

総 合

光 学 走 査 顕 微 鏡

河 田 聡・南 茂 夫

大阪大学工学部応用物理学教室 〒565 吹田市山田丘 2-1

(1989年5月29日受理)

Optical Scanning Microscope

Satoshi KAWATA and Shigeo MINAMI

Department of Applied Physics, Faculty of Engineering, Osaka University,
2-1, Yamada-oka, Suita 565

1. はじめに—レーザー光源と光学顕微鏡

いま、手元にある光学顕微鏡のランプハウスにレーザーをセットするとどんな像が得られるだろうか？ 散散な結果をもたらすはずである。第1に、ヘリウムネオンの暗い赤色でしかサンプルが見えない。しかも、その像はギラギラとしていて、さらにその上にスペckルパターンや干渉縞が重畳して、非常に見づらい。分解能も、普通の顕微鏡より低い。

これらは、すべて、レーザーがコヒーレント光源であることによる弊害である。コヒーレンスが売り物のレーザーだが、光学顕微鏡とレーザー光源は、そのマッチングが最悪で、レーザーを使うメリットは何もないように見えてくる。

それに比べて、手元にある光学顕微鏡は何とよくできていることだろう。画質も良く、分解も高く、そのままにカラー像を観察できる。これまで、あまりに当り前のように使っていて、白色光のインコヒーレントな Koehler 照明法のすばらしさを忘れてしまいがちになる。なぜレーザーを使わなければならないのだろうか？

この総合報告では、通常の光学顕微鏡と比較しつつ、歴史的な経緯を見ながら、レーザー顕微鏡の長所と短所を整理し直してみたい。

2. 光学走査顕微鏡の歴史

2.1 フライングスポット顕微鏡

最初に提案された光学走査顕微鏡は、Young らのフライングスポット顕微鏡 (1951)¹⁾ であるといわれている。

その原理は、CRT 上をラスタースキャンする光のスポットを試料に結像させ、その透過光強度を光电検出し、TV モニター上に表示させるものである。このような装置は、テレビ・ビデオ技術やエレクトロニクス技術を利用することができるため、

- 1) 実際の像より明るく表示したり、
- 2) 明るさやコントラストをコントロールすることができ、また
- 3) 赤外や紫外光など、肉眼では見えない波長域の像を可視化することができる、

などの特徴を有する。ただし、現在では、高感度、高解像度の撮像素子が各種、開発されており、それらを用いたビデオマイクロスコープが簡便でかつ実用的であるので、これらの機能は、もはや、光学走査顕微鏡の大きなセールスポイントにならないと思われる*1。

Young らの最初の論文には実験例は示されていないが、その後 1956 年に、Montgomery らが紫外顕微鏡としてこの原理を用い、装置を試作し実験結果を示した²⁾。

2.2 ニポウディスク走査顕微鏡

Young らがフライングスポット顕微鏡を提案したと同じころ (1951年)、Mellors らは、図1に示すようなニポウ (Nipkow) ディスクを、顕微試料の結像面か視野絞りの位置に設け、それを毎秒30回、回転させることにより、画像のサンプリングを行なった⁴⁾。ニポウ

*1 光学走査顕微鏡とビデオマイクロスコープの比較は、Welford によって行なわれているが³⁾、現在では少し視点が異なり、本稿で後に述べる点がビデオマイクロスコープにない、走査顕微鏡の特徴であると思われる。

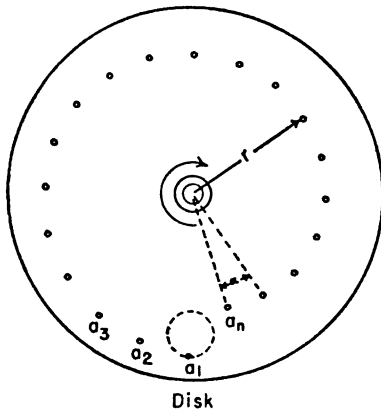


図 1 ニポウディスク⁴⁾

ディスクは 1884 年に Paul Nipkow によって発明され、テレビジョン開発の初期に、撮像機と受像機の両方において用いられた機械的なスキャナーである。これを等速回転させると、スパイラル上に等間隔に設けられた小開口が、順次ラスタースキャン (テレビジョン走査) し、画像を構成する⁵⁾。

Mellors らの目的は、蛍光標識された癌細胞の検出であり、そのためには、光電子増倍管を用いる必要があった。そこで、ニポウディスクの各小開口を、試料面で癌細胞の大きさ ($10 \mu\text{m}\phi$) にし、走査本数 20 本、30 分の 1 秒/フレームで画面走査し、光電子増倍管によって顕微測光を行なった。論文中には、ニポウディスクを試料像面のみならず照明側に設置した光学系や、落射照明系も示されている。

2.3 Minsky のパテント

1989 年現在、研究開発されている光学走査顕微鏡の基本的な原理は、1957 年に Marvin Minsky が出願したパテント (1961 年に発効)⁶⁾ においてほとんど述べられている。図 2 はパテントに示された光学系である。光源はまだレーザーがなかったのでランプを使っているが、ピンホールが光源側と検出器側の両側に設置されており、後に述べる共焦点光学系 (ただし、彼はこれを、

double focusing optical system と呼んでいる) をすでに構成している。また、走査機構も具体的に図示されており、三つのボイスコイルが試料ステージを x, y, z 方向にスキャンし、出力信号は光電変換されてオシロスコープ上に画像表示されるように構成されている。

2.4 タンデム走査顕微鏡

1966 年、チェコスロバキアの Petran らはニポウディスクをもとに、膨大な数の穴をもつマスクを考案し、これを用いたタンデム走査光学顕微鏡を開発した⁷⁾。この光学系は、ニポウディスクを用いている点において、Mellors らのニポウディスク走査顕微鏡と似ているが、原理的には全く違う発想によって考案されている。まず、1) Petran らのニポウディスクの小穴は、照明系と結像系の両方において物体の像面を走査し (それゆえ、タンデム走査と名付けられている)、共焦点光学系になっている。共焦点系を構成した目的は、小穴によって散乱光をカットしコントラストを向上させることにある。さらに、2) 像面内に複数の穴を設け、それらを同時に走査する。像の観察は、肉眼 (あるいは写真) によって、これら複数の穴を通して行なわれる。走査の目的は光電測光ではなくコントラスト向上のために共焦点系を構成することにある。分解能は穴の大きさによって決まるのではなく、各穴の中の空間分布も肉眼によってさらに解像できる。

2.5 最初のレーザー走査顕微鏡

レーザーを走査顕微鏡の光源として初めて用いたのは、1969 年、Davidovits ら⁸⁾ であると思われる。この光学系は、反射型の共焦点系であり、スキャンは対物レンズ自身を動かす方法をとっている。したがって、ステージ走査ではなく、ビーム走査の 1 号機でもある。論文⁸⁾ において彼らは、共焦点系が、1) 厚みのある試料に対して、フォーカスした面だけが観察でき、他面からの散乱やフレヤ光はカットできること、2) レーザーを使うのにもかかわらず、干渉ノイズなどが結像に寄与しないこと、などを指摘している。また、とくに、生物観察を目的としたときの、レーザー光による組織の熱的

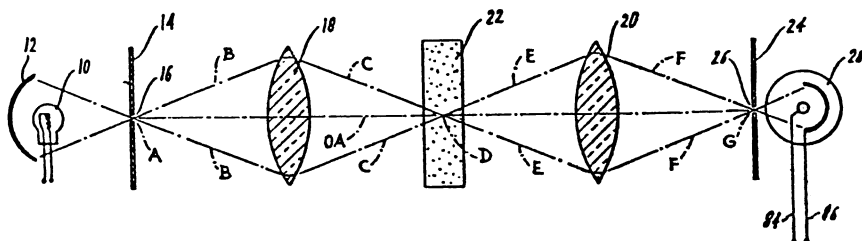


図 2 Minsky のパテント⁶⁾

破壊や、光電子増倍管による反射光強度の検出感度について検討し、非染色、非固定での神経繊維の観察を、実際に試作した装置によって行なっている。

2.6 1977~80年頃

レーザー走査顕微鏡が非常に広く知られるようになったのは、おそらく1980年を過ぎてであろうが、それは、1977~80年頃の、OxfordのSheppardとWilsonのグループと、オランダのBrakenhoffのグループの精力的な研究とその成果に啓発されたところが大きいと思われる。

とくにSheppardらのグループは、部分コヒーレント伝達関数を用いて非共焦点型(Type 1)と共焦点型(Type 2)の光学走査顕微鏡の照明系を含んだ結像特性を導出し、その結果、非共焦点型は従来のインコヒーレント照明顕微鏡と等価の結像特性をもち、共焦点型はより広い空間周波数帯域を有することを示唆した⁹⁾。また、共焦点型のレーザー走査反射顕微鏡において深さの識別ができることを実験的に示し¹⁰⁾、これを応用して、回折限界で決まる分解能を低下させずに焦点深度をいくらでも深くできる反射顕微鏡¹¹⁾や、表面形状を定量測定できる顕微鏡¹²⁾を考案し、実際に実験データを示した。また、分解能をさらに向上させるために、光が試料を多数回通過するような、多重反射光学系を含む共焦点光学系¹³⁾を考案し、分割型検出器を用いた微分コントラスト顕微鏡¹⁴⁾を提案した。さらにOBIC(Optical Beam Induced Contrast)像観察¹⁵⁾や、非線形光学材料観察¹⁶⁾など、レーザー走査顕微鏡の数多くの応用分野を開拓した¹⁷⁾。

Brakenhoffらは高NA(~1.3)の液浸レンズを試料の両側に用いたレーザー走査顕微鏡¹⁸⁾やレーザー走査の干渉顕微鏡¹⁹⁾などを試作し、また光源にHe-Cdレーザーの422nmを用いることにより、分解150nmを実現した²⁰⁾。

この1978~80年頃の研究の成果は、2冊の書籍^{17,21)}にまとめられている。おそらくこれらの研究成果に啓発されてであろう、1984年頃からレーザー走査顕微鏡が製品化されはじめた²²⁾。

2.7 1987~90年頃

前節で述べたように今から約10年前に、第1のピークとして、レーザー走査顕微鏡に関する多くの理論的、実験的研究成果が得られた。そして、現在、すなわち1987~90年には、第2のピークとして、今度は実用的研究が進み、多くの製品が各社から発表されつつある。国際会議も多く開かれるようになり²³⁻²⁵⁾、国内でも研

究会が定期的に行なわれるようになった^{26,27)}。装置を製品販売しているメーカーも数社を越えるようになった。

2.8 日本における歴史

日本では、光学の立場からは阪大の鈴木(現、大阪電通大)らが透過および反射のレーザー走査顕微鏡を^{28,29)}、医学・生物学の分野からは、京都府立医大の藤田らが顕微蛍光測光の目的にレーザー走査蛍光顕微鏡を³⁰⁾、最初に試作した。また、製品としては、レーザーテック社が最初に商品化に成功している³¹⁾。理論研究は、筆者らのグループが比較的最近に行なっており³²⁾、早大の大頭らはレーザー走査の眼底検査装置を開発している³³⁾。さらに、かなり早く1972年頃から東大の藤井らは、レーザー顕微鏡の面白いバージョンとして、結像レンズの要らないヘテロダイン検波方式を採用した顕微鏡を提案している³⁴⁾。そのほか、最近では、多くの研究がみられるが、ここでは割愛する。

3. レーザー走査顕微鏡の利点 —なぜ走査型か?

さて、レーザー顕微鏡は、なぜ走査顕微鏡なのだろうか? それには、光メモリがホログラムメモリでなくコンパクトディスクとして実現したこと、電子顕微鏡がSEM(走査電顕)であること、あるいは、写真機が電子スティルカメラに取って替わられるかも知れないことなどと、共通の理由があり、また一方、レーザー顕微鏡固有の別の理由がある。

レーザー顕微鏡を走査型にする最大の理由は、最初に述べたレーザー光源の致命的欠点(ただし、単色性を除いて)を、走査光学系が解消してくれることにあると思われる。走査光学系は、たとえレーザーを使っても、空間的にインコヒーレントな光源を構成することができ、その結果、分解が高く品質の良い画像を提供することができる。しかし、それだけでは、光源をレーザー化する必要はなく、レーザー特有の欠点を解消したにすぎない。レーザー走査顕微鏡にはレーザー走査顕微鏡特有の新たなメリットがあるはずである。ここではその特徴、メリットを一つずつ指摘していきたいと思う。

表1に、レーザー走査顕微鏡の特徴を、非走査型との比較を含めて列挙した。表において、○は走査型の長所、△は走査型と非走査型がともに有する特徴、そして、×は走査型の欠点を表わす。

3.1 レーザー走査顕微鏡は高コントラスト

Sheppardら以前におけるレーザー走査顕微鏡の開発の動機は、この顕微鏡が、従来の光学顕微鏡より散乱光

表 1 レーザー走査顕微鏡の特徴 (非走査型との比較)³⁵⁾

1.	△	ビデオ・エレクトロニクス技術とのカップリング
2.	○	高コントラスト; 散乱が少ない
3.	△	コヒーレント雑音 (干渉縞, スペックルパターン) がない
4.	△	コヒーレンス制御可能 (輪帯照明, 偏斜照明など)
5.	△	空間フィルタリング可能 (位相差, 微分干渉など)
6.	○	共焦点制御可能 (タイプ1~タイプ2)
7.	○	表面形状計測機能 (反射系)
8.	○	長焦点深度表示機能 (反射系)
9.	○	超高分解能 (蛍光系)
10.	○	断層観察, 三次元結像能力 (蛍光系)
11.	△~○	各種エネルギー変換観察 (OBIC, ラマン, 蛍光など)
12.	×~○	単色性
13.	×	装置が大掛かり

の影響を受けなく, 高いコントラストの像を与えてくれる点にあった⁶⁻⁸⁾. 図3に, 従来の一様照明の透過光学顕微鏡と, 走査顕微鏡における, 非焦点面に存在する微

粒子による散乱光の像への寄与の様子を示す. とくに, 生きたままの生物細胞など, 厚みのある試料の透過観察において, フォーカス面以外からの散乱光の影響は, 像のコントラストに著しい低下を招く. このメリットは, とくに鈴木らが明確に主張しており, 従来だと染色しなければ見えないような細菌類や細胞を, 無染色でコントラスト高く観察できる様子を示している²⁹⁾. 図3からも明らかなように, このメリットは, 後述の共焦点系でなくとも有効である.

3.2 スペックルフリー, フリンジフリー

さらに図4(b)に示すように, 検出器が, 空間分解をもたない, 点(あるいは面)検出器であるので, 光源に空間コヒーレンスの高いレーザーを用いても, フォーカス位置近くの試料の構造やダストに依存するリング上の干渉縞, イメージセンサーの窓のスペーシングによる干渉縞, あるいは, その他の面における不均質な面分布やほこりにより生ずるスペックルパターンなど, 一切のコヒーレント雑音(干渉縞)が, 面検出器の場合は積分され, 点検出器の場合はカットされ, 結局, 結像には寄与しない. 要するに, 点光源を用いているにもかかわらず, インコヒーレント光源を用いているのと等価な結像特性を示し, し

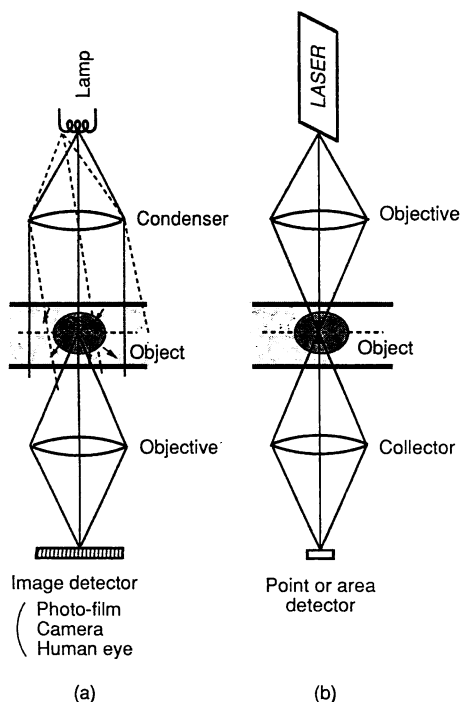


図3 散乱光の像への寄与の様子
(a) 従来の光学顕微鏡,
(b) レーザー走査光学顕微鏡

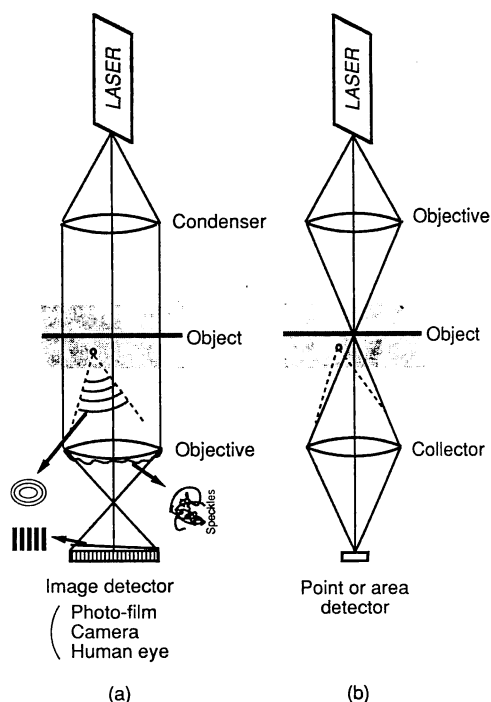


図4 コヒーレント雑音の影響
(a) 従来の光学顕微鏡,
(b) レーザー走査光学顕微鏡

たがって、焦点深度も、コンデンサストップを絞らないインコヒーレントなケラー照明の場合のそれと等価になる。

3.3 コヒーレンス制御とフィルタリング

従来の透過光学顕微鏡の結像特性を決めるものは、照明系のコヒーレンスと、結像系の瞳関数である。このコヒーレンスの制御と、結像系における瞳の制御—フィルタリング—は、走査型顕微鏡においても、通常の光学顕微鏡と全く同等に実現することができる。ただし、その制御の位置は、図5³⁵⁾に示すように、通常の顕微鏡と逆になる。このことは、1975年に Kermisch が明らかにした³⁶⁾。

したがって、走査顕微鏡は、従来の顕微鏡のもつすべての結像モード—コヒーレント～インコヒーレント照明、輪帯・偏斜照明、位相差、微分干渉、アポダイゼーション、暗視野など—を実現することができる。これまでの装置の機能を全く失わない、ということは、それに取って替わる装置となるべきものの重要なファクターであり、走査顕微鏡の大きな特徴であるといえよう。

前節において走査型顕微鏡はインコヒーレント照明の顕微鏡の結像特性をもつと述べたが、それは、図5(b)のコレクターレンズの後焦平面に、絞りが入っていない場合であり、もし、その位置の光軸上に点検出器を設けるかピンホールをいれると、観察される像はコヒーレント照明下の試料像と等価になる。

3.4 タイプ1～タイプ2

図5(b)において、従来型(a)にない新しい制御ファクターは、検出器面にある。ここでのアパーチャーの面積を無限小にしたとき、光学系は試料面を中心に完全

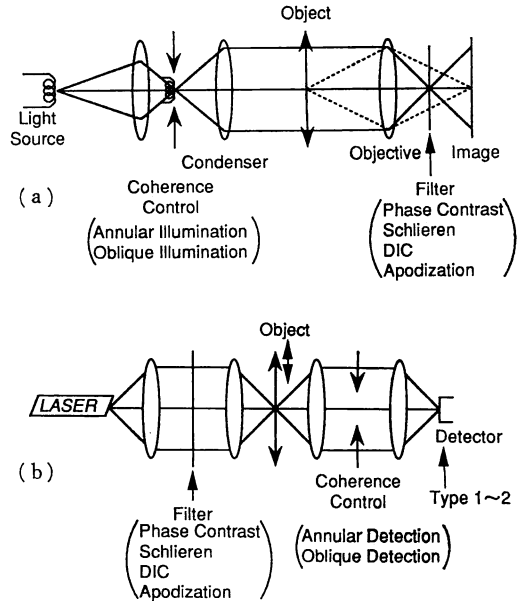


図5 コヒーレンス制御とフィルタリングの位置の比較 (a)従来の光学顕微鏡, (b)レーザー走査光学顕微鏡

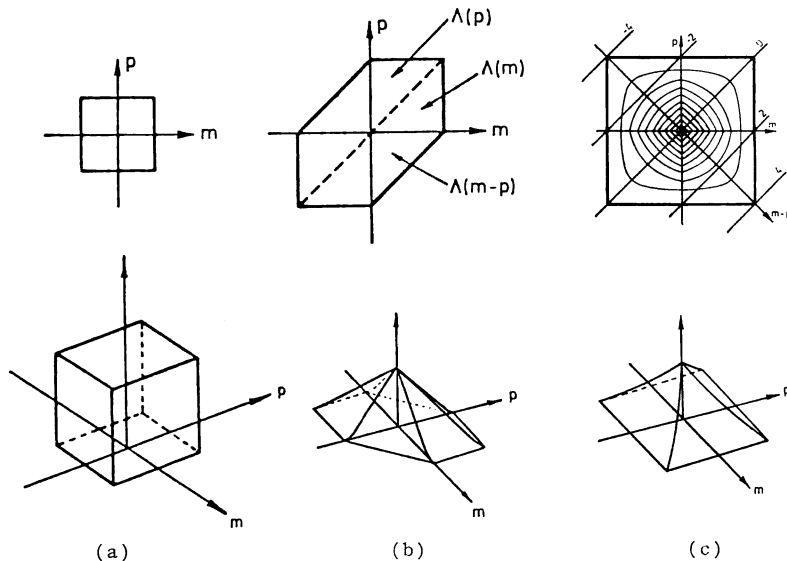


図6 部分コヒーレント伝達関数の比較⁹⁾

(a)コヒーレント検出(通常の顕微鏡のコヒーレント照明も同じ), (b)Type 1(ほぼ、インコヒーレント検出;通常の顕微鏡のインコヒーレント照明も同じ), (c)Type 2(共焦点系)

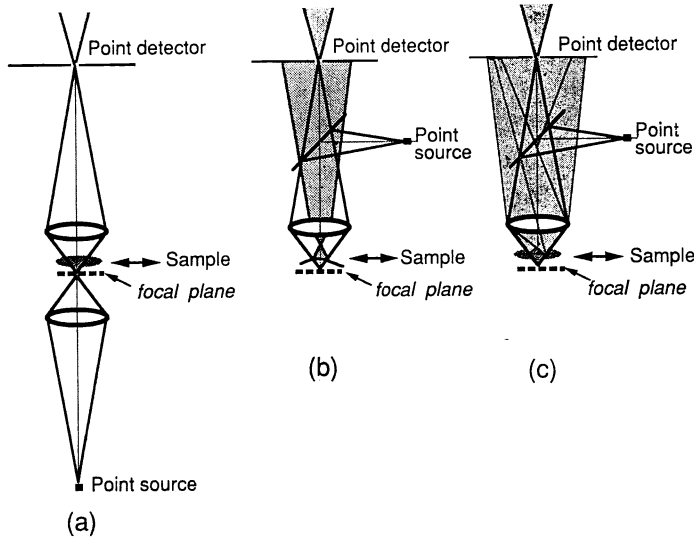


図 7 共焦点レーザー走査顕微鏡の光学系⁴⁴⁾
 (a)透過顕微鏡, (b)反射顕微鏡, (c)落射蛍光顕微鏡

に対称となる。この系は、共焦点系と呼ばれる。Shepard は、検出器の面積が十分大きいときを Type 1、十分小さいとき（すなわち、共焦点型）を Type 2 と呼び、その間の結像特性を部分コヒーレント光学伝達関数で議論した⁹⁾。

図 6 に、コヒーレント検出（従来型の顕微鏡でいうならコヒーレント照明）およびインコヒーレント検出の Type 1 の走査型顕微鏡と、Type 2 の走査型顕微鏡の部分コヒーレント伝達関数 (PCTF) の帯域を示す。PCTF $C(m, n; p, q)$ は、物体の複素振幅透過関数 $t(x, y)$ のフーリエ変換 $T(m, n)$ と、形成される画像の強度分布 $I(x_s, y_s)$ とを結びつける関数で、次式で与えられる。

$$I(x_s, y_s) = \iiint C(m, n; p, q) T(m, n) T^*(p, q) \times \exp 2\pi j \{ (m-p)x_s + (n-q)y_s \} dm dn dp dq \quad (1)$$

ここで x, y は物体の空間座標を表わし、 x_s, y_s はビームの物体面上の走査位置を表わす。部分コヒーレント伝達関数 $C(m, n; p, q)$ は光学系によってのみ決まり、物体に依存しない伝達関数である。図 6 では、簡単のため 1 次元構造物体を考え、 $C(m; p) = C(m, 0; p, 0)$ を示している。図 6 は、Type 2 が最も高い空間分解を有することを示唆しているが^{*2)}、厳密には、(1)式は、物体構造 $t(x, y)$ に対して非線形であり、分解能は物体構造に依存する。光学伝達関数 (OTF) と違うところで

ある。

3.5 反射顕微鏡における深さ分解能

これまでの議論は、照明系を含んだ透過型の顕微鏡に関するものである。その結論は、走査型の共焦点顕微鏡は、従来の顕微鏡より高い分解能が期待できることであった。しかし、共焦点光学系の魅力は、これまで述べてきた透過型より、むしろ反射型と蛍光顕微鏡において発揮される。図 7 にレーザー走査顕微鏡の三つのタイプ（透過、反射、蛍光）の光学系の原理図を示す。図 7 (b) のレーザー走査反射顕微鏡において、点光源（レーザー）から出た光は、対物レンズによってフォーカス位置に置かれた試料面上に集光され、試料によって反射された光は再び対物レンズを通り、光検出器上に点像を結ぶ。画像構成には、試料ステージあるいは、レーザービームを相対的に走査する。

反射顕微鏡において共焦点系を構成するためには、点光源の虚像の位置に点検出器を置くか、あるいはその位置にピンホールを設け、その後側でピンホールを通過した光をすべて面検出器によって検出させる。

さて、試料の観察箇所が、図 7 で示すようにフォーカス位置（破線）からずれていたとすると、反射光は、検出器位置に結像せず、そこでは円形状にぼけた強度分布を与える。点検出器は広がった点像のほんの一部の光量のみを検出するので、たとえ試料の反射率が 1 でも、ディフォーカス状態での試料像のコントラストは非常に低いことになる。要するに、フォーカス位置から離れるにしたがって、画像はぼけるのではなく、消えていくので

*2) 実際、たとえば点物体の広がり、従来のインコヒーレント照明の場合の 27% 小さい^{9), 17)}

ある。これは、従来の反射顕微鏡では決して実現できない、光学走査顕微鏡の大きな特徴である。

a. 光軸走査による焦点深度増長

面内 (x - y 軸) 走査に加え、試料を光軸 (z 軸) の方向にも動かし、各 z 位置において得られる像を足し合わせると、試料に凹凸があっても、どの位置においてもピントの合った像が得られる。Sheppard はこの方法を axial scan (光軸走査) と呼んでいる³⁷⁾。従来の顕微鏡で凹凸のある試料を観察すると、焦点深度外の面の構造はぼけてしまうのに対し、共焦点顕微鏡では、フォーカス面のみが像コントラストをもち、他の面は見えない。このような試料を、共焦点顕微鏡で axial scan して観察すると、分解能を損なうことなく、焦点深度を増長させることができる。

この観察モードは、従来の顕微鏡のトレードオフであった、回折限界による分解能と焦点深度の問題をそれぞれ独立にしまい、分解能を高くするために、NA の大きなレンズを用いても、いくらでも深い焦点深度を実現することができるようになった³⁸⁾。

b. Surface profiling

ピントの合っている面のみしか見えないことを逆に利用してやると、試料の深さ方向の位置を求めることができる。Hamilton らはこの原理を用いて、顕微形状測定器を試作し、 $0.1 \mu\text{m}$ の z 軸分解を実現した³⁹⁾。

3.6 蛍光顕微鏡—3次元が見える

厚みのある試料を通常の顕微鏡で観察すると、フォーカス面近傍の面からのディフォーカス像の重畳により、

観察面の像がクリアに見えない。したがって、現実には、厚みをもつ試料に対しては、対物レンズの NA で決まる分解能よりはるかに悪い解像度しか得られない。このことは、とくに、高分解でかつ微弱光観察を要求する蛍光顕微観察において、シリアスな問題となる。

フォーカス面以外の像をぼけないように、焦点深度を深くするためには、対物レンズの NA を小さくすればよいが、そうすれば当然分解能の低下を招き、高分解顕微観察の目的に矛盾する。また、NA を小さくするとエネルギーの収集効率も落ち、蛍光顕微鏡においては許されることではない。

さて、蛍光顕微鏡においても、レーザー走査の共焦点顕微鏡として用いると、図7(c)に示すように観察面以外からの蛍光は、検出器面上に設置されたピンホールによりカットされ、3次元蛍光分布のうち、特定の断面(観察面;フォーカス面)だけの蛍光分布が観察される。そこで、フォーカス面を順次ずらしていく(光軸(z 軸)を走査する)と、3次元が見えてくる。

焦点から外れるに従って、点像は広がってぼけるのではなく、消えていくので、これまでの蛍光顕微鏡では、上方から観察している限りその存在が見えなかった、薄膜や板など、面方向に構造をもたない蛍光試料も、共焦点走査顕微鏡では、その存在、奥行き方向の分布が観察できる。

レーザー走査の蛍光顕微鏡の3次元結像特性は、筆者らによって詳しく理論解析されており^{32,40)}、検出器面積や、照明系の瞳関数等の最適化設計が行なわれてい

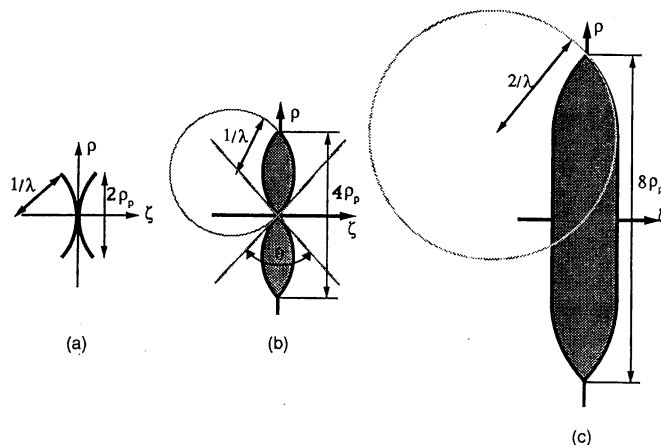
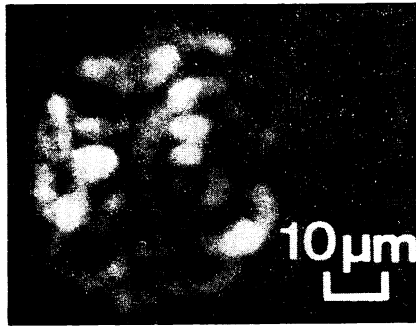
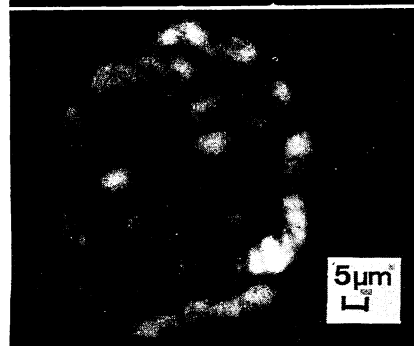
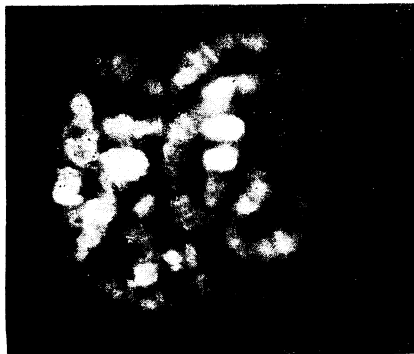


図8 顕微鏡の3次元空間周波数帯域⁴²⁻⁴⁴⁾

(a)コヒーレント照明透過顕微鏡、(b)インコヒーレント照明透過顕微鏡＝レーザー走査透過顕微鏡＝落射蛍光顕微鏡＝レーザー走査蛍光顕微鏡(非共焦点型)、(c)レーザー走査共焦点蛍光顕微鏡



(a)



(b)

図9 従来の蛍光顕微鏡像とレーザー走査共焦点蛍光顕微鏡像の比較^{40,44)} (試料: ユスリカ唾液腺染色体). (a) 落射蛍光顕微鏡像 (実際には, レーザー走査顕微鏡で, 非共焦点系にして得た像), (b) レーザー走査共焦点蛍光顕微鏡像シリーズ (特定の断面が観察され, かつぼけていないクリアな像が得られている. 光軸方向に $1 \mu\text{m}$ 間隔)

る⁴¹⁾.

図8に, 1次のBorn近似を用いた場合の各種透過顕微鏡の3次元空間周波数帯域と, 3次元強度点像分布関数のフーリエ変換によって求めた各種蛍光顕微鏡の3次元空間周波数帯域を示す⁴²⁻⁴⁴⁾. 共焦点型のレーザー走査蛍光顕微鏡(図(c))は, 面内方向(ρ 軸)に対して, 従来の落射蛍光顕微鏡やインコヒーレント照明透過顕微鏡(図(b))の2倍⁴⁵⁾, コヒーレント顕微鏡(図(a))の4倍の分解能を有する. また, 光軸方向(ζ 軸)に対しては, 図(a)や(b)と異なり, ζ 軸上にも帯域広がりをもつ^{*3)}. この3次元帯域の図は, 先に定性的に述べた, レーザー走査の蛍光顕微鏡を用いれば薄膜や多層膜などの3次元分布が観察できる, すなわち, 真に3次元結像機能を有することを, 理論的に証明している.

図9に従来の落射照明蛍光顕微鏡と, レーザー走査蛍光顕微鏡で観察された画像を示す^{40,44)}. レーザー走査蛍光顕微鏡がはるかにクリアな像を与えている理由は, 図8における面内方向の分解が高いことによるのではなく, むしろ光軸方向に分解をもち, ディフォーカス像が重畳していないことによると考えられる.

この蛍光顕微鏡における3次元分解機能や, 反射系における深さ識別機能は, 透過型においてはたとえ共焦点系を用いても得られない, レーザー走査顕微鏡の特徴のひとつである.

4. 装置について

17世紀以来長い歴史をもつ光学顕微鏡, それが, 新しいレーザー走査顕微鏡にとって替わられるかどうかは, 装置化の技術力にかかっていると思う. 3.3節で述べたように, これまでの光学顕微鏡がもつ機能をすべてカバーでき, さらに, 走査系と共焦点系のもたらす表1に示した多くの機能をもつのであるから, すべての光学顕微鏡がレーザー走査型に代わって何ら不思議はない. しかし, 逆に, レーザー走査系の装置は, これまでの目視型あるいはビデオマイクロスコープと比べて, はるかに複雑で大掛かりであり, 調整も容易でなく高価なものとなる. 逆に, よほどのメリットが無い限りこれまでの顕微鏡にとって替わることはないかもしれない.

*3) 図(b)は8の字状の帯域をしており, ζ 軸近傍に, 対物レンズのNAで決まる帯域角度の制限がある. このような8の字状の3次元伝達関数は, 焦点からはずれるにしたがって, 点像が広がることを示唆する. 一方, 図(c)はカットオフが ρ 軸方向に対してフラットなローパス特性を有しており, これは, ディフォーカス像が面内に広がらないことを意味している.

レーザー走査顕微鏡は、特殊で高価な計測装置になるのか、これまでの光学顕微鏡の広範な分野のマーケットに進出して、新しい光学顕微鏡として一般に使われるようになるのか、それは、今後の新しい機能とその応用分野の開拓とともに、装置化技術、およびその要素技術の研究開発にかかっていると思う。

4.1 光源—レーザー

タンデム型(2.4節)を除いて、光源には通常レーザーを用いる。とくに共焦点系では点光源としてレーザーの使用は必須である。現在製品化されているレーザー顕微鏡は、すべてガスレーザーを光源に用いているが、ガスレーザーはスイッチを入れてから安定発振するまで時間がかかり、また高圧電源が必要で、さらにサイズが大きく長いので、ランプに替わるには、実用上問題が大きい。光学走査顕微鏡の光源には、半導体レーザー(LD)や、LD励起のYAGレーザー(あるいは、その2次、3次高調波発生器付き)など、固体レーザーが用いられるべきであろう。サイズもコンパクトになり、高圧電源も不要になる。

レーザー光源の空間コヒーレンスの高さは、3.2、3.3節で述べたとおり、走査系を構成することによって解決されるとして、時間コヒーレンスの高さ—単色性—は致命的な場合がよくある。しかし、先に述べたと同じ理由で、色素レーザーや多波長同時発振のガスレーザーは、あまり使い勝手がよくない。これも、最近実用化研究が進んでいるアレキサンドライトやTi:サファイヤなどの、チューナブルな固体レーザーが非常にプロミシングだと思われる。

発光ダイオード(LED)も、最近高輝度化の研究が進み、また2波長、3波長のLEDも製品化されており、これらも光学走査顕微鏡の光源として使えるかもしれない。

4.2 走査機構—ビーム走査とステージ走査

レーザー走査顕微鏡における最大の技術的問題点は、おそらく走査機構であろう。結局のところ、光を振らすべきか(ビーム走査)、試料を動かすべきか(ステージ走査)、結論が出ていないような気がする。走査顕微鏡が登場した初期においても、フライングスポット顕微鏡とニポウディスク顕微鏡はビーム走査型であり、Minskyの顕微鏡はステージ走査であり、また、早い時期に開発された製品においても、カールツァイスはガルバノミラーによるビーム走査型、バイオラッドのSOM 100はボイスコイルによるステージ走査であった。

しかし、最近の製品は、ビーム走査が主流を占めるよ

うになってきている。それはおそらくリアルタイムで像が見えることによると思われる。しかし高速で変化したり動く試料以外は、必ずしもビデオレートで走査する必要はなく、多分に人間工学的(心理学的)ファクターにより、ビーム走査が要求されている場合が多い。むしろ、次に述べるレンズの収差の問題や、装置化の容易さ、精度、コンパクトさの点において、メカニカルなステージ走査が有利なケースも多いはずなのだが、その最たる例が、コンパクトディスクやレーザーディスクである。コンパクトディスクと同様、少なくとも固体表面などスタティックな試料の観察は、ステージ走査でよいのではないだろうか? 心理学的、人間工学的問題は、ディスプレイの工夫により解決されよう*4。

一方、高速性以外においても、ビーム走査が必要とされるケースは、マッキングオイルを使う場合や、ステージ走査の振動により、試料の位置や形状など、状態が変化する恐れがある場合が挙げられる。

また、励起・照明走査系と結像走査系が共有できない場合(たとえば、透過顕微鏡や、音響光学素子で励起光走査し、蛍光測光する場合など)、検出器に撮像管あるいは撮像素子(ビディコンやCCDカメラなど)を用いることも考えられる。この場合、走査は電子走査となる。共焦点系を構成するためには、イメージディセクターなど、蓄積効果のない撮像素子を用いる。イメージディセクターを用いた場合、検出器の大きさ(4.4節において議論)はダイノードの前のアパーチャーの大きさに対応する。

表2に現在用いることのできる走査方式とその長所欠点を示す³⁵⁾。実際には、水平(x)と垂直(y)および光軸(z)方向のそれぞれの走査に、異なる方式を用いるケースがよくある。

4.3 対物レンズ

走査顕微鏡の対物レンズを議論する際に必ず対比されるのは、コンパクトディスク(CD)のピックアップレンズである。筆者は、CD成功の鍵は、光源とレンズにあったと考えている。CDの開発においては、光源には、小型で、安価、低電力でウォーミングアップタイムの要らない半導体レーザーを開発し、かつ量産化に成功し、また、ピックアップレンズは、軽くてコンパクトな、プラスチックの非球面の一枚レンズを開発し、かつモル

*4 人間工学的立場からついでに言うと、現在のTVの解像度は顕微鏡観察には全く不満足で(そのため、このままでは、TVカメラを用いたビデオマイクロスコープは成功しえない)、ハイビジョンの走査方式が、顕微鏡観察にこそ真剣に望まれる。

表 2 レーザー走査顕微鏡の走査方式の比較³⁵⁾

走査方式：走査エレメント	コメント
ビーム走査：	高速走査性，液浸系も可，試料に対して無振動 (生きた生物試料，溶液中に浮遊する試料など)
ガルバノミラー	高精度，中速
共振ガルバノミラー	高速，回転速度分布あり
ポリゴンミラー	高精度，高速，デッドタイム長い，やや大掛かり
タービン駆動ポリゴンミラー	超高速 (ビデオレート可)，回転速度が不安定
AO 偏向器	ビデオレート可，分散あり (蛍光には使用不可)，小さい開口
ホロスキャナー	大掛かり，中速，分散あり
ステージ走査：	広視野，高精度走査，低収差，低価格，光学調整容易，小型
ボイスコイル	安価，低速，小型，速度ムラあり
ステッピングモータ	広視野，超低速
ピエゾ素子	最高精度，低速，小型
ステッピングモータ+ピエゾ	広視野，高精度，小型，超低速
エアベアリング	大掛かり

ド法により量産化に成功した。従来の顕微鏡対物を使う限り，重いし，高いし，何より量産ができなかったであろう。

このような，全く新しいレンズを設計できた理由は，CD の光学系がレーザー走査系であるおかげである。すなわち，レーザー光源は単色であるので色収差補正は要らなく，また，観察するのは軸上に絞られたスポットのディスクからの反射光であり，非軸の収差を補正する必要もないのである。レーザー走査顕微鏡も同様，レーザー走査系であるので，もし，ステージ走査方式を採用すれば，被観測光がスペクトル広がりをもつ蛍光系の場合を除いて，CD のピックアップレンズをそのまま利用できる。あるいは，CD において全く新たに専用レンズを開発したように，光学走査顕微鏡も，新たに専用レンズを設計されるべきかもしれない。

4.4 ピンホールと検出器

光学走査顕微鏡の最後の重要なキー・エレメントは，光検出器である。とくに，蛍光測光は微弱光測光であるので，高感度低雑音の光検出器が必要であり，共焦点走査系の場合，さらにピンホールによって光量がカットされるので，検出器の選択・開発は非常に重要である。

共焦点は，点光源と点検出器で構成されることが特徴であるが，点光源はレーザーを使うことにより自動的に実現できるとして，点検出器はその設計に十分な検討が必要である。実際には，上に述べたように，検出器自身の面積が小さいものを設計するより，その直前にピンホールを設置するのが普通である。その位置合せもさるこ

とながら，とくにビーム走査の場合，ビームを試料上では走査しても，検出器上では，全く動くことのないように設計，製作しなければならず，ピンホールが小さければ小さいほど，その調整は困難を極める。

では，点検出器とは，どれくらい小さくあるべきなのだろうか？ 共焦点系は，理論的には無限に小さい検出器を想定するが，小さい検出器は検出器面に届くエネルギーをロスすることになり，顕微測光においては致命的ともいえる。共焦点系のメリット (3次元が見える，深さがわかる，など) を損なわず，エネルギーロスを克服できるような検出器サイズはないものだろうか？

筆者らは，検出器の面積，形状の最適化を検討してきた。図 10 に筆者らによって求められた，レーザー走査蛍光顕微鏡の 3次元 OTF の，検出器面積に関する比較を示す⁴¹⁾。図の見方は図 8 と同じである。図 10 (b) は，検出器 (あるいはピンホール) の大きさを，対物レンズが作るエアリーディスク (エアリーパターンの最初の暗線までの円) と同じにした場合の 3次元 OTF であり，図 (a) の点検出器 (共焦点系) および，図 (d) の面検出器 (非共焦点系：検出器面積が十分広い) と比較して，

- 1) 面内分解能は非共焦点系並み (従来の落射蛍光系とも同じ) であるが，
- 2) 光軸方向には，共焦点系のように，角度制限無く分解機能をもっていることがわかる。さらに，
- 3) エアリーディスクの大ききまで検出器を広くすることによって，観察面からの発光エネルギーはほと

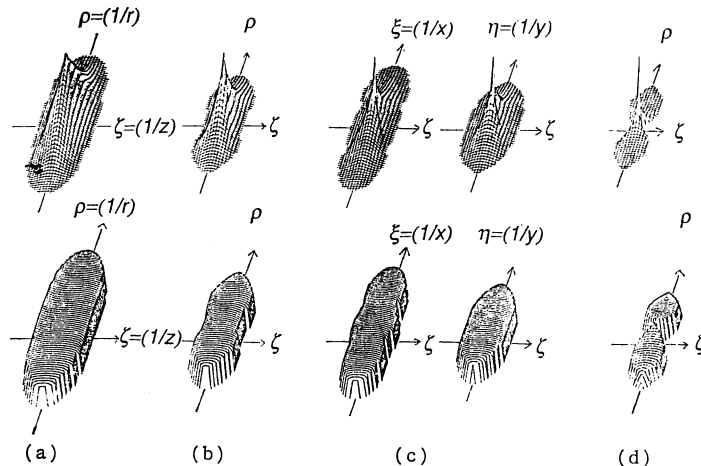


図 10 3次元 OTF によるレーザー走査蛍光顕微鏡の検出器面積の比較⁴¹⁾
 (上側はリニアスケール, 下側は log スケール)
 (a)点検出器 (Type 2; 共焦点蛍光顕微鏡), (b)検出器の大きさが対物レンズの作るエアリー・ディスクと同じ場合, (c)線検出器 (Type 1.5), (d)面検出器 (Type 1: 非共焦点蛍光顕微鏡)
 =通常の落射蛍光顕微鏡

んど収集できる。(それ以上広げても, 他の面からの発光, 散乱光を収集していることになり, メリットはない。)

エアリーディスクの大きさは, 試料面では非常に小さいが, 検出器側では拡大系であるので, その大きさは数 μm ~ 10 数 μm 程度となり, 光学調整も容易になる。

図 10(c)は点ではなくて, 直線状に伸びた検出器(あるいは, 検出器の前にピンホールならぬスリットを設ける)をもつ走査顕微鏡の3次元 OTF である⁴¹⁾。Koester が, 1980年に角膜測定に考案した走査顕微鏡⁴⁵⁾や, 日本で最初に製品開発された LaserTec 社の音響光学偏向器と1次元 CCDを用いた走査顕微鏡³¹⁾は, この光学系に対応しており, 決して共焦点系ではなく, Type 2と呼ばれるべきではないのだが, 蛍光系において3次元が見えたり, 反射系で深さ識別ができ, 共焦点系の性質を有していることが知られていた。筆者らは, このようなスリット検出器を, Sheppard の定義による Type 1 と Type 2 のちょうど中間のような形状をしているところから Type 1.5 と呼んでいるが, 図 10(c)を見れば,

- 1) 面内分解は, スリットの広がる方向(図中, $\xi=1/x$ 軸)には Type 1 程度, スリットを切る方向(図

中, $\eta=1/y$ 軸)には Type 2 に近い帯域をもっており, また,

- 2) 光軸方向には, 角度制限なく, スリットの方向に依存せず, 分解機能を有していることが確認できる⁴¹⁾。

5. おわりに

レーザー走査顕微鏡の講演会が, 展示会を併設して大阪で開催されたのは, 1988年1月のことである²⁶⁾。もちろん, それ以前から, レーザー走査顕微鏡は広く知られた装置であり, 多くの優れた研究業績も見られていたわけだが, この講演会が, この顕微鏡に関する研究開発および市場開拓のひとつのトリガーになったことも事実だと思われる。

その後, レーザー顕微鏡研究会が設立され, トリガリングだけに終わらず, 地道な研究開発のうねりが続くよう, 環境づくりが進められている。ブームをインパルスに終わらせないためには, 常に密度の濃い研究が必要であり, 長所ばかりでなく, むしろ問題点や障害物に対する十分な認識と対策が必要である。

この総合報告では, レーザー走査顕微鏡のメリットを列挙するのみならず, それらが, 本当に有用な機能なのかどうか吟味しながら, この新しい顕微鏡を概観してみた。これからこの分野に参入される研究者の方々に, 何らかの参考になれば, 望外の喜びである。

⁴¹⁾ これは非常にユニークな顕微鏡で, 光源はランプを用い, 走査は, 4角プリズムを回転させるだけでビーム走査を実現し, 像は写真フィルムあるいは肉眼で直接記録あるいは観察できる。実際に, Koester らは, この原理を装置化し, 実験データも示している⁴¹⁾。

文 献

- 1) J. Z. Young and F. Roberts: *Nature*, **167** (1951) 231.
- 2) P. O'B. Montgomery, F. Roberts and W. Bonner: *Nature*, **177** (1956) 1172.
- 3) W. T. Welford: "Theory and principles of optical scanning microscopy," *Scanned Image Microscopy*, ed. E. A. Ash (Academic, 1980).
- 4) R. C. Mellors and R. Silver: *Science*, **114** (1951) 356-361.
- 5) V. K. Zworykin and E. G. Ramberg: *Photoelectricity and Its Application*, 4th ed. (John-Wiley, New York, 1961) Chap. 16, pp. 366-367.
- 6) M. Minsky: U. S. Patent No. 3013467 (1961).
- 7) M. Petran and M. Hardravsky: *Science*, **157** (1967) 305-307; *J. Opt. Soc. Am.*, **58** (1968) 661-664; チェコスロバキア・パテント No. 7720 (1966).
- 8) P. Davidovits and M. D. Egger: *Nature*, **223** (1969) 831; *Appl. Opt.*, **10** (1971) 1615-1619.
- 9) C. J. R. Sheppard and A. Chodhury: *Opt. Acta*, **24** (1977) 1051-1073; C. J. R. Sheppard and T. Wilson: *Opt. Acta*, **25** (1978) 315-325; C. J. R. Sheppard and T. Wilson: *Optik*, **55** (1980) 331-342.
- 10) D. K. Hamilton, T. Wilson and C. J. R. Sheppard: *Opt. Lett.*, **6** (1981) 625-626.
- 11) T. Wilson and D. K. Hamilton: *J. Microsc.*, **128**, Pt. 2 (1982) 139-143.
- 12) D. K. Hamilton and T. Wilson: *Appl. Phys. B*, **27** (1982) 211-213.
- 13) C. J. R. Sheppard and T. Wilson: *Opt. Acta*, **27** (1980) 611-624.
- 14) Dekkers and de Lang; T. Wilson and C. J. R. Sheppard: *Proc. SPIE, Int. Opt. Computing Conf.*, **232** (1980) 203-209; D. K. Hamilton and C. J. R. Sheppard: *J. Microsc.*, **133**, Pt. 1 (1984) 27-39.
- 15) T. Wilson, J. N. Ganaway and P. Johnson: *J. Microsc.*, **118**, Pt. III (1980) 309-314.
- 16) T. Wilson and C. J. R. Sheppard: *Opt. Acta*, **26** (1979) 761-770.
- 17) T. Wilson and C. Sheppard: *Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy* (Academic, London, 1984).
- 18) G. J. Brakenhoff, P. Blom and P. Barends: *J. Microsc.*, **117**, Pt. 2 (1979) 219-232.
- 19) G. J. Brakenhoff: *J. Microsc.*, **117**, Pt. 2 (1979) 233-242.
- 20) G. J. Brakenhoff, G. J. S. Binnerts and C. L. Wildringh: *Scanned Image Microscopy* (Academic, London, 1980).
- 21) E. A. Ash, ed.: *Scanned Image Microscopy* (Academic, London, 1980).
- 22) Carl Zeiss 社 (西独), IBT デュブリエ社 (現, Laser Sharp; 英), 日本自動制御 (現, レーザテック), 各カタログ.
- 23) Scanning Imaging Technology Conference, chaired by T. Wilson and L. Balk: *Proc. SPIE*, **809** (Hague, Netherlands, 1987).
- 24) 1988 Conference on Scanning Microscopy Technologies and Applications, chaired by E. C. Teague: *Proc. SPIE*, **897** (Los Angeles, 1988).
- 25) 1st Conference on Confocal Microscopy, Abstract Digest (Amsterdam, Netherlands, 1989).
- 26) 応用物理学会関西支部講演会・展示会: "レーザー走査顕微鏡—生物観察応用を中心として—", 資料集 (大阪, 1988).
- 27) 第3回レーザー顕微鏡研究会, 講演会資料集 (東京, 1989).
- 28) 中口智之, 一岡芳樹, 鈴木達朗: 第27回春季応用物理学予稿集, 2a-P-6 (1980) p. 52; Y. Ichioka, T. Kobayashi, H. Kitagawa and T. Suzuki: *Appl. Opt.*, **24** (1985) 691-696.
- 29) T. Suzuki and Y. Horikawa: *Appl. Opt.*, **25** (1986) 4115-4121; 鈴木達朗, 堀川嘉明: レーザー研究, **15** (1987) 636-646.
- 30) 藤田哲也, 高松哲郎: *パリティ*, **2**, No. 8 (1987) 56-59; T. Takamatsu and S. Fujita: *J. Microsc.*, **149**, Pt. 3 (1988) 167-174.
- 31) 栗村大吉, 大出孝博, 米沢 良: 光学技術コンタクト, **24** (1986) 612-617; 日経マイクロデバイス (1985, 10月) 139-143.
- 32) 中村 収, 河田 聡, 南 茂夫: *応用物理*, **57** (1988) 784-791.
- 33) 大頭 仁: *光学*, **17** (1988) 212-219; 日本眼光学学会誌, **8** (1987) 1-7.
- 34) 藤井陽一: *応用物理*, **48** (1979) 66-69; 藤井陽一, 尾崎政男: 16回画像工学コンファレンス論文集 (1985) pp. 247-252.
- 35) 河田 聡, 南 茂夫: 電気学会全国大会講演論文集, **S 6** (1989) 13-16.
- 36) D. Kermisch: *J. Opt. Soc. Am.*, **65** (1975) 887-891.
- 37) Ref. 17, Chap. 5.
- 38) C. J. Sheppard, D. K. Hamilton and I. J. Cox: *Proc. R. Soc. Lond. A*, **387** (1983) 171-186.
- 39) D. K. Hamilton and T. Wilson: *Appl. Phys. B*, **27** (1982) 211-213; *J. Appl. Phys.*, **53** (1982) 5320-5322.
- 40) 河田 聡, 中村 収, 南 茂夫: 第18回画像工学コンファレンス論文集 (1987) 39-42.
- 41) 河田 聡, 有本理恵子, 南 茂夫: 第36回春季応用物理学学会予稿集 (1989) 4pZA-9, p. 817; 河田 聡: 第3回レーザー顕微鏡研究会講演資料集 (1989) 23-29.
- 42) N. Strieble: *Opt. Acta*, **31** (1984) 1233-1241.
- 43) S. Kawata, O. Nakamura and S. Minami: *J. Opt. Soc. Am. A*, **4** (1987) 292-297.
- 44) 河田 聡: 光技術コンタクト, **26** (1988) 43-50; 河田聡, 南 茂夫: *O plus E*, **113** (1989) 87-93.
- 45) I. J. Cox, C. J. R. Sheppard and T. Wilson: *Optik*, **60** (1982) 391-396.
- 46) C. J. Koester: *Appl. Opt.*, **19** (1980) 1749-1757.