

能動的焦点位置変調に基づく 球面収差補正・位相差顕微鏡法



技術解説

生田 孝*

Spherical aberration corrected phase microscopy based on active defocus modulation

Key Words : Active image processing, Aberration correction, Phase microscopy, Defocus modulation, Transmission electron microscopy

1. はじめに

薄い生物試料切片のような光学的吸収がほとんど無い位相物体を無収差光学顕微鏡で観察すると、合焦点位置でほとんどコントラストが消失する。この様な合焦点位置での位相物体のコントラスト消失を避ける目的で、試料に光学的吸収を導入する染色技術が用いられてきた。この染色法は試料を位相物体から振幅物体に換合焦点位置でのコントラストを得るもので、光学顕微鏡のみならず、透過型電子顕微鏡においても、医学、生物学分野の試料を対象として広く利用されている。しかしながらこの様な染色技術の導入は、多少なりとも試料自体を改変している事、試料中の期待した部位に必ずしも自由に染色できるものでない事などの理由のため、可能であるならば避けるべきものである。これに替わる位相物体観察手段は、光学顕微鏡についてはすでに数十年以前に Zernike の発明になる位相差顕微鏡法によって実現され、染色法を補う手法として広く各分野で利用されている。

図1に示すように、Zernike の位相差顕微鏡法の核心は対物レンズ後ろ側焦点面におかれた

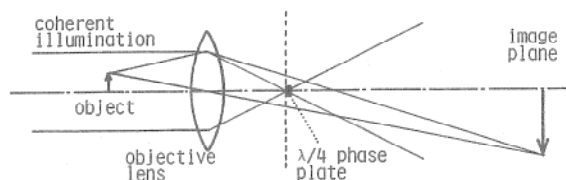


図1 Zernike の位相差顕微鏡法。

$\lambda/4$ 位相板であって、試料からの直接透過光のみに $\pi/2$ の位相変化を加える。この結果弱位相物体はあたかも弱振幅物体であるように変換され、無収差結像系においては合焦点位置で位相コントラストが正しく観察される。さらにあまり知られていないがこの位相差顕微鏡法では、弱振幅物体は位相物体であるように観察され、合焦点位置前後で逆転したコントラストを生じるとともに合焦点位置でコントラスト消失をきたす。

一方、光学顕微鏡と基本的には同じ結像光学系を有する透過型電子顕微鏡においては、残念ながら、先の $\lambda/4$ 位相板を実現することはきわめて困難である。加えて透過型電子顕微鏡で用いられる磁場型電子レンズには原理的に球面収差をゼロに出来ないと言う宿命があり、問題をさらに複雑化している。球面収差を含む電子レンズを用いざるを得ない透過型電子顕微鏡による位相物体観察では通常、近軸焦点位置からやや離れた位置に焦点を設定する。この様な焦点設定 (Scherzer 焦点) では焦点はずれと球面収差の影響が互いに打ち消しあってある程度広い空間周波数領域で一定に近い負の光学伝達関



*Takashi IKUTA
1947年7月30日生
1975年大阪大学大学院工学研究科
応用物理学専攻博士課程修了
現在、大阪電気通信大学工学部応
用電子工学科、教授、工学博士、
応用物理学
TEL 0720-24-1131

数を与えうる。しかしながらこれらの空間周波数領域外からの反転した光学伝達関数部分が混入する結果、高い分解能は実現できない。電子線波長は0.1-0.01Åのオーダーであるのに透過型電子顕微鏡において、いまだ1Åを切る分解能が達成されていない主原因は電子レンズにおけるこの球面収差の残存にあると言える。

透過型電子顕微鏡の分野では電子レンズ球面収差係数引き下げの努力が長きにわたって継続して行われてきた。また高加速電圧化による波長短縮によって実効的な球面収差の影響を抑える事も並行して実行されている。しかしながら前者はもはや技術的限界に近く、後者は高速電子線による試料損傷がとくに有機試料について重大な問題点となっている。

一方上記とは異なったアプローチとして、電子レンズにおいて収差補正が実現できない制限条件を巧妙に回避した球面収差補正レンズ(薄膜レンズ¹⁾や多極子レンズ²⁾などの試みや、in-lineあるいはoff-axis型の電子線ホログラムによる波面検出を利用した球面収差補正補正法³⁾、さらには1枚または焦点はずれ量の異なる複数の観察像を使用したフーリエ空間上での収差補正フィルタリング手法⁴⁾などが報告されている。ここで透過型電子顕微鏡では多くの場合位相物体を観察対象とするので、先のホログラム法やフーリエ空間上でのフィルタリング法は当然ながら位相差顕微鏡にも対応できるものになっている。

さて著者らは光学顕微鏡や透過型電子顕微鏡を対象として、結像・照明光学系あるいは観察試料自体に対する「能動的な変調」を積極的に導入した画像処理手法⁵⁾を提案している。さらにこの様な「能動型画像処理手法」の一応用として、デフォーカス変調に同期した正負両極性の荷重付き画像積分を利用した球面収差補正手法^{6,7)}を報告している。本技術報告においては、まず本手法による球面収差補正の原理を紹介するとともに、用いる荷重関数の設定によって通常型・位相差型の両顕微鏡に対応できることを光学顕微鏡によるシミュレーション実験の結果をもとに示す。また本手法は元来透過型電子顕微鏡への応用を主目的として考案されたも

のであるが、荷重関数の変更によって高次の残留球面収差を含む光学顕微鏡にも柔軟に対応可能であることを述べる予定である。

2. 球面収差補正の原理

今連続露光中の写真フィルムを例に取れば、これが入力画像列を「負」の荷重で画像積分するデバイスであることが理解できよう。画像積分の荷重値は、照明光の強度を変える、あるいは積算時間を変えるなどの方法で「負」の範囲で自由に設定できる。写真フィルムに限らず多くの撮像デバイスには同等の性質があり、例えば観察対象物の能動的並進移動と荷重付き画像積分を組み合わせることで、実空間線形空間フィルタリング処理を実現できるはずである。しかしながら「正」または「負」のみの荷重値に制限される場合、その応用はきわめて限定されたものになる。ここで純光学的に両極性荷重関数を実現することは不可能ではないが、画像処理として必要なダイナミックレンジと精度を有するとは言えず、限定した利用しかなされていない。

これに対して近年、フレームメモリーに代表されるデジタル技術の導入によって、十分な精度での正負両極性荷重付き画像積分が可能になった結果、先の様な観察対象物の能動的並進移動を利用した直接的な空間フィルタリング処理を実現できるようになった^{5,8)}。これらの処理では主として観察対象物の面内2次元並進移動が利用されているが、光軸方向への移動、すなわちデフォーカス量の能動的制御を積極的に利用することも可能である。

今、その様な処理を想定する。ここで観察像のデフォーカスシリーズを $i(x, y, \Delta f)$ 、荷重関数を $Wg(\Delta f)$ とすれば、処理のプロセスは、

$$\hat{i}(x, y) = \int_{-\infty}^{\infty} Wg(\Delta f) \cdot I(x, y, \Delta f) \cdot d\Delta f, \quad \dots\dots(1)$$

で与えられる。(u, v)を、(x, y)に対応する空間周波数成分とし、 $\hat{i}(x, y)$ と $i(x, y, \Delta f)$ のフーリエ変換をそれぞれ $\hat{I}(u, v)$ と $I(u, v, \Delta f)$ と表現する。これにより(1)式は、

$$I(u, v) = \int_{-\infty}^{\infty} Wg(\Delta f) \cdot I(u, v, \Delta f) \cdot d\Delta f, \quad \dots\dots\dots(2)$$

と書ける。線形結像系では $I(u, v, \Delta f)$ は、観察対象のフーリエ変換 $F(u, v)$ と、結像光学系光学的伝達関数(OTF), $H(u, v, \Delta f)$ により、

$$I(u, v, \Delta f) = H(u, v, \Delta f) \cdot F(u, v), \quad \dots\dots(3)$$

と積の形で与えられる。

今、処理の実効的伝達関数 $\hat{H}(u, v)$ を観察対象物 $F(u, v)$ と処理像 $\hat{I}(u, v)$ によって、

$$\hat{I}(u, v) = \hat{H}(u, v) \cdot F(u, v) \quad \dots\dots\dots(4)$$

と定義すれば、(2)-(4)式から、 $\hat{H}(u, v)$ につき、

$$\hat{H}(u, v) = \int_{-\infty}^{\infty} Wg(\Delta f) \cdot H(u, v, \Delta f) \cdot d\Delta f, \quad \dots\dots\dots(5)$$

を得る。本式は結像系の光学的伝達関数をもとに、与えられた実効的伝達関数から必要な荷重関数を決定する積分方程式と考えられる。通常、任意の結像系光学的伝達関数から必要な荷重関数の一般解を解析的に求めることは著しく困難である。

さて顕微鏡の光学系を考え、垂直コヒーレント照明の下で、無染色生物試料のような入射光がほとんど透過する薄い弱散乱物体を観察する場合を仮定する。この場合の観察対象は試料の複素透過率 $f(x, y) = 1 + fr(x, y) + i \cdot fi(x, y)$ であって、フーリエ空間では、

$$F(u, v) = \delta(u, v) + Fr(u, v) + i \cdot Fi(u, v), \quad \dots\dots\dots(6)$$

と表現される。 $Fr(u, v)$ と $Fi(u, v)$ はそれぞれ 1 より十分小さい実数関数 $fr(x, y)$ と $fi(x, y)$ のフーリエ変換であることに注意されたい。

このような弱散乱物体の結像は試料を透過する強い直接透過波と弱い試料からの散乱波(回折波)との干渉縞によって形成される線形結像項が支配的であり、 $Fr(u, v)$ と $Fi(u, v)$ に対する独立な光学的伝達関数(OTF)の和の形で、

$$I_{\text{linear}}(u, v, \Delta f) = Hr(u, v, \Delta f) \cdot Fr(u, v) + Hi(u, v, \Delta f) \cdot Fi(u, v), \quad \dots\dots\dots(7)$$

と書ける。試料複素透過率の実部・虚部に対する独立な OTF, $Hr(u, v, \Delta f)$ と $Hi(u, v, \Delta f)$ はそれぞれ、

$$Hr(u, v, \Delta f) = 2 \cdot \cos(\gamma(u, v) - 2\pi w \cdot \Delta f), \\ Hi(u, v, \Delta f) = 2 \cdot \sin(\gamma(u, v) - 2\pi w \cdot \Delta f), \quad \dots\dots\dots(8)$$

と求められる。ここで $\gamma(u, v)$ は光学系の本質的な波面収差関数であり、デフォーカスによる位相変化 $2\pi w \cdot \Delta f$ を除いて定義した。垂直コヒーレント照明と結像光学系の軸対称性の仮定の下に、面内空間周波数を $q = (u^2 + v^2)^{1/2}$ とすると、 $\gamma(u, v)$ は $\gamma(q)$ と表現して差し支えない。また w は光軸方向空間周波数に対応するものであり、 $w(q) = (1 - (1 - \lambda^2 \cdot q^2)^{1/2}) / \lambda$ で与えられる。この関係から q は w の関数としても定義でき、 $q(w) = ((1 - (1 - \lambda \cdot w)^2)^{1/2}) / \lambda$ と書ける(図2のEwald回折球参照)。

(8)式は w を固定して考えるとそれぞれ Δf に対する単純な cosine/sine 関数であるので(5)式の荷重関数値の積分方程式は直交関係より容易に求められる。試料複素透過率の実部・虚部に対する処理の荷重関数 $Wg_r(\Delta f)$ ならびに $Wg_i(\Delta f)$ は、それぞれ、

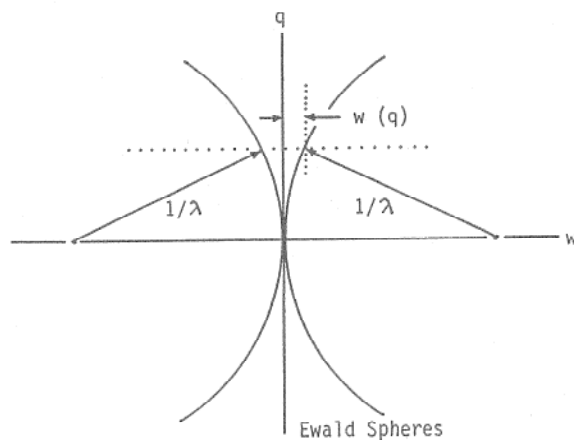


図2 Ewaldの回折球上での面内空間周波数 q と光軸方向空間周波数 w の対応。

$$\begin{aligned}
 W_{g_r}(\Delta f) &= \int_0^\infty \hat{H}(q(w)) 2\cos(\gamma(q(w)) - 2\pi w \Delta f) \cdot dw, \\
 W_{g_i}(\Delta f) &= \int_0^\infty \hat{H}(q(w)) 2\sin(\gamma(q(w)) - 2\pi w \Delta f) \cdot dw, \\
 &\dots\dots(9)
 \end{aligned}$$

であることが導かれる。

ここで(9)式で求められた荷重関数 $W_{g_r}(\Delta f)$ ならびに $W_{g_i}(\Delta f)$ を(2)式に導入, 観察画像のデフォーカスシリーズ $I(u, v, \Delta f)$ に対し, 荷重付き画像積分を取る事で無収差観察が試料複素透過率の実部・虚部に対して実現できるはずである。しかしながらとりわけ収差を含む光学系では観察像よりデフォーカス原点, $\Delta f=0$ を正確に求めることは困難である。この場合意識的に荷重関数の原点を移動させて最良の処理像を得る場所を探すべきであろう。この荷重関数原点移動量を Δf_0 とおき(2)式積分中の荷重関数を $W_g(\Delta f - \Delta f_0)$ と書き直すと(2)式は,

$$\begin{aligned}
 \hat{I}(u, v, \Delta f_0) &= \int_{-\infty}^\infty W_g(\Delta f - \Delta f_0) \cdot I(u, v, \Delta f) d\Delta f, \\
 &\dots\dots(10)
 \end{aligned}$$

となり, 処理像 $\hat{I}(u, v)$ が Δf_0 の関数として $\hat{I}(u, v, \Delta f_0)$ の形で与えられる。

さて垂直コヒーレント照明の下でその観察像が(7, 8)式で与えられる弱散乱物体を, 処理の対象とする。荷重関数 $W_{g_r}(\Delta f - \Delta f_0)$ による処理像のフーリエスペクトル $\hat{I}_r(u, v, \Delta f_0)$ は想定した実効的光学伝達関数 $\hat{H}(u, v)$ に対して,

$$\begin{aligned}
 \hat{I}_r(u, v, \Delta f_0) &= \\
 &\cos(-2\pi w \cdot \Delta f_0) \cdot \hat{H}(u, v) \cdot Fr(u, v) \\
 &- \sin(-2\pi w \cdot \Delta f_0) \cdot \hat{H}(u, v) \cdot Fi(u, v), \\
 &\dots\dots(11)
 \end{aligned}$$

と書ける。荷重関数原点移動量 Δf_0 がゼロで無い場合には, 試料複素透過率の虚数部情報が $-\sin(-2\pi w \cdot \Delta f_0)$ なる係数で混入するとともに試料実数部情報もまた $\cos(-2\pi w \cdot \Delta f_0)$ の係数で劣化することが示される。(8)式を参照すれば, この $\cos(-2\pi w \cdot \Delta f_0)$ の形の劣化関数が無収差系のデフォーカスに伴う帯域劣化

と同じ形を取る事がわかる。すなわち荷重関数原点移動量 Δf_0 は本処理でのデフォーカス量そのものとみなして良い。

一方試料複素透過率虚数部を再生する荷重関数 $W_{g_i}(\Delta f - \Delta f_0)$ による処理像フーリエスペクトル $I_i(u, v, \Delta f_0)$ は, 同様にして求められ,

$$\begin{aligned}
 I_i(u, v, \Delta f_0) &= \\
 &\cos(-2\pi w \cdot \Delta f_0) \cdot H(u, v) \cdot Fi(u, v) \\
 &+ \sin(-2\pi w \cdot \Delta f_0) \cdot H(u, v) \cdot Fr(u, v), \\
 &\dots\dots(12)
 \end{aligned}$$

である。先と同様に Δf_0 がゼロで無い場合に試料実数部情報が混入するとともに, 試料虚数部情報についてもまた $\cos(-2\pi w \cdot \Delta f_0)$ の係数で劣化する事がわかる。この事は本処理が球面収差の補正に加えて, 試料虚数部情報を見かけ上実数部情報であるかのように変換していることを表現するものである。振幅変化量・位相変化量が十分に小さい弱振幅物体・弱位相物体は, 複素透過率から見ればそれぞれ純粋な実数部・虚数部を持つが, (8, 11, 12)式により弱振幅物体が弱位相物体に, 弱位相物体が弱振幅物体に, それぞれ変換されていることがわかる。これにより本処理法が本方式が Zernike の位相差顕微鏡法を $\lambda/4$ 位相板無しに実現したものであることが理解できよう。さらに本処理方式は, その球面収差除去能力を考えると, Gabor の in-line hologram に対応する波面検出手段にあたと結論出来る。

以下, 光学顕微鏡による本処理法の実験例を示す。

3. 光学顕微鏡による球面収差補正実験

光学顕微鏡に用いられる対物レンズは通常かなり良く球面収差が除去されている(はずである)。しかしながら設計波長と違った波長を用いた場合, あるいは指定厚のカバーガラスが使用できない場合などにおいては球面収差が発生し, 見え味が悪くなる。

さて電子顕微鏡の分野では, この様な球面収差の影響を定量的に判定する手段として, 各デフォーカスシリーズの2次元ディフラクトグラム(パワースペクトル)を求め, 空間周波数 q

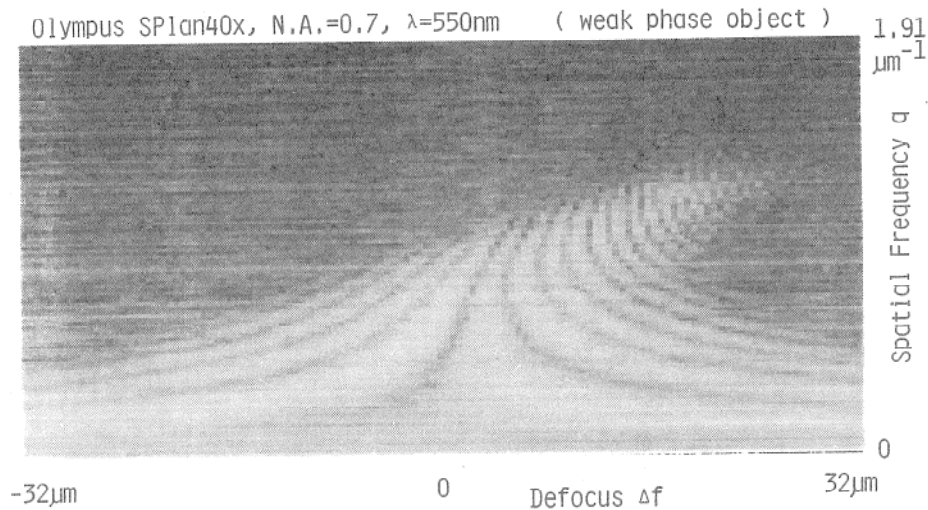


図3 弱位相試料(有機脂肪酸微小液滴, 指紋)デフォーカスシリーズのThonマップ(パワースペクトル半径方向成分対デフォーカス量の関係). Olympus Splan40x (N.A.=0.7), カバーガラス使用せず.

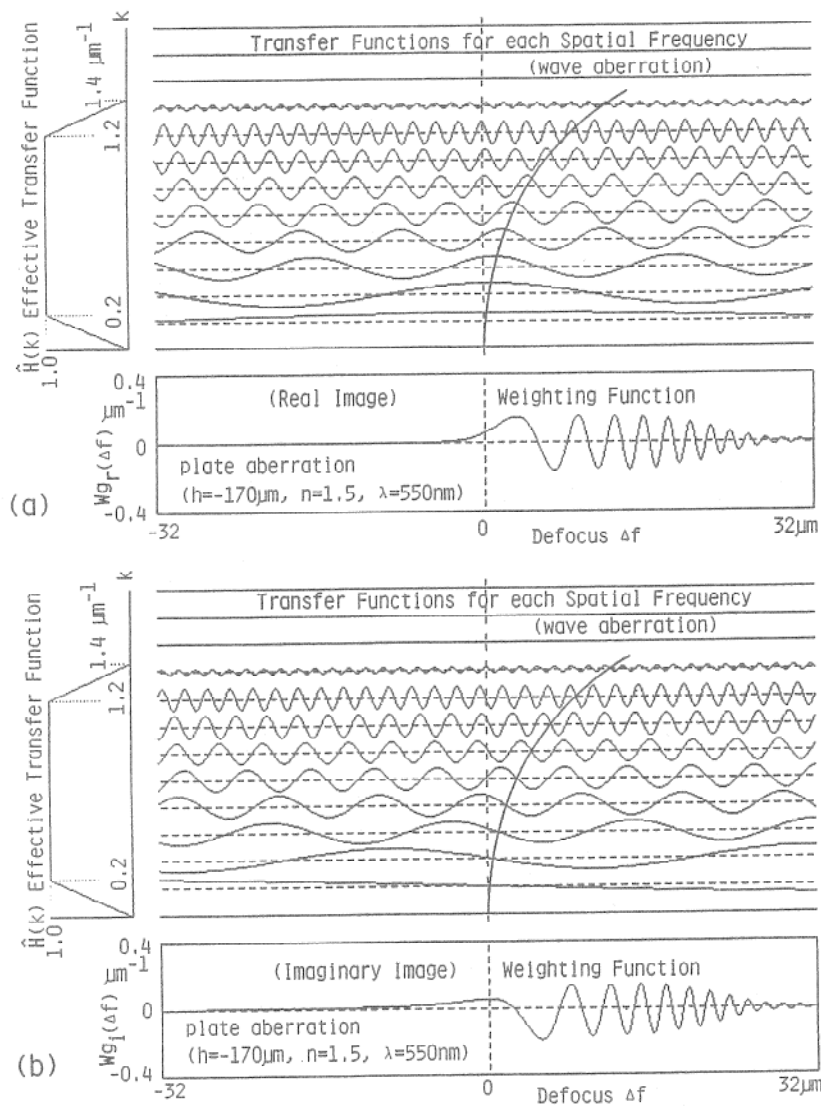


図4 対物レンズ(カバーガラス無し)の光学的伝達関数と球面収差補正用荷重関数.
 (a) 試料複素透過率実数部(弱振幅試料)対象, (b) 試料複素透過率虚数部(弱位相試料)対象.

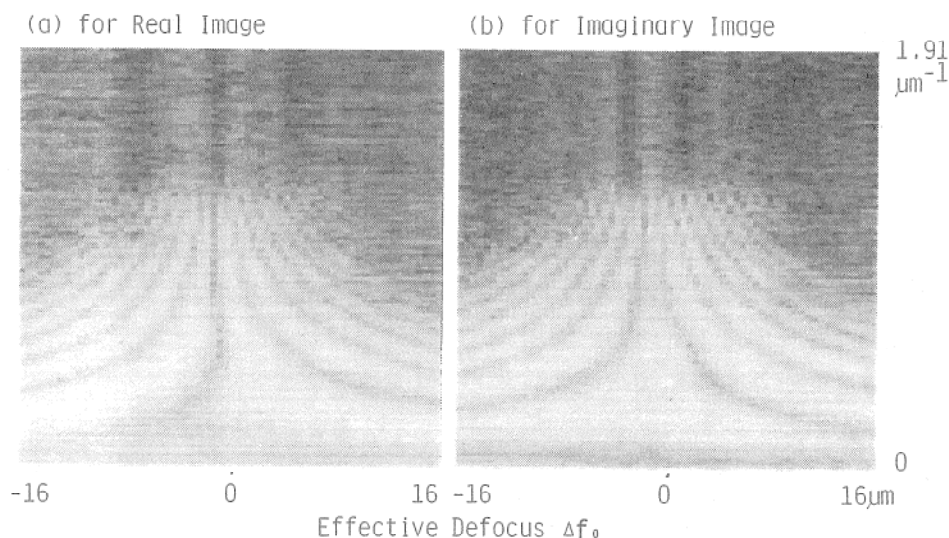


図5 球面収差補正処理結果のThonマップによる表示,
(a) 試料複素透過率実数部(弱振幅試料)対象, (b) 試料複素透過率虚数部(弱位相試料)対象.

とデフォーカス量 Δf をパラメータとして画像表示する(Thonのマップ)ことが行われている^{9,10}. 図3には生物用対物レンズであるOlympus, Splan40x (N. A. =0.7)を用いて, ほぼ弱位相物体と考えられる有機脂肪酸の微小液滴(指紋)をカバーガラス無しで観察したデフォーカスシリーズを基にしたThonのマップを示す. Thonのマップには完全にはコヒーレント照明でない事によるパワースペクトルの高域減衰に加えて, 高域ほど間隔の狭まる多数の暗線が認められる.

観察対象物がこの例のように弱い位相物体あるいは弱い振幅物体である場合, Thonのマップは試料のパワースペクトルと(8)式で表される光学系の光学的伝達関数(弱い位相物体については $H_i(u, v, \Delta f)$, 及び弱い振幅物体については $H_r(u, v, \Delta f)$)の絶対値二乗の積を表示している事になる. したがって光学伝達関数の大きさや符号を直接反映するものではないが, 暗線に付いては明らかに $H_i(u, v, \Delta f)$, あるいは $H_r(u, v, \Delta f)$ のゼロ点を表現している. 先の実験例では, $0 = \sin(\gamma(q) - 2\pi w(q) \cdot \Delta f)$, すなわち $n \cdot \pi = \gamma(q) - 2\pi w(q) \cdot \Delta f$ の関数対応をこれらの暗線が示している. とりわけ中央から立ち上がり, 右方向に傾斜して行く暗線は $0 = \gamma(q) - 2\pi w(q) \cdot \Delta f$ に相当し, 先に示した w と q との対応関係を利用して直接的に波面収差関数, $\gamma(q)$ を与えてくれるものである.

さて実験で使用した対物レンズは生物用であり, カバーガラスの使用を前提としている. 図4(a, b)には, 厚さ $h = -170 \mu\text{m}$, 屈折率 $n = 1.5$ の平板ガラスに由来する球面収差(高次球面収差も含めた)関数を基に(9)式から計算された球面収差補正用荷重関数を試料複素透過率の実部・虚部別に示す. 厚さが負の平板ガラスを仮定するのは, カバーガラスの使用を前提とした対物レンズをカバーガラス無しで使用したためである. 次に図5(a, b)にこれらの荷重関数を(10)式に適用, 収差補正処理を試みた結果を, 荷重関数原点移動量 Δf_0 を実効デフォーカス量とみなしたThonのマップの形で示す.

試料複素透過率の実部を収差補正する荷重関数を用いた図5(a)の例では, 中央暗線は低域を除きほぼ垂直に立ち上がり, 球面収差がかなり取り除けた事を示している. しかし合焦点位置は垂直暗線となるので, 弱位相物体である試料のコントラストはこの位置で最小となる. すなわちこの荷重関数は, 通常顕微鏡を無収差化するものに相当する. 一方試料複素透過率虚数部を収差補正する図5(b)では, Thonのマップは実効デフォーカス量に対し左右対称で, かつ合焦点位置である中央部は暗線とならず明線になる. すなわち後者の荷重関数は収差補正を実現するとともに弱位相物体を弱振幅物体であるように観察させる, 無収差位相差顕微鏡を実現していることが確認された.

ここで述べた結像光学系の球面収差補正・位相差顕微鏡法は主として本質的に球面収差が除去出来ない透過型電子顕微鏡を対象として開発してきたものであり、その極限分解能をいくらかかなりと改善しようとするものであった。この方向での研究成果については、文献⁷⁾を参照されたい。一方光学顕微鏡については対物レンズ球面収差は基本的に除去出来るものの、使用条件によっては残留球面収差、特に高次球面収差が問題になる場合がある。残留波面収差関数が求められ、光軸回りの軸対称性が保証されていること(すなわち非点収差のない結像光学系)を前提にすれば、本処理法の適用は荷重関数の数値計算のみに帰結する。対物レンズ自体に対する光学的な収差補正とは異なり、実空間上での荷重付き画像積分と言うきわめてシンプルな処理原理にもとづいているとともに、位相差用対物レンズを必要としない本手法の実用面での柔軟性は高いと言える。必要なハードウェアの追加(フレーム・インテグレーター、焦点制御及び荷重計算用パーソナル・コンピューターなど)によって今後広く光学顕微鏡分野での応用が可能であると期待される。

4. ま と め

本技術報告においては、コヒーレント垂直照明の下での、観察像のデフォーカスシリーズを荷重付き画像積分する方式の球面収差補正の原理を紹介した。また用いる荷重関数の設定によっ

て通常型・位相差型の両顕微鏡に対応できることを光学顕微鏡によるシミュレーション実験の結果を基に示した。本手法は元来透過型電子顕微鏡への応用を主目的として考案されたものであるが、荷重関数の変更によって高次の残留球面収差を含む光学顕微鏡にも柔軟に対応可能であることを述べた。

参 考 文 献

- 1) M. Kuzuya, M. Hibino, and S. Maruse, Ultramicroscopy 15, 233 (1984)
- 2) S. Okayama, Nucl. Instr. Methods, A298, 488 (1990)
- 3) A. Tonomura, T. Matsuda and J. Endo, Japanese J. Appl. Phys., 18, 1373 (1979)
- 4) E. Kerkland, B. Siegel, N. Ueda and Y. Fujiyoshi, Ultramicroscopy 5, 479 (1980)
- 5) T. Ikuta, Appl. Opt., 24, 216 (1985)
- 6) T. Ikuta, J. Electron Microsc., 38, 415 (1989)
- 7) Y. Taniguchi et al, Ultramicroscopy 41, 323 (1992)
- 8) 生田 孝, 応用物理, 58, 911 (1989)
- 9) W. Krakow, K. H. Downing and B. M. Siegel, Optik 40, 1 (1974)
- 10) J. Frank, S. C. McFarlane and K. H. Downing, Optik 52, 49 (1978)

