

時空間におけるラマン分光の極限化

島田林太郎*・加納 英明*・岩田 耕一**・濱口 宏夫*

Ultimate Time- and Space-Resolved Raman Spectroscopy

Rintaro SHIMADA*, Hideaki KANO*, Koichi IWATA** and Hiro-o HAMAGUCHI*

Recent developments of time- and space-resolved linear and non-linear Raman spectroscopy are reviewed. Focus is placed on picosecond time-resolved Raman spectroscopy, ultra-broadband multiplex CARS microspectroscopy and hyper-Raman microspectroscopy. A novel molecular phenomenon, “molecular near-field effect in resonance hyper-Raman scattering” is also discussed with a view to nanometer-resolved vibrational spectroscopy.

Key words: Raman microspectroscopy, CARS, hyper-Raman

科学における自然の理解は、まず物質界を階層構造として分類・細分化することを基本としている。この階層構造において、より上位の階層は下位の階層物質を部品とし、それらの「組織化」による構造形成によって成立すると考えることで、階層間の関係を捉えることができる。量子力学は、この物質階層構造の底辺を支える素粒子、原子、分子を中心にそれらの組織化構造形成の機構解明を主たる役割として誕生、発展してきた。その過程において、量子論以前において存在していた物理学と化学の明確な境界はもはや存在なくなり、物質界の統一的な理解が大きく前進した。「バイオの世紀」といわれる 21 世紀を迎えたこれからの科学は、より上位の階層における物質の構造、機能、組織化機構の解明を新たな課題とし、究極的には生物をもこの階層構造に含めた自然界の統一的な理解を目論んでいる。

分子分光学の対象も、この科学の潮流と歩みを共にし、物質の階層構造の底辺に位置する原子、分子系から、より上位の階層に拡大の一途をたどっている。ここで、対象となるのは、分子会合体、分子錯合体、高分子、自己組織化膜、脂質二重膜などのミクロな化学系から、細胞小器官、細胞、組織、器官などのマクロな生物系に至る、多様な複合分子組織体である。これらの複合分子組織体の構造や機能を解明し、その組織化の機構を分子レベルで統一的に理

解するためには、分子のサイズであるナノメートルの空間分解能と、分子に生起するダイナミクスの時間領域であるフェムト秒～ピコ秒の時間分解能を備えた極限的分光計測法の開発が必須である。

ラマン散乱や赤外線吸収により観測される振動スペクトルは、分子の個性を鋭敏に反映する特性をもち、「分子の指紋」とよばれる^{1,2)}。振動スペクトルが得られさえすれば、その解析から分子種を特定し、さらに構造やダイナミクスについての詳細な情報を抽出することが可能となる。本報告では、筆者らがこれまでに推進してきたラマン分光における時間および空間分解能の極限化の成果を、それを複合分子組織体の構造、機能、組織化機構の解明に応用した例とともに紹介する。まず、時間領域の極限化として、ピコ秒時間分解ラマン分光法と、それを励起状態スチルベンの振動冷却過程観測に応用した例を紹介する。次に、空間領域の極限化として、非線形ラマン分光に基づく新しい顕微分光法を紹介する。さらに、顕微鏡を用いる手法とは全く異なるアプローチ、すなわち単分子をプローブとしてその近傍空間だけを選択的に観測する新たな局所空間振動分光計測の可能性について考察する。最後に、これら極限の空間分解能と時間分解能を同時に達成する分光法の可能性について述べる。

* 東京大学大学院理学系研究科化学専攻 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1) E-mail: hhama@chem.s.u-tokyo.ac.jp

** 東京大学大学院理学系研究科附属スペクトル化学研究センター (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

1. ピコ秒時間分解ラマン分光法

1.1 時間分解ラマン分光法の概略

時間分解ラマン分光法は、刻々と時間変化する現象を観測する「時間分解分光法」の一種である。時間分解分光法には多くの種類があるが、赤外分光法とともに振動分光法の一種であるラマン分光法を用いると、測定対象となる分子に関して豊富な構造情報を得ることができる。化学分析の目的には核磁気共鳴法も頻繁に利用されるが、核磁気共鳴法で可能な時間分解測定はミリ秒までである。マイクロ秒～サブピコ秒の時間領域で物質構造の変化を観測する場合、時間分解ラマン分光法と時間分解赤外分光法が最適の分光法であるといえよう。

ラマン散乱の測定では、時間変化するラマン分極の周波数成分を分光器で分離して検出する周波数領域での方法と、分極の時間変化を精密な光学遅延回路を利用して検出し、その後で数値的にフーリエ変換する時間領域の方法とがある。どちらの方法を用いるかは研究の目的によって選択すべきであるが、一般的には測定可能なスペクトル領域が広くマルチチャンネル検出器の利用による高効率な測定が可能な周波数領域での方法が有利であろう。以下では、周波数領域における時間分解自発ラマン散乱について論じる。なお、興味のある読者は、最近出版された時間分解ラマン分光法に関するより詳しい総説^{3,4)}を合わせて参照されたい。

1.2 時間分解ラマン分光法の光源

時間分解ラマンスペクトルの測定には、いわゆる「ポンプ-プローブ法」を利用する。まず「ポンプ光」を試料に照射し、その後で「プローブ法」によって試料のラマンスペクトルを測定する。ポンプ光とプローブ光が試料に到着する時間差を変えることで、ポンプ光の照射によって引き起こされる試料の変化を刻々と記録する。ポンプ光とプローブ光の時間およびスペクトル特性は、時間分解ラマン分光計にとって本質的な重要性をもつ。

ポンプ-プローブ法による時間分解ラマン分光法の時間分解能は、ポンプ光とプローブ光の相互相関時間で決定される。相互相関時間は、それぞれの光パルスの時間幅と相互のタイミングジッターによって決まる。色素レーザーからの出力をポンプ光やプローブ光として用いる場合は、パルス間のタイミングジッターが時間分解能を決める支配的な要因となる場合が多い。しかし、単一のレーザーによる高調波発生や光パラメトリック増幅のみを利用する場合には、タイミングジッターはパルス幅に比べて無視できる。この場合、相互相関時間は単一のポンプ光パルス (I_{pump}) とプローブ光パルス (I_{probe}) のたたみこみ積分 ($I_{\text{pump}} \otimes$

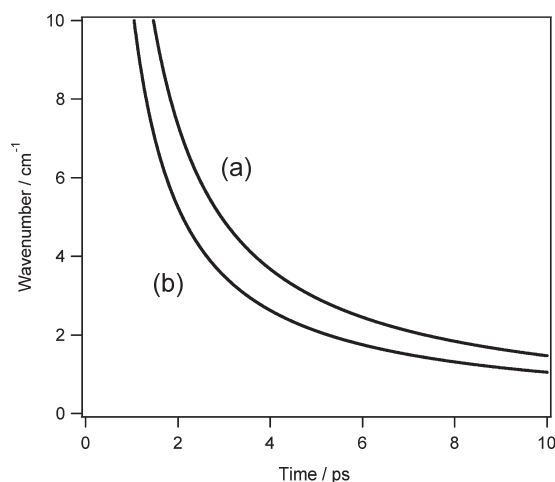


図1 フーリエ変換パルスにおける、光強度の波数幅と時間幅（両方とも半値全幅）の関係。光強度のパルス形が (a) ガウス関数および (b) sech^2 のとき。

I_{probe}) の時間幅と一致する。

時間分解ラマン分光法の波数分解能は、プローブ光の波数幅と分光器のスリット関数によって決まる。たとえば、典型的な測定条件である分光器の焦点距離 30 cm、機械的スリット幅 200 μm 、回折格子の刻線数 1800 本/mm、プローブ光波長 600 nm における分光的スリット幅は約 6 cm^{-1} である。以下で述べるように、数ピコ秒よりも短い光パルスを用いる場合は、光パルスの波数幅がスリット関数の幅である 6 cm^{-1} よりも大きくなる。ピコ秒時間分解ラマン分光法では、分光器のスリット関数とプローブ光の波数幅の両方に注意する必要がある。

光を電磁波で表現すると、光パルスは波束になる。この波束の時間幅と波数幅の間には一定の関係があり、両者の積をある定数よりも小さくすることはできない。電場の 2 乗に相当する光の強度で考えると、この定数はパルス形が sech^2 の場合に 10.5 ps cm^{-1} 、ガウス関数の場合に 14.7 ps cm^{-1} となる。この 2 種類のパルス形における光パルスの時間幅と波数幅の関係を図 1 に示す。

光パルスの時間幅と波数幅が図 1 で示された双曲線上に位置するとき、その光パルスはフーリエ変換限界にあるという。時間分解ラマン分光計で利用する光パルスがフーリエ変換限界からどの程度離れているかは、その分光計の性能を評価するひとつの指標となる。筆者らがかつて製作したピコ秒時間分解ラマン分光計では、同期励起色素レーザーを色素増幅器で増幅して得たプローブ光を得ていたが、このプローブ光の時間幅は 3.2 ps、波数幅は 3.5 cm^{-1} であった⁵⁾。両者の積は 11.2 となっており、 sech^2 のフーリエ変換限界とほぼ一致していた。しかし、現在波長可変なピコ秒光源として利用されることが多い光パラメトリック増幅

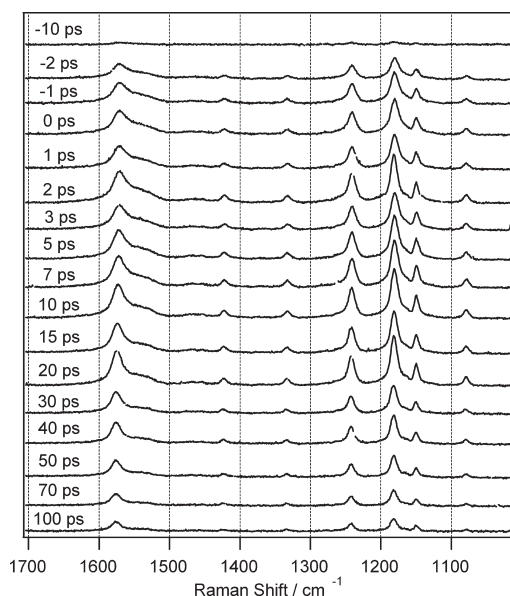


図2 クロロホルム溶液中における最低励起一重項状態の *trans*-スチルベンの室温における時間分解ラマンスペクトル。

器の出力では、時間幅と波数幅の積が $25\sim 30\text{ ps cm}^{-1}$ 程度である。パルス形としてガウス関数を仮定したとしても、フーリエ変換限界の約2倍にもなる。いうまでもなく、波長選択の自由は時間分解ラマン分光計のポンプ光にとってもプローブ光にとっても重要であり、分光計を設計する際に検討する最重要項目のひとつである。光パラメトリック増幅器を利用することで、筆者らは可視全域に及ぶような幅広い波長選択性を得た。しかし、その代償として、フーリエ変換限界の光パルスをあきらめるといった代償を支払っている。

1.3 時間分解ラマン分光法の測定例

時間分解ラマン分光法の応用例は多くある。これらの一部は、総説⁶⁻⁹⁾にもまとめられている。本稿では、筆者らが研究を続けている振動冷却と分子間エネルギー移動現象について解説する。

溶液の中で分子のある振動の自由度にエネルギーを与えて非平衡状態をつくり出したと仮定する。このエネルギーは、次の瞬間から分子内および隣接する他の分子の多くの自由度へと分配され移動する。物質にとって最も基本的な現象のひとつであるこのエネルギー移動過程（最初の分子にとっては振動冷却過程）は、巨視的には熱伝導過程としてよく理解される。しかし、その分子論的な機構は、現在も不明である。サブピコ秒～数十ピコ秒の時間領域で進行し、かつ振動単位が本質的な役割を演じるこの現象は、ピコ秒時間分解ラマン分光法にとって好適な観測対象となる。

筆者らは、種々の溶液中での最低励起一重項 (S_1) 状

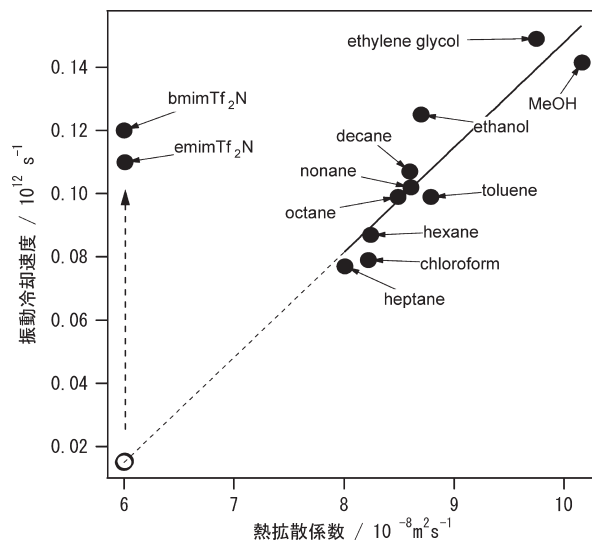


図3 最低励起一重項状態の *trans*-スチルベンの振動冷却速度と溶媒の熱拡散定数の関係。

態の *trans*-スチルベンの振動冷却過程をピコ秒時間分解ラマン分光法で測定した¹⁰⁾。クロロホルム溶液中での S_1 状態の *trans*-スチルベンの室温での時間分解ラマンスペクトルの測定例を図2に示す (294 nm ポンプ, 588 nm プローブ)。図中のすべてのバンドは、 S_1 状態の *trans*-スチルベンのラマンバンドである。図からわかるように、 1570 cm^{-1} のラマンバンドの形状 (および位置) は、時刻に応じて鋭敏に変化する。265~315 K の範囲で温度を変化させつつ測定したところ、このラマンバンドのピーク位置は室温からの温度変化に比例して変化することがわかった。 1570 cm^{-1} のラマンバンドを「ピコ秒ラマン温度計」として利用することで、非平衡状態にある分子が冷却する過程を追跡することが可能になった。

実測された冷却曲線は、溶媒の熱拡散定数を比例定数とする熱拡散方程式の解でよく再現できた。ただし、実験結果の再現には、溶質である *trans*-スチルベン分子に相当する $1.3\text{ nm} \times 0.7\text{ nm} \times 0.2\text{ nm}$ の直方体の各辺にそれぞれ 2.5 nm を加えた $3.8\text{ nm} \times 3.2\text{ nm} \times 2.7\text{ nm}$ の直方体の内部に含まれる溶質分子および溶媒分子がまず温度上昇し (初期条件)、そこから熱拡散が開始すると仮定する必要があった。10種類の有機溶媒中で同様の測定と解析を行ったところ、得られた10個の振動冷却速度は、溶媒の巨視的な熱拡散定数とよい相関を示した¹⁰⁾ (図3)。これらの実験結果は、ポンプ光の持続時間 (3.2 ps) 内で溶質から隣接する溶媒分子にエネルギー移動が起こり、そこが熱源となってさらにバルクの溶媒に熱エネルギーが拡散していくと考えるとうまく説明できる。ポンプ光で与えたエネルギーの大きさと、測定された時刻0での温度上昇から、第一

溶媒和圏にあり溶質から励起エネルギーを受け取る溶媒分子の個数は、5~12個であると推定された¹¹⁾。

筆者らは最近、同じ「ピコ秒ラマン温度計」を用いてイオン液体中で振動冷却速度を測定した¹²⁾。イオン液体中での振動冷却速度は、通常の有機溶媒の場合とは異なり、溶媒の熱拡散定数との相関を示さないことが明らかとなった。図3の白い円は温度拡散率から予測される2種類のイオン液体(emimTf₂NとbmimTf₂N)中での振動冷却速度であり、その直上の黒い円が実測値である。両者の大きな乖離は、光学的には均一にみえるイオン液体中にメゾスコピックな「局所構造¹³⁾」が存在すると考えると、説明できる。

ピコ秒時間分解ラマン分光法は、光パルスの特性をその限界まで追求することで成立する分光法である。その実験は必ずしも容易ではない。しかし、この分光法によって、われわれは物質の1ピコ秒ごとの時間変化を詳細に知ることができるのである。

2. CARS 顕微分光法とその応用

2.1 はじめに

ラマン分光と顕微分光を組み合わせたラマン顕微分光法は、サブマイクロメートルの空間分解能で試料中の「分子の指紋」を得ることができるユニークな手法である。ラマン顕微分光法を用いれば、細胞などの生体試料を、染色することなく分子レベルで可視化することができる¹⁴⁻¹⁸⁾。しかし、ラマン顕微分光法にはいくつかの短所も存在する。まず、自発ラマン散乱の散乱断面積が小さいため、信号強度が微弱で、数秒~数分程度の長時間の露光を必要とする。次に、蛍光性の試料の場合、微弱なラマン信号が蛍光に埋もれて観測不能になってしまうことがある。本章で紹介する coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) 顕微分光法は、蛍光の影響を避け、微弱なラマン信号を増幅し、その結果ラマンイメージを高速かつ高い振動コントラストで得ることのできる手法であり、非線形ラマン顕微分光法の中でも特に注目を集めている手法のひとつである。

CARS 顕微鏡は1982年にはじめて試作され¹⁹⁾、現在ではさまざまな方式のものが製作されている²⁰⁻²²⁾。しかし、特定の振動共鳴のみを選択的に可視化するCARS顕微“鏡”(CARS microscopy)では、「分子の指紋」のもつ情報を十二分に引き出ししているとはいえない。ラマン(CARS)スペクトルの豊富な分子情報を有効に活用できるCARS顕微“分光法”(CARS microspectroscopy)の開発が求められている。顕微鏡下でCARSスペクトルを効率よく

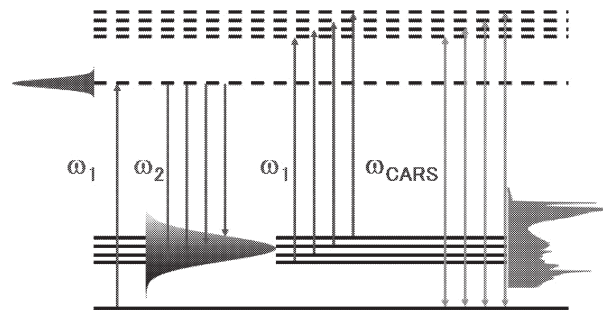


図4 CARSのエネルギーダイアグラム。

得る方法として、マルチプレックスCARS過程の利用が考えられる(図4)。マルチプレックスCARS分光では、狭帯域なポンプ光(ω_1)および広帯域なストークス光(ω_2)を用いる。この2つのレーザー光の角振動数差 $\omega_1 - \omega_2$ が、分子のラマン活性モードの角振動数 Ω と一致すると、試料中の多数の分子の振動が位相をそろえて励振される。広帯域なストークス光を用いることにより、複数の振動モードを同時に励振することが可能であるマルチプレックスCARS過程を顕微鏡に応用した報告はいくつかあるが²²⁻²⁴⁾、ストークス光の帯域がレーザーの発振帯域幅により制限されていたため、測定可能波数領域が $<600 \text{ cm}^{-1}$ 程度に限られていた。フォトニック結晶ファイバーと、それを用いて得られるスーパーコンティニューム(supercontinuum; SC)光の出現²⁵⁾が、この状況を一変させた²⁶⁻²⁸⁾。SC光は、紫外から近赤外まで1オクターブ以上の超広帯域なスペクトルを有しており、いわば“白色レーザー”ともよべる全く新しい光源である。SC光のもつこの広帯域特性をマルチプレックスCARS過程に生かすことで、CARSの同時測定可能波数帯域が飛躍的に向上した。

2.2 超広帯域マルチプレックスCARS顕微分光

図5に、筆者らが開発した超広帯域マルチプレックスCARS顕微鏡の実験装置を示す^{27,28)}。光源にはcwモード同期Ti:sapphire発振器(Coherent社; Vitesse)を用い、その出力を一部フォトニック結晶ファイバー(Crystal Fiber社; NL-PM-750)に導入してSC光を発生させる。SC光の波長成分のうち、近赤外成分を広帯域ストークス光(ω_2)として用いる。一方、発振器からの残りの基本波をバンドパスフィルターにより狭帯域化してポンプ光(ω_1)とし(波数幅約 20 cm^{-1})、光学遅延を経由させた後、ノッチフィルターによりストークス光と同軸で顕微鏡へと導入する。2つの光パルスは対物レンズにより試料に集光される。通常、CARS発生には位相整合条件が満たされる必要があるが、対物レンズの高いNA値のため、この

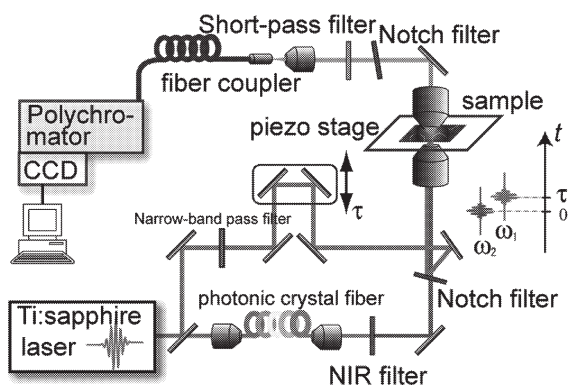


図5 超広帯域マルチプレックス CARS 顕微分光装置。

条件は緩和され、幅広い波数領域で CARS 光の発生が可能となる。試料から発生した CARS 光を対向させた別の対物レンズで集め、各種フィルターを経由させた後、分光器 (Acton 社; SpectraPro 300i) および CCD カメラ (Roper Scientific 社; Spec-10:400BR/XTE または PIXIS 100B) で分光測定する。試料は三軸ピエゾステージ (MadCity; Nano-LP-100) 上に載っており、三次元的なスキャンが可能である。本装置の空間分解能は、面内・面外方向でそれぞれ約 $0.5 \mu\text{m}$, $1.5 \mu\text{m}$ である。

2.3 CARS 分光イメージング—花粉への応用

図6に、サクラの花粉を試料とした CARS 分光イメージングの実験結果を示す²⁹⁾。露光時間は1点あたり100 ms である。図6 (a) に示したマルチプレックス CARS スペクトルは複数のピークから構成されている。特に 1100 , 1500 cm^{-1} 付近のピークはカロテノイドに特徴的な信号であり、それぞれ C-C, C=C 伸縮振動に帰属される。これに対して、 2850 cm^{-1} 付近に観測される強い信号は、C-H 伸縮振動に帰属される。これまでの筆者らの研究から、カロテノイドではこのように強い信号が C-H 伸縮領域にみられないこと、そして、リン脂質は長鎖アルキル鎖から構成されており、非常に強い信号を C-H 伸縮振動領域に与えること、がわかっている。花粉にはカロテノイドや脂質が構成成分として含まれることが知られている。したがって、C-C, C=C 伸縮振動における信号はカロテノイドに、C-H 伸縮振動における信号は脂質に由来するバンドであると考えられる。図6 (b)~(d) には、C-C, C=C, C-H 伸縮振動それぞれによる CARS イメージを示す。図6 (b) および (c) は同じイメージを与えており、どちらも顆粒状の部分で特に強いコントラストを与えている。これは、C-C および C=C 伸縮振動に由来するバンドが同一の化学種 (カロテノイド) からのものであるという筆者らの帰属とよく対応する。一方、C-H 伸縮振動による CARS イメー

ジ (図6 (d)) は、図6 (b) および (c) と異なり、花粉全体の形状を与えている。また、発芽孔 (花粉管の出口) も3個所の位置でみられる。C-H 伸縮振動によるイメージでも、顆粒状の部分で強い信号が観測されることから、この部分でカロテノイドと脂質が高濃度で共存していることがわかる。このように、マルチプレックス CARS 顕微分光法を用いることにより、異なる化学種を異なる振動コントラストで可視化することができる。

2.4 CARS 分光イメージング—生細胞への応用

CARS 顕微分光によりイメージを高速に取得することができるため、細胞分裂時のオルガネラの動きなど、生細胞内で起こる動的な過程を実時間で追跡することも可能である。一例として、図7に分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*; *S. pombe*) 生細胞の C-H 伸縮領域における時間分解 CARS イメージングの結果を示す。1画像あたり約3.2分で取得している。この結果は、酵母の細胞分裂を明瞭に捉えている。酵母の内部には、信号強度の強いスポットが複数個所存在し、分裂中に細胞内を移動する様子が観察できる。これらはリン脂質を豊富に含むミトコンドリア等の膜系オルガネラであると考えられる。また、分裂前には、細胞中央付近に多糖類から構成される隔壁が出現することも可視化されている。以上のように、CARS を用いることで生細胞のダイナミクスを追跡することも可能である。

3. ハイパーラマン顕微分光法とその応用

3.1 ハイパーラマン散乱

生細胞など、多様な化学種の存在する複雑な系で起こる現象を振動分光によって研究する場合、ラマン散乱と相補的な赤外活性振動を観測できることは、未知分子種の同定や対象分子の構造、挙動の詳細な解析のために非常に重要である。しかし、上述の CARS 顕微分光やラマン顕微分光に比べて赤外顕微鏡の空間分解能は1桁ほど劣っているため、顕微鏡下では赤外活性振動情報はラマン活性振動情報に比べ、より大きな空間で平均化されたものしか得られない。顕微分光法における空間分解能の限界は、おもに光の回折限界によって決まり、赤外光線を用いる (far-field) 赤外顕微鏡では、数マイクロメートルが空間分解能の限界であるからである。

筆者らは、赤外光線を用いずに赤外活性振動が観測可能な振動分光法に着目することで、赤外光の回折限界による空間分解能の限界を超えることが可能になると考え、ハイパーラマン散乱を利用した新たな顕微振動分光法を開発した³⁰⁾。

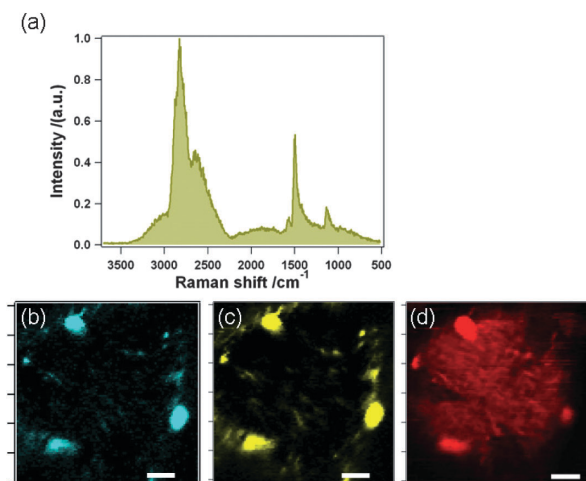


図6 サクラの花粉のCARSスペクトル (a) とCARSイメージング (b)~(d). それぞれC-C (b), C=C (c), C-H (d)伸縮振動に対応する. スケールバーは5 μm .

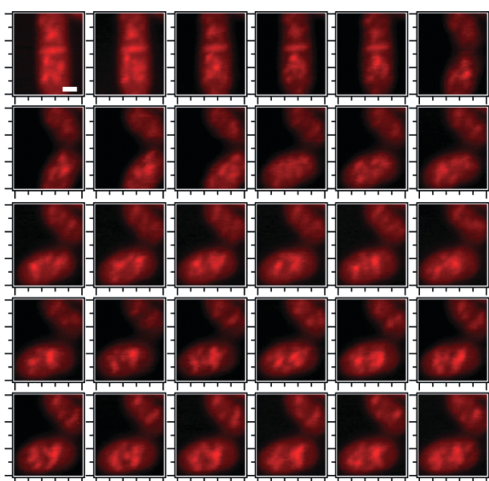


図7 分裂酵母のC-H伸縮振動によるCARSイメージング. スケールバーは1.5 μm .

ハイパーラマン (HR) 散乱は、1965年に Terhune らによってはじめて実験的に観測された非線形ラマン散乱のひとつであり³¹⁾、図8で示されるようなエネルギーダイアグラムで表すことができる。ハイパーラマン過程により分子は異なる振動準位に遷移するとともに、入射光子の2倍のエネルギーから遷移に要したエネルギーだけ振動数シフトした光が散乱されるため、散乱光のスペクトルを観測することでラマン散乱と同様に分子の振動スペクトルを得ることができる。3光子が関係するHR散乱は、ラマン散乱に比べて以下に挙げるような特徴をもつ³²⁻³⁶⁾。1) 振動の選択律がラマン散乱と相補的になり、すべての赤外活性振動モードがHR活性になる。2) 赤外吸収やラマン散乱では不活性な、いわゆるサイレントモードがHR活性になる場合がある。3) 入射光子に比べて散乱光子が高エネルギーになるため、蛍光や励起光の影響のないバックグラウンドフリーの観測が可能である。さらに、このHR散乱を顕微鏡に応用することで、以下に挙げるような利点を得ることができる。4) 励起光としてラマン散乱と同様に可視・近赤外光を用いることが可能であり、サブマイクロメートルの空間分解能を達成できる。5) 非線形光学効果により、共焦点系を構成することなく三次元的な空間分解能をもつ。

これらの特徴を合わせることで、サブマイクロメートルの空間分解能をもち、赤外活性振動モードを観測できる新たな顕微振動分光手法、ハイパーラマン顕微分光を実現することができる。

3.2 ハイパーラマン顕微分光計
実験装置の概略を図9に示す。光源はcwモード同期Ti:sapphire発振器 (Coherent社, Vitesse-800) を用い

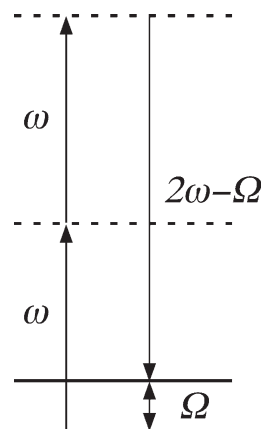


図8 HR散乱のエネルギーダイアグラム.

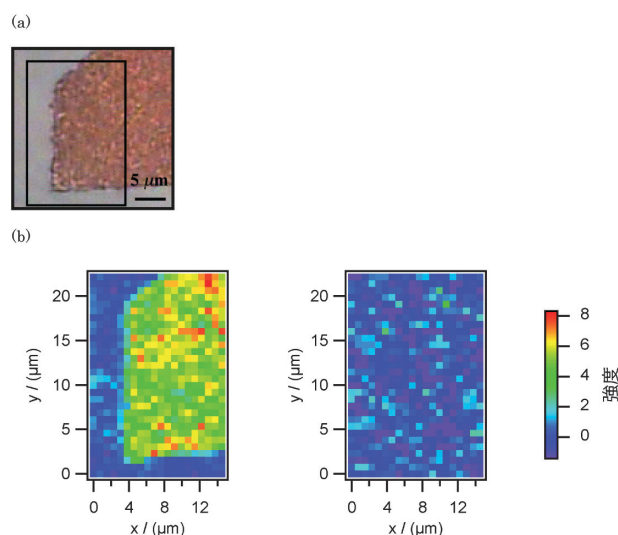


図11 全トランス- β -カロテン微結晶の光学像 (a), 1564 および 1944 cm^{-1} におけるHRイメージ (b).

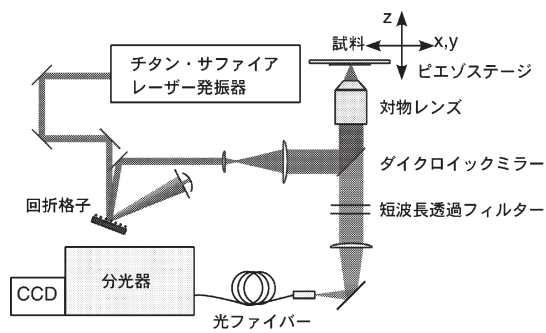


図9 HR顕微分光計の装置図。

た。出力光の中心波長は800 nm、繰り返しは80 MHz、パルス幅は100 fsである。スペクトル分解能の向上と励起波長の可変化のために、発振器から出力された広帯域なパルス光を回折格子を用いて波長選択し、同時にスペクトル幅約0.5 nm (=10 cm⁻¹) のピコ秒パルス光に変換している。この光を光学顕微鏡に導入し、対物レンズを用いて試料に照射している。試料からのHR散乱光は同じ対物レンズによって集光した後、励起光をフィルターで除去し、分光器とCCDカメラを用いて分光測定している。

3.3 β-カロテン結晶への応用

本装置を全トランス-β-カロテンに応用した例を示す。β-カロテンは反転対称をもつために、ハイパーラマン散乱とラマン散乱の間では振動の選択律に相互禁性則が成り立ち、ラマン散乱では観測できない赤外活性振動モードを有している。

微結晶中のβ-カロテンのハイパーラマンスペクトルを図10(a)に示す。比較のために、KBrディスク中の固体β-カロテンの赤外吸収スペクトル(b)、およびβ-カロテン微結晶の自発ラマンスペクトル(c)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すべて観測されたが、自発ラマンスペクトルでは観測されなかった。このことから、ハイパーラマン散乱で赤外活性振動を観測していることが確認できた。赤外スペクトルの帰属³⁷⁾をもとに、1564 cm⁻¹および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。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11(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11(b)右)。図から明らかのように、ハイパーラマン信号による高コントラストな結晶イメージの取得に成功した。これらの結果から求めた本装置の空間分解能は、面内方向については<0.5 μm、奥

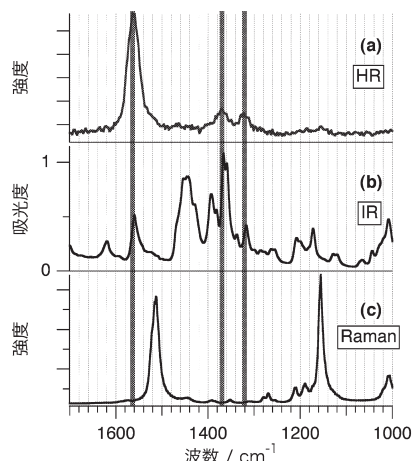


図10 全トランス-β-カロテン微結晶のHRスペクトル(a)、赤外吸収スペクトル(b)、自発ラマンスペクトル(c)。

行き方向については<1.4 μmであった。

図で示した1564 cm⁻¹の振動モードを赤外顕微鏡で観測する場合、赤外光の波長から推定した空間分解能は6 μm程度になると予想される。本研究は、この空間分解能を1桁向上することに成功しており、ハイパーラマン散乱を用いた赤外活性振動イメージングの有用性を示している。

3.4 分子近接場効果

上述のハイパーラマン顕微分光の研究過程において、溶液中のハイパーラマン散乱に関する非常に興味深い現象を発見した³⁸⁾。溶液中に微量存在する溶質分子によって、近傍の溶媒分子のハイパーラマン散乱強度が10⁶倍程度も増強されるという現象であり、これを応用することで、ナノメートルスケール空間の局所空間分解測定も可能になると期待される。

溶液中の全トランス-β-カロテンのHRスペクトルを図12に示す。溶媒は、シクロヘキサンおよび四塩化炭素である。溶液中のβ-カロテンの共鳴HRスペクトルには、結晶中のものには存在しない新たなバンドが溶媒ごとに異なる位置に観測された。これらのバンドが溶媒依存性を示すことから、バルクの溶媒由来のHR散乱に由来するものであると予想したが、溶液と同条件で測定した純溶媒のHRスペクトルにはHRバンドは全く観測されなかった。これは、β-カロテンのHR散乱が電子共鳴効果により増強されたために検出可能な強度を与える一方、溶媒ではこのような共鳴による増強がなく溶媒由来のHR散乱強度が本装置の検出限界以下であるために検出されなかったと考えられる。ところが、これらの溶媒依存性を示すバンドの振動数は、おおよその溶媒の赤外活性振動モードの振動数と非常によく一致することがわかった。図13(左)に、シクロヘキサン溶液中のβ-カロテンの共鳴HRスペクトル

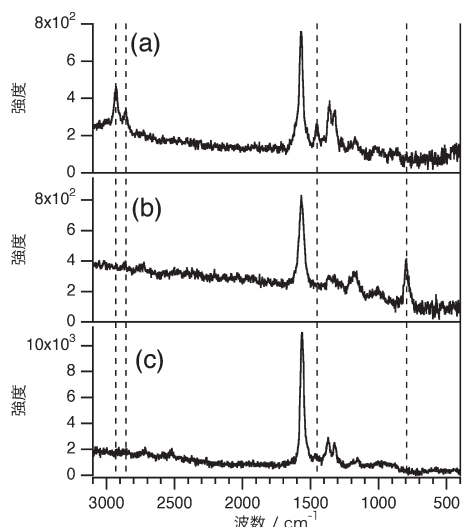


図12 全トランス- β -カロテン溶液のHRスペクトル。溶媒はシクロヘキサン (a), 四塩化炭素 (b), 全トランス- β -カロテン微結晶のHRスペクトル (c)。点線は溶液中で新たに現れたバンドを示す。

ル (a) とシクロヘキサンのみのHRスペクトル (b), シクロヘキサンの赤外吸収スペクトル (c) を示す。また, 図13 (右) に, 四塩化炭素溶液中の β -カロテンの共鳴HRスペクトル (d) と四塩化炭素のみのHRスペクトル (e), 四塩化炭素の赤外吸収スペクトル (f) を示す。さらに, 溶媒の水素をすべて重水素置換した重シクロヘキサン溶液中では, 新たに現れるバンド位置がシクロヘキサンより低波数シフトを示すことも明らかになった。これは, 重水素化に伴って変化した溶媒の振動モードが観測されていると考えることで説明できる。実際に観測された低波数シフトの大きさも, この解釈とよく一致するものであった。これら

の結果から, 溶液中で現れた新たなバンドは溶媒由来のHR信号であると帰属した。

先にも述べたように, 溶媒由来のHR信号は単に溶媒のみを同条件で測定しても観測可能な強度を示さず, β -カロテン分子を溶質として加えることではじめて観測可能になることがわかった。以上の結果から, 溶質近傍に存在している溶媒分子のHR信号強度が β -カロテン分子によって増強されていると結論した。筆者らは, この現象を β -カロテンの分子近接場効果とよぶことを提唱している。現時点では, この増強機構に関しては未知な部分が多いが, おそらく β -カロテンに溶媒和する程度の近傍の溶媒分子のみが増強された信号に寄与していると推測している。得られた信号強度と関与する分子数の概算から, β -カロテンの存在による増強効果の大きさは 10^6 以上と見積もっている。

この新たに発見された分子近接場効果によって, プロブとなる溶質のナノスケール近傍の局所空間に存在する分子のみを選択し, 振動分光学的に検出, 分析することが可能になると期待される。さらに, 振動スペクトルに含まれる豊富な情報を解析することで, このような特定の状況にある分子の同定や, 分子構造変化や分子間相互作用について詳細に解析することが可能になると考えられる。

筆者らによる振動分光計測の極限化の試みのうち, 線形および非線形ラマン分光に関する現状をまとめた。ピコ秒時間分解ラマン分光は, すでに時間とエネルギーの不確定性による原理的境界に到達している。CARSおよびハイパーラマン顕微分光では, 光の回折限界の空間分解が達成

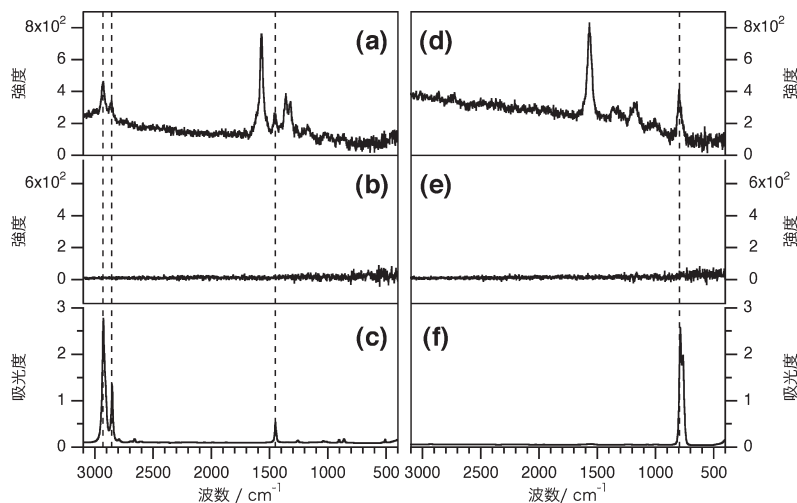


図13 HRスペクトルと溶媒の赤外吸収スペクトルとの比較。(a)~(c) はシクロヘキサン, (d)~(f) は四塩化炭素を溶媒とした場合の結果。それぞれ上から β -カロテン溶液のHRスペクトル, 溶媒のみのHRスペクトル, 溶媒の赤外吸収スペクトル。

されている。ピコ秒/サブマイクロメートルの時空間分解ラマン分光は、今すぐに実現可能であるが、顕微鏡下で繰り返し照射に耐えうる試料系の選択が重要なポイントになる。また、これまでに全く知られていなかった共鳴ハイパーラマン散乱の分子近接場効果を用いれば、ピコ秒/ナノメートルの時空間分解能で、分子アンサンブルを計測できる可能性がある。今後、時空間分解振動分光の分野は、想像を超えて急速に発展するのではないかと筆者らは感じている。

文 献

- 1) 水島三一郎, 島内武彦: 赤外線吸収とラマン効果 (共立出版, 1958).
- 2) 瀧口宏夫, 平川暁子: ラマン分光法 (学会出版センター, 1988).
- 3) 瀧口宏夫: 化学測定の事典—確度・精度・感度, 梅澤喜夫編 (朝倉書店, 2005) 13章.
- 4) 岩田耕一: “時間分解ラマン”, 実験化学講座 分光 (I), 第5版, 日本化学会編 (丸善株式会社, 2005) p. 560.
- 5) K. Iwata, S. Yamaguchi and H. Hamaguchi: “Construction of a transform-limited picosecond time-resolved Raman spectrometer,” *Rev. Sci. Instrum.*, **64** (1993) 2140-2146.
- 6) H. Hamaguchi: “Transient and time-resolved Raman spectroscopy of short-lived intermediate species,” *Vib. Spectra Struct.*, **16** (1987) 227-309.
- 7) H. Hamaguchi and T. L. Gustafson: “Ultrafast time-resolved spontaneous and coherent Raman-spectroscopy — The structure and dynamics of photogenerated transient species,” *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **45** (1994) 593-622.
- 8) 岩田耕一, 瀧口宏夫: “ピコ秒時間分解ラマン分光法”, 分光研究, **44** (1995) 61-73.
- 9) 高田雄太, 岩田耕一, 瀧口宏夫: “時間分解ラマン分光”, 触媒, **47** (2005) 341-345.
- 10) K. Iwata and H. Hamaguchi: “Microscopic mechanism of solute-solvent energy dissipation probed by picosecond time-resolved Raman spectroscopy,” *J. Phys. Chem. A*, **101** (1997) 632-637.
- 11) H. Hamaguchi and K. Iwata: “Physical chemistry of the lowest excited singlet state of trans-stilbene in solution as studied by time-resolved Raman spectroscopy,” *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **75** (2002) 883-897.
- 12) K. Iwata, K. Yoshida, Y. Takada and H. Hamaguchi: “Vibrational cooling process of S_1 trans-stilbene in ionic liquids observed with picosecond time-resolved Raman spectroscopy,” *Chem. Lett.*, **36** (2007) 504-505.
- 13) H. Hamaguchi and R. Ozawa: “Structure of ionic liquids and ionic liquid compounds: Are ionic liquids genuine liquids in the conventional sense?” *Adv. Chem. Phys.*, **131** (2005) 85-104.
- 14) G. J. Puppels, F. F. M. De Mul, C. Otto, J. Greve, M. Robert-Nicoud, D. J. Arndt-Jovin and T. M. Jovin: “Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microspectroscopy,” *Nature*, **347** (1990) 301-303.
- 15) Y.-S. Huang, T. Karashima, M. Yamamoto and H. Hamaguchi: “Molecular-level pursuit of yeast mitosis by time- and space-resolved Raman spectroscopy,” *J. Raman Spectrosc.*, **34** (2003) 1-3.
- 16) T.-S. Huang, T. Karashima, M. Yamamoto, T. Ogura and H. Hamaguchi: “Raman spectroscopic signature of life in a living yeast cell,” *J. Raman Spectrosc.*, **35** (2004) 525-526.
- 17) Y.-S. Huang, T. Karashima, M. Yamamoto and H. Hamaguchi: “Molecular-level investigation of the structure, transformation, and bioactivity of single living fission yeast cells by time- and space-resolved Raman spectroscopy,” *Biochemistry*, **44** (2005) 10009-10019.
- 18) Y. Naito, A. Toh-e and H. Hamaguchi: “*In vivo* time-resolved Raman imaging of a spontaneous death process of a single budding yeast cell,” *J. Raman Spectrosc.*, **36** (2005) 837-839.
- 19) M. D. Duncan, J. Reintjes and T. J. Manuccia: “Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope,” *Opt. Lett.*, **7** (1982) 350-352.
- 20) A. Zumbusch, G. R. Holtom and X. S. Xie: “Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-Stokes Raman scattering,” *Phys. Rev. Lett.*, **82** (1999) 4142-4145.
- 21) M. Hashimoto, T. Araki and S. Kawata: “Molecular vibration imaging in the fingerprint region by use of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy with a collinear configuration,” *Opt. Lett.*, **25** (2000) 1768-1770.
- 22) J.-X. Cheng and X. S. Xie: “Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: Instrumentation, theory, and applications,” *J. Phys. Chem. B*, **108** (2004) 827-840.
- 23) C. Otto, A. Voroshilov, S. G. Kruglik and J. Greve: “Vibrational bands of luminescent zinc(II)-octaethyl-porphyrin using a polarization-sensitive “microscopic” multiplex CARS technique,” *J. Raman Spectrosc.*, **32** (2001) 495-501.
- 24) G. W. H. Wurpel, J. M. Schins and M. Müller: “Chemical specificity in three-dimensional imaging with multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy,” *Opt. Lett.*, **27** (2002) 1093-1095.
- 25) J. K. Ranka, R. S. Windeler and A. J. Stentz: “Visible continuum generation in air-silica microstructure optical fibers with anomalous dispersion at 800 nm,” *Opt. Lett.*, **25** (2000) 25-27.
- 26) T. W. Kee and M. T. Cicerone: “Simple approach to one-laser, broadband coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy,” *Opt. Lett.*, **29** (2004) 2701-2703.
- 27) H. Kano and H. Hamaguchi: “Ultrabroadband ($>2500\text{ cm}^{-1}$) multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy using a supercontinuum generated from a photonic crystal fiber,” *Appl. Phys. Lett.*, **86** (2005) 121113.
- 28) H. Kano and H. Hamaguchi: “*In-vivo* multi-nonlinear optical imaging of a living cell using a supercontinuum light source generated from a photonic crystal fiber,” *Opt. Express*, **14** (2006) 2798-2804 (<http://www.opticsexpress.org>).
- 29) H. Kano and H. Hamaguchi: “Vibrational imaging of a single pollen grain by ultrabroadband multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy,” *Chem. Lett.*, **35** (2006) 1124-1125.
- 30) R. Shimada, H. Kano and H. Hamaguchi: “Hyper-Raman microspectroscopy: A new approach to completing vibrational spectral and imaging information under a microscope,” *Opt. Lett.*, **31** (2006) 320-322.
- 31) R. W. Terhune, P. D. Maker and C. M. Savage: “Measurements of nonlinear light scattering,” *Phys. Rev. Lett.*, **14** (1965) 681-684.
- 32) S. J. Cyvin, J. E. Rauch and J. C. Decius: “Theory of hyper-Raman effects (nonlinear inelastic light scattering): Selection rules and depolarization ratios for the second-order polarizability,” *J. Chem. Phys.*, **43** (1965) 4083-4095.
- 33) D. A. Long and L. Stanton: “Studies of nonlinear phenomena I. Theory of the hyper Raman effect,” *Proc. R. Soc. London, Ser. A*, **318** (1970) 441-457.

- 34) D. L. Andrews and T. Thirunamachandran: "The hyper-Raman effect: A new approach to vibrational mode classification and assignment of spectral lines," J. Chem. Phys., **68** (1978) 2941-2951.
- 35) V. N. Denisov, B. N. Mavrin and V. B. Podobedov: "Hyper-Raman scattering by vibrational excitations in crystals, glasses and liquids," Phys. Rep., **151** (1987) 1-92.
- 36) L. D. Ziegler: "Hyper-Raman spectroscopy," J. Raman Spectrosc., **21** (1990) 769-779.
- 37) S. Saito and M. Tasumi: "Normal-coordinate analysis of β -carotene isomers and assignments of the Raman and infrared bands," J. Raman Spectrosc., **14** (1983) 310-321.
- 38) R. Shimada, H. Kano and H. Hamaguchi: "Molecular near-field effect and intensity enhancement of solvent modes in resonance hyper-Raman scattering," J. Raman Spectrosc., **37** (2006) 469-471.

(2007年4月25日受理)