

1P052 過渡蛍光検出赤外分光法を応用したファーフールド赤外超解像顕微分光

(東工大資源研・オリンパス)

酒井 誠、大森 努、川島安武、武田朗宏、渡邊武史、池滝慶記^{*}、藤井正明

【序】我々はこれまで2波長二重共鳴分光法と光学との融合により、回折限界を凌駕する空間分解能、即ち超解像を有する光学顕微鏡が実現できることを示してきた。この超解像顕微鏡法は、通常の光学顕微鏡、即ちファーフールド顕微鏡の利点を活かしたまま空間分解能を高めるものであり、ナノスケールの超解像分解能を有しつつ、1)真空などを必要とせず *in situ* の観測も可能であり、2)共焦点光学系により、物体内部の断層像を基にした3次元可視化が可能であること、3)機械的プローブを用いる必要がないため物質内部の3次元構造の観察が可能である。2波長 Dip 分光法(図1(a))は第1のレーザー光で S_1 に励起した後、さらに第2のレーザー光を照射することにより高励起状態 S_n へ励起する。 S_n では速い無輻射過程が起きるため、第2のレーザー光照射によって蛍光が抑制される。この蛍光抑制過程を利用することによって、光の回折限界で限定される光学顕微鏡の分解能を打破する超解像顕微鏡が実現されている。(本討論会の講演番号 4P059 および 4P060 を参照)

本研究では、新たに赤外光と可視光を用いた二重共鳴分光法である過渡蛍光検出赤外分光法(図1(b))をファーフールド超解像顕微分光へ応用した。過渡蛍光検出赤外分光法は、従来振動緩和の研究手段として用いているもの(講演番号 2D14 参照)であり、第1の赤外レーザー光によって特定の振動に赤外励起した分子のみを第2の可視レーザー光により選択的に電子励起することで生じる S_1 からの蛍光(過渡蛍光)を検出する分光法である。この時、過渡蛍光は赤外光と可視光の重なり部分でのみ発生するため、蛍光発生領域は、赤外の振動情報を有すると同時に、回折限界を突破した空間分解能を併せ持つ。この赤外超解像顕微分光に成功したので報告する。

【赤外超解像原理】従来の赤外顕微鏡では、赤外光を試料へ集光し、透過もしくは反射率変化をモニターする。この時の空間分解能は、赤外光の集光スポットサイズで決まるが、その大きさはレンズの NA と波長で決まる回折限界により制限される。即ち、回折限界以下に集光することは物理的に不可能であり、 $3\mu\text{m}$ (NA=0.6、波長 $3\mu\text{m}$ のときの回折限界)の壁を超えるのは極めて困難である。我々の提案する赤外顕微鏡は、赤外の回折限界を遙かに凌ぐ分解能を有する可能性を秘めている。図2に赤外超解像原理を示す。赤外光と可視光を同時に照射すると、2色が重なったところからのみ蛍光が発生する。赤外光および可視光はそれ

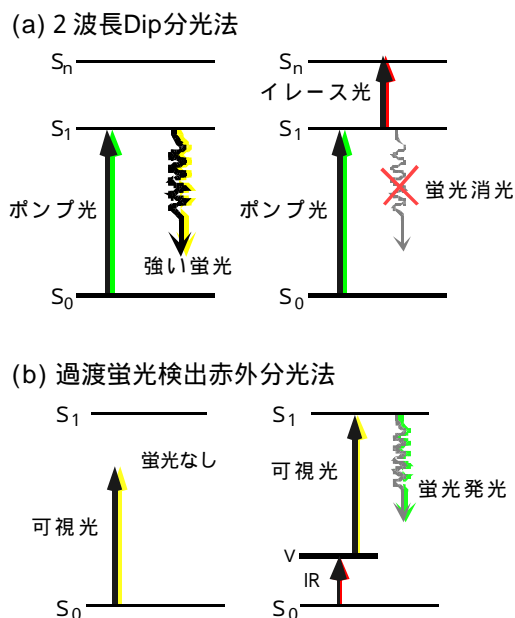


図1：2波長二重共鳴分光法

それぞれの波長に依存する回折限界以下に集光できないが、この重なり部分の蛍光領域は原理上、可視光の回折限界まで収縮可能である。即ち、赤外の振動情報を可視光の回折限界に依存する空間分解能で取り出す赤外超解像顕微分光が実現できる。

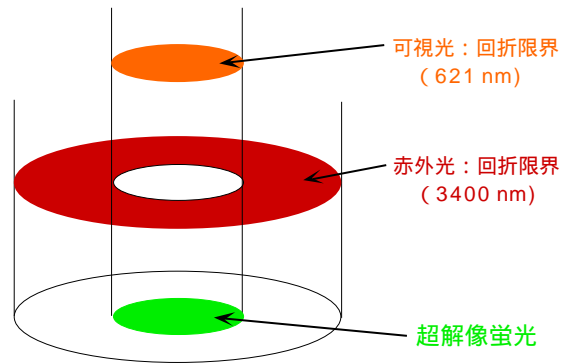
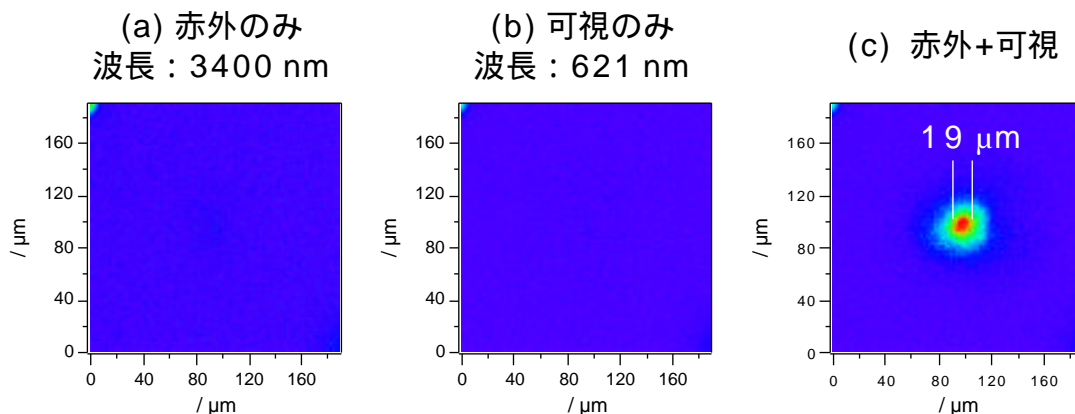


図 2：赤外超解像の原理

【結果と考察】 蛍光測定用の 1cm 角石英セルに 0.5mM/l のローダミン 6 G /重クロロホルム溶液 2ml を加えて過渡蛍光像を測定した結果を図 3 に示す。2 色のピコ秒レーザーの波長およびビーム径 () は、可視光：621nm (7.5mm)、赤外光：3400nm (1mm) を用い、焦点距離 10mm の対物レンズで集光した。(a) 赤外光のみ、あるいは(b) 可視光のみを入射した場合には蛍光は全く観測されないが、(c) 両者を同時入射した場合には蛍光像が明瞭に観測されている。蛍光像がローダミン 6 G 分子の赤外吸収に依存するかどうかを確認するために赤外光の波長をローダミン 6 G 分子の赤外吸収が無い 2750nm に変えたところ、蛍光が消失した。さらに、赤外光と可視光の遅延時間依存性を測定したところ、赤外光を時間的に先に入射した場合のみ信号が生じ、可視光を先に入射した場合は蛍光が消失した。以上の事実から、観測された蛍光像は赤外振動励起準位を経由する赤外 - 可視の二重共鳴信号であることは明白である。また、蛍光像の半値全幅は 19 μ m と観測されている。赤外のビーム径：1mm から理論的に求められる回折限界は $\sim 41\mu$ m であるが、蛍光像はこれを遥かに凌駕している。即ち、この時点で既に回折限界の 2 倍以上の赤外超解像が達成されている。一方、可視のビーム径：7.5mm から求められる回折限界は $\sim 1\mu$ m であり、蛍光像はこれよりはかなり大きく、まだ 1 桁以上向上する余地が残されている。原因としては、溶液試料を測定に用いたため、焦点の深さ方向の分解能が低下し蛍光像が大きくなった事が挙げられる。今後、共焦点光学系を組むなどすれば改善される。当日は、赤外超解像の平面および深さ方向の空間分解能の議論を行う。また、時間分解測定、波長依存測定などの赤外超解像顕微分光の結果および振動緩和との関係についても論じる予定である。



・回折限界 = $0.61 \lambda / NA$ ($NA = D/2f$)

図3：赤外超解像の観測