

固体照明の最適化、光源から試料面へ

ジャスミン・シェーファー、イアン・ジョンソン、クラウディア・ジャフィ

ライトエンジンからの光子が顕微鏡の試料面に向かう途中で失われる場合、光路を追跡して障害点を探索しよう。

蛍光顕微鏡では、さまざまな固体技術を用いた高度なライトエンジンがますます使用されるようになってきている。これらの光源の設計は、水銀や金属ハライドアークランプの大きな制限を克服し、これら初期の照明オプションをはるかに超える優れた性能を実現している。固体ライトエンジンは高いシグナルノイズ比(SNR)と分解能をもたらし、検出限界も低く、蛍光顕微鏡アプリケーションにおける感度と安定性、さらにはデータ品質、寿命、コスト削減も高まった。

しかしながら、その性能の真価を実現するためには、照明器の出力が顕微鏡の試料面に伝搬される必要がある⁽¹⁾、⁽²⁾。光源と顕微鏡の試料面を接続する光路を解析することで、装置の性能を最適化するだけでなく、照明に関するトラブルシューティングを行うためのフレームワークを得ることができる。

真実への光路

試料面において蛍光励起の欠損が発見された場合、その問題は光源に原因があると考えるのは適切であるように思える(そしてよくあることだ)。しかし、そのような帰属は一般的には不適切である。なぜなら、光路に沿って介在するすべてのコンポーネントが関与する可能性があるという事実があるためだ。すべての光学コンポーネントは、照明器の出力を顕微鏡に伝搬させ(図1)、システム全体のスループットに影響をもたらす。そのため、すべての光学コンポ

ネントによる寄与を用心深く検討しなければ、真に問題を解決することはできない。

固体ライトエンジンから顕微鏡の試料面への光スループットの段階的な分析を表に示す。10倍対物レンズ(位置5A)を用いた試料面で測定された放射束は15~50mW/mm²の照射量に対応しており、これは広視野蛍光顕微鏡に必要な範囲内(1~100mW/mm²)である。

蛍光顕微鏡アプリケーションでは、一定量の蛍光放射が発生するのに必要な放射束密度は、すべての波長において同じとは限らない。蛍光放射密度が、蛍光体による吸光に利用できる光子の数に依存するためであり、一定レベルの放射束密度に対して波長とともに増加する。他の要因が一定である限り、375nm 励起光で特定の蛍光強度レベ

ルを生成するために必要な放射束密度は2倍、すなわち750nm(2×375nm)となる。その結果、赤色スペクトル領域(635/22nm、表の右端の列を参照)では、より低い放射束レベルとなり、蛍光顕微鏡という状況下では想像よりも影響は少ない。

表1に示される放射束レベルは、従来の広視野蛍光顕微鏡では十分すぎるほどではあるが、改善する機会は存在する。そうした改善は、2つの主要なアプリケーション要件に向けられている。第一に、SNRを損なうことなく、より短い時間でより多くの画像を取得するため、カメラの露出時間を短くすることと関連づけて光源からの放射束を上げることが求められている。第二に、広視野蛍光顕微鏡の空間分解能を上げるための多くの技術には、照明を空間的にフィルタリングすることが含まれる。空間的フィルタリングによる損失を補償するには、光源の出力を増加

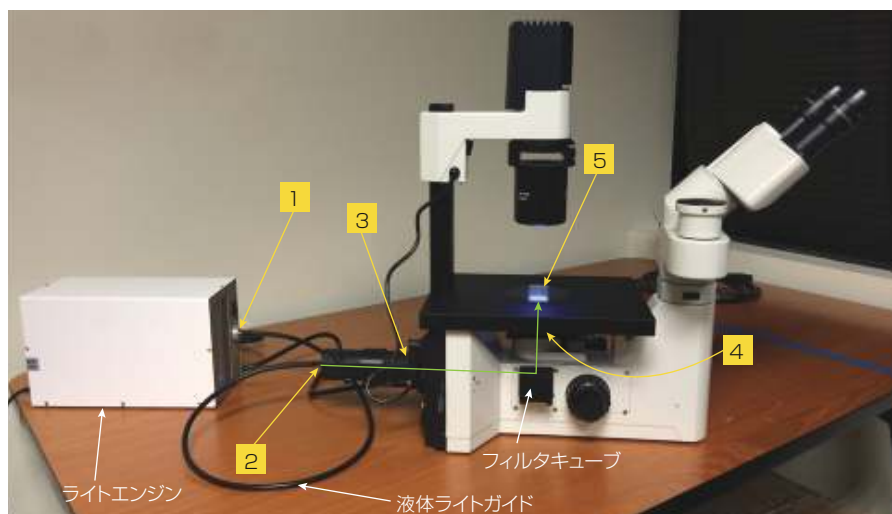


図1 倒立蛍光顕微鏡への固体ライトエンジンの組み合わせ。黄色で示された1~5の位置は、表に記載されているスループット測定に使用される光路の場所と対応する。緑の線は、コリメータアダプタの入力から試料面への光路の方向を示す。

表1 SPECTRA XライトエンジンからニコンTi顕微鏡の試料面への光スループロット

位置 (図を参照)	放射束 (mW)			
	紫 (390/22nm)	シアン (475/28nm)	緑 (555/28nm)	赤 (635/22nm)
1. ライトエンジン出力	470	445	1110	345
2. 液体ライトガイド出力終端 (コリメータアダプタ入力)	250	230	520	195
3. 顕微鏡入力 (コリメータアダ プタ入力)	145	170	395	150
4. 対物レンズバックプレーン (フィルタ後、対物レンズ前)	130	120	220	65
5A. 試料面 (10倍対物レンズ、 開口数0.5)	110	105	195	55
5B. 試料面 (40倍対物レンズ、 開口数0.75)	25	25	45	15

米コヒレント社 (Coherent) のFieldMaxII-TOパワーメーターをPM3サーモパイル検出器に接続し、パワーを計測した結果を上に表示 (精度は±5mW)。光源はルメンコ社 (Lumencor) のSPECTRA Xライトエンジンで、内部は390/22nm、475/28nm、555/28nm、635/22nm (中心波長/半値全幅帯域幅) 励起フィルタを使用した。ライトエンジンからの出力は、直径3mmの液体ライトガイドとルメンコ社のコリメータアダプタを通過して顕微鏡 (ニコンTi) に伝搬され、米セムロック社 (Semrock) のFF409/493/573/652-DiO2クアッドダイクロイックによって試料面に届き、開口数0.5の10倍対物レンズまたは開口数0.75の40倍対物レンズを通過する。

させるか、顕微鏡との結合を改善するか、またはその両方を行う必要がある。

よりよいものとなるために

実例として、表に示した光路の段階別に改善する方法を簡単に検討してみよう。

ライトエンジン: 本例で使用されたSPECTRA Xライトエンジンに内蔵されている非コヒーレント光源とは対照的に、固体ダイオードレーザ光源を使用することで出力 (特に放射束密度に関して) の向上を実現できる。

液体ライトガイド: 液体ライトガイドは、ライトエンジンの振動を顕微鏡から分離させるという点でメリットがある。また、顕微鏡の周囲はしばしば雑多となるが、そこから離れた場所に光源を設置することも可能となる。しかし、これらの利点は、ライトエンジンの出力の35~50%を犠牲にすることになる。ただ、十分に高出力なライトエンジンならば、こうしたロスの問題にならないだろう。また、直径がさらに

大きい液体ライトガイド (例えば3mmの代わりに5mm) を使えば放射束がかなり大きくなるが、増加した放射束を試料面に伝搬させるため、通常は顕微鏡の光路を再設計する必要がある。

コリメータアダプタ: フライアイレンズが内蔵されたコリメータは、アクロマートレンズをベースにした従来設計と比較して、光スループロットと空間的な均一性に優れている⁽³⁾。

対物レンズ: 落射蛍光顕微鏡では、検出された蛍光強度は対物レンズの開口数 (NA) の4倍に比例する。そのため、適切な作動距離を有し、最も高い開口数をもつ対物レンズを選択するのが好ましい。

蛍光顕微鏡の照明はパラダイムシフトの真っ只中にある。従来のアークランプには有毒な水銀蒸気が含まれているなど、多くの問題があった。一方、これまでのLEDでは光学的な出力要件を満たしていない。固体ライトエンジンはこれらの課題を解決しており、新たな課題として光が不十分であると

判明したときには、固体ライトエンジンは候補となり得る。しかし、前述した分析のステップを踏むことで、顕微鏡ユーザーは照明と顕微鏡の関係を詳細に理解することができ、このような問題の真の原因を突き止める自信を得られるだろう。こうすることで、最新の固体ライトエンジンによって得られる性能を最大限に発揮する際に、研究者を支援できるだろう。

参考文献

- (1) D. Grünwald, S. M. Shenoy, S. Burke, and R. H. Singer, Nat. Protoc., 3, 1809-1814 (2008).
- (2) D. Dormann, PLoS One, 14, e0214659 (2019).
- (3) B. Van Giel, Y. Meuret, and H. Thienpont, Opt. Eng., 46, 043001 (2007).

著者紹介

ジャスミン・シェーファーはルメンコ社のテクニカルサポートスペシャリスト、イアン・ジョンソンは同社テクニカルサポートディレクター、クラウドディア・ジャフィは同社の共同創業者で営業開発部長。iain.johnson@lumencor.com, claudia.jaffe@lumencor.com
https://lumencor.com

LFWJ