

高度顕微鏡法の実用上の考慮点

セス・W・ベリー、ジム・パッサルゴ、パラシャント・プラバート

研究対象の生物学を正確に描く高度イメージング法のデータを確かなものとするためには、鍵となる課題の理解が必要である。

ほんの10年前では、全反射照明蛍光 (TIRF) 顕微鏡法や超分解能顕微鏡法は物理学者、エンジニア、学際的な科学者や研究者の領域がほとんどだった。商業的なターンキーシステムを利用できる機会が増えたことで、これらの技術に接することが大きく広がり、世界中で科学の発展を加速させている。

しかし、まれにしか使わないユーザーでも、装置の技術的基礎の知識、特に理論と実践をつなぐ考慮点に関することから得られるものはある。ここでは、いくつかの鍵となる光学的考慮を取り上げる。これらは、イメージの忠実性や質、光透過率、分解能、そしてデータの信頼性を最大化するのに役立つだろう。

高い開口数の対物

定められた倍率で利用可能で最も高い開口数 (NA) をもつ対物を用いることで、顕微鏡の分解能は最大化できる。ここで、空間的にお互いに非常に近い、2つの極小の蛍光粒子を考えよう。これらの粒子を別のものとして分解するためには、顕微鏡は実際のサイズで描写しなければならない。しかしながら、レンズを通した光の物理特性によって、それぞれの粒子は点広がり関数 (PSF、図1) と呼ばれる3次元的な不鮮明画像となってしまふ。PSFが、粒子の実際のサイズに可能な限り近いときに、x、y、z方向の最大分解能が得られる。物理特性として、NA対物が高いほどPSFが小さくなる。

NAが達成しうる最大数は、一般的に、対物の倍率、光学収差の補正度合い、油浸レンズとともに増加する。実用的にも理論的にも、NAの限界は1.4~1.7である (対物NAは液浸媒体の光収集能と屈折率 (RI) によって決まり、RIの高いオイルが最大NAを生み出す)。回折限界による顕微鏡法のXY分解能の限度は約0.25 μm だったが、いくつかの超分解能顕微鏡法技術では約10倍となる約0.025 μm (25nm) まで向上できる。

PSFの形状から推論できることとして、最大NAレンズを用いてもz方向の分解能は半分程度 (約0.5 μm) であり、超分解能顕微鏡法技術では約10倍以上に向上できるだろう (多くの超分解能顕微鏡法では、xy軸の分解能では大きく向上できる反面、z軸の分解能の向上はわずかだ⁽¹⁾)。より高いNAレンズはまた、光透過率を増加さ

せる (すなわちシステムの感受性を最大化させる)。そのレンズは通常、最大補正プランアポクロマトレンズであり、色の忠実性、イメージの質を向上させ、画素シフト (画像レジストレーション) を減少させる。レンズのNAを最大化することで常にx-y-z分解能を最大化できるが、広い被写界深度や深い組織のイメージングのときなどは、やや小さいNAが好まれるときがある。

ダイクロイックの平坦度

一般的な落射蛍光顕微鏡では、ダイクロイックのビームスプリッタが試料に届く比較的短い波長の励起光を反射させ、試料から検出器に届く長い波長の放出蛍光を透過する (図2)。ダイクロイックは、透過率と反射率が高いこと、レーザー波長に合ったエッジ急峻度が高いこと、後面の反射防止膜が優れていること、ガラスの自己蛍光が低いこと、レーザー損傷閾値が高いこと、透過波面エラー (TWE) が低いことが条件である⁽²⁾。だが、最先端のイメージ

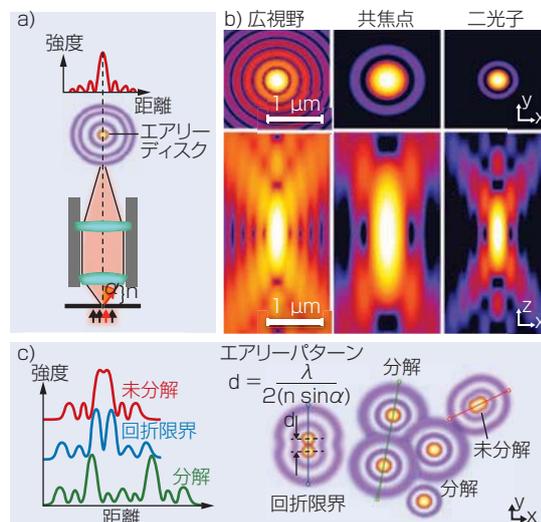


図1 焦点面の光源点では、回折から生じる同心円状のリングパターンに囲まれたエアリーディスクとして、顕微鏡対物を描写する (a)。これらのエアリーパターン (b上段) が、3次元で投影したときにPSF (b下段) を構成する^{(12)、(13)}。これらのPSFの幅はx、y分解能、深さはz分解能を示す。レンズのNAが高いほどエアリーパターンとPSFは小さくなり、より高い分解能となる (c)。(全ての画像は、クリエイティブコモンズのオープンアクセスライセンス供与条件による許諾に基づいて複製⁽¹⁴⁾)

ング技術で鍵となるダイクロイックの特徴は、平坦度だ。励起経路や吸収経路でダイクロイックの平坦度が不十分だと、イメージの質、統一性、分解能、ピクセル配置、信号対雑音比 (SNR) を損なう可能性があり、結果としてデータの解釈、信頼性、定量可能性に影響を与える。TIRFや超分解能顕微鏡は、その性質上、特にダイクロイックの収差の影響を受けやすい。

TIRFでは、ダイクロイックの屈曲がどんなものでもビームプロファイルに非点収差を及ぼすであろう。さまざまな予想しない角度で光が試料に入り、結果としてバックグラウンドの蛍光が増え、SNRが低下する⁽³⁾。大きな屈曲や表面のむらがあると、TIRFを得ることや、干渉縞の生成すら困難になりうる⁽⁴⁾。

似たような考慮点は、他の超分解能アプローチにも通じるだろう。構造化照明顕微鏡法 (SIM) では、よりフレキシブルでユーザーフレンドリなアプローチ⁽⁵⁾のひとつである、システムの非点収差を修正することが、光学的分解能の劇的な向上につながるとわかっている⁽⁶⁾。非点収差を最小化するために、可能な限りで最も平坦なダイクロイックを用いることが大きな改善につながるはずだ。

あらゆる非点収差、そして他の収差も、実効分解能を減少させるだろう。なぜなら、そのような光学収差によって、完璧に平坦なダイクロイックが作る理想的な回折限界のPSFとは異なるスポットサイズや形状が生まれうるからだ。ピークバレー (P-V) 平坦度が $\lambda/10$ (0.1waves/インチ) の厚さ3mmガラスと、P-Vが $\lambda/2$ (0.5waves/インチ) の厚さ1mmガラスという新しいダイクロイックは、それらの要求を満たす。そして、TIRF、SIM、PALM、STORM、STED、GSDIM、SPIM、MUM、パ

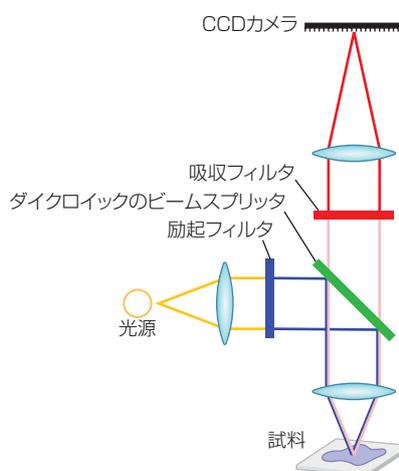


図2 一般的な落射蛍光顕微鏡の構成では、望みの波長を分離させるために、励起光は最初にレーザを抽出するフィルタを通され、ダイクロイックで反射して試料に届く。放射された蛍光はダイクロイックに戻って透過する。検出器に信号が届く前に、吸収フィルタで望みの放射光をさらに分離し、不要な散乱光をブロックする。

ターン照明、レーザを用いる共焦点顕微鏡法 (図3)、さらにLEDまたは広帯域の光源を用いる超分解能技術 (図4) のようなイメージング技術にも利点をもたらす。

誘導放出抑制 (STED) 顕微鏡法では、予想されるサイズ、形状、励起ビームの規則性、そして特に“ドーナツ状”の抑制ビームの規則性を変える光学収差からの影響を大きく受けやすい。われわれは非点収差を、十分に平坦でないビームスプリッタの歪曲光学収差で

あると見なしている⁽⁷⁾。さらに、STEDで要求されるドーナツ状の抑制ビームは、非点収差の影響を非常に受けやすいため、「非点収差があると焦点視野はすでにゆがんでおり、これら2つのパターンによって、おそらく超分解能の光学顕微鏡法は使い物にならないだろう」⁽⁸⁾。思い通りの、そして信頼できるSTEDのためには、ダイクロイックの平坦度は重要である。これら平坦度を考慮することは、パルス波と連続波 (CW) 両方のSTEDに当てはまる一方で、パルスのSTEDでは超高速レーザを使用するので光学最適化がさらに必要になるだろう。

試料中のPSFの深さで変わるPSFの形状 (楕円率) について、光学的非点収差の変化は予測可能だ。言い換えれば、非点収差によって変化したPSFの正確な形状特性から、z軸における正確な位置情報がわかる。すなわち、既知で制御された方法で意図的に非点収差を作ることで、PSFの物理特性はサブ回折精度で軸 (z軸) 分解能を再現するのに利用できる。このアプローチを早期に実現した3D-STORMは、円柱レンズが作る非点収差を利用する⁽⁹⁾。より最近に報告された同様のアプローチでは、制御された非点収差を作り、

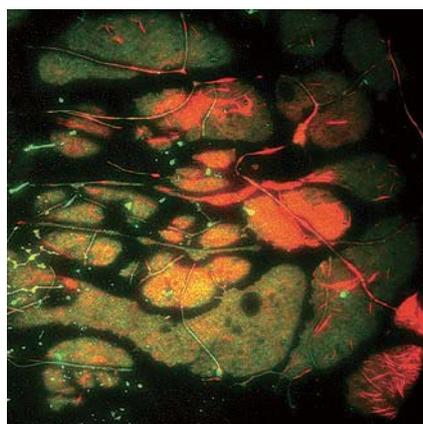


図3 GFPカドヘリンとRFPアクチンを添加したアフリカツメガエルの胚を、セムロック社のLF405/488/561/635-Bで $\lambda/2$ の平坦度の超分解能顕微鏡キューブを用いる二色TIRFでイメージングした。(提供: 米バージニア大 (University of Virginia) のケックイメージングセンター (Keck Imaging Center))

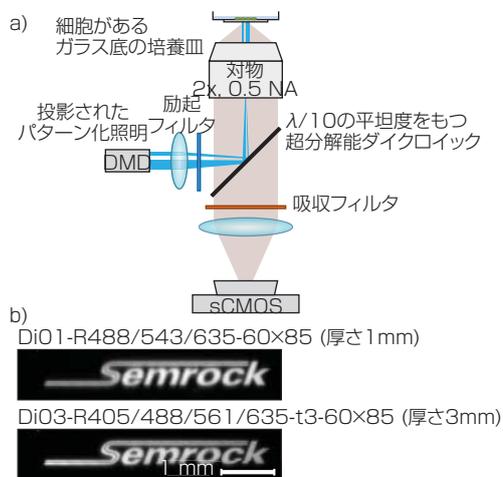


図4 ひとつの神経細胞を光遺伝学的に刺激するためにデジタルマイクロミラーデバイス(DMD)を用いるイメージング構成では、バイナリ画像がDMD上に投影され、システムのキャリブレーションのために均一な蛍光膜が試料上で撮像される。照射パターンを伴うLEDの励起光はカスタムな60×85mmのダイクロイックで反射し、試料からの蛍光放射はダイクロイックを透過する(a)。(b)では、平坦度が不十分なダイクロイックではビーム内で収差を起こすが(上段)、セムロック社の厚さ3mmで $\lambda/10$ の平坦度をもつダイクロイックは収差を効率的に消去する(下段)(提供: Qステート・バイオサイエンス社のワーリー氏とジョン・フエランテ氏)。

類似した分解能向上効果をもたらす可変鏡を用いる⁽¹⁰⁾。

超分解能イメージングを実現する理想の(つまり制御された)非点収差を作るために使う光学を選択するとき、あるいは類似の方法によって正確で信頼できる局在と分解能情報を得るためには、不要な非点収差を最小化するか消去しなければならないと考えることは重要である。そのため、ダイクロイックは波面の歪曲を最小限にすべきなのだ。

イメージングの質を維持するためにさらなる平坦度が要求されるシーンは、処理量の増大、より広い視野のイメージング、より大きな径の照射ビーム(LEDのように)であるが、これらに対する需要が現在、多くの技術を推進させる。新たな $\lambda/10$ の平坦度をもつダイクロイックによって、大きな径のビームを用いても反射ビームへの影響を最小限にできる。例えば、TIRFなら反射レーザービームに対して22.5mm、SIMなら633nmの反射イメージングビームに対して37mmである⁽¹¹⁾。米Qステート・バイオサイエンス社(Q-State Biosciences)のキット・ワーリー氏(Kit Werley)の最近の実験によると、セムロック社の厚さ3mmで $\lambda/10$ の平坦度をもつダイクロイックは「ひとつの神

経細胞に光遺伝学的に刺激するために、LED励起源を用いて、試料上でマイクロミラーアレイをイメージングするとき、収差を効率的に消去する(図4)。

スタンダードな厚さ(1mm)のガラスを使うことは、多くの先端顕微鏡システムにとって、超平坦度のダイクロイックが業界標準のキューブ内に極めて簡単に「すっぽりと当てはまる」ことを意味し、費用対効果のあるシステムのアップグレードとして使うよう推奨される。フィルタのキューブやフォルダにダイクロイックを慎重にマウントすることが決定的であると言及することは大切である。なぜなら、トルクや他のストレスによって平坦度は大きく変わってしまうかもしれないからだ。特に、マウントするプラットフォームやキューブが平坦度を維持するために特別に設計されていないときはそうである。セムロック社の新しい超分解能の顕微鏡法キューブは、厚さ1mmのダイクロイックのような平坦度の仕様の維持を保証している。これらを使うことで、透過におけるビームシフトや光散乱を最小限に抑え、異なる厚さのダイクロイックをホールドするキューブの間で切り替えたときに要求されるかもしれない再調整を不要にする⁽¹²⁾。

励起フィルタと吸収フィルタ

透過率が最も高い特性であり、検出器に届くまでにSNRを減少させるであろう励起迷光をよくブロックする(OD6以上の)励起フィルタと吸収フィルタを選ぶことが大切である。

レーザーは通常スペクトル的に100%純粋でなく、しばしば他の波長のシグナルが含まれているため、レーザーを抽出するフィルタ(励振器)を用いることでバックグラウンドを減少し、SNRを上げることができる。一般的にはレーザーの先端にそのようなフィルタを取り付けることが推奨されるが、この場所はファイバを用いるシステムでは特に非現実的だろう。例えばTIRFシステムでは、しばしばフィルタキューブ内に励起フィルタがないのだが、レーザーを抽出するフィルタはそこに組み込まれることがある。抽出するフィルタは、可能なきは常に光学ベンチトップシステムから2~3度傾けるべきだ。これにより、レーザーキャビティへの後方反射を防ぐことができる。

もうひとつの重要な側面は、励起フィルタと吸収フィルタが透過性とブロック要件を有していることを確保することだ。加えて、全てのフィルタのスペクトルエッジを最適化することで、最大SNRを保証できる。これらのデザイン需要は、励起フィルタ、吸収フィルタ、ダイクロイックフィルタを含むスタンダードなフィルタセット構成の中に提供されている(図5)。多くの設定では、フィルタのセットではなく個々のフィルタを用いる。セムロック社のSearchLight tool (<https://searchlight.semrock.com>)は、そのようなイメージング設定でシグナルとSNRのトレードオフを評価できる。

最後に、顕微鏡の放射経路における吸収フィルタとダイクロイックの組み

産業用途で高い信頼性を発揮

RF励起セラミックコア CO₂レーザー



セラミックコア テクノロジー

▶ 長寿命

混合ガスとの反応なし
高温焼成による不純物除去

▶ 高い出力安定性

金属ボディの3倍
低い熱膨張率
キャビティ長の安定

▶ 高速立上り／立下り

高圧ガスを充填

- CW モデル：最大 120 W 出力
- パルス発振モデル：
250 W パワー、1-150 kHz 繰返し

<http://www.japanlaser.jp/>

E-mail: lase@japanlaser.jp



本 社 〒169-0051 東京都新宿区西早稲田2-14-1
TEL: 03-5285-0853 (直)

大阪支店 **TEL: 06-6323-7286**
名古屋支店 **TEL: 052-205-9711**

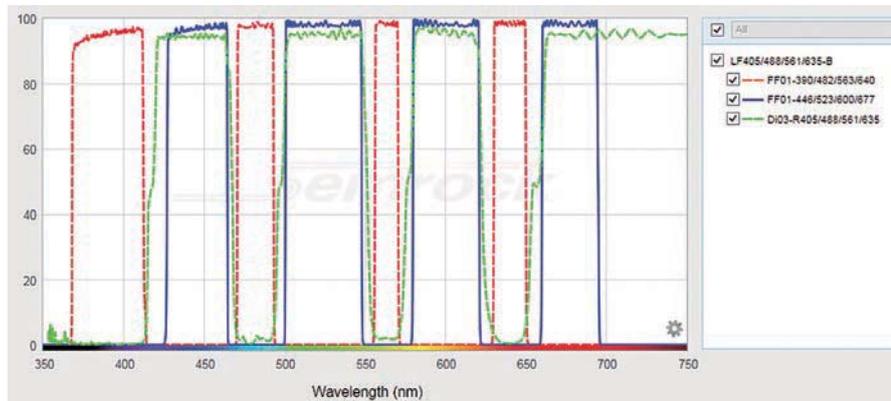


図5 蛍光の最大忠実性を実現するには、励起フィルタ、吸収フィルタ、ダイクロイックビームスプリッタのデザインによってお互いを補完し合うことが求められる。スペクトルプロットはSearchLightを用いて再現できる (<http://bit.ly/2bZrIkP>)。

合わせは、異なる色の間で画素シフト (画像レジストレーション) のパフォーマンスに大きな影響を与える。マルチカラーの超分解能技術には、サブピクセルの画像レジストレーションが求められる。光学、機械コンポーネントにおける技術が発展しているにもかかわらず、サブピクセルの画像レジストレーションの需要 (例えば10分の1) はソ

フトウェア処置が最もよく扱っている。本稿では、顕微鏡法システムやデータ収集を最適化するための実用的な助言を紹介したが、これらのトピックの議論としては十分ではない。理論とハンズオンの経験の両面から得られる、さらに詳細に掘り下げた白書は2016年末に www.semrock.com で公開される予定だ。

参考文献

- (1) L. Schermelleh, R. Heintzmann, and H. Leonhardt, *J. Cell Biol.*, 190, 2, 165-175 (2010).
- (2) See "Optical filters for laser based fluorescence microscopes," <http://bit.ly/2ccLZt>.
- (3) A. Yildiz and R. D. Vale, *Cold Spring Harb. Protoc.*, 9, 801-810 (2015).
- (4) P. Prabhat and T. Erdogan, *BioOptics World* (Jan/Feb. 2009); see <http://bit.ly/2bZiKyD>.
- (5) J. A. Thorley, J. Pike, and J. Z. Rappoport, "Super-resolution microscopy: A comparison of commercially available options," *Fluorescence microscopy: Super-resolution and other novel techniques*, Elsevier Inc., 199-212 (2014).
- (6) D. Debarre, E. J. Botcherby, M. J. Booth, and T. Wilson, *Opt. Express*, 16, 13, 9290-9305 (2008).
- (7) See "Flatness of dichroic beamsplitters affects focus and image quality," <http://bit.ly/2ccLZtT>.
- (8) S. Deng, L. Liu, Y. Cheng, R. Li, and Z. Xu, *Opt. Express*, 18, 2, 1657-1666 (2010).
- (9) B. Huang, W. Wang, M. Bates, and X. Zhuang, *Science*, 319, 5864, 810-813 (2008).
- (10) I. Zeddin et al., *Opt. Express*, 20, 5, 4957-4967 (2012).
- (11) See "Practical flatness," *Semrock Wavelengths Newsletter*, 7, 1 (Apr. 2016); <http://bit.ly/2ccMTX1>.
- (12) H. C. Ishikawa-Ankerhold, R. Ankerhold, and G. P. Drummen, *Molecules*, 17, 4, 4047-4132 (2012).
- (13) A. Diaspro et al., *Biomed. Eng. Online*, 5, 36 (2006).
- (14) See <http://bit.ly/1GZ2EOO>.

著者紹介

セス・W・ペリーはリサーチサイエンティスト、ライター、技術コンサルタント、米ベルオプティクス社 (Veroptics LLC、www.veroptics.com) の創設者、ジム・パッサルゴは米 IDEX ヘルスアンドサイエンス社 (IDEX Health & Science LLC) のユニットであるセムロック社の事業分野ダイレクター、パラシャント・プラバートは同社の事業分野リーダーである。

e-mail: p Prabhat@idexcorp.com URL: www.semrock.com