

## 生組織深部の超解像イメージングへ： 光の乱れをアクティブに補正する補償光学

### Towards the Super-Resolution Imaging inside Living Body: Active Correction of Optical Disturbance by Adaptive Optics

玉田 洋介<sup>a</sup>, 早野 裕<sup>b</sup>, 亀井 保博<sup>a</sup>, 服部 雅之<sup>a, b</sup>

Yosuke Tamada, Yutaka Hayano, Yasuhiro Kamei and Masayuki Hattori

<sup>a</sup>自然科学研究機構 基礎生物学研究所

<sup>b</sup>自然科学研究機構 国立天文台

**要旨** 超解像イメージングは、光の理論限界を超えた分子スケールの空間分解能で細胞の蛍光観察を行う技術であり、今後の分子生物学研究に必須となってくることが予想される。しかし、生きた細胞や組織の深部で起きる生命現象を観察する場合、超解像性能がうまく発揮できないことが知られている。これは、イメージングに用いる光が、生細胞や組織を通過する際に複雑に乱れることに起因する。この光の乱れの問題を解決し、生細胞や組織の深部でも超解像イメージングを可能にすると期待されているのが、補償光学である。補償光学は天文学において発展した技術であり、地上望遠鏡を用いた天体観測の際に、大気揺らぎによる光の乱れを補正することで、高解像の天体観測を可能にしている。本稿では、補償光学の概要と、補償光学を生細胞や組織のイメージングに適用する研究について紹介するとともに、補償光学を用いた超解像イメージングへの発展について考察する。

**キーワード**：補償光学、光の乱れ、ライブセルイメージング、深部イメージング、超解像イメージング

#### 1. はじめに

蛍光タンパク質などの蛍光プローブを用いて細胞内外の分子や構造を標識し、蛍光顕微鏡を用いて観察する蛍光細胞イメージングはいまや分子生物学研究に必要不可欠となっている<sup>1)</sup>。さらに、光の理論限界を超えた解像度で蛍光観察を行う超解像イメージングによって、従来の蛍光顕微鏡の解像度では解明できなかった分子スケールの生命現象が次々と明らかにされつつある<sup>2)</sup>。今後、蛍光細胞イメージングと同じく、超解像イメージングも分子生物学研究に必須となると予想される。しかしながら、今のところ、あらゆる生命現象に対して超解像イメージングが適用できるわけではない。観察したい生命現象が組織の内部で起きる場合、超解像性能がうまく発揮できないことが知られている。それは、細胞や組織を通過する際の光の乱れに原因がある。細胞や組織には屈折率の異なる構造や散乱物質などが大小複雑に混在している。そこをイメージングに用いる光が通過することで、光は複雑に乱れ、その結果得られる像が劣化してしまう。この光の乱れは通常の（超解像でない）蛍光イメージングでも解像度劣化の原因

となっているが、精密な光の配置や計算によってナノスケールの分解能を達成する超解像顕微鏡では、わずかな光の乱れによって超解像性能が発揮できなくなってしまう（図1）<sup>3)</sup>。

この光の乱れを抑制するため、多様な透明化技術が確立されている<sup>4~6)</sup>。透明化とは、細胞を固定してできるだけ細胞内の構造を維持しつつ、細胞内の媒質を入れ替えて屈折率を均一化し、光の乱れを抑制する手法である。しかし、透明化は観察する細胞や組織を殺してしまうため、生きた細胞や組織における分子動態を観察するライブセルイメージングには用いることができない。現在、生きた細胞や組織の深部観察に用いられているのが二光子顕微鏡<sup>7)</sup>であり、より長波長の励起光を用いることで光の屈折や散乱の問題を緩和し、組織深部のイメージングに成果を挙げている。しかし、長波長の光でも屈折や散乱の影響が完全になくなるわけではない。二光子顕微鏡では、二光子励起のために光のエネルギーを励起点に集中させる必要があるが、光のわずかな乱れによって光の集中が乱れて二光子励起が起きづらくなるため、組織深部では像が著しく暗くなるという問題が存在する<sup>8)</sup>。

#### 2. 光の乱れを補正する補償光学

こうした生きた細胞や組織による光の乱れを直接補正して、像劣化の問題を解決すると期待されているのが、補償光学である（図2）。補償光学は天文学において発展してきた技

<sup>1)</sup> 〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38

TEL: 0564-55-7545; FAX: 0564-55-7548

E-mail: tamada@nibb.ac.jp

2017年6月7日受付、2017年7月5日受理

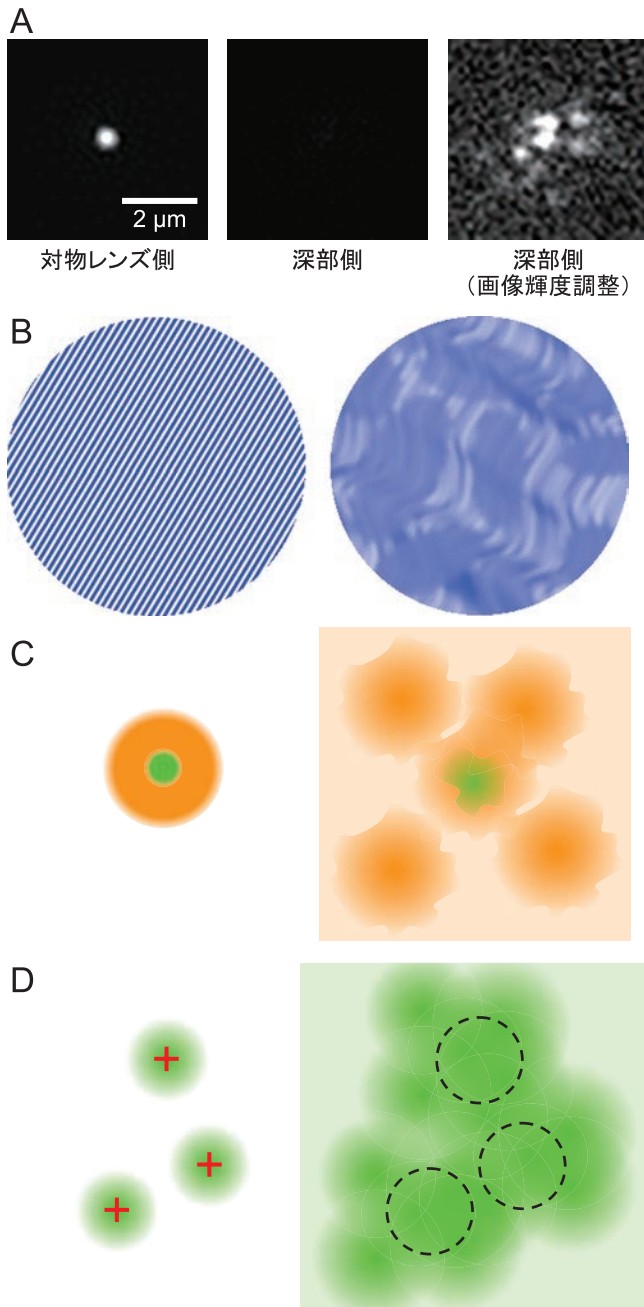


図1 植物細胞深部における超解像イメージングの模式図。  
 A. 一層の植物細胞（ヒメツリガネゴケ葉細胞）の対物レンズ側に貼りついた390 nmの蛍光ビーズ像（左図）と、対物レンズから見て奥側に貼りついた蛍光ビーズ像（中央図，右図）。中央図は右図と同じ図だが，明るさを左図にあわせたもの。一層の植物細胞を通過するだけで光は著しく乱れ，点像分布が劣化する。B-D. Aの結果から予想される，一層の植物細胞をSIM (B)，STED顕微鏡 (C)，一分子局在顕微鏡 (D)で観察した場合の模式図。左図は植物細胞の対物レンズ側，右図は植物細胞の奥側を観察した場合を示す。Bは焦点面における構造化証明のパターン，CはSTEDレーザーの集光（橙）と得られる蛍光（緑）の分布，Dは焦点面の3分子から得られる蛍光像をそれぞれ示す。D左図の赤十字は蛍光から推定された分子の位置を，右図の点線は光の乱れがない場合に蛍光が得られる領域を示す。

術で，地上望遠鏡を用いて天体を観測する際，大気の揺らぎによって生じる光の乱れを実時間で計測し，補正することで，天体観測の高解像度化を実現してきた。補償光学は，すばる望遠鏡をはじめ各国の大型望遠鏡に設置され，高解像観測を主軸とする観測天文学に必要な不可欠の技術となっている<sup>9)</sup>。

補償光学の主要要素は，波面センサー，制御コンピューター，空間光変調器からなり，さらに参照光源を必要とする。補償光学の動作を説明すると，まず波面センサーを用いて参照光源となる比較的明るいガイド星からの光を計測し，その光の乱れを測定する。その情報をもとに，制御コンピューターが補正量を計算し，空間光変調器をフィードバック制御する。空間光変調器によって補正された光の乱れの残差はさらに波面センサーによって計測され，制御コンピューターによって補正量が計算され，空間光変調器によって光の乱れが補正される。この制御を，光の乱れが変化する速度よりも早く繰り返す。

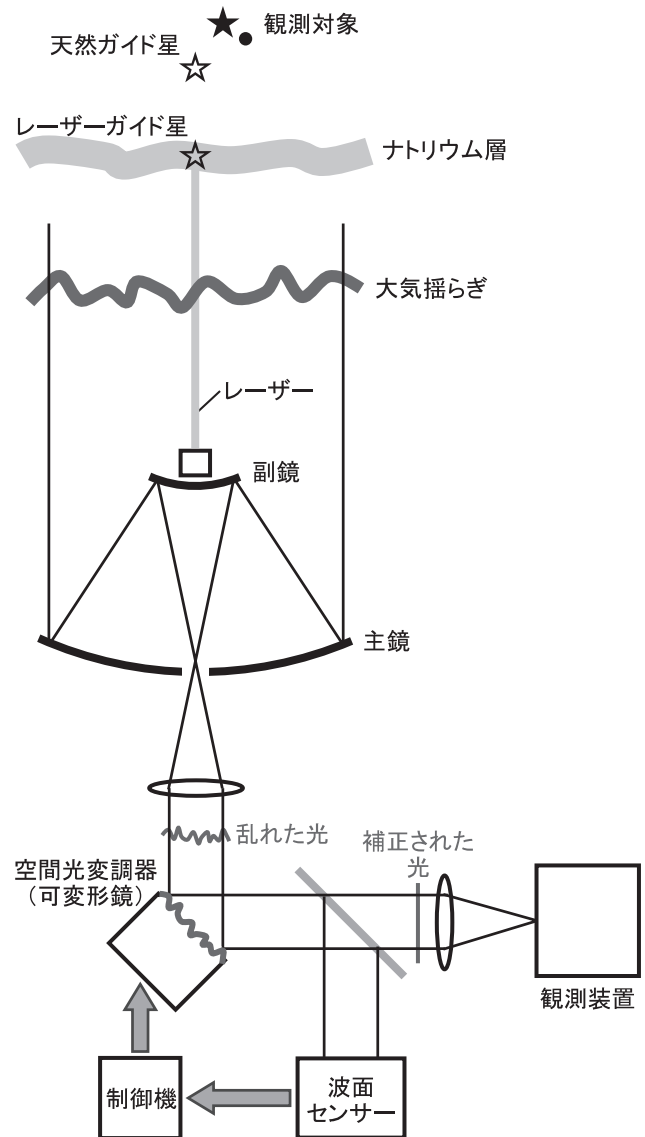


図2 天体観測のための補償光学の模式図。補償光学のフィードバック制御を下部の矢印で示す。

返すクローズドループによって、光の乱れは補正され、ガイド星の周辺について鮮明な像を得ることができる。現在では、上空約90 kmに存在するナトリウム層をレーザー励起して得られる人工ガイド星を参照光源として用いることが可能となり、補償光学が適用可能な天域は大幅に拡大されている<sup>10,11)</sup>。

この補償光学を顕微鏡に適用することで、生きた細胞や組織によって生じる光の乱れを補正し、生きた組織深部でも超解像イメージングが実現できると期待される<sup>12,13)</sup>。補償光学をライブセルイメージングや超解像イメージングに適用しようとする研究は、まだ限られた研究室からしか報告されていないものの、研究自体は世界各地で行われており、超解像イメージングの必要性拡大に伴って、研究がさらに発展すると考えられる。

### 3. 補償光学を超解像イメージングに適用する際の課題

天体観測に使用されている補償光学をそのままライブセルイメージングや超解像イメージングに使用しても、十分な補正能が得られないことが分かってきている。その理由の一つが、補正範囲の狭さである。現在の天体観測用補償光学の補正範囲は、参照光源であるガイド星を中心に約10秒角（約1/360度）である。地球上から見た月の直径が約30分角（約0.5度）であることから、補正範囲がどれだけ狭いかがわかる。天体観測の場合は、人工ガイド星を観測対象の天体のごく近傍（数秒角以内）に設定すれば、観測対象の天体一つを観察する分には問題ない。しかし、ライブセルイメージングの場合はほぼ常に広視野観測が求められるため、天体観測の補償光学では視野が決定的に不足する。

この問題は、例えば広視野を照明しなくてはならない構造化照明顕微鏡法（SIM）<sup>14)</sup>では致命的な問題であるが、入射光で試料内を走査する誘導放出（STED）顕微鏡法<sup>15)</sup>では、補正範囲が狭くても走査の過程で補正量を随時変更すれば広視野観察が可能であるように思われるかもしれない。しかし、補正範囲が狭い場合、走査のスピード（一般に $\mu$ 秒オーダー）に補正のスピード（一般にm秒オーダー）が追いつかないため、現実的ではない。また、生体内には必ずしも適切な頻度で参照光源を得られないため、部位ごとの補正量を決定することは容易ではない。

次の問題が、光が通過する媒質の性質の違いである。望遠鏡に設置された補償光学の補正対象である大気揺らぎの変化速度は数十～数百 Hz と速いが、低次、つまり比較的複雑でない成分が多い。それに対して、生きた細胞や組織は一般に稠密である<sup>16,17)</sup>。生きた細胞や組織を目で見た時、半透明ないしは混濁していることからわかるように、それらを通じた光の乱れは非常に複雑である。そのため、比較的複雑でない成分を高速で補正する現在の天体観測用補償光学を生きた細胞や組織に使用しようとしてもなかなか補正性能を上げることができない。

### 4. 走査累積波面計測補償光学系

従来の補償光学の狭い視野の問題を解決するために、現在主に2つの手法がとられている。1つ目は、ある程度広い領域に共通する光の乱れのみを補正する方法である。この手法では、補正範囲と補正精度がトレードオフの関係にあり、補正範囲を広くすればするほどそこを通過する光の乱れが平均化されるため、補正精度が低下する。現在研究が行われているライブセルイメージング用、超解像イメージング用の補償光学の大半がこの手法を用いている。

その中でも特筆すべきは、米国 Janelia Research Campus の Kai Wang 博士（現 Chinese Academy of Sciences）、一分子局在化法の開発者の一人でもある Eric Betzig 博士らによって構築された走査累積波面計測補償光学系（筆者らの意識、鍵となる“descan”を「走査累積」と訳した<sup>3)</sup>）である（図3）<sup>18)</sup>。この手法は、観察領域を任意の小さなブロックに分割し、そのブロック内を3次元的に走査しながら光の乱れの計測を行うものである。その際、ガルバノミラーの後ろに波面センサーを配置することで、広い領域から得られた蛍光を累積しながら光の乱れを計測することが可能となる。この手法は、多様な生物試料に応じて補正範囲を任意に設定できるだけでなく、光障害と光の乱れの計測の安定性についても優れている。具体的には、レーザーが3次元空間を走査しながら光の乱れ計測を行うため、1点からの蛍光を用いて光の乱れ計測を行う従来手法と比較して、蛍光タンパク質の退色や細胞へのダメージが軽減される。また、特定の領域内で参照光源として使える明るい蛍光体を得ることは容易ではないが、3次元空間を走査し、光の乱れの情報を累積しながら計測することで、

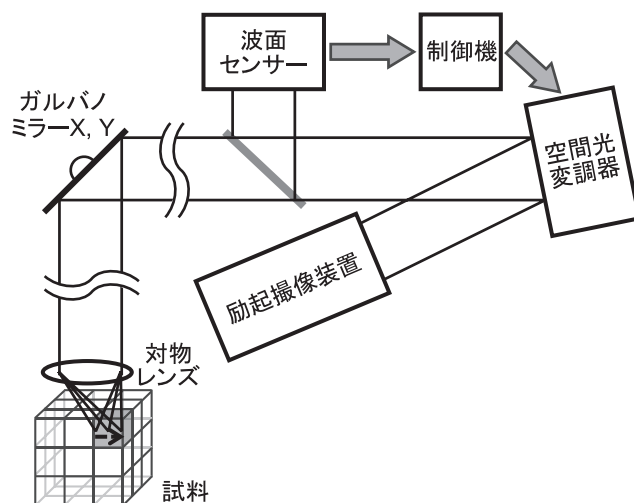


図3 走査累積波面計測補償光学顕微鏡の模式図<sup>18)</sup>。観察領域を任意のサイズのブロックに区切って、それぞれのブロックを励起光で走査しつつ、得られた蛍光を累積して波面センサーにて計測することで、特定の参照光源がなくても安定して光の乱れを測定することができる。図では試料を $3 \times 3 \times 3$ の27ブロックに区切っている。

生物試料に一般的な弱くまばらな蛍光であっても安定して光の乱れを計測することができる。

## 5. 広視野補償光学系

走査累積波面計測補償光学系であっても、補正範囲と補正精度がトレードオフであることには変わりはない。補正精度を確保しながら、ある程度広い補正視野を得る方法はないのだろうか。天文学では、そうした方法として広視野補償光学が提案され、そのための研究開発が始められている(図4)<sup>19,20)</sup>。広視野補償光学は、複数の参照光源と波面センサーを用いて、光の乱れを引き起こす大気揺らぎの構造をトモグラフィによって3次元的に推定し、それをもとに複数の空間光変調器により補正を行うものである。これによって、一枚の空間光変調器を用いる従来の補償光学より広視野かつ精度良く補正を行うことが可能となる。

広視野補償光学を天体観測に用いる際の一番の難点がトモグラフィによる大気揺らぎの構造の3次元的な推定であ

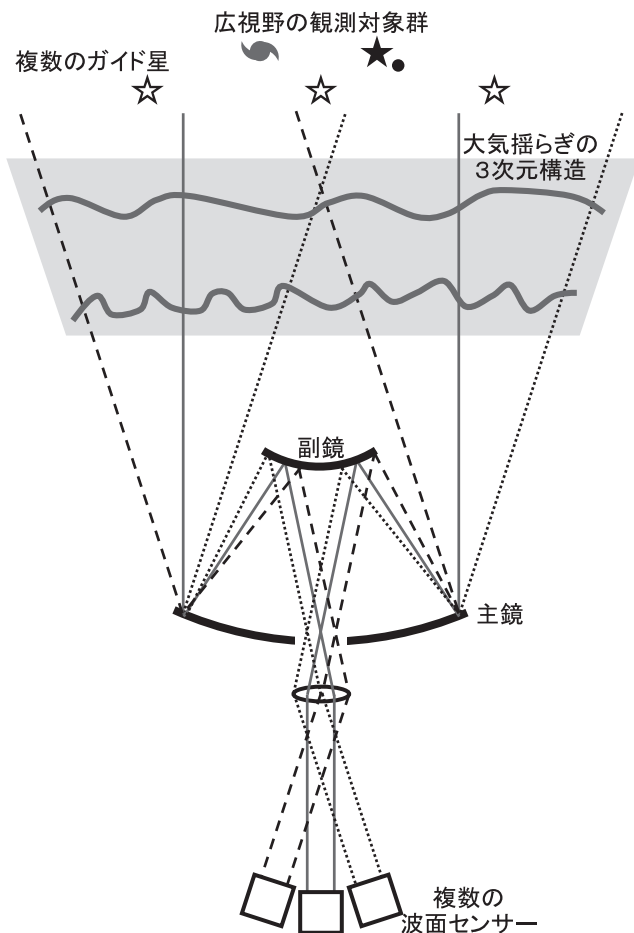


図4 広視野補償光学の模式図。複数の参照光源と複数の波面センサーを用いてそれぞれ光の乱れを計測し、トモグラフィによって大気揺らぎの構造を3次元的に推定する。その情報をもとに、複数の空間光変調器を用いて光の乱れを広視野・高精度に補正する。補正に用いる複数の空間光変調器や撮像素子、制御コンピューターなどは省略している。

る。大気揺らぎの変化速度は速いため、高速(少なくとも1秒間に数百回程度)で大気揺らぎの構造を推定する必要がある。そのため的高速アルゴリズムの開発は容易ではない。一方、生物試料では光の乱れを生じさせる構造体の動きが大気揺らぎほど速くないものが一般的であるため、生物試料における揺らぎの3次元構造をよりじっくりと推定することができる。光の乱れを生じさせる構造体の動きが遅い場合は、複数の波面センサーを用いる必要もなく、一つの波面センサーで順次異なる参照光源を用いて光の乱れを計測し、その後3次元構造を推定してもよい。大型地上望遠鏡と比べて、顕微鏡は機器や光学系が小型ではるかに安価であることもあり、広視野補償光学の基礎的な研究は顕微鏡を用いた方が進めやすいのではないかと考えている。

## 6. それぞれの生物試料に適した補償光学系の設計

次に、大気揺らぎと生物試料の違いの問題に移ろう。補償光学を有効に機能させるためには、光の乱れを引き起こす構造体について、大きさや移動速度、また光に対する影響などといった特性を十分に調査した上で、その構造体による光の乱れを十分に補正できる補償光学系を設計する必要がある。地上望遠鏡に補償光学が実装される際には、光の乱れの原因となる大気揺らぎの性質が十分に調べられ、大気揺らぎによる光の乱れの補正に必要な補償光学のパラメーターが決定された。例えば、すばる望遠鏡では、光の乱れ補正の精度を決める空間光変調器の素子数は188、ストローク(光の位相に対する補正量)は数 $\mu\text{m}$ 、クロズドループの速度は1kHzであり、すばやく動く大気揺らぎに追従しつつ、大気揺らぎによる光の乱れの大部分を補正できる構成となっている<sup>11)</sup>。

その一方、生物試料について、光を乱す原因となる構造体やその構造体と光との相互作用についてはほとんど明らかになっていない。筆者らは、植物細胞(ヒメツリガネゴケ葉細胞)の光学特性を位相差顕微鏡や蛍光ビーズを用いた点像分布解析により明らかにし、葉緑体が植物細胞における揺らぎの主要な原因であることを解明した<sup>17,21)</sup>。また、楕円体である葉緑体の短軸が光が通過する際に、約半波長分、光の位相を遅らせていることを明らかにした。用いた植物細胞における葉緑体の大きさ(典型値で直径5 $\mu\text{m}$ )や動く速度(数 $\mu\text{m}/\text{分}$ )は光学顕微鏡で観察可能である。これらのパラメーターから、葉緑体による光の乱れを補正するためには、最低でも144素子の空間光変調器、数 $\mu\text{m}$ のストローク、数Hzのクロズドループが必要であることを解明し、実際にこの仕様を備えた補償光学系を構築し、植物細胞深部の高解像イメージングを実証した<sup>21,22)</sup>。このように、生物試料は細胞や組織ごとに光学特性が異なるため、補償光学の性能を十分に引き出すためには、観察したい対象ごとに光学特性を調べておき、それに応じた補償光学系を設計する必要がある。

## 7. まとめ：生組織深部の超解像イメージングへ

超解像イメージングに補償光学を適用する研究は、ライ

ブセルイメージング用補償光学研究のパイオニアでもある英国 Oxford 大学の Martin Booth 博士により主に進められている<sup>13,23,24)</sup>。それに加えて、STED 顕微鏡など走査型の超解像顕微鏡には走査累積波面計測補償光学系を用いることが可能であり、また広視野補償光学系が確立されれば走査型以外の顕微鏡にも適用可能である。このようなライブセルイメージング用補償光学の研究が進展することによって、カバーガラスの近傍だけでなく、生きた組織深部での超解像イメージングが実現する日もそう遠くないと考えられる。

最後に、ライブセルイメージング用補償光学の研究が、天体観測など他の研究分野の補償光学研究に役立つことはないのだろうか？ 上述した天体観測用の補償光学は、大気揺らぎの穏やかな数千 m 級の山の頂上に設置され、さらに天気の良い夜の大気揺らぎにあわせて設計されている。例えば、すばる望遠鏡はハワイのマウナケア山 (4,205 m) の頂上に設置され、さらに補償光学が精度よく動作するのは雲がない天気の良い夜に限定される。そうした揺らぎの小さい大気に対して、生きた生物試料は稠密であり、大気で例えれば、大気の揺らぎが強く、しばしば雲がかかった状態に近い。今後、小型で取り回しやすく、安価な顕微鏡の光学系を用いてライブセルイメージング用補償光学の研究が進むことで、小型の望遠鏡、また、大気の揺らぎがより強く、さらには、霞みがかかっているなどの厳しい条件でも動作が可能な補償光学系の開発につながることを期待している。

## 文 献

- 1) Ettinger, A. and Wittmann, T.: *Methods Cell Biol.*, **123**, 77–94 (2014)
- 2) 岡田康志 (編): 初めてのでもできる! 超解像イメージング, 羊土社, 東京, 1–307 (2016)
- 3) 玉田洋介, 早野 裕, 服部雅之: 岡田康志 (編), 初めてのでもできる! 超解像イメージング, 羊土社, 東京, 263–270 (2016)
- 4) Tainaka, K., Kubota, S.I., Suyama, T.Q., Susaki, E.A., Perrin, D., Ukai-Tadenuma, M., Ukai, H. and Ueda, H.R.: *Cell*, **159**, 911–924 (2014)
- 5) Kurihara, D., Mizuta, Y., Sato, Y. and Higashiyama, T.: *Development*,

- 142, 4168–4179 (2015)
- 6) Hasegawa, J., Sakamoto, Y., Nakagami, S., Aida, M., Sawa, S. and Matsunaga, S.: *Plant Cell Physiol.*, **57**, 462–472 (2016)
- 7) Denk, W., Strickler, J.H. and Webb, W.W.: *Science*, **248**, 73–76 (1990)
- 8) Ji, N., Milkie, D.E. and Betzig, E.: *Nat. Methods*, **7**, 141–147 (2010)
- 9) Davies, R. and Kasper, M.: *Annu. Rev. Astron. Astr.*, **50**, 305–351 (2012)
- 10) Foy, R. and Labeyrie, A.: *Astron. Astrophys.*, **152**, L29–L31 (1985)
- 11) Hayano, Y., Takami, H., Takato, N., Kanzawa, T., Kamata, Y., Nakashima, K., Iye, M. and Oya, S.: *Proc. SPIE*, **4007**, 149 (2000)
- 12) Booth, M.J.: *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.*, **365**, 2829–2843 (2007)
- 13) Booth, M., Andrade, D., Burke, D., Patton, B. and Zurauskas, M.: *Microscopy*, **64**, 251–261 (2015)
- 14) Gustafsson, M.G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 13081–13086 (2005)
- 15) Willig, K.I., Rizzoli, S.O., Westphal, V., Jahn, R. and Hell, S.W.: *Nature*, **440**, 935–939 (2006)
- 16) Vogelmann, T.C.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **44**, 231–251 (1993)
- 17) Tamada, Y., Murata, T., Hattori, M., Oya, S., Hayano, Y., Kamei, Y. and Hasebe, M.: *Int. J. Optomechatron.*, **8**, 89–99 (2014)
- 18) Wang, K., Milkie, D.E., Saxena, A., Engerer, P., Misdeld, T., Bronner, M.E., Mumm, J. and Betzig, E.: *Nat. Methods*, **11**, 625–628 (2014)
- 19) Conan, R., Bradley, C., Lardière, O., Blain, C., Venn, K., Andersen, D., Simard, L., Véran, J.-P., Herriot, G., Loop, D., Usuda, T., Oya, S., Hayano, Y., Terada, H. and Akiyama, M.: *Proc. SPIE*, **7736**, 77360T (2010)
- 20) Gendron, E., Vidal, F., Brangier, M., Morris, T., Hubert, Z., Basden, A., Rousset, G., Myers, R., Chemla, F., Longmore, A., Butterley, T., Dipper, N., Dunlop, C., Geng, D., Gratadour, D., Henry, D., Laporte, P., Looker, N., Perret, D., Sevin, A., Talbot, G. and Younger, E.: *Astron. Astrophys.*, **529**, L2 (2011)
- 21) 玉田洋介: 光学, **44**, 384–390 (2015)
- 22) Hattori, M. and Tamada, Y.: *Proc. SPIE*, **10021**, 1002106 (2016)
- 23) Gould, T.J., Burke, D., Bewersdorf, J. and Booth, M.J.: *Opt. Express*, **20**, 20998–21009 (2012)
- 24) Gould, T.J., Kromann, E.B., Burke, D., Booth, M.J. and Bewersdorf, J.: *Opt. Lett.*, **38**, 1860–1862 (2013)