

全反射蛍光顕微鏡(TIRFM)は、ガラス基板近傍の試料のみに届くエバネッセント場を局所的な励起光として用いる光学顕微鏡です.エバネッセント場を利用して背景光を大幅に低減することで、水中、室温で蛍光色素1分子をリアルタイムイメージングすることができます.本稿では、TIRFMの基本原理と装置の構築法を解説します.

まえがき:界面における光の全反射とエバネッセント場の形成

全反射蛍光顕微鏡(Total Internal Reflection Fluorescence Microscope: TIRFM)は、光の全反射で生じるエバ ネッセント場で観察試料を励起します¹⁾.まず、屈折率の高い 媒質から低い媒質に向け光を入射するケースを考えてみましょ う(図1).このとき、入射角がある角度以上(臨界角)にな ると光は両媒質の界面で全反射します.両媒質の屈折率を $n_1, n_2(n_1 > n_2)$ とすると臨界角 θ_c は式(1)で表されます.

$$\sin\theta_{\rm c} = n_2/n_1 \tag{1}$$

これは、スネルの法則で低屈折媒質側の屈折角が 90°で あるのに相当します. 生体試料を観察対象とした全反射照明 蛍光顕微鏡では、屈折率の高い媒質にはホウケイ酸ガラス (BK7、 n_1 =1.52、ただし光の波長により若干変化します)、 低い媒質には水 (n_2 =1.33)が用いられることがほとんどで、 ガラスと水の界面の臨界角は 61.0°となります.

高屈折率側から入射された光が界面で全反射する際,界 面の低屈折率側の表面に「しみ出す」光をエバネッセント場 と呼びます²⁾. エバネッセント場は遠距離には伝播できず,その強度*I*は界面から離れるに従い指数関数的に減衰します.

$$I = I_0 \exp(-z/d) \tag{2}$$

式(2)の *I*₀は界面におけるエバネッセント場の強度, *z*は界 面からの距離, *d*はエバネッセント場の「しみ出しの深さ(侵 入長)」です. *d*は媒質の屈折率,光の波長 *λ*,および入射



図1 ガラス(屈折率 1.52)と水(屈折率 1.33)の界面にガラス側から入射した光の全反射によるエバネッセント場の形成. エバネッセント場の侵入長 *d*は 100 nm 程度である.



図2 TIRFM を構築する2つの方式.(a) ブリズム型,(b) 対物レンズ型.対物レンズ型では、高い開口数(NA=1.4以上)をもつ対物レンズの辺縁部(>w_o)からレーザー光を入射する.

角 θ (ただし $\theta > \theta_c$) によって決まります (式(3)).

$$d = \lambda / 4\pi \sqrt{(n_1 \sin \theta)^2 - n_2^2} \tag{3}$$

例えば入射光の波長を 532 nm (2 倍波 YAG レーザー), 入射角を 66° とすると、ガラスと水の界面で発生するエバネッ セント場の水側への侵入長は d=106 nm となります.また, 入射角 θ の最大値は 90° ($\sin(90^\circ)=1$) なので、エバネッセ ント場の侵入長の最小値 d_{\min} は式(4) で表され、波長 532 nm、 $n_1=1.52$ (ガラス)、 $n_2=1.33$ (水) では $d_{\min}=58$ nm となります.

$$d_{\min} = \lambda / 4\pi \sqrt{n_1^2 - n_2^2}$$
 (4)

エバネッセント場を形成させる方法:プリズム型と 対物レンズ型

光の全反射で形成されたエバネッセント場を用いると、ガラ ス表面から 100 nm 程度の距離に存在する蛍光色素を選択的 に励起することができます.光学顕微鏡上でエバネッセント場 を形成させ照明光に用いる方法には、プリズム型と対物レンズ 型の2種類があります(図2).プリズム型,対物レンズ型と もに多くの場合,励起光には平行性の高いレーザー光が用い られます.

プリズム型では、試料を観察するためのプレパラート(フ ローセル)のスライドガラス側に密着させたプリズムにレー ザー光を入射し、スライドガラスと試料水溶液の界面で全反 射させてエバネッセント場を形成します(図 2(**a**))¹⁾. プリズ ム型では、入射光のビーム径を大きくすれば大きな面積のエ バネッセント場を形成することができます.また、低い開口数 (NA)の低倍率の対物レンズが利用できます.これらの理由 からプリズム型では、直径が数百 µm 以上の広い視野も観察 可能という利点をもちます.一方、対物レンズが接するカバー ガラスとは反対側のスライドガラス面上にエバネッセント場を形 成するため、観察には試料の厚みを数十 µm 程度に非常に 薄くするか、作動距離が長い対物レンズを使用する必要があ ります.

プリズム型のこのような欠点を解決する方法として、最近は 対物レンズ型が頻繁に使用されています(図2(b))³⁾.対物 レンズ型では、高い NA をもつ油浸対物レンズ(NA=1.4 以 上、最近は1.49 のものが主流です)の辺縁部からレーザー 光を入射し、カバーガラスと試料の界面にエバネッセント場を 形成させます.高い NA の対物レンズは高倍率(60倍以上) であり、さらに形成できるエバネッセント場の面積も限られるた め(後述)、一般的に観察できる視野は直径100 µm 以下に 限定されます.対物レンズ型では広い視野の観察は難しくなり ますが、光学顕微鏡(我々はオリンパス(株)社製の倒立型顕 微鏡を利用)の落射照明用ポートからレーザー光を導入する だけで構築が可能となります.また試料の上部があくので、 試料への薬剤の添加や溶液交換などが容易になるという利点 もあります.

3. 対物レンズ型 TIRFM の構築

対物レンズの NA は、焦点位置にある点光源から発せられ



図3 対物レンズ型 TIRFM の構築例. ND: 減光フィルタ、BE: ビームエキスパンダ、FS: 視野絞り、L₁: レンズ、M₁: ミラー、DM: ダイクロイックミラー、BF: バリアフィルタ、L₂: 顕微鏡の鏡筒レンズ (オリンパス社の顕微鏡では f_2 =180 mm). (a)L₁の手前の試料面と共役な位置に M₁ を置き角度をあおる方法. 各光学部品は、L₁の焦点距離 f_1 との間で f_1 =a+b=c が成り立つように配置する (図中の a+b と c の縮尺は異なる点に注意されたい). (b)L₁の後に M₁ を置いて平行移動する方法. M₁の平行移動により光路長が変化する (Δx) 点に注意が必要. 各光学部品は、L₁の焦点距離 f_1 との間で f_1 =a+b+c+ Δx が成り立つように配置する. (c) (a)の方式の構築例. L₁ として焦点距離 450 mm のレンズを利用 (f_1 =450 mm). 定盤のねじ穴の間隔は 25 mm.

る光をどのくらい広い角度まで集められるかの尺度であり、式 (5)で定義されます.

 $NA = n_1 \sin \theta_{NA} \tag{5}$

ここで θ_{NA} は対物レンズが光を集めうる最大の角度であり, n_1 はガラス(油浸オイル)の屈折率 1.52 となります(図 2 (b)).よって例えば,NA=1.49の対物レンズの θ_{NA} は 78.6° となります.また,前述したガラスと水の界面の臨界角 61.0° はNA=1.33(1.52×sin(61.0°))に相当します.対物レンズ 型 TIRFM の構築には,この臨界角以上の領域に相当する対物レンズの辺縁部にレーザー光を入射する必要があります.

対物レンズ型 TIRFM の光学系の模式図を図3 に示しま す.励起光に用いるシングルモードレーザーの強度分布はガ ウス関数で近似され、中心部と辺縁部で強度が大きく異なり ます. この強度分布を緩和して均一に近づけるため,ビーム エキスパンダ (BE) でビーム径を広げて視野絞り (Field Stop: FS) で中心部のみを用います.また,対物レンズから 出射されたレーザー光を平行光にしてガラスと試料界面への 入射角を一定にするため,レンズ (L₁)を用いて対物レンズ の後焦点面にあらかじめ集光させます.レーザー光の入射角 の調整は,L₁の手前の試料面と共役な位置にミラー (M₁) を置きその角度をあおる方法 (図 3(**a**)),またはL₁の後に M₁を置き平行移動させる方法 (図 3(**b**))の2種類が一般 的です.図 3(**c**)は前者 (図 3(**a**))の方法の構築例となりま す.なお,後者 (図 3(b))の方法では、ミラーの平行移動 によって光路長が変化するので注意が必要です (図 3(b)の Δx).また,構築に必要な光学部品や光学素子は、シグマ光 機(株)⁴⁾,ソーラボジャパン(株)⁵⁾,クロマテクノロジ ジャパン



図4 輪帯照明 TIRFM の構築例.(a)エバネッセント場の偏光の模式図.一方向のみから入射した光で形成したエバネッセント場は大きく偏光している.(b)輪帯照明光学系の模式図.回折光学素子を用いて輪帯照明を形成し偏光を解消.輪帯絞りと後焦点面,試料面と視野絞りはそれぞれ共役な位置に配置する.(c)顕微鏡入射直前の輪帯照明の写真.(d)実際の構築例. 定盤のねじ穴の間隔は 25 mm.

合同会社⁶⁾,(株)オプトライン⁷⁾などから購入することができます.

なお、実際のレーザー光のビーム径は無限小でなく有限な 大きさをもつため、対物レンズの NA が高いほど光学系の調 整は容易になります.具体的にいうと、エバネッセント場を形 成するには、図 2(b)の対物レンズ下部に示した w_c w_{NA} の 間にレーザー光を入射、集光させる必要があります.ここで w_c , w_{NA} はそれぞれ、入射角 θ_c , θ_{NA} に対応する光軸から 対物レンズ辺縁部への距離です.対物レンズの焦点距離を とすると、正弦条件から w_{NA} は式(6)で表されます.

$$w_{NA} = f \times NA \tag{6}$$

例えば、オリンパス社製の倍率 60 倍の対物レンズ (NA=1.49)を例にとると、焦点距離fは3 mm(オリンパス 社製顕微鏡の鏡筒レンズ L₂の焦点距離 180 mm より 180 mm/60=3 mm と計算)なので、 w_{NA} =4.47 mm となります。 同様に、 w_c =3 mm×1.33=3.99 mm となります。よって、 $w_{NA}-w_c$ =0.48 mm の幅にレーザー光を入射、集光させるこ とになります。また、試料面で形成されるエバネッセント場の 面積は、視野絞り後のビーム径、およびレンズ L₁と対物レンズの焦点距離の比で決まります。例えば、ビーム径が5 mm, L₁の焦点距離が f_1 =300 mm とすると、60 倍の対物レンズの 焦点距離f=3 mm より、試料面でのエバネッセント場の直径 は50 μ m (5 mm×(3 mm/300 mm))となります。ビーム径が 大きすぎる(>10 mm)と対物レンズ辺縁部への入射が困難 になり、試料面での完全な全反射が達成できなくなります。こ のため、対物レンズ型で形成できるエバネッセント場の大きさ は一般的に直径 100 μ m 以下に限定されます。

TIRFM を利用するうえでの注意点:エバネッセント場の偏光特性

対物レンズ型に限らず,TIRFM を構築,利用するうえで注 意すべき点は,エバネッセント場の偏光特性です²⁾.全反射 により形成されるエバネッセント場は,入射面に垂直な p 偏光 方向の成分はほとんど打ち消され,入射面に平行な s 偏光の 成分のみをもちます(図4(a)).このため,1方向のみから 光を入射して形成させたエバネッセント場は,ガラス表面に平 行な平面において大きく偏光しています.よって,ガラス表面 に蛍光色素を強固に結合させた場合,エバネッセント場の偏 光方向に対して蛍光色素の遷移モーメントがどちらを向いてい るかで励起効率が大きく異なり,蛍光強度に大きなばらつきが 生じます.この問題を解決するため,直交する2方向から光 を入射してエバネッセント場を形成させる方法や⁸⁾,リング状 の入射光(輪帯照明)を用いてエバネッセント場を形成させ る方法が報告されています^{9,10)}.これらの方法を用いると,ガ ラス表面に平行な方向での蛍光色素の向きによらず,一定の 蛍光強度を得ることができます(ただし,ガラス表面に垂直な 方向の向きの違いによる強度のばらつきは解消されません). 図4(b)~(d)は,輪帯照明 TIRFMの光学系の例を示してい ます.この例では,回折光学素子(米国 MEMS Optical 社 製 Diffractive diffuser #075)を用いて輪帯照明を形成してい ますが,代わりにアキションレンズ(円錐レンズ,例えばソー ラボジャパン社製 AX2510-A)を用いることも可能です.

なお、エバネッセント場の偏光特性を逆手に取ると、1分子 の蛍光色素の向きを検出することも可能になります.例えば、 対物レンズ辺縁部に沿って入射位置を周期的に回転させるこ とで偏光の向きを一定周期で回転させ、タンパク質に強固に 結合させた蛍光色素の向きの変化からタンパク質1分子の構 造変化を検出する方法が報告されています^{11,12)}.

5. むすび

筆者が研究用の光学顕微鏡を初めて触ったのは,研究分 野を大きく変えて1分子蛍光イメージングに取り組み始めた博 士後期課程からでした.当初は研究室に同じテーマに携わる 者はおらず,1人で手探りの状態でTIRFMの構築を試みて いました.そのときの経験は今,大きな財産となっています. 若い読者の方々もぜひ,自らの手で積極的に顕微鏡をいじっ ていただければと思います.「習うより慣れろ」です.次回は,TIRFMによる1分子イメージングの実際例について解説します.

文 献

- 1) D. Axelrod: Methods in Cell Biol. 30, 245 (1989).
- D. Axelrod, T.P. Burghardt, and N.L. Thompson: Ann. Rev. Biophys. 13, 247 (1984).
- M. Tokunaga, K. Kitamura, K. Saito, A.H. Iwane, and T. Yanagida: Biochem. Bioph. Res. Co. 235, 47 (1997).
- 4) http://www.sigma-koki.com
- 5) http://www.thorlabs.jp
- 6) https://jp.chroma.com
- 7) http://www.opto-line.co.jp
- M.G. Bell, R.E. Dale, U.A. van der Heide, and Y.E. Goldman: Biophys. J. 83, 1050 (2002).
- 9) H. Makyio, R. Iino, C. Ikeda, H. Imamura, M. Tamakoshi, M. Iwata, D. Stock, R.A. Bernal, E.P. Carpenter, M. Yoshida, K. Yokoyama, and S. Iwata: EMBO J. 24, 3974 (2005).
- 10) K. Adachi, K. Oiwa, T. Nishizaka, S. Furuike, H. Noji, H. Itoh, M. Yoshida, and K. Kinosita, Jr.: Cell 130, 309 (2007).
- T. Nishizaka, K. Oiwa, H. Noji, S. Kimura, E. Muneyuki, M. Yoshida, and K. Kinosita, Jr.: Nat. Struct. Mol. Biol. 11, 142 (2004).
- 12) T. Masaike, F. Koyama-Horibe, K. Oiwa, M. Yoshida, and T. Nishizaka: Nat. Struct. Mol. Biol. 15, 1326 (2008).

(2018年1月15日 受理)



飯野 亮太 (いいの りょうた)

2000 年名古屋大学大学院理学研究科単位取得退学.03 年 博士(理学). 国立研究開発法人科学技術振興機構(JST) ERATO 研究員.大阪大学産業科学研究所特任助手.助手. 助教,東京大学工学系研究科講師.准教授を経て、14 年 6 月より大学共同利用機関法人自然科学研究機構分子科学研究 所・岡崎統合バイオサイエンスセンター教授.総合研究大学院 大学教授兼任.