

回折限界をどう超えるか

— 超解像蛍光イメージング —

藤田 克昌

Beyond the Diffraction Limit: Super-Resolution Fluorescence Imaging

Katsumasa FUJITA

It has been believed that spatial resolution of optical microscopy is limited by the diffraction limit of light, where two small objects separated with the distance less than about a half of illuminated wavelength can not be separated in the optical image. Recently several methods were proposed to overcome this limitation and bring about the spatial resolution without limitation by theory. These super-resolution imaging techniques were realized by utilizing saturation effects in optical phenomena, such as fluorescence excitation and stimulated emission and by using photoswitchable fluorescent molecules. The spatial resolution has been improved by a factor of several ten with these techniques. In this article, I introduce concepts for overcoming the diffraction limits in fluorescence microscopy and show several examples of super-resolution imaging.

Key words: Super resolution microscopy, saturated excitation (SAX) microscopy, stimulated-emission depletion (STED) microscopy, photoactivation localization microscopy (PALM), stochastic reconstruction microscopy (STORM)

1. はじめに—Return of the optical microscope

光学顕微鏡の空間分解能は低いといわれるようになって久しい。電子顕微鏡や原子間力顕微鏡が身近になり、光学顕微鏡の数百倍の空間分解能が手に入った。手軽な顕微観察、また生体の観察のツールとしての光学顕微鏡は健在だが、「顕微鏡」を最も特徴づける空間分解能の話になると分が悪い。

光学顕微鏡の空間分解能の限界を最初に示したのはドイツの Abbe である。彼は、1873 年に光学顕微鏡は波長の半分程度しか観察できないことを導いた。この空間分解能の限界は、光学顕微鏡の光学像を含むあらゆる光の分布が光の干渉により形成されることより生じる。1990 年以降のレーザー顕微鏡の時代になっても回折限界の壁は高く、共焦点顕微鏡等で光学系の工夫を行っても、せいぜい 2 倍程度の空間分解能の向上しか得られなかった^{1,2)}。近接場顕微鏡等ではプローブ顕微鏡技術をうまく利用してこの限界を超えた³⁾が、伝搬光を使ういわゆるファーフィールド顕微鏡においては、依然として回折限界の壁が立ちだか

った。光学的な手法のもつリモート性や生体への優しさを生かすためにも、回折限界の突破は顕微鏡開発者にとっての夢であった。

しかし、近年、この状況が一変しつつある。伝搬光のみを利用した場合においても、数十 nm 程度の空間分解能が得られる手法が実用レベルで複数登場してきた^{4,5)}。これらの手法では、試料と光との分子レベルでの相互作用を利用し、光学系で決定される値よりも数倍から数十倍高い空間分解能を実現している。実際は、蛍光分子がみせるさまざまな光学応答を利用しているため⁶⁾、これらはすべて蛍光顕微鏡における超解像の実現である。どの手法においても空間分解能は光の波動性に制限されておらず、顕微観察ツールとしての光学顕微鏡の復権、“Return of the optical microscope”が目前に来ている。

本報告では、蛍光顕微鏡において回折限界を超えるためのコンセプトから、それらの光学顕微鏡への実装までを紹介する。

2. 2つのタイプの超解像法

光学顕微鏡の結像特性は光学系の特性により決定されると考えがちである。しかし、実際の結像特性は、光を照射した分子の光学応答にも大きく依存する。その分子の特性をうまく利用して超解像を実現した顕微鏡は、大きく分けて、1) 分子の高次の非線形応答を利用するもの、2) 発光制御可能な分子を利用するもの、の2つのタイプがある。

分子の非線形な光学応答を利用した顕微鏡として、二光子蛍光顕微鏡がよく知られている⁷⁾。レーザー顕微鏡の空間分解能は、通常、試料を照明するレーザースポットの大きさと同程度である²⁾。しかし、二光子顕微鏡では、蛍光の強度が励起光の強度の2乗に比例するため、蛍光が発光する領域はレーザースポットの大きさよりも小さい。そのため、光学系で決定される空間分解能 (=レーザースポットの大きさ) よりも高い空間分解能が得られる⁸⁾。

超解像顕微鏡のいくつかは、光学応答の飽和時に現れる高次の非線形な応答を利用する。飽和現象は光吸収や誘導放出等のさまざまな光学現象に現れ、照明光の強度と信号光の強度との関係に高い非線形性が生まれる。これをうまく利用すれば、波長の数十分の1の空間分解能を得ることが可能になる。

また、発光制御可能な分子を利用する方法では、試料内の分子1つひとつを個別に観察して、顕微鏡画像を形成する。通常の蛍光顕微鏡像では、試料内に2つの微小な発光点がある場合、それらの像の位置が光学系で決定される点像の広がりよりも近くなると、2つの発光点として区別できなくなる。しかし、同時に観察される分子が1つのみであれば、その位置を正確に測定することは可能である。通常の蛍光試料の場合には試料内に数多くの蛍光分子が存在するが、それぞれの分子の発光を時間的に制御できれば、それらの位置を個別に求め、試料内での分布を正確に把握できる。

以下、光学応答の飽和にみられる非線形な光学応答を利用した超解像法と、分子の発光制御を利用した超解像法に分け、その原理と実験例を紹介する。

3. 高次の非線形応答を利用した超解像法

3.1 線形効果の飽和時に現れる非線形応答

十分大きな強度の光が物質に入射すると、多くの光学応答が飽和する。例えば、一光子吸収のような線形な光学現象であっても、ある程度以上の強い光が試料に照射されると、光吸収が生じなくなる。この場合、分子に入射する光強度と光吸収量との関係は非線形となり、そこには高次の非線形応答が含まれる。飽和現象はさまざまな光学応答に

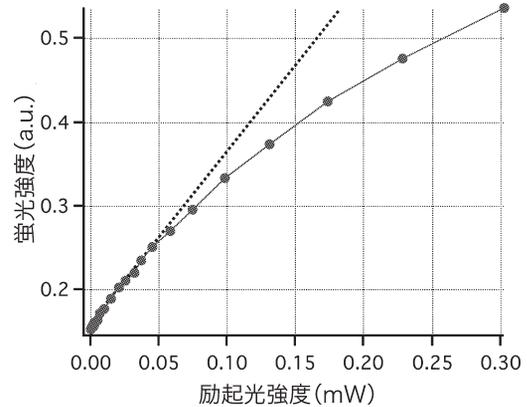


図1 ローダミンB水溶液により測定した蛍光強度と励起光強度との関係。励起光強度が大きくなると蛍光強度が飽和していき、励起光と蛍光との関係が非線形になる。

みられ、光吸収、光励起、誘導放出、光異性化等が挙げられるが、これらすべてが超解像イメージングに利用されている。以下、これらを利用した超解像技術のうち、比較的シンプルなものから順に紹介する。

3.2 分子励起の飽和を利用した超解像法

蛍光分子を励起する際、励起光の強度を徐々に上げていくと、測定される蛍光の強度も同様に上昇するが、そのうち飽和する。これは、光の照射範囲にある分子の数は有限であり、蛍光分子が励起後に時間遅れをもって発光する(蛍光寿命をもつ)ためである。図1は、ローダミンB水溶液を励起した際の、励起光強度と蛍光強度との関係である。レーザー光強度を高めると、蛍光の強度が飽和していく様子がわかる。この飽和励起時に現れる非線形な蛍光応答を利用した超解像技術が提案され、saturated excitation (SAX) 顕微鏡とよばれている^{9,10)}。

SAX 顕微鏡では、対物レンズにより光を試料内の一点に集光して蛍光を励起する。焦点中心付近の光強度はきわめて高くなるため、レーザー焦点の中心部位では際だって飽和励起現象が現れ、励起光と蛍光との関係が非線形となる。一方、焦点中心から離れるに従い、飽和は起こりにくくなり、励起光と蛍光との関係は線形になっていく。このとき、非線形な応答のみを線形な応答から分離検出できれば、焦点中心付近にある分子からの蛍光信号のみを取り出せる。このため、レーザー焦点を走査しながら非線形な信号のみを検出すれば、高解像度の蛍光像を構成できる。

蛍光応答が非線形かどうかは、励起光強度を変化させながら蛍光の強度を測定すればわかる。励起光の強度を変調すると、蛍光信号も同様に変調される(図2)。蛍光応答が線形な場合には、蛍光信号の変調周波数は励起光のそれと全く同じであるが、非線形な応答が生じると、蛍光の変

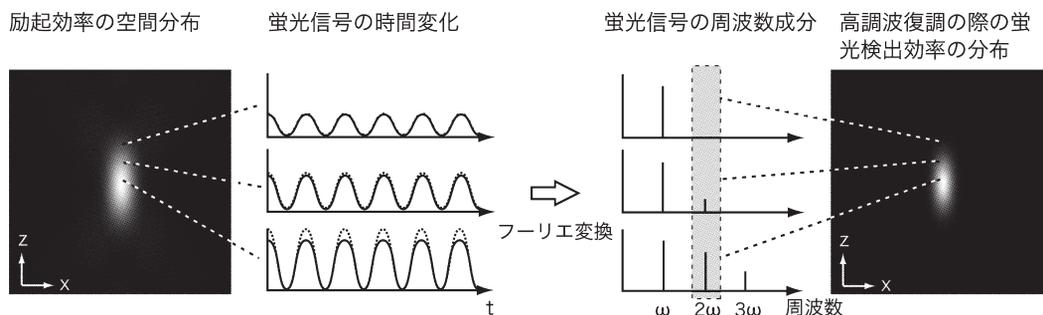


図2 飽和励起による空間分解能向上の原理。飽和励起が顕著に現れるレーザースポット中心の蛍光応答のみを、高調波復調により分離して検出。

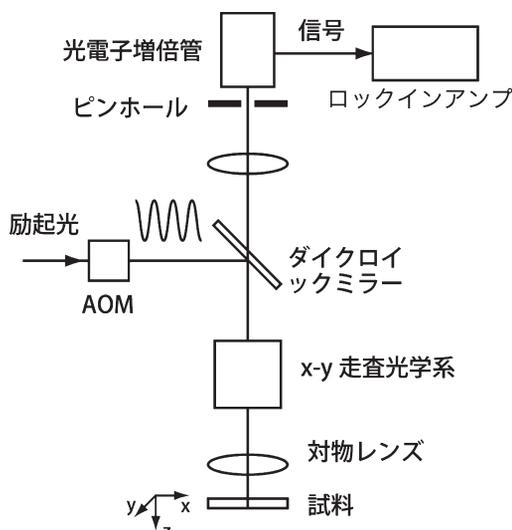


図3 飽和励起 (SAX) 顕微鏡の光学系。

調信号にひずみが現れ、高調波周波数で変調された信号が現れる。この高周波成分こそが非線形な蛍光応答を示しており、それを周波数フィルターにより分離検出すれば、レーザー焦点内のより狭い領域の蛍光信号のみを取り出せる。

この飽和励起を利用した超解像レーザー走査顕微鏡の光学系を図3に示す。通常のレーザー走査顕微鏡に、励起光の強度変調のための音響光学変調器 (AOM) と蛍光信号の周波数フィルタリングのためのロックインアンプとを追加すれば、図3の顕微鏡システムが実現できる。この光学系を用いて生体試料を観察した例を図4に示す。試料はミトコンドリアを ATTO488 により染色したヒトがん細胞 (HeLa 細胞) で、波長 488 nm の連続発振レーザー光を使用して観察した。試料内の同一部位を、通常の共焦点顕微鏡 (図4 a)), および飽和励起を用いた顕微鏡 (図4 b)) により観察し、それぞれの結果において空間分解能の比較を行った。図4 a), b) の比較から、飽和励起時には明らかに空間分解能が向上していることがわかる。また、図4 c),

d) は同じ試料の深さ方向の断面を示している。図4から、飽和励起により三次元のすべての方向で空間分解能が向上することがわかる。

飽和励起により得られる空間分解能は、どの程度まで高次の非線形応答を検出可能かで決まる。図5は ATTO488 水溶液を波長 488 nm の光で励起した際に得られる、励起光強度と蛍光信号との関係である¹⁰⁾。図5では、高調波周波数での復調時には励起光強度のべき乗に比例した蛍光信号が得られており、復調周波数を大きくすればその非線形性も大きくなる。このべき乗に比例する応答特性のため、レーザー焦点付近で蛍光信号が検出される領域も、レーザー光の強度のべき乗で与えられる。図6は、基本周波数 ω およびその整数倍の高調波周波数で蛍光信号を復調した際の、レーザー焦点周辺の蛍光検出領域 (点像分布関数) を示す (計算結果)¹¹⁾。蛍光が線形に応答する従来の顕微鏡 (復調周波数: ω) に比べ、高調波成分はより狭い領域に信号が局在することがわかる。また、復調周波数を大きくすれば、点像分布関数の広がり小さくなり、空間分解能が向上する。このため、この手法には理論的な空間分解能の限界は存在しない。しかし、高次の非線形応答は非常に微弱な信号として現れるため、実際の空間分解能は蛍光検出の信号対雑音比で決定される。図5の測定では、光電子増倍管を検出器に用いており、光電子増倍管に起因するショットノイズが信号対雑音比を決定している。図5より、現システムでは、5次の非線形応答まで検出可能なことがわかり、通常の蛍光顕微鏡に比べ、約5倍の空間分解能の向上が見込まれる。

SAX 顕微鏡では、レーザー光強度の変調のみで超解像が実現できる。以下に挙げる他の超解像技術に比べて達成されている空間分解能はあまり高くないが、簡便で、応用範囲の広い超解像法として期待されている。飽和励起は上記のようなレーザー走査顕微鏡以外にも、パターン照明励起を行う蛍光顕微鏡 (saturated structured illumination

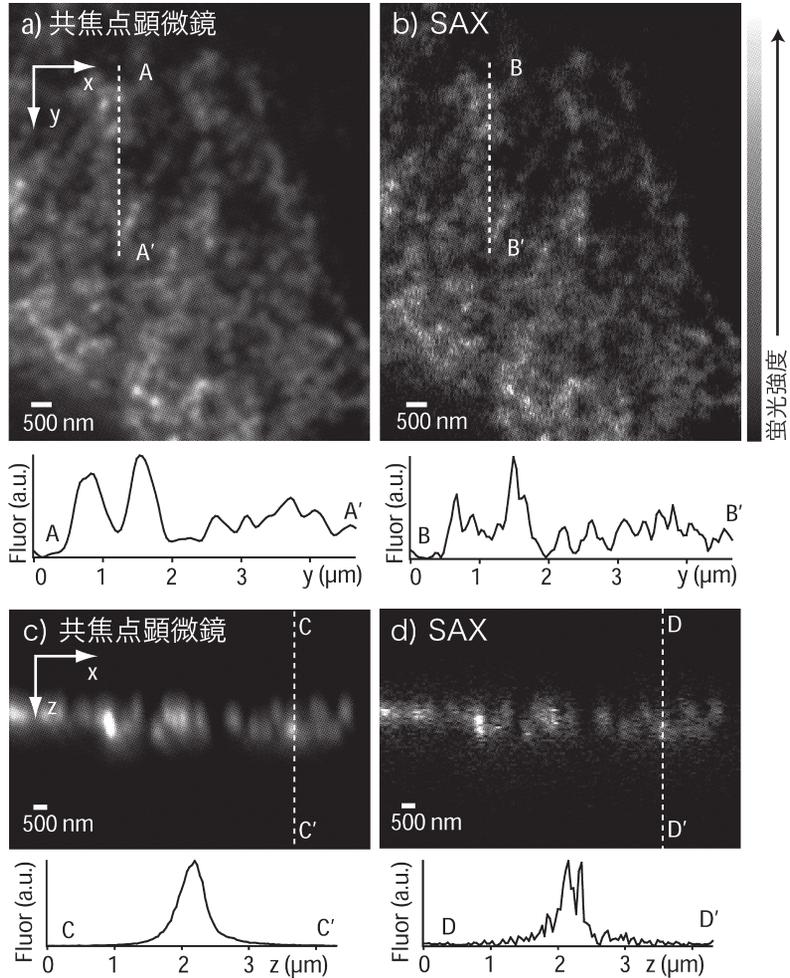


図4 HeLa細胞のミトコンドリアの共焦点蛍光像。励起光を10 kHzで変調した際の、a) 共焦点蛍光像（10 kHzで復調，飽和なし），およびb) 飽和励起蛍光像（20 kHzで復調）。c) およびd) 同じ試料の深さ方向の断面。（巻頭カラー口絵参照）

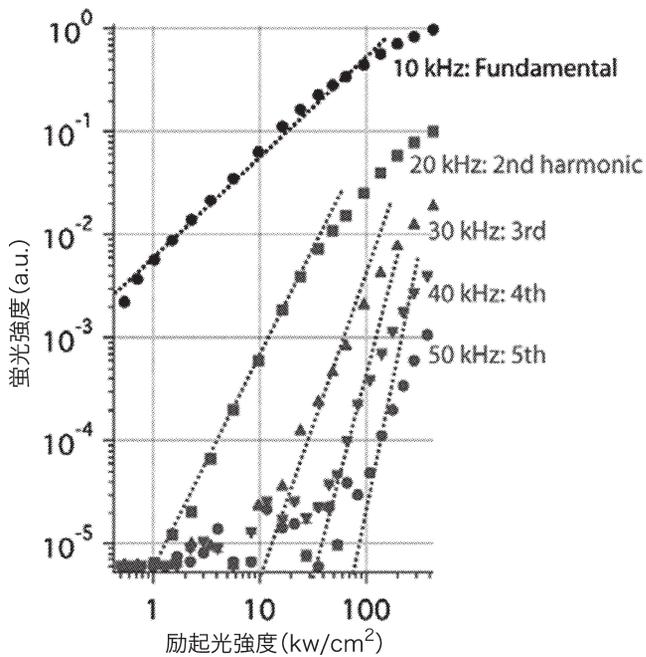


図5 高調波復調により観察される蛍光の非線形応答。

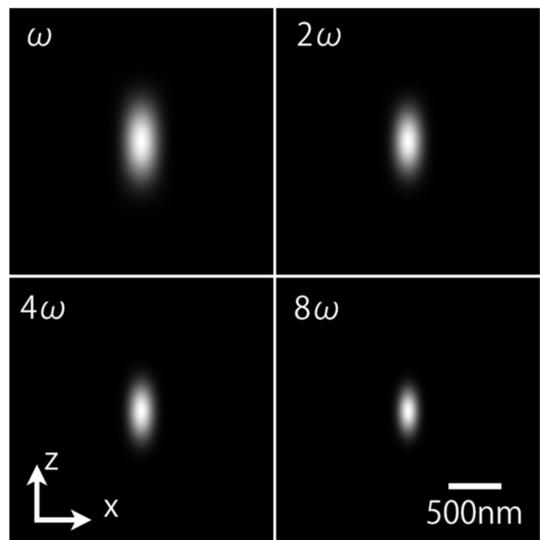


図6 SAX顕微鏡の点像分布関数。復調周波数を大きくすればより高次の非線形応答を利用でき、空間分解能をより向上できる。

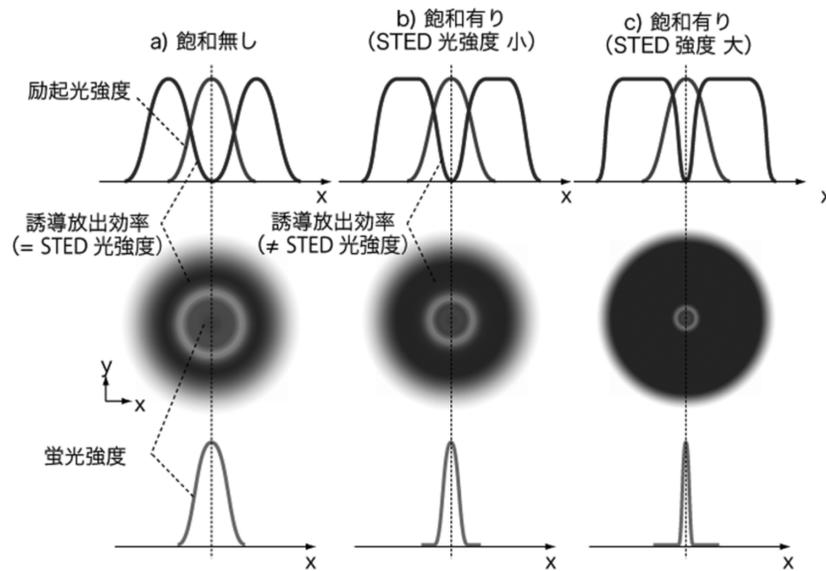


図7 STED顕微鏡の原理。励起スポットの周辺部分を誘導放出により消光させ、空間分解能を向上する。誘導放出効率が飽和すると、蛍光発光部位の面積が狭まり、回折限界を超えた空間分解能が得られる。

microscopy, SSIM)¹²⁾にも利用されており、画像処理と併用する必要があるが、約50 nmの空間分解能での観察例が示されている¹³⁾。

3.3 誘導放出の飽和を利用した超解像法

誘導放出の効率も100%を超えることはなく、その結果、高次の非線形な光学応答が誘起される。これを利用した顕微鏡は、stimulated emission depletion (STED) 顕微鏡とよばれ、これまで数十 nmの空間分解能での観察例が報告されている¹⁴⁻¹⁷⁾。

STED顕微鏡では、誘導放出を利用して、自然放出による蛍光発光の領域を狭めることにより高空間分解能を達成する。試料内の蛍光分子は対物レンズによって一点に集光された励起光により励起され、それにオーバーラップする形でドーナツ状の分布の光 (STED 光) が照射される (図7a))。このとき、励起スポットの中心部分は自然放出により蛍光を発するが、周辺部分はSTED光による誘導放出のため自然放出による蛍光を発しない。この自然放出光のみを検出すれば、励起焦点内のより狭い領域からの蛍光分子のみを検出できる。STED顕微鏡は励起レーザー周辺部位の蛍光を発光させなくすることで、空間分解能を向上する。しかし、STED光の“ドーナツの穴”の大きさも回折限界により制限されるため、このままでは従来の顕微鏡に比べ2倍程度の空間分解能しか得られない。

STED顕微鏡では、誘導放出の飽和を利用して“ドーナツの穴”を回折限界を超えて小さくする。誘導放出の効率は100%で飽和するため、STED光の強度を大きくし

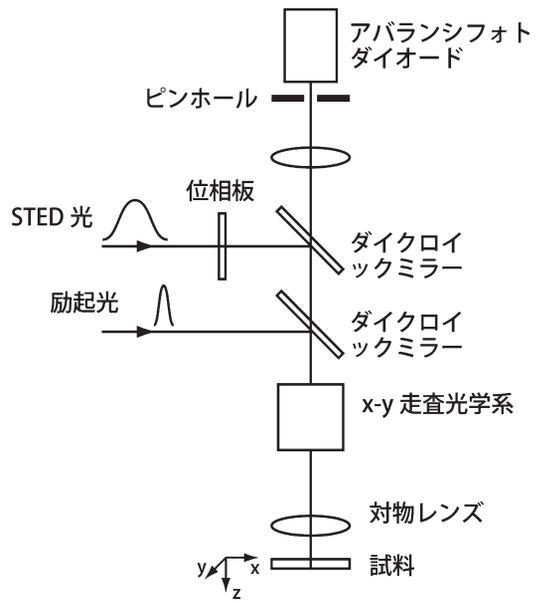


図8 STED顕微鏡の光学系の例。

ていくと、自然発光が可能な領域はどんどん小さくなる (図7b)~c))。すなわち誘導放出の飽和を利用すれば、レーザースポットよりもはるかに小さい領域に蛍光の発光を制限できる。

図8にSTED顕微鏡の光学系の例を示す。STED顕微鏡は、励起用、誘導放出用の2つのレーザーを利用する。励起用レーザーからの光は、従来のレーザー顕微鏡と同様、対物レンズにより試料内の一点に集光され蛍光を励起する。一方、STED光はレンズ焦点部位で光が弱め合う

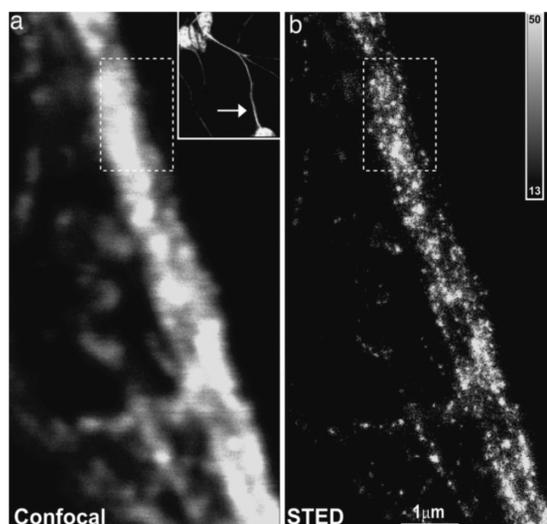


図9 STED顕微鏡により観察した神経芽細胞腫内の神経繊維¹⁵⁾。

ような位相条件で対物レンズに入射し、ドーナツ状の光分布を焦点面に形成する。多くの場合、励起光、STED光の両方にパルスレーザーが用いられる(励起光、STED光ともに連続発振レーザーが用いられた例もある¹⁶⁾。これは、励起状態から振動緩和を経て自然発光に至る過程で効率よく(タイミングよく)誘導放出を行うためである。分子の励起状態の寿命を考慮し、STED光には数百psのレーザー光が用いられる。蛍光と誘導放出光の分離は光学フィルターにより行う。STED光の線幅は蛍光のそれよりもはるかに小さいので、検出波長領域をうまく選べばSTED光と蛍光とを簡単に分離できる。

図9にATTO532で免疫染色された神経芽細胞腫内の神経繊維の像を示す¹⁵⁾。STEDの利用により、通常の共焦点顕微鏡よりも4~5倍程度高い空間分解能が得られていることがわかる。

STED顕微鏡の空間分解能は、どれだけSTED光の強度を強くできるかによって決定される。高強度のSTED光は蛍光分子を褪色させてしまうため、上記のSAX顕微鏡と同様、褪色しにくい蛍光分子がプローブとして用いられる。最近、ダイヤモンド空格子点における発光を利用した褪色しない蛍光プローブも開発されており、このようなプローブを用いれば、非常に高い空間分解能を実現できる¹⁸⁾。高い空間分解能を得るためには、ドーナツ状のSTED光の中心強度をゼロにすることも重要である。この部分の光強度がゼロでなければ、肝心の中心部分の蛍光も誘導放出で失われてしまう。加えて、誘導放出の効率の空間的な変化もなだらかになり、蛍光発光の領域を狭めることが難しくなる。このため、STED顕微鏡は試料内部で発生する波面収差に弱く、屈折率分布をもつ試料の観察

が苦手である。

STED顕微鏡と似たコンセプトで超解像を実現する技術としては、GSD (ground state depletion)^{19,20)}とRESOLFT (reversible saturable optical fluorescence transitions)²¹⁾とが提案されている。これらの手法では、分子の励起が可能な領域を事前に制限した後に励起光を照射し、蛍光を測定する。STED顕微鏡では蛍光分子を一度励起しておいてから、消光(depletion)させるが、GSD、RESOLFTでは、蛍光分子をあらかじめ励起できない状態、すなわちオフの状態にしてから、励起光を照射する。GSDを利用する手法では、蛍光分子を励起三重項状態にすることで、スイッチオフの状態をつくりだす。励起された蛍光分子がとる過程には、発光や無輻射遷移によりエネルギーを放出して基底状態に戻る過程と、交換交差により励起三重項状態へ遷移する過程とがある。励起三重項状態に遷移した分子の寿命は数百 μs ~数ms(低酸素濃度下)と、一重項状態の寿命(数ns)と比べて長いため、分子の励起を繰り返せば、ほとんどの分子を励起三重項状態にすることが可能である。すなわち、“飽和”励起三重項をつくり、基底状態(ground state)にある分子を枯渇(depletion)させる。RESOLFTは、光異性化反応を示す分子を用いる。多くの場合、異性化により光吸収や蛍光発光の特性が異なるので、この違いを用いてオン/オフを切り替える。この光異性化反応も飽和応答を示すため、STED、GSDと同様、空間分解能の向上に利用できる。

3.4 多光子顕微鏡との比較

多光子励起顕微鏡、高調波顕微鏡も非線形な光学応答を利用した顕微鏡であり、回折限界を超えた空間分解能を有している²²⁾。しかし、これらの顕微鏡は超解像顕微鏡としてはあまり扱われない。その理由は、これらの非線形光学現象を利用した光学顕微鏡では、波長の長い近赤外光により試料が照明されるため、たとえ回折限界の2倍、3倍の空間分解能が得られたとしても、実際の空間分解能は可視光を用いた場合と同程度にしかならない。近赤外光を使う理由は、多光子吸収や高調波発生によって得られる蛍光や散乱光の信号光を可視域で得るためである。原理的には可視光を用いて試料を照明し、非線形光学効果を誘起できるが、信号光が紫外域に生じるため検出が困難になってしまう。

すなわち、従来の光学顕微鏡において空間分解能の限界を決定しているのは、試料に入射する光の波長ではなく、試料から得られる信号光(蛍光等)の波長である。信号光の波長で決定される限界を超えなければ、実質的に光学分解能の壁を超えたことにはならない。

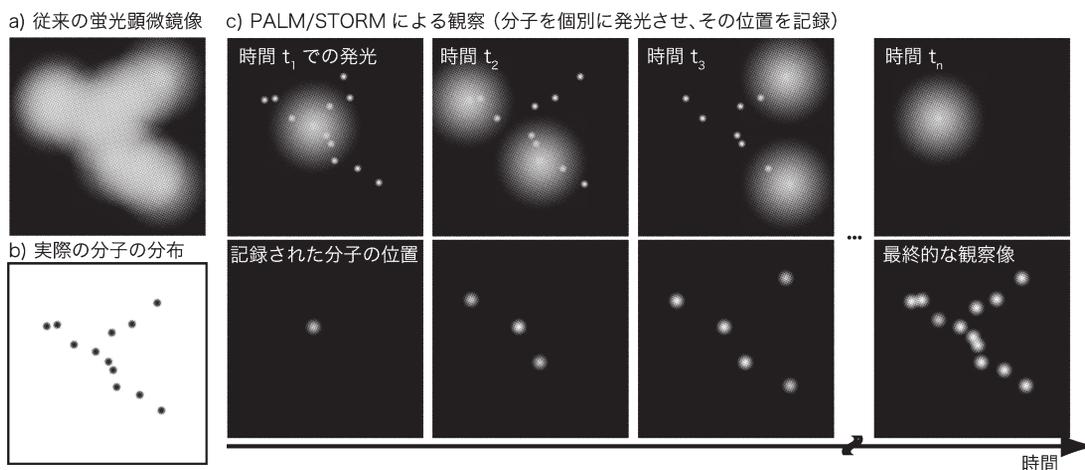


図10 PALM, および STORM による超解像イメージング. a) 視野内の蛍光分子を同時に観察した場合の像. b) 実際の蛍光分子の分布. c) 少数の蛍光分子を発光状態にし, 個別に観察. すべての分子の位置を記録していけば, 空間分解能の高い蛍光像を構築できる.

飽和顕微鏡では, 試料を照明する光も信号光も可視光であり, かつ光学現象の飽和が高次の非線形な応答を生む. これが超解像実現のトリックである.

4. 分子の発光制御を利用した超解像法

従来の光学顕微鏡では, 波長の半分以下の距離に近づいた2つの微小な発光点を区別することができない. しかし, 発光点が1つだけであれば, その位置は波長の数百分の1の精度で決定できる²³⁾. 微小な発光点は結像面上に点像分布関数で与えられる光強度の分布を形成するため, その中心位置を求めれば発光点の試料内での座標を決定できる. これを応用して超解像を実現したのが, PALM (photoactivated localization microscopy)²⁴⁾, STORM (stochastic optical reconstruction microscopy)²⁵⁾ とよばれる超解像顕微鏡であり, これまで数十 nm の空間分解能で細胞内を三次元観察した例が報告されている²⁶⁾.

通常, 蛍光試料には数多くの蛍光分子 (発光点) が存在するが, これらの蛍光分子が時間的に別々に発光するならば, 同時に観察される蛍光分子は1つのみとなり, その位置を正確に把握できる. 個別に発光する分子の位置を正確に記録すれば, それが試料全体の蛍光分子の分布, すなわち顕微鏡像となる. 従来の顕微鏡では試料内の発光点を同時に観察するため, それらを空間的に分離することは不可能であった.

PALM, STORM では, 蛍光の発光を制御 (スイッチング) できる蛍光プローブを利用し, それぞれの蛍光分子の発光を時間的に分離する. はじめ試料中の蛍光プローブは発光しないオフの状態にあり, それらに光を照射してオン状態にする. このとき, 照射光の強度を非常に弱くす

ると, 照射領域の限られた数の分子のみがオンになり, 他の多くの分子はオフのままとなる. オンとなった分子は視野内にランダムに分布するが, 通常の広視野蛍光顕微鏡で観察すれば, それぞれの分子の位置を記録できる. しばらくすると分子は褪色もしくは消光状態に移行するので, 再度スイッチング光を照射し, 今度は別の分子をオンにして, その位置を記録する. これをすべての分子を観察するのに十分な回数だけ繰り返せば, 視野全体の蛍光分子の分布を画像として得ることができる (図10).

PALM, STORM の空間分解能は, いかに正確に分子の位置を知ることができるかで決まる. いいかえると, 測定された分子の座標の標準偏差はどの程度か, ということである. 検出される光子が1つの場合, 測定位置の標準偏差は点像分布関数 σ で与えられる. そのため, N 個の光子が得られる場合の分散は, σ/\sqrt{N} となる. これが PALM, STORM の空間分解能である. 500 nm 付近に発光ピークをもつ分子を観察する場合, 分子1つあたり100個の光子を検出できれば, 約 25 nm の空間分解能を達成できる.

図11は, 微小管およびミトコンドリアを免疫染色したサル腎臓細胞を STORM により得た観察像である²⁶⁾. 従来の蛍光顕微鏡像に比べ, 数十倍高い空間分解能が STORM により実現されている. 細胞内の微小管 (緑) とミトコンドリア (紫) の形および位置関係を詳細に把握することができる.

本手法の難点は, 分子1つひとつの位置を測定するため, 観察に時間がかかってしまうことである. 測定時間を短くすると1分子あたりから計測される光子の数が減少し, 空間分解能が低下する. また, 対物レンズ焦点面以外

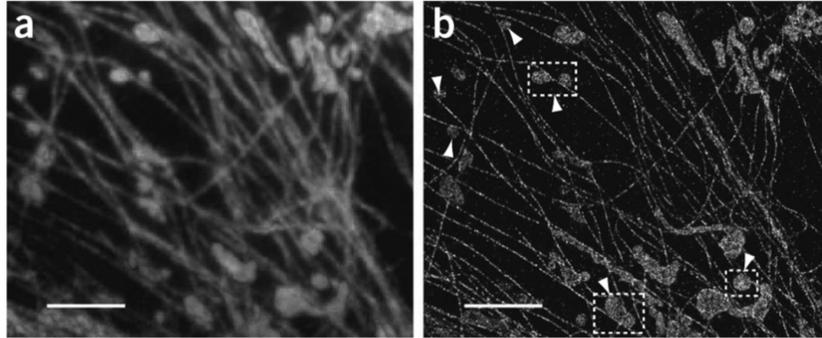


図11 サル腎臓細胞の蛍光像。a) 従来の蛍光顕微鏡, b) STORMによる観察像²⁶⁾。スケールバー=3 μm 。(巻頭カラー口絵参照) [Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Methods²⁶⁾, copyright (2008)]

のぼけた蛍光像からは分子の位置を精度よく決定できない。そのため、最初に発表されたPALM, STORMではどちらも全反射照明を利用して、細胞の底面のみの分子を励起し観察していた^{24,25)}。厚みのある試料を観察するためには、光学系に工夫の必要がある²⁷⁻²⁹⁾。

PALM, STORMとも超解像実現の原理は同じであるが、同じ時期(2006年)に別のグループから発表されたため、異なる名称でよばれることになったと思われる。このころ細胞内の一分子計測は十分に確立された実験技術であり、一分子の動きを数nmの精度で追跡することも多く行われていたため、このような超解像技術が登場するのは時間の問題であった²³⁾。最初のPALMの報告の筆頭著者のBetzigは、1995年の時点で試料内の各分子を空間とは別の次元(PALM/STORMの場合は時間)に展開して超解像を得る手法のコンセプトを発表³⁰⁾しており、また、実際の細胞観察では、分子の褪色³¹⁾や細胞内を浮遊する分子の動きを利用して蛍光スイッチングを行う手法も提案されている³²⁾。2006年に発表されたそれぞれの技術は、本原稿執筆時まで、多重染色された試料の観察^{26,33,34)}、生きた細胞の観察³⁵⁾に適用されている。技術面でも、三次元超解像光学系²⁷⁻²⁹⁾、二光子励起との組み合わせ³⁶⁾、蛍光分子の高速スイッチング法³⁷⁾、励起三重項状態を利用したより簡単な蛍光スイッチング法の提案^{38,39)}等、新しい展開がすでにみられている。光学系への技術的な要求はそれほど高くないため、この新しい手法は今後多くの場面で活用されるだろう。

5. おわりに—オプティクスからフォトニクスへ

本報告では、近年進展が著しい蛍光を利用した超解像イメージング技術について紹介した。これらは、蛍光分子のもつ光学特性を理解し、それを利用することにより回折限界を超えることに成功している。従来の光学顕微鏡の結像

特性は、光学系で決定される伝達関数を用いて議論されることが多かったが²⁾、ここで紹介した手法では分子の応答関数が空間分解能をおもに決定している。また、本特集にみられるように、蛍光顕微鏡以外にも超解像イメージング技術の開発が進んでいる。いずれも技術レベルの高い手法であり、今後の光源や検出器の発展が鍵である。

従来の広視野顕微鏡からレーザー顕微鏡(特に共焦点顕微鏡)に光学顕微鏡の旗手が移ったのと同様の変化が、顕微イメージングに起こりつつあると感じる。レーザー顕微鏡の黎明期には光学系やレーザー技術、制御技術が重要な役割を担ったが、今回の変化には光学系や光源の貢献は少ない。高感度検出器の登場が超解像の実現に貢献した部分もあるが、限界を超える鍵は光と物質との相互作用の理解にあった⁶⁾。光波の伝搬と混合を考えた従来のオプティクスから、光子と物質との相互作用を考えるフォトニクスへのパラダイムシフトがここにある。

新しい技術を開拓するうえで、このようなパラダイムシフトを意識することは非常に重要である。では、今後どのような新技術が登場するのであろうか。超解像技術としては先駆けの近接場顕微鏡では、観察対象と光とだけでなく、さらにプローブとの相互作用を考えて、数nmの空間分解能を実現できる方法が提案されている^{40,41)}。また、バイオイメージングでは、分光学的手法を取り入れ、蛍光等の標識を使用しない分子イメージング技術の開発が進んでいる⁴²⁻⁴⁵⁾。フォトニクスを活用した新しい顕微鏡技術がこれからもまだまだ登場しそうである。

文 献

- 1) O. Nakamura and S. Kawata: "Three-dimensional transfer-function analysis of the tomographic capability of a confocal fluorescence microscope," *J. Opt. Soc. Am. A*, **7** (1990) 522-526.
- 2) M. Gu: *Principles of Three-Dimensional Imaging in Con-*

- focal Microscopes* (World Scientific Publishing, Singapore, 1996) pp. 123-150.
- 3) Y. Inouye and S. Kawata: "Near-field scanning optical microscope with a metallic probe tip," *Opt. Lett.*, **19** (1994) 159-161.
 - 4) S. W. Hell: "Microscopy and its focal switch," *Nat. Methods*, **6** (2009) 24-32.
 - 5) S. W. Hell: "Far-field optical nanoscopy," *Science*, **316** (2007) 1153-1158.
 - 6) M. Fernández-Suárez and A. Y. Ting: "Fluorescence probes for super resolution imaging in living cells," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9** (2008) 929-943.
 - 7) W. Denk, J. H. Strickler and W. W. Webb: "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy," *Science*, **248** (1990) 73-76.
 - 8) O. Nakamura: "Three-dimensional imaging characteristics of laser scan fluorescence microscopy: Two-photon excitation vs. single-photon excitation," *Optik*, **93** (1993) 39-42.
 - 9) K. Fujita, M. Kobayashi, S. Kawano, M. Yamanaka and S. Kawata: "High-resolution confocal microscopy by saturated excitation of fluorescence," *Phys. Rev. Lett.*, **99** (2007) 228105.
 - 10) M. Yamanaka, S. Kawano, K. Fujita, N. I. Smith and S. Kawata: "Beyond the diffraction limit biological imaging by saturated excitation (SAX) microscopy," *J. Biomed. Opt.*, **13** (2008) 050507.
 - 11) S. Kawano, M. Yamanaka, K. Fujita, N. I. Smith and S. Kawata: "Imaging properties of saturated excitation (SAX) microscopy," *Proc. SPIE*, **7184** (2009) 718415.
 - 12) R. Heintzmann, T. M. Jovin and C. Cremer: "Saturated patterned excitation microscopy—A concept for optical resolution improvement," *J. Opt. Soc. Am. A*, **19** (2002) 1599-1609.
 - 13) M. G. L. Gustafsson: "Nonlinear structured-illumination microscopy: "Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102** (2005) 13081-13086.
 - 14) 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.
 - 15) G. Donnert, J. Keller, R. Medda, M. A. Andrei, S. O. Rizzoli, R. Lührmann, R. Jahn, C. Eggeling and S. W. Hell: "Macromolecular-scale resolution in biological fluorescence microscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103** (2006) 11440-11445.
 - 16) K. I. Willig, B. Harke, R. Medda and S. W. Hell: "STED microscopy with continuous wave beams," *Nat. Methods*, **4** (2007) 915-918.
 - 17) U. V. Nägerl, K. I. Willig, B. Hein, S. W. Hell and T. Bonhoeffer: "Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105** (2008) 18982-18987.
 - 18) E. Rittweger, K. Y. Han, S. E. Irvine, C. Eggeling and S. W. Hell: "STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution," *Nat. Photonics*, **3** (2009) 144-147.
 - 19) S. W. Hell and M. Kroug: "Ground-state-depletion fluorescence microscopy: A concept for breaking the diffraction resolution limit," *Appl. Phys. B*, **60** (1995) 495-497.
 - 20) S. Bretschneider, C. Eggeling and S. W. Hell: "Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy by optical shelving," *Phys. Rev. Lett.*, **98** (2007) 218103.
 - 21) M. Hofmann, C. Eggeling, S. Jakobs and S. W. Hell: "Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102** (2005) 17565-17569.
 - 22) A. Diaspro: *Confocal and Two-Photon Microscopy: Foundations, Applications, and Advances* (Wiley-Liss, New York 2001).
 - 23) J. Gelles, B. J. Schnapp and M. P. Sheetz: "Tracking kinesin-driven movements with nanometer-scale precision," *Nature*, **331** (1988) 450-453.
 - 24) E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz and H. F. Hess: "Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution," *Science*, **313** (2006) 1642-1645.
 - 25) M. J. Rust, M. Bates and X. Zhuang: "Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)," *Nat. Methods*, **3** (2006) 793.
 - 26) B. Huang, S. A. Jones, B. Brandenburg and X. Zhuang: "Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution," *Nat. Methods*, **5** (2008) 1047-1052.
 - 27) B. Huang, W. Wang, M. Bates and X. Zhuang: "Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy," *Science*, **319** (2008) 810-813.
 - 28) M. F. Juetten, T. J. Gould, M. D. Lessard, M. J. Mlodzianoski, B. S. Nagpure, B. T. Bennett, S. T. Hess and J. Bewersdorff: "Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples," *Nat. Methods*, **5** (2008) 527-529.
 - 29) G. Shtengel, J. A. Galbraith, C. G. Galbraith, J. Lippincott-Schwartz, J. M. Gillette, S. Manley, R. Sougrat, C. M. Watermann, P. Kanchanawong, M. W. Davidson, R. D. Fetter and H. F. Hess: "Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106** (2009) 3125-3130.
 - 30) E. Betzig: "Proposed method for molecular optical imaging," *Opt. Lett.*, **20** (1995) 237-239.
 - 31) M. P. Gordon, T. Ha and P. R. Selvin: "Single-molecule high-resolution imaging with photobleaching," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101** (2004) 6462-6465.
 - 32) A. Sharonov and R. M. Hochstrasser: "Wide-field sub-diffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103** (2006) 18911-18916.
 - 33) M. Bates, B. Huang, G. T. Dempsey and X. Zhuang: "Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes," *Science*, **317** (2007) 1749-1753.
 - 34) H. Shroff, C. G. Galbraith, J. A. Galbraith, H. White, J. Gillette, S. Olenych, M. W. Davidson and E. Betzig: "Dual-color superresolution imaging of genetically expressed probes within individual adhesion complexes," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104** (2007) 20308-20313.
 - 35) H. Shroff, C. G. Galbraith, J. A. Galbraith and E. Betzig: "Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics," *Nat. Methods*, **5** (2008) 417-423.
 - 36) J. Fölling, V. Belov, R. Kunetsky, R. Medda, A. Schöle, A. Egner, C. Eggeling, M. Bossi and S. W. Hell: "Photochromic rhodamines provide nanoscopy with optical sectioning," *Angew. Chem.*, **119** (2007) 6382-6386.
 - 37) A. Egner, C. Geisler, C. von Middendorff, H. Bock, D. Wenzel, R. Medda, M. Andresen, A. C. Stiel, S. Jakobs, C. Eggeling, A. Schöle and S. W. Hell: "Fluorescence nanoscopy in whole cells by asynchronous localization of

- photoswitching emitters," *Biophys. J.*, **93** (2007) 3285-3290.
- 38) C. Steinhauser, C. Forthmann, J. Vogelsang and P. Tinnefeld: "Superresolution microscopy on the basis of engineered dark states," *J. Am. Chem. Soc.*, **130** (2008) 16840-16841.
- 39) J. Fölling, M. Bossi, H. Bock, R. Medda, C. A. Wurm, B. Hein, S. Jakobs, C. Eggeling and S. W. Hell: "Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecules return," *Nat. Methods*, **5** (2008) 943-945.
- 40) H. Watanabe, Y. Ishida, N. Hayazawa, Y. Inouye and S. Kawata: "Tip-enhanced near-field Raman analysis of tip-pressurized adenine molecule," *Phys. Rev. B*, **69** (2004) 155418.
- 41) T. Yano, Y. Inouye and S. Kawata: "Nanoscale uniaxial pressure effect of a carbon nanotube bundle on tip-enhanced near field Raman spectra," *Nano Lett*, **6** (2006) 1269.
- 42) A. Zumbusch, G. R. Holtom and X. S. Xie: "Vibrational microscopy using coherent anti-Stokes Raman scattering," *Phys. Rev. Lett.*, **82** (1999) 4014.
- 43) 橋本 守: "コヒーレントアンチストークスラマン散乱を用いた顕微鏡", *分光研究*, **49** (2000) 51-61.
- 44) 藤田克昌: "第二高調波顕微鏡", *光学*, **33** (2004) 715-717.
- 45) K. Hamada, K. Fujita, N. I. Smith, M. Kobayashi, Y. Inouye and S. Kawata: "Raman microscopy for dynamic molecular imaging of living cells," *J. Biomed. Opt.*, **13** (2008) 044027.

(2009年3月19日受理)