

医学系研究科共同研機分析セミナー 2025年4月15日

# 超解像蛍光顕微鏡で どこまで見えるか

## Principles of Super-resolution Microscopy

平岡 泰  
Yasushi Hiraoka

大阪大学 大学院 生命機能研究科  
Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University

1

### 超分解能光学顕微鏡 Super-resolution microscope - 分解能の限界を超える Beyond the resolution limit

- そもそも、光学顕微鏡の分解能の限界とは  
What the resolution limit is
- 顕微鏡像はどのように作られるか  
How an image is generated through a microscope
- どのようにして限界を越えるのか  
How we can go beyond the resolution limit
- 越えたら、どこまで見えるのか  
What we can see beyond the resolution limit
- 分解能を台無しにする方法  
How we can destroy the resolution

2

### 蛍光顕微鏡の基礎 Principle of fluorescence microscopy

The diagram illustrates the principle of fluorescence microscopy. It shows a light source (光源) emitting light that passes through an excitation filter (励起フィルター) and a dichroic mirror (ダイクロイックミラー). The light then passes through an objective lens (対物レンズ) to illuminate a specimen (試料). The specimen emits fluorescence (蛍光), which is collected by the objective lens and passes through a barrier filter (バリアフィルター) and another dichroic mirror. The light then passes through an ocular lens (接眼レンズ) to form a microscopic image. The diagram also includes a graph of Transmittance (透過率) vs. Wavelength (波長) showing the excitation spectrum (励起スペクトル) and fluorescence spectrum (蛍光スペクトル).

3

### Resolution そもそも、光学顕微鏡の分解能の限界とは

Diffraction limit 回折限界

2 point images

Airy disk

Diameter of Airy disk  
Airyディスクの直径

Minimum distance for separation

Rayleigh's criterion  
レーリーの分解能

$0.61 \lambda / NA$

波長:wavelength  $\lambda$  開口数:Numerical Aperture (NA)

4

### 開口数 NA Numerical Aperture

Objective lens 対物レンズ

Dry Lens 乾燥レンズ

Air  $n=1$

カバーガラス Cover slip 試料 Specimen

スライドガラス Glass slide

$NA = n \sin \theta$

Objective lens 対物レンズ

Oil immersion Lens 油浸レンズ

Oil  $n=1.518$

カバーガラス Cover slip 試料 Specimen

スライドガラス Glass slide

5

### 顕微鏡像はどのように作られるか Formation of microscopic images

Point image

点像の広がり

Point object

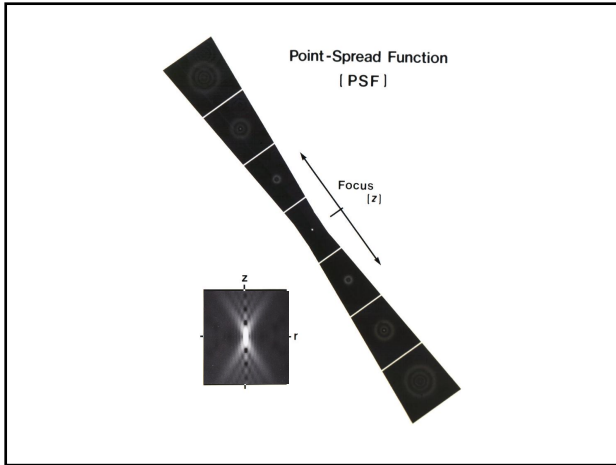
顕微鏡像 ← [光学顕微鏡] ← 試料物体

Microscopic image

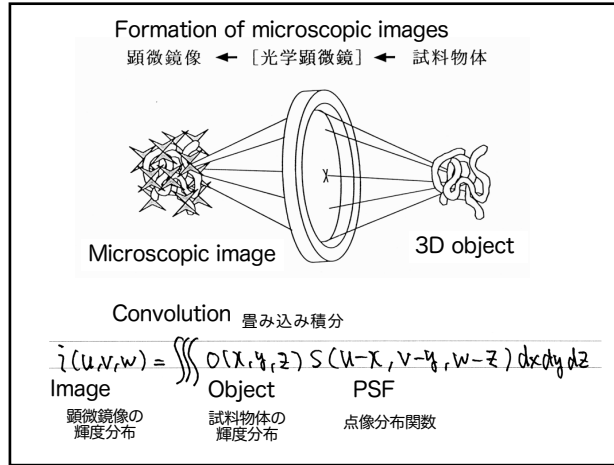
3D object

顕微鏡像の形成

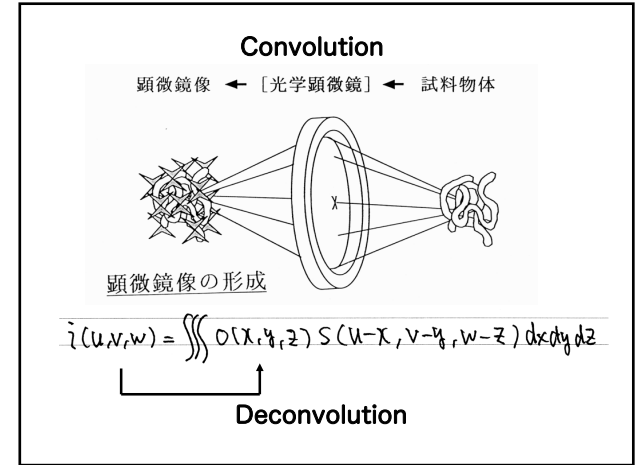
6



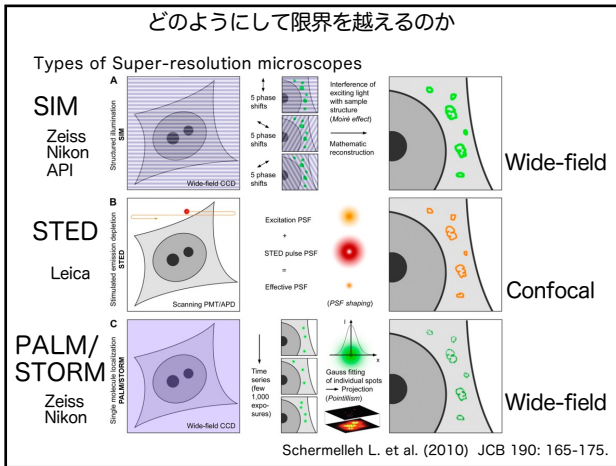
7



8



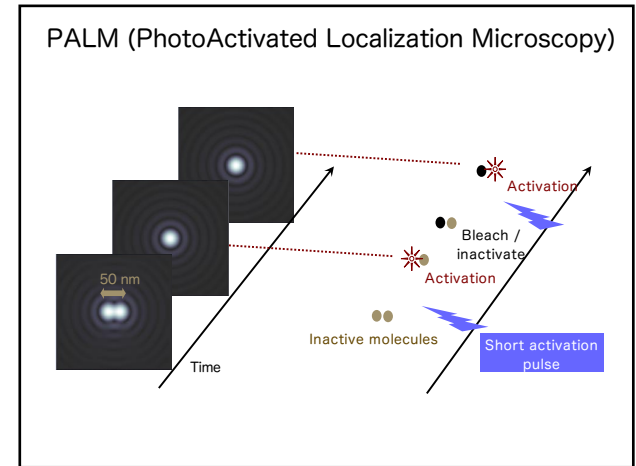
9



10

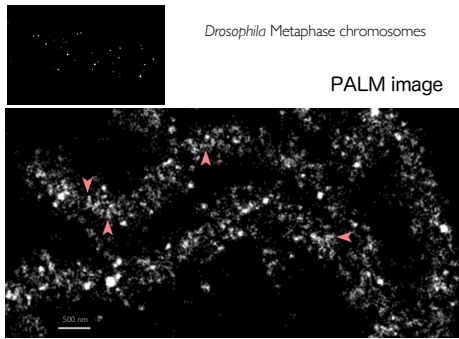


11



12

PALM (PhotoActivated Localization Microscopy)



13

Confocal microscope

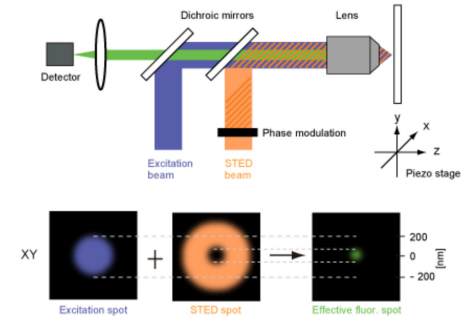
STED  
Stimulated Emission Depletion



Stephan Hell  
The Nobel prize 2014

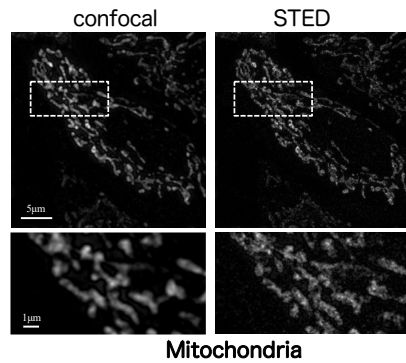
14

STED (Stimulated Emission Depletion) microscopy



15

STED (Stimulated Emission Depletion) microscopy



Sample: ObgH1-GFP in HeLa cell

16

Wide-field microscope

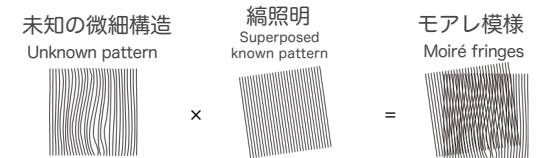
SIM  
Structured Illumination Microscopy



Mats Gustafsson  
(1960-2011)

17

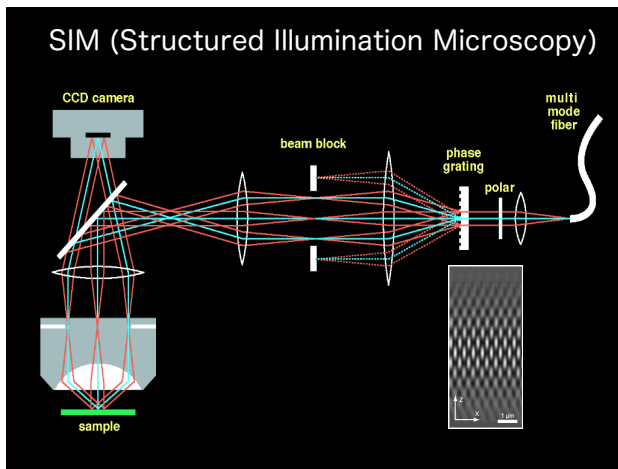
SIMの原理： 縞照明とモアレ模様  
Principle of SIM Structured Illumination and Moiré fringes



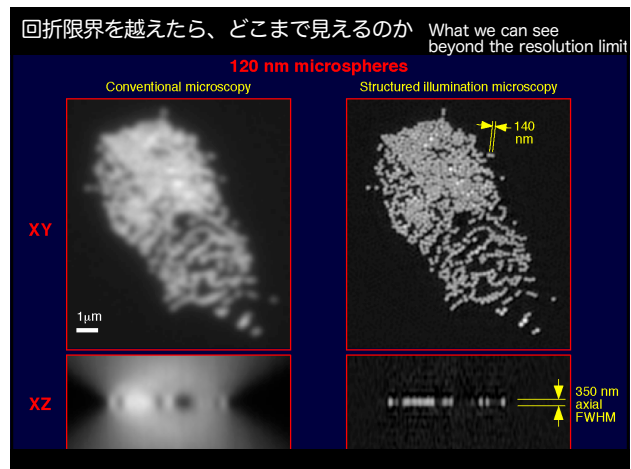
Moiré fringes can be resolvable

モアレ模様は分解能より大きくなる

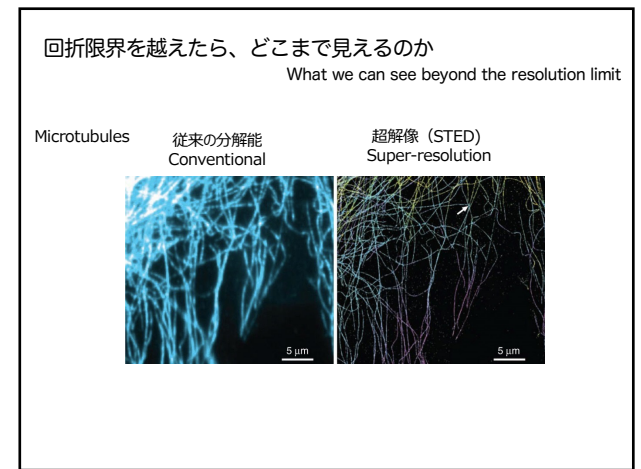
18



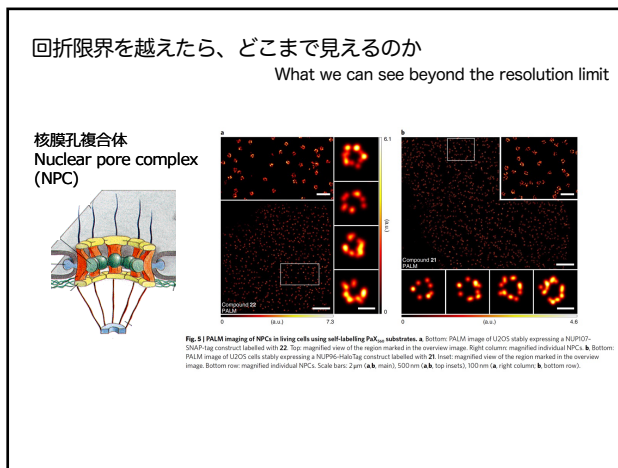
19



20



21



22

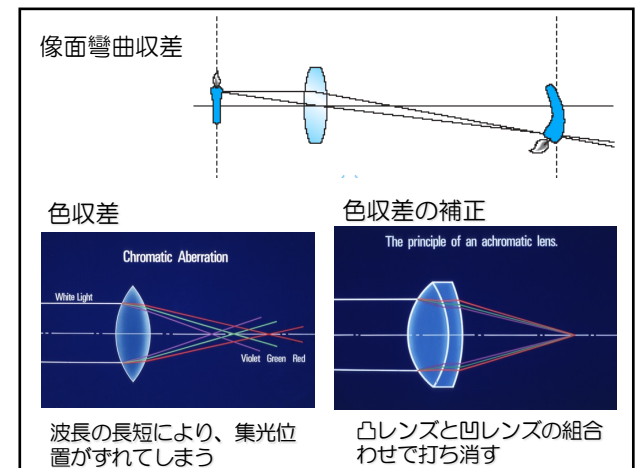
### 分解能を台無しにする方法

Aberration of the objective lens can easily destroy the resolution  
対物レンズの収差が分解能を破壊する

Important to minimize aberrations especially in super-resolution microscopy  
収差を低減することは、超解像イメージングでは特に重要

Chromatic Aberration	色収差
Curvature-of-Field Aberration	像面湾曲収差
Spherical Aberration	球面収差

23



24

**球面収差**  
Spherical Aberration

PlanApo 60  
1.4 oil  
∞ / 0.17

Immersion 油浸  
Coverslip カバーガラス  
Specimen 試料

対物レンズは、以下の条件を満たす時に球面収差が無いように補正されている

- (1)正しい厚さのカバーガラスを使用し、
- (2)正しい屈折率の液浸（水浸・油浸等）をし、
- (3)試料がカバーガラスの直下（直近）にある

Objective lenses are corrected for spherical aberration when:

- (1) immersion with correct refractive index is used
- (2) a coverslip with correct thickness is used
- (3) the specimen is immediately on the coverslip

25

**球面収差 Spherical aberration**

光路長の過不足（屈折率のミスマッチ）  
Mismatch of refractive index

光路長の過不足を生じる要因  
Causes of spherical aberration

- ・ カバーガラスの厚さ  
Mismatch of coverslip thickness
- ・ 液浸（水浸、グリセロール浸、油浸）の屈折率  
Refractive index of immersion
- ・ 試料溶液の屈折率  
Refractive index of sample solution
- ・ **試料自体の屈折率**  
Refractive index of specimens

オイル	1.518
グリセロール	1.47
水	1.33
<b>細胞質</b>	<b>~1.4</b>

26

2007 初版 Textbook (in Japanese) 2015 新版

講義と実習  
**生細胞蛍光イメージング**  
阪大・北大 顕微鏡コースブック

原口 穂子  
本村 宏 監修  
平岡 泰 監修

**FLUORESCENCE IMAGING**

新・生細胞  
**蛍光イメージング**  
原口穂子・本村 宏・平岡 泰 監修

共立出版

27