

# 医療用 3 色レーザを用いた透過型高精度位相計測干渉顕微鏡の開発

研究代表者 工学部メディア画像学科 教授 陳 軍

共同研究者 エフケー光学研究所 開発部長 遠藤 潤二

## 1. はじめに

近年、高齢化社会が急速に進むにつれて新しい診断や医療技術の開発が求められている。とりわけ、病変細胞の識別や細胞機能の解明のために活きた生物細胞の非侵襲での定量計測がますます重要である。従来の染色観察法は細胞の性質を変えてしまうと共に、定量計測が不可能であった。また、独立した両腕を持つ従来型干渉顕微鏡は、振動や空気揺らぎの影響を受けやすく、現場での応用が困難であった。その上、干渉顕微鏡の光源に単一波長のレーザ光を用いるため、光学顕微鏡本来の特長である色情報が欠落すること、試料の波長分散が計測できないこと、染色による病理検査法との対比が難しいことなどの課題があった。

本研究の目的は、われわれが開発した共通光路干渉顕微鏡に 3 色レーザを導入し、振動などの影響を受けない、光の色情報をも活用できる超高安定・高精度の新しい干渉顕微鏡システムの開発である。

## 2. 原理と光学系

RGB 3 色レーザを光源に用いた共通光路位相シフト干渉顕微鏡の構成を図 1 に示す。システムのコンパクト化をはかるため、3つのレーザ光をファイバー合波器で一つの準白色光に合波して干渉顕微鏡の光源として用いた。また、それぞれのレーザ光強度を独立に調整できるようにするため、絞りをを用いたレーザビーム径の調整機構を考案した。試料は無限遠補正の対物レンズと結像レンズでカメラの撮像面に結像される。

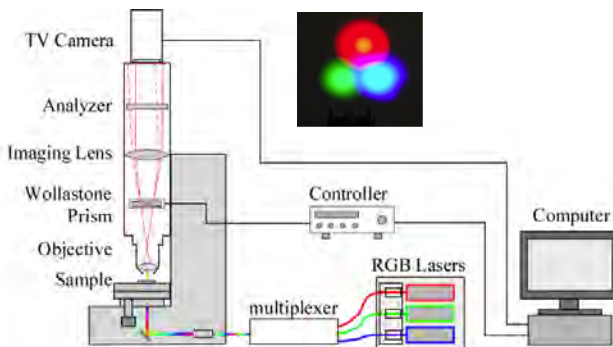


図1 3 色レーザを用いた共通光路干渉顕微鏡の構成

試料を透過した光はウォラストン・プリズム(WP)によって2度の分離角で偏光方向が直交する2つの直線偏光に分割され、これらの光は偏光板を通過し干渉する。カメラによって検出される干渉縞の強度分布は

$$I_{\lambda}(x, y; \delta) = a_{\lambda}(x, y) + b_{\lambda}(x, y) \cos[2\pi fx + \varphi_{\lambda}(x, y) + \delta], \quad (1)$$

と表すことができる。ここで  $a_{\lambda}(x, y)$  と  $b_{\lambda}(x, y)$  は干渉縞のバイアスと振幅で、 $2\pi fx$  は干渉する 2 光波間の波面の傾きである。 $\varphi_{\lambda}(x, y)$  は被検の位相分布で、厚さ  $t$ 、屈折率分布  $n_{\lambda}(x, y)$  の試料の場合、

$$\varphi_{\lambda}(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} t [n_{\lambda}(x, y) - n_r], \quad (2)$$

となる。ここで、 $\delta$  は WP の横移動による位相シフトである。位相計測を行う際、ピエゾ素子で WP を光軸に対して横方向に移動させて  $\pi/2$  ずつの位相シフトを導入し、4 つ以上の干渉縞画像を撮像して計算機に取り込み、位相シフト干渉法の位相導出アルゴリズムを用いて被検の位相分布を計算する。

このシステムでは、干渉する 2 光波はほぼ同じ光路を透過するため、空気揺らぎや振動などの影響はキャンセルされ、超高安定の位相計測を可能になる。また、高安定性から、システム固有の誤差も引き算で除去できる。

## 3. 実験と実験結果

実験では、ファイバー出力半導体レーザ FOLS02 と DPSS レーザを用いた。レーザの発振波長はそれぞれ赤 671nm、緑 532nm、青 457nm である。試料の拡大にはオリンパス社製の対物レンズ(LMPLFLN 20X, NA 0.4)を用いた。また、干渉画像の撮像には、C-MOS カメラ Mako G-507C (Allied Vision) と CCD カメラ KP-M2(日立国際電気)を用いた。

赤、緑、青各色レーザ単独や、3 色レーザを同時に用いたときの干渉画像をそれぞれ図 2 (a)~(d) に示す。いずれの場合でもコントラストの高い干渉画像が得られている。次に、位相計測の線形性や、計測誤差、及び再現性を調べた。各色で同程度の結果が得られ、その中の緑色のレーザ光で行った結果を図 3 に示す。

図 3(a)は干渉画像、(b)は得られた光路差の3Dプロット、(c)はラインプロットと誤差である。結果から、位相計測の線形性がよく、また位相誤差のRMS値が $\lambda/700$ 程度であった。

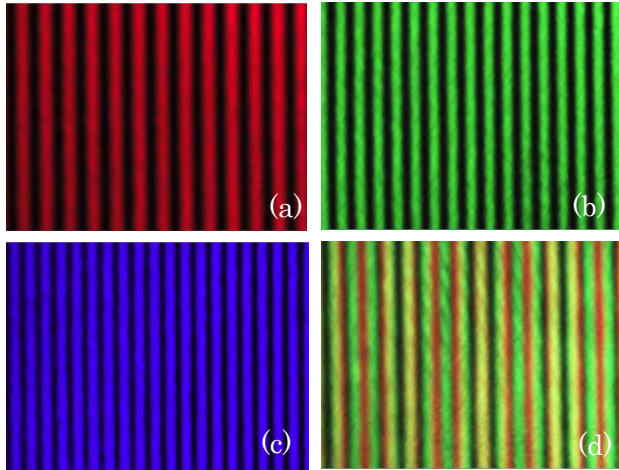


図2 3色レーザを用いたときの干渉画像:(a) 赤色, (b) 緑色, (c) 青色, (d) 3色レーザ同時入射

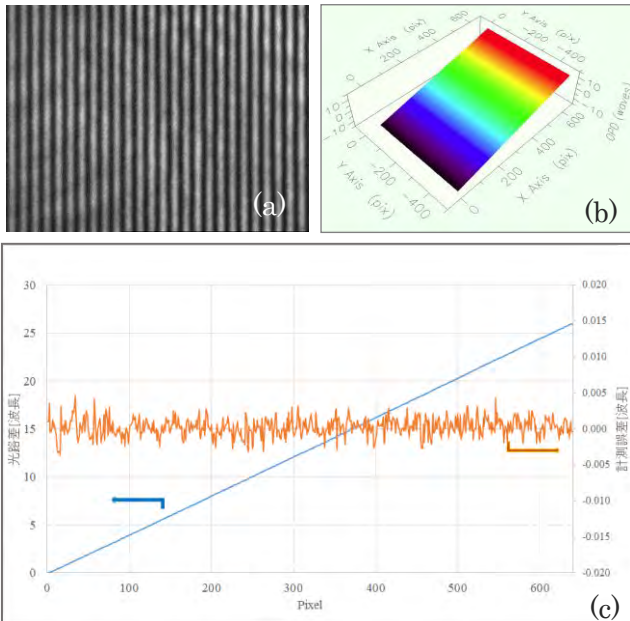


図3 位相計測の線形性と誤差:(a) 干渉画像, (b)計測した波面の3Dプロット, (c)光路差のラインプロットと誤差

次にタマネギの鱗片葉を試料として、通常の顕微鏡では困難な細胞核の計測を行った。実験には赤レーザを用いた。実験結果を図4に示す。図4(a)は通常の透過型光学顕微鏡による写真で、(b)は干渉画像、(c)は計測で得られた細胞核の3Dプロットである。細胞の中に隠れている細胞核の計測が可能となった。

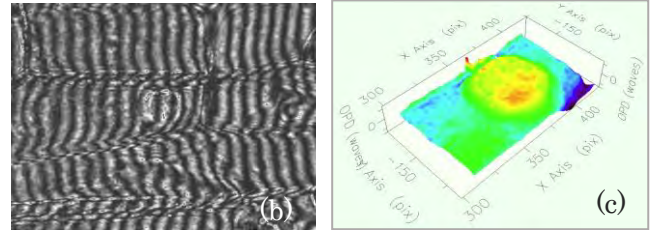
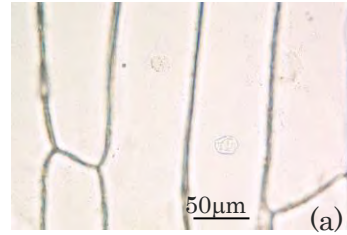


図4 タマネギ表皮細胞の計測結果:(a) 通常の透過型顕微鏡像, (b) 干渉画像, (c) 細胞核の光学厚さの3Dプロット

#### 4. おわりに

ウォラストン・プリズムを用いた透過型共通光路位相シフト干渉顕微鏡に、RGB 3色のレーザ光を光ファイバー合波器で合波した白色光源を導入することで、共通光路による高安定・高精度の特徴を維持しながら、白色光照明の顕微観察ができ、被検試料の波長分散の計測が可能となった。さらに、異なる波長による位相計測結果の組み合わせによって、長い等価波長による段差試料などへの応用も期待できる。3色波長での同時位相計測は今後の課題である。

謝辞:本研究は「平成 28 年度文部科学省私立大学研究ブランディング事業」の助成を受けて行われたものである。

#### 文献:

1) J. Schmit, K. Creath, and J. C. Wyant, in *Optical Shop Testing*, D. Malacara, ed., p.667 (2007).

本研究に関する学会発表と体験ワークショップ開催:

- 1) 陳 軍, 柿沼 慎, 相良 拓哉, 第 42 回光学シンポジウム 講演予稿集 p.61(2017.6).
- 2) 陳 軍, 遠藤 潤二, “透過型共通光路位相シフト干渉顕微鏡の高精度化” *Optics & Photonics Japan 2017* (東京), 講演予稿集 CD:2aB3(2017.11).
- 3) 陳 軍, 平松 昌晃, 遠藤 潤二, “多波長共通光路位相シフト干渉顕微鏡の研究” 第 65 回応用物理学会春季学術講演会 (2018.3.20 発表予定) .
- 4) 「色をつくる体験ワークショップ B-偏光色を楽しもう-」の開催、厚木キャンパスにて、参加者 26 名(2017.11).