

ラマン顕微鏡

1 はじめに

ラマン散乱分光法は、近赤外や中赤外の吸収分光法とともに、化学組成のイメージング手法として利用されている。加えて、物質の濃度、結晶相、応力/歪み、そして結晶性についても判別が可能であり、同じサンプルから様々な視点のイメージを得ることができる。

2 原理

物質に光を照射すると散乱光が発生する。そのほとんどは照射光と同じ波長のレイリー散乱光であるが、わずかに波長の異なる散乱光も含まれている。これをラマン散乱光と呼ぶ。レイリー散乱光とラマン散乱光のエネルギー差は、物質内の原子間振動のエネルギーに対応している。そのため、散乱光を分光したスペクトルには化学結合情報が反映される。ラマンスペクトルの横軸には、エネルギーに比例する単位として波数（波長の逆数）を用い、レイリー散乱光の波数をゼロとした波数差（ラマンシフト）で表す。

ラマン顕微鏡では、単波長の励起光源として主にレーザー光が用いられる。光学顕微鏡の対物レンズを通してレーザー光を試料の微小領域に照射し、同じ対物レンズを通して試料からの後方散乱光を集光する。

ラマンイメージを得るためにはレーザースポットが自動的かつ正確に試料上を走査する機構が必要で、一般的には自動ステージを使ったポイントマッピングが行われている。300 mm × 300 mm の駆動範囲を持つ大型ステージも利用されており、測定領域の制限は少ない。顕微鏡光学系を生かした高い空間分解能が達成でき、非常に微弱なラマン散乱光でも検出することができる。マッピングの所要時間は、一般的には1ポイント当たり1~10 s のオーダーであるが、10 ms 程度の高速データサンプリングの手法も開発されている。

ポイントマッピング以外のデータサンプリング手法として、ラインスキャンやグローバルイメージングも利用されている¹⁾。また、最近、XY方向にレーザーをスキャンする手法も実用化された。この機構を使えば、対物レンズを交換することなく、ステップサイズに合わせてレーザースポットサイズを広げることができる。自動ステージと組み合わせることにより、比較的大きなステップサイズであっても、深さ空間分解能を生かした正確なマクロラマンイメージを得ることができる。

ラマンイメージングは、三次元 (X, Y, Z) の任意の

組み合わせで実行することができる。加えて、時間分解や熱走査のような他の測定操作と組み合わせることも多いが、他にも、一次元の深さ方向分析 (Z)、二次元光学的断面測定 (XZ あるいは YZ)、三次元体積マッピング (XYZ) があり、それぞれ目的に合わせて利用されている。

3 特徴 (長所・短所)

ラマン顕微鏡による測定は一般に光学顕微鏡下で行われ、大気中での非破壊・非接触イメージングが可能という長所がある。また、特別な前処理も必要としない。さらに、可視レーザー光を分析プローブとして利用する場合、空間分解能約 1 μm のラマンイメージを簡単に取得することができる。一方、短所として、ラマン散乱強度がレイリー散乱の百万分の一程度と非常に微弱であることがあげられる。このため、ラマン顕微鏡では、感度が低い、あるいは競合現象である蛍光発生の影響を受ける、といった問題点が指摘されてきた。しかし、近年では、レーザーをはじめとする光学部品の進歩と共焦点型顕微光学系の採用により感度が向上し、試料から発生する蛍光の影響も軽減されている。

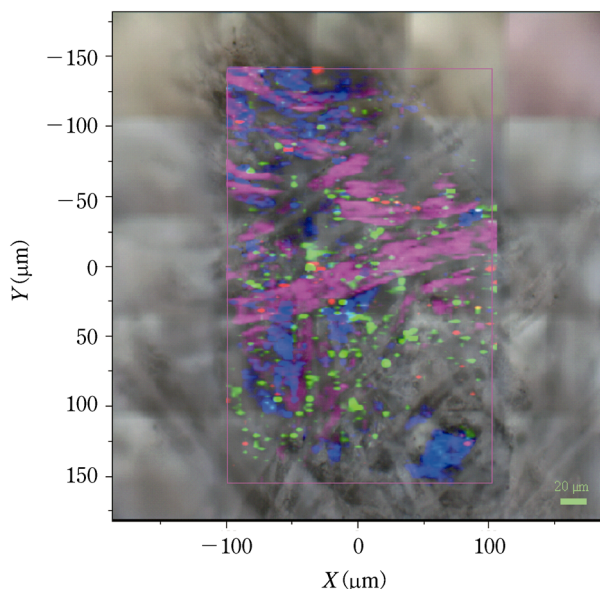
4 得られる画像とその解釈

ラマンスペクトルは物質の指紋とも呼ばれ、結晶構造や分子構造に対応した固有の波形を示す。互いに干渉しないラマンバンドの強度を使って、構成成分毎のラマンイメージを作成することができる。また、多変量解析などの高度なアルゴリズムを用い、わずかなスペクトル変化を画像化する技術も利用されている。図1は、多変量解析により作成したラマンイメージと光学顕微鏡イメージとを合成したものである。試料は黒い異物が混入したメモ用紙で、紙の成分であるセルロース (紫) の中に、異物であるカーボン (青) が含まれている様子がわかる。白色顔料である酸化チタンマイクロ微粒子の分布も、アナターゼ型 (赤)・ルチル型 (緑) の区別も含めて明瞭に捉えられている。このように、ラマンスペクトルに含まれる豊富な化学情報によって、有機物質・無機物質の分布を一度の測定で同時に取得することができる。

5 アプリケーション事例

5.1 医薬品：錠剤中の活性薬剤の評価

創薬研究では、わずかに得られる微小結晶粒の測定が必要とされる。さらに、同じ分子構造であっても結晶化



光学顕微鏡イメージにカーボン（青）、アナターゼ型酸化チタン（赤）、ルチル型酸化チタン（緑）、セルロース（紫）のラマンイメージを合成した。

図1 黒い異物が混入したメモ用紙のラマンイメージング

の条件によって複数の結晶構造を持つものがあり、結晶形によって薬理活性が異なることもある。一般にはX線回折法による結晶構造解析が行われているが、 μm サイズの結晶粒子を測定するには空間分解能が足りない。そのため、ラマン顕微鏡を使った微小結晶粒の結晶形スクリーニングが行われている²⁾。錠剤の製剤プロセスや保管環境（湿度、温度、圧力）により活性薬剤の分散状態や結晶形が変化する場合があり、ラマンイメージングはその評価手法にも応用されている³⁾⁴⁾。

5.2 半導体：ナノスケール薄膜の表面応力イメージ

集積回路（IC）の微細化に伴い、性能不良や故障の要因となりうる応力や歪みの管理が重要となっている。また、電子移動度を向上させる技術として、ウェハ上薄膜やICチップの局所応力の制御も必要である。しかし、測定領域が微小であるため、ウェハ反り評価法やX線回折法は適用が難しい。一方、半導体材料であるシリコン（Si）の結晶格子振動（フォノン）に由来するラマンバンドは、半値幅が小さく強い強度を持つ。結晶格子に応力がかかると振動数がわずかに変化することから、ラマンピークのシフト量を使って応力分布イメージを作成することができる。

実例として、De Wolf⁵⁾が、局所酸化膜技術により作成した $3\mu\text{m}$ 角、および $3\mu\text{m}$ 幅のライン構造を持つSi素子や、銅基板に接合したSiチップの断面の応力イメージをラマン顕微鏡で測定している。ただし、応力によるピーク波数シフトは約 500MPa でわずか 1cm^{-1}

であり、このような分析には高いスペクトル分解能を有する装置が必要である。他の例として、励起レーザー波長が短くなるほど半導体材料の吸収係数が大きくなることを利用し、測定深さを制御することも行われている。特に、紫外レーザーは、nmオーダーの表層を測定する場合に有効である。

5.3 生体試料

有機物の成分分布の情報が得られることから、生体試料分析においてもラマンイメージングへの期待は高い。しかし、複雑系である生体試料から着目している化学成分について選択的に情報を抽出するためには、様々な工夫が必要になる。また、試料調整の過程における生分解を防ぎ、できるだけ生きた状態を維持することも重要である。イメージ情報の重なりをなくすために薄膜にすることも行われている。寺田ら⁶⁾はラットの眼球の切片を凍結乾燥し網膜部位のラマンイメージを測定し、染色法観察像との比較により、光受容体付近の化学組成分布を捉えていることを確認している。また、生体試料では、試料ダメージや試料からの自家蛍光の影響を避けるため、近赤外レーザーが利用される。一例として、YAGレーザー（ 1064nm ）によるバクテリア1個体の細胞内イメージングが報告されている⁷⁾。また、選択的に標的物質のイメージを測定するために、共鳴ラマン効果やラマン標識を利用する場合もある。例えば、細胞内に金属ナノコロイドを導入した際に金属表面で起こる増強効果（surface enhanced raman spectroscopy : SERS）を利用した、細胞内の薬物分布測定が報告されている⁸⁾⁹⁾。

文 献

- 1) 中田 靖, 内原 博 : 分光研究, **58**, 84 (2009).
- 2) T. Kojima, S. Onoue, N. Murase, F. Katoh, T. Mano, Y. Matsuda : *Pharm. Res.*, **23**, 806 (2006).
- 3) E. Lee : “*Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*”, Edited by R. Salzer, H. W. Siesler, p.377 (2009), (Wiley-VCH Verlag GmbH, Germany).
- 4) G. Z. Papageorgiou, D. Bikiaris, E. Karavas, S. Politis, A. Docoslis, Y. Park, A. Stergiou, E. Georgarakis : *AAPS Journal*, **8**, E623 (2006).
- 5) I. De Wolf : *Spectroscopy Europe*, **15/2**, 6 (2003).
- 6) N. Terada, N. Ohno, S. Saitoh, Y. Fujii, H. Ohguro, S. Ohno : *Microsc. Res. Tech.*, **70**, 634 (2007).
- 7) M. Ando, M. Sugiura, H. Hayashi, H. Hamaguchi : *Appl. Spectrosc.*, **65**, 488 (2011).
- 8) C. Eliasson, A. Loren, J. Englebretsson, M. Josefson, J. Abrahamsson, K. Abrahamsson : *Spectrochim. Acta, Part A*, **61**, 755 (2005).
- 9) I. Nabiev, A. Baranov, I. Chourpa, A. Beljebbar, G. D. Sockalingum, M. Manfait : *J. Phys. Chem.*, **99**, 1608 (1995).

〔榎堀場製作所 中田 靖〕