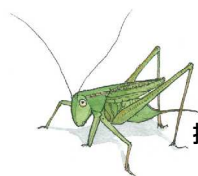


超解像蛍光顕微鏡



技術解説

藤田 克昌*

Superresolution fluorescence microscopy

Key Words : optical microscopy, laser microscopy, fluorescence, super resolution, diffraction limit

はじめに

1900 年前後に顕微鏡の結像理論の基礎が確立されてから、光学顕微鏡では光の波長の半分以上の構造は解像できないとされてきた。しかし、近年、この波動性の限界を超えた空間分解能を有する超解像顕微鏡が多く登場しており、その中でも顕著な功績を挙げた E. Betzig 氏、S. W. Hell 氏、W. E. Moerner 氏に 2014 年のノーベル化学賞が贈られた。本稿では、まず簡単に光学顕微鏡の空間分解能について概説した後、超解像顕微鏡の原理やそれを可能とした技術背景について簡単に紹介する。

光学顕微鏡の空間分解能

光学顕微鏡には数多くの種類があるが、これまで開発されてきた超解像顕微鏡は主に蛍光を発する試料の観察を目的としているため、ここでは蛍光顕微鏡の空間分解の限界について、まず簡単に解説する。

蛍光顕微鏡は、広視野顕微鏡とレーザー走査顕微鏡との 2 つに大別される。広視野顕微鏡では、試料の観察領域が一様に照明され、その照明光に励起された試料が発する蛍光を使って検出器（目の網膜やカメラ上）に像を結ばせる。このとき光は波として空間を伝搬していくため、たとえば 1 つの分子から出た光であっても、検出器上ではある程度の大きさに

広がったスポットとして観察される。この像（点像と呼ばれる）の広がりのために、波長の半分よりも近い距離に近接した発光点を分離して観察することはできなかった（図 1 a）。

もう一方のレーザー走査顕微鏡では、レーザー光を試料に集光して試料の蛍光を励起する。レーザー集光点内の試料のみが蛍光を発するため、この蛍光の強度を測定しながら別の部位にレーザー集光点を移動させるという、レーザー走査を行うことによって観察面の蛍光物質の分布を計測していく。この場合、レーザー集光点の大きさが分解可能な構造の大きさを決定する。つまり、レーザー集光点が小さければ短い距離での蛍光試料の変化を細かく判別できるが、大きければ大雑把にしか判別できない。このレーザー集光点の大きさも光の波動性により決定されており、波長の半分程度が限界である。このためどんなに高性能なレンズを用いてもレーザー集光点よりも小さな構造体を解像することはできなかった（図 1 b）。

これらの 2 つの蛍光顕微鏡について多くの超解像法が提案されているが、以下に、ノーベル賞の受賞理由となった局在化顕微鏡と STED 顕微鏡とを紹介する。加えて、私自身が以前より開発してきた超解像顕微鏡である飽和励起顕微鏡についても簡単に紹介する。

局在化顕微鏡 (Localization Microscopy)

局在化顕微鏡は広視野蛍光顕微鏡をベースに開発された超解像顕微鏡である。広視野蛍光顕微鏡では、図 1 a に示したように、蛍光発光体をすべて同時に結像してしまうため、それらの点像が重なってしまい、各発光体を区別できないでいた。では、各発光体を同時に結像しなければどうなるであろうか。

局在化顕微鏡は、各発光体を異なる時間で発光さ



* Katsumasa FUJITA

1972年12月生
大阪大学 大学院工学研究科 応用物理学専攻 (2000年)
現在、大阪大学 大学院工学研究科 精密科学・応用物理学専攻 准教授
博士(工学) フォトニクス
TEL : 06-6879-7847
FAX : 06-6879-7330
E-mail : fujita@ap.eng.osaka-u.ac.jp

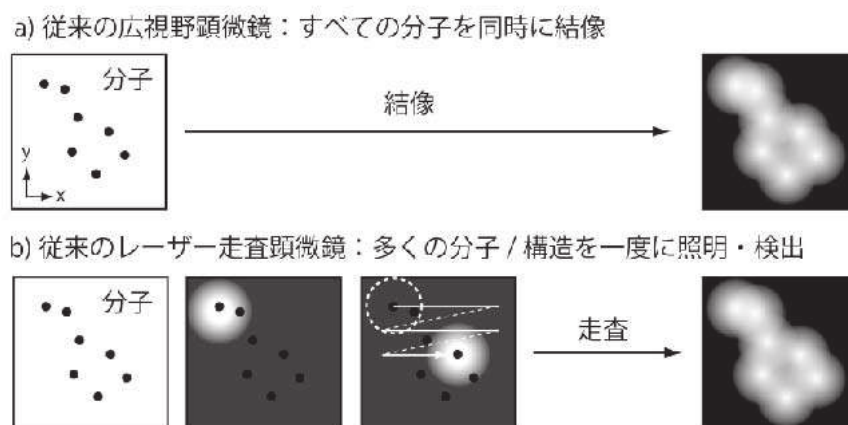


図1 a) 従来の広視野蛍光顕微鏡、およびb) レーザー走査顕微鏡による結像の様子。
光の波動性により像が広がり、空間分解能を制限している。

せることにより、各発光体を分離して計測する。図2 a)に示すように、各発光体が異なる時間に発光すれば、それらを1つずつ計測していき、その点像の中心を発光体の座標として記録すれば良い。発光点が1つの場合は、位置の計測 (Localization) の精度は $\sigma / \sqrt{N}$ (σ : 点像の広がり、 N : 検出される光子数) となり、波長の半分よりも高くできる。2つの発光点があっても波長の半分以上離れていれば問題なく、別々に位置計測を行える。このように発光点の計測を時間的に分離して計測していけば、高い精度で蛍光体の分布を知ることができ、この分布が蛍光観察像となる。

この発光点を分離して計測するという手法は1995年にBetzigにより提案された[1]。しかし、その当時は時間的に発光点を分離するというアイデア

には至っておらず、現実的な手法としては認識されていなかった。その後、Moerner氏らが蛍光体の発光性を光でon/off制御できることを発見した[2]。この発光性の制御に着目することによりBetzig氏は、超解像顕微鏡のアイデアを具体化することに成功し2006年に発表した。2006年には、Hess氏、Zhuang氏もよく似た局在化顕微鏡法をそれぞれ提案しており[3-5]、現在も活発に開発、応用を進めている。この二人はノーベル賞の受賞者には選ばれなかったのは、Betzig氏のアイデアとMoerner氏の発見が超解像顕微鏡の開発の鍵となったためであろう。Betzig氏、Hess氏、Zhuang氏はそれぞれの手法をPhotoactivated localization microscopy (PALM)、Fluorescence photoactivation localization microscopy (FPALM)、Stochastic optical reconstruction mi

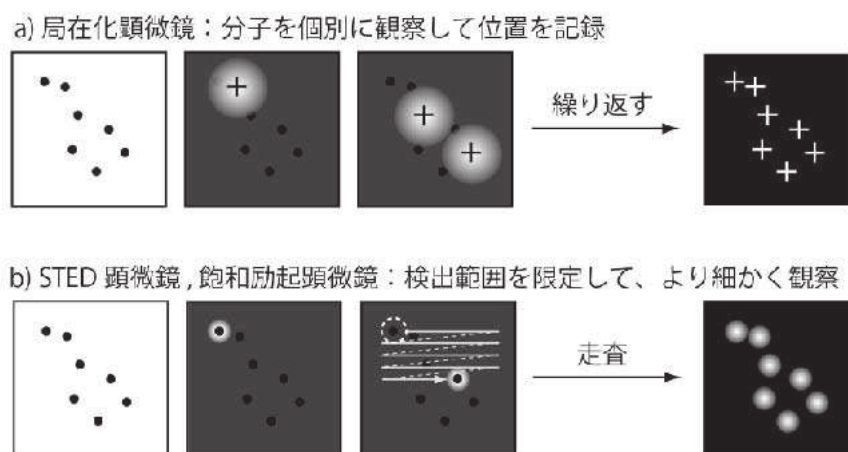


図2 a) 局在化顕微鏡、およびb) STED 顕微鏡、飽和励起顕微鏡による空間分解能向上の原理。

croscopy (STORM) と名付けて発表しており、局在化顕微鏡はこれらの名でも知られている。

局在化顕微鏡での観察結果の例として、図3に細胞内の微小管を局在化顕微鏡で観察した例を示す。局在化顕微鏡では空間分解能が大きく向上しており、細胞内部の微小管のネットワークをより詳細に観察できていることが分かる。

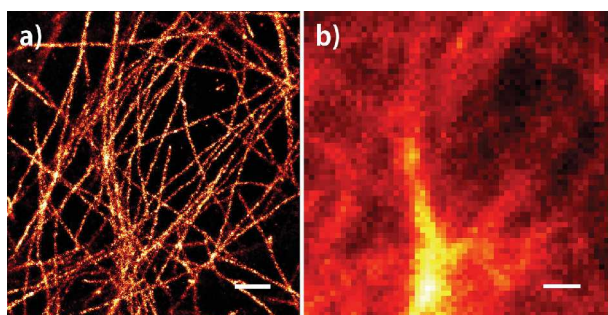


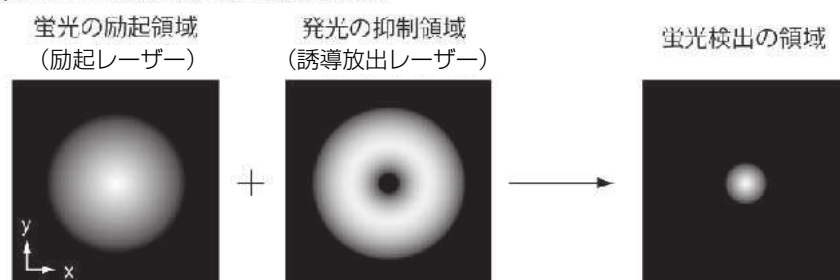
図3 a) 局在化顕微鏡、および b) 従来の広視野蛍光顕微鏡により観察した HeLa 細胞の微小管の蛍光像。米カリフォルニア大学の Bo Huang 先生により提供。

STED 顕微鏡 (Stimulated Emission Depletion Microscopy) / 飽和励起顕微鏡 (Saturated Excitation Microscopy)

レーザー走査顕微鏡では、いかに蛍光発光の検出範囲を小さくできるかで空間分解能が決定される。しかし、レーザー集光点の大きさは光の波長で決定され、この物理限界を破ることはできない。そこで、レーザー走査顕微鏡の超解像化では、レーザー集光点の大きさを変えずに、蛍光を検出する領域を狭めるというアプローチをとっている (図2b)。それが以下で紹介する STED 顕微鏡、飽和励起顕微鏡である。

STED (Stimulated Emission Depletion) 顕微鏡は、誘導放出を利用して蛍光の検出領域を狭めている [6]。図4に示すように、励起レーザー集光点周辺に誘導放出用の別のレーザー光をドーナツ状に配置する。励起レーザーで励起された蛍光分子のうち、励起集光点の周辺部位は誘導放出により発光し、その中心部は自然放出により発光する。このため、自然放出による蛍光のみを検出すれば、励起レーザー集光点の中心部分の蛍光分子のみを計測でき、通常のレーザー走査顕微鏡に比べて空間分解能を向上で

a) STED による蛍光検出領域の制限



b) STED 光の強度の増大による空間分解能の向上

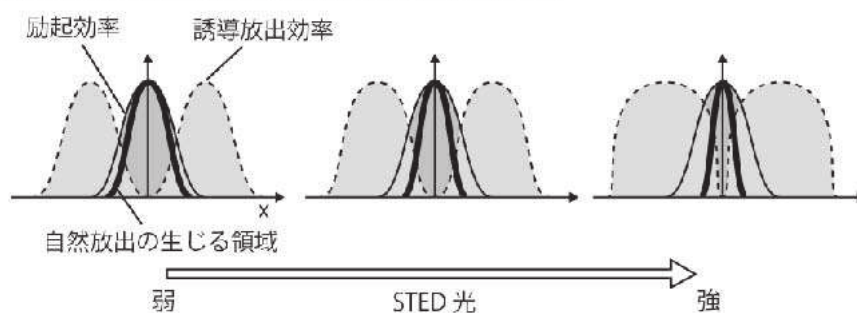


図4 STED 顕微鏡における空間分解能向上の原理。
a) 誘導放出を利用し、自然放出による蛍光の発光領域を制限。
b) 誘導放出を飽和させ、さらに空間分解能を向上。

きる。誘導放出では誘導放出レーザーと同じ波長の発光が生じ、自然放出では広いスペクトル領域において発光が生じる。このため、波長フィルターを用いれば容易に自然放出のみを測定できる。

上記のように STED 顕微鏡では誘導放出レーザーのドーナツの穴の大きさを小さくできれば空間分解能を高めることができる。しかし、ドーナツ状に成形された光では、その穴の大きさも波長の半分が限界である。これでは、従来の光学顕微鏡の限界を超えることはできない。

STED 顕微鏡では誘導放出の飽和を利用してドーナツの穴の大きさを実質的に波長の半分よりも小さくする。誘導放出の効率は 100% を超えることは無いため、図 4 に示すように、誘導放出レーザーの強度を大きくしていけば、誘導放出効率でみたドーナツの穴は次第に小さくなっていく。これは、ドーナツの穴の中心の光強度がゼロの部分では、いくら誘導放出レーザーの強度を大きくしても誘導放出は起こらず、自然放出での発光のみとなるためである。誘導放出レーザーの強度を大きくできれば非常に高い空間分解能を得られることになるが、実際は試料や発光体を強度の高い光が破壊されない程度にレーザー強度を抑える必要があり、これが実際の空間分解能の限界（生体試料では 40nm 程度）を決定する。褪色を生じない蛍光体である蛍光性ナノダイヤモンドを使った実験では 7nm の空間分解能が達成されている。

図 5 は STED 顕微鏡で観察したヒト癌細胞内の微細構造である。従来のレーザー走査顕微鏡（共焦点顕微鏡）に比べ、STED 顕微鏡では細胞内の構造がより詳細に捉えられていることが分かる。

我々が開発をしている飽和励起顕微鏡もレーザー走査型の顕微鏡であり、蛍光発光の飽和現象を利用して空間分解能を向上させる [7]。蛍光分子を励起する光の強度を大きくしていくと、それに比例して蛍光の強度も大きくなるが、そのうち飽和する。飽和が生じる理由は、蛍光分子の励起状態には寿命があり、励起状態にある蛍光分子にさらに励起光子が入射しても、蛍光強度の上昇は生じないことによる。レーザー光を集光して蛍光励起を行う場合は、励起光強度の高い集光スポットの中心付近で飽和励起が顕著に表れ、その部位での励起光強度と蛍光強度との関係は非線形となる。この非線形な蛍光応答のみ

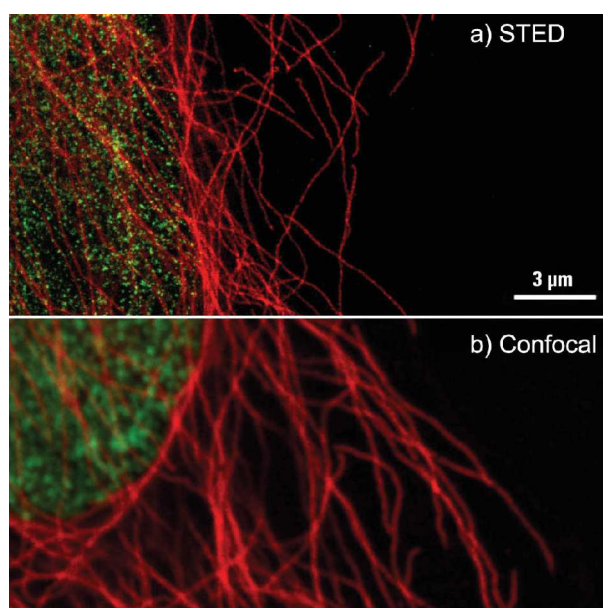


図 5 a) STED 顕微鏡、および b) 共焦点顕微鏡により観察された HeLa 細胞の細胞内の微細構造。ライカマイクロシステムズ (株) より提供。

を分離検出できれば励起レーザー中心部位の蛍光分子のみを限定的に計測でき、空間分解能が向上した観察像を取得できる。

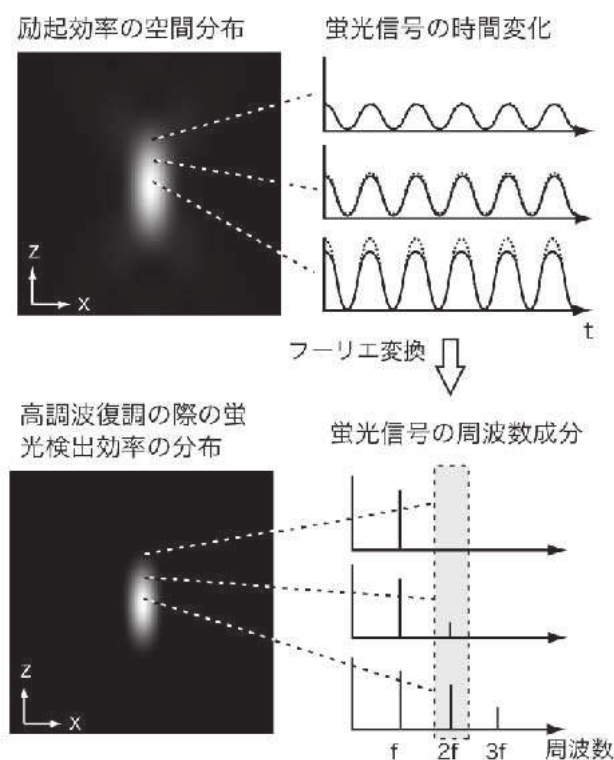


図 6 飽和励起顕微鏡における空間分解能向上の原理。蛍光励起の飽和により生じる非線形な蛍光応答を検出することで高い解像度の像を得る。

この飽和を生じた蛍光発光の検出は、時間的に強度変調されたレーザー光により蛍光を励起し、蛍光信号をその2倍、3倍の高調波周波数で復調することにより行う(図6)。これにより非線形に応答する蛍光信号を分離検出でき、その強度の空間分布により蛍光像を構築できる。この手法は、一般的な共焦点顕微鏡のレーザー光強度を変調し、検出する蛍光信号をロックイン検出するという簡易な手法で実現できる。図7に従来のレーザー走査顕微鏡(共焦点顕微鏡)、および飽和励起顕微鏡により観察されたヒト細胞の骨格構造(アクチンフィラメント)を示す[8]。飽和励起を行って観察した結果では、細胞の内部構造をより詳細に結像できていることが分かる。SAX 顕微鏡では高調波復調の周波数を大きくすると空間分解能を制限無く向上できる。しかし、高調波信号の強度が小さいため、実際には、蛍光測定信号対雑音比により復調に利用可能な周波数は制限されている。

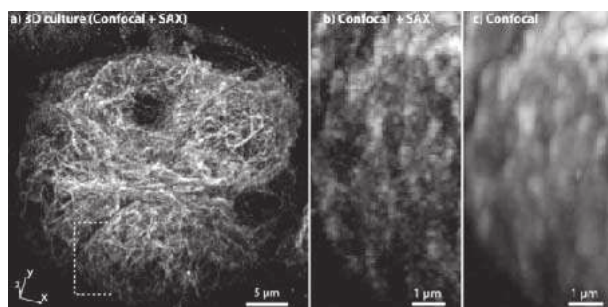


図7 a) 飽和励起顕微鏡で観察した3次元培養されたHeLa細胞の骨格構造(アクチン繊維)。b)はa)の点線部位の拡大像。c)は同じ部位を従来の共焦点顕微鏡により観察した結果。

おわりに

局在化顕微鏡やSTED顕微鏡は数年前には実用化され、販売されている。高価なものであるため、まだ多くの研究室には普及しておらず、医学、生物学分野を大きく前進させたという点には至っていない。それでもなお2014年にノーベル賞が贈られたのは、これまでの限界を超えた解像力での光学観察が、多くの研究者の手に届く範囲にもたらされたことによるものであろう。それにより今後多くの新しい発見があると期待されているものと思われる。実際、位相差顕微鏡(ゼルニケ、1953年)、暗視野顕微鏡(ジクモンディ、1925年)、電子顕微鏡(ルスカ、1986年)、走査トンネル顕微鏡(ビーニッヒ、ローラー、1986年)と顕微鏡の開発には多くのノーベル賞が贈られている。そのどれもが現在の科学の発展に大きく寄与していることを考えると、超解像蛍光顕微鏡も今後の科学の発展に大きく貢献すると期待できるだろう。

参考文献

1. Betzig, Opt. Lett., 20, 237 (1995).
2. Dickson et al., Nature, 388, 355 (1997).
3. Betzig et al., Science, 313, 1642 (2006).
4. Hess et al., Biophys. J., 91, 4258 (2006).
5. Rust et al., Nat. Methods, 3, 793 (2006).
6. Hell et al., Opt. Lett., 19, 780 (1994).
7. Fujita et al., Phys. Rev. Lett., 99, 228105 (2007).
8. Yamanaka et al., J. Biomed. Opt., 18, 126002 (2013).

