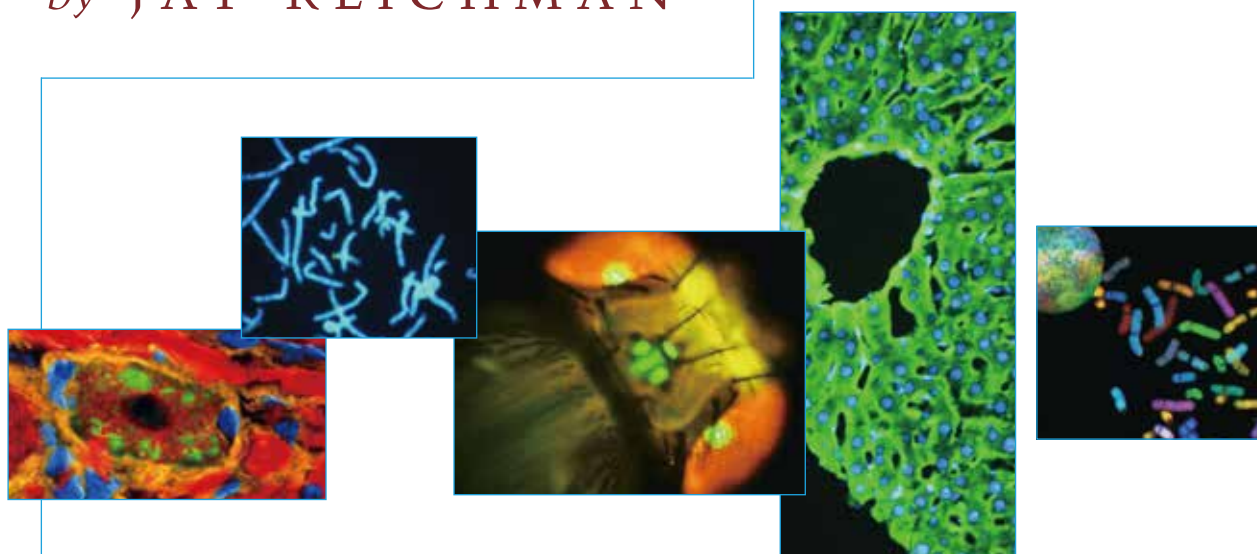


C H R O M A T E C H N O L O G Y C O R P

HANDBOOK *of*
OPTICAL FILTERS
for FLUORESCENCE
MICROSCOPY

by JAY REICHMAN



HB2.0/June 2017

翻訳・編集 奥川 久

C H R O M A T E C H N O L O G Y C O R P	
HANDBOOK of OPTICAL FILTERS for FLUORESCENCE MICROSCOPY	
by JAY REICHMAN	

蛍光顕微鏡について	2
励起および発光スペクトル	
蛍光信号強度	
蛍光顕微鏡	
蛍光顕微鏡で使用するフィルターの種類	
蛍光顕微鏡の進化	
光学フィルター概論	8
用語	
実際の製品について	
色ガラスフィルター	
薄膜コーティング	
音響光学フィルター	
液晶可変フィルター	
蛍光顕微鏡用フィルターの設計	14
画像コントラスト	
蛍光スペクトル	
光源	
検出器	
ビームスプリッター	
光学的品質	
光学的品質パラメータ	
ケーラー照明を備えた広視野顕微鏡の光学的品質要件	
サブピクセルレジストレーション用フィルターセット	24
共焦点顕微鏡用フィルター	25
共焦点蛍光顕微鏡の光学要件	
ニポウディスク CFM	
レーザースキャン CFM	
共焦点蛍光顕微鏡のスペクトル要件	
ニポウディスク CFM	
レーザースキャン CFM	
複数プローブ観察用フィルター	29
参考文献	30
用語集	31

蛍光顕微鏡には、高性能な光学フィルターが不可欠です。フィルターは蛍光顕微鏡を構成する「パーツ」に過ぎませんが、使い方次第では非常に高い効果が得られますので、実用的な知識を身に着けることは研究や装置開発に大いに役立つはずです。

本書は、当社のエンジニアが様々な蛍光顕微鏡やアプリケーション用フィルター設計の経験を通じ、設計原理やノウハウをまとめたものです。覚えておくべき用語や知っておくべき実用情報もたくさん入っています。本文中でカギカッコ「」で囲った用語について、31 ページ以降で解説をまとめましたので、ぜひご覧ください。なお参考文献も載せましたので、詳細はそちらをご覧ください。

クロマテクノロジー社について

当社は、以下に示すような「スペクトル、SN 比、品質」に高い精度が求められるアプリケーション用光学フィルターを設計、製造する専門会社です。

- 微弱信号検出蛍光顕微鏡およびサイトメトリー
- 天文学における分光イメージング
- レーザー装置
- ラマン分光

本社工場内で設計から生産までの全てを行う「一貫体制」を取っております。10 年以上の経験と高い専門性を持つスタッフが「費用対効果」の高いソリューションを提供することに専念しています。

著者紹介

Jay Reichman : Brown 大学卒、機械工学専攻

1991 年に設立された Chroma Technology Corp. の共同創立者の一人で、現在は設計エンジニアリング部門のダイレクター。30 年以上、薄膜コーティングの設計及び製造に従事。蛍光顕微鏡から融合プラズマ診断に至るまで、様々なアプリケーションの専門家。レーザー走査顕微鏡、ニポウディスク共焦点顕微鏡、多光子顕微鏡、超解像顕微鏡 (SIM、STED)、m-FISH、TIRF、CARS など、顕微鏡に使われるフィルターの設計やコーティング技術を開発する一方、フローサイトメーター、PCR 分析装置など顕微鏡以外の製品に使われるフィルターも開発。天文学分野においても、ハッブル望遠鏡の広域惑星カメラ用フィルターの設計も手掛けた。



翻訳・編集からひと言

このたびはハンドブックをご覧いただき、誠にありがとうございます。当社の多層膜フィルターは蛍光顕微鏡を用いる研究用途はもちろん、がんや感染症などの医学診断や FA や EV などの産業用途にも使われています。本書は光学や顕微鏡をご存じ無い方にも理解できるよう、できる限り分かり易く翻訳・編集することに努めました。お手元に置いていただき、お気軽に目を通していただけますと幸いです。

Chroma Technology Japan 合同会社 ゼネラルマネジャー 奥川 久
2022 年 3 月

蛍光顕微鏡について

「**蛍光**」とは、物質がある波長の光を吸収し、ほぼ同時に*¹別の波長の光を放射する「**分子現象**」です。放射する際のエネルギーは吸収エネルギーより小さいため、蛍光波長は吸収波長より長くなります。これが所謂「**励起および発光**」現象と呼ばれるものです。有機物であれ非有機物であれ、いくらかの蛍光を出します。20世紀の初頭、蛍光顕微法が始まった当初、顕微鏡学者は物質から発する「**一次蛍光**」または「**自家蛍光**」を調べていましたが、今では非常に明るい蛍光を放ち、標本の一部を選択的に染色することが可能な色素が多く開発されています。こうした色素を使う方法を、「**二次蛍光**」法または「**間接蛍光**」法と呼びます。これらの色素は「**蛍光色素**」と呼ばれ、抗体や核酸などの有機活性物質と結合したものは「**蛍光プローブ**」と呼びます（蛍光色素や蛍光プローブという用語は、しばしば同じ意味で使用されます）。今では、青、緑、オレンジおよび赤だけでなく、近赤外でピークを持つ蛍光色素もあります。蛍光色素を使う間接蛍光法を用いる場合、標本の自家蛍光はあまり望ましくなく、顕微鏡イメージングにおいてはじゃまものとして扱われます。

励起および発光スペクトル

図1は、蛍光色素の励起と発光の典型的なスペクトルを示しています。これらのスペクトルは、「**分光蛍光光度計**」によって取得されます。分光蛍光光度計は、照明部と検出部にある分光光度計で構成されています。まず試料は、蛍光を放射する波長の光によって強く照らされます。蛍光スペクトルは、照明光の波長を固定した状態で検出部の分析光度計をスキャンすることによって取得します。次に、蛍光が最も明るくなる波長に固定し、照明部の分光光度計をスキャンして蛍光強度の変化を測定することで励起スペクトルを取得します。フィルタを設計際には、取得したスペクトルを相対強度スケールに正規化したデータを使います。

色は、光の波長によって定量的に表すことができます。蛍光スペクトルを表すための最も一般的な波長単位は、「**ナノメートル (nm)**」です。可視光の色は、概ね下記の波長に分類できます（図2）。

紫～藍	400 ～ 450 nm
青～水色	450 ～ 500 nm
緑	500 ～ 570 nm
黄～橙	570 ～ 610 nm
赤	610 ～ 750 nm 前後

* 1 分子が蛍光を発するのにかかる時間（蛍光寿命）は、ナノ秒（10⁻⁹ 秒）のオーダーです。燐光は蛍光とは別の発光現象であり、その時間はミリ秒から数分のオーダーです。

可視光より短波長側の帯域は近「**紫外線**」帯域 320 ～ 400 nm で、長波長側の帯域は「**近赤外線**」帯域 750 ～ 約 2500 nm になります。320 ～ 2500 nm の帯域は、クラウンガラスや窓ガラスの透過帯域を示しています。この帯域が蛍光顕微鏡で最もよく使用される帯域です。一部のアプリケーション、特に有機化学では、中紫外線帯域（190 ～ 320 nm）の励起光を使いますが、特殊な UV 透過照明光学系が使われます。

蛍光顕微鏡やフィルター設計に関係する色素スペクトルの特徴として、いくつか挙げられます。まず第一に、励起スペクトルや蛍光スペクトルの帯域が限られているということです。稀に非常にブロードな場合がありますが、ほとんどの蛍光色素の励起スペクトルや蛍光スペクトルの帯域は広くありません。図1は典型的な蛍光色素のスペクトルを示しています。2つのスペクトルのピーク波長の違いは、「**ストークスシフト**」と呼ばれます。第二に、蛍光強度は励起波長によって異なりますが、蛍光スペクトルの形は励起波長によらず一定ということです*²。また第三に、蛍光色素の励起スペクトルと蛍光スペクトルは、pH レベルや色素濃度や他の物質との結合など細胞環境が変化するとシフトする場合があります。そのような特徴を使った色素として、FURA-2 や Indo-1 があります。これらの色素は、H⁺（pH レベル）、Ca²⁺、Na⁺などのイオン濃度の変化に伴い励起スペクトルや蛍光スペクトルが大きく変化するので、そうしたイオンの測定にとっても有効です。最後に、色素の蛍光効率が時間と共に低下する光化学反応があり、それは光退色または「**退色**」と呼ばれます。

蛍光信号強度

一定の強さの励起光を照射した場合でも、染色された標本から放出される蛍光量が異なることがあります。その原因としては、以下のようなことが挙げられます。1) 染色部分の色素濃度や厚さの違い、2) 色素の「**吸光係数**」の違い、3) 色素の「**量子効率**」の違い、4) 顕微鏡の視野内に実際に存在する染色された物質の量に違い。吸光係数とは、その色素濃度と標本厚によってどれだけの入射光が吸収されるかを示す値で、色素の励起スペクトルによって示される波長毎で異なる吸収特性も含まれます。蛍光色素の多くはピーク励起波長で高い吸光係数となりますが、実際の標本では許容される最大色素濃度に限界があるため、染色された標本が実際に吸収する光の総量は多くありません。

* 2 蛍光スペクトルはある程度「形」を変える場合もありますが、ほとんどのアプリケーションにとって問題になるレベルではありません。蛍光のメカニズムの詳細な説明については、Lakowicz（1983）を参照方

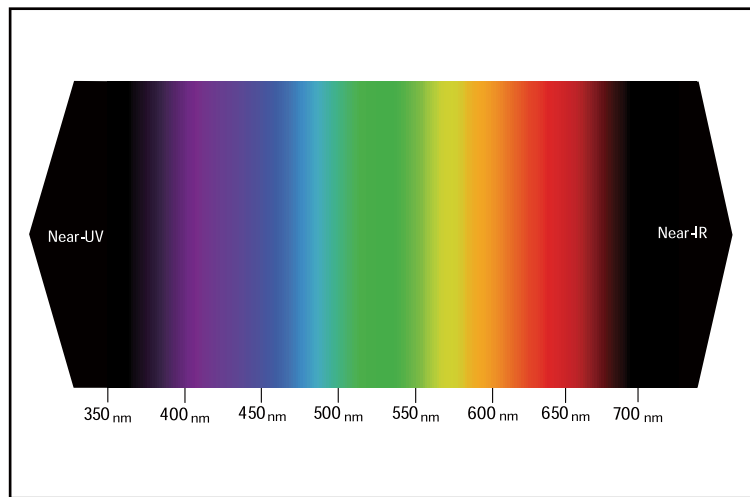


図2
スペクトルのカラー領域

吸収した光エネルギーと放出された蛍光エネルギーの比である量子効率、吸収された光のエネルギーがどれだけ蛍光に変換されるかを示します。最も効率の高い蛍光色素の量子効率は約 0.3 ですが、光退色など「減光」のプロセスにより実際にはもっと小さくなる場合があります。

量子効率が小さいということに加え、多くの標本の場合観察視野内に染色された物質が非常に少ししかいないため、一般的な蛍光観察においては励起光に対する蛍光強度が 10⁴ 分の 1 から 10⁶ 分の 1 しかありません。微量の蛍光物質を使う最新技術（例えば、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション）においては、その比率が 10⁹ 分の 1 や 10¹⁰ 分の 1 という低い値となる場合もあります。従って適切なコントラストで蛍光画像を観察するには、蛍光顕微鏡は蛍光信号を減少させることなく、励起光を最大 10¹¹ 分の 1 以下に減衰（非常に弱い蛍光の場合）させる必要があります。蛍光顕微鏡はどのようにしてこのような課題を克服しているのでしょうか？ それを実現するため光学フィルターは不可欠な部品であることは確かですが、蛍光顕微鏡自体の構成も重要な要素となっています。

蛍光顕微鏡

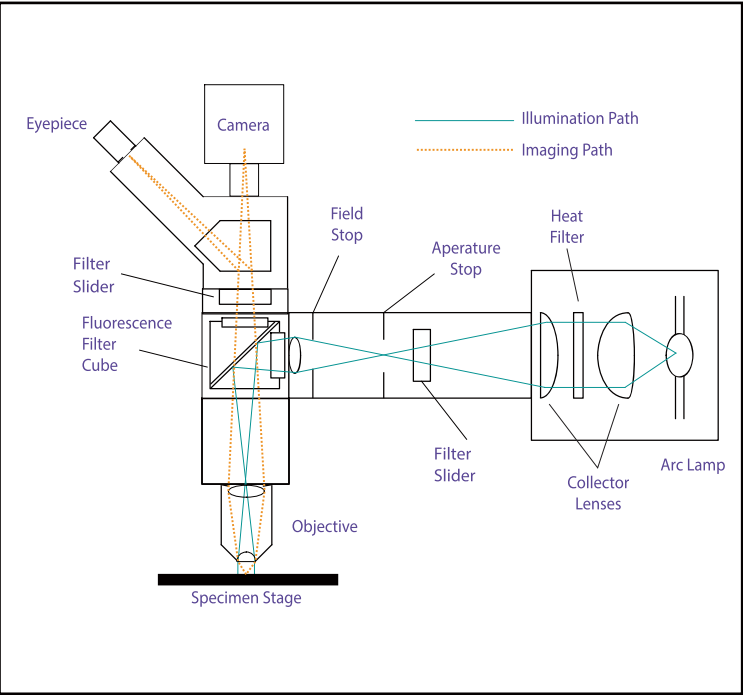


図 3
落射蛍光顕微鏡の概略図。照明光学系と結像光学系を分けて表示
照明光学系 —————
結像光学系 ···········

の 1（微弱蛍光標本の場合）に減らし、蛍光をほとんど透過するようにすればよいということになります。幸いにも、こうした厳しい要件を満たすことができるフィルター技術があります。（10 ページから始まるセクションで説明します）

蛍光顕微鏡で使用するフィルターの種類

落射蛍光顕微鏡のフィルターは、蛍光フィルターキューブに収容された 3 つのフィルターで構成されます。励起フィルター、吸収フィルターおよびダイクロイックミラーです。典型的な「フィルターキューブ」を図 4 に示します。

- 1) 「励起フィルター」は、指定された色素を効率的に励起する波長の光のみを透過します。フィルターブロックの名前は、励起フィルターの色に合わせて付けられています
UV or U：DAPI や Hoechst33342 などの色素のための紫外線励起タイプ
B：FITC や類似色素のための青色励起タイプ
G：TRITC、TexasRed® などの緑励起タイプ
励起フィルターは以前はショートパスフィルターがよく使われていましたが、現在ではバンドパスフィルターが主に使われます。
- 2) 「吸収フィルター」(バリアフィルターまたはエミッションフィルターとも呼ばれます) は、励起光を減衰させる一方、試料から出る蛍光を効率良く透過します。蛍光は常に励起光より長波長（赤側）です。吸収フィルターには、バンドパスフィルターとロングパスフィルターがあります。吸収フィルターの透過色は、U 励起では青または淡黄色、B 励起では緑または濃い黄色、G 励起ではオレンジまたは赤です。

- 3) 「ダイクロイックビームスプリッター」(以下、ダイクロイックミラー*³) は、顕微鏡の光路に対して 45 度に設置して使います。コーティングは、励起光を反射し蛍光を透過するという機能があります。最近のダイクロイックミラーは、反射及び透過の効率が非常に高く、励起光は 95% 以上の反射率、蛍光は約 95% の透過率になります。これにより、反射率 50% 透過率 50%、即ち効率 25% の旧式ハーフミラーから効率は大幅に改善されました。ガラス「基板」は通常、UV 透過型の合成石英など、自家蛍光の低い材料が使われます。

ほとんどの顕微鏡には、2 から 4 個のフィルターキューブを保持できるスライダーもしくはタレットが付いています。各キューブに取りついたフィルターは性能を発揮できる組み合わせになっており、各フィルタースペクトル特性を知らずにフィルターやビームスプリッターを混合して使用すると、性能を損ねたり危険な観察を行うことになる場合があるので、避けてください。

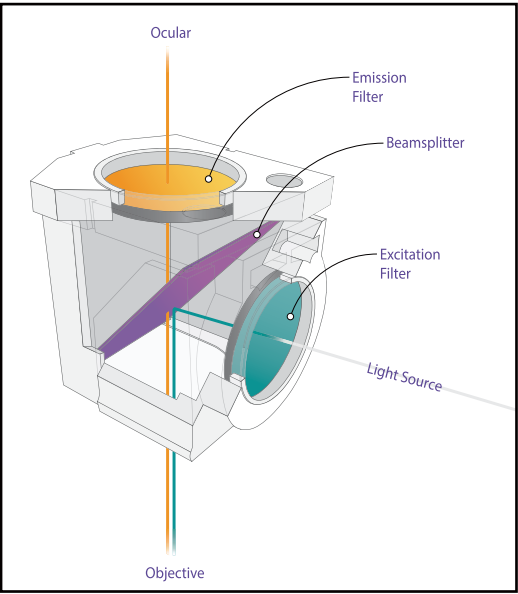


図 4
蛍光フィルターキューブの概略図

* 3 「ダイクロイック」という用語は、光の偏光状態に応じて光を選択的に吸収する結晶またはその他の材料を表す際にも使用されます。（ポラロイド社のプラスチックフィルム偏光子が最も一般的な例です。）そうした呼び名と混同しないように「ダイクロマティック」と呼ぶ場合もある。

蛍光顕微鏡のその他の光学フィルター

- 1) 「**熱フィルター**」：ホットミラーとも呼ばれ、多くの顕微鏡の照明光学系に組み込まれています。赤外光 (通常は 800 nm より長い波長) を減衰させ、ほとんどの可視光を透過します。
- 2) 「**ND フィルター**」：通常はコレクターレンズと開口絞りの間にあるフィルタースライダまたはフィルターホイールに収容されており、照明の強度を調整するために使用します。
- 3) 蛍光以外の用途で使用される内蔵フィルター：透過光顕微鏡用カラーフィルター、偏光顕微鏡用直線偏光フィルターなど

蛍光顕微鏡の進化^{*4}

100 年にわたる開発と革新の結果、蛍光顕微鏡は今日のような構成になりました。永年にわたる開発の歴史を振り返ることで、様々なコンポーネントの機能をよりよく理解することができます。

初期の蛍光顕微鏡では、目に見えない紫外線で試料を励起することにより、励起光と蛍光をうまく分けることができました。そのためバリアフィルターはあまり必要としていませんでした^{*5}。20 世紀初頭の蛍光顕微鏡は、巨大で危険な 2000W の鉄のアークランプを使用した光源を使い、ゼラチンに溶けたウッド溶液(ニトロソジメチルアニリン染料)化合物と液体硫酸銅のチャンバーと青紫色の色ガラスの組み合わせにより、フィルターの役目をしていました。最初の励起フィルターは、可視光が比較的少ない近紫外領域の広いバンドのもので作られ、顕微鏡学者が試料の 1 次蛍光を観察していました。顕微鏡学者は、ほとんどの物質が紫外線で励起されると蛍光を発するため、とても助かったようです。1914 年にはこのタイプの顕微鏡に初めて蛍光色素が使われ、細胞のさまざまな部位を選択的に染色するため、初めて 2 次蛍光が使われるようになりました^{*6}。

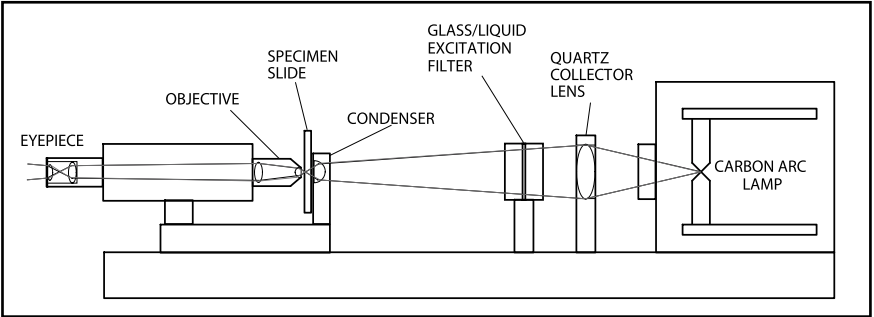


図 5
初期の透過型蛍光顕微鏡の概略図。(Kasten の後、1989 年)

図 5 に示すように、最初の蛍光顕微鏡は「**透過照明**」でした。コンデンサーレンズとして「**明視野**」用や「**暗視野**」用の油浸レンズが使用されましたが、それぞれに大きな欠点がありました。明視野コンデンサーでは、当時の光学フィルターの性能が悪かったため、照明強度はかなり悪なりました。中抜けの円錐状のビームで照射する暗視野コンデンサーでは、励起光が対物レンズに入らないので、光学フィルターへの

の要求が緩和されました。しかし照明効率が大変悪く、加えて「**開口数**」の小

* 4 ほとんどの情報は、次の参考資料から引用：Kasten (1989)。

* 5 最初に使用されたバリアフィルターは、危険な紫外光から目を保護する淡黄色のカパースリップでしたが、初期の蛍光顕微鏡の中には、これさえ使わなかったものがあった

* 6 いくつかの蛍光色素は他の目的のため 19 世紀後期に作られたもので、その目的は寄生組織を染色し有害光線に反応させるなど、化学療法薬としての用途で使用された

さな対物レンズしか使えなかったため、解像度も明るさも非常に低下しました^{*7}。

蛍光顕微鏡における最も重要な進歩は、1929 年の蛍光顕微鏡用同軸「**落射照明**」装置の開発によってもたらされました。同軸落射照明は、大きくて不透明な標本の蛍光観察に初めて利用されました。最初の落射蛍光顕微鏡は、おそらくビームスプリッターに銀のハーフミラーを使用しており効率は 25% だったと思われます。それでもいくつかの重要な利点がありました。1) コンデンサーとして開口数の高い対物レンズが使えるようになり、明るさが格段に改善した。2) 反射して油浸対物レンズに戻る励起光は、入射時の約 1% であった^{*8}。3) 位置合わせが容易であった。さらに 1948 年に E.M. Brumberg が紫外線励起用として紹介し、1960 年代に J. S. Ploem によって独自に開発されて可視励起を可能にしたダイクロイックミラーの開発により、ビームスプリッターの効率がほぼ 100% に向上しました。それによって顕微鏡のフィルタ機能がさらに向上しました。Ploem が落射照明光学系を開発し、さらに青と緑の励起用の狭帯域干渉フィルターや複数蛍光色素を観察する際にフィルターとビームスプリッターを簡単に交換できるようにしたフィルターキューブが開発され、さらなる進化を遂げました^{*9}。こうした進化により落射蛍光顕微鏡の商品化が進みました。

この期間に他の重要な技術的進歩もありました。1) コンパクトな水銀灯とキセノンアークランプの開発 (1935 年) 2) 色フィルターガラス製造の進歩：これにより可視光で効率的に励起できる蛍光色素が使えるようになった (そのため、例えば単純なタングステンフィラメント光源の使用が可能になった) 3) 顕微鏡対物レンズ設計の進歩 4) 顕微鏡用反射防止コーティングの導入 (1940 年頃)

最近の技術開発によって、蛍光顕微鏡は生物学や生物医学の目覚ましい発展に寄与してまいりました。とりわけそうした進歩は、超高感度カメラ^{*10} やレーザー照明や共焦点および多光子顕微鏡の開発、デジタル画像処理の進歩や、新しい蛍光色素および蛍光プローブの開発、そして光学フィルターおよびビームスプリッターの進化のお陰だと言えるでしょう。

* 7 Abramowitz (1993)

* 8 非金属試料を想定

* 9 出来事の情報と序列は Bas Ploem 博士との会話を通じて確認、2006 年

* 10 Video Microscopy by Dr. Inoué (1986) は、ビデオイメージングと顕微鏡の一般的な使用法を詳しく説明した優れたテキストです。

光学フィルター概論

蛍光顕微鏡に使う光学フィルターの設計を詳細に説明する前に、性能を絞って実際の特性を述べながらいくつかの用語を紹介します。

用語

フィルターセットについて説明するのに、紫や青や緑といった色で示せば十分説明できる場合もありますが、いくつかの重要な用語に精通していると、特別な色素用セットを扱う時に役立ちます。フィルター性能を示す際に最もよく使われる単位は、光の波長を示すナノメートルで、蛍光色素スペクトルを示す場合と同じです。フィルターの色は、「バンド幅」や波長領域と深く関係しています。そのことは 550 ～ 590 nm の範囲のフィルターをみるとよく分かります。狭帯フィルターでは透過した光は薄い緑色に見えますが、広帯域フィルターとりわけロングパスフィルターでは黄味を帯びた明るいオレンジ色に見えます。

光学フィルターのスペクトル性能を説明する際の大切な用語のいくつかを以下に示します。図 6 から図 9 を参照してください

- 1) 「バンドパス」フィルターは、「中心波長 (CWL)」と「バンド幅 (FWHM)」*¹¹ で表されます。中心波長は透過率がピークの 50% になる 2 つの波長の中央値を示し、FWHM はそれらの波長の幅を示します。
- 2) 「ロングパス (LP)」フィルターは透過率がピークの 50% になる立ち上がり波長、「ショートパス (SP)」フィルターは透過率がピークの

50% になる立ち下がり波長で表わします。特に立ち上がりや立ち下りの傾斜が鋭い LP または SP フィルターは、「エッジフィルター」と呼ばれることがあります。「平均透過率」は、スペクトル全体ではなくフィルターの有効透過領域内で計算されます。(「ハイパス」とか「ローパス」という用語は、周波数を扱う場合に用いられますが、波長を表す際にはあまり使用しません)

- 3) 「減光レベル」はブロッキングレベル、減光範囲は「ブロッキング範囲」と称し、通常は下記で計算される「OD 値」(Optical Density) で示します。

$$OD = -\log(T) \text{ or } OD = -\log(\%T / 100)$$

例：OD 4.5 = $3 \times 10^{-5}T$ (0.003 %T)

OD 値は、吸光度と同様、対数の値を使いますが、光学フィルターでは吸収以外の様々な方法で減光させています。例えば、薄膜干渉フィルターは主に反射によって減光させ、音響光学フィルターは回折を使って減光させます。その

ため Optical Density(光学密度)という用語はより正確と言えます。(これらのフィルターについては、10 ページから始まるセクションで詳細に説明します)

「クロストーク」は、減光レベルに関連した用語です(図 7)。クロストークとは、励起フィルターと吸収フィルターを直列に置き照明光を入射させた際に、励起フィルターを透過した光が吸収フィルターでどれだけ減光されるかを示す値です。この値は、蛍光フィルターセットを構成するため励起フィルターと吸収フィルターとマッチさせる際に重要になる値になります。

- 4) 「傾き」とは、フィルターが透過帯域から減光帯域に変わる帯域における立ち下り、もしくはその逆の場合の帯域における立ち上りの鋭さを表します。図 8 は、同じバンド幅や同じ立ち上がり波長を有する、2 つの異なるフィルターのスペクトルを示しています。2 つのバンドパスフィルター(濃い紫と薄い紫)は、どちらも同じ透過特性を示していますが、OD 値を示すグラフでは傾きが大幅に異なることが分かります。傾きを示す際は、どの波長でどの程度のブロッキングレベルが必要かを指定します。

- 5) 「入射角 (AOI)」とは、図 9 に示すように、フィルター表面に垂直に立てた軸と入射する光の進む方向(光軸)が交わる角度です。ほとんどのフィルターは、「標準入射角」である入射角 0 度で使用するよう設計されています。ただしビームスプリッターの場合、通常の入射角は 45 度です。薄膜干渉コーティングや音響光学デバイスなど、ほとんどのタイプのフィルターは角度依存性があります。これは、スペクトル特性が角度によって変化することを意味します。従って、もしフィルターやビームスプリッターを入射角 0 度または 45 度以外の角度で使用するような場合には、角度を指定する必要があります。

こうした角度依存性により、もしフィルターに収束または発散ビームを入射させて使う場合、光ビームの「ハーフコーンアングル」を指定する必要があります。(図 10) ハーフコーンアングルは、光ビームの F 値または開口数 (NA) で表すこともでき、それらはハーフコーンアングルのサイン(正弦)の値になります。

- 6) ダイクロイックミラー(非垂直で使われる薄膜干渉コーティング)により、ある程度の「偏光」が生じますが、その効果は波長および設計で異なります。いくつかの関連する用語を図 9 に示します。「P 偏光」(TM モード)というのは、ミラーの入射面に平行(即ちコート面に垂直)な電界振動成分であり、「S 偏光」(TE モード)は、ミラーの入射面に垂直(即ちコート面に平行)な電界振動の成分を示します。典型的なダイクロイックミラーの偏光特性を図 11 に示します。

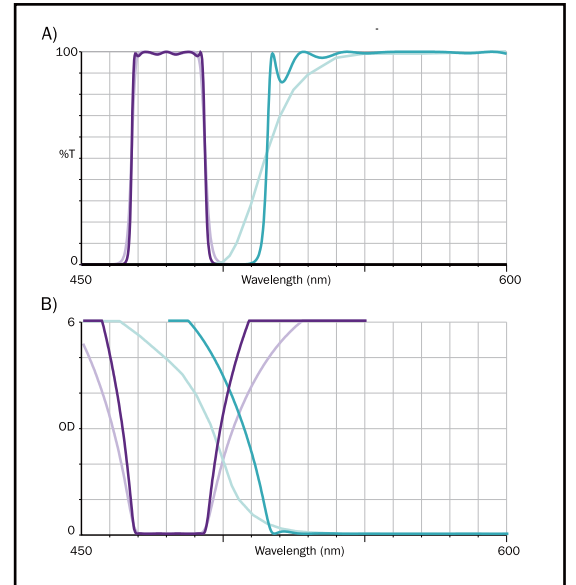


図 8 傾きの異なるフィルターセット A) 透過率、B) OD 値

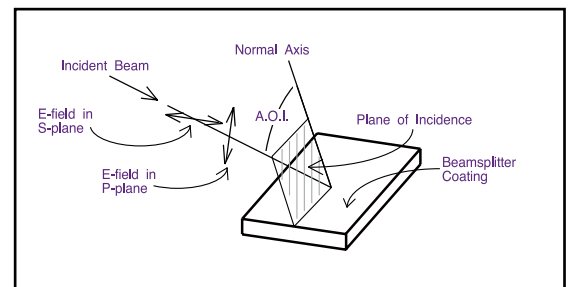


図 9 偏光に関する用語と概略図。法線はコート面に垂直な軸であり、入射面は法線と入射光ビームの光軸の 2 つの直線でできる平面のこと

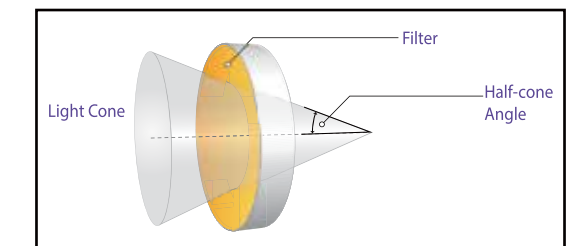


図 10 発散または収束ビームのハーフコーンアングル図

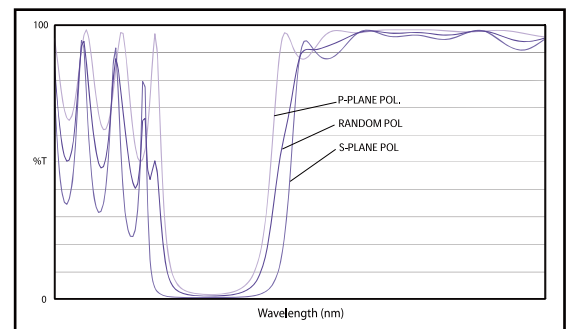


図 11 ダイクロイックミラーの偏光特性の例。このミラーでは、488nm のアルゴンイオンレーザーの S 偏光を反射するように設計されています。

図 6 A) 透過特性に関する用語 B) ブロッキング特性に関する用語

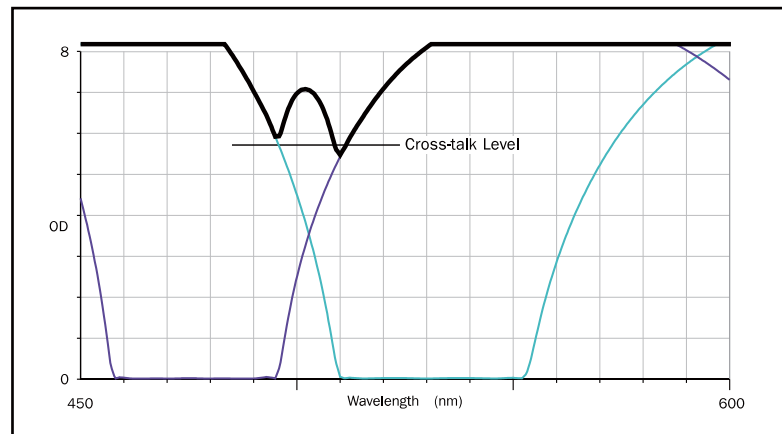


図 7 直列に配置した 2 つのフィルターのクロストークレベル

* 11 Full Width at Half of Maximum Transmission (半値全幅)

実際の製品について

蛍光分析で使用されるフィルターには、主に色ガラスと薄膜コーティングの技術が使われています。特別なアプリケーションでは音響光学式可変フィルターの使用も増えています。これらの製品について後ほど説明します。その他の光学フィルターではホログラフィックフィルターや液晶可変フィルター(LCTF) などがありますが、蛍光顕微鏡にはあまり使用されません。

色ガラスフィルター

吸収ガラスとも呼ばれる「色ガラスフィルター」は、蛍光分析で最も広く使用されているタイプのフィルターです。特に、黄色とオレンジのシャープカットフィルターやUVを透過して可視光を吸収する、所謂「黒ガラス」はよく使われています。色ガラスフィルターは吸収によって光を減衰させるので、スペクトル性能はガラスの厚さで変わります。厚さを増やすとブロッキングレベルは上がりますが透過率も減少するため（図12）、最適な厚さを事前に決めておく必要があります。ガラスメーカーが提供する厚さのものは、一般的な用途に使うのに適していますが、アプリケーションによっては違う厚さのものを使う必要がある場合があります。

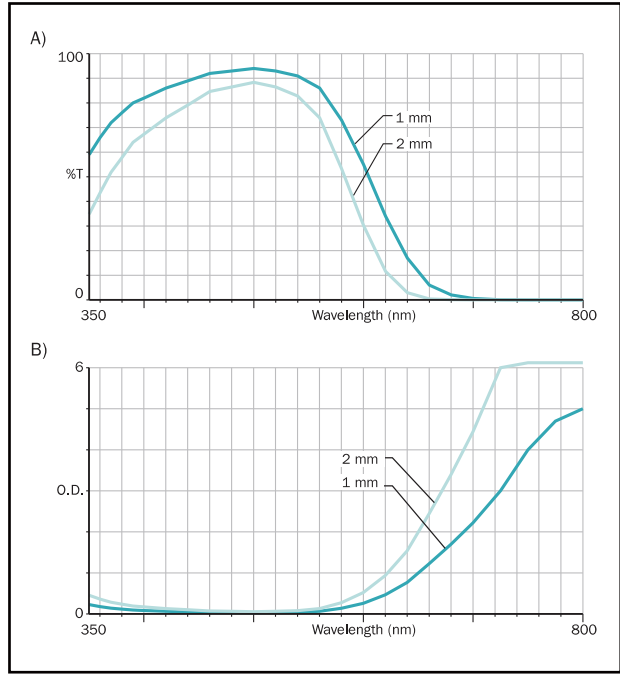


図 12
1mm および 2mm 厚の近赤外ブロッキングガラス (Schott®BG-39) のスペクトル A) 透過率,B) OD 値 (Schott Glasswerke カタログより)

色ガラスフィルターの長所

- 1) 比較的安価
- 2) 通常の状態では安定していて長寿命*¹²
- 3) スペクトル特性は入射角に依存しない。ただし厚さの増加に伴うわずかな変化を除く

色ガラスフィルターの短所

- 1) ガラスの種類が少ない
 - 2) バンドパスタイプのものは、傾きが緩く透過率が低い
 - 3) 厚さによってスペクトル性能が変わり、厚さが変更しにくい
 - 4) ロングパスフィルターの多くには、自家蛍光がある
 - 5) 吸収したエネルギーの大部分は熱に変換されるため、強化ガラスでないとガラスが強い照明により割れることがある
- ポリマーを使用したフィルターは色ガラスフィルターに分類され、同等の色ガラスフィルターに比べて自家蛍光が低く、ロングパスバリアフィルターやND フィルターとして使用されています。（以下で説明する薄膜型 ND フィルターと混同しないように気を付けてください）

* 12 例外事項 1) シャープカットのロングパスカラーフィルターでは、立ち上がりが1℃当たり約0.1～0.15 nm 変化 2) 一部の色ガラスフィルターは、UV 光（ソラリゼーション）や湿度の影響を受ける（Schott Glasswerke カタログ。）

薄膜コーティング

薄膜コーティング技術が使われる製品としては、1) 反射ミラーやNDフィルターなどの金属コーティング、2) 干渉フィルターの主な用途である「薄膜干渉コーティング」、が挙げられます。薄膜干渉コーティングの最大の利点は、非常にフレキシブルな特性を示すことにあります。図13に示すように、干渉膜は、薄い材料の層を積み上げてできており、それぞれの厚さは、光の波長のオーダー（通常は光の波長の約1/4、即ちおおよそ100ナノメートル）です。各材料自体は無色透明ですが、各層の界面で反射した光が干渉し合い、一部の波長を反射し、他の波長を透過します。自然界における薄膜干渉の例としては、シャボン玉が挙げられます。玉の内面と外面で反射した光が干渉し、シャボンの厚さに応じて異なる色になります*¹³。

バンドパス、ショートパス、ロングパスなどのフィルターやダイクロイックミラーは、どのようなタイプのフィルターでも、ほぼすべて干渉膜で設計し、製造することが可能です。積層する数や各層の厚さを変えることで、波長やバンド幅やブロッキングレベルを高精度に制御できます。また従来の単純なバンドパス、ロングパス、ショートパスよりも複雑なフィルターでも製作可能です。例えば、図14に示すのは、改良型マグネトロンスパッタ製法を使用して作った複数バンドを持つフィルターですが、透過率の高いバンドが複数あり、蛍光顕微鏡の貴重なツールとなっています。

薄膜干渉コーティングにおける制約事項

- 1) 従来の干渉フィルター設計では、ブロッキング範囲が限られていました。密封された中に誘電体を積層するコーティング技法が何十年にもわたって業界の標準になっていました。干渉コーティングと吸収ガラスの両方を用いることで、ブロッキング範囲は広がりました。しかし透過率が低下したり厚さが厚くなるという難点もありました。追加の「ブロッカー」がないフィルターと、ブロッカーが追加された同じフィルターの例を図15に示します。固定細胞、植物の自家蛍光イメージング、フローサイトメーター、プレートリーダーなどの比較的信号レベルの高い実験で、このタイプのフィルターは優れた性能を発揮します

* 13 シャボン玉とは異なり、光学薄膜は固体材料（多結晶またはアモルファス）からできており、コーティング層の厚さは非常に均一です。

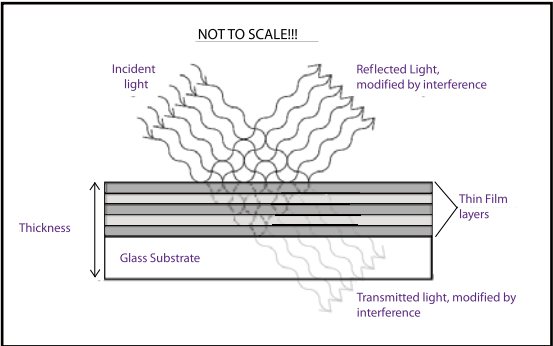


図 13
薄膜干渉コーティングの概略図

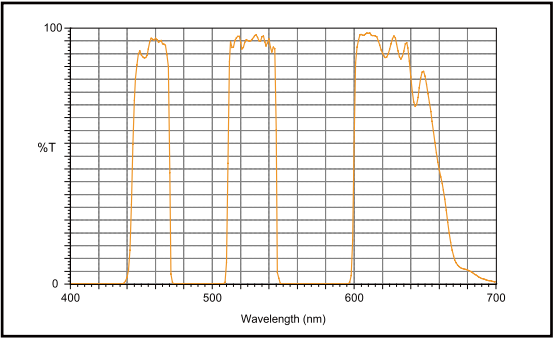


図 14
DAPI、FITC、および TexasRed® 蛍光用に設計されたトリプルバンドフィルターのスペクトル。(Chroma Technology Corp P/N 69002 のエミッションフィルター)

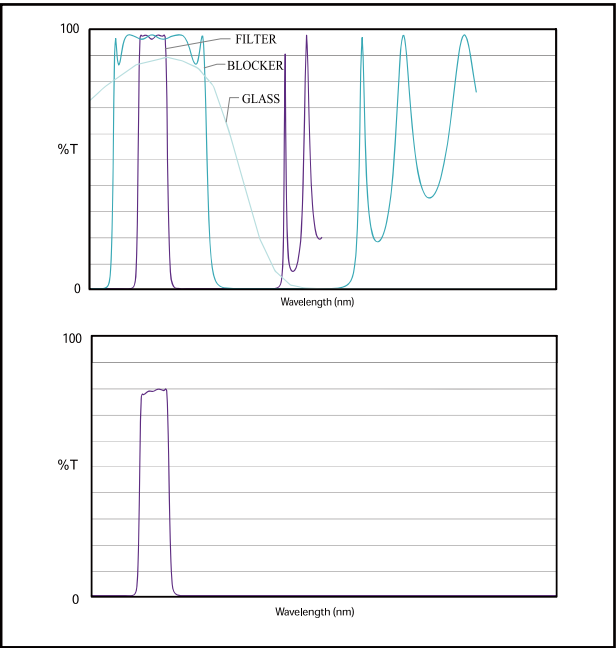


図 15
ブロック成分のあるフィルターの例：A) ブロックのないフィルターとブロッキング成分のスペクトル、広域ブロッカーと赤外線ブロックの青いフィルターガラスを含む、B) ブロックフィルターのスペクトル。赤外線の遮断範囲（図示せず）は、青いガラスの範囲で決まり、約1.2 ミクロン程度

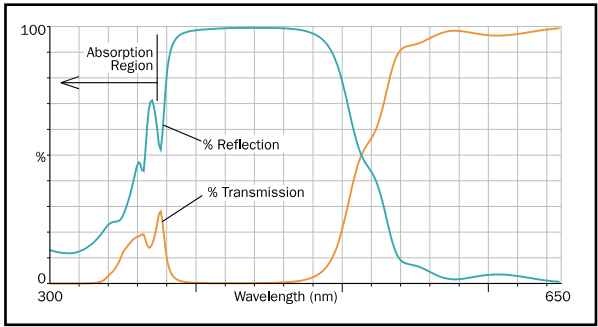


図 16
反射と吸収。このダイクロイックミラーは、UV の吸収率が高い

コーティング技術の進歩により、従来の制限は大幅に軽減されました。金属膜や吸収ガラスとは異なり、干渉膜は有限のブロッキング範囲を持っていますが、高エネルギーコーティング技術はブロッキング領域を拡張しながら透過率を上げることができます。例えば改良型マグネトロンスパッタ技術によって製造されたフィルターは、コーティング設計に高度なブロッキング方式を採用することで、広い範囲の消光を実現します。こうした方式でブロッキング領域を拡張したフィルターでは、バンドパスの透過率は下がりにません。このようにして作られた SN 比の高いフィルターにより、少しでも多くの光子を取得する必要があるアプリケーションにおいて優れたデータを取得できるようになりました。

2) 従来のフィルター技術ではコーティング材料の透過範囲が限られ、その範囲外ではコーティングによる透過や反射より吸収が高くなっていました。可視フィルターとして優れたコーティング材料には UV を非常に多く吸収するものがあり、UV フィルターには別の材料を使用する必要がありました。その結果 UV フィルターは、可視光フィルターに対して性能が限られ、設計自由度が低い傾向があります。さらに吸収があるため、吸収をゼロと仮定して透過スペクトルから反射率を計算できないということになります。

図 16 は、可視光領域において高反射するように設計されたダイクロイックミラーの例です。UV 領域で透過率が低下しているのは、反射のためではなく吸収のためです。一般に、可視光を反射するように設計されたビームスプリッターが UV も反射するとは限りません。新しい高エネルギーコーティング技術によって製作されたフィルターでは、紫や近紫外域の広い範囲で透過率の高い材料を使用しています。

3) 9 ページで述べたように、干渉膜は入射角に敏感です。入射角が大きくなると、スペクトルはより短い波長にシフトします。つまり、スペクトルはブルーシフトします*¹⁴。さらに斜め入射で起きる偏光効果は、ほとんどのアプリケーションにおいて嫌われるため、設計時には偏光の影響を極力抑えるようにしますが、完全に排除することは困難です。ただし、こうした偏光効果は、特殊なアプリケーションで有効に利用されることもあります。

音響光学フィルター

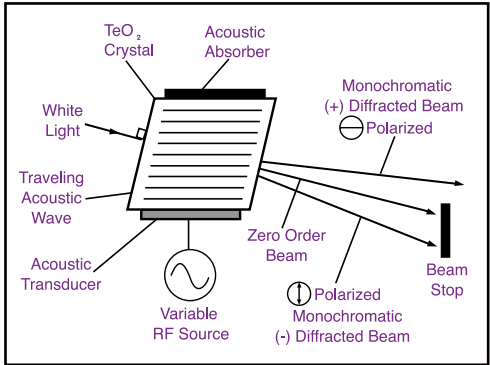


図 17
AOTF の概略図。(Brimrose Corp. から)

図 17 の概略的に示されている「音響光学式可変フィルター (AOTF)」は、特にレーザー励起用フィルターとしてよく使用されます。このフィルターは、結晶に高周波数で音響振動を与えることで内部に回折格子を形成します。周波数を変えることで、使用可能領域におけるいかなる波長の光でも迅速に、かつ高精度に回折させることができます。一般的な AOTF は、ハーフコーンアングルが約 5 度までのビームに使用可能です。なお AOTF は、外部装置を使用する電子制御デバイスです。

* 14 入射角が大きくなると薄膜の実質的な厚さは厚く（光路長が長く）なり、干渉する反射光同士
の光路長の差は小さくなる。

AOTF の長所

- 1) マイクロ秒で波長切り替えが可能、波長スキャン、複数の周波数を混合することによるマルチバンドフィルタ生成可能
- 2) 音響振動の振幅を変化させることにより、強度を高速に変更可能

AOTF の短所

- 1) FWHM の限界（可視光で約 2 nm）、励起フィルターとして使用する場合、白色光源からの光に限る
- 2) 開口が小さい（約 10mm 以下）こと、厚さが約 25mm と厚い
- 3) 直線偏光で出射、無偏光の光で使用すると透過率は最大 50%

液晶可変フィルター

液晶可変フィルター (LCTF) は、開口が大きく光路もまっすぐなため高い画質でフィルタリングが可能で、吸収フィルターとしてよく使われる電子制御デバイスです。LCTF の心臓部は複数の波長板から成り、それぞれが液晶層と対になって偏光板に挟まれた複屈折材料の層で構成されています。液晶層の複屈折は、液晶層に隣接する透明な導電膜に印加される電圧を変化させることによって微調整されます。

つまり、波長板の複屈折により入射する偏光は波長に応じて異なる角度に回転します。そして 2 つ目の偏光板で回転した偏光は減衰されるため、結果として回転により波長に応じた振幅変化に変換されることになります。LCTF 設計者は、波長板の数や各波長板の複屈折量などを変えることにより、フィルタリングのパラメータを制御します。

LCTF の特徴

- 1) ミリ秒のオーダーで波長選択可能
- 2) 波長の違いによる画像シフトがない
- 3) 減衰が可変
- 4) バンド幅 (FWHM) が選べる、スペクトル範囲が変えられる、ブロッキングレベルが変えられる。ただし、それらのパラメーターはある程度相互依存あり

LCTF は偏光光学部品であるため、偏光されていない光の最大透過率は 50% です。実在のデバイスは、波長とブロッキングレベルによりますが、50% を大幅に下回る場合もあります。ただし、落射蛍光顕微鏡で特殊な偏光ビームスプリッターを使用すると、これらのロスを軽減できます。市販されている製品の最大ブロッキングレベルは約 10 万分の 1 です。

蛍光顕微鏡用フィルターの設計

蛍光顕微鏡用フィルター設計の目標は、高コントラストで高品質な画像が得られるフィルターセット（励起フィルター、吸収フィルター、ダイクロイックミラー）を作ることにあります。

画像のコントラストは、いくつかの要因の組み合わせから成ります。

1) 画像の明るさ、2) 「SN比」で示される背景に対する蛍光の明るさ、3) 観察や撮影において目で見た時との差がより少ないカラーバランスなどです。画像が暗く十分な信号が検出できないと、SN比を改善しても画像コントラストは向上しません。そのためフィルターは、高スループット（つまり、広帯域かつ高透過）で、低クロストークであることが求められます。さらに、最大コントラストを引き出す最良の方法はアプリケーションまたはテクニックに依存することが多く、フィルター設計者はさまざまなアプリケーションについて理解する必要があります。フィルター設計者がアプリケーションに関する情報をどのように使うのかについて、以下で詳しく説明します。

フィルターが使われる顕微鏡に必要な光学性能を理解し、各フィルターが正しい仕様で製造されることを確認することにより、高い画質が得られます。そうした必要条件を満たすためにも、設計者は顕微鏡光学の基礎に精通し、アプリケーションと技術について十分理解していなければいけません。そうした知識は、照明やサンプル操作に使用するレーザー、デジタル画像処理、コンピューターを利用したポジショニングや制御、超高感度検出デバイスなど、新しい技術を使うアプリケーションが増え続ける今日において、特に重要となっています。

さらに、フィルター設計者は、顕微鏡のメーカーやタイプによって異なるフィルター寸法の違いを把握する必要があります。

画像コントラスト

フィルターセットが蛍光色素に対してどのように最適化するかについて説明するため、FITC 色素で染色された標本を例にとり、フィルターをどのように設計するのかについて説明します。

蛍光スペクトル

フィルタセットを設計する際に最も重要な情報は、色素のスペクトル特性であり、図 18A に示すような励起および発光スペクトルです。もしこの情報だけを使って励起フィルターと吸収フィルターを設計するのであれば、すべての励起スペクトル領域を透過するショートパスフィルターを使用して試料を励起し、全ての発光スペクトル領域を透過するロングパスフィルターを使用して観察すればよいということになります。図 18B に、FITC 用フィルターのペアを示します。これらは理想的なショートパスフィルターとロングパスフィルターになっていますが、実際のフィルターでは立上りや立下りに傾きがあるので、立下りと立ち上がりの間隔を広げる必要があります。さらに励起用のショートパスフィルターでは透過できる紫外領域に限界があります。

さらに実際の標本では、他に考慮すべき点があります。例えば UV 光を透過するようなショートパスの励起フィルターを使用すると、試料中の物質が自己蛍光を発することがよくあります。特に病理サンプルは、自家蛍光を発生する傾向があります。また、エネルギーが高い紫外光を照射すると蛍光色素がより速く退色したり、試料に光ダメージを与える場合があります。そのため吸収が高い領域のみを透過することで十分な強度で励起できる図 18C に示すようなバンドバスタイプの励起フィルターを使います。

試料が 2 つ目の蛍光色素（例えば図 18D に示すような励起および発光スペクトルを持つ TRITC）で染まっている場合、この色素はわずかながら青色領域でも励起されます。従ってロングパスの吸収フィルターを FITC 観察に使用すると、TRITC が発するわずかなオレンジ色の発光が観察されます。そうしたフィルターを使いモノクロカメラを使って画像取得すると、TRITC が局在する部位に FITC があるかのような画像が取れることになり、あまり望ましくありません。この場合、FITC の吸収フィルターは FITC の蛍光ピーク付近のみ含む狭い帯域のフィルター（図 18E）にする必要があります。図 18E のフィルターは、Chroma の 49 シリーズ ET フィルターの一例です。

画像の明るさが重視されないサイトメトリーでは、各蛍光色素をできる限り識別するため、時にはさらに狭いバンドバスフィルターが使用されます。

光源

これまでの説明では、すべての波長が同じ出力で放射される架空の光源、つまり理想的な白色光を想定していました。実際の光源はさまざまなスペクトルを持ち、多くの場合、光源のタイプを念頭に置いてフィルター設計することが求められます。以下は、蛍光顕微鏡によく使用される光源のリストです。

1) **水銀ランプ**は、蛍光顕微鏡に使われる最も一般的な光源であり、紫外線と可視光で高輝度（「ルミナンス」、「ラディアンس」）が必要な時によく使われます。水銀のスペクトル（図 19）は、不連続です。その出力は、輝線と呼ばれるいくつかの狭い帯域から成り、各輝線の幅は 10nm ほどです。ほとんどの汎用フィルターセットには、これらの輝線の 1 つ以上を透過する励起フィルターが入っていますが、例外もあります。その 1 つを次の例で示します。図 20 は、水銀ランプによって FITC の励起スペクトルを改善した場合の効果を示しています。436 nm の輝線を含む広帯域励起フィルターを使うと、この輝線を含まない狭帯域なフィルターよりも大幅に明るい蛍光が得られます。しかしその輝線を使うことで、ほとんどの試料で蛍光信号に比べ自家蛍光がより増加するため、全体的な SN 比が低下します。ただし、蛍光出力が極端に低いアプリケーションや FITC スペクトルがブルーシフトするような場合*¹⁵ では、436nm の輝線を

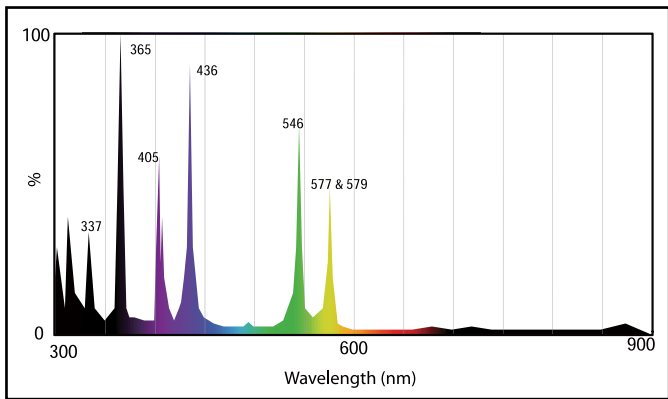


図 19
水銀ランプのスペクトル。(300 nm 未満の中紫外線出力は表示されていません。)

* 15 このシフトは、pH 値は低い時（6 未満の pH）に発生する場合があります（Haugland, 1992）。

図 18
A) FITC の吸収および発光スペクトル
B) 吸収および発光スペクトルに重ねた理想的な FITC 用フィルターペア
C) 励起にバンドパスフィルターを使った FITC 用フィルターペア
D) FITC スペクトルに重ねた TRITC の吸収および発光スペクトル
E) FITC 用バンドパスフィルターペア（Chroma Technology Corp P / N 49002）。FITC と TRITC の吸収と発光スペクトルを重ね合わせて表示

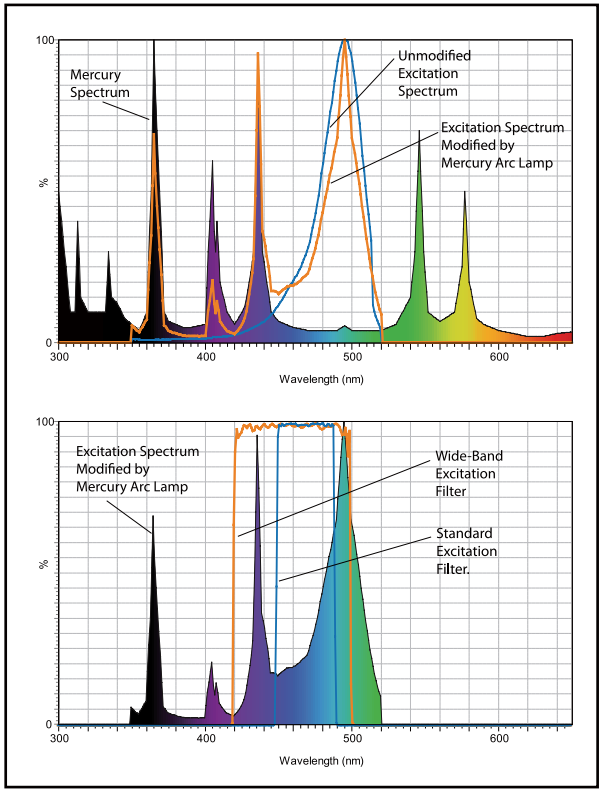


図 20
A) FITC の励起スペクトル、水銀ランプスペクトルによって補正された励起スペクトル（100% 相対ピーク T に正規化）
B) 広帯域励起フィルターのスペクトルに重ね合わせた FITC の補正励起スペクトル

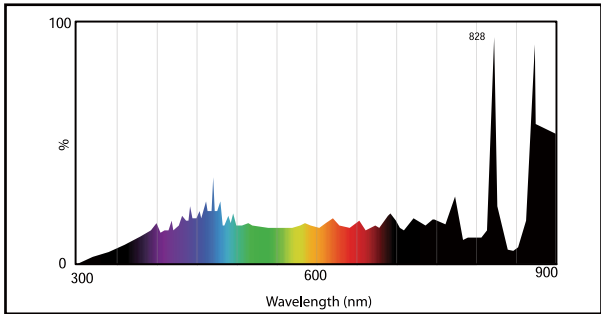


図 21
キセノンランプのスペクトル

含む広帯域励起フィルターを使うことで検出性能が向上する場合もあります。因みに、励起帯域が変わっても、蛍光スペクトルはあまり変わらないので、励起帯域に関係なく同じ吸収フィルターが使用できることを覚えておくといよいでしょう。

2) **キセノンランプ**は、可視光領域で比較的連続したスペクトルを持っています。(図 21) そのため、色素や試料のスペクトル特性を定量的に分析するシステムで良く用いられます。ただし、同等のワット数の水銀ランプほど明るくはありません。水銀ランプの出力が比較的弱い 450 ～ 500 nm の領域でも、キセノンランプはわずかに明るい程度です。これには 2 つの理由があります。まず第一にキセノンランプのアーキは同等出力の水銀ランプのアーキよりも大きいため、一般的な顕微鏡では、試料に照射される光の量が減少します。水銀ランプとキセノンランプに関するいくつかの関連データを表 1 に示します。ランプ毎のアーキサイズの違いに注目してください。第二に、キセノンランプの出力は、図 21 に示すように、近赤外と赤外領域においてかなり大きくなっています。赤外線の高い出力は、キセノンランプにもう 1 つの欠点をもたらします。それは、励起フィルターが近赤外線(>800 nm) で優れたブロッキングを発揮するように設計する必要があり、フィルターの取り付け場所によっては、より高い耐熱性を持つように設計する必要があるという点です。

3) **メタルハライドランプ**は、蛍光顕微鏡用光源として徐々に使用されるようになっていきます。スペクトルはモデル間で大きなばらつきがあります。一般的には水銀ランプのスペクトルに似ていますが、輝線間の強度は大きくなっています。この点では、キセノンランプに似ています。メタルハライド光源は、従来の水銀およびキセノンランプに比べて大きな利点があります。a) ランプの寿命が、水銀ランプは 200 時間、キセノンランプは 400 時間に対して、最大 2000 時間と非常に長い。b) 楕円形反射板を備えたハウジング内に構成されており、位置合わせが簡単で、ずれが起きづらく安定している。

メタルハライドランプの短所はアーキサイズが大きく（最小サイズは約 1.2 mm）、楕円反射鏡の光学系の制約により平均輝度がキセノンランプと同程度になることです。またキセノンランプ同様、水銀ランプよりも赤外線の出力が高くなっています。

表 1
キセノンおよび水銀ランプのデータ。太字は、蛍光顕微鏡で使われる最も一般的なランプを示す。(Abramowitz、1993 年から)

ランプタイプ	出力 (ワット)	輝度 (ルーメン)	平均照度 (カンデラ /mm ²)	アーキサイズ (w x h mm)	寿命 (時間)
水銀					
50 W	50	1300	900	0.20 × 0.35	200
100 W	100	2200	1700	0.35 × 0.25	200
200 W	200	10000	400	0.60 × 2.20	400
キセノン					
75 W	75	1000	400	0.25 × 0.50	400
150 W	150	3000	150	0.50 × 2.20	1200

4) **発光ダイオード (LED)** 光源は、学校で使われるような安価な顕微鏡で人気が高まっています。LED は、FWHM が約 10 ～ 40 nm で、比較的狭いスペクトル幅を持つという点でランプとは異なります。図 22 は、いくつかの代表的な LED 光源のスペクトルを示しています。励起フィルターはブロッキング範囲を拡張する必要がないので、蛍光顕微鏡にとって魅力的です。ストークスシフトが大きい蛍光色素を使用するアプリケーションでは、励起フィルターは必要ない場合もあります。ただし、ほとんどのアプリケーションでは、ストークスシフトが小さな蛍光色素を使用しますので、励起フィルターと吸収フィルターのペアが必要です。

LED には他にも重要な利点があります。a) LED の寿命は通常少なくとも 10,000 時間で、多くは 50,000 時間以上点灯します。b) 出力は寿命期間中は比較的一定です。c) 固体デバイスであるため、出力(オン/オフと強度の両方) はミリ秒のオーダーで高速に制御可能です。蛍光顕微鏡で LED 光源を使う際の主な欠点は、明るさです。ただし LED 技術の進歩により、LED が放射するスペクトル帯域と同じ帯域で比較すると、ランプ光源とほぼ同じ明るさを持つ LED が出てきています。LED 光源の主な欠点は、皮肉なことに、スペクトル発光帯域が狭いことです。これには 2 つの理由があります。a) マルチチャンネルアプリケーションの場合、いくつかの異なる色の LED を組み合わせる必要がありますが、比較的複雑な光学系を組むため明るさが暗くなる場合があります。b) 商品化されている波長は限られており、特に蛍光観察に有用な水銀の 546 nm の輝線に一致する緑色の LED はあまりありません*¹⁶。また、単色 LED はロットごとにピーク波長がばらつき（最大 20 nm）、温度や LED を駆動する電流の大きさによっても波長が変わる（最大 5 nm）ことがあるので、気を付ける必要があります。

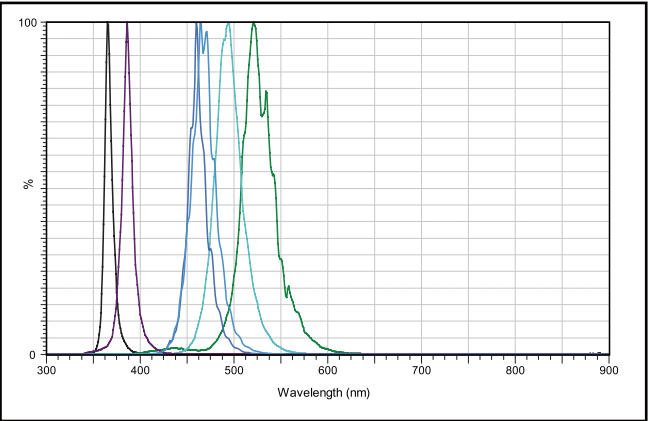


図 22
代表的な LED 光源のスペクトル。公称波長：365 nm、390 nm、455 nm、470 nm、505 nm、および 535 nm。(390 nm LED データは日亜化学工業より)

* 16 現在、蛍光剤 (conversion phosphor) を使うことで、こうした状況は改善されています。蛍光剤は LED に塗布され、LED の光を吸収し長い波長の光を放出します。蛍光色素の励起スペクトルと一致するようなスペクトルを持つ蛍光剤が選べるようになっている

5) **レーザー**は、狭いスペクトル幅で非常に高い輝度があるため、あらゆる共焦点蛍光顕微鏡で使われるようになりました。ただし、レーザー光はコヒーレント光なのでサンプルフィールド全体を均一に照明するのが難しく、広視野蛍光顕微鏡に使用されることはあまりありません。レーザー照明用のフィルター設計の詳細については、25 ページを参照してください。

検出器

励起フィルターを設計する際には、検出器に感度がある不要な光は全て取り除くようにします。アークランプやフィラメントからは、近紫外から赤外線まであらゆる波長の光が射出されるので、フィルターは検出器の感度がある全範囲にわたって不要な光を遮光する必要があります。しかしレーザー光を使う場合、励起フィルターの遮光範囲はレーザーの出力範囲をカバーするだけで済みます。そのためアルゴンイオンレーザー用のフィルターには赤外線の遮光は、特に必要ありません（図 23）

図 24 は、いくつかの検出器のスペクトル感度を示しています。図示されていませんが、非増幅型シリコンフォトダイオードや CCD は 1100 nm まで感度を持ち、1200 nm でゼロに低下します。またマイクロチャンネルプレートで増幅されるシリコン検出器は、図示した Intensified video のスペクトルと同様の感度範囲を持っているので、気を付けてください。

さらに、次の 3 つの理由から吸収フィルターでなく励起フィルターで不要な帯域の光を遮光することが望ましいです。1) 試料が受ける放射線が少なくなる、2) 吸収フィルターの膜数が少なくなり画質が向上する、3) 多くの顕微鏡では、吸収フィルターを保持する部分は浅いため、厚さが厚くなるようなフィルターの追加は避けるのが良い。ただし、例えば紫外線励起では、励起フィルターのブロッキング範囲を拡張すると、紫外線の透過率が低下します。そういう場合、代わりに吸収フィルターに赤外線を遮光するブロッキング膜を入れるのが適切です。

可視の画像取得を行う際は、内蔵する露出計によっては赤外線に感度があるものがあるので、露光時間に影響を及ぼさないように赤外線を遮光することが重要です。

ビームスプリッター

フィルターセットを決める際、最後に励起フィルターと吸収フィルターのスペクトルに合うダイクロイックミラーを選ぶ必要があります。励起光を高反射し蛍光を高透過するビームスプリッターは、信号を最大化するだけでなく、バックグラウンドノイズを低減し、コントラストを改善します。改良型マグネトロンスパッタリングの高度なコーティング技術により、励起領域で 95% 以上反射率、蛍光領域で平均 95% 以上の透過率が実現できるようになりました。

45 度などの大きい入射角では、コーティングによって偏光を生じる可能性があるため、設計者は偏光を最小限に抑えるようにしています。顕微鏡などのイメージング用のビームスプリッターは、通常、ガラス基板に直接塗布された 1 つまたは 2 つのコーティングでできており、取り扱いには特に注意が必要です。光源と試料に面する面は、ビームスプリッターの「おもて面」と呼ばれます。おもて面がどちらであるかを判断するのは難しい場合があるため、メーカーでは通常正しい方向を示す何らかのマーキングを付けています。

図 25 は、FITC 用に設計した、励起フィルター、吸収フィルター、およびこれらのフィルターに合うダイクロイックミラーのフィルターセットを示しています。

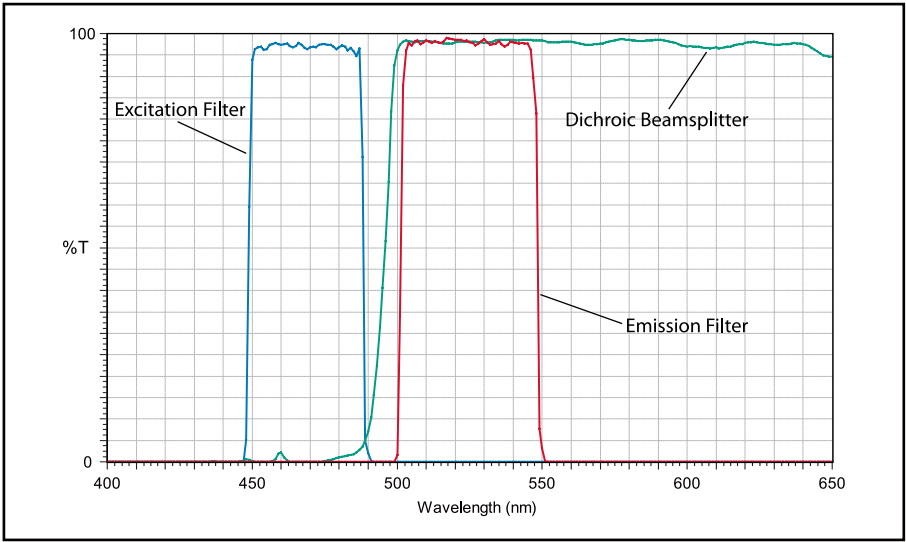


図 25
FITC 用フィルターセット（Chroma Technology Corp P / N 49002）

光学的品質

光学フィルターに求められる光学的品質は、フィルターのタイプ（特に、照明用なのか検出用なのか）、顕微鏡タイプおよび使用目的などによって異なります。例えばレーザー走査型共焦点顕微鏡による定量的画像解析に使用される吸収フィルターの光学的品質は、広視野顕微鏡で目視観察を行う際の励起フィルターの光学的品質とは大きく異なります。すべてのタイプのフィルターとすべてのアプリケーションにおける要求精度は、ここでは説明いたしません。が、主要な品質パラメーターと基本的な顕微鏡構成を理解することで、どのような状況にも対応するガイドラインを作成できますので、以下に示します。

光学的品質パラメータ

下記は、画質を定義するために使用されるフィルターやビームスプリッターの重要なパラメーターのリストです。最初の3つのパラメーターを図26に示します。

- 1) 「**平面度**」は、光学素子表面が理想平面からどれだけズレているかを示し、可視光の波長（通常は550または630 nmですが、バンドパスフィルターのCWLを使用する場合もあります）の分数または倍数で表されます。平面波が表面で反射したときに受ける反射波面歪み（RWD）は、平面度の2倍です^{*17}。ただし、RWDという用語を使用する仕様では、垂直入射時の基板の平面度を示します。それは市販の干渉計を用いた場合の標準的な測定方法だからです。仕様が本当にRWDであり、平面度ではない場合には、明確に注記する必要があります。
- 2) 「**透過波面歪み（TWD）**」は、光学素子を透過したときに平面波が受ける歪みの尺度であり、前述の平面度の場合と同様に、波長の分数または倍数で表されます。光学素子表面の平面度と、わずかですが内部の屈折率の不均一性が組み合わさって、光学素子の全体的なTWDが決まります。
- 3) 「**くさび**」（平行度とも呼ばれます）は、光学素子の2つの表面がどれだけ平行であるかを示す尺度です。くさび角は通常、分や秒という単位で表されます。くさび状になっていると、光ビームが進む方向に「**偏角**」が生じ、例えば画像シフトを引き起こします。偏角の量は、フィルターのくさび角の約半分です^{*18}。コーティングのくさびは、ほとんど偏角を生じませんが、軸外の内部反射によりゴースト画像を引き

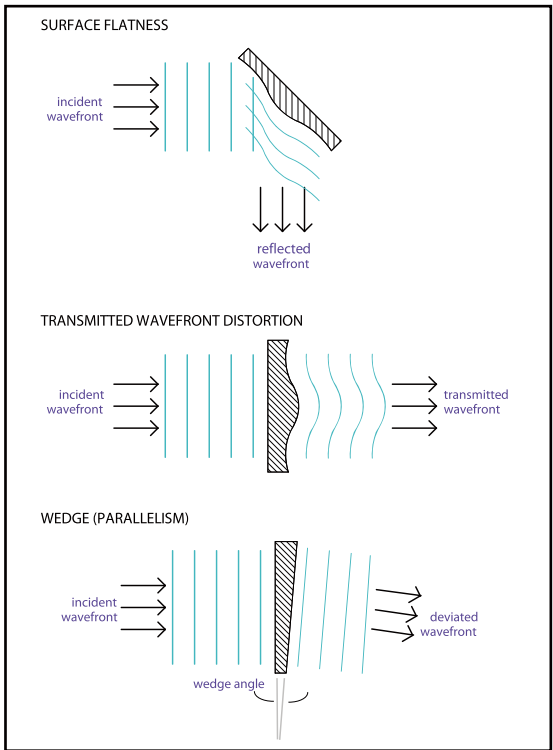


図 26
表面の平面度、透過波面歪み、およびくさびの影響

* 17 厳密には、これは垂直入射で反射した光にのみ当てはまります。非垂直入射で反射した光の場合、角度のコサイン（余弦）の値になります。たとえば、45度の入射角での反射波面歪みは、表面の平面度の約1.4倍です。

* 18 小さな入射角の場合、偏角 = (N - 1) α。ここで、N はフィルターのガラス屈折率、α はくさび角です。ほとんどのフィルターは、屈折率が約1.5の光学ガラスを使用しています。

起こすことがあります。

- 4) フィルターの「**有効径**」は、顕微鏡の開口部より小さくしてはいけません。またフィルターの有効径を通らず周辺を通った光が漏れ出ないようにすることも重要です。フィルターメーカーは通常、確実にそうした漏れを防ぐためフィルターはリングに入れて販売しています。リングなしでフィルターを購入した場合、漏れがないようにフィルターを取り付けるのはお客様の責任になるので、気を付けてください。
- 5) 「**スクラッチ／ディグ**」は、MIL 規格で測定されます。例：「S/D = 80 / 50」。ディグは、フィルター内に含まれるツブや小さな気泡、コーティングに含まれる異物などが含まれます。
- 6) 「**ピンホール**」は、干渉フィルターの膜にできる小さな欠陥のことで、通常はコーティング中に基板についたほこりの粒子によって引き起こされます。ピンホールサイズは、高輝度照明装置を使った条件下で標準ピンホールサンプルと比較して測定します。

ケーラー照明を備えた広視野顕微鏡の光学的品質要件

ほとんどの蛍光顕微鏡は、「**ケーラー照明**」光学系（4 ページの図3に図示）を使った「**広視野**」落射蛍光システムです。以下は簡単な説明です。

ケーラー照明では、照明光を制御するために2つの調整可能な絞りが用意されています。対物レンズの後ろ側焦点面と共役位置にある「**開口絞り**」と、試料面と共役な位置にある「**視野絞り**」です。視野絞りは、開口絞りを対物レンズの後ろ側焦点面に投影するレンズの近くに配置されます。コンデンサーレンズは、ランプのアーク像を開口絞り位置に投影します。これにより次の3つの重要な効果が得られます。1) ランプのアーク像が試料面で焦点が合わない（アフォーカル）ため、均一に照明できる。2) 視野絞り像が標本上に投影されるので、視野全体を照明したり、視野の一部を照明したりするように調整できる。3) 照明する範囲を変えることなく（絞りを調整することで）照明の開口数を変えることができる^{*19}。

上述に基づいてケーラー照明顕微鏡の光学的品質要件を考えると、下記になります。

* 19 ケーラー照明光学系の詳細については、Inoué（1986）または顕微鏡メーカーの文献を参照

- 1) 顕微鏡の照明光学系は、フレアを最小限に抑えて標本を均一に照明するように設計されておりますが、光源像や開口絞り像を忠実に結像するようになっていません。そのため励起フィルターは、高画質に必要な小さな透過波面歪み^{* 20}を持つものである必要はなく、業界標準と一般に考えられているものを使います。同様に、ダイクロイックミラーの平面度も画質に影響はないので、高い平面度は要求されません。
- 2) フィルターキューブ内のビームスプリッターの傾きの違いにより、フィルターキューブを切り替えたときに、照明スポットの位置（つまり、試料面上の視野絞りの画像）にシフトが生じる場合があります。一般的なアプリケーションでは、45度+/-3分で角度が合っていれば問題はありません。（反射ビームの角度は入射ビームの角度に等しいため、この角度公差によって生じるビームの偏角は、公差の2倍、つまり+/-6分になります。）初めからフィルターキューブにビームスプリッターが取り付けられている場合、ビームスプリッターを適切に位置合わせするのはサプライヤーの責任です。ただしフィルターキューブを顕微鏡に取り付けるときは、適切に位置合わせするように注意してください。
- それとは対照的に、キューブの位置合わせ誤差による視野内の画像の位置ずれや画像の「重ね合わせずれ」が起こることはほとんどありません。
- 3) また励起フィルターがくさび状になると、偏角によって照明スポットの位置は少々シフトしますが、画像の重ね合わせずれが生じることはありません。フィルターキューブに取り付けられたダイクロイックミラーの角度のみ、公差内にするように調整します。
- 4) ダイクロイックミラーや吸収フィルターを含む結像光学系のフィルターの透過波面歪みは画質に影響を及ぼします。
- 5) 吸収フィルターとビームスプリッターがくさび状になっていると、フィルターまたはキューブを切り替えた際に、画像の重ね合わせずれを生じます。従ってこれらに使われるガラスは、くさび角を小さく抑えることが重要になります。
- さらに、ビームスプリッターの厚さの誤差は、重ね合わせずれを引き起こす場合があります。厚さ誤差に対するずれ量は、顕微鏡によって異なります。「有限遠光学系」の落射蛍光顕微鏡は、結像光路において光ビームがコリメートされていない場合があります^{* 21}、結像光学系でコリメートされている「無限遠光学系」の顕微鏡より、一般的には厚さの差にセンシティブです。

* 20 ここでいう「画質」とは、光学システムの全体的な性能を低下させないレベルの光学的品質を意味します。一般的な顕微鏡では、光学フィルターとビームスプリッターのTWDは1インチあたり1波長が適切であると考えられています。

* 21 最新の有限遠光学系顕微鏡では、フィルターブロックの前後に凹レンズと凸レンズを備え、キューブ内で光ビームがコリメートされるように改善されています。ただし、それによって影響は小さくなりますが、完全に排除されるわけではありません。

- サブピクセルレジストレーション（SPR）を必要とするフィルターセットでは、ダイクロイックミラーと吸収フィルターくさび角と厚さを制御する必要があります。SPR フィルターセットの光学的品質要件については、24 ページで詳しく説明します。
- 6) 通常、励起フィルターは視野絞り（ケーラー照明の像面と共役面）付近に配置されるため、励起フィルター上にピンホールがあると目立つため、取り除く必要があります。
- 7) ダイクロイックミラーは、励起光で照明され、結像光路の一部にもなっているため、自家蛍光を最小限に抑える必要があります。
- ビームスプリッター平面度と透過波面歪みについては、別々の規定（仕様）が必要ですので、ご注意ください。
- 上で述べた見解に基づき、広視野落射蛍光顕微鏡で使用されるフィルターの代表的な仕様を表 2 に示します。

表 2
広視野落射蛍光顕微鏡のフィルターの光学仕様

項目	フィルター種類		
	励起フィルター	吸収フィルター	ビームスプリッター
平面度	規定なし	規定なし	10 λ／インチ未満
透過波面	規定なし	1 λ／インチ	1 λ／インチ
くさび	6 分未満	1 分	1 分
スクラッチ／ディグ	80 ／ 50	60 ／ 40	40 ／ 40
ピンホール	ゼロ	最小限	規定なし（*）
自家蛍光	規定なし	できる限り小さく	最小限

（*）キズ、ブツにて規定

サブピクセルレジストレーション用フィルターセット

複数の蛍光色素で染められた標本画像を作成する場合、一般的には高解像度のモノクロカメラを使用して各蛍光色素の画像を個別に取得し、各々の画像に疑似カラーをつけ重ね合わせて表示します。画像は、蛍光色素ごとに異なるフィルター「キューブ」を使用して取得されます。各フィルターキューブは、顕微鏡のスライダーやターレットに取り付けられます。

共局在の分析を行う研究では、各画像のシフト量を1ピクセル以内にして重ね合わせる必要があります。重ね合わせ時の画像シフトを小さく抑えたフィルターセットは、「サブピクセルシフト (SPR)」フィルターセットと呼ばれます。

画像シフトの主な原因は、ダイクロイックミラーと吸収フィルターがくさび状になっているためです。SPRを達成するための要件は、顕微鏡の光学系やCCD検出器のタイプによって異なりますが、くさび角の仕様は概ね、ビームスプリッターで2秒、吸収フィルターで10秒となります。ビームスプリッターのくさび角が厳しいのは、次の2つの理由からです。

- 1) 45度で入射した光の偏角は、垂直入射時よりも大きい
- 2) ビームスプリッターは、くさび角の小さいガラス基板が使える

画像シフトの2番目の原因として、吸収フィルターとダイクロイックミラーの厚さが挙げられます。厚さによるシフト量は顕微鏡によって異なりますが、有限遠光学系の落射蛍光顕微鏡は、結像光路で光ビームがコリメートされていないため、無限遠光学系顕微鏡のようにフィルターキューブが配置されているところで光ビームがコリメートされた顕微鏡に比べ、吸収フィルターとダイクロイックミラーの厚さの違いに敏感です。セット内の吸収フィルターの厚さ公差が0.2mm以下で、ビームスプリッターの厚さ公差が0.2mm以下であれば、影響はほとんどありません^{* 22}。

画像シフトのもう1つの原因として、ダイクロイックミラーの平面度が挙げられます。干渉膜で作ったダイクロイックミラーは、膜応力により基板が反る場合があります。膜応力は、コーティングプロセスに大きく依存します。マグネトロンやイオンビームスパッタ法では、応力が非常に高くなり、薄いガラス基板を使うと大きく歪みます。結像光路内の光ビームがコリメートされていないと、この反りによって結像ビームがシフトを引き起こす場合があります。この効果は、顕微鏡スライダーやターレットに取り付けられているセット内のすべてのダイクロイックミラーが異なる蒸着方法で製造されていると、さらに顕著になります。

* 22 これは、フィルターに使用されているガラス基板の屈折率が同等であることが前提です。

共焦点顕微鏡用フィルター

共焦点蛍光顕微鏡 (CFM) で使用するフィルターを設計するには、顕微鏡の光学構成を考慮する必要があります。各メーカーのCFMは独自の構成となっており、固有の光学仕様になっています。ほとんどのシステムは、2つのタイプに分類でき、一方はニポウディスクを使うタイプで、もう一方はレーザービームを走査するタイプです。これら2つのタイプについて、標準的な広視野顕微鏡の光学系と比較しながら簡単に説明します。焦点深度、解像度、画像生成技術など、CFM光学系のより詳細な解説については、CFMメーカーの文献や顕微鏡もしくは生物学・遺伝学などの実験技術に関連する科学雑誌に掲載された記事をご参照ください。

共焦点蛍光顕微鏡の光学要件

ニポウディスク CFM

図 27 は、広帯域アークランプ照明、ニポウディスクユニット、カメラまたは肉眼観察のいずれかの画像検出器を備えたCFMの概略図です。

このニポウディスクCFMは、標準的な広視野顕微鏡と同様の光学系 (図 3 に示されている) となっています。ディスクは試料面に共役な位置に設定されており、通常はケーラー照明を使用して、視野全体にわたって均一に照明するようになっています。従って励起フィルターの透過波面とダイクロイックミラーの平面度は広視野顕微鏡の場合と同じで、さらに吸収フィルターとビームスプリッターの透過波面も、広視野顕微鏡の場合と同じです。特殊なCFMを作るため焦点距離が変わり仕様が変更になる場合もありますが、フィルターのくさび角の仕様については、特に変更されません。

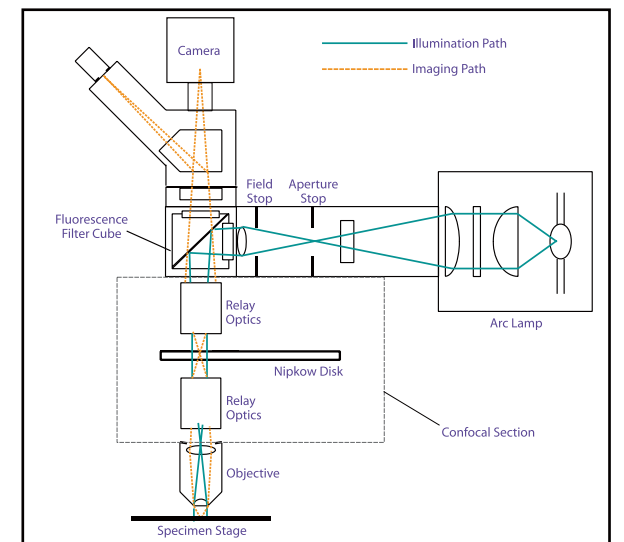


図 27
ニポウディスク共焦点蛍光顕微鏡の概略図。

レーザースキャン CFM

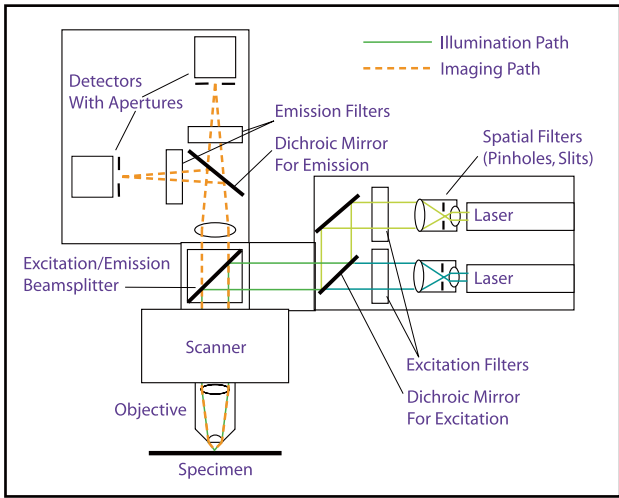


図 28
レーザースキャン共焦点蛍光顕微鏡の概略図。

図 28 は、レーザー光源、可動ミラー部および光電子増倍管 (PMT) などの測光検出部を備えた CFM の概略図です。この CFM の光学系は、広視野顕微鏡の光学系とは大きく異なります。2 つの大きな違いは次の通りです。

- 1) 照明用ピンホール（またはスリット）は、標本面に直接レーザースポットを結ぶように、「クリティカル照明」によって試料面に投影されます
- 2) 画像生成方法はテレビの走査線イメージング方式と同様で、検出器から出る電気信号を試料上のレーザースポットの位置に合わせて配置します。検出器から出る電気信号は、共役ピンホール（またはスリット）を通過する蛍光の強度に応じて変化します。

この CFM では、試料面でより理想的なスポットを結ぶようにす

るため、レーザービームが歪まないようにし、理想的光路からの偏角も最小になるようにします。さらに、この CFM は比較的長い光路長になっているため、フィルターによる偏角が増幅されます。従って励起フィルターとビームスプリッターには、吸収フィルターやビームスプリッターと同等以上の品質や重ね合わせ精度が必要になります。ほとんどの装置は、励起フィルターとビームスプリッターに対して、1 インチあたり 1 波長以下の波面歪みと平面度が求められます。ウェッジの仕様も厳しく、フィルターを切り替える際の位置合わせ調整を最小限に抑えるために、通常は 1 分以内になります。

検出光学系では、対物レンズと検出ピンホールの間に配置される光学部材はすべて、高品質である必要があります。概略図では、示されているすべての吸収フィルターとビームスプリッターがその部材に当たります。いくつかの装置では、メインのビームスプリッターと検出ユニットの間にピンホールが 1 つだけ配置されますが、その場合、ピンホール通過後の検出ユニット内のフィルターの波面歪や平面度などの光学的要件はそれほど厳しくありません。

共焦点蛍光顕微鏡のスペクトル要件

スペクトル要件は照明方法と検出方法によって異なりますが、ニポウディスク CFM の照明および検出方法はレーザースキャン CFM の照明および検出方法と異なるので、スペクトル要件もこれら 2 つのカテゴリで分類できます。

ニポウディスク CFM

ニポウディスク CFM の光源と検出システム（図 26）は標準の広視野落射蛍光顕微鏡（EFM）と同じ構成なのでスペクトル要件も基本的に同じですが、例外がひとつあります。余分な光学部材（ニポウディスク）の追加により信号強度が弱まったり不要な反射や散乱が生じたりするため、励起フィルターと吸収フィルターのペアは非常に低いクロストークにしなければなりません^{* 23}。

* 23 一部のシステムは、ニポウディスクからの反射を減らすために偏光光学系を使っている場合もある

さらに、フィルターはピンホールがないよう、特別に注意する必要があります。

レーザースキャン CFM

レーザースキャン CFM のフィルターとビームスプリッター（図 27）は、使用するレーザーに対して最適に機能するように設計されています。現在最も一般的なレーザーは、レーザーダイオード (LD) や DPSS などの固体レーザーなどですが、可視光領域のレーザーが数多くあります。図 23 に示すような従来からあるアルゴンイオンレーザーやヘリウムネオンレーザーやアルゴンクリプトンレーザーも使用されています。レーザー用のフィルターを設計するときは、次の点を考慮します。

- 1) 励起フィルターは、レーザーの出力領域全体をカバーするブロッキング性能になっている必要があります。従来のレーザー光源に対しては 800 nm までブロックするものが適していますが、DPSS レーザーは使用する半導体レーザーの成分を持ち、532 nm レーザーでは 1064 nm の成分を持ち、検出器で検出してしまうことがあります。レーザー用励起フィルタで考慮すべきことのひとつは、フィルターへの熱負荷を減らすために吸収は避け反射によって可能な限り不要な成分の光を減衰させることです。例えばアルゴンイオンレーザー用の UV 励起フィルターは、レーザー出力の大部分が集中している可視光の青緑色領域で高い反射率を持つようにします。
- 2) CFM で使用されるレーザーはほとんどが偏光しているため、最適なビームスプリッターを設計する際には、偏光条件に関する知識が非常に役立ちます。例えば図 9 に示したダイクロイックミラーは、アルゴンイオンレーザーの 488 nm ラインの S 偏光方向での使用に最適化されており、立ち上がり波長を 500 nm にして蛍光をより多く透過するようにしています。励起光が偏光であっても、蛍光はほとんど無偏光になるため、ビームスプリッターは S と P 両方の偏光で蛍光を効率的に透過する必要がありますので、注意する必要があります。偏光条件に関する情報は、特にマルチバンド「ポリクロイック」ビームスプリッターを設計する際、蛍光信号をできるだけ取得するため反射帯域を狭くする際に役立ちます。
- 3) 吸収フィルターは、透過する領域より短波長側にあるすべてのレーザー波長をブロッキングする必要があります。複数の蛍光プローブを使用する場合では、プローブ間の信号クロストークを向上させるため、蛍光帯域の長波長側もブロッキングすることをお勧めします。ただし長波長側のブロッキング範囲は検出器の検出範囲をカバーすればよいので、PMT では 700 nm までブロックすれば良い場合もあります。（図 24）

表 3
複数プローブを取得する方法

方法	装置	長所	短所
1. シングルバンドフィルターセット	・一般顕微鏡	・追加の機器が不要 ・画像が明るい	・同時イメージング不可 ・色ずれの可能性のある画像
2. マルチバンドフィルターセット	・一般顕微鏡	・色ずれがない同時観察 ・追加の機器が不要（特別なフィルターセットを除く）	・明るさが低下 ・キセノンアーク照明ではお勧めしない ・カラーバランスは固定のまま
3. マルチバンドビームスプリッター マルチバンド吸収フィルター シングルバンドフィルター	・照明光路にフィルターホイールまたはスライダーを備えた顕微鏡 ・写真カメラ、または画像処理を備えた電子カメラ	・色ずれがない連続的な観察 ・正確に重ね合わせ画像、カラーバランス調整可能 ・最適化された励起フィルターにより、方法 2 よりも明るい画像を提供	・追加の機器（フィルターホイールまたはスライダー）が必要
4. マルチバンドビームスプリッター シングルバンド吸収フィルター シングルバンド励起フィルター シングルカメラ撮影	・照明光路とイメージング光路の両方にフィルターホイールまたはスライダーを備えた顕微鏡 ・写真カメラ、または画像処理を備えた電子カメラ	・励起フィルターと吸収フィルターは、方法 1 と同様の明るさになるように設計可能 ・色ずれが少ない（ビームスプリッターが動かないことによる）	・追加の機器(2つのフィルターホイールまたはスライダー) が必要 ・吸収フィルター切り替えによる色ずれの可能性
5. マルチバンドビームスプリッター シングルバンド吸収フィルター シングルバンド励起フィルター 複数カメラ撮影	・照明光路にフィルターホイールまたはスライダーを備えた顕微鏡 ・チャンネルを分離するためのビームスプリッター、および各チャンネルに個別の吸収フィルター	・方法 4 の利点に加えて： ・吸収フィルターによる色ずれがない ・追加のアプリケーションをサポート（レシオイメージングなど）	・追加のビームスプリッターとカメラを必要、装置が複雑
6. 方法 4 および 5 の変形 ビームスプリッターにハーフミラーを使用		・励起フィルターと吸収フィルターを任意に組み合わせて使用可能	・明るさは最大 80% 低下、特別な光源をお勧め（レーザーなど）

複数プローブ観察用フィルター

一般顕微鏡で色素ごとに最適なフィルターキューブを使用して、複数の蛍光色素で染色された標本を多重露光または複数撮影で画像取得する場合、個々に撮影した画像がシフトするという問題が発生します。吸収フィルターとビームスプリッターのくさび量の違い、ビームスプリッターの厚さや位置合わせの違い、さらにはキューブを切り替えるときに発生する機械的振動などがそうしたシフトを起こす原因になります。一部の方法では、そうしたシフトをある程度のレベルまで減らすことはできますが、多くの方法ではより高度なフィルター設計と装置が必要になります。

表 3 は、複数の蛍光色素で染められた標本を観察するための方法について示しています。これらの方法には、図 29 に示すようなマルチバンドフィルターセットを使う方法や、マルチバンドとシングルバンドの両方のフィルターを組み合わせる方法が含まれます。これらすべての方法は、色ずれを起こさないように設計されています。2 の方法では、最大 3 色を同時に観察できるものを提供しています。（マルチバンドフィルターがセットに追加されている場合、3 から 6 の方法でも同時観察行うことができます。）この表は単なるガイドであり、すべての方法や構成を示すものではありません。

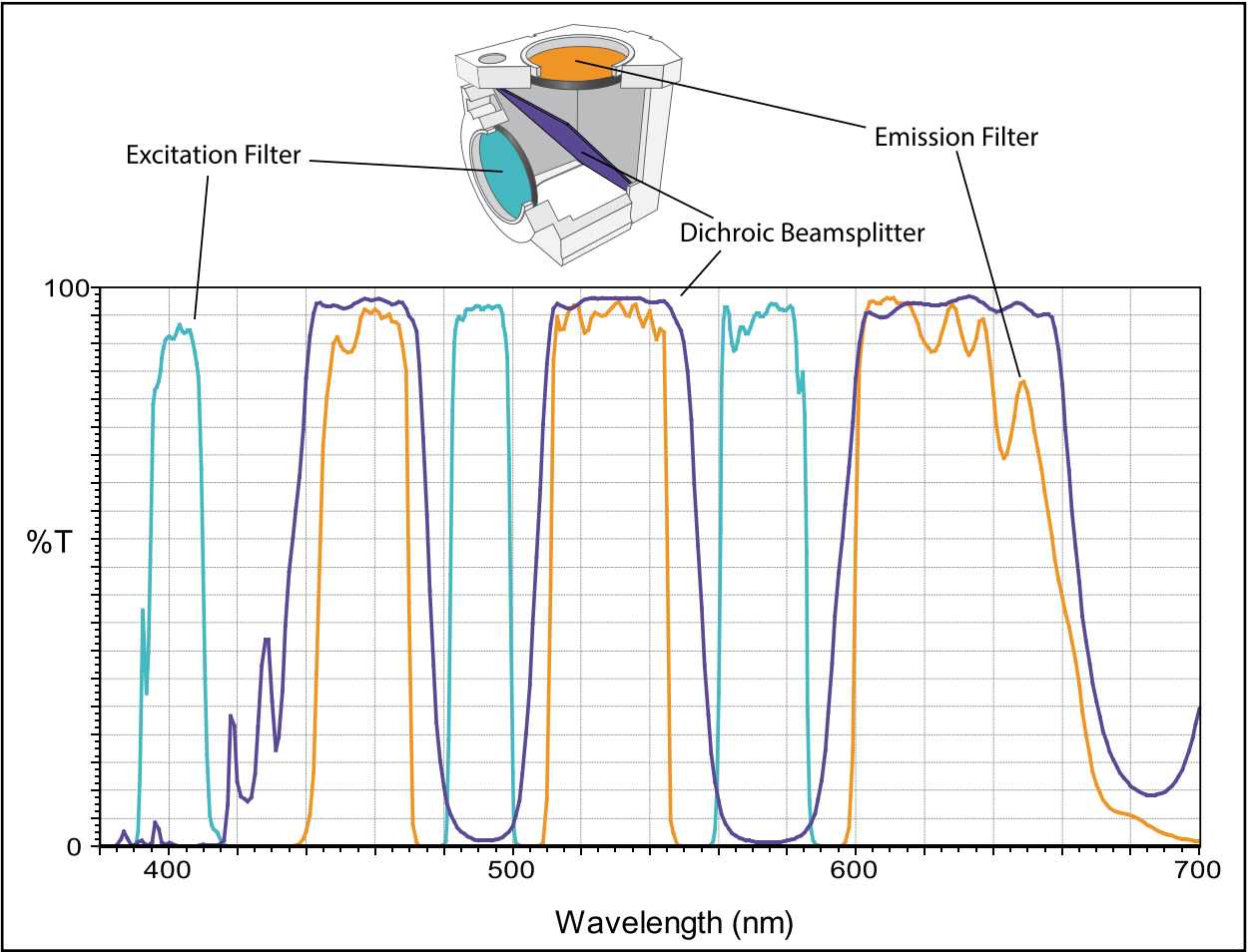


図 29
DAPI、FITC、TexasRed® 用に設計されたトリプルバンドフィルターセットのスペクトル。（Chroma Technology Corp P / N 69002）

参考文献

Abramowitz, M. (1993) *Fluorescence Microscopy*: The Essentials. Olympus America, Inc.

Brimrose Corp., Baltimore, MD. *AOTF Spectroscopy* (March 1993 catalogue).

Ealing Electro-optics (1992) Product Guide, Holliston, MA.

Haugland, R.P. (1992) *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 5th ed. Molecular Probes, Eugene, OR.

Inoué, S. (1986) *Video Microscopy*. Plenum Press, New York.

Kasten, F. H. (1989) The origins of modern fluorescence microscopy and fluorescent probes. *Cell Structure and Function by Microspectrophotometry* (E. Kohen and J. G. Hirschberg, eds.). Academic Press, San Diego, CA.

Lakowicz, J. (1983) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press, NewYork.

Schott Glasswerke. Mainz, Germany. *Optical Glass Filters* (catalogue).

References for Liquid Crystal Tunable Filters (p.13)

Cambridge Research and Instrumentation, Inc., Cambridge, MA. *Varispec Tunable Imaging Filter* (catalogue).

Morris, Hannah R., Clifford C. Hoyt, Peter Miller, and Patrik J. Treado (1996) Liquid crystal tunable filter Raman chemical imaging. *Applied Spectroscopy* **50**:806-808.

Hoyt, Clifford (1996) Liquid crystal tunable filters clear the way for imaging multiprobe fluorescence. *Biophotonics International* **July/August**.

用語集

(アルファベット・あいうえお順、参照ページ付き)

【アルファベット順】

FWHM

バンド幅 FWHM を参照

ND フィルター (p6)

ある範囲内ですべての波長に対して光を一定量だけ減衰させるフィルター。
金属膜で作られたフィルターは、一般的には色フィルターよりも範囲が広く、耐熱性が高い

OD 値 (p8)

透過率の対数を符号反転させた値：OD = - log10(T)、T は透過率 (0 ≤T≤1)

P 偏光 (p9)

偏光を参照

SN 比 (S / N) (p14)

背景の明るさ（ノイズ）に対する蛍光の明るさ（信号）の比

S 偏光 (p9)

偏光を参照

TE モード

S 偏光の別名。偏光を参照

TM モード

P 偏光の別名。偏光を参照

【あ】

暗視野 (p6)

照明光が直接対物レンズに入らないように角度をつけて標本を照明する透過照明方法、もしくはその照明方法に使われるコンデンサーのタイプを示す

一次蛍光 (p2)

標本中の物質に標識した蛍光色素からの発光ではなく、標本自体が発する蛍光発光。自家蛍光を参照

色ガラスフィルター (p10)

工業や科学用途に製造された色付きガラス。蛍光顕微鏡で使用される一般的なタイプとしては、UV 透過型フィルター（別名、黒フィルター）、赤外線吸収フィルター、黄やオレンジや赤のシャープカットロングパスフィルターなどがある。このフィルターは、吸収することによって光を減衰させるため、スペクトル性能はガラスの厚さに依存する

エッジフィルター (p8)

ショートパスまたはロングパスフィルターの別名。このように呼ぶ場合、通常は非常に鋭い立上りまたは立下りを持つフィルターを示す

おもて面 (p19)

入射光に面するように設計されたビームスプリッターの面。フィルターキューブに取りつける際、この面は光源と標本の両方に面する。ビームスプリッターは正しい方向に取り付けることで、性能が向上する

音響光学式可変フィルター (AOTF) (p12)

ある結晶に高周波で音響振動を与えることで透過回折格子を形成する結晶素子。周波数をすばやく変えて目的の波長の光を回折出射させ、その波長の光をデバイスに入射する

【か】

開口絞り (p21)

照明光学系に配置された明るさ調整用絞り。照明ビームの開口数を変える。照明輝度を変える際に使用

開口数 (NA) (p6)

顕微鏡で、試料に照射する光（コンデンサーの NA）または対物レンズに集光する光（対物レンズの NA）の円錐角。NA が高いと、画像の明るさと解像度の両方が向上する。 $(NA = n \times \sin(\theta))$ 。n は試料周辺媒体の屈折率、 θ は光の円錐角

重ね合わせずれ (p22)

光学素子を出し入れしたり、別の素子と交換した際に発生する画像の位置ずれ

傾き (p9)

透過領域から遮光領域へ遷移するスペクトルの立上りまたは立下りの鋭さ

干渉フィルター

薄膜干渉コーティングを参照

間接蛍光 (p2)

二次蛍光とも称す。蛍光顕微法では、染色またはプローブとして標本に導入された蛍光色素が蛍光を発する。**一次蛍光**を参照

基板 (p5)

ビームスプリッターのベースとして使用される研磨された光学ガラス板

吸収フィルター (p5、図 4)

バリアフィルターまたはエミッションフィルターとも称す。励起フィルターが透過した光を減衰させ、標本から出る蛍光を効率良く透過するフィルター

近赤外線 (NIR) (p3)

波長が約 750 から 2500 ナノメートルの電磁線

くさび (p20)

平行度。光学素子における外面の完全平行からの偏差。分や秒という単位の角度で示される

クリティカル照明 (p26)

ケーラー照明とは対照的に、光源像を試料面にフォーカスさせるタイプの照明光学方法。**ケーラー照明**参照

クロストーク (p9、図 7)

励起フィルターと吸収フィルターの透過スペクトルを重ねた際にクロスする波長における OD 値。ビームスプリッターの OD 値も含める場合もある

ケーラー照明 (p21)

通常は広視野落射蛍光顕微鏡で使われ、光源像が試料面で完全に焦点が合わないよう設計されている照明光学系

蛍光 (p2)

光を吸収し、吸収したエネルギーの一部をエネルギーが低い長波長の光として放射する分子現象で、励起と発光としてよく知られる。蛍光では、励起と発光のプロセスがほぼ瞬時（ナノ秒オーダー）に発生し、他の発光現象とは区別される

蛍光プローブ (p2)

標本中の標的物質を選択的に染色するため、タンパク質や抗体や核酸などの活性物質に結合した蛍光色素

蛍光色素 (p2)

標本を直接染めるか、もしくは活性物質に結合して蛍光プローブを作成か、いずれかの蛍光色素

減光 (p4)

蛍光色素の量子効率を低下させる化学プロセス

減光レベル (p8、図 6)

ブロッキングレベルとも称す。透過帯域以外の帯域における減光の割合。減光レベルは、OD 値で表す（OD を参照）

広視野 (p21)

共焦点落射蛍光顕微鏡とは対照的に、全視野が照らされる落射蛍光顕微鏡。明視野という用語を使う場合もあるが、これは透過明視野照明と混同される可能性がある

【さ】

サブピクセルシフト SPR (p24)

フィルターを切り替える際に生じる画像の重ね合わせズレが起きないように高精度に作られたフィルターセットであることを説明するために使用される用語

紫外線 (UV) (p3、図 2)

波長が約 100 ～ 400 ナノメートルの領域の電磁波。3 つの異なるバンドは次の通り。1) 近紫外、320 ～ 400 nm。2) 中紫外、190 ～ 320 nm ; 3) 真空紫外、190 nm 未満。UV-A および UV-B という用語は、明確な生理学的効果を持つバンドを示す：特に 320 ～ 380 nm と 280 ～ 320 nm に相当

自家蛍光 (p2)

蛍光色素以外の物質から発する蛍光。標本からの一次蛍光、液浸油や他の媒体からの蛍光、顕微鏡内のガラス光学部品からの蛍光など

視野絞り (p21)

照明装置内に配置され、標本の照明領域を調整する絞り

ショートパス (SP) (p8)

決められたスペクトル範囲で、長い波長を減衰させ、短い波長を透過する光学フィルター。名称は、ピーク透過率の 50% の立下り波長で表す

スクラッチ / ディグ (p21)

光学面のキズやブツの大きさや数の最大許容値を定義する仕様。S/D 値（たとえば、80/50）は、キズの幅をミクロンで、ディグ直径を数十ミクロン単位でそれぞれ指定します。厳密に基準を設ける必要がある場合は、様々な評価手順があります（たとえば、軍用規格 MIL-F-48616）が、通常はキズやブツは視覚によって定性的に評価するのが一般的

吸光係数 (p3)

蛍光色素の波長ごとの吸収特性

ストークスシフト (p3)

蛍光色素の吸収スペクトル（励起スペクトル）のピーク波長と蛍光スペクトルのピーク波長の差

【た】

ダイクロイックビームスプリッター (p5、図 4)

ダイクロイックミラーとも称す。フィルターキューブに収納された特殊なミラーで、励起光を反射し蛍光を透過する特性を持つ。顕微鏡の他の部分で、光を分離したり合成したりする場合にも使われる

退色 (p3)

蛍光強度が時間とともに減少する光化学反応

中心波長 (CWL) (p8、図 6A)

バンドパスフィルターにおける、立ち上がり波長と立下り波長の平均（中央）の波長

透過照明 (p6)

試料を透過する光を使う照明方法。コンデンサーを使用して光を集束させる

透過波面歪み (TWD) (p20)

平面波が光学素子を透過するときに受ける歪みの尺度であり、可視光の波長（通常は 550 または 630 nm）の分数または倍数で示す

【な】

ナノメートル (nm) (p2)

光の波長を示す単位：1 nm = 10 オングストローム、1/1000 ミクロン

二次蛍光 (p2)

間接蛍光を参照

入射角 (AOI) (p9、図 9)

フィルタに入射する光の表面に垂直な軸からの角度。例えば表面に垂直に入射する時の AOI は 0 度

熱フィルター (p6)

赤外線を減衰させ、可視光線を透過するフィルター。減衰は、吸収（色ガラス）や反射（干渉膜、ホットミラーと呼ぶ）や、その 2 つの組み合わせによって実現される

【は】

ハーフコーンアングル (p9)

収束または発散するビームの最も広がった光線と光軸の間の角度。開口数も参照

薄膜干渉コーティング (p11)

極薄層を多層に形成した光学コーティングのひとつ。各材料は無色だが、層の各境界面で反射した光が干渉によって結合し、ある波長は反射し他の波長は透過するようになる。薄膜干渉コーティングは干渉フィルターの主成分であるが、ガラス基板や 1 層以上の色ガラスで分かれた 1 つ以上のコーティングから成る

バックグラウンド (p4)

意図しない一次または間接的な検出光。原因としては、励起フィルターと吸収フィルター間のクロストーク、フィルターのピンホールからの光漏れ、カメラの電子ノイズ、および自家蛍光が挙げられる

バリアフィルター

吸収フィルターを参照

バンドパス (p8、図 6)

立ち上がり波長と立下り波長で透過する領域を定めた光学フィルター。中心波長とバンド幅で表す

バンド幅 FWHM (p8、図 6A)

FWHM (Full width at half of maximum) とも呼ぶ。ピーク透過率の 50% の波長間（立上り波長から立下り波長まで）の幅。ピーク透過率の 10% の波長間の幅で示す場合もある

標準入射角 (p9)

入射角 0 度

ピンホール (p21)

干渉フィルターのコーティング上の微小欠陥。コーティングする基板上のほこり粒子が原因の場合が多い

フィルターキューブ (p5、図 4)

蛍光色素にマッチしたフィルターセットを保持する立方体ユニット。セットには、励起フィルターと吸収フィルターとダイクロイックミラーが含まれる

フィルターブロック

フィルターキューブの別名

ブロッカー (p11、図 15)

ブロッキング範囲を拡大するために追加するコーティングで、バンドパスフィルターに用いられる。ブロッカーはフィルターのバンドパス領域をカバーし、高透過率で広いバンド幅を有する特性を持つ

ブロッキング範囲（p8、図 6B）

指定された減衰率となる波長範囲

分光蛍光光度計（p2）

蛍光物質の励起および発光スペクトルを測定するために使用される機器

平均透過率（p8、図 6A）

透過する領域内での平均透過率。バンドパスフィルターの場合、FWHM の領域での平均透過率

平行度

くさびを参照

平面度（p20）

可視光の波長（通常は 550 または 630 nm）の分数または倍数で表される完全な平面からの平坦性偏差の値

偏角（p20）

フィルターを通る光はガラスの屈折やくさびによって進む方向が変わるが、変わった角度のこと。角度は、分（1/60 度）や秒（1/60 分）などの単位で表示

偏光（p9）

光の伝搬によって起きる電磁界振動の方向と位相の制限。振動は光の進む方向に垂直で、進行方向を示す軸の周りの角度で示すことができる。振動方向と位相が時間とともに急速かつランダムに変化する光を、無偏光と呼ぶ。振動が特定の角度に制限される光を、直線偏光と呼ぶ。光は完全に直線偏光でなく、部分的に直線偏光であることもある。振動方向が一定周期で変化する光を、楕円偏光と呼ぶ。円偏光は、振動の振幅がすべての角度で等しい楕円偏光である。光が楕円偏光の場合、振動の方向は光の周波数で伝搬軸を中心に回転する。

光が角度をもって鏡面に入射すると、表面の入射面（P 面）に平行な電界振動の成分は、入射面に垂直な成分（S 面）とは異なる特性を示す。これにより、面の向きに直交する偏光効果が生じる

ホットミラー

熱フィルター参照

ポリクロイック（p27）

複数の反射帯域と透過帯域を持つダイクロイックミラーの総称

【ま】

無限遠光学系（p22）

無限遠位置に画像を形成する対物レンズを用い、二次対物レンズで結像面上に画像を形成するタイプの顕微鏡で採用されている光学系。（像は、接眼レンズによって形成される）この構成では、顕微鏡の画像形成に影響を与えることなく、対物レンズと第二対物レンズの間の距離を変えることができるため、対物レンズと鏡筒の間の距離を柔軟に変えられる。無限遠補正光学系用に設計された対物レンズは、従来の鏡筒長が決まっている（有限系）対物レンズと互換性がないので、注意のこと

明視野（p6）

視野を直接照らす透過照明方法、もしくは透過照明で使われるコンデンサーのタイプを示す

【や】

有限遠光学系（p22）

対物レンズによって中間像を形成する顕微鏡で採用されている光学系。（画像は、接眼レンズによって結像する）対物レンズから接眼レンズまでの距離は、異なる顕微鏡間で対物レンズを交換できるように、長さ 160 mm に決められている。無限遠補正を参照

有効径（p21）

欠陥や障害物のない範囲。フィルターの有効径は、概ね金属製リングや開口部材の開口部分の大きさで決まる

【ら】

落射蛍光顕微鏡（p4）

対物レンズを通して標本を励起し、同時に蛍光取得する蛍光顕微鏡

落射照明（p7）

透過照明に対比して行われる照明方法で、観察側から試料を照明する。ダイクロイックミラーなどのビームスプリッターによって対物レンズを通る光によって照明される

ラディアンズ（p15）

光源の放射輝度を表す単位。1 ラディアンズとは、光源の単位面積あたり放射される単位立体角あたりの放射光束のこと。1 平方センチメートルあたりの 1 ステラジアンワットの数。輝度は、人間の目で認識される光源の明るさの尺度（測光尺度）であり、1 平方センチメートルあたりのカンデラで表す

量子効率（p3）

蛍光色素が吸収した光に対してどれだけ蛍光を発光したかを表す尺度

ルミナンス（p15）

ラディアンズを参照

励起および発光（p2）

蛍光を参照

励起フィルター（p5、図 4）

特定の色素を効率的に励起する照明光のみを透過するフィルター。吸収フィルターを参照

ロングパス（LP）（p8）

決められたスペクトル範囲で、短い波長を減衰させ、長い波長を透過する光学フィルター。ロングパスフィルターの名称は、立ち上がり波長（透過率 50%の波長）で表される



Chroma Technology Japan 合同会社

〒231-0015 横浜市中区尾上町 4-57
横浜尾上町ビルディング 8 階
Phone : 045 285 1583
e-mail : japan@chroma.com

Chroma Technology Corp

10 Imtec Lane
Bellows Falls, VT 05101 USA
Toll Free: 800-824-7662
Phone: 802-428-2500
Fax: 802-428-2525