報 文 3

コンフォーカル光学系における分光法の一提案

大 出 孝 博・山 内 良 彦

レーザーテック株式会社 技術部, 横浜市港北区綱島東 4-10-4 (〒223)

(1990 年 10 月 29 日受理)

Study on Confocal Spectroscopy

Takahiro ODE and Yoshihiko YAMAUCHI

Lasertec Corp. Engineering Depart., 4-10-4 Tsunashima-higashi
Kohoku-ku Yokohama Japan 223

(Received October 29, 1990)

Confocal microscope system, which has higher resolution than an ordinary microscope, has spectrometric capability with no special optical elements. It is found by calculation that the confocal microscope system with SFS1 lens which has 20.9 aberration number has 0.6 nm spectral resolution. This report describes about some applications of the system.

1. はじめに

走査型レーザー顕微鏡 (Scanning Laser Microscope: 以下 SLM) は, 最近顕微観察手段の一つとして注目され, いくつかの優れた総説^{1)~4)}もある. この SLM の応用分野として有効なものとして考えられているものに, 生物分野での共焦点蛍光検鏡法がある. この共焦点蛍光検鏡法においては, 標本からの蛍光を分光することが重要であることが知られており, その機能を持った製品も市場に存在する.

従来これらの装置は, ダイクロイックミラー又は, グレーティングを用いて分光する方法が多く用いられている. ここでは, 共焦点光学系そのものを応用して, 特別な分光素子を付加することなく分光を行なう可能性について述べる.

2. コンフォーカル光学系

コンフォーカル光学系 (共焦点光学系) とは, Fig. 1 の様に対物レンズを用いて, 試料上にレーザー光を微小スポットとして投影し, そこからの反射光又は蛍光などを像面に置かれたピンホール背面の検出器によって, 受

光するという光学系のことである.

また, コンフォーカル光学系は, Sheppard らによって理論上従来の顕微鏡よりも結像特性が優れていることが明らかにされており⁵⁾, 以下 Fig. 2 を用いてその結像特性について説明する.

点を光学系を用いて結像させた場合の像面上の点像の拡がり, 円形開口から回折する光の拡がりと同じに考えることができ, Fig. 2(a) の像面上の光の拡がり $I(p)$ は次式で表される.

$$I(P) = |h(Z)|^2 \quad (1)$$

但し, P : 円形開口の分布関数

h : スリット開口で規格した光軸からの距離,
 $Z (= \pi \rho / \lambda F)$ の点像分布関数

λ : 光の波長

ρ : 円形開口の半径

F : 開口から像面までの距離

Fig. 2(b) は, (1) 式において, 規格化された Z 以外の値を定数として, 計算したものである.

$Z=3.832$ に光のない所ができ, それより外側には, ハローと呼ばれる明暗の環ができる. ハローは, 中心に

Fig. 1 This figure shows origin of the depth discrimination or optical sectioning property of confocal optical system.

(a) Point spread from circular aperture.

(b) Calculated value of point spread function $I(P)=|h(z)|^2$ in case (a).

Fig. 2

比べ暗く、一般にその存在は無視できる。従って、 $Z=3.832$ の明るい円板 (エアリーの円板と呼ばれている) が実際の分解能の限界を決めると考えてもよい。つまり結像された2つの像は、エアリーの円板の半径より離れていれば、完全に解像していることになる。コンフォーカル光学系の場合、照明側、検出側、2回の結像で検出

Fig. 3 This graph shows calculated value about $I(P')=|h_1(Z_1)*h_2(Z_2)|^2$. It is obvious that confocal microscope has a smaller point spread function than that of ordinary microscope.

器上の輝度は、以下のようにになる。

$$I(P')=|h_1(Z_1) * h_2(Z_2)|^2 \quad (2)$$

但し、*：コンボリューション

h_1 ：照明側の点像分布関数

h_2 ：結像側の点像分布関数

(2) 式について、(1) と同様の条件で点像分布を計算したものが Fig. 3 である。Fig. 3 の実線で表されている通り点像分布は従来の光学系より狭くなり、解像度は向上することがわかる。

コンフォーカル光学系では、迷光や不要散乱光及びハローは検出器前のピンホールを通過できないので、その画像はコントラストのある解像度の高いものになる。また、点検出器には合焦点面以外からの反射光は、ほとんど通過できないので、得られる画像は focus 面からの光のみとなる。

前述した様にコンフォーカル光学系は、一般の顕微鏡よりも面内分解能が高く、また光軸方向にも分解能を持つ。この光軸方向にも、分解能をもつ特性のことをオプティカルスライシングとも呼ぶ。共焦点蛍光検鏡法では、厚みを持った生物標本からの蛍光像をオプティカルスライシングして観察できることが、有効であると考えられている。

3. 分光の工夫

コンフォーカル光学系によって、得られた像を分光する方法としてよく知られているのは、Fig. 1 に示すピンホールを通過した光をダイクロイックミラー等によ

って分光するというものである。

ここでは、Fig. 1 のレンズに極めて色分散の大きいものを使用することを考えてみる。このレンズに要求される性質としては、軸上色収差のみが大きく、他の収差は良く補正されていることが必要である。仮にこのレンズを色収差レンズと呼ぶことにする。この場合、試料からの蛍光は、その波長に応じて Fig. 4 に示す様に光軸方向に分散する。そこで、Fig. 4 のピンホールを光軸に沿って移動させれば、検出器からの出力は、ピンホールの光軸上の位置に応じて分光されたものとなる。この方法の場合、光学系自体が非常に単純であるから従来の分光器よりもより少ない光量損失で分光を行える可能性

Fig. 4 If objective lens has chromatic aberration, focal length will depend upon the wavelength of reflected or fluorescence light ($\lambda_0, \lambda_1, \dots$).

Fig. 5 Basic schematic of confocal spectroscopy

$$I = \left(\frac{-3.6}{340} \right)^2 = 1.1 \times 10^{-4}$$

Fig. 6 Description of beam spot size according to wavelengths. The refractive index of SFS1 at $F=486.13$ nm is $n_F=9.5455$, and at $d=587.56$ nm is $nd=1.92286$. In this condition, the beam spot size of F ray becomes $340 \mu\text{m}$ at fd position, and d ray becomes $3.6 \mu\text{m}$.

がある。また、コンフォーカル光学系の基本スタイルをそのまま使用しているので、従来の光学顕微鏡以上の面内分解能を期待できると同時に、3次元分解能や迷光除去能力も損なう事が無い。この原理を実現しようとするとき、軸上色収差のみが大きい顕微鏡の対物レンズは、入手が困難であるから、Fig. 4の光学系を無収差レンズL1と軸上色収差のみが大きい色収差レンズL2とに分けて考えたものがFig. 5である。

ここでFig. 5の光学系において仮に、L2の硝材にアッペ数20.9のSFS1を使用すると仮定したときの分光特性を幾何光学的な近似を用いて求める。まず、このレンズで $F=486.13$ nmを励起光に用い、 $d=587.56$ nmの付近の蛍光を集光させた場合の焦点面付近のビーム径の光軸方向に対する変化をFig. 6に示す。ここで計算にあたってL2のF線における焦点距離を100 mm、射出瞳径は20 mmと仮定した。また、このときのピンホール径は、 d 線の蛍光が標本から返ってくるものとして、その蛍光が作る回折像のスポット径と等しいものとして計算した。

次に、ビームスポット径の変化より分光特性を計算によって求める。まず、結像面で Δl デフォーカスしたときのビームスポット径 W は次式で近似的に与えられる。

$$W = (D/f) \times \Delta l + w_{\min} \quad (3)$$

ここで、 f =レンズの焦点距離

D =レンズ入射光の径

$w_{\min}$ =最小ビームスポット径

$$I = (1.22 \times \lambda \times f / D)$$

また、 λ_F で焦点距離 f_F の平凸レンズは曲率半径 r とすると、

$$r = f_F \times (n_F - 1) \quad (4)$$

が成り立つ。ここで n_F は、 λ_F でのレンズ材質の屈折率である。更に、このレンズの任意波長 λ における屈折率は、

$$n_\lambda^2 = A_0 + A_1 \lambda^2 + A_2 \lambda^{-2} + A_3 \lambda^{-4} + A_4 \lambda^{-6} + A_5 \lambda^{-8} \quad (5)$$

ここで $A_0 \dots A_5$ は、定数

で与えられる⁹⁾。また、このレンズの波長 λ での焦点距離は(4)式より、

$$f_\lambda = f_F \cdot \frac{n_F - 1}{n_\lambda - 1} \quad (6)$$

で求められる。ここで λ を d 線として f_λ を求めると、103.4 mmとなり、この位置に回折限界のピンホール($r=3.6 \mu\text{m}$)を置くものとする。 λ が d 線以外の場合には、de-focusによって光はぼけてピンホールを通過できる光量が減少する。その比 I は、 $I = (w_{\min}/W)^2$ で与えられ、(3)、(6)式を用いて変数 n_λ のみの式

$$I = \left(\frac{\frac{w_{\min}}{D} \cdot \frac{n_F - 1}{n_\lambda - 1} \times f_F - f_d}{f_d} + w_{\min} \right)^2 \quad (7)$$

で表される。(5)、(7)より波長 λ と I の関係を計算した結果をFig. 7に示す。Fig. 7より明らかな様にコンフォーカル光学系を応用した光学系で分光を行なうと、

Fig. 7 Calculated result of spectral resolution by using SFS1 Lens ($\nu d=20.9$). This graph shows $FWHM=0.6$ nm when $\phi 7.2$ μ m pin hole is placed at $fd=103.4$ nm position. And intensity is $I=(w/W(\Delta l))^2$.

半値幅で 0.6 nm の波長選択度が得られることがわかる。

以上より共焦点光学系と色収差の大きいレンズを組み合わせて、特別な光学部品を使用せずに分光できる可能性が示された。

4. 動作安定化

このアイデアは、検出器前のピンホールを光軸に沿って正確にアライメントをとりながら、移動しなければならないという欠点がある。具体的には、数 μ m 径程度のピンホールを数 mm にわたって移動することとなり、そのとき要求されるピンホールの真直度は、サブミクロン以下である。これは、実現に多少の困難をともなう可能性のあるものである。この欠点を取り除いたものが Fig. 8 の光学系であり、色収差レンズの結像点に反射鏡を置き、選択された波長のみがピンホールを通過できるように工夫が加えられている。この場合、ピンホールと結像点は色収差レンズによって互いに共役の位置にあるので、アライメント精度は要求されない。このシステ

Fig. 8 Confocal spectrograph which is reduced alignment error.

ムでは、たとえミラーが移動する際に面倒れを発生しても、レンズの瞳がその反射光を受光できるだけの大きさを持っていれば、分光結果に影響を与えない。従って、機械的に安定な分光が可能となる。

5. ま と め

色収差を利用して分光する技術については、赤外域では 1911 年に Rubens らによって報告されている⁷⁾。しかし、この技術は炎の輝線スペクトルを求めるためのものであり、像を形成することは目的ではなかった。ここでは、照明光の試料上における輝度が、十分に高いコンフォーカル光学系にこの原理を用いることで、ピンホールを回折限界にまで絞り込むことによって、半値幅 0.6 nm という比較的シャープな分光特性が得られることを示した。また、ピンホールを走査するかわりに実像面に置かれた鏡面を走査することで、機械的安定度の高い分光も可能であることを示した。この方式の長所は、構造が比較的単純なため理論値に近い効率を期待できることであり、光量が著しく少ない場合従来の分光器より有利であると考えられる。

また、この色収差レンズを用いたコンフォーカル分光

システムは、顕微鏡システムとしての応用に限定されるものではなく、チューナブルキャビティーとして、エタロンに代わるものとしてなど、他分野にも応用の可能性が広がるものと考ええる。

参考文献

- 1) T. Wilson, C. J. R. Sheppard, "Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy", Academic Press, London (1984).
- 2) 河田 聡, 南 茂夫, "光学走査顕微鏡", 光学 18, 380-391, (1989).
- 3) 大出孝博, "反射型レーザー走査顕微鏡", 光学 18, 392-398, (1989).
- 4) 大出孝博, "レーザー走査顕微鏡の開発", 日経サイエンス 10, 42-53, (1990).
- 5) C. J. R. Sheppard and A. Choudhury: Image Formation in the Scanning Microscope, OPTICA ACTA, Vol. 24, No. 10, p. 1051, (1977).
- 6) 早水良定, "光機器の光学 I", 日本オプトメカトロニクス協会, p. 395, (1988).
- 7) H. Rubens and R. W. Wood: Focal Isolation of Long Heat-Waves, Philosophical Magazine, Vol. 21, pp. 249-265, (1911)