

# 最近の技術から

## レーザー走査顕微鏡

杉山由美子・田名網健雄・御厨 健太

横河電機(株)センサ研究所 〒180 武蔵野市中町 2-9-32

### 1. はじめに

最近、新世代の光学顕微鏡として共焦点走査型光学顕微鏡が進歩し、注目を集めている。

共焦点顕微鏡の用途は、大きく分けて半導体などの材料分野と生物系に大別できる。どちらの分野においてもその有効性は認知され、普及の段階に入っていると考えられる。そして、より広い分野での活用のための次世代として、より高速・小型・高分解能な共焦点顕微鏡への要求が高まっている。

筆者らは特に 1ms/画面の高速測定を目標に、高速・小型・高分解能な共焦点顕微鏡用の光スキャナを開発した。

### 2. 共焦点の原理と特長

図1に従来の光学顕微鏡を示す。光源としてハロゲンランプ等の面光源を用い、カメラや肉眼といった面の受光器を用いている。このため、測定したい点以外からの散乱光などが測定点からの光に混入する。また、光軸方向にずれた点からの光はボケとして測定光に重なってくるため分解能が十分得られない。

これに対して図2に示す共焦点系では、試料をピンポイントで照明する。そのためにレーザー光または非レーザー光とピンホールの組み合わせを用いる。これによって測定点以外からの散乱光を防いでいる。また受光器側では、測定点以外からの光をカットするために受光器の前に空間フィルタとしてピンホールを設置している。

このため焦点のあった点の光はピンホールを通して受光器で測定されるが、焦点の合っていない点からの光はピンホールで遮光される。すなわち、測定点と同一面内にある迷光はピンホールの横に結像する。したがって、ピンホールに入らない。また、光軸方向にずれた点の光は対物レンズによってピンホールの前で広がる。したがって、受光される光は激減されてしまう。

このように共焦点系を用いることで、面内方向は理論

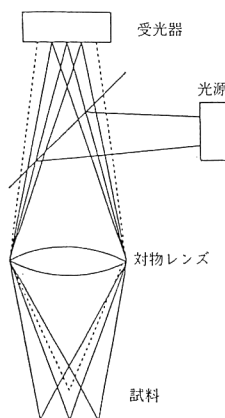


図1 通常の光学顕微鏡

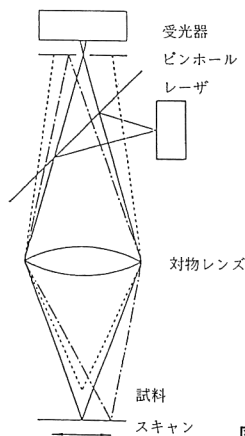


図2 共焦点顕微鏡

的には通常の光学顕微鏡に比べて1.4倍の解像度を持つ。また、光軸方向には $1\mu\text{m}$ 以下の分解能を持つ。

### 3. 構成と原理

図3に著者らによる試作品の概要構成を示す。

光スキャナには2枚のディスクがあり、図で上方のディスクには約1万個のマイクロレンズが形成されている。このディスクに上方からレーザーの平行光を入射すると、マイクロレンズにより下方に集光される。

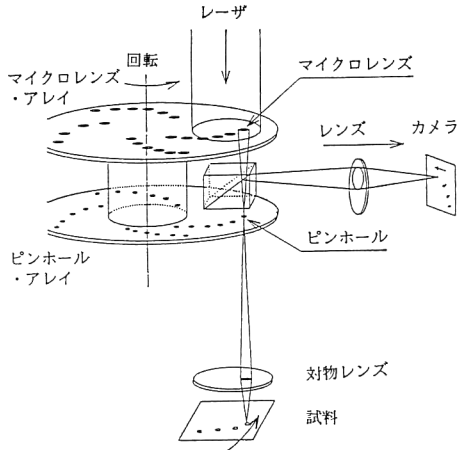


図3 試作品の構成

この集光点下方のディスクが設置してある。ディスク上にはマイクロレンズと同一パターンの共焦点ピンホールが形成してあり、光はこのピンホールを通過し、対物レンズを介して試料上にスポットを形成する。試料からの反射光、または蛍光などによる戻り光をビームスプリッターとリレーレンズによりカメラ上へ結像する。

2枚のディスクは機械的に結合してあり、両者を同時にモーターで回転させる。すると、スポットも回転と同期して試料上をラスタースキャンする。この試料上のラスタースキャンは同時にカメラの撮像面上にも投影され、2次元の共焦点画像を形成する。

#### 4. 特 徴

この走査方式の最大の特長は、XY 両軸の共焦点効果が得られ、同時にビデオレートはもちろん最大 1ms/画面の高速測定が可能なことである。また、図3の構成は単純でコンパクトである。

しかし、従来の方式はピンホール板のみで構成されていたため、S/N が悪いという欠点を持っている。

光量(S)が弱くなるのは共焦点効果を得るために、ピンホール同士を離す必要があるためである。ピンホールの直径とピンホール間距離が1対10の場合、面積比でピンホールの開口率は1%と非常に小さい。また逆に、

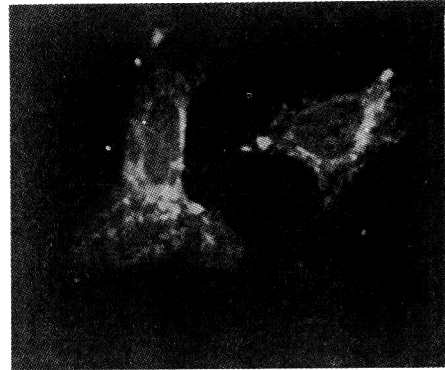


図4 心筋細胞のビデオレート蛍光像

ピンホールを通過できない99%の光がピンホール板表面で反射し、カメラに背景光や迷光(N)となって混入してしまう。

これに対して、筆者らは図3に示すように共焦点ピンホールの前にマイクロレンズを用いる方式を考案し採用した。これによって、従来迷光(N)となっていた光を信号(S)として活用し、同時に迷光自身も低減できる。

#### 5. ま と め

ピンホール走査型光スキャナの共焦点ピンホールにマイクロレンズを付加することでピンホール単体の場合に比べて10倍以上に効率を向上することができた。

また、この構成で対物レンズのNA 0.9、レーザーの波長488nmのとき、光軸方向の分解能の実測値は約 $0.53\mu\text{m}$ が得られ、この光スキャナを用いて1msで1画面の高速画像やXY共に共焦点のビデオレート蛍光画像(図4)を測定することができた。

#### 文 献

- 1) 杉山由美子, ほか: “マイクロレンズアレイを付加した高速共焦点レーザー・スキャナ”, SICE '93 Kanazawa, 205 M-9 (1993) p. 479.
- 2) 田名網健雄, ほか: “マイクロレンズアレイを付加した共焦点蛍光スキャナ”, 第54回応用物理学会学術講演会, 29 aSA/III-16 (1993) p. 884.

(1994年8月31日受理)