

レーザービームの屈折を検出する走査レーザー顕微鏡

三 井 隆 久

Scanning Laser Microscope That Detects the Refraction of the Laser Beam

Takahisa MITSUI

Summary — We have developed a scanning laser microscope system that can measure the spatial inhomogeneity of the refractive index, using the laser beam refracted by the sample. Using this microscope, we can observe almost transparent samples, such as live cells, without any use of dyes. Furthermore, we have visualized the Brownian motion of cell structures by detecting the random fluctuation in the photoelectric current. This allows us to understand the rigidity of cell structures and the mobility within.

Key words: laser microscope, refractive index, quadrant photodiodes, Brownian motion, cell

1. 序論

レーザー光は20世紀に開発された指向性の高い単色光であり、白色光を用いた光計測より遙かに高精度な計測が達成できる。しかしながら、細胞組織の観測はほとんどの場合白色光で試料を照らす光学顕微鏡により行われている。白色光顕微鏡は、フック以来300年以上の開発の歴史があり、性能は光を用いて達成できる理論限界に至っている。¹⁾

このような中であって、レーザー光を利用した顕微鏡が如何にあるべきかは、光計測の研究者にとって慎重な熟考を必要とする課題である。レーザー光が単色光ゆえに干渉性が高いことは、高精度計測に適している反面、画像化には不利である。光を物体に照射すると僅かではあって

慶應義塾大学医学部物理学教室 (〒223-8521 横浜市港北区日吉4-1-1) : Department of Physics, Keio University School of Medicine, 4-1-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama, Kanagawa 223-8521, Japan [Received Apr. 4, 2005]

も一部の光は乱反射して迷光となる。白色光であれば、迷光は画像の背景を僅かに明るくするだけであり、それほど大きな障害にはならない。しかし、レーザー光は干渉性が高いので迷光が画像形成光と干渉し、見苦しい干渉縞が生じる。このような不必要な干渉を最小限に抑えるためには、レーザー光の照射領域を最小限にすること、すなわち、レーザービームを回折限界まで集光して試料に照射する必要がある。これゆえ、レーザー顕微鏡は走査型にならざるを得ない。走査型レーザー顕微鏡として様々な方法が考えられるが、白色光顕微鏡よりも優れた顕微鏡を作り上げるのは困難であった。

実用化されているレーザー顕微鏡の原型は、1957年にミンスキー²⁾が提案した共焦点レーザー走査顕微鏡^{3, 4)}である。対物レンズを用いて集光したレーザー光を試料に照射し、後方散乱された照射光もしくは蛍光を同じ対物レンズを用いて集め、空間フィルター（ピンホール）を用いて余分な光を除去した後、光電変換を行う方式である。この方式は、分解能、感度、迷光などの点で白色光顕微鏡と同じかそれ以上である。しかしながら、彼らの考案した共焦点レーザー走査顕微鏡は、後方散乱を検出する方式であり、後方散乱光が生じる場合しか動作しない。生きている細胞組織は、ほとんどの場合無色透明で、屈折率もなめらかに変化しているため、後方散乱がほとんど生じない。無染色では、蛍光も発生しない。一方、透過光を利用した共焦点顕微鏡⁵⁾も提案されているが、光学系が複雑なうえに透明な物体の可視化には向いていない。このようなわけで、この方式により完璧なレーザー顕微鏡が完成したというわけではない。

本論文では、屈折率の空間不均一性を可視化する走査レーザー顕微鏡について述べる。^{6, 7)}この顕微鏡では、試料の屈折率の空間不均一性に伴うレーザー光の伝搬方向の変化を検出する。したがって、細胞組織のように無色透明な物体であっても僅かな屈折率変化があるので、観測が可能である。また、光電変換器は高速 (>7MHz) なので、光電流に含まれる交流成分を検出することで、細胞内組織のブラウン運動を可視化することができる。

同様な目的で白色光顕微鏡を改良した微分干渉顕微鏡^{8, 9)}や位相差顕微鏡¹⁰⁾も屈折率の空間不均一性を可視化している。これらの顕微鏡と比較すると、本顕微鏡は、ブラウン運動やタンパク質などの分子の濃度揺らぎも可視化できるという利点がある。

2. 動作原理

本顕微鏡を大別すると透過型と反射型に分けられる。透過型は、培養細胞や透明な微生物の観察に適し、反射型は界面の観察や鏡表面に付着した分子膜などの観察に適する。

図1(a)に透過型の動作原理を示す。レーザー光は対物レンズにより集光され、焦点に置かれた試料を通過し、光検出器へ至る。対物レンズによりレーザー光は、レンズの開口数と光の波長で決まる大きさまで集光される。この値はおおよそ $0.5\mu\text{m}$ 程度である。このとき、焦点の一部に細胞組織など周囲と屈折率が異なる物体があると、レーザー光は屈折し、図1に示すように伝搬方向が変化する。伝搬方向の変化は焦点内での屈折率勾配に比例するので、伝搬方向の変化を検出しながら試料を掃引すれば、試料の屈折率勾配の画像化が行える。

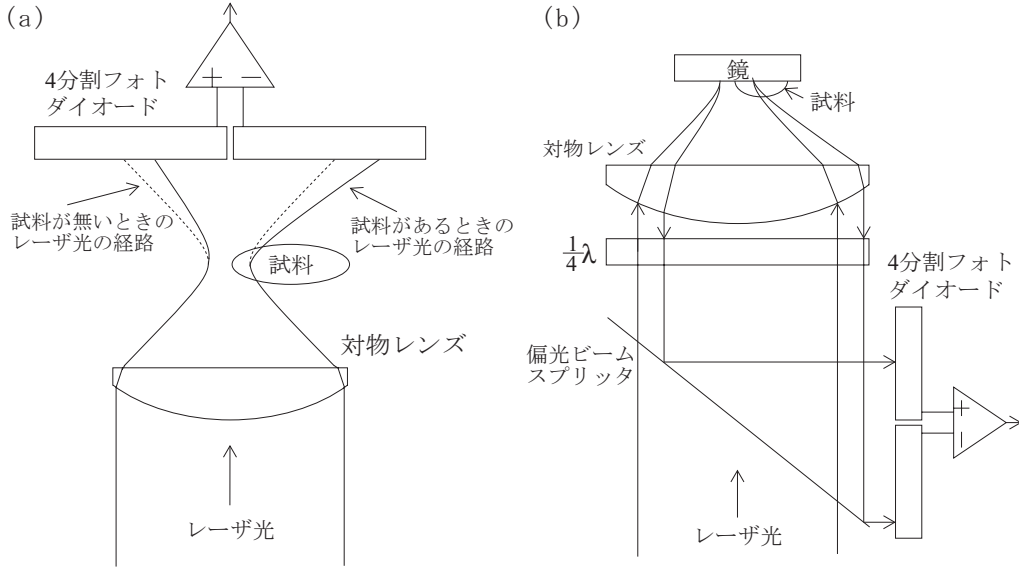


図1 レーザービームの屈折角測定の実験原理図 (a)透過型, (b)反射型

試料が固体の場合には上述のとおりであるが、生細胞のように液体中の試料は、ブラウン運動を行う。このため、レーザービームの屈折角は、試料内部のブラウン運動に伴い激しく変化する。屈折角の変化分を検出しながら試料の掃引を行うと、試料内部の動きやすさを画像化することができる。

図1(b)に反射型の動作原理を示す。試料は鏡面に付着しているか、界面の状態を観察する場合を想定しよう。対物レンズにより集光されたレーザー光は、鏡面で反射して逆戻りをする。このとき、鏡面に付着した物体の屈折率に不均一性があると光は屈折し、反射角度が変化する。反射角度の変化を検出しながら試料位置を掃引すると、鏡面上の物体の画像化ができる。

3. 実際の装置

図2(a)に透過型顕微鏡の構造を示す。光源は波長780nm、光出力3 mWの半導体レーザーである。分解能は波長に比例するため、短波長にしたほうが細かい構造を観察することに適するが、生細胞に対する損傷が大きくなる。市販の共焦点顕微鏡では波長を400nmとしている場合が多いが、ここでは生細胞観察を目的としているので、損傷の小さい780nmとした。

半導体レーザー光には大きな収差があるため、アナモルフィックプリズムペアおよび円筒レンズを用いて収差の補正を行った。完全に収差の無い光を得るためには、単一モード光ファイバーへ光を入れて、抜けてくる光のみを利用するのが理想的であるが、ここでは簡便にするため用いなかった。

本顕微鏡は、レーザービームの位置を固定して、試料の位置を掃引するとにより画像化を行う

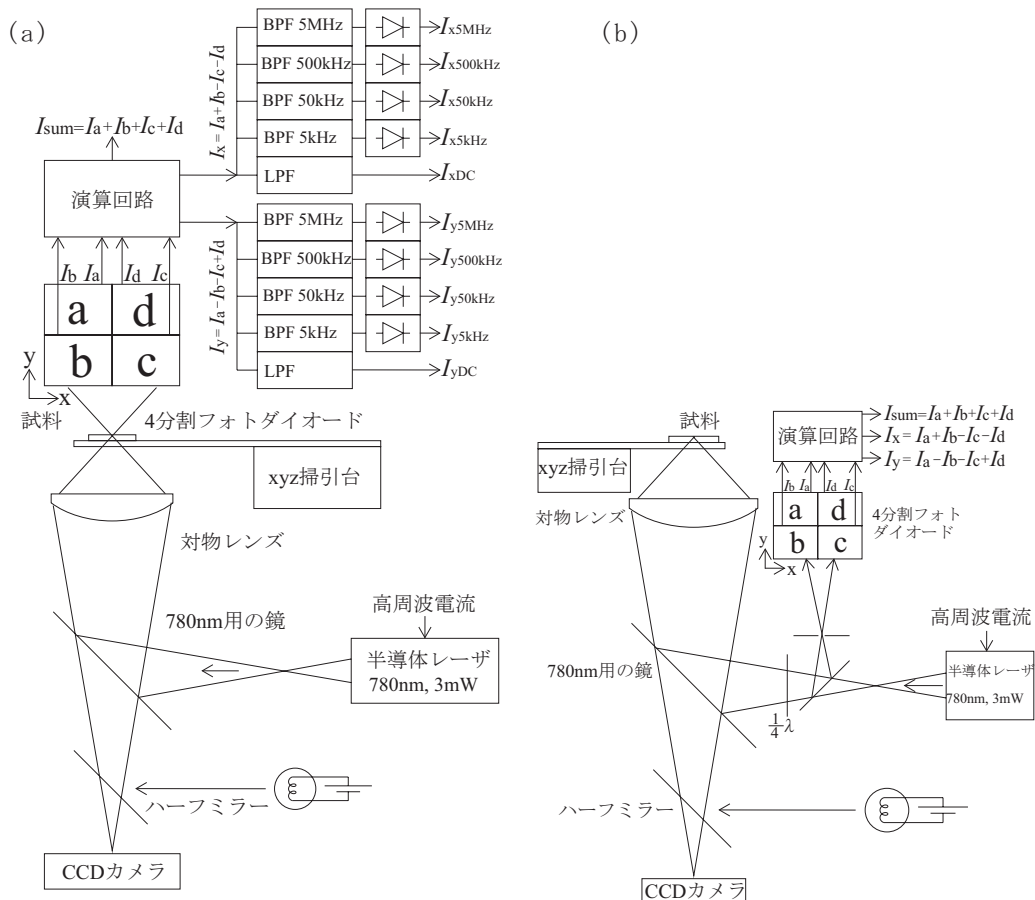


図2 実験装置の構成 (a)透過型, (b)反射型
 CCDカメラは、観測域の選定や焦点あわせに用い、計測時には使用しない。

方式である。試料はxyz掃引台 (NanoCube P-611, Physik Instrumente) の上になせ、最大 $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ の掃引を行うことができる。このときの画素数は 512×512 で、一枚の画像計測に要する時間は500sである。計測時間が長いのは、掃引台の性能による。掃引台はx方向へ往復運動しながら、y方向へゆっくりと移動することで行う。このとき、x方向への往復運動の速度が速くなると、折り返し直後に掃引台が不安定になり、画像が乱れる。計測時間を短くするためには、軽くて剛性の高い掃引台を用いるか、試料位置を固定して、レーザービームを掃引する方式にする必要がある。

1回の計測に500sかかるので、観測域の選択や焦点を合わせるために別な観察装置、ここではCCDカメラを用いた。レーザー光を集光させる場合と同一の対物レンズを用いて落射顕微鏡構成とした。レーザー顕微鏡として観察を行う場合には白色光照明は切った。

レーザー光の伝搬方向変化の検出は4分割フォトダイオード (S7479, 浜松ホトニクス) を用いて行った。4分割フォトダイオードは互いに近接した4個のフォトダイオードからなり、全

での出力を足し合わせることで光の強度 I_{sum} が得られ、和と差を組み合わせることで、レーザービームの中心位置のxおよびy方向への変位(I_x , I_y)を求めることができる。和および差の演算は、演算増幅器を組み合わせで行った。また、これらの出力は周波数フィルターによってふり分けを行い、直流成分(I_{xDC} , I_{yDC})、5 kHz成分(I_{x5kHz} , I_{y5kHz})、50kHz成分(I_{x50kHz} , I_{y50kHz})、500kHz成分(I_{x500kHz} , I_{y500kHz})、5 MHz成分(I_{x5MHz} , I_{y5MHz})に分けた。交流成分は、アナログ乗算器を用いて自乗しxとy成分の和を求めることで強度に変換した。交流成分の観測により、ブラウン運動の検出を周波数帯別に行うことができる。

序論で述べたように、顕微鏡の光源としてのレーザーは干渉性が高すぎるため、迷光が画像構成光と干渉し、縞模様の乗った画像となる場合がある。本顕微鏡においては、生細胞など通常の試料ではこの影響は無視できる大きさであるが、均一性の高い試料(研磨したガラスなど)を高感度で観測する場合は無視できない。このような場合、半導体レーザーの注入電流に交流や雑音を入れ、レーザー光の干渉性を下げると縞模様は効果的にキャンセルできる。このような目的で、適切な大きさの高周波電流を半導体レーザーに注入した。

図2(b)に、反射型の装置の構造を示す。透過型とほとんど同じであるが、反射光を効率よく取り出すため、光の偏光面を操作する装置が入れている。半導体レーザー光は直線偏光なので、偏光面を合わせれば、変更ビームスプリッターはほとんど損失無く透過する。その後、1/4波長板により円偏光に変えて試料へ行き、鏡で反射して逆行する。反射光もまた円偏光であり、先ほどと同一の1/4波長板により直線偏光に戻る。しかしながら、このときの直線偏光の向きは、入射光と直交しているため、偏光ビームスプリッターによりほとんど全て反射される。

4. 観測像の例

図3に、洗浄したカバーガラス(Matsunami No.1, 18×18×0.17mm)の表面を $\sqrt{I_{\text{xDC}}^2 + I_{\text{yDC}}^2}$ を用いて透過型で画像化した結果を示す。観測領域は $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ である。本カバーガラスは通常の顕微鏡観察における使用には全く問題ないが、表面に $2\mu\text{m}$ 程度の大きさの構造があるのがわかる。本顕微鏡はレーザー光の屈折を見ているため、ガラス表面の幾何学的な凹凸と屈折率の不均一性(材質の不均一性、脈理)を区別できず、どちらの理由で生じたかは分からない。同じカバーガラスを白色光を用いた市販の微分干渉顕微鏡で観測したが、このような構造は見いだせなかった。これは目視の微分干渉顕微鏡よりも本顕微鏡の方が感度が高いことに起因する。おそらく、市販の微分干渉顕微鏡であっても、画像データをコンピュータに取り込み強調処理⁸⁾をすれば同じ構造の観測が可能であると思われる。

図4は、タマネギの上皮細胞を透過型で観測した結果であり、試料は乾燥を防ぐため、2枚のカバーガラスの間(0.7mm)に水とともに封入した。したがって、無染色で細胞が生きたままで観測を行っている。(a)は、 I_{sum} を記録した画像である。この画像は、白色光顕微鏡で観察したときと類似の画像になるので、比較のために用いた。(b)は、 $\sqrt{I_{\text{xDC}}^2 + I_{\text{yDC}}^2}$ を記録した画像である。(a)と比較すると、立体的で輪郭のはっきりした画像になっている。(c)は、 I_{xDC} を記録し

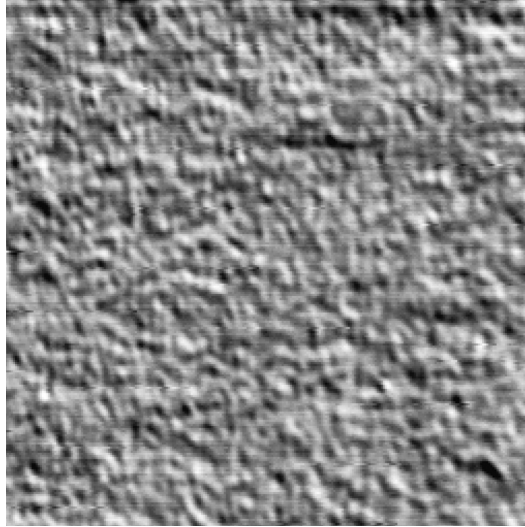


図3 洗浄したカバーガラス表面の観測結果
観測域は $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ 。

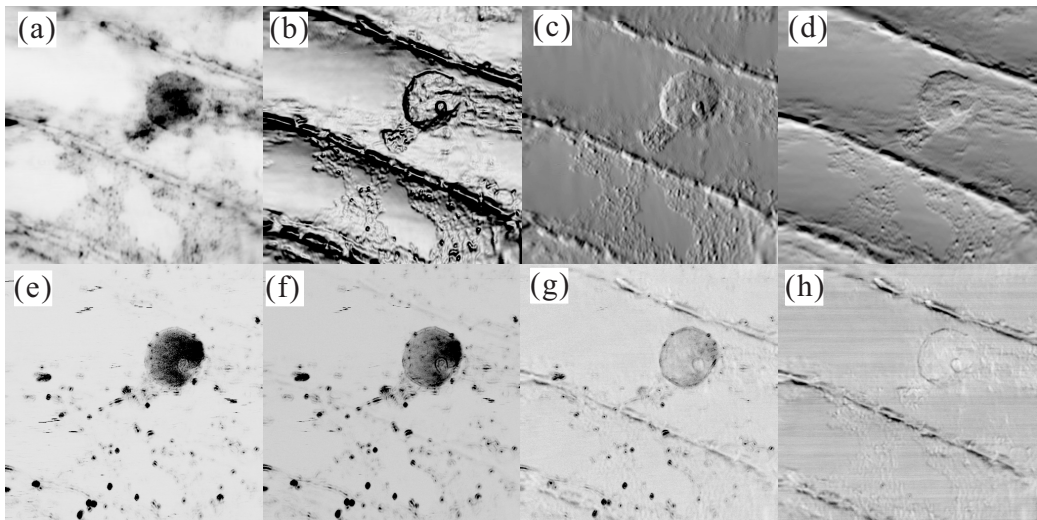


図4 玉ネギの上皮細胞の観測結果

観測域は $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ 。(a) I_{sum} , (b) $\sqrt{I_{\text{xDC}}^2 + I_{\text{yDC}}^2}$, (c) I_{xDC} , (d) I_{yDC} , (e) $I_{\text{x5kHz}}^2 + I_{\text{y5kHz}}^2$, (f) $I_{\text{x5kHz}}^2 + I_{\text{y5kHz}}^2$, (g) $I_{\text{x500kHz}}^2 + I_{\text{y500kHz}}^2$, (h) $I_{\text{x5MHz}}^2 + I_{\text{y5MHz}}^2$ 。交流成分を用いると、ブラウン運動の可視化ができる。細胞核内部に激しいブラウン運動があることが分かる。細胞壁はブラウン運動を行わないので、(e)と(f)には写らない。5 MHzの画像は、ブラウン運動に起源のある信号か、レーザーの振幅雑音に起源のある信号か分からない。

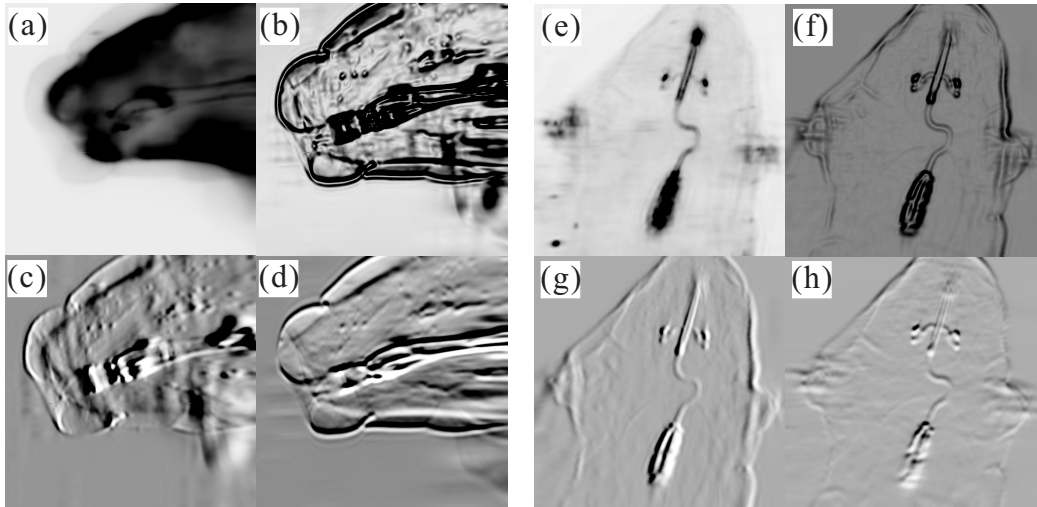


図5 クマムシの観測結果

観測域は $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ 。(a)~(d)は固定したクマムシ (*Macrobiotus* sp.) を透過型で観測した結果。(a)は、 I_{sum} を記録した画像、 $\sqrt{I_{\text{xDC}}^2 + I_{\text{yDC}}^2}$ を記録した画像、(c)は、 I_{xDC} を記録した画像、(d)は、 I_{yDC} を記録した画像である。(e)~(h)は別なクマムシ (*Diphascoson* sp.) の観察例。

た画像である。x方向の屈折率勾配を記録しているので、x方向に陰影の付いた画像になっている。(d)は、 I_{yDC} を記録した画像である。y方向の屈折率勾配を記録しているので、y方向に陰影の付いた画像になっている。(e)は、 $I_{\text{x5kHz}}^2 + I_{\text{y5kHz}}^2$ を記録した画像である。白は信号が無く、黒くなるに従い信号強度が増大するように描画した。細胞壁は、硬くブラウン運動を行わないので、記録されない。一方、細胞核内容物は、激しくブラウン運動を行っているので強い信号が出ている。(f)は、 $I_{\text{x50kHz}}^2 + I_{\text{y50kHz}}^2$ を記録した画像である。(e)とほとんど同じ画像であるが、信号強度は1/10程度に低下している。ブラウン運動に伴う信号は、周波数 f に対して $1/f$ で減少する傾向である。(g)は、 $I_{\text{x500kHz}}^2 + I_{\text{y500kHz}}^2$ を記録した画像であり、(h)は、 $I_{\text{x5MHz}}^2 + I_{\text{y5MHz}}^2$ を記録した画像である。5 MHzのブラウン運動の信号は、微小であり、本装置で検出が行われているか否かは今のところ分からない。(h)の画像は、レーザー光の振幅雑音に関連した現象であると考えているが、詳細は不明である。

図5(a)~(d)は固定したクマムシ (*Macrobiotus* sp.) を透過型で観測した結果である。(a)は I_{sum} を記録した画像、(b)は $\sqrt{I_{\text{xDC}}^2 + I_{\text{yDC}}^2}$ を記録した画像、(c)は I_{xDC} を記録した画像、(d)は I_{yDC} を記録した画像である。この試料は、光学的に密であり、レーザー光が多重散乱をしている。このため、透過光強度を記録した図5(a)は、不鮮明で霞んだ像になっている。一方、レーザー光の屈折角を記録した図5(b)~(d)は、鮮明である。これは、本方法に弾道光 (ballistic light)¹¹⁾を選択検出する働きがあることによると思われる。多重散乱された光は、伝搬方向が広がり、4分割フォトダイオードの受光面に均一に照射されるので差信号である I_{xDC} や I_{yDC} には反映されにくい。図5(e)~(h)は別なクマムシ (*Diphascoson* sp.) を観察した例である。このクマムシは比較的透明なので、前者よりも輪郭のくっきりした像になっている。

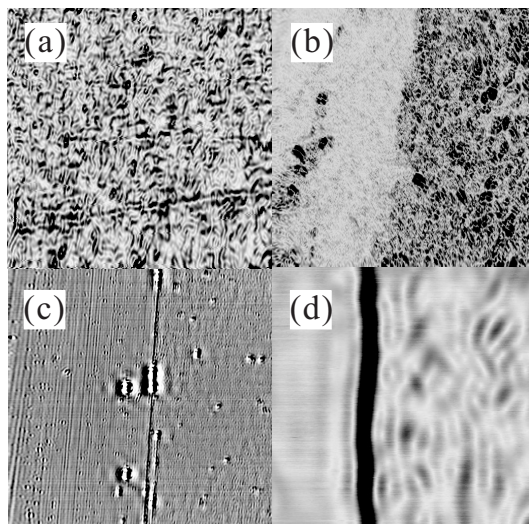


図6 反射型での観測例

(a)アルミ蒸着ミラーの表面。観測域は $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ 。(b)フェリチンの単分子膜。観測域は $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ 。分子は主として右半分に分布している。(c)ストレプトアビジンの単分子膜。観測域は $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ 。分子は主として右半分に分布している。左側の分子は爪楊枝で削り取った。(d)ストレプトアビジンの単分子膜。観測域は $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ 。分子は主として右半分に分布している。左側の分子は爪楊枝で削り取った。この観測から、本顕微鏡の分解能が 600nm であることが分かる。

図6は、反射型で計測した例である。図6(a)は、光学実験で使用するアルミ蒸着ミラーの表面であり、 $\sqrt{I_{\text{xDC}}^2 + I_{\text{yDC}}^2}$ を記録し、掃引範囲は $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ である。この鏡は、通常のレーザー光学実験を行う上で十分な性能であるが、傷を含めて、様々な構造が観察できる。図6(b)はシリコン単結晶基板上的フェリチン分子の単分子膜の観察結果で、 $\sqrt{I_{\text{xDC}}^2 + I_{\text{yDC}}^2}$ を記録し、掃引範囲は $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ である。分子は主として右側にあり、左側は比較のため分子をなるべく付着させないようにした。図6(c)はシリコン単結晶基板上的ストレプトアビジンの単分子膜の観察結果で、 I_{xDC} を記録し、掃引範囲は $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ である。右側が単分子膜の領域で、左側は比較のため単分子膜を爪楊枝で削り取った。図6(d)もシリコン単結晶基板上的ストレプトアビジンの単分子膜の観察結果であるが、 $\sqrt{I_{\text{xDC}}^2 + I_{\text{yDC}}^2}$ を記録し、掃引範囲は $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ である。左側はシリコン単結晶基板であり、右側が単分子膜である。両者の境界が黒くなっているのは、屈折率の傾きを計測しているため、境界での傾きが一番大きいためである。単分子膜とシリコン単結晶基板の境界を急峻な単ステップと仮定すると、この図から、本反射型顕微鏡の空間分解能が 600nm であることが分かった。また、左側は、シリコン単結晶基板なので、ほとんど構造が無いが、右側の単分子膜上には構造があることが分かる。これは、分子は小さく（数nm）本顕微鏡では単離して観察することはできないので、分子の二次元結晶上における格子欠陥が観察されていると思われる。

5. 考察

数々の観測例から、本方式で実用になるような計測が可能であることは明らかである。ここでは、顕微鏡にとって最も重要な分解能について考えてみる。

本顕微鏡は、4分割フォトダイオードにより、レーザービームの中心位置のずれを計測し、集光ビーム内での屈折率の傾きを計測している。屈折率の傾きを計測しているのであるから、あ

る意味で集光ビーム内部での試料のさらに細かい構造を計測していると言える。レーザー光は対物レンズ（集光レンズ）により回折限界まで集光しているので、更に細かい構造が見えることは、波動光学の基本原則である「回折限界以下の細かい構造は観察できない」という原則に反しているように思える。この点について詳しく考察することで本顕微鏡の計測原理と分解能について考えてみよう。

開口数の小さい対物レンズにより集光した光は、ビームスポットは大きいけれど、伝搬方向の広がり小さいので、伝搬方向の変化を容易に計測できる。したがって、ビームスポット内のさらに細かい構造を求めやすいといえる。一方、開口数の大きい対物レンズにより集光した光は、ビームスポットは小さいけれど、伝搬方向の広がり大きいので、伝搬方向の変化の検出は難しくなる。したがって、ビームスポット内のさらに細かい構造は求めにくいといえる。このことから、集光レンズの開口数のみで解像度が決まらないことが分かる。

レーザービームの屈折を計測する顕微鏡の分解能は、集光レンズの開口数、すなわちビームスポットの大きさのみで決まるのではなく、受光器の大きさと試料と受光器との距離、言い換えれば、受光器の開口数にも依存する。このことは、受光器が4分割フォトダイオードの場合には、ビームスポット内の屈折率の傾き（1次微分）が求まり、9分割フォトダイオードを用いればビームスポット内の屈折率の2次微分まで求めることができ、16分割フォトダイオードを用いればビームスポット内の屈折率の3次微分まで求めることができるというように、受光側での工夫により高次の微分値が計測できることから理解できる。一見、分解能は無制限に向上しそうであるが、解析を行った結果、高次の微係数は集光レンズの開口数が上がるほど計測が困難になり、開口数1の場合には1次の微係数ですら計測は困難である。（困難であるが、不可能ではない。）したがって、本顕微鏡は開口数が1よりも小さい対物レンズを用いた観察において、開口数の余り（1との差）を利用して、集光スポット内の試料の細かい情報を受光側の開口数で引き出しているといえる。また、通常利用する対物レンズの開口数が0.5より大きいことを考えると、意味のあるのは1次微分までなので、本方法は「顕微鏡の分解能を2倍に向上させる簡便な方法」であるといえる。

残念なことに、開口数の大きい集光レンズは本方法に不向きなように思えるかもしれない。実際、開口数1では理論的に困難なのだから、通常使われている開口数0.9の対物レンズでは現実問題として不可能であると結論するのも当然かもしれない。しかし、実際は容易にできる。これは、レーザー計測が高感度であることと関連している。水平方向の分解能は波長程度(500nm程度)であっても、垂直方向の感度は単原子ステップ(0.1nm以下)でも容易に計測できるだけの感度がある。したがって、たとえわずかでも開口数に余裕があれば本方法で屈折率の傾きは容易に計測できる。さらなる発展である多分割フォトダイオードを用いた高次の微係数計測も実用になる可能性がある。

現在では、屈折率を計測する顕微鏡として、微分干渉顕微鏡と位相差顕微鏡が実用化されている。これらと比較してみよう。微分干渉顕微鏡は、伝搬位置の僅かにずれた2つの光を用いて計測する。これは、光がぶれている、もしくはピントが合っていない場合と類似なので、分

解能が低下する。位相差顕微鏡は、対物レンズの開口の一部を参照光のために利用しているため、実質的な開口数が低下し、分解能がさがる。これらと比較すると、本方法は、集光レンズの分解能（開口数）を全く犠牲にせずに屈折率の傾きを観測している。これは、走査レーザ方式なのでできることである。

6. まとめ

レーザビームの屈折を検出することによる屈折率の空間不均一性を可視化する顕微鏡について述べた。本顕微鏡は、類似の目的で開発された微分干渉顕微鏡や位相差顕微鏡と同様に試料の屈折率情報を可視化することの他に、試料内部のブラウン運動を可視化する事もできる。

本顕微鏡は、現在のところ、一回の計測に500s要している。これは、主として試料を掃引しているため、高速掃引ができないことによる。計測速度は、レーザビームを掃引する方式へ変更することで向上できる。

謝辞

本研究を行うにあたり、古野泰二先生から有用な助言と単分子膜試料の作成をして頂き、鈴木忠先生からクマムシの標本を提供して頂き、感謝いたします。また、青木健一郎先生からは様々な助言をいただき、感謝いたします。

参考文献

- 1) M. Pluta: *Advanced light Microscopy* (Elsevier, New York 1988).
- 2) M. Minsky: US Patent, 3, 013, 467, "Microscopy Apparatus" Dec. 19, 1961 (filed Nov. 7, 1957).
- 3) P. Davidovits and M. D. Egger: *Nature*, **223** (1969) 831.
- 4) P. Davidovits and M. D. Egger: *Appl. Opt.*, **10** (1971) 1615.
- 5) A. E. Dixon, D. Damaskiinos and M. R. Atkinson: *Nature*, **351** (1991) 551.
- 6) D. K. Hamilton, C. J. R. Sheppard and T. Wilson: *J. Microsc.*, **135** (1984) 275.
- 7) T. Mitsui: *Jpn. J. Appl. Phys.*, **44** (2005) 3279.
- 8) E. M. Slayter and H. S. Slayter: *Light and Electron Microscopy* p.154 (Cambridge University Press, Cambridge 1992).
- 9) S. Terakawa, J. H. Fan, K. Kumakura and M. Ohhara-Imaizumi: *Neurosci. Lett.*, **123** (1991) 82.
- 10) F. Zernike: *Z. tech. phys.*, **16** (1935) 454.
- 11) T. Mitsui, K. Sakurai: *Appl. Opt.*, **35** (1996) 2253.