(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年3月19日(19.03.2020)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2020/054466 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 15/02 (2006.01) *G01B 11/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2019/034228

(22) 国際出願日： 2019年8月30日(30.08.2019)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2018-170407 2018年9月12日(12.09.2018) JP
特願 2019-085230 2019年4月26日(26.04.2019) JP

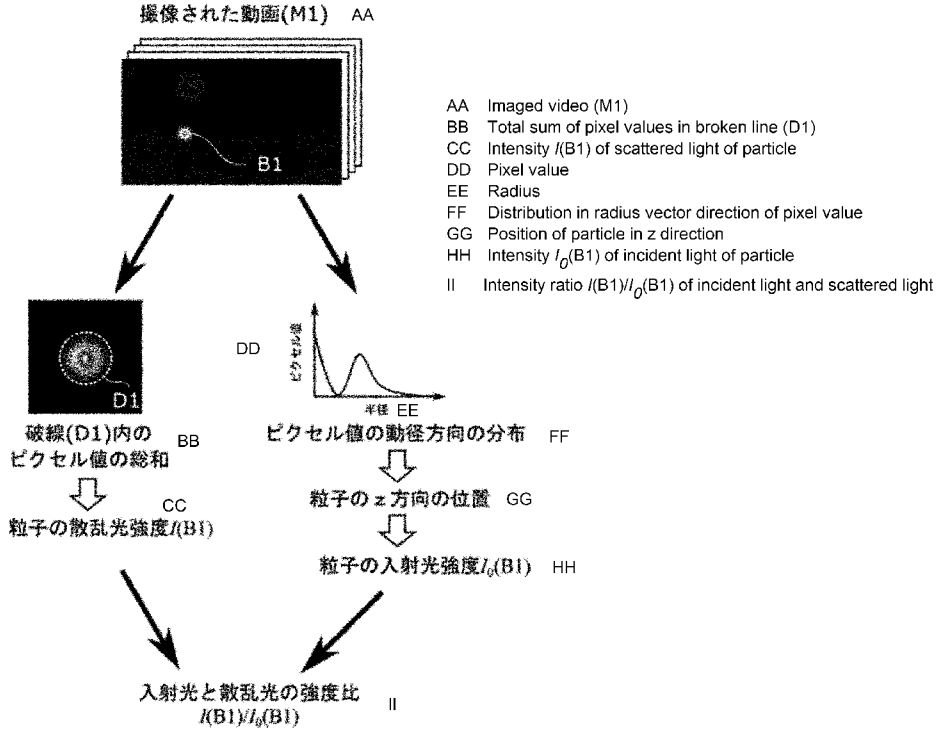
(71) 出願人: 国立研究開発法人産業技術総合研究所(**NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY**) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 加藤 晴久(**KATO Haruhisa**); 〒3058560 茨城県つくば市梅園1－1－1 中央第1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 松浦 有祐(**MATSUURA Yusuke**); 〒3058560 茨城県つくば市梅園1－1－1 中央第1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 中村 文子(**NAKAMURA Ayako**); 〒3058560 茨城県つくば市梅園1－1－1 中央第1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

(54) **Title:** PARTICULATE OBSERVATION DEVICE AND PARTICULATE OBSERVATION METHOD

(54) 発明の名称： 微粒子観察装置及び微粒子観察方法



(57) **Abstract:** The purpose of the present invention is to provide a particulate observation device using light scattering, which includes a means for determining the three-dimensional position of a particle, and can measure an accurate particle diameter or impart various properties of same. The present invention is characterized by including a position determination means which captures, with an optical microscope, an image of light scattered from particles in a dispersion medium to which laser light is emitted, and determines a three-dimensional position of each particle from the obtained two dimen-

WO 2020/054466 A1

[続葉有]

CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

sional image, wherein the position determination means obtains two-dimensional coordinates along the two-dimensional image from luminescent point positions of the particles, and determines the depth position along a coordinate axis vertical to the two-dimensional image from the diameters of diffraction fringes of the luminescent points.

(57) 要約：粒子の三次元位置を決定する手段を含み、粒子径の正確な計測や、その諸物性を与え得る微粒子観察装置を提供することであり、光散乱を用いた微粒子観察装置である。レーザー光を照射した分散媒中の粒子からの散乱光を光学顕微鏡で撮像し、得られた二次元画像から粒子のそれぞれの三次元位置を決定する位置決定手段を含み、位置決定手段は、二次元画像に沿った二次元座標を粒子の輝点位置から求めるとともに、二次元画像に垂直な座標軸に沿った奥行き位置を輝点の回折縞の径から決定することを特徴とする。

明　細　書

発明の名称 ： 微粒子観察装置及び微粒子観察方法

技術分野

[0001] 本発明は、光学セル内の分散媒中の微粒子を観察するための装置及びその方法に関し、特に、二次元画像から粒子のそれぞれの三次元位置を決定する手段を含み粒子径や材質などの情報をも与え得る微粒子観察装置及び微粒子観察方法に関する。

背景技術

[0002] 特許文献１や２に示すように、分散媒中の微粒子の粒子径を計測する方法として、光学セル内の分散媒にレーザー光を照射し、ビデオカメラによって粒子の運動を連続的に撮像して動きを捕捉し、粒子径を求める方法が知られている。例えば、特許文献１において、粒子追跡法（ＰＴＡ法、Particle Tracking Analysis）で、連続的に撮像された画像から粒子のブラウン運動を捕捉し、粒子径を求めている。

[0003] 一般的には、複数の二次元画像から個々の粒子の動きを捕捉し、自己拡散係数Ｄをブラウン運動の大きさとして求め、下記のようなストークスアインシュタインの式から個々の粒子径ｄを決定する。粒子の自己拡散係数Ｄは粒子径ｄのみに依存するため、粒子の材質を問わず、粒子径を決定できる。ここで、粒子径が十分に小さいとき、二次元画像上には、粒子からの散乱光が輝点として撮像される。

[0004] [数1]

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta d} \tag{1}$$

k_B: ボルツマン定数　η: 分散媒粘度　π: 円周率　T: 絶対温度

[0005] 一方、個々の粒子からの散乱光強度は、粒子径だけでなく、他の材料物性、例えば、粒子の材質を反映した屈折率にも依存し、散乱光強度を計測することで、上記したブラウン運動から計測された粒子径を用いてこの屈折率を

求めることができる。例えば、レーザー光の波長よりも十分に小さい径の粒子においては、光散乱がレイリー散乱となるため、散乱光強度Ｉは下記のような比例関係式で表される。この比例係数をあらかじめ校正粒子を用いて求めておけば、分散媒に対する粒子の相対屈折率ｍを求めることができる。

[0006] [数2]

$$I \propto \left|\frac{m^2-1}{m^2+2}\right|^2 \frac{d^6}{\lambda^4} I_0 \qquad (2)$$

λ: レーザー光の波長　I_0: 入射レーザー光の強度

[0007] 非特許文献１では、サブミクロンサイズの粒子について、市販のＰＴＡ装置を用いて分散媒中の個々の粒子の散乱光を撮像し、画像解析によって撮像された輝点画像から散乱光強度を計算して、屈折率を求めた例が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：国際公開第２０１６／１５９１３１号

特許文献2：特開２００８－２６１７３７号公報

非特許文献

[0009] 非特許文献1：E van der Pol, FAW Coumans, A Sturk, R Nieuwland, TG van Leeuwen; Nano Letters 14 6195-6201

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] ＰＴＡ法による粒子径の正確な決定には、三次元的な粒子位置における移動を捕捉する必要がある。また、上記したように、入射光に対する散乱光の強度比（I/I_0）を計測して粒子の諸物性を求める方法において、レーザー光のような強度分布の空間的に一様でない光源を用いた場合には、粒子位置における入射光の光強度を補正しなければ、正確な計測はできない。そのためには、粒子のレーザー光束内での位置、つまり、三次元的な粒子位置を知る

必要がある。

[0011] この点、特許文献２では、三次元的な粒子位置について、カメラの焦点面での二次元画像上の位置とともに、該画像に対する前後方向（奥行き方向）の粒子の位置をカメラの光軸方向と垂直方向の流れをナビエストークスの方程式の流速に対する解析解を用いることで求め得るとしている。

[0012] 本発明は上記したような事情に鑑みてなされたもので、その目的とするところは、粒子径の正確な計測や、その諸物性の情報をも与え得る微粒子観察装置及び微粒子観察方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明による微粒子観察装置は、光散乱を用いた微粒子観察装置であって、レーザー光を照射した分散媒中の粒子からの散乱光を撮像する光学顕微鏡部と、前記光学顕微鏡部で得られた二次元画像から前記粒子のそれぞれの三次元位置を決定する処理部と、を含み、前記光学顕微鏡部は、前記粒子について回折縞を有する輝点として前記二次元画像を与え、前記処理部は、前記二次元画像に沿った二次元座標を前記粒子の輝点位置から求めるとともに、前記二次元画像に垂直な座標軸に沿った奥行き位置を前記輝点の前記回折縞の径から決定することを特徴とする。

[0014] かかる発明によれば、位置決定手段によって二次元画像から粒子の三次元位置を正確に決定でき、粒子径の正確な計測や、粒子の諸物性の情報を与え得る。

[0015] また、本発明による微粒子観察方法は、光散乱を用いた微粒子観察方法であって、レーザー光を照射した分散媒中の粒子からの散乱光を撮像する光学顕微鏡で得られた二次元画像から前記粒子のそれぞれの三次元位置を決定する位置決定ステップを含み、前記位置決定ステップは、前記二次元画像に沿った二次元座標を前記粒子の輝点位置から求めるとともに、前記二次元画像に垂直な座標軸に沿った奥行き位置を前記輝点の回折縞の径から決定することを特徴とする。

[0016] かかる発明によれば、位置決定ステップによって二次元画像から粒子の三

次元位置を正確に決定でき、粒子の物性を得ることができる。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]本発明による微粒子観察装置のブロック図である。

[図2]光学セルを示す斜視図である。

[図3]光学セルの他の例を示す斜視図である。

[図4]本発明による微粒子観察方法を示すフロー図である。

[図5]入射光と散乱光の強度比の求め方の例を説明する図である。

[図6]入射光と散乱光の強度比の求め方の他の例を説明する図である。

[図7]最外回折縞の半径と散乱光強度との関係を示すグラフである。

[図8]粒子の奥行き方向の位置を最外回折縞の半径との関係を示すグラフである。

[図9]粒子の奥行き方向の位置と散乱光強度との関係を示すグラフである。

[図10]微粒子観察装置及び市販のＰＴＡ装置による散乱光強度の累積分布を示すグラフである。

[図11]ポリスチレン粒子の粒子群の屈折率の計測結果を示すグラフである。

[図12]シリカ粒子の粒子群の屈折率の計測結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0018] 以下に、本発明による実施形態の１つである微粒子観察装置及びその観察方法について説明する。

[0019] まず、微粒子観察装置について図１乃至図３を用いて説明する。

[0020] 図１は、粒子径を求め得るとともに粒子の散乱光強度比を算出することのできる微粒子観察装置１を示すブロック図である。微粒子観察装置１は、粒子２を分散させた分散媒３を注入して内部に流通させ得る光学窓４を有する光学セル５と、波長λのレーザー光６ａを光学セル５の内部の分散媒３に向けて照射できるレーザー光照射部６と、粒子２から発生した散乱光による散乱光画像を撮像することができる撮像装置７と、かかる散乱光画像を解析する解析装置８とを備える。

[0021] レーザー光照射部６は撮像装置７によってレーザー光６ａによる粒子２か

らの散乱光を撮像しやすいように配置される。撮像装置７は開口数がＮＡである対物レンズを含む倍率Ｍの光学顕微鏡システムと、ＣＣＤカメラ、ＣＭＯＳカメラ等、散乱光像を動画として保存することができるカメラとを備える。ここでは、レーザー光６ａの光軸を、光学セル５の長手方向と平行にかつ撮像装置７のカメラの光軸と垂直にして、さらに光学セル５の厚さ方向に向けて配置している。後述する説明のため、撮像装置７の光軸方向をｚ軸とし、光軸に垂直な方向をｘ軸、ｙ軸とする。なお、レーザー光６ａの光軸方向と撮像装置７の光軸方向は必ずしも垂直である必要は無く、粒子２からの散乱光を撮像できればよいので、上記した装置構成例に限定されるものではない。

[0022] 図２は、光学セル５の斜視図である。光学セル５の上面に備えた流入口１０から注入された分散媒３は、アスペクト比が１より十分に大きい矩形断面を持つ流路によりレーザー光６ａの光軸と平行な流速ベクトルを維持しながら流動し、光学セルの上面に備えた流出口１１から排出される。

[0023] 図３に示すように、流速ベクトルの方向とレーザー光６ａの光軸方向は必ずしも平行である必要は無く、例えば、流入口２１、流出口２２を側面に備える光学セル２０を使用し、レーザー光６ａを流れ方向と垂直に照射してもよい。

[0024] 次に微粒子観察装置１を用いた微粒子観察方法について、図４乃至図６を用いて説明する。

[0025] 図４に示すように、まず、レーザー光６ａの照射によって発生する粒子２からの散乱光を撮像装置７によって撮像して解析装置８内に二次元画像による動画として保存する（Ｓ１）。次に、隣接するフレームで輝点の二次元座標（ｘ－ｙ座標）を比較して最も近接した輝点同士を同一粒子によるものとした対応付けを行うことで粒子を追尾し、個々の粒子のｘｙ平面内の二次元運動の軌跡を求める（Ｓ２）。近接する輝点が存在しない場合は粒子がレーザーの照射領域から外れたものと判断し、粒子の追尾を停止する。次に、ＰＴＡ法により、求めた運動軌跡から個々の粒子の拡散係数を計算し、ストー

クスアインシュタインの式により粒子径を算出する（Ｓ３）。なお、ＰＴＡ法については公知ゆえに詳述しない。

[0026] 次に、図５を併せて参照すると、個々の粒子の散乱光強度を求める（Ｓ４）。すなわち、撮像された動画Ｍ１から他の粒子からの散乱光による輝点の重なっていない輝点Ｂ１を抽出し、輝点Ｂ１を完全に囲むような領域Ｄ１の内部のピクセル値の総和を輝点Ｂ１の輝度とし、撮像装置７の露光時間、感度の効果を補正することにより散乱光強度Ｉ（Ｂ１）を求める。同時に、輝点Ｂ１の回折縞の形状、例えば回折縞の動径方向のピクセル値の分布を解析することにより粒子のｚ軸方向の奥行き位置を特定し、二次元画像上の輝点の二次元座標と併せて粒子の三次元の位置を決定する。さらに、あらかじめ計測しておいた又は既知のレーザー光６ａによる入射光の三次元の強度分布と比較することで輝点Ｂ１に対応する粒子に入射する入射光強度I_0（Ｂ１）を求める。最後に、散乱光と入射光の強度比Ｉ（Ｂ１）／I_0（Ｂ１）を算出する。以上のような手順は、処理部としての解析装置８によって実行され、適宜その結果を出力できるようになされている。

[0027] なお、上記したように、撮像装置７のカメラの光軸をレーザー光６ａの光軸と垂直に配置した場合であって、動画Ｍ１の二次元画像に平行な面内におけるレーザー光６ａの強度を一定とみなせる場合、三次元位置のうち奥行き位置のみを用いて入射光強度を求めることができる。つまり、入射光強度の分布は奥行き方向（ｚ軸方向）のみの分布とみなし、簡便に入射光強度を得るようにしてもよい。

[0028] そして、かかる強度比と粒子径との関係を調べることで、粒子を構成する材料を推定する（Ｓ５）。例えばレーザー光６ａの波長λより小さい粒子であれば、強度比を粒子径の６乗で除した値を、既知材料による粒子と比較することにより、数２に記載した入射光強度、散乱光強度、粒子を構成する材料の屈折率、粒子径の関係式から未知材料の粒子の屈折率を得ることが可能である。このようにして得られた屈折率に基づき、粒子を構成する材料を推定できる。

[0029] 散乱光強度の計測Ｓ４において、撮像された動画（Ｍ１）の回折縞のパターン（形状）からレーザー光６ａによる入射光の強度分布を求めてもよい。この方法について図６を用いて詳述する。

[0030] 動画（Ｍ１）に撮像されている単一の粒子からの散乱光による輝点に着目し、粒子がｚ軸方向に移動することによって回折縞の形状と散乱光強度が時間変化する様子を解析する。

[0031] 例えば、図６では、単一の粒子による輝点の回折縞のパターンがＢ２－１、Ｂ２－２、Ｂ２－３と変化していく様子を表している。それぞれの輝点に関して、散乱光強度Ｉ（Ｂ２－１）、Ｉ（Ｂ２－２）、Ｉ（Ｂ２－３）と、上記した方法により回折縞の動径方向のピクセル値の分布を計算し、最外回折縞の半径と散乱光強度の関係を調べる。単一の粒子に関しては、入射光強度と散乱光強度は比例するので、最外回折縞半径と入射光強度との関係が得られたことに相当する。すなわち、他の粒子についての輝点（Ｂ３）に関し、最外回折縞の半径から入射光強度I_0（Ｂ３）に換算し、散乱光強度Ｉ（Ｂ３）を計測して散乱光と入射光の強度比Ｉ（Ｂ３）／I_0（Ｂ３）を求めることができる。

[0032] 次に、上記した微粒子観察方法を使用した屈折率計測において、粒子径分布によって生じる前記強度比の分布を補正することによる計測の高精度化について図４を用いて説明する。

[0033] 図４を参照すると、まず、粒子散乱光の撮像（Ｓ１）、粒子の運動解析（Ｓ２）を実施する。次に、粒子径の算出（Ｓ３）において、算出された個々の粒子径の値はブラウン運動のランダムな影響を受けているために確定値ではなくバラつきを含んでいる。そのため、計測される粒子径分布は真の分布よりも広幅化する。したがって、例えば文献（Y Matsuura et al., Physical Chemistry Chemical Physics 20 17839）に記載されている補正法を使用し、広幅化を補正した粒子径分布を取得する。

[0034] 次に、散乱光強度の解析（Ｓ４）を、上記と同一の手順で実施することによって、個々の粒子の散乱光／入射光強度比を求める。

[0035] そして、材質の判別（Ｓ５）においては、次に示す手順により粒子群の相対屈折率を決定することで粒子群を構成する材料を推定する。まず、散乱光／入射光強度比、粒子径、相対屈折率の間の関係において、粒子径の値を平均値に固定した時の散乱光／入射光強度比と相対屈折率の関係を求めておく。この関係は、例えばレーザー光６ａの波長λより十分小さい粒子であれば数２に記載した関係式により得られ、また波長λと同程度の粒子径であればミー散乱理論により得られる。次に、上で求めておいた散乱光／入射光強度比と相対屈折率の関係を用いて、個々の粒子に関して散乱光強度の解析（Ｓ４）により得られた散乱光／入射光強度比を相対屈折率に変換する。粒子径分布によって生じる散乱光強度の分布の影響により、この変換された個々の粒子の相対屈折率は分布を持つこととなる。そして、粒子径分布によって生じた見かけの屈折率分布を補正することで、粒子群の相対屈折率を決定する。この補正行程について以下に詳述する。

[0036] 粒子径分布の標準偏差をσ（ｄ）とすると、粒子径分布によって生じる散乱光／入射光強度比の分布の標準偏差σ_d（Ｉ／I_0）は以下によって表される。

[0037] [数3]

$$\sigma_{\mathrm{d}}(I/I_0)=\left[\frac{\partial(I/I_0)}{\partial d}\right]\sigma(d) \tag{3}$$

[0038] この強度比の分布の影響によって生じる見かけの相対屈折率分布の標準偏差σ_d（ｍ）は下記式により表される。

[0039] [数4]

$$\sigma_{\mathrm{d}}(m)=\left[\frac{\partial m}{\partial(I/I_0)}\right]\sigma_{\mathrm{d}}(I/I_0)=\left[\frac{\partial(I/I_0)}{\partial d}\Big/\frac{\partial(I/I_0)}{\partial m}\right]\sigma(d) \tag{4}$$

[0040] そこで、得られた粒子群の平均粒子径と平均相対屈折率に対する∂（Ｉ／I_0）／∂ｄ、∂（Ｉ／I_0）／∂ｍを計算する。この計算は、例えばレーザー光６ａの波長λより十分小さい粒子であれば数２に記載した関係式により実施でき、また前記波長と同程度の粒子径であればミー散乱理論により実施

できる。そして粒子径の算出（Ｓ３）により決定された粒子径分布の標準偏差を使用して、σ_d（ｍ）が算出される。

[0041] 次に個々の粒子の散乱光／入射光強度比より得られた粒子群の相対屈折率の分布の標準偏差を$\sigma_{observed}$（ｍ）として、補正された屈折率分布の標準偏差$\sigma_{corrected}$（ｍ）を以下の式により定める。かかる補正により、ブラウン運動によって広幅化された粒子径分布が粒子群の屈折率に与える影響を排除することが可能である。実際に補正を行った例については後述する。

[0042] [数5]

$$\sigma_{\mathrm{corrected}}(m)=\sqrt{\left(\sigma_{\mathrm{observed}}(m)\right)^2-\left(\sigma_{\mathrm{d}}(m)\right)^2} \quad (5)$$

実施例

[0043] 微粒子観察装置１を用いて輝点の回折縞のパターンと入射光強度との関係を調査した例について述べる。なお、粒子２としては直径１００ｎｍのポリスチレンラテックス粒子を使用し、分散媒３としては水を使用した。

[0044] 光学セル５の流路については、幅１０ｍｍ、厚さ０．８ｍｍとした。レーザー光照射部６には波長５３２ｎｍのレーザー光６ａを照射可能な固体レーザーを使用し、撮像装置７で観察する位置においてビームウエストのスポットサイズを１９０μｍとするガウシアンビームとなるように凸レンズを用いて集光した。

[0045] 撮像装置７は、レーザー光６ａの光軸に対して垂直な光軸を有するように配置された光学顕微鏡と、粒子２からの散乱光を撮像するｓＣＭＯＳカメラとを備える。光学顕微鏡には開口数ＮＡ＝０．２５、ガラス補正無しの１０倍対物レンズを使用し、ｓＣＭＯＳカメラのイメージセンサーは１画素を６．５μｍ角相当とし、対物レンズで拡大されることで０．６４８μｍ／ｐｉｘｅｌの空間分解能で散乱光を撮像できる。流路の中央が顕微鏡の焦点面となるように顕微鏡の高さを調整した。これにより粒子２からの散乱光は、厚さ０．４ｍｍの分散媒、光学セル５上面の厚さ１．６ｍｍの石英ガラス製の光学窓４、対物レンズを通過してｓＣＭＯＳイメージセンサー上に集光され

る。これにより得られる散乱光の像をフレームレート３０ｆｐｓ、露光時間３３．２ｍｓで撮像し、一連の二次元画像による動画Ｍ１を得た。

[0046] 図７には、動画Ｍ１において、単一の粒子からの散乱光による輝点について、最外回折縞半径と散乱光強度の関係を調べた結果を示す。図７において、横軸は０．６４８μｍ／ｐｉｘｅｌとして校正した最外回折縞半径を表しており、縦軸は計測された散乱光強度を表す。また、エラーバーは繰り返し標準偏差を表している。そして、顕微鏡の焦点面から粒子が離れ、最外回折縞半径を増大させるにしたがって、散乱光強度が低下するという結果が得られた。

[0047] かかる散乱光強度の低下が入射光強度の低下によるものかどうかを確かめるために、粒子のｚ軸方向の位置と最外回折縞半径との関係に関する理論計算を行った。焦点面と対物レンズとの間に、屈折率１．３３、厚さ０．４ｍｍの水と、屈折率１．４６、厚さ１．６ｍｍのガラスが存在することを考慮し、文献（SF Gibson et al., Journal of Optical Society of America A 9 154-166）に記載されている回折縞パターンの理論式を使用して、粒子のｚ軸方向の位置と最外回折縞半径との関係を計算した結果を図８に示す。

[0048] 図８において、横軸は、顕微鏡の近軸に関する幾何光学的焦点面をｚ＝０とし、対物レンズから離れる方向を正としたときの粒子のｚ軸方向の位置を表す。一方、縦軸はｓＣＭＯＳイメージセンサー上に現れる輝点画像の最外回折縞半径Ｒを対物レンズ倍率（Ｍ＝１０）で除した値、すなわち対物レンズによって拡大された画像に相当する最外回折縞半径を表している。同図によると、ｚ＞３０μｍでは、最外回折縞半径が線形に増大することがわかる。この時のフィッティングの式は下記の通りであり、同図に実線で示した。

[0049] [数6]

$$\frac{R}{M} = c_1 z - c_2$$
$$c_1 = 0.1417\ [-], c_1 = 3.4718\ [\mu\mathrm{m}] \qquad (6)$$

[0050] またｚ＝２０μｍ付近で粒子に最もピントが合い、ｚ＜０では明瞭な回折

縞を得られなかった。ｚ＝０からピントの合う位置がずれるのは、水とガラスが光路に入ることにより、収差を生じるためである。

[0051] 図９に示すように、図７において得られた最外回折縞半径と散乱光強度の関係は上記式を用いてｚと散乱光強度の関係に直すことができる。さらに、レーザー光６ａがガウシアンビームであることを考慮し、ガウス関数によってフィッティングした結果が同図内の実線である。フィッティングの結果、散乱光強度が１／ｅ^{2}となる幅Δｚは１８０μｍであり、入射光のビームウエストのスポットサイズ１９０μｍとおおむね一致していた。結果、本実施例により、単一粒子の回折縞と散乱光強度から入射光強度分布が得られることが示された。また図７により、使用した微粒子観察装置１では最外回折縞半径が５μｍ以下となる粒子に関する入射光強度は一定とみなせることが示された。

[0052] 次に、上記した入射光強度が一定とみなせる範囲に位置する多数の粒子の散乱光強度を計測した例について示す。ここで計測装置１、粒子２、分散媒３は前述したものと同じものを使用した。

[0053] 光学セル５の流入口１０から分散媒３を流量０．０１ｍＬ／ｍｉｎで注入し、撮像装置７により分散媒３とともに流動する粒子２からの散乱光を撮像した。そして、最外回折縞半径が５μｍ以下となる輝点を３００個程度抽出して散乱光強度を算出し、累積分布を求めた。

[0054] また比較実験として、ビームウエストのスポットサイズが２０μｍ程度に集光されている市販のＰＴＡ装置を使用して粒子からの散乱光の撮像を行い、輝点を３００個程度抽出して散乱光強度を算出して累積分布を求めた。ただし、市販のＰＴＡ装置ではレーザー光が照射されている体積が小さく回折縞は現れなかったので、撮像されたすべての輝点の散乱光強度を累積分布の計算に使用した。

[0055] 図１０は上述した２種類の実験結果を示している。実線は微粒子観察装置１により得られた散乱光強度の累積分布であり、破線は市販のＰＴＡ装置による結果を表す。ただし、散乱光強度はそれぞれの分布の中央値で規格化し

た。この結果、市販のＰＴＡ装置では８４％と非常にブロードになるのに対し、微粒子観察装置１では分布の相対標準偏差が２６％であった。つまり、微粒子観察装置１により入射光強度分布を考慮した場合の方が、粒子の散乱光強度の計測精度が向上することが示された。

[0056] 次に、粒子の散乱光強度を基に、粒子径分布の影響を補正して粒子群の屈折率を計測した例について図１１及び図１２を用いて説明する。ここで微粒子観察装置１、分散媒３は前述したものと同じものを使用し、粒子２としては前述の直径１００ｎｍのポリスチレンラテックス粒子に加え、直径６０ｎｍのポリスチレンラテックス粒子と直径８０ｎｍのシリカ粒子を使用した。

[0057] 光学セル５の流入口１０（図２参照）から分散媒３を流量０．０１ｍＬ／ｍｉｎで注入し、撮像装置７により分散媒３とともに流動する粒子２からの散乱光を撮像した。

[0058] 個々の粒子の散乱光強度解析は次の２つの条件で行った。（１）撮像されたすべての輝点を使用して個々の粒子の散乱光強度データとする。（２）入射光強度が一定となる条件である最外回折縞半径が５μｍ以下となる輝点のみを抽出して、個々の粒子の散乱光強度データとした。

[0059] 撮像された散乱光は流動場中の粒子から生じたものであるので、文献（Ｙ Ｍatsuura et al., Analytical Chemistry 90 4182）に記載されている流れ場粒子追跡法（ＦＰＴ法、Flow Particle Tracking）により個々の粒子径を評価し、ブラウン運動による広幅化を補正することによって粒子径分布を決定した。

[0060] 屈折率は、数２に記載されている比例関係式を用いて散乱光強度から算出した。まず、上記した散乱光強度解析の２つの条件それぞれについて、直径１００ｎｍのポリスチレンラテックス粒子における計測された散乱光強度の中央値が数２に記載されている比例関係の右辺に一致するように比例定数を決定した。この比例定数の決定に際し、粒子径の値にはＦＰＴ法により決定された平均粒子径を使用した。次に、直径６０ｎｍのポリスチレンラテックス粒子と直径８０ｎｍのシリカ粒子に関して、数２を基に個々の粒子の散乱

光強度から相対屈折率を求めた。

[0061] そして、上記したようにブラウン運動による粒子径分布の拡幅化の影響についての補正を実施することで、粒子群の屈折率を決定した。かかる補正においては、数４に記載された（Ｉ／Ｉ$_0$）をそれぞれｄ及びｍで偏微分した項を数２に記載された関係式により決定した。

[0062] 図１１に、直径６０ｎｍのポリスチレン粒子に関する粒子群の屈折率測定結果を示した。ただし分散媒３の屈折率を考慮して、横軸を絶対屈折率に変換した。図中の実線が示すのは、入射光強度を一定とする条件である最外回折縞半径を５μｍ以下とする輝点のみを抽出して個々の粒子の散乱光強度データとした後に上記した粒子径分布の影響を補正して得られた屈折率の分布である。一方で破線が示すのは、撮像されたすべての輝点を使用して個々の粒子の散乱光強度データとした後に粒子径分布の影響を補正せずに得られた屈折率分布である。ポリスチレン粒子群の屈折率は単一の値であると考えられるが、破線で示す補正せずに得た屈折率分布は広範囲に亘った。一方で実線の示す補正して得た屈折率分布は１．５９３±０．０１５であり、ほとんど単一の値と言える程度に狭い範囲の分布となった。この値はレーザー光６ａの波長におけるポリスチレンラテックスの屈折率（１．５９８）とよく一致した。

[0063] 図１２に、直径８０ｎｍのシリカ粒子に関する粒子群の屈折率測定結果を示した。実線及び破線が示すのは、図１１の場合と同様にそれぞれ補正をして得られた屈折率分布及び補正をせずに得られた屈折率分布である。破線で示す補正せずに得た屈折率分布は広範囲に亘った。一方で、実線で示す補正して得た屈折率分布は１．４５９±０．００６であり、ほとんど単一の屈折率の値と言える程度に狭い範囲の分布となった。この値はレーザー光６ａの波長におけるシリカの屈折率（１．４６１）とよく一致した。

[0064] すなわち、微粒子観察装置１により入射光強度分布を考慮し、かつ粒子径分布の影響を補正することによって高精度に粒子群の屈折率を評価できることが示された。

符号の説明

[0065] １　微粒子観察装置

２　粒子

３　分散媒

４　光学窓

５　光学セル

６　レーザー照射部

６ａ　レーザー光

７　撮像装置

８　解析装置

１０　流入口

１１　流出口

請求の範囲

[請求項1] 光散乱を用いた微粒子観察装置であって、

レーザー光を照射した分散媒中の粒子からの散乱光を撮像する光学顕微鏡部と、前記光学顕微鏡部で得られた二次元画像から前記粒子のそれぞれの三次元位置を決定する処理部と、を含み、

前記光学顕微鏡部は、前記粒子について回折縞を有する輝点として前記二次元画像を与え、

前記処理部は、前記二次元画像に沿った二次元座標を前記粒子の輝点位置から求めるとともに、前記二次元画像に垂直な座標軸に沿った奥行き位置を前記輝点の前記回折縞の径から決定することを特徴とする微粒子観察装置。

[請求項2] 前記処理部は、前記三次元位置から前記粒子のブラウン運動の大きさを決定し、前記大きさから粒子径を与えることを特徴とする請求項１記載の微粒子観察装置。

[請求項3] 前記処理部は、予め得た入射光の強度分布に対応させて前記三次元位置での入射光強度を決定し、前記粒子について、前記入射光に対する前記散乱光の強度比と前記粒子径との関係から相対屈折率を得ることを特徴とする請求項２記載の微粒子観察装置。

[請求項4] 前記粒子の粒子径分布によって生じる前記強度比の分布を補正した上で前記相対屈折率を得ることを特徴とする請求項３記載の微粒子観察装置。

[請求項5] 前記光学顕微鏡部は、前記レーザー光の光軸に沿った平面を前記二次元画像として与えることを特徴とする請求項１記載の微粒子観察装置。

[請求項6] 前記奥行き位置は、前記光学顕微鏡の焦点位置からのずれ量と前記回折縞の前記径との比例関係に基づいて決定することを特徴とする請求項１記載の微粒子観察装置。

[請求項7] 光散乱を用いた微粒子観察方法であって、

レーザー光を照射した分散媒中の粒子からの散乱光を撮像する光学顕微鏡で得られた二次元画像から前記粒子のそれぞれの三次元位置を決定する位置決定ステップを含み、

前記位置決定ステップは、前記二次元画像に沿った二次元座標を前記粒子の輝点位置から求めるとともに、前記二次元画像に垂直な座標軸に沿った奥行き位置を前記輝点の回折縞の径から決定することを特徴とする微粒子観察方法。

[請求項8] 前記三次元位置から前記粒子のブラウン運動の大きさを決定し、前記大きさから粒子径を算出する粒子径算出ステップをさらに含むことを特徴とする請求項７記載の微粒子観察方法。

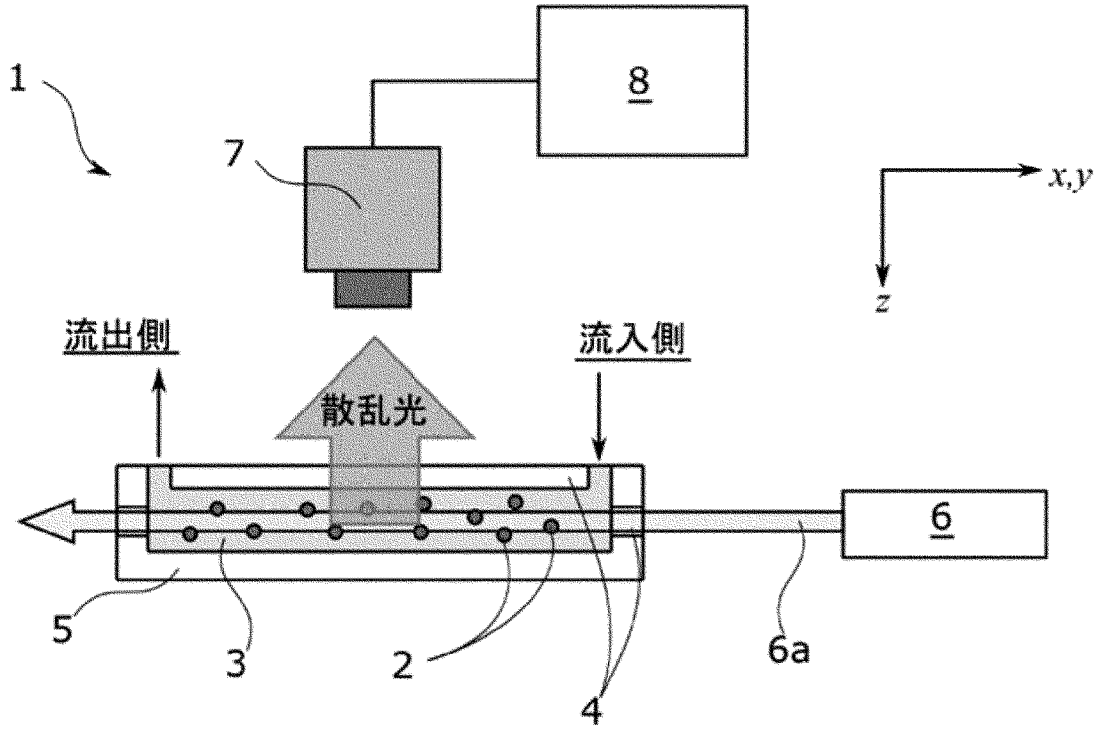
[請求項9] 予め得た入射光の強度分布に対応させて前記三次元位置での入射光強度を決定し、前記粒子について、前記入射光に対する前記散乱光の強度比と前記粒子径との関係から前記粒子の相対屈折率を得ることを特徴とする請求項８記載の微粒子観察方法。

[請求項10] 前記粒子の粒子径分布によって生じる前記強度比の分布を補正した上で前記相対屈折率を得ること特徴とする請求項９記載の微粒子観察方法。

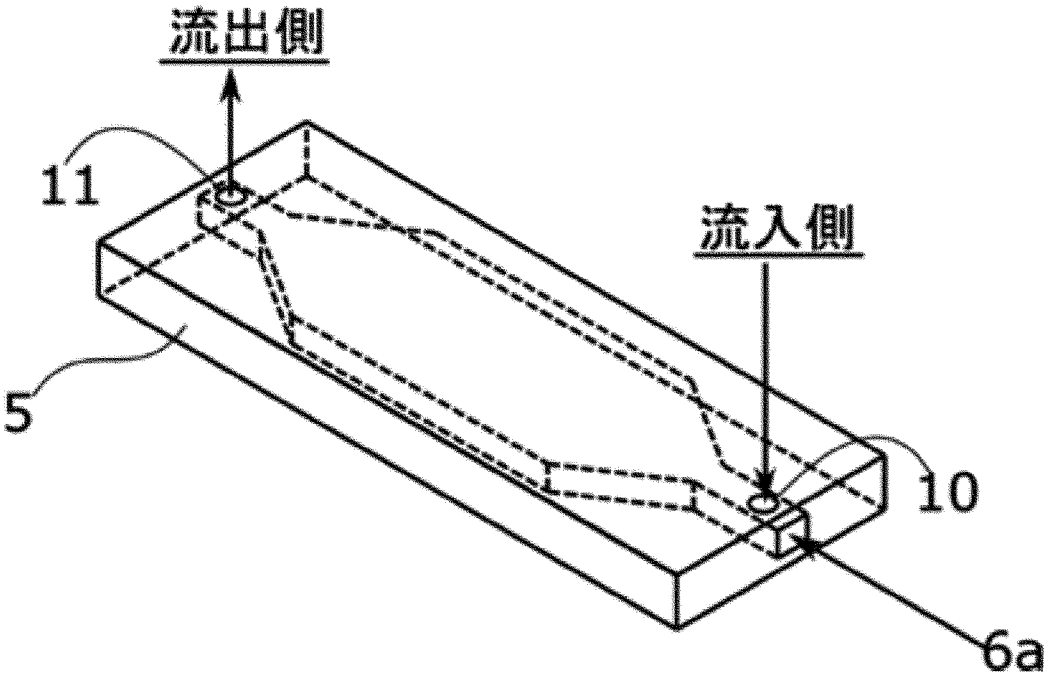
[請求項11] 前記二次元画像は、前記レーザー光の光軸に沿った平面に対応することを特徴とする請求項７記載の微粒子観察方法。

[請求項12] 前記奥行き位置は、前記光学顕微鏡の焦点位置からのずれ量と前記回折縞の前記径との比例関係に基づいて決定することを特徴とする請求項７記載の微粒子観察方法。

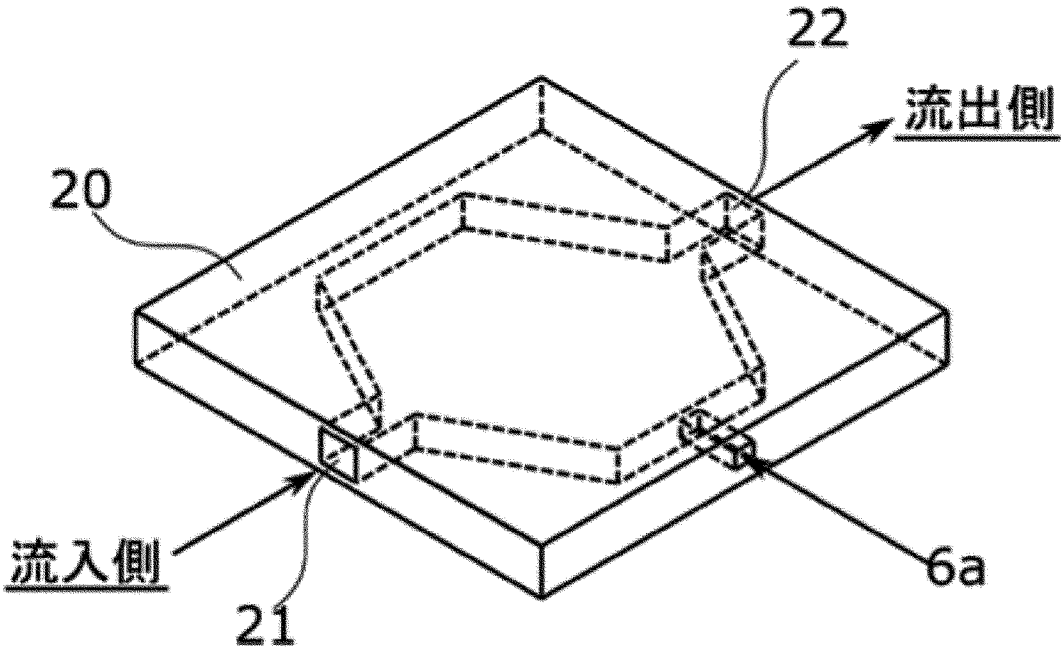
[図1]



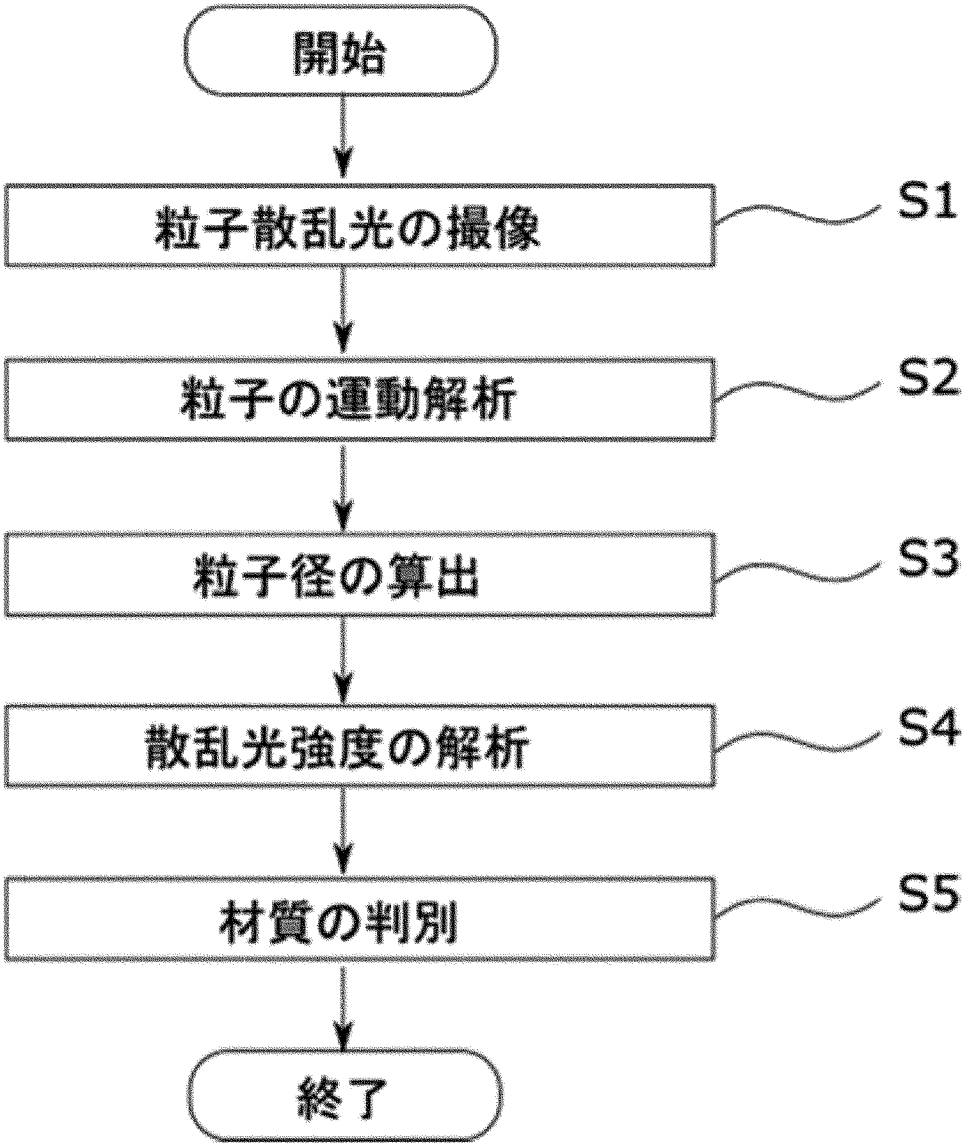
[図2]



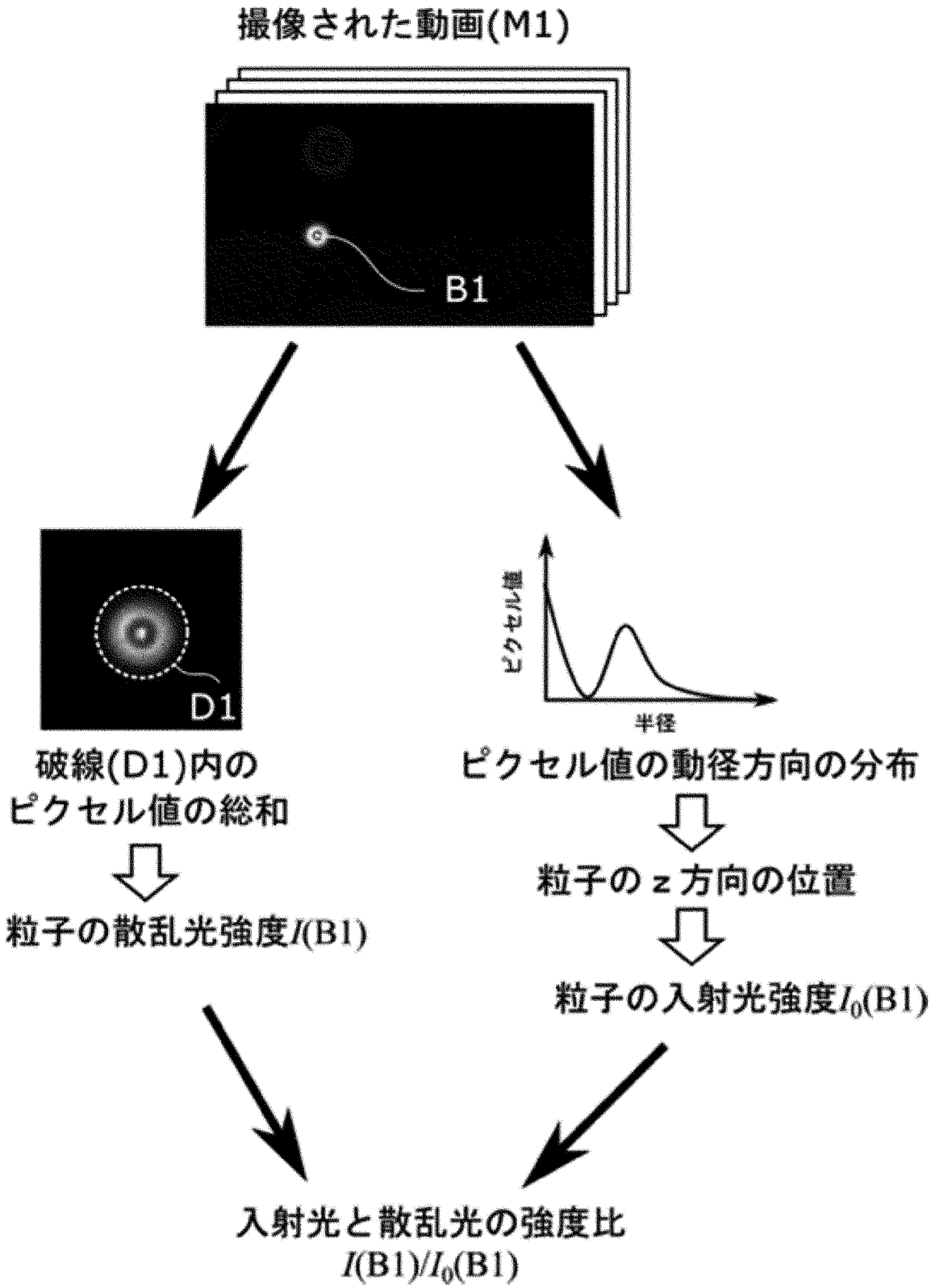
[図3]



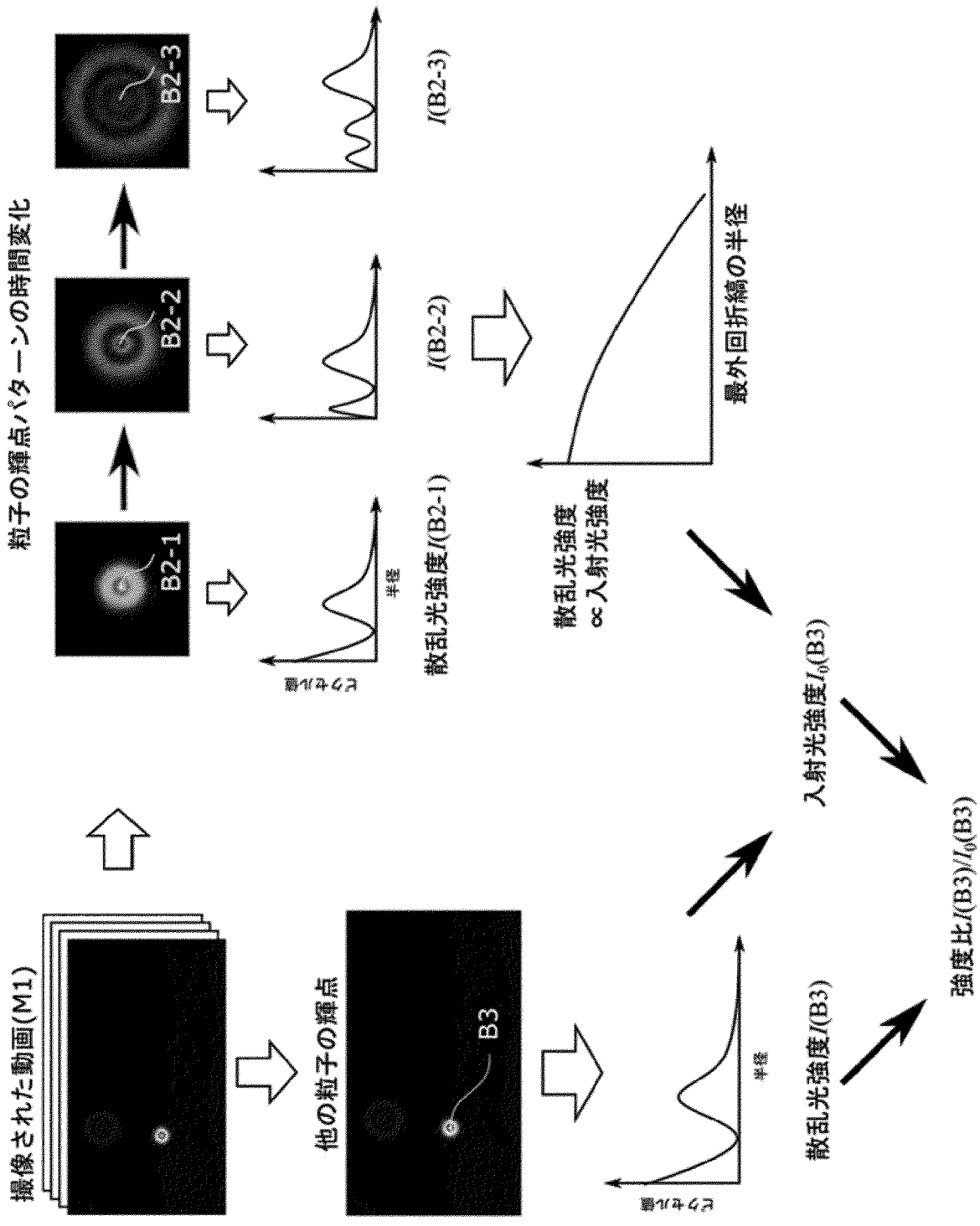
[図4]



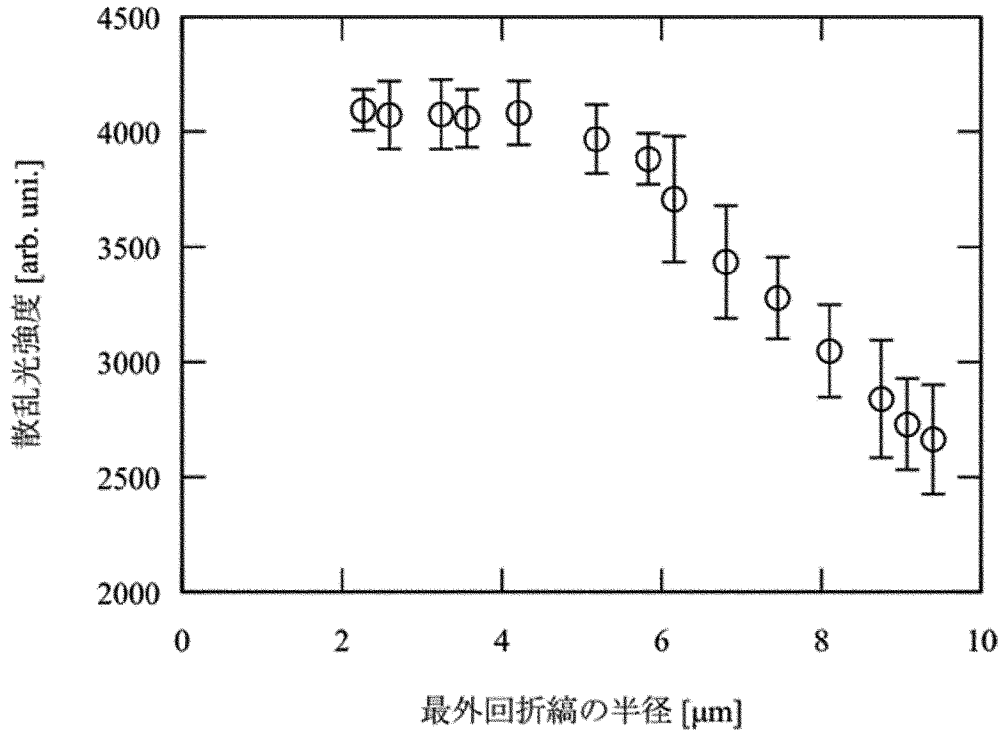
[図5]


撮像された動画(M1)
B1
D1
ピクセル値
半径
破線(D1)内の
ピクセル値の総和
粒子の散乱光強度I(B1)
ピクセル値の動径方向の分布
粒子のz方向の位置
粒子の入射光強度I0(B1)
入射光と散乱光の強度比
I(B1)/I0(B1)

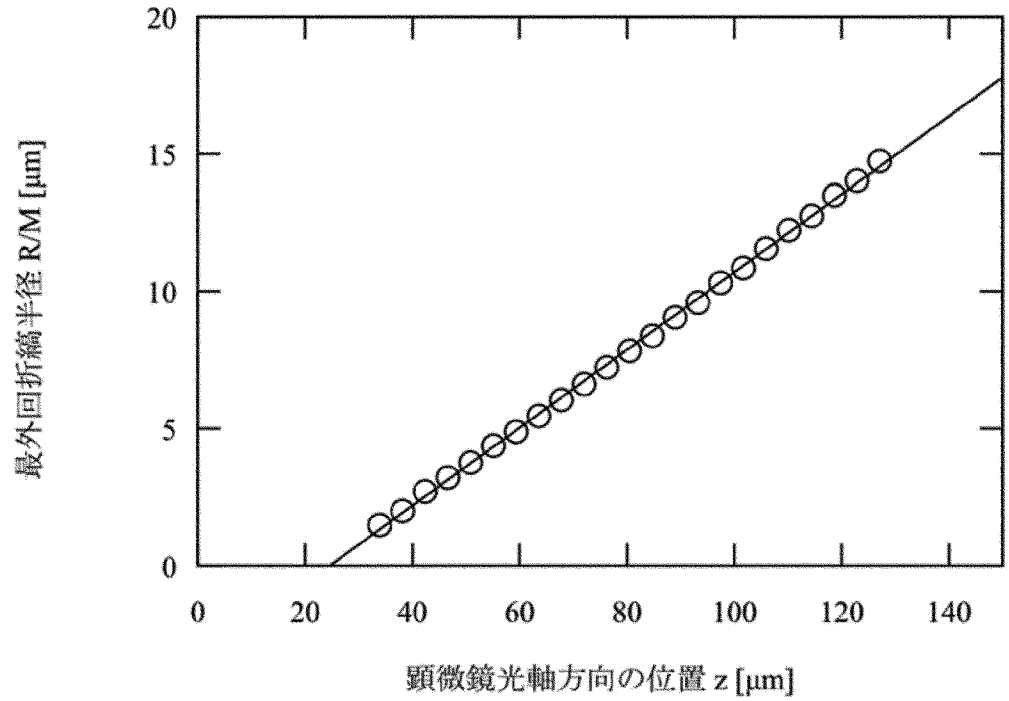
[図6]


撮像された動画(M1)
他の粒子の輝点
B3
ピクセル値
半径
散乱光強度/(B3)
入射光強度I_0(B3)
強度比I(B3)/I_0(B3)
粒子の輝点パターンの時間変化
B2-1
B2-2
B2-3
散乱光強度I(B2-1)
I(B2-2)
I(B2-3)
散乱光強度
∝入射光強度
最外回折縞の半径

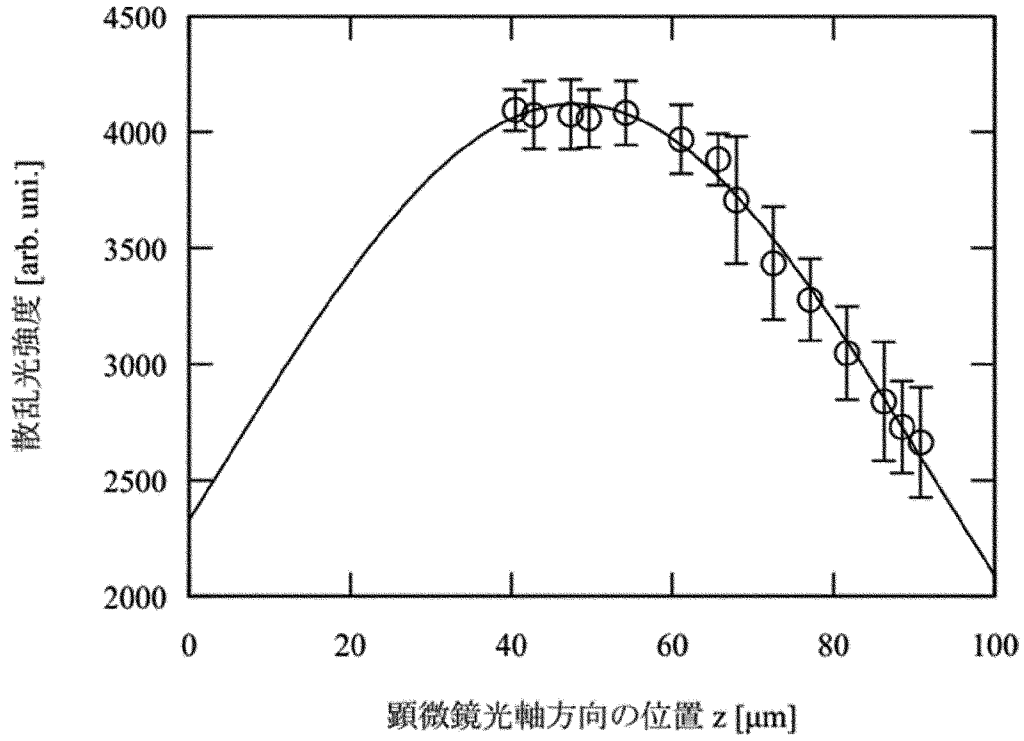
[図7]


4500
4000
3500
3000
2500
2000
0
2
4
6
8
10
散乱光強度 [arb. uni.]
最外回折縞の半径 [μm]

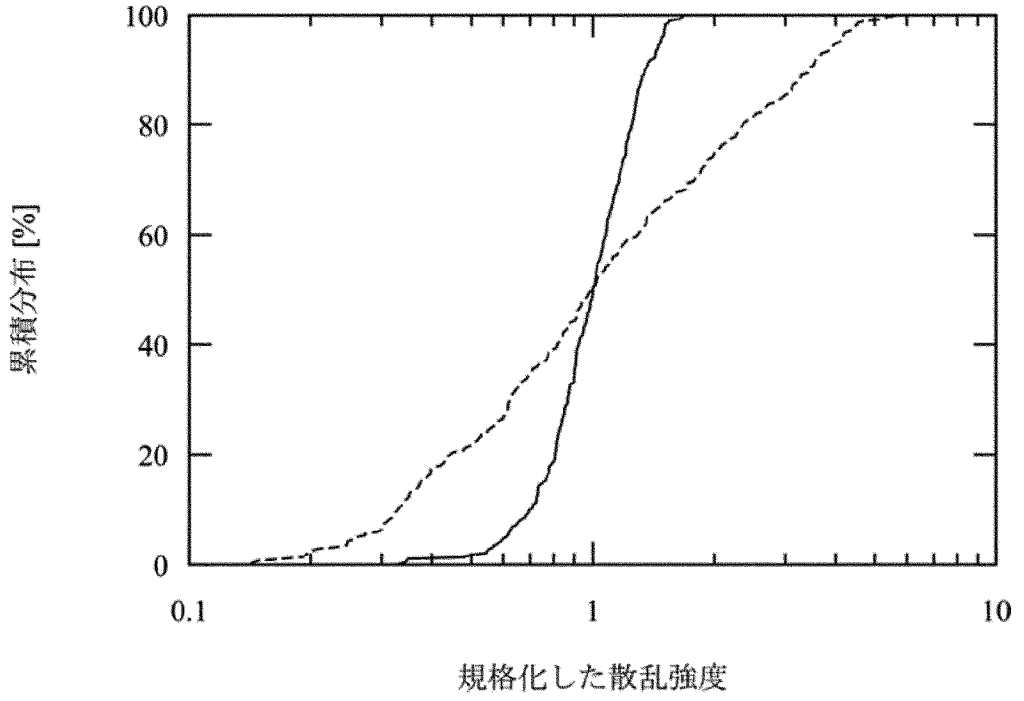
[図8]


20
15
10
5
0
0
20
40
60
80
100
120
140
最外回折縞半径 R/M [μm]
顕微鏡光軸方向の位置 z [μm]

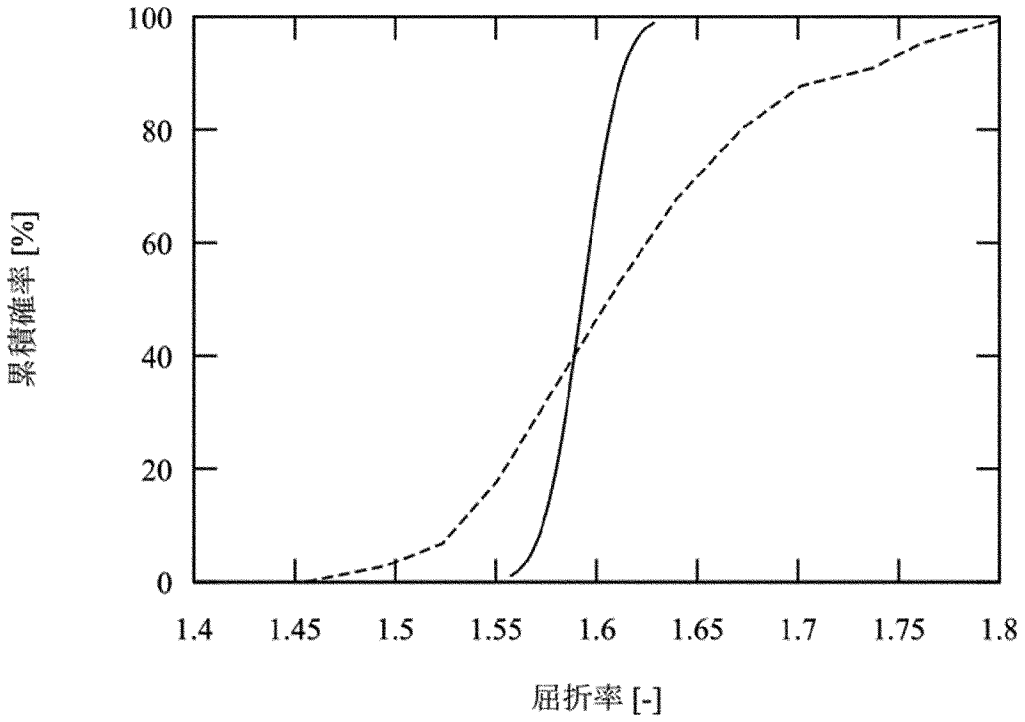
[図9]


4500
4000
3500
3000
2500
2000
散乱光強度 [arb. uni.]
0
20
40
60
80
100
顕微鏡光軸方向の位置 z [μm]

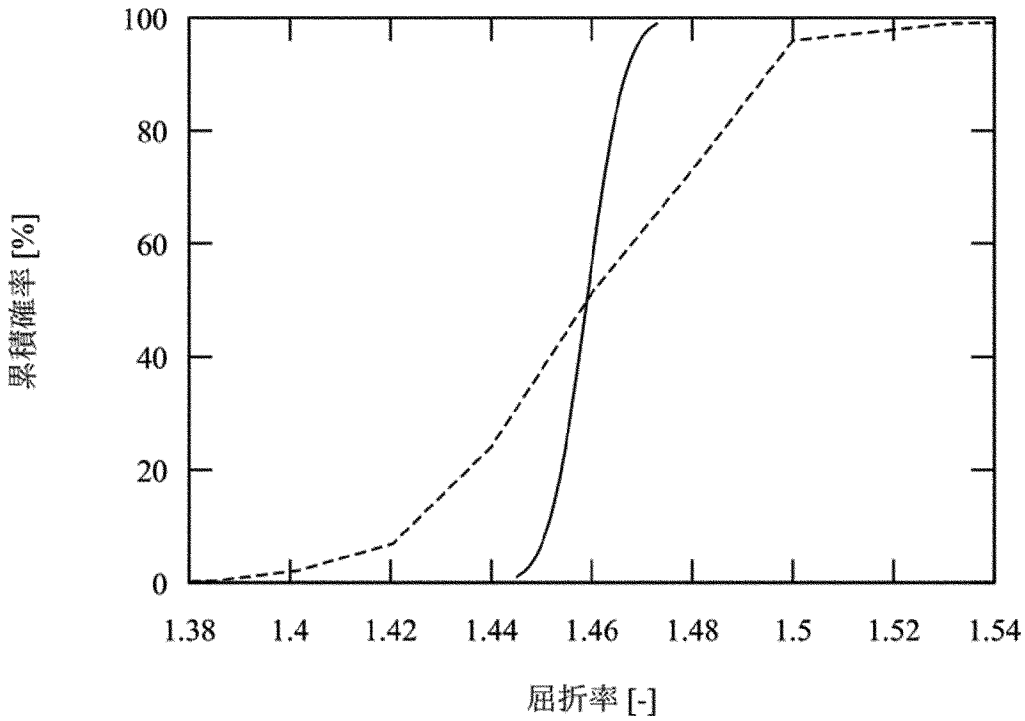
[図10]


100
80
60
40
20
0
累積分布 [%]
0.1
1
10
規格化した散乱強度

[図11]


累積確率 [%]
100
80
60
40
20
0
1.4
1.45
1.5
1.55
1.6
1.65
1.7
1.75
1.8
屈折率 [-]

[図12]


累積確率 [%]
100
80
60
40
20
0
1.38
1.4
1.42
1.44
1.46
1.48
1.5
1.52
1.54
屈折率 [-]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/034228

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. G01N15/02(2006.01)i, G01B11/00(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)
Int.Cl. G01N15/02, G01B11/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
(JDreamIII) & キーワード：粒子、散乱光、匝折縞、画像、粒子径及びそれに類する用語

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2016/159131 A1 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) 06 October 2016, entire text, all drawings & US 2018/0120214 A1, entire text, all drawings & EP 3279636 A1	1-12
A	JP 2008-261737 A (THE UNIVERSITY OF ELECTRO-COMMUNICATIONS) 30 October 2008, entire text, all drawings & US 2010/0110177 A1, entire text, all drawings	1-12
A	GIBSON, Sarah Frisken, "Experimental test of an analytical model of aberration in an oil-immersion objective lens used in three-dimensional light microscopy", Journal of the Optical Society of America. A. Optics, Image Science, and Vision, vol. 9, no. 1, 1992, pp. 154-166	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"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)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"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
"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
"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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 November 2019 (12.11.2019)	19 November 2019 (19.11.2019)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/034228

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2012-515351 A (NEW YORK UNIVERSITY) 05 July 2012, entire text, all drawings & US 2012/0135535 A1, entire text, all drawings & EP 2387708 A1 & CN 102365543 A	1-12
A	JP 2006-113462 A (TOHOKU UNIVERSITY) 27 April 2006, entire text, all drawings (Family: none)	1-12
A	JP 2018-49019 A (OSAKA UNIVERSITY) 29 March 2018, entire text, all drawings & US 2016/0349165 A1, entire text, all drawings & EP 3101410 A1	1-12
A	JP 2017-534886 A (ECOLE SUPÉRIEURE DE PHYSIQUE ET DE CHIMIE IND DE LA VILLE DE PARIS) 24 November 2017, entire text, all drawings & US 2017/0307509 A1, entire text, all drawings & EP 3204755 A1 & CA 2964079 A & CN 107003228 A & KR 10-2017-0091088 A	1-12

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１９／０３４２２８

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　G01N15/02(2006.01)i, G01B11/00(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.　G01N15/02, G01B11/00

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

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１９年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１９年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１９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）

（JDreamⅢ）＆　キーワード：粒子、散乱光、回折縞、画像、粒子径及びそれに類する用語

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
A	WO 2016/159131 A1 (国立研究開発法人産業技術総合研究所) 2016.10.06, 全文, 全図 & US 2018/0120214 A1 全文, 全図 & EP 3279636 A1	1-12
A	JP 2008-261737 A (国立大学法人　電気通信大学) 2008.10.30, 全文, 全図 & US 2010/0110177 A1 全文, 全図	1-12
A	GIBSON Sarah Frisken, Experimental test of an analytical model of aberration in an oil-immersion objective lens used in	1-12

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　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	国際調査報告の発送日
１２．１１．２０１９	１９．１１．２０１９

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
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）　２Ｊ　４４５５
野田　華代
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３２５２

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
	three-dimensional light microscopy, Journal of the Optical Society of America. A. Optics, Image Science, and Vision, Vol.9,No.1, 1992, P154-166	
A	JP 2012-515351 A (ニューヨーク　ユニバーシティー) 2012.07.05, 全文, 全図 & US 2012/0135535 A1 全文, 全図 & EP 2387708 A1 & CN 102365543 A	1-12
A	JP 2006-113462 A (国立大学法人東北大学) 2006.04.27, 全文, 全図 (ファミリーなし)	1-12
A	JP 2018-49019 A (国立大学法人大阪大学) 2018.03.29, 全文, 全図 & US 2016/0349165 A1 全文, 全図 & EP 3101410 A1	1-12
A	JP 2017-534886 A (エコール　シュペリュール　ドゥ　フィジーク　エ　ドゥ　シミ　アンドゥストゥリエール　ドゥ　ラ　ヴィーユ　ドゥ　パリ　－　ウーエスペーセーイー　パリテック) 2017.11.24, 全文, 全図 & US 2017/0307509 A1 全文, 全図 & EP 3204755 A1 & CA 2964079 A & CN 107003228 A & KR 10-2017-0091088 A	1-12