

多焦点共焦点ラマン分光顕微鏡の開発

(東大院・理*、NCTU**) ○奥野将成*、濱口宏夫**

【序】顕微ラマン分光法は、非染色・非侵襲で生体試料の分子情報を取得することのできる手法として、昨今大きな注目を集めている。顕微ラマン分光法は上記以外にも多くの利点を持っているが、信号強度が微弱であるために、ラマン分光イメージの取得に多大の時間を要し、生体の動的挙動の研究に活用されにくいのが現状である。通常の顕微ラマン分光法では、ラマン分光イメージの取得時間を短くするために試料への照射レーザー光を強くすると、生体試料への光・熱ダメージが顕著になってしまう。そこで我々は、単位面積当たりの照射レーザー光強度を低く抑えたまま、試料に多点でのレーザー照射を行うことで、試料から一挙に複数のラマンスペクトルを得ることができる、多焦点共焦点ラマン分光顕微鏡を開発し、ラマン分光イメージングの高速化を目指した。

【実験装置】図1に我々が開発した、多焦点共焦点ラマン分光顕微鏡の装置図を示す。レーザー光をマイクロレンズ・アレイによって多焦点化し、それぞれのレーザー・ビームをピンホール・アレイへと集光し、通過させた。ピンホール・アレイを通過した後、それぞれのレーザー・ビームは平行光として対物レンズの瞳に集光された。これらのビーム束を対物レンズにより試料へと集光することによって、試料へのレーザー光の多焦点照射を実現した。本実験では適切な光学素子を用いることにより、試料下で焦点の間隔を $2\ \mu\text{m}$ 、焦点の数を 64 点(8 x 8)とし、また、それぞれの焦点を回折限界近傍まで集光することができた。発生したラマン散乱光は、入射レーザーと同じ対物レンズで集光され、ピンホール・アレイを通過させた。このとき、それぞれの焦点について、共焦点効果によって、光軸方向の分解能を得、焦点以外からの信号・背景光を排除することができる。ラマン散乱光は、ピンホール・アレイを通過した後、エッジ・フィルタを通過し、レイリー散乱光の除去後、ファイバ・バンドルへと集光された。このファイバ・バンドルは、顕微鏡側の一端が 8 x 8 の正形状に、分光器側の一端が 1 x 64 のライン形状となっており、分光器スリットに直接取り付けられた。

このようなファイバ・バンドルを用いることで、3次元情報(2次元位置情報+スペクトル情報)を2次元情報(1次元位置情報+スペクトル情報)へと変換し、CCDカメラでの検出を可能にした。分光器へと導かれたラマン散乱光は、分散され、CCDカメラで検出された。このよう

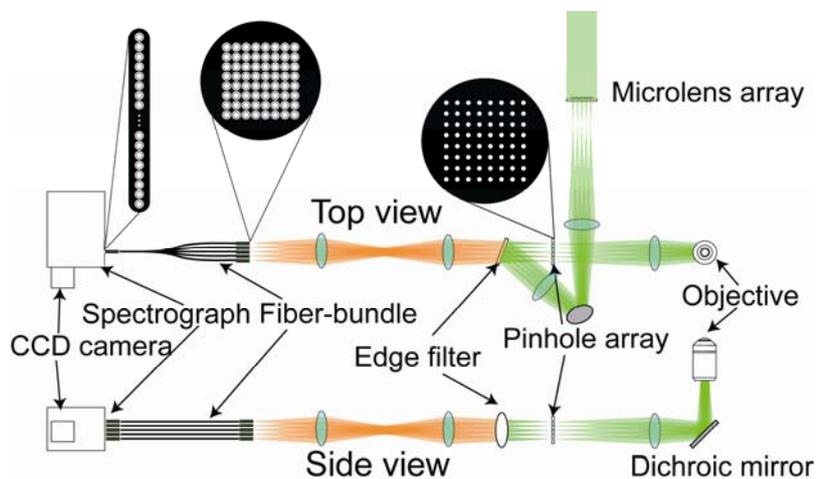


図1 多焦点共焦点ラマン分光顕微鏡の装置図。

に、マイクロレンズ・アレイ、ピンホール・アレイ、及びファイバ・バンドルを用いることによって、高い空間分解能を持って、広い領域のラマンスペクトルを一度に測定することができる装置を開発した。空間分解能は実測で面内:<350 nm、光軸方向:<1.2 μm であった。

【実験結果】図2に出芽酵母生細胞を測定した例を示す。(a)は一度の露光によって得られた、CCD上のイメージである。一度の露光によって、48個のラマンスペクトルが同時に得られた。縦軸の番号がそれぞれ試料下での各焦点に対応している(b)。(c)及び(d)に、(a)における、異なる二点(27)および(30)から得られたラマンスペクトルを示した。これら二点は全く異なったスペクトルを与えており、試料上の異なる二点が、CCD上で空間分解されて複数のスペクトルが得られることが確かめられた。

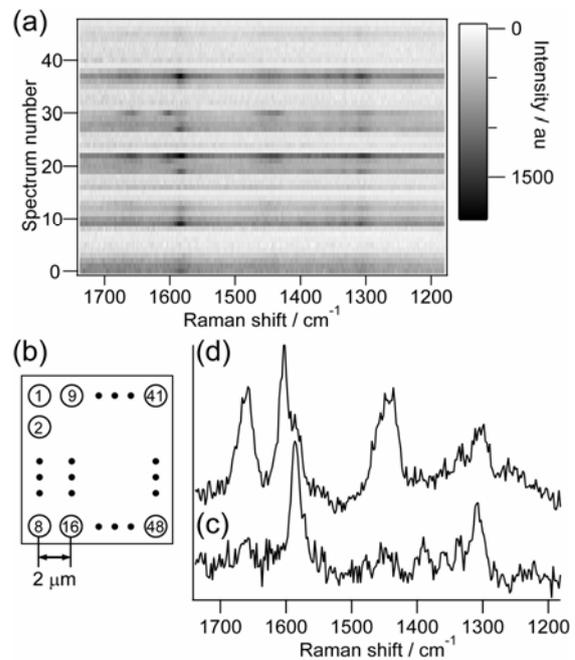
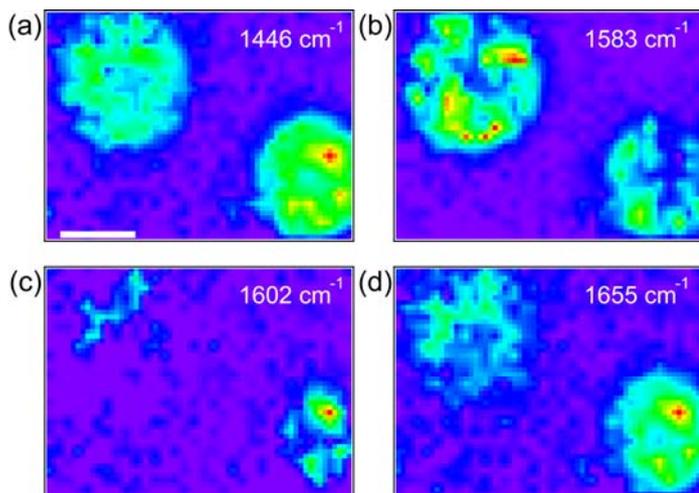


図3は出芽酵母生細胞を測定した結果を、ラマン分光イメージとして再構成したものである。レーザー照射は各焦点あたりおよそ1 mWである。これらのイメージは16 x 12 μm (32 x 24 ピクセル)からなり、露光時間は1 sec/ 48 ラマンスペクトル、全体のイメージ取得時間は20秒である。このような短い取得時間で、明瞭なラマン・イメージを得ることに成功した。それぞれ(a) 1446 cm^{-1} , (b) 1583 cm^{-1} , (c) 1602 cm^{-1} , (d) 1655 cm^{-1} のラマン分光イメージであり、各ラマンバンドはそれぞれ

図2 本装置によって、出芽酵母細胞を測定した結果。(a) 一度のCCDの露光で得た、CCDのイメージ。(b) 試料下での焦点と(a)の縦軸との対応。(c),(d) (a)の2点におけるラマンスペクトル。

れCH変角振動、シトクロムcのポルフィリン環のC=C伸縮振動、”生命のラマン分光指標”¹、amideI and/or C=C伸縮振動である。48個のスペクトルを1秒で得ることは、1スペクトルを20ミリ秒で得ることに相当する。通常のラマン分光顕微鏡ではこのような短時間で生細胞のラマンスペクトルを取得するのは非常に困難である。このように、多焦点共焦点ラマン分光顕



微鏡の開発により、従来の単焦点のラマン分光顕微鏡と比較して、数10倍のイメージング速度を実現した。

図3 本装置で得た、出芽酵母細胞のラマン・イメージ。(a) 1446 cm^{-1} , (b) 1583 cm^{-1} , (c) 1602 cm^{-1} , (d) 1655 cm^{-1} . スケールバーは4 μm 。

¹ Y-S. Huang, T. Karashima, M. Yamamoto and H. Hamaguchi, *Biochemistry* **44**, 10009-10019 (2005).