

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K17735

研究課題名(和文)超解像フォトサーマル顕微測定によるソフトマター系の非平衡ナノ物性研究

研究課題名(英文)Study of soft matter physics with a high resolution photothermal microscopy

研究代表者

宮崎 淳(MIYAZAKI, JUN)

和歌山大学・システム工学部・講師

研究者番号：50467502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：光吸収性分子の分布を高空間分解能・高感度で光学的に可視化できるフォトサーマル顕微鏡を開発し、それを用いてゲルを対象としたソフトマター系のマイクロ物性を計測した。具体的には(1)ゲル中の極微スケールの熱伝搬過程、(2)熱発生によって引き起こされるゲル中のナノ粒子の運動を測定した。これらの測定結果から微視的に不規則な構造をもつソフトマター系の熱伝搬過程と、熱により駆動される非平衡系としてのマイクロな運動との関係を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A high sensitivity and high resolution photothermal microscopy was developed for imaging of tiny amount of chromophore molecules in a medium. Using the microscope, we studied physical properties of soft matter by measuring thermal diffusion process in agarose gel in nano-scale and motion of individual nanoparticles embedded in the gel. From this, the relation between thermal diffusion process and micro-scale movement of soft matter induced by heat was investigated.

研究分野：応用光計測

キーワード：光熱変換顕微鏡 熱伝搬過程 ソフトマター ナノ粒子 超解像 非線形・非平衡系

1. 研究開始当初の背景

高分子、液晶、生体物質など、非一様な構造をもつソフトマター系の多様な物性を理解するには、物質内の様々な運動モードを微視的に観察する必要がある。本研究は代表者が独自に開発してきた超解像フォトサーマル (photothermal : PT) 顕微鏡を用いて、ソフトマター系のナノスケールの非平衡過程の解明することを目的とする。具体的には(1)高分子ゲルのナノ領域の熱伝搬、(2)高分子ゲル中に閉じ込めたナノ粒子をプローブとした、熱刺激により引き起こされるゲルの微視的な運動を計測し、熱伝搬(散逸)と運動・揺動との関係について明らかにする。熱と運動量の輸送とが相互に結合しているであろうソフトマター系の物性研究に超解像 PT 顕微鏡を展開することで、その非平衡系としての性質の統一的・普遍的な理解を目指す。

PT 顕微鏡とは、光励起した分子近傍の熱発生に伴う微小な屈折率変化を、波長の異なるもう一つのレーザー光(検出光)を入射し、検出する光学イメージング法である。レーザースポットの位置を走査しながら各点で測定することで、試料(光吸収体)の平面または3次元イメージが得られる。近年、金ナノ粒子をプローブ分子とした生細胞イメージング、またメラニンやヘモグロビン等の光吸収係数の大きい生体分子を対象としたラベルフリーイメージングなどの応用が行われている。

今までに生物組織のイメージングを目的に省スペースで低コストな半導体レーザーを用いた高感度・超解像 PT 顕微鏡の開発を行ってきた。新たに開発した PT 顕微鏡は光源のノイズを低減する新しい検出法を導入し、さらにアポダイゼーション法により従来の光学顕微鏡の2倍の分解能($\sim 100\text{nm}$)の超解像を実現した。PT 顕微鏡は蛍光分子だけでなく、金属ナノ粒子やカーボン材料のような化学的に安定で褪色の影響の少ない無蛍光性の分子・粒子をも超解像で観察できることが特徴である。

一方、PT 顕微鏡は、単に光吸収体のコントラスト像を得るだけでなく、励起光強度を変調し観測信号の周波数応答(位相-周波数、及び振幅-周波数応答)を測定することで、光刺激に対する物質の応答、すなわちナノ空間の熱伝搬、及び熱発生に伴う固体中の音響波の伝搬を時間・空間的に観察できるという大きな特徴がある。さらに高速タイムラプス観察やPT信号の自己相関測定(PT相関分光法)から、溶液やソフトマター系など柔らかい媒質中の光吸収体の運動・揺動や物質の構造変化をミリ秒、マイクロ秒の時間スケールで観察できる。

2. 研究の目的

本研究では PT 顕微鏡を用いて、高分子ゲルなどのソフトマター系を対象としたナノスケールの非平衡過程を物理学的観点から

の理解することを目的とする。具体的には、(1)高分子ゲル中の熱伝搬の空間・時間的振舞いを直接観察し、空間的に非一様な中でどのように熱エネルギー伝搬が起きているかを明らかにする。

(2)高分子ゲル中の金属粒子などのナノサイズの光吸収体(微粒子)を対象に、微粒子の運動・揺動を測定する。特に熱的に励起した微粒子から周辺の媒質へ熱伝搬が起きているときの微粒子の運動・揺動(「非平衡」ブラウン運動)に着目し、熱伝搬と運動・揺動との関係を明らかにする。

熱と運動量の輸送とが相互に結合することによって生じると予測されるソフトマター系の特徴的な性質を、PT 顕微鏡で得られる多様な情報から実験的に明らかにし、非平衡系としての性質の統一的・普遍的な理解を目指す。

3. 研究の方法

PT 顕微鏡を用いて(1)高分子ゲル等の微視的に非一様な構造をもつソフトマター系の熱伝搬過程を観察する。そのため励起光と検出光の試料中での焦点位置を制御し、さらに光源強度を変調して信号の周波数応答を計測するためのシステムを構築する。また(2)熱により誘起される高分子ゲル中のナノ光吸収体(微粒子)の運動・揺動を測定し、熱伝搬と運動・揺動との関係を明らかにする。試料には金ナノ粒子(直径 5-100nm)やカーボンナノチューブを分散させた高分子ゲルを対象にして、微粒子の運動を高速・高空間分解能で実時間計測するための実験系を構築する。以下に本計画の鍵となる熱伝搬測定とナノサイズの光吸収体の運動計測法について説明する。

(1). 熱伝搬測定法

励起光の変調周波数が数 MHz 以上でレーザーのスポットサイズより小さくなると、観測信号強度(検出光の相対強度変化)は減少する。同時に光吸収体から近傍の媒質への熱伝搬速度が有限であることに起因して、励起光の変調に対して位相が $\pi/2$ 遅れた成分が現れる。従って観測信号の振幅(位相)-周波数応答から熱伝搬に関する時間的情報を得る。

(2). ナノ粒子の運動計測

ナノ粒子(光吸収体)の位置の追跡のため3点測位法に基づく高速タイムラプス測定を行う。具体的には単一粒子を対象に、3点をガルバノミラーを使って逐次走査し、各点の信号強度から粒子の重心位置を決定する。時間分解能は 5 ms を目標とする。蛍光分子をつかった位置計測と違い、PT 信号には褪色やプリンキングの影響が少ないためデータの信頼性が高く長時間(数分以上)の測定も可能である。

4. 研究成果

最初に、より高感度でナノ粒子の運動および熱伝搬計測を行うために新しい光検出法（空間分割バランス検出法）を提案・導入した。PT顕微鏡では試料がポンプ光を吸収することで熱が発生し、それに伴い屈折率が変化する。この屈折率変化をもう一つのレーザー光（プローブ光）で検出する。屈折率変化により焦点近傍に熱レンズが形成され、透過するプローブ光の強度分布が空間的に変化する。このとき例えば透過光の中心部の光強度が減衰すると、外側の光強度は強くなる。そのため従来はピンホール等により外側の光をカットして中心部の変化のみを検出していたが、本手法では中心部と辺縁部を空間的に分けて差動検出することで信号強度を従来と比べて約2倍向上させることに成功した。さらに差動検出によりプローブ光の強度雑音を除去し、信号雑音比を従来法と比べて4.9倍向上させることができた。

この空間分割バランス検出法をガルバノミラー駆動のレーザー走査型PT顕微鏡に実装させるために、入射光を同心円状に2分割する分割ファイバ束を製作した。レーザー走査してもプローブ光が分割ファイバ束に入射するように、ファイバ束の入射面をコンデンサレンズの瞳面と共役な位置に配置した。ファイバからの出射光はバランス光検出器に入射させる。透過光の強度変化は透過光断面の中心部および辺縁部ほど大きく、それぞれ逆位相の関係である。一方で、中心部と辺縁部の境界部分では光強度は変化しない。従ってこの境界部分の光は信号に寄与せず、雑音や受光素子の飽和の原因になる。そのためコンデンサレンズの瞳面に円環状の光ブロックを配置して、境界部分の光を遮断することで信号雑音比をより向上させることに成功した。ビームスポット径を小さく絞り、さらに透過光を効率よく集めるためには試料と対物レンズ、コンデンサレンズの間に油浸オイルを満たして屈折率マッチングをとる必要がある。そのため観察中にオイルが垂れないよう、従来水平型だった顕微光学系を倒立型になるよう変更した。

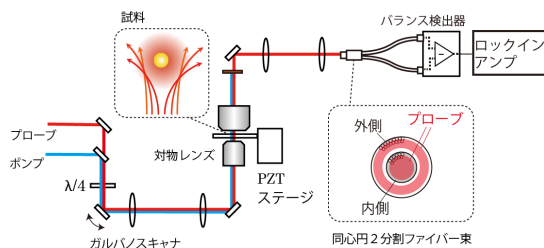


図1 空間分割バランス光検出法による高感度PT顕微鏡

本研究では出力40 mWの低コストの半導体レーザーをプローブ光源に用いた。光検出器には最初は帯域幅1 MHzの市販の大面積バランス光検出器を用いて測定を行ったが、受光素子まで到達するプローブ光強度が弱く（～

0.4 mW）、検出器の電氣的ノイズ（熱雑音）と競合してしまった。また熱伝搬計測のためにはより帯域幅の広い光検出器が必要であった。そのため、本測定装置に最適な、より低ノイズでかつ広帯域なバランス型光検出器を製作した。具体的にはファイバ束の大きさとの関係で決まる最適な大きさの光受光素子と、熱雑音を抑えるため負荷抵抗の大きくかつ高速なI/Vアンプとを用いたバランス型光検出器を製作した。製作した光検出器の雑音等価電力は3.6 pW/Hz^{1/2}であり、本測定装置のプローブ光電力でも光ショット雑音限界の感度で測定できるようになった。この測定システムの検出感度を評価するため、アガロースゲル中の金ナノ粒子を測定したところ、検出限界（SN = 1）となる金ナノ粒子の温度変化は0.1 K（積算時間10 μs）であり、極めて高感度な測定ができることが分かった。

当初の計画では、ポンプ光の周波数をスイープさせながら信号強度を測定し、信号の周波数応答から熱伝搬の速さを求める予定であった。しかし運動している粒子に対して信頼性の高い測定を行うには、周波数応答を瞬時に計測する必要がある。そこで複数の周波数の信号を同時に計測するための多チャンネルロックイン増幅器を製作した。市販の直交復調器の評価ボードの入力段にバンドパスフィルター、出力段にローパスフィルターを接続しロックイン増幅器を製作した。ローパスフィルターには歪を抑えるために最適な遮断周波数特性を持つ8次ベッセル型フィルターを採用した。同時に2周波数の信号を測定するため、同じ基本特性のロックインアンプを2つ作製した。また複数の周波数でポンプ光を同時に変調させるために市販の半導体レーザーマウント内の回路を改造した。

さらに3点法によりガルバノミラーを駆動してナノ粒子の運動を計測するためのプログラムを製作した。PCとADDAコンバータとの通信速度から粒子追跡の時間間隔は最小で10 ms程であった。PVA中に分散させた金ナノ粒子をピエゾステージで駆動して位置精度と追跡可能な速度を追跡の状況の評価したところ、位置精度の誤差は静止状態で12 μm、追跡可能速度は最大であった。

以上の装置を製作した後、まずアガロースゲル中に分散させた直径20 nmの単一金ナノ粒子を対象に断面像の時間系列を計測した[図2]。ガルバノミラーにより同じ位置を時間間隔25 msでスキャンし、ポンプ光強度を変化させながら粒子の動きの変化を計測している。ポンプ光強度が小さいときには、金ナノ粒子はゲル中にトラップされているが、ポンプ光強度を大きくすると熱により粒子が駆動され、ホッピング拡散を示す様子が観察された。このとき拡散状態とトラップされた状態を間欠的に繰り返している。さらに光強度を大きくするとよりランダムな動きを示すことが分かった。このとき金ナノ粒子近傍

の温度が融点を越えてゲルが液状になったためと思われる。

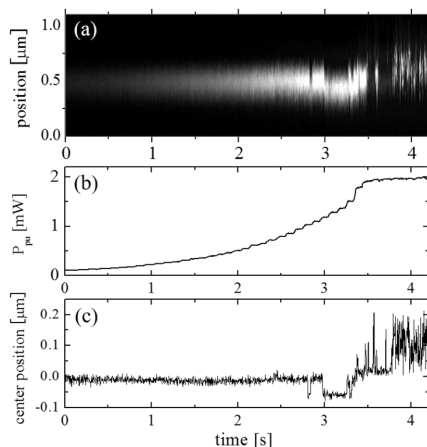


図2 アガロースゲル中の金ナノ粒子の運動の光刺激に対する依存性。(a)ラインスキャン像、(b)ポンプ光強度、(c)粒子の中心位置

さらに金ナノ粒子の動きを3点法により追跡しながら、2周波数での信号強度を同時に測定し、運動と熱伝搬速度の同時測定を試みた。しかし実験環境における機械的な振動により、高精度な粒子追跡が行えないことが原因で、両者の正確な相関を解明するには至らなかった。位置精度は最大12 nmであり、目標の1/3程の精度であった。さらに粒子の動きが予想より速く、現状の時間分解能では追跡することができなかった。正確な相関の解明にはこれらの課題を解決する必要がある。今後、装置の機械的な振動の除去、高出力光源をプローブ光に用いて信号雑音比をさらに向上させる、3点法以外の高速な位置決め方法を採用するなどの改良を行う予定である。

本研究では、ソフトマター中のナノ粒子の運動および熱伝搬計測のため、PT顕微鏡の高感度化に取り組んできたが、開発した装置を用いてソフトマター系のみならず生物試料を対象としたバイオイメージングにも応用した。それにより脳内の脂質や筋肉中のミトコンドリアなどの内因性色素の高感度イメージングに成功し、研究成果として発表した。さらに単一単層ナノチューブの多波長イメージングによる解析など、材料科学研究への展開を拓くことができた。

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 4件)

1. 宮崎淳、小林孝嘉、光熱変換顕微鏡によるバイオイメージング、分光研究 67 巻 2 号、(2018) 査読有 (印刷中)
2. J. Miyazaki and T. Kobayashi, “Photothermal microscopy for high sensitivity and high resolution absorption contrast imaging of

biological tissues”*Photonics* 4, 32 (2017) 査読有

3. J. Miyazaki “Improvement of signal-to-noise ratio in photothermal microscopy by optimizing detection aperture”*Opt. Commun.* 390, 99-104 (2017) 査読有

4. J. Miyazaki, T. Iida, S. Tanaka, A. Hayashi Takagi, H. Kasai, S. Okabe, and T. Kobayashi “Fast 3D visualization of endogenous brain signals with high-sensitivity laser scanning photothermal microscopy” *Biomed. Opt. Express* 7, 1702-1710 (2016) 査読有

[学会発表](計 8件)

1. Jun Miyazaki “Photothermal microscopy for high-sensitivity and high-resolution absorption contrast imaging of biological tissues” 生物物理学学会、熊本大学、2017年9月19-21日

2. 宮崎淳、 “高感度・高分解・光熱変換顕微計測法による生物組織の無標識イメージング” 平成29年度日本分光学会年次講演会2017年5月23-25日

3. 宮崎淳、 “光熱変換顕微計測法の開発とバイオイメージングへの応用” 和歌山大学・和歌山県工業技術センター研究者交流会(和歌山県工業技術センター) 2017年3月9日

4. 宮崎淳、 “高感度・高分解・光熱変換顕微計測法の開発とバイオイメージングへの応用”, 第11回NIBBバイオイメージングフォーラム(基礎生物学研究所) 2017年2月14-15日

5. 宮崎淳、 “高感度・高空間分解3次元顕微イメージング法の開発” 第25回わかやまテクノ・ビジネスフェア(ホテルアバローム紀の国、和歌山市) 2016年11月18日

6. 宮崎淳、 “高感度・高空間分解・光熱変換顕微計測法の開発とバイオイメージングへの応用” 大阪府立大学・和歌山大学工学研究シーズ合同発表会(和歌山大学岸和田サテライト) 2016年10月27日

7. 宮崎淳、小林孝嘉、 “高速・高感度フォトサーマル顕微法の開発と脳内の内因性色素のイメージング” 第77回応用物理学学会秋季学術講演会(朱鷺メッセ)(注目講演)2016年9月

8. 宮崎淳、川角洸史、鶴井博理、小林孝嘉 “高解像フォトサーマル顕微鏡による生体組織の3次元多色イメージング” 平成27年度日本分光学会年次講演会(東工大) 2015年6月

[その他]

ホームページ

大学ホームページ

<http://wakarid.center.wakayama-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 淳 (MIYAZAKI, Jun)
和歌山大学・システム工学部・講師
研究者番号：50467502