

## &lt;特集「光学顕微鏡法 -その歴史と展望-」&gt;

## 超解像顕微鏡の原理と診断応用に向けた試み

藤 田 克 昌\*

大阪大学大学院工学研究科精密科学・応用物理学専攻

Super-resolution Microscopy: Principles  
and Applications in Medical Diagnosis

Katsumasa Fujita

Department of Applied Physics, Osaka University

## 抄 録

近年、光学顕微鏡の解像力向上のための技術開発の進展が著しい。それらは超解像顕微鏡と呼ばれ、特に、蛍光顕微鏡における開発が進んでいる。そのうちいくつかは普及が進んでおり、今後、生物学、医学、および治療／診断への応用が期待されている。超解像顕微鏡には様々な種類があり、各顕微鏡における原理、また特徴も大きく異なっている。そのため、それらを今後利用していくためには、使用方法だけでなく原理の理解も重要になる。本稿では、代表的な超解像顕微鏡の原理について紹介し、それらの技術の病理診断への応用の試みについて最近の研究例を報告する。

キーワード：超解像顕微鏡，蛍光顕微鏡，組織診断，免疫組織化学，分子標的。

## Abstract

The recent development for improving the spatial resolution in optical microscopy has enabled us to resolve sample structures beyond the limit by the wave nature of light. Especially, the development has been achieved for fluorescence microscopy, and the applications in biology and medicine have been emerging after the commercialization of the microscopes. There are different types of super-resolution microscopy, and understanding the principle is essential to apply the techniques to proper applications. In this article, I would like to introduce the principle of the techniques, perspectives and the recent reports related to medical, especially diagnosis, applications of the super-resolution techniques.

**Key Words:** Super-resolution microscopy, Fluorescence microscopy, Tissue diagnosis, Immunohistochemistry, Molecular marker.

## はじめに：超解像顕微鏡とは

超解像顕微鏡とは、従来の光学顕微鏡に比べ

て高い空間分解能をもつ顕微鏡の総称である。従来の光学顕微鏡の空間分解能は光の波長の半分程度と言われており、可視光の波長が400～

平成29年11月6日受付 平成29年11月6日受理

\*連絡先 藤田克昌 大阪府吹田市山田丘2-1

fujita@ap.eng.osaka-u.ac.jp

700 nm であるので、 $1\ \mu\text{m}$  よりも少し小さな構造までしか光学顕微鏡では観察できない。これは光の波動性によるもので、光の干渉、また回折の効果が、この限界を超えて空間分解能を向上することを妨げてきた。1870年頃にアッペが提案した結像理論により空間分解能の限界が明らかになり、その後、多くの種類の光学顕微鏡も同様の限界を持つことが示された。近年に報告されたいくつかの超解像顕微鏡は、この光の波動性により制限されることなく空間分解能を向上することに成功し、その代表的な技術は2014年のノーベル化学賞を受賞している。

光学顕微鏡は基礎医学から診断、治療を含む医療にまで広く普及しており、その発展は、従来技術では観察できなかった情報をもたらしてくれる。そのため、現在急速に発展している超解像顕微鏡技術が医学・医療の現場に導入され、その発展に寄与することは想像に難くない。従来手法を発展させるだけでなく、それらを破壊する全く新しい技術、概念をもたらすことになるかもしれない。

本稿では、まず超解像顕微鏡技術がどのようなものかについて、原理と応用例を簡単に紹介する。超解像技術の医療応用については、まだまだ例が少ないが、この数年に報告された研究例を紹介するとともに、今後の展望について述べる。

## 蛍光顕微鏡とその限界の突破

光学顕微鏡には多くの種類があり、その全てにおいて光の波動性の限界を超えることに成功した訳ではない。現在最も進歩が著しいのは、試料中の発光体の分布を観察する蛍光顕微鏡である。ほとんどの場合、試料内の蛍光物質（多くの場合は蛍光分子）を光（励起光）で照明し、それを吸収したのちに生じる蛍光発光で画像をつくる。この蛍光顕微鏡には、おおきくわけて二つの画像構築の方法があり、ひとつが広視野顕微鏡、もうひとつがレーザー走査顕微鏡と呼ばれる。このどちらにおいても超解像の方法が複数提案されており、蛍光物質を巧みに制御することで、光の波動性と顕微鏡光学系で決定される空間分解能を超えた解像力をもたらす<sup>1)</sup>。

### 1. 広視野顕微鏡

広視野顕微鏡で顕微鏡試料を観察すると、どのような小さな発光体（たとえば1分子）であっても、ある程度の大きさをもったぼやけた像として観察される。この理由は、光が波としての性質をもつため、どのようにきつく絞り込んだとしても波長の半分よりも小さく集光できないことに寄因する。生物試料の場合、蛍光物質として蛍光色素や蛍光性タンパク質をあらかじめ観察対象に導入しておき、それを観察するが、それぞれの蛍光分子が実際より大きく結像されるため、それらの細かな分布を確認することができない（図1a）。

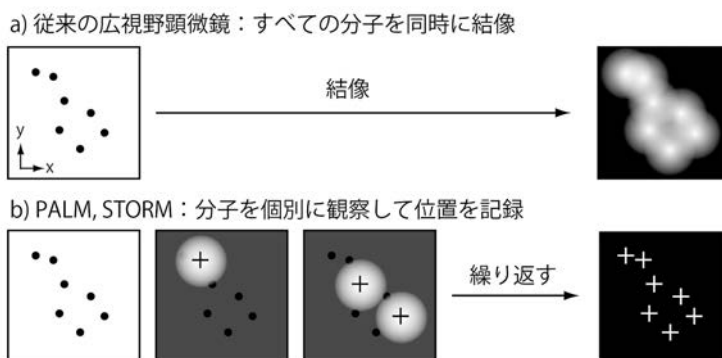


図1 広視野蛍光顕微鏡における結像と1分子検出による超解像法。

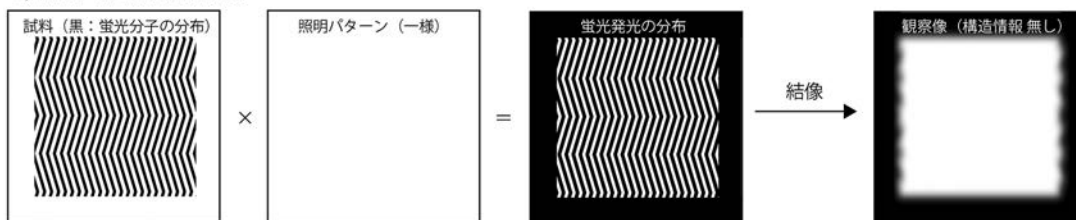
では、各蛍光分子を別々に観察すればどうだろうか。同時に観察するとお互いが重なってしまうが、時間で分けて別々に観察すれば、それらを見分けることができる。さらに、図1bのように、分子がひとつだけ観察されていることが確実にあれば、その中心座標を決定すれば、極めて高い精度で分子の位置を計測できる。広視野顕微鏡の超解像法では、このように分子をひとつずつ別のフレームに分けて観察し、その分子の位置の決定を繰り返す方法で画像を構築する。これを実現するには、なんらかの方法で蛍光分子が発光できる状態 (on) と発光できない状態 (off) とを繰り返すことが必要になる。この方法は、光スイッチングという方法や、蛍光のブリンキングのような自発的な明滅現象を利用して実現される。このような手法は PALM, FPLAM, もしくは STORM と呼ばれ、2006年に独立した複数のグループから報告された<sup>2-4)</sup>。特に蛍光性タンパク質を用いる方法が PALM と呼ばれ、蛍光色素を用いる方法が STORM と呼ばれ区別されているが、観察原理は同じである。

PALM/STORM の空間分解能はいかに精度良く個々の分子の位置を計測できるかによって決定される。信号対雑音比が高い、すなわち分子

ひとつから検出される蛍光光子の数が多いほど、位置決め精度が高くなり、その空間分解能は  $\lambda/\sqrt{N}$  ( $\lambda$ : 波長,  $N$ : 光子数) 程度となる。通常、数千ほどの光子が観察されるため、波長の数十分の1 (数十 nm) の空間分解能を達成できる。

広視野顕微鏡には他に、構造化照明法と呼ばれる超解像技術がよく知られている<sup>5)</sup>。この技術は従来の広視野顕微鏡に比べて約2倍程度の空間分解能の向上と、奥行き方向への空間分解能をもたらす。構造化照明法では、モアレという効果を利用する。モアレは細かな縞を重ねると、その縞より大きな縞のパターンが現れる効果である。微細な縞状のパターンをもつ光を試料を照明すると、試料の細かな構造が大きな構造に変換 (モアレ効果のため) されて観察される (図2b)。この状態では、観察像はもとの試料構造とは一致しないが、細かな構造の情報は観察像に含まれているので、画像処理によってこの細かな情報を抽出する (9~15枚程度画像を取得して、構造情報をフーリエ空間で抽出し、連結させる。一樣照明ではこの情報が含まれない (図2a))。上記の PALM/STORM と比べると空間分解能は高くないが、照明法の工夫のみで

a) 従来の広視野顕微鏡



b) 構造化照明顕微鏡

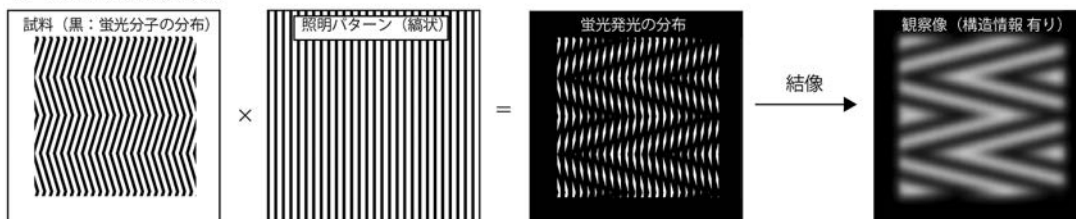


図2 一樣照明と構造化照明における結像の違い。構造化照明ではモアレの効果により構造情報が画像に記録されるが、一樣照明ではその情報は失われてしまう (顕微鏡の空間分解能の制限による)。

空間分解能を向上でき、また従来から使用されて蛍光色素のほとんどを利用できるため、様々なタイプの生物試料の観察に利用されている。

## 2. レーザー走査顕微鏡

共焦点顕微鏡や2光子励起顕微鏡は、レーザー走査顕微鏡の代表例である。上記の広視野顕微鏡と違い、レンズによる結像の効果を利用せず、対物レンズでレーザー光を試料に絞り込んで照明し、その集光スポット内で発生する蛍光の強度を観察する。これだけでは画像をつくることができないので、レーザー集光スポットを試料内で移動（走査）しながら、蛍光の強度を測定していき、試料内の蛍光強度の分布、すなわち蛍光像をコンピューター上で再構築する（図3a）。このため、レーザー走査顕微鏡の場合は、いかにレーザー集光スポットを小さくできるかが空間分解能を決定し、その限界はやはり光の波動性により制限されている。

レーザー走査顕微鏡における超解像観察では、検出する蛍光発光の範囲を狭めるにより空間分解能を向上する。レーザー集光スポットのサイズが小さくできないのならば、発光の範囲を小さくすればよい。これを実現する方法として知られているのが誘導放出を利用した方法（STED）である<sup>6)</sup>。誘導放出とは光を吸収した分子に、さらに光を照射し、分子を強制的に発光させる現象である。このときの発光は後から照射する光と同じ波長となるため、自然に発光

する蛍光（自然放出）と誘導放出による光とは発光波長で区別できる。STED法では照明スポットの周りにドーナツ状にSTED用の光を照射し、自然放出で発光する蛍光の領域を狭める。この状態で試料を走査することで高い空間分解能の像を得る（図3b）。STED用の光の強度を上げると、自然放出での発光領域は狭まるため、空間分解能の理論的な限界は無い。しかし、実際には試料の損傷により照射可能な光強度に限界があるため、実用的な空間分解能は40 nm程度までである。STED顕微鏡はレーザー走査型のため、レーザー走査を速度を大きく出来れば時間分解能を向上できる。実際には速度は蛍光の信号量に依存するが、十分に明るい試料であればビデオレートでの観察も可能である。

### 超解像顕微鏡の医療／ 診断応用に向けて

上記のように多くの超解像法が提案されており、それらのほとんどは蛍光顕微鏡である。基礎医学、生物学研究においては様々な応用が容易に想像できるが、医療、診断となると現時点では応用は限られる。しかし、病理診断においては免疫組織化学により染色し、細胞質や核、また最近ではマーカー分子／タンパクの分布を観察する機会が多く、また術中の組織診断、また分子標的の検出等、蛍光法の活躍の場が増えてきた。以下、あまり多くはないものの、現時

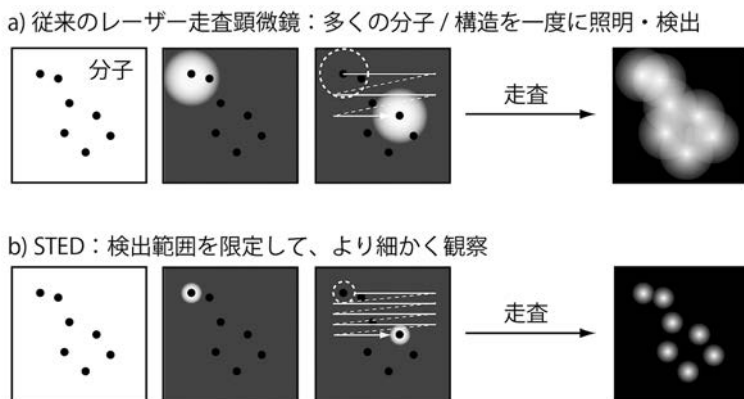


図3 レーザー走査蛍光顕微鏡による観察像の形成とSTEDによる超解像法。

点で、より医療の現場に近いところで超解像顕微鏡の応用の試みについて紹介する。

超解像顕微鏡は高い空間分解能をもつことが特徴であるため、これまで電子顕微鏡で行われてきた診断への利用がまず考えられる。その例として多く報告されているが腎疾患組織の観察である。2013年頃から、上記のSTORM, STED顕微鏡、構造化照明顕微鏡が用いられ、糸球体濾過障壁付近の微細構造やタンパク質分布 (agrin, integrin, laminin, collagen, podocin, nephrin 等) の観察例が、報告されている<sup>7-10)</sup>。例として、図4に、従来の顕微鏡 (広視野蛍光顕微鏡, WF) および超解像顕微鏡により得た微小変化群 (MCD), および正常な組織 (Control) の観察像を示す<sup>10)</sup>。超解像顕微鏡では、糸球体基底膜の微細構造がはっきりと観察されている。これらの報告では、ネフローゼ症候群で見られるポドサイトの足突起消失の超解像顕微鏡の観察が有用な例と

して紹介されている<sup>9)10)</sup>。また, podocin, nephrin を染色した切片をSTED顕微鏡より観察することで, Heymann腎炎でみられるスリットダイアフラグムの形状変化 (動物モデル) の観察に成功している<sup>8)</sup>。これらの腎疾患組織の顕微鏡観察には電子顕微鏡が用いられてきたが, 光学顕微鏡でこれが可能となれば, 試料作製や観察時間の短縮や設備コストの削減が期待できる。

タンパク質や遺伝子マーカーの利用は近年癌診断の分野で進んでおり, 超解像顕微鏡の高い解像力が今後活用されると期待できる。これまでは, ミトコンドリアタンパク質を染色してSTED顕微鏡で観察した例, また良く知られているHER2遺伝子の増加もSTED顕微鏡, STORMを用いて従来の蛍光顕微鏡により観察されている<sup>11)12)</sup>。図5は, 従来の蛍光顕微鏡およびSTORMにより観察したFISH法により染色した乳癌細胞におけるHER2遺伝子 (赤) とCEP17 (緑, セ

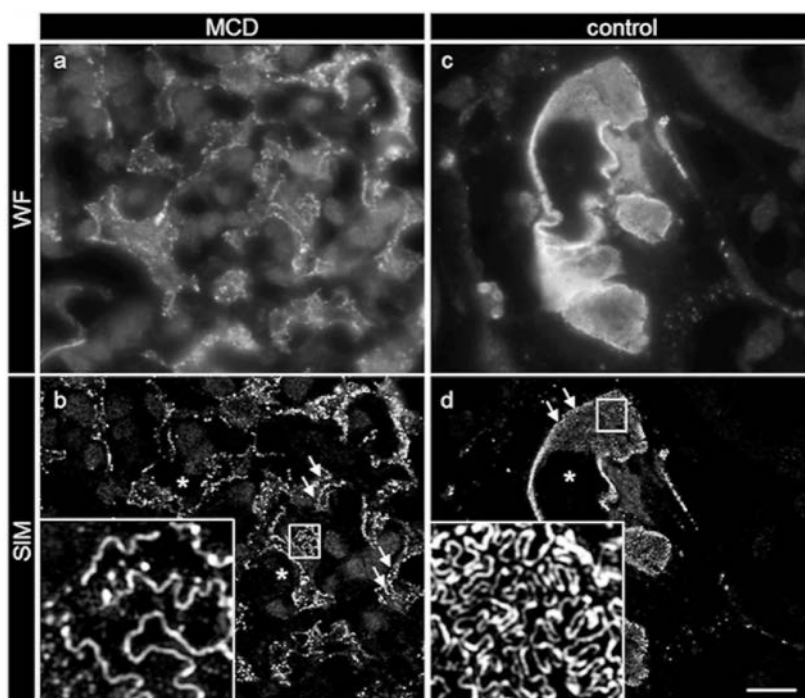


図4 従来の顕微鏡 (広視野蛍光顕微鏡, WF) および超解像顕微鏡により得た微小変化群 (MCD), および正常な組織 (control) の観察像. nephrin を蛍光染色. スケールバーは10  $\mu$ m を示す. 文献10より抜粋.

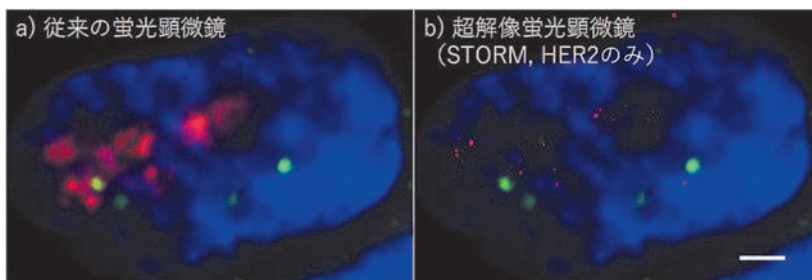


図5 従来の顕微鏡（広視野顕微鏡）および STORM で観察された FISH 染色の乳癌細胞。赤、および緑は、それぞれ HER2、および CEP17 の分布を示す（超解像観察は HER2 のみ）。STORM 観察では HER2 遺伝子の増幅が明確に確認できる。スケールバーは  $3\mu\text{m}$  を示す。シスメックス株式会社 岡田昌也氏、岩永茂樹氏からの提供。

ントロメアの部位) の分布を示している。診断にはそれぞれの蛍光スポットの数の比 (HER2/CEP17) が利用されるが、超解像観察ではこれをより正確に行うことができると期待される<sup>12)</sup>。

多くの病理診断では、低倍率での顕微鏡観察が行われることが多く、上で紹介した超解像顕微鏡の高い解像力が不要である場合がほとんどである。しかしながら、新しい顕微鏡観察技術は、従来の手法では見つけられなかった試料の違いをより明確にできるため、応用研究としては今後も進めて行くべきであろう。超解像顕微鏡に関しては、一分子の計測や非常に正確な光の制御技術が必要となり、現場での利用に適した装置の開発が求められる。内視鏡への超解像顕微鏡の組み込みに向けた基礎技術の開発も試みられており<sup>13)</sup>、これらの研究が実を結べばさらに多くの場面での活躍が期待できるであろう。

### おわりに：光技術を超えて

超解像顕微鏡は一見すると「顕微鏡」技術に思えるが、実は空間分解能の向上の鍵となったのは蛍光分子の応答である。すなわち、超解像観察顕微鏡の実現には、光技術だけではなく、分子レベルでの計測や制御が重要であった。この点に着目するとなぜ超解像顕微鏡の開発にノーベル「化学」賞が贈られたのも理解できる。それでは、生物、すなわち観察対象の方からの

観察技術向上に向けたアプローチは可能であろうか。

観察対象の方からは、顕微観察を助けるような試料作製の工夫がなされている。その中で、最近注目されている技術のひとつに生体組織の透明化がある<sup>14)</sup>。これは生体組織内部での光散乱を抑え、組織内の屈折率を一定とする技術である。組織内部の観察を可能とする技術として開発されたものであるが、試料を透明化すると超解像顕微鏡での観察も容易になる<sup>11)</sup>。超解像には限らないが、多くの組織切片を透明化して、それらを3次元観察した例が報告されている<sup>15)</sup>。他には、生体組織を膨張させ、それを従来の共焦点顕微鏡で観察することも提案されている。病理診断に向けた試みが報告されており<sup>16)</sup>、このような超解像技術および3次元観察技術が病理診断、また医学の発展にどのように貢献していくか技術開発の観点からも興味深い。

蛍光法も利用が増えたとは言え、日常的には HE や酵素抗体法により染色された切片を用いた診断がほとんどである。これらの標本は色素への光吸収を利用して観察される。しかしながら、超解像法のほとんどは蛍光試料の観察のために開発されている。光吸収観察における超解像法が登場すれば、従来の診断に新しい付加価値をもたらすことができるかもしれない。また、ラマン散乱等を用いた無標識での観察技術も急

速に発展しており<sup>17)</sup>、診断、医療応用に向けた新しい光学観察技術の開発が今後も進むものと期待する。本稿作成にあたり超解像顕微鏡の医療／診断応用について議論させていただいた京

都府立医科大学の原田義規博士に深く感謝する。

開示すべき潜在的利益相反状態はない。

## 文

- 1) 藤田克昌. 超解像顕微鏡の進展 2010; Vol.50, No.4, pp.174-179.
- 2) Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 2006; 313: 1642-1645.
- 3) Rust MJ, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Meth* 2006; 3: 793-796.
- 4) Hess ST, Girirajan TPK, Mason MD. Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy. *Biophys J* 2006; 91: 4258-4272.
- 5) Gustafsson MG. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc* 2000; 198: 82-87.
- 6) Hell SW, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett* 1994; 19: 780-782.
- 7) Suleiman H, Zhang L, Roth R, et al. Nanoscale protein architecture of the kidney glomerular basement membrane. *eLife* 2013; 2: 1471-1518.
- 8) Unnersjö-Jess D, Scott L, Blom H, Brismar H. Super-resolution stimulated emission depletion imaging of slit diaphragm proteins in optically cleared kidney tissue. *Kidney International* 2016; 89: 243-247.
- 9) Pullman JM, Nylk J, Campbell EC, Gunn-Moore FJ, Prystowsky MB, Dholakia K. Visualization of podocyte substructure with structured illumination microscopy (SIM): a new approach to nephrotic disease. *Biomed*

## 献

- Opt Express 2016; 7: 302-311.
- 10) Siegerist F, Ribback S, Dombrowski F, et al. Structured illumination microscopy and automatized image processing as a rapid diagnostic tool for podocyte effacement. *Sci Rep* 2017; 7: 11473.
- 11) Ilgen P, Stoldt S, Conradi L-C, et al. STED Super-resolution microscopy of clinical paraffin-embedded human rectal cancer tissue. *PLoS ONE* 2014; 9: e101563-e101568.
- 12) Okeda M, Kubo T, Masumoto K, Iwanaga S. Super resolution imaging of HER2 gene amplification. *Proc SPIE* 2017; 9714: 97140E-1.
- 13) Gu M, Kang H, Li X. Breaking the diffraction-limited resolution barrier in fiber-optical two-photon fluorescence endoscopy by an azimuthally-polarized beam. *Sci Rep* 2014; 4: 3627.
- 14) Richardson DS, Lichtman JW. Clarifying tissue clearing. *Cell* 2015; 162: 246-257.
- 15) Nojima S, Susaki EA, Yoshida K, et al. CUBIC pathology: three-dimensional imaging for pathological diagnosis. *Sci Rep* 7: 9269.
- 16) Zhao Y, Bucur O, Irshad H, et al. Nanoscale imaging of clinical specimens using pathology-optimized expansion microscopy. *Nat Biotechnol* 2017; 35: 757-764.
- 17) Ohira S, Tanaka H, Harada Y, et al. Label-free detection of myocardial ischaemia in the perfused rat heart by spontaneous Raman spectroscopy. *Sci Rep* 2017; 7: 42401.

## 著者プロフィール



藤田 克昌 Katsumasa Fujita

所属・職：国立大学法人大阪大学大学院工学研究科精密科学・応用物理学専攻・准教授

略歴：2000年 大阪大学大学院工学研究科博士後期課程修了 博士（工学）

1998年4月～2000年3月 日本学術振興会特別研究員（大阪大学）

2000年4月～2002年3月 日本学術振興会特別研究員（京都府立医科大）

2002年4月～10月 阪大フロンティア研究機構 科学技術振興特任教員

2002年10月～2007年8月 大阪大学大学院工学研究科 助手

2007年8月～現職

専門分野：光学顕微鏡

学部の卒業研究から一貫して光学顕微鏡の開発研究に従事。最近ではラマン散乱顕微鏡、超解像顕微鏡の開発とアプリケーションに関する研究に取り組んでいる。

- 主な業績：1. Ando J, et al. Alkyne-tag SERS screening and identification of small-molecule-binding sites in protein. *J Am Chem Soc* 2016; 38: 13901.
2. Watanabe K, et al. Structured line illumination Raman microscopy. *Nat Commun* 2015; 6: 10095.
3. Palonpon AF, et al. Raman and SERS microscopy for molecular imaging of live cells, *Nat Protocols* 2013; 8: 677-692.
4. Okada M, et al. Label-free Raman observation of cytochrome c dynamics during apoptosis, *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 28-32.
5. Hamada K, et al. Raman microscopy for dynamic molecular imaging of living cells. *J Biomed Opt* 2008; 13: 044027.
6. Fujita K, et al. High-resolution confocal microscopy by saturated excitation of fluorescence. *Phys Rev Lett* 2007; 99: 228105.