

新しい顕微鏡の技術

寺 川 進

Key words : エバネッセンス顕微鏡 (evanescence microscope), 全反射顕微鏡 (total internal reflection microscope), 正倒両立顕微鏡 (bilateral microscope), 位相定量顕微鏡 (quantitative phase microscope), 近接場露光顕微鏡 (near field exposure microscope), 開口数 (numerical aperture), 蛍光指示薬 (fluorescent probe), 一分子蛍光 (single molecule fluorescence), 感光樹脂 (photo sensitive resin)

最近登場したいくつかの新しい光学顕微鏡を概観し、その特徴と使用法について紹介してみたい。

I. エバネッセンス顕微鏡

エバネッセント波は光が透明な屈折率差のある界面で全反射する際に生ずる薄い光の層である。その厚みは容易に 50 nm ほどにも薄くなるので、照明される空間の体積は著しく小さくなる。そこに含まれる分子の数はひとつひとつ数えられるほどに少なくなり、これを蛍光励起のための照明として使うことにより、一分子イメージが容易に観察できる。理想的なエバネッセント光を作り、それによって蛍光を効率的に観察するためには、開口数がこれまでの理論に基づく最高値を超える超高開口数のレンズを使うのがよい。すなわち、開口数 (NA) が 1.65 や 1.45 という値のレンズ¹⁾ (オリンパスの阿部と筆者らによって 1994 年に初めて製作されたもの) を使うと照明、観察共に極めて容易になる²⁻⁴⁾。これらのレンズは、臨界角より大きな範囲に入射する光を集められるだけの大きさを持っている。従来、Abbe の顕微鏡の分解能に関する理論があり、水中にある対象をガラスのレンズを用いて観察する場合、対物レンズの開口数の最大値は 1.33 となり、これより大きな開口数のレンズは作っても意味がないということになっていた。これは、“水中にある物”については確かに正しいことであるが、実は、水とガラスの界面に波長に比べて小さな発光体がある場合に

は、光は 360 度の方向に等方的に放射されず、特別な現象が起きるので正しくない。すなわち、ガラス側の臨界角方向を中心にしたある広がりの方角へ高い割合で光の放出が起こるのである⁵⁾。このような光を十分に集めるには、開口数は 1.33 では不充分であり、より大きな開口数の対物レンズが有効である。さらに、開口数が 1.33 より大きいとレンズを通したレーザー光の導入 (through the lens illumination: TTL 照明) が可能になる⁶⁾。レンズの後面からその端に光を導入したとき、レンズの前焦点に向かう光がガラスと水の界面で全反射する条件を達成するには、開口数が 1.33 より大きい必要がある。開口数が大きいと、このような光のレンズの端への入射領域の余裕が大きいものとなり、全反射照明が容易にできるのである。

単純な倒立蛍光顕微鏡 (ダイクロイックミラーを持つ落射式のもの) に超高開口数の対物レンズを取り付けるだけで、全反射顕微鏡のための本体とすることができる。あとは、レーザーを用意し、その光を適切な集束角度で対物レンズの後方焦点に集めるだけでよい。これは簡単に自作できる (図 1)。後方焦点に集束された光束はそこから広がりながらレンズに入り、前方焦点の方角へ平行な光束となって走り、界面で全反射する。このような光を作るためのレンズの位置調整は、表 1 のような順で行う (倒立顕微鏡の場合)。

テトラメチルロダミンのような明るい蛍光を持つものならば、20 mW ほどのレーザーで、その一分子イメージがすぐに観察できる。分子イメージは形

浜松医科大学光量子医学研究センター

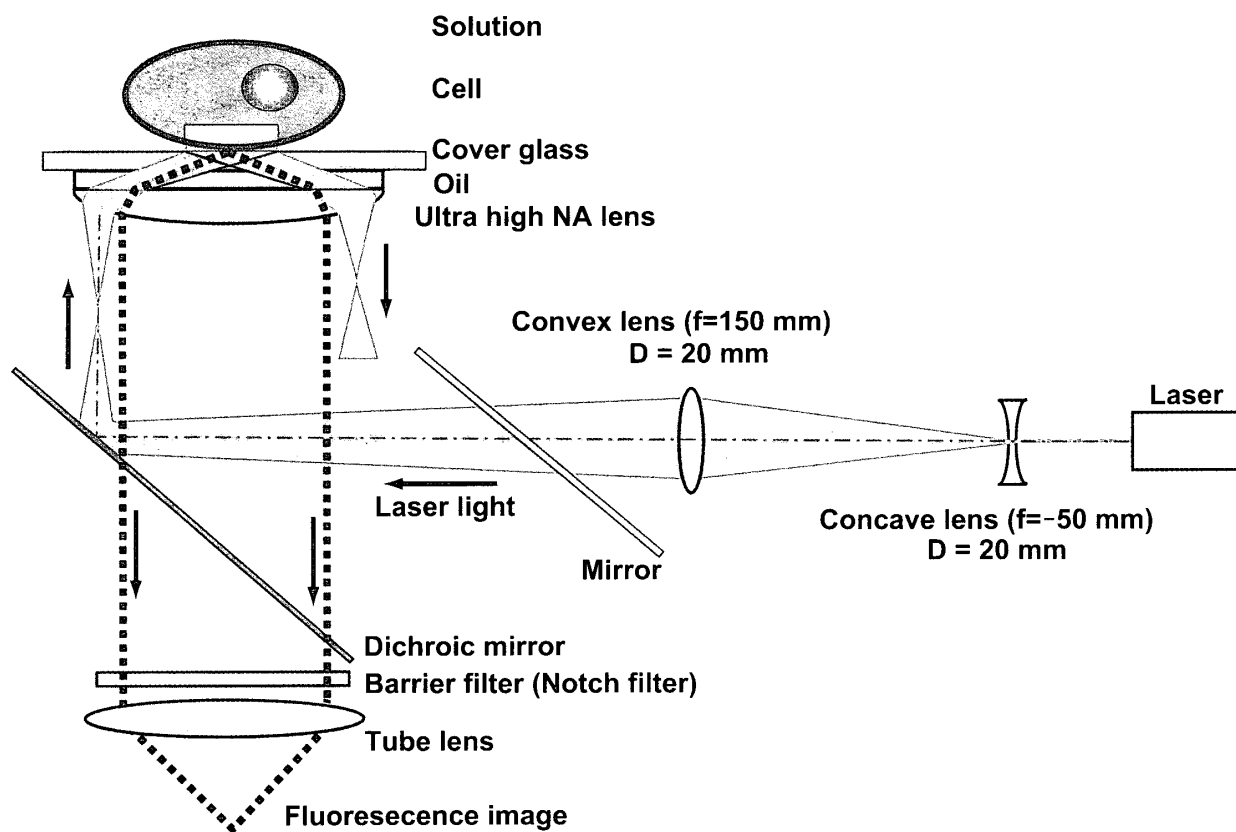


図1 エパネッセンス顕微鏡を自作するためのプラン

顕微鏡本体は古いモデルでも使える。必要パーツを並べることができさえすればよい。レーザー光はなるべく外に漏らさないようにする。

表1 エパネッセンス顕微鏡の調整法

1. レボルバーを回転させてレンズの無い空の孔の位置を選ぶ。この状態で、レーザー光が孔の中心を通過して、天井に当たるようにする。
2. レボルバーを回転させて低倍レンズを選び、光が真っ直ぐ出る様にレーザーの光軸を調整する。
3. 超高開口数レンズを選んで、再度、ビームがレンズ中心を真っ直ぐ通過して、真上の天井に当たるように光軸を調整する。
4. 次にビーム調整レンズの位置を光軸上で前後に動かし、天井に当たったレーザービームの大きさが最小になるようにする。
5. 溶液の入った標本ディッシュをステージに載せてから、光軸を移動させて、レンズへの入射位置を辺縁に動かし、天井のビームスポットが部屋の壁に沿って下へ降り、ステージより下に反射するようにする。
6. 以上の操作により全反射状態が実現する。

がなく、フォーカスの位置を探すのが困難であるが、何か大きな蛍光性のごみなどをガラス面上に見つけ

るとよい。

開口数が1.65のレンズを使うときは、液浸油、カバーガラスともに屈折率の高い材料($n = 1.78$)でなければならない。そのようなオイルは多少の臭いがあり、乾燥して固体になりやすい。油の素材は明らかでないが、販売元の Cargille Laboratories 社によると、特に強い毒性はないという。使用後、油を拭くときに、固まった油がレンズを傷つける可能性もある。屈折率の高いカバーガラスは、通常のものに比べてもろい。また、高価でもある。従って繰り返して使用したいが、その洗浄が問題となる。洗剤、アセトン(プラスチックを溶かすので注意)、アルコール、酸、アルカリなどを使って洗う。また、細胞によってはこのガラスに接着しないことがある。ポリリジンや薄いコラーゲンのコートをして接着性が改善する場合もあるが、なお接着せずの上では培養できない細胞もある。ウシの副腎クロマフィン細胞は薄いコラーゲンコートで培養できるが、ラッ

トの同じ細胞は高屈折率ガラス上での培養が極めて困難であった。しかし、多くの細胞(PC12, MIN-6, 網膜双極細胞, HeLa 細胞, CHO 細胞)は、このガラス上で培養できる。

開口数が 1.45 の対物レンズを使っても全反射条件は容易に達成できる。このレンズは通常の液浸油とカバーガラスとを組み合わせで使用するので、上記のような問題はない。全反射を起こす光束の入射可能領域も 1.65 の場合と同じように広く、価格が安い。ただ、蛍光像の明るさは低下し、 $NA = 1.65$ の方が 2 倍ほど明るい。

開口数 1.45 のレンズはオリンパス、ニコン、ツァイスの各社から購入できる。イメージはほぼ対物レンズだけに依存したものとなるので、どこの製品でも他の会社の顕微鏡本体に互換的に取り付けられる。ただし、ニコンの対物レンズだけは直径が大きいので、他社の鏡体に付けるのは難しい。ニコンには 100 倍と 60 倍とがあり、60 倍には収差補正環が付いていて、カバーガラスの厚みなどに対して最適画像が得られるように調節できる。開口数 1.65 の 100 倍対物レンズは今のところオリンパスからのみ入手可能である。ツァイスの開口数 1.45 の対物レンズは短波長の透過性がよいという。開口数 1.45 と 1.65 の比較については、Axelrod の論文を参照されたい⁷⁾。

II. 正倒両立顕微鏡

我々は倒立顕微鏡の上に正立顕微鏡を乗せ、ひとつの標本を上下から観察する顕微鏡システムを作った⁸⁾(図2)。異なる性質の対物レンズ2個を使用することができ、細胞の観察と操作の幅が大きく広がる。低倍率と高倍率の対物レンズを上下に付け、それぞれの像をビデオカメラで捉えて、モニター上で並べて観察すると、全体像を観察しながら、拡大像を観察できる。電極を神経細胞の突起にあてながら、細胞体の反応を見るというような時に役立つ。照明はダイクロイックミラーを介して光路の中間から標本に導く。片方は緑、片方は赤の光で同時に明視野像が得られる。蛍光モードであれば、励起光源は上か下のどちらか一方にあればよい。一つの標本から

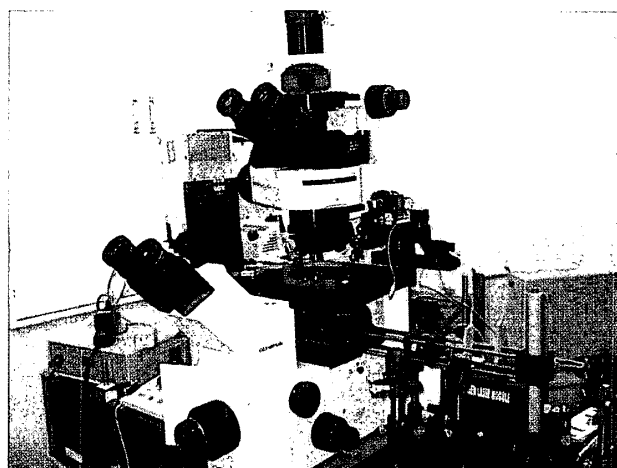


図2 正倒両立顕微鏡

通常の倒立顕微鏡の照明装置のある位置に正立顕微鏡を取り付けてある。標本を上下から2個の対物レンズで挟む形になる。

出る光をできるだけ大きな面の対物レンズで集めることで、レンズの高い開口数が生かせ、分解能の高い像となる。上下の2本のレンズを使って光を集めると合成開口レンズとなり、開口数が倍になる。これは、分解能を高めることにつながる。このような効果を実際に得るには、ビデオカメラで2つの独立の画像を捉えてもだめで、2つの対物レンズで捉えられる光束を光として実際にひとつに合わせ、標本から発する全ての光の干渉が起こるようにしなければならない。これを実現することを狙ったものが4Pi(π)顕微鏡である。対称性のよいレンズを精密に光軸を合わせて並べなければならず、実際には劇的に分解能を上げるのは困難である。

正倒両立顕微鏡のもう少し実用的な使用法は、籠入り化合物(caged compound)の光解除(photo-uncaging)実験である。近紫外光の照射によって多様な化学物質を不活性型から活性型に変化させることができる。例えば、籠入りグルタミン酸を光解除すると神経細胞を光で刺激することができる。このとき、紫外光の照射領域が極小の大きさになることが望ましい。そのためには、紫外光に対して収差の少ない、かつ、水中の対象に対して収差の少ない対物レンズを使う必要がある。水浸型の60倍対物レンズはそのような性質が光解除に適している。神経樹状突起の一点において、グルタミン酸の光解除刺激を与え

112 III. 観察技法の基礎と新たな展開

るには、正立側にこのレンズを使う。それによって引き起こされた細胞の反応をエバネッセンス法によって観察するには、開口数 1.65 の対物レンズを倒立側に使用して可視光レーザーを導入し、エバネッセンス光を作り出す。

III. QPi 顕微鏡

標準的な対物レンズを付けた明視野顕微鏡によって得られる画像を演算処理することにより、位相差像を得る手法が QPi 顕微鏡である (図 3)。これは、オーストラリアの K. A. Nugent によって開発された理論的な手法である⁹⁾。フォーカスの合ったところで 1 枚の明視野像を撮り、続いて、フォーカスを短い方と長い方へ動かしてそれぞれ 1 枚ずつの明視野像を撮る。これらの 3 枚の画像を QPi といわれるプログラムによってコンパイルすると一枚の位相差像が得られるものである。デコンボリューション処理の手法に似ている。筆者はメルボルン大学において実際の顕微鏡によるデモを見たが、まあまあの位相差像であった。通常の位相差像によく見られる細胞周囲のハローは少なかった。また、明暗のコントラストは位相量を広い範囲で定量的に表しているように思われた。プログラムの値段は位相差用レンズと位相差用コンデンサーを購入するのと同じ程度であり、実際の導入は迷うところであるが、理論的には面白い方法である。利点は、計算によって微分干渉像も得られることである。微分干渉用のセットを購入することも加味して比較すると、プログラムのほうが廉価といえる。プラスチック・ディッシュのように微分干渉観察に向かない基質に培養した細胞を観察する場合にも、微分干渉 (的な) 像が得られるのは利点であろう。その点ではホフマン・モジュレーション・コントラスト法に比肩した能力といえる。実際には、フォーカスを自動的に動かして画像を入力するためのハードウェア (カメラ、電動焦点機構、インターフェース) も必要であり、かなり高価になる。実用上の問題は、画像コンパイルの演算に 10 秒程度かかることであり、現在の PC の能力ではリアルタイム画像は得られない。また、QPi のプログラムは画像のコンパイルを行うだけのものになっており、ゆっくりとした細胞の変化を経時的に追うタイムラプス記録をしようとする場合は、自分で 3 枚の画像セットを逐次記録していくようなプログラム

ラストは位相量を広い範囲で定量的に表しているように思われた。プログラムの値段は位相差用レンズと位相差用コンデンサーを購入するのと同じ程度であり、実際の導入は迷うところであるが、理論的には面白い方法である。利点は、計算によって微分干渉像も得られることである。微分干渉用のセットを購入することも加味して比較すると、プログラムのほうが廉価といえる。プラスチック・ディッシュのように微分干渉観察に向かない基質に培養した細胞を観察する場合にも、微分干渉 (的な) 像が得られるのは利点であろう。その点ではホフマン・モジュレーション・コントラスト法に比肩した能力といえる。実際には、フォーカスを自動的に動かして画像を入力するためのハードウェア (カメラ、電動焦点機構、インターフェース) も必要であり、かなり高価になる。実用上の問題は、画像コンパイルの演算に 10 秒程度かかることであり、現在の PC の能力ではリアルタイム画像は得られない。また、QPi のプログラムは画像のコンパイルを行うだけのものになっており、ゆっくりとした細胞の変化を経時的に追うタイムラプス記録をしようとする場合は、自分で 3 枚の画像セットを逐次記録していくようなプログラム

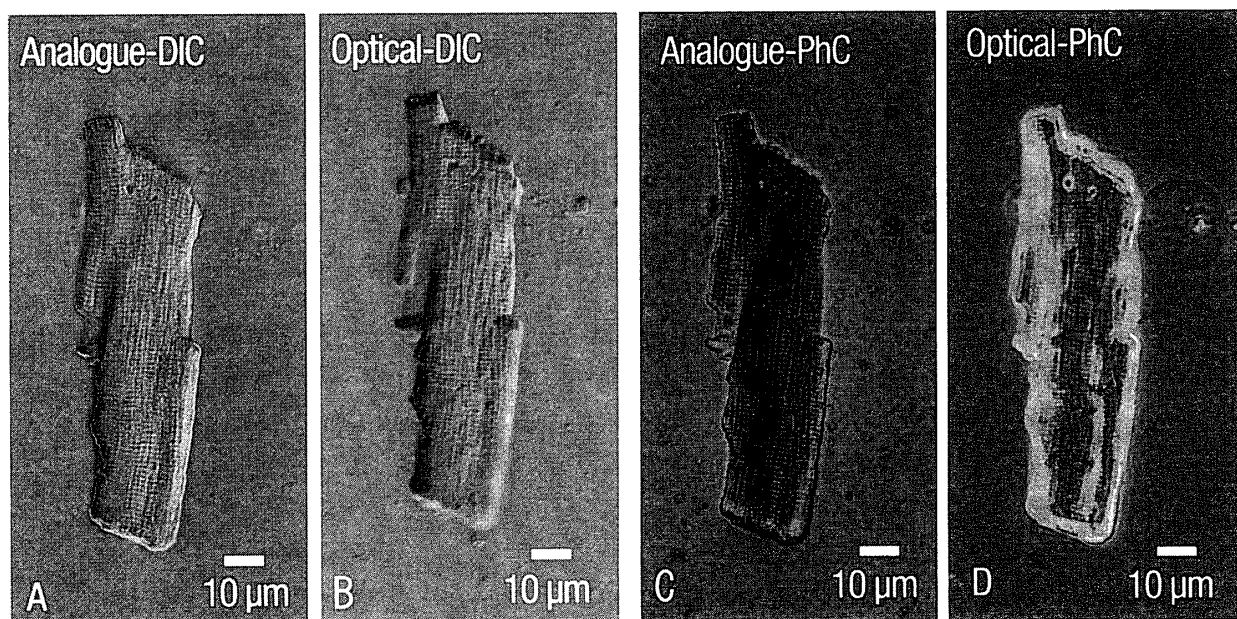


図 3 QPi による画像処理

A: 明視野像を画像処理して得た微分干渉像。B: 微分干渉レンズを使って得た像。C: 明視野像の画像処理で得た位相差像。D: 位相差レンズを使って得た像。Today's Life Science 誌 3-4 月号より。

を用意して、カメラなどそれに見合ったハードウェアを動かさなければならない。そうして得た各時点での3枚の像のセットを逐一QPiによって処理することになる。オーストラリアの販売元であるIatia (アイエイチア)社では、まだタイムラプス観察ができるソフトを開発していないのが残念である。

IV. 近接場露光式顕微鏡

近接場光は、全反射のときのエバネッセント光か、極小サイズのピンホールから出る光として利用されることが多い。光の場が波長よりはるかに小さくなり、小さな対象を選択的に観察することができる。

しかし、これらの特殊な条件でなくても全ての物の表面から光が出る場合にも、その表面近傍の領域では近接場光としての性質が現れる。静岡大学の川田善正らは、このことを利用して光マイクロイメージングをしようとする試みを進めている^{10, 11)}。光を当てると収縮する性質のある感光性樹脂(ウレタン-ウレア共重合体にアゾ色素を結合したもの)を使うと画像の記録ができるが、そのような樹脂の上に観察対象を完全に密着させた状態で光照射をすると、主に対象から生ずる近接場光の効果によって密着部位の樹脂が収縮(または消失)する。対象物を洗い流した後に、この表面の凹凸を原子間力顕微鏡で読み出すと、対象の微細な構造が読み取れる(図4)。

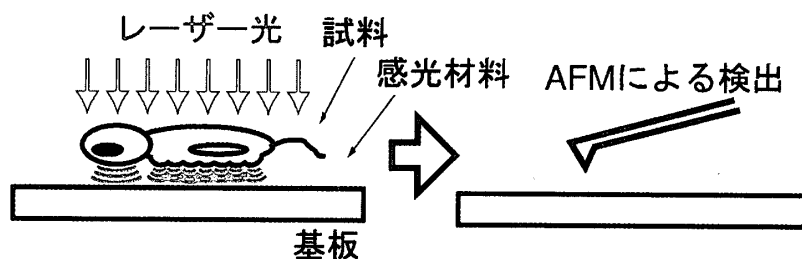


図4 近接場露光による顕微鏡像の構成法(静岡大学・川田善正らによる)

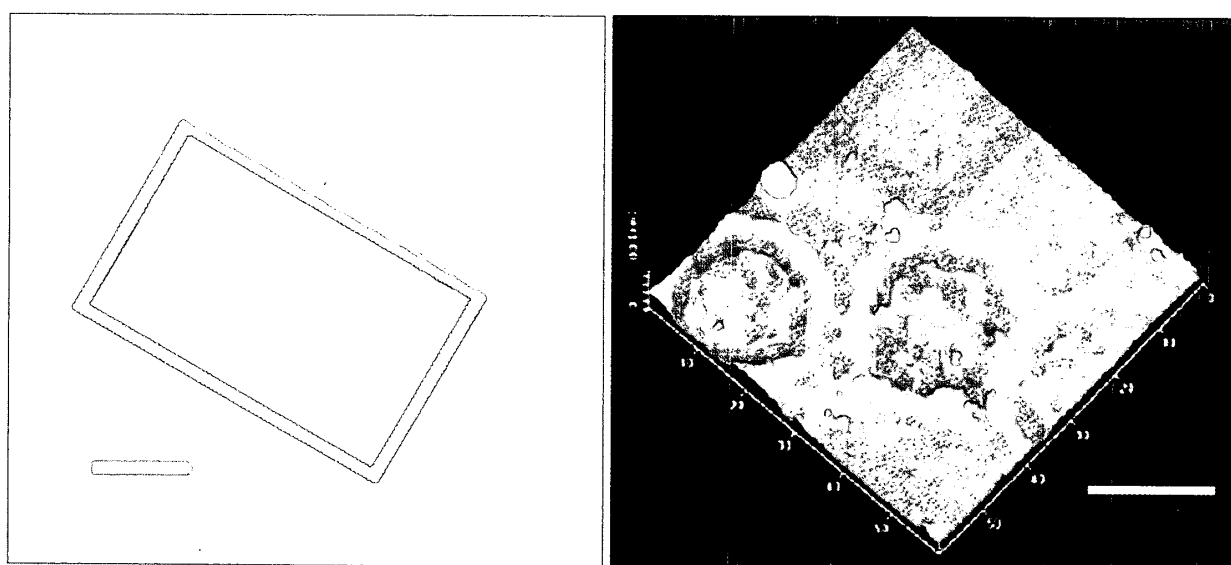


図5 近接場露光によりウレタン-ウレア樹脂に記録した3個のHeLa細胞の形状

左: 樹脂の上に培養した細胞の明視野像。右: 同じ細胞群へ露光した後、樹脂表面をAMFによりトレースしたもの。較正棒は20 μm 。縦の凹凸は100 nm前後である。(川田, 山本, 若園, 寺川ほか)

今は、レーザー光を樹脂面に対して垂直に当て、密着している対象物の中で屈折した光が樹脂に投影されるのを記録している。確かに細かな構造が記録されるが、生細胞のような標本の場合(図5)、どのような構造が現れているのかの解釈が困難なところがある。各部分の屈折と吸収とが合成された複雑な光の効果が重なるので、見慣れない像が得られる。ビーズのような単純な構造体であると、その凸レンズ効果に対応した跡と思われる像が得られる。直径が100 nmを下回るビーズでも小さな跡が検出できる。しかし、細胞を構成するタンパクではあまり大きな屈折率効果がない点が問題である。光照射をするたびに樹脂の収縮効果は加算されるので、原理的には、動いている対象でも多重露光記録が可能である。短い時間のフラッシュ光でも十分記録はできる。生体に応用する場合にはその特徴を生かす必要があるが、将来が期待されるイメージングの方法である。

以上、いくつかの新しい顕微鏡技術を見てきたが、観察の方法は数限りなく存在する。それぞれのニーズに合わせて採用を考えるとときの参考となれば幸いである。

文 献

- 1) Terakawa S, Sakurai T, Abe K: Development of an objective lens with a high numerical aperture for light microscopy. *Bioimages* **5**: 24, 1997.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Steyer JA, Almers W: A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 268–275, 2001.
- 5) Hellen E, Axelrod D: Fluorescence emission at dielectric and metal-film interfaces. *J. Opt. Soc. Am. B.* **4**: 337–350, 1987.
- 6) Tokunaga M, Kitamura K, Saito K, et al: Single molecule imaging of fluorophore and enzymatic reaction achieved by objective-type total internal reflection fluorescence microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**: 47–53, 1997.
- 7) Axelrod D: Selective imaging of surface fluorescence with very high aperture microscope objectives. *J. Biomed. Opt.* **6**: 6–13, 2001.
- 8) 櫻井孝司, 寺川 進, 青野 寧 他: 正倒両立顕微鏡の開発. *バイオイメージング* **9**: 76–77, 2000.
- 9) Delbridge LMD, Kabbara AA, Bellair C, et al.: Quantitative Phase Imaging – A New Way to ‘See’ Cells. *Today’s Life Science*, March/April, 2002.
- 10) Kawata Y, Murakami M, Egami C, et al.: Nonoptically probing near-field microscopy for the observation of biological specimens. *Appl. Phys. Lett.* **78**: 2247–2249, 2001.
- 11) Kitano H, Murakami M, Kawata Y, et al.: Non-optically probing near-field microscopy with illumination of total internal reflection. *J. Microsc.* **202**: 162–171, 2000.