

2P026 波長可変レーザーを用いたラマン散乱直接イメージング法の開発

東大院・理 ○福住裕ノ介、加納英明、濱口宏夫

【序】近年、顕微ラマン分光法による生細胞の研究が進展している。ラマン分光法を用いると、顕微観察において従来必須であった染色技術を必要とせず、分子種・分子構造の特定を行うことが可能である。しかしながら、空間各点毎のスペクトルを測定する従来型の顕微ラマン分光法では、長時間の測定が必要であるため、生細胞中の生化学反応等を追跡することは非常に困難である。そこで本研究では、ラマン散乱の二次元イメージを高速測定する装置の開発をおこなった。本装置では波長可変レーザーと固定波長のバンドパスフィルターを用いることにより、励起波長を変化させることでラマンシフトを選択測定することが可能である(図1)。また顕微鏡と高感度 CCD カメラとの組み合わせにより、ラマン散乱光を直接測定できるので、ラマンイメージを高速に得ることができる。

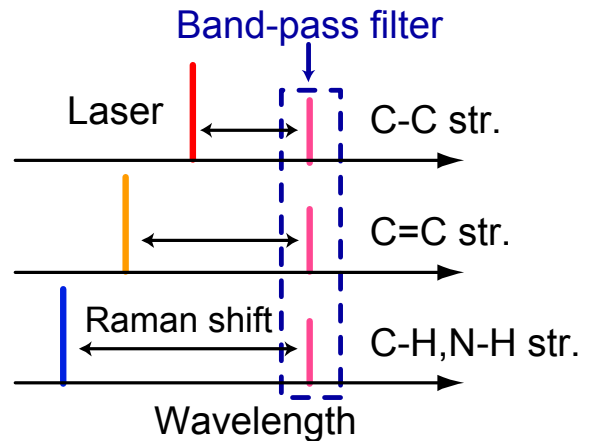


図1 ラマン散乱直接イメージングの原理

【実験】光源には Nd:YVO₄ レーザー (Millennia, Spectra Physics) を励起光源とする波長可変色素レーザー (375B, Spectra Physics) を用いた。色素は DCM を使い、640nm~670nm の波長範囲で測定した。ラマンイメージングの測定では、試料にレーザーを集光せず一様に照射されるように光学系を組み(図2)、ロングパスフィルターとバンドパスフィルター(800 nm 中心, 波数分解能 10 cm⁻¹) でラマン散乱光を選択的に取り出し、近赤外に高感度な CCD カメラ (Spec-10:400BR/XTE, Princeton Instruments) で測定した。測定時間は 60 秒である。ラマンスペクトルの測定ではレーザーを試料に集光し、CCD カメラの位置にファイバースコープを導入して分光器で測定した、用いたレーザー光の波長は 650, 653, 655, 657.5, 660nm であった。

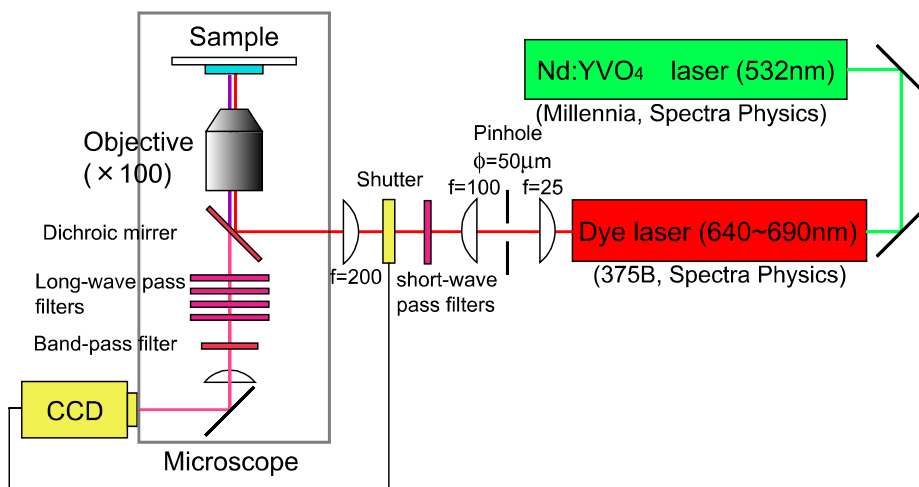


図2 ラマンイメージング測定の実験装置

【結果・考察】本研究では分裂酵母 (*Schizosaccharomyces Pombe*) を試料として用いた。励起波長を変化させたときの C-H 伸縮領域のラマンスペクトルを図 3 に示す。分裂酵母にレーザーを照射した結果からバックグラウンドを差し引いた結果を示している。分裂酵母はラマンシフト 2900 cm^{-1} 付近に C-H 伸縮振動由来のピークが観測されることがこれまでの我々の研究により確認されており、本研究でも同様な信号が観測された。励起波長を変化させることでラマンシフトが系統的に変化していることがわかる。次に図 4 (a) に分裂酵母のラマンイメージングの結果を示す。ラマン共鳴の結果 (レーザー波長 649 nm) から、ラマン非共鳴の結果 (レーザー波長 656 nm) を差し引くことにより、蛍光のバックグラウンドが除去されたラマンイメージングを得ることが出来た。酵母の輪郭および内部構造を観察することができる。比較のために光学顕微鏡写真を図 4 (b) に示す。測定時間は 60 秒で、従来のイメージング法の 1/100 程度の短時間測定で酵母のラマンイメージングを得ることが出来た。

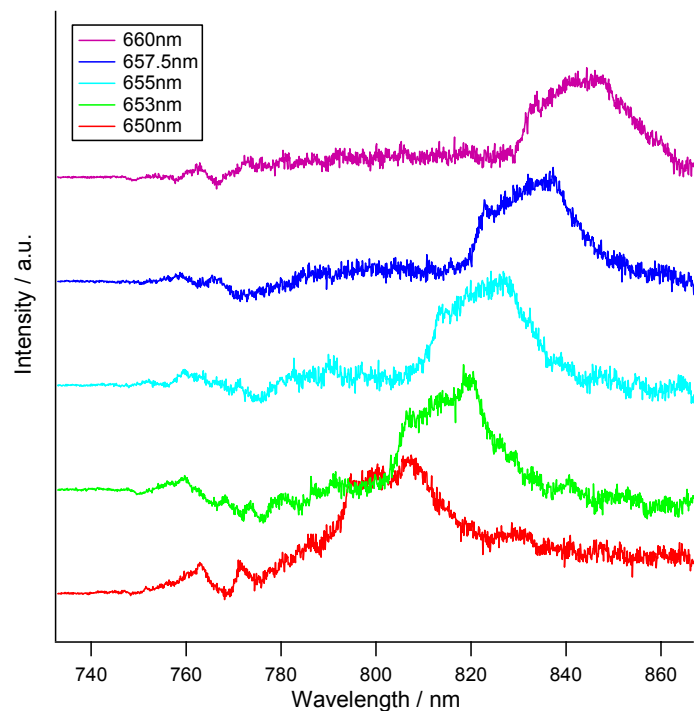


図 3 ラマンスペクトルの測定結果

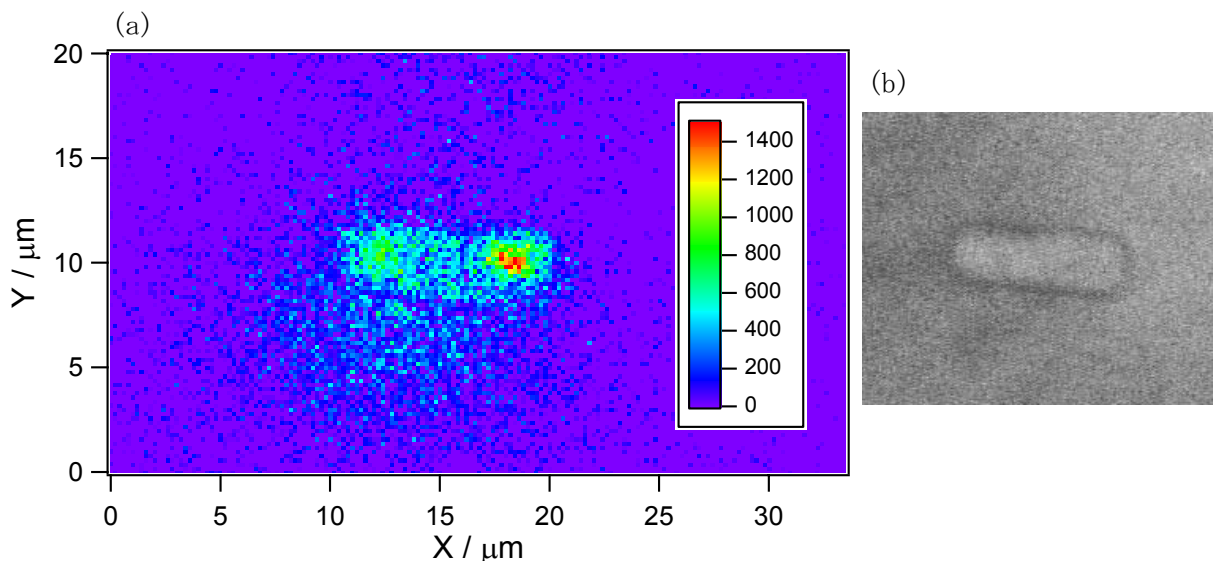


図 4 (a) 酵母のラマンイメージング
(b) 酵母の顕微鏡写真