

■ 光学工房

ガルバノミラーの位置はどこ？

顕微鏡の視野絞りと開口絞り

筆者は仕事柄、生物学者と話す機会が多いのですが、「レーザー顕微鏡において、ガルバノミラーはどこに配置されているのか？」という質問をよく受けます。

よくよく考えると、顕微鏡において対物レンズでレーザー光を絞って、サンプルの任意の場所に照射するという応用はきわめて多いと感じます。例えば、光学分野では、レーザー顕微鏡以外にレーザー光トラッピング、マイクロ光造型など、また、生物分野では、UV 光照射により局所的に特定のイオン等を解離させる caged 解除法、レーザー光で活性酸素を発生させ局所的な機能を潰す CALI 法、蛍光物質の色を変化させるフォトコンバージョン法などがそのよい具体例です。

上の問いに対する答えを説明するときに、光学の人にとっては、光源側から出発して下流に向かって説明するのが一般的ですが、生物の人には、リレーという概念に馴染みがないせいか、どうもこの順番では理解できないことが多いようです。そのためいつも、サンプル側から光源に向かって上流へと図を描きながら説明していくと、光学の知識がさほどなくてもおおむね理解していただけるようです。今回は、この順序で作図をしながらガルバノミラーの位置を明らかにし、顕微鏡でキーとなる光学素子の位置を統一的に理解しようと思います。

1. レーザースポットを形成するには？

対物レンズの（前側）焦点面にレーザースポットを形成するには、平行光を対物レンズの後ろ側から入射させればよいことは自明かと思います（図1 (a)）。この平行光を傾ければ、スポットの位置を光軸からずらすことができますが、さて、傾けるときにどの位置を回転中心にすべきかを考えます。一見したところどこを回転中心にしてもよさそうに思いますが、対物レンズの後側焦点位置を回転中心にするのがよさそうです。なぜなら、顕微鏡の場合は

この位置が光線のけられが一番最小になるからです。したがってこの位置にガルバノミラーを置けばよいのですが、一般に対物レンズの後側焦点位置は対物レンズの内部にあるので、この位置には置くことができません。そこで、この位置を別の場所にリレーする、すなわち平行光を傾ける回転中心を別の場所に移動させるような光学系を考えます。

2. 回転中心をリレーする

まず、対物レンズと同じ焦点距離をもつ別のレンズ1を加え、図1 (b) のように対物レンズの後側焦点位置とレンズ1の焦点位置とが一致するように配置します。この図においてAを中心に180度回転させると、光線を含めて対物レンズとレンズ1とが重なるので、点aからの光は点a'に、点bからの光は点b'にそれぞれ集光することが直感的に理解できます。

さらに、このレンズ1と同種のレンズ2を追加し

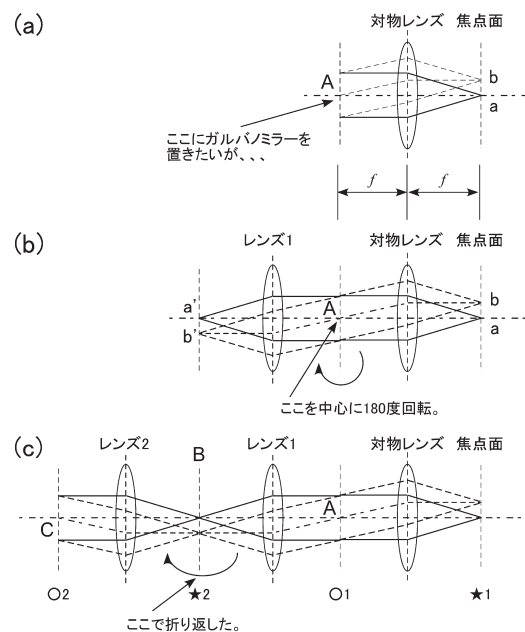


図1 レーザースポットの形成とガルバノミラーの位置。

ます (図1 (c)). このときもレンズ1の焦点位置とレンズ2の焦点位置とが一致するように配置します。こうするとそれぞれの光線はどうなるでしょうか。レンズ1とレンズ2はちょうどBを境に折り返しているだけなので、Aを通った異なる角度の平行光は、再びCに集まってくるのがわかります。このようにして、本来ガルバノミラーを置きたい位置Aを別の位置Cにリレーさせることができました。このように説明していくと、光学に不慣れた人にも図形の対称性だけでリレーの光学系を理解してもらえます。なお、上の説明では簡単のためすべてのレンズの焦点距離は同じとしましたが、実際の光学系ではそれぞれのレンズの焦点距離は異なりますが、本質的には同じです。

3. ガルバノミラーを液晶SLMに換えたら？

さて、図1 (c)のレンズ1とレンズ2のペアを見て気が付いた方もいると思いますが、このレンズペアはいわゆる4fの光学系です。4fの光学系といえば、真っ先に思い浮かぶのが空間周波数フィルタリングです。周期構造物体の周波数成分をフーリエ面に展開して、各周波数成分に変化させた後に再合成するというものです。

では、顕微鏡の光学系でガルバノミラーの代わりに周期構造をもつ二次元的な回折格子を用いたらどうなるでしょうか。回折格子を用いると、C点を中心に離散的な角度で回折した回折光は、サンプル上では複数のスポットを形成します。さらに、回折格子に代えて液晶を用いた位相変調型の空間光変調器(SLM)を用いて、複数のスポットを動的に変化できるようにしたものが、マルチスポットの光トラップです¹⁾。最近では、200本ものビームでトラップできる装置も市販されています²⁾。光学的な位置は、液晶SLMもガルバノミラーと全く同じということになります。

表1 FSにあるもの、ASにあるもの。

FS	AS
クリティカル照明のときの アーク or フィラメント	ケーラー照明のときのアー ク or フィラメント
共焦点ピンホール	ガルバノミラー
ニボウディスク	音響光学素子 ³⁾
空間光変調器 (DMD) ⁴⁾	空間光変調器 (液晶) ¹⁾
CCDカメラの撮像面	位相差リング, 位相板
眼の網膜	(微分干渉プリズム)

4. FS vs AS

顕微鏡の本には必ず、視野絞り (field stop; FS) と開口絞り (aperture stop; AS) という言葉が出てきます。手元にある本を見ると「視野絞りは、観察している実視野だけに照明光が当たるようにするための調整機構であり、開口絞りは、照明光の入射角を観察に適した値に合わせるための調整機構である」というように機能について書かれていますが、それぞれの位置がどこかは明確には書かれていません。筆者は「FSの位置とは、対物レンズの前側焦点 (すなわちサンプル) の位置およびそれと共役な位置」「ASの位置とは、対物レンズの後側焦点位置およびその共役位置」として理解していますが、実用上はこれで十分だと思います。具体的に示すと、図1では、★がFS位置 (およびその共役位置)、○はAS位置 (およびその共役位置) です。

このような立場からみると、ガルバノミラーはAS位置 (○2) に配置すべきということになります。また、別の見方をすれば、一度FSの位置 (★2) にスポットを形成させ、それを、レンズ1と対物レンズによって、サンプル上 (★1) にリレーさせるといった見方もできます。

顕微鏡に関する論文を読んでいると、その光学系を実現するにあたって最も重要な光学素子は、FSかASのいずれかの位置に配置されていることに気がつきます。思いつくままに、FSにあるもの、ASにあるものを表1にまとめてみました。機能面からみると、光軸に垂直な位置をサンプル面内の位置に

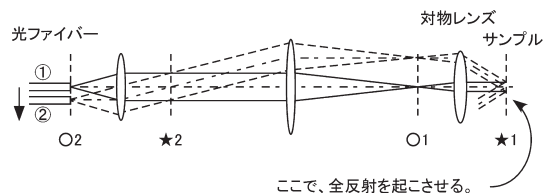


図2 対物レンズを用いた全反射照明の光学系。

変換するものがFS、傾きをサンプル面内の位置に変換するものがASにあるということになります。

5. エバネセント照明の光学系は

最後に、生物でよく用いられている全反射（エバネセント）照明の光学系を紹介し、この場合のFS、AS位置を確認しておきます。光学の分野では、エバネセント光というプリズムや光導波路を用いて発生させる場合が多いですが、生物の分野ではこれ以外に、非常に高い開口数の対物レンズの内壁ぎりぎりにレーザー光を通し、カバーガラスと溶液との界面でエバネセント光を発生させ、細胞の底面を局所的に励起して蛍光を観察したりします⁵⁾。図2に光学系の一例を示します。この図においても★がFSで、○がASを表します。光ファイバーの出射端はASの位置（○2）にあり、出射したレーザー光をリレーさせて対物レンズの後側焦点（○1）に一度集光させると、対物レンズを出た光はサンプル上（★1）では平行光となります。光ファイバーの出射端を光軸上（①）から外側（②）へとずらして

いくと、対物レンズを出た平行光は次第に傾き、その後、臨界角を超えて全反射を起こし、エバネセント照明が実現できます。この場合はASでの横のずれをFSでの傾きに変換しているため、先ほど（図1(c)）とは役割が逆転していることになります。

このように、顕微鏡の光学系は、どこがFSかASの位置なのかを常に意識しているととても理解しやすくなります。

この記事に関する問い合わせは、tenchan@brain.riken.jp までお願いいたします。

（理化学研究所脳科学総合研究センター 深野 天）

文 献

- 1) J. E. Curtis, B. A. Koss and D. G. Grier: "Dynamic holographic optical tweezers," *Opt. Comm.*, **207** (2002) 169-175.
- 2) <http://www.arrayx.com/index.html>
- 3) S. Shoham, D. H. O'Connor, D. V. Sarkisov and S. S-H. Wang: "Rapid neurotransmitter uncaging in spatially defined patterns," *Nat. Methods*, **2** (2005) 837-843.
- 4) T. Fukano and A. Miyawaki: "Whole-field fluorescence microscope with digital micromirror device: Imaging of biological samples," *Appl. Opt.*, **42** (2003) 4119-4124.
- 5) M. Tokunaga, K. Kitamura, K. Saito, A. H. Iwane and T. Yanagida: "Single molecule imaging of fluorophores and enzymatic reactions achieved by objective-type total internal reflection fluorescence microscopy," *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **235** (1997) 47-53.