薄膜スリットプローブを用いた近接場蛍光イメージの再構成法

Method of Near-field Fluorescence Image Reconstruction Using A Thin-slit Probe

山川 真一[1), 天谷 賢治[2), M. Parameswaran (Ash)[3)

Shinichi YAMAKAWA, Kenji AMAYA and M. Parameswaran (Ash)

1) 東京工業大学大学院情報理工学研究科 (〒152-8552 目黒区大岡山 2-12-1, E-mail: yamakawa.s.aa@m.titech.ac.jp)
2) 東京工業大学情報理工学研究科 (〒152-8552 目黒区大岡山 2-12-1, E-mail: kamaya@a.mei.titech.ac.jp)
3)Simon Fraser University (Burnaby, B.C., Canada, V5A 1S6, E-mail: param@cs.sfu.ca)

A new near field fluorescent imaging technique by a thin-slit probe which uses thin-layer waveguides was developed. The method is based on a process of scanning the narrow illumination band over the sample and on the deconvolution scheme. In order to reconstruct the sample profile, rotation and translation scanning is required. The deconvolution can be performed by employing the existing method which is familiar in the computed tomography technology. Numerical simulations are performed to demonstrate the technique's capability of achieving super-resolution observation using the thin-slit probe. Current near-field optical microscopes use metal-coated optical fiber probes. Although there are several methods to make the fiber probe, it is not easy to make. Thin-layer waveguides with slit-shaped apertures which width is smaller than the wavelength of the light can be made using the technology of micro-electro-mechanical systems (MEMS) or of semiconductor processes such as sputtering and chemical vapor deposition (CVD). The thin-slit probe is easier and less expensive to make using these technologies than the conventional metal-coated optical fiber probe which has a tiny hole on its tip. Semiconductor laser can also be used as an illuminating probe. The thin-slit probe is located adjacent to the sample and scanned to illuminate a slit-shaped tiny area of the sample. The slit is rotated horizontally and scanned over the sample perpendicularly to the slit. The total amount of light intensity which goes through slit-shaped area of the sample can be observed in the far field. A collection of light intensity data is achieved by scanning.

Key Words: Optical measurement, Inverse problem, Near-field fluorescence microscope, Super resolution, Thin film, Deconvolution

1. はじめに

光のように波を利用してものを見るまたは描く場合には, その分解能は波長で制限されるという回折限界が存在する. 近年, 回折限界を越える超解像技術の一つとして近接場顕微鏡に関する研究が活発に行われている. (1, 2, 3, 4).

近接場顕微鏡では Fig.1 に示すように, 金属などでコーティングされた光ファイバの先端に開けた観察光の波長より小さい穴から, 光を照射または集光し, 試料の極近傍で波長より小さい領域を観測することで回折限界を越えた分解能を得ている. プローブを試料全体に渡ってスキャンすることで試料の全体像を得る. 従って, プローブ先端に開いた穴の大きさが得られる分解能の制約となる. その一方, 穴の微小化によりそこを通る微弱光の高精度な計測が必要となる. エッチングや溶融延伸など様々な作製法が提案されているが, 先端の非常に微小なプローブの作製は容易でなく, また脆弱で壊れ易い. (5, 6).

プローブの先端から得られる光強度を大きくするために, スリット状のプローブを用いた赤外近接場顕微鏡が提案されている (7). スリットの幅は波長より小さく, スリットと直交する方向に1次元スキャンするとその方向には回折限界を越えた分解能を得ることができる. スリットを水平面内で回転し, あらゆる角度から1次元スキャンして得られる複数の観測量から, CT(Computed Tomography) の原理を利用し, 試料の超解像画像を再構成する.

一方, MEMS (Micro Electro Mechanical System) や半導体技術ではスパッタリングや CVD (Chemical Vapor Depo-

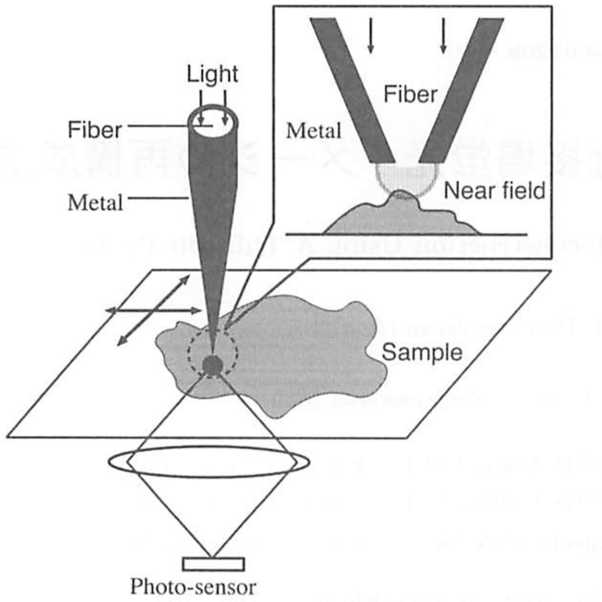

Fig. 1 Overview of a conventional near-field optical microscope using a fiber probe

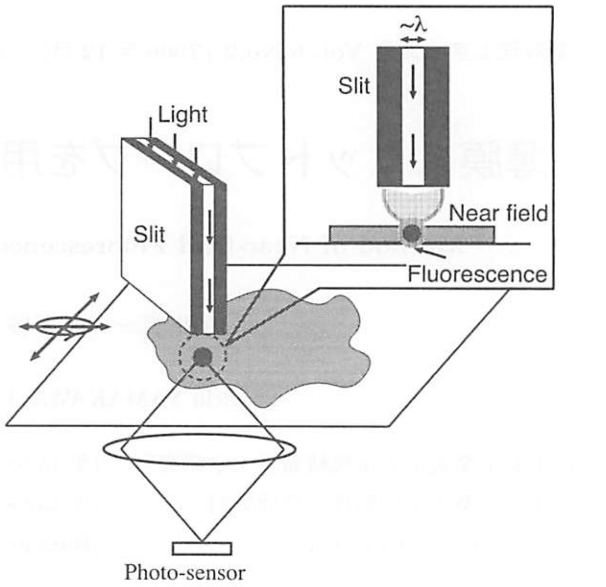

Fig. 2 Overview of the detecting system of the near-field fluorescence using a thin-slit probe

sition）などを用いることでナノスケールの薄膜の生成を容易に実現している[8]．これらの技術を応用することで，観察光の波長より狭いスリット状の開口を持った薄膜導波路を容易に作製することができる．

本研究では，Fig.2 に示すような薄膜スリットプローブを用いた近接場蛍光顕微鏡を提案する．スリットプローブ近接場顕微鏡にてレーザ光源を用いるには，光の複素振幅を観測する必要があったのに対し，蛍光を観測する場合には光強度のみの観測で良いため，観測が容易となる．半導体レーザの開口そのものがスリット形状のため，半導体レーザを直接プローブとして用いることでこれまでに得られなかった大きな照射光強度を得ることが可能となり，大きな蛍光強度の観測が期待できる．

本論文では，薄膜スリットプローブから光を照射し，観察光の波長より小さい蛍光試料の再構成画像を得る手法の有効性を示す．まず，薄膜スリットプローブを試料の極近傍でスキャンして観察画像を得る順解析手法を示し，次に再構成画像を得る逆解析手法を示す．最後に，数値シミュレーションを用いて，本手法の数値実験を行った結果を示す．

2. 薄膜スリットプローブを用いた観測の原理

本研究では，Fig.2 に示す波長より薄い平面の導波路を持った薄膜スリット，もしくは半導体レーザを照射プローブとして利用する．薄膜スリットは高屈折率の材料を低屈折率の材料で挟み込んだ構造で，3 層の真中の高屈折率材の内部を光が伝播する．波長より薄い平面の導波路を光が伝播する現象は，光導波路などの研究で確認されている[9, 10]．半導体レーザは薄膜の活性層を半導体で挟み込んだ構造となっており，薄膜の活性層から照射されるレーザを照射光として利用すれば，大きな光強度が得られる．

照射プローブの下端から外部に伝播した光は，蛍光処理した試料を帯状に照射する．プローブを試料の極近傍に近づけ，波長より狭い幅のスリット状の領域に光を照射することができる．このプローブを用いて Fig.3 に示すように試料の極近傍で帯状に照射し，その部分からの蛍光強度の総和を観測する．

Fig.4 に示すようにスリットを水平面内で回転させ，スリットと垂直方向にスキャンしながら，試料に光を照射して蛍光強度を観測する．得られる複数の観測量から，蛍光色素分布を未知数とする連立方程式を構成する．この連立方程式の構造は CT（Computed Tomography）で取り扱われているものと同様であるので，方程式の求解には既存の CT の様々な再構成アルゴリズムが利用できる．

連立方程式を解いて得られる蛍光色素分布の分解能は，スリットの幅に依存する．スリットの幅が狭ければ得られる分解能は向上し，広ければ分解能は低下する．スリットが広くなると連立方程式が悪条件となるため得られる分解能が低下する．

本手法では，波長より狭い幅のスリットを適用するので回折限界を越えた超解像イメージングが実現できる．

2.1. 数理モデル

Fig.3 に示すように薄膜スリットを用いて試料を帯状に照射し，試料からの蛍光を観測する数理モデルを以下に示す．Fig.3 の x, y は試料に固定された座標系，X, Y は xy 座標系を θ だけ回転した座標系である．X はスリットの垂直方向，Y はスリットの長手方向である．スリットから外部に照射される光強度分布を $f(X,Y)$，試料上の蛍光色素分布を $h(x,y)$ とすると，フォトセンサで観測される蛍光強度の総和 $p(X,Y,\theta)$ は $f(X,Y)$ と $h(x,y)$ のコンボリューションとなり式 (1) で表

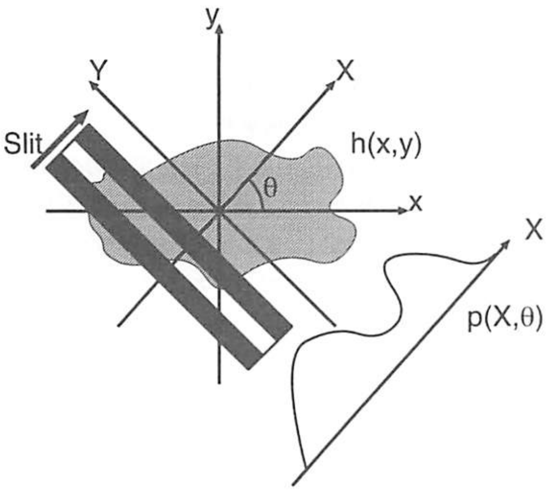

Fig. 3 Observation of the near-field fluorescence from the sample

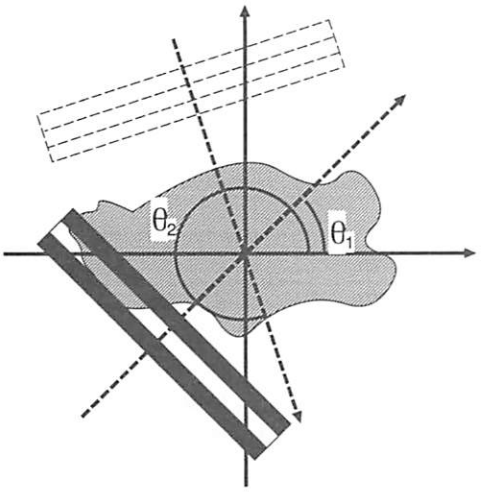

Fig. 4 Scanning over the sample at different angles using a thin-slit probe

される．

$$p(X,Y,\theta) = \int_{-\infty}^{\infty}\int_{-\infty}^{\infty} f(X-X',Y-Y')h(x,y)dX'dY' \quad (1)$$

$$x = X'\cos\theta - Y'\sin\theta \quad (2)$$

$$y = X'\sin\theta + Y'\cos\theta \quad (3)$$

簡単のため，スリットの長さ（Fig.3 の Y 方向）が試料に対して十分大きいとすると，スリットから外部に照射される光強度分布の Y 成分は一様とみなせる．そこで，$f(X,Y)$ を X のみの関数 $f(X)$ とすると，$p(X,Y,\theta)$ も X と θ の関数で表され，式 (1) は式 (4) のように書き換えられる．

$$p(X,\theta) = \int_{-\infty}^{\infty}\int_{-\infty}^{\infty} f(X-X')h(x,y)dX'dY' \quad (4)$$

式 (4) の積分を入れ換えて整理すると観測方程式は次式で表される．

$$p(X,\theta) = \int_{-\infty}^{\infty} f(X-X')g(X',\theta)dX' \quad (5)$$

$$g(X',\theta) = \int_{-\infty}^{\infty} h(x,y)dY' \quad (6)$$

薄膜スリットを用いた観測の観測方程式は式 (5) のように，スリットから外部に照射される光強度分布 $f(X)$ とスリットの長手方向での蛍光色素分布の積分とのコンボリューションで表すことができる．

2.2. 再構成手法

薄膜スリットからの照射光の強度分布 $f(X)$ を既知として，観測量 $p(X,\theta)$ から試料の蛍光色素分布 $h(x,y)$ を求める逆問題を解く手法を示す．試料の蛍光色素分布を求める逆解析手法は，$f(X)$ を用いて式 (5) をデコンボリューションし $g(X,\theta)$ を求める過程と，$g(X,\theta)$ から $h(x,y)$ を再構成する過程の 2 つの過程からなる．$g(X,\theta)$ から $h(x,y)$ を再構成する逆解析には，一般的に広く利用されている CT（Computed Tomography）アルゴリズムを利用することができる．薄膜スリットからの照射光の強度分布 $f(X)$ はスリットに入射される光強度とスリットの形状から数値的に求めるとする．すなわち，スリットの長さ（Fig.3 の Y 方向）が試料に対して十分大きいと仮定し，2 次元ヘルムホルツ方程式を有限要素法でモデル化し，スリットから外部に照射される光強度分布の $f(X)$ を数値的に求める．

まず，デコンボリューションを用いて観測量 $p(X,\theta)$ から $g(X,\theta)$ を求める過程を説明する．$p(X,\theta), f(X), g(X,\theta)$ の 1 次元フーリエ変換をそれぞれ $P(\omega,\theta), F(\omega), G(\omega,\theta)$ とすると，式 (5) は式 (7) のように書き換えられ，式 (8) のように $g(X,\theta)$ の 1 次元フーリエ変換 $G(\omega,\theta)$ を求めることができる．

$$P(\omega,\theta) = F(\omega)\cdot G(\omega,\theta) \quad (7)$$

$$G(\omega,\theta) = \frac{P(\omega,\theta)}{F(\omega)} \quad (8)$$

しかし，実際には $F(\omega)$ が 0 となる場合，または 0 に近い値を持つ場合には，0 割りや求めたい画像には含まれないノイズ成分の拡大が発生し再構成が困難となる．そこで，式 (8) の $1/F(\omega)$ の代わりにウィナーフィルタ $W(\omega,\theta)$ を用いる．ウィナーフィルタはノイズによるボケ画像を改善するフィルタとして利用されている [11]．

$$\hat{G}(\omega,\theta) = P(\omega,\theta)\cdot\frac{W(\omega,\theta)}{F(\omega,\theta)} \quad (9)$$

$$W(\omega,\theta) = \frac{|F(\omega,\theta)|^2}{|F(\omega,\theta)|^2+\sigma n^2} \quad (10)$$

ただし，$\hat{G}(\omega,\theta)$ は $G(\omega,\theta)$ の推定値，σ は誤差の分散，n は定数である．

次に $\hat{G}$ から h を再構成する手法を示す．再構成には CT で利用されている種々の再構成アルゴリズムが利用できるが，ここでは FBP（Filtered Backprojection）法 [12, 13, 14] を採用する．

蛍光色素分布 $h(x,y)$ の 2 次元フーリエ変換 $H(\xi,\eta)$ は式 (11) のように表される.

$$H(\xi,\eta)=\int_{-\infty}^{\infty}\int_{-\infty}^{\infty}h(x,y)\exp^{-i(\xi x+\eta y)}\,dxdy \qquad (11)$$

ここで,$\xi=\omega\cos\theta$, $\eta=\omega\sin\theta$ として極座標 (ω,θ) で表すと次式となる.

$$\begin{aligned}&H(\omega\cos\theta,\omega\sin\theta)\\&=\int_{-\infty}^{\infty}\int_{-\infty}^{\infty}h(x,y)\exp^{-i\omega X}\,dxdy &(12)\\&X=x\cos\theta+y\sin\theta &(13)\end{aligned}$$

さらに, 式 (12) を変形すると, 以下のようになる.

$$\begin{aligned}&H(\omega\cos\theta,\omega\sin\theta)\\&=\int_{-\infty}^{\infty}\int_{-\infty}^{\infty}h(x,y)\exp^{-i\omega X}\,dXdY &(14)\\&=\int_{-\infty}^{\infty}\left[\int_{-\infty}^{\infty}h(x,y)dY\right]\exp^{-i\omega X}\,dX &(15)\\&=\int_{-\infty}^{\infty}g(X,\theta)\exp^{-i\omega X}\,dX &(16)\\&=G(\omega,\theta) &(17)\end{aligned}$$

式 (17) は, 蛍光色素分布の 2 次元フーリエ変換 $H(\omega\cos\theta,\omega\sin\theta)$ と観測値の 1 次元フーリエ変換 $G(X,\theta)$ が等しいことを表している. $H(\xi,\eta)$ の 2 次元フーリエ逆変換は極座標 (ω,θ) で表すと式 (18) となる.

$$\begin{aligned}h(x,y)&=\frac{1}{4\pi^2}\int_0^{\pi}\int_{-\infty}^{\infty}H(\omega\cos\theta,\omega\sin\theta)\\&\quad\exp^{i\omega(x\cos\theta+y\sin\theta)}|\omega|d\omega d\theta \qquad (18)\end{aligned}$$

式 (18) は式 (17) を用いて以下のように変形できる.

$$\begin{aligned}&h(x,y)=\\&\frac{1}{4\pi^2}\int_0^{\pi}\int_{-\infty}^{\infty}G(\omega,\theta)\exp^{i\omega X}|\omega|d\omega d\theta \qquad (19)\end{aligned}$$

式 (19) の $|\omega|$ は高周波数成分を拡大し解が不安定となるため, 実際には様々なフィルタ関数が用いられている. 本研究では, 式 (21) で表される Shepp-Logan フィルタ [15] をフィルタ関数として用いる. 従って, 式 (19) より蛍光色素分布の推定値 $\hat{h}(x,y)$ を式 (20) のように求めることができる.

$$\begin{aligned}&\hat{h}(x,y)\\&=\frac{1}{4\pi^2}\int_0^{\pi}\int_{-\infty}^{\infty}G(\omega,\theta)R(\omega)\exp^{i\omega X}\,d\omega d\theta \qquad (20)\end{aligned}$$

$$R(\omega)=\begin{cases}|\omega|\frac{\sin(\Delta\omega/2)}{\Delta\omega/2} & |\omega|\le\frac{\pi}{\Delta}\\ 0 & |\omega|>\frac{\pi}{\Delta}\end{cases} \qquad (21)$$

ただし, Δ はサンプリング間隔である.

3. 数値実験

数値実験を行い, 薄膜スリットプローブを用いた近接場蛍光顕微鏡の原理を実証し本手法の有効性を確認する. まず, 薄膜スリットから外部に照射される近接場光の強度分布を求めるための光伝播解析を示す. 次に近接場光の強度分布を用いて, 薄膜スリットを試料上でスキャンして観察像を得る順解析を行った結果を示す. 最後に順解析で求めた結果を模擬観測値として逆解析を行い, 再構成行う.

3.1. 薄膜スリットでの光伝播解析

薄膜スリットから試料に照射する近接場光の強度分布を求めるため, 光伝播解析を行う. 薄膜スリットの長手方向は無限に広がっていると仮定し, 2 次元光伝播解析を行う.

光の複素振幅 u は式 (22) で表される 2 次元スカラヘルムホルツ方程式を満たす [16].

$$\nabla^2u+k^2u=0 \qquad (22)$$

ここで, k は波数である. ヘルムホルツ方程式 (22) を Galerkin 法に基づく 2 次元有限要素法を用いて定式化し [16], 解くことで伝播する光の強度分布 $|u|^2$ が得られる.

解析は Fig.5 に示すような条件で行った. 上部の長方形部は薄膜スリットの導波路を表し, 下部の半円部は空気中を示す. 屈折率は空気中で 1.0, 導波路で 1.5 とした. 波長は 800[nm] とした. 光が入射する長方形部の上端を境界 Γ_1, 領域から外部に光が透過する円周部を境界 (吸収境界条件 [16])Γ_2, それら以外の光が透過しない境界 Γ_3 として次式で境界条件を与えた.

$$\begin{aligned}u&=u_0 &:\ \Gamma_1 \qquad (23)\\ \frac{\partial u}{\partial n}&=(-ik-\frac{\kappa}{2})u &:\ \Gamma_2 \qquad (24)\\ \frac{\partial u}{\partial n}&=0 &:\ \Gamma_3 \qquad (25)\end{aligned}$$

ここで, κ は境界の曲率で, n は境界の外向き法線方向を表す. 式 (24) はその境界が光源や散乱体から十分遠い場合, または光が境界にほぼ垂直に入射する場合に成り立つ境界条件である. 本解析では空気中にもれだした光は球面状に広がり境界にほぼ垂直に入射すると考えられるので式 (24) を用いた.

解析した光強度分布 $|u|^2$ を Fig.6, Fig.7 に示す. Fig.6 は Fig.5 における真中の縦軸上の光強度分布を示す. Fig.7 は導波路と空気の境界から 20[nm] 離れた位置の空気中での光強度分布を示す. 薄膜スリットを利用して試料をスキャンする照射光 (式 (5) の $f(X)$) として, Fig.7 の強度分布を用いる.

3.2. 順解析結果

前節で求めた薄膜スリットからの近接場光の強度分布 (Fig.7), 式 (5) を用いて, 順解析を行う. 試料の蛍光色素分布を Fig.8 に示す. 白色部を蛍光色素とし, 大きさは 100[nm] $\times$ 100[nm] で, 100[nm] の間隔である. 試料画像 Fig.8 を 1° 間隔で 0° ～ 180° までスキャンした観察画像を Fig.9 に示す. Fig.9 の縦軸はスキャン角度, 横軸はスキャン位置を示す. さらに, スキャン画像 Fig.9 に誤差を加えた画像を Fig.10 に示す. ここでの誤差とは薄膜スリットによる計測の誤差を表し, 近傍点との相関はないとした. また割合は各データに対して 10% とし, 一様乱数にて与えた.

3.3. 再構成結果

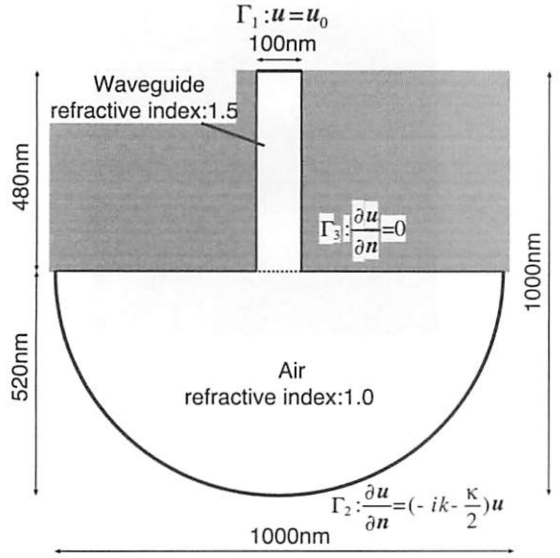

Fig. 5 Analysis model : the rectangular part is a waveguide which refractive index is 1.5 and the semicircular part is air which refractive index is 1.0

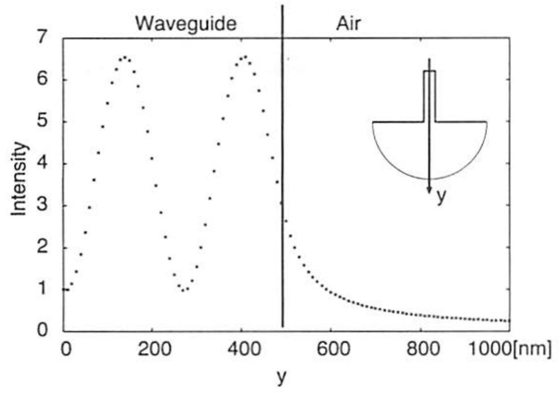

Fig. 6 Intensity distribution on the y axis

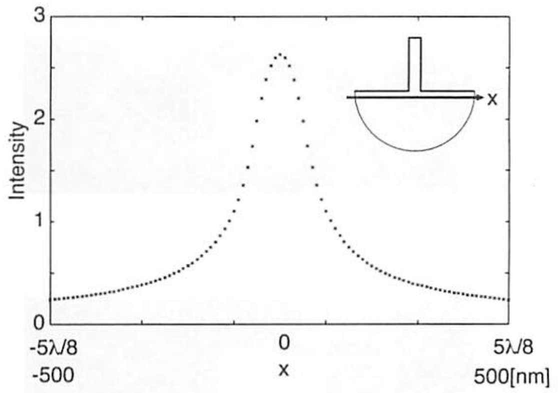

Fig. 7 Intensity distribution 20[nm] away from the waveguide edge

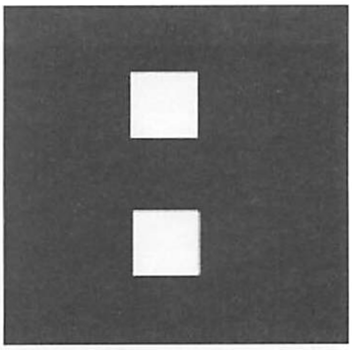

Fig. 8 Sample profile : squares are 100[nm] × 100[nm] and 100[nm] apart.

観察画像 Fig.9, Fig.10 から，式 (9)，式 (20) を用いて試料画像を再構成した結果を示す.

観察画像 Fig.9 を元に再構成した試料画像を Fig.11 に示す. 正方形の角がはっきり確認できるほど上手く再構成されていることが確認できる.

誤差 10% を加えた観察画像 Fig.10 を元に再構成した試料画像を Fig.12 に示す. 正方形の角の存在は確認できないものの, 白色部が二つ存在することははっきりと確認できる.

元画像, 誤差無しの再構成画像, 10% 誤差を加えた再構成画像の縦方向の中心の分布を Fig.13 に示す. 誤差が無い場合には正解とほぼ一致しており，誤差がある場合にも分布の特徴を捉えている.

ここで，式 (10) の σn^2 は Fig.9 において $\sigma n^2 = 10^{-7}$, Fig.10 において $\sigma n^2 = 600$ としてデコンボリューション行なった.

4. 結言

薄膜スリットプローブを用いた近接場蛍光顕微鏡の有効性を数値的に実証した. 波長より狭い幅の薄膜スリットプローブで, 蛍光試料の極近傍をスキャンして得られる観測量から, 一般的に広く利用されている CT(Computed Tomography) アルゴリズムを用いて薄膜スリットの幅程度の分解能で試料の画像を再構成出来ることを確認した.

薄膜スリットは既存の半導体技術を利用することで針状のプローブに比べ容易, 安価に作製でき，さらに, 半導体レーザやフォトセンサをスリットにカップリングして組み込むことにより効率的な照射や観測が期待できる. また, 半導体レーザ自体を照射用プローブとして利用することも可能である. 従来, スリットプローブを用いた近接場顕微鏡にてレーザ光源を利用するには, 光の複素振幅を観測する必要があったが蛍光の観測では強度のみで良いため, 観測が容易になる.

通常の近接場顕微鏡で使用する針状のプローブは水平面内で 2 次元の精密制御を必要とするが, 薄膜スリットプローブはスリットの長手方向を試料に対して十分大きく取ることで, 長手方向の精密な制御を必要としない. 一方, 角度は無次元数であるためその制御は比較的容易である. 従って, 薄膜スリットプローブを用いた場合, ナノスケールの精密な制御が必要な次元数を 1 次元減らすことができ, また高速スキャンが可能となる.

参考文献

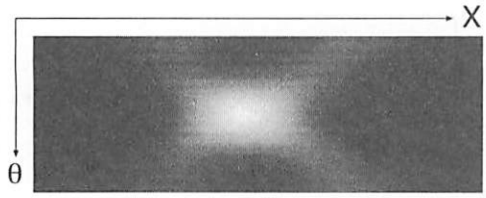

Fig. 9 Observed image without error

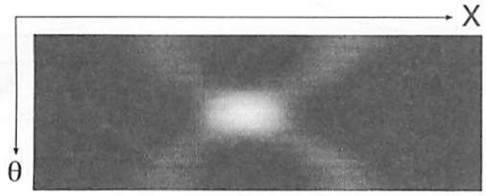

Fig. 10 Observed image with 10% error

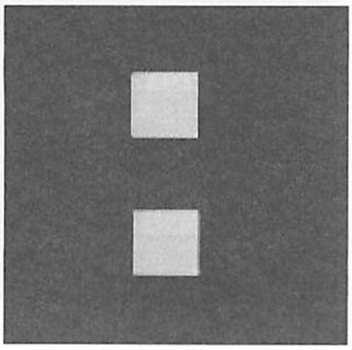

Fig. 11 Reconstructed image without error

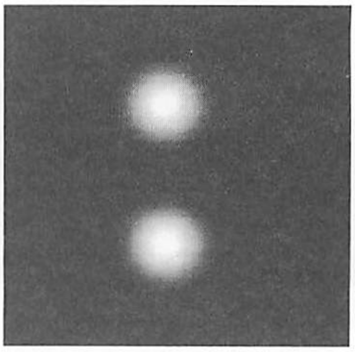

Fig. 12 Reconstructed image with 10% error

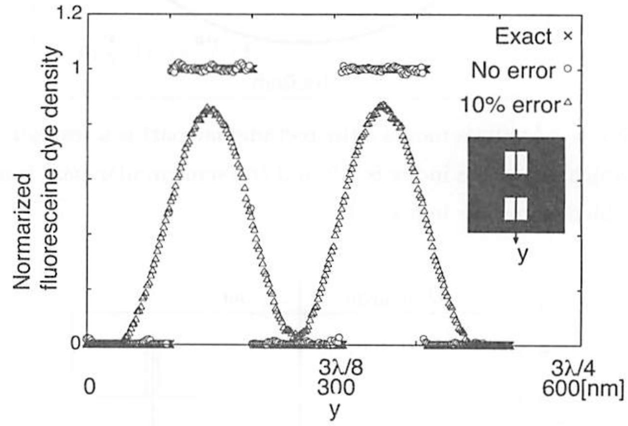

Fig. 13 Comparison of the exact data and the reconstructed data on the y axis

(1) Kawata, S., *Super Resolution in Optics,* (2002) , Japan Scientific Societies Press

(2) Fujita, T., Kawata, S., *Recent Progress in optical microscopy Vol.1: Laser Scanning Microscopy,* (1995) , Gakusaikikaku

(3) Kawata, S., *Near-Field Optics and Surface Plasmon Polaritons*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2001)

(4) Paesler, M.A., Moyer, P.J., *Near-field optics Theory, Instrumentation, and Applications*, (1996), John Wiley & Sons, Inc.

(5) Courjon, D., *Near-Field Microscopy and Near-Field Optics,* (2003) , pp.139–174, Imperial College Press

(6) Kawata, S. et al, *Nano-Optics,* (2002) , pp.61–74, Springer-Verlag Berlin Heidelberg

(7) Kawata, S. et al, Infrared near-field micro-spectroscopy using a scanning slit probe *Journal of the Spectroscopical Society of Japan*, Vol. 45, (1996), pp.93-99

(8) Ruska, W.S., *Microelectronic Processing—A Introduction to the Manufacture of Integrated Circuits,* (1987) pp.237-295, New York, McGraw-Hill

(9) Neuschaefer, D. et al, Planar waveguides as efficient transducers for bioaffinity sensors, *Proceedings of SPIE*, Vol. 2836, (1996) pp.221-234

(10) Duveneck, G.L at el, Novel generation of luminescence-based biosensors—single-mode planar waveguide sensors, *Proceedings of SPIE*, Vol. 2928, (1998) pp.98-109

(11) Russ, J.C., *The Imaging Processing Handbook 2nd Edition,* (1995) pp.283–346, CRC Press, Inc.

(12) Swenberg, C.E. et al, *Imaging Techniques in Biology and Medicine,* (1988) pp.257–299, Academic Press, Inc.

(13) Bracewell, P., *Fourier Analysis and Imaging,* (2003) pp.505-544, Klumer Academic / Plenum Publishers New York

(14) Yatagai, T., *Light and Fourier Transform,* (2001), pp.12–32, pp.88–101, Asakura-Shoten

(15) A.M. Ali et el, Image reconstruction techniques using projection data from transmission method, *Annals of Nuclear Energy,* vol. 31 (2004) pp.1415-1428

(16) Jianming, J., *The Finite Element Method in Electromagnetics*, 2nd ed. (2002), John Wiley & Sons, Inc.