

## 24. 超解像位相差顕微鏡の開発

居波 渉

静岡大学 学術院工学領域 機械工学系列

Key words : 超解像顕微鏡, 微分位相コントラスト, 無染色

### 緒 言

無色透明で透過光に対して位相変化のみを与える位相物体である細胞の観察には位相差顕微鏡が幅広く用いられている。しかし、位相差顕微鏡の空間分解能は光の回折限界により制限されている<sup>1)</sup>。そのため、より細かい構造やその動きについて解析することはできなかった。位相差顕微鏡を用いることで無染色の生きた細胞を高コントラストに観察できる。しかし、その空間分解能は光の回折限界により制限される。そのため、より細かい構造を観察することはできなかった。本研究では、微分位相コントラスト超解像顕微鏡を開発し、この問題を克服する。

空間分解能の高い顕微鏡には、環境制御透過型電子顕微鏡<sup>2)</sup>、X線顕微鏡<sup>3)</sup>、超解像蛍光顕微鏡<sup>4-6)</sup>がある。環境制御透過型電子顕微鏡とX線顕微鏡は非常に高い空間分解能を有しているが、電子線やX線の照射による試料へのダメージが避けられない。近年開発された超解像蛍光顕微鏡は光を用いているが、試料を蛍光染色する必要がある。

試料を染色することなく観察できる光学顕微鏡には、位相差顕微鏡、微分干渉顕微鏡、ラマン顕微鏡、デジタルホログラフィー顕微鏡などがある。しかし、これらの手法の空間分解能は、光の回折限界によって制限されている。

このように、無染色の試料を観察可能で、観察による試料ダメージがなく、光の回折限界を超えた空間分解能で細かい構造を明瞭に観察できる顕微鏡はない。そこで、微分位相コントラスト超解像顕微鏡の開発が必要である。

### 方 法

ここでは、我々がこれまで開発してきた電子ビームを用いた超解像光学顕微鏡<sup>7)</sup>に微分位相コントラストを得るための光学系を導入する。そして、その空間分解能や位相情報の検出感度を明らかにする。さらに、生きた生物細胞の観察を行い、細胞が高コントラストで観察できることを実証する。

図1 (a) に微分位相コントラスト法について示す。下から電子線を照射し、蛍光薄膜で光ナノスポットを生成する。この光ナノスポットの一部分が試料のエッジ部を通ると、屈折により光の進行方向が変わる。そうすると、検出器面上に形成される光スポットの位置は中心から外れる。試料の中心部に光ナノスポットが当たる場合は、光は屈折するが、全ての光線が屈折するため、その進行方向は変わらず、検出器面上のスポット位置は変化しない。試料右側のエッジでも同様に光の一部が屈折する。しかし、今度は左側のエッジの場合と反対方向に、光の進行方向が変わる。このように、検出器面上のスポットの位置から屈折率の変化を検出することができる。図1 (b) に得られる差分信号を示す。試料の屈折率変化がある部分で光が曲げられ、検出器面の中心から外れる。そのため、屈折率が変化する部分で強い信号が得られる。左右のエッジで光の曲げられる方向が異なるため、差分信号の符号が反転する。すでに、我々は、これまで開発してきた数値計算法で、電子ビームを用いた超解像光学顕微鏡に微分位相コントラスト法を適用可能なことを確認している。計算により、エッジ部をナノメートルサイズの光スポットで照明すると、検出器面上のスポットの位置が中心から外れることが示された。

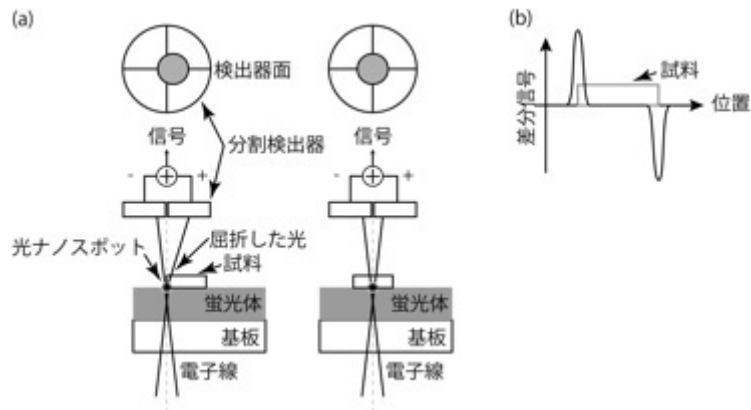


図1. 微分位相コントラスト法の原理

- (a) 試料のエッジに入射した光は屈折し、検出器の中心からずれる。
- (b) 試料のエッジ部ではない場合、光は直進し、検出器の中心に入る。

## 結果

図2に4分割検出器を搭載した超解像顕微鏡の写真を示す。光学顕微鏡の上部に4分割検出器が取り付けられている。この検出器からの信号を4つのアンプでそれぞれ増幅し、それをA/D変換してコンピュータに取り込んだ。

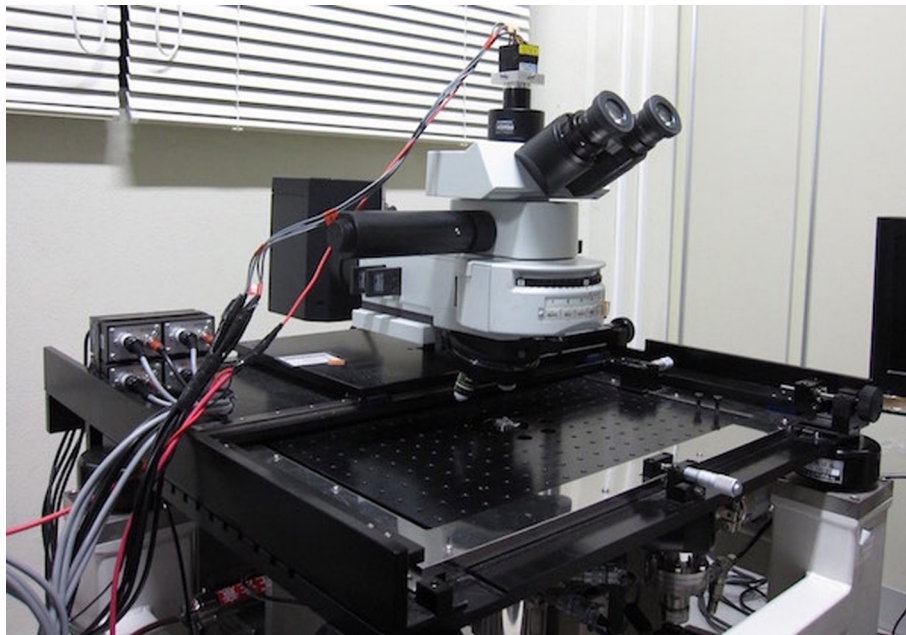


図2. 4分割検出器を搭載した超解像顕微鏡  
光学顕微鏡の上部に4分割検出器が設置されている。

図3 (a) に分割検出器を用いて取得したシリカ粒子の顕微鏡像を示す。観察像の輝度は分割検出器の左右方向の検出強度の差分である。図3 (a) から、シリカ粒子のエッジ部分で強度が高くなっていることが分かる。シリカ粒子のエッジ部分では、シリカ粒子に入射する光としない光がある。シリカ粒子に入射した光は屈折するため、検出器に入射

する光強度が強くなる。それに対して、シリカ粒子に入射しない光は、屈折しないため光強度が変わらない。この差分を画像化するため、シリカ粒子のエッジ部分で強度が高くなる。分割ディテクターの各部分で検出した信号の差を用いれば、高感度にエッジ部分などを検出できる。また、シリカ粒子のない背景部分の強度はゼロになっていることが分かる。これは、シリカ粒子のない部分では、光の屈折が起こらないために、分割検出器の左右に入射する光の強度が同じになるためである。図3 (b) に単一検出器を用いて取得した EXA 観察像を示す。観察像が分割ディテクターの場合と異なることが分かる。単一検出器を用いた場合には、明視野観察であるためシリカ粒子のある部分で光強度が高くなっている。図3 (b) より、単一検出器を用いた場合、シリカ粒子のない背景部分においても光強度を有していることが分かる。これは、電子線で励起されたカソードルミネッセンスがそのまま対物レンズで集光され、検出されたためである。そのため、単一検出器では、透明な物体を観察した際に像のコントラストを上げることは難しい。分割検出器を用いることで、単一ディテクターを用いて取得した観察像と比較して、コントラストを向上させることに成功した。

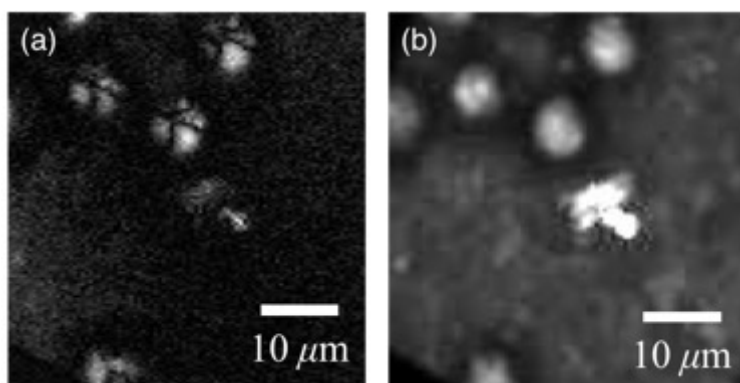


図3. (a) 分割と (b) 単一検出器を用いて取得した顕微鏡画像

分割検出器の方が高いコントラストである。単一検出器の場合、試料がない位置においても光が検出されている。

図4に分割検出器で得られた画像の強度プロファイルを示す。破線は、シミュレーション結果である。シミュレーションは、蛍光薄膜に照射した電子線の軌道を計算し、そこからナノサイズの光スポットを計算する。そして、その光ナノスポットが試料に入り、試料を透過した後の光強度分布を求める。この光強度分布から、ナノサイズの光スポットがある位置にある時の検出される光強度が分かる。光スポットの位置を変えてその位置での光強度を求めることで、今回のシミュレーション結果を得た。実験結果とシミュレーション結果が良く一致している。このことから、分割検出器を用いた差分検出では、エッジで高い強度を持つことが分かる。また、光が屈折しない、試料のない部分と粒子の中央部で強度がほぼゼロになっている。これより、分割検出器を用いた本超解像は、高いコントラストを有する画像を取得できることが分かる。

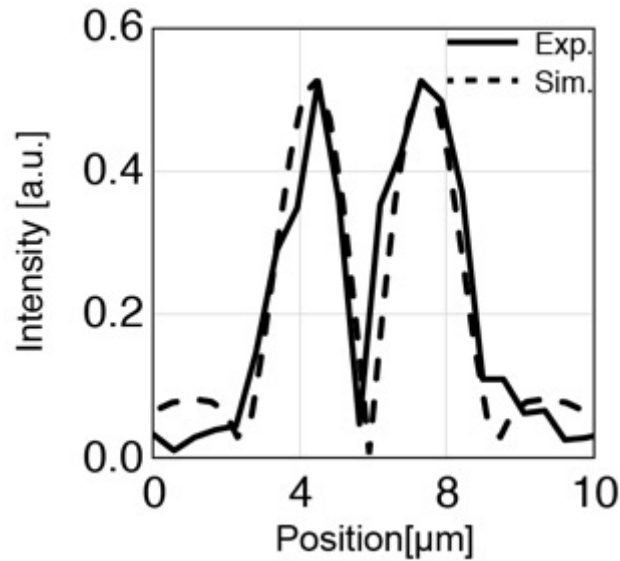


図4. 分割検出器で得られた画像の強度プロファイル  
 実線は実験結果、破線はシミュレーション結果を示す。  
 実験結果とシミュレーション結果が良く一致した。

## 考 察

分割検出器を超解像顕微鏡に導入することで、従来に比べ高いコントラストの像を取得することができた。実験結果とシミュレーション結果を比較すると良く一致した。試料のエッジ部で像強度が強くなり、一様なところでは像強度が弱くなった。超解像位相差顕微鏡は、蛍光染色等の細胞への操作をなるべく減らして、細胞のありのままを観察する必要がある応用において非常に有用である。

## 文 献

- 1) Abbe E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. Arch. Mikrosk. Anat. 1873;9(1):413-8. doi:10.1007/bf02956173
- 2) de Jonge N, Ross FM. Electron microscopy of specimens in liquid. Nat Nanotechnol. 2011;6(11):695-704. doi: 10.1038/nnano.2011.161.
- 3) Chao W, Harteneck BD, Liddle JA, Anderson EH, Attwood DT. Soft X-ray microscopy at a spatial resolution better than 15 nm. Nature. 2005;435(7046):1210-3. doi: 10.1038/nature03719
- 4) Hell SW, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. Opt Lett. 1994;19(11):780-2. PubMed PMID: 19844443
- 5) Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, Davidson MW, Lippincott-Schwartz J, Hess HF. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. Science. 2006;313(5793):1642-5. doi: 10.1126/science.1127344
- 6) Huang B, Wang W, Bates M, Zhuang X. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. Science. 2008;319(5864):810-3. doi: 10.1126/science.1153529.
- 7) Inami W, Nakajima K, Miyakawa A, Kawata Y. Electron beam excitation assisted optical microscope with ultra-high resolution. Opt Express. 2010;18(12):12897-902. doi: 10.1364/OE.18.012897.