

読者のなかで、蛍光顕微鏡に触ったことがある方は、ほとんどいないと思います。光学の教科書をもて蛍光顕微鏡に関する記述はほとんどありません。しかし、細胞を扱う生物学にとっては顕微鏡というと蛍光顕微鏡のことを指すぐらいメジャーな存在です。蛍光顕微鏡できらきら光る細胞を見ていると、まるでミクロの世界の星空を眺めているような気分になります。細胞が光るといっても、細胞そのものが光っているわけではありません。細胞内に導入された蛍光物質を励起光で励起し、その蛍光物質から生じる蛍光を観察します。「励起」という言葉を聞くとものすごく強い光を当てなければならないと思われがちですが、実際にはそれほど強い光を当てる必要はありません。市販されている5mmの砲弾型のLED程度の明るさで十分観察ができます。

1. 蛍光顕微鏡ってどんなもの？

さて、一般的な蛍光顕微鏡の構成は図1のようになっています。励起用の光源には水銀ランプやキセノンランプが用いられます。ランプから出た白色光はレンズ系を通して顕微鏡に導入され、励起フィルター（干渉フィルター）で蛍光物質を励起する波長域の光のみが選択された後、ダイクロイックミラーで反射され、対物レンズを通して試料に照射されます。試料から発した蛍光は、今度

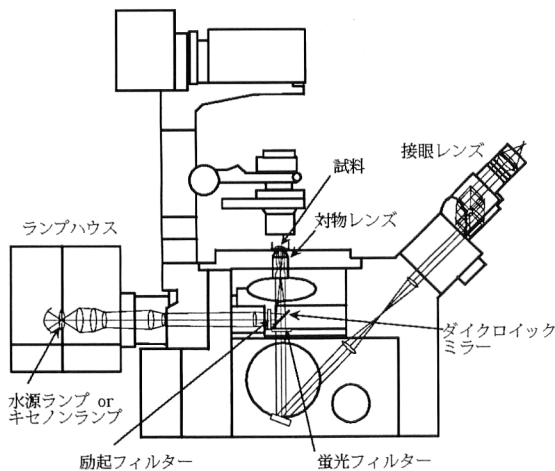


図1 蛍光顕微鏡の構成。

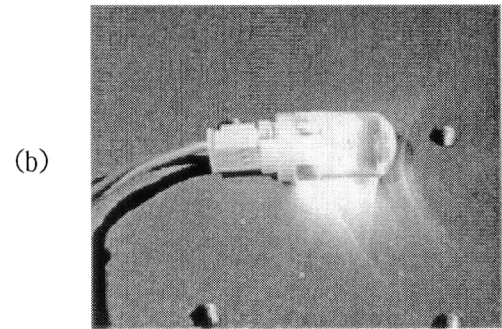
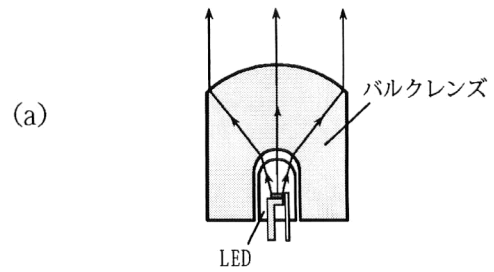


図2 スフィア光源。(a) 構成図および (b) 実物。

は逆に対物レンズ、ダイクロイックミラー、蛍光の波長の光のみを通過させる蛍光フィルターを通った後、接眼レンズを通して目に到達します。

光源に発光ダイオード (LED) を用いる場合には、ランプの位置に LED を配置すればよいのですが、一筋縄にはいきません。LED のまわりのプラスチックモールドが悪さをして、単レンズを用いただけではうまくコリメートできません。また、LED を正面からみると LED チップそのものからくる光と、チップの後方に置かれた反射面からくる光の2つがあるのがわかります。これが曲者で、どこまでいってもこの光路の違う2つの光に起因する変なパターンが残ってしまいます。顕微鏡にとって照明ムラは大敵です。では、どのようにしてコリメートしつつ、照明ムラを低減すればよいのでしょうか。もちろん、複数枚のレンズや非球面レンズ等を用いて最適な設計をすることが考えられますが、せっかく LED という簡易な光源を用いているのに、光学系がガチガチに複雑になってはいただけません。ここで、簡単に使えるアイテムをひとつ紹介します。その名もスフィア光源といい、仙台にあるラボ・スフィアというベンチャー企業が製造販売しています。これは図2に示すように砲弾型のLEDを

バルクレンズ（成型加工したプラスチック）にはめ込むだけの簡単なものなのですが¹⁾、使ってみると大変良好です。1 m 先の壁に向かって照射してもほとんど広がらず、また、変なパターンも生じません。

顕微鏡のランプハウスを取り外し、スフィア光源を置いてだけで細胞の蛍光像を撮ったものが図3です。これは、HeLa 細胞（「ヒーラ細胞」と読む）という癌細胞の細胞質にカメレオン²⁾という蛍光タンパク質を発現させたものです。なお、LEDには白色LED（日亜化学、NSPW500BS）を用い、励起フィルター（干渉フィルター）で470~490 nmの成分の光のみを照射しています。また、蛍光は525~545 nmの蛍光フィルターを使っています。スフィア光源を用いると照明ムラもほとんどなく、また、高効率で光を伝送できるので、LEDは定格電流値20 mAのところを5 mAまで下げ、CCDの露光時間は100 msで撮像しています。

2. 蛍光顕微鏡にLEDを使うメリットは？

さて、蛍光顕微鏡の励起光源にLEDを使うメリットを考えてみます。LEDの利点は、①発熱が少ない、②安定性が高い、③強度調節が容易、④オンオフが瞬時、⑤変調が容易、⑥寿命が長い、などです。蛍光顕微鏡でもこれらの利点が生きてきます。特に、発熱が少ないということが重要です。通常、水銀、あるいはキセノンランプの光は、10%あるいは1%の透過率のND（neutral density）フィルターで減光して観察しています。蛍光物質によってはさらに減光させます。したがって、ランプに投入された電力のうち大部分は熱に変わってしまいます。筆者が属する研究室では、8畳の部屋に4台もの蛍光顕微鏡のセットが所狭しと設置されていますが、すべてのセットを同時に使用することがよくあります。この場合、部屋の温度は30°Cを軽く超えます。細胞にとっては理想的な環境ですが、人にとってはたまったものではありません。実際に真冬でもTシャツ一枚で汗だくになって実験をやっています。さて、人はともかくとして、一番問題となるのは、ランプによって発生した熱が顕微鏡本体に伝

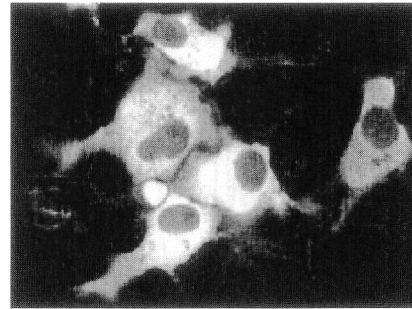


図3 LEDで励起したHeLa細胞。細胞質に蛍光タンパク質カメレオンを発現させた。

わり、顕微鏡の部材が膨張することにより焦点がずれてしまうことです。特に60倍や100倍の高倍率で観察をする場合は、焦点深度が浅い分だけ余計に深刻な問題となります。これを防ぐために、顕微鏡メーカーは非常に苦労しています。これに対してLEDを用いると、発熱は少ないので、このような問題点は解消されます。

また、安定性が高いということも重要です。一般に、水銀ランプ等の強度は数パーセント程度ふらふら変動します。さらに、アークのちらつきもあります。昔は、顕微鏡の観察というと組織や細胞内の器官の形態を観察することが主流でしたが、近年は、細胞の機能の解析に研究の重点が移ってきています。例えば、細胞内のカルシウムイオンの濃度に応じて蛍光強度が変化するような蛍光物質を細胞内に導入し、細胞に薬剤をかけて刺激を加えた場合に、そのイオンの濃度が時間的および空間的にどのように変化していくかということ、蛍光強度の変化を記録することにより測定します。この場合に、光源の強度が時間的に変動してしまうと、最終的に測定したいイオンの濃度の値が不正確なものになってしまいます。このような点でLEDのように安定性が高い光源は蛍光観察にとって理想的なものといえます。

さらに、LEDは電流によって強度が簡単に変えられるだけでなく、パルス駆動にしてデューティー比を変えることによっても強度を調節できるので、もはやNDフィルターは不要となります。

このほか、最近では、マルチカラーイメージング

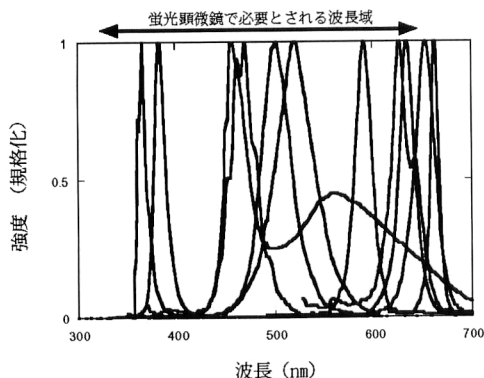


図4 LEDのスペクトル.

といて、単一の蛍光物質だけではなく、複数の蛍光物質を細胞内の異なる場所に導入し、励起波長を切り替えて撮像していくことがよく行われています。励起波長の切り替えは、フィルターホイールといて、励起フィルターを6枚とか10枚とかはめ込んだ円盤を回転させることによって行います。この場合だと、どうしても機械的な動作が必要なので、数百ms程度のタイムラグが生じてしまいます。しかし、LEDでは高速にスイッチングが可能なので、複数のLEDを用いることにより、動きの速い試料や現象でもタイムラグなしで測定ができます。

なお、変調の機能を生かしたイメージングはまだあまり行われていませんが、今後非常に期待されています。

3. 蛍光顕微鏡に必要な波長域とLEDの波長域

さて、蛍光顕微鏡の励起光に必要な波長域はどのくらいかという、おおむね330~650 nmです。これに対して、比較的容易に入手できるLEDのスペクトルを図4に示します。可視域は5 mmの砲弾型のデータです。また、紫外域のLEDは100 mWクラスのを示しています。これをみると蛍光顕微鏡に必要な波長域はほとんどカバーできていますが、400 nm前半と350 nm以下の紫外域がありません。先日、日亜化学のLED開発担当の方

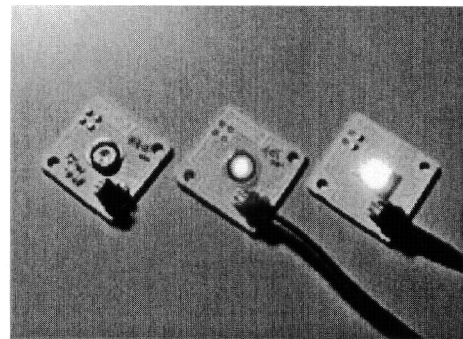


図5 高出力LED (左から365 nm, 405 nm, 白色. いずれも100 mW, 日亜化学提供).

と話す機会があり、405 nmの半導体レーザーがあるのに、なんで400 nm付近のLEDがないのかという質問をしてみたところ、物はとっくにできているが、市場がまだないとのこと。早速、お願いをして405 nmの100 mWクラスの高出力LEDを送っていただきました(図5)。これで、可視光の波長域はほとんどカバーできます。あとは、紫外の340 nmあたりのLEDが利用可能になれば、Fura-2(「フラ・ツー」と読む)という最もメジャーな蛍光色素が使えるので蛍光顕微鏡の光源としては文句なしです。しかし、現在のところまだ研究レベルでは発光が確認されていますが³⁾、実用レベルで使えるにはもう少し時間がかかりそうです。今後の展開が楽しみです。

この記事に関するお問い合わせは kato@optsun.riken.go.jp もしくは ura@dj.kit.ac.jp までお寄せください。

(理化学研究所脳科学総合研究センター 深野 天)

文 献

- 1) 特開 2001-44515.
- 2) 宮脇敦史編：実験医学別冊 ポストゲノム時代の実験講座③ GFPとバイオイメージング 蛍光タンパク質の発現と検出の基本から生体機能の可視化まで(羊土社, 2000).
- 3) 平山秀樹, 木下敦寛, 青柳克信：“InAlGaN 四元混晶を用いた300 nm帯紫外高輝度LEDの開発”, 応用物理, 71 (2002) 204-208.