

共焦点顕微鏡の歴史は古く、Marvin Minsky による 1957 年出願の米国特許にまで遡ります<sup>1-3)</sup>。現在では各社からさまざまな製品が出されており、工業系試料の計測や生物標本の蛍光測定をはじめ幅広いアプリケーションで活用されています。本稿では共焦点顕微鏡の原理とその発展について説明します。

### 1. 共焦点顕微鏡の原理

共焦点顕微鏡の原理を図 1 を用いて説明します。ランプの照明光をピンホールにより点光源とし、試料を照射します（レーザーを用いる場合もあります）。焦点面と光学的に共役な位置（共焦点面）にピンホールを配置すると、焦点面からの戻り光は検出器に到達しますが、非焦点面からの戻り光はほとんど到達することができません。共焦点顕微鏡では、この共焦点効果と呼ばれる作用により、焦点面の上下からの光も検出器に到達する一般の顕微鏡と比べると、特に光軸方向の分解能が大幅に向上します。

この特徴により高解像、高コントラストの顕微鏡画像を得ることができます。

### 2. 共焦点光学系（顕微鏡）の発展

前節で説明したように、共焦点顕微鏡には大きな利点がありますが、基本的な構成では点照明なので試料全面を同時に観察することができず、観察に時間がかかるという不利な面もあります。これを解決

するためにさまざまな工夫がなされ、発展を遂げられました。顕微鏡に限らず共焦点を用いた光学系におけるそれらの実例について紹介していきます。

#### 2.1 共焦点光学系の高速化

##### ○ライン照明

図 2 に示す光学系では、ビームシェーパーによりレーザーを長方形断面形状に変換して標本をライン照明して、戻り光に対する共焦点ピンホールとしてスリットを用いています（カール ツァイス LSM5 LIVE<sup>4)</sup>。これにより 1 方向の走査を省略でき、毎秒 120 フレーム（512×512 画素）の高速走査を実現しています。この機能は生物・医学分野での動的観察に威力を発揮するものと考えられます。

##### ○ニポウディスク（マルチピンホールディスク）

高速化の手法としては、多数のピンホールが渦巻状に配置されたニポウディスク（マルチピンホールディスクの一種）を用いる方法もあります。ニポウディスクを照明することで同時に多数のビームが射出され、ディスクを回転させることにより観察領域全体をスキャンします。この機構により最大 1000 フレーム/秒という超高速走査を実現しているものもあります（横河電機 CSU シリーズ<sup>5)</sup>。

##### ○非走査マルチビーム共焦点法

図 4 に示した非走査マルチビーム共焦点法と呼ばれる光学系では、ハロゲン光源でマルチピンホールアレイを同時照明することで面内方向の走査を不要とし、光路中に挿入する平行平板の厚さを変えることにより光軸方向の走査を行っています（高岳製作

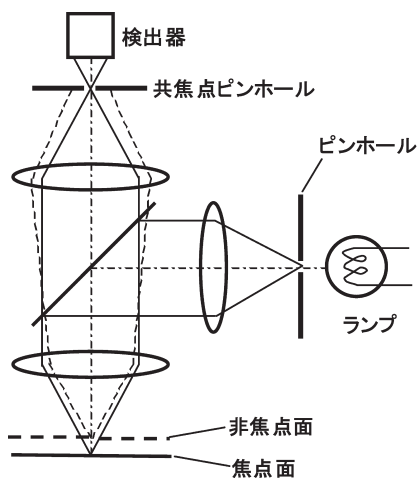


図1 共焦点顕微鏡の原理。

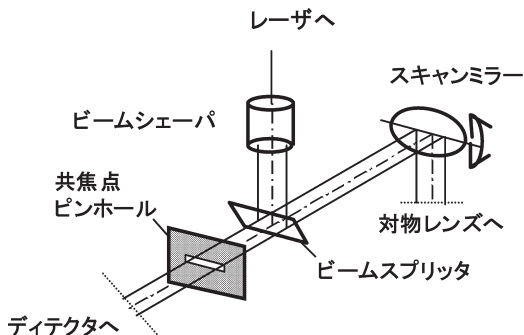


図2 ライン照明光学系の概念図。

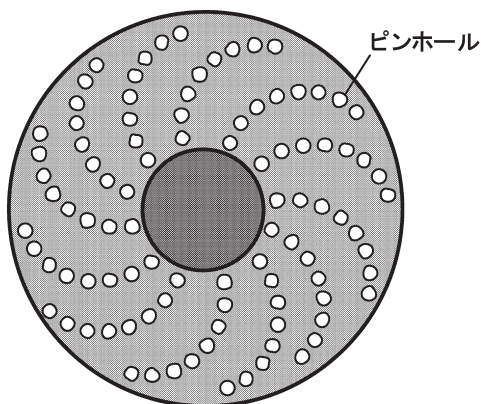


図3 ニポウディスクの概念図。

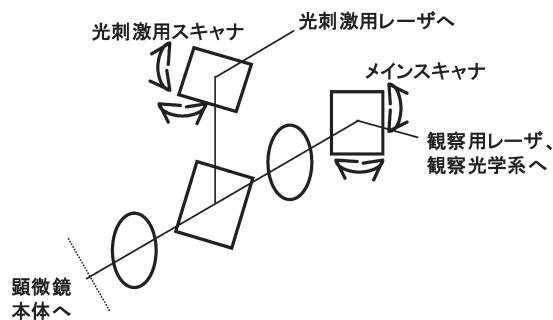


図5 ツインスキャナーシステムの概念図。

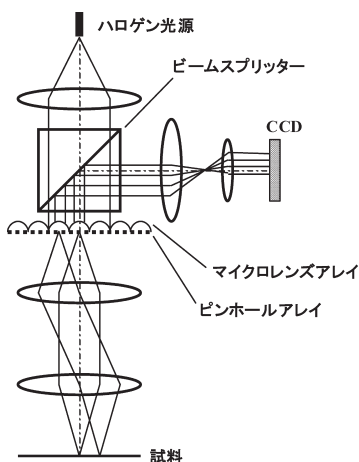


図4 非走査マルチビーム共焦点法の概念図。

所 NCS-5000)<sup>6,7)</sup>。これにより面内方向の走査の高速化だけでなく、光軸方向の走査の高速化も実現しています。その結果、面内方向 6 mm×6 mm、光軸方向 0.2 mm の範囲を 0.2 秒という非常に短時間で三次元計測が可能になっています。

## 2.2 共焦点光学系の多機能化

### ○ ツインスキャナーシステム

観察用のメインスキャナーとは別に光刺激用のスキャナーを搭載したツインスキャナーシステムを採用することにより、観察とは独立して標本に光刺激を与えることができます (オリンパス FV-1000)<sup>8)</sup>。この機能は FRAP (fluorescence recovery after

photobleaching: 光退色後の蛍光強度回復) や FLIP (fluorescence loss during photobleaching: 光退色による蛍光強度損失) をはじめとする各種の生物アプリケーションへの応用が可能です。

共焦点顕微鏡の原理とその発展について簡単に説明しました。さらに詳しくは各ウェブサイトをご参照ください。また、本稿では言及できませんでしたが、分光測定機能についても活発な開発がなされており、めざましい進歩をみせています。このように共焦点顕微鏡は現在も進化を続けており、今後の進展が目される技術です。

この記事についてのお問い合わせは、光科学及び光技術調査委員会の門野までお願いいたします。

## 文 献

- 1) 藤田哲也監修, 河田 聡編: 新しい光学顕微鏡1 レーザ顕微鏡の理論と実際 (学際企画, 1995).
- 2) 藤田哲也監修, 石川春律・高松哲郎編: 新しい光学顕微鏡2 共焦点レーザー顕微鏡の医学・生物学への応用 (学際企画, 1995).  
以上は共焦点顕微鏡全般の参考文献として.
- 3) M. Minsky: US patent No. 3013467.
- 4) カール ツァイス, <http://www.zeiss.co.jp/C125694A004AE3CB/Contents-Frame/70A9681E9ED6F3A749256C3F000F6601>
- 5) 横河電機, <http://www.yokogawa.co.jp/SCANNER/genri2.html>
- 6) 高岳製作所, <http://www.takaoka.co.jp/product/ele/sanjigenkekan.html>
- 7) 日本電機工業会, <http://www.jema-net.or.jp/Japanese/denki/2004/de-0407/p35-36.pdf>
- 8) オリンパス, [http://www.olympus.co.jp/jp/lisg/bio-micro/product/fv1000/fv1000\\_sf01.cfm](http://www.olympus.co.jp/jp/lisg/bio-micro/product/fv1000/fv1000_sf01.cfm)