

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 11 日現在

機関番号：82110

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13708

研究課題名(和文)キラル材料の微細構造解析を目指した円偏光二色性顕微鏡の開発

研究課題名(英文)Development of circular dichroism microscopy for structural analysis of chiral material

研究代表者

青木 裕之(Hiroyuki, Aoki)

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 J-PARCセンター・研究副主幹

研究者番号：90343235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、円偏光二色性(CD)顕微鏡計測を実現するため、微弱な楕円偏光を利用した分光計測を行う。本計測を実現するためには微小位相差を有する波長板の方向を制御することが必要となる。本研究では2台のEOMを用いた新しい光学システムを開発することで、楕円偏光状態を10 kHzの周期で行うことを実現し、高速かつ高感度なCD計測が可能であることを示した。また同光学システムを組み込んだ顕微鏡光学系を構築することで、高分子スピコート薄膜中に分散したポリスチレンラテックス粒子(直径 300 nm)について、粒子の透過画像検出が可能であることを確認した。

研究成果の概要(英文)：The current project aims at the development of circular dichroism (CD) microscopy. In a microscopy measurement, the CD signal have to be detected from a small sample volume because the probe beam is focused. Modulated elliptical polarized light enables the highly sensitive CD measurement; however, the conventional method using a rotating retarder cannot increase the modulation rate faster than the order of 1 Hz. In the current study, novel modulation optics has been developed by using a pair of electro-optics (EO) modulators. The EO modulators are inserted in the optical axis at angles of -4 and +4 degrees, and the high voltage is applied alternately to each EO modulator. This system enabled the modulation of the polarization state up to 10 kHz. Moreover, the polarization modulation system was integrated into a microscopy system, and nanometric polymer particle was observed successfully.

研究分野：高分子物性

キーワード：円偏光二色性

1. 研究開始当初の背景

分子の持つキラリティは、触媒や光学的機能を発現する重要な役割を担っている。生体中では勿論のこと、合成材料においても新しい機能発現を目指したらせん高分子材料等の創成が盛んに研究されている。より高度な機能を実現するためには、分子そのもののキラリティだけでなく、分子集合体の nm~μm スケールの構造が重要となるものと考えられる。このようなキラル分子による構造設計を行うためには、第一に分子のキラリティの空間分布を評価するための顕微鏡技術が必須となる。しかしながら、キラリティを評価するための円偏光二色性 (CD) は、微弱な信号を検出するため、試料体積が小さくなる顕微鏡測定においては、十分な信号強度が得られないため、CD 信号に基づく光学顕微鏡を実現することは困難であった。そのため、キラル計測を行うことのできる顕微鏡を開発するためには、高感度の CD 分光手段の実現が必要とされる。

2. 研究の目的

本研究においては、局所領域におけるキラリティ計測を実現するための超高感度かつ高速な測定を行うことのできる CD 分光法の開発を行い、これを顕微分光光学系へと発展させることで、CD 顕微鏡の実現を目標としている。

楕円偏光変調を利用した高精度な CD 検出光学系を開発し、これを共焦点顕微鏡系に組み込むことで局所観察を実現することを目指す。

3. 研究の方法

電気-光学素子、グラントムソンプリズムからなる、偏光状態を任意に制御可能な光学系を作製し、その最適化を行うことで高速 CD 計測を実現可能なシステムの構築を試みた。

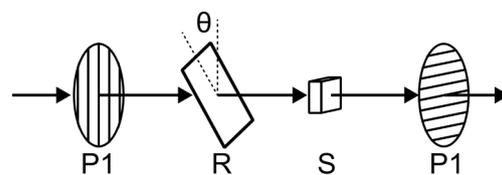


図1 楕円偏光 CD 計測の光学系

4. 研究成果

CD 測定においては左回り円偏光および右回り円偏光を入射時の吸光度差を計測する。一般に左右円偏光入射時の吸光度差は大きくないため、微量の資料に対して高精度に CD 信号を得ることは難しかった。そのため、東北・和田らによって提案された楕円偏光を用いた分光法の原理を利用する (Murakami, M. *et al. Chem. Lett.* **42**, 261-263)。これは、入射プローブ光として右回り及び左回り楕円偏光を入射することで、検出時の信号差を大きくするものである。図1に CD 測定の光学系の模式図を示す。偏光子 P1 によって直線偏光としたプローブ光は、偏光軸に対してθだけ傾いた遅相子 (R) を透過することで楕円偏光として試料 (S) に入射し、その透過光強度 $I(\theta)$ を P1 と直交した偏光子 P2 を通して測定する。このとき、左右楕円偏光入射時の信号 $I(\theta)$ および $I(-\theta)$ を計測する。通常の CD 測定においては R として 1/4 波長板を使用し、試料に円偏光を入射する。一方、本手法では遅相子として位相差δが非常に小さいものを使用し、試料に楕円偏光を入射する。このとき、円偏光二色性信号ΔAは

$$\frac{I(\theta) - I(-\theta)}{I(\theta) + I(-\theta)} = \frac{1.15 \Delta A}{\sin 2\theta \tan(\delta/2)} \quad (1)$$

で与えられる。ここで R の位相差δおよび回転角であるθを小さく取ると、観測量である式(1)左辺が微小なΔAに対しても大きな数値を取るため、検出が容易となる。

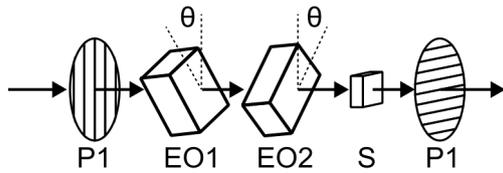


図2 EO素子を用いた高感度・高速CD計測光学系。

楕円偏光を用いたCDでは測定感度が向上するが、顕微鏡測定を行う際には微小領域の信号を一点一点走査しながら計測を行わなくてはならないため、高速な計測が求められる。しかし、このようなCD測定においてはRを回転させる必要があるが、光学素子を物理的に回転する速度には制限があり、高速測定を行うことができない。そこで本研究では、Rとして新たに電気光学(EO)素子によるCD測定系を構築した。EO素子は印加電圧によってレターデーションを制御できる可変遅相子であり、2台のEO素子(EO1、EO2)を入射偏光に対して遅相軸を±4度だけ回転させて設置した(図2)。光源として、波長408nmの半導体レーザーを用いた。ここでEO1およびEO2に対して、交互に $\pi/3$ の位相差を発生させた。これは図1に光学系においては、 $\delta = \pi/3$ の遅相子を、±4度で回転させたことに相当する。図3はその際の透過光の偏光状態の時間変化を示したものである。時間変化する電圧によって位相差を制御された2台のEO

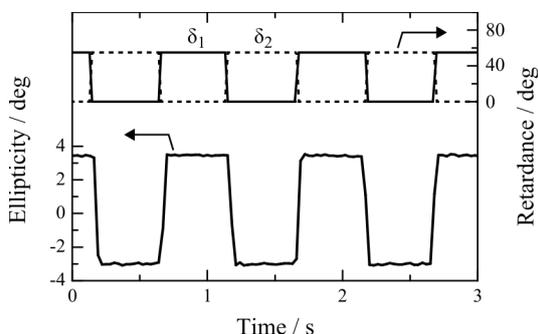


図3 EO素子による楕円偏光変調。上段の実線及び破線はそれぞれEO1、EO2に与えた位相差 δ_1 、 δ_2 を示す。下段はEO1、EO2透過後の偏光の楕円率。

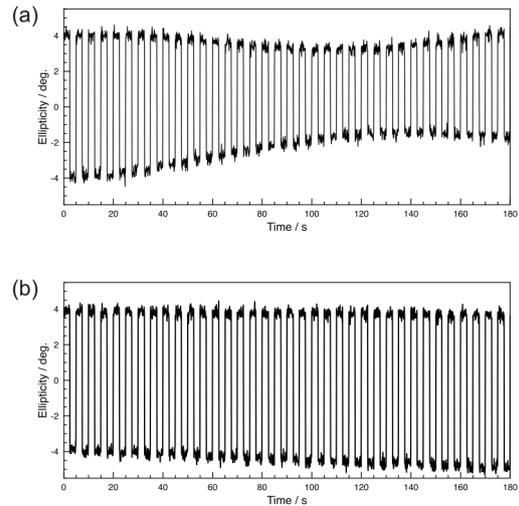


図4 EO変調器による楕円偏光の変調。光学系の温度安定化前(a)および安定化後(b)での測定結果。変調周期は5秒。

素子によって、楕円偏光の向きと楕円率を変調することができた。図に示す変調は1秒周期で行っているが、ここで観測された偏光状態の変化は100ms程度で行われており、Rを物理的に回転させる手法と比較して十分に高速な楕円偏光状態のスイッチングを行うことができた。さらに、この100msの応答速度は、今回検出に使用した偏光光度計の応答速度によって決定されているものである。EO素子自体は100kHz以上の周波数で動作させることも可能であるため、アバランシェ・フォトダイオードを使用した高速な検出器を用いることで、さらに高速な偏光状態の変調も行うことが可能であり、10kHzまでの動作を確認している。このように、本研究で開発した光学系によって楕円偏光を高速に制御可能であることが示された。

電気光学素子によって楕円偏光の高速変調を行うことで、高感度CD測定の高速度が見込まれたものの、電気光学素子は周辺環境の影響を受けやすく、温度変動によって位相差が変化する現象が見られた。図4(a)は180秒間にわたってEO変調器を動作させた際に測定された透過光の楕円率の変化である。5秒周期で与えたEO変調器への供給電圧によって、楕円率が-4度から+4度まで大きく変調

している様子が観察されている。しかし、その振幅は長時間で変動している様子が見て取れる。これは、計測光学系が温度による影響を受けやすいことを示している。そこで光学系を安定な構造とすること、さらに、EO 変調器の温度制御を行うことで外部環境の影響を低減し、測定の安定化を図った。楕円偏光制御光学系全体のサイズは、当初のシステムでは 1 m 程度の光路長があったが、これを全体で 40 cm に短縮することでコンパクトな構成の光学系に設計し直した。また、EO 変調器を含む光学系を恒温槽中に入れ、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ の温度制御を行った。このような新しい光学系による楕円偏光変調の様子を図 4 (b) に示す。得られる楕円偏光は数分間にわたって一定の楕円率を示しており、これまでの光学系に対して著しく安定性が向上した。これにより、微小な CD 信号を定量的に測定することが可能となった。

高安定な楕円偏光光学系を構築できたことで、これを顕微鏡光学系に組み入れることを行った。図 2 の光学系において試料 S の直前及び直後に対物レンズ(10x, NA 0.25)を導入した。これにより、入射楕円偏光を集光した状態で試料に照射し、透過した信号光を再び対物レンズによってコリメートした後に偏光子 P2 を通して検出する構成とした。さらに試料は 2 次元ピエゾステージによって走査することで、試料上の任意の点にプローブ光を入射することができるようにした。

試料として蛍光色素含有ポリスチレン微粒子 (粒径 300 nm) をポリビニルアルコール薄膜中に分散し、楕円偏光変調を行わず、透過光による顕微鏡観察を行った。図 5 は構築した顕微鏡光学系によって観察された透過光強度画像を示している。微粒子の色素が入射光を吸収するため、微粒子が暗く観察されていることが分かる。このように本研究において構築した光学系によってナノメートルスケールの微粒子を観察することができた。続いて、キラル分子を含有したポリスチレン微粒子を使用してキラル顕微鏡測定の検証を試みたが、代表者の所属機関の移籍によって試料調製が研究期間終了までに完了することができなかった。

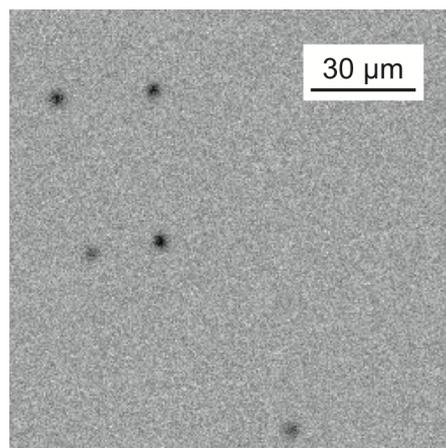


図 5 色素含有ポリスチレン微粒子の透過顕微鏡画像。微粒子の粒径は 300 nm。

以上のように、楕円偏光を高速に変調可能な光学系を開発し、またこれを顕微鏡光学系に組み入れることで、高感度の顕微 CD 測定の可能性を示すことができた。本萌芽研究によって得られた成果は、今後の新しい CD 顕微鏡の礎となるものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

- (1) Hiroyuki Aoki, "Conformation and dynamics of single polymer chain studied by optical microscopy techniques beyond the diffraction limit", *Microscopy*, in press.

〔学会発表〕 (計 6 件)

- (1) Hiroyuki Aoki, "Single-Molecule Analysis of Polymer Materials by Fluorescence Nanoscopy", *Nano S&T-2016*, 2016/10/26-28, Singapore (Singapore).
- (2) 鈴木啓介, 青木裕之, "粒子追跡マイクロレオロジーによる架橋ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)の局所粘弾性評価", 第 65 回高分子討論会, 2016/9/14-16, 神奈川大学 (神奈川県横浜市) .

- (3) Hiroyuki Aoki, "Properties of Polymer Materials Studied by Super-resolution Optical Microscopy", International Symposium of Spectroscopical Society of Japan 2016, 2016/5/25, 大阪大学 (大阪府豊中市) .
- (4) Hiroyuki Aoki, Taiki Kuroda, Toru Asada, Tomomi Tanii, "Conformation of single polymer chain in spin-cast thin films revealed by super-resolution fluorescence microscopy", Pacificchem 2015, 2015/12/15-20, Honolulu (USA).
- (5) 青木裕之, "超解像ナノイメージングによる単一高分子鎖の形態解析", 第64回高分子討論会, 2015/9/15-17, 東北大学 (宮城県仙台市) .
- (6) Hiroyuki Aoki, "Application of super-resolution optical microscopy to polymer materials at single molecule level", Single Molecule Localization Microscopy Symposium 2015 (SMLMS2015), 2015/8/26-28, Bordeaux (France).

〔図書〕 (計 1 件)

- (1) 青木裕之, “外部応力下における高分子鎖の振る舞い — ナノ光学顕微鏡による単一高分子鎖の直接計測による評価 —”, 高分子の残留応力対策 pp.324-330, 技術情報協会, 2017.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木裕之 (AOKI, Hiroyuki)

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構
原子力科学研究部門 J-PARC センター
・研究副主幹

研究者番号：90343235