

走査型レーザー照明を用いた 位相差および暗視野照明顕微鏡法の開発

佐藤毅*, 白根智崇**, 和田祐子**^a, 今井洋**^b, 上村慎治**

Development of phase-contrast/dark-field microscopy with scanning laser illumination

Tsuyoshi SATO*, Tomotaka SHIRANE**, Yuuko WADA**^a,
Hiroshi IMAI**^b & Shinji KAMIMURA**

Abstract

For the specimen illumination in conventional bright-field light microscopes, incoherent light sources such as halogen lamps or mercury tubes are used, but there is a certain limitation of image brightness as we cannot focus light source images in small spots. On the other hand, laser light sources with single wavelengths and parallel light path would be useful as we can focus for bright illumination. However, due to high speckle noise coming from complicated reflections on the surfaces of optical lenses and beam stops equipped inside microscope system, laser is almost useless for light sources. In this study, we designed a novel optics to scan laser light on the front focal plane of condenser lens, *i.e.*, aperture plane, that is, with light sources placed optically at an optically infinite distance from specimens. Diatom standard specimens were used for the observation in both the phase contrast image and the dark field microscopy, and we could reduce speckle noise under applicable magnitude. Although we could not solve the problem of biased brightness of illumination depending on specimen angles, the new optics presented here is expected to be useful for the observation of fine structures with high image brightness.

1. 緒言

光学顕微鏡は生物学において広く使われる実験装置であり、肉眼では不可視な物体を視覚的に拡大する光学機器である。一般に、照明用の光源として、ハロゲンランプ、白熱灯、超高圧水銀灯やキセノンランプなど、コヒーレンス性の低い光源を使うことが多い。対照的な光源として、コヒーレントなレーザー光を光学顕微鏡の光源に用いると、鏡筒部分にある絞り、中間レンズを含む光学系等、さらに照明系にもあるレンズ・絞りなど無数に存在する光学素子で起こる散乱や回折によって生じる迷光が、結像面上で互いに干渉し合う。さらに、結像に直接関わる光線との間でも干渉し合うことで、複雑な干渉縞（スペckルノイズ）が生じる結果となる。さらに、光軸に平行にコンデンサレンズ内に入射したレーザー光線は、光軸方向の位置に関係なく、絞りなどの影となる像を生じるために、拡大像そのものがまったく試料のものとはかけ離れたものとなることが多い（Fig. 1）。

レーザー光を照明光として用いるメリットも多いのは事実である。共焦点蛍光顕微鏡では、光源は無限遠方にある点と見なせて、試料面上で小さく集光できる特性を生かした光学系としている。試料面で観察する箇所以外には照明光が当たらないように、つまり、常に試料面上の一箇所だけに注目して結像させる設計にすることで、上のスペckルノイズの問題を解決している。レーザー光を用いるもう一つの利点は、単波長であり、蛍光顕微鏡でない限り、色収差を考慮しなくても済む設計が可能である。さらに、集光特性を生かして、非常に高い像輝度での観察も可能となる。

上の利点を生かし、スペckルノイズを軽減する方法は、これまで様々な試みがあるが、多くは、レーザー光の位相をランダムにするための方法、例えば、中途に入れた振動フィルターや散乱液を用いたり、光ファイバーを通したりする方法が知られているが、いずれも、レーザー光の大きな特色である集光特性を犠牲にせざるを得ない[1,2]。本研究では、従来型の光学系をできるだけ活用し、スペckルノイズを軽減させると共に、レーザー光の集光特性を残したまま、高い観察輝度が達成できる光学系を設計した。その構成から、機能検査の試験を行ったので、ここに報告する。

* 中央大学大学院理工学研究科生命科学専攻 〒112-8551 東京都文京区春日1-13-27

** 中央大学理工学部生命科学科 〒112-8551 東京都文京区春日1-13-27

^a お茶の水女子大学湾岸生物教育研究センター 〒294-0301 千葉県館山市香11

^b 大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻 〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町1-1

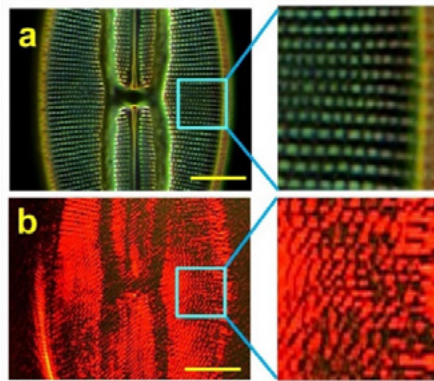


Fig. 1 通常照明とレーザー光照明の比較. ケイ藻標準試料 (8 form test plate, K.D.Kemp, *Navicula lyra*) を用い, 簡易暗視野照明法により, 通常ハロゲン照明光 (a) とレーザー光照明 (b) を比較した (Plan 20DC, NA0.4). スケールは, 100 μm . 後者では, 観察像に重なって, 強いスペckルノイズが見られる.

2. 方法

照明光源

顕微鏡 (Optiphot, Nikon) の照明には, 半導体赤色レーザー (iBEAM660, Toptica Photonics) を用いた. 波長は 660 nm, ビーム径は, 縦 2.72 mm, 横 2.55 mm, 最大出力は 75 mW である. 半導体レーザーの電源切り替えや出力等の設定は RS232C 通信用ソフトウェア (HyperTerminal) で行い, 出力を最小の 1 mW に設定して用いた. 像輝度の調整上, さらに減光する必要があったため, 偏光ビームスプリッター, および 1/2 波長板を用いて光量の調節を行った.

照明用のレーザー光は, ビームエキスパンダ (1/4-20, 3X Beam Expander, Edmond) を通し, 径約 3 mm の平行光として簡易型暗視野照明, 位相差顕微鏡用コンデンサレンズに導入した. レーザー光は, コンデンサレンズ (NA 1.25, Phase Contrast, Nikon) の前焦点面の環状絞り (リング絞り) を通さずに, 直接顕微鏡光学系に導入する方が, 環状絞りによる回折, 散乱がなく照明系としては理想的であると考えられる. しかし, 本研究のレーザーのビーム径は, 位相差顕微鏡用の環状絞りのスリット幅と比較すると大きすぎ, かつ暗視野照明用の環状絞りのものと比較すると小さすぎる (Fig. 2). 本研究では, コンデンサレンズの各環状絞りの有無が像に与える影響についても検討した.

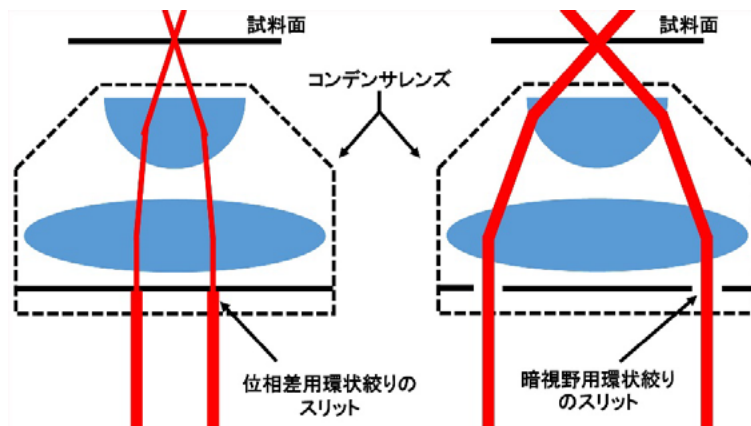


Fig. 2 位相差顕微鏡用の環状絞り, および簡易型暗視野照明用環状絞り, 環状に走査するレーザー光の位置関係を示す模式図. 位相差用環状絞りのスリット幅はレーザー光径より小さいため, 位相差用環状絞りにおいて回折光が発生する.

走査用ミラー

本研究の特色は, 光源として用いるレーザー光を直接顕微鏡光学系に導入するのではなく, 圧電素子を用いて, 任意の角度と速度ですりこぎ運動させた反射ミラー, および, アキシコンレンズを使い, レーザー光を任意の直径で環状に走査して照明光として用いる点 (Fig. 2, 3) である. この反射ミラーはレーザー光の環状走査用に用いているが, 以降, 走査用ミラーとよぶことにする.

アキシコンレンズ[3,4]は, はじめは角度を付けた光拡散素子として考案されたものであるが, 現在, 平行なレーザー光をベッセルビームに変換する光学素子として用いることが多い[5-7]. ここでは同じ角度のアキシコンレンズを Fig.

3に示すように、組にして使い、平行な環状照明光として使用した[8, 9]. ベッセルビームにする時の円錐頂点の波長スケールの精度は必要とせず、アキシコンレンズの側面傾斜角度のみが重要となるために、加工上の精度は高い必要はないのが特徴である.

走査用ミラーの駆動装置として、ノート型コンピュータ (ProBook 4730s, Windows7, 64 bit, 日本ヒューレット・パカード) を使い、作成した正弦波データ (LabVIEW 2011, version 11.01f2) を DA コンバーター (NI 9263 with BNC/NI USB-9162, National Instrument) を通して出力してもらった. Fig. 4にLabVIEWで作成したアプリケーションのブロックダイアグラムを示す. この DA コンバーターの3チャンネルには、振幅と周波数は任意の値を出力できるようにし、各チャンネルの位相差は $2/3\pi$ とした (Fig. 5). 正弦波1波長ごとのサンプル数は250とした. この条件では出力する周波数は400 Hzが上限となる.

得られた位相のずれた正弦波信号は、ピエゾ駆動電源 (E-509.S3, E-503.00, Physik Instrumente) を通して昇圧し、走査用ミラー用のピエゾアクチュエーター (S-316.00, Physik Instrumente) へ送った. この装置の最大傾斜角は $1200 \mu\text{rad}$ 、共振周波数は5.5 kHzである. 内蔵された3個のピエゾアクチュエーターへ 0π , $2/3\pi$, $4/3\pi$ ずつずれた周期で正弦波信号を送ることで、ミラー部分が傾斜し、円錐型に広がるレーザー光となる. この出力信号の周波数を50 Hz以上に上げるとピエゾアクチュエーター内の機械的なノイズが増える傾向が見られたので、アナログ出力モジュールとピエゾ駆動電源の間のチャンネルごとに $0.1 \mu\text{F}/10 \text{k}\Omega$ の減衰回路を入れて用いた.

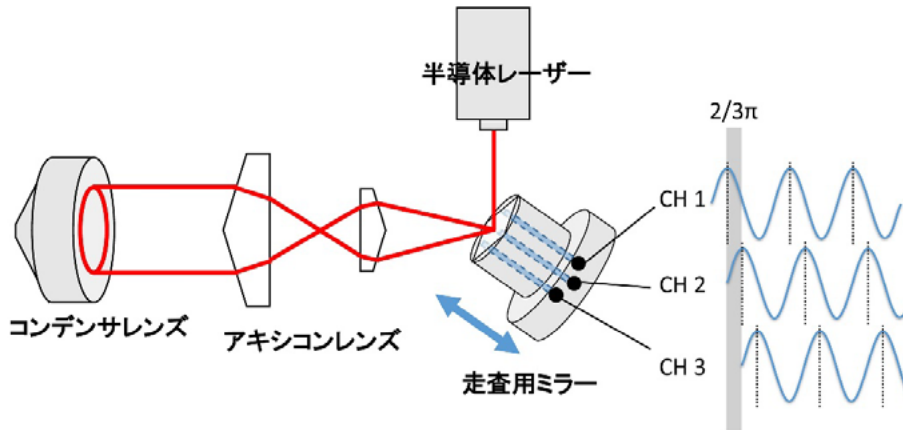


Fig. 3 走査用ミラーの模式図. 内蔵された3本の圧電素子に電圧を供給することで伸縮する. ミラーが傾斜することで、環状に広がるレーザー光となる. アキシコンレンズを通すことで、コンデンサレンズへ平行な環状照明光として導入することができる.

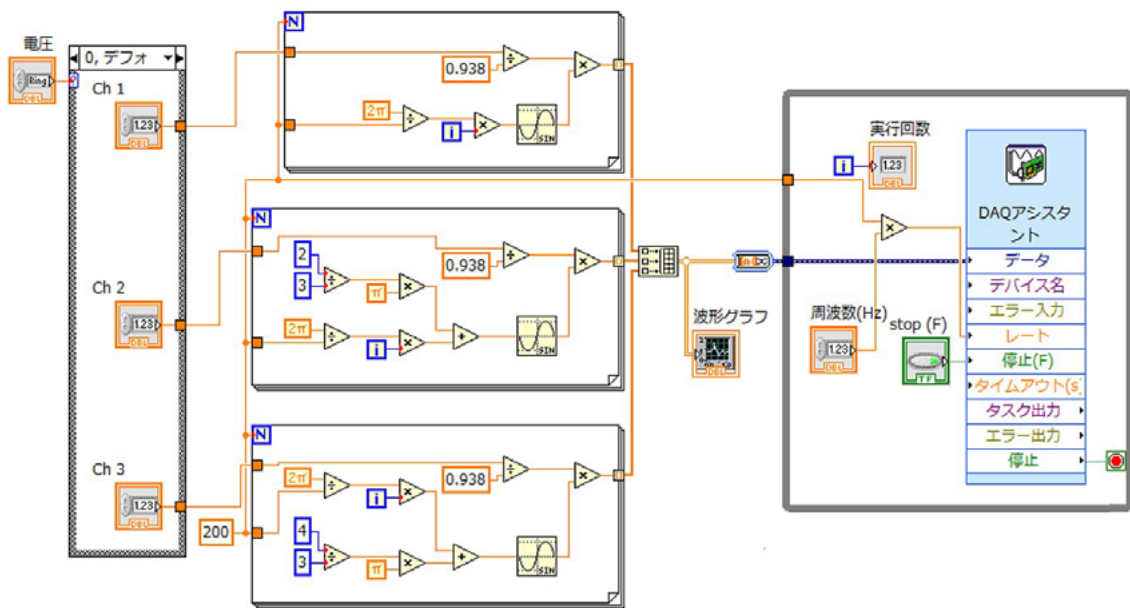


Fig. 4 LabVIEWのブロックダイアグラム

その他光学素子

暗視野照明に必要な大きさの径を持つ環状照明光を形成させるために、前述のように、走査用ミラーの下流に2つのアキシコンレンズを設置しレーザー光の走査径を拡大した (Fig. 3, Fig. 6)。レーザー光をアキシコンレンズの中心に導入することでも、環状の照明光に変換可能である[8,9]。しかし、この場合にはアキシコンレンズの頂点の研磨精度が大変重要となり、また、中心部を屈折せずに抜けるレーザー光を完全には取り去ることはできない。この解決策として、本研究では、アキシコンの円錐斜面を用いることにした。アキシコンレンズを通すことで、走査用ミラーによって円状に走査するレーザーのスポットは、点から円弧状に広がるが、上流側のアキシコンレンズ(径 25.4 mm, 角度 160°, 夏目光学)を使い、環状に走査するレーザー光をより光軸の外側へと屈折させ、下流側に配置したもう一つのアキシコンレンズ(径 50.0 mm, 角度 160°, 夏目光学)を使い、再び平行光として顕微鏡光学系に導入した。位相差顕微鏡を用いる場合、暗視野のそれと比較して環状照明のための径が小さいので、アキシコンレンズは使用しなかった。

走査用ミラーによって環状型にしたレーザー光は、Fig. 6 に示す第3の平面鏡(32945, 径 25 mm, Edmund Optics)を通して、光学顕微鏡 (Optiphot, Nikon) のコンデンサレンズへ導入した。コンデンサレンズを通過した環状レーザー光は、対物レンズ内後焦点面にある位相板内のフィルター用リングと共役な大きさとし、これを芯出し望遠鏡で視認しつつ、各光学ミラーの傾斜角を調節した。顕微鏡拡大像は、CMOS カメラ (VC-4303, Micro Vision) で撮影した。Fig. 6 に実際の装置全体の模式図を示す。レーザー光源の出口からコンデンサレンズの開口絞り位置までの光路はおよそ 2.4 m である。

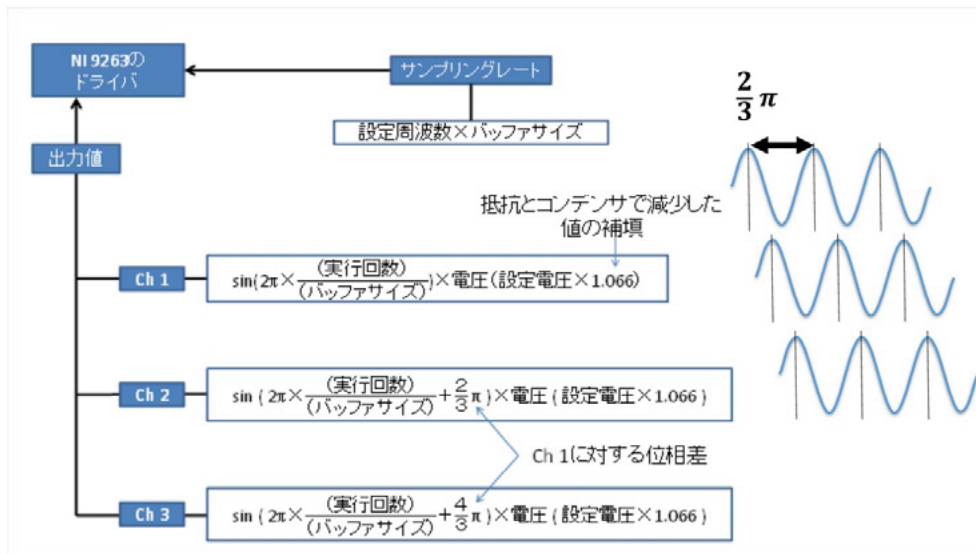


Fig. 5 LabVIEW からアナログ出力モジュールへ指令するプログラムの概要図。出力値は正弦波に電圧を乗算し各チャンネルに位相差を与えた数値である。

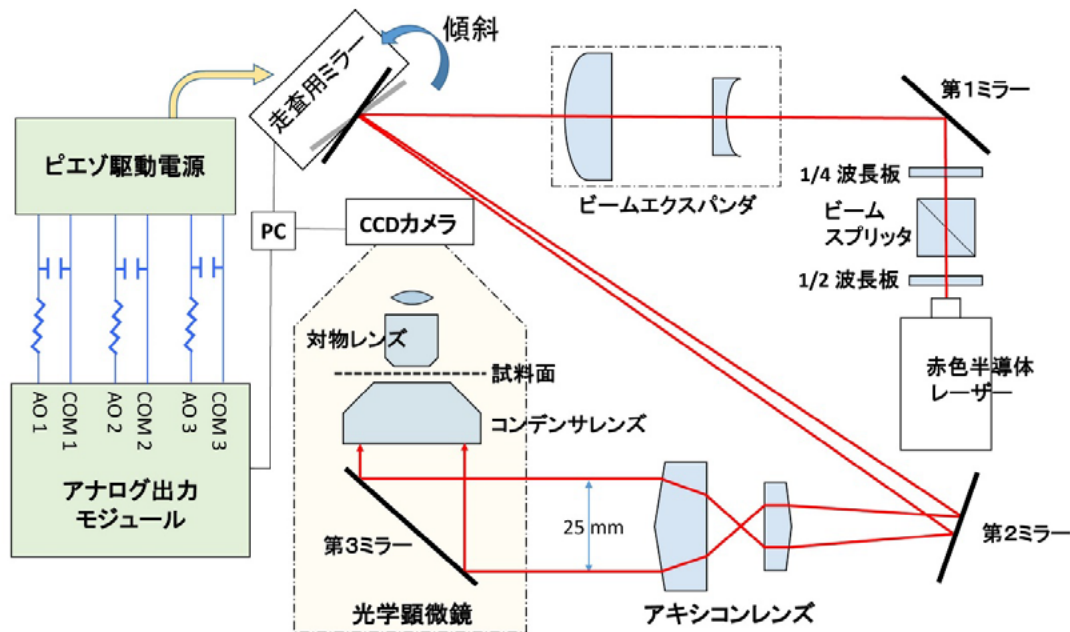


Fig. 6 実験光学系の模式図。照明光はレーザーから顕微鏡下部に取り付けたミラー3を通過後、顕微鏡のコンデンサレンズ、対物レンズ、CCDカメラへ到達する。走査用ミラーのミラー部の傾斜角を高速で回転させることで環状のレーザー光を形成させ、アキシコンレンズでレーザー光の走査径を拡大する。走査用ミラーを駆動するためのアナログ信号を出力する出力モジュールの各チャンネルはAO（アナログ出力）とCOM（アース）から取り出した信号をピエゾ素子駆動装置に導入した。この接続で、時定数調整のために10 kΩの抵抗と0.1 μFのコンデンサを用いた。

3. 結果と考察

レーザー光照明の走査効果

レーザー光を照明に使用する際の問題点はスペックルノイズが発生し、像質を低下させることである。これまでレーザー光の位相をランダム化したり、振動する光学素子を光路に挿入したりする方法が用いられてきた[10-13]。本研究では、照明光の減衰を極力抑え、スペックルノイズを効果的に軽減する手段として、試料へ照射するレーザー光の照射角を刻々と変化させることにした。この光路変化に伴い、スペックルノイズの形状も変化することを利用し、加算平均することで、スペックルノイズを軽減させることができると期待した。

レーザー光の走査がスペックルノイズにもたらす影響を調べるために、走査を止めレーザー光をある1点に停止させて試料を照射した場合と、レーザー光を環状に走査した場合とで、比較した結果をFig. 7に示す。走査していない時に、位相差観察像で見られたマイクロメータの周辺に現れた強いスペックルノイズの多くが、環状にレーザー光を走査することでキャンセルされ、より均一な輝度での観察像となった。この変化は、位相差像で特に大きく、0次光を多く含むことになる位相差顕微鏡像の特徴を反映しているものと考えられる (Fig. 7c, 7d)。暗視野照明像においても、レーザー光を走査した結果、スペックルノイズが軽減することがわかった。

画像処理による画質の改善

本研究で開発した顕微鏡照明法は、走査用ミラーを駆動することで像の中のスペックルノイズの発生箇所が時間的に変化する。撮影記録する場合、1枚のスナップショットよりは、動画として連続録画し、その後に動画を編集処理の方が、よりノイズ軽減の効果が大きいと考えた。動画の編集処理の方法として、各フレームにおいて点在するスペックルノイズを打ち消すために全フレームを加算平均する手法を用いた。

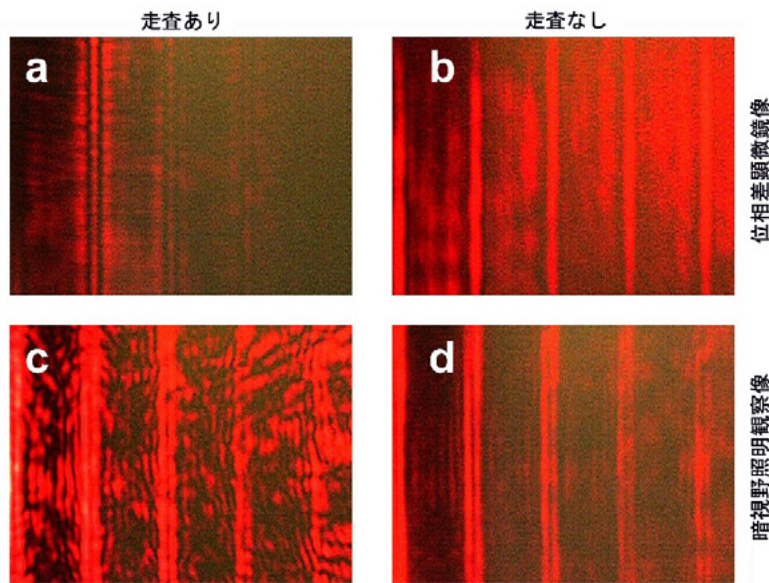


Fig. 7 レーザー光のコノスコープ面環状走査の効果. a と b, 位相差顕微鏡像. c と d, 暗視野照明観察像. a と c, レーザー光の走査していない時. d と b, レーザー光の走査開始後.

位相差顕微鏡を用い、レーザー光を 20 Hz で走査し、20 倍対物レンズを用いて動画記録 (30 fps) したものをもとに処理した例を Fig. 8 に示す. 20-30 枚の画像を加算平均することで、レーザー走査、1 回のサイクル分の画像が平均化され、スペックルノイズが軽減されることがわかった. 以降、位相差および暗視野顕微鏡で画像を得る際には、サンプルを録画しフレームを、少なくともレーザー光走査一周分以上の加算平均を行うことにした. 加算平均回数は、30, 300, 600 のフレーム数の間で大きな差がなかったことから、レーザー光走査の 1 周期分の積算時間で十分であると判断した.

レーザー光の走査速度を 1 ~150 Hz の影響を調べた結果を Fig. 9 に示す. 走査回数に応じて観察像の輝度が上昇することがわかった. これは、単位時間あたりの照射量が同じであることを考えると不自然な印象であるが、加算平均時のスペックルノイズの振幅の違いが現れていると考えられる. 遅い走査時間では、飽和輝度に近い、より明るい点と輝度の低い位点があり、より大きなコントラストで記録されるためと推測している. 本研究では、走査周波数 150 Hz 以上での高速のレーザー光走査も試みたが、ピエゾ素子駆動装置の出力の限度を超えており、走査径が小さくなる傾向があった. この場合、後述する暗視野照明法で用いるアキシコンレンズを使用することで解決できると考えられる. 150 Hz のレーザー光走査速度、20 fps での動画記録の場合、各フレーム間の画像に変化が少なく、比較的、均一な輝度での実時間記録ができることがわかった. この撮影条件で、以降の撮影観察は行うことにした.

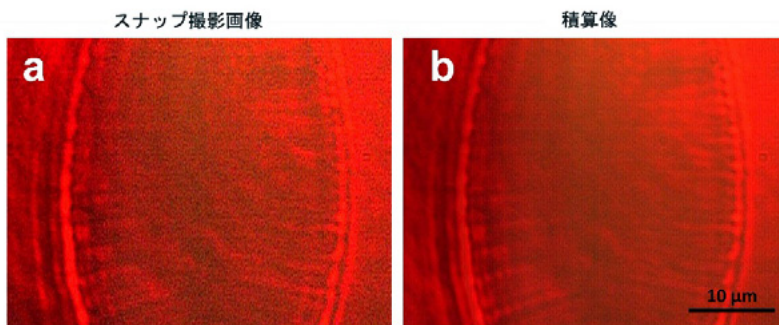


Fig. 8 スナップ撮影画像 (a) と加算平均した像 (b) の比較 (ケイソウ *Surireila gemma* の標本). 20 倍対物レンズ、レーザー走査速度 20 Hz, CCD カメラ (30 fps) で撮影した位相差顕微鏡観察像.

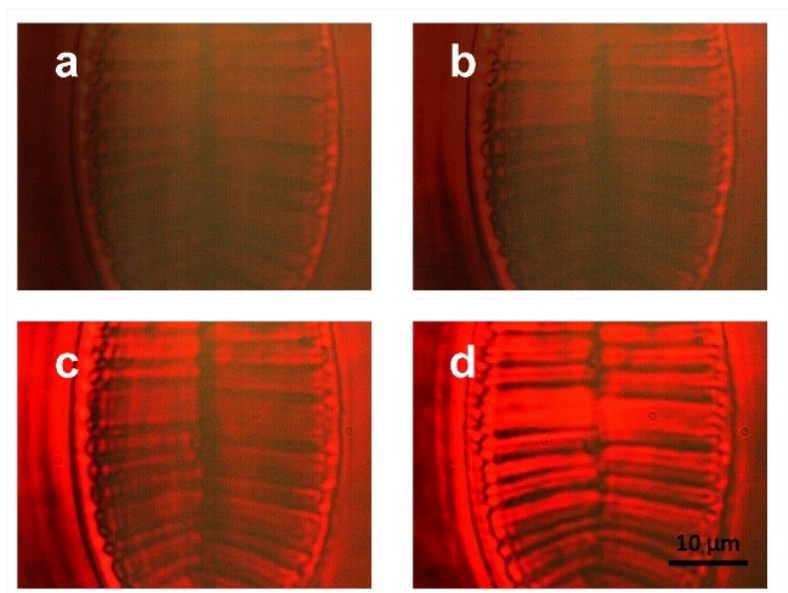


Fig. 9 走査周波数が位相差像に与える影響. a-d, 1, 10, 40, 150 Hz のレーザー光走査速度で照明した時のケイ藻標準標本の観察像. 1 秒間撮影し加算平均を行った結果.

環状絞りの有無による位相差像の比較

コンデンサレンズ前焦点面に置かれている位相差用や暗視野照明用の環状絞りは、従来の光学顕微鏡では必要不可欠である。本研究では、走査用ミラーでレーザー光を環状に走査している機構上、これらの環状絞りは本来不要のはずである。しかし、用いたレーザー光のビーム径が、位相差顕微鏡用のコンデンサレンズにある環状絞りより若干大きく、コンデンサレンズに入射する前段階で位相差用環状絞りをを用いて成形する必要があった。Fig. 10 に、この位相作用環状絞りの効果について調べた結果を示す。

撮影条件は、走査周波数 150 Hz で 1 秒間撮影したのち、加算平均したものである。芯出し望遠鏡で調べた対物レンズ後ろ焦点面の観察像も合わせて撮影した。その結果、環状絞りを通さないと、完全な位相差顕微鏡条件が達成できず、明視野照明に近い観察像となることがわかった。また、環状絞りを通すことで、観察像は改善され、より位相差顕微鏡像に近い像が得られることがわかった。さらに、スペckルノイズに関しては、大きな変化はなく、環状絞り面でのレーザー光の散乱の影響は少ないと考えられる。これは、試料面とは光学的には無限遠の関係になるコンデンサ焦点面でのレーザー散乱のためと推察される。

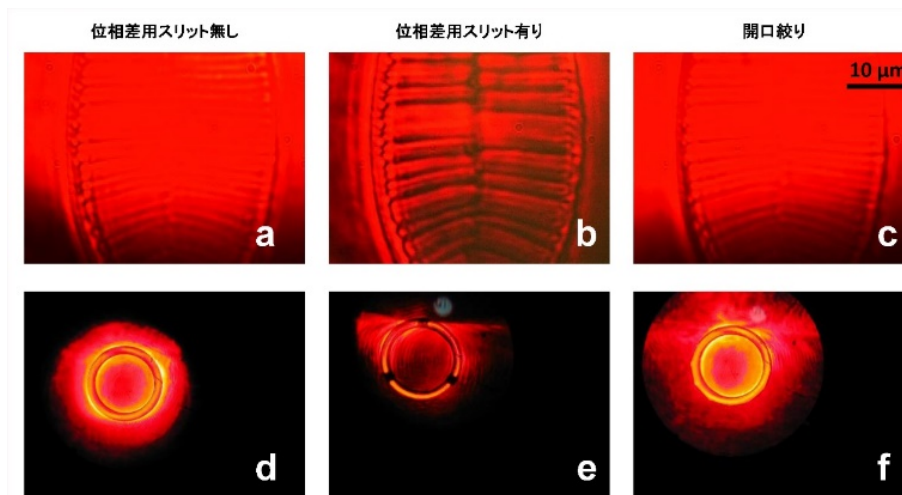


Fig. 10 位相差顕微鏡用環状絞りの有無による観察像の変化. レーザー光走査速度 150 Hz, 対物レンズ 20 倍, CCD カメラ (30 fps) で 1 秒間撮影し加算平均を行った. 環状絞りをコンデンサレンズの上流に挿入することで、位相差顕微鏡の条件が達成されることが確認できる. 目立ったスペckルノイズの増減はなかった. この環状絞りの有無による観察像の違いは、暗視野照明条件下では少ない. しかし、後述するように、試料の方向による輝度の差が大きい問題点となっていることが明らかとなった.

従来の光学顕微鏡と本顕微鏡の位相差像比較

従来のハロゲン光源を使ったインコヒーレント光照明による位相差顕微鏡観察像と本顕微鏡で観察される位相差像との比較を行った (Fig. 11). 走査型レーザー照明法の条件は, 前述の走査周波数 150 Hz, レーザー出力 1 mW, 環状絞有り, 撮影時間 1 秒の加算平均像である.

本研究で開発した位相差顕微鏡で得られた位相差像は, 従来のそれと比較して画像全体の平均輝度が高いことがわかった. 本来は, 70mW の出力を持つレーザー光を低く減光している点からも, 観察像の輝度を上げる方法として走査型レーザー照明法は有力な照明法になることを示唆している. 観察像の上で輝度の不均一な部分が見られるが, アキシコンレンズの光軸や走査軸の調整など, 今後の改善で解消できると期待している. 得られた観察像をもとにフーリエ変換後の周期構造分析を行った結果, ケイ藻標本独特の周期構造も同等に観察されている点も確認できた. 拡大像の分解能という点でも目立つ大きな差は無いと考えられる.

暗視野照明法における集光特性と問題点

本研究で開発したレーザー光走査法を暗視野照明法に用いたとき, 観察試料の方向によって輝度の変化が大きく現れることがわかった. 特に, マイクロメータのように一方向へ向きの揃った標本があるときは (Fig. 12a - d), その差は顕著である. 従来の暗視野照明による観察では, 方向によらずに一律な照明条件となるのに対して, 「4」の刻印のように角度の異なるものが混在した場合, 方向による輝度の変化が大きく現れた.

標本を 90° 回転して撮影した時の前後の比較も行った (Fig. 12e - g). ケイ藻標本の *Nitzschia sigma* は, 長軸に対して直交する方向に特徴的な周期構造を持つケイ藻であるが, プレパラートを回転した場合, ある決まった角度付近でしか, この構造を観察できなかった. 本光学系の第 3 ミラーの位置および角度を調節することで, 擬似的に斜光照明法にすることが可能であるが, 別の角度の周期構造を観察するように再調整は可能であるが, 試料の持つ周期構造の全てを同時に観察することができなかった.

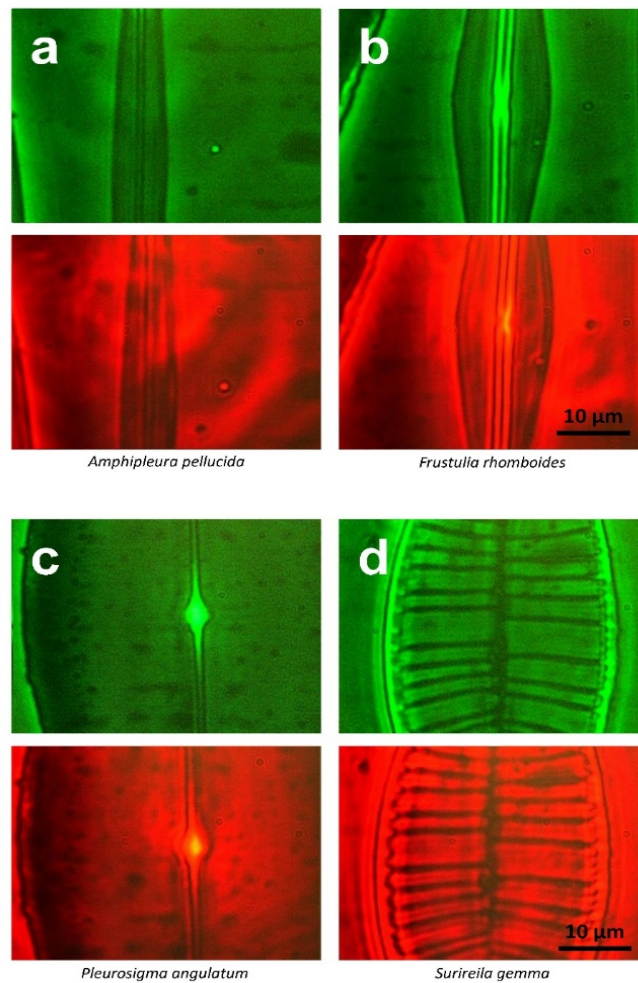


Fig. 11 従来の観察像 (上側) と本研究で開発したレーザー走査型照明法による位相差顕微鏡像 (下側) との比較. それぞれのケイ藻標準試料を用いた.

この現象は照明光の偏光特性と、レンズの歪み、および、レンズ曲面での偏光[14, 15]が影響している可能性が高い。試料へ照射するレーザー照明光は 1/2 波長板とビームスプリッタを通して直線偏光となって顕微鏡光学系に入射する。試料を透過し発生する散乱光や、走査用ミラーを通して試料への照射角を回転させた場合でも、偏光方向が変化することはない。この偏光状態が観察試料の輝度に影響を与えているのかを確認するため、ビームスプリッタ下流に 1/4 波長板を導入しレーザー光を円偏光にした照明光も試みた。さらに偏光特性の小さい微分干涉顕微鏡用の対物レンズを使用した場合においても、第 3 ミラーの位置調整を行わない限り特定方向の周期構造しか確認されなかった。アキシコンレンズの代わりに、凸レンズ 2 枚を組み合わせる、あるいは凸レンズより球面収差の小さい平凸レンズと凸レンズを組み合わせる方法とアキシコンレンズ 2 枚を組み合わせるなどの、コンデンサに至るまでの光学系の改善も必要かも知れない。

観察試料の方向特性の問題点は未解決であるが、マイクロビーズのような微小で等方的な物体を照明する照明方法として、本研究で開発した手法は有効であることが示された (Fig. 13)。これは、Noda ら[8]が示した方法に類似している。違いは、本研究の照明法がレーザー光をコンデンサ開口絞り上で円形に走査する方法を用い、試料に照射されるレーザー光の方向が刻々と変わる条件となっているのに対して、Noda らの方法で、位相が揃い試料に対して円錐状に集光する光路のレーザービームとなっている点である。Noda らの示す集光特性には、まだ強いスペックルノイズが見られるが (Noda ら, Fig.2c 参照)、本研究では、高い観察輝度が達成できた上に、スペックルノイズの面での改善が見られている。nm~pm 精度の位置計測への応用も可能と考えられる。

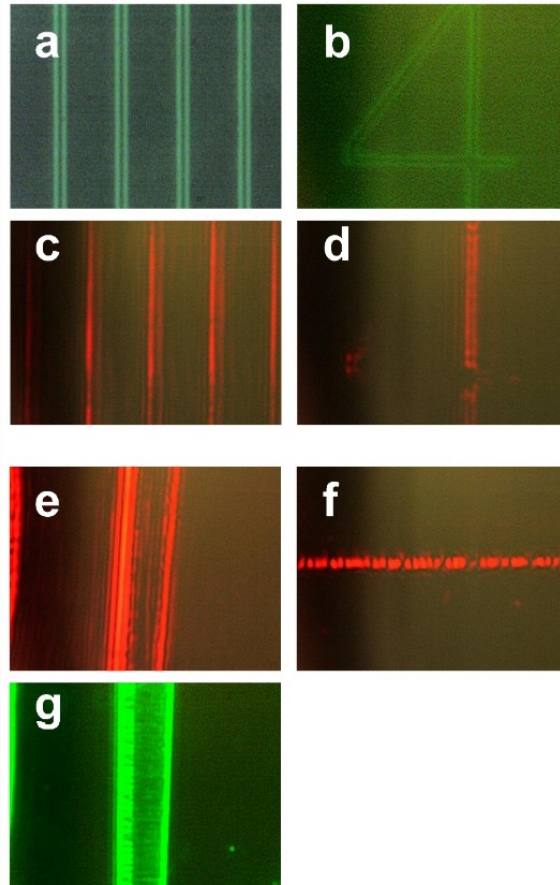


Fig. 12 従来型および本暗視野顕微鏡で得たマイクロメータ像の比較。撮影条件は図 1, 4 と同一である。

4. 結び

本研究では、従来の光学顕微鏡の照明光をハロゲンランプ光からレーザー光に換えた新しい位相差顕微鏡及び暗視野顕微鏡を組み立て、その性能を評価した。位相差顕微鏡は、従来のそれと比較して輝度が高く、スペックルノイズの少ない観察像が達成できた。スペックルノイズキャンセラーとしての実用化に近づくことができた。本研究の暗視野照明法で試したのと同様に、開口絞り面の絞りを介さずに照明光を導入することで、さらに像の改善が可能と思われる。また、光の波長に関しては、本来は、位相差顕微鏡用の位相板は緑色領域の光で正確に 1/4 波長の位相差を与える設計となっているので、この点でも、改善できる余地はある。本研究で調べた暗視野照明法は、観察画面内の限られた方向の試料しか検出できなかった。これは、円偏光照明としても改善されず、現状では従来の暗視野顕微鏡より像質が悪く実

用化には程遠い。しかし、マイクロビーズのような微細で方向性のない観察試料の場合、非常に高い輝度の暗視野照明が達成でき、nm~ μ m 計測のための照明方法として利用できる可能性が高い。

5. 謝辞

本研究は、中央大学理工学研究所共同研究費、および、文部科学省科学研究費特定領域研究（21023018）の補助で実施された。研究への支援を深く感謝したい。なお、本研究は、佐藤毅が主たる光学系デザインの設計と構築、および、基本性能の確認を行い、白根智崇がマイクロビーズを用いた実験へと展開したものである。本年、残念なことに、研究者としての誠実な姿勢と独特の創造性において尊敬してやまない井上信也先生がご逝去された。ここで先生のお仕事を引用するような形で本論文をまとめることで、謹んで、井上先生への深い哀悼の気持ちを表したい。

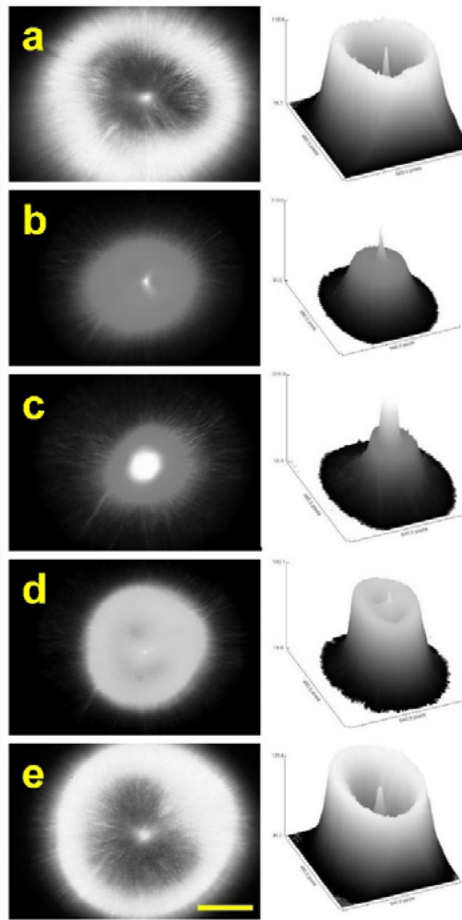


図 13 暗視野照明条件下で観察した直径 $0.34 \mu\text{m}$ のマイクロビーズ像。a~e と、コンデンサを試料に近づけながら観察した結果。観察像の輝度分布を示したグラフを右に示す、スケールは $50 \mu\text{m}$ 。

5. 参考文献

- [1] Upatnieks, J. & Lewis, R.W. (1973) Noise suppression in coherent imaging. *Appl. Opt.* 12, 2161–2166.
- [2] Goodman, J.W. (2006) Speckle phenomena in optics: Theory and Applications (Roberts and Company Publishers, Greenwood Village, CO).
- [3] Chabrie, C. (1904) Sur le diastoloscope, nouvel appareil D'optique destiné a obtenir de très forts grossissements et a mesurer de très petits déplacements d'objets lumineux. *Ann. De Chim. Et de Phys.* 2, 449-465.
- [4] McLeod, J.H. (1954) The axicon—A new type of optical element. *J. Opt. Soc. Am.* 44, 592-597.
- [5] Ren, Q. & Birngruber, R. (1990) Axicon: A new laser beam delivery system for corneal surgery. *IEEE J. Quantum Electron.* 26, 2305-2308.
- [6] Jarutis, V. et al. (2000) Focusing of Laguerre–Gaussian beams by axicon. *Opt. Comm.* 184, 105-112.
- [7] Arlt, J. & Dholakia, K. (2000) Generation of high-order Bessel beams by use of an axicon. *Opt. Comm.* 177, 297-301.
- [8] Noda, N. & Kamimura, S. (2008) A new microscope optics for laser dark-field illumination applied to high

- precision two dimensional measurement of specimen displacement. *Rev. Sci. Instrum.* 79, 023704.
- [9] Belanguer, P.A. & Rioux, M. (1978) Ring pattern of a lens-axicon doublet illuminated by a Gaussian beam. *Appl. Opt.* 17, 1080-1086.
- [10] Hard, R., Zeh, R. & Allen, R.D. (1977) Phase-randomized laser illumination for microscopy. *J. Cell. Sci.*, 23, 335-343.
- [11] J. G. Garcia-Sucerquia, J.G. et al. (2005) Reduction of speckle noise in digital holography by using digital image processing. *Optik (Stuttg.)* 116(1), 44-48.
- [12] Maycock, J. et al., (2007) Reduction of speckle in digital holography by discrete Fourier filtering. *J. Opt. Soc. Am. A* 24(6), 1617-1622.
- [13] Sharma, A. (2008) Improvement of signal-to-noise ratio in digital holography using wavelet transform. *Opt. Lasers Eng.* 46(1), 42-47.
- [14] Inoue, S. (1951) A method for measuring small retardation of structures in living *Exp. Cell Res.* 2:513-517.
- [15] Inoue, S. & Dan, K. (1951) Birefringence of the dividing cell. *J. Morphol.* 89:423.