

フェムト秒蛍光アップコンバージョン顕微鏡

藤野 竜也・田原 太平

Femtosecond Fluorescence Up-Conversion Microscope

Tatsuya FUJINO and Tahei TAHARA

We have developed the femtosecond fluorescence up-conversion microscope, which simultaneously achieved 500-fs time and 340-nm space resolution in fluorescence measurements. We measured femtosecond time-resolved fluorescence from micrometer-sized particles in liquid and studied ultrafast exciton dynamics in organic microcrystals (perylene), with use of this new microscope. The performance of the fluorescence up-conversion microscope is discussed.

Key words: confocal microscope, fluorescence, femtosecond, time-resolved spectroscopy

超高速分光による分子ダイナミクスの研究はこれまで主として均一な系に対して行われてきたが、現実的な系は高度に不均一である場合が多い。したがって、微小な領域または不均一な環境に存在する分子の励起状態ダイナミクスを位置選択的に観測することが重要である。このような測定には、高い時間分解能をもつ分光手段と、高い空間分解能をもつ顕微鏡技術を融合させた時間分解顕微分光法が有効な手段となる。時間分解分光と顕微測定を組み合わせた研究はこれまでも多くあるが¹⁻³⁾、蛍光顕微分光においては、フェムト秒領域の時間分解測定は行われていなかった。筆者らは、蛍光アップコンバージョン法と共焦点光学顕微鏡を組み合わせた新しい顕微鏡（フェムト秒蛍光アップコンバージョン顕微鏡）を開発し、ナノメートルの空間分解能とフェムト秒の時間分解能を蛍光顕微測定においてはじめて同時に実現した。本稿では、まず従来の蛍光時間分解測定法と蛍光アップコンバージョン法の原理を説明比較したのち、開発した顕微鏡の装置と性能を解説し、最後にいくつかの測定例について述べる。

1. 蛍光信号の時間分解計測とアップコンバージョン法

蛍光顕微鏡による時間分解測定は、これまで主として、

時間相関光子計数法⁴⁻⁶⁾あるいはストリークカメラ^{7,8)}を用いて行われてきた。これらの方法では、光検出器の時間分解能を利用して、試料から発する蛍光を時間分解測定する。

最も広く用いられている時間相関光子計数法による時間分解蛍光測定の原理を図1(a)に示す。この方法では、光パルスを用いて試料を励起し、試料から発する蛍光を光子計数法（フォトンカウンティング法）によって計測する。この方法では、励起光1パルスに対して最大でも蛍光光子を1つしか測定しない（信号強度の線形性を保つために、実際には測定光子の数は励起光パルスの数の10分の1以下にとどめる）。光電子増倍管の光電面から得られる蛍光1光子に対応する光電流は増幅されたのち、計数可能な電気的なパルスに整形される。この蛍光光子由来の電気パルスと、励起に用いた光パルス由来の電気パルスの時間間隔を、時間波高変換器（time-amplitude converter）によって計測する（実際には、励起パルスの数より蛍光光子の観測イベント数のほうが少ないので、蛍光光子から次の励起パルスまでの時間を計測する）。この測定を多数回繰り返し、励起パルスからどれほどの遅延時間後に蛍光光子が観測されたかに関するヒストグラムをつくることによって、蛍光信号の時間変化（時間分解蛍光）を得ることができる。

一方、ストリークカメラは、図1(b)に示すような構造をした装置である。入射光(蛍光)は光電面によって電子に変換され、電極によって加速されてストリーク管の中を走る。これにタイミングを合わせてストリーク管の偏向電極板にのこぎり波的な電圧を印加すると、光電面を発生した時間によって進行方向と直角方向に感じる電場が変わるので、ストリーク管の中での電子の軌道が変わる。結局、光がストリーク管に入射した時刻に応じて対応する光電子は検出面上で異なる位置で観測されることになり、信号光の時間情報が検出面の(縦方向の)位置情報へと変換される。検出面に到達した光電子は、通常マイクロチャンネルプレートで増幅されたのち、蛍光面によってもう一度光に変換され、CCD検出器によって二次元情報として検出される。ストリーク像は基本的に二次元であるが、1軸はこのように時間軸として使われる。分光器と組み合わせてもう1つの軸に波長を分散させることで、異なる波長の信号(スペクトル)を時間分解して一度に測定することができる。

これらの方法ではいずれも光検出器のエレクトロニクス
の時間分解能を用いて蛍光の時間分解測定を行っている。
時間相関光子計数法では、主として、光電子増倍管の中での光電流パルスの時間広がり
が時間分解能を決める。時間広がり
の少ないマイクロチャンネルプレート(MCP)型光電子増倍管を用いても、30~40 psの時間分解能にとどまる⁴⁾。ストリークカメラの時間分解能は光電面におかれたスリット幅で決まり、フェムト秒の時間分解能を達成するものもある。しかし通常の場合には、信号の積算を行うため電気系のタイミングジッターが時間分解能を決定する。二次元性を生かし、分光器と組み合わせて時間分解スペクトルを測定する場合には、分光器中の時間広がりも時間分解能を左右する。ストリークカメラを用いて行われた蛍光顕微鏡の時間分解分光測定では、10 ps程度の時間分解能が得られた報告がされている⁷⁾。しかしながら、このような検出器のエレクトロニクスの時間分解能を利用した測定では、フェムト秒の時間分解能を達成することは難しい。

一般に、時間分解分光においてフェムト秒の時間分解測定を行うには、光励起を行うポンプ光と分光計測を行うプローブ光にフェムト秒光パルスを使ったポンプ・プローブ法が用いられる。この場合、ポンプ光とプローブ光は同一のレーザー光源からつくり、それぞれの光パルスが試料点に到達するまでの空間的な距離を調節することでタイミングをつくり出す。ちなみに、1 psのタイミングをつくり出すには、一方の光パルスの光路を0.3 mm 変えればよい。この方法では光励起(ポンプ光)と分光計測(プローブ光)の間のタイミングにジッターがなく、フェムト秒の光パル

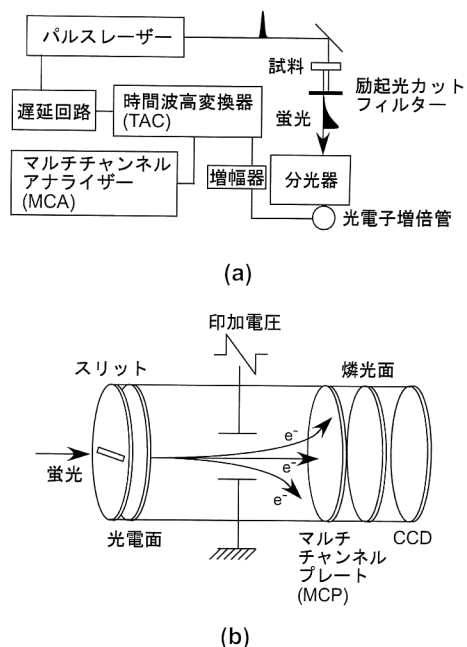


図1 時間相関光子計数法 (a) およびストリークカメラ法 (b) の原理図。

スを用いれば、光パルスの時間幅に対応した時間分解能がそのまま得られる。

蛍光測定の場合には、光励起を行えば蛍光は試料から自発的に発するため、吸収分光などとは異なり、分光計測を行うためのプローブ光を試料に導入する必要がない。したがって蛍光の時間分解測定では、時間相関光子計数法やストリークカメラのように検出器の時間分解能を利用して時間分解する方法がある意味で一番素直といえるが、上述の通りフェムト秒の時間分解能を実現するのは困難である。これに対して、蛍光測定にポンプ・プローブ法の原理を応用することによってフェムト秒の時間分解計測を行うのが、蛍光アップコンバージョン法である⁹⁾。

蛍光アップコンバージョン法の原理を図2に示す。まず、試料をフェムト秒パルスによって光励起する。すると試料から図のように時間変化する蛍光信号が発せられるが、これをもう1つ別のフェムト秒パルス(これをゲート光という)と合わせて非線形結晶に集光することで、両者の和周波光を発生させる(和周波発生とは、振動数 ω_1 と ω_2 をもつ光を反転対称性をもたない物質に導入すると、振動数 $\omega_1 + \omega_2$ をもつ光が発生する二次の非線形光学現象である)。このとき発生する和周波光の強度は、ゲート光強度と、ゲート光と時間的・空間的に重なっている蛍光強度の積に比例する。そこでゲート光の強度を一定に保ち、ゲート光と励起光をある時間差に設定して和周波光強度を測定すると、その強度はその遅延時間の蛍光強度に比例した

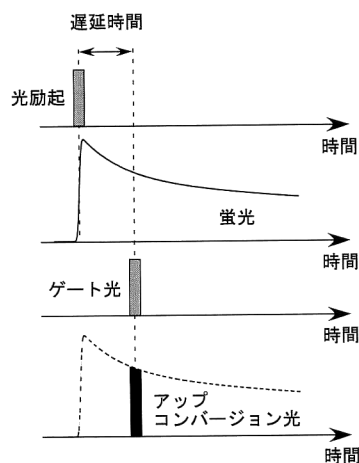


図2 時間分解蛍光アップコンバージョン法の原理図。

ものとなる。すなわち、遅延時間を変えながら和周波光強度を測定し、その強度を遅延時間に対してプロットすると、それは蛍光の時間変化を表すもの（時間分解蛍光）になっている。この方法はゲート光をプローブとした一種のポンプ・プローブ法と考えることができ、その時間分解能は用いた光パルスの時間幅で決まる。蛍光アップコンバージョン法は、現在、フェムト秒領域の時間分解蛍光測定に最もよく用いられている手法である¹⁰⁾。

2. フェムト秒蛍光アップコンバージョン顕微鏡

前章で述べたアップコンバージョン法と共焦点顕微鏡を組み合わせることで、微小領域からの蛍光（一般には発光）信号をフェムト秒の分解能で時間分解測定することができるはずである。筆者らはこの着想に基づいて装置を開発し、フェムト秒蛍光アップコンバージョン顕微鏡と名づけた¹¹⁾。開発した蛍光アップコンバージョン顕微鏡のブロック図を図3に示す¹²⁾。光源にはダイオード励起のNd:YVO₄ レーザー（コヒーレント社 Verdi V-5, 5 W）で励起したチタンサファイアレーザー（コヒーレント社 Mira-900 F）を用いている。このレーザーからは、波長 800 nm、時間幅 75 fs、パルスエネルギー 9 nJ のフェムト秒パルスが繰り返し 76 MHz で得られる。このフェムト秒パルスから、厚さ 1 mm の非線形結晶（LBO）を用いて第二高調波を発生させる。発生した 400 nm の第二高調波はダイクロイックミラー（DM）で 800 nm の基本波と分離され、試料の励起光（ポンプ光）として用いられる。400 nm の励起光はまずプリズム対へと導かれ、励起光の波長成分の短波長成分が時間的に早く、逆に長波長成分が遅くなるようなタイミング（これを負の分散という）が与えられる。これは、顕微鏡の光学素子を通る際に励起光が得てしまう正の分散

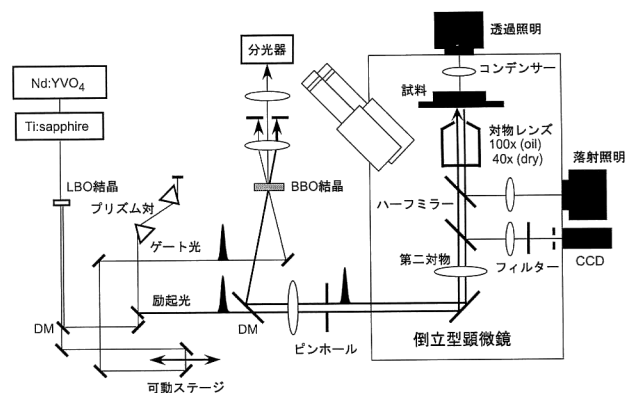


図3 フェムト秒蛍光アップコンバージョン顕微鏡のブロック図^{11,12)}。

をあらかじめ補償して、試料点でのパルス時間幅が最も短くなるようにするためである。負の分散を与えられたパルスは共焦点光学系のアパーチャー（ピンホール）にレンズで集光され、それを通して倒立型顕微鏡（Nikon, TE-2000U）へと導入される。光路には偏光方向を調整するための半波長板と、強度を調整するための ND フィルターが設置してある。顕微鏡に導入された励起光は、対物レンズを通して試料上に集光される。試料点での励起光強度は、試料のダメージを防ぐために通常 13 pJ（ ~ 1 mW）以下に抑える。試料から発する蛍光は、レーザー導入に用いられた光学系を通して顕微鏡外へ導かれ、ピンホールを抜けたあとダイクロイックミラーによって励起光と分離され、和周波発生用の非線形結晶（BBO、厚さ 1 mm）へ集光される。一方、ゲート光には第二高調波発生に用いられたあとの残りの基本波を用いる。このゲート光は、遅延時間調整のための可動 X 軸ステージ上に設置したミラーで折り返されたのち、アップコンバージョン（和周波発生）用の非線形結晶（BBO）へと集光され、蛍光と空間的に重ねられる。蛍光とゲート光の和周波光は、空間的にはゲート光と蛍光の間の方向に発生し、また波長的にはゲート光が 800 nm の場合、450 \sim 700 nm の蛍光は 290 \sim 370 nm の紫外光へと変換される。アップコンバートされた蛍光はアパーチャーによって空間的に、また光学フィルター（HOYA, U-34）によって波長的に分離されたのち、分光器（Jobin-Yvon, HR-320）へと導かれ、光電子増倍管（Hamamatsu, H6180-01）とフォトンカウンター（Hamamatsu, H8784）を使って光子計数法によって検出される。測定で得られるのは、特定の波長、特定の遅延時間における蛍光の強度の情報であるので、遅延時間を変えながら測定を行い特定波長での時間変化を得る。検出する蛍光波長は、和周波発生に用いる結晶の位相整合条件と分光器によって選択する。分光器のスリットは、通常、波長分解能を約 5 nm（340 nm

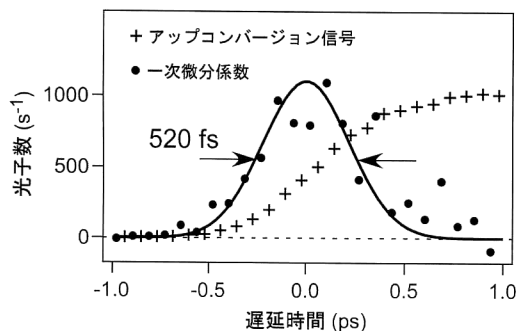


図4 ローダミンB溶液フィルムからの蛍光を用いたアップコンバージョン顕微鏡の時間分解能の評価 ($2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, methanol, 600 nm, 100倍 ($NA=1.3$) 対物レンズ使用)¹²⁾. 時間原点付近の微分係数をガウス型関数でフィッティングすることにより時間分解能は520 fs (FWHM).

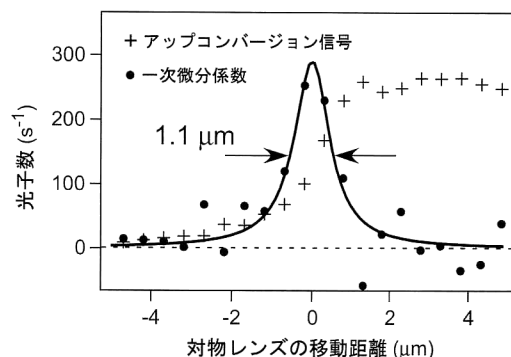


図5 共焦点光学配置のピンホール径を $50 \mu\text{m}$ にした場合の対物レンズと試料との距離に対するアップコンバージョン光強度の変化¹²⁾. 微分係数のフィッティングにより深さ方向の分解能は $1.1 \mu\text{m}$.

のアップコンバージョン光の場合、波数分解能は約 450 cm^{-1} となるように設定して測定を行っている。

3. フェムト秒蛍光アップコンバージョン顕微鏡の性能¹²⁾

3.1 時間分解能

開発した蛍光アップコンバージョン顕微鏡の時間分解能を、蛍光色素（ローダミン B）溶液からの蛍光を時間分解測定することによって評価することができる。ローダミン B を 400 nm の光で励起すると、生成した電子励起一重項状態からの蛍光が瞬間的に現れる。この蛍光寿命は約 1.5 ns であり、いま問題にしている時間領域に比べて十分長いので、この蛍光の時間変化はほぼ階段関数的であると考えてよい。時間原点の瞬間的な蛍光の立ち上がりは、測定の時間分解能が有限の場合、これを反映して“なまる”から、時間原点付近での時間分解蛍光信号の一次微分をとれば、装置の時間応答を知ることができる。図4に実際に測定された蛍光の立ち上がりと、その一次微分（差分）を示す。得られた時間応答をガウス型関数でフィッティングして、その半値全幅の値から、100倍の対物レンズ ($NA=1.3$) を用いた場合の時間分解能は 520 fs であると見積もられた。40倍の対物レンズ ($NA=0.75$) を用いた場合には、 460 fs という値が得られた。この約 500 fs というアップコンバージョン顕微鏡の時間分解能は、励起光の時間幅 (160 fs) とゲート光の時間幅 (75 fs) の相互相関関数の時間幅 (180 fs) に比べると低下しているが、これは顕微鏡の光学素子に由来する群速度分散のためである（発した蛍光が光学系を通過することによって得てしまう群速度分散は補償されていない）。得られた本装置の時間分解能は、時間相関光子計数法を用いた蛍光顕微鏡の時間分解能に比べて約 100 倍、これまで最高の時間分解能を実現していたストリークカメラを用い

たものに比べても 10 倍程度時間分解能が向上している。

3.2 XY 平面方向の空間分解能

XY 空間分解能は通常の共焦点顕微鏡と同様で、原理的には回折限界で決まる。アップコンバージョン顕微鏡における空間分解能は、試料点における励起光のレーザースポット像を測定し、その空間プロファイルから評価した。レーザースポットは完全な円ではなかったため、長軸方向と短軸方向のプロファイルをそれぞれよく再現するローレンツ関数でフィッティングし、その半値全幅の平均を求めたところ、約 340 nm (100 倍の対物レンズ使用時) であった。この値は共焦点光学配置のピンホール径を $50 \mu\text{m}$ とした場合で、ピンホール径を $200 \mu\text{m}$ 以上に広げた場合には 390 nm であった。

3.3 Z 軸深さ方向の空間分解能

蛍光アップコンバージョン顕微鏡は共焦点光学配置をとっているため、深さ方向の空間分解能をもつ。この深さ方向の分解能は、試料部に色素溶液膜をおき、アップコンバージョン信号を対物レンズと試料の距離を変えながら観測することにより評価した（遅延時間は適当な時間に固定）。Z 軸方向の空間分解能のため、レーザーの焦点面が色素溶液の外にある場合には試料からの蛍光は検出系に到達しないが、焦点面が溶液表面に到達すると信号が現れはじめる。この蛍光信号強度を対物レンズの位置を変えながら測定し、その一次微分をとれば Z 軸方向の空間分解能を評価できる。この深さ方向の空間分解能は、共焦点光学系のピンホール径に強く依存する。ピンホール径を $50 \mu\text{m}$ にした場合のデータを図5に示す。これより約 $1.1 \mu\text{m}$ の Z 軸深さ方向の空間分解能が実現されていることがわかる。

通常の共焦点顕微鏡の場合には、Z 軸深さ方向の空間分解能はピンホール径のみによって決まる。蛍光アップコ

表1 フェムト秒蛍光アップコンバージョン顕微鏡分解能 (ピンホール径 $50\ \mu\text{m}$).

対物レンズ	時間分解能	XY 空間分解能	深さ (Z) 分解能
$100\times$ ($NA=1.3$)	520 fs	340 nm	$1.1\ \mu\text{m}$
$40\times$ ($NA=0.75$)	460 fs	710 nm	$2.3\ \mu\text{m}$

ンバージョン顕微鏡の場合は、これにあわせて和周波発生過程が Z 軸深さ方向の空間分解能に寄与している。前述したように、和周波発生過程では蛍光信号はゲート光とともに薄い非線形結晶上に集光され、それらが重なった部分のみから和周波光が発生する。したがって、このアップコンバージョンの過程が実効的に第2のピンホールとして機能し、Z 軸方向の空間分解能を向上させる。実際、共焦点光学系のピンホールを全開にした場合でも、この和周波発生プロセスのみによって約 $5.3\ \mu\text{m}$ の深さ分解能が実現された¹²⁾。

以上のようにして評価された蛍光アップコンバージョン顕微鏡の時間分解能および空間分解能を表1にまとめる。

4. 測定例

4.1 レーザートラッピングを併用した蛍光ビーズからの蛍光観測

蛍光アップコンバージョン顕微鏡を用いた測定例として、まず液体中の微小粒子からの蛍光の時間分解測定¹²⁾について述べる。液体中に存在するマイクロメートルオーダーの粒子はブラウン運動により溶液中を動き回っているため、分光測定を行うためには、まず粒子を空間的に固定することが必要である。このような目的のためには、レーザートラッピング法が有効である。これは、まわりの媒質(液体)に比べて屈折率が高い微小粒子内をレーザー光が通ることにより、粒子の重心をレーザー光の光軸へ近づける力が働くことを利用して、粒子を“捕獲”する手法である。蛍光アップコンバージョン顕微鏡では、高繰り返しのモードロックレーザーを光源として用いているために、励起光を同時にレーザートラップのための光源として利用することができる。すなわち、本装置では励起光が自動的に液体中の微小粒子をレーザー集光点にトラップするので、微小粒子からのフェムト秒時間分解蛍光測定を容易に行うことができる。

粒径約 $4.85\ \mu\text{m}$ の蛍光ビーズの顕微鏡下での像を図6(a)に示す。レーザー光を照射している間はレーザー集光点にトラップされているが、レーザー照射を止めると蛍光ビーズはブラウン運動によって動き出してしまふ(図6(b))。この蛍光ビーズはクマリン色素を含んでいて、波長

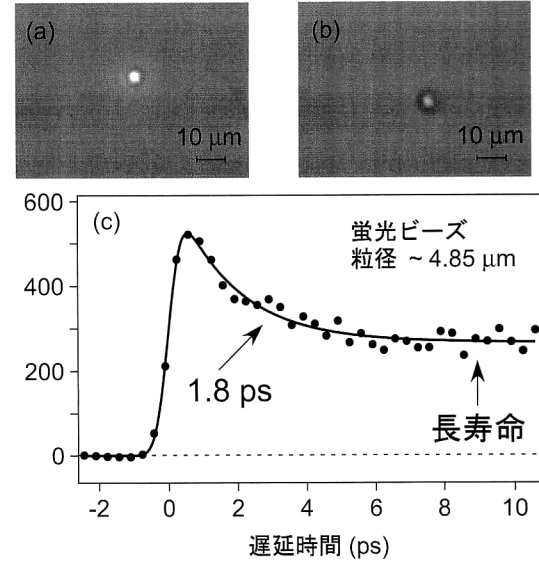


図6 レーザートラッピング中の蛍光ビーズ (a). トラッピング用レーザーの照射を止めると、ブラウン運動により動きはじめる (b). レーザートラッピング中の蛍光ビーズのフェムト秒時間分解蛍光 (c) ($520\ \text{nm}$, $100\times$ ($NA=1.3$) 対物レンズ使用)¹²⁾.

$520\ \text{nm}$ を発光極大とする蛍光を発する。 $520\ \text{nm}$ での蛍光の時間変化を、アップコンバージョン顕微鏡によって測定したものを図6(c)に示す。時間原点での蛍光の瞬間的な立ち上がりや、数ピコ秒の時間領域での蛍光強度の時間変化が明瞭に時間分解されている。この実験はアップコンバージョン顕微鏡によって、溶液中の微小粒子の蛍光がフェムト秒の分解能で時間分解測定できることを示している。筆者らは同様な方法で微小液滴中における色素分子の時間分解蛍光測定を行い、液滴中での蛍光分子の回転緩和などを観測している。

4.2 有機微結晶からの超高速蛍光とフェムト秒寿命イメージング

もうひとつの応用例として、有機微結晶の超高速蛍光ダイナミクスの観測を示す¹¹⁾。測定に用いた α -ペリレン有機微結晶の顕微鏡写真を図7(a)に示す。図からわかるように、大きさが約 $20\ \mu\text{m}$ の微結晶である。このペリレンの微結晶を光励起すると、最初に非局在化したフリーエキシトンが生成される。これは格子のひずみを誘起して、Y状態と呼ばれる中間状態に緩和し、最終的に局在化したE状態(セルフトラップエキシトン)へと緩和する。光励起後、順番に現れるこの3つの励起状態はそれぞれ波長の異なる蛍光を発するとされており、低温においては、 $480, 530, 600\ \text{nm}$ に蛍光を与える^{13,14)} (エネルギーの緩和を反映して、しだいに長波長シフトしている)。この3つのうちのフリーエキシトン、Y状態の寿命は短く、常温での定常蛍光

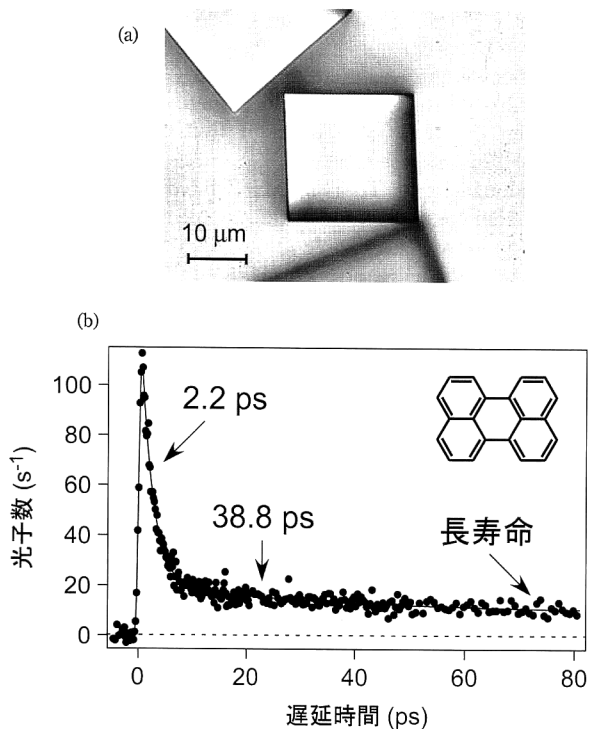


図7 測定に用いた α -ペリレン微結晶 (a) とフェムト秒時間分解蛍光 (b) (520 nm, 100倍 ($NA=1.3$) 対物レンズ使用). 得られた3つの寿命成分はそれぞれフリーエキシトン (2.2 ps), Y状態 (38.8 ps), E状態 (長寿命) に対応¹¹⁾. (カラー口絵参照)

スペクトルはほとんど緩和後のE状態からの蛍光による。

この α -ペリレン微結晶からの蛍光をフェムト秒アップコンバージョン顕微鏡で時間分解測定し、観測された時間分解蛍光信号を図7 (b) に示す。光励起に続いて現れる3つの励起状態に対応して、蛍光減衰は3つの成分からなっている。最も短い寿命成分は寿命2.2 psで、これはフリーエキシトンの蛍光に、2番目に短い蛍光成分 (時定数38.8 ps) はY状態のものに、第3の寿命の長い成分 (~ナノ秒) はE状態からの蛍光に帰属することができる。実際、観測蛍光波長を短波長側にすると第1の蛍光成分のみとなり、また長波長にすると第3の蛍光寿命成分が主たる成分となる。これは、先に述べた3つの励起状態の蛍光波長と一致している。

フェムト秒アップコンバージョン顕微鏡は~400 nm程度の空間分解能を有するため、このような微結晶内でも、その中で励起位置を変えながら蛍光ダイナミクスを測定することができる。 α -ペリレンの微結晶中の各点で蛍光ダイナミクスを測定し、観測されたフリーエキシトンの寿命を二次元画像として表示したものを図8に示す。図中、赤が寿命の短い領域、青が寿命の長い領域である。この図からわかるように、約20 μm の微結晶中でも位置によって、フ

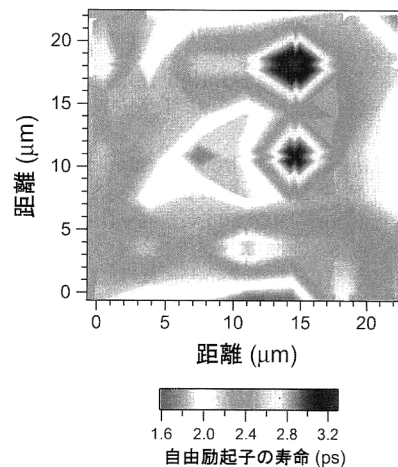


図8 図7で測定に用いた α -ペリレン微結晶におけるフェムト秒ダイナミクスイメージ. 各結晶位置におけるフリーエキシトンの寿命の二次元イメージ. (カラー口絵参照)

リーエキシトンの寿命は1.6~3.2 psの範囲で変化している。このように光学的には一見均一に見える微結晶の中にも、フリーエキシトンの寿命に変化を与えるような不均一性があることがわかる。高強度のレーザー照射によりダメージを与えた実験などから、筆者らは、この寿命の違いは局所的な格子欠陥の濃度の違いによるものであると考えている。図8に示した二次元像はペリレン微結晶をエキシトンの寿命によってイメージ化したものであり、蛍光寿命イメージング (FLIM) の一種であると考えられる。このように、蛍光アップコンバージョン顕微鏡を用いることによって、フェムト秒蛍光ダイナミクスに基づいた物質の可視化が可能である。

本稿では、筆者らが最近開発したフェムト秒アップコンバージョン顕微鏡の原理、装置と性能、およびいくつかの測定例を示した。この顕微鏡は時間分解顕微鏡測定において、フェムト秒の時間分解能とナノメートルオーダーの空間分解能をはじめ同時に実現した。蛍光分光は最も基本的な分光法のひとつであるが、同時に最も強力な分光法のひとつである。微小領域のフェムト秒蛍光ダイナミクス観測を可能にするこの顕微鏡は、ナノサイエンスやナノテクノロジーの有力な研究手段のひとつになりうると思われる。

文 献

- 1) H. Masuhara: "Space- and time-resolved laser spectroscopy and photochemistry of organic solids," J. Photochem. Photobiol. A, **62** (1992) 397-413.
- 2) T. Itoh, T. Asahi and H. Masuhara: "Femtosecond light scattering spectroscopy of single gold nanoparticles," Appl.

- Phys. Lett., **79** (2001) 1667-1669.
- 3) B. A. Nechay, U. Siegner, M. Achermann, F. Morier-Genaud, A. Schertel and U. Keller: "Femtosecond near-field scanning optical microscopy," *J. Microsc.*, **194** (1999) 329-334.
 - 4) D. McLoskey, D. J. S. Birch, A. Sanderson, K. Suhling, E. Welch and P. J. Hicks: "Multiplexed single-photon counting. I. A time-correlated fluorescence lifetime camera," *Rev. Sci. Instrum.*, **67** (1996) 2228-2237.
 - 5) W. Becker, H. Hickl, C. Zander, K. H. Drexhage, M. Sauer, S. Siebert and J. Wolfrum: "Time-resolved detection and identification of single analyte molecules in microcapillaries by time-correlated single-photon counting (TCSPC)," *Rev. Sci. Instrum.*, **70** (1999) 1835-1841.
 - 6) S. J. Lassiter, W. Stryjewski, B. L. Legendre, Jr., R. Erdmann, M. Wahl, J. Wurm, R. Peterson, L. Middendorf and S. A. Soper: "Time-resolved fluorescence imaging of slab gels for lifetime base-calling in DNA sequencing applications," *Anal. Chem.*, **72** (2000) 5373-5382.
 - 7) U. Neuberth, L. Walter, G. v. Freymann, B. D. Don, H. Kalt, M. Wegener, G. Khitrova and H. M. Gibbs: "Combining a scanning near-field optical microscope with a picosecond streak camera: Statistical analysis of exciton kinetics in GaAs single-quantum wells," *Appl. Phys. Lett.*, **80** (2002) 3340-3342.
 - 8) R. V. Krishnan, E. Biener, J. H. Zhang, R. Heckel and B. Herman: "Probing subtle fluorescence dynamics in cellular proteins by streak camera based fluorescence lifetime imaging microscopy," *Appl. Phys. Lett.*, **83** (2003) 4658-4660.
 - 9) J. Shah: "Ultrafast luminescence spectroscopy using sum frequency generation," *IEEE J. Quantum Electron.*, **24** (1988) 276-288.
 - 10) S. Takeuchi and T. Tahara: "Femtosecond ultraviolet-visible fluorescence study of the excited state proton transfer reaction of 7-azaindole dimer," *J. Phys. Chem. A*, **102** (1998) 7740-7753.
 - 11) T. Fujino and T. Tahara: "Femtosecond fluorescence up-conversion microscopy: Exciton dynamics in α -perylene microcrystal," *J. Phys. Chem. B*, **107** (2003) 5120-5122.
 - 12) T. Fujino and T. Tahara: "Characterization and performance of the femtosecond fluorescence up-conversion microscope," *Appl. Phys. B*, **79** (2004) 145-151.
 - 13) H. Auweter, D. Ramer, B. Kunze and H. C. Wolf: "The dynamics of excimer formation in perylene crystals," *Chem. Phys. Lett.*, **85** (1982) 325-329.
 - 14) H. Nishimura, T. Yamaoka, K. Mizuno, M. Iemura and A. Matsui: "Luminescence of free and self-trapped excitons in α - and β -perylene crystal," *J. Phys. Soc. Jpn.*, **53** (1984) 3999-4008.

(2004年7月10日受理)