

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/030202

発行日 平成29年3月2日 (2017.3.2)

(43) 国際公開日 平成27年3月5日 (2015.3.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64	2 GO 4 3
GO 2 B 21/00 (2006.01)	GO 2 B 21/00	2 HO 5 2

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 26 頁)

出願番号 特願2015-534349 (P2015-534349)	(71) 出願人 504133110 国立大学法人電気通信大学 東京都調布市調布ヶ丘一丁目5番地1
(21) 国際出願番号 PCT/JP2014/072810	(74) 代理人 100107766 弁理士 伊東 忠重
(22) 国際出願日 平成26年8月29日 (2014.8.29)	(74) 代理人 100070150 弁理士 伊東 忠彦
(31) 優先権主張番号 特願2013-178953 (P2013-178953)	(72) 発明者 宮崎 淳 東京都調布市調布ヶ丘一丁目5番地1 国立大学法人電気通信大学内
(32) 優先日 平成25年8月30日 (2013.8.30)	(72) 発明者 小林 孝嘉 東京都調布市調布ヶ丘一丁目5番地1 国立大学法人電気通信大学内
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	
(31) 優先権主張番号 特願2014-128920 (P2014-128920)	
(32) 優先日 平成26年6月24日 (2014.6.24)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	

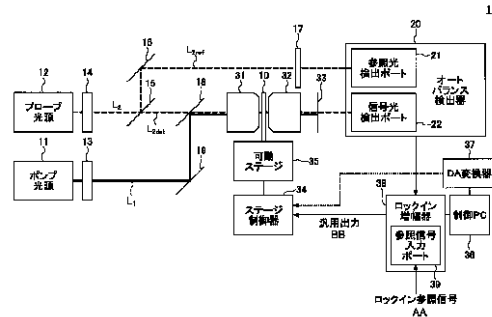
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光学測定装置、光学測定方法、及び顕微イメージングシステム

(57) 【要約】

【課題】 光学測定において効果的にノイズを除去して微小な信号を感度よく検出する。

【解決手段】 光学測定装置は、試料を励起するポンプ光を照射する第1光源と、前記励起された試料の変化を測定するプローブ光を照射する第2光源と、前記プローブ光を検出プローブ光と参照プローブ光に分割するビームスプリッタと、前記励起された試料を透過した前記検出プローブ光を受光する第1入力ポート、前記励起された試料を透過しない前記参照プローブ光を受光する第2入力ポート、及び前記検出プローブ光と前記参照プローブ光の差分を表わす電気信号を出力する出力端を有するバランス検出器と、前記バランス検出器の出力から所定のロックイン周波数で所望の信号を検出するロックイン増幅器と、を有する。



- 11... PUMP LIGHT SOURCE
- 12... PROBE LIGHT SOURCE
- 20... AUTO-BALANCE DETECTOR
- 21... REFERENCE LIGHT DETECTION PORT
- 22... SIGNAL LIGHT DETECTION PORT
- 34... STAGE CONTROLLER
- 35... MOVABLE STAGE
- 36... CONTROL PC
- 37... DIA CONVERTER
- 38... LOCK-IN AMPLIFIER
- 39... REFERENCE SIGNAL INPUT PORT
- AA... LOCK-IN REFERENCE SIGNAL
- BB... GENERAL-PURPOSE OUTPUT

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料を励起するポンプ光を照射する第 1 光源と、
 前記励起された試料の変化を測定するプローブ光を照射する第 2 光源と、
 前記プローブ光を検出プローブ光と参照プローブ光に分割するビームスプリッタと、
 前記励起された試料を透過した前記検出プローブ光を受光する第 1 入力ポートと、前記
 励起された試料を透過しない前記参照プローブ光を受光する第 2 入力ポートと、前記検出
 プローブ光と前記参照プローブ光の差分を表わす電気信号を出力する出力端と、を有する
 バランス検出器と、
 前記バランス検出器の出力から、所定のロックイン周波数で所望の信号を検出するロッ
 クイン増幅器と、
 を有する光学測定装置。

10

【請求項 2】

前記プローブ光は、第 1 変調周波数で変調されており、
 前記ポンプ光は、第 2 変調周波数で変調されており、
 前記ロックイン増幅器は、前記第 1 変調周波数と前記第 2 変調周波数の差周波数の参照
 信号と、前記バランス検出器の出力とを入力として、前記差周波数で前記信号をロッ
 クイン検出することを特徴とする請求項 1 に記載の光学測定装置。

【請求項 3】

前記第 2 光源は白色光源から所定の波長の光を選択して前記プローブ光として照射し、
 前記第 1 光源は、前記白色光源から前記所定の波長以外の光を選択して前記ポンプ光と
 して照射し、
 前記ロックイン増幅器は、前記ポンプ光の強度を変調する光強度変調信号の変調周波数
 の参照信号と、前記バランス検出器の出力とを入力として、前記変調周波数で前記信号を
 ロックイン検出することを特徴とする請求項 1 に記載の光学測定装置。

20

【請求項 4】

前記バランス検出器は、前記参照プローブ光を光電変換して得られる参照光電流を所定
 の分割比で分割し、前記分割された一方の電流成分と、前記検出プローブ光を光電変換し
 て得られる検出光電流との差分を電圧信号に変換して出力し、
 前記所定の分割比は、前記電圧信号に含まれる直流成分が最小となるようにフィードバ
 ック制御されることを特徴とする請求項 1 に記載の光学測定装置。

30

【請求項 5】

前記フィードバック制御の上限周波数は、前記ポンプ光と前記検出プローブ光で前記試
 料を走査する速度よりも大きく、前記ロックイン増幅器の前記ロックイン周波数よりも小
 さいことを特徴とする請求項 4 に記載の光学測定装置。

【請求項 6】

前記ポンプ光と前記プローブ光を円環ビームに成形するビーム成形器と、
 前記円環ビームに成形された前記ポンプ光と前記プローブ光を前記試料に入射させる第
 1 光学系と、
 をさらに有することを特徴とする請求項 1 に記載の光学測定装置。

40

【請求項 7】

前記ポンプ光と前記プローブ光を同軸に重畳する第 2 光学系、
 をさらに有し、
 前記ビーム成形器は、前記第 1 光学系と前記第 2 光学系の間に挿入されることを特徴と
 する請求項 6 に記載の光学測定装置。

【請求項 8】

前記第 1 光源及び前記第 2 光源は、近赤外領域よりも短波長の可視領域のレーザー光を
 出射する半導体レーザーであることを特徴とする請求項 1 に記載の光学測定装置。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の光学測定装置と、

50

前記ポンプ光及び前記プローブ光に対して前記試料を相対的に走査する走査機構と、
前記ロックイン増幅器により前記試料上の各走査点で検出された前記信号を収集し、処
理する演算処理部と、
を有することを特徴とする顕微イメージングシステム。

【請求項 10】

ポンプ光で試料を照射して前記試料を励起し、
プローブ光を検出プローブ光と参照プローブ光に分割して、前記検出プローブ光で、前
記ポンプ光の照射と同時に前記試料を照射し、
前記試料を透過した検出プローブ光をバランス検出器の第 1 入力ポートで受光し、
前記試料を透過しない前記参照プローブ光を前記バランス検出器の第 2 入力ポートで受
光し、
前記バランス検出器から、前記検出プローブ光と前記参照プローブ光の差分を表わす電
気信号を出力し、
前記バランス検出器の出力から、所定のロックイン周波数で所望の信号を検出する、
ステップを含むことを特徴とする光学測定方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ポンプ光とプローブ光を用いて高感度、高解像の光学測定を行う光学測定技
術と、これを利用した顕微イメージングシステムに関する。

20

【背景技術】

【0002】

光学顕微鏡は、原子間力顕微鏡と異なり、非接触で対象物を観察することができる。ま
た、電子顕微鏡と異なり、生体の活動を生きたまま観察することができる。

【0003】

光学測定のひとつに、ポンプ光とプローブ光を用いたポンプ - プローブ測定法がある。
ポンプ光を試料に入射して試料中の分子を励起し、別のレーザー光（プローブ光）を試料
に入射してその透過率（または反射率）の変化を検出する。ポンプ - プローブ測定法は、
分子の光励起状態のダイナミクスを高い時間分解能で測定することができ、光学材料や生
体試料などの測定に広く適用されている。

30

【0004】

ポンプ - プローブ測定を顕微鏡下のナノスケールの空間分解能で行なう測定が、ポンプ
- プローブ顕微測定である。この方法では、ビーム位置を試料上で走査し、各点でデー
タを取得することでポンプ - プローブ信号の顕微イメージを得ることができる。

【0005】

たとえば測定対象の分子が光を吸収する場合、その分子の誘導放出、励起状態吸収、励
起に伴う基底状態にある分子の減少によるブリーチング、温度上昇による分子近傍の屈折
率変化などがプローブ光の透過率変化に寄与する。このプローブ光強度の変化量は一分子
あたり 10^{-6} から 10^{-7} である。光学顕微鏡の対物レンズを通したレーザービームの焦
点面の体積は 10^{-13} cm^3 であり、その中に存在する分子数は限られているため、ポ
ンプ - プローブ顕微測定で得られる信号は非常に小さい。

40

【0006】

微弱な信号を測定する方法に、ロックイン検出法がある。この方法は、設定したある周
波数（ロックイン周波数）の三角関数と信号の積をとり、その周波数の信号を低周波に変
換したあと、ローパスフィルタによって信号成分を取り出す。この点で、ロックイン検出
は実効的に狭帯域のバンドパスフィルタとして働く。すなわちロックイン周波数と異なる
周波数で観測されるノイズを除去し、ロックイン周波数付近にある信号を検出すること
によって、信号対ノイズ比を向上させる。また、ローパスフィルタの時定数を長く取るこ
とにより、帯域幅を狭め、ノイズをより効果的に除去することができる。ポンプ - プロ
ーブ測定法では主にポンプ光強度をロックイン周波数で変調し、ポンプ光照射によるプロ
ーブ

50

光の変調を、ロックイン増幅器を用いて検出する。

【0007】

しかしながら、ロックイン周波数付近で観測されるノイズは原理的に除去できない。また、ローパスフィルタの時定数を長くすると、信号の変化に対する応答が遅くなり、試料を走査しながら各点で測定して画像を得るために長時間の測定が必要となる。ノイズに埋もれたポンプ-プローブ顕微測定 of 微弱信号を検出するにはロックイン検出法に加えて、より根本的な対策が必要である。

【0008】

ポンプ-プローブ法では、試料を透過させた後のプローブ光の微弱な変化を検出するためプローブ光強度の揺らぎの影響を除去することが信号対ノイズ比の向上に有効である。一般に、レーザーの光強度の揺らぎは低周波領域が支配的であり、高周波ほどその影響が小さい。このため、数メガヘルツ(MHz)から数十メガヘルツ(MHz)の高周波のロックイン周波数でポンプ-プローブ顕微測定を行ってノイズの影響を軽減することが提案されている(たとえば、非特許文献1及び2参照)。

【0009】

ロックイン周波数を高く設定して信号対ノイズ比を向上させる方法には、以下の問題点あるいは限界がある。

(1) ロックイン周波数(ポンプ光の変調周波数)に試料の分子の応答が追従しないと、検出信号は測定できない。例えば蛍光分子の誘導放出信号を測定する場合、ロックイン周波数の上限は蛍光寿命の値により決まる。さらに蛍光分子の三重項状態を考慮した場合、その寿命はマイクロ秒であるため、数MHz以上での光強度の変調は信号強度の低下を招く。そのため、生体の機能解析、医療や材料科学などの分野で必要とされる、反応中間体、三重項励起状態、ナノ構造体の熱拡散過程、高分子や蛋白質の構造変化などに起因するマイクロ秒からミリ秒の比較的遅い時間スケールの光励起ダイナミクスは測定できない。

(2) 光源にパルス光を用いる場合、パルスの繰り返し周波数はロックイン周波数に比べて大きくなくてはならない。また、パルス間の強度の安定性が高い光源に限られるため、実際に用いることのできる光源の種類が制約される。現在、ポンプ-プローブ顕微鏡で用いられる光源は、主に近赤外の波長で数十MHzの繰り返し周波数を持つチタンサファイア発振器に限られており、特定の波長の光を得るには光パラメトリック増幅器等の波長変換のための大掛かりな装置が外部に必要となる。特に可視光全域の白色光源であるスーパーコンティニウム光はパルス間の強度揺らぎが大きいため、高周波ロックイン検出法でもノイズを除去することができない。

(3) 半導体レーザーは小型、高効率で、近年さまざまな発振波長をもつ素子が開発されており、レーザー顕微鏡の連続発振光源として最適である。しかし、ノイズを低減するために光学系の戻り光の影響を抑える必要がある。また、動作電流や温度などの動作条件を安定化して、レーザー発振の縦モードが不安定に変動するモードホップを抑える必要がある。このような安定化機構を備えるにはコストがかかる。また、レーザー作用に本質的な量子雑音はギガヘルツ(GHz)帯で共鳴状のピークを持ち、半導体レーザーで量子雑音を抑制するには光フィードバックなど特別な機構が必要である。

【0010】

なお、ポンプ-プローブ測定ではなく、気体試料のレーザー測定にバランス検出器を用いる構成が知られている(たとえば、特許文献1参照)。

【0011】

一方、通常の光学顕微鏡で観察できる構造の大きさは光の回折限界により決まり、波長の半分程度であるが、近年、光の回折限界を超えた様々な超解像光学顕微鏡が提案されている。1994年に提案されたSTED(stimulated emission depletion)顕微鏡では、励起された蛍光分子のうち焦点辺縁にある分子の発光を抑制するため、焦点面で円環状の強度分布をもつ一本のレーザー光(誘導放出光)を入射して超解像を実現する。STED顕微鏡では、回折限界値の4~5倍程度(50nm以下)の解像度で生体試料の観察が可能であるが、効率的に誘導放出を引き起こすためには数100mW以上の高強度のレー

10

20

30

40

50

ザーが必要である。

【 0 0 1 2 】

また、超短パルスレーザーを光源に用いて円環ビームと二光子励起法（蛍光顕微法、電流測定顕微法）を組み合わせることでサイドローブを抑制し、解像度を向上する方法が報告されている（たとえば、非特許文献 3 及び 4 参照）。しかし、二光子励起では一光子励起の 2 倍の波長を有する近赤外の光源が必要となり、可視光源と比べ解像度向上に難がある上、高コストで実用化が困難である。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 3 】

【 特許文献 1 】 米国特許第 5 1 3 4 2 7 6 号明細書

【 非特許文献 】

【 0 0 1 4 】

【 非特許文献 1 】 W. Min, S. Lu, S. Chong, R. Roy, G.R. Holtom, and X.S. Xie, “ Imaging chromophores with undetectable fluorescence by stimulated emission microscopy ”, Nature, 461, 1105-1109 (2009).

【 非特許文献 2 】 L. Tong, Y. Lie, B.D. Dolash, Y. Jung, M.N. Slipchenko, D.E. Bergstrom and J.X. Cheng, Nature nanotechnology 7 (1), 56-61 (2012)

【 非特許文献 3 】 S. W. Hell, et al. “ Annular aperture two-photon excitation microscopy ”, Optics Communications 117 (1995), 20-24

【 非特許文献 4 】 K. A. Serrels, et al. “ 70 nm resolution in subsurface optical imaging of silicon integrated-circuit using pupil-function engineering ”, Applied Physics Letter 94, 073113 (2009)

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 5 】

そこで、光源の種類を問わず、簡易な構造でノイズを低減し、高感度かつ高解像のポンプ - プロブ測定技術を提供することを課題とする。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 6 】

上記課題を解決するために、任意の光源からのポンプ光とプロブ光を用いる光学測定において、バランス型ホモダイン検出を行った後にロックイン検出することで、光励起に起因する微弱な信号を高感度で検出する。

【 0 0 1 7 】

また、ポンプ光とプロブ光を円環ビームとすることで、回折限界を超える高解像の測定を実現する。

【 0 0 1 8 】

具体的には、本発明のひとつの側面における光学測定装置は、

試料を励起するポンプ光を照射する第 1 光源と、

前記励起された試料の変化を測定するプロブ光を照射する第 2 光源と、

前記プロブ光を検出プロブ光と参照プロブ光に分割するビームスプリッタと、

前記励起された試料を透過した前記検出プロブ光を受光する第 1 入力ポートと、前記試料を透過しない前記参照プロブ光を受光する第 2 入力ポートと、前記検出プロブ光と前記参照プロブ光の差分を表わす電気信号を出力する出力端と、を有するバランス検出器と、

前記バランス検出器の出力から、所定のロックイン周波数で所望の信号を検出するロックイン増幅器と、

を有する。

【 0 0 1 9 】

好ましい構成例として、プロブ光を第 1 変調周波数で変調し、ポンプ光を第 2 変調周

10

20

30

40

50

波数で変調し、ロックイン増幅器は、第1変調周波数と第2変調周波数の差周波数の参照信号と、バランス検出器の出力とを入力として前記差周波数で前記信号をロックイン検出する。

【0020】

別の好ましい構成例として、第1波長のポンプ光と、前記第1波長と異なる第2波長のプローブ光とを円環ビームに成形し、円環ビームに成形されたポンプ光とプローブ光を試料に入射して、試料を透過したプローブ光と試料を透過しない参照プローブ光とをバランス検出してから、前記所定のロックイン周波数で所望の信号をロックイン検出する。

【発明の効果】

【0021】

光源の種類を問わずレーザーノイズを効率的に除去して、微小な光励起信号を感度よく検出することができる。さらに、ポンプ光とプローブ光に円環ビームを用いることで、回折限界を超える高解像の測定を実現することができる。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】第1実施形態の光学測定装置の概略構成図である。

【図2】図1の装置に適用される光源の構成例を示す図である。

【図3】図1の装置に適用される光源の別の構成例を示す図である。

【図4】バランス検出器によるノイズキャンセル効果を示す図である。

【図5】バランス検出器によるノイズキャンセル効果を示す図である。

【図6】第1実施形態の光学測定装置によるポンプ-プローブ顕微画像を示す図である。

【図7】第2実施形態の光学測定装置の概略構成図である。

【図8】円環ビームの焦点面での強度分布とポンプ-プローブ信号の点広がり関数を説明する図である。

【図9】第2実施形態のサイドローブ抑制効果を、ポンプ光による二光子励起の場合と比較して示す図である。

【図10】金ナノ粒子のポンプ-プローブ顕微画像である。

【図11】図10の画像の横方向(x方向)と縦方向(y方向)の断面強度を示す図である。

【図12】円環ビームを用いたときの蛍光ビーズのポンプ-プローブ顕微画像を、円形ビームを用いたポンプ-プローブ顕微画像と比較して示す図である。

【図13】図12の蛍光ビーズを標識するナイルレッドの励起スペクトル及び蛍光スペクトルと、図12のI-I'ラインの断面強度を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0023】

図面を参照して、実施形態の光学測定の手法と構成を説明する。

<第1実施形態>

図1は、第1実施形態の光学測定装置1の概略構成図である。光学測定装置1は、ポンプ光源11と、プローブ光源12と、オートバランス検出器20と、ロックイン増幅器38を有する。ポンプ光源11は、試料10を光励起するためのポンプ光(L_1)を照射する。プローブ光源12は、光励起による試料10の透過率変化を検出するためのプローブ光(L_2)を照射する。ポンプ光とプローブ光は、空間モードを整え、且つビーム径を拡大するため、対物レンズとピンホールで構成される空間フィルタ13、14にそれぞれ導かれる。プローブ光 L_2 は、ビームスプリッタ15により分割される。

【0024】

分割された一方のプローブ光は、参照光(L_{2ref})として、減光フィルタ17を通してオートバランス光検出器20の参照光検出ポート21に入射する。もう一方のプローブ光は検出光(L_{2det})として、ダイクロイックミラー18を介してポンプ光と空間的に重ね合わせられて、対物レンズ31を介して試料10に入射する。対象とする分子が光を吸収する場合、分子の誘導放出、励起状態吸収、励起に伴う基底状態の分子の減少による

10

20

30

40

50

ブリーチングなどが検出プローブ光の透過率変化に寄与する。試料 10 からの透過光は集光レンズ 32 によりコリメートされる。

【0025】

試料 10 を透過した後のポンプ光と試料 10 から発生する蛍光は、色ガラスフィルターまたは狭帯域干渉フィルタ 33 によりブロックされ、検出情報をのせたプローブ光（検出信号光 L_{2det} ）のみがオートバランス検出器 20 の信号光検出ポート 22 に入射する。参照光検出ポート 21 で、参照光 L_{2ref} は図示しないフォトダイオードに入射し、電流に変換される。同様に、信号光検出ポート 22 で、検出信号光 L_{2det} は図示しない別のフォトダイオードに入射し、電流に変換される。

【0026】

オートバランス検出器 20 の内部で、参照光電流は 2 つに分割され、一方の参照光電流と検出信号光電流の間で引き算が行われる。参照光電流の分割比は、引き算後の電流の DC 成分がゼロになるようにフィードバック制御される。参照光電流と検出信号光電流の引き算により、2 つのチャンネル間のコモンモードノイズ（レーザーノイズ）はキャンセルされる。また、参照光電流の分割比を、引き算後の DC 成分がゼロになるように制御することで、検出信号光と参照光の強度比のアンバランスをキャンセルすることができる。すなわち、ビーム走査中の透過光は、試料 10 の屈折率や定常吸収の不均一等に起因して変動し、検出信号光と参照光の強度比のアンバランスを引き起こすが、このアンバランスを分割比のフィードバック制御によりキャンセルすることができる。

【0027】

オートバランス検出器 20 からの出力は、ロックイン増幅器 38 に接続され、試料 10 の光励起に起因する情報を乗せた信号が検出される。試料 10 を可動ステージ 35 に取り付け、試料位置を走査して各点でデータを検出することで試料 10 のイメージを構築することができる。光学測定装置 1 は、走査を制御するために、コンピュータ 36 およびステージ制御器 34 を備える。コンピュータ 36 はロックイン増幅器 38 の汎用出力ポートまたは DA 変換器 37 を介してステージ制御器 34 に接続され、可動ステージ 35 のアクチュエータ（不図示）を制御する。またコンピュータ 36 はロックイン増幅器 38 を制御して、測定データを収集する。

【0028】

ロックイン増幅器 38 には、ロックイン参照信号が入力される。後述するように、実施形態のロックイン参照信号は、プローブ光の変調信号と、ポンプ光の変調信号の差周波成分（ $|f_1 - f_2|$ ）により生成される。オートバランス検出器 20 において、参照光電流の分割比のフィードバック制御回路の上限周波数は、試料走査速度（1 ピクセルあたりの測定時間）より大きく、かつ、ロックイン増幅器 38 に入力されるロックイン参照信号の周波数より小さく設定される。これにより、オートバランス検出器 20 にて、レーザーノイズと、試料スキャン中の検出信号光と参照光の強度比アンバランスを同時にキャンセルし、ロックイン増幅器 38 で光励起に起因するポンプ・プローブ信号のみを検出することができる。

【0029】

図 2 は、図 1 の光学測定装置 1 で用いられる光源システム 2 を示す。図 2 の例では、連続発振レーザーを用いてポンプ・プローブ顕微システムを実現する。

【0030】

ポンプ光とプローブ光の光源として、波長の異なる 2 つの連続発振半導体レーザー 74 および 64 を用いる。ロックイン検出を行うために、半導体レーザー 64 の光強度を変調する信号発生器 41 と、半導体レーザー 74 の光強度を変調する信号発生器 42 が配置される。

【0031】

信号発生器 41 からの変調信号は、分配器 43、増幅器 62、バイアス・ティー 63 を通して半導体レーザー 64 に入力される。増幅器 62、バイアス・ティー 63 および半導体レーザー 64 は、シールドケース 61 内に収容され、バイアス・ティー 63 にレーザー

10

20

30

40

50

電源 6 5 が接続される。同様に、信号発生器 4 2 からの変調信号は、分配器 4 4、増幅器 7 2、バイアス・ティー 7 3 を通して半導体レーザー 7 4 に入力される。増幅器 7 2、バイアス・ティー 7 3 および半導体レーザー 7 4 は、シールドケース 7 1 内に収容され、バイアス・ティー 7 3 にレーザー電源 7 5 が接続される。シールドケース 6 1, 7 1 を用いることで、不要輻射による半導体レーザー 6 4 と半導体レーザー 7 4 の間の電氣的干渉を抑える。

【 0 0 3 2 】

信号発生器 4 1 で生成される変調信号に同期して、プローブ光用の半導体レーザー 6 4 を駆動するバイアス電流に、外部から変調信号が印加される。バイアス電流はレーザー電源 6 5 からバイアス・ティー 6 3 を介して半導体レーザー 6 4 に印加される。信号発生器 4 2 で生成される変調信号に同期して、ポンプ光用の半導体レーザー 7 4 を駆動するバイアス電流に、外部から変調信号が印加される。バイアス電流はレーザー電源 7 5 からバイアス・ティー 7 3 を介して供給される。この構成でキロヘルツ (k H z) からギガヘルツ (G H z) の広帯域にわたって変調することができる。

10

【 0 0 3 3 】

分配器 4 3 から分岐されて出力と分配器 4 4 から分岐された出力は、ロックイン増幅器 3 8 のロックイン参照信号の生成のために用いられる。分配器 4 3 は、信号発生器 4 1 からの信号を、30 dB 減衰器 4 5、増幅器 4 7 を通して周波数ミキサー 4 9 に接続する。分配器 4 4 は、信号発生器 4 2 からの信号を、30 dB 減衰器 4 6、増幅器 4 8 を通して周波数ミキサー 4 9 に接続する。減衰器 4 6 は、信号発生器 4 2 による ω_2 成分を減衰させて信号発生器 4 1 の変調信号 (ω_1) に対する影響を除去する。減衰器 4 5 は、信号発生器 4 1 による ω_1 成分を減衰させて信号発生器 4 2 の変調信号 (ω_2) に対する影響を除去する。低周波フィルタ 5 1 により、周波数ミキサー 4 9 の出力から差周波成分 ($|\omega_1 - \omega_2|$) が取り出されロックイン増幅器 3 8 の参照信号入力ポート 3 9 に接続される。

20

【 0 0 3 4 】

このように、プローブ光とポンプ光をそれぞれ異なる周波数 (ω_1, ω_2) で変調し、試料 1 0 を透過後のプローブ光強度変化の差周波成分 ($|\omega_1 - \omega_2|$) をロックイン検出する。ポンプ光とともにプローブ光を変調することで、差周波を固定した状態でそれぞれの変調周波数を変えることができ、高速検出器や高速ロックイン増幅器を用いなくても、試料分子の応答を広い周波数領域にわたって測定することができる。またプローブ光を変調することで、発振縦モードをマルチモード化し、ノイズを軽減することができる。

30

【 0 0 3 5 】

図 3 は、図 1 の光学測定装置 1 で用いられる別の光源システム 3 の概略図である。図 3 の例では、スーパーコンティニウム光源 8 1 を使用する。スーパーコンティニウム光源 8 1 は、約 450 nm から 2 μ m の広帯域の波長が得られる白色パルス光源 8 1 である。白色パルス光源 8 1 に含まれる赤外光は、赤外カットフィルタ 8 2 により除去される。また白色パルス光源 8 1 の偏光はランダムであるため、偏光プリズム 8 3 を用いて特定の直線偏光の光のみを取り出す。さらに、ダイクロイックミラー 8 4 を使って、505 nm 以上の波長の光を透過してプローブ光に用い、それ以下の波長の光を反射してポンプ光に用いる。

40

【 0 0 3 6 】

ダイクロイックミラー 8 4 の透過光は、干渉フィルタ 8 5 により特定の波長帯の光のみが選択されて、プローブ光として出射される。ダイクロイックミラー 8 4 の反射光は、ミラー 8 6 により光強度変調器 8 7 に導かれ、ポンプ光の光強度が変調される。光強度変調器 8 7 は、光強度変調制御器 8 8 を介して信号発生器 8 9 により制御される。信号発生器 8 9 から分配される信号が、ロックイン増幅器 3 8 のロックイン参照信号として用いられる。

【 0 0 3 7 】

図 3 の例では、白色パルス光源 8 1、ダイクロイックミラー 8 4、及び干渉フィルタ 8

50

5でプローブ光源を構成する。また、白色パルス光源81、ダイクロイックミラー84及び光強度変調器87でポンプ光源を構成する。ロックイン参照信号は、ポンプ光の変調周波数を有する。

【0038】

図4は、図1の光学測定装置1に組み込まれたオートバランス検出器20のレーザーノイズのキャンセリング効果を示す。図4(A)は、図2の連続発振半導体レーザー64、74を含む光源システム2を用いたときのプローブ光のノイズスペクトルを、図4(B)は、図3のスーパーコンティニウム(白色パルス)光源81を含む光源システム3を用いたときのプローブ光のノイズスペクトルを示す。

【0039】

図4(A)で、上側のスペクトルがバランス前のスペクトル、下側のスペクトルがバランス後のスペクトルである。連続発振半導体レーザー64として、発振波長が655nmの半導体レーザーを用い、オートバランス検出器20の信号光検出ポート22に入射するプローブ光の強度は640μWである。レーザーノイズは0から200kHzの領域で約20dB低減される。

【0040】

図4(B)で、上側のスペクトルがバランス前のスペクトル、下側のスペクトルがバランス後のスペクトルである。図3の干渉フィルタ85を用いて640±5nmの波長のプローブ光のみを検出している。スーパーコンティニウム光源81のパルスの繰り返し周波数は40MHzである。オートバランス検出器20の信号光検出ポート22に入射するプローブ光の強度は640μWである。スーパーコンティニウム光源81はパルス間の揺らぎが非常に大きい(最大20%(rms))不安定な光源であり、オートバランス検出器20を作動させない場合は、レーザーノイズは、-50dBm程度である。一方、オートバランス検出器20を作動させた場合、レーザーノイズは-85dBmにまで低減する。このときの光強度対雑音比は、最大でも 10^{-6} である。光励起によるプローブ信号の強度変化は一分子あたり 10^{-7} から 10^{-6} であり、ビーム焦点内の微小体積にある少数分子からの信号を測定することができる。ビーム走査中の透過率変動の影響も、オートバランス検出器20での自動調整機構(参照光電流の分割比のフィードバック制御)でキャンセルされ、光励起に起因した信号のみを高感度で検出できることがわかる。

【0041】

図5は、実施形態の光学測定装置1を用いた試料10の測定結果である。図5(A)はオートバランス検出器20を動作させたときの顕微画像、図5(B)はオートバランス検出器20を動作させない場合の顕微画像である。図5(C)は、図5(A)と図5(B)のX-X'ラインに沿った信号強度を示す図である。

【0042】

試料10には、オートバランス処理の有無にかかわらず、650nmにピーク蛍光波長を持つCdSe/ZnS量子ドットで標識したマウスT細胞を用いた。光源として、図2に示した連続発振半導体レーザーを有するポンプ光源11とプローブ光源12を用いた。ポンプ光とプローブ光は、それぞれ488nmと660nmの発振波長を持つ。ポンプ光で量子ドットを光励起する。プローブ光の波長は量子ドットの蛍光スペクトルにオーバーラップしており、検出されるポンプ-プローブ信号は主に誘導放出に起因している。ポンプ光とプローブ光を、それぞれ3MHzと3.12MHzで変調し、ロックイン参照信号の周波数を二つの差周波(120kHz)に設定する。

【0043】

試料10へ入射したポンプ光とプローブ光の出力は、それぞれ1mWと210μWである。ロックイン増幅器38の時定数は5ms、ピクセルサイズは0.4μm×0.4μm、画像サイズは20μm×20μmである。図5(B)でオートバランス検出器20を動作させない場合は、信号光ポート22の出力を直接ロックイン増幅器38に接続した。

【0044】

図5(A)でオートバランス検出器20を動作させた場合は、細胞の表面に標識された

10

20

30

40

50

量子ドットの鮮明なイメージが得られるが、図5(B)では、細胞を視覚的に認識することができない。図5(C)のX-X'断面の信号強度を比較すると、画像のバックグラウンドノイズは、オートバランス機能を用いた場合 1.5×10^{-6} (rms)であるのに対し、バランス機能を用いない場合は 9.8×10^{-6} (rms)である。このことから、特別な安定化機構を備えない連続発振半導体レーザーを光源に用いた場合でも、従来はバックグラウンドノイズに埋もれて検出できなかった微小な信号を高感度で検出できることがわかる。

【0045】

図6は、光学測定装置1による顕微画像の空間分解能を評価するためのポンプ-プローブ画像である。実施形態のポンプ-プローブ光学測定装置1では、信号強度がポンプ光とプローブ光の積で決まる。この非線形特性により、二つのレーザービームが重なり合わさったとき、光強度の強い焦点中心部分にある分子からの信号が選択的に検出される。すなわち試料10からの検出領域を狭い範囲に限定することができ、光の回折限界を超えた超解像が実現できる。

10

【0046】

実施形態の光学測定装置1の空間分解能を評価するために、非発光性の金ナノ粒子のポンプ-プローブ顕微画像を測定した。金ナノ粒子にレーザーを入射すると、プラズモン共鳴により光は吸収され、その際の基底状態の分布の減少がプローブ光の透過率を変化させる。試料10として、サイズが20nmの金ナノ粒子水溶液をガラス基板上に滴下し乾燥させた試料を用いて、ポンプ-プローブ顕微画像を取得した。

20

【0047】

図6(A)は、試料10を光軸と垂直な面(x-y平面)に走査したときの画像、図6(B)は光軸に対して平行な面(x-z平面)に走査した時の(深さ方向の)画像である。図6(A)の矢印で示す明るい点が個々の金ナノ粒子であり、そのサイズは半値全幅で $284 \text{ nm} \pm 32 \text{ nm}$ である。回折理論により計算されるビーム径のサイズは、ポンプ光とプローブ光でそれぞれ 313 nm 、 341 nm であるから、実施形態のポンプ-プローブ測定で超解像が実現されていることが確認される。

【0048】

一方、図6(B)から光軸方向(深さ方向)の分解能は $1.1 \pm 0.1 \mu\text{m}$ である。回折理論により計算される光軸方向のスポットサイズは、ポンプ光とプローブ光でそれぞれ $1.08 \mu\text{m}$ 、 $1.18 \mu\text{m}$ であり測定値とほぼ同等である。ビームのコリメート方法の改善、特に対物レンズの後焦点面でのビーム強度の均一性を向上させることで、面内方向の分解能のさらなる向上と、光軸方向(深さ方向)での超解像が得られると期待できる。

30

【0049】

以上述べたように、オートバランス検出器を用いることで、汎用半導体レーザーや白色光源を用いた場合でも、レーザーノイズや光源のバックグラウンドノイズを相殺するとともに、試料や走査機構の不均一に起因する参照光と検出信号光の強度のアンバランスを低減する。この構成により、特別な光源や光源安定化機構を用いなくても、ポンプ-プローブ測定において微小な情報信号を高感度で取り出すことができる。

【0050】

さらに、ポンプ光とプローブ光の差周波を一定にして変調周波数を変えることで、広い周波数領域にわたって試料の応答を測定することができる。また、ポンプ光とプローブ光の差周波成分をロックイン参照信号とすることで、高周波ロックイン検出法に頼らずに低ノイズの信号を検出することができる。

40

< 第2実施形態 >

図7は、第2実施形態の光学測定装置101の概略構成図である。第2実施形態では、ポンプ光とプローブ光に円環ビームを用いて回折限界を超える高解像の測定を実現する。図7(A)に示すように、光学測定装置101は、試料130を光励起するポンプ光 L_1 を照射する第1の光源111と、光励起による試料130の変化を検出するプローブ光 L_2 を照射する第2の光源112と、バランス検出器123と、ロックイン増幅器124を

50

含む。

【 0 0 5 1 】

第 2 実施形態では、ポンプ光 L_1 の光源 1 1 1 として波長 4 8 8 n m の半導体レーザーを用い、プローブ光 L_2 の光源 1 1 2 として波長 6 4 0 n m の半導体レーザーを用いる。光源 1 1 1、1 1 2 はともに可視光を出力する安価な連続波の半導体レーザーである。

【 0 0 5 2 】

ポンプ光 L_1 とプローブ光 L_2 は、それぞれ空間フィルタ 1 1 3、1 1 4 を通過してその空間モードが整えられ、ダイクロイックミラー 1 1 7 で同軸に重ね合わせられる。ダイクロイックミラー 1 1 7 は、ポンプ光 L_1 を全反射し、プローブ光 L_2 を透過させる。ダイクロイックミラー 1 1 7 へ導かれるプローブ光 L_2 の一部はビームスプリッタ 1 1 5 で分割され、参照光として、マルチモードファイバ (M M F) 1 2 2 を介してバランス検出器 1 2 3 の参照光ポート 1 2 1 b に入力される。

10

【 0 0 5 3 】

ダイクロイックミラー 1 1 7 で重畳されたポンプ光 L_1 とプローブ L_2 は、円環アパーチャを有するフィルタ 1 2 0 を通過する。フィルタ 1 2 0 は、円環ビームを生成するビーム成形器として機能する。第 2 実施形態では、図 7 (B) に示すように、反射防止コーティング付き円形ガラス板 2 0 1 に直径が 6 m m の円形アルミシール 2 0 2 を張り付けて、環状部を有するフィルタ 1 2 0 を作製する。ポンプ光 L_1 とプローブ光 L_2 を通す環状部の厚さは、一例として 1 . 2 m m とする。円環ビームを生成するフィルタ 1 2 0 を、ダイクロイックミラー 1 1 7 と後述する対物レンズ 1 2 8 の間の光路上の任意の位置に挿入するのが望ましいが、ポンプ光 L_1 とプローブ光 L_2 のそれぞれを円環ビームに成形した後同軸に重畳してもよい。

20

【 0 0 5 4 】

フィルタ 1 2 0 で生成された円環ビームは、偏光ビームスプリッタ 1 2 5 を介して対物レンズ 1 2 8 に入射し、試料 1 3 0 へ導かれる。試料 1 3 0 を透過したポンプ - プローブ光は、コンデンサレンズ 1 2 9 で集光され、バンドパスフィルタ 1 3 2 およびレンズ 1 3 3 を介して、プローブ光 L_2 のみがバランス検出器 1 2 3 の他方のポート 1 2 1 a に入射する。

【 0 0 5 5 】

バランス検出器 1 2 3 は、レーザーノイズをキャンセルし、ショット雑音限界の高感度で測定するために、第 1 実施形態で用いたのと同様のオートバランス検出器であるのが望ましい。バランス検出器 1 2 3 では、ポート 1 2 1 b に入力される参照光 (プローブ光の一部) と、ポート 1 2 1 a に入力される試料 1 3 0 透過後の検出光が、それぞれ電流に変換される。参照光電流は 2 つに分割され、一方の参照光電流と検出光電流の引き算が行われる。参照光電流の分割比は、引き算後の電流の D C 成分がゼロになるようにフィードバック制御される。参照光電流と検出信号光電流の引き算により、2 つのチャンネル間の共通モードノイズ (レーザーノイズ) はキャンセルされて、ポンプ光 L_1 の励起によって試料 1 3 0 に生じた変化の成分が出力される。参照光電流の分割比を、引き算後の D C 成分がゼロになるように制御することで、検出信号光と参照光の強度比のアンバランスをキャンセルすることができる。ビーム走査中の透過光は、試料 1 3 0 の屈折率や定常吸収の不均一等に起因して変動し、検出光と参照光の強度比のアンバランスを引き起こすが、このアンバランスを分割比のフィードバック制御によりキャンセルすることができる。

30

40

【 0 0 5 6 】

バランス検出器 1 2 3 の出力は、ロックイン増幅器 1 2 4 の入力に接続される。ポンプ光 L_1 とプローブ光 L_2 の強度は、それぞれ I_1 、 I_2 で変調されており、ポンプ - プローブ信号である透過光の差周波成分 $| I_1 - I_2 |$ が、ロックイン増幅器 1 2 4 によりヘテロダイン的に検出される。本実施形態では I_1 を 1 M H z、 I_2 を 1 . 0 1 5 M H z とする。光源 1 1 1 および 1 1 2 に用いられるレーザダイオードへの注入電流を変調することで、光源 1 1 1 の光強度と光源 1 1 2 の光強度を変調する。

【 0 0 5 7 】

50

ロックイン増幅器 1 2 4 で検出されるのは、周波数 $| \nu_1 - \nu_2 |$ のビート信号である。このビート信号、すなわちポンプ - プローブ信号は、試料 1 3 0 でのポンプフィールドとプローブフィールドの相互作用によって生成され、試料 1 3 0 における光励起に起因する情報を乗せている。ロックイン検出に用いられる参照信号は、光源 1 1 1 の強度変調に用いた変調周波数 ν_1 と、光源 1 1 2 の強度変調に用いた変調周波数 ν_2 の差周波から生成される信号である。

【 0 0 5 8 】

試料 1 3 0 をピエゾステージ 1 3 1 に固定し、試料 1 3 0 を走査しながら各点でのポンプ - プローブ信号を検出・収集し、図示しない演算装置（図 1 の制御コンピュータ 3 7 参照）でマッピング等の処理を行うことで、顕微画像を得ることができる。試料位置を確認するために CMOS カメラ 1 2 6 が用いられ、バンドパスフィルタ 1 2 7 により CMOS カメラ 1 2 6 へプローブ光 L_2 だけが入射される。

10

【 0 0 5 9 】

図 8 と図 9 を参照して、動作原理を説明する。図 8 (A) は円環ビームの模式図、図 8 (B) は焦点面での強度分布とポンプ - プローブ信号の点広がり関数 (P S F : point spreading function) を示す図である。

【 0 0 6 0 】

光学顕微鏡の空間解像度は、光ビームが対物レンズに入射したときの焦点面でのスポットサイズ（回折限界値）で決まり、その強度分布は入射ビームの形状に依存する。円環ビームが対物レンズ 1 2 8 に入射すると、焦点面での光強度分布の主ピークは、通常の円形ビームの場合と比べて鋭くなるが、主ピーク周辺に現れるサイドローブも強くなる。この現象は、図 8 (B) の太い実線（円環ポンプ光）と破線（円環プローブ光）で示されるとおりである。発明者らは、このサイドローブからの寄与を抑えることで、空間解像度を向上させることができることに思い至った。

20

【 0 0 6 1 】

図 8 (A) において、ポンプ光 L_1 とプローブ光 L_2 の瞳面での円環の外径を D 、内径を d 、レンズの焦点距離を f とする。このとき、焦点面での動径方向 r の強度分布はスカラ回折理論から式 (1) 及び式 (2) で与えられる。

【 0 0 6 2 】

【 数 1 】

30

$$I(r) = (1 - \varepsilon^2) \left\{ [I_c(\rho)]^{1/2} - \varepsilon^2 [I_c(\varepsilon\rho)]^{1/2} \right\}^2 \quad (1)$$

$$\rho = 2(NA)r/\lambda \quad (2)$$

ここで、 $I_c(r)$ は円形ビーム ($\varepsilon = 0$) を入射したときの焦点での強度分布であり、ベッセル関数 $J_1(x)$ を使って、式 (3) で表現される。

40

【 0 0 6 3 】

【数 2】

$$I_c(r) = [2J_1(\pi\rho)/\pi\rho]^2 \quad (3)$$

式(2)のNAはレンズの開口数であり、試料30中の屈折率をnとすると、 $NA = nD/f$ で与えられる。は入射光の波長である。 10

【0064】

一方、ポンプ-プローブ信号のPSFは、ポンプ光とプローブ光の強度分布の積となる。図8(B)では、ポンプ光 L_1 とプローブ光 L_2 の波長をそれぞれ488nmと660nm、 $NA = 0.95$ に設定し、円形ビームの場合($\alpha = 0$)と円環ビームの場合($\alpha = 0.8$)の双方について、焦点面での強度分布とPSFをシミュレーションしている。

【0065】

個別の円環ビームに着目すると、中心部の主ピークは円形ビームの場合と比較して鋭くなるが、サイドローブも同時に大きくなる。その強度比SLR(side lobe ratio)は約15%であり、通常の蛍光顕微鏡ではこのサイドローブが像の解像度に悪影響をもたらす。 20

【0066】

これに対し、ポンプ-プローブ信号のPSF(図8(B)の太い一点鎖線)は2つのビームの強度の積であるため、強度の強い部分が支配的になってSLRが1%に減少し、かつ主ピークはさらに鋭くなる。その半値全幅は164nmであり、円形プローブビームの回折限界値 $0.51 \lambda / NA = 344 \text{ nm}$ と比べて1/2.1倍となる。また、円形ビームの場合のポンプ-プローブPSF(図8(B)の細い点線)の半値全幅の212nmと比べて、1/1.3倍となり、解像度は向上する。

【0067】

なお、円環ポンプ光 L_1 と円環プローブ光 L_2 の波長をそれぞれ500nmと640nmにしたときの分解能は110nm、400nmと520nmにしたときの分解能は90nmにまで向上する。実施形態の光学測定方法は、観察対象に応じて、最適な波長を選択することができ、測定の自由度が高い。 30

【0068】

図9は、二色のポンプ光及びプローブ光を用いたときの効果を説明する模式図である。図9(A)に示すように、ポンプ-プローブ法では、観測される信号はポンプ光 L_1 とプローブ光 L_2 との強度の積に比例し、強度の強い主ピークの中心部分に存在する分子から優先的に信号が検出される。また、サイドローブピークの位置は波長に依存するため、波長の異なる2色をポンプ光 L_1 とプローブ光 L_2 に用いることで、異なる位置にサイドローブが現れる。ポンプ光 L_1 とプローブ光 L_2 の波長を異ならせた場合(たとえばポンプ光 L_1 の波長を488nm、プローブ光 L_2 の波長を660nm)、2つの円環ビームを重ね合わせたときのサイドローブの寄与を、単一波長の場合と比べて約半分に抑制できる。 40

【0069】

これに対し、図9(B)の従来 of 二光子励起測定法では、二光子を励起するポンプ光が照射され、同じ位置に現れるサイドローブピークが乗算されるため、SLRは2.3%になる。そもそも二光子励起法は、近赤外波長の超短パルス(フェムト秒~ピコ秒)の照射による蛍光検出であることから、本発明とは構成も測定原理も異なる。二光子励起法は、チタンサファイアレーザー等の高価で高い技術を持つ技術者によるメンテナンスの必要な光源を要し、解像度は可視光光源より低く実用化、商業化が困難である。 50

【 0 0 7 0 】

第2実施形態では、波長の異なる可視領域の円環ビームを用いてポンプ・プローブ信号を観測することで、低コストかつ簡易な構成で、焦点面でのサイドローブの影響を1/10以下に抑制し、解像度を約2倍に向上する。

【 0 0 7 1 】

図10および図11は、第2実施形態の測定例1を示す。測定例1では、図7の光学測定装置101で試料中の金ナノ粒子を観察する。図10(A)は、ガラス基板上に分散させた金ナノ粒子のポンプ・プローブ顕微画像、図10(B)は円環のポンプ・プローブビームを入射したときの単一の金ナノ粒子の顕微画像、図10(C)は、円形のポンプ・プローブビームを入射したときの単一の金ナノ粒子の顕微画像である。

10

【 0 0 7 2 】

試料として、20 μ mの厚さのポリビニルアルコール(PVA)中に、金ナノ粒子を3次元的に分散させものを用意する。円環のポンプ・プローブ光をスキャンした平面の近傍に位置する金ナノ粒子ほど、ポンプ・プローブ信号の強度が強くなる。

【 0 0 7 3 】

金ナノ粒子は、サイズ20nmでポンプ光 L_1 の波長(488nm)でプラズモン共鳴により光を吸収する。このとき、金ナノ粒子近傍の温度上昇にともなう屈折率の微小な変化が、プローブ光 L_2 を散乱・屈折させて光透過率の変化を引き起こし、ポンプ・プローブ信号に寄与する。

【 0 0 7 4 】

試料に入射するポンプ光の強度は0.7mW、プローブ光の強度は0.3mWである。ロックイン増幅器の時定数は0.5ms、1ピクセル当たりの滞在時間は1ms、画像の解像度は300 \times 300ピクセルである。

20

【 0 0 7 5 】

図10(B)の円環ビームによる1個の金ナノ粒子のポンプ・プローブ顕微画像と、図10(C)の円形ビームによる1個の金ナノ粒子のポンプ・プローブ顕微画像を比較すると、バランス検出後のロックイン検出により、図10(C)でも金ナノ粒子を明確に観察することができるが、図10(B)で円環ビームを用いることにより、金ナノ粒子の輪郭がより鮮明になっている。これは、異なる波長の円環ビームの重ね合わせにより主ピークが鋭くなる一方で、サイドローブが相殺され、解像度とコントラストの両方が向上するためである。

30

【 0 0 7 6 】

図11(A)は、図10(B)と図10(C)の顕微画像の横方向(x方向)の断面強度を、図11(B)は、図10(B)と図10(C)の顕微画像の縦方向(y方向または入射光の偏光方向)の断面強度を示す。黒丸は、円環ビームを用いた場合(図10(B))の断面強度、三角マークは、円形ビームを用いた場合(図10(C))の断面強度である。データ点をつなぐ実線はガウシアンフィットを示す。

【 0 0 7 7 】

開口数が1に近い収束ビームのため、x方向での解像度が、y方向(入射光の偏光方向)と比べて、約5%高い。ガウス関数を使ったフィッティングから、図11(A)では、円環ポンプ・プローブビームを用いた場合の半値全幅は、 162 ± 4 nm、円形ポンプ・プローブビームを用いた場合の半値全幅は、 232 ± 3 nmである。図11(B)では、円環ポンプ・プローブビームを用いた場合の半値全幅は、 196 ± 6 nm、円形ポンプ・プローブビームを用いた場合の半値全幅は、 245 ± 7 nmである。この測定結果によると、バランス型ホモダイン検出後のロックイン検出により、円形ポンプ・プローブビームでも十分に高い解像度が得られるが、円環ビームを用いることで円形ビームよりも解像度がさらに20~30%向上する。この値は、上述の理論計算とほぼ一致する。

40

【 0 0 7 8 】

また、プローブ光の回折限界値(焦点面でのスポットサイズの半値全幅)は344nmであるため、第2実施形態のように円環ポンプ・プローブビームを用いることで、通常の

50

走査型光学顕微鏡の約2倍、解像度が向上する。

【0079】

図12および図13は、第2実施形態の測定例2を示す。測定例2では、図7の光学測定装置101で試料中の蛍光ビーズを観察する。図12(A)は、円環ビームを入射した場合のガラス基板に分散させた蛍光ビーズのポンプ-プローブ顕微画像、図12(B)は、比較例として、ガラス基板上の同じ領域に円形ビームを入射した場合の蛍光ビーズのポンプ-プローブ顕微画像である。

【0080】

蛍光ビーズのサイズは1 μ mであり、600nmに蛍光スペクトルピークをもつナイルレッドで標識されている。ナイルレッドの励起スペクトルは、図13(A)の左側のカーブ、蛍光スペクトルは図13(A)の右側のカーブである。図13(A)に示すように、プローブ光の波長は蛍光スペクトルの長波長側と重なっている。この場合、誘導放出利得によるプローブ光の強度変化が主としてポンプ-プローブ信号に寄与する。

10

【0081】

図13(B)は、図12(A)と図12(B)のI-I'ラインでの断面強度を示す図である。黒丸が図12(A)の円環ビームを用いた場合のポンプ-プローブ信号強度、三角マークが図12(B)の円形ビームを用いた場合のポンプ-プローブ信号強度である。バランス型ホモダイン検出後にロックイン検出することで、円形ビームでも十分に鋭いスペクトルが得られるが、円環ビームを用いることで、立ち上がりがさらにシャープになっている。円環ビームを用いた場合、円形ビームを用いる場合と比較して解像度がさらに向上することがわかる。

20

【0082】

測定例1、2の結果から、第2実施形態の光学測定方法は、金ナノ粒子のような非蛍光性物質にも、蛍光性物質にも適用可能であることがわかる。可視領域でのレーザー光を用いて非接触で微小な状態変化を測定できることから、生体内の観察、測定にも適用することができる。

【0083】

第2実施形態の構成、手法は、2色のレーザー光を試料に入射し、試料からのポンプ-プローブ信号を測定することで、収束円環ビームの焦点近傍のサイドローブを抑制して、解像度を向上することができる。ビーム位置を走査しながらイメージング測定を行うことで、空間解像度を通常の光学顕微鏡と比べて2倍に向上することができる。

30

【0084】

バランス型ホモダイン検出後のロックイン検出により低ノイズ、高感度の測定ができることは第1実施形態と同様である。また、第1実施形態、第2実施形態を通して、近赤外領域より短波長の2色の光を用いるので、低コスト、省スペースで維持管理の容易な連続発振半導体レーザーを光源として利用できる。第2実施形態では、さらに以下の利点を有する。

(1) 超超解像イメージを得るための複雑な画像演算処理が不要なためアーティファクトを軽減できる。

(2) 特別な蛍光色素を必要とせず、公知の超解像法では測定困難な金属ナノ粒子のような弱蛍光・非蛍光性の物質でも測定可能である。

40

(3) 光励起分子のダイナミクス(電子エネルギー緩和、光励起キャリアの再結合、熱拡散など)の超解像測定が可能である。

【0085】

本出願は、2013年8月30日に出願された日本国特許出願第2013-178953号、及び2014年6月24日に出願された日本国特許出願第2014-128920号に基づきその優先権を主張するものであり、同日本国特許出願の全内容を参照することにより本願に援用する。

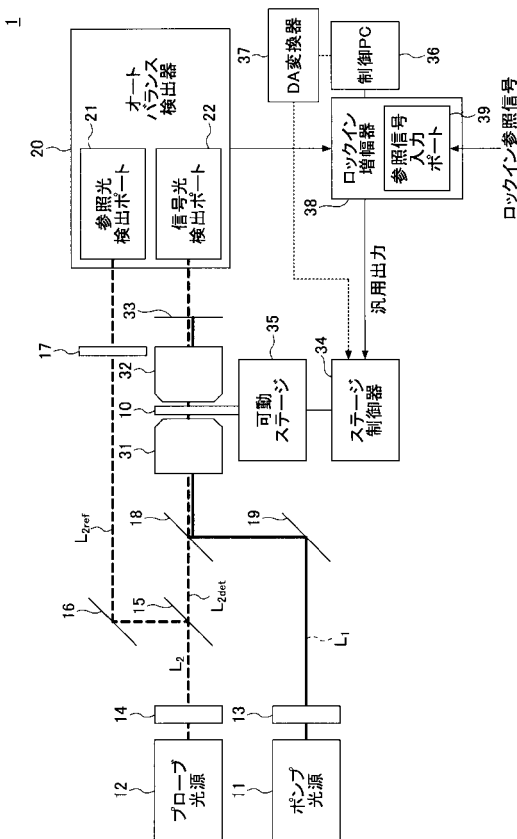
【符号の説明】

【0086】

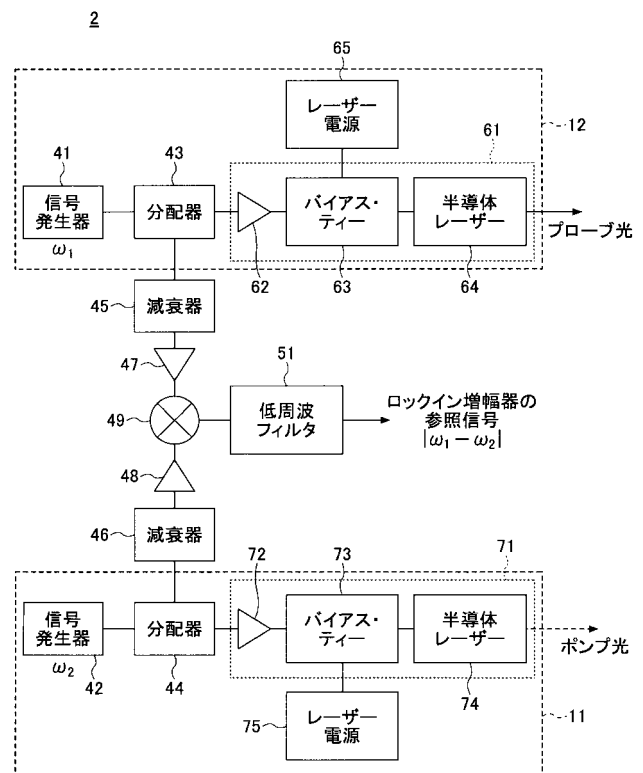
50

- 1, 101 光学測定装置
- 2, 3 光源システム
- 10, 130 試料
- 11, 111 ポンプ光源 (第1光源)
- 12, 112 プローブ光源 (第2光源)
- 20, 123 バランス検出器
- 21, 121b 参照光検出ポート
- 22, 121a 信号光検出ポート
- 38, 124 ロックイン増幅器
- 120 円環アパーチャを有するフィルタ (ビーム成形器)

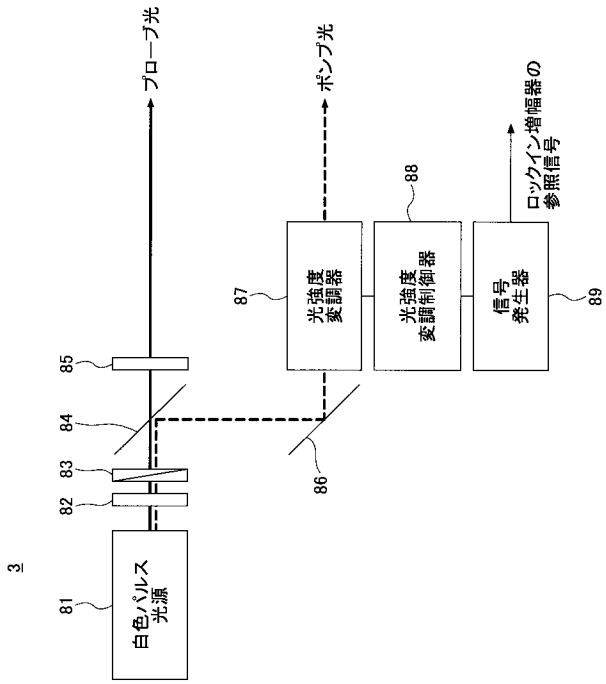
【図1】



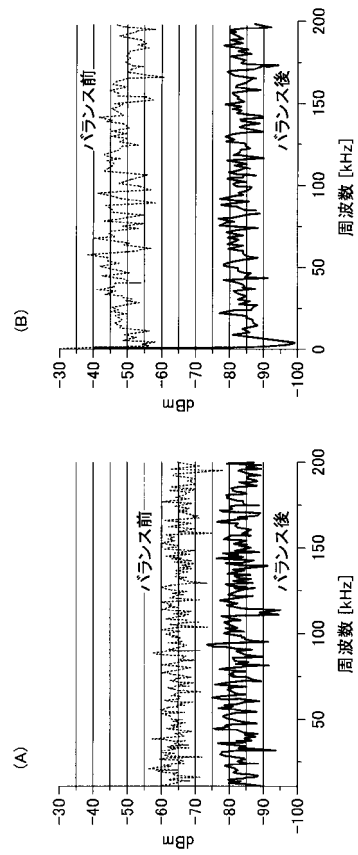
【図2】



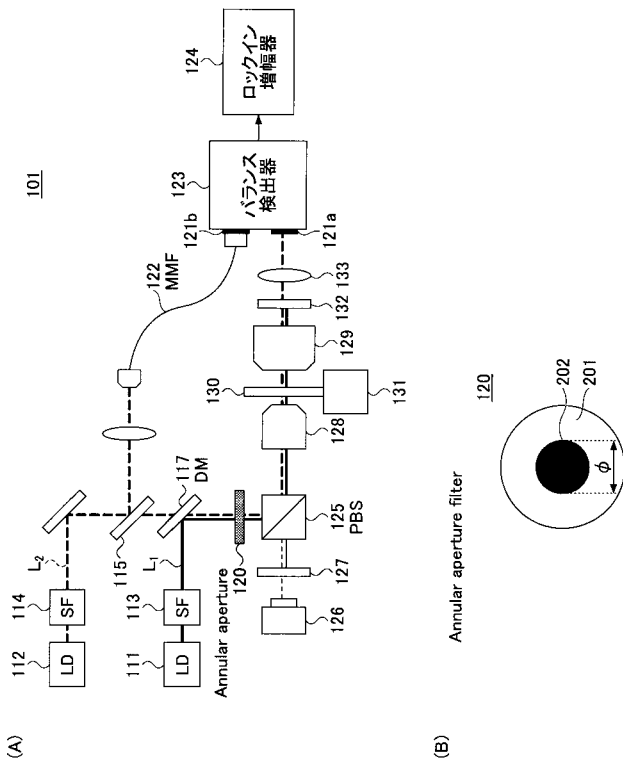
【 図 3 】



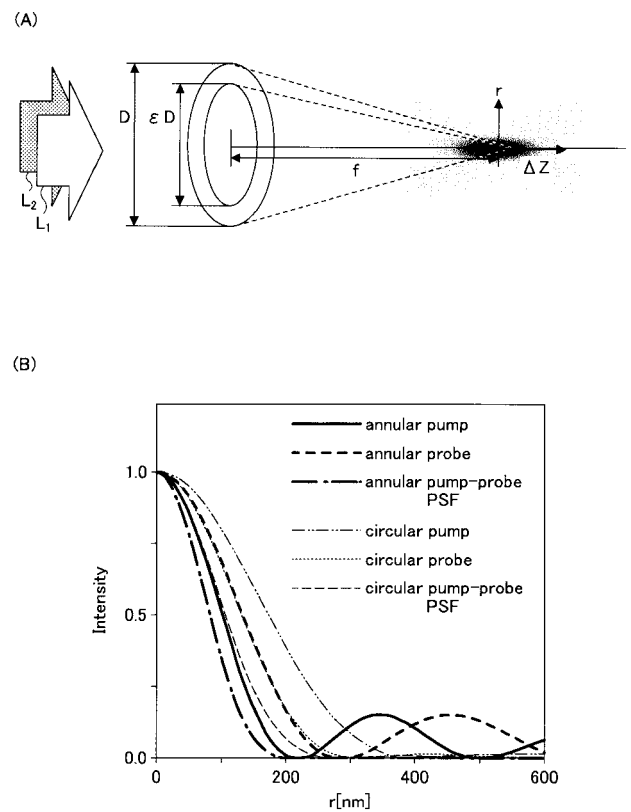
【 図 4 】



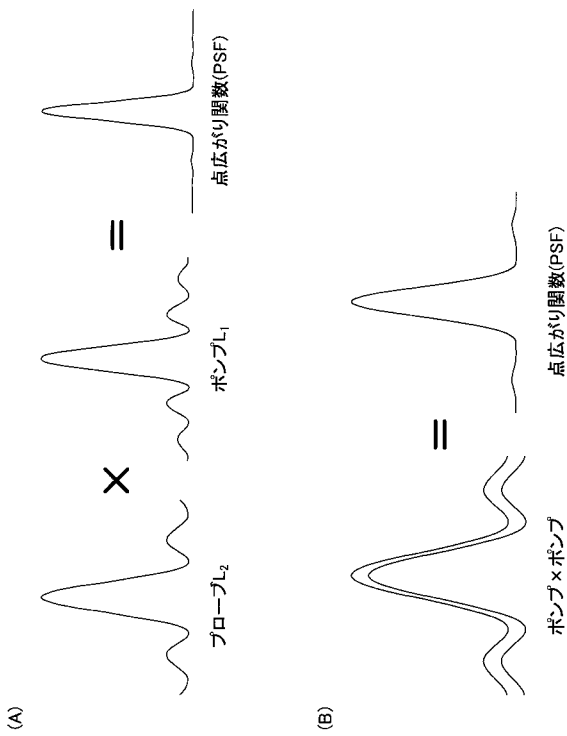
【 図 7 】



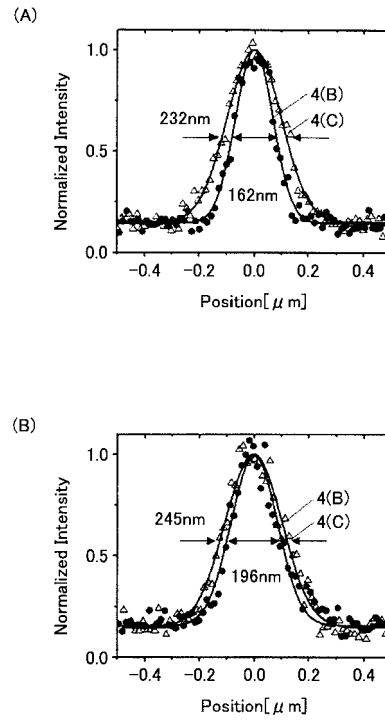
【 図 8 】



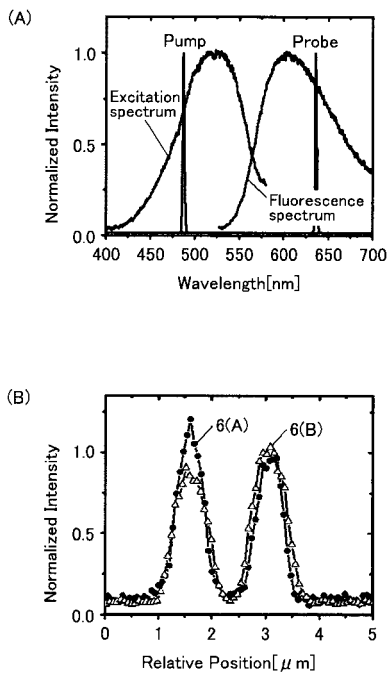
【 図 9 】



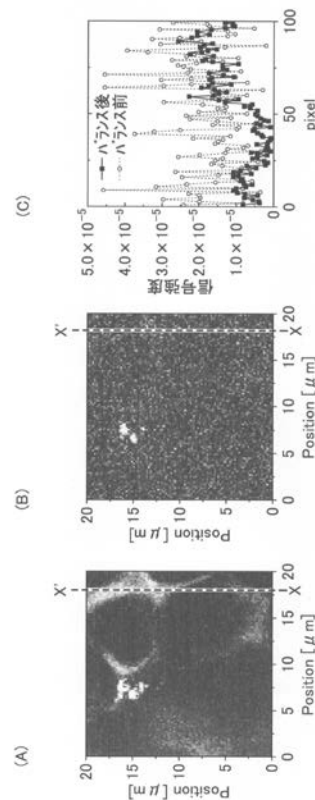
【 図 1 1 】



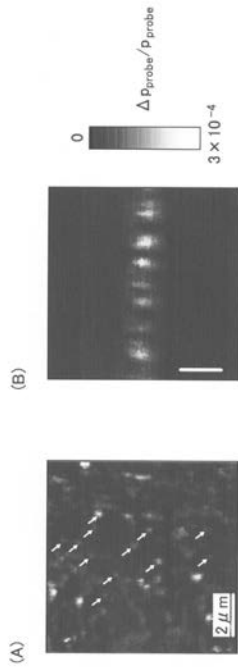
【 図 1 3 】



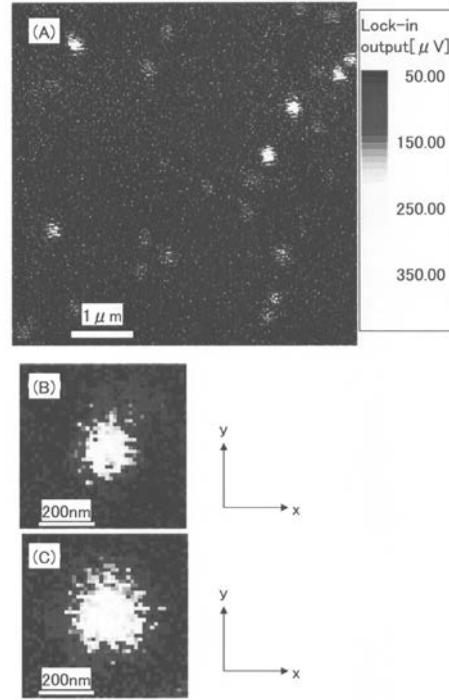
【 図 5 】



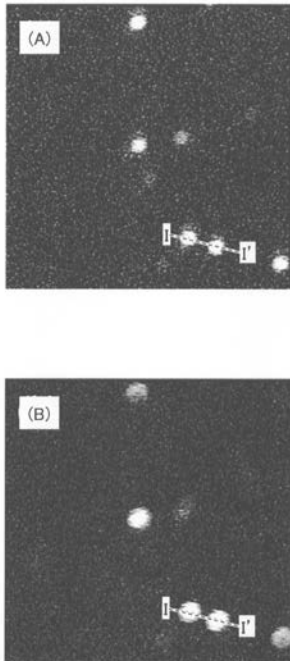
【 図 6 】



【 図 1 0 】



【 図 1 2 】



【手続補正書】

【提出日】平成27年1月28日(2015.1.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料を励起するポンプ光を照射する第1光源と、
前記励起された試料の変化を測定するプローブ光を照射する第2光源と、
前記プローブ光を検出プローブ光と参照プローブ光に分割するビームスプリッタと、
前記励起された試料を透過した前記検出プローブ光を受光する第1入力ポートと、前記励起された試料を透過しない前記参照プローブ光を受光する第2入力ポートと、前記検出プローブ光と前記参照プローブ光の差分を表わす電気信号を出力する出力端と、を有するバランス検出器と、

前記バランス検出器の出力から、所定のロックイン周波数で所望の信号を検出するロックイン増幅器と、
を有し、

前記バランス検出器は、前記参照プローブ光を光電変換して得られる参照光電流を所定の分割比で分割し、前記分割された一方の電流成分と、前記検出プローブ光を光電変換して得られる検出光電流との差分を電圧信号に変換して出力し、

前記所定の分割比は、前記電圧信号に含まれる直流成分が最小となるようにフィードバック制御され、

前記フィードバック制御の上限周波数は、前記ポンプ光と前記検出プローブ光で前記試料を走査する速度よりも大きく、前記ロックイン増幅器の前記ロックイン周波数よりも小さいことを特徴とする光学測定装置。

【請求項2】

前記プローブ光は、第1変調周波数で変調されており、

前記ポンプ光は、第2変調周波数で変調されており、

前記ロックイン増幅器は、前記第1変調周波数と前記第2変調周波数の差周波数の参照信号と、前記バランス検出器の出力とを入力として、前記差周波数で前記信号をロックイン検出することを特徴とする請求項1に記載の光学測定装置。

【請求項3】

前記第2光源は白色光源から所定の波長の光を選択して前記プローブ光として照射し、
前記第1光源は、前記白色光源から前記所定の波長以外の光を選択して前記ポンプ光として照射し、

前記ロックイン増幅器は、前記ポンプ光の強度を変調する光強度変調信号の変調周波数の参照信号と、前記バランス検出器の出力とを入力として、前記変調周波数で前記信号をロックイン検出することを特徴とする請求項1に記載の光学測定装置。

【請求項4】

(削除)

【請求項5】

(削除)

【請求項6】

前記ポンプ光と前記プローブ光を円環ビームに成形するビーム成形器と、

前記円環ビームに成形された前記ポンプ光と前記プローブ光を前記試料に入射させる第1光学系と、

をさらに有することを特徴とする請求項1に記載の光学測定装置。

【請求項7】

前記ポンプ光と前記プローブ光を同軸に重畳する第2光学系、
をさらに有し、

前記ビーム成形器は、前記第1光学系と前記第2光学系の間に挿入されることを特徴とする請求項6に記載の光学測定装置。

【請求項8】

前記第1光源及び前記第2光源は、近赤外領域よりも短波長の可視領域のレーザー光を出射する半導体レーザーであることを特徴とする請求項1に記載の光学測定装置。

【請求項9】

請求項1、2、3、6、7、8のいずれか1項に記載の光学測定装置と、
前記ポンプ光及び前記プローブ光に対して前記試料を相対的に走査する走査機構と、
前記ロックイン増幅器により前記試料上の各走査点で検出された前記信号を収集し、処理する演算処理部と、
を有することを特徴とする顕微イメージングシステム。

【請求項10】

ポンプ光で試料を照射して前記試料を励起し、
プローブ光を検出プローブ光と参照プローブ光に分割して、前記検出プローブ光で、前記ポンプ光の照射と同時に前記試料を照射し、
前記試料を透過した検出プローブ光をバランス検出器の第1入力ポートで受光し、
前記試料を透過しない前記参照プローブ光を前記バランス検出器の第2入力ポートで受光し、
前記バランス検出器から、前記検出プローブ光と前記参照プローブ光の差分を表わす電気信号を出力し、
前記バランス検出器の出力から、所定のロックイン周波数で所望の信号を検出する、
ステップを含み、
前記バランス検出器において、前記参照プローブ光を光電変換して得られる参照光電流を所定の分割比で分割し、前記分割された一方の電流成分と、前記検出プローブ光を光電変換して得られる検出光電流との差分を電圧信号に変換して出力し、
前記所定の分割比は、前記電圧信号に含まれる直流成分が最小となるようにフィードバック制御され、
前記フィードバック制御の上限周波数は、前記ポンプ光と前記検出プローブ光で前記試料を走査する速度よりも大きく、前記ロックイン増幅器の前記ロックイン周波数よりも小さいことを特徴とする光学測定方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2014/072810
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N21/59(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N21/00-21/74, G02B21/00-21/36		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2001-228121 A (Japan Science and Technology Corp.), 24 August 2001 (24.08.2001), paragraphs [0053] to [0059], [0075], [0092]; fig. 1, 5 & US 6549285 B1 & WO 2001/061321 A1 & CA 2368278 A	1, 2, 9, 10 3-8
Y	JP 2009-150649 A (Osaka University), 09 July 2009 (09.07.2009), paragraph [0032]; fig. 5 & WO 2006/104237 A1	3
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 11 November, 2014 (11.11.14)	Date of mailing of the international search report 25 November, 2014 (25.11.14)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/072810

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 6-341897 A (International Business Machines Corp.), 13 December 1994 (13.12.1994), paragraphs [0018] to [0019], [0025] to [0026] & US 5134276 A & EP 480182 A2	4, 5
Y	JP 2013-76770 A (Olympus Corp.), 25 April 2013 (25.04.2013), paragraphs [0049] to [0064]; fig. 6, 8, 9 & US 2013/0083322 A1	6, 7
Y	JP 2009-75063 A (Kobe Steel, Ltd.), 09 April 2009 (09.04.2009), paragraph [0019] (Family: none)	8

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2014/072810									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N21/59(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N21/00-21/74, G02B21/00-21/36											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2014年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2014年	日本国実用新案登録公報	1996-2014年	日本国登録実用新案公報	1994-2014年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2014年										
日本国実用新案登録公報	1996-2014年										
日本国登録実用新案公報	1994-2014年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X Y	JP 2001-228121 A (科学技術振興事業団) 2001.08.24, 【0053】-【0059】、【0075】、【0092】、図1、図5 & US 6549285 B1 & WO 2001/061321 A1 & CA 2368278 A	1, 2, 9, 10 3-8									
Y	JP 2009-150649 A (国立大学法人大阪大学) 2009.07.09, 【0032】、図5 & WO 2006/104237 A1	3									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 11.11.2014		国際調査報告の発送日 25.11.2014									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 波多江 進	2W 9508								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3250									

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2014/072810

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 6-341897 A (インターナショナル・ビジネス・マシーンス・コーポレーション) 1994.12.13, 【0018】 - 【0019】、【0025】 - 【0026】 & US 5134276 A & EP 480182 A2	4, 5
Y	JP 2013-76770 A (オリンパス株式会社) 2013.04.25, 【0049】 - 【0064】、図6、図8、図9 & US 2013/0083322 A1	6, 7
Y	JP 2009-75063 A (株式会社神戸製鋼所) 2009.04.09, 【0019】 (ファミリーなし)	8

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG

(出願人による申告)平成22年度、独立行政法人科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業チーム型研究(CREST) 研究領域「先端光源を駆使した光科学・光技術の融合展開」における研究課題「高性能レーザーによる細胞光イメージング・光制御と光損傷機構の解明」、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(72)発明者 川角 洸史

東京都調布市調布ヶ丘一丁目5番地1 国立大学法人電気通信大学内

Fターム(参考) 2G043 AA04 BA16 DA02 EA01 EA10 FA02 FA06 HA05 HA09 JA03

KA02 KA08 KA09

2H052 AA07 AA09 AC04 AC05 AC15 AC34

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。