

バイオイメーjingで 知っておくべき 蛍光顕微鏡の基礎

鈴木健史

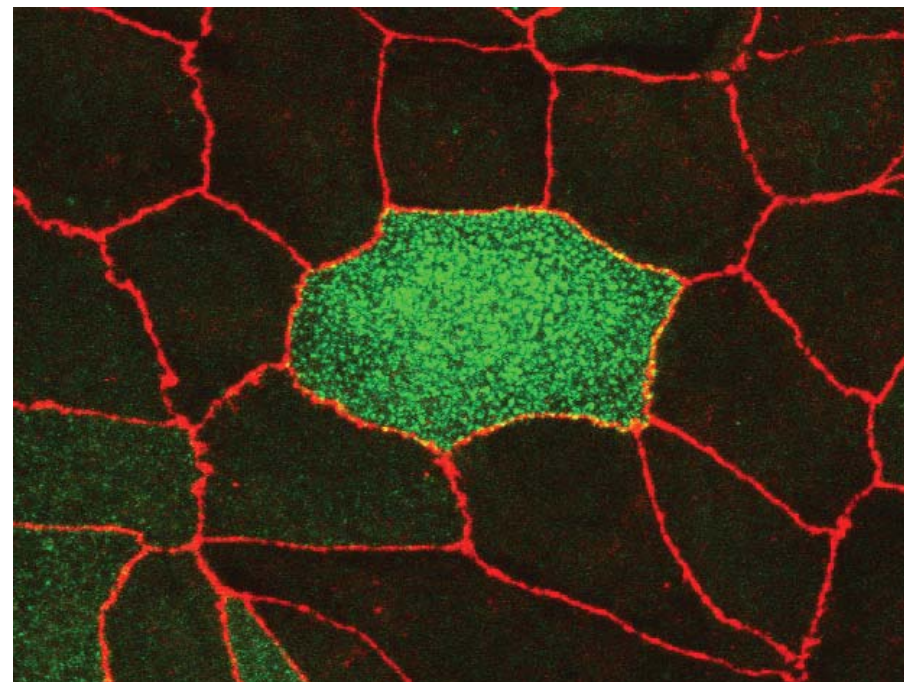
札幌医科大学 医療人育成センター 生物学教室

生物学教室のホームページで解説書のPDFファイルを公開しています。

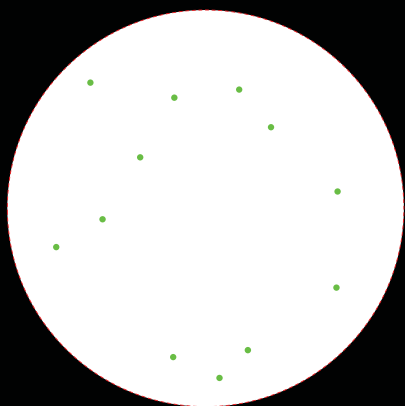
<https://web.sapmed.ac.jp/biol/download.html>

プロセルfで配布したハンドアウトとは違う内容が含まれています

修正版のハンドアウトは明日プロセルfで配布します



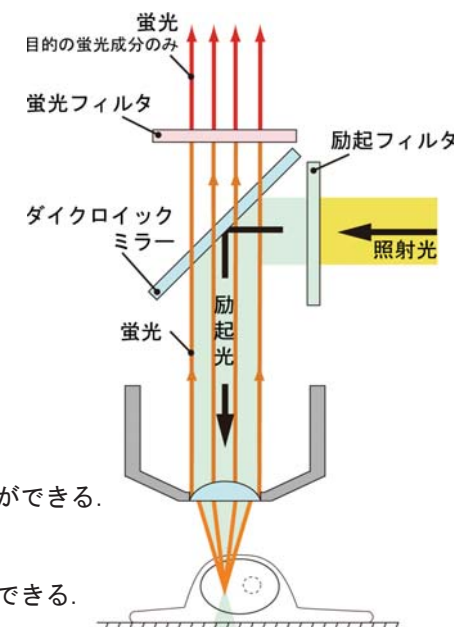
蛍光顕微鏡の原理



暗い背景にシグナルの輝点を検出するのでコントラストが高い。
たとえシグナルがレンズの解像度に満たない大きさであっても、
輝点の明るさとその位置を知ることができる。

蛍光顕微鏡法の原理

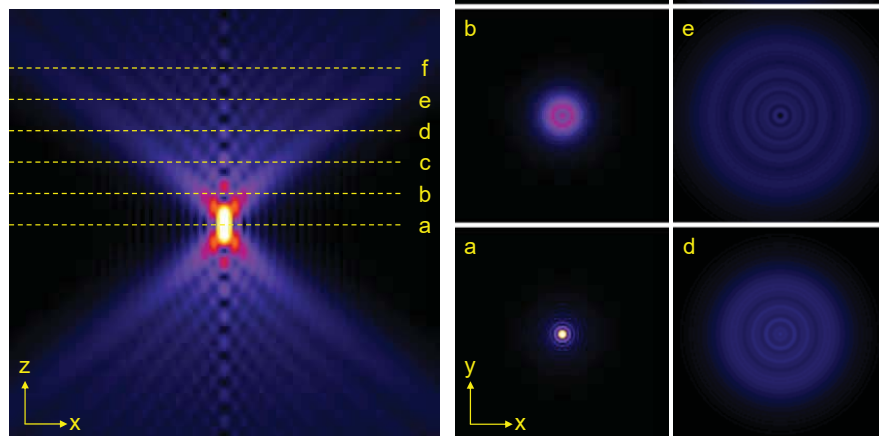
特定の波長の光を反射し、それ以外の光を通過させる鏡（ダイクロイックミラー）を利用し、励起光の光路と蛍光の光路を分離する。



蛍光標識した分子のみを観察することができる。

目的の分子のみを観察できる。
非常に高い分解能で局在位置を同定できる。

対物レンズを通してみると、
1つの輝点が3次的に広がって見える



何が蛍光顕微鏡画像の質を決めるのか？

1. 対物レンズ
 - 倍率
 - 開口数
 - 浸漬液の種類（水浸，油浸など）
2. 撮像システム
 - 冷却CCDカメラ
 - 光電子増倍管
 - 走査システム（XY走査型，ニポウ板）
3. 光源
 - 高圧アークランプ，レーザー，LED
4. 画像処理
 - 平滑化処理，デコンボリューション

蛍光顕微鏡における対物レンズの開口数と見え方の関係

開口数が小さいとき（開口絞りを絞ったとき）

焦点深度が深くなり，幅広い範囲にピントが合う。
コントラストが高まる。
像の輪郭が強調される（アンシャープマスキング効果）
解像度が悪くなる。
暗くなる。

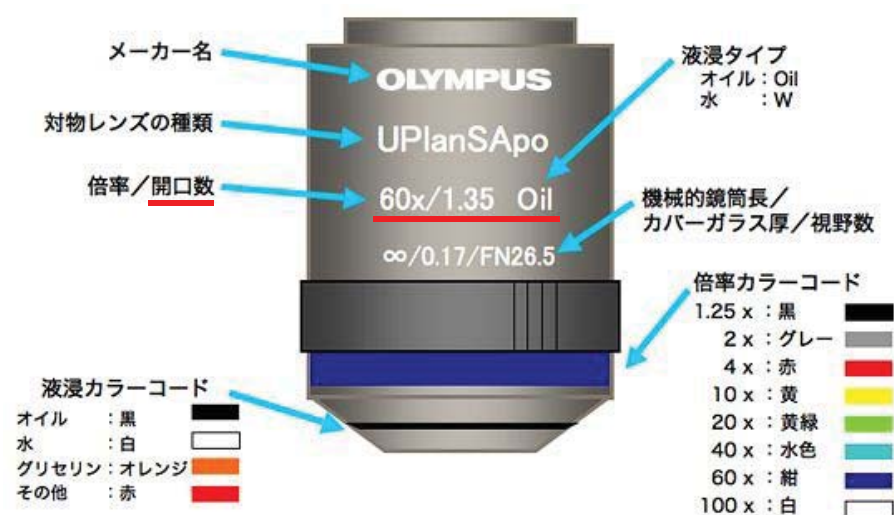
開口数が大きいとき（開口絞りを開放したとき）

焦点深度が狭くなり，狭い範囲にしかピントが合わない。
コントラストが弱まる。
像の輪郭強調がなくなる。

解像度がよくなる。
明るくなる。

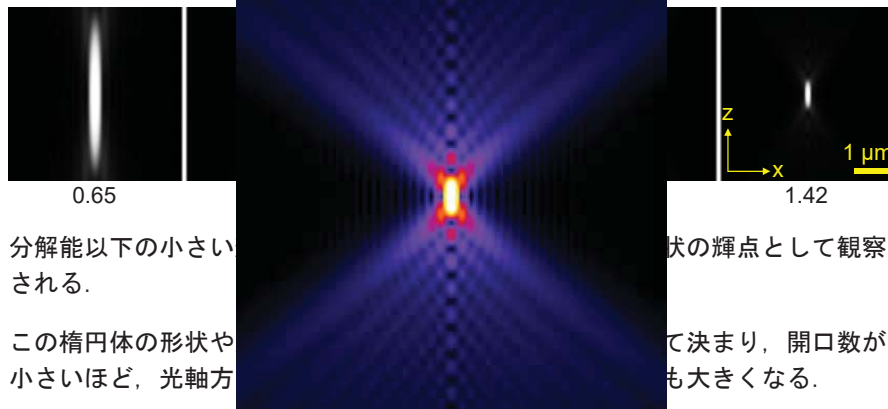
細胞内の細かい構造を観察できる
暗い蛍光観察に適している

蛍光顕微鏡では基本的に開口数の大きい対物レンズが適している



顕微鏡の解像度は、xy軸方向に比べて光軸方向は粗い。

理論的には、開口数1.64で光軸方向とxy平面方向の解像度が同じになる。
しかし、実用的には開口数1.42程度が限界。



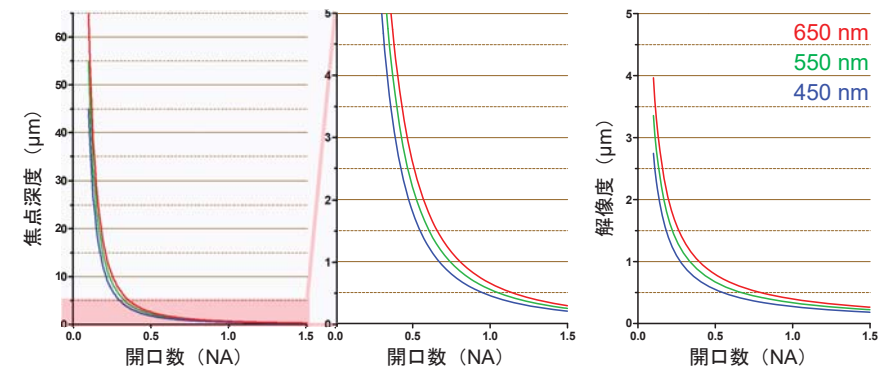
分解能以下の小さい
される。

この楕円体の形状や
小さいほど、光軸方

開口数の大きい対物レンズを使うと、楕円体の大きさを小さくでき、光軸方向
の間延びも小さく抑えることができる。

顕微鏡像の解像度は対物レンズの開口数と観察光の波長で決まる。

開口数が多いほど焦点深度が狭まり、光軸方向の解像度が高まる。
xy平面上の解像度も高まる。

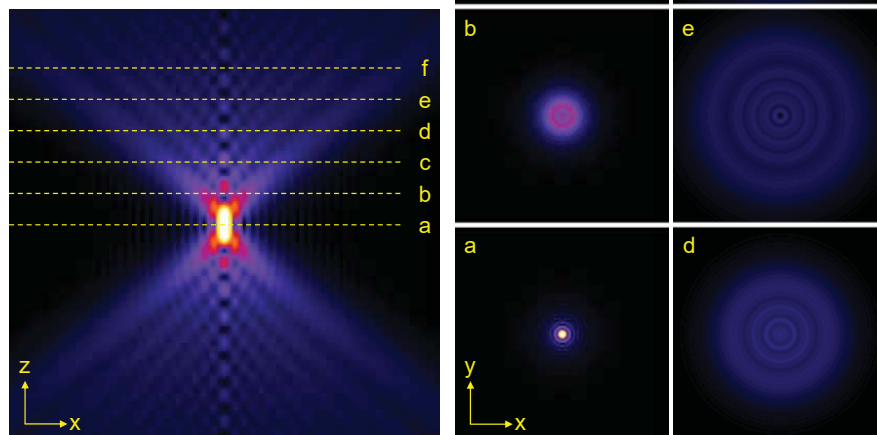


$$\text{焦点深度} = \frac{\lambda}{NA^2}$$

$$\text{解像度} = \frac{0.61 \cdot \lambda}{NA}$$

対物レンズを通してみると、
1つの輝点が3次元的に広がっ
て見える

= ボケの正体



蛍光顕微鏡画像の質を落とすノイズ

ノイズの種類

ランダムノイズとパターンノイズ：

ボケ：標本の輝度分布を反映した**パターンノイズ**

対物レンズの合焦範囲以外に存在する輝点がにじんで画像
に写り混むもの。

光ショットノイズ：**ランダムノイズ**

光子数をカウントする際の統計的変動によって生じる。
微弱光を観察する場合にもっとも厄介なノイズ。

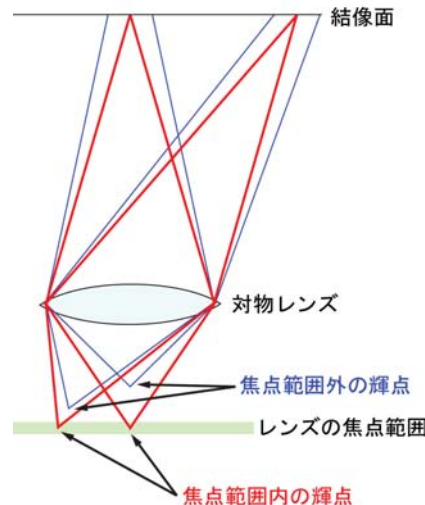
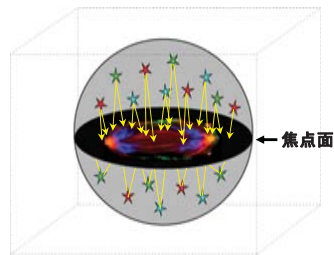
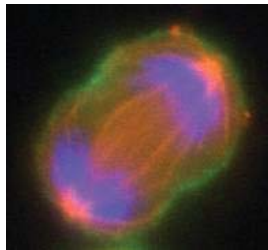
光源ノイズ：ランダムノイズ

励起光源の光強度の揺らぎやちらつきに起因する。

検出器ノイズ：ランダムノイズ、パターンノイズ

撮像素子に起因するノイズ。暗電流ショットノイズなど。

細胞内の微細な構造を顕微鏡で観察すると像がボケる

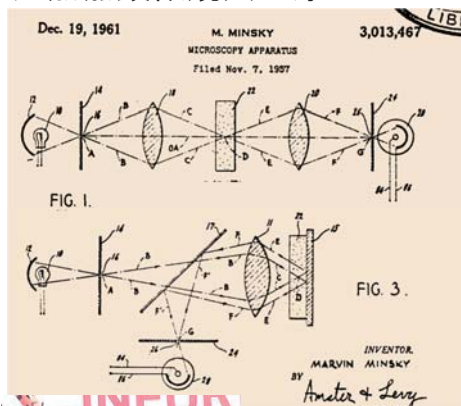


ボケは、非焦点面の輝点からの光が像に混入したもの

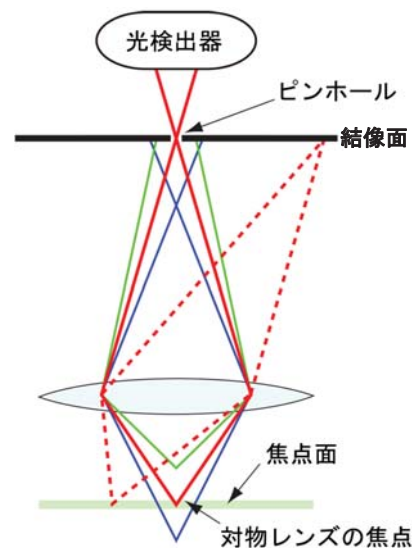
ボケのない蛍光顕微鏡像を得るための5つの方法

- ① 標本の焦点面以外の部分をあらかじめ切除する方法
薄切切片法（ライブセルイメージングは不可能）
- ② ピンホールなどにより光学的に焦点以外の光を除去する方法
共焦点レーザー顕微鏡法
- ③ 焦点にある蛍光分子のみを励起する方法
マルチフォトン励起蛍光顕微鏡法
- ④ ガラス表面のエバネッセント場内のみを励起する方法
全反射顕微鏡法
- ⑤ デジタル画像処理でボケを取り除く方法
デコンボリューション顕微鏡法
ぼけ除去（deblurring）
画像修復法（image restoration）

共焦点顕微鏡法の原理



対物レンズの焦点からの光はピンホールを通過する。
焦点以外からの光はピンホールに遮られてしまう。



共焦点顕微鏡法

対物レンズの焦点を x, y 平面状で走査し、点の集合体としての平面画像を得る

走査方法の違いで2つのタイプに分けられる

走査型共焦点レーザー顕微鏡：

ミラーを動かして走査する。

各 x, y 座標点の輝度情報を逐次獲得する。

光電子増倍管（PMT）で光を検出する。

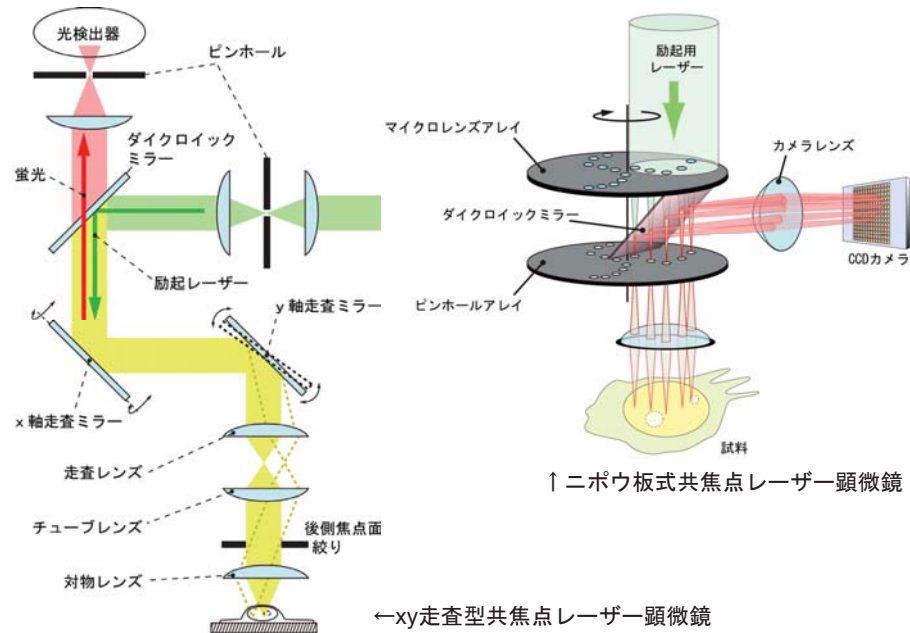
ニポウ板式レーザー共焦点顕微鏡：

穴の開いた円盤を回転させ x, y 平面全体を走査する。

平面像をごく短時間で一挙に獲得する。

冷却CCDカメラなどで画像を撮影する。

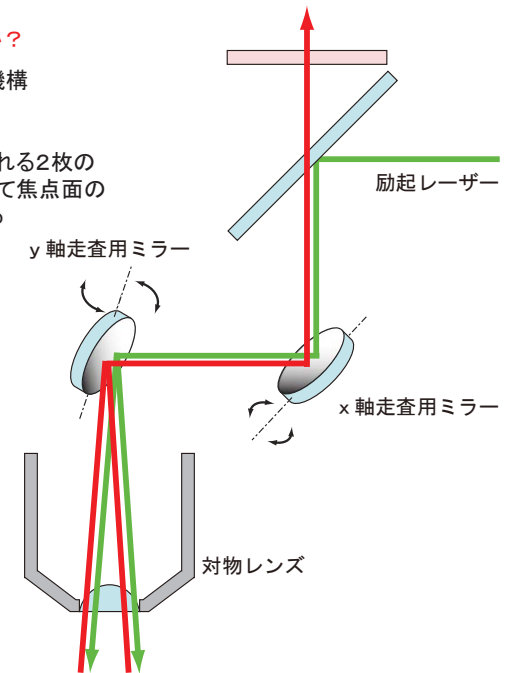
共焦点顕微鏡法の走査システム



どのようにして平面画像を得ているのか？

走査型レーザー共焦点顕微鏡の走査機構

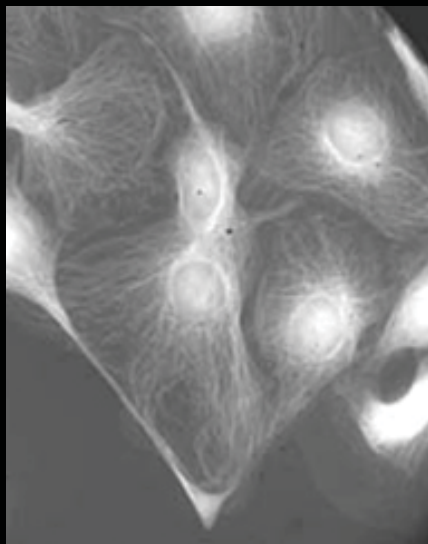
レーザー光路に、ガルバノミラーと呼ばれる2枚の鏡を仕込み、反復運動させることによって焦点面のxy座標の各点の光情報を逐次取得する



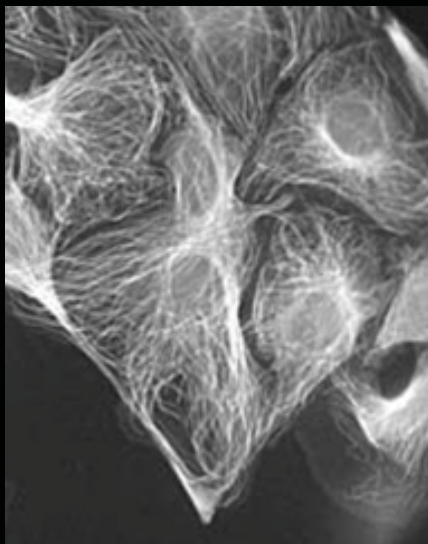
走査に時間がかかる。

捜査範囲を自在にコントロールできるので任意の部分のみの走査や蛍光脱色が可能である。

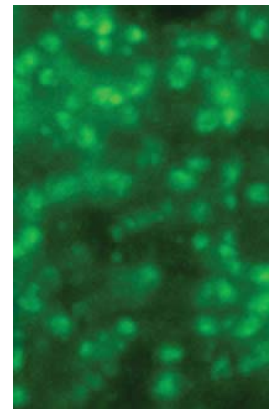
通常の蛍光顕微鏡像



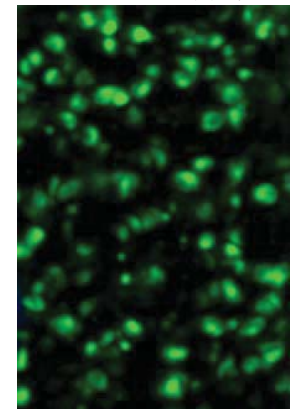
共焦点レーザー顕微鏡像



蛍光顕微鏡



共焦点レーザー顕微鏡



● GAD65 (神経終末)

共焦点レーザー顕微鏡を使えば簡単にボケのない蛍光顕微鏡像を撮像できる。

しかし：共焦点レーザー顕微鏡は高価で、研究室単位で導入しにくい。
共同利用機器の顕微鏡は、自由にカスタマイズできない。

→ ライブセルイメージングや、タイムラプスイメージングに利用しにくい

デコンボリューション顕微鏡法

ボケ除去法 (deblurring)

nearest-neighbor (簡便で効果が大きく実用的)

画像修復法 (image restoration)

constrained iterative algorithm

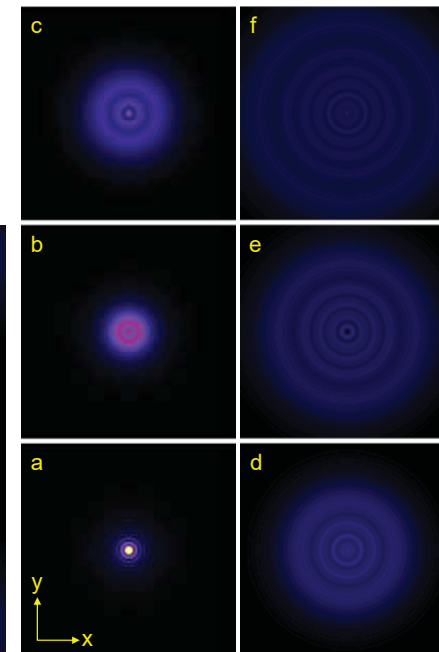
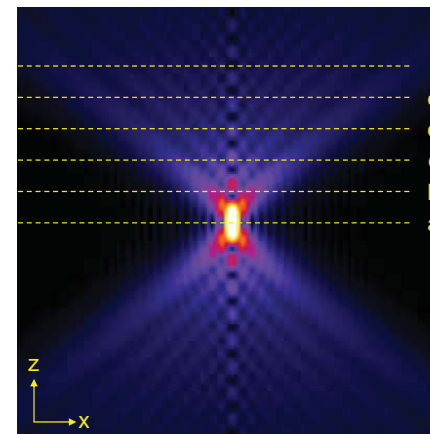
classical methods

statistical methods (maximum likelihood estimation)

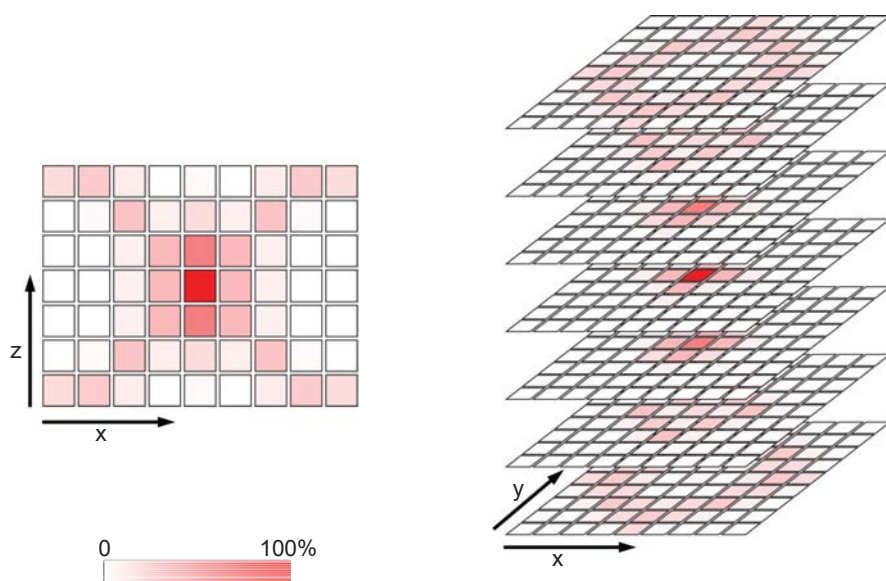
点像分布関数PSFを用いてボケを計算し、
撮像した3次元画像からボケ成分を除去する。

Point Spread Function 点像分布関数 PSF

対物レンズを通してみると、1つの
輝点が3次的に広がって見える

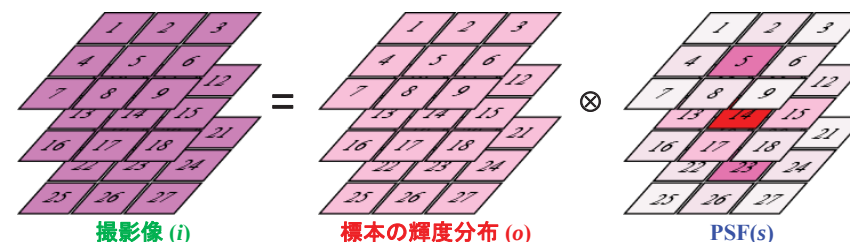


デジタル3次元空間座標で表したPSFの模式図



顕微鏡像の数学的モデル

各画素の輝度値 = 対応する座標における標本の輝度値
+ 他のすべての空間座標の輝点からのボケ
= すべての空間座標の輝点からの光の総計



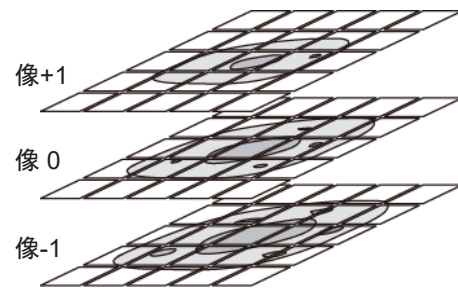
$o1$ の輝点から $i14$ の画素に写り込むボケの量 = $o1 \times s27$

$$i14 = (o1 \times s27) + (o2 \times s26) + (o3 \times s25) + (o4 \times s24) + (o5 \times s23) + \dots \\ \dots + (o23 \times s5) + (o24 \times s4) + (o25 \times s3) + (o26 \times s2) + (o27 \times s1)$$

PSFがわかれば、標本がどのようにボケて見えるかがわかる。

→ ボケ成分を計算できる (ただし標本の輝度分布がわかった場合)

ボケ除去法 (deblurring) : ニアレストネイバー法

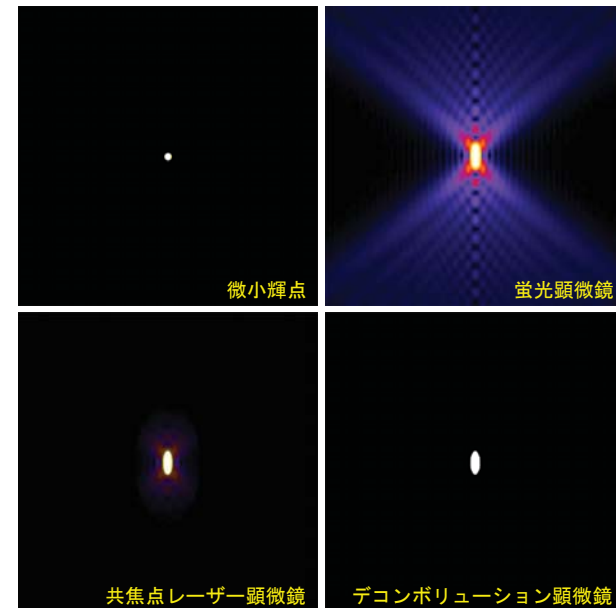


「像+1」「像-1」から「像0」に移り込むボケ成分をPSFを用いて計算し、それを「像0」から減算し出力する。

利点：計算が速く、ボケ除去効果も十分。

問題点：ボケを含む撮影像からボケ成分を計算しているため、結果の精度は高くない。

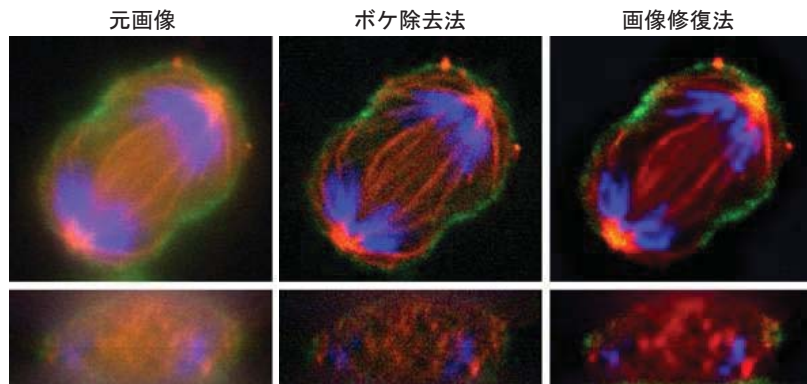
各顕微鏡法における微小輝点の見え方 (イメージ図)



デコンボリューション顕微鏡法

ボケ除去法：精度は落ちるが、十分にボケを除去できる。
撮影条件がゆるく、様々な研究に利用できる。

画像修復法：極めて高い精度で、標本の輝度分布を再現する。
光ショットノイズの除去効果も期待できる。
ただし、高い空間分解能での3次元撮影が必須。



培養B細胞 (分裂像) ●微小管 ●IA^k (表面抗原) ●DAPI

蛍光顕微鏡画像の質を落とすノイズ

ノイズの種類

ランダムノイズとパターンノイズ：

ボケ：標本の輝度分布を反映したパターンノイズ

対物レンズの合焦範囲以外に存在する輝点が生じて画像に写り込むもの。

光ショットノイズ：ランダムノイズ

光子数をカウントする際の統計的変動によって生じる。
微弱光を観察する場合にもっとも厄介なノイズ。

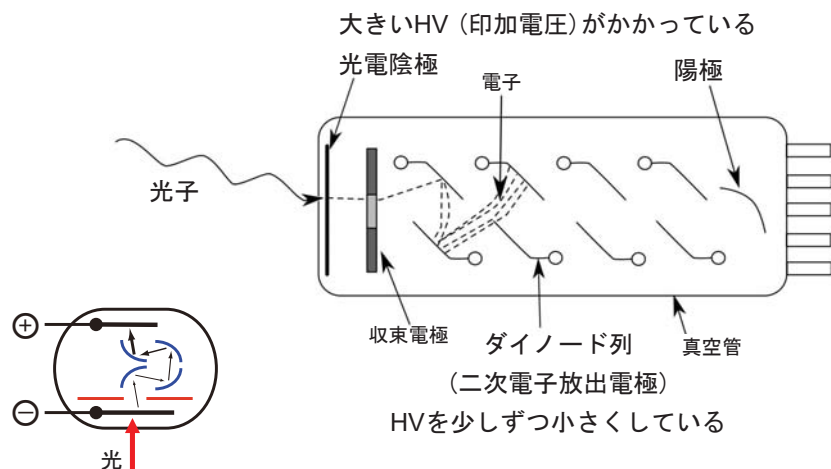
光源ノイズ：ランダムノイズ

励起光源の光強度の揺らぎやちらつきに起因する。

検出器ノイズ：ランダムノイズ、パターンノイズ

撮像素子に起因するノイズ、暗電流ショットノイズなど。

光電子増倍管のしくみ



光量が十分なとき＝光子数と放出する電子数（出力電圧）が正比例する
 光量が微弱なとき＝放出する電子数が大きくバラつく

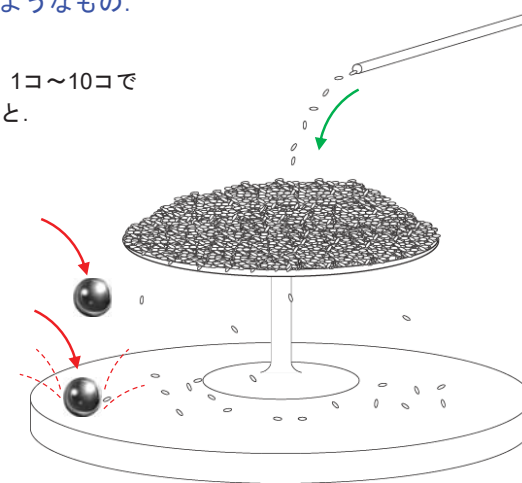
光量計測は、テーブルに当たるパチンコ玉の数を、こぼれる米粒の数で計測するようなもの。

例えば、パチンコ玉 1 つあたり、1 コ～10 コで平均 5 コの米粒がこぼれるとすると。

パチンコ玉の数が多いとき、こぼれる米粒数はパチンコ玉の 5 倍に収束する。

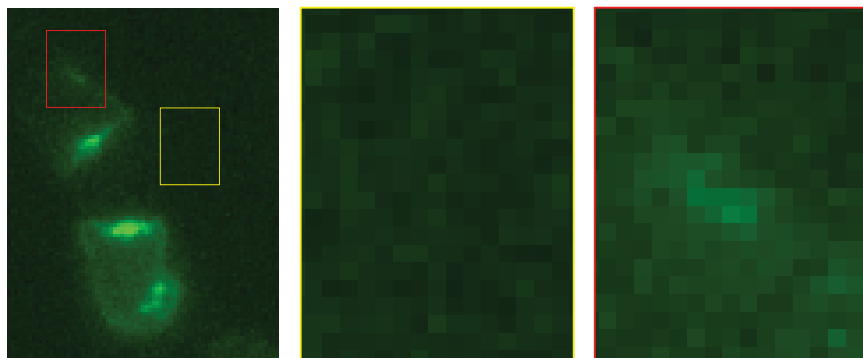
しかし、パチンコ玉が極端に少ない場合は、こぼれる米粒数が統計的にバラつく。

光ショットノイズ



光ショットノイズ：ランダムノイズ

光子数をカウントする際の統計的変動によって生じる。
 微弱光を観察する場合にもっとも厄介なノイズ。



イメージセンサ：光信号を電気信号に変換する。

光子 → 電子

光電子増倍管 = 光電効果

CCD = フォトダイオードによる光起電力効果

光ショットノイズの対処法

シグナル量を増やす

1. 露光時間を延ばす → 時間分解能が犠牲になる
2. 解像度を犠牲にして感度を高める
 ピクセルビンングにより測光面積を増やす
 ピンホールを大きくして測光スポットの径を大きくする

画像処理で対応する

1. 時間平均化（撮像時実行タイプの画像処理）
 カルマンフィルター
2. 平滑化処理 → 像がぼやけ、空間分解能が犠牲になる
3. デコンボリューション（画像復元法）

顕微鏡システムの能力を最大限に引き出すために

空間分解能を落として感度を稼げ！

分解能を必要最低限度に落とす.

シグナル強度を確保する.

どの程度の解像度が最低限必要なのか,
常に考えながら研究を進めるとよい.