

蛍光顕微鏡の最高性能を引き出すための 球面収差の解決に向けて

田島 鉄也（慶應義塾大学 医学部 共同利用研究室）

TAJIMA Tetsuya : Towards a solution of spherical aberration for the best performance of fluorescence microscopy.

The causes and countermeasures for spherical aberration in fluorescence microscopes under actual usage conditions are discussed. To minimize spherical aberration, it is important to use an objective lens medium with a refractive index close to that of the sample (mounting medium). Correction ring is difficult to use, but when used appropriately it provides good performance in correcting spherical aberration.

1. 本報告の趣旨

蛍光顕微鏡において最高性能を発揮するためには、顕微鏡の画像を悪化させる要因の一つである球面収差への対策が不可欠である。そこで球面収差を最小化する方法について検討したので報告する。

前半はサンプル（封入剤）と、対物レンズ媒質の屈折率を近づけることの重要性について述べる。

後半は対物レンズの補正環の機能と問題点について述べる。

2. 球面収差とは何か？

球面収差とは顕微鏡の画像の質を悪化させる現象である（図 1）。

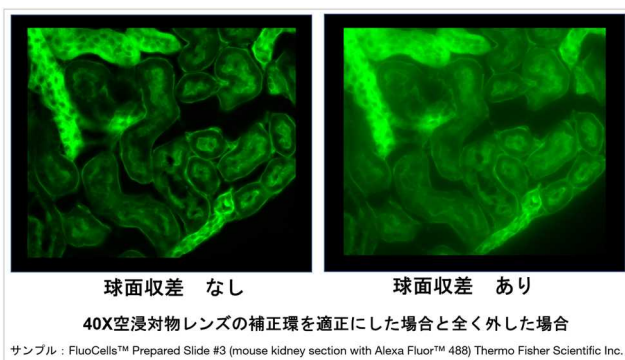


図 1. 球面収差がある場合とない場合の蛍光顕微鏡画像

一般的な意味での球面収差と、顕微鏡における球面収差は以下のようにその定義が異なっている（図 2）。

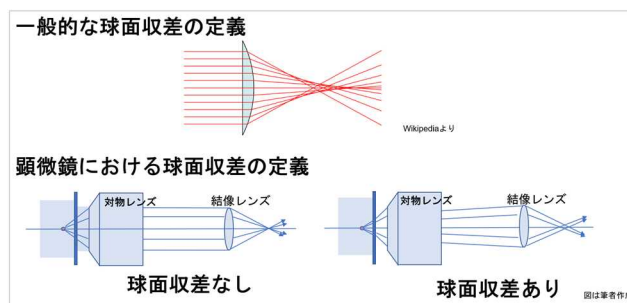


図 2. 球面収差の定義

・一般的な球面収差の定義：

かつてはレンズ加工の都合上、レンズ表面は球面の一部であり、一枚のレンズに平行光を入射した場合、レンズの中心付近を通る光線と外側を通る光線が同じところに集まらない状態になる現象が知られていた。いわゆる「ピントぴったりの場所が存在しない」状態になる。これを一般的な意味における球面収差という（図 2 上）。

・顕微鏡における球面収差の定義：

上記の一般的な球面収差の問題は、近年のレンズの設計、制作技術の向上によりすでに克服されている。顕微鏡における球面収差は上記とはまた別の事象である。顕微鏡においてはサンプルから対物レンズに入った光は平行光線となり結像レンズによって一点に集まるようにできている。しかしサンプルの状況によっては、対物から出た光が平行光線にならず焦点が 1 点に定まらない状態になり、「ピントぴったりの場所がなくなる」状態になる。このことを顕微鏡における「球面収差」という（図 2 下）。

3. 共焦点レーザー顕微鏡における球面収差の現れ方

共焦点レーザー顕微鏡の場合、球面収差が起きていると周辺部分の光線がピンホールで除かれ、レンズの中央付近を通る光だけが検出器に入る。本来の明るさより暗くなりノイズが増加し解像力も落ちる。

しかし、画面の輝度レベル補正で明るく見えてしまい、球面収差が発生していても気が付かずに使ってしまうことが多い(図3)。

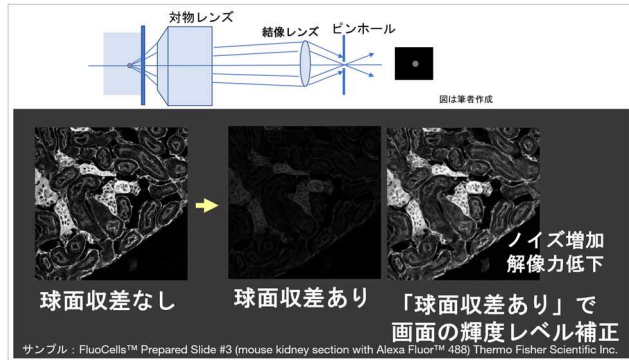


図3. 共焦点顕微鏡における球面収差の現れ方

4. 顕微鏡の球面収差の原因

顕微鏡の場合、球面収差はサンプル(組織+封入剤)と対物レンズの関係によって生じる。図4に示すように、それには3つの原因がある。

- (1) サンプル①と対物レンズ媒質①'との屈折率の差
 - (2) カバーガラスの厚み②のバラつき(通常0.17mm程度)
 - (3) カバーガラス表面から観察場所までの距離③
- このうち、(1)がもっとも大きな原因である。

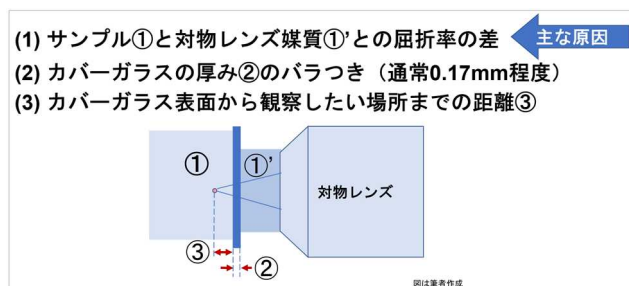


図4. 顕微鏡における球面収差の原因

(なお、対物レンズ媒質①'とは、対物レンズ先端とカバーガラスの間にある物質のことで、種類として空気、水、グリセリン、シリコンオイル、ノーマルオイルなどがある)

5. サンプルと対物レンズ媒質の屈折率差による球面収差発生のおくみ

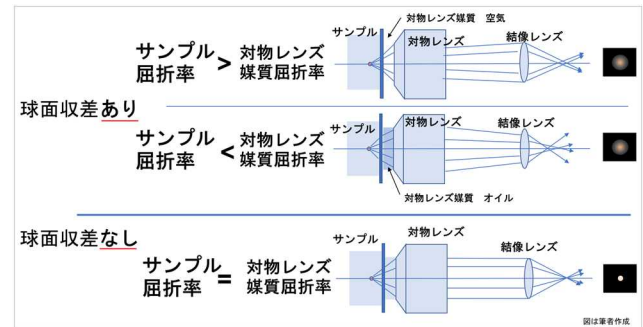


図5. 顕微鏡における球面収差発生のおくみ

図5にあるようにサンプルの屈折率が対物レンズ媒質の屈折率に比べて大きい場合でも小さい場合でも、対物レンズから出射する光が平行光にならず、球面収差が発生する(図5)。

6. 比較検証実験

球面収差発生の原因を確かめるために、屈折率のわかっているサンプル(屈折率1.4)に対して、媒質の異なる2本の対物レンズを使い、共焦点レーザー顕微鏡で画像を撮った。1本はノーマルオイルで1.52の屈折率、もう1本はシリコンオイルでサンプルと同じ1.4の屈折率である。

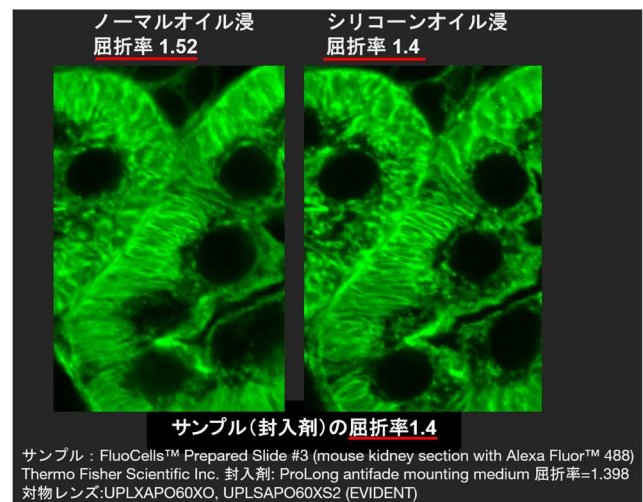


図6. 対物レンズ媒質の違いによる比較

結果、サンプルと同じ屈折率1.4のシリコンオイル浸の対物レンズで撮った画像(図6右)のほうが、屈折率1.52のノーマルオイル浸対物レンズで撮った画像(図6左)よりも解像力、コントラストともに優れていた。サンプルの屈折率に近い媒質の対物レンズを使うことで球面収差が減少することが確かめられた。

7. サンプル封入剤と対物レンズ媒質とのマッチング

サンプルの屈折率に近い媒質の対物レンズを使うと
 いても、では具体的にどうするのか？

① サンプル		② 対物レンズ媒質	
種類	サンプル、封入剤等	屈折率	
生細胞封入剤	Prolong Glass	1.38程度	シリコンオイル (1.4) or 水(1.33)
		始め 1.38, 1日後 1.46, 2日後 1.51, 5日後 1.52	
	Prolong Gold	始め 1.38, 1日後 1.44, 2日後 1.46, 5日後 1.47	始め シリコンオイル (1.4) 5日後 グリセリン (1.46)
		始め 1.38, 1日後 1.44, 2日後 1.46, 5日後 1.47	始め シリコンオイル (1.4) 5日後 グリセリン (1.46)
	Slow Fade Gold	1.42	シリコンオイル (1.4),
VECTAR SHIELD	1.45	グリセリン (1.46)	

図 7. サンプル封入剤と対物レンズ媒質の屈折率

試薬メーカーのウェブサイトには封入剤の屈折率が掲載されているので、その屈折率に近い媒質を持った対物レンズを使うことである。中には Prolong シリーズのように、カバーガラスとスライドガラスの間に挟むと硬化するのに数日かかり屈折率が変化していく封入剤もある (図 7)。

ただし球面収差の発生の仕方は複雑なので、実際はいくつかの対物レンズで見比べることをお勧めする。

組織透明化試薬に対しても同様である。

8. 補正環とは何か？

本報告の後半は対物レンズの補正環について述べる。

対物レンズによっては周囲にリングがついているものがある。これが補正環である。リングには目盛りがあり、カバーガラスの厚みを表している。0.17mm が標準となっている (図 8)。



図 8. 対物レンズの補正環

補正環は、対物レンズ内にある補正レンズを動かし、対物レンズから出る光を平行光にする役割があり、これによって球面収差を補正できる (図 9)。

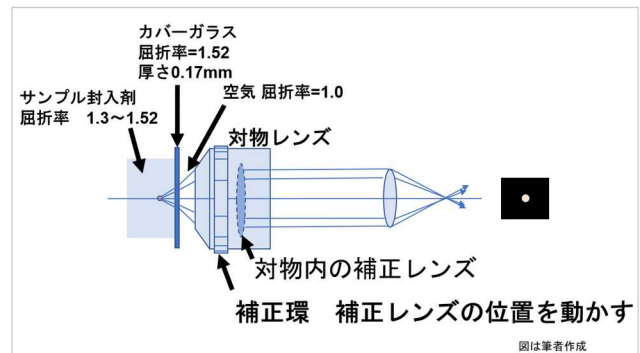


図 9. 補正環の機能

補正環は「4. 顕微鏡の球面収差の原因」に挙げた球面収差の 3 つの原因のいずれに対しても効果がある。



図 10. 補正環の扱いにくさ

しかし、特に倒立型顕微鏡において補正環は扱いにくいものである。図 10 に示すように目盛りが見えなかったり、補正環を回すためにステージ下から手を入れなければならなかったり、対物レンズに触れるだけでフォーカスがずれたりなど実用上の問題がある (最近では自動補正環というものも開発されているが、まだ一般的なものではない)。

9. 補正環の効果

補正環の効果を確認めるべく、実験を行った。



図 11. 補正環の効果実験

図 11 に示すように厚さ 16µm のスペーサー付きのスライドガラスとカバーガラスを用意し、直径 0.2µm の蛍光ビーズをつけて間を水で満たした。カバーガラス

は厚みのバラつきがあるため、マイクロメーターで測り 0.170mm のものと 0.138mm のものを選定した。

この状態で、40 倍の空浸の補正環付き対物レンズを用い、落射蛍光顕微鏡でビーズの Z スタック画像を撮った。撮影した画像の Z 方向の断面を示すと、丸いはずのビーズは、顕微鏡のボケの効果によって細長くみえた。球面収差が発生するとさらにその像が伸びて見え、球面収差が発生していることを確認できた。

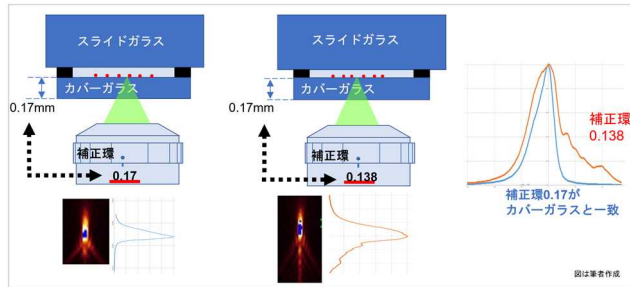


図 12. カバーガラスの厚みと補正環

まず厚さ 0.17mm のカバーガラスに貼り付いているビーズを観察した (図 12)。補正環の目盛りがカバーガラスの厚みと同じ 0.17 の場合におけるビーズの Z スタック画像の断面と、その輝度プロファイルを示す (図 12 左: 青い山の線)。この輝度プロファイルは鋭い山を描き、球面収差が少ないことを示していた。

そしてその状態で補正環の位置を 0.138 付近に動かし同様に Z スタック画像を取得し輝度プロファイルを描いたところ、ビーズの Z スタックの断面が縦に伸びてしまった (図 12 中: 赤い山の線)。輝度プロファイルを最初の青い山の線と比べると、赤い山の線のほうが山の幅が伸びており、球面収差が発生していることがわかった (図 12 右)。

こうして、カバーガラス面上を観察する場合、補正環をカバーガラスの厚みに合わせることが大切で、そこから外れると球面収差が発生することが確認できた。

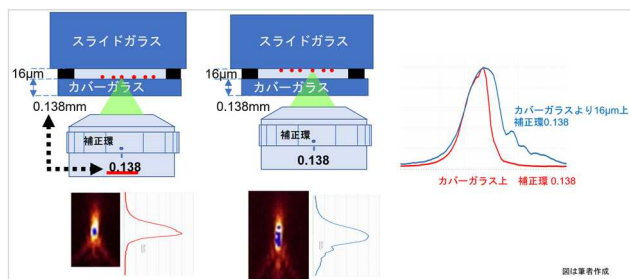


図 13. カバーガラスから離れたところでの球面収差

次に、カバーガラスから離れた場所にあるものを観察する際に生ずる球面収差の補正方法について述べる。厚さ 0.138mm のカバーガラスを用いて、ガラス面上

にあるビーズを観察した。補正環目盛りは 0.138 付近にした。輝度プロファイルの山は尖っており、球面収差が少ないことを示していた (図 13 左: 赤い山の線)。

そのまま対物レンズを上げてカバーガラスから 16 μ m 離れたところにあるビーズに焦点を合わせ、Z スタック画像を撮り、輝度プロファイルを描くと山の幅が伸びてしまい、球面収差が発生していることがわかった (図 13 中: 青い山の線, 図 13 右: 二つの山の比較)。

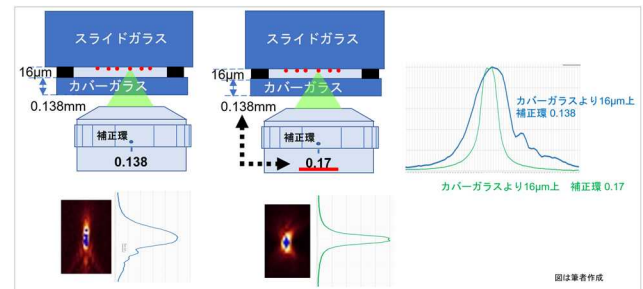


図 14. カバーガラスから離れたところでの球面収差の補正

そこで、補正環を回して最も輝度プロファイルの山が細くなる場所を探した。ちょうど 0.17 の箇所になると輝度プロファイルの山の幅が非常に細くなり、球面収差の少ない状態になった (図 14 中: 緑の山の線, 図 14 右: 二つの山の比較)。このようにカバーガラスから離れた場所で、補正環を回して適切に調整することにより球面収差を最小化することができた。

10. まとめ

球面収差を最小化するには、サンプル (封入剤) の屈折率を調べ、なるべく近い屈折率の媒質を持つ対物レンズを使うことが原則である。

補正環は (使いにくい) が正しく使うと良い性能を発揮する。

特に厚い組織切片標本の観察などにおいては、球面収差に気を付けるべきである。

11. 謝辞

本報告の作成にあたって、慶應義塾大学医学部共同利用研究室・松尾光一教授はじめ共同利用研究員のスタッフの皆様にご多大なご指導、ご協力をいただいた。

株式会社エビデントの坂倉正洋氏・藤田祐崇氏、田邊竜太郎氏、ライカ マイクロシステムズ株式会社の加藤寛子氏に必要な技術情報の提供や技術的アドバイスをいただいた。

改めて感謝申し上げます。