

共焦点顕微鏡の光学系を用いた超解像顕微鏡法

Super-Resolution Microscopy Based on the Confocal Microscope Optics

岡田 康志

Yasushi Okada

理化学研究所・生命システム研究センター

東京大学大学院理学系研究科

要旨 生きた細胞内の微細構造が動く様子を高分解能で観察するためには、空間分解能と比例して時間分解能を向上させる必要がある。しかし、従来の超解像顕微鏡法においては、時間分解能を犠牲にして空間分解能を向上させるものが多く、生きた細胞の観察には適していなかった。筆者らは、超解像顕微鏡法の一つである構造化照明法の原理が共焦点顕微鏡と類似していることに基づき、共焦点顕微鏡の光学系を用いることで構造化照明法を高速化することに成功した。生細胞観察に広く用いられているスピニングディスク式の共焦点顕微鏡の光学系を利用することで、時間分解能 10 ms (100 フレーム毎秒)、空間分解能約 100 nm (回折限界の 2 倍) が達成され、生きた細胞内での細胞内小器官の微細動態が観察可能となった。

キーワード：超解像蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡、構造化照明、スピニングディスク共焦点顕微鏡

1. はじめに

19 世紀に Abbe は、回折格子を通過した回折光がレンズに入射できるかを考察することで、レンズを通過することができる空間周波数には上限があること (カットオフ周波数 f_c)、すなわち達成可能な分解能の限界が回折により制限されることを示した¹⁾。これが Abbe の公式で、(対物) レンズの開口角を θ 、レンズと試料の間の浸液の屈折率を n 、用いる光の波長を λ とし、分解能の限界は

$$d = \frac{1}{f_c} = \frac{\lambda}{2n \sin \theta}$$

となる。たとえば、水中の試料では $n = 1.33$ であるから、分母は 2.66 以下である。すなわち、500 nm の可視光の場合、分解能の限界は $500/2.66 \approx 190$ nm となる。多くの細胞内小器官は、これより小さいため、その形態・動態を光学顕微鏡で観察することは困難であった。

この回折限界を超えて高い分解能を達成する顕微鏡法が超解像顕微鏡法である。20 世紀末頃から、蛍光顕微鏡の特徴を巧みに利用して、Abbe の議論の前提を回避することで超解像顕微鏡法の開発が活発に進められた。蛍光分子局在化法、誘導放出制御法、構造化照明法など様々な方法が開発され、市販化も進んでいる。そのような超解像顕微鏡法を用いるこ

とで、従来は電子顕微鏡を用いなければ観察することが出来なかった微細な形態を蛍光顕微鏡で見ることができるようになった。しかし、光学顕微鏡の一つの特徴である生きた細胞の中での動態観察は困難であった。

たとえば、細胞の中で細胞内小器官が動く速度は $1 \mu\text{m/s}$ 程度である。100 ミリ秒の間に 100 nm 動くので、分解能 100 nm で観察するのであれば 100 ミリ秒より十分速いシャッター速度が必須である。しかし、既存の超解像顕微鏡は、多数回の計測あるいは原画像取得を繰り返して一枚の超解像画像を作成するため、1 秒あるいはそれ以上の時間をかけて撮影する必要があり、動く試料の観察は困難であった。

2. 超解像顕微鏡の高速化を阻む壁

超解像顕微鏡法の原理を簡単に復習しつつ、なぜ高速撮影が難しいかを考えてみよう。

蛍光分子局在化法 (SMLM, Single Molecule Localization Microscopy) では、視野内の蛍光分子全ての位置を計測することで超解像顕微鏡像を再構成する (図 1)²⁾。蛍光分子の位置計測のためには、それぞれの蛍光分子の像が互いに重ならないようにする必要がある。そのために、蛍光色素や照明条件を工夫して、全体のうちごく一部の蛍光分子だけが蛍光を発するようにすることで、像の重なりを避ける。

従って、一枚の原画像では、視野内の蛍光分子のごく一部のみが光っているだけであり、数千~数万枚の原画像を撮影・解析することで全蛍光分子の位置が決定され、超解像顕微鏡像が再構成できる。そのため、仮に原画像 1 枚を 1 ミリ秒で撮影しても、1000 枚の撮影には 1 秒を要する。即ち、高速

〒565-0874 大阪府吹田市古江台 6-2-3
TEL: 06-6155-0118; FAX: 06-6155-0112
E-mail: yokada@riken.jp
2017 年 6 月 7 日受付, 2017 年 7 月 19 日受理

化は難しい。

誘導放出制御法 (STED, Stimulated Emission Depletion) は、共焦点レーザー走査顕微鏡 (CLSM, Confocal Laser Scanning Microscope) の発展型である。CLSM では、限界まで収束させたレーザー光を試料に照射し、その点から生じた蛍光強度を計測する。試料の各点で計測した蛍光強度のマップとして画像が得られる。従って、その分解能はレーザー照射スポットの大きさで決まるが、これも回折により制限される。このとき、励起レーザー光と同軸に焦点面でドーナツ型になるよう位相制御した第2のレーザー光を照射して照射スポットの周辺部の蛍光をオフにすることができれば、ドーナツの孔の部分の蛍光だけが残り、スポットのサイズを小さくすることができる (図2)。すなわち分解能を向上させることができる。しかし、本手法は、試料を1点ずつ走査していく方式であるため、高速化は難しい。例えば 512×512 ピクセルを1ピクセル数マイクロ秒で計測しても、1枚の超解像蛍光顕微鏡像を取得するのに1秒程度の時間を要してしまう。

3つ目の方法が、構造化照明法 (SIM, Structured Illumina-

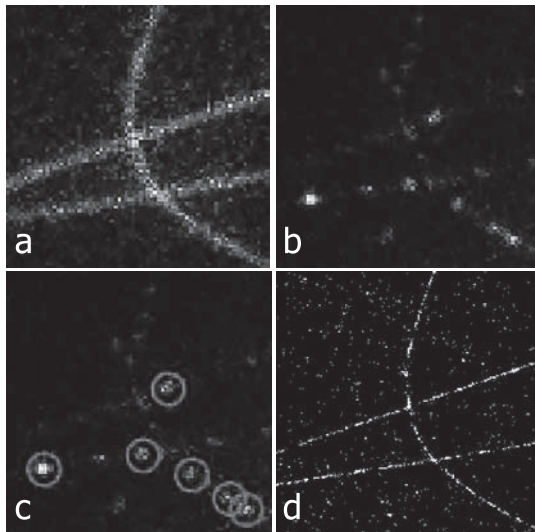


図1 蛍光分子局在化法の原理。全蛍光分子 (a) のうち、ごく一部だけをオンにし (b)、その位置を計測する (c)。全蛍光分子の位置の計測結果から高分解能画像を再構成する (d)。文献2) より転載。

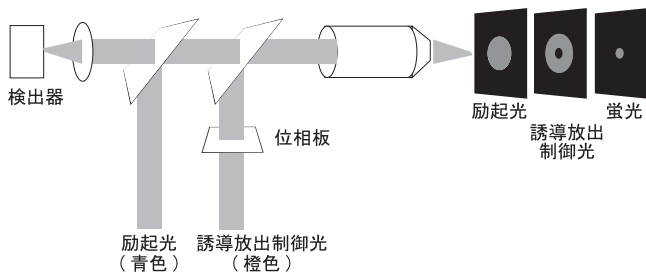


図2 誘導放出制御法の原理。位相板を用いてドーナツ状に整形した誘導放出制御光により、蛍光がドーナツの穴の部分に局限される。文献2) より転載。

tion Microscope) である。その原理はモアレ干渉すなわち喰り (ビート) である (図3)。

Abbe の考察と同様に、空間周波数 f の縞模様を観察する場合を考えてみよう。一様に照明した場合、レンズを通過できる空間周波数の上限がカットオフ周波数 f_c であった。ここで、一様な照明の代わりに、空間周波数 f' の縞模様状の強度分布を持つ照明で照らしてみよう。2つの縞模様がモアレ干渉を起こし、 f と f' の差に相当する低周波数の成分が生じる。従って、対物レンズを通過できる空間周波数の上限を $f_c + f'$ まで広げることができる。ただし、ここで照明に用いる縞模様もレンズ系を通して作成するため、その空間周波数 f' は照明系の開口数によって制限される。特に落射蛍光のように同じ対物レンズで照明と観察を行う場合は、照明の縞模様の周波数の上限も f_c に一致するので (簡単のため、ここでは励起光と蛍光の波長の違いは無視する)、この方法で観察可能な空間周波数の上限は $f_c + f_c = 2f_c$ となる。すなわち、この方法の分解能の限界は、回折限界の2倍である。

さて、このとき得られる顕微鏡像は、モアレ干渉像をレンズ系で結像させたものであり、元の周波数成分 f とモアレ干渉で生じた周波数成分 $f - f'$ および $f + f'$ の3つの成分の重ね合わせである (図4)。そこで、3成分を分離するために、

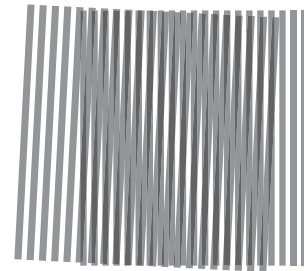


図3 モアレ干渉

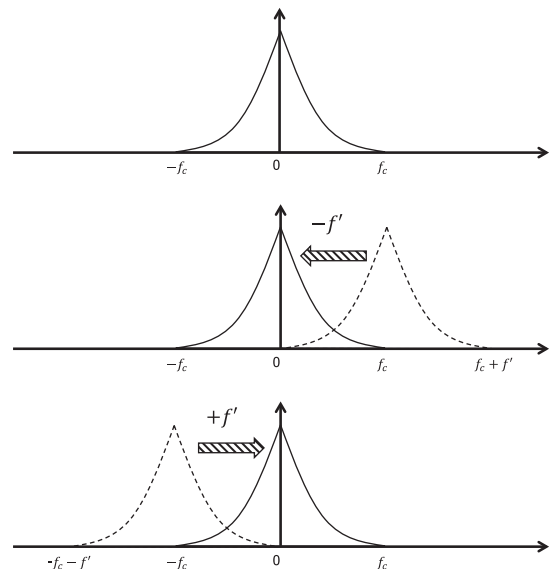


図4 モアレ干渉により3つの成分が重ね合わされる様子

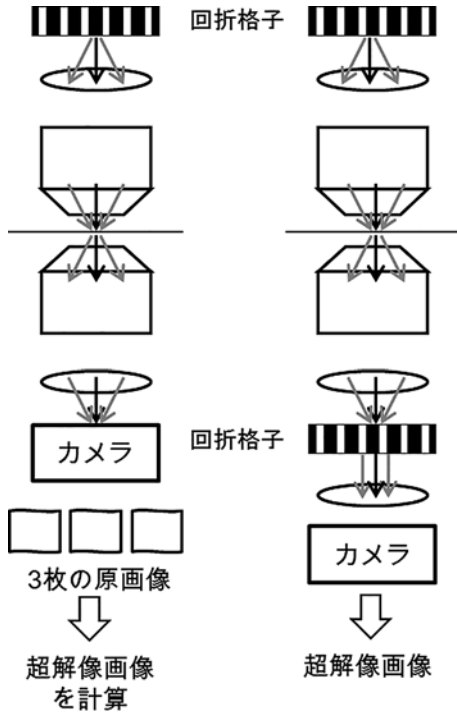


図5 SDSRMの原理. 左:従来の構造化照明法, 右:スピニングディスク超解像顕微鏡 SDSRM. 文献4)より改変して転載.

照明の縞模様の位相を120度ずつ変えて3枚の画像を撮影する。また、モアレ干渉の効果は、縞模様の方向に依存するので、1方向の縞模様だけではその方向の分解能しか向上しない。通常は、2次元面内ではほぼ等方的な効果を得るために、縞模様の方向を120度ずつ変えて3方向（あるいは更に多方向）の撮影を行う。従って、合計9枚（以上）の原画像を撮影し、これを利用して超解像蛍光顕微鏡像を計算機上の画像処理により再構成する。

このように、SIMでは分解能が回折限界の2倍までしか伸びないが、必要な原画像の枚数が少ないため、比較的高速化が容易である。

3. スピニングディスク超解像顕微鏡 SDSRM

上述の通り、SIMは、モアレ干渉成分を分離する計算のために縞模様の方向1枚毎に3枚、縞模様の方向3方向分で合計9枚の原画像を必要とする。もし1枚の原画像から直接超解像画像が得られれば、約10倍の高速化が可能である。理論的には、図5のように、モアレ干渉の元となった照明系の縞模様と同じ周波数・位相の縞模様ともう一度干渉させれば、再び干渉が生じて、 $(f-f') + f'$ のような周波数成分が生じる。即ち、モアレ干渉によって対物レンズを通過できるようになった超解像成分が元の空間周波数成分として復活する。

これを実装するためには、落射蛍光の光路で照明と観察の共通光路に縞模様状のスリットパターンを置けばよい。この光学系は、スリット移動式共焦点顕微鏡に他ならない。すなわち、適切に設計すれば、スリット移動式共焦点顕微鏡は、

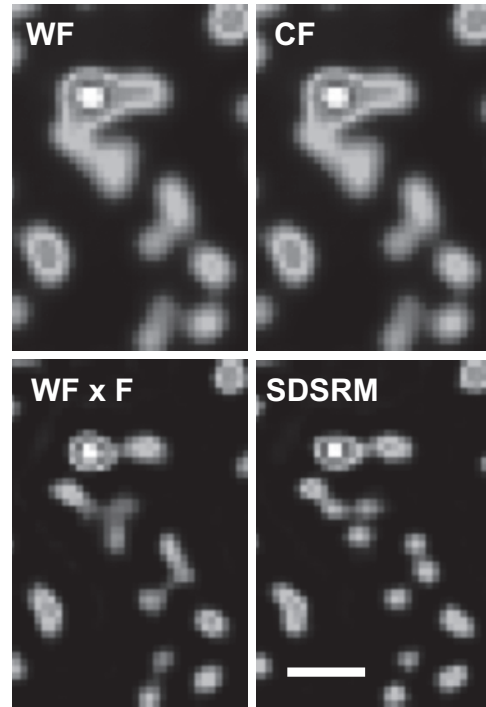


図6 蛍光ビーズを用いた分解能のテスト. WF:従来の落射蛍光顕微鏡像, CF:共焦点顕微鏡像, WFxF:WF像をデコンボリューション処理した像, SDSRM:スピニングディスク超解像顕微鏡像. スケールバーは0.5 μm . 文献4)より改変して転載.

SIMと同等の超解像が達成できることが示唆された⁴⁾。スリット移動式共焦点顕微鏡を2次元に拡張すれば、スピニングディスク式共焦点顕微鏡となることから、スピニングディスク式共焦点顕微鏡の光学系を用いることで、SIMと同様の超解像顕微鏡を構成することが可能となる。

そこで、私たちは、上記理論に基づく設計でディスクを作成し、既存のスピニングディスク式共焦点顕微鏡に組み込んで分解能の計測を行った(図6)。その結果、落射蛍光法(WF)、共焦点顕微鏡(CF)、デコンボリューション法(WFxF)では分離して解像することの出来ない蛍光ビーズが、キレイに分離して見えることが確認された。そして、この方法をスピニングディスク超解像顕微鏡法 SDSRM (Spinning Disk Super-Resolution Microscopy) と命名し、ライブセルイメージングに必要な時間分解能を達成するための調整を行った。その結果、シャッター速度は最高で10ミリ秒すなわち100フレーム毎秒まで高速化することに成功し、1 $\mu\text{m}/\text{s}$ 以上の速度で動く細胞内小器官を動きによるボケの影響なく超解像ライブイメージングすることに成功した(図7)。

4. 簡易超解像顕微鏡

詳しい議論は割愛するが⁴⁾、SDSRMにおいて、超解像に寄与する高分解能成分を得るためには、縞模様の開口が0.5 Airy unit (以下 AU)程度であることが主に効いている。縞模様の間隔は、大きくしても画像が全体に暗くなるだけで、

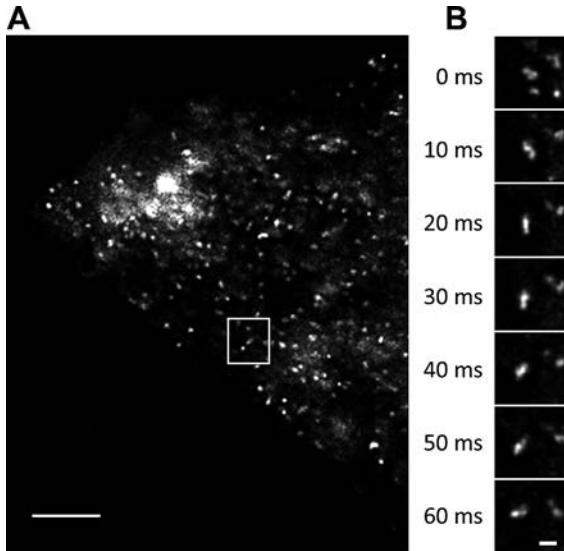


図7 高速に動く細胞内小器官(リサイクリングエンドソーム)の動態. A)全体図, B)Aの四角い枠部分の拡大図. スケールバー 5 μm (A), 0.5 μm (B). 文献4)より転載.

分解能には直接影響しない. そこで, 縞模様の間隔を無限に広げた場合を考えると, SDSRMはピンホール開口を0.5 AU程度まで絞ったCLSMと等価であることが判る.

CLSMでピンホール開口を無限小にしたときにカットオフ周波数が通常の蛍光顕微鏡の2倍になるという理論的な考察は, 共焦点顕微鏡が提唱された初期に行われていた. しかし, ピンホール開口を小さくすると, ピンホールを通過して検出器に到達する光子の量が減ってしまう. 生物試料の蛍光観察では, フォトブリーチングや光毒性などの問題があり, 実用的な信号強度を得るためにピンホール開口を1 AU程度まで広げて用いることが通例であった.

私たちは, SDSRMと同様の理論的考察に基づき, ピンホール開口が0.5 AUで通常の蛍光顕微鏡の約2倍の分解能が達成可能であると考え, 実機での計測を行った. 従来型の検出器である光電子増倍管を用いた場合は, S/Nが悪く分解能はあまり伸びなかったが, 最近導入されたGaAsP光電面を持つ新型検出器を用いることでS/Nは大幅に改善された. さらに, 64回加算平均などでS/Nを向上させることで, 理論通りに分解能が向上できることが確認された. しかし, この方法では, 多数回の加算平均処理のため撮影時間が5分以上かかってしまう. これについては, デコンボリューション法を併用することで大幅に改善可能であることが確認された. 現在では, 多くの新型検出器を装備したCLSMで高分解能化オプションのような形で本手法が実装されている.

5. イメージスキャニング顕微鏡

このように, 共焦点顕微鏡を用いると, 単にピンホールを閉じるだけで, 簡単に分解能を向上させることができる. しかし, ピンホールを閉じることにより信号のロスが生じる. 生細胞観察など, 励起光強度に制限がある場合には, 信号の

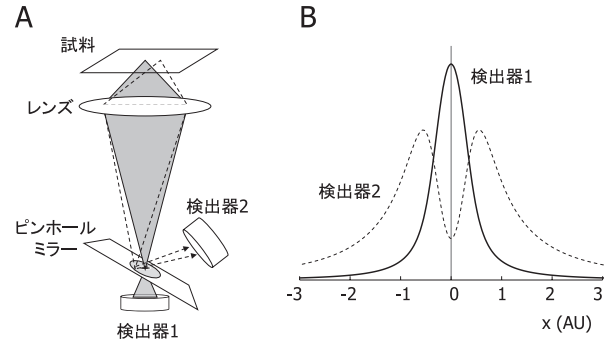


図8 VAASの原理. A) ピンホールの空いたミラーを用いることで, ピンホールを通過しなかった光を2つめの検出器に導くことができる. B) 2つの検出器のPSF. 両者の差をとることで, 信号を減弱することなくシャープなPSFが実現できる.

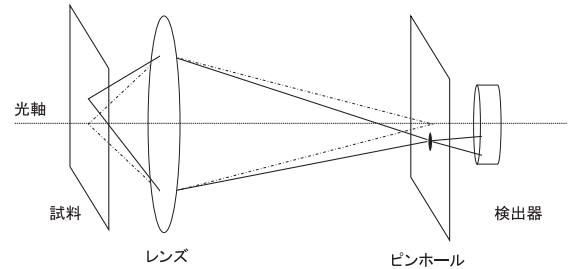


図9 ISMの原理. 光軸からずれたピンホールは, 試料面で光軸から逆方向にずれた点からの光を通過する.

ロス最低限に留めたい.

そこで, ピンホールの開口を閉じることなく分解能を向上させる方法として, 私たちは同心円状の二重ピンホールを用いた検出器 (VAAS: Virtual Adaptive Aperture System) を考案した⁵⁾. 中央のピンホールを通過した信号と, 中央のピンホールを通過できず周囲のドーナツ型の部分を通過した信号を同時に取得する. 両者の差をとることで, ピンホールを閉じることなく, そして信号強度を減弱させることなく, 分解能を向上させることが可能となる.

これを発展させた方法として, ピンホール面に二次元検出器を置く Image Scanning Microscopy (ISM) がドイツのグループによって提案された⁶⁾. その原理を簡単に紹介しよう.

通常の共焦点顕微鏡では, 光軸上にピンホールが置かれている. そのため, 試料面の光軸上の点からの光がピンホールを通過して検出される.

では, ピンホールを光軸からほんの少しずらすとどうなるだろうか (図9). ピンホールを通過するのは, 試料面で光軸から逆方向に少しずれた点からの光となる.

同様に, ピンホールを1個だけ置くのではなく, 例えば, 9個のピンホールを3×3の正方形に並べたものを置いて, 各ピンホールを通過した光を別々の検出器で検出すると, 各検出器は試料面のそれぞれ異なる点からの光を検出していることになる.

この状態で, 通常の共焦点顕微鏡と同様に試料を2次元

に走査すると、9個の検出器は少しずつずれた画像を記録することになるので、得られた9枚の画像は、互いに少しずつ上下左右にずれているものの同一の画像になる筈で、ズレを補正すれば互いに重ねることができる。このとき、ピンホールが1個の共焦点顕微鏡に比べると、光軸上のピンホールを通過することが出来なかった光も、周りの8個のピンホールを通過して検出器に到達している。すなわち、通常の共焦点顕微鏡ではピンホールを通過せず捨ててしまう光を、信号として有効に利用することができる。

この原理を実装した共焦点顕微鏡が、Zeiss社から市販化された。32本の光ファイバーを束ねたもの一端をピンホールの代わりに置き、ファイバーの他端を32チャンネルの光電子増倍管アレイに導く。光ファイバーの各開口が、0.2 AU相当のピンホールとして作用し、32個のピンホールが2次元的に並んだ検出器として働く。従って、個々のピンホール径は0.2 AU相当まで絞り込まれて、高い空間解像度が達成でき、しかもピンホール面に届いた光は光ファイバーのどれかに入射して検出されて、信号として有効に利用される。

6. まとめと展望

共焦点顕微鏡がミンスキーによって提案されて60年以上、

生物学研究への応用が広まって約30年が経過した。既に成熟した技術として定着普及している装置と思われがちであるが、本稿で述べたように超解像顕微鏡という新しい視点から見直すことで、共焦点顕微鏡光学系の新しい活用法が見出されている。これからも、周辺技術たとえば光源・検出器・プローブの発展と、新しい解析手法の開発によって、更に大きく発展させることが可能ではないかと期待される。

謝 辞

SDSRMはオリンパス社との、VAASはニコン社との共同研究の成果である。オリンパス社の阿部勝行氏、林真市氏、ニコン社（当時）の奥川久氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Abbe, E.: *Arch. für Mikroskopische Anat.*, **9**, 413–418 (1873)
- 2) 岡田康志: 原田慶恵, 石渡信一 (編) 1分子生物学 化学同人, 252–261 (2014)
- 3) Arroyo-Camejo, S. et al.: *ACS Nano*, **7**, 10912–10919 (2013)
- 4) Hayashi, S. and Okada, Y.: *Mol Biol Cell.*, **26**, 1743–1751 (2015)
- 5) Okugawa, H.: *Proc. SPIE* 6860, 68600K (2008)
- 6) Sheppard, C.J.R., Mehta, S.B. and Heintzmann, R.: *Opt. Lett.*, **38**, 2889–2892 (2013)