

理工学研究科:居



0003503588

R

静岡大学博士論文

共焦点型偏光顕微鏡の三次元結像特性に関する研究

大学院理工学研究科  
システム科学専攻  
居波 渉



# 目次

要約	1
序論	3
第1章 偏光顕微鏡	5
1.1 複屈折性	5
1.2 従来の偏光顕微鏡の原理	5
1.3 従来の偏光顕微鏡の問題点	5
第2章 共焦点レーザー走査顕微鏡	9
2.1 共焦点レーザー走査顕微鏡の原理	9
第3章 共焦点型偏光顕微鏡	14
3.1 ベクトル理論による点像解析	14
3.1.1 ベクトル理論による焦点近傍の光強度分布	19
3.2 共焦点型偏光顕微鏡の原理	22
3.2.1 ピンホールサイズの検討	22
第4章 共焦点型偏光顕微鏡による観察	25
4.1 共焦点型偏光顕微鏡の実験光学系	25
4.2 ラテックス球の観察	25
4.2.1 コントラストの改善	25
4.2.2 三次元分解能	28
4.3 アスコルビン酸の観察	28
4.4 ナイロンの断面観察	28
4.5 生物試料の観察	31
4.5.1 複眼の観察	31
4.5.2 仮道管の観察	31
4.6 まとめ	32

<b>第 5 章 共焦点型偏光顕微鏡の結像特性の解析</b>	<b>37</b>
5.1 Mie の散乱理論を用いた共焦点偏光顕微鏡の結像特性の解析 . . . . .	37
5.2 拡張型 Mie の散乱理論 . . . . .	37
5.3 共焦点型偏光顕微鏡の結像特性 . . . . .	49
5.3.1 計算手順 . . . . .	49
5.3.2 計算方法の検証 . . . . .	51
5.3.3 従来の偏光顕微鏡と共焦点型偏光顕微鏡との結像特性の比較	53
5.4 平面基板上の微小球の電磁場解析 . . . . .	57
5.4.1 計算手順 . . . . .	57
5.4.2 計算方法の検証 . . . . .	59
5.4.3 平面基板上の微小球による光散乱 . . . . .	61
5.4.4 平面基板上の球に対する共焦点型偏光顕微鏡の結像特性 . .	66
5.5 まとめ . . . . .	69
<b>第 6 章 共焦点型偏光顕微鏡の蛍光偏光観察への応用</b>	<b>70</b>
6.1 蛍光偏光観察の原理 . . . . .	70
6.2 蛍光顕微鏡の原理 . . . . .	72
6.3 共焦点型偏光顕微鏡による蛍光観察 . . . . .	74
6.3.1 臭化擬イソシアニン色素 (PIC-Br) の蛍光の偏光観察 . . . . .	76
6.3.2 ペリレンの蛍光の偏光観察 . . . . .	79
6.3.3 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene(DPH) 結晶の蛍光偏光観察結果	81
6.4 蛍光偏光観察の生物への応用 . . . . .	84
6.4.1 リポソームの配向性の解析 . . . . .	86
6.5 まとめ . . . . .	90
<b>第 7 章 総括</b>	<b>91</b>
<b>参考文献</b>	<b>93</b>
<b>謝辞</b>	<b>97</b>
<b>論文及び学会発表</b>	<b>98</b>
<b>付 録 A 微小球に働く放射圧の解析</b>	<b>100</b>
A.1 微小球に働く放射圧の計算 . . . . .	100
A.2 微小球に働く放射圧の計算結果 . . . . .	100

付 録 B ダイクロイックミラーの特性 (アルゴンイオンレーザー用)	105
付 録 C ダイクロイックミラーの特性 (青色ダイオードレーザー用)	106
付 録 D フィルターの特性	107

# 要約

高コントラストで高分解能・三次元分解能をする共焦点型偏光顕微鏡を開発し、その結像特性の解析およびその有効性を実験により示した。

第1章では、従来の偏光顕微鏡について説明する。偏光顕微鏡の特徴、従来の偏光顕微鏡がもつ問題点について述べた。

第2章では、共焦点レーザー顕微鏡のもつ三次元分解能などの特徴について説明した。

第3章では、共焦点型偏光顕微鏡の原理について述べた。従来の偏光顕微鏡の問題点である、対物レンズによる偏光面の回転による像への影響を知るため、焦点面に出来る電場分布をベクトル理論により解析した。その電場分布から、検出器の前のレンズの焦点位置にピンホールをおき中心のみを検出することで、対物レンズで偏光面の回転した成分を除去できることを示した。対物レンズにより偏光面の回転した成分を除去できる量はピンホールのサイズに依存するため、そのサイズについて検討した。

第4章では、実際に共焦点型偏光顕微鏡のシステムを構築し、ポリスチレンラテックス球、アスコルビン酸の結晶、生物試料を観察した。従来の偏光顕微鏡と比較し高コントラストで、かつ三次元分解能を有することを示した。

第5章では、拡張 Mie の散乱理論を使って共焦点型偏光顕微鏡の結像特性を解析した。そして、従来の偏光顕微鏡で偏光観察を行うと、対物レンズの偏光面の回転の影響を受け、精度良く偏光特性を測定できないことが分かった。共焦点系を導入することで光軸方向に分解能を有することも確認した。数値計算による解析結果と実験による観察結果は一致した。さらに、平面基板上的微小球による電磁場解析法を開発し、共焦点型偏光顕微鏡で基板上的微小球を観察した場合の基板の影響を検討した。

第6章では、共焦点型偏光顕微鏡を蛍光観察に応用した。蛍光の偏光を観察することで分子の配向を観察できることを示した。ペリレンの結晶において、高感度に三次元で分子の配向を観察した。生体観察ではリポソームを蛍光標識し、そ

の分子配向を観察した。共焦点型偏光顕微鏡を、蛍光偏光解消測定に導入すれば、生体膜の状態や抗体-抗原反応などの生体分子間相互作用を高感度かつ三次元に解析することができることを示した。

# 序論

偏光顕微鏡は試料の微小な構造によって散乱された光の偏光面の回転を検出することにより、高感度に弱散乱体を観察する手法として、岩石、鉱物、液晶、複屈折性結晶、光弾性効果、磁気カー効果、高分子素材などの研究に用いられてきた。しかしながら、偏光顕微鏡を高分解能化すると、対物レンズで光が集光される際、その対物レンズで偏光面が回転し偏光状態が乱れてしまう、という問題点があった。そのため、観察像のコントラストが低下してしまい数マイクロオーダーの生物細胞の観察には適していなかった。

一方、共焦点顕微鏡は1961年に M. Minsky によって提案され、その後 T. Wilson と C. Sheppard らによって研究が進められた。共焦点顕微鏡は、試料の1点のみに光を集光し、そのスポットからの散乱光を検出器の直前に置かれたピンホールを通過した光のみを検出する。そのため、フォーカス面以外からの散乱光の影響がなく、高コントラストの観察像が得られる。さらに、共焦点顕微鏡は深さ方向の分解能があるため、光学的薄切による3次元観察が可能である。

T. Wilson らは1995年に共焦点型の偏光顕微鏡を提案し、その結像特性について議論した。彼らは、微小な点物体における結像特性を弱散乱近似を用いて解析した。

偏光顕微鏡は、微小な屈折率変化などによって生じる偏光面の変化を検出するため、弱散乱近似の適用には限界があり、また実際の実験結果の評価に点物体の近似を用いることはできない。特に、生物試料は複雑な3次元構造をしているため、弱散乱近似を適用することは困難である。

本研究では、偏光顕微鏡に共焦点光学系を導入し、高コントラスト、高分解能を実現した共焦点型偏光顕微鏡のコントラストの低下とピンホールのサイズとの関係などについて議論した。また、拡張型 Mie 散乱理論を初めて顕微鏡の結像特性解析に応用し、偏光顕微鏡の3次元結像特性の解析を行った。拡張型 Mie 散乱理論を適用することにより、弱散乱近似を用いずに、偏光顕微鏡のベクトル的な結像特性を明らかにした。そして、開発した顕微鏡を用いて、生物細胞の微小な

構造の観察や偏光特性の解析をした。さらに、蛍光試料の観察にも応用し、蛍光色素により標識した生物細胞の蛍光の偏光特性を測定した。蛍光は、色素分子の発光軸の方向(発光にかかわる電子の振動方向)に沿って偏光するため、蛍光の偏光状態を測定することで、蛍光標識した部分の繊維の方向や表面状態、細胞膜のリン脂質の配列、流動性や回転拡散の速さ、アクチンの繊維軸まわりの回転などの情報が得られる。



# 第1章 偏光顕微鏡

## 1.1 複屈折性

複屈折とは、物質中を光が通過するとき、光の振動面(偏光)の向きによってその進む速度が異なることである。図1.1に複屈折結晶の光の伝播について示す。 $x$ 方向に振動する光が $y$ 方向のそれよりも試料の中をゆっくり通過する。その結果、複屈折結晶から出た光は、通過速度の差の分だけ位相差が発生する。これは、複屈折結晶が $x$ 軸と $y$ 軸とで異なる屈折率を持つからである。高分子配向膜、液晶高分子、光学結晶、などは複屈折性を示す。また、等方性の物質でも外部から応力を加えたりすると一時的に異方性を示し(光弾性効果)、複屈折を生じる。

## 1.2 従来の偏光顕微鏡の原理

図1.2に従来の偏光顕微鏡の光学系を示す。光源からの光を偏光子で直線偏光とし、試料を照明する。試料で散乱した光を対物レンズで集光し、検光子で偏光面の回転した成分のみを検出し、電荷結合素子(CCD)上に結像する。

偏光特性をもつ試料を偏光面が直交した偏光子と検光子との間に置けば、試料による偏光面の回転が観察できる。試料を回転させながら観察することで、偏光面を回転させる構造がその配向に応じて現れる。このように偏光顕微鏡は、入射させた直線偏光の光の偏光面が試料により、どれくらい回転したのかを観察することができる顕微鏡である。液晶、複屈折性結晶、光弾性効果、磁気カー効果などを高感度に検出するために用いられている。

## 1.3 従来の偏光顕微鏡の問題点

偏光顕微鏡において、試料による偏光面の回転がまったく無くても、光は検光子を通過し検出される。これは、光が対物レンズにより集光される際、その対物レンズにより偏光面が回転してしまうからである。従来の偏光顕微鏡は、対物レ

レンズによる偏光面の回転により、試料の偏光特性を精度良く観察できない。また観察像のコントラストも悪くなる。この対物レンズによる偏光面の回転は、対物レンズのNAが大きいほど、大きい。これが、従来の偏光顕微鏡の高分解能化が困難であった理由である。

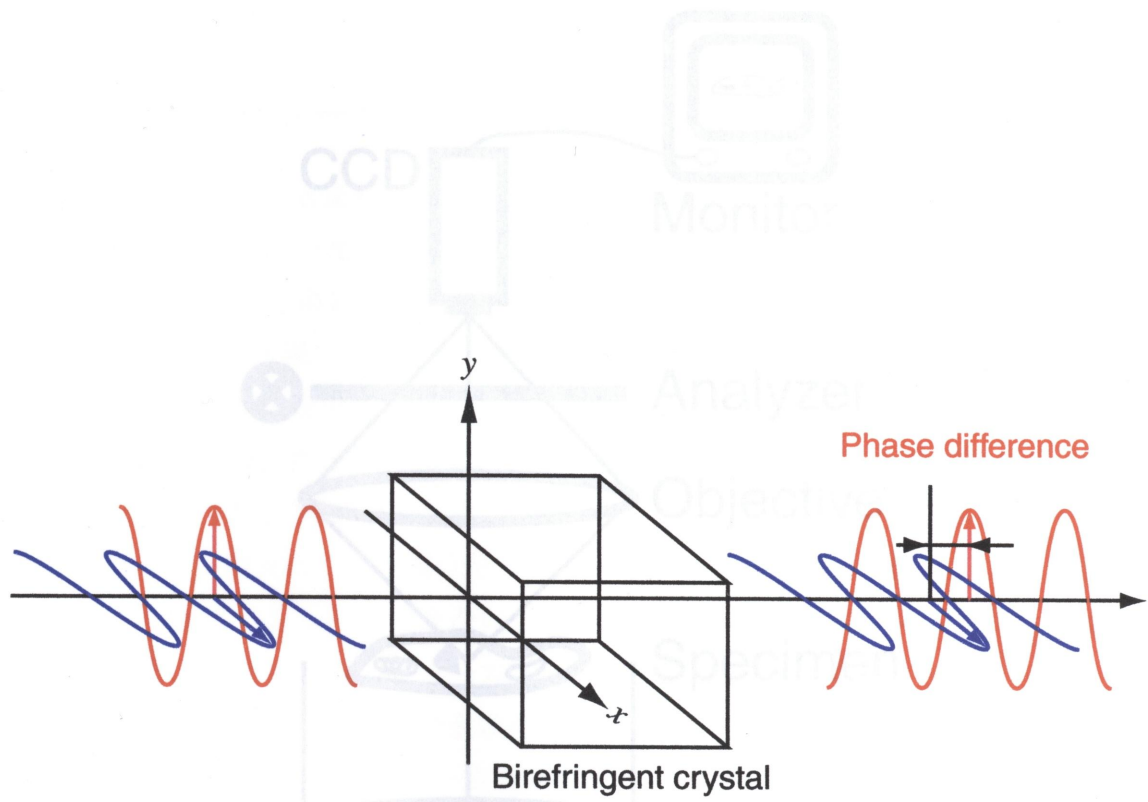


图 1.1: Propagation of the light in birefringent crystal.

图 1.2: Polarization Microscope

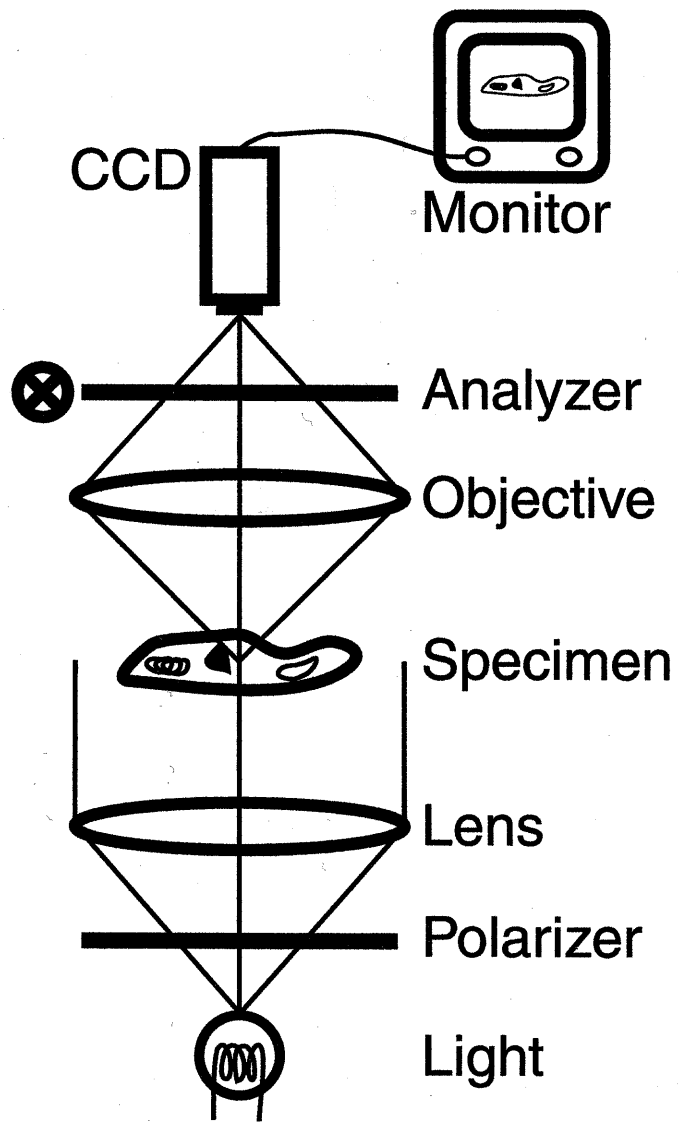


图 1.2: Polarization Microscopy.

## 第2章 共焦点レーザー走査顕微鏡

### 2.1 共焦点レーザー走査顕微鏡の原理

図 2.1 にレーザー走査共焦点顕微鏡の光学系を示す。光源には安定化したレーザーを用い、レーザー光を対物レンズにより試料上の一点のみに集光し、試料で散乱した光を同じ対物レンズで集める。その光はレンズにより集光し、ピンホールを通過した光 (赤線) のみを検出器で検出する。そして、レーザー光で試料を走査することで観察像を得る [1]。

共焦点顕微鏡は、焦点からの光のみ検出するので光軸方向にも分解能を有する。青線で示すように、試料の観察箇所が対物レンズのフォーカス位置からずれていたとすると、反射光は、検出器位置に結像しない。したがって、ほとんどの光がピンホールを通過することはできない。そのため、対物レンズのフォーカス位置からずれた像は観察されず、フォーカス位置だけの観察像を得ることができる。これは、反射型共焦点レーザー走査顕微鏡の大きな特徴である。

図 2.2 に反射型共焦点レーザー走査顕微鏡とレーザー走査顕微鏡で得られた集積回路の観察像を示す。反射型では、焦点の合った部分だけが観察され、焦点から外れた部分は消えていることがわかる。それに対して、レーザー走査顕微鏡の観察像では、焦点から外れた部分もぼやけた像として観察されている。また、共焦点顕微鏡の観察像のほうがコントラストが高く、シャープである。

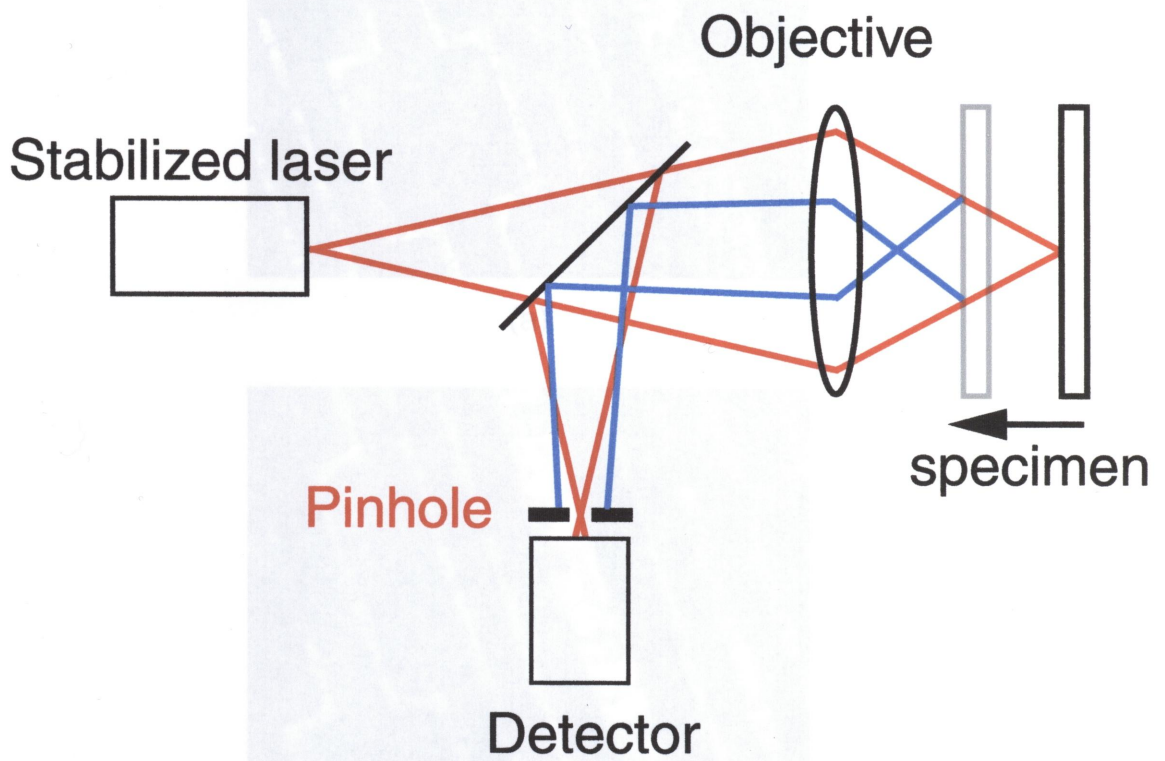
反射型共焦点レーザー走査顕微鏡では、従来の顕微鏡でトレードオフの関係にあった、回折限界による分解能と焦点深度との問題を解決した。分解能を高くするために NA の大きな対物レンズを用いると焦点深度が短くなるが、光軸方向に焦点を移動させることで深い焦点深度を実現できるようになった [2]。

また、レーザー走査顕微鏡は、1点のみに光を集光するため、高コントラストの観察像が得られる [1][3][4]。従来の光学顕微鏡では、生きたままの生物細胞などの厚みのある試料の観察において、フォーカス面以外からの散乱光が、観察像のコントラストを著しく低下させる。フォーカス面以外からの散乱光の影響を受け

ないので、従来だと染色しなければ見えないような細菌類や細胞を、無染色で高コントラストで観察できるようになった [5, 6]。

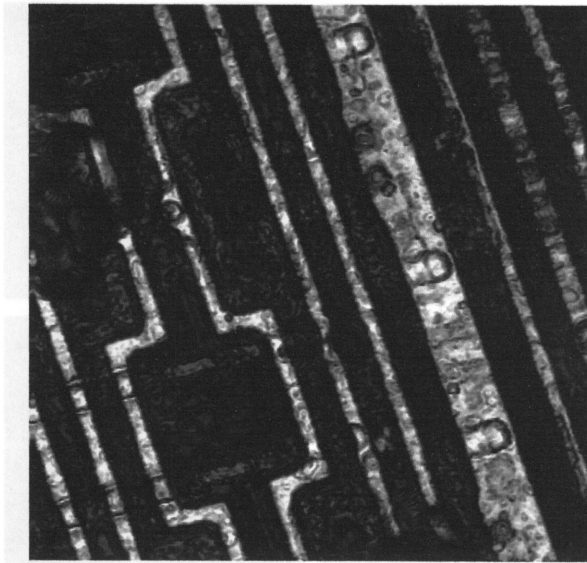
図 2.3 に共焦点レーザー走査顕微鏡でウニの卵を観察した結果を示す。光軸方向に  $2.1\mu\text{m}$  間隔でフォーカス面をずらしている。焦点のあった部分だけが観察できていることが分かる。焦点の合っていない部分は、従来の顕微鏡のようにぼやけていくのではなく、消えていつている。このように共焦点レーザー走査顕微鏡は、フォーカス面だけを観察できるので、フォーカス面を光軸方向に走査することで試料の三次元の情報を得ることが可能である。

レーザー走査共焦点顕微鏡は蛍光観察においても非常に有効である [7, 8, 9]。蛍光観察は微弱光観察であるため、フォーカス面以外からの光は観察像の質の低下に大きな影響を与える。レーザー走査共焦点顕微鏡では、フォーカス面以外からの光を検出器の直前においたピンホールによりカットするため、フォーカス位置だけの蛍光分布が観察される。そこで、フォーカス位置を光軸方向に走査することで、三次元で構造を見ることが出来る。

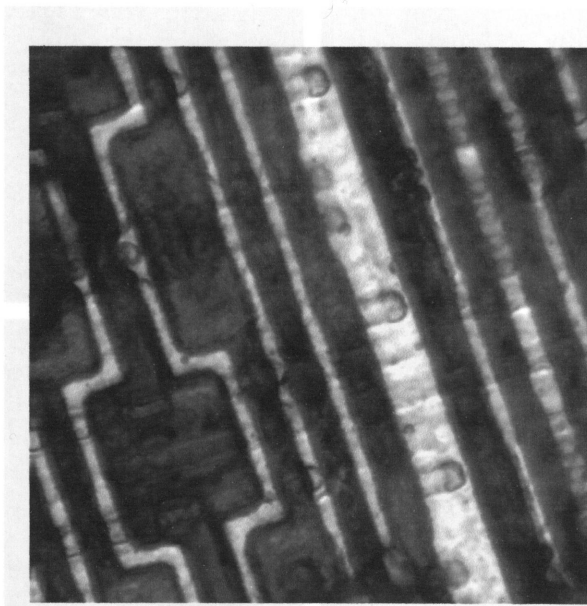


☒ 2.1: Optical configuration of confocal laser scanning microscope.

☒ 2.2: Observation results of IC pattern with (a) confocal laser scanning microscope and (b) laser scanning microscope.



(a)



(b)

5 $\mu$ m

图 2.2: Observation results of IC pattern with (a) confocal laser scanning microscope and (b) laser scanning microscope.



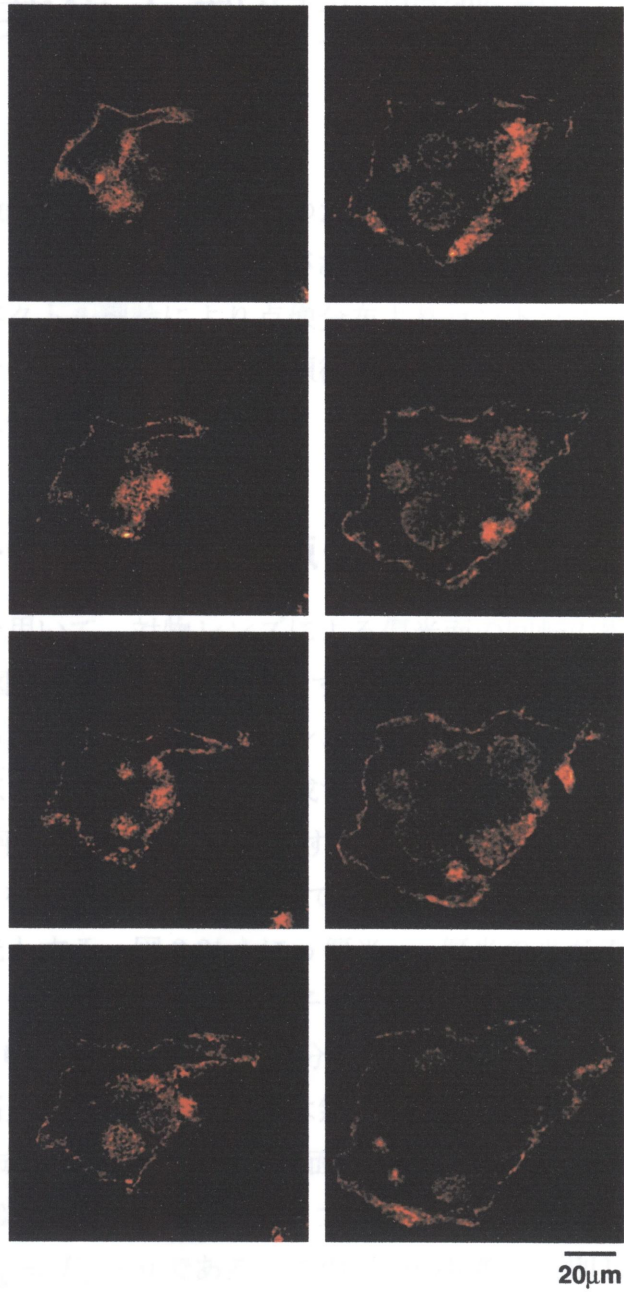


図 2.3: Three-dimensional observation results of echinoid with confocal laser scanning microscope with various focal planes. The  $z$  step size was  $2.1\mu\text{m}$ .

## 第3章 共焦点型偏光顕微鏡

従来の偏光顕微鏡には、高分解能化のために開口数の大きい対物レンズを用いると、コントラストが低下する問題点がある [10]。本章では、それらの問題を解決するために、ベクトル理論により点像分布よりコントラストの低下のメカニズムを解析する。そして、共焦点型偏光顕微鏡の原理について述べる。また、ピンホールのサイズについても検討した。

### 3.1 ベクトル理論による点像解析

ベクトル理論を用いて、対物レンズによる偏光面の回転の影響について検討する [11][12][13]。図 3.1 に計算モデルを示す。直線偏光の光が対物レンズによって、焦点に集光される場合を考える。対物レンズの半径と焦点を結んだ直線と対物レンズの中心と焦点とを結んだ直線とが成す角を  $\theta$  と置く。入射光の電気ベクトルは図 3.1 の  $y$  軸に平行な直線偏光と仮定する。また、入射光の波面法線と  $x-y$  平面の法線を含む面を入射面とする。そして、入射面に対し平行な成分を  $p$  偏光、垂直な成分を  $s$  偏光とする。図 3.2(a) に  $p$  偏光、 $s$  偏光の光がそれぞれ対物レンズにより集光され、偏光面が回転する様子を示す。 $p$  偏光では、図 3.2(a) に示すように、偏光面は  $z$  軸方向に倒れ、 $E_z$  成分が発生している。それに対し、図 3.2(b) に示すように  $s$  偏光では偏光面の回転は無い。また、対物レンズの  $NA = \sin \theta$  が大きいほど、 $E_z$  成分が大きくなる。像面に  $p$  偏光で入射する光 (図 3.2(a)) は、 $E_x = 0$ 、 $E_y = |\mathbf{E}| \cos \theta$ 、 $E_z = |\mathbf{E}| \sin \theta$  であり、 $s$  偏光で入射する光 (図 3.2(b)) は、 $E_x = |\mathbf{E}|$ 、 $E_y = E_z = 0$  である。この二つの状態を区別して像面への寄与を考える。図 3.3 は、入射瞳を光の入射側から見た状態である。像面上に  $p$  偏光、 $s$  偏光として入射する成分を  $E_p$ 、 $E_s$  とおくと、図 3.3 より各成分は次式で書ける。

$$E_p = |\mathbf{E}| \sin \varphi = |\mathbf{E}| \frac{\eta}{\sqrt{\xi^2 + \eta^2}} \quad (3.1)$$

$$E_s = |\mathbf{E}| \cos \varphi = |\mathbf{E}| \frac{\xi}{\sqrt{\xi^2 + \eta^2}} \quad (3.2)$$

像面上での電場のベクトル成分  $E_x$ 、 $E_y$ 、 $E_z$  に対する  $E_p$ 、 $E_s$  の寄与は、

$$E_x = E_p \cos \theta \cos \varphi - E_s \sin \varphi \quad (3.3)$$

$$E_y = E_p \cos \theta \sin \varphi + E_s \cos \varphi \quad (3.4)$$

$$E_z = E_p \sin \theta \quad (3.5)$$

である。式 (3.3)~(3.5) に式 (3.1)、(3.2) を代入し、 $\sin \theta = \sqrt{\xi^2 + \eta^2}$ 、 $\cos \theta = \zeta$  から、点  $Q(\xi, \eta)$  から像面への寄与  $\delta E^{\xi, \eta}(P)$  は、

$$\begin{aligned} \delta E_x^{\xi, \eta}(x, y, z) &= \exp[-ik(\xi x + \eta y - \zeta z)] \sqrt{\zeta} \\ &\quad \cdot \frac{\xi \eta}{\sqrt{\xi^2 + \eta^2}} (\zeta - 1) dS \end{aligned} \quad (3.6)$$

$$\begin{aligned} \delta E_y^{\xi, \eta}(x, y, z) &= \exp[-ik(\xi x + \eta y - \zeta z)] \sqrt{\zeta} \\ &\quad \cdot \frac{\xi^2 + \eta^2 \zeta}{\sqrt{\xi^2 + \eta^2}} (\zeta - 1) dS \end{aligned} \quad (3.7)$$

$$\delta E_z^{\xi, \eta}(x, y, z) = \exp[-ik(\xi x + \eta y - \zeta z)] \sqrt{\zeta} \eta dS \quad (3.8)$$

ここで

$$dS = d \frac{\xi \eta}{\cos \theta} = \frac{d\xi d\eta}{\zeta} \quad (3.9)$$

である。したがって、像面上での電場ベクトル成分 ( $E_x$ 、 $E_y$ 、 $E_z$ ) は、

$$\begin{aligned} E_x(x, y, z) &= C \int \int_A \exp[-ik(\xi x + \eta y - \zeta z)] \\ &\quad \times \frac{\xi \eta}{\sqrt{\xi^2 + \eta^2}} \left( \sqrt{\zeta} - \sqrt{\frac{1}{\zeta}} \right) d\xi d\eta \end{aligned} \quad (3.10)$$

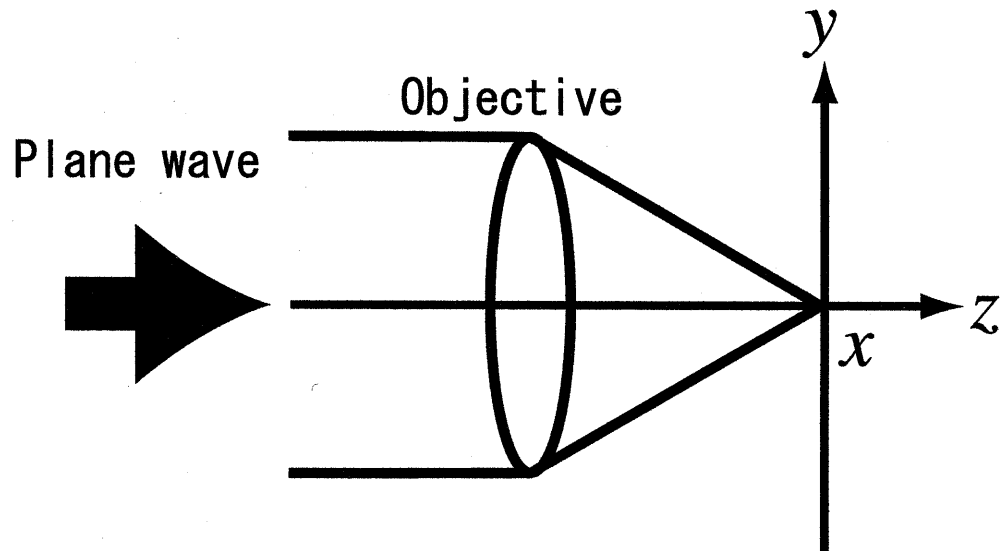
$$\begin{aligned} E_y(x, y, z) &= C \int \int_A \exp[-ik(\xi x + \eta y - \zeta z)] \\ &\quad \times \frac{1}{\sqrt{\xi^2 + \eta^2}} \left( \eta^2 \sqrt{\zeta} + \xi^2 \sqrt{\frac{1}{\zeta}} \right) d\xi d\eta \end{aligned} \quad (3.11)$$

$$E_z(x, y, z) = C \int \int_A \exp[-ik(\xi x + \eta y - \zeta z)] \eta \sqrt{\frac{1}{\zeta}} d\xi d\eta \quad (3.12)$$

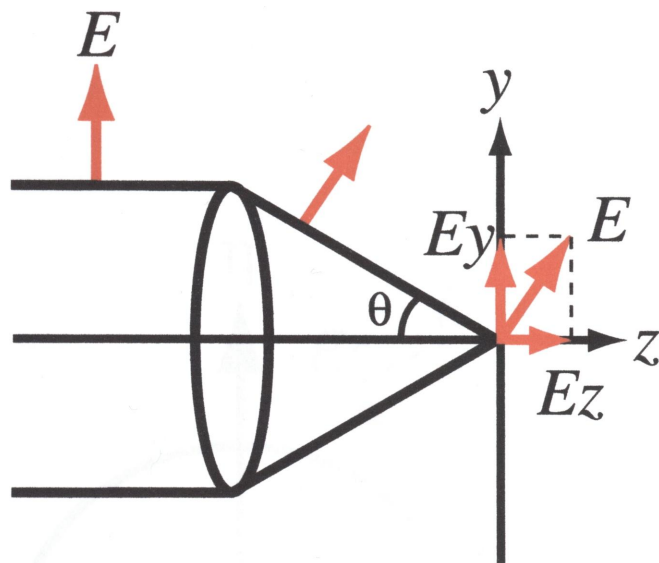
と書ける。ただし、 $C$  は、波長と焦点距離から決まる積分定数である。また、磁場のベクトル成分 ( $H_x$ 、 $H_y$ 、 $H_z$ ) はマクスウェルの方程式

$$\nabla \times \mathbf{E} = -\mu_0 \dot{\mathbf{H}} = -ik \sqrt{\frac{\mu_0}{\epsilon_0}} \mathbf{H} \quad (3.13)$$

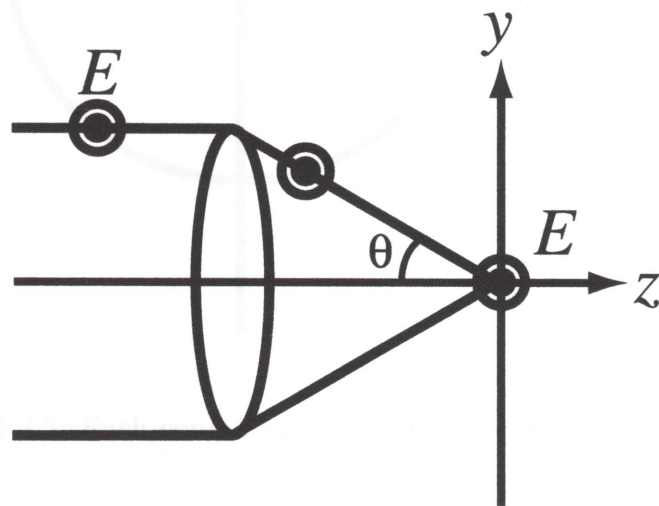
から求めることが出来る。



☒ 3.1: Coordinate system.



(a) *p* polarization



(b) *s* polarization

图 3.2: Rotation of polarization.

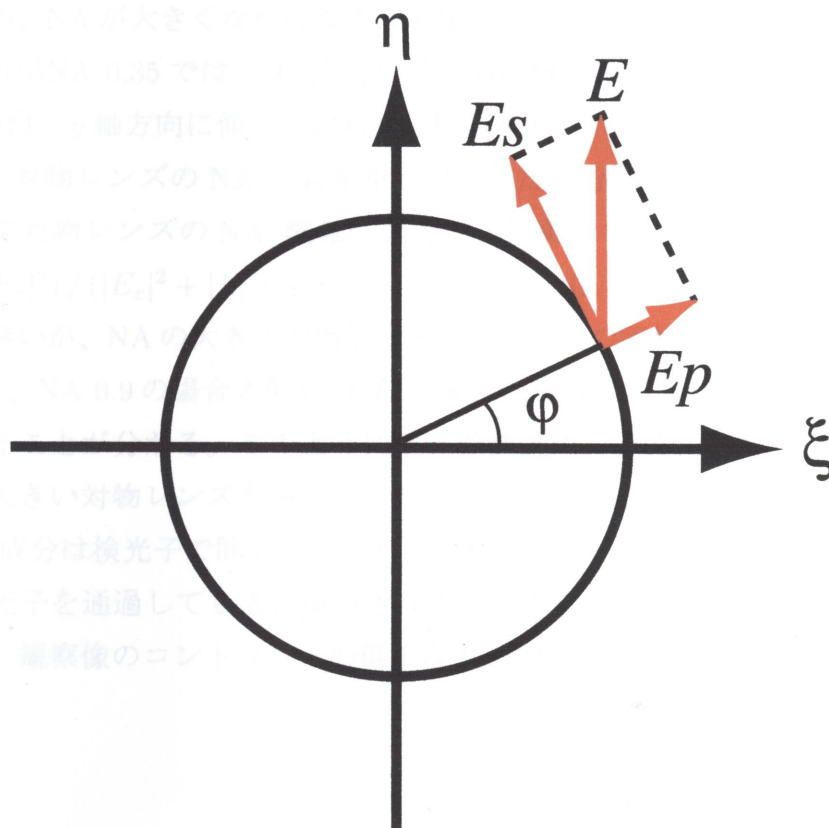


図 3.3: Each component of electric vector.

### 3.1.1 ベクトル理論による焦点近傍の光強度分布

3.1 節で導いた、式 (3.10)、(3.11)、(3.12) を用いて焦点面の光強度分布を求めた。図 3.4 に各成分の計算結果を示す。図 3.4(a) は NA が 0.95、図 3.4(b) は NA が 0.35 場合の計算結果である。図 3.4(a) から NA 0.95 の場合は、入射光が  $y$  成分しか持っていなかったにもかかわらず、 $|E_x|^2$ 、 $|E_z|^2$  成分が発生していることが分かる。また、 $|E_y|^2$  成分が中心対像ではなく  $y$  軸方向に伸びた楕円になっていることが分かる。これは、図 3.3 の瞳上の  $\eta$  軸上近辺から来る光は、像面ではほぼ  $p$  偏光となるため、NA が大きくなればなるほど像面へ寄与が減るからである。それに対し、図 3.4(b) NA 0.35 では、 $|E_x|^2$ 、 $|E_z|^2$  成分はほとんど発生していない。また、 $|E_y|^2$  成分は、 $y$  軸方向に伸びておらず、円形をしている。

図 3.5 に対物レンズの NA と偏光面の回転した成分  $|E_x|^2$ 、 $|E_z|^2$  との関係を示す。横軸に対物レンズの NA、縦軸に偏光面の回転した成分の全体に対する割合  $(|E_x|^2 + |E_z|^2) / (|E_x|^2 + |E_y|^2 + |E_z|^2)$  をとった。NA が小さいと偏光面の回転はほとんど無いが、NA の大きさの増加とともに偏光面の回転は大きくなる。例えば図 3.5 より、NA 0.9 の場合入射光の  $|E_y|^2$  成分の 20% もの光が  $|E_x|^2$ 、 $|E_z|^2$  成分になっていることが分かる。このように偏光顕微鏡において、分解能を上げるために NA の大きい対物レンズを使うと、その対物レンズにより偏光面が回転してしまう。 $E_y$  成分は検光子で除去できるが、対物レンズによって発生した  $E_x$ 、 $E_z$  成分は、検光子を通過してしまい検出される。そのため、精度のよい偏光特性の解析の困難、観察像のコントラストの低下などの問題を引き起こす。

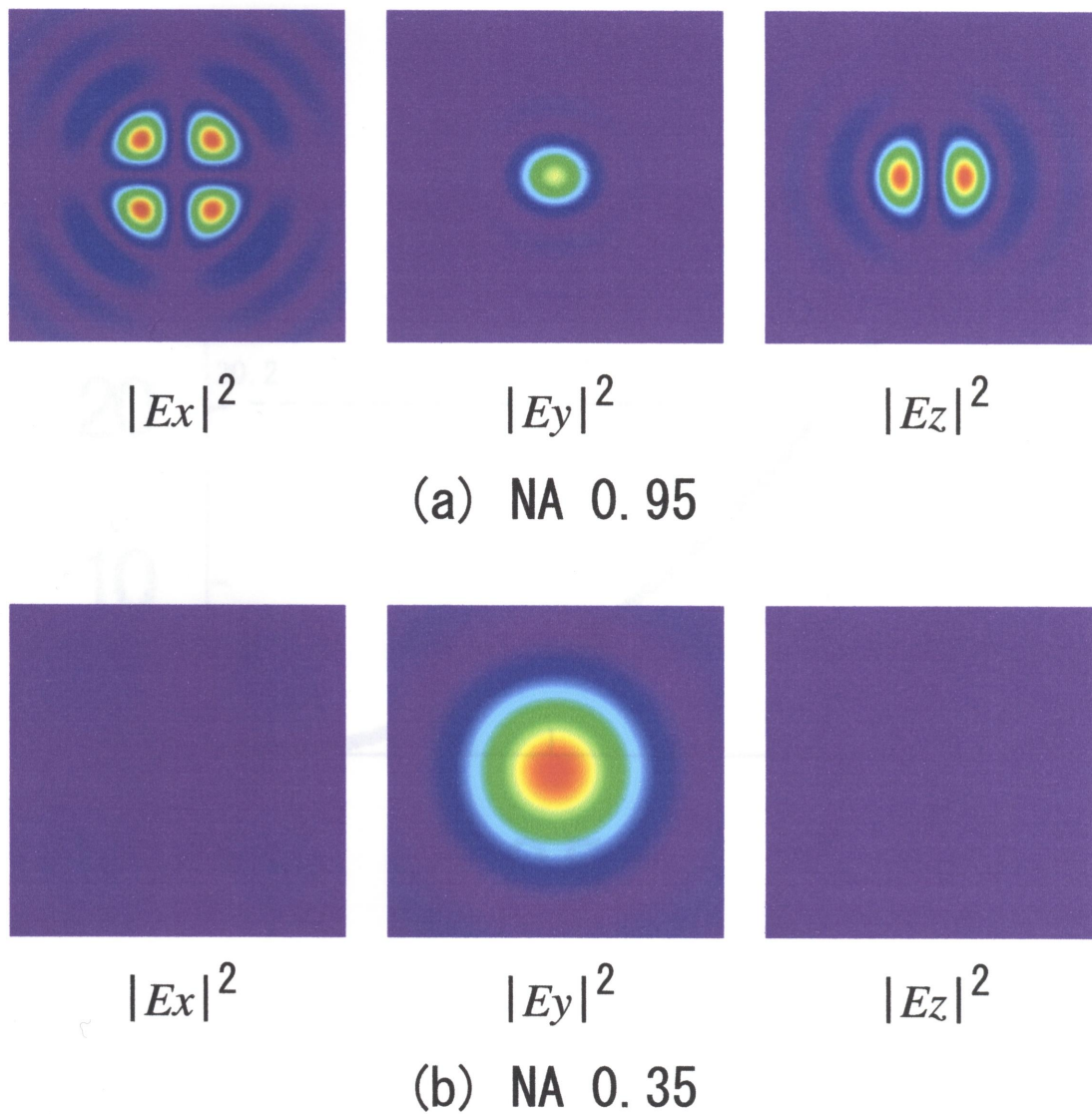


Figure 3.4: The ratio of intensity of  $x$ ,  $y$  and  $z$  components of electric field in focal plane.

☒ 3.4: Electric field's intensity distribution in focal plane.



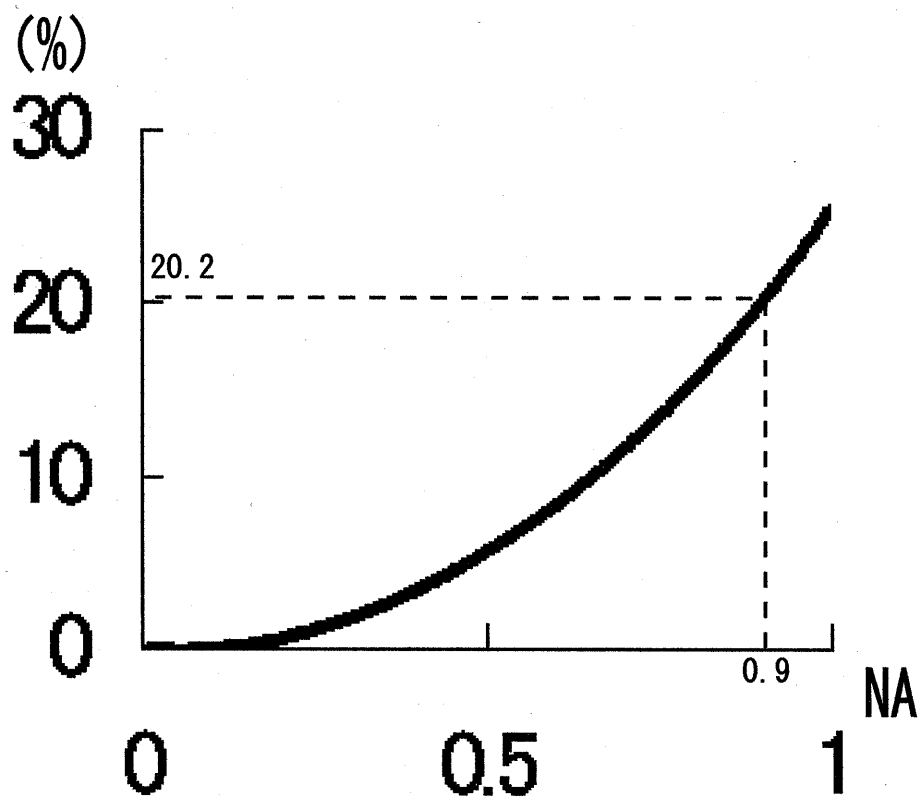


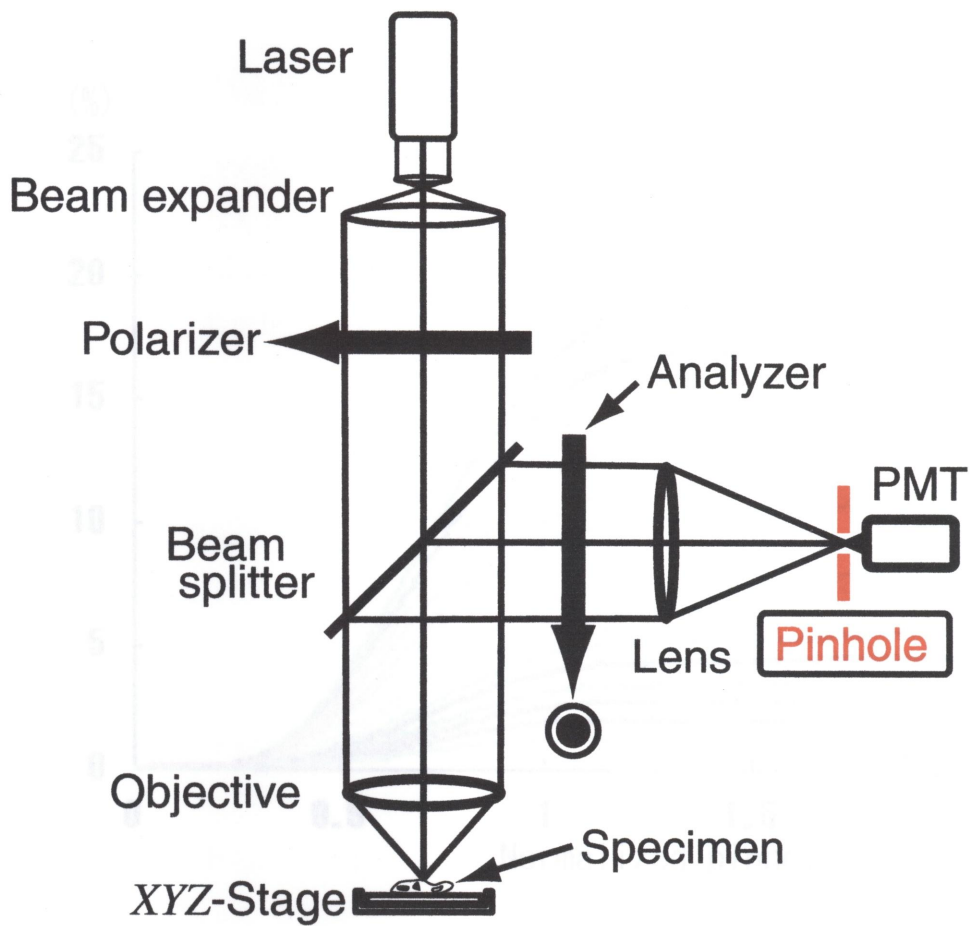
图 3.5: The ratio of intensity of  $x$  and  $z$  components to total intensity vs the NA.

## 3.2 共焦点型偏光顕微鏡の原理

図 3.6 に共焦点型偏光顕微鏡の光学系を示す。従来の偏光顕微鏡に共焦点光学系を導入した。光源からのレーザー光を偏光子で直線偏光とし、対物レンズで試料上の一点に集光する。試料で散乱した光を同じ対物レンズで集め、ビームスプリッターで検出系へ導く。そして、検光子で偏光面の回転した成分のみを取り出し、レンズで結像する。検出器の直前にピンホールを置き、対物レンズにより偏光面が回転した成分を除去する。ピンホールにより、図 3.4(a) の  $|E_x|^2$ 、 $|E_z|^2$  成分の  $x = y = 0$  の強度のみを検出する。図 3.4(a) から分かるように、 $x = y = 0$  の電場の強度はゼロになっている。したがって、対物レンズにより偏光面の回転した光はピンホールを通過することはできない。そのため高分解能化のために NA の大きい対物レンズを用いてもコントラストが低下することは無い。しかし現実には、偏光面が回転した成分を除去できる量は、ピンホールのサイズによって異なる。次にピンホールサイズについて検討する。

### 3.2.1 ピンホールサイズの検討

図 3.7 にピンホールのサイズとそのピンホールを通過する光の量との関係を示す。横軸にそれぞれのレンズの NA でのエアリーディスクの半径で規格化したピンホールの半径、縦軸にピンホールを通過する光の強度と全体の光の強度 ( $|E_x|^2 + |E_y|^2 + |E_z|^2$ ) との割合をとった。ピンホールを通過する光の強度は、すべての NA で、ピンホールの半径の増加とともに強くなっていく。しかし、ピンホールの半径がエアリーディスクの半径より大きくなると、ピンホールを通過する光の強度はほぼ一定となる。これは、検光子を通過する成分 ( $|E_x|^2 + |E_z|^2$ ) がピンホールをすべて通過してしまうからである。この結果から、共焦点顕微鏡での最もよいとされるエアリーディスクと同じピンホールサイズ [14][15] より、小さいものを選ばなければいけないことが分かる。また、共焦点型偏光顕微鏡での観察においては、観察する試料に対して得たいコントラストと対物レンズの NA とから、図 3.7 を用いて、ピンホールのサイズを決定する。



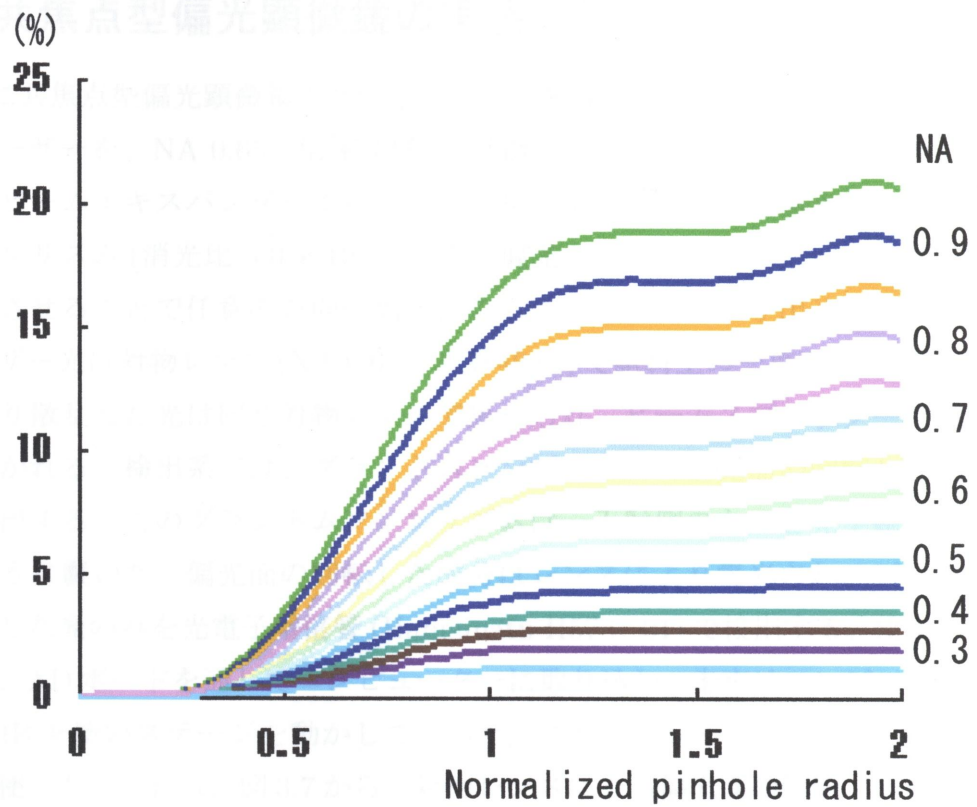
⊗ 3.6: The optical configuration of polarization confocal microscope.

⊗ 3.7: The ratio of intensities of reflected light from a dielectric sphere to the incident light as a function of the particle size for lenses of various NA.

## 第4章 共焦点型偏光顕微鏡による観察

### 4.1 共焦点型偏光顕微鏡の原理

図 3.7(a) に共焦点型偏光顕微鏡による観察結果を示す。図 3.7(b)(c) は、図 3.7(a) の結果から得られた強度成分の強度比が共焦点型偏光顕微鏡によるもので、図 3.7(a) の結果より、ラテックス球のエッジ部分では光の偏光状態が異なることがわかる。



### 4.2 ラテックス球の観察

図 3.7: The ratio of intensities of  $x$  and  $z$  components to the total intensity vs the pinhole size for lenses of various NA.

## 第4章 共焦点型偏光顕微鏡による 観察

### 4.1 共焦点型偏光顕微鏡の実験光学系

図 4.1 に共焦点型偏光顕微鏡の光学系を示す。光源に波長 632.8nm のヘリウム・ネオンレーザーを、NA 0.65、倍率 40 倍の対物レンズを用いた。光源からのレーザー光はビームエキスパンダーで拡げ、レーザー光を  $\lambda/4$  板で円偏光とし、グラントムソンプリズム (消光比  $5.0 \times 10^{-5}$ ) で直線偏光とする。グラントムソンプリズムを回転させることで任意の方向の偏光面をもつ直線偏光が取り出せる。直線偏光のレーザー光は対物レンズ (NA 0.65、倍率 40 倍) で試料上の一点に集光される。試料により散乱した光は同じ対物レンズで集められ、ビームスプリッターで検出系へと導かれる。検出系では、グラントムソンプリズムで偏光面の回転した成分のみを検出する。このグラントムソンプリズムは、入射側のものと光学軸が直角になるように置いた。偏光面の回転した成分はレンズにより集光され、ピンホールを通過した光のみを光電子増倍管 (Hamamatu H5781-01) で検出する。検出した光強度は、AD ボードを通してコンピューターに取り込む。走査はコンピューターから GP-IB を使いステージを動かして行った。また、ピンホールサイズは  $30\mu\text{m}$  のものを使った。これは、図 3.7 から、対物レンズによる偏光面の回転で発生した  $|E_x|^2, |E_z|^2$  成分の約 3% の光がピンホールを通過する条件である。

### 4.2 ラテックス球の観察

#### 4.2.1 コントラストの改善

図 4.2(a) に共焦点型偏光顕微鏡で三つの直径  $25\mu\text{m}$  のラテックス球を観察した結果を示す。図 4.2(b)(c) は、図 4.2(a) の赤線部分の断面をとったものである。(b) が共焦点型偏光顕微鏡によるもの、(c) が従来の偏光顕微鏡によるものである。図 4.2(a) より、ラテックス球のエッジ部分で偏光面が回転していることが分かる。し

かし、入射光の偏光方向と平行な部分のみが透過する。これは、偏光方向と平行な部分と垂直な部分とを区別する。

断面図 4.2(b) と 4.2(c) とを比較すると、偏光成分がのっておらず、コントラストが低くなる。これは、偏光成分がのってしまっている。偏光されるときに偏光面が回転してしまっている。物レンズを回すと、偏光面が回転してしまっている。

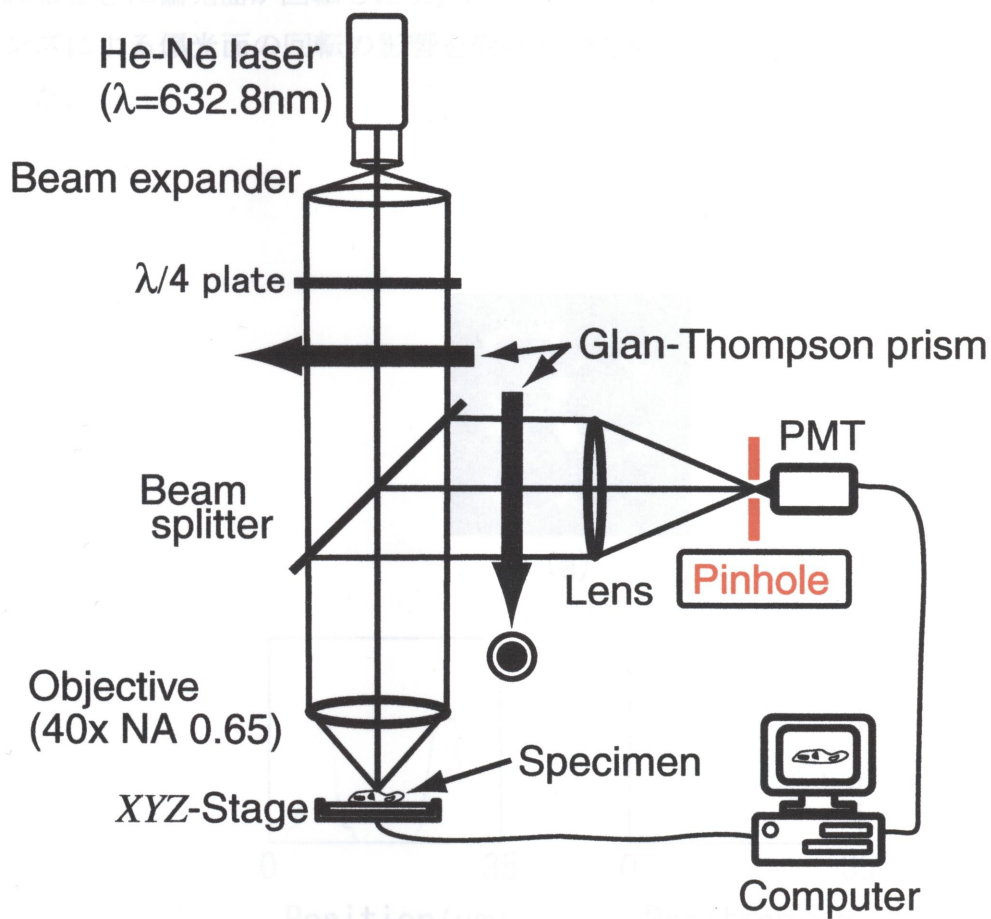


図 4.1: Experimental set-up of polarization confocal microscope.

図 4.2: The observation results of three substrates. (a) Observation with a polarization microscope. (b) Part of the image with a polarization microscope. (c) The same cross section as (b) but observed with a conventional microscope.

かし、入射光の偏光方向と平行な部分と垂直な部分のエッジは検出されていない。これは、偏光方向と平行な部分と垂直な部分では偏光面が回転しないことを意味する。

断面図 4.2(b) と 4.2(c) とを比較すると、(b) 共焦点型偏光顕微鏡では全くバイアス成分がのっておらず、コントラストが高い。それに対し、(c) 従来の偏光顕微鏡では、バイアス成分がのってしまっている。バイアス成分は対物レンズにより集光されるときに偏光面が回転した  $E_x, E_z$  成分である。共焦点型偏光顕微鏡は、対物レンズによる偏光面の回転の影響を受けないため、コントラストが高いことが分かった。

### 4.3 アスコルビン酸の観察

図 4.5 にアスコルビン酸の結晶を撮った結果を示す。偏光顕微鏡では、結晶の方位が異なることが出来る。しかし、方位の違いを検出できていない。また、結晶の欠陥(部分)の細かい構造観察はぼやけてしまっており、

共焦点型偏光顕微鏡(対物レンズの回転を検出でき

### 4.4 ナイロンの観察

図 4.5 にナイロンの結晶を撮った結果を示す。従来の偏光顕微鏡では、方位の違いを検出できていない。また、結晶の欠陥(部分)の細かい構造観察はぼやけてしまっており、共焦点型偏光顕微鏡(対物レンズの回転を検出でき

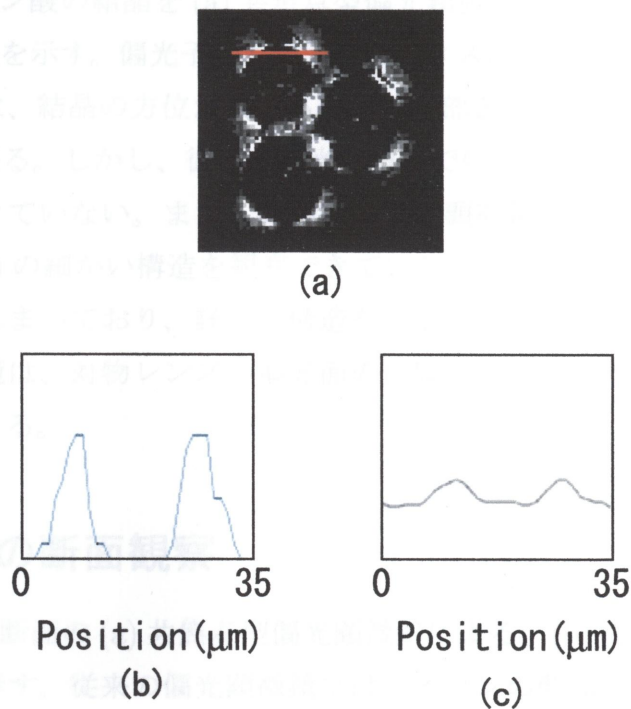


図 4.2: The observation results of three polystyrene particles with the confocal polarization microscope (a). (b) Part of the cross section of the particle edge. (c) The same cross section as (b) but observed with a conventional polarization microscope.

## 4.2.2 三次元分解能

図 4.3 に共焦点型偏光顕微鏡で直径  $25\mu\text{m}$  のラテックス球を焦点面を変えて観察した結果を示す。焦点面を  $3\mu\text{m}$  づつ対物レンズから遠ざかる方向へ動かした。開発した偏光顕微鏡は、共焦点系なので三次元分解能を有している。球の 4 つの明るい部分が中心部から外側へと広がっていつている。それぞれの焦点面での球の断面の半径がそれぞれ異なっているため、その焦点面での球の断面の円に対応したエッジが検出されている。このように共焦点型偏光顕微鏡は、三次元分解能を有するため、三次元偏光解析が可能である。

## 4.3 アスコルビン酸の観察

図 4.4 にアスコルビン酸の結晶を (a) 共焦点型偏光顕微鏡、(b) 従来の偏光顕微鏡により観察した結果を示す。偏光子と検光子とはクロスニコルの関係である。共焦点型偏光顕微鏡では、結晶の方位が異なる部分、A 部と B 部を高コントラストに区別することが出来る。しかし、従来の偏光顕微鏡では、A' 部と B' 部の結晶の方位の違いを観察できていない。また、共焦点型偏光顕微鏡では、結晶に出来た傷 (図中の矢印の部分) の細かい構造を観察できていることがわかる。従来の偏光顕微鏡ではぼやけてしまっており、詳しい構造を知ることは出来ない。このように共焦点型偏光顕微鏡は、対物レンズの偏光面の影響を受けないため、微小な偏光面の回転を検出できる。

## 4.4 ナイロンの断面観察

図 4.5 にナイロンの断面の (a) 共焦点型偏光顕微鏡による、(b) 従来の偏光顕微鏡による観察結果を示す。従来の偏光顕微鏡ではナイロンの断面全体が観察されているが、共焦点型偏光顕微鏡では焦点の合った部分しか観察されていないことが分かる。そのため、観察像がぼやけてしまっている。図 4.5(c) に観察像の断面図を示す。実線が共焦点型偏光顕微鏡の観察像の A-A' の、破線が従来の偏光顕微鏡の観察像 B-B' の断面図である。共焦点型では、対物レンズによる偏光面の回転した成分の影響を受けないため、その成分によるバイアス成分が無くなっていることが分かる。従来の偏光顕微鏡は、試料による偏光面の回転がないにもかかわらず、検出強度のピークに対して 50% もの光が検出されてしまい、コントラスト



が低下してゆく。また、共焦成型偏光顕微鏡を用いた観察を行っている。

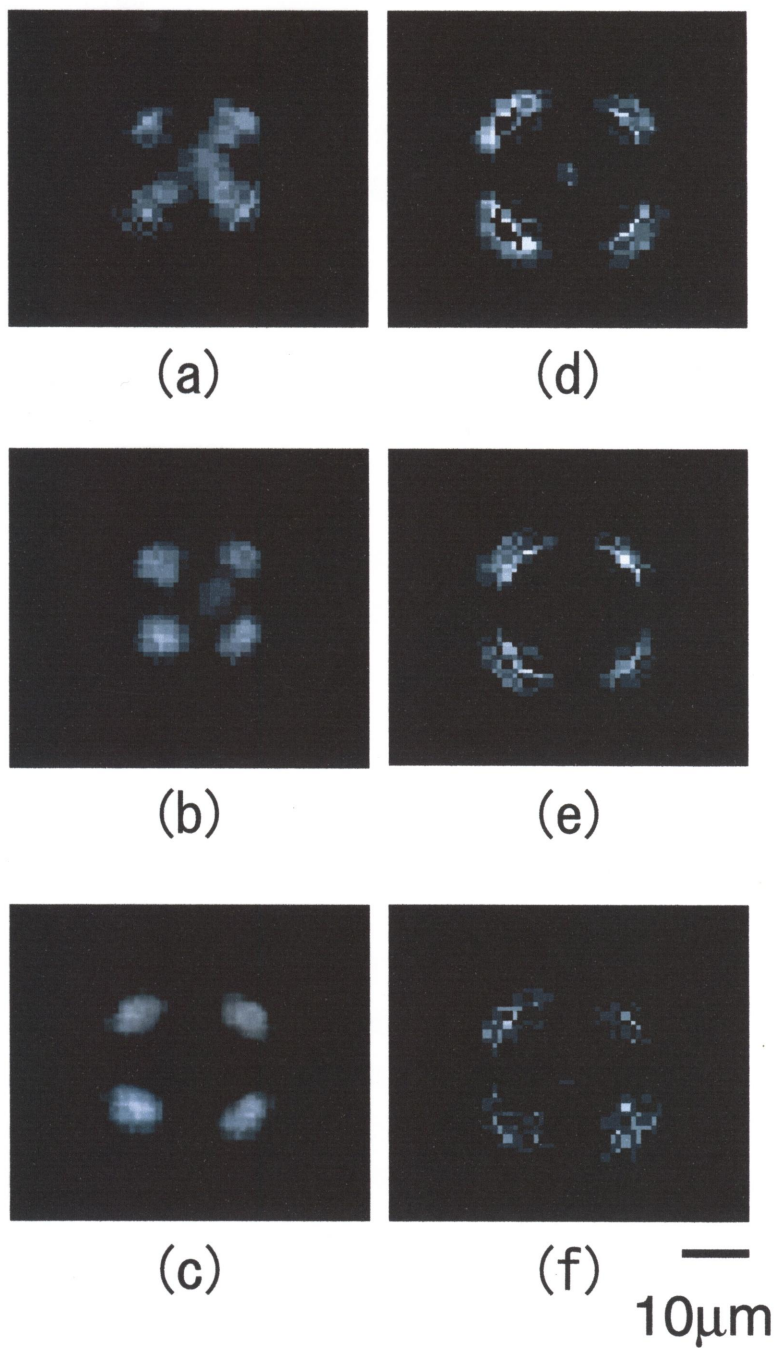


図 4.3: The observation results of particles with various focal planes. The  $z$  step size was  $3\mu\text{m}$ .

が低下している。また、共焦点型偏光顕微鏡では、従来の偏光顕微鏡に比べ、細かい構造を観察できている。

## 4.5 生物試料の観察

### 4.5.1 複眼の観察

図 4.6 に共焦点型偏光顕微鏡でトンボの複眼を観察した結果を示す。複眼の一つ一つの要素である個眼のエッジの部分が検出されている。そして、光軸方向に  $3\mu\text{m}$  ずつ焦点をずらしていくと、その焦点面に対応した個眼のエッジが明るくなっている。

個眼は半球であるため、ラテックス球を観察した図 4.3 のようにエッジ部分が 4 つに分かれて明るくなると考えられる。しかし、観察結果はそのようにならなかった。原因は、個眼が半球であって球ではないためと、試料が大きく傾いていてそれぞれの個眼の真上から照明していないためである。共焦点型偏光顕微鏡は、分解能を上げるために NA の大きい対物レンズを用いても、高コントラストであり、三次元分解能を有するので、これまで観察が難しかった数マイクロオーダーの生物細胞の偏光特性の解析にも適用可能であることが分かった。

### 4.5.2 仮道管の観察

図 4.7(a)-(d) に共焦点型偏光顕微鏡で、(e)-(h) に従来の偏光顕微鏡で仮道を三次元に観察した結果を示す。光軸方向には、 $1\mu\text{m}$  間隔である。偏光子と検光子はクロスニコルである。図 4.7(b) 矢印 A、B から、細胞内の球状の組織を観察できていることが分かる。しかし、図 4.7(b) 矢印 A'、B' においてはその組織を観察できていない。また、共焦点型偏光顕微鏡は、従来の偏光顕微鏡では観察できない、細胞の外壁 (図 4.7(c) C 部, (g) C' 部) の細かい構造を観察できていることが分かる。さらに、共焦点型では、対物レンズによる偏光面の回転の影響を受けないのでバックグランド成分がなくなり、高コントラストである。また、光軸方向に焦点を動かすと、観察できる部位が変わることが分かる。高コントラストである。共焦点型偏光顕微鏡は、高い偏光検出能、空間分解能を有しており、細胞の観察にも適している。

## 4.6 まとめ

ベクトル理論により焦点での電場分布を解析し、偏光顕微鏡の高分解能化で高開口数の対物レンズを用いると偏光面の回転が問題になることを示した。開口数が0.9において、対物レンズによる偏光面の回転により約20%の光が検光子を通過する。そして、従来の偏光顕微鏡に共焦点系を導入することにより、対物レンズによる偏光面の回転の影響を除去できることを示した。ピンホールが対物レンズで偏光面の回転した成分を除去できる光量は、そのピンホールのサイズにより決まる。そこで、ピンホールのサイズと対物レンズにより偏光面の回転した成分を除去できる光量との関係を明らかにした。この結果から、一般に共焦点顕微鏡での最も良いとされるピンホールのサイズ(対物レンズのエアリーディスクと同じ半径)より、小さいものを選ばなければいけないことが分かった。さらに、実際の共焦点型偏光顕微鏡での観察においては、観察する試料に対して得たいコントラストと対物レンズのNAとから、ピンホールのサイズを決定しなければならない。

また、実際に共焦点型偏光顕微鏡を作製し、ポリスチレンラテックス球の三次元観察を行った。共焦点型偏光顕微鏡は対物レンズによる偏光面の回転の影響を受けることなく、試料の偏光特性を正しく高コントラストに観察でき、かつ三次元分解能を持つことが分かった。従来の偏光顕微鏡ではポリスチレンラテックス球による偏光面の回転がないところでも光が検出されてしまい、試料の偏光特性を正しく観察できない。また、アスコルビン酸の結晶の観察を行った。そして、従来の偏光顕微鏡に比べ、微小な偏光特性を観察できることを示した。結晶の三次元観察を行い、従来の偏光顕微鏡では観察できない結晶内部の偏光特性を観察することができた。共焦点型偏光顕微鏡は、対物レンズによる偏光面の回転の影響を受けないだけでなく、試料内部の偏光特性も観察することが可能であり、三次元偏光解析に非常に有効な手段であることが分かった。

そして、共焦点型偏光顕微鏡による生物試料の観察においても、従来の偏光顕微鏡では観察できない細かい構造を高感度に検出できた。

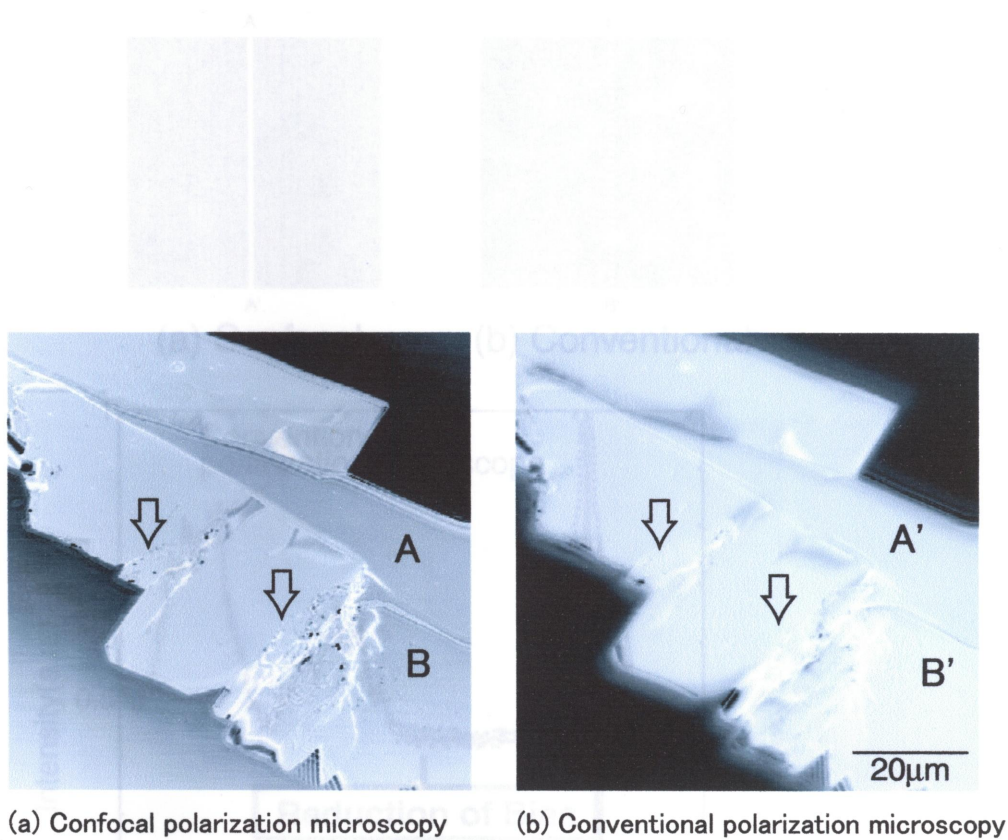


图 4.4: 维生素 C 的观察结果: (a) 共焦偏振显微镜和 (b) 常规偏振显微镜。

图 4.5: 维生素 C 的切片观察结果: (a) 共焦偏振显微镜和 (b) 常规偏振显微镜。A-A' 线在 (a) 和 B-B' 线在 (b)。

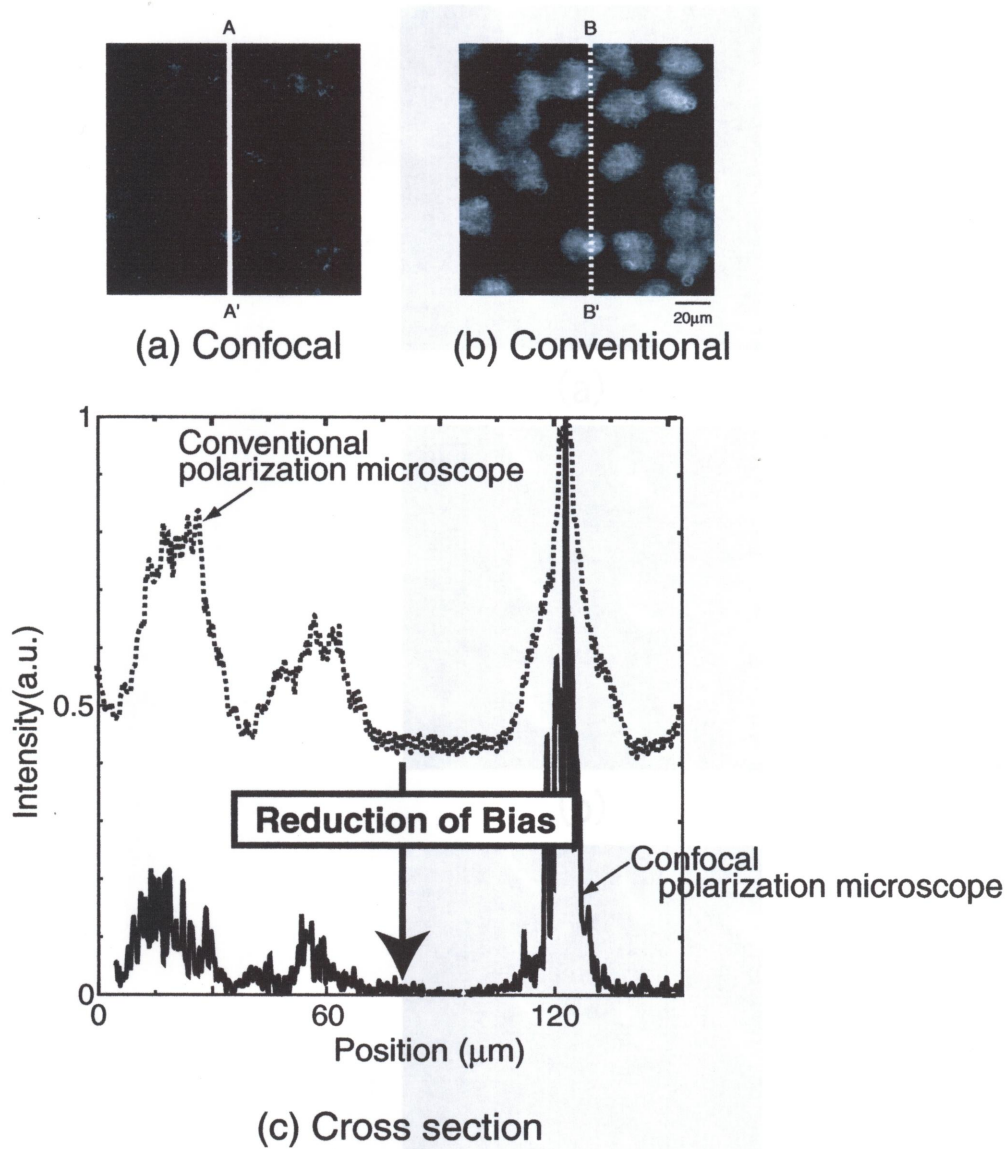


图 4.5: The observation results of section of nylon: (a) confocal polarization microscope and (b) conventional polarization microscope. (c) Profile along A-A' line in (a) and B-B' line in (b).

图 4.6: The observation results of dogwood leaf with various focal planes. The system was similar to the system in figure 4.5.

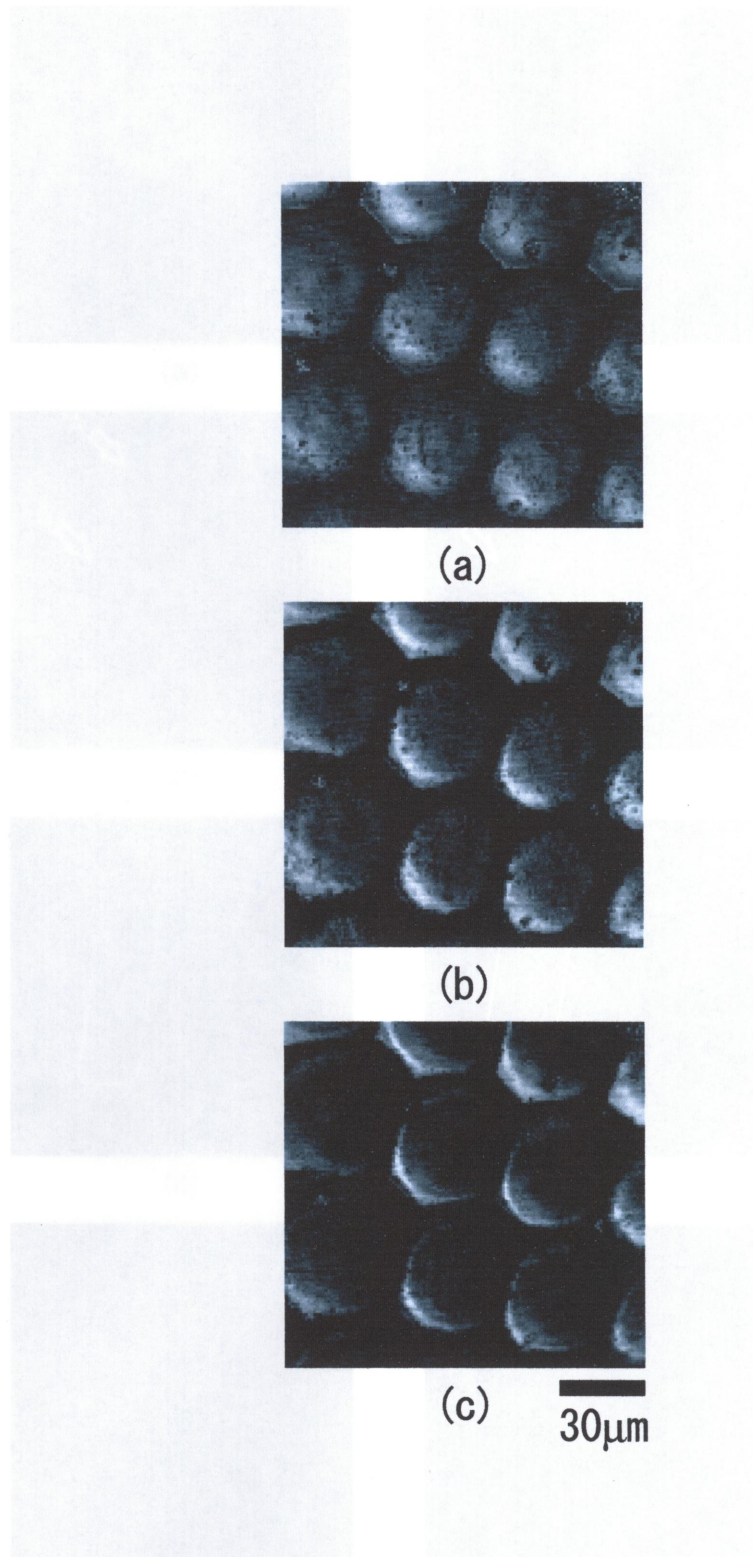


图 4.6: 用共焦偏振显微镜对蜻蜓眼在不同焦平面上的观察结果。z 步长为  $3\mu\text{m}$ 。

图 4.7: (a)-(c) 共焦偏振显微镜对蜻蜓眼的观察结果；(d)-(h) 传统偏振显微镜对蜻蜓眼的观察结果。

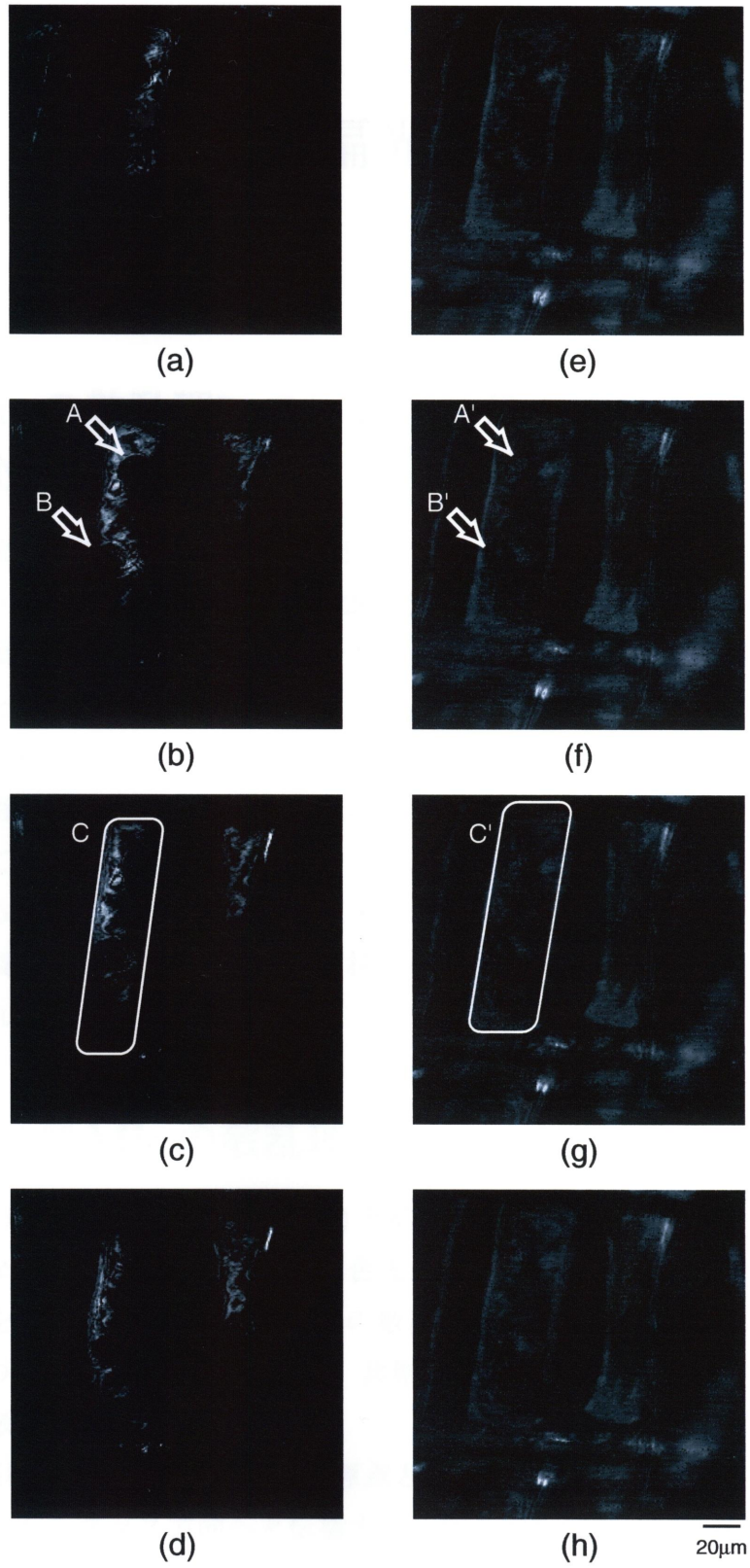


图 4.7: 气孔的观察结果。(a)-(d) 共焦偏振显微镜。(e)-(h) 常规偏振显微镜。 $z$  步长大小为  $1\mu\text{m}$ 。



## 第5章 共焦点型偏光顕微鏡の結像特性の解析

### 5.1 Mieの散乱理論を用いた共焦点偏光顕微鏡の結像特性の解析

共焦点顕微鏡の結像特性はSheppardらのグループにより、部分コヒーレント伝達関数を用いて導出された[16, 17, 18, 2]。その結果、共焦点型は従来のインコヒーレント照明顕微鏡と等価の結像特性をもち、共焦点型はより広い空間周波数帯域を有することが分かった。しかし、これはスカラー理論であり、偏光を扱う共焦点型偏光顕微鏡ではベクトル理論を用いる必要がある。ここでは、拡張型Mieの散乱理論を用いて共焦点型偏光顕微鏡の球に対する結像特性を解析する。球形状の試料としては、ポリスチレンラテックス球、金粒子がある。これは、細胞表面抗原に対する免疫学的マーカーや抗原・抗体・レクチンを結合した生体分子反応性粒子の作製に応用される。生体にも核やリソソームなど球形をした生物細胞も数多く見られる[19, 20, 21]。

### 5.2 拡張型Mieの散乱理論

図5.1に一般的なMieの散乱理論(a)と拡張型Mieの散乱理論(b)との違いを示す。一般的なMieの散乱理論は平面単色光が入射した場合の球の内部及び周囲の電磁場分布を与える[22]。拡張型Mieの散乱理論は任意の入射光に対し、球の内部及び周囲の電磁場分布を与える[23]。共焦点偏光顕微鏡の結像特性の解析には拡張型Mieの散乱理論を用いる。

図5.2に座標系を示す。球の中心を原点とし、球の半径を $a$ とする。入射光は $z$ 軸のマイナスからプラス方向へと伝播する。球を囲む媒質は非伝導で、かつ、この媒質も球も非磁性と仮定する。

時間依存性を  $\exp(-i\omega t)$  とすると、電気および磁気ベクトルの時間に依存しない部分は、球の内外で時間を含まない Maxwell の方程式

$$\text{curl}\mathbf{H} = -k_1\mathbf{E} \quad (5.1)$$

$$\text{curl}\mathbf{E} = k_2\mathbf{H} \quad (5.2)$$

を満足する。ただし、

$$k_1 = \frac{i\omega}{c} \left( \epsilon + i \frac{4\pi\rho}{\omega} \right) \quad (5.3)$$

$$k_2 = \frac{i\omega}{c} \quad (5.4)$$

である。通常の波数  $k$  は

$$k^2 = -k_1 k_2 \quad (5.5)$$

で与えられる。ここで、球を囲む媒質に関する量は上付添字 I によって表し、球に関する量は添字 II で表すものとする。

境界条件は  $\mathbf{E}$  と  $\mathbf{H}$  の接線成分が球表面前後で連続、すなわち

$$\left. \begin{aligned} E_{tang}^{(I)} &= E_{tang}^{(II)} \\ H_{tang}^{(I)} &= H_{tang}^{(II)} \end{aligned} \right\} \text{where } r = a \quad (5.6)$$

である。

境界条件を満足するために、入射場  $\mathbf{E}^{(i)}$  と  $\mathbf{H}^{(i)}$  および球の内部における場  $\mathbf{E}^{(w)}, \mathbf{H}^{(w)}$  と共に、球を囲む媒質では、2次的な (散乱または回折) 場  $\mathbf{E}^{(s)}, \mathbf{H}^{(s)}$  を考える。

2つの領域における全電場は

$$\left. \begin{aligned} \mathbf{E} &= \mathbf{E}^{(i)} + \mathbf{E}^{(s)} && \text{球の外部} \\ &= \mathbf{E}^{(w)} && \text{球の内部} \end{aligned} \right\} \quad (5.7)$$

と表される。磁気ベクトルも同様に表される。

今回の問題では、

$$\left. \begin{aligned} x &= r \sin \theta \cos \phi \\ y &= r \sin \theta \sin \phi \\ z &= r \sin \theta \end{aligned} \right\} \quad (5.8)$$

によって定義される球座標  $r, \theta, \phi$  を用いる。任意のベクトル  $\mathbf{A}$  の成分の直角座標から球座標への変換は、

$$\left. \begin{aligned} A_r &= A_x \sin \theta \cos \phi + A_y \sin \theta \sin \phi + A_z \cos \theta \\ A_\theta &= A_x \cos \theta \cos \phi + A_y \cos \theta \sin \phi - A_z \sin \theta \\ A_\phi &= -A_x \sin \phi + A_y \cos \phi \end{aligned} \right\} \quad (5.9)$$

で与えられる。これらの公式を  $\text{curl} \mathbf{A}$  に適用すると、

$$(\text{curl} \mathbf{A})_r = \frac{1}{r^2 \sin \theta} \left\{ \frac{\partial (r A_\phi \sin \theta)}{\partial \theta} - \frac{\partial (r A_\theta)}{\partial \phi} \right\} \quad (5.10)$$

$$(\text{curl} \mathbf{A})_\theta = \frac{1}{r \sin \theta} \left\{ \frac{\partial (A_r)}{\partial \phi} - \frac{\partial (r A_\phi \sin \theta)}{\partial r} \right\} \quad (5.11)$$

$$(\text{curl} \mathbf{A})_\phi = \frac{1}{r} \left\{ \frac{\partial (r A_\theta)}{\partial r} - \frac{\partial (A_r)}{\partial \theta} \right\} \quad (5.12)$$

となる。以上より、場を記述する方程式 (5.1)(5.2) を球座標で表すと、

$$-k_1 E_r = \frac{1}{r^2 \sin \theta} \left\{ \frac{\partial (r H_\phi \sin \theta)}{\partial \theta} - \frac{\partial (r H_\theta)}{\partial \phi} \right\} \quad (5.13)$$

$$-k_1 E_\theta = \frac{1}{r \sin \theta} \left\{ \frac{\partial (H_r)}{\partial \phi} - \frac{\partial (r H_\phi \sin \theta)}{\partial r} \right\} \quad (5.14)$$

$$-k_1 E_\phi = \frac{1}{r} \left\{ \frac{\partial (r H_\theta)}{\partial r} - \frac{\partial (H_r)}{\partial \theta} \right\} \quad (5.15)$$

$$k_2 H_r = \frac{1}{r^2 \sin \theta} \left\{ \frac{\partial (r E_\phi \sin \theta)}{\partial \theta} - \frac{\partial (r E_\theta)}{\partial \phi} \right\} \quad (5.16)$$

$$k_2 H_\theta = \frac{1}{r \sin \theta} \left\{ \frac{\partial (E_r)}{\partial \phi} - \frac{\partial (r E_\phi \sin \theta)}{\partial r} \right\} \quad (5.17)$$

$$k_2 H_\phi = \frac{1}{r} \left\{ \frac{\partial (r E_\theta)}{\partial r} - \frac{\partial (E_r)}{\partial \theta} \right\} \quad (5.18)$$

となり、境界条式 (5.6) は、

$$\left. \begin{array}{l} E_\theta^{(I)} = E_\theta^{(II)} \quad E_\phi^{(I)} = E_\phi^{(II)} \\ H_\theta^{(I)} = H_\theta^{(II)} \quad H_\phi^{(I)} = H_\phi^{(II)} \end{array} \right\} \text{for } r = a \quad (5.19)$$

とかける。式 (5.13)~(5.18) と式 (5.19) が Mie の理論の基礎方程式である。

これらの方程式の解を、それぞれ式 (5.13)~(5.18) を満たし、互いに 1 次独立な場 ( ${}^e \mathbf{E}, {}^e \mathbf{H}$ ) と ( ${}^m \mathbf{E}, {}^m \mathbf{H}$ ) の和として表す。ただし、これらは、

$${}^e E_r = E_r \quad {}^e H_r = 0 \quad (5.20)$$

および

$${}^m E_r = 0 \quad {}^m H_r = H_r \quad (5.21)$$

を満たすものとする。これらの表示が基礎方程式と矛盾しないことを確認する。式 (5.14) と式 (5.15) で  $H_r = {}^e H_r = 0$  とすると

$$k_1 {}^e E_\theta = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} (r {}^e H_\phi) \quad (5.22)$$

$$k_1 {}^e E_\phi = -\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} (r {}^e H_\theta) \quad (5.23)$$

となる。これを、式(5.17)と式(5.18)とに代入すると

$$\left(\frac{\partial^2}{\partial r^2} + k^2\right)(r^e H_\theta) = -\frac{k_1}{\sin\theta} \frac{\partial^e E_r}{\partial\phi} \quad (5.24)$$

$$\left(\frac{\partial^2}{\partial r^2} + k^2\right)(r^e H_\phi) = +k_1 \frac{\partial^e E_r}{\partial\theta} \quad (5.25)$$

が得られる。式(5.13)と共に、式(5.24)(5.25)が、 ${}^e E_r, {}^e H_\theta$  および  ${}^e H_\phi$  を記述する方程式である。しかし、これらの解がすべて物理的な場を表すのではなく、補助条件  $\text{div}^e \mathbf{H} = 0$  を満たさなければならない。このとき、 ${}^e H_r = 0$  という仮定で補助条件を球座標で表すと

$$\frac{\partial}{\partial\theta}(\sin\theta^e H_\theta) + \frac{\partial}{\partial\phi}({}^e H_\phi) = 0 \quad (5.26)$$

となり、式(5.26)が成立すれば、式(5.16)は自動的に満足される。なぜならば式(5.22)(5.23)を式(5.16)に代入すると

$$0 = \frac{1}{k_1^2 r^2 \sin\theta} \frac{\partial}{\partial r} \left[ \frac{\partial}{\partial\theta}(\sin\theta^e H_\theta) + \frac{\partial}{\partial\phi}({}^e H_\phi) \right] \quad (5.27)$$

となり、式(5.26)が成立すれば、上式が恒等的に満足されるからである。まったく同様に、 ${}^m E_r = 0$  の場合にも成立する。

磁場の動径成分がゼロである解は、電気波 (electric wave) と呼び、電場の動径成分がゼロである解は、磁気波 (magnetic wave) と呼ばれる。以下に、これらは Debye ポテンシャル (Debye's potential) というスカラーポテンシャル  ${}^e \Pi$  と  ${}^m \Pi$  からそれぞれ導かれることを証明する。

はじめに、式(5.16)において  ${}^e H_r = 0$  であることを用いると、 ${}^e E_\phi$  と  ${}^e E_\theta$  はスカラー関数の勾配

$${}^e E_\phi = \frac{1}{r \sin\theta} \frac{\partial U}{\partial\phi} \quad (5.28)$$

$${}^e H_\theta = \frac{1}{r} \frac{\partial U}{\partial\theta} \quad (5.29)$$

によって表現できる。そこで

$$U = \frac{\partial(r^e \Pi)}{\partial r} \quad (5.30)$$

と置くと、式(5.28)は、

$${}^e E_\theta = \frac{1}{r} \frac{\partial^2(r^e \Pi)}{\partial r \partial\theta} \quad (5.31)$$

$${}^e E_\phi = \frac{1}{r \sin\theta} \frac{\partial^2(r^e \Pi)}{\partial r \partial\phi} \quad (5.32)$$

となる。これより、式(5.22)(5.23)は、

$${}^e H_\phi = k_1 \frac{\partial^e \Pi}{\partial \theta} = \frac{k_1}{r} \frac{\partial (r^e \Pi)}{\partial \theta} \quad (5.33)$$

$${}^e H_\theta = -\frac{k_1}{\sin \theta} \frac{\partial^e \Pi}{\partial \phi} = -\frac{k_1}{r \sin \theta} \frac{\partial (r^e \Pi)}{\partial \phi} \quad (5.34)$$

であれば満足される。式(5.33)(5.34)を式(5.13)に代入すると、

$${}^e E_r = -\frac{1}{r \sin \theta} \left\{ \frac{\partial}{\partial \theta} \left( \sin \theta \frac{\partial^e \Pi}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{\sin \theta} \frac{\partial^2 {}^e \Pi}{\partial \phi^2} \right\} \quad (5.35)$$

が得られる。ここで

$$P = \left( \frac{\partial^2}{\partial r^2} + k^2 \right) (r^e \Pi) \quad (5.36)$$

と置く。式(5.10)(5.11)(5.12)を式(5.24)(5.25)に代入すると、

$$\sin \theta \frac{\partial P}{\partial \theta} + \frac{\partial^e E_r}{\partial \phi} = 0 \quad (5.37)$$

$$\sin \theta \frac{\partial P}{\partial \phi} + \frac{\partial^e E_r}{\partial \theta} = 0 \quad (5.38)$$

が求まる。上式の和をとると、

$$\left( \sin \theta \frac{\partial}{\partial \theta} + \frac{\partial}{\partial \phi} \right) (P + {}^e E_r) = 0 \quad (5.39)$$

これより、 $P + {}^e E_r = \text{const}$  となり、定数をゼロと置くと、

$$\frac{1}{r} \frac{\partial^2 (r^e \Pi)}{\partial r^2} + \frac{1}{r^2 \sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left( \sin \theta \frac{\partial^e \Pi}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{r^2 \sin^2 \theta} \frac{\partial^2 {}^e \Pi}{\partial \phi^2} + k^2 {}^e \Pi = 0 \quad (5.40)$$

とすると満足する。この式より、式(5.35)は、

$${}^e E_r = \frac{\partial^2 (r^e \Pi)}{\partial r^2} + k^2 r^e \Pi \quad (5.41)$$

と書ける。以上より、式(5.31)-(5.41)式(5.13)-(5.18)に基礎方程式の解であることが証明できる。

同様に、磁気波に対して行えば、 ${}^e \Pi$  に対する式(5.40)と同じ微分方程式を満たすポテンシャル ${}^m \Pi$  から、すべての場が導ける。基礎方程式の完全な解は、2つの場を加えることで、以下のように書ける。

$$E_r = {}^e E_r + {}^m E_r = \frac{\partial^2 (r^e \Pi)}{\partial r^2} + k^2 r^e \Pi \quad (5.42)$$

$$E_\theta = {}^e E_\theta + {}^m E_\theta = \frac{1}{r} \frac{\partial^2 (r^e \Pi)}{\partial r \partial \theta} + k_2 \frac{1}{r \sin \theta} \frac{\partial (r^m \Pi)}{\partial \phi} \quad (5.43)$$

$$E_\phi = {}^e E_\phi + {}^m E_\phi = \frac{1}{r \sin \theta} \frac{\partial^2 (r^e \Pi)}{\partial r \partial \phi} - k_2 \frac{1}{r} \frac{\partial (r^m \Pi)}{\partial \theta} \quad (5.44)$$

$$H_r = {}^e H_r + {}^m H_r = \frac{\partial^2 (r^m \Pi)}{\partial r^2} + k^2 r^m \Pi \quad (5.45)$$

$$H_\theta = {}^e H_\theta + {}^m H_\theta = \frac{1}{r} \frac{\partial^2 (r^m \Pi)}{\partial r \partial \theta} - k_1 \frac{1}{r \sin \theta} \frac{\partial (r^e \Pi)}{\partial \phi} \quad (5.46)$$

$$H_\phi = {}^e H_\phi + {}^m H_\phi = \frac{1}{r \sin \theta} \frac{\partial^2 (r^m \Pi)}{\partial r \partial \phi} + k_1 \frac{1}{r} \frac{\partial (r^e \Pi)}{\partial \theta} \quad (5.47)$$

ポテンシャル ${}^e \Pi$ と ${}^m \Pi$ は共に、微分方程式(5.40)の解であるが、式(5.40)は波動方程式

$$\nabla^2 \Pi + k^2 \Pi = 0 \quad (5.48)$$

を球座標に直したものである。また、境界条件は、 $E_\theta, E_\phi, H_\theta$ および $E_\phi$ が、球表面 $r = a$ 上で連続より

$$k_1 r^e \Pi, \quad k_2 r^m \Pi, \quad \frac{\partial}{\partial r} (r^e \Pi), \quad \frac{\partial}{\partial r} (r^m \Pi) \quad (5.49)$$

となる。これでこの回折問題は、前述の境界条件を満足する波動方程式の2つの互いに独立な解を求めることに帰着する。

波動方程式(Helmholtz)の最も一般的な変数分離による解は、

$$r \Pi = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \left[ \tilde{A}_{lm} \psi_l(kr) + \tilde{B}_{lm} \chi_l(kr) \right] Y_{lm}(\theta, \phi) \quad (5.50)$$

と表される。 $\tilde{A}_{lm}$ と $\tilde{B}_{lm}$ は任意定数、 $\psi_l$ と $\chi_l$ はRicatti-Bessel function[24]、 $Y_{lm}(\theta, \phi)$ はspherical harmonic function[25]である。したがって、入射場(添字*i*)、散乱場(添字*s*)、内部場(添字*w*)のスカラポテンシャルは式(5.50)と同じように表すことが出来る。入射場は、

$$r^e \Pi^{(i)} = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \tilde{A}_{lm} \psi_l(kr) Y_{lm}(\theta, \phi) \quad (5.51)$$

$$r^m \Pi^{(i)} = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \tilde{B}_{lm} \psi_l(kr) Y_{lm}(\theta, \phi) \quad (5.52)$$

である。ただし、 $\chi_l$ は原点で閉じておらず物理的におかしいので除外した。散乱場は、

$$r^e \Pi^{(s)} = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \tilde{a}_{lm} \xi_l^1(k_1 r) Y_{lm}(\theta, \phi) \quad (5.53)$$

$$r^m \Pi^{(s)} = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \tilde{b}_{lm} \xi_l^1(k_1 r) Y_{lm}(\theta, \phi) \quad (5.54)$$

ただし、 $\xi_l^1 = \psi_l - i\chi_l$  とする。球の内部場は、

$$r^e \Pi^{(w)} = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \tilde{c}_{lm} \psi_l(k_2 r) Y_{lm}(\theta, \phi) \quad (5.55)$$

$$r^m \Pi^{(w)} = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \tilde{d}_{lm} \psi_l(k_2 r) Y_{lm}(\theta, \phi) \quad (5.56)$$

と表される。

式(5.51)-(5.56)を式(5.42)-(5.47)に代入することで、入射場、散乱場、内部場の電磁場分布が求められる。また、これらの式の $l=0$ の項は $\partial Y_{00}/\partial\theta = 0$ なので取り除いた。したがって、入射場は、

$$E_r^{(i)} = \frac{1}{r^2} \sum_{l=1}^{\infty} \sum_{m=-l}^l [l(l+1) A_{lm} \psi_l(k_1 r) Y_{lm}(\theta, \phi)] \quad (5.57)$$

$$E_{\theta}^{(i)} = \frac{1}{r} \sum_{l=1}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \left( k_1 A_{lm} \psi_l'(k_1 r) \frac{\partial Y_{lm}(\theta, \phi)}{\partial\theta} + imk_1 B_{lm} \psi_l(k_1 r) \frac{Y_{lm}(\theta, \phi)}{\sin\theta} \right) \quad (5.58)$$

$$E_{\phi}^{(i)} = \frac{1}{r} \sum_{l=1}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \left( imk_1 A_{lm} \psi_l'(k_1 r) \frac{\partial Y_{lm}(\theta, \phi)}{\partial\theta} - k_1 B_{lm} \psi_l(k_1 r) \frac{Y_{lm}(\theta, \phi)}{\sin\theta} \right) \quad (5.59)$$

であり、散乱場は、

$$E_r^{(s)} = \frac{1}{r^2} \sum_{l=1}^{\infty} \sum_{m=-l}^l [l(l+1) a_{lm} \xi_l^1(k_1 r) Y_{lm}(\theta, \phi)] \quad (5.60)$$

$$E_{\theta}^{(s)} = \frac{1}{r} \sum_{l=1}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \left( k_1 a_{lm} \xi_l^1(k_1 r) \frac{\partial Y_{lm}(\theta, \phi)}{\partial\theta} + imk_1 b_{lm} \xi_l^1(k_1 r) \frac{Y_{lm}(\theta, \phi)}{\sin\theta} \right) \quad (5.61)$$

$$E_{\phi}^{(s)} = \frac{1}{r} \sum_{l=1}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \left( imk_1 a_{lm} \xi_l^1(k_1 r) \frac{\partial Y_{lm}(\theta, \phi)}{\partial\theta} - k_1 b_{lm} \xi_l^1(k_1 r) \frac{Y_{lm}(\theta, \phi)}{\sin\theta} \right) \quad (5.62)$$

であり、内部場は、

$$E_r^{(s)} = \frac{1}{r^2} \sum_{l=1}^{\infty} \sum_{m=-l}^l [l(l+1) c_{lm} \psi_l(k_2 r) Y_{lm}(\theta, \phi)] \quad (5.63)$$

$$E_{\theta}^{(s)} = \frac{1}{r} \sum_{l=1}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \left( k_2 c_{lm} \psi_l'(k_2 r) \frac{\partial Y_{lm}(\theta, \phi)}{\partial\theta} \right)$$

$$+ imk_2 d_{lm} \psi_l(k_2 r) \frac{Y_{lm}(\theta, \phi)}{\sin \theta} \quad (5.64)$$

$$E_\phi^{(s)} = \frac{1}{r} \sum_{l=1}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \left( imk_2 c_{lm} \psi_l'(k_1 r) \frac{\partial Y_{lm}(\theta, \phi)}{\partial \theta} - k_2 d_{lm} \psi_l(k_2 r) \frac{Y_{lm}(\theta, \phi)}{\sin \theta} \right) \quad (5.65)$$

と表される。

次に、散乱場における係数  $a_{lm}, b_{lm}$ 、内部場における係数  $c_{lm}, d_{lm}$  を求める。境界条件 (5.49) と  $\Pi_1 = \Pi^{(i)} + \Pi^{(s)}$  と  $\Pi_2 = \Pi^{(w)}$  とから  $a_{lm}, b_{lm}, c_{lm}, d_{lm}$  は

$$a_{lm} = \frac{\psi_l'(k_2 a) \psi_l(k_2 a) - \bar{n} \psi_l(k_2 a) \psi_l'(k_1 a)}{\bar{n} \psi_l(k_2 a) \xi_l^{(1)}(k_1 a) - \psi_l'(k_2 a) \xi_l^{(1)}(k_1 a)} A_{lm} \quad (5.66)$$

$$b_{lm} = \frac{\bar{n} \psi_l'(k_2 a) \psi_l(k_2 a) - \psi_l(k_2 a) \psi_l'(k_1 a)}{\psi_l(k_2 a) \xi_l^{(1)}(k_1 a) - \bar{n} \psi_l'(k_2 a) \xi_l^{(1)}(k_1 a)} B_{lm} \quad (5.67)$$

$$c_{lm} = \frac{\xi_l^{(1)}(k_1 a) \psi_l(k_1 a) - \xi_l^{(1)}(k_1 a) \psi_l'(k_1 a)}{\bar{n}^2 \psi_l(k_2 a) \xi_l^{(1)}(k_1 a) - \bar{n} \psi_l'(k_2 a) \xi_l^{(1)}(k_1 a)} A_{lm} \quad (5.68)$$

$$d_{lm} = \frac{\xi_l^{(1)}(k_1 a) \psi_l(k_1 a) - \xi_l^{(1)}(k_1 a) \psi_l'(k_1 a)}{\psi_l(k_2 a) \xi_l^{(1)}(k_1 a) - \bar{n} \psi_l'(k_2 a) \xi_l^{(1)}(k_1 a)} B_{lm} \quad (5.69)$$

と表される。 $\bar{n}$  は複素比屈折率であり、次式で表される。

$$\bar{n} = (n_2/n_1)^{1/2} \quad (5.70)$$

最終段階として、係数  $A_{lm}, B_{lm}$  を入射場から求める。入射場が球の表面上に形成する電磁場分布の動径成分  $E_r^{(i)}(a, \theta, \phi)$  は、spherical harmonics を用いて次のように表される。

$$E_r^{(i)}(a, \theta, \phi) = \sum_{l=1}^{\infty} \sum_{m=-l}^l e_{lm} Y_{lm}(\theta, \phi) \quad (5.71)$$

ただし、

$$e_{lm} = \int_0^{2\pi} \int_0^\pi \sin \theta E_r^{(i)}(a, \theta, \phi) Y_{lm}^*(\theta, \phi) d\theta d\phi \quad (5.72)$$

$r = a$  を代入した式 (5.57) と式 (5.71) より

$$\frac{l(l+1)}{a^2} A_{lm} \psi_l(k_1 a) = e_{lm} \quad (5.73)$$

したがって、係数  $A_{lm}, B_{lm}$  は、

$$A_{lm} = \frac{a^2}{l(l+1) \psi_l(k_1 a)} \int_0^{2\pi} \int_0^\pi \sin \theta E_r^{(i)}(a, \theta, \phi) Y_{lm}^*(\theta, \phi) d\theta d\phi \quad (5.74)$$



また、同様に磁場から

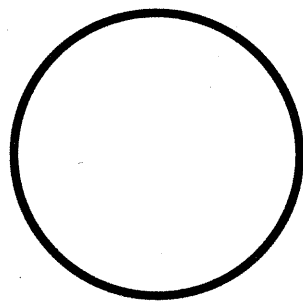
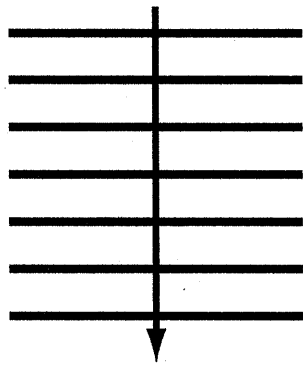
$$B_{lm} = \frac{a^2}{l(l+1)\psi_l(k_1a)} \int_0^{2\pi} \int_0^\pi \sin\theta H_r^{(i)}(a, \theta, \phi) Y_{lm}^*(\theta, \phi) d\theta d\phi \quad (5.75)$$

と表される。

これらを要約すると、任意の光が球に入射したときの、散乱場及び球の内部の場は次のように求めることが出来る。係数  $A_{lm}, B_{lm}$  は、入射場が球の表面に形成する電磁場を積分することで求めることが出来る。係数  $A_{lm}, B_{lm}$  と式 (5.66)-(5.69) より、係数  $a_{lm}, b_{lm}, c_{lm}, d_{lm}$  が求まる。そして、最後に式 (5.57)-(5.65) から、球の周囲の入射場、散乱場、および球の内部の電磁場分布が決定する。

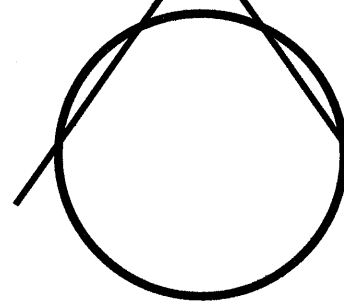
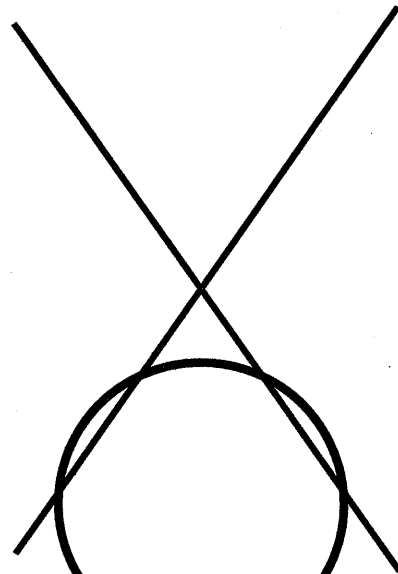
例として、図 5.3 に球に集光したガウスビームが入射した場合の球の周囲及び内部の電場の強度分布を示す。図 5.3(a) に示すように球の位置を左から右へ動かした。球の半径を  $a = 2.5\lambda$ 、屈折率を  $n = 1.33 + 5.0 \times 10^{-6}i$ 、波長を  $\lambda = 1.06\mu m$  とした。また、入射光の集光したガウスビーム [23] のビームウエストの半径を  $w_0 = 0.8a$  とした。球の位置は、 $y = -0.9a, -0.8a, -0.7a \dots + 0.8a, +0.9a$  と変えた。球の内部と球の外部で屈折率が異なるために干渉縞のピッチが異なっていることが分かる。また、球の端にビームが入射すると、球とその外部との境界面で光が全反射を繰り返しながら伝播していることが分かる。

Plane wave



(a)

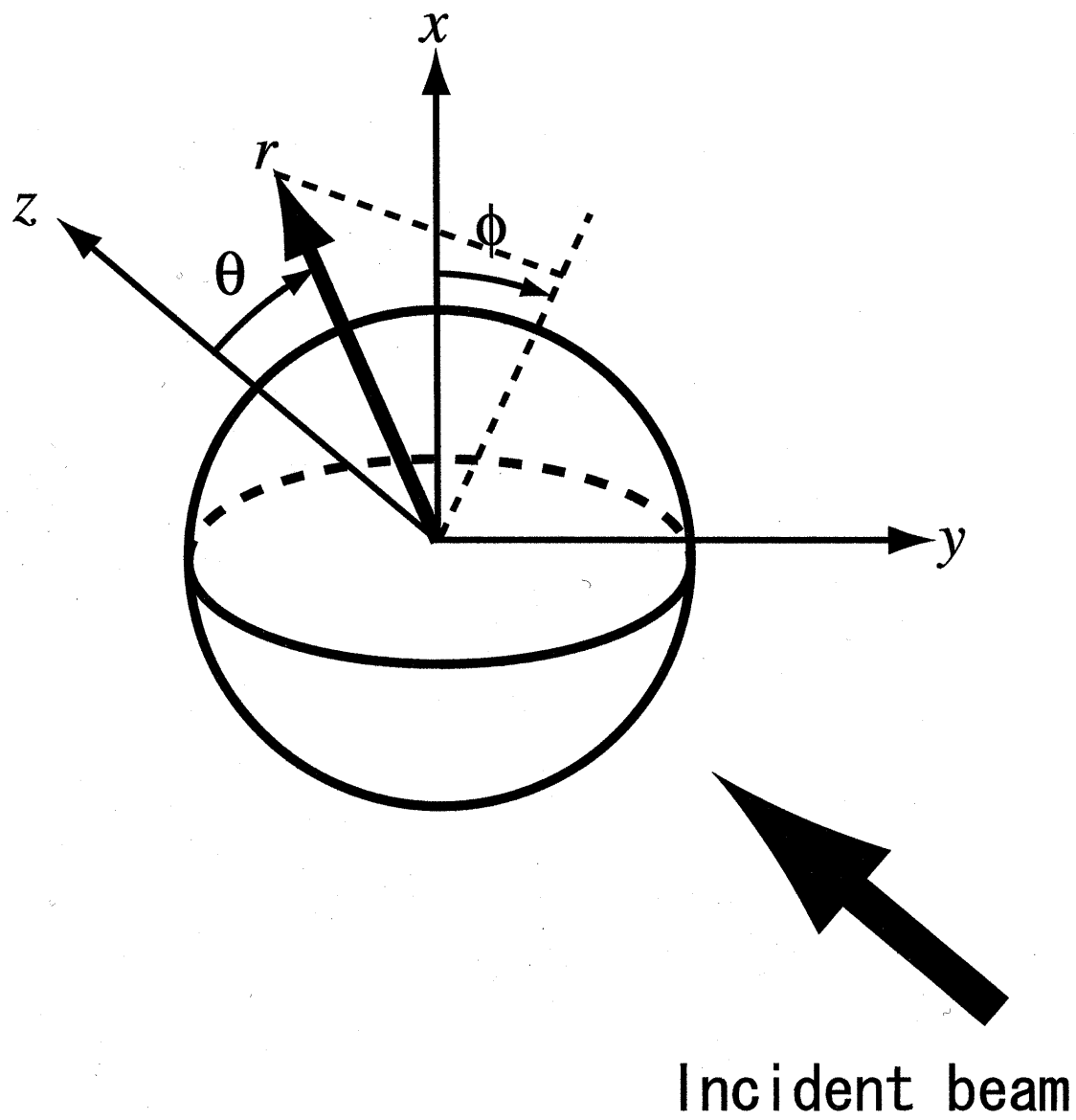
Arbitrary incident wave



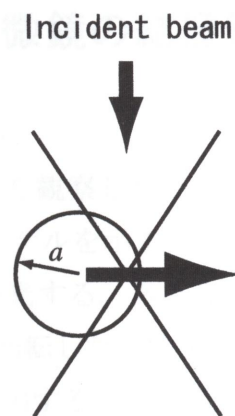
(b)

Spherical particle

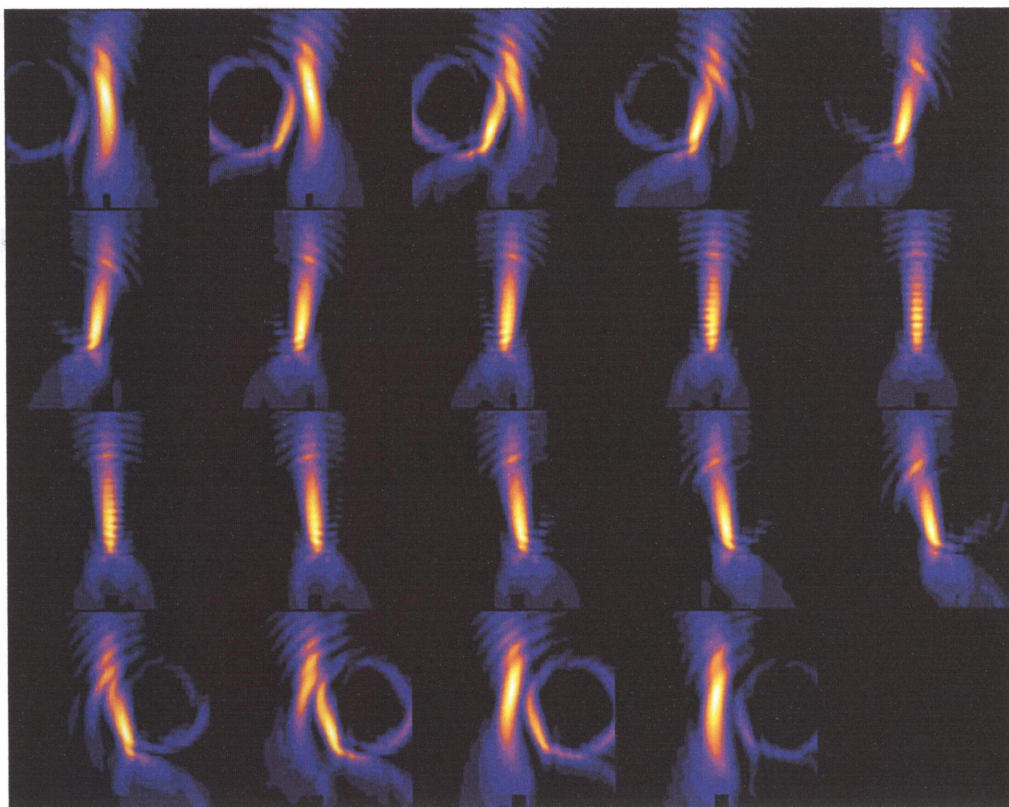
图 5.1: (a) Mie theory. (b) Expanded mie theory.



☒ 5.2: Coordinate ssystem.



(a)



(b)

图 5.3: (a) 计算模型 of expanded mie scattering theory. (b) Calculation results of intensity distribution in  $y$ - $z$  plane for a transverse polarized  $TEM_{00}$  mode focused Gaussian beam propagating in  $+z$  axis direction incident upon a homogeneous sphere various focal point positioning.

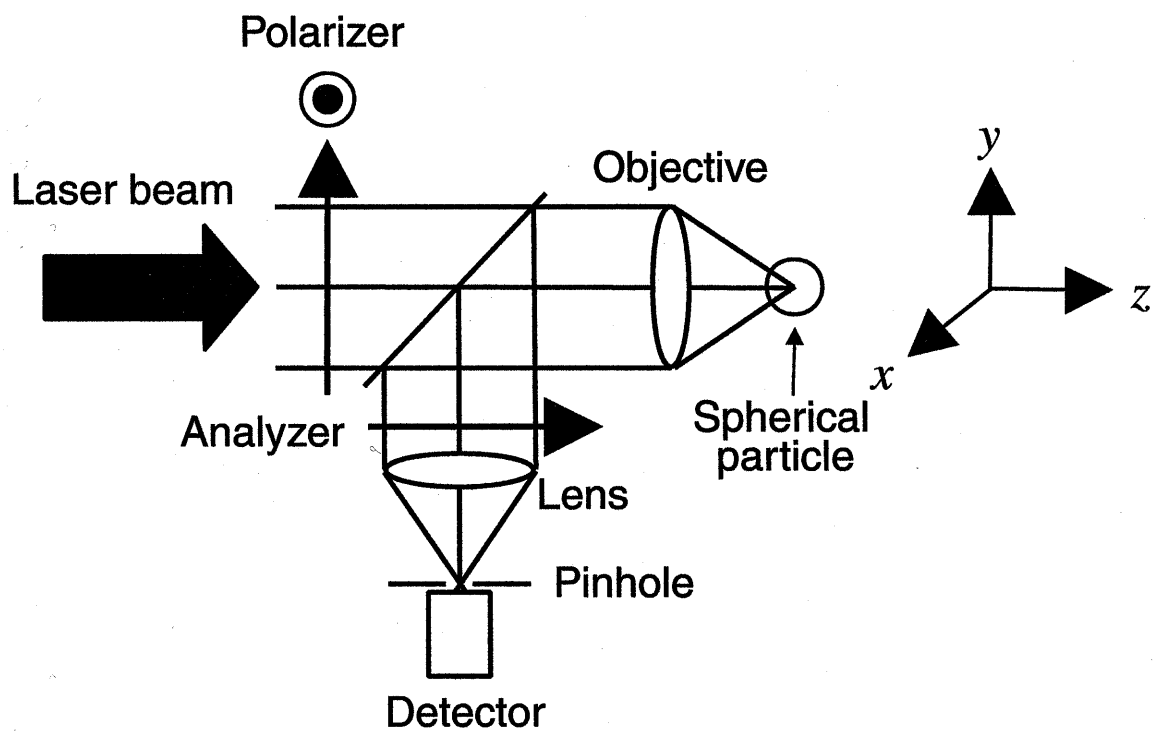
## 5.3 共焦点型偏光顕微鏡の結像特性

### 5.3.1 計算手順

共焦点型偏光顕微鏡で微小球を観察したときの三次元結像特性を Mie の理論を用いて解析する。図 5.4 に計算モデルを示す。レーザー光を偏光子で直線偏光とし、対物レンズで試料上の一点に集光する。散乱光を対物レンズで集め検出系へと導く。そして、検光子で偏光面の回転した成分を取り出し、結像レンズで結像し、ピンホールを通過した光のみを検出する。入射場には、第 3.1.1 章のベクトル理論を用い、散乱場は上で述べた拡張型 Mie の散乱理論を用いて求めた。共焦点型偏光顕微鏡において 1 点あたり検出される光強度は、散乱場の電場の振幅分布を球から十分に離れた平面 ( $z = z_0$ ) で、積分して求める。散乱場の電場分布を  $E_s(x, y, z)$  とすると 1 点あたり検出される光強度  $I(x, y)$  は、以下のように表される。

$$I(x, y) = \left| \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} E_s(x, y, z) dx dy \Big|_{z=z_0} \right|^2 \quad (5.76)$$

そして、焦点位置  $(x, y)$  を走査して、共焦点型偏光顕微鏡で微小球を観察したときの観察像を得る。



⊠ 5.4: Calculation model for the image formation characteristic analysis to observe a spherical particle with confocal polarization microscope.

### 5.3.2 計算方法の検証

T. Wilson[10] らが理論的に求めた点散乱物体の共焦点型偏光顕微鏡像と比較する。図 5.5 に微小球の半径を変えたとき、共焦点型偏光顕微鏡で得られる像を示す。観察像は  $x-y$  平面の光強度分布を表す。図 5.5(a) は、半径  $a = 2.5\lambda$ 、(b) は、半径  $a = 1.5\lambda$ 、(c) は、半径  $a = 0.5\lambda$  である。微小球の半径を小さくしていくと、T. Wilson[10] らの結果と一致することが分かる。これより、この計算方法は正しいといえる。

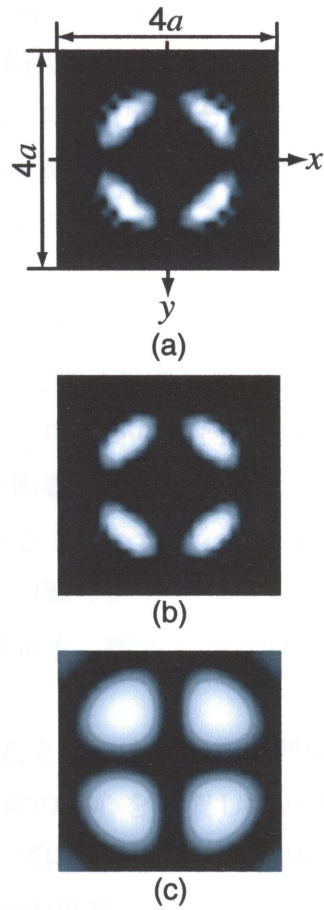


図 5.5: Calculated results for the images obtained by use of a confocal polarization microscope. The mages are of particles with radii of (a)  $a = 2.5\lambda$ , (b)  $a = 1.5\lambda$ , (c)  $a = 0.5\lambda$ .



### 5.3.3 従来の偏光顕微鏡と共焦点型偏光顕微鏡との結像特性の比較

図 5.6 に微小球を観察したときに得られる像の計算結果を示す。図 5.6(a) は共焦点型偏光顕微鏡、(b) は従来の偏光顕微鏡の場合の計算結果である。球の半径を  $a = 2.5\lambda$ 、屈折率を  $n = 1.33 + 5.0 \times 10^{-6}i$ 、波長を  $\lambda = 1.0\mu\text{m}$ 、対物レンズの NA を 0.9 とした。そして、焦点面を光軸方向に  $z = -0.5a, 0.0, +0.5a$  と変えた。

共焦点型偏光顕微鏡では、偏光面の回転しない偏光子と検光子の方向で強度がゼロになっているが、従来の偏光顕微鏡では、光が検出されていることが分かる。さらに、従来の偏光顕微鏡は、球の中心部分で光が検出されている。これは、焦点面以外からの偏光面の回転を検出しているためだと思われる。共焦点型偏光顕微鏡は、光軸方向に分解能をもつため、焦点面以外からの光の影響は受けていないことがわかる。

図 5.7 に、図 5.6 の焦点が  $z = 0$  の場合の像の断面図を示す。球の中心と、急のエッジ部  $y = a$  で断面をとった。(a) は共焦点型偏光顕微鏡、(b) は従来の偏光顕微鏡の場合の計算結果である。中心部の断面図より、共焦点型偏光顕微鏡は対物レンズによる偏光面の回転の影響を受けないため、球による偏光面の回転がない場所で光強度は低くなっていることがわかる。それに対し、従来の偏光顕微鏡では対物レンズによる偏光面の回転の影響を受けて、球による偏光面の回転のないところ（球の中心部および偏光子、検光子の方向）でも光強度が高くなっているのが分かる。

図 5.8 に光軸方向に走査したときの (a) 共焦点型偏光顕微鏡と (b) 従来の偏光顕微鏡との応答の比較を示す。球の中心を走査したときの応答（赤線）を見ると、共焦点型偏光顕微鏡は対物レンズによる偏光面の回転をまったく受けておらず、また、 $y = 0.1a$ （青線）では、球の境界で光強度が強くなっている事がわかる。このことから、共焦点型偏光顕微鏡は、光軸方向に分解能を持つことが考えられる。従来の偏光顕微鏡は、対物レンズの偏光面の回転の影響を受け、球の偏光特性を検出できていない。

このように、共焦点型偏光顕微鏡は、対物レンズによる偏光面の影響を受けないため、従来の偏光顕微鏡に比べ、精度良く試料の偏光特性の解析が行えることが分かった。さらに、光軸方向に分解能を有していることが分かった。これより共焦点型偏光顕微鏡は、偏光特性の三次元解析に非常に有効なツールであるといえる。

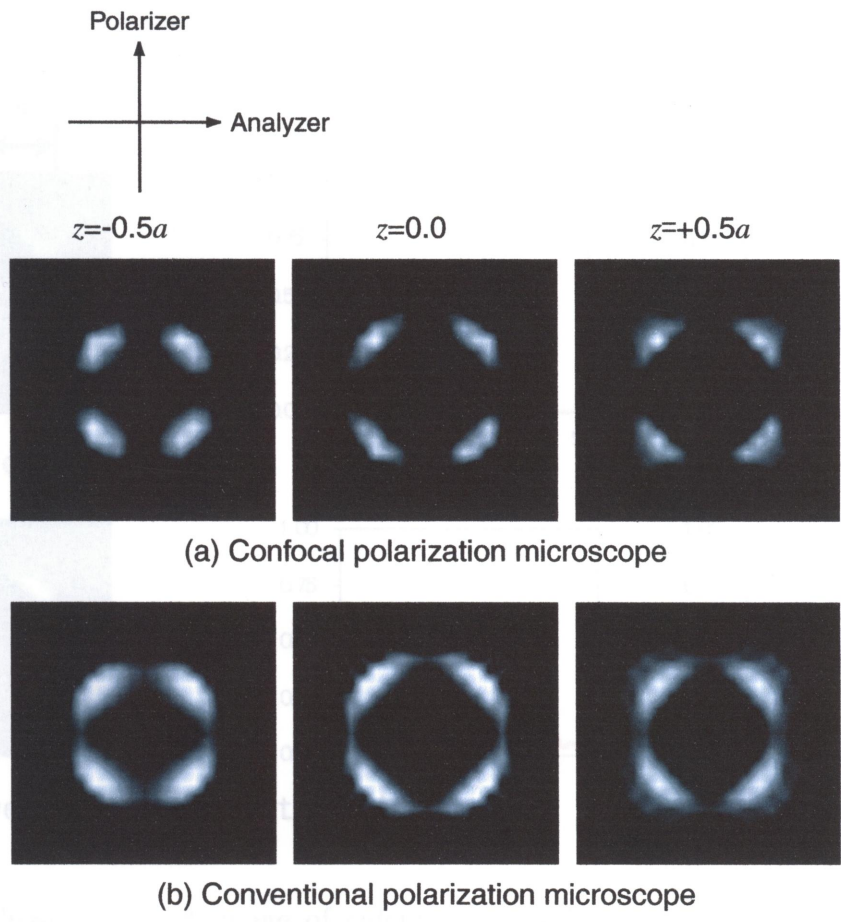


图 5.6: Calculation results of image observed a spherical particle with (a) confocal polarization microscope, (b) conventional polarization microscope.

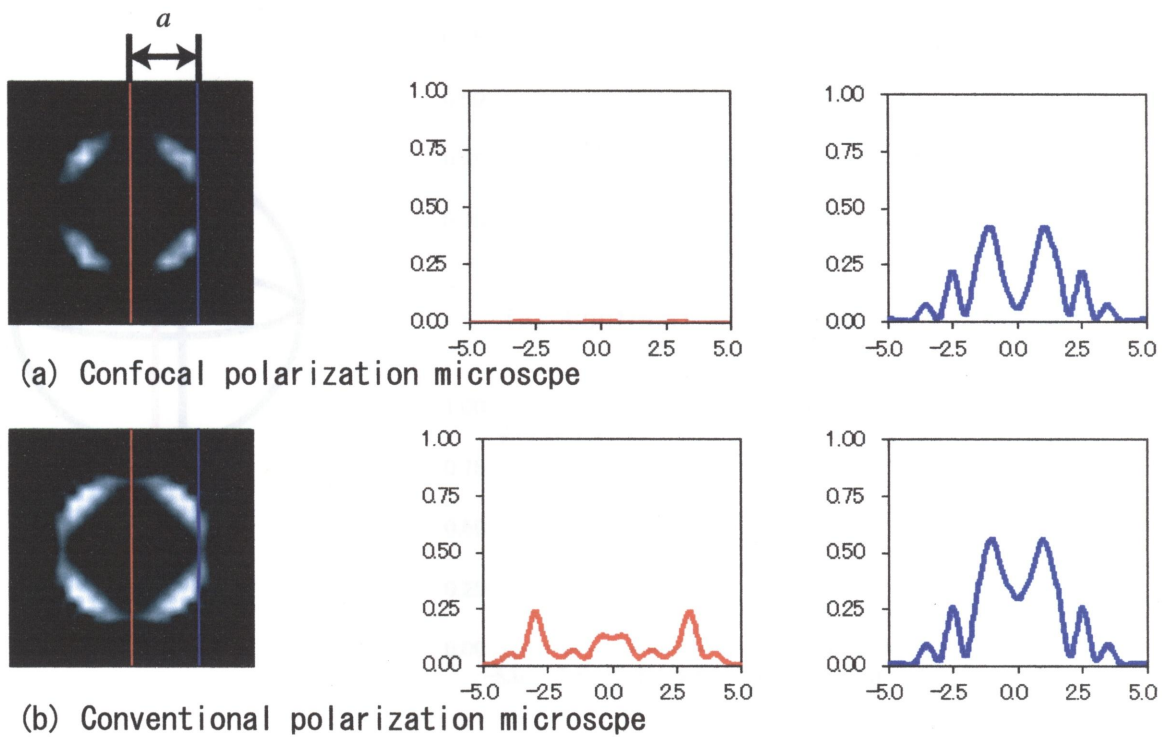


图 5.7: 计算结果的图像横截面。 (a) 共焦偏振显微镜。 (b) 常规偏振显微镜。

## 5.4 平面基板上の微小球の電磁場解析

平面基板と誘電体球の境界面に電磁波が照射される場合、球面上に電磁波が反射され、また基板に透過する。この透過光と球面上に反射された光との干渉により、球面上に電磁波の強度が分布する。この分布は、球面上に電磁波が照射される位置、球の半径、誘電体の誘電率、基板の誘電率、および電磁波の波長によって変化する。この分布を観測することで、球の位置や形状、誘電体の誘電率、および基板の誘電率を推定することができる。

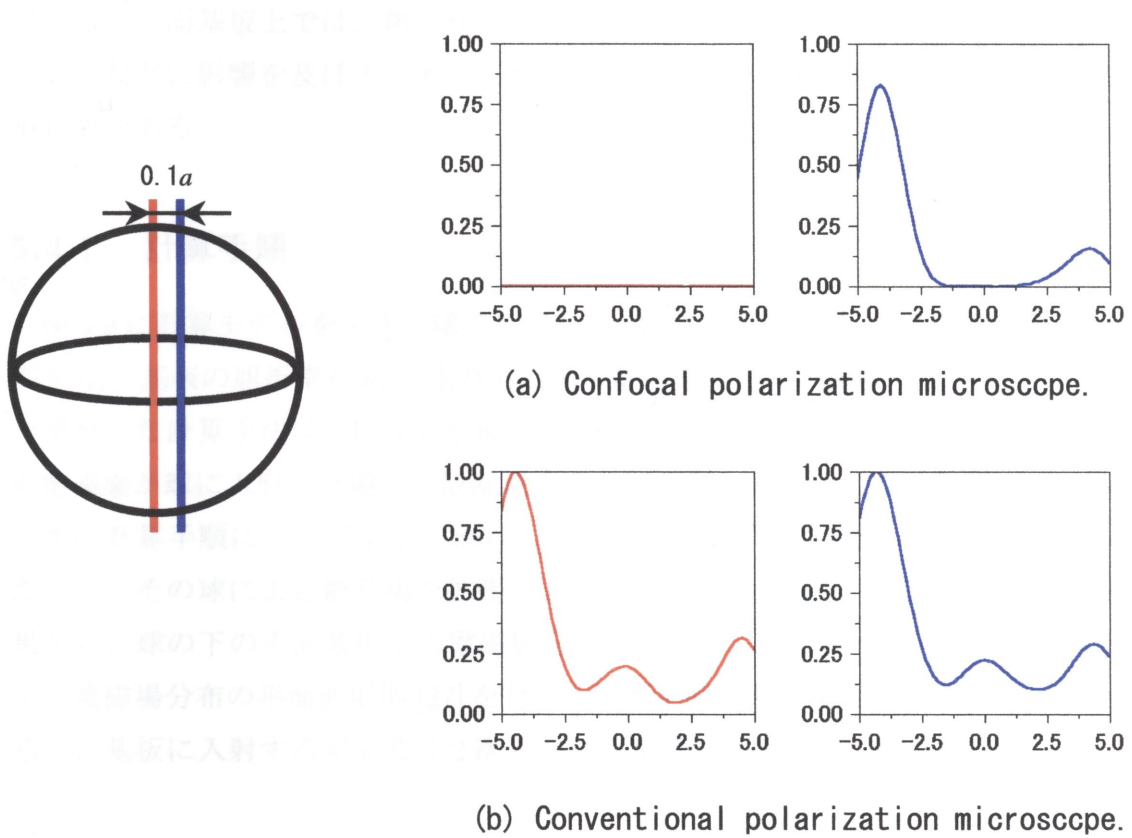


図 5.8: Cross section of image of calculation results. (a) Confocal polarization microscope. (b) Conventional ploarization microscope.

この反射率を計算し、反射光と外側から入射した光との干渉を観測する。この反射光と外側から入射した光との干渉を観測することで、球の位置や形状、誘電体の誘電率、および基板の誘電率を推定することができる。この繰り返し計算を、平面基板上の微小球の電磁場解析と呼ぶ。この計算は、誘電体球と誘電体基板の境界面に電磁波が照射される。

## 5.4 平面基板上の微小球の電磁場解析

5.2節では、微小球に光が入射した場合の散乱について述べた。この節では、基板上の微小球に光が入射した場合の光の散乱について解析する。細胞内の核などは細胞膜上に存在しており、その細胞膜の影響を考慮する必要がある。また、生物細胞は培地で培養、観察される。基板上に細胞を固定したセンサーなどが開発されており、平面基板上的微小球のイメージングや電磁場分布の解析が必要とされている。平面基板では、微小球と平面基板との間で多重散乱が起こり、イメージングなどに影響を及ぼすと考えられ、基板の影響を考慮した光の散乱場の解析が必要である。

### 5.4.1 計算手順

図 5.9 に計算モデルを示す。球の半径を  $a$ 、屈折率を  $n_i$ 、球の周囲の媒質の屈折率を  $n_e$ 、基板の屈折率を  $n_s$ 、球の中心から基板表面までの距離を  $d$  とする。ここで開発した計算手法は、Fuller と Kattawar の順次散乱の手法 [26] と 5.2 節の任意の電磁場が球に入射した場合の散乱場を扱う拡張型 Mie の散乱理論を用いている。

次に計算手順について示す。始めに、単一の球に対して外部から入射光が入ったとし、その球による散乱場を拡張型 Mie の散乱理論を用いて計算する。この結果から、球の下の平面基板上的電磁場分布を求めることができる。次に平面基板上的電磁場分布の平面波展開 [27] を行う。平面基板上的電場分布を  $E(x, y, d)$  とすると、基板に入射する平面波は 2 次元フーリエ変換より次式で書ける。

$$\mathbf{A}(f_x, f_y) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \mathbf{E}(x, y, d) \times \exp[-2\pi i(f_x x + f_y y)] dx dy. \quad (5.77)$$

そして、それぞれの平面波の入射角に対して、 $p$  成分、 $s$  成分に分け、フレネルの反射率を計算し、反射光を求める。それらの平面波を伝播させ、再び球に入射させる。この反射光と外部からの入射場が単一球に入射したとして、同様の計算を繰り返す。この繰り返し計算を電場分布が変わらなくなるまで繰り返す。このようにして、平面基板上的微小球による散乱場を計算することができる。この繰り返し計算は、誘電体球と誘電体基板のような弱い相互作用の場合は、数回で収束する。

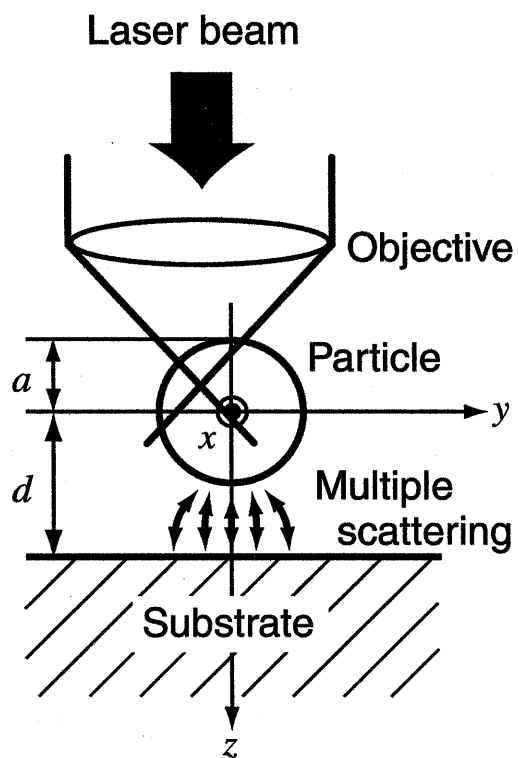


图 5.9: Calculation model of Mie scattering on or above the substrate.

## 5.4.2 計算方法の検証

図 5.10 に開発した計算方法と Barton の結果 [23] とを比較した結果を示す。実線 (a) は、入射光がガウシアンビームで、平面基板がない場合の光散乱場の  $z$  軸断面であり、Barton の結果である。破線 (b)、(c)、(d) は、それぞれ平面基板の位置が  $z = +1.3a$  ( $d = 1.3a$ )、 $z = +2.5a$  ( $d = 2.5a$ )、 $z = +9.0a$  ( $d = 9.0a$ ) の場合である。微小球と平面基板との距離  $d$  が小さくなるにつれ、平面基板のない場合の結果の実線 (a) に近づいていっていることが分かる。特に、 $d = 9.0a$  では、基板のない場合の結果とほとんど同じである。この結果より、開発した計算方法は、十分に正しいと言える。

### 5.4.3 平面基板上の微小球による光散乱

平面基板に微小球が存在する光散乱場を計算する際、基底に誘電体基板を設ける場合と金属球と誘電体球との場合を比較する。

#### 誘電体球と誘電体基板

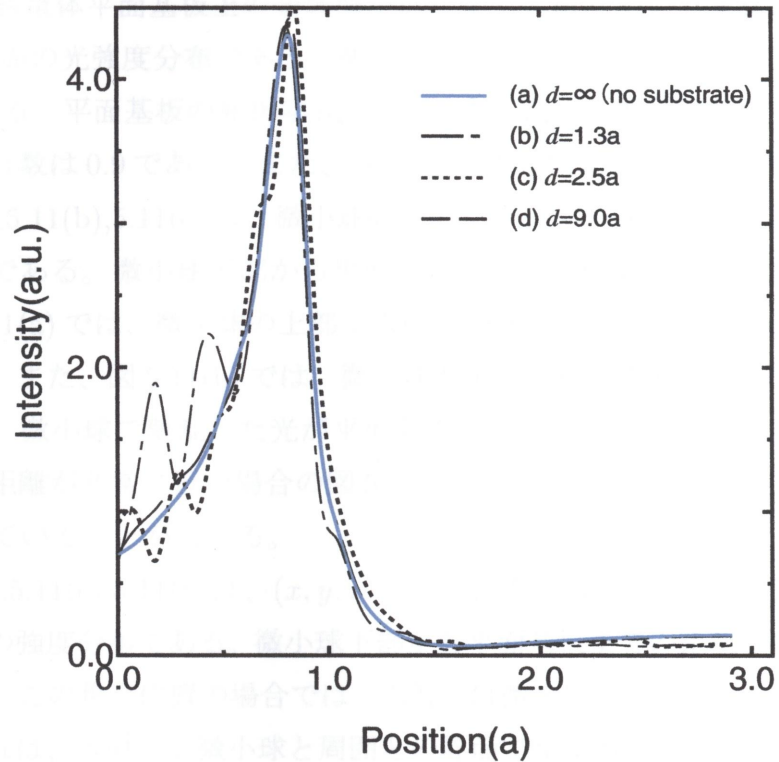


図 5.10: The cross sections of electromagnetic field along the  $z$  direction. The solid line (a) represents Barton's result in Ref. [23]: the scattered field without a substrate. The broken lines (b), (c) and (d) are the cross sections when a dielectric substrate exists at the  $z = +1.3a$  ( $d = 1.3a$ ),  $z = +2.5a$  ( $d = 2.5a$ ) and  $z = +9.0a$  ( $d = 9.0a$ ), respectively.



### 5.4.3 平面基板上の微小球による光散乱

平面基板上の微小球による光散乱場を求め、開発した計算方法を検証する。誘電体球と誘電体基板の場合と金属球と誘電体基板の場合について述べる。

#### 誘電体球と誘電体基板

図 5.11 に誘電体平面基板上の金属微小球による光散乱場の計算結果を示す。図は、 $y-z$  平面の光強度分布である。微小球の半径  $a$  は光の波長と同じ、屈折率  $n_i$  は、1.5 である。平面基板の屈折率  $n_s$  は、1.5 とした。入射光は収束光とし、対物レンズの開口数は 0.9 である。また、入射光の偏光方向は、 $x$  軸方向である。

図 5.11(a), 5.11(b), 5.11(c) は、微小球の中心にレーザー光を集光した場合の電場の強度分布である。微小球下部から平面基板までの距離  $d$  は、 $\infty$ 、 $1.5\lambda$ 、 $0.1\lambda$  とした。図 5.11(a) では、微小球の上部で入射光と球で反射した光が干渉していることが分かる。また、図 5.11(b) では、微小球と平面基板との間に干渉縞ができていいる。これは、微小球で散乱した光が平面基板で反射したからである。微小球と平面基板との距離が非常に近い場合の図 5.11(c) では、平面基板にカップリングした光が発生していることが分かる。

図 5.11(d), 5.11(e), 5.11(f) は、 $(x, y, z) = (0.0, 1.5a, 0.0)$  にレーザー光を集光した場合の電場の強度分布である。微小球下部から平面基板までの距離  $d$  は、 $\infty$ 、 $1.5\lambda$ 、 $0.1\lambda$  とした。この焦点位置の場合では、入射光は微小球の中を伝播していることが分かる。これは、入射光が微小球と周囲との界面で全反射を繰り返しながら、伝播しているからである。また、図 5.11(a), 5.11(b), 5.11(c) と同様に、微小球の上方で入射光と反射光による干渉縞が発生している。図 5.11(f) では、微小球の表面で発生した近接場が平面基板とカップリングしている。カップリングした光は臨界角である  $41.8^\circ$  の方向に伝播している。また、図 5.11(e) の平面基板と微小球との距離  $d$  が  $1.5\lambda$  の場合では、カップリングは起こっていない。このことから、図 5.11(f) におけるカップリングは近接場が寄与しているということが言える。このようなことは考えられることであり、計算方法が正しいことを示している。

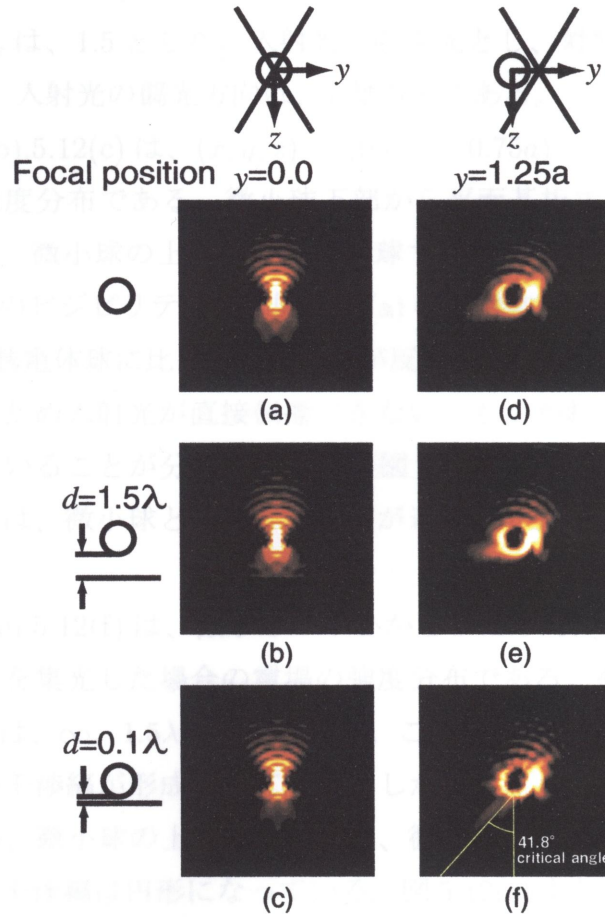


図 5.11: The scattered intensity distributions in the  $y - z$  plane by a dielectric particle near a dielectric substrate. The refractive indices of both the particle and the substrate are 1.5. In (a), (b) and (c) the laser beam is focused at the center of a particle or  $(x, y, z) = (0, 0, 0)$ , while in (d), (e) and (f) the beam is focused at  $(x, y, z) = (0, 1.25a, 0)$ ; (a) and (d) show the scattered field without the substrate or  $d = \infty$ ; (b) and (e) show the field of  $d = 2.5a$ , and (c) and (f) show the field of  $d = 1.1a$ .

## 金属球と誘電体基板

図 5.12 に誘電体平面基板上の金属微小球による光散乱場の計算結果を示す。図は、 $y-z$  平面の光強度分布である。微小球の半径  $a$  は光の波長と同じ、屈折率  $n_i$  は、 $0.9744 + 1.850i$  である。これは、波長 633nm における金の屈折率である。平面基板の屈折率  $n_s$  は、1.5 とした。入射光は収束光とし、対物レンズの開口数は 0.9 である。また、入射光の偏光方向は、 $x$  軸方向である。

図 5.12(a), 5.12(b), 5.12(c) は、 $(x, y, z) = (0.0, 0.0, 0.75a)$  にレーザー光を集光した場合の電場の強度分布である。微小球下部から平面基板までの距離  $d$  は、 $\infty$ 、 $1.5\lambda$ 、 $0.1\lambda$  とした。微小球の上部で入射光と球で反射した光が干渉していることが分かる。干渉縞のビジビリティは、図 5.11(a) の誘電体球の場合より高くなっている。なぜなら、誘電体球に比べ金属球の方が反射率が高いためである。また、微小球が金属であるため入射光が直接伝播できないにもかかわらず、微小球の下で電場が強くなっていることが分かる。また、図 5.12(b)、図 5.12(c) から、微小球の下の電場の強度は、微小球と基板との距離が近いほど強くなっていることが分かる。

図 5.12(d), 5.12(e), 5.12(f) は、微小球の中心から  $z$  軸方向に  $0.75a$  だけずらした位置にレーザー光を集光した場合の電場の強度分布である。微小球下部から平面基板までの距離  $d$  は、 $\infty$ 、 $1.5\lambda$ 、 $0.1\lambda$  とした。この場合は、図 5.12(a) と同様にビジビリティの高い干渉縞が形成されている。しかし、焦点の位置が微小球の中心より下にあるため、微小球の上部だけでなく、微小球の両側面からの反射光の寄与も大きいため、干渉縞は円形になっている。図 5.12(c) より、微小球の下で電場が増強されていることが分かる。この微小なスポットの強度は約 10 倍程度増強されている。また、全幅半値幅は、 $y$  軸方向で  $0.23a$ 、 $z$  軸方向で  $0.25a$  である。これは、微小球と平面基板との多重散乱により、電場が増強された結果である。さらに、図 5.12(e) より金属球に入射した光により発生した近接場が平面基板とカップリングして、基板中を伝播していることが分かる。

図 5.13 に、図 5.12(d), 5.12(e), 5.12(f) の  $z$  軸の断面図を示す。平面基板と微小球との距離が近い場合に、非常に強度が強く、局在化されたピークが、球の下にできていていることが分かる。このピークの半値幅は、 $z$  軸方向で  $0.25a$  と非常にシャープである。このピークは、レーザートラッピングを利用したニア・フィールド顕微鏡 [28] に非常に有効である。この電場増強は、ニア・フィールド顕微鏡で用いられていることであり、開発した計算方法が正しいことを示している。

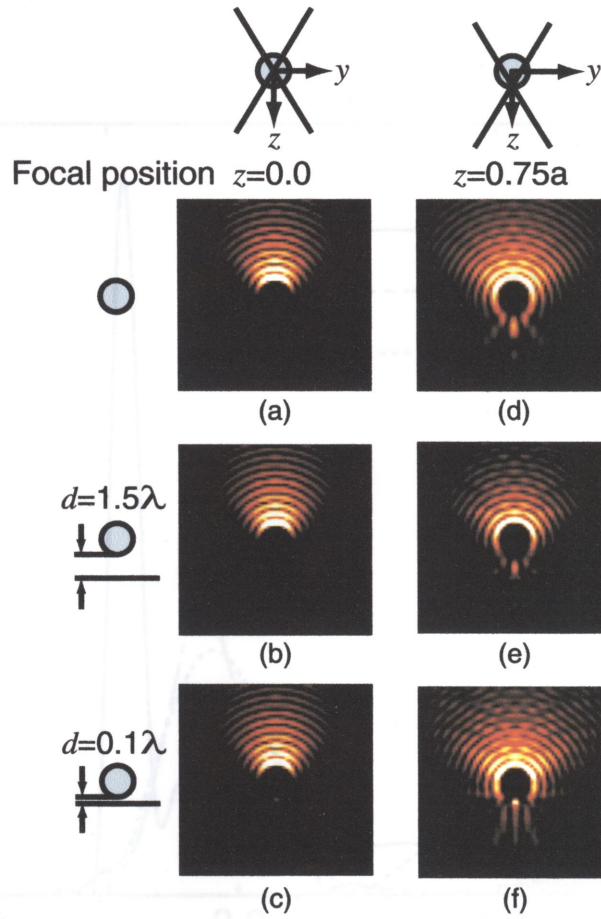


图 5.12: The scattered intensity distributions in the  $y-z$  plane by a metal particle near a dielectric substrate. The refractive indices of the metal particle and the substrate are  $0.9744 + 1.850i$  and  $1.5$ , respectively. In (a), (b) and (c) the laser beam is focused at the center of the particle or  $(x, y, z) = (0, 0, 0)$ , while in (d), (e) and (f) the beam is focused at  $(x, y, z) = (0, 0, 0.75a)$ ; (a) and (d) show the scattered field without the substrate or  $d = \infty$ ; (b) and (e) show the field of  $d = 2.5a$ , and (c) and (f) show the field of  $d = 1.1a$ .

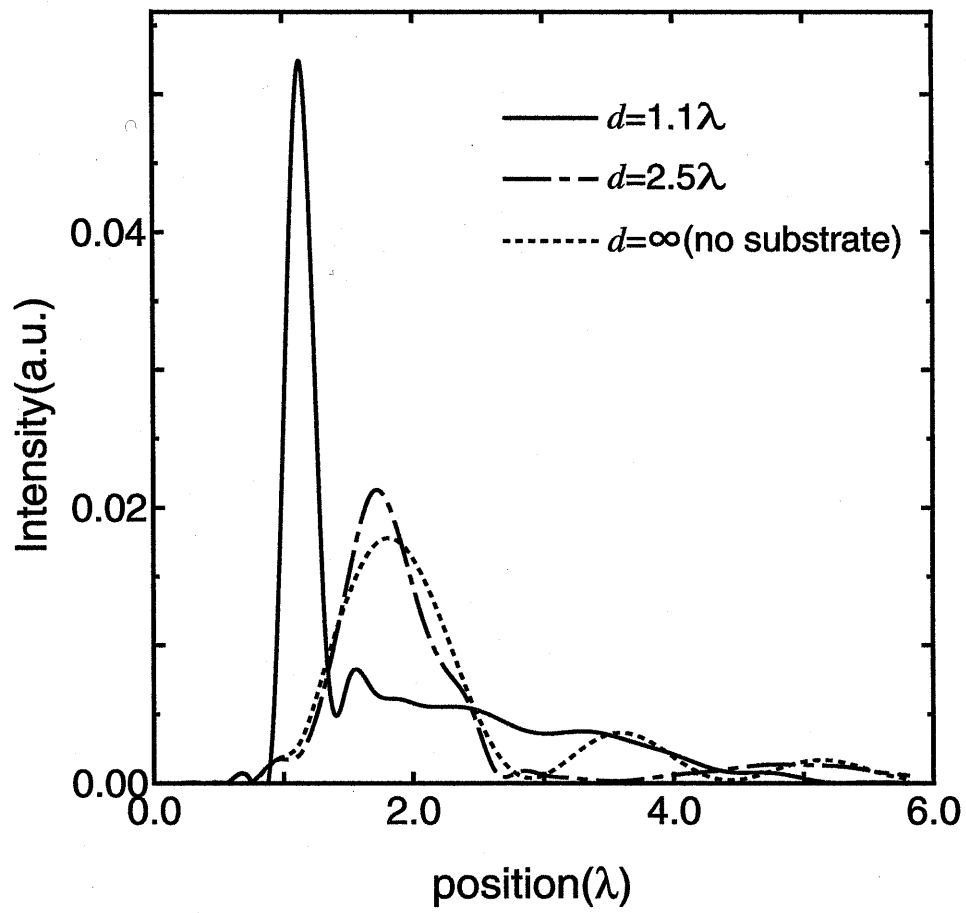


Fig. 5.13: The cross sections of Figs. 3(d), 3(e) and 3(f) along  $z$  axis. The full width at half maximum of the peak is about  $0.25a$ .

#### 5.4.4 平面基板上的の球に対する共焦点型偏光顕微鏡の結像特性

5.3節では、平面基板のない場合について解析した。ここでは、平面基板上の微小球を偏光顕微鏡により観察した場合の結像特性について解析し、平面基板の影響について議論する。図 5.14 に計算モデルを示す。 $x$  軸方向に偏光した直線偏光の入射光を対物レンズの微小球の一点に集光する。散乱光は 5.4.1 小節で述べた平面基板上での拡張型 Mie の散乱理論を用いた。そして、検光子を通過する  $y$ 、 $z$  成分から偏光顕微鏡により検出される信号を求めた。

図 5.15 に微小球の下に基板がある場合の (a) 共焦点型偏光顕微鏡、(b) は従来の偏光顕微鏡の結像特性の計算結果を示す。球の半径を  $a = 2.5\lambda$ 、屈折率を  $n = 1.33 + 5.0 \times 10^{-6}i$ 、波長を  $\lambda = 1.0\mu\text{m}$ 、対物レンズの NA を 0.9 とした。そして、焦点面を光軸方向に  $z = -0.5a, 0.0, +0.5a$  と変えた。これらの条件は、5.3 節と同じである。そして、平面基板の屈折率は、 $n_s = 1.57$  とした。共焦点型偏光顕微鏡では、基板のない場合と同様に偏光面の回転しない偏光子と検光子の方向で強度がゼロになっている。しかし、基板のある場合には、明るい部分が多重になっている。これは、基板からの反射光の影響である。従来の偏光顕微鏡では、 $z = 0.0$ 、 $z = +0.5a$  において偏光子の方向で光が検出されてしまう。

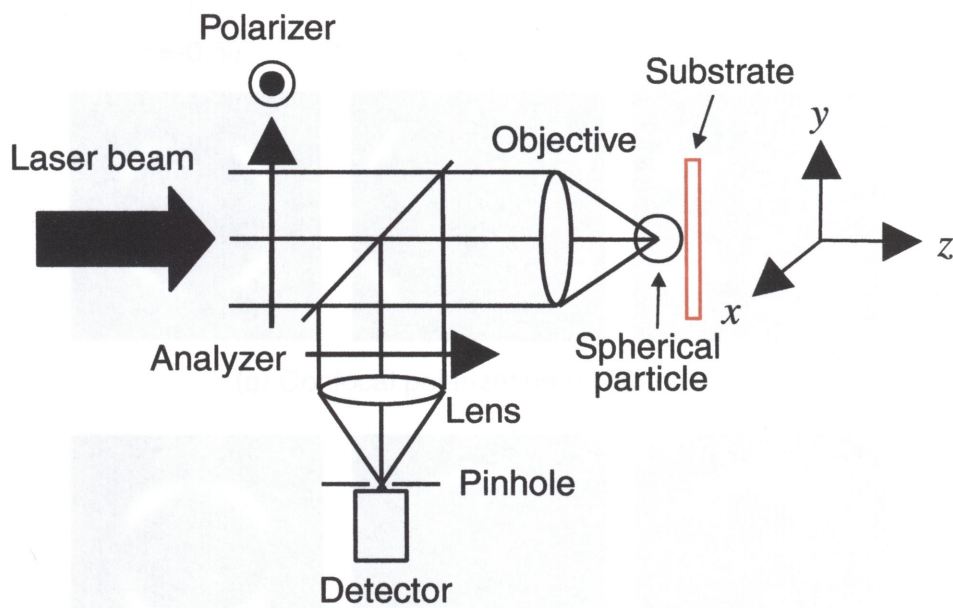


图 5.14: 计算模型用于图像形成特性分析以观察基板上的球形颗粒，使用共焦偏振显微镜。

## 5.5 まとめ

非球形粒子の散乱現象を、電磁気学に基づいて厳密に計算した結果、従来の偏光顕微鏡とは異なる散乱パターンを抽出することができた。特に、粒子の形状や位置によって、散乱光の偏光状態が顕著に変化する。この結果は、粒子の形状や位置を高精度で測定するための新たな手法を開拓する上で重要な手がかりとなる。

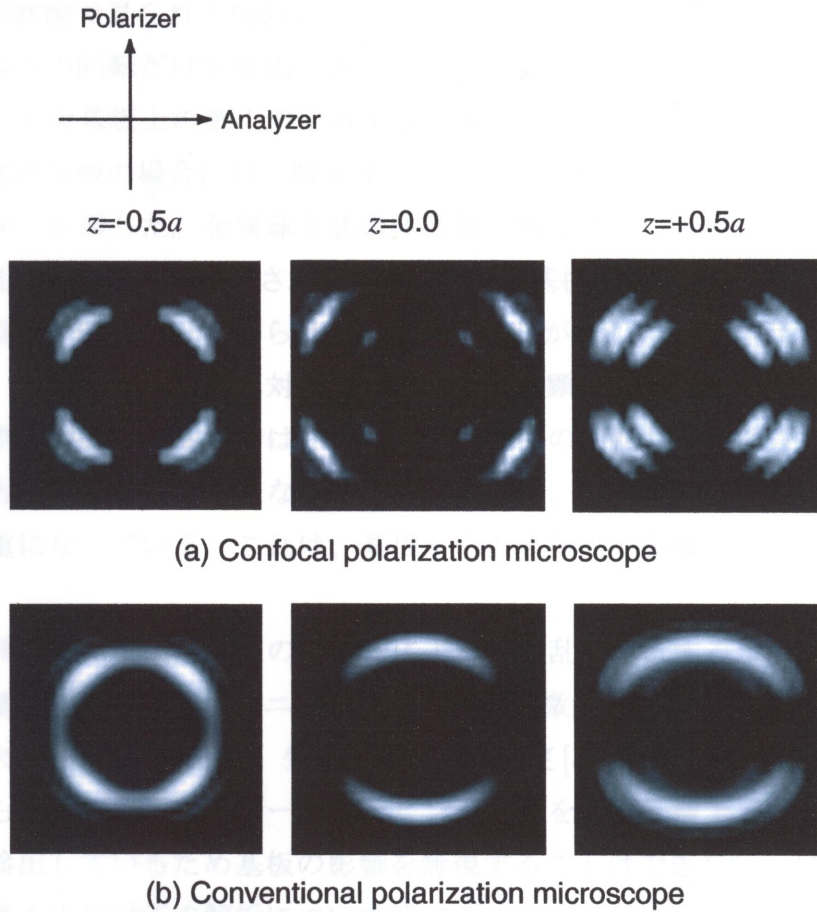


図 5.15: Calculation results of image observed a spherical particle on the substrate with (a) confocal polarization microscope, (b) conventional polarization microscope.



## 5.5 まとめ

拡張型 Mie の散乱理論を用い、共焦点型偏光顕微鏡の球に対する結像特性を解析した。その結果、従来の偏光顕微鏡では、球による偏光面の回転のない部分でも、偏光面の回転を検出することを示した。光軸応答でも、球による偏光面の回転ではない擬似ピークが検出された。それに対し、共焦点型偏光顕微鏡では、従来の偏光顕微鏡で見られた擬似ピークは見られなかった。共焦点型偏光顕微鏡は、球による偏光の回転だけを検出でき、三次元分解能を有することを示した。

さらに、平面基板上の微小球に対する光散乱を解析する方法を開発した。誘電体球と誘電体基板の場合には、微小球で発生した近接場が基板とカップリングし、臨界角方向へ伝播した。金属球と誘電体基板の場合では、金属球と平面基板の間の多重散乱により電場が増強された。また、平面基板を徐々に遠ざけていくと Mie の散乱理論と一致した。これらは、開発した方法が正しいことを示している。

そして、平面基板上の球に対する共焦点型偏光顕微鏡の結像特性について解析した。共焦点型偏光顕微鏡では、球による偏光面の回転しない部分では偏光子と検光子の方向で強度がゼロになっている。しかし、基板のある場合には、明るい部分が多重になっている。これは、基板からの反射光の影響があることを示している。

ここで開発した平面基板上の微小球による光散乱を解析する手法は、プローブ先端での電場増強を利用するニア・フィールド顕微鏡 [28, 29, 30]、摩擦計測 [31]、粘性の三次元分布の計測 [32]、生体の力学量の測定 [33] の解析にも非常に有効である。これらの計測は、レーザートラッピング [34] を平面基板上で行い、微小球のずれ量を検出しているため基板の影響を無視することはできない。付録 A に基板上の球に働く光放射圧の解析について述べる。

## 第6章 共焦点型偏光顕微鏡の蛍光偏光観察への応用

蛍光観察は、観察部位だけを蛍光プローブにより染色することにより、高感度に試料を観察することができる手法であり幅広く用いられている。特に組織細胞化学や分子生物学の分野において、細胞内でのDNAやRNA[35, 36, 37]、あるいは様々な蛋白、Caイオン濃度などの局在や定量を目的として、様々な研究に用いられている[38, 39]。また、細胞内での分子間の相互作用や分子構造の解析に応用されている[40, 41]。

### 6.1 蛍光偏光観察の原理

蛍光分子の遷移モーメントはその分子の構造によって決まるある方向を向いている。そのため、その励起確率は励起光の偏光方向に依存する。図6.1に示すように蛍光分子の遷移モーメントと励起光 $\mathbf{P}$ の偏光方向とすると、蛍光分子が励起光で励起される確率は次式で書ける。

$$p(\alpha) = p_0 \cos^2 \alpha \quad (6.1)$$

ここで $\alpha$ は分子の遷移モーメントと励起光の電場ベクトルがなす角度である。分子の遷移モーメントと励起光の電場ベクトルが平行のときに励起確率が最大となり、分子の遷移モーメントと励起光の電場ベクトルが垂直のときに励起確率が0になることが分かる。図6.2に直線偏光で蛍光を励起した場合の励起確率を示す。蛍光分子が励起光の電場ベクトルの振動方向と平行であれば、励起される確率が高いため蛍光は強くなる。それに対し、励起光の電場ベクトルの振動方向と垂直の場合には蛍光は励起されない。

このように蛍光は、蛍光分子の発光にかかわる電子の振動方向に沿って偏光する[42]。

## 6.2 蛍光顕微鏡の原理

②

蛍光分子は特定の波長の光を吸収し

光(図6.1)の電場を吸収する分子のこと

励起の上昇する特定の分子は

励起を吸収し、励起状態である

励起した分子は、蛍光を放射する

励起した分子は、励起状態である

励起した分子は、励起状態である

励起した分子は、励起状態である

励起した分子は、励起状態である

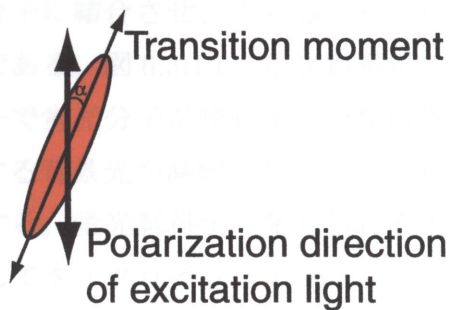


図 6.1: Relation between the electric field vector of excitation light and the transitional moment of a fluorescence molecule.

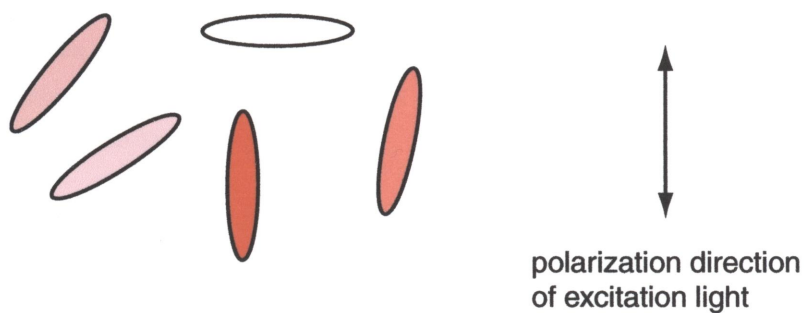


図 6.2: Excitation probability of fluorescence.

## 6.2 蛍光顕微鏡の原理

蛍光分子とは特定の波長の光を吸収して(図 6.3a の  $\lambda_1$ ), それよりも長い波長の光(図 6.3a の  $\lambda_2$ )を放出する分子のことである。蛍光顕微鏡は、その蛍光分子を試料内の注目する特定の分子に結合させ、蛍光分子の分布、偏光、蛍光寿命や動きなどを観察する顕微鏡である。図 6.3(b) に蛍光顕微鏡の光学系を示す。光源の照明光は、励起フィルターで蛍光分子が吸収する波長以外の光はカットされる。これにより、観察を邪魔する背景光が減弱される。この励起光が、対物レンズを通し集光され試料を照明する。蛍光試料から発せられる蛍光は、励起光と逆向きに進んで対物レンズを通してダイクロイックミラーに到達する。ダイクロイックミラーは、特定の波長以下の光を反射して、それ以上長い波長の光を透過する性質を持つ。そのため、蛍光はこのミラーを透過するが、励起光が試料で反射した成分は透過できない。そして、吸収フィルターで、注目する蛍光以外の波長をカットして、検出器により検出する。

高倍率物レンズ (NA 0.65、倍率約 100倍) を用いて、分子を励起し、蛍光を発生させる。このとき、励起光の波長よりも長い波長の光を発生させる。この現象を Stokes shift と呼ぶ。

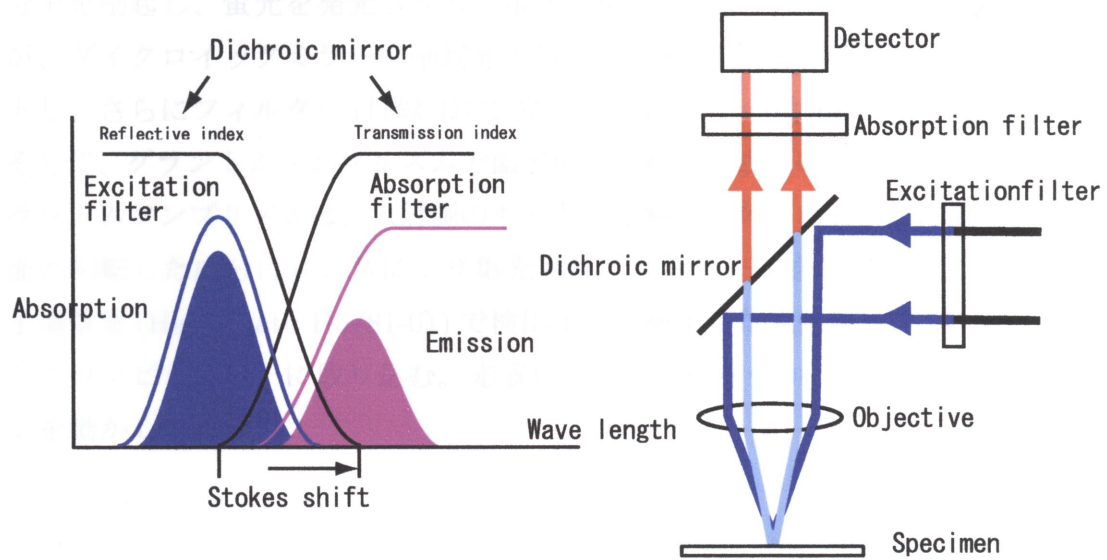


図 6.3: (a) Excitation and emission, relations the reflection and transmission character of excitation filter, absorption filter and dichroic mirror. (b) Optical path of fluorescence microscope.

### 6.3 共焦点型偏光顕微鏡による蛍光観察

図 6.4 に蛍光観察のための共焦点型偏光顕微鏡の光学系を示す。光源には波長  $\lambda=514.5\text{nm}$  の  $\text{Ar}^+$  レーザーを用いた。光源からのレーザー光はビームエキスパンダーで拡げ、レーザー光を  $\lambda/4$  板で円偏光とし、グラントムソンプリズムで直線偏光とする。用いたグラントムソンプリズムの消光比は  $5.0 \times 10^{-5}$  である。グラントムソンプリズムを回転させることで任意の方向の偏光面をもつ直線偏光が取り出せる。励起光であるレーザー光を、ダイクロイックミラー (付録 B) で方向を変え、対物レンズ (NA 0.65、倍率 40 倍) で試料上の一点に集光する。そして、蛍光分子を励起し、蛍光を発光させる。蛍光と散乱光が同じ対物レンズで集められるが、ダイクロイックミラーで励起光の波長である  $514.5\text{nm}$  の波長の散乱光をカットし、さらにフィルター (付録 D) で波長  $524\text{nm}$  以下の蛍光以外の光を取り除く。そして、グラントムソンプリズムで偏光面の回転した成分のみを検出する。このグラントムソンプリズムは、入射側のものと光学軸が直角になるように置いた。偏光面の回転した成分はレンズにより集光され、ピンホールを通過した光のみを光電子増倍管 (Hamamatu H5781-01) で検出する。検出した光強度は、AD ボードを通してコンピューターに取り込む。走査はコンピューターから GP-IB を使いステージを動かして行った。

6.3.1 臭化炭イソシアニン色素 (PI-Cy3) の蛍光の検出

臭化炭イソシアニン色素の凝集体は、溶液中で垂直に照射されたレーザー光によって励起され、その励起状態から基底状態へ遷移する際に蛍光を発する。この蛍光の強度を測定するために、検出器として PMT (Photomultiplier Tube) が用いられる。また、この装置はコンピュータと接続されており、測定データの処理が行われる。

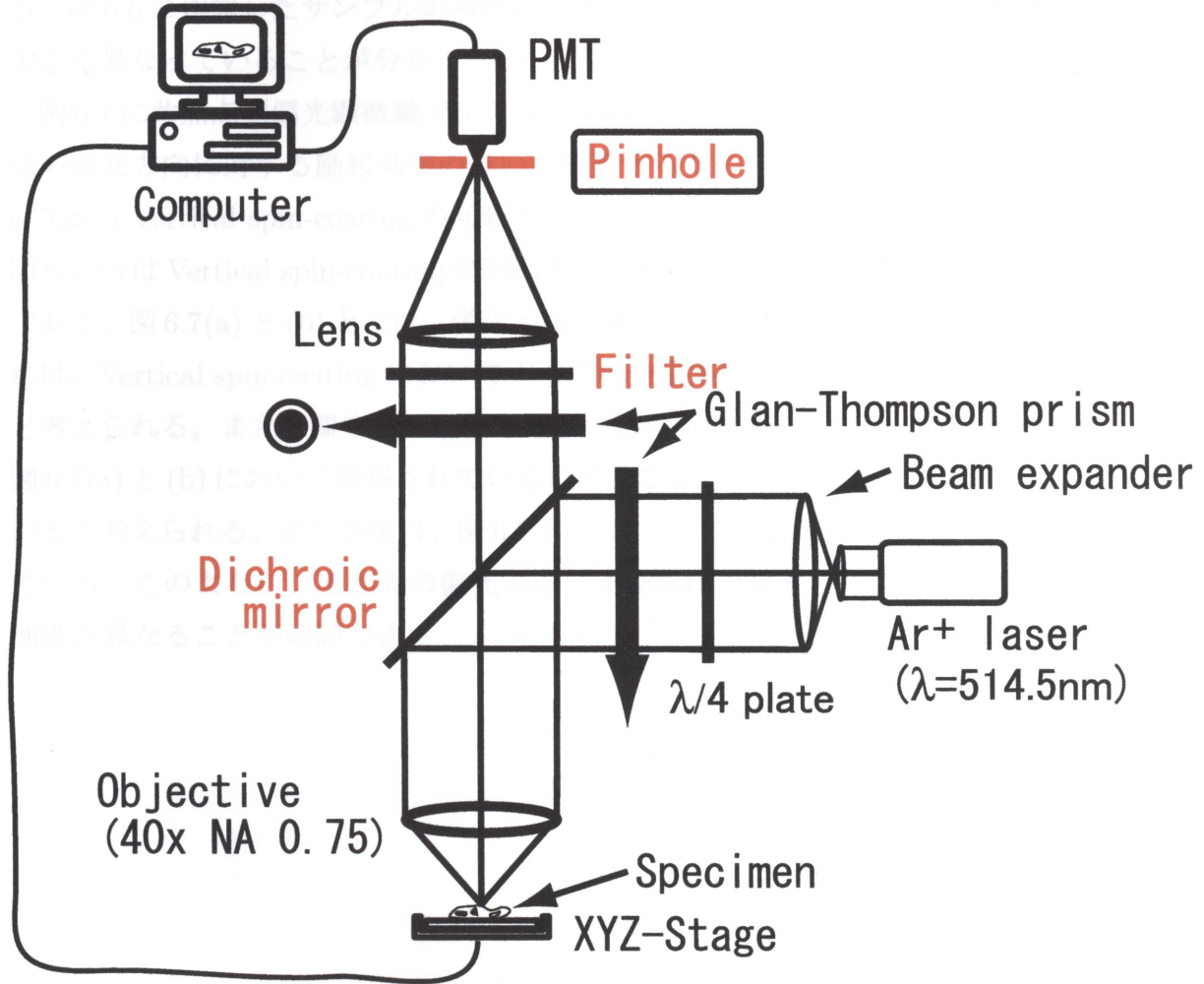


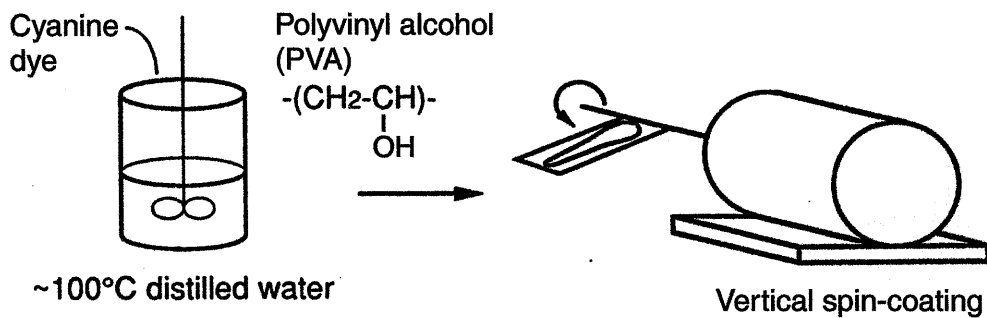
図 6.4: Optical configuration of polarization confocal microscope for fluorescence.

### 6.3.1 臭化擬イソシアニン色素 (PIC-Br) の蛍光の偏光観察

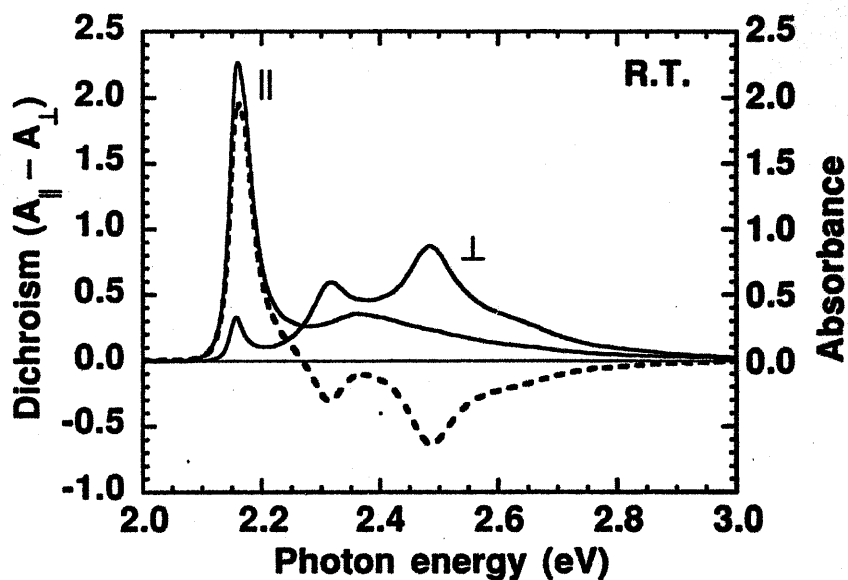
臭化擬イソシアニン色素の J 凝集体は、2 次、3 次の光学的非線形性をもつ物質である。図 6.5 にサンプルの作製法を示す。40mg の PVA を沸騰した 2ml の水に溶かし、10mg の臭化擬イソシアニン色素をくわえた。これを Vertical spin-coating した。Vertical spin-coating することで分子の向きを 1 方向にそろえることが出来る。図 6.6 に作製したサンプルの特性を示す [43]。入射光の偏光方向により吸収が大きく異なっていることが分かる。

図 6.7 に共焦点型偏光顕微鏡でシアニンを観察した結果を示す。ここでは、励起光の偏光方向に対する励起効率の違いを観察するため、検光子を使用しない。図 6.7(a) は Vertical spin-coating の回転方向と平行な偏光の励起光を入射した場合、図 6.7(b) は Vertical spin-coating の回転方向と垂直な偏光の励起光を入射した場合である。図 6.7(a) と (b) とでは、蛍光が強く発光している場所が異なっている。これは、Vertical spin-coating においてすべての分子が同じ方向を向かなかつたためと考えられる。また、観察像中心部では、円形の欠陥が観察されている。これは、図 6.7(a) と (b) において観察されているため、ここでは、分子がランダムになっていると考えられる。蛍光強度は、図 6.7(b) に比べ図 6.7(a) が最大で約 2 倍強くなっている。このように、励起光の偏光方向と J 凝集体の向きとにより発光する蛍光強度が異なることが確認できた。





⊠ 6.5: Schematic diagram of the vertical spin-coating method.



⊠ 6.6: Absorption (thin solid lines) and dichroic (dotted line) spectra of oriented J-aggregates of PIC-Br in a PVA film measured at room temperature. Absorption spectra were measured for parallel(||) and perpendicular( $\perp$ ) polarizations to orientation axis. Calculated spectrum is also depicted for parallel (closed bar) and perpendicular (open bar) polarizations.

### 6.3.2 ベリレンの蛍光の偏光観察

図6.7に示すように、ベリレンの蛍光は、偏光観察により、分子の配向が観察された結果を示す。図6.7(a)は、偏光観察の結果、分子の配向が観察された結果を示す。図6.7(b)は、偏光観察の結果、分子の配向が観察された結果を示す。

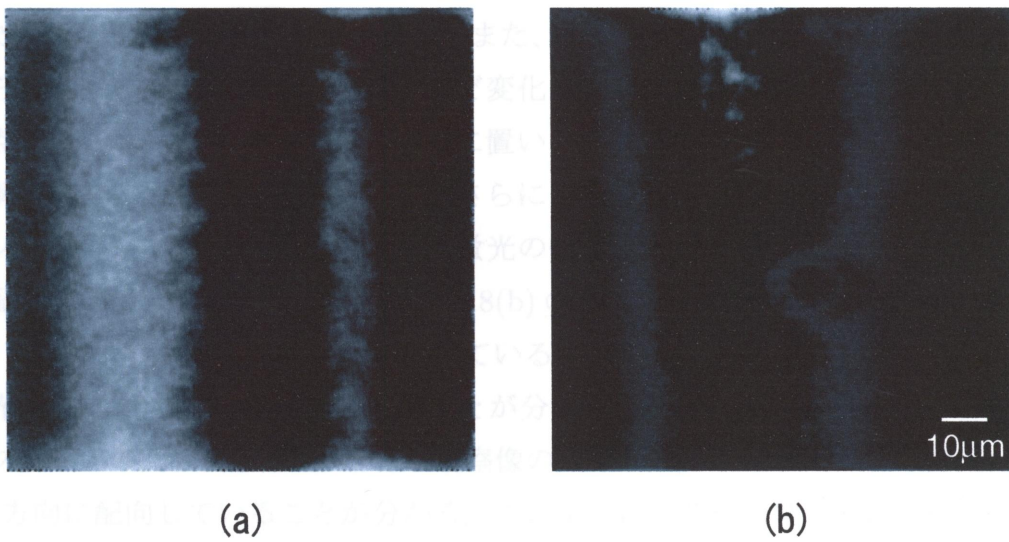


図 6.7: Observation results of Cyanine dye. (a) parallel polarized incident beam in the direction of the rotation. (b) perpendicular polarized incident beam in the direction of the rotation.

### 6.3.2 ペリレンの蛍光の偏光観察

図 6.8 に有機物質のペリレンの蛍光を従来の偏光顕微鏡 (a) と共焦点型偏光顕微鏡 (b) で観察した結果を示す。光軸方向に  $5\mu\text{m}$  ずつ光軸方向に動かして観察した。また、共焦点型偏光顕微鏡では、クロスニコル (入射側と検出側のグラントムソンプリズムの光学軸が直角) のときを  $0^\circ$  として検出器側のグラントムソンプリズムの角度を  $0^\circ$ 、 $60^\circ$ 、 $90^\circ$  と回転して観察した。図 6.8(a) と (b)  $0^\circ$  のときから、共焦点型偏光顕微鏡の方が非常にシャープな観察像であることが分かる。これは、従来の偏光顕微鏡では、励起された蛍光がすべて検出され、共焦点系では検出器の直前に置いたピンホールで対物レンズの焦点以外で励起された蛍光はカットするためこのような結果となっている。また、光軸方向に動かした結果も同様の理由から、従来の偏光顕微鏡ではほとんど変化の見られない観察像となっている。共焦点型偏光顕微鏡では検出器の直前に置いたピンホールの効果により光軸方向に分解能を有していることが分かる。さらに、共焦点型偏光顕微鏡で検出器側のグラントムソンプリズムを回転させ、蛍光の偏光を解析することにより、蛍光分子の配向を解析することができる。図 6.8(b) の矢印 A、B、C、D の強度を比較すると、矢印 B で蛍光強度が最大となっている。このことから、矢印 B の部分では、蛍光分子は  $30^\circ$  方向を向いていることが分かる。また、図 6.8(b) のグラントムソンプリズムの回転角が  $0^\circ$  の場合の観察像の矢印 E、F、G より、内部では蛍光分子が  $0^\circ$  方向に配向していることが分かる。このように、共焦点型偏光顕微鏡は、蛍光分子の三次元的な配向を観察できることがわかる。

### 6.3.3 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPh6) の結晶化

図 6.7 (a) は、DPh6 の結晶化を顕微鏡観察した結果である。図 6.7 (b) は、DPh6 の結晶化を顕微鏡観察した結果である。

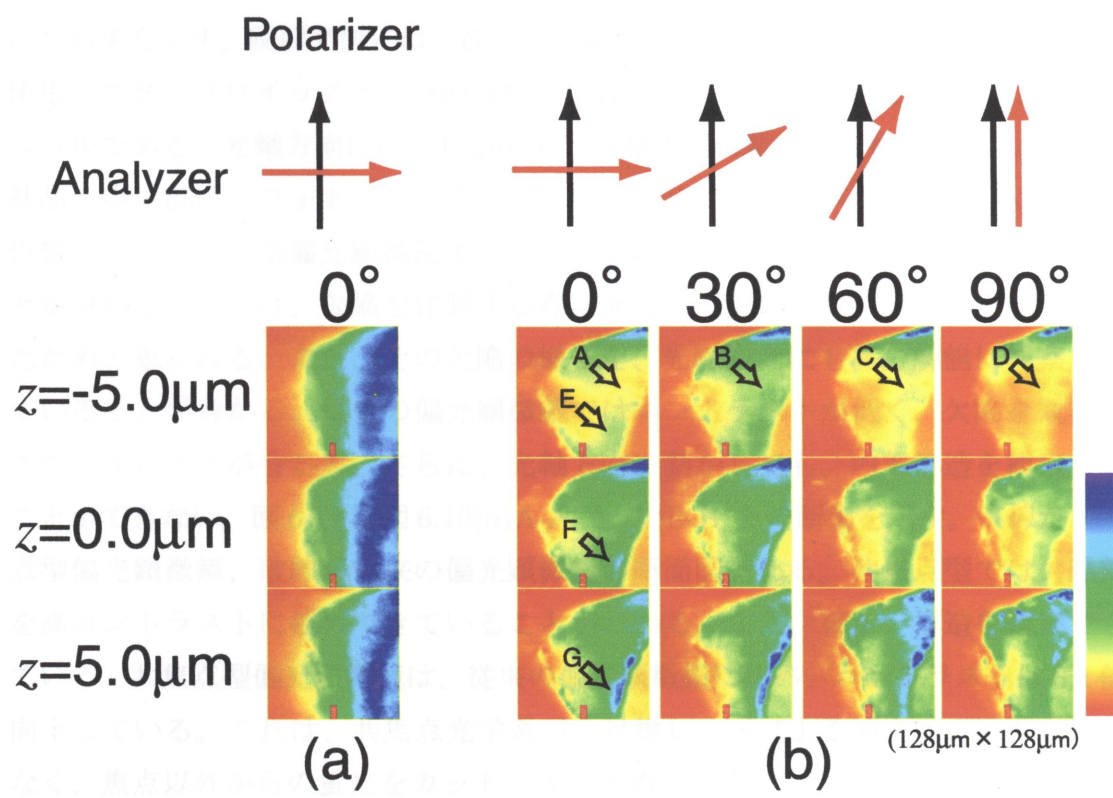


図 6.8: Observation results of the fluorescence of perylene with (a) conventional polarization microscope, (b) confocal polarization microscope.

### 6.3.3 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene(DPH) 結晶の蛍光偏光観察結果

図 6.9 に 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene(DPH) の構造を示す。DPH は、吸収と発光の遷移双極子が分子の長軸と平行になっている円筒形の分子である。従って、それらの蛍光偏光は分子の回転運動がない状態で高く、周囲との相互作用に起因する分子の長軸方向の変化に非常に敏感である。

図 6.10 に DPH の蛍光を共焦点型偏光顕微鏡 (a) と従来の偏光顕微鏡 (b) で観察した結果を示す。励起光源には、波長 408nm の青色ダイオードレーザーを用いた。使用したダイクロイックミラーの特性を付録 C に示す。偏光子と検光子はクロスニコルである。光軸方向には、 $1.5\mu\text{m}$  ずつ光軸方向に動かして観察した。DPH の結晶の中央部は、フォトブリーチングを起こさせて、蛍光が出ないように欠陥を作製した。共焦点型偏光顕微鏡では、その欠陥の周りで偏光面が回転していることが分かる。これは、欠陥を作製する際に発生した熱により、分子の配向が乱れたためと思われる。また、その欠陥の様子を、光軸方向にも高分解能に観察できていることが分かる。従来の偏光顕微鏡ではコントラストが低く、欠陥を観察できていないことが分かる。さらに、光軸方向に動かしても、内部構造を観察することができない。図 6.11 に図 6.10(a)A-A' と (b)B-B' との断面を示す。実線が共焦点型偏光顕微鏡、破線が従来の偏光顕微鏡の断面図である。共焦点型では欠陥部を高コントラストに観察できていることがわかる。また、細かい構造を観察できている。共焦点型偏光顕微鏡は、従来の偏光顕微鏡に比べ、コントラストは 3.1 倍向上している。これは、共焦点光学系が、対物レンズによる偏光面の回転だけでなく、焦点以外からの蛍光をカットできるためである。

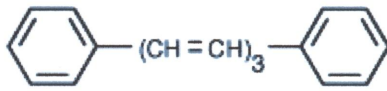


图 6.9: Structure for DPH.

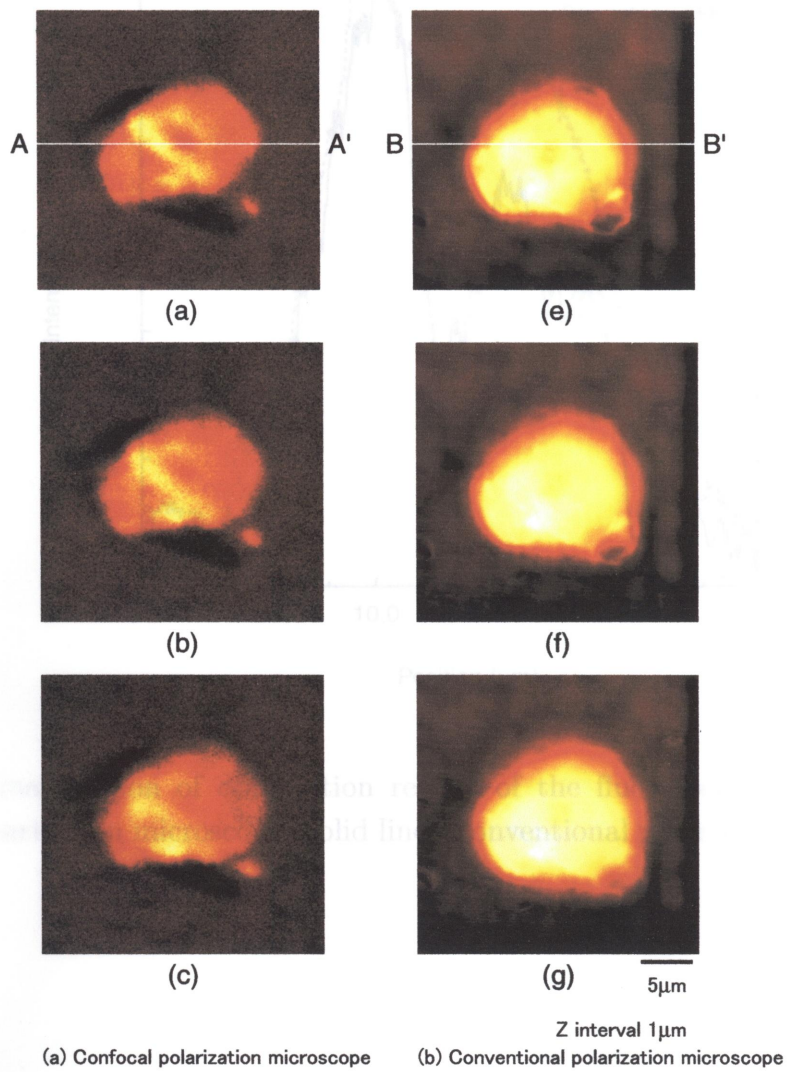
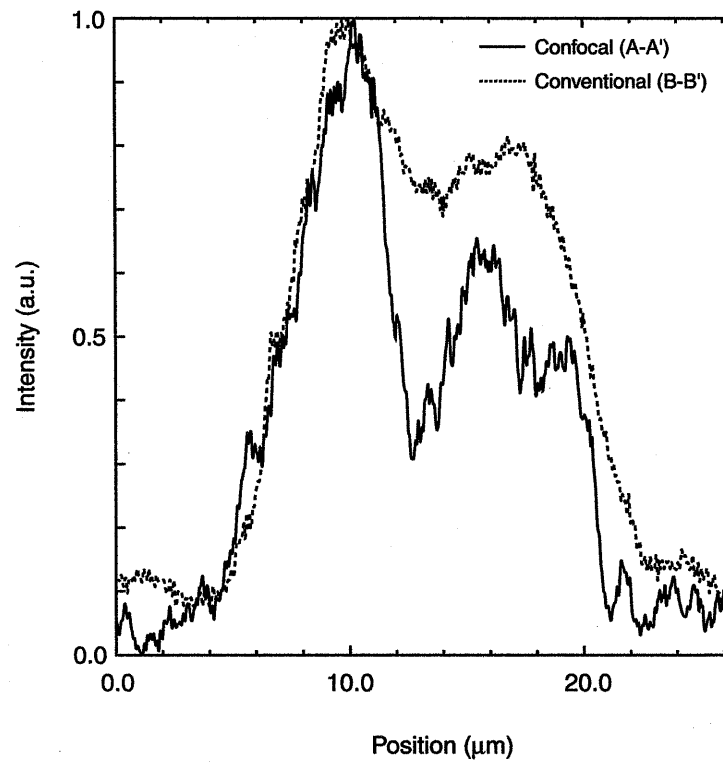


图 6.10: Observation results of the fluorescence of DPH with (a) confocal polarization microscope, (b) conventional polarization microscope.



⊠ 6.11: Cross section of observation results of the fluorescence of DPH with confocal polarization microscope (solid line), conventional polarization microscope (dash line).

## 6.4 蛍光偏光観察の生物への応用

図 6.12 に抗原-抗体の蛍光偏光測定の例を示す [44]。蛍光標識された抗体が抗原と結合する。そうすると、蛍光分子はある一定の方向を向く。従って、蛍光の偏光を測定することで抗体の向きが分かる。また結合していない抗体は、ブラウン運動しているために偏光度は低い。この他にも DNA-タンパク質 [45, 46]、タンパク質-タンパク質 [47] などの生体分子間相互作用に応用することができる。次に、図 6.13 に生体膜の蛍光偏光観察について示す。図に示すように生体膜の分子は配向しており、それを蛍光標識し観察することで生体膜の分子の配向性がわかる。蛍光が非常に偏光した状態で観察できれば、生体膜の配向性が高いということやその分子の向きがわかる。さらに、局所領域の流動性や構造のゆらぎなども知ることができる [48, 49, 50]。アクチンフィラメント、微小管や線維束の配向性などの観察にも応用することができる [51, 52]。



### 6.4.1 リボソームの配向性の解析

#### リボソームの作製

図 6.14 にリボソームの作製法を示す。

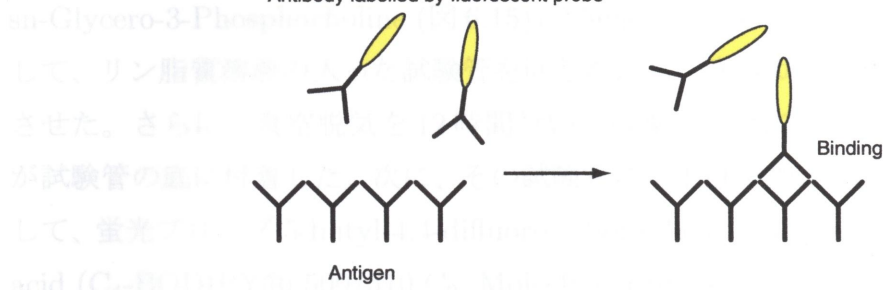


図 6.12: Biomolecular interaction.

#### リボソームの観察結果

図 6.18 に (a) 共焦点顕微鏡を用いた観察結果を示す。共焦点顕微鏡を用いた観察結果は、蛍光分子は励起光の照射方向と平行な方向に偏光している。これは、励起光の照射方向と平行な方向に偏光している。共焦点顕微鏡を用いた観察結果は、励起光の照射方向と平行な方向に偏光している。共焦点顕微鏡を用いた観察結果は、励起光の照射方向と平行な方向に偏光している。

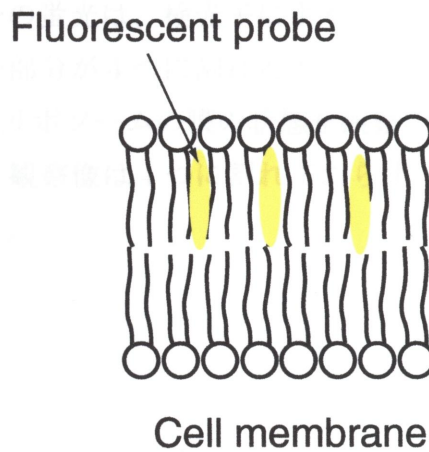


図 6.13: Orientation of cell membrane.

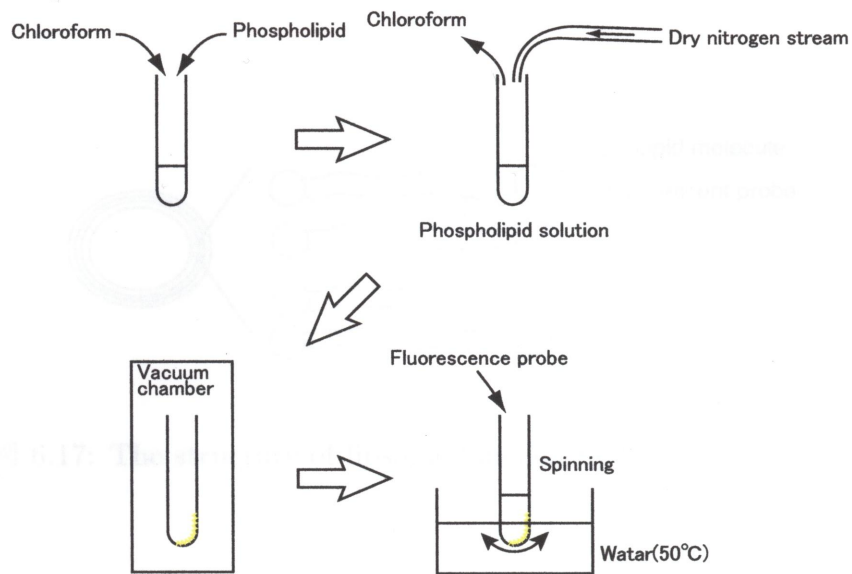
## 6.4.1 リポソームの配向性の解析

### リポソームの作製

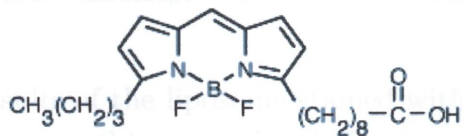
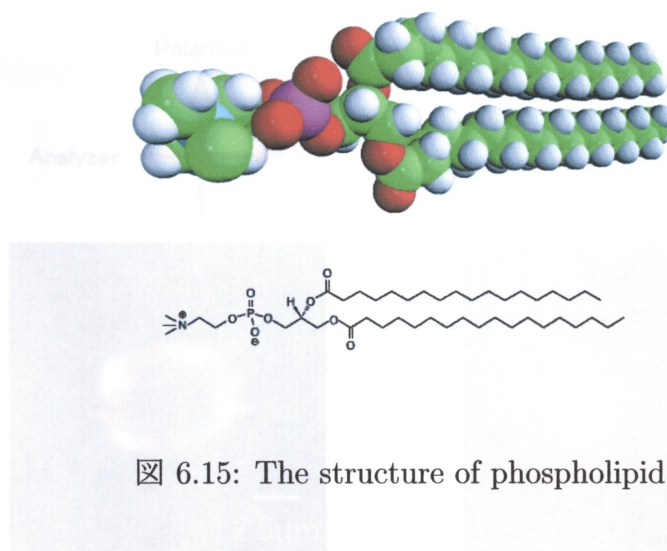
図 6.14 にリポソームの作製法を示す。まずはじめに、リン脂質 (1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (図 6.15)) 2.5mg をクロロホルム 1.0ml に溶した。そして、リン脂質溶液の入った試験管を回しながら、窒素ガスを吹き付け溶媒を気化させた。さらに、真空脱気を 12 時間行い、溶媒を完全になくした。リン脂質の膜が試験管の底に付着した。次に、その試験管に水 1ml を加え、65 °C で攪拌した。そして、蛍光プローブ 5-butyl-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza- s-indacene-3-nonanoic acid (C<sub>4</sub>-BODIPY® 500/510 C<sub>9</sub>, Molecluar Probes (図??) 1mg を DMSO 1ml に溶かしたものをリポソームの入った溶液に加えた。図 6.17 に作製したリポソームの構造を示す。リポソームはリン脂質が球状に並んだ物質である。

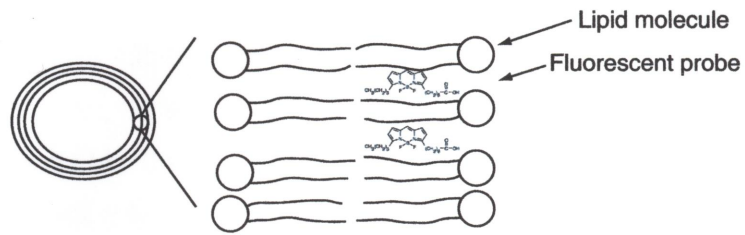
### リポソームの観察結果

図 6.18 に (a) 共焦点型偏光顕微鏡と (b) 従来の偏光顕微鏡でリポソームを観察した結果を示す。共焦点型偏光顕微鏡では、リポソームは明るい部分が 4 つに割れている。これは、図 6.19 に示すように、入射光の偏光方向と、平行な成分をもつ蛍光分子は励起され、垂直な部分の蛍光分子は励起されない。そして、入射光の偏光方向と平行な成分の蛍光は、検光子によりカットされる。そのため、リポソームの観察像の明るい部分が 4 つに割れるのである。このように、蛍光の偏光状態を観察することで、リポソームの膜の状態を観察できることが分かる。一方、従来の偏光顕微鏡では、観察像は 4 つに割れておらず、蛍光の偏光を高感度に観察できないことが分かる。

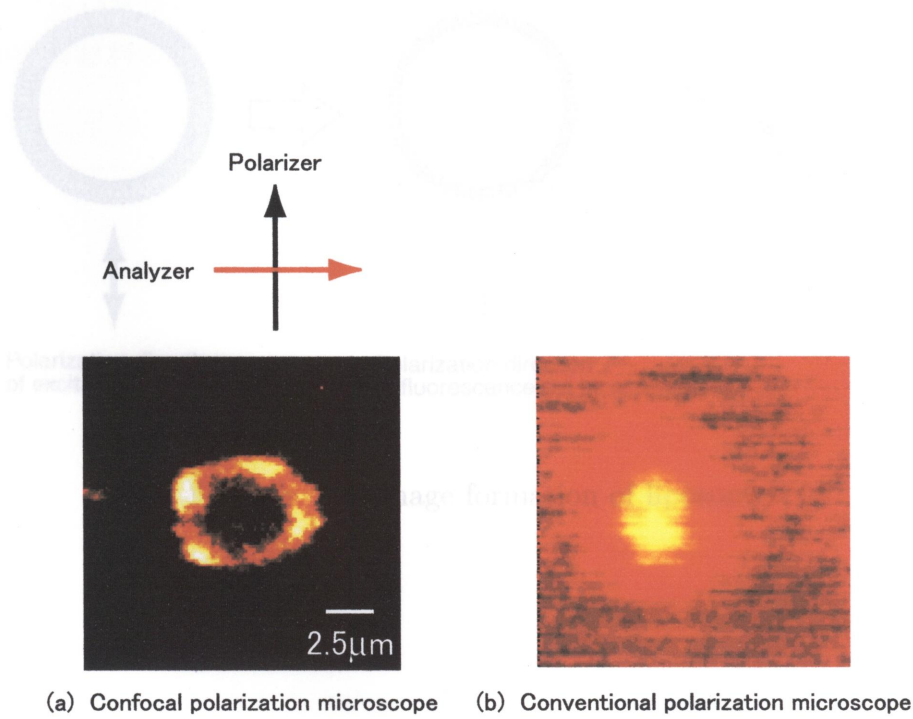


☒ 6.14: The method of producing liposome.





☒ 6.17: The structure of liposome labelled by fluorescence probe.



☒ 6.18: Observation results of the liposome stained with BODIPY with (a) confocal polarization microscope, (b) conventional polarization microscope.

## 6.5 まとめ

蛍光観察に用いる型偏光顕微鏡は、従来の偏光顕微鏡よりも高解像度、高感度を有する。これは、偏光分解能を有する液晶を用いた偏光装置を用いたことによる。また、液晶を用いた偏光装置により、対物レンズの焦点以外で発生した光を除去することにより、高解像度の観察が可能である。従来の偏光顕微鏡は、従来の偏光顕微鏡に比べて、高解像度の観察が可能である。また、液晶を用いた偏光装置により、対物レンズの焦点以外で発生した光を除去することにより、高解像度の観察が可能である。また、液晶を用いた偏光装置により、対物レンズの焦点以外で発生した光を除去することにより、高解像度の観察が可能である。

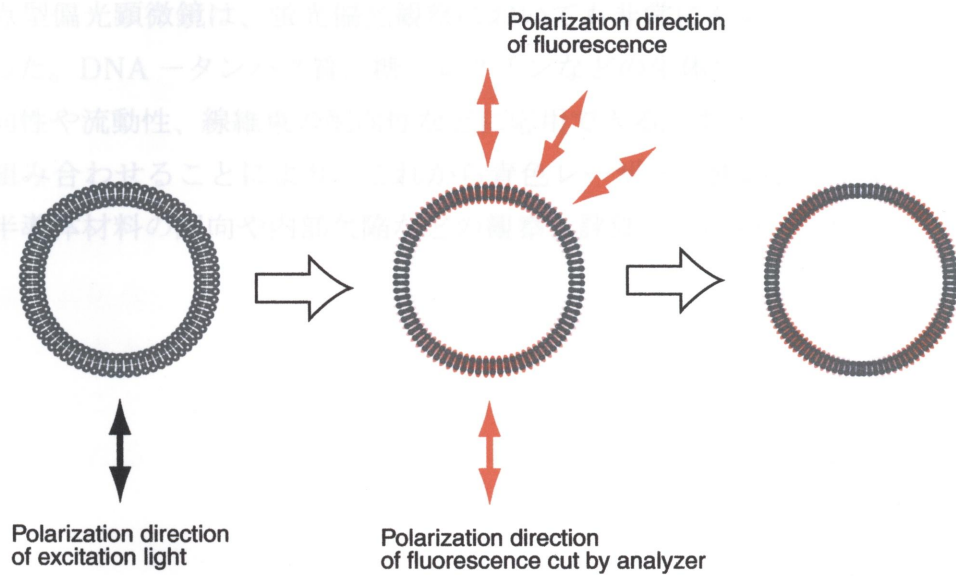


図 6.19: The image formation of liposome.

## 6.5 まとめ

蛍光観察に共焦点型偏光顕微鏡を応用し、従来の偏光顕微鏡に比べ、高コントラストでかつ三次元分解能を有することを示した。従来の偏光顕微鏡では観察できない蛍光性結晶の内部の分子の配向性や欠陥を観察することができた。これは、共焦点光学系により、対物レンズにより偏光面が回転した成分が励起した蛍光や対物レンズの焦点以外で発生した蛍光を除去しているためである。共焦点型偏光顕微鏡は、従来の偏光顕微鏡に比べ、コントラストは3.1倍向上した。また、生物への応用では、蛍光プローブの蛍光偏光を観察することにより、従来の偏光顕微鏡では困難であったリポソームの分子配向を観察することができた。このように共焦点型偏光顕微鏡は、蛍光偏光観察においても非常に有効な手段であることが分かった。DNA-タンパク質、糖-レクチンなどの生体分子間相互作用や生体膜の配向性や流動性、線維束の配向性などに応用できる。また、2光子励起蛍光顕微鏡と組み合わせることにより、これから青色レーザーに使われる GaN や ZnO などの半導体材料の配向や内部欠陥などの観察、評価への応用が期待できる。

## 第7章 総括

第1章では、従来の偏光顕微鏡は、対物レンズで偏光面が回転してしまうため高分解能化が難しいという問題点について述べた。

第2章では、共焦点レーザー顕微鏡のもつ特徴（高コントラスト、光軸方向の分解能など）について説明した。

第3章では、従来の偏光顕微鏡の問題点である、対物レンズによる偏光面の回転による像への影響を知るため、焦点面に出来る電場分布を求めた。その電場分布から、検出器の前のレンズの焦点位置にピンホールをおき中心のみを検出することで、対物レンズで偏光面の回転した成分を除去できることが分かった。さらに、偏光面の回転した成分を除去するためのピンホールのサイズについて検討した。その結果、共焦点型偏光顕微鏡のピンホールは、共焦点顕微鏡で最適とされるエアリーディスクと同じ半径のピンホールでは大きすぎ、偏光面の回転した成分を除去できないことがわかった。共焦点型偏光顕微鏡では、対物レンズのNAと観察像に要求されるコントラストからピンホールサイズを決定しなければならないことを示した。

第4章では、実際に共焦点型偏光顕微鏡を構築した。そして、様々の試料を観察し、その有効性を示した。共焦点型偏光顕微鏡によるポリスチレンラテックス球の観察では、球のエッジ部分で偏光面が回転する様子が観察できた。しかし、偏光子と検光子の方向では偏光面は回転しない。試料を光軸方向に動かし、焦点面を変えると、その球断面の円の半径に対応したエッジ部分が観察できた。従来の偏光顕微鏡に比べバイアス成分がカットされており、高コントラストであった。アスコルビン酸の結晶の観察において、従来の偏光顕微鏡に比べ、高コントラストであり、結晶の構造の解析に有効であることを示した。また、生物試料として昆虫の複眼や仮道管を観察した。その結果、生物試料の偏光特性を三次元に観察することができ、従来の偏光顕微鏡では得ることのできない知見を得ることができた。

第5章の拡張 Mie の散乱理論を使った共焦点型偏光顕微鏡の結像特性の解析において、数値計算による結果と実験による観察結果が一致した。また、従来の偏光顕微鏡で偏光観察を行うと、対物レンズの偏光面の回転の影響を受け、精度良

く偏光特性を測定できないことが分かった。共焦点系を導入することで光軸方向に分解能を有することも確認した。さらに、平面基板上的微小球による電磁場解析法を開発し、共焦点型偏光顕微鏡で基板上的微小球を観察した場合の基板の影響を検討した。

第6章では、共焦点型偏光顕微鏡を蛍光観察に応用した。蛍光の偏光を観察することで分子の配向を観察できることを示した。共焦点型偏光顕微鏡によるペリレンの観察では、分子の配向の3次元観察を行った。検光子を回転することで分子の配向を決定できる。また、生物細胞の観察へ応用では、リポソームを蛍光標識し、その分子配向を観察した。共焦点型偏光顕微鏡を、蛍光偏光解消測定に導入すれば、生体膜の状態や抗体-抗原反応などの生体分子間相互作用を高感度かつ三次元に解析することができる。



## 参考文献

- [1] M. Minsky, U. S. Patent NO. 3013467 (1961).
- [2] C. J. Sheppard, D. K. Hamilton and I. J. Cox, Proc. R. Soc. Lond. A, **387**, 171-186 (1983).
- [3] M. Petran and M. Hardravsky, Science, **157**, 305-307 (1967).
- [4] P. Davidovits and M. D. Egger, Nature, **223**, 831 (1969).
- [5] T. Suzuki and Y. Horikawa, Appl. Opt., **25**, 4115-4121 (1986).
- [6] 鈴木達郎, 堀川嘉明, レーザー研究, 15, 636-646 (1987).
- [7] 河田 聡, 中村 収, 南 茂夫, 第18回画像工学コンファレンス論文集, 39-42 (1987).
- [8] 河田 聡, 光技術コンタクト, **26**, 43-50 (1988).
- [9] 河田 聡, 南 茂夫: O plus E, **113**, 87-93 (1989).
- [10] T. Wilson, R. Juškaitis and P. Higdon, Opt. Commun. **141**, 298 (1997).
- [11] R. Burtin, Opt. Acta, **3**, 104-109 (1956).
- [12] B. Richards and E. Wolf, Proc. R. Soc. London Ser. A, **253**, 358-379 (1959).
- [13] M. Born and E. Wolf, "Principles of Optics", (Pergamon, Oxford, 1970).
- [14] S. Kawata, R. Arimoto and O. Nakamura, J. Opt. Soc. Am. A **8**, 171 (1991).
- [15] C. J. R. Sheppard, M. Gu and M. Roy, J. Microsc. **168**, 209 (1992).
- [16] C. J. R. Sheppard and A. Chodhury, Opt. Acta, **24**, 1051-1073 (1977).
- [17] C. J. R. Sheppard and T. Wilson, Opt Acta, **25**, 315-325 (1978).

- [18] C. J. R. Sheppard and T. Wilson, *Optik*, **55**, 331-342 (1980).
- [19] S. Inoue and H. Sato, *J. Gen. Physiol.*, **50**, 259 (1967).
- [20] 井上 信也, 佐藤 英美, 生物物理学講座, "遺伝情報", **3**, p.151 (吉岡書店, 1966).
- [21] 佐藤 英美, 細胞工学, **6**, 246 (1987).
- [22] G. Mie, *Ann. d. Physik. (4)* **25**, 377, (1908).
- [23] J. P. Barton, D. R. Alexander, and S. A. Schaub, *J. Appl. Phys.* **64**, 1632 (1988).
- [24] W. D. Ross, *Appl. Opt.* **11**, 1919 (1972).
- [25] W. H. Press, B. P. Flannery, S. A. Teukolsky, and W. T. Vetterling, *Numerical Recipes, The Art of Scientific Computing* (Cambridge University, England, 1986)
- [26] K. A. Fuller and G. W. Kattawar, *Opt. Lett.* **13**, 90 (1988).
- [27] J. W. Goodman, "Introduction to Fourier Optics", 49, (McGraw-Hill, New York, 1968).
- [28] S. Kawata, Y. Inouye, and T. Sugiura, *Jpn. J. Appl. Phys., Part2* **33**, L1725 (1994).
- [29] M. Gu, and P. C. Ke, *Opt. Lett.*, **24**, 74 (1999).
- [30] K. Sasaki, H. Fujiwara and M. Masuhara, *J. Vac. Sci. Technol. B, Microelectron. Nanometer Struct.* **15**, 2786 (1997).
- [31] Y. Inouye, S. Shoji, H. Furukawa, O. Nakamura, and S. Kawata, *Jpn. J. Appl. Phys. Part2* **37**, L684 (1998).
- [32] B. Kołodziejczyk, R. Ługowski and Y. Kawata, *Technical Digest of Focus on Microscopy 2000*, P.40 (2000).
- [33] A. Ishijima, T. Doi, K. Sakurada, and T. Yanagida, *Nature* **352**, 301, (1991).
- [34] A. Ashkin, *Phys. Rev Lett.*, **24**, 156 (1970).

- [35] G. J. Schut, J. Zhou and M. W. W. Adams, *J Bacteriol* **183**, 7027-7036 (2001).
- [36] S. Takayama, E. Ostuni, P. Le, Duc, K. Naruse, DE. Ingber, GM. Whitesides, *Nature* **411**, 1016 (2001).
- [37] EF. Moreira , C. Jaworski, A. Li, IR. Rodriguez, *J Biol Chem* **276**, 18570-18578 (2001).
- [38] 河内秀幸, 南川哲寛, 高松哲郎, ”高速走査共焦点レーザー顕微鏡による心室筋対細胞間のカルシウム波伝播の解析, 心筋の構造と代謝”, **13**, 1990(1991).
- [39] Li. Wen-hong, J. Llopis, M. Whitney, G. Zlokarnik, R. Y. Tsien, *Nature*, **392**, 936 (1998).
- [40] F. J. Perrin, *Phys. Radium* **7**, 390-401 (1995).
- [41] W. J. Checovich, R. E. Bolger and T. Burke, *Nature*, **375** (1995).
- [42] 木下一彦・御橋廣眞 (編) 蛍光測定—生物科学への応用, 学会出版センター (1983).
- [43] K. Misawa and T. Kobayashi, *Nonlinear Optics*, **89**, 2754 (1988).
- [44] K. Nielsen, D. Gall, M. Jolley, G. Leishman, S. Balsevicius, P. Smith and F. J. Thomas, *Immunol. Methods* **195**, 161-168 (1996).
- [45] P. Aich, R. Sen and D. Dasgupta, *Biochemistry* **31**, 2988-97 (1992).
- [46] K. A. Alexander, and W. C. Phepls, *Biochemistry* **35**, 9864-72 (1996).
- [47] Y. Bai, G. M. Perez, J. M. Beechem, and P. A. Weil, *Mol Cell Biol* **17**, 3081-93 (1997).
- [48] K. Adachi, T. Matsubishi, Y. Nishizawa, J. Usukura, M. Momota, J. Popinigis and T. Wakabayashi, *Exp Mol Pathol* **61**, 134-51 (1994).
- [49] J. R. Dynlacht, and M. H. Fox, *Radiat Res*, **130**, 48-54 (1992).
- [50] J. R. Dynlacht, and M. H. Fox, *Int J Hyperthermia*, **8**, 351-62 (1992)

- [51] H. Sosa, E. J. G. Peterman, W. E. Moerner, and L. S. B. Goldstein, *Nature Struct. Biol.* **8**, 540-544 (2001).
- [52] S. Ichiro, M. Hidetake, I. Shin'ichi and K. Kazuhiko , Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, pp. 5646-650 (1997)

## 謝辞

本研究の遂行及び論文の作成にあたり、終始熱心にご指導ご助言を戴いた川田善正助教授に心から感謝いたします。

本論文に対して貴重なご助言とご指導を賜りました静岡大学 工学部 佐々木彰教授、同 工学部 金子透教授、静岡大学電子科学研究科 長村利彦教授、静岡大学 工学部 大坪順次教授に厚く御礼申し上げます。

プログラミングに対し有益な助言を戴いた三浦憲二郎教授に感謝いたします。また、回路の作製など多岐にわたり、多くの助言と協力を惜しまず戴いた静岡大学 工学部 岩田太助教授に感謝します。

リポソームの作製についてご教授頂いた静岡大学理学部の山崎 昌一助教授に感謝申し上げます。また、本研究のに助言・協力を戴いた川田研究室の中野氏、そして、川田研究室のメンバーに厚くお礼申し上げます。

# 論文及び学会発表

## ■ Paper

1. Y. Kawata and W. Inami, "Confocal microscope for three-dimensional polarization analysis," *Jpn. J. Appl. Phys.*, 37, pp. 6648-6650 (1998).
2. W. Inami and Y. Kawata, "Three-dimensional imaging analysis of confocal and conventional polarization microscopes using Mie scattering theory," *Appl. Opt.*, 39, pp. 6369-6373 (2000).
3. W. Inami and Y. Kawata, "Analysis of the scattered light distribution of a tightly focused laser beam by a particle near a substrate," *J. Appl. Phys.*, 89, 5876 (2001).
4. W. Inami and Y. Kawata, "Photon force analysis for a spherical particle near a substrate illuminated with a tightly focused laser beam," (submitted to *J. Appl. Phys.*).
5. Suk-Chun L, W. Inami and Y. Kawata, "Volume Holographic for Spherical Aberration Correction and Parallel Data Access in Three-Dimensional Memory," *Jpn. J. Appl. Phys.*, 40, pp. 1796-1797 (2001).

## ■ Conference

1. T. Takahashi, N. Takahashi, N. Yamura, T. Nakamura, M. Yoshioka, W. Inami and Y. Kawata, "Growth of  $\text{Fe}_4\text{N}$  epitaxial layers displaying anomalous light reflectivity modulated by an external magnetic field," *J. Mater. Chem.*, 11, pp. 3154-3157 (2001).
2. 太田 章博、居波 渉、川田 善正, "多層膜基板上に存在する微小球による光散乱の解析," *Optics Japan '02* (日本光学会年次学術講演会) (2002).
3. 居波 渉、川田 善正, "共焦点型偏光顕微鏡による蛍光の偏光特性の三次元観察," 第 63 回応用物理学学会学術講演会, 新潟大学, (Niigata 24-27 Sep, 2002)

4. Wataru Inami, Hideki Fujiwara, Yoshimasa Kawata, and Keiji Sasaki, "RADIATION FORCE DETERMINED BY THE MULTISCATTERING BETWEEN THE SPHERICAL PARTICLE AND THE SUBSTRATE," Multi Dimension Microscopy (Melbourne, 25-28 November, 2001).
5. Yoshimasa Kawata, Masaharu Nakano and Wataru Inami, "PHOTONIC CRYSTAL STRUCTURES FOR THREE-DIMENSIONAL OPTICAL MEMORY," Multi Dimension Microscopy (Melbourne, 25-28 November, 2001).
6. 居波涉, 川田善正, "基板上の微小球による光散乱場と放射圧の解析," レーザ顕微鏡研究会第27回講演会, 一橋記念講堂 (Tokyo 29-30 Oct, 2001).
7. 高崎秀久, 居波涉, 藤原英樹, 堀田純一, 川田善正, 笹木敬司, "界面近傍における微粒子トラップ位置の離散的変化の解析," Optics Japan '01 (日本光学会年次学術講演会) (Tokyo, 2001).
8. 中野雅晴, 居波涉, 川田善正, 江上力, 杉原興浩, 岡本尚道, 土森正昭, 渡辺修, "フォトニック結晶構造を有する記録媒体を用いた3次元光メモリ," 第62回応用物理学会学術講演会, 愛知工業大学, (Aichi 11-14 Sep, 2001)
9. 寺田和弘, 高橋直行, 中村高遠, 居波涉, 川田善正, 吉岡正行, "窒化スズ薄膜の作製と光学特性," 第62回応用物理学会学術講演会, 愛知工業大学, (Aichi 11-14 Sep, 2001)
10. Wataru Inami and Yoshimasa Kawata, "Analysis of radiation force for a spherical particle near a substrate illuminated by a tightly focused laser beam," CLEO /Pacific Rim 2001 (Chiba, 16-19 July, 2001).
11. Wataru Inami and Yoshimasa Kawata, "Radiation force determined by the multiscattering between a spherical particle and a substrate," Focus on Microscopy (Amsterdam, 1-4 April, 2001).
12. Wataru Inami and Yoshimasa Kawata, "平面基板上の微小球に働く放射圧の解析," 春季 第48回応用物理学関係連合講演会 (Tokyo 2001)
13. Wataru Inami and Yoshimasa Kawata, "Confocal polarization microscopy for the analysis of fluorescent materials," Focus on Microscopy 2000 (Shirahama, 9-13 April, 2000).
14. 居波涉, 川田善正, "Mieの散乱理論を用いた共焦点型偏光顕微鏡の三次元結像特性の解析," 第60回応用物理学会学術講演会 (甲南大学, 2 Sep, 1999).
15. 居波涉, 川田善正, "三次元偏光解析のための共焦点型顕微鏡," 第45回応用物理学関係連合講演会, (東京工科大学, 29 March, 1998).

# 付録A 微小球に働く放射圧の解析

近年、研究が進んでいるレーザートラッピングの放射圧について述べる。レーザートラッピングは光が及ぼす力を使って小さい粒子、細胞をつかまえ、これを自在に動かすことができる技術である。このレーザートラッピングは、ニア・フィールド顕微鏡、摩擦力顕微鏡、表面力顕微鏡、粘性の三次元測定、生体の力学量の測定などに幅広く用いられており、ナノテクノロジー・バイオテクノロジーにおいて重要な技術である。これらのアプリケーションは、粒子に働く放射圧や捕捉位置を計測している。平面基板上でトラップした場合、放射圧や捕捉位置は多重散乱により決まる。したがって、これらのシステムの分解能、精度を向上には、平面基板の影響を考慮する必要がある。

## A.1 微小球に働く放射圧の計算

微小球に働く放射圧  $F$  は、球表面で単位ベクトルとマクスウェルの応力テンソル  $\mathbf{T}$  との内積を積分することで求めることができ、次式で書ける。

$$\langle \mathbf{F} \rangle = \langle \oint_s \hat{\mathbf{n}} \cdot \mathbf{T} ds \rangle \quad (\text{A.1})$$

ただし、 $\langle \rangle$  は時間平均を表す。マクスウェルの応力テンソル  $\mathbf{T}$  は微小球の電磁場分布より次式で書ける。

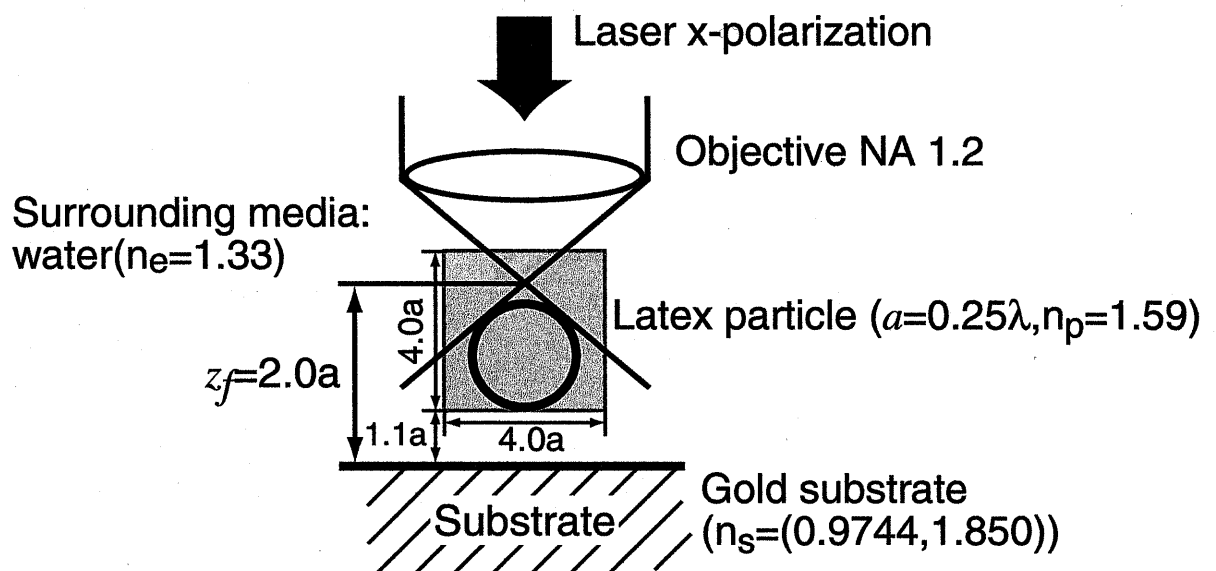
$$\mathbf{T} = \frac{1}{4\pi} \left( \epsilon \mathbf{E}\mathbf{E} + \mathbf{H}\mathbf{H} - \frac{1}{2} (\epsilon E^2 + H^2) \mathbf{I} \right) \quad (\text{A.2})$$

## A.2 微小球に働く放射圧の計算結果

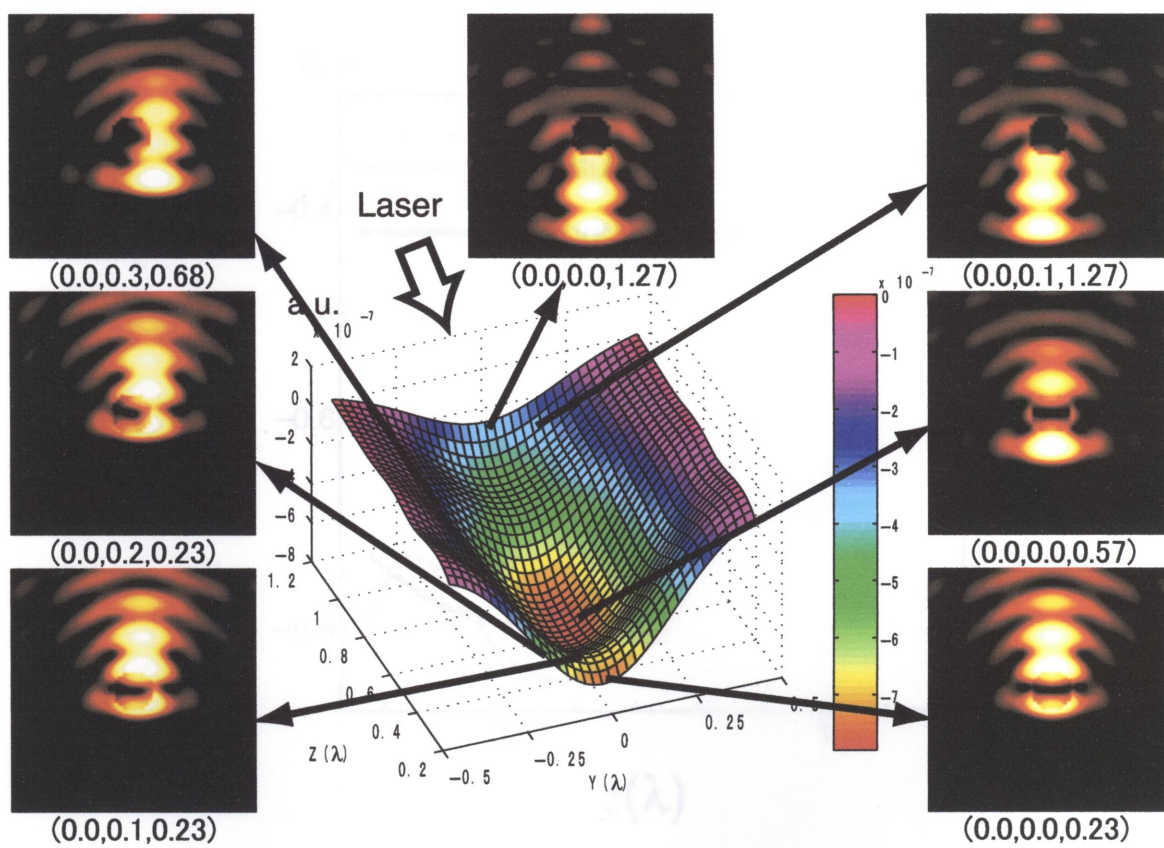
図 A.1 に計算条件を示す。球の半径は  $a = 0.25\lambda$ 、球の屈折率は  $n_p = (1.59, 0.0)$ 、平面基板の金で屈折率は  $n_s = (0.9744, 1.850)$  である。球の周りの媒質の屈折率は



$n_e = 1.33$ 、対物レンズの開口数は1.2とした。また、対物レンズに入射する平面波は  $x$  軸方向に偏光している。対物レンズの焦点位置と平面基板との距離は  $z_f = 2.0a$  である。ポテンシャルの計算範囲は、図 A.1 の灰色部分で、サイズは  $2.0a \times 2.0a$  である。図 A.2 に微小球のポテンシャルと光の散乱場の計算結果を示す。光散乱場の分布より平面基板からの反射光により、干渉縞が発生していることが分かる。そして、微小球は干渉縞の明線部分でトラップされやすくなることが分かる。微小球がトラップされる位置が、多重散乱により発生した干渉縞により2箇所になっていることがわかる。平面基板がある場合のトラップ位置は、 $z = 0.25\lambda$  と  $z = -0.58\lambda$  である。平面基板がない場合のトラップ位置は、 $z = 0.37\lambda$  である。図 A.3 にポテンシャルの断面図を示す。平面基板のある場合は、多重散乱により発生した干渉縞によりポテンシャルが変調されていることが分かる。この変調の間隔は、 $\lambda/2$  である。また、平面基板の近くで、基板方向に押しつける力が発生している。これは、微小球と平面基板との間での多重散乱により電場が増強され、微小球下部で電場が増強された結果である。



☒ A.1: Calculation condition of potential of radiation force for a spherical partichel near a substrate.



☒ A.2: Calculation results of potential of radiation force for a spherical particle near a substrate and light-intensity distributions.

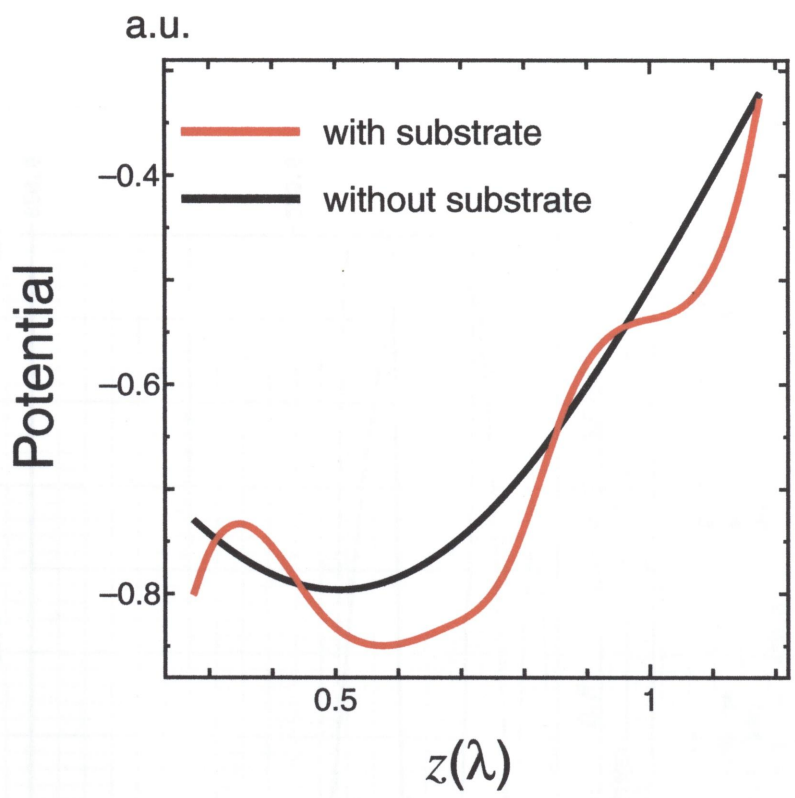


図 A.3: Cross section of the potential along  $z$ -axis with substrate, without substrate

# 付録B ダイクロイックミラーの特性 (アルゴンイオンレーザー用)

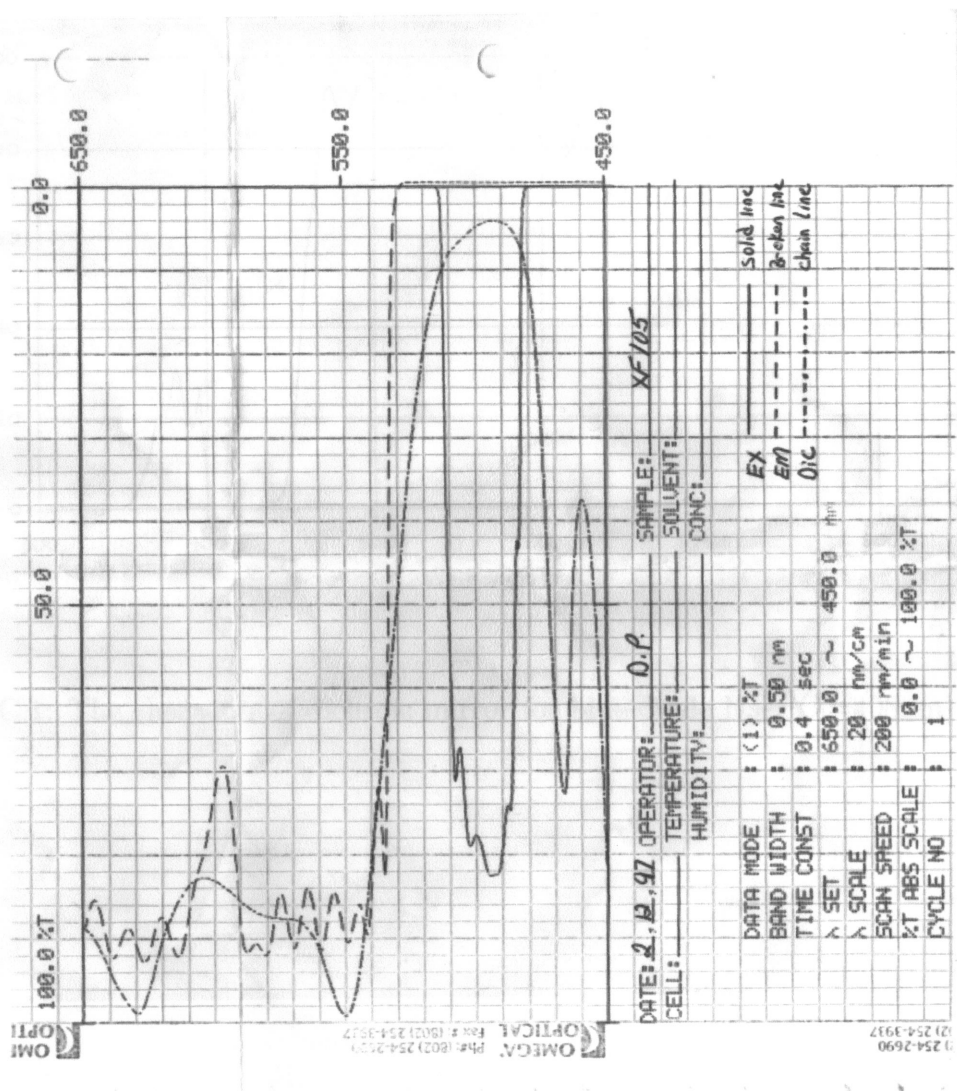


図 B.1: The character of dichroic mirror for Ar<sup>+</sup> laser ( $\lambda=514.5\text{nm}$ ).

## 付録C ダイクロイックミラーの特性 (青色ダイオードレーザー用)

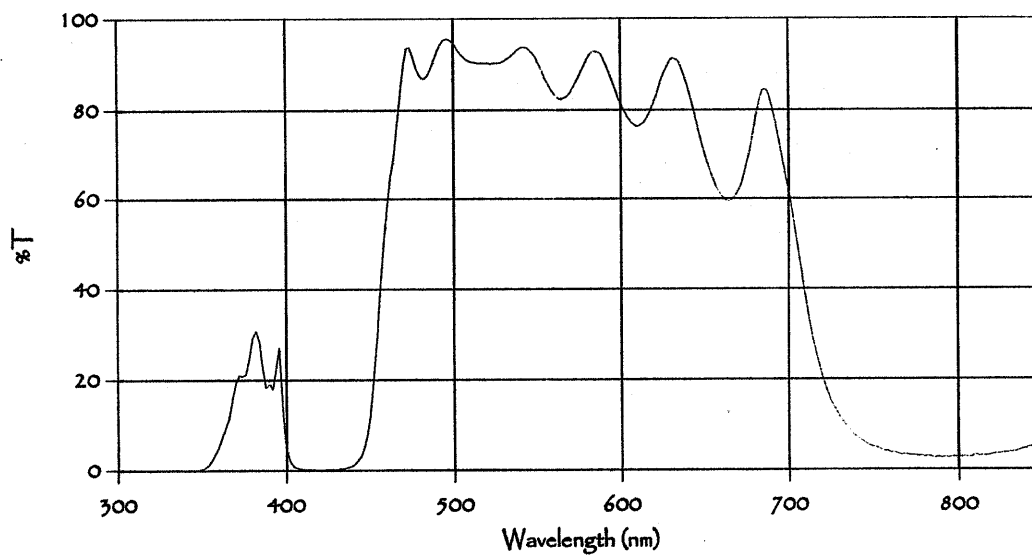
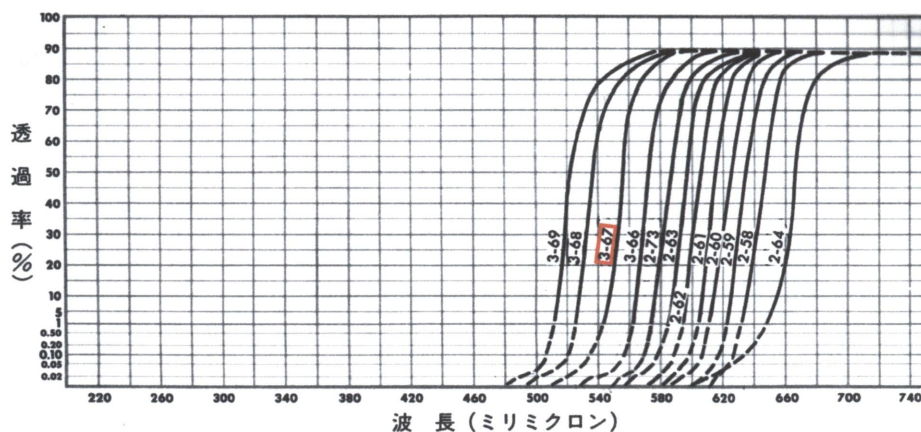


図 C.1: The character of dichroic mirror for blue diode laser ( $\lambda=408\text{nm}$ ).

## 付録D フィルターの特性



コントロールデータ(シャープカット黄・赤色フィルター)

C.S. ナンバー	ガラスコードナンバー	A	B	C	D	熱膨張係数	nd
2-64	2030	648-725	750	620	-	44	1.507
2-58	2403	637-648	678	617	15	43	1.507
2-59	2404	628-637	667	608	15	43	1.507
2-60	2408	619-628	658	599	15	43	1.507
2-61	2412	610-619	649	590	15	43	1.507
2-62	2418	599-610	640	579	15	43	1.507
2-63	2424	588-599	629	568	15	43	1.507
2-73	2434	578-588	618	558	15	43	1.507
3-66	3480	567-578	608	547	15	43	1.507
3-67	3482	544-567	597	524	15	43	1.507
3-68	3484	527-544	574	507	15	43	1.507
3-69	3486	513-527	557	493	15	43	1.507
3-70	3384	491-513	558	466	20	89	1.506
3-71	3385	466-491	551	441	25	89	1.506
3-72	3387	436-466	541	411	30	89	1.506
3-73	3389	416-436	511	391	35	89	1.506
3-74	3391	400-416	491	-	35	89	1.506
3-75	3060	$T_{365} < .5\%$	$T_{405} > 40\%$	-	-	104	1.521

図 D.1: The character of filter.