九州大学学術情報リポジトリ Kyushu University Institutional Repository

共焦点レーザー蛍光光子計数顕微鏡による 水面分子 の観測

原田,明 九州大学大学院総合理工学研究院物質科学部門

Zheng, Xue-Ying Department of Molecular and Material Sciences, Interdisciplinary Graduate School of Engineering Sciences, Kyushu University

https://doi.org/10.15017/16601

出版情報:九州大学大学院総合理工学報告. 22 (3), pp.281-288, 2000-12. 九州大学大学院総合理工学

バージョン: 権利関係:

共焦点レーザー蛍光光子計数顕微鏡による水 面 分 子 の 観 測

原 田 明*·郑 雪 英**

(平成12年8月30日 受理)

Observation of Dye Molecules at the Air-Water Interface by Using Confocal Fluorescence Photon-Counting Microscope

Akira HARATA* and Xue-Ying ZHENG**

Confocal fluorescence photon counting microscope has been developed and applied to observe dye molecules (rhodamine 6G or dioctadecyl-rhodamine B) at the water surface under the conditions of ultra-small surface density of the molecules. Discussion is made to prove it possible that a confocal microscope has a capability of surface-selective observation of dye molecules on the water surface even when the dye molecules are water-soluble. Molecular properties required for the surface-selective observation is quantitatively discussed of the equilibrium constant and maximum density, of surface adsorption, and fluorescence detection efficiencies for molecules at the surface and in the bulk solution. Comments for sample preparation were made for estimating concentration of molecules in the ultra dilute solution. A possibility of single molecule detection at the water surface is discussed as well.

1 緒 言

我々がもっともなじみ深くごく身近にある物質であ る水は、様々な化学種を溶解する能力を始めとして実 は極めて特異な物理的・化学的挙動を示す液体である. その特性はバルク液体中でもさることながら表面・界 面でも特異な物理的・化学的・生物学的な性質として 現れる. それゆえに水面それ自体と水面での分子の挙 動は幅広く研究の対象となってきた. 近年, 水面にい る分子を分光学的に研究する技術が次々と開発され, ようやく分子論的な観点から"水面"にメスが入り始 めている. ここ10年間に, 吸収・蛍光スペクトル測定 はもとより第2高調波発生法11-31や和周波発生法21-41な どの界面選択性を有する非線形レーザー分光法を用い て,水面上にある分子の挙動が精力的に研究されてき た.しかし、これらの手法には弱点がある.すなわち、 感度的な制限により、観測対象となる分子の密度が低 い場合には適用できない. このような場合, ある程度 長い時間に渡って観測することで信号雑音比を向上さ せるのは常套手段である.しかし、その結果として得 られる時間平均的な情報は分子間相互作用の詳細や動 力学的な考察を行うには不十分であるし, 多くの場合 に長時間に渡る観測は望ましくない. このような実験 観測上の問題が明らかになる一方で, 近年の計算機利 用環境の急速な改善を背景として, 主に分子動力学的

なシミュレーションを用いて、界面での分子の動きを 模擬的に計算することが精力的に行われており⁵、界 面において個々の分子の動きを観測できる手法を確立 して実験的な考察を加えることの重要性は増しつつあ ると考える.

ところで、この10年の間に、蛍光性色素分子に関し ては, 固体表面上に固定されている場合には一つ一つ の分子の発光スペクトルがや時間分解蛍光減衰曲線が の測定が可能となり、液体中でも一つ一つの分子を数 える8/-10)ことが可能となっている.これらの観測には, 近視野場顕微鏡やレーザー蛍光顕微鏡, 中でも共焦点 レーザー蛍光顕微鏡が威力を発揮してきた. 我々の研 究グループでも, 他に先駆けて共焦点レーザー蛍光顕 微鏡を水面上の不溶性蛍光色素分子の観測に用いて, 表面選択的な蛍光スペクトル測定を行い、蛍光性分 子がドメインを形成して動き回ることを報告してき た¹¹⁾⁻¹³⁾. そこでの表面分子密度の下限は10⁻¹⁴mol/cm² (60 molecules/ μ m²) 程度であった. 我々はさらに,こ れまでに観測例の無い極低分子密度の条件下における 分子の水面上での挙動の研究を目的として, 水面にあ る分子を高感度かつ選択的に観察できる共焦点レー ザー蛍光光子計数顕微鏡を開発し、水面上の蛍光性分 子の運動などに伴う蛍光光子数の時間変動を観測し. 自己相関解析などを用いて解析し会合挙動や拡散挙動 に関して考察してきている14)15).

本報文では, 共焦点レーザー蛍光光子計数顕微鏡に よる可溶性色素分子の水面上での挙動の表面選択的な

^{*}研究院・物質科学部門

^{**}学府·物質理工学専攻

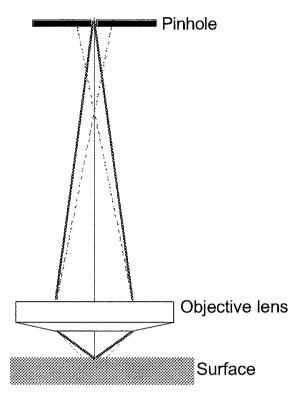


Fig. 1 Principle of three dimensionally space-selective observation with a confocal fluorescence microscope.

観測に関して、先の実験結果¹⁰¹⁵に立脚して、原理・ 実験手法に関する幾つかの問題をより詳細に検討した 結果を報告する。特に、可溶性色素分子の水面上での 選択観測に関する検討、極低分子密度の条件に必須と なる超希薄溶液の調製法に関わる検討、さらに、未だ 実現されていない水面上にある分子についての単分子 検出の可能性についての検討の結果を報告する。

2. 原理:共焦点レーザー蛍光顕微鏡による 水面分子の選択検出

共焦点レーザー蛍光顕微鏡は3次元的な空間分解能を有するという特徴があるので、生体細胞内にある微小構造体の立体的な形状観測などに用いられている1¹⁰. 簡単に原理を述べる. 顕微鏡下で試料にレーザー光(励起光)を集光照射した場合に光路中では全ての場所から発光が生じ得るが、励起光強度の強い焦点付近から発せられる蛍光のみを光検出器の前方に設置したピンホール上に結像すると焦点からはずれた位置で発せられた蛍光は効率的に除去できる(Fig. 1). すなわち、空間中のある一点のみを選択的に観測できることになり3次元的な空間分解能が生じる. 原理から分かるように共焦点レーザー蛍光顕微鏡は光学顕微鏡であるので、光回折の影響を避けることはできない. したがって、可視域の光を用いる限り、空間的な分解能はもっとも良くてサブミクロンにすぎない. 一方、後

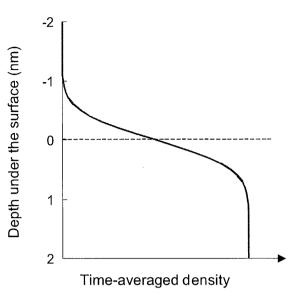


Fig. 2 Density profile of water molecules near the air-water interface at 300K, calculated with a thermodynamic basis.

述するように、静置された水面は平坦である。 色素溶 液の表面を考えた場合, この平坦な表面上にも分子は 存在するだろうけれどもバルク中にも多量に存在する はずである. 共焦点レーザー蛍光顕微鏡程度の空間分 解能しか持たない装置では、バルク中の分子からの蛍 光も観測してしまうので,一見,水面にいる分子のみ を選択的に観測することは困難に思われる.しかし, もし観測対象となる色素分子が界面活性を持ち表面に のみ存在するときには表面選択的な観測が可能である ことは容易に推察がつく.次に,可溶性色素を対象と した時には、色素分子が界面活性を持って水面に集ま る場合や色素が水面のみで蛍光性を持つ場合が問題と なるだろう. 本節では、これまで検討されていなかっ たこの問題を定量的に扱うことにより, 共焦点レー ザー蛍光顕微鏡により水面上にある分子の表面選択的 観測を行うための判断基準を導く.

2.1 水面の厚さ

まず、厳密さをさておいて水面の厚さを大まかに見積もっておく。なお以下では、水面の厚さ・位置といった概念を定義せずに用いるが、分子の大きさを問題とする定義であればどれを用いても議論に問題は生じない。水が分子からなる以上は静置した水面でも数学的な平面ではあり得ない。また、個々の分子は熱運動をしているのであるから水面の位置は揺らいでいるはずである。熱力学をベースとした界面張力波理論のに基づく考察によれば、水面には時間平均でみるとFig. 2 に示すような密度分布があると予想できる。ここで空間的な密度分布を特徴づけるパラメーターは、水面の位置について、平均値からの標準偏差 σ を意味する一つだけであり、次式で定義され、長さの次元

を持つ.

$$\sigma^{2} = \frac{kT}{4\pi\gamma} \ln \frac{1 + (2\pi l_{c}/\xi)^{2}}{1 + (2\pi l_{c})^{2}/S} \approx \frac{kT}{2\pi\gamma} \ln (2\pi l_{c}/\xi) \quad (1)$$

ここで、 γ は界面張力、S は液面の面積、g は重力加速度、k は Boltzmann 定数、T は絶対温度、 ρ_0 は密度、 ξ はバルクの構造相関長で水の場合おおよそ $0.6\sim0.9$ nm である。キャピラリー長 l_c は水表面では $(\gamma/\rho_0 g)^{1/2}$ で定義される。表面張力が他の液体に比べて飛び抜けて大きい($\gamma=72.75 \mathrm{mNm}^{-1}$, $20 \mathrm{C}$)水では、温度300K において $\sigma=0.38 \mathrm{nm}$ と見積もられる。これは、可視光の波長と比較すると問題とならないほど小さいので水面は光学的に平坦であるといって良い。しかし、この値は水分子の直径とされる $0.3 \mathrm{nm}$ よりは大きい。さらに (1) 式が、表面吸着した分子のせいでに界面張力が下がった場合には界面の幅が広がることを示していることを考えると、個々の溶質分子にとって水面は平坦であるとは言い難い。

2.2 色素分子の水面吸着

本研究で用いたローダミン 6G (Rh6G) は典型的な 蛍光性色素分子である. エタノール溶液中での蛍光量 子収率はほぼ1であり、耐光性にも優れるため色素 レーザー用の蛍光色素として頻繁に用いられている. また、液体中での単一分子検出の実験のほとんどがこ の分子やその類似分子を用いて行われてきた. モル吸 光係数は550nm 付近で最大値(105M-1cm-1 程度)を 持ち、濃度1μM~1 mM 程度の水溶液は鮮橙色を呈 す. 水溶性の色素であるが後述するように界面活性を 持ち水面への吸着も無視できない、ここで我々が問題 とするのは極低濃度の溶液であり, 吸着分子の表面密 度も大きくはないので、簡単のために溶質分子の水面 への吸着がLangumuir型の吸着等温式に従うと仮定す る. すなわち、溶質の濃度を C(M)、表面分子密度を N_s (mol/cm²), 最大吸着時の分子密度を N_{MAX} (mol/ cm²) とすると, 次式が成り立つ.

$$\frac{N_{MAX}}{N_S} = 1 + \frac{1}{K_{aa}C} \tag{2}$$

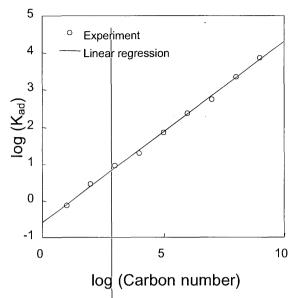


Fig. 3 Relation between number of carbon atoms and adsorption equilibrium constant K_{ad} for normal carbonic acids.

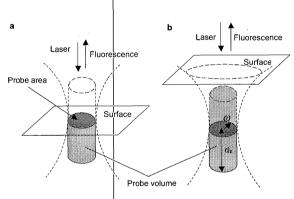


Fig. 4 Schematic illustration for the probe area and the probe volume in confocal microscope observation:

(a), surface observation; (b), bulk observation. ω , radius of focused laser beam; d_z , half-height of the probe volume.

 $N_{MAX}=7\times10^{-11}$ mol cm $^{-2}$ の値を持つことが報告されている 18 . Fig. 3 の 回帰直線を補外して判断すると、RhB 分子は13.4個の炭素原子を持つ直鎖カルボン酸と同等な水面吸着挙動を示すと言える。これは、nトリデカン酸とミリスチン酸の中間程度の値である.水溶性色素分子については、著者らの知る限り系統的に吸着定数を調べた。 お果の報告が無い. これらの分子種はその色合いのため直感的には溶けやすく表面吸着も少ないと感じてしまうが、思いの外水面に容易に吸着することに注意するべきである.

なお、溶質の濃度が極端に低いときに(2)式は、

$$N_S \cong N_{MAX} K_{ad} C \tag{3}$$

と近似でき, 溶質の濃度と表面分子密度には比例関係

が成り立つ.

2.3 共焦点レーザー蛍光顕微鏡での観測領域:水 面分子の選択的観測

前述したように共焦点レーザー蛍光顕微鏡は3次元 的な空間分解能を持つ. 観測領域(その中にある蛍光 性分子からの蛍光を効率良く観測できる範囲)の形状 は回転楕円体になると予想される. この形状は光学伝 達関数を用いて厳密に解析できるものであるが、ここ では簡単のために円柱として扱う. 共焦点レーザー蛍 光顕微鏡を用いる水面分子の選択的観測を考えるには, Fig. 4 に示したように観測領域が、a"水面と交差す る場合"と b "完全に水没する場合"とを比較すれば 良い、円柱の半径を ω 、高さを2d、とし、水面を観 測するときには円柱の半分が水面下にあるとする. 観 測面積(水面と円柱との重なる面積)と観測体積(溶 液と円柱が重なる体積) は、それぞれ、 $\pi\omega^2$ と $\pi\omega^2 d_z$ である. 一方, バルク溶液中を観測するときの観測面 積と観測体積は、それぞれ、0と $2\pi\omega^2 d_z$ になる。な お、半径 ω は励起光・蛍光の波長や観測に用いる顕 微鏡対物レンズの開口数によって、高さ $2d_z$ は、そ れらおよび共焦点位置にあるピンホールの直径によっ て決まる10. 可視紫外域の光をレンズ系で扱う限りに おいて d_z の下限はサブミクロン程度に過ぎない. こ れは、(1)式で与えられる界面の厚さと比較すると2 桁以上大きい.

さて、観測対象とする蛍光性分子のバルク溶液中の濃度が C であり表面密度が N_s であることを考慮して、観測される蛍光フォトン数が C や N_s に比例するとすると、蛍光フォトン数について、水面を観測するときとバルク溶液を観測するときの比 R_f は、次式で表すことができる.

$$R_f = (\eta_s \pi \omega^2 N_s + \eta_b \pi \omega^2 d_z C) / (2\eta_b \pi \omega^2 d_z C),$$
(4)

ここで、 (η_s, η_b) は、それぞれ、表面観測とバルク観測における蛍光フォトンの観測効率を表す。 R_f の値が1より十分に大きければ、バルクからの蛍光は表面からの蛍光に比べて無視できる程弱いと言える。次に、溶質濃度が低い場合の(3)式を(4)式に代入して整理すれば、

$$R_f = 0.5(L_s/d_z + 1), (5)$$

が得られる。ここで, $L_s=(\eta_s/\eta_b)K_{ab}N_{MAX}$ である。 L_s は,長さの次元を持ち,観測対象となる蛍光性分子の性質で決まる量である。(5) 式は R_f 値が対象分子の性質 L_s と円柱の高さ d_z の比で決まることを示 す. d_z を $1 \, \mu m$ 程度まで小さくできる共焦点レーザー 蛍光顕微鏡では様々な分子の表面挙動が観測対象となり得る. 例えば、前出の RhB 分子の K_{ad} , N_{MAX} の値を用いて、さらに $\eta_s = \eta_b$ であるとすると、 $d_z = 1.5$ μ m に対して $R_f = 110$ であるのでバルクからの蛍光の寄与は 1 %に満たない. 以上、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて水面分子の選択的観測が可能であることが理論的に導かれた. ここで、分子の性質 L_s を指標として用いれば、表面選択性の程度を定量的に議論できることが重要な点である.

以上の理論は単純化されており現実の実験系が含む幾つかの問題点を考察から外している。例えば、もっとも影響の大きいものとして、観測領域の正確な形状の効果と液面での光の屈折の効果とを問題とすべきである。しかし、これらの影響でさえ R_f の桁を変えることはないと考えられるので、上記の考えは、共焦点レーザー蛍光顕微鏡により可溶性分子の水面観測を行う際の指針として十分だと考える。むしろ問題とすべきは、分子の性質 L_s 決める K_{ad} , N_{Max} , η_s の値についてのデータがまだ十分に測定・整理されていないことである。

3. 実 験

3.1 共焦点レーザー蛍光光子計数顕微鏡観測

実験に用いた装置は光源,顕微鏡,単一光子計数システムの3つの部分で構成されている $^{(4)}$.装置概略を Fig. 5 に示した.励起光源はアルゴンイオンレーザー (514.5nm, 10mW) である.レーザー光は,レーザー ラインフィルター (515FS10-12.5, Andover 社)を 用いて余分な光を除去した後に,顕微鏡対物レンズ (開口数 0.65, 倍率×40, 動作距離 0.65mm) で水面

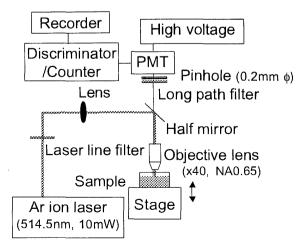


Fig. 5 Experimental setup for laser-induced fluorescence measurement of dye molecules at the water surface with a confocal photon counting microscope.

上に集光照射した. 光波長と開口数から水面上におけ る光ビームの半径は0.49μm, 面積は0.75μm²と推定 された. 同じレンズで試料からの蛍光を集め、干渉 フィルターに通して散乱光を除去した後に, 共焦点位 置にあるピンホール(直径 200µm)上に結像させた. このピンホールを通過した光を, 光電子増倍管 (R5600U, 浜松ホトニクス) と光子計数装置 (PC-545A, NF 回路ブロック) を用いて単一光子計数法で 検出した. 円筒の高さに当たる共焦点長は $3.0\mu m$ (d_z $=1.5\mu m$) と推定される. デジタルレコーダー (8835メモリーハイコーダ、日置電子)を用いて 0.5ms 毎の光子カウントを5~10秒間に渡って記録 してデータとした. 水面観測は、レーザーラインフィ ルターを光路から取り除いて Ar イオンレーザー管か ら発せられる光を液面で反射させてアライメント取っ てから, 再度レーザーラインフィルターを光路に挿入 することで容易に行える13. バルク溶液の観測は、表 面観測の設定から試料溶液を数 10μm 上方に移動さ せることで実現した.

蛍光性試薬としては、水に不溶な蛍光性分子として dioctadecyl-rhodamine B (RhC18)を、可溶性分子として Rh6G を用いた. 試料溶液の調製については特に注意すべき事項があるので次節で述べる. RhC18試薬は Molecular Probe 社製品 (#D-307) をそのまま用いた. 水は市販の純水製造装置 (Milli-Q, Millipore)を用いて得た.

全ての水面上の分子からの蛍光の観測は室温条件下、開放系で行った。このため水が常に蒸発し続けており、水面の位置は時間とともにわずかながら変わってゆく。直径 $6~{\rm cm}$ の円柱形の試料セルを用いて行った本実験では、 $2~{\rm \mu m}/{\rm f}$ の速度で水面が移動していくことを実験的に確認した。その速度は、本実験の観測時間と共焦点長から考えて問題にならない範囲であると結論した。なお、用いた試料溶液は $10~{\rm mL}$ である。

3.2 試料調製とバルク濃度 C の補正

本研究における溶液試料は、溶質である色素の濃度にして 10^{-11} M $\sim 2 \times 10^{-10}$ M で調製した、本研究を進める中で、水溶性でありながらある程度の界面活性を持つ分子の極低濃度溶液の調製に関する注意点が明確になったのでここに述べる。問題は、表面や界面吸着により溶質分子がバルク溶液中から減り、濃度 C が初期濃度 C (吸着を無視して計算した濃度) より低下することにある。この注意点は、理論的に新規な知識をもたらす話ではない。しかし、ホルモンをはじめとする各種の生理活性物質が、本研究で問題としている濃度範囲においても生態系に決定的な作用を及ぼすこと、それら物質の環境動態を知ることが今後ますます求められると予想されることなどを考えると今後重

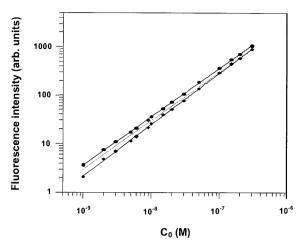


Fig. 6 Dependence of fluorescent intensity on Rh6G concentration C_0 in bulk solutions of ethanol (\blacksquare) and of water (\spadesuit). Fluorescence was collected at 550 nm with 515-nm excitation. The solid lines are the result of fitting with all the experiment data of the respective solutions. The dotted line with a unit slope is plotted to clearly show a deviation of fluorescent intensity for the water solution from generally expected one for an Rh6G solution with no substantial adsorption.

要になるだろう.

共焦点レーザー蛍光顕微鏡による液面観測では,表 面選択性について(4)式で表されるように表面分子密 度とバルク溶液濃度の比を問題にするので, 表面吸着 が飽和するような高濃度溶液の観測は困難になる. 必 然的に希薄溶液が観測対象となるが, 観測対象となる 分子の総数が少ない超希薄溶液では, 界面吸着のため に濃度 C が初期濃度 Coより低下する効果が顕著と なる. この効果は、バルク溶液の蛍光測定においても しばしば観測される. 例として Fig. 6 には, バルク 溶液の蛍光強度 Fと試料の初期濃度 С₀とをエタ ノール溶液と水溶液について、Rh6Gの濃度範囲 10^{-9} M $\sim 3 \times 10^{-7}$ M で測定した結果を示した. この測 定は、溶液の蛍光スペクトル測定に用いる光路長1cm の石英セルを用いて蛍光分光光度計(日立, F4010) で行った. Rh6G のような色素は、水の含有率の高い 溶媒系の溶液においては、試料の希釈に用いるガラス 製の容器の壁面への吸着も予想されるので、これを避 けるために溶媒をエタノールとして適切な濃度の希釈 溶液系列を調製した後に、これらを石英セル中におい て最終濃度が目的値 Coとなる様に滴下する手順を とった. なお, 検討した濃度の下限が 10⁻⁹M である のは、用いた装置の検出限界による.

この濃度範囲において Rh6G 分子では会合体の形成を無視できる。また、試料溶液の吸光度は0.05以下と十分小さい。したがって $\log(F)$ と $\log(C_0)$ とは傾き 1 の直線上にのるはずである。エタノール溶液系では $\log(F)$ $-\log(C_0)$ プロットの傾きは1.00 (回帰係数

 $R^2 = 0.9996$)であり予想通りであった. 一方, 水溶液系では、傾きは1.05(回帰係数 $R^2 = 0.9996$)で 1 より有意に大きい. 試料調製に細心の注意を払ってもなお, 水溶液系で $\log(F)$ $-\log(C_0)$ プロットの傾きが1 より大きくなるのは、界面吸着により実際の濃度が C_0 に比べて低くなるからだと考えられる.

共焦点レーザー蛍光光子計数顕微鏡による液面分子の観測ではバルク蛍光測定で扱った濃度より低い濃度の試料を扱うことになるので、界面吸着による真のバルク濃度 C の C_0 からの低下は深刻になる。我々はこれを次の様にして評価した。まず、物質量収支から次式が成り立つ。

$$C_0 V = C V + N_s S + N_g S_g \tag{6}$$

ここで、V は試料溶液の体積、S は液面の面積、 S_g は溶液に接した壁面の面積、 N_g は壁面での吸着分子密度である。溶液の濃度は極めて低濃度なので、液面への吸着と石英セル壁面への吸着の両方について(3)式が成り立つと仮定する。すなわち、 $N_S=N_{MAX}K_{ad}C$ 、 $N_g=N_{MAX,g}K_{ad,g}C$ とする。ここで、g の添え字は壁面への吸着に関する量であることを示し、その添え字がついている記号の定義は水面の場合と同様である。これらを使って(6)式を書き換えると、

$$C = C_0 V / (V + N_{MAX} K_{ad} S + N_{MAX,g} K_{ad,g} S_g)$$
 (7)

となり C と C_0 に比例関係が得られる. 本実験の場 合には V = 10mL, S = 28.3cm², $S_g = 34.9$ cm² は既 知である. 共焦点レーザー蛍光光子計数顕微鏡観測に 用いた試薬分子である Rh6G に関して直接の参考値 は無いので、類似化合物 RhB の値を参考とするとと もに、水面と石英セル壁面への吸着挙動が同様である ことを仮定すると $K_{ad} = K_{ad,g} = 5 \times 10^5 \mathrm{M}^{-1}$, N_{MAX} $=N_{MAX,g}=7 imes10^{-11} ext{mol/cm}^2$ なので(7)式から C=0.82C₀が得られる. 本実験での低濃度条件下ではバ ルク濃度に約2割の減少があると結論した. なお, 実 際の測定は試料調整後に20分以上を待ってから行った. これは経験的には十分な時間ではあるし、高濃度溶液 では十分であることが実験的に確かめられるが, 10⁻¹⁰M 以下の低濃度溶液を扱う場合についてもこの 時間内に十分な吸着平衡が成り立っているということ が証明されているわけでは無い.

4. 結果と考察

4.1 共焦点レーザー蛍光光子計数顕微鏡による液 面分子の観測例

水溶性色素分子 Rh6G の水面での観測結果に関し

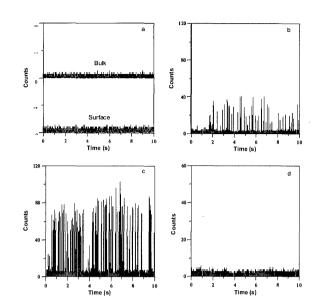


Fig. 7 Temporal fluctuation of fluorescence photon counts observed with the confocal fluorescence microscope : (a) , results of the surface and bulk observation of pure water ; (b) and (c) , results of the surface observation of R6G aqueous solutions with concentrations of (b) , 1×10^{-11} M and (c) , 5×10^{-11} M, respectively ; and (d) , results of the bulk observation for 1×10^{-10} M R6G aqueous solutions.

て引用文献15で報告した実験結果と考察を述べておく. Fig. 7 (a) から (c) には、Rh6G 水溶液の液面上を観 測したときの測定結果を示した. 図の結果は, (a) が 純水の表面を観測した場合(参考にバルクを観測した 場合も示されている), (b) は1.0×10⁻¹¹ M 溶液の表 面を観測した場合, (c) は5.0×10⁻¹¹ M溶液の表面を 観測した場合である. これらの結果は、Rh6G 水溶液 では Rh6G 分子由来の蛍光フォトンバースト (経時 的に観測したとき、蛍光光子がある時間にまとまって 観測され、別に時間にはほとんど観測されない現象を 指す)が観測されることを示している. Fig. 7 (d) はバルク観測の結果で、溶液の濃度は1.0×10-10M と (b) の比べて1桁大きい. バルク観測では蛍光フォト ンバーストが観測されないことを示しており、 蛍光 フォトンバーストが表面の分子由来であることが確認 された.

Fig. 8 は、Rh6G 水溶液について共焦点レーザー蛍光光子計数顕微鏡を用いて表面上の分子からおよびバルク中の分子からの蛍光強度の濃度依存性である.観測した濃度範囲内において、表面観測とバルク観測ともに、観測された蛍光強度は試料溶液の初期濃度に比例したが、その傾きには大きな違いがあり、表面からの蛍光が圧倒的に強いことが確認された.それぞれの実験値について回帰直線の傾きを求めた.傾きの比として得られる蛍光強度比 Rf は59 であった.この値は、2.3節で吸着平衡定数となどから計算した値(Rf =

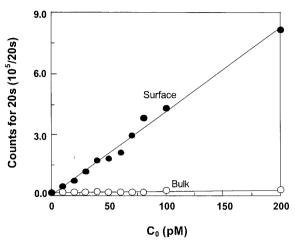


Fig. 8 Accumulated photon counts for 20 s detected with the confocal fluorescence microscope for the air-water interface (●) and the bulk (○) of R6G aqueous solutions with initial bulk concentration C₀. Sample solutions were placed on the microscope stage more than 20min before the measurement.

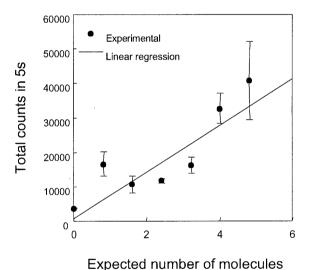


Fig. 9 Accumulated photon counts in 5 s detected with the confocal fluorescence microscope for the RhC18-spread water surface, as a function of expected number of RhC18 molecules in the probe area.

110) の0.54倍である。オーダーが違わないことは2.3節で扱った理論の妥当性を実験的に示すものである。 さらに、もし η_s/η_b が0.5だとすると 2 つの値はほぼ 一致することになる。

以上の結果は、共焦点レーザー蛍光光子計数顕微鏡が可溶性色素の溶液に対しても、表面選択的な分子観測に用いることが可能であること、および、その結果はバルク観測とは明確に異なった情報を与えることを示している。蛍光フォトンバーストが現れるのは、極めて希薄な溶液の表面においても色素分子が会合体を形成していることを示すものである。ただし、この会合体は高濃度溶液のバルク中で存在することが知られ

ている無蛍光性の会合体とは性質が異なり、蛍光性でなければならず希薄溶液の表面に特徴的なものであると考えられる.

4.2 液面における単一分子計測の可能性の検討

Rh6G 水溶液の場合,液面上にある分子の密度は 3.2節で論じたように吸着によるバルク濃度の変化を 問題にすべきである. 一方, 不溶性の色素分子である RhC18 の場合は、セル壁面への吸着に十分な配慮を 行うだけで容易に表面分子密度の平均値を計算できる. ここでは、水面分子に対する検出感度を議論するため に、引用文献14において RhC18 分子について報告し た測定結果をもとにデータ処理を行った. 検出された 蛍光光子数の濃度依存性について, 5s 間の水面観測 を5回繰り返して得た結果をまとめて Fig. 9 に示し た. 図の横軸は水面分子密度と観測面積の積として得 られる分子の観測面積内での存在確率の期待値である. データは水面上での分子の会合体形成と不均一分布を 反映して大きくばらついたが、ここでは平均値のみを 用いて, 色素分子の表面分子密度に蛍光光子数が比例 するとして線形回帰により傾きを求めた. 1分子あた り 1350cps (counts/s) と 914cps のバックグラウンド カウントを得た. 0.5ms 毎の観測では, 0.68 count/ 分子の信号と 0.46counts の雑音が平均値として期待 されることになる. この試料の場合も蛍光フォトン バーストとして特徴づけられる 20counts/0.5ms を超 えるカウント数が頻繁に観測されていたので水面の分 子は会合していると結論した14). しかし, この結論は 逆に, 分子会合が無い場合 (個々の分子からの蛍光を 観測する場合)には、この程度の光子計数率で蛍光 フォトンバーストを捕らえることは困難であることを 意味している. 単純に統計的な理由から, 個々の分子 を捕らえるにはおおよそ20倍の感度向上が求められる. さて,ここでの問題は水面上にいる1分子からの蛍 光が観測できるかである. 1つの分子が発する蛍光光 子数を N_F (photons/s) として、期待される計数率 C_F

$$C_F = \eta_{\text{optics}} \, \eta_{\text{CFM}} \, \eta_{\text{detector}} \, \eta_{\text{electrnics}} \, N_F \,$$
 (8)

(cps) は次式で表すことができる.

ここで、 η_{optics} (0.17) は光学素子(レンズ、フィルター、半透鏡、ピンホールなど)の透過率を表し、 η_{CFM} (0.11) は指向性の無い蛍光を顕微鏡対物レンズで集光できる割合を示しており、開口数の2乗に比例する値である。 η_{detector} (0.1) は検出器として用いた光電子増陪管の量子収率である。 $\eta_{\text{electrnics}}$ (0.8) はカウンターの性能に基づく値で不感時間の割合に対応する。なお、丸括弧内の値は本実験系について見積もられる値である。これから判断して、我々が用いた装

置の蛍光検出効率(η_{optics} η_{CFM} η_{detector} $\eta_{\text{electrnics}}$) は 0.14%程度であったと推定できる。ローダミン分子に 関しては $N_F=10^6$ (photons/s) であると見積もられ ている。この値を用いて推定される $C_F=1410$ cps は 実験的に求めたものと同等になった。このことからこの見積もりは妥当であるといえる。

さて、仮に、観測に用いる対物レンズの開口数を0.65から0.9に、検出器を光電子増陪管から単一光子計数型のアバランシェホトダイオード(量子効率最大0.7)に、半透鏡を透過率が0.5から0.9のものに変更したとすると、単純計算で蛍光の検出効率は24倍向上する。これらは技術的に可能な範囲内である。すなわち、液面の分子でも単一分子計数が可能である。

5. ま と め

液面における2次元的な稀薄状態での分子挙動の検 討は始まったばかりである. 生体に関わる化学反応や 溶媒抽出など分析化学・溶液化学においてより重要性 の高い液液界面については報告例もない. これまで. 液面や液液界面の分子挙動は、熱力学的な平衡を前提 として理解する現象であった. 一方, 溶液内の化学反 応においては、個々の分子の動きを観測することで初 めて理解できる現象を見いだそうとする努力が始まっ ている. 我々は、界面においてこそ個々の分子の動き を捕らえることが重要であると考え、それを可能とす る方法の開発を試みてきた. 残念なことに, もっとも 観測しやすいと考えられる分子を対象としているにも 関わらず未だ道半ばである.しかし、そこにおいてさ え、希薄状態の分子が液面で形成する特徴的な会合体 が存在する証拠の一端を捕らえることができていると 考えている. 本論文では, 共焦点レーザー蛍光顕微鏡 が、ある特性を持つ色素分子の希薄溶液の表面を表面 選択的に観測するのに有効な方法であることを示し, 分子特性と表面選択性の程度を関連付ける簡単な関係 式を導いた、また、そのような溶液を調製するにあ たっての濃度に関する注意事項に関して論じた. さら

に、水面上にある個々の分子挙動を捕らえることが実現可能であることを示した。ここで論じたことは、今のところ直ちに応用に結びつくとは思わないが、来るべき新しい世紀には界面の単分子化学とでも呼べるような領域が開拓され、特に生理活性性物質の環境動態や生体内挙動に関して統計処理の呪縛からある程度の距離をおいて論じることができる新しい観点が生まれることを期待し、その様な試みを進める上での鍵になるだろうと考える。

参考文献

- 1) Y.R. Shen, Nature, 337 (1989) 519.
- 2) R.M. Corn, D.A. Higgins, Chem. Rev. 94 (1994) 107.
- 3) K.B. Eisenthal, Chem. Rev. 96 (1996), 1343.
- 4) Q. Du, R. Superfine, E. Freysz, Y.R. Shen, Phys. Lev. Lett., 70 (1993) 2313.
- 5) I. Benjamin, Chem. Rev., 96 (1996) 1449.
- 6) X.S. Xie, Acc. Chem. Res., 29 (1996) 598.
- 7) X.S. Xie, R. Dunn, Science, 265 (1994) 316.
- 8) S. Nie, D.T. Chiu, R.N. Zare, Science, 266 (1994) 1018.
- 9) P.M. Goodwin, W.P. Ambrose, R.A. Keller, Acc. Chem. Res., 29 (1996) 607.
- 10) M.D. Barnes, W.B. Whitten, J.M. Ramsey, Anal. Chem., July 1 (1995) 418 A.
- 11) Y.-Q. Li, S. Sasaki, T.Inoue, A. Harata, T. Ogawa: Appl. Spectrosc., 52 (1998) 1111.
- 12) Y.-Q. Li, M. N. Slyadnev, T.Inoue, A. Harata, T. Ogawa: Langmuir, 15 (1999) 3035.
- 13) Y.-Q. Li, T.Inoue, A. Harata, T. Ogawa: Instrum. Sci. & Technology, 27 (1999) 159.
- 14) X.-Y. Zheng, A. Harata, T. Ogawa: Chem. Phys. Lett., 316 (2000) 6.
- 15) X.-Y. Zheng, A. Harata, T. Ogawa: Specrtochim. Acta Part A, (2000) in-press.
- 16) 河田 聡編「超解像の光学」(学会出版センター, 1999)
- 17)「化学便覧·基礎編」改訂3版 Ⅱ-95頁 (丸善, 1984), および表7.29.
- 18) 妹尾 浩一郎,「大学院総合理工学研究科修士論文(物質理工学専攻,平成12年3月)」.測定はシンクロトロン放射光を光源とする光イオン化法,レーザー2光子イオン化法,および界面張力測定を用いた.