

コンフォーカル表面プラズモン顕微鏡の開発

[1] 組織

代表者：加野 裕

(室蘭工業大学大学院)

対応者：川田 善正

(静岡大学電子工学研究所)

[2] 研究経過

金属表面に励起される自由電子の集団的な振動の量子である表面プラズモンは、金属表面の屈折率変化を高感度に測定するプローブとして有用性が知られており、この特性を利用した顕微鏡の開発が進められている。特に、表面プラズモンを金属表面の顕微領域に局在させる手法を用いることによって、光の回折限界に達する空間分解能を得ながら、屈折率分布イメージングにおけるコントラストを保つことができるため、透明な生体細胞構造物の無染色観察などでの活用が始まっている。

本研究では、この顕微鏡の空間分解能やイメージング速度の向上を目的として、光学系の改良を検討した。従来の走査型表面プラズモン顕微鏡では、励起される表面プラズモンの伝搬定数から局所的な屈折率を測定していたが、本研究では、特定の空間周波数を有する照明光を、金属表面の局所に照射し、表面プラズモンの励起による反射光強度変化を測定する。表面プラズモンの励起効率が、局所的な屈折率に依存するため、屈折率変化を反映した像を得ることができる。また、この方式では、検出系においても反射光を検出する領域を制限することができる。スポット照明されている領域と光学的に共役な位置に点検出器を配置して、制限された領域からの光を検出する方法はコンフォーカル光学系として知られているが、これを表面プラズモン顕微鏡に利用する。

本研究においては、代表者、対応者間でメール等を利用して研究打ち合わせを実施した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本研究では、以下に示す研究成果を得た。

まず、顕微鏡の像特性を評価するために、点像分布関数の計算を行った。この顕微鏡は反射型であるため、照明系によって基板(ガラス/金薄膜/空気雰囲気のクレッチマン配置)の表面に生成される集光スポットの複素振幅分布と、検出系に設ける点検

出器の像の複素振幅分布の積によって表される。照明光の波長を 632.8nm とし、照明系には輪帯瞳、検出系には円形瞳に相当する瞳関数を、照明系と検出系の双方にラジアル偏光を想定すると、コンフォーカル表面プラズモン顕微鏡の強度点像分布関数は、半値全幅がおよそ 130 nm のシングルピークとなる。これは、表面プラズモンの回折限界で決定される最小局在スポットの半値全幅およそ 190 nm に比べ、およそ 32%縮小されており、コンフォーカル光学系の導入によって、表面プラズモンの顕微鏡の空間分解能が向上することを示している。

なお、照明系、検出系のいずれか、もしくは両方の偏光を直線偏光とすると、強度点像分布関数はシングルピークではなく、2つのメインピークを形成する。たとえば、励起系をラジアル偏光、検出系を直線偏光とする場合、励起光は基板表面において、光軸対称な回折限界スポットを生成するが、ここに結像される点検出器は、表面プラズモンの生成する主要な電場である光軸方向の振動成分が打ち消されるような干渉となるため、光軸上の振幅は微弱となり光軸対称な2つのスポットを形成する。これらの積の結果、点像分布関数は2つのメインピークを形成する。以上より、偏光の最適化が重要であることが分かるが、その実現には、照明系、検出系の双方に直線偏光とラジアル偏光を変換する偏光コンバーターを必要とする。本研究では、偏光コンバーターを2台用意することができなかったため、次善の方法として、対物レンズの射出瞳と共役な位置に、左右で π の位相差を与える素子を配置することとした。これによって、検出器の像も光軸上で強め合うように干渉するため、光軸上にメインピークが形成される。検出系に左右対称の偏光を想定した場合の強度点像分布関数のメインピークは、照明系、検出系ともにラジアル偏光である場合のそれとほぼ等しい半値全幅であった。ただし、検出系の偏光軸に依存した方向性が表れ、サイドローブも大きくなる。

つづいて、この像特性の検証実験を行った。実験では、直線偏光のレーザー光を拡大し、空間位相変調器(浜松ホトニクス, LCOS-SLM X10468-07)とフーリエ変換レンズを用いて環状光分布を生成し、その偏光を、液晶層の旋光を利用する偏光コンバーターによってラジアル偏光に変換した。環状光分布を NA1.65 の対物レンズの入射瞳にリレーし、膜厚

44 nm の金でコーティングされた、屈折率 1.78 のカバーガラス表面に集光した。カバーガラス表面は、イメージセンサーと光ファイバー接続型のフォトダイオードに結像されており、これらの検出器で反射光の測定を行った。直径 200nm のポリスチレン球を試料とし、イメージセンサーによって取得される反射光パターンの光軸中心付近の積分値を画素値としてイメージを生成し、フォトダイオードで得られる反射光強度を画素値とするイメージと比較したところ、ほぼ等しいイメージが得られた。この実験において、フォトダイオードを利用する場合の走査速度は、利用した走査ステージ（メスグリオ、17MAX301）の限界走査速度（最高応答周波数 200Hz）まで向上させることができた。ただし、ここで用いた光ファイバーのコア径は、コンフォーカル効果を発揮するのに十分な小ささではなかったため、空間分解能の向上は確認できなかった。

また、直径 $1\mu\text{m}$ のポリスチレン球を用い、その観察を行った。イメージセンサーによって取得される反射光強度分布から、光軸近傍のみの値を積分し、画素値とすることで、コントラスト高く透明微小球を観察できた。このとき、さらに、対物レンズの射出瞳と共役な位置に、左右で π の位相差を与える位相板を配置し、反射光強度分布を観察した。位相板を配置しない状態では、基板表面を結像しているイメージセンサーに、ドーナツ状の分布が得られるのに対し、光軸上にメインピークが形成されることを確認できた。ただし、微小球のイメージについては、サイズの縮小を確認することはできなかった。現時点では、偏光コンバーターの技術的な問題が、その原因であると理解している。利用した偏光コンバーターには、無反射コーティングが施されておらず、不要な干渉パターンがイメージセンサーに重畳してしまい、試料の構造を明瞭に観察することが難しい

という問題が生じた。また、このコンバーターの入射面と射出面の平行度が低いため、コンバーターを挿入すると、照明光のスポット位置が移動してしまい、コンフォーカル光学系の光学調整に問題が生じた。そのため、プロジェクト期間内に、コンフォーカル効果を確認する実験結果を得ることはできなかった。

（3-2）波及効果と発展性など

本プロジェクトの研究成果より、開発した装置の動作限界速度は、従来のイメージセンサーのデータ取得速度から、走査機構の動作速度まで向上させることができた。空間分解能については、技術的な問題で実験的な向上を達成するに至らなかったが、理論的に、大幅な向上を期待できることが明らかになった。従来から、生体細胞を画像観察するシステムとして、（1）無染色で細胞の主要構造物を観察することが可能、（2）空間分解能で観察することが可能、（3）水中の生きた細胞を観察することが可能、（4）基板表面から 100nm 程度の領域を選択的に観察することが可能、などの特徴を有していたが、これを維持したまま、観察時間の向上が図られた。これにより、生体細胞に生じる物理的、化学的な刺激に対する細胞応答のメカニズム解明などに寄与することが期待できる。

〔4〕成果資料

本プロジェクトに係る成果については、空間分解能向上に係る技術的な問題を早期に解決した後、論文投稿を行う予定である。