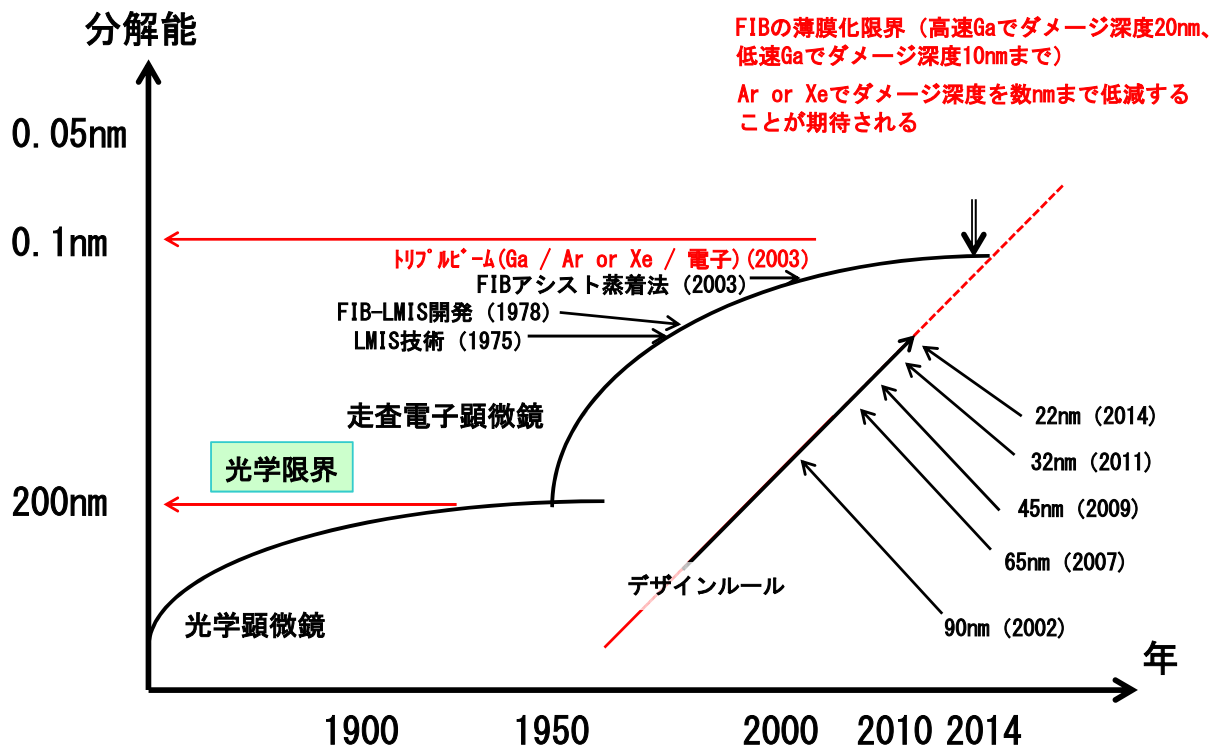


FIB-SEM/TEM



26



文部科学省

MINISTRY OF EDUCATION, CULTURE, SPORTS,
SCIENCE AND TECHNOLOGY-JAPAN

光学顕微鏡

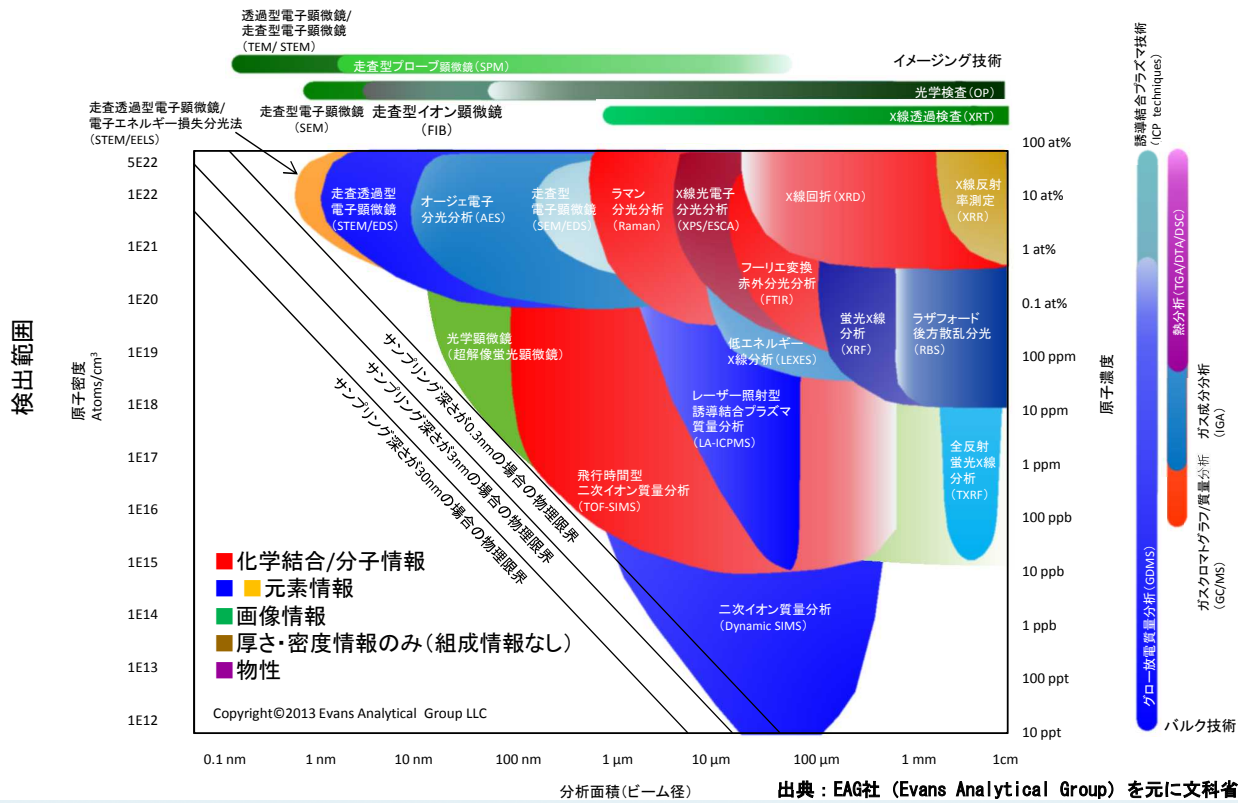
27



文部科学省

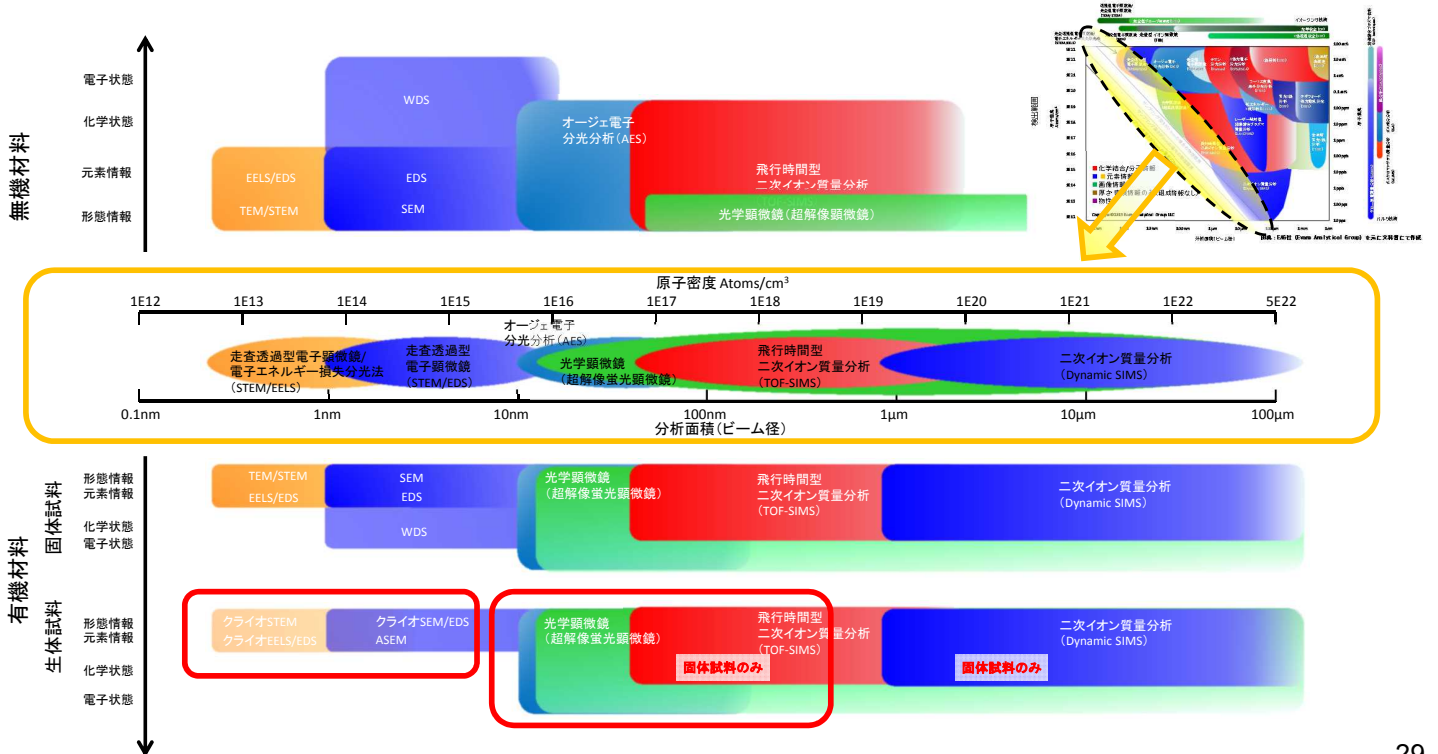
MINISTRY OF EDUCATION, CULTURE, SPORTS,
SCIENCE AND TECHNOLOGY-JAPAN

表面・微小部分析手法の比較

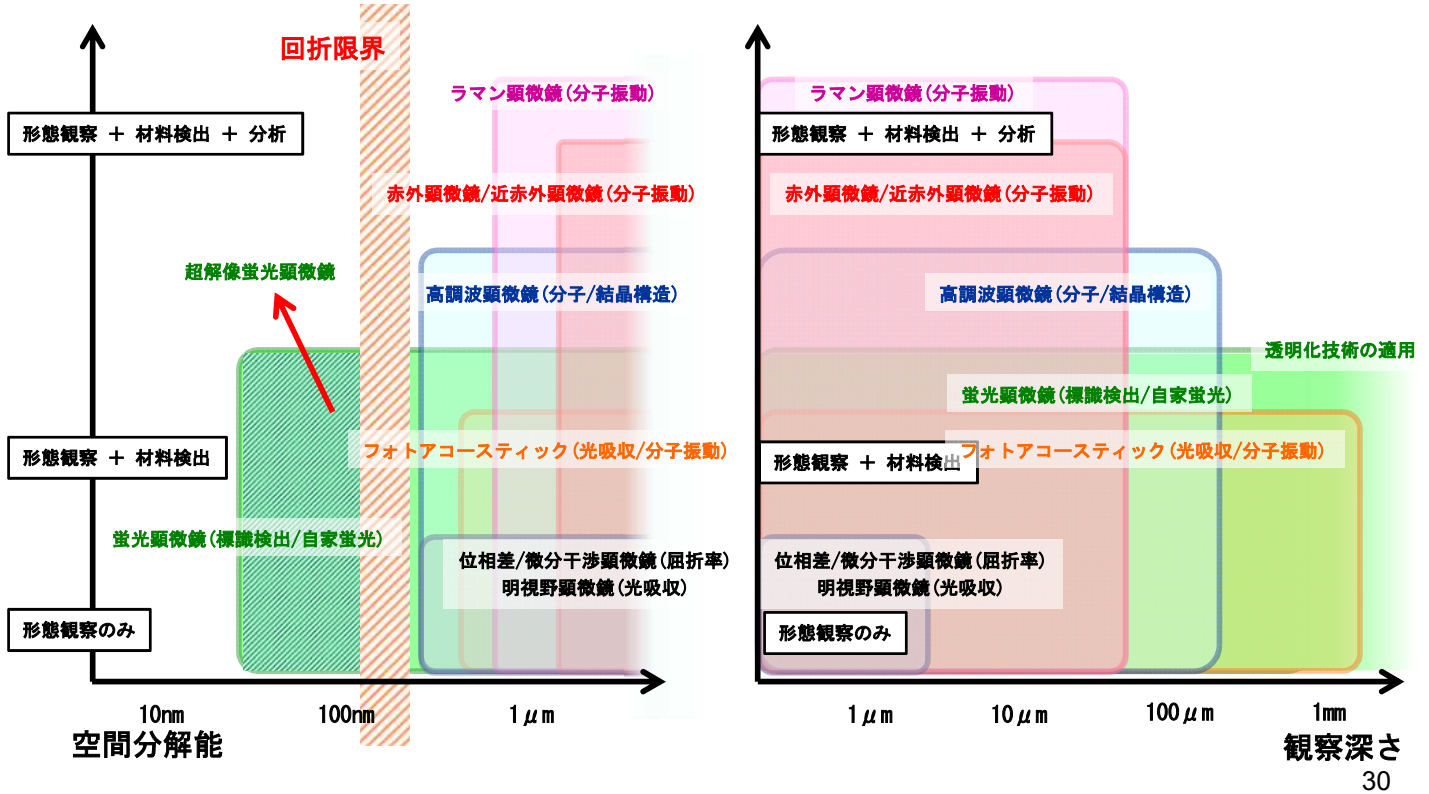


出典: EAG社 (Evans Analytical Group) を元に文科省にて作成 28

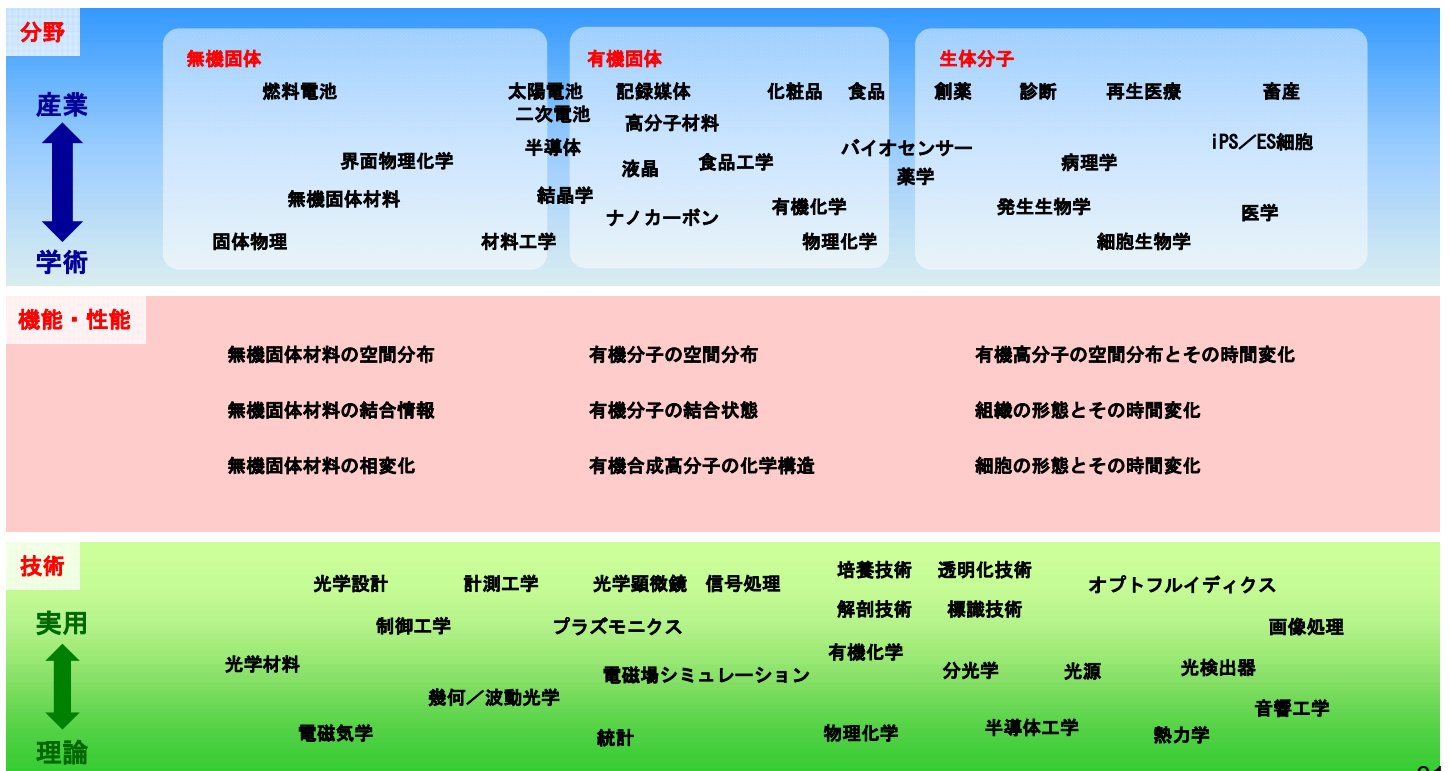
表面・微小部分析手法の比較



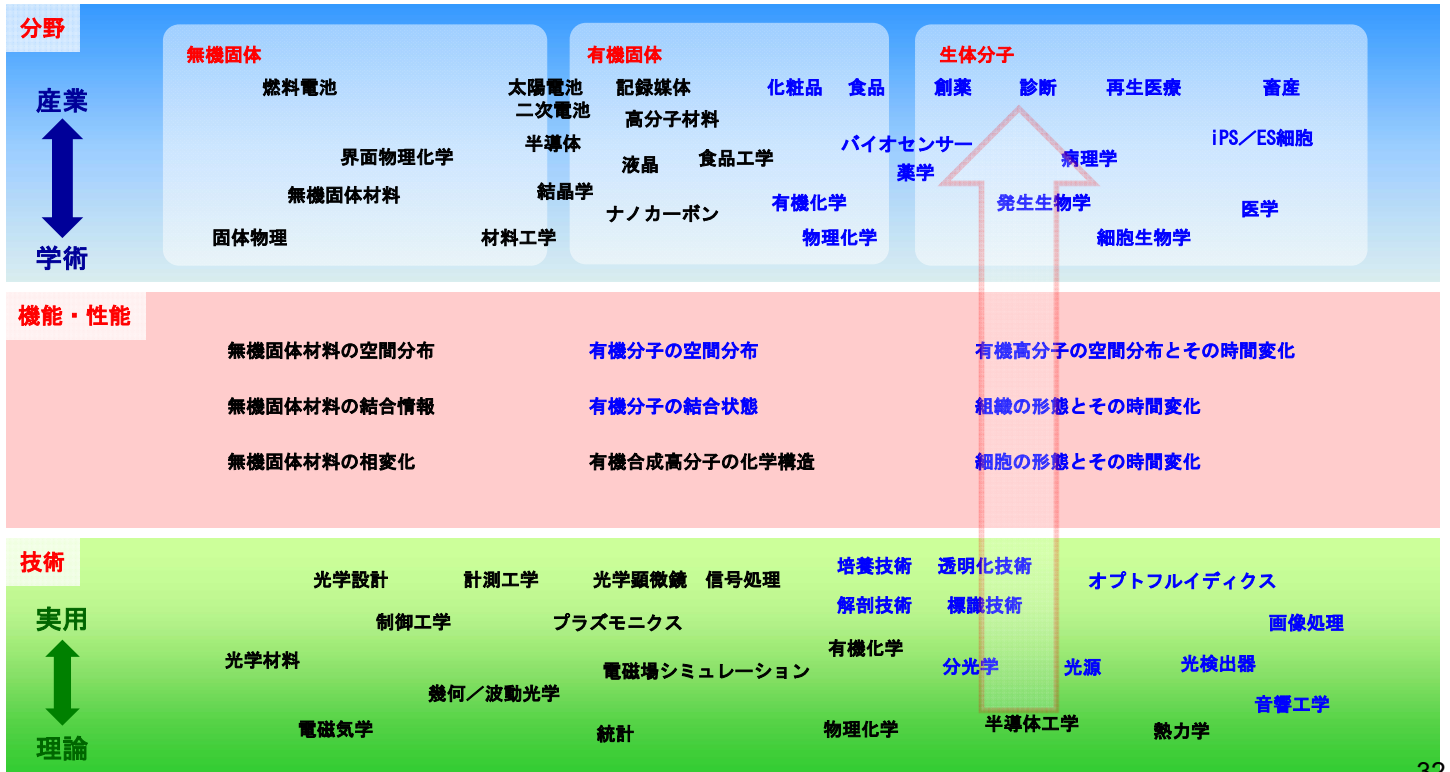
光学顕微鏡の種類と機能



光学顕微鏡分野技術俯瞰図

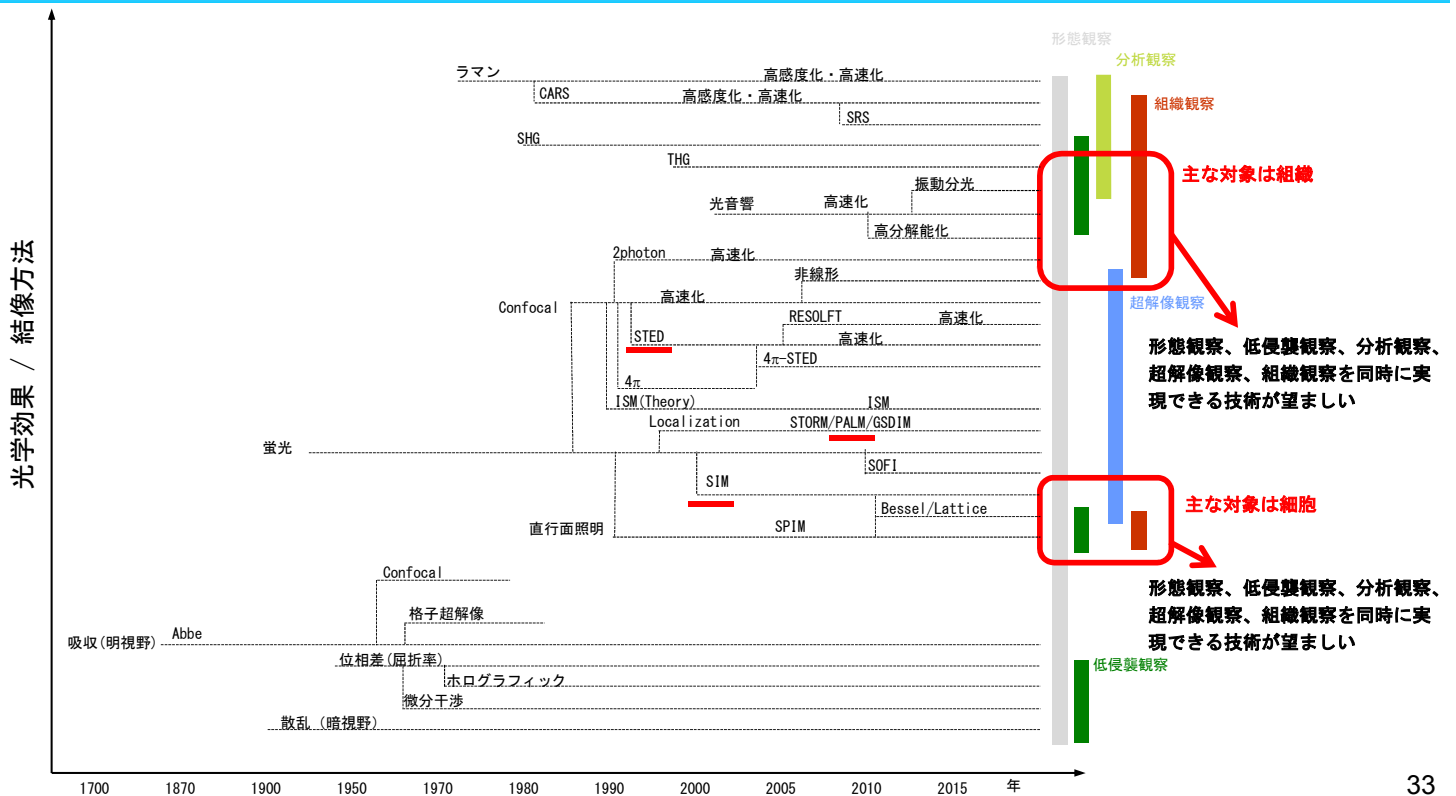


超解像蛍光顕微鏡、分析顕微鏡、顕微診断装置



32

モダリティ（光学効果／結像方法）と技術変遷



33

光学顕微鏡

基本原理

- ・ 試料に光を照射した際に生じる光吸収、光散乱、発光、音波発生といった光学効果を利用して試料の形態情報を得る。
(空間分解能や観察深さなどの特徴、物質分析能力などの機能は使用する光学効果により大きく異なる。)
- ・ 観察対象の生体分子を蛍光プローブなどのプローブ分子で標識し、そのプローブ分子の発光を捉えることで生体観察する。
(生体観察を繰り返すことで、タンパク質等の3次元的な空間分布の経時変化を捉える。)
- ・ 照射する光や検出する光学効果に変調を加える、あるいは、分子のエネルギー遷移状態をコントロールすることで空間分解能を超解像化する。
- ・ ラマン散乱や高調波発生などの光散乱効果から、材料中の分子の振動分光解析および界面構造/状態の情報を取得する。

効果が期待できる研究分野

・ 生物学、基礎医学 ・ 医学 (診断、治療、再生医療) ・ 薬学 ・ 半導体工学 ・ 材料工学 ・ 畜産 ・ 植物学

産業応用が期待される分野

・ 医療、創薬、各種材料、デバイスの分析 (太陽電池、二次電池、カーボン材料等)

必要となる要素技術

- ・ 高ダイナミックレンジ、より高速、低雑音な光検出器 ・ 高出力光源や多波長 (短波長、長波長、可変波長など) 光源
- ・ マルチスケール観察技術、マルチモーダル観察に適した光学素子 (レンズ、フィルター、高スループット分光素子等)
- ・ 生体試料の自動調整、撮像/画像処理技術 ・ 他の観察技術との協調/連携制御技術
- ・ 標識技術: 強度の高い信号光を生じるプローブ分子開発。超解像や長波長発光、環境センシング、機能発現、生体刺激などの機能性をもつプローブ分子開発。

今後開発が期待される技術・システム

- ・ 超解像蛍光顕微鏡の発展: さらなる空間分解能の向上、蛍光プローブなどのプローブ分子を必要としない超解像技術、および、非侵襲性が向上した超解像技術。
- ・ 外部環境変化や薬剤等の各種刺激に対する細胞応答のスクリーニング等に適用可能な高スループット観察技術
- ・ 分析顕微鏡: 生体分子や材料、デバイス等を対象とした形態情報取得と分析を同時に行う計測システム、
より観察深さを深くした内部観察技術 (可変波長光源や透明化技術など)
- ・ マクロ (生体機能やデバイス特性等) の情報とミクロ (生体分子/細胞や材料品質/特性等) の情報をシームレスに観察/取得可能なマルチスケール技術
- ・ 材料の経年劣化、病変等の長いタイムスパンで発生する現象を追跡しつつ発生頻度の少ない重要な現象を捉えるマルチタイムスケール観察技術

その他の波及効果

- ・ 開発に伴い得られる微細な空間での光と物質の相互作用に関する知見は、微細加工や記録、材料の特性制御の技術開発へも波及効果があり、新しい機能や特性を持つ新規デバイスの開発に繋がる。
- ・ 顕微鏡技術がマイクロフルイディクス等の化学デバイスの研究開発へ利用されることで、バイオセンサー、環境センサー、診断を行う微小なデバイスの開発、高度化が促進される。

必要となる要素技術 (結像特性の向上、分析力の向上)

○ 空間/時間分解能の向上

1. 検出器、レンズの開発

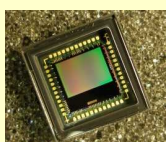
超解像蛍光顕微鏡の空間分解能は光検出の信号対雑音比、ダイナミックレンジにより決定される。光検出器の量子効率の向上、読み出し/増幅ノイズの低下、ウェルサイズの向上、読み出し速度の向上は、どれもが空間分解能の向上に寄与する。

各種収差がよく補正され、かつ高スループットの対物レンズを歩留まり良く製造する技術や"Adaptive Optics"のようなレンズの機能を補正・補完する装置も顕微鏡全体の質の向上に大きく資する。

2. 蛍光プローブの開発

超解像蛍光顕微鏡の空間分解能は試料を標識する蛍光プローブの明るさ、耐褪色性、光スイッチングのon/offコントラストおよび応答速度に依存する。これらを改善した蛍光プローブが開発されれば空間分解能、および時間分解能をさらに向上できる。

光音響用のプローブについては、音響波を効率的に発するため、近赤外波長でのモル吸光係数が大きく、かつ蛍光量子収率が小さい (光音響量子効率が大い) プローブの開発が望まれる。



CMOSイメージセンサー¹⁾



超解像用プローブ(スイッチングプローブ)²⁾

3. 無標識超解像原理の開発

光散乱、反射、および吸収を用いる顕微鏡も各種材料やデバイス観察に活用されており、これらの超解像化も望まれる。蛍光顕微鏡と同様、試料における光学効果を詳細に理解し活用することで超解像顕微鏡化は可能となる。そのためには上記の光検出器の性能向上、また後に示す分析能力の向上に資する光学デバイス、機器の開発が必要となる。

○ 機能化 (生体機能の観察)

生体機能を超解像観察するためには、超解像観察に適し、かつ各種イオン濃度や電位・温度感受性のプローブ、定量性の高いプローブ、生体に非侵襲なプローブが必要となる。

1) Wikipedia, <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Matrixw.jpg>
2) 東京大学 浦野泰照、神谷真子

必要となる要素技術（分析力の向上、マルチモーダル化）

○ 分析能力の追加・向上

分光分析が可能であることも光学効果を使う利点であるため、これをイメージングと組み合わせることにより、試料の形態情報と物質情報を同時に取得でき、豊富な情報を目的に応じて提供できる。たとえば、分子種や結晶の同定や、その特性の変化といったミクロな情報から、材料の力学特性、デバイスの特性、細胞や生体組織の識別や診断といったマクロな情報の取得まで、幅広い活用範囲が見込まれる。

そのためには、分光分析に適した、高スループット・高解像度の光回折素子およびデバイス、狭線幅レーザー、波長可変光源（可視から赤外）、広帯域光検出器（特に近赤外から赤外）とそれらの低ノイズ、高解像度化が望まれる。

また、非線形光学効果の活用は分光分析の幅をさらに広げる可能性があるが非線形光学効果の誘起に適した超短パルスレーザーは高価で扱いが難しく、このため、超短パルスレーザーの小型化、低コスト化は、技術開発と普及の両方を促進すると期待される。



小型超短パルスレーザー¹⁾
(ファイバーレーザー)

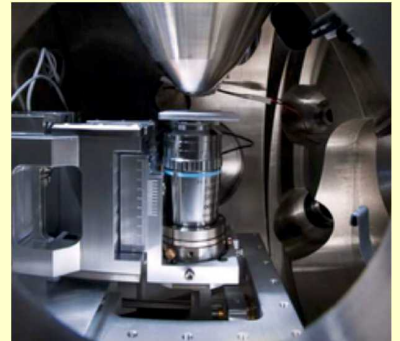


イメージング分光器²⁾

○ マルチモーダル化

赤外およびラマン分光をはじめとした分析要素を取り入れたイメージングの開発により、形態情報に加え、物質情報を同時に取得できるようになる。これにより生体や材料の機能とイメージ情報とを関連でき、目的に応じた詳細な試料分析が可能となる。そのためには、蛍光、光音響、ラマン散乱等の複数の効果を用いて試料の同一箇所を、可能な限り同時に観察するシステム構築が必要となる。

また、MRI装置や電子顕微鏡と光学顕微鏡観察を組み合わせた装置、およびそれを可能とするための標識技術（たとえば、蛍光およびMRI観察が可能なプローブ）の開発も期待される。



Correlative Microscope (蛍光顕微鏡+電子顕微鏡)の試料設置部³⁾

1) IMRA America, Inc.

2) 分光計器株式会社

3) Liv et al., PLoS ONE 8(2): e55707 (2003).



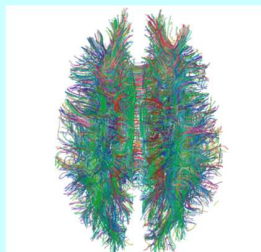
必要となる要素技術（ビッグデータ解析、ユーザビリティの向上）

○ ビッグデータ解析

光学顕微鏡の非侵襲性および分光分析能力により膨大なデータ（3次元形態、試料/物質特性、およびそれらの経時変化）の取得が可能となると予想される。取得されたデータの中から有意な情報を抽出し可視化する技術が必須となる。

材料の分光分析情報については、計測手法や記録方法を標準化し、データベースの構築、活用を容易にする必要がある。

また、得られた解析結果を評価するための基準も定める必要がある。



脳神経網のマッピング¹⁾

○ 画像処理技術の開発

光学顕微鏡の応用が広がるに伴い、低コントラストでの観察、特定条件での観察、リアルタイム観察などが重要になる。このような応用に適用するためには、ノイズ低減やデコンボリューション・高速解析などのあらたな解析技術の開発が必要である。

○ ユーザビリティの向上

超解像、分光分析等、多くの機能を光学顕微鏡に組み込むことが可能であるが、観察可能な試料形態が制限されたり、操作は複雑であったりすると活用されることはほぼ不可能である。また、生体試料の観察に関しては、試料の生理活性を保ったまま試料を設置可能であり、かつ様々な処置（投薬、電気/機械刺激等）が可能な装置が求められる。ハードウェア、ソフトウェアの両方について、応用を踏まえた上で設計を進めることが必要である。

マルチモーダル観察が可能な装置については、試料の移動やモード切替を速やかに自動でおこなうハードウェア開発が必須となる。



顕微鏡用インキュベーター²⁾

1) Gigandet et. al. PLoS ONE 3(12): e4006. (2008).

2) 株式会社 東海ヒット

