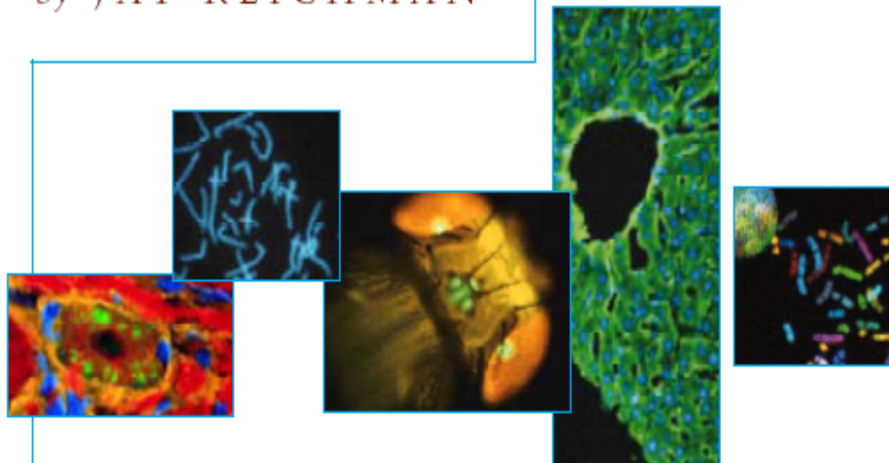


CHROMA TECHNOLOGY CORP

HANDBOOK *of*
OPTICAL FILTERS
for FLUORESCENCE
MICROSCOPY

by JAY REICHMAN



HB1.2/December 2007

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

励起と吸収スペクトル
蛍光信号の輝度
蛍光顕微鏡
蛍光顕微鏡に使用されるフィルターの種類
蛍光顕微鏡の進化

光学フィルターについて 8

フィルターを表す用語
その他の製品
色ガラスフィルター
薄膜コーティングフィルター
AO フィルター

蛍光顕微鏡用フィルターのデザイン 14

イメージングコントラスト
蛍光スペクトル
光源
デテクター
ビームスプリッター
光学品質
光学品質を決めるパラメータ
ケラ照明落射顕微鏡に要求される光学品質

共焦点顕微鏡用フィルター 21

要求される光学品質
ニポウディスクスキャンング
レーザースキャンング
共焦点蛍光顕微鏡に求められるスペクトル特性
ニポウディスクスキャンング
レーザースキャンング

マルチプローブアプリケーション用フィルター 25

参考 26

語彙集 27

蛍光顕微鏡を使用するには要求に応じたスペクトル幅と物理的特性を持つ光学フィルターが必要です。フィルターの選定は、ご使用の顕微鏡のタイプと何をご覧になりたいかによって変わります。フィルター自体は、複雑な顕微鏡システムの中では比較的簡単な光学系ですが、最適に設計されたフィルターを使用すれば素晴らしい効果を発揮します。蛍光顕微鏡に使用する際も、光学フィルターの原理を知ることは大変有用なのです。

このフィルターガイドは、クロマテクノロジーの技術者が、様々な顕微鏡やアプリケーションに対応するフィルター設計の際に用いる原理とノウハウをまとめたものです。このガイドは落射顕微鏡、共焦点顕微鏡、マルチ蛍光プローブの同時観察などにも有用です。またこのガイドには、フィルターが顕微鏡の光学アライメントにどのような影響を与えるかについての情報、詳細についても記載してあります。

最終項には有用な語彙を記載してありますので、こちらもご覧ください。

色素についての物理的/化学的情報、特定の色素プローブに対応するアプリケーション、サンプルの準備方法、顕微鏡の光学系などについての詳細については、詳細に説明している様々な文献がありますので、そちらを参照下さい。顕微鏡メーカーが出している、蛍光顕微鏡と顕微鏡のアラインメントに関する文献がお奨めです。

クロマテクノロジーについて

クロマテクノロジーは従業員が株主の会社で、色の識別や光学品質、信号の S/N 比が非常に重要な、下記を代表とするアプリケーション用フィルターのデザインと製造を行っています。

- 信号レベルが小さな蛍光顕微鏡やサイトメトリー
- 天文光学用スペクトルイメージング
- レーザーを利用した機器
- ラマン分光

クロマ社は、永年のコーティングと製造経験を持つスタッフによって運営されていますので、フィルターに関するどのようなお問い合わせに対しても納得頂ける提案が可能です。殆どの場合、フィルターデザイン等は無償で行いますので、お気軽にお申し付け下さい。

蛍光顕微鏡について

蛍光という現象は、物質にある光を照射すると、その物質がその光を吸収し瞬時に¹それとは違う、より低いエネルギー

と長い波長の光を発するという、分子的現象を指します。この過程は一般的に、「励起」と「吸収/蛍光」という言葉で知られています。有機、無機を問わず殆どの物質は何かしらの蛍光特性を持っています。

1世紀ほど前の初期の蛍光顕微鏡では、この**一次(primary)蛍光**や**自家蛍光**を観察するのみでしたが、現在では数多くの色素が開発され、より輝度の高い蛍光を捕えたり、観察したいサンプルに応じて色素を使い分けることが可能です。これらの方法は、**二次(Secondary)**あるいは**間接(indirect)蛍光**と呼ばれています。

色素は**蛍光クロム(fluorochromes)**と呼ばれ、他の有機活性物質(抗体や核酸)に使用される場合は**蛍光プローブ**や**蛍光リン(fluorophores)**とも呼ばれます。

現在では色素の種類も近赤外、青、グリーン、オレンジ、赤といった特定のピーク特性を持つ色素が開発されています。蛍光クロムを使用して間接蛍光法を用いる場合、一般的には自家蛍光は不要なものとされ、これが画像取り込みの際の不要な光の一番の要素となっています。

励起と吸収スペクトル

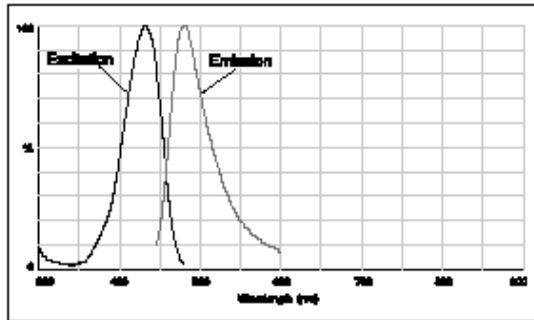


図1 一般的な色素の励起・吸収のスペクトル

図1は蛍光色素の励起と吸収の一般的なものです。

これらのスペクトルは2つの分光器(照明用分光器と解析用分光器)を組合わせた蛍光分光光度計と呼ばれる機器によって計測されています。最初、色素を何らかの蛍光を引き起こす光によって強力に照射、この照射光の波長を固定した上で、解析用分光器をスキャンして蛍光波長のスペクトルを計測します。その後、解析側を最も輝度の高い

吸収スペクトルに固定し、照射用分光器の波長をスキャン

して、励起スペクトルを計測、この固定励起波長で吸収強度の範囲を測定します。フィルターを設計するには、このスペクトルを相対強度に置換えます。

この光スペクトルは、光波長の定量で表します。蛍光スペクトルを表すのに、最もよく使用されるのがナノメートル(nm)です。可視域の色は大まかに言うと、下記のように表すことが可能です(図2)。

紫	青	400 ~ 450nm
青	青緑色	450 ~ 500nm
グリーン		500 ~ 570nm
黄色、オレンジ		570 ~ 610nm
赤		610 ~ およそ 750nm

¹ 分子が蛍光発光するのに要する時間は、大体ナノ秒(10^{-9} 秒)です。蛍光は、ミリ秒から分単位の寿命を持つ、別のフォトルミネッセンス現象なのです。

可視スペクトルの最短波長は、近紫外(near-UV)の 320 から 400nm、最長波長は近赤外 (near-IR)の 750 から 2500nm あたりまでです。320 から 2500nm の波長範囲は、クラウンガラスや窓ガラスの透明度の限界で、また蛍光顕微鏡において最も使用頻度の高い波長でもあります。有機化学では中 UV 域 (190 ~ 320nm)を利用しますが、この場合はそれ用のオプティクスを使用する必要があります。

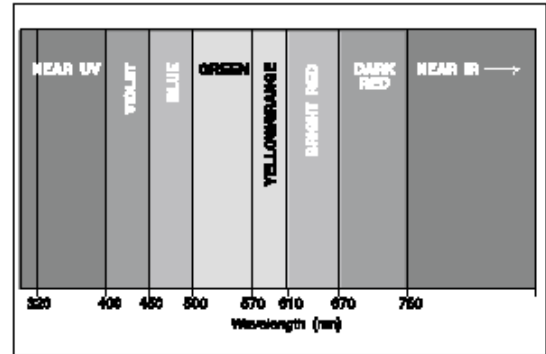


図 2 スペクトルを色で表したもの

蛍光スペクトルには、顕微鏡とフィルターのデザインに関わる色々な特性があります。

第 1 に、ある種のサンプルは広帯域の励起と吸収スペクトルを持つものがありますが、殆どの蛍光色素は励起スペクトルと吸収スペクトルが厳密に規定されています。図 1 のスペクトルはその典型的な例です。2 つのピーク波長の違いはストークシフトと言われます。第 2 に、全体的な吸収の強度は励起波長によって異なりますが、吸収のスペクトル分布は励起波長には殆ど依存しません²。第 3 に、色素の励起、吸収波長は、pH レベル、色素濃度、他の物質との組み合わせなどによる細胞環境によってシフトします。FURA-2 や Indo-1 などのある種の色素は、H⁺ (pH レベル)、Ca²⁺や Na⁺などのイオン濃度によって、励起、吸収のスペクトルが大きくシフトすることが知られており、特に有用です。最後に、フォトブリーチングや褪色と呼ばれる、時間経過と共に色素の蛍光効果が短くなる反応があります。

蛍光信号の輝度

染色したサンプルに励起光を照射した際、得られる蛍光信号量に影響を与える条件がいくつかあります。

- 1) 染色部分の色素濃度とサンプルの厚さ
- 2) 色素の消失係数
- 3) 色素の量子係数
- 4) 顕微鏡視野内にある実際の染色量。

消失係数によって、色素濃度とサンプル厚に対してどれだけの入射光が吸収され、それにより蛍光色素の励起スペクトルに対する波長依存性のある吸収特性が分ります。殆どの蛍光色素はピークの励起波長で高い消失係数を持っていますが、サンプルを正しく準備すればサンプルの最大濃度が確保できます。これによって、サンプル自体による吸収を減らすことが可能です。

2 蛍光スペクトルの「形」がたまに変わる事がありますが、殆どの場合大きな影響はありません。
参考文献 Lakowicz (1983) for an in-depth description of the mechanism of fluorescence.

蛍光と吸収される光エネルギーの比である量子係数は、吸収された光エネルギーがどの程度蛍光に変換されるかを決定します。殆どの蛍光色素の量子係数はおよそ0.3ですが、実際の数値はクエンチングとして知られるフォトリーチングの1種であるによって減少します。

これらの要因の組み合わせ、また多くのサンプルは視野内においての染色部分はほんのわずかでしかないことから、殆どの場合において励起光と吸収の強度比は高い蛍光物質でも 10^{-4} から 10^{-6} です。最近では技術が進歩し (situ 混合の蛍光など)、 10^{-9} や 10^{-10} の消光比も得られています。

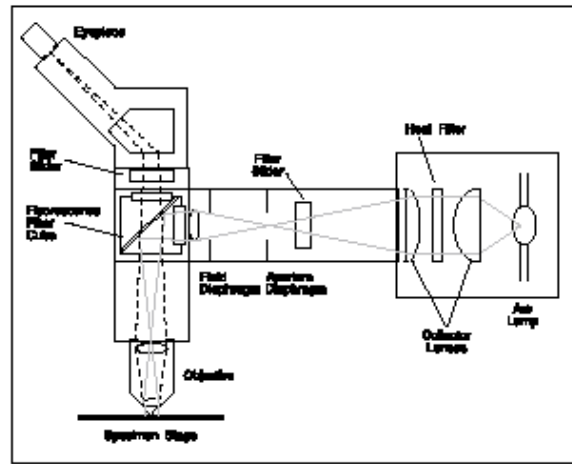
このようにして、最適なコントラストで蛍光を観察するためには、蛍光顕微鏡が蛍光信号を消すことなく励起光を減衰させる必要があります。微弱な蛍光を観察する場合、 10^{-11} 程度までの減衰が必要ですが、これは蛍光顕微鏡では無理なため、光学フィルターが不可欠となる訳です。また蛍光顕微鏡本来の構成があればこそ、フィルターを使用する優位点も出てきます。

蛍光顕微鏡

図 3 は典型的な蛍光顕微鏡の構成を示したものです。入射光が照射光で、最も一般的な蛍光顕微鏡の構成です。この顕微鏡において最も重要な機能は、入射光で照射しているため、サンプルからの散乱光及びガラス表面からの反射光として戻ってくる励起光のみをカットすればよい点です。高品質の油浸性対物レンズの使用(自家蛍光が最小で低蛍光オイルを使用した材質)すれば、戻り光は散乱光を入射光の 1/100 程度まで抑えることが可能です。加えてダイクロイックフィルターが、励起光をサンプル側に反射させ、散乱光をカット(係数は 10 から 500)します。(ダイクロイックフィルターに付いては下記参照)

油浸性のレンズを使用した蛍光顕微鏡で、ダイクロイック以外のフィルターを使用しない場合、観察される蛍光に対する励起光の比率は 1(高輝度蛍光)から 10^5 ないし 10^6 (低輝度蛍光)まで

下がります。例えば蛍光と励起光の比を 10^6 とか 10^7 (低輝度蛍光サンプル)を得たいのであれば、フィルターを使用してバックグラウンドを除去しながらも、蛍光信号を殆ど透過させる必要があります。フィルター技術によって、これら厳しい要求に応える事が可能になりました(詳細は P.10 参照)。



照射光
 イメージング光
 図 3
 落射顕微鏡の一般的な構成図。
 サンプルへの照射光とイメージングが別々に示されている。

蛍光顕微鏡に使用されるフィルターの種類

蛍光顕微鏡の初歩的なフィルターセットは、フィルターキューブ(フィルターブロックとも言う)に、励起フィルター、吸収(吸収)フィルターとダイクロイックフィルターの3種を組み込んでセットにしたものです。一般的なキューブは図4を参照下さい。

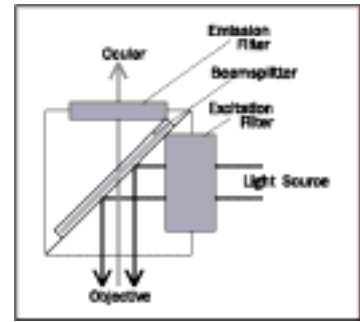


図4 蛍光キューブの構成

1) **励起用**フィルター(エキサイターとも言う)は、特定の色素を照射する波長のみを透過します。通常フィルターブロックは、励起用フィルターの種類から下記のように呼ばれます。:

U あるいは UV	DAPI, Hoechst 33342 などの UV 励起用
B	FITC やそれら色素の青色励起用
G	TRITC や Texas Red [®] 等のグリーン励起用

以前はショートパス(短波長のみ透過)フィルターが使用されていましたが、今では殆どの場合バンドパスフィルターが使用されています。

2) **吸収**フィルター(バリアフィルターや蛍光フィルターとも言う)は、励起用フィルターからの透過光を全て減衰させ、サンプルからの蛍光光のみを効果的に透過します。この光は常に、励起光より長波長(時には赤まで)となります。こちらには、バンドパスフィルターかロングパスフィルターが使用されます。通常、吸収フィルターの透過色はUブロックでは青や薄黄、Bブロックでは緑や濃黄、Gブロックではオレンジや赤となります。

3) **ダイクロイックフィルター**(ダイクロイックミラーやダイクロイックビームスプリッターとも言う³⁾)は、顕微鏡の光路に対して 45° で設置される、コーティング付薄ガラスです。このコーティングは、1色(励起光)を反射し、他の色(蛍光光)を透過させます。現在のダイクロイックフィルターは、これを効果的に得る(例えば励起光を 90%以上反射させ、吸収をおよそ 90%で透過させる)事が出来るようになりました。従来使用されていた銀コートミラーでは反射率 50%、透過率 50%、効率 25%程度でした。ガラス(基板とも言う)は UV 対応石英などのような、自家蛍光が殆どない材料を使用します。

殆どの顕微鏡には、2 から 4 個のフィルターブロックをマウントできるようなスライダーやタレットが付いています。それぞれのブロック内のフィルターは、3 つのセットになっている事が必要です。またそれぞれのフィルターのスペクトルがきちんと確認して使用して下さい。

蛍光顕微鏡で使用される光学フィルターには下記が挙げられます。:

- 1) 熱吸収フィルター(ホットミラーとも言う)は、殆どの照射集光レンズと一緒に使用されています。このフィルターは、赤外光(800nm 以上の光)を減衰させ、可視光のみを透過します。
- 2) ND フィルターは、フィルタースライダーやフィルターホイール内に装着し、集光レンズと開口絞りの間で使用します。照射光の輝度を調整します。
- 3) 蛍光以外に使用されるフィルターとしては、色ガラスフィルターが顕微鏡の透過光調整用に、また直線偏光フィルターが偏光顕微鏡用に使用される事があります。

蛍光顕微鏡の進化 ⁴

上記に示した現在の蛍光顕微鏡の基本構成は 100 年以上前に発見、開発されたものです。永年に亙る開発を見てみると、様々な部品の役割をより理解する事が出来ます。

初期の蛍光顕微鏡は、サンプルを UV 光で励起することによって、励起光と蛍光を適切に分離していました。これは、バリアフィルターなしでの観察が可能です ⁵。これら初期の蛍光顕微鏡の中には、大きくて危険度の高い 2,000W の鉄製アーク灯を Wood 氏の取った方法 (nitrosodimethylaniline 染料)ゼラチン、液体銅硫酸塩チャンパー、青紫フィルターの組み合わせ - でフィルタリングするものがありました。この最初の励起フィルターによって、近 UV 光とごく微量の可視光が透過され、サンプル上の自家蛍光を観察することに成功しました。殆どの物質は、UV 光によって励起される事が分ったのです。1914 年には初めて蛍光色素が細胞のそれぞれの位置を染色するのに使用されました。二次蛍光の使用です ⁶。

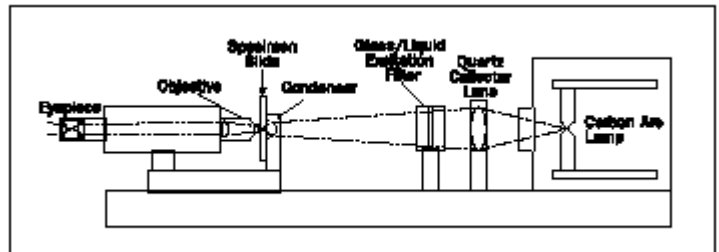


図5 初期の透過型蛍光顕微鏡の構成
(After Kasten, 1989.)

これら初期の蛍光顕微鏡は図5のように、ダイアスコピック(透過光)照射を利用していました。明視野と暗視野両方の油浸性コンデンサーが使用されましたが、それぞれには致命的な欠点がありました。明視野コンデンサーでは、照射の

最大強度は当時利用可能であった光学フィルターの性能によって非常に限られており、暗視野コンデンサーは励起光を円錐型に斜めに入射するため、大部分が対物レンズには入射せず、結果光学フィルターの機能を減らしていました。しかし、照射効率が大きく減少する事により対物レンズはより小さな開口数を必要とし、輝度と分解能は結果的に悪くなってしまいました ⁷。

4 この情報の殆どは Kasten(1989)によるものです。

5 最初に使用されたバリアフィルターは薄黄色カバーガラスでした。これは元々放射光から目を護るためのものでしたが、初期の蛍光顕微鏡ではこれでも役立ちました。

6 いくつかの蛍光色素は、他の目的のために18世紀に合成されたものです。寄生物の染色用、駆除用に開発した化学薬品などが含まれます。

7 Abramowitz (1993)

Chroma Technology アプリケーションノート

蛍光顕微鏡の最も重要な進歩は、1929年に蛍光顕微鏡用に開発された反射(明視野-episcopic illumination)照射です。反射照射は最初、大きくて不明瞭なサンプルの蛍光吸収を観察する為に使用されました。これらの最初の落射蛍光顕微鏡は、半分銀のミラーをビームスプリッターとして使用していました。恐らく全体で最大効率率は25%程度だったでしょう。しかしこれには下記の様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を使用できるので、高い輝度を得ることが出来る
- 2) 前記のような、油浸性対物レンズへの励起光の反射強度が、入射光に対して1%程度⁸
- 3) アライメントが容易

1948年、UV励起用 E. M. Brumberg氏がダイクロイックミラーを発表、その後1960年代に J. S. Ploem氏が可視光励起を可能にし、ビームスプリッターの効率をほぼ100%まで改良、顕微鏡のフィルタリング効果を大きく改善することに成功しました。Ploem氏による更なる改善には、ブルー、グリーン励起用狭帯域干渉フィルター、フィルターキューブの開発もあります。フィルターキューブの登場により、複数の蛍光色素を使用する際にフィルターやビームスプリッターの交換が非常に簡単になり⁹、これらの進歩は顕微鏡の商品化を導きました。

この歴史的時期にもう1つの重要な技術的進歩がありました。

- 1) コンパクトな水銀蒸気とキセノンアークランプの開発(1935)
- 2) 色ガラスフィルターの生産性が向上し、可視光励起の蛍光色素が使用可能になった(これによりタングステンフィラメント光源などのシンプルな光源の使用が可能になりました)
- 3) 顕微鏡の光学設計の進歩
- 4) AR コートの開発(1940)

より最近の技術的開発は、生物学と生物医学の研究の進歩と共に蛍光顕微鏡を大きく進歩させ、現在でも高感度カメラ¹⁰、レーザー照射、共焦点顕微鏡、デジタルイメージプロセッシング、数百に及ぶ蛍光色素、蛍光プローブの開発、また光学フィルターの性能開発による画期的革新が続いています。

8 非金属サンプルを想定しています。

9 情報と開発については2006年のDr. Bas Ploemとのやりとりに基づいています。

10 Inoue(1986)は、ビデオイメージングと顕微鏡の使用法について説明した素晴らしいテキストです。

光学フィルターについて

蛍光顕微鏡用光学フィルターデザインについて詳しい説明をする前に、フィルター特性や特徴を説明するのに使用されている用語を説明します。

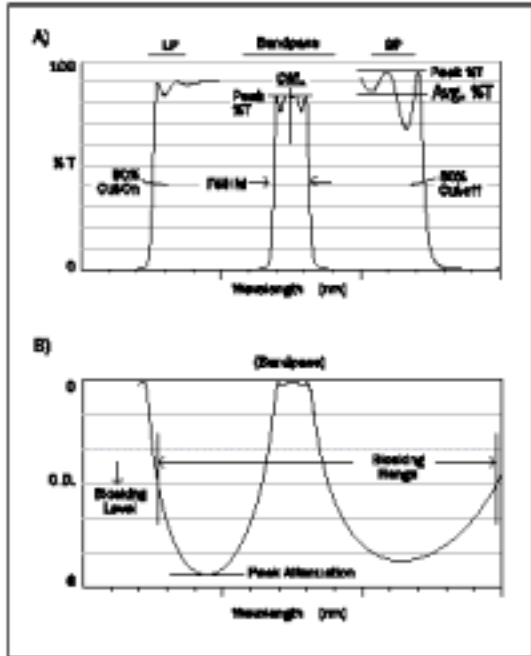


図 6
A) 透過特性の表し方
B) ブロッキングの表し方

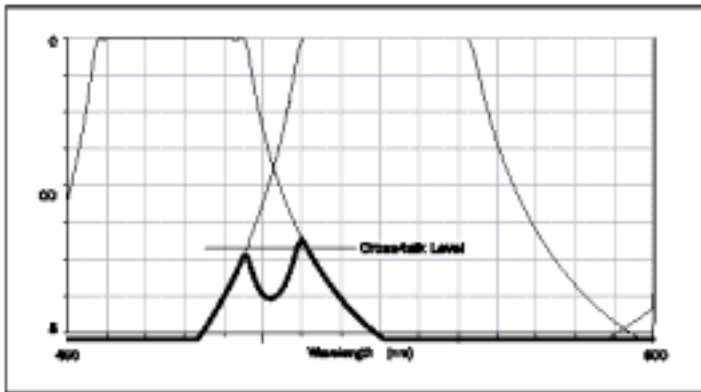


図 7 つながった2つのフィルターのクロストークレベル

フィルターを表す用語

U、B、G の様に、色の通称がそのまま基本フィルターセットに使用されるのが適切ですが、特殊な染料やプローブ用には、さらに正確な用語説明の表記に慣れ親しむことが有用です。フィルターの性能を記述する最も一般的な単位は、光の波長表記 (nm) で、上述した蛍光色素のスペクトルと同じです。フィルターの色は、バンド幅 (下記参照) が指定された波長と同じです。例えば 550 から 590nm の範囲で狭帯域のフィルターを覗いたときには薄いグリーンで、広帯域 (特にロングパスフィルター) では、黄色または明るいオレンジ色に見えます。

フィルターの特性を表す幾つかの用語は、下記のように定義されます。図 6 から 9 を参照下さい。

1) **バンドパスフィルター** は中心波長 (CWL) とバンド幅 (FWHM) で表されています¹¹。中心波長は計算値で全透過の 50% に相当するポイントの波長、FWHM は全透過強度の 50% に相当するバンド幅を示しています。

2) **ロングパスとショートパスフィルター** (LP と SP) は立上がり、立下り時の透過強度比が 50% に相当する波長です。LP/SP フィルターはエッジフィルターとも呼ばれ、とてもシャープな立上がり、立下りを可能にします (次頁参照)。平均透過率は、フィルターの指定波長範囲のみを計算し、すべての波長範囲に適用される訳ではありません。 ("highpass" "lowpass" の仕様では、波長よりも周波数の精度が重視される為、この記述は書いてい

ませんので注意してください)

3) **減衰レベル** 及び **減衰幅** (ブロッキングレベル及びブロッキング幅) は、OD (optical density = 光学濃度) で定義されています。

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

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

OD 値(光学濃度)は吸収分析法と同じ対数の単位を使っていますが、フィルターは吸収以外の方法で光を減衰しています。例えば、薄膜干渉フィルターは主に反射によって、また音響光学式フィルターは回折によって光をブロッキングしています。従って"optical density"の表現がより正確です(これらのフィルター製品については 10 ページの最初に説明しています)。

減衰率と関係する用語で **cross-talk クロストーク(図 7)** があります。これは 2 枚のフィルターを合わせて使ったときの最小減衰率を表しています(仕様範囲全体)。この数値は、蛍光フィルターセットで励起フィルターと吸収フィルターを組み合わせるときに重要です。

4) **スロープ**はブロッキングから最大透過までの立ち上がりのシャープさを表しています。図 8 で示した 2 つのフィルターセットはバンド幅とカットオンは同じですが、スロープが異なっています。この図で、2 つのバンドパスフィルターは 100%の透過スケールではほとんど同じですが、OD のスケールではスロープが全く違っています。スロープはブロッキングレベルが指定されている様なフィルターでは、波長によって示される事があります。

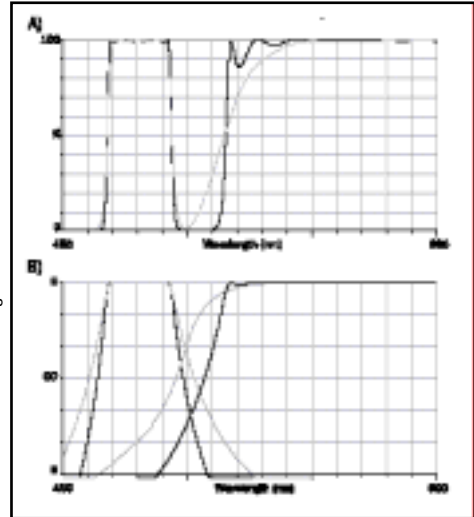


図 8 フィルタースロープの表し方
A) 透過率 B) 光学濃度(OD)

5) **入射角 (AOI)**は図 9 の様に、フィルターに入射する光の光

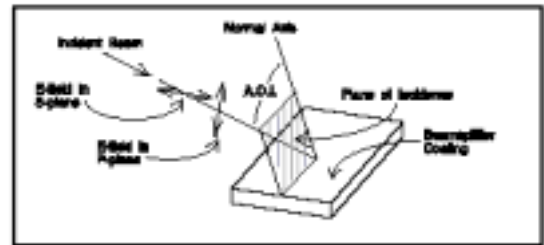


図 9 偏光を説明したイラスト。
コーティングへの入射光は通常垂直光で、入射面は通常の入射

軸とフィルターに垂直な軸の角度差です。ほとんどのフィルターではこの角度を 0° で計算しています。ただし、ビームスプリッターは通常 45° 入射です。薄膜干渉コーティングや音響光学素子など、ほとんどのフィルターは入射角度に規定があり、規定された角度以外で使用すると特性が変わってしまいます(これらについては次の章でより説明しています)。もしフィルターやビームスプリッターを通常の 0° 及び 45° AOI 以外で使用する場合は注意が必要です。

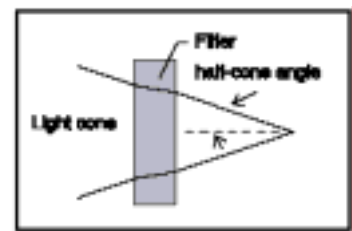


図 10 入射光の拡がり/集光角度

また、角度による影響を考える時、集光光や広がり角を持った光と一緒にフィルターを使用する場合、入射光の半推角が必要な場合があります(図 10)。広がり角は、半推角と同じ f ナンバーや開口数(NA)で表す事が出来ます。

6) **ダイクロイックビームスプリッター(また、通常でない入射角用干渉コーティングを使用したフィルター)** は、波長やデザインによって、**偏光量に影響**を与えます。関連事項を図 9 に記述しました。

P 面(TM モードとも言う。"横磁界") は、ビームスプリッターの入射面に対して平行な光の要素で、S 面(TE モード、"縦磁界")は、ビームスプリッターの入射面に対して垂直な光の要素です。平均的なダイクロイックビームスプリッターの偏光影響は図 11 に記述しています。

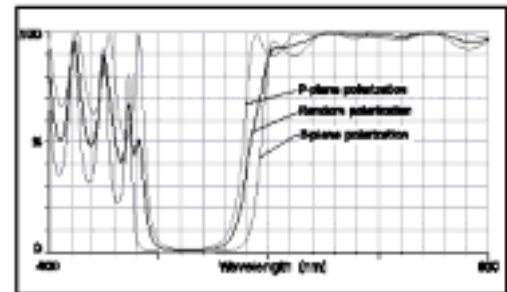


図 11 ダイクロイックミラーの典型的偏光特性。
直線 S 偏光の 488 アルゴンレーザー用に設計したコーティング

その他の製品

蛍光分析に使用されているフィルター技術の主なタイプは、色ガラスフィルターと薄膜コーティングの 2 種類です。また特殊なアプリケーションでは、音響光学素子を利用した可変フィルターの使用が増えています。これらの製品については下記に説明しています。ホログラフィックフィルターや液晶可変フィルターなどありますが、蛍光顕微鏡ではあまり使用されていません。

色ガラスフィルター

色ガラスフィルターは吸収ガラスフィルターとも呼ばれ、蛍光顕微鏡では最も頻繁に使用されています。中でも黄色とオレンジのシャープカットフィルター、UV 光を透過し可視光を吸収する”黒色”ガラスがよく使用されます。

ガラスフィルターは吸収によってのみ光を減衰させるため、スペクトルはガラスの厚さによって変化します。厚さが増す程ブロッキングレベルは高くなりますが、その分透過率も落ちます (図 12)。そのため、最適な厚さを決めることが大切です。ガラスメーカーが通常在庫しているガラス厚で殆どの使用に対応しますが、特殊なアプリケーションでは厚さの選定も必要です。

色ガラスのフィルターの利点は下記の通りです。

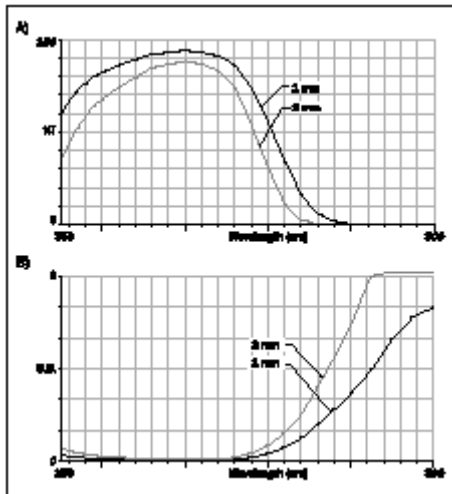


図 12 厚さ 1mm, 2mm 時の近赤外ブロッキングガラスのスペクトル (Schott BG-39)
A) 透過率 B) 光学濃度 (OD)

- 1) 比較的廉価である
- 2) 通常の保存環境でも安定性があり、寿命が長い¹²
- 3) 有効厚さの変化による小さな変化を除いてスペクトル特性が入射角に依存しない

色ガラスのフィルターの問題点は下記の通りです。

- 1) 選択肢が少ない
- 2) バンドパスタイプは立ちあがりが悪く、透過ピークも低い
- 3) フィルターの厚さによってスペクトルが変化するため、使用できるフィルターの厚さが制限される
- 4) 殆どのロングパスフィルターガラスに自家蛍光がある
- 5) 吸収されたエネルギーの殆どが熱に変換されるため、強化ガラスでないとはびが入る事がある

ガラスフィルターの項目にはポリマーフィルターも含まれます。ポリマーフィルターはガラスフィルターやある種の ND フィルターと比較して自家蛍光が低いため、ロングパスバリアフィルターとして使用される事があります (以下で説明する薄膜 ND フィルターとは違います)。

10 12 起こり得る事柄として
1) シャープカットロングパスフィルターガラスは温度変化によって 0.1~0.15nm/ のカットオンシフトが起こる。
2) ある種のフィルターガラス、強い UV 照射 (solarization) や高湿に影響を受ける (Schott Glasswerke catalogue 参照)

薄膜コーティング

薄膜コーティングには下記の 2 種類があります。1) 全反射ミラーや ND フィルターなどに使用される金属コーティング 2) 干渉フィルターの主部分の薄膜干渉コーティングです。薄膜干渉コーティングの最大の特徴は、許容範囲が非常に大きい点です。図 13 に示すように、干渉コーティングは薄い材料の層(1つの層の厚さは通常 4/1 波長程度、厚さとしては 1/10,000mm)を何層にも重ねたものです。

それぞれの材料には色はありませんが、それぞれの干渉を重ね合わせて行く事で、ある波長を反射したり透過するという特性が出てきます。薄膜干渉の一般的な例として、石鹸の泡の色があげられます。泡の内部と外部で干渉が起こり、層の中の同じ厚さのところに色が出てきます。¹³

干渉コーティングを使用すれば、バンドパス、ショートパス、ロングパス、ダイクロイックビームスプリッターなど殆どどんなフィルターのデザインも可能です。層の厚さ、数を調整することによって、波長、バンド幅、ブロッキングレベルのデザインが出来るので、標準のバンドパス、ロングパス、ショートパス以外にも様々なフィルターの作成が可能です。図 14 のような 2 つ以上のバンド幅を持ったものも販売可能となり、蛍光観察に貢献しています。

しかし薄膜干渉フィルターにも下記のような限界があります。

ブロッキングは、限定された波長範囲内でのみ特性を発揮します。この波長範囲を広げるため、広帯域のブロッキング素子や色ガラスフィルターなどを組み合わせます。ブロッキング素子を加えると透過率のピークが減少し、物理的厚さを増加させます。ブロッキングなしフィルターとブロッキング付きフィルターの例を図 15 に示してあります。

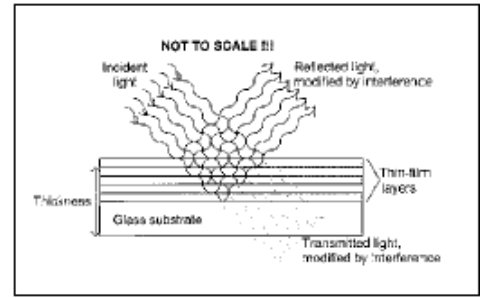


図 13 薄膜干渉コーティング

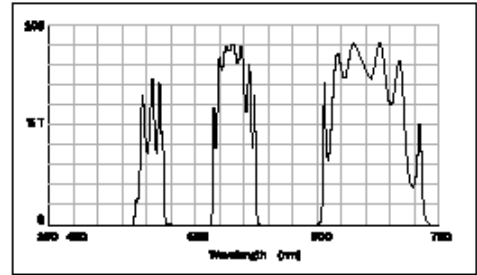


図 14 DAPI, FITC, Texas Red[®] 用トリプルバンドコーティングのスペクトル (Chroma 61002M)

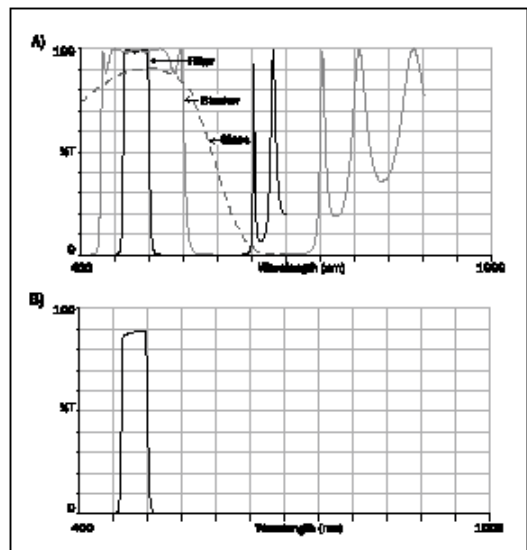


図 15 ブロッキングフィルターの例。
A) ブロッキングなしフィルターのスペクトル。広帯域「ブロッカー」と赤外ブロッキングブルーフィルターガラス
B) ブロッキングフィルターのスペクトル。赤外(表示外)ブロッキング域はブルーガラスによって決定、1.2 μmあたり

13 石鹸の泡と違うのは、光学薄膜は固体(多結晶体や非晶質)から形成され、コーティング膜厚は非常に均一な厚さがある点です。

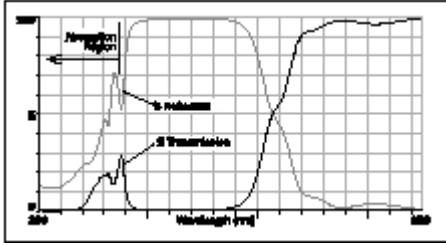


図 16 反射率 vs. 透過率
このダイクロイックビームスプリッターは UV 域において吸収がある

ととは限らないため、透過率データから反射率を計算する事は出来ません。図 16 は、可視光域にのみ高い反射率を持つダイクロイックビームスプリッターを示したものです。UV 域での透過率の減少は反射でなく吸収によるものです。一般的に、可視光を反射するビームスプリッターが UV 光を反射するとは限りません。

3) P.12 にもあるように、干渉コーティングは入射角に依存されます。入射角が大きくなると、コーティングのスペクトル特性は短波長側にシフトします¹⁴。また、入射角によって起こるコーティングの偏光影響も殆どのアプリケーションにおいては避けたい問題です。デザインによって影響を減らすことは出来ませんが、完全に取り去ることは不可能です。しかしこの影響もアプリケーションによっては効果的に働く場合もあります。

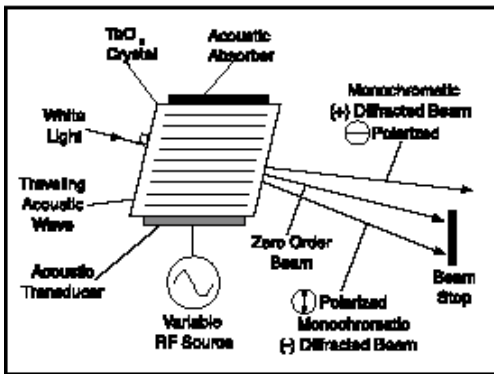


図 17 AOTF の原理(Brimrose Corp.より)

Acousto-Optical(音響光学)フィルター

図 17 に示した音響光学可変フィルター (acousto-optical tunable filter: AOTF)はほとんどの場合励起光、特にレーザー励起光をフィルタリングするのに適しています。適切な結晶に RF 信号を与えると結晶自体の透過回折率が変わるという特性を利用し、周波数を変えて光の波長をすばやくチューニングする事が可能です。代表的な AOTF の許容入射角は約 5 度で、外部コントローラによる電気制御が可能です。

AOTF の利点として次の点があげられます。

- 1) マイクロ秒で波長を変えたりスキャンが可能。複数以上の周波数を組み合わせればマルチバンドフィルタリングも可能
- 2) 信号の増幅によって、光強度を素早く変える事ができる

AOTF の問題点は下記の通りです。

- 1) FWHM が制限される(可視域では約 2nm)ため、AOTF を励起フィルター側で使用すると白色光からの出力が限られる

12 14 薄膜コーティングは入射角が大きくなるほど厚みが増しますが、膜内の光路長が変わると反射光線に影響を与えます。

- 2) 有効径が小さく(約 10mm かそれ以下)全体厚が大きい(約 25mm)。
- 3) 出力される光が偏光されるため、無偏光ビームを入射した場合、出力が最大で 50%になる

液晶可変フィルター Liquid Crystal Tunable Filters*

液晶可変フィルター(LCTF)は、吸収フィルターとして使用が増えつつある電気コントロールデバイスです。これは有効径を大きく取れる事、光路内にそのまま入れられる事から、イメージングクォリティを保持できる点で注目されています。LCTF の心臓部は、リニアポラライザーの間に複屈折フィルターと液晶の層を挟んだ、連続した波長板です。液晶層の複屈折性を利用した波長板の最大効率、液晶層に隣り合ったの伝導コーティングに様々な印加電圧を加える事によって最適化されます。

つまり、波長板の複屈折フィルターは入射光の偏光特性を回転させ、2 つ目のポラライザーが偏光を減衰させて元の角度に戻します。LCTF のフィルター特性は、連なった波長板の数や複屈折率など様々な要素の組み合わせによる設計が可能です。

LCTF の特性を下記にまとめます:

- 1) ミリ秒オーダーでの波長選択が可能
- 2) 波長依存性のないイメージシフト
- 3) 様々な減衰率
- 4) 半値幅(FWHM)、可変域、ブロッキングレベルの選択が可能(それぞれの条件が相互に影響)

LCTF は偏光部品のため、無偏光ビームを入射した場合の最大透過率は 50%となります。波長やブロッキングレベルにもよりますが、現存する他のデバイスでは透過率は 50%以下です。落射蛍光顕微鏡に使用される特殊な偏光ビームスプリッターは、この損失を軽減することができます。一般的な製品のブロッキングレベルはおおよそ 10^{-5} です。

* P.26 を参照

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製造の1番の目的は、イメージングコントラストとクオリティを提供できるフィルターセット(励起、吸収、ダイクロイックビームスプリッターフィルター)を作ることです。

イメージングコントラストは、いくつかの要素によって決定します。1) 画像の絶対輝度、2) S/N(消光比)として知られる蛍光信号とバックグラウンドの比率、3) 目視/撮影対象物の範囲を限定する-カラーバランスです。画像自体に観察可能な明るさがなければ S/N 比を向上させたところでイメージングコントラストは向上しません。よって、フィルターには高いスループット(広い透過幅と高い透過率)、低いクロストークが必要です。加えて、最大のコントラストを得る最善の方法はアプリケーションや技術に依存する事が多いため、設計においては様々なアプリケーションに対する理解、特に下記情報が重要です。

イメージングクオリティは、顕微鏡に求められる光学的要求の見極めと、それぞれのポイントで求められるフィルターを使用する事で保たれます。光学的要求を見極めるには顕微鏡で使用する光学部品についての基本的な理解とアプリケーション、技術面の理解が必要です。特に今日ではレーザーによる励起/サンプルマニピュレーション、デジタルイメージング、PC コントロールの位置決め装置、高感度デテクターの開発など、技術進歩による多くのアプリケーションが生まれています。加えて、様々な顕微鏡のメーカーとモデルで使用されるフィルターのサイズも知っておく必要があります。

イメージングコントラスト

特定の色素用に最適化したフィルターセットについて FITC 用のフィルターを例に、設計法についても併せて説明します。

蛍光スペクトル

設計で最も重要なのは図18Aにあるように、色素のスペクトル特性です。問題が色素のスペクトルだけであれば、励起スペクトルを透過するショートパスフィルターと吸収スペクトルを透過するロングパスフィルターがあれば十分観察可能です。

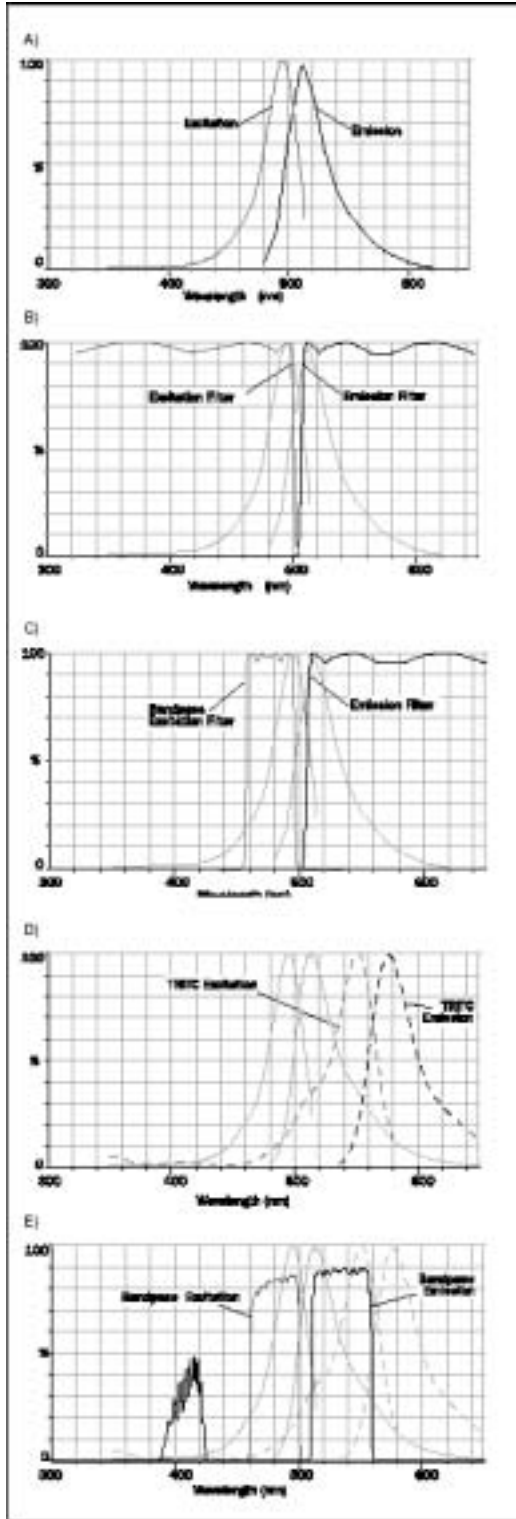


図 18

- A) FITC の励起、吸収スペクトル
- B) FITC の励起と吸収に重ねた「理想的」フィルター
- C) FITC 用バンドパス励起フィルターのセット
- D) FITC スペクトルに TRITC 励起と吸収スペクトルを重ねたもの
- E) FITC と TRITC の励起/吸収スペクトルに重ねた FITC 用バンドパスフィルターセット(Chroma 型番 41001)

この特性を持った組み合わせが図 18B で、「理想的な」ショートパス/ロングパスフィルターを示しています。実際のフィルターはカットオン、カットオフのスロープがあるためもっと広い分離域が必要となり、ショートパスフィルターでは UV 域にカットオフポイントが存在します。

また実際の観察では他にも考慮すべき点があります。多くのサンプルはショートパス励起フィルター(特に UV 光を透過するフィルター)を使用すると自家蛍光が発生しやすくなります。特に、病理学サンプルには自家蛍光が発生しやすいものが多く存在し、UV 光は(量子などの)高いエネルギーを持っているため、色素の光褪色(Photobleaching)量を増やしたりサンプルへの光ダメージを起こす可能性があります。よって、図 18C のように FITC 励起が最大にできる帯域をなるべく狭く、しかも適切な強度を持ったフィルターを選択する必要があります。

サンプルが 2 つ以上の色素で染色されている場合、それが例えば TRITC(図 18D)で染色されている場合、TRITC はブルー域に低いながらも非常に効率の高い励起波長を持っています。FITC 用にロングパスフィルターを使用すると、TRITC の吸収域のオレンジが同時に見えてしまう可能性があります。白黒カメラで観察を行っている場合には、色の識別を行えないため避けたい現象です。これを避けるには、吸収フィルターを FITC 用の吸収帯域に合わせた狭帯域のバンドパスフィルター(図 18E)に変える必要があります。図 18E は Chroma 社の HQ41 シリーズの例を示したものです。吸収フィルターが 410nm で「もれて」透過させてしまう可能性のある光を励起フィルターが減衰させている事に注目して下さい。

サイトメトリーアプリケーションでは画像輝度がそれほど重要でないため、もっと帯域の狭いバンドフィルターを使用して色素の識別率を高めています。

光源

ここまでは、全ての色で同じ出力が得られるような、完璧な白色光源が存在するものとして説明してきました。通常、蛍光顕微鏡に使用される光源は水銀アークランプで、これは UV、可視域に高い輝度(ルミネッセンスあるいはラジアンズで表されます)を持っています。この光源のスペクトルは図 19 に示すように、連続光とは程遠く、殆どの出射光はラインと呼ばれる、それぞれが 10nm 程度の狭いバンド幅しかありません。フィルターを使用する場合の一般的な目的は、これらのラインの 1 本あるいは何本かを透過させる励起フィルターです。もちろん例外もあります。その例を図 20 に示します。

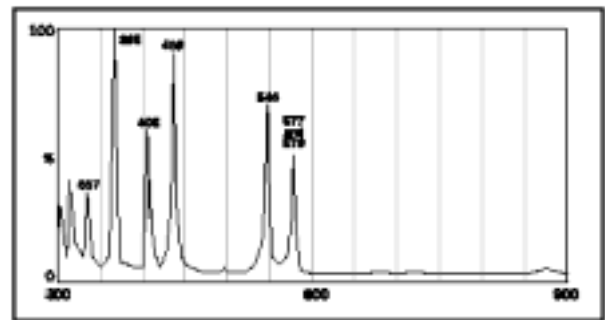


図 19
水銀アークランプのスペクトル
(300nm 以下の中 UV 域は表示していません)

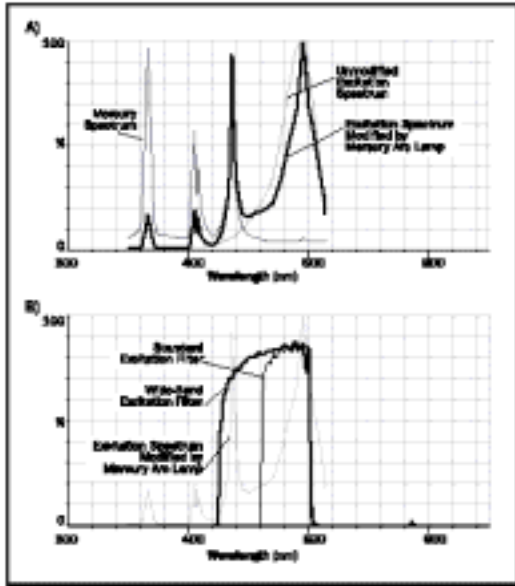


図 20
A) FITC 励起スペクトル。そのままの状態/水銀アークランプによって制限を受けた場合(100% 相対ピーク T に標準化)
B) FITC に標準/広帯域励起フィルターを重ね合わせたもの

この図は、水銀ランプの照射によって FITC の励起スペクトルが「制限」される様子を示しています。436nm を含む広帯域励起フィルターを使用すると、このラインを含まないフィルターに比べて非常に明るい(1.25 から 1.50 倍程度)吸収の信号が得られます。殆どの場合自家蛍光によるノイズ増加の方が自家蛍光の信号よりも大きい場合、全体の S/N 比減少が期待されますが、絶対値が非常に低い蛍光や FITC スペクトルがブルーシフト¹⁵したような場合、436nm ラインを含む広帯域励起フィルターを使用した方が、より高い検知信号を得られる可能性があります。吸収のスペクトルはそれほど大きな制限を受けませんので、励起フィルターのバンド幅に関わらず同じフィルターを使用できます。

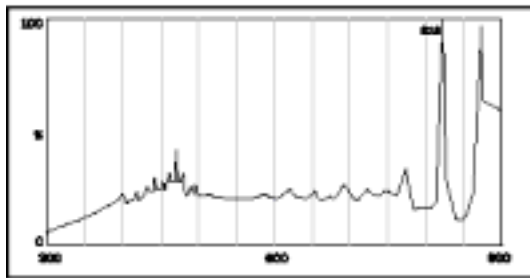


図 21 キセノンランプの発振スペクトル

蛍光顕微鏡で使用される別の光源はキセノンアークランプで、可視域に比較的連続した発振線を持っています(図 21)。キセノン光源は色素のスペクトル特性やサンプルの定量分析によく使用されますが、同じワット数で比較すると水銀ランプほどの輝度はありません。FITC の励起域(450 ~ 550nm)では水銀ランプの出力は比較的低いのですが、それでもキセノンはそれよりわずかに明るい程度です。主にこれが原因で、キセノンランプのアークサイズは同等の水銀ランプアークに比べると約 2 倍の大きさになってしまい、これにより典型的な顕微鏡構成ではサンプル上に集光可能な光の量が減ってしまいます。水銀ランプとキセノンランプの比較データを表 1 に示しています。アークサイズ

の違いが分かります。

表 1

水銀とキセノンランプの比較データ。蛍光顕微鏡に使用される最も一般的なサイズでの比較 (1993 Abramowitz より)

ランプの種類	出力 (w)	光束 (lm)	平均輝度 (cd/mm ²)	アークサイズ w x h(mm)	寿命 (時間)
水銀					
HBO 50W/3	50	1300	900	0.20 x 1.35	200
HBO 100W/2	100	2200	1700	0.25 x 0.25	200
HBO 200W/2	200	10000	400	0.60 x 2.20	400
キセノン					
XBO 75W/2	75	950	400	0.25 x 0.50	400
XBO 150W/1	150	3000	150	0.50 x 2.20	1200

検出器

励起フィルターは、検出器で拾える範囲以外の光をブロックする必要があります。アークランプ、フィラメントランプ共、近 UV から可視域全体に発振線があるため、フィルターは検出器の感知域全体に亘って最適な減衰量を持っている事が重要です。

15 pH レベルが低い(6 以下)時にこのような現象が起こります (1992 Haugland)

しかし、レーザー照射の場合必要はブロッキングは発振波長のみです。図 22 のような Ar-ion レーザーの場合には IR ブロッキングは必要ありません。

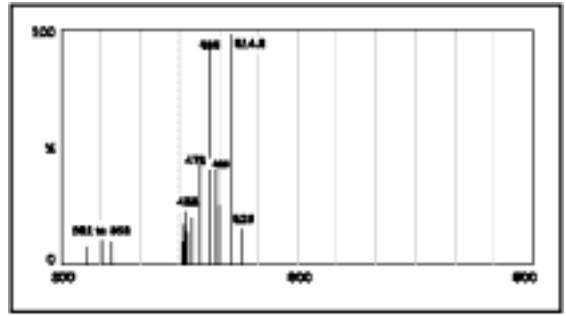


図 22
Ar-ion レーザーの典型的スペクトル
(スペクトラフィジックスレーザー社データより)

図 23 は代表的な検出器のそれぞれの感知スペクトルを示したものです。1100nm まで感知域があり 1200nm まで感知がゼロになるようなインテンシファイヤーSi フォトダイオードや CCD は表示していません。マイクロチャンネルプレートのようなインテンシファイヤーSi デテクターは、図 23 のインテンシファイヤービデオスペクトルとほぼ同じ感知域を持っています。

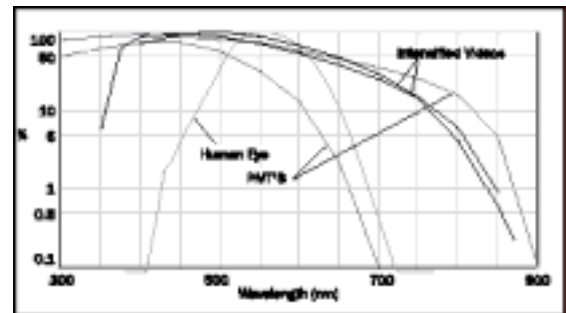


図 23
代表的な検出器の感知波長。
それぞれのスペクトルはピーク感度に正常化(ビデオと PMT データは浜松ホトニクス社データより)

一般的に、不要な帯域をブロックするには吸収フィルターではなく、励起フィルターで行う事が好まれます。これには 3 つの理由が挙げられます。

- 1) サンプルへの照射量を減らすことが出来る
- 2) イメージングクォリティを上げられる吸収フィルターの数が少ない
- 3) 多くの顕微鏡では厚みが決まった吸収フィルターホルダーがあるので、最終厚さが変わるような部品は望ましくない。

UV 励起のようなケースでは、励起フィルターのブロッキング域を拡張するとピーク透過率が大きく下がってしまうことがあります。このような場合は、吸収フィルターの IR ブロッキング域を拡張した方がいい場合があります。

可視域で撮影を行う場合は組み込みの光度計が IR に反応して露光時間に影響を与えるため、IR ブロッキングが重要です。

ビームスプリッター

フィルターセット設計の最終的な段階は、励起と吸収フィルタースペクトルに合ったビームスプリッターの選択です。励起光を 90%以上反射、吸収域で平均 90%以上の透過率を持っている事が望まれます。比較的高い 45° で光を入射すると、コーティングは強い偏光特性を持つ傾向があるため、この影響を出来るだけ小さくする事が必要です。顕微鏡などのイメージングにビームスプリッターを使用する場合、ガラス

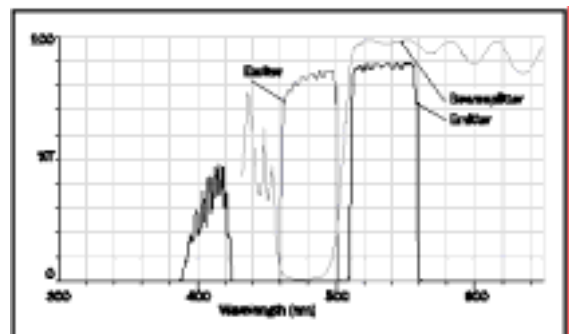


図 24
FITC 用フィルターセット(Chroma 社型番 41001)

基板に 1 層あるいは 2 層のコーティングが施されていますので、取り扱いには最新の注意が必要です。光源とサンプル側に向けた面が入射面です。入射面の向きが分かりにくい場合が多いので、通常正しい入射方向を示すマークが付いています。図 24 は Chroma 社の FITC 用フィルターセットのグラフです。励起、吸収、ダイクロイックビームスプリッターがそれぞれ合致したスペクトルで構成されている事が分ります。

光学品質

フィルターに要求される光学品質はフィルターの種類(照射用/イメージング用/検知用など)、顕微鏡の種類、アプリケーションによって大きく変わります。例えば、レーザースキャニング共焦点顕微鏡で定量イメージング分析を行う場合に吸収フィルターに求められる品質は、標準的な落射型顕微鏡で目視観察する際の励起フィルターに求められる品質とは大きく異なります。全てのタイプのフィルターとアプリケーションに応じた要求項目をここで述べる事は出来ませんが、主要な光学品質パラメータと基本的な顕微鏡の構成をあげて、殆どの場合に当てはまる一般的なガイドラインを説明します。

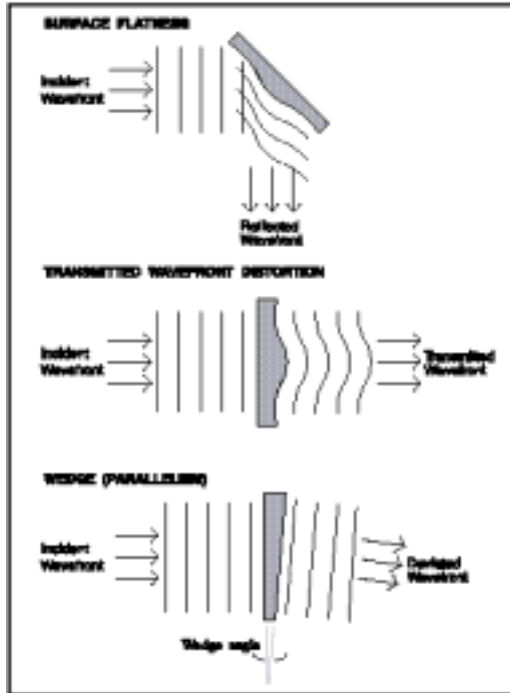


図 25
平面度、TWD、ウエッジ効果を表したもの

光学品質を決めるパラメータ

フィルターとビームスプリッターのイメージングクォリティ全体を定義するのに使用される、最も重要なパラメータは下記の通りです。最初の 3 つのパラメータは図 25 の通りです。

- 1) **Surface flatness(平面度)**は完全な光学部品のみならず計測したい光学部品の面の偏差を計測したもので、普通可視光(550nm から 630nm、もしくはバンドパスフィルターの中心波長を使用)のゆらぎや重なり具合を数えます。入射面から光が反射する時、波面収差は平面度の 2 倍です¹⁶。ビームスプリッターやミラーからの反射光の波面収差は反射面(通常は入射面)の平面度によってのみ決定されます。
- 2) **TWD(透過波面収差)**は光学素子を透過する際の光の収差を計測したもので、平面度と同じく光のゆらぎや重なり具合によって計測します。光学素子の平面度と屈折率の均一性を乱す内部構造を併せて、光学素子の全体的な TWD を表します。

- 3) **Wedge(ウエッジ(平行度))**は光学素子の外表面がどれくらい平行に保たれているかを表したもので、アーク分もしくはアーク秒で表します。ウエッジは主に光の進行方向の角度偏差(イメージングシフトなど)に影響を与えます。角度偏差量は一般的なフィルターの場合 1/2 ウエッジ角です¹⁷。コーティング面の内部ウエッジはあまりビームの偏差には影響を与えませんが、軸ずれによる内部反射の結果としてゴーストイメージを引き起こす可能性があります。

16 通常角で光を反射する際に当てはまります。通常角でない反射光の量はコサイン係数に加減されます。45°で反射した光の波面収差は表面度の約 1.4 倍です。

17 小さな入射角の場合、角度偏差 = (N - 1) * ウエッジ角、N はフィルターのガラスの屈折率、ウエッジ角はウエッジ角。ガラスフィルターの屈折率はおおよそ 1.5。

4) **Clear Aperture(有効径)**は、顕微鏡の絞りを制限してはいけません。有効径のエッジ部分からフィルタリングされていない光が漏れこまないようにする事も大変重要です。

5) **Scratches/digs(スクラッチ/ディグ)**は、MIL 標準の数値で「80/50 scratch/dig」などと記載します。Dig は、フィルター内の微粒子や小さな気泡、コーティング内の目に見える含有物なども含みます。

6) **Pinhole(ピンホール)**は干渉フィルターコーティングの小さな欠陥で、コーティング時に基板にあった小さな微粒子によって引き起こされます。ピンホールサイズは、高い強度を持つ照準器を使った明確な条件下で、標準の最大許容ピンホールに従って計測しなくてはなりません。

Kohler 照明(ケーラ照明)落射顕微鏡に要求される光学品質

殆どの顕微鏡は、P. 4 の図 3 にあるようなケーラ照明を利用した落射蛍光顕微鏡です。簡単なシステム説明は下記の通りです。

ケーラ照明では光をコントロールするために 2 つの調整可能な絞りを使用します。開口絞り (Aperture diaphragm) は対物レンズの射出瞳側に結像させ、視野絞り (field diaphragm) はサンプル面で結像させます。視野絞りは視野レンズの近くにあり、視野レンズは開口絞りで対物レンズの射出瞳に結像させます。集光レンズアセンブリ (コンデンサーレンズ) はランプ光を開口絞りに集光し、対物レンズの射出瞳に集光します。この構成によって 3 つの基本的な効果を得ることができます。1) ランプ光はサンプル上で完全に焦点外で、これによって明るく均一な照明が可能 2) 視野絞りからの光がサンプル上に集光さる。視野絞りはどの部品からも独立した状態で、視野内での完璧な調整が可能 3) 開口絞りを調節すると照射光の開口数が、照射サイズを変えることなく調整可¹⁸。

これを念頭に考えると、このタイプの顕微鏡に必要な光学品質は下記のようになります。

1) 顕微鏡照射側の光学部品は、サンプル上に均一な照射を最低限のフレアで行う事ができること。そして、光源や絞りのイメージング品質を必要以上に損なわないこと。よって、励起フィルターにはイメージングクォリティの TWD は必要なく¹⁹、光学品質の一般的な標準仕様が必要です。同様に、ダイクロイックフィルターの平面度にもイメージングクォリティは必要ありません。

18 ケーラ照明光学系の詳細については Inoue(98)もしくは顕微鏡メーカーの資料を参照下さい。

19 「イメージングクォリティ」の意味は光学品質であって、システムの仕様全体を指すものではありません。一般的な顕微鏡では、フィルターやビームスプリッターでインチあたりの TWD が必要な仕様と考えられています。

2) フィルターブロック入れ替えの際には、フィルターブロック内のビームスプリッターは多少のアライメントずれが起こり、これによって照射スポットの位置がずれます(サンプル上の視野絞りのイメージなど)。一般的なアプリケーションでは、 45° に対して ± 3 アーク分の公差は適切だと考えられています(反射角度はいつでも入射角度と同じなので、このアライメント公差によって起こる角度偏差は2倍、つまり ± 6 アーク分)。ビームスプリッターが既にフィルターブロックに装着してある場合、ビームスプリッターをきちんと装着するのは供給側の責任となります。加えて、フィルターブロックを顕微鏡に装着する時も適切なアライメントが必要です。

逆に、レジストレーションシフトとして知られる全視野のイメージにはアライメントずれはあまり影響を与えません。

3) 同様に、励起フィルターのウエッジによって引き起こされる角度偏差の影響は照射スポットの位置シフトにつながります。しかし、イメージ自体にはレジストレーションシフトは起こりません。ウエッジはフィルターブロックのダイクロイックミラーのアライメント公差内でコントロールする必要があります。

4) イメージング路のダイクロイックビームスプリッターや吸収フィルターはイメージングクォリティのTWDが重要です。

5) ダイクロイックビームスプリッター、吸収フィルターにおけるウエッジの影響は、フィルターやブロック交換時のレジストレーションシフトになります。ウエッジはそれぞれの部品レベルできちんと調整しなくてはなりません。

加えて、ビームスプリッターの厚さのばらつきはレジストレーションシフトを起こす可能性があります。この厚さに関わるシフト量は顕微鏡に依存します。標準の筒長の落射蛍光顕微鏡のオプティクスではイメージング路に光があり、完璧な平行光ではありません。²⁰ よって、イメージングパスで平行光を得られる無限遠補正光学系採用の顕微鏡よりも厚さのばらつきに影響を受けやすくなります。

6) 励起フィルターは通常視野絞りの近くに設置されているので(ケーラ照明のイメージ面に結像する位置)励起フィルターのピンホールは大変目立つため除去しなくてはなりません。

7) ダイクロイックビームスプリッターは励起/吸収どちら側でも照射されるため、ダイクロイックビームスプリッターの自家蛍光は最小化しなくてはなりません。

ビームスプリッターは、平面度TWDとも他の部品とは違う仕様の設定が重要です。

20 このタイプの最先端モデルは、ブロック内のコリメーションを向上させるためハウジング内にリレーレンズを採用しています。影響は小さくなりますが、完全に除去される訳ではありません。

上記から、落射型蛍光顕微鏡に使用されるフィルターに求められる光学品質を下記表2にまとめました。

表2 落射型蛍光顕微鏡で使用されるフィルターの一般的光学品質

光学品質パラメータ	フィルターの種類		
	励起	吸収	ビームスプリッター
平面度	なし	なし	< 10 waves per inch
透過波面	なし	1 wave per inch	1 wave per inch
ウェッジ	< 6 アーク分	1アーク分	1アーク分
スクラッチ/ディグ	80/50	60/40	40/40
ピンホール	なし	最小	仕様なし*
自家蛍光	仕様なし	適切な範囲内	最小

* スクラッチ/ディグ仕様に基づいた数値

共焦点顕微鏡用フィルター

共焦点蛍光顕微鏡 (confocal fluorescence microscopes) で使用するフィルターを設計する際、最初に顕微鏡の光学系を考えなくてはなりません。殆どすべての共焦点蛍光顕微鏡はそれぞれ独自の光学系を構成しているため、光学系も独自の仕様が必要になります。しかしほとんどのシステムは1つないし2つの基本的カテゴリーにグループ分けが可能です。スキャニングにレーザーを使用するニポウディスク機構で 사용되는光学系と落射型顕微鏡の光学系との比較を下記に説明します。共焦点顕微鏡のさらに詳しい理解、視野震度、イメージング結合技術などについては共焦点顕微鏡製造メーカーの資料や学術誌を参照してください。

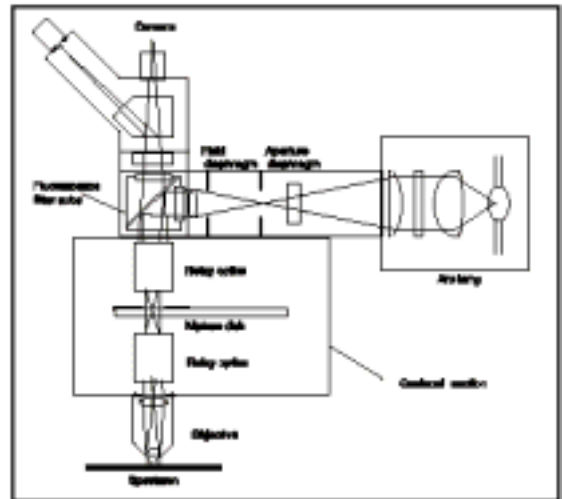


図26 ニポウディスクスキャニング共焦点蛍光顕微鏡の構成図

要求される光学品質

ニポウディスクスキャニング共焦点顕微鏡

図26は広帯域アークランプ照射による共焦点顕微鏡の構成図です。ニポウディスクスキャニング機構、イメージング検出器、カメラもしくは接眼レンズです。

この顕微鏡は、図3にあるような標準的な広視野スコープの基本に近い光路を持っています。ディスクはサンプル面に結像する地点にあり、全視野にわたって均一に(通常はケラ照明で)照射されなくてはなりません。

ディスクはサンプル面に結像する地点にあり、全視野にわたって均一に(通常はケーラ照明で)照射されなくてはなりません。よって、励起フィルター透過光の波面に対する要求とダイクロイックビームスプリッターの平面度に対する要求は落射型顕微鏡に対する要求と同じです。同様に、吸収フィルターとビームスプリッターの透過波面に対する要求も落射型顕微鏡に対する要求と同じです。それぞれのフィルターに対するウェッジ要求も一般的には変わりません。特殊な共焦点顕微鏡で、焦点距離に色々種類がある場合はこの限りではありません。

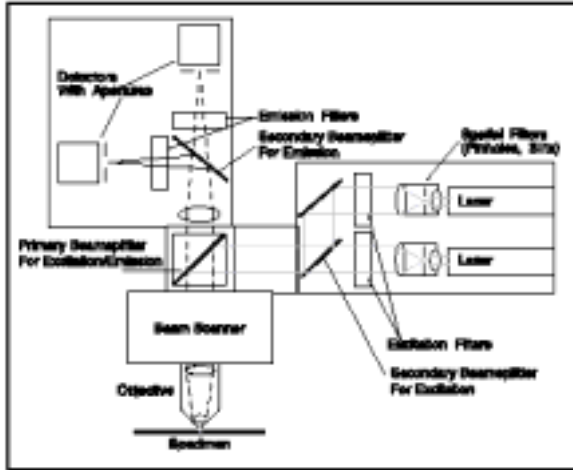


図 27 レーザースキャニング共焦点蛍光顕微鏡の構成図

レーザースキャニング共焦点顕微鏡

図27はレーザー照射の共焦点顕微鏡の構造を示したもので、ミラーが動くスキャニング機構、PMTのような測光検出器から構成されています。この顕微鏡デザインの光路は落射型顕微鏡とは大きく異なります。2つの大きな違いは

1) 照射側ピンホール (もしくはスリット) は、レーザーポットがサンプル上に直接集光する**臨界照射**によって、サンプル上に結像する

2) イメージは、サンプル上のレーザースポット位置にある検出器からの電気信号に合わせたタイミングで結像され、その方式はテレビの結像機構と似ている。検出器からの電気信号は結像ピンホール(スリット)径を通過した蛍光信号の強度の強さに応答する。

この構成では、レーザー光にゆがみなどが生じていない事が重要です。これはサンプル上で最適な集光を得るため、また光路からの角度偏差を最小に抑えるためです。加えて、このタイプの共焦点顕微鏡は殆どのものが比較的長い光路を持っており、これによってフィルターからの角度偏差を増幅させてしまう可能性が高いのです。よって、励起フィルターとビームスプリッターに対する光学品質とレジストレーションの要求値は吸収フィルター、ビームスプリッターへの要求と同等もしくはそれ以上でなくてはなりません。殆どのシステムは、吸収フィルターとビームスプリッターに対して、TWDと1 wave/inchの平行度要求があります。ウェッジについても同様で、1アーカ分がそれ以下になっています。これは、フィルターの交換時にアライメントのずれを最小に抑えるためです。

吸収側の光学系では、対物レンズと検出器入射径の間にある全ての部品がイメージングクオリティを持っている事が望まれます。図に示したように、これには全ての吸収フィルターとビームスプリッターが含まれます。メインの励起/吸収、ビームスプリッターと検出器側ユニットの間にアパーチャを設置しているシステムもあります。この場合、検出器ユニット内のフィルターに対する光学要求は、緩やかなものになっています。

共焦点蛍光顕微鏡に求められるスペクトル特性

求められるスペクトルの要求に応じて、顕微鏡の照射と検出器タイプが決まります。ニポウディスクスキャニング共焦点顕微鏡の照射、検出器システムはレーザースキャニング共焦点顕微鏡のものとは異なるため、殆どが2つのカテゴリーのどちらかに分かれます。

ニポウディスクスキャニング共焦点顕微鏡

この構成(図26参照と上記参照)では光源と検出器システムは標準の落射型蛍光顕微鏡と同じで、スペクトル要求も基本的にはほぼ同じです。1つ例外があり、信号強度が減少したり、光学部品を追加した場合、不要な反射やスキャタリングが引き起こされます。この場合、励起と吸収フィルターのセットは非常に低いクロストークが必要です²¹。加えて、フィルターのピンホールコントロールにも細心の注意が必要です。

レーザースキャニング共焦点顕微鏡

この構成のフィルターとビームスプリッター(図27と上記参照)は使用するレーザーに対して最適な設計がされています。最も一般的なレーザーは図22のアルゴンイオンレーザーで、他の一般的なレーザーはHeNe(543もしくは633nm)とアルゴンクリプトン(351-363、488、515、568、647nm)です。レーザーと使用するフィルターをデザインする場合、下記の点に注意する必要があります。

1) 励起フィルターがレーザーからの出射スペクトルをブロックしていること。800nmまでをブロックするフィルターなら、上記のどんなレーザーも使用が可能です。レーザー励起のフィルタリングで考慮すべき重要な点は、フィルターにかかるレーザーからの熱影響を下げるため、反射光を出来るだけ減衰させる必要があるという点です。例えば、アルゴンイオンレーザーと使用するUV励起フィルターは、殆どの波長が集まっている可視域のブルーからグリーン域での高い反射率が必要です。

2) 殆どの共焦点顕微鏡の場合、使用されるレーザーは偏光されているため、最適なビームスプリッターを設計するには偏光に関する知識が大変有用です。例えば図10にあるビームスプリッターは、488nmアルゴンイオンレーザーと使用するのにS面で使用するよう最適化されています。これは、ビームスプリッターのカットオン波長が500nmの時に蛍光信号に対して最大のスルーputを得られるようにするためです。励起信号が偏光されていても、蛍光信号は無偏光です。このためビームスプリッターは両方の偏光状態の蛍光を効果的に透過しなくてはなりません。偏光の知識は、特にマルチバンドのポリクロイックビームスプリッターの設計に有用です。マルチバンドフィルターは、蛍光信号を最大に透過させるため、非常に細い反射域が必要とされるためです。

21 反射による影響を減らすために、偏光素子を使用しているシステムもあります。

3) 吸収フィルターは、全てのレーザーラインを含む短波長側にブロッキング範囲がなくてはなりません。長波長側のブロッキングは、複数プローブを使用するアプリケーションでそれぞれの信号の選択性を高めるのに必要ですが、ここではブロッキングはデテクターの感度領域、PMTでは700nm程度で問題ありません(図23)。

表3 マルチプローブを使用するアプリケーションの方法

方法	部品	利点	欠点
1 シングルバンドセット	標準顕微鏡	追加部品は不要 最も明るいイメージ	同時観察は不可能 画像を重ねた場合は不明瞭になる
2 マルチバンドセット	標準顕微鏡	レジストレーションエラーなしでの同時観察 追加部品が必要 (特別なフィルターセットを除く)	輝度が下がる キセノン照射には不向き カラーバランスが決まっている
3 シングルバンド励起フィルター、ビームスプリッターと吸収フィルターはマルチバンド	照射光路にフィルターホイールもしくはスライダー付き顕微鏡 カメラもしくはCCDカメラ	レジストレーションエラーなしで時間をずらした観察 重ねた画像の正確なレジストレーション。カラーバランスの調整 方法2よりも輝度の高い励起フィルターの選択が可能	追加部品が必要 (フィルターホイールやスライダーなど)
4 マルチバンドビームスプリッター、シングルバンド励起、吸収フィルター シングルカメラ	照射、イメージング光路両方にフィルターホイールかスライダー付き顕微鏡 カメラもしくはCCDカメラ	方法1に近い輝度を持つ励起、吸収フィルター レジストレーションエラーの減少 (ビームスプリッターの動きをなくしたため)	追加部品が必要 (フィルターホイールやスライダーなどが2つ) エミッター間のレジストレーションエラーが残る
5 マルチバンドビームスプリッター、シングルバンド励起、吸収フィルター マルチカメラ	照射、イメージング光路療法にフィルターホイールかスライダー付きの顕微鏡 それぞれのチャンネルを持った吸収フィルターとそのチャンネルに合致したビームスプリッター	方法4の利点に加えて 吸収フィルターのレジストレーションエラーの除去 他のアプリケーション(レシオイメージングなど)が可能	ビームスプリッター、カメラに加えてもっと複雑な機構が必要
6 方法4、5のマルチバンドビームスプリッターをニュートラルビームスプリッターに変更		励起、吸収、どんな組み合わせでも使用可能	輝度が80%程度まで減少するため特殊な光源が必要(レーザー照射など)

マルチプローブアプリケーション用フィルター

複数の色素で染色したサンプルから複数の露光撮影や複数のイメージを取りたい場合、標準的な顕微鏡でそれぞれ別れたフィルターキューブを使用すると、それぞれの撮影でレジストレーションシフトが起こるのは避けられません。吸収フィルターとビームスプリッターのウエッジのバラつき、ビームスプリッター厚さのバラつき、アライメントのずれ、機械的バラつきによって、ブロックを交換すると必ずシフトが起こります。アプリケーションによってはこの影響は大きなものではないですが、殆どの場合フィルターのデザインと光学特性を向上させる必要があります。

表3のリストは、マルチプローブアプリケーション用の観察方法を示しています。ここにはマルチバンドフィルターセット(図28参照)とマルチバンド、シングルバンドフィルターを組み合わせた使用法も紹介されています。これらの方法はいずれも前述のレジストレーションシフトを除去するように設計されています。方法の2は3つまでの光を別々に観察する事が可能で、3から6の方法でもフィルターセットにマルチバンドフィルターを加えれば可能です。このリストは単なるガイドで、すべての可能な方法と組み合わせを述べている訳ではありませんので、注意して下さい。

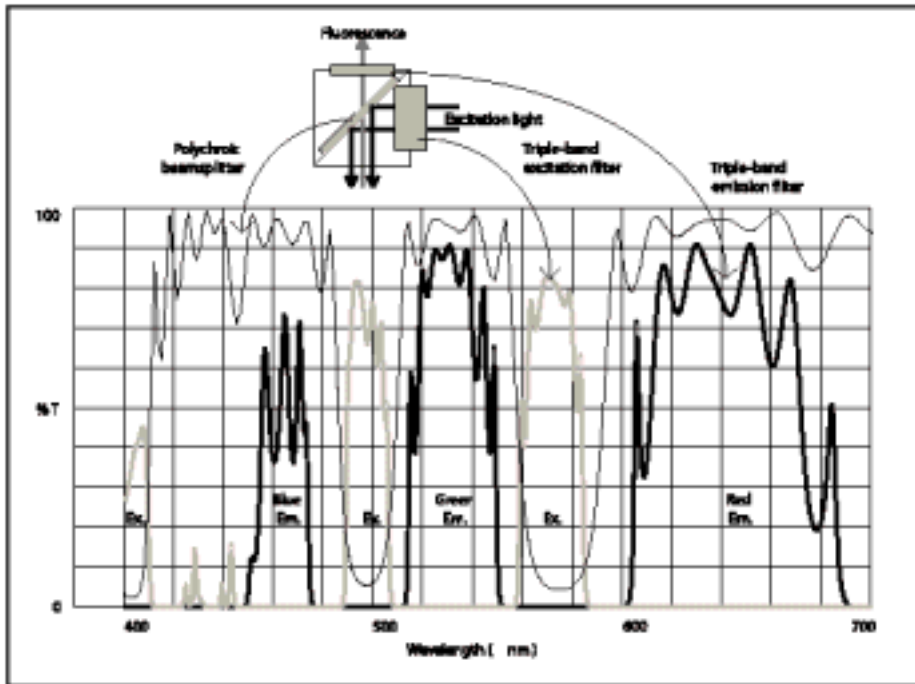


図 28 DAPI、FITC、Texas Red® のために設計されたトリプルバンドフィルターセットのスペクトル (Chroma 社型番 61002)

参考文献

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

Olympus America, Inc.

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

Haugland, R.P. (1992) *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*,

5th ed. Molecular Probes, Eugene, OR.

Inoue, 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, New York.

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.

語彙集

()は参照ページ

Acousto-optical tunable filter (AOTF) 音響光学素子 (p. 12)

結晶に音響振動を与える周波数を与える事で、回折グレーティング効果を得られるアクティブ結晶。周波数を変えることにより、任意の波長への素早いチューニング、透過が得られる。

Angle of incidence (AOI) 入射角 (p. 9, 図 9)

フィルター面に対して垂直な軸とフィルターへ入射する光の光軸間の角度

Angular deviation 角度偏差 (p. 18)

システムにおける、本来の光軸と実際の光の進行方向のずれ。アーク分(1/60 角)やアーク秒(1/60 アーク分)の単位で表す

Aperture diaphragm 開口絞り (p. 19)

照射側光学系に設置された調整可能絞り。照射光の開口数(Numerical aperture)を調整し、明るさをコントロールする

Attenuation level 減衰率 (p. 8, 図 6)

ブロッキングレベルとも言う。光学フィルターの透過範囲外のスペクトル部分でどの程度の減衰が行われているかを表したもの。減衰率は Optical density(光学濃度)の単位でも表す (Optical density 参照)

Autofluorescence 自家蛍光 (p. 2)

蛍光顕微鏡で見られる、蛍光色素以外からの全ての蛍光。サンプル自体の持つ初期蛍光、基板からの蛍光、イマージョンオイルからの蛍光など全てを指す

Average transmission 平均透過率 (p. 8, 図 6A)

光学フィルターの(全体のスペクトルではない)有効透過域の平均値。バンドパスフィルターの場合、透過域の FWHM を指す

Background バックグラウンド (p. 4)

蛍光信号を観察する際に感知される不要な光。初期、バックグラウンドの原因としては、励起と吸収のクロストーク、フィルターのピンホールからの漏れ光、カメラの電気ノイズ、自家蛍光がある

Bandpass バンドパス (p. 8, 図 6)

短波長側にカットオン、長波長側にカットオフを持つ光学フィルター。バンドパスフィルターは中心波長とバンド幅で表す

Bandwidth バンド幅 (p. 8, 図 6A)

FWHM (Full width at half of maximum transmission)。バンドパスフィルターの場合、通常カットオンとカットオフ波長での透過率が最大透過率の 50%になる地点の間を指す。たまに 10%の点を指す場合もある

Barrier filter バリアフィルター

Emission filter 参照

Blocking level ブロッキングレベル

Attenuation level 参照

Blocking range ブロッキング範囲 (p. 8, 図 6B)

定義された減衰レベルを、光学フィルターが保持できる波長範囲

Blocker ブロッカー (p. 11, 図 15)

フィルターの当初のコーティングのブロッキング範囲を広げる為にバンドパス干渉フィルターに組み入れる薄膜干渉コーティング。ブロッカーは、最初のフィルターのバンド幅で高い透過率を持つ広帯域バンドパスフィルター

Brightfield 明視野 (p. 7)

視野が直接照射される照射法。この照射にはコンデンサーレンズを使用する

Center wavelength (CWL) 中心波長 (p. 8, 図 6A)

バンドパスフィルターの場合、最大透過率の 50%になるカットオンとカットオフ波長の算術的平均値

Clear aperture 有効径 (p. 19)

光学フィルターの表面で制限がない部分。干渉フィルターでは金属マウントや不透明な材料によって有効径が制限される

Critical illumination 臨界照明 (p. 22)

光源をサンプル上に結像する照射光学系の1種。ケーラ照明と比較される。Kohler 照明参照

Cross-talk クロストーク (p. 9、図 7)

並べて置いた 2 つのフィルターの (定義された波長域の) 最小減衰率。ビームスプリッターの透過スペクトルが含まれる事もある

Darkfield 暗視野 (p. 7)

対物レンズに直接光を入れずサンプルを斜めに照射する方法の 1 つ。この照射にはコンデンサーレンズを使用する

Dichroic beam splitter ダイクロイックビームスプリッター (p. 5、7 注釈、図 4)

ダイクロイックミラー、ダイクロマティックビームスプリッターとも言う。フィルターキューブに装着する特殊なミラーで、励起フィルターからの光を反射し、蛍光信号を吸収フィルター側に透過する。ダイクロイックビームスプリッターは、波長によって光を分けたり合わせたりする場合に顕微鏡内で使用される

Edge filter エッジフィルター (p. 8)

ショートパスやロングパスフィルターの別名。非常にシャープなカットオン、カットオフを持ったフィルターを指す

Emission filter 吸収フィルター (p. 5、図 4)

バリアフィルターとも言う。励起フィルターからの透過光を全て減衰させ、サンプルからの蛍光光を最大効率で透過させる

Emitter エミッター

Emission filter 参照

Epifluorescence microscope 落射蛍光顕微鏡 (p. 4)

反射光などを使ってサンプルを照射する蛍光顕微鏡

Episcopic illumination 落射照射 (p. 4)

入射型照射。サンプルからの透過光ではなく反射光による照射方法。照射光は、部分反射かダイクロイックのビームスプリッターによって対物レンズを通して反射する

Excitation and emission 励起と吸収 (p. 2)

Fluorescence を参照

Excitation filter 励起フィルター (p. 5, fig. 4)

エキサイターとも言う。色素を効率的に励起するために、照射光の特定の波長のみを透過するフィルター
Emission filter参照

Exciter エキサイター

Excitation filter参照

Extinction coefficient 消散係数 (p. 3)

蛍光色素の吸収特性を表したもの

Fading 褪色

Photobleaching参照

Field diaphragm 視野絞り (p. 19)

照射光学系に位置する調整可能絞りでサンプルへの照射範囲をコントロールする

Filter block フィルターブロック

Filter cube参照

Filter cube フィルターキューブ (p. 5, fig. 4)

着脱可能な六角形のユニットで蛍光フィルターセットを装着する。セットには通常励起フィルター、吸収フィルター、(いつもではないが)ダイクロイックフィルターが入っている。

Filter glass フィルターガラス (p. 10, 13 注釈)

吸収ガラスとも言う。特殊な用途のために製造されるカラーガラスで、蛍光顕微鏡で使用されるもっとも一般的なフィルターガラスは、UV透過の「黒ガラス」フィルター、IR熱吸収フィルター、黄色、オレンジ、赤のシャープカットロングパスフィルター。フィルターガラスは吸収によって光を減衰させるため、効率はガラスの厚さに依存する

Fluorescence 蛍光 (p. 2, 2 注釈)

物体が光を吸収し、吸収したエネルギーの一部を違う色の光、より低いエネルギーと長い波長で放射する分子現象。この過程は励起と吸収として知られている。蛍光は、励起と吸収がナノ秒単位という短い時間で起こる点が、他のルミネッセンスとは大きく異なる

Fluorescent probe 蛍光プローブ (p. 2)

フルオロフォアとも言う。サンプル内のターゲットとする物質のみを染色するために、たんぱく質、抗体、核酸などの物質に働きかけるよう結合された蛍光色素

Fluorochrome (p. 2)

蛍光プローブを作るために、直接サンプルを染色、もしくは活性物質に結合された蛍光色素

Fluorophore フルオロフォア

蛍光プローブ参照

Front surface 前面 (p. 17)

ビームスプリッターの入射光側の面。フィルターキューブでは、光源とサンプル側の面。ビームスプリッターは正しく設置した方がよりよりパフォーマンスを発揮する

FWHM

バンド幅を参照

Half-cone angle 半円錐角 (p. 9)

発散もしくは広がる光線のほとんどの斜光線と光軸間の角

Numerical aperture参照

Heat filter 熱フィルター (p. 6)

赤外放射を減衰させるが、可視光は透過させる光学フィルター。減衰は、フィルターガラスによる吸収や、ホットミラーと呼ばれる薄膜干渉コーティングによる反射、もしくは両方を利用して行う

Hot mirror ホットミラー

Heat filter参照

Indirect fluorescence 間接蛍光 (p. 2)

二次蛍光とも言う。蛍光顕微鏡で蛍光染色やプローブによるサンプルからの蛍光現象

Primary fluorescence参照

Infinity-corrected optics 無限遠補正光学系 (p. 20)

顕微鏡の光学構成の1つ。対物レンズの結像は無限大で、2つ目のチューブレンズ(結像レンズ)は中間映像平面で結像。この中間映像平面は次に接眼レンズで集光される。この構成では、対物レンズとチューブレンズの距離が顕微鏡のイメージ結像特性に影響を与えることなく変えられるため、対物レンズと接眼レンズ間の距離を柔軟に変える事が出来る。無限遠補正光学系に設計された対物レンズは標準の筒長光学系に設計された対物レンズとの置き換えはできないので、注意が必要

Interference filter 干渉フィルター

薄膜干渉コーティング

Kohler illumination ケーラ照明 (p. 19-20, 19 注釈)

照射光学系の1種で、落射型蛍光顕微鏡で使用される。光源の結像がサンプル上で焦点を結ばないのが特徴

Longpass (LP) ロングパス (p. 8, 図6)

有効なスペクトル範囲内で、短波長側を減衰させ、長波長側を透過させる光学フィルター。LPフィルターは最大透過率が50%の地点で表す

Luminance 輝度

Radiance参照

Nanometer (nm) ナノメートル (p. 2)

光の波長を表すのに使用される一般的な単位。

1 nm = 10 angstroms (Å) = 10^{-9} meters 1000 nm = 1 micron (μ) = 10^{-6} meters

Near infrared (NIR) 近赤外 (p. 3, 図2)

電磁波のスペクトル域で、およそ750から2500 nmを指す

Neutral-density (ND) filter 減衰フィルター (p. 6)

フィルターの有効帯域内で、光の量を減衰させる光学フィルター。一般的に金属コートフィルターの方がガラスフィルターよりも広い減衰範囲を持ち、熱にも強い。

Normal incidence 法線入射 (p. 9)

0度入射角

Numerical aperture (NA) 開口数 (p. 7, 19)

顕微鏡において、コンデンサーレンズのNAなど、サンプルに集光される有効な最大錐角。もしくは対物レンズに捉えられる光(対物レンズのNA)。NAが高くなると輝度と像の解像度が高くなる ($NA = N \sin(\theta)$)。

N: サンプル周辺の媒質の屈折率 θ : 光の最大錐角の半角

Optical density (OD) 光学濃度 (p. 8)

透過率の対数関数で $OD = -\log(T)$ T: 透過率 ($0 \leq T \leq 1$)

Parallelism 平行度

Wedge参照

Photobleaching 光褪色 (p. 3)

褪色とも言う。時間経過とともに蛍光強度が弱まる光学反応

Pinholes ピンホール (p. 19)

干渉フィルターのコーティングに見られる小さな亀裂で、通常コーティング時のちりやほこりが原因

Polarization 偏光 (p 6, 10, 21; 図9)

光が伝搬する際の電磁場振動の方向と位相が制限されている状態。これらの振動は伝搬光の進行方向に対して横方向で、軸に対して角度を持たせることが可能。振動の方向と位相が素早くかつランダムに変化する時に、その光は「Unpolarized 無偏光」と呼ばれる。振動が一定の時間以上特定の角度に制限されている場合、その光は「plane-polarized 面偏光」と呼ばれる。光は一部もしくは全部の面偏光が可能。振動の相対位相が一定の期間にわたって、一定の角度の繰り返しで変化する時に、その光は「elliptically polarized 楕円偏光」と呼ばれる。「Circular polarized 円偏光」は振動の増幅が全角において等しい、特殊な場合である。光が楕円に偏光している場合、振動の方向は光の時間軸に対して回転する。

光が面に対して非垂直入射で反射面に入射した場合、入射面に対して並行な電場振動部分(P-plane P面)は入射面に対して垂直な部分(S-plane S面)とは違う動きをする。これが、反射面に直交する偏光効果を引き起こす

Polychroic ポリクロイック 多色性の (p. 23)

ダイクロイックビームスプリッターの名前で、複数の反射バンドと透過域を持つ

P-plane P面

Polarization参照

Primary fluorescence 初期蛍光 (p. 2)

蛍光顕微鏡において、色素からの信号ではなくサンプルそのものの蛍光信号

Autofluorescence参照

Quantum efficiency 量子効率 (p. 3)

吸収された蛍光色素がどの程度効果的に蛍光信号に変換されて放出されるかを計測したもの

Quenching (p. 4)

生体内の本来の場所で蛍光色素の量子効率が減少する化学的行程

Radiance ラジアンズ 放射輝度 (p. 15)

光源のラジOMETリック輝度を計測したもの。ラジアンズは、光源のそれぞれのエリアからの立体角ごとの光放射エネルギー。一般的な単位は $W/sr/m^2$ 。ルミナンス(Luminance)は光度測定など、人間の目で感知する光源の輝度を計ったもので一般的に $1cm^2$ あたりのカンデラで計測する

Registration shift (p. 20)

光学部品を動かした時(取り外し、調整、交換など)にサンプルの見え方がずれること

Scratch/dig スクラッチ/ディグ (p. 19)

光学部品表面で許されるスクラッチとディグの最大の大きさと数字を表したもの。Scratch/dig は 80/50 など表され、それぞれ Scratch: スクラッチ(ひっかき傷)幅は「 μm 」で、dig: ディグ(へこみ)径は $1/10 \mu m$ 。MIL-F-48616 などの厳しい検査基準は守らなくてはならないが、目視によるスクラッチ/ディグの検査でも有用である

Shortpass (SP) ショートパス (p. 8, 図 6)

有効なスペクトル範囲内で、長波長側を減衰させ、短波長側を透過させる光学フィルター。SPフィルターは最大透過率が50%の地点となるカットオフ波長で表す

Signal-to-noise (S/N) 消光比 (p. 14)

バックグラウンドの輝度(the noise)に対する計測したい色素の輝度(the signal)の比較

Slope スロープ (p. 9, 図 8)

フィルターの透過範囲からブロッキング範囲へ移る透過曲線のシャープさを計測したもの

Spectrofluorimeter 蛍光分光光度計 (p. 2)

蛍光物質の励起と吸収を計測する機器

S-plane S面

Polarization参照

Standard tube-length optics (p. 20)

ほとんどの顕微鏡で使用される光学構成で、対物レンズが中間映像平面に結像する。次に、この中間映像平面が接眼レンズによって集光される。対物レンズを保持するノーズピースと接眼レンズを保持するバレル間の距離は通常 160mm で、対物レンズが交換しやすくなっている。Infinity-corrected 参照

Stokes shift ストークシフト (p. 3)

色素のピーク励起強度とピーク吸収強度間の波長のずれ

Substrate 基板 (p. 5)

ビームスプリッターコーティング用光学ガラス基板 (研磨あるなしに関わらず)

Surface flatness 平面度 (p. 18, 図 25)

完璧な面をもった光学部品の表面精度との偏差を計測したもの。可視光(通常 550 ~ 630nm)の波長ゆらぎや重なり方を計測する

TE-mode

S 面偏光とも言う。(Transverse-electric モードの略)。Polarization 参照

Tin-film interference coating 薄膜干渉コーティング (p. 11, 図 13)

光学コーティングの種類で μm 単位の薄膜層を重ねたもの。コーティングに使用される材料に色はないが、薄膜層の間の干渉での反射によって特定の波長を反射し、残りを透過する。薄膜干渉コーティングは干渉フィルターの重要な部分で、1枚以上のコーティングから成っている。コーティングはガラス基板とフィルターガラスの1枚以上の層部分によって形成される

TM-mode

P 面偏光とも言う。(Transverse-magnetic モードの略)。Polarization 参照

Transmitted wavefront distortion(TWD) 透過波面歪み (p. 18, 図 25)

光学部品を透過した光の波面の歪み。可視光(通常 550 ~ 630nm)の波長ゆらぎや重なり方を計測する

Ultraviolet (UV) 紫外線 (P. 3, 図 2)

およそ 100 から 400nm までに波長域の電磁波域。3つの大きな帯域に分別される。

1)近 UV: 320 から 400nm、2)中 UV: 190 から 320nm、3)真空 UV (VUV): 190nm 以下。

UV-A と UV-B という用語は生物学的影響による分け方で、それぞれ 320 から 380nm、280 から 320nm を指す

Wedge ウエッジ (p.18, 図 25)

平行度。完璧な平行度を持っている光学基盤との偏差を計測したもの。通常、arcmin もしくは arcsec で表される

Wide-field 広視野 (p. 19)

共焦点落射蛍光顕微鏡に対して、全ての視野が照射される落射型蛍光顕微鏡。Brightfield 明視野という言葉でも表すこともあるが、Brightfield illumination と混合しやすいので注意が必要