

蛍光，偏光，顕微鏡

慶應大・理工・物理 木下一彦

(1) 蛍光とフィルター

蛍光光度計でも蛍光顕微鏡でも，蛍光測定が上手にできるかどうかはフィルターの使い方で決まります。

「えっ，フィルターって何のこと？」という学生諸君は，是非お読みください。

蛍光測定の命は，見たいものだけを見ること，すなわち邪魔な励起光をシャットアウトして，目的とする蛍光色素からの蛍光だけを見ること．これを完璧に実現すれば，蛍光色素1分子（を付けた蛋白質分子1個）が動きまわる様子を顕微鏡で見ることが可能です。でも，市販の蛍光顕微鏡をそのまま覗いたら，蛍光試料がなくてもほっと光って見えます。励起光の一部が通り抜けてきてしまうのです。1分子どころか，細胞の見えもイマイチです。

励起光と蛍光（一般に蛍光のほうが長波長）を分離するために，蛍光光度計には分光器が，蛍光顕微鏡にはダイクロイックミラーとフィルターがセットされています。しかしいずれも不完全で，目的とする波長以外の光も必ず通します。そこで必要に応じ，図1のような長波長カットフィルターを励起側に，短波長カットフィルターを蛍光側に足して，よけいな光が通り抜けないようにします。フィルターをたくさん揃えて使いこなせるようになったら，もうベテランです。

① 励起フィルターが肝心。多くの光源は長波長側のほうが明るく，この光が漏れてくることが多いです。

② とくに顕微鏡用は，近赤外光に感度があるビデオカメラが多いのでしっかり近赤外までカット。必要なら光源直後に⑦の熱線カットフィルターなどを。

③ 図1はChroma Technology*製のフィルターセットの例で，少なくとも透過曲線に関するかぎり最高級品。励起，蛍光の2枚を重ねると透過率は 10^{-12} 以下。しかも透過帯の間隔が分離波長（図では約555nm）の40分の1くらいで，これ以下はまず望めません。

④ 図1のような対数表示データ（近赤外領域まで）をもらっておくこと。

⑤ Chromaは標準品程度の値段（数万円から）で特注可能。分離波長の指定が難しいが，蛍光顕微鏡用なら，励起効率を犠牲にしても蛍光側をできるだけ短波長から立上げて巾広くとるのがおすすめ。

⑥ ただし励起スペクトル，蛍光スペクトルは条件により変化するから注意。Ca²⁺プローブのindo-1など，細胞内では水中とずいぶん違います。

⑦ 日本製フィルターでは朝日分光**が高性能。カラーレスという名の熱線カットフィルターをはじめ広帯域で立ち上がり急峻なものをおすすめ。特注も安くなったそうです。

⑧ 短波長カットフィルター，とくに蛍光光度計用なら富士フィルムのプラスチックフィルターが千円以下でガラスフィルターより性能がよい（写真屋さん有り）。両側にガラスを接着して反射防止膜を付けるのも可。

⑨ 透過帯の幅の狭い（20nmとか）フィルターが必要になることは滅多にありません。なるべく透過帯が広く裾切れのよいものを揃えましょう。必要なら2種重ねます。

⑩ 同じフィルターを2枚重ねれば，透過帯の裾切れはよくなります。

(2) フィルターホルダー

市販の蛍光顕微鏡には追加フィルターの置き場所がほとんどありません。とくに励起側には，光源側から

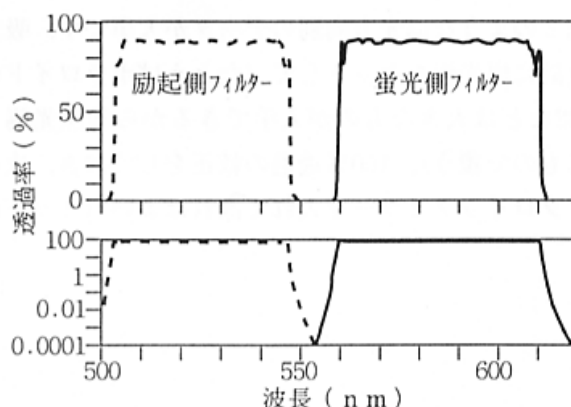


図1. 蛍光顕微鏡用フィルターセットの例（テトラメチルローダン用の特注品）。蛍光側の透過率が610nmから再び落ちるのは，多層コーティングにより560nmの立ち上がりを急峻にすることを主目的としたため。

* FAX : (USA 1)-802-257-9400

** TEL : 03-3909-1151

順に熱線カットフィルター、ニュートラルデンシティーフィルター（光量調整）、長波長カットフィルターと、5、6枚は入れられる余裕がほしいのです。私たちは、顕微鏡本体と水銀ランプの間に、円筒を2つに割った形のフィルター受けを組み込みました。小さなフィルターは円形枠に入れて大きさをそろえています。干渉フィルターは斜めに置くと透過波長がずれるので注意。ついでに電子シャッター（コバル製、電池で駆動）も取り付け、重宝しています。

(3) ダイクロイックミラー

図2に、蛍光顕微鏡用のダイクロイックミラーの透過曲線の例を示します。100%から引いた残りが反射率です。入射光の偏光方向により透過曲線（反射曲線）が大きくずれることをよく憶えておいてください。

このために、ダイクロイックミラーの波長分離能には限界があります。励起光を観察側に通さないという目的に対しては、補助的な役割しか果たさないと認識してください。大事なのは、ここで蛍光が減りすぎないようにすること。(1)⑤に通じますが、励起光の反射率は必ずしも100%をねらわなくてよいと思います。しかし、以下の問題もあるのです。

水銀ランプには、546nmをはじめとして強い輝線が何本かありますが、ダイクロイックミラーの分離帯（図2では550~565nm）が輝線にかかると、図からわかるように励起光が偏光してしまうのです。細胞膜中などで蛍光色素が配向していると、ある向きの膜が直角方向を向いた膜より明るく見えたりします。

というわけで、ダイクロイックミラーも目的により使い分けが必要です。Chroma、朝日分光、シグマ光機***など特注可。同じものをたくさん特注すると（グループ買い）はるかに安くなる場所もあります。

図2のような偏光方向別のデータが大事です。吸光度計に偏光板をセットして（たとえばポラロイドのHN32などは大きなものが入手できるから参照光側も同じもので覆う）、100%透過の較正をしておき、次にダイクロイックミラーを入れて測ればよい（ミラーは

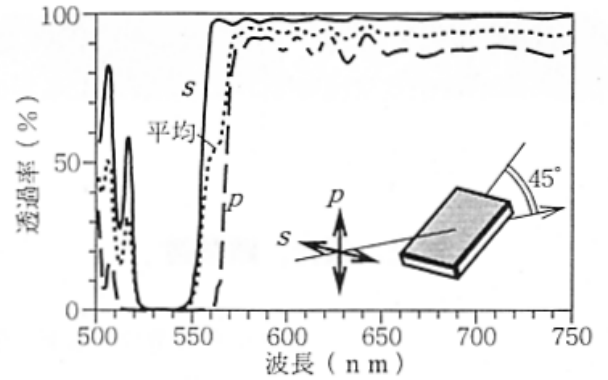


図2. ダイクロイックミラーの偏光方向 (p, s) 別特性. 図1のフィルターと組み合わせ、水銀ランプの546nmの輝線による励起に用いる。シグマ光機特注品。

45度傾けないと駄目ですよ)。(1)④と違い、対数目盛の必要はありません。偏光板は使用波長域が限られているので、あらかじめ2枚を直角させて透過率0を確かめておくこと。

(4) 偏光をなくす

きちんとした偏光測定をするには、測定用の偏光子以外の部分は全く偏光に影響を与えないことが望ましいのですが、蛍光顕微鏡の光路は無偏光系とはいえません（共焦点顕微鏡は特に注意）。ダイクロイックミラーは最悪で、フィルターの組み合わせで図2の分離帯部分を避けるしか手がありません。

励起光のわずかな偏光をなくすには、スライドガラス（またはカバーガラス）を1~数枚、斜めにして光路に入れるのが簡単です（スペースがなければ(2)に述べたフィルター受けを使用）。ガラス表面でのわずかな反射によるロスが偏光方向に依存するのを利用するのは、対物レンズをはずして偏光板を置き、パワーメーターを見ながら偏光板を回して光量が変わらなければよい。メーター自身に偏光特性があり得るので、偏光板と一緒に回すのがこつです。

この方法は、安価で波長依存性が極端に大きくないのが特徴。