

## 液晶空間光変調素子による偏光制御を用いた第二高調波顕微鏡

橋 本 守

### Second-Harmonic-Generation Microscopy with Polarization Pattern Control of Exaction Beam Using Liquid-Crystal Spatial-Light-Modulator

Mamoru HASHIMOTO

The arbitrary distribution of the electric field direction on beam cross-section is controllable by spatial light modulators using parallel aligned nematic liquid crystal, and the beam enables the generation of arbitrary direction of electric field at the focus point. We have developed a second harmonic microscopy system excited by the polarization distribution controlled beam and demonstrated the possibility of three-dimensional molecular orientation with high spatial resolution.

**Key words:** nonlinear microscopy, molecular orientation, spatial-light-modulator, radially polarized beam

光学顕微鏡は、大気中や溶液中の試料をサブミクロンの空間分解能で観測できるため、医学・生物学領域のみならず工業界でも古くから広く用いられている。また、最近ではレーザー光を光源とし、検出器の前にピンホールを設置した共焦点顕微鏡がメーカー各社から販売され、工業界では反射光を、生物・医学領域では蛍光を観測するものが普及してきた。共焦点顕微鏡の大きな特徴は、三次元的なイメージングすなわち、試料を物理的に切り出すことなく、ある断面の像を得ることができる点にある<sup>1)</sup>。近年チタンサファイアレーザーに代表される超短パルスレーザーが比較的手軽に使えるようになって、多光子吸収などの非線形光学効果を用いた顕微鏡が開発され<sup>2)</sup>、より厚い試料の三次元観測や無染色な細胞イメージング等が可能となってきた<sup>3,4)</sup>。

一方、顕微鏡下での分子の配向や結晶の軸方向の決定など、物質の向きの観測も、古くから行われてきた。その代表が偏光顕微鏡であり、鉱物結晶や、液晶、高分子等の軸決定や配向観測に現在でもよく用いられている<sup>5)</sup>。偏光顕微鏡のおもな観測方法として、平行光束（あるいは、それ

に近い状態）で試料を照明し、クロスニコル状態とした偏光子を通して像を観測するオルソスコープ観測や、高 NA のコンデンサー、ならびに対物レンズを用いて、対物レンズの瞳面の強度像をクロスニコル状態にした偏光子を通して観測するコノスコープ観測等が知られている。いずれも、試料の複屈折性を利用した観測法であり、オルソスコープ観測では光軸方向の空間分解能はないものの、光軸に垂直な二次元平面内の結晶軸や分子配向の決定ができるコノスコープ観測では空間分解能はほとんどもないものの、三次元的な配向を観測できるという特徴をもつ<sup>6,7)</sup>。しかし、両者とも高い三次元空間分解能をもちつつ分子の向きを観測することはできない。

最近進展してきた観測法として、単一分子の配向観測が挙げられる。単一分子を焦点から約  $1\ \mu\text{m}$  ほどデフォーカスして観測すると、ドーナツ状の像が得られ、その強度分布と半径から三次元的な配向が決定可能となり<sup>8)</sup>、高分子中色素分子の回転拡散観測が報告されている<sup>9)</sup>。しかしながら、個々の分子の蛍光像を観測する必要があるため、単一分子計測のみに適用可能であり、またデフォーカスし

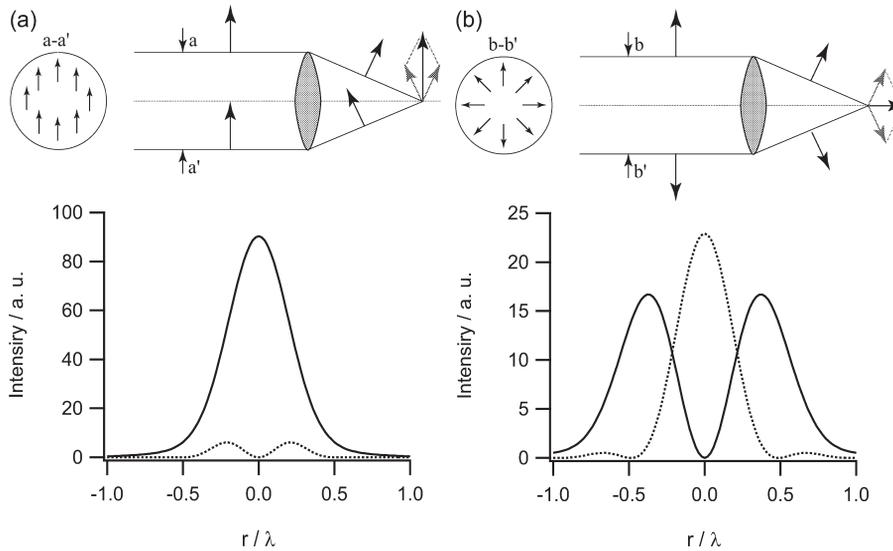


図1 直線偏光 (a), およびラジアル偏光 (b) 集光時の焦点面での光強度。実線は光軸に垂直な電場成分の強度, 点線は光軸に平行な電場成分の強度を示す。なお,  $NA=1.4$ , 屈折率  $n=1.52$  を仮定し, 瞳面でのビームの強度分布は一様であるとした。

て観測するためその空間分解能, 特に光軸方向の空間分解能が低くなってしまふ。さらに, 通常の観測では光軸方向に向いた分子は励起することが難しいため, 観測される蛍光の強度が非常に小さくなるといった問題がある<sup>8)</sup>。

筆者らは, 単一分子ではなく, 連続的に分子が分布したような状態での分子配向を高い空間分解能を保ちながら観測する手法として, 多光子顕微鏡とビーム断面内の偏光分布制御を組み合わせる手法の開発を行っている。このビーム断面内偏光分布の制御には, 液晶空間光変調素子を用いている<sup>10)</sup>。本稿では, その原理と現状について報告する。

## 1. ラジアル偏光と分子配向観測

遷移確率すなわち吸収や励起の確率  $\Gamma$  は, 遷移双極子モーメント  $\mu_a$ , 励起光の電場  $\mathbf{E} = (E_x, E_y, E_z)$  に依存し

$$\Gamma \propto |\mu_a \cdot \mathbf{E}|^2 \quad (1)$$

で与えられる。したがって, 光電場の方向と分子の向きによって吸収や励起, 散乱の効率が異なることを利用すれば, 分子の向きを観測することができる。赤外吸収分光においては, 試料を回転させながらその吸収を観測することによって分子内の官能基の向きを観測することなどが行われている<sup>11,12)</sup>。しかしながら, 高空間分解能で顕微鏡観測する場合, 対物レンズと試料間の距離すなわち作動距離は大きくとれず, 光軸に垂直な軸に対して試料を回転させることは不可能になってしまう。したがって, 光軸方向に遷移双極子モーメントをもつように配向している分子を観測

するためには, 試料を回転するのではなく, 光軸方向に電場を形成することが必要不可欠である。

光は電磁波でありその電場は進行方向に垂直である。例えば, 直線偏光を集光した際に得られる光強度の各成分を示すと図1 (a) のようになる。したがって, 焦点の中心では光軸方向に向いた電場がなく, 焦点からずれたところでピークをもつ。また, そのピーク強度も面内方向成分に比べて小さいものとなる。

一方, ラジアル偏光<sup>13)</sup>とよばれる放射状の偏光分布をもつ光を集光すると, その焦点で光軸方向の電場が形成される (図1 (b))<sup>13,14)</sup>。そして, その強度は焦点で最大値をとり, またそのピーク強度は面内成分に比べて大きい。Novotny らは, ラジアル偏光を用いて単一分子の観測を行い, 励起光の偏光状態を直線偏光やラジアル偏光に切り替えることで, 焦点での電場の向きを変え三次元分子配向の観測が可能であることを示した<sup>15)</sup>。

## 2. 平行配向した液晶空間光変調素子による偏光分布制御

ラジアル偏光を形成する手法が, これまでに数多く考案されてきた。例えば, レーザーキャビティーに工夫を加えて直接発振させるものや<sup>16-18)</sup>, マッハ・ツェンダー干渉系を改造したもの<sup>19,20)</sup>, 分割  $\lambda/2$  板を用いたもの<sup>21)</sup>, である。しかしながら, これらの手法ではラジアル偏光しか作り出せなかったり一様な直線偏光との変換に機械的な操作が必要とされていた。最近, 筆者らを含め, いくつかのグループが液晶空間光変調器を用いて, 機械的な操作を行

わずに自由に、偏光・位相分布を形成する手法を開発した<sup>22-24)</sup>。

その原理は、ガラス等の光学材料の複屈折を正確に計測するときに使われるセナルモンの手法<sup>25)</sup>を利用したものである。直線偏光が複屈折性をもつ物質を通過すると、その偏光状態は複屈折によって楕円偏光へと変化するが、この楕円偏光を  $1/4\lambda$  板に通すと、再び直線偏光へと変換できる。このとき楕円率、すなわち複屈折にともなって直線偏光の向きが変化する。セナルモンの手法では、この直線偏光の向きを計測することで、試料の複屈折量（リタデーション：直行した2偏光間の位相差）を観測するが、逆にリタデーションを調整することで直線偏光の向きを制御することができる。

$x$  軸方向に向けた直線偏光が、リタデーションが調整可能なバビネ板  $M(\eta)$  ( $x$  軸から  $45^\circ$  傾いた方向に光学軸をもつ)、 $\lambda/4$  板  $Q$  を透過した状態を考える。このとき、出力される偏光の状態をジョーンズベクトルで表すと、

$$\begin{aligned} \mathbf{E}_{\text{out}} &= \begin{pmatrix} E_x \\ E_y \end{pmatrix} = \mathbf{QR}(-\pi/4)\mathbf{M}(\xi)\mathbf{R}(\pi/4)\begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} \\ &= \exp(-i\eta/2) \begin{pmatrix} \cos \eta/2 \\ \sin \eta/2 \end{pmatrix} \end{aligned} \quad (2)$$

となる。ただし、

$$\mathbf{M}(V) = \begin{pmatrix} \exp\{-i\eta(V)\} & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (3)$$

はバビネ板等によって与えられた位相量であり、また回転を表す演算子  $\mathbf{R}$  は

$$\mathbf{R}(\alpha) = \begin{pmatrix} \cos \alpha & \sin \alpha \\ -\sin \alpha & \cos \alpha \end{pmatrix} \quad (4)$$

$\lambda/4$  板  $Q$  は

$$\mathbf{Q} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & \exp(-i\eta/2) \end{pmatrix} \quad (5)$$

で表される。したがって、 $\eta$  を変化させれば、直線偏光の向きを変えることができる。

ただしここで注意しなければならない点は、式(2)は位相項  $\exp(-i\eta/2)$  を含んでいることである。すなわち、セナルモンの手法で直線偏光を回転させた場合には、回転に伴って位相も変化してしまうのである。偏光の状態のみに着目すれば、全体的な位相の変化は考慮されないが、ビーム断面内の偏光分布を制御する今回のような場合には、ビーム断面内の各点での位相関係も重要となり、もう1つリタデーションが調整可能な素子を用意して、位相変化を補償する必要がある。

この原理に従い反射型の平行配向した液晶空間光変調素子（浜松ホトニクス：X8267-790C）<sup>26)</sup> を用いたビーム断面内偏光分布制御システムを図2に示す。平行配向した液晶

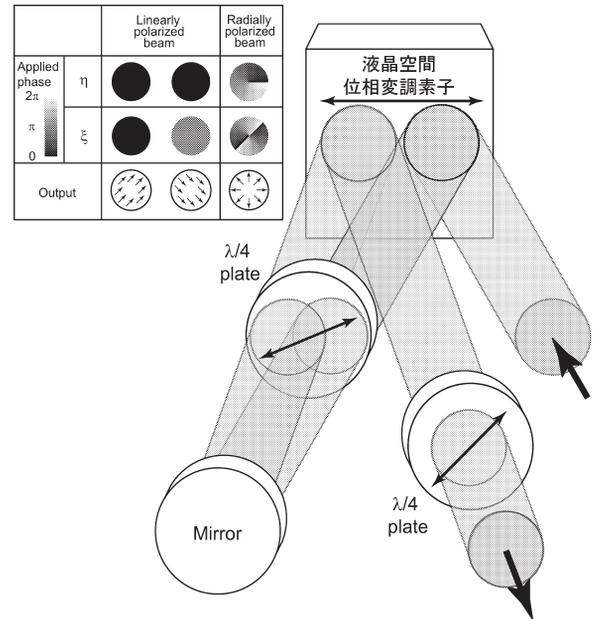


図2 反射型空間光変調素子を用いた、ビーム断面偏光・位相制御装置の光学系。

素子は先に述べたバビネ板のように、リタデーションが調整可能な一軸性結晶と同様なふるまいを見せる。また、空間的には  $768 \times 768$  素子に分割された細かなリタデーション分布を与えることができ、ビーム断面内の各箇所ごとに偏光の方向を変えたビームを形成することができるようになる。なお、図中左上には、液晶空間光変調素子へ与える信号と得られるビームの偏光状態を示す。水平方向に直線偏光したレーザー光は、PAL-SLMで一度反射された後、 $22.5^\circ$  傾いた  $\lambda/4$  板を往復した後再び液晶空間光変調素子で反射されて、その後  $45^\circ$  傾いた  $\lambda/4$  板を透過する。第1反射では、レーザー光の偏光方向と PAL-SLM のリタデーションの制御可能な方向が揃っているため純粋な位相操作が行われ、第二反射による位相変化を補償するために用いる。第2反射の前に、 $22.5^\circ$  傾いた  $\lambda/4$  板を往復して通過することにより、その偏光方向は  $45^\circ$  傾く。したがって、第2反射では、PAL-SLM の光学軸に対して  $45^\circ$  傾いた偏光が入射され、直線偏光は楕円偏光へと変換される。最後に楕円偏光が  $\lambda/4$  板によって直線偏光へと変換される。

図3に得られたラジアル偏光の強度分布を示す。偏光子を通して観測すると、偏光子の方向に従った部分が明るく観測されており、ラジアル偏光が形成されていることがよくわかる。なお、この手法では第1反射と第2反射の間が結像関係となっていないため、回折の影響が生じ、中心部で干渉の結果相殺され強度が弱くなっていることがわかる。このため、2台の液晶空間光変調素子を用いて、互い

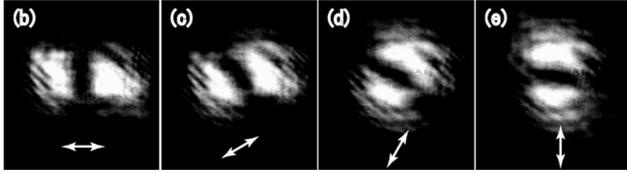
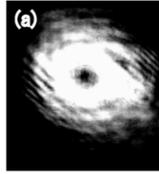


図3 開発したビーム断面偏光・位相制御装置で形成されたラジアル偏光ビームの強度分布。(a)は直接観察した強度分布を、(b~e)は偏光子を通して観測した強度分布(偏光子の方向は図中矢印で示す)。

の反射面を結像関係としたシステムも開発されている<sup>23)</sup>。

### 3. 第二高調波発生顕微鏡による三次元分子配向観測例

ビーム断面内の偏光分布を制御することによって、特定の方向に向いた分子のみを選択的に励起することができる。しかしながら、高い空間分解能で観測する、特に光軸方向に分解して観測することは容易ではない。なぜなら、共焦点配置を取ることができないからである。図4に、焦点に置かれた単一ダイポールから放射された光が像面で形成する強度分布を示す。図を見てわかるように、ちょうどダイポールの向きが光軸方向にあると、像側の焦点中央ではその光強度はほぼゼロになってしまう(光軸方向にダイポールが向いていると、瞳面での偏光分布はラジアル偏光となる。しかし像面ではNAが小さいため、十分な光軸方向成分が形成されない。また、NAを大きくしても磁場が焦点中央ではゼロ、すなわちポインティングベクトルがゼロとなり、結局電磁場はピンホールを通過することはできない)。したがって、ピンホールを設置して共焦点配置にすると、光軸方向に向いた分子からの信号を検出することができなくなってしまう。この打開方法として非線形光学効果の利用が挙げられる。

非線形光学現象は、励起光電場の2乗や3乗に比例して生じる現象である。したがって、レーザー光を集光した場合その焦点近傍のみで非線形光学効果を生じさせることができ、共焦点配置のようにピンホールを検出器側に配置しなくても光学的に切り出した像を得ることができる。すなわち、励起光のみで高い空間分解能を得ることができ、三次元空間分解と三次元配向計測を両立させることが可能となる。

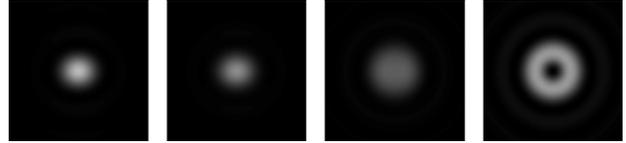


図4 焦点に置かれた単一ダイポールを観測した際に得られる強度像(100λ×100λ)。ただし、物空間の屈折率n=1.52, NA=1.4, 像空間での屈折率1, 像倍率60倍とした。なお左から光軸に対してダイポールは90°, 60°, 30°, 0°傾いている。なお、30°, 0°傾いたダイポールの強度像はそれぞれ2倍, 5倍明るさを強調して示している。

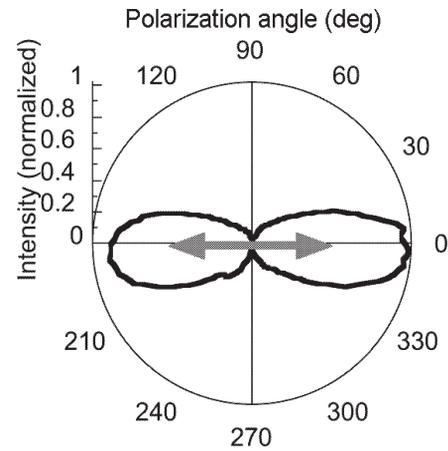


図5 第二高調波のコラーゲン分子配向と偏光依存性。中心からの距離は第二高調波光の強度を、方向は励起光(直線偏光)ならびに観測光の偏光方向を表し、矢印はコラーゲン分子の向きを示す。(安井武史博士(大阪大学)提供<sup>29)</sup>)

筆者らは非線形光学現象として第二高調波発生を用いた第二高調波顕微鏡<sup>27)</sup>に偏光分布制御を適用した。第二高調波発生は二次の非線形光学現象で、高強度の光入射により入射波長の半波長の光が発生する現象である。偶数次数の非線形光学現象は、反転対称性をもつ分子では発生せず、また反転対称性をもつように配列しても発生しない<sup>28)</sup>。このため、第二高調波発生は非常に分子配向に敏感で、また偏光依存性が高いことが知られている。例えば、図5にヒトアキレス腱コラーゲン線維から発生する第二高調波の偏光依存性を示す<sup>29)</sup>。コラーゲン分子は、三重螺旋構造となっているため非反転対称となり、また、束となって線維束を形成している。さらに、アキレス腱のコラーゲン線維は同一方向に配向しているため偏光依存性が非常に高い。

第二高調波顕微鏡による三次元分子配向観測の検証のため、ヒトアキレス腱コラーゲン線維を用いた観測例を図6に示す。試料は、ヒトアキレス腱切片をその線維に対して水平方向ならびに垂直方向に厚さ10μm厚にスライスしたもので、上段(a~c)は、紙面上縦方向にコラーゲン線

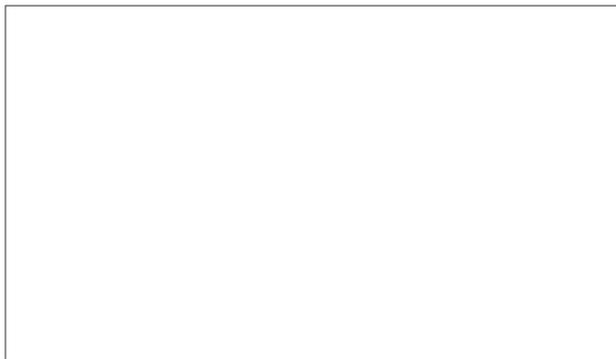


図6 ヒトアキレス腱の第二高調波イメージ。上段(a~c)は紙面上下方向, 下段(d~f)は紙面垂直方向にコラーゲンが配向した試料を, 紙面上下方向に偏光した直線偏光(a, d), 左右方向に偏光した直線偏光(b, e), ラジアル偏光(c, f), で励起して観測した結果を示す<sup>10)</sup>。

維が配向するように, 下段(d~f)は, 紙面に垂直な方向にコラーゲン線維が配向するようにスライスした試料である。また, それらの試料を, それぞれ左から紙面上下方向の直線偏光ビーム, 左右方向の直線偏光ビーム, ラジアル偏光を照射して観測した。上段の試料においては, 分子の向きと同じ向きの直線偏光ビームで励起した場合に最大の強度が得られ, また下段の試料ではラジアル偏光が最大の強度を示した。どちらの試料においても, 焦点でコラーゲン線維の方向と同じ電場をもつ光で励起した場合に最も強い第二高調波が得られ, 三次元的な分子配向を観測可能であることがわかった。ただし, 上段に比べ下段では励起光の偏光状態が異なっても, 得られる第二高調波信号の変化はそれほど大きくなかった。これは, 図1(b)に示すように, ラジアル偏光を集光した場合焦点では光軸に向けた光が形成されるものの, その周りでは面内方向に向けた電場が無視できないほど大きいことが原因であると思われる。したがって, 輪帯照明など瞳面での強度分布を調整し, 空間分解能と分子配向を両立させた最適な状態を検討する必要があると思われる。

平行配向した液晶空間光変調素子を用いることで, ビーム断面内の偏光の向きの分布を光学部品を機械的に駆動することなく, 電子制御することが可能であることを示した。また, このビーム断面内の偏光分布制御を非線形光学顕微鏡へ応用することで, 三次元空間分解能と三次元配向観測を両立可能であることが示された。今後の課題は, 分子の向きを定量的に評価することであるが, このためには焦点近傍の電場ベクトルの分布と3階のテンソルで表される二次の非線形感受率を考慮に入れ, 第二高調波発生の発生をより詳細に評価しなければならない<sup>30)</sup>。

なお, 本手法は生体組織観察のみならず, 工業的にも液晶分子などの観測に有効であると思われる。特に微細化が著しい液晶デバイス等において, 電極-電極間の微細な液晶の動き等の観測に応用可能であり, 従来になかった新しい顕微鏡技術になり得ると期待している。

## 文 献

- 1) T. Wilson, ed.: *Confocal Microscopy* (Academic Press, London, 1990).
- 2) W. Denk, J. H. Strickler and W. W. Webb: "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy," *Science*, **248** (1990) 73-76.
- 3) A. Zumbusch, G. R. Holtom and X. S. Xie: "Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-Stokes Raman scattering," *Phys. Rev. Lett.*, **82** (1999) 4142-4145.
- 4) M. Hashimoto, T. Araki and S. Kawata: "Molecular vibration imaging in the fingerprint region by use of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy with a collinear configuration," *Opt. Lett.*, **25** (2000) 1768-1770.
- 5) E. Gorecka, A. D. L. Chandani, Y. Ouchi, H. Takezoe and A. Fukuda: "Molecular orientational structures in ferroelectric, ferroelectric and antiferroelectric smectic liquid crystal phases as studied by conoscope observation," *Jpn. J. Appl. Phys.*, **29** (1990) 131-137.
- 6) 浜野健也: "第7章 オルソスコープ観測", "第8章 コノスコープ観察", 偏光顕微鏡の使い方 (技報堂, 1950).
- 7) 坪井誠太郎: "第III編 偏光顕微鏡による観察", 偏光顕微鏡 (岩波書店, 1959).
- 8) M. Böhmer and J. Enderlein: "Orientation imaging of single molecules by wide-field epifluorescence microscopy," *J. Opt. Soc. Am. B*, **20** (2003) 554-559.
- 9) H. Uji-i, S. M. Melnikov, A. Deres, G. Bergamini, F. D. Schryver, A. Herrmann, K. Müllen, J. Enderlein and J. Hofkens: "Visualizing spatial and temporal heterogeneity of single molecule rotational diffusion in a glassy polymer by defocused wide-field imaging," *polymer*, **47** (2006) 2511-2518.
- 10) K. Yoshiki, M. Hashimoto and T. Araki: "Second-harmonic-generation microscopy using excitation beam with controlled polarization pattern to determine three-dimensional molecular orientation," *Jpn. J. Appl. Phys.*, **44** (2005) L1066-L1068.
- 11) T. Hasegawa: "A novel measurement technique of pure out-of-plane vibrational modes in thin films on a nonmetallic material with no polarizer," *J. Phys. Chem. B*, **106** (2002) 4112-4115.
- 12) T. Hasegawa, H. Kakuda and N. Yamada: "Leucine fastener formation mechanism between peptide  $\beta$ -sheets in a monolayer studied by infrared multiple-angle incidence resolution spectroscopy," *J. Phys. Chem. B*, **109** (2005) 4783-4787.
- 13) K. S. Youngworth and T. G. Brown: "Focusing of high numerical aperture cylindrical vector beams," *Opt. Express*, **7** (2000) 77-87.
- 14) 小澤祐市, 佐藤俊一: "軸対称偏光ビームの発生と集光特性", *光学*, **35** (2006) 625-634.
- 15) L. Novotny, M. Beversluis, K. S. Youngworth and T. G. Brown: "Longitudinal field modes probed by single molecules," *Phys. Rev. Lett.*, **86** (2001) 5251-5254.
- 16) D. Pohl: "Operation of a ruby laser in the purely transverse

- electric mode TE<sub>01</sub>,” *Appl. Phys. Lett.*, **20** (1972) 266-267.
- 17) A. V. Nesterov, V. G. Niziev and V. P. Yakunin: “Generation of high-power radially polarized beam,” *J. Phys., D: Appl. Phys.*, **32** (1999) 2871-2875.
  - 18) I. Moshe, S. Jackel and A. Meir: “Production of radially or azimuthally polarized beams in solid-state lasers and the elimination of thermally induced birefringence effects,” *Opt. Lett.*, **28** (2003) 807-809.
  - 19) S. C. Tidwell, D. H. Ford and W. D. Kimura: “Generating radially polarized beams interferometrically,” *Appl. Opt.*, **29** (1990) 2234-2239.
  - 20) S. C. Tidwell, G. H. Kim and W. D. Kimura: “Efficient radially polarized laser beam generation with a double interferometer,” *Appl. Opt.*, **32** (1993) 5222-5229.
  - 21) R. Dorn, S. Quabis and G. Leuchs: “Sharper focus for a radially polarized light beam,” *Phys. Rev. Lett.*, **91** (2003) 233901.
  - 22) M. Hashimoto, K. Yamada and T. Araki: “Proposition of single molecular orientation determination using polarization controlled beam by liquid crystal spatial light modulators,” *Opt. Rev.*, **12** (2005) 37-41.
  - 23) M. R. Beversluis, L. Novotny and S. J. Stranick: “Programmable vector point-spread function engineering,” *Opt. Express*, **14** (2006) 2650-2656.
  - 24) B. Jia, X. Gan and M. Gu: “Direct measurement of a radially polarized focused evanescent field facilitated by a single LCD,” *Opt. Express*, **13** (2005) 6821-6827.
  - 25) 鶴田匡夫: “偏光の測定”, *応用光学 2* (培風館, 1990).
  - 26) N. Fukuchi, B. Ye, Y. Igasaki, N. Yoshida, Y. Kobayashi and T. Hara: “Oblique-incidence characteristics of a parallel-aligned nematic-liquid-crystal spatial light modulator,” *Opt. Rev.*, **12** (2005) 372-377.
  - 27) J. N. Gannaway and C. J. R. Sheppard: “Second-harmonic imaging in the scanning optical microscope,” *Opt. Quantum Electron.*, **10** (1978) 435-439.
  - 28) 花村榮一: “非線形光学応答”, *量子光学* (岩波書店, 2000).
  - 29) T. Yasui, Y. Tohno and T. Araki: “Determination of collagen fiber orientation in human tissue by use of polarization measurement of molecular second-harmonic-generation light,” *Appl. Opt.*, **43** (2004) 2861-2867.
  - 30) E. Yew and C. Sheppard: “Effects of axial field components on second harmonic generation microscopy,” *Opt. Express*, **14** (2006) 1167-1174.

(2006年11月24日受理)