

バイオイメーキングで知っておくべき蛍光顕微鏡の基礎

鈴木 健史

札幌医科大学 医療人育成センター 生物学教室

キーワード：蛍光顕微鏡法 (fluorescent microscopy), 共焦点レーザー顕微鏡法 (confocal laser microscopy), ノイズ (noise), ボケ (blur), 開口数 (numerical aperture), デコンボリューション顕微鏡法 (deconvolution microscopy), 光電子増倍管 (photomultiplier tube), 冷却 CCD (cooled charge coupled device), 蛍光色素の選び方

はじめに

GFP など蛍光タンパク質を使った生体分子標識技術が著しく発展し、細胞内で起きている生化学反応の現場を、実際に見て確認することが可能になってきた。これにともない、蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡を活用した研究が爆発的に増え、生化学や分子生物学などこれまで顕微鏡をほとんど使わなかった分野でも日常的に顕微鏡が使われるようになってきている。光学顕微鏡技術も近年著しく発展し、多機能かつ高性能な機種が爆発的に普及してきている。また、蛍光タンパク質標識プローブを作るための分子生物技術のキット化や、遺伝子導入技術の高効率化も手伝って、生きている動物や組織、細胞内における生体分子の観察が手軽に行えるようになった。固定標本を使う蛍光抗体染色法にしても、良質の抗体や蛍光標識二次抗体が手軽に購入できるようになりさまざまな研究分野で日常的に活用されている。顕微鏡技術は、もはや形態学者の特殊技術ではなくなった。

しかし、蛍光バイオイメーキングに対するニーズが増大する一方で、蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡のしくみや、各種撮像装置のしくみとその特性、撮像時にユーザーが設定する各種パラメーターの意味、顕微鏡画像の品質、ノイズの本質など、高品位なイメージデータを取得するためにユーザーが知っておくべき基礎知識についてシステマチックに学べる場所は意外に少ない。研究現場で行われる先輩ユーザーによる簡素な技術指導は、ルーチンワーク化したイメージデータ収集の目的には効率が良いが、データ収集過程で発生するさまざまな問題に臨機応変にかつ的確に対処するためには、ユーザー各個人が基礎をしっかりと理解しておくことが重要である。本講では、蛍光顕微鏡技術の基本原則を解説し、蛍光バイオイメーキングで知っておくべき顕微鏡の基礎を解説する。

1. 蛍光顕微鏡：検出感度が高いわけ

蛍光顕微鏡は蛍光物質が発する蛍光を検出する光学顕微鏡で、生体試料に含まれる特定の分子の観察を可能にする¹⁾。分子の大きさは 0.1~数十ナノメートル程度なので、分解能が数百ナノメートルの光学顕微鏡では原理的に分子を見分けることはできない^{注1}。しかし蛍光顕微鏡の場合、目的の生体分子を発光させることで分解能以下の小さい分子の検出を可能にし、光学分解能の範囲内でその位置を特定できる。特定の生体分子を見る方法として、酵素抗体染色法など目的分子を発色させる方法もあり、組織レベルでの分子の存在を確認する手法として普及している。しかし、蛍光顕微鏡法と違って背景が明るいため、背景からの漏れ光 (= ボケ成分, 後述する) が大量にシグナルの色点上加算されてしまいシグナル検出感度が悪い。このため、分解能以下の小さい色点の検出は不可能で、細胞内レベルの細かい分子位置の特定に使うのは難しい。これに対し蛍光顕微鏡法は、真つ暗な背景の中に蛍光標識分子の輝点を見るので、背景からの漏れ光がまったく存在しない。このため、コントラストが高くシグナル検出能力が極めて高い (ただし後述するように、蛍光顕微鏡像も近隣の輝点シグナルからの漏れ光を含み、これはボケの原因となる)。特殊な蛍光顕微鏡システムを使えば、たった 1 個の分子が発する蛍光シグナルの検出も可能で、1 分子生命科学という研究分野の技術基盤になっている。

蛍光色素を発光させるには試料に励起光を照射する必要があるが、通常は対物レンズを通して励起光を照射し、試料に含まれる標識分子が放つ蛍光を同じ対物レンズを通して検出する¹⁾。これを落射照明といい、正立型、倒立型問わず多くの蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡がこの照明システムを使う。同じ対物レンズで照明と検出を同時に行うので、

照明系の光路と検出系の光路が対物レンズ部で完全に重なる。ダイクロイックミラーという特定の波長域の光を反射しそれ以外の光を透過させる特殊な鏡により、この2つの光成分を分離する（図1）。なお、照明光源から励起波長の光を取り出すための励起フィルター（excitation filter）と、ダイクロイックミラーを透過してくる光の中から目的の蛍光シグナル以外の光成分を取り除く蛍光フィルター（emission filter；吸収フィルター absorption filter ともいう）を備える。最近では、蛍光フィルターに代えて回折格子を使ったスペクトル分光光学系を備える共焦点レーザー顕微鏡も普及し始めている。

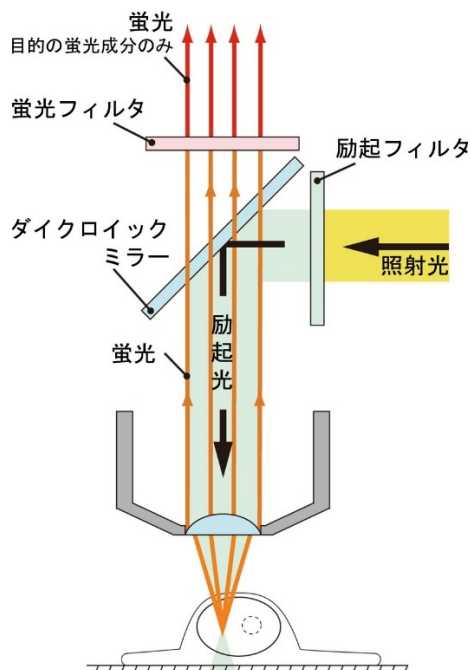


図1. 蛍光顕微鏡のしくみ。蛍光顕微鏡は、対物レンズを通して試料に励起光を照明し、試料からの蛍光を同じ対物レンズで観察する。ダイクロイックミラーは、特定の波長域の光のみを反射しそれ以外の波長の光を通す特殊な鏡で、励起光と蛍光を分離する蛍光顕微鏡の要となる素子である。

注1：対物レンズの分解能（ δ ）は、観察する光の波長（ λ ）と対物レンズの開口数（NA）で決まる。最高級の油浸対物レンズ（NA=1.4）で可視光を観察する場合、180 nm（紫）～ 280 nm（赤）程度となる。ちなみに対物レンズの分解能は次の式で計算できる。

$$\delta = \frac{0.61 \cdot \lambda}{NA}$$

II. はてしないノイズとの戦い

蛍光パライミエージングで最もやっかいなのはノイズである。蛍光パライミエージングは常にノイズと格闘しているといっても過言ではなく、ノイズを最小限に抑えた画像がよいデータとされる。ノイズが少なければ以後の画像処理や画像解析の精度が増し、データの利用価値と信頼性が増大するからである。ノイズ問題を克服するためには、敵の正体すなわちノイズの原因と性質をしっかりと理解しておく必要がある。ノイズの量は S/N 比というパラメーターで表され、このとき S はシグナルの分布域（分散）を示し、N はノイズの分布域を示す。蛍光パライミエージングでは、シグナル以外の成分を全てノイズとして扱い、ノイズの輝度値の分布域が大きいほどノイズの多い悪い画像となる。また、シグナル輝度値の分布域が小さく、ノイズのそれに重なる場合もノイジーな悪い画像となる。

撮影した顕微鏡画像にノイズが多く乗っていたとしても、シグナルとノイズを明確に区別できれば、画像処理で画像からノイズ成分を除去できる。例えば、シグナルが強くシグナルの輝度分布域がノイズのそれから十分に離れていれば、

ヒストグラムを少し調整するだけで簡単にシグナルのみを抽出できる。しかし蛍光パライミエージングの場合、さまざまな理由からシグナルを識別できるぎりぎりの条件での撮像を余儀なくされることが多く、シグナルとノイズの区別が常に問題になる。特に高速度の撮像が必須なライブセルイメージングでは、ノイズ問題が顕著である。蛍光パライミエージングで特に問題になるノイズは、ボケ、光ショットノイズ、光源ノイズ、検出器ノイズの4つである²⁾。

ボケ：対物レンズの合焦範囲以外に存在する輝点が滲んで画像に写り混むもので（図2）、顕微鏡画像の画質に最も大きく影響するノイズである。試料内に蛍光性のゴミなどがあり、それが強く光って近傍部の観察の邪魔になることがあるが（ハレーションという）、これは典型的なボケノイズである。また、ゴミではなく標識分子に由来する輝点であっても、対物レンズの焦点範囲の外側で光っていればそれはボケとして画像に写り込んでしまう。ボケは試料内のシグナル分布パターンを反映したノイズなので、うまく処理すれば、真のシグナル輝度分布を算出するための手掛かりとして利用できる。これを行う画像処理が後述のデコンボリューション顕微鏡法である。画像処理は大抵は画像データの定量性を低下させるが、デコンボリューション法は逆に画像データの定量性を大きく改善する。また、試料に施す工夫や顕微鏡システムの工夫で、ボケを効率よく除去することも可能である。ボケ除去については次節で詳しく述べる。

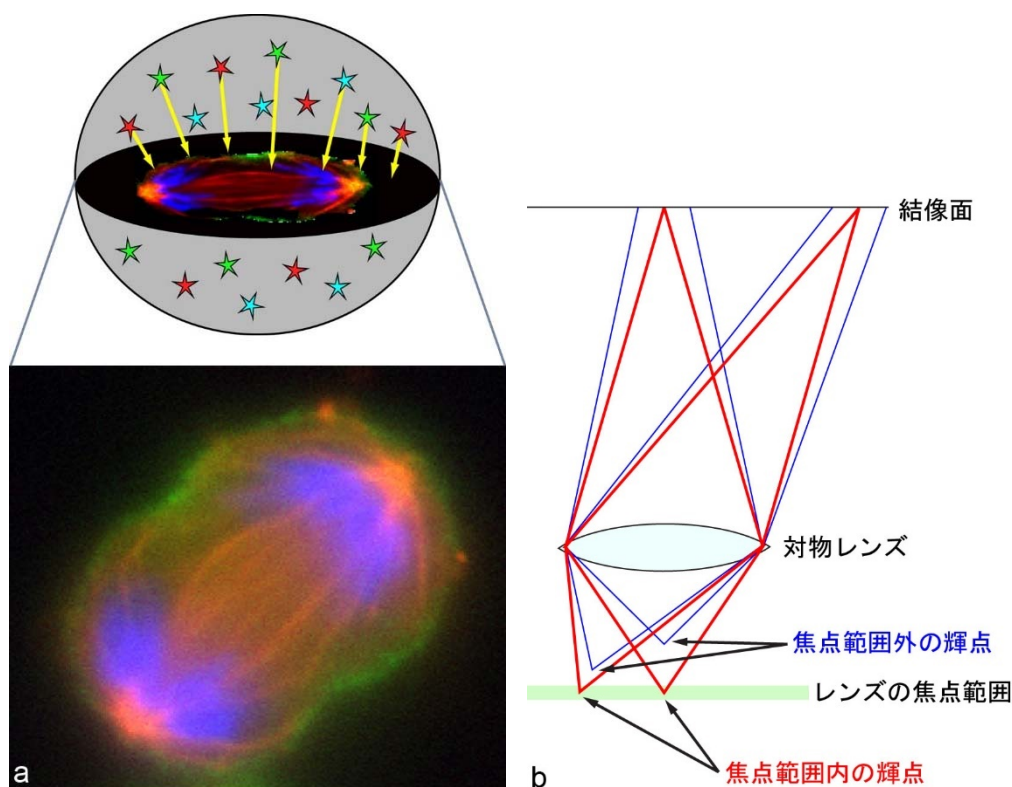


図2. ボケの正体. a: ボケは、対物レンズの合焦範囲以外に存在する輝点が滲んで画像に写り混んだものである。b: 対物レンズの直下にある蛍光物質は、落射照明によりすべてが励起されてしまい蛍光を放つが、対物レンズの焦点深度の範囲内にある蛍光輝点は結像面で点に戻り結像する（赤）。焦点深度の範囲外に存在する輝点は結像面で広がり結像せず（青）、ボケとして画像に写り込む。

光ショットノイズ：光子数をカウントする際の統計的変動によって生じるランダムノイズで、フォトンノイズ、フォトンショットノイズなどともいう^{注2}。非常に暗く光子数が極度に少ない場合に目立つが、シグナルが明るく光子数が十分に多ければまったく問題にならない。しかし、蛍光ライブセルイメージングでは露光時間を極短時間に押さえる必要があり、シグナルが微弱でショットノイズの分布域内に埋没してしまう問題が生じやすい。光ショットノイズは背景の暗黒部にランダムに乗るが、シグナルは蛍光標識分子が存在する座標に必ず検出されるので、同じ視野を複数回撮影し画像演算で平均化画像をつくれればかなり軽減できる。しかし、ライブセルイメージングでは同じ視野を複数回撮像するのは困難である。撮像後の画像処理で、光ショットノイズに埋没した微弱なシグナルを識別抽出するのは困難で、蛍光強度が極めて微弱な場合は、無理に撮像してもデータとして利用できないことも多い。露光時間や励起光強度、ピクセルビンニングなどの撮像条件を調整してシグナル量を増やし、シグナル分布域が光ショットノイズの分布域に埋没しない

ように注意する。

光源ノイズ：高圧水銀ランプなど励起光源の光強度の揺らぎやちらつきに起因するノイズである。高圧水銀ランプの場合、新しいものでもミリ秒から秒単位のオーダーで数%程度の揺らぎが発生する。これはタイムラプス撮影や3次元撮影の場合に、一連の画像セット間での照射ムラの原因となる。特に、老朽化したランプでは10%以上の揺らぎが発生し、ちらつきとして問題が顕在化する。ヒストグラム補正で各画像のシグナル分布域とバックグランドレベルをそろえることで問題を解決できるが、かなり手間のかかる作業である。共焦点レーザー顕微鏡で使うレーザーも、出力光強度に揺らぎがありこれは画像に乗るランダムノイズの原因になり得るが、最近のシステムは出力が安定しており大きな問題になっていない。初期のガスレーザーを使う古いシステムでは、各画素ごとに数%もの照射ムラを生じることがあり問題だったが、技術革新によりほぼ解決されたと考えてよいだろう。通常の蛍光顕微鏡システムでも、高輝度LED照明や長寿命安定化アークランプなど技術革新が進行しているので、問題は解決されつつある^{注3}。

測定器ノイズ：CCDカメラや光電子増倍管（photomultiplier tube：PMT）などの撮像素子に起因するノイズで、いろいろあるが、蛍光バイオイメージングで問題になるのは暗電流ショットノイズである^{注4}。光電子増倍管で印加電圧を上げた場合や、EM-CCD（electron multiplying CCD）で増幅率を上げ増感した場合に発生する。注2に述べたように蛍光バイオイメージングで使う撮像素子は、金属板に光子が当たると電子が放出される光電効果現象を利用しており、この放出電子数を出力電圧として測定することで光量を計測する（図3）。このため、電子数を増幅することで大幅に感度を高めることができる。光電子増倍管の場合、金属面にかける電圧を高めることで放出電子数が増え増感できるが、光と無関係に不連続的な電子の漏出が発生しノイズが画像にランダムに乗ってしまう。これは暗黒下でも生じるランダムノイズで、暗電流ショットノイズという。EM-CCDの場合は、出力レジスタと呼ばれる信号出力部に電圧をかけることで、出力電子数を増幅する。これにより通常のCCDに比べて感度を数十～数千倍に高められるが、光電子増倍管と同様に暗電流ショットノイズが生じる。これらの撮像素子では、微弱な蛍光シグナルを撮像する場合に、電圧を下げ感度を落とすと光ショットノイズがノイズの主要成分になり、電圧を上げ感度を高めると暗電流ショットノイズがノイズの主要成分になる（EM-CCDも、増感により光ショットノイズの分布域がひろがるので注意）。背景部の輝度ムラである光ショットノイズと違い、暗電流ショットノイズは、シグナル部を含む画像全体にランダムに加算される強い砂粒状のノイズとして出現する。漏れ出た電子数が僅かであっても、その後の増幅系で大幅に増幅されてしまうため、強いノイズになるのである。時間平均化像をつくることで軽減・除去できるが、ノイズが気にならない程度にまで電圧を下げるのが最も効果的である。また、平滑化処理などの画像処理でも効率よく除去できるが、空間分解能の低下を伴う。なお、増感機能のない通常の冷却CCDでは、暗電流ショットノイズは発生しない。

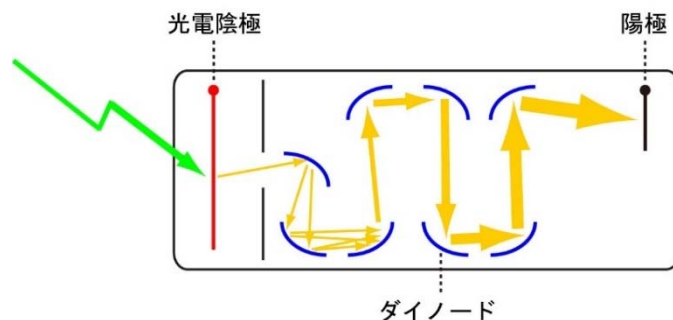


図3. 光電子増倍管のしくみ。金属板に光子が当たると電子が飛び出す光電効果を利用した超高感度の測光装置である。金属板に電子を帯電させておくことで効率よく電子を飛び出させることができ、このため光電子増倍管の光検出部には、光電陰極という帯電させたアルカリ金属の薄板を用いる。光電陰極に光子が当たると電子が飛び出し、叩き出された電子はダイノードと呼ばれる二次電極に向かう。ダイノードは電位が光電陰極より低くなっているがやはり帯電しており、ダイノードに電子が当たると数倍量の電子が飛び出す。ダイノードからはじき出された電子はさらに電位の低い次のダイノードに飛び同様に数倍量の電子をはじき出す。1つの光電子増倍管には10個程度のダイノードを装備しており、光電陰極から叩き出された電子が10～100万倍程度に増幅されて陽極に蓄積する（図中の矢印は電子の流れを示す）。例えば、ダイノードごとに電子が4倍量に増えると、ダイノード10個で電子量が約100万倍になる。光電子増倍管の感度は、光電陰極の帯電量すなわち光電陰極にかかる印加電圧（HV）によって調整することができる。

注 2：光電子増倍管などの顕微鏡画像を撮像する撮像素子はすべて、光子の衝突により金属や半導体が電子を放出する光電効果（CCD では特に光起電力効果という）を利用して光量を計測する（図 3）。放出する電子数は基本的に衝突する光子数に比例するが、光子の衝突回数が少ない場合は放出電子数に統計的な誤差を多く含んでしまう。これはコインを投げて表が出る割合が、投げる回数を十分に多くすると 1/2 に収束するが、回数が少ないと大きくバラつくのと同じである。撮像素子の場合、金属板に光子が 1 つ当たったときに電子が飛び出す確率が一定だったとしても、光子が当たる回数が少ないときは飛び出す電子数が大きくバラつき、光子数が増えると一定の値に収束する。なお、光電子増倍管では、HV で電子が飛び出る確率が変わり、感度を調整できる。つまり、暗く露光時間内に衝突する光子数が少ないときは放出電子数のばらつきが大きくなるが、明るく光子数が多いときは統計的誤差が解消され、測定値の直線性が確保できるのである。この放出電子数のばらつきは画素輝度値のばらつきとして現れ、これを光ショットノイズという。蛍光シグナル強度が十分に強い場合は、暗黒部での画素輝度値のばらつきは目立たず問題にならないが、シグナルが微弱な場合は画質を損なう主原因として問題になる。

注 3：蛍光顕微鏡用に最近普及し始めている高輝度 LED は輝度ゆらぎが 0.5～2% に抑えられており、10,000 時間以上の長寿命で点灯回数に制限がなくゆらぎの増大がほとんどないため、蛍光バイオイメージング用の光源として優れている。100,000 時間の使用で 70% の輝度が保証されている製品もある。LED の輝度ゆらぎは電源のふらつきが主原因なので、電源を安定化することで抑制できる。一方、高圧水銀ランプなどの蛍光顕微鏡用アークランプは、明るい、ゆらぎ問題に加えて寿命が 200～500 時間程度と短く、点灯回数が 100 回程度に限られており使いにくい。高圧水銀ランプのゆらぎ・ふらつきは、熱や電磁場の影響によるもので、安定化電源を用いても大きく改善されない。点灯後 20 分間程度はランプ温度が安定せず出力が安定しない。また老朽化にともない出力が落ち、寿命までに 70% 程度に輝度が落ちる。なお、高価だが長寿命でゆらぎの少ないアークランプ（キセノンランプ）も開発されており、寿命が 10,000 時間以上でゆらぎを 1% 以内に抑えた最高性能を追求した製品もある。

注 4：デジカメなどでよく耳にする暗電流とは違うので注意すること。暗電流とは CCD や CMOS 撮像素子に常時生じる漏れ電流のことで、これにより個々の撮像素子に固定パターンノイズが発生する。CCD などの撮像素子では、構成画素のひとつひとつが一種のコンデンサーになっており、定格の動作電圧をかけると一定の電流が漏出し、これを暗電流という。暗電流は熱電子に起因し、環境温度と時間の影響を受けるが、光量は関連しない。なお光電子増倍管などと違い、動作電圧を変えることによる感度の調整はできない。各画素ごとに製造時の微妙なムラを含むため、漏れ電流の量が画素ごとに僅かに異なり、撮影画像に常に乗る固定パターンノイズが生じる。このパターンを利用すれば、写真からデジカメを特定することも可能で、犯罪捜査などで活用されている。なお、素子を冷却することで暗電流をほぼゼロに抑えることが可能で、蛍光バイオイメージング用の冷却 CCD では、製造ムラがほとんどない最高級素子を使い、それを高精度に冷却制御することで、暗電流パターンノイズの問題を解決している。

Ⅲ. 顕微鏡像がボケるわけ：ボケを除去する 5 つの方法

高倍率の対物レンズで蛍光染色した培養細胞を観察すると像がボケる。一方、低倍率の対物レンズを使うとボケが少なく、細胞全体がシャープに見える。これらの現象は、ボケと対物レンズの開口数に強い相関があるため生じる。つまり、開口数によって合焦する範囲すなわち焦点深度が決まり、その範囲外にある構造をボカしてしまうのである。開口数が多いほど焦点深度が浅く、狭い範囲の構造にしかピントが合わない。一般的に高倍率の対物レンズほど開口数が多いが、倍率とボケが直接関連するわけではい。次式に示すように焦点深度 d は開口数 NA の 2 乗に反比例する（図 4）。

つまり、 $NA=1.4$ の最高級の対物レンズでは 280 nm の厚み幅にしか合焦しないのに、 $NA=0.5$ のレンズでは 2.2 μm の厚み幅に、 $NA=0.1$ では 55 μm もの厚み幅に合焦するのである（波長が 550 nm の緑色光を観測した場合）。ボケは対物レンズの合焦範囲以外に存在する輝点が滲んで見えるもので（図 2）、対物レンズの合焦範囲が広がれば相対的にボケが生じにくい。丈が 9 μm 程度の培養細胞であれば、開口数が 0.25 の対物レンズで細胞全体を合焦範囲内に納めることができ、ボケのない撮像が可能となる。しかし、合焦範囲が厚いということは、小さい輝点を 3 次元観察すると光軸方向に大きく引き延ばしてしまうことになる（デコンボリューションの節で詳述する。図 8c 参照）。しかも注 1 に示した

ように、開口数は顕微鏡像の解像度にも大きく影響し、開口数 0.25 の対物レンズの分解能は $1.34\ \mu\text{m}$ である。これでは細胞内構造との関連や分子の共局在の研究には使えない。開口数はまた、明るさにも大きく影響し、極めて暗い標本を観察する蛍光顕微鏡の場合、基本的に開口数の大きい明るい対物レンズが望ましい^{注5}。また、蛍光バイオイメージングでは細胞内構造との関連性や分子の共局在を研究対象にすることが多く、分解能に対するニーズも大きい。このためボケがあっても、明るく分解能が高い開口数の大きい対物レンズが好んで使われるのである。

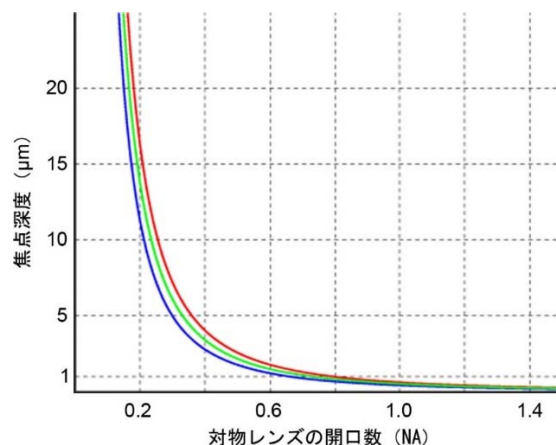


図 4. 対物レンズの開口数と焦点深度の関係。焦点深度は顕微鏡観察時にピントが合う厚み幅のことで、対物レンズの開口数の 2 乗に反比例する。線の色はそれぞれ、赤色蛍光 (650 nm)、緑色蛍光 (550 nm)、青色蛍光 (450 nm) を観察した際の対物レンズ開口数と焦点深度の関係を示す。 λ は観察光の波長

ボケは対物レンズの合焦範囲以外の輝点が原因なので、厚さ $0.5\sim 2\ \mu\text{m}$ 程度の準超薄切片をつくって合焦範囲外の輝点を取り除いてしまえば、ボケのない像を撮影することが可能である (図 2)。蛍光抗体染色法などで組織の準超薄切片を用いるのは、抗体の浸透性などの改善に加えて、ボケのない美しい像を撮影できるという意味で意義が大きい。しかし、細胞を生きたまま観察する蛍光ライブセルイメージングには使えない。

ボケを除去するための効果的な方法がいろいろと開発されており、共焦点レーザー顕微鏡はその代表例である。現在、1) 薄切片法、2) ピンホールを使う方法 (共焦点レーザー顕微鏡)、3) 多光子励起法 (多光子励起顕微鏡)、4) エバネッセント励起法 (全反射蛍光顕微鏡)、5) デコンボリューション法 (ボケ除去法、画像修復法) の 5 つの技法が、ボケのない顕微鏡画像取得に利用されている。

薄切片法：上に述べたように、対物レンズの焦点深度より薄い切片をつくることにより、ボケの原因をはじめから除外する。準超薄切片をさらに共焦点レーザー顕微鏡で観察している例を見ることがあるが、準超薄切片にするだけでボケが除去されるので、スペクトルイメージングによるアンミキシングを行う場合以外はあまり意味がない。

ピンホールを使う方法：いわゆる共焦点顕微鏡法のことで、光路にピンホールを設置し、対物レンズの焦点のみの輝度情報を取得する方法である。標本を 2 次的にスキャンすることでボケのない顕微鏡像を取得する (詳細は次節)。

多光子励起法：物質の多光子吸収過程という物理現象を利用した方法で、対物レンズの焦点のみで蛍光色素を励起する。多光子吸収過程とは、光子密度を極めて高くした場合に物質が 2 個またはそれ以上の光子を同時に吸収し、倍または数倍のエネルギーをもつ光 (すなわち $1/2$ 波長のあるいは $1/3\sim$ 波長の光) を吸収したときと同じ作用を示すことをいう。対物レンズの焦点のみでの励起なので、その蛍光を検出すれば、標本内の 1 座標点の輝度情報が得られる。共焦点レーザー顕微鏡と同様に焦点面全体を 2 次的にスキャンすれば、ボケのない蛍光顕微鏡像が得られる。光源には光子密度が著しく高い高出力パルスレーザーを用い、照射光が集約される対物レンズの焦点でのみ多光子吸収過程を惹起する。また、照射光には蛍光色素を直接励起しない長波長の光を用いる (最大吸収波長の 2 倍程度またはそれ以上)。パルスレーザーを用いるのは試料のダメージを避けるためで、透過性の高い長波長の照射光を使うため、深部組織の観察などに効果的である。

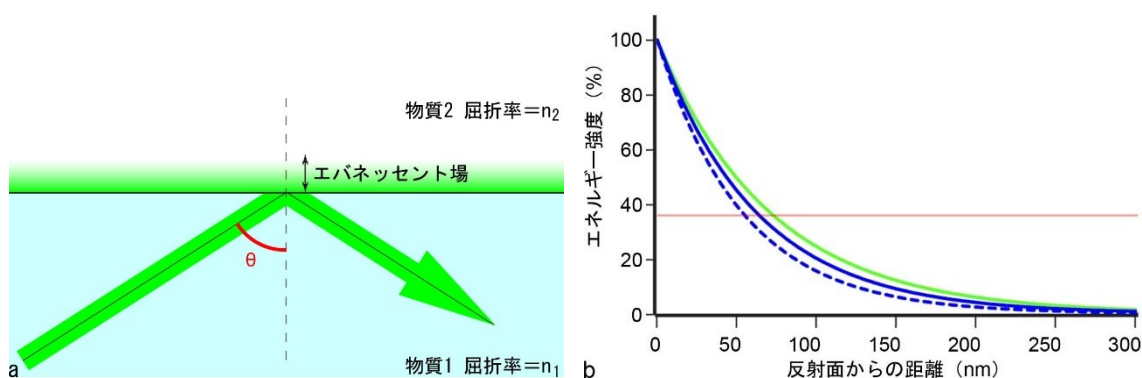


図 5. エバネッセント場. **a**: ガラスと水など、屈折率の違う物質の境界面を光が通過すると光は屈折する。この境界面に対して光の入射角が臨界角より大きくなると、境界面で光がすべて反射してしまい光は透過しなくなる。これを全反射という。全反射するとき光は物質 1 から物質 2 へ透過できないが、光エネルギーが作用しう領域が物質 2 側の反射面近傍に極薄く生じる。これをエバネッセント場という。エバネッセント場は電磁場の一種なので、場の領域内に光エネルギーを受ける物質がなければ、エネルギーの伝播は起こらず、光エネルギーは全て反射される。**b**: エバネッセント場のエネルギー伝播力は、反射面からの距離が離れると指数関数的に減衰する。青の実線は、入射角 75°の青色光 (488 nm : GFP 励起用など) の、青の破線は同じ青色光で入射角が 85°のときの、緑は緑色光 (555 nm : RFP 励起用など) で入射角 75°のエバネッセント場の強度を示す。エバネッセント場は、入射角が大きいほど薄く、照射光の波長が長いほど厚くなる。赤線は、エネルギー強度が 1/e すなわち 36.79%に減衰するラインを示す。

エバネッセント励起法: 試料を乗せたカバーガラス (またはスライドガラス) に全反射角度で励起光を入射し、ガラス表面に生じるエバネッセント場の領域内にある試料のみを励起する方法で、全反射顕微鏡法ともいう。エバネッセント場とは、屈折率の異なる 2 つの媒質の境界面で光が全反射するとき、反射面反対面の極近傍に浸透する電磁場をいう^{注 6} (図 5)。可視光域の励起光を用いた場合、ガラス表面から 200 nm 程度までの極めて薄い範囲を励起することができる。準超薄切片法と同様に、対物レンズの合焦範囲の外側に輝点がないのでボケが生じない。ただし、ガラス表面に接した試料しか観察できないので、1 分子生命科学など用途は限られる。

デコンボリューション法: 数学的アルゴリズムを用いた画像処理により、3 次元蛍光顕微鏡画像セットからボケ成分を計算し元画像から除去する方法で、標本内の輝点分布を高精度に再現できる (詳細は後述)。上に挙げた他の手法はすべて、ボケを邪魔なノイズとして切り捨てる技術であるのに対し、デコンボリューション法はボケノイズを真の輝度分布算出のために活用する。標本の真の輝度分布を出力するので、シグナル量の定量などにも有効である。

注 5: 明視野観察と違い蛍光観察の場合は対物レンズを通して試料を照明するので、コンデンサで開口を調整することはできない。一部の対物レンズには、コントラストや明るさ調整の目的で開口絞り環がついている。これを絞ることで、暗くなり解像度が低下するが、コントラストを改善し焦点深度を深くすることができる。

注 6: 図 5 に示すように、エバネッセント場は反射面の対側表面に薄くまとわりついた電磁場の一種で、入射光と同じ波長特性 (周波数特性) を持つが、光としては伝播しない。電線の周囲に生じる電磁場と同じで、その場の空間内に反応する物質がなければエネルギーのロスはない。つまり、エバネッセント場の領域内に光を散乱したり吸収したりする物質がなければ、光エネルギーはロスせず全て反射されてしまう。エバネッセント場の中に光に反応する物質があるときのみに、散乱や吸収が起こりエネルギーが伝播するのである。このとき蛍光物質であれば、励起され蛍光を放つ。エバネッセント場の厚みは、作用しうエネルギー量が 1/e すなわち約 37%に減衰する距離 d で代表され、次の式で計算できる³⁾。

$$d = \frac{\lambda}{4\pi(n_1^2 \times \sin^2 \theta - n_2^2)^{1/2}}$$

このとき、 λ は励起光の波長、 n_1 はガラスの屈折率 ($=1.51 \sim 1.52$)、 n_2 は試料を含む媒質 (通常は

水)の屈折率(水の場合 1.33), θ は励起光の入射角度を示す. $n_1=1.52$, $n_2=1.33$, 入射角度 $=75^\circ$ とすると, $d=0.128\lambda$ となり, 励起光に可視光域の $400\sim700\text{ nm}$ の波長を用いると $51\sim90\text{ nm}$ となる. また, エバネッセント場の強さ $I_{(z)}$ は次の式で示され, 反射面からの距離 z が大きくなるにつれ指数関数的に減衰する (図 5b).

$$I_{(z)} = I_{(0)} e^{-z/d}$$

$I_{(0)}$ は全反射面でのエネルギー強度すなわち入射光自体の光強度を示す. パイオイメージングでは, 励起エネルギーが $1/e^2$ (約 13.5%) に減衰する d の 2 倍値を, エバネッセント場の有効厚み幅とすることが多い.

Ⅲ. 共焦点レーザー顕微鏡法: ピンホールでボケを遮る

共焦点レーザー顕微鏡は, 対物レンズの焦点に位置する一つの輝点からの光が対物レンズ通過後に一つの点に収束する位置すなわち結像面に小さいピンホールを置き, その輝点のみを観察できるように工夫した蛍光顕微鏡である (図 6). 別の場所に位置する輝点からの光は, ピンホールに遮られてしまい, 光検出器に到達できない. これによって, 対物レンズの焦点面にある 1 つの点座標の輝度の選択的な測定が可能になる. 対物レンズの焦点とピンホールの 2 つの点が光学的に共役していることから共焦点顕微鏡という.

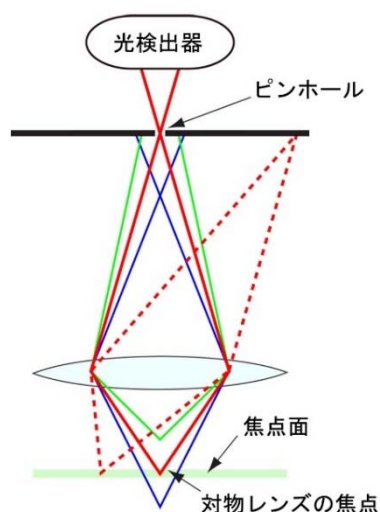


図 6. 共焦点顕微鏡のしくみ. 共焦点顕微鏡は, 対物レンズの焦点からの光が点に戻る位置すなわち結像面にピンホールを置き, 1 つの焦点以外からの光成分をカットする. その焦点にある輝点からの光は 100% ピンホールを通過し光検出器に到達するが (赤実線), それ以外からの光はピンホールによって遮られてしまい光検出器に到達しない (青および緑線). 焦点面の他の場所にある輝点からの光は, ピンホールのある結像面で点に戻るが, そこにピンホールがないため光検出器に届かない (赤点線).

これだけでは試料内の 1 点のみの光情報を測定するだけだが, ステージを動かすなどして試料全体を走査すれば, 試料全体の 3 次元輝度分布情報を集めたデジタル画像を得ることができる⁷⁾. しかし生体試料を載せたステージを高精度かつ高速度に動かすのは難しく, 多くの共焦点顕微鏡では, 照明系と検出系の共通光路に 2 枚の鏡を組み込み, それを高速度に反復運動させることによって, 対物レンズの焦点面全域を効率よく走査している (図 7). また, ピンホールの位置を動かすことで標本を走査することも可能で, 多数のピンホールを開けたディスク (ニポウ円盤; Nipkow disk) を回転させることで極めて高速度に焦点面全域を走査するシステムも存在する¹⁾. 前者は, 1 つの点で標本を走査することから, 走査型共焦点レーザー顕微鏡 (confocal laser scanning microscope, CLSM) と呼ばれる. 後者は, ニポウ盤型共焦点顕微鏡, あるいは同時に多数のレーザービームで試料を走査することからマルチビーム式共焦点顕微鏡などと呼ばれる¹⁾. これらの共焦点顕微鏡で得られる画像は, 焦点以外の輝点からの光をカットしボケ成分をほとんど含まな

いことから、共焦点像（confocal image）とか光学的断層像（optical section）と呼ばれる。標本を z 軸方向に動かしながら、光学的断層像を連続的に撮影することで、試料全体の 3 次元輝度分布情報を得ることができ、蛍光標識分子が組織細胞内で立体的にどのように分布しているか解析できるようになった。

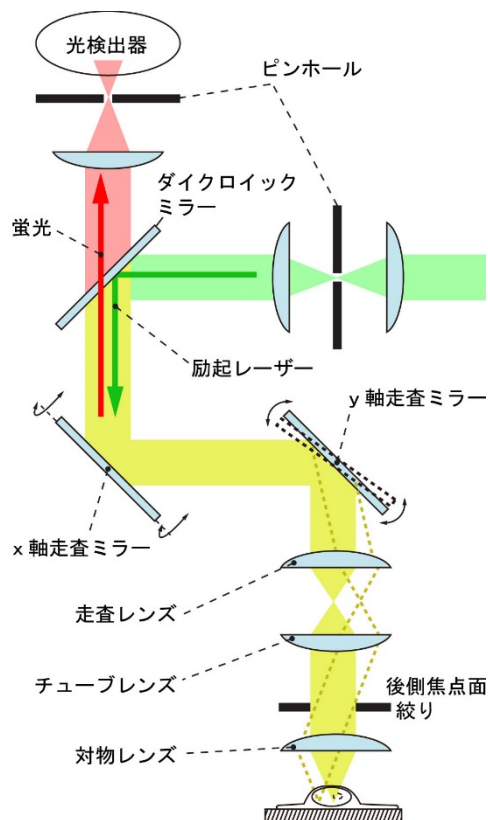


図 7. 走査型共焦点レーザー顕微鏡の走査システム. 光路に組み込んだ 2 枚の鏡を高速度で反復振動させ、焦点面の x y 平面座標の各点の光情報を逐次取得する。以前は走査速度に難があったが、技術革新によりライブセルイメージングにも対応できる速度になってきている。

この 2 つのタイプの共焦点顕微鏡は画像の取得方法が大きく異なり、ニポウ盤型共焦点顕微鏡は冷却 CCD カメラに撮像に用いる。この場合、イメージの標本化と量子化^{注 7}の両方を CCD カメラで行うので、解像度はカメラの画素数とピクセルビンニングによって決まり、各画素の光強度分解能は標本の明るさに加えカメラの感度と露光時間に左右される。このあたりは CCD カメラを備えた通常の蛍光顕微鏡と同じである。一方、走査型共焦点レーザー顕微鏡は、光電子増倍管を使って試料内の各座標点の輝度を 1 つずつ順次決定し画像を構築する。解像度は走査間隔によって決まり、光強度分解能は光電子増倍管の感度と走査速度に左右される。

注 7: デジタル画像は輝度情報を持った画素の集合である。デジタル画像を得る際に、画像を画素の集合体として小区画に分割することを標本化（sampling）といい、画像の空間分解能を規定する。CCD カメラではカメラの画素数で規定され、走査型共焦点顕微鏡ではサンプリング周波数によって規定される。一方、画素ごとの輝度情報を数値化することを量子化（quantization）という。一般的に各画素の輝度を 8 から 16 ビット（256～65536 階調）で量子化する。標本化と量子化を合わせてデジタル化という。

IV. デコンボリューション顕微鏡法：ボケを情報として利用する

先に述べたように、ボケは、試料内のシグナル分布パターンを反映したノイズなので、真のシグナル輝度分布パターンを算出するための手掛かりとして利用することができる^{2, 4~6}。撮像した画像の輝度分布は、試料の真の輝度分布が

顕微鏡光学系を通過したためにボケたものである。デコンボリューション顕微鏡法は、顕微鏡光学系がどのように像をボカすかの情報を使って、コンピュータ画像処理により撮像した画像データすなわちデジタル画像から真の輝度分布を計算で導き出すのである。デコンボリューション法を完全に理解するには顕微鏡画像の数学的表現を学ぶ必要があるが、ここでは文章のみで概略を解説する。

標本内のある座標点の輝度を蛍光顕微鏡で観察した場合、その座標点自体の輝度に周囲の輝点から混入した光を合算した値が計測される。例えば、ある座標点の近傍にとても明るい輝点がある場合、その輝点から漏れ出た光の影響を受けてしまい、座標点の真の輝度値から大きくずれた計測値を得てしまう。この計測値に混入する光の量は、観察座標点とボケ輝点間の距離と方向、およびボケ輝点の輝度によって決まる。つまり、ボケ輝点が観察座標点に近いほど、あるいはボケ輝点の明るいほど混入光量が大きくなる。このため、標本の 3 次元座標空間内のある座標点を顕微鏡観察すると、その座標点の真の輝度値に加え、標本内のあらゆる座標点からの混入光量を加算した値が計測されることになる。ちなみに、ある座標点の測定値に他の座標点からの影響が加算されることを数学的に「畳み込み (convolution)」といい、畳み込まれた成分を除去し真の値を算出することを「逆畳み (deconvolution)」という。

つぎに、ある輝点からの光が周囲の座標点にどの程度影響するかを考えてみる。その輝点の輝度値を 100%とした場合、すぐ近傍には 30%相当とか 40%相当など大量の光がボケとして写り混んでしまう座標点があるだろう。もう少し離れた座標点では写り混む光量がぐっと減り数%程度になる。このように、ある輝点からの光が周囲の座標点にどの程度写り混むかを 3 次元的にプロットしたものを 3 次元点像分布関数 (3-dimensional point spread function; 3D-PSF または単に PSF) という (図 8)。PSF は、直径が光学分解能以下の小さい蛍光ビーズを 1 個だけ焦点面をずらしながら 3 次元的に撮像して、1 つの輝点からの光が周囲の座標点にどの程度写り込むかを計測することで得られる (実測 PSF)。PSF はまた、開口数や屈折率、蛍光波長など顕微鏡光学系のパラメータから算出することも可能で、これは論理的 PSF という。PSF を用いると、試料内の各輝点からの光が、どのようにボケ拡がって像に写り込むかを計算できるようになる。この計算したボケ成分を撮影した顕微鏡画像から差し引いて除去すれば、標本自体の輝度分布情報を高精度に再現することができる。これを、デコンボリューション顕微鏡法という。

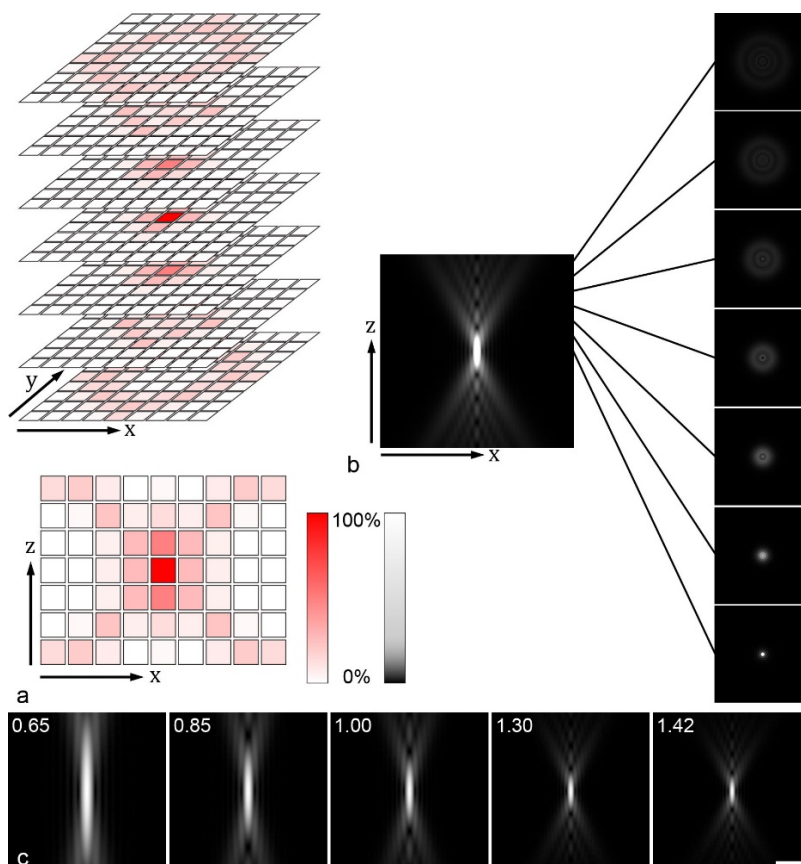


図 9. 点像分布関数 : PSF (Point Spread Function). a : PSF の模式図。PSF は、1 つの輝点周囲の座標点にどの程度影響するかを 3 次元座標にプロットしたもので、標本の 3 次元空間において中心の 1 座標点にのみ

に輝点が存在し、それ以外の座標に輝点がまったく存在しない場合に各座標の輝度がどのように観測されるのかを示す。図では、中央のピクセルが輝度 100%の輝点で、周辺部の座標への影響の度合いを色の濃さで示している。図では xy 方向に 9 画素、z 軸方向に 7 画素しか描いていないが、実際には、xy 方向に数百画素、z 方向に数十～百数十画素からなる巨大な 3 次元空間座標系でのプロットになる。理想的には、輝点がある座標のみで真の輝度値を測定し、輝点がない座標点では輝度値ゼロと撮像できるのが望ましいが、レンズを通して観察した場合、必ず 3 次元的な輝点の滲みが発生する。これは光が波の性質を持つためで、標本の真の輝度分布をレンズを通して計測することはできない。b: 論理的 PSF の例。画像処理ソフトウェア ImageJ の PSF generator プラグインを用いて算出した。算出に用いた光学パラメーターは、NA=1.4、油浸オイルの屈折率=1.51、標本浸漬液の屈折率=1.33 (H₂O)、動作距離=150 μ m、蛍光波長=509 nm (GFP) である。印刷でボケの広がり具合を認識しやすいよう γ 補正をしているので注意 (下のグレースケールを参照するとよい)。c: 対物レンズの開口数の違いによる PSF の変化。ボケの広がり具合の違いに注意。上の数値は開口数を示し、パネルは xz 平面ですべて同じスケールで示す。バー=2.5 μ m。直径がゼロからナイキスト数 (分解能の半値幅) までの輝点を顕微鏡で見ると、このパネルのように観察されるということで、開口数の低い対物レンズは輝点を拡大し特に z 方向に大きく引き延ばしてしまうのに対し、開口数の高い対物レンズは像の拡大が小さく抑えられており比較的コンパクトな点像を出力する。

デコンボリューション顕微鏡法は使用するアルゴリズムの違いで、ボケ除去法 (deblurring) と画像修復法 (image restoration) の 2 つに大きく分けることができる。ボケ除去法は焦点面をずらして 3 枚の画像を撮影し、上下 2 枚の画像から中央の画像に写り込むボケ成分をそれぞれ計算し、それらを中央の画像から差し引くだけの局所的な簡略法 (local operation) である。これに対し、画像修復法は 3 次元画像セット全体を使って PSF を元に標本の真の 3 次元輝度分布を高精度に追求する手法 (global operation) である。画像修復法はさらに、逆フィルター法 (inverse filtering) と漸近法 (constrained iterative deconvolution) に分けることができる。デコンボリューション顕微鏡法では、主にボケ除去法と漸近法が利用されている。

ボケ除去法: 隣接画面からのボケ成分を目的の画像から減算する手法である。ニアレストネイバー法に代表されるが、変法としてノーネイバー法がある。ニアレストネイバー法は、ある画像に写し込まれたボケが上下の隣接画像に由来すると仮定し、どの程度のボケが隣接画像に写し込まれるかを PSF を用いて計算し、それを目的の画像から減算することによって行われる。計算が速くアーティファクトがない。S/N 比の低い画像や、標本化レベルの低い粗い画像に適用しても十分な効果が得られるのが最大の特徴である。蛍光ライブセルイメージングでは十分なシグナル強度が得られない場合が多く、ピクセルビニングや広い Z スパンでの撮影が余儀なくされるが、このような場合にも十分な効果が期待できるのがニアレストネイバー法である。ノーネイバー法はニアレストネイバー法を簡略化した手法で、目的の画像自体を仮の隣接画像と見なしてボケを除去する。3 次元撮像の必要がなく、2 次元タイムラプスムービーなどの鮮鋭化に有効である。

画像修復法: 厚みのある標本ではボケノイズ成分が多すぎて処理しきれず格子模様状のアーティファクトを出力してしまうことがあるが、細胞が数層程度までの培養細胞の観察では、極めて高精度の結果を出力する。3 次元顕微鏡画像セットを準備し、その観察像自体を仮に標本の輝度分布そのものと見なした場合、どのような 3 次元画像が観察されるかを PSF を用いて算出する。これはつまり観察像をさらにボカした像である。この 2 重にボカした像から元の観察像を差し引いてボケ成分を算出する。このボケ成分を元の観察像から減算し、これを標本の輝度分布 (標本輝度分布推定値) と見なし、再度 PSF を畳み込ませてボカし像を算出する。続いて、そのボカし像と元の観察像との差分を取り、これを標本輝度分布推定値から差し引き、これを次の標本の輝度分布とする。標本の輝度分布推定結果にボケ成分が残存している間は、PSF でボカした像と元の観察像が一致することではなく差分が生じるので、それをその推定結果から減算し次の推定値にする。PSF でボカした像と元の観察像の差がゼロになるまで、計算サイクルを回し輝度分布推定値のアップデートを繰り返す。PSF をでボカした像が元の観察像に完全に一致したら、すなわち差分がゼロになったら、その直前の輝度推定画像セットを最終結果として出力する。この最終結果は、顕微鏡光学系の PSF でボカすと撮像結果とまったく同じ画像になるので、これを標本の真の輝度分布と見なすことができるのである^{2, 4~6}。

漸近法の改良法として、ノイズを除去する統計的手法を漸近法の計算サイクルに組み込んだ MLE デコンボリューション (MLE: Maximum Likelihood Estimation=最尤法) や、計算サイクルの過程で PSF 自体もアップデートするブラインドデコンボリューション法などがある。MLE デコンボリューションはノイズ除去効果が高く、S/N 比のあまりよくない画像や、標本に厚みがあってボケを大量に含む画像でも利用できる。ブラインドデコンボリューション法は、対物レンズ製造時の個体差までも補正した高精度な画像復元を可能にする。

漸近法は、ボケ除去法と違って元画像に要求する条件が厳しく、使用する対物レンズの分解能以下の細かさでサンプリングした高精細 3 次元顕微鏡画像セットを必要とする。画素サイズがレンズの解像度より大きいと、ボケの広がり具合を実際より大きく計算してしまい、出力精度が下がるからである。もちろん、Z 軸方向のアンダーサンプリングも許されないで、対物レンズの焦点深度以下の細かい Z スパンでの 3 次元撮影が要求される。このため、固定染色した培養細胞標本を高精度にボリュームレンダリングする場合などでは漸近法は絶大な威力を発揮するが、ライブセルイメージングでこの撮影条件を満たすのは極めて困難である。ライブセルイメージングの場合は、十分な効果が得られ且つ撮影条件がゆるいニアレストネイバー法が適している。図 9 に示すように、共焦点レーザー顕微鏡と比べても漸近法が理論的にポテンシャルが高いことがわかる。ただし、実際にはさまざまなノイズが邪魔をするため共焦点顕微鏡を超える像を得るのは難しい。手間がかかるが、ボケノイズを共焦点顕微鏡で大まかに除去した上で漸近法によるデコンボリューション処理を加えることで共焦点顕微鏡の限界を超えた高品質な像を得ることができる。

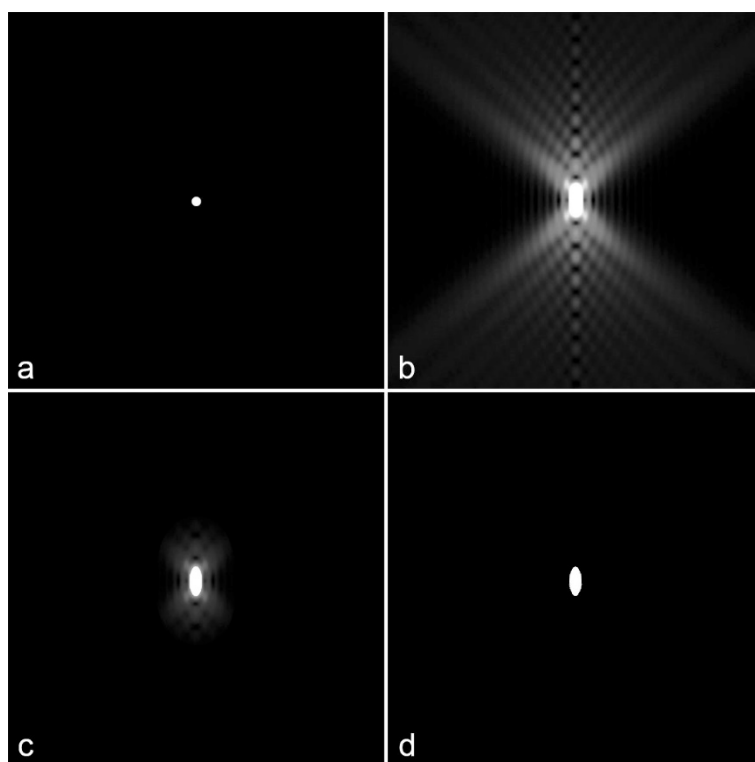


図 9 共焦点顕微鏡象とデコンボリューション顕微鏡象の違い。a: 対物レンズ分解能の半分の直径の輝点を xz 座標平面上にプロットした。b: a の輝点を通常の蛍光顕微鏡で観察した場合の xz 平面像。対物レンズの PSF が得られる。c: a の輝点を共焦点レーザー顕微鏡で観察した場合の xz 平面像。対物レンズの焦点に相当する楕円体の輝点が観察され、その周囲を僅かなボケ成分が取り囲む。d: b の蛍光顕微鏡像を漸近法によりデコンボリューションした xz 平面像。サンプリングが十分に細かければ、対物レンズの分解能に相当する楕円体の輝点を得られる。理論的には、漸近法のポテンシャルは共焦点顕微鏡法より高い。ニアレストネイバー法の場合は、c の共焦点像に準じる象が得られる。(注意: 写真はすべてモードでシミュレーションではない。文献 7 で実際に撮像した xz 像を比較している)

V. 光電子増倍管を使いこなす

共焦点レーザー顕微鏡で高品質な画像データを得るには、光電子増倍管の基本的パラメーターについてよく理解しておく必要がある¹⁾。特に重要なパラメーターは、印加電圧、ゲイン、オフセット、時間フィルタリングの 4 つである。

光電子増倍管の印加電圧: 光電子増倍管 (PMT) の光陰極極にかかる電圧のことで通常 HV (high voltage) という。これを調整することで感度を調整できるが、HV を上げて感度をアップさせると明暗に関係なく電子が不連続的にこぼ

れ出てしまい、それが増幅されて強いノイズを発生させてしまう（暗電流ショットノイズ）。電圧を下げればノイズを軽減できるが感度も下がる。蛍光観察は基本的に高感度である必要があるが、ノイズとのバランスを見て電圧の上げ過ぎに注意する。通常、定格電圧の 70% 程度を上限にするとよい。定格電圧は設定できる最大電圧のことで、最大 1000V の PMT の場合は 700V 程度を上限とする。

ゲイン：蛍光観察では光電子増倍管の出力電圧が微弱で極めて狭い範囲内に収まってしまうことが多く、各画素の輝度値に僅かな階調差しか生じないことが多い。このため、光強度分解能が極端に悪くなってしまう。この場合、出力電圧をアンプ回路で増幅すると、輝度の分布域が広がり階調差が拡大しコントラストが改善する。通常、1（増幅なし）～数倍程度にまで増幅する。ただし、光ショットノイズの輝度分布域もそのまま広げてしまうので、蛍光シグナルが微弱な場合に感度増強効果を期待して使うのは誤りである。

オフセット：光電子増倍管の出力電圧値に加減する値を示し、出力画像の明るさ調整に使われる。取得画像の最低輝度値がゼロに近づくように出力電圧値から一定の値を減じ、さらにゲインで最大輝度値が飽和値の少し下になる程度に増幅すれば、シグナル分布域をシステムのダイナミックレンジいっぱい押し広げることができる。つまり、ゲインとオフセットを併用することで、コンピューター画像処理でいうヒストグラム補正に相当する調整が可能になるのである⁶⁾。この場合、オフセットが「明るさ調整」でゲインが「コントラスト調整」に相当する。量子化前の調整なので、ヒストグラムが飛び飛びになることなくダイナミックレンジをフルに活用でき、後の画像解析の精度を高めることができる。

時間フィルタリング：同じ試料を繰り返し何度も走査し、各画素ごとの輝度値の平均値や中央値を出力する撮像時実行タイプの画像処理フィルターである。画像に乗るランダムノイズの低減効果が高く、特に暗電流ショットノイズの除去効果が顕著である。コンピューター画像処理では、単純平均フィルターやメディアンフィルターなどの空間平滑化フィルターがノイズ除去に利用されるが、複数画素分の情報を 1 つの画素にたたみ込んでしまうため、像がボケるなど空間分解能の低下をとまってしまう⁶⁾。時間フィルタリングは、空間分解能を低下させずに、ノイズを除去する。共焦点顕微鏡の場合、時間フィルタリング用にカルマンフィルター (Kalman filtering) あるいはそれに類したデジタル画像処理フィルターを装備している製品が多い¹⁾。これは各画素ごとの輝度変動データを高度に統計処理して、真の輝度値を推定出力する画像処理フィルターであるが、スキャン回数が数回程度と少ない場合は単純時間平均フィルターとほぼ同じと考えてよい。いずれも完全に時間軸方向でのみの平滑化フィルターとして機能し、空間分解能をまったく低下させずにノイズを除去する。ただし同じ試料を何度も走査する必要があり、空間分解能の代わりに時間分解能が犠牲になる。数回のスキャン回数で十分な効果が得られるので、退色防止などの観点からスキャン回数を 3～5 回程度に設定することが多い。

VI. 解像度を犠牲にして感度を稼ぐ

蛍光バイオイメージングでは S/N 比が高い画像がよいデータとされる。S/N 比が高いとはノイズに比べてシグナル量が多い画像ということで、撮像時にいかにシグナル量を確保するかが重要になってくる。シグナル量を増やすには、計測時間を長くするか CCD カメラなどの測光スポットの大きさ（受光面積）を大きくすればよいが、前者の場合は時間分解能が犠牲になり後者の場合は空間分解能が犠牲になる。ライブセルイメージングでは蛍光退色と光毒性の影響や細胞や分子の動きによるブレを最小限に抑える必要があり、時間分解能を犠牲にしてシグナル量を確保することが難しい。励起光強度を強めても蛍光発光量を増やせるが、蛍光退色と光毒性の影響も大きくなる。このように、蛍光ライブセルイメージングでは露光時間、励起光強度、蛍光退色、光毒性のバランスをとるのが非常に難しい。

このような場合は、光電子増倍管や CCD カメラなど撮像装置の感度を高めることで撮像データの S/N 比を高めることができる。CCD カメラの場合は、最初からなるべく高感度の冷却 CCD カメラを準備するのが望ましいが、カメラを交換せずに CCD の感度を高める方法が 1 つある。ピクセルビニング (pixel binning) という技術で、2×2 あるいは 4×4 などの正方隣接する複数個の画素を一つの画素として扱うことで、1 画素当たりの受光面積を広げ感度を稼ぐ。複数個の画素に蓄積した電荷を足し合わせるため、2×2 では感度が単純に 4 倍になり、4×4 では 16 倍、8×8 では 64 倍もの感度になる。しかし当然ながら、画素面積の拡大にともなって画像の空間分解能が犠牲になる。走査型共焦点顕微鏡の場合は、ピンホール径を大きくすることで測光スポットを大きくし、それに合わせて走査画素数すなわち解像度を落とすことで感度を高めることができる¹⁾。微弱光観察の場合、空間分解能を必要最低限に抑えることによって、できるだけ S/N 比の高い画像を得ることがとても重要である。

また先に紹介したように、EM-CCD では出力レジスタにかかる電圧を調整することで、光電子増倍管では印加電圧を調整することで高感度化できる。暗電流ショットノイズに注意する必要があるが、露光時間を短縮できるので高速度タ

イメージングや3次元ライブセルイメージングに効果的である。ただし、EM-CCDや光電子増倍管を使っている研究でも、イメージングシステムの検出限界に近い非常に厳しい条件で撮影しなければならないことが多く、この場合もピクセルビニングによる増感が有効である。

空間分解能が低くてもS/N比が高ければデータとして活用できるが、S/N比が低ければいくら空間分解能が高くてもデータとして信頼できない。蛍光バイオイメージングでは解像度より感度が大事で、目的の形態がぎりぎり確認できる程度にまで分解能を落としてでもシグナル量を確保した方が、中途半端に分解能が高いノイジーな画像より有益なのである。

VII. 共焦点とデコンボリューション：どちらを使う？

大学などで、最新鋭の走査型共焦点レーザー顕微鏡を共同利用機器として導入する例が増えており、ユーザー登録するだけで簡単に共焦点顕微鏡を使える環境が整いつつある。しかし、蛍光バイオイメージングでは、研究内容にあわせて顕微鏡インキュベータや培地交換システムなどのオプションを装着する必要がある、また長時間あるいは長期間にわたって機器を占有することも多く、できれば研究室単位で占有・カスタマイズできるシステムを備えるのが望ましい。この場合、共焦点レーザー顕微鏡は高価で新規参入を妨げる高いハードルになっている。この点、通常の蛍光顕微鏡システム（冷却CCDカメラ、撮像ソフトウェア込み）は、最も安価な共焦点レーザー顕微鏡の1/4程度で、デコンボリューション顕微鏡システムを導入できるので、検討してみるとよい。

この場合、自分の研究が共焦点レーザー顕微鏡とデコンボリューション顕微鏡法、あるいは通常の蛍光顕微鏡のどれを使うのがよいのかよく考える必要がある。末尾に付けた表1に各顕微鏡法の利点と欠点を示した。走査型共焦点レーザー顕微鏡はオールマイティで、どのような研究目的にも対応するが、導入費用が極めて高いのが欠点である。いくら高性能で多機能なシステムが共同利用機器として導入されていたとしても、利用者が研究目的に合わせてカスタマイズできないのであれば、その機能を最大限に活用できない。ただし、FRAP解析のように標本の特定領域のみを蛍光退色させるような実験や、各座標点の蛍光をスペクトル分析する研究など、走査型共焦点レーザー顕微鏡が不可欠な研究分野もある。

デコンボリューション顕微鏡法は、通常の蛍光顕微鏡システムにフォーカス制御システムとデコンボリューションソフトウェアを足すだけでシステムアップでき、コストパフォーマンスが極めてよい。ボケ除去法と画像修復法があるが、より簡便なボケ除去法でも、共焦点レーザー顕微鏡には劣るがそれに準じるレベルの画像データを取得できる。撮像時間が早いので、培養細胞のタイムラプス解析であれば、ボケ除去法が最適であろう。また撮像条件が厳しいが漸近法では、共焦点レーザー顕微鏡と同程度あるいはそれ以上の精度の画像データを取得できる。漸近法はボケ除去法とアルゴリズムが違うだけで、まったく同じシステムで撮像できコストパフォーマンスが高い。撮像条件が厳しいのが欠点であるが、固定細胞内の分子の細かい局在解析などに適している。

共同利用の共焦点顕微鏡が使えるという理由だけで、はじめからデコンボリューション法を検討していない研究者が多いようだが、それぞれ利点と欠点があるので、本当は自分の研究に適したシステムを選ぶべきであろう。また、カスタマイズできないシステムはいくら多機能・高性能であっても、使い勝手が悪く活用できないことが多い。デコンボリューション顕微鏡法は、既存のあるいは中古の蛍光顕微鏡をベースにシステムアップすることも可能なので、共同利用機器に不便を感じているひとは検討してみるとよい。

おわりに

蛍光バイオイメージングはノイズとの格闘である。ノイズの少ない画像データは、高精度の画像解析が可能で信頼できるからである。逆にノイジーな画像データは信頼性に欠け利用しにくい。蛍光バイオイメージングでは、微弱な蛍光シグナルを高速度に撮像しなければならないことが多く、蛍光シグナルの輝度分布が光ショットノイズの分布域に埋もれてしまいやすい。この状況に陥っているときに、何も考えずにルーチンにデータを撮像し続けると、ノイジーで利用価値のないデータばかりが大量に溜まってしまうことになる。データ保存用のハードディスクはいくら使っても大したことないが、時間と人的資源の浪費は問題である。EM-CCDや走査型共焦点レーザー顕微鏡であれば、印加電圧を調整することで、そうでなければ、高感度の撮像装置に替えたり、露光時間を延ばしたり、励起光強度を強めることで、状況をかなり改善できる。使用する顕微鏡イメージング機器のしくみをしっかり知っておくことは、さまざまな状況に素

早くかつ的確に対応することにつながり重要である。また、すべての顕微鏡イメージングシステムで、空間分解能を落とすことで感度を稼げるので、分解能を必要最低限度に落としてシグナル強度を確保するように心がけるとよい。これは、使用する顕微鏡イメージングシステムの能力を最大限に引き出すコツなので心得ておくとうい。またこのためにも、自分の研究がどの程度の解像度を最低限必要とするのか、深く考えながら研究を進めるとよいだろう。

参考文献・ウェブサイト

- 1) 鈴木健史：共焦点レーザー顕微鏡および蛍光顕微鏡を使いこなすための基礎知識。組織細胞化学 2011（日本組織細胞化学会編）。中西印刷。京都。pp. 103-115. 2011.
- 2) Swedlow JR: Quantitative fluorescence microscopy and image deconvolution. *Methods in Cell Biology* **72**: 349-367. 1998
- 3) Axelrod, D: Total Internal-Reflection Fluorescence Microscopy. *Methods in Cell Biology* **30**: 245-270. 1989
- 4) 鈴木健史, 高田邦昭. デコンボリューション顕微鏡法. 顕微鏡, **41**: 120-123, 2006
- 5) Cannell MB, McDorland A, Soeller C: Image enhancement by deconvolution. Pawley JB eds., *Handbook of biological confocal microscopy*, Third edition, pp. 488-500. 2006
- 6) 鈴木健史, 高田邦昭: 画像処理の原理と実際. 高松哲郎編, わかる実験医学シリーズ パイオイメージングがわかる. 羊土社. 東京. pp. 83-96. 2005.
- 7) Shaw PJ: Comparison of widefield/deconvolution and confocal microscopy for three-dimensional imaging. Pawley JB eds., *Handbook of biological confocal microscopy*, Third edition, pp. 453-467. 2006
- 8) 浦野泰照: 蛍光の基本. 三輪佳宏編, 実験がうまくいく蛍光・発光試薬の選び方と使い方. 羊土社. 東京. pp. 12-17. 2007.
- 9) インビトロジェン社, Fluorescence Spectra Viewer : <https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>

表 1. 走査型共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) とデコンボリューション顕微鏡法の比較

	CLSM	ボケ除去法	画像修復法
ボケ除去能力 (図 9 参照)	◎ : 十分に高い	○ : CLSM に準じる.	◎ : CLSM 相当
解像度	自由 : 標本の明るさに合わせて調整できる.	自由 : 標本の明るさに合わせて調整できる.	厳しい条件がある : 対物レンズの解像度以下の解像度での撮像が必要.
2 次元撮像	◎ : 1 平面のみの撮像でも共焦点像が得られる.	○ : 3 枚以上の 3 次元画像セットが必要.	× : 数十枚以上の 3 次元画像セットが必須.
3 次元撮像速度	○ : 解像度により調整可能.	◎ : 解像度により調整可能. 2 次元平面の走査が不要な分, CLSM より高速.	△ : 高解像度での 3 次元撮像が必須なため, 長時間露光が必要になる.
タイムラプス解析	○	◎	×
ボリュームレンダリング	○ : 十分な精度での 3 次元解析が可能.	○ : 十分な精度での 3 次元解析が可能.	◎ : 最高精度での 3 次元解析が可能.
標本の厚み	◎ : 励起光が届く範囲まで. 厚みのある組織標本でも効果的にボケを除去する.	○ : 励起光が届く範囲まで. 厚みがあるほどボケ除去効果が落ちる.	× : 数十ミクロン=細胞数層程度まで.
固定標本	◎	◎	◎
ライブセルイメージング	○	◎	×
FRET 解析	◎	○ (ソフトウェア次第)	
FRAP 解析	◎	×	
スペクトルイメージング	◎ (要分光システム)	×	
導入費用	2 千万円程度 (最小構成) ~ 1 億円程度 (ハイエンド) : レーザーの本数やチャンネル数, 分光システムの有無などで価格が大きく異なる.	5 百万円程度 (最小構成) ~ 2 千万円程度 (ハイエンド) : 通常の蛍光顕微鏡システムからのシステムアップも可能. カメラのグレードと台数, 高速フィルタホイールやピエゾステージの有無などで価格が大きく異なる.	