

スキャンレスデュアルコム顕微鏡による共焦点位相イメージング

長谷 栄治^{*,**}・南川 丈夫^{*,**}・水野 孝彦^{*,**}・
山本 裕紹^{**,***}・安井 武史^{*,**}

Confocal Phase Imaging by Use of Scan-Less Dual-Comb Microscopy

Eiji HASE^{*,**}, Takeo MINAMIKAWA^{*,**}, Takahiko MIZUNO^{*,**}, Hirotsugu YAMAMOTO^{**,***} and Takeshi YASUI^{*,**}

We present confocal phase imaging with scan-less dual-comb microscopy, in which the confocal 2D image of a sample was encoded on the spectrum of optical frequency comb (OFC) by the 2D spectral disperser, and then the image-encoded OFC spectrum is acquired by dual-comb spectrometer to decode the 2D image. This approach enables to establish both confocal amplitude and phase imaging under the scan-less condition. We demonstrated a proof-of-principle experiment of the proposed method by confocal phase imaging of a variety of samples.

Key words: confocal microscopy, optical frequency comb, dual-comb spectroscopy

はじめに

共焦点レーザー顕微鏡 (confocal laser microscope; CLM)¹⁻³⁾ は、共焦点効果による高い深さ分解能と迷光除去能力をもち、低侵襲・非接触での三次元イメージングを可能にすることから、非接触表面形状測定を始めとした工業分野や、細胞・組織イメージングといったバイオ分野を中心に幅広く応用されている。例えば、工業応用では測定対象の吸収/散乱/反射分布といった情報を取得し、バイオ応用では細胞などを蛍光標識することで得られる蛍光強度を画像化している。このように、通常の CLM では光強度計測に基づいてイメージコントラストを付与しているため、透明または無蛍光の測定対象を可視化することは困難である。また、共焦点効果による深さ方向の分解能は波長オーダー (サブ μm) 程度に制限されるため、nm オーダーの奥行き段差構造を分解することはできないという問題がある。透明または無蛍光の測定対象に対しては、光強度を利用する代わりに光の位相を用いれば、イメージコントラストを付与できる。例えば、位相差顕微鏡^{4,5)} や定量位相

顕微鏡^{6,7)} では、光の干渉を用いて対象を伝搬中に受けた位相変化を計測することによって、屈折率/光学的厚さ/幾何学的構造に基づいて画像化する。しかし、位相の折り返しにより、深さ方向のダイナミックレンジが波長オーダーに制限される。もし CLM に位相コントラストを導入できれば、共焦点性を付与しながら、無染色での細胞の可視化や、数十 nm オーダーの表面構造をもつ反射物体の計測に適用可能となり、応用研究が加速すると考えられる。

CLM の共焦点光学系は、光源ピンホール、サンプル焦点および検出ピンホールを共役とするため、点計測に基づいている。そのため、イメージ取得には焦点スポットを二次元的に機械的走査する必要がある。しかし、これらの機械的な走査機構は高速計測の障害になるだけでなく、振動などの環境外乱に対する脆弱性に繋がる。このような現状から、機械的走査機構を不要とすることで、高速かつ外乱にロバストな CLM が望まれている。そこで、CLM における機械的走査を省略する有力な手法として、空間/波長変換 (スペクトルエンコーディング) がある⁸⁻¹⁰⁾。これは、

*徳島大学ポスト LED フォトニクス研究所 (〒770-8506 徳島県徳島市南常三島町 2-1) E-mail: hase@tokushima-u.ac.jp

**JST, ERATO 美濃島知的光センサイザプロジェクト

***宇都宮大学オプティクス教育センター (〒321-0904 栃木県宇都宮市陽東 7-1-2)

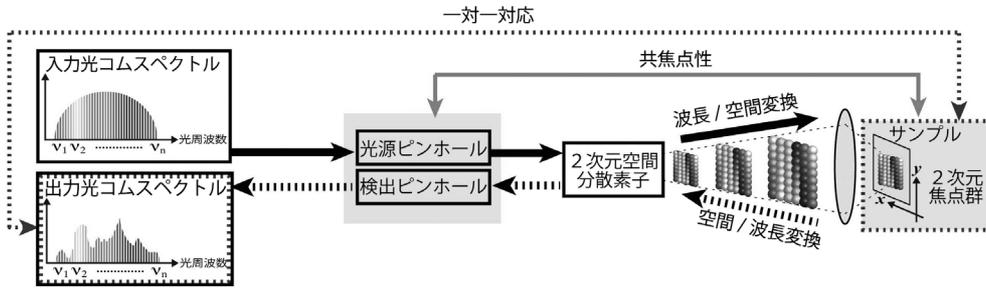


図1 スキャンレスデュアルコム顕微鏡の概念図.

空間情報を広帯域スペクトルに重畳し、スペクトル波形から空間情報を抽出する技術である。われわれは、空間/波長変換を行う広帯域スペクトル光として、光コムに着目した。光コムは、多数の安定な光周波数モード列が繰り返し周波数 (f_{rep}) 間隔で規則的に櫛 (コム) の歯状に並んだ超離散マルチスペクトル構造を有する。さらに、 f_{rep} とキャリアエンベロープオフセット周波数 f_{ceo} をレーザー制御でマイクロ波周波数標準に位相同期すれば、光コムを構成する光周波数モード列 (絶対周波数 $\nu_n = f_{\text{ceo}} + n f_{\text{rep}}$) を、周波数標準にトレーサブルな「光周波数の物差し」として、光周波数標準や光周波数計測の分野で利用可能である。これまでに、デュアルコム分光法¹¹⁾ で取得されたモード分解光コムスペクトルにおける「周波数精緻性」や「きわめて広い周波数ダイナミックレンジ」を利用したガス分光¹²⁾ や距離計測¹³⁾ が報告された。

ここで、光コムを「光周波数の物差し」としてではなく、「圧倒的多数の離散チャンネルを有する光キャリアー」として利用すれば、新しい応用展開が拓ける。すなわち、波長/空間変換によってイメージ画素情報を光コムにスペクトル重畳させた後にモード分解光コムスペクトルから読み出せば、イメージ画素とコムモードを一対一対応させることが可能になり、スキャンレスなイメージ取得が可能になる。この際、イメージ情報がスペクトル重畳された光コムを共焦点ピンホールに通すことにより共焦点性も付与でき、フルフィールドイメージングと共焦点イメージングを両立できる。さらに、フーリエ変換分光に基づくデュアルコム分光法では、振幅スペクトルに加えて位相スペクトルの取得も可能である。したがって、得られた振幅・位相の両スペクトルから振幅・位相の両イメージを再構成することが可能となり、CLMにおいて位相に基づく新たなイメージコントラストを導入できる。本稿では、われわれが開発したスキャンレスデュアルコム顕微鏡による共焦点位相イメージング^{14,15)} について紹介する。

1. 原理

スキャンレスデュアルコム顕微鏡の概念図を図1に示す。入力される光コムは光源側ピンホールを通過した後、二次元空間分散素子によって、個々のコムモードが異なる角度で空間分散され、光学フーリエ面上で二次元のレインボースペクトログラフが形成される。これを対物レンズで集光することにより、サンプル上にコムモードの二次元焦点群が照射される。その結果、イメージ画素がコムモードにスペクトル重畳される。サンプルから反射された個々のコムモードは同一光路を逆伝搬することにより、再び空間的に重畳される。その後、検出器側ピンホールを通過させることにより共焦点性を付与し、デュアルコム分光法によって振幅および位相スペクトルを取得する。図2に、本手法によって取得可能な共焦点振幅および位相イメージの概念図を示す。波長/空間変換によって二次元の焦点群が形成されるが、それぞれのスポットは共焦点性によって Δz の共焦点ボリューム内のみの情報をもつ。このような光をデュアルコム分光法によって計測すれば、モード分解振幅および位相スペクトルが計測できる。それぞれのコムモードは波長/空間変換に基づいてイメージ画素と一対一対応しているため、最終的にはスペクトルから共焦点振幅および位相イメージが取得可能となる。

二次元の波長/空間変換素子として、直交配置した VIPA (virtually imaged phased array) と回折格子を用いる^{8-10,16)}。VIPA とは、光の入射面側に反射率 100%、出力面に反射率 96% 以上の反射コーティングがされた傾斜型ファブリー・ペローエタロン板である。シリンドリカルレンズによって線集光された光は AR コーティング (反射率 0%) の入射窓から VIPA に入射し、出力面で大部分が反射される。反射光は拡散しながら再び入射面側で反射し、その後一部の光を放出しながら多重反射を繰り返す。これにより、点光源が後方に一定の間隔で仮想的に配置され、傾斜角の大きい回折格子のように振る舞う。この際、VIPA からの透過スペクトルは図3 (a) に示すように $\Delta \nu_{\text{FSR}}$ 間隔の

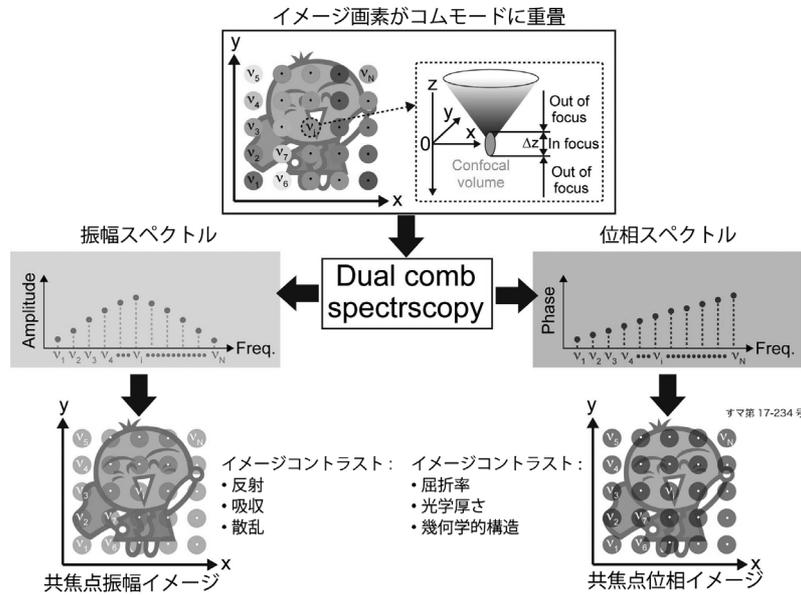


図2 共焦点振幅および共焦点位相イメージ。

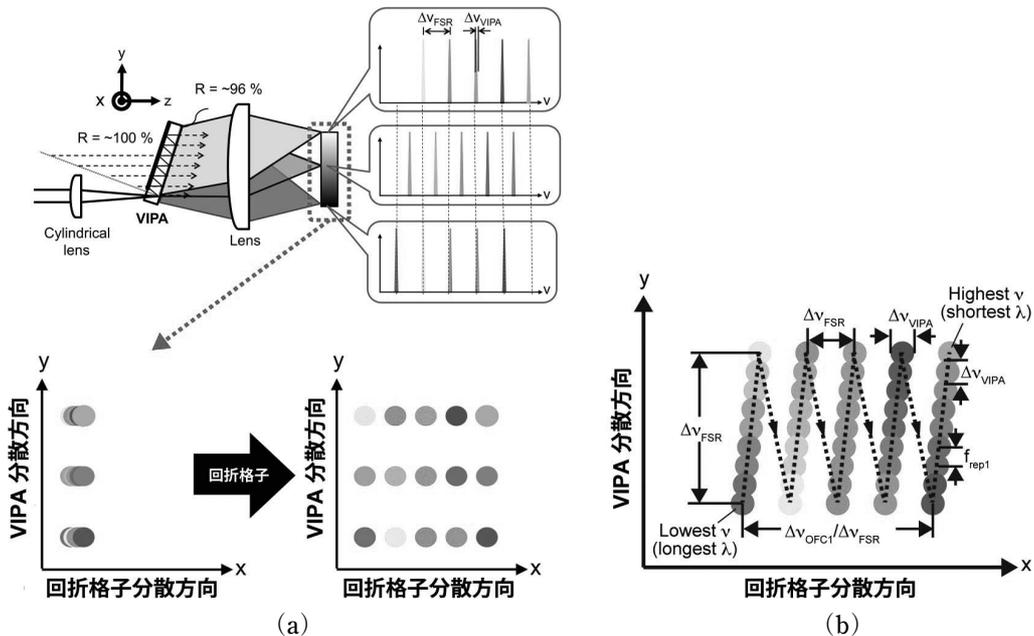


図3 (a) 二次元の波長 / 空間変換素子, (b) 波長 (周波数) と空間の対応関係。

共鳴透過ピークを示す. y 方向においてはこれらの多重透過ピーク周波数 (波長) がシフトしているのに対して, x 方向ではそれぞれの透過ピークは同一位置で空間的に重なっているため, これを直交に配置した回折格子に入射させ, 透過ピーク波長を分離することにより, コムモードを二次元空間に展開させることが可能となる.

2. 実験装置

図4に実験装置の概略図を示す. 光源には, 狭線幅のCWレーザーを介することによって高精度に相対ロック

制御された2台のErファイバコム (シグナルコムおよびローカルコム, $\lambda_c \approx 1550 \text{ nm}$, $f_{\text{rep}} \approx 100 \text{ MHz}$, $\Delta f_{\text{rep}} = 1234 \text{ Hz}$) を用いている¹⁷⁾. 顕微鏡照明用光源として用いられるシグナルコムから出射した光は, バンドパスフィルターによって帯域制限 ($\Delta\lambda \approx 24 \text{ nm}$) がかけられた後, ピンホールを通過することによって点光源化される. ビームスプリッターを通過した成分は, シリンドリカルレンズによって線集光され, VIPA (共振周波数間隔 (FSR): 15 GHz, フィネス: 110) と回折格子 (1200 lp/mm) からなる二次元波長 / 空間変換素子に入射する. これにより,

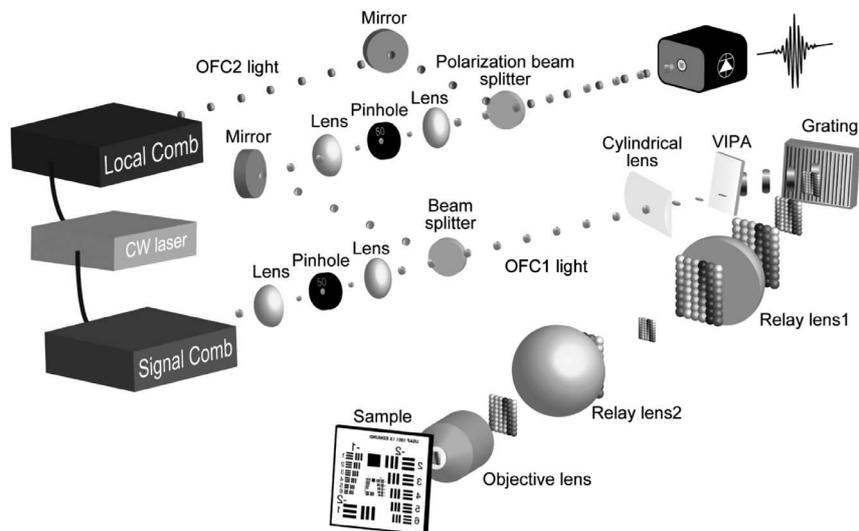


図4 実験装置の概略図。

個々のコムモードが異なる角度で二次元空間分散されたレインボービームが生成され、リレーレンズと対物レンズ (NA 0.25) を経て、二次元の焦点スポット群としてサンプル上に照射される。この際に、反射/吸収/散乱または位相変化といったサンプルの光学特性空間分布は、スペクトル変調されてシグナルコムにエンコードされる。サンプルから戻ってきた光は、逆方向から同一の二次元波長/空間変換素子を通することにより、空間的に分散したそれぞれのコムモードは再び重ね合わせられる。ビームスプリッターによって反射した成分は、共焦点性付与のためのピンホールを通過した後、デュアルコム分光のためのローカルコムと空間的に重ね合わせられ、発生したインターフェログラムをフォトディテクターと高速デジタイザー (サンプリング周波数: f_{rep}) によって計測する。このインターフェログラムをフーリエ変換することによって得られた振幅・位相スペクトルとイメージ画素の一対一対応関係を用いて、共焦点振幅および位相イメージを取得する。実際にスペクトルからイメージを再構成する前には、あらかじめ取得しておいた参照スペクトル (ミラーをサンプルに利用) を用いて正規化処理を行う。振幅スペクトルでは振幅比を算出し、位相スペクトルでは位相差を取ることで、シグナルコムがもつ元々のスペクトル形状および初期位相の影響を相殺している。したがって、本実験で得られる位相イメージは、厳密には位相差イメージである。

3. 実験結果

はじめに、テストチャートを測定対象に用いて本手法の原理確認実験を行った。図5 (a) に示すように、ガラス基板の上にテストパターンをもった反射クロムコート (厚さ

約 100 nm) がなされているポジティブタイプのテストチャートを用いており、これらの構造によって反射率 (振幅) および位相に変化が現れるものと予想される。図5 (b) および (c) に構造がないミラー部分において、図5 (d) および (e) にはチャート構造が存在する部分において取得した振幅および位相スペクトルを示す。インターフェログラムの総取得時間は 81 ms (取得レート Δf_{rep} : 1234 Hz, 積算回数 100 回) である。スペクトル帯域は 192.8 THz から 194.3 THz までの 1.5 THz であり、 f_{rep} は 100 MHz であることから、15000 本のコムモードから構成されている。ここで、図5 (b) の構造がない部分での振幅スペクトルにおける微細構造は、VIPA の透過ピーク周波数を表している。図5 (b) の振幅スペクトルとの比較から明らかのように、図5 (d) のチャート構造がある部分の振幅スペクトルでは、構造を反映してスペクトルに変調がかかっていることが確認できる。一方で、位相スペクトルでは図5 (c), (e) どちらにおいても $\pm\pi$ の範囲の値を取ることがわかる。次に、前述の正規化処理を行った後の振幅および位相スペクトルを図5 (f), (g) に示す。正規化処理により、図5 (f) の振幅スペクトルでは、振幅 (反射率) の高い部分と低い部分に分かれていることがわかる。また、位相スペクトルでは、0 rad 付近を中心として何らかの構造を反映したスペクトルとなっていることがわかる。このようにスペクトルに構造がエンコードされていることが確認できたので、次に SN 比が良好な 12382 本のコムモードを抽出した後、波長空間変換に基づいてイメージの再構成を行った結果を図6 (a), (b) に示す。画像のピクセル数は、コムモード本数と同一であり、 82×151 ピクセル ($220 \mu\text{m} \times 1013 \mu\text{m}$) で構成されている。図6 (a),

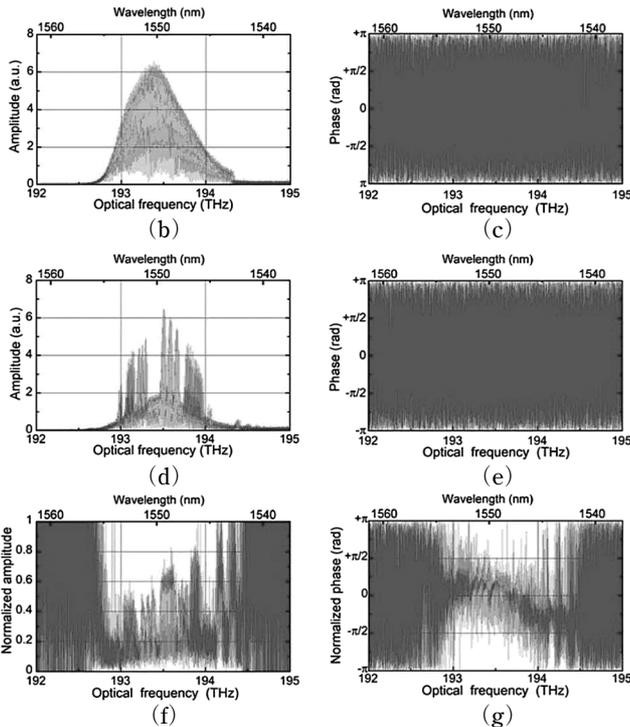
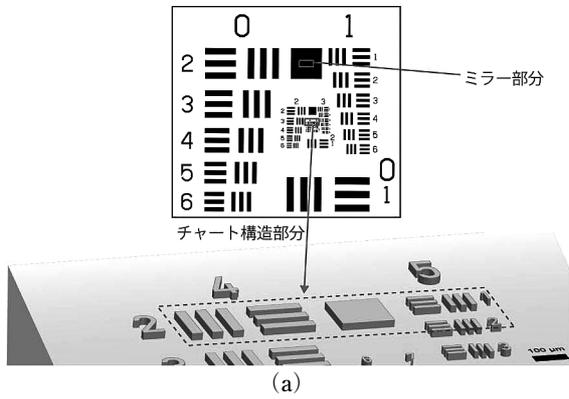


図5 (a) テストチャートの概略図, (b), (c) テストチャートのミラー部分で取得した振幅, 位相スペクトル, (d), (e) テストチャートの構造部分で取得した振幅, 位相スペクトル, (f), (g) 正規化処理した振幅および位相スペクトル。

(b) から, 共焦点振幅・位相イメージのどちらにおいても, テストチャートの構造を明確に反映した結果が得られていることを確認できた。これらの画像の空間分解能は回折限界によって制限されており, 面内, 深さ方向のどちらにおいても実測値と理論値はよく一致していた。一方, 位

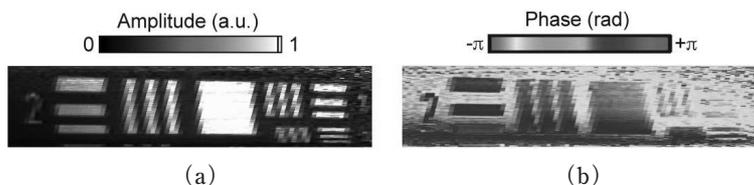


図6 テストチャートの顕微イメージ, (a) 共焦点振幅イメージ, (b) 共焦点位相イメージ。

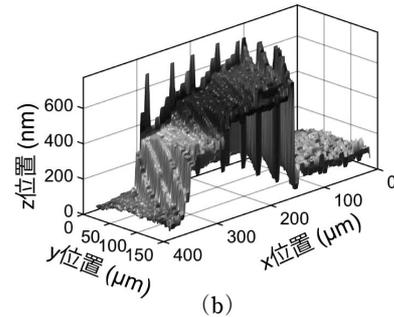
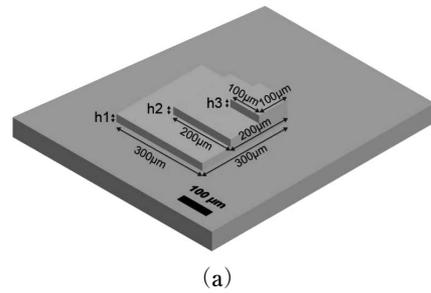


図7 (a) 段差構造サンプルの概略図, (b) 共焦点位相イメージからの三次元構成図。

相の分解能については, 光学系全体の振動・空気ゆらぎなどの外乱に対する堅牢性, シグナルコムとローカルコム間におけるタイミングジッター, インターフェログラムのSN比などに依存する位相ノイズにより決定される。この値を評価するため, 100回の共焦点位相イメージを計測し, 同一ピクセルにおける位相値の標準偏差を位相分解能とした。この計測から, 位相分解能は $0.028 \text{ rad} (= \lambda/224)$ と算出された。ここで, 共焦点位相イメージングを表面形状測定に応用する際, 測定対象の高さ分布 $H(x,y)$ は計測した位相分布 $\phi(x,y)$ を用いて以下の式で表すことができる。

$$H(x,y) = \frac{1}{2} \frac{\phi(x,y)}{2\pi} \lambda = \frac{\lambda}{4\pi} \phi(x,y) \quad (1)$$

上式と位相分解能および光コムの中心波長 (1550 nm) を代入することによって, 位相による高さ測定分解能は 3.5 nm と算出できる。この計算から, 本手法では通常のCLMにおける深さ分解能と比較して2~3桁程度よい値が得られているということがわかる。

上記のような共焦点位相イメージングにおける高い深さ

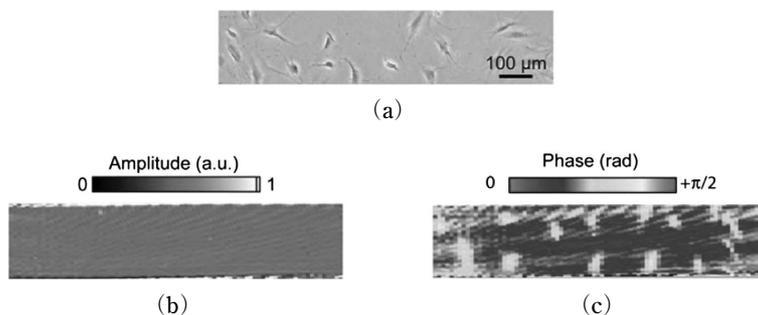


図8 (a) 線維芽細胞 (NIH3T3 細胞) の位相差顕微鏡イメージ, (b) 共焦点振幅イメージ, (c) 共焦点位相イメージ.

分解能の効果を確認するため, 図7 (a) に示すような3段の nm オーダー形状をもった対象の表面形状測定を行った. 図7 (b) は共焦点位相イメージの位相値と式 (1) を用いて得られた段差サンプルの高さ分布を三次元表示したものである. イメージから, 3つの段差が測定できていることが確認でき, それぞれの段差は $h_1 = 317 \pm 12$ nm, $h_2 = 122 \pm 13$ nm, $h_3 = 51 \pm 18$ nm と求められた. これらの段差は, AFM (atomic force microscope) を用いて事前に測定しておいた値とよく一致しており, 共焦点位相イメージングの妥当性が確認できた.

最後に, 位相の利用による透明物体の可視化のデモンストレーションとして, 線維芽細胞 (NIH3T3) の計測を行った. はじめに, 細胞接着タンパクでコートしたスライドガラス上に細胞を播種し, 位相差顕微鏡で観察した際の結果を図8 (a) に示す. イメージから, 視野内において細胞が点在している様子が確認できる. 共焦点イメージングの際には, 実験装置に記載のように反射配置の光学系を利用するため, 金コートしたスライドガラス上に同様の密度で細胞を播種して計測を行った. まず, 図8 (b) の共焦点振幅イメージでは, イメージコントラストは光振幅に基づくことから, 光強度で画像化する従来 CLM と同様, 視野内において何も構造が確認できておらず, 細胞のような透明物体の測定は困難であることがわかる. 一方, 図8 (c) の共焦点位相イメージでは, 細胞が存在する位置における屈折率変化によって, イメージにコントラストが付与されている. 共焦点位相イメージで可視化された構造は, 図8 (a) の位相差顕微鏡を用いた場合のイメージと類似していることから, 細胞の輪郭が可視化できていると考えられ, 本手法によって共焦点性を付与しながら透明物体の計測が可能であることが証明できた.

ま と め

本稿では, スキャンレスデュアルコム顕微鏡による共焦

点位相イメージングについて紹介した. 本手法により, CLM に光の位相に基づく新たなイメージコントラストを付与することが可能となった上, レーザービーム走査を必要とせずスキャンレスに共焦点振幅・位相イメージを取得できた. 現在われわれのシステムにおけるイメージの取得レートは, 用いる光コムの繰り返し周波数やイメージの SN 比によって数百 Hz 程度に制限されており, スキャンレス特性を完全に生かしきれていない状況である. 一方, 最近になって他グループにより, 微小光共振器¹⁸⁾あるいは電気光学変調器¹⁹⁾を用いた高繰り返し周波数の光コムを利用したスキャンレスデュアルコムイメージング手法が報告され, 数百 kHz~数 MHz のフレームレートでのイメージ計測が可能となっており, 本手法の今後の応用拡大が期待される.

また, われわれのグループでは, 蛍光強度・蛍光寿命の取得が可能でスキャンレスデュアルコム蛍光顕微鏡²⁰⁾, レーザースキャンを行うかわりに分光情報の取得が可能なレーザー走査型デュアルコム顕微鏡²¹⁾や, シングルピクセルイメージングを用いたスキャンレスデュアルコム分光イメージング法²²⁾などさまざまなデュアルコム分光法のイメージング応用を行っており, 関連の参考文献などもあわせて参照願いたい.

本研究は, JST, ERATO 美濃島知的シンセサイザ (IOS) プロジェクト (JPMJER1304), 日本学術振興会・科研費・基盤研究 (A) 19H00871, 中谷医工計測技術振興財団・平成 29 年度技術開発研究助成【特別研究】によって助成された.

文 献

- 1) P. Davidovits and M. D. Egger: *Nature*, **244** (1973) 366-367.
- 2) G. J. Brakenhoff, P. Blom and P. Barends: *J. Microsc.*, **117** (1979) 219-232.
- 3) C. J. Sheppard and D. M. Shotton: *Confocal Laser Scanning Microscopy* (BIOS Scientific, Oxford, 1997).

- 4) F. Zernike: *Physica*, **9** (1942) 686–698.
- 5) D. B. Murphy: *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging* (Wiley, Hoboken, 2002).
- 6) H. Iwai, C. Fang-Yen, G. Popescu, A. Wax, K. Badizadegan, R. R. Dasari and M. S. Feld: *Opt. Lett.*, **29** (2004) 2399–2401.
- 7) C. J. Mann, L. Yu, C. M. Lo and M. K. Kim: *Opt. Express*, **13** (2005) 8693–8698.
- 8) G. J. Tearney, M. Shishkov and B. E. Bouma: *Opt. Lett.*, **27** (2002) 412–414.
- 9) K. Goda, K. K. Tsia and B. Jalali: *Nature*, **458** (2009) 1145–1149.
- 10) S. A. Diddams, L. Hollberg and V. Mbele: *Nature*, **445** (2007) 627–630.
- 11) I. Coddington, N. Newbury and W. Swann: *Optica*, **3** (2016) 414–426.
- 12) E. Baumann, F. R. Giorgetta, W. C. Swann, A. M. Zolot, I. Coddington and N. R. Newbury: *Phys. Rev. A*, **84** (2011) 062513.
- 13) I. Coddington, W. Swann, L. Nenadovic and N. Newbury: *Nat. Photonics*, **3** (2009) 351–356.
- 14) E. Hase, T. Minamikawa, S. Miyamoto, R. Ichikawa, Y.-D. Hsieh, Y. Mizutani, T. Iwata, H. Yamamoto and T. Yasui: *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, **25** (2019) 6801408.
- 15) E. Hase, T. Minamikawa, T. Mizuno, S. Miyamoto, R. Ichikawa, Y.-D. Hsieh, K. Shibuya, K. Sato, Y. Nakajima, A. Asahara, K. Minoshima, Y. Mizutani, T. Iwata, H. Yamamoto and T. Yasui: *Optica*, **5** (2018) 634–643.
- 16) M. Shirasaki: *Opt. Lett.*, **21** (1996) 366–368.
- 17) Y. Nakajima, H. Inaba, K. Hosaka, K. Minoshima, A. Onae, M. Yasuda, T. Kohno, S. Kawato, T. Kobayashi, T. Katsuyama and F.-L. Hong: *Opt. Express*, **18** (2010) 1667–1676.
- 18) C. Bao, M.-G. Suh and K. Vahala: arXiv:1809.09766 (2018).
- 19) P. Feng, J. Kang, S. Tan, Y.-X. Ren, C. Zhang and K. K. Y. Wong: *Opt. Lett.*, **44** (2019) 2919–2922.
- 20) 水野孝彦, 長谷栄治, 南川丈夫, 山本裕紹, 安井武史: “デュアル光コムビートの2次元周波数多重化ビームを用いた蛍光イメージング法の開発”, 日本光学会年次学術講演会 Optics & Photonics Japan 予稿集, 2aA5T (東京, 2018).
- 21) T. Minamikawa, E. Hase, S. Miyamoto, H. Yamamoto and T. Yasui: “Development of confocal laser scanning microscopy by use of optical frequency comb,” *Technical Digest of the Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO)*, paper SF2C.3 (San Jose, 2017).
- 22) K. Shibuya, T. Minamikawa, Y. Mizutani, H. Yamamoto, K. Minoshima, T. Yasui and T. Iwata: *Opt. Express*, **25** (2017) 21947–21957.

(2019年7月19日受理)