

ディビジョン番号	10
ディビジョン名	分析化学

大項目	1. 分析化学
中項目	1-12. 顕微鏡
小項目	1-12-5. オプティカル顕微鏡

概要（200字以内）

生きた細胞の中、および生体丸ごとなど生体組織における生体分子の動態を極めて高い時間・空間分解能で顕微観察するオプティカル顕微鏡の開発が進んでいる。検出系の革新としては、共焦点顕微鏡、極細径スティック対物レンズを搭載したオプティカル顕微鏡等が開発され、照明法の革新としては、多光子励起顕微鏡、STED 顕微鏡、SPIM 等が革新技術として開発されている。多くは将来の *in vivo* での可視化計測技術としての発展が期待される。

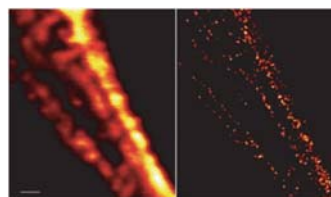


図1 従来の共焦点顕微鏡と STED 顕微鏡による神経細胞の蛋白質の観察。
(スケールバーは 500 nm)

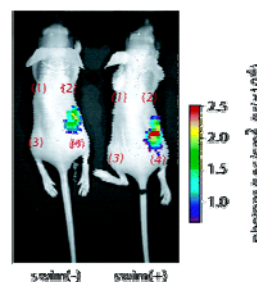


図2 *In vivo* 発光イメージング。

現状と最前線

オプティカル顕微鏡は、細胞や組織など、生きた生物試料を拡大観察する目的で、17 世紀以来用いられている。この間、位相差法、偏光法、蛍光法、微分干渉法、暗視野法など、種々の観察方法が取り入れられ、かつ改良を重ね、一連のオプティカル顕微鏡は基礎生命科学研究、医学研究において不可欠の研究ツールとして、広く認識されている。

現在の生命科学及び医学研究で最も使われているオプティカル顕微鏡は共焦点レーザー走査顕微鏡であろう。共焦点レーザー走査顕微鏡では、照明側と光検出側それぞれにピンホールを置き、検出ピンホールと照明ピンホールとを共有するようになっているため、非焦点ぼけを排除できる。共焦点位置を二次元に走査することにより、二次元像を得ることが出来る。顕微鏡の焦点を段階的に移動させ、一連の二次元像をコンピュータ上で積み重ねれば、三次元立体像を構築できる。レーザー光の走査については、ガルバノミラーを用いるものが主流であるが、二万個程度のピンホールを有するニポウディスクの円盤を回転させ、リアルタイムで共焦点二次元画像を得る手法も開発され、先端的な研究で用いられている。

照明法の革新として、分子の多光子吸収過程に着目した、多光子励起蛍光顕微鏡が開発された。特に、2光子励起蛍光顕微鏡については、既に実用化している。一個の蛍光分子がその吸収波長の2倍の波長の光子2個を同時に吸収し、励起波長の半波長より少し長い波長の蛍光を

発する過程を観察することになる。2光子励起は励起光の光子密度の2乗に比例するため、励起光の光子密度が高いところ、すなわち対物レンズの焦点だけでおこる。このため、2光子励起蛍光顕微鏡においては、Z軸の解像度が極めて高い鮮明な画像が得られる。また、励起に用いる波長が長いことから、生体試料の光損傷が小さいことに加えて、生体試料の深部観察が可能なのが2光子励起蛍光顕微鏡の大きな利点である。

オプティカル顕微鏡の空間分解能は、光の回折のため、光の波長程度と限界があることが1873年、Ernst Abbeにより説明されている。この回折限界を克服し、従来のオプティカル顕微鏡の空間分解能を一桁程度向上させる技術が開発されている。誘導放出抑制（STED）顕微鏡がそれである。励起光パルスに引き続いて、ドーナツ型のSTED光をサンプルに照射すると、STED光の照射部位では、蛍光分子が誘導放出抑制のため蛍光を発しない。結果として、励起光は当たっているがSTED光は当たっていないドーナツの中心部でのみ蛍光発光が観察されることになる。このため、回折限界を大幅に克服する、数十ナノメートルの空間分解能が得られることが示されている。

選択的平面照射顕微法（SPIM）では、単一光線ではなく、集束光面で試料を照らすことにより、生きた胚や細胞塊の三次元像が映し出され、従来法と比較して高い解像度と焦点深度が実現している。

生体試料に突き刺すことの出来る極細径スティック対物レンズを搭載した顕微鏡が開発され、生体試料深部の細胞を観察するためのツールとして実用化している。

生体の *in vivo* 観察については、特にカメラの高感度化や光学系の革新を背景として、発光顕微鏡や *in vivo* 蛍光顕微鏡が開発されている。

将来予測と方向性

- ・ 5年後までに解決・実現が望まれる課題
 - 多色蛍光のリアルタイム同時可視化計測を可能とする顕微鏡の開発
 - 発光顕微鏡の時間・空間分解能の向上

- ・ 10年後までに解決・実現が望まれる課題
 - 10ナノメートルオーダーの空間分解能を有する顕微鏡の実用化
 - マウスなど生体深部における一つ一つの細胞内の分子過程の *in vivo* 可視化計測

キーワード

蛍光, 発光, イメージング, 分解能, *in vivo*

(執筆者: 佐藤守俊)