

D. 共焦点顕微鏡をマスターする

超高開口数レンズの使用法

寺川 進, 櫻井 孝司

Key words : 高分解能観察 (high resolution microscopy), 一分子蛍光 (single molecule fluorescence), エバネッセント光 (evanescent wave), 回折限界 (diffraction limit), 臨界角 (critical angle), 高屈折率 (high refractive index), 全反射蛍光 (total internal reflection fluorescence)

はじめに

顕微鏡の使用者がレンズの選択を考えると、まず倍率を選ぶ必要があるが、次には、開口数 (NA : numerical aperture) を考慮する必要がある。開口数は、個々のレンズ (レンズ筒) に記載されており、倍率とは独立に決まっている重要なパラメータである。開口数は概ね次の4つの範囲に分けられる。

低開口数	0.5 以下
中開口数	0.5 ～ 0.8
高開口数	0.9 ～ 1.33
超高開口数	1.40 以上

顕微鏡の分解能は、倍率ではなく、ほぼ対物レンズの開口数のみによって決まる。したがって、開口数の大きなレンズを作ろうとする努力が続けられてきており、同じ倍率では開口数の大きなレンズのほうが、高価である。開口数は、レンズの直径が大きいと大きく、その焦点距離が小さいと大きくなる。つまり、できるだけ大きな、かつ、近いところに焦点を結ぶことのできるレンズが求められてきた。これは、とりもなおさず、明るいレンズが求められてきたということである。倍率を上げると、像は暗くなり、同じ倍率なら明るいレンズの方がよい写真を撮るのに有利である。その理由からも高開口数のレンズが求められる。直径が大きく焦点距離が短いレンズは、その大きな直径のどの部分を通る光に

対しても同じ焦点が共有されなければならない。これは、収差が小さいということを意味する。このような条件を満たすレンズの設計は、たいへん難しいが、不可能ことではない。しかし、多くの教科書は、大きな開口数のレンズを作ろうとする努力はあるところまでで無駄となると警告している。したがって、顕微鏡の分解能には限界が生じ、この物理的に超えられない限界の分解能は回折限界と呼ばれる。実際、光学顕微鏡で0.2 μm を切る分解能を直接的に達成することは困難である。

I. 開口数と分解能

さて、開口数 (NA) の定義は、

$$\text{NA} = n \cdot \sin \alpha$$

で与えられる。ただし、 n はレンズと対象物の間を埋める媒質の屈折率、 α はレンズが対象に対して張る立体角の半分である (図1参照)。

一方、顕微鏡像の分解能は、

$$d_{\min} = \lambda / (2 \text{NA})$$

と表わされる。 d_{\min} は分解できる2点間の (最短) 距離、 λ は光の波長、NA は上記の開口数である (図2参照)。数式が作られた理論は、図1と2にある関係に基づいている。簡単に整理すれば、

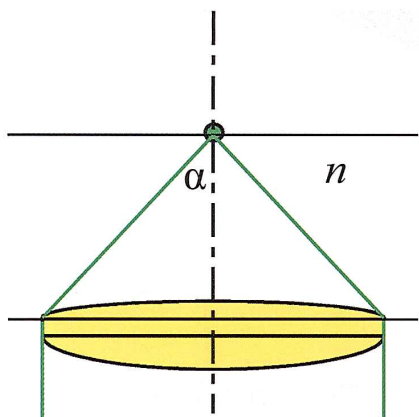


図1 開口数の定義に関わるレンズのパラメータ

レンズから観察対象に対して張る立体角の半分を α とする。対象物とレンズの間の空間を埋めている媒質の屈折率を n とする。 α はレンズの直径と焦点距離に依存する。明るいレンズとは、対象から四方に放射される光をより多く捉えられるものをいう。

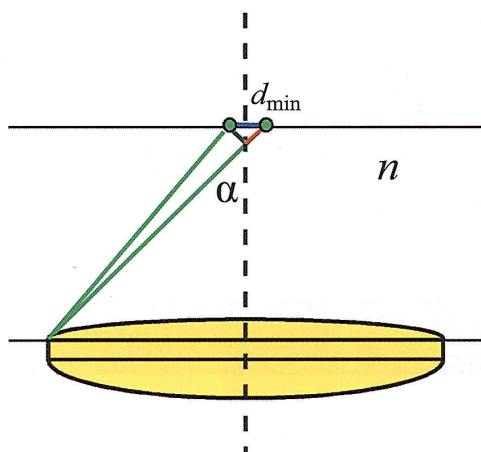


図2 レンズの明るさと分解能

d_{\min} の距離だけ離れた微小な2点からの光は波として広がり、レンズの端から端までの領域で捉えられる。一方の端で考えると、2点が区別されるには、一方の点からの波が山となり、他方の点からの波が谷となっておれば、十分区別される。赤い線分は光路差を示し、これが半波長に等しければよく区別される。ある波長に対してそのようになるには、レンズの直径が大きく、焦点距離が短い方が、 d_{\min} が小さくなる。屈折率 n は光線の実効波長を変える効果を持つ。

光軸中心では光の干渉の結果すべての光ビームの波の山が重なって明るくなるということ、中心からずれたところでは波の山と谷が重なり暗くなることにつぎる。

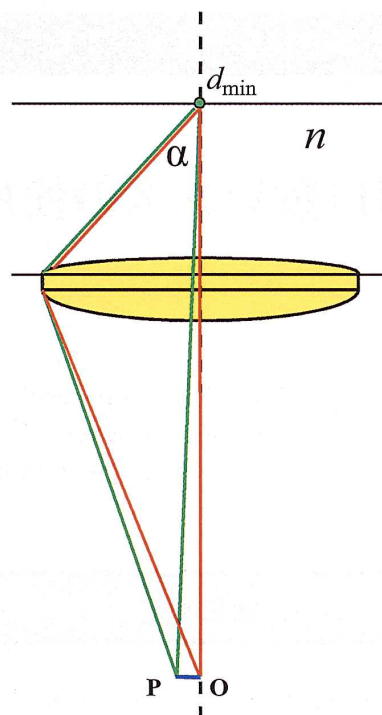


図3 レンズが作る小さな輝点の像の広がり

明るい一点から発する光をレンズで像にする場合、点Oですべてのビームが干渉して明るくなるように設計されている。Oのそばの点Pにも同じ輝点からの光がやってくるが、ここでは光路距離の違いがあり、干渉の結果暗くなる。このため、Oを中心とする輝点の像ができる。OPの距離は、レンズの直径が大きい方が小さくなる。レンズ中心と辺縁とを通る赤と緑の線として表した光線のそれぞれの組は、実は同心円的な波紋として一体のものであることに注意すれば、像の広がりがある程度までになるか理解できる。広がりの詳細は、点像強度分布関数 (Point Spread Function: PSF) によって表される。

II. 高い分解能の追求

数式を見ると、 d を小さくするには、3つの方法しかないことになる。すなわち、 λ を小さくする、 α を大きくする、 n を大きくする、の3つである。このうち、 λ を小さくするというのは、紫外線を使用することである。 λ が小さい方が、小さな物質との相互作用が起きやすく、小さな物の情報を捉えやすい。そのためには、紫外線に対して透過度がよく収差が少ないレンズと、紫外線を高感度に捉えられるカメラが必要である。紫外線は、360 nmでDNAによる、280 nmでタンパクによる吸収があり、200 nmを切ると塩素イオンによる吸収が強くなる。こ

これらの吸収により、コントラストは得られるが、また、細胞は殺傷作用を受け、生細胞の観察には使いにくい。固定標本には応用できる可能性がある。

α と n とを大きくすることは、NA を大きくすることに他ならない。 α が大きいことは、対象から広がって放射される光を多く集めて像形成に寄与するということである。形成される像の鮮明さもレンズの大きさに関係する(図3)。 α は90度まで大きくすることで \sin が最大となるので、ここに限界がある。 α が90度ということは、標本がレンズの表面上に置かれるということである。これに対して上限が無いように見えるのは、 n である。通常のスライドガラス上の乾燥固定標本を観察する場合は、媒質は空気となっており、 $n=1.00$ である。レンズとガラス間の空間をガラスと同じ屈折率の油で埋めると $n=1.52$ となり、NA は大きくなる。さらに、屈折率が高い油を使用し、同時に標本を載せるガラスも屈折率の高いものを使用すれば、NA はさらに大きくなる。 n が大きいということは、その中の光の速度が遅くなるということであり、その媒質中での波長が短くなることである。色は変わらないが、紫外線を使用する観察と似た状況になる。標本を屈折率の高い媒質中に包埋し、その媒質中のまま拡大光学系に取り込めば、短い波長で観察することになる。

III. 超高開口数レンズの登場

水中に存在する標本(生細胞)を観察するには、開口数1.33のレンズで標本から発せられる光を(すべて)十分に集めることができる。この故に、生物顕微鏡用にレンズの開口数を上げる試みは、無用と考えられ、100年間以上その努力は忘れ去られていた。著者は、科学研究費補助金の申請にこの問題を取り上げ、ガラスの屈折率を高める提案で採択されて、新レンズの開発に着手することができた。オリンパス社の阿部の理解ある協力によって、実際に設計・製作が進み、当初、目指していた開口数1.80は諦めたものの、開口数1.65の実用性の高い新しいレンズを誕生させることができた(図4)。これは、史上、最も明るい、最も分解能の高いレンズである^{1,2)}。

このレンズでは、従来の浸漬油($n=1.52$)と異なり、屈折率がより高い油($n=1.78$)による油浸をす

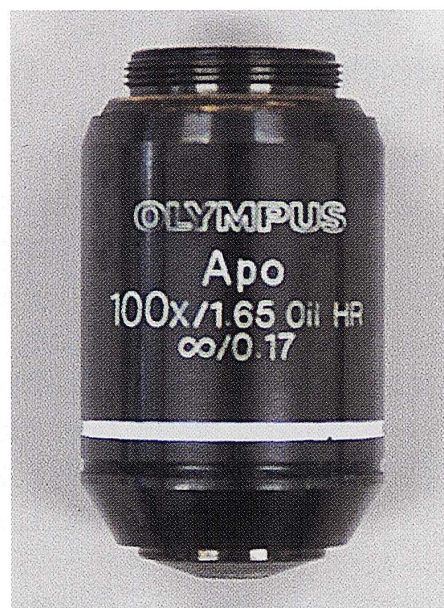


図4 超高開口数対物レンズの一例(オリンパスApo 100×, NA1.65, HR)

1994年に寺川と阿部(オリンパス)によって開発された。

る。浸漬油としてはCargille社から入手できるものを使用しているが、その成分は定かではない。過去にはヒ素原子を含む化合物が使われたということであるが、現在は、そうでないと同社は言っている。変わった臭いがすることと、通常の油より早く乾燥して固化しやすいことが目立つ特徴であるが、実際に使用した感触では、強い毒性があるようには思われない。532 nmの励起光で調べると、従来の油より多少の多めの自家蛍光がある。レンズのガラス自体も通常ガラスよりは多い自家蛍光がある。しかし、これらは焦点に集まるものものではなく、蛍光観察において大きな問題とはならない。

対象物はスライドガラスではなく、厚さ0.17 mmのカバーガラスに載せて観察し、そのガラスも、屈折率が高いもの($n=1.78$)を用いる。カバーガラスの方は、通常ガラスに比べて硬くてもろい感じであり、大きな面を光学研磨するのが困難で、研磨中の破損が多いため、かなり高価である。細胞を観察する場合は、このカバーガラスを底に貼ったプラスチックディッシュに細胞を培養するか、搭載する。細胞がこのガラスに接着することが観察の条件となるが、細胞によっては、明らかに通常ガラスより接着しにくいものがある。遭遇した一例は、ラットの

クロマフィン細胞（初代培養）である。ウシのクロマフィン細胞の接着は問題ないが、ラットのそれは接着しにくい。しかし、まったく接着しないわけではなく、確率が低いだけである。薄くコラーゲン塗付をすることで接着性は高まる。筆者の研究室では、ラットのクロマフィン細胞の細胞膜でおこる開口放出を、エバネッセント光励起（後述）の蛍光観察で検出することに成功している。HeLa細胞、MIN-6細胞、PC-12細胞などの接着については問題がない。

このレンズの登場の後、超高開口数の有用性が認められ、各社から新しいレンズが市販されるようになった。いずれも、開口数が1.45ないし1.49のものとなっている。これらのレンズは、これまでの1.35NAレンズや1.40NAレンズの縁を伸ばしただけに近い改造であり、従来通りの油（ $n=1.52$ ）による油浸と、通常のカバーガラス（ $n=1.52$ ）を使用できる。したがって、通常のカバーガラスを底に貼ったプラスチックディッシュに培養した細胞が観察できる。

IV. 固浸法

標本とレンズの間の空間を満たすものとして、油の代わりに固体を使うと（固浸という）、大きな n を持つ物質の選択肢は広がる。ダイヤモンドの屈折率が高いこと（ $n=2.4$ ）はよく知られている。非常に

固いので加工しにくい点が難である。柔らかいものでは、 KTaO_3 がある。その屈折率は温度によって大きく変わるが、室温でも2.2以上である。ゲルマニウムの屈折率は4以上である。ただし、透過するのは赤外線だけである。

n を高めることは未開の領域のようであるが、実はすでに、一部、この領域の開拓も進んでいる。油を使った油浸レンズの代わりに、固体を使った固浸レンズを構成する方法である。固浸レンズでは、レンズと対象物の間を固体で埋めるということになる。これは、対象物が固体の表面に密着している状態を前提とする。密着の程度は観察する光の波長に比べてわずかな（1/5程度以下の）隙間しかないということである。すなわち、標本から発せられる近接場光を十分に捉えるような近接性が必要である。この点で、標本がガラス上に載っている場合もガラスに対して固浸している状況といえる。分解能以下の大きさである分子を単体として観察する場合、ガラスに対する近接性は極めて高いものとなる。これは、一分子観察に有利な条件である。

固浸状態における分子からの発光の様子は1987年に、HellenとAxelrodによって明らかになった³⁾。彼らは、ガラスと水の界面に存在する分子レベルの光源から放射される光の空間的な強度分布をMaxwellの電磁波方程式から計算した。その結果、臨界角の方向にピークを持ち、水相とガラス相で大

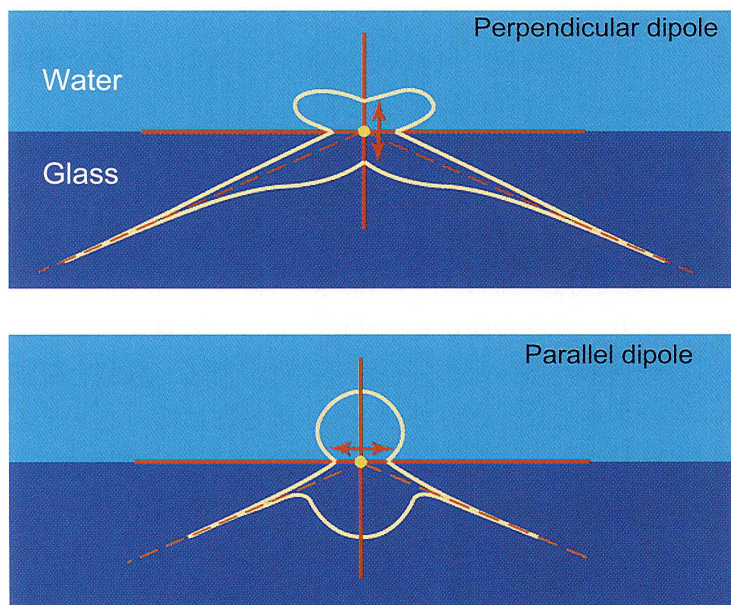


図5 固浸状態にある分子からの発光の空間的な強度分布（黄色の曲線）

水とガラスの界面に存在する分子レベルの発光体から放射される光は均等には分布せず、臨界角（点線）の方向に強く放射される。発光源であるダイポール（振動子）が、界面に垂直に振動する場合（上）と、平行に振動する場合（下）といずれにおいても、臨界角より大きな角度の領域にも強い放射をしており、水相よりガラス相に光の放射率が高い。（文献3より）

大きく非対称となる光強度の分布が明らかになったのである(図5)。かつて、Ernst Abbeは顕微鏡の対物レンズが集めている光は、観察対象の物体によって回折された光であることを明らかにした。物体の細かな構造が光を回折してその進行方向を側方に曲げる。細かい構造体を透過した光ほど、その回折角は大きくなる。こうして広がった光を集められるレンズが、細かい構造を像として再現できるのであり、より大きく広がった光を集められるレンズ(開口数が高いレンズ)が高い分解能を持つという理解に至った。Abbeの時代には、近接場光の物理はあまり進んでおらず、ガラス界面上の微小光源から発する光の強度分布は知られていなかった。屈折に関するSnellの法則などの幾何光学的な解析と、波動としての光波の回折と干渉を中心とした解析であった。ガラスという固体の上であっても、その上に載せられた水の中に物体がある場合に、その像をレンズで捉えるという状況では、NAが1.33という値のレンズを使うことで、物体からガラス内に入ってくる光を完全に捉えることができ、それ以上NAを大きくしても、対象から放射される光をさらに多く捉えることはできない。これがSnellの法則の示すところである。この状況では、NAの大きさは1.33(水の屈折率)で限界となる。これは、NAをより大きくすることが物理的にできないということではなく、大きくしても何も改善されないという意味である。実際のところ、NAのより大きなレンズ(超高開口数レンズ)を使っても、その状況では、実効的なNAは1.33にしかならないということである。これが、超高開口数レンズを使用しようとするときの大きな落とし穴である。

V. 超高開口数レンズの有効範囲

超高開口数レンズの使用できる範囲は、極めて狭い。それは、対象物が小さくて、かつ、焦点に置いたガラス表面に密着している場合だけである。NAが高いものとして働くのは、ガラス面に近接した領域のみである。ガラスに細胞が接着している場合、接着面の細胞膜に対しては超高開口数のレンズとして実際に作用しているが、細胞膜から1 μm 深く入った細胞質に対しては、NAは1.33に低下している。

VI. 超高開口数レンズの応用

超高開口数の対物レンズを使用することが有効なのは、次のようないくつかの場合に限られる。

1. 透過型の光学系としての使用

透過型の場合には、単純明視野モード、位相差モード、微分干渉モードがあるが、上記のように、観察対象物がガラスに密着したものである場合、その像の分解能は、開口数に応じて、高いものになる。このためには、実際には、照明側のコンデンサーレンズもNAが同じ程度に超高開口数のレンズであることが条件である。超高開口数レンズは、これまでにない大変面白いコンデンサーレンズとして働くので、明るさの欲しい応用、たとえば、倍率を高めた観察をしたいとき、高速度撮影をしたいとき、感度の低いカメラ(カラーカメラなど)を使いたいときには有用である。単純明視野法では、コントラストを上げる場合にはコンデンサーの絞りを絞ることがよいとされるので、使用できない(使用しても意味が無い)場合もある。位相差法では、位相板が挿入されるので、対物レンズの開口数がやや下がる形になり、効果は少し低くなる。微分干渉法では、コンデンサー側も対物側もその開口数を完全な形で使うことができるので、開口数の分解能への寄与がそのまま生じる。観察をするためのチェンバーの作り方を図6に示した。超高開口数レンズを用いた微分干渉法の観察例を図7に示す。一見、走査電顕の像に近いようなイメージが得られる。

2. 共焦点蛍光顕微鏡の光学系として

落射照明型蛍光顕微鏡では、励起光を照射するコンデンサーレンズと蛍光を集める対物レンズが共通であり、超高開口数の一つのレンズが2回使われる構成となる。励起光を点として走査し、それによる蛍光を2次元配列することで画像を作る共焦点法の蛍光像は超高開口数レンズを使うと鮮明になる。共焦点法の特徴のひとつは、ある程度厚みのある組織でも、光軸(Z軸)に直角の方向に光学的に切断したような像が得られることである。このような光学的切断の能力、すなわち、切断した断層像の厚みを評

144 D. 共焦点顕微鏡をマスターする

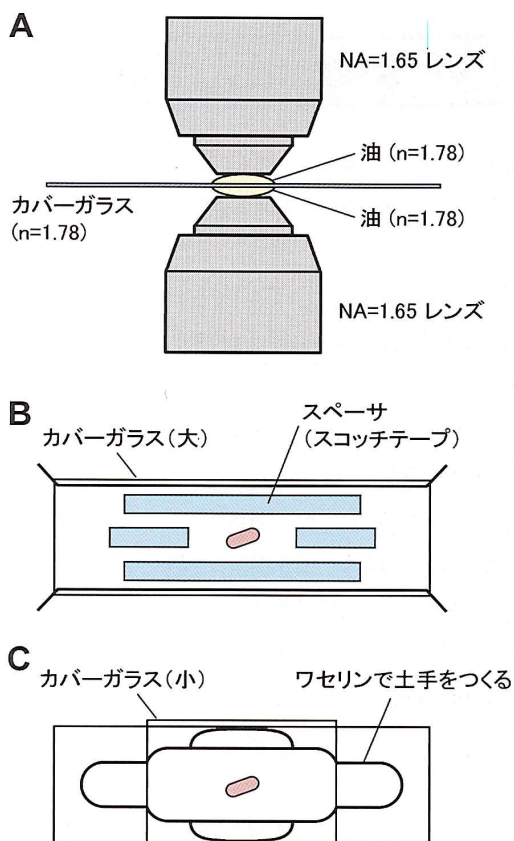


図6 超高開口数レンズを用いた細胞観察法

A; コンデンサーレンズと対物レンズを同じNAのものの組み合わせとする。BとC; 標本(赤色)は2枚の大小のカバーガラスによってはさむ。Bのように、カバーガラス間にはテープを貼り、間隙を作る。Cのようにワセリンを使って土手をつくり、溶液が逃げないようにする。2枚のガラスはワセリンの接着力で貼り付ける。ワセリンの土手で小さいカバーガラスの両脇に作ったプールを利用して、細胞外溶液の灌流をして、薬物刺激をする。灌流には、ペリスタルティック・ポンプを使用する。

価するには、小さな輝点となるような対象物を観察し、焦点を連続的に変えてその蛍光輝点の明るさの変化を調べることが行われる。直径 $0.2\ \mu\text{m}$ の蛍光ビーズをカバーガラスの上に置き、その蛍光像を記録しながら、焦点位置を連続的に変えると、図8のような関係が得られる。焦点面外にある蛍光輝点に対しては、共焦点系にあるピンホール板が光線を遮り、暗い像となる。焦点移動に対して急速に暗くなるのが共焦点光学系の性能となる。図のベル型の曲線の半値幅がその光学切断能力を表している。開口数1.35のレンズと開口数が1.65のレンズで比較すると、半値幅は $1.1\ \mu\text{m}$ と $0.8\ \mu\text{m}$ となり、超高開口数レンズの方が切断能力が高いことが分かる。このことは、NA=1.65レンズを使えばいつでも成り立つというわけではない。繰り返しになるが、ビーズがガラス面に接しているときに限って半値幅が小さくなるが、ビーズがガラスから $1\ \mu\text{m}$ でも離れているとそうはならないことに注意しなければならない。

3. 全反射照明蛍光顕微鏡の光学系として

超高開口数対物レンズは観察用に使う場合には、上記のような注意が必要であるが、照明に使うと他のレンズではできないことができる点がユニークである。通常の明視野照明のコンデンサーレンズとして使う場合には、対物レンズの後方からその瞳いっぱい平行光を入れ、レンズ前方に集束した光を標本に当てることになる。全反射照明では、レンズ後

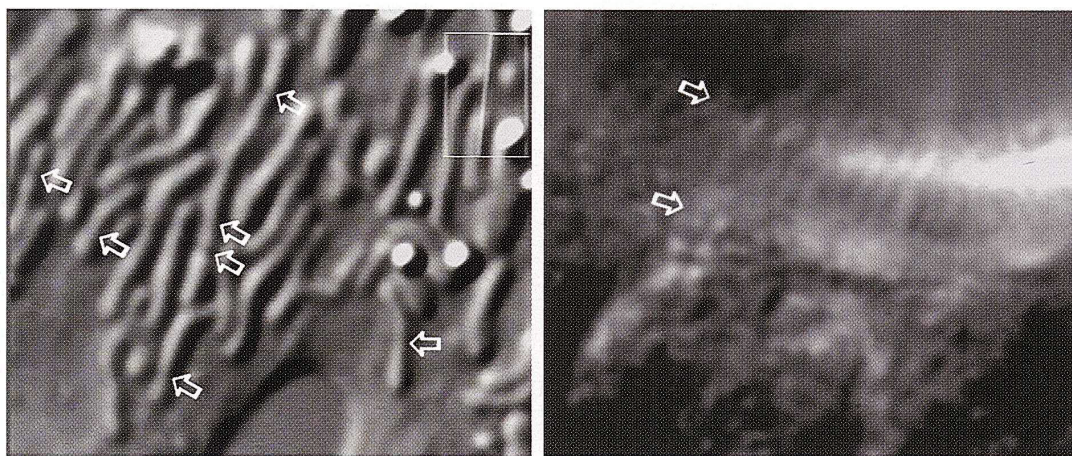


図7 超高開口数対物レンズを使った観察例

微分干渉法で捉えた線維芽細胞のミトコンドリア(左)と小腸上皮細胞の刷子縁(右)。ミトコンドリア内にクリステのように思われる構造が見える(矢印)。また、刷子縁のマイクロビリーの一本ずつが区別して見える(矢印の間のゾーン)。オリンパスApo100 \times , NA1.65, HRレンズ使用。

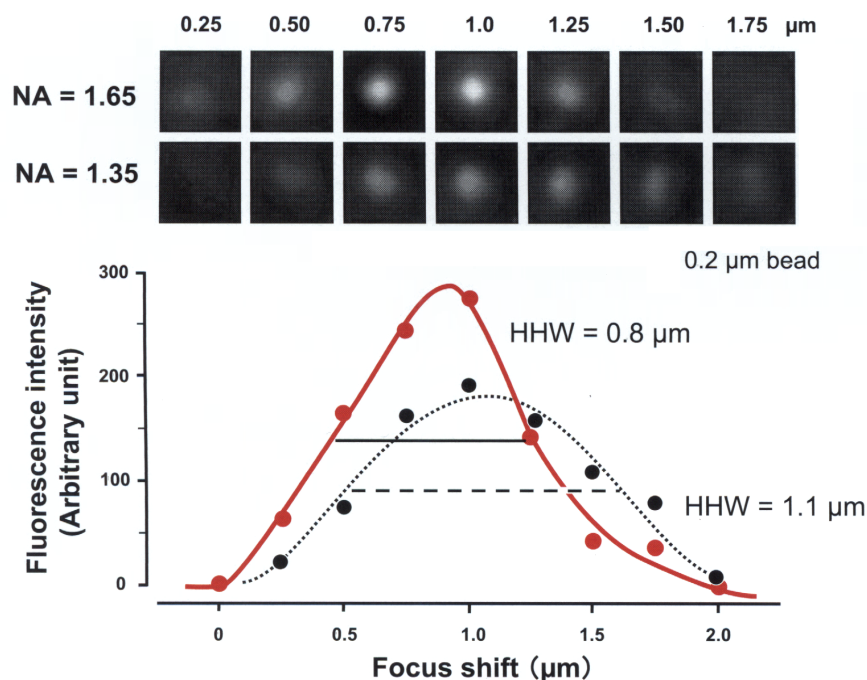


図8 直径0.2 μm の蛍光ビーズの共焦点像
同じ共焦点蛍光顕微鏡で観察し、異なる開口数の対物レンズ間で比較した。上図、ビーズの明るさを、焦点位置（上の数値）を変化させて、記録した。下図、焦点の移動量（横軸）に対して、ビーズの蛍光の明るさ（縦軸）をプロットした。赤丸、NA = 1.65の場合。黒丸、NA = 1.35の場合。

方から、瞳の辺縁の部分にのみ光を入射させる。すると、対物レンズの前方に回った光は、標本を載せるカバーガラスの表面で全反射することになる。超高開口数であることと、レンズの辺縁近傍を通る光が、標本の載ったガラス面で全反射することとは、同義である。水中にある対象物からの光が対物レンズに入射しない領域があることが、超高開口数レンズが超という字で修飾される理由である。その領域にレンズ後方からやってくる光は、レンズの前方に遠ざかっていくような光路を取ることはできず、再びレンズに戻ってくるような光路を取る¹⁾。このような光路を作ることは、超高開口数レンズの特徴であり、高開口数のレンズでは実際上不可能である。全反射照明の光路については、拙著⁴⁾や“組織細胞化学2008”の小林剛氏の稿⁵⁾によくまとめられているので、そちらを見られたい。超高開口数のレンズを用いて、全反射系を作りそのエバネッセント光で蛍光励起をする仕事は、多数が報告されている。我々は、開口放出⁶⁾やイオンチャネル⁷⁾の動態観察へこの方法を応用した。また、最近行った研究の一例を、図9に示す。

超高開口数でも、その数値に応じて、全反射光を作れるような光の通れる領域の大きさは変化する。開口数がより大きい方が、余裕のある領域を形成する。開口数が1.40のレンズは、超高開口数のレンズ

に含まれ、これを用いて全反射照明を行ったという報告がなされている。しかし、これを実際に行うことはかなり困難であり、全反射光とそうでない光（透過光）が混在する状況になりがちである。確実に全反射光だけを作りだすには、1.45や1.50のように、1.33を大きく超えるような開口数の大きさが必要である。開口数1.65のレンズはその点で、大きな全反射の窓ともいえるべき領域を持ち、確実に全反射光だけを作りだすことができる。全反射光のための経路に余裕があると、2本のビームを通すことも可能になり、生ずるエバネッセント光の到達深度が異なるような照明を交互的に作ることもできる⁸⁾。さらに、全反射で生ずるエバネッセント光で励起された蛍光物体からの蛍光を集める能力が高いため、明るい像が得られる。開口数1.45のレンズと開口数1.65のレンズを同じレーザー強度で比較すると、観察される蛍光には5倍ほどの明るさの違いがある。

光が屈折率界面で全反射するときには作りだされるエバネッセント光で、一分子観察をすることは容易であるが、一種の背景蛍光が混入して妨げとなる現象がある。これは、観察対象としている蛍光分子とは異なる蛍光一分子像の混入である。観察面としてカバーガラスの表面に水中から湧き上がるように付着する。照明のためのエバネッセント光があると発生よりも退色が早い一分子蛍光像のような

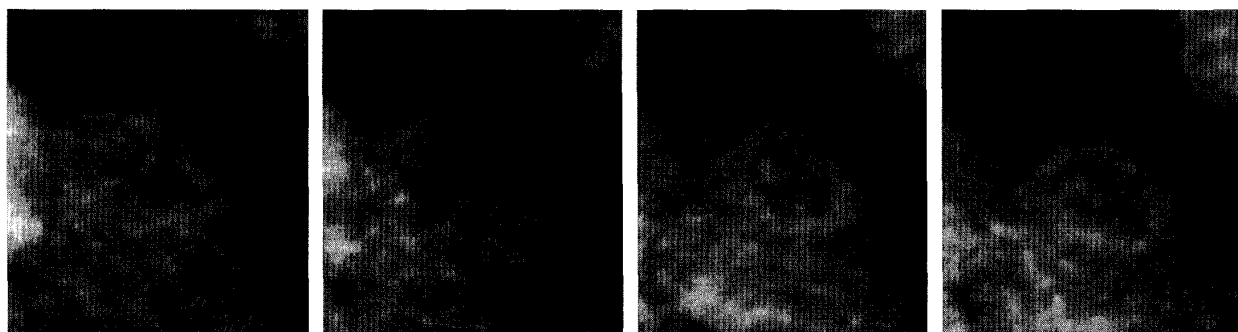


図9 RAW細胞に発現させたアクチン-DsRedの波紋のように広がる反応
TIRF顕微鏡下にタイムラプス記録した。約20秒の経過で、アクチンの分布がリング状に広がるのが見られる。

輝点が増えることが無いので気が付きにくい。しかし、照明を消してしばらく暗黒に保ってから点灯して観察すると、視野一面に輝点が付着しているのがわかる。それらは1秒くらいで消失する。顕微鏡の載物台を移動させても、光の当たっていなかった部分に多数輝点が蓄積しているのがわかる。純度の高い脱イオン水や蒸留水を使用しても生ずる。ガラス面上を空気にしても生ずる。さいわい、輝度は低く、退色までの時間が短いので、通常の観察では邪魔にならないが、場合によっては一分子蛍光の輝点としてカウントされることにもなりうる。発生の原因は不明であるが、真空では生ずることは無いであろう。NA=1.45の光学系でも同じ輝点が見られるが、NA=1.65の場合に比べて暗く、目立ちにくくなる。しかし、観察対象としての蛍光性分子（たとえばロダミン）の輝点の明るさとの割合（1/4程度）が変わるわけではない。これは、NA=1.65の光学系が単に明るいということを示している。ガラス表面に何らかの物質をコーティングすることで目立たなくなることもあるが、ロダミンを基準としたときの蛍光強度比で調べるとあまり変わらない。この背景輝点に対する対策はまだ確立していないのが現状である。

4. 斜光照明光学系として

全反射する条件が作れる場合は、照明光源の位置を調節することで細胞を載せたガラスの表面に平行に近い方向に走る光線を作ることにもできる^{9,10)}。この場合も光の薄い層で細胞を切断するように照明できる。この方法も分子的な蛍光像を観察するのに有効である。超高開口数のレンズでなくてもこのよう

な照明光線の光路を作ることとは可能である。

おわりに

光学顕微鏡は長い歴史を持ち、その要としての対物レンズも改良が重ねられてきた。しかし、まだ、その進化の歴史は終わっていない。これからの光の時代の主役として、さらなる変貌を遂げて行くことであろう。顕微鏡ユーザは、レンズの進化の系統樹の中で、その位置を見極めて、それぞれの応用に適したレンズを採用し、また、改良のアイデアを提案していくことが望まれる。未来の顕微鏡は、ダイヤモンド・レンズ、眼のような柔軟なレンズ、対象を包み込むレンズ、形状可変レンズなど、様々な変種を搭載していることが考えられる。レンズレス光学系も交えて、それらがヒトの視界を広げ、ミクロの世界への限りなき活動の拡大を推進するであろう。

文 献

- 1) Kawano Y, Abe C, Kaneda T, et al.: High numerical aperture objective lenses and optical system improved objective type total internal reflection fluorescence microscopy. Proc. SPIE **4098**: 142–151, 2000.
- 2) Terakawa S, Tsuboi T, Sakurai T, et al.: Fluorescence micro-imaging of living cells and biomolecules with ultra high NA objectives. Proc. SPIE **4597**: 121–127, 2001.
- 3) Hellen EH, Axelrod D: Fluorescence emission at dielectric and metal-film interfaces. J. Opt. Soc. Am. B, **4**: 337–350, 1987.
- 4) 寺川 進：近接場光照明蛍光顕微鏡 ～タンパク質活

- 動の観察. 生命科学のための機器分析実験ハンドブック (西村善文編), 羊土社, pp.105-110, 2007.
- 5) 小林 剛: 全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) を用いたイメージング. 細胞組織化学2008 (日本組織細胞化学会編), 学際企画, 東京, pp.137-147, 2008.
- 6) Tsuboi T, Kikuta T, Sakurai T, et al.: Water secretion associated with exocytosis in endocrine cells revealed by micro forcemetry and evanescent wave microscopy. *Biophys. J.* **83**: 172-183, 2002.
- 7) Sonnleitner A, Mannuzzu LM, Terakawa S, et al.: Structural rearrangements in single ion channels detected optically in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 12759-12764, 2002.
- 8) Wakazono Y, Sakurai T, Ohara-Imaizumi S, et al.: Intracellular dynamics observed by mode switching of microscope with a light incidence to the interface at alternate angles through the ultra high NA objective. *Proc. SPIE* **6088**: 60881L-1-60881L-6, 2006.
- 9) Sakurai T, Wakazono Y, Yamamoto S, et al.: Slit-scanning microscope with a high NA objective lens for analysis of synaptic function. *Proc. SPIE* **5322**, 108-113, 2004.
- 10) Tokunaga M, Imamoto N, Sakata-Sogawa K: Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. *Nat. Methods* **5**: 159-161, 2008