# **JAIST Repository**

https://dspace.jaist.ac.jp/

Title	光和周波顕微鏡を用いた生物試料の非線形顕微分光に よる研究	
Author(s)	興山,涉	
Citation		
Issue Date	2016-03	
Туре	Thesis or Dissertation	
Text version	ETD	
URL	http://hdl.handle.net/10119/13525	
Rights		
Description	Supervisor:水谷 五郎, マテリアルサイエンス研究科 , 博士	



Japan Advanced Institute of Science and Technology

# 光和周波顕微鏡を用いた生物試料の 非線形顕微分光による研究

北陸先端科学技術大学院大学

興山 渉

## 博士論文

# 光和周波顕微鏡を用いた生物試料の

# 非線形顕微分光による研究

興山 涉

## 主指導教員 水谷 五郎

北陸先端科学技術大学院大学

マテリアルサイエンス研究科マテリアルサイエンス専攻

## 平成 28 年 3 月

#### Abstract

#### School of materials science, Wataru Kouyama

The sum frequency generation (SFG) microscopy uses the second order nonlinear effect excited by two laser beams with visible and infrared wavelength. This effect is sensitive to the symmetry of material's structure because it occurs only at non-centrosymmetric parts in the sample. Hence this microscope is expected to be useful in the observation of biomaterials because most biomolecules have chiral or non-centrosymmetric structure. However, until now SFG microcopies have not been completely successful in observation of several samples so far. Therefore, it is necessary to try to observe on as many different samples.

In this study, I used the two type biological samples, fish scale and cracked rice. These samples contain biomolecules such as collagen and starch. The collagen is included in fish scales, and the starch is included in cracked rice. The collagen and starch can generate relatively strong SFG signals.

The first discuss is about the fish scales. In this study, a scale of *Pagrus major* was used as the samples. Fish scales contain collagen. The collagen is a protein based on glycine, prolin, and hydroxyproline, and their chains are combine to form a triple-helical structure. Collagen is the main ingredient in the animal skin, bones, tendons, cartilage, and teeth. Because of such characteristics, the collagen is studied in the fields of anti-aging, food, cosmetics, healthy supplement, living body or medical materials such as an artificial cornea and vascular grafts. SFG spectra and SFG images have been observed on the fish scales. Compering to the collagen of Achilles tendon of a cow(*Bos Taurus*). The peak near 2950 cm<sup>-1</sup> in the fish scale SFG spectrum was assigned to the fish collagen. The two collagen spectra showed different line shapes and widths owing to a difference in the background nonlinearity. In the SFG image of the fish scale cross section, stronger signal was observed from the sea side than from the body side.

The second discussion is about the cracked rice. I observed SFG images of the rice kernels and the correlation between the cracking of rice and the molecular structure of amylopectin in them. The samples were the normal and the cracked japonica nonglutinous rice Koshihikari and Nipponnbare, which were cultivated at Shiga Prefecture Agricultural Technology Promotion Center. I attempted SFG spectroscopy in the C-H stretching vibration region for normal and cracked rice kernels. The rice kernels are including so much starch. The starch is composed of two components of homopolymers: amylose, a linear polimer of 1000 links glucose molecules, and amylopectin, a high branching polymer of 10,000-100,000 linked glucose molecules. The amylopectin molecule has complicated branch linkages and its molecular weight is much larger than that of amylose. Thus, the molecule allows for a lot of functional properties according to the variety of its structure. In Nipponbare, the width of the SFG spectrum C-H vibration peak at 2915cm<sup>-1</sup> of the cracked rice kernals was broader than that of the normal ones, while for Koshihikari there was no clear difference. The width of the 2015cm<sup>-1</sup> peak is suggested to originate from the variety of the higher-order structure of saccharide chains in amylopectin.

#### Key Words

nonlinear optics, sum frequency generation spectroscopy and microscopy, cracked rice, fish scale, starch, amylopectin collagen

i

#### 目次

第1章 序論		
1.1 研究の背景		
1.1.1 顕微分光法	3	
1.1.2 共焦点光和周波顕微鏡	5	
1.1.3 生物系試料を2次の非線形光学顕微鏡で測定する背景	9	
1.1.4 コラーゲンとデンプン	11	
1.2 研究の目的		
第1章参考文献		

第2章	理論的背景	19
2.1 非線形光学効果		19
2.2.1	非線形分極	19
2.1.2	2 光第2高調波発生,光和周波発生および光差周波発生の概要	20
2.1.3	3 位相整合	21
2.1.4	非線形感受率	25
2.1.5	・ 光パラメトリック過程の概要	27
2.1.6	5 非線形分極の対称性	28
2.1.7	光和周波発生と共鳴効果	29
2.1.7	波長程度の長さの媒質における SFG 光の発生と伝搬	30
2.1.8	3 高次の非線形分極	32
/// o		

第2章参考文献

第3章 実験系	34	
3.1 共焦点光和周波顕微鏡の概要	34	
3.2 共焦点顕微鏡の分解能		
3.3 使用光源		
3.4 共焦点光和周波顕微鏡の光学系	40	
3.4.1 共焦点光和周波顕微鏡の実験系	40	
3.4.2 光学系の詳細	41	
3.5 共焦点光和周波顕微鏡を用いた観察の手順	43	
3.5.1 SFG 光の検出の過程	43	
3.5.2 顕微像とスペクトルの測定手順	45	
3.6 赤外吸収スペクトルの測定手順		
第3章参考文献		

式料	49
既要	49
Ξ.	49
は構造	50
デンプン	51
イプンの概要	52
~プンの種類及び分子構造	53
ミロペクチンの合成	57
プンの SFG 分光による測定	58
既要	60
米	60
ココの構造	61
ラーゲンの分子構造	62
	株料 既要 要 本構造 デンプン イプンの概要 イプンの種類及び分子構造 ミロペクチンの合成 イプンの SFG 分光による測定 既要 # コの構造 ラーゲンの分子構造

第4章参考文献

第5章 実験結果	64
5.1 魚の鱗の測定結果	64
5.1.1 試料の準備	64
5.1.2 魚の鱗断面の SFG 測定	66
5.1.3 魚の鱗の SFG スペクトルの解析結果	68
5.2 胴割れ米と正常米の実験結果	72
5.2.1 試料の準備	72
5.2.2 コメの SFG スペクトルの測定結果	74

第5章参考文献

第6章	考察	81
6.1	魚の鱗に関する考察	81
6.2	コメ試料の SFG 測定に関する考察	83
第6章	参考文献	

第7章	結論と今後展望	8	6
第7章	結論と今後展望	8	6

謝辞	88

【付録】

博士副テーマ論文

第1章 序論

1.1 研究の背景

生き物を直接可能な限り生きている状態で実験すること,特に生体分子が生きている生物の中でどのように存在しそして振る舞うのかを実際に見ることは難しい作業である。なぜなら分子はあまりにも小さく当然人の目で見ることはできず,そのためには顕微鏡を使用する必要があるが,例えば光学顕微鏡では生物のそのままの細胞一個を見るのに十分な性能ではあるがその中で分子がどう振る舞っているかを見るには性能が足りず,また電子顕微鏡のような高解像度の顕微鏡は分子を見ることはできても,真空を必要とするなど生物が生きる環境からはかけ離れた環境を構築する必要があり,これも難しい。そのため生物を生きたまま直接測定する技術の開発,言い換えると生物を観測するための特殊な顕微鏡の開発は現在でも続いている。その一例が2014年にノーベル化学賞を受賞したBetzigらの顕微鏡である[1.1]。この顕微鏡は対象となる分子にレーザー光を照射し蛍光発光を起こし,分子の存在を検出するという蛍光顕微鏡の原理を下敷きとした顕微鏡である。しかし通常の蛍光顕微鏡では可視光領域の光を使う関係上一般的な光学顕微鏡の分解能(数 100nm)以下のものの識別が難しいのに対して,Betzigらの顕微鏡は可視光領域の光を使いながらも分子一個のレベル(数 nm から数+ nm)での測定を可能とした点で画期的であった。

蛍光を用いた顕微鏡は簡便な分子識別ができる顕微鏡であるが、多くの分子の蛍光は非 常に弱く、また強い蛍光を出す分子は限られているため、実際の測定には蛍光分子を測定 対象分子と結合させて測定を行うことになる。一方で、蛍光顕微鏡のように測定対象の分 子に手を加えるのと異なり分子の振動を検出して画像化を行うというラマン顕微鏡や赤外 顕微鏡が存在する[1.2]。

赤外およびラマン顕微鏡はそれぞれ赤外分光およびラマン分光法を用いて測定を行うが, どちらの手法においても分子振動を励起するという点で共通する。しかし,試料への光電 磁場の印加が行われたときに,ラマン散乱が分子分極率の変化を,赤外吸収は電気双極子 モーメントの変化を検出するというそれぞれ別の情報を検出するため,赤外とラマンの顕 微鏡が与える情報はそれぞれ異なったものとなる。

赤外およびラマン顕微鏡の利点は,試料に対して特別前処理等が必要なく測定できると いうことにある。しかし欠点として,ラマン顕微鏡においては,ラマン散乱が非常に微弱(蛍 光分子ではない分子の蛍光発光よりも弱い)であるため非常に強力な励起光を必要とし,そ のために試料に損傷が生じる可能性があること,赤外顕微鏡においては励起光が赤外領域 の光であるため,試料への損傷はないものの顕微鏡としての分解能が可視光を使う顕微鏡 と比べて非常に悪い(最小で数 µm 程度)ことが挙げられる。また赤外顕微鏡は水の赤外領域 での吸収が非常に強くそのため水中や水分の多い環境の測定には向かないため,生物の測 定には制約があるが,ラマン効果はこのような制約がないため,生物種の測定に効果的で, かつ分解能も通常の光学顕微鏡程度確保できるため,生物分野での研究においても一般化 しつつある [1.3]。

上記の顕微鏡はそれぞれ線形光学効果に基づく顕微鏡であるが、それとは別に電場の2 乗 3 乗に比例する効果を利用した顕微鏡も存在する。ここではそのうちの光第 2 高調波顕 微鏡について述べる。非線形光学はレーザーの開発からほどなく現象の発見に至り,光第2 高調波発生もレーザー発明の次の年の 1961 年に Franken らにより報告された[1.4]。そして この現象を利用した第2高調波発生顕微鏡も1978年にGannawayとSheppardによって開発 された[1.5]。光第2高調波発生は、ある媒質に強い光電磁場をかけた時に起こる光学効果で、 条件次第で入射光の 2 倍の周波数を持つ光が新たに発生する。この効果は基本的に媒質の 中心対称性が破れているときに起こる現象であるため、この現象を利用する光第 2 高調波 顕微鏡は、対称性の破れに起因する現象を可視化することができる。具体的には液体の水 は分子の形自身はよく知られているようにくの字型であり、反転対称性を持たないため対 称性の破れを持つが,液体の状態ではそれがランダムに存在するため,全体としてみると 反転対称性を持つ。しかし、何らかの物質の上に水滴として存在しているときはその物質 と接する面において、相互作用により水分子は一定の方向を向く。そのためこの界面にお いてのみ水は非対称性を持つこととなる。光第 2 高調波顕微鏡はそういった対称性の破れ た一部の部分からの情報を選択的に抽出することができる。光第2 高調波分光および顕微 鏡はそういった意味では表面界面の測定で力を発揮している顕微鏡である。しかしこの特 徴は生体分子の測定の場合においても効果的な場合がある。すなわち、生体分子は多くの 場合キラリティを持つため、完全に対称な分子構造となっていたりすることが少なく、多 くの場合測定が可能である。この顕微鏡の場合も赤外やラマン顕微鏡の場合と同様に試料 を前処理等することなく測定が可能で、条件によっては特定の分子を識別することも可能 であるが、上記の赤外やラマン顕微鏡と比べると分子の識別能力は弱い。なぜなら、この 顕微鏡の測定では分子の形状や向きの偏りを見るのみであるからである。しかし第 2 高調 波発生をより一般化した光和周波発生を利用すると分子の識別が可能となる。それについ てはのちに述べる。

ここまでいくつかの顕微鏡を例に挙げたが、これらの手法は全て顕微分光法という呼び 名で分類することができる。以下にこれらの分光法を順を追って説明していく。

 $\mathbf{2}$ 

#### 1.1.1 顕微分光法

顕微鏡は、一般に人の目に見えない小さなものを観察するための光学装置のことをさす が、顕微分光法というとそれとは異なる意味をもつ。具体的には、顕微分光法はそれ以前 に多く研究されてきた様々な分光測定法と顕微鏡を組み合わせた手法のことを指す[1.2]。分 光法は、ある程度の大きさを持つ試料を用意して、光を当て、その応答から試料の性質を 調べる手法である。分光装置自体は最低限、光源と試料とその応答を測定するための検出 器だけで構成できるため試料の状態は人の目で見ることのできる程度の大きさの分解能で しか情報を得ることができない。そのため、人の目で見ることの難しい小さな領域の測定 には何かしら別の装置を導入する必要がある。そのための装置として顕微鏡を用いれば、 その性質上数 µm 程度の領域の情報をえり分けて測定することが可能になる。例えば人が裸 眼で見ることのできる限界の大きさは個人差と年齢と体調にもよるが、概ね 100µm である ので数 µm であっても人の目に見える世界よりも小さな世界である。以上から、顕微分光法 は微小な領域の情報を得ることのできる手法であるといえる。

ここでいう顕微鏡とは基本的には光学顕微鏡のことを指す。光学顕微鏡はその起源は諸 説あるが、16世紀ころに発明されている[1.6]。光学顕微鏡は、2枚の凸レンズを組み合わせ るという簡単な構造でありながら、ヒトの目で見ることのできない小さなものを見ること ができた。光学顕微鏡の構造は単純なものであったが、精密さが求められるため、初期の 顕微鏡の倍率は数倍程度に過ぎなかった。その後の技術の高まりによって顕微鏡の倍率は 1000倍程度まで向上し、概ね数 100nm までのものを簡単に見ることができるようになった。 しかし、20世紀の初頭には光学顕微鏡の分解能は理論限界に達してしまったため光学顕微 鏡の分解能向上の研究は電子顕微鏡のほうに移っていった。電子顕微鏡は、原子一つを見 ることのできる顕微鏡ではあるが、一方で制限も多く、例えば生き物を生きたまま直接観 察したり、水中に置かれた試料を測定したりするといったことが難しいため、解像度が低 いが測定対象に対する制限が少ない光学顕微鏡のような一般性を得ることはできていない。 そのため光学顕微鏡はいまだに微小なものを分析するためのツールとして重要な位置を占 めている[1.2]。

光学顕微鏡の限界分解能は光源の波長により決まるため、単純に X 線のような波長の短い光を使うことで解像度を高めることができる[1.7]。しかし、物質は光源により様々な応答を見せるので、それらに合わせて様々な種類の顕微鏡が考案された。

一般的に顕微鏡は目に見えないような小さなものを見るための手法として知られている が、本研究で用いる顕微分光法は光学顕微鏡に様々な分光技術を応用することで微小領域 の物性を調べる手法である[1.2]。そのため、この手法では対象試料の画像化と分光法と同様 の試料解析を一つの装置で行うことになる。顕微分光法として知られる装置は、多くはそ れが開発される以前に確立された分光技術を応用したものである。例を挙げるとラマン分 光法を応用したラマン顕微鏡、赤外吸収分光法を応用した赤外顕微鏡、蛍光分光法を利用 した蛍光顕微鏡、近接場光学を利用した近接場光学顕微鏡などが存在する。ラマンや赤外 顕微鏡のように比較的長い歴史と膨大なデータの蓄積がある分光法を用いた顕微鏡はすで に製品化され比較的容易に測定が行えるが、レーザーの発明により初めて測定が可能とな った非線形分光法など比較的新しい技術を用いた顕微分光法は分光法自体が発展途上でも あるため、多くの発展余地を残している状況である。

本研究で用いる共焦点光和周波顕微鏡は非線形分光法の一種である 2 次非線形光学分光 法を利用した顕微鏡となっている。2 次の非線形光学は入射電場の二乗に比例して起こると いう光学現象で、インプットとアウトプットが単純な比例関係で表すことのできない非線 形現象である。共焦点光和周波顕微鏡においては、2 次の非線形光学効果のうちの光和周波 発生(Sum Frequency Generatio:SFG)を利用する。この手法は 2 種類の電場を用いることが大 きな特徴である。本研究では特に分子からの情報を得るために分子の振動と共鳴する赤外 領域の波長の電場を用いている。

顕微分光法を用いると光源の特性を反映した像を得ることができるが、それだけでなく 分光器としても働かせることもでき、さらに顕微鏡観察との併用で測定箇所を厳密に決め ることも可能である。本研究で用いる共焦点光和周波顕微鏡は、特定領域の分子振動を可 視化できることを特徴としている。光和周波顕微鏡は多くの場合、対称性の破れた表面・ 界面の研究に多く用いられているが、キラリティのあるような媒質の測定においても力を 発揮している。

#### 1.1.2 共焦点光和周波顕微鏡

共焦点光和周波顕微鏡は、上に述べた顕微分光の手法をとることのできる顕微鏡として 開発された。基本的には、1999年にFlörsheimerらにより開発された光和周波顕微鏡[1.8]と 同様の顕微鏡であるが、大きな特徴としては結像光学系に共焦点機構を採用している点で ある。この機構の採用により、理論分解能の向上が図られることなどの恩恵を受けている。 まずは光和周波顕微鏡について説明をする。

#### (1) 光和周波(SFG)顕微鏡

光和周波(SFG)顕微鏡は光和周波発生(Optical Sum Frequency Generation :SFG)と呼ばれる 現象を利用した顕微鏡である。光和周波発生は 2 つの励起光電場を同時に媒質へ照射した ときに入射光の和の周波数の光が新たに発生する現象である。入射光の波長に特に制約は ないが、本研究では入射光の一つを可視光、もう一つを赤外光とするやり方を用いる。こ うすることで赤外光と分子の振動との共鳴を起こすことができるので、振動分光を行うこ とができるようになる。これは可視-赤外光和周波分光法と呼ばれるものである[1.9]。光和 周波顕微鏡はこの原理を応用したものである。

振動分光法を利用した顕微鏡は振動分光顕微鏡と呼ばれる。このタイプの顕微鏡の代表 はラマン顕微鏡と赤外顕微鏡である。それぞれラマン分光法,赤外吸収分光法の原理を応 用し分子振動を画像化できる顕微鏡である。光和周波顕微鏡も赤外光を用いて分子振動と 共鳴を取るため振動分光顕微鏡である。それぞれに特徴があるが,光和周波顕微鏡の特徴 として大きなものは,対称性の破れに敏感であるという点にある。この特徴によって,媒 質の対称性の破れを可視化することができ,さらに振動分光によって物質種の識別も行う ことができる。さらに,SFG発生では基本的に入射光よりもSFG光の方が波長は短くなる ため,振動分光顕微鏡としての分解能は赤外吸収顕微鏡よりも大幅に向上する。

Flörsheimer らによって光和周波顕微鏡が開発(Fig.1.1)されたとき、その時の論文で測定対象とされていた試料はLangmuir-Blodgett(LB)膜であった(Fig. 1.2)。この膜はプリズムに1分子層のみ塗布された状態で存在し、背面から入射した可視光と分子振動に共鳴する赤外光を入射させ、SFG光を結像させている[1.8]。一般に赤外分光顕微鏡は試料にある程度の厚みを必要とするが、この研究結果から明らかなようにSFG顕微鏡では単分子層からのSFG光の画像化が可能である。

SFG 顕微鏡の研究は最初の研究成果が発表されてから 2000 年の Shen らの有機結晶の測 定[1.9](Fig.1.2)、2003 年の Kuhnke らの自己組織化膜の測定[1.10](Fig.1.3)などが続いた。 その後も SFG 顕微鏡の研究報告は続き、年々増加傾向にあるが、これまでに発表された論文 は全部で 100 例程度に過ぎない。その数は年数百件論文が発表されている光和周波分光法 の研究よりも明らかに少ない。その原因は単純には研究グループの数が少ないことである が,顕微鏡構築には SFG 分光の光学系に追加して結像光学系を組まなければならないため, SFG 分光よりも研究開始のハードルが高いこと、さらにより本質的には, SFG 顕微鏡の将 来性がまだ十分に認識されていないためであろう。



Fig.1.1 Flörsheimer らの SFG 顕微鏡の光学配置(試料回り)[1.8]



Fig.1.2 LB 膜の SFG 顕微鏡像[1.8]



Fig.1.3 有機結晶の SFG 像[1.9]



Fig.1.4 自己組織化膜の SFG 顕微鏡測定の結果[1.10]

(2) 共焦点光和周波顕微鏡

光和周波顕微鏡の現状は前記の通りであるが,ここでは本研究で用いる顕微鏡,共焦点 光和周波顕微鏡について簡単に説明する。

光和周波顕微鏡は単純には上に挙げたような光和周波顕微鏡の結像光学系に共焦点光学 系を組み込んだものである。共焦点機構を持つ共焦点顕微鏡自体は、1957年にアメリカの Marvin Minsky により発明された古くから存在する顕微鏡である[1.11]。

一般に光学顕微鏡の分解能は対物レンズの開口数と光源の波長で決まるが,これは厳密 には光源と光学系が理想的な状態の場合のみ達成される。それゆえ,光源が理想的でない 通常の光学顕微鏡の分解能は理論分解能よりも悪くなってしまう。共焦点顕微鏡は光源を 理想的な点光源として扱えるように考え出された顕微鏡である。

一般的な回折限界の理論は光源が点光源の単色光である場合に達成される。共焦点顕微 鏡は試料を照らす光源を点光源とするために小さなピンホールを用いる。同時に,試料上 の焦点以外からの散乱光などの混入によるコントラストの低下を防ぐために結像光学系に もピンホールを配置する。こうすることで,理想的な試料上の一点の情報のみを得ること ができる。この光学系は対物レンズと結像光学系の焦点が共役となることから,共焦点機 構と呼ばれる。この共焦点機構により回折限界をわずかに超える分解能をもつ。また、一 般的な光学顕微鏡では対物レンズの焦点を物質内部へ移動させると画像としてはぼけてし まうが、共焦点顕微鏡では、ピンホールによりぼけが取り除かれ鮮明な画像を得ることが できる。つまり共焦点顕微鏡は試料の表面(平面分解能)だけでなく内部の方向への分解能 (深さ分解能)を持っている。

しかし共焦点顕微鏡は高解像度化の影響で一回の測定で観察できる範囲が極めて狭いた め、広範囲の1個の画像として出力するためには試料上を走査する必要がある。こうして 得られた画像は試料を焦点面で輪切りにした2次元像であるが、同じ範囲で深さのみを順 次変えて画像を取りそれを重ね合わせることにより3次元像を構築することも可能である。

共焦点和周波顕微鏡は上記 2 つの顕微鏡の特長を併せ持つ顕微鏡となっている。すなわ ち,対称性のない媒質からのみ信号を得られることと同時にその媒質の振動分光を行える こと,分子振動と共鳴する波長の光を短波長の光へ変換するため振動分光顕微鏡として高 分解能を持つこと,共焦点機構によりさらに高解像度化を図り,理論的には回折限界を超 える分解能を持つことができること,3次元分解能を持つこと,これらの特長を一つの装置 の中に併せ持つ。このような顕微鏡は世界でも北陸先端大にある1台のみである。

このような多くの特徴を持つ顕微鏡ではあるが、開発されてから日が浅いため、装置の 適用例は決して多くなく、測定を成功させた試料は ZnS[1.12]、モチ米[1.13]、セルロース [1.14]のみとなっている。このため本顕微鏡の応用可能性の余地はまだ多く残されたままで ある。 1.1.3 生物系試料を2次の非線形光学顕微鏡で測定する背景

2 次の非線形効果はレーザーの黎明期から知られているためその分光法の研究は比較的 長い歴史の積み重ねがある。もともと 2 次の非線形光学はキラリティを持つ分子系で特異 的に起こすことができるため、少なからず研究例が存在する。例えば、Roth らによるコラ ーゲンの SHG 顕微鏡測定[1.15]、Mizutani らのグルコース、アミロペクチン、デキストリン の SFG 顕微鏡測定[1.16]、Sakai らによる人の髪の毛の SFG 顕微鏡測定 [1.17]などがある。 これらの生体試料は固体表面・界面の測定と異なり、全体的に大きく複雑な構造を持って いることが多い。そのため、生物試料の非線形分光ではレーザー光の光電磁場によって分 極が生じそこから非線形信号が発生するといった単純な効果だけではなく、分子の高次構 造等の影響により多様な結果を得ることができる。例えば、植物を使った測定において、 多くの人々が一口にデンプンと総称する試料において、植物の種類により異なる SFG 応答 が測定される[1.18](Fig.1.5)。ここの研究では、A タイプ、B タイプと分類されるアミロペク チンを比較しそれぞれを SFG 分光により見分けている。このように SFG 分光では分子の高 次構造を判別することができるため、構造が物性に大きく寄与するような系での測定に威 力を発揮できると考えられる。



Fig.1.5 デンプンの SFG スペクトル(a)えんどう豆(A-タイプアミロペクチン), (b)Hylon VII デ ンプン(B-タイプアミロペクチン)(c), (d)アミロース[1.18]

1.1.4 コラーゲンとデンプン

(a)コラーゲン

コラーゲンは全ての多細胞生物に存在し、ほとんどすべての結合組織の主要構成成分で 動物体タンパク質の 25%を占める。コラーゲンは主にグリシン・プロリン・ヒドロキシプ ロリンという3種類のアミノ酸からなり、これらが直鎖状に結合しさらに直鎖が3本集ま って3重らせん構造をとっている(Fig.1.7)[1.19]。コラーゲンを骨格に動物は体組織を形成し ているため、コラーゲンを理解することは生き物を理解するうえで欠かせない。

コラーゲンの特性は生物が棲む環境により変わる。例えば、コラーゲンのらせん構造は 一定温度以上で分解されるが、その温度が生物種により異なる。一般に陸上生物ではその 温度が高く、水中生物で温度が低い傾向にある[1.20]。2次の非線形光学顕微鏡観察におい て多く観察されてきたものはラットのしっぽである[1.21],[1.22]。

コラーゲンを利用する商品をつくる場合,ヒトに近い陸棲生物由来のものでは感染症と いうリスクを常に考えなければならないが,ヒトから遠い水棲生物由来のコラーゲンでは そのリスクは小さくさらに鱗のような器官に存在するコラーゲンでは不純物も少ないため 注目されている[1.23]。

本研究で用いるマダイはその学名(Pagrus Major: パグルス・マヨル/大きな鯛)が示す通り 成長すると 1m に達する大きな魚である。マダイは日本近海に多く生息し、日本国内におい てはよく知られた魚である。体の大きさに比例してその鱗も大きく、厚さも数 100 µ m にな る。また、魚の持つ鱗は鋼鱗と軟鱗に分けられるが、マダイは前者に区分される。マダイ のウロコはまた少量のキチンを含む。



(b)デンプン

植物中のデンプンの観察は、学校の理科の教育課程において一般的に行われてきたこと である。しかしその時に使われる手法はヨウ素デンプン反応によってデンプンを着色する というものであり、一般的な光学顕微鏡では着色することによってしかデンプンを選別す ることができない。デンプンを始めとした生体由来の物質は基本的に非対称な構造を持ち、 物質の非対称な構造を観察できる 2 次非線形光学顕微鏡で観察可能である。植物中のデン プンは初めシャジクモにおいて第 2 高調波顕微鏡により観察され[1.32]、その後光和周波顕 微鏡を用いた研究により信号の発生源がデンプンの一種であるアミロペクチン(Fig.1.7)で あることが確認された[1.24]。その後アミロペクチン 100%のデンプンを持つモチ米の胚乳 から強い SFG シグナルの発生が確認された。米中のアミロペクチンだけでなくグルコース を初めとした各種糖類(マルトース、フルクトース、セルロース等)の SFG 測定も成功して いる[1.25]。

本研究ではコメを試料として用いるが、コメは大きく分けてジャポニカ種とインディカ 種に分けられる。稲作は各地に伝搬していく中で、その土地の気候に合った種が取捨選択 され現在にいたる[1.26]。

日本で栽培されているうるち米とモチ米はともにジャポニカ種の一種である。両者の形 態は大きく異なる。モチ米はうるち米と違い、胚乳が収穫後の乾燥に伴ってりよく化(ハゼ る)し、白色不透明なものとなっている[1.27]ほかにも、うるち米のデンプンは直鎖上で粘り 気の少ないアミロースと、分岐が多く粘り気の強いアミロペクチンという2種類の糖が混 ざったかっこうのデンプンを持つが、モチ米の胚乳においてアミロースの割合はわずかで あり、デンプンはほぼ全てアミロペクチンからなる。当然このような胚乳における組成の 違いから、物理化学的な性質にも違いが生じる。

デンプンの物理化学的な性質は品種による違いだけではなく,栽培環境によっても変化 する可能性があり特に高温登熟障害と呼ばれる一種の不良米の発生は栽培されるイネの品 質にかかわる問題となっている。本研究で取り上げるイネの高温登熟障害は、イネの登熟 期に高温にさらされることにより、本来収穫されるべき米とは異なる米質を持った米がで きてしまう障害である。主な症状としては、未熟粒,胴割れ粒の発生等がある。これらの 異常の発生は収穫米の整粒歩合を低下させることになる。異常のない整粒が多いほど,も しくは整粒以外の異常米の割合が少ないほど良い米とされ,玄米の品位検査においても高 い検査等級となる。具体的には整粒歩合が 70%を下回ると 2 等米と格付けされ,米の買い 取り価格が下がってしまうため農家にとって打撃となる。[1.28]

これらの障害の発生要因は以前から研究されてきており、未熟米に関してはデンプンの 合成と蓄積に原因があることがわかっている。一方で胴割れ米の場合その原因としては夏 場の高温や収穫時期の遅れによる発育のしすぎというものがあるが、ほかにも登熟初期の 高温が穎果の急激な成長をもたらし、そのことが胚乳構造やデンプン蓄積特性に何らかの 影響を及ぼして胴割れしやすい米質になっていることが推察されている。[1.29] 一方、米に含まれるイネデンプンはそれ自体興味深い物性や化学的性質を持つ物質であ る。デンプンは光合成最終産物として、葉緑体に蓄積されうる同化デンプンと、長期貯蔵 に適した器官に蓄えられる貯蔵デンプンの2種類のデンプンが存在する。米に含まれるイ ネデンプンは同化デンプンである。イネデンプンには大きく分けてアミロースとアミロペ クチンがあり、これらはイネの発芽に必要なエネルギー源として胚乳へ蓄えられている。

デンプンはさらに特有の形状とサイズを持つデンプン粒を形成する。水に入れると沈殿 し、これを加熱すると、デンプン粒は膨潤し粘性が急激に高まり糊状になる。さらに過熱 するとデンプン粒が壊れ、内部にパックされたアミロペクチン分子やアミロース分子が飛 び出してくる。このような性質を持つため洗濯糊のように古くから食用以外の用途でもデ ンプンは利用され、現在でも多数の工業製品が作られている。

最近では、個体の持つ遺伝情報を改変し自然界にはない構造を持ったデンプンを作り出 す試みがある。こうした試みによりこれまでとは一味違った物性を持つデンプンが生み出 されている。現在食品以外で使われる植物由来の製品は紙のように古くからあるものが主 流であるが、プラスチック製品を置き換えるなどしてデンプンを使って作られる製品が増 えていく可能性は大いに存在する[1.29]。



Fig. 1.7 アミロペクチンの構造[1.30]

1.2 本研究の目的

光和周波顕微鏡は特定の媒質の特定の場所の情報を特異的に取得することのできる顕微 鏡であるが、これまでになされた研究の多くが、表面・界面の研究や分子科学的な研究分 野での利用が多く、それ以外の分野への広がりはまだ少ないのが現状である。そのため、 本研究の基本的な目的は、2次非線形光学顕微鏡の一種である共焦点光和周波顕微鏡の生物 学分野への適用可能性を評価することにある。光和周波発生を含む 2 次の非線形光学はレ ーザーの誕生とともに発展しすでに 50 年以上の歴史を持つが、分光法としては表面界面の 分野の研究ではよく利用されているが、生物学分野での利用は増えてきているもの、研究 するグループが少ないこともあって発展可能性を残している状況である。具体的な研究内 容としては、多くの生物由来の分子がキラリティを持つことから 2 次非線形効果が許容で ある点を利用し、生物試料を直接観察する好例を確立する。

特に本研究では以前の研究において単体の測定実績があるコラーゲンとデンプンを対象 にし、それを含む生体試料である魚鱗(コラーゲン)及びコメ(デンプン)の測定を行った。本 研究の測定は特に C-H 振動の領域に着目して測定を行った。この領域は隣接する O-H 振動 の領域と重なってしまっているため IR 分光においては詳細を把握することは難しいが、 SFG 分光においては O-H 振動の影響が小さいため C-H 振動領域のより詳細な解析が可能で あると考えられるからである。

コメ中のデンプンはアミロースとアミロペクチンからなり,特にアミロペクチンは品種 により性質が異なる物質で,その違いはアミロペクチンの分子鎖の長短などの構造の違い によるものと考えられている。光和周波発生を用いる測定法は基本的に構造に敏感な手法 であり、こういったアミロペクチンの構造の違いを SFG 測定により読み取り,正確に解析 をすることができれば,大きく複雑で解析の難しいアミロペクチンの理解を深めることが できると考えられる。今回は高温登熟障害の一種である胴割れ米とそうでない正常なコメ とを比較し本顕微鏡の評価を行った。

他方,魚鱗に関しては,鱗中のコラーゲンをターゲットとした測定を行う。コラーゲン は2次の非線形光学顕微鏡においてよく用いられる評価試料であるが,その多くはラット の尾の腱であり,陸上の動物のものである。しかし,生き物は魚のような水棲の生き物の 方が多く存在し,資源としての利用できる量も魚の方が多く簡単である。しかしながら, 魚由来のコラーゲンを常温で測定することは構造が壊れてしまい和周波発生が起こらなく なるため難しい。そのため魚の鱗中に存在するコラーゲンの測定を行うことで,陸上の生 物由来のコラーゲンと比較を行う。これらを通して本顕微鏡のポテンシャルを明らかにす ることが本研究の大きな目的である。 第1章参考文献

[1.1]Eric Betzig, George H. Patterson, Rachid Sougrat, O. Wolf Lindwasser, Scott Olenych, Juan S. Bonifacino, Michael W. Davidson, Jennifer Lippincott-Schwartz, Harald F. Hess, Science 313, 1642-1645 (2006)

[1.2]日本分光学会編『分光測定入門シリーズ第 10 巻 顕微分光法-ナノ・マイクロの世界 を見る分光法』(2009)

[1.3] Christian W. Freudiger, Wei Min, Brian G. Saar, Sijia Lu, Gary R. Holtom, Chengwei He, Jason C. Tsai, Jing X. Kang, and X. Sunney Xie, Science 322, 1857-1861 (2008)

[1.4] P.A. Franken, A.E. Hill, C.W. Peters, and G. Weinreich, Physical review letters Volume 7, 118-120(1961)

[1.5] J.N. Gannaway, and C.J.R. Sheppard Oprical and Quantum Electronics 10 435-439 (1978)

[1.6]http://www.nobelprize.org/educational/physics/microscopes/timeline/index.html

[1.7] D.Sayre et al. Acta Cryst. A51, 237-252 (1995)

[1.8] M. Flörsheimer, C. Brillert, H. Fuchs, Materials Science and Engineering C 8–9, 335–341(1999)

[1.9] Y. Shen, J. Swiatkiewicz, J. Winiarz, P. Markowicz and P. N. Prasad, Applied Physics Letters Vol.77 2946-2949 (2000)

[1.10] K. Kuhnke, D.M.P. Hoffmann, X.C. Wu, A.M. Bitter, K. Kern, Applied Physical Letter Vol.83(2003)

[1.11] M.Minsky U.S. Patent No 3,013,467, (1961)

[1.12] K. Locharoenrat, H. Sano, G. Mizutani , Phys. Status Solidi C 6, No. 1, 304 (2009).

[1.13] H.Y.Li et al., Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology 2012, 3, 286-291 (2012)

[1.14] H. C. Hieu et al, Applied Spectroscopy, 65(11): 1254-1259 (2011)

[1.15] S Roth, I Freund, The Journal of chemical physics 70, 1637-1643 (1979)

[1.16] G. Mizutani, , T. Koyama, S. Tomizawa, H. Sano, Spectrochimica Acta Part A, 62 845-849(2005)

[1.17] M. Sakai, K. Kikuchi, M. Fujii, Chemical Physics Vol. 419 261–265(2013)

[1.18] L. Kong, C. Lee, S. H. Kim, G. R. Ziegler, The Journal of Physical Chemistry B, 118, 1775–1783(2014)

[1.19] D. Voet, J.G. Voet, C.W. Pratt, Fundamentals of Biochemistry Third edition (Wiley, Hoboken, New Jersey, 2006).

[1.20] Y. Nomura, et al. Biosci Biotechnol Biochem. 60, 2092 (1996).

[1.21] S. Roth, et al. J. Chem. Phys. 70, 1637 (1979).

[1.22] S.J. Lin, et al. Proc. SPIE 6084, Optical Interactions with Tissue and Cells 17, 60840S (2006).

[1.23] Y. Miyauchi et al., J. Opt. Soc. Am. A 23, 1687-1690 (2006)

[1.24] H. C. Hieu et al, Applied Spectroscopy, 65(11): 1254-1259 (2011)

- [1.25] 佐藤洋一郎『DNA 考古学』東洋書店(1999)
- [1.26] 萩野知美ほか日本作物学会関東支部会報 (15), 34-35, 2000-12-01
- [1.27] 森田敏日本作物学会紀事第 77 巻(2008)
- [1.28] K.Nagata et al. Japanese Journal of Crop Science. 73 336-342 (2004)
- [1.29] 中村保典 化学と生物 Vol. 44 No.3 (2006)

[1.30] A. Buléon, P. Colonna, V. Planchot, S. Ball, International Journal of Biological Macromolecules Vol.23 85-112(1998)

[1.31] 日本学術振興会マイクロビームアナリシス第 141 委員会『マイクロビームアナリシ ス・ハンドブック 第2章』オーム社(2014)

[1.32] G. Mizutani, Y. Sonoda, H. Sano, M. Sakamoto, T. Takahashi, S. Ushioda, Journal of Luminescence Vol. 87 824–826(2000)

[1.33] A. Bhattacharjee, and M. Bansal, IUBMB Life, Vol. 57, 161–172 (2005)

第2章 理論的背景

2.1 非線形光学効果

#### 2.1.1 非線形分極

非線形光学で対象となる光と物質はともに粒子性と波動性の両面を持つ。そのため、光 も物質も究極的には量子論を用いて正確に記述できるが、問題によっては光を古典的な電 磁波として扱うことで近似的に記述できる。この場合、現象は入射光電場 E による物質の 電気分極 P の生成と電気分極による物質からの出力光波の生成、の 2 つの過程に分けて取 り扱える。

多くの場合光電磁場に対する物質の応答は電気分極 P の生成として記述される。このと きの関係式は電磁気学により、

$$\mathbf{P}(t) = \varepsilon_0 \chi \mathbf{E}(t) \tag{2.1.1}$$

と比例関係で表わされる。このとき χ は電気感受率と呼ばれる比例定数である。この関係は 入射電場 E が小さい場合の極限である。しかし一般に P と E の関係は線形ではなく非線形 である。E の効果があまり大きくない場合, P と E の関係は以下のようにあらわされる。

$$\mathbf{P}(t) = \varepsilon_0 \chi^{(1)} \mathbf{E}(t) + \varepsilon_0 \chi^{(2)} \mathbf{E}(t) \mathbf{E}(t) + \varepsilon_0 \chi^{(3)} \mathbf{E}(t) \mathbf{E}(t) \mathbf{E}(t) + \cdots$$
$$= \mathbf{P}^{(1)} + \mathbf{P}^{(2)} + \mathbf{P}^{(3)} + \cdots$$
(2.1.2)

となる。式中の $\chi^{(2)}\chi^{(3)}$ はそれぞれ、2次、3次の非線形感受率と呼ばれる。 $\mathbf{P}^{(2)}\mathbf{P}^{(3)}$ はそれぞれ 2次、3次の非線形分極という。また E も P もベクトルであるため非線形感受率はテン ソル量となる。

本研究では**P**<sup>(2)</sup>に由来する2次の非線形光学効果を用いている。

2.1.2 光第2高調波発生,光和周波発生および光差周波発生の概要

光和周波発生は、2 つの異なる周波数の光が物質に入射したときにおこる現象である。2 次の非線形分極 **P**<sup>(2)</sup> は式(2.1.2)より

$$\mathbf{P}^{(2)}(t) = \varepsilon_0 \boldsymbol{\chi}^{(2)} \mathbf{E}(t) \mathbf{E}(t)$$
(2.1.3)

である。今、入射電場が2つの周波数成分の和である時

$$\mathbf{E}(t) = E_{10} \cos \omega_1 t + E_{20} \cos \omega_2 t \tag{2.1.4}$$

この電場が作る2次非線形分極**P**<sup>(2)</sup>は

の関係が成り立つ。

$$\mathbf{P}^{(2)}(t) = \varepsilon_0 \chi^{(2)} \left[ \cos \omega_1 t + \cos \omega_2 t \right]^2 = \frac{\varepsilon_0 \chi^{(2)}}{2} \cos(2\omega_1) t + \frac{\varepsilon_0 \chi^{(2)}}{2} \cos(2\omega_2) + \varepsilon_0 \chi^{(2)} + 2\varepsilon_0 \chi^{(2)} \cos(\omega_1 + \omega_2) t + 2\varepsilon_0 \chi^{(2)} \cos(\omega_1 - \omega_2) t$$
(2.1.5)

となる。各項のうち  $2\omega_1$ ,  $2\omega_2$  を含む項は入射光それぞれの第 2 高調波発生(Second harmonic generation: SHG), 周波数  $\omega$  を含まない項は光整流、 $\omega_1+\omega_2$ を含む項は光和周波発 生(Sum frequency generation: SFG)、 $\omega_1-\omega_2$  を含む項は差周波発生(Difference frequency generation: DFG)と呼ばれる現象にそれぞれ該当する。今,  $\omega_1+\omega_2 \in \omega_{SFG}$ ,  $\omega_1-\omega_2 \in \omega_{DFG}$ とあらわすと, 周波数に関してそれぞれ

$$\mathbf{k}_{2} + \mathbf{k}_{2} = 2\mathbf{k}_{2}(SHG)$$

$$\mathbf{k}_{1} + \mathbf{k}_{2} = \mathbf{k}_{SFG}(SFG)$$

$$\mathbf{k}_{1} - \mathbf{k}_{2} = \mathbf{k}_{DFG}(DFG)$$
(2.1.7)

の関係となっている。実際の SHG 光, SFG 光および DFG 光はこの方向に出射される。入 射光がすべて同軸の場合は入射光の反射光と SFG 光等は同軸に出射される。ただし,入射 光と発生する SFG 光などは全て周波数が異なるため,媒質に対して垂直入射する場合を除 き完全に一致することは複屈折結晶などの特殊な場合を除き無い。また,実際に SFG 光等 が発生するためには,次節に説明する位相整合条件も必要になる。 2.1.3 位相整合

ここでは、非線形分極によって生じる SFG 光がどのように伝搬するか実際に方程式を解いて考える。

(1) 非線形分極を発生源とする波動方程式の導出

まず、Maxwell 方程式は外部電流iを無視して

$$\nabla \times \mathbf{E} + \frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t} = 0$$

$$\nabla \times \mathbf{H} = \frac{\partial \mathbf{D}}{\partial t}$$

$$\nabla \cdot \mathbf{D} = \rho$$

$$\nabla \cdot \mathbf{B} = 0$$
(2.1.8)

となり、また電束密度 D を

$$\mathbf{D} = \varepsilon_0 \mathbf{E} + \mathbf{P}^L + \mathbf{P}^{NL} = \varepsilon_{SF} \mathbf{E} + \mathbf{P}^{NL}$$
(2.1.9)

とおく。

式(2.19)の第1式に $\vec{\nabla}$ ×をかけると

$$\nabla \times \nabla \times \mathbf{E} + \nabla \times \frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t} = 0$$

$$\therefore \nabla (\nabla \cdot \mathbf{E}) - \mathbf{E} (\nabla \cdot \nabla) + \nabla \times \frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t} = 0$$
(2.2.10)

ここで、等方媒質中ではk L E であるので

$$i\mathbf{k} \cdot \mathbf{E} = 0 \leftrightarrow \nabla \cdot \mathbf{E} = 0$$

となり、また磁場 B は**B** = µ<sub>0</sub>**H** であるので、式(2.1.8)の第 2 式、式(2.1.9)を式(2.1.10) 式へ代入し整理すると波動方程式

$$\nabla^{2}\mathbf{E} - \mu_{0}\varepsilon_{SFG}\frac{\partial^{2}\mathbf{E}}{\partial t^{2}} = \mu_{0}\frac{\partial^{2}\mathbf{P}^{NL}}{\partial t^{2}}$$
(2.1.11)

が導かれる。

非線形な光学応答をする媒質中に周波数の異なる 2 つの波が入ってきたと考えて、媒 質中で発生する SFG 光の強度を求める。伝播する電磁波の作る非線形分極を

$$\mathbf{P}^{NL} = \chi^{(2)} (E_1 e^{i(k_{\omega_1} z - \omega_l t)} E_2 e^{i(k_{\omega_2} z - \omega_2 t)})$$
  
=  $\chi^{(2)} E_1 E_2 e^{i(k_{\omega_1} + k_{\omega_2}) z - i(\omega_l + \omega_2) t}$  (2.1.12)

とし、式(2.1.11)へ代入する。また、空間微分は z のみを残し、電場は x 方向のみを考える。すると。式(2.1.11)は

$$\frac{\partial^2 \mathbf{E}_{SFG}}{\partial z^2} - \mu_0 \varepsilon_{SFG} \frac{\partial^2 \mathbf{E}_{SFG}}{\partial t^2} = \mu_0 (-\omega^2 SFG) \chi^{(2)} \mathbf{E}_1 \mathbf{E}_2 e^{i(k_{\omega_1} + k_{\omega_2})z - i(\omega_1 + \omega_2)t}$$
(2.1.13)

となる。ただし、 $\omega_{SFG} = \omega_1 + \omega_2$ とし、 $E_{SFG}$ は発生する SFG 光の x 方向の電場振幅とする。

(2) 波動方程式の同次解

媒質中で自由に振動する波の電場振幅 E<sub>H</sub>を求める。 同次解 E<sub>H</sub>を満たす方程式は式(2.3.6)の右辺を0にした同次方程式

$$\frac{\partial^2 \mathbf{E}_{SFG}}{\partial z^2} - \mu_0 \varepsilon_{SFG} \frac{\partial^2 \mathbf{E}_{SFG}}{\partial t^2} = 0$$
(2.1.14)

である。これは自由な平面波の従う方程式である。この方程式の解は

$$E_{H} = E_{H0} e^{i(k_{SF}z - \omega_{SF}t)}$$
(2.1.15)

となる。ただし、分散関係

$$ck_{SFG} = \sqrt{\frac{\varepsilon_{SFG}}{\varepsilon_0}}\omega_{SFG} \qquad (k_{SFG} = \sqrt{\mu_0 \varepsilon_{SFG}}\omega_{SFG}) \qquad (2.1.16)$$

が成り立つことが必要になる。

(3) 波動方程式の非同次解

非線形分極によって媒質中で強制的に振動する波の電場振幅 E<sub>IH</sub> を求める。 非同次解 E<sub>IH</sub>の満たす方程式は式(2.1.13)そのものである。 式(2.1.13)の解は

$$E_{IH} = E_{IH0} e^{i(k\omega_1 + k\omega_2)z - i\omega_{SFG}t}$$
(2.1.17)

となる。ただし、

$$E_{IH0} = \frac{\mu_0 \chi^{(2)} E_1 E_2 \omega^2_{SFG}}{(k_{\omega_1} + k_{\omega_2})^2 - \mu_0 \varepsilon_{SFG} \omega^2_{SFG}}$$
(2.1.18)

となることが必要である。

(4) SFG 光の電場振幅と位相整合条件

SFG 光の電場振幅 Esr は波動方程式の一般解であり、これまで求めた同次解 En と非同 次解 En の線形結合、

$$E_{SFG} = E_{III} + cE_{II} \tag{2.1.19}$$

となる。(cは任意の定数)

ここで、初期条件はz=0のとき $E_{sFG}=0$ であるので式(2.1.19)、式(2.1.17)、式(2.1.15) より

$$cE_{H0} = -E_{IH0}$$

が求まる。従って SFG 光の電場振幅 EsF は

$$E_{SFG} = E_{IH0} \left[ e^{i(k_{\omega_1} + k_{\omega_2})z - i\omega_{SFG}t} - e^{ik_{SF}z - i\omega_{SFG}t} \right]$$
(2.1.16)

となり、整理して

$$E_{SFG} = E_{IH0} 2i \sin\left(\frac{(k_{\omega_1} + k_{\omega_2} - k_{SFG})z}{2}\right) e^{\frac{i(k_{\omega_1} + k_{\omega_2})z + ik_{SFG}z - i2\omega_{SFG}t}{2}}$$
(2.1.17)

となる。ここで、 $k_{\omega_1} + k_{\omega_2} - k_{SFG} = \Delta k$ とすると、EIH0は式(2.1.18)、式(2.1.16)より

$$E_{IH0} = \frac{\mu_0 \chi^{(2)} E_1 E_2 \omega^2_{SFG}}{(k_{\omega_1} + k_{\omega_2})^2 - k^2_{SFG}} = \frac{\mu_0 \chi^{(2)} E_1 E_2 \omega^2_{SFG}}{\Delta k (k_{\omega_1} + k_{\omega_2} + k_{SFG})}$$
(2.1.18)

となるので SFG 光強度 IsFg は

$$I_{SFG} = \left| E_{SFG} \right|^2 \propto E^2_{IH0} \sin^2 \left( \frac{\Delta k \cdot z}{2} \right) \propto \left( \frac{\sin \left( \frac{\Delta k \cdot z}{2} \right)}{\frac{\Delta k \cdot z}{2}} \right)^2 z^2 \qquad (2.1.19)$$

となる。

よって $\Delta k = 0$ のとき

$$\lim_{\Delta k \to 0} \left( \frac{\sin\left(\frac{\Delta k \cdot z}{2}\right)}{\frac{\Delta k \cdot z}{2}} \right)^2 z^2 = z^2$$
(2.1.20)

となり SFG 光の強度 IsFG は距離 z の二乗に比例して増加していく。これより、 $\Delta k = 0$ つまり、運動量が保存している場合、非線形光学結晶から非常に強い SFG 光を取り出すことができる。このような条件、 $\Delta k = 0$ となることを位相整合条件という。

また、位相不整合となる場合、 $\Delta k \neq 0$ の場合はSFG光の振幅は結晶の中で空間的に振動 する。この場合、SFG光の強度は $2\pi/\Delta k$ の周期で振動することになる。そのためこの半分 の長さ、

$$l_c = \frac{\pi}{\Delta k} \tag{2.1.21}$$

ごとに強度は極大となる。この長さ *l*<sub>c</sub>をコヒーレント長と呼んでいる。そのため、この長さ 以下の試料系で実験する場合には、位相整合条件を厳密に満たす必要は無い。しかし、実 際の SFG 光の強度は位相整合条件だけでなく試料の非線形感受率の大きさにも影響される。 2.1.4 非線形感受率

ここでは非線形感受率を古典的なモデルを用いて求める。物質は原子に束縛された電子 (双極子)の集まりとする。簡単のため、束縛電子の固有振動はすべて等しく、また、電子間 の相互作用は無視できるとする。光を照射する前、電子は基底状態にあるとする。この時 物質に光を照射すると電子は光電磁場を感じて運動を開始する。光電磁場が弱く運動の振 幅が十分小さい間は、調和振動をすると考えられるが、光電磁場が強くなると電子の非調 和成分の効果が表れ始める。

双極子の大きさは光の波長に比べ十分小さいから、1個の電子の運動を考える場合、光の 電場は空間的に一様であるとしてよい。周波数ωの交流電場

$$E(t) = \frac{1}{2} E e^{-i\omega t} + \frac{1}{2} E^* e^{i\omega t}$$
(2.1.22)

のもとでの電子の運動は運動方程式

$$\frac{d^2x}{dt^2} + 2\Gamma \frac{dx}{dt} + \frac{1}{m} \frac{\partial U}{\partial x} = -\frac{e}{2m} E e^{-i\omega t} + c.c.$$
(2.1.23)

に従う。ここで、x(t)は電子の平衡状態からの変位、mは電子の質量、eは素電荷、 $\Gamma$ は 電子の振動の減衰係数である。ポテンシャルUは平衡点x=0で極小値をとり、

$$\frac{1}{m}\frac{\partial U}{\partial x} = \Omega^2 x + ax^2 + bx^3 + \cdots$$
(2.1.24)

と展開できる。ここで、 $\Omega$ は電子の共鳴周波数、a, bは非線形光学効果を説明するため に導入した非調和項の係数である。

非線形項を摂動と考え、変位を *x* = *x*<sub>1</sub> + *x*<sub>2</sub> + *x*<sub>3</sub> + · · · と摂動展開する。第一近似 *x*<sub>1</sub>は電場 と同じ周波数で定常的に振動する強制振動の解となる。第 2 近似は 2 次の非線形項から発 生し

$$\frac{d^2 x_2}{dt^2} + 2\Gamma \frac{dx_2}{dt} + \Omega^2 x_2 = -ax_1^2$$
(2.1.25)

を満たす。これを解いて

$$x_{2}(t) = -\frac{a}{4} \frac{e^{2}}{m^{2}} \frac{E^{2} e^{-2i\omega}}{D^{2}(\omega)D(2\omega)} + c.c - \frac{a}{2} \frac{e^{2}}{m^{2}} \frac{\left|E\right|^{2}}{\left|D(\omega)\right|^{2}D(0)}$$
(2.1.26)

が求まる。この時

$$D(\omega) = \Omega^2 - 2i\Gamma\omega - \omega^2$$
(2.1.27)

である。これから非線形感受率

$$\chi^{(2)}(-2\omega) = \frac{aNe^3}{\varepsilon_0 m^2 D^2(\omega) D(2\omega)}$$
$$\chi^{(2)}(0) = \frac{aNe^3}{\varepsilon_0 m^2 D(\omega) D(-\omega) D(0)}$$
(2.1.28)

が導かれる。この式から、一般に $\omega_3 = \omega_1 + \omega_2$ のとき、和差周波発生の感受率が

$$\chi^{(2)}(-\omega_3) = \frac{aNe^3}{\varepsilon_0 m^2 D(\omega_1) D(\omega_2) D(0)}$$
(2.1.29)

と書ける。一般に KDP や BBO といった非線形光学結晶と呼ばれる結晶において非線形感 受率の値は大きい。そのため、これらの結晶は高調波発生器や光パラメトリック発振器に よるレーザー光の波長変換によく用いられる。 2.1.5 光パラメトリック過程の概要

光パラメトリック過程は第2高調波発生などと同様に2次の非線形光学効果の一種である。 その中身は大きく分けて光パラメトリック発振と光パラメトリック増幅の2つに分けられる。

光パラメトリック過程は基本的に上記の光和周波発生の逆過程と考えることができる。 式で書くと,

$$\omega_3 = \omega_1 + \omega_2 \tag{2.1.30}$$

である。(2.1.6)式の SFG に関する関係の右辺と左辺をひっくり返したものだが、2つの周波数の光を用いて1つ固定した周波数の光を得る光和周波発生に対して、1つの光から2つの 周波数を持つ光への変換であることから、式中の ω<sub>1</sub> と ω<sub>2</sub>の周波数の組み合わせは無数に存 在する。その周波数は位相整合条件により変化するため、任意の周波数の光を得ることが できる。

ここで、 $\omega_3 をポンプ光と表現する。ある媒質中で式(2.1.30)の関係が成り立っているとき$  $外部から新たに外部から新たに <math>\omega_1$  もしくは  $\omega_2$  に相当する周波数の光が媒質中に入射した 際にポンプ光のエネルギーを受け取って  $\omega_1$  もしくは  $\omega_2$  の光が増幅される過程を光パラメ トリック増幅(Optical parametric oscillation: OPO)、外部からのエネルギーの流入がなく単純 にポンプ光から  $\omega_1$  および  $\omega_2$  の光が発生する現象が光パラメトリック発振(Optical parametric generation: OPG)である。この現象と差周波発生を利用すると可視光から 10µm 程度の赤外光 までの波長の光を任意に出力することのできる波長変換器を造ることができる。

#### 2.1.6 非線形分極の対称性

非線形分極は偶数次と奇数次の場合で扱いが異なり,偶数次の場合対称性を満たす媒 質では非線形分極がゼロとなるという特徴を持つ。一方,奇数次の非線形光学効果はその 発生源となる非線形分極がすべての物質に存在できるため、どのような物質でも起こる現 象である。2次の非線形光学効果は偶数次の非線形光学効果であるため、対称性を持つ媒質 中においては起こらない。そのため,2次の非線形光学効果は対称性の破れた媒質でのみお こすことができる。このことを以下に示す。

2次の非線形分極は式(2.1.3)より、

$$\mathbf{P}^{(2)}(t) = \varepsilon_0 \boldsymbol{\chi}^{(2)} \mathbf{E}_{\omega_1}(t) \mathbf{E}_{\omega_2}(t)$$
(2.1.31)

である。ここでは媒質の構造に反転対称性のある場合を考える。このような物質の場合、 加える電場を反転させれば、分極もそのまま反転する。式(2.1.31)を反転操作すると

$$\mathbf{P}^{(2)}(t) = -\mathbf{P}^{(2)}(t)$$
$$\mathbf{E}_{\omega_1}(t) = -\mathbf{E}_{\omega_1}(t)$$
$$\mathbf{E}_{\omega_1}(t) = -\mathbf{E}_{\omega_2}(t)$$

となるので(2.1.31)より、

$$-\mathbf{P}^{(2)}(t) = \varepsilon_0 \chi^{(2)}(-\mathbf{E}_{\omega_1}(t))(-\mathbf{E}_{\omega_2}(t)) = \varepsilon_0 \chi^{(2)} \mathbf{E}_{\omega_1}(t) \mathbf{E}_{\omega_2}(t)$$
(2.1.32)

となる。(2.1.31)式と(2.1.32)式が同時に成り立つには

$$\mathbf{P}^{(2)}(t) \neq 0$$
  

$$\mathbf{E}_{\omega_{1}}(t) \neq 0$$
  

$$\mathbf{E}_{\omega_{2}}(t) \neq 0$$
  
(2.1.33)

となる必要があるため、非線形感受率は

$$\chi^{(2)}=0$$

となる。非線形感受率が0であるため、非線形分極は0となるので、分極は励起されな くなり、2次の非線形光学効果は起こらない。このことにより、2次の非線形光学効果は反 転対称性が破れた部分のみで起きる。
### 2.1.7 光和周波発生と共鳴効果

非線形光学現象は任意の周波数の電磁波に対して発生するが、物質のあるエネルギー準 位に一致すると、共鳴効果により非線形効果が増大する。

SFG 分光法は、観測試料の分子振動と、入射した赤外光の振動数を一致させ、共鳴現を発生させることにより SFG 光の出力を増大させ試料の情報を得る手法である。SFG 光の周波

数を $\omega_{SFG}$ とすると、

$$\hbar\omega_{SFG} = \hbar\omega_{IR} + \hbar\omega_{vis} \tag{2.1.34}$$

のエネルギー保存則が成り立つ。ここで<sup>ħ</sup>はプランク定数である。2つの異なるエネルギー を持つ光子の一方のエネルギーが分子振動の振動励起状態(実準位)のエネルギーと一致 したとき、光子との間に共鳴現象が起こり発生する SFG 光強度が増大する。逆に光子の持 つエネルギーが振動励起状態のエネルギーに一致していなければ非共鳴状態となり、SFG 光強度は増加せず弱い SFG 光が観測される。

本研究では可視光の周波数を一定にし、赤外光の周波数を変化させて、赤外光の光子エネ ルギー<sup>ħω</sup> と分子振動の振動励起状態とを一致させることにより SFG 光強度が増大する。こ の時の SFG スペクトルのピーク位置から、試料の分子振動数を知ることができる。 2.1.7 波長程度の長さの媒質における SFG 光の発生と伝搬

2.1.3 節では非線形光学媒質で発生する SFG 光は位相整合条件を満たすと媒質の長さ z の 2 乗に比例して SFG 光が増大することを説明した。しかし、媒質が波長程度の長さ(z~λ) しかないような場合は位相整合という考え方だけではその振る舞いを議論することができない。

波長以下の長さの媒質から発生する SFG 光強度は非線形分極の数とその分極がそろって いるかいないかによって決まる。



Fig 2.1 非線形分極の配向がそろっている結晶で発生する SFG 光の模式図

非線形分極  $P_1$ 、 $P_2$ 、… $P_n$ で発生する SFG 光の電場振幅をそれぞれ  $E_1$ 、 $E_2$ 、… $E_n$ とし結 晶で発生する SFG 光を  $E_{total}$ とすると、

$$E_{total} = E_1 + E_2 + \dots + E_n \qquad (E_n \propto P_n)$$
(2.1.35)

となる。ここで結晶中の非線形分極の配向(位相)がそろっている場合は

$$P_1 = P_2 = \dots = P_n \qquad \qquad \therefore E_1 = E_2 = \dots = E_n \tag{2.1.36}$$

となるので、SFG 光の強度 I は

$$I = |E_{total}|^{2} = |E_{1} + E_{2} + \dots + E_{n}|^{2} = |nEn|^{2} = n^{2}|E_{n}|^{2}$$
(2.1.37)

となる。

よって非線形分極の配向がそろっていると SFG 光強度は分極の数 n の 2 乗に比例し強い SFG 光が発生する。

一方、結晶中の非線形分極の配向(位相)がそろっていない場合は

$$P_1 \neq P_2 \neq \dots \neq P_n \qquad \qquad \therefore E_1 \neq E_2 \neq \dots \neq E_n \tag{2.1.38}$$

であるので、SFG 光の強度は

$$I = |E_{total}|^{2} = |E_{1} + E_{2} + \dots + E_{n}|$$
  
=  $(E_{1} + E_{2} + \dots + E_{n})(E_{1} + E_{2} + \dots + E_{n})^{*}$   
=  $|E_{1}|^{2} + |E_{2}|^{2} + \dots + |E_{n}|^{2} + \sum_{i \neq j}^{n} E_{i}E_{j}^{*}$   
(2.1.39)

となり、さらに、左辺の最終項は打ち消しあって0となる。 $(\sum_{i \neq j}^{n} E_{i}E_{j}^{*} = 0)$ 

また、 $|E_1| \approx |E_2| \approx \cdots \approx |E_n|$ であると仮定すると SFG 光強度は

$$I = |E_1|^2 + |E_2|^2 + \dots + |E_n|^2 = n|E_n|^2$$
(2.1.40)

となる。

よって非線形分極がランダムに配向していると SFG 光強度は分極の数 n に比例し式 (2.1.37)の結果と比べるとずっと弱い SFG 光となる。

2.1.8 高次の非線形分極[2.7][2.8]

ここまでに述べた非線形光学効果はあくまでも電気双極子近似のもとで理想化された条件で議論されたものである。現象論としてはこの範囲で十分議論可能であるが、実際には 電気双極子だけでなく、電気四重極子や磁気双極子の効果も存在する。この場合の光和周 波発生の非線形分極はより高次の項を取り込んだ下記の式としてあらわされる[2.7]。

$$\mathbf{P}^{NL}(\omega) = \mathbf{P}(\omega) - \nabla \cdot \vec{Q}(\omega) + \frac{c}{i\omega} \nabla \times \mathbf{M}(\omega) + \cdots$$
(2.1.41)

ここで

$$\omega = \omega_{1} + \omega_{2}$$

$$\mathbf{P}(\omega) = \ddot{\boldsymbol{\chi}}^{D} : \mathbf{E}(\omega_{1})\mathbf{E}(\omega_{2}) + \ddot{\boldsymbol{\chi}}^{P} : \mathbf{E}(\omega_{1})\mathbf{E}(\omega_{2})$$

$$\vec{Q}(\omega) = \ddot{\boldsymbol{\chi}}^{Q} : \mathbf{E}(\omega_{1})\mathbf{E}(\omega_{2})$$

$$\mathbf{M}(\omega) = \ddot{\boldsymbol{\chi}}^{M} : \mathbf{E}(\omega_{1})\mathbf{E}(\omega_{2})$$
(2.1.42)

である。

ここの**P**,  $\vec{Q}$ , **M**はそれぞれ電気双極子,電気四重極子,磁気双極子である。(2.1.41)の第 1項は電気双極子の寄与,第2項は電気四重極子の寄与,第3項は磁気双極子の寄与である。 (2.1.42)式中の $\ddot{\chi}^{D}$ , $\ddot{\chi}^{P}$ , $\ddot{\chi}^{Q}$ , $\ddot{\chi}^{M}$ はそれぞれの効果に対応した非線形感受率であるが,電 気双極子作用に相当する感受率のみ $\ddot{\chi}^{D}$ , $\ddot{\chi}^{P}$ の二つに分けられ,前者が電場により誘起さ

気双極子作用に相当する感受率のみ  $\chi^{2}$ ,  $\chi^{2}$  の二つに分けられ, 前者が電場により誘起された非線形感受率で後者が媒質中に元から存在する局所的な非線形感受率である。

電気双極子近似の範囲では、バルクにおいて中心対称性を持つ場合非線形分極はゼロと なっていたが、実際には電気四重極子等高次の効果はゼロとならず非線形分極はこのよう な系においても存在する[2.8]。

本研究で用いる試料は生物に由来するものであり、生物由来の試料は基本的にキラリティを持つため、電気双極子の項はゼロとならない。しかし、電気双極子の作用と比べて電気四重極子および磁気像極子の作用は高次の効果であることもあって実際の SFG 強度への寄与は小さいため[2.9]、測定される SFG 光はほぼ電気双極子作用によるものと考えることができる。

第2章参考文献

[2.1] 矢島達男『非線形光学の基礎 I』 レーザー研究 1999 年 1 月号(1999)

[2.2] レーザー学会編『レーザーハンドブック』オーム社(1982)

[2.3] 黒田和男『非線形光学』コロナ社(2008)

[2.4] 日本物理学会編『量子エレクトロニクス』朝倉書店(1965)

[2.5] R.W.Boyd 「Nonlinear optics」 Academic Press (1992)

[2.6]N.Blombergen 「Nonliner optics 4<sup>th</sup> Edition」 World Scientific Publishing Co. Pte.Ltd. (1996)

[2.7] M. A. Belkin, T. A. Kulakov, K.-H. Ernst, L. Yan, and Y. R. Shen Phys. Rev. Lett. 85, 4474 (2000)

[2.8] P. Guyot-Sionnest, Y.R. Shen, Phys. Rev. B 38 7985 (1988)

[2.9] Y.G. ZHUO, H.Lee, K.J. HSU, M.J. Huttunen, M. Kauranen, Y.Y. LIN, S.W. CHU, Journal of microscopy, 253(3), 183-190. (2014).

第3章 実験系

3.1 共焦点光和周波顕微鏡の概要

本研究では共焦点光学系を組み込んだ和周波顕微鏡を用いている。

一般的な光学顕微鏡と共焦点顕微鏡の結像光学系の違いを模式的にあらわしたものを Fig.3-1 に示す。共焦点顕微鏡は結像レンズと検出器の間にピンホールを配置した光学配置 となっている。一般にレンズで集光された光の焦点は理想的な点とはならず、光学顕微鏡 では対物レンズの焦点以外の光もノイズとして検出してしまうが、共焦点顕微鏡ではこの 焦点以外からの光をピンホールでカットするためコントラストが良くなる。しかしこうし て得られる光は小さな一点のみで、顕微鏡像とは異なる。そのため、共焦点顕微鏡では試 料上を走査して画像を得る。また、共焦点機構により顕微鏡の結像特性が変わり、平面分 解能の向上と試料内部方向への分解能を得ることができる。

共焦点光和周波(SFG)顕微鏡ではこの原理を応用している。つまり共焦点光和周波顕微鏡 では、焦点以外から発生した SFG 光は検出器前に置かれたピンホールでカットされる。そ のため、通常の SFG 顕微鏡より鮮明な画像が得られる。共焦点光学系は基本的に焦点面の 情報のみを得るため、焦点面が観察対象の内部にあっても観察できこれにより Z 方向を区 別した観察も可能である。結像光学系で使用するピンホール径は小さい方が解像度は高く なるが、試料内部の SFG 光もカットすることになるため、検出できる SFG シグナルはピ ンホール径が小さいほど少なくなる。そのため、試料の、SFG シグナルの発生効率が大き いほどピンホール径を小さくでき、高解像度の測定が可能となる。

# 3.2 共焦点顕微鏡の分解能

以下に共焦点顕微鏡の分解能を求める式を示す[3.1]。

XY 軸  

$$\mathbf{r} = \frac{0.61\lambda}{\sqrt{2}NA} = 0.4\mu m$$
(3.2.1)  
Z 軸  

$$\mathbf{r} = \frac{1.4n\lambda}{NA^2} = 3.2n\mu m$$
(3.2.2)

λ は波長を表す。今回は SFG の波長の 460nm で計算した。NA は対物レンズの開口数(0.45) であり、n は屈折率である。

通常の顕微鏡の分解能を以下に示す。

$$\mathbf{r} = \frac{0.61\lambda}{NA} = 0.6\,\mu m\tag{3.2.3}$$

(3.2.2)

(3.2.1)と(3.2.3)の結果を比べると、共焦点機構を導入すると√2倍分解能が向上したことが分 かる。その上(3.2.2)のようにZ方向の分解能を持つため物質の内部の観察が可能となる。



Fig.3.1. 光学顕微鏡と共焦点顕微鏡の原理

3.3 使用光源

非線形光学効果の発生には強い光電磁場を必要とする。本顕微鏡ではそのための光源として Nd:YAG レーザーとそれを励起光源とする OPA/OPG/DFG システムを用いる。以下に 説明する。

本研究では、波長約 3µm の赤外光発生のために, OPG(Optical Parametric Generation)/OPA(Optical parametric Amplification)/DFG(difference frequency generation)システムを用いる。

OPG/OPA/DFG システムの内部ではシステムへ入射したレーザー光が OPG 過程、OPA 過程、DFG 過程を踏み 3µm の赤外光へ波長変換される。以下にこれらの過程の説明をす る。

(1) OPG および OPA 過程

OPG/OPA システムでは周波数  $\omega_p$ のポンプ光に含まれるエネルギーが、次式のエネルギー保存則を満たすように、2 つの異なる光子  $\omega_s$ (シグナル光)と  $\omega_i$  (アイドラー光)に変換される。

$$\omega_p = \omega_s + \omega_i \tag{3.3.1}$$

(i)OPG 過程

OPG/OPA ではポンプ光として波長 532nm の光を用いる。BBO 結晶(8-BaB<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)は異方 性結晶で複屈折による角度依存性を有するので、結晶を光軸に対して回転させることによ り、実効屈折率を変化させることが出来る。よって BBO 結晶の角度を変化させることによ って、BBO 結晶の方位に対応した位相整合条件を満たす、特定の波長をもったシグナル光 とアイドラー光が BBO 結晶から出てくる。つまり、BBO 結晶を通過したポンプ光は、シ グナル光とアイドラー光に分離する。この段階ではシグナル光とアイドラー光は単色化さ れていない。

そして、2 つの BBO 結晶により発生した幅を持つシグナル光とアイドラー光と、ポンプ光 をダイクロイックミラーにより別々の光路に分離する。近赤外光のシグナル光は回折格子 によって単色化される。

## (ii)OPA 過程

次に、単色化されたシグナル光を再びポンプ光と重ね合わせ、再度 BBO 結晶を通過させる。その結果、OPA 過程によって、波長 523nm のポンプ光が優先的にシグナル光とアイドラー光に分離され、結果的に波長が約 820nm 前後のシグナル光が増幅される。

## (2)DFG 過程

次は、BBO 結晶によって発生した波長 820nm のシグナル光と YAG レーザーの基本光で

ある波長 1064nm のポンプ光を重ね合わせ、非線形光学結晶である AgGaS<sub>2</sub>結晶を通過さ せる。その結果、結晶中で差周波発生(DFG)現象が起こり、3μm の遠赤外光が発生する。 最後に OPG/OPA から出力される光は 3μm の赤外光のみにするため、1064nm と 820nm の波長の光は ZnSe によって吸収される。よって、OPG/OPA から出力される光は波長 3μm の赤外光だけとなる。

2次の非線形分極は

$$P^{(2)}(\omega_{1} + \omega_{2}) = \varepsilon_{0} \chi^{(2)} : E_{\omega_{1}} E_{\omega_{2}}$$
(3.3.2)

と表わされ、SFG はこの分極から発生し、2 つの励起光 $\omega_1 \ge \omega_2$ の電場強度 $E_{\omega_1} \ge E_{\omega_2}$ の積 に比例する。SFG 光を検出するためには入射電場強度を大きくする必要があるが、電場強 度が大きくなり過ぎると試料にダメージを与える可能性が出てくる。従って、励起光源と しては、連続発振のレーザー光よりもより大きな電場強度が得られるパルスレーザー光源 を用いる方が、同量のエネルギーで高い SFG 強度を獲得することができる。また、熱によ

る試料へのダメージも少ない。

本研究では、ピコ秒 Nd:YAG レーザー(Ekspla PL2143B)より発振させた 1064nm の光を 元として Harmonic unit より 532nm を、OPG/OPA/DFG システムより約 3µm のレーザー 光を発振させ和周波発生のための光源として用いる。

以下が、キャビティー・ダンプ方式モードロック Nd<sup>3+</sup>:YAG レーザーおよび OPG/OPA/DFG システムの基本仕様である。

(1) レーザー光システム:キャビティー・ダンプ方式モードロック Nd:YAG レーザー

## EKSPLA Laser PL2143B

パルス幅:25 [psec]

繰り返し周波数:10 [Hz]

ビーム波形:ガウシアン分布

ビーム径:10[mm]

出力波長:基本光:1064 nm、倍波:532 nm、三倍波:355 nm、四倍波:266 nm 定格出力:基本光:80 mJ/pulse、倍波:40 mJ/pulse、三倍波:20 mJ/pulse、四 倍波:10 mJ/pulse,

(2) OPG/OPA システム

#### EKSPLA PG501/DFG

(OPG/OPA 過程):波長 680 ~2299nm

(DFG 過程): AgGaS<sub>2</sub>結晶使用:波長 2.301 ~10.07µm(4346~993cm<sup>-1</sup>) GaSe 結晶使用:波長 10 ~20µm 赤外光ライン幅:[6cm<sup>-1</sup>]

3.4 共焦点光和周波顕微鏡の光学系

3.4.1 共焦点光和周波顕微鏡の実験系

Fig.3.2 に共焦点光和周波顕微鏡の光学系の概略図を示す。

ピコ秒 Nd<sup>3+</sup>:YAG レーザーから照射された基本波の赤外光(1064nm)が Harmonic unit に入り、一部が倍波の可視光(532nm)となる。1064nm と 532nm の 2 本の光が OPG/OPA/DFG システムにより波長変換され、約 3000nm の赤外光を発生させる。この赤 外光を金平面ミラーによって試料まで導く。 また、Harmonics unit から取り出された光 は Delay line、ND filter を通り,顕微鏡の対物レンズで集光され試料上に垂直に照射され る。試料からの約 460nm の散乱 SFG 光はほぼ垂直に発生し,直上の対物レンズ(NA=0.45)、 ダイクロイックミラー、バンドパスフィルターなどを通り、結像レンズと 2mm のピンホー ルからなる共焦点機構を通り,最終的に光電子増倍管で検出される。



Fig.3.2 共焦点和周波顕微鏡の実験系

#### 3.4.2 光学系の詳細

本研究ではSFG測定システムの光学系は可視光、赤外光、SFG光の3系統から構成される。

### 可視光系

赤外光と可視光のタイミングを同期させるため Delay line を設置し、励起光のエネルギー を調整するために、532nm の可視光側に ND(Neutral Density)filter を設置した。また、観 察する試料によって偏光子を用いた。

#### Delay line (P21)

SFG 光を発生させるためには、可視光と赤外光を試料に同じタイミングで入射させる必要 がある。本測定システムでは、可視光の光路長を Delay line で変化させることにより、可 視光の試料への入射タイミングを調整し、赤外光と同期させる。

#### ND(Neutral Density)filter(ND)

励起光のエネルギーを減衰させ、入射光のパワーを調節する。光路には 1/10 カットする ND filter が 2 枚と回転式の ND filter が入っている。回転式の ND filter はコンピュータで 制御する。

ダイクロイックミラー(DCM21)

発生した SFG 光を反射する誘電体多層ミラー。532nm の可視光のほとんどが透過する。

#### ピンホール(PH21,PH22)

共焦点顕微鏡の光源は点光源である必要があるため、可視光を絞る。

## 偏光板(シグマ光機)(F21)

レーザー光の特定の偏光成分(P 偏光、S 偏光)のみを透過させる素子。可視光側を S 偏光と する為に使用する。

### 赤外光系

OPG/OPA/DFG システムから発生する赤外励起光を試料位置に導くために金平面ミラーを 設置した。また、赤外光を試料表面に導くために赤外補助光として半導体レーザーを用いた。

金平面ミラー(M11-15)

赤外光側には、赤外の反射率の高い金コーティングミラーを採用した。波長は800nm ~12μm の光に対して反射率は98%である。

半導体レーザー(OPA/OPG/DFG内)

SFG 測定を行う際の赤外光を導くための補助光として用いた。本研究で用いる~3µm の 波長領域の光は通常の赤外光検知板では検知できないため、赤外光の光路を視覚的に把握 することは難しく、光学パス構築、調整には多大な労力を要する。そこで、この半導体レ ーザーと OPG/OPA/DFG から発生する赤外光の光路を一致させると、この半導体レーザー の光によって、視覚的に赤外光を把握でき、光学パス構築にかかる労力を軽減できる。

## SFG 光検出系

SFG 顕微鏡システムの場合、試料から発生した SFG 光は可視光と同じ光路を通りダイク ロイックミラーで反射され、バンドパスフィルターで信号光以外をカットしたうえで結像 レンズ、ピンホールを通り光電子増倍管で検出される。

## ダイクロイックミラー(DCM21)

このミラーは誘電体多層膜で表面をコーティングされており特定の周波数の光のみを反射 する。この光学系の場合,460nm 付近の SFG 光のみを反射させ,532nm の可視光はその ほとんどを透過させる。しかし,僅かな反射が存在するため、ノイズ除去のため後述のバ ンドパスフィルターも同時に用いる。

バンドパスフィルター

このフィルターは、特定の周波数の光のみを透過させるフィルターで、発生した SFG 光の みが透過出来る波長帯を持つものを使用する。本研究では朝日分光製の狭帯域用フィルタ ー(MX0460:中心透過波長 460nm, 半値幅 10nm)及びエドモンドオプティクス製の広帯域用 フィルター(TS 蛍光用バンドパスフィルター 466NM X 40NM 2: 中心波長 466nm, 半値幅 40nm)の 2 枚を使用した。

結像レンズ(L30)

結像レンズは入ってきた SFG 光を集光する役割を持つ。

ピンホール(PH23)

ピンホールは結像レンズの焦点に設置しており、試料の焦点面以外からの光をカットする役目を持つ。ピンホールの大きさは 5µm から 2mm まであり、小さいものを使えば分解能は(3.1)と(3.2)へ近づくが、同時に検出できる信号も弱くなるため、状況に応じて大きさは変える。

3.5 共焦点光和周波顕微鏡を用いた観察の手順

共焦点光和周波顕微鏡による観察過程について簡単に説明する。

3.5.1 SFG 光の検出の過程

本顕微鏡では、532nmの可視光と約 3000nmの赤外光を利用する。以下はこの光を得るための手順である。

- Nd:YAG レーザーの基本光(1064nm)の一部が Harmonic unit で第二高調波(532nm) へ変換される。この時発生した 532nm の光を二つに分け一方を可視光として利用し、 もう一方は OPA/OPG/DFG システムへ入れる。
   532nm の光とレーザーの基本光 1064nm の光が OPA/OPG/DFG システムを通り波 長変換され波長約 3000nm の赤外光を発生させる。
- 2) 赤外光はそれ単独で見ることはできないので、OPA/OPG/DFG内にあるガイド光と 光路を合わせた上で光軸調整を行う。赤外光の光路は金平面ミラーを用いて組まれている。この金平面ミラーの中心付近にガイド光が当たるように、また下の台と平行になるように赤外光の光軸を調整する。最終的に赤外光は試料近くにある集光レンズにより試料へ集光される。ただし赤外光とガイド光の集光点は違う。そのためガイド光だけでは正確性に欠ける。

そのため、セロハンテープに水性ペンを塗ったものを用意する。3000nmの光を見 られる IR カードというものは販売されていないが、相応の強度の赤外光をセロハン テープに塗った水性インクに集光・照射すると赤外光の当たった部分が焼けて変色す る。これを顕微鏡で見ながら調整すれば集光レンズの焦点と赤外光の当たる場所を細 かく調整できる。

赤外光は基本的に可視光と同じ場所に来るように調整する。しかし、赤外光のビームパターンは一定とは限らず、励起の Nd<sup>3+</sup>:YAG レーザーや OPG/DFG システムの 状態によって異なる。具体的には試料上に集光点がいくつもできることがある。この 場合ビームパターンを一定とするためには Fig.3.3 の OPG/DFG と M1 の間にレンズ とアイリスを配置し調整を行う。アイリスを可能な限り小さく絞り、レンズを一枚余 分に通すことで、集光点の数が少なくなり調整がやりやすくなる。

 Harmonic unit から出た可視光はミラーを使って台と平行になるよう調整する。その 後赤外光と同じタイミングで試料へ照射されるように Delay Line によって赤外光と 同じ光路長になるように調整する。

また、OPA/OPG/DFG システムをとおって発振される赤外光と違って可視光は試料にダメージを与えるには十分な強度がある場合がほとんどであるため、可視光の光路上に減衰用のND回転フィルターを設置してある。

4) 2)および3)で調整された532nmの可視光と約3000nmの赤外光が試料上へ照射されると、試料から散乱SFGが発生する。試料で発生した散乱SFG光は対物レンズから可視光と同じ光路を通り、ダイクロイックミラーで反射されたのち、460nm付近のSFG光以外をカットするバンドパスフィルターを通り、ピンホール前の結像レンズを通って、ピンホールを通過し、PMTで検出される。

3.5.2 顕微像とスペクトルの測定手順

1) SFG 顕微像測定

SFG 顕微像の測定は基本的に試料上をレーザー光で走査して行われる。しかし実際にレ ーザー光の照射箇所を動かすことは難しいため,基本的に動くのは試料の方である。試料 を動かすのはピエゾ素子を用いた X-Y 軸を担当するピエゾステージ(step 5nm)と Z 軸に相 当する可視光の対物レンズを動かすことで試料上を走査する。構造上 3 次元測定が可能な 顕微鏡ではあるが,実際の測定は 2 次元の画像を順次測定し並べることで行われる。以下 に簡単に流れを述べる。

a) 測定前に共焦点光和周波顕微鏡の焦点と光学顕微用の焦点が一致しているため,光学顕 微鏡の画像を見ながら測定位置の調整と焦点合わせを行う。そのため光学顕微鏡上で焦点 を決めることが難しい試料の測定は難しい。

b) 試料ヘレーザー光を導入し, PMT のスイッチを入れ電流値を調整し SFG 光の検出感度 を調整する。SFG 光は PMT で検出された電圧の形で記録され,この電圧の大きさに応じ て画像上の点の明るさに差(白から黒へ段階に応じて濃淡がつく。白が最も強い強度となる) をつけ,その点を測定位置ごとに並べることで SFG 像は構築される。この構築は基本的に 自動化されているが,その濃淡の閾値はこちらで指定する。例えば閾値を 1V とすると 1V 以上の測定値を白色で表示し,それ以下を黒まで段階をつけて表示させる(Fig.3.3)。



Fig.3.3 SFG 像の例 (a)光学顕微鏡像 (b)SFG 顕微鏡像

c) 測定にかかる時間は測定の範囲と測定ステップの大きさ,および一点当たりの測定回数 により決まる。測定範囲の最大値は一辺 100μm,ステップの最小は 5nm,一点当たりの測 定回数は1回以上で適宜調整する。 2) SFG スペクトルの測定手順

SFG スペクトルは上記の SFG 像の測定の場合と異なり試料のステージを固定して行う。 基本的には画像測定と同様の手順で行うが,一点一点の測定ごとに波長を切り替えて測定 を行う。その手順を以下にまとめる。

a) 基本的には画像測定と同様, 試料上の測定位置は光学顕微鏡の焦点となっている。この 焦点において一定の回数測定しスペクトル上の一点として記録する。測定の回数はこちら で適宜指定するが, 1回の測定の時間は概ね 0.2 秒かかる。スペクトルの一点に付き 100 回 測定するとすれば一点に付き約 20 秒で測定した。

レーザー光の測定ステップは波数に換算して 1cm<sup>-1</sup>程度から測定することができるが,現 在使用している OPG 出力光は 5cm<sup>-1</sup>程度のスペクトル幅を持つため,それよりも大きい 10cm<sup>-1</sup>程度以上の測定ステップを指定するほうが望ましい。

b) SFG スペクトルの測定においても PMT における検出の感度は適宜調整することにな るが、スペクトル同士の比較にはこの値は可能な限り固定するのが望ましい。また、日に よってもレーザー光の調子は異なるためその調整のために参照試料として ZnS のスペクト ルも同じ日に測定する。

c) 測定されたスペクトルは実際の生データと ZnS のデータとの強度比の形となるように 解析する。

3.6 赤外吸収スペクトルの測定手順

ここに、SFG スペクトルとの比較のために行った赤外吸収(IR)分光の手順をまとめる。

a) 使用装置

パーキンエルマー社製 Spotlight 200 FT-IR Microscopy System

b) 測定法

全反射(ATR)法

c) 測定手順

① ATR 法によるスペクトル測定では,測定時に試料を結晶に載せて,器具で圧力をかけ, 押し付けて測定を行う。そのため単純に試料をステージに乗せるだけで測定が可能かつ試 料が小さくとも測定をすることができる SFG 顕微鏡と違ってある程度の試料の大きさと押 さえつけても壊れないような材質または形状であることが必要である。例えば, 鱗のよう に薄く平べったく,比較的丈夫な試料なら問題なく測定を行えるが, コメのような試料の 場合そのままでは測定が難しく,また圧力をかけすぎると砕けてしまうため薄く平べった い板状に切るなどの工夫が必要である。

② 試料の問題さえ乗り越えられれば測定自体はソフトウェアによりほぼ自動化されて おり簡単な初期設定を行い,測定を開始するだけである。ただしこの時試料の設置がうま くいっていないと,光の吸収をうまく測定できないため注意が必要である。

③ 測定の繰り返しはこちらで任意に指定でき、その任意の回数測定した結果は自動的 に平均化され出力される。繰り返しの数は 2 回でも問題は少ないが、データの信頼性を確 保するためには 3 回以上が望ましい。

46

第3章参考文献

[3.1] G. Cox and C. J. Sheppard Microc. Res Thech. 63:18-22(2004)

### 第4章 測定試料

#### 4.1 コメの概要

4.1.1 概要

日本で主に栽培されているイネは学名を Oryza sativa(通称アジアイネ)と称されるイネ属の一種である。ほかにも西アフリカで栽培されている Oryza glaberrima(和名アフリカイネ)と称される品種をはじめとしてイネ属は 19 種類に分類されている(Table 4.1)。

表のうち表最下部からの 2 種のみが栽培種でその他は全て野生種である。アジアイネは その大きく分けると胴体の長い長粒米(インディカ種)と胴体の短い短粒米(ジャポニカ種)に まず分けられる。日本に多く流通しているものは後者の短粒米であるが、その組成の違い やそれからくる味の違い、その他の特性により多くの品種名を持つものが存在するが、こ れらは全て同一の種として扱われる。そのため、基本となる構造は基本的に共通する。

学名	主な生育地	備考
Oryza rufipogon Griff	東南アジア	野生種
<i>Oryza nivara</i> Sharma et Shastry	東南アジア	野生種
Oryza barthii A. Chev	熱帯アフリカ	野生種
Oryza breviligulata A. Chev . et	熱帯アフリカ	野生種
Roehr		
Oryza australiensis Domin	オーストラリア	野生種
Oryza eichingeri A. Peter	東部および中央アフリカ	野生種
Oryza punctata Kotschy ex Stend.	熱帯アフリカおよび南アフリ	野生種
	力	
Oryza officinalis Wall.	東南アジア	野生種
Oryza minuta Preal.	フィリピン	野生種
Oryza latifolia Desv.	中南米	野生種
Oryza alta Swallen.	中南米	野生種
Oryza grandiglumis Prod.	中南米	野生種
Oryza ridleui Hook.	東南アジア	野生種
Oryza longiglumis Jansen.	ニューギニア	野生種
Oryza brachyantha A. Chev. Et	熱帯アフリカ	野生種
Roehr.		
Oryza meyeriana Baill.	南アジアおよびマレー半島	野生種
Oryza schlechteri Pliger	ニューギニア	野生種
Oryza glaberrima Steud.	熱帯アフリカ	栽培種, アフリカイネ
Oryza sativa L.	南極以外の世界各地	栽培種、アジアイネ

Table 4.1 稲の品種一覧[4.7]

4.1.2 基本構造

収穫されたイネは大雑把に分けると、イネ全体を覆う籾殻とその中の一般に食され、さらにデンプンを貯蔵している胚乳、次の芽の元である胚および胚乳と籾殻の間に存在する 糠層からなるというのが一般的な理解である。しかし実際にはもう少し細かく、構造は分けられている(Fig.4.1)。

収穫された玄米は外側を黒褐色の固い果皮に覆われている。その内側は薄いフィルム状 の種皮が胚と胚乳を包んでいる。さらに内側の胚乳はタンパク質と糊粉層でおおわれてい る。その内部にはデンプン貯蔵柔組織と呼ばれる組織が存在する。胚は基本的に生きた細 胞組織であるのに対して胚乳は死んだ細胞組織であると考えられている。デンプン貯蔵柔 組織の細胞は組織の内部ほど大きく、細胞壁は薄く、デンプン粒が満ちている。デンプン 粒とデンプン粒の間には隙間があり少量のたんぱく顆粒が存在している。胚乳組織内には 植物の茎にある維管束のような通導管は全くないが、場所により胚乳細胞の形や配列が異 なっていて、それらが維管束と同様の働きをし、組織内の物質の移動に関係していると考 えられている。

また、胚は、胚乳に食い込むようにして種子の先端に埋め込まれている。胚と胚乳の境 界面には胚盤という薄い組織が存在する。[4.7]



Fig.4.1 イネの構造の模式図

## 4.2 植物とデンプン

4.2.1 デンプンの概要

米の大部分はデンプンで構成されている。デンプンは α1→4 結合の D-グルカンを主鎖と する多糖である。デンプンは分子が規則正しく配列して成長生成した一種の結晶とみなさ れる粒子として存在する。デンプンは下記のような光合成反応により形成されるグルコー ス(Fig.4.2)が重合したものである。

$$6CO_2 + 6H_2O \to C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \tag{4.2.1}$$

グルコースは正式には D-グルコースといいほとんどの場合グルコピラノースという円 環状の形態で存在している。グルコピラノースは鏡像異性体の関係にある α型β型の2種 類の形をとりうるが、自然界に存在するものは全てα型である。

デンプンは一般的には Fig.4.3 のようにヨウ素デンプン反応を用いて観察する。

デンプンは大きく分けるとアミロースとアミロペクチンからなり,基本的に分子の短い アミロースは青く,分子の長いアミロペクチンは赤く着色される。コシヒカリのデンプン ではそれらが混ざって存在するため,紫色に見える。

基本的にデンプンは植物中において数 μm の大きさのデンプン粒の形で存在している。そのためデンプン自体は顕微鏡で観察可能である。その構造の詳細は分子自体が巨大かつ複 雑で変化に富んでいるため正確な分子量を含めてあまり明らかではないが,結晶性の多層 構造をとっていると考えられている(Fig.4.4)。



Fig.4.2 α-D グルコース[4.11]



Fig.4.3 コシヒカリのヨウ素デンプン反応の顕微鏡観察像



Fig.4.4 デンプン粒の構造[4.1]

4.2.2 デンプンの種類及び分子構造

デンプンを構成する主成分は α1→4 結合の D-グルカンであるアミロース(amylose)と、こ れに α1→6 結合の側鎖が加わったアミロペクチン(amylopectin)である。これらは、D-グル コピラノースがグリコシド結合(glycosidic bond)して高分子となったものである。グルコピ ラノースは水溶液中に存在する開環型グルコースが環化してできたものである。(Fig.4.2)。 このアミロースやアミロペクチンは高次の結晶構造を取ることが知られている。そこで、 アミロースとアミロペクチンの高次構造について以下に述べる。

1)アミロース

アミロースは α-D-グルコピラノース(Fig.4.2)単位が α-1,4 グリコシド結合した直鎖状分子 からなる。組成そのものはセルロースと共通するが、アミロースではグルコース分子の向 きが一方光にそろっているのに対して、セルロースでは隣り合う分子同士は裏返しの構造 で互い違いに結合している[4.2]。そのため、アミロースは不規則ならせん状の構造を持つ分 子となり、セルロースは完全に直線の分子である。アミロースはデンプン総量のおおよそ 20%を占めており、その分子量はおおよそ数 1000 である。基本的には直鎖上の分子構造で あるが、α1-6 結合により少数の分枝を持つ場合もある。ヨウ素デンプン反応においてはら せん構造の内部にヨウ素が入り込み呈色する。

## 2) アミロペクチン

アミロペクチンは α-D-グルコピラノースの 1,4 グリコシド結合した主鎖と、α-1,6 グリコ シド結合による分岐した構造の分子で、各分岐は平均 24~30 残基ごとに存在し、総分子量 は数百万個に達する非常に大きな分子である[4.2]。デンプンは植物におけるエネルギー貯蔵 物質であるが、グルコースのみを素材としているという点で動物性のエネルギー貯蔵物質 であるグリコーゲンと共通する。しかし Fig.4.5 の通りアミロペクチンとグリコーゲンは構 造が大きく異なる。グリコーゲンが単純に完全にランダムにグルコースが結合し、成長し ているのに対して、アミロペクチンは一方向に分枝を作りながら成長する。この成長の仕 方は各種の酵素の働きにより厳密に決まっており、品種や種類によってそれぞれ異なる形 状を持つ。



Fig.4.5 グリコーゲンとアミロペクチンの分子構造の比較[4.3]

4.2.3 アミロペクチンの合成

以下にデンプンの合成について説明する。デンプンは基本的に Fig.4.6 の図に示すような 過程で合成されていると考えられている。

基本的には、光合成によって合成されたグルコースを基礎に合成されるが、下記の4つの酵素によりその合成は制御されていると考えられている。

基本的に表の上から 3 つの酵素はアミロペクチンを成長させるための酵素であるが,最 下部の酵素のみ他とは違い分子鎖を短くする働きを持つ。

Table 4.2 アミロペクチン合成にかかわる酵素[4.4]

酵素名	主な働き
スターチシンチターゼ(SS)	α-1.4 結合の伸長
ADP-グルコースピロフォスフォリラーゼ	ADP グルコースの生成
(AGPase)	
デンプン枝造り酵素(BE)	α-1.6 結合の生成
デンプン枝切り酵素(DBE)	<b>α-1.6</b> 結合を加水分解



Fig.4.6 デンプン合成の模式図[4.3]

4.2.4 デンプンの SFG 分光による測定

ここまでに挙げたデンプン等のスペクトルは先行研究により測定されている。その結果 を Fig.4.7 および 4.8 に引用する。

Fig.4.7 中の a,b はシャジクモの造卵器からの SFG スペクトル, c はアミロペクチン, d はアミロース, e はグルコース, f はβシクロデキストリンの結果である。この結果を見る と,同様にデンプンと一括りにされることの多いアミロースとアミロペクチンにおいて SFG 光の発生において極端な違いがあることがわかる。また,シャジクモからのスペクト ルとアミロペクチンからのスペクトルの形状は似ておりまたピーク位置もほぼ一致してい るため,デンプンからの SFG スペクトルはアミロペクチンが主であることがわかる。

Fig.4.8 はもち米の SFG スペクトルの測定結果である。コメの写真の右側の黄色い場所 が胚,大半を占める薄い白色が胚乳,両者の間でより白く見える場所が破砕領域と呼ばれ る場所である。スペクトルの結果はこのうちの破砕領域(a)とそれ以外の胚乳(b)~(d)で測定 されている。スペクトルの形状は測定場所により違うが,すべてのスペクトルにおいて Fig.4.9 のアミロペクチンのピークと同様の位置にピークがみられる。またスペクトルの強 度に着目すると(a)の位置で最も大きく他の位置では比較的弱いことがわかる。



Fig.4.7 シャジクモおよび糖鎖の SFG スペクトル[4.5](a)シャジクモの造卵器全体、(b)シャジクモ造卵器の一部(c)アミロペクチン(d)アミロース



Fig.4.8 もち米の胚乳からの SFG スペクトル[4.6]

#### 4.3 魚鱗の概要

4.3.1 魚鱗[4.8]

鱗は古生代の無顎類が備えていた歯質の装甲板から変化したものと言われている。
鱗の
発達は 2 つの方向へ進み、一つは軟骨魚類の楯鱗に、もう一つは硬骨魚類に見られるコズ
ミン鱗、硬鱗、円鱗および櫛鱗へと変化した。

# (a) 楯鱗

楯鱗は軟骨魚類に見られる。楯鱗は構造と発生が歯と同じであるため皮歯とも呼ばれる。 体表に突出する棘の部分と,鱗の内側の真皮層へ根を下ろす菱形の基底板からなる。棘の 部分はまた内側から髄,歯質およびエナメル層の3層に分けられる。髄は結合組織からな り,基底板の小孔を通して神経や血管が入り込んでいる。歯質は固く,内部に髄から入り 込む細管が分布している。エナメル質は光沢があり,棘の先端部分を覆っている。

(b) コズミン鱗と硬鱗

コズミン鱗は主として化石魚類に見られ,底面から表面に向かって板骨層あるいはイソ ペディン,歯質に似たコズミン層および光沢のある薄いエネメル層あるいは硬歯質の3層 からなり,コズミン層には多数の髄腔,血管腔,細管などがある。

硬鱗はジズミン鱗のコズミン層が退化して 2 層になり,表層のエナメル層が肥厚してガ ノイン層に置き換えられた状態にある。

(c) 円鱗と櫛鱗

円鱗と櫛鱗は硬骨魚類とくに真骨類に普通にみられるもので一般にこれらの鱗は薄く, 底層のコラーゲン繊維からなる繊維板層と表面の固い骨質層からなる。円鱗はマイワシ, サケ,アユ,フナ、メダカなどに見られ表面はなめらかである。櫛鱗はウスハダカ、スズキ、 マダイ、カナガシラなどに見られ、鱗の後部露出面に小棘が並ぶ点で円鱗と異なる。

60

4.3.2 ウロコの構造

ウロコを形成するコラーゲン繊維は一本約 100nm のコラーゲン繊維が整列して存在して いる。その繊維質は数µmごとに繊維方向が角度 90° ずつ変化するベニヤ板のような階層 構造をとる。このようなコラーゲン繊維の構造はウロコだけではなく人の角膜実質や骨組 織においても観測される[4.9]。

魚は基本的に地上よりも低温環境となる水中で生活しているため,熱帯産の一部を除き, 編成温度が低い。これは,魚の持つコラーゲンは構造安定化に必要なプロリンが少ないた めである。このためほとんどの魚のコラーゲンは室温環境下では構造が維持されない[4.9]。 しかし、ウロコ中のコラーゲンはコラーゲン繊維の骨組みにカルシウムを主成分とするミ ネラルが結合して強固な構造を持つ。また、コラーゲン分子は分子間で強固な架橋構造を 持ち不溶性のコラーゲン繊維となっている。

## 4.3.3 コラーゲンの分子構造[4.2][4.10]

コラーゲンはその構造から 28 種類に分類されている(Table 4.3)。全ての型のコラーゲンは 3 重らせん構造を持っているが、すべての分子が 3 重らせん構造を持っている場合もあれば 一部のみにらせん構造を持つものもある。成熟した I 型コラーゲンは約 1000 のアミノ酸を 含み前者に属する。鎖の一つ一つは α 鎖と呼ばれ 1 巻き 3 残基の左巻きポリプロリンらせ ん構造を作っている。この α 鎖が 3 本集まり右巻き超らせんを造り直径 1.4nm,長さ約 300nm の棒状の分子を形成する。この直鎖同士は水素結合により結合している。コラーゲ ンは皮膚や骨、腱、軟骨、歯の主要繊維成分である [4.2]。コラーゲン分子はグリシン・プ ロリン・ヒドロキシプロリンの 3 つの基本となる分子からなるが、コラーゲンの分子鎖に おいて 3 残基ごとに必ずグリシンが現れるという特徴がある。他の 2 残基は基本的に任意 であるためこのような繰り返し構造は(Gly-X-Y) とあらわされる。今回測定する鱗中のコラ ーゲンは I 型と呼ばれるものであり、皮膚、腱、骨などに多く含まれる。

型	組織
Ι	ほとんどの結合組織、骨を含む
II	軟骨、硝子体
III	皮膚、肺、脈管系、など伸展性結合組織
IV	基底膜
V	組織中の微量成分I型コラーゲンを含む
VI	ほとんどの結合組織
VII	アンカー(錨)繊維
VIII	内皮細胞、その他
IX	II 型コラーゲンを含む組織
Х	肥大軟骨
XI	II 型コラーゲンを含む組織
XII	II 型コラーゲンを含む組織
XIII	多くの組織
XIV	I 型コラーゲンを含む組織
XV	多くの組織
XVI	多くの組織
XVII	皮膚のヘミデスモソーム
XVIII	多くの組織(例、肝、腎)
XIX	横紋筋肉種細胞株細胞

Table 4.3 コラーゲンの種類(一部)[4.10]

第4章参考文献

[4.1] S. Ball, H.P. Guan, M. James, A. Myers, P. Keeling G. Mouille, A. Buléon, P. Colonna, J. Preiss, Cell, Vol. 86 349–352 (1996)

[4.2] D. Voet, J.G. Voet, C.W. Pratt, Biochemistry Third edition (Wiley, Hoboken, New Jersey, 2004).

[4.3] Y. Nakamura, Plant and Cell Physiology Vol. 43 718-725 (2002)

[4.4] 藤田直子, 化学と生物 Vol.51 400-407 (2013)

[4.5] G. Mirzutani, Y. Miyauchi, Surf. Interface Anal. Vol. 42 1675–1679 (2010)

[4.6] Hongyan Li, Yoshihiro Miyauchi, Nguyen Anh Tuan, Goro Mizutani, Mikio Koyano, Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology 2012, 3, 286-291 (2012)

[4.7] 松尾孝峯編「稲学大成」第一卷 形態編 農村漁村文化協会 (1990)

[4.8] 岩井保,「新水産学全集4 水産脊椎動物 II 魚類」恒星社厚生閣 (1985)

[4.9] 生駒俊之、田中順三、表面科学 Vol.32 545-550 (2011)

[4.10] R.K. Murray, D.A. Bender, K.M. Botham, P.J. Kennelly, V.W. Rodwell, P.A. Weil, Harper's Illustrated Biochemistry 28<sup>th</sup> Edition (McGraw-Hill Companies, Inc. New York, 2012)

[4.11] L. Kong et al, The Journal of Physical Chemistry B 118.7, 1775-1783 (2014)
# 第5章 実験結果

#### 5.1 魚の鱗の測定結果

## 5.1.1 試料の準備

魚の中で私はマダイの鱗を試料として用いた(Fig.5.1)。鱗からこの真鯛は2年物であると 推定される。

マダイを試料とした理由は、一つ目は鱗が他の魚に比べると大きく、断面を観察しやすいこと。もう一つはコラーゲン含有量が 41%[5.8]と海洋性の魚においては重量なため、強い SFG 光の発生が期待できると考えたからである。

比較試料とすることのできる純粋コラーゲンからの SFG スペクトルはすでに知られてい るデータが存在する[5.4]。しかしこれらの結果はネズミの尾の腱由来のもので,魚由来のも のとは異なる。そのため比較のためには魚に由来するコラーゲンを用いることが理想であ るが、魚由来のコラーゲンは変性温度が低い場合が多く[5.7],また測定のレーザーによる温 度上昇の影響も考えられるため、今回は変性温度の高い哺乳類のコラーゲン(牛のアキレス 腱由来)を比較試料として用いた。

試料は鱗を半分に切断し、それを生け花用の給水スポンジ(大創産業株式会社製)に突きさした状態で行った。(Fig.5.2)

実験では、断面の共焦点顕微鏡像とSFG像および断面のSFGスペクトルの取得を行った。 この時の測定偏光は AllPP である。



Fig.5.1 真鯛



Fig.5.2 マダイの鱗と給水スポンジ



Fig.5.3 鱗の断面の顕微鏡像

5.1.2 魚の鱗断面の SFG 測定結果

魚鱗断面における光学顕微鏡の白色光で照射した場合の CCD 像、共焦点線形像、共焦点 光和周波像を Fig. 5.4 に示す。

魚鱗は時間が経過すると皮膚に面していた鱗側に反り返ってしまうため、焦点を合わせることが難しい。そのため、鱗断面を3ヶ所にわたり撮影後に合成した。また、図の上が 外界に面していた鱗側、下が魚の胴体に面していた鱗側である。

Fig.5.4(a)の光学線形像を見ると,数十µm程度の層が積層していることが見て取れる。う ろこにおいては層ごとに繊維の方向が異なるため,反射率に違いが見えていると考えられ る。(b)の共焦点線形像でもおおむね同様であるが,濃淡の出方はわずかに異なる。(c)を見 ると,画像の濃淡は概ね(a)と一致している。この像中で白い点が多い場所は SFG の発生が 効率よく起きた場所である。また(c)においては,画像上部だけでなく,画像下部において も SFG 発生の濃淡が見て取れる。これは(a)の線形の光学顕微鏡の CCD 像よりもはっきり している。



Fig.5.4 魚の鱗断面の観察 (a)線形 CCD 像, (b)線形共焦点像, (c)SFG 像(2950cm<sup>-1</sup>)

5.1.3 魚の鱗の SFG スペクトルの解析

鱗断面の SFG 強度スペクトルと比較用の牛コラーゲンの結果を Fig.5.4 に解析結果を Table5.1 に示す。また,比較のために Fig.5.5 に鱗の IR スペクトルを示す。ただし, IR スペ クトルは断面のものではなく表面のものである。

Fig.5.4のSFG スペクトルを以下の式を用いてフィッティングした。

$$\left|\chi^{SFG}\right|^{2} = \left|\chi^{NR}\right|^{2} + \frac{\left|\chi_{V}\right|^{2}}{\left(\omega - \omega_{V}\right)^{2} + \Gamma_{V}^{2}} + 2\chi^{NR}\frac{\chi_{V}\left(\omega - \omega_{V}\right)}{\left(\omega - \omega_{V}\right)^{2} + \Gamma_{V}^{2}}\cos\varphi$$
$$-2\chi^{NR}\frac{\chi_{V}\Gamma_{V}}{\left(\omega - \omega_{V}\right)^{2} + \Gamma_{V}^{2}}\sin\varphi$$
(5.1)

γ<sup>NR</sup>:感受率の非共鳴成分

ω:入射光の波数

ω: 分子の共鳴周波数

$$\Gamma_{v}$$
: ピーク幅

 $\theta: \chi^{NR} \geq \chi_{V}$ の応答速度の違いによる位相差

Fig.5.4 において(a)が海に面していた鱗側であり、(b)が皮膚に面していた鱗側で,(c)が先 にもあげた牛コラーゲンの SFG スペクトルである。

すべてのスペクトルで 2950cm<sup>-1</sup> 付近に非対称形のピークが確認できる。解析結果ではピ ークの位置は Fig.5.4(a)2954±2.21cm<sup>-1</sup>, (b) 2948±.00003cm<sup>-1</sup>, (c) 2956±2.70cm<sup>-1</sup>でスペクトルの 半値幅は(a)85±29.5cm<sup>-1</sup>, (b) 81±.00002cm<sup>-1</sup>, (c) 76±27.4cm<sup>-1</sup> どの試料でもほぼ同じであること がわかる。解析結果から,非共鳴のバックグラウンドの非線形感受率と共鳴非線形感受率(ピ ークの高さに相当)を計算した。Table5.1 のこのスペクトルを比較すると,それぞれの試料 で(a)2.98±0.68×10<sup>-3</sup>(b) 2.54±0.227×10<sup>-3</sup> (c) 3.54±0.702×10<sup>-3</sup> とそれぞれ異なる値となった。具体 的には,魚の鱗からの SFG スペクトルと牛のコラーゲンのスペクトルでは,ピーク位置や ピーク幅は同じであるにもかかわらず,牛の方が鱗よりも感受率が大きくなっている。そ のため牛のコラーゲンの方が鱗のスペクトルよりも太く見える。

文献から、ウロコのコラーゲンと牛のコラーゲンの大きな違いはハイドロキシプロリン の含有量と不純物の量である[5.5]。他にもウロコにおいてはコラーゲン繊維が高密度に充填 しているため、一般に使われる動物の腱由来のコラーゲンよりも純度が高いという特徴が ある。このため、スペクトルの非共鳴成分の違いはコラーゲンの組成の違いや純度の違い に由来するものと考えられる。

SFG 像と SFG スペクトルの結果を見ると、画像においては海側と皮膚側とで見られるような変化をスペクトルにおいては見出すことができない。基本的に画像においては SFG 光の発生密度を見ており、スペクトルはその像の中の一点のみの SFG 強度測定である。スペ

クトル同士に大きな違いは見られないことから,SFG 像の海側と皮膚側の違いはコラーゲンの組成は同一でその密度の違いであることが考えられる。

SFG スペクトルのピークは, IR スペクトルではこのピークにあたる部分は弱くスペクト ルの肩のような状態の部分にあたる。また, IR スペクトルでは O-H 振動の領域にあたる 3000cm<sup>-1</sup>以上の周波数帯の吸収が大きいのに対し, SFG スペクトルにはその吸収帯はほぼ 一定となっている。この吸収帯は IR 分光においてアミド基の吸収と同定されているが[5.4] この吸収帯におけるアミド基の C-N 振動は弱いことが知られている [5.4]。そのためコラー ゲンの SFG スペクトルにおいては C-H<sub>2</sub>の伸縮振動のみが観測されている。



Fig.5.4 魚の鱗および牛アキレス腱由来のコラーゲンの SFG スペクトル(a)ウロコの外界に面 する側(Seaside)の SFG スペクトル, (b)ウロコの体に面する側(Body side)の SFG スペクトル, (c)牛アキレス腱由来のコラーゲンの SFG スペクトル



Fig.5.5 ウロコの IR スペクトル

	$\chi^{NR}/\chi_{V}$ (×10 <sup>-3</sup> )	Peak position	Peak phase	Peak width		
真鯛鱗海側(a)	2.98±0.678	$2954\pm2.21 \text{ cm}^{-1}$	16.2±103.5 °	$85\pm29.5~{\rm cm}^{-1}$		
真鯛鱗皮膚側(b)	$2.54 \pm 0.227$	$2948 \pm 0.00003 \text{ cm}^{-1}$	1.5±161.7 °	$81\pm0.00002~\text{cm}^{-1}$		
牛アキレス腱(c)	3.54±0.702	2956±2.7 cm <sup>-1</sup>	85.6±23.8°	$76\pm27.4 \text{ cm}^{-1}$		

5.2 胴割れ米と正常米の実験結果

5.2.1 試料の準備

試料は、平成22年収穫のコシヒカリと日本晴それぞれの正常米と胴割れ米(イネの胴割れ については第1章1.1.4(b)を参照)を用いた(Fig.5.4)。今回使用した試料は滋賀県にある農業 技術振興センターにおいて屋外栽培されたものを使用した。これらの試料の収穫日はコシ ヒカリが9月8日、日本晴が9月28日である。この年の滋賀県の気温は平年よりも2度ほ ど高くなっていた[5.10]。

試料はすべてデザインナイフ(Fig.5.5)で慎重に半分に切断し、その断面で測定を行った (Fig.5.6)。Fig.5.6 の左側の黒く見える部分が胚乳組織、左側の白く見える帯状部分を境にし て右側が胚組織である。胚と胚乳の境界の帯状の部分が今回測定した破砕領域(海綿状の胚 乳組織)である。この部分は比較的強い SFG 発生が起こる場所でもある[5.9]。また、胚乳に おいて画像が黒いのは、光がほとんど透過してしまって反射光が弱いためである。試料は 各々2 個ずつ用意し、各試料 2 か所ずつ測定し、その平均値を一つの試料の結果とした。場 所の選定はスペクトルを観測できない場所も存在するため完全に任意ではなく、スペクト ル測定が可能な程度の SFG 強度を持つ点を選んでいる。スペクトルの測定は、赤外光の波 数を 2750cm<sup>-1</sup>から 3150cm<sup>-1</sup> まで変化させて行った。測定回数は一点に付き 121 回、測定時 間は約 25 秒である。測定ステップは 10cm<sup>-1</sup>である。一回の測定に付き 41 点データを取得 しているため測定時間は約 17 分である。一つのスペクトルは4 つのスペクトルの平均であ るため、一つのスペクトルの蓄積時間は合計で 68 分である。 しかし測定の波長の変化は 手動であり、スペクトルの1 点に付き 1 個のデータを保存する手間があるため 15 分程度長 くなる。

測定偏光は AllPP である。



Fig.5.4 コメ試料, a はコシヒカリ, b は日本晴, 矢印のついたものが胴割れ米



Fig.5.5 コメの切断に使用したカッター



Fig.5.6 コシヒカリ正常米の顕微鏡観察

5.2.2 コメの SFG スペクトルの測定結果

Fig 5.7 および Fig.5.8 にコシヒカリと日本晴の AllPP 偏光での SFG スペクトルの結果を, Table 1 に解析結果を示す。測定は AllSP 偏光でも行ったが,ほぼ同様の結果となったため, AllPP の結果のみを載せた。また,参考のためにコシヒカリの IR スペクトルを Fig.5.9 に示 す。フィッティングの式は以下である[5.1]。

$$\left|\chi^{SFG}\right|^{2} = \left|\chi^{NR} + \frac{\chi_{1}e^{i\theta_{1}}}{\left(x - \omega_{1} - i\gamma_{1}\right)} + \frac{\chi_{2}e^{i\theta_{2}}}{\left(x - \omega_{2} - i\gamma_{2}\right)}\right|^{2}$$
(6.1)

各スペクトルは同条件で測定した参照試料の多結晶 ZnS のスペクトル測定の結果との比で ある。ここで使われているパラメーターは以下である

# χ<sup>NR</sup>:非共鳴の非線形感受率

χ:ピークの共鳴非線形感 受率

ω:ピーク位置

- 9:ピーク位相
- 各パラメーターの添え字はピークの番号を示す。



Fig. 5.7 コシヒカリの SFG スペクトル(a)正常なコシヒカリの SFG スペクトル, (b)胴割れした コシヒカリの SFG スペクトル



Fig. 5.8 日本晴の SFG スペクトル(c)正常な日本晴の SFG スペクトル, (d)胴割れした日本晴の SFG スペクトル



Fig.5.9 コシヒカリの IR スペクトル

Table 5.2 スペクトル解析結果

	コシヒカリ正常米	コシヒカリ胴割れ米	日本晴正常米	日本晴胴割れ米
$\chi^{NR}$	1.2±0.01	0.8±0.01	0.9±0.01	0.8±0.01
$\chi^{I}$	19.3±2.6	15.9±3.1	19.3±3.1	25.1±3.5
$\omega^1$	2913.7±2.0 cm <sup>-1</sup>	2916.0±2.5 cm <sup>-1</sup>	2913.9±2.7 cm <sup>-1</sup>	$2909.5 \pm 3.6 \text{ cm}^{-1}$
γ1	16.2±2.1cm <sup>-1</sup>	16.9±2.9 cm <sup>-1</sup>	$20.7 \pm 3.0 \text{cm}^{-1}$	$26.5\pm3.3 \text{ cm}^{-1}$
$\theta^{I}$	233.5±10.7°	203.2±14.5°	235.0±12.3°	266.9±13.2°
$\chi^2$	36.8±8.0	34.1±7.8	29.6±6.5	19.7±7.5
$\omega^2$	2970.1±3.1 cm <sup>-1</sup>	$2974.5\pm3.7 \text{ cm}^{-1}$	2966.5±3.2 cm <sup>-1</sup>	$2958.7 \pm 2.9 \text{ cm}^{-1}$
γ <sup>2</sup>	12.1±2.9cm <sup>-1</sup>	$16.0\pm4.1$ cm <sup>-1</sup>	12.42.7cm <sup>-1</sup>	12.2±3.6cm <sup>-1</sup>
$\theta^{2}$	75.4±4.5°	81.5±6.3°	64.3±6.1°	$48.0{\pm}15.8^{\circ}$

Fig.5.7 および Fig.5.8 をみるとすべての試料で 2920cm<sup>-1</sup>及び 2970cm<sup>-1</sup>付近に大きな SFG ピークが観測され、2950cm<sup>-1</sup>に深いディップが見られる。二つの特徴的なピークとディップ の形状はアミロペクチンの特徴的なスペクトル形状と類似しており、測定されたスペクト ルはアミロペクチンのものであると考えられる。これらのピークのうち 2920cm<sup>-1</sup>付近のピ ークは C-H 振動によるものと考えられ、また 2970cm<sup>-1</sup>付近のピークは C-H<sub>2</sub> 振動に由来する と考えられる[6.2][6.3]。また、低波数側のピークの幅を比較するとコシヒカリ正常米で 16.2 ±2.1cm<sup>-1</sup>、胴割れ米で 16.9±2.9 cm<sup>-1</sup>、日本晴れ正常米で 20.7±3.0cm<sup>-1</sup>、胴割れ米で 26.5± 3.3 cm<sup>-1</sup>となっており、どちらの試料でも胴割れ米の方が正常米よりもやや太くなっている。

グルコースから形成される糖鎖の SFG スペクトルは、分子構造の違いによりそれぞれ異 なる形状を持つ。例えば、グルコースとシクロデキストリンの結果では分子構造が大きく 複雑なデキストリンのほうがピーク幅は太い。さらに巨大な分子であるアミロペクチンで はスペクトルがより複雑な形となっている。これらはそれぞれグルコースがもととなって いる物質であるので共鳴する置換基も同様であるが、その構造が違うことによってスペク トルが変化している。アミロペクチンは非常に巨大であることから分子構造の種による違 いもかなり大きく、SFG スペクトルも種類により変化する[5.3]。よって、コメの特に日本 晴については胴割れ米と正常米とで分子の構造に変化が生じていることが推察される。

また、コシヒカリと日本晴の正常米同士を比較すると、コシヒカリの低波数側のピーク 幅が 16.2±2.1cm<sup>-1</sup>、日本晴で 20.7±3.0cm<sup>-1</sup>となっている。

SFG と IR とではどちらも C-H 振動の領域においてピークを持つ(SFG:2910cm<sup>-1</sup> および 2970cm<sup>-1</sup>, IR:2919cm<sup>-1</sup>および 2950cm<sup>-1</sup>)。低波数側のピークはほぼ同じ位置に出現している が,高波数側のピークの位置は一致していない。また IR スペクトルのピークがある位置 (2950cm<sup>-1</sup>)に SFG スペクトルではディップが形成されている。これは, IR スペクトルにお いては,吸収は誘電率の虚部の 2 乗に比例しているので基本的に近接したピーク同士は足 し合わせの関係のみとなるのに対して,SFG スペクトルにおいては,複素数の  $\chi^{(2)}$ の絶対 値の 2 乗に比例するためピークの位相の差により強め合いや打ち消される効果が働くため であると考えられる。

79

第5章参考文献

[5.1] 廣瀬千秋, SFG スペクトルの形(http://comp.chem.tohoku.ac.jp/hirose/chap8-1.pdf)

[5.2] Y. Miyauchi et al., J. Opt. Soc. Am. A 23, 1687-1690 (2006)

[5.3] L. Kong et al, The Journal of Physical Chemistry B 118.7, 1775-1783 (2014)

[5.4] R.Mendoza, D.R.Yankelevich, M. Wang, K.M. Reiser, C.W. Frank, A. Knoesen, Biophys. J. **93**, 4433 (2007).

[5.5] R. Duan et al. Food Chem.112, 702 (2009)

[5.6] 猪飼篤 著,タンパク質の辞典,朝倉書店(2008)

[5.7] 生駒俊之、田中順三、表面科学 Vol.32 545-550 (2011)

[5.8] 加藤隆史,バイオミネラリゼーションとそれに倣う新機能材料の創製,シーエムシー出版(2007)

[5.9] Hongyan Li, Yoshihiro Miyauchi, Nguyen Anh Tuan, Goro Mizutani, Mikio Koyano, Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology 2012, 3, 286-291 (2012)

[5.10] Japan Meteorological Agency Hikone Local Meteorological Office (2011)

(http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/monthly\_s1.php?prec\_no=60&block\_no=47761&yea r=2011&month=&day=&view=,

http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/nml\_sfc\_ym.php?prec\_no=60&block\_no=47761&yea r=&month=&day=&view=) 第6章 考察

本節では魚の鱗と胴割れ米の SFG スペクトルについての考察を行う。

基本的にどちらの試料も天然由来のものをほぼそのまま測定しているが、そのいずれにおいても比較的強い SFG 光の発生を確認した。

6.1 魚の鱗の SFG に関する考察

Fig.5.4 を見ると鱗とコラーゲンのすべてのスペクトルで 2950cm<sup>-1</sup>付近に非対称な形状の ピークを持つ。これは他のコラーゲンの結果とも類似しており、また同じ装置で測定した 牛のコラーゲンとも同様の結果が得られているため、鱗中のコラーゲンの測定ができたと 考えられるが、本研究で行った実験は IR 測定における指紋領域の測定ではないため、厳密 ではない。しかし、魚の鱗を構成する主成分は繊維状のコラーゲンと無機物の水酸アパタ イトであり、後者は C-H 基を持たないため、本研究のような C-H 振動領域の測定では強い 共鳴 SFG を発するとは考えにくい。そのため、本研究の共鳴ピークを持つようなスペクト ルはコラーゲンに由来するものと考えられる。

陸上生物に由来するコラーゲンと水中生物に由来するコラーゲンとでは組成が異なり, 特に魚のコラーゲンは不純物が少ない[6.4]一方,牛のコラーゲンには脂質などの不純物が多い[6.6]。牛のコラーゲンと鱗のスペクトルの解析結果を比較すると牛のコラーゲンの方が非 共鳴の非線形感受率が大きい。そのため、コラーゲンのSFGスペクトルにおいてはコラー ゲンの組成等を反映した結果が得られるものと考えられる。本研究で試みた範囲内では純 粋な魚コラーゲンのSFG発生を確認することができなかったが、これは単純にコラーゲン を抽出する過程で3本鎖の分子構造が壊れているためであると考えられる。言い換えると、 コラーゲンがその構造を維持している場合でない限りSFGスペクトルは測定できないと考 えることができる。このことから、コラーゲンからのSFG発生はその構造に依存すると考 えることができる。

また, IR で測定される O-H 振動の領域の吸収は, SFG スペクトルにおいては測定されない。これは SFG 測定において O-H の振動が観測されるためには水分子等が配向している必要があり, ウロコ内部においてはそのような状態で O-H 基が存在していないためであると考えられる。

次に、共焦点 SFG 像を比較する。SFG 像の上側で SFG 強度が強く下側で SFG 強度が弱 いという傾向があった。魚の鱗はその多くが繊維層からなるが、この層は繊維の方向が 90° 異なる層が積み重なってできている。この層は数十 µm 程度の厚さを持つため一般的な光学 顕微鏡で観察可能な大きさである。そのため光学顕微鏡像と線形共焦点顕微像ではこの向 きの違いが反射率の差となって濃淡としてあらわされていることが考えられる。一方で、 SFG 顕微鏡像における濃淡は単純に反射率の差よりも繊維方向の向きの違いによるコラー ゲン繊維の向きの違いが大きいことが考えられるが、解析結果では誤差が大きく詳細はわ からない。繊維の方向による変化を見るためには方位角に依存する SFG 光の変化を測定す ることが必要であるが、本顕微鏡にはそのための機能がない(手動で試料の向きを変えることもできるが、そうすると測定位置も変わってしまうため難しい)ため本研究では行っていない。

6.2 米試料の SFG 測定に関する考察

本研究は、共焦点光和周波顕微鏡の性能評価という側面を持つ。特にその観点を念頭に 置きコメ試料の結果の SFG スペクトルの考察を行う。

本顕微鏡に限らず,2次の非線形光学顕微鏡は特定の場所や物質を選択的に測定できるこ とがわかっている。そのため、本研究は生物中の特定分子に的を絞った測定を行った。

まず米に関しては、以前は SFG 光強度が強いモチ米に絞った測定を行っていたが、今回 はそこから対象を拡大し、うるち米の測定を行った。うるち米のデンプンはアミロースと アミロペクチンの 2 種類からなるが、今回のスペクトルは 2915cm<sup>-1</sup> と 2970cm<sup>-1</sup>付近にピー クを持ち 2950cm<sup>-1</sup> にディップを持つという特徴的なスペクトル形状から他研究と同様にア ミロペクチン由来のものを測定したと考えられる[6.2][6.5]。

米の SFG 発生源がアミロペクチンに由来することは以前の研究からわかっていたことで あるが、今回はさらに一歩進めてコシヒカリと日本晴といううるち米の 2 品種の米を用意 して測定を行った。

それぞれの正常米と胴割れ米の比較から,日本晴の試料において2本ある特徴的なピークのうち主に低波数側のピークに計算された誤差より大きな違いがみられた。具体的には 正常米の方のピーク幅が約6cm<sup>-1</sup>細い傾向にある。また両方の品種において胴割れ米は正常 米よりもSFG光が全体的に小さくなっていた。胴割れ米の発生は収穫期よりも登熟初期の 気象条件(主に気温)に影響されることがわかっており,このことから胴割れ発生の原因はデ ンプンの異常ではないかと推察されている[6.7]。これらと,米の主成分がアミロペクチン(う るち米の場合概ね半分)であることを考慮すると,胴割れ米と正常米では主にアミロペクチ ンの分子の構造などに何らかの異常が起こっていることがSFG計測からも推定できる。

もともとアミロペクチンの分子は小さく結晶性を持つ物質である。このような物質にお ける SFG 光の強度は結晶の配向がそろっている場合に強くなり、それが乱れると弱い強度 となる。また、今回測定したようなコメの破砕領域においてはデンプン粒の大きさがその 外側(概ね数 µm の大きさ)よりも小さくなっている。このことから、この領域において発生 する SFG 光は分子の配向の影響がほかの場所よりも大きいことが考えられる。そのため胴 割れ米と正常米における SFG スペクトルの強度の違いはデンプン粒の配向の影響が考えら れる。アミロペクチンの合成は主に酵素反応によっており、気温の違いがこの反応に何ら かの影響を与えたと考えられる。

純粋にコシヒカリと日本晴を比較しても同様の傾向がみられ、コシヒカリにおいて低波 数側のピーク約 4cm<sup>-1</sup>細い。精米状態であるが、この 2 種は米粒の固さに違いがある[6.1]。 基本的にコシヒカリのほうが米質が固く、日本晴は柔らかい。また、胴割れ米においても 胴割れしているものの方が正常な状態のコメよりも米質が全体的に脆くなっている。どち らにおいても米質が固い方のスペクトルが細くなっているため、SFG スペクトルはこの違 いを見分けている可能性がある。

次にスペクトルの形状について考察する。アミロペクチンのスペクトルは2 つのピーク

とその間にディップを持つという形状である。今回は2つのピークの間にディップがある ため、ピークの位相が正負逆転していることが考えられ、解析結果からもピークの位相の 差が概ね 120°から 200°程と計算されている。具体的には正常なコシヒカリで 158.1±14.1°, 胴割れコシヒカリで 118.8 ± 22.4°, 正常な日本晴れで 163.7±11.9°, 胴割れ日本晴で 202.6±13.4°となっている。低波数側のピークは C-H 振動の高波数側のピークは C-H2 振動 に由来すると考えられる。そのためピークが重なり合う 2950cm<sup>-1</sup> 付近で SFG 信号の打ち消 し合いが起こりピーク間にディップが形成される。実際コシヒカリの ATR 測定において SFG 測定の範囲内で 2919cm<sup>-1</sup>および 2950cm<sup>-1</sup>の 2 つのピークが隣接して測定されている。 文献によれば、アミロペクチン内のグルコピラノース環において炭素原子は C1-C6 まで 6 つ存在するが、C1とC6以外はそれぞれC-Hの結合の向きが互いに逆向きとなっているた め完全に効果が打ち消され,結果には影響しない(Fig.6.1)。残った C1 の C-H 基と C6 の C-H2 基の向きに着目すると置換基の向きは 180°以下の角度を常になしているため完全には打 ち消されずそれぞれに由来する SFG 光が発生する。この時の CH,基のみは他の炭素と違い 環の外に存在するため置換基の向きにある程度の任意性がある。もしもこの CH<sub>2</sub>基が C1 の 炭素と逆向きに存在しているとするとそれぞれの双極子モーメントも逆向きであり,  $\chi^{(2)}$ の 符号も正負が逆となる。このためそれぞれのピークが重なり合うところで信号が打ち消さ れディップが形成されると考えられる[6.2][6.3]。これが二つのピークの間のディップの原因 と考えられる。このような指摘は本研究が初めてである。



Fig.6.1 グルコースの分子構造[6.2]

第6章参考文献

[6.1]奥野元子他 日作紀 61(2) 244-250(1992)

[6.2] L. Kong et al, The Journal of Physical Chemistry B 118.7, 1775-1783 (2014)

[6.3] D. Voet, J.G. Voet, C.W. Pratt, Biochemistry Third edition (Wiley, Hoboken, New Jersey, 2004)

[6.4] R. Duan, et al. Food Chemistry, 112, 702 (2009).

[6.5] Y. Miyauchi et al., J. Opt. Soc. Am. A 23, 1687-1690 (2006)

[6.6] 生駒俊之、田中順三、表面科学 Vol.32 545-550 (2011)

[6.7] 長田健二, 佐々木良治, 大平陽一, 日本作物学会紀事 Vol. 82 42-48 (2013)

### 第7章 結論と今後の展望

本研究は共焦点光和周波顕微鏡の評価,主として生体サンプルに対する測定ツールとし ての性能評価を行うために行った。そのための測定試料としてうるち米と魚の鱗を取り上 げた。それぞれ解析の対象としたのは,試料そのものではなく,試料中の特定分子であっ た。米においてはデンプンの一種であるアミロペクチンを,鱗においてはコラーゲンを測 定した。それぞれは単体で2次の非線形光学効果が特異に発生することがわかっている物 質であり種々の米粒や魚鱗においてもこの2次の非線形応答を観察することができた。2次 の非線形光学効果は分子の配向が乱雑さを含むと弱くなるので,生体サンプルでもこれら の分子が観測できたということは分子に配向があるということを意味している。以下にそ れぞれの結果をまとめる。

魚のウロコにおいては、断面の SFG 像と断面からの SFG スペクトルを測定した。その結 果、鱗中のコラーゲンの分布を確認することができた。今回のウロコのような薄い試料の 断面を測定し分析できたことは、今後の本顕微鏡による生物試料の測定においては薄いサ ンプルの断面を測定できるという意味で一つの重要な測定技術となると考えられる。

米の測定においては、正常米と胴割れ米のスペクトルにおいて 3000cm<sup>-1</sup> 領域のピーク群 の低波数側のピークに違いがみられた。SFG スペクトルにおいては、分子構造の違いがス ペクトルの太さとなって表れるという結果がすでに出ているため、この結果は正常米と胴 割れ米においてアミロペクチンの構造に変化が生じているという推定を補強する形となる と考えられる。

以前の研究では、アミロペクチンの SFG スペクトル中の 2950cm<sup>-1</sup>付近のディップの原因 は不明確であったが、今回の結果の解析結果から、ピークの位相の違いを見出した。この ことは、文献との比較から、アミロペクチンの構成単位となっているグルコースの置換基 の向きの違いがスペクトルのディップとなっていることを示唆していると考えることがで きる。 今後の展望

ここまでに本顕微鏡を用いて行われた研究は本研究を含めほぼ試料の表面付近での測定 に限られている。本顕微鏡は共焦点機構を持つ顕微鏡であるから,試料内部方向の観察が 可能であるはずであるが,共焦点機構の要であるピンホールの径を小さくすると,シグナ ル光の減少を伴うため,コントラストが低下し鮮明な画像の取得は難しくなる。表面の研 究において特異的に用いられていることの多い 2 次非線形光学顕微鏡の現状を考えると, こういったバルク方向の測定は今後の発展を考えると重要であると思われる。今回の研究 までの蓄積でそのような測定は可能であると考えられるが,長時間の測定が必須となるた め,まだ実現はしていない。

また試料に関しては、米一つをとっても測定対象が少数の品種に限られているため、他 の品種のコメとの比較が、なおも必要であると考えられる。コメは物性の異なるいくつも の品種から成り立つため、それらの特性の違いとスペクトルの違いを定量的に調べること ができれば一定の法則性が見いだせると考えられる。

また、今回の研究によりコメの SFG 測定によってコメ中のアミロペクチンを定量的に測 定することができる可能性が出てきたため、今後はアミロペクチンのさらなる理解のため、 特に不明確な点の多い登熟初期のコメ試料をサンプルとして測定することが計画されてい る。もともとアミロペクチンは分子構造が複雑かつ巨大であるためその解析が既存の方法 ではまだ難しいところがある。この計画ではイネの登熟段階においてアミロペクチンが同 じものなのか、といったところから始めていく。SFG 測定だけでどのようにアミロペクチ ンが変化しているかを判別することは難しいが、本研究とそれ以前の研究から、SFG 測定 ではアミロペクチンの高次構造違うサンプル同士を比較するときにその違いを識別するこ とができると考えられているため、コメの成長段階における構造の違いを見いだせるかど うかを詰めていく計画である。

### 謝辞

本研究を行うにあたって指導教官である水谷五郎教授には、研究その他のことに対して 多くのご指導、ご助言をいただき深く感謝申し上げます。試料を始め、研究について様々 なご助言をいただきました、滋賀県立大学の長谷川博先生深く感謝を申し上げます。コメ 試料の提供をいただきました滋賀県立農業技術振興センターの研究員の方々にお礼を申し 上げます。うろこの試料を提供していただきました能美市の料理屋一八の寺岡さんにお礼 を申し上げます。また、私に研究のやり方を教えていただきました、元研究員の李紅燕さ ん、先輩の村本いずみさん、私のもとで研究および実験を手伝ってくれた、小川敦司さん、 中村惇さん、西田貴博さん、皆様に深く感謝を申し上げます。最後になりますが、私の国 際会議への旅費を補助していただきました、北陸先端科学技術大学院大学へ深く感謝を申 し上げます。

# 業績一覧

刊行論文

 Wataru Kouyama, Athushi Ogawa, Li Hongyan, Haruyuki Sano Yoshihiro Miyauchi and Goro Mizutani

"Sum Frequency Generation Confocal Microscopy Observation of a Fish Scale" e-J. Surf. Sci. Nanotech. Vol. 12 (2014) 259-262

 Wataru Kouyama, Takahiro Nishida, Khuat Thi Thu Hien, Goro Mizutani, Hiroshi Hasegawa, and Hiroaki Miyamura

"Optical Sum Frequency Generation Spectroscopy of Cracked Nonglutinous Rice (Oryza sa-tiva L.) Kernels", J. Biomater. Nanobiotechnol. Vol. 7 13-18 (2016)

国際学会

 Wataru Kouyama, Athushi. Ogawa, Li Hongyan, Haruaki Sano, Yoshihiro Miyauchi and Goro Mizutani

"Sum Frequency Generation Confocal Microscopic Observation of Fish Collagen"

9th International Symposium on Atomic Level Characterizations for New Materials and Devices '13, December 5, 2013, Hawaii, USA (Poster)

2. Wataru Kouyama, Takahiro Nishida, Khuat Thi Thu Hien, Goro Mizutani, Hiroshi Hasegawa, Hiroaki Miyamura

"Analyzing Cracked Non-glutinous Rice Kernels by SFG spectroscopy"

17th International conference on luminescence and Optical spectroscopy of condensed matter, July 15, 2014, Wroclaw, Poland (Poster)

国内学会

1. 興山渉,小川敦司,李紅燕,水谷五郎,宮内良広, Nguyen Anh Tuan 「共焦点光和周波顕微鏡による発芽したモチ米断面の観察」 日本物理学会 2011 秋季大会 2011 年 9 月 21 日(富山大学,ポスター)

2. 興山渉,小川敦司,李紅燕, Nguyen Anh Tuan,水谷五郎 「発芽したモチ米断面の共焦点光和周波顕微鏡像」

平成 23 年度応用物理学会北陸·信越支部学術講演会 2011 年 11 月 19 日(金沢歌劇座,口頭)

3. 小川敦司,興山渉,李紅燕,佐野陽之,水谷五郎,宮内良広

「共焦点光和周波顕微鏡を用いた魚コラーゲンの観察」

2011年度日本物理学会北陸支部定例学術講演会 2011年11月26日(福井大学、口頭)

- 興山渉,小川敦司,李紅燕,Nguyen Anh Tuan,長谷川博,宮内良広,水谷五郎 「共焦点光和周波顕微鏡による胴割れうるち米の観察」
   2011 年度日本物理学会北陸支部定例学術講演会 2011 年 11 月 26 日(福井大学,口頭)
- 5. 小川敦司,興山渉,李紅燕,佐野陽之,水谷五郎,宮内良広 「フィッシュコラーゲン試料を用いた共焦点光和周波顕微鏡の性能評価」 第22回光物性研究会 2011 年 12 月 10 日,(熊本大学工学部,ポスター)
- 6. 興山渉,小川敦司,李紅燕, Nguyen Anh Tuan,宮内良広,水谷五郎
  「発芽したもち米試料の共焦点光和周波顕微鏡観察」
  第 22 回光物性研究会 2011 年 12 月 10 日,(熊本大学工学部,ポスター)
- 7. 興山渉,小川敦司,李紅燕, Nguyen Anh Tuan, 長谷川博, 宮村弘明, 宮内良広, 水谷 五郎

「共焦点光和周波顕微鏡を用いた胴割うるち米の観察」

日本物理学会 2012 年年次大会 2012 年 3 月 24 日, (関西学院大学, ポスター)

8. 中村惇志,興山渉,長谷川博,宮村弘明,宮内良広,水谷五郎 「うるち米およびもち米の光和周波分光」

日本物理学会 2012 年秋季大会 2012 年 9 月 18 日(横浜国立大学,ポスター)

9. 興山渉,中村惇志,宮内良広,水谷五郎

「共焦点光和周波顕微鏡によるタマムシ鞘翅の観察」

- 日本物理学会 2013 年秋季大会 2013 年 9 月 26 日(徳島大学, ポスター)
- 長谷川博・興山渉・李紅燕・水谷五郎・宮村弘明・日野耕作
   「光和周波分光法による米粒の観察」
   2012 年 12 月 8 日(土) に第 174 回近畿作物・育種研究会例会(口頭)
- 11. 興山 渉,西田貴博,長谷川博,宮村弘明,水谷五郎「胴割れしたうるち米の光和周波分光」第 23 回光物性研究会 2013 年 12 月 11 日(大阪市立大学,ポスター)

12. 興山渉,西田貴博,中村惇志,水谷五郎

「共焦点光和周波顕微鏡によるタマムシ翅鞘中のキチンの観察」
日本物理学会 2014 年年次大会 2014 年 3 月 29 日 (東海大学, ポスター)
13. 西田貴博,興山渉, Khuat Thi Thu Hien,水谷五郎
「共焦点光和周波顕微鏡によるコガネムシ翅鞘の観察」
第5回 SFG 研究会 2014 年 8 月 3 日(筑波大学, ポスター)

14. 興山涉,西田貴博, Khuat Thi Thu Hien,水谷五郎,長谷川博,宮村弘明

「共焦点光和周波顕微鏡による米粒中デンプンの比較」

第75回応用物理学会秋季学術講演会2014年9月(北海道大学,口頭)