

# 光と物質の非線形相互作用を利用した構造化照明顕微鏡

照井 勇輝  
(株式会社ニコン)

近年、回折限界を上回る分解能をもつ超解像顕微鏡の研究が盛んに行われており、生物分野の研究者の注目を集めている。提案されている手法の多くは、蛍光顕微鏡を想定している。蛍光顕微鏡とは、観察対象を蛍光分子で標識し、励起した蛍光分子から発せられる蛍光を観測する手法であり、生物分野において広く普及している。超解像顕微鏡の中には、原理的には無限に高い分解能をもつ手法も存在する。これは従来の光学理論が間違っていたことを意味するのではなく、従来の理論が想定していなかった、光と蛍光分子の非線形相互作用を利用しているからである。本稿では、超解像顕微鏡の一種である構造化照明顕微鏡を題材にして、光と蛍光分子の非線形相互作用によって分解能が向上する仕組みを解説する。既存の枠組みにとらわれずに性能向上を達成した一例として、楽しんでいただければ幸いである。

## 1. 構造化照明顕微鏡

非線形の場合を議論する前に、線形相互作用の場合から始めよう。「線形」の意味については次節で明らかにする。構造化照明顕微鏡 (structured illumination microscopy; SIM) は、特定のパターンの照明を用いることにより、従来顕微鏡の約 2 倍の分解能が得られる手法である<sup>1)</sup>。正弦波照明を用いるのが一般的であるが、原理的には照明パターンはこれに限らない (スペckル照明でもよい!)。以下では正弦波照明の場合について説明するが、ほかの照明パターンでも本質は変わらない。

正弦波状の強度分布をもつ光を試料に照射すると、試料中に存在する蛍光分子が励起されて蛍光を発する。このとき、蛍光分子の分布がもつ本来の空間周波数とは別に、照明光の空間周波数だけシフトした周波数成分が発生する (図 1 (a))。これはモアレとよばれており、蛍光分子の分布と照明縞の空間周波数ベクトルをそれぞれ  $\vec{K}_s$ 、 $\vec{K}_m$  とすると、モアレの空間周波数ベクトルは次式で表される。

$$\vec{K}_m = \vec{K}_s \pm \vec{K}_m \quad (1)$$

図 1 (b) において、従来顕微鏡が観測可能な周波数成分は

実線内部のみであるが、SIM では点線内部の成分が粗いモアレ成分に化けて観測できるようになる。このモアレ成分を周波数空間でシフトして元の周波数成分に戻してやることで、従来よりも高周波数までの物体スペクトルを再構成できる、というのが SIM の基本的なアイデアである。一般的に、照明縞は対物レンズを使って形成されるため、 $\vec{K}_m$  は対物レンズの限界周波数で制限される。また、モアレも同じ対物レンズを使って観測されるため、 $\vec{K}_m$  も同じ限界周波数で制限される。そのため、SIM の解像限界は、従来顕微鏡の 2 倍まで向上できることになる (厳密には励起光波長は蛍光波長より短いため、蛍光波長を基準に考えると 2 倍以上向上する)。

数式を用いて、より詳しく説明しよう。蛍光顕微鏡で得られる像強度分布  $I_{im}(\vec{r})$  は次式で表される。

$$I_{im}(\vec{r}) = (O(\vec{r})I_{in}(\vec{r})) \otimes PSF(\vec{r}) \quad (2)$$

ここで、実空間での位置を  $\vec{r}$ 、試料中の蛍光分子の分布を  $O(\vec{r})$ 、照明光強度分布を  $I_{in}(\vec{r})$ 、顕微鏡の点像強度分布を  $PSF(\vec{r})$  とした。 $\otimes$  は畳み込みを表す。正弦波状の照明パターンは次式で表される。

$$I_{in}(\vec{r}) = 1 + C \cos(\vec{K}_m \cdot \vec{r} + \phi) \quad (3)$$

式 (3) を式 (2) に代入してフーリエ変換すると、像のスペクトルは次式で表されることがわかる。

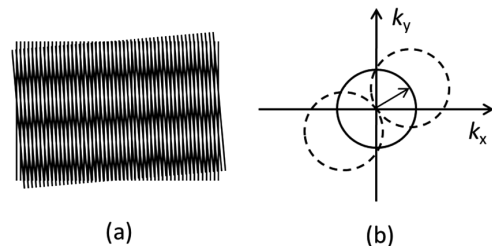


図 1 (a) モアレの例。細かい縦縞を少しずつ重ね合わせると、その差周波である粗い横縞が現れる。(b) 通常観測できる周波数成分 (実線部) と、モアレとして観測できる周波数成分 (点線部)。矢印は照明縞の空間周波数ベクトル。

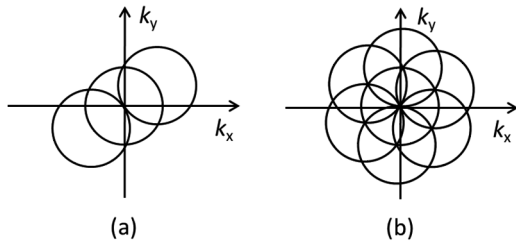


図2 (a) 1方向の縞照明によって得られるSIMのスペクトル. (b) 3方向の縞照明によって得られるSIMのスペクトル. 分解能の等方向性が向上する.

$$\begin{aligned} \hat{I}_{\text{im}}(\vec{k}) &= \hat{O}(\vec{k})OTF(\vec{k}) \\ &+ \frac{C}{2}\hat{O}(\vec{k}+\vec{K}_{\text{im}})OTF(\vec{k})e^{i\phi} \\ &+ \frac{C}{2}\hat{O}(\vec{k}-\vec{K}_{\text{im}})OTF(\vec{k})e^{-i\phi} \quad (4) \end{aligned}$$

ここで  $OTF(\vec{k})$  は顕微鏡の光学伝達関数であり,  $PSF(\vec{r})$  のフーリエ変換で与えられる. ハットはそれぞれのフーリエ変換に対応している. さて, 式 (4) の第1項は通常の顕微鏡像のスペクトルと等価である. それに対し, 第2, 3項には正弦波照明の空間周波数だけシフトした物体スペクトルが含まれている. これがモアレに相当しており, 通常は観測できない超解像成分が含まれている. この超解像成分を利用するために, 照明の位相を変えて複数の画像を取得することで, 第1, 2, 3項を分離する. 照明の位相を  $\phi_0, \phi_1, \phi_2$  と変化させると, そのとき得られる像のスペクトル  $\hat{I}_{\text{im}0}(\vec{k}), \hat{I}_{\text{im}1}(\vec{k}), \hat{I}_{\text{im}2}(\vec{k})$  は次式で表される.

$$\begin{pmatrix} \hat{I}_{\text{im}0}(\vec{k}) \\ \hat{I}_{\text{im}1}(\vec{k}) \\ \hat{I}_{\text{im}2}(\vec{k}) \end{pmatrix} = OTF(\vec{k}) \begin{pmatrix} 1 & \frac{C}{2}\exp(i\phi_0) & \frac{C}{2}\exp(-i\phi_0) \\ 1 & \frac{C}{2}\exp(i\phi_1) & \frac{C}{2}\exp(-i\phi_1) \\ 1 & \frac{C}{2}\exp(i\phi_2) & \frac{C}{2}\exp(-i\phi_2) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \hat{O}(\vec{k}) \\ \hat{O}(\vec{k}+\vec{K}_{\text{im}}) \\ \hat{O}(\vec{k}-\vec{K}_{\text{im}}) \end{pmatrix} \quad (5)$$

照明の位相と  $OTF(\vec{k})$  が既知であれば, 式 (5) の連立方程式を解くことができ,  $\hat{O}(\vec{k}), \hat{O}(\vec{k}+\vec{K}_{\text{im}}), \hat{O}(\vec{k}-\vec{K}_{\text{im}})$  が得られる. これらをスペクトル空間の元の場所に配置してやることにより, 超解像スペクトルが得られる (図2 (a)). ただし, このままでは方向ごとに分解能が変化してしまうため, 正弦波照明を回転させて複数の方向に対して上述の処理を行うことが多い. 3方向で行えば, ほぼ等方的な超解像性が得られる (図2 (b)).

図3にSIM画像の例を示す. 従来顕微鏡ではぼやけてしまう100 nm程度の微細構造が明瞭に観察できていることがわかる.

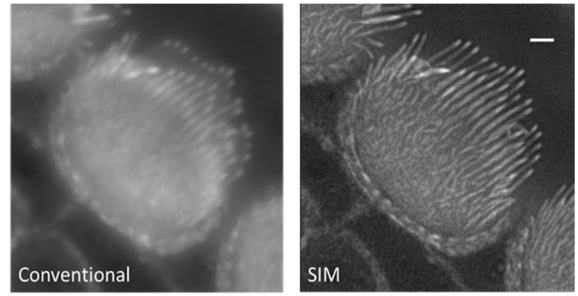


図3 従来顕微鏡による画像 (左) とSIM画像 (右) の比較. Alexa Fluor 488で染色したマウス内耳蝸牛管 (生後1日目) のF-アクチン. スケールバーは1  $\mu\text{m}$ . 標本作成: 小南賀乃子, 富樫英, 高井義美 (神戸大学大学院医学研究科分子細胞生物学分野).

## 2. 非線形構造化照明顕微鏡

前節で述べたように, 実は線形相互作用の範囲でも超解像を達成できる. しかし, 線形のSIMで検出できる空間周波数は, 照明パターンに含まれる空間周波数  $K_{\text{im}}$  で決まってくる. どんなに照明系を工夫しても,  $K_{\text{im}}$  の上限は照明光の波数の2倍であり, 光の波数に基づく制約から逃れることはできない. しかし, 光と蛍光分子の非線形相互作用を利用すれば, この制約から解放される. 蛍光顕微鏡で得られる像強度分布を書き直そう.

$$I_{\text{im}}(\vec{r}) = E(\vec{r}) \otimes PSF(\vec{r}) \quad (2')$$

ここで,  $E(\vec{r})$  は試料中の蛍光強度の分布である. 式 (2) では, 蛍光強度が照明光強度に比例するという次式の「線形性」を仮定していたわけだ.

$$E(\vec{r}) = O(\vec{r})I_{\text{im}}(\vec{r}) \quad (6)$$

しかし, 式 (6) は常に成り立つわけではない. 例えば, 照明光強度が弱いうちは線形性が成り立つが, 強くなるにつれて蛍光発光効率が飽和するため, 非線形性が現れる<sup>2)</sup>. このような場合でも, 次に示す式 (6') が成り立つように実効的な照明光強度分布  $I'_{\text{im}}(\vec{r})$  を定義できる.

$$\begin{aligned} E(\vec{r}) &= O(\vec{r})I'_{\text{im}}(\vec{r}) \\ &= O(\vec{r})[a_1I_{\text{im}}(\vec{r}) + a_2I_{\text{im}}^2(\vec{r}) + \dots] \quad (6') \end{aligned}$$

$a_1$  は相互作用の性質や照明光強度に依存する係数である.  $I_{\text{im}}(\vec{r})$  が正弦波であったとしても, 非線形相互作用を介して,  $I'_{\text{im}}(\vec{r})$  にはその高調波成分が含まれる. そのため, 非線形SIMでは  $\hat{O}(\vec{k}), \hat{O}(\vec{k}+\vec{K}_{\text{im}}), \hat{O}(\vec{k}-\vec{K}_{\text{im}})$  のみならず, さらに高次の成分  $\hat{O}(\vec{k}+2\vec{K}_{\text{im}}), \hat{O}(\vec{k}-2\vec{K}_{\text{im}}), \dots$  の情報を取得できる (図4). もはや光の波数の制約を受けずに, 原理的には無限に高い分解能を得ることが可能になる! とはいふものの, 高次の高調波成分ほど振幅が小さいので, 実際にどこまで分解能が上がるかは撮影画像のSN比によって決まる. 論文では, 従来の4倍程度の分解能が報告されている<sup>2)</sup>.

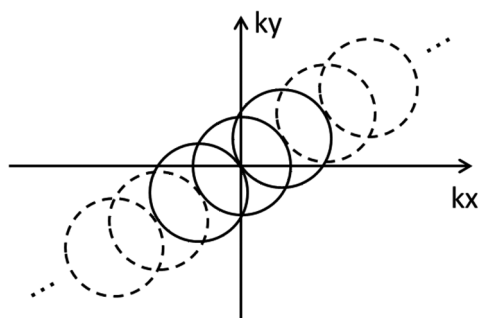


図4 線形 SIM で観測できる周波数成分 (実線部) と, 非線形 SIM で観測できる周波数成分 (点線部).

ここでは蛍光の飽和現象を利用した手法を解説したが, そのほかにもフोटスイッチャブルな蛍光分子や, 誘導放出現象を利用する手法も提案されている<sup>3,4)</sup>. どの手法も, 光と蛍光分子の非線形相互作用を利用することで, 実際の照明光強度分布よりも高い空間周波数をもつ分布を実効的に作り出しているのだ.

光と蛍光分子の相互作用を利用することで, 従来の光学理論の枠組みでは実現できない分解能が得られる仕組みについて解説した. 現在の生物顕微鏡観察において蛍光分子の果たす役割は大きく, さまざまな蛍光分子の開発が進められている. 観察に用いる顕微鏡を光学的に改良するだけでなく, 観察する対象にも化学的に手を加えることで, 観察能力を全体として向上させることができるのである. 超解像顕微鏡分野の研究者が 2014 年にノーベル賞を受賞したが, 物理学賞ではなく化学賞だった理由もこのあたりにあるのかもしれない. 本稿が読者の皆様の発想のきっかけになれば幸いである.

## 文 献

- 1) M. G. L. Gustafsson: *J. Microsc.*, **198** (2000) 82-87.
- 2) M. G. L. Gustafsson: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **102** (2005) 13081-13086.
- 3) E. H. Rego, L. Shao, J. J. Macklin, L. Winoto, G. A. Johansson, N. Kamps-Hughes, M. W. Davidson and M. G. L. Gustafsson: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **109** (2012) E135-E143.
- 4) F. Dake: *Opt. Rev.*, **23** (2016) 587-595.

(2017 年 4 月 20 日受理)