

# 紫外・可視光を用いた多機能共焦点レーザー走査顕微鏡の開発

金井美一<sup>\*1</sup>・神崎陽介<sup>\*2</sup>・若木守明<sup>\*3</sup>

## Development of multifunctional confocal laser-scanning microscope with UV/VIS laser source

by

Yoshikazu Kanai, Yousuke Kanzaki and Moriaki Wakaki

(Received on Sep. 26, 2006 & accepted on Nov. 22, 2006)

### Abstract

Many types of confocal laser-scanning microscope (CLSM) have been developed and widely used. Various advanced optical materials such as photonic crystals and nanostructure materials are making the headlines as a result of the rapid growth of nanotechnology research. CLSM is one of the most useful characterization tools for these applications. Although there are several commercial CLSMs at present, they cannot satisfy nanotechnology research requirements, and a new multifunctional CLSM, having flexibility for various applications and higher performances, must be developed. As the first step, a CLSM using UV/VIS light sources was prototyped. The optical system is optimally designed for the two wavelengths of UV 325.0nm and VIS 632.8nm. The transmission and fluorescence characteristics of several lens materials were measured to optimize the lens design. An UV laser is used to achieve higher resolution, and a VIS laser is used for multiple functions. An optical system with an objective lens having NA: 0.95, EFL: 2.5mm, WD: 1.5mm and spatial resolution: 160nm was realizable. Several specimens were characterized to evaluate the performance of the fabricated system, and some optical materials under study were measured for evaluation and interesting results were obtained. Multifunctional measurements are being planned as a next step. This system will help advance the research of nanostructures, photonic crystals and biological systems.

**Keywords:** Confocal laser microscope, Nanostructure, Ultraviolet, Optical design

## 1. 緒言

様々なタイプの共焦点レーザー走査顕微鏡(CLSM)<sup>1,2,3</sup>が開発され、生物/医療/電子/機械/材料といった多くの分野に広く応用されている。CLSMの典型的な特長は、レーザー光を光源として使用していることと3次元イメージング計測にある。近年ナノテクノロジー研究の急速な成長に伴い、更に高い分解能をもった近接場走査光学顕微鏡(SNOM)等が注目を浴びている。しかし、CLSMはSNOMがもたない3次元計測という特長をもち、かつSNOMと光学顕微鏡の中間の分解能と測定範囲を持っているため、いまだに重要な役割を果たしている。

現在、フォトニック結晶やナノ構造材料のような先端的な多くの種類の光学材料が注目を浴びて研究されており、CLSMはこれらの材料の微小領域での挙動解明において最も有用な計測装置の一つである。現在では種々のCLSMが市販されているが、

それらの研究における計測要求を満たすことが出来ないため、種々の応用に適合する柔軟性を持った多機能CLSMの開発が望まれている。そこで我々は紫外光と可視光の光源を備えた独自の多機能CLSMを開発した。分解能の向上を目指し、光源としてHe-Cdレーザーの紫外光325.0nmを用いた。顕微鏡の分解能は基本的に観測波長に比例するため、その短波長化が計られてきているが、波長350nm以下の波長領域になると光学系に困難さを生じるため実用化は成されていない。短波長を生かした性能を達成するためには、対物レンズが最も重要な要素の一つであるため、本装置に最適なレンズを新規に開発した。本装置の目標である多機能化のため、対物レンズも含めた光学系は紫外光に最適化するだけでなく、可視も含めた波長に適するように設計した。350nm以下の波長に適したレンズ材料は限られているため、紫外と可視両方の領域でアクロマートを達成することは、設計/製作を困難にしている。そこで何種類ものレンズ材料の特性(透過/蛍光)を測定して、最適な材料を選定して用いた。試作した装置で幾つかの標準試料を計測して基本性能を確認するとともに、微細構造を有する数種類の光学材料を計測して興

\*1 理工学研究科総合理工学専攻博士課程  
\*2 工学研究科光工学専攻博士課程前期  
\*3 工学部光・画像工学専攻教授

味ある結果を得ることができ、種々の応用に適合した多機能 CLSM 装置開発の基礎を確立した。

## 2. 装置構成

装置全体は、光学系、レーザー光源、スキャナ、検出器、信号増幅器、制御ユニット、データ取得ユニットそしてソフトウェアで構成される (Fig. 1)。

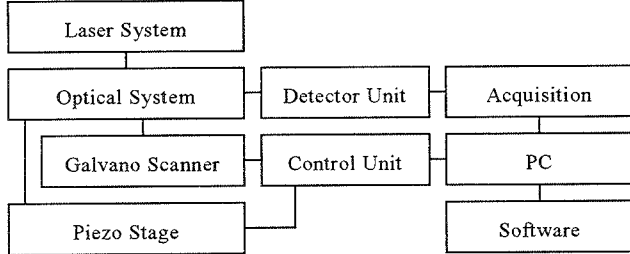


Fig. 1. System configuration of the developed CLSM system.

### 2. 1 光学系

共焦点光学系は、対物レンズの焦点位置と検出器前のスリット位置が共役な関係となっている。レーザー光は対物レンズで微小径に集光されて試料に照射され、その試料面で反射した光は同じ対物レンズで集光されて検出器前のスリット面に結像される。よって焦点位置からの反射光だけがスリットを通過して検出される。本装置の光学系全体の構成を Fig. 2 に、目標とする装置の仕様を Table 1 に示す。走査領域 50 x 50um において 100nm オーダーの空間分解能を目指した。紫外と可視の光源として、それぞれ He-Cd レーザー (金門電気 IM3031R 波長: 325.0nm/ 出力: 8mW/ ビーム径: 1mm) と He-Ne レーザー (Melles Griot 05-LHR-120 波長: 632.8nm/ 出力: 7mW/ ビーム径: 1mm) を使用した。レーザー光は 2 つのガルバノ・スキャニング・ミラー (CTI 6220) で走査され、スキャニング・ミラー上の像は 2 組のリレーレンズを用いて対物レンズの入射瞳上に結像される。この装置に最適化した対物レンズ (NA0.95、焦点距離 2.5mm) を専用に設計/製作して使用した。測定試料を対物レンズ下のピエゾステージ (ナノコントロール NC211) 上に置き、光軸方向に精密に移動した。反射光はスリット後方に置いた光電子増倍管 (浜松ホトニクス R1894) で検知する。光電子増倍管は紫外光に対して高い感度を持ち、その出力信号は増幅回路を経由してデータ取得ユニットに接続される。

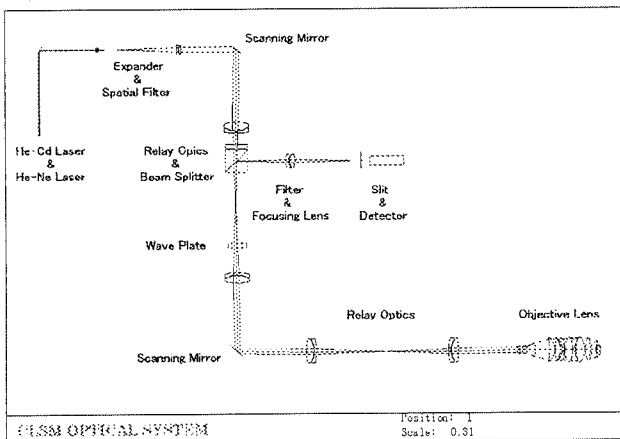


Fig. 2. Schematic diagram of the optical system for the developed CLSM system.

### Specification of the System

Wavelength	: UV 325.0nm (He-Cd Laser)
	: VIS 632.8nm (He-Ne Laser)
Scanning Area	: 50um x 50um
Spacial Resolution	: <200nm @325.0nm
Vertical Resolution	: <100nm @325.0nm

Table 1. Specification to be attained by the developed CLSM system.

### 2. 2 制御系

3次元画像取得のために、面内(X/Y)は2枚のガルバノ・スキャニング・ミラーを用いてビームを走査し、面外(Z)はピエゾ・ステージに試料を搭載して走査する (Fig. 3)。コンピュータからインターフェイスを介して各ユニットを連動させて画像を取得する。データはXY方向のラスタースキャンをおこないながら各点での信号強度を取得し、全面データを取得後にZ方向にステップ移動させて同様に画像取得をおこなう。繰り返して取得したデータを処理して3次元画像を構築する。XYおよびZ方向走査は 10nm の分解能で設定が可能である。

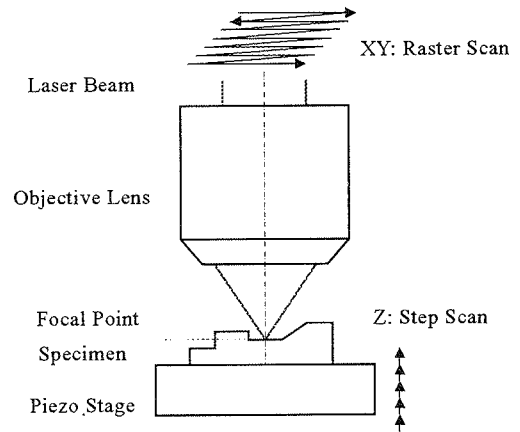


Fig. 3. Schematic layout of 3D scanning method of the developed CLSM system.

### 2. 3 機構系

多機能 CLSM を目的とするため、多種類のレーザーに対応する必要がある。これに備え光学系は自由度の高い防振台上に設置した。主要な光学系部分の一つのユニットにまとめ、光軸ズレを生じない構成とした。

## 3. 光学系設計

光学系は、上記の種々の応用に適した柔軟性と所望の性能を持つように設計した。第一の目標は従来以上の分解能を得ることと、多機能化の基本構成を確立することであり、最も重要な要素である対物レンズもこの装置に最適化するように開発した。光学的分解能  $\Delta r$  は下記の式で表され、使用波長  $\lambda$  を短くすることとレンズの開口数  $\sin \alpha$  を大きくすることで向上できる。

$$\Delta r = 0.46 \lambda / \sin \alpha$$

そこで光源に紫外光連続発振レーザーの中でも最も波長の短い He-Cd レーザー(波長:325nm)を用い、NA0.95 の対物レンズを設計した。今後の多機能化のためには可視域においても高性能を維持する必要があり、短波長/高 NA/アクロマートという厳しい条件が要求される。使用する波長において高透過率/適正な分散/低蛍光の特性を持つ材料が少ないため、最初に検討しなくてはならない課題は材料である。この波長帯で一般に使用されている材料は石英 (SiO<sub>2</sub>)、フッ化カルシウム (CaF<sub>2</sub>) とその他数種類の硝子である。数種類の材料に関して透過率と蛍光特性を測定し、要求を満たす材料を選択した。もう一つの課題は、限られた光学材料を用いての紫外と可視に対する色収差補正設計である。

3. 1 レンズ材料選定実験

分光光度計 (日本分光 V-570) を用いて、数種類の光学材料の蛍光と透過特性を測定した。その結果を Table2 に示す。最終的に FPL51, PBL26, BSL7, FSL5, ADF10, CaF<sub>2</sub> を光学系に使用した。325nm の波長をもつレーザー光で励起したときに発生する蛍光のピークは、376nm から 407nm の波長域で観察され、これらのラインは干渉フィルタを用いて除去できる。ADF10 の吸収は僅かに他の材料に比較して高いが、設計の許容範囲内にあった。

Material	Fluorescence	Absorption
FPL51	No Peak	<0.10
PBL26	407	0.18
BSL7	392	<0.10
FSL5	405	<0.10
CAF2	377	<0.10
ADF10	376	0.54

[nm]                      [O.D.]

Table 2. Characterized result of fluorescence and absorption of optical materials used for the developed CLSM optical system.

3. 2 光学設計

本装置においては、全体光学系の最適化もさることながら、対物レンズの高性能化が最も重要な要素となっている。レンズ材料選定実験の結果をもとにして、光学系の設計をおこなった (光学設計ソフト ORA 製 Code-V を使用)。

He-Cd レーザーと He-Ne レーザーのビームは、ダイクロイック・ミラーを用いて同軸光路にし、エキスパンダに導入する。エキスパンダは5倍の倍率をもち、ビームを5mm の径にコリメートする。エキスパンダ光学系は、FSL5/PBL26 /PBL6/SL5 の材料を用いたダブルレットの組み合わせで構成される。拡大されたビームは、スキャニングミラーで反射し FSL5/PBL26 材料を用いたダブルレット対で構成されるリレー光学系で伝送される。リレー光学系はアフォーカル系の構成をもち、スキャニングミラー上の像が対物レンズの入射瞳に結像される。リレー光学系はアフォーカル系の構成をもち、スキャニングミラー上の像が対物レンズの入射瞳に結像される。50 x 50um の範囲をスキャニングするための画角は 0.825 度である。NA が小さいレンズの場合には石英とフッ化カルシウムの組み合わせだけで設計が可能であるが、NA が大きい場合には不可能である。高次の球面収差によって生じる波長依存性を補正するには、異なった屈折率と分散を持った数種類の光学材料が必要となる。対物レンズ

は波長 325.0nm と 632.8nm における焦点距離が一致するように設計し、最終的に FPL51/ PBL26/ BSL7/ FSL5/ CaF<sub>2</sub>/ ADF10 の 6 種類の光学材料からなる 13 枚のレンズで構成した。対物レンズの構成を Fig. 4 に、レンズデータを Table 3 に示す。

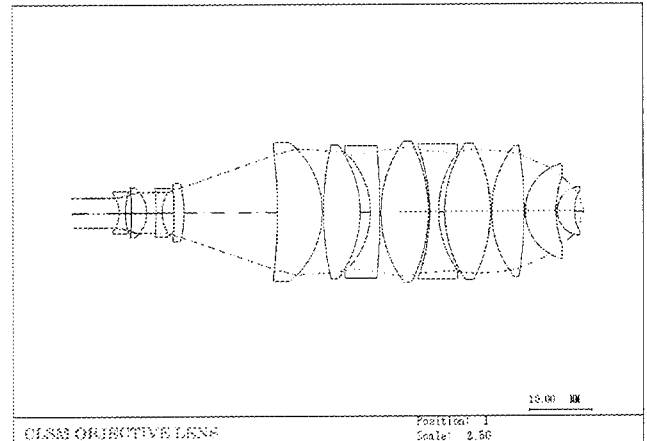


Fig. 4. Lens configuration of objective lens for the developed CLSM optical system.

ELEMENT	RADIUS OF CURVATURE		THICKNESS	DIAMETER	GLASS
	FRONT	BACK			
OBJECT	INF				
1	-4.944	11.977	1.000	5.751	FPL51
			0.937		
2	-55.748	-5.163	2.444	6.918	PBL26
			1.456		
3	-59.817	6.042	1.000	6.671	BSL7
			1.920		
4	-46.580	-19.184	1.588	8.092	FSL5
			15.069		
5	-82.993	-14.587	7.224	20.403	FPL51
			0.200		
6	48.290	-18.214	5.913	19.614	CAF2
			1.681		
7	-13.216	-136.580	1.500	19.416	ADF10
			0.200		
8	19.099	-24.845	7.741	20.733	CAF2
			0.200		
9	-31.381	16.202	1.500	19.775	ADF10
			0.969		
10	19.548	-23.346	7.359	19.995	CAF2
			0.200		
11	17.181	-71.461	5.223	19.198	CAF2
			0.200		
12	7.984	16.585	4.923	13.924	CAF2
			0.200		
13	4.006	6.805	2.752	7.531	FSL5
IMAGE			3.624		
	IMAGE DISTANCE		0.399		

[mm]

Table 3. Lens data of objective lens for the developed CLSM optical system.

4. 光学設計評価

光学系全体の性能は対物レンズの性能に大きく影響されるため、対物レンズを中心に性能評価をおこなった。対物レンズ設計結果の仕様を Table 4 に示す。紫外・可視両方において、NA を除いた全ての諸元で同じ性能の設計が達成できた。

Wavelength [nm]	325	632.8
Effective Focal Length [mm]	2.500	2.500
Back Focal Length [mm]	0.399	0.399
Front Focal Length [mm]	8.316	8.316
F-Number [mm]	0.526	1.000
Image Distance [mm]	0.399	0.399
Overall Length [mm]	74.500	74.500
Image Height [mm]	0.036	0.036
Field Angle [deg.]	0.825	0.825

Table 4. Design result of the objective lens specification.

対物レンズの収差特性を、Fig. 5 に示す。全画角において無収差の回折限界性能が得られている。

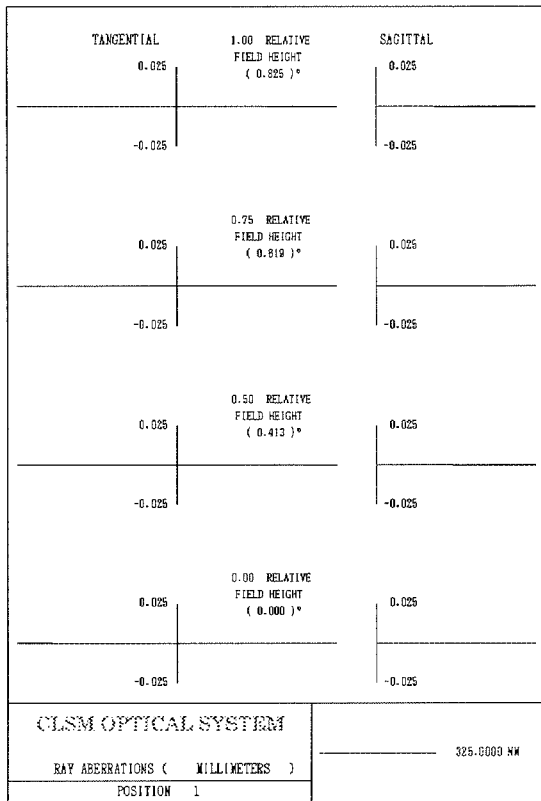


Fig. 5. Ray aberrations of the objective lens.

波面エラーを Fig. 6 に示す。波面エラーは  $\lambda/10$  以下の値を示し、波動光学的評価においても優れた性能を持つことがわかる。

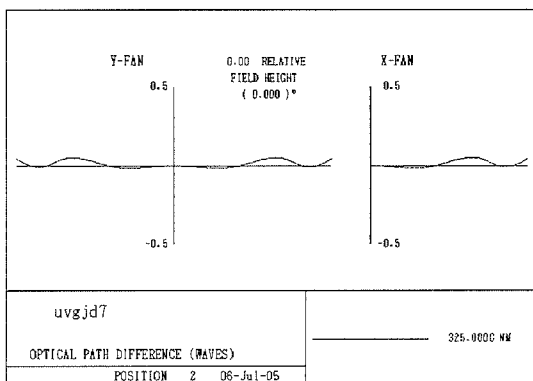


Fig. 6. Wavefront error of the objective lens.

対物レンズの湾曲特性を Fig. 7 に示す。走査範囲内において 100nm 以下のフラットフィールドが達成されている。

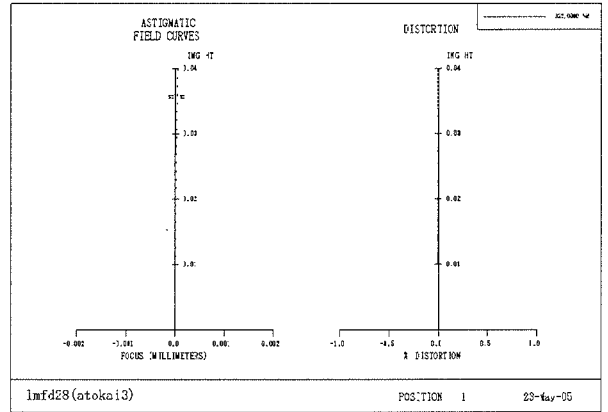


Fig. 7. Astigmatism and distortion of the objective lens.

対物レンズの MTF を Fig. 8 に示す。装置の分解能に十分な周波数特性をもっている。

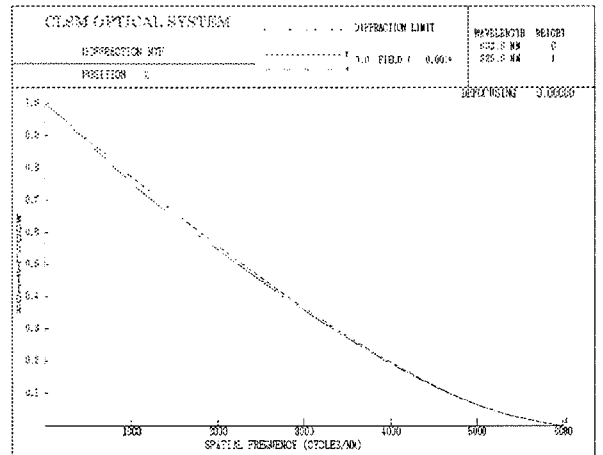


Fig. 8. Diffraction MTF of the objective lens.

光学系全体を通した収差特性を Fig. 9 に示す。無収差の性能が得られている。

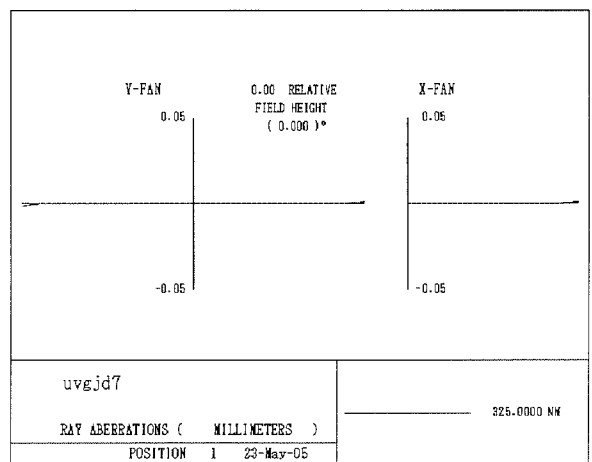


Fig. 9. Ray aberrations of the optical system.

光学系全体を通した受光光学系のスポットダイアグラムを Fig. 10 に示す。全走査範囲において RMS16 $\mu$ m の集光径が得られている。

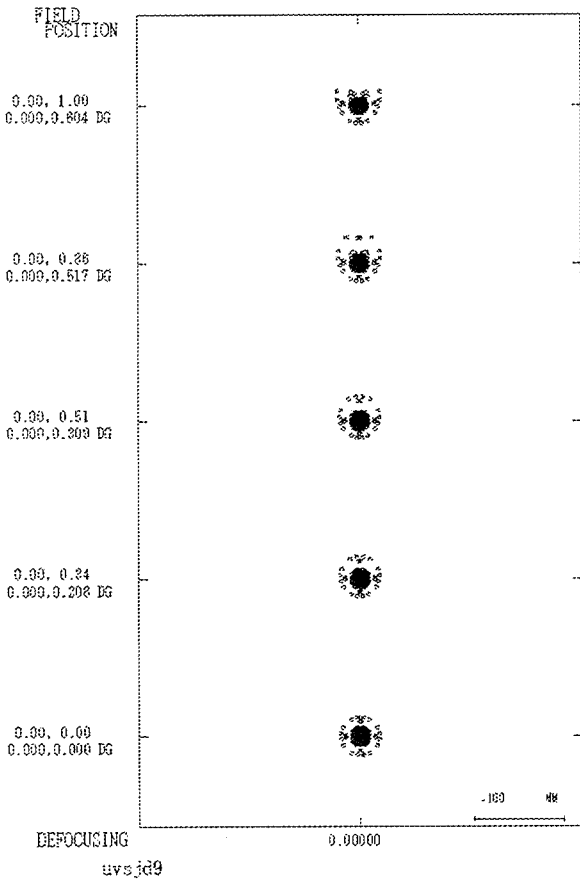


Fig. 10. Spot diagram of the optical system.

光学系全体の設計結果を Table 5. に示す。面内分解能 157nm、面外分解能 86nm が得られた。この性能は設計目標を十分に達成している。

Specification of the System	
Wavelength	: UV 325.0nm (He-Cd Laser) VIS 632.8nm (He-Ne Laser)
Scanning Area	: 50 $\mu$ m x 50 $\mu$ m
Spacial Resolution	: 157nm @325.0nm 306nm @632.8nm
Vertical Resolution	: 86nm @325.0nm 167nm @632.8nm

Table 5. Design result of the optical system specification.

## 5. 装置試作

光学設計にもとづき、装置を試作した。装置全体の外観を Fig. 11 に示す。

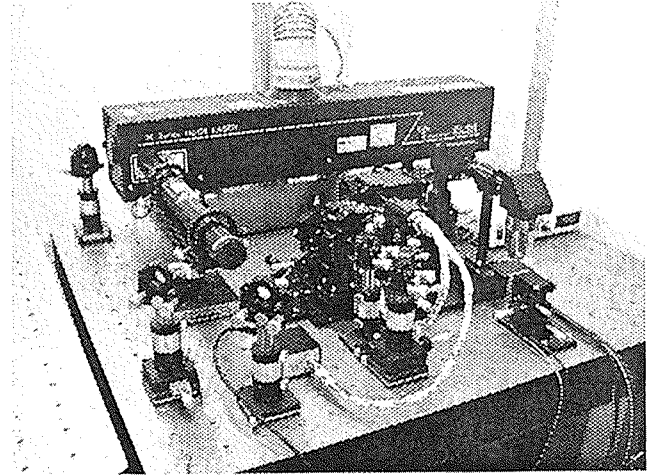


Fig. 11. System view of the fabricated CLSM system.

装置の性能を確認するために、数種類の標準試料の幾何形状を測定した。溝本数 150 本/mm の一般的な回折格子を計測した結果を Fig. 12 に示す。回折格子の山を観察し、そのピッチは 6.66 $\mu$ m と計測され良好な結果を得た。

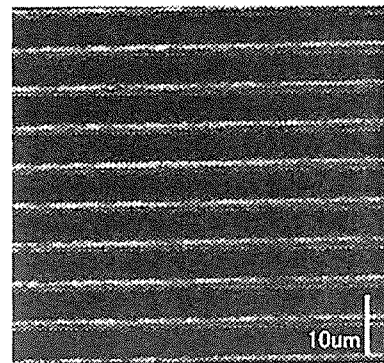


Fig. 12. CLSM image of diffraction grating with the groove of 150 lines/mm.

## 6. 応用計測

### 6. 1 フォトドーピング材料

試作装置性能の初期評価のために、最新の光材料（ナノ粒子、フォトドーピング材料、マイクロレンズアレイ等）を測定し、興味ある結果が得られた。

325nm の紫外線レーザーを用いた Ag:GeS<sub>2</sub> アモルファス中におけるフォトドーピング効果を観察した結果を Fig. 13 に示す<sup>3,4)</sup>。フォトドーピング効果は As<sub>2</sub>S<sub>3</sub> and GeS<sub>2</sub> のようなアモルファスカルコゲナイドフィルムの中で生じる。それは、カルコゲナイドの吸収端近くの光子エネルギーをもった光を照射する事

によって、カルコゲナイドフィルム上に堆積した Ag 層がカルコゲナイド層内に異常拡散する現象です。異常拡散とは Ag 原子のステップ状の拡散で、ドーパされた原子密度が指数関数的に減少する通常の拡散と異なる。ドーパされた領域を可視レーザー顕微鏡によって精細に観察した。この実験によって、紫外レーザー光を用いてドーパ領域のマイクロ操作が可能であるという、興味深い効果が発見された。紫外レーザービームをスキャニングしてサブミクロンオーダーの任意の微細なドーピングパターンが得られる。これは新たなデバイス製造方法の可能性を秘めている。

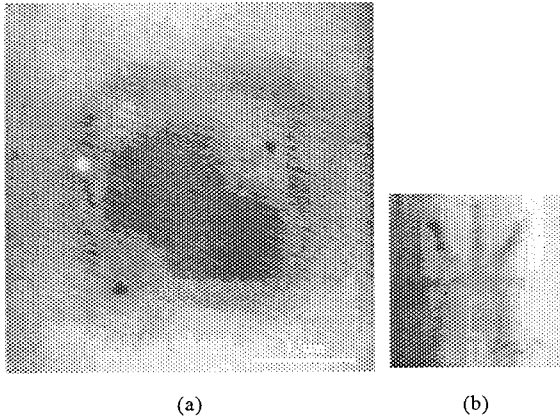


Fig. 13. CLSM image of photo doping sample in Ag:GeS<sub>2</sub> amorphous thin film. Square pattern (a) and Chinese character “光” were written by He-Cd laser and the images were read by He-Ne laser.

#### 6. 2 マイクロレンズアレイ

マイクロレンズアレイをレーザー顕微鏡で観察した結果を Fig.14 に示す<sup>56)</sup>。このマイクロレンズアレイはレーザープロセッシング法によって作られた。波長 10.6μm の CO<sub>2</sub> レーザービームを石英ガラス板に集光して照射すると、局所熔融により高品質のマイクロレンズ形状が形成される。各レンズ素子の直径は約 200 μm である。それぞれのレンズ表面の勾配と境界が観察できた。

これら 2 つの応用において加工中の計測が可能であり、要求する形状や品質を達成するためのプロセスコントロールに役立つことが大いに期待される。実験結果は、開発したレーザー顕微鏡の基本性能とその応用の可能性を実証した。

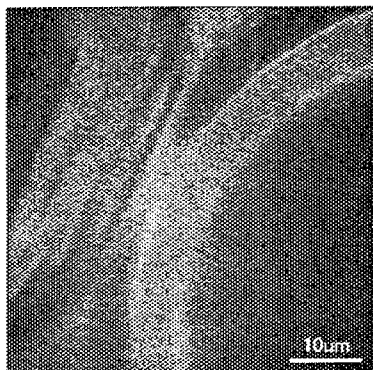


Fig. 14. CLSM image of micro lens array fabricated using CO<sub>2</sub> laser.

## 7. 結言

多機能共焦点レーザー走査顕微鏡開発の第一段階として、紫外と可視の光源を備えた高分解能共焦点レーザー走査顕微鏡を試作し、その機能と可能性を確認した。以下に本研究で得られたシステムの特徴を述べる。

- 1) 分解能向上のために、紫外光連続発振レーザーの中でも最も波長の短い He-Cd レーザー(波長 325nm)を光源として用いた。
- 2) 350nm 以下の波長で使用可能なレンズ材料の透過/蛍光特性を測定し、顕微鏡光学系に最適な材料を選定した。
- 3) 紫外波長と可視波長に最適化した高 NA 対物レンズを設計し、優れた結像性能を得た。
- 4) 設計した共焦点レーザー走査顕微鏡を試作し、基本性能を確認した。
- 5) 数種類の光学材料を測定し、興味深い結果が得られた。

基本機能とコンポーネントの完成が確認されたが、3次元画像構築と多機能化を含めたシステムとしては未完であるので、今後さらに開発を進めて、極短パルスレーザーと組み合わせた多機能計測の完成を目指している。この装置は、高調波発生、多光子励起、時間分解計測、蛍光顕微鏡等を目的とし、ナノ構造、フォトニック結晶、バイオロジー等の研究に役立つものと期待している。

## 参考文献

1. Davidovits P and Egger AMD: Nature, 223: 831, 1969; Appl Opt., 10 (1971) 1615.
2. Wilson T and Sheppard CJR: Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy, Academic, London, 1984
3. J. Lee, T. Ogawa, M. Wakaki, F. Uehara and T. Arai: Jpn. J. Appl. Phys., 33 (1994) 5865.
4. Y. Murakami, T. Ogawa, M. Wakaki and S. Kawabata: Jpn. J. Appl. Phys., 39 (2000) 509.
5. M. Wakaki, Y. Komachi and G. Kanai: Appl. Opt., 37 (1998) 627.
6. H. Murotani, M. Wakaki, S. Kawabata and K. Nakamoto: Laser Beam Shaping V, Proc. of SPIE, 5525 (2004) 226.