



位相差顕微鏡の像コントラストに関する考察

大木 裕史

(株)ニコン光学本部光学技術開発部 〒140 東京都品川区西大井 1-6-3

(1991年2月13日受付, 1991年6月19日受理)

Theoretical Considerations on Phase Contrast Imaging

Hiroshi OOKI

Optical Division, Research and Development Department, Nikon Corp.,
1-6-3, Nishi-Ohi, Shinagawa-ku, Tokyo 140

(Received February 13, 1991; Accepted June 19, 1991)

A new approach for analyzing phase contrast imaging is proposed. It is shown, in the phase contrast microscope, the intensity distribution of the phase contrast image is represented by the simple imaging equation which is similar to that of the ordinary incoherent imaging. This equation clarifies the characteristics of phase contrast microscopy.

1. はじめに

位相差顕微鏡が F. Zernike によって発表されてから 55 年がたつ。この間、位相差法は顕微鏡の一大勢力として微分干渉法とともに位相物体を見るための有力な手段となってきた。しかし中田¹⁾が指摘しているように、その像の見え方について、世間一般の理解にはなお少なからぬ誤解が見受けられるように思われる。

多くの教科書(たとえば文献 2))では、位相物体の振幅分布を

$$o(x) = \exp[i\phi(x)] = 1 + i\phi(x) \quad (1)$$

としたとき、位相差法による像の強度分布 $I(x)$ は

$$I(x) = 1 + 2\phi(x) \quad (2)$$

となととしている。従って(2)式からは $\phi(x)$ に応じて強度が変わることになる。すなわち階段状の表面をもった物体を観察するとき、各ステップごとに明暗の差があらわれなければならない。しかし現実には必ずしもそうでなく、階段の幅がある程度以上広いときには、像のコントラストは階段の段差部分にのみあらわれ、他の部分はすべて同じ明るさに見える。この段差部分にあらわれるコントラストがハロと呼ばれ、位相差法において重要な役割を果たすのであるが、以上に述べたようにこうした見え方は(2)式からは導かれぬ。一般的な解析として

は、古くは Bennett らによる教科書³⁾、比較的最近のものでは Nagel⁴⁾、Yamamoto ら⁵⁾の報告があり、結像の様子は詳しく調べられている。ただしこれらの文献では、とくに定性的な理解をするのに都合のよい扱いをしているわけではない。そこで、この論文の目的は、位相差法の結像について簡素化したモデルを用いて解析を行い、その独特なコントラストについて直観的な理解ができるような式を導くことにある。

なお、位相差顕微鏡の簡単な構成図を Fig. 1 に示しておく。

2. 位相差法の結像公式

位相差顕微鏡の結像も、基本的には一般の部分コヒーレント結像で扱うことができる。すなわち複素コヒーレンス度を $\mu(x)$ 、物体の振幅分布を $o(x)$ 、対物レンズの透過関数を $K(x)$ とすれば像強度分布 $I(x)$ は

$$I(x) = \iint_{-\infty}^{\infty} \mu(s-t) o(s) o^*(t) K(s-x) \times K^*(t-x) ds dt \quad (3)$$

となる。なお、簡単のため以後の式の導出もすべて一次元で取り扱う。二次元への拡張は容易である。

さて透過関数 $K(x)$ は瞳関数 $f(\xi)$ (開口数 NA) のフーリエ変換である。位相差法の場合、瞳に光の位相を

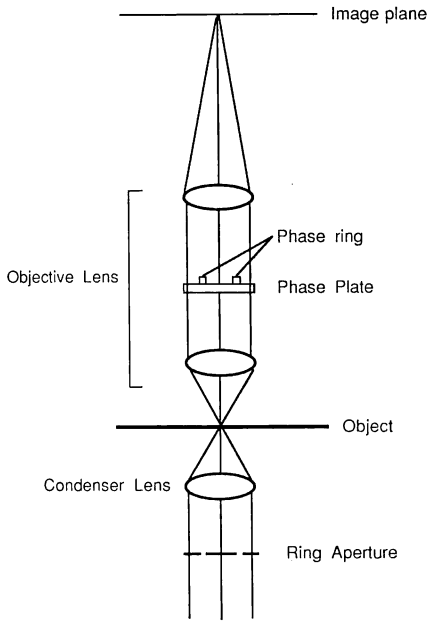


Fig. 1 Schematic drawing of the phase contrast microscope.

$\pm 90^\circ$ 変える位相リングが瞳座標の $NA_i \sim NA_o$ にわたって入っているとすれば, $f(\xi)$ は次のように定義できる.

$$f(\xi) = f_a(\xi) \pm i f_b(\xi) \quad (4)$$

ここに

$$f_a(\xi) = \begin{cases} 1 & (NA_o < |\xi| < NA) \\ 0 & (NA_i < |\xi| < NA_o) \\ 1 & (|\xi| < NA_i) \end{cases} \quad (5)$$

$$f_b(\xi) = \begin{cases} 0 & (NA_o < |\xi|) \\ 1 & (NA_i < |\xi| < NA_o) \\ 0 & (|\xi| < NA_i) \end{cases} \quad (6)$$

ただし位相膜の吸収は無視した. いま $f_a(\xi)$, $f_b(\xi)$ のフーリエ変換をそれぞれ $K_a(x)$, $K_b(x)$ とすれば明らかに

$$K(x) = K_a(x) + i K_b(x) \quad (7)$$

である. また, 照明系に配置されるリング絞りと位相リングのサイズが同一であると仮定すれば, Van Cittert-Zernike の定理より複素コヒーレンス度 $\mu(x)$ は

$$\mu(x) = K_b(x) \quad (8)$$

で与えられる. (6)式が照明系に配置されるリング絞りを示す関数と同じになることを考えれば明らかであろう. (1), (7), (8)式より(3)式は

$$I(x) = \iint K_b(s-t) \{1+i\phi(s)\} \{1-i\phi(t)\}$$

$$\begin{aligned} & \times [K_a(s-x) \pm i K_b(s-x)] \\ & \times [K_a^*(t-x) \mp i K_b^*(t-x)] ds dt \quad (9) \end{aligned}$$

いま無収差円形開口を考えれば $K_a(x)$, $K_b(x)$ は実関数だから以後複素共役記号は省略する. (9)式を展開して ϕ についての一次の項のみとりだし, これを $I_\phi(x)$ とすれば,

$$\begin{aligned} I_\phi(x) = & i \iint K_b(s-t) [\phi(s) - \phi(t)] \\ & \times [K_a(s-x) K_a(t-x) \\ & + K_b(s-x) K_b(t-x)] ds dt \\ & + \iint K_b(s-t) [\phi(s) - \phi(t)] \\ & \times [\pm K_a(s-x) K_b(t-x) \\ & \mp K_b(s-x) K_a(t-x)] ds dt \quad (10) \end{aligned}$$

ここで $K_b(x)$ は偶関数であり

$$K_b(s-t) = K_b(t-s) \quad (11)$$

が成り立つ. これより(10)式右辺第一項は0になることが容易にわかる. よって $I_\phi(x)$ を与えるのは(10)式右辺第二項のみである. 従って

$$\begin{aligned} I_\phi(x) = & \iint K_b(s-t) [\phi(s) - \phi(t)] \\ & \times [\pm K_a(s-x) K_b(t-x) \\ & \mp K_b(s-x) K_a(t-x)] ds dt \\ = & \iint K_b(s-t) \phi(s) \\ & \times [\pm K_a(s-x) K_b(t-x) \\ & \mp K_b(s-x) K_a(t-x)] ds dt \\ & + \iint K_b(t-s) \phi(s) \\ & \times [\mp K_a(t-x) K_b(s-x) \\ & \pm K_b(t-x) K_a(s-x)] ds dt \\ = & \pm 2 \iint K_b(s-t) \phi(s) \\ & \times [K_a(s-x) K_b(t-x)] ds dt \\ & \mp 2 \iint K_b(s-t) \phi(s) \\ & \times [K_b(s-x) K_a(t-x)] ds dt \quad (12) \end{aligned}$$

ここで, $K_b(x)$ の自己相関は $\{f_b(\xi)\}^2$ のフーリエ変換であり, これは(6)式より $f_b(\xi)$ のフーリエ変換, $K_b(x)$ に等しい. よって下式が導かれる.

$$\begin{aligned} & \iint K_b(s-t) \phi(s) [K_a(s-x) K_b(t-x)] ds dt \\ & = \int \phi(s) K_a(s-x) ds \int K_b(s-t) K_b(t-x) dt \end{aligned}$$

$$= \int \phi(s) K_a(s-x) K_b(s-x) ds \quad (13)$$

一方、 $K_a(x)$ と $K_b(x)$ の接合積は積 $f_a(\xi) f_b(\xi)$ のフーリエ変換であり、これは(5)、(6)式よりゼロである。よって

$$\begin{aligned} & \iint K_b(s-t) \phi(s) [K_b(s-x) K_a(t-x)] ds dt \\ &= \int \phi(s) K_b(s-x) ds \int K_b(s-t) K_a(t-x) dt \\ &= 0 \end{aligned} \quad (14)$$

(13)、(14)式を(12)式に代入すれば、最終的に下式が導かれる。

$$I_\phi(x) = \pm 2 \int \phi(s) K_a(s-x) K_b(s-x) ds \quad (15)$$

ここで右辺の複号は位相膜の位相変化量 $\pm 90^\circ$ に対応している。

(15)式が位相差法による位相物体の像のコントラストを最も簡潔に与える式である。もちろん(15)式は無収差円形開口、かつ位相リングとリング絞りのサイズが同一であること、等の仮定のもとに導かれているので、透過関数 $K(x)$ として任意の関数をとることはできないが、一般的な接合積の形で表現されることから直観的な見通しがよく、位相差法による結像の定性的な理解に極めて有用である。明らかに(15)式は、 $\phi(x)$ なる強度分布をもつ物体を、 $[K_a(x) K_b(x)]$ なる点像強度分布を有する光学系でインコヒーレント結像した場合に等しい。なお、ここでは簡単のため位相膜の吸収は無視したが、これを考慮に含めることは容易である。

3. 位相差法の定性的な説明

ここでは(15)式をもとに位相差法による像の特徴を直観的に理解することにする。

まず $\phi(x)$ が一定 ($=\phi_0$) の場合を考えると

$$\begin{aligned} I_\phi(x) &= \pm 2\phi_0 \int_{-\infty}^{\infty} K_a(s-x) K_b(s-x) ds \\ &= \pm 2\phi_0 \int_{-\infty}^{\infty} ds \\ &\quad \times \int_{-\infty}^{\infty} f_a(\xi) \exp[-i k \xi (s-x)] d\xi \\ &\quad \times \int_{-\infty}^{\infty} f_b(\eta) \exp[-i k \eta (s-x)] d\eta \\ &= \pm 2\phi_0 \int_{-\infty}^{\infty} f_a(\xi) d\xi \int_{-\infty}^{\infty} f_b(\eta) d\eta \\ &\quad \times \int_{-\infty}^{\infty} \exp[-i k(\xi+\eta)(s-x)] ds \end{aligned}$$

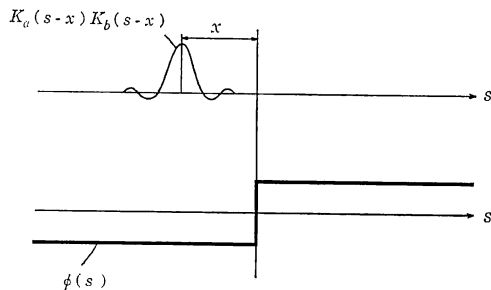


Fig. 2 Diagram of the imaging equation.

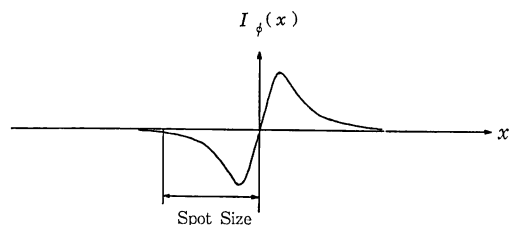


Fig. 3 Intensity distribution of the image deduced from Fig. 2.

$$= \pm 2\phi_0 \int_{-\infty}^{\infty} f_a(\xi) f_b(-\xi) d\xi = 0 \quad (16)$$

ゆえにこの場合、つねに $I_\phi(x)$ はゼロとなり ϕ_0 の値によらない。これは位相差法の MTF が直流周波数成分に対してゼロになることに対応している。(16)式の積分範囲は $-\infty < s < \infty$ であるが、 $K_a(x)$ 、 $K_b(x)$ が積分に寄与するのはある程度の範囲までである。便宜上これをスポットサイズと呼ぶことにすれば、物体の位相分布がフラットになるような領域の幅がスポットサイズより大きくなれば事実上 $I_\phi(x)$ はゼロになると考えてよい。ここで階段状の表面をもった位相物体の結像を考えてみよう。前述の通り段差からスポットサイズ以上離れたところでは $I_\phi(x)$ はゼロになる。段差近傍では、 $\phi(x)$ と $K_a(x) K_b(x)$ の接合積を図で考えれば (Fig. 2 参照)、Fig. 3 のようなコントラストを得られることが直観的に理解できる。これがハロの構造である。

また(15)式と Fig. 2 より位相板の進み遅れを逆にとると Fig. 3 のコントラストが逆転することも容易にわかる。

4. 位相差法の等価点像強度分布と MTF

最後にいくつかの位相リングサイズに対する位相差結像の点像強度分布関数 PSF(x)、すなわち $K_a(x) K_b(x)$ と MTF を Fig. 4 に示す。もちろんこれは(5)(6)(15)式を2次元に拡張すれば容易に計算できる。それぞ

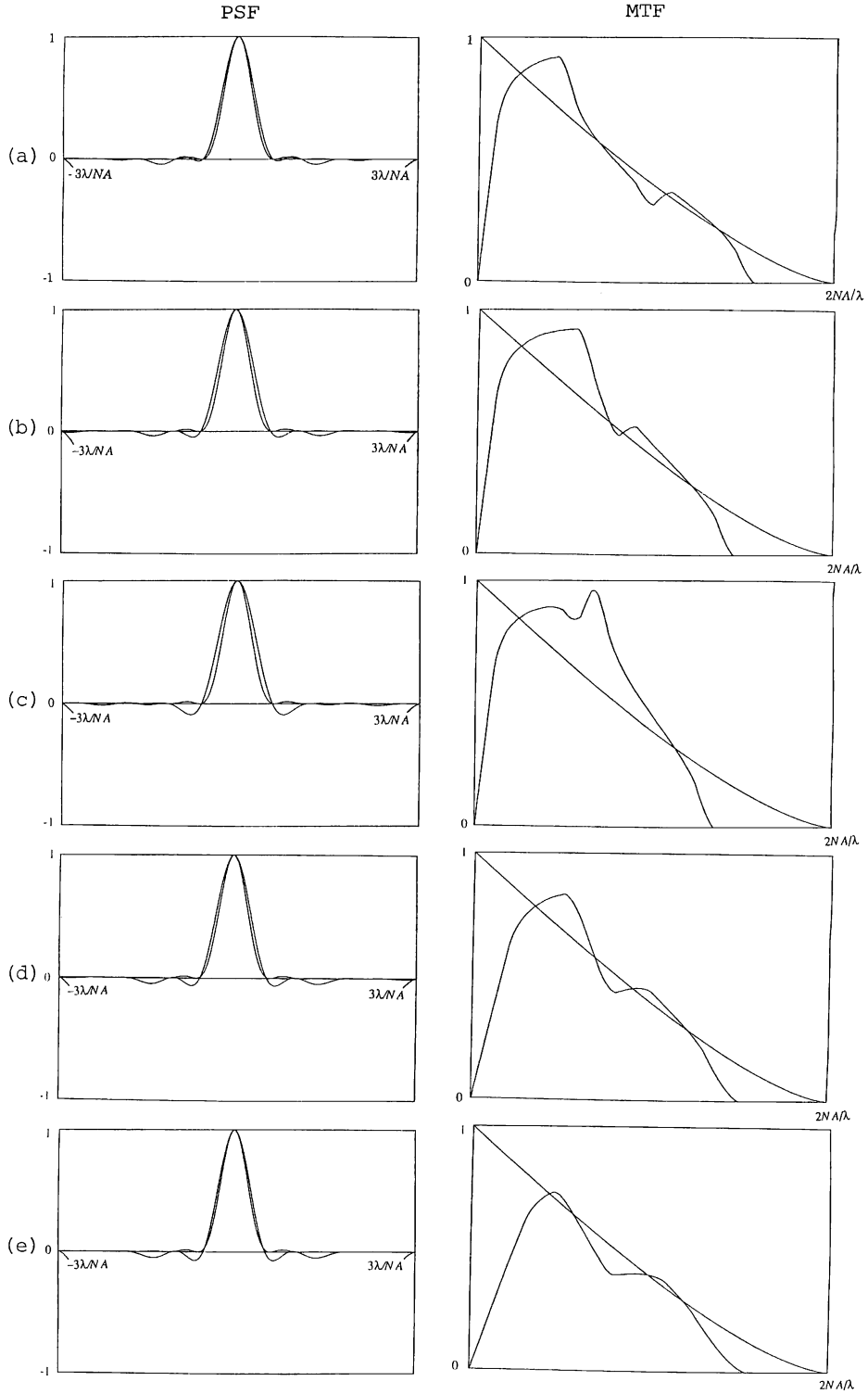


Fig. 4 Effective PSF and MTF of the phase contrast imaging. The inner radius r_a and the outer radius r_b of the phase ring are assumed to be (a) $r_a=0.45$, $r_b=0.55$, (b) $r_a=0.35$, $r_b=0.45$, (c) $r_a=0.25$, $r_b=0.35$, (d) $r_a=0.30$, $r_b=0.50$, (e) $r_a=0.25$, $r_b=0.55$, respectively, where the aperture radius is normalized to be 1.

れのグラフには通常のインコヒーレント結像の場合のPSF, およびMTFを併記した。PSFのグラフでは, 細い方のピークが通常の場合である。なお, PSFの横軸フルスケールは $3\lambda/NA$ とした。

前節の直観的な理解により, PSFの計算結果から位相リングの最適サイズが推定できる。明らかにPSFはメインピークが細く, かつその外側が大きく負に落ち込んでいるものの方が段差点でのコントラストは良いといえる。

5. おわりに

位相差法による結像の見通しの良い簡単な定式化を行った。これによりハロの原理, および必ずしも位相 ϕ に依存した明暗が得られないことの原因が直観的に明らかとなった。

良く知られているように結像公式には(3)式のような物体面(または像面)座標で表示する方法と, 瞳座標で表示する方法(相互透過係数を用いて記述する)とがあ

る。積分範囲が明確に制限されること, および周期構造物体が離散スペクトルを有すること, などから一般の計算には瞳座標表示の結像公式の方が確実に優れている。が, 像のコントラストの直観的な把握に際しては, しばしば物体面座標表示が有用であることを付記しておく。

最後に, 多くのご教示をいただいた東海大学開発技術研究所中田一郎教授に感謝の意を表したい。

文 献

- 1) 中田一郎: “微分干渉顕微鏡と位相差顕微鏡のコントラストについて”, 物性, 8月号(1973) 505-514.
- 2) M. Born and E. Wolf: *Principles of Optics*, 5th ed. (Pergamon Press, Oxford, 1975).
- 3) A. H. Bennett, H. Osterberg, H. Jupnik and O. W. Richards: *Phase Microscopy* (John Wiley & Sons, New York, 1951).
- 4) C. M. Nagel, Jr.: “Some analytical investigations of phase contrast imaging,” *Bell Syst. Tech. J.*, **50** (1971) 1943-1967.
- 5) K. Yamamoto and A. Taira: “Some improvements in the phase contrast microscope,” *J. Microscopy*, **129** (1983) 49-62.