

位相変調方式蛍光寿命測定手法に関する研究

2017年3月

水野孝彦

目 次

1 章 序論	1
1.1 蛍光寿命測定の意義	1
1.2 蛍光寿命測定手法	2
1.3 研究目的	9
1.4 本論文の構成	12
参考文献	14
2 章 位相変調励起光源を用いた位相変調方式 蛍光寿命測定法	18
2.1 緒言	18
2.2 位相変調励起光源を用いた位相変調法の動作原理	21
2.3 数値シミュレーション	24
2.4 装置構成	26
2.5 実験結果および考察	30
2.5.1 蛍光ガラスの蛍光寿命測定	30
2.5.2 クマリン 152 およびローダミン 6G 混合溶液の蛍光寿命測定	32
2.6 結言	34
参考文献	35
3 章 光子計数型位相変調方式蛍光寿命測定法	37
3.1 緒言	37
3.2 測定原理	41
3.3 装置構成	44
3.3.1 高周波変調 LD 駆動回路	44
3.3.2 光子計数型位相変調方式蛍光寿命計	46
3.4 実験結果および考察	48
3.4.1 入射光量に対する検出光子数の直線性とチャンネル間幅微分直線性	48
3.4.2 光子計数型位相変調法とアナログ測光型位相変調法の比較	50
(i) 微弱光測定における PC-PMF と従来型 PMF の比較	50
(ii) 高周波変調光の測定における PC-PMF と従来型 PMF の比較	52
3.4.3 蛍光寿命測定結果	55
3.5 結言	59
参考文献	60

4 章	アダマール変換型位相変調方式蛍光寿命 イメージング法	63
4.1	緒言	63
4.2	フーリエ変換型位相変調法とアダマール変換型 イメージング法の測定原理	65
4.2.1	フーリエ変換型位相変調法	65
4.2.2	アダマール変換型イメージング法	67
4.3	アダマール変換型位相変調方式蛍光寿命イメージング装置の 構成と動作	70
4.3.1	アダマール変換型位相変調方式蛍光寿命イメージング装置	70
4.3.2	LED アレイ 駆動回路	73
4.4	実験結果	75
4.4.1	1 成分試料の蛍光寿命イメージング	77
4.4.2	2 成分試料の蛍光寿命イメージング	79
4.5	考察	81
4.6	結言	82
	参考文献	83
5 章	総括	85
	本研究に関する公表論文	88
	本研究に関する学会発表	89
	その他の光計測に関する公表論文および学会発表	90
	謝辞	91

1 章 序論

1.1 蛍光寿命測定の意義

物質情報の取得という観点で、蛍光分光法はあまたの分光分析手法の中で、一般的かつ有力な手法の一つである。蛍光分光法は、より一般的で簡便な吸収分光法と比較して、蛍光を発する試料でありさえすれば、原理的により高感度な測定が可能である[1]。そのような蛍光を特徴づける代表的な事項として、1) 蛍光励起スペクトル、2) 蛍光発光スペクトル、3) 分極、4) 蛍光寿命の4つが挙げられる[2-4]。

1) の「蛍光励起スペクトル」は、試料が希薄であれば、通常の吸収スペクトルと同等な情報を与える。2) の「蛍光スペクトル」は、試料の種類と量によって、それぞれ異なったスペクトルと強度を与えるが、これが蛍光分光法で物質の定性定量分析が可能となる理由である [2-5]。3) の「分極」は、試料分子の分極に起因する励起遷移モーメントと発光遷移モーメントに応じて、蛍光の偏光状態が励起光のそれに対して変化する現象である。したがって、その波長依存性を調べれば、試料の異方性スペクトルが得られる。4) の「蛍光寿命」は、励起された分子が励起一重項状態の最低電子レベルから基底状態の各振動レベルへ緩和する際の平均時間のことを指し、これも分子の種類によって変化する。この現象には蛍光を伴わない無輻射遷移や分子の周囲環境が関係する。量子収率とも密接な関係があり、物理化学的に重要な情報を与える[2-4]。分析の観点からは、スペクトルが類似している場合でも蛍光寿命値は異なる場合が多く、分析の識別能力を向上させるという意味で実用的な使い道もある[6]。このような蛍光寿命値の測定もしくは蛍光減衰の時間的な挙動の測定を、その他のスペクトルや偏光測定と同時に行えば、時間分解スペクトルや時間分解異方性スペクトルが得られる[2-4, 7, 8]。このような動的な測定手法は古くから提案され、現在でもますます多用され、今後も装置やデバイスの進歩と相まって進展すると考えられる。

蛍光寿命値は対象とする分子の周囲環境に依存して変化すると述べたが、このことはすなわち蛍光寿命値の変化を通してその周囲環境がモニタできるということである。すなわち、溶媒緩和[9-11]や、消光[11-12]、分子の回転ブラウン運動の可視化[13, 14]、分子のコンフォーメーションの変化の推定[2-4, 15]、最近では蛍光共鳴エネルギー移動(FRET; Förster resonance energy transfer) [3, 16, 17]などが、適切な蛍光プローブの開発と歩調を合わせて盛んに調べられている。このような状況では、一成分とは限らず多成分の蛍光寿命値の正確な把握が必要である。また蛍光そのものは一般に微弱であり、通常のアナログ測光では測定しにくい場合もある。蛍光寿命値は、短いものはピコ秒以下から長いものでは遅延蛍光の数百マイクロ秒以上の範囲に亘る。

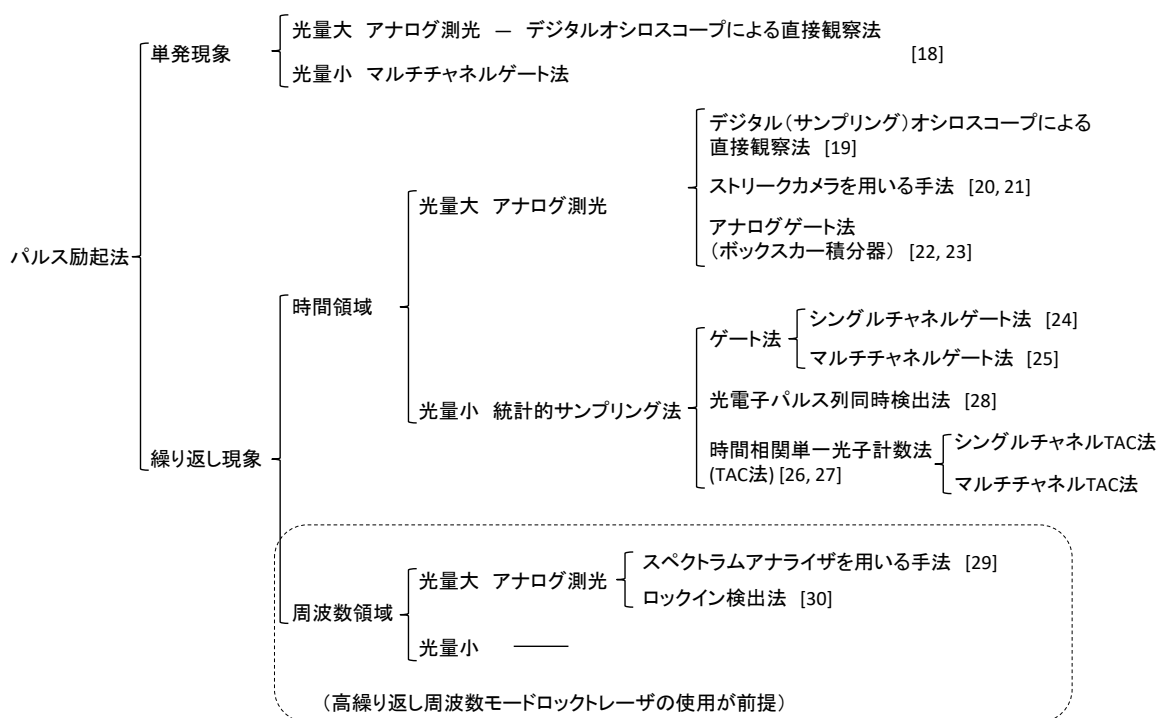
一方、上で述べた試料の識別という観点では、特に生体関連試料の分析の現場において、測定を必要とする蛍光寿命値の範囲はサブマイクロ秒からナノ秒領域に集中している。そこでは、スクリーニング目的という意味で蛍光寿命の概略値が分かればよいという場合も少なくない。しかし、蛍光寿命計は励起光として定常光を用いる蛍光分光光度計に比べて高価であり、またその取扱いにもある程度の熟練を要する。最近では、比較的多くのメーカーが専用の装置を市販するようになってきたが(例えば、EasyLife™series, Photon Technology International, Inc.や、Quantaaurus- Tau™ series, 浜松ホトニクス)、それでもより目的に合った装置の開発が期待されている。

1.2 蛍光寿命測定手法 [18]

蛍光寿命の測定手法は、蛍光寿命値の大小、蛍光強度の強弱、励起波長、繰り返し励起可能か否かなどによっていかようにも分類できる。しかし、慣習的に励起手法に応じて、パルス励起法と位相変調法に大きく分類する場合が多い。これは、蛍光の系を線形な系と見做して、インパルス応答を測定するか定常応答を測定するかに対応している。パルス応答法は自明であるが、定常応答法では適当な周波数で変調した励起光を試料に照射し、生じた蛍光信号の励起波形に対する変調度比、あるいは位相差を求める。その変調周波数を変化させながら測定を繰り返し行うことによって、初めてパルス励起法と同等の情報が得られる。したがって、測定時間を一定として蛍光寿命値を求めるといった場合には、位相変調法はパルス励起法と比較して情報論的に精度の高い情報を与える。これが、パルス励起法で時間的な蛍光減衰波形が直接測定できるという大きな優位性に対して、位相変調法が数少ないながらも依然として活用されている大きな理由の一つと思われる。

パルス励起法を分類した結果を表 1.1 に示す。まず、現象が単発現象であるか繰り返し励起可能であるかで分類される。単発現象の場合は、光量が十分大きければ、通常のアナログ測光に基づいた、蓄積機能を有するオシロスコープによる直接観察が可能である[19]。程度にも依るが光量が小さくなるとマルチチャネルのゲートを用いるデジタルサンプリング法になる。これは、検出器から出力される光電子パルス列をデジタル信号とみなし、それを計数することで光強度を測定する手法である。フォトン数を直接計数するので発光強度の検出下限は低くなるが、分解時間はゲート幅で決まる。したがって、単発現象の場合には蛍光寿命の短いものを測定することは事実上不可能である。

表 1.1 パルス光励起による蛍光寿命測定法の分類。



現象が繰り返し励起可能であれば、サンプリング法の原理にしたがって、SN 比と分解時間を向上させた測定が可能となる。ここでは便宜上、時間領域測定法と周波数領域測定法に分類した。時間領域測定法で蛍光強度が十分強い場合は、古くからあるアナログ測光法が適用でき、デジタルサンプリングオシロスコープを用いる手法[20]、ストリークカメラを用いる手法[21, 22]、ボックスカー積分器を用いる手法[23]などが利用される。これらを総称してアナログゲート法と呼ぶこともできるが、サンプリングゲートの位置を測定システムのどの箇所に設けるかが問題となる。当然ながら測定系のできるだけ前段に位置させるのが SN 比の観点で望ましく、検出器の前に適切な変調器を設置するのが望ましい。しかし、適用波長やスピードなど技術的観点、または価格などの考慮が必要である。一般には微弱蛍光を測定するための検出器としては光電子増倍管(PMT; photomultiplier tube)が用いられるが、そのダイノードを制御してゲート動作させる各種の手法が昔から多く提案されている[24]。しかし、PMT の出力に市販のボックスカー積分器を接続するのがごく一般的である。

蛍光強度が弱くなるとデジタル測光に基づいた統計的サンプリング法が用いられる。統計的サンプリング法では、試料励起後の発生した光電子パルスの発生時刻の確率密度関数が、蛍光強度が強い場合の減衰波形と相似であることを利用して、その発生頻度を発生時刻の関数としてヒストグラムを作成する。最も簡単には、単一ゲートを配置してその時刻を逐次走査するシングルチャンネルゲート法がある[25]。しかし信号の利用効率が非常に低い。これを改善したのがマルチチャンネルゲート法である[26]。この欠点は分解時間が高々5 ns 程度であることである。それに対してピコ秒のオーダーの分解時間を達成できるのが、時間相関単一光子計数法(TC-SPC; time-correlated single-photon-counting)[27, 28]である。この手法は時間分析に時間振幅変換機(TAC; time-to-amplitude converter)を用い、ヒストグラム作成に波高分析器(PHA; pulse height analyzer)モードで動作させたマルチチャンネルアナライザ(MCA; multichannel analyzer)を用いる。問題となるのは、やはりその信号利用率の低さとヒストグラム作成に要するシステムの不感時間である。信号利用率の低さはTACに起因し、たとえある程度の蛍光強度がある場合でも、ヒストグラムに波形歪を生じさせないために、故意に減光させて測定する必要がある。これらの問題は励起繰り返し周波数の上限を決めてしまう。結果として測定に膨大な時間がかかることになる。もともとの蛍光が本当に微弱の場合には仕方がないが、多くはそれを甘受せざるを得ない場合が多い。しかし、多くの場合、特に生体試料関連の測定においては、分解時間のある程度犠牲にしても測定に要する時間を短縮させたいという要求が強い。これに応える手法が光電子パルス列同時検出法である[29]。この手法の採用によってTACの信号利用率の低さを2桁程度改善させられる。しかし、ヒストグラム作成に関する不感時間の問題に関しては、完全解決には至っていない。

パルス励起光源に関しては、古くから各種の気体放電管が用いられ、市販のXeランプをナノ秒パルス点灯させる方法なども開発されている[30]。しかし繰り返し周波数は高々10 kHz程度であり、パルス幅も数ns程度である。こういった背景から、現在主に使用されているのは依然としてモードロックレーザである。発振波長に大きな制限がつくものの、現在の大部分の装置では、これとTACの組み合わせの形態をとっている。モードロックレーザのパルス幅は数100 fsから数ps

であり理想的なパルス光源とあって良い。また、繰り返し周波数も数 10 MHz 以上と高速である。平均強度も数 100 mW と非常に強い。しかし、蛍光寿命を測定するという目的に対しては幾分大掛かりであり、実験室レベルでは許されるものの、コストの面からも利用しづらい場合がある。

モードロックレーザから得られる繰り返しパルス列は、周波数領域で見ると高次の高調波成分を含む。したがってその高次の成分での振幅比、位相差から、複数成分の蛍光寿命値が推定できる。このことから、これを周波数領域測定法と分類した。実際には、検出器の出力をスペクトラムアナライザやロックイン検出器に導き、それら高次高調波に対応した周波数の応答を抽出する [31, 32]。マイクロチャンネルプレートを組み合わせた PMT(MCP-PMT; microchannel-plate type photomultiplier tube)等の十分高速な検出器を利用すれば、10 GHz を超える応答が得られ、数 10 ps の蛍光寿命値にも対応可能である [33]。しかし、この周波数領域測定法のデータ解析は、後で述べる位相変調法と全く同じである。したがって、このような分類自体に意味が無くなっているのかもしれない。

一方、近年では励起光源の選択肢の一つとして、LED や LD が着目されている。紫外波長域の LED や LD が容易かつ安価に入手できるようになり、装置の形態も見直されるようになってきた [34-36]。励起光源をコンパクトに構成でき、機械的に堅牢であり、また様々な波長に対応させられるからである。したがって、スクリーニングを目的とした蛍光寿命測定装置には、非常に魅力的な励起光源と言える。しかし、駆動法にもよるが、パルス幅はサブ ns から数 ns 程度である。図 1.1 には、以上のパルス励起法の各手法を、横軸を蛍光寿命値、縦軸を蛍光強度として整理した。

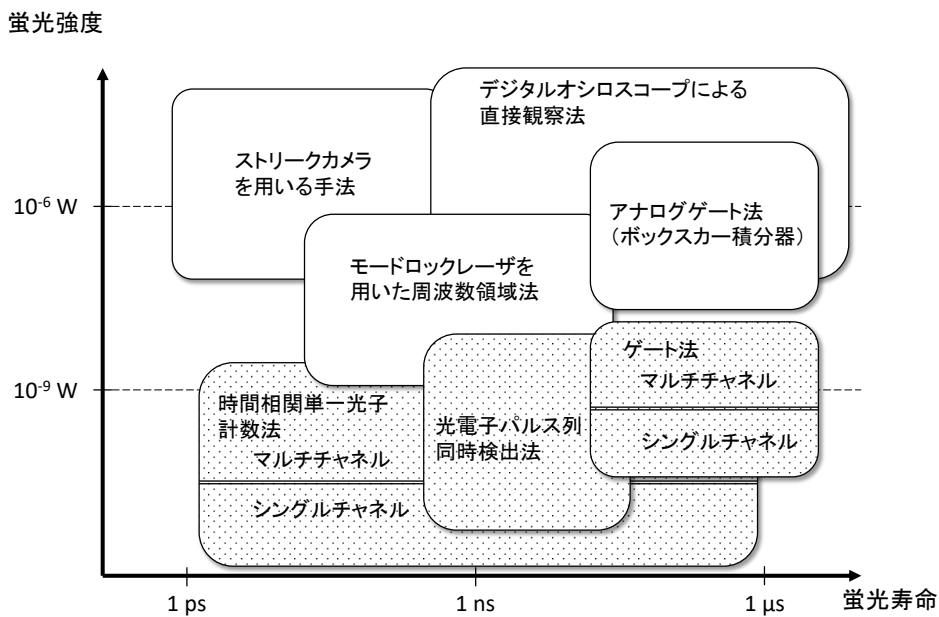


図 1.1 パルス励起法において蛍光寿命および蛍光強度に依存した各種測定法の位置づけ。網掛部は統計的サンプリング法に基づく手法で、それ以外はアナログ測光法に基づく。

次に、表 1.2 に位相変調法の分類を示す。パルス励起法の場合と同様に、現象が単発現象であるか繰り返し励起可能であるかで分類されるべきであるが、位相変調法では原則として単一の周波数で変調するため、原理的に単発現象には対応できない。繰り返し現象に対しては、形式的には時間領域法と周波数領域法に分けた。時間領域法は、観測された時間波形から直接振幅比と位相差を求める手法とする。パルス励起法の場合と同様に、光量が十分大きい場合であれば、サンプリングオシロスコープが使用できる[37]。光量が小さい場合は原理的に対応できない。しかし、それを克服する手法が提案されている。すなわち、パルス励起法の場合と同様に、統計的サンプリング法を用いて正弦波波形のヒストグラムを作成するという手法である[38]。この手法は光子計数形位相変調法(PC-PMF; photon-counting-type phase-modulation- fluorometry)と名付けられている。このようにして時間領域法で得られた波形をフーリエ変換により周波数領域で解析すると、ノイズを除去と相俟って良好な解析ができる。この観点からは周波数領域法と呼ぶべきかもしれない。

一方、観測した時間波形をフーリエ変換し周波数分解する場合や、ロックイン検出やスペクトラムアナライザを用いることで周波数分解し、その後解析を行う場合は周波数領域法に分類させられる。周波数領域法においても、アナログ測光に基づいた測定が行われているが、やはり原理的に微弱蛍光には対応できない。周波数分解する測定法の意義は、次の2つが挙げられる。(i) ノイズ除去による SN 比の向上。(ii) 複数の励起周波数を用いた測定。(i)を達成する手段として、ロックイン検出法を組み合わせた手法や、スペクトラムアナライザを用いた手法が提案されている[31, 39, 40]。一方、(ii)の必要性であるが、単一の励起変調周波数だけでは、蛍光減衰波形が単一指数関数減衰で表される試料しか原理的に対応できないからである。多成分から成る試料の測定には、ノイズが皆無としても、少なくとも成分数だけ変調周波数を逐次切り替えた測定が必要となる[41-43]。位相変調法では、1つの変調周波数に対して、振幅比と位相差という2つの測定が同時に行えるが、測定の精度の観点で、位相情報だけを使用する場合も多いからである。また、たとえ試料が単一成分であったとしても、その事実を確認するためには複数の変調周波数における測定が必要となる。このような測定の煩雑さを解消するために、あるいは試料の経時変化を防止する意味で、周波数多重正弦波を用いる手法[44]や、周波数チャープ波を利用する手法[45-46]が提案されている。

他方、蛍光の系を線形とした場合、励起光をランダム変調し、生じた蛍光波形との相互相関を求める手法も存在する。この手法はもっと考慮されるべきと思われるが、ナノ秒以下の蛍光寿命値に対する適切な変調手段があまり見当たらないという事情と測定の SN 比の問題で、さほど多くの報告例はない[47]。

表 1.3 に、以上の各種法の特徴を、励起波形と多成分試料への対応可否に着目して整理したものを示す。また、図 1.2 には、位相変調法の各手法を、横軸を蛍光寿命値、縦軸を蛍光強度として整理したものを示す。

表 1.2 位相変調法による蛍光寿命測定法の分類.

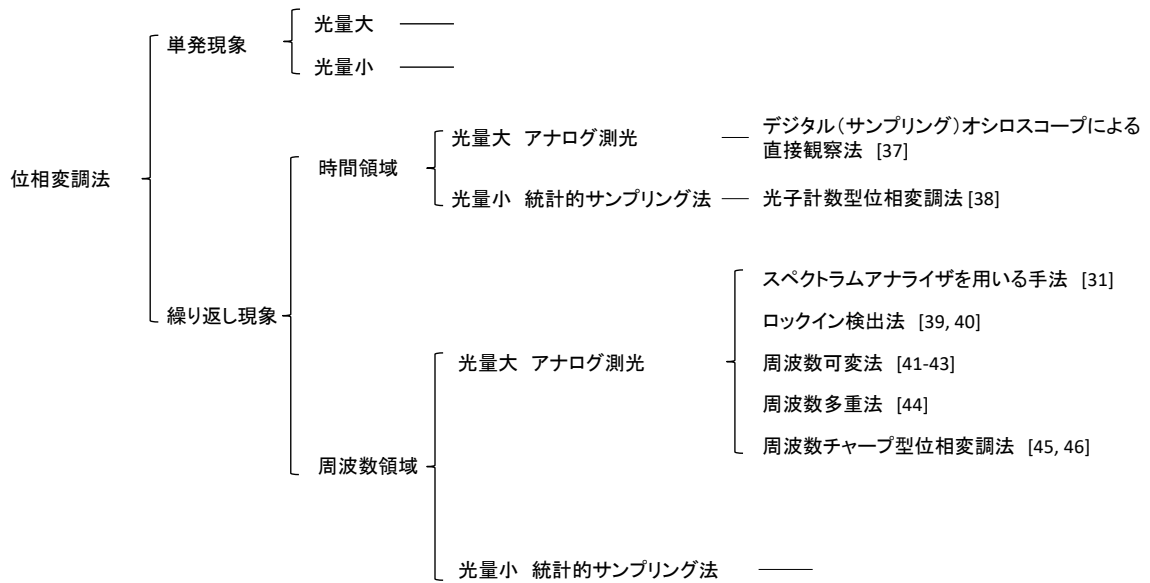


表 1.3 位相変調法に用いられる励起波形の分類と多成分試料への対応可否.

励起波形	設定できる変数	時間波形	スペクトル	多成分試料への対応可否
パルス	λ, t_w, f_r			◎
正弦波	λ, f			△
ランダム	λ			○
周波数多重正弦波	λ, f_1, f_2, \dots			△
チャープ波	$\lambda, f_{start}, f_{stop}, f_r$			◎

λ : 励起波長, t_w : パルス幅, f_r : 繰り返し周波数, f : 変調周波数, f_1, f_2, \dots : 多重する周波数, f_{start} : 掃引開始周波数, f_{stop} : 掃引終了周波数

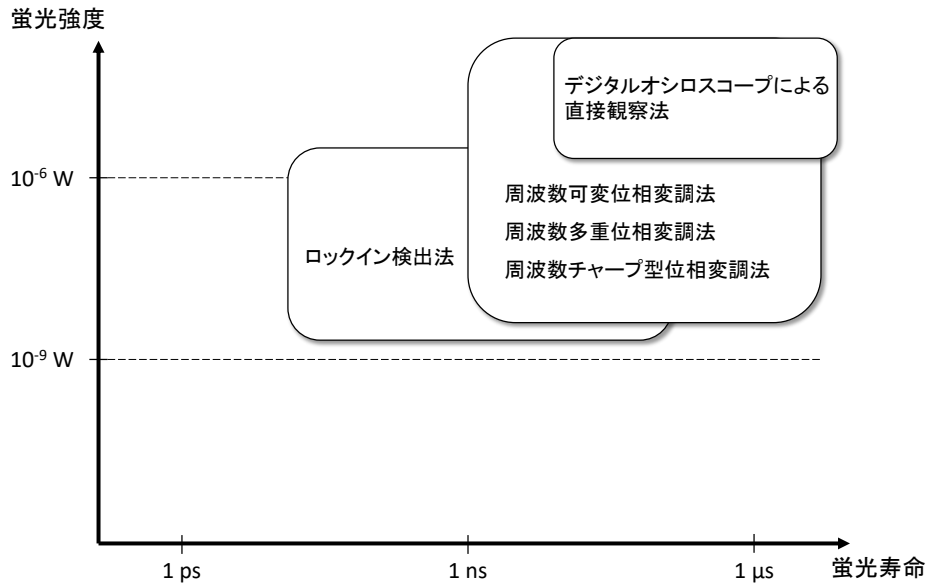


図 1.2 位相変調法において蛍光寿命および蛍光強度に依存した各測光法の位置づけ.

以上、試料の蛍光寿命を点測定する手法について概説したが、次に 2 次元画像を取得する手法について言及する。これは、顕微蛍光寿命イメージング(**FLIM**; fluorescence lifetime imaging microscopy)として既に定着しており、蛍光ラベルを導入した生体試料の局所的な観察など、生化学分野で広く利用されている [48].

従来の **FLIM** は、検出器に着目して 2 種類に分類できる。すなわち、(i) 共焦点顕微鏡を用いたスキャン法と (ii) 高速ゲート付きイメージインテンシファイアと **CCD** カメラのような 2 次元検出器を組み合わせた **wide-field FLIM** である。前者の共焦点顕微鏡を用いたスキャン法では、試料ステージまたは励起スポット位置を走査し、光電子増倍管 (**PMT**) のような単一検出器を用いる [49, 50]. そのため、微弱な蛍光に対応可能であり、高い 3 次元空間分解能が達成できる。しかし、機械的な走査方式のため測定に長時間を必要とする。したがって短時間で変質してしまうような生体試料には対応させづらい。ガルバノ鏡を使用した高速走査も可能であるが[51], やはり機械的振動等への注意深い対応が要求される。

そのような理由で、**wide-field FLIM** の採用も大いに要求されている。**Wide-field FLIM** では、観察領域全体を同時に励起し、時間的なゲートを用いて時間分解蛍光イメージを得る[52]. **FLIM** には、光源としてパルス励起光と正弦波変調光を用いる 2 つの方式がある。パルス励起光を採用する場合には、ゲート時刻のタイミングを励起パルス時刻に対して時間的に遅延走査させながら蛍光減衰波形を取得する。しかし、分解時間はゲート時間幅で決定されてしまい、たかだか数ナノ秒オーダである。また信号の収集効率が低く、測定に要する時間も長くなってしまふ。それを克服するため、蛍光減衰時間内に複数個の時刻に固定ゲートを設け蛍光寿命値を算出する手法もあるが[3, 48], 蛍光減衰波形が単一指数関数波形であることが前提であり、多成分試料には対応しにくい。加えて二次元検出器のフレームレートで繰り返し周波数の上限が制限されるという問題

もある。高速の二次元検出器も開発されてはいるが高価である(例えば, pco.flim™ serie, “Luminescence lifetime imaging camera”, PCO AG).

そこで, 光源として正弦波変調光を採用し, 位相変調法で蛍光寿命を算出する手法がよく用いられている。この手法では, 例えば, 正弦波一周内に互いに 90° 位相の異なる 4 つのゲートを用意し, 参照信号に対する位相差, もしくは振幅比から蛍光寿命値を算出する[53]。正弦波励起のため, 試料に対するダメージが少なく, 生体試料に対して多くの適用例の報告がある。しかし, 多成分試料に対応するためには複数個の変調周波数での測定が必用である。また, 単一成分であってもそれを確認するためには複数個の励起周波数での測定が必要となる。微弱蛍光や短い蛍光寿命種の試料に対しては, パルス光励起の場合と同様に対応が難しい。

一方, マルチプレックスイメージング法に基づいた蛍光寿命イメージング法が少数ながら提案されている。これは, すりガラスを用いて励起光の空間強度をランダムに変調する相関イメージング法である。走査型イメージングと同様に点検出器が利用できるが, 空間変調パターンの特性により測定時間が長く利用しづらい[54]。蛍光寿命イメージングの実施法の一つとして, 多成分試料に対して複数個の蛍光寿命値毎に, 相対成分比率の画像取得法が提案されている[53]。たとえば, 生体試料の詳細な分析に有用な手法であるが, しかし, 装置の分解時間や検出感度の限界から, このようなイメージングは困難であった。したがって, 多くの場合は視野内の局所位置ごとの平均蛍光寿命値のマッピングに留まっていた。

以上の FLIM の各手法を, 図 1.3 に, 横軸を蛍光寿命値, 縦軸を蛍光強度として整理した。

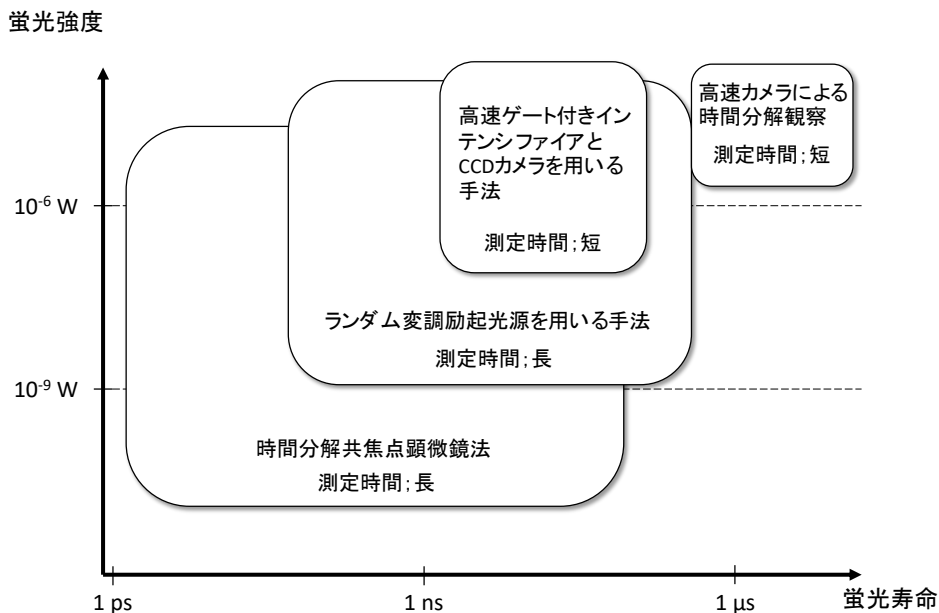


図 1.3 蛍光寿命イメージング法において測定速度と, 蛍光寿命および蛍光強度に依存した各手法の位置づけ。

1.3 研究目的

本論文では、以上のような技術的背景を踏まえ、次に示すような位相変調方式蛍光寿命測定法の改良を図った。

(1) 位相変調法の多成分蛍光試料への対応を目的とし、「位相変調励起光源を用いた位相変調方式蛍光寿命測定法」を初めて提案した。位相変調励起光源は、キャリア周波数 f_c を中心とし、位相変調周波数 f_m 間隔で複数の側波帯を有している。また、側波帯の数は最大位相偏移 $\Delta\phi$ によって変化させられる。これらの各々の側波帯を用いることで、複数の成分から成る蛍光試料の測定が可能となる。チャープ波形や周波数多重正弦波と比較して、位相変調波は容易に発生できる。

(2) 位相変調法の微弱光蛍光への対応と、分解時間の向上を目的とし、TC-SPC システムを導入した、光子計数型位相変調法(PC-PMF; photon-counting phase-modulation- fluorometer)を初めて提案した。これにより、フォトンカウンティングレベルの微弱蛍光に対応可能となる。さらに、検出器のアナログ帯域を超えた測定が可能となる。原理的には TAC-MCA ペアに依存した高い分解時間が得られ、サブナノ秒オーダーの蛍光寿命の試料が測定可能になる。ここでは、LD を最大 1.0 GHz で変調させる回路も自作した。

(3) 多成分試料に対して複数個の蛍光寿命値毎に相対成分比率の画像取得を目的として、アダマール変換型蛍光寿命イメージング法を提案した。マルチプレックスイメージング法の一つであるアダマールイメージング法により、PMT 等の点検出器が利用でき、高感度化、分解時間の向上が見込める。また、観察点の機械的走査無く測定が行える。さらに、チャープ波形を用いた位相変調法を導入することで、多成分試料へも対応させた。結果的に、信頼性の高い測定が可能となり、蛍光寿命値毎の相対成分比率の画像化が十分可能な SN 比が得られる。

(1)および(2)では、位相変調法の新たな測定法を提案した。これら提案手法の位置づけを表 1.4 および図 1.4 に追加した。また、表 1.5 で、励起光変調波形によりこれらの手法をまとめた。また、(3)は蛍光寿命イメージング法のための新たな手法の提案である。この位置づけを図 1.5 に示した。

表 1.4 位相変調法の分類における，本論文で提案する手法の位置づけ．下線部が提案する手法．

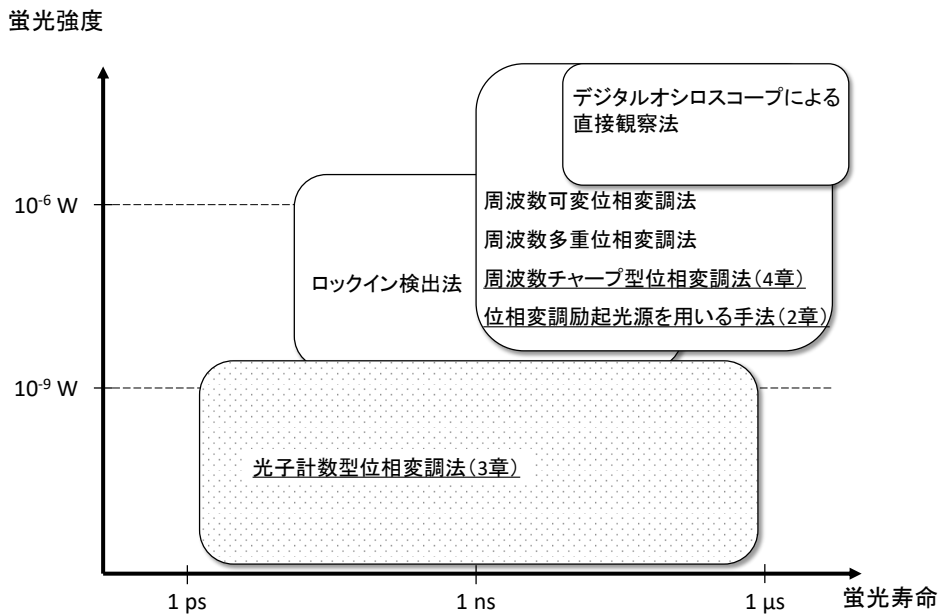
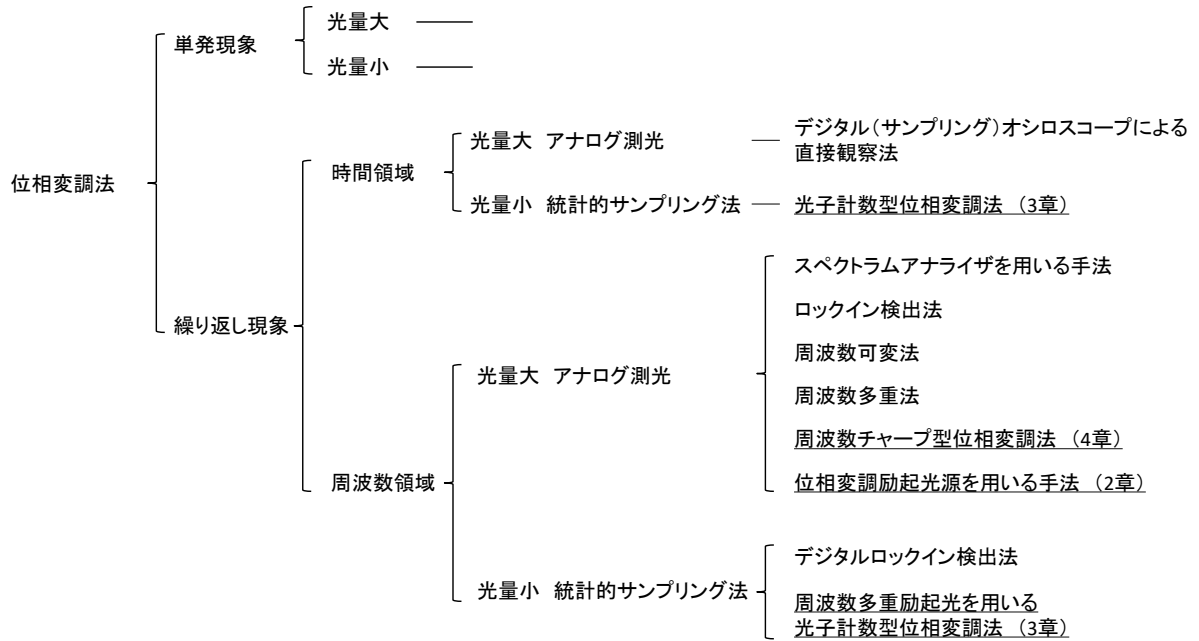
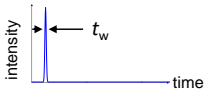
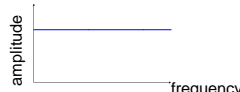
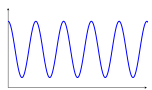
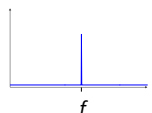
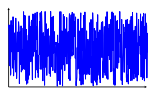
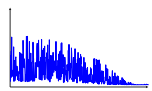
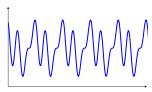
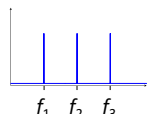
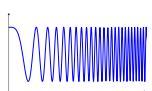
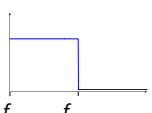
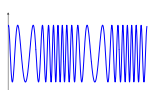
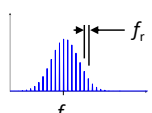


図 1.4 位相変調法における，提案手法の位置づけ．網掛部はデジタル測光に基づく手法で，それ以外はアナログ測光である．下線部が提案する手法．

表 1.5 位相変調法で用いられる励起波形の分類と提案手法の位置づけ、および多成分試料への対応可否。下線部が提案する部分。

励起波形	設定できる変数	時間波形	スペクトル	多成分試料への対応可否
パルス	λ, t_w, f_r			◎
正弦波	λ, f			△
ランダム	λ			○
周波数多重正弦波	λ, f_1, f_2, \dots			△
チャープ波 (4章)	$\lambda, f_{start}, f_{stop}, f_r$			◎
位相変調正弦波 (2章)	$\lambda, f_c, f_m, \Delta\phi$			○

λ : 励起波長, t_w : パルス幅, f_r : 繰り返し周波数, f : 変調周波数, f_1, f_2, \dots : 多重する周波数, f_{start} : 掃引開始周波数, f_{stop} : 掃引終了周波数, f_c : 搬送波周波数, f_m : 位相変調周波数, $\Delta\phi$: 最大位相推移

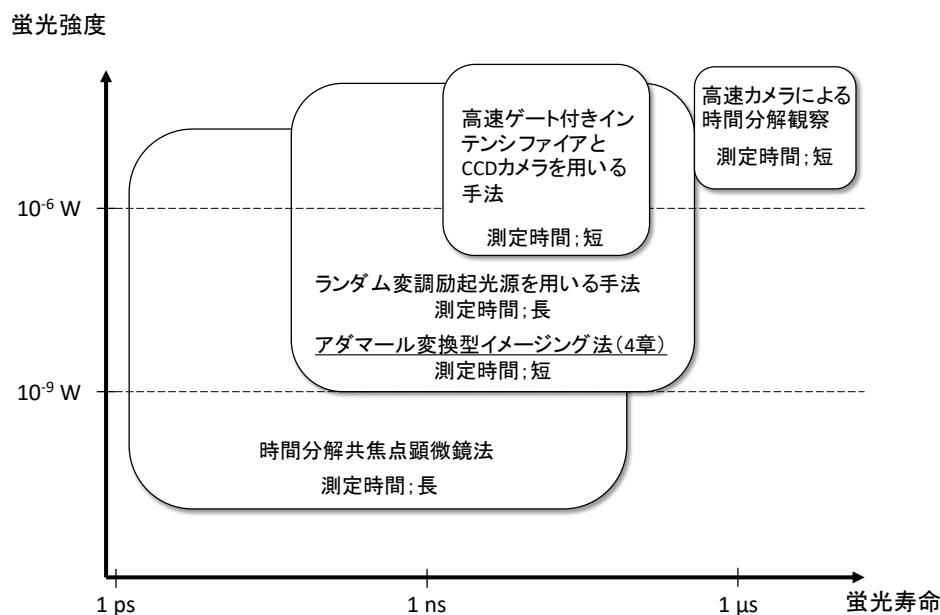


図 1.5 蛍光寿命イメージング法において測定速度と、蛍光寿命および蛍光強度に依存した各手法の位置づけ。下線部が提案する手法。

1.4 本論文の構成

本論文は第 1 章を含めた本文 5 章から構成されている。本論文の構成と各章のつながりを図式化したものを図 1.6 に示す。

第 1 章では従来の蛍光寿命計を概観し、本研究の意義と目的を述べた。

第 2 章では位相変調励起光源を用いた位相変調方式蛍光寿命計について述べる。提案する装置の動作原理と、実際に構築した装置を示す。さらに、実際に複数の蛍光種で構成されたサンプルを測定対象とした原理検証実験を行った結果を示す。

第 3 章では光子計数型位相変調方式蛍光寿命計について述べる。装置の動作原理と、実際に構築した装置の概要を示す。原理検証実験として、実際にサブナノ秒の蛍光寿命を有するサンプルの測定を行った結果を示す。

第 4 章ではアダマール変換型蛍光寿命イメージング装置について述べる。装置の動作原理、実際に構築した装置の概要を示す。さらに、原理検証実験として、蛍光寿命イメージングを行った結果を示す。

第 5 章では、本研究で得られた成果を総括し、今後の課題と将来の展望について述べ、本論文の結論とする。

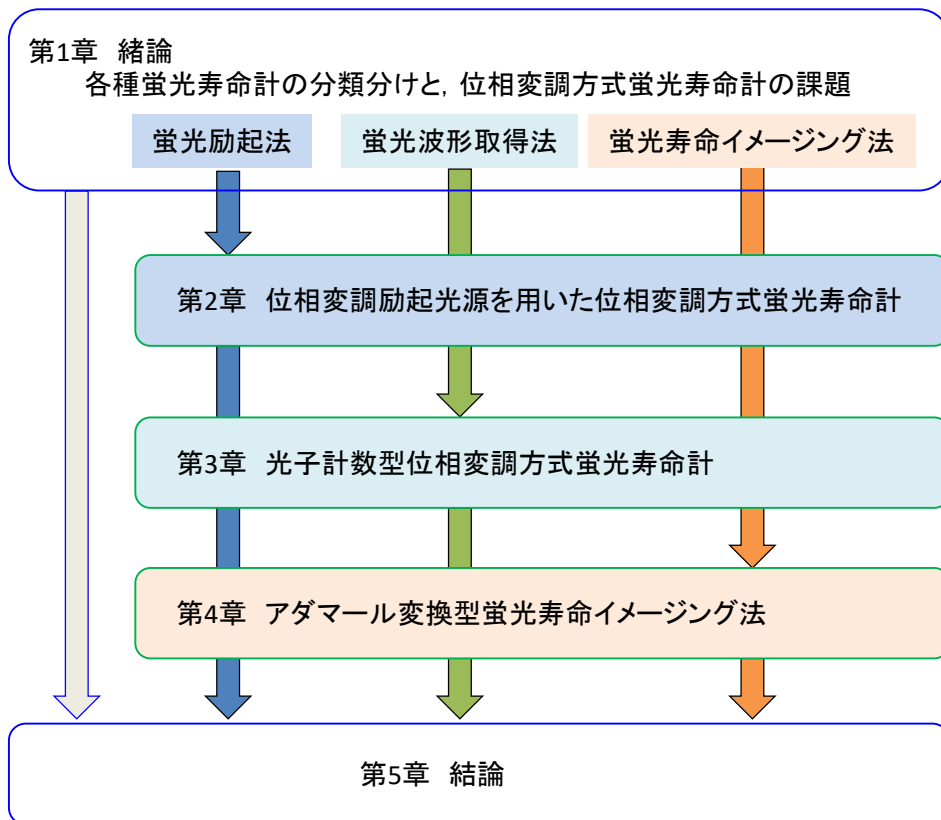


図 1.6 本論文の構成と各章のつながり

参考文献

- [1] 中原勝儼, 「日本分光学会測定法シリーズ 13 分光測定入門」, 第 2 刷, 学会出版センター, 1990 年.
- [2] 木下一彦, 御橋廣眞, 「日本分光学会測定法シリーズ 3 蛍光測定」, 第 5 刷, 学会出版センター, 1997 年.
- [3] J. R. Lakowicz, "Principle of Fluorescence Spectroscopy", Third edition, Springer, 2006.
- [4] D. V. O'Connor, D. Phillips, 平山鋭, 原清明, 「ナノ・ピコ秒の蛍光測定法と解析法」, 第 2 刷, 学会出版センター, 2000 年.
- [5] 日本分析化学会, 「微量光分析法」, 共立出版, 1960 年.
- [6] M. Y. Berezin, and S. Achilefu, "Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging", *Chem. Rev.*, **110**, No. 5, 2010, 2641-2684.
- [7] J. A. Levitt, D. R. Matthews, S. M. Ammer-Beg, and K. Suhling, "Fluorescence Lifetime and Polarization-Resolved Imaging in Cell Biology", *Curr. Opin. Biotechnol.*, **20**, No. 1, 2009, 28-36.
- [8] D. M. Jameson, and J. A. Ross, "Fluorescence Polarization/Anisotropy in Diagnostics and Imaging", *Chem. Rev.*, **110**, No. 5, 2010, 2685-2708.
- [9] M. Vincent, J. Gallay, and A. P. Demchenko, "Solvent Relaxation around the Excited State of Indole: Analysis of Fluorescence Lifetime Distributions and Time-Dependence Spectral Shifts", *J. Phys. Chem.*, **99**, 1995, 14931-14941.
- [10] W. R. Ware, S. K. Lee, G. J. Brant, and P. P. Chow, "Nanosecond Time - Resolved Emission Spectroscopy: Spectral Shifts due to Solvent - Excited Solute Relaxation", *J. Chem. Phys.*, **54**, 1971, 4729-4737.
- [11] J. R. Lakowicz, and G. Weber, "Quenching of fluorescence by oxygen. Probe for structural fluctuations in macromolecules", *Biochem.*, **12**, No. 21, 1973, 4161-4170.
- [12] J. R. Lakowicz, and G. Weber, "Quenching of protein fluorescence by oxygen. Detection of structural fluctuations in proteins on the nanosecond time scale", *Biochem.*, **12**, No. 21, 1973, 4171-4179.
- [13] G. Weber, "Rotational Brownian Motion and Polarization of the Fluorescence of Solutions", *Adv. Protein Chem.*, **8**, 1953, 415-459.
- [14] J. A. Lavitt, D. R. Matthews, S. M. Ameer-beg, and K. Suhling, "Fluorescence lifetime and polarization-resolved imaging in cell biology", *Curr. Opin. Biotechnol.*, **20**, 2009, 28-36.
- [15] M. R. Eftink, and L. A. Selvidge, "Fluorescence quenching of liver alcohol dehydrogenase by acrylamide", *Biochem.*, **21**, No. 1, 1982, 117-125.
- [16] W. J. O'Hagan, M. McKenna, D. C. Sherrington, O. J. Rolinski, and D. J. S. Birch, "MHz LED source for nanosecond fluorescence sensing", *Meas. Sci. Technol.*, **13**, No. 1, 2002, 84.
- [17] J. W. Borst, and A. J. W. G. Visser, "Fluorescence lifetime imaging microscopy in life sciences." *Meas. Sci. Technol.*, **21**, No.10, 2010, 102002.
- [18] 木下修一, 太田信廣, 永井健治, 南不二雄, "発光の事典 —基礎からイメージングまで—,

3.2.3 周波数領域法（位相法）", 朝倉書店, 2015年.

- [19] S. S. Brody, "Instrument to Measure Fluorescence Lifetimes in the Millimicrosecond Region", *Rev. Sci. Instrum.*, **28**, No. 12, 1957, 1021.
- [20] H. Merkelo, S. R. Hartman, T. Mar, and G. S. Singhal Govindjee, "Mode locked lasers: measurements of very fast radiative decay in fluorescent systems", *Science*, **164**, 1969, 301.
- [21] H. Inoue, M. Hida, N. Nakashima, and K. Yoshihara, "Picosecond fluorescence lifetimes of anthraquinone derivatives. Radiationless deactivation via intra- and intermolecular hydrogen bonds", *J. Phys. Chem.*, **86**, No. 16, 1982, 3184-3188.
- [22] N. S. Bergano, P. A. Jaanimagi, M. M. Salour, and J. H. Bechtel, "Picosecond laser-spectroscopy measurement of hydroxyl fluorescence lifetime in flames", *Opt. Lett.*, **8**, No. 8, 1983, 443-445.
- [23] R. G. Bennett, "Instrument to Measure Fluorescence Lifetimes in the Millimicrosecond Region", *Rev. Sci. Instrum.* **31**, 1960, 1275.
- [24] D. R. James, A. Siemiarzuck and W. R. Ware, "Stroboscopic optical boxcar technique for the determination of fluorescence lifetimes", *Rev. Sci. Instrum.*, **63**, 1992, 1710.
- [25] J. M. Harris, and F. E. Lytle, "Measurement of subnanosecond fluorescence decays by sampled single - photon detection", *Rev. Sci. Instrum.*, **48**, 1977, 1469.
- [26] C. H. Bamford, R. G. Compton, and C. F. H. Tipper, "Modern Methods in Kinetics", 1st edition, Elsevier Science, 1983.
- [27] U. P. Wild, A. R. Holzwarth, and H. P. Good, "Measurement and analysis of fluorescence decay curves", *Rev. Sci. Instrum.*, **48**, 1977, 1621.
- [28] M. G. Badea, and L. Brand, "Time-resolved fluorescence measurements", *Methods in Enzymol.*, **61**, 1979, 378-425.
- [29] T. Iwata, T. Uchida, and S. Minami, "A Nanosecond Photon-Counting Fluorimetric System Using a Modified Multichannel Vernier Chronotron", *Appl. Spectrosc.*, **39**, No.1, 1985, 101-109.
- [30] T. Araki, A. Yamada, and T. Uchida, "An intense, high - repetition nanosecond light source using a commercially available Xe - arc lamp", *Rev. Sci. Instrum.*, **64**, 1993, 1758.
- [31] F. V. Bright, and G. M. Hieftje, "Rapid-scanning frequency-domain fluorometer with picosecond time resolution", *Appl. Opt.*, **26**, No. 17, 1987, 3526-3529.
- [32] M. J. Wirth, and S. Chou, "Phase-resolved subnanosecond spectroscopy using the beat frequencies from mode-locked lasers", *Appl. Spectrosc.*, **42**, 1988, 483-486.
- [33] G. Laczko, I. Gryczynski, Z. Gryczynski, W. Wiczak, H. Malak, and J. R. Lakowicz, "A 10 - GHz frequency - domain fluorometer", *Rev. Sci. Instrum.* **61**, 1990, 2331.
- [34] T. Araki, and H. Misawa, "Light emitting diode - based nanosecond ultraviolet light source for fluorescence lifetime measurements", *Rev. Sci. Instrum.* **66**, 1995, 5469.
- [35] P. Herman, and J. Vecer, "Frequency Domain Fluorometry with Pulsed Light - Emitting Diodes", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1130**, 2008, 56-61.

- [36] S. Landgraf, "Use of ultrabright LEDs for the determination of static and time-resolved fluorescence information of liquid and solid crude oil samples", *J. biochem. biophys. methods*, **61**, No. 1, 2004, 125-134.
- [37] T. Iwata, T. Kamada, and T. Araki, "Phase-Modulation Fluorometer Using an Ultraviolet Light-Emitting Diode", *Opt. Rev.*, **7**, No. 6, 2000, 495-498.
- [38] T. Iwata, A. Hori, and T. Kamada, "Photon-counting phase-modulation fluorometer", *Opt. rev.*, **8**, No. 5, 2001, 326-330.
- [39] J. Sipior¹, Gary M. Carter², Joseph R. Lakowicz³ and Govind Rao³, "Blue light-emitting diode demonstrated as an ultraviolet excitation source for nanosecond phase-modulation fluorescence lifetime measurements", *Rev. Sci. Instrum.* **68**, 1997, 2666.
- [40] P. Harms, J. Sipior, N. Ram, G. M. Carter, and G. Rao, "Low cost phase-modulation measurements of nanosecond fluorescence lifetimes using a lock-in amplifier", *Rev. sci. instrum.*, **70**, No. 2, 1999, 1535-1539.
- [41] E. Gratton, and M. Limkeman, "A continuously variable frequency cross-correlation phase fluorometer with picosecond resolution", *Biophys. J.*, **44**, No. 3, 1983, 315-324.
- [42] E. Gratton, M. Limkeman, J. R. Lakowicz, B. P. Maliwal, H. Cherek, and G. Laczko, "Resolution of mixtures of fluorophores using variable-frequency phase and modulation data", *Biophys. J.*, **46**, No. 4, 1984, 479-486.
- [43] J. R. Lakowicz, G. Laczko, H. Cherek, E. Gratton, and M. Limkeman, "Analysis of fluorescence decay kinetics from variable-frequency phase shift and modulation data", *Biophys. J.*, **46**, No. 4, 1984, 463-77.
- [44] T. Iwata, "Proposal for Fourier-transform phase-modulation fluorometer", *Opt. rev.*, **10**, No. 1, 2003, 31-37.
- [45] T. Iwata, H. Shibata, and T. Araki, "Construction of a Fourier-transform phase-modulation fluorometer", *Meas. Sci. Technol.*, **16**, No. 11, 2005, 2351.
- [46] T. Iwata, A. Muneshige, and T. Araki, "Analysis of data obtained from a frequency-multiplexed phase-modulation fluorometer using an autoregressive model", *Appl. spectrosc.*, **61**, No. 9, 2007, 950-955.
- [47] J. M. Ramsey, G. M. Hieftje, and G. R. Haugen, "Time-resolved fluorimetry via a new cross-correlation method", *Appl. Opt.*, **18**, No. 12, 1979, 1913-1920.
- [48] E. B. Munster, and W. J. Gadella, "Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM)", *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.*, **95**, 2005, 143-175.
- [49] X. F. Wang, T. Uchida, and S. Minami, "A fluorescence lifetime distribution measurement system based on phase-resolved detection using an image dissector tube", *Appl. Spectrosc.*, **43**, 1989, 840-845.
- [50] I. Bugiel, K. Koonig, and H. Wabnitz, "Investigation of cells by fluorescence laser scanning microscopy with subnanosecond time resolution," *Lasers Life Sci.* **3**, No. 1, 1989, 47-53.
- [51] K. Taejoong, G. DaeGab, and L. Jun-Hee, "Enhancement of fluorescence confocal scanning microscopy lateral resolution by use of structured illumination", *Meas. Sci. Technol.*, **20**, No. 5, 2009, 055501.

[52] X. F. Wang, T. Uchida, D. M. Coleman, and S. Minami, "A two-dimensional fluorescence lifetime imaging system using a gated image intensifier", *Appl. Spectrosc.*, **45**, No. 3, 1991, 360-366.

[53] J. R. Lakowicz, and K. W. Berndt, "Lifetime - selective fluorescence imaging using an rf phase - sensitive camera", *Rev. Sci. Instrum.*, **62**, 1991, 1727.

[54] Q. S. Hanley, D. J. Arndt-Jovin, and T. M. Jovin, "Spectrally Resolved Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy", *Appl. Spectrosc.*, **56**, No. 2, 2002, 155-166.

2 章 位相変調励起光源を用いた位相変調方式蛍光寿命測定法

2.1 緒言

分析化学や、生化学、有機もしくは無機材料工学において、蛍光寿命の測定は蛍光試料の成分分析において重要な役割を果たす。例えば、スペクトル形状が類似する試料の識別に際し、蛍光寿命の値に基づいて 2 つあるいは複数の成分から構成される蛍光試料を分析することができる。

1 章でも述べたように、蛍光寿命測定法はパルス励起法と位相変調法の 2 種に大別できる [1]。パルス励起法では、蛍光試料の系のインパルス応答を測定する。この手法を採用すると直接蛍光減衰波形が取得できる。また、時間相関単一光子計数法(TC-SPC; time-correlated single-photon-counting)を採用するところによって、微弱な蛍光を高い精度で測定できる。これが、パルス励起法が一般的に用いられている主な理由である。しかし、強いパルス励起エネルギーは、試料へダメージを与える危険や非線形光学効果を引き起こす可能性もあるため、測定に際しては十分な配慮が必要となる。一方、位相変調法は、正弦波変調された励起光を用いて、試料の定常周波数応答を測定する。したがって、位相変調法は、生体試料の分析に有用と考えられる。しかし、一度の測定で単一の変調周波数の応答しか得られない。複数の成分で構成される試料の測定には、複数の変調周波数を逐次切り替えて測定を行う必要がある。この問題を解決するために、励起光源として高繰り返し周波数モードロックレーザを利用した位相変調法が提案されている。モードロックレーザによってもたらされる高速繰り返し周波数の高次の高調波は、多成分試料の測定に利用できる。しかし、強いパルス励起エネルギーを試料へ与える恐れは依然として解消されていない。また、このようなシステムは、実験室で利用する場合に適するが、生体試料のスクリーニング等の実用目的では利用しづらい。システムが大型化し、高コストであり、またレーザの調整やメンテナンスが複雑であるためである。なおかつ、波長選択の自由度も高くはない。

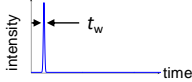
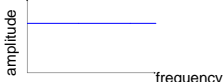

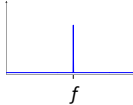
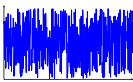
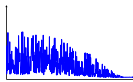
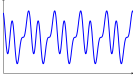
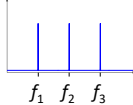
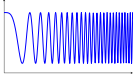
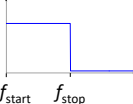
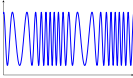
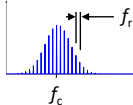
以上のような背景に対し、近年の紫外または青色 LED や LD の登場は、システムの構成を見直す機会となったと思われる。正弦波変調励起光源を用いる従来型の位相変調法に、励起光源として LED や LD を利用することで、容易かつ安価にシステムを構築することができる [2-7]。LED や LD の発光波長は固定されているが、様々な発光波長のものが市販されており、試料の吸収体と一致するものを適宜選択可能である。したがって、従来型の位相変調法でも、生体試料のスクリーニングといった目的に対しては有用である。しかし、実際の応用に際して、次の 2 つの問題がある。(i) 位相変調法の使用は量子収率が高い蛍光試料に制限され、また(ii) 試料の蛍光減衰波形が単一指数関数で表される場合でしか利用できない。前者の問題は、3 章で述べる光子計数型位相変調法を導入することによって緩和できる。後者の問題に対して、位相変調法による複数の変調周波数における同時測定が提案されている [8-22]。また、LED を励起光源として使用したフーリエ変換型位相変調法や、周波数多重方式位相変調法も提案されている [23-25]。しかし、これらの手法ではチャープ波

形や、周波数多重正弦波を必要とし、その波形生成が幾分面倒であり、実際の分析装置として適用しづらい場合もある。

以上のような背景において、本章では位相変調励起光源を用いた位相変調方式蛍光寿命測定法を提案する。位相変調励起光源では、キャリア周波数 f_c を中心としたその上下の周波数帯域に変調周波数 f_m の間隔で多数の側波帯が得られる。これら多数の側波帯を用いることで、複数の成分から成る蛍光試料の測定が可能となる。このような位相変調波は、市販の位相同期回路(PLL; phase locked loop)を利用することで容易に得られる。表 2.1 は、励起光変調波形に着目し従来のパルス励起光源も含めて、位相変調励起光源を用いた手法の位置づけを示したものである。上述の装置構成の簡便さに加えて、多成分試料へ適用可能であることから魅力的な手法であることが直観的に理解できる。

本章では、原理検証を目的として、任意波形発生器によって位相変調波を生成し、デジタルオシロスコープで波形を記録するという、非常に簡便な位相変調方式蛍光寿命計の構成と実験結果について述べる。装置の基礎性能評価のために、3種類の無機蛍光ガラス、1 μM ローダミン 6G エタノール溶液と 1 μM クマリン 152 エタノール溶液の混合溶液の蛍光寿命測定を行った。

表 2.1 位相変調法で用いられる励起波形の分類と多成分試料への対応の可能性.

励起波形	設定できる変数	時間波形	スペクトル	多成分試料への対応可否
パルス	λ, t_w, f_r			◎
正弦波	λ, f			△
ランダム	λ			○
周波数多重正弦波	λ, f_1, f_2, \dots			△
チャープ波 (4章)	$\lambda, f_{start}, f_{stop}, f_r$			◎
位相変調正弦波 (2章)	$\lambda, f_c, f_m, \Delta\phi$			○

λ : 励起波長, t_w : パルス幅, f_r : 繰り返し周波数, f : 変調周波数, f_1, f_2, \dots : 多重する周波数, f_{start} : 掃引開始周波数, f_{stop} : 掃引終了周波数, f_c : 搬送波周波数, f_m : 位相変調周波数, $\Delta\phi$: 最大位相推移

2.2 位相変調励起光源を用いた位相変調法の動作原理

図 2.2 に、位相変調励起光源を用いた位相変調法の動作概念図を示す。図 2.2(a)に示す位相変調励起波形 $e(t)$ は、時刻 t の関数として、

$$e(t) = A \cos\{2\pi f_c t + \Delta\phi \cos(2\pi f_m t)\}, \quad (2.1)$$

と表される。ここで、 f_c はキャリア周波数、 f_m は位相変調周波数、および $\Delta\phi$ は最大位相偏移である。このとき、蛍光波形は図 2.2(b)のように、励起光波形と蛍光減衰波形のコンボリューションとして表される。これら時間波形を測定した後に、計算機上でフーリエ変換した後に解析を行う。図 2.2(c)および(d)は、励起光波形の振幅スペクトル $A_1(f)$ と位相スペクトル $\theta_1(f)$ を表し、また図 2.2(e)および(f)は、蛍光波形の振幅スペクトル $A_2(f)$ と位相スペクトル $\theta_2(f)$ を表す。(c)および(e)から分かるように、変調波形はキャリア周波数 f_c を中心とし、位相変調周波数 f_m 間隔で複数の側波帯成分を有している。また、側波帯の数は $\Delta\phi$ によって変化させられる。これらの各々の側波帯に対して、励起光と蛍光波形の振幅および位相スペクトルから、変調比 $M(f) = A_2(f)/A_1(f)$ 、および位相差 $\alpha(f) = \theta_2(f) - \theta_1(f)$ が測定できる。したがって、それぞれの周波数で蛍光寿命値が同時に算出できる。ここで、振幅が小さい側波帯の位相の値はノイズの影響を受けやすいため、しきい値を設けて破棄する。その閾値を(c)および(e)中に破線で示す。こうして、励起光および蛍光のスペクトルの位相値の差をとることで離散的な位相差スペクトル $\theta(f)$ を得る。これを(g)に示す。試料の蛍光減衰波形を単一指数関数と仮定する場合、蛍光寿命値 τ は $\theta(f)$ から $\tan \theta(f) = 2\pi f \tau$ の関係式を用いて算出できる。ここで f は励起光変調周波数である。多成分試料であっても、周波数領域法を適用することで蛍光寿命が算出できる。

本手法によって正確な測定を行うためには、蛍光寿命に応じた最適な f_c 、 f_m 、および $\Delta\phi$ の設定が必要である。 $\tan \theta(f) = 2\pi f \tau$ から、次のような式が導出できる。

$$\frac{\Delta\tau}{\tau} = \frac{2\Delta\theta}{\sin 2\theta}. \quad (2.2)$$

測定に適した変調周波数 f_{opt} は、 $\Delta\tau/\tau$ が最小となる場合であり、そのとき得られる位相差は $\theta = \pi/4$ となる。したがって、位相変調波形の変数を設定する場合、試料のたまかな蛍光寿命が分かっているならば f_{opt} の近傍に f_c を設定するとよい。蛍光寿命が未知の場合には、広い周波数帯域を測定できるように、 f_m を大きく設定するか、 $\Delta\phi$ を大きく設定することで対応できる。ただし、 $\Delta\phi$ を大きく設定すると広い周波数帯域に多数の側波帯が現れるが、その側波帯 1 つ当たりの振幅は小さくなることに留意しなければならない。したがって、適切にしきい値を設けて、SN 比が低い周波数領域を破棄する必要がある。ノイズにも依存するが、経験的には、 $f_m = f_c/10$ と設定し $\Delta\phi$ を 2π と設定することで、 f_c を中心とした 12 本の側波帯

が得られ、 $2f_c$ までの周波数帯域に対応できる。振幅スペクトルのピーク値に対して10%の閾値レベルを設定することで、これらの周波数において位相測定が可能である。

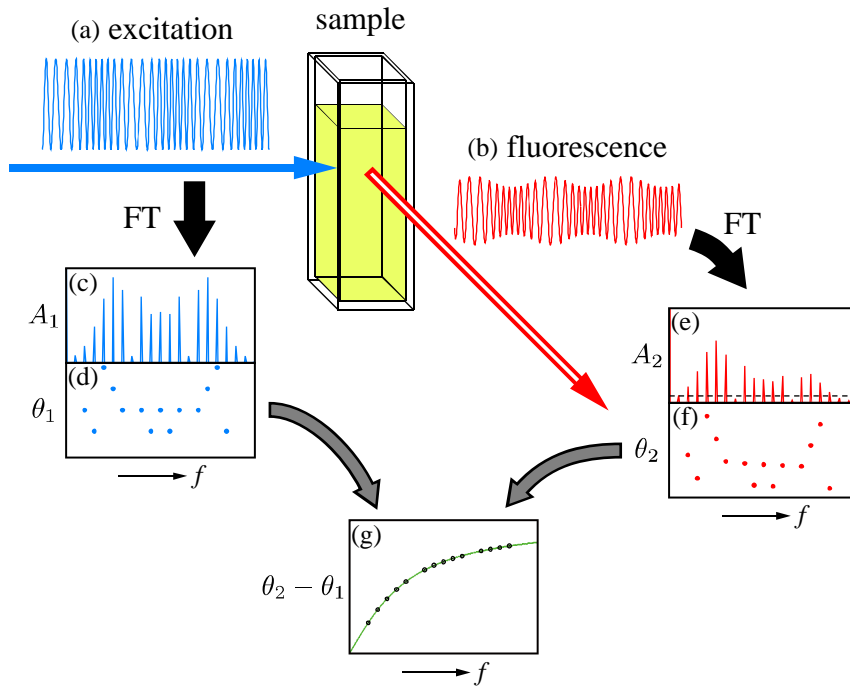


図 2.1 位相変調励起光源を用いた位相変調方式蛍光寿命測定法の原理の説明図.

2.3 数値シミュレーション

提案手法の原理の正当性を検証するために、多成分試料の蛍光寿命測定を想定した数値シミュレーションを行った。図 2.2(a)に、位相変調励起波形を示す。ここで、 $f_c = 100$ MHz, $f_m = 10$ MHz, $\Delta\phi = 2\pi$ とした。波形の測定条件は、サンプリング周波数 $f_s = 25$ GHz (サンプリング周期 $\Delta t = 40$ ps), サンプリングレコード長 $N = 10,000$ と設定した。図 2(b)に蛍光波形を示す。これは、位相変調励起波形と蛍光減衰波形をコンボリューションしたものである。蛍光減衰波形は 2 成分を仮定し、

$$f(t) = a_1 \exp(-t/\tau_1) + a_2 \exp(-t/\tau_2), \quad (2.3)$$

とした。ここで、 $\tau_1 = 10.0$ ns, $\tau_2 = 1.0$ ns, および $a_2/a_1 = 5.0$ とした。励起光と蛍光には、それぞれ独立した $1\sigma = 5\%$ のガウシアンノイズを重畳した。(a)のフーリエ変換により得られた振幅スペクトルおよび位相スペクトルを、それぞれ図 2(c)および(d)に示す。同様に、(b)のフーリエ変換により得られた振幅スペクトルおよび位相スペクトルを、それぞれ図 2(f)および(g)に示す。図 2(e)は、(c)に示す 10%のしきい値により(d)から選択した各変調周波数における位相を示している。同様に、図 2(h)は、(f)に示す 10%のしきい値により(g)から選択した、各変調周波数における位相を示している。図 2(i)は、(e)および(h)から算出された位相差スペクトルを示している。ここで、図中の実線は、2 成分試料と仮定しフィッティングにより得た位相曲線である。以上の数値シミュレーションを、独立したノイズ源を用いて 30 回行った。その結果、蛍光寿命の推定値として $\tau_1 = 9.9 \pm 0.1$ ns, $\tau_2 = 1.0 \pm 0.1$ ns, および $a_2/a_1 = 4.9 \pm 0.1$ が得られた。励起波形および蛍光波形の両者に独立した 5%-ガウシアンノイズを重畳している状況であっても、良好に測定が行えることを確認した。

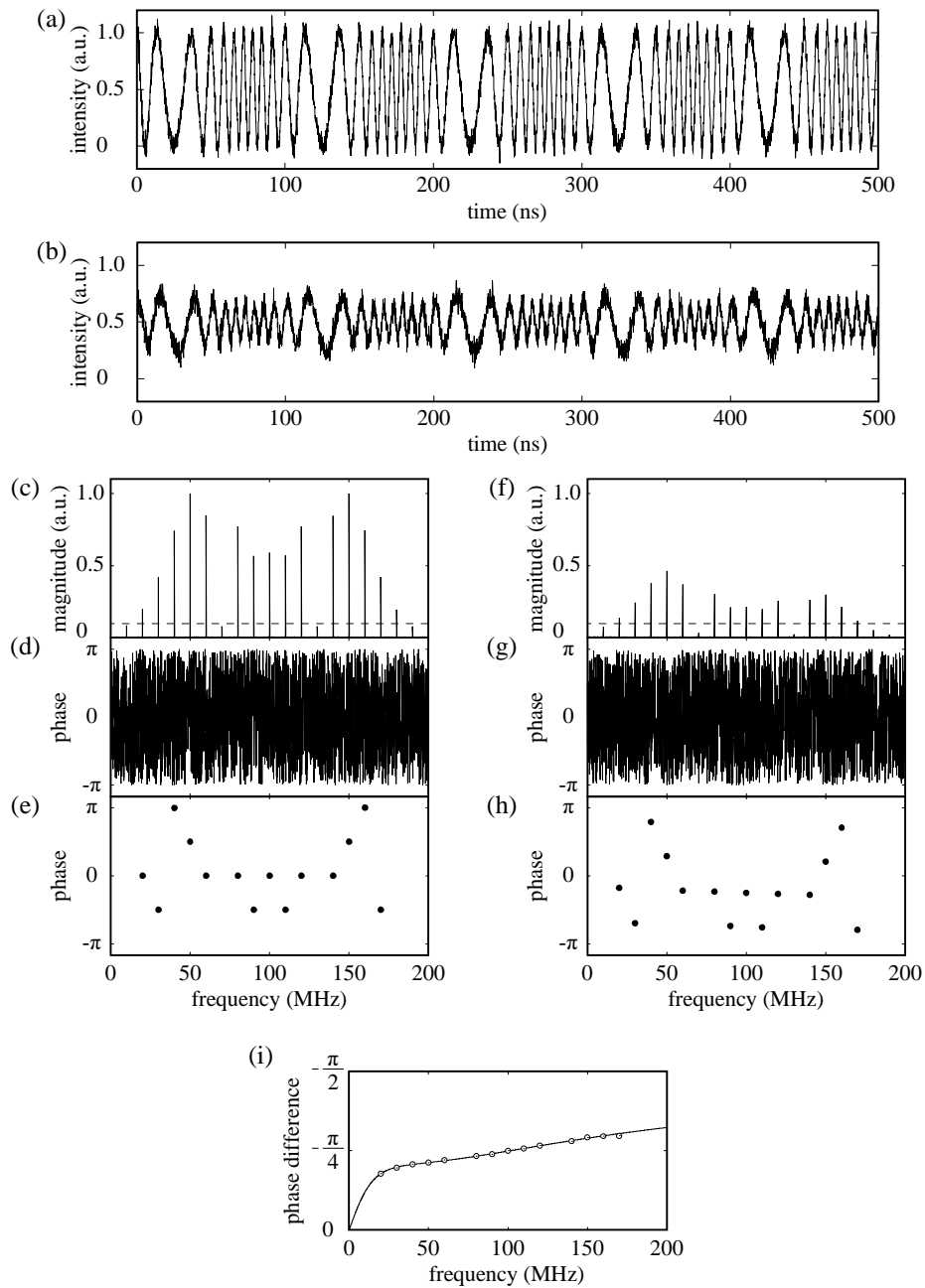


図 2.2 位相変調励起光源を用いた位相変調法の数値シミュレーション結果. (a)位相変調励起光波形. ここで, $\Delta\phi = 2\pi$, $f_c = 100$ MHz, $f_m = 10$ MHz, $f_s = 25$ GHz, $N = 10,000$ とした. (b)蛍光波形. ここで, $\tau_1 = 10.0$ ns, $\tau_2 = 1.0$ ns, $a_2/a_1 = 5.0$ とした. (a)および(b)には, それぞれ独立した 5% のガウシアンノイズを重畳した. (c)および(d)は, (a)をフーリエ変換することで得られた振幅スペクトルと位相スペクトルである. (f)および(g)も同様に, (b)から得られた振幅スペクトルと位相スペクトルである. (e)および(h)は, (d)および(g)から選択した変調周波数に対する位相である. 位相を選択するにあたり用いたしきい値は, (c)および(f)中に点線で示している. (i)位相差スペクトル. 実線は, $\tau_1 = 10.0$ ns, $\tau_2 = 1.0$ ns, $a_2/a_1 = 5.0$ における位相差を表している.

2.4 装置構成

図 2.3 に、位相変調励起光源を用いた位相変調方式蛍光寿命計のブロック図を示す。また、図 2.4 に、構築した装置の外観を示す。性能の実証のために、2つの基本的な測定実験を行った。第一の実験では、蛍光ガラスであるルミラス B, ルミラス G9, ルミラス R7(住田光学ガラス)の蛍光寿命測定を行った。図 2.5 に、それらの蛍光スペクトルを示す。吸収ピーク波長と蛍光ピーク波長は、ルミラス B は 353 nm および 413 nm, ルミラス G9 は 315 nm および 543 nm, ルミラス R7 は 393 nm および 613 nm である。本測定装置では、試料の吸収波長を考慮し、紫外 LED ($\lambda = 365$ nm, NSHU590E, 日亜化学工業)を励起光源として用いた。紫外 LED は 15 mA の DC バイアス電流で駆動し、任意波形ジェネレータ(AWG 520, テクトロニクス)から得られた 20 mA_{pp} をその DC バイアス電流に重畳することで位相変調させた。試料表面での励起光の平均パワーは約 10 nW であった。蛍光の検出に際しては、光電子増倍管(PMT, 7400U, 浜松ホトニクス)の前段に長波長透過フィルタ(LPF)を挿入した。LPF としては、ルミラス B の場合は SCF-50S-42L (カットオフ波長 420 nm, シグマ光機), ルミラス G9 の場合は SCF-50S-48Y (カットオフ波長 480 nm, シグマ光機), ルミラス R7 の場合は SCF-50S-58O (カットオフ波長 580 nm, シグマ光機)を用いた。PMT の出力信号は直接デジタルオシロスコープ(TDS5054B, テクトロニクス)に導入させた。ここで、サンプルレコード長 $N = 5,000$ とし、オシロスコープ上で 1,000 回の積算を行った。なお、サンプリング周波数は、測定時間窓内に位相変調波形が 20 周期分得られるように適宜設定した。位相変調波形のパラメータのうち、(f_c, f_m)は各試料毎に 2 種の条件を設定し、一方で $\Delta\phi$ は 2π に固定した。 (f_c, f_m) の条件は、ルミラス B において(i) (50 kHz, 5.0 kHz)と(ii) (500 kHz, 50 kHz), ルミラス G9 において(i) (500 Hz, 50 Hz)と(ii) (5.0 kHz, 500 Hz), ルミラス R7 において(i) (500 Hz, 50 Hz)と(ii) (5.0 kHz, 500 Hz)とした。なお、励起光変調波形を取得する場合には、試料の位置にアルミニウム製の拡散板を設置した。

第二の実験では、エタノール中の 1 μ M ローダミン 6G, エタノール中の 1 μ M クマリン 152, および 2 成分試料を想定し 2 つの溶液を体積比 1:1 で混合した溶液について蛍光寿命測定を行った。混合溶液において再吸収や FRET 等への配慮が必要であるが、溶液の濃度を十分に低くすることでそれらの影響を排除している。図 2.6 に、それらの蛍光スペクトルを示す。ローダミン 6G の吸収および蛍光のピーク波長はそれぞれ 531 nm と 553 nm であり、またクマリン 152 ではそれぞれ 400 nm および 505 nm であった。これらの測定においては、励起光源として青紫色 LD ($\lambda = 405$ nm, NDV4313, 日亜化学工業)を用いた。その駆動条件は、70 mA の DC バイアス電流に 40 mA_{pp} の振幅の位相変調波を重畳させた。試料セル部での励起光の平均パワーは約 65 μ W であった。LPF は、クマリン 152 の測定では SCF-50S-48L (カットオフ波長 480 nm, シグマ光機), ローダミン 6G と混合溶液の測定では SCF-50S-42L (カットオフ波長 420 nm, シグマ光機)を用いた。蛍光波形測定条件は、レコード長 $N=100,000$, 積算回数 10,000 と設定した。位相変調波形のパラメータは、 $\Delta\phi=2\pi$ とし、また(f_c, f_m)は、(i) (20 MHz, 2.0 MHz) および (ii) (100 MHz, 10 MHz) と、2 種類の条件を設定した。

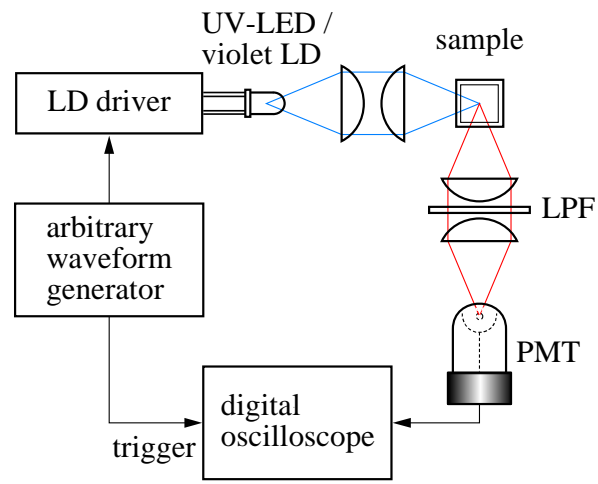
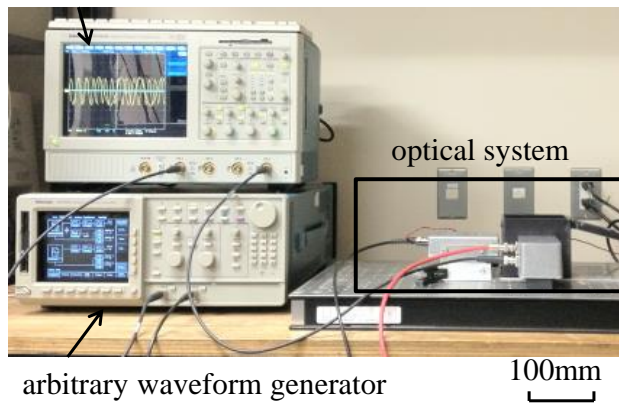


図 2.3 位相変調励起光源を用いた位相変調方式蛍光寿命計のブロック図.

(a) measurement system
digital oscilloscope



(b) optical system

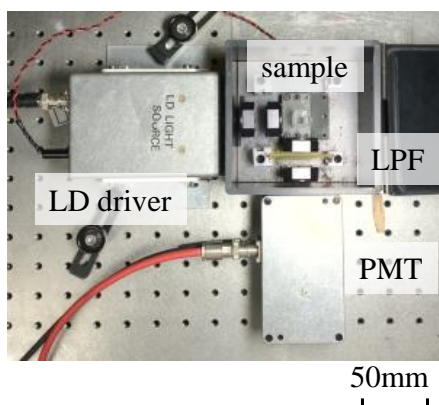


図 2.4 測定装置の外観. (a)装置全体, (b)光学系.

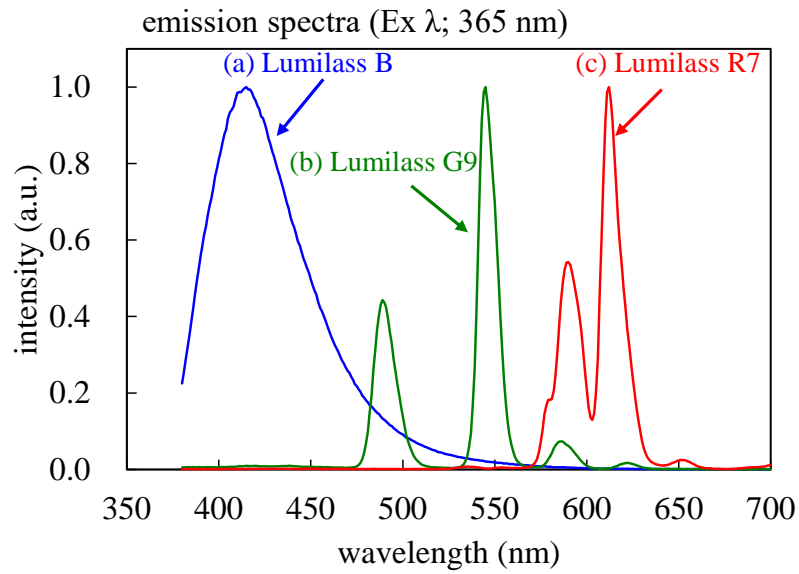


図 2.5 蛍光ガラスの蛍光スペクトル. (a)ルミラス B, (b)ルミラス G9, (c)ルミラス R7.

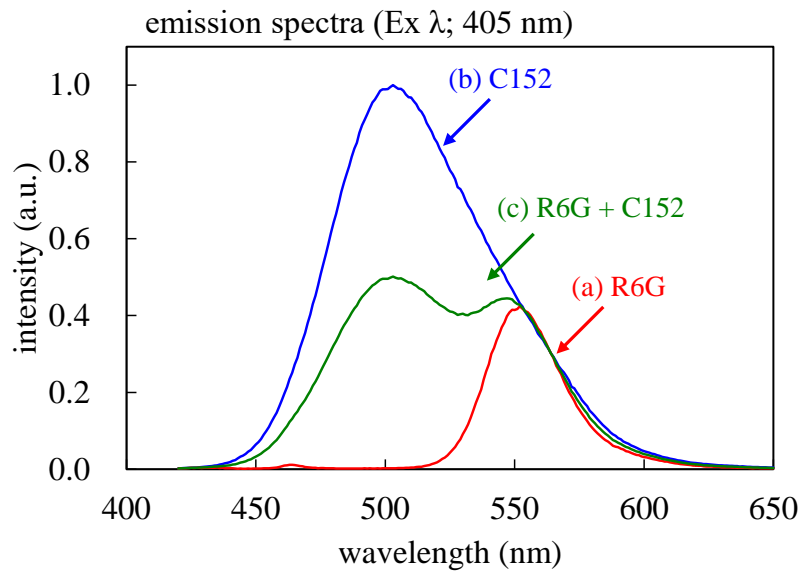


図 2.6 多成分試料を想定した蛍光寿命測定に用いた蛍光試料の蛍光スペクトル. (a) $1 \mu\text{M}$ ローダミン 6G エタノール溶液, (b) $1 \mu\text{M}$ クマリン 152 エタノール溶液, (c) は(a)および(b)を体積比 1:1 で混合した溶液.

2.5 実験結果および考察

2.5.1 蛍光ガラスの蛍光寿命測定

図 2.7 に、ルミラス B, ルミラス G9, およびルミラス R7 の測定で得られた位相差, 振幅比スペクトルを示す. 図中の実線は, 各々の測定結果からフィッティングによって得られた位相差スペクトルと振幅スペクトルである. また, 装置構成の節で述べたように, 各試料において 2 種類の条件で測定を行ったが, 条件(i)での測定結果を白丸で, 条件(ii)の結果を黒丸で示している. ルミラス B とルミラス R7 においては, 単一指数関数減衰の仮定のもとで推定された蛍光減衰波形は, それぞれ $792 \pm 0.1 \text{ ns}$ と $2.15 \pm 0.01 \text{ ms}$ となった. 一方, ルミラス G7 においては, 単一指数関数減衰では近似できず, 図 2.4(c)に示すように 2 つの指数減衰関数の和として良く近似できた. このときの蛍光寿命の推定値は, $\tau_1 = 2.31 \pm 0.01 \text{ ms}$, $\tau_2 = 35.5 \pm 0.1 \text{ ns}$ で, それらの振幅比は $a_2/a_1 = 850 \pm 10$ となった. 以上の結果は, 複数のいずれの測定条件においての結果と同様となった. 一方, これら蛍光ガラスの組成については十分な情報がメーカーから提供されておらず, 蛍光種およびその成分数についての詳細はなお不明である. しかしメーカーが提示している試料の蛍光減衰波形とは差異がない事を確認している[26].

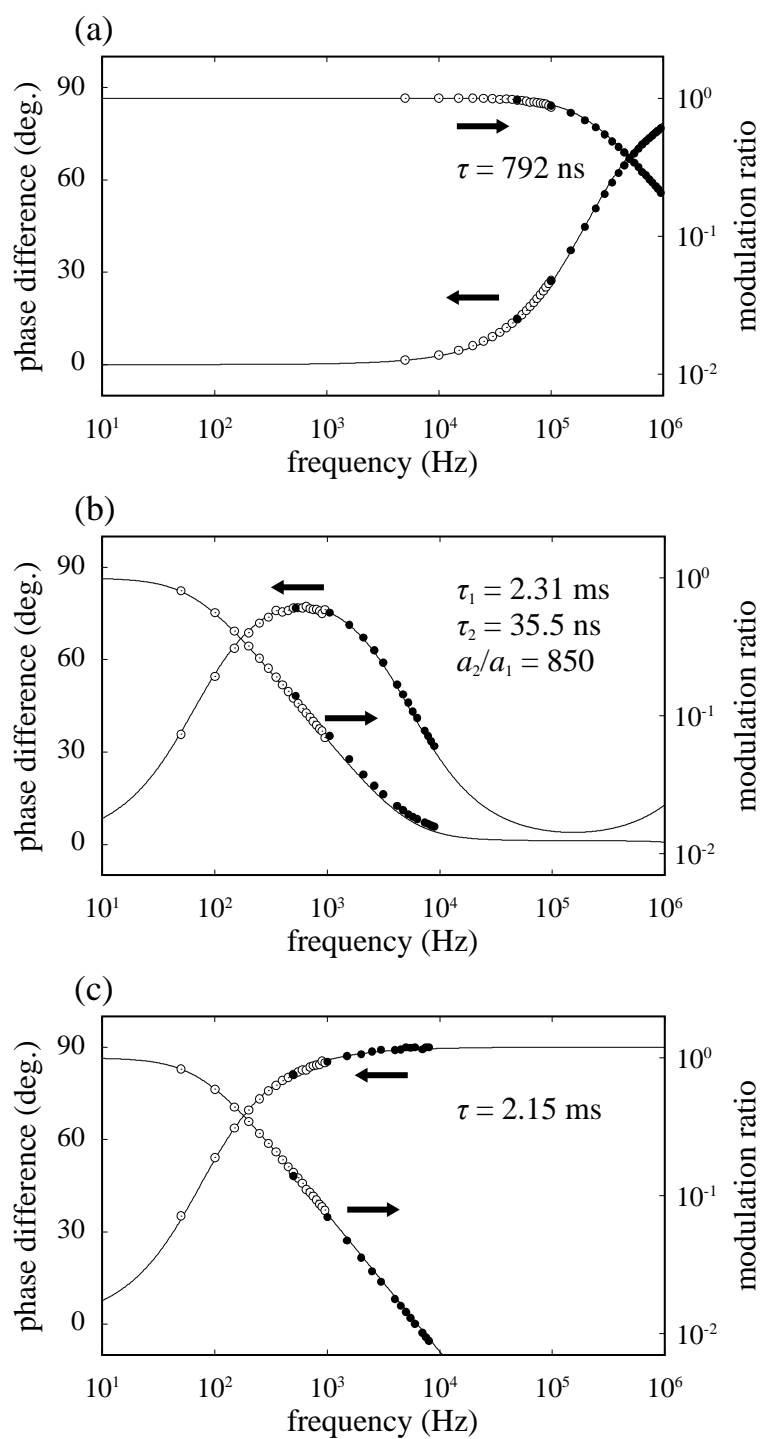


図 2.7 蛍光ガラスの振幅比および位相差スペクトルの測定結果. それぞれ, (a)ルミラス B, (b)ルミラス G9, (c)ルミラス R7 の結果を示す. 測定値は, (f_c, f_m) の条件に応じて, 条件(i)を白丸, 条件(ii)を黒丸で示す. また, 図中の実線は, 振幅比および位相差スペクトルの計算値を表す.

2.5.2 クマリン 152 およびローダミン 6G 混合溶液の蛍光寿命測定

図 2.8 に, (a)エタノール中の 1 μ M ローダミン 6G, (b)エタノール中の 1 μ M クマリン 152, および(c)混合溶液の変調周波数に対する位相差の測定結果を示す. 図中の実線は, フィッティングにより得られた位相曲線を示している. このとき, それぞれの蛍光寿命は, (a) 4.0 ± 0.1 ns, (b) 1.6 ± 0.1 ns, および(c) $\tau_1 = 4.0 \pm 0.1$ ns, $\tau_2 = 1.6 \pm 0.1$ ns, および $a_2/a_1 = 11 \pm 0.5$ となった. ローダミン 6G およびクマリン 152 の蛍光寿命値は, 既報の文献と良く一致した [27, 28]. さらに, 以上の値を定常蛍光スペクトル測定の結果と突き合わせて考察する. 図 2.6 に示した蛍光スペクトルの強度は $a_i \tau_i$ に比例する. ここで, τ_i は成分 i の蛍光寿命であり, a_i は成分 i の初期振幅である. 図 2.6 のスペクトル測定結果から, クマリン 152 エタノール溶液とローダミン 6G エタノール溶液のスペクトルの強度比は約 4.0 である. 位相変調法により得た結果は $a_2 \tau_2 / \tau_1 a_1 = 4.4$ であり, さほど大きな相違が無く, 提案装置が良好に動作していると考えられる.

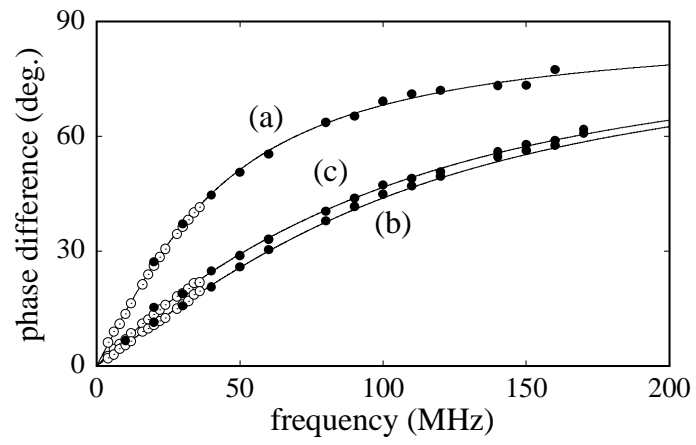


図 2.8 位相差スペクトルの測定結果. (a)ローダミン 6G, (b)クマリン 152, (c)ローダミン 6G とクマリン 152 の混合溶液.

2.6 結言

位相変調励起光源を用いた位相変調方式蛍光寿命測定法を提案した。本手法においては、位相変調励起光源が有する複数の側波帯を蛍光寿命測定に適用する。その結果、一回の測定で多成分試料への対応が可能となる。また、たとえ単一成分の試料であったとしても、その蛍光減衰成分が単一成分であるどうか確認するといった目的に対しても、本手法は利用価値がある。

装置的には、原理検証のため、位相変調励起波形を任意波形ジェネレータで発生させ、蛍光波形を記録するためにデジタルオシロスコープを用いたが、機器組込みを考える場合には、波形の変復調には市販の PLL-IC を使用すればよい。提案した位相変調方式蛍光寿命計は構築しやすく、操作が簡単であるため、蛍光試料のスクリーニングに有用である。また、本提案法は位相変調励起波形を採用したが、周波数変調(FM; frequency modulation)を用いてもよい。両者は本質的には同一の変調法であり、得られる側波帯の分布も同等である。

参考文献

- [1] J. R. Lakowicz, "Principle of Fluorescence Spectroscopy", Third edition, Springer, 2006.
- [2] J. Sipior¹, Gary M. Carter², Joseph R. Lakowicz³ and Govind Rao³, "Blue light-emitting diode demonstrated as an ultraviolet excitation source for nanosecond phase-modulation fluorescence lifetime measurements", *Rev. Sci. Instrum.* **68**, 1997, 2666.
- [3] P. Harms, J. Sipior, N. Ram, G. M. Carter, and G. Rao, "Low cost phase-modulation measurements of nanosecond fluorescence lifetimes using a lock-in amplifier", *Rev. sci. instrum.*, **70**, No. 2, 1999, 1535-1539.
- [4] T. Iwata, T. Kamada, and T. Araki, "Phase-Modulation Fluorometer Using an Ultraviolet Light-Emitting Diode", *Opt. Rev.*, **7**, No. 6, 2000, 495-498.
- [5] H. Szmackinski and Q. Chang, "Micro- and Sub-nanosecond Lifetime Measurements Using a UV Light-Emitting Diode", *Appl. Spectrosc.*, **54**, No. 1, 2000, 106-109.
- [6] P. Herman, and J. Vecer, "Frequency Domain Fluorometry with Pulsed Light - Emitting Diodes", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1130**, 2008, 56-61.
- [7] T. Iwata, A. Hori, and T. Kamada, "Photon-Counting Phase-Modulation Fluorometer", *Opt. Rev.*, **8**, No. 5, 2001, 326-330.
- [8] R. D. Spencer and G. Weber, "Measurements of Subnanosecond Fluorescence Lifetimes with a Cross-Correlation Phase Fluorometer", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **158**, No. 1, 1969, 361-376.
- [9] H. Merkelo, S. R. Hartman, T. Mar, and G. S. Singhal Govindjee, "Mode-Locked Lasers: Measurements of Very Fast Radiative Decay in Fluorescent Systems", *Science*, **164**, No. 3877, 1969, 301-302.
- [10] M. J. Wirth and S. Chou, "Phase-Resolved Subnanosecond Spectroscopy using the Beat Frequencies from Mode-Locked Lasers", *Appl. Spectrosc.*, **42**, No. 3, 1988, 483-486.
- [11] F. V. Bright, C. A. Monig, and G. M. Hieftje, "Rapid Frequency-Scanned Fiber-Optic Fluorometer Capable of Subnanosecond Lifetime Determinations", *Anal. Chem.*, **58**, No. 14, 1986, 3139-3144.
- [12] F. V. Bright, C. A. Monig, and G. M. Hieftje, "Rapid-scanning frequency-domain fluorometer with picosecond time resolution", *Appl. Opt.*, **26**, No. 17, 1987, 3526-3529.
- [13] F. V. Bright, C. A. Monig, and G. M. Hieftje, "A new dual-channel frequency-domain fluorometer for the determination of picosecond rotational correlation times", *Appl. Spectrosc.* **42**, No. 2, 1988, 272-276.
- [14] M. Hauser and G. Heidt, "Phase fluorometer with a continuously variable frequency", *Rev. Sci. Instrum.*, **46**, No. 4, 1975, 470-471.
- [15] H. P. Haar and M. Hauser, "Phase fluorometer for measurement of picosecond processes", *Rev. Sci. Instrum.*, **49**, No. 5, 1978, 632-633.
- [16] G. Ide, Y. Engelborghs, and A. Persoons, "Fluorescence lifetime resolution with phase

- fluorometry", *Rev. Sci. Instrum.*, **54**, No. 7, 1983, 841-844.
- [17] E. Gratton and M. Limkeman, "A continuously variable frequency cross-correlation phase fluorometer with picosecond resolution", *Biophys. J.*, **44**, No. 3, 1983, 315-324.
- [18] E. Gratton, M. Limkeman, J. R. Lakowicz, B. P. Maliwal, H. Cherek, and G. Laczko, "Resolution of mixtures of fluorophores using variable-frequency phase and modulation data", *Biophys. J.*, **46**, No. 4, 1984, 479-486.
- [19] J. R. Lakowicz, G. Laczko, H. Cherek, E. Gratton, and M. Limkeman, "Analysis of fluorescence decay kinetics from variable-frequency phase shift and modulation data", *Biophys. J.*, **46**, No. 4, 1984, 463-477.
- [20] B. A. Feddersen, D. W. Piston, and E. Gratton, "Digital parallel acquisition in frequency domain fluorimetry", *Rev. Sci. Instrum.*, **60**, No. 9, 1989, 2929-2936.
- [21] E. Gratton, D. M. Jameson, N. Rosato, and G. Weber, "Multifrequency cross-correlation phase fluorometer using synchrotron radiation", *Rev. Sci. Instrum.*, **55**, No. 4, 1984, 486-494.
- [22] S. A. Vinogradov, M. A. Fernandez-Searra, B. W. Dugan, and D. F. Wilson, "Frequency domain instrument for measuring phosphorescence lifetime distributions in heterogeneous samples", *Rev. Sci. Instrum.*, **72**, No. 8, 2001, 3396-3406.
- [23] T. Iwata, "Proposal for Fourier-Transform Phase-Modulation Fluorometer", *Opt. Rev.*, **10**, No. 1, 2003, 31-37.
- [24] T. Iwata, H. Shibata, and T. Araki, "Construction of a Fourier-transform phase-modulation fluorometer", *Meas. Sci. Technol.*, **16**, No. 11, 2005, 2351-2356.
- [25] T. Iwata, A. Muneshige, and T. Araki, "Analysis of Data Obtained from a Frequency-Multiplexed Phase-Modulation Fluorometer Using an Autoregressive Model", *Appl. Spectrosc.*, **61**, No. 9, 2007, 950-955.
- [26] <http://www.sumita-opt.co.jp/en/functional/lumilass.pdf>.
- [27] D. Magde, R. Wong, and P. G. Seybold, "Fluorescence Quantum Yields and Their Relation to Lifetimes of Rhodamine 6G and Fluorescein in Nine Solvents: Improved Absolute Standards for Quantum Yields", *Photochem. Photobiol.*, **75**, No. 4, 2002, 327-334.
- [28] P. Dahiya, M. Kumbhakar, T. Mukherjee, and H. Pal, "Effect of protic solvents on twisted intramolecular charge transfer state formation in coumarin-152 and coumarin-481 dyes", *Chem. Phys. Lett.*, **414**, No. 1, 2005, 148-154.

3章 光子計数型位相変調法

3.1 緒言

本章では、微弱蛍光に対応可能であり、かつ分解時間を向上させた、光子計数型位相変調方式蛍光寿命計(PC-PMF; photon-counting-type phase-modulation-fluorometer)を提案する。そして、その有用性を基礎的な性能評価実験結果をもとに示す。PC-PMFそれ自体のアイデアと、原理確認のための初歩的な装置構成については、既に岩田らにより報告されている[1]。しかし、PC-PMFの意義について、微弱光対応が可能になるということ以外には殆ど注意が払われていなかった。さらに検討を進め、本章に述べる潜在的な重要性を認識するに至った。

蛍光寿命測定は、分析化学、生化学、物性研究、医用応用など様々な分野で利用されており重要である。たとえば、分析化学においては、蛍光スペクトル形状がほぼ同じような2つの試料を識別・同定する目的でも利用される。測定装置に着目すれば、偏光子と検光子を追加することによって、試料の動的異方性偏光解消測定の目的にも使用できる[2]。

蛍光寿命の測定方法は、古くからパルス励起法と位相変調法[3, 4]の2つに大きく分類されてきた。より一般的な手法は蛍光減衰波形を直接観測できるパルス励起法であるが、後述するように位相変調法も測定精度の点では有望とされる。しかし、位相変調法には大きな問題点として、1) 単一の指数関数に従う蛍光減衰応答を与えるような試料にしか適用できないこと、2) 微弱蛍光には原理的に全く対応できないことがある。前者の問題点は、2章のような手法を導入し、複数個の変調周波数における測定を行えば解決できる[5, 6]。後者の問題点に対する解決策の一つが、本章で述べるPC-PMFである。

位相変調法は、1965年頃の高繰り返し周波数で短パルス幅を有するモードロックレーザー(MLL; mode-locked laser)の登場によって周波数領域法に進化した[4, 7]。すなわちMLLを励起光源とし、検出器出力をスペクトルアナライザに導入する[3, 8]。もしくは高速オシロスコープで蛍光応答時間波形の測定を行いフーリエ変換する。そして、MLLの基本波と高調波成分を参照信号とし、蛍光信号のそれらに対する振幅比及び位相差を測定する。この手法によって複数成分を有する試料の高速同時測定が可能になった。近年では、検出系のエレクトロニクスに細心の注意を払った変調周波数10 GHzに達するシステムも報告されている[9]。一方、パルス励起法でもMLLを励起光源とし、時間分析器として時間振幅変換器(TAC)とマルチチャンネルアナライザ(MCA)を用いる時間相関単一光子計数法(TC-SPC)のシステムの採用が一般的になった。チャンネル当たりの分解時間は数psのオーダーとなる。現在、これら2つの方式の唯一の難点を挙げるとするならば、装置構成が複雑高価になるといったことと、励起波長の選択にやや自由度が不足するといった事ぐらいである。

しかし、1995年以降は紫外LEDやLDなどが安価で利用できるようになり、蛍光寿命測定装置に対する考え方が少し変わってきた[10-13]。その結果、古くからの位相変調法でも、蛍光寿命の概略値を素早く取得するといったスクリーニングのような限定した目的には十分に利用できるようになった。ここで、位相法が利用できるという一番大きな理由は、パル

ス法に対する大きな優位性があるからである。すなわち、測定対象とする蛍光寿命と比較して低い変調周波数であっても周波数分解測定により良好な S/N 比が確保でき、高精度に短い寿命種の測定ができる。例えば、数 10 MHz 程度の変調周波数でも 10 ns 以下のオーダーの蛍光寿命測定が精度よく行える。その根拠を定性的に説明すると次のようになると考えられる。すなわち、パルス法がインパルス応答として系の広帯域周波数応答を一度に測定しているのに対し、位相法は唯一の変調周波数での系の定常応答を測定している。単純比較はできないが、同一測定時間でのターゲットとする変調周波数当たりの情報量と言う観点では位相法のほうが有利である。したがって、LED や LD を励起光源とした従来の位相法でも十分利用価値がある。しかし、既に指摘したように、古くからの位相変調法は原理的に単一成分の蛍光寿命測定しかできず、複成分に対しては複数の変調周波数を採用しなければならない。この難点に対しては、単純に複数の変調周波数を使用するというだけでなく、可変変調周波数[14-16]、フーリエ変換型位相法[17, 18]、マルチプレックス周波数法[19, 20]、および 2 章で挙げた位相変調励起光源を用いる手法[21]が提案されている。

しかしそれ以外にも、位相法にはこれまであまり注意が払われていない技術的な問題点がいくつか存在する。その第 1 の問題点は光検出器に関することである。微弱光の汎用高感度検出器としては、高速光電子増倍管(PMT)の使用が一般的である。その際、PMT の負荷抵抗の値は、それに接続される同軸ケーブルや高速アンプとのインピーダンスマッチングのために通常は 50Ω とする必要がある。この状態で通常のアナログ測光を行うと PMT の平均陽極電流が容易に最大絶対定格を超えてしまい、カソードやアノード電極の劣化を早めてしまう。これを防ぐために負荷抵抗を大きくすると変調信号に追従できなくなる。結果として、従来の位相法は、蛍光強度が十分な試料に対しても、PMT へ入射する蛍光強度を故意に減光せざるを得ない。PMT の印加電圧を下げてもよいが、あまり下げ過ぎると応答速度に悪影響を与えるため推奨されない。最近では、検出器として、光子計数用ガイガーモードアバランシェフォトダイオード (APD) の利用も報告されているが[22,23]、そのような高速 APD は受光面積が例えば $0.1\text{mm}\times 0.1\text{mm}$ 程度と極端に小さいため使いづらい。結局、従来の位相法の適用対象は、現実的には中程度の蛍光強度を有する試料になってしまいがちである。

位相法の第 2 の問題点は、達成できる分解時間の限界である。一般に、位相法のパルス法に対する優位性の理由として位相測定の精度が高いことが挙げられる。しかし、PMT の出力容量やそれに接続される同軸ケーブルの静電容量などを合成すると少なくとも 50pF になり、PMT の負荷抵抗の値を 50Ω に設定した場合、アナログ的な応答時定数は 2.5ns 以上になってしまう。したがってこのような状況において得られた数ナノ秒の蛍光寿命値は、たとえ数学的デコンボリューション法[24, 25]が導入されたとしても、結果として信頼性を欠いている。

PC-PMF ではこれらの問題点をすべて解決できる。PC-PMF は、従来の位相法のテクニックと、通常はパルス励起法で用いられる単一光子相関法(TC-SPC)法のテクニックを組み合わせた手法である。そこでは時間振幅変換機(TAC)とマルチチャンネルアナライザ(MCA)が用いられている。これらを結合させることにより極微弱蛍光に対応させている。微弱光測定が目的なので光電面劣化の問題が大幅に緩和される。さらに、MCA のチャンネル当たりの分解時間も従来の TC-SPC 法と同じにでき、PMT の周波数帯域を超えた測定が可能となる。測定時間の問題は残るが、もともと極微弱蛍光測定が目的であるからある程度は許容できる。さらに極微弱光領域では、分解時間とのトレードオフを考慮しつつ、PMT の負荷抵抗をある程度大きくして感度を稼ぐような試みも可能である[25-29]。このような背景のもとで、前述のようにPC-PMFそれ自体のアイデアが既に岩田らにより報告されている[1]。しかし、蛍光励起光源として LED を用いた初期段階のものであり、変調周波数は高々20MHzであった。MCA には変調周波数の 1 周期未満の波形しか取得できず位相測定の精度も向上させにくい状況であった。

本章では、励起光源として高周波変調させた紫色 LD を採用することで、短い蛍光寿命への対応を図った取り組みについて述べる。LD を光源として採用し、簡易な LD 駆動回路を適用することで、変調周波数 1.0 GHz での安定駆動を実現した。位相測定のために必要な、複数周期に亘る波形取得を行うための方法を整理した。結果として、周波数 1.0 GHz においても十分な振幅を有した複数周期の正弦波を得ることができた。これにより、短い蛍光寿命に対応可能となり、また同時に高い位相測定精度が得られる事を実験的に確認した。このように、性能を向上させた PC-PMF の位置づけを図 3.1 に示す。本提案手法により、蛍光検出器をアナログ動作させる従来型の位相変調法に比べ、微弱蛍光への対応と、短い蛍光寿命への対応が拡張される。

本章では、まず PC-PMF の動作原理について述べ、提案する装置構成を示す。装置の基礎的な性能評価を行い、また従来のアナログ測光方式位相変調法と比較した結果について示す。そして、実際にサブナノ秒の蛍光寿命を有する試料を測定し、本測定手法の有用性を示す。

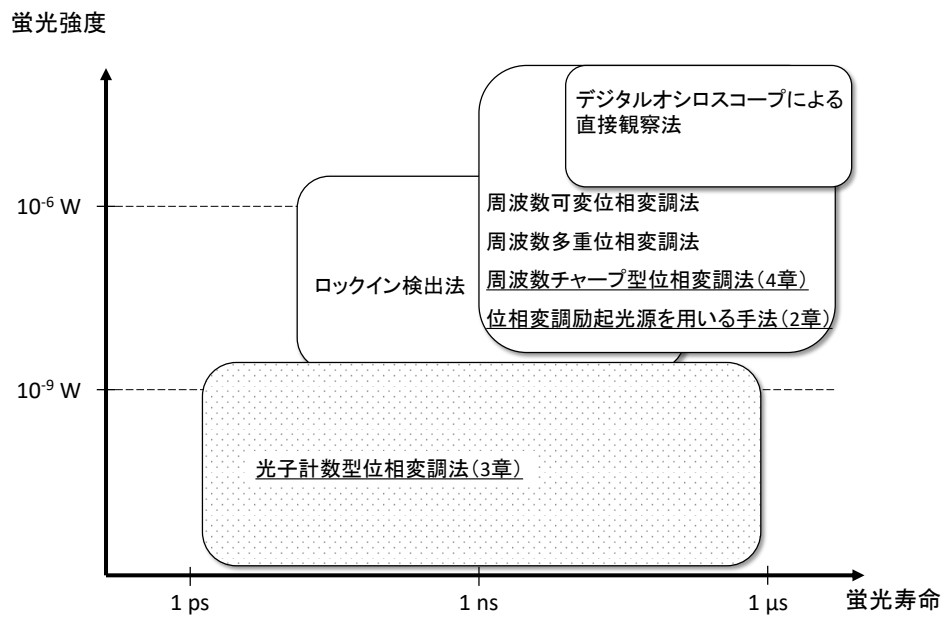


図 3.1 位相変調法における, 提案手法の位置づけ. 網掛部はデジタル測光に基づく手法で, それ以外はアナログ測光である. 下線部が本章で提案する手法.

3.2 測定原理

図 3.2 に光子計数型位相変調法(PC-PMF)の測定原理を説明するためのタイミング図を示す。(a)に、周波数 $f(=1/T)$ の励起光波形を示す。これが参照波形となる。このとき、蛍光強度が十分に強ければアナログ測光が可能となり、蛍光波形は(b)に示すようになる。図に示す位相角 q は、励起光に対する蛍光波形の位相差である。従来型の PMF において、蛍光寿命値 τ は、蛍光減衰波形が単一の指数減衰関数で与えられると仮定できる場合には(a), (b)を測定し、 q を求めることによって、 $\tan \theta = 2\pi f\tau$ の関係式から算出する。

しかし、蛍光強度が微弱になると、PMT の出力波形は(c)に示すような光電子パルス列状態となり、もはやアナログ測光ができなくなる。ここで、光電子パルス発生時刻の確率密度関数は、蛍光強度が大きい場合の(b) に示した蛍光強度に比例する。さらに蛍光強度が微弱になると、(d) に示すような単一光子状態となる。すなわち、全測定時間範囲の間に高々1個の光子しか到来しないような状況になる。しかし、この状態であっても、光電子パルスの検出時刻の確率密度関数と蛍光強度の比例関係は保たれている。この状態で、従来のパルス励起の TC-SPC 法で用いられている TAC を動作させる。TAC の計時スタート信号は、励起光周波数 f を n で分周したクロックパルス(e)とする。そして、(d)の単一光電子パルスをストップ信号として入力する。TAC では、(f)に示すように、クロックパルスエッジと光電子パルスのエッジの時間差を振幅に変換し、この出力信号を波高分析(PHA)モードで動作する MCA に導入する。こうして多数回の励起を繰り返せば、MCA には蛍光強度が強い場合の蛍光波形と相似なヒストグラムが取得できる。PC-PMF の場合には、正弦波形のヒストグラムが作成できる。この構成では、システムクロックパルスの周期が全時間測定範囲となり、そこに周期 T の複数個のサイクルの正弦波が現れる。もともと測定対象からの蛍光が微弱なので、入射光強度に由来する波形歪の問題は殆ど存在しない。また、1 サイクル毎の波形が等しいため、入射光強度を十分に落とせばどのサイクルを計数しても波形歪の問題は生じない。このようにして最終的に得られる蛍光波形のヒストグラムを(g) に示す。以上のような手順で、参照波形と蛍光波形を取得する。蛍光寿命値の算出手法は、従来の PMF の場合と同様である。以上が微弱蛍光に対応可能な PC-PMF の動作原理である。

一方で、本システムは、TAC-MCA ペアを用いる TC-SPC システムそのものであり、光子を受け入れられない時間である「デッドタイム」が存在する。これは、TAC の測定時間幅 T_s 中に 1 個の光子しか検出できない事によるデッドタイムと、MCA 上にヒストグラムを作成する際の A/D 変換時間 ADC time に由来するデッドタイムが存在するが、一般に MCA のデッドタイムが支配的である。デッドタイム中に光電子パルスが入力されても計数されないため、結果としてカウント効率が低下し、場合によっては測定波形が歪む。これについては、

3.4.1 節で再び取り上げる。しかし、微弱蛍光を測定対象とする場合光子検出頻度は低いので、多くの場合問題にならない。蛍光が強い場合は、ND フィルタ等で検出頻度を下げること容易に対応可能である。

TAC と MCA を導入することによって、従来の TC-SPC 法の場合と同様に、PMT の周波数帯域を超えた分解時間が達成できる。すなわち、従来のアナログ方式の PMF の分解時間を大幅に改善できる。実質的には、分解時間を制限する要因は、光源、もしくは使用する PMT の電子走行時間のばらつきに起因するジッタのみとなる。

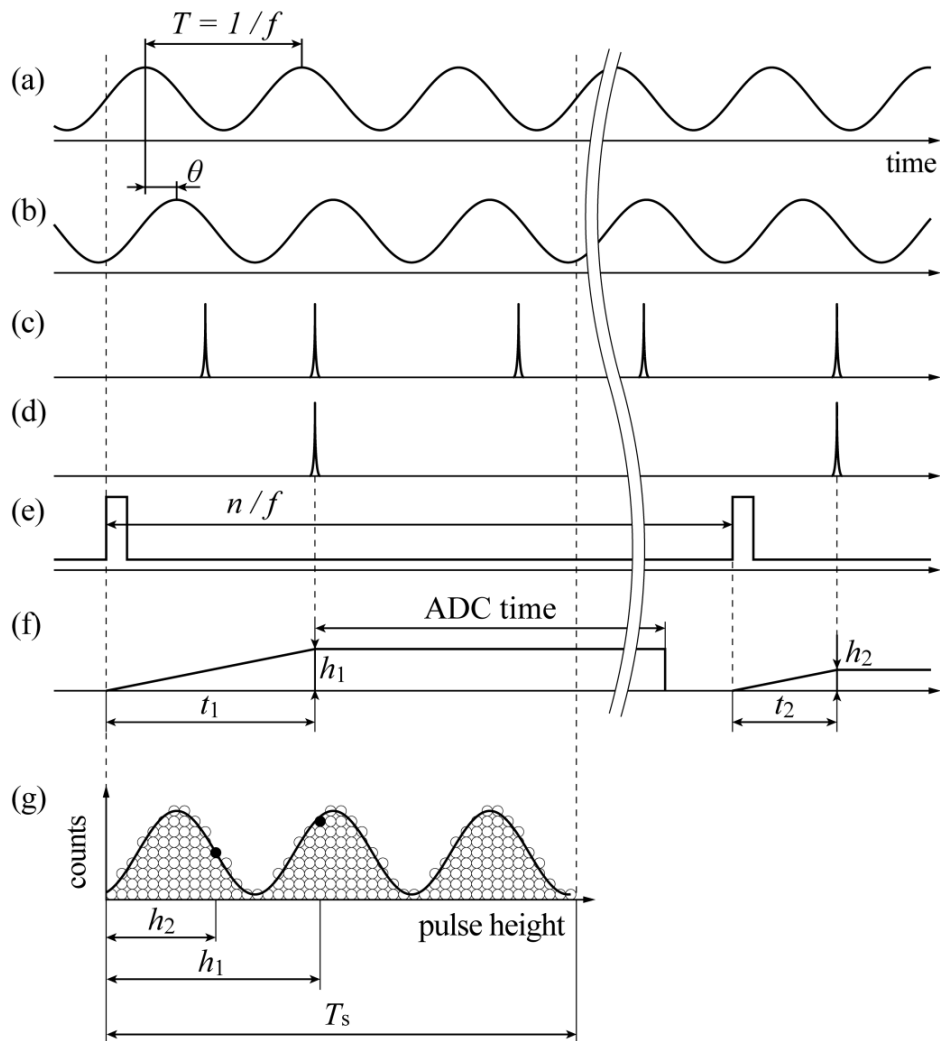


図 3.2 光子計数形位相変調法の動作概念図. (a)励起光波形, (b)強度が十分強い場合の蛍光波形, (c)強度が微弱な場合の蛍光波形, (d)単一光電子パルス状態の蛍光波形, (e)システムのクロック波形, (f)TAC の出力信号, (g)MCA 上で作成されるヒストグラム波形.

3.3 装置構成

3.3.1 高周波変調 LD 駆動回路

図 3.3 に、高周波変調 LD 駆動回路を示す。励起光源として、紫色 LD(NDV4313, wavelength = 405 nm, maximum output power = 140 mW, threshold current = 35 mA, Nichia)を用いた。この LD は、測定する試料の励起波長帯域に応じて、容易に他の発振波長の LD に交換可能である。

LD の強度変調にあたり、駆動電流を直接高周波変調させる内部変調方式を採用した。これにより、1.0 GHz 程度までであれば、小規模な回路構成で十分な変調度が得られる。提案する駆動回路は、DC 駆動部と AC 変調駆動部の 2 つの部位で構成される。DC 駆動部は LD の発光強度を長期的に安定化制御し、また LD のしきい値電流に対し十分なバイアス電流を与える。一方で、AC 変調駆動部により正弦波を重畳させている。

DC 駆動部は、LD の発光強度をモニタリングし、フィードバック制御によりその発光強度を安定化させている。LD に内蔵されているフォトダイオード(PD; photo-diode)の光起電力を、オペアンプ(TL072AP, Texas Instruments)を用いた電流-電圧変換回路により検出する。それと同時に、同オペアンプにより制御電圧と比較し DC 駆動電流を決定している。制御電圧を 1.40 V と設定した場合、LD に流れる DC 駆動電流は 70 mA となった。オペアンプの出力電圧は、高周波トランジスタ Q1(BFG591, transition frequency 7.0 GHz, maximum collector current 200 mA, NXP Semiconductors)で構成されたエミッタフォロア回路により電圧-電流変換され、LD に DC バイアスが印加される。以上の閉ループにより負帰還がかかり、DC 発光強度が安定化される。なお、この制御の応答速度は電流-電圧変換回路のフィルタ時定数によって決定される。ここでは、変調周波数より十分小さな値とし、100 kHz のカットオフ周波数を設定した。

AC 駆動部は、発振器からの正弦波を、高周波トランジスタ Q2(BFG591, NXP Semiconductors)で構成されたエミッタフォロア回路により電圧-電流変換し、LD に印加した。ここで、Q2 で構成された電圧-電流変換回路を線形動作させるために、入力した正弦波に DC バイアスを重畳した。入力する正弦波の振幅を 1.0 V_{pp} とした場合、LD に流れる AC 変調電流は 20 mA_{pp} となった。

以上の構成によって LD 駆動回路を実際に製作した。この外観を図 3.4 に示す。このように、プリント基板上に部品を実装することにより小型な変調光源の製作が可能である。この LD は前述のように、他の波長のものに容易に交換可能であるし、また回路規模が小さいので波長毎に取り揃えることも難しいことではない。

製作した励起光源の変調度は、変調周波数 100 MHz において 75 %、変調周波数 1.0 GHz において 50 %であった。ここで、変調度は、発光の時間波形の振幅と平均強度の比と定義した。

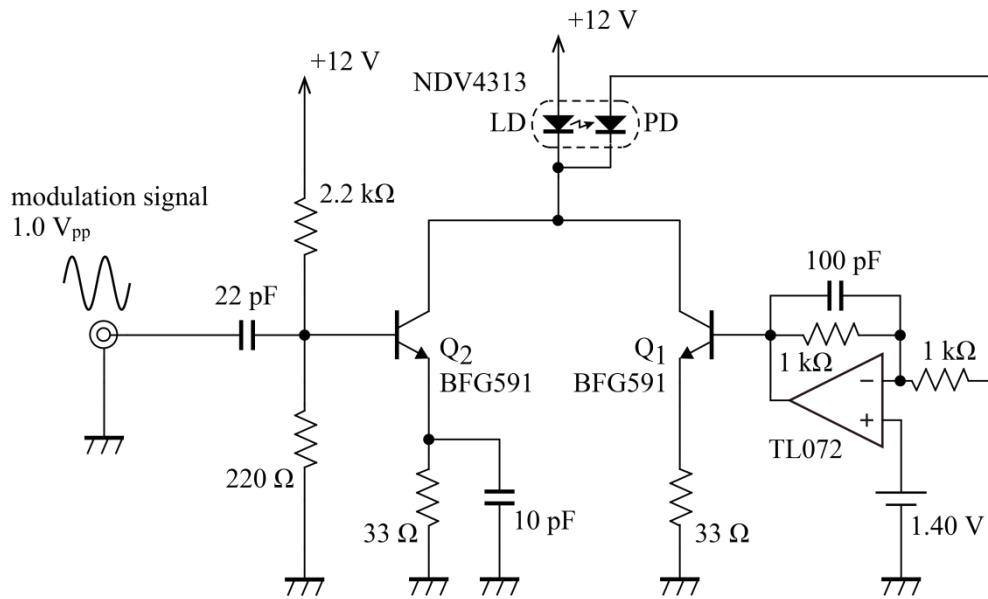


図 3.3 高周波変調 LD 光源の回路図.

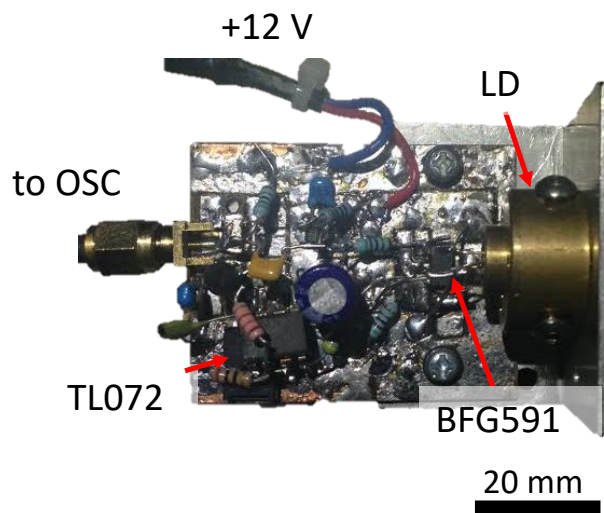


図 3.4 作成した高周波変調 LD 光源の外観.

3.3.2 光子計数型位相変調方式蛍光寿命計

図 3.5 に、構築した PC-PMF のブロック図を示す。励起光源として 3.3.1 節に示した LD 光源を利用した。変調のための正弦波信号は位相同期回路(PLL IC, ADF4350BCPZ, Analog Devices)により発生させた。PLL IC は、基準発振器(AWG520, Tektronix)からの 10 MHz をもとに周波数をアップコンバートさせ、100 MHz から 1.0 GHz のレンジで同期発振させた。サンプルからの蛍光は、ロングパスフィルタ(LPF, SCF-50S-44Y, 透過波長 440 nm, Sigma Koki)を透過させた後に PMT (R7400U, カソード-アノード間電圧 -1000 V, Hamamatsu Photonics)で検出した。検出する蛍光強度を調整するために、適宜サンプルと PMT の間に ND フィルタを挿入した。PMT からの光電子パルスは低雑音高速アンプ (LNA, type 574, Ortec)を経て定比率型波高弁別器 (CFD, type 584, Ortec) に導入した。その出力をスタート信号として、時間振幅変換器 (TAC; type 566, Ortec)に入力した。TAC のストップ信号は、オシレータからのシステムクロックパルスを、高周波プリスケラ(HMC434, Hittite Microwave)およびプログラマブル分周器(74HC163, Toshiba)により n 分周したものを入力した。分周比 n は、ストップ信号の周波数が 10 MHz となるように設定した。このように、スタート信号を光電子パルスとし、ストップ信号にシステムのクロックパルスを用いる接続法は「リバーズ接続」と呼ばれる[2]。リバーズ接続により、光子が検出された場合のみカウント動作が行われるので、計数効率が向上する。TAC の出力はマルチチャンネルアナライザ (MCA; TRUMP CARD 8k, Ortec) に入力し、ヒストグラム波形を作成した。

位相変調法を実施するにあたり、まず励起光波形を取得した。この場合、サンプルセルを設置する位置に、反射率に波長依存性が無いアルミニウム製の拡散板を設置した。TAC と MCA の動作条件は、TAC の測定時間幅は 50 ns とし、MCA のチャンネル数を 8192 とした。したがって、チャンネル当りの分解時間は 6.1 ps である。前述のように、本システムの測定時間の大部分は、TAC-MCA ペアにおける AD 変換時間である。今回用いた MCA の変換時間は 8.0 μ s であるため、したがってヒストグラムに光子をカウントする最大繰り返し周波数は 125 k counts/s に制限される。

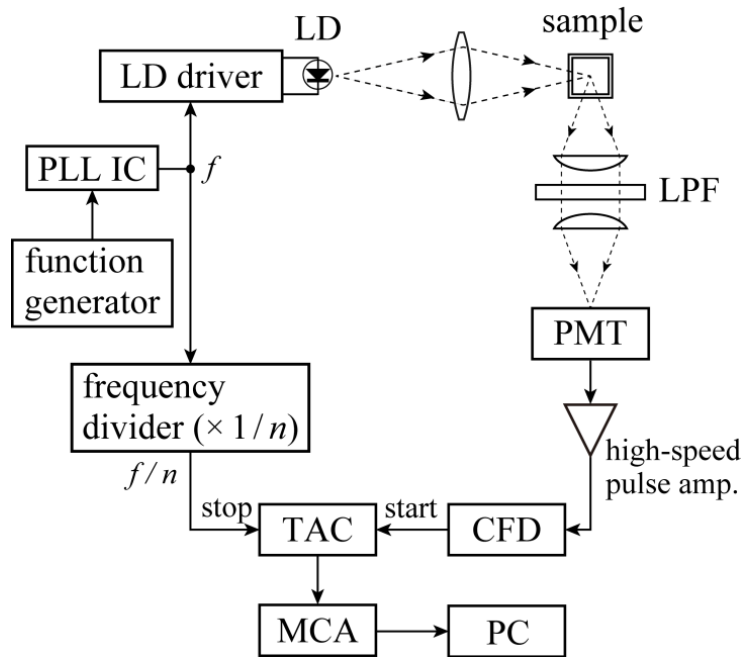


図 3.5 PC-PMF のブロック図. LD:レーザダイオード, LPF: 長波長透過フィルタ, PMT: 光電子増倍管, CFD: 定比率波高弁別器, TAC: 時間振幅変換器, MCA: マルチチャンネルアナライザ, PC: パーソナルコンピュータ.

3.4 実験結果および考察

3.4.1 入射光量に対する検出光子数の直線性とチャンネル間幅微分直線性

PC-PMFの基礎特性を評価した。本節では定常光入射におけるPC-PMFの動作特性について示す。定常光入射における評価内容は、チャンネル間の計数量の均一性を表す微分直線性と、入射光量に対する光子計数効率の直線性とした。

光子計数効率 Q の定義は、パルス励起におけるTC-SPCシステムで利用される場合は、励起パルス1周期あたりにTAC-MCAペアによって光子を検出・記録できる確率である。一方でPC-PMFでは、固定された励起パルス1周期という単位時間が存在しないため直接適用することができない。簡易的には変調に用いる正弦波1周期で代替できるが、PC-PMFを運用する場合において f は可変であるので、それに依存して Q が変化してしまう。そこで、変調周波数を同期分周して10MHzの基準クロックを作り、これによってTAC-MCAペアを駆動した。この場合における光子計数効率 Q は、 $Q=Nn/Rf$ と定義した。ここで、 N はヒストグラム中の全光子カウント数であり、 R は全測定時間である。また、 f/n は、光源の変調周波数 f を n 分周することで10MHzとなるように設定した。すなわち、本定義による Q は、100 ns中にカウントされる光電子パルスの平均数を表す。このように、従来のTC-SPCシステムで使用される定義とは異なっているため、直接に値の比較はできないが、その一方で相対的には従来の Q と同等の意味を有している。

図3.6(a)に、入射光強度 P に対する Q の測定結果を示す。ここで、測定時間 $R=2400$ sと設定した。使用した光源は、直流駆動した白色LED(NSPW510BS, 日亜化学工業)を用いた。LEDからの光をNDフィルタで適宜減光し、光パワーメータ(1830-C, Newport)を用いてあらかじめ光強度を較正した。(a)において、比例関係を示す実線から、5.0%までの偏差を許容した場合、 P に対する Q の線形性は入射光量20 nWまで維持された。したがって、波形歪無くPC-PMFを利用するためには、PMTへの入射光量を $P<20$ nWとして使用する必要がある。

次に、定常光を入射した場合における、チャンネル間幅の微分直線性を評価した。装置構成は上記のものと同じである。図3.6(a)に示した、線形領域の点Aにおいて取得されたヒストグラム波形を(b)に示す。ここで、 $R=4790$ s、 $P=10$ nWとした。この条件では、チャンネル間で均一なヒストグラム波形が得られた。チャンネル当たりの平均カウント数は9945であり、相対標準偏差(RSD)は1.1%であった。光電子パルスの検出数のゆらぎはポアソン分布に従うことから、提案するPC-PMFシステムが正常に動作していることを示している。また、(a)中の非線形領域の点Bにおいて取得されたヒストグラム波形を(c)に示す。ここで、 $R=940$ s、 $P=45$ nWとした。(c)は、チャンネル間で様な計数が行われていないことを示している。この歪は、TACの動作速度を上回る頻度で光電子パルスを検出したため、カウントされない光電子パルスが発生したためと考えられる。

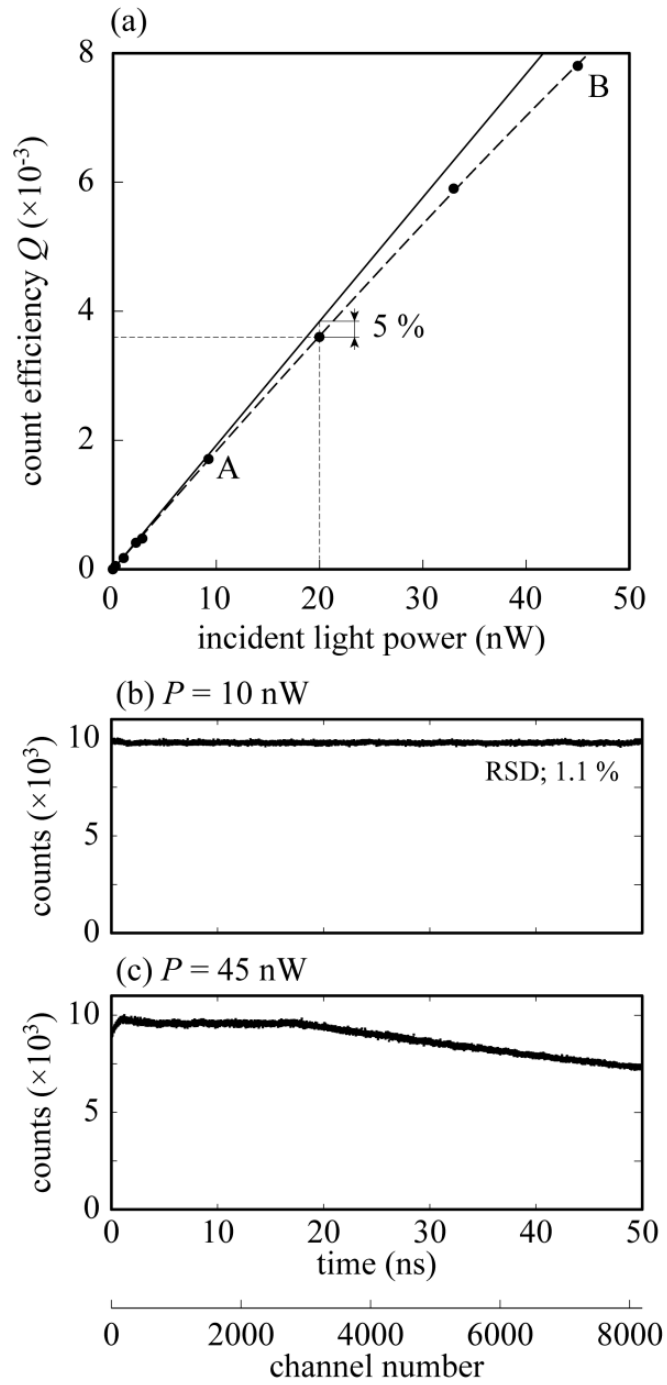


図 3.6 (a)入射光量 P に対する光子計数効率 Q の測定結果, (b)入射光量 $P=10$ nW において取得したヒストグラム波形, (c)入射光量 $P=45$ nW において取得したヒストグラム波形.

3.4.2 光子計数型位相変調法とアナログ測光型位相変調法の比較

(i) 微弱光測定における PC-PMF と従来型 PMF の比較

アナログ光検出法を用いる従来の PMF は、3.1 節で述べたように中程度の蛍光強度が得られる場合において適用できるが、一方で提案する PC-PMF は極めて弱い蛍光の検出において有用である。従来型の PMF と PC-PMF のそれぞれで蛍光強度の適用範囲を比較するために、強度が異なる励起光の変調波形の測定を行った。光源は $f = 100 \text{ MHz}$ で変調された LD とし、PMT 上の平均入射光強度 P を段階的に変化させた。

図 3.7 の左側は PC-PMF、右側は従来型の PMF によって取得した励起光波形を示す。PC-PMF における P は、(a)100 nW, (b)10 nW, (c)1.0 nW とし、最大計数値が 10^4 となるまで光子計数を行った。このとき、測定時間 R と計数効率 Q は、それぞれ(a) $R = 210 \text{ s}$, $Q = 14.2 \times 10^{-3}$, (b) $R = 2370 \text{ s}$, $Q = 1.7 \times 10^{-3}$, (c) $R = 24120 \text{ s}$, $Q = 0.17 \times 10^{-3}$ となった。各条件において入射光に対する光子計数値は、3.4.1 節の結果によると(a)では P が強すぎるため線形増加とはならないが、(b)および(c)では線形性が保たれる範囲である。ここで、TAC-MCA ペアの非線形性による歪を受けた、チャンネル番号 0 ~ 424 および 7986 ~ 8191 における計数値は除去した。

従来型の PMF による測定では、デジタルオシロスコープ(TDS5054B, Tektronix)を用いてアナログ波形を記録した。 P は、(d) $10 \mu\text{W}$, (e) $1.0 \mu\text{W}$, (f) 100 nW とした。ここで、S/N 比良く波形を記録するために、オシロスコープ上にて 10^4 回の波形の平均処理を行った。ここで、PMT は PC-PMF と同じものを使用し、負荷抵抗は 50Ω 、カソード-アノード間電圧は -900 V とした。(d)において、 100 MHz の正弦波が得られたが、 $P < 1.0 \mu\text{W}$ に相当する(e)および(f)の場合において S/N 比が極めて低いため、もはや正弦波を得ることが困難である。一方 PC-PMF では、 $P < 10 \text{ nW}$ に相当する(b)および(c)において正弦波が得られた。(a)の $P = 100 \text{ nW}$ においては歪んだ正弦波が得られているが、これは図 3.6(c)と同じく高すぎる Q により線形性が悪化したためである。しかし、このように入射光強度が強すぎる場合であっても、ND フィルタ等を用いて十分減光させることで歪み無く波形の取得が可能である。

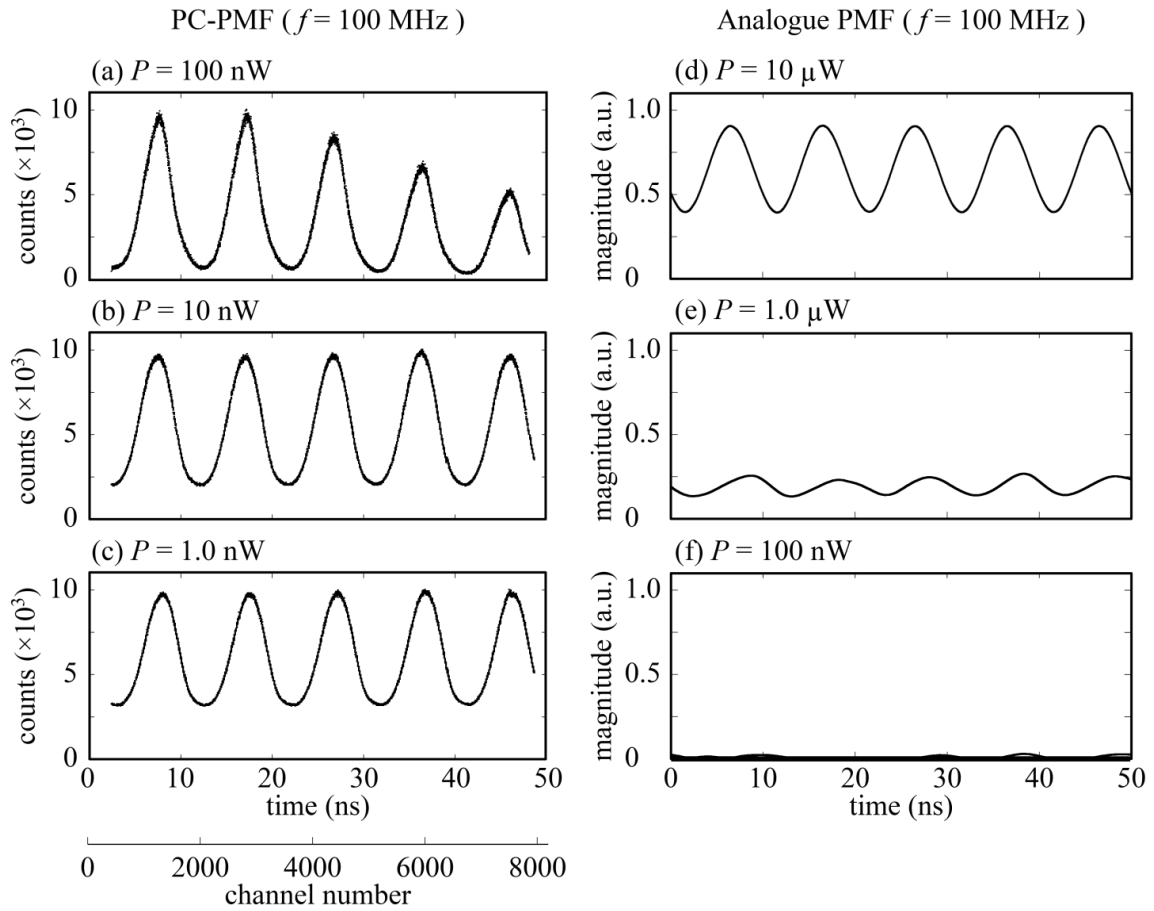


図 3.7 微弱光測定における PC-PMF と従来型 PMF の比較. 光源の変調周波数は $f = 100$ MHz である. (a) PC-PMF による取得波形, $P = 100$ nW, (b) PC-PMF による取得波形, $P = 10$ nW, (c) PC-PMF による取得波形, $P = 1.0$ nW, (d) アナログ PMF による取得波形, $P = 10$ μ W, (e) アナログ PMF による取得波形, $P = 1.0$ μ W, and (f) アナログ PMF による取得波形, $P = 100$ nW.

(ii) 高周波変調光の測定における PC-PMF と従来型 PMF の比較

高周波変調光の測定において従来のアナログ測光に基づく PMF は、3.1 節に述べたように装置構成上の制約から SN 比の良い波形取得が困難である。一方 PC-PMF では、PMT のアナログ帯域を超えた分解時間が発揮できる。両者を実験的に比較し、PC-PMF で対応できる最大変調周波数を確認した。光源は、3.3.1 節に示したように最大変調周波数 1.0 GHz まで対応できる。平均入射光強度 P を固定し、変調周波数 f を段階的に変化させた。

図 3.8 の(a), (b), (c)は、PC-PMF によって得られた励起光のヒストグラム波形である。それぞれの P および f は、(a) $P = 10 \text{ nW}$, $f = 250 \text{ MHz}$, (b) $P = 10 \text{ nW}$, $f = 500 \text{ MHz}$, (c) $P = 10 \text{ nW}$, $f = 1.0 \text{ GHz}$ とし、ヒストグラム中の最大計数値が 10^4 となるまで光子計数を行った。このとき、測定時間 R と計数効率 Q は、全ての条件において $R = 2400 \text{ s}$, $Q = 1.7 \times 10^{-3}$ であった。この条件では、3.4.1 節と 3.4.2 節に示すように、入射光量に対して検出光子数は線形性を有する。なお、取得したヒストグラム波形のうち、TAC-MCA ペアの非線形性を無視できる時間幅が 46 ns 分得られた。図 3.8 では波形を明示するために 20 ns 幅の結果を抜き出して示している。(c)では、 $f = 1.0 \text{ GHz}$ としたにも関わらず 100 MHz に相当するわずかな歪が見られる。これは PLL を構成する VCO の長期の不安定性に由来するものである。いずれの結果においても、光源の変調波形が十分な振幅で得られている。

比較として、従来のアナログ測光に基づく PMF を想定し、アナログ測光によって励起光波形を取得した。得られた波形を図 3.8(d), (e), (f)に示す。それぞれの P と f は、(d) $P = 10 \text{ }\mu\text{W}$, $f = 250 \text{ MHz}$, (e) $P = 10 \text{ }\mu\text{W}$, $f = 500 \text{ MHz}$, (f) $P = 10 \text{ }\mu\text{W}$, $f = 1.0 \text{ GHz}$ とした。ここで、3.4.2(i)節と同様に、デジタルオシロスコープ(TDS5054B, -3dB カットオフ周波数 500 MHz, Tektronix)を用いて波形を取得した。PMT の陰極陽極間電圧は -900 V とし、PMT とデジタルオシロスコープ間は 0.5 m の RG-58A/U 型 BNC ケーブルで接続した。(e)と(f)では、波形が大きく減衰している。これは、PMT の出力容量や同軸ケーブルの静電容量で構成される RC ローパスフィルタと、デジタルオシロスコープのアナログ帯域による影響である。使用した同軸ケーブルの静電容量は 50 pF であり、PMT の負荷抵抗は 50Ω と設定した。したがって、PMT 出力部に形成される RC ローパスフィルタの -3dB カットオフ周波数は 63.7 MHz である。さらにデジタルオシロスコープのカットオフ周波数も加味すると、500 MHz を超える波形の取得は困難である。

一方、PC-PMF においては 1.0 GHz と、PMT 出力回路のアナログ帯域を大きく超えた周波数帯域まで波形が得られている。これは、次のように説明できる。PC-PMF では PMT が出力する光電子パルスをデジタル信号とみなし、そのパルスの立ち上がりタイミングを波形取得に用いる。光電子パルスの時間波形はアナログ帯域に依存して高周波成分が減衰するが、その一方で光電子パルスの立ち上がりタイミングに変化は無い。結果としてアナログ測光よりも高い時間分解能が得られる。さらに、TAC-MCA ペアの最小分解時間は TAC の時間幅($T_s = 50 \text{ ns}$)と MCA のチャンネル数(8192)で決定され、6.1 ps と十分な分解時間を有している。実際に PC-PMF を利用する際に分解時間を決定する要因は PMT 内における電子走

行時間の拡がりによる時間的ジッタが支配的である。例えば、提案装置で使用している光電子増倍管であれば、約 0.2~0.3 ns との報告例がある[2]。電子走行時間拡がりを低減する解決法として、MCP-PMT の利用が最適である[9]。その他に、アパーチャを用いて光電面における蛍光検出スポット径を小さくすることや、陰極-陽極間印加電圧を増加させることによっても電子走行時間拡がりを低減させることができる。

PC-PMF システム全体としての分解時間は、光電子パルスの時間的ジッタだけでなく LD の変調周波数の安定性にも依存する。変調周波数は PLL-IC の発振安定性に依存し、約 300 ps のジッタを含む。このとき、長時間波形を積算すると、 $f = 1.0 \text{ GHz}$ において振幅が-3dB となる。この観点から、3.3.1 節に示した LD の最大変調周波数は 1.0 GHz とした。

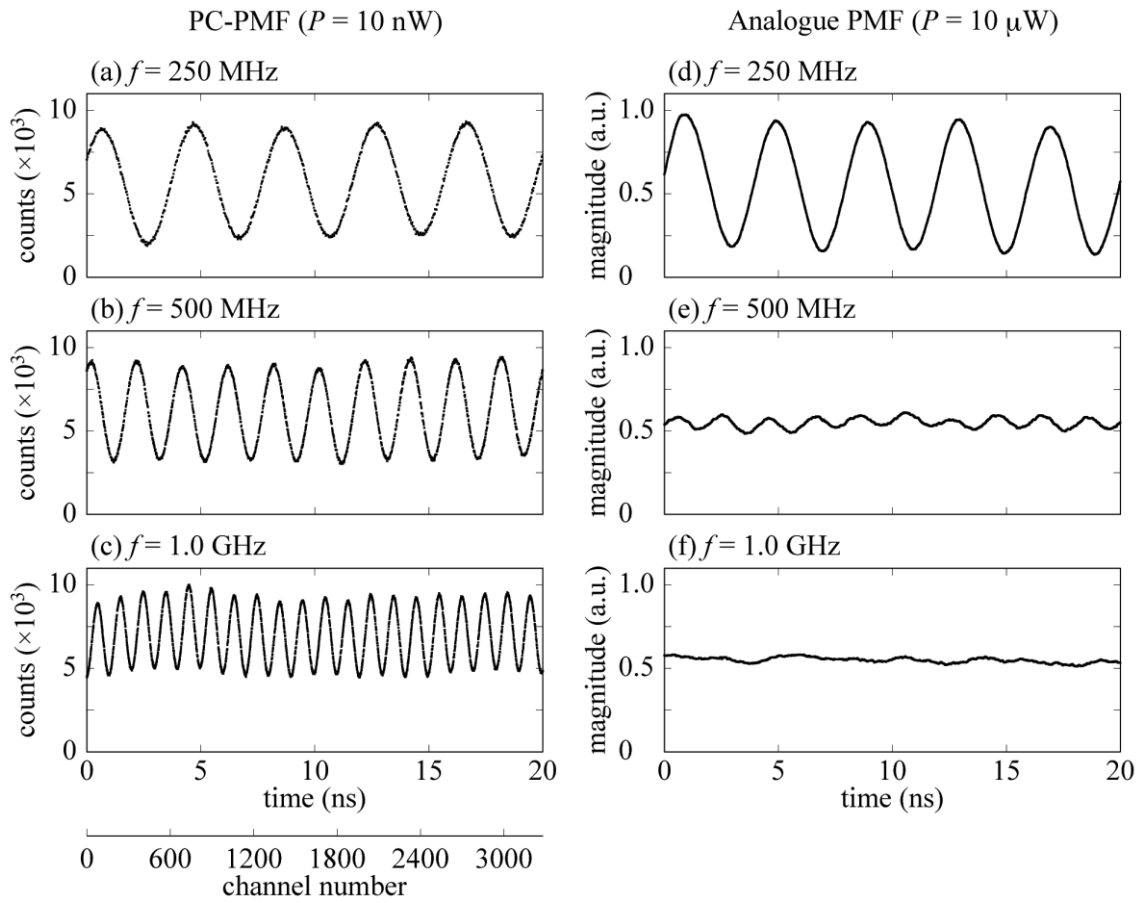


図 3.8 高周波変調光の取得による PC-PMF と従来型 PMF の比較. それぞれの変調周波数は, (a) $f = 250$ MHz, (b) $f = 500$ MHz, (c) $f = 1.0$ GHz, (d) $f = 250$ MHz, (e) $f = 500$ MHz, and (f) $f = 1.0$ GHz とした. また, 入射光強度は, (a), (b), (c)において 10 nW, (d), (e), (f)において 10 μ W とした.

3.4.3 蛍光寿命測定結果

PC-PMF の性能を検証するために、標準的な蛍光試料である 1.0 nM クマリン 152 エタノール溶液の蛍光寿命を測定した。励起ピーク波長と発光ピーク波長は、それぞれ 405 nm および 480 nm である。励起光源は、3.3.1 節で示したように 405 nm の LD を用いた。一方、蛍光測定のために、検出側にカットオフ波長 440 nm の LPF (SCF-50S-44Y, シグマ光機) を挿入した。1.0 nM の濃度では、アナログ測光に基づく従来型の PMF アナログ測光では検出できない。図 3.9 に、測定により得られた励起光ヒストグラム波形と、蛍光ヒストグラム波形を示す。測定条件は、 $f = 100\text{MHz}$, $R = 2400\text{ s}$ と設定した。このとき、 $Q = 1.7 \times 10^{-3}$ となった。得られたヒストグラム波形から、畳み込み自己回帰モデルに基づくデータ解析法[29]により蛍光寿命を推定した結果、 $\tau = 1.6 \pm 0.1\text{ ns}$ ($\theta = 68.0 \pm 2.0^\circ$) が得られ、文献値と良く一致した値となった[31]。

さらに、サブナノ秒オーダーの短い蛍光寿命を示す試料として、1.0 mg/L DAPI (4', 6-diamidino- 2-phenylindole) - Tris/EDTA (tris (hydroxymethyl) aminomethane / ethylenediamine-tetraacetic acid) 溶液の測定を行った。これは、DNA プローブとして応用される蛍光色素である。励起ピーク波長と発光ピーク波長は、それぞれ 360 および 460 nm である。励起光源として 405 nm の LD と、蛍光フィルタとしてカットオフ波長 440 nm の LPF (SCF-50S-44Y, シグマ光機) を再び用いた。図 3.10(a), (b), (c) は、それぞれ、 $f = 250\text{ MHz}$, 500 MHz , 1.0 GHz と設定した場合に得られた励起光ヒストグラム波形と蛍光ヒストグラム波形を示す。ここで、全ての測定において測定時間 $R = 2400\text{ s}$ とした。それぞれの条件において得られた Q および θ は、(a) $Q = 1.7 \times 10^{-3}$, $\theta = 72^\circ$, (b) $Q = 1.7 \times 10^{-3}$, $\theta = 75^\circ$, (c) $Q = 1.7 \times 10^{-3}$, $\theta = 80^\circ$ であった。ここで、図を見やすくするために 20 ns の時間幅だけを抜き出して示している。図 3.11 は、変調周波数に対する位相差の測定結果を示している。100 MHz から 1.0 GHz までの各変調周波数における測定を 5 回繰り返し、平均値と標準偏差を求めた。各点は 5 回の平均値であり、またエラーバーは標準偏差を表している。

ここで、試料の減衰波形が二つの指数関数減衰で表現されると仮定しフィッティングを行った結果、蛍光寿命値 $\tau_1 = 2.8 \pm 0.1\text{ ns}$, および $\tau_2 = 0.19 \pm 0.05\text{ ns}$, 初期振幅比 $a_2/a_1 = 2.7 \pm 0.1$ との仮定下において良好にフィットした。得られた蛍光寿命値により算出された位相曲線を、図中を実線で示している。この結果においても、文献とよく一致した値が得られた[32]。

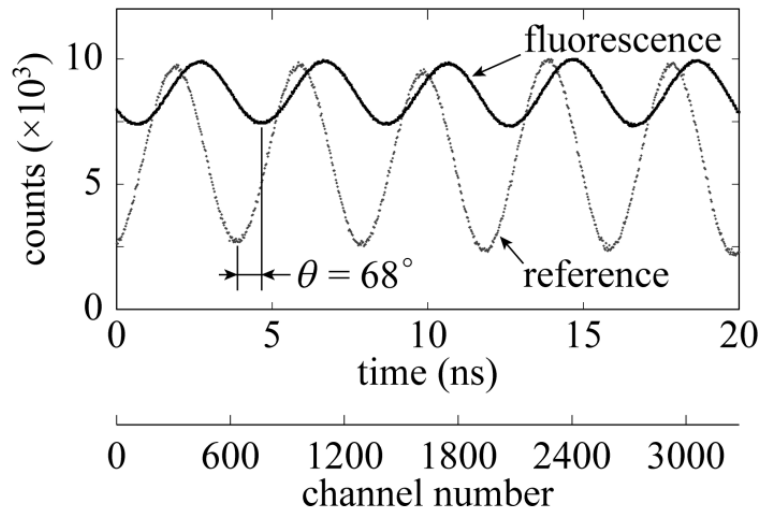


図 3.9 PC-PMF によって得られた励起光ヒストグラム波形と、1.0 nM クマリン 152 エタノール溶液の蛍光のヒストグラム波形. 変調周波数は 100 MHz である. 蛍光寿命を単一指数関数減衰と仮定した場合, 測定結果から蛍光寿命は $t = 1.6 \pm 0.1 \text{ ns}$ と算出された.

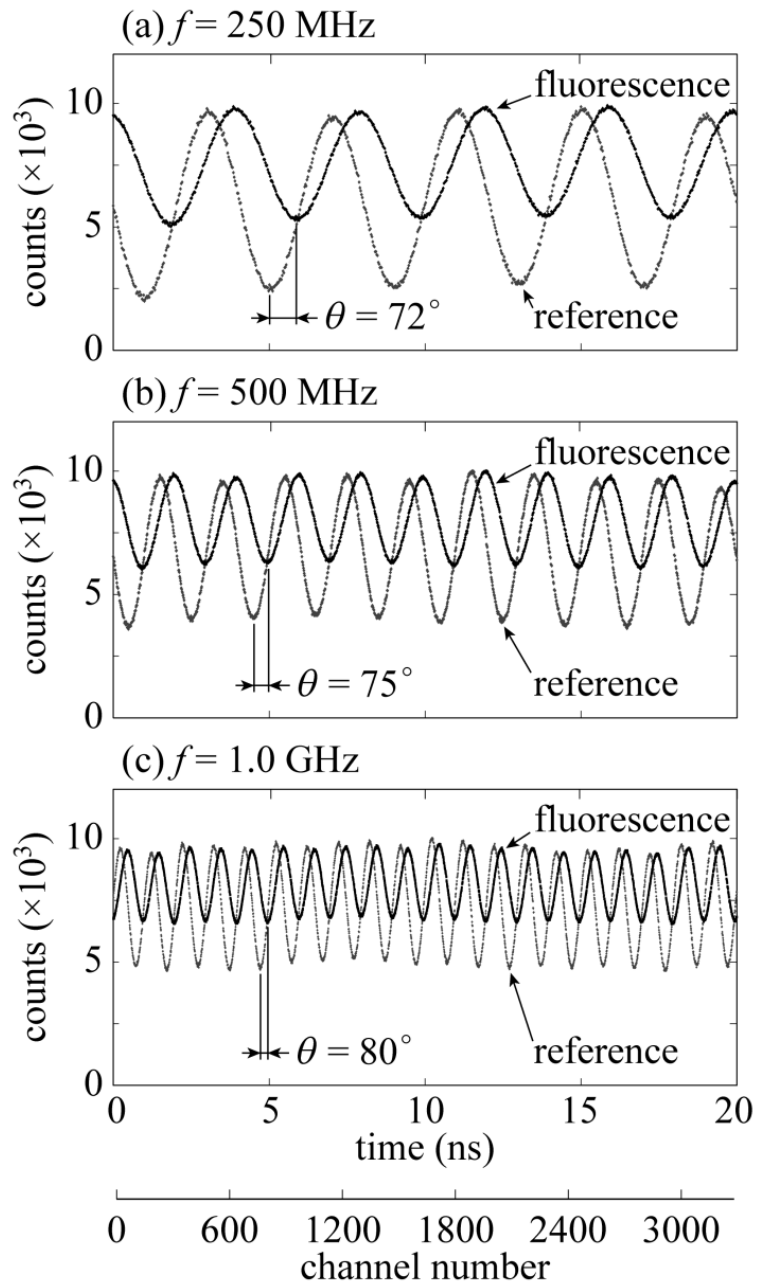


図 3.10 PC-PMF によって得られた励起光ヒストグラム波形と、1.0 mg/L DAPI - Tris/EDTA 溶液の蛍光のヒストグラム波形。変調周波数は、(a)250 MHz, (b) 500 MHz, (c) 1.0 GHz である。

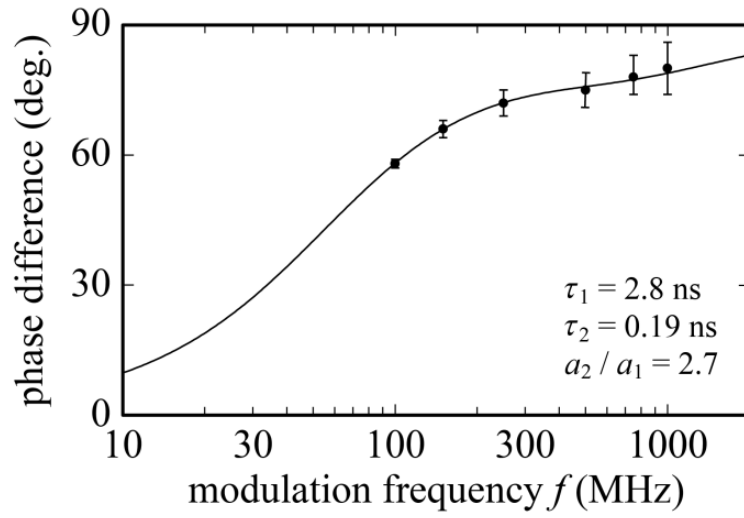


図 3.11 測定により得られた，変調周波数に対する位相差の分布．実線は 2 成分系と仮定した場合の位相曲線を示す．この結果から $\tau_1 = 2.8 \pm 0.1 \text{ ns}$ ， $\tau_2 = 0.19 \pm 0.05 \text{ ns}$ ， および初期振幅比 $a_2 / a_1 = 2.7 \pm 0.1$ と推定した．

3.5 結言

アナログ測光に基づいた従来の PMF を改良し，感度と分解時間を向上させるために，TC-SPC 法に基づいた蛍光検出システムを導入した PMF を構築した．LD を励起光源とした PC-PMF は，シンプルかつ小型な装置構成が実現できる．LD の最大変調周波数は 1.0 GHz であり，従来のアナログ測光による測定周波数帯域を上回る．従来の PMF に TC-SPC 技術を導入することで，低量子収率の蛍光試料の測定のためだけでなく，分解時間の向上においても有効であることを実験的に確認した．これによって，感度と分解時間は検出器の性能に制限され，パルス励起に基づいた TC-SPC 法と同等の性能が達成できた．以上で提案した PC-PMF は，試料のスクリーニング目的に対してとくに有効である．多成分蛍光試料を測定対象とする場合においては，2 章で提案した PM-PMF の導入も可能である．

参考文献

- [1] T. Iwata, A. Hori, and T. Kamada, "Photon-counting phase-modulation fluorometer," *Opt. Rev.* **8**, 326-330 (2001).
- [2] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy 3rd. ed.* (Springer, New York, 2006).
- [3] F. V. Bright, and G. M. Hieftje, "Rapid-scanning frequency-domain fluorometer with picosecond time resolution," *Appl. Opt.* **26**, 3526-3529 (1987).
- [4] H. Merkelo, S. R. Hartman, T. Mar, and G. S. Singhal Govindjee, "Mode locked lasers: measurements of very fast radiative decay in fluorescent systems," *Science* **164**, 301-302 (1969).
- [5] G. Ide, Y. Engelborghs, and A. Persoons, "Fluorescence lifetime resolution with phase fluorometry," *Rev. Sci. Instrum.* **54**, 841-844 (1983).
- [6] M. J. Wirth, and S. H. Chou, "Phase-resolved subnanosecond spectroscopy using the beat frequencies from mode-locked lasers," *Appl. spectrosc.* **42**, 483-486 (1988).
- [7] R. D. Spencer, and G. Weber, "Measurements of subnanosecond fluorescence lifetimes with a cross-correlation phase fluorometer," *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **158**, 361-376 (1969).
- [8] E. R. Menzel, and Z. D. Popovic, "Picosecond-resolution fluorescence lifetime measuring system with a cw laser and a radio," *Rev. Sci. Instrum.* **49**, 39-44 (1978).
- [9] G. Laczko, I. Gryczynski, Z. Gryczynski, W. Wiczak, H. Malak, and J. R. Lakowicz, "A 10-GHz frequency-domain fluorometer," *Rev. Sci. Instrum.* **61**, 2331-2337 (1990).
- [10] J. Sipiior, G. M. Carter, J. R. Lakowicz, and G. Rao, "Blue light-emitting diode demonstrated as an ultraviolet excitation source for nanosecond phase-modulation fluorescence lifetime measurements," *Rev. Sci. Instrum.* **68**, 2666-2670 (1997).
- [11] T. Iwata, T. Kamada, and T. Araki, "phase-modulation fluorometer using an ultraviolet light-emitting diode," *Opt. Rev.* **7**, 495-498 (2000).
- [12] P. Herman, and J. Vecer, "Frequency domain fluorometry with pulsed light emitting diodes," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1130**, 56-61 (2008).
- [13] P. Harms, J. Sipiior, N. Ram, G. M. Carter, and G. Rao, "Low cost phase-modulation measurements of nanosecond fluorescence lifetimes using a lock-in amplifier," *Rev. Sci. Instrum.* **70**, 1535-1539 (1999).
- [14] J. R. Lakowicz, G. Laczko, H. Cherek, E. Gratton, and M. Limkeman, "Analysis of fluorescence decay kinetics from variable-frequency phase shift and modulation data," *Biophys. J.* **46**, 463-477 (1984).
- [15] E. Gratton, M. Limkeman, J. R. Lakowicz, B. P. Maliwal, H. Cherek, and G. Laczko, "Resolution of mixtures of fluorophores using variable-frequency phase and modulation data," *Biophys. J.* **46**, 479-486 (1984).

- [16] J. R. Lakowicz, and B. P. Maliwal, "Construction and performance of a variable-frequency phase-modulation fluorometer," *Biophys. Chem.* **21**, 61-78 (1985).
- [17] T. Iwata, "Proposal for Fourier-transform phase-modulation fluorometer," *Opt. Rev.* **10**, 31-37 (2003).
- [18] T. Iwata, H. Shibata, and T. Araki, "Construction of a Fourier-transform phase-modulation fluorometer," *Meas. Sci. Technol.* **16**, 2351-2356 (2005).
- [19] T. Iwata, A. Muneshige, and T. Araki, "Analysis of data obtained from a frequency-multiplexed phase-modulation fluorometer using an autoregressive model," *Appl. Spectrosc.* **61**, 950-955 (2007).
- [20] T. Iwata, R. Ito, Y. Mizutani, T. Araki, "Autoregressive-model-based fluorescence-lifetime measurements by phase-modulation fluorometry using a pulsed-excitation light source and a high-gain photomultiplier tube," *Appl. Spectrosc.* **63**, 1256-1261 (2009).
- [21] T. Mizuno, Y. Mizutani, and T. Iwata, "Phase-modulation fluorometer using a phase-modulated excitation light source," *Opt. Rev.* **19**, 222-227 (2012).
- [22] T. Miyata, T. Iwata, and T. Araki, "A nanosecond-gate-mode-driven silicon-avalanche-photodiode and its application to measuring fluorescence lifetimes of Ce-doped YAG ceramics," *Meas. Sci. Technol.* **23**, 035501 (2012).
- [23] T. Miyata, T. Araki, and T. Iwata, "Correction of the intensity-dependent phase delay in a silicon avalanche photodiode by controlling its reverse bias voltage," *IEEE J. Quantum Electron.* **39**, 919-923 (2003).
- [24] T. Iwata, H. Shibata, and T. Araki, "Extrapolation of band-limited frequency data using an iterative Hilbert-transform method and its application for Fourier-transform phase-modulation fluorometry," *Meas. Sci. Technol.* **18**, 288-294 (2007).
- [25] T. Iwata, H. Shibata, and T. Araki, "A deconvolution procedure for determination of a fluorescence decay waveform applicable to a band-limited measurement system that has a time delay," *Meas. Sci. Technol.* **19**, 015601 (2008).
- [26] T. Iwata, T. Takasu, and T. Araki, "Simple photomultiplier-tube internal-gating method for use in subnanosecond Time-Resolved Spectroscopy," *Appl. Spectrosc.* **57**, 1145-1150 (2003).
- [27] T. Iwata, T. Inoue, and T. Araki, "Pseudo lock-in light detection method for a gain-modulated photomultiplier-tube," *Opt. Rev.* **11**, 19-23 (2004).
- [28] T. Iwata, H. Ochi, and T. Araki, "A proposal of a pseudo-lock-in light-detection scheme by sinusoidal modulation of bias voltages applied to two dynodes in a photomultiplier tube," *Meas. Sci. Technol.* **20**, 065901-8 (2009).
- [29] T. Iwata, H. Kiyoto, Y. Mizutani, and T. Araki, "Comparison of a pulsed-excitation and a phase-modulation method for estimating fluorescence lifetimes using a convolved-autoregressive model and a high-gain PMT," *Opt. Rev.* **17**, 513-518 (2010).

- [30] T. Iwata, T. Uchida, and S. Minami, "A nanosecond photon-counting fluorimetric system using a modified multichannel vernier chronotron," *Appl. Spectrosc.* **39**, 101-109 (1985).
- [31] S. Nad, M. Kumbhakar, and H. Pal, "Photophysical properties of coumarin-152 and coumarin-481 dyes: unusual behavior in nonpolar and in higher polarity solvents," *J. Phys. Chem. A* **107**, 4808-4816 (2003).
- [32] M. L. Barcellona, and E. Gratton, "The fluorescence properties of a DNA probe," *Eur. Biophys. J.* **17**, 315-323 (1990).

4章 アダマール変換型蛍光寿命イメージング法

4.1 緒言

蛍光寿命は、発光スペクトル、励起スペクトル、蛍光の偏光とともに、蛍光を特徴づける重要な項目の一つである。スペクトル情報に蛍光寿命という情報を新たに付加することにより、試料の識別能力を向上させられるだけでなく、分子の動的挙動や蛍光共鳴エネルギー移動(FRET; fluorescence resonance energy transfer)などに関する重要な情報も取得できる[1, 2]。特に顕微蛍光寿命イメージング(FLIM; fluorescence lifetime imaging microscopy)は、適切な蛍光ラベルを導入することにより、生体試料の局所的な観察など生化学分野で広く利用されている [3,4]。

従来の FLIM は、検出器に着目して2種類に大別できる。すなわち、(i)共焦点顕微鏡を用いたスキャン法と(ii)イメージンテンシファイアと CMOS カメラのような2次元検出器を組み合わせた wide-field FLIM (WF-FLIM)である。前者の共焦点顕微鏡を用いたスキャン法では、試料ステージまたは励起スポット位置を走査し、光電子増倍管 (PMT) のような単一検出器を用いる[5,6]。そのため、微弱な蛍光に対応可能であり、高い3次元空間分解能が達成できる[7]。しかし、機械的な走査方式であるため測定に長時間を必要とする。したがって短時間で変性してしまうような生体試料には対応させづらい。ガルバノ鏡を使用した高速走査も可能であるが、やはり機械的振動等への注意深い対応が要求される。

そのような理由で、WF-FLIM の採用も大いに必要である。WF-FLIM では、観察領域全体を同時に励起し、時間的なゲートを用いて時間分解蛍光イメージを得る。しかし検出感度は、PMT や APD のような高感度シングルチャネル検出器には及ばない。ここで、FLIM には、光源に着目すると、パルス励起光と正弦波変調光を用いる 2 つの方式が存在する。パルス励起光法では、励起パルス時刻に対してゲート時刻のタイミングを時間的に遅延走査させながら蛍光減衰波形を取得する。しかし、分解時間はゲート時間幅で決定されてしまい、たかだか数ナノ秒オーダーである。また信号の収集効率が低く、測定に要する時間も長くなってしまふ。それを克服するため、蛍光減衰時間内に複数個の時刻に固定ゲートを設け蛍光寿命値を算出する手法もあるが[8]、蛍光減衰波形が単一指数関数波形であることが前提であり、多成分試料には対応しにくい。加えて二次元検出器のフレームレートで繰り返し周波数の上限が制限されてしまうという問題もある。高速掃引可能な二次元検出器も開発されてはいるが [9]、やはり画素数の制限があり高価である。そこで、光源として正弦波変調光を採用し、位相変調法で蛍光寿命を算出する手法がよく用いられている。この手法では、例えば、正弦波一周期内に互いに 90° 位相の異なる 4 つのゲートを用意し、参照信号に対する位相差、もしくは振幅比から蛍光寿命値を算出する[10, 11]。正弦波励起のため、試料に対するダメージが少なく、生体試料に対する多くの適用例がある。しかし、多成分試料に対応するためには複数個の変調周波数での測定が要求される。また、たとえ単一成分であってもそれを確認するためには複数個の励起周波数での測定が必要となる。

また、微弱蛍光や短蛍光寿命種の試料に対しては、パルス光励起の場合と同様に対応が難しい。

このような従来の FLIM の問題を解決するために、本章ではアダマール変換型蛍光寿命イメージング (HT-FLI; Hadamard transform fluorescence lifetime imaging) 法を新たに提案する。HT-FLI は、既報の変調周波数を掃引する位相変調法 (FT-PMF; Fourier transform phase modulation fluorometry) [12] とアダマール画像取得法 (HTI; Hadamard transform imaging) [13-15] を結合させた新規な手法である。

類似の概念のシミュレーションベースの報告は既にある[16]。しかし、それはアダマール変換に基づく測定のマルチプレックスアドバンテージに着目した提案である。検出器雑音が優勢な場合の測定の SN 比と信号利用効率は確かに向上する。しかし、蛍光測定で必須となる PMT のような可視紫外波長域での光子検出器を利用する場合は、そのような状況は少なく、結果的にマルチプレックスアドバンテージの寄与は小さい。ここでは、むしろ、従来の WF-FLIM の感度と時間分解能の問題点を緩和する目的で、HTI 法を利用することを提案する。その結果、PMT のような高感度な単一検出器が使用できるため、ダイナミックレンジの制約を受けることなく、高い分解時間で高感度測定が可能となる。また、巡回アダマール励起パターンを利用すれば、高速な励起パターンマスクの電気的な走査が実現できる[13]。本提案手法においては、多成分試料に対して複数個の蛍光寿命値毎に、相対成分比率の画像が比較的容易に取得できるようになる。これはもちろん従来手法でも取得可能であるが、上述の理由により多成分試料に対応するのが難しく実現させにくかった。したがって多くの場合は視野内の局所位置ごとの平均蛍光寿命値のマッピングに留まっていた [4-10]。

提案の第一の目的は HT-FLI の概念を提案することである。第二の目的は、提案した概念の原理検証のために試作した簡易バージョンの装置の構成とその性能評価について詳述することである。そのため、製作した装置では手法の検証に重点を置き、蛍光の測定光学系を単純なインライン配置とした。また、励起光源は自作の 8×8 ピクセルで構成される青色 LED アレイとした。そのため、画像の空間分解と算出可能な蛍光寿命値の下限を犠牲とした。すなわち、試作機の画像の分解は LED の配置間隔である 3.0 mm であり、算出可能な蛍光寿命値の下限は LED の変調周波数の上限 50MHz で決まる。したがって、現在の実用的な FLIM の要求仕様と比較するとかなりの隔りがある。実用的な FLIM の実現が喫緊の課題であるが、その設計の指針については後述する。

4.2 フーリエ変換型位相変調法とアダマール変換型イメージング法の測定原理

本章で提案する HT-FLI は、フーリエ変換型位相変調方式蛍光寿命計(FT-PMF)部とアダマール変換画像処理(HTI)部で構成される。多成分蛍光寿命測定に対応できる FT-PMF をベースとし、それに HTI を組み合わせることで2次元イメージングに対応できるよう拡張した。以下、それぞれを簡単に説明する。両者を組み合わせた HT-FLI については次章で説明する。

4.2.1 フーリエ変換型位相変調法

FT-PMF の動作原理については既に報告済であるため[12]、ここでは概要説明に留める。図 4.1 に、FT-PMF における測定の概念図を示す。この手法では、励起変調周波数をある一定の周波数範囲 f_{\min} から f_{\max} まで、時間幅 T で掃引させる方式の位相変調方式蛍光寿命計である。その結果得られる蛍光波形は、変調周波数に応じて振幅 A 、位相 θ とも時間的に変化する。したがって、参照光と蛍光波形の両者を取得し、離散フーリエ変換(DFT)処理を経て、それぞれの振幅比 $m(f) = \{A_{em}(f)/A_{em}(0)\} / \{A_{ex}(f)/A_{ex}(0)\}$ 、位相差 $\theta(f) = \theta_{em}(f) - \theta_{ex}(f)$ を変調周波数の関数として算出すれば、2章と同様の位相法のデータ処理手法にしたがって蛍光寿命値が算出できる。ここで、 A は振幅、 θ は位相を表しており、添字の ex と em は、それぞれ励起光波形と蛍光波形を表している。ここで、 $f_{\min} = 0$ とすれば、フーリエ変換処理を経て蛍光減衰波形も算出できる[12]。単一成分試料のみならず多成分蛍光試料に対しても有用である。なお、解析周波数の分解は、取得した波形のデータ点数 L 、サンプリング周波数を f_s とおくと、 $\Delta f = f_s / L$ となる。このうち、蛍光寿命の推定に用いることができるデータ点数 K は、 $K = L (f_{\max} - f_{\min}) / f_s$ となる。

2章で述べた PM-PMF と対比させると、FT-PMF は励起光にチャープ変調波形を用いた場合として取り扱える。ここでは原理検証を目的とするため、広い変調周波数帯域を同時に測定できる FT-PMF を採用したが、PM-PMF でも構わない。

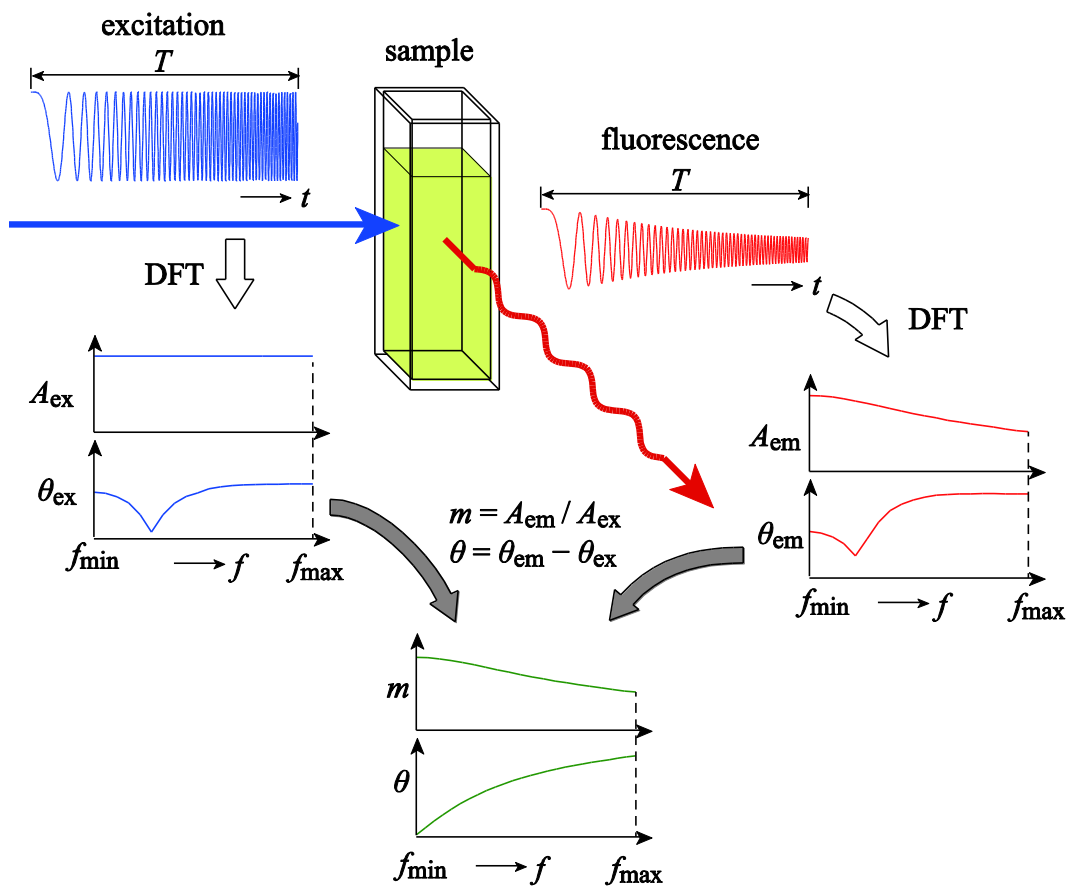


図 4.1 FT-PMF の測定概念図.

4.2.2 アダマール変換型イメージング法

HTI 部には、励起照明用の構造化光源として $n \times n$ 個の LED からなる 2 次元アレイを用いる。ここでの目的は 2 次元の画像処理であるが、2 次元 HT 処理は用いず、簡単のため 1 次元処理の手順を 2 次元にそのまま展開して 1 次元 HT 処理を適用する。その概要を以下に述べる。まず、測定システムを図 4.2(a)に示す。このシステムは、光源と、既知の N 個のアダマールマスク、試料 \mathbf{G} 、および点検出器で構成される。光源からの照明光を個々のアダマールマスクに透過させ、そのときの試料を透過した光強度を点検出器により得る。結果として、 N 個の時系列ベクトル値 \mathbf{y} が得られる。 \mathbf{y} から、HTI に基づいた解析法によって試料の像 \mathbf{G} と等価な列ベクトル \mathbf{g} を得る。

HTI に際し、本提案では、 $n \times n$ ピクセルからなる LED アレイで構成された構造化照明によってアダマールマスクパターンを形成した。LED アレイを駆動するパターンの作成には、単純に 1 次元アダマール変換を拡張した手法を利用した。まず、観察視野領域を $n \times n$ からなる画素に分割し、図 4.2(b)に示すように $N \times 1$ の試料像列ベクトル \mathbf{g} を作成する。ここで、 $N = n \times n$ である。すなわち、 \mathbf{g} は \mathbf{G} を再配置したものである。HTI におけるマスクパターンの投影は、この試料の像ベクトル \mathbf{g} と、 $N \times N$ のマスク行列 \mathbf{M} を、図 4.2(c)に示すように乗算することに相当する。結果として、 $N \times 1$ の観測列ベクトル $\mathbf{y} (= \mathbf{M}\mathbf{g})$ が得られる。マスク行列 \mathbf{M} は、 $N \times N$ のアダマール行列 \mathbf{H} から次のようにして得られる。 \mathbf{H} は、1 行目と 1 列目の要素が全て 1 であり、残りの $(N-1) \times (N-1)$ の部分は巡回アダマール行列 \mathbf{H}' とする。 \mathbf{H}' を構成する要素は $\{-1, 1\}$ である。次に要素が全て 1 である $N \times N$ の行列 \mathbf{B} を作成する。そして、 $\mathbf{M} = (\mathbf{B} - \mathbf{H})/2$ の演算から、図 4.2(d)に示す $N \times N$ のマスク行列 \mathbf{M} ができる。その要素は $\{1, 0\}$ から成り、1 は光を透過、0 は遮光というように対応付けられる。 \mathbf{M} の 1 行 1 列目の要素は全て 0 となる。 \mathbf{M} のその他の要素は、 \mathbf{H}' の要素の 1 を 0 に、-1 を 1 に置き換えたものとなる。したがって \mathbf{M} の中の \mathbf{H}' に対応する部分も巡回行列となる。なお、 \mathbf{H}' の各行の巡回パターンは maximal length shift-register sequences の方法にしたがって作成できる[13]。 \mathbf{g} は、測定により得られた \mathbf{y} から次のように算出できる。まず、 $\mathbf{y} = \mathbf{M}\mathbf{g}$ において、 $\mathbf{M} = (\mathbf{B} - \mathbf{H})/2$ であるので、 $\mathbf{y} = (\mathbf{B} - \mathbf{H})\mathbf{g}/2$ となる。このとき、 \mathbf{M} の 1 列目の要素は全て 0 であるので、 \mathbf{g} の第 1 要素を $g_1 = -(g_2 + \dots + g_N)$ としても測定に影響は無い。このとき、 $\mathbf{B}\mathbf{g} = \mathbf{0}$ となるので、 $\mathbf{y} = -\mathbf{H}\mathbf{g}/2$ となる。さらに、 \mathbf{H} の転置行列 \mathbf{H}^T を両辺に掛けることで、 $\mathbf{H}^T\mathbf{y} = -\mathbf{H}^T\mathbf{H}\mathbf{g}/2$ となる。 \mathbf{H} は正規化されており $\mathbf{H}^T\mathbf{H} = \mathbf{I}$ である。ここで、 \mathbf{I} は $N \times N$ の単位行列である。したがって、 $\mathbf{H}^T\mathbf{y} = -\mathbf{M}\mathbf{g}/2$ となり、 $\mathbf{g} = -2\mathbf{H}^T\mathbf{y}/N$ となる。さらに、 \mathbf{H} はエルミート行列であるので、 $\mathbf{H}^T = \mathbf{H}$ である。したがって、 $\mathbf{g} = -2\mathbf{H}\mathbf{y}/N$ から \mathbf{g} が得られる。

実際の照明に用いる LED のマスクパターンは、上記の $N \times N$ の行列 \mathbf{M} から作成する。図 4.2(d)に示すように、この \mathbf{M} の第 1 行の要素を左から順番に n 個ずつ取り出して、行方向に順番に並べて $n \times n$ の正方配置とし、マスク番号 $i = 1$ の照射パターンとする。次に第 2 行に対して同様の操作を行い、 $i = 2$ の照射パターンとする。以下同様の操作を第 N 行まで行い、 $i = N$ まで N 個の照射パターンが得られる。行列 \mathbf{M} の第 1 行の要素は全て 0 であるため、 $i =$

1におけるマスクパターンは完全な遮光マスクとなり，そこで測定される観測データ y_1 は 0 である．また，行列 \mathbf{M} の第 1 列の要素は全て 0 であるため，復元された画素の $(w, h) = (1, 1)$ の要素は 0 となる．ここで， w と h は画像中におけるピクセル位置を表し， w はピクセルの高さ位置， h はピクセルの横位置である．なお， \mathbf{M} の $\{1, 0\}$ のパターンを反転させても同様の操作により測定が可能である．

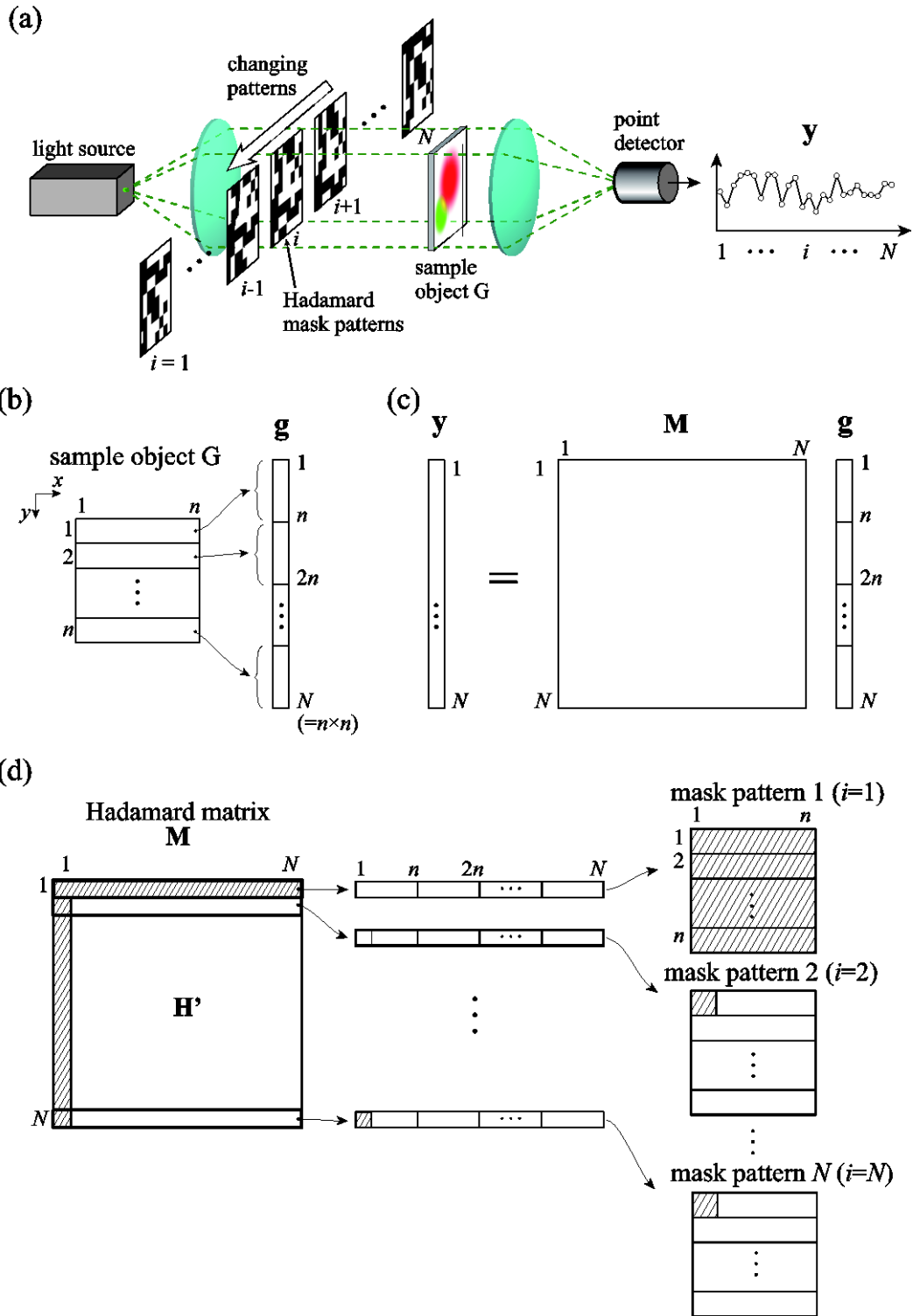


図 4.2 1 次元巡回アダマール行列を用いた 2 次元画像取得法. (a) HTI システムのブロック図, (b) 試料像の列ベクトル g と試料像 G の関係, (c) HTI 法による観測列ベクトル y とアダマール行列 M , 試料像の列ベクトル g の関係, (d) アダマール行列 M からマスクパターンの作成.

4.3 アダマール変換型位相変調方式蛍光寿命イメージング装置の構成と動作

4.3.1 アダマール変換型位相変調方式蛍光寿命イメージング装置

図 4.3 に、FT-PMF と HTI を組み合わせた、HT-FLI システムのブロック図を示す。励起光源は、 $n \times n$ 個の LED (発光中心波長 525 nm, OSTG1608C1A, Opto Supply) を配置した LED アレイとした。これをアダマールマスクパターンにしたがって、順次 ON/OFF 駆動させる。こうして得られる LED アレイの像を試料上に結像させ、LED の位置に対応する点を励起させる。用いた試作機では $n = 8$ とした。LED の配置間隔は物理的に 3.0 mm であり、それを試料上に等倍結像させた。試料からの蛍光は、長波長透過フィルタ(LPF)を経て、インライン配置とした PMT(R7400U, Hamamatsu Photonics)に入射させた。PMT からは、励起マスクパターンの切替えに同期した $N (=n^2 = 64)$ 個の時系列データが得られる。

N 個の励起マスクパターンを切り替えるタイミング図を図 4.3(a)に示す。 N 個の励起マスクパターンのそれぞれの照射時間幅 $T (=2.0 \mu\text{s})$ 内で、図 4.3(b)に示すように ON 状態のすべての LED をチャープ波形で高速変調させる。すなわち、時間的に同期させて、周波数 $f_{\min} (=0 \text{ Hz})$ から $f_{\max} (=50 \text{ MHz})$ まで、時間的に線形な周波数掃引を行う。このとき PMT からは、図 4.3(c)に示すように、試料上の画素毎の蛍光寿命値(場合によっては 0, もしくは複数点の蛍光が重なり合った状態)に応じて振幅と位相が変化した蛍光の時系列信号が $N (=64)$ セット得られる。それぞれの区間 T の信号は、空間的な $N/2 (=32)$ 画素分の合成加算信号である。それを、全データ点数 10^6 、サンプリング時間間隔 400 ps、垂直分解能 11 ビットの測定条件を設定したデジタルオシロスコープ(TDS5054B, Tektronix)を経て、パソコンに取り込み LabVIEW(National Instruments)で処理する。ここで、個々の励起マスクパターンに対応した蛍光波形のサンプリング間隔は $\Delta t (=400 \text{ ps})$ とし、各区間のデータ点数は $L (=5,000)$ とした。したがって、1 回の掃引に要する時間は $\Delta t L (=2.0 \mu\text{s})$ であり、パターン切り替えのためのデットタイム $T_d (=2.0 \mu\text{s})$ も含めると $T (=4.0 \mu\text{s})$ と設定できる。1 回の画像測定に要する時間は $NT (=256 \mu\text{s})$ となり、従来の通常に使用される 2 次元検出器のフレームレートより高速な画像取得が可能となる場合もある。

得られた蛍光波形の解析では、まず、図 4.3(d)のように時系列信号をマスクパターンに対応した区間に分けて $L (=5,000)$ 点の DFT を施すことにより、 N セットの実部と虚部のスペクトルペアを得る。ここで、SN 比が高い $k (\ll N)$ 個の変調周波数成分を選択抽出する。実際には f_1 から f_2 の周波数帯域を $\Delta f (=f_s / N)$ 毎に k (例えば、 $k=10$) 分割する。その結果、 k 個の各周波数において、 N 個の要素からなる実部と虚部のスペクトル行列 $N \times k$ を得る。これらの各列に対して逆 HT を施すことにより、図 4.3(e)のように k 個の異なる周波数に対する画像列ベクトルが算出できる。これらは、 $n \times n$ の解像度を有する実部と虚部のスペクトル画像である。同様の処理により参照信号をあらかじめ取得しておき、図 4.3(f)に示すように k 個の周波数に対する $n \times n$ の大きさの位相差イメージと振幅比イメージを得る。ここで、 $f = 0$ に相当する振幅比イメージは、通常の蛍光強度画像に相当する。これらのデータに対して、図中 P で表すように、1 点ずつ従来の位相変調法に基づいた解析を行う [11]。任意の成分数

を c と仮定して、図 4.3(g) のように各成分の蛍光寿命値毎の相対蛍光強度比率イメージ a が得られる。分析可能な最大成分数は、ノイズが無いと仮定すれば、 $c_{\max} = k/2$ となる。なお、測定の SN 比を確保するために、必要に応じて p セットの時系列信号の積算処理を行う。以上の処理においては、測定した時系列データを DFT によって周波数領域データとした後、有限個の k 個の周波数のみを選択して逆 HT を行った。この操作によって、時系列データを選択せずにそのまま逆 HT を行った場合と比較して、計算時間が大幅に低減できている。DFT が線形演算であるためこのような処理が可能となる。

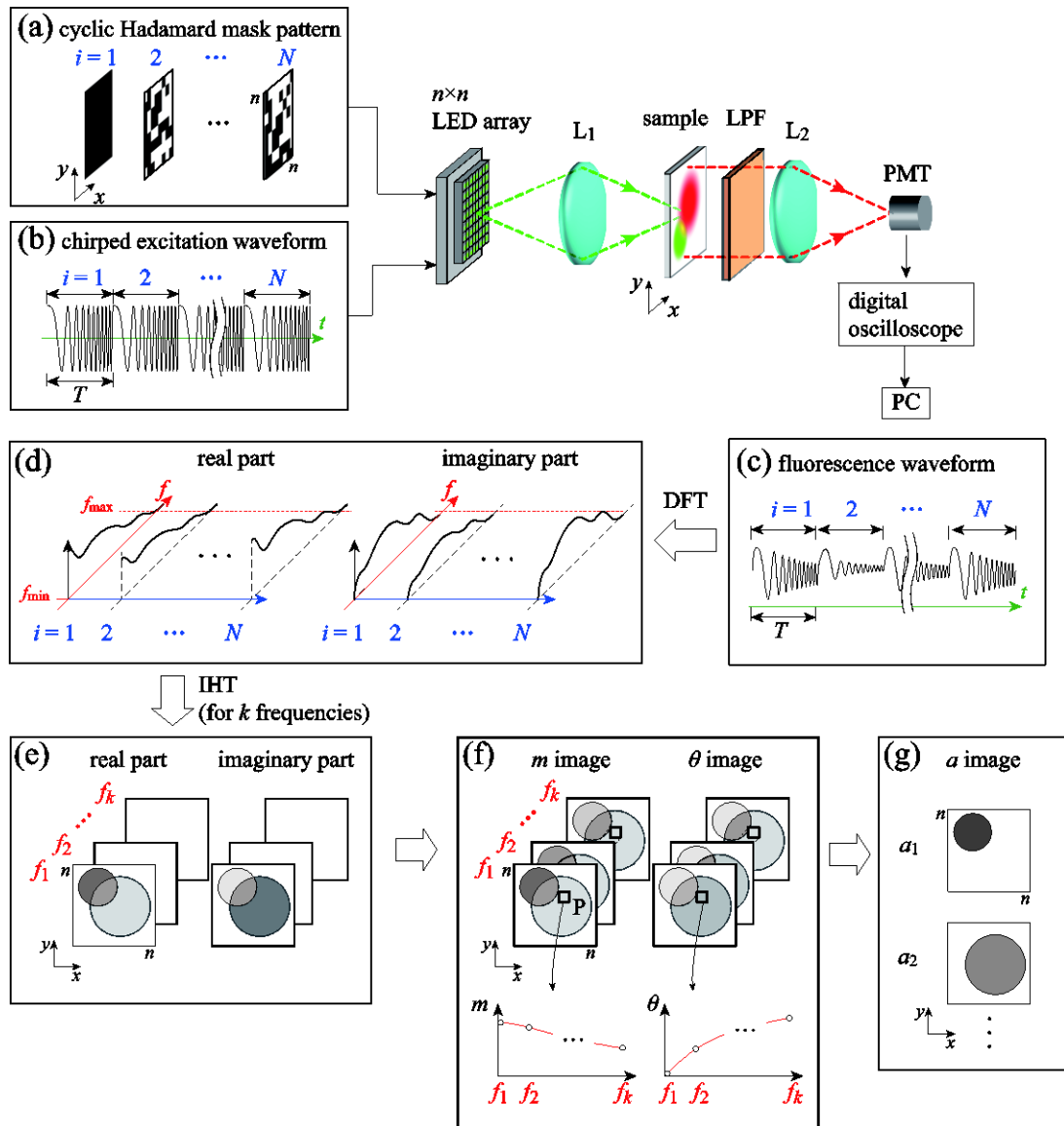


図 4.3 HT-FLI の動作とデータ処理の概念図. (a)巡回アダマールマスクパターン, (b)チャープ励起波形, (c) 時系列蛍光波形, (d) N 組の実部スペクトルと虚部スペクトル, (e)(d)からアダマール逆変換により得られた実部画像と虚部画像. (f)振幅比画像 m と位相差画像 θ , (g) 蛍光寿命値毎の相対蛍光強度比率イメージ a .

4.3.2 LED アレイ駆動回路

図 4.4 に, $n \times n$ の LED アレイドライバ駆動回路の動作概念を示す. 駆動回路は, $n \times n$ ($=N=64$) ビットから成るアダマールパターンの巡回用のシフトレジスタ(CSR, cyclic shift register, 74HC194 $\times 16$, 動作最大周波数 70 MHz, Toshiba), システムの基準クロックの発生に用いたファンクションジェネレータ(WF1965, NF Corporation), アダマールパターンの初期値設定回路, チャープパルス発生器(AWG, arbitrary waveform generator, 最大周波数 1.0 GHz, AWG520, Tektronix), そして LED 駆動用の 64 ビットのトランジスタアレイから成る. 図 4.4(A)にシステムの基準クロックを示す. 基準クロックの周期は $T_c = 4.0 \mu\text{s}$ とし, パターンの切り替えと周波数の掃引開始を同期させる. 4.3.1 節で述べたように, LED アレイはアダマールパターンに基づいて ON/OFF 制御される. この切替えタイミングを図 4.4(B)に示す. ON 制御されている光源は, 同時にチャープ波形で高周波変調される. 周波数の掃引は, パターンの切替えが完了した後に周波数の掃引を行う. パターン切替えの待機時間は $T_d = 2.0 \mu\text{s}$ とし, 図 4.4(C)に示すように, 基準クロックから T_d だけ遅延させた掃引開始パルスをもとに周波数掃引を開始する. 結果として, 図 4.4(D)のようなチャープ波形が得られる. チャープ波形掃引周期は $T = 2.0 \mu\text{s}$ とし, $f_{\min} = 0 \text{ Hz}$, $f_{\max} = 50 \text{ MHz}$ とした. こうして得られたアダマールパターンとチャープ波形を NAND ゲート(TC74AC00FT, 最大出力電流 25 mA/gate, Toshiba)で重畳し, その出力で個々の LED を駆動する. NAND ゲートを用いるため, 正弦波が 2 値化され矩形波となるが, 周波数分解の後に解析を行うため動作に影響は無い. それぞれの LED はピーク電流 6.4 mA で駆動した.

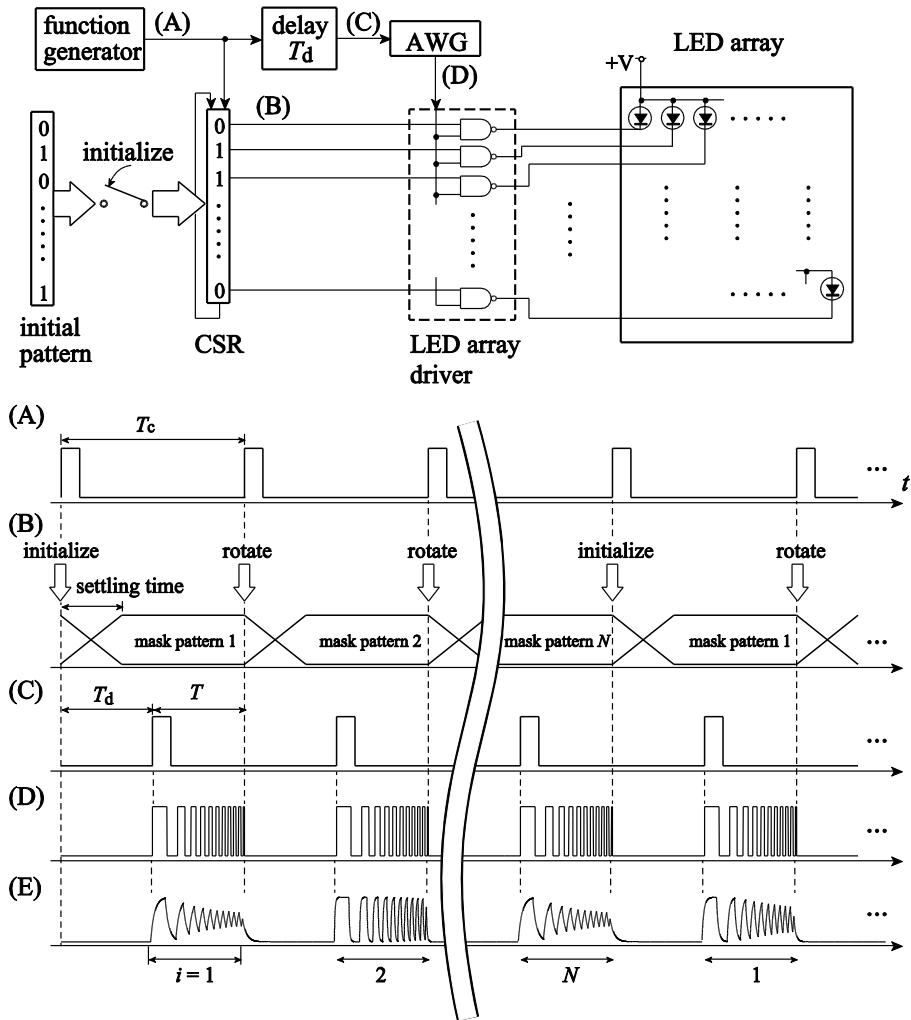


図 4.4 LED アレイ駆動回路. (A)システムのクロックパルス, (B)投影パターン切り替えタイミング, (C)波形取得トリガパルス, (D)チャープ変調波形, (E)得られる蛍光波形.

4.4 実験結果

提案手法の原理検証として、2種の測定実験を行った。1つ目の実験では、単一成分試料の蛍光寿命イメージングを行った。ここでは、次の2種類の蛍光標準試料を測定対象とした。(i)10 μ M ローダミン 6G エタノール溶液(R6G, 吸収極大波長 525 nm, 発光ピーク波長 555 nm), (ii)10 μ M ローダミン B エタノール溶液(RB, 吸収極大波長 555 nm, 発光ピーク波長 580 nm)である。これらは、2つの石英製角型分光セルに別々に注入し、図 4.5(a)に示すように励起視野内に並べた配置とした。以降はこの配置を(A)とする。(A)は、単一成分試料が空間的に分布している場合のイメージングを想定している。

2つ目の実験では、多成分試料が空間的に分布している場合を想定した。R6G および RB を異なる体積比で混合した3種の試料の測定を行った。R6G および RB の混合比は、それぞれ (iii) 0.25:0.75, (iv) 0.5:0.5, および (v) 0.75:0.25 とした。これらは、図 4.5(b)に示すような空間配置とした。この配置は以降(B)と表記する。

図 4.5(c)および(d)に、(i) R6G, (ii) RB, および (iv) R6G:RB=0.5:0.5 の混合溶液の励起スペクトルと蛍光スペクトルを示す。それぞれの吸収ピーク波長は、(i)540nm, (ii)555 nm, (iv)550 nm であり、また蛍光ピーク波長は(i) 560 nm, (ii) 575 nm, (iv) 569 nm であった。この結果をもとに、励起光投影光路に透過波長 550 ± 10 nm のバンドパスフィルタ (VPF-25C10-50-55000, シグマ光機)を設置し、蛍光検出光路にはカットオフ波長 580nm の蛍光透過フィルタ LPF(SCF-50S-580, シグマ光機)を挿入した。

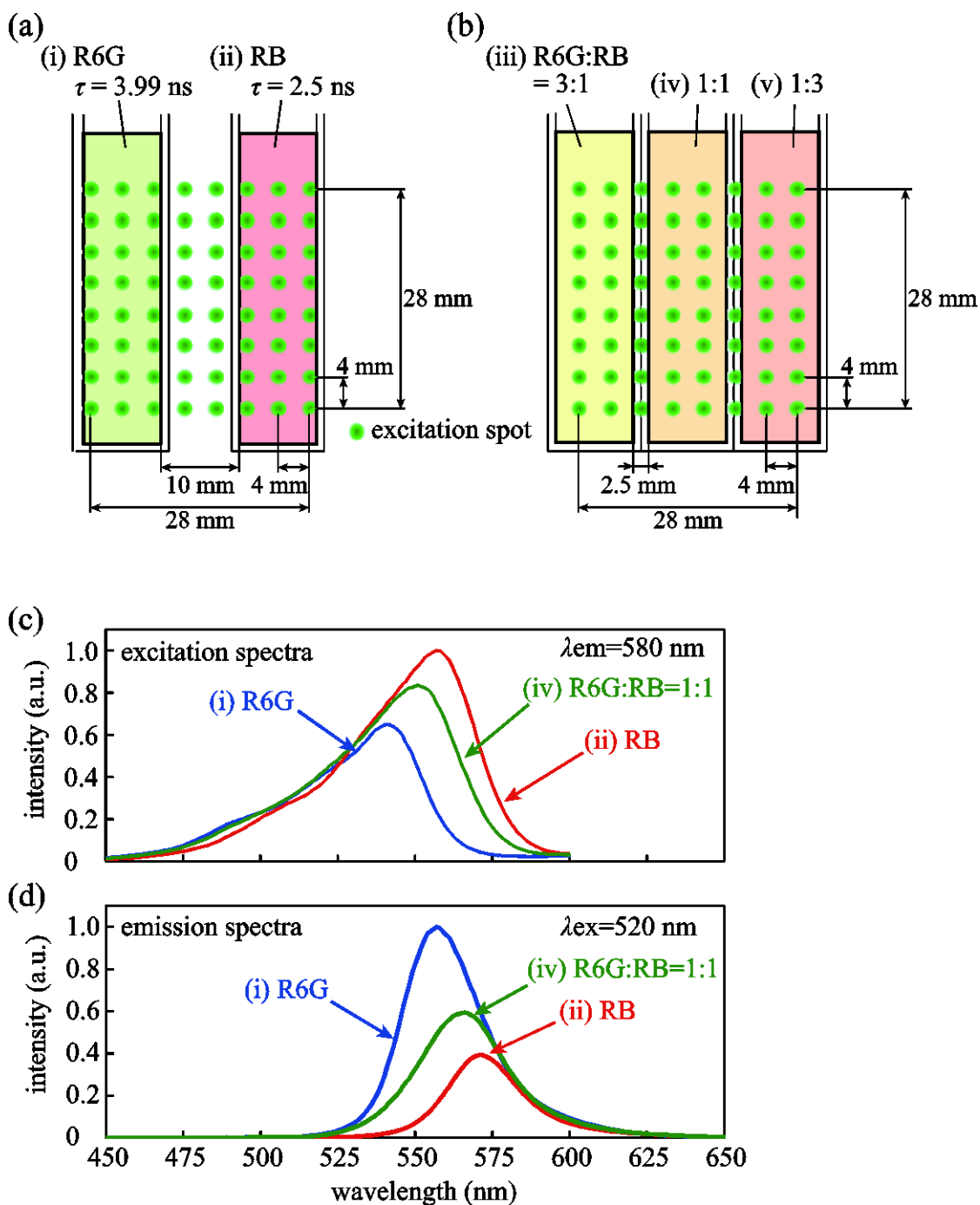


図 4.5 検証に用いたサンプル。(a)および(b)サンプルの配置。(a)は $10 \mu\text{M}$ ローダミン 6G エタノール溶液(図中では(i)R6G と表記)と $10\mu\text{M}$ ローダミン B エタノール溶液(図中では(ii)RB と表記)を配置した。(b)R6G と RB を混合した 2 成分試料を配置した。(c)試料の励起スペクトル。図中では代表値として試料(i), (ii), (iv)のスペクトルを示している, 同様に(d) 試料(i), (ii), (iv)の蛍光スペクトル。

4.4.1 1成分試料の蛍光寿命イメージング

配置(A)における蛍光寿命イメージングの結果を図 4.6 に示す. 図 4.6(a)は, $f=0$ における蛍光強度画像である. 画像中央部の 2 列は, セル間の空気層に相当する. また, 4.2.2 節で述べたように $(x,y) = (1,1)$ の画像要素は情報を持たない. 図 4.6(b)および(c)は, (a)における代表点 X と Y における $m(f)$ および位相差 $\theta(f)$ を示している. 各点の蛍光減衰波形を 2 成分の指数関数減衰と仮定しフィッティングにより蛍光寿命値を推定したところ, (b)では蛍光寿命 $\tau_1 = 4.2 \text{ ns}$, (c)では $\tau_2 = 2.5 \text{ ns}$ となった. これらは, R6G と RB の蛍光寿命に相当する. これらの値は, 文献値とよく一致した[17, 18]. このとき, それぞれの点における蛍光相対強度 a_2/a_1 は, X において零, Y において 0.5 となった. これを各点毎に行い得られた蛍光相対強度画像を図 4.6(d)に示す. これは, RB に相当する蛍光寿命 $\tau = 2.5 \text{ ns}$ の成分の強度分布を示しており, 試料の配置通りの結果となった. 図 4.6(e)は, $\tau = 4.2 \text{ ns}$ の成分の初期振幅を表しており, R6G の領域では発光が観察されているが RB の領域では信号が得られていない. 同様に, 図 4.6(f)は $\tau = 2.5 \text{ ns}$ の成分の初期振幅を表しており, 当然ながら RB が存在する領域のみにおいて信号が得られた.

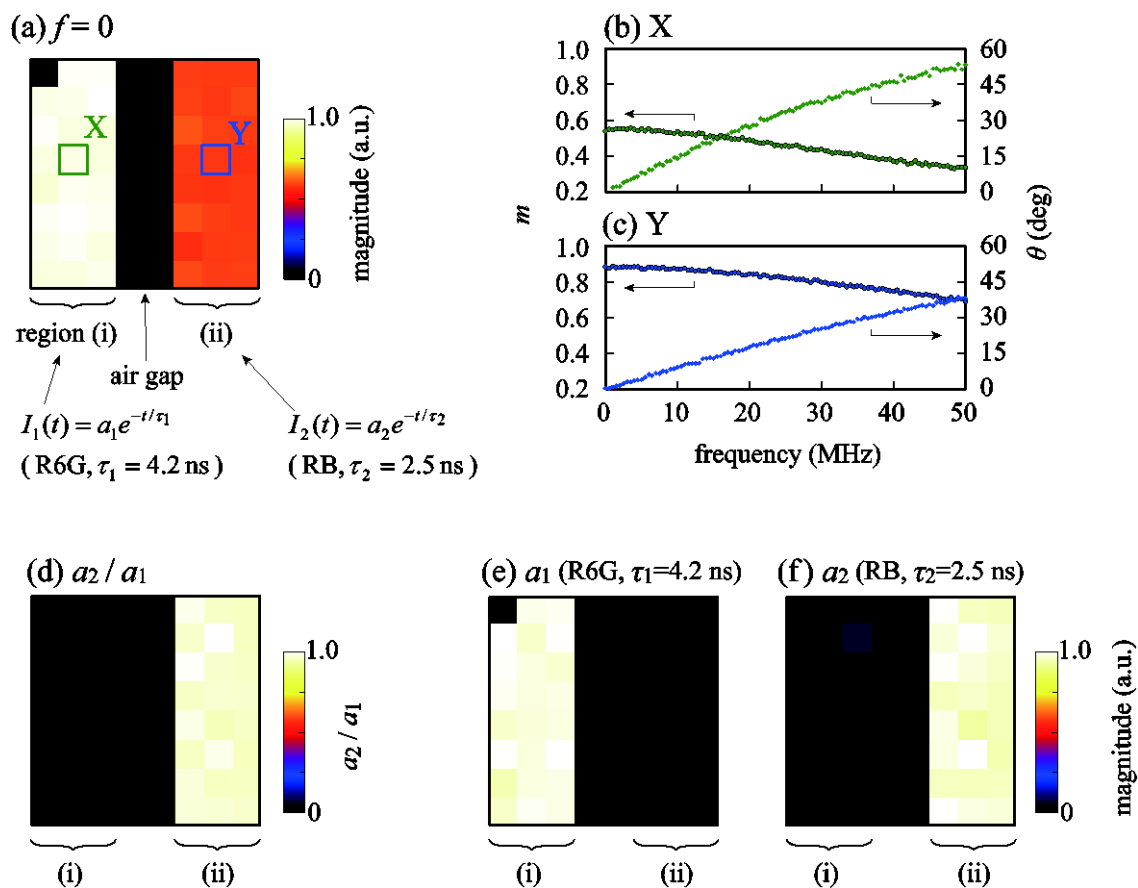


図 4.6 (a)HT-FLI による定常光成分の測定画像, (b)(a)における X 点で測定された周波数に対する変調度と位相差の変化, (c)(a)における Y 点での周波数に対する変調度と位相差の変化, (d)初期振幅比の相対強度分布, (e) $\tau_1 = 4.2 \pm 0.21$ ns の成分に相当する a_1 の分布. (f) $\tau_2 = 2.5 \pm 0.13$ ns の成分に相当する a_2 の分布.

4.4.2 2成分試料の蛍光寿命イメージング

配置(B)における蛍光寿命イメージングの結果を図 4.7 に示す。図 4.7(a)は、 $f=0$ における蛍光強度画像である。図 4.7(a)中に示している X, Y, Z を代表点とし、それぞれの $m(f)$ と $\theta(f)$ を図 4.7(b), (c), (d) に示す。4.4.1 節と同様に、蛍光減衰波形を 2 成分の指数関数減衰と仮定しフィッティングにより蛍光寿命値を推定した。その結果、視野内の全ての点において $\tau_1 = 4.2 \text{ ns}$, $\tau_2 = 2.5 \text{ ns}$ として良好にフィットした。それぞれの点における蛍光相対強度 a_2/a_1 は、X において 0.52, Y において 0.81, Z において 0.92 となった。これを各点毎に行い得られた蛍光相対強度画像を図 4.7(e) に示す。これは、RB に相当する蛍光寿命 $\tau_2 = 2.5 \text{ ns}$ の成分の強度分布を示しており、試料中の RB の濃度分布と同様の結果となった。図 4.7(f) は、 $\tau = 4.2 \text{ ns}$ の成分の初期振幅を表しており、R6G の濃度分布に対応する初期振幅が得られている。同様に、図 4.6(f) は $\tau = 2.5 \text{ ns}$ の成分の初期振幅を表しており、これは RB の濃度分布に対応していることがわかる。また、これら R6G と RB の初期振幅は、4.4 節冒頭におけるスペクトル測定の結果と比較して妥当であることが確認できる。

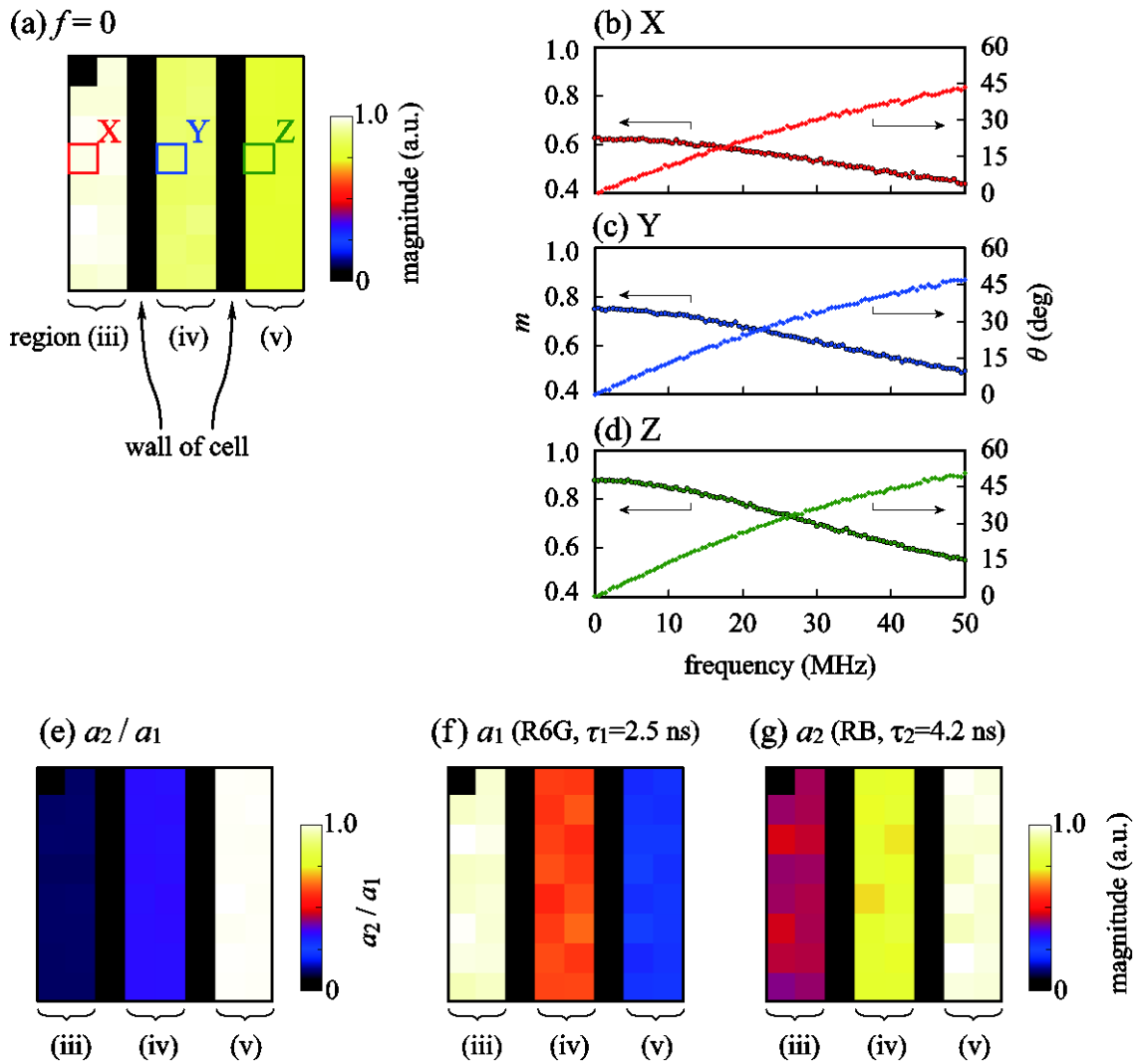


図 4.7 (a)HT-FLI による定常光成分の測定画像, (b)(a)における X 点で測定された周波数に対する変調度と位相差の変化, (c)(a)における Y 点での周波数に対する変調度と位相差の変化, (d)(a)における Z 点での周波数に対する変調度と位相差の変化, (e) 初期振幅比の相対強度分布, (f) $\bar{\tau}_1=4.2\pm 0.21$ ns の成分に相当する a_1 の分布. (g) $\bar{\tau}_2=2.5\pm 0.13$ ns の成分に相当する a_2 の分布.

4.5 考察

本章で提案する HT-FLI システムは、その原理検証のために LED アレイを用いた装置構成を採用したが、実用に際しては空間解像度が不足している。多数の LED を高密度で配置することで高い空間解像度を達成できるが、DLP(Digital Light Processing)プロジェクタと LD(Laser Diode)を組み合わせた光源の採用も有望である。例えば、13.6 μm ピッチで 1024 \times 768 ピクセルのミラーアレイを有する DLP Discovery 4100(Texas instruments)と \times 100 の蛍光顕微鏡を組み合わせることで回折限界で制限されるまでの空間分解能が実現できると考えられる。このとき、励起パターンの最大切り替え速度は 32 k pattern / sec と非常に高速であり、128 \times 128 ピクセルであれば 0.5 秒でイメージングが可能である。また、提案システムにおける LED の最大変調周波数は高々 50 MHz 程度であったが、LED を LD に置き換えることで最大変調周波数は 1.0 GHz まで向上できる。これにより、数十ピコ秒の速い蛍光寿命の測定が可能となる[19]。

一方で、HT-FLI で解像できる最大のピクセル数は、光学系と検出系の両方によって制限される。たとえば、 $n \times n$ ピクセルで、1 画素あたりのビット深さ l bit の画像を取得するためには、検出システムのビット深さは $q (= l + \log_2(n^2/2))$ ビット必要である。例えば、 $n = 64$, $l = 6$ bit の場合、 $q = 17$ bit となる。 q が制限された状況において n を増加させる場合は、測定時間が許す限りの積算処理を行うことが有効である。実際に、 p 回の積算処理を行った場合は、 $q = l + \log_2(n^2/2) + \log_2 p$ となる。他に、光検出のダイナミックレンジそのものを拡大するために、ヘテロダイン光検出法[20]や、微弱蛍光の測定であれば光子計数法[19]の利用が有効である。

4.6 結言

アダマール変換に基づく蛍光寿命イメージング法(HT-FLI)を提案した。HT-FLI の原理検証のために装置を試作し、検証を行った。HT-FLI 法は、HT イメージングとフーリエ変換型位相変調方式蛍光寿命計を組み合わせたものである。提案装置では、従来のゲート付き 2次元検出器を用いる場合に比べ、検出感度、分解時間、測定時間の面において高い性能が得られる。原理検証として、蛍光標準試料であるローダミン 6G とローダミン B エタノール中溶液の蛍光寿命イメージングを行った。結果として、それぞれの成分に相当した蛍光寿命分布画像が得られた。空間分解能の向上は、DLP プロジェクタを用いれば、対応可能であり、将来的に実用的な FLIM として利用できる可能性がある。

参考文献

- [1] J. R. Lakowicz, "Principle of Fluorescence Spectroscopy", Third edition, Springer, 2006.
- [2] J. A. Lavitt, D. R. Matthews, S. M. Ameer-beg, and K. Suhling, "Fluorescence lifetime and polarization-resolved imaging in cell biology", *Curr. Opin. Biotechnol.*, **20**, No. 1, 2009, 28-36.
- [3] H. Wallrabe, and A. Periasamy, "Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy", *Curr. Opin. Biotechnol.*, **16**, No. 1, 2005, 19-27.
- [4] T. W. J. Gadella Jr., T. M. Jovin, and R. M. Clegg, "Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM): Spatial resolution of microstructures on the nanosecond time scale", *Biophys. Chem.*, **48**, No. 2, 1993, 221-239.
- [5] X. F. Wang, T. Uchida, and S. Minami, "A fluorescence lifetime distribution measurement system based on phase-resolved detection using an image dissector tube", *Appl. Spectrosc.*, **43**, No. 5, 1989, 840-845.
- [6] I. Bugiel, K. Koonig, and H. Wabnitz, "Investigation of cells by fluorescence laser scanning microscopy with subnanosecond time resolution", *Lasers Life Sci.*, **3**, No. 1, 1989, 47-53.
- [7] A. Squire, and P. I. H. Bastiaens, "Three dimensional image restoration in fluorescence lifetime imaging microscopy", *J. Microsc.*, **193**, No. 1, 1999, 36-49.
- [8] X. F. Wang, T. Uchida, D. M. Coleman, and S. Minami, "A two-dimensional fluorescence lifetime imaging system using a gated image intensifier", *Appl. Spectrosc.*, **45**, No. 3, 1991, 360-366.
- [9] D. Elson, J. Requejo-Isidro, I. Munro, F. Reavell, J. Siegel, K. Suhling, P. Tadrous, R. Benninger, P. Lanigan, J. McGinty, C. Talbot, B. Treanor, S. Webb, A. Sandison, A. Wallace, D. Davis, J. Lever, M. Neil, D. Phillips, G. Stamp, and P. French, "Time-domain fluorescence lifetime imaging applied to biological tissue", *Photochem. Photobiol. Sci.*, **3**, No. 8, 2004, 795-801.
- [10] J. R. Lakowicz, H. Szmajcinski, K. Nowaczyk, K. W. Berndt, and M. L. Johnson, "Fluorescence lifetime imaging", *Anal. Biochem.*, **202**, No. 2, 1992, 316-330.
- [11] J. R. Lakowicz, and K. W. Berndt, "Lifetime-selective fluorescence imaging using an rf phase-sensitive camera", *Rev. Sci. Instrum.*, **62**, No. 7, 1991, 1727-1734.
- [12] T. Iwata, H. Shibata, and T. Araki, "Construction of a Fourier-transform phase-modulation fluorometer", *Meas. Sci. Technol.*, **16**, No. 11, 2005, 2351-2356.
- [13] M. Harwit and N. L. Sloane, "Hadamard transform optics", Academic Press, 1979.
- [14] R. D. Swift, R. B. Wattson, J. A. Decker, R. Paganetti, and M. Harwit, "Hadamard transform imager and imaging spectrometer", *Appl. Opt.*, **15**, No. 6, 1976, 1595-1609.
- [15] Q. S. Hanley, P. J. Verveer, and T. M. Jovin, "Spectral imaging in a programmable array microscope by Hadamard transform fluorescence spectroscopy", *Appl. Spectrosc.*, **53**, No. 1, 1999, 1-10.
- [16] K. Hassler, T. Anhut, and T. Lasser, "Time-resolved Hadamard fluorescence imaging", *Appl. Opt.*, **44**, No. 35, 2005, 7564-7572.

- [17] D. Magde, R. Wong, and P. G. Seybold, "Fluorescence quantum yields and their relation to lifetimes of rhodamine 6G and fluorescein in nine solvents: Improved absolute standards for quantum yields", *Photochem. Photobiol.*, **75**, No. 4, 2002, 327-334.
- [18] D. Magde, G. E. Rojas, and P. G. Seybold, "Solvent dependence of the fluorescence lifetimes of xanthene dyes", *Photochem. Photobiol.*, **70**, No. 5, 1999, 737-744.
- [19] T. Mizuno, S. Nakao, Y. Mizutani, and T. Iwata, "Photon-counting 1.0 GHz-phase-modulation fluorometer", *Rev. Sci. Instrum.*, **86**, No. 4, 2015, 043110.
- [20] P. Harms, J. Sipior, N. Ram, G. M. Carter, and G. Rao, "Low cost phase-modulation measurements of nanosecond fluorescence lifetimes using a lock-in amplifier", *Rev. Sci. Instrum.*, **70**, No. 2, 1999, 1535-1539.

5 章 総括

本論文では、位相変調方式蛍光寿命測定法の測定手法と装置の改良について論じた。

第 1 章では、従来の蛍光寿命計を概観し、本研究の位置づけと目的を述べた。

第 2 章では、位相変調法の多成分蛍光試料への対応を目的とし、位相変調励起光源を用いた位相変調方式蛍光寿命測定法を提案した。原理検証実験として、励起光源に LED と LD を用いた測定装置を構築し、蛍光標準資料として 3 種類の蛍光ガラスと、ローダミン 6G エタノール溶液、クマリン 152 エタノール溶液、およびそれらの混合溶液の蛍光寿命測定を行った。本手法は、多成分試料のみならず、たとえ単一成分の試料に対しても、それが単一成分であるかどうかを確認するために有用である。ここでは、原理検証のために位相変調励起波形を任意波形ジェネレータで発生させ、蛍光波形を記録するためにデジタルオシロスコープを用いたが、実際の変調や復調には市販の PLL-IC を使用することができる。提案した位相変調方式蛍光寿命計は製作し易く、操作が簡単で、蛍光試料のスクリーニングという目的に有用である。

第 3 章では、位相変調法の微弱光蛍光への対応と分解時間の向上を目的とし、通常はパルス暦法で使用される TC-SPC システムを導入した光子計数型位相変調法(PC-PMF; photon-counting phase-modulation- fluorometer)を提案した。これにより、位相変調法においてもフォトンカウンティングレベルの微弱蛍光に対応可能となった。また、TC-SPC の導入によって、検出器の帯域を超えた測定が可能となり、サブナノ秒オーダーの分解時間を達成した。さらに、本測定装置は LD を励起光源としており、簡易な装置構成でサブナノ秒の分解時間が得られる。実際に原理検証実験として、LD を最大 1.0 GHz まで変調させ、サブナノ秒の蛍光寿命を有する DAPI-TRIS/EDTA 溶液の蛍光寿命測定を行い、本測定装置の有用性を示した。

第 4 章では、アダマール変換型蛍光寿命イメージング法を提案した。これは、イメージングのためのアダマールイメージング法と蛍光寿命測定のためのフーリエ変換型位相変調法を組み合わせた手法である。原理検証のために自作の LED アレイを励起光源とした測定システムを構築した。この装置は、従来のゲート付き二次元検出器を用いる場合に比べ検出感度、分解時間、測定時間のすべての面において高い性能が得られている。そして、蛍光標準試料である、エタノール中のローダミン 6G とローダミン B のイメージングにより、各成分に相当した蛍光寿命分布画像が得られた。LED アレイを自作したため、空間的な解像点が 64 (8×8) 点と悪いが、1.0 ms 未満の測定時間で高速にイメージングができることを実証した。

表 5.1 と図 5.1 に、第 1 章で示した位相変調方式蛍光寿命測定法の位置づけを示した表と図を再掲する。また、表 5.2 と図 5.2 には、第 1 章で示した蛍光寿命イメージング法の位置づけを示したものである。これら表中および図中の下線部が本論文で提案した手法である。

表 5.1 位相変調法による蛍光寿命測定法の分類. 下線部が提案した手法.

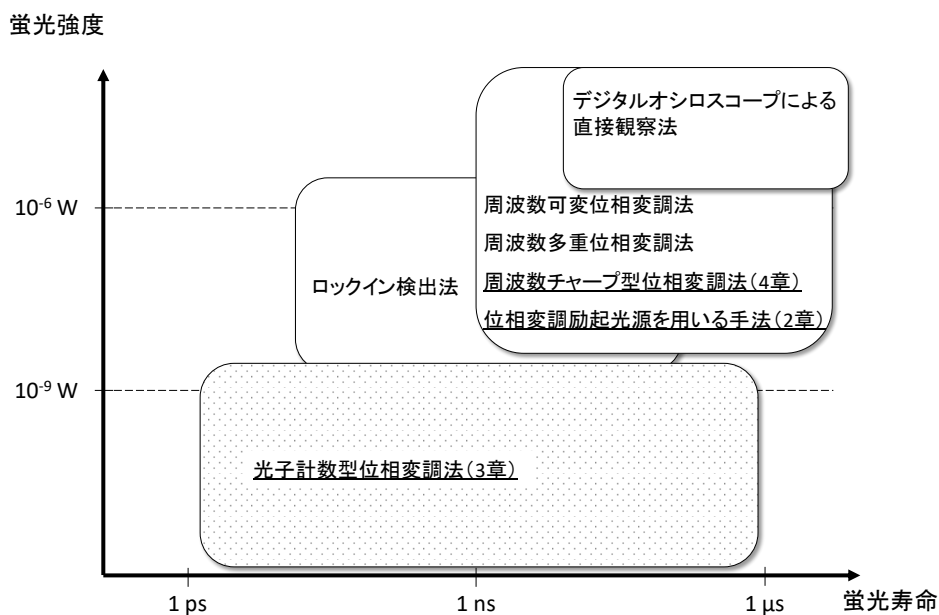
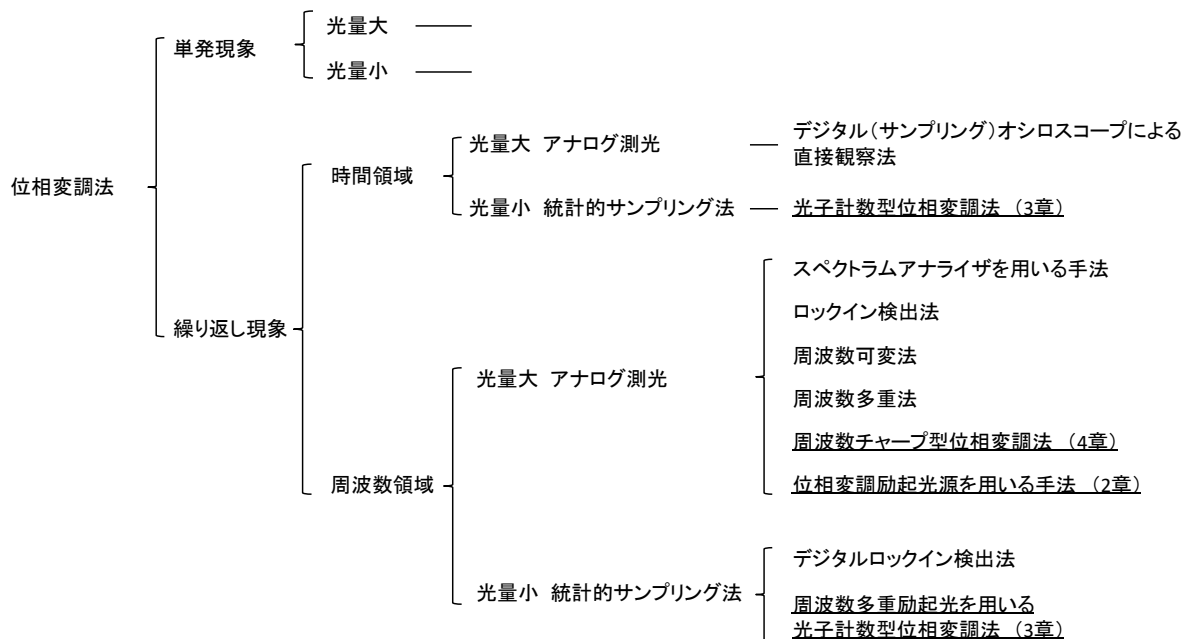


図 5.1 位相変調法において蛍光寿命および蛍光強度に依存した各測光法の位置づけ. 網掛部はデジタル測光に基づく手法で, それ以外はアナログ測光による. 下線部が提案した手法.

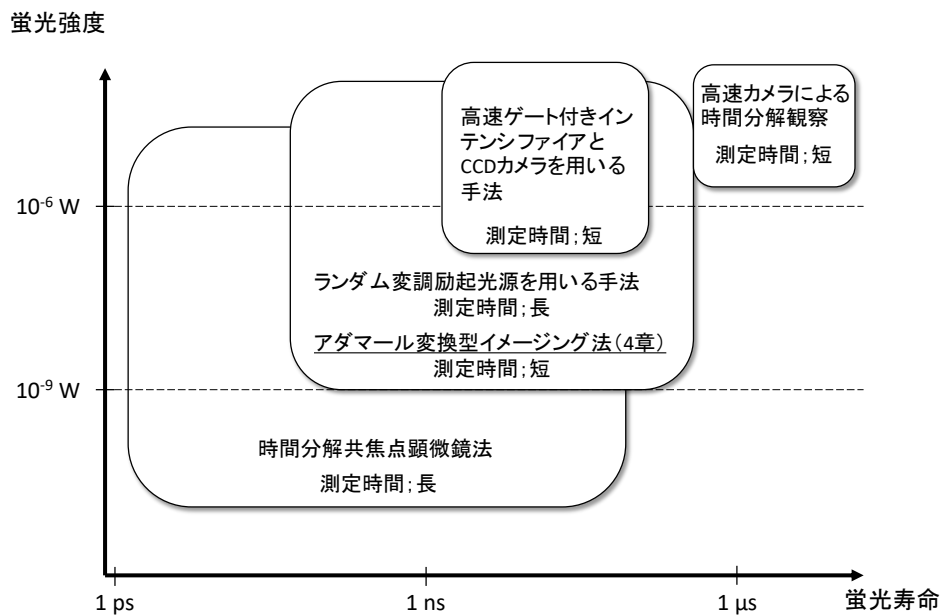


図 5.2 蛍光寿命イメージング法において測定速度と、蛍光寿命および蛍光強度に依存した各手法の位置づけ。下線部が提案した手法。

本提案手法の今後の展望として、次の2つが挙げられる。1) 光子計数型位相変調法のカウンtrレート向上、および2) アダマール変換型蛍光寿命イメージング法の顕微鏡観察への適用である。1) において、TAC-MCA ペアを利用する TC-SPC システムを用いる場合、分解時間は非常に小さい値となるが、カウンtrレートは低い。一方、位相変調方式蛍光寿命測定法に適用する場合には、装置の分解時間がサブナノ秒程度であっても、原理的にピコ秒オーダの蛍光寿命測定に利用できると考えられる。そこで、光電子パルス列同時検出法を適用した位相変調方式蛍光寿命測定計を現在検討している。カウンtrレートの問題に対しては、高速カウンティングの目的に最適化した光電子パルス列同時検出回路を、FPGA(field programmable gate array)上に組み込むことで実現できる。一方、2) においては、4章に示した装置構成では自作 LED アレイを用いたため、たかだか数 mm の空間分解能であり、また全ピクセル数は 64 であった。空間分解能の向上は、DLP プロジェクタを用いることで対応可能であり、これを適用したアダマール変換型蛍光寿命イメージング装置(HT-FLIM; Hadamard-transformed fluorescence- lifetime-imaging microscopy)を現在検討している。

本研究に関する公表論文

第 2 章

1. Takahiko Mizuno, Yasuhiro Mizutani, and Tetsuo Iwata, “Phase-Modulation Fluorometer Using a Phase-Modulated Excitation Light Source”, *Optical Review*, Vol. **19**, No. 4, Page 222-227, April, 2012.

第 3 章

2. Takahiko Mizuno, Seiji Nakao, Yasuhiro Mizutani, and Tetsuo Iwata, “Photon-counting 1.0 GHz-phase-modulation fluorometer”, *Review of Scientific Instruments*, Vol. **86**, No. 4, Page 043110, April, 2015.

第 4 章

3. Takahiko Mizuno, and Tetsuo Iwata, “Hadamard-transform fluorescence-lifetime imaging”, *Optics Express*, Vol. **24**, No. 8, Page 8202-8213, April, 2016.

本研究に関する学会発表

第2章

[国際学会]

1. Takahiko Mizuno, Yasuhiro Mizutani, and Tetsuo Iwata, “Phase-modulation fluorometry using a phase-modulated light source”, 12th Conference on Methods and Applications of Fluorescence, Strasbourg (France), P9, 2011.9.

[国内学会]

2. 水野孝彦, 水谷康弘, 岩田哲郎, 「位相変調励起光源を用いた位相変調方式蛍光寿命測定法」, Optics & Photonics Japan 2011, 大阪, 28aF4, 2011.11.

3. 水野孝彦, 水谷康弘, 岩田哲郎, 「位相変調励起光源を用いた YAG: Ce 蛍光体の蛍光寿命測定」, 2011 年度計測自動制御学会四国支部学術講演会, 徳島, PS2-09, 2011.11.

4. 水野孝彦, 宮田剛, 水谷康弘, 岩田哲郎, 「位相変調励起光源を用いた Ce: YAG セラミックスの蛍光寿命測定」, 第 59 回応用物理学関係連合講演会, 東京, 18a-B9-2, 2012.3.

第3章

[国内学会]

5. 水野孝彦, 水谷康弘, 岩田哲郎, 「近赤外波長域光子計数型位相変調方式蛍光寿命計の構築」, 第 73 回応用物理学会学術講演会, 愛媛, 12a-F8-4, 2012.9.

6. 水野孝彦, 水谷康弘, 岩田哲郎, 「位相変調励起光源を用いた光子計数型位相変調方式蛍光寿命測定計」, 第 60 回応用物理学会春季学術講演会, 神奈川, 29p-A2-1, 2013.3.

7. 水野孝彦, 水谷康弘, 岩田哲郎, 「光子計数型位相変調方式蛍光偏光解消測定装置の提案」, Optics & Photonics Japan 2013, 奈良, 12pP18, 2013.11.

8. 水野孝彦, 水谷康弘, 岩田哲郎, 「1.0 GHz 光子計数型位相変調方式蛍光寿命計」, 第 75 回応用物理学会秋季学術講演会, 北海道, 18p-S8-4, 2014.9.

9. 水野孝彦, 水谷康弘, 岩田哲郎, 「周波数変調励起光源を用いた光子計数型位相変調方式蛍光寿命計」, Optics & Photonics Japan 2014, 東京, 7aD10, 2014.11.

第4章

[国際会議]

10. Takahiko Mizuno, Yasuhiro Mizutani, and Tetsuo Iwata, “Proposal of a Hadamard-transform fluorescence- lifetime imaging method”, 14th Conference on Methods and Applications of Fluorescence, Würzburg (Germany), P84, 2015.9.

11. 水野孝彦, 水谷康弘, 岩田哲郎, 「相互相関に基づく蛍光寿命イメージング法の提案」, 第 62 回応用物理学会春季学術講演会, 神奈川, 11p-A14-1, 2015.3.

12. 水野孝彦, 岩田哲郎, 「巡回アダマール励起パターンと単一検出器を用いた蛍光寿命イメージング法の提案」, Optics & Photonics Japan 2015, 東京, 29aB7, 2015.10.

その他の光計測に関する公表論文および学会発表

[共著論文]

1. Yasuhiro Mizutani, Kota Shinagawa, Takahiko Mizuno, and Tetsuo Iwata, “Time-Between-Photons Method for Measuring Fluorescence Lifetimes”, *Optical Review*, Vol. **20**, No. 1, Page 1-6, January, 2013.

[国内学会, 筆頭]

2. 水野孝彦, 水谷康弘, 岩田哲郎, 「近赤外波長域光子計数型蛍光寿命測定」, *Optics & Photonics Japan 2012*, 東京, 23pP7, 2012.11.

3. 水野孝彦, 水谷康弘, 岩田哲郎, 「蛍光寿命測定用レーザダイオード光源の高速パルス駆動」, 第74回応用物理学会秋季学術講演会, 京都, 17a-P11-5, 2013.9.

4. 水野孝彦, 多賀貴規, 岩田哲郎, 「FPGAを用いた高効率光電子パルス列同時検出方式蛍光寿命計」, 第77回応用物理学会秋季学術講演会, 新潟, 16p-C32-4, 2016.9.

5. 水野孝彦, 多賀貴規, 岩田哲郎, 「高効率光子計数型位相変調方式蛍光寿命計」, *Optics & Photonics Japan 2016*, 東京, 2aD4, 2016.10.

6. 水野孝彦, 多賀貴規, 岩田哲郎, 「高効率光電子パルス列同時検出方式蛍光寿命計」, *Optics & Photonics Japan 2016*, 東京, 2pP13, 2016.10.

[国内学会, 非筆頭]

7. 宮田剛, 朝日太郎, 中山亨, 水野孝彦, 岩田哲郎, 荒木勉, 「Ce:YAG結晶化ガラス蛍光体における蛍光寿命のCe濃度依存性」, 第59回応用物理学関係連合講演会, 東京, 17p-F11-17, 2012.3.

8. 多賀貴規, 水野孝彦, 岩田哲郎, 「FPGAを用いた光子計数型位相変調方式蛍光寿命測定計の製作」, 第77回応用物理学会秋季学術講演会, 新潟, 14a-P2-12, 2016.9.

9. 多賀貴規, 水野孝彦, 岩田哲郎, 「多チャンネル同期光子計数型位相変調方式蛍光寿命測定計」, *Optics & Photonics Japan 2016*, 東京, 2pP14, 2016.10.

10. 長谷悠樹, 水野孝彦, 岩田哲郎, 「FPGAを用いた1ビット光子相関計による蛍光寿命計」, 第64回応用物理学会春季学術講演会, 神奈川, 15p-P10-10, 2017.3.

謝辞

本研究を進めるにあたり，終始懇切丁寧なご指導を賜りました徳島大学大学院理工学研究部岩田哲郎教授に感謝致します。研究全般のみならず，研究者としての在り方や私事に至るまで多くのご助言を頂きました。教授の指導なくして本研究をとりまとめる事はできませんでした。深く感謝の意を表しますとともに厚くお礼申し上げます。

本学大学院理工学研究部安井武史教授，ならびに橋本修一教授には，本論文の内容についてご検討いただくとともに，貴重なご教示を賜りました。ここに感謝の意を表し，厚くお礼申し上げます。

大阪大学工学研究科水谷康弘准教授には，徳島大学に在籍しておられた間に指導していただきました。大阪大学に移籍されてからも，普段から激励のお言葉を頂きました。ここに感謝の意を表し，厚くお礼申し上げます。

本学工学部機械工学科光応用計測研究室の学生諸氏には，本研究を進めるにあたり多大な協力を頂きました。特に，中尾星志氏（同研究室，2011年修士課程修了），品川幸太氏（同研究室，2011年修士課程修了），大橋浩二氏（同研究室，2014年修士課程修了）には，本研究の要となる実験結果の収集やとりまとめにおいてご助力を頂きました。ここに感謝の意を表し，厚くお礼申し上げます。

最後に，博士後期課程への進学を快く承諾し，かつ絶えず励ましと援助をしてくれた父水野万亀雄氏，母水野敬子氏をはじめとする家族に深く感謝致します。そして，どのような状況であっても応援し続けてくれた素晴らしいパートナーである上田井麻耶氏に心から感謝致します。

平成 29 年 3 月吉日
水野孝彦