

令和元年6月14日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H03945

研究課題名(和文) 超解像ベクトリアル偏光干渉レーザー顕微鏡による微粒子イメージング

研究課題名(英文) Nanoparticle Imaging with Vectorial Polarization Interferometric Laser Microscope

研究代表者

江上 力 (Egami, Chikara)

静岡大学・工学部・教授

研究者番号：70262798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：近年、医学・薬学分野では薬剤投与経路の最適化を目的として、DDSナノ微粒子の研究開発が盛んである。一方、薬剤DDS粒子は当然のことながら蛍光プローブをドーピングすることができないことから、ナノ領域での新たな分光・計測技術が求められている。本研究ではDDS微粒子の表面・内部のナノ・サブミクロン構造・薬理特性について、安価な複数の連続発振レーザーを用いたベクトリアル偏光干渉非線形レーザー顕微鏡を開発し、マトリックス中で測定可能な超解像タイムラプスイメージング法を提案する。これまでに培った生体計測での基礎技術と光ディスク用のデータピックアップ技術をDDS薬剤微粒子のナノ・サブマイクロ計測技術へ応用展開する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在のDDSはAFM表面計測が主流であり、より複雑な内部立体構造を有する球形 dendritic 等では計測が不可能で、より簡便で有効な構造解析手段が未だ提案されていないのが実情であり、各国がしのぎを削っている。当方が考案した偏光干渉顕微技術はこれをブレイクスルーできる可能性があり、DDS輸送体の分光イメージングへ応用展開も可能であると判断し研究をスタートした。結果、提案技術はDDS輸送体の3次元分光計測において非常に有効な手法であり、医学・バイオの研究領域における波及効果が大きいということが確かめられた。

研究成果の概要(英文)：In recent years, applications of nano-particles to medical diagnosis and medical treatment have been studied intensively. Increasing attention to nanoparticle in particular has been devoted to drug delivery system (DDS). There are varieties of DDS technologies and a very significant number of DDS medicines already launched out in the world.

In this paper, incorporating a polarization interferometer into a nonlinear confocal microscope, we propose polarization-interferometric nonlinear confocal microscopy in order to analyze a single nanoparticle (200-nm diameter) doped with organic chromophores in liquid solutions. Measuring nanoparticles less than a half wavelength of an illuminating wave, general optical microscopes have poor spatial resolving power without toxic fluorescent indicator probes. We studied the contrast transfer function (CTF) and three dimensional spectroscopic imaging of the nanoparticle.

研究分野：Nonlinear Optics

キーワード：レーザー顕微鏡 微粒子 偏光干渉

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19, CK - 19 (共通)

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(ドーパント)を結合・ドーピングさせ, 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, ドーパント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

近年, 医学・薬学分野では薬剤投与経路の最適化を目的として, DDS ナノ微粒子の研究開発が盛んである. 一方, 薬剤 DDS 粒子は当然のことながら蛍光プローブ色素をドーピングすることができないことから, 同粒子を3次元で評価するための, 新たな分光・計測技術が求められている. 本研究では DDS 微粒子の表面・内部のナノ・サブミクロン構造・薬理特性について, 安価な複数の連続発振レーザを用いたベクトリアル偏光干渉非線形レーザ顕微鏡を開発し, マトリックス中においても測定可能な分光イメージング法を提案する. これまでに培った生体顕微計測の基礎技術と光ディスク用のデータピックアップ技術を DDS 薬剤微粒子のナノ・サブマイクロ計測技術へ応用展開する.

本研究では DDS ナノ微粒子の表面や内部の光学的特性評価において, 短パルスレーザ分光法や蛍光プローブ色素を使用することなく, 比較的安価な複数の連続発振レーザ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ピングすることは難しい. 本顕微鏡は従来のレーザ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る. この目的のもと, 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

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た, 偏光干渉非線形レーザ顕微鏡を提案する. レーザ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<sup>(3)</sup>分布)をナノレベルで推定するレーザ顕微システムを開発した.

本研究で用いた偏光干渉共焦点顕微鏡の概略図を図1に示す. 本顕微鏡はマイケルソン型干渉計型の偏光干渉計を組み込んだ共焦点レーザ顕微鏡である. 光源として  $\lambda = 517.2, 638.5, 686.3 \text{ nm}$  の3波長のCW(Continuous Wave)レーザダイオードを選択して使用する. レーザダイオードからは s 偏光の光波が出射される. 出射ビームは, ビームエキスパンダーを通過し, 対物レンズの NA(Numerical Aperture) を最大限に活用するために対物レンズの瞳径の大きさに拡大される. 次にビームスプリッターで測定光路と参照光路の2つにビームは分

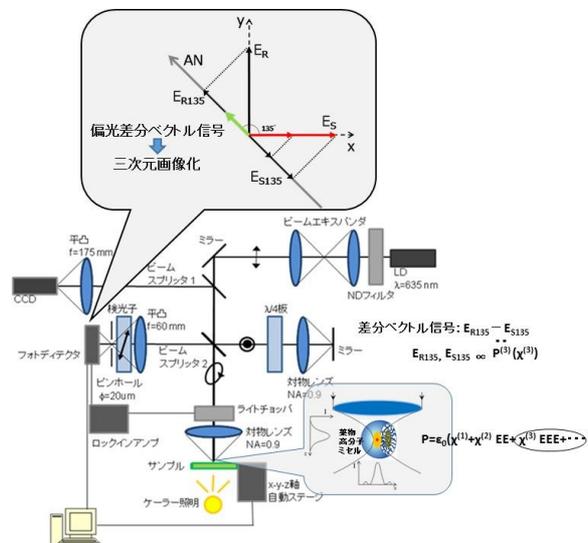


図1 偏光干渉共焦点顕微鏡の光学系

割される．測定光路側ではピエゾステージにサンプルを載せ、参照光路側はミラーを設置している．両光路のビームはそれぞれ  $NA=0.9$  の対物レンズによって、測定光路のサンプルと参照光路のミラー上にある対物レンズの焦点に集光される．この対物レンズの性能が、共焦点レーザ顕微鏡の基本的な空間分解能を決定する．参照光路側には、ビームを各波長に合わせて s 偏光から p 偏光に状態を変更するための位相連続可変の液晶位相補償板と、参照光路の光強度を測定光路の散乱光の強度と等しくするための ND フィルタを設置している．両光路から返ってきたビームは、ビームスプリッタを通過・重ね合わされたのち干渉光となり、検光子を透過して平凸レンズで集光され、直径  $10\ \mu\text{m}$  のピンホールを通過した後、ロックインアンプを使用してフォトディテクタで検出される．上記の検光子は、偏光干渉解析において重要な役割を持つ、最小分解能  $0.002^\circ$  の性能を持つ自動回転検光子である．ロックインアンプ参照周波数として  $10\ \text{kHz}$  のチョッパー周波数を生成する目的で、干渉計での SN 比を改善するための電流変調レーザダイオードを使用している．一般的に色素を含む有機物の散乱光の応答周波数は遅いもので  $\text{MHz}$  である．そのため、光波に  $10\ \text{kHz}$  の変調を加えても、散乱光の応答周波数とは周波数の桁数が大きく異なるため、測定物質にとって  $10\ \text{kHz}$  の変調は CW のビームとみなすことができ、影響を与えない．加えて、図中には示していないが、光学系全体の精密な光軸位置とレンズ等の光学部品の正確な中心位置を決定するために、光学系中に別途レーザ光源を使用したオートコリメート光学系を併設装備させた．他波長での分光計測を実施するには同光学システムの使用は必要不可欠なものである．検光子を通過後、フォトディテクタ上で得られる信号は測定光と参照光の偏光差分ベクトル信号となっている．実際の測定では、ナノ微粒子にドーブされたクロモファンの等方性領域において差分信号をゼロとする工程が必要となる．そのために、偏光解析用の自動回転検光子を装備する．これにより、非等方性領域からの非線形散乱信号におけるコントラスト空間分解能を理想的には無限大にすることが可能となる．

#### 4. 研究成果

3 節で述べた手法に基づき、DDS ナノ微粒子の多波長 3 次元分光光学系によって得られた成果を以下で述べる．

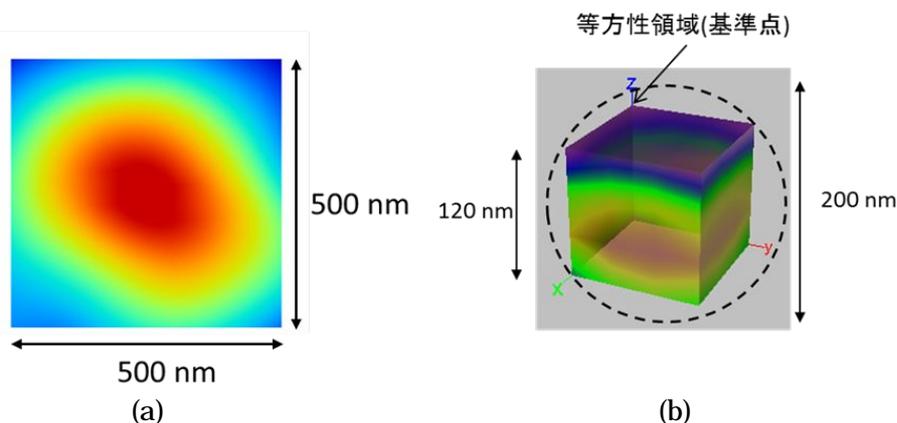


図 2 共焦点顕微鏡による観測結果: (a)断層画像, (b)3 次元画像.

分光計測の準備段階として、プレスキャンによりナノ微粒子中におけるクロモファンドーブでの等方性領域を事前決定しなければならない．本研究で使用した擬似 DDS 微粒子の共焦点レーザ顕微鏡による断層画像を図 2(a)に、断層画像を積層処理して得られた微粒子の 3 次元画像を図 2(b)に示す．図 2(a)は、対物レンズの焦点を微粒子の中心付近に設定し、光軸と垂直な面をなす x-y 方向にピエゾステージを動かして測定を行った  $500\ \text{nm} \times 500\ \text{nm}$  の断層画像である．図 2(b)は、図 2(a)のような断層画像を光軸方向 (z 方向)に焦点を移動させながら複数枚取得し、積層処理して 3 次元化した画像である．測定領域である微小球内部を  $120\ \text{nm} \times 120\ \text{nm} \times 120\ \text{nm}$  で測定しており、中心に近づくほど微粒子の散乱光は大きくなった．図 2(b)では画像を見やすくするため、散乱光の大きな中心部分を一部透明化処理している．同図においてほぼ等方性散乱とみなせる領域で、自動回転検光子によって偏光差分ベクトルを 0 とし、等方性領域の基準点として設定する．また、逆の視点から、同顕微鏡では内部の微細な構造を判別できないことも分かる．

上記のプレスキャン行程の後、実際に偏光干渉共焦点顕微鏡を使用して、DDS ナノ微粒子の 3 次元分光計測を行った．使用した光学定数は次に示す意味を持つ．散乱光の電界ベクトルの楕円偏光の主軸の傾き角  $\theta$  を測定し、楕円偏光を構成する x 偏光と y 偏光の位相差  $\delta$  を導出する．波長  $\lambda = 638.5\ \text{nm}$  のレーザを使用して測定した一例を示す．

図 2(b)に示した微粒子内部のうち、微粒子内にて偏光干渉による散乱信号が最も小さい地点を探す．その地点を微粒子内の等方性領域とみなして基準点とした．等方性領域にて、自動回転検光子を回転させて、散乱信号が最大値となる検光子の角度  $\theta_0$  を求めた．この角度を等方性の基準角度 ( $\theta_0 = 0^\circ$ )として、参照光路を閉じた共焦点光学系 (共焦点偏光解析器)を用いて、検光子を  $360^\circ$  回転させて散乱信号の変化を測定した．また、等方性領域において参照光

路を開け、偏光干渉の差分がほぼ 0 となる自動回転検光子の角度  $\theta$  を測定した。次に、図 2(b)の等方性領域以外で、同様に共焦点偏光解析器により散乱信号が最大となる角度  $\theta'$  と散乱信号の値を測定した。等方性領域と異方性領域の偏光を比較し、 $\theta' - \theta_0$  より、楕円偏光の主軸の傾き角を求めることができる。図 3(a)に測定した  $\theta$  の断層画像を、図 3(b)に微粒子内部の 3 次元画像を示す。図 3(a), (b)より微粒子内のマクロ領域における色素分子の配向状態を推定することができる。ここで、 $\theta$  は等方性領域を基準とした相対的な値である。

仮に検光子を x 軸に対して 45 度で設置した際、得られる偏光干渉の強度は下記の式(1)となる。

$$|E_{out}(\theta = -\pi/4)|^2 = A_s^2 \left( 1 - \cos\psi + \sin\psi \cos\delta - \frac{1}{2} \sin 2\psi \cos\delta \right) \quad (1)$$

この式を楕円偏光を構成する x 成分と y 成分の位相差  $\delta$  について整理すると

$$\delta = \cos^{-1} \left[ \frac{|E_0(\theta = -\pi/4)|^2 / A_s^2 + \cos\psi - 1}{\sin\psi - (1/2) \sin 2\psi} \right] \quad (2)$$

となる。ここで  $|E_0(\theta = -\pi/4)|^2$  は等方性領域における偏光干渉差分ベクトルが 0 の時の干渉信号であり、 $\psi$  は楕円変更の傾き角である。以上、すべての値は本顕微鏡で測定可能な値であり、式(2)を用いて  $\delta$  を算出することができる。

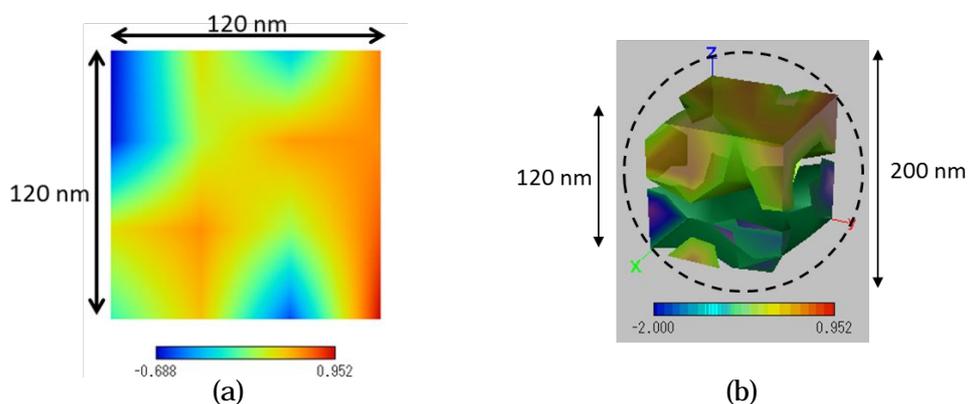


図 3 偏光共焦点顕微鏡による  $\delta$  の観測結果: (a)断層画像, (b)3 次元画像

加えて、クロモファの主軸と副軸間の位相差  $\delta$  を式(2)を用いて画像化したデータを図 4 に示す。図 4(a)は  $\delta$  の断層画像を、図 4(b)は微粒子内部の 3 次元画像を表す。このデータから可視化されている部分は色素の分布密度が小さく、可視化されていない部分は逆に大きいと推定できる。ここで、 $\delta$  は等方性領域を基準とした相対的な値である。

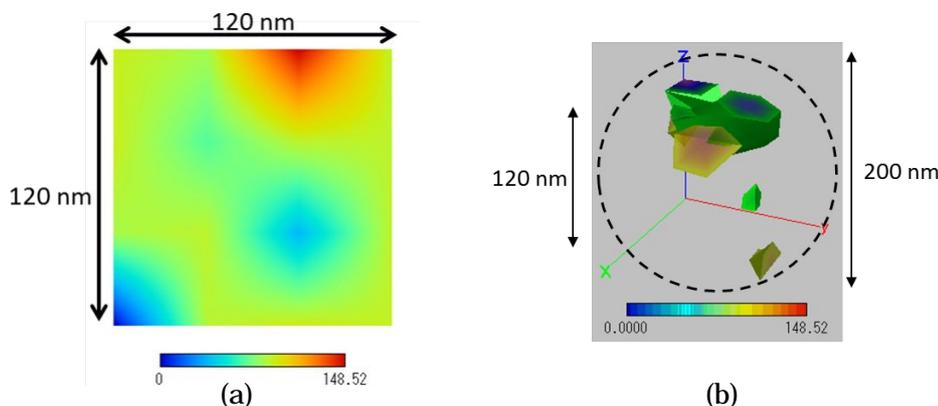


図 4 偏光共焦点顕微鏡による  $\delta$  の観測結果: (a)断層画像, (b)3 次元画。

続いて、光源として 3 波長のレーザを使用して通常の共焦点顕微鏡及び偏光干渉共焦点顕微鏡における CTF の特性評価を行った。得られたデータを表 1, 2 に示す。誘電率の虚部は媒質の吸収係数に相当し、波長依存性を持つ。そこで、色素を含んだ擬似 DDS 微粒子に対して、共鳴領域から分散領域に渡る 3 種類のレーザ波長  $\lambda = 517.2, 638.5, 686.3$  nm を選択した。

最初に、共焦点顕微鏡により得られた測定結果を検討する(表 1 参照)。各波長に対する微粒子の散乱信号を、電圧変換した最大測定値と最小測定値および画像のコントラストを表 1 にまとめる。ここで、最大測定値は異方性領域の最大の散乱信号であり、最小測定値は等方性領域の信号とみなす。そのため、この 2 つの値がコントラスト分解能の指標となる。波長ごとの散乱信号の変化は、サンプル媒質の分極しやすさの違い、吸収係数の差につながる。そのため、

微粒子外の等方性領域の反射信号と比較することで、異方性領域である微粒子の散乱信号をより明確に検出することができる。表1より、波長 =686.3 nm のレーザが最も信号のコントラストが良く、使用した3種のレーザのうち 擬似 DDS 微粒子に付与された色素の測定に関して、吸収の面では最も測定に適したレーザであるといえる。

次に偏光干渉共焦点顕微鏡でも同様に測定した結果を検討する(表2参照)。偏光干渉共焦点顕微鏡でも同様に、波長 =686.3 nm の分散領域にある光源を使用した場合が最もコントラストの良い散乱信号が得られ、本 DDS 微粒子の測定に適していることが明らかである。

以上得られた成果をまとめると、クロモファの共鳴領域、分散領域に関わらず、各波長で共焦点顕微鏡におけるコントラストよりも偏光干渉共焦点顕微鏡におけるコントラストが格段に向上していることが分かる。この顕微鏡における散乱光は3次の非線形分極によって生じる光であるため、入射光強度が大きくなるとコントラストもさらに大きな値が得られる。ひいてはCTFの大幅な向上にもつながることになる。但し、これにはクロモファの光退色(フォトリーチ)を伴うことになるため、実際のDDS分光においては入射光強度とCTF値はトレードオフの関係にあるため、十分な注意が必要である。

表1 共焦点顕微鏡におけるコントラストの波長依存性。

波長 $\lambda$ [nm]	最大測定値 [V]	最小測定値 [V]	コントラスト
517.2	2.1395	2.0648	0.0178
638.5	2.1211	1.9840	0.0334
686.3	2.1398	1.9216	0.0537

表2 偏光干渉共焦点顕微鏡におけるコントラストの波長依存性。

波長 $\lambda$ [nm]	最大測定値 [V]	最小測定値 [V]	コントラスト
517.2	0.23965	0.19271	0.1086
638.5	0.25141	0.18081	0.1633
686.3	0.48406	0.19863	0.4181

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

(1)Tomographic Imaging of DDS Polymeric Nanoparticle with Polarization Interferometric Confocal Microscope (S. Kawasaki and C. Egami) submitted to Mol. Cryst. Liq. Cryst (査読有)

(2)Three-dimensional imaging of DDS particle with polarization interferometric confocal microscope including MEMS mirror scanner (S. Kawasaki and C. Egami) Molecular Crystals and Liquid Crystals Pages 89-93 Published online: 02 May (2018). (査読有)

(3)Optical anisotropy measurement of polymeric nanoparticle with polarization interferometric confocal microscope (Y. Hata and C. Egami) Molecular Crystals and Liquid Crystals, Volume 654, Pages 169-173, (2017). (査読有)

(4)High contrast measurement of nanoparticle with polarization interferometric nonlinear confocal microscope (K. Fujita and C. Egami) Mol. Cryst. Liq. Cryst 629, pp. 254-257 (2016). (査読有)

(5)Measurement of inhomogeneous absorptive organic media with polarization interferometric confocal microscope (K. Fujita and C. Egami), Opt. Rev., Volume 22, Issue 3, pp 410-414(2015). (査読有)

〔学会発表〕(計6件)

(1)Spectroscopic Imaging of DDS Nano-particle by Polarization Interferometric Nonlinear Confocal Microscopy (C. Egami) Fi02018 Washington DC (2018)

(2)High-contrast-resolution single nano-particle imaging with MEMS-scanning mirrors based polarization-interferometric nonlinear optical microscope (C. Egami) ANNIC 2018 Berlin (2018)

(3)High-contrast-resolution single nanoparticle spectroscopy with MEMS-scanning mirrors based polarization-interferometric laser microscope (C. Egami) ANNIC 2017 Rome (2017).

(4)Spectroscopy of DDS Polymeric Nanoparticle with Polarization Interferometric Nonlinear Confocal Microscopy (C. Egami and S. Kawasaki) Advanced Photonics 2016 Vancouver (2016)

(5)Microanalysis of DDS Nanoparticle by Polarization Interferometric Nonlinear Confocal Microscopy (C. Egami) ANNIC2016 Barcelona (2016).

(6)Microanalysis of nanoparticle with polarization interferometric nonlinear confocal microscope (C. Egami) ANNIC2015 Paris (2015)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者  
なし

(2)研究協力者  
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。