

超解像顕微鏡を説明し、できることを知る

小林 健太郎（北海道大学 電子科学研究所）

KOBAYASHI Kentarou: What can the super resolution microscope do and do not?

Although super resolution microscope system that can observe the details of cell or organelle structures have been introduced in university or research institute in Japan, they are not yet widely known and used, partly because it is obviously more difficult to explain the principle of observation than standard optical microscope. Since we considered it a top priority to be able to explain it in an easy-to-understand manner for operator, we introduced one example of how to explain it to beginners.

1. 目的

光学顕微鏡は、人間の目では見ることのできない微細な試料の可視化を目的として設計された。特に近年になって開発された広義の蛍光顕微鏡は、細胞内小器官を観察できるため、各種の生体機能、生命現象の可視化に不可欠であり、研究者に広く利用されている。

ただし光学顕微鏡は、可視光近傍の波長の光を観察手段としているため、光の波長に起因する「200 ナノメートル」という光学分解能があり、これより微細な構造を明瞭に観察することは不可能であった。そこで近年では、「試料への光の照射方法」を工夫することにより、光学分解能の200ナノメートル以下の構造の可視化を達成した超解像顕微鏡が開発された。この超解像顕微鏡を開発した研究者に2014年にノーベル化学賞が授与されたこともあり、また3種類の観察方法による超解像顕微鏡が光学顕微鏡メーカーから市販されているため、急速に超解像顕微鏡の存在感が高まって注目を集め、国内の各大学等へも超解像顕微鏡の導入が進んでいる。

しかし従来の光学顕微鏡と比較すると、超解像顕微鏡はその観察原理の説明が格段に難しいため、装置担当者でも理解が追い付きにくいのが実状である。後述のように、フリーのオンライン百科事典プロジェクトとして知られる Wikipedia で、「超解像顕微鏡」に関する箇所¹を一読しても、十分に内容を把握することさえ難しい。更には名前に「超」の字が冠されているため、“従来の光学顕微鏡を圧倒的に凌駕する優れた機器”という印象が先行して過度の期待が高まりがちであり、期待に応えられない場合の失望感が増すばかりである。

そのため、まずは装置担当者こそが、超解像顕微鏡での観察原理の理解に加えて、超解像法の長所と短所、更にはその限界を把握し、研究者が納得できる説明を

可能とすることが最優先と考え、検討を行ってきた。本発表では、その紹介事案の1つを紹介した。

2. Wikipedia での記載の確認¹

フリーのオンライン百科事典として広く知られている Wikipedia は、各事項の詳細を有志が記入する形式となっており、数多の情報が網羅的に記載されているため、さまざまな事項の概要把握に取り掛かる際には有用である。3種類の超解像顕微鏡法の記載を確認したところ、2024年2月22日現在では、以下の内容となっていた。

誘導放出抑制顕微鏡法 従来の光学顕微鏡では可視光に依存する場合、分解能は200nmが限界だった。そのような状況を打開すべく、これまでに様々な試みが模索されてきた。その中の一つである誘導放出抑制顕微鏡法は蛍光顕微鏡の一種である。蛍光色素分子に励起光を照射すると、エネルギー状態の高い励起状態になり、その後基底状態へと落ちる時に蛍光を生じる。しかし励起状態でSTED光を照射した場合には「誘導放出」と呼ばれる現象が起きることによって色素は蛍光を出さずに強制的に基底状態に落ち、この時に放出される光は蛍光とは異なる光なので容易に区別が可能である。観測スポットの大きさはSTED光を強くしていけば原理的にはどこまでも小さくできるものの、実際には強度の制約から数10nm程度が限界とされる。

光活性化局在性顕微鏡法 従来の光学顕微鏡では可視光に依存する場合、分解能は200nmが限界だった。そのような状況を打開すべく、これまでに様々な試みが模索されてきた。その中の一つである光活性化

局在顕微鏡法は蛍光顕微鏡の一種で1回の撮像では200nmの分解能が限界だが、非常に弱い光を照射して、200nm以上の間隔で蛍光物質を1分子を検出できるように調整してからこの時の画像をいったん保存してから蛍光を止めて、また弱い光を照射すると、確率的に先ほどとは異なる集団の1分子を検出できるのでこれを全分子を測定するまで繰り返すことにより得られた画像を重ね合わせると全分子を検出した超解像画像となる。

構造化照明顕微鏡 空間分解能を向上させるために使用される構造化照明法は縞状の光を試料に照射して現れたモアレ縞に含まれている、通常の観察範囲外の情報をソフトウェアによって解析することで回折限界の約2倍、またはおよそ100nmの分解能の画像が得られる。

以上ようになっており、光学顕微鏡の初級者が、観察原理や各手法の特徴の把握として参照しても、この記載のみでは内容の把握が難しい。

3. 説明方法の検討1

超解像顕微鏡の原理の説明に先立って、まず「光学顕微鏡での観察では、なぜ分解能は波長に依存するのか？」を理解する必要がある。

「計測における分解能は、その測定手段に依存し、測定手段の半分が限界である」という原理は、一般的にはサンプリング定理（標本化定理）に近いため、概ねはこの説明で十分である。ただしサンプリング定理の説明となると、物理学や数学、そしてフーリエ変換の概念の理解が必須であるが、生物系分野の学生や研究者では、三角関数が含まれる数式や「フーリエ変換」という言葉が登場した時点で、更なる理解をあきらめがちであるのが実状である。

そこで数式等を使わずとも、大よその概念が理解できる説明を目指した。今回はひとまず、「1ミリメートルまで測ることができる定規で長さを計測するには、最低単位の1ミリメートルの半分が限界だろう」ということを、実際の写真例を用いて示した。自然科学の基礎実験等では、最小単位の十分の一まで読み取ることが推奨されるが、実のところは困難であるため、最小単位の半分程度が限界である。

要点を抑えた簡潔な説明ではあるが、「測定手段と分解能」の関係の概説となったと思われる。

4. 説明方法の検討2

優れたサンプルが作製できるならば、光学顕微鏡で分子1個の蛍光シグナルも観察可能である。しかしこのような場合でも、「200ナノメートル」という光学分解能の制約を受けるため、蛍光シグナルは数ナノメートル程度となる実際の分子サイズより格段に大きく観察される。実際の超解像顕微鏡では、この蛍光シグナルを200ナノメートル以下へと縮小することによって分解能を向上させているため、各超解像法での原理の概略を説明できるようになることで、一層の理解を進めることができると思われる。

そこで、「円状に計測されたシグナルのサイズを小さく絞る」方法について、比喩を交えた実例を示すことで説明を行った。併せて、当学に設置された超解像顕微鏡で観察した顕微鏡画像、特に3次元モデルやタイムラプス動画を紹介することにより、超解像顕微鏡で観察することに意義があることを示すことができた。

5. 超解像顕微鏡の短所や限界

超解像顕微鏡で注意を要する点として、なによりも「超解像」顕微鏡であり、「超」顕微鏡ではない点である。すなわち、「従来の光学顕微鏡で観察できなかった小さい対象」が観察可能となるのではなく、「ぼんやりして区別できなかった対象の識別」の識別が可能となることに過ぎない。

このため、一例として個々の線維状構造、微小サイズの粒子の明瞭な観察、あるいは分子Aと分子Bの厳密な局在化の検討においては、超解像顕微鏡での観察に大いに意義がある。

一方で超解像顕微鏡は、下位互換のシステムとは言えないため、上記の目的に合致しない場合は、わざわざ利用する必要がない。そして3種類のいずれの観察法でも、画像の再構築、あるいは強制的な蛍光の消光が必須であるため、取得したオリジナルの蛍光強度から大幅な変更を余儀なくされる、こうした理由のため、「蛍光強度の増減」を観たい場合や、2種類の蛍光輝度の比を取る場合で超解像顕微鏡を利用すべきではなく、一般の共焦点顕微鏡、更には十数年前からあるような、一般の光学顕微鏡の利用が適している。

また超解像顕微鏡では分解能が高くなり、特に前述の光活性化局在性顕微鏡法、あるいはこちらを発展させた1分子局在化超解像顕微鏡法では、最小で20ナノ

メートル程度と、分子サイズに匹敵する観察が可能となる。この分解能は、目的のタンパク質等と、それを標識した蛍光プローブのサイズに近づく。

しかしあくまでも、光学顕微鏡での観察で把握できるのは、「蛍光プローブ」の位置であって、「本来目的としているタンパク質」の位置が直接的に把握できるわけではない。また目的の分子等に蛍光標識を行うことにより、その嵩高さや重さにより、本来の分子運動が大幅に制限を受ける可能性もある。このように、分解能が高くなるほど、「目的と手段」の考慮が重要であることも留意すべきである。

こうした点は、装置担当者こそが常に留意し、そして機器利用を希望する研究者等に注意喚起を行うべきであるため、日常的な説明や今回の発表でも、念を押した説明を行っている。

6. 現状でのまとめと課題点

本発表では、全国の大学等への導入が進む超解像顕微鏡について、わかりやすくかつ明確に原理を説明するとともに、観察事例の紹介を行い、更には必ずしも超解像顕微鏡での観察にそぐわない事例も紹介を行った。このため装置担当者から研究者へ、一層洗練された研究支援や研究手法を提案できる可能性が高まったと期待される。生体試料の観察手法として、超解像顕微鏡は優れた観察手法であるものの、現段階では普及途中であるため、なによりも研究者へ関心と興味の喚起が必須である。研究者の側でも、「何ができるか?」、あるいは「どのような目的では、この装置は適していないか?」を自らが確認、検討させることで、最適な装置利用につながられると考えられる。

ただし現段階では、当学に設置されたタイプの超解像顕微鏡については、数学や物理学を用いず、比喻を交えて観察原理を説明することは不可能である。このため最も肝心な当学の生物系の研究者には、明瞭な説明を行うことができないのが実状である。このため、観察原理を一層わかりやすい説明方法の検討が急務である。

また最近の観察動向として、極めて微細な構造を可視化する超解像顕微鏡よりも、サンプルの広域観察、あるいはサンプル全体の3次元高速観察に需要が多いように思われ、実際に当学の超解像顕微鏡の利用もやや伸び悩んでいる。「超解像顕微鏡では、今まで到底不可能であった、生命現象の可視化も達成できる」事例を更に探索するとともに、Webサイト等で観察画像例

の掲示等を行い、更なる普及に努める必要がある。

7. 超解像顕微鏡に関する文献

本発表では、わかりやすい超解像顕微鏡の原理等の説明を最大限に優先しており、光学原理等を導入した詳細な説明とは到底言えない。

一方で大阪大学の藤田克昌教授が学術誌で日本語論文²を、東京大学の岡田康志教授らが書籍³を著している。前者は観察原理等が網羅されていて読みやすく書かれており、後者は国内の顕微鏡開発等に従事する研究者により、超解像顕微鏡に関する数多のトピックが収録されており、自らで超解像顕微鏡を構築することも可能である。

興味のある方は、両者を限なく熟読することをお薦めする。

謝辞

本発表は、北海道大学電子科学研究所ニコイメージングセンターの諸スタッフ（三上秀治教授、松尾保孝助教、富菜雄介特任助教、中野和佳子技術専門職員）、ならびに生理学研究所兼生命創成探究センターに異動の前スタッフ（根本知己教授、堤元佐特任助教）との日頃の協議等から、アイデアが得られた内容を基として発表を行いました。この場を借りて、諸氏に感謝を申し上げます。

参考文献

- 1) オンライン百科事典Wikipedia「超解像顕微鏡法」、「誘導放出抑制顕微鏡法」、「光活性化局在性顕微鏡法」。
<https://ja.wikipedia.org/wiki/超解像顕微鏡法>
- 2) 藤田克昌（大阪大学）、「超解像顕微鏡の原理と展望」、応用物理, 87 (3), 164-170, 2018.
- 3) 岡田康志（東京大学）編, 「実験医学別冊 最強のステップUPシリーズ 初めてでもできる!超解像イメージング」(羊土社), 2016.