

対物型全反射顕微鏡の原理

東京理科大学 工学部 応用生物科学科 講師 **まさいけ 政池** **ともこ 知子**

蛍光顕微鏡で試料を観察するとき、ガラス表面と溶液の界面付近に焦点を絞る場合があります。例えば、細胞運動の観察においてガラスに接着して力を出している部位のみを見たい場合や、ガラス表面に固定した蛍光分子や蛍光タンパク質を1分子ずつ観察する場合などがこれにあたります。このような場面に最適なのがAxelrodらが1984年に論文発表した全反射照明です。この照明法を用いると、夜空に光る星を見るように背景光を落として観察を行うことができます。光とレンズの基本的な性質を理解していれば、市販の蛍光顕微鏡の骨組みを利用して比較的簡単に全反射顕微鏡を作成することができます。

本稿では対物型全反射顕微鏡の原理と実際の作り方について解説します。

レンズの性質を用いて、斜めに入射する平行光を作る

小学校の理科でレンズの性質を習った人も多いと思います。最初に習う概念は「光軸」

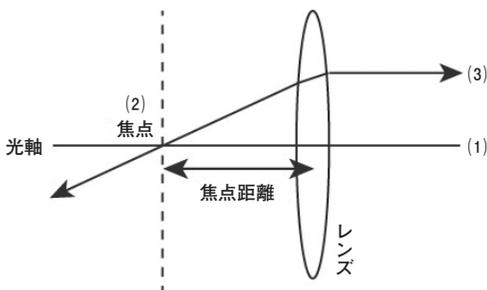


図1 集光レンズの性質 基礎編

でした。

ここでは簡単に、レンズに対して垂直に入射し、かつレンズの中心を通る軸としておきましょう。次に、集光レンズについてのルールが登場します。集光レンズとは、文字通り光が集まるように作られたレンズのことで、虫眼鏡をイメージすれば分かりやすいと思います。理科の実験で太陽光を虫眼鏡で黒い紙に集光して焦がしたことがある人もいると思います。また、一昔前には野良ネコを撃退するためと称してペットボトルに入れた水を玄関の外に置くのが流行しましたが、これがレンズの役割をはたして集光し火事になる危険性があると言われたのも思い出されます。集光レンズの基礎的な性質が分かれば、顕微鏡の光学系の大事な部分を理解できたと言えます(図1)。

【レンズの性質 (基礎編)】

- (1) レンズの中心を通る光は直進する。
- (2) 焦点とは、光軸に平行な光がレンズを通った後に光軸と交わる点である。

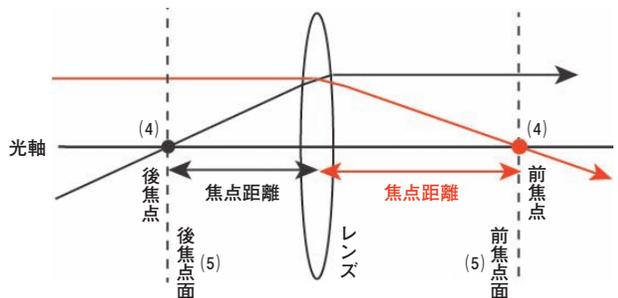


図2 集光レンズの性質 拡張編 1

(3) レンズの焦点を通る光はレンズを通った後、光軸に平行な向きに進む。

これらのルールに、拡張ルールを加えてみましょう(図2, 3)。

【レンズの性質(拡張編)】

(4) 両凸レンズには前焦点と後焦点があり、一般的には異なる焦点距離を持つ。

(5) 焦点面とは、焦点を含み光軸に垂直な平面である。

(6) 焦点面で集光した光はレンズを通ると平行光になる。

基本編の(2)と(3)のルールを改めてよく読むと、光の進む向きが異なるだけで、実は同じ光の道筋のことを言っています。これを拡張して、光がレンズのどちら側から入射するかによって2つの焦点を区別すれば(図2), 拡張編のルール(4)を理解できます。後焦点とは、レンズを中心に置いたとき、観察対象がある側ではなく、レンズをはさんで反対側にある、像ができる側の焦点のことです。レンズの両側の面が同じ性質を持っているとは限らないため、親切な光学部品メーカーのカタログのレンズの章を見ると、例えば、 f_a , f_b というようにきちんと2つの焦点距離を区別して書かれていることがあります。

(5)と(6)のルールを説明する前に、「主光線」と「光束」という概念を導入しておきます。主光線とは光線の中心を示した線で、必要な場合にはそこに光の「幅」を肉付けして作図します(図3)。このように太さのある光を光束と言います。さて、ルール(5), (6)を読むと、焦点を含み光軸に垂直な面(図2, 3の前焦点面, 後焦点面)には特徴がありそうです。まず、後焦点で集光する光に幅を描き加えるとレンズに向かって広がっていきませんが、レンズを通った後には一定の幅をもちながら、広がりも狭まりもしない「光軸に平行な」平行光として進みます(図3の青線)。

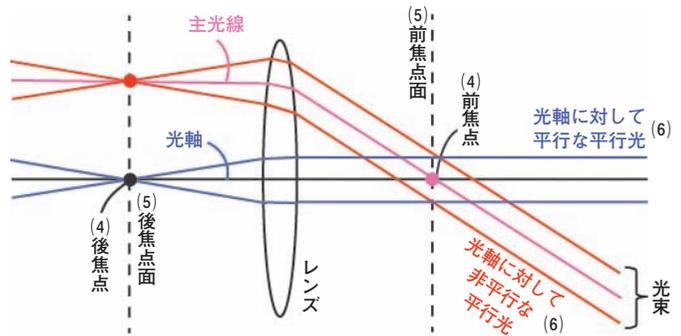


図3 集光レンズの性質 拡張編2

次に、後焦点面の任意の点(ただし後焦点を除く)で集光する光は、レンズを出たあと「光軸に平行ではない斜め向き」の平行光として進みます(図3の赤線)。これが、後焦点面で集光した光がもつ面白い特徴なのです。

現在よく使われている無限系と呼ばれるタイプの顕微鏡用の対物レンズを仮想的な1枚のレンズと見立てた場合、その後焦点面を瞳と呼び、ここに置いた絞りを調節すると、前焦点面上のどの点についても照明や取得する像の明るさを一様に変化させることができます。

対物レンズから照明光を入射する光学系のうち、斜め方向に照明光を入射する場合(図3赤線)、これを斜光照明と言ひ、入射角度が大きくなると全反射照明になります。

斜めに入射する平行光で全反射照明をつくる

前項では簡単なレンズの法則に始まり、斜めに入射する平行光までを解説しました。それでは、どのくらいの角度をつけて対物レンズに入射すれば全反射照明になるのでしょうか。これを考えるにあたって、屈折の法則(Snell's Law)を理解しておく必要があります。媒質Aから媒質Bに光が入射するとき(図4, 左), 入射角, 屈折角, 絶対屈折率の間には次の式1が成り立ちます。

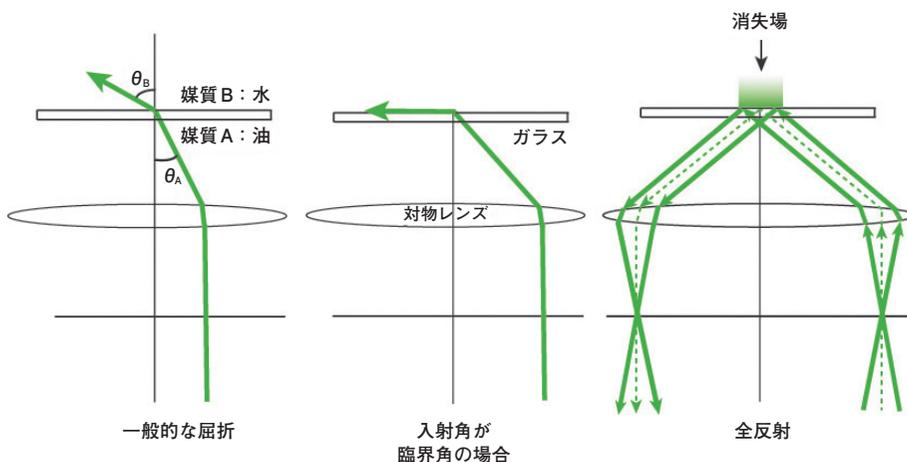


図4 ガラスと水の界面での屈折と全反射

$$\frac{\sin\theta_B}{\sin\theta_A} = \frac{n_A}{n_B} \quad \text{式1 屈折の法則}$$

(θ_A : 入射角, θ_B : 屈折角, n_A : 媒質Aの絶対屈折率, n_B : 媒質Bの絶対屈折率)

式1だけを眺めていてもピンとこないのですが、式2のように変形すると断然面白くなります。

$$n_A \sin\theta_A = n_B \sin\theta_B$$

式2 変形したスネルの法則

媒質が変わると入射（および屈折）角は変遷していきませんが、式2を見ると、ある媒質にある角度で入射した光は、その後ずっと $n \sin\theta$ の値を一定に保つように進むことが分かるのです。そうであれば、この値をひとまとめにしてあらたな概念としてとらえようという発想から、開口数 $n \sin\theta$ (numerical aperture, N. A.) が定義されています。

屈折角が 90° になると光は媒質AとBの界面を走り（図4、中央）、もはや通常の屈折ではなくなります（図4、中央）。入射角がそれよりもっと大きくなると、屈折角が 90° を超えて光は媒質Bに入射せず媒質Aに戻ってくるため（図4、右）、全反射となります。全反射を実現する入射角は、ガラス（媒質A）の屈折率1.52と水（媒質B）の屈折率1.33を式1もしくは式2に代入すれば求めることができます。

この計算を行うと、入射角が 61° 以上、開口数が1.33以上になると全反射が起こることが分かります。対物レンズの筒には例えば N.A. 1.49などと開口数が刻印されていますので、どの対物レンズが全反射照明に使用できるかはこれをみれば分かります。

全反射照明では、実は水中に光の浸みだしが起こります。これは進まないで界面近傍にまとわりついているので、エバネッセント光と表現されることがあります。この光が作る場を消失場（エバネッセント場）と呼びます。ガラスと水の界面から水中方向に向かう高さ z における消失場の強度は下記の式3で表されます。

$$I(z) = I(0)e^{-z/d} \quad \text{式3 消失場の強度}$$

$I(0)$: ガラスと水の界面における消失場の強度, z : 界面から水中方向の高さ, d : 減衰長（侵入長）

この式から分かるように、エバネッセント光は界面で強度が最大であり、水中に行くに従って指数関数で強度が下がるため、ガラスとの界面近傍のみを照らすことができます。減衰長 d は強度が界面の $1/e$ に下がる水中方向の高さを表し、この値はエバネッセント場の「厚み」の指標となります。入射角が大きくなると減衰長は短くなり、照らされる水中の高さ範囲がより限定されるため、ノ

イズ（背景光）に対して信号（観察する物体からの光）が高くなります。このことから、冒頭に述べたガラス面の1分子の観察や接着部位の観察が可能になるのです。

対物型全反射照明の組み立て方

それでは、開口数1.33を超える平行光をガラス界面に入射する全反射照明の光学系を組み立てるには具体的にどのようにしたらよいのでしょうか。

「レンズの性質を用いて、斜めに入射する平行光を作る」章で解説した通り、対物レンズの後焦点面に集光するようにレーザー光を入射すれば斜めの平行光となって対物レンズから光が出ていきますから、これを実現するために、狙った位置に入射光を集光するレンズを1枚用意すればよいのです。ただし、この光学系を作成するためには、観察（撮影）側の光学系も理解しておく必要があります。

フォーカスが合っている場合、試料面の1点から出た光は対物レンズで平行光となり、結像レンズ（第二対物レンズ）によって観察者の目の網膜もしくはカメラの撮像面に結像します（図5）。これが観察（撮影）側の光学系です。全反射照明においても同じ対物レンズを利用しますが、撮影側の第二対物レンズは通さず、顕微鏡に標準では用意されていない集光レンズを新たに別の場所に設置して照明光を対物レンズの後焦点面に集光させるのです。照明側と撮影側を比較すると、対物レンズは共通で利用し、集光レンズを別々に用意しているのが分かります。

さらに、「斜めに入射する平行光で全反射照明をつくる」章で示したように入射光に角度をつけるため、ミラーも設置します。2枚

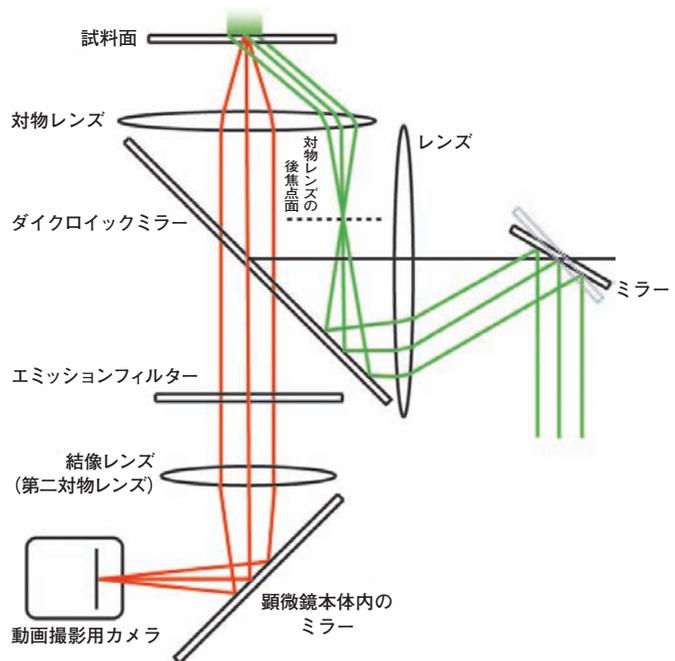


図5 ミラーを用いた全反射型顕微鏡

のガラスの間に水中に浮かせた無数の蛍光ビーズを封入して観察すると、光の経路にあるビーズが光ることから、光の筋道が分かります。この像を見ながらミラーを調節すると、全反射になる臨界角で背景光が下がり急にビーズが一様に暗くなるので開口数1.33の境界がはっきり分かります。斜めに入射しさえすれば360°どの向きから入射してもかまいませんし、開口数も1.33以上であれば対物レンズが保証する上限の開口数ぎりぎりまで上げて、消失場の減衰長を最大限に抑えることもできます。

この光学系でもう一つ重要な役割を果たすのは光学フィルター（ダイクロイックミラー、エミッションフィルター）です。入射レーザー光の波長は反射し、試料から放出される光の波長は通す性質を持ったダイクロイックミラーを45°の角度で設置し、併せて撮影側への照明光の漏れ込みをカットするために撮影側にエミッションフィルターを設置することで、照明光と試料から出る光の交通整理をします。

全反射照明による1分子蛍光観察の 落とし穴 – 偏光 –

電場と磁場の変化が相互に影響すると電磁波となりますが、光もこの電磁波の一種であり波として伝搬する性質があります。この振動の向き（振動面）が変わらず一定である光の偏光は直線偏光であるといいます。偏光子は特定の偏光成分を通す素子であるため、偏光子が透過できる偏光の向きと直線偏光の光の向きが一致するとほぼすべてを透過し、直交するとほとんど透過しないという現象が起こります（図6）。スキーををするときに偏光ガラスでできたゴーグルをかけるのは、特定の偏光成分の光を遮断して減光し、目を雪焼けから保護するためです。

ここで、レーザー光で全反射照明を実現するときのエバネッセント光の偏光成分について考えます。はじめに、X、Y、Z軸を定義し

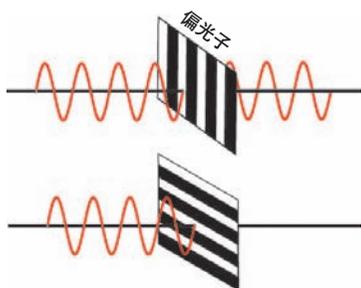
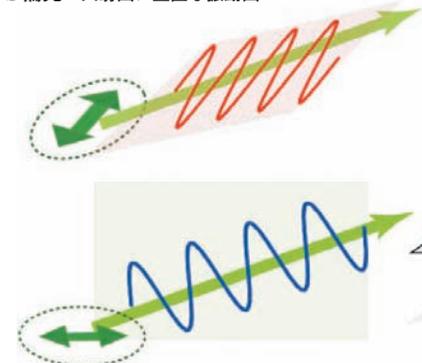


図6 偏光子が通す光の偏光成分

S偏光 入射面に垂直な振動面



P偏光 入射面=振動面

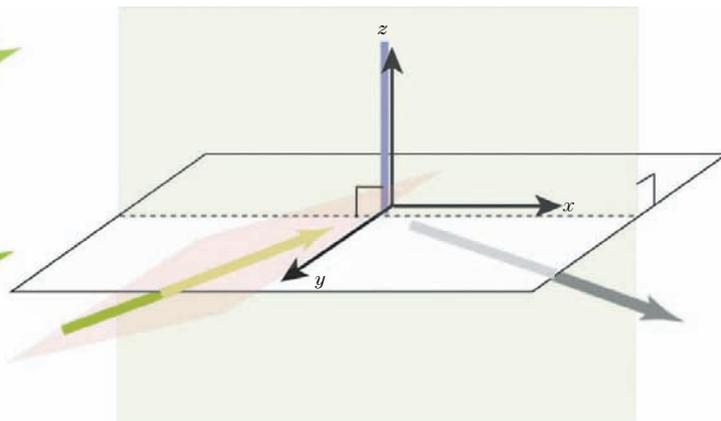


図7 入射面とS偏光、P偏光

ましょう。試料が載っているガラス面に垂直な軸をZ軸とし、入射光線を試料面に射影した進行方向をX軸とします（図7）。このとき、XZ平面を入射面といいます。この入射面が光の振動面と一致する場合光の偏光成分はP偏光であり、入射面と振動面が直交する場合S偏光であるといいます。S偏光の光を入射すると、エバネッセント場はY軸方向の偏光成分のみをもちます。一方、P偏光の光を入射すると、エバネッセント場はZ軸方向に立ち、わずかにX軸方向の成分も持ちます。

では、蛍光分子はどのような偏光をもった光を吸収して蛍光を発するのでしょうか。例えば、1分子でも蛍光を画像化できるほど明るいことで知られるショッキングピンク色をしたローダミン系の色素は、ベンゼン環が3つ連なった構造のxantene骨格の長軸方向に振動する偏光成分の光のみを吸収します。このことから、ランダムな向きでこの蛍光分子がガラス基板の上に固定されている場合、励起光の偏光の向きとほぼ完全に一致している分子は明るく光りますが、角度がずれている場合暗めになり、励起光の偏光の向きが分子の遷移双極子モーメントの向きと直交する場合はほとんど光らないという事態が発生してしまいます。さらに、励起光の偏光の向きはS偏光とP偏光でも異なるため、照明側の影響

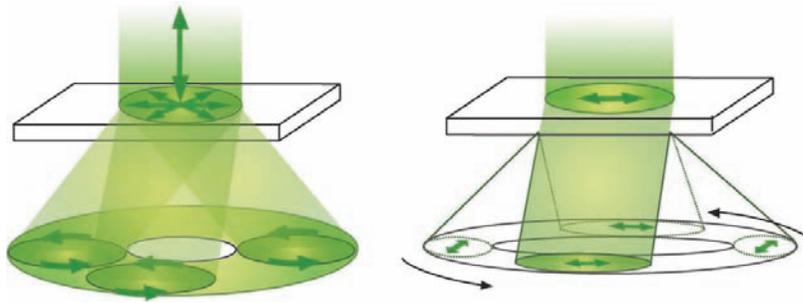


図8 全反射顕微鏡における円偏光の輪帯照明（左）と直線偏光の偏光変調照明（右）

も考慮しなければなりません。

本来1分子蛍光観察の利点は、蛍光分子を個別に定量計測し結合・解離のダイナミクスを明らかにすることや、塊になった複数の蛍光分子が1段階ずつ同じ蛍光強度の落ち幅で段階退色するのを観察して会合数を決定することなどにあるはずなのですが、分子の向きと照明の偏光の偏りが影響して1個分の蛍光強度が変わるとなると、その利点を活かしづらくなります。

全反射照明における偏光の問題を緩和・利用する

前項では一方向から入射する直線偏光の全反射照明がつくる消失場の偏光の偏りについて解説しましたが、それを緩和する光学系や、逆手にとって利用する光学系も存在しますので、この章ではそれらについて解説します。

これまで直線偏光のみについて話をしてきましたが、ある光が、同じ振幅のS偏光成分とP偏光成分できており、SとPの位相が1/4波長分ずれているとき、光の振動面が回転する円偏光となります。円偏光を対物レンズの後焦点面上の高開口数位置で集光させて全反射照明をつくると、等方的ではないもののX、Y、Z全方向に成分を持つ照明となり、直線偏光で問題となっていた照明の偏光成分の偏りが緩和されます。

さらに、この円偏光を、一方向からではなくドーナツ状に等開口数の全方向から入射す

るのが円偏光の全反射輪帯照明です（図8左）。この照明はXY方向に完全に等方的な強度をもつ照明であり、Z方向にはXYの約2倍程度の偏光成分をもちます。この照明であれば、蛍光分子の段階退色による分子数計測や蛍光分子の結合・解離計測もより信頼性が高まります。

逆に、対物レンズの後焦点面において等開口数の円周上を周回させる励起光を用いた光学系も存在します（図8右）。この場合、蛍光分子の遷移双極子モーメントの向きと照明の偏光方向が一致したときに蛍光強度が最大になり、直交したときに最小となります。励起光の回転を一定周波数で繰り返すと蛍光分子から発する蛍光の強度が振動するため、その位相の変化から蛍光分子の相対角度変化を割り出すことができます。これは、全反射顕微鏡の偏光の特徴を逆手に取った光学系であると言えます。

このように、対物型全反射顕微鏡の基礎を理解し、偏光にまつわる特徴まで把握すると一段と高度な全反射顕微鏡を作ることができます。蛍光分子1個を単一のタンパク質や基質に目印として結合し、これらの顕微鏡を用いて結合・解離、個数、角度を調べると、生物試料の作動メカニズムに素過程レベルで切り込むこともできます。全反射顕微鏡の構築は凝り始めると奥が深くトラブルシューティングも大変な場合がありますが、基本的なものは簡単に設置できます。レゴブロック感覚で組み立ててみませんか。