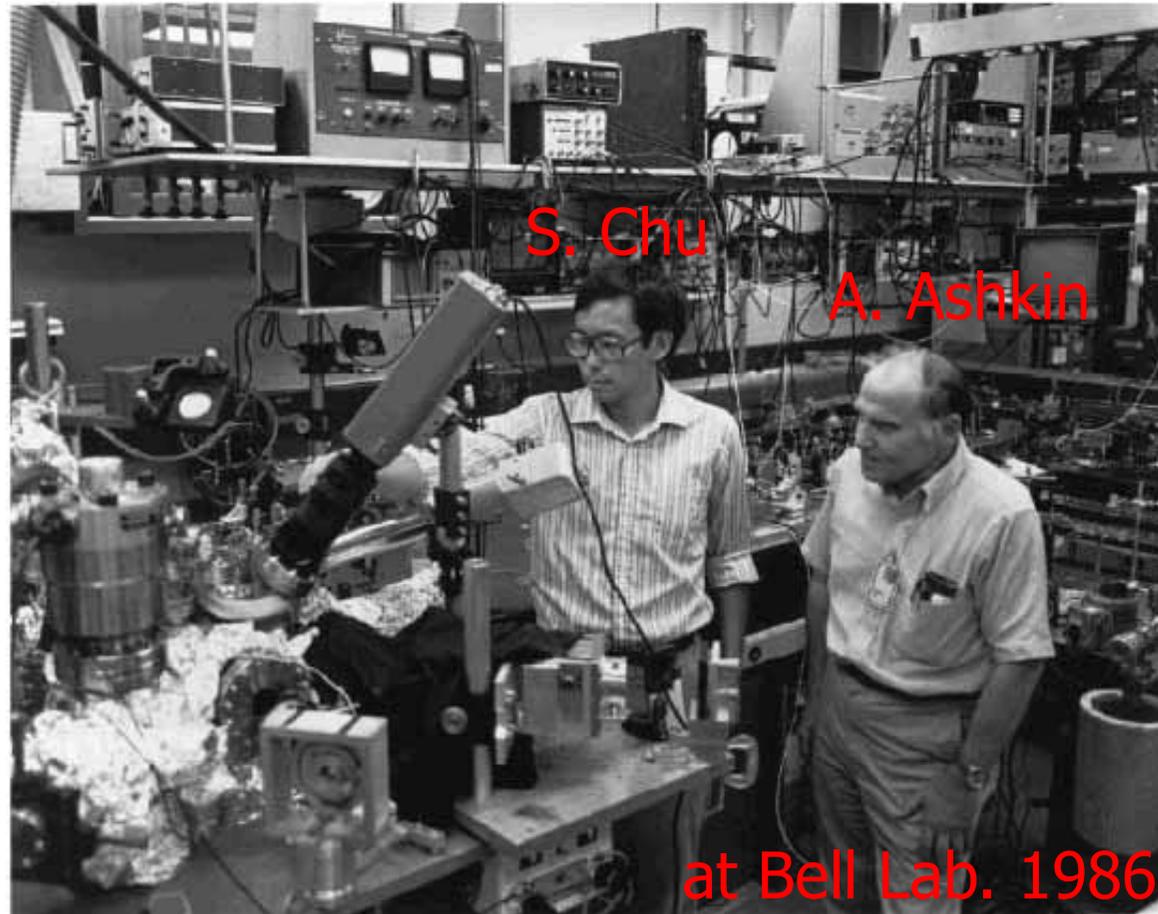
近接場光学顕微鏡のプローブ  
として使用可能

Bright Spot -> Scattered light from particle  
(Point light source of 40-nm diam)

# 光ピンセットの歴史

- 1970 A.Ashkin    Optical Levitation
- 1986 A.Ashkin    Laser Trapping (=Tweezers)
- 1986 S.Chu        Laser Cooling
- 1992 T.Sugiura    Evanescent Drive
- 1994 T.Sugiura    LT-NSOM
- 1995 S.Block      Force Measurement
- 1996 S.Chu        **Nobel Prize** (Laser Cooling)
- 1997 T.Sugiura    LT-NSOM with Gold
- 2000 T.Sugiura    Surface Force Measurement
- 2001 E.Cornell    **Nobel Prize** (B-E Condensation)

# 歴史の1ページ

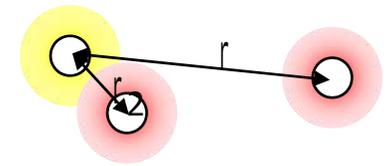
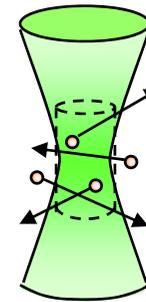
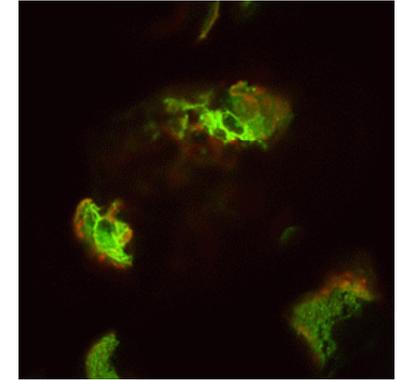
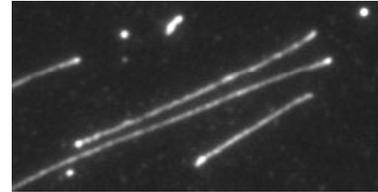


Steven Chu and Art Ashkin in front of the first optical trapping apparatus in 1986  
Rev. Mod. Phys., Vol. 70, No. 3, July, 1998

# 先端バイオ計測基礎(杉浦忠男、情報)

## 1) 先端バイオ計測 - 基礎 -

- ・ バイオ計測とは
- ・ バイオイメージング  
バイオイメージングの基礎  
光学顕微鏡、蛍光  
共焦点顕微鏡、二光子顕微鏡
- ・ マイクロマニピュレーション(光ピンセット)  
光ピンセットの基礎



## 2) 先端バイオ計測 - 応用 -

- ・ 一分子計測  
一分子計測の基礎  
一分子イメージング
- ・ 蛍光イメージングを用いた計測  
蛍光共鳴エネルギー移動  
蛍光相関分光法
- ・ 一分子マニピュレーション、力計測

