

2色レーザー光を用いたナノ空間超解像蛍光計測法<sup>†</sup>

池滝慶記・渡邊武史\*・酒井 誠\*・石内俊一\*

尾松孝茂\*\*・山元公寿\*\*\*・藤井正明\*

オリンパス光学工業株式会社先進技術研究所 ☎ 192 8512 東京都八王子市久保山町 2 3  
 \*分子科学研究所電子構造研究系 ☎ 444 8585 愛知県岡崎市明大寺町西郷字中 38  
 \*\*千葉大学工学部情報画像工学科 ☎ 263 0022 千葉県千葉市稲毛区弥生町 1 33  
 \*\*\*慶応義塾大学理工学部化学科 ☎ 223 8522 神奈川県横浜市港北区日吉 3 14 1

(2003年2月10日受付; 2003年3月6日掲載決定)

Super-resolution Fluorescence Microscopy in Nano-meter Scale  
 Region Using Two-color Laser Beams

Yoshinori IKETAKI, Takeshi WATANABE\*, Makoto SAKAI\*, Shun-ichi ISHIIUCHI\*,  
 Takashige OMATSU\*\*, Kimihisa YAMAMOTO\*\*\* and Masaaki FUJII\*

Olympus Optical Co., Ltd., 2 3 Kuboyama-cho, Hachioji, Tokyo 192 8512

\*Institute for Molecular Science, Myodaiji, Okazaki, Aichi 444 8585

\*\*Department of Information and Imaging Science, Chiba University, 1 33 Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba 263 0022

\*\*\*Department of Chemistry, Keio University, 3 14 1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama, Kanagawa 223 8522

(Received February 10, 2003; Accepted March 6, 2003)

A super-resolution fluorescence microscopy using two-color laser beams was proposed. The microscopy is based on the combination of two-color fluorescence dip spectroscopy and a phase modulation technique for the laser beam. By applying the proposed technique to a laser-scanning microscope, a fluorescence image of a sample can be observed with a spatial resolution overcoming the optical diffraction limit. To demonstrate validity of the microscopy, we constructed a scanning microscope system using commercial nano-second pulse lasers. An image of micro beads containing dye molecules was observed by the microscopy. We succeeded in obtaining the image with a resolution overcoming the diffraction limit in nano-meter scale region. The experimental data showed that the resolution was improved three times at least. The microscopy is expected to be an appropriate analysis method for the samples with nano-meter scale structures.

## 1. 緒 言

蛍光計測法は、光照射により観察試料を電子励起し、試料から発光する蛍光を捕捉する計測法である。この方法は、高感度な材料分析法として、その地位を確立している。その分析能力は、1分子計測までも可能とする<sup>1)</sup>。加えて、可視光により、非破壊かつ非接触で試料評価ができるという操作性面の特長も持ち合わせている。以上

のような特長を活かし、現在では、生体計測、ゲノム解析、機能材料評価等の様々な用途に応用されている<sup>2,3)</sup>。しかしながら、最大の問題点として、電子顕微鏡や各種近接場顕微鏡と比較すると空間分解能において劣ることがあげられる<sup>4)</sup>。具体的には、レイリーの回折限界式(1)が示すように、空間分解能の限界( $\delta$ )が光学系の開口数(NA)と光の波長( $\lambda$ )の比によって物理的に限定され(光の回折限界)、可視光を用いる限り、得られる空間分解能は波長オーダーの数百nmに止まっている<sup>5,6)</sup>。

$$\delta = 0.61 \frac{\lambda}{NA} \quad (1)$$

<sup>†</sup> 第22回表面科学講演大会(2002年11月26日~11月28日)にて発表

E-mail: y\_iketaki@ot.olympus.co.jp

我々は、上述の問題点を解決すべく、光の回折限界により空間分解能が制限されない超解像蛍光計測法を提案する。本論文では、本超解像蛍光計測法の原理を紹介すると同時に、その検証実験結果についても報告する。

## 2. 提案原理

提案する超解像蛍光計測法は、2波長蛍光 Dip 分光法と呼ばれる分光技術と波面光学の一種である光空間変調技術を融合させたものである<sup>7, 8)</sup>。

一般に、ある波長の光（ポンプ光）で基底状態 ( $S_0$ ) の分子を第一電子励起状態 ( $S_1$ ) に励起すると蛍光を発する。しかし、このとき、別の波長の光（イレース光）を同時に照射し、分子をより高位の電子励起状態 ( $S_n$ ) に励起すると、分子は内部転換および系間交差を繰り返して、無輻射過程により  $S_0$  状態に緩和する<sup>9, 10)</sup>。この事実は、Fig. 1 が示すように波長の異なる2色の光により分子を共鳴吸収させることで、分子からの蛍光を人為的に抑制できることを示している（以下、蛍光抑制効果と呼ぶ）。物理化学の分野では、本共鳴過程における蛍光強度の変化を測定することにより、高い励起状態をもつ分子の構造解析や反応過程の解明が行われている。この方法は2波長蛍光 Dip 分光法と呼ばれ、標準的な分析法として確立している<sup>11)</sup>。

我々は、この2波長蛍光 Dip 分光法により誘起された蛍光抑制効果を基礎とすることで、超解像蛍光計測法を提案する。すなわち、ポンプ光とイレース光を一部重ねて試料上に回折限界で集光すると、これら2つの光が重複した領域で蛍光が抑制されるので、蛍光領域が光の回折限界以下に制限される。その結果として、光の回折限界より狭い領域から発光した蛍光のみを観測することができる。例えば、Fig. 2 が示すように、光軸上で光強度が存在しない中空状の強度分布をもつベッセル1次ビームを用いれば、集光したポンプ光の辺縁部の蛍光が抑制されるので<sup>12)</sup>、蛍光領域は中心部のみとなる。この状態で観察試料を2次元空間走査すれば、光の回折限界を凌駕する高い空間分解能で、試料の蛍光画像を得ることができる。

## 3. 蛍光抑制効果の実験

超解像蛍光計測法は蛍光抑制過程の存在を前提とする。そこで、2波長蛍光 Dip 分光法により、実用的な蛍光標識分子であるローダミン6Gの蛍光抑制効果に関して、その分光特性を調べた。ローダミン6Gは、波長530 nm 近傍に  $S_0 \rightarrow S_1$  遷移に伴う強い吸収帯があり、560 nm 近傍で蛍光強度のピークをもつ<sup>13)</sup>。一方、550 nm 650 nm より長波長側には  $S_1 \rightarrow S_n$  の吸収帯が存在する。蛍光帯

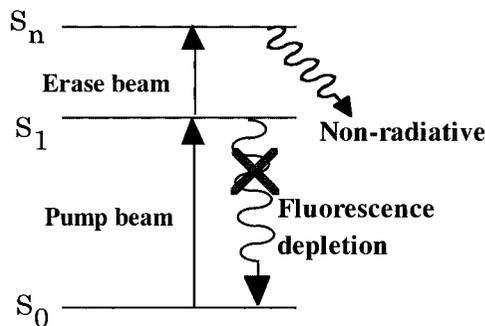


Fig. 1 Scheme of two-color fluorescence dip spectroscopy. The pump beam excites a molecule with the ground state ( $S_0$ ) to the  $S_1$  state. Then, the erase beam further excites the  $S_1$  molecule to higher excited states,  $S_n$ . Due to various relaxation processes from an  $S_n$  state, such as an internal conversion to the ground state, molecule from  $S_n$  can decay without fluorescence.

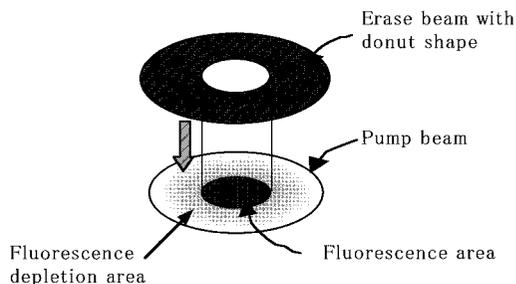


Fig. 2 Principle of the proposed microscopy. The 1st-order-Bessel beam with a “donut shape” for the erase beam is introduced onto some part of a focused pump beam area on a dyed sample, and the fluorescence depletion process takes place at the part where two beams overlap.

域から外れた、600 nm 以上の波長領域のイレース光をポンプ光と同時照射すれば、イレース光が蛍光検出を妨げることなく、蛍光抑制効果を誘起することができる。

Fig. 3 は、実験方法を示す。ポンプ光光源として Nd:YAG パルスレーザの2倍高調波（波長：532 nm、パルス幅：7 ns）を用いる。また、この光でローダミンBを用いた色素レーザを励起し、イレース光（599 nm）を発振させる。そして、光路長 10 mm の石英セルの中にローダミン6Gをメタノール中に0.01 mM/l で分散させて、集光したポンプ光（1 mmφ）とイレース光（2 mmφ）を同軸で同時照射する。本実験では、光軸と直交して発光する蛍光を光ファイバ分光器により測定し、蛍光スペクトルの変化を観測する。

Fig. 4 は蛍光ピーク波長すなわち 552.76 nm における

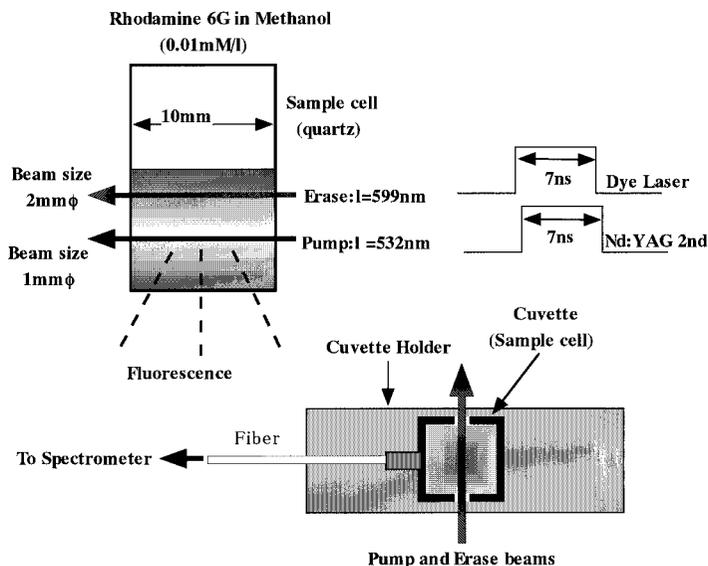


Fig. 3 Schematic diagram of the experimental setup. The fluorescence depletion process for Rhodamine 6 G is observed by using the two-color dip spectroscopy.

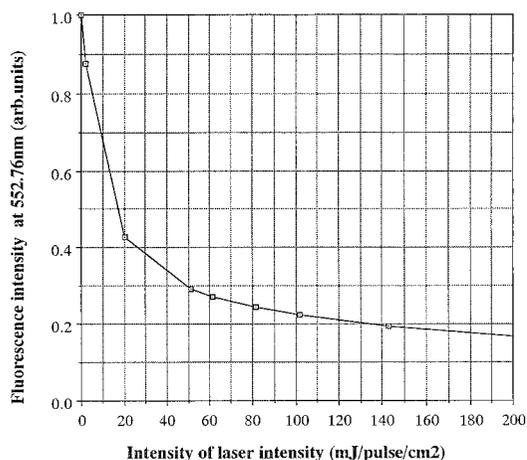


Fig. 4 Fluorescence intensity at a wavelength of 552.76 nm plotted as a function of the erase laser intensity. The fluorescence intensity exponentially decreases corresponding to the erase laser intensity.

蛍光強度をイレース光のパルスエネルギーの関数としてプロットしたものである。それらによれば、蛍光強度はパルスエネルギーに対して強い非線形性を示し、指数関数的に減少する。100 mJ/pulse/cm<sup>2</sup>のイレース光を入射すると蛍光強度は20%以下に減少する。このときのパルスエネルギーを、集光点におけるレーザー強度に換算すると15 MW/cm<sup>2</sup>になる。したがって、これと同程度のレーザー

強度でイレース光を集光すれば、その強度プロファイルと Fig. 4 の特性曲線により決定される空間的特性をもつ蛍光抑制効果が、集光面上で発現することを意味する。

#### 4. ベッセル1次ビームの発生

超解像蛍光計測法において、イレース光の生成および形状整形技術も重要なキーテクノロジーである。本計測法の到達空間分解能の上限が、この技術の完成度によって左右されるといっても過言ではない。我々は液晶型の光空間変調器を用いて、中空形状を有するベッセル1次ビームの生成を試みた。

ベッセル1次ビームは、ビーム面内において光軸を周回する方向に連続的に位相が変化し、光軸を周回すると $2\pi$ だけ位相が変化するような位相分布をもつ。その結果、光軸上で電場強度が相殺されるので、ビーム中央で光強度がゼロとなる<sup>14)</sup>。このビームを集光すれば焦点面でイレース光として理想的な「ドーナツ」形状をもつ光強度分布が得られる。もし、上記の位相分布に対応する屈折率分布を光空間変調器の液晶面に光により書き込み、その液晶面からの回折光を取り出せば、この回折光は1次ベッセルビームとなる。我々は、光空間変調器(浜松フォトリクス: PAL-SLM)により1次ベッセルビームを生成し、そのビームクオリティについて評価を行った<sup>15)</sup>。

Fig. 5 に、1次ベッセルビームの生成法と評価方法を

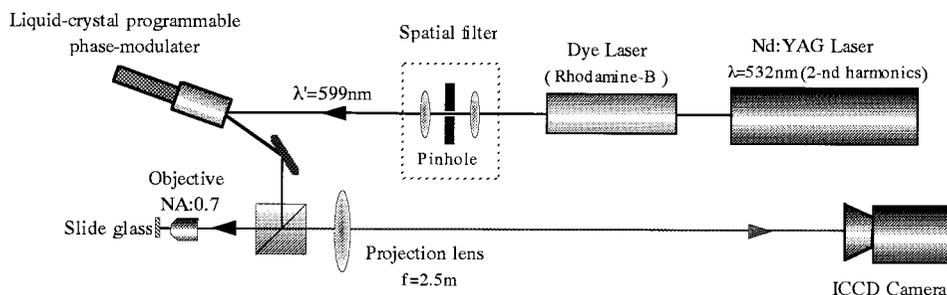


Fig. 5 Evaluation of the generated 1st-order-Bessel beam. To examine the modulated pattern of the beam, we observed the reflection pattern of the beam from a slide glass located on the focal plane of the objective.

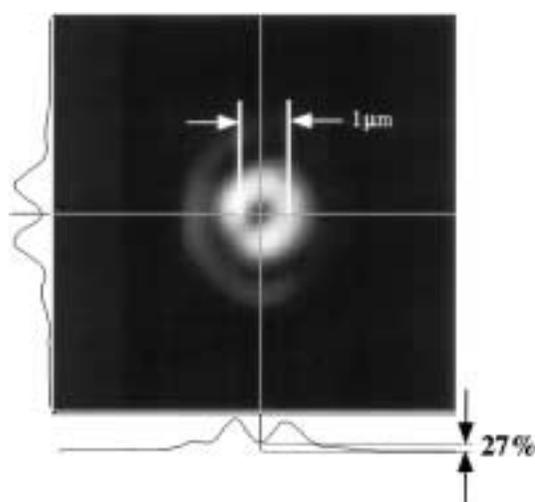


Fig. 6 Observed pattern of the 1st-order-Bessel beam at the focal point. The image taken by the ICCD camera indicates that the focused erase beam has the donut pattern with a center hole with 1  $\mu\text{m}$  size.

示す。光源には、パルス YAG レーザの 2 倍波（波長：532 nm，パルス幅：7 nsec）で色素レーザー（ローダミン B）で励起したときに発生するレーザー光：波長 599 nm を用いた。発生したレーザー光を空間フィルタおよびコリメータレンズで平面波に変換後，光空間変調器の液晶面で回折させ，1 次ベッセルビームに空間変調する。生成された 1 次ベッセルビームを顕微鏡対物（NA：0.7）でスライドガラス表面に集光し，反射した光を再び顕微鏡対物でコリメートする。そして，焦点距離 2500 mm の凸レンズにより倍率 266 で拡大し，超高感度 CCD カメラ（PIMAX: Princeton Instruments Co., Ltd.）の感光面上に結像させる。

Fig. 6 は撮影したベッセル 1 次ビームの強度プロファ

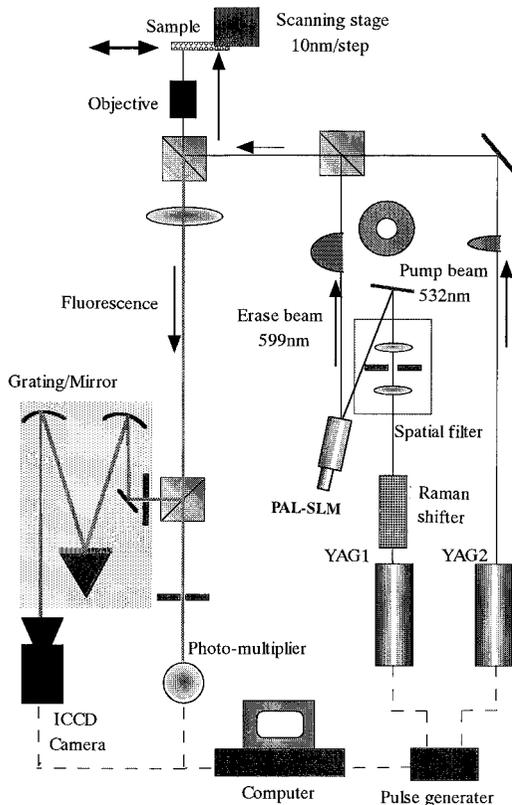
イルである。Fig. 6 が示すようにビーム中央において約 1  $\mu\text{m}$  の径をもつ窪みが形成できている。ビーム中央部の強度は辺縁部のそれと比較すると約 27% 程度まで低下している。装置の観察光学系の分解能が 0.5  $\mu\text{m}$  であり，その強度プロファイルを十分な空間分解能で観察できていないことを考慮すると，実際にはビーム中央部の強度は更に下回るので，強度プロファイルはより中空形状に近いことが期待できる。

## 5. 検証実験

走査顕微方式で蛍光画像を計測することにより，超解像蛍光計測法を検証した。検証実験では，顕微鏡対物レンズでポンプ光とイレース光の 2 色レーザー光を蛍光試料上に集光する。そして，この試料を 2 次元走査させながら各点における蛍光信号をコンピュータにストアし，蛍光画像を形成する。本検証実験では試料としてローダミン 6 G を含有した蛍光ビーズを用い，本計測法の評価を行った。

### 5.1 実験装置

Fig. 7 に，装置全体構成を示す。ポンプ光とイレース光を発生させるために各々独立の 2 台の YAG レーザを用意した。ポンプ光には，HOYA-Continuum: Mini-light-II（10 Hz，20 mJ/pulse@532 nm）を用いた。このレーザーはパルス幅が 3~4 nsec であり，通常の YAG レーザと比較するとパルス幅が短い。一方，イレース光発生用に，Spectra-Physics: GCR-130（10 Hz，200 mJ/pulse@532 nm）を準備した。この光で  $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$  結晶を励起して 2 次の誘導ラマン光（波長 599 nm：パルス幅 7 nsec）を発生させ，これをイレース光とする。発生したイレース光のパルス幅はポンプ光の 2 倍の時間幅をもち，超解像効果を有効に引き出すための必要条件を満たしている。2 台の YAG レーザの発振は，フラッシュランプトリガと Q-スイッチトリガに TTL 信号を与えることで電気的な制



**Fig. 7** Experimental setup for verification of the super-resolution fluorescence microscopy. The 2-nd harmonics of an Nd:YAG laser was used as the pump beam. To generate the erase beam at a wavelength of 599 nm, a  $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$  Raman crystal was irradiated by another Nd:YAG laser. The pulse-delay generator synchronized both lasers. Scanning the sample stage, the fluorescence signal from the sample was detected by the photo-multiplier.

御が可能であり、簡便にパルスジェネレータにより蛍光抑制効果の発現を最適化できる。イレース光は空間フィルタにより波面が整えられた後、光空間変調器の液晶面でベッセル1次ビームに空間変調される。そして、このイレース光はハーフミラによりポンプ光と同軸に調整される。これらの光はキューブミラで偏向されたのち、顕微鏡対物レンズにより蛍光試料に集光される。蛍光試料は走査ステージに搭載されており、絶対位置分解能: 10 nm/step で2次元空間走査が可能である。試料から発光した蛍光は、顕微鏡対物でコリメートされ焦点距離2.5 mの投影レンズより、光電子増倍管の光電変換面上に結像される。この際、試料面より散乱するポンプ光とイレース光が蛍光信号と混じらないように、599 nmと532

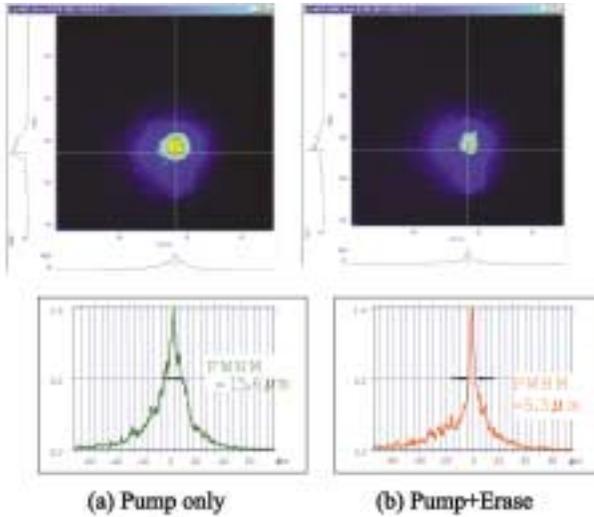
nm ノッチフィルタを光路に挿入した。Fig. 7 に示すように、本実験装置は高感度分光 CCD カメラシステムを搭載し、試料面における蛍光像や発光スペクトルが計測できるので、光学調整状態がモニタできる。

## 5.2 実験結果

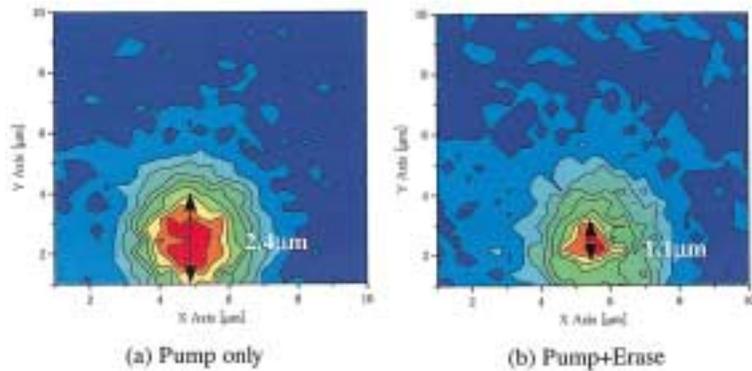
検証実験に先立って実験装置の光学調整状態を確認した。すなわち、ローダミン 6G を分散した  $3 \mu\text{m}$  厚の PMMA ポリマ切片にポンプ光およびイレース光を集光して、CCD カメラシステムにより、その蛍光スポットのサイズの変化を確認した。Fig. 8 は、ポンプ光単独照射したとき (a) とイレース光 ( $40 \text{ MW}/\text{cm}^2$ ) を同時照射した時 (b) の蛍光スポット像を示す。ポンプ光およびイレース光は有効開口数 0.02 で集光した。Fig. 8 (a) において、ポンプ光単独照射時における蛍光スポットサイズは、半値幅でほぼ回折限界の  $15 \mu\text{m}$  程度であるが、イレース光を同時照射すると3分の1のサイズに収縮している。すなわち、中空状のビームプロファイルをもつイレース光により、蛍光スポットの外輪部の蛍光が抑制され、スポット中央部の蛍光領域のみが残留している様子がわかる。提案する超解像蛍光計測法により回折限界の3倍以上の空間分解能で蛍光微観察ができる可能性を示唆している。このような装置調整状態で検証実験を行った。

Fig. 9 に  $1 \mu\text{m}$  径の蛍光ビーズを2次元空間走査したときの検証実験結果である。すなわち、最高蛍光強度のポイントで正規化した相対強度の二次元分布である。Fig. 9 (a) はポンプ光のみを照射したときのビーズの像である。このとき使用した顕微鏡対物レンズの有効 NA は 0.14 であるので、ポンプ光を試料面に集光した場合、回折限界式 (1) で与えられる  $2.3 \mu\text{m}$  の半値幅をもつ光強度分布が形成される。したがって、ビーズを2次元空間走査すれば、この光強度分布に対応するビーズの蛍光像が得られるはずである。Fig. 9 (a) によれば、得られたビーズ像のサイズは、半値幅でほぼ  $2.4 \mu\text{m}$  であり、これは正しく回折限界サイズに対応している。それに対して、Fig. 9 (b) はイレース光を同時照射したときのビーズ像である。この時の像サイズは、半分以下の  $1 \mu\text{m}$  程度であり、回折限界のサイズを遥かに下回っていることがわかる。すなわち、空間分解能は2倍以上も向上している。

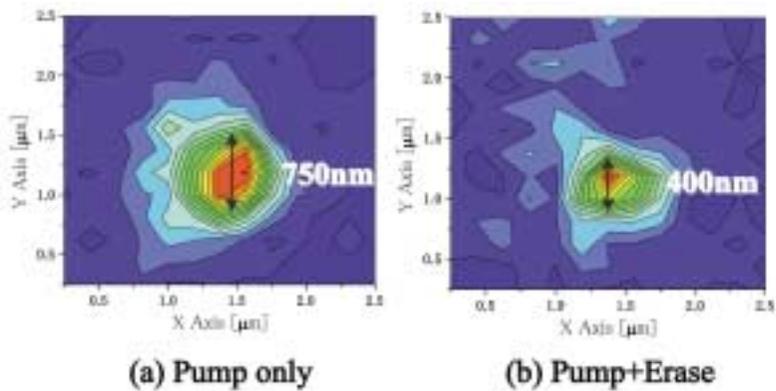
更に、より微小領域における超解像効果の発現を確認するために、NA: 0.7 の高開口対物レンズを用いて実験を行った。もし、ポンプ光を回折限界で集光すると、そのサイズは、強度分布の半値幅で評価すると  $460 \text{ nm}$  となるが、本実験ではそれよりも十分小さい  $175 \text{ nm}$  径の蛍光ビーズを用いた。Fig. 10 (a) と (b) は、それぞれ、



**Fig. 8** Observed fluorescence spot profile on the PMMA film containing Rhodamine 6 G without and with irradiation of the erase beam with doughnut shape. The spot size with the erase beam irradiation ((a)) reduces to that of 1/3 in the absence of the irradiation ((b)).



**Fig. 9** Scanning fluorescence image of 1  $\mu\text{m}$ -micro bead with Rhodamine 6 G taken by introducing only pump beam ((a)) and both pump and erase beams ((b)). The former corresponds to an image given by conventional optical microscopy, and the observed image size of the micro bead is almost the optical diffraction limit of 2.4  $\mu\text{m}$ -FWHM. On the other hand, the image given by the proposed method has a size smaller than that of half in the absence of the erase beam.



**Fig. 10** Scanning fluorescence image of 175 nm-micro bead taken by introducing only pump beam ((a)) and both pump and erase beams ((b)). The image given by the proposed method ((b)) has a size of 400 nm- FWHM. This value is smaller than the diffraction limit of 460 nm- FWHM.

ポンプ光単独照射時およびイレース光同時照射時のビーズ像を示す。Fig. 10 (a) において、得られたビーズ像のサイズは  $750 \text{ nm}$  と予想よりも大きい値を示している。これは、対物レンズを高 NA 化して焦点深度を浅くしたものの、デフォーカスステージの位置精度が  $\pm 0.2 \mu\text{m}/\text{step}$  に止まっており、観察試料を焦点面に正確に移動できないことが最大の理由である。しかしながら、このような状況でも、Fig. 10 (b) に示すように、イレース光を同時照射するとビーズ像のサイズは半分近く収縮し、回折限界以下の  $400 \text{ nm}$  を示す。すなわち、光の波長サイズのナノ空間領域でも提案蛍光計測法は有効であることを示している。なお、この時のイレース光のエネルギーは、 $2 \text{ nJ}/\text{pulse}$  であり、この値を単位面積当たりのエネルギーに変換すると  $40 \text{ mJ}/\text{pulse}/\text{cm}^2$  ( $18 \text{ MW}/\text{cm}^2$ ) であり、Fig. 4 の実験データと矛盾しない結果である。Fig. 10 (b) に着目すると、ビーズ中心部における絶対蛍光強度は、Fig. 10 (a) の強度と比較する 3 割程度少ない。この原因としては、イレース光がビーム中心部において光強度が完全にゼロではなく、若干の蛍光抑制が起こっていることが推測される。すなわち、この事実はイレース光の空間変調が完全ではないことを意味し、今後の技術的な課題であると同時に、更なる空間分解能向上のためのキーテクノロジーであると考えられる。

更に、本超解像蛍光計測法のデモンストレーションとして、ローダミン 6 G を分散した PMMA ポリマ切片の切断界面を横断するように 1 次元走査を行い、その表面の状態を計測した。一方、Fig. 11 は超解像顕微鏡法による測定結果であり、太線はポンプ光単独照射時の表面状態の測定結果を示し、細線はポンプ光およびイレース光同時照射したときの測定結果を示す。Fig. 11 によれば、横軸は試料の走査に応じて、蛍光強度が変化をしている。これはポリマをマイクロトームで切断した際に、発生した表面の凹凸やローダミン 6 G の濃度分布斑に対応する。ポンプ光とイレース光同時照射時には、ポンプ光単独照射では観測できなかった高い空間周波数成分に対応する多くの微細構造が鮮明に確認できる。これは、取りも直さず、顕微鏡法の空間分解能評価で最も重要な指標である 2 点分解能の向上を示している。

## 6. 超解像蛍光計測法の表面分析法への応用

我々の実験結果が示すように、超解像蛍光計測法を用いれば、回折限界に制限されることなく空間分解能は 2 倍以上も向上する。仮に、開口数: 1.4 の油浸レンズを利用すると、式 (1) で与えられる回折限界は  $0.23 \mu\text{m}$  であるので、その半分である  $0.11 \mu\text{m}$  サイズの蛍光体の識別が可能であることを示唆する。今後、光源系および

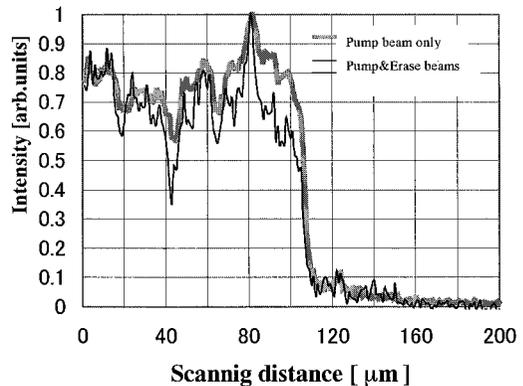
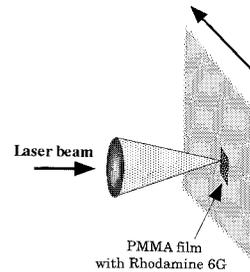


Fig. 11 Measured cross sectional profile of the PMMA film with Rhodamine 6 G by introducing only pump beam (thick-line) and both pump and erase beams (thin-line). The film was sliced by a microtome. Roughness of the film surface and density distribution of Rhodamine 6 G influence on the measured profile. As shown in the profile with the thin-line, fine structures can be clearly observed, and this result shows that a resolving power is improved using the proposal method.

検出系を含めた全システムの最適化作業を進めれば、提案する超解像蛍光計測法により、 $100 \text{ nm}$  を上回るような極めて高い空間分解能で試料の構造観察ができることも期待できる。この分解能は、軟 X 線を用いた各種の先進的な顕微分析法に匹敵するものである<sup>16)</sup>。

本超解像蛍光計測法では、プローブとして可視光を用いるので、基本的には非接触・非破壊で材料評価ができる。更に、検出光学系に共焦点光学系を採用すれば、材料内部も 3 次元的に分析できる<sup>17)</sup>。加えて実用上の最大のメリットとして、真空や触針といった特殊環境やデバイスの利用を前提としないことがあげられる。例えば、本計測法をレーザ走査型顕微鏡に応用すれば、高機能でありながらも、コンパクトで極めて取り扱いが容易な分析装置が実現する<sup>18)</sup>。

現在、ナノテクノロジーの発展はめざましい。意欲的な材料研究者等は、量子ドットや dendrogram に代表される

様々な新奇なナノメータサイズの人工構造体を次々と創製しつつある<sup>19, 20</sup>。このような背景の中、我々の提案する超解像蛍光計測法は新世代のマテリアルサイエンスの発展に貢献できる基本的な評価ツールと成り得ることが期待できる。

## 7. 結 語

2色レーザ光を用いた超解像蛍光計測法を提案した。本計測法は、2波長蛍光 Dip 分光法とレーザビームに対する空間変調技術を融合した技術を基礎とする。本計測法をレーザ走査型顕微鏡に応用することで、光の回折限界を上回る空間分解能で、試料の蛍光観察が可能となる。本計測法の有効性を示すために、市販のナノ秒パルスレーザを用いた走査型顕微鏡システムを作製し、色素分子を含有したマイクロビーズの蛍光像を計測した。ナノメータ空間領域において、我々は、回折限界を打ち破る空間分解能で蛍光像を得ることができた。また、実験データは、空間分解能が少なくとも3倍程度向上していることを示している。本計測法は、ナノメータスケールの空間構造をもつ試料に適した評価法となることが期待される。

## 謝 辞

本研究は、文部科学省：独創的革新技術開発研究提案公募制度の助成により行われました。また、その一部は、科学技術振興事業団：若手個人研究推進事業「さきがけ21」および研究成果最適移転事業「独創モデル化」の助成において行われました。最後に、本研究の推進に関してご支援を頂きました茅 幸二分子科学研究所長と遊佐厚オリンパス光学工業株式会社先進技術研究所長に感謝を致します。

## 文 献

- 1) M. Ehrenberg and R. Rigler: Chem. Phys. Lett. **4**, 390 (1974).
- 2) F. Fujita: J. Comp. Neurol. **155**, 311 (1974).
- 3) 吉川裕之, 増原 宏: 分光研究 **51**, 203 (2002).
- 4) A. Lewis and K. Lieberman: Anal. Chem. **63**, 623 (1991).
- 5) E. Abbe: Arch. für Mikr. Anat. **9**, 413 (1873).
- 6) M. Born and E. Wolf: "Principle of Optics 6 ed." (Pergamon, Oxford, 1980) p. 245.
- 7) A. Goto, M. Fujii and M. Ito: Chem. Phys. Lett. **135**, 407 (1987).
- 8) G. Machavariani, N. Davidson, E. Hasman, S. Blit, A.A. Ishaaya and A.A. Friesem: Opt. Commun. **209**, 265 (2002).
- 9) H. Fujiwara, H. Fukumura and H. Masuhara: Chem. Phys. Lett. **99**, 11844 (1995).
- 10) H. Fukumura and H. Masuhara: Chem. Phys. Lett. **221**, 373 (1994).
- 11) S. Ishiuchi, M. Sakai, K. Daigoku, T. Ueda, T. Yamanaka, K. Hashimoto and M. Fujii: Chem. Phys. Lett. **347**, 87 (2001).
- 12) Y. Iketaki, T. Omatsu, T. Suzuki, O. Sato and M. Fujii: CLEO 2000 & Trends in Optics & Photonics Series (TOPS), 39 (2000).
- 13) E. Sahara and D. Treves: IEEE. J. Quantum Electronics **13**, 962 (1977).
- 14) H. Ne, N.R. Heckenberg and H. Rubinztein-Dunlop: J. Mod. Opt. **42**, 217 (1995).
- 15) Y. Igasaki, F. Li, N. Yoshida, H. Toyoda, T. Inoue, N. Mukozaka, Y. Kobayashi and T. Hara: Optical Rev. **6**, 339 (1999).
- 16) Y. Iketaki, Y. Horikawa, S. Mochimaru, K. Nagai, M. Atsumi, H. Kamijou and M. Shibuya: Opt. Lett. **19**, 1804 (1994).
- 17) C. Sheppard: J. Opt. Soc. Am. A **2**, 121 (1985).
- 18) A. Boyde: Science **230**, 1270 (1985).
- 19) K. Yamamoto, M. Higuchi, S. Shiki, M. Tsuruta and H. Chiba: Nature **415**, 509 (2002).
- 20) M. Ikezawa and Y. Masumoto: Phys. Rev. B **61**, 12662 (2000).