

2P020

温度数 K における一分子分光のための高開口数対物レンズの開発
 (東工大・物理) 稲川博敬, 丸尾美奈子, 藤芳 暁, 松下道雄

An objective with a high numerical aperture for single-molecule spectroscopy at a few kelvins
 (Department of Physics, Tokyo Institute of Technology)
 Hironori Inagawa, Minako Maruo, Satoru Fujiyoshi, Michio Matsushita

【序】2007年に、我々は低温中で回折限界性能で動作する反射対物レンズの開発に成功した[1]。これを用いて、温度1.5 Kでのタンパク質1分子の蛍光分光に成功した[2-3]。しかし、反射対物レンズの開口数NAは0.52で、空気中でのNAの原理限界1と比べるとまだ向上の余地を残しており、測定系の応用範囲が限られている。図1に示した反射対物レンズの2枚の球面鏡のみでNAを上げようとする、球面収差が原因で集光性能が下がる。そこで、この反射対物レンズに加えて半球レンズを用いることで、NA = 0.79に向上することに成功したので報告する。

【レンズデザイン】図1に対物レンズ・半球レンズペアの配置を示す。半球レンズの曲率中心Oを対物レンズの焦点と一致するように配置する。対物レンズに入射した平行光は2枚の球面鏡で反射され、球面波となる。球面波は半球レンズの球面S1(曲率半径3 mm)から入射して、平面S2に集光される。測定分子はこの平面S2にスピコートする。

【公差設定】以下に、製作にあたり考慮した公差について示す。光学計算には光学設計ソフトウェアZEMAXを用いた。半球レンズで高い加工精度が要求されるのが球面S1と、レンズ厚Lである。まずはS1の加工精度について議論する。図2にS1の球面精度(P-V値)に対する集光性能の計算値を示す。図の縦軸に示す集光性能は、図1の原点Oから全立体角(4π)に放射される球面波の全エネルギーのうち、反射対物レンズに捕集されて結像レンズによって結ばれた像の第一暗環内に集められるエネルギーの割合と定義する。図2から、球面精度がλ/4以下ならば集光性能の低下は3%未満に抑えられるので、これを球面精度の公差に指定した。実際に完成した半球レンズの球面精度の検査値はλ/6.4であり、集光性能の低下は2%未満に抑えられる。

次に、レンズ厚Lについて議論する。図3に、Lの設計値(3.00 mm)からのずれΔLに対する集光性能の計算値を示す。図3をみるとΔL = ±0.10 mmでの集光性能の低下分は2%程度であり、Lに高い加工精度を要求しなくても集光性能の著しい低下は起こらない。一方、球面S1の場合とは異なり、Lのずれは軸上色収差と倍率色収差を生じるので、これらについても考慮する必要がある。図4に波長700 nmを基準にしたときの波長に対する軸上色収差の計算値を示す。グラフaがΔL = 0.00 mm、グラフcがΔL = -0.01 mmの場合で、ΔLが0.00 mmから離れるほど軸上色収差が顕著に大きくなる。ΔL = -0.01 mmの場合、400 nm ~ 700 nmの波長領域では軸上色収差は最大0.12 μmである。これはレンズペアの焦点深度0.47 μm(波長405 nm)よりも十分小さい値なので、測定には問題ない。よって、レンズ厚の公差を-0.01 mm ≤ ΔL ≤ 0.00 mmと指定した。次に、倍率色収差について、表1に波長700 nmを基準にしたときの計算値を示す。ΔLが設計値(a)、設定公差(c)、実際のレンズの値(b)それぞれの場合について示したが、設定した公差範囲内ではΔLが倍率色収差には全く影響しない。なお、405 nm ~ 700 nmの波長領域では、倍率

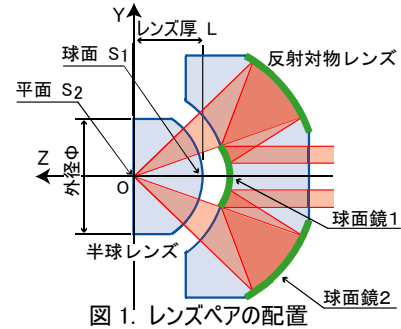


図1. レンズペアの配置

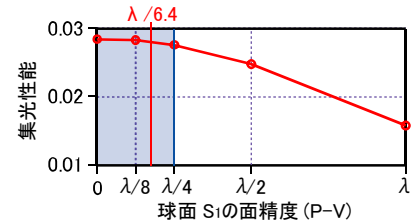


図2. 球面S1の面精度に対する集光性能。計算波長λは405 nm。青く塗りつぶしたのが設定した許容精度(λ/4以下)。赤線で示したのが完成品の検査値λ/6.4。

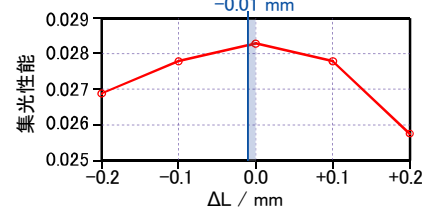


図3. 半球レンズの厚Lの設計値(3.00 mm)からのずれΔLに対する集光性能。計算波長は405 nm。青く塗りつぶした範囲が設定公差(-0.01 mm)。

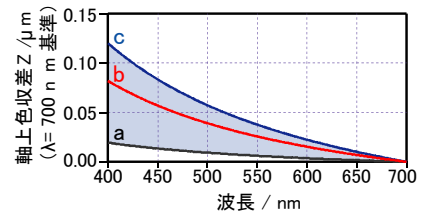


図4. 軸上色収差。ΔL = 0.00 mm(a)、ΔL = -0.0062 mm(b)、ΔL = -0.01 mm(実際の検査値)の場合(c)。

表1. 倍率色収差(λ = 700 nmを1倍とする)

波長λ	(a) ΔL = 0.0000 mm	(b) ΔL = -0.0062 mm	(c) ΔL = -0.0100 mm
700 nm	1.0000	1.0000	1.0000
633 nm	0.9988	0.9988	0.9988
532 nm	0.9962	0.9963	0.9964
473 nm	0.9940	0.9941	0.9941
405 nm	0.9902	0.9902	0.9903

色収差が1%未満に抑えられている。光軸から20 μm 離れた位置にある分子の測定では(実際の測定ではこの程度離れた位置で使用できれば十分である)、1%の倍率の違いは0.2 μm の位置ずれに対応する。集光領域を波長700 nmでの第一暗環半径内に固定して波長405 nmでの測定に切り替えることを想定した場合、0.2 μm の位置ずれによって生じる集光量の損失は11%である。この程度の損失は測定に差し支えない。

【レンズペアの評価】対物レンズと半球レンズペアの評価を一分子測定によっておこなった。試料には濃度 10^{-12} MのAlexa Fluor 647色素(Alexa)溶液を用い、それを合成石英基板にコートする従来の方法と、半球レンズにコートする今回の方法とを比較した。

図5に評価に用いた共焦点顕微システムを示す。励起光のレーザー(波長633 nm)は可変NDフィルターを用いて、試料上の励起光強度が $1.4 \times 10^2 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ となるように調整した。この励起光をロングパスフィルターで反射し、レーザー走査のための2枚の $f = 100 \text{ mm}$ アクロマートレンズ(一方は電動、他方は固定)を通して対物レンズによって試料に集光させた。試料分子からの蛍光は励起光と逆の経路を通し、2枚のロングパスフィルターを透過させた後、 $f = 150 \text{ mm}$ のアクロマートレンズでコア径100 μm のマルチモードファイバーにカップルし、APD(Avalanche PhotoDiode)によってその光子数を計測した。試料の光退色やブリンキングを抑えるため、試料箱内はアルゴンでパージして測定した。

図6に合成石英基板を用いた場合(A)と半球レンズを用いた場合(B)におけるAlexa 1分子の蛍光画像およびその強度断面を示す。第一暗環半径 r_{1st} は合成石英基板を用いた場合が0.57 μm (理論値0.58 μm)であるのに対して、半球レンズを用いると0.40 μm (理論値0.40 μm)となり1/1.4倍になった。半球レンズを用いることによるNAの向上(1.46倍)に応じて、顕微鏡の空間分解能が上がったことを確認した。

集光量を比較するため、広い領域でイメージングをして取得された全ての1分子の輝点について、ピーク強度を計算した。図7に半球レンズを用いない場合(A)と半球レンズを用いた場合(B)における輝点のピーク強度分布をヒストグラムで示す。半球レンズを用いることで、分布が強度の強い側へシフトしている。蛍光強度の和平均は半球レンズを用いない場合の184 cpsに対し、半球レンズを用いると448 cpsとなり、2.4倍(理論値2.3倍)に増加した。NA向上に見合った集光性能の向上を確認した。

【参考文献】

- [1] M. Fujiwara et al, *J. Opt. Soc. Am. B*, **26**, 1395 (2009).
- [2] S. Fujiyoshi et al, *Phys. Rev. Lett.*, **100**, 168101 (2008).
- [3] S. Fujiyoshi et al, *Phys. Rev. Lett.*, **106**, 078101 (2011).

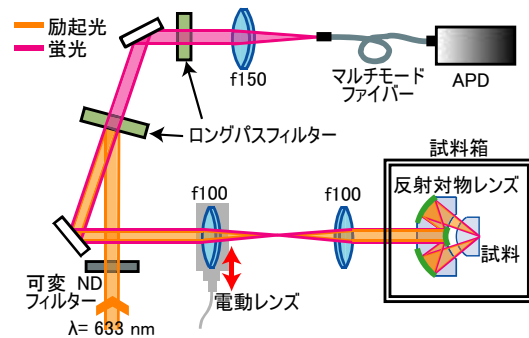


図5. 共焦点顕微鏡システム

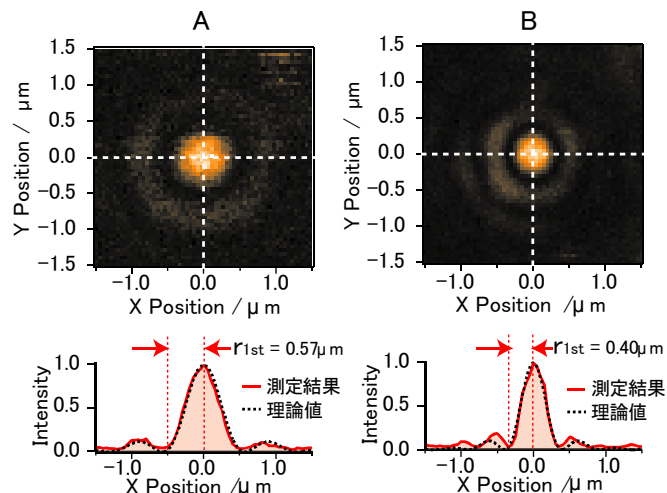


図6. 合成石英基板を用いた場合(A)と半球レンズを用いた場合(B)のAlexa 1分子の蛍光画像(上段)とその強度断面(下段)。強度断面は赤の実線が測定結果で黒の破線が計算値。 r_{1st} は測定結果を理論曲線にフィッティングすることで求めた第一暗環半径。

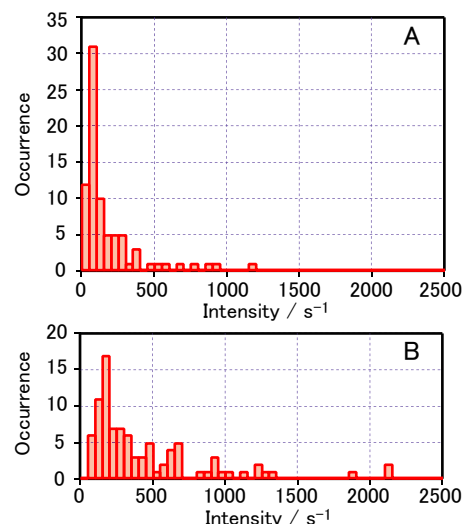


図7. 1分子蛍光の強度分布。Aが合成石英基板を用いた場合で、計測した分子の総数は80、平均蛍光強度は184 cps。Bが半球レンズを用いた場合で、分子の総数は92、平均蛍光強度は448 cps。励起光強度はいずれも $1.4 \times 10^2 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ 。