

深部まで明るく鮮明に構造をとらえる ～対物レンズの選び方～

屈折率のミスマッチに起因する「球面収差」は、画像の解像度や輝度の低下の原因となり、イメージングにおける課題の一つである。本アプリケーションノートでは、小腸上皮細胞三次元培養系であるエンテロイド(Enteroid)の三次元イメージングを例に、「球面収差」の影響を明示し、適切な浸液と対物レンズの選び方について紹介する。

球面収差とは？

対物レンズを使って集光する途中で屈折率が変化すると、光軸を通る光線と、光軸から離れた場所を通る光線は一点に集光しない(図1A, B)。この現象を「球面収差」という。

屈折率1.49の媒質中に存在するビーズを観察する場合、光は媒質($n=1.49$)、カバーガラス($n=1.55$)、カバーガラスと対物レンズの間の浸液を通過する。このとき、浸液の種類によって発生する球面収差の量は変化し、その影響は観察面がカバーガラスから離れた深部になるほど大きくなる。例えば、媒質に近い屈折率をもつシリコンオイル($n=1.40$)を浸液とした場合、水($n=1.33$)を浸液とする場合と比較して、球面収差の影響を軽減することができる(図1C)。

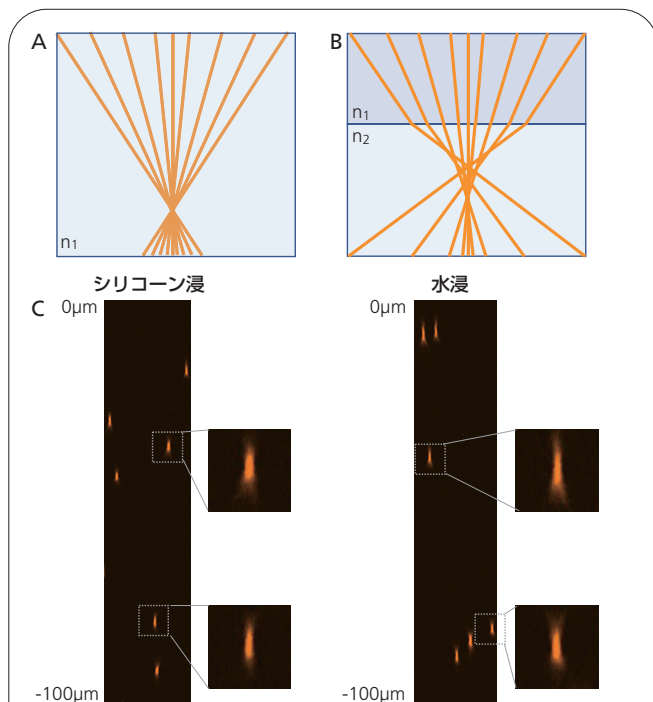


図1

- (A) 屈折率(n_1)が均一な媒質中では、光は一点に集光。
 (B) 屈折率が異なる媒質($n_1 > n_2$)を光が通過する場合、光は一点に集光しない。
 (C) 屈折率1.49の媒質中の蛍光ビーズのPSF像。深部になるほど、水浸ではビーズ像が伸び、シリコン浸では伸びの影響が少ない。蛍光ビーズは200 nm径のテトラスペックを使用し、561 nm励起でZスタック撮影した(XY解像度：0.14 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ 、Zステップ：0.2 μm)

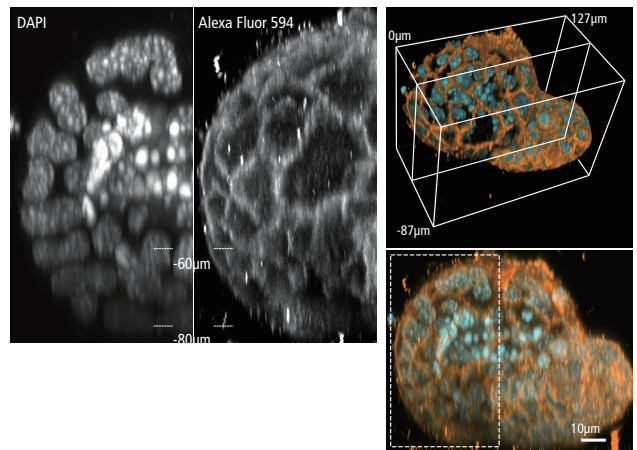
実験内容

細胞膜および細胞核を染色したエンテロイドを、屈折率の異なる透明化試薬(RapiClear、屈折率1.45/1.47/1.49、SunJin Lab)で処理し、シリコン浸または水浸の対物レンズで観察することにより、屈折率のミスマッチに起因する球面収差の影響を評価した。

図2：屈折率1.49のRapiClearで透明化したエンテロイドの観察

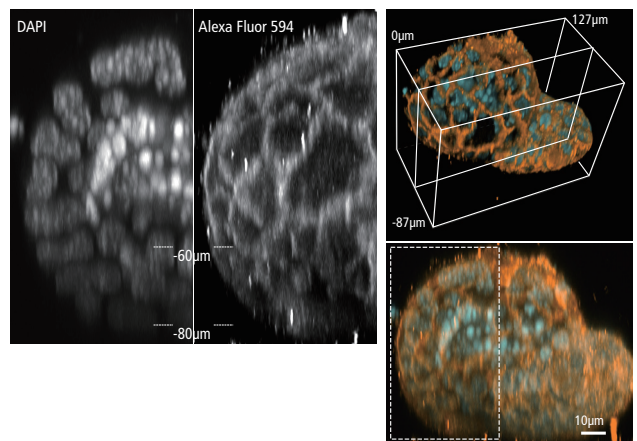
A. シリコン浸対物レンズ

XY解像度：0.12 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ 、Zステップ：0.5 μm



B. 水浸対物レンズ

XY解像度：0.12 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ 、Zステップ：0.7 μm

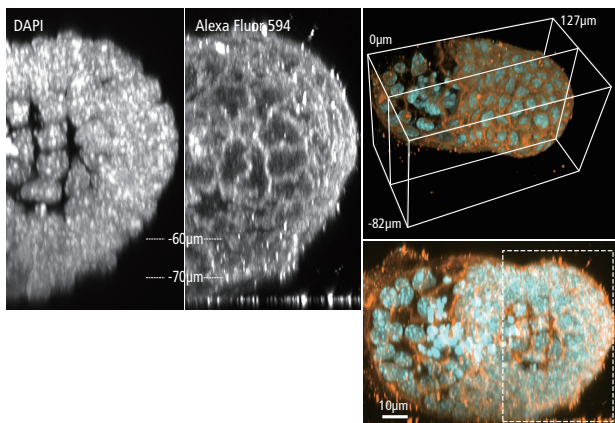


シアン：DAPI(細胞核)、オレンジ：Alexa Fluor 594 (E-カドヘリン)

図3：屈折率1.47のRapiClearで透明化したエンテロイドの観察

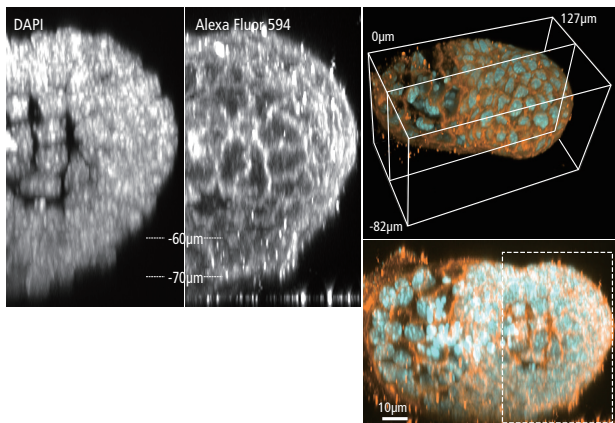
A. シリコン浸対物レンズ

XY解像度：0.12 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ 、Zステップ：0.5 μm



B. 水浸対物レンズ

XY解像度：0.12 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ 、Zステップ：0.7 μm

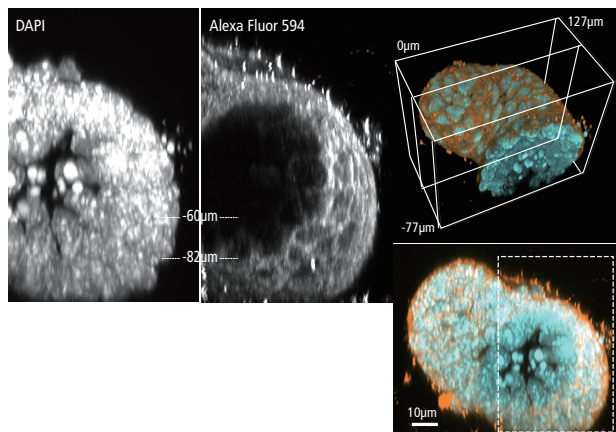


シアン：DAPI(細胞核)、オレンジ：Alexa Fluor 594 (E-カドヘリン)

図4：屈折率1.45のRapiClearで透明化したエンテロイドの観察

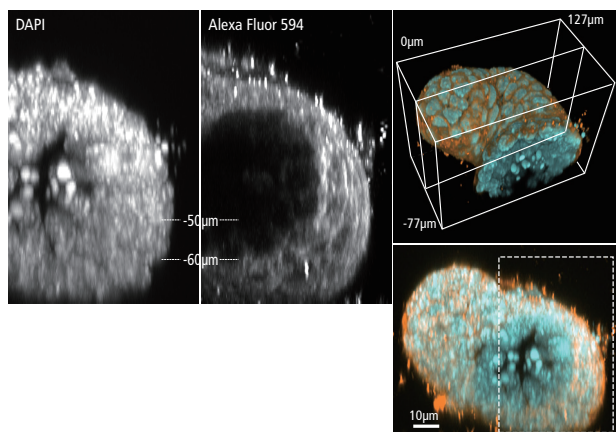
A. シリコン浸対物レンズ

XY解像度：0.12 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ 、Zステップ：0.5 μm



B. 水浸対物レンズ

XY解像度：0.12 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ 、Zステップ：0.7 μm



シアン：DAPI(細胞核)、オレンジ：Alexa Fluor 594 (E-カドヘリン)

結果とまとめ

今回使用した屈折率の異なる3種類のエンテロイドの場合、標本深部においても、シリコン浸の方が水浸よりも像の伸びが少なく、細胞構造の観察に適していた。

このように、深部まで明るく高精細な画像を取得するためには、使用する対物レンズは倍率や作動距離だけでなく、その浸液の屈折率も考慮して選択することが非常に重要である。

謝辞

標本および画像をご提供いただきました、北海道大学大学院先端生命科学研究所 細胞生物科学分野 自然免疫研究室の横井友樹先生、中村公則先生、ならびに綾部時芳先生に深謝致します。

参考

Nikon's MicroscopyU
<https://www.microscopyu.com/microscopy-basics/water-immersion-objectives>

製品情報

CFIプランアポクロマートLambda S 25XC SiI

生物標本に近い屈折率のシリコンオイルを使用することで、深部まで明るく、組織の三次元構造を高精細にとらえます。広視野対応により、組織の全体像も効率的に取得することができます。



共焦点レーザー顕微鏡システム A1R HD25

高スループットと高解像イメージングを可能にする、世界最大の25mmの視野を実現。生体組織やモデル生物などの大型サンプルの観察に最適です。

