破壊的な蛍光顕微鏡

クリストファー・シュメイト

照明、フィルタ、カメラなどの顕微鏡の構成要素の進歩により、システムの設計にパラダイムシフトが起きており、その影響は広範囲にわたる。

顕微鏡は、世界で最もありふれた研究室の機器である。ある研究室では、他のどの機器よりもまず顕微鏡を所有するようになっている。このように顕微鏡法は、イノベーションが絶え間なく新たな進展を生み出している分野だ。

ここ10年における最も劇的な進歩により、光学顕微鏡法の最もありふれたモードの1つが変化している。倒立顕微鏡、落射顕微鏡、広視野顕微鏡は、その構造のほぼすべての構成要素に関する進歩によって破壊的な影響を受けている。携帯電話のように、現在の倒立顕微鏡の設計や性能は10年前のものをはるかに凌駕している。その結果、新たな形状となり、機能が設計を導くシナリオが描かれている。

最も基本的なこととして、顕微鏡にはイメージセンサ（ヒトの眼またはカメラ）、接眼レンズ、サンプルホルダー、観察対象物がある。初期のデザインでは、これらの構成要素を鏡筒の中に並べていたが、構造が進歩するにつれ、鏡台や試料ステージ、接眼レンズ、調光式照明を収めるための筐体が登場した。初期の試行錯誤では、基本的に構成要素は筐体デザインに合わせられた。そのため、カメラがよりよく機能するために筐体を再設計するのではなく、スタンダードな構造に合わせてカメラが作られた。カメラ設計がより複雑化するにもかかわらず、である。この伝統的な顕微鏡筐体のデザインは顕微鏡のベンダー大手4社やその同類によって守られてきた（**下の写真**）。本記事では、蛍光顕微鏡の主な構成要素と、現在お互いに影響を与えている技術的破壊について述べる。顕微鏡法の設計の未来におけるインパクトも示す。

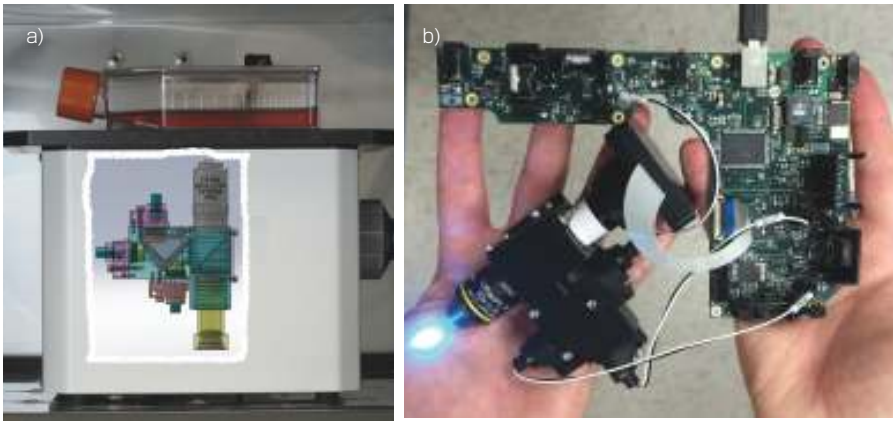
照明

透過光は単純な白熱電球から得られるが、蛍光励起には高い強度を持つ特定の励起波長を必要とする。ほとんどの応用で使われる可視波長で十分な強度をもたらすために、さまざまなアーク灯が開発されてきた[1]。興味深いのは、アーク灯のスペクトルまたはレーザ線として利用できるものの中から最も顕著に励起できるものとして、初期の蛍光色素が設計されたことだ。我々はこれら初期に好まれた波長と共存を続けている。

LEDの出現と、LEDが消費者や通信市場で使われることで、十分な強度かつ適切な波長で利用できるところまで技術が進んだ。アーク灯に対するLEDの利点は多くある。

- **LEDにはウォームアップやクールダウンの時間が必要ない**
- **シャッターなしでオンとオフを瞬時に切り替えることができる**
- **多くのアーク灯の寿命が数百時間であるのに対してLEDの寿命は1万から5万時間である**
- **時間による強度の減衰がない**
- **アーク灯より低コスト**
- **強度をパルス幅変調で連続的に変えることが可能**
- **所要電力がより低い**
- **LEDは狭帯域放射であるため、弱い紫外線（UV）や赤外線（IR）を放射しない**
- **LEDは数センチではなく数ミリメートル範囲で照射する（図1）**
- **使用済みLEDは危険廃棄物と見なされていない**

現在のところ、各波長に対応する別々のLEDを必要とすることは強調



接眼レンズのない顕微鏡の設計は非常にシンプルなものとなる（a）。米エタルマ社（Etaluma）の光学モジュール（b）。

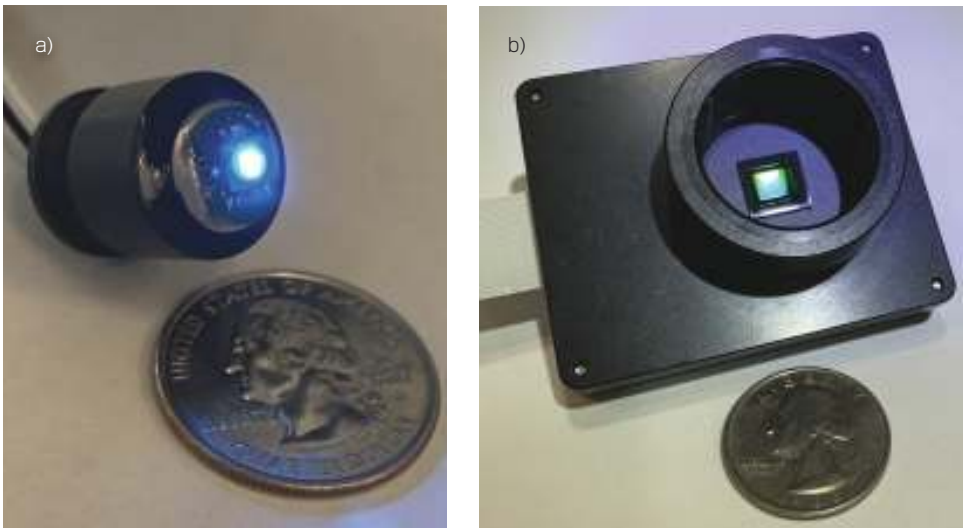


図1　LEDはアーク灯に比べ多くの利点がある（a）。CMOSカメラは、CCDカメラの多くの性能特性を上回る（b）。（提供：エタルマ社提供）

すべきだろう。すでにベンダーは、フィルタを通したアーク灯に代わる、直接マウントできる非常に明るいLEDエンジンを提供している。これらの照射システムは、従来の光路の非効率性を代償するほど十分な明るさでなければならない。

フィルタ

従来より、アーク灯の励起波長を選択したり、不要な幅広い放射を排斥したりして、励起から不要なUVとIR波長を除去するためにフィルタを必要としている。これと比較して単色LEDでは、スペクトルをさらに狭めるためだけに励起フィルタが用いられる。またダイクロイックフィルタは、サンプルに対して励起を反射させるために用いられ、より長い発光波長が眼やイメージングセンサに届くようになる。これらのフィルタは発光を描写するために、数ケタ大きい非励起散乱波長を排斥するために必要だ。散乱光は、蛍光放射強度のほぼ1000倍である。

近年の無限遠補正光学系は、有限共役光学系よりも複雑化するものの、フィルタなどの光学構成要素を光路に誘導できる。フィルタはほとんどの場合、物理的に光路の内部と外側に移動される。しばしば、励起、ダイクロイック、放射範囲を選択するために3つのフィルタホイールが一斉に機能する、光路を変更することで必然的に画像レジス

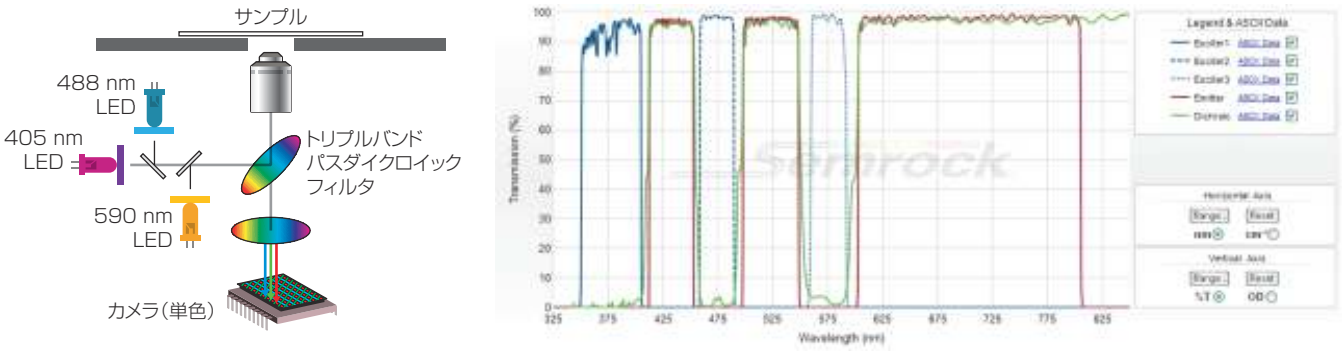


図2　SearchLightツール（右）が示すように、マルチバンドパスフィルタにより半導体のロバスト性とゼロピクセルシフトが可能になる。（提供：米セムロック社（Semrock））

図3 コンパクトで高解像な3色蛍光顕　鏡のモジュールは、ピクセルシフト合成をとして高感　とするためにLED励起、マルチバンドフィルタ、CMOSカメラを用いる。

トレーションが変わり、各蛍光チャネルに対してピクセルシフトとして知られている、異なるイメージシフトが生成される。

最初にマルチバンドパスフィルタを用いたのはダン・ピンケル氏（Dan Pinkel）だ（**図2**）[2]。マルチバンドダイクロイックフィルタは、複数の異なる励起をサンプルに反射させ、さらに各チャネルのそれぞれの励起を透過させることができる。一致したマルチバンドパスの放射フィルタはさらに、センサにとって不要な光を排斥する。この構造により、フィルタホイールがなくなり、ピクセルシフトが不要な、コンパクトな半導体のフィルタソリューションが存在するようになる。多位置ホイールにあるカスタムフィルタを代替できない欠点はあるものの、普及している色素に対するマルチバンドフィルタのセットは商業的に入手可能だ。

カメラ

最初の蛍光イメージは、ミラーとレンズのあるポートを通じて筐体にマウントされた一眼レフのフィルムカメラを使い、接眼レンズからカメラに画像を送り、長時間露光でキャプチャされた。長時間露光するときには、露出中の動きと振動を最低限に抑える必要がある。この理由により、従来の顕微鏡のほとんどは巨大で重い空気振動テーブルの上に置かれている。

天文学が遠い星のかすかな光を捉えるためにCCDカメラを開発したため、CCDカメラは蛍光顕微鏡法のわずかな蛍光のための自然なツールとなった。CCDカメラは一般的に高価で、高度なペルシェ冷却と電子増倍エレクトロニクスを必要とする[3]。

もともとCMOSセンサの性能はかなり低かったが、消費者向けのデジタルカメラやスマートフォンの出現により、CCDとCMOSのギャップは埋まりつつある。過去30年間CCDのリーダーであったソニーが2017年に製造を中止し、2020年に出荷終了予定であるほどだ。現在、CMOSセンサは低コスト、高速な読み出し速度のためにビデオ、スマートフォン、デジタル一眼レフに応用され、それらの主要なセンサとなっている。

科学研究用CMOS（sCMOS）は、現在の顕微鏡法で用いられる、より高性能なバージョンを意味する。sCMOSは、優れた量子効率とダイナミックレンジ、暗ノイズ仕様をもち、CCDセンサと同等のパフォーマンスを有するグローバルシャッター方式である。CMOSは、より高性能の応用においてもCCDに置き換わるだろうと推定されている。電子増倍型デバイス（emCCD）やペルシェ冷却なしに、CMOSカメラはCCDカメラより2～10倍小さい。重量、サイズ、環境抵抗性が、新たな顕微鏡法の構造において位置づけられる。

筐体

顕微鏡法の歴史のほとんどにおいて、ヒトの眼は画像の感度に適していない。そのため、顕微鏡のデザインはこれまで接眼レンズを重視している。デジタルイメージングの時代においても、この特徴は、システムにデジタルカメラが搭載されていない場合に続いている。この設計では観察するために、画像をステージから相対的に人間工学的な位置に向け直すことが必要となる。問題は、光路でレンズやミラーが多くなればなるほど信号が弱くなることだ。概算では、ある屈折率を持つ素

材から別の素材に光が移動するとき、4%もの光が喪失する。そのため、光がレンズを通過するとき、強度の最大8%が失われる。従来の設計では、イメージセンサに届く前に60%以上の光子が失われるとされる。対象物から届く画像を維持するために、レンズが多くなるほど多くの調節が必要になることは強調すべきだろう。

光子効率が低くなると、バックグラウンドも高くなる。シグナルノイズ比は最重要であり、バックグラウンドが高ければ素晴らしいシグナルも無意味だ。解決のため、回転式の遮光ドアのある暗室が作られた。

接眼レンズへの固執は、使いやすいという事実で説明できる。それゆえ、ユーザーは画像を評価するとき、接眼レンズの使用を心地よいと感じる。しかし、カメラとディスプレイの解像度が向上するにつれて新世代の顕微鏡使用者は、接眼レンズのために前屈姿勢で何時間も過ごすのではなく、ヘッドアップディスプレイを通じて4Kモニターから画像を得ることが快適と感じつつある。

前述したように、高倍率と高感度は、筐体デザインでは解決できない、振動のない環境を必要とした。そのため、巨大で空気圧サスペンションのある防振台が必須となった。

従来の巨大な筐体デザインの利点は、アップグレードのために専用に作られたポートと接続する付属品による拡張性だ。新たな技術が利用可能になるにつれ、フィルタホイール、進化したカメラ、レーザ、回転盤、マイクロミラーアレイを含む付属品のいくつかは、ベースとなるプラットフォームより高価になっている。一方で、装置の通常のユーザーにとって、難解な付属品の追加は重荷となっている。

小型に、安価に、パワフルに

技術が発展するにつれ、製品はより小型に、安価に、パワフルになる傾向にある。顕微鏡法もこの傾向の影響を受け、これまで述べた構成要素は、光路長や光路内の構成要素数、動作が最小化された筐体をベースとする顕微鏡設計の新たな時代の到来を告げている。こうした破壊により、数十年に渡る製品ライン設計のレガシーがない市場に新たな企業が参入できる道が開かれる。

照明、フィルタ技術、CMOSカメラの発展により、手のひらに収まる顕微鏡が作られるだろう。小型サイズにより振動抵抗性ができ、振動台が不要になる。これらの進展により、感受性の劇的な増加（2倍以上）と所要電力の減少（5 VDC）、そして環境抵抗性が実現する。高感度により暗室の需要がなくなり、シンプルな設計により、技術的専門知識がなくても装置を簡単に扱えるようになる。サイズと所要電力の減少は、より多くのカメラを平行に置くことができ、狭いスペースに複数の顕微鏡を設置できることを意味する（**図3**）。

環境抵抗性により、組織培養インキュベータ、グローブボックス、低酸素や嫌気性チャンバ、さらに冷蔵庫内で動作する*in situ*（その場で）顕微鏡法が可能になる。生きた細胞の成長や振る舞いを観察することは、生物医学分野における近代の顕微鏡法の中で最も強力な使用法の1つである。

参考文献

(1) http://bit.ly/BOWref1
(2) http://bit.ly/BOWref2
(3) http://bit.ly/BOWref3

著者紹介

クリストファー・シュメイトは、エタルマ社CEOである。
e-mail：cshumate@etaluma.com
URL：https://etaluma.com

LFWJ

創業50年
日本最大級の
レーザー専門商社

JLC JAPAN LASER

レーザー光源

光計測器・測定器

光学関連部品・光周辺機器

検査装置・イメージング機器

加工装置

光技術に関するご相談は
https://www.japanlaser.co.jp/
E-mail:jlc@japanlaser.co.jp

JLC JAPAN LASER 株式会社日本レーザー

本　社　〒169-0051 東京都新宿区西早稲田2-14-1
TEL: 03-5285-0861
大阪支店　TEL: 06-6323-7286
名古屋支店　TEL: 052-205-9711