

# 定在エバネセント波照明による超解像イメージング

高橋 哲\*・臼杵 深\*\*・高増 潔\*

## Super Resolution Imaging Using Standing Evanescent Wave Illumination

Satoru TAKAHASHI\*, Shin USUKI\*\* and Kiyoshi TAKAMASU\*

This article presents a lateral resolution improvement for total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy that employs a combination of standing evanescent light and a sample distribution (fluorescence distribution) retrieval algorithm with successive approximation. In this method, a super resolution imaging beyond the diffraction limit can be achieved based on the iterative reconstruction of multiple fluorescence images detected under the active control of the spatial distribution of the standing evanescent wave illumination. In this report, first, the principle of the lateral resolution improvement is shown from the viewpoint of the bandwidth of the transferred spatial frequencies extended by the fine structure of standing evanescent illumination and the sample distribution reconstruction process. Next, theoretical and experimental analyses of its characteristics are discussed. This method has the unique abilities of the sub-100 nm resolution even in the case of the long working distance condition due to the total internal reflection material of high refractive index.

**Key words:** fluorescence microscopy, TIRF microscopy, lateral resolution improvement, evanescent light, Rayleigh criterion

高屈折率媒質内部から低屈折率媒質界面へ、臨界角度以上の入射角度でレーザーを入射すると、全反射条件を実現できる。この全反射状態においては、低屈折率媒質中を自由空間伝搬する光波は存在せず、すべての光波は、反射光波として再び高屈折率媒質内部を伝搬する。しかし、界面近傍に関しては、低屈折率媒質側にも光エネルギーが局在することが知られており、これをエバネセント光という。このエバネセント光を照明光として、高屈折率媒質界面および近傍の顕微観察を行うのが全反射照明蛍光顕微鏡<sup>1,2)</sup> (total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy) である。このエバネセント光特有の光エネルギー局在性を積極的に利用することで、例えば液中等で三次元的に分散しているサンプルに対して、全反射媒体界面近傍100 nm程度の領域に存在するサンプルのみを限定照明することができる。そのため、落射照明等の通常の伝搬光照

明と比較し、界面近傍に存在するサンプルの光学応答のみを、使用対物レンズの焦点深度内外から発生する背景光ノイズを排除した形態で高感度検出できることが全反射照明蛍光顕微鏡の大きな特徴である。この特徴を利用し、観察対象分子の存在密度を適切に制御することで、一分子観察も実現されている<sup>3)</sup>。これは、局所照明光により光軸方法の分解能を向上させたことに相当するが、横方向の分解能は、依然、観察対物レンズの開口数と波長に依存した回折限界の影響を受け、例えば、エバネセント光照明領域に多数の対象分子が存在する場合等は、それらの面内方向の分離観察は困難となっていた。

以上の背景のもと、本稿では、全反射照明蛍光顕微鏡の横方向分解能向上<sup>4,5)</sup>を実現する一手法として、対向エバネセント波を照明として適用する面内解像力向上法<sup>6,7)</sup>をとりあげ、本研究室の取り組みを中心に紹介する。

\* 東京大学大学院工学系研究科 (〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1) E-mail: takahashi@nanolab.t.u-tokyo.ac.jp

\*\* 静岡大学若手グローバル研究リーダー育成拠点 (〒432-8651 浜松市中区城北 3-5-1)

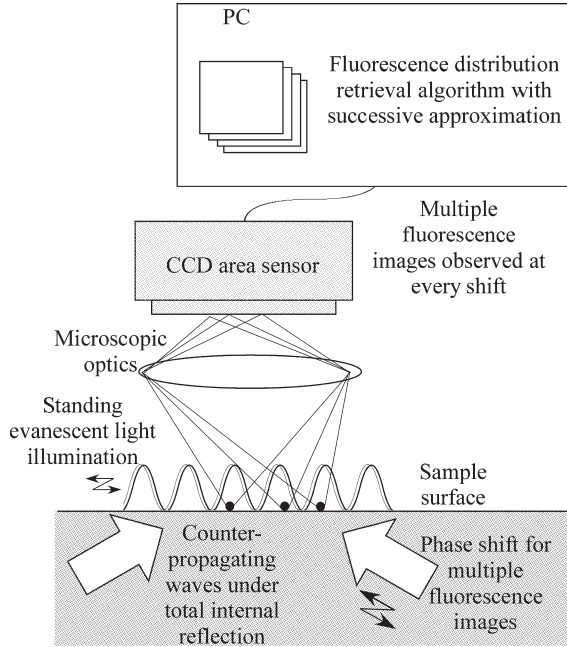


図1 定在エバネセント波照明による超解像イメージングの概念図。

### 1. 定在エバネセント波照明による超解像イメージング

図1に、定在エバネセント波照明を用いた超解像イメージング法の概念図を示す。反射鏡等を用いてエバネセント光を対向励起させ、両者の干渉現象を利用することにより、観察サンプル界面近傍の局在的光エネルギー染みだし領域において、面内方向に空間的周期状光エネルギー分布をなす定在エバネセント波を生成させる。このとき生成される定在エバネセント波の周期ピッチは、全反射条件で入射している光波の入射角度に依存するが、おおよそ、全反射媒体内部の伝搬波長の半分程度までの微小周期が可能となる。本手法は、この微細周期状照明分布（定在エバネセント波）を微小シフトさせ、変化する結像イメージを複数取得し、それらの複数結像イメージを再構成することで回折限界を超えた物体分布イメージングを行う。すなわち、微細周期状面内変調照明が有している帯域情報を結像イメージに反映させる（1章1節）とともに、観測条件の異なる複数の結像イメージから逐次の再構成を行う（1章2節）ことでロバスト性の高い超解像観察を実現するものである。

#### 1.1 変調照明による帯域拡大および帯域拡大効果による限界解像力

一般に結像分布  $r(x)$  は、観察面の光応答分布  $s(x)$  に対して点像分布関数  $psf(x)$  を用いて

$$r(x) = psf(x) \otimes s(x) \quad (1)$$

と表される。これから周期状変調照明  $i(x)$  を用いた場合の結像分布は、

$$r(x) = psf(x) \otimes [i(x) \cdot a(x)] \quad (2)$$

$$i(x) = \frac{1 + \cos(2\pi f_m x + \theta)}{2} \quad (3)$$

となる。ただし、光応答強度（例えば励起蛍光強度）が励起照明強度に対して線形であると仮定し、 $a(x)$  を物体分布（例えば蛍光密度分布）、 $f_m$ 、 $\theta$  を、それぞれ、周期状変調照明の変調周波数、位相シフト量とした。式(3)を式(2)に代入して両辺をフーリエ変換すると、

$$R(f) = \frac{1}{2} OTF(f) A(f) + \frac{1}{4} e^{i\theta} OTF(f) A(f - f_m) + \frac{1}{4} e^{-i\theta} OTF(f) A(f + f_m) \quad (4)$$

となる<sup>7)</sup>。ただし、結像分布  $r(x)$ 、物体分布  $a(x)$ 、点像分布関数  $psf(x)$  のフーリエ変換を、それぞれ、 $R(f)$ 、 $A(f)$ 、光学伝達関数  $OTF(f)$  とした。式(4)において、第1項は、物体分布  $a(x)$  が有している空間周波数成分のうち、結像光学系 ( $OTF$ ) で決定される遮断周波数までの成分のみが結像分布  $r(x)$  に反映されるといった一般的な結像機構に相当し、第2、3項が変調照明による効果を示す。すなわち、この結像分布  $r(x)$  には、結像光学系 ( $OTF$ ) の遮断周波数だけに限定されず、照明分布の変調周波数  $f_m$  分だけ帯域拡大した物体分布情報も含まれることになる。変調照明による超解像顕微法<sup>6-10)</sup> は、この帯域拡大効果を基本的な超解像原理としている。本手法において定在エバネセント波を微小シフトさせながら、それぞれのシフト位置での結像イメージを複数観察することは、式(4)の位相項  $\theta$  を回転させながら、複数の  $R(f)$  情報を取得することに相当する。

この帯域拡大の効果をレイリー基準に基づき定量化すると、 $f_c$ 、 $NA$ 、 $\lambda_s$ 、 $\lambda_r$ 、 $T$ 、 $n$ 、 $\phi$  をそれぞれ、結像光学系遮断周波数、開口数、光源波長、蛍光波長、定在エバネセント波強度分布ピッチ、全反射媒体屈折率、全反射角度として、式(5)のように記述できる<sup>7)</sup>。なお、式(6)には、比較のため通常の一様照明下におけるレイリー解像限界を示した。

$$R_{\text{standing evanescent illumination}} = \frac{1.22}{f_c + f_m} = \frac{1.22}{\left(\frac{2NA}{\lambda_r}\right) + \left(\frac{1}{T}\right)} = \frac{0.61}{\left(\frac{NA}{\lambda_r}\right) + \left(\frac{n \sin \phi}{\lambda_s}\right)} \quad (5)$$

$$R_{\text{conventional illumination}} = \frac{1.22}{f_c} = \frac{0.61}{(NA/\lambda_f)} \quad (6)$$

図2 (a) は、式 (5) に基づいて、定在エバネセント波照明強度分布ピッチ  $T$  とレイリー解像限界値の関係を示したもの ( $NA=1.2$ ,  $\lambda_f=447$  nm) である。これより、ピッチ  $T$  を小さくするほど、解像力が向上し、変調照明周波数が分解能向上に直接寄与していることがわかる。また、図2 (b) は、結像系開口数  $NA$  とレイリー解像限界値の関係を示したもの ( $T=85$  nm,  $\lambda_f=447$  nm) であるが、これより、本手法は、全反射媒体の屈折率を高め、定在エバネセント波照明強度分布ピッチを微小化することで、開口数に支配されない解像特性を有することがわかる。これは、超長作動距離観察下においても高解像力を維持できることを意味している。すなわち、マイクロマニピュレーターに代表される顕微観察下での多様な機能素子を、対物レンズ-サンプル間に挿入しながら、100 nm を上回る面内分解能が発現可能なことを示唆しており、本顕微法特有のユニークな特性となっている。

### 1.2 複数結像イメージを用いた逐次物体分布再構成

図3に、複数結像イメージを用いた逐次物体分布再構成フロー例<sup>7)</sup>を示す。未知なサンプルに対して、定在波照明を適用し、照明シフトを行いながら、結像イメージを複数取得する。一方で、計算機内において、初期値として一般的な物体分布  $A_0$  を設定し、定在エバネセント波照明時の結像分布を計算により求める。この計算結像分布と、実際に

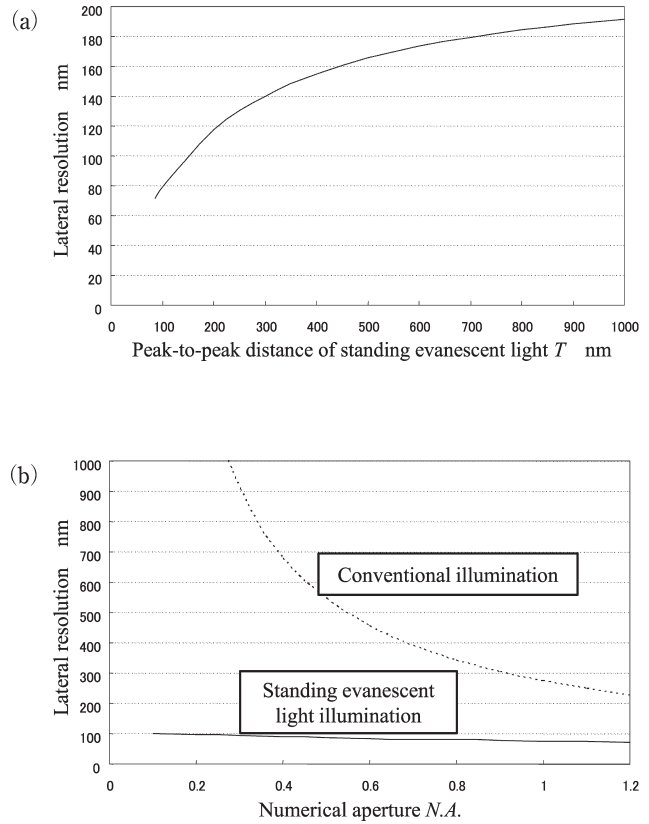


図2 定在エバネセント波照明の帯域拡大効果が解像特性に及ぼす影響。(a) 定在波照明強度分布ピッチ  $T$  の影響、(b) 結像系開口数  $NA$  の影響。

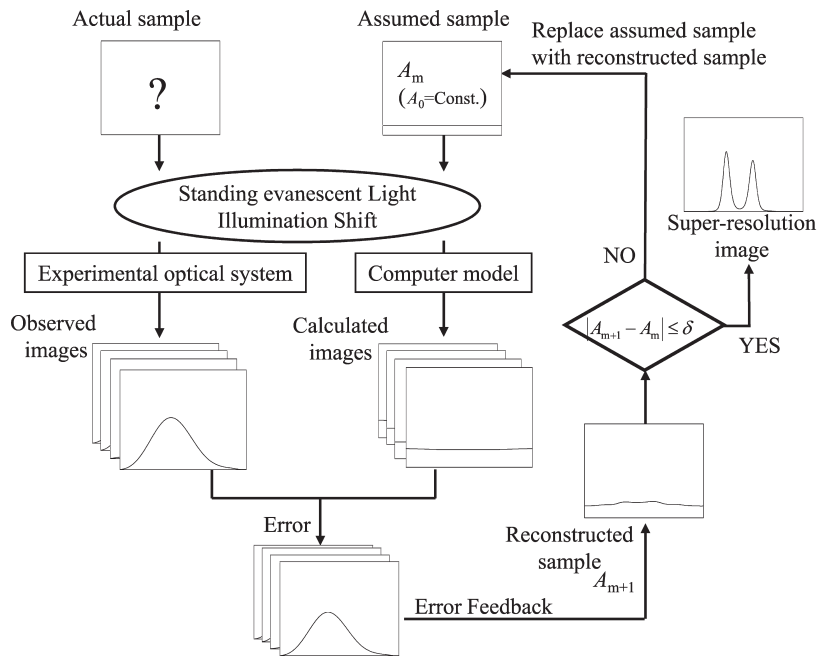


図3 複数結像イメージを用いた逐次物体分布再構成フロー。

表1 計算機シミュレーション条件.

Parameter	Symbol	Value
Numerical aperture of imaging optics	$NA$	1.2
Wavelength of light source	$\lambda_s$	365 nm
Wavelength of fluorescence light	$\lambda_r$	447 nm
Refractive index of TIR medium	$n$	2.14
Incident angle of TIR surface	$\theta$	60 degree
Peak-to-peak distance of standing evanescent light	$T$	98.5 nm
Conventional Rayleigh diffraction limit	$L$	227 nm
Shift step	$S_s$	33 nm
Shift count	$S_c$	2 (=3 illuminations)
Iteration count	$I_c$	1000

観察された結像イメージを比較, エラー値を算出して, 推定物体分布  $A_1$  に修正を施す. これを, 定在エバネセント波照明をシフトさせながら逐次的に繰り返し演算することで, 物体分布を再構成する. 以上により, 帯域拡大情報を有する複数結像イメージ群を再構成物体分布に反映させることが可能であり, またこのプロセスは, 数学モデルにあてはめた物体分布探索処理をしていることに相当するため, 原理上は, 変調照明周波数で規定される帯域拡大効果以上の超解像性の発現可能性も有したものとなる.

## 2. 計算機シミュレーションによる解像特性解析

### 2.1 基本解像特性

基本解像特性について検討するため, 観察対象として, 2点の離散的蛍光サンプルを想定し, 計算機内で解像シミュレーション (表1は基本的なシミュレーション条件) を試みた. 図4に, 2点間隔を設定光学系のレイリー解像限界値に設定したものを示す. 図(a), (b)は, それぞれ, 定在エバネセント波照明と離散的サンプルの配置関係および, それらの配置に対する結像イメージを示している. こ

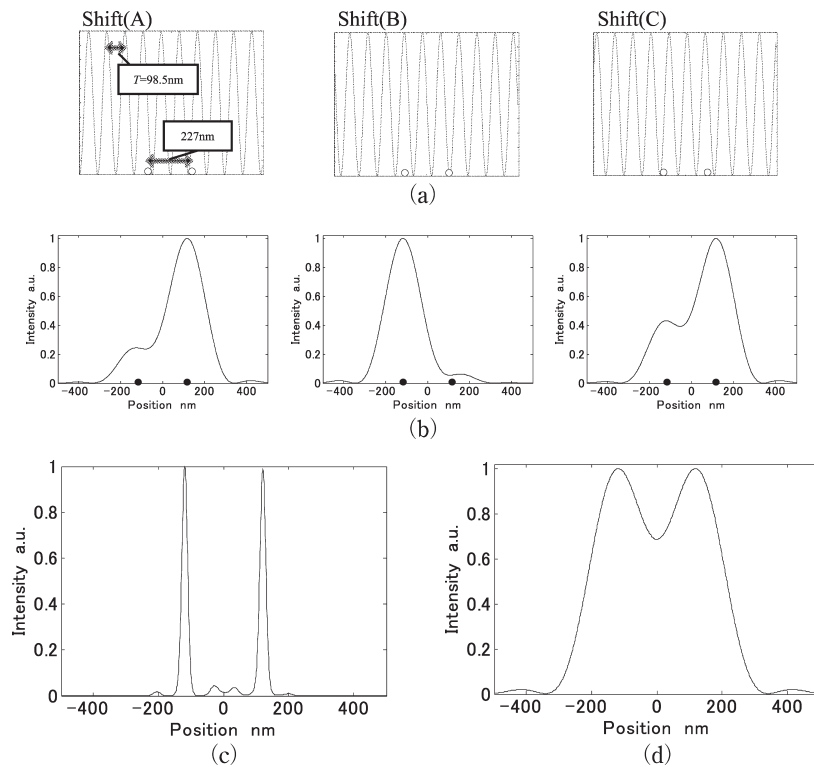


図4 離散的2点サンプル (レイリー解像限界距離) の基本解像シミュレーション結果. (a) 定在エバネセント波照明と離散的2点サンプルの関係, (b) (a) の照明下において観察される結像イメージ, (c) (b) の複数結像イメージ群を用いた再構成物体分布 (本手法による超解像イメージ), (d) 同様照明下において観察される結像イメージ (従来の顕微鏡観察像).

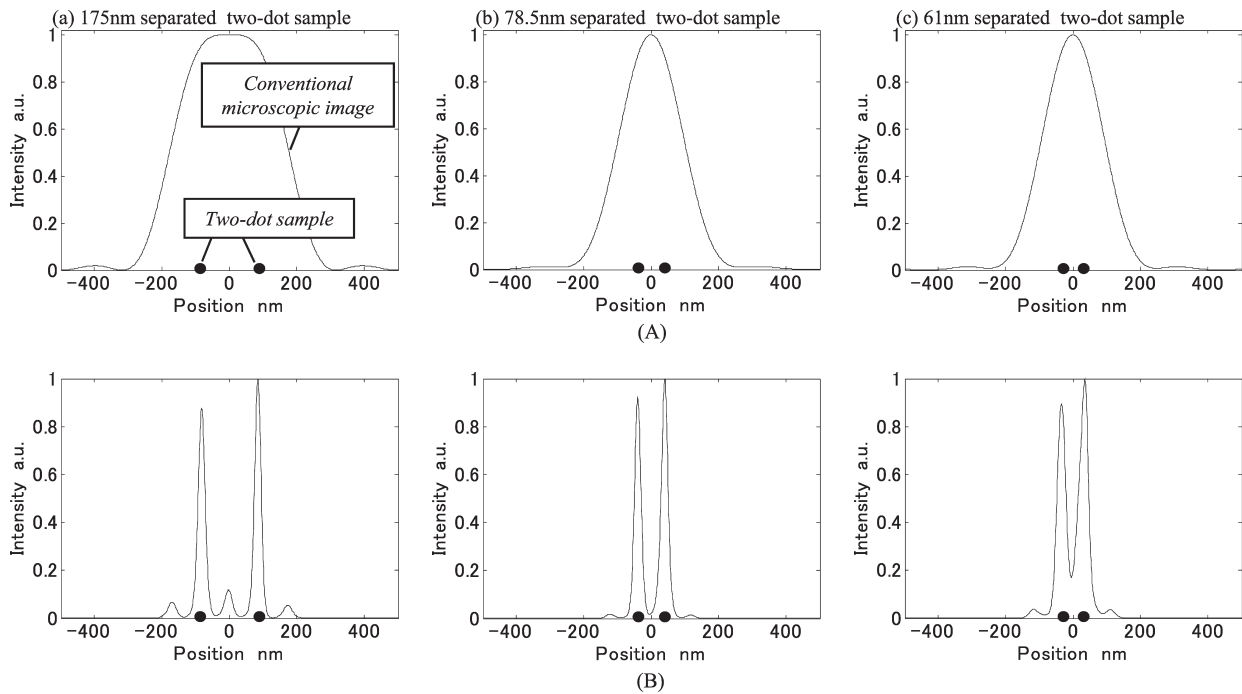


図5 離散的2点サンプルの解像シミュレーション例 (2点間隔変化の影響)。(A) 一様照明下において観察される結像イメージ (従来の顕微鏡観察像), (B) 複数結像イメージ群を用いた再構成物体分布 (本手法による超解像イメージ)。

のように、取得される結像イメージは、定在エバネセント波の微細周期状照明による変調を受けるが、依然、伝搬光結像系による回折限界の影響を受け、明確な2点識別はできず、照明位置変化に対応して強度分布が変化していく様子が観察される。これらの複数結像イメージ群を用いて、1章2節の逐次物体分布再構成を行った (図4 (c))。これより、一様照明下において観察される結像イメージ (図4 (d)) と比較して、解像力が大きく向上していることがわかる。

図5は、2点間隔を変化させたときの、一様照明下における結像イメージ (図5 (A)) と再構成超解像イメージ (図5 (B)) を比較して示したものである。図 (a), (b), (c) はそれぞれ、175 nm 間隔 (一様照明下のスパロー解像限界に相当)、78.5 nm 間隔 (定在エバネセント波照明強度分布ピッチによる帯域拡大効果を勘案したレイリー解像限界)、61 nm 間隔 (定在エバネセント波照明強度分布ピッチによる帯域拡大効果を勘案したスパロー解像限界) のときのシミュレーション結果となっている。一様照明下では、スパロー解像限界に対応した、2点ピークは分離せずフラットな強度分布を有した結像イメージ (図5 (A) (a)) が得られているが、これに対して本手法 (図5 (B) (a)) では、2点ピークが明確に分離された再構成物体分布が得られていることがわかる。さらに、定在エバネセント波照明強度分布ピッチによる帯域拡大効果を勘案したス

パロー解像限界間隔の離散サンプル (図5 (B) (c)) においても、2点ピークが確認できる。これから、ノイズのない理想環境下においては、本手法の逐次再構成演算により変調照明の帯域拡大効果を上回る解像ができていくことがわかる。

## 2.2 ノイズ環境下におけるロバスト性の検討

ノイズ環境下における解像特性を調べるため、逐次再構成演算に入力する結像イメージ群に恣意的にノイズを重ねさせてシミュレーションを行った。図6に、結像イメージに、その最大輝度の0% (図6 (a)), 20% (図6 (b)), 30% (図6 (c)) の振幅を有するランダムノイズを付加した際の結果について示す。これから、結像イメージに最大輝度の30%のノイズがのった場合 (図6 (B) (c)) でも、ある程度、2点ピークの確認が可能であることがわかる。

この解像性は、定在エバネセント波照明の単位シフト量 (シフトステップ)  $S_s$  とシフト回数  $S_c$  に大きく依存する。図7は、ノイズレベル30%のときに、シフトステップ  $S_s$  を10 nmに設定し、シフト回数  $S_c$  を変化させたものである。シフト回数  $S_c$  が6回までは、明確な2点ピークは確認できないが、11回にすることで明確に識別が可能になる。また、図5, 6の比較から、同じシフト回数 ( $S_c=2$ ) でも、解像できるケース (図6 (B) (c)) と解像できないケース (図7 (b)) があることがわかる。これは、シフトステップの違いによる (前者は  $S_s=33$  nm, 後者は  $S_s=$

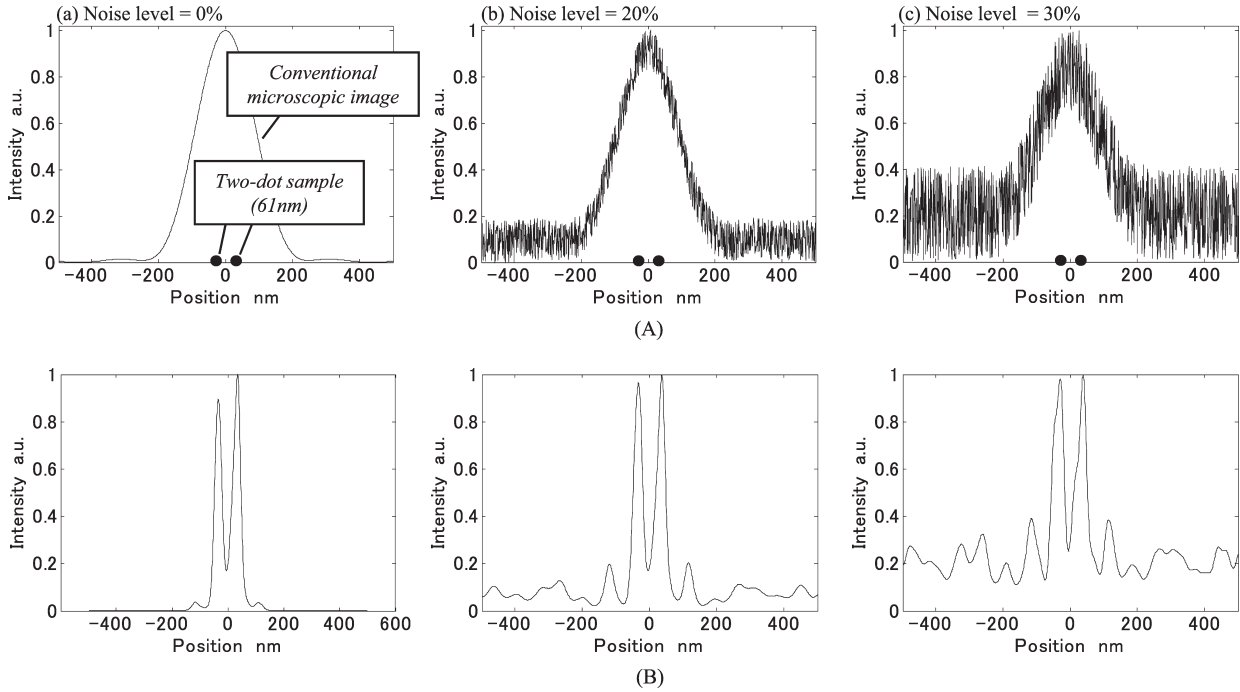


図6 ノイズが解像イメージに及ぼす影響 (単位シフト量  $S_s=33$  nm, シフト回数  $S_c=2$ ). (A) 一様照明下において観察される結像イメージ (従来の顕微鏡観察像), (B) 複数結像イメージ群を用いた再構成物体分布 (本手法による超解像イメージ).

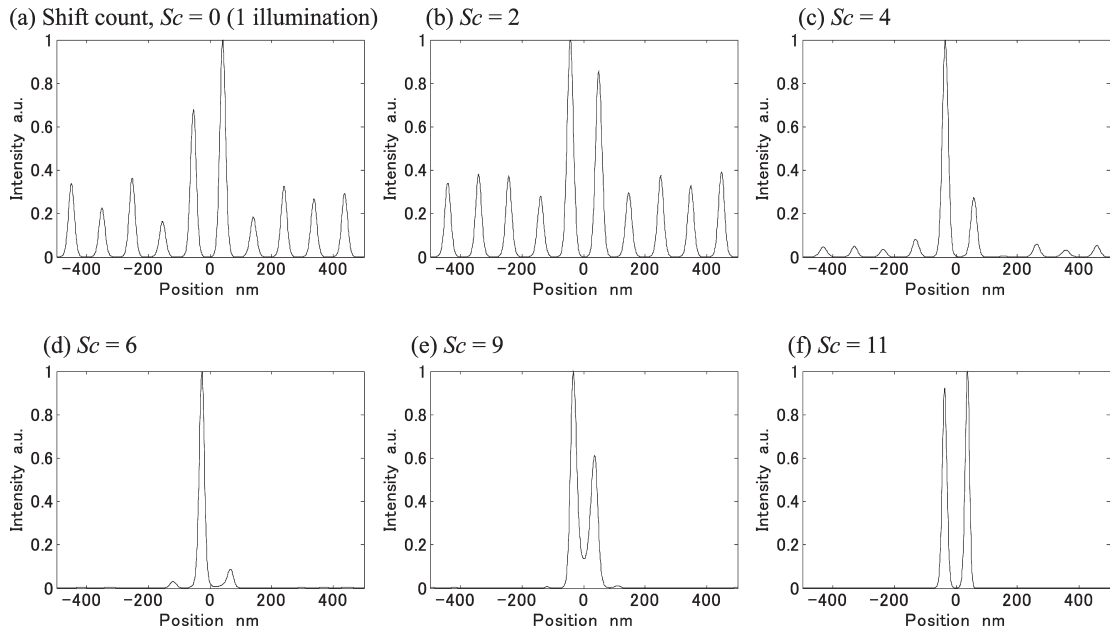


図7 シフト回数  $S_c$  が解像イメージに及ぼす影響 (付加ノイズレベル 30%, 単位シフト量  $S_s=10$  nm).

10 nm) ものである。この影響を詳細に調べたのが、図8である。ここでは、解像レベルを、物体分布再構成率 (再構成物体分布と設定物体との相関値)  $R_r$  で定量化して示した。シフト回数とともに、 $R_r$  は大きくなり、単位シフト量とシフト回数の積がおおよそ 100 nm に達すると、ほぼ一定値になることがわかる。この 100 nm の値は、設定した定在エバネセント波照明強度分布ピッチの 98.5 nm

に対応しており、これより、本手法においては、変調照明周期の 1 ピッチ分について、まんべんなく照明シフトさせることが重要になることがわかる。また、このシフト条件を満足した場合に得られる物体分布再構成率は、それぞれ、約 0.95 ( $S_c=10$  nm), 0.87 (20 nm), 0.83 (10 nm) となっており、細かい単位シフト量にすることで、よりノイズに対してロバスト性の高い解像特性が得られることが

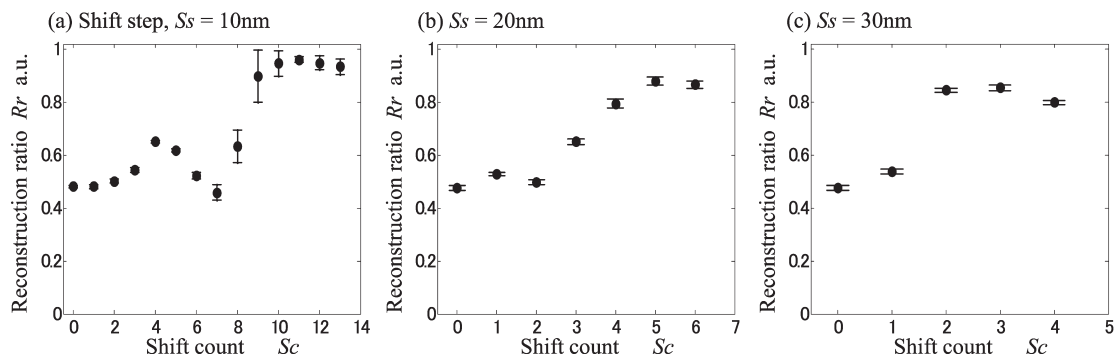


図8 単位シフト量  $S_s$  とシフト回数  $S_c$  が解像イメージに及ぼす影響 (物体分布再構成率  $R_r$  による定量評価)。

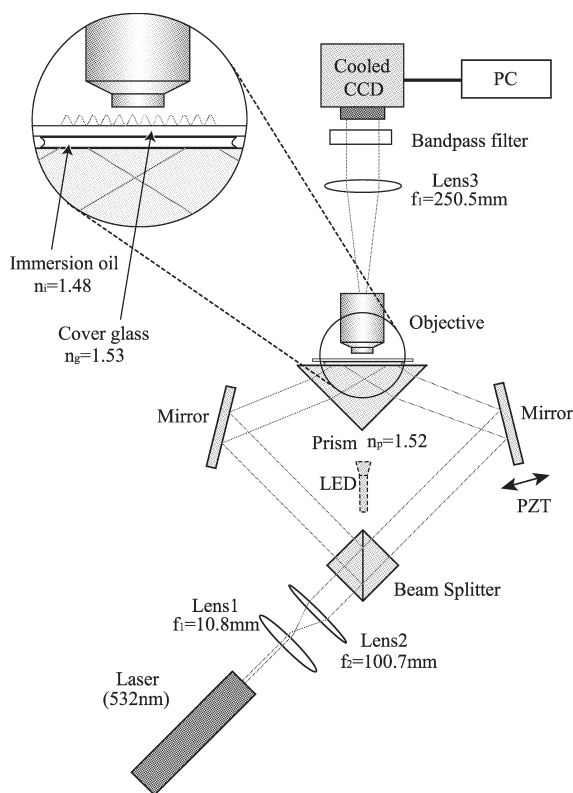


図9 定在エバネセント波照明を利用した顕微観察実験装置。

わかる。一般に正弦波状の変調照明をシフトする場合、数学的には、3回以上のシフト情報は冗長情報になるため、ノイズのない理想環境下においては(3回以上の)多数シフトの効果は、原理上、解像性向上に反映されないが、上述のように、さまざまな外乱が混入する実環境下においては、解像性の向上に寄与することになる。

### 3. 標準蛍光粒子を用いた解像力向上検証基礎実験

図9に、プリズムを利用した定在エバネセント波照明顕微観察実験装置の模式図を示す。光源より出射したレーザービームをビームスプリッターで分岐し、それぞれを、プリズム内において対向させた形態で全反射させることで、定在エバネセント波照明を実現する。この際、一方の光路状のミラーにはPZTが設置され、これによりナノスケールでの照明シフトが可能となる。図10に実験結果の一例を示す。ここでは、解像力向上に対する検証目的のため、カバーガラス上に散布した標準蛍光粒子を観察対象とし、水浸ではなく気相中で観察を行った。さらに、結像NAを超えた解像が可能であることを検証するにあたり、比較的低いNAの結像系 ( $NA\ 0.35$ :レイリー解像限界  $927\text{ nm}$ ) を用いて超解像実験を行い、その後、高NA結像系 ( $NA\ 0.90$ :レイリー解像限界  $361\text{ nm}$ ) により、対象箇所

表2 解像力向上検証基礎実験の実験条件。

Parameter	Symbol	Value
Numerical aperture of imaging optics	$NA$	0.35
Wavelength of light source	$\lambda_s$	532 nm
Wavelength of fluorescence light	$\lambda_f$	612 nm
Refractive index of TIR medium	$n$	1.52
Incident angle of TIR surface	$\theta$	55 degree
Peak-to-peak distance of standing evanescent light	$T$	325 nm
Conventional Rayleigh diffraction limit	$L$	927 nm
Shift step	$S_s$	47 nm
Shift count	$S_c$	7 (=8 illuminations)
Iteration count	$I_c$	2000

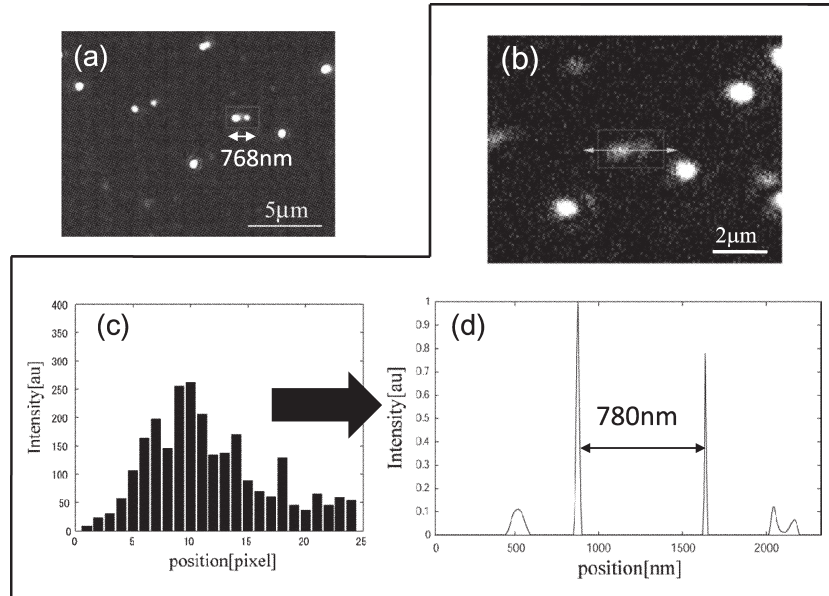


図10 標準蛍光粒子を用いた解像力向上検証基礎実験。(a) 一様照明下、高 NA (0.9) 顕微鏡による結像イメージ：一様照明レイリー基準 361 nm, (b) 一様照明下、低 NA (0.35) 顕微鏡による結像イメージ：一様照明レイリー基準 927 nm, (c) イメージ (b) の矢印部の断面強度プロファイル, (d) 定在エバネセント波照明による複数シフト画像から得られた再構成物体像プロファイル (b) と同じ低 NA 条件)。

を高分解能観察することで実験結果の検証を行った。詳細な実験条件は表 2 に示す。高 NA 結像系で観察された標準蛍光粒子の 2 点構造 (図 10 (a)) は、低 NA 結像系 (図 10 (b), (c)) では、2 点としては観察されない。この低 NA 結像系において、定在エバネセント波照明をシフトさせながら、8 枚の結像イメージを取得し、上述の逐次物体分布再構成を行ったものが図 10 (d) である。一様照明下においては解像されていなかった標準蛍光粒子の 2 点構造が、本解像法により、明確に 2 点ピークとして検出されていることがわかる。

エバネセント定在波照明を複数シフトさせた際の結像イメージを用いる本手法の超解像メカニズムは、観測条件を変えながら取得した複数の物体情報から直接的に解像力向上を行う<sup>11)</sup>と同時に、一般的に超解像再生問題が有するノイズ脆弱性問題<sup>12)</sup>を軽減し、そのロバスト性を向上させたものと解釈可能である。この両者の実現のうえで、変調照明には高い空間周波数が望まれる。その観点から、全反射媒体の高い屈折率を利用できる定在エバネセント波は、理想的な変調照明のひとつであるといえる。すなわち本手法は、全反射媒体の高い屈折率値を面内分解能向上へ寄与させていることに相当し、結果として超長作動距離観察下においても 100 nm を上回る面内分解能を発現可能なユニークな特性を有する。現在、コヒーレント結像への対

応や、STED<sup>4)</sup> や多光子<sup>5)</sup> などの非線形効果との融合等<sup>13,14)</sup> の取り組みがなされており、今後、多様なアプリケーション<sup>15-17)</sup> へ適応が可能な広い汎用性を有する超解像顕微法としての確立が期待される。

## 文 献

- 1) D. Axelrod: "Cell surface contacts illuminated by total internal reflection fluorescence," *J. Cell Biol.*, **89** (1981) 141-145.
- 2) D. Axelrod: "Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology," *Traffic*, **2** (2001) 764-774.
- 3) G. Cappello, M. Badoual, A. Ott, J. Prost and L. Busoni: "Kinesin motion in the absence of external forces characterized by interference total internal reflection microscopy," *Phys. Rev. E*, **68** (2003) 021907.
- 4) S. W. Hell and J. Wichmann: "Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: Stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy," *Opt. Lett.*, **19** (1994) 780-782.
- 5) W. Denk, J. H. Strickler and W. W. Webb: "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy," *Science*, **248** (1990) 73-76.
- 6) G. E. Cragg and P. T. C. So: "Lateral resolution enhancement with standing evanescent waves," *Opt. Lett.*, **25** (2000) 46-48.
- 7) S. Takahashi, S. Okada, H. Nishioka, S. Usuki and K. Takamasu: "Theoretical and numerical analysis of lateral resolution improvement characteristics for fluorescence microscopy using standing evanescent light with image retrieval," *Meas. Sci. Technol.*, **19** (2008) 0804006.
- 8) M. G. L. Gustafsson: "Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination micros-



- copy," *J. Microsc.*, **198** (2000) 82-87.
- 9) R. Fedosseev, Y. Belyaev, J. Frohn and A. Stemmer: "Structured light illumination for extended resolution in fluorescence microscopy," *Opt. Laser. Eng.*, **43** (2005) 403-414.
  - 10) J. T. Frohn, H. F. Knapp and A. Stemmer: "True optical resolution beyond the Rayleigh limit achieved by standing wave illumination," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97** (2000) 7232-7236.
  - 11) 河田 聡: "物理計測における最近の信号回復論", *応用物理*, **55** (1986) 2-23.
  - 12) 河田 聡: *超解像の光学* (学会出版センター, 1999) pp. 97-106.
  - 13) R. Heintzmann: "Saturated patterned excitation microscopy with two-dimensional excitation patterns," *Micron*, **34** (2003) 283-291.
  - 14) P. T. C. So, H. S. Kwon and C. Y. Dong: "Resolution enhancement in standing wave total internal reflection microscopy: A point-spread-function engineering approach," *J. Opt. Soc. Am. A*, **18** (2001) 2833-2845.
  - 15) L. Shao, B. Isak, S. Uzawa, D. A. Agard, J. W. Sedat and M. G. L. Gustafsson: "I<sup>3</sup>S: Wide-field light microscopy with 100-nm-scale resolution in three dimensions," *Biophys. J.*, **94** (2008) 4971-4983.
  - 16) E. Chung, D. Kim, Y. Cui, Y. H. Kim and P. T. C. So: "Two-dimensional standing wave total internal reflection fluorescence microscopy: Superresolution imaging of single molecular and biological specimens," *Biophys. J.*, **93** (2007) 1747-1757.
  - 17) 臼杵 深, 西岡宏晃, 高橋 哲, 高増 潔: "変調照明シフトによる超精密加工表面の超解像光学式欠陥計測に関する研究 (第2報) 一定在波照明シフト実験による解像原理の実験的検証一", *精密工学会誌*, **74** (2008) 581-586.

(2009年3月10日受理)