

電子線励起を利用した近接場光学顕微鏡

川田 善正^{*,***}・居波 渉^{**,***}

Electron-Beam Excited Advanced Optical Microscope

Yoshimasa KAWATA^{*,***} and Wataru INAMI^{**,***}

We propose ultra-high resolution optical microscope which has ten nanometer spatial resolution laterally and can observe dynamic behaviors of biological specimens under various circumstances. A nano-optical light source is excited by a focused electron beam.

Key words: near-field scanning optical microscopy, nano-imaging, thin film technology, biotechnology, scanning electron microscopy

バイオテクノロジーなどの技術の進展とともに、生体試料を高分解能で観察したいとの要求が高まっている。サブミクロンから数十ナノメートルの分解能で微小細胞の機能、細胞間の相互作用などの観察が期待されている。これらの要求に応えるため、原子間力顕微鏡 (AFM) などのプローブ走査顕微鏡、走査型電子顕微鏡 (SEM) などを用いて生体試料を観察する技術の開発が進められている。これらの顕微鏡は、非常に高い空間分解能を有しており、有効なツールであるが、一方では、真空が必要であったり、試料が導電性の物質に限られるなど、生体試料を生きのまま観察することが困難な場合も多い。

光学顕微鏡は、SEM、AFM などに比べて分解能では劣るものの、扱いやすく、水中でも試料を観察できるなど、多くの特徴を有している。また、より高分解能を目指して、近接場 (ニアフィールド) 光学顕微鏡の開発も盛んに進められている¹⁻³⁾。これらの技術の進展とともに、光学顕微鏡は、今後のナノフォトニクスとバイオテクノロジーを融合したナノバイオフォトニクス分野において、非常に有効に利用されていくものと考えられる。

本稿では、光を用いて生体試料を高分解能に観察する方法として、電子線励起型の近接場 (ニアフィールド) 光学顕微鏡を紹介する。

1. 近接場光学顕微鏡

近接場光学顕微鏡は、図 1 (a) に示すようにガラスファイバーの先端を先鋭化し、金属コートしてその先端に微小開口を作製したプローブを用いる。先端の微小な開口から漏れ出た光で試料を照明して、観察する。したがって、近接場光学顕微鏡の分解能は、微小開口の大きさに決まり、十分小さな開口を用いることにより、高い分解能を実現することが可能である。試料の観察像を得るにはファイバープローブを二次元に走査する。

近接場光学顕微鏡は、従来の光学顕微鏡に比べて非常に高い分解能を有するため、細胞内の微小器官の機能解明、相互作用の解明に利用することが可能である。また、試料の観察に光を用いるため、分光法との組み合わせによる定性分析が行える、真空が必要ないため生きた生物試料をそのまま観察できるなど、従来の光学顕微鏡がもつ利点をそのまま利用することが可能である。これらの利点は、走査型電子顕微鏡 (SEM)、走査型トンネル顕微鏡 (STM) など他の高分解能イメージング法と大きく異なる。

近接場光学顕微鏡では、先端を先鋭化したプローブを、試料から数十ナノメートルの一定距離を保って走査しなければならないため、観察画像の取得には時間を要する。そのため、動きのある生物細胞など生きた生体試料の観察や高速現象の観察を行うことは困難であり、バイオテクノロ

*静岡大学工学部 (〒432-8561 浜松市中区城北 3-5-1) E-mail: kawata@eng.shizuoka.ac.jp

**静岡大学若手グローバル研究リーダー育成拠点 (〒432-8561 浜松市中区城北 3-5-1)

*** (独) 科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業 (JST CREST)

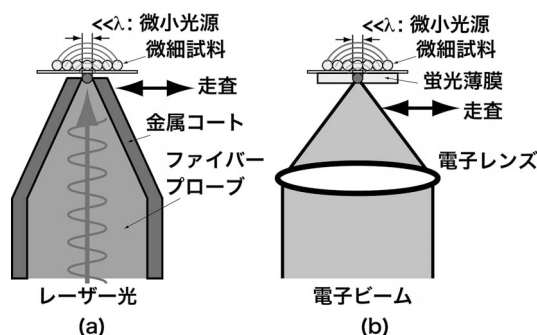


図1 (a) 微小開口を用いた近接場光学顕微鏡の原理と (b) 電子線励起による近接場光学顕微鏡。

ジーへの応用は制限されていた。

2. 電子線励起による近接場光学顕微鏡⁴⁾

われわれの研究グループでは、電子線励起を利用した高分解能近接場光学顕微鏡の開発を進めている⁴⁾。図1 (a) に示すように、これまでの照明型の近接場光学顕微鏡では、波長以下の微小開口を用いて試料を照明する光源の大きさを制限することにより、回折限界を超えた高分解能化を実現している。

電子線励起を利用した近接場光学顕微鏡では、蛍光薄膜に収束電子線を照射し、電子線で蛍光の発光領域を制限する。図1 (b) に電子線励起による近接場光学顕微鏡の原理を示す。蛍光薄膜上に試料を直接配置し、収束した電子線で蛍光の輝点を励起する。蛍光薄膜上に生じた微小な輝点は、通常の近接場光学顕微鏡において、微小開口によって生じたエバネセント波を利用して試料を照明することと原理的に全く等価である。試料と蛍光薄膜の距離が十分小さい場合、電子線励起によって生じた微小蛍光光源のエバネセント波で試料を観察することができ、回折限界を超えた分解能を実現することが可能となる。電子線を走査することにより、蛍光発光の領域を走査し、画像を取得する。

本システムでは、電子線によって微小な輝点を実現するため、観察系は通常のレーザー走査型光学顕微鏡と同様の結像システムとなる。したがって、すでにこれまでに開発されてきた光学顕微鏡の光学系を検出システムに応用することによって、高い空間分解能と多くの機能をもつ検出システムを構築することが可能である。

また、試料を配置する蛍光薄膜の部分で光学顕微鏡部と電子顕微鏡部が分離されるため、試料を配置する部分には真空や金属膜の蒸着などは全く必要なく、通常の光学顕微鏡と同様の環境で使用することが可能である。

本手法は次のような利点を有する。

1) ナノメートルオーダーの分解能を実現可能：電子線ビームを集光して蛍光薄膜を励起するため、光の回折限界

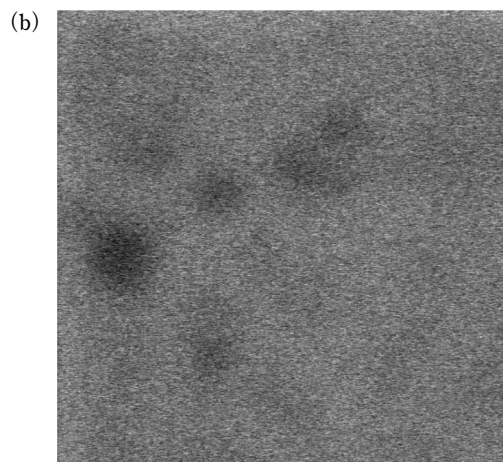
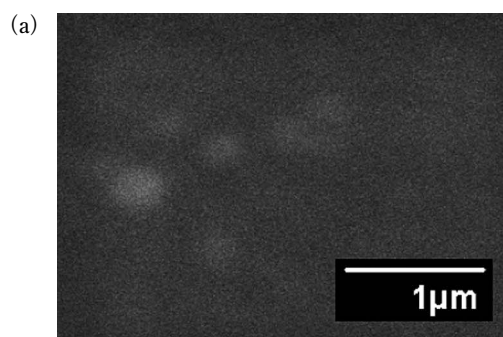


図2 直径 100 nm の微小球の観察結果、(a) 二次電子像と (b) 蛍光検出像。

によらない微小な点光源を実現することが可能である。そのため従来の光学顕微鏡の分解能を大きく超えた分解能を実現することが可能となる。

2) 生物試料の光学定数 (吸収, 屈折率分布) などによって決まる光強度分布を観察可能：光学顕微鏡結像部分で検出されるのは、微小光源から試料を透過した光、または微小光源によって励起された蛍光強度分布である。したがって開発する顕微鏡システムでは、試料の光学定数分布を測定することが可能である。これは、X線による透過画像や電子顕微鏡による観察像、原子間力顕微鏡で試料の凹凸を観察するのは、全く観察対象が異なる。

3) 電子線を走査するため高速な観察が可能：電子線を走査することにより、容易に微小光源を走査することができ、高速な観察が可能である。

4) 蛍光薄膜材料の選択による高機能化：いろいろな機能をもつ蛍光薄膜 (発光波長特性, 偏光特性, 非線形光学応答など) を用いることによって、さまざまな機能をもつ光ナノイメージング手法を実現することが可能である。

図2に分解能評価の基礎実験として、直径 100 nm のラテックスを観察した結果を示す。この実験では、SEMの

試料台部分を改造し、光電子増倍管で蛍光を観察可能とし、蛍光膜上に直接ラテックスを配置し、電子線で蛍光を励起した。図2 (a) は二次電子像、(b) は蛍光像である。蛍光膜上のラテックスが観察されており、電子線励起により 100 nm 以下の分解能を有する顕微鏡が実現できていることが確認できる。

本稿で紹介した光学顕微鏡システムは、生物に優しい光学顕微鏡の特徴と非常に高い分解能をもつ電子顕微鏡のそれぞれの利点を融合した、新しいイメージング手法である。このような特徴を有する新しい光学顕微鏡を実現することによって、これまで観察できなかった微小な領域の生命現象を明らかにすることが可能となり、ナノ・バイオテ

クノロジーに大きく寄与するものと期待できる。

文 献

- 1) Y. Inouye and S. Kawata: "Near-field scanning optical microscope with a metallic probe tip," *Opt. Lett.*, **19** (1994) 159-161.
- 2) M. Ohtsu and H. Hori: *Near-Field Nano-Optics* (Kluwer Academic/Plenum Publishers, NewYork, 1999).
- 3) Y. Kawata, M. Murakami, C. Egami, O. Sugihara, N. Okamoto, M. Tsuchimori, and O. Watanabe: "Non-optically probing near-field microscopy for the observation of biological living specimens," *Appl. Phys. Lett.*, **78** (2001) 2247-2249.
- 4) W. Inami, K. Nakajima, A. Miyakawa and Y. Kawata: "Development of ultrahigh-resolution optical microscope using nano-optical source excited with focused electron beam," *Technical Digest of The 7th Asia-Pacific Conference on Near-Field Optics (APNFO-7)* (2009) p. 29.

(2010年2月18日受理)