装置と技術

時間分解3次元レーザー顕微蛍光・吸収分光法

笹木 敬司・越岡 雅則・増原 宏

新技術事業団・極微変換プロジェクト 京都市下京区中堂寺南町 17
京都リサーチパーク内 (〒600)

(1990 年 10 月 15 日受理)

Time- and Three-Dimensional Space-Resolved Fluorescence and Absorption Microspectroscopy

Keiji SASAKI, Masanori KOSHIOKA, and Hiroshi MASUHARA

Microphotoconversion Project, Research Development Corporation of Japan,
Kyoto Research Park, 17 Chudoji-minami, Shimogyo-ku, Kyoto 600

(Received October 15, 1990)

1. 緒 言

ピコ秒・フェムト秒の超短パルスレーザーを用いた時間分解分光法により、分解、異性化、付加反応の研究やエネルギー移動、電子移動の機構解明が盛んに進められているが¹⁾、従来の研究対象は一般に気相や希薄溶液等の空間的に均一な系である。しかし、高分子・半導体等の各種固体材料や生物試料では不均一系が多く、その不均一構造が物理・化学的機能を持つことも少なくない。その様な試料の光反応過程を解析するには、空間的な分解能も付加した計測法が必要である。この要求に対し、最近、顕微鏡を導入してマイクロメートル・オーダーのスポットで蛍光の時間分解測定を行う装置がいくつか報告されている²⁾。しかし、それらはすべて2次元平面的な測定であり、深さ方向の情報が得られないだけでなく、上下の物質の蛍光が誤差となって重畳するため正確な測定が困難である。一方、深さ分解能を持つ測定法としては、エバネッセント波を利用した蛍光・吸収の時間分解測定法が提案されており³⁾、また、界面高調波発生を用いて界面の動的構造を測定する手法もある⁴⁾。しかし、これらは逆に平面的には均一であることを仮定しているため、固体表面・界面層等の限られた系にしか適用

できない。

そこで我々は、最近盛んに研究開発が進められている共焦点レーザー走査顕微鏡を導入して3次元空間分解・時間分解蛍光・吸収分光システムを開発した。共焦点レーザー顕微鏡は、レーザー光を使った結像系で問題となるコヒーレント雑音が生じないだけでなく、従来の光学顕微鏡より散乱光の影響が少ないため、測定精度が高いという特徴がある。さらに、共焦点レーザー顕微鏡の最も大きな特徴として、蛍光型における3次元空間分解機能がある。この機能により、従来の蛍光顕微鏡ではできなかった3次元構造の定量的測定が可能である⁵⁾。一方、吸収による物質情報を測定する場合についても、共焦点レーザー走査吸収顕微鏡が既に開発されている。しかし、吸収型は蛍光型とは異なり2次元空間分解能しか持たず、深さ方向の情報が得られない。そこで、我々は、モニター（プローブ）用の共焦点レーザー吸収顕微鏡に、さらに共焦点系で励起（ポンプ）用レーザー光学系を追加して、レーザー誘起吸収を観測する方式により、3次元空間分解能を有した顕微吸収測定を可能とした⁶⁾。これを我々は、3次元レーザー誘起吸収顕微鏡と呼んでいる。ここでは、これらの蛍光型と誘起吸収型の共焦点レーザー顕微鏡に、それぞれ、時間相関光子計数

Fig. 1. Block diagram of the time- and 3-D space-resolved fluorescence and absorption spectroscopic system.

法^{1,7)}とポンプ-プローブ¹⁾法による時間分解計測技術を導入して、空間的には3次元的にマイクロメートルの分解能を、時間的にはピコ秒分解能を持つ顕微蛍光・吸収分光システムを開発したので報告する。

2. 測定システムの構成

2.1 レーザー光源

開発した時間分解3次元顕微分光システムの構成をFig. 1に示す。レーザー光源としては、CWモード同期Nd:YLFレーザー(Quantronix 4217ML)の第2高調波で同期励起したキャビティダンブ色素レーザー(Coherent 702-1, 色素: ロードミン 6G)を用いた。このパルスレーザー光を第2高調波発生器(KDP結晶)に通し、ダイクロイックミラーで第2高調波パルス(波長: 280~300 nm)と、変換されずに残った基本波パルス(波長: 560~600 nm)に分離する。パルス幅は共に2~10 psで、繰り返しは通常3.8 MHzである。このうち、第2高調波パルスは、蛍光および誘起吸収用の励起光源とし、基本波パルスは誘起吸収測定用のモニター光源として用いる。この2つのパルスレーザー光は、それぞれに後述する操作を施した後、ダイクロイックミラーで同軸(共焦点系)にし、レンズ系で顕微鏡(Zeiss UMSP-50)に導く。この際、レーザー光学系が顕微鏡の開口径とフォーカス位置に合うようにレンズ系を調整する。顕微鏡内では、第2高調波、基本波共にダイクロイックミラーで反射し、石英対物レンズ(×100, NA=1.25)で試料

に集光する。

2.2 蛍光測定系

3次元空間・時間分解蛍光測定は、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡と時間相関光子計数法を利用している⁸⁾。まず、第2高調波パルスで誘起された試料の蛍光は、励起光の進行方向と反対方向に同じ対物レンズで集められ、ダイクロイックミラーを通してピンホール面上に結像される。この際、試料のフォーカス面以外からのインコヒーレントな蛍光は、ピンホール面でデフォーカス状態となるため、そのほとんどがカットされる。その結果、フォーカス位置の蛍光だけが選択され、3次元空間分解能が得られる⁹⁾。ピンホールの直径は40 μmで、これは試料面で換算するとφ0.25 μmとなる。ピンホールを通った蛍光は、分光器(Zeiss 474345)で波長分解された後、マイクロチャンネルプレート型光電子増倍管(Hamamatsu Photonics R2809U-07)で検出する。この検出信号と励起レーザー光のパルス信号は、それぞれ波高弁別器(Tennelec TC454)を通り、時間-電圧変換器(Tennelec TC864)及びマルチチャンネル波高分析器(Seiko EG&G7800)で統計的に時間相関演算が行なわれ、時間分解波形が得られる。試料の3次元構造は、3次元走査ステージで試料を動かし、フォーカス位置を相対的に変えて求める。ステージの最小ステップは光軸方向に0.1 μm、光軸に垂直な面方向には0.25 μmである。走査ステージ、分光器、及び時間相関光子計数装置はパーソナルコンピュータ(NEC PC9801RA)で制御する。

Fig. 2. Optical system of the laser-induced absorption microscope.

本蛍光測定系で広い波長範囲の蛍光スペクトルを測定する場合、対物レンズの色収差により測定スポットの位置が波長によって異なるという問題がある。本システムで用いた対物レンズの場合、例えば、波長 400 nm と 600 nm で焦点位置が約 $0.5 \mu\text{m}$ ずれる。この問題は、ピンホールの位置を色収差に合わせて上下に動かすことで解決できるが、顕微鏡内のピンホールを調整するのは困難である。そこで、本システムでは、波長によって試料を動かすと同時に、それに合わせて励起レーザー光学系も調整して色収差補正を行っている。この操作もコンピュータで自動的に制御することができる。

2.3 過渡吸収測定系

イオンなどの非蛍光性分子の同定や、反応の主要中間体の検出には、蛍光に代わって吸収の測定が必要となる。そこでまず、我々は、吸収の空間分解測定法として、共焦点レーザー誘起吸収顕微鏡を開発した⁹⁾。Fig. 2 に本顕微鏡の原理図を示す。まず、励起用レーザー光をダイクロイックミラーで反射した後、試料に集光する。このとき、仮に均質な試料を考え、これを A～E の 5 つの層に分けてみると、どの層においても吸収される励起光のエネルギーは同じなので励起分子の個数は等しい。しかし、レーザー光が集光している C 層では、励起面積は小さいが励起分子の密度は高くなる。この励起分子密度を光軸方向の位置の関数として表すと、その波形はフォーカス位置を中心とし、半値幅が波長オーダーとなる。この励起光学系と共焦点系でモニター用レーザー光を試料に照射すると、励起領域だけをモニター光が透過するので、励起分子の密度に比例した吸光度が得られる。従って、波長オーダーの微小領域で選択的に吸収が起こる。試料を透過した光は、さらに共焦点系でピンホール面上に結像し、検出器で吸収を測定する。本顕微鏡は、以上の様に光軸方向にも位置の選択性があり、3次元空間分解能を持つ。このことを光学伝達関数の理論から解析してみると、本顕微鏡の 3 次元結像特性は蛍光型

の共焦点レーザー走査顕微鏡と同じであることが示された。

このレーザー誘起吸収顕微鏡を過渡吸収測定法と組み合わせると 3 次元空間・時間分解吸収測定系を構築した⁹⁾。Fig. 1 において、試料を透過したモニター光（基本波）と励起光（第 2 高調波）は試料の下にあるコンデンサーレンズで集められミラーで反射した後、ピンホール面上に結像される。このうち励起光はフィルターでカットし、モニター光だけをフォトダイオード (Hamamatsu Photonics G1964) で検出する。時間分解測定は、顕微鏡に入る前に、光学遅延装置でモニター光を励起光に対してある時間だけ遅らせ（光速: 0.3 mm/ps ）、その遅延時間を走査することにより時間分解波形を得る。従って、時間分解能はレーザー光のパルス幅だけで決まり、検出器には依存しない。検出信号は、顕微鏡に入る前のモニター光強度と共に差動増幅器 (Kimura-Denshi TS-1A) にかける。さらに、励起レーザー光を 1 kHz でチョッピングし、ロックイン増幅器 (Stanford Research Systems SR530) で微小吸収を検出する。

3. システムの性能評価

光物理・光化学的挙動がよくわかっている化合物を用いてフィルム状の試料を作り、その測定結果からシステムの性能を評価した。Fig. 3 は、蛍光測定における光軸方向、すなわち試料の深さ方向の空間分解能を調べた結果である。試料は *p*-ターフェニルを含有したポリメタクリル酸メチルのフィルム ($1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$) を 2 枚の顕微鏡用石英カバーガラスではさんだものを用いた。このフィルムの厚さ方向に *p*-ターフェニルの定常蛍光の強度測定を行った。約 $10 \mu\text{m}$ のフィルムの部分だけで蛍光が観測されており、フィルム界面での波形を数学的に解析した結果から、光軸方向の空間分解能は $0.5 \mu\text{m}$ と得られた。また、光軸に垂直な面内の分解能は $0.3 \mu\text{m}$ であった。

Fig. 3. Depth profile of steady-state fluorescence of *p*-terphenyl-doped poly(methyl methacrylate) film at 345 nm.

Fig. 4. Time-resolved fluorescence spectra of a single microcapsule containing toluene solution of pyrene. Fluorescence intensity is normalized by the maximum value.

Fig. 4 は、時間分解蛍光スペクトルを測定した結果である。試料は、ピレンを含有したトルエン溶液 (1.3×10^{-2} M) を内液としメラミン樹脂で包んだ球状のマイクロカプセル (粒径 $19.2 \mu\text{m}$) であり、その中心部で測定を行った。蛍光スペクトルの測定波長範囲は 300 nm から 1000 nm の紫外から近赤外領域に渡って可能であり、波長分解能は 1 nm である。本システムの装置応答関数の半値全幅は 33 ps であり、数学的処理により 2 ps 程度の寿命成分まで解析することができる。

次に、吸収測定における深さ方向の分解能を調べた結果を Fig. 5 に示す。試料は *p*-ターフェニルを含有した

Fig. 5. Depth profile of laser-induced absorption of *p*-terphenyl in cyclohexane solution layer at 345 nm.

Fig. 6. Absorption decay curve of *p*-terphenyl in cyclohexane solution layer at 345 nm.

シクロヘキサン溶液 (1.0×10^{-3}) を 2 枚の石英カバーガラスではさんで液膜にしたものである。この液膜の厚さ方向に *p*-ターフェニルの誘起 ($S_0 \leftarrow S_1$) 吸収のプロファイルを測定した。石英-液膜界面での波形から光軸方向の分解能は $1.0 \mu\text{m}$ と得られた。空間分解能が蛍光測定より低いのは、本測定で用いたコンデンサーレンズの開口径数 ($\text{NA}=0.85$) が対物レンズ ($\text{NA}=1.25$) より小さいためである。

Fig. 6 は Fig. 5 の矢印の位置で時間分解吸収測定を行った結果である。減衰の時定数は 950 ps であり、この空間分解能下で文献値¹⁰⁾ とよく一致している。また、時間原点における立ち上がり時間から時間分解能は 10 ps と得られた。これは、本測定におけるレーザー光のパルス幅 (約 10 ps) から予想された値とほぼ一致する。

4. 結 言

マイクロメートル・ピコ秒の分解能を持つ 3 次元空間・時間分解顕微蛍光・吸収分光システムを開発した。本

システムにより、3 次元的に微小な空間領域を任意に、かつ選択的に蛍光・吸収測定することが可能となった。また、本システムで得られる多次元的なデータから物質情報を解析するための高速・高精度な数学的手法も既に開発している¹¹⁾。現在、我々は、マイクロカプセル、ポリマーフィルム、ラテックス微粒子、液滴、半導体の微細パターン、生物細胞などの様々な不均一系の動的解析を試みているが、従来のマクロな測定では埋もれて見えなかった化学現象を少しずつ解明できつつある^{8,12,13)}。

文 献

- 1) 吉原経太郎：分光研究 **39**, 123 (1990).
H. Masuhara: *Laser in Polymer Science and Technology, Application II*, ed. Fouassier and J. F. Rabek (CRC Press, Boca Raton, 1990) p. 235.
- 2) S. Kinoshita and T. Kushida: *Anal. Instrum.* **14**, 503 (1985).
- 3) H. Masuhara, U. Mataga, S. Tazuke, T. Murao, and I. Yamazaki: *Chem. Phys. Lett.* **100**, 415 (1983).
- 4) C. V. Shank, R. Yen, C. Hirlimann: *Phys. Rev. Lett.* **51**, 900 (1983).
- 5) 河田 聡, 南 茂夫: 光学 **8**, 380 (1989).
- 6) 笹木敬司, 越岡雅則, 増原 宏: 第 51 回応用物理学会学術講演会, 要旨集 p. 833 (1990).
- 7) D. V. O'Connor and D. Phillips: *Time-Correlated Single-Photon Counting* (Academic Press, New York, 1985).
- 8) K. Sasaki, M. Koshioka, and H. Masuhara: 17th Int. Quantum Electronics Conf., Tech. Digest, p. 170. (1990).
- 9) 笹木敬司, 越岡雅則, 増原 宏: 第 51 回応用物理学会学術講演会, 要旨集 p. 833 (1990).
- 10) M. Van Den Zegel, N. Boens, D. Daems, and F. C. De Schryver: *Chem. Phys.* **101**, 311 (1986).
- 11) 笹木敬司, 増原 宏: 第 37 回応用物理学関係連合講演会, 要旨集 p. 794 (1990).
- 12) H. Misawa, M. Koshioka, K. Sasaki, N. Kitamura, and H. Masuhara: 13th IUPAC Symposium on Photochemistry, Abstracts, p. 288 (1990).
- 13) H. Misawa, M. Koshioka, K. Sasaki, N. Kitamura, and H. Masuhara: Mater. Res. Soc. '90 Fall Meeting, Symposium on Dynamics in Small Confining Systems, M7.9 (1990).