

3P135

ハイパーラマン顕微分光計の開発と β -カロテンへの応用

(東大院理) ○島田 林太郎, 加納 英明, 濱口 宏夫

【序】 ラマン顕微鏡に代表される光学顕微鏡と振動分光法を組み合わせた生細胞の観察法は、非接触非破壊で対象を観察できる上、分子レベルで物質の分布や構造、挙動に関する情報が得られるため生物を研究する上で非常に有用な手法である。本研究では、このような振動顕微分光の新たな手法としてハイパーラマン顕微分光計を開発した[1]。ハイパーラマン (HR) 散乱は分子の超分極率によって引き起こされる光の散乱現象であり、ラマン散乱と同様に振動分光法として用いることができる。その特徴として以下のような点が上げられる。1)全ての赤外活性振動モードはハイパーラマン活性になる。2)赤外吸収やラマン散乱では不活性な振動モードでもハイパーラマン活性になるものがある。3)非線形光学効果により共焦点系を構成することなく 3 次元的な空間分解能をもつ。これらの特徴をあわせることでサブミクロンの空間分解能を持ち、赤外活性な振動モードをプローブできる振動分光顕微鏡を実現した。

【実験】 実験装置の概略図を図 1 に示す。モード同期Ti:Sapphire発振器からのフェムト秒パルス(中心波長 800 nm, スペクトル幅 11 nm, 繰り返し 80 MHz, 出力 850 mW)を回折格子で空間的にスペクトル分散した後、その一部をスリットにより切り出すことでスペクトル幅約0.5 nmのピコ秒パルスに狭帯域化し、励起光として用いた。この励起光を対物レンズ(x40, NA 0.9)後方から入射し、試料上に集光させた。焦点に対する試料の位置はピエゾステージで制御できる。試料上から後方にでてくるHR信号は同じ対物レンズを通して集光

し、励起光を除去するローパスフィルター 2 枚を透過した後、ファイバーに導入した。ファイバーを通した光はポリクロメーターで分散した後、CCDカメラを用いてスペクトル測定している。この装置を用いて β -カロテン微結晶(ベンゼン飽和溶液から再結晶)のHRイメージ測定をした。また、全トランス- β -カロテンのシクロヘキサン溶液(5mM)、四塩化炭素溶液(9mM)、ベンゼン溶液(9mM)のHRスペクトルを測定した。

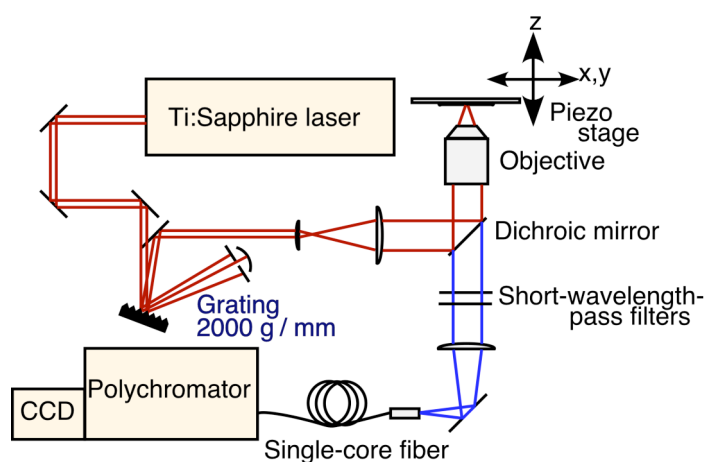


図 1 装置図

【結果と考察】 β -カロテン微結晶のハイパーラマンスペクトルを図 2(A)に示す。比較のために β -カロテン微結晶の自発ラマンスペクトル、及び KBr ディスク中の固体 β -カロテンの赤外吸収スペクトルも示す。HR スペクトルで観測された 1564 cm^{-1} 、 1370 cm^{-1} 、 1322 cm^{-1} の振動バンドは赤外吸収スペクトルでは全て観測されたが自発ラマンスペクトルでは観測されなかった。これは、全トラン

ス- β -カロテン分子構造が反転対称性を持つためにハイパーラマン散乱とラマン散乱の間で相互禁制則が成り立っているためだと考えられる。1564 cm^{-1} 及び1322 cm^{-1} の振動モードは β -カロテン分子の共役鎖の伸縮振動に、1370 cm^{-1} の振動モードは共役鎖中のメチル基の変角振動に帰属した[2]。次いで強度の最も強い1564 cm^{-1} のバンド強度を用いて β -カロテン微結晶のハイパーラマンイメージングを行った(図2(B)左)。比較のためにバンドの観測されない1944 cm^{-1} において同様のイメージングも行った(図2(B)右)。図から明らかなように、ハイパーラマン信号による高コントラストなイメージングに成功した。なお本装置の空間分解能を実験的に求めたところ、面内方向については $0.6 \pm 0.2(\mu\text{m})$ 、奥行き方向については $1.4 \pm 0.4(\mu\text{m})$ という結果が得られた。

次に溶液中の全トランス- β -カロテンのHRスペクトル測定を行った。溶媒として四塩化炭素、シクロヘキサン、ベンゼンをそれぞれ用いた。得られたスペクトルを図3に示す。溶媒のみのハイパーラマン散乱も測定したがどの溶媒についても明らかな振動バンドは観測されなかった。溶液中のスペクトルには微結晶中のスペクトルと同じバンドが観測されたほか、溶液ごとにそれぞれ異なった位置に微結晶中のスペクトルには観測されなかった新たなバンドが観測された。この結果は、ハイパーラマン散乱の共鳴の機構を考察する上で極めて興味深く、現在解析を進めているところである。

[1] R. Shimada, H. Kano and H. Hamaguchi, (submitted)

[2] S. Saito and M. Tasumi, *J. Raman Spectrosc.* **14**, 310 (1983)

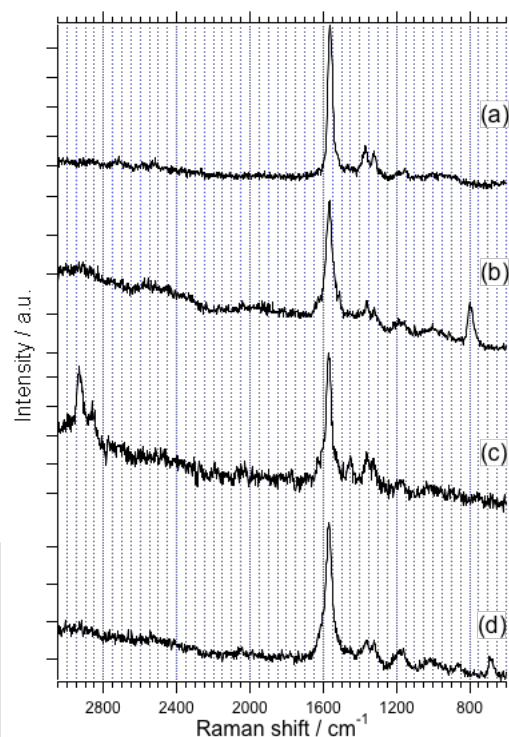
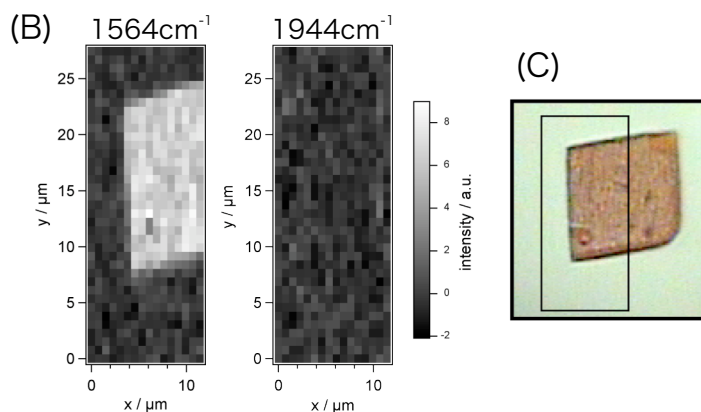
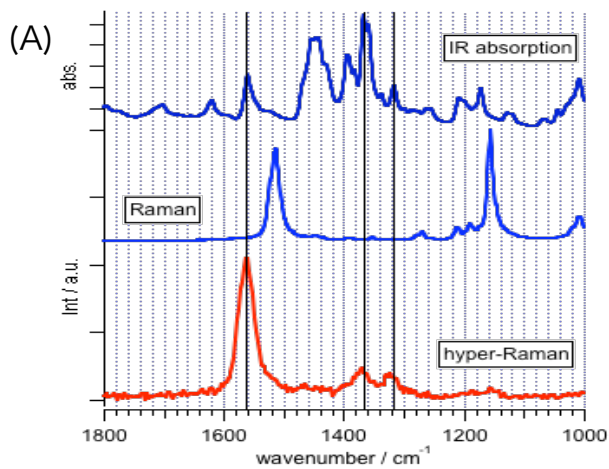


図3 β -カロテンのHRスペクトル(a)微結晶 (b)四塩化炭素溶液 (c)シクロヘキサン溶液 (d)ベンゼン溶液

図2 (A) β -カロテン微結晶のIR/ラマン/HRスペクトル (B) β -カロテン微結晶のHRイメージ (C) β -カロテン微結晶の顕微鏡写真