

解 説

透過型レーザー走査顕微鏡

鈴木 達 朗

大阪電気通信大学工学部精密工学科 〒572 寝屋川市初町 18-8

(1989年3月29日受理)

Scanning Laser Microscope of Transparent Type

Tatsuro SUZUKI

Department of Precision Engineering, Faculty of Engineering,
Osaka Electro-Communication University,
18-8, Hatsu-cho, Neyagawa 572

1. はじめに

レーザー顕微鏡は大きく分けて反射型と透過型に分類されよう^{1,2)}。反射型は図1(a)に示すようにレーザービームLを対物レンズOBL1によって回折限界まで絞り、かくして得られた微小輝点でもって試料Sを照射し、その反射光を再びOBL1に通し、その反射光を半透鏡HFMで取り出してその集束光を通常、ピンホールPHを通して光電検出器PDに導き、電気的出力として取り出しブラウン管CRTに送られる。Sの2次元像を得るためには通常、Sを機械的に2次的に動かして行なう。もちろん必要に応じて種々の変形形式が生じるのは当然である。上記においてPHを用いるのはいわゆるconfocal type^{1,3)}とするために必要である。この形式は、像の横、縦の分解能、像の鮮明度を上昇させることに役立つ。

一方、透過型^{1,2,4)}は図1(b)に示すようにOBL1で絞られたLの微小輝点でもってSを照射するまでは反射型と同一であるが、これではSを透過した光束をコンデンサーレンズCOLで集光し、その集光された光束をPDに導き、電気的出力として取り出す。この場合、図1(c)のように、OBL1と同一の対物レンズOBL2でもって透過光を絞り、その像点にピンホールPHを置けばやはりconfocal typeとなる⁵⁻⁹⁾。以上のように反射型も透過型もconfocal typeであるのとそうでないものとの分類が可能である。また、走査方式も図1(a)~(c)に示すように試料Sを機械的に2次元状に動かして

走査を行なう試料走査型と、図1(d)に示すように光束そのものを2次的に動かして走査する光束走査型に分類することも可能であり、目的に応じて種々の形態のものが作られる¹³⁾。

2. 生物を試料とする走査型レーザー顕微鏡

ここでは試料を微生物と限定しよう。生物学の研究には古くから通常の光学顕微鏡(以下略してCM)が用いられている。CMで大口径数の対物レンズを用いて微生物を高分解能で観察するためには良く知られているようにコンデンサーレンズの開口数を対物レンズのそれとほぼ等しくしなければならぬ。そうすると大開口数の対物レンズを使用した場合、得られた像のコントラストは後で示すように著しく劣化する。たとえば試料が細菌などの場合、その像はほとんど見えない。そこで試料を適当な染料を用いて染色しなければならぬ。つまり試料を殺してしまうことになる。もちろん動的試料の観察も不可能である。

微生物を生きのまま観察したいということは生物学者にとって昔からの夢であろう。もちろんこうした目的に対して、位相差顕微鏡があり、これも有用な方法ではあるが、これは試料の位相差の変化を検出するのみであって、試料の濃淡の分布を知ることはできない。この濃淡の分布を知りたいという欲望をある程度かなえてくれるのが、レーザー顕微鏡(scanning laser microscope, 以下略してSLM)である。SLMにおいては後で述べる理由によってその像のコントラストはCMに比べて著し

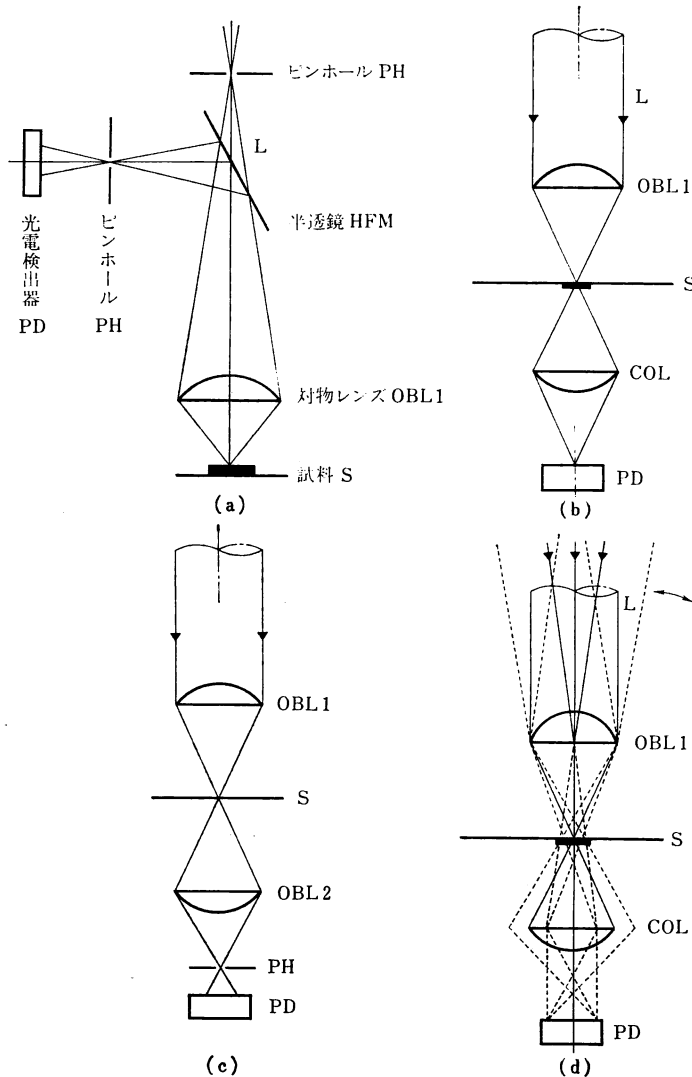


図1 レーザー顕微鏡の種々の形式

(a) 反射型レーザー顕微鏡, 試料走査型. (b) 透過型レーザー顕微鏡, 試料走査型. (c) Confocal type 透過型レーザー顕微鏡, 試料走査型. (d) 光束走査透過型レーザー顕微鏡.

く高く, 試料は通常, 染色せずに見られるからである.

3. 走査方式と実時間性

1章で述べたように SLM においては対物レンズで生じた微小輝点をもって試料 S を 2 次的に走査しなければならない. この走査方式として先に述べたように微小輝点は固定したままで S を 2 次的に動かして行なう方式 (試料走査型)^{1,2)} と, S は固定したままで, 対物レンズに入射するレーザービームをある角度だけ 2 次的に振らせて, したがって微小輝点のほうを S 上 2 次的に動かして走査する方式 (光束走査型) の二つがある^{1,2)}.

このうち前者の方式では光学系の中の光束は動くことなく, 光軸に対して回転対称である. したがって光学系を最も有利な条件で使用でき, 対物レンズは球面収差のみ補正しておけばよく, 非球面レンズ 1 枚でもって構成することも可能である. したがってまた, レンズの種類にも大きな自由度があり, 可視光のみならず, 紫外, 赤外への応用も可能であろう.

また 1章で述べたように光電検出器 PD の前にピンホールを置くことによって confocal 系を作ることでもでき, 有利である. ただ試料走査型の難点, とくにそれを動く生物試料に対して用いるとき, 試料台を高速でもつ

てX, Y 2方向に振らせる必要のあることである。この走査には通常、スピーカーのボイルコイル^{1,2)}、張られたピアノ線等の振動が使われており、数百 Hz の振動である。したがってブラウン管 CRT の垂直方向の走査線の数を 500 本とすれば、1 フレームの画面を得るのにスタートしてから何秒かの時間がかかり、到底テレビレートの実時間でもって観察することはできない。事実、顕微鏡観察には広い視野の中から観察したい部位を採し出し、その採し出した部位でまた深さ方向に微妙なピント合せをくり返さなければならない。ごくわずかのピント違いによって生物試料は大きくその像の様相を変えるのである。そのつど、出画までに数秒の時間を要していたのではなかなか大変であり、動かない試料以外ではまず実用不可能である。また数百 Hz の強制共振振動を利用するためにはきわめて軽い試料台⁹⁾が必要である。このような試料台の設計、製作はなかなか困難であり、また試料の交換も大変であろう。

以上、換言すれば動かない試料を観察する以外試料走査型はまず実用不可能である。動かない生物試料、または半導体、金属等の観察には confocal 系を構成することができるので試料走査型は有利である。ただ透過型として confocal 系を構成した場合、もし試料が生物試料の場合、対物レンズを低倍率から高倍率へと、また、その逆に頻繁に交換しなければならない。そのつど対物レンズとコンデンサーレンズの双方を同時に交換しなければならない。また、交換したレンズ類の光軸には通常、わずかの差異があるのが普通なのでその交換のたびごとに、ピンホールの位置を微妙に調整し直さなければならずこれは時間のかかる大変な仕事であろう¹⁰⁾。ピンホールの大きさは、コンデンサーレンズによって生じた微小輝点のエアリーディスクと同一程度でなければならずその調整は大変であることを、透過型 confocal レーザー顕微鏡の開発に 5 年間費した Brakenhoff⁹⁾ も述べている。

反射系においては同一対物レンズをレーザービームの行きと帰りに 2 度使用するので透過型にくらべてはるかに実施は容易である。ただ試料走査型になるので実時間性は得にくく、また、反射像を観察するという制約もある。したがって生物試料用としては螢光像¹⁴⁻¹⁶⁾を観察するのに有利であろう。

後者の方式、すなわち光束走査型にも 2 種類あって、光束を振らせるのに振動鏡あるいは回転鏡¹⁾などを使う機械的方式と、超音波光偏向素子^{1,17)}を使う方式である。このうち前者においては鏡の鋸歯状振動あるいは回転を

利用するのであまり高速の走査は望めなく、やはり実時間観察は無理であろう。しかし試料台は CM と同じで、構造も簡単で、丈夫なものが作れ、試料の交換等の取扱いも簡単である。また振れ角も大きくとれるので視野も広く、また波長依存性もない。超音波光偏向素子 (以下 AOD と略記) の場合はその走査速度は電気光学的に行なわれるためきわめて高速で、ビデオレートの実時間性をもって十分に実時間観察が可能である⁹⁾。ただ振れ角が小さく、また波長依存性があるという欠点をもつ。したがって現在では紫外への拡張は無理であろう (水晶を使えば可能であるが振れ角があまり小さすぎる)。また光束走査型では対物レンズに入射する光束は斜めから入射するので、色収差を除き、十分収差の補正されたものを使う必要がある。

4. 試作した走査型レーザー顕微鏡

生物用であり、微生物の透過情報を得ることとした。また生きた動く試料を対象としているので走査方式には実時間性を要求されるので、必然的に AOD^{4,18)}を用いた光束走査型となり (図 1 (d)), confocal type は使用できない。以上の条件の下に設計試作した SLM のブロックダイアグラムを図 2⁴⁾に示す。

レーザーとしては He-Ne または He-Cd レーザーが用いられる。H はレーザーで、それからの光束はビームエキスパンダ EX を通り、スポットサイズ約 8 mm に拡大される。またピンホール P によって不要の横モードは除かれる。EX を出た平行ビームは最初の光偏向素子 AOD₁ に入る。その開口径は 3.5 mm である。AOD₁ は入射光束を Y 方向 (CRT 上では垂直方向) に振らせる。AOD₁ によって振られた光束はレンズ L₁, L₂ から成るリレーレンズ系を通して第 2 の光偏向素子 AOD₂ の入射瞳上に結像され、AOD₂ によって X 方向に振られる (CRT 上では水平方向)。

AOD₁ と AOD₂ は同一であるが、振れの振動数は AOD₁ にて 60 Hz, AOD₂ にて 15.75 kHz である。AOD₂ を出た光束は AOD₂ にて発生する円筒レンズ効果を補正するためのシリンドリカルレンズ¹⁸⁾ (図では 90° 回転して画いてある) を通過する。AOD₂ の射出瞳はリレーレンズ L₃, L₄ を通して顕微鏡対物レンズ OBL の射出瞳上に結像されるが、この場合 OBL の射出瞳上に結ばれた AOD₂ の射出瞳の直径は 100 倍の OBL の射出瞳の径より十分大きくなるよう、リレーレンズ L₃, L₄ の倍率はとられている。その理由は gaussian ビームに対して分解能を保証するためである。

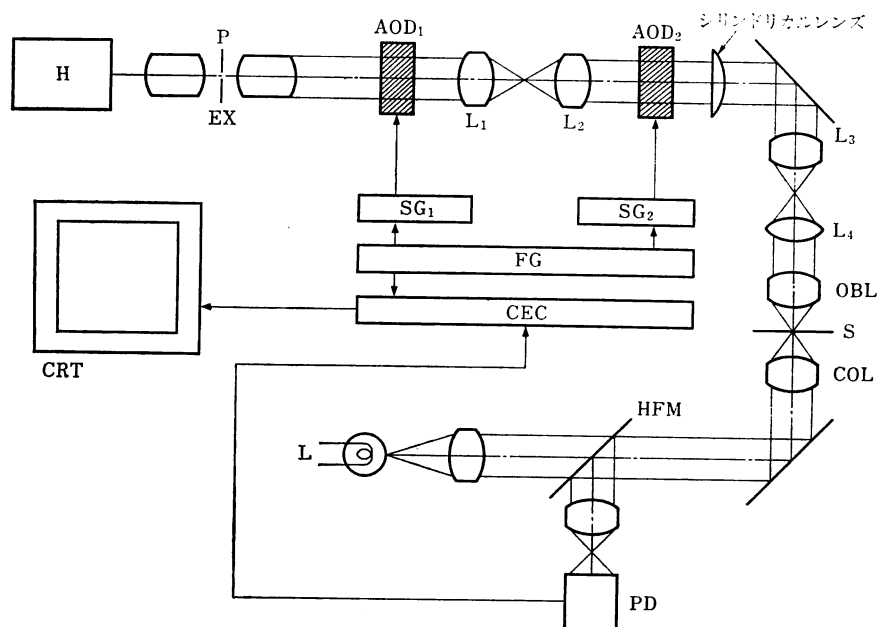


図2 試作した透過型レーザー顕微鏡のブロックダイアグラム

OBL によって回折限界まで絞られた微小輝点は AOD₂, AOD₁ の作用によって試料 S を X, Y 方向に走査する。S の 1 フレームを CRT 上に画写する時間は 1/30 秒であり、ビデオレートでの実時間観察は十分可能である。S を透過した光束は集光レンズ COL を通して光電検出器 PD に達する。この電気的出力はコントラスト増強回路 CEC を経てブラウン管（モニターテレビ）の輝度軸に送られる。関数電圧発生器 FG はそれぞれ 60 Hz, 15.75 kHz の矩形波電圧を発生し、これらはそれぞれスイープジェネレーター SG₁, SG₂ に送られ、AOD₁, AOD₂ を駆動する。また S の走査と CRT とは同期していることはいままでのない。

なお、図面では省略したが CM として使用する場合はレンズ L₄ の上にプリズムを挿入してランプ L からの光路を横方向に曲げて接眼鏡あるいはカメラで観察、あるいは撮影する。

5. AOD と視野の広さ

レーザー顕微鏡に 1970 年ごろ水晶を AOD として用いたものが報告されているが¹⁷⁾、水晶の AOD はあまりにも偏向角が小さくて実用にはならなかったと思われる。われわれはわが国で近年開発された TeO₂ の off (110) type の異方性ブラッグ回折を用いた AOD を使用した¹⁸⁾。この TeO₂ を用いた AOD は偏向角が 2.7° と比較的大きく、かつまた上記の AOD は偏向中

の光の強度変化が小さく (0.5 dB 以下)、このことはコントラスト増強回路を活用する上で必要な条件である。

さてこの AOD を用いたときの試料 S 上の視野の広さ ΔL は

$$\Delta L = f \Delta \theta (\theta_4 / \theta_3) \quad (1)$$

で表わされる。f は OBL の焦点距離で、100 倍の OBL の場合、1.8 mm である。 $\Delta \theta$ は AOD の偏向角で今の場合、 $\Delta \theta = 2.7 \pi / 180 \text{ rad}$ 。 θ_4, θ_3 はリレーレンズ L₃, L₄ 系から決まってくる量で今の場合 $\theta_4 / \theta_3 = 0.39$ となる。これらを (1) 式に代入して $\Delta L = 33 \mu\text{m}$ となる。通常の細菌の大きさは 1~5 μm 、細胞で 30 μm 前後であるから、上記の ΔL はちょうど具合のよい広さとなる。もしこの ΔL が上記の 2 倍となったとすれば、CRT 上、倍率を 1/2 にして写像しなければならず、CRT の走査線の数からくる分解能 (6 章参照) の関係からかえって具合が悪いのである。

6. 分解能、倍率、CRT の所要走査線数

CM の分解能 $\Delta \varepsilon$ は

$$\Delta \varepsilon = 0.61 \lambda / \text{NA} \quad (2)$$

で与えられる。ただしこの式が成り立つのは対物レンズの NA とコンデンサーレンズのそれが等しい場合である。λ は光の波長である。SLM に関しては OBL への入射ビームがガウシアンであるから、OBL によって回折限界まで絞られた回折像 (微小輝点) が (2) 式と同じ

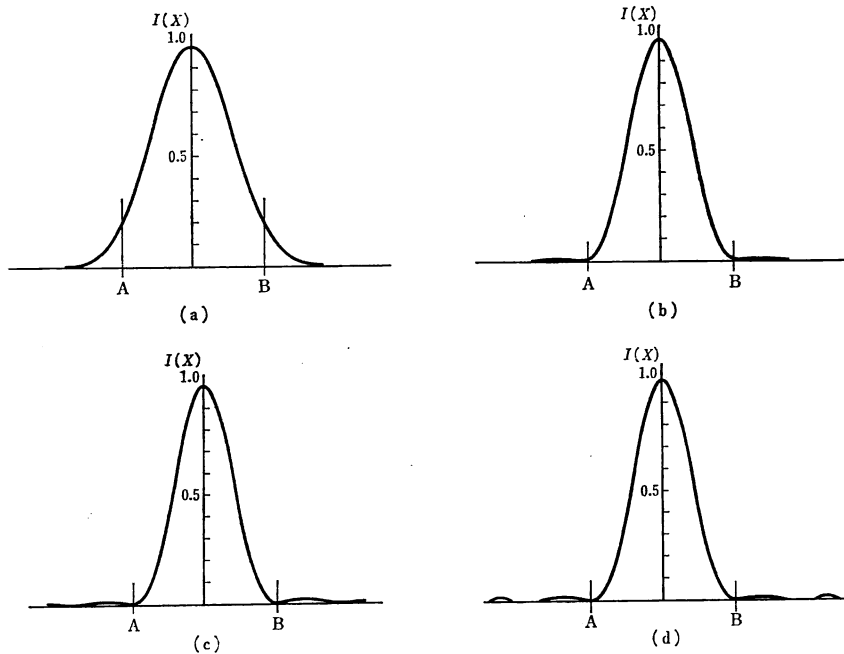


図3 入射ガウシアンビームに対するフラウンホーファ回折像
(a) $\sigma=0.5$, (b) $\sigma=1.0$, (c) $\sigma=1.5$, (d) $\sigma=1000$, 平面波入射とみなす。

$\Delta\epsilon$ をもつかどうか, すなわち SLM の分解能が(2)式と同じ値をもつかどうかは速断できない. そこで筆者は計算機シミュレーションによって, 対物レンズに入射する光束がガウシアンであるときの回折像を求めて見た. その結果を図3に示す.

図3において σ は入射ガウシアンビームのスポットサイズとレンズ径との比であり, 図(d)は $\sigma=1000$ なのでほぼ平面波が入射したときと考えられ, 図上, Airy diskの半径に相当する位置をA, Bで表わした. 図より σ が1より大きければ(入射ガウシアンビームのスポットサイズが対物レンズの射出瞳径より大きい場合), その回折像は入射光が平面波の場合($\sigma=1000$, 図(d))とほとんど変わらないことを示している. 筆者のSLMは4章で述べたようにこの条件は十分満たしているので分解能として(2)式を使うことができよう. そこでHe-Neレーザーを用いたとして $\Delta\epsilon$ を計算すると, $\lambda=0.6328\ \mu\text{m}$, OBLの $\text{NA}=1.4$ (100倍のOBL)として $\Delta\epsilon=0.28\ \mu\text{m}$. またHe-Cdレーザーを用いた場合, $\Delta\epsilon=0.19\ \mu\text{m}$ となり, これらは葡萄状球菌を用いた実験でも確かめられた⁴⁾.

上記の $\Delta\epsilon$ をCRT上で分解するためには少なくとも2本の走査線が必要である. そこで視野の広さを ΔL ((1)式)とするとCRTには最小 $N=(\Delta L/\Delta\epsilon)\times 2$ 本

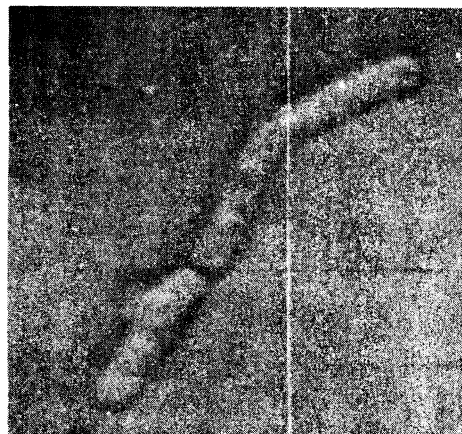
の走査線が必要であり, He-Neレーザーの場合, $N=(33/0.28)\times 2=236$ 本の走査線を必要とする. 逆にいえばCRTの走査線の数がかこれ以下であれば, たとえSLMで分解したとしても, CRTで分解できないことになる. 実際には上記の2倍以上の走査線がCRT上で像を良く見るためには必要である. 筆者のCRTは $N=512$ 本であるから上の条件は満たされている.

一方, 上記の ΔL はCRTの縦画面いっぱいに投影され, 筆者の場合それは210 mmであるから, 倍率 $M=210\times 10^3/33\approx 6364$ 倍となる.

7. 実験結果

試作器が完成してから約3年, 細菌類, 染色体, 藻類について多くの実験を行ない, だいたい所期の成果を得て多くの学会に発表した. ここでは紙面の都合上, ごく若干の例を述べたい.

図4は大桿菌の例で(a)はCMモードで, (b)はSLMモードで同じ場所を撮影したものである. モードの切り換えはレバー1本で即座に行ないうる. 対物レンズは100倍, NA 1.4のものを用いた. CMモードでは菌の内部構造はほとんどわからないが, SLMモードでは明瞭にわかる. 菌は無染色なので, 採取したまま即座に見られるので, 菌の迅速な同定に役立つであろう. とも



(a)



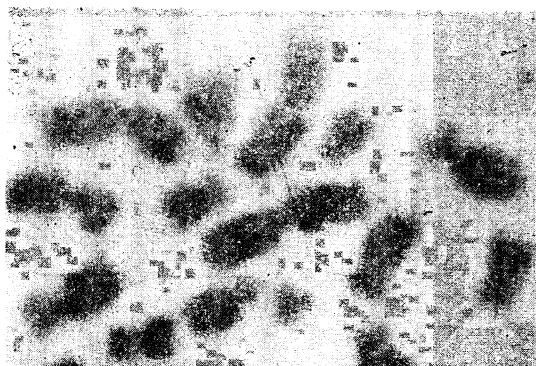
(b)

図4 大桿菌のCM像(a)とSLM像(b), ともに無染色

CM: 通常顕微鏡, SLM: レーザー顕微鏡

に He-Ne レーザーである。図5は人間の染色体であるが、これは無染色では全く見えないのでギムザ染色を行なってある。(a)はCMモードで、(b)はSLMモードであり、SLMモードでは染色体の内部構造がかなり見られる。染色体の研究にはその目的によってCM、位相差顕微鏡、走査型電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡があるが、SLMは分解能については電子顕微鏡よりはるかに劣るが、一方それでは得られなかった透過の濃淡情報を与え、また、CMよりは詳細な情報を与えるので、今後、染色体の多角的な研究の一つの分野を担うことになるであろう。

図6は緑藻類の一種ユーグレナの写真であるが、(a)はCMモード、(b)はSLMモードで、40倍の対物レンズを用い、He-Cdレーザーである。細胞の内部構造がSLMでCMに比べて非常に良くわかり、また鞭毛も明瞭にわかるが、これは激しく動いているので、CMと



(a)



(b)

図5 人間の染色体のCM像(a)とSLM像(b), ギムザ染色

SLMではレバーを切り換える間にその位置が変わったものと思われる。もちろん、無染色の生きている試料である。

8. SLMがCMより高コントラストの理由

SLMのコントラストは光学系自体によるものと、電子回路(CEC)によるものとの二つがあり、その相乗作用によって高コントラストが発生するものと思われる。光学系自体によるものはconfocal typeとそうでない場合とで若干その理由について異なるところがあるが、ここでは後者の場合について述べよう。定量的には応用物理講演会(1988年春、秋季)において筆者が発表しているのでここでは定性的に述べてみたい。

図7(b)はCMの場合、同(a)はSLMの場合の光学系であり、(b)より説明すると、試料Sを細菌とし、光源からの光はコンデンサーレンズCOLを通して照明されている。Sの内部は無数の光散乱性微粒子で満たされているとし、Sを照明する光の強度はSの各部分について一様である。いま対物レンズOBLがS内の点A



(a)



(b)

図 6 ユーグレナ (緑藻の一種) の CM 像(a)と SLM 像(b), 無染色

にピントを合わされていたとする。もしA点に吸収があればA点は周囲より暗く見えるはずである。ところが光束内の任意の点B, あるいは光束の近傍にあるC点に存在する光散乱性微粒子は光源からの光を散乱し, OBLに入射する。その結果, A点の像にかなり程度の散乱光強度を与え, A点の像のコントラストを低下させてしまう。これがCM像のコントラスト低下の定性的理由であり, また対物レンズのNAが大きいほど, このA点以外の散乱光を受け取る割合が増大し, いっそうコントラストを弱めてしまう。これらは細菌等を観察する場合, よく知られた事実である。

同(a)図はSLMの場合である。OBLはA点にピントを合わされているとする。A点に吸収があればA点は

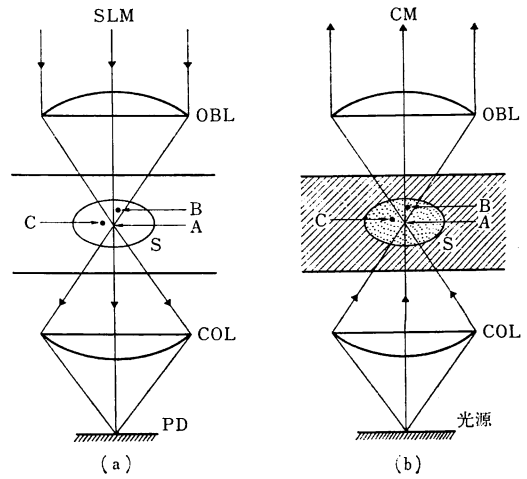


図 7 CM と SLM の像のコントラストの差異の理由 (a) SLM, (b) CM

周囲より暗く見えるはずである。そこで光束内の任意の点Bを考えると, B点に存在する光散乱性微粒子は光を散乱するであろう。ところがもしB点がA点より光軸方向に若干離れていたとすると, B点への入射光の強度はA点のそれと比べて十分小さい。レーザービームの場合, 微小輝点(ピント点)のごく近傍はその強度は大きい, 光軸方向にA点から離れるに従って急速に(距離の2乗にはほぼ逆比例して)小さくなるはずである。したがって散乱光の強度も十分小さい。したがってA点の像に与える散乱光強度も比較的小さい。したがってA点の像のコントラストの低下も小さい(CMの場合はA, B, C点ともに入射光強度は等しい)。C点はこの場合レーザービーム外にあるから, A点の像のコントラストに何の影響をも与えない。

以上の理由により SLM は CM に比べて光学系自体が高コントラストで, かつ雑音が少ない(カバーガラス等に付着したゴミ等による雑音は上に述べた理由によってほとんど像面に現われない)。このように光学系自体が高コントラストでかつ雑音も少ないため, 電子回路(CEC)によるコントラスト増強もうまく動作するのであり, 単に CEC のみでコントラストを上げようとするばうまくいかないことも実験で確かめている。これはスライドガラス, カバーガラス, テレビ受像系の光学系に付着したゴミによる像のコントラストもともに上げてしまうからである。

9. む す び

紙面の大部分が結局, 主として筆者の研究報告に終わ

ってしまったことをお詫びしたい。これは現在、レーザー顕微鏡が主として反射型の confocal type に移ってしまったためであろう。透過型としては Brakenhoff^{5,6,8)} の開発したものと筆者のもの^{4,9)} くらいしかあまり見当らないからである。ともあれ筆者の実験においても He-Cd レーザーを用いたものは分解能 $0.19 \mu\text{m}$ に達し従来の CM の分解能 ($0.24 \mu\text{m}$ くらいといわれる) をかなり上回る性能が得られた。実験の結果、細菌類、細胞などを無染色で生きたまま、その透過像を高コントラストで見ることができた。これらは走査型電子顕微鏡あるいは透過型電子顕微鏡、通常の光学顕微鏡ではできないことであり、レーザー顕微鏡の独壇場である。今後の研究、とくに実時間性をもつ confocal type の透過型レーザー顕微鏡の開発が望まれる。

終りに試作機の開発に当りご尽力をいただいたオリンパス光学工業(株)光学開発部の故平昭夫部長、山本公明課長、堀川嘉明氏に深甚の感謝の意を表したい。なお細菌類の試料については大阪大学微生物研究会深井孝之助理事長、東堤総課長、染色体については関西学院大学理学部小島吉雄教授、藻類試料については大阪大学教養部石川依久子助教授に大変お世話になり、また有益な助言をいただいたことに厚くお礼申し上げる次第である。

文 献

1) T. Wilson and C. Sheppard: *Theory and Practice of*

- Scanning Optical Microscopy* (Academic Press, 1984).
- 2) E.A. Ash: *Scanned Image Microscopy* (Academic Press, 1980).
- 3) C. J. R. Sheppard: *IEEE. J. Quantum Electron.*, **QE-13** (1977) 490.
- 4) T. Suzuki and Y. Horikawa: *Appl. Opt.*, **25** (1986) 4115.
- 5) G. J. Brakenhoff: *J. Microsc.*, **117**, Pt. 2 (1979) 233-242.
- 6) G. J. Brakenhoff, P. Blom and Barends: *J. Microsc.*, **117**, Pt. 2 (1979) 219-232.
- 7) H. J. B. Marsman, R. Strichen and R. W. Wijadts Van Resandt: *Rev. Sci. Instrum.*, **54** (1983) 1047.
- 8) G. J. Brakenhoff, H. T. M. van der Voort and N. Nanninga: *Anal. Chim. Acta*, **163** (1984) 231.
- 9) Y. Ichioka, T. Kobayashi, H. Kitagawa and T. Suzuki: *Appl. Opt.*, **24** (1985) 691.
- 10) H. T. M. van der Voort, G. J. Brakenhoff and G. C. A. M. Jansser: *Optik*, **78**, No. 2 (1988) 48.
- 11) C. J. R. Sheppard and H. J. Matthews: *J. Mod. Opt.*, **35** (1988) 145.
- 12) C. J. R. Sheppard: *Appl. Opt.*, **27** (1988) 4782.
- 13) C. J. R. Sheppard and X. Q. Mao: *J. Mod. Opt.*, **35** (1988) 1169.
- 14) 天神美夫, 杉田道夫, 堀川嘉明, 山本満則: *Oncol. Chemother.*, **4** (1988) 353.
- 15) 河田 聡, 中村 収, 南 茂夫: 第18回画像工学コンファレンス (1987) p. 39.
- 16) 河田 聡, 中村 収, 南 茂夫: *応用物理*, **57** (1988) 784.
- 17) J. Lekavich, G. Hrbek and W. Watson: *Electro-Optical System Design Conf. NY* (1970) pp. 650-661.
- 18) F. Tanaka and K. Tani: *Natl. Tech. Rep.*, **26**, No. 2 (1980).