レーザーオリジナル

ナノ秒パルスレーザー誘起光音響効果
による生体試料の測定丹野直弘*・築瀬 聡之*・横戸 健一*
及川和夫**・鎌田 仁**

(1986年 4 月14日 受理)

Measurement of Living Samples by Nanosec Laser-
Pulse-Induced Photo-acoustic EffectNaohiro TANNO*, Satoyuki YANASE*, Kennichi YOKOTO*
Kazuo OIKAWA** and Hitoshi Kamada**

(Received April 14, 1986)

The paper presents some measurements of the ultra-trace of living cells and the depth of NO₂ exposure of plant by using a nanosec laser-pulse-induced photoacoustic method. For the purpose of the measurement, we produced a coaxial stress transducer composing a z-cut LiNbO₃ single crystal. The photoacoustic measurement was performed using some samples such as human leukocyte, begonia and petunia.

1. はじめに

1940年頃からガス分析計などに応用されてきた光音響効果は、単色性に優れ高輝度な光源であるレーザーを用いることで、気体のみならず、固体、液体や従来の方法では測定が困難な高光散乱体、不透明体や生物試料に対する有効な測定手段となり、今日では ppb から ppt 領域の極微量分析法としても、多くの関心を集めるようになった¹⁻⁵⁾。

このレーザー誘起光音響分光法の基本的測定

法は、CWレーザー光を音声周波数で変調して試料を照射することで発生した熱源による光音響信号をマイクロフォンで検出することである。最近では、擬似ランダム変調を利用した相関光音響分光法^{6,7)}や、2周波レーザーを用いる差分吸収光音響分光法⁸⁾などの研究も行なわれ、測定精度の向上が計られている。この他に、光源にパルスレーザーを用い、高速応答可能な圧電性トランスデューサーなどで信号を検出するパルスレーザー誘起光音響分光法が主にCO₂レーザーを用い行なわれている⁹⁾。この二つの方法の主な違

* 山形大学工学部電子工学科 (〒992 米沢市城南 4-3-16)

** 山形大学工学部応用化学科 (〒992 米沢市城南 4-3-16)

* Dept. of Electronics, Faculty of Engineering, Yamagata University (992 Johnan 4-3-16, Yonezawa Yonezawa-shi).

** Dept. of Chemistry, Faculty of Engineering, Yamagata University (992 Johnan 4-3-16, Yonezawa-Yonezawa-shi).

いは、前者が試料の光エネルギーの吸収による熱源からの熱拡散による圧力変動を測定対象としているのに対し、後者はこの熱源による熱弾性効果で発生する弾性波をその対象としている点である¹⁰⁾。光音響効果において熱弾性効果が支配的になるのは、レーザーのパルス幅がマイクロ秒以下の時である。パルスレーザーを用いると、CWレーザー光に較べて光エネルギーの音響信号への変換効率が良いので、生体などの熱的、光学的に損傷を受け易い試料を損うことなく高感度で測定することが容易になる。これは高分解能で試料の極微量物質の分布を測定する際に、レーザー光を集光して高輝度で使用する必要がある場合には特に顕著になる特徴である。しかし、弾性波は高周波成分を含むので、その帯域で良好な特性を有するトランスデューサーが必要となる。

本研究ではこれまでほとんど試みられていないナノ秒パルスレーザー誘起光音響効果を用いた生体試料の極微量検出とNO₂ガスの汚染度測定を試みた。光源にパルス幅数nsecの窒素レーザー励起波長可変レーザーを用いることから、まずLiNbO₃単結晶を用いた同軸型トランスデューサーを試作し、これを用いて生体試料を対象に測定を行なったので、その実験方法や測定結果などについて報告する¹¹⁾。

2. パルス応答光音響効果の原理

赤外よりも短い波長の光で試料を照射すると良く知られた電子遷移により光エネルギーを吸収する。励起電子はその後蛍光や燐光を発するか、あるいは熱になる無放射遷移で基底状態へ緩和する。一般にこの緩和過程は数ナノ秒と速いので熱弾性効果を引き起し、弾性波が生じて光音響信号となる。したがって、この問題を解析する基礎となる式は、熱源になる初期温度からの超過温度分布を表わす熱伝導方程式と弾性波を表わす波動方程式であり、それらは次のように表わされる。

$$\nabla^2 \theta = \frac{1}{\kappa} \frac{\partial \theta}{\partial t}, \quad (1)$$

$$\nabla^2 u = \frac{1}{C^2} \frac{\partial^2 u}{\partial t^2} + \beta \text{grad } u \quad (2)$$

$$C = (B/\rho)^{1/2} \quad (3)$$

ここで、 θ は超過温度分布、 κ は熱伝導率、 u は微小変位ベクトル、 B は体積弾性率、 ρ は密度、 β は熱膨張係数である。微小変位ベクトル u とそれによる圧力分布 P との間には、

$$B \nabla^2 u - B \beta \text{grad } \theta = -\text{grad } P, \quad (4)$$

なる関係があることから、(1)、(2)式を適当な条件で解くことで光音響信号となる圧力分布 P が求まる。

SigristとKneubuhlはこの2式を極座標で点熱源を仮定して、弾性波が放射状に伝搬するとして r 成分のみを考え解いており、それらの解は次のように与えられている¹²⁾。

$$\theta(r, t) = \frac{E_a}{\rho \sigma (4 \pi \kappa t)^{3/2}} \exp\left(-\frac{r^2}{4 \kappa t}\right) \quad (5)$$

$$P(r, t) = -\frac{\beta E_a C^3}{2 \pi^{3/2} \sigma r_D^3} \frac{1}{r} \left(t - \frac{r}{C}\right) \times \exp\left\{-\left[\frac{C}{r_D^3} \left(t - \frac{r}{C}\right)^2\right]\right\} \quad (6)$$

ここで、 E_a は吸収された光エネルギー、 r_D は熱源の半径、 σ は比熱である。(6)式は近似的に

$$P_{\max} = \frac{\beta E_a C^2 e^{-1/2}}{(2 \pi)^{3/2} \sigma r_D^3 r} \propto \frac{E_a}{r_D^2} \frac{1}{r}, \quad (7)$$

と最大値を与える。 E_a はレーザー光のスポット中心での強度を I_0 とすると、レーザー波長 λ に依存する光吸収係数 $\alpha(\lambda)$ を考えて、 $E_a = \alpha(\lambda) \cdot I_0$ と表わされる。したがって(7)式は

$$P_{\max} \propto \frac{I_0}{r_D^2 r} \alpha(\lambda), \quad (8)$$

となり、光音響信号はレーザーパワー I_0 および

Fig. 1 Schematic of the stress transducer.

光吸収係数 $\alpha(\lambda)$ に比例することがわかる。

3. 試作トランスデューサーと実験方法

3.1 試作トランスデューサー

ナノ秒パルスレーザーにより発生する光音響信号は、多くの場合数百 kHz から数百 MHz の周波数になるため、従来のマイクロフォンや厚く重い圧電トランスデューサーなどではそれらの周波数特性から測定に用いることは困難である。そこで、この高周波光音響信号を検出するために高速応答可能なトランスデューサーを試作した。Fig. 1 にその構造を示す。検出素子には両面を研磨した 4 mm 角、厚さ 100 μm の Z-cut LiNbO_3 単結晶を用い、厚さ 50 μm の検出面（アルミホイル）と銅棒に導電性接着剤で貼りつけて電圧検出を行うようにしている。高周波信号にตอบสนองさせるため、検出素子は薄くした同軸構造とした。この試作したトランスデューサーのインピーダンス特性を測定したところ、2 GHz から 12 GHz の間に四つの共振点を有し、8.6 GHz で最も大きな共振を示す。このことは、このトランスデューサーが GHz 帯域まではフラットな特性有していることを示

Fig. 2 Setup of the sample and transducer.

Fig. 3 Block diagram of a pulse laser-induced photoacoustic measuring system.

すものである。また、およその感度は $90 \mu\text{V}/\mu\text{bar}$ と見積られ、感度・帯域積は PZT の圧電素子より 10 倍程大きい。出力特性は、800 μV までは線形性を示す。試作トランスデューサーは、ナノ秒パルスにも良好な応答を示す有用な素子であることがわかり、以下の測定を行なった。

3.2 実験方法

はじめに、前述したトランスデューサーと試料との実験時の構成を簡単に述べる。検出試料は原さ 1 mm のスライドガラスではさみ、トラン

スデューサーに直接レーザーが当たり雑音を生じないようにアルミホイルで裏打ちしたものを、トランスデューサーの検出面に圧着した。このアルミホイルによる光音響信号は無視できる程度あることは実験的に確かめてある。レーザービームは集光レンズで約 $100\ \mu\text{m}$ 径に絞り試料に照射した。試料、スライドガラス、アルミホイル、トランスデューサーの間は音響インピーダンスの整合をとるためシリコンオイルで充填した。Fig. 2 にその構成を示す。

これらの素子構成を含め測定に用いた装置の全体の構成をFig. 3 に示す。光源は窒素レーザー励起波長可変色素レーザー (Molelectron UV-12, DL-11) を用いた。レーザーのパルス幅は $3\ \text{nsec}$ であり、最大ピーク出力は約 $30\ \text{KW}$ である。レーザー色素には Coumarin 481 と DPS を用いた。レーザー発振のスペクトル幅は約 $0.3\ \text{nm}$ 、マルチモードである。パルス繰返しは可変であるが、本実験では単一パルス発振毎に測定を行なった。レーザーの断面強度分布を比較的一様にするため、円形開口スリットによりガウシアンビームの中心部分のみを取出して用いた。照射レーザービームは適宜減衰させ、集光レンズにより、試料に応じ適当な直径に絞り、試料面を照射した。試料からの音響信号は先に述べたトランスデューサーで検出し、帯域 $200\ \text{MHz}$ の前段増幅器で 1000 倍に増幅した後、フォトダイオードの出力をトリガとした TEKTRONIX 7904 オシロスコープで直接波形を観測した。

まずはじめに、本測定で試料として用いたヒトの白血球、レタリングカーボン、およびベゴニアの葉における信号波形について述べる。ヒトの白血球はそれ自体では紫外域に吸収のピークを持つために測定が困難なので、 $405\ \text{nm}$ 付近に吸収のピークを持つヘマトポルフィリン二塩酸塩 (HP 2 HCl) で染色した。HP 2 HCl は、腫瘍親和性を示し殺細胞効果のあることが有名なヘマトポルフィリンの一種であり、細胞質や細胞膜にとりこまれることが知られている。本研究では、他に塩基性で細胞の核にとりこまれるアクリジンオレンジ (AO) も染色に用いた。

Fig. 4 Typical signal waves obtained by our transducer. (a) leukocyte (dye by HP 2 HCL), (b) lettering carbon, (c) begonia leaf.

AOは480 nm付近に吸収のピークを有する。ペコニアは生物指標植物として知られており、主な光吸収物質はクロロフィルで、光吸収のピークは480 nm付近と680 nm付近にある。

これらの生体試料における信号波形の観測例をFig. 4 (a)~(c)に示す。いずれも数MHzの振動波形として、それぞれの試料に応じ異なる波形が観測された。これはそれぞれの光吸収物質の分布と音響インピーダンスの特性に応じ生じたものと思われる。このように試料によって信号波形に差異があることから、本測定においては光音響信号の相対値として信号波形のpeak-to-peakをその出力の値として測定を行なった。以後の測定値はいずれもこれを用いて表示してある。

4. 生体細胞の微量分析測定

Fig. 5 Photoacoustic signal of leukocyte as a function of laser peak power. AO density: 6.9×10^{-4} mol/l, leukocyte counts: 1530 cells/mm^3 and laser wavelength: 480 nm.

Fig. 6 Photoacoustic signal of leukocyte as a function of its count. AO density: 6.9×10^{-4} mol/l and laser wavelength: 480 nm.

生体を試料としたパルスレーザー誘起光音響法の微量分析への応用として、ヒトの正常白血球を試料として測定を試みた。試料はヒトの全血からFICOLL-PAQUEを用い遠心分離した白血球を、AOおよびHP 2 HClで常温で15分間染色した後、生理食塩水で洗浄して余剰の色素を除き、スライドガラスに塗抹して用いた。白血球数は顕微鏡下で数えて算出した。

はじめにAOにより染色した白血球試料でのレーザーパワー依存性と血球数依存性の測定結果をFig. 5, Fig. 6にそれぞれ示す。レーザー波長はAOの吸収ピークの480 nmに設定した。レーザーパワー依存性の測定では、白血球数が、 1530 cells/mm^3 の試料を用いた。結果は最低で $5.56 \mu\text{J/pulse}$ のレーザーパワーで信号が観測でき、レーザーパワーに対して良い線形性を示している。これは前述した光音響効果の出力がレーザーパワーに対して線形な現象であるこ

Fig. 7 Photoacoustic signal of leukocyte as a function of laser peak power. HP 2 HCL density: 1.0×10^{-4} mol/l, leukocyte counts: 3570 cells/mm³ and laser wavelength: 406 nm.

Fig. 8 Photoacoustic signal of leukocyte as a function of its count. HP 2 HCL density: 1.0×10^{-4} mol/l and laser wavelength: 406 nm.

と一致するものである。白血球数依存性の測定結果は、音響出力をレーザーパワーで規格化してグラフに表わしたが、かなりバラツキを示した。これは信号強度が小さいためと思われる。

次に HP 2 HCL により染色した白血球試料での同様の測定結果を Fig. 7, Fig. 8 に示す。レーザー波長は HP 2 HCL の吸収のピークである 406 nm を用いた。レーザーパワー依存性では白血球数 3570 cells/mm³ の試料を用いたこともあって、AO の場合よりも小さい 2.8 μJ/pulse のレーザーパワーで最少信号が観測された。レーザーパワーの依存性は、AO の場合と同様に、良い線形性を示した。

Fig. 8 に示す白血球数依存性の場合、AO での測定結果とは違い良い線形性が得られた。最少 488 cells/mm² の白血球数で測定が可能であったが、これは全血量に換算すると、全血 1

mm³ に含まれる白血球数が 7000 個程度であることから、約 72 μmm³ となる。この検出限界は信号の積算処理などを行ない S/N 比の向上を図ることできさらに良い値が得られるものと思われ、本方法による高感度微量分析測定の可能性を示すものである。

5. NO₂ 汚染植物の測定

大気汚染は重要な社会問題となり恒常的な計測も行なわれているが、生体への影響の観測にはしばしば指標生物が用いられ、それらの目視観測で汚染の度合いが計られている¹³⁾。本測定では、その様な指標植物であるペコニアおよびペチニアを用い、NO₂ の曝露汚染法で汚染し、その音響信号依存性などを測定した。特に葉の表面状態の目視測定と対比するため、音響信号の 2 次元分布測定も試みた。このような測定ではレーザー光を走査する方法と試料を走査する

Fig. 9 Photoacoustic signal distribution of lettering "O". laser wavelength : 483 nm and laser peak power : 0.22 KW.

方法とがあるがここでは、レーザービーム径を約20 μm に集光し試料を走査する方法で測定した。

はじめに予備実験として、レタリングカーボンの"O"の字をスライドガラスに貼りつけたものを試料として分布測定を行なった。その結果をFig. 9に示す。レーザー波長は483 nm, レーザーパワーは0.22 KWとした。X-Yステージは、両軸方向とも100 μm ステップで微動し音響信号を測定し、図に示すようにプロットした。図の測定結果は肉眼で見るときれいな"O"の字にはならず部分的に乱れているが、これは顕微鏡下で確認したところではレタリングの凹凸や裂け目に対応するものである。このことから光吸収物質の分布の微視的な情報を得ることが可能であることも示された。

次に、試料をベゴニアの葉に変えて同様の測定を行なった。ベゴニアは鉢植で健常に育成し盛期(5~7月)のものを用いた。Fig. 10(a)に健常な葉による音響信号分布を示す。レーザービーム径は20 μm とし、X軸方向に20 μm ステップで、Y軸方向に50 μm ステップで微動させた。測定結果を見ると二つの信号の強い列があるが、この列には含まれた信号の弱い部分は葉脈であり、このことから葉脈近傍にクロロフィルが多く分布していることがわかる。これら

Fig.10 Photoacoustic signal distribution of (a) normal begonia leaf and (b) 100 ppm.hr NO_2 exposed begonia leaf. Laser wavelength : 483nm and laser peak power : 1.1 kW.

Fig. 11 Photoacoustic spectrum of begonia leaf as a parameter of exposure of NO_2 .

の部分は目視では濃い緑色を呈している。

NO_2 による曝露汚染の方法は、鉢植全体が収容できる曝露チャンバーを造り、その体積を満たす所定の NO_2 ガスを発生させ鉢植全体を汚染する方法を用いた。Fig. 10 (a)に NO_2 ガスに100 ppm・hrだけ曝露した後、24時間以後に測定した結果を示す。健全な葉の場合と同様に葉の葉脈近傍を選択し測定したものである。図から判るように音響信号は著しく低下しており、他のいくつかの部位にある葉についても同様な測定結果であった。これらの葉は目視では全く黄変しておらず、健全な葉とほとんど区別できなかった。曝露量が1000 ppm・hrを越えると目視できる黄変が観測され、自然大気汚染環境下での測定される結果と対応するものとなる。この時の音響信号はさらに微弱な値であった。

Fig. 11に曝露量をパラメータにし、レーザー波長を変え測定した光音響スペクトル特性を示

Fig. 12 Photoacoustic signal of begonia leaf as a function of NO_2 exposure quantity. Laser wavelength: 483 nm and laser peak power: 1.6 KW.

す。これらの波長域は、クロロフィルの一つの吸収ピーク近傍に対応している。測定結果は、レーザービーム径を約1 mmに拡げベコニアの葉の平均的な組成による音響信号を示す。これより、 NO_2 の曝露量が1000 ppm・hrになるとほとんど音響効果が生ぜず、従ってクロロフィルは大部分変容し、葉の細胞は壊死しているものと思われる。目視では判別できない100 ppm・hr程度の曝露量でも細胞レベルでは壊死が生じており、その結果音響信号の低下となって計測し得たものと考えられる。

Fig. 12, 13に音響信号の NO_2 曝露量依存性を示す。Fig. 12はベコニアの葉で Fig. 13はペチニアの葉である。レーザー波長は、クロロフィルのもう一つの吸収のピークである483 nmを用いたがFig. 11と同様の特性があることがわかる。すなわち、いずれの植物の場合も健全な葉に対して曝露汚染された葉の音響信号は、その曝露量に対して指数的に減少する。このこと

Fig.13 Photoacoustic signal of petunia leaf as a function of NO₂ exposure quantity. Laser wavelength : 483 nm and laser peak power : 2.9KW.

は、葉を構成するフロロフィルを含む細胞が、細胞単位毎に壊死していることを意味していると思われる。本測定では曝露量を詳細に変えて測定できる程試料を入手できなかったが、図がわかるように 10 ppm・hr 以下の希薄な汚染度もある程度光音響法を用いると判別できることを示している。

6. おわりに

ナノ秒パルスレーザー誘起光音響法を応用す

ることで、高感度微量分析や汚染植物の高感度検出を非破壊で測定できる可能性が示された。光音響効果を用いることで不透明な細胞等の生体試料や、顕微鏡や目視では検出不可能な層構造物質でも光吸収物質があれば高感度で測定できる。近年大きな問題である NO_x や SO_x の大気汚染度も指標生物の採取により市街地の分布を測定できる可能性もある。本研究で試作したトランスデューサーやその測定法は CW レーザーを用いた光音響法に対して、単時間で非破壊で測定できる特徴を有しており、今後さらに高感度化を積算処理等で計れば、このような測定に実用できるようになることが期待される。

参 考 文 献

- 1) A.C.Tam and C.K.N.Patel: Appl. Opt. **18** (1979) 3348.
- 2) J.C.Murphy and L.C.Aamodt: J. Appl. Phys. **48** (1977) 3504.
- 3) A.Hordrik and H.Schlossberg: Appl. Opt. **16** (1977) 101.
- 4) Allan Rosencwaig: Phys. Today **28** (1975) 23.
- 5) T.Sawada, S.Oda and H.Kamada: Proc. Jpn. Acad. **54** (1978) 189.
- 6) K.Kato, S.Ishino and Y.Sugitani: Chem. Lett. **53** (1980) 783.
- 7) 及川, 丹野, 藤沢, 鎌田: 分光研究, **33** (1984) 86.
- 8) T.Hoshimiya, N.Tanno, S.Yanase and H.Kamada: 13th Cong. Int. Comm. Optics, Sapporo (1984).
- 9) C.K.N.Patel and A.C.Tam: Rev. Mod Phys. **53** (1981) 517.
- 10) 沢田編著: 光音響分光法とその応用—PAS, (学会出版センター 1982).
- 11) 築瀬, 丹野, 成沢, 鎌田: 電子通信学会技術研究報告, OQE 83—63 (1983).
- 12) M.W.Sigrist and F.K.Kneubuhl: J. Acoust. Soc. Am. **64** (1978) 1652.
- 13) 松中編: 環境汚染と指標生物 (朝倉書店 1979).