

Beyond the diffraction limit?

BY Ernst H.K. Stelzer, News & Views, *Nature*, **417**:806-807 (2002)

回折限界は破られたのか？

光は波であり、その故に回折する。この性質は、光学顕微鏡下で生体分子の位置などを高い精度で決めようとするとき、大きな障害となる。光学顕微鏡技術を駆使することで、この「回折限界」も打破する糸口がつかめるようになった

アッペの理論による光学顕微鏡分解能の限界^{注1}、量子物理学におけるハイゼンベルクの不確定性原理。この2つの理論は、それぞれ、ある種の物理量を決定するときの分解能や精度を規定している。DybaとHell¹の最近の報告 (*Physical Review Letters*) によると、このうちのアッペ限界がうち破られたという。

1873年、Ernst Abbe²は、光学顕微鏡下で求めうる2点間の最小距離は、技術的な限界によって決まるのではなく、理論的に説明しうることに気付いた。この距離、回折限界、は、(光の波長) / (光の回折角) で決まる^{注1}。どのように光学系を工夫したとしても、この分解能の限界を打破することはできなかった。

それから約50年後、Werner Heisenberg³は、量子的な性質を示す「物体の位置」や「運動量」などの物理量は、互いに独立に振る舞えないことに気付いた。ある1つのパラメータを決める精度は、他のパラメータの決定精度に依存し、2つのパラメータを同時に高い精度で求めることはできない。つまり、ある一つの物理量の計測精度を高めれば高めるほど、その代償として、他の物理量の計測精度を落とすことになる。このハイゼンベルクの不確定性原理ほど、これまで徹底的に検証しつくされたものはなく、現在の量子物理学の根幹となっていることは言うまでもない。そのことを疑う余地もないであろう。ハイゼンベルクの原理とアッペ限界とは、互いに関連し合っていることも、Stelzer⁴の論文で示されている。

近年、アッペ限界を克服できる光学顕微鏡を開発したという報告がなされている。生物学の分野で大きなインパクトを与えた共焦点顕微鏡法も、その一例である。蛍光色素で標識した試料のごく一部を照明し、その蛍光色素を励起する。同時に、その一点から発生する蛍光の強度を精密に計測する。この方法によって、胚などの多少分厚い観察試料であっても、その内部構造の一断面を切り取って見たかのような観察像(光学的な切片像)を得ることができる。このような観察が可能になったのは、蛍光強度を検出する装置の非線形的な性質、つまり、検出される信号が蛍光強度そのものではなく、その二乗に比例している点、また、焦点の合った箇所以外からの光を効率よく排除できるように光学系が工夫されている点、の2つの工夫があったからである。

Lukosz⁵の研究を基に、Gustafssonら⁶は高い分解能でアクチン繊維束の観察を行っている。彼らは、強度が正弦波的に変化するような特殊な照明系を用い、光学顕微鏡の分解能を100nm付近

まで改善させることができた」と報告している。しかし、ここまでのところ、すべてアッペ限界を超えるような顕微鏡技術ではない。

土壌細菌、*Bacillus megaterium*、の観察で、波長の760nmの光を使い、蛍光標識分子を33nmの分解能で観察したとDybaとHell¹は、今回、報告している。それが本当ならば、彼らはアッペの分解能限界を打破したことになる。彼らの用いた新しい手法は、次の2つである。一つは、「4共焦点蛍光顕微鏡法」とよばれるものである⁷。まず、開口数の大きな対物レンズを2本使い、観察試料を2方向より挟み込むようにする。観察試料から見た場合、全方向（立体角で4ステラジアンに相当）へ放射される蛍光をすべて回収して結像させるので、4共焦点顕微鏡とよばれている。さらに、観察試料を2方向よりコヒーレントな光で同時照明する。すると光軸方向に光の干渉縞パターンが発生し、観察試料の一部（明暗の縞があるので、ちょうど半分の体積分）のみが励起されることになる（実際は、縞模様^{注2}に励起される）。対物レンズの結像特性をあらかじめ精密に調べておけば、コンピュータ画像処理法と組み合わせることで、縞模様励起パターンの中から、目的の部分だけを切り取って観察するが可能となる。

もう一つの手法は、多少ややこしい^{注3}。まず、試料を通常の集光させたパルスレーザー光で照明する。その直後（1 psec 後）発光する蛍光と同じ波長で、先の集光させた部分ではなく、その両側（光軸上）の領域に集光するように工夫したパルスレーザー光で照明する。中心がちょうど抜けて暗くなっているスポットで照明するようなものである。これにより、レーザーパルスで照射された箇所の蛍光はかき消され、残った狭い部分（暗い部分に相当する箇所、gap ところでは呼んでいる）の蛍光のみが、数 psec 後に像として観察されることになる。DybaとHellは、4共焦点顕微鏡を使って、このgap形パターン照射法を実現した。

さて、33nmのスポットサイズで観察されたものは何であったのか？彼らは、本当に33nmの分解能を達成したことになるのだろうか？彼らの実験結果は、一見なるほどと思わせるものであるが、分解能を実際に改善したというには疑問がある。*Bacillus Megaterium*の細胞膜観察像（論文中、Fig.4）では、ある間隔で配置している膜構造物が示されているが、これは、従来の共焦点顕微鏡法によっても観察できる構造である。新手法では、この2つの膜構造がより明確に観察されたと記載されている。しかし、それは、膜構造の位置をより高い精度で決めることができた^{注4}というだけのことに過ぎず、観察像の分解能を向上させた事にはならないのではあるまいか。分解能とは、あるコントラストで識別される2つの構造物間の最小距離として、定義されてしかるべきものだからである⁸。

Toralso di Francua^{9,10}らの指摘する通り、光学系の工夫により、回折像の中心ピークは、ずっと狭くシャープにすることはできる。しかし、それにより、一般に観察したい像（回折ピーク）の両側のピーク(side lobe)も大きくなる傾向にある。この効果は、DybaとHellの示した観察像にも認めることができる。コンピュータ画像処理によって、この中心回折ピークのみを抽出する作業が必要となるのは当然であろう。すなわち、著者の主張する観察像の改善は、顕微鏡新技術による恩恵の結果とは言い難く、画像処理法に頼った結果であると考えるのが妥当ではあるまいか。また、構造に関する別の知見があったからこそ、識別できたと言えるのではないだろうか。画像のS/N比（信号/雑音強度比）がかえって悪くなっているという問題点もある。

しかし、どのような方面で利用できるかは、まだ不明ではあるものの、この論文に示されている技術的な改良点は、非常に評価すべきものである。現時点では、ハイゼンベルクは正しく、ア

ツベの限界は、まだ打ち破られてはいない。それは、事実ではあるが。

Ernst H.K.Stelzer

Cell Biology & Biophys Programme, EMBL

1. Dyba, M. & Hell, S. Focal spots of size $\lambda/2.3$ open up far-field fluorescence microscopy at 33 nm axial resolution. *Phys. Rev. Lett.*, **88**:163901 (2002).
2. Abbe, E. *Arch. Mikrosk. Anat.*, **9**:413-468(1873).
3. Heisenberg, W. *Z. Phys.*, **43**:172-198 (1927).
4. Stelzer, E.H. & Grill, S. The uncertainty principle applied to estimate focal spot dimensions. *Opt. Commun.*, **173**:51-56 (2000).
5. Lukosz, W. *J. Opt. Soc. Am.*, **57**:932-941 (1967).
6. Gustafsson, M.G.L., Agard, D.A. & Sedat, J.W. I5M: 3D widefield light microscopy with better than 100nm axial resolution. *J. Microscop.*, **195**:10-16 (1999).
7. Hell, S. & Stelzer, E.H.K. Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope. *J. Opt. Soc. Am. A*, **9**:2159-2166 (1992).
8. Stelzer, E.H.K. *J. Microscop.*, **198**:15-24 (1997).
9. Toraldo di Francia, G. *Atti Fond. Giorgio Ronchi*, **7**:366-372 (1952).
10. Martinez-Corral, M., Caballero, M.T., Stelzer, E.H.K. & Swoger, J. Tailoring the axial shape of the point spread function using Toraldo concept. *Opt. Express*, **10**:98-103 (2002).

注 1. アッベの定義した分解能 () は、 $\Delta x = \lambda / (n \cdot \sin \theta)$ である。ただし、 λ は、光の波長、 n は周囲媒質の屈折率。 θ は観察試料で回折光と光軸とのなす角度で、対物レンズに入射可能なもっとも大きな開き角を示す。 $n \cdot \sin \theta$ は、対物レンズの開口数と呼ばれるパラメータである。上の式は、コヒーレント光で照明された縞模様格子パターンを想定し、顕微鏡下で識別できる最小格子幅として導く事ができる。

注 2. ‘Sanding wave excitation’ という呼び方もある。最近の報告では、Albrecht, B., Faila, A.V., Schweitzer, A. & Cremer, C. Spatially modulated illumination microscopy allows axial distance resolution in the nanometer range. *Appl. Opt.*, **41**:80-87 (2002). などもある。

注 3. Klar, T.A., Jakobs, S., Dyba, M., Egner, A. & Hell, S.W. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulation emission. *Proc. N. A. S.*, **97**:8206-8210 (2000) に、この照明方法に関する詳細が記されている。

注 4. 光学顕微鏡の分解能と、光学顕微鏡を用いた計測の精度とは、互いにまったく別のパラメータと理解するのが正しい。光学顕微鏡と位置センサを用いることで、nm ~ pm もの高い精度で、物体の位置を求めることも可能である。以下に、計測に関わる参考文献を列挙する。

- Bobroff, N. Position measurement with a resolution- and noise-limited instrument. *Rev. Sci. Instru.* **57**:1152-1157 (1986).
- Art, J.J., Crawford, A.C. & Fettiplace, R. A method for measuring cellular movement less than the wavelength of light. *J. Physiol.*, **371**:18P (1986).
- Kamimura, S. Direct measurement of nanometric displacement under an optical microscope. *Appl. Opt.*, **26**:3425-3427 (1987).
- Gelles, J., Schnapp, B.J. & Scheetz, M.P. Tracking kinesin-driven movements with nanometre scale precision. *Nature*, **331**:450-453 (1988).
- Denk, W. & Webb, W.W. Optical measurement of picometer displacement of transparent microscopic objects. *Appl. Opt.*, **29**:2382-2391 (1990).
- Florin, E.-L., Hoerber, J.K. & Stelzer, E.H. High-resolution axial and lateral position sensing using two-photon excitation of fluorophores by a continuous-wave Nd:YAG laser. *Appl. Phys. Lett.*, **69**:446-448 (1996).
- Higurashi, E., Sawada, R. & Ito, T. Axial and lateral displacement measurement of a microsphere based on the critical-angle method. *Jpn. J. Appl. Phys.*, **37**:4191-4196 (1998).
- Allersma, M.W., Gittes, F., deCastro, M.J., Stewart, R.J. & Schmidt, C.F. Two-dimensional tracking of ncd motility by back focal plane interferometry. *Biophys. J.*, **74**:1074-1075 (1998).
- Pralle, A., Prummer, M., Florin, E.-L., Stelzer, E.H.K. & Hoerber, J.K.H. Three-dimensional high-resolution particle tracking for optical tweezers by forward scattered light. *Microscop. Res. Tech.*, **44**:378-386 (1999).
- Schmidt, M., Nagorni, M. & Hell, S. Subresolution axial distance measurement in far-field fluorescence microscopy with precision of 1 nanometer. *Rev. Sci. Instru.*, **71**:2742-2745 (2000).
- Rohrbach, A. & Stelzer, E.H. Three-dimensional position detection of optically trapped dielectric particles. *J. Appl. Phys.*, **91**:5474-5488 (2002).

2002.6.24

訳・注（上村 / 東大・総合文化・生命環境）