

顕微鏡対物レンズ CFI Plan Apochromat λ D シリーズの開発

高木英嗣

Development of the CFI Plan Apochromat Lambda D Series Objectives for Biological Microscopes

Hidetsugu TAKAGI

プランアポクロマート λ D シリーズを2021年12月に発売した。世界最高レベルの NA と WD を有し、視野全域における優れた光学性能を誇り、広波長帯域の色収差補正がなされたプランアポクロマート対物レンズシリーズである。ニコンの顕微鏡対物レンズの最高峰に位置するプランアポクロマート対物レンズシリーズには、これまで λ シリーズと VC シリーズがあった。本論文では λ シリーズと VC シリーズの長所を継承した λ D シリーズの光学設計技術と製造技術について紹介する。

顕微鏡システムにおいて最も重要な心臓部と言われる顕微鏡対物レンズの重要事項の1つに光学硝材選択がある。特に、広波長帯域の色収差補正を実現するには、最適な光学硝材を選択する必要がある。ここでは2枚の薄肉単レンズの色消しから出発し、3枚の薄肉単レンズの色消しについて説明する。更に共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡における色収差の影響を解説し、観察画像を比較する。

ニコンの誇る波面収差計測技術と最適化技術から生まれた波面収差最適化システムについて説明する。この波面収差最適化システムのシミュレーション結果を報告する。

In December 2021, we launched seven models of CFI Plan Apochromat Lambda D Series objectives for biological microscopes. The Plan Apochromat objective lens series provides the world's highest levels of Numerical Aperture and Working Distance, excellent optical performance over the entire field of view, and chromatic aberration correction across a wide wavelength range.

To date, the Plan Apochromat objective lens series, which is the highest spec of Nikon's microscope objective lenses, comprised the λ and VC series. Herein, we introduce the optical design and manufacturing technologies of the λ D series, which has the advantages of both λ and VC series.

We begin with the achromatism of two thin lenses, explain that of three thin lenses and the influences of chromatic aberration in a confocal laser scanning fluorescence microscope, and finally show the actual images.

Furthermore, we explain the wavefront aberration optimization system developed using Nikon's wavefront aberration measurement and optimization technologies. Finally, we report the simulation results of this wavefront aberration optimization system.

Key words 対物レンズ, 解像限界, 顕微鏡
objective lens, resolution limit, microscopy

1 はじめに

近年、光学顕微鏡システムは目覚ましい進歩を遂げている。しかし、E. Abbe の時代から現代においても、光学顕微鏡に置いて解像力を決定づける心臓部は、顕微鏡対物レンズであることに変わりはない。

本論文では、2021年12月に発売した CFI Plan Apochromat λ D シリーズについて紹介する (Fig. 1)。

2 開発背景

ニコンの顕微鏡対物レンズの最高峰に位置するプランアポクロマート対物レンズシリーズには、これまで λ シリーズ、そして VC シリーズがあった。

λ シリーズは、ニコンの顕微鏡システムの最大の特徴である広視野と周辺視野での高い収差性能を有し、ナノクリスタルコートを用いた可視域から近赤外領域までの高い透過率を実現している。一方、VC シリーズは λ シリーズには無い 405 nm から可視域における軸上色収差性能を有しており、特に、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡観察におい

て市場から高い評価を頂いていた。

近年、生物顕微鏡市場において、デジタルイメージング技術や蛍光色素技術が発展し、明視野観察から共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡まで対応した広視野かつ広波長帯域での観察を可能にする顕微鏡対物レンズが望まれていた。まさしくλシリーズとVCシリーズの長所を継承した顕微鏡対物レンズが必要とされていた。



Fig. 1 本対物レンズシリーズの図

3 仕様

CFI Plan Apochromat λD シリーズは、世界最高レベルの NA と WD を有し、優れた視野周辺における光学性能を誇り、広波長帯域の色収差補正がなされたプランアポクロマート対物レンズシリーズである。

ニコンの全ての顕微鏡観察・システムを支えている。開発するにあたって、パワー配置を一から見直し、設計から製造・検査に至るまで新シリーズとして一新した。

下記に、本対物レンズシリーズの仕様を示す (Table 1)。

Table 1 CFI Plan Apochromat λD シリーズの仕様

| | 60x | 100x | 40x | 20x |
|---------|------|------|-------|------|
| NA | 1.42 | 1.45 | 0.95 | 0.80 |
| WD [mm] | 0.15 | 0.13 | 0.21* | 0.80 |
| 色収差 | Apo | Apo | Apo | Apo |
| 平坦性 | Plan | Plan | Plan | Plan |
| 浸液 | 油 | 油 | 乾燥 | 乾燥 |

| | 10x | 4x | 2x |
|---------|------|------|------|
| NA | 0.45 | 0.20 | 0.10 |
| WD [mm] | 4.00 | 20.0 | 8.50 |
| 色収差 | Apo | Apo | Apo |
| 平坦性 | Plan | Plan | Plan |
| 浸液 | 乾燥 | 乾燥 | 乾燥 |

* 補正環付き

4 広波長帯域における色収差補正

顕微鏡対物レンズの光学設計において、最も重要な項目の1つが光学硝材選択である。ここでは広波長帯域の軸上色収差補正を実現するのに必要な3枚の薄肉単レンズに依る軸上色収差について紹介し、倍率色収差補正の基本概念について解説する。

はじめに2枚の薄肉単レンズ a, b における1次の色消し条件と2次の色消し条件を確認し、3枚の薄肉単レンズへと拡張する。ここで1次の色消しとは、2波長の焦点位置が重なることを指し、2次の色消しとは3波長の焦点位置が重なることを意味する。広波長帯域での色収差補正では2次の色消しが必須となる。2枚の薄肉単レンズの合成焦点距離と色消し条件は下記と書ける。

$$\Phi_a + \Phi_b = \Phi \quad (1)$$

$$\frac{\Phi_a}{v_a} + \frac{\Phi_b}{v_b} = 0 \quad (2)$$

$$P_a \frac{\Phi_a}{v_a} + P_b \frac{\Phi_b}{v_b} = 0 \quad (3)$$

ここで、 Φ_a , v_a , P_a はそれぞれ薄肉単レンズのパワー、アッペ数、部分分散比とした。パワーは焦点距離の逆数である。2枚の薄肉単レンズで、1次の色消しと2次の色消しを実現するには、式(4)の条件を満たす光学硝材が必要になる。上記の色消し条件に限りなく近づけるには、薄肉単レンズ a, b の光学硝材の恒数値は、アッペ数の差はより大きく、部分分散比の差はより小さくする必要がある。

$$\frac{(P_a - P_b)}{(v_a - v_b)} \Phi \approx 0 \quad (4)$$

しかし、光学硝材は実際には離散的に存在し、蛍石などを用いても限りがあり、広波長帯域での軸上色収差補正を実現することはできない。

その為、2枚の薄肉単レンズの考え方を3枚の薄肉単レンズ a, b, c へと拡張する。

$$\Phi_a + \Phi_b + \Phi_c = \Phi \quad (5)$$

$$\frac{\Phi_a}{v_a} + \frac{\Phi_b}{v_b} + \frac{\Phi_c}{v_c} = 0 \quad (6)$$

$$P_a \frac{\Phi_a}{v_a} + P_b \frac{\Phi_b}{v_b} + P_c \frac{\Phi_c}{v_c} = 0 \quad (7)$$

薄肉単レンズの式をまとめると、下記のように書ける [1] - [3].

$$\Phi_b = \frac{P_c - P_a}{P_b - P_a} \frac{v_b}{T} \Phi \quad (8)$$

$$T = \frac{v_a(P_b - P_c) + v_b(P_c - P_a)}{P_b - P_a} - v_c \quad (9)$$

Fig. 2 に光学硝材の恒数表を示す。ここで T は光学硝材恒数表においては、点 c から横軸に平行に点 a と点 b を結ぶ直線へ伸ばした直線の長さである。言い換えれば、2 枚の色消し条件を満たすような光学硝材は現実には得られないが、二つの光学硝材 a, b を用いることで、仮想的な光学硝材 d' を作り出していることを表している。特に着目すべき点が Φ_b の符合である。Fig. 2 の様な恒数値を有する硝材を用いる際には、 Φ_b は正のパワーをもつ。蛍石、クラウン系光学硝材だけでなく、正の部分分散比を持つフリント系光学硝材を加えることで、軸上色収差が低減できることを示している。

実際の光学系では、上記の様な単純な議論だけでは成り立たず、10数枚の光学硝材を組み合わせ、広波長帯域の軸上色収差補正を実現している。

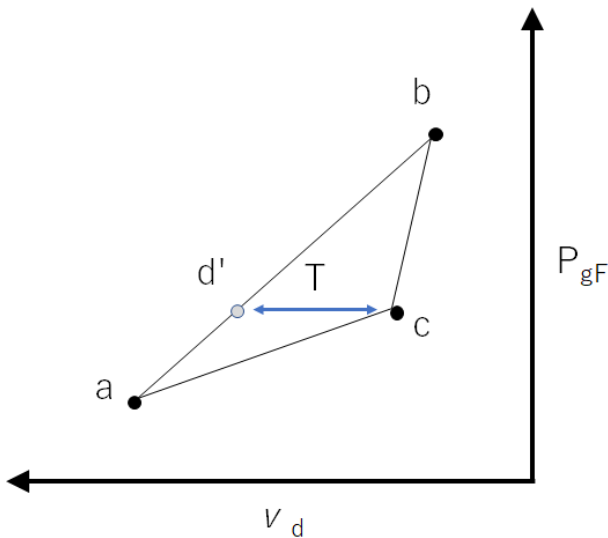


Fig. 2 光学硝材恒数表

次に、倍率色収差補正について説明する前に、ここで顕微鏡対物レンズの開発の歴史について触れておきたい。100年以上前に、E. Abbe は高倍対物レンズで課題になっていた倍率色収差を補正するために、コンペンション方式を開発した。しかし、コンペンション方式は、接眼レンズと対物レンズの組み合わせで倍率色収差を補償していた為、接眼レンズの無いカメラ観察時に倍率色収差が発生するという課題があった。そこで1976年頃にニコンは Chromatic aberration Free (CF) 方式を採用し、対物レンズと接眼レンズがそれぞれ単体で収差が補正されている顕微鏡システムを開発した [4]。更に、一般的な観察方法として広く使われている共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡観察においては、これまで問題にならなかった倍率色収差に

よる視野周辺のシェーディングが課題となった。ここでは、特に高倍対物レンズにおける倍率色収差補正技術について紹介する。

高倍対物レンズの主なパワー配置は、Fig. 3 のように物体（標本）側から、正のパワーを持つ前群と負のパワーを持つ後群の順に並んでいる。簡単の為、図には主光線として d 線の光線（緑）を示し、短波長側の色収差を表すために F 線の光線（紫）が発生する向きだけを示す。前群は像面湾曲、軸上色収差、球面収差を補正している。一方で、後群は光線の通過する光軸からの距離が高い。すなわち、軸外収差の1つである倍率色収差を補正するのに適したレンズ群は後群である。Fig. 3 に示すように、正のパワーを持つ前群と負のパワーを持つ後群はどちらも像面上でプラスに倍率色収差を発生させる。その為、前群と後群で打ち消しあうように、後群の光学硝材を正のパワーを持つ高分散のフリント系光学硝材と負のパワーを持つ低分散のクラウン系光学硝材に分ける。Fig. 3 のようにフリント系光学硝材はクラウン系光学硝材よりも高分散の為、効率良く F 線を補正することができる。

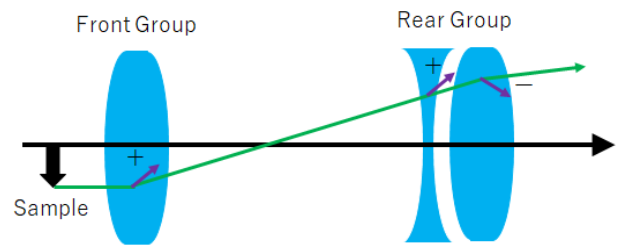


Fig. 3 パワー配置

特に、油浸対物レンズの浸液は水やシリコン浸液に比べて、高分散の為、浸液による色収差は軸上色収差だけでなく倍率色収差の発生量も大きく対物レンズで補正しなければならない色収差の量も大きい。前述の正のパワーを持つフリント系光学硝材には、高分散の光学硝材を用いることもある。この時、倍率色収差の1次スペクトルの補正後の残渣として、倍率色収差の2次スペクトルが発生する。その為、部分分散比がより低い光学硝材を後群の正レンズに、部分分散比がより高い光学硝材を負レンズにするのが望ましい。ニコンは光学硝材の開発から生産まで、グループ内で一貫して行っている為、硝材選択の自由度は高く、軸上色収差はもちろんのこと倍率色収差の2次スペクトルまで補正された光学設計を可能にした。この倍率色収差のもたらす画質への影響と設計の効果については、次の章で示す。

5 共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡

ここでは共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡における倍率色収差の2次スペクトルの影響について議論する。共焦点

レーザー走査型蛍光顕微鏡の配置は次のような構成を考える (Fig. 4)。光源となるレーザー光源による励起光が対物レンズを通して蛍光試料を照射し、発せられる蛍光を信号として対物レンズが検出する。この時、ストークスシフトで励起光の波長と蛍光の波長は数10~数100 nm程度異なってくる。この波長差におけるわずかな色収差がどのように画質に影響するかをここでは考える。

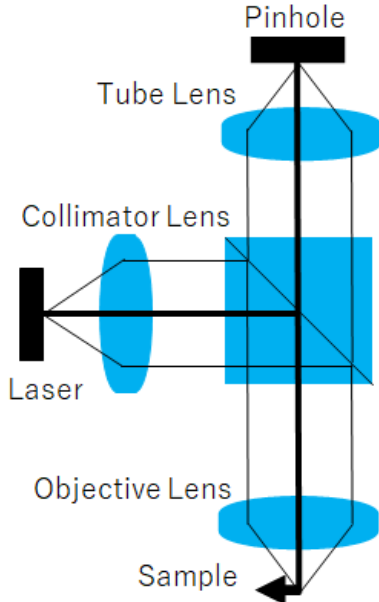


Fig. 4 共焦点レーザー走査型顕微鏡の模式図

共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡の励起光学系による点像強度分布を $PSF_{ex}(x)$ 、蛍光光学系における点像強度分布を $PSF_{em}(x)$ とする。ピンホール形状を表す透過率分布を $PH(x)$ とするとレーザー走査で得られる点像強度分布 I は以下のようにかける。

$$I = o(x) * [PSF_{ex}(x) \cdot (PSF_{em}(x) * PH(x))] \quad (10)$$

ここで $o(x)$ は蛍光試料の密度分布である。*は畳み込み積分とする。依って、実効的な点像強度分布 $PSF_{eff}(x)$ を以下のように定義する [5]。

$$I = o(x) * PSF_{eff}(x) \quad (11)$$

$$PSF_{eff}(x) = [PSF_{ex}(x) \cdot (PSF_{em}(x) * PH(x))] \quad (12)$$

ここでは倍率色収差が実効的な点像強度分布 $PSF_{eff}(x)$ に与える影響を見積もる為、 $PSF_{ex}(x)$ と $PSF_{em}(x)$ を色収差以外は無収差と仮定して計算した。Fig. 5は、励起光の点像強度分布 $PSF_{ex}(x)$ と蛍光の点像強度分布 $PSF_{em}(x)$ とピンホールの透過率分布 PH 、そして実効的な点像強度分布 $PSF_{eff}(x)$ である。Fig. 5Aは $PSF_{ex}(x)$ と $PSF_{em}(x)$ が重なった無収差における計算結果である。この時、 $PSF_{ex}(x)$ と $PSF_{em}(x)$ と $PH(x)$ は最大1になるように規格化して表示している。

一方、倍率色収差が発生した時の計算結果が Fig. 5B である。励起光の点像強度分布 $PSF_{ex}(x)$ と蛍光の点像強度分布 $PSF_{em}(x)$ は横にシフトし、得られる実効的な点像強度分布

布 $PSF_{eff}(x)$ の強度は低下する。その結果、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡の画像は、シェーディングとなって表れる。より直感的には、レーザーで励起された蛍光試料が検出光学系を通して、ピンホールを抜けて信号を検出するわけだが、検出光学系が色収差を持つ場合に信号強度が低下する。また同程度の明るさを得ようとすると、光毒性は高くなり蛍光試料は損傷してしまう。軸上色収差が発生している場合は、光軸方向で類似の振る舞いを示す。

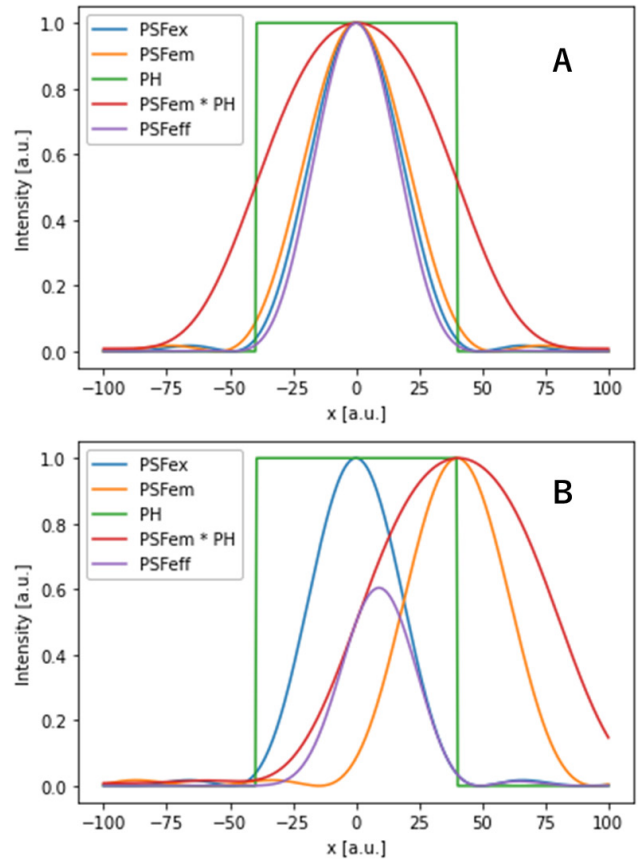


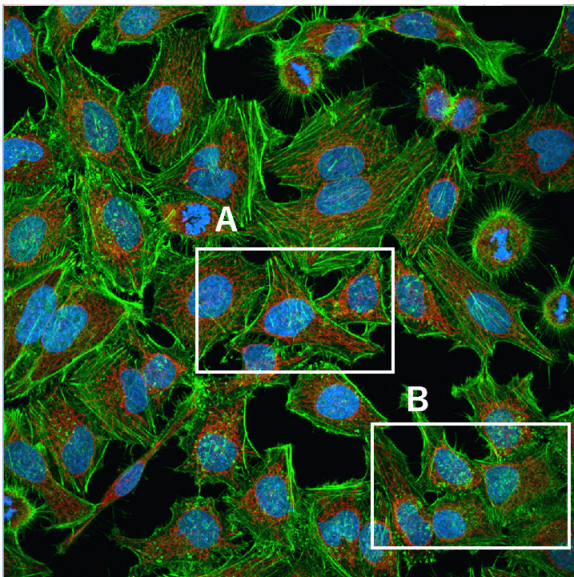
Fig. 5 共焦点レーザー走査型顕微鏡の実効的な点像強度分布 PSF_{eff}

Fig. 5の計算では、倍率色収差の影響を議論する為に含めなかったが、軸外コマ収差や軸外アス収差が発生すると実効的な点像強度分布 $PSF_{eff}(x)$ は低下し、更に $PSF_{eff}(x)$ の形状が崩れて解像力が失われる。今回開発した対物レンズシリーズでは、コマ収差とアス収差を徹底的に排除し、視野周辺までシェーディングも少なくシャープな画像が得られるようにした。

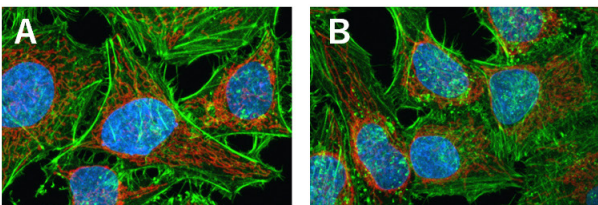
効果を実証する為に、FOV25の広視野共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡観察における新開発の対物レンズと従来対物レンズの比較をおこなった。Fig. 6にCFI Plan Apochromat λ D 60xのFOV25共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡の観察画像を示す。対物レンズ以外の観察条件は、全て同一条件下で行った。従来品は、DAPI染色された細胞核は軸上色収差の影響で視野中央部でも暗く、視野周辺部に

及ぶと倍率色収差の影響で極端に暗くなっていることが分かる。この視野中央部から視野周辺部にわたるシェーディングの変化は、レーザーパワーを上げてても変わらない。一方で、軸上色収差と倍率色収差が補正された CFI Plan Apochromat λ D 60x は、視野中央部から視野周辺部まで均一でシャープな画像が得られることが分かる。

CFI Plan Apochromat λ D60xOil



CFI Plan Apochromat λ D60xOil



Conventional product

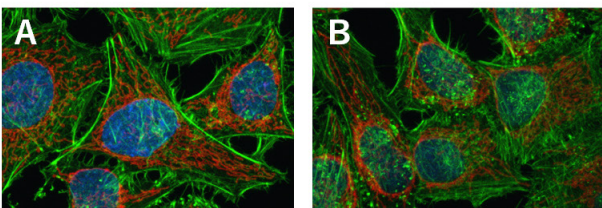


Fig. 6 CFI Plan Apochromat λ D60xOil と従来対物レンズの共焦点レーザー走査型顕微鏡 FOV25画像
HeLa 細胞 : DAPI, 488-Actin, 568-Mitochondria

6 波面収差最適化システム

ここでは顕微鏡対物レンズの製造技術について、紹介する。顕微鏡対物レンズは無収差に近い光学設計がなされているが、実際には製造誤差により収差が発生する。その為、対物レンズの有する波面収差量を正確に測定する波面収差測定装置と限りなく設計値へ近づける最適化技術が重要と

なる。

試料から発せられる点光源の集まりを物体として、顕微鏡は観察している。理想的な点光源から発せられる光は、顕微鏡対物レンズを通して、平行な平面波へと変換される。顕微鏡対物レンズが収差を持つ場合、理想的な平面波からわずかに誤差を持つ。このわずかな誤差を波面収差と呼び、光学系の結像性能の評価に用いられる。特に、Zernike 多項式は単位円上で定義された直交多項式で、光学収差との相性が良い。ニコンの持つ波面計測技術は、顕微鏡対物レンズだけでなく、半導体露光装置やカメラの交換レンズにも使われておりイメージング技術を支える最も重要な技術の1つである。

仮に、数ミクロン精度の製造公差で各レンズが製造されていても、光の波長は数 100 nm の為、発生する波面収差の量としては無視することはできない。その為、組立調整時に波面収差が最小になるように最適化を行う必要があり、次のような問題を解くことに相当する。例えば、式 (13) のように表現することが出来る。式 (13) では、Zernike 多項式で表現された計測波面収差を z で表し、変数 x はコンペンセーターの状態を表す。また、敏感度を表す変化マトリックスが H である。各 Zernike 成分がゼロとなるようなコンペンセーターの最適解 x を求める必要がある。このような計算は、多くの場合、最小二乗法を用いて最適解を得ることができる [6]。

$$\min_x \|Hx - z\|^2 \quad (13)$$

顕微鏡対物レンズでは、視野全域にわたって高い収差性能が要求され、広波長帯域の軸上色収差を補正しなければならない為、同焦点わずか 60 mm の中に10数枚のレンズが用いられる。その為、収差成分への敏感度を示すコンペンセーターの変化マトリックス H の各成分は、ほとんど独立していない。例えば、この変化マトリックスの各成分の独立性が良くない場合、あるコンペンセーター x_1 を用いて収差成分 z_1 をコンペンセートすると別の収差成分 z_2 が大きくなってしまふ。現実にはコンペンセーターの可動範囲は有限で、コンペンセーター自身も誤差を持つ為、式 (13) のような簡単な表現で表すことはできず、より複雑な制約付き最適化問題となる。すなわち、波面収差計測された1本1本の対物レンズに対して、複雑な制約付き最適化問題を解いて最適化しなければならない。波面収差最適化システムが登場する以前までは、顕微鏡対物レンズの作業者は手探りで調整を行わなければならなかった。とりわけ、高倍高 NA 対物レンズは、非常に高い敏感度を持ち、球面収差や偏芯コマ収差は解像限界まで要求される為、製造は困難を極めていた。

近年の AI 技術が活発になる以前から、ニコンは光学設計ソフトから自社開発し、光学系の評価計算はもちろんのこと、最適化分野においても長年にわたって研究開発を続け

てきた。我々は、この顕微鏡対物レンズの組立調整時における複雑な制約付き最適化問題を解くために、独自に開発した最適化エンジンを適用させた。最適化システムのシミュレーション結果として、調整する前の対物レンズの波面収差と波面収差最適化システムで最適化した後の対物レンズの波面収差をそれぞれ Fig. 7A と Fig. 7B に示す。無収差光学系の波面収差は、より平坦な形状となる。すなわち、光学系は無収差結像に近づいていると言える (Fig. 7B)。

この波面収差計測技術と波面収差最適化技術が、1本1本の顕微鏡対物レンズを光学設計者の設計値に限りなく近づけている。まさに理想的な顕微鏡対物レンズ製造システムといえる。

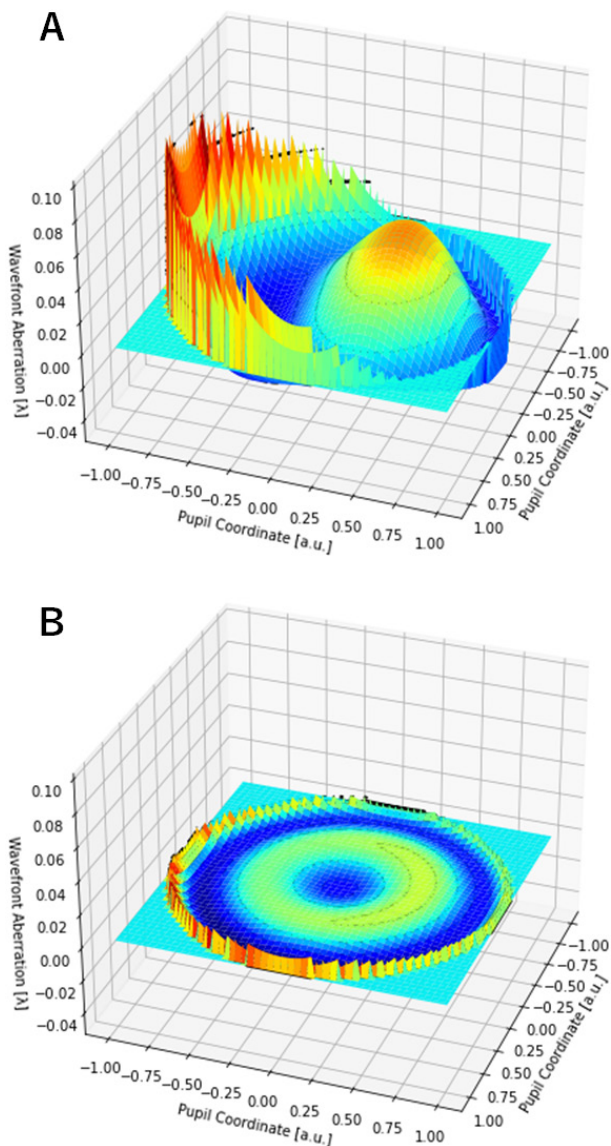


Fig. 7 波面収差最適化システムのシミュレーション

7 まとめ

CFI Plan Apochromat λ D シリーズは、 λ シリーズと VC シリーズを統合し、NA, WD, 平坦性, 視野数を両立した顕微鏡対物レンズである。ニコンの顕微鏡システムの最大の特徴である広視野と周辺視野での高い収差性能を有し、広波長帯域の色収差補正がなされたニコンの顕微鏡システムの心臓部にふさわしい対物レンズシリーズである。

ニコンのもつ光学設計技術と製造技術の粋を集めた本対物レンズシリーズは、今後、バイオイメージングなどを始めとした科学・産業技術の発展に貢献していくと考えている。

今回、代表する形で筆を取らせていただいた。多くの方のご尽力の上の開発である。この場を借りて、深く感謝を申し上げる。

引用文献

- [1] A. E. Conrady, *Applied Optics and Optical design*, Part 1. Dover Publications, 1929.
- [2] H. Gross, H. Zugge, M. Peschka, F. Blechinger, *Handbook of Optical Systems*, Vol. 3. Wiley-VCH, 2007.
- [3] 小穴純, 幾何光学, 新技術コミュニケーションズ, 1986.
- [4] 牛田一雄, “新しい顕微鏡光学系,” 光学, vol. 10, no. 5, pp. 22-29, 1981.
- [5] 渋谷真人, 大木裕史, 回折と結像の光学, 朝倉書店, 2005.
- [6] 高橋友刀, レンズ設計-収差係数から自動設計まで, 東海大学出版会, 1994.

高木英嗣 Hidetsugu TAKAGI
光学本部 第一設計部
1st Designing Department
Optical Engineering Division



高木英嗣
Hidetsugu TAKAGI