

# 顕微鏡の使い方ノート

## はじめての観察からイメージングの応用まで

改訂第3版 序 (野島 博)

初版 序 (野島 博)

### 第1章 顕微鏡の歴史 (野島 博)

I	ガラスの発見	16
II	レンズの発明	17
III	光学用レンズの作製と望遠鏡・顕微鏡の発明	17
IV	顕微鏡大量生産の時代	18
V	分解能の限界	19
VI	分解能への挑戦	19
VII	電子顕微鏡の開発	20
VIII	走査型プローブ顕微鏡	20
	①走査トンネル顕微鏡	21
	②原子間力顕微鏡	21
IX	新世代顕微鏡	21
X	バイオサイエンスにおける次世代型顕微鏡	22
XI	画像記録の進展	22
XII	バイオイメージング技術の発達	23

### 第2章 各種の顕微鏡でできること

I	はじめに	(坂口一紀) 24
II	明視野観察 (Bright Field)	(坂口一紀) 24
	①特徴・メリット ②目的・用途	
III	位相差観察 (Phase Contrast)	(坂口一紀) 25
	①特徴・メリット ②目的・用途 ③必要なアクセサリ	
IV	微分干渉観察 (Differential Interference Contrast)	(坂口一紀) 26
	①特徴・メリット ②目的・用途 ③必要なアクセサリ	

<b>V</b>	<b>暗視野観察 (Dark Field)</b> (坂口一紀) 27
	① 特徴・メリット ② 目的・用途 ③ 必要なアクセサリ
<b>VI</b>	<b>偏光観察 (Polarizing)</b> (坂口一紀) 27
	① 特徴・メリット ② 目的・用途 ③ 必要なアクセサリ
<b>VII</b>	<b>蛍光顕微鏡</b> (阿部勝行) 28
	① 目的・用途 ② 特徴・メリット ③ 蛍光観察における注意点
<b>VIII</b>	<b>共焦点レーザースキャン顕微鏡</b> (石館文善) 30
	① 目的・用途 ② 特徴・メリット

## 第3章 光学顕微鏡

<b>I</b>	<b>基礎知識</b> (坂口一紀) 33
	① 光学顕微鏡の構成 33
	① 光学顕微鏡の構成 ② 光学顕微鏡の種類
	② 光学系の特徴と性能 34
	① 倍率 ② 実視野 ③ 開口数 ④ 分解能 ⑤ 焦点深度 ⑥ 像の明るさ
	③ 光学系の機能 38
	① 光学系の構成 ② 照明光学系 ③ 観察光学系
	④ いろいろな観察法 44
	① 明視野観察 ② 位相差観察 ③ 微分干渉観察 ④ 蛍光観察 ⑤ 暗視野観察
<b>II</b>	<b>基本的な取り扱い</b> (横山茂樹) 53
	① はじめに 53
	② 顕微鏡構成 54
	③ 使用前の初期調整 54
	① ケーラー照明の調整 ② コンデンサーの絞り調整法
	④ 顕微鏡操作 57
	① 各顕微鏡共通の基本操作 ② 明視野顕微鏡 ③ 位相差顕微鏡 ④ 微分干渉顕微鏡
	⑤ 暗視野顕微鏡 ⑥ 簡易偏光顕微鏡 ⑦ 蛍光顕微鏡 ⑧ 検鏡方法切り替え早見表
	⑤ 顕微鏡使用上のヒント 63
	① 視度調整法 ② コンデンサー絞り ③ 顕微鏡の能力
	⑥ デジタルカメラ撮影 66
	① シングル画像撮影 ② 画像の保存と処理 ③ 多重蛍光撮影
	⑦ デジタル画像の処理ソフト 71
	⑧ メンテナンス法 71
	① メンテナンス ② レンズクリーニングに準備するもの ③ レンズのゴミ除去方法
	④ 対物レンズのオイル後始末方法 ⑤ コーティング製品のクリーニング

## 第4章 蛍光顕微鏡

(阿部勝行)

<b>I</b>	<b>蛍光顕微鏡の概要</b> 75
	① 目的・用途 75

②特徴	75
<b>II 蛍光の原理</b>	75
<b>III 蛍光顕微鏡の基本構成</b>	77
①基本構成要素	77
②蛍光顕微鏡用の光源	78
③蛍光顕微鏡用のフィルター	79
①励起フィルター ②ダイクロイックミラー ③蛍光フィルター	
④蛍光顕微鏡用の対物レンズ	80
<b>IV 基本的な使い方</b>	81
①各部の名称	81
②標本の観察	82
<b>V よい蛍光像を得るためのポイント</b>	89
①よい蛍光像とは	89
②適切なフィルターの選択	90
①励起フィルターによる選択 ②蛍光フィルターによる選択	
③蛍光観察に適した対物レンズの選択	94
①蛍光観察に要求される対物レンズ性能 ②対物レンズの調整について	
④迷光を小さくする	97
⑤自家蛍光についての注意（対物レンズを除く）	98
①イメージジョンオイルの自家蛍光 ②標本組織そのものから出る自家蛍光	
⑥標本の褪色防止	100
<b>VI 取り扱いと手入れのしかた</b>	101
①顕微鏡本体の取り扱いと手入れ	101
②対物レンズの手入れ	101
③蛍光キューブ、フィルターの取り扱いと手入れ	102
<b>VII 全反射蛍光顕微鏡</b>	103
①はじめに	103
②全反射蛍光顕微鏡の原理	103
①全反射とエバネッセント光 ②全反射蛍光顕微鏡の種類	
③全反射蛍光顕微鏡の構成と使用法	104
①全反射蛍光顕微鏡の基本構成 ②全反射蛍光顕微鏡に適した対物レンズ ③全反射蛍光顕微鏡の観察手順	
④全反射蛍光顕微鏡の応用例	109
⑤全反射蛍光顕微鏡使用上の注意	110
①試料の設置 ②レーザーに対する安全性 ③干渉縞に対するトラブルシューティング	

## 第5章

# CCDカメラを利用した画像処理法

(曾我正宣)

<b>I ライフサイエンス分野における CCD カメラ</b>	113
<b>II CCD カメラの歴史とその原理</b>	113

<b>III</b>	<b>CCDカメラを選択する際のポイント</b>	116
	①各種 CCD カメラ	116
	①モノクロ CCD カメラ ②カラー CCD カメラ ③ビデオカメラ ④感度増倍機能つき CCD カメラ ⑤高速フレーム冷却 CCD カメラ	
	②製品の性能比較のポイント	120
	①素子サイズ ②量子効率 ③ダイナミックレンジ ④冷却温度（暗電流） ⑤読み出しノイズ ⑥転送速度とフレームレート	
<b>IV</b>	<b>CCDカメラの使用方法</b>	124
	①明視野撮影	124
	②蛍光撮影	126
	①カラー CCD カメラによる蛍光撮影 ②モノクロ CCD カメラによる蛍光撮影	
<b>V</b>	<b>CCDカメラを用いたいろいろなアプリケーション</b>	132
	①タイムラプスシステム	132
	②デコンボリューションシステム	132
	③FRAP, FLIP, PA-GFPなどのレーザーを使用したアプリケーション	133
	④TIRF（全反射蛍光顕微鏡）システム	134
	⑤FRET	135

## 第6章 共焦点レーザースキャン顕微鏡

<b>I</b>	<b>はじめに</b>	(石館文善) 136
<b>II</b>	<b>共焦点レーザースキャン顕微鏡の特徴</b>	(石館文善) 137
<b>III</b>	<b>共焦点レーザースキャン顕微鏡の原理</b>	(石館文善) 141
<b>IV</b>	<b>画像を作る</b>	(石館文善) 142
	①操作を始める前の注意	142
	②システムのセットアップ	142
	①対物レンズ ②主な操作パラメータの設定	
	③操作の実際（単染色試料の観察）	143
<b>V</b>	<b>操作の詳細</b>	(石館文善) 145
	①試料の状況を双眼鏡筒で確認する	145
	②スキャン時のチェックポイント	145
	①シングルセクション（2D）の場合 ②3D, 4D, タイムラプスなどの場合	
<b>VI</b>	<b>多重蛍光像および3D, 4Dの画像</b>	(石館文善) 149
	①多重蛍光像	149
	①クロストークを減らすために	
	②3D（立体像再構築）	150
	③4D（3Dの時系列）	152
	④2D時系列	152
	⑤試料の褪色防止	153
	⑥画像劣化の諸要因	153

<b>VII</b>	<b>非蛍光プローブ，反射干渉，透過光/蛍光検鏡</b>	(石館文善)	154
①	非蛍光プローブ		154
②	反射干渉検鏡法		155
③	透過光像の作り方		156
④	共焦点蛍光像と透過光像との合成		158
⑤	多彩なスキャニングテクノロジー		159
<b>VIII</b>	<b>CLSMによるスペクトルイメージング</b>	(石館文善)	160
①	スペクトルイメージングの特徴		160
②	スペクトルイメージングの原理		162
③	効果的な使い方		163
	① ピークが近接した緑または赤蛍光近傍の多重蛍光像を分離し画像化する	② ターゲットの 蛍光シグナルから自家蛍光の成分を除く	③ スペクトルが時々刻々と変化する現象をとらえる
	④ 多重蛍光シグナルの同時取得かつ分離		
④	レファレンスペクトルをきっちり把握		166
	① レファレンスの準備	② データ取得のポイント	
⑤	時々刻々変化するスペクトルの解析		168
⑥	FRET		169
	① 458 nmレーザーつきフィルター方式	② スペクトルイメージング方式	
<b>IX</b>	<b>FRAP</b>	(石館文善)	170
<b>X</b>	<b>FCS/FCCS</b>	(石館文善)	171
	① FCS/FCCSの原理	② 2分子間相互作用の解析	
<b>XI</b>	<b>RICS</b>	(石館文善)	174
<b>XII</b>	<b>FLIM</b>	(石館文善)	175
<b>XIII</b>	<b>高速イメージング</b>	(石館文善)	175
<b>XIV</b>	<b>2光子励起顕微鏡による生体深部イメージング</b>	(横井英司)	176
①	はじめに		176
②	原理		176
③	顕微鏡・関連機器の構成		176
	① 共焦点レーザースキャン顕微鏡との違い		
④	特徴・メリット		178
⑤	脳内深部イメージングのための対物レンズのススメ		179
	① 可視～近赤外域の透過率の高い対物レンズを使う	② 脳の深部を観察する場合は インデックスミスマッチ補正が重要	③ N.A.と検出視野の大きな対物レンズを使う
<b>XV</b>	<b>光刺激</b>	(石館文善)	181
	① 刺激からイメージングまでCLSMのみで完結	② 外部刺激デバイスによる刺激	
<b>XVI</b>	<b>最新の技術動向</b>	(石館文善)	181

## 第7章 技術革新の著しい顕微鏡

<b>I</b>	<b>ハイコンテツスクリーニング</b>	(塩田 良)	185
	はじめに	① 目的・用途	② 原理
		③ 特徴・メリット	④ 操作・手順の概略

<b>II</b>	<b>質量顕微鏡法</b>	(小河 潔) 189
	はじめに ①目的・用途 ②原理 ③顕微鏡・関連機器の構成 ④特徴・メリット	
	⑤操作・手順の概略	
<b>III</b>	<b>多光子レーザーสキャン顕微鏡 (MP-LSM) の応用例</b>	194
	はじめに	(石館文善)
	①2光子励起顕微鏡による脳内深部イメージング	(横井英司) 194
	①操作・手順 ②画像の評価	
	②MP-LSMによる麻酔下のマウス脳神経細胞観察-1	(石館文善) 196
	①麻酔下のマウス脳神経細胞観察における問題点 ②画像の評価	
	③MP-LSMによる麻酔下のマウス脳神経細胞観察-2	(石館文善) 197
	①画像の評価	
	④MP-LSMによる固定マウス脳神経細胞観察	(石館文善) 197
	①画像の評価	
<b>IV</b>	<b>細胞培養システム内蔵型顕微鏡</b>	198
	はじめに	(小島清嗣)
	①インキュベーター一体型顕微鏡	(小島清嗣) 198
	①顕微鏡・関連機器の構成 ②目的・用途 ③特徴・メリット ④操作・手順の概略	
	⑤注意点	
	②生細胞・組織観察時の注意点	(石館文善) 202
	①顕微鏡の選定 ②生細胞に元気でいてもらうために	
<b>V</b>	<b>超解像顕微鏡</b>	207
	はじめに	(根本隆治)
	①Photo activated localization microscopy (PALM)	(石館文善) 207
	①原理 ②特徴・メリット	
	②SIM技法	(根本隆治) 210
	①目的・用途 ②原理 ③操作・手順の概略	
	③STED (Stimulated Emission Depletion) 法	(伊集院 敏) 214
	①目的・用途 ②原理 ③構成 ④特徴・メリット ⑤操作・手順の概略 ⑥注意点	
<b>VI</b>	<b>高解像度3Dライブセル光学顕微鏡</b>	(根本隆治) 219
	はじめに ①目的・用途 ②原理 ③操作・手順の概略	
<b>VII</b>	<b>非線形現象を利用した顕微鏡 (SHG・CARS)</b>	(林 真市) 223
	はじめに ①目的・用途 ②原理 ③顕微鏡・関連機器の構成 ④特徴・メリット	
	⑤その他の非線形光学顕微鏡法	

## 付 録 227

- 各種レンズの用途 ●各種観察法の分類および観察対象 ●各社対物レンズ一覧表 ●代表的な蛍光試薬の励起吸収カーブ ●蛍光の褪色防止の例 ●共焦点レーザー顕微鏡に関するデータ一覧 ●エミッションフィルターの機能と吸収スペクトル ●画像処理ソフトウェア一覧 ●顕微鏡活用に便利なWebサイト一覧

## 索引 243