

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656001

研究課題名(和文)水-氷(融液-結晶)界面の分子レベル直接観察：超高感度位相差顕微鏡の開発

研究課題名(英文)Molecular-level in-situ observation of water-ice crystal (melt-crystal) interfaces by developing ultrahigh sensitivity phase contrast microscopy

研究代表者

佐崎 元 (SAZAKI, GEN)

北海道大学・低温科学研究所・教授

研究者番号：60261509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：気相や溶液からに比べて極めて速い融液からの結晶成長を分子レベルで直接観察することを目指し、位相差顕微法の超高感度化に挑んだ。対物レンズ後焦点面の輪帯フィルターとリングスリットの幅を、通常の1/4に細くした(対物レンズとリングスリットを新たに作製)。これにより、直接光の光量を減じ、回折光の光量を増大させた結果、生物系の標準試料であるヒーラ細胞および水-氷(融液-結晶)界面のコントラストをそれぞれ約2.1倍および1.5倍向上させることに成功した。これらの結果は、直接光の光量を任意に減じるデバイスを今後付加することで、さらにコントラストを向上させることが原理的には可能であることを示す。

研究成果の概要(英文)：We tried to improve the contrast level of phase-contrast optical microscopy significantly, aiming at molecular-level in-situ observation of melt-crystal interfaces. We made widths of an orbicular filter (placed at a back focal plane of an objective) and a ring slit 1/4 times thinner (we newly prepared an objective and a ring slit), to decrease the intensity of transmitted light and also to increase the intensity of diffracted light. Then we succeeded in improving the phase-contrast levels of HeLa cells (standard samples in biology) and water-ice (melt-crystal) interfaces about 2.1 and 1.5 times higher, respectively. These results suggest that the addition of a device that can arbitrarily decrease the intensity of transmitted light can further improve phase contrast level, by perfectly matching the intensities of transmitted and diffracted light.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎、応用物性・結晶工学

キーワード：水-氷界面 融液-結晶界面 分子レベル直接観察 超高感度位相差顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

(1) Si 結晶など、産業界で用いられる多くの実用材料結晶は融液から育成するが、融液と結晶の界面を分子レベルで観察できた例は未だなく、その疎過程は不明なままである。

(2) 申請者らはこれまでにレーザー共焦点微分干渉顕微鏡を開発し、気相から成長する氷結晶表面上で単位ステップ(0.37 nm 高さ)の直接観察に初めて成功した[G. Sasaki, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107, 19702-19707 (2010)]. しかし、本顕微鏡はレーザー走査のため、1画面の取得に1~数秒を要して遅く、極めて成長が速い水-氷界面へは適用が難しい。

(3) 申請者らはこれまでに、高速観察(1秒間に33画面以上)が可能な位相差顕微鏡を用いて、タンパク質結晶表面上の単位ステップ(5.6 nm 高さ)の直接光学観察に成功している[P. Dold, et al., J. Cryst. Growth, 293, 102-109 (2006)]. 位相差顕微鏡の方が微分干渉顕微鏡よりも高さ方向にはより高感度であるため、位相差顕微鏡を究極的に高感度化することで、極めて速く成長する融液-結晶界面でも単位ステップを高速に直接光学観察できるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

(1) 位相差顕微鏡は、試料からの回折光と透過光を干渉させることで試料にコントラストを与える。回折光と透過光の強度が完全に同じである時に最大のコントラストが得られるが、通常の結晶表面観察では透過光の強度が回折光に比べて極めて大きい。そのため、透過光強度を減じて調整できる素子を作製・配置し、透過光と回折光の強度差を減じることで、位相差コントラストを高め、超高感度化に挑む。

(2) 本申請で新たに開発する超高感度位相差顕微鏡を用いて、水-氷結晶界面を直接光学観察し、融液-結晶界面の分子レベルその場観察に挑む。

3. 研究の方法

(1) 位相差顕微鏡と超高感度化の原理：位相差顕微鏡は、試料からの回折光(図1aの波D)と透過光(図1aの波A)を用いる。透過光の位相を1/4波長だけずらして(図1bの波A)、回折光と干渉させることで、光の位相差を強度差に変換する(図1cの波P)。この際、透過光と回折光の強度が完全に同じである時に最大のコントラスト  $(P-A)/A=D/A$  (図1d)が得られる。結晶表面を観察する際には、通常、透過光Aの強度は回折光Dの強度に比べて数10倍以上大きい。そのため、回折光との干渉で得られる位相差コントラスト  $D/A$  はわずかしかない(図1c)。しかし、透過光Aの強度を回折光Dの強度と完全にマッチす

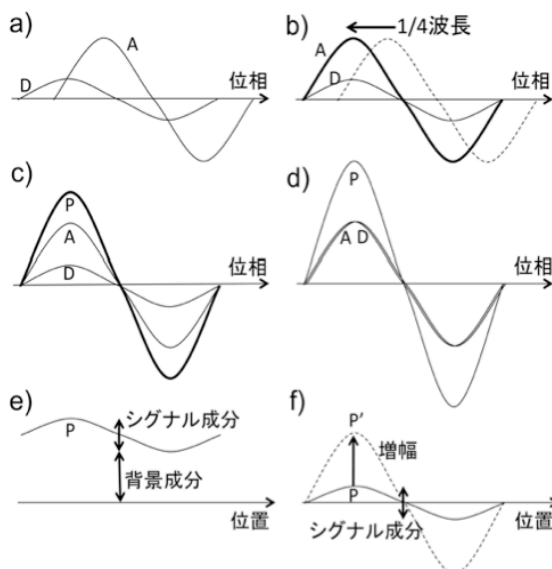


図1 位相差顕微鏡と超高感度化の原理図

るよう減じてやることが出来れば、極めて大きなコントラストが原理上得られる。また、通常の位相差顕微鏡観察の場合には、透過光の大きな背景成分の上にシグナル成分が含まれるが(図1e)、背景成分を十分に減じることができると、シグナル成分は容易に増幅することができ(図1f)、極めて高いシグナル/ノイズ(S/N)比と感度が得られる。

(2) 当初予定していた開発：位相差顕微鏡の最も単純化した光路図を図2に示す(実際の光路図はもっと複雑であるが、要点を説明するために単純化した)。リングスリットからの照明光は、試料を透過した光(図2の実線)と試料での散乱光に別れる。散乱光の大部分は互いに打ち消し合うが、ブラッグの回折条件を満たした散乱光のみが回折光(図2の点線)として特定の角度に現れる(単純化のため図では1次の回折光のみを表示している)。透過光と回折光は対物レンズの後焦点面上で異なる位置に焦点を結ぶため、透過光のみに様々な処理を施すことが出来る。図2中の後焦点面は通常対物レンズ内部に存在し、ここに直接光の位相をずらす1/4波長板と輪帯減光フィルター(培養細胞の観察に最適化された減光フィルターが通常用いられる)が配置されている。図2では省略されているが、後焦点面と等価な位置が顕微鏡鏡筒内部の後段側にもう1つ存在する。ここに、透過光の強度を自在に減じ調整できる輪帯減光フィルターを配置する(図2の光学素子の配置場所)。これにより、透過光と回折光の強度をマッチさせ、位相差コントラストを飛躍的に増大させる。

(3) 実際に行った開発：上記(2)が当初予定していた開発内容であるが、研究費の配分額が申請額の約60%に減額された。そのため、顕微鏡鏡筒内部の後段側の対物レンズ後焦点面と等価な位置に各種の輪帯減光フィル

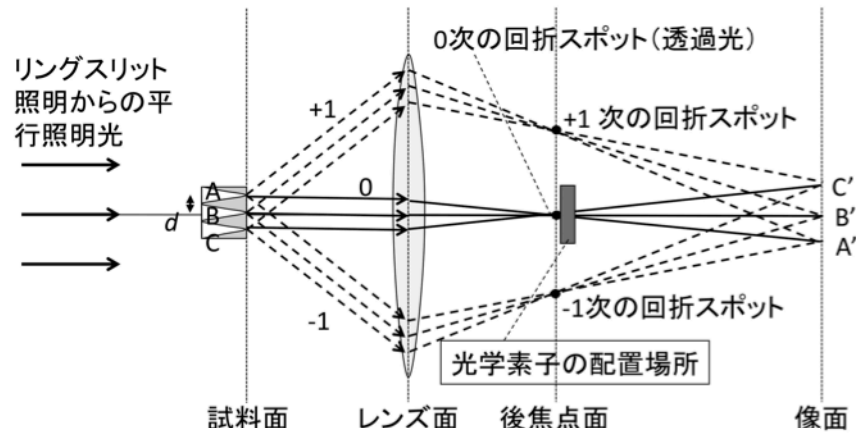


図2 開発する超高感度位相差顕微鏡の単純化した光路図

ターを配置する方式はとらないことにした。透過光と回折光の強度を完全にマッチングさせることはできないが、当研究で提案する方法の「原理的な有効性」をより低金額で確認するために、リングスリットおよび対物レンズの輪帯フィルターの幅を市販品の1/4に細くした、特型のリングスリットと対物レンズを作製することにした。これにより、透過光の強度を弱めると共に、対物レンズがより多くの回折光を集めることができるため、回折光の強度を実効的に強めることができる。また本方式ではさらに、回折光の実効的な開口数を大きくすることで、分解能を向上させることができる。

上記の開発内容の変更は、株式会社オリンパスエンジニアリングと入念な打ち合わせを行った上で決定した。平成24年度に、特型の対物レンズ(10倍)およびリングスリットの設計と作製を行った。納入が平成25年3月29日となったため、購入は平成26年度になった。そして、平成26年度に、生物分野での標準試料であるヒーラ細胞、および水-氷(融液-結晶)界面のその場観察実験を行い、位相差顕微鏡の高感度化を確認した。

#### 4. 研究成果

(1) ヒーラ細胞を用いた、位相差顕微鏡の高感度化の確認：まず、生物分野において光学顕微鏡観察の標準試料とされるヒーラ(HeLa)細胞を試料として観察実験を行った。図3にその一例を示す。図3A, Bはそれぞれ、通常および高感度化した位相差顕微鏡による観察像を示す。通常の位相差顕微鏡像(図3A)では、ヒーラ細胞の核が認識されるのみで、核周辺に存在する細胞質はほとんど可視化出来なかった。一方、高感度化した位相差顕微鏡像(図3B)では、核はもちろんのこと、細胞質も明瞭に可視化することができた。また、培地に相当する部分も、図3Bの方が図3Aに比べて明瞭に暗く、背景光をうまく減じることができていることがわかる。

図3におけるコントラストの違いを定量化するために、図中の白線で示した「培地-細胞質-培地」部分の輝度プロファイルを計測した結果を図4に示す。培地部分と細胞質

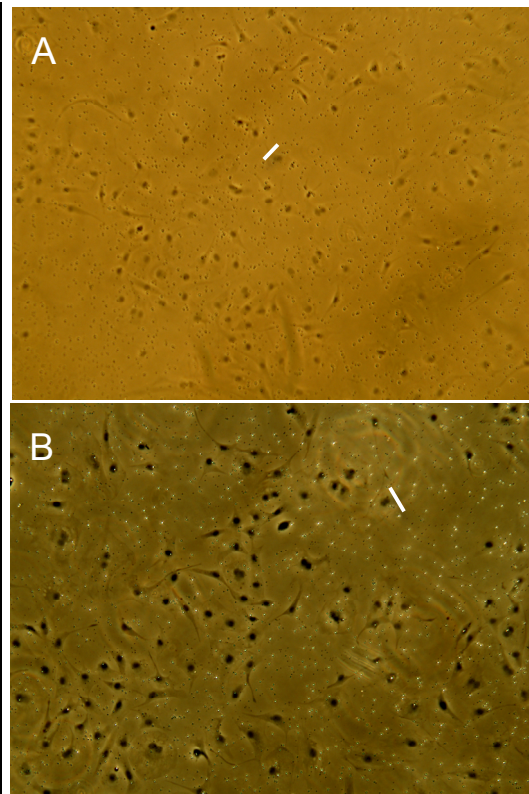


図3 通常(A)および高感度化(B)位相差顕微鏡によるヒーラ細胞のその場観察

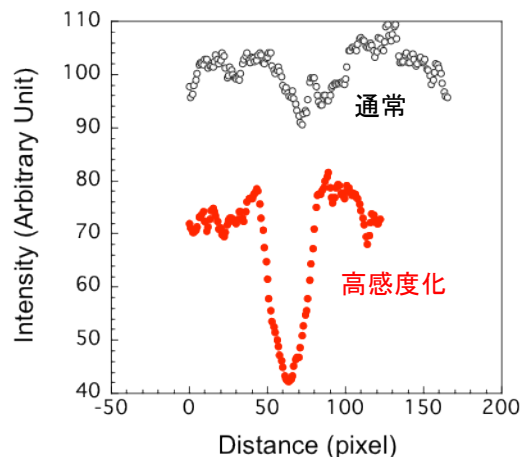


図4 位相差顕微鏡による背景(培地部分)とヒーラ細胞の細胞質が示すコントラスト

部分の輝度の差は、高感度化した位相差像の方が通常の位相差像に比べて、約 2.1 倍大きかった。この結果より、ヒーラ細胞の観察においては、今回の開発によって位相差コントラストを約 2.1 倍高感度化することに成功したと結論できる。

(2) 水（融液）中で成長する氷結晶の観察：次に、過冷却水中で成長する氷結晶のその場観察を行った。観察には、当研究室でこれまでに開発した「自由成長観察チャンバー」を用いた (S. Zepeda, et al., *Cryst. Growth Des.*, **8**, 3666-3672 (2008))。図 5 にその場観察の一例を示す。図 5A および B は、通常および高感度化した位相差顕微鏡による像を示す。過冷却水部分の輝度は、図 5A に比べて B の方が明瞭に小さく、背景光をうまく減じることができていることがわかる。しかし、図 5 の像からは、図 3 に示したヒーラ細胞像ほどの明瞭な違いは認められなかった。

そこで次に、図 5 でのコントラストの違いを定量化するために、図 5 中の白線で示した「水-氷結晶」部分の輝度プロファイルを計測した結果を図 6 に示す。水部分と氷結晶のエッジ部分の輝度の差は、高感度化した位相差像の方が通常の位相差像に比べて、約 1.4 倍大きかった。また、水部分と氷結晶の内部部分の輝度の差は、高感度化した位相差像の方が通常の位相差像に比べて、約 1.6 倍大きかった。これらの結果より、水中での氷結晶の観察においては、今回の開発による位相差コントラストの改善（約 1.5 倍）は、ヒーラ細胞での改善（約 2.1 倍）に比べて小さいことがわかった。

通常の位相差観察用対物レンズの輪帯フィルター中の ND フィルターの減光率は、生物細胞観察時に良い位相差コントラストを示すように設定されている。そのため、水中での氷結晶の観察において位相差コントラストの改善が小さかった原因は、透過光と回折光の強度を完全にマッチングさせることができなかつたことにあると結論づけることができる。透過光と回折光の強度は、観察に用いる試料や観察系に大きく依存する。そのため、光量マッチングの問題を完全に解決するには、LCOS（液晶デバイス）等を用いて「任意に」透過光の光量を調整することがやはり重要であることが確認された。

今回の研究期間中に行った開発では、水中で成長する氷結晶を分子レベルでその場観察することはかなわなかつた。しかし、今回の開発により、「直接光の光量を減じ、回折光の光量を増大させることで、位相差コントラストを向上させることができる」という基本コンセプトは正しいことが証明できた。将来、LCOS 等を用いてさらなる改良を加えることで、過冷却水中の氷結晶の分子レベルその場観察に再度挑戦したい。

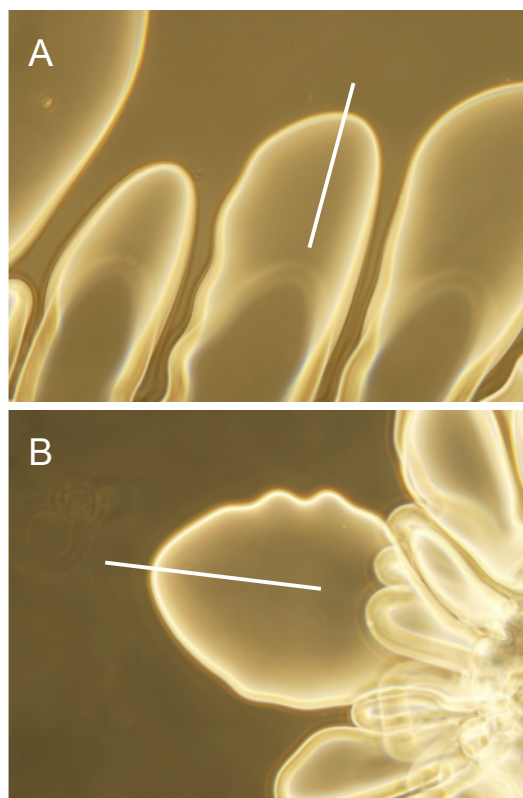


図 5 通常 (A) および高感度化 (B) 位相差顕微鏡による水中の氷結晶のその場観察

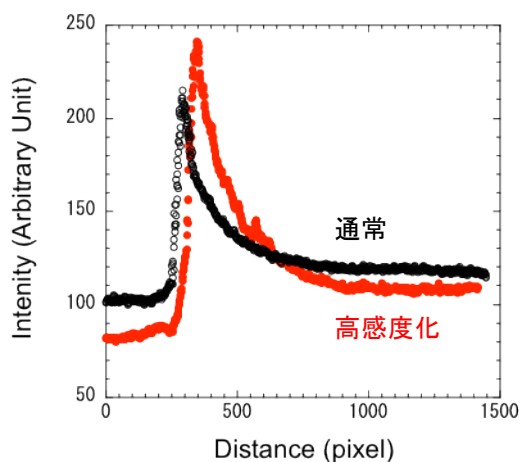


図 6 位相差顕微鏡による水と氷結晶が示すコントラスト

## 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 2 件)

(1) G. Sazaki, H. Asakawa, K. Nagashima, S. Nakatsubo, Y. Furukawa, "Double spiral steps on Ih ice crystal surfaces grown from water vapor just below the melting point", *Crystal Growth & Design*, published in a web version. DOI: 10.1021/cg4014448 【査読有り】

(2) G. Sazaki, H. Asakawa, K. Nagashima, S. Nakatsubo, Y. Furukawa, "How do quasi-liquid layers emerge from ice

crystal surfaces?”, *Crystal Growth & Design*, **13**, 1761-1766 (2013). DOI: 10.1021/cg400086j 【査読有り】

〔学会発表〕(計 11 件)

(1) 佐崎 元, 麻川明俊, 長嶋 剣, 中坪俊一, 古川義純, 「氷結晶表面の擬似液体層の生成機構と熱力学的安定性」, 領域 9, 11 合同シンポジウム「氷の結晶成長-実験とシミュレーションによる最近の進展」, 日本物理学会第 69 回年次大会, 2014 年 3 月 27-30 日, 東海大学湘南キャンパス, 神奈川県. 【招待講演】

(2) G. Sazaki, H. Asakawa, K. Nagashima, S. Nakatsubo, Y. Furukawa, “How do quasi-liquid layers emerge from ice crystal surfaces?”, 13th International Conference on the Physics and Chemistry of Ice (PCI-2014), Dartmouth University, Hanover, USA, March 17-20, 2014. 【招待講演】

(3) G. Sazaki, H. Asakawa, K. Nagashima, S. Nakatsubo, Y. Furukawa, “Double spiral steps on Ih ice crystal surfaces grown from water vapor just below the melting point”, 13th International Conference on the Physics and Chemistry of Ice (PCI-2014), Dartmouth University, Hanover, USA, March 17-20, 2014.

(4) 佐崎 元, 麻川明俊, 長嶋 剣, 中坪俊一, 古川義純, 「氷結晶表面上の渦巻ステップの構造について」, 第 43 回結晶成長国内会議, 2013 年 11 月 6-8 日, 長野市生涯学習センター, 長野県.

(5) 佐崎 元, 麻川明俊, 長嶋 剣, 中坪俊一, 古川義純, 「氷結晶の表面融解過程の高分解光学観察」, 日本化学会有機結晶部会第 22 回有機結晶シンポジウム, 2013 年 10 月 30 日~11 月 1 日, 北海道大学札幌キャンパス, 北海道. 【招待講演】

(6) 佐崎 元, 麻川明俊, 長嶋 剣, 中坪俊一, 古川義純, 「氷ベール面上での渦巻ステップの構造について」, 日本物理学会 2013 年秋季大会, 2013 年 9 月 25-28 日, 徳島大学常三島キャンパス, 徳島県.

(7) G. Sazaki, H. Asakawa, K. Nagashima, S. Nakatsubo, Y. Furukawa, “Thermodynamic stabilities of quasi-liquid layers on ice basal faces”, 2nd Fusion Materials Special Meeting, Arcadia Ichigaya, Tokyo, Japan, October 27-28, 2013. 【招待講演】

(8) G. Sazaki, H. Asakawa, K. Nagashima, S. Nakatsubo, Y. Furukawa, “In-situ observation of emergences of quasi-liquid layers from ice basal faces by advanced optical microscopy”, The 17th International Conference on Crystal Growth and Epitaxy, The University of Warsaw, Warsaw, Poland, August 11-16, 2013.

【招待講演】

(9) 佐崎 元, 麻川明俊, 長嶋 剣, 中坪俊一, 古川義純, 「氷結晶表面の光学その場観察: 表面融解による擬似液体層の生成」, 第 40 回食品の物性に関するシンポジウム, 2013 年 9 月 20-21 日, ルポール讃岐, 香川県. 【招待講演】

(10) 佐崎 元, 麻川明俊, 長嶋 剣, 中坪俊一, 古川義純, 「氷結晶表面での擬似液体層生成過程の光学その場観察」, 資源・素材学会, 2013 年 9 月 3-5 日, 北海道大学札幌キャンパス, 北海道. 【招待講演】

(11) 佐崎 元, 麻川明俊, 長嶋 剣, 中坪俊一, 古川義純, 「氷結晶底面での表面液体相(擬似液体層)の生成と歪みの効果」, 2013 年日本結晶成長学会特別講演会: バイオ有機物質における結晶成長-その基礎と応用-, 2013 年 5 月 17 日, キャンパスイノベーションセンター東京国際会議室, 東京都. 【招待講演】

〔図書〕(計 1 件)

(1) Y. Furukawa, G. Sazaki, H. Nada, “Chapter 17 Surface of Ice”, K. Wandelt (Ed.), *Surface and Interface Science*, pp. 305-348 (WILEY-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2014).

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)  
なし

○取得状況(計 0 件)  
なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/ptdice/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐崎 元 (SAZAKI, Gen)

北海道大学・低温科学研究所・教授  
研究者番号: 60261509

(2) 研究分担者

古川 義純 (FURUKAWA, Yoshinori)

北海道大学・低温科学研究所・教授  
研究者番号: 20113623

長嶋 剣 (NAGASHIMA, Ken)

北海道大学・低温科学研究所・助教  
研究者番号: 60436079

(3) 連携研究者

なし