

SPPC アレイ検出器を用いた共焦点超解像イメージング

大川潤也, 小森谷大介, 楠井雄太

Confocal Super-Resolution Imaging using SPPC Array Detector

Junya OHKAWA, Daisuke KOMORIYA and Yuta KUSUI

細胞は生き物の体を作る基本的な構成要素である。この数十マイクロメートル程度の大きさの細胞の中には、核、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体などのたくさんのオルガネラ（細胞内小器官）や、無数の蛋白質が存在し、生命活動を維持するために機能している。オルガネラや蛋白質は蛍光染色が可能で、長年蛍光顕微鏡でイメージングされてきた。近年では、様々な細胞機能や病態生理のメカニズムをより正確に理解するために、より高い空間分解能での観察が求められるようになってきている。

共焦点レーザー顕微鏡システム AX/AX R は、焦点外の不要な光を取り除いた断層像を取得することが出来る蛍光顕微鏡であり、細胞の観察に使用されている。我々は、AX/AX R に超解像検出器ユニット NSPARC (Nikon SPatial ARray Confocal) を新たに搭載した。NSPARC は SPPC アレイという特殊な検出器を用いることで、従来の共焦点顕微鏡の長所を損なうことなく、空間分解能を向上させることが出来る。本稿では、まず NSPARC の空間分解能向上の光学的原理を説明する。続いて、検出器に使用している SPPC アレイ検出器について説明する。最後に、生物サンプルでのアプリケーション例を紹介する。

Cells are the basic elements of living organisms. Cells, which are several tens of micrometers in size, contain numerous organelles such as the nucleus, mitochondria, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus, including countless proteins that function to maintain life activities. Organelles and proteins can be fluorescently stained and have been imaged with a fluorescence microscope for several years. To understand the physiological mechanism more accurately, higher spatial resolution imaging is required.

The confocal laser microscope system AX/AX R is a fluorescence microscope that can acquire thin optical sectioning images without unnecessary out-of-focus light, and is utilized to image cells. We installed a new super-resolution detector unit NSPARC (Nikon SPatial ARray Confocal) on the AX/AX R. NSPARC employs a special detector called an SPPC array to improve spatial resolution without sacrificing the advantages of conventional confocal microscopes. Here, we first explain the optical principle of improving the spatial resolution of the NSPARC, and then explain the SPPC array detector. Finally, we introduce an application model for biological samples.

Key words 共焦点顕微鏡, 超解像イメージング
confocal microscopy, super resolution

1 はじめに

共焦点顕微鏡 [1] が観察対象とするのは、数百 μm ~ 数 mm 程度の組織切片や細胞塊から数 $10 \mu\text{m}$ の細胞 (Fig. 1 (a)), さらに一番小さいものでは数 100 nm のオルガネラと呼ばれる細胞内の微細構造である。これらのオルガネラは蛍光蛋白質や蛍光色素で染め分けることができ、共焦点顕微鏡で細胞内での動態を観察することが出来る (Fig. 1 (b-e)). オルガネラの構造や細胞内局在は、細胞機能や病態生理と密接に関係しており、ライフサイエンスや創薬をはじめとした産業の分野で観察対象になっている。

しかし、通常の共焦点顕微鏡では、オルガネラの外形を捉えることは出来るが、微細な内部構造を鮮明に捉えるには、後述するように時間分解能の大幅な低下や光ダメージの増加といった大きなトレードオフを伴う問題点があった。そこで我々は、これらのトレードオフを伴わず、従来の共焦点顕微鏡のアプリケーションで空間分解能を改善させることが出来る超解像検出器ユニット NSPARC の開発を行った。

2 NSPARC の光学原理

まず初めに共焦点顕微鏡の概要を説明する。共焦点顕微

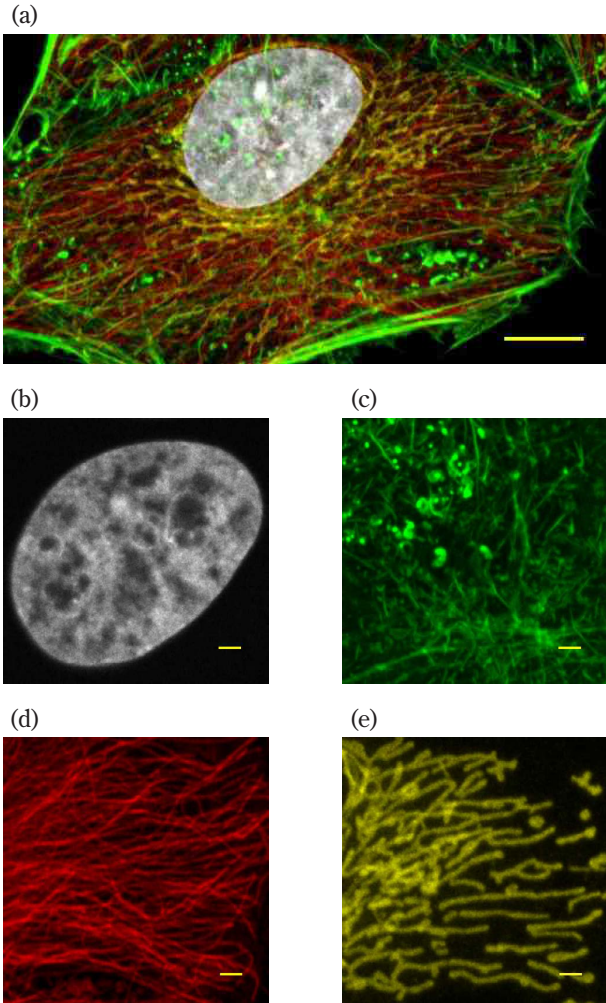


Fig. 1 共焦点顕微鏡で撮影した多重染色画像

(a) HeLa 細胞の 4 種類のオルガネラを蛍光染色し、共焦点顕微鏡 AX にて撮影。

- 白：核
- 緑：アクチン（細胞骨格）
- 赤：微小管（細胞骨格）
- 黄：ミトコンドリア

(b-e) 各オルガネラを拡大した単色画像。

スケールバー (a) 10 μm, (b-e) 2 μm

鏡はレーザー走査型顕微鏡の一種であり、試料からの蛍光を共焦点ピンホールに通すことで余分な外乱光をカットし、焦点近傍の蛍光のみを取り出している。共焦点光学系によりピンホールとレーザー光源は常に共役関係を保った状態で、試料表面をレーザー走査していく。ピンホールを通った蛍光を PMT 等の光検出器によって光量計測し、スキャンミラーの位置と計測光量に対応付けた光量マップを作成することで標本画像が取得できる (Fig. 2)。ピンホールによる外乱光の抑制により共焦点顕微鏡で取得できる画像は高 S/N (信号雑音比) であるのが特徴である。

S/N を確保しつつ高空間分解能の画像を得るにはピンホール径を蛍光の Point spread function (PSF) の理論計算から算出する結像スポットの大きさである Airy 径と同程度まで絞った条件にする必要がある。共焦点顕微鏡ではピン

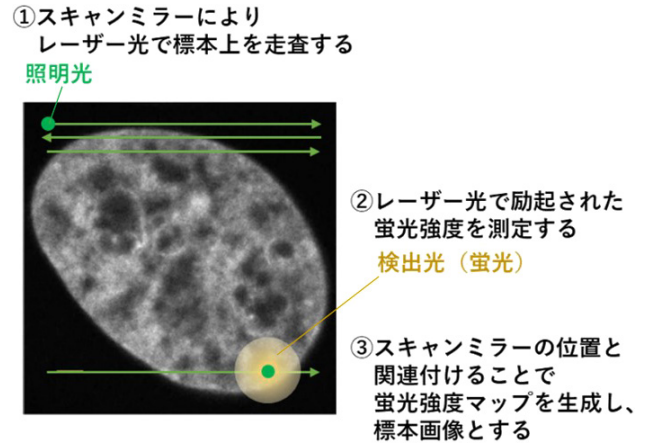


Fig. 2 共焦点顕微鏡による蛍光信号像取得スキーム

ホール径を表すのに AiryUnit (AU) 換算した値を用いるのが一般的で、本稿でも同様の表現で説明する。

一般的な観察では、ピンホール径は空間分解能と S/N のバランスが取れる 1 AU (=1.22 λ/NA) に近い値に設定する。ただし空間分解能を優先とするケースではピンホールを 1 AU 以下に絞る場合もある。ピンホール径を小さくすると、空間分解能は向上するが、1 AU 以下のピンホール径では蛍光信号も大幅にカットしてしまうので結果として S/N は悪化する。ピンホール径の変化に対する空間分解能と蛍光強度の関係を比較すると、1 AU 以下に絞った条件では空間分解能の改善率に比べて、蛍光強度の低下は急峻であることが分かる (Fig. 3)。S/N の悪化は後工程の画像処理であるデコンボリューション (逆畳み込み計算) 結果にも悪影響を及ぼす。したがってピンホールを絞るほど高分解能の画像が得られるという訳ではない。高分解能画像を取得するには S/N を維持したまま、分解能を改善する必要がある。そのため、走査速度を遅くするか、レーザーパワーを強くして、S/N を改善する必要がある。しかしこれらの対策は、時間分解能の低下や試料への光ダメージ増加という大きなトレードオフを伴う。NSPARC はこの空間分解能と S/N のトレードオフの関係を打開した顕微鏡装置で、Image scanning microscopy [2]–[5] (以下 ISM) に基づいた光学系を採用し、高 S/N と高空間分解能を両立した画像取得が可能である。

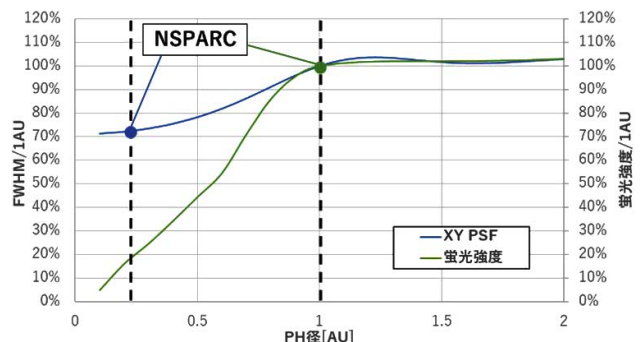


Fig. 3 ピンホール径と輝度・空間分解能の関係
FWHM : Full Width at Half Maximum (半値全幅)

次に NSPARC で使用しているイメージング技術である ISM について説明する。ISM ではピンホールの代わりに 2 次元のアレイ検出器をレーザー光源と共役となる位置に配置する。この検出器はピンホールとしての役割を持ちながら、同時に光量計測も行う。さらにアレイ検出器を使用することで検出面に投影された蛍光を各画素で分割して光量計測することができ、後述する画像処理と合わせることで空間分解能を向上させることができる。標準の観察条件では 5×5 画素のアレイ検出器に 1 AU が内接する条件で投影しており、1 画素当たり 0.2 AU サイズの蛍光を取り込んでいる (Fig. 4)。

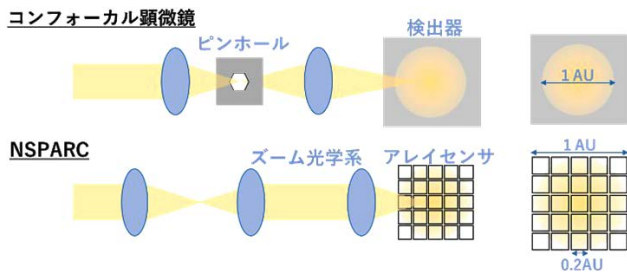


Fig. 4 共焦点顕微鏡と NSPARC の光学系の比較

アレイ検出器の各画素それぞれが光量計測した結果から光量マップを生成し画像として出力する。それら出力画像は各画素が 0.2 AU 径のピンホールとして作用した画像に相当するので空間分解能が向上しているが、1 AU 以下のピンホール条件で撮影された画像となるため暗く S/N の悪い画像である。しかし各画素から得られた画像を合算すると 1 AU 相当の蛍光信号が確保できるため、画像の S/N を上げることができる。ただし各画素で得られる画像間には像ずれが発生しており、ただ合算だけでは空間分解能も 1 AU 相当となってしまふ。ISM では、0.2 AU の空間分解能を保ったまま画像をシフトさせて合算するリアサイメント処理を行うことで従来の共焦点顕微鏡では困難であった高分解能と高 S/N を両立した画像を取得することができる (Fig. 5)。

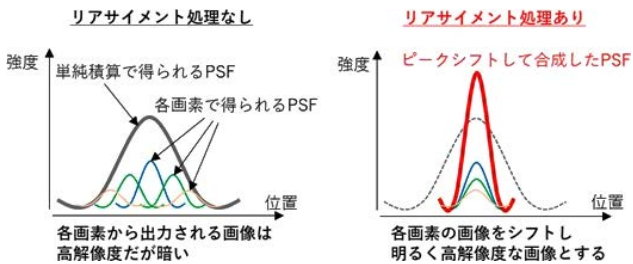


Fig. 5 リアサイメント処理と PSF の関係

ISM で使用している画像処理であるリアサイメント処理について基本原理を説明する。共焦点顕微鏡の結像性能を表す実効 PSF_{eff} は計算により求めることができ、アレイ検出器の各画素の実効 PSF_{eff} も見積もることができる。リア

サイメント処理では理論計算によってアレイ検出器の各画素配置に起因する PSF シフト量を計算し、合成の際に逆方向にシフトさせて各画素の PSF ピーク位置を一致するよう補正している。

共焦点顕微鏡で得られる実効 PSF_{eff} は、励起光学系で決まる PSF_{ex} に蛍光光学系で決まる PSF_{em} とピンホール関数 PH から (1) 式で求まる。

$$PSF_{eff}(r) = PSF_{ex}(r) \{PSF_{em}(r) \otimes PH(r)\} \quad (1)$$

アレイ検出器を用いた ISM の光学系では各画素が微小のピンホールとして作用しているのに加え、各画素の配置によって光軸からシフトした位置にある。したがって各画素の実効 PSF_{eff} を計算する関係式は、アレイ検出器の配置と同じ軸ずれを持つ位置にピンホールを配置した場合の (2) 式で求まる。

$$PSF_{eff}(r) = PSF_{ex}(r) \{PSF_{em}(r) \otimes PH(r-d)\} \quad (2)$$

この場合の PSF_{eff} は光軸からシフトした位置にピーク位置を持つことが分かる (Fig. 6)。画素の位置によってシフト量もシフト方向も変わる為、画素ごとにシフトの補正量を計算し、各画素からの出力画像を移動させ合算する。この画像をシフトして合算する処理をリアサイメント処理といい、0.2 AU の空間分解能を維持したまま、各画素で撮影した画像を合算することが出来る。リアサイメント画像は、標準の 1AU 画像に対して S/N を維持したまま、空間分解能を約 1.3 倍向上させることが出来る。

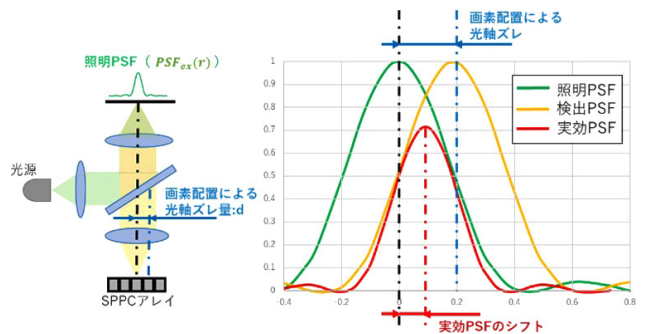


Fig. 6 ISM の PSF

またリアサイメント処理後の実効 PSF を用いて、リアサイメント画像に対してデコンボリューションを行うことができる。この画像処理によって背景光のボケを取り除き、より空間分解能を高めることが出来る。Fig. 7 に (a) 共焦点画像、(b) リアサイメント画像、(c) リアサイメント画像にデコンボリューションをした画像を示す。共焦点画像では分解できなかった 2 本の線状の構造体が、リアサイメント処理で谷間が確認できるようになり、さらにデコンボリューションで明確に 2 本に分解できていることが分かる。

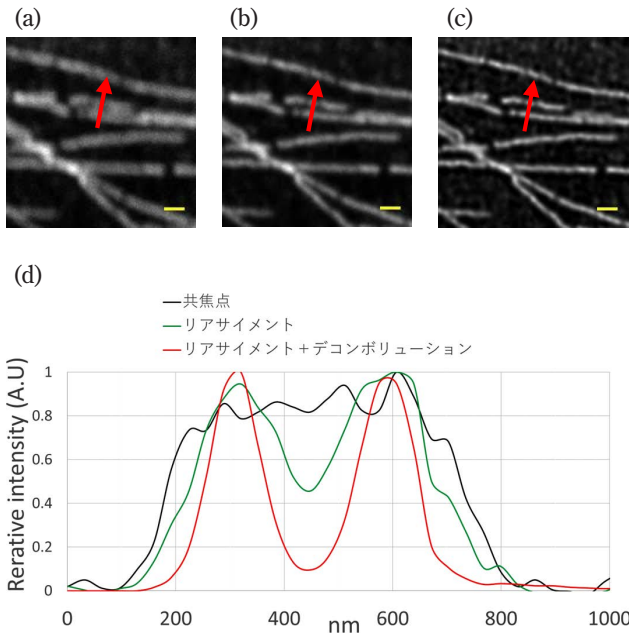


Fig. 7 生物サンプルでの空間分解能

PlanAPO λ D 60x 1.42で撮影した HeLa 細胞の微小管.

- (a) 共焦点画像
- (b) リアサイメント画像
- (c) リアサイメント画像+デコンボリューション処理
スケールバーはそれぞれ 500 nm
- (d) (a)-(c) に図示したラインプロファイル.

3 SPPC アレイ検出器

続いて、NSPARC で新たに採用した、Single Pixel Photon Counter (SPPC) アレイ検出器の説明を行う。NSPARC にて使用している検出器は新開発した SPPC アレイである。SPPC アレイは Avalanche Photo Diode (APD) をアレイ状に並べたフォトンカウンティング素子である。Single Photon Avalanche Diode (SPAD) アレイと呼ばれることもある。ISM のためには 2 次元のアレイ状の検出器が必要であった。従来の光電子増倍管 (PMT) を使用するアイデアも開発初期にはあったが、サイズが大きいに加え、検出面をアレイ状に並べることが難しい。そこで我々は 25 画素の APD がアレイ状に設置された SPPC アレイを採用した。

NSPARC にて使用している SPPC アレイは $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ の正方形を 1 画素として 25 画素が敷き詰められている (Fig. 8)。検出器の受光面は 25 画素合わせてもわずか $250 \mu\text{m} \times 250 \mu\text{m}$ しかない。検出器のサイズを大きくすることは可能だったが検出器のサイズを大きくすると集光するための光学系が長くなってしまい装置のサイズが大きくなってしまふ。逆に小さい検出器の場合は、アライメント調整に高い精度が要求される。また検出器の画素サイズは感度やノイズにも影響を及ぼす。様々な検討をした結果、画素サイズ $50 \mu\text{m}$ が最適だと判断した。

PMT と比べるとサイズは小さくなっているが検出効率や感度波長範囲といった画質に直結する性能は PMT と同等

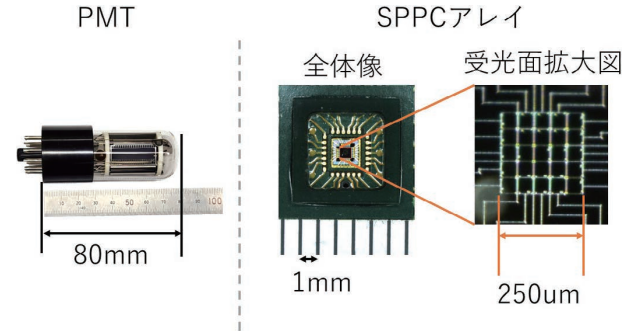


Fig. 8 PMT と SPPC アレイのサイズ比較

PMT が約 $80 \text{ mm} \times 28 \text{ mm}$ に対して SPPC アレイは約 $7 \text{ mm} \times 7 \text{ mm}$ である。

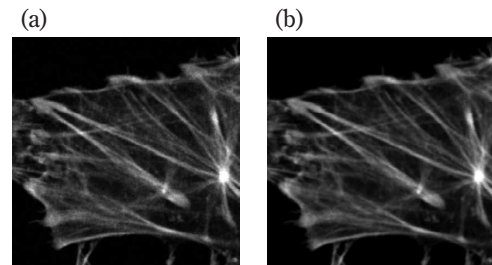


Fig. 9 GaAsP PMT と SPPC アレイの比較

- (a) GaAsP PMT で撮影した共焦点画像
- (b) SPPC アレイ検出器で撮影した共焦点画像

の性能を有する。実際に取得した画像からも SPPC アレイにて PMT と遜色ない画像が取得できていることが分かる (Fig. 9)。

直接画質に影響する部分ではないが、使い勝手の部分でも SPPC アレイは改善がある。PMT は強い入射光を受けると感度が劣化する可能性がある。そのため使用中も強い光が入射されないように気を付ける必要がある。共焦点顕微鏡 AX では強い光が入射した時は撮影を止める安全機能を搭載していた。SPPC アレイは PMT と比べると入射光によるダメージはなく安心して使用ができる。そのため撮影中に安全機構により撮影が中断されるわずらわしさもない。

SPPC アレイの信号出力から画像を構築するプロセスに関して説明をする。SPPC アレイはフォトン 1 個が入射するとそれを増倍し 1 個の電気パルス信号を出力する APD をアレイ状に並べたものである。PMT などの多くの検出器は光を電圧の強弱に変換し AD 変換をすることによりその電圧値を取得する。そして AD 変換された数値が画像の輝度値になる (Fig. 10上)。しかし SPPC アレイはフォトンが受光面にあたると光量の大小に関係なく固有の電圧パルスを出力する。このパルスを経路によりカウントすることによって何フォトン入射したかカウントすることができる。SPPC アレイではこのカウント数が画像の輝度値になる (Fig. 10下)。このように SPPC アレイは、PMT とは信号出力方式も大きく異なり、微弱光の計測においては PMT よりも高い S/N と安定した測定を実現することができる。

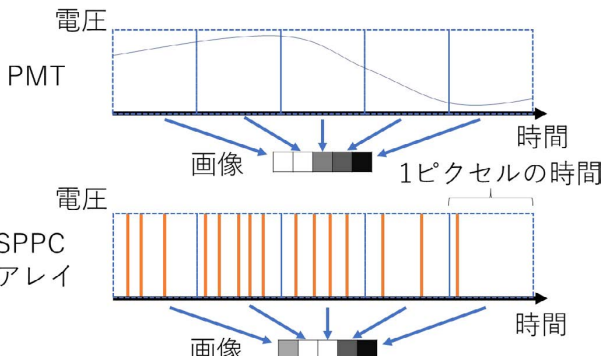


Fig. 10 PMTとSPCCアレイの画像構築方法の違い

PMTはアナログ電圧の強弱が画像の輝度値になるがSPCCアレイは1ピクセルの時間内に何パルスカウントできたかが画像の輝度値になる。

4 生物サンプルのアプリケーション

NSPARCを使った3つのアプリケーションを紹介する。まず初めにマルチカラーイメージングの画像をFig. 11に示す。固定をしたHeLa細胞の核をDAPI、微小管をAlexa Fluor™ 488 (Thermo Fisher Scientific Inc-JP. 東京, 日本)、ミトコンドリア外膜をAlexa Fluor™ 568 (Thermo Fisher Scientific Inc-JP.)という蛍光プローブで染色した (Fig. 11 (a))。励起波長は405, 488, 561 nmの3波長で順次に励起をしてNSPARCでイメージングをした。Fig. 11 (b-d)にリアサイメント+デコンボリューション画像、Fig. 11 (e-g)に共焦点画像を示す。前者の画像でコントラストと

S/Nが著しく改善しており、各オルガネラの微細構造が鮮明に捉えられている。NSPARCは、共焦点画像顕微鏡の従来のアプリケーションである多色撮影で空間分解能を改善させることが可能であり、オルガネラ間の相互作用や、蛋白質分子の局在の研究での活躍が期待される。

次に、ミトコンドリアをターゲットにしたライブセルイメージングの画像をFig. 12を示す。ミトコンドリアは外膜と内膜の二重膜で構成され、内膜は内部に向かって陥入したクリステと呼ばれる縞状の構造を取っている。蛍光プローブはクリステ構造が見えるように、MitoTracker™ Green FM (Thermo Fisher Scientific Inc-JP.)を使用した。Fig. 12 (a)にリアサイメント+デコンボリューション画像、Fig. 12 (b)に共焦点画像を載せた。後者の画像ではぼけていたクリステが、前者の画像では、コントラストが上がり鮮明に可視化された。次にタイムラプス撮影でミトコンドリアの形態変化を観察した。ミトコンドリアの形態は細胞内でダイナミックに変化することで知られ、秒単位で分裂や融合を繰り返している。Fig. 12 (c)では、1.9 fps, 3秒間隔のタイムラプス撮影で500 nm程度の微小なミトコンドリアが激しく動き回り、大きなミトコンドリアに融合する瞬間を捉えた。ミトコンドリアの形態と細胞の活性 (Viability) との間には相関関係があることが知られており、ミトコンドリアの形態と疾患との関連に着目した研究でNSPARCが活躍することが期待される。

最後に、透明化処理をしたマウス脳スライスのzスタック画像をFig. 13に示す。10倍対物レンズで撮影した5x5枚

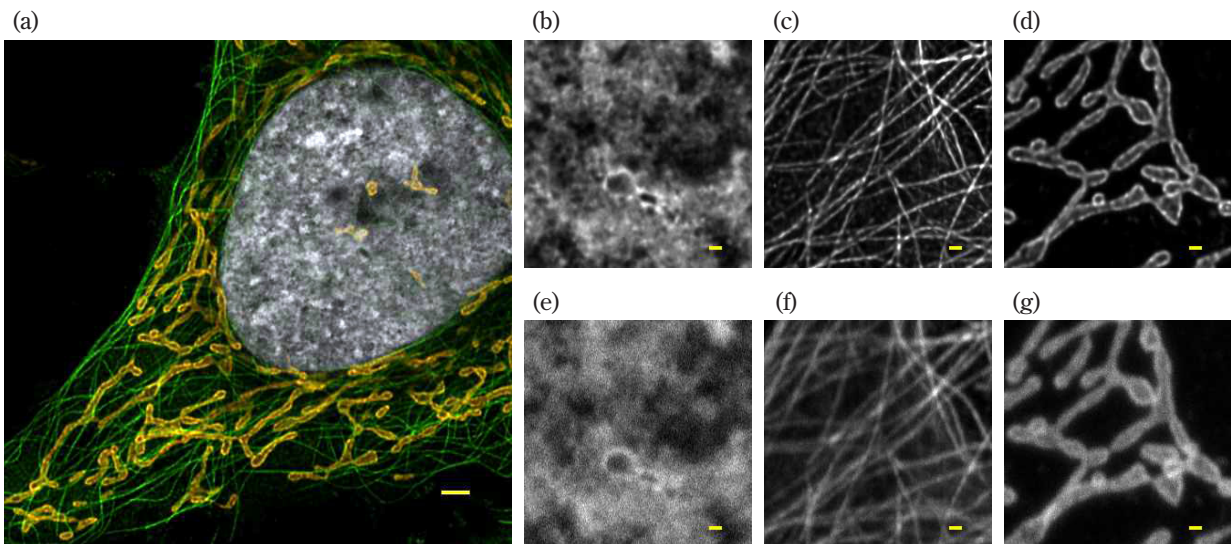


Fig. 11 マルチカラーイメージングの画像

- (a) 固定したHeLa細胞のリアサイメント+デコンボリューション画像。
白：核 (405 nm 励起), 緑：微小管 (488 nm 励起), 橙：ミトコンドリア (561 nm 励起)。
対物レンズは PlanAPO2D 60x 1.42 oil で撮影。
- (b-d) リアサイメント+デコンボリューション画像。b) 核, c) 微小管, d) ミトコンドリア
- (e-g) 共焦点画像 e) 核, f) 微小管, g) ミトコンドリア
スケールバーは (a) 2 μ m, (b-g) は 500 nm

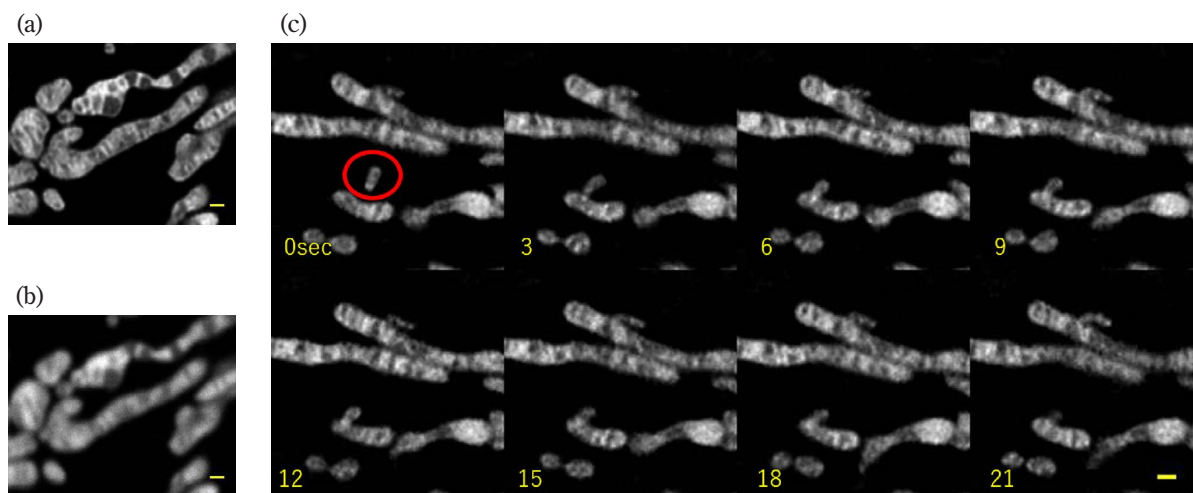


Fig. 12 ミトコンドリアのライブセルイメージング

MitoTracker™ Green FM で染色をしたミトコンドリア画像. 対物レンズは PlanAPO λ D 60x 1.42 oil で撮影.

(a) リアサイメント+デコンボリューション画像と (b) 共焦点画像.

(c) アサイメント+デコンボリューション画像のタイムラプス画像.

撮影速度 1.9 fps, 3 sec 間隔で撮影.

スケールバーはそれぞれ 500 nm

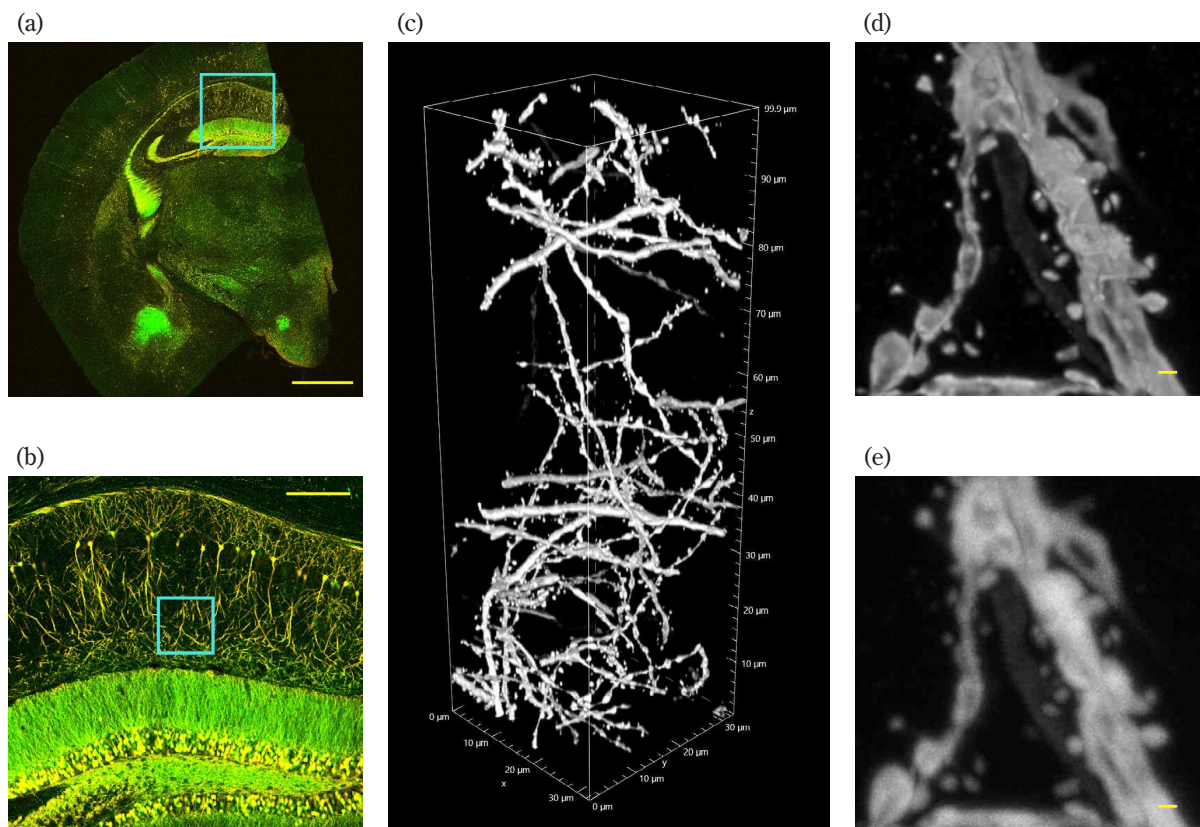


Fig. 13 透明化マウス脳スライスの z スタック画像

(a) 透明化マウス脳スライスの全体像. Plan PlanApo10x/0.45で撮影した 5x5 枚のタイリング共焦点画像.

(b) (a) の一部を拡大した共焦点画像.

(c) (b) の水色枠の部分のリアサイメント+デコンボリューション画像の立体構成図.

PlanApo λ D60x 1.42 oil を使用して撮影.

(d) (c) の 80-100 um 深部の Max Projection の拡大 (リアサイメント+デコンボリューション画像).

(e) (c) の 80-100 um 深部の Max Projection の拡大 (共焦点画像).

スケールバー (a) 1000 um, (b) 200 um, (d, e) 500 nm

サンプルご提供 : Lin Daniel, PhD. SunJin Lab Co.

のタイリング画像 (Fig. 13 (a)) と一部を拡大した画像 (Fig. 13 (b)) を示す。eYFP という蛍光蛋白質を発現させた神経細胞が密集している様子が分かる。さらに、対物レンズを60倍の油浸対物レンズに切り替えて Fig. 13 (b) の水色枠の部分を z スタック撮影して、立体構成した図を Fig. 13 (c) に示す。神経回路を構成する樹状突起が様々な方向に走っている様子を捉えることが出来た。また、樹状突起の表面に直径数百 nm 程度のスパインと呼ばれる棘状の構造も確認できた。Fig. 13 (c) の z スタックの 80~100 um 深部の Max projection 画像を拡大した一部を Fig. 13 (d) に示す。Fig. 13 (e) の共焦点画像と比較すると、スパインが単に球状ではなく、様々な形状をしていることが分かる。このように深部 z スタック撮影においても NSPARC は有用である。

以上の3つの作例で示した様に、NSPARC は、共焦点画像顕微鏡の多色観察、ライブセル観察、深部観察などの一般的なアプリケーションで、トレードオフを伴うことなく、空間分解能を向上することが可能である。

5 まとめ

従来の共焦点イメージングに対してトレードオフの無い ISM 技術を搭載した NSPARC は今後、共焦点顕微鏡のスタンダードになると考えている。4章で示した以外にも、多くの共焦点顕微鏡のアプリケーションで、空間分解能を大きく向上させることが可能であり、アカデミアでのバイオイメージングのみならず、創薬における薬効評価や毒性試験などの産業の分野でも幅広く活躍することが期待できる。例えば、NSPARC の深部観察能を活かした3次元培養細胞での癌の浸潤観察や、低光毒性を活かした光ダメージに敏

感なミトコンドリアや神経細胞の薬剤応答による形態変化の観察が挙げられる。これまで観察できなかった、または見逃されていたオルガネラの形態変化や、蛋白質局在など、新たな評価指標が発見され、薬効評価の効率化、精度向上につながることを期待する。

謝辞

最後に、本製品は Italian Institute of Technology の Nanoscopy Lab, Molecular Microscopy and Spectroscopy Lab との共同研究から生み出されたことを強調しておきたい。Italian Institute of Technology の Professor Alberto Diaspro, Dr.Paolo Bianchini, Dr.Giuseppe Vicidomini および研究室のスタッフ一同の皆様には、多大なるご支援とご協力を頂いた。この場を借りて改めて感謝の意を伝えたい。

引用文献

- [1] A. Diaspro, *Confocal and Two-Photon Microscopy Foundations, Applications, and Advances*, New York: Wiley-Liss, 2001.
- [2] C. B. Müller and J. Enderlein, "Imaging Scanning Microscopy," *Phys. Rev. Lett.*, Vol. 104, no. 19, 198101, 2010.
- [3] C. J. R. Sheppard, "Super-resolution in confocal imaging," *Optik*, Vol. 80, no. 2, pp. 53-54, 1988.
- [4] M. Castello *et al.*, "Image scanning microscopy with a quadrant detector," *Optics Letters*, Vol. 40, no. 22, pp. 5355-5358, 2015.
- [5] M. Castello *et al.*, "A robust and versatile platform for image scanning microscopy enabling super-resolution FILM," *Nature methods*, Vol. 16, pp. 175-178, 2019.

大川潤也 Junya OHKAWA
ヘルスケア事業部 技術統括部 システム開発部
System Development Department
Technology Solutions Sector
Healthcare Business Unit

楠井雄太 Yuta KUSUI
光学本部 第一設計部
1st Designing Department
Optical Engineering Division

小森谷大介 Daisuke KOMORIYA
ヘルスケア事業部 技術統括部設計部
Designing Department
Technology Solutions Sector
Healthcare Business Unit