

平成30年5月24日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13938

研究課題名(和文) ナノ構造体の化学種識別計測を指向した空間位相変調・非線形顕微分光装置の開発

研究課題名(英文) Development of nonlinear microspectroscopic apparatus with spatial light modulation for molecular-selective imaging of nano-structured media

研究代表者

伴野 元洋 (Banno, Motohiro)

東京理科大学・理学部第一部化学科・講師

研究者番号：40432570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、非線形光学過程を応用した分子種識別顕微分光装置への、空間光位相変調技術組み入れによる従来の限界を越えた高空間分解能化に取り組んだ。非線形光学過程に用いる二色のレーザー光のうち、一方の焦点位置でのスポットを同心円形状に変えることで信号発生領域を制限し、用いる光の波長や装置の光学素子を変えずに15%の空間分解能向上に成功した。また、媒質深部での高空間分解計測を可能とするため、空間光位相変調技術を応用した補償光学技術に基づいた独自アルゴリズムによる波面補正技術を取り入れ、波面最適化の基礎要素を構築した。

研究成果の概要(英文)：A microscopic spectrometer based on nonlinear optics with an ultra high spatial resolution by spatial light modulation has been developed. In the developed apparatus, one of two laser beams, applied for the generation of a nonlinear optical signal, was modulated, and the focal spot of the beam was shaped co-circular. Due to the spot shaping, the area generating the nonlinear optical signal was limited. By this development, the spatial resolution was successfully improved by 15% without changing the wavelengths of the input laser lights and the optical elements used in the apparatus. In addition, in the study, a wavefront optimization mechanism was also added to the developed apparatus with a custom-made algorithm based on the adaptive optics. By this development, a basis of a microscopic spectrometer for highly space-resolved measurements of deeply buried samples has been successfully established.

研究分野：物理化学

キーワード：超解像顕微分光 ラマン分光 顕微振動分光 空間光位相変調 波面整形

### 1. 研究開始当初の背景

レーザー顕微鏡と分光学的手法を組み合わせた顕微分光手法が広く開発・応用されている。これらの顕微分光手法によって、従来の顕微鏡による対象の「微小な形状」を観測すると同時に、「その部分部分に存在する化学種」を特定することも可能となる。具体的な応用対象の例としては、材料分野での材料変性や欠陥の検出、生物分野での生細胞中の化学種分布イメージングなどが挙げられる。

近年ではさらに、以下のような試料も測定対象として需要が高まっている。

- ・材料分野：多層薄膜（有機 EL，有機薄膜太陽電池），生体模倣材料（撥水性表面）

- ・生物分野：細胞小器官（ミトコンドリア，ゴルジ体など），ウイルス

これらの対象の大きさは1ミクロン程度以下（サブミクロン）である。ところが、従来の顕微分光装置では、光をその波長以下の径まで絞り込むことが困難であるという制約（回折限界）のため、これらのサブミクロン以下の構造体内部における化学種分布イメージングは困難であった。ただし、多層薄膜やミトコンドリアのように、サイズが従来の顕微分光装置の空間分解能と同程度のものもある。このような対象に対しては、数十%程度の空間分解能向上が果たせれば、より有効に顕微分光手法が応用できるようになると期待される。

研究代表者は研究開始時点までにおいて、超短パルスレーザーを用いた、非線形光学過程に基づいた顕微分光手法の開発と応用研究に従事してきた。非線形分光で計測する信号は、一般的な線形分光とは異なり、2つ以上の光線を試料内の同一の点に、同時に照射した時のみ発生する。したがって、一方の光のスポット形状を制御し、2光線が重なり合う空間を制限することで、従来の空間分解能を越えた高空間分解計測が可能であると着想した。

### 2. 研究の目的

研究開始当初の背景に記した着想に基づき、(1) 2つのレーザー光が空間的に重なった領域から発生する非線形分光、(2) 空間位相波面制御によって一方の光のスポット形状を変化・2つの光が重なる領域を制限、という2点を特徴とした、回折限界を越えた空間分解能を持つ顕微非線形分光手法の方法論を開発することを目的とした。より具体的には、上記した2つの特徴を、研究代表者が研究開始時点までに開発してきた誘導ラマン散乱（Stimulated Raman Scattering, SRS）分光装置に取り込むことで、従来の限界を越える高空間分解・化学種識別画像計測を可能とする装置を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

研究代表者は、回折限界を越える空間分解

能での顕微分光計測を達成するべく、2つの光線を用いる非線形光学分光法と、光波面の空間位相分布を制御して、光を集光した際の焦点形状を変化可能な空間光位相変調技術とを組み合わせ、従来法の空間分解能を超える手法に着想した。特に、SRS過程を対象とした場合の、具体的なスポット整形による空間分解能向上のイメージを図1に示す。対象とする分子にSRS過程を誘起させるために使用する2つの光線（励起光、ストークス光）のうち、一方（図1では励起光）に空間光位相変調を施し、焦点形状を二重同心円状に整形する。非線形光学によって発生する信号は2つの光が重なった部分から発生するため、この光スポット整形によって二重同心円の内側の小円部分からのみ信号を発生させることができる。

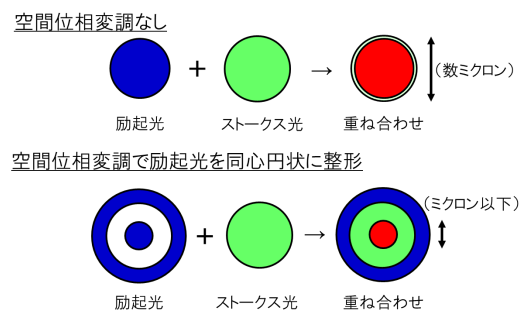


図1. 空間位相変調技術を用いたスポット整形による空間分解能向上の概念図。励起光のスポット形状を変え、2つの光の重なった部分（赤色で図示）を限定する。

この空間光位相変調によるスポット整形には、反復フーリエ変換法を応用した。その概念図を図2に示す。任意の形状に焦点位置でのビームスポットを整形するにあたり、対物レンズで集光前のビームの、強度と位相の空間分布が、集光された焦点における強度と位相の空間分布と互いにフーリエ変換、逆フーリエ変換の関係にあることを応用した。集光前のビームの強度分布は実測可能であり、集光後のビームの強度分布としては、スポット整形の目標とする二重同心円形状を入力する。図2で示したような、逆フーリエ変換とフーリエ変換のペアを繰り返す（通常 10

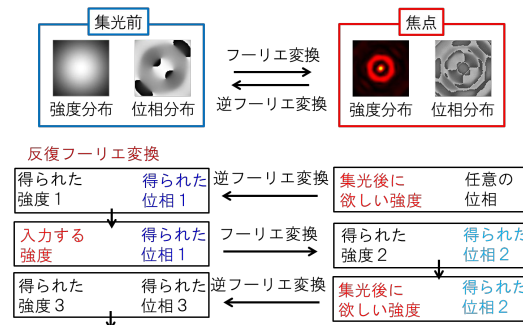


図2. 反復フーリエ変換法によるスポット整形の概念図。

回以上)ことで、二重同心円形状にスポット整形するために必要な、入射前のビームに施す空間位相変調パターンを計算することができる。計算によって得た位相変調パターンを、SRS 顕微分光装置に組み込んだ空間光位相変調器 (Spatial Light Modulator, SLM) に投影させ、入射光の位相の空間分布を変調させることで、目標とする形状の焦点を結びょうにした。

#### 4. 研究成果

##### 空間光位相変調によるスポット整形

まず、研究代表者らが開発してきた SRS 顕微鏡に SLM を導入した。さらに、焦点スポットを整形するための自作アルゴリズムを開発した。図 3 に構築した装置のダイアグラムを示す。SRS 顕微鏡で用いる 2 色のレーザー光のうち、波長の長い側 (ストークス光) の光路上に SLM を導入した。続いて、本装置を用いて試料内に集光した焦点におけるスポット形状を制御するため、SLM に出力する波面整形パターンを計算するための反復フーリエ変換法を基にしたアルゴリズムを開発した。図 4 に示すように、自作アルゴリズムを用いて計算した位相パターンによる変調を施すことで、試料内の焦点において、ストークス光を、目的とする同心円形状に整形することに成功した。以上のように、SRS 顕微鏡に焦点スポット整形機構を組み込んだ。

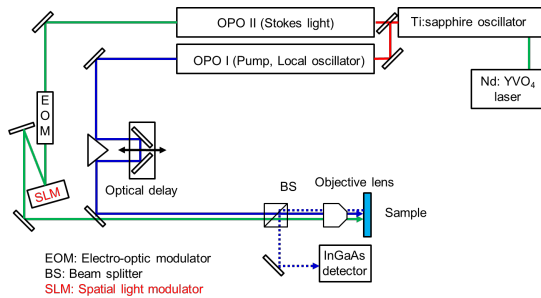


図 3 . 開発した SRS 顕微鏡のダイアグラム

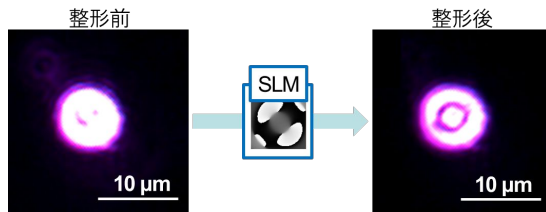


図 4 .SLM による空間位相変調前後の焦点ビームスポット。形状の違いを明確に示すため、焦点から深さ方向で少しずつ離れた位置で計測した。空間光位相変調によって同心円パターンが形成されている。

##### 空間分解能向上の見積もり

スポット形状整形機構の組み込みによる装置の空間分解能の向上を定量的に見積もるため、図 5 に示したように、ポリマーフィ

ルムの縁付近を対象として、試料位置を掃引しつつ SRS 信号を計測した。フィルムの縁をまたいで試料掃引しつつ計測することで得られた、SRS 信号の試料位置依存性を図 6 に示す。SRS 信号強度の立下りを、ガウス関数型の装置応答関数を仮定したモデル関数でフィットし、装置応答関数を見積もった。

$$I(x) = \int_0^x A \exp\left(-\frac{y^2}{\gamma^2}\right) dy \quad (1)$$

ここで、 $I(x)$  は実測した信号強度の試料位置  $x$  への依存性、 $A$  は信号強度に応じた比例定数、 $\gamma$  は装置応答関数の幅を表すパラメータをそれぞれ表す。その結果、 $\gamma$  の値は SLM がオフの時に  $0.73 \mu\text{m}$ 、オンの時に  $0.62 \mu\text{m}$  と求められ、スポット整形を行わない場合と比較して、SLM をオンにし、ストークス光の焦点を同心円形状に整形した場合、装置応答関数の幅がおよそ 15% 減少したと見積もられた。以上の結果から、本研究で開拓した空間光位相変調技術によるスポット整形という方法論が、用いる光の波長や光学素子を変えることなく非線形顕微分光手法の空間分解能を向上させる有用な手段であることを実証した。

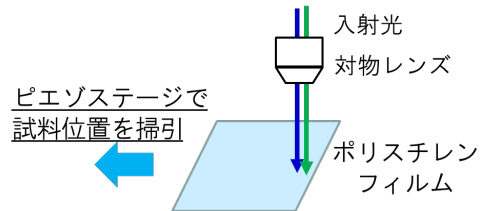


図 5 . 空間分解能定量的ための計測の概念図

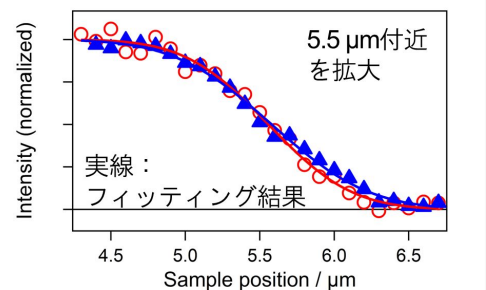
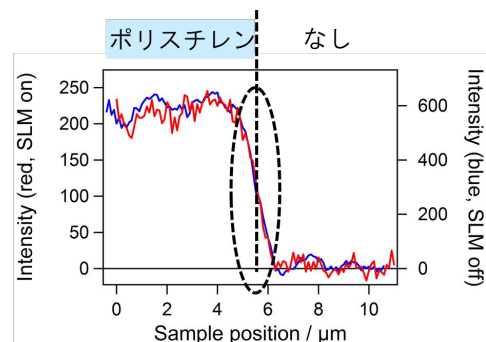


図 6 . ポリスチレンフィルムの縁周辺で計測した SRS 信号強度 (赤: SLM on, 青: SLM off) の試料位置依存性。5.5  $\mu\text{m}$  付近の立下りが、フィルム試料の縁にあたり、信号強度変化の急峻さが空間分解能を反映する。



## 補償光学技術による深部高空間分解計測への発展

本研究における当初の装置開発の目標である、空間光位相変調技術を SRS 顕微鏡に組み込むことによる平面方向の空間分解能の向上について、ここまでの装置開発によってほぼ達成した。一方でこのような顕微分光技術の応用先として、媒質に埋もれた試料内部の高空間分解計測がニーズとして大きいことを知った。ところが、媒質に埋もれた部位を対象とした顕微分光計測の際、対象の前面にある媒質によって光の位相波面が乱され、理想的な焦点を結ばず、空間分解能が低下するという問題があった。そこで、当初目的である空間光位相変調を基とした高空間分解能化に加えて、同技術を媒質に埋もれた部位へも応用可能とする装置の開発を志向した。

埋もれた部位での高空間分解計測達成の手段として、媒質による位相波面乱れの影響をキャンセルする、補償光学の手法を採用した。この補償光学的に光の位相波面を制御するため、前記した空間光位相変調技術を応用したアルゴリズムを開発し、SRS 顕微鏡に組み込んだ。本方法論ではまず、位相変調を施さない状態で、対象部位に信号発生用の光を照射し、誘導ラマン散乱信号を取得する。続いて、位相変調パターンを変えつつ、信号強度を計測し、最も信号強度の高くなる位相変調パターンを見つける。この信号強度が最も大きくなったときに、対象部位に最も理想的に光を集光したことを示す。本年度の研究では、空間光位相変調器に波面位相パターンを投影しつつ誘導ラマン散乱信号強度を計測し、波面位相パターンを変えつつその強度をモニターするシステムを構築した。さらに最適な位相変調パターンを見つけ出すため、遺伝的アルゴリズムに基づいた繰り返し計算プログラムを作成した。

実際にシリコン基板を対象として、SRS 信号を最適化した。この時の最適化の様子を図 7 に示した。図 7 に示すように、現在では試料表面からの信号を対象とした最適化の段階ではあるが、レーザー光源や光の通過する光学素子に由来する位相波面乱れの影響をキャンセルし、信号強度の増大につながる結果が得られた。これらの開発によって、深部における高空間分解計測を可能とする装置の基本要素を完成させた。

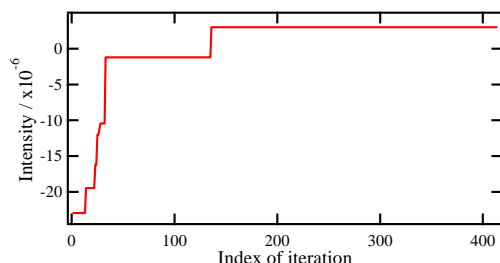


図 7 .シリコン基板からの SRS 信号の最適化。縦軸が信号強度、横軸が波面最適化のための計算回数を表す。

## まとめ

本研究では、非線形光学過程の 1 つである SRS 過程を用いた分子種識別顕微分光装置への、空間光位相変調技術組み入れによる高空間分解能化に取り組んだ。本技術を用いて、非線形光学過程に用いる二色のレーザー光のうち、一方の焦点位置でのスポット形状を変えることで、信号発生領域を制限し、結果として 15% の空間分解能向上に成功した。また、媒質深部での高空間分解計測を可能とするため、空間光位相変調技術を応用した補償光学技術による、独自アルゴリズムによる波面補正技術を取り入れ、波面最適化の基礎要素を構築した。以上の本研究における技術開発によって、将来的に従来の限界を越えた高空間分解分光計測が発展していくことが期待される。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Motohiro Banno, Takayuki Kondo, Hiroharu Yui, Development of molecular-selective differential interference contrast microscopy utilizing stimulated Raman scattering, *Opt. Lett.* 43, 1175-1178 (2018) 査読有 . DOI: 10.1364/OL.43.001175

Motohiro Banno, Hiroharu Yui, Stimulated Raman scattering interferometer for molecular-selective tomographic imaging, *Appl. Spectrosc.* 71, 1677-1683 (2017) 査読有. DOI: 10.1177/0003702817693232

Motohiro Banno, Konosuke Onda, Hiroharu Yui, Improvement of Spatial Resolution for Nonlinear Raman Microscopy by Spatial Light Modulation, *Anal. Sci.* 33, 69-74 (2017) 査読有. DOI: 10.2116/analsci.33.69

〔学会発表〕(計 3 件)

伴野元洋, 高橋すみれ, 由井宏治, 差動型ヘテロダイン誘導ラマン散乱顕微鏡による水に埋もれた表面微細構造の深さ定量三次元イメージング, 日本分析化学会第 66 年会, 2017 年 9 月 10 日, 東京理科大学葛飾キャンパス (東京都葛飾区)。

伴野元洋, 恩田康之介, 由井宏治, 空間位相変調による誘導ラマン散乱顕微鏡の高空間分解能化の試み, 第 77 回分析化学討論会, 2017 年 5 月 28 日, 龍谷大学深草キャンパス (京都府京都市)。

恩田康之介, 伴野元洋, 由井宏治, 空間位相制御による近赤外非線形分光顕微鏡の高空間分解能化, 平成 28 年度日本材料科学会学術講演大会, 2016 年 6 月 29 日, 産業技術総合研究所臨海副都心センター (東京都江

東区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伴野 元洋 (BANNO, Motohiro)  
東京理科大学・理学部第一部化学科・講師  
研究者番号：40432570

(3) 連携研究者

由井 宏治 (YUI, Hiroharu)  
東京理科大学・理学部第一部化学科・教授  
研究者番号：20313017

谷口 淳 (TANIGUCHI, Jun)  
東京理科大学・基礎工学部電子応用工学  
科・教授  
研究者番号：40318225