

結像光学系の3次元結像特性

Three-dimensional Imaging Characteristics in Imaging Optical Systems

生 田 孝

Takashi Ikuta

^a大阪電気通信大学工学部

要 旨 本講座では透過型光学顕微鏡を用いた結像実験の結果を示した上で、光学顕微鏡、電子顕微鏡に適用可能な結像光学系3次元結像特性の概念を述べる。これら実験結果は3次元光学的伝達関数(3D-OTF)を基にして解釈、議論される。最後に3次元結像特性の改善に向けて、照明・結像系の能動的な制御と逐次画像処理を用いた新しい結像手法を提案する。

キーワード：電子顕微鏡、光学顕微鏡、3次元結像理論、3次元結像特性、光学的伝達関数

1. はじめに

電子顕微鏡分野では長年にわたり対物レンズの球面収差低減が最大の技術的課題であったが、近年多極子レンズによる収差補正技術^{1,2)}が実用化され、サブロングストローム分解能への展開が期待されている。最新の収差補正器では、対物レンズ取込み半角 θ が数10 mrad程度の範囲まで波面収差補正が可能である³⁾。これを対物レンズの開口数(Numerical Aperture, $NA = \sin\theta$)に直すと、 $NA \sim 0.1$ のオーダーにかなり近づきつつある事を意味する。

一方、光学顕微鏡対物レンズでは古くより組み合わせレンズによる収差補正が実施されており、乾燥系対物レンズについて、 $0.9 \sim 0.95$ のNAが実現されている。光学顕微鏡では対物レンズNAの増加によって、分解能改善とともに焦点深度が急激に浅くなる事がよく知られている。この3次元結像特性により試料の3次元的观察が可能となっている。先に述べた、電子顕微鏡対物レンズのNAが急増していることに注目すると、今や電子顕微鏡においても光学顕微鏡と同様の3次元結像特性の議論を行うべき段階が来たように感じられる。

さて本講座では光学顕微鏡、電子顕微鏡を区別せず、結像光学系としての3次元光学的伝達関数(3D-OTF; 3D Optical Transfer Function)の定義と性質を最初に議論する。その上で、光学顕微鏡でのデフォーカスシリーズ観察実験の結果とそれらの3次元スペクトルを示す。引き続き、3次元光学的伝達関数(3D-OTF)の理論式を基に、観察実験結果の解釈を試みる。最後に照明・結像系の能動的な制御と逐次画像処理

を組み合わせた3次元結像特性の改善手法への発展について述べる。

2. 3次元光学的伝達関数の定義

通常の顕微鏡観察では、結像光学系のデフォーカス量 Δf をパラメーターとして2次元観察像強度分布のデフォーカスシリーズ $i(\mathbf{r}_{2D}, \Delta f) = i(x, y, \Delta f)$ を得る。ここで $\mathbf{r}_{2D} = (x, y)$ は試料面内の2次元座標である。しかしこの像強度分布を生じる原因となった観察試料の物理量(吸収、位相変化など)は必ずしも2次元分布とはかぎらない。一般的にこれを3次元試料関数 $f(\mathbf{r}) = f(x, y, z)$ と書く。座標系 $\mathbf{r} = (x, y, z)$ は試料に固定されているものとする。ここで z 軸は光軸であり、慣習に従って試料から見て結像レンズ側に正の向きを取る。試料をこのように3次元分布関数として取り扱うならば、2次元観察像強度 $i(\mathbf{r}_{2D}, \Delta f)$ もまた3次元化すべきである。デフォーカス Δf に対応する z 座標は、結像光学系近軸焦点面(Gauss面)の z 座標と見なせばよい。デフォーカス定義の慣習上の違いから、光学顕微鏡の分野では、通常 $z = \Delta f$ であるが、電子顕微鏡分野では $z = -\Delta f$ とする場合が多い。この対応関係を用いてデフォーカスシリーズ $i(\mathbf{r}_{2D}, \Delta f)$ を3次元観察像 $i(\mathbf{r}) = i(x, y, z)$ に書き換えるものとする。

3次元観察像 $i(\mathbf{r})$ と3次元試料関数 $f(\mathbf{r})$ の間に線形性がある場合(線形結像)には、3次元観察像 $i(\mathbf{r})$ は、 x, y, z に対する3次元コンボリューション記号、***を用いて、

$$i(\mathbf{r}) = g(\mathbf{r})***f(\mathbf{r}), \quad (1)$$

と書ける。 $g(\mathbf{r})$ は結像光学系の3次元点拡がり関数(3D-psf; 3D-Point Spread Function)と呼ばれる。よく知られた実空間とFourier空間の関係より、 $f(\mathbf{r}), i(\mathbf{r}), g(\mathbf{r})$ それぞれの3次元スペクトル、 $F(\mathbf{g}), I(\mathbf{g}), G(\mathbf{g})$ の間には、以下の関係、

^a 〒572-8530 寝屋川市初町18番8号
TEL: 072-825-4673
E-mail: ikuta@isc.osakac.ac.jp
2009年3月30日受付

$$I(\mathbf{g}) = G(\mathbf{g}) \cdot F(\mathbf{g}), \quad (2)$$

が成立する。上式で $\mathbf{g} = (u, v, w)$ は 3 次元空間周波数ベクトルである。 u, v, w をそれぞれ \mathbf{g} の x, y, z 方向成分とする。ここで面間隔 d の 3 次元平行縞の 3 次元空間周波数ベクトル \mathbf{g} は平行縞面の法線方向（前方、後方の 2 方向、 $\pm\mathbf{g}$ ）を向き、その絶対値は $|\pm\mathbf{g}| = 1/d$ である。この空間周波数定義を用いると、3 次元 Fourier 変換 $F_{3D}\{\}$ および逆変換 $F_{3D}^{-1}\{\}$ の定義式は、

$$F(\mathbf{g}) = F_{3D}\{f(\mathbf{r})\} = \iiint_{-\infty}^{\infty} f(\mathbf{r}) \cdot \exp(-i2\pi \cdot (\mathbf{g} \cdot \mathbf{r})) \cdot d\mathbf{r},$$

および、

$$f(\mathbf{r}) = F_{3D}^{-1}\{F(\mathbf{g})\} = \iiint_{-\infty}^{\infty} F(\mathbf{g}) \cdot \exp(i2\pi \cdot (\mathbf{g} \cdot \mathbf{r})) \cdot d\mathbf{g}, \quad (3)$$

となる。

3 次元点拡がり関数 $\mathbf{g}(\mathbf{r})$ の 3 次元スペクトル $G(\mathbf{g}) = F_{3D}\{\mathbf{g}(\mathbf{r})\}$ は、結像光学系の 3 次元光学的伝達関数 (3D-OTF; 3D Optical Transfer Function) と呼ばれ、試料の 3 次元スペクトル情報 (3 次元空間周波数情報) が 3 次元観測像にどう伝達されるかを複素数で表現するものである。ここで (2) 式を実空間の観測像 $i(\mathbf{r})$ にもどすと、

$$\begin{aligned} i(\mathbf{r}) &= F_{3D}^{-1}\{I(\mathbf{g})\} = \iiint_{-\infty}^{\infty} F(\mathbf{g}) \cdot G(\mathbf{g}) \cdot \exp(i2\pi \cdot (\mathbf{g} \cdot \mathbf{r})) \cdot d\mathbf{g}, \\ &= \iiint_{-\infty}^{\infty} \left\{ \int_{-\infty}^{\infty} F(\mathbf{g}) \cdot G(\mathbf{g}) \cdot \exp(i2\pi \cdot \mathbf{w} \cdot z) \cdot d\mathbf{w} \right\} \\ &\quad \cdot \exp(i2\pi \cdot (\mathbf{g}_{2D} \cdot \mathbf{r}_{2D})) \cdot d\mathbf{g}_{2D}, \end{aligned} \quad (4)$$

となる。 w に関する 1 次元 Fourier 変換は、位置 z での像 2 次元スペクトル、 $I(\mathbf{g}_{2D}, z)$ であり、

$$I(\mathbf{g}_{2D}, z) = \int_{-\infty}^{\infty} F(\mathbf{g}) \cdot G(\mathbf{g}) \cdot \exp(i2\pi \cdot \mathbf{w} \cdot z) \cdot d\mathbf{w}, \quad (5)$$

で求められる。

さて試料がごく薄く、 $z = 0$ に位置する場合には、デルタ関数を用いて、3 次元試料関数 $f(\mathbf{r})$ を $\delta(z) \cdot f_{2D}(\mathbf{r}_{2D})$ で置き換える。

この時、3 次元試料関数のスペクトル $F(\mathbf{g})$ は、 w に依存せず、 $F(\mathbf{g}) = F_{2D}(\mathbf{g}_{2D})$ と書けるようになる。ここで $F_{2D}(\mathbf{g}_{2D})$ は 2 次元試料関数 $f_{2D}(\mathbf{r}_{2D})$ の 2 次元スペクトルである。これにより上式の、位置 z での観測像の 2 次元スペクトルを求める積分は、 $F_{2D}(\mathbf{g}_{2D})$ を積分外に出して、以下のように書きなおせる。すなわち、

$$\begin{aligned} I(\mathbf{g}_{2D}, z) &= \int_{-\infty}^{\infty} F_{2D}(\mathbf{g}_{2D}) \cdot G(\mathbf{g}) \cdot \exp(i2\pi \cdot \mathbf{w} \cdot z) \cdot d\mathbf{w} \\ &= F_{2D}(\mathbf{g}_{2D}) \cdot G(\mathbf{g}_{2D}, z). \end{aligned} \quad (6)$$

ここで、 $G(\mathbf{g}_{2D}, z)$ は位置 z (ごく薄い試料ではデフォーカスに対応) をパラメーターとする、通常の意味での 2 次元光学的伝達関数 (2D-OTF) であり、3D-OTF、 $G(\mathbf{g})$ を用いて、

$$G(\mathbf{g}_{2D}, z) = \int_{-\infty}^{\infty} G(\mathbf{g}) \cdot \exp(i2\pi \cdot \mathbf{w} \cdot z) \cdot d\mathbf{w}, \quad (7)$$

与えられる。これによりごく薄い試料の場合、インフォーカス ($z = 0$) での 2D-OTF は、3D-OTF の w 軸方向への投影積分である事が判る。

画像処理の分野では 2 次元スペクトルを用いた 2 次元 Fourier 空間上での画像処理が広く行われている。このような画像処理の延長として 3 次元 Fourier 空間での画像処理を考えてみよう。図 1 には 3 次元試料関数 $f(\mathbf{r})$ とその 3 次元スペクトル $F(\mathbf{g})$ の対応に加えて、典型的な 3 次元フィルタリング処理である、 w 軸 (光軸方向空間周波数) へのローパスフィルターの適用結果を模式的に示した。 uv 面近傍のみのスペクトルを残すように w 軸方向にローパスフィルターを適用する。これにより uv 面上に残留する 3 次元空間周波数情報はそれらの \mathbf{g} ベクトルが光軸に直交することから、すべて光軸に平行な 3 次元平行縞のみで構成され、焦点深度が拡大される。結果的にローパスフィルター通過帯域の逆数に比例して焦点深度が拡大された 3 次元像に変換される。この方法はすでに 1970 年代に光学顕微鏡において行われており、Häusler による焦点深度拡大処理⁴⁾としてよく知られている。ここで w 軸方向のローパスフィルターは 3 次元空間周波数

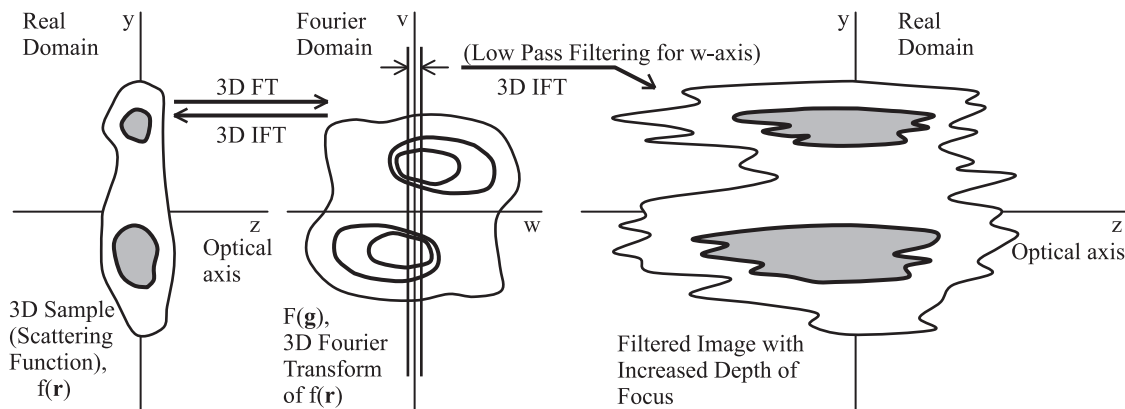


図 1 3 次元試料関数 $f(\mathbf{r})$ とその 3 次元スペクトル $F(\mathbf{g})$ の対応、ならびに w 軸 (光軸方向空間周波数) へのローパスフィルターの適用結果。ローパスフィルター通過帯域の逆数に比例して焦点深度が拡大された 3 次元像に変換される。

空間で実施せずとも、Häusler が行ったように単にデフォーカスを変化させ、画像の積算を取るのみで（実空間で）実行可能である。さらにこの状況は色収差を含む結像光学系で自然に生じていることに注目されたい。

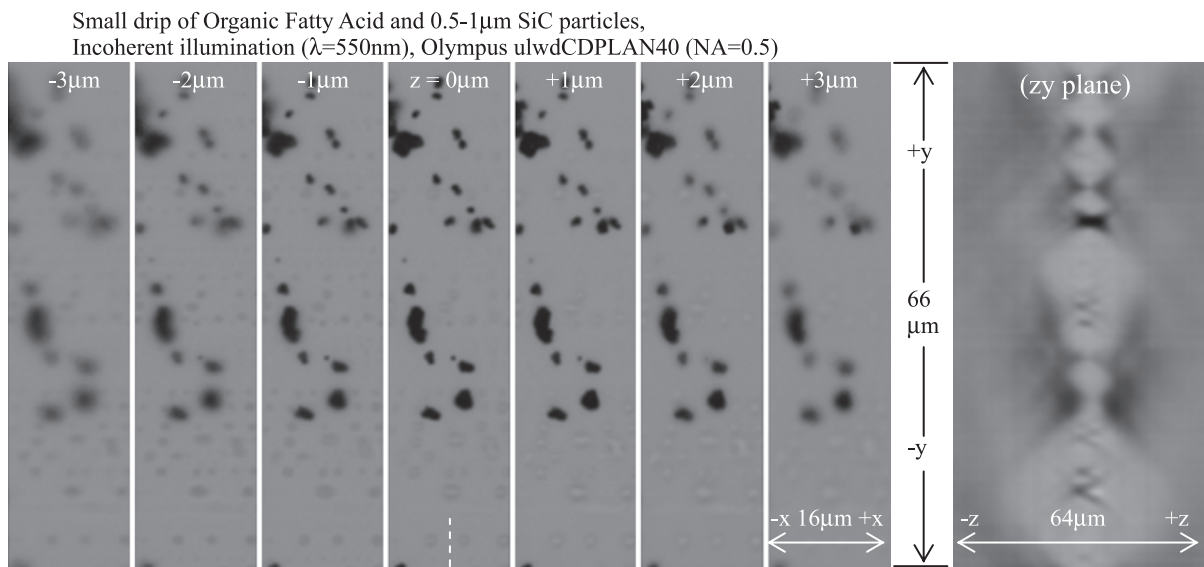
光学顕微鏡であれ、電子顕微鏡であれ、3次元光学的伝達関数 3D-OTF は、照明条件と結像光学系開口数および波面収差関数、さらには試料そのもの（何を試料関数に選ぶか）によって大きく変化する。以下では光学顕微鏡を用いた3次元像観察実験の例を示してこの状況を説明する。

3. 3次元結像観察実験

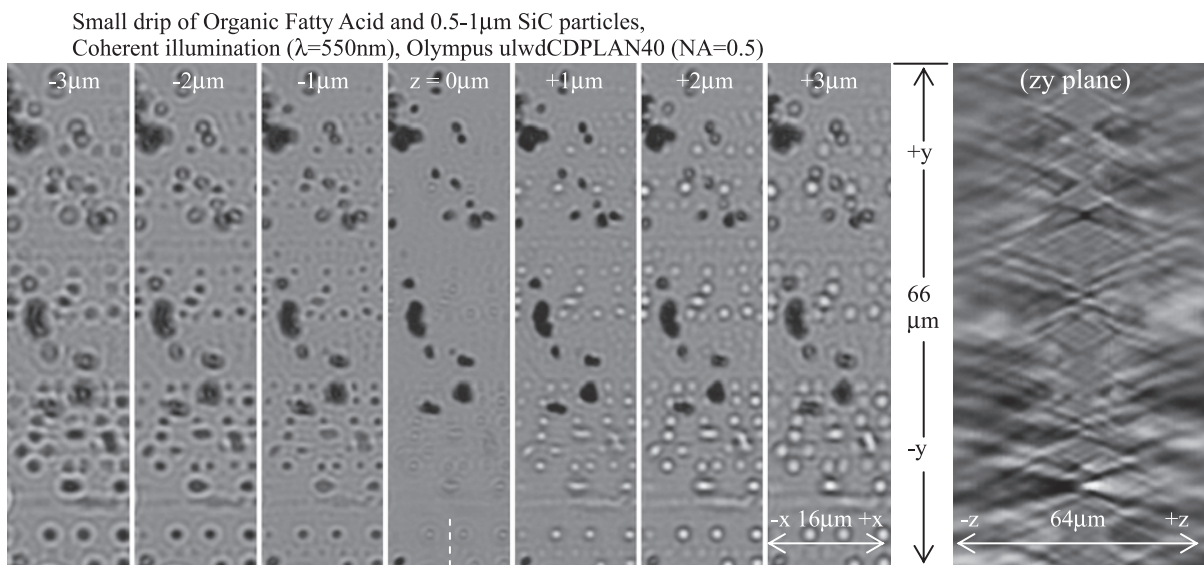
光学顕微鏡による3次元結像の観察例（試料面内観察像と、

光軸に平行な断面像）を図2に示した。試料は、スライドガラス上に付着した有機脂肪酸のマイクロオーダー液滴（単なる指紋であるが、位相物体と見なせる）と、0.5–1 μm の SiC 粉末（振幅（吸収）物体と見なせる）である。対物レンズは、開口数 NA = 0.5 の Olympus ulwdCDPLAN40 であって、補正環によりほぼ球面収差 0 に調整してある。また光源波長 λ は約 550 nm である。

光学顕微鏡であれ電子顕微鏡であれ結像光学系の結像特性は照明光の空間的コヒーレンスに大きく左右される。まず図2 (a) は対物レンズの瞳全域を照明するインコヒーレント照明でのデフォーカスシリーズである。位相物体と見なせる有機脂肪酸液滴のコントラストはごくわずかしか現れてい



(a) Defocus series for microscope images under incoherent illumination



(b) Defocus series for microscope images under coherent illumination

図2 スライドガラス上に付着した有機脂肪酸のマイクロオーダー液滴と、0.5–1 μm の SiC 粉末の光学顕微鏡による3次元結像の観察例 (a) インコヒーレント照明でのデフォーカスシリーズ、(b) ほぼ垂直コヒーレント照明（照明系 NA ~ 0.02）でのデフォーカスシリーズ。

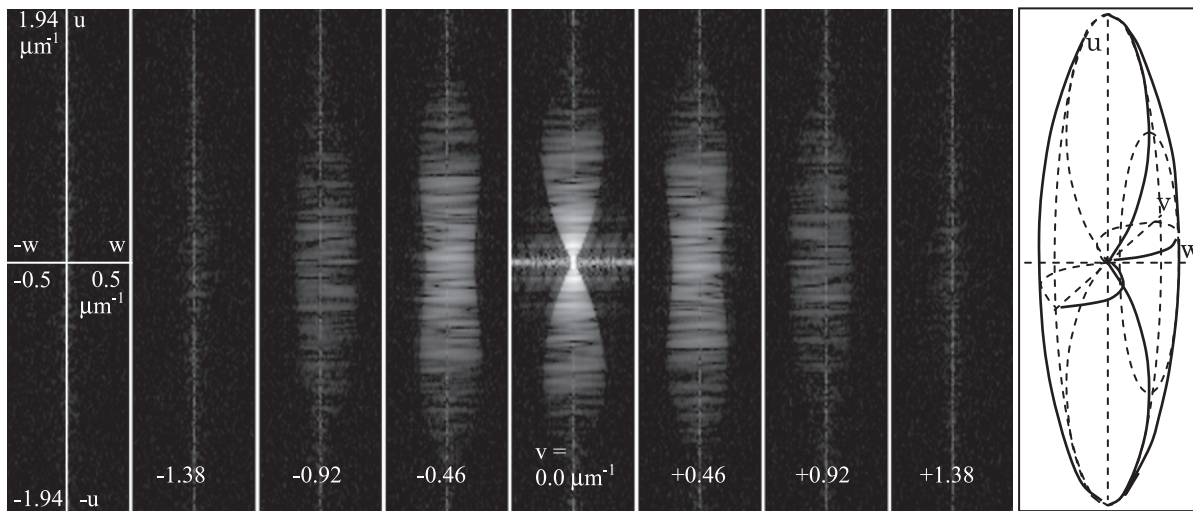
ないが、振幅物体である SiC 粉末のコントラストは黒く明瞭で、デフォーカスの変化と共にインフォーカス前後で対称にぼけが生じている。zy 平面（光軸に平行な断面）での観察像では、スライドガラス面上で y 軸方向に並んだ一つ一つの SiC 粒子が 3 次元的に拡がって観察され、3 次元点拡がり関数に対応している状況が判る。

一方図 2 (b) は、ほぼ垂直コヒーレント照明（照明系開口数 NA ~ 0.02）でのデフォーカスシリーズである。インフォーカスでは主として振幅物体のコントラストが観察されるが、その前後では位相物体のコントラストも強く現れている。ここで位相物体のコントラスト変化はインフォーカス前後で黒から白に変化するのに対し、振幅物体のコントラスト

は対称的に変化している。これらの結果は振幅（吸収）物体と位相物体では 3 次元点拡がり関数が異なり、異なった 3 次元光学的伝達関数 3D-OTF が対応する事を示唆している。

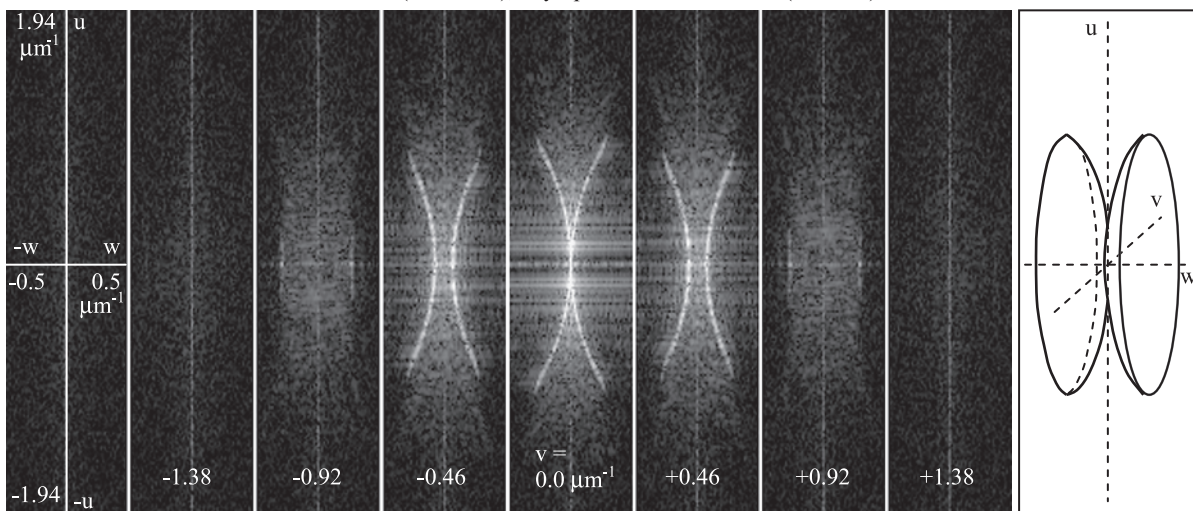
図 3 (a) には、図 2 (a) のインコヒーレント照明時観察像の 3 次元スペクトル（対数圧縮したパワースペクトル）を表示した。一つ一つは wu 断面（zx 面に対応）であり、異なった v 値（y 方向空間周波数）を持つ。v=0 の wu 断面は回転中心の断面である。SiC 粉末はかなり小さくその 3 次元試料関数のスペクトル $F(\mathbf{g})$ は全方向の \mathbf{g} に対し、高い空間周波数まで値を有している。観察像の 3 次元スペクトルが $I(\mathbf{g}) = F(\mathbf{g}) \cdot G(\mathbf{g})$ で与えられることを考えると、インコヒーレント照明時の 3D-OTF, $G(\mathbf{g})$ は、w 軸に突き刺さった、中央

Small drip of Organic Fatty Acid and 0.5-1 μm SiC particles,
Incoherent illumination ($\lambda=550\text{nm}$), Olympus ulwdCDPLAN40 (NA=0.5)



(a) 3D spectra of defocus series for microscope images under incoherent illumination

Small drip of Organic Fatty Acid and 0.5-1 μm SiC particles,
Coherent illumination ($\lambda=550\text{nm}$), Olympus ulwdCDPLAN40 (NA=0.5)



(b) 3D spectra of defocus series for microscope images under coherent illumination

図 3 図 2 のデフォーカスシリーズの 3 次元スペクトル（パワースペクトルを対数圧縮して輝度表示）；(a) インコヒーレント照明でのデフォーカスシリーズ・パワースペクトル，(b) ほぼコヒーレント照明でのデフォーカスシリーズ・パワースペクトル。

部が閉じた浮き輪状の領域外では急激に0となって情報伝達の切断が起きているように見える。

3D-OTF 伝達域の w 方向 (光軸 z 方向空間周波数) の幅は、試料面内空間周波数 $\mathbf{g}_{2D} = (u, v)$ がほぼ NA/λ になる $0.9\text{--}1.0\ \mu\text{m}^{-1}$ 付近で最大となり、およそ $-0.25\ \mu\text{m}^{-1} < w < +0.25\ \mu\text{m}^{-1}$ の範囲を通過させている事が判る。面内空間周波数が0に近づくと、 w 方向の通過帯域も0に近づく。面内空間周波数が低い領域では、焦点深度は深くなり、面内空間周波数が NA/λ になるあたりで焦点深度は最も浅くなる。さらに面内空間周波数が高くなると、焦点深度は逆に深くなっていく。図3(a)の3次元パワースペクトルからは明確ではないが、面内空間周波数が $2 \cdot NA/\lambda$ に近づくと、 w 方向通過帯域は0に近づいていくように見える。

更に垂直コヒーレント照明の場合についても、図3(b)に観察像の3次元パワースペクトルを示した。特に $v=0$ の回転中心の wu 断面では、原点で接する2つの円弧上に強いパワースペクトルが観察される。3次元的に見れば、原点で w 軸に突き刺さった2つのお椀の面以外では $G(\mathbf{g})$ が0となって、大きな3次元情報欠落が生じている。これら2つのお椀は後で判るように回折理論で言うところのEwald球に対応している。インコヒーレント照明時の中央部が閉じた浮き輪状の領域もまたこれらのお椀から求められる。試料面内 (uv 面) での最大通過空間周波数はコヒーレントカットオフと呼ばれるが、この実験では NA/λ に近い、 $0.9\text{--}1.0\ \mu\text{m}^{-1}$ 程度である。またコヒーレントカットオフでのEwald球殻の w 値は、ほぼ $\pm 0.25\ \mu\text{m}^{-1}$ になる。これらはインコヒーレント照明時の w 方向カットオフ値と対応している。

垂直コヒーレント照明時の3次元パワースペクトルには、2つのEwald球のお椀面上以外にも、お椀の間や周囲に弱いパワースペクトルのハローが観察される。これらのハローは試料からの散乱が増えるにつれ、急激に強度を増し、インコヒーレント照明時の3次元パワースペクトルと同様の外形を持つようになる。以下、図2, 3の実験結果を説明できる3次元結像理論⁵⁾を紹介する。詳細については著者による総合報告⁶⁾なども御参照頂きたい。

4. コヒーレント照明時の結像光学系3次元光学的伝達関数

これまでの議論では観察の対象となる試料関数の物理量を不明確にしたまま取り扱った。顕微鏡の結像特性を議論するにはこれを明確にする必要がある。透過型顕微鏡において観察の対象たる物理量としては、用いる照明波に対し観察可能なコントラストを生じることが前提であり、試料の強度透過率や振幅透過率を用いることが多い。生物試料などについては位相変化も観察の対象とするので、より一般的に試料の複素透過率を考える事にする。

ごく薄い試料の2次元複素透過率 $f_{2D}(\mathbf{r}_{2D})$ は、試料前面位置 $z=0_-$ での照明波の時間 t を含む波動関数 $\varphi_0(\mathbf{r}_{2D}, z=0_-, t)$ と透過後試料後面位置 $z=0_+$ での透過波の波動関数 $\varphi_t(\mathbf{r}_{2D}, z=0_+, t)$ により、

$$\varphi_t(\mathbf{r}_{2D}, z=0_+, t) = f_{2D}(\mathbf{r}_{2D}) \cdot \varphi_0(\mathbf{r}_{2D}, z=0_-, t), \quad (8)$$

で定義される。照明波として振幅1、波長 λ 、振動数 (周波数) f 、波数ベクトル \mathbf{k}_0 の平面波を用い、 $f_{2D}(\mathbf{r}_{2D})$ を2次元 Fourier 変換で表現すると、

$$\begin{aligned} \varphi_t(\mathbf{r}_{2D}, z=0_+, t) &= f_{2D}(\mathbf{r}_{2D}) \cdot \exp(i2\pi(\mathbf{k}_{0,2D} \cdot \mathbf{r}_{2D} - ft)), \\ &= \iint_{-\infty}^{\infty} \{F_{2D}(\mathbf{g}_{2D}) \cdot \exp(i2\pi((\mathbf{k}_{0,2D} + \mathbf{g}_{2D}) \cdot \mathbf{r}_{2D}) - ft)\} \cdot d\mathbf{g}_{2D}, \end{aligned} \quad (9)$$

である。ここで、 $\mathbf{k}_{0,2D}$ は \mathbf{k}_0 の試料面内成分である。また波数ベクトルに 2π を含まない定義を用いたので、 $|\mathbf{k}_0| = 1/\lambda$ になる。さて上式で表される試料後面での2次元波動関数の波数ベクトル $\mathbf{k}_{0,2D} + \mathbf{g}_{2D}$ には w 成分が追加され、後方に伝搬する散乱波 (回折波) \mathbf{k}_s となる。

上式ではごく薄い2次元試料を仮定したが、弱散乱の仮定の下で、厚みのある3次元試料に拡張してみたい。3次元試料を多数のごく薄い切片にスライスすれば z 座標の異なる個々の切片で複素透過率 $f_{2D}(\mathbf{r}_{2D}, z)$ が定義できるが、これらの値はほぼ1であり切片を通過する際の振幅と位相に対応する微小変化量がそれぞれ実部、虚部として加算される形である。これらの変化量を単位長さあたりに換算し、3次元複素散乱関数 $\mathbf{f}(\mathbf{r})$ と見なす。さらに直接透過波を考慮する為、 $\mathbf{f}(\mathbf{r})$ の3次元スペクトル $\mathbf{F}(\mathbf{g})$ について、 $\mathbf{g}=0$ の近傍では直接透過波の複素振幅に対応したデルタ関数とする。観察試料が吸収のない弱位相物体であれば、 $\mathbf{f}(\mathbf{r})$ 中の直流成分を除いた変動成分 ($\mathbf{g} \neq 0$) については虚数部のみが残り実数部は0となる。逆に弱振幅物体であれば、実数部のみが残り虚数部は0となる。

さて上記複素散乱関数 $\mathbf{f}(\mathbf{r})$ の3次元スペクトル $\mathbf{F}(\mathbf{g})$ を用いると、弱散乱仮定 (Born 近似) の下で、(9) 式の $F_{2D}(\mathbf{g}_{2D})$ を3次元スペクトル $\mathbf{F}(\mathbf{g})$ で置き換え、エネルギー保存条件、 $1/\lambda = |\mathbf{k}_0| = |\mathbf{k}_0 + \mathbf{g}|$ に対応するデルタ関数、 $\delta(|\mathbf{k}_0 + \mathbf{g}| - 1/\lambda)$ を導入する事で、 \mathbf{g} に対する3次元積分の形で後方伝搬波の波動関数 $\varphi_t(\mathbf{r}, t)$ が表現できる。すなわち、

$$\varphi_t(\mathbf{r}, t) = \iiint_{\text{allg}} \delta(|\mathbf{k}_0 + \mathbf{g}| - 1/\lambda) \cdot \mathbf{F}(\mathbf{g}) \cdot \exp(i2\pi((\mathbf{k}_0 + \mathbf{g}) \cdot \mathbf{r} - ft)) \cdot d\mathbf{g}, \quad (10)$$

となり、Bragg 回折波 $\mathbf{k}_s = \mathbf{k}_0 + \mathbf{g}$ が、 $\delta(|\mathbf{k}_0 + \mathbf{g}| - 1/\lambda) \cdot \mathbf{F}(\mathbf{g})$ の複素振幅で生じる事を表している。

弱散乱試料では、直接透過波 \mathbf{k}_0 の振幅 a_0 は1に近く、試料後面に出来る直接透過波と多数の回折波との間に形成される不動の3次元干渉縞 $\pm \mathbf{g} = \pm(\mathbf{k}_s - \mathbf{k}_0)$ として試料の空間周波数情報が伝達される。しかし回折波 $\mathbf{k}_s = \mathbf{k}_0 + \mathbf{g}$ がEwald球に乗らず、Bragg 回折条件を満たさねば、3次元空間周波数情報は一切観測できない。コヒーレント照明では、結像光学系を通る以前に3次元的に見て大幅な空間周波数情報の欠落が生じている事に注目されたい。

我々が像を観察する場合には、試料透過後の3次元伝搬波を、結像光学系を通して結像光学系の後ろに配置されたスクリーンに投影する。結像光学系の役割は、直接透過波 \mathbf{k}_0 と

回折波 $\mathbf{k}_s = \mathbf{k}_0 + \mathbf{g}$ を再度、試料面と共役なスクリーン面上で干渉させる所にある。結像光学系では、直接透過波と回折波は光学系瞳による通過制限（瞳切断）を受けると共に、通過出来た波については結像光学系の波面収差関数による位相変化を被る。図4に示すように進行方向が \mathbf{k}_0' ならびに \mathbf{k}_s' に変わった直接透過波と回折波は、スクリーン面近傍で干渉し、3次元干渉縞 $\mathbf{k}_s' - \mathbf{k}_0'$ を形成する。直接透過波もしくは回折波、あるいは両者が瞳切断により結像光学系を通過できなかった時、3次元干渉縞は形成されず、その元になった試料の3次元空間周波数情報も観測される事は無い。

結像光学系の瞳制限と波面収差関数の影響は本来、結像光学系通過後の3次元干渉縞に生じるものであるが、「試料近傍における見かけの3次元干渉縞」を考える場合には、これらが試料後方に伝搬する際にあらかじめ考慮しておく。試料後面から射出された波数ベクトル $\mathbf{k} (|\mathbf{k}| = 1/\lambda)$ の平面波について、結像光学系の複素伝達特性 $H(\mathbf{k})$ を、 $H(\mathbf{k}) = 1 \cdot \exp(-i\gamma(\mathbf{k}))$ (\mathbf{k} ; 瞳内), および、 $H(\mathbf{k}) = 0$ (\mathbf{k} ; 瞳外) とすれば、3次元化された試料後方伝搬波動をあらわす(10)式は、見かけの上で、

$$\varphi_t(\mathbf{r}, t) = \iiint_{\text{allg}} H(\mathbf{k}_0 + \mathbf{g}) \cdot \delta(|\mathbf{k}_0 + \mathbf{g} - 1/\lambda|) \cdot F(\mathbf{g}) \cdot \exp(i2\pi \cdot ((\mathbf{k}_0 + \mathbf{g}) \cdot \mathbf{r} - ft)) \cdot d\mathbf{g}, \quad (11)$$

と書ける。この表現は結像光学系を通して見た「みかけの」伝搬波である事に注意する必要がある。これで試料を含め3次元化された試料後方伝搬波動の式が得られた。

2次元複素透過率 $f_{2D}(\mathbf{r}_{2D})$ を拡張した、試料の3次元複素散乱関数 $f(\mathbf{r})$ は、実数部関数 $f_r(\mathbf{r})$ と虚数部関数 $f_i(\mathbf{r})$ により、 $f(\mathbf{r}) = f_r(\mathbf{r}) + i \cdot f_i(\mathbf{r})$ と書ける。ここで $f_r(\mathbf{r})$, $f_i(\mathbf{r})$ は共に実数関数であり、対応する3次元スペクトル、 $F_R(\mathbf{g})$, $F_I(\mathbf{g})$ を用いて、 $F(\mathbf{g}) = F_R(\mathbf{g}) + i \cdot F_I(\mathbf{g})$ となる。

後方伝搬波動を表す(11)式を、 $F(\mathbf{g})$ について $f_r(\mathbf{r})$ に対応する $F_R(\mathbf{g})$, $f_i(\mathbf{r})$ に対応する $F_I(\mathbf{g})$ に分離し、かつ弱散乱の仮定に従い $\mathbf{g} = 0$ の直接透過波の複素振幅をコヒーレント照明波 \mathbf{k}_0 の関数として、特別に $a_0(\mathbf{k}_0)$ と書けば、上式は、

$$\varphi_t(\mathbf{r}, t) = a_0(\mathbf{k}_0) \cdot H(\mathbf{k}_0) \cdot \exp(i2\pi \cdot (\mathbf{k}_0 \cdot \mathbf{r} - ft)) + \iiint_{\mathbf{g} \neq 0} \delta(|\mathbf{k}_0 + \mathbf{g} - 1/\lambda|) \cdot \{F_R(\mathbf{g}) + i \cdot F_I(\mathbf{g})\} \cdot \exp(i2\pi \cdot ((\mathbf{k}_0 + \mathbf{g}) \cdot \mathbf{r} - ft)) \cdot d\mathbf{g}, \quad (12)$$

となる。これら「みかけの」試料後方伝搬波を強度 $i(\mathbf{r}, \mathbf{k}_0) = \varphi_t(\mathbf{r}, t) \cdot \varphi_t^*(\mathbf{r}, t)$ に直すことで、「みかけの」3次元観察像が得られる。積分変数の変換と、 $F_R(\mathbf{g})$ と $F_I(\mathbf{g})$ の \mathbf{g} に対する対称関係を利用して書き直せば、 $i(\mathbf{r}, \mathbf{k}_0)$ は、位置に依存しない背景強度 $i_{bg}(\mathbf{k}_0)$ と、線形結像成分 $i_{lin}(\mathbf{r}, \mathbf{k}_0)$ ならびに非線形結像成分 $i_{non-lin}(\mathbf{r}, \mathbf{k}_0)$ の和として求められる。 $i_{bg}(\mathbf{k}_0)$ を除いて、 $i_{lin}(\mathbf{r}, \mathbf{k}_0)$ は、

$$i_{lin}(\mathbf{r}, \mathbf{k}_0) = \iiint_{\mathbf{g} \neq 0} \{G_R(\mathbf{g}, \mathbf{k}_0) \cdot F_R(\mathbf{g}) + G_I(\mathbf{g}, \mathbf{k}_0) \cdot F_I(\mathbf{g})\} \cdot \exp(i2\pi \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{r}) \cdot d\mathbf{g}, \quad (13)$$

と Fourier 逆変換で表現できる。像強度 $i_{lin}(\mathbf{r}, \mathbf{k}_0)$ は、試料3次元複素散乱関数 $f(\mathbf{g})$ の実数部 $f_r(\mathbf{g})$, 虚数部 $f_i(\mathbf{g})$ に対して線形であり、それぞれ独立した3次元光学的伝達関数(3D-OTF), $G_R(\mathbf{g}, \mathbf{k}_0)$ および $G_I(\mathbf{g}, \mathbf{k}_0)$ を持っている。これらは、コヒーレント照明波 \mathbf{k}_0 の関数として、

$$G_R(\mathbf{g}, \mathbf{k}_0) = \delta(|\mathbf{k}_0 - \mathbf{g} - 1/\lambda|) \cdot (+1) \cdot a_0(\mathbf{k}_0) \cdot H(\mathbf{k}_0) \cdot H^*(\mathbf{k}_0 - \mathbf{g}) + \delta(|\mathbf{k}_0 + \mathbf{g} - 1/\lambda|) \cdot (+1) \cdot a_0^*(\mathbf{k}_0) \cdot H^*(\mathbf{k}_0) \cdot H(\mathbf{k}_0 + \mathbf{g}), \quad (14)$$

および、

$$G_I(\mathbf{g}, \mathbf{k}_0) = \delta(|\mathbf{k}_0 - \mathbf{g} - 1/\lambda|) \cdot (-i) \cdot a_0(\mathbf{k}_0) \cdot H(\mathbf{k}_0) \cdot H^*(\mathbf{k}_0 - \mathbf{g}) + \delta(|\mathbf{k}_0 + \mathbf{g} - 1/\lambda|) \cdot (+i) \cdot a_0^*(\mathbf{k}_0) \cdot H^*(\mathbf{k}_0) \cdot H(\mathbf{k}_0 + \mathbf{g}), \quad (15)$$

で与えられる。上2式の3D-OTFは3次元観察像の \mathbf{g} ベクトルが取り得る範囲を規定する。

図5に任意の照明波 \mathbf{k}_0 の下での $G_R(\mathbf{g}, \mathbf{k}_0)$ および $G_I(\mathbf{g}, \mathbf{k}_0)$ の概形と OTF 値を示した。入射方向に沿った原点で相接する2つの Ewald 球、 $\delta(|\mathbf{k}_0 + \mathbf{g} - 1/\lambda|)$ および $\delta(|\mathbf{k}_0 - \mathbf{g} - 1/\lambda|)$ の上で、かつ瞳切断、 $H^*(\mathbf{k}_0) \cdot H(\mathbf{k}_0 + \mathbf{g})$ および $H(\mathbf{k}_0) \cdot H^*(\mathbf{k}_0 - \mathbf{g})$ を受

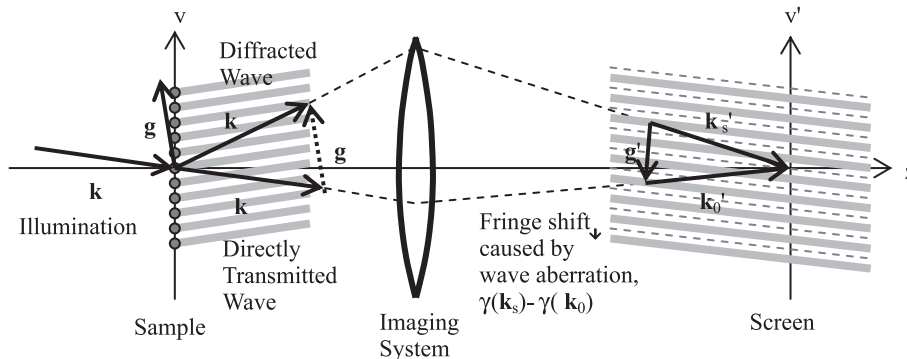


図4 振幅格子によって発生した回折波 $\mathbf{k}_s = \mathbf{k}_0 + \mathbf{g}$ と直接透過波 \mathbf{k}_0 が試料後面に作る3次元干渉縞と、結像光学系を通過し、進行方向が \mathbf{k}_0' ならびに \mathbf{k}_s' に変わった回折波と直接透過波が、スクリーン面近傍で再度干渉し、3次元干渉縞 $\mathbf{g}' = (\mathbf{k}_s' - \mathbf{k}_0')$ を形成する様子。

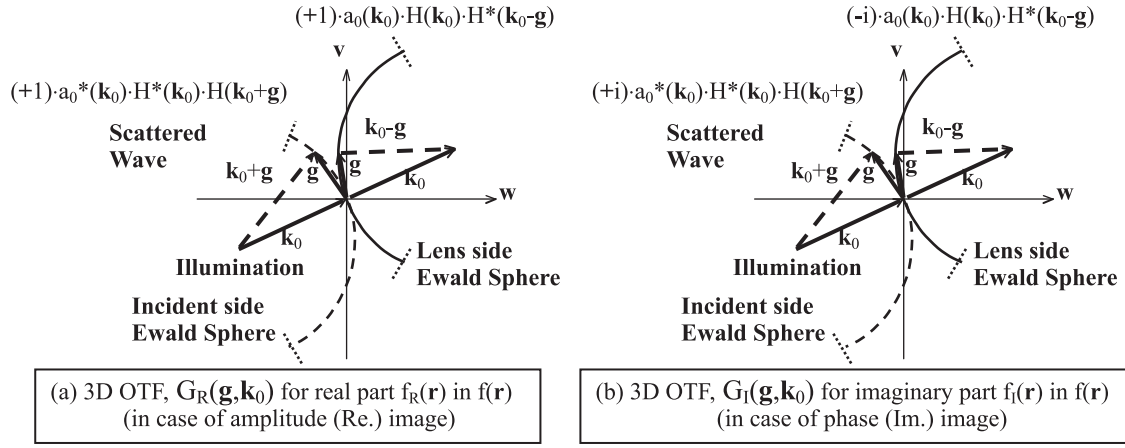


図5 コヒーレント照明 \mathbf{k}_0 の下での、試料3次元複素散乱関数 $f(\mathbf{r})$ の実数部に関する線形結像3D-OTF, $G_R(\mathbf{g}, \mathbf{k}_0)$ および虚数部に関する線形結像3D-OTF, $G_I(\mathbf{g}, \mathbf{k}_0)$ の概形とOTF値。

けていない2球殻(お椀)以外ではOTF値は完全に0であり、コヒーレント照明時観察像の3次元情報欠落の大きさを物語っている。

図に記入したように、Ewald球の球殻上でのOTF値は $G_R(\mathbf{g}, \mathbf{k}_0)$ と $G_I(\mathbf{g}, \mathbf{k}_0)$ 共に、照明入射側 ($\delta(|\mathbf{k}_0+\mathbf{g}|-1/\lambda)$ に相当)、結像系レンズ側 ($\delta(|\mathbf{k}_0-\mathbf{g}|-1/\lambda)$ に相当) の両Ewald球殻について共通な係数, $a_0^*(\mathbf{k}_0)\cdot H^*(\mathbf{k}_0)\cdot H(\mathbf{k}_0+\mathbf{g})$ と $a_0(\mathbf{k}_0)\cdot H(\mathbf{k}_0)\cdot H^*(\mathbf{k}_0-\mathbf{g})$ が含まれる。この様に類似してはいるが、 $G_R(\mathbf{g}, \mathbf{k}_0)$ では、+1, +1の対称係数、 $G_I(\mathbf{g}, \mathbf{k}_0)$ では、+i, -iの反対称係数がそれぞれのEwald球殻に付くとともに本質的に異なる点がある。これらの違いは複素散乱関数の実数部と虚数部からの回折波面の進み方の相違が原因となっている。

上の2式で表せる3D-OTFのEwald球殻は $G_R(\mathbf{g}, \mathbf{k}_0)$ と $G_I(\mathbf{g}, \mathbf{k}_0)$ についてまったく同形であり、垂直コヒーレント照明の下では w 軸原点から見て左右対称になる。結像光学系の瞳切断を考慮すれば、面内空間周波数に対するカットオフ周波数は、 NA/λ になる。これはコヒーレントカットオフ周波数として知られている。またこの面内カットオフ周波数で、照明入射側および結像系レンズ側のEwald球殻の w 値は、 $w = \pm\{1-(1-(NA)^2)^{1/2}\}/\lambda$ になる。先に示した実験条件を代入すれば、 $NA/\lambda = 0.91 \mu\text{m}^{-1}$, $\{1-(1-(NA)^2)^{1/2}\}/\lambda = 0.244 \mu\text{m}^{-1}$ であり、図3(b)の3次元スペクトルから求まる値に近い。

直接透過波と回折波が結像光学系の瞳切断を受けず、かつ試料が弱散乱性で、 $a_0(\mathbf{k}_0) = 1$, $H(\mathbf{k}_0) = \exp(-i\gamma(\mathbf{k}_0))$ および、 $H(\mathbf{k}_0+\mathbf{g}) = \exp(-i\gamma(\mathbf{k}_0+\mathbf{g}))$ と書ける場合、照明入射側、結像系レンズ側の両Ewald球殻について3D-OTF, $G_R(\mathbf{g}, \mathbf{k}_0)$ および $G_I(\mathbf{g}, \mathbf{k}_0)$ の共通部分は、それぞれ位相因子, $\exp(i\cdot(\gamma(\mathbf{k}_0)-\gamma(\mathbf{k}_0+\mathbf{g})))$, $\exp(-i\cdot(\gamma(\mathbf{k}_0)-\gamma(\mathbf{k}_0-\mathbf{g})))$ のみとなる。これらは波面収差によって観察像(試料複素散乱関数実数部, 虚数部共に)の3次元縞が法線方向に移動するが、コントラストはまったく変化しない事を示している。

最後の非線形結像成分 $i_{\text{non-lin}}(\mathbf{r}, \mathbf{k}_0)$ は、 $f_R(\mathbf{g})$, $f_I(\mathbf{g})$ に対し線形ではなく、スペクトルの形で、

$$\begin{aligned}
 F_{3D}\{i_{\text{non-lin}}(\mathbf{r}, \mathbf{k}_0)\} &= I_{\text{non-lin}}(\mathbf{g}, \mathbf{k}_0) \\
 &= \iiint_{\mathbf{g}' \neq 0, -\mathbf{g}} \{\delta(|\mathbf{k}_0+\mathbf{g}'+\mathbf{g}|-1/\lambda) \cdot \delta(|\mathbf{k}_0+\mathbf{g}'|-1/\lambda) \\
 &\quad \cdot H(\mathbf{k}_0+\mathbf{g}'+\mathbf{g}) \cdot H^*(\mathbf{k}_0+\mathbf{g}')\} \cdot F(\mathbf{g}'+\mathbf{g}) \cdot F^*(\mathbf{g}') \cdot d\mathbf{g}',
 \end{aligned} \tag{16}$$

と求められる。非線形結像を表す上式は形式上、回折波 $\mathbf{k}_0+\mathbf{g}'$ を照明波とした結像の \mathbf{g}' についての合成の形を取っている。 $\mathbf{k}_0+\mathbf{g}'$ は結像系の瞳全体をカバー出来るので、非線形結像成分の \mathbf{g} ベクトルは、図6に示すように、2つのEwald球殻には制限されず、図示されている瞳制限の範囲に拡がって分布する。これにより試料面内方向に最大 $2\cdot NA/\lambda$, 光軸方向に最大 $\pm\{1-(1-(NA)^2)^{1/2}\}/\lambda$ まで、結像光学系の開口数 NA に対応して拡がる事が示される。試料の散乱が小さいと、弱い回折波間の干渉である為、非線形結像成分は線形結像成分に比べ相対的にコントラストが小さくなる。一方、試料からの散乱が大きくなると急激にコントラストが増加する。試料散乱関数との間に線形性が無い為、定量的な像解析には適さない。

先に示した観察実験では垂直コヒーレント照明時の3次元パワースペクトルに、Ewald球殻以外に、球殻の間や周囲に弱いハローが観察されている。これらは非線形結像成分の寄与による。コヒーレント照明の下で線形結像成分が3次元的に帯域制限を受け、Ewald球殻上のみ存在する一方、非線形結像成分がハローとして分布することは、3次元Fourier空間上でのフィルタリング処理で両者の分離が可能であることを示唆している。

さらに上記3次元結像の取り扱いを部分的コヒーレント照明、さらにはインコヒーレント照明の場合に拡張したい。しかしながら厳密な解析には3次元相互変調係数(3D-cross modulation coefficient)の取り扱いが必要となり見通しが立てにくくなるので、以下では弱散乱性試料に限り、コヒーレント照明時の3D-OTFの考え方を延長する。

弱散乱物体で主体となる3次元線形結像のスペクトル

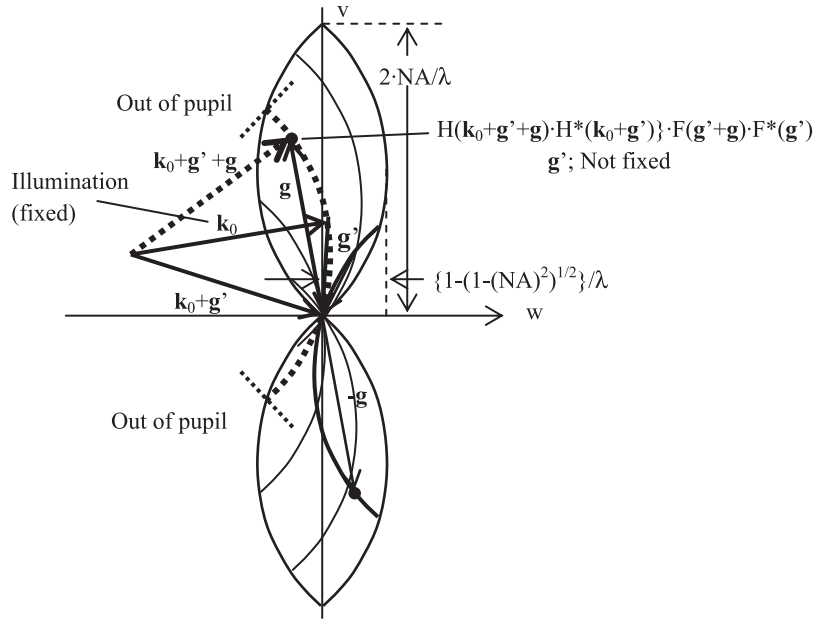


図6 非線形結像成分の3次元スペクトル $I_{\text{non-lin}}(\mathbf{g}, \mathbf{k}_0) = I_{\text{non-lin}}^*(-\mathbf{g}, \mathbf{k}_0)$ の概形. \mathbf{g} ベクトルは2つの Ewald 球殻に制限されることなく, 図示されている範囲に広がって分布する.

$I_{\text{lin}}(\mathbf{g}, \mathbf{k}_0)$ は, 部分的コヒーレント照明の下では, 光源強度分布 $\sigma(\mathbf{k}_0)$ を荷重とする, 照明波 \mathbf{k}_0 の3次元積分で与えられ,

$$I_{\text{pc,lin}}(\mathbf{g}) = \left\{ \iint_{\text{all } \mathbf{k}_0} \sigma(\mathbf{k}_0) \cdot \delta(|\mathbf{k}_0| - 1/\lambda) \cdot G_R(\mathbf{g}, \mathbf{k}_0) \cdot d\mathbf{k}_0 \right\} \cdot F_R(\mathbf{g}) + \left\{ \iint_{\text{all } \mathbf{k}_0} \sigma(\mathbf{k}_0) \cdot \delta(|\mathbf{k}_0| - 1/\lambda) \cdot G_I(\mathbf{g}, \mathbf{k}_0) \cdot d\mathbf{k}_0 \right\} \cdot F_I(\mathbf{g}), \quad (17)$$

になる. 照明波の入射角度の拡がりに伴う線形結像成分の3D-OTFの形状変化を図7に示す.

光源強度分布 $\sigma(\mathbf{k}_0)$ が狭くコヒーレント照明に近い状況では, ほぼ2つの Ewald 球殻の近傍のみに3次元スペクトル

が集中する. $\sigma(\mathbf{k}_0)$ が広がると, 3次元スペクトルの球殻の厚さが徐々に増す. $\sigma(\mathbf{k}_0)$ が \mathbf{k}_0 によらず一定値のインコヒーレント照明では線形結像成分3次元スペクトルもコヒーレント照明時の非線形結像成分と同じ, 試料面内方向に最大 $2 \cdot \text{NA}/\lambda$ まで, 光軸方向に最大 $\pm \{1 - (1 - (\text{NA})^2)^{1/2}\}/\lambda$ まで, 結像光学系の開口数 NA に対応して広がる.

図7には無収差光学系を仮定して, 試料散乱関数実数部・虚数部に対する OTF の係数値を合わせ記入した. $\sigma(\mathbf{k}_0)$ が広がり, 空間的コヒーレンスが低下すると両 Ewald 球殻が重なり合う. この時, 入射側 Ewald 球殻上での \mathbf{k}_0 と $\mathbf{k}_0 + \mathbf{g}$ の組, ならびにレンズ側 Ewald 球殻上での \mathbf{k}_0' と $\mathbf{k}_0' - \mathbf{g}$ の組が同じ

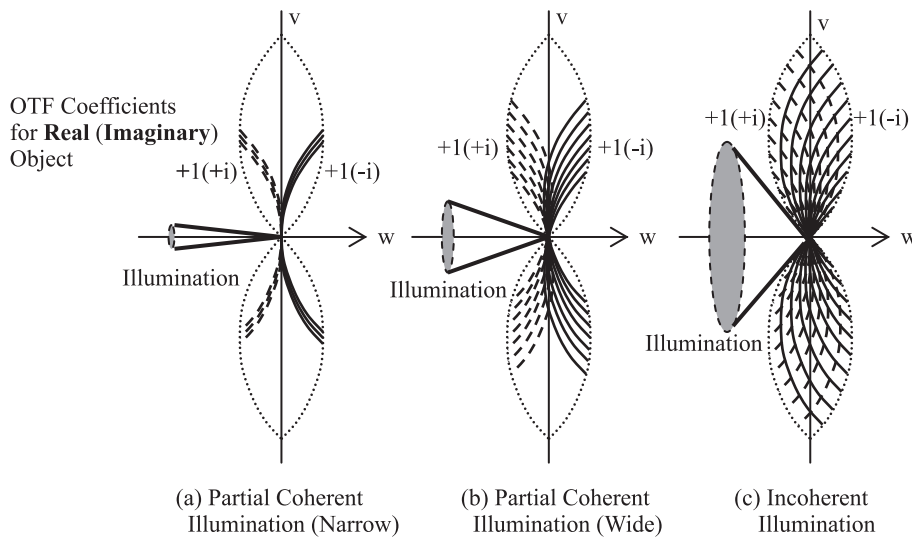


図7 照明波の入射角度の拡がりに伴う線形結像成分3D-OTFの形状変化と試料散乱関数実数部・虚数部に対する OTF の係数値 (無収差光学系仮定).

\mathbf{g} の結像に関わり、OTF 値は双方の和で評価する必要がある。

この様な状況で、試料 3 次元複素散乱関数の虚数部 $F_I(\mathbf{g})$ に関する 3D-OTF については OTF 値の係数が $+i$, $-i$ で反対称である事より、相殺する現象が起こる。さらに、インコヒーレント照明で無収差結像系ではそれらが同等に OTF 値に寄与し、複素散乱関数の虚数部 $F_I(\mathbf{g})$ のコントラストがほぼ消失する。一方複素散乱関数の実数部 $F_R(\mathbf{g})$ については OTF 値の係数が $+1$, $+1$ と対称であってコントラストの消失は発生しない。図 7 (c) がその状況に当たる。

観察試料が弱位相物体である時、複素散乱関数の実数部 $F_R(\mathbf{g})$ はほとんど 0 で、虚数部 $F_I(\mathbf{g})$ のみが生じる。3 次元スペクトルの分布範囲、ならびに位相物体のコントラストがほぼ消失する状況は、インコヒーレント照明下の観察実験 (図 2 (a), 図 3 (a)) に明瞭に現れている。

5. 3 次元結像理論に基づく結像方式の提案

3 次元結像理論では試料複素散乱関数虚数部 (位相) 情報が、実数部 (振幅位相) 情報と同様、デフォーカスシリーズの 3 次元スペクトル中に (3 次元的に大きな帯域制限を伴ってはいるが) 保存されている事が示される。さてコヒーレント照明下でデフォーカスシリーズが収集されている場合、3 次元 Fourier 空間上での画像処理によって Ewald 球殻の照明側で $-i$ の係数、レンズ側に $+i$ の係数を乗じて $G_I(\mathbf{g}, \mathbf{k}_0)$ を対称化すれば、インフォーカスで試料散乱関数の虚数部にコントラストが付く。一方、 $G_R(\mathbf{g}, \mathbf{k}_0)$ が反対称となり、実数部のコントラストは消失する。これにより位相板無し位相差顕微鏡法が実現できる。

この方法では波面収差関数 $\gamma(\mathbf{k})$ が既知である場合、結像光学系複素伝達関数による、両 Ewald 球殻上での $H^*(\mathbf{k}_0) \cdot H(\mathbf{k}_0 + \mathbf{g})$ および $H(\mathbf{k}_0) \cdot H^*(\mathbf{k}_0 - \mathbf{g})$ の OTF 係数値が確定するので、逆フィルターによる波面収差補正も同時実施可能である。さらに Ewald 球殻近傍のみの情報を抽出して、非線形結像情報を排除出来る。電子顕微鏡で実用化するには、高輝度電子銃と、数十枚以上のデフォーカスシリーズを試料ドリフトの影響を受けずに高速に連続収集するハードウェアが必要になる⁷⁾。著者らは本手法を「3 次元フーリエ・フィルタリング法」と呼んでおり、収差補正とともに非線形結像による乱れの無い位相像が得られている。

上記の方法は際立った特徴を持つ一方、回折現象による本質的な 3 次元的帯域制限を伴い、深さ情報などの 3 次元検出には向かない。さて深さ方向の情報を検出する手法の一つである CT 法では、試料回転によるローテーションシリーズ取

集の上で、投影定理に基づき、欠落した 3 次元情報を補完・再生する事が行われている。CT 法では投影定理に基づき投影情報を利用するが、本講座で述べた焦点深度拡大観察はまさに投影情報を得るものである。先に示したように、インコヒーレント照明下での観察像 3 次元スペクトルは uv 平面上にスペクトルが存在し、 w 方向の帯域制限により投影像が求められる。しかし虚数部 (位相) 情報にほとんどコントラストが生じない。この為、光学顕微鏡・電子顕微鏡共に実数部 (振幅) 情報が加わる様、試料の染色が行われる。

試料散乱関数の虚数部 (位相) 情報を用いて CT 法を実現するには、虚数部 (位相) 情報の焦点深度拡大が不可欠である。詳細は省略するが、動的なホローコーン (コヒーレント) 照明と焦点深度拡大および逐次フィルタリング処理を組み合わせると複素散乱関数実数部 (振幅) と虚数部 (位相) の独立分離抽出と非線形結像排除が実現される。加えて結像光学系の波面収差関数が回転不変形であれば、無収差結像が実現され、収差補正が不要になる⁸⁾。本方式は著者による光学顕微鏡による予備的検討実験を経て、大阪大学のグループにより透過型電子顕微鏡への適用の結果が報告されている⁹⁾。

この様な照明・結像系の能動的な制御と逐次画像処理を組み合わせた顕微鏡観察法は、従来の静的な結像法に制限されない 3 次元結像特性をもたらす点で多大な可能性を有する。3 次元結像特性の解析はそれらの基盤となり、光学顕微鏡のみならず、電子顕微鏡についても誠に重要な意義を持つ事を指摘して本講座のまとめとしたい。

文 献

- 1) Rose, H.: *Optik*, 85, 19–24 (1990)
- 2) Haider, M., Rose, H., Ulemann, E., Schwan, B., Kabius, B. and Urban, K.: *J of Electron Microsc.*, 47, 395–405 (1998)
- 3) Sawada, H., Hosokawa, F., Kaneyama, T., Ishizawa, T., Terao, M., Kawazoe, M., Sannomiya, T., Tomita, T., Kondo, Y., Tanaka, T., Oshima, Y., Tanishiro, Y., Yamamoto, N. and Takayanagi, K.: *Japanese J. Appl. Phys.*, 46, L568–L579 (2007)
- 4) Häusler, G.: *1972 Opt. Com.*, 6, 38–42 (1972)
- 5) Streibl, N.: *J. Opt. Soc. America*, A, 2, 121–127 (1985)
- 6) 生田 孝: 応用物理, 71, 389–400 (2002)
- 7) Kawasaki, T., Takai, Y., Ikuta, T. and Shimizu, R.: *Ultramicroscopy*, 90, 47–59 (2001)
- 8) Ikuta, T.: *J. Electron Microsc.*, 47, 427–432 (1998)
- 9) Kitade, K., Yoshimori, H., Ikuta, T., Kimura, Y. and Takai, Y.: Proc of 9th Asia-Pacific Microscopy Conference (APMC9), (held in Jeju island, Korea, 2–7 Nov. 2008, ID: I01-03) p. 79