

## 最近の技術から

# レーザー顕微鏡

藤井 陽一・尾崎 政男

東京大学生産技術研究所 〒106 東京都港区六本木 7-22-1

### 1. はじめに

最近、レーザーの進歩とともに、レーザーの有する優れたコヒーレンスを利用した新しい顕微鏡がいくつか考案されるようになった。コヒーレンスが優れていると、十分に小さいスポットに集束でき、したがってかなり強い光強度が得られる、という利点がある。これをを利用して、(1)レーザー光照明顕微鏡、(2)光走査顕微鏡、(3)光ヘテロダイイン顕微鏡などのレーザー顕微鏡がある。

### 2. レーザー光照明顕微鏡

レーザー光がコヒーレントで強力であることを利用して、それを通常の光学顕微鏡の照明光源として用いる。あるいは、螢光等の特殊な効果の像を見る。この分野は、最もよく実用とむすびついて進歩している。

螢光測光法は生物試料の情報を得るために重要な手段である。とくに核酸、酵素活性、蛋白、多糖類、脂質、種々の活性基をはじめとして過酸化脂質、細胞内 pH、 $\text{Ca}^{2+}$  イオンなど多くの細胞内物質を高精度で定量できる。光源にレーザーを用いた場合、制御性が高く単色性に優れており、輝度も高いため、励起光をフィルターで除去するのが容易で、コントラストのよい像が得られる。発光像が明るいので露光時間も少なく解像度がよい。このレーザー螢光顕微鏡により細胞内カルシウムイオン定量<sup>1)</sup>や癌細胞の識別<sup>2)</sup>など種々の生物試料の測定が報告されている。そして、次章で述べる走査型式を取り入れた走査型レーザー螢光顕微鏡も提案されている<sup>3)</sup>。

### 3. 走査型光顕微鏡

通常の光学顕微鏡は、対象物を平面的な画像として観察するのに対し、走査型光顕微鏡 (SOM : scanning optical microscope) は、集束した光点を物体に対して走査して、それを画像として表示する。

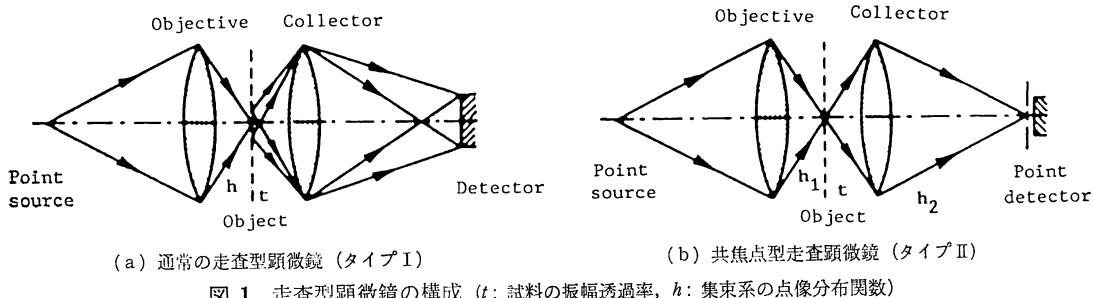
この結像系の大きな特徴は、集束光学系が、常に光軸上の光線を用いるので、像平面上で収差が変動すること

による像の歪みがないことである。照明する光は走査中の1点だけではなく、周囲を一様に照明することができないで、不必要的散乱光やフレアによるコントラストの低下を防ぐことができる。走査は、A. 試料、B. 集束光点、のいずれか一方を行なう。Aの方法は、一般的で、機械的構成が容易で、広い画角がとれるが、試料走査部の質量が大きくなりやすく、高速の走査ができない。Bの方法は、高速の走査ができるが、走査速度に反比例して走査角が小さくなるので、画角を広げることが困難である。鈴木のグループは AOM による高速走査の応用に成功して、分解能  $0.3 \mu\text{m}$  の良質な高速走査画像を得ている<sup>4)</sup>。

SOM には、照明側の集束光学系にのみ依存する場合 (タイプI) と、これに光検出側の集束光学系の分解能も加えてさらに分解能を改善する場合 (共焦点型、あるいはタイプII) とがある (図1)。これら的方式の横方向分解能は集束光学系で集束したスポットの大きさに依存することになり、原理的には、通常の光学顕微鏡と同程度であるが、短い波長のレーザーの採用により、これよりよい値にできる。Brakenhoff<sup>5)</sup> らは、 $\lambda=442 \text{ nm}$  の He-Cd レーザーを光源とした共焦点走査型顕微鏡で、 $150 \text{ nm}$  の分解能を得ている。この共焦点走査型顕微鏡は、物体が奥行方向に動いたときに、急激にコントラスト振幅が低下するので、これにより奥行方向の分解能も得ることができる。また、試料を含む共焦点の光学系をファブリ・ペロー共振器におきかえることにより、微小な試料の透過率の変化に対する感度を向上させることができる。

上述の光走査顕微鏡を光による他の効果を測定するものに拡張することができる。集束した照明光による高調波発生像、フォトルミネセンスの像、電気的効果 (光起電力、光導電性など) の分布像等を得ることができる。

周期的にパルス光を試料に照射して、幾何学的、材料学的あるいは結晶学的な欠陥によって生ずる不均等な温度上昇から生ずる熱的波動、周期的温度上昇による温度分布や赤外線放射あるいはこれに伴って生ずる音波を検

図1 走査型顕微鏡の構成 ( $t$ : 試料の振幅透過率,  $h$ : 集束系の点像分布関数)

出して像を得る顕微鏡システムは、光音響顕微鏡、光熱顕微鏡などの名称で呼ばれている<sup>6)</sup>。このシステムの分解能は、集束した照明光のスポット径と熱的な拡散とのかね合いで決まり、実例では数  $\mu\text{m}$  程度が得られている。

これらの効果に対して、励起源として電子ビーム、その他の粒子線、X線やマイクロ波などのほかの波長の電磁波、あるいは超音波なども用いることができる。光方式の利点は、ある程度の分解能が得られ、真空を必要としないことである。

#### 4. 光ヘテロダイン顕微鏡

光ヘテロダイン・レーザー顕微鏡は、ヘテロダイン検波を用い、信号光と参照光とを用い、それらの位相波面が光検出器上で一致しているときのみ差周波数成分が検出され、一致していないときは、受光器全体としては打ち消され検出されない<sup>7)</sup>。図2のように角周波数  $\omega$  の光を光学顕微鏡の対物レンズで絞り、球面波の参照光とし、角周波数  $\omega + \Delta\omega$  の光を照明光とする。すると、照明された試料の各点から出る球面波の中で、参照光球面波の中心とビーム・スプリッタに関する対称の位置にある点からの光と参照光とのビート成分のみが卓越して検出

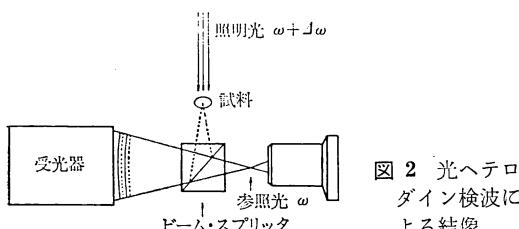


図2 光ヘテロダイン検波による結像



図3 光ヘテロダイン顕微鏡によるマイクロフィルムの像

される。これを走査、検出することで画像が得られる。

図3は、マイクロフィルム上の文字（全体の長さは約0.9 mm）の再生像である。分解能は参照光源の集束の度合に依存するが、横方向分解能は、理論的には、数  $\mu\text{m}$  と予想され、図からもその程度と考えられる。奥行方向分解能は、理論的には、およそ数十  $\mu\text{m}$  程度である<sup>8)</sup>。

#### 5. 結論

レーザー顕微鏡は、本質的には、光学顕微鏡と同じものであり、分解能も同じ程度である。しかし、共焦点型の採用により、散乱光、フレアに対するSN比が向上し、三次元分解能も測ることができる。また蛍光、光導電効果等の像を見ることができるなど副次的効果もある。

また、真空装置を必要とせず、*in vivo* (非破壊) で検鏡が可能であるという利点がある。したがって、適当な画像処理装置とともに、他の顕微鏡と併用してその利用価値を高めることが期待される。

終りに本稿をまとめる機会を与えてくださった東京大学工学部神谷武志教授に深謝する。

#### 文 献

- 1) 佐藤俊一、稻場文男：“細胞工学用レーザー顕微鏡システムの試作開発Ⅰ,” 特定研究 “光波利用センシング” 第8回研究会議講演資料 (1987) pp. 65-70.
- 2) 加藤大典: 光ファイバの基礎と応用 (総合電子出版社、東京, 1983) 20章.
- 3) J. S. Ploem: “Laser scanning fluorescence microscopy,” Appl. Opt., 26 (1987) 3226-3231.
- 4) 鈴木達朗: 電気学会光・量子デバイス研究会資料, OQD-85-65 (1985).
- 5) G. J. Brakenhoff, J. S. Binnerts and C. L. Woldringh: “Developments in high resolution confocal scanning light microscopy,” Scanned Image Microscopy, ed. E. A. Ash (Academic Press, New York, 1980) pp. 183-200.
- 6) M. Luukkala: “Photoacoustic microscopy at low modulation frequencies,” *ibid.*, pp. 273-289.
- 7) Y. Fujii, H. Takimoto and T. Igarashi: “Optimum resolution of laser microscope by using optical heterodyne detection,” Opt. Commun., 38 (1981) 85-90.
- 8) 尾崎政男、藤井陽一: “光ヘテロダイン顕微鏡の奥行方向分解能”, 生産研究, 38 (1986) 513-516.

(1987年12月28日受理)