

位相変調型微分干渉顕微鏡 ——透過物体の位相分布の定量測定——

伊藤 雅英*・石渡 裕**・塚田 明宏*・谷田貝豊彦*

*筑波大学物理工学系 〒305-8573 つくば市天王台 1-1-1

**オリンパス光学工業(株)医療システムカンパニー医用事業技術支援部 〒192-8507 八王子市石川町 2951

Retardation Modulated Differential Interference Contrast Microscope: Quantitative Phase Measurements

Masahide ITOH*, Hiroshi ISHIWATA**, Akihiro TSUKADA* and Toyohiko YATAGAI*

*Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, 1-1-1, Tennoudai, Tsukuba, Ibaraki 305-8573

**Technical Support Department, Medical System Group, Olympus Optical Co., Ltd., 2951, Ishikawa-cho, Hachioji, Tokyo 192-8507

We propose a new technique for obtaining the quantitative phase distribution on differential interference contrast (DIC) microscope to modulate relative phase retardation between two shared beams. Using partial coherent theory we extract the phase information from two different retardation images. For the object in a weak phase region, simple formula is derived. We also discuss the case when the phase of the object become over a weak phase region. Considering a quadratic phase term we also reconstruct phase distribution quantitatively. The experimental results and discussions are presented, and the quantitative phase distributions of transmission gratings are reconstructed.

Key words: differential interference contrast, retardation modulated, phase measurement, microscope, Nomarski

1. はじめに

光学顕微鏡はサブミクロンオーダーの加工物体の形状や、生体の構造の測定に広く用いられている。なかでも微分干渉 (differential interference contrast: DIC) 顕微鏡¹⁾においては顕微鏡技術に干渉計測技術を付加することにより、サブナノメートルの段差や位相差の可視化、透明物体の位相情報の抽出などが可能となるため、集積回路素子、微小生体構造の観測などの重要なツールとなっている。従来から微小物体の精密測定には、走査型電子顕微鏡 (scanning electron microscope: SEM) や走査型トンネル顕微鏡 (scanning tunneling microscope: STM) などが用いられてきた。しかしながら、SEM や STM は装置が大がかりである上、生体などを生きている状態で観測することは困難である。

通常の微分干渉顕微鏡では試料の凹凸の判断は難しく、得られる画像には試料の振幅透過率 (濃淡) と位相情報とが混在しているため、これまで鏡面の傾きの定量測定に関する報告はいくつかあった^{2,3)}ものの、位相差量や段差量を定量的に観測画像から求めることは困難であった。

本論文では、部分的コヒーレント結像理論を用いて微分干渉顕微鏡の結像式を求め、干渉する2光束間の位相差 (リターデーション) と得られる像の関係を明らかにする。それに基づき、2つの波面相互のリターデーションを変調することにより、微分干渉顕微鏡像から物体の振幅透過率分布と位相情報像を分離する新しい方法を提案する。また、本方法を用いて、これまで定性的にしか測定できなかった位相差量あるいは段差量を定量的に測定する新しい方法を提案する。弱位相近似が成立する場合の解析法、およ

E-mail: itoh@bk.tsukuba.ac.jp

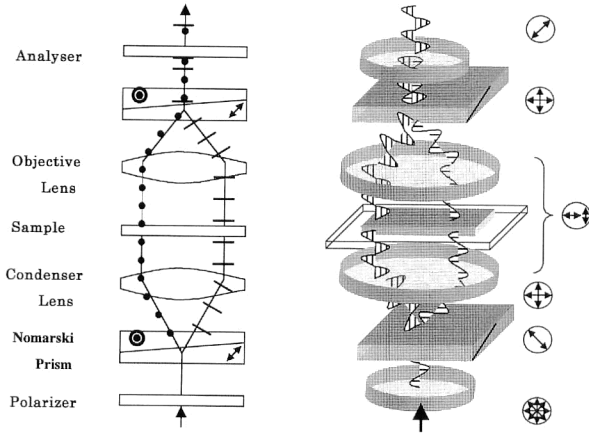


Fig.1 Principles of differential interference contrast (DIC) microscope.

び、近似が成立しない範囲の物体に対する拡張理論についても議論と実験をおこなった。

2. 原理

2.1 微分干渉顕微鏡の結像特性

まず微分干渉顕微鏡の原理について述べる (Fig. 1). 光源からの光は偏光子で 45 度の直線偏光が選択された後、コンデンサーレンズの瞳面に置かれたノマルスキープリズムで互いに直交する直線偏光成分に角度分離され、試料面に照射される。ここで、試料面上での横ずらし (シア)量は顕微鏡の分解能以下に設定されている。試料を透過後、対物レンズの瞳位置に配置されたノマルスキープリズムで合一され、-45 度に置かれた検光子を通して干渉像が形成される。

一般に、部分コヒーレント照明における結像は、

$$I(x) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \bar{a}(f_1) \bar{a}^*(f_2) T(f_1, f_2) \times \exp\{-2\pi i(f_1 - f_2)x\} df_1 df_2 \quad (1)$$

と書くことができる⁴⁾。 $\bar{a}(f)$ は、観測物体 $a(U)$ の複素透過率のフーリエ変換となっている。ここで、 U, f_i, x は、それぞれ、物体面、瞳面および像面での座標である。関数 $T(f_1, f_2)$ は部分的コヒーレント結像の空間周波数特性 (transmission cross coefficient: TCC) とよばれ、

$$T(f_1, f_2) = \int_{-\infty}^{\infty} S(\xi) P(f_1 + \xi) P^*(f_2 + \xi) d\xi \quad (2)$$

で表される。 $S(f)$ は入射瞳面上での有効光源で、相互相関強度のフーリエ変換であり、また $P(f)$ は結像系の瞳関数である。

ここで、観測物体として位相物体を考える。

$$a(U) = \exp\{-i\phi(U)\} \quad (3)$$

$\phi(U)$ は観測物体の位相情報である。これを 2 次までテ

イラー展開

$$a(U) = 1 - i\phi(U) - \frac{1}{2}\phi^2(U) \quad (4)$$

し、そのフーリエ変換を求めると、

$$\bar{a}(f) = \delta(f) - i\Phi(f) - \frac{1}{2}\Phi(f) \otimes \Phi^*(f) \quad (5)$$

となる。ここで $\Phi(f)$ は $\phi(U)$ のフーリエ変換、記号 \otimes はコンボリューションである。式 (5) を式 (1) に代入し、式 (2) を用いて書き直し、 Φ の 3 次以上の項を無視して整理すると、

$$I(x) = \left[T(0, 0) - \frac{1}{2} \int_{-\infty}^{\infty} \{T(f, 0) + T(0, -f)\} \times \exp(-2\pi i f x) \Phi(f) \otimes \Phi^*(f) df \right] + \left[i \int_{-\infty}^{\infty} \{T(f, 0) - T(0, -f)\} \Phi(f) \times \exp(-2\pi i f x) df \right] + \left[\int_{-\infty}^{\infty} T(f, f) \Phi(f) \Phi^*(f) df \right] + \left[\int_{-\infty}^{\infty} T(f, -f) \Phi(f) \Phi^*(-f) \exp(-4\pi i f x) df \right] \quad (6)$$

なる近似式を得る。ここで、省略されている項

$$\iint_{f_1 \neq \pm f_2} T(f_1, f_2) \Phi(f_1) \Phi^*(f_2) \times \exp\{-2\pi i(f_1 - f_2)x\} df_1 df_2 \quad (7)$$

は高次の回折光どうしの干渉項であり、ここでは省略した。

微分干渉顕微鏡は偏光干渉を利用しているので、式 (6) を偏光を考慮した式に書き換える。ノマルスキープリズムのシア量を Δ 、2 つの偏光成分リターデーション量を θ として、瞳関数をジョーンズベクトルで表し、検光子を透過する際の干渉をジョーンズマトリクスで表すと、式 (2) の TCC は、

$$T(f_1, f_2) = \int_{-\infty}^{\infty} S(\xi) \{A(\xi) P(f_1 + \xi)\} \times \{A^*(\xi) P^*(f_2 + \xi)\} d\xi \quad (8)$$

と書くことができる。ただし、

$$P(f) = \begin{bmatrix} -\frac{1}{\sqrt{2}} \exp[i(\pi\Delta f + \theta)] P(f) \\ \frac{1}{\sqrt{2}} \exp(-i\pi\Delta f) P(f) \end{bmatrix} \\ A(f) = \begin{bmatrix} \frac{1}{\sqrt{2}} \exp(-i\pi\Delta f) & \frac{1}{\sqrt{2}} \exp(i\pi\Delta f) \\ 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (9)$$

である。

したがって、 $T(f, 0) - T(0, -f) = \sin(\pi \Delta f) M(f)$ および $T(f, 0) + T(0, -f) = (1 - \cos\theta) \cos(\pi \Delta f) M(f)$ が得られるので、微分干渉顕微鏡の結像特性は最終的に以下のようになることがわかる。

$$\begin{aligned}
 I(x, \theta) &= \left[\frac{C}{2} (1 - \cos\theta) \left\{ M(0) - \int_{-\infty}^{\infty} \cos(\pi \Delta f) M(f) \right. \right. \\
 &\quad \left. \left. \times \Phi(f) \otimes \Phi^*(f) \exp(-2\pi i f x) df \right\} \right] \\
 &+ \left[i C \sin\theta \int_{-\infty}^{\infty} \sin(\pi \Delta f) M(f) \Phi(f) \exp(-2\pi i f x) df \right] \\
 &+ \left[\frac{C}{2} \int_{-\infty}^{\infty} \cos(2\pi \Delta f + \theta) m_0(f) \Phi(f) \Phi^*(f) df \right] \\
 &+ \left[\frac{C}{2} \int_{-\infty}^{\infty} \left\{ \cos(2\pi \Delta f) - \cos\theta \right\} m_d(f) \Phi(-f) \Phi^*(f) \right. \\
 &\quad \left. \times \exp(-4\pi i f x) df \right] \quad (10)
 \end{aligned}$$

ここで、

$$\begin{aligned}
 M(f) &= \int_{-\infty}^{\infty} S(\xi) P(\xi + f) P^*(\xi) d\xi \\
 m_0(f) &= \int_{-\infty}^{\infty} S(\xi) P(\xi + f) P^*(\xi + f) d\xi \\
 m_d(f) &= \int_{-\infty}^{\infty} S(\xi) P(\xi + f) P^*(\xi - f) d\xi \quad (11)
 \end{aligned}$$

であり、 C は定数である。 $\sin(\pi \Delta f) M(f)$ は微分干渉顕微鏡の周波数応答関数 (optical transfer function: OTF) であり、Fig. 2 のような関数となっている。式(10) の第1項は試料を透過した0次光成分で、入射光から回折光を引いたものである。第2項は試料の微分像、第3項は+1次または-1次回折光どうしが干渉した屈折光 (傾き) 成分で、くさび状の屈折率分布を表すので、ここでは無視する。第4項は±1次間の干渉による倍周波の非線形成分である。観測試料が弱位相物体の場合、式(10) において位

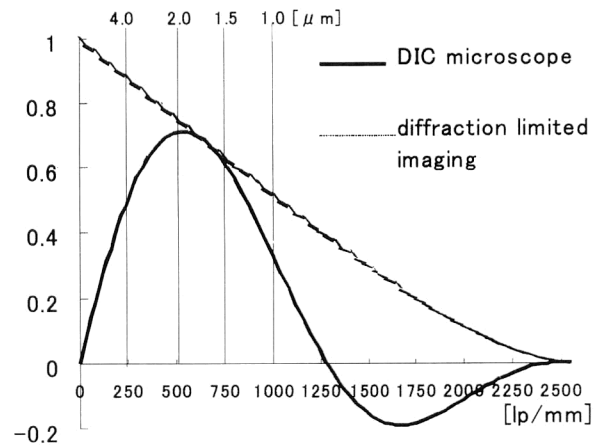


Fig. 2 Optical transfer function (OTF) of DIC microscope and diffraction limited imaging.

相に関する2次以上の高次項は小さいとみなして省略することができ、

$$\begin{aligned}
 I(x, \theta) &= \frac{C}{2} (1 - \cos\theta) M(0) + i C \sin\theta \int_{-\infty}^{\infty} \sin(\pi \Delta f) \\
 &\quad \times M(f) \Phi(f) \exp(-2\pi i f x) df \quad (12)
 \end{aligned}$$

と書くことができる⁹⁾。式(12) の第1項は0次回折光 (透過光) で明視野像に相当している。第2項は試料の位相分布の微分像を表している。

微分干渉顕微鏡でリターデーション量を変化させる方法として、ノマルスキープリズム自体を平行移動する方法と、Fig. 3 に示すようなコンペンセーターを用いるセナルモン法がある。本論文では、偏光子の回転角を制御することで、リターデーション量を容易に変えられるセナルモン法を用いた。セナルモン法では、リターデーション量 θ の変化は偏光子の回転角の θ 倍になる。

2.2 位相変調法

試料面は平面であると仮定して、式(10) においてリターデーション量を変化させたときに得られる画像について

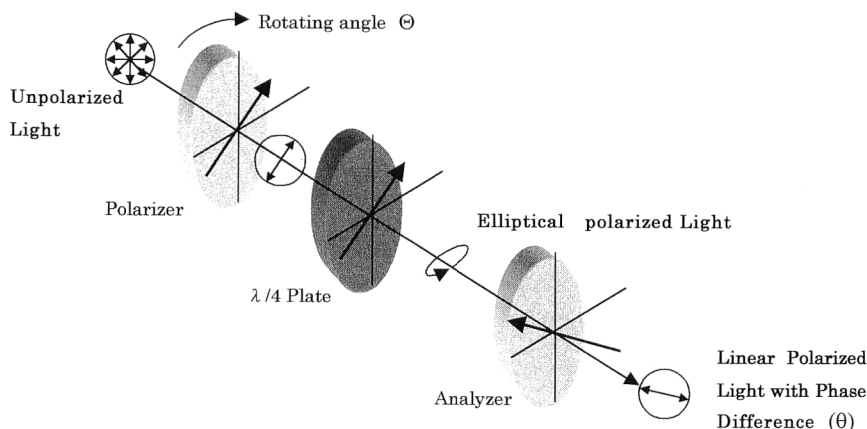


Fig. 3 Sénarmont method to control the phase difference between two orthogonally linear polarized light.

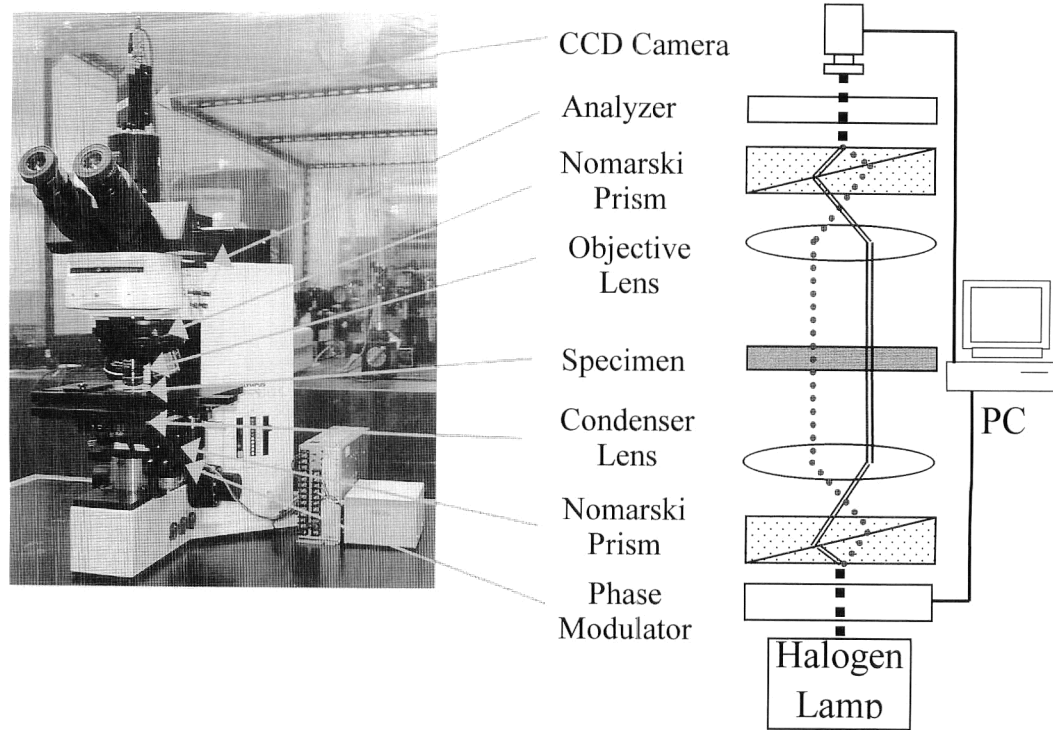


Fig. 4 Basic arrangement of experimental setup in a transmission type DIC microscope (Olympus Optical Co., Ltd., B×60).

考える。リターデーション量 θ のときの画像と $-\theta$ のときの画像を引き算すると、

$$I_p(x, \theta) = I(x, \theta) - I(x, -\theta) \\ = 2iC \sin\theta \int_{-\infty}^{\infty} \sin(\pi\Delta f) M(f) \Phi(f) \\ \times \exp(-2\pi i f x) df \quad (13)$$

となる。また、両者の和をとると、

$$I_a(x, \theta) = I(x, \theta) + I(x, -\theta) \\ = C(1 - \cos\theta) \left\{ M(0) - \int_{-\infty}^{\infty} \cos(\pi\Delta f) M(f) \right. \\ \left. \times \Phi(f) \otimes \Phi^*(f) \exp(-2\pi i f x) df \right\} \\ + C \int_{-\infty}^{\infty} \left\{ \cos(2\pi\Delta f) - \cos\theta \right\} \\ \times m_a(f) \Phi(f) \Phi^*(-f) \exp(-4\pi i f x) df \quad (14)$$

となることがわかる。式(13)は物体の位相分布に対応した像を表している。これを光学系のOTFでデコンボリューションすることにより、試料の位相分布 $\phi(U)$ を求めることができる。その結果、式(4)から観測物体の位相分布を再構成することができる。しかしながら、このままでは定数 C が不定であり、位相の絶対量を決めることはできない。この定数は観測物体の透過率分布および、光源の光量に対応している。

一方、式(14)は物体からの振幅透過率画像に相当して

いる。弱位相の場合、式(14)の右辺の第2項と第3項はその寄与が小さいとして省略できる。したがって、式(14)は

$$I_a(x, \theta) = C(1 - \cos\theta) M(0) \quad (15)$$

となり、この和画像から定数 C を求めることができる。

3. 実験

3.1 実験装置

本実験装置はオリンパス光学工業株式会社製の透過型微分干渉顕微鏡 BX60 を改造した。装置の構成を Fig. 4 に示す。対物レンズ (objective lens) は同社の LC Plan F1 (倍率×40, $NA=0.6$) であり、倍率×3.3の写真接眼レンズ (photo eyepiece) と倍率1/3のテレビアダプターを用いて1倍でリレーし、東京電子工業株式会社の CCD カメラ (CS8330: 1/3 インチ白黒) 上に結像した。照明光源 ($NA=0.6$) はハロゲンランプで、波長 550 ± 30 nm の干渉フィルターを入れて準単色にしてある。光源側の偏光子 (polarizer) はコンピューター制御されたパルスモーターで駆動され、その回転角に同期して、CCD カメラからの画像がコンピューターに取り込まれる。

3.2 試料

透過型位相物体として Fig. 5 に示すように溶融石英基板にエッチングで格子を形成した位相格子を用いた。格子のピッチを T 、深さを d で表す。本実験では、溝の深さ

$d=0.1\ \mu\text{m}$ のもの、および $d=0.3\ \mu\text{m}$ のものを用いた。位相差量としては、前者は 0.09λ で弱位相物体に相当し、後者は 0.27λ で弱位相近似の成り立たない領域の物体となっている。

3.3 弱位相物体の測定

弱位相物体の場合、偏光子の角度が θ のときの画像と、角度が $-\theta$ のときの画像との和をとることにより、式(15)の試料の吸収 C に対応する振幅透過率画像を得ることができる。その C の値を用いることにより、式(13)の差画像から、物体の位相分布を以下の式にしたがって求めることができる。

$$\phi(x) = \frac{(1 - \cos\theta) \{\text{deconv}[I_p(x, \theta)]\}}{2 \sin\theta I_a(x, \theta)} \quad (16)$$

ここで、deconv は光学系の応答関数によるデコンボリューションであり、

$$\text{deconv}[I_p] = \mathcal{F}^{-1} \left[\frac{\mathcal{F}\{I_p(x, \theta) - I_p(x, -\theta)\}}{\sin(\pi\Delta f) M(f)} \right] \quad (17)$$

となっている。 \mathcal{F} および \mathcal{F}^{-1} はそれぞれ、フーリエ変換およびフーリエ逆変換である。ここではヒルベルト変換を併用することで微分像の積分操作も同時に行っている。パルスモーターの回転角 θ は、リターデーション量 θ が $\pi/2$ になるように、 $\pi/4$ とした。Fig. 6, に溝深さ $d=0.1\ \mu\text{m}$ で、ピッチがそれぞれ $T=8\ \mu\text{m}$, $16\ \mu\text{m}$, および $32\ \mu\text{m}$ の格子の測定結果を示す。いずれのピッチにおいても、位相分布から計算された溝の深さは正しく絶対量を示して

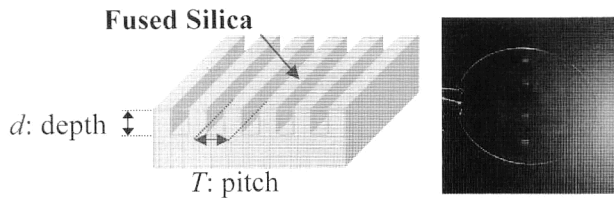


Fig. 5 Samples of transmission type phase grating made by fused silica.

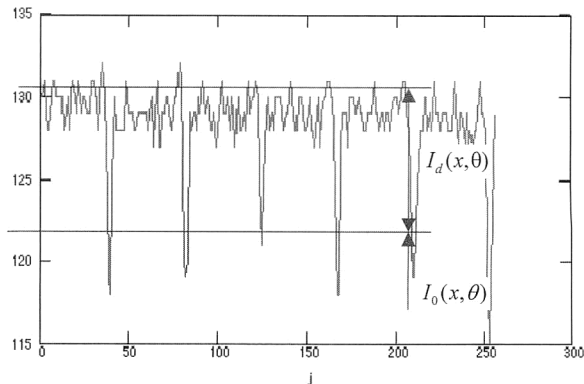
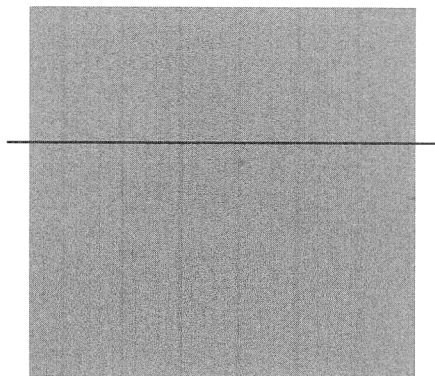


Fig. 8 The summed image in the case of the object in out of weak phase approximation, and the estimation of intensity components.

いる。

同様の測定を溝深さ $d=0.3\ \mu\text{m}$, ピッチ $T=16\ \mu\text{m}$ のものについておこなった結果が、Fig. 7である。この試料の場合、弱位相近似が成立しないため、実際の値より溝深さが浅い ($\sim 0.2\ \mu\text{m}$) 結果が得られていることがわかる。

3.4 弱位相近似が成立しない物体の測定

弱位相近似が適用できない場合は、式(14)から位相の2乗(非線形成分)に相当する振幅情報を補正する必要がある。試料は平面であるとして、式(14)を0次光成分 $I_0(x, \theta)$ と非線形成分 $I_d(x, \theta)$ の2つの部分に分けて考える。すなわち、

$$I_a(x, \theta) = I(x, \theta) + I(x, -\theta) = I_0(x, \theta) + I_d(x, \theta) \quad (18)$$

と表す。 $I_0(x, \theta)$ と $I_d(x, \theta)$ は、

$$I_0(x, \theta) = C(1 - \cos\theta) \left\{ M(0) - \int_{-\infty}^{\infty} \cos(\pi\Delta f) \times M(f) \Phi(f) \otimes \Phi^*(f) \exp(-2\pi fx) df \right\} \quad (19)$$

および、

$$I_d(x, \theta) = C \int_{-\infty}^{\infty} \left\{ \cos(2\pi\Delta f) - \cos\theta \right\} m_d(f) \Phi(f) \times \Phi^*(-f) \exp(-4\pi fx) df \quad (20)$$

となる。 $I_0(x, \theta)$ は弱位相近似の場合と同じように物体の振幅透過率の情報を担っている。実際の和画像の例で、それぞれが相当する量を示す(Fig. 8)。このことから、位相情報の絶対量を得るのに必要な0次回折光強度 $I_0(x, \theta)$ を求めるためには、測定値から $I_d(x, \theta)$ の値を差し引く必要がある。

ここで、 α を画像の狭い範囲の強度の平均値とすると、

$$\alpha = I_0(x, \theta) + I_d(x, \theta) \quad (21)$$

であり、式(4)からわかるように、位相物体が振幅情報に寄与するのは $I_d(x, \theta) = \phi(x)^2/2$ の成分であるから、

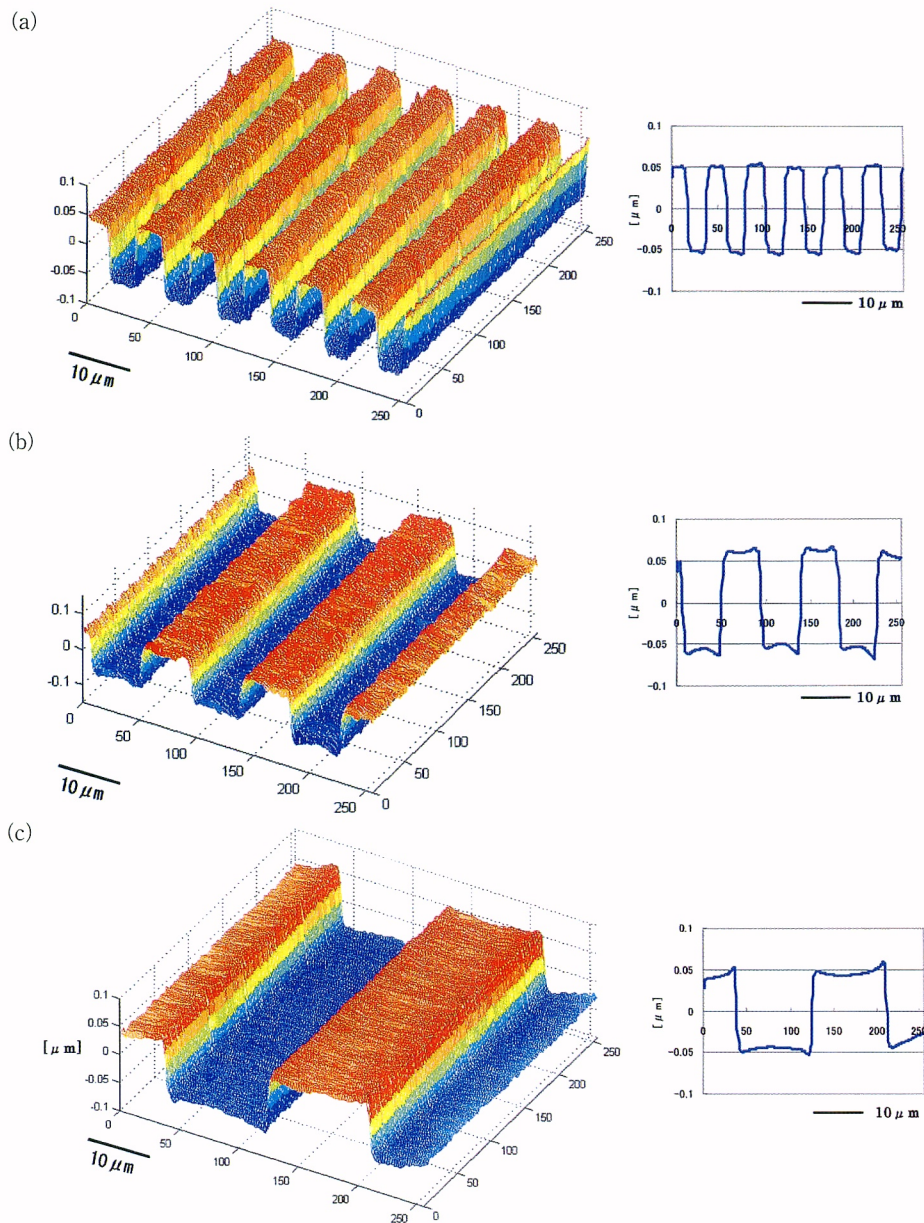


Fig. 6 Three-dimensional images of fused silica gratings (a weak phase region). (a) Pitch $8\ \mu\text{m}$, depth $0.1\ \mu\text{m}$. (b) Pitch $16\ \mu\text{m}$, depth $0.1\ \mu\text{m}$. (c) Pitch $32\ \mu\text{m}$, depth $0.1\ \mu\text{m}$.

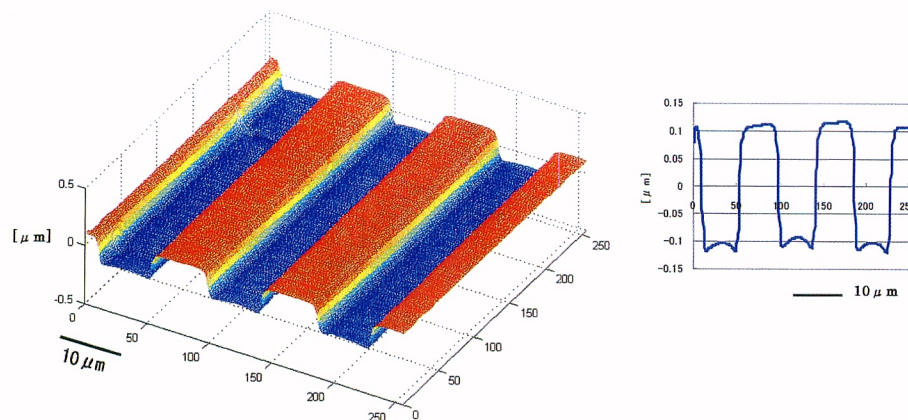


Fig. 7 Three-dimensional images of fused silica gratings over a weak phase region: pitch $16\ \mu\text{m}$, depth $0.3\ \mu\text{m}$.

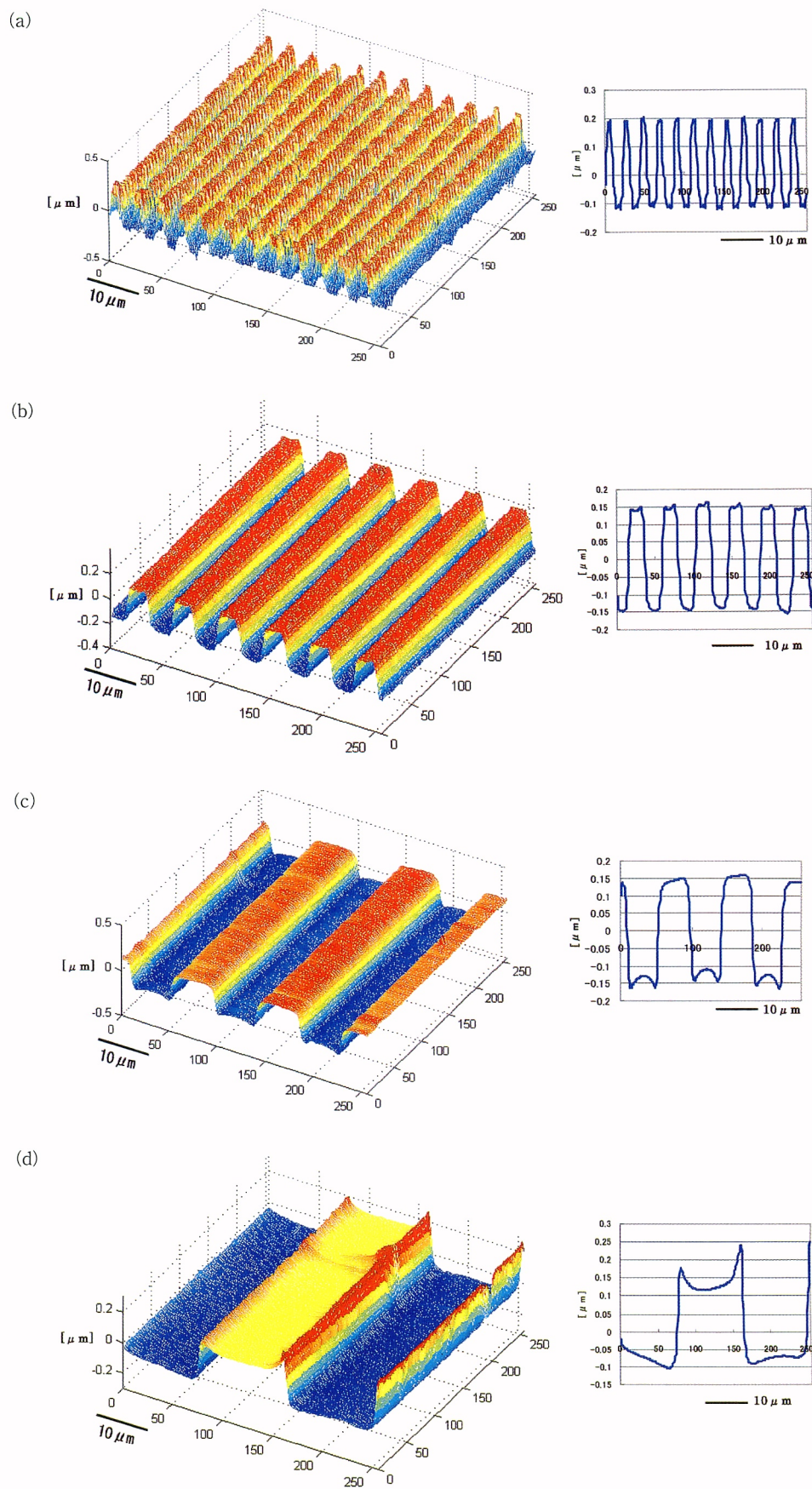


Fig. 9 Three-dimensional images of fused silica gratings over a weak phase region. (a) Pitch $4\ \mu\text{m}$, depth $0.3\ \mu\text{m}$. (b) Pitch $8\ \mu\text{m}$, depth $0.3\ \mu\text{m}$. (c) Pitch $16\ \mu\text{m}$, depth $0.3\ \mu\text{m}$. (d) Pitch $32\ \mu\text{m}$, depth $0.3\ \mu\text{m}$.

$$I_0(x, \theta) = \alpha - I_d(x, \theta) = \alpha \{1 - \phi(x)^2/2\} \quad (22)$$

となる。したがって、式(16) に対応して

$$\begin{aligned} \phi(x) &= \frac{(1 - \cos\theta) \{\text{deconv}[I_p(x, \theta)]\}}{2 \sin\theta I_0(x, \theta)} \\ &= \frac{(1 - \cos\theta) \{\text{deconv}[I_p(x, \theta)]\}}{2\alpha \sin\theta \{1 - \phi(x)^2/2\}} \end{aligned} \quad (23)$$

が得られる。第1次近似としては、右辺の $\phi(x)$ は $\text{deconv}[I_p(x, \theta)]$ とおいてかまわないので、弱位相近似が成立しない領域での位相の再構成式としては、

$$\phi(x) = \frac{(1 - \cos\theta) \left\{ \frac{\text{deconv}[I_p(x, \theta)]}{\alpha} \right\}}{2 \sin\theta \left[1 - \frac{1}{2} \left\{ \frac{\text{deconv}[I_p(x, \theta)]}{\alpha} \right\}^2 \right]} \quad (24)$$

を得ることができる。本手法に基づき、溝深さ $d=0.3 \mu\text{m}$ で、ピッチがそれぞれ $T=4 \mu\text{m}$, $8 \mu\text{m}$, $16 \mu\text{m}$, および $32 \mu\text{m}$ の格子を測定し、結果を解析した (Fig. 9)。 $T=4 \mu\text{m}$, $8 \mu\text{m}$, および、 $16 \mu\text{m}$ の場合は絶対的な位相分布が測定されていることがわかる。 $T=32 \mu\text{m}$ の場合、絶対量が再現されていない理由は、デコンボリューションの際の逆フィルターの特性によるものである。もともと微分干渉顕微鏡は空間周波数がゼロ (平面) の付近では感度がなく、そのため逆フィルターはそこで発散するが、数値計算的には有限の値としている。したがって、ゼロ周波数成分の多く含まれる画像については、本方法をそのままでは適用できないと思われる。

4. ま と め

われわれは微分干渉顕微鏡のシアーされた2光束間に位相差を与えることにより、画像のコントラストを変調させ、変調量 $\pm\theta$ の画像どうしの差画像が試料の位相成分に、和画像が振幅透過率画像成分に対応していることを示した。弱位相近似が成立する (位相差が約 0.2 rad より小さい) 試料の場合、和画像は試料の振幅透過率分布そのものとみなせるので、その値を用いて差画像の常数項を求め、位相分布の絶対値を求めることができた。また、弱位相近似が成立しない場合の位相再構成法について議論し、振幅情報に位相分

布に関する2次の補正を与えることにより絶対値を求めることができることがわかった。

今後は、空間周波数の低次の項を多く含む試料に対する再構成法、 $\pi/2$ 以上の段差をもつ物体への拡張を検討していく。大きな段差をもつ試料の場合、合致法⁶⁾などを適用することが考えられる。また、本論文ではシアー方向が1次元であり、位相の再構築にあたってはあるラインを基準としている。完全な2次元分布の再構成には、直行する2方向の微分像が必要であり、プリズムの回転などが考えられる。2次元的な位相分布測定とその再構成法についてはすでに検討している⁷⁾。本手法は、反射型微分干渉顕微鏡を用いた工業分野の計測、散乱体をとおしてのセクション効果を利用した生体の内部計測などへの応用が期待される。

文 献

- 1) M. Françon: *Progress in Microscopy* (Pergamon Press, New York, 1961) p. 199.
- 2) D. L. Lessor, J. S. Hartman and R. L. Gordon: "Quantitative surface topography determination by Nomarski reflection microscopy. 1: Theory," *J. Opt. Soc. Am.*, **69** (1979) 357-366.
- 3) J. S. Hartman, R. L. Gordon and D. L. Lessor: "Quantitative surface topography determination by Nomarski reflection microscopy. 2: Microscope modification, calibration, and planar sample experiments," *Appl. Opt.*, **19** (1980) 2998-3009.
- 4) G. S. Bhatnagar and R. S. Sirohi: "Effect of partial coherence on the resolution of a microscope. II: Annular aperture at condenser," *Opt. Acta*, **18** (1971) 547-553.
- 5) H. Ishiwata, M. Itoh and T. Yatagai: "Retardation modulated differential interference microscope and its application to 3-D shape measurement," *Proc. SPIE*, **2873** (1996) 21-24.
- 6) M. H. Tsai, H. X. Huang, M. Itoh and T. Yatagai: "Fractional fringe order method using Fourier analysis for absolute measurement of block gauge thickness," *Opt. Rev.*, **6** (1999) 449-454.
- 7) X. K. Tian, M. Itoh and T. Yatagai: "Simple algorithm for large-grid phase reconstruction of lateral-shearing interferometry," *Appl. Opt.*, **34** (1995) 7213-7220.