

プリンストン・インスツルメンツ社製 高感度冷却 CCD 分光器を使った、コヒーレントラマン 分光イメージング測定

Coherent Raman Spectroscopic Imaging Measurements Using Princeton Instruments Cooled High Sensitive Camera and Spectrometer

佐野 隆三^a, 逢坂 雄良^a

Ryuzo Sano and Takeyoshi Osaka

1. はじめに

ラマン分光を顕微鏡法に応用した顕微ラマン分光法ではラマン散乱の散乱断面積が非常に小さい為、生細胞から良好なラマンスペクトルを得る為には数秒から数分の露光時間を必要としていた。その問題を解決した手法が、高性能、高感度 CCD カメラ分光器（米国プリンストンインスツルメンツ社 以下 PI 製）を使った Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) 顕微分光法である。

今回は、CCD カメラ分光器の特徴とそれによって得られた結果を紹介する。

2. CARS 顕微分光装置

Figure 1 に、超広帯域 CARS 顕微分光装置の概略を示す¹⁻³。

使用する高感度 CCD は電子冷却型の PI 社製モデル PIXIS-100BR を用いた。これは冷却温度が $-70^{\circ}\text{C} \sim -90^{\circ}\text{C}$ で暗電流ノイズを低くし、量子効率が近赤外域で 95% と高い検出器である為、高い S/N 比で微弱光を検出することができる。また、背面照射型のエタロニング^{注1}効果（干渉縞）を抑えたディープディプリッション型^{注2}である為、近赤外線レーザー励起で微弱ラマン信号の弊害となったエタロニングを防ぐことが可能になった。読み出し回路は A/D 変換 2 MHz, 1 msec 読み出し (1 KHz 同期) に加え、カスタムチップ設定により、CARS イメージングの連続取得が可能である。分光器部は非点収差を補正した PI 社製 SpectraPro と f 値 2.0 の最も明るいレンズ分光器、PI 製モデル LS785 を使用している。(Figure 2 PIXIS)

光源にはフェムト秒モード同期 Ti:Sapphire レーザーまたはサブナノ秒マイクロチック Nd:YAG レーザーを用い、出

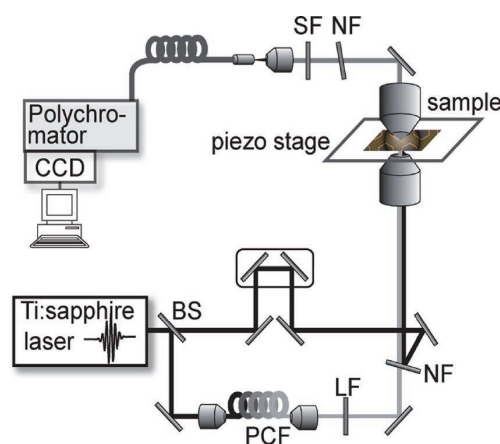


Figure 1. Multiplex CARS experimental setup; SF, LF, NF, BS, and PCF are short-pass, long-pass, notch filters, beam splitter, and photonic crystal fiber, respectively.



Figure 2. PIXIS Deep Cooled CCD Camera.

^a 株式会社 日本ローパーPI 事業部
連絡先 〒135-0033 東京都江東区深川 2-8-19 サクラビル 3F
電子メール tosaka@roper.co.jp

注1 エタロニング
近赤外領域の光が、薄膜 Si 層の表面反射と裏面反射から戻ってくる光の多重反射によって、起こる干渉縞
注2 ディープディプリッション型
Si 基板上に高抵抗のエピタキシャル Si を厚く成長させ、近赤外光の吸収を高めた構造

力の一部を PCF に導入してスーパーコンティニューム光（以降、白色レーザー光と呼ぶことにする）を発生させた。白色レーザー光は可視から近赤外まで幅広いスペクトルを有するが、そのうち近赤外成分のみを選び、広帯域ストークス光 (ω_2) として用いた。一方、発振器からの残りの基本波を狭帯域化してポンプ光 (ω_1) とし、光学遅延を経由させた後、ノッチフィルターによりストークス光と同軸に重ねた。二つの光パルスは、同軸のまま顕微鏡へと導入され、対物レンズにより試料へと集光される。通常、CARS 発生には位相整合条件が満たされる必要があるが、対物レンズの高い NA 値（本セットアップでは 0.9）のため、この条件は緩和され、幅広い波数領域で CARS 光の発生が可能となっている。試料から発生した CARS 光を対向させた対物レンズで集め、各種フィルターを経由させた後、分光器（PI 社）及び CCD カメラ（PI 社）で分光測定した。

Figure 3 に分光器及び CCD カメラの概観を示す。

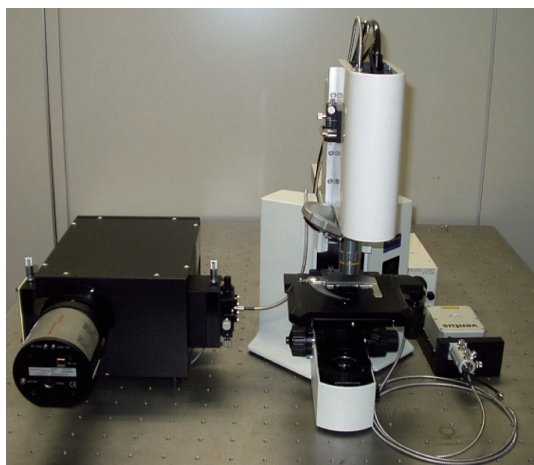


Figure 3. PIXIS and Spectrometer.

試料は三軸ピエゾステージ上に載っており、三次元的な像を得ることが可能である。

CARS 過程は非線形光学過程であるため、レーザー光が強く集光された部分からのみ信号光が発生する。その結果、共焦点顕微鏡のようにピンホールを導入する必要がなく、高い三次元空間分解能を実現することができる。本装置の空間分解能は、面内・面外方向でそれぞれ約 $0.5 \mu\text{m}$, $1.5 \mu\text{m}$ であった⁴。

3. CARS 分光イメージングの一例

3.1 花粉

Figure 4 にサクラの花粉を試料とした実験結果を示す⁵。露光時間は一点あたり 100 ms である。光源にはフェムト秒 Ti:sapphire レーザーを用いた。花粉は非常に強い自家蛍光を発するため、自発ラマンスpekトルの測定は困難である。このため、あらかじめレーザー光照射により光褪色をさせたり⁶、銀ナノ粒子を用いた表面増強ラマン散乱（surface-enhanced Raman scattering; SERS）によりラマン信号を増強

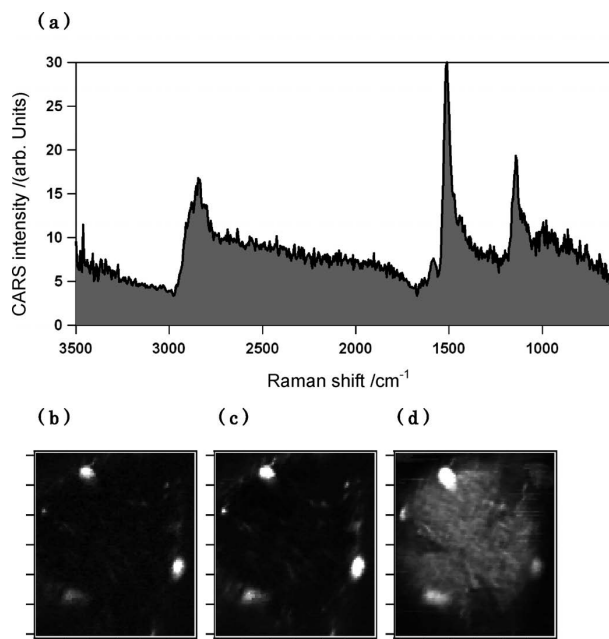


Figure 4. CARS spectrum and image of Cherry pollen. (1 scale= $5 \mu\text{m}$)

させたり⁷してラマンスpekトルを取得した例が報告されている。これに対して本実験では、蛍光の妨害を受けにくいという CARS の利点を活かすことで、花粉の CARS スペクトルを前処理無しで高速に取得することに成功した。さて、Figure 4 (a) に示したマルチプレックス CARS スペクトル^{注3}（強度補正済み）は複数のピークから構成されている。特に 1100 , 1500 cm^{-1} 付近のピークはカロテノイドに特徴的な信号であり、それぞれ C-C, C=C 伸縮振動に帰属される。これに対して、 2850 cm^{-1} 付近に観測される強い信号は、C-H 伸縮振動に帰属される。これまでの実験から、カロテノイドではこのように強い信号が C-H 伸縮領域に見られないこと、そして、脂質は長鎖アルキル鎖から構成されており、非常に強い信号を C-H 伸縮振動領域に与えることがわかっている。これに加え、花粉にはカロテノイドや脂質が構成成分として含まれることが、生化学的手法を通して明らかとなっているため、C-C, C=C 伸縮振動における信号はカロテノイドに、C-H 伸縮振動における信号は脂質に由来するバンドであると考えられる。Figure 4 (b-d) には C-C, C=C, C-H 伸縮振動それぞれによる CARS イメージを示す。Figure 4 (b) 及び (c) は同じイメージを与えており、どちらも顆粒状の部分で特に強いコントラストを示している。これは、C-C 及び C=C 伸縮振動に由来するバンドが同一の化学種（カロテノイド）からのものであるという我々の同定と矛盾しない。一方、C-H 伸縮振動による CARS イメージ (Figure 4 (d)) は、Figure 4 (b) 及び (c) と異なり、花粉全体の形状を与えている。また、発芽孔も複数の位置

注3 マルチプレックス CARS
狭帯域レーザーと広帯域レーザーの組み合わせにより、CARS のスペクトル情報を取得する方法

で見られる。C-H 伸縮振動によるイメージでも、顆粒状の部分で強い信号が観測されることから、この顆粒状の部分でカロテノイドと脂質が高濃度で共存していることが予想される。このように、マルチプレックス CARS 顕微分光法を用いることにより、異なる化学種を異なるコントラストで可視化計測することが可能である。

3.2 生細胞への応用

Figure 5 に、フェムト秒 Ti:sapphire レーザーを用いて分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*; *S. pombe*) 生細胞のマルチプレックス CARS イメージングを行った結果を示す⁸。Figure 5 (a) には酵母にレーザー光を照射したときのマルチプレックス CARS スペクトルが示されている。露光時間は 100 ms である。2850 cm^{-1} 付近に観測されるピークは、リン脂質、タンパク質、多糖類等に含まれる C-H 伸縮振動に由来する信号である。この CARS 信号によりイメージを構成した結果を Figure 5 (b) に示す。CARS により、様々な分裂周期にある複数の酵母細胞が明瞭に可視化されている。酵母の内部には、信号強度の強い部分が複数箇所存在するが、これらはリン脂質を豊富に含むミトコンドリア等の膜系オルガネラや、多糖類から構成されている隔壁に由来すると考えられる。

サブナノ秒マイクロチップ Nd:YAG レーザーを光源として用いることで、近赤外 1064 nm 以上の波長帯域での光源を用いた CARS 分光イメージングも可能である。この装置でも、deep depletion タイプのカメラの利用は必須である。一例として、出芽酵母生細胞の CARS 分光イメージングの結果を Figure 6 に示す⁹。様々な振動モードにより、生細胞を“色づけ”することが可能になった。

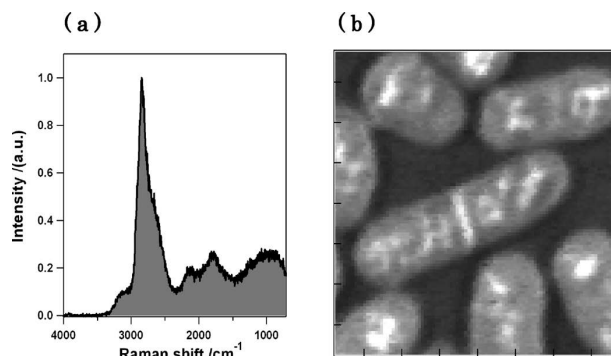


Figure 5. CARS spectrum and image of living fission yeast cells. (1scale = 2 μm).

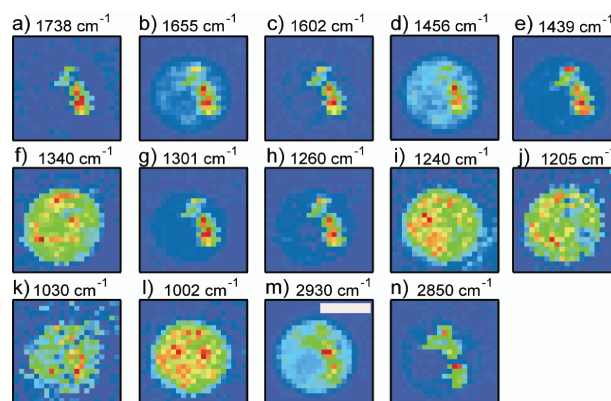


Figure 6. Label-free and multi-frequency image of a living budding yeast cell.

4. おわりに

CARS 顕微分光装置は、生体試料を構成する様々な分子種を、分子の指紋であるラマンスペクトルに基づいて多彩に“色分け”することが可能である。本方法は、既知の分子を可視化することが得意な蛍光イメージングと比べ、スペクトルを通して、未知の分子をも分析・検出することを

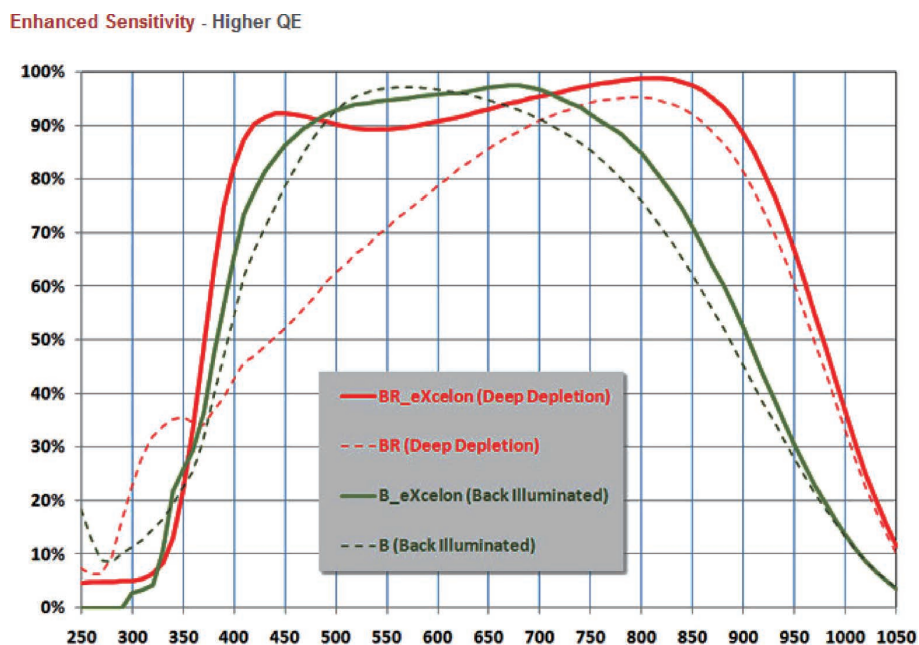


Figure 7. PIXIS 100BR eXcelon QE Curve.

可能とするため、生細胞内でこれまで知られていなかった分子や分子構造についても研究対象とすることができる。

今回使用した PIXIS-100BR は、特に近赤外領域で感度が高い CCD カメラの為、良好なデータが得られたが、最近リリースした PI 社の eXcelon (エクセロン) 技術を搭載したカメラを用いると、より良いデータが得られると期待されている。eXcelon 技術とは、PI 社の独自開発した CCD 素子であり、エタロニング効果を低減させる為に背面薄化シリコン処理を行うことで可能になり、かつ従来の量子効率も従来に比べ、UV~NIR 領域で 15~20% も増加した。低いエタロニング、高い量子効率で、近赤外領域での微弱光計測に期待がよせられている。

Figure 7 に、PIXIS100BR eXcelon の QE グラフを示す。

引用文献

- (1) 加納英明, 島田林太郎, 濱口宏夫, 応用物理 **2006**, 75, 682-688.
- (2) Kano, H.; Hiroo, H. *Molecular Science* **2007**, 1, A0005.
- (3) Kano, H.; Hamaguchi, H. *Appl. Phys. Lett.* **2005**, 86, 121113/1.
- (4) Kano, H.; Hamaguchi, H. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 3120-3126.
- (5) Kano, H.; Hamaguchi, H. *Chem. Lett.* **2006**, 35, 1124-1125.
- (6) Ivleva, N. P.; Niessner, R.; Panne, U. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 381, 261-267.
- (7) Sengupta, A.; Laucks, M. L.; Davis, E. J. *Appl. Spectrosc.* **2005**, 59, 1016-1023.
- (8) Kano, H.; Hamaguchi, H. *Opt. Express* **2006**, 14, 2798-2804.
- (9) Okuno, M.; Kano, H.; Leproux, P.; Couderc, V.; Day, J.; Bonn, M.; Hamaguchi, H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 6773-6777.

(受理日 2011年2月21日)