

4P060 2波長Dip分光法を応用したファーフールド超解像顕微鏡の開発

-点像分布関数の理論的考察-

(オリンパス¹・東工大³) 池滝慶記¹, 渡邊武史², 酒井誠², 石内俊一², 藤井正明²

【序】ある波長の光(ポンプ光)で分子を S_1 に励起すると蛍光を発する。しかし、2波長Dip分光法において、別の波長の光(イレース光)を同時照射して他の電子状態に励起すれば、蛍光過程が抑制できる(蛍光抑制効果)。我々はこの効果を用いた超解像顕微鏡法に関するの研究を展開している[1]。本講演では、同分光法における蛍光強度の変化(Dip-ratio)に関して、理論的な側面より包括的な定量解析を行った。このDip-ratioは、本顕微鏡法の結像性能を左右する本質的なパラメータである。すなわち、本顕微鏡法の空間分解能は、ポンプ光とイレース光の集光パターン及びDip-ratioによって決定される。解析では、 S_0 、 S_1 及び S_n の3準位が関与する共鳴遷移過程を考慮したモデルを提案し、Dip-ratioの一般解を求めた。本講演では、この結果を基に、2波長Dip分光法の諸条件が点像分布関数に与える影響も理論的に考察する。

【レート方程式解析モデル】Dip-ratioは、分子構造が起因するところの分子固有の光応答特性である。図1に、2波長蛍光Dip分光法の励起ダイアグラムを示す。通常は、ポンプ光で基底状態(S_0)の分子を状態 S_1 に励起すると分子は S_1 状態より蛍光を発して S_0 状態に緩和するが、更にイレース光を照射すれば、分子はより高い量子状態(S_n)に励起され、 S_1 状態を経由せず直接 S_0 に戻る緩和過程が起こる。更に、イレース光の波長が蛍光波長帯域に重複していれば誘導放出過程も起こる。このとき、 S_1 状態からの蛍光量が減少し、その変化がDipとして観測される。一般に、蛍光強度は S_1 状態のポピュレーションに比例するので、Dip-ratioはこのポピュレーションを求めることにより解析することができる。すなわち、ポピュレーションを観測時間(T)で積分した量が観測された蛍光強度であるので、Dip-ratio($P(I_e)$)は式(1)で与えられる。

$$P(I_e) = \frac{\int_0^T n_1(t, I_e) dt}{\int_0^T n_1(t, 0) dt}, \quad (1)$$

$n_1(t, I_e)$ は S_1 状態のポピュレーションであり、イレース光のフォトンフラックスと観測時間の関数となる。更に、 $n_i(t, I_e)$ は、 S_0 状態($n_0(t, I_e)$)及び S_n 状態($n_2(t, I_e)$)のポピュレーションを加えた3準位のレート方程式により決定される。使用した分光パラメータを図1及び表1に示す。

$$\begin{bmatrix} \frac{dn_0(t, I_e)}{dt} \\ \frac{dn_1(t, I_e)}{dt} \\ \frac{dn_2(t, I_e)}{dt} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -\sigma_{01}I_p & \frac{1}{\tau} + \sigma_f I_e & k_{20} \\ \sigma_{01}I_p & -\frac{1}{\tau} - \sigma_f I_e - \sigma_{12}I_e & k_{21} \\ 0 & \sigma_{12}I_e & -k_{20} - k_{21} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} n_0(t, I_e) \\ n_1(t, I_e) \\ n_2(t, I_e) \end{bmatrix}, \quad (2)$$

Tab.1 Spectroscopic parameter for fluorescence depletion process

σ_{01}	S_0 to S_1 absorption cross section
σ_{12}	S_1 to S_2 absorption cross section
σ_f	Induced emission cross section
τ	Fluorescence life time
k_{21}	S_n to S_1 relaxation velocity
k_{20}	S_n to S_0 relaxation velocity
I_p	Photon flux for pump beam
I_e	Photon flux for erase beam

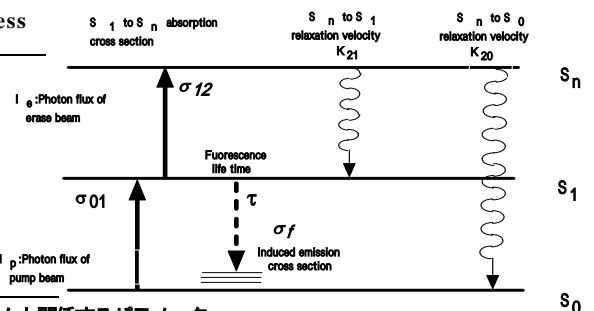


図1及び表1：2波長蛍光Dip分光法の励起ダイアグラムと関係するパラメータ

方程式 (1) は、線形の 1 回の微分方程式であり、一般に下記の様な形式の解をもつ。

$$\begin{aligned} n_0(t, I_e) &= D_{11}e^{\gamma t} + D_{12}e^{\gamma t} + D_{13} \\ n_1(t, I_e) &= D_{21}e^{\gamma t} + D_{22}e^{\gamma t} + D_{23}, \\ n_2(t, I_e) &= D_{31}e^{\gamma t} + D_{32}e^{\gamma t} + D_{33} \end{aligned} \quad (3)$$

ここで、 D_{nm} は初期条件から決まる係数であり、 $\gamma_{1,2}$ は式 (5) の 3x3 係数行列の固有値である。式 (3) の指数部の成分は、ポンプ光及びイレース光照射開始直後の過渡的な遷移によるポピュレーションの変化を示し、それ以外の D_{n3} は光照射が続き定常状態に至った場合の各状態のポピュレーションを示す。 $|\gamma_{1,2}|$ の逆数は過渡期間が終了する時間に対応し、一般に 1nsec 以内で定常状態になる。ナノ秒のレーザー光源を用いた 2 波長蛍光 Dip 分光法の場合、指数項の影響を無視できる。

$$\begin{aligned} n_0(t, I_e) &\approx D_{13} \\ n_1(t, I_e) &\approx D_{23}, \\ n_2(t, I_e) &\approx D_{33} \end{aligned} \quad (4)$$

従って、 S_1 状態のポピュレーション: D_{23} を式 (1) に代入すれば、本超解像顕微鏡法で重要な Dip-ratio を算出することが出来る。この時、振動緩和速度は、ポンプ光による励起速度より速いものと仮定した。

$$P(I_e) = \frac{\frac{1}{\tau}}{\frac{1}{\tau} + (\sigma_f + \sigma_{12} \frac{k_{20}}{k_{20} + k_{21}}) I_e} = \frac{1}{1 + \tau \sigma_{dip} I_e}, \quad (5)$$

【結果】 メタノール溶液中のローダミン 6G 分子に関して式 (5) で得られた結果を、実験データ () と比較した[2]。そのときの各定数を表 2 に示す。図 2 は dip 断面積: σ_{dip} をパラメータとしたときの Dip-ratio とイレース光 (599nm) の光子フラックスの関係を示す。 σ_{dip} を 10^{-16}cm^2 前後に選ぶと実験結果をほぼ再現できることが分かる。ローダミン 6G に関しては、599nm の波長領域では S_1 S_n 吸収帯域と誘導放出帯域が重複するので正確な σ_{dip} は不明であるが、 S_1 S_n 及び誘導断面積が 10^{-16}cm^2 オーダーであることが報告されており[3]、本解析結果は妥当なものであると判断できる。本講演では、これらの結果を基に、イレース光に 1 次ベッセルビームを用いた場合の超解像顕微鏡法の理論的な蛍光強度分布を算出し、2 波長 Dip 分光法の諸条件が本顕微鏡の点像分布関数に与える影響を理論的に考察する。詳細は、当日に報告する。

Table I spectroscopic parameter for Rhodamine 6G

σ_{01}	$4 \times 10^{-16} \text{cm}^2$
σ_{12}	$5.5 \times 10^{-17} \text{cm}^2$
σ_f	$1.1 \times 10^{-16} \text{cm}^2$
τ	3nsec
k_{21}	$3 \times 10^{11} \text{ 1/sec}$
k_{20}	$3 \times 10^{10} \text{ 1/sec}$
I_p	$10^{23} \text{ photons/sec/cm}^2$

【参考文献】

- [1] T. Watanabe, et. al. *Chem. Phys. Lett.* **371** 634-639 (2003).
 [2] Y. Iketaki, et. al, *Appl. Spectrosc.*, **57**, 1312-1316 (2003).
 [3] E. Sahara, et. al., *IEEE. J. Quantum Electronics.* **13**, 962-967 (1977).

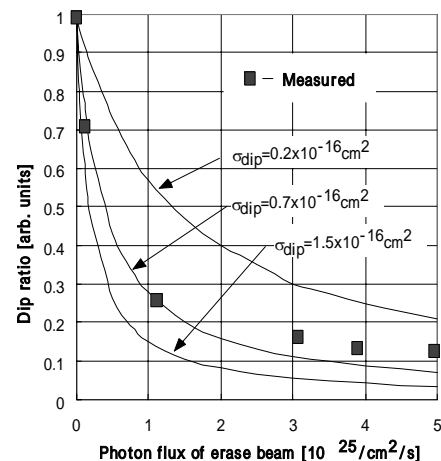


図 2 : Rhodamine 6G の Dip ratio のイレース光強度依存性