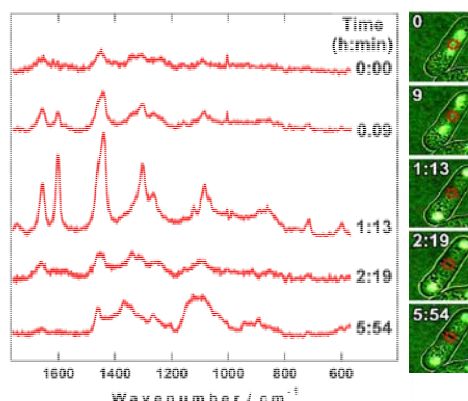


ディビジョン番号	10
ディビジョン名	分析化学

大項目	1. 分析化学
中項目	1-12. 顕微鏡
小項目	1-12-6. 顕微ラマン分光

概要（200字以内）

線形および非線形ラマン分光を顕微鏡と組み合わせ、ps の時間分解能、サブ μm の空間分解能でラマンスペクトルを測定することができる（顕微ラマン分光）。生細胞の *in vivo* 分析、工業材料中の異物分析、半導体のストレス分析などに応用されている。特定のラマンバンドの強度を3次元プロットすると、試料の物質分布を分子レベルで可視化することができる（ラマンイメージング）。近接場効果を用いて空間分解能を nm レベルに向上させる試みがなされている。



分裂酵母の時空間分解ラマンスペクトル

現状と最前線

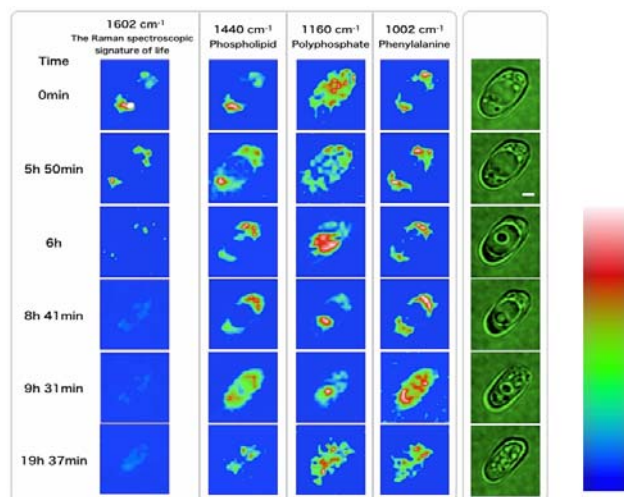
線形ラマン分光を用いた共焦点顕微ラマン分光の技術は確立されており、既に多数の市販品が提供されている。典型的な空間分解能（励起波長 632.8 nm）は、100 μm のピンホールを用いたとき、水平方向で 250 nm、奥行き方向で 1.8 μm である。この値は励起光の回折限界 ($\lambda/2.5$, λ は励起光の波長) に達しており、近接場効果などの新しい原理を導入しない限りこれ以上の改善は望めない。近接場効果を用いた空間分解ラマン分光として、金属を付着させた STM の探針を用いるチップ増強ラマン分光の可能性が盛んに研究されており、10 nm 単位の空間分解測定が報告されている。また最近発見された共鳴ハイパーラマン散乱における分子近接場効果は、新しい空間分解ラマン分光の可能性を示唆しており興味深い。

非線形ラマン分光、とくに CARS (Coherent anti-Stokes Raman Scattering) を用いた顕微ラマン分光の開発も盛んに行われている。この手法では、2 波長のレーザー電場が重なった空間のみから信号が発せられるので、共焦点配置をとらなくても奥行き方向に高い分解能を持たせることができる。典型的な空間分解能（励起波長 800 nm）は、水平方向で 500 nm、奥行き方向で 1.5 μm である。顕微 CARS 分光では、線形ラマン分光に比べて強い信号が得られるので、以下に述べるラマンイメージング測定を短時間に行えるという利点がある。また、試料からの蛍光による妨害を受けにくい点も顕微 CARS 分光の長所にあげられる [1]。

顕微ラマン分光の大きな長所として、ラマン信号を用いたラマンイメージングによる物質分布

の分子レベル可視化がある。蛍光を用いる方法に比べ、ラマン分光では標識などの前処理を必要としないので、真にあるがままに試料の物質分布を調べることができる。図に出芽酵母の自然死にともなう細胞内の物質分布の変化をラマンイメージによって追跡した結果を示す。栄養枯渇によりミトコンドリアの呼吸活性が低下すると、ダンシングボディーと呼ばれる顆粒が液胞内に突如出現し、その後時間を経て細胞内の構造が崩れて細胞死に至る過程が、分子レベルで明瞭に可視化されている。生化学的手法で細胞死が断定されるのは、図に見られる変化が起こったさらに後の段階である。このように、顕微ラマン分光によって細胞死の初期過程が初めて分子レベルで明らかにされた。顕微ラマン分光を用いてラマンマッピング画像を取得するには、現在のところ 10 分以上の時間を要するが、顕微 CARS 分光では数分で取得可能である。将来の技術革新によって、測定時間が秒のオーダーまで短縮されることが望まれる。顕微鏡下でレーザー光を試料全体に照射し、狭帯域フィルターを用いて直接にラマン散乱画像を取得する手法も研究されているが、この手法は

奥行き方向に空間分解能を持たない。顕微ラマン分光は、空間と時間を分解した振動スペクトル情報を与えるユニークな分析手法として、生細胞を始めとする様々な系に適用されつつある。装置の性能（感度、空間分解能、測定時間）の向上と安定化により、応用範囲はさらに爆発的に拡大するものと予想される。



出芽酵母自然死のラマンマッピングによる追跡

加納英明、島田林太郎、濱口宏夫
応用物理、Vol. 75、682-688 (2006).

来予測と方向性

- ・ 5年後までに解決・実現が望まれる課題
 - 1) 長波長励起による蛍光の妨害を回避した顕微ラマン分光の開発
 - 2) 顕微CARS分光による高速振動イメージング技術の開発
- ・ 10年後までに解決・実現が望まれる課題
 - 1) チップ増強効果を利用した回折限界を超えた超高解像度顕微ラマン分光の開発
 - 2) 分子近接場効果を用いた新しい空間分解ラマン分光の開発

キーワード

ラマンスペクトル、ラマンイメージング、生細胞、近接場効果、分子近接場効果

(執筆者： 濱口宏夫)