顕微鏡型複屈折マッピングシステム*

海老澤 瑞枝** 大谷 幸利*** 梅田 倫弘***

Microscopic System for Birefringence Mapping

Mizue EBISAWA, Yukitoshi OTANI and Norihiro UMEDA

A microscopic birefringence measurement is proposed to detect optical anisotropy in microscopic area. The stress from industrial processes and molecular orientation are detected by visualizing birefringence distribution. An analytic algorithm with local-sampling phase shifting is employed for achieving a high resolution. The error caused by the initial birefringence of the optical system is corrected by subtracting the in-phase vector. A Berek compensator is used for accuracy check. We demonstrate our method by measuring the cross section of an optical disk made from plastic, and a bio-sample. In our experiments, we were able to obtain a precision of $\pm 0.2^\circ$.

Key words: birefringence, microscopic measurement, local-sampling phase shifting technique, correction of subtraction in phase

1. はじめに

透明なプラスチックやガラスを材料として製作される光学素子、ディスプレイ基板の内部情報を得るために複屈折計測が広く用いられている^{1)~3)}。複屈折を計測することによって、材料の応力分布や高分子の配向分布をとらえることができる。製品に求められる品質の向上にともない、従来無視されていた微小な複屈折が製品の品質に影響を与えるようになってきた。さらに、これらの要求される領域が小さくなってきている。このような要求を満たすためには顕微鏡下で、微小領域で複屈折計測を行う必要がある。しかし、顕微鏡下で複屈折計測を行う場合、ミラーでの反射によって生じる位相差やレンズ系を保持する際の応力による複屈折といった装置自体のもつ複屈折の影響を受けてしまう。このためサンプルのもつ微小な複屈折が装置のもつ複屈折に埋もれてしまうという問題が生じる。そこで、本研究では光学系のもつ複屈折を試料計測時の複屈折からベクトル的に減算し、システムのキャリブレーションをする方法を提案する。これを用いて実際の試料の複屈折を測定する。

2. 複屈折計測原理

2.1 局所サンプリング法による位相検出

図1に顕微鏡型複屈折計測装置を示す。光源(SLD)からの光は偏光子(P)を透過して45°の直線偏光となる。この透過光はレンズ系でコリメートされ1/4波長板(Q)を透過し円偏光となった後、バビネ・ソレイユ補償器(BSC)などの位相変調素子によって任意の位相差が与えられる。試料(S)を透過した光は複屈折の影響によって楕円偏光となる。最後に検光子(A)を透過した光強度はCCDカメラで検出される。検出された光強度より試料の複屈折位相差と主軸方位を求める。

入射光強度をI、位相変調素子によって与えられる位相差を δ 、方位を θ とすると検出される光強度 I_t は、出射光のストークスパラメータより求める。出射光のストークスパラメータ S' は次式より得られる。

$$S' = A_{\theta+45^\circ} \cdot X_{\Delta, \phi} \cdot R_{\delta, \theta} \cdot Q_{90^\circ} \cdot S \quad (1)$$

ここで、 Δ 、 ϕ は試料の位相差と方位を示す。45°の直線偏光である入射光のストークスパラメータ S を示す。

$$S = \begin{bmatrix} s_0 \\ s_1 \\ s_2 \\ s_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 1 \\ 0 \end{bmatrix} \quad (2)$$

$\lambda/4$ 板 Q_{90° 、位相変調素子 $R_{\delta, \theta}$ 、検光子 $A_{\theta+45^\circ}$ 、試料 $X_{\Delta, \phi}$ は以下のよう表す。

$$Q_{90^\circ} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \end{bmatrix} \quad (3)$$

$$R_{\delta, \theta} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 - (1 - \cos \delta) \sin^2 2\theta & (1 - \cos \delta) \sin 2\theta \cos 2\theta \\ 0 & (1 - \cos \delta) \sin 2\theta \cos 2\theta & 1 - (1 - \cos \delta) \cos^2 2\theta \\ 0 & \sin \delta \sin 2\theta & -\sin \delta \cos 2\theta \end{bmatrix} \quad (4)$$

$$A_{\theta+45^\circ} = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} 1 & \cos 2(\theta + 45^\circ) & \cos^2 2(\theta + 45^\circ) \\ \cos 2(\theta + 45^\circ) & \cos^2 2(\theta + 45^\circ) & \sin 2(\theta + 45^\circ) \sin 2(\theta + 45^\circ) \cos 2(\theta + 45^\circ) \\ \sin 2(\theta + 45^\circ) \sin 2(\theta + 45^\circ) \cos 2(\theta + 45^\circ) & \sin^2 2(\theta + 45^\circ) & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (5)$$

* 原稿受付 平成15年 10月 28日

** 学生会員 東京農工大学工学研究科 (小金井市中町2-24-16)

*** 正会員 東京農工大学 (小金井市中町2-24-16)

$$X_{\Delta, \phi} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 - (1 - \cos \Delta) \sin^2 2\phi & 0 & 0 \\ 0 & (1 - \cos \Delta) \sin 2\phi \cos 2\phi & 0 & 0 \\ 0 & \sin \Delta \sin 2\phi & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ (1 - \cos \Delta) \sin 2\phi \cos 2\phi - \sin \Delta \sin 2\phi & 1 - (1 - \cos \Delta) \cos^2 2\phi & \sin \Delta \cos 2\phi & -\sin \Delta \cos 2\phi \\ 1 - (1 - \cos \Delta) \cos^2 2\phi & \sin \Delta \cos 2\phi & \cos \Delta & 1 \end{bmatrix} \quad (6)$$

試料 X の位相差を微小であるとし、 $\Delta \ll 1$ とすることによって

$$X_{\Delta, \phi} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & -\Delta \sin 2\phi \\ 0 & 0 & 1 & \Delta \cos 2\phi \\ 0 & \Delta \sin 2\phi & -\Delta \cos 2\phi & 1 \end{bmatrix} \quad (7)$$

と近似することができる。

以上の式より光強度 I' は

$$I' = \frac{1}{2} I \left[1 - \cos \left\{ \tan^{-1} \Delta \cos (2\theta - 2\phi) + \delta \right\} \right] \quad (8)$$

で表わされる。

位相変化 Φ を

$$\Phi = \tan^{-1} \Delta \cos (2\theta - 2\phi) \quad (9)$$

とすると、式(8)は以下のように表わすことができる。

$$\begin{aligned} I'_i &= \alpha (1 + \beta \cos (\Phi + \delta)) \\ &= a_0 + a_1 \cos \delta_i + a_2 \sin \delta_i \\ \left. \begin{aligned} a_0 &= \alpha \\ a_1 &= \alpha \beta \cos \Phi \\ a_2 &= -\alpha \beta \sin \Phi \end{aligned} \right\} \quad (10) \end{aligned}$$

Φ は位相変化を表わし、検出法には局所サンプリング法を用いた⁴⁾。位相変調素子における位相 δ を N 段階変化させたものとする。誤差を含む実測値 $\hat{I}_i$ と上式の理論値 I'_i の差が最小となるような a_0, a_1, a_2 を決めることにより最も確からしい位相 Φ を求める。最小二乗法により行列を用いて

$$\begin{bmatrix} 1 & \frac{1}{N} \sum \cos \delta_i & \frac{1}{N} \sum \sin \delta_i \\ \frac{1}{N} \sum \cos \delta_i & \frac{1}{N} \sum \cos^2 \delta_i & \frac{1}{N} \sum \sin \delta_i \cos \delta_i \\ \frac{1}{N} \sum \sin \delta_i & \frac{1}{N} \sum \cos \delta_i \sin \delta_i & \frac{1}{N} \sum \sin^2 \delta_i \end{bmatrix} \begin{bmatrix} a_0 \\ a_1 \\ a_2 \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} \frac{1}{N} \sum \hat{I}_i \\ \frac{1}{N} \sum \hat{I}_i \cos \delta_i \\ \frac{1}{N} \sum \hat{I}_i \sin \delta_i \end{bmatrix} = 0 \quad (11)$$

$$\begin{bmatrix} a_0 \\ a_1 \\ a_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{1}{N} \sum \hat{I}_i \\ \frac{2}{N} \sum \hat{I}_i \cos \delta_i \\ \frac{2}{N} \sum \hat{I}_i \sin \delta_i \end{bmatrix} \quad (12)$$

を得ることが出来る。

ただし、ここでは与える位相差 δ を $0 \sim 2\pi$ で等間隔に変化させる。

Fig.1 Microscopic measurement system for birefringence distribution

式(10)、式(12)より位相 Φ は

$$\Phi = -\tan^{-1} \frac{\sum_{i=0}^N \hat{I}_i \sin \delta_i}{\sum_{i=0}^N \hat{I}_i \cos \delta_i} \quad (13)$$

となる。局所サンプリング法ではサンプルのもつ複屈折に合わせ、 δ を変化させて測定レンジを制約する。その結果、ディテクタのダイナミックレンジに対してわずかな位相変化による光強度の差が十分大きく得られるため、高分解能な計測が可能となる。

位相変調素子の方位を $0 \sim 3\pi/4$ まで $\pi/2$ 毎変化させ各位相 $\Phi_0 \sim \Phi_3$ 求める。これによって試料の複屈折位相差 Δ 、主軸方位 ϕ は、

$$\Delta = \frac{1}{2} \sqrt{(\Phi_2 - \Phi_0)^2 + (\Phi_3 - \Phi_1)^2} \quad (14)$$

$$\phi = \frac{1}{2} \tan^{-1} \left(\frac{\Phi_1 - \Phi_3}{\Phi_0 - \Phi_2} \right) \quad (15)$$

と表わすことができる。

2.2 装置誤差のキャリブレーション

実際に装置で計測を行う場合、光学素子による偏光状態の変化や光軸調整時の誤差が生じる。そのため 2.1 に示した解析を行うだけでは実験光学系のもつ複屈折から生じる誤差は補償されていない。また、画像検出で広く用いられている 4 ステップ位相シフト法では計測を行う際、光強度の最小値から最大値までを計測範囲としてサンプリング点をとっているのに対して、本実験で解析方法として用いた局所サンプリング法では光強度の変化が少ない位相付近を計測範囲とすることにより微小な位相変化を拡大して検出している。このため、同じダイナミックレンジのディテクタを用いても、4 ステップ位相シフト法に比べて高分解能な計測が可能となる反面、装置による複屈折位相変化の影響も受けやすくなる。

そこで、装置のもつ複屈折を取り除き、試料の複屈折のみを検出するためにキャリブレーションを行う。複屈折 R は量(複屈折位相差 Δ)と方向(主軸方位 ϕ)をもつベクトル量であることから、試料の複屈折の方位と装置の複屈折の方位が一致していない場合、式(16)に示すようにベクトルによる減算を行う必要がある。ここで s はサンプルの値、 m は計測値、 n は装置のみの値とする。

$$R(\Delta_s, \phi_s) = R(\Delta_m, \phi_m) - R(\Delta_n, \phi_n) \quad (16)$$

このような方位を考慮した計算を行うためには単純に複屈折位相差と主軸方位の結果を減算するのではなく、方位の情報も含んだ位相変化の段階で補正を行う必要がある。

まず、試料を何も入れない状態で位相差を与え、光強度の変化を検出する。この検出された光強度と式(13)より方位 θ での位相変化 Φ_n が得られる。方位 θ を $0, \pi/4, \pi/2, 3\pi/4$ と変化させることにより位相変化 $\Phi_{n0}, \Phi_{n1}, \Phi_{n2}, \Phi_{n3}$ を得る。これをヌルの状態での位相とする。ヌルの位相には装置のもつ複屈折の量と方向の情報がふくまれている。同様に、試料を置き位相 $\Phi_{m0}, \Phi_{m1}, \Phi_{m2}, \Phi_{m3}$ を求める。この位相には装置と試料両方の複屈折情報が含まれている。これらの位相から試料のみによる位相変化 $\Phi_{s0}, \Phi_{s1}, \Phi_{s2}, \Phi_{s3}$ を求める。式(17)に示すように各方位で位相の減算を行う。

$$\begin{aligned}\Phi_{s0} &= \Phi_{m0} - \Phi_{n0} \\ \Phi_{s1} &= \Phi_{m1} - \Phi_{n1} \\ \Phi_{s2} &= \Phi_{m2} - \Phi_{n2} \\ \Phi_{s3} &= \Phi_{m3} - \Phi_{n3}\end{aligned}\quad (17)$$

位相ごとの減算によるキャリブレーションを行なうことにより、光学系のもつ複屈折と試料のもつ複屈折を量として扱うのではなく、方位も考慮したベクトルとしてとらえることができる。そのため、試料の複屈折が微小な場合も高精度な計測が可能となる。

3. 複屈折計測装置の検定

3.1 キャリブレーション

キャリブレーションの有効性を調べるために、図 2 に示す実験光学系で計測を行った。光源には波長 635nm、スペクトル幅 2nm のスーパーリミネセントダイオードを使用し、試料として複屈折位相差の設計値が 5.8° とされている薄膜歪標準器を 0° に設置した。キャリブレーションを行っていない結果を図 3(a)、複屈折をスカラーとして減算を行った結果を図 3(b)、2.2 で述べたようにベクトルとして位相減算を行った結果を図 3(c)に示す。このときの計測領域は $15 \times 15 \text{mm}$ であった。

図 3(a)のキャリブレーションを行わない結果では複屈折位相差、主軸方位でノイズが多く見られるほか、断面において位相差からむらが多く生じていることがわかる。(b)の複屈折をスカラー量として減算した結果では試料と装置の主軸方位が考慮されず、複屈折位相差の計測も誤差を多く含み、かえって精度を悪化させる結果となった。(c)の位相の減算によるキャリブレーションを行った結果は(a)、(b)の結果に比べて面内の複屈折位相差の分布にむらがなく、定量性の面でも精度よい計測が可能となった。また、ベクトルによる減算を行っているため試料の主軸方位のみを検出することができた。さらに、図 3 (a),(b),(c)における複屈折位相差の二次元分布内のむらを定量的に考察するために、複屈折位相差の結果を図 4 (a),(b),(c)にヒストグラムで表わす。試料の複屈折位相差 5.8° を図中に点線で示す。図 4(a)に示すキャリブ

レーションを行わなかった複屈折位相差のヒストグラムでは、画素数のピーク位置が試料の複屈折位相差から 1° ずれており、ばらつきが大きい。また、複屈折をスカラー量として減算した(b)では、ピーク位置が 3° ずれており定量性に欠ける。これらに対して、位相の減算によるキャリブレーションを行った(c)では試料の複屈折位相差と画素数のピーク位置とよく一致した。このことから位相減算によるキャリブレーションを行った場合、面内で一様に定量的な計測が可能となることが示せた。

3.2 顕微鏡型複屈折計測装置の精度検定

実際に図 1 に示す顕微鏡型複屈折計測装置によってベレックの補償器を試料として用い、精度検定を行った。ベレックの補償器は平板状の方解石を光軸垂直方向に回転させ光路長の変化によって任意の位相差を得る。

Fig.2 Experimental setup

Fig. 3 (a) Result without correction, (b) Correction of subtraction in quantity, (c) Correction of subtraction in vector

Fig. 4 Histogram of phase difference (a) Result without correction, (b) Correction of subtraction in quantity, (c) Correction of subtraction in vector

結果を図 5 に示す。横軸にベレックの補償器によって複屈折を与えた設定値、縦軸に計測結果を示す。このときの複屈折位相差の残差誤差は $\pm 0.2^\circ$ となり主軸方位では $\pm 2^\circ$ となり高精度な計測が可能となった。

Fig.5 Measured birefringence phase difference and orientation

4. 複屈折分布計測の応用例

4.1 ディスク断面の複屈折計測

光ディスクは射出成形によって作られる。このとき金型内をプラスチックが流れることによりプラスチックの配向と冷却の残留応力により複屈折が発生する。この複屈折分布を調べることは成形プロセスにとって重要である。そこで、図 1 の顕微鏡型複屈折計測装置において図 6 のようにディスクをマイクロームで厚さ $550\mu\text{m}$ の短冊状に切り出し、断面の計測を 4 ステップ位相シフト法を用いて行った。対物レンズは 10 倍のものを使用し、計測領域は $1\times 1\text{mm}$ とする。複屈折位相差の二次元分布とその A-A'断面を図 7(a), (b)に示し、主軸方位を(c)に示す。(a),(b)の結果よりディスク表面では複屈折位相差が大きく、それより内側では複屈折位相差が小さくなり、厚さ方向の中央部に向かうとまた複屈折位相差が大きくなることからわかる。主軸方位は複屈折位相差のような分布はなく、厚さ方向に対して一定の向きをもつことが見て取れる。刃物で切断した場合も同様の結果が得られていることから切断による残留応力の影響は少ないと考える。このようにサンプルの複屈折位相差が大きい場合、装置のもつ複屈折は結果に大きな影響を与えないと考えられる。しかし、次に示すような複屈折の小さな試料の計測に応用した場合、装置の持つ複屈折を無視できなくなる。

Fig.6 Measurement domain of slice of optical disk

Fig.7 Result of Measured for optical disk

4.2 生体試料の複屈折計測

顕微鏡下において微小な複屈折の計測が望まれている応用例として、生体細胞の観察がある⁵⁾。しかし、装置内の対物レンズで $2\sim 3^\circ$ ⁴⁾、ミラーでの反射で約 10° の複屈折位相差が生じることから、生体試料の微小な複屈折が埋もれてしまうという問題が生じる。これを防ぐためにキャリブレーションを行い、得られた複屈折分布から通常の顕微鏡では観察できない内部構造や分子配向を視覚化する。

本実験ではタマネギの表皮細胞を試料に用い、複屈折計測を行った。原画像を図 8(a)に示し、複屈折位相差と主軸方位の解析結果を図 8(b), (c)に示す。

Fig.8 Two-dimensional birefringence distribution of onion cells

原画像では個々の細胞を区切っている細胞壁が線のように観察できるのみであるのに対して、複屈折計測を行うと細胞壁が他の部分にくらべ複屈折位相差が大きく、その主軸方位は繊維方向と一致する場合、細胞壁と直交する向きであることが分かった。このことは細胞壁におけるセルロースが繊維と垂直に配向されるといわれていることと一致する⁶⁾。また、図中の点線内に示すように細胞中央に小さな透明体が確認できるが、原画像だけではどのような形状をしているか分からない。しかし、複屈折計測から楕円状のものが重なっていることが分かった。

以上より、微小な複屈折位相差を顕微鏡上で検出することにより、一般の顕微鏡像からでは得られない透明体の構造や内部情報を得ることができた。

5. ま と め

顕微鏡型複屈折計測システムを提案した。ここでは装置そのものをもつ複屈折分布を補償するために、装置の複屈折と試料の複屈折とをベクトル減算して補償した。実際には、位相の減算による

キャリブレーションを行うことによって対物レンズやミラーでの反射によって生じる偏光状態の変化の影響を受けることなく試料の複屈折のみによる位相変化を検出することができた。その結果、複屈折の要因を多く含む顕微鏡型計測装置においても試料の複屈折位相差を高精度に計測することが可能となった。応用例として微小な複屈折を持つ生体試料の計測を行ったところ、装置の複屈折に埋もれることなく位相差と主軸方位の分布が得られ、原画像からでは確認できない内部情報を取得することができた。

参 考 文 献

- 1) 野口正人, 石川剛: 複屈折空間分布測定法, 光学技術コンタクト, **31**, 5 (1993) 241.
- 2) 持田悦宏: 位相変調法による複屈折測定と応用, 光学技術コンタクト, **27**, (1989) 127.
- 3) Y.Otani and T.Yoshizawa: Polariscopes using the phase shifting technique, SPIEvol2265(1994)54.
- 4) Y.Otani and T.Yoshizawa: The local-sampling phase shifting technique for precise two dimensional birefringence measurement, OptRev.,**1**,1(1994) 103.
- 5) Guang Mei and Rudolf Oldenbourg: Fast imaging polarimetry with precision universal compensator, Proc.SPIE, 2265 (1994) 29.
- 6) 富永佳也, 江口英輔, 江頭威, 藤義博: 細胞の微細構造(1980) 96.