

## 熱レンズ顕微鏡

馬渡 和真<sup>\*1</sup>・比企伸一郎<sup>\*2</sup>・福澤 隆<sup>\*2,\*3</sup>・山口 淳<sup>\*3</sup>  
服部 明彦<sup>\*3</sup>・渡慶次 学<sup>\*4</sup>・北森 武彦<sup>\*1,\*2,\*4,\*5</sup>

### Thermal Lens Microscope

Kazuma MAWATARI<sup>\*1</sup>, Shinichiro HIKI<sup>\*2</sup>, Takashi FUKUZAWA<sup>\*2,\*3</sup>, Jun YAMAGUCHI<sup>\*3</sup>,  
Akihiko HATTORI<sup>\*3</sup>, Manabu TOKESHI<sup>\*4</sup> and Takehiko KITAMORI<sup>\*1,\*2,\*4,\*5</sup>

Recently, a detection method having single molecule level sensitivity and wide applicability has been increasingly desired, because sample volume of analysis has been becoming smaller and smaller like single cell and microchip analysis. Conventionally, laser-induced fluorescence method has been frequently used for these purposes. However, its application was limited to the fluorescent samples. In this paper, we describe the principle of a thermal lens microscope which can detect non-fluorescent molecules at the single molecule level, and its performance, instrumentation including development of practical devices and applications to analysis on single cell and microchip.

**Key words:** thermal lens effect, thermal lens microscope, single molecule detection, microchip, SELFOC<sup>®</sup> micro lens

顕微鏡といえば通常微小物体の形状を観測する手法であるが、X線領域から赤外領域までの幅広い領域の分光法と組み合わせることによって、濃度や組成、状態などの物質情報や化学情報などを得ることができるようになる。特に最近では、単一細胞などの生体試料を *in-situ*, *in-vivo* 測定できる光学領域の顕微鏡に対するニーズが高まっており、単一分子レベルの感度と汎用性が求められている。これまで、感度の点から、レーザー誘起蛍光法を応用した共焦点蛍光顕微鏡や近接場蛍光顕微鏡がおもに用いられており、実際に単一分子測定が多数報告されている<sup>1)</sup>。しかし、蛍光法は原理的に測定対象が蛍光物質に限定されるために、汎用性という点が欠落している。これらの背景のもとに、筆者らは、非蛍光性物質を単一分子レベルの感度で測定できる熱レンズ顕微鏡を独自に開発してきた。熱レンズ分光法自体は約40年前から知られている古い原理であるが、顕

微鏡との組み合わせを実現できたのは筆者らが最初であり、これは熱レンズ分光法に適した光学的な工夫に起因している。現在では、熱レンズ顕微鏡は微小空間の高感度かつ汎用測定ツールとして広く認知されてきている<sup>2)</sup>。また、測定ツールとしての普及を推進するために、小型化など実用化のための開発も行っている<sup>2)</sup>。

そこで本稿では、熱レンズ顕微鏡の原理と装置開発、およびその応用例について紹介する。

### 1. 熱レンズ顕微鏡の原理

まず、図1(a)を用いて、一般的な(マクロな系での)熱レンズ分光法について説明する。通常、熱レンズ法には、測定対象の吸収波長にあわせた波長の励起光と、吸収をもたないプローブ光の2本のレーザー光を用いる。測定対象に吸収された励起光のエネルギーが無輻射緩和を経て熱と

<sup>\*1</sup> 独立行政法人科学技術振興機構 (〒150-0022 東京都渋谷区渋谷 3-1-6 TMSビル5F)†

<sup>\*2</sup> マイクロ化学技研(株) (〒213-0012 川崎市高津区坂戸 3-2-1 KSP 東棟 207)

<sup>\*3</sup> 日本板硝子(株) (〒229-1189 相模原市西橋本 5-8-1)

<sup>\*4</sup> (財)神奈川科学技術アカデミー光科学重点研究室マイクロ化学グループ (〒213-0012 川崎市高津区坂戸 3-2-1 KSP 東棟 307)

<sup>\*5</sup> 東京大学大学院工学系研究科 (〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1) E-mail: kitamori@icl.t.u-tokyo.ac.jp

† 研究場所は東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻北森研究室。

して放出されると、レーザーの強度分布（通常ガウス分布）および熱拡散により焦点付近に光軸に垂直な温度勾配が生成する。温度変化が微小である場合、温度変化  $\Delta T$  は屈折率変化  $\Delta n$  と比例の関係にある。このため、 $\Delta n$  が中心部で最も大きく、光軸から離れるほど  $\Delta n$  が小さくなる屈折率分布を生じる。この屈折率分布が、擬似的な光学レンズ（熱レンズ）として作用する。これを熱レンズ効果と呼ぶ。一般的に、熱レンズのレンズとしての度は、定常状態では  $1/f = \alpha l (dn/dT) / \pi J \kappa \omega^2$  のように表される<sup>3,4)</sup>。ここで、 $f$  は熱レンズの焦点距離、 $J$  はジュールの係数、 $\kappa$  は媒質の熱伝導率、 $\omega$  は励起光のスポット半径、 $P$  は励起光のパワー、 $\alpha$  は吸収係数（試料の濃度に比例）、 $l$  は光路長（通常セルの深さに相当）、 $dn/dT$  は屈折率の温度係数である。この熱レンズ効果により励起光自身も光路が変化するので、この変化を試料の後に設置したピンホールにより検出することが可能である（一光束法）。しかし、この場合、原理的に高バックグラウンド測定となり、また試料や容器壁面による励起光の散乱など測定の外乱が混入しやすいので、一般的には試料に吸収のない波長のプローブ光を同軸に導入して、これにより熱レンズ効果を検出する（二光束法）。この場合、プローブ光の光量変化は、熱レンズの度すなわち試料の濃度に比例するために、この光量変化から定量分析が可能となる。前述の式からわかるように、熱レンズ分光法の感度は、光学的には励起光のパワー  $P$  を上げて強く絞る（ $\omega$  を小さくする）ほど向上することがわかる。また、試料の吸収係数  $\alpha$ 、媒質の屈折率の温度係数  $dn/dT$  と熱伝導率  $\kappa$  の比（媒質に由来する増強因子）が大きいほど感度が向上する。

以上述べた一般的な熱レンズ分光法は、約40年前から知られている古い原理であり、特にレーザーが開発された1970年代から積極的に用いられ、同様に光吸収を利用する吸光光度法と比べて2桁から3桁も高感度であることが実証されてきた。しかし、顕微鏡化については、これまで実現しなかった。それは、以下に述べるように、1960年代にはすでに対物レンズの色収差補正技術が確立されていたため、感度が著しく低かったためであると推察される。筆者らは、色収差の補正されていない旧式で安価な対物レンズが熱レンズ分光法に最適であることを発見し、熱レンズ顕微鏡をはじめて実現した。

図1(b)に、顕微鏡下での熱レンズ効果の模式図を示す。図1(b)左は、励起光とプローブ光の焦点が一致している場合、右は焦点差（色収差に相当）をもつ場合を示している。図1(b)左の場合、励起光の焦点（すなわち熱レンズの中心）とプローブ光の焦点が一致しているために、幾何光

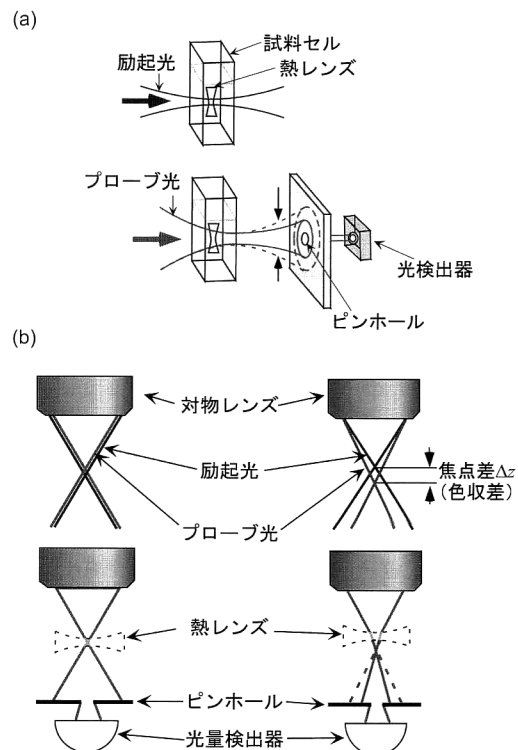


図1 (a) 熱レンズ分光法の原理。(b) 熱レンズ顕微鏡の光学配置。励起光とプローブ光に焦点差がない場合には、プローブ光の光路は変化せず、熱レンズ効果は検出できない(左)。励起光とプローブ光に適切な焦点差(色収差)がある場合には、プローブ光の光路が変化し、ピンホール後のプローブ光量が増加することにより熱レンズ効果が検出できる。

学的な考察から、プローブ光の光路は熱レンズによって変化しない。すなわち、熱レンズ効果の検出は困難である。しかし、図1(b)右のように、励起光とプローブ光の焦点に差をつけた場合には、プローブ光の光路が熱レンズにより変化するために、高感度な定量分析が可能となる。この焦点差  $\Delta z$  には最適値が存在し、熱レンズによる回折効果も加わって  $\Delta z = \sqrt{3} l_c$  となる<sup>5)</sup>。ここで、 $l_c$  はプローブ光の共焦点長であり、プローブ光の波長を  $\lambda$ 、プローブ光のスポット径を  $2\omega_0$  として、 $l_c = (\pi\omega_0^2) / \lambda$  と書き表せる。スポット径は、 $NA$  を対物レンズの開口数として、 $2\omega_0 = 1.22 \lambda / NA$  から計算できる。例えば、プローブ光波長 633 nm、対物レンズの  $NA = 0.46$  の場合、 $2\omega_0 = 1.7 \mu\text{m}$ 、 $l_c = 3.5 \mu\text{m}$  となるため  $\Delta z = 6.1 \mu\text{m}$  で最適配置となる。 $\Delta z$  の最適値の計算では、焦点差や共焦点長に比べて十分に薄い熱レンズ効果を仮定しているが、前述の計算からわかるとおり、顕微鏡下では励起光およびプローブ光を強く絞ることにより  $\Delta z$  は数  $\mu\text{m}$  となり、そのために  $1 \mu\text{m}$  厚の試料であってもすでに十分に薄いとはいえない。その結果、 $\Delta z$  の最適値は先ほどの理論予想と異なる値になる。したがって、現実の最適化は、測定試料ごとに実験的に定める

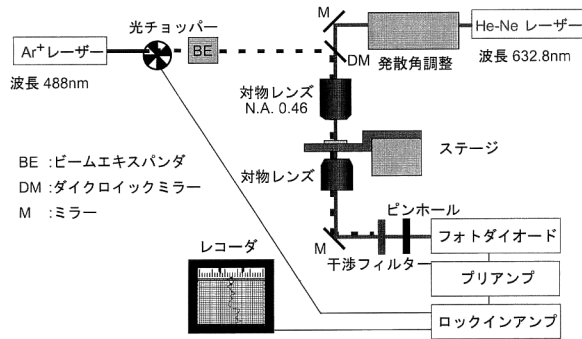


図2 熱レンズ顕微鏡の装置図。

必要がある。特に  $10\ \mu\text{m}$  厚以上の溶液を測定試料とする場合、試料の屈折率に依存して光学条件が変化するため、焦点を  $z$  軸方向に連続的に変化させる光学部品群が必須となる。筆者らは、さまざまな試料に適用できるように、 $\Delta z$  を簡便かつ高精度に調整できる焦点調整ユニットをもつ熱レンズ顕微鏡を設計・製作・改良してきた。

## 2. 熱レンズ顕微鏡の装置開発

図2に、熱レンズ顕微鏡の典型的な装置図を示す。基本的に、励起光とプローブ光を同軸に対物レンズに導いて、試料に集光照射すればよい。試料を透過した光は対物レンズによって再び平行光にされた後、励起光はフィルターによってカットされ、プローブ光のみがピンホールを通った後にフォトダイオードにより検出される。ノイズを低減するために、励起光は光チョッパーによりある周波数 (1 kHz 程度) で強度変調され、プローブ光の出力成分の中から変調周波数と同期する成分のみがロックインアンプで検出される。焦点差の調整のために、プローブ光の出射直後に、ビームエキスパンダーを改良した発散角調整ユニットが配置されている。これにより、最適な焦点差を実現している。

このように初期の熱レンズ顕微鏡は、大型のレーザーを用い、光学部品を防振台の上にばらばらに組み上げていたために、必然的に光路長が  $1\sim 2\ \text{m}$  と長くなっていた。そのために、微妙な光軸調整が要求され、実用という点からは程遠い装置構成であった。筆者らは、これらの問題を解決するために、小型のレーザーを用い、光源から検出器までを顕微鏡に一体化したデスクトップサイズの熱レンズ顕微鏡を開発した<sup>6)</sup>。装置図とその写真を図3に示す。励起光には半導体励起の固体レーザー (代表的な波長  $532\ \text{nm}$ )、プローブ光には半導体レーザー (波長  $670\ \text{nm}$ ) を用いた。調整箇所は、焦点差調整用のレンズ対とダイクロイックミラー、コンデンサーレンズの3つだけで、従来と比べて操作

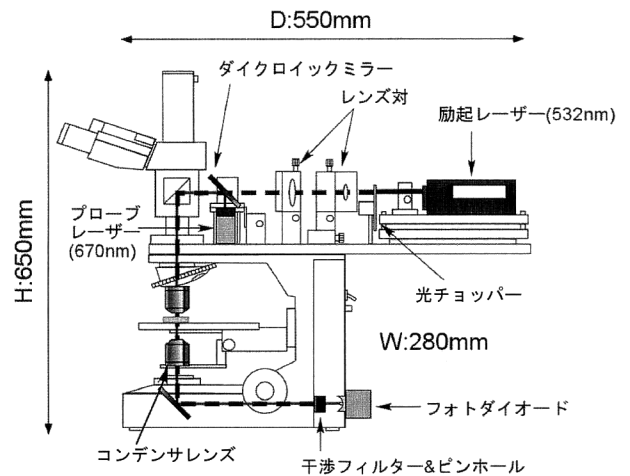


図3 デスクトップ熱レンズ顕微鏡の装置図と写真。

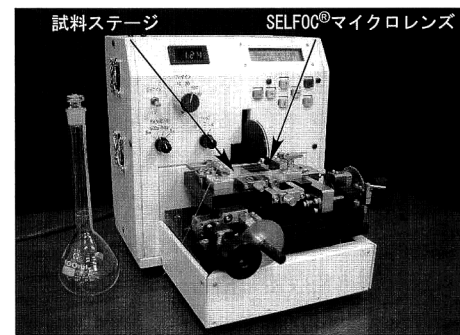
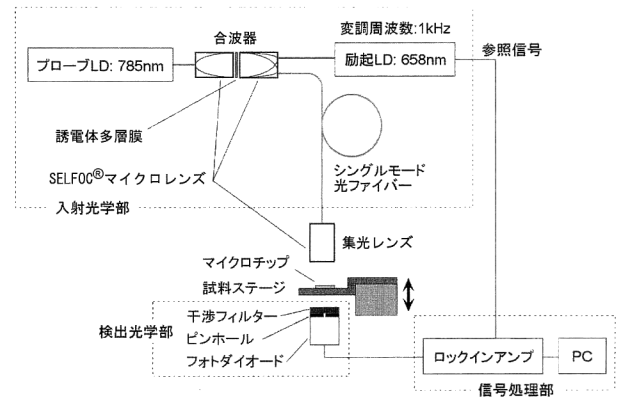
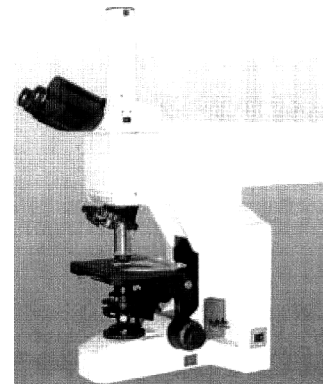


図4 パームトップ熱レンズ顕微鏡の装置図と写真。

性が大幅に向上した。また、本装置は、小型でありながら従来と同等の感度を有するうえに、一体化したことで振動などの外乱に対する耐性が大幅に向上した。なお、本装置は、大学発ベンチャーであるマイクロ化学技研株式会社<sup>††</sup>より市販されるに至っている。さらに現在では、デスクトップサイズからパームトップサイズへの開発を進めている。図4に、開発した装置の装置図と写真を示す<sup>7,8)</sup>。パームトップサイズ化にあたっては、従来の空間光学系からファイバー光学系とすることで、大幅な小型化を実現した。また、熱レンズ光学系に必要な①励起光とプローブ光の同軸調整、②励起光とプローブ光の焦点差の調整については、すべて光ファイバーとSELFOC<sup>®</sup>マイクロレンズ(日本板硝子株式会社製)により実現した。SELFOC<sup>®</sup>マイクロレンズとは、中心軸からの距離により連続的に屈折率を変化させた円筒形状のレンズであり、光通信で頻繁に用いられている。まず、①の同軸調整については、励起光を反射しプローブ光を透過する誘電体多層膜を2つのSELFOC<sup>®</sup>マイクロレンズ(直径:1.8 mm, 長さ:4 mm)で挟んだ構造の合波器により、自動的に実現できている。また、②の焦点差の調整については、SELFOC<sup>®</sup>マイクロレンズの直径や長さ、材質を変えることで最適な焦点差とした。本装置の場合、励起光に658 nm, プローブ光に785 nm(ともに半導体レーザー:LD), 集光用のSELFOC<sup>®</sup>マイクロレンズには直径1 mm, 長さ2.3 mmを用いたので、焦点差は40  $\mu\text{m}$ (設計値)となる。さらに、検出光学系をシンプルな構成として小型化し、信号処理に必要なロックインアンプの機能を限定してボード化することで、全体として $W \times D \times H: 220 \text{ mm} \times 230 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ の実用的な装置を開発することができた。

### 3. 熱レンズ顕微鏡による超高感度分析

#### 3.1 非蛍光性試料の単一分子定量

熱レンズ顕微鏡は、その測定原理上、固体表面上でも液体中でも測定可能である。最初に、溶液中の測定例について示す。溶液中の単一分子測定については、現在ではロー

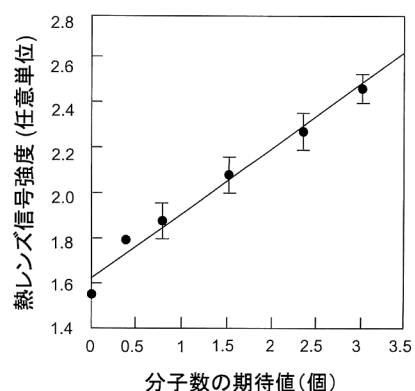


図5 検量線(溶質:鉛オクタエチルポルフィリン, 溶媒:ベンゼン)。

ダミンやフルオレセインなどの蛍光分子であれば、レーザー誘起蛍光法と共焦点顕微鏡を組み合わせれば、分子1個を検出することができる<sup>9)</sup>。蛍光法以外では、表面増強ラマン分光法や走査型電気化学顕微鏡を用いて、微粒子表面の分子や電気化学増幅による検出が報告されている<sup>9)</sup>。しかし、それらは特別な系にしか適応できず、液体や細胞内、細胞表面あるいはゲル中の超微量の非蛍光性分子を検出するには適さない。熱レンズ法は、光吸収に基づく分光法なので、広範囲の系に適応することができる。表1には、筆者らがこれまでに測定してきたものの中から、代表的なものをまとめた<sup>10-14)</sup>。

前述の熱レンズ効果の式で示したように、熱レンズ測定には好適な媒質(この場合は溶媒)があり、それらを選択することによって高感度な測定、つまり低濃度の試料を測定することができる。一般に、有機溶媒は水に比較すると10~30倍大きな増強因子をもっている<sup>15)</sup>、有機溶媒中の吸光度の大きな溶質を試料にすると熱レンズ測定には好都合である。図5に、溶質を鉛オクタエチルポルフィリン、溶媒をベンゼンにした場合の検量線を示す。鉛オクタエチルポルフィリンは測定波長(488 nm)で、比較的大きなモル吸光係数(32000  $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ )をもつ。検量線の横軸は、通常は試料濃度であるが、ここでは測定体積(7.2 fl:  $f=10^{-15}$ )内に存在する分子数の時間平均値(期待値)を示し

表1 熱レンズ顕微鏡による代表的な測定例。

検出限界	溶質	媒体	文献
0.4分子	ポルフィリン	ベンゼン	10)
48分子	色素分子	水	11)
7分子	DNA	ポリアクリルアミドゲル	12)
480分子	色素分子	組織細胞上	13)
1粒子	10 nm 銀微粒子	水	14)

<sup>††</sup> マイクロ化学技研(株)のホームページ: <http://www1.odn.ne.jp/imt/>

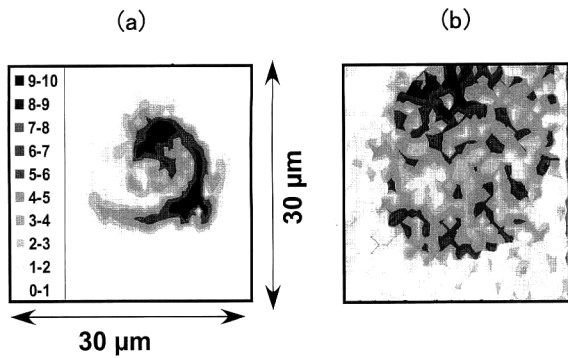


図6 神経細胞のアポトーシス過程の測定結果。試料を二次元に走査しながら、シトクロム *c* の分子分布を画像化した。数値は熱レンズ信号値。(a) アポトーシス前、(b) アポトーシス後。(カラー口絵参照)

である。このような分子数のきわめて少ない領域でも非常によい直線性を示しており、検量線から求めた定量限界 ( $2\sigma$ ) は 0.34 分子で、検出限界 ( $S/N=2$ ) は 0.32 分子となる。この測定ではロックインアンプの時定数 (積算時間) が 4 秒なので、測定した 0.4 分子という値は時間平均値であり、測定時間 4 秒のうち 1.6 秒間は測定体積中に分子が 1 個存在していて、残りの 2.4 秒間は分子が 1 個も存在していないということに対応している。

また、粒径 10 nm の銀超微粒子であれば、銀微粒子のまわりに生成する急峻な温度勾配によって、カウンティングできることも示されている<sup>14)</sup>。

このように、熱レンズ分光法を顕微鏡化することによって、非蛍光性試料の単一分子定量が実現した。今後、単一分子カウンティングが実現することによって、測定ツールという枠にとどまらず、新しい単一分子化学・生物化学を構築していけるのではないかと期待している。

### 3.2 単一細胞イメージング

生化学研究においては、培養細胞を用いてその応答を調べる実験が盛んに行われており、生命の仕組みを知るための基礎研究として重要視されている。しかしながら、ごく小さな細胞内 (通常数十  $\mu\text{m}$ ) に極微量しか存在しない物質の時間変化を実時間で直接観察することはきわめて難しい。これまででは、蛍光性のプローブ分子を細胞内に導入して、蛍光顕微鏡観察によって解析を行うのが一般的であった。しかし、この方法では、プローブ分子そのものが細胞に何らかの影響を及ぼしてしまい、系が乱されて正しい現象を観察できていないという可能性を払拭できない。一方、熱レンズ顕微鏡は、励起光を  $1\mu\text{m}$  まで絞ることで、試料の吸光度を  $1\mu\text{m}$  の空間分解能で高感度に測定できる。したがって、試料あるいはレーザー光を二次元走査することで、細胞内部や細胞上における特定の化学物質の濃度分

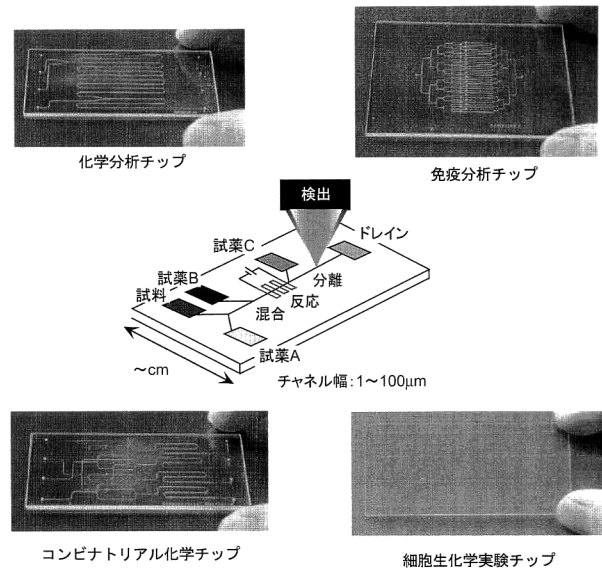


図7 Integrated Chemistry Laboratory の概念と、実際に製作したマイクロチップの例。

布を画像化でき、定量分析することができる。また、透過光量もしくは発光量そのもの (絶対値) が信号となる他の光学的手法とは異なり、熱レンズ顕微鏡ではプローブ光量変化の中の変調周波数と同期する成分 (すなわち透過光量に対する相対値) を測定するので、細胞内外での光散乱の影響を受けにくく、定量的な測定が可能となる。これまでに、肥満細胞組織内のヒスタミン分布<sup>13)</sup> や尿管組織内のトブラマイシン分布<sup>16)</sup> などを測定した。図6に、培養した神経細胞のアポトーシス過程を単一細胞で測定した例を示す<sup>17)</sup>。アポトーシス過程の指標として、電子伝達系を構成するシトクロム *c* の分子分布を測定した。このように、熱レンズ顕微鏡を用いることで、単一細胞中の分子分布の高感度かつ高空間分解能での直接測定が可能となった。

### 3.3 マイクロチップの検出器として

近年、数 cm 角のガラスやシリコン、プラスチック基板上 (マイクロチップ) に  $100\mu\text{m}$  程度の微細流路 (マイクロチャネル) を作製し、反応、分離、検出などの化学分析操作を集積化する、 $\mu\text{-TAS}$  (micro total analysis systems) あるいは lab-on-a-chip と呼ばれる研究が注目を集めている。特に、DNA 解析を目指した研究が注目されているが、それらは電気泳動による分離に主眼が置かれており、他の汎用的な分析操作の集積化にはほとんど至っていない。そこで筆者らは、それらとは異なる観点から、マイクロチップを “Integrated Chemistry Laboratory” と称し、文字通り「化学実験室を集積化する」研究を進めてきた (図7)。マイクロチップの利点は、試料量の大幅な低減や化学処理時間の短縮、および流路デザインにより複雑な反応を制御

表2 熱レンズ顕微鏡によるマイクロチップ上での測定例。

	検出対象	検出限界	分析時間	備考
環境分析	鉄錯体	7.7 zmol	60 秒	イオン対抽出
	コバルト錯体	0.72 zmol	60 秒	
	カリウムイオン	4.5 zmol	1 秒	イオンフォア分子を用いたイオン対抽出
	ナトリウムイオン			
	コバルトイオン	0.072 zmol	10 分	キレート反応+抽出
	コバルトイオン	0.13 zmol	90 秒	キレート反応+抽出+共存イオンの分解・除去
免疫分析	s-IgA	<1 $\mu$ g/ml	<1 時間	金コロイド標識
	CEA	0.03 ng/ml	35 分	金コロイド標識
	インターフェロン- $\gamma$	0.01 ng/ml	50 分	マルチチャンネルアッセイ
	BNP	0.1 pg/ml	35 分	ELISA 法
生化学分析	鉄イオン	6 zmol	150 秒	
	アスコルビン酸	1 zmol	30 秒	
	カテコールアミン	2 zmol	15 秒	
	過酸化水素	50 zmol	—	光熱変換効果を利用した反応制御
細胞分析	シトクロム <i>c</i>	—	—	単一細胞のアポトーシスの画像化
	一酸化窒素	0.1 $\mu$ M	20 分	マクロファージの刺激応答のモニタリング
分離分析	アミノ酸	0.2 zmol	—	DABSYL 標識アミノ酸類のキャピラリー電気泳動

s-IgA：分泌型免疫グロブリン A, CEA：癌胎児性抗原, BNP：脳性ナトリウム利尿ペプチド, ELISA：酵素免疫検定法, DABSYL：4-dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl.

できることなどが挙げられる。現在では、マイクロチップは化学、バイオ分析から合成まで幅広く用いられ、世界中で開発競争が行われており、すでに一部実用化されている。しかし、これら多くの利点に対して、検出という観点からみると、試料量が少ないということは大きなデメリットである。したがって、汎用的で超高感度な検出法は、集積化化学実現のためのキーポイントとなる。そこで筆者らは、汎用性、応用性、感度の点から、熱レンズ顕微鏡を集積化化学実験室の検出法へと応用した。また、熱レンズ顕微鏡の原理の説明からもわかるように、実試料など目的物質以外に励起光を吸収するような物質を含む混合試料の場合には、目的物質だけでなく、夾雑物も信号発生に寄与してしまう。すなわち、選択性が低い。したがって、化学分離により選択性を付与できる集積化化学実験室と熱レンズ顕微鏡の組み合わせは、双方の欠点を補うことができるために非常に相性がよい。

実際に筆者らは、熱レンズ顕微鏡を開発したことで、免疫分析や生化学分析、環境分析など、広範囲の分析システムの集積化に成功した。例えば、免疫分析では、従来 15 時間要していた反応時間を、マイクロチップ化により 10 分以内で完了することができ、感度についても、熱レンズ顕微鏡により従来よりも 30 倍程度の高感度化を実現できている。表 2 に、これまでに実現してきたものをまとめた。詳細については、誌面の都合上、総説を参照されたい<sup>2)</sup>。現在は、32 チャンネル並列分析など、分析システムのさらなる高度化を進めている。

本稿では、熱レンズ顕微鏡の基本的な原理と装置開発の

流れ、最近の応用例について紹介した。熱レンズ顕微鏡は、非蛍光性の試料を単一分子レベルで定量できる顕微鏡であり、その汎用性を生かして幅広い分野で用いられてきている。現在は、暗視野法などの顕微鏡観察法と組み合わせることによって、単一分子カウンティングに向けた高感度化を進めている。また、機能としても、紫外励起熱レンズ顕微鏡、フェムト秒時間分解熱レンズ顕微鏡、電気化学熱レンズ顕微鏡、円二色性熱レンズ顕微鏡などさらなる高機能化に取り組んでおり、今後、熱レンズ顕微鏡が広く用いられていくことを期待している。

## 文 献

- 1) W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. H. Jett, A. V. Orden, J. H. Werner and R. A. Keller: "Single molecule fluorescence spectroscopy at ambient temperature," *Chem. Rev.*, **99** (1999) 2929-2956.
- 2) T. Kitamori, M. Tokeshi, K. Sato and A. Hibara: "Thermal lens microscopy and microchip chemistry," *Anal. Chem.*, **76** (2004) 52 A-60 A.
- 3) 片山幹郎: "熱レンズ分光法", レーザー化学 (II), 片山幹郎編 (裳華房, 1985) pp. 250-272.
- 4) 北森武彦: "熱レンズ分光法", 光熱変換分光法とその応用, 澤田嗣郎編 (学会出版センター, 1997) pp. 15-19.
- 5) M. A. Proskurnin and A. G. Abroskin: "Optimization of optical system parameters in dual-beam thermal lens spectrometry," *J. Anal. Chem.*, **54** (1999) 401-408.
- 6) S. Hiki, M. Tokeshi, A. Hibara and T. Kitamori: "Development of a desktop-sized thermal lens microscope," *Bunseki Kagaku*, **52** (2003) 569-574.
- 7) A. Hattori, H. Yamaguchi, J. Yamaguchi, Y. Matsuoka, S. Kanki, T. Fukuzawa, T. Miwa, M. Toyama, M. Tokeshi and T. Kitamori: "Practical studies on compact photothermal lens spectroscopy detection system with micro chemical chip," *Proceedings of Micro Total Analysis System* (Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 2003) pp.

- 359-362.
- 8) M. Tokeshi, J. Yamaguchi, A. Hattori and T. Kitamori: Anal. Chem. (in press).
  - 9) 火原彰秀, 渡慶次学, 北森武彦: “一分子を測る”, *ぶんせき*, **10** (2000) 591-596.
  - 10) M. Tokeshi, M. Uchida, A. Hibara, T. Sawada and T. Kitamori: “Determination of subyoctomole amounts of nonfluorescent molecules using a thermal lens microscope: Subsingle molecule determination,” Anal. Chem., **73** (2001) 2112-2116.
  - 11) K. Sato, H. Kawanishi, M. Tokeshi, T. Kitamori and T. Sawada: “Subzeptomole molecule detection in a micro-fabricated glass channel by thermal lens microscope,” Anal. Sci., **15** (1999) 525-529.
  - 12) J. Zheng, T. Odake, T. Kitamori and T. Sawada: “Fast slab gel electrophoresis separation of DNA fragments with a short migration distance using thermal lens microscope,” Anal. Sci., **15** (1999) 223-227.
  - 13) K. Uchiyama, A. Hibara, H. Kimura, T. Sawada and T. Kitamori: “Thermal lens microscope,” Jpn. J. Appl. Phys., **39** (2000) 5316-5322.
  - 14) K. Mawatari, T. Kitamori and T. Sawada: “Individual detection of single-nanometer-sized particles in liquid by photothermal microscope,” Anal. Chem., **70** (1998) 5037-5041.
  - 15) S. E. Bialkowski: *Photothermal Spectroscopy Methods for Chemical Analysis* (John Wiley & Sons, New York, 1996) pp. 290-291.
  - 16) H. Kimura, M. Mukaida, T. Kitamori and T. Sawada: “Quantitation of drug concentration by thermal lens microscope in a renal tubule of fixed kidney,” Anal. Sci., **13** (1997) 729-734.
  - 17) E. Tamaki, K. Sato, M. Tokeshi, K. Sato, M. Aihara and T. Kitamori: “Single-cell analysis by a scanning thermal lens microscope with a microchip: Direct monitoring of cytochrome c distribution during apoptosis process,” Anal. Chem., **74** (2002) 1560-1564.

(2004年7月27日受理)