

# 顕微鏡用レーザを選択する方法

ダニエル・カレン、マティアス・シュルツェ

光学顕微鏡の仕様を定める際、レーザ波長と出力が重要なパラメータであることは明らかだが、それ以外にも多数の項目を検討する必要がある。

蛍光顕微鏡は、さまざまな種類の生化学物質と物理的構造(形態)を観察するための独自の機能を備え、ライフサイエンス全般で広く使用されている。レーザは、優れた空間輝度と単色性(スペクトル輝度)の特長を併せ持つことから、蛍光顕微鏡、特に共焦点レーザ走査型顕微鏡(CLSM: Confocal Laser Scanning Microscopy)を使用する多くの用途において、光源として用いられている。

複数の技術的性能パラメータによって定義される、幅広い種類のレーザが提供されており、レーザの専門知識を持たないユーザーにとっては、その選択は難しい作業かもしれない。しかしその選択が、実験の成否を分ける可能性は高い。本稿では、最も重要なパラメータを取り上げ、それらが顕微鏡の性能に与える

影響について解説する。

## 波長

波長は、レーザの代表的なパラメータだが、最適な波長の選択は必ずしも容易ではない。最も単純な方法は、レーザ波長を蛍光体励起スペクトルのピークに合わせ、カットオフフィルタまたはバンドパスフィルタを使って、散乱したレーザ光がカメラや光検出器に到達しないように遮断することである。これにより、ストークスシフトされた蛍光発光だけが検出される。

レーザはフィルタよりも、スペクトルがはるかにシャープ(幅が狭く傾斜が険しい)であるため、フィルタから逆算して選択するのがよい場合が多い。例えば、励起ピークの短波長側の傾斜で、蛍光色素をレーザ励起する場合が多い。

それは、波長を短くすることによって、散乱レーザ光と、長波長の蛍光の間の分離が大きくなり、フィルタの要件が緩和されて、S/N比(画像のコントラスト)が増加するためである。

1つの顕微鏡システムで、複数の蛍光体を観察できるように、ますます広範囲にわたる励起波長が顕微鏡メーカーやユーザーによって求められるようになっており、フィルタに対する要件は、かつてないほど厳しくなっている。顕微鏡は現在、最大7種類の異なる波長に対応するのが一般的である。

複数のレーザや検出チャンネル間のクロストークを回避することも、顕微鏡の動作波長帯域幅を、近赤外(near IR)スペクトル領域まで拡大することがますます求められている理由の1つである。反ストークス放射に基づく賢

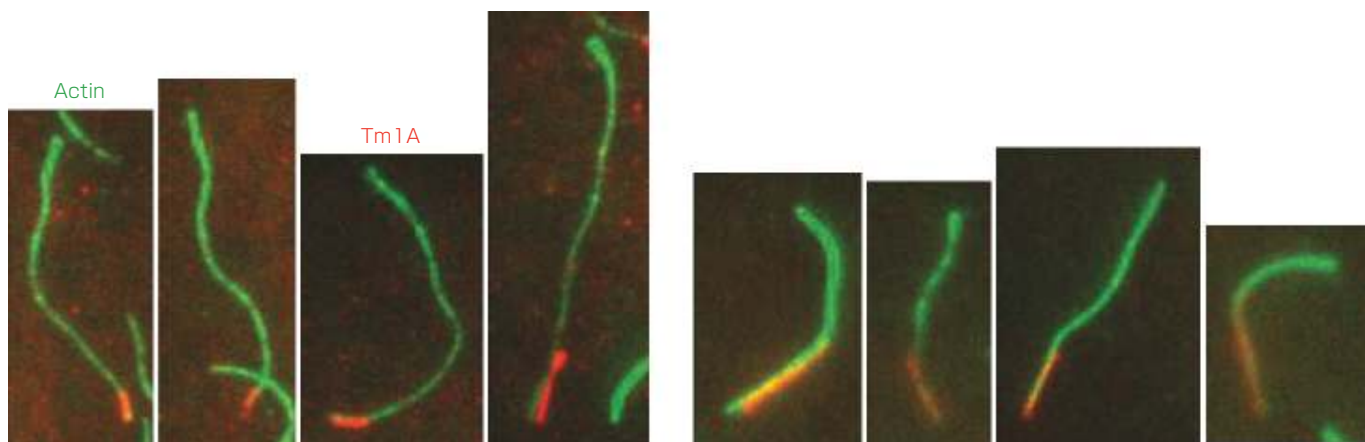


図1 コヒーレント社のレーザコンバイナ「Galaxy」で結合された2つの励起レーザを使用して取得した、全反射照明蛍光顕微鏡(TIRF: Total Internal Reflection Fluorescence)画像。アクチンフィラメントの結合に関する研究の一環として撮影されたもので、赤色シグナルは、640nmで励起されたCy5標識のTm1A(タンパク質)蛍光で、緑色シグナルは、488nmで励起されたAlexa488標識アクチン<sup>(1)</sup>。

明な手法により、1台のシリコンベースのカメラを使用して画像を検出することができる。シリコン製CCD/CMOSの量子効率、800nmを超えると急激に低下する。レーザーメーカーはこのニーズに応えるために、808nmやさらには980nmの波長を持つレーザーを提供している。

## 出力

出力もレーザーの代表的なパラメータで、画像強度はレーザー出力にほぼ比例する。レーザー励起蛍光は、ほとんどの蛍光体に対して効率的なプロセスで、1に近い量子効率を得られる場合が多い。一方、共焦点顕微鏡は光学的に非効率なシステムで、対物レンズによって収集された蛍光の最大99%が共焦点ピンホールによってブロックされ、3次元解像度の画像強度が低下する。

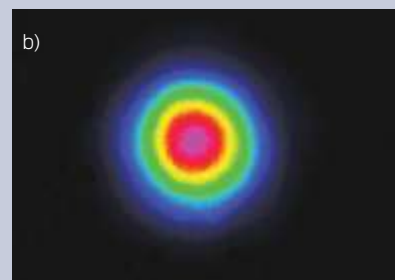
しかし、出力が最大のレーザーが、必ずしも最良の選択肢ではない。レーザー出力とともに、光損傷と散乱光の両方が増加し、レーザーコストも増加するためである。原則として、試料表面で1~10mW程度というのが、一般的に多くの共焦点顕微鏡において適切な出力レベルである。つまり、標準的な顕微鏡光源および走査光学部品の効率から考えて、レーザー出力は数十mWということになる。

それ以上の出力が必要となる用途も存在する。例えば、新しいディスク走査型顕微鏡は、試料上の複数の焦点を同時に撮像することによって、さらに高速なフレームレートに対応する。ここでは通常、各焦点において必要な強度(と速度)を達成するために、より高い出力が必要となる。

光活性化局在性顕微鏡法(PALM: photoactivated localization microscopy)や誘導放出抑制顕微鏡法(STED: stimulated emission dep-

## レーザー技術に関する注記

レーザーは従来、技術、波長、定格出力によって規定されていた。しかし今日では、顕微鏡の構築者もユーザーも、出力ビーム特性は気にするが、それを製造するための基盤のレーザー技術はあまり気にかけない。このようなパラダイムシフトは、レーザーメーカーが技術に関係なく共通のプラットフォームを開発したことに端を発している。たとえば、コヒレント社は、半導体レーザーと光励起半導体レーザー(OPSL)という2つの相補的な半導体技術を、同じプラグアンドプレイ形式でパッケージ化している。半導体レーザーは、短波長(488nm以下)と赤色/近赤外波長(640nm以上)において、効率と変調速度に優れているためである。一方のOPSL技術は、半導体レーザーがまだ実用的ではない可視域の中央から紫外域にかけての波長を提供する。また、OPSLは出力がスケラブルであるため、数百mWの出力による超解像アプリケーションに対応する。



異なるレーザー技術を同一の形態、寸法、機能でスマートにパッケージ化したことは、主要な進歩である。これにより、顕微鏡に必要なビーム品質で、広い波長範囲をカバーすることができる。パッケージに集積された高精度光学部品により、半導体レーザーは、低非点収差の円形ビームを出力でき(a)、OPSL技術は、さらに高いビーム品質と円形性を実現する(b)。

letion)などの超解像手法にも、高い出力が必要である。こうした超解像手法は、漂白や飽和による蛍光体のオン/オフの切り替えに依存するためである(図1)。最近まで、これにはワットレベルの出力が必要だったが、それでは出力とコストが高すぎるようになった。実際に最適な出力は数百mWで、レーザーメーカーは現在、250~500mWの出力範囲でますます多くのレーザー波長を提供することにより、こうした用途に対応している。

## ビーム品質

ビームモード品質は、焦点サイズに直接影響を与え、焦点サイズによって

光効率が決まる。それは共焦点顕微鏡が、試料面上の1つ以上の小さなスポットにレーザーを集光し、共焦点開口部を通してそのスポットからの蛍光を撮像することによって動作するからである。焦点以外に照射された光は、出力の無駄になるだけでなく、バックグラウンドノイズを増加させ、それに伴い全体的な画像コントラストを低下させる恐れもある。

共焦点顕微鏡にはマルチモードレーザーが使用できるが、光を均質化して空間的にフィルタリングするための光学部品の併用が一般的に必要で、それによって複雑さが増し、効率が低下する。したがって、ビーム品質が低いマルチ



図2 複数のレーザを単一の「Laserbox」シャーシに統合することにより、電源とユーザーインターフェースの冗長性をなくすることができる。ファイバ結合出力は、コヒレント社の「Galaxy」などのプラグアンドプレイ式のビーム結合モジュールによって、1本のシングルモードファイバに結合することができる。

モードレーザは、製造が容易でコストも低い場合が多いが、結局は不経済になってしまう可能性が高い。

端的に言って、CLSMにはTEM<sub>00</sub>レーザが最適である。出力仕様は、TEM<sub>00</sub>コンテンツで80%以上、またはM<sup>2</sup><1.2である。

レーザノイズも、共焦点画質に影響を与える重要な項目である。画像ノイズを最小限に抑えるには、強度ノイズは広い帯域幅(例えば、20Hz～20kHz)にわたって低くしなければならない。これには、平均ノイズ(二乗平均平方根[RMS]ノイズ)とピーク・ツー・ピークノイズの両方が含まれる。ビーム指向性の温度に伴うシフトも、強度ノイズと解像度の低下につながるので、5μrad/℃未満とすることを推奨している。

## 変調

走査画像には、何らかの変調機能が必要である。少なくとも、フライバツ

ク中にレーザを停止できなければならない。変調には、デジタルとアナログの両方の方式がある。デジタル変調は、単純なオン/オフの切り替えで、アナログ変調は、アナログ入力信号に応じて出力を変化させる。

速度の点では、半導体レーザによる変調が最も高速で、メガヘルツレベルのスウィッチングレートでのデジタルおよびアナログ変調が可能だが、アナログダイナミックレンジは、100:1強程度に限定される。光励起半導体レーザ(OPSL: Optically Pumped Semiconductor Laser)はもう少し変調が遅く(最大値はデジタルで50kHz、アナログで100kHz)、ダイナミックレンジは同程度(50:1)で、半導体励起固体(DPSS: Diode Pumped Solid State)レーザは変調をまったくサポートしない。したがって、レーザの種類にもよるが、一般的には直接変調が可能である。しかし直接変調は、重要な項目で

ない場合が多い。ほとんどの顕微鏡に、変調を可能にするために、音響光学変調器(AOM: Acousto-Optic Modulator)か、音響光学チューナブルフィルタ(AOTF: Acousto-Optic Tunable Filter)が搭載されているためである。

## ファイバデリバリ

共焦点顕微鏡は、シングルモードのファイバコネクタを介してレーザ光を受信するように設定される。FC/APC(フェルールコネクタ/アングルドフィジカルコンタクト)規格が最も一般的に使用されており、市場の約80%を占めている。ディスク走査型など、一部の新しい形態の顕微鏡では、FC/PC8コネクタが使用されている。レーザは、自由空間ビームで出力され、ベアファイバか、コネクタで終端されたファイバにピグテール接続される。

レーザをシングルモードファイバに結合するのは非常に難しく、開口数

(NA: Numerical Aperture)の大きな光学部品の微妙なアライメントを制御する必要がある。このアライメントの最適化には何時間もの時間がかかり、顕微鏡ユーザーにとって、非常に手間となるため、顕微鏡あるいはビームコンバイナに対する適切なファイバコネクタ終端をすでに装備するレーザが求められる。

ここで1つ、ファイバ結合レーザに関する注意点がある。第1世代製品、特に波長が短く出力が高いものは、わずか数百時間で送信出力が最大で数パーセント低下し、耐用期間がわずかに1000時間になってしまう場合があった。主な要因は、シングルモードファイバ結合に必要な高強度の集光による、ファイバ端面の損傷(光析出)である(それよりもまれな要因として、ファイバ自体の光損傷がある)。このことからレーザメーカーは、米コヒレント社(Coherent)の「Extended Life Interface」のような、独自の仕組みを実装して、ファイバのシングルモード特性を損なうことなく、ファイバ端面の出力密度を低下させている。こうした仕組みによって、レーザ/ファイバユニットの標準的な耐用期間は1万時間以上に延長される。

## 複数レーザにわたる互換性

最大7本のレーザを単一の顕微鏡入力に接続することに伴うもう1つの問題が、レーザの共通性である。すべてのレーザの形態、寸法、機能が同じであれば、顕微鏡のメーカーとエンドユーザーの両方にとって、複数レーザの統合も新規レーザへのアップグレードも、はるかに容易になる。これは、電源、熱管理要件、電子的インタフェース、ビーム位置、ビーム径、拡がり角、方位角などが同一であることを意味する。

レーザメーカーは、ライフサイエンス

向けのすべてのレーザを、内部的な技術に関係なく、同じ出力区分形式でパッケージ化することにより、この複数レーザの共通性に関するニーズに対応している(「レーザ技術に関する注記」参照)。また、これらのレーザには現在、スマートなプラグアンドプレイ技術が一般的に搭載されており、レーザを交換するだけで出力を上げたり、新しい波長を追加したり、耐用期間が終了したレーザを交換したりできるようになっている。コヒレント社の「OBIS」レーザファミリは、この共通スマートプラットフォームの概念を採用する1つの例である。

この共通プラットフォームの概念は最近、物理的な統合にも拡張されている。複数のレーザを単一のパッケージに搭載することにより、同じ電源を複数装備する必要がなくなり、全体的なシステムフットプリントが簡素化される。コヒレント社では「Laserbox」によってこれが実現されており、単一のタッチスクリーンコントローラによって、すべてのレーザを操作するオプションが提供されている。

## ビーム結合

最後のステップは、すべてのレーザを、顕微鏡の単一入力のファイバコネクタ(FC/APCまたはFC/PC8)に接続することである。従来は、各レーザのビームをコリメートして、複数の二色性ビームスプリッタによってそれらを連続的に結合しなければならなかった。続いて結合したビームを、レンズ

を使用してシングルモードファイバに効率的に結合する必要があるが、レンズの光学特性は波長によって本質的に異なる。ありがたいことに、ユーザーによるアライメントや調整の必要なく、レーザをシームレスに結合する、既製の集積モジュールが提供されている。これは、スマートモジュールのプラグアンドプレイ機能を、自然な形で発展させたもので、ファイバ接続レーザの追加または交換を、数時間ではなく数秒間で行うことができる。

このようなビーム結合モジュールの最初の製品が、コヒレント社の「Galaxy」である(図2)。特許技術を使用して、ユーザーが選択した最大8つの波長に対するFC入力コネクタを装備する。最小限の内部屈折光学部品で、ビームを1本のアライメント済みの出力ファイバに結合する。このシングルモードの偏波保持ファイバは、ユーザー指定のFC/APCまたはFC/PC8で終端され、すべての一般的な共焦点顕微鏡に直接接続される。

レーザの進歩により、さらなる機能を備え、操作が簡素化され、コストが抑えられた、新世代の蛍光顕微鏡ツールが実現できるようになった。しかし、まさにこの成功が原因で、市場に製品があふれ、特定の用途に対する最適なソリューションの選択を難しくしているともいえる。いくつかの主要なレーザパラメータが顕微鏡性能に与える影響を理解することにより、この選択が簡素化され、より良い結果につながる可能性がある。

### 参考文献

(1) J. Y. Hsiao, L. M. Goins, N. A. Petek, and R. D. Mullins, *Curr. Biol.*, 1-10 (2015).

### 著者紹介

ダニエル・カレン(Daniel Callen)は米コヒレント社(Coherent)の製品マネージャー、マティアス・シュルツェ(Matthias Schulze)は同マーケティング・ディレクター。

e-mail: daniel.callen@coherent.com URL: www.coherent.com

LFWJ