

超解像顕微鏡の技術と応用

The Technologies and the Applications of Super Resolution Microscopy

及川 義朗

Yoshiro Oikawa

(株)ニコンインステック バイオサイエンス営業本部
アプリケーション技術部

要旨 光学顕微鏡の解像度は光の回折限界によりおよそ 200 nm である。近年、この限界を超えるべく新技術が開発され、実際の顕微鏡に適用されて製品となり、超解像顕微鏡と呼ばれている。その一つ「構造化照明法」は、周期構造をもった「縞模様」の照明にすることで、モアレ効果を利用して従来捕らえられなかった回折光を取り込み、解析により超解像画像を得る技術であり、解像度は水平方向、Z 軸方向とも従来顕微鏡の約 2 倍、また時間分解能も 1 枚 1 秒程度を実現した。もうひとつの技術「ローカリゼーション法」は、1 分子ごとに離散して蛍光を発するように工夫した標本で、1 画面あたり 100 ポイント程度の点の画像をとって重心を記録することを数千回以上繰り返し、点像の集合として超解像画像を生成する方法である。この技術により、空間分解能は水平方向、Z 軸方向とも従来顕微鏡の約 10 倍の解像度を実現した。本稿ではこれらの技術を紹介する。

キーワード：回折限界、超解像顕微鏡、構造化照明法、ローカリゼーション法

1. はじめに

光学顕微鏡の解像度は光の回折限界により、およそ 200 nm 程度である。従来よりこの限界を超えるべくさまざまな手法が提案されてきたが、近年いくつかの技術は実際の顕微鏡に適用されて製品として利用できるようになり、それらは超解像顕微鏡と呼ばれている。超解像技術のひとつである「構造化照明法」は、照明方法を工夫することにより超解像画像を得る技術であり、空間分解能は水平方向、Z 軸方向とも従来顕微鏡の約 2 倍の解像度を、また時間分解能も 1 枚 1 秒程度を実現した。もうひとつの技術である「ローカリゼーション法」は、蛍光分子を 1 つずつばらばらに励起してそれらの中心位置をプロットしていき、点の集まりとして超解像画像を生成する技術であり、空間分解能は水平方向、Z 軸方向とも従来顕微鏡の約 10 倍の解像度を実現した。本稿では、これら 2 つの超解像技術について述べる。

〒100-0006 東京都千代田区有楽町 1-12-1 新有楽町ビル 4 階
TEL: 03-3216-9163
2012 年 8 月 17 日受付

2. 構造化照明法超解像顕微鏡の技術

落射蛍光観察で標本に照明光があたった時、光は標本の構造によって回折を起こす。顕微鏡の「結像」とは、直接的な反射光、すなわちゼロ次の回折光と、構造の大きさによって角度の変わる 1 次の回折光の両方を対物レンズがとらえ、ゼロ次回折光と 1 次回折光とを像面で干渉させてできる模様のことである。この 1 次回折光は構造体が小さくなるほど回折角が大きくなる（広がる）。したがって、対物レンズの開口数で 1 次回折光をとらえられる大きさの構造までが、結像できる解像度の限界であり、これより小さい構造体では 1 次回折光の広がり角が大きく、対物レンズでとらえられないため解像できない。ここで、ある周期構造を持った照明（構造化照明）をほどこすと、広がってとれえられなかった 1 次回折光は「回折」して対物レンズで取り込むことができる。この情報から超解像画像を再構築するのが、構造化照明法の超解像顕微鏡である。構造化照明法によれば水平方向約 100 nm、Z 軸方向約 300 nm の解像度が得られる^{1,2)}。

顕微鏡の照明は通常はムラのない均一な照明であるが、超解像顕微鏡 N-SIM では、ある既知の空間周波数を持った周期構造（縞模様）を標本に照射する。これが従来の顕微鏡で解像できないほどの微小構造に照射されると「モアレ模様」という、粗い、すなわち空間周波数が低い模様（図 2）が現れる。

今、モアレ縞の空間周波数を v_3 、構造化照明の空間周波

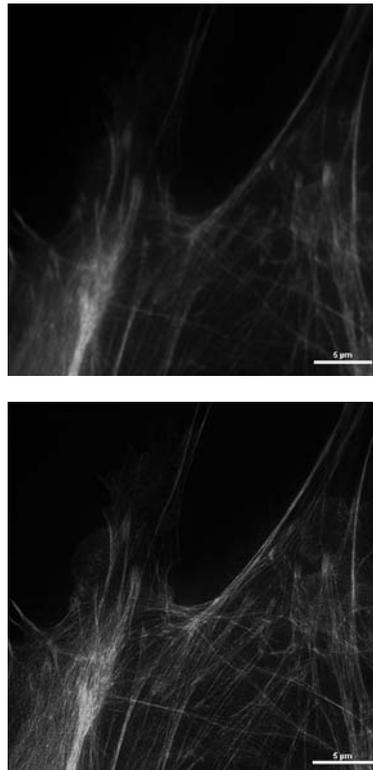


図 1 従来の落射蛍光画像(上)と構造化照明法超解像画像(下)の比較。細胞：Bovine Pulmonary Artery (ウシ肺動脈) アクチンを Alexa488 で標識。

数を v_2 , 元になった標本の微細構造の空間周波数を v_1 とすると, $v_1 = v_2 + v_3$ という関係がなりたつ (図3). ここで v_2 は既知, またモアレは画像から読み取れるので, この2項より未知の項 v_1 が算出できる. これが, 構造化照明法の基本

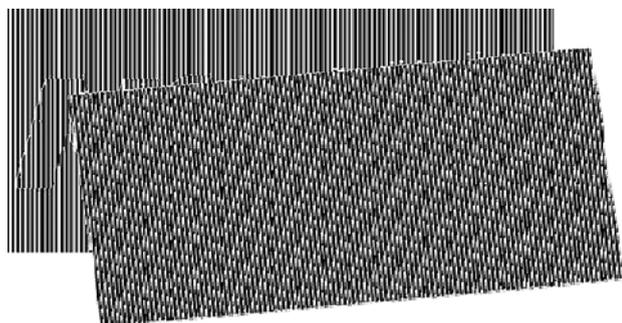


図2 モアレ模様. 2つの異なる空間周波数をもったパターンが重なると低い空間周波数の縞が現れる.

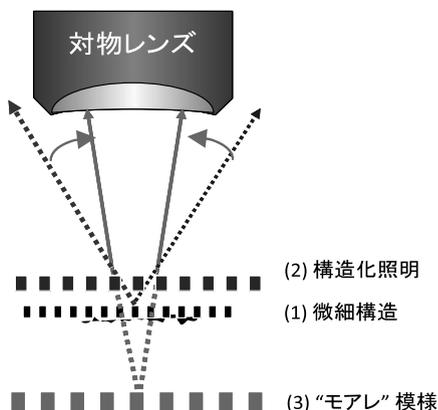


図3 モアレ模様の原理: 構造化照明により1次回折光が「回折」する.

原理である.

しかし, モアレ模様を「画像」として取得できても, どのようにして微細構造を再構築すればいいだろうか. このためには, 画像をフーリエ変換して, 周波数空間に変換した状態で作業する.

構造化パターンを複数回移動した画像を取得することによって, 従来顕微鏡で解像できている画像成分 (低周波成分) とモアレという形で読み込んだ超解像成分 (高周波成分) とを区別して分離することができる. フーリエ変換された周波数空間上で, それら分離された超解像成分 (高周波成分) を本来の空間周波数の位置に再配置する. この結果, 表現される空間周波数は従来成分 (低周波成分) の2倍の位置まで拡張される. 最後に逆フーリエ変換することで, 実空間上の超解像画像として再構築される. 以上が構造化照明の原理である^{1,2)}.

この方法によれば, xy 方向解像度が約 100 nm と, 従来顕微鏡の約 2 倍の解像度が得られ, さらに Z 方向も解像度が約 300 nm と, 従来約 2 倍の解像力を得ることができる. また 1 枚の画像は約 1 秒程度で取得できるのでライブセルイメージングにも適用が可能となる³⁾.

下記画像作例では, 直径約 300 nm といわれるミトコンドリアの内部構造である「クリステ」が認識される. かつ約 1 秒/枚ほどの時間分解能で画像取得できている. 赤い丸で囲った部分では特に活発な活動が見られる.

この構造化照明の技術の大きな特徴は, 純粋に光学的な理論に基づいているため蛍光標本であれば試薬を選ばずどのような標本でも超解像画像を得ることができること, および上記の例のように画像取得時間が短いことである.

さらに構造化照明は Z 方向も分解能が高くなる, すなわち光学断層像を得ることができ, 共焦点顕微鏡のように複数の Z スタック画像を取得して3次元画像再構築も可能であ

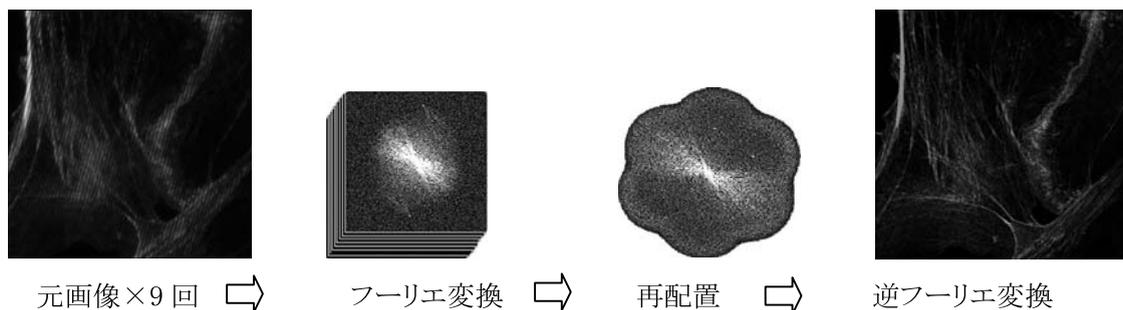


図4 構造化照明法超解像画像の生成プロセス

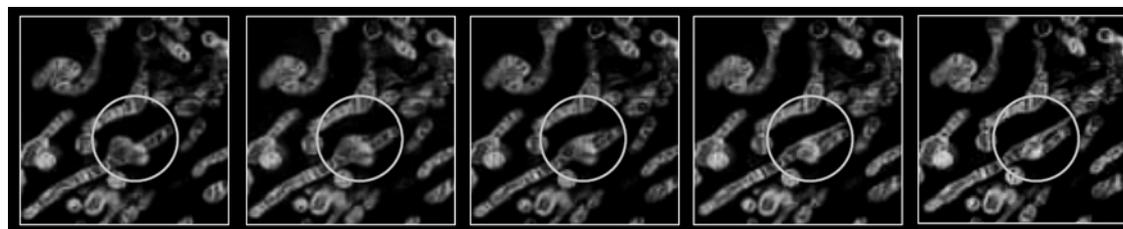


図5 HeLa 細胞のミトコンドリア. MitoTrackerRed で蛍光標識.

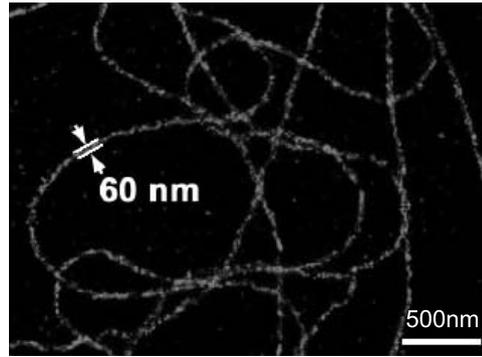
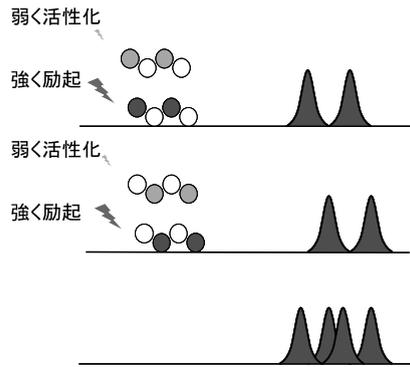


図6 ローカリゼーション法の原理および点の集合で生成されたローカリゼーション法超解像画像。
(画像は、アフリカ緑猿腎細胞の微小管)

る。固定細胞，培養細胞，組織，脳切片など観察できる標本の種類は多様である。

3. ローカリゼーション法超解像顕微鏡の技術

解像度とは2つの離れた点を2つであると認識できる距離で定義される。2つの点が極めて接近すると、あたかも一つの点であるかのように見えてしまう。しかし、もしも2つの点の蛍光を一つずつ別々にとらえることができれば、その輝度分布の中心位置(重心位置)を座標情報としてプロットし、次にもうひとつの点の中心位置をプロットすることで、2点を別々に認識できる。ローカリゼーション法ではこのように、蛍光分子をばらばらに光らせてそれらの中心位置を記録するというステップを1万回以上繰り返すことで、点の集合として超解像画像を生成する技術である。この方法によれば水平方向約20 nm、Z軸方向約50 nmと、従来の光学顕微鏡の10倍程度の解像度を得ることが出来る⁴⁾。

通常の蛍光試薬では、励起光があたるとすべての分子が蛍光を発するため、輝度分布が重なり、1分子ごとの中心位置を記録することが出来ない。そこでローカリゼーション法超解像では、ON-OFFが可能なフォトスイッチャブルな蛍光試薬を用いる。最初に全体を不活性化状態にしたあと、弱い光をあてると一部の蛍光色素のみが活性化される。その後、読み出しのための励起光をあてると1分子ずつばらばらに蛍光を発することになり、その中心位置をプロットすることを繰り返すことで、点描の集まりとして超解像画像が構築される。以上がローカリゼーション法の原理である(図6)。

さらにN-STORMという製品においては、画像取得のカメラの前にシリンダリカルレンズを配置すると点像のボケ具合が焦点面の上下で非対称となることを利用して、Z情報を読み取ることでZ軸方向の分解能約50 nmを実現している。

下記(図7)は、ローカリゼーション法超解像顕微鏡でHela細胞でのミトコンドリアと微小管の2色での超解像画像を取得した例である。この画像では横幅が約30 μm程度である。

4. おわりに

超解像顕微鏡は、これまでの光学顕微鏡では解像できな

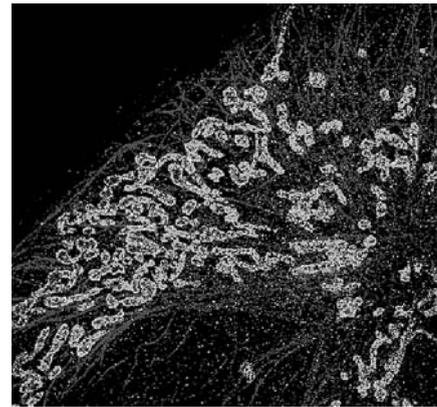


図7 ローカリゼーション法超解像顕微鏡による画像作例。
Hela細胞のミトコンドリアと微小管。

かった、微細な構造やそのダイナミクスをとらえることが出来るようになった。構造化照明法超解像顕微鏡では、固定細胞、培養細胞、組織切片、脳切片、植物細胞など多様なサンプルでの画像取得、従来の顕微鏡ではとらえることのできなかった、微細構造、あるいは2種類の微小領域でのタンパク質の共局在などの画像作例に成功している。ローカリゼーション法超解像顕微鏡は原理上固定細胞が対象となってしまうが、クラスリン、微小管、ミトコンドリアなどの超解像画像が得られている。

超解像顕微鏡という技術が実際に製品として使えるようになった今後は、従来の電子顕微鏡の作業の置き換えや、全く新しい知見が生まれることを期待している。

文 献

- 1) Gustafsson, M.G.L., Shao, L., Carlton, P.M., Wang, C.J.R., Golubovskaya, I.N., Cande, W.Z., Agard, D.A. and Sedat, J.W.: *Biophys J BioFAST*, published on March 13, 2008 as doi: 10.1529/biophysj.107.120345
- 2) Gustafsson, M.G.L.: *Journal of Microscopy*, 198, Pt 2, 82-87 (2000)
- 3) Kner, P., Chhun, B.B., Griffis, E.R., Winoto, L. and Gustafsson, M.G.L.: *NATURE METHODS*, VOL.6 NO.5 (2009)
- 4) Rust, M.J., Bates, M. and Zhuang, X.: *NATURE METHODS*, VOL.3 NO.10, 793-795 (2006)