

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25286070

研究課題名(和文) 高次非線形ラマン散乱顕微鏡による結晶化モニタリング

研究課題名(英文) Crystallization monitoring using higher order nonlinear Raman scattering microscopy

研究代表者

橋本 守 (Hashimoto, Mamoru)

大阪大学・基礎工学研究科・准教授

研究者番号：70237949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：4次ラマン散乱(FOCRS)分光顕微鏡を結晶化モニタリングに用いることを提案した。結晶化は飽和溶液中でのプロセスであり、結晶と飽和溶液からの信号を分別する必要がある。偶数次の非線形光学現象は、中心対称性を持つ物質からは禁制となるため、4次の非線形光学効果であるFOCRSを用いることで、非中心対称性の結晶の分子振動情報の、溶液の影響ない観測が期待できる。FOCRS分光顕微鏡を開発し、対称心を持つ水和DAST結晶と対称心を持たない無水DAST結晶のFOCRSとCARSを観測した。CARSでは両者でラマンバンドが得られるが、FOCRSでは無水結晶のみラマンバンドを示し、FOCRSの選択性を示した。

研究成果の概要(英文)：We propose to use fourth order coherent Raman scattering (FOCRS) microspectroscopy for monitoring the crystallization process. The crystallization is a process in the saturated solution. The even order nonlinear phenomenon is prohibited from the solution and provides only the information of crystallized part. FOCRs also provides the information of crystal and the molecular information by the molecular vibration.

We have developed a multiplex FOCRs microspectroscopy system using supercontinuum light generated by a photonic crystal fiber. We succeed in observation of FOCRs hyper-spectral image of a DAST (4-dimethylamino-N-methyl-4-stilbazolium tosylate) crystal in saturated solution. We also observed FOCRs and CARS (coherent anti-Stokes Raman scattering) hyper-spectral images of hydrated and anhydrated DAST crystals. CARS bands are clearly observed for both of crystals, but only the anhydrated DAST crystals show FOCRs bands. As a result, the selectivity of FOCRs was declared.

研究分野：顕微分光

キーワード：結晶化 非線形光学 ラマン散乱分光 光学顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の構造解析には、その結晶化が不可欠な技術である。ヒトゲノム解読が達成された今日では、ポストゲノム研究としてタンパク質にターゲットを置いた研究が盛んに行われている。タンパク質の構造を解析する手法には、X線回折、NMR等が用いられるが、なかでもX線回折は精緻な構造を決定できるため、広くタンパク質の構造解析に用いられている。しかしながら、タンパク質の結晶化がしばしば問題となる。最近では超短パルスレーザーを飽和溶液中に集光させる等の新しい結晶化手法が開発されているが、高品位な結晶作製のためには、結晶化プロセスの可視化が重要な課題である。また、近年DAST結晶などの有機イオン性結晶がTHz発生素子などの光学デバイスとして用いられるようになってきたが、高品位で大きな結晶を作製するためには、結晶化プロセスにおける溶液の温度管理、濃度管理等が必要となるため、これもまた結晶作成プロセスのモニタリングが必要不可欠である。

2. 研究の目的

溶液法を用いた結晶化では、飽和溶液中で結晶化が起きるため、結晶周囲の飽和溶液と結晶化された物質を見分ける必要がある。本研究では、溶液状態のランダムに配向した状態と、結晶化されて高度に配向した状態を分子対称性から見分け、また結晶化した物質の状態を振動分光によって観察する、新しい可視化手法の開発を行う。

3. 研究の方法

本研究では、狭帯域な ω_1 光と、広帯域な ω_2 光を用い、一度にスペクトル情報を得るマルチプレックス分光を採用した4次ラマン顕微分光システムを開発し、結晶観察を行なった。また、その高速化を目指して、4次ラマンのヘテロダイン検出、ライン照明検出が可能な非線形ラマン散乱顕微鏡の開発を行なった。

図1にマルチプレックス4次ラマンシステムの構成図を示す。構成はマルチプレックスCARS顕微鏡とほぼ同等なものであるが[1]、その観測波長領域が異なる。フェムト秒チタンサファイアレーザーからの光を2分割し、一方を光学フィルターにより狭帯域化し、 ω_1 光に用いる。そして、他方をフォトニック結晶ファイバーに入射し、広帯域なsupercontinuum光を得る。これらの2つの光を時間的・空間的に重ね合わせ、光学顕微鏡へ導入し、試料へ集光する。発生した4次ラマン散乱光を光ファイバーで冷却CCDを検出器とした分光器へと導き、そのスペクトルを得る。ファイバーを用いることで、透過側、反射側同時にスペクトルを得ることが可能である。イメージは、試料を乗せたPZTステージを走査することで得る。まずは、狭帯域光の波長を808nmとし、広帯域光にこれより長波長の光を用いたシステムを構築した。

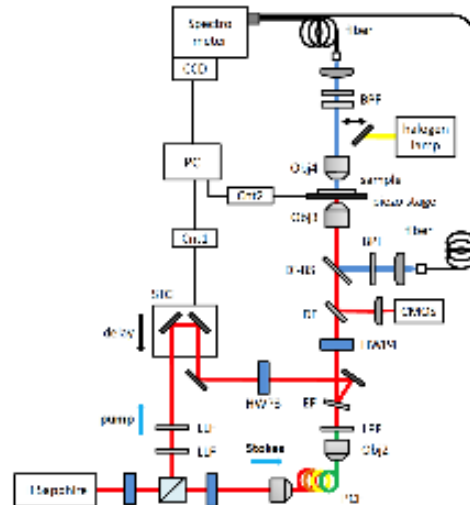


図1 フォトニック結晶ファイバーを用いた4次ラマン散乱顕微鏡の構成図

また、結晶化プロセスを観測する場合、観測の高速性が要求される。そこで、試料から発生した和周波と4次ラマン散乱を干渉させて高強度な4次ラマン散乱光を検出するヘテロダイン検出を試みた。この場合、EF(エッジフィルター)をノッチフィルターに、LPF(長波長透過フィルター)をSPF(短波長透過フィルター)取り替えた。

一方、高速に観測するために観測光の強度を高くすると、結晶は簡単に破壊される。そこで、ライン照明とCCDの2次元性を利用したライン照明非線形ラマン散乱顕微鏡を開発した。これにより、露光時間を長くしてS/N比を減少させ、試料の破壊を防ぎながらの観測が可能となる。ただし、光源にフォトニック結晶ファイバーを用いる場合、十分な光強度を得ることができない。そこで、光源に広帯域な10fsとピコ秒レーザーを同期させたシステムを用いたマルチプレックスライン照明非線形ラマン散乱顕微鏡を開発した。

4. 研究成果

有機イオン性結晶で高い非線形感受率を持つDAST(4-dimethylamino-N-methyl-4-stilbazolium tosylate)結晶の飽和溶液中での4次ラマン散乱スペクトルイメージングを行なった。狭帯域(ω_1)光のみで観測すると、 $2\omega_1$ に高強度な第二高調波が現れ、その低周波側に3つのハイパーラマンバンド(1175 cm^{-1} , 1350 cm^{-1} , and 1580 cm^{-1})が観測された。この状態に、広帯域な ω_2 光を照射すると、第二高調波の短波長側に、ハイパーラマン散乱に鏡対象なスペクトルが観測された。これにより、4次ラマンスペクトルを観測可能であることが分かった。

また、構成分子は同じで、対称性の異なる2種類の試料を用意してCARS(coherent anti-Stokes Raman scattering)と4次ラマ

ン散乱の観測を行なった．非線形光学結晶として用いられる DAST 結晶は，単斜晶系の結晶構造を有する赤い結晶（無水 DAST 結晶）であるが，水を含有する場合中心対称性を持つ構造を持つオレンジ色の結晶（水和 DAST 結晶）となることが知られている [2]．これらの試料の 4 次ラマン散乱スペクトルと CARS スペクトルを観測した．

CARS では，両結晶から先に示した 3 つのラマンバンドが観測されたが，4 次ラマンでは，無水 DAST 結晶で 3 つのラマンバンドが観測されたが，水和 DAST 結晶では信号が現れなかった．4 次ラマン散乱は，偶数次の非線形光学現象であるため，対称心を持つ試料からは発生しない．一方，3 次の非線形光学効果である CARS では，そのような選択則はない．このため，対称心を持たない結晶からは 4 次ラマン散乱信号が得られたが，対称心を持つ結晶からは信号が得られず，4 次ラマン散乱によって，非中心対称性の物質からのみ信号が得られることが明瞭に示された．

また，高強度な 4 次ラマン散乱信号を得るために，ヘテロダイン検出を試みた．狭帯域₁光と高帯域₂光を $\omega_1 < \omega_2$ とすると，発生する和周波と 4 次ラマン光の周波数が重なる．このため，両者が干渉し，結果的に 4 次ラマン光を増強することが可能である [3]．そこで，コンティニウム光の短波長側を用いるシステムを構築し，その取得を試みた．その結果，四次ラマン散乱信号の強度を 2 桁向上できることが分かった．

さらに，CCD 検出器の 2 次元性を生かして，高速なハイパースペクトル観測を実現するために，励起光をシリンドリカルレンズで直線状にしたライン走査非線形ラマン散乱顕微鏡を開発した．これまで用いていた，フォトニック結晶ファイバーでは，数 10 mW の出力しか得られないため，励起光をライン状にした場合，光強度が弱すぎて非線形光学効果を十分に発揮できない可能性がある．そこで，励起光源に広帯域な 10 fs レーザーと ps レーザーを用い，両者を同期させて試料に照射するシステムを構築した．これにより，指紋領域と呼ばれる $500\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ を一度に観測可能であり，検出器の 2 次元性を生かして，数十倍の高速イメージングが可能であることを示した．

< 引用文献 >

H. Kano and H. Hamaguchi, "Femtosecond coherent anti-Stokes Raman scattering spectroscopy using supercontinuum generated from a photonic crystal fiber", *Appl. Phys. Lett.*, Vol. 86, 121113 (2005)

G. L. Bryant Jr, C. P. Yakymyshyn and K. R. Stewart, "Structure of 4'-di-methylamino-4-methyl-4-azastilbenium p-toluene-sulfonate hydrate",

Acta Cryst., C49, 350-351(1993).

S. Yamaguchi and T. Tahara " (4) Raman Spectroscopy for Buried Water Interfaces", *Angewandte Chemie International*, Vol. 46, pp. 1521-3773 (2007).

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

M. Hashimoto, H. Niioka, K. Ashida, K. Yoshiki, and T. Araki, "High-sensitivity and high-spatial-resolution imaging of self-assembled monolayer on platinum using radially polarized beam excited second-harmonic-generation microscopy", *Appl. Phys. Express*, 査読有り, Vol. 8, p. 112401 (2015). doi: 10.7567/APEX.8.112401

M. Hashimoto, H. Kanoh, H. Niioka, and T. Araki, "Fourth-order coherent raman microspectroscopy for detection of material symmetry", *Proc. SPIE*, 査読有り, Vol. 8948, 894817-1-6 (2014). doi: 10.1117/12.2040848

T. Minamikawa, T. Takagi, H. Niioka, M. Kurihara, N. Hashimoto, T. Araki, and M. Hashimoto, "Molecular orientation imaging of liquid crystals by tunable-polarization-mode coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy", *Appl. Phys. Express*, 査読有り, Vol. 6, p. 072401 (2013). doi: 10.7567/APEX.6.072401

[学会発表](計 8 件)

山田貴大, 福島修一郎, 橋本守, "10 フェムト秒レーザーを用いたライン走査型マルチプレックス非線形ラマン散乱顕微鏡による生体分子種の識別", 日本機械学会 第 28 回バイオエンジニアリング講演会, 東京工業大学大岡山キャンパス(東京), Jan. 9-10 (2016).

新岡宏彦, 橋本守, "マルチプレックス四次ラマン顕微鏡の開発と非線形光学結晶観察", 日本分光学会赤外ラマン分光部会シンポジウム, 大阪大学豊中キャンパス(大阪), Jan. 27 (2015).

C. Ninagawa, T. Furukawa, H. Niioka, T. Araki, and M. Hashimoto, "Observation of organic nonlinear optical crystal by multiplex fourth order Raman

microscope”, 2nd KANSAI Nanoscience and Nanotechnology, The Congrès Convention Center, Osaka, JAPAN, Dec. 10-11, 10 (2014).

蜷川知可子, 新岡宏彦, 荒木勉, 橋本守, “4次ラマン顕微鏡を用いた非中心対称性結晶の選択的観察”, 日本光学会年次学術講演会 Optics Photonics Japan 2014, 筑波大学東京キャンパス文京校舎(東京), Nov. 5-7 (2014).

C. Ninagawa, H. Niioka, and T. Araki and M. Hashimoto, “Observation of anhydrous and hydrated DAST crystals using multiplex fourth order Raman microscope”, JSAP-OSA Joint Symposium 2014, the 75th Autumn Meeting, pp. 18a-C3-11, The Japan Society of Applied Physics, Hokkaido University, Hokkaido, Japan, Sep. 17-19 (2014).

橋本守, “非線形ラマン散乱顕微鏡による無染色イメージング”, 日本顕微鏡学会 様々な極微イメージング技術研究会 第2回研究会, 東北大学 金属材料研究所2号館1階講堂(仙台), Mar. 1 (2014).

蜷川知可子, 加納寛人, 新岡宏彦, 荒木勉, 橋本守, “マルチプレックス四次ラマン散乱顕微鏡によるDAST結晶のイメージング”, 平成25年度日本分光学会国際シンポジウム・年次講演会, p. 83, 大阪大学豊中キャンパス(大阪), Nov. 19-21 (2013).

H. Niioka, H. Kanoh, T. Araki, and M. Hashimoto, “Imaging of a DAST crystal by using multiplex fourth order Raman scattering microscopy”, Program and Abstract Book, Seventh International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS7), Kobe, Japan, Aug. 25-30 (2013).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 1 件)

名称: 誘導ラマン散乱顕微鏡
発明者: 橋本 守
権利者: 国立大学法人大阪大学
種類: 特許
番号: 5831901
取得年月日: 2015.11.6
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://sml.me.es.osaka-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 守 (HASHIMOTO Mamoru)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・准教授

研究者番号: 70237949

(2) 研究分担者

福島 修一郎 (FUKUSHIMA Shuichiro)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教

研究者番号: 40362644

(3) 連携研究者

新岡 宏彦 (NIIOKA Hirohiko)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教

研究者番号: 70552074