

表面プラズモン共鳴と2光子励起蛍光を用いた 超高感度単一有機分子イメージング

Single molecule imaging by using surface plasmon enhancement and two-photon fluorescence excitation

研究代表者 大阪大学大学院基礎工学研究科物理系専攻電子光科学分野 助手
田中拓男

Instructor, Dept. of Physical Science, Graduate School of Engineering Science, Osaka Univ.
Takuo Tanaka

We proposed a single molecule imaging system. To detect very weak fluorescence light from a single molecule, this system utilizes surface-field enhancement of surface plasmon resonance, high spatial resolution of confocal microscope technique, and non-linear response of two-photon fluorescence excitation. We developed a high-speed surface plasmon sensor and a compact laser-feedback confocal microscope. The surface plasmon sensor can detect multiple samples with high sensitivity and high-speed detecting. The laser-feedback confocal microscope had $4\mu\text{m}$ axial resolution and $1\mu\text{m}$ lateral resolution without pinhole detector.

1. 研究の目的

近年、病理学のみならず臨床検査分野においても、DNAを構成する個々の塩基分子の配列や細胞内のタンパク分子などを単一分子レベルで検出、測定する機会が多くなっている。しかし、例えば現在DNAの塩基配列の決定には、電気泳動法を基本原理とした測定法が主に用いられており、この手法には測定に時間がかかるなどの問題点がある。つまり、これらの分野では、高速でかつサンプルにダメージを与えることなく、分子レベルの情報を再現性良く検出・測定できる技術の開発が望まれている。

一方生物学や医学分野では、細胞組織といった μm ~ mm オーダーの試料の観察には、光学顕微鏡がよく使用されている。これは光学顕微鏡が試料の像をリアルタイムに観察でき、なおかつ光を使った測定法は非接触でリモートセンシングできることから、生体試料を傷つけず生体そのものに及ぼすダメージが少ないためである。しかし、光学顕微鏡には、(1)分解能が光の回折によって波長程度(サブミクロンオーダー)に制限されてしまうため、分子のような波長より細かな試料は観察できない、(2)顕微鏡で厚みのある試料を観察するとピントのボケた像が重畳するので、試料を薄くスライスしなければならず、この結果として生体試料を殺してしまい光計測のメリットが活かされていない、(3)現在の顕微鏡では、非常に変化の少ない屈折率や吸収率の分布を検出することができない、といった問題点があるため、分子レベルの検出・測定には、積極的に用いられていない。

そこで本研究では、これら光学顕微鏡が持つ問題点を解決し、生体単一分子の特性や状態を高速かつ再現性良く検出可能な光学システムの開発を試みた。この目的のために、次のような

システムを考案した。まず、(2)の問題に関しては、これまで研究を行ってきた共焦点レーザー走査顕微鏡の3次元分解特性に着目した。共焦点レーザー走査顕微鏡は、光源であるレーザーと、試料内部に集光したレーザースポットならびに微小な点光検出器を共役な位置に配置した光学系で構成されており、厚みのある試料を物理的にスライスすることなく、その内部を観察できるようなした光学系である[1]。また、(3)の問題に関しては、表面プラズモンによる光電場の増強作用を用いて微量な試料を高い感度で検出できる計測技術に着目した。そして、共焦点レーザー走査顕微鏡と表面プラズモンセンサー技術を融合させることにより、微量でかつ屈折率や吸収率の変化が小さい試料を、高感度に検出することを考案した。さらに(1)の問題に関しては、表面プラズモンが持つ近接場による超解像特性に加え、プラズモンを多光子過程で励起することにより、その非線形性を利用して、光学顕微鏡の分解能をさらに向上させることを考案した。この目的に沿って、本年度は基礎実験として、表面プラズモンを用いた高感度屈折率・吸光度センサーの試作と、レーザー走査型共焦点顕微鏡の試作を平行して行った。

2. 表面プラズモン

金属表面に光が入射すると、光の電場により金属中の自由電子は、集団的な縦波振動を起こす。この振動をプラズマ振動と呼び、またこの振動の量子をプラズモンと呼ぶ。プラズモンには、金属の表面付近に振動が局在する表面モードが存在し、これを表面プラズモンと呼ぶ。

金属表面に励起される表面プラズモンの波数は、金属に接した媒質の誘電率に依存する。表面プラズモンの波数が変化するとそれを励起す

るための光の波数も変化するが、これは励起光の入射角が変化することと等価である。つまり、表面プラズモンを励起する光の入射角の変化から、金属表面に接している媒質の屈折率を検出できる。一方この表面プラズモンの励起角は、金属表面で反射される光の強度を測ることにより、検出可能である。それは、表面プラズモンが励起されると、光のエネルギーが表面プラズモンへ吸収され、反射光強度が減少するからである。つまり入射角を変化させて、反射光強度を測定したとき、その強度が最も小さくなる入射角を求めることにより、表面プラズモンの励起角を知ることができる。しかし従来の表面プラズモンセンサーは、そのほとんどが、(1) 試料(プリズム)を回転させて表面プラズモンの励起角を走査していたため、測定に時間がかかる、(2)液体セルに試料を入れていたため、測定に多量の試料が必要である、(3)一度に計測できる試料の数が限られており、同時に多数の試料を計測し、比較することができない、という問題点があった。そこでこれらの問題を解決するため、実時間でなおかつ少量の試料で測定が可能なシステムの試作を行った。

実験結果

試作したシステムの光学系を図1に示す。光源には、He-Neレーザー(波長632.8nm)を使用し、このレーザー光をコリメートした後にシリンドリカルレンズを用いてプリズム表面でライン状に集光した。この時、光は全てプリズム面で全反射し、かつ表面プラズモンの励起角が含まれるように入射角を選択してある。プリズム表面で全反射した光は、もう一方のシリンドリカルレンズでフーリエ変換され、そのフーリエパターンはCCDカメラによって測定される。プリズム表面には、膜厚55nmの銀薄膜が真空蒸着法によって蒸着されており、この銀薄膜の上に試料となる液体を滴下する(Kretschmann配置)。プリズム表面へ集光された光は、多数の相異なる入射角を持つ平面波の集まりと等しい。従って、これら多数の平面波のうちプラズモンを励起する入射角を持った光のみがプラズモンにエネルギーを奪われるため、結果としてその入射角に対応する光の反射光強度のみが低下し、フーリエ面に置かれたCCDカメラの受光面には、黒いバンドが現れる。この黒いバンドの位置は、光の入射角に対応するため、バンドがどの位置に現れたかを検出することにより、試料の屈折率が瞬時に測定できる。また多数の試料の液滴をライン状のレーザースポット上に並べることより、多数の試料の屈折率を同時に検出することが可能となる。

実験結果を図2に示す。図2は純水と、濃度0.04, 0.1[g/cm³]の食塩水の3種類を滴下したときの測定結果である。図より屈折率(濃度)の違いに応じて光強度の低いバンドの位置がずれていることが確認できる。このシステムでは、現在のところ約0.000002の屈折率差を検出することが可能である。この値は、CCDカメラの画素のピッチによって制限されており、理論的に

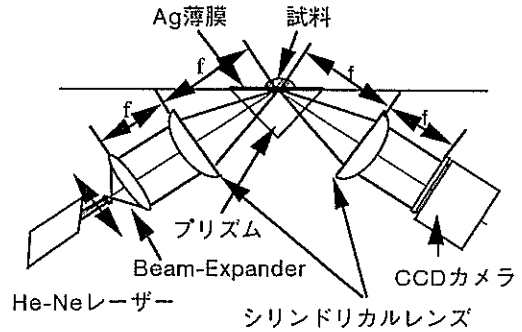


図1 リアルタイム表面プラズモンセンサー光学系

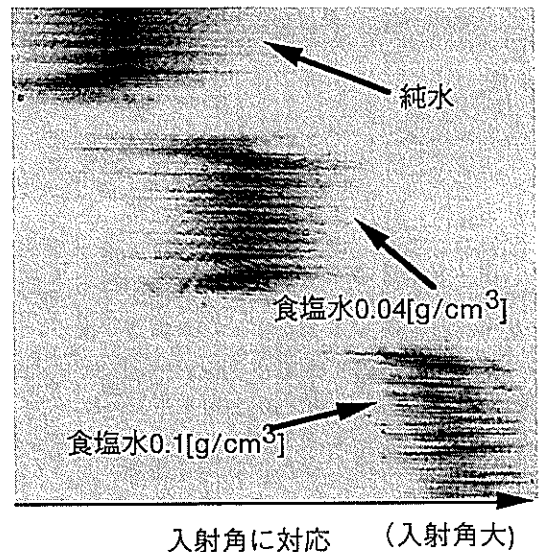


図2 表面プラズモンセンサーによる測定結果

はより高密度のディテクタを用いることにより、1桁程度向上する。

次に検出に必要な試料の量を求める。表面プラズモンの励起角に影響を与えるのは、金属表面近傍のサンプルのみであり、離れた位置にあるサンプルは、光電場の影響を受けない。これは表面プラズモンの電場が金属表面から離れるにしたがって指数関数的に減衰するからである。理論計算よりプラズモンの励起角に影響を与えるのは、金属表面から1200nm程度までの試料である。また表面プラズモンの、境界面に平行な方向の伝搬長は、最大で30μm程度である。以上の結果より、測定に必要なサンプルの量は、約3400μm³ (3.4pl)と結論できる。

以上の実験と解析から、レーザー光を集光した微小領域においても、表面プラズモンを利用した高感度屈折率測定法は有効であり、また実時間測定や多数の試料の同時測定など従来のシステムにはなかった特徴を有するシステムを実現することができた。

3. 半導体レーザーを用いたレーザーフィードバック共焦点顕微鏡

先に述べたように、光を用いて試料を観察する光学顕微鏡は、リモートセンシングが可能であるため、試料を直接傷つけないという特徴や、可視域の光を使用すれば試料のダメージが最小限に押さえられるため、電子顕微鏡等と比較すると生体試料に対する影響が非常に少ない測定法として、広く使用されている。しかしながら、光学顕微鏡には、厚みのある試料を観察できないという最大の欠点があった。これは例えば、細胞を生きたまま観察しようとして、細胞内部にピントを合わせても、その上下の像がボケた像として重畳するため、ピントの合った部分を観察できなくなるからである。この問題を解決する方法として、3次元的な分解能を有する共焦点顕微光学系が提案されている。そこで、本研究ではこの共焦点顕微光学系の3次元結像特性に着目した。そして、ピンホールの位置調整が困難であるという共焦点顕微鏡の問題点を解決するために、1つの試みとして、光源である半導体レーザーの特性を利用することにより、半導体レーザーのみで光の検出も同時に行い、ピンホール光検出器が不要で小型なシステムの試作を行った。

本研究で試作した共焦点レーザー走査顕微鏡の光学系を図3に示す。この光学系には、光検出器はなく半導体レーザーが光源であると同時に光検出器の役割を果たす。これは半導体レーザーに光を戻すと、半導体レーザーのpn接合面間の電圧が光強度に応じて変化する現象を利用したものであり、試料で反射したレーザー光の強度は、pn接合面間の電圧を測定することにより検出することができる。まず半導体レーザー(松下電子工業LNCQ02PS, $\lambda=660.1\text{nm}$)の光をコリメータレンズでコリメートした後、対物レンズ($\times 40$, $\text{NA}=0.65$)を用いて試料上に集光する。試料で反射された光は、再度対物レンズに入射し、半導体レーザーに帰還される。半導体レーザーは、定電流駆動されており、そのpn接合面間の電圧をコンピュータで計測する。試料は、コンピュータコントロールされたx-y-zステージ上に固定されており、このステージを3次元的に走査して、コンピュータで像を再構成する。

実験結果

まず、試料ステージにミラーを置き、その反

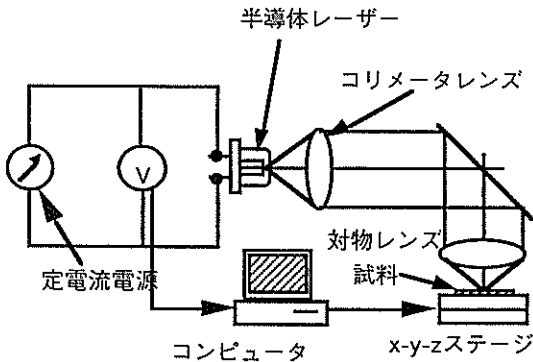


図3 半導体レーザーフィードバック顕微鏡

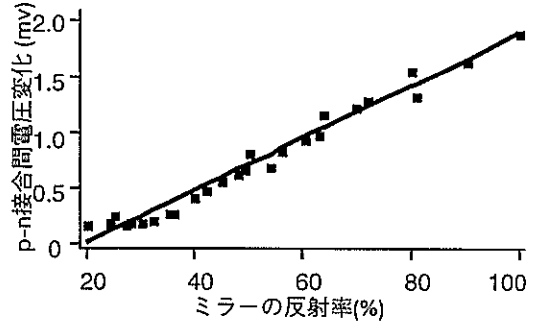


図4 光の戻り量とpn接合面間の電圧変化

射率を変えることにより、帰還されるレーザー光強度を変化させ、その時のpn接合面間の電圧を測定した。測定結果を図4に示す。図4より、pn接合面間の電圧の変化は、半導体レーザーに戻ってくる光の強度に対してほぼ線形に変化しており、電圧変化から反射光強度を検出できていることが確認できる。

次に、試料として平面ミラーを置き、そのミラーを光軸方向に走査することにより、試作した共焦点顕微鏡の光軸方向の応答特性を測定した。測定結果を図5に示す。図5より、試作したピックアップ光学系の光軸方向の応答は、半値全幅で $4\mu\text{m}$ であり、従って3次元物体を約 $2\mu\text{m}$ 間隔で光軸方向に分離して観察可能であることが確認できた。これは試作した光学系が共焦点光学系と等価な3次元物体に対する解像特性を持つことを示している。

試作した共焦点顕微鏡を用いて実際にLSI素子を観察した。そして、焦点位置を変化させて再生像の変化を見た。この実験結果を図6に示す。図6は、 $2\mu\text{m}$ ごとに焦点位置を変えて測定した4枚の画像である。実験結果より、焦点位置を変化させると、ピントの合う高さが異なるため、各高さごとの構造が観測できていることがわかる(特に矢印で示した部分は変化が大きい)。また、焦点位置から外れた部分の像は、ボケずに消えており、焦点の合った部分の像のみが観測できている。このように、試作したレーザー帰還型共焦点顕微鏡によって奥行きの方に $2\mu\text{m}$ 程度の分解能を実現できることを確認した。試作したシステムは、従来の共焦点顕

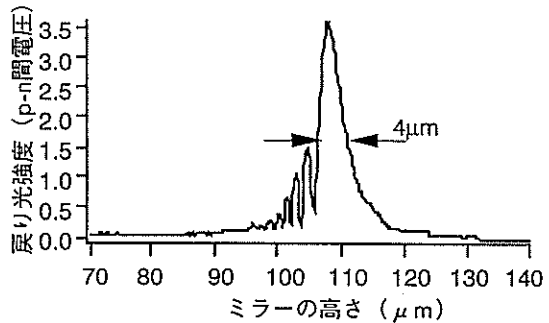


図5 光軸方向の応答特性

微鏡のようにピンホールを位置を細かく調整する必要がなく、光の相反性により、自ずからレーザー光は検出器である半導体レーザーに戻ってくる。従って、3次元分解能を有しながらも、調整が非常に簡単でなおかつコンパクトな光学系を実現できた。

4. 今後の課題と発展

本研究では、高感度な屈折率（吸収率）センサー並びにコンパクトで3次元分解能を有する顕微システムとして、それぞれ表面プラズモンセンサーならびにレーザーフィードバック共焦点顕微鏡を試作し、光学顕微領域下での高感度分子測定、分子検出の可能性を確認した。我々は現在、本研究で得た知見を基に、表面プラズモンセンサーとレーザー走査型共焦点顕微鏡を融合し、生体分子計測を目的とした実システムの試作を行っている。このシステムは、まず表面プラズモンにおけるKretschmann配置のプリズムのかわりに油浸対物レンズを用いて、光を全反射状態で集光し、生じたエバネッセント場スポットにより、表面プラズモンを局所的に励起する。表面プラズモンの励起状態は、試料の屈折率変化や吸収率変化に大きく依存するため、反射光を共焦点光学系で検出することにより、試料の状態を、数～数十ナノメートルオーダーで検出するというものである。現在の課題は、(1)光の回折限界をどこまで越え、どこまで高い分解能を実現できるか、(2)単一分子からの信号は非常に微弱であるため、どこまでノイズ

を低減し、S/N比を上げられるかである。これらの問題は、数百フェムト秒のパルス幅を持つ超単パルスレーザーを用いた非線形現象を利用することにより、解決できると考えており、このような技術を積極的に取り入れながら、さらに研究を展開していく予定である。

5. 参考文献

- 1) T. Wilson and C. Sheppard, "Theory and practice of scanning optical microscopy," Academic Press (1984)
- 2) K. Matsubara, S. Kawata and S. Minami, Appl. Opt., 27, 1160 (1988)
- 3) A. Otto, Z. Phys., 216, 313 (1971)
- 4) E. Kretschmann, Z. Phys., 241, 313 (1971)
- 5) Dror Sarid, Phys. Rev. Lett., 47, 1927 (1981)
- 6) R. W. Wood, Philos. Mag., 4, 396 (1902)
- 7) S. N. Jasperson and S. E. Schnatterly, Phys. Rev., 188, 759 (1969)
- 8) G. P. Bryan-Brown, M. C. Jory, S. J. Elston and J. R. Sambles, J. Mod. Opt., 40, 959 (1993)
- 9) H. Kano and S. Kawata, Appl. Opt., 33, 5166 (1994)
- 10) T. Wilson, "Confocal Microscopy," Academic Press (1990)

7. 発表論文

田中拓男, 紫藤則和, 山本錠彦, '1998年第1回放射科学研究会 (1998)

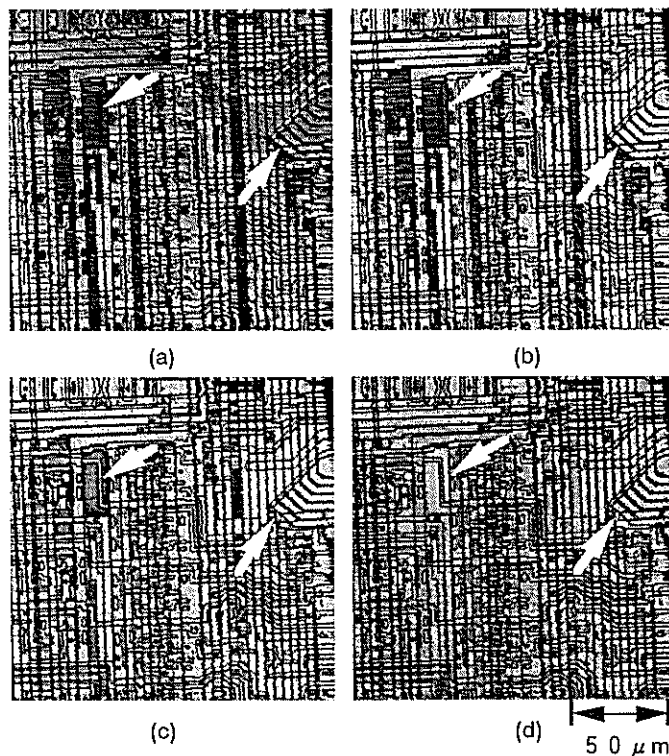


図6 測定結果 (試料: LSI素子)

(a) $z=0$, (b) $z=2$, (c) $z=4$, (d) $z=8$ (μm)