

レーザー光の顕微鏡への応用

永井 昌平・朝倉 利光

レーザーを光学へ応用する新しい試みとして、レーザーを光源とした顕微鏡を試作するための予備実験を行なった。レーザービームの性質、いろいろな光学系による顕微鏡の実験およびレーザー顕微鏡の設計の考察などについて報告する。

1. はじめに

レーザーの開発以来、その応用については多くの人々が研究している。その中でも光学機械への応用は有望なものがあり、その方向への予備実験がなされている。顕微鏡の光源としても取り上げられ、すでに Lang¹⁾ や Peppers²⁾ により実験成果が報告された。これらの研究では、既成の顕微鏡の光源として連続発振のガスレーザーやパルス状発振のルビーレーザーを用いた場合、試料上の光のエネルギー密度や試料自体に与える効果および観察される像などについて、今までの一般の光源を用いた場合との比較がなされた。したがってレーザーを光源とした新しい光学系からなる顕微鏡による実験ではなく、単に今までの顕微鏡の光源として用いたに過ぎない。

ここではレーザーを光学へ応用する新しい試みとして、レーザーを光源とした新しい光学系による顕微鏡を試作するための予備実験を行なった³⁾。レーザー光は可干渉距離が非常に長く、かつ共振器の両端からの光が可干渉である。このため干渉顕微鏡に関し、かなりの簡易化が可能となる。すなわち可干渉距離が長いということは、参照波面に関してまったく任意の光路を通ることが許される。従来は参照光々路と照明光々路の光路差は零でなければならず、そのため両光路中の光学系もまったく同じものを使う必要があった。ところがレーザーを光源に使用すれば、光路長が異なっても容易に干渉縞が観察され、この干渉縞の間隔も参照光々路中の一部光学系を移動することにより調整でき、光路差零の近辺に調整する必要もなく、調整はきわめて容易である。

さらに従来のもものでは半透明鏡を光が通ることが多く、光量が減少して非常に暗かったが、レーザーを光源とした場合には光源自体が強力なものであり試料のいかに問わず、かなりの明るい視野が得られる。その上共振器の両端からのレーザービームが利用できるので、光量に関しては今までの光源の場合に比較して十二分のものが得られる。

このようなレーザー光の特色を生かせば、従来の顕微鏡とりわけ干渉顕微鏡を簡易化できる。ここではレーザービームの性質と、それをを用いての干渉顕微鏡の光学系

の考察とその実験結果を報告する。

2. レーザービームの光学

光源としてガス・レーザーを用い、この発光体は He と Ne の混合気体で、高周波の無極放電方式で励起している。一般にレーザー発振は多モードになっているが、試料を一樣に照明するためには単一モードで発振した光を使うことが望ましい。そのためにはレーザー発振器内に挿入したピンホールを十分小さくして単一モードで発振させ、それを光源として集光レンズ（顕微鏡対物レンズなどを用いる）を通してその焦点面に試料を置いてそれを照射する。ここで注意すべきことは、レーザービームを使った場合に焦点面上にできるスポットの形態である。集光レンズの開口が一樣に照明された場合には、その f ナンバーにより決定される直径 $d = 2.44 \lambda f$ ($f = F/D$ で、 F は集光レンズの焦点距離、 D は射出端面での開口の直径) の Airy disc が焦点面上にできる。しかし一般に単一モードにより開口を照射した場合には、モードの径が開口のそれより小さいために一樣に照明することなく、上記のような Airy disc は生ぜず、焦点面上にできるスポットは次のようにして求めなければならない。すなわち単一モード (TEM₀₀) の強度分布を調べるとガウス分布をしていることがわかり、その振幅分布を $a(r) = a_0 e^{-\frac{r^2}{d_1^2}}$ でおくことができ、 d_1 は常数であるがここでは中心の振幅分布が $1/e$ に低下した r の位置を示す。このようなガウス関数で表わされる振幅分布の光束が集光レンズに入り、その開口がこの光束より大きい場合には、焦点面上にできる回折像は再びガウス関数 $b(s) = b_0 e^{-\frac{s^2}{d_2^2}}$ で表わされる振幅分布となる (ガウス分布のフーリエ変換はガウス分布となることから出る)。ここで $d_2 = \frac{2\lambda f}{\pi}$ で、 $f = \frac{F_1}{d_1}$ で F_1 は集光レンズの焦点距離、 d_1 は集光レンズに入るときのレーザー光源の直径であるが、ここではガウス分布であるとしてその中心振幅が $1/e$ とする位置の直径である。これからわかるように焦点面上の回折像は Airy disc とならず、ガウス分布状の回折像となる。以上のことを実験に用いたレーザー光束について計算すると、焦点面上にできるガウス状回折像

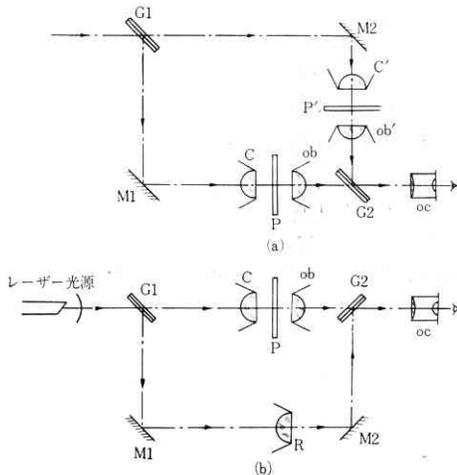
の直径は $d_2 = 6.44 \mu$ ($d_1 = 4\text{mm}$, $F = 32\text{mm}$, $\lambda = 6328 \text{ \AA}$) である。したがって焦点面上にできる回折像の直径は Airy disc の中央回折像のそれより約 2.6 倍大きい。が、実際には高次回折像は生じないため Airy disc より試料を照明する光源としては適している。また、回折像の encircled energy の計算からわかることは、Airy disc の場合の中央回折像に集中する光量は全光量の 84% であるが、ガウス分布の回折像の場合には中央の振幅が $1/e$ になる範囲に入る光量は全光量の 87% となり、回折像における光量の集中度もガウス分布状の回折像の方がよい (このようなことは apodization の研究からなされている)。

このような考察からわかるように、レーザービームを用いる場合には光束を考え入れた光学現象の取扱いを行なわねばならない。多モード発振によるレーザー光を用いる場合でも、光学系の開口より光束の直径が小さいときには上と同じような取扱いが必要である。

3. 透過型干涉顕微鏡

(1) Mach-Zehnder 型

1) 反射鏡による参照光の伝送 第1図は Mach-Zehnder 型干涉計を利用したもので、(a) は従来の干涉



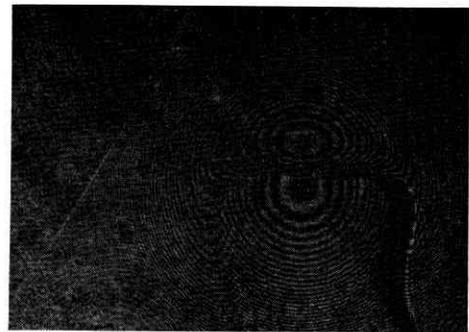
G1, G2: 半透鏡 M1, M2: 反射鏡 C, C': 集光レンズ ob, ob': 対物レンズ oc: 接眼レンズ P: 試料 P': 参照試料 R: 波面補正レンズ

第1図 従来の Mach-Zehnder 型干涉顕微鏡とレーザーを用いた干涉顕微鏡の比較

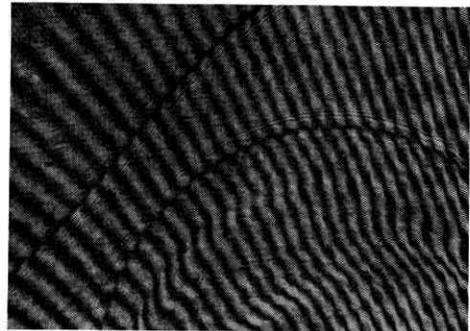
顕微鏡であり、(b)はレーザーを光源に用いた場合の干涉顕微鏡の光路図を示したものである。従来のものでは、参照光々路 G1-M2-G2 と、照明光々路 G1-M1-G2 の光路差を零にするため、コンデンサー C, C' および対物 ob, ob' をまったく同じレンズを用い、かつ試料ガラス P と同じ参照試料 P' を置かねばならない。これに対して (b) のように、レーザー光源を用いたものでは、参照光の光路を考慮する必要がなく、まったく異なった

光路を通ることが許される。ただし参照光々路に波面補正レンズ R を置き、それを適当に移動することにより、参照波面を補正して適当な数の干涉縞を得るようにする。さらに適当な補正板を入れれば、いっそう良い補正を行なうことができる。この場合照明系は、レーザー光の指向性が良いため、ケーラー照明系にすることは意味がなく、したがってコンデンサーレンズは全視野を明るくするような適当な位置にもってくる。

レーザーを光源とした上のような方法で撮った写真が第2図である。試料は液体を薄くのはしたものであり、



(a)

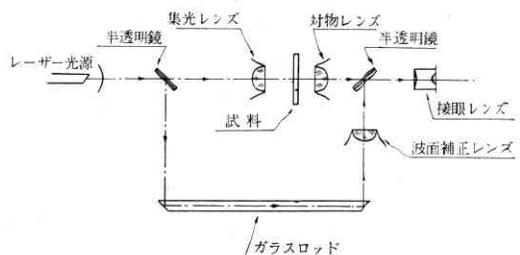


(b)

第2図

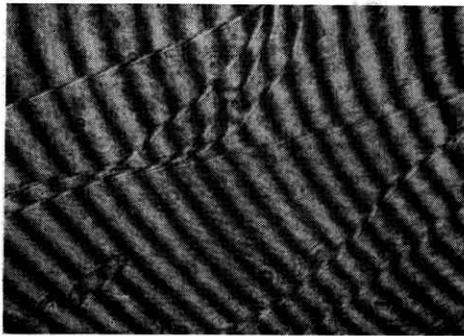
対物レンズは 40 X を使用した。(a) は参照波面が適当でなく干涉縞の数が多すぎたものであり、(b) は波面補正レンズを移動して補正を行ない、縞数を少なくしたものである。

2) マクロな光伝ガラスによる参照光の伝送 この光学系は第3図に示すとおりで、1) の場合と同じであるが参照光をガラスロッドによって伝送したところに特徴



第3図 ガラスロッドを用いたレーザー干涉顕微鏡

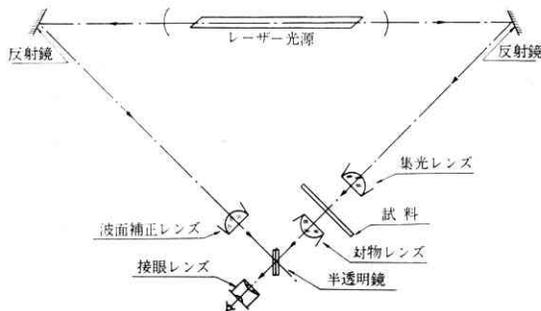
がある。この場合に使用されたガラスロッドは、長さ 300 mm、断面が 15×15 mm の正方形のものである。ここでのロッドは直線状であるが、折曲したガラスロッドを用いても実験を行なっている。このようなマクロなガラスロッドを用いると、参照光の調整が容易になるばかりでなく、外気の影響からも防がれ、得られる干渉縞がきわめて安定し、その上取りはずしも便利であり目的にそったいろいろな方法でロッドの配置ができる。さらに折曲したガラスロッドを用いると、参照光のしめる空間を縮少できる利点もある。第 4 図はこの方法で得られた顕微鏡写真で、試料は雲母板の薄片、対物は 10 X を使用してある。



第 4 図

(2) 両側ビームを利用した干渉顕微鏡

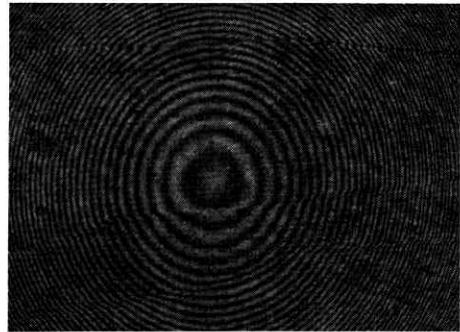
第 5 図はレーザー光源の両端から出た光を利用した透過型干渉顕微鏡の光路図を示すもので、一端を出たレーザービームは照明光々路としてコンデンサー、試料、対物レンズを通り、他端から出たビームは波面補正レンズを通り、像面に適当な参照波面を与える。したがって試料の位相差に応じた等高線状の縞を得ることができる。この場合もコンデンサーレンズは全視野を明るくするような位置におかれる。この方法の利点は両側ビームを用いるため、光量が片側ビームを利用するときの 2 倍とな



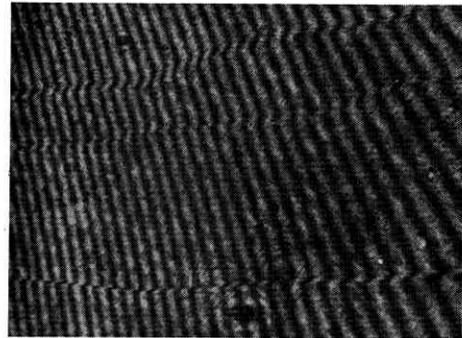
第 5 図 両側ビームを用いた透過型

り非常に明るい観察を行なうことができる。

この方法で得られた写真が第 6 図で、試料は雲母板、対物は 40 X を利用した。(a)は波面補正を行なわなかったもの、(b)はそれを行なって縞数を少なくしたものである。



(a)



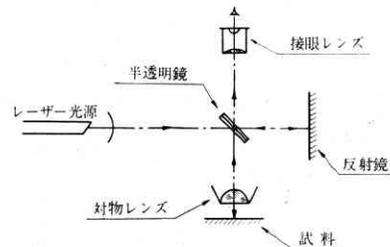
(b)

第 6 図

4. 反射型干渉顕微鏡

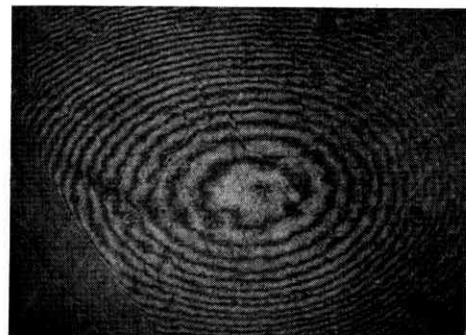
(1) Linnik 型

Linnik 型干渉顕微鏡の簡易化を行なったものが第 7 図である。従来のものでは参照光の通る反射鏡側に試料



第 7 図 片側ビームを用いた反射型

側の対物レンズとまったく等しいものを置かねばならなかったが、レーザー光を用いることによりその必要がな



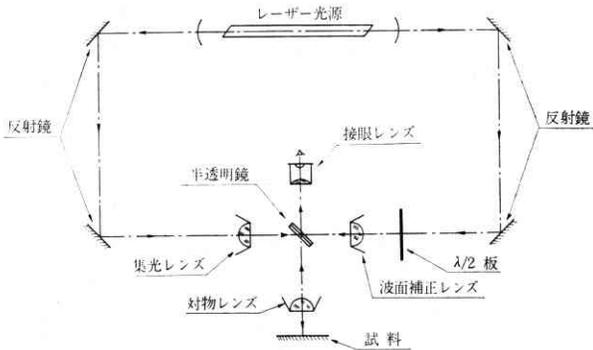
第 8 図

くなった。この反射鏡と球面鏡あるいはレンズ系と反射鏡の組合せを用いると任意の参照波面が得られる。

この方法によって得られた写真が第8図で、試料は蒸着面の汚れ、対物レンズは6Xを使用した。

(2) 両側ビームを利用した干涉顕微鏡

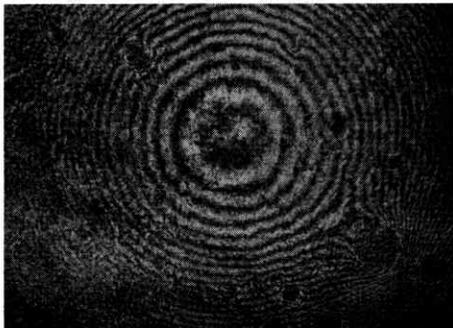
第9図がレーザー光源の両側から出た光を利用した反



第9図 両側ビームを用いた反射型

射型干涉顕微鏡の光路図である。光源の一端から出た光は照明光々路として、コンデンサーレンズと対物レンズを通り試料を照明する。一方他端から出た光は、波面補正レンズを通して適当な参照波面を与える。このさい照明光々路の光は半透明鏡を2回通るのに対し、参照光々路の光は1回であるから、両光路による光の強度が異なり、干涉縞のコントラストが悪くなる。そのため参照光々路に $\lambda/2$ 板を入れ偏光面を 90° 変え、接眼部の偏光板を回転して高コントラストの縞を得るようにしてある。

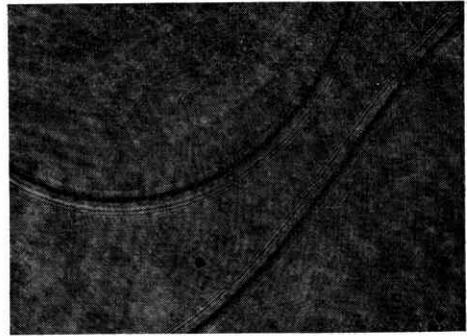
上の方法で撮った写真が第10図である。試料は蒸着面汚れ、対物は6Xを使用してある。



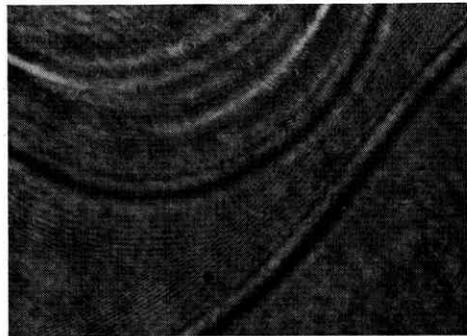
第10図

5. 回折効果

レーザーを光源としたときの特徴は、レーザー光のコヒーレンスが良いため物体の edge による回折現象が顕著に現われることである。すなわち少し焦点ずれを与えると著しい回折現象が現われる。その例が第11図であり、(a)は焦点面、(b)は焦点ずれを与えたときである。したがって透明物体などを検鏡した場合、その物体を見つけたことは容易であり、かつ回折現象を見て焦点を合わせることも比較的簡単である。しかし厚さのある複雑



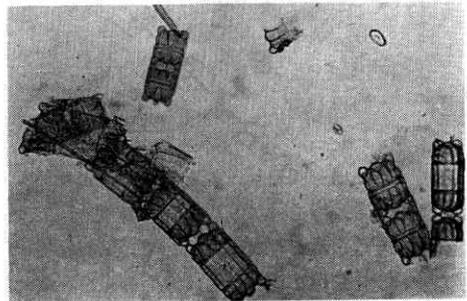
(a)



(b)

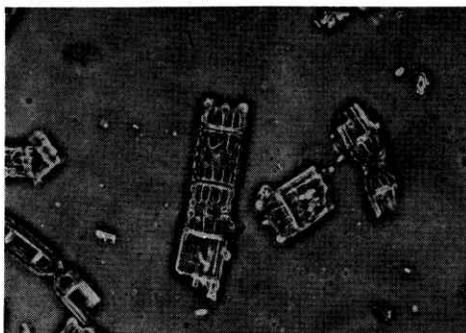
第11図

な物体に対しては、焦点面にある部分は明瞭に現われるが、それからずれた部分では回折現象が著しくなり、全体として不明瞭になることがある。したがってできるだけ厚さのない試料を作って観察すればよい。しかし一般の生物学の試料に対しては、この回折効果が大きく悪影響することはない。その例が第12図であり、(a)は白色光源、(b)は位相差法、(c)はレーザー光によるものである。この3者を比較すると、全体としていちばん良く出ているのがレーザー光を用いた場合である。(b)の位相差法の写真では部分的にはかなり明瞭な所があるが、周辺で明るく不明瞭になっている。これに比較してレーザー光源の場合には、細部も周辺も一様に明瞭に出ている。ただし焦点がずれた試料に対しては、回折効果が強く出て部分的に不明瞭になっている。このようにレーザー光を用いた顕微鏡は、位相差顕微鏡より物体全体



(a)

第12図



(b)



(c)

第 12 図

の細部を明瞭にする働きがある。

6. 考 察

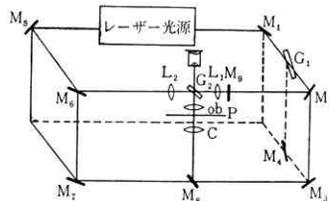
以上のことから、レーザー光をそのまま顕微鏡光源とした場合、かなり複雑な生物試料にも適し、かつ位相物体の厚さや屈折率の測定にも適していることがわかる。また干渉距離が長いということは、参照光々路がどのような光路を通ってもかまわないという利点があり、従来の干渉顕微鏡を簡易化し、かつ調整が容易となっている。またここで用いたレーザー光のモードの影響は、視野を一樣な明るさにするか否かに関係する以外は、顕微鏡写真の像そのものにはほとんど悪影響がない。したがって多モード発振で十分な光量を用いることができる。

また実験結果から、レーザー光が単一波長であるために 0 次の縞を見つけることが困難であること、および回折の影響で視野が汚れる（これがスリガラスの回転などにより解決できる）などの欠点があることがわかった。しかしこれらの欠点は利点に比べて小さいものである。この利点を生かせば、ここで行なった実験に用いた光学系および機能をすべて備えた干渉顕微鏡を 1 台にまとめることが可能である。その一つの提案として第 13 図のような光学系が考えられる。このような光学系を用いると、今までの実験のすべての機能を含むことになる。すなわち、

(1) Mach-Zehnder 型

照明光々路: $M_1G_1M_4M_3M_8G_2$

参照光々路: $M_1G_1M_2G_2$ (M_9 ははねのけてある)



- $M_1 \sim 9$: 反射鏡
- $M_{2,3,5}$: 微動調整可能
- M_6 : 90° 回転
- M_8 : 180° 回転
- M_9 : はねのけ式で微動可能
- $G_{1,2}$: 半透明鏡
- $L_{1,2}$: 補正レンズ(微動可能)

第 13 図

(2) 両側ビームによる透過型

照明光々路: $M_5M_6M_7M_8G_2$

参照光々路: $M_1M_2G_2$ (M_9 ははねのけてある)

(3) Linnik 型

照明光々路: $M_5M_6G_2PG_2$

参照光々路: $M_5M_6G_2M_9G_2$

(4) 両側ビームによる反射型

照明光々路: $M_5M_6G_2PG_2$

参照光々路: $M_1M_2G_2$

このような全機能を有する顕微鏡にも、二三の問題点がある。第 1 は鏡筒長の問題で、一般に反射型で 200 mm、透過型で 160 mm で両者で異なることである。しかしこの件については、鏡筒長 200 mm に設計された生物用対物が市販されているので、これを用いることで解決できる。第 2 の問題は、鏡機をコンパクトに造り上げることであるが、鏡機の大きさはレーザー共振器の大きさで決まる。現在入手可能なレーザー光源には、小型のもので 160 mm、300 mm などがあるが、寿命の点で 300 mm のものが 160 mm より 3 倍くらい長い。またパワーの点でも 160 mm のものは、300 mm のものに比べて数分の一程度であり、このようなことから 300 mm のものを使うのが望ましい。ここで 300 mm のものを使用したとすると、全体の大きさが 400 mm × 300 mm × 200 mm 程度のものになり、使用上不便を感じることはないと思われる。現在このような考察から、第 13 図の光学系を有する干渉顕微鏡を設計中である。

ここで述べたものは選定研究費によるものであり、久保田教授、小瀬助教授のご指導をいただいております。ここに御礼申し上げます。
(1965 年 7 月 13 日受理)

文 献

- 1) K.R. Lang, F.S. Barnes, J.C. Daniel and J.C. Maisel: Nature 201 (1964) 675
- 2) N.A. Peppers: Applied Optics 4 (1965) 555
- 3) 永井昌平, 朝倉利光: 春季応用物理学会予稿集 (1965)