

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23656183

研究課題名(和文)ベクトリアル偏光干渉非線形レーザ顕微鏡によるナノ微粒子分光イメージング

研究課題名(英文) Nanoparticle Imaging with Polarization-interferometric Nonlinear Confocal Microscope

研究代表者

江上 力 (Egami, Chikara)

静岡大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70262798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：非線形共焦点顕微鏡にマイケルソン型のベクトリアル偏光干渉を組み込んだ新しいタイプの3次元分光計測システムを構築した。単一ナノ微粒子にドーパされた非等方的なクロモファ分布を高空間分解能で分布計測可能なシステムである。被測定物体からの等方的バックグラウンド散乱信号を参照光信号との偏光干渉ベクトリアル差分演算によって強制的に抑制することで、極微小領域に生じる僅かな非線形感受率変化をコントラストエンハンス画像として再生することができる。これによりz軸に沿った光学的断層画像から3次元での(3)分布の影像化に成功した。以上、助成期間内で提案顕微システムの最適化設計と実際の微粒子計測・評価を行った。

研究成果の概要(英文)：In this work, incorporating a Michelson-type polarization-vector interferometer in to a nonlinear confocal microscope, we propose novel microscopy in order to observe a single nanoparticle inhomogeneously doped with chromophores. Here, in the first step, we set the polarization-interferometric confocal signal minimum while scanning homogeneous matrix outside of inhomogeneous areas in the nanoparticle. As a next step, the microscope measures the inhomogeneous areas. As a result, the inhomogeneous areas with third-order susceptibility shines out against the dark background with high contrast. The microscope has observed an inspection image inside the single nanoparticle. Three-dimensional image obtained from the confocal microscope proposed is comprised of a series of optical sections along the z axis. The microscope can resolve detail in the nanoparticle with susceptibility distribution.

研究分野：光計測

科研費の分科・細目：機械工学・知能機械学・機械システム

キーワード：微粒子 顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

現在、DDS(Drug Delivery System)が、医療、製薬、バイオなどの分野で注目され、盛んに研究されている。DDSとは、微粒子の表面や内部にステロイドや有機薬理体等(ドーナツ)を結合・ドープさせ、血管を通して、目標とする患部(臓器、細胞、病原体など)に薬物を効果的かつ集中的に送り込む技術である。DDS微粒子は、空気中または液体中において、ナノサイズオーダーでのサイズ保証、ドーナツの均一性の評価が必要であるが、その技術は未だ確立されていないのが実情である。

2. 研究の目的

本研究では医学・バイオ分野で盛んに利用されるナノ微粒子の表面や内部の光学的特性について、短パルスレーザー分光法にて利用される蛍光色素をドープすることなく比較的安価な複数の連続発振レーザーを利用したベクトリアル偏光干渉非線形光学顕微鏡にて分光計測する新たな手法を提案する。蛍光色素は毒性を有するものが多数あり、これを医学・薬学利用のナノ微粒子にドープすることは難しい。本システムは走査型のベクトリアル偏光干渉非線形レーザー顕微鏡システムであり、高空間分解能でナノ微粒子の3次元分光イメージングを可能とする全く新しい計測法である。3次元分解能が非常に高いことで知られているレーザー顕微鏡に、マイケルソン型の干渉計と偏光干渉計を組み合わせ、偏光干渉非線形レーザー顕微鏡を提案した。レーザー光を被測定媒体内部に集光し非線形光学効果を発現させ、さらに偏光干渉を利用することで物質固有の光散乱強度や吸収係数・屈折率分布情報などを読みとることが可能となる。局所的に誘起される僅かな非線形感受率を線形散乱光と非線形散乱光間でのベクトリアル差分として分光計測する。ベクトリアルな偏光干渉信号に反映される非線形散乱成分情報と強度干渉信号に反映される位相情報を3次元同時スキャンすることにより真の分光画像情報(内部⁽³⁾分布)をナノレベルで推定するレーザー顕微システムを開発した。

本顕微鏡は従来のレーザー顕微鏡に比べ高い面内分解能とコントラストでの観察が可能となり、同システムの新たな応用として、近年、特に注目されているDDS利用としてのナノ微粒子の3次元分光計測への応用を主眼として置き開発を行った。微粒子の表面や内部にステロイド、有機薬理体等(ドーナツ)を結合・ドープさせ血管を通して病理細胞へ直接投与するための伝達キャリアとしての微粒子を形成する。しかし、わずか数個の微粒子を空気または液体中でナノメートルオーダーにてサイズ保証し、表面・内部でのドーナツの均一性を評価する方法は現在未だ確率されていないのが実情である。そのため本研究では、上記顕微システムの面内方

向の分解能の向上を、CTF (Contrast Transfer Function) 測定を行うことにより検証し、また、ナノサイズの微粒子サンプルの内部観察を行い、微粒子の3次元測定を試みた。

3. 研究の方法

まず最初にベクトリアル偏光干渉計の設計を行った。顕微システムでは被測定物体のバックグラウンド(均一な⁽³⁾領域からの散乱)信号を参照光とのベクトル差分により強制的に抑えることで極微小領域に生じる僅かな感受率変化をコントラストエンハンス画像として再生することができる。レーザー顕微鏡内に偏光干渉系を構築するには、光軸近傍、焦点近傍の電界ベクトルについてのみベクトル差分を実現可能な偏光干渉系を設計する必要がある。しかも将来的には多波長同時励起が可能な光学系を目指すため、多波長下での各種収差条件(色収差、波面収差等)を考慮した光学系の設計が非常に重要となる。本顕微鏡の特徴でもある⁽³⁾テンソル分布の3次元スキャンを行うために、被測定物体のバックグラウンド付近のみの偏光ベクトル差分をゼロにし、微粒子表面・内部に僅かに誘起される⁽³⁾テンソル成分を高精度に3次元分離検出することが可能となる。散乱光のモードパターンには各セクタ部位の⁽³⁾テンソルに応じた偏光状態のモードパターンもコンボリュートされる。これより電界ベクトルの空間モードを畳畳スキャンすることで真の画像を推定した。

実際に構築した偏光干渉非線形レーザー顕微鏡システムの基本構成を図1に示す。共焦点光学系とマイケルソン干渉系となっており、その中にベクトリアル偏光差分干渉系を構築している。位相情報を推定する強度干渉系と⁽³⁾情報を推定するベクトリアル偏光差分干渉系の機能を共に備える。参照信号と均一バックグラウンドからの非線形散乱信号とのベクトル差分を極力ゼロに抑え、不均一ナノ領域から生じる僅かな差分ベクトル変化を画像処理することにより⁽³⁾の分布情報を3D影像化する。物体への非線形分極励起は入射集光プローブ光自体が担い、同光は物体操印機能も有する。その際、レーザービームスキャナやナノピエゾステージを使ってプローブ光をスキャンし、⁽³⁾テンソル成分による多波長3次元分光を試みる。本システムはナノ物体の空間的な非対称性によって僅かに生じる非線形分極からの偏光ベクトル差分量を検出するため、総パワー数mW程度のLDレーザー光源があれば十分であることも確認できた。色素ドープナノ微粒子が示す僅かな線形吸収量⁽¹⁾に応じて最適な励起光源・波長を選択して使用する。

実際の実験手順は以下の通りである。光源には、色素ドープ微粒子の共鳴波長に近い、波長=635nmのLDを用いた。まず、s偏光に直線偏光されたレーザーをビームエキスパ

ンダによって拡大し、ビームスプリッタへ入射する。ビームスプリッタによって2つに分けられた光のうち、透過したレーザを NA=0.9 の対物レンズへ入射し、サンプルに集光させることで s 偏光から楕円偏光に変化した散乱光を検出する。ビームスプリッタによって反射したもう一方のレーザは、 $\lambda/4$ 板へ入射しミラーによって反射され、同 $\lambda/4$ 板を 2 度通過することで偏光が 90° 回転し、s 偏光から p 偏光に変化する。これを、参照光として利用する。参照光側には、散乱光との位相差を合わせるために同じ対物レンズを配置する。楕円偏光の散乱光と p 偏光の参照光を、適切な角度に調節した検光子へ入射して干渉させ、焦点距離 $f=30\text{ mm}$ の平凸を用いて、直径 $\phi=10\text{ }\mu\text{m}$ のピンホールを通し干渉光を検出した。このとき、サンプルの焦点面とピンホールの位置が共焦点の関係にある。また、光源であるレーザ光をオシレータにより周期的な信号に変調し、この周波数に同期させたロックインアンプを用いてノイズを減少させることで、高精度な測定を行った。

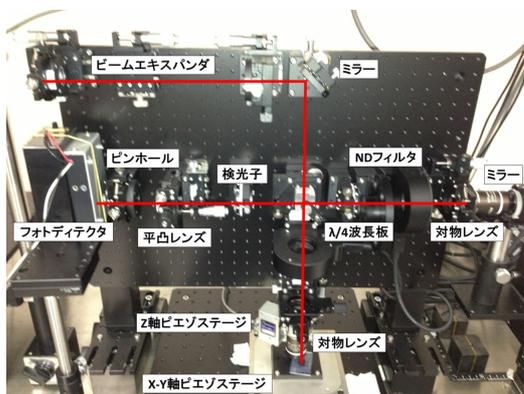


図1 偏光干渉共焦点レーザー顕微鏡の実体写真。

作製した光学顕微鏡の性能を評価するために基本分解能の測定を行った。測定位置にはサンプルとして、光軸に垂直に置かれたミラーを設置し、光軸方向に z 軸ピエゾステージを走査し、共焦点散乱信号のみを測定した。共焦点反射信号の半値幅を光軸方向基本分解能と定義すると、 $0.70\text{ }\mu\text{m}$ であった。通常このままの分解能で計測を行うと $0.70\text{ }\mu\text{m}$ 以下の差異を分解することができず、分解能以下のサイズでの 3 次元計測を行うことができない。続いて、共焦点光学系にマイケルソン干渉計を組み込み、同様に z 軸自動ステージによりミラーを操作させて干渉信号の畳重した共焦点散乱信号を測定した。共焦点面に配置した検光子の角度を s 偏光と p 偏光のちょうど中間値をとる 45° とした時、共焦点マイケルソン干渉信号は強度型の信号となり、共焦点反射信号に一定の周期の信号が重なった波形となる。同干渉信号の最大値を示

す光軸方向移動量の値が試料表面の絶対位置となる。この波の数をカウントすることで共焦点光学系の分解能以上で内部屈折率分布を計測することが可能である。例えば、媒質内部の平均屈折率が一様であり、 $n=1.5$ とすると、ひとつ干渉縞の間隔は約 $0.10\text{ }\mu\text{m}$ となり共焦点信号上に約 $0.10\text{ }\mu\text{m}$ のスケールを描いたことと等価になる。但し、同顕微鏡は強度依存型の干渉法である。

次に、実際に作成した偏光干渉共焦点レーザー顕微鏡の分解能特性を評価するため、模擬 DDS サンプル群（色素ドープナノ微粒子群）を利用して、様々な空間周波数に対して、入射光強度を変化させて CTF 曲線を測定した。微粒子間隔がいろいろと異なる微粒子群に対し、配置周期から空間周波数を逆算し、そのコントラスト信号を測定した。同顕微鏡の空間分解能性能を評価するには CTF 測定がもっとも妥当だと判断した。得られた CTF 曲線を図 2 に示す。入射光強度 $I=80\text{ [W/cm}^2\text{]}$ は線形領域での基本共焦点光学系における CTF 曲線であり、空間周波数の高い部分ではほとんど測定ができないことが分かる。一方、それ以上の入射光強度では非線形分極が誘起され、分解可能なコントラスト値が大幅に改善されていることが分かる。同データから推測するに、 $I=2.5\times 10^4\text{ [W/cm}^2\text{]}$ より大きな強度領域では $5\text{ [1/}\mu\text{m}]$ 以上の空間周波数の分解が十分期待される。

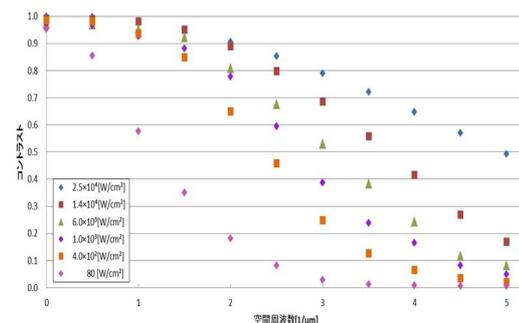


図2 コントラスト分解能の空間周波数依存性。

4. 研究成果

顕微鏡システムの構築と基本性能評価を終え、実際に偏光干渉共焦点レーザー顕微鏡を使用して、単一ナノ微粒子の 3 次元測定を行った。得られた成果について報告する。

最初に、干渉系の機能を利用せず、共焦点光学系のみを利用し、微粒子の影像を試みた。実際の測定では各種 z 軸位置において共焦点断面画像をセクションングし、得られたセクション画像を PC 上で 3 次元に積層合成処理をすることで、ナノ微粒子単体の影像化が可能となる。これにより同顕微鏡の基本計測精度の検証を行った。得られた画像を図 3 に示す。サンプルとして 10% 程度の分散値を持つ

直径 200nm の色素ドープ単一微粒子を使用した。DDS 模擬微粒子としては妥当なサイズ領域を選択した。結果が示すように、得られた 3 次元画像においてもほぼ同等のサイズ評価が可能であり、基本光学系の性能としては妥当であると考えられる。

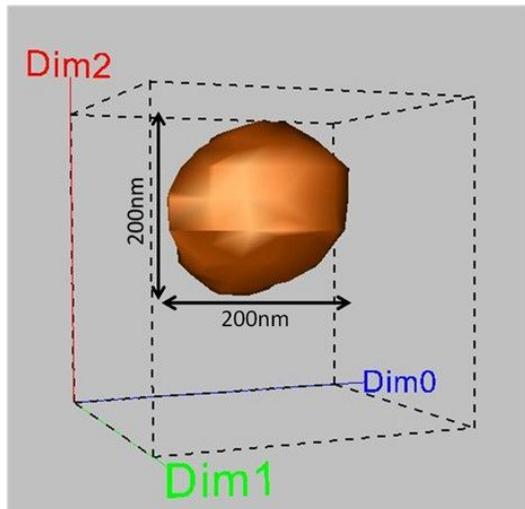
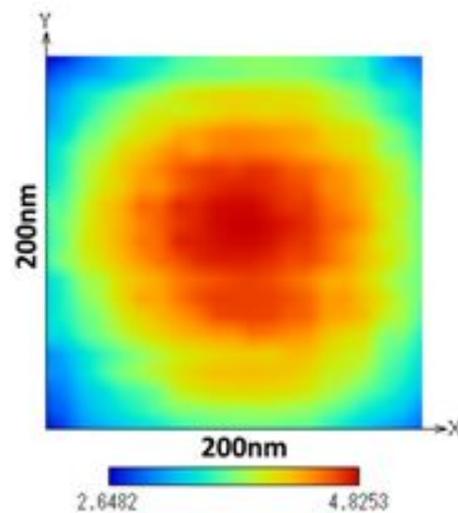


図3 線形光強度領域での微粒子表面の偏光干渉共焦点レーザー顕微鏡による 3 次元計測画像。

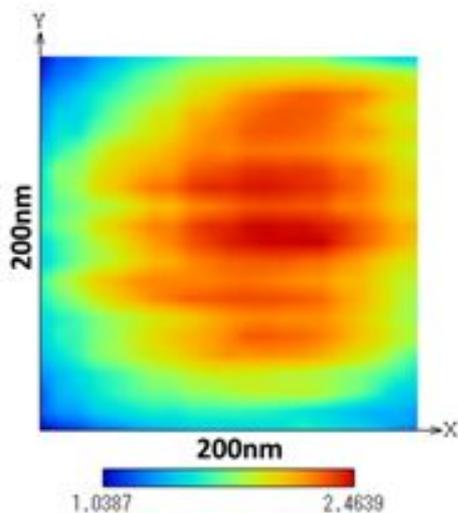
次に、偏光干渉系の機能を利用して、物体散乱光と参照散乱光との差分ベクトル演算にて、微粒子内部の非線形感受率測定を行った。先ほどの微粒子形状の 3 次元映像処理と同様に、先に適当な z 軸位置での微粒子内部のセクションングを行った。得られた断層画像の例を図 4 に示す。最初の図 4 (a) は線形領域下での断層画像で、通常の共焦点顕微鏡と同様のものが得られた。共焦点顕微鏡の面内方向基本分解能（エアリーディスク径: 0.86 μm ）以下の微小色素分布を計測することはできず、ほぼ均一散乱による断層画像となっている。次に示す図 4 (b) は非線形領域かでの断層画像で、共焦点顕微鏡による画像とは異なり、内部の非線形感受率分布ひいては微小領域での色素分布が測定されていることが分かる。これにより非線形領域では、微粒子内部の不均一な色素分布を捉えられていることが分かる。特に非線形高強度領域においては、中強度領域に比べ、微小球内部の色素が存在する部分と存在しない部分でのコントラストがはっきりと出ていることが分かる。このことより、実際に 3 次元計測を行ったことから、非線形性の評価ができ、サンプルに入射する光強度を強くすることで、コントラスト分解能を大幅に向上させることができることが分かる。

上記にて得られた一連のセクション画像（断層画像）を PC 上で 3 次元に積層合成処理をすることで、ナノ微粒子単体の影像化を行った。得られた画像を図 5 に示す。この場

合入射光強度は非線形領域の $I = 2.5 \times 10^4$ [W/cm^2] で、比較的大きな (3) が誘起されていることが、前述のコントラスト分解能の解析データからも明らかである。結果、本来基本面内方向分解能がほぼエアリーディスク径 0.86 μm 、光軸方向分解能が共焦点反射信号の FWHM 値 0.70 μm 程度の共焦点顕微鏡では観測が難しい、直径 200 nm の微粒子内部のおそらく色素分布を反映する (3) を非常に高い空間分解能で測定可能であることが確認できる。



(a)



(b)

図4 偏光干渉共焦点レーザー顕微鏡による微粒子内部の断層計測画像：(a)線形光強度領域、(b)非線形光強度領域。

以上の結果からも、同提案顕微システムはサブミクロンサイズの吸収物体の (3) 分布を 3 次元で分光計測する手法として有効であることが分かる。

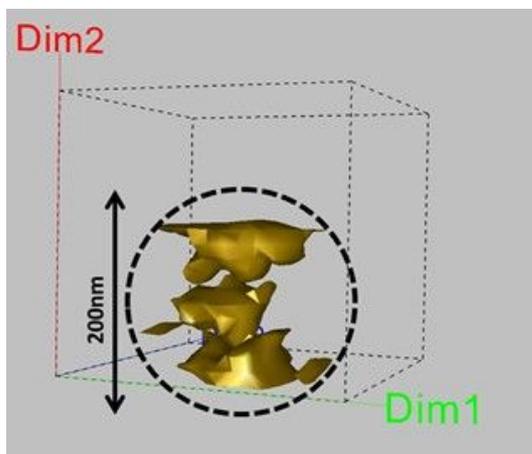


図5 非線形光強度領域での偏光干渉共焦点レーザー顕微鏡による微粒子内部の⁽³⁾分布3次元計測画像。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

K. Fujita and C. Egami, Nanoparticle Imaging with Polarization Interferometric Nonlinear Confocal Microscope, Advances in Condensed Matter Physics 査読有, Vol. 2014 2014, p 176862

C. Egami, Cross section measurement of nanoparticle with polarization-interferometric confocal microscope, Proc. 20th Aust. Inst. Phys. Cong. 査読有, Vol. 255 2012, p87

C. Egami, K. Kuwahara, Internal surface measurement of nanoparticle with polarization-interferometric nonlinear confocal microscope, Int. J. Chem. and Env. Eng. 査読有, Vol. 59 2011, pp.1115-1120

[学会発表](計 5件)

C. Egami and K. Fujita, 3D Nanoparticle Analysis with Polarization-interferometric Confocal Microscope, Int. Conf. on Experimental Mechanics (ICEM) 2013, 2013/11/25, Bangkok

藤田 倅平, 江上 力, 偏光干渉非線形共焦点顕微鏡によるナノ微粒子の三次元影像, 第74回応用物理学会秋季学術講演会, 2013/09/17, 同志社大学, 京都

C. Egami, Polarization-interferometric Nonlinear Confocal Microscopy for Measuring Single Nanoparticle, Nonlinear Optics 2013, 2013/07/24, Hawaii

大野雄平, 和田口由樹, 江上 力, ポリスチレン微粒子による非線形共焦点干渉顕微鏡のCTF測定, 第73回応用物理学会学術講演会, 2012/09/13, 愛媛大学(愛媛県松山市)

C. Egami and K. Kuwahara, Internal surface measurement of nanoparticle with polarization-interferometric nonlinear confocal Microscope, International Conference on Microelectronics, Optoelectronics, and Nanoelectronics 2011/11/28, NH Laguna Palace, Venice, Italy

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江上 力 (EGAMI CHIKARA)

静岡大学・工学研究科・教授

研究者番号: 70262798

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし