レーザーラマンマイクロプローブ法
—基礎と医学への応用—

Laser Raman Microprobe Method
—Its Principle and Medical Application—

尾崎幸洋、吉浦昌彦、岩本武夫、入山啓治

Yukihiro OZAKI, Masahiko YOSHIURA, Takeo IWAMOTO and Keiji IRIYAMA

東京慈恵会医科大学共同利用研究部

Division of Biochemistry, The Jikei University School of Medicine

要旨

レーザーラマンマイクロプローブはラマン分光器に光学顕微鏡を組み合わせた装置である。この装置を用いれば、顕微鏡で組織を見ながら、調べたい箇所にレーザー光の焦点を絞り、その部分(直径1~100 μm)のラマンスペクトルを非破壊的に測定することができる。得られたスペクトルを解析することによって微量部分の成分の同定や構造解析を行うことができる。レーザーラマンマイクロプローブは10年ばかり前に開発されて以来、広範囲な医学、生物学の分野に応用されている。本稿はこのレーザーラマンマイクロプローブ法の特色と医学への応用の現状について解説することを目的としている。

Laser Raman microprobe, developed mainly in France and the USA during the last decade, consists of a laser light source, an optical microscope, and a Raman spectrometer. The technique has several advantages. One is the ability of nondestructive compound identification. Another is the ease of sample preparation. Yet another is the potential of providing information about molecular structure of micro sample. This review aims at surveying the present status of Laser Raman microprobe method in the medical field and discussing its future prospects.

1. はじめに

生体物質や生体組織中に含まれる成分の同定を行なう場合、実際に目で見ながら、あるがままの状態(in situ)で調べたい部分の同定ができれば、それが一番望ましい。最近ある特定の分光装置に顕微鏡を組み合わせた種々の顕微分光法が著しく進歩し、顕微鏡下での in situ 分析がしだいに一般的に行なわれるようになってきた¹⁻⁸⁾。顕微分光法の代表的な例としては、顕微蛍光分光法、顕微赤外分光法、レーザーラマンマイクロプローブ法⁴⁻⁸⁾(ラマン分光器に光学顕微鏡を組み合わせたもの)などがあるが、筆者らはこのうち特にレーザーラマンマイクロプローブ法に注目している⁹⁻¹²⁾。この方法は、顕微鏡で組織を見ながら、調べたい箇所にレーザー光の焦点を絞り、ラマンスペクトルを測定する方法で、次のような特色を持っている⁴⁻⁸⁾。1)非破壊的に化合物の同定ができる。2)固体、液体、フィルム状態など物質の形態に関係せず、in situ 分析が可能である。3)レーザー光を光源として用いるので、微量分析、局所分析に適している。4)物質の同定だけでなく分布をも調べることができる(この場合特別な付属装置を必要とする)。レーザーラマンマイクロプローブは10年ばかり前にアメリカ^{4, 5)}とフランス^{6, 7)}で同時に開発され、たちまち材料分析、環境分析、生体分析等で用いられるようになった。医学分野への応用も1970年代の終りごろには始まり、最近では自らこの方法に取り組む医学者も増えてきた^{12, 20)}。このような状況のもとでレーザーラマンマイクロプローブ法の医学への応用について概観することは十分に意義があると思われる。本稿では、レーザーラマンマイクロプローブ法の原理と装置についてまず解説し、つづいて医学の各分野への応用例を取り上げてこの方法の特色と問題点について論じたい。

2. ラマン分光法とは?

レーザーラマンマイクロプローブ法というのは顕微鏡

下で行なうラマン分光法のことである(顕微ラマン分光法とも呼ばれる)。したがってレーザーラマンマイクロプローブ法の原理はラマン分光法の原理そのものである。ラマン分光法はラマン効果に基づく散乱分光法でその歴史はかなり古い^{21, 22)}(インドのラマンがラマン散乱を発見したのは1928年のことである)。ラマン効果を厳密に理解するためには高度な物理学の知識を必要とするが、ラマン効果の現象そのものはごく簡単なものである。今、図1のようにある分子に振動数 ν_0 の光(フォトン)があたった場合を考える。この場合圧倒的に多くのフォトンには振動数を変えずに(エネルギーを変えずに)そのまま散乱される。これがレイリー散乱である。これに対しごく一部のフォトンには振動数を変えて($\nu_0 \pm \Delta\nu$)散乱される。これがラマン散乱である。* ラマン散乱が起こるのは分子とフォトンが衝突したときにエネルギーのやりとりを行うからである。すなわち $\pm\Delta\nu$ は分子が獲得したエネルギー、あるいは失なったエネルギーに相当する。このエネルギーは生物医学への応用に関する限り、分子の振動エネルギーと考えてよい。 $\pm\Delta\nu$ は当然個々の分子の構造や性質に依存するので、ラマンスペクトルを測定することにより、物質の定性定量分析を行ったり構造解析を行ったりすることができる。

* (脚注)振動数が小さくなる($\nu_0 - \Delta\nu$)散乱をストークスラマン散乱、振動数が大きくなる($\nu_0 + \Delta\nu$)散乱を反ストークスラマン散乱と呼ぶ。一般にストークスラマン散乱の方が反ストークスラマン散乱よりも散乱強度が強いので、ラマンスペクトルを測定する場合ストークスラマン散乱を測定する。

ラマンスペクトルの測定は概念的には非常に簡単で、試料に光を当てその散乱光の強度と波長を分光器を用いて解析すればよいだけである。光源としては現在ではもっぱらレーザーが用いられる。単色性にすぐれしかも高

図1 ラマン散乱とレイリー散乱

図2 ラマンマイクロプローブの概略図

い光子密度が得られるレーザーがラマン分光の光源として最適であることは言うまでもない。もちろんマイクロアナリシスはレーザーの使用によって初めて可能になるものである。

3. レーザーラマンマイクロプローブ⁴⁻⁸⁾

一口にレーザーラマンマイクロプローブと言っても単にラマン分光装置に光学顕微鏡を取り付けた簡単なものからイメージング(特定の物質の分布をテレビカメラ上に写し出すこと)や高感度を目的とした高級なものまでいろいろある。一般には簡易型がよく普及している。図2はラマンマイクロプローブの概略図である。光源としてよく用いられるのは、 Ar^+ 、 Kr^+ 、 He-Ne 、色素レーザーなどで、ふつう200mW程度の出力が必要である。試料は通常の光学顕微鏡での観察の場合と同様にして水平な試料台の上に置かれる。白色光を用いて分析すべき個所を確認した後、そこにレーザー光を照射する。レーザー光は顕微鏡の対物レンズを用いて最高 $1\mu\text{m}$ 程度まで絞ることができる。試料からのラマン散乱光はこの対物レンズを用いて 180° 方向に集光され、ビームスプリッターを通して分光器に導かれる。検出系としては光電子増倍管の他にマルチチャンネル検出器も使用される。イメージングやある振動数領域の同時測定にはマルチチャンネル検出器が欠かせない。レーザーラマンマイクロプローブのより詳しい解説は文献4-8などを参照していただきたい。

4. レーザーラマンマイクロプローブ法の応用例

レーザーラマンマイクロプローブ法はこれまでに病理学^{13, 15-17)}、臨床検査医学^{12, 14, 15)}、生理学²⁰⁾、環境医学^{20, 24, 25)}、内科学¹²⁾、泌尿器科学¹⁴⁾、眼科学¹⁸⁾、歯科学¹⁹⁾などの広範囲な医学分野に応用されている。ここで

図3 異物を取り込んだために多核の巨大セルに異形化したリンパ節の標準切片($5\mu\text{m}$)。このリンパ節は指に人工関節(シリコンゴム製)を入れている患者から取ったものである。矢印は問題の異物を示す。ラマンスペクトルの測定はこの異物と星印で示した細胞質の部分について行われた。

(Abraham, J.L., Etz, E.S.: Science, 206: 716 (1979) より)

は6つの応用例を取り上げて、レーザーラマンマイクロプローブ法の現状と可能性について解説する。

[1] リンパ節に含まれた異物の同定^{13, 16)}

AbrahamとEtz¹³⁾はレーザーラマンマイクロプローブ法を用いてリンパ節に含まれた異物の同定を行った。組織や物質中に含まれる異物や微粒子の同定はレーザーラマンマイクロプローブ法が最も得意とするところである。図3は異物を含んだリンパ節の標準切片($5\mu\text{m}$)の顕微鏡写真である¹³⁾。このリンパ節は指に人工関節(シリコンゴム製)を入れている患者のもので、異物の侵入のために多核の巨大セルに異形化している。矢印で示されているのが問題の異物である。ラマンスペクトルの測

図4 (A) 細胞質(図3の星印の部分)のラマンスペクトル、(B) リンパ節に含まれた異物(図3の矢印)のラマンスペクトル、(C) 患者の人工関節と同じものの小さな断片のラマンスペクトル。(A)、(B)のスペクトル中Sと印したラマン線は試料の支持台として用いたサファイヤによるもの。
(Abraham, J.L., Etz, E.S.: Science, 206: 716(1979)より)

定はこの異物と星印で示した細胞質の部分について行われた。図4(A), (B)はそれぞれ細胞質と異物のラマンスペクトルである¹³⁾。ラマンスペクトルの測定には染色していない組織切片が用いられた。励起光はAr⁺レーザーの514.5nm線、レーザーパワーは40mWである。またレーザーのスポットの直径は16μmで、異物の大きさは約24μmであった。BのスペクトルはAのスペクトルとは全く異なっているので、Bのスペクトルは細胞質からの寄与を含んでいない純粋な異物のスペクトルと考えられる。Cのスペクトルは患者の人工関節と同じものの小さな断片(〜60μm)のラマンスペクトルである。注目すべきことにBとCのスペクトルはきわめてよく似ている。このことからAbrahamとEtz¹³⁾はリンパ節に含まれている異物は患者の人工関節を作っているシリコンゴムであると結論した。

De Mulら¹⁶⁾もまたレーザーラマンマイクロプローブ法を用いてリンパ節中に存在する異物の同定を行った。彼らは珪肺患者から取った2種類のリンパ節の試料を調べた¹⁶⁾。1つの試料にはα-石英が含まれていることがあらかじめわかっていたが、もう1つの試料に含まれている異物についてはそれが何であるのか不明であった。試料はパラフィンで包埋され、通常のスライドガラスの上にのせられた。パラフィンはキシロールで除かれた。試料は各々2つ用意され、そのうち1つは染色された。

図5 (A) 珪肺患者のリンパ節に含まれた異物のラマンスペクトル、(B) タルク(滑石)のラマンスペクトル。(De Mul, F.F.M., Buiteveld, H., Lankester, J., Mud, J., Greve, J.: Human Pathology, 15: 1062(1984)より)

ラマンスペクトルの測定に用いられた試料は染色されていない方である。

最初の試料中に含まれている異物(直径2μm)のラマンスペクトルを測定したところ、得られたスペクトルは振動数、強度とも完全にα-石英のものに一致することがわかった。このことからα-石英がリンパ節に含まれていることが確認された¹⁶⁾。図5の(A)は2番目の試料に含まれている異物(直径2μm)のラマンスペクトルである¹⁶⁾。一方(B)のスペクトルは参照するために測定されたタルク(滑石)のラマンスペクトルである。両者のスペクトルは互いによく似ているのでDe Mulら¹⁶⁾は異物はタルクであると結論した。さらに彼らは同じ試料に含まれた他の異物についてもラマンスペクトルを測定し、それが金紅石(ルチル; TiO₂)であることを突き止めた¹⁶⁾。
[2] 肺組織中の蓄積物の同定^{15, 16)}

De Mulら^{15, 16)}は肺組織中の蓄積物の同定にもレーザーラマンマイクロプローブ法が有力なことを示した。彼らはまず珪肺患者の肺組織中の蓄積物を調べた¹⁵⁾。蓄積物の大きさは直径3μm程度で、ラマンスペクトルの測定はレーザースポットの直径1.6μm、レーザーパワー4mW(514.5nm)の条件で行われた。いくつかの蓄積物のラマンスペクトルを測定したところ2種類の蓄積物が存在することが明らかになり、それらのスペクトルと参照スペクトルとの比較から蓄積物がCaCO₃とMgCO₃であることがわかった¹⁵⁾。

De Mulら¹⁶⁾が調べたもう1つの試料は、“pulmonary blue bodies”の患者の肺組織である。この病気の患者の肺組織にはいわゆる“blue bodies”が蓄積物として

図6 “pulmonary blue body” のラマンスペクトル。下に棒線で示されたスペクトルは CaCO_3 によるものである。

(De Mul, F.F.M., Buiteveld, H., Lankester, J., Mud, J., Greve, J.: Human Pathology, 15: 1062 (1984) より)

含まれている。彼らはこの“blue bodies”の実体を *in situ* で明らかにすることを試みた¹⁶⁾。図6に示したのがこの“blue bodies” (直径15~40 μm) のラマンスペクトルである¹⁶⁾。このスペクトルは参照スペクトル (図6には棒線で示されている) との比較から明かなように振動数、相対強度ともに CaCO_3 のスペクトルとして説明することができる¹⁶⁾。しかしながら純粋の CaCO_3 の固体に比べ“blue bodies”ははるかにレーザー光によって損傷を受けやすい。また“blue bodies”のラマン線の強度は純粋の CaCO_3 のその半分程度である。さらに“blue bodies”のラマンスペクトルは2800 cm^{-1} 付近に巾の広い蛍光によるバックグラウンドを示す。これらの実験事実から De Mul ら¹⁶⁾は“blue bodies”は主として CaCO_3 からなるがそれだけでなく有機化合物をも含んでいると結論した。

[1], [2] で解説したように、レーザーラマンマイクロプローブ法は組織中の微量物質の同定にはきわめてすぐれた方法である。従来、微量物質の同定にはX線回折や走査電子顕微鏡などが用いられてきたが、これらの方法では成分の元素分析や無機分析だけしかできないことが多かった。それに対しレーザーラマンマイクロプローブ法の場合にはピコグラム単位の微量物質でも化合物の同定までできる。また試料の準備という点からもレーザーラマンマイクロプローブ法が一番楽である。このようにレーザーラマンマイクロプローブ法は数々の長所を持つ

図7 (A) コレステロール系混合石中の白色微粒子のラマンスペクトル、(B) ビリルビン系胆石中の白色微粒子のラマンスペクトル、(C) 亜鉛ステアリン酸のラマンスペクトル。(Ishida, H., Kamoto, R., Uchiyama, S., Ishitani, A., Ozaki, Y., Iriyama, K., Tsukie, E., Shibata, K., Ishihara, F., Kameda, H., Appl. Spectrosc., in press より)

ているので、今後ますます活発に組織中の微量物質の同定に用いられるであろう。

レーザーラマンマイクロプローブ法は胆石¹²⁾や結石¹⁴⁾の微量分析にも適用されている。[3], [4] ではそれらの例について解説する。

[3] 胆石の微量成分の分析¹²⁾

胆石の中には不規則な層状構造を持つものや、微粒子状の結晶を含むものなど構造的に複雑なものも多い。胆石の微細構造はその成因を反映しているので、病気の根本原因を知るためには微細構造を明らかにすることがぜひとも必要である。胆石の分析にはこれまで、赤外吸収スペクトル、ガスクロマトグラフ分析、示差熱分析などが用いられてきた。これらの方法はそれぞれすぐれた特色を持っているが、いずれも破壊分析法である。レーザーラマンマイクロプローブ法には目で見ながら、しかも非破壊的に胆石の成分分析ができるという長所がある。またこの方法を用いれば成分の同定のみならず、その分布をも明らかにすることができる可能性がある。最近東レの石田ら¹²⁾はレーザーラマンマイクロプローブ法による胆石の微量分析に成功した。

彼ら¹²⁾は代表的なコレステロール系胆石とビリルビン系胆石、それに複雑な層状構造を持つコレステロール系混合石のラマンスペクトルを測定した。図7の(A),(B)はそれぞれ混合石中の白色微粒子、ビリルビン系胆石中の白色微粒子のラマンスペクトルである¹²⁾。微粒子の大きさは直径20~100 μm 、一方レーザーのスポットの直径は2 μm であった。用いられた励起光は Ar^+ レーザーの514.5nm線である。石田ら¹²⁾は(A)(B)のラマンスペクトルが長い炭化水素鎖構造を持つ物質に特有のものであることに気付き、予想されるいくつかの物質のラマンスペクトルと(A)(B)のスペクトルとを比較した。その結果、(A)(B)のスペクトルが(C)に示すような高級脂肪酸のスペクトルに非常に近いことを見出した。赤外吸収スペクトル法やX線マイクロアナライザー法による分析結果とも考え合わせて、彼らはこの白色微粒子がパルミチン酸カルシウムであると推定した¹²⁾。彼らは白色微粒子の他にも3種類の胆石のいろいろな部分のラマンスペクトルを測定し、コレステロールやビリルビンの存在などを確認した。現在のところ残念ながら、バックグラウンドが強いために、胆石中の微量物質の分布をテレビカメラ上に写し出すことには成功していない。しかしそれも今後、装置の進歩によっては可能になるう。

[4] 結石の微量成分の分析¹⁴⁾

Daudonら¹⁴⁾はレーザーラマンマイクロプローブ法と赤外吸収スペクトル法を併用して合計150個にも及ぶ、腎臓石、尿管結石、膀胱結石を調べ、60種類以上の成分の同定を行った。胆石の場合と同様にこれらの成分の同定は、個々の石の形成過程を知る上で必要欠くべからざるものである。特に結石の核となっている物質の同定は結石症の根本原因を調べる重要な手がかりを与える。

ラマンや赤外分析で特筆すべきことは、これらの分光法を用いれば単に結石の成分の同定ができるばかりでなく、それらの結晶形まで決めることができるという点である。たとえばシュウ酸カルシウム石にはヒューエライト石とウェデライト石があるが、この2つの石は強いラマンバンドが 1462cm^{-1} (ヒューエライト)に現われるか、あるいは 1476cm^{-1} (ウェデライト)に観測されるかによって区別することができる。リン酸カルシウム石も同様にラマンあるいは赤外吸収スペクトルの測定からリン灰石とブラッシュ石に分類することができる。リン灰石はさらに純粋のリン灰石と炭酸イオンを結晶中に含んだものとに区別することができる。この区別にはレーザーラマンマイクロプローブ法が威力を発揮する¹⁴⁾。純粋のリン灰石はリン酸基によるラマンバンドを 959cm^{-1} に示すが、炭酸イオンが増えれば増えるほどこのバンドは高波

図8 (A)尿酸水素カリウムのラマンスペクトル、(B)尿酸水素カルシウムのラマンスペクトル。

(Daudon, M., Protat, M.F., Reveillaud, R. J., Jaeschke-Boyer, H.: *Kidney International*, 23 : 842 (1983)より)

数側にシフトする。炭酸イオンが飽和したリン灰石はそのバンドを 963cm^{-1} に与える。したがってラマンバンドの位置からどの程度炭酸イオンが含まれているかを知ることができる¹⁴⁾。

尿酸塩はシュウ酸結石の核などにしばしば見られる。レーザーラマンマイクロプローブ法を用いれば尿酸水素アンモニウム、尿酸水素カリウムなど種々の尿酸塩の区別も比較的容易に行うことができる。図8の(A)(B)はそれぞれ尿酸水素カリウムと尿酸水素カルシウムのラマンスペクトルである¹⁴⁾。両者のスペクトルは全般的によ

く似ているが、 583cm^{-1} のラマン線、 1004cm^{-1} のラマン線などの様子においてははっきりと区別することができる。

Daudon ら¹⁴⁾はレーザーラマンマイクロプローブ法と赤外吸収スペクトル法を比較し、前者はきわめて微量(直径約 $1\text{ }\mu\text{m}$)の成分でも分析が可能であるという長所を有するが、反面蛍光によってラマンスペクトルが妨害されたり、強いレーザー光によって試料が損傷したりする短所があると指摘している。

[5] 水晶体に含まれる水晶体蛋白質の in situ 分析¹⁸⁾

近年、ラマン分光法を用いた水晶体の老化や白濁化の研究が活発に行なわれるようになり、その方法による白内障の予知も検討され始めている^{9-11, 26)}。水晶体のラマンスペクトルを測定すると3種類の水晶体蛋白質(α -, β -, γ -クリスタリン)のラマンスペクトルと水晶体に含まれる水のラマンスペクトルの重ね合わせのスペクトルが得られるので、ラマンスペクトルの測定から3種類の水晶体蛋白質の相対濃度や水の相対含量、さらには水晶体蛋白質の高次構造などに関する情報が in situ で得られる^{9-11, 26)}。水晶体蛋白質の相対濃度や水の相対含量は水晶体の各部分によって異なり、また水晶体の白濁化や病変はきわめて局部的に発生することも多いので、水晶体中の微小部分の分析を行う方法を確立しておくことが望まれる。Gijsbers ら¹⁸⁾はごく最近、レーザーラマンマイクロプローブ法による水晶体の研究を報告した。彼らはレーザーラマンマイクロプローブ法と走査電子顕微鏡、透過電子顕微鏡を併用して水晶体の微小部分の病変を調べることを考えた。通常のラマン分光法で調べることのできる最小体積は $10^{-3}\text{ }\mu\text{L}$ 程度であるが、マイクロプローブ法を用いると $10^{-7}\text{ }\mu\text{L}$ 程度の微小体積からもラマンシグナルを得ることができる¹⁸⁾。したがってわずか2~3個の水晶体繊維の範囲に限定された白濁化をも調べることができるのである。彼らの研究はまだ予備的な域を出ないが、図9の結果は水晶体研究におけるレーザーラマンマイクロプローブ法の将来性を示すものとして注目値する。図9の(A)(B)はいずれも人間(26才)の水晶体皮質部分のラマンスペクトルであるが、(A)ではレーザー光の焦点が水晶体の表面に近い皮質部分に結ばれているのに対し、(B)ではそれが核に近い皮質部分に結ばれているという違いがある¹⁸⁾。(A)(B)のスペクトルには3つのはっきりした相違が見られる。まず第1は試料を固定するために用いられたカコジル酸バッファーによるラマンバンド(608cm^{-1})の程度で、このバンドは(A)においてはるかに強い。2番目の相違点は、 622cm^{-1} のフェニルアラニン残基(Phe)によるラマンバン

図9 人間(26才)の水晶体の皮質部分のラマンスペクトル。(A)水晶体の表面に近い皮質部分、(B)核に近い皮質部分。(Gijsbers, G., Vrensen, G., Willekens, B., Maatman, D., De Mul, F., Greve, J.: Prosser, V. (Ed.), Laser Raman Scattering Spectroscopy of Biological Objects, in press, Elsevier, 1987より)

ドと 644cm^{-1} のチロシン残基(Tyr)によるラマンバンドの相対強度である。この相対強度は(A)では1.2 : 1、(B)では1 : 1になっている。実際の Phe と Tyr の存在比は上の比に1.25をかけたものなので、上の結果は周辺部に近い皮質では Phe と Tye の存在比が1.5 : 1で、核に近い皮質ではそれが1.25 : 1であることを示している。もう1つの相違点は 830cm^{-1} と 855cm^{-1} に観測される2本の Tyr 残基によるラマン線(チロシンダブルレットと呼ばれる)の強度比である。図から明らかなように、 830cm^{-1} のラマン線の相対強度は(A)においてより強くなっている¹⁸⁾。Gijsbers ら¹⁸⁾は、これは Tyr 残基の微環境が周辺部の皮質と核に近い皮質とでいくぶん異なっているためであると解釈しているが、 α -, β -, γ -クリスタリンの相対含量が異なるためにチロシンダブルレットの強度比が変化しているのかもしれない。さらに $4000\sim 2800\text{cm}^{-1}$ の領域のラマンスペクトルの比較から

図10 (A) *Colpidium campylyum* の細胞内に取り込まれた不溶性物質のラマンスペクトル、(B) 4', 4'-dichlorodiphenyl のラマンスペクトル。
(Dive, D., Devynck, J.M., Leroy, G., Fourmaux, M.N., Moschetto, Y.: *Experientia*, 36: 832 (1980) より)

水の相対含量も周辺部と核に近い部分とでは異なることがわかった。Gijsbersら¹⁸⁾は白濁化した微小部分(2～3個の水晶体繊維に限定された部分)とそのすぐ近くの透明な部分のラマンスペクトルの比較を試みているが、残念ながらまだレーザービームが白濁化した微小部分に確かに焦点を結んでいるか否かを確認できていないため測定結果の信頼性が十分ではない。今後の発展が期待される。

[6] 環境医学、公衆衛生学分野への応用²⁰⁾

レーザーラマンマイクロプローブ法は大気中の粉塵²⁴⁾やアスベスト²⁵⁾の分析など環境問題に関連した分野にも幅広く応用されている。ここでは環境医学、公衆衛生学分野への応用例として纖毛虫の細胞中に蓄積した殺虫剤の分析²⁰⁾の研究を紹介する。纖毛虫は食物のみならずいろいろな物質を細胞内に取り込む習性を持っている。Diveら²⁰⁾は纖毛虫 *Colpidium campylyum* の培養液に殺虫剤 4', 4'-dichlorodiphenyl あるいは β -endo-

sulfan を加え、それらが *Colpidium* の細胞内に取り込まれるか、もし取り込まれるとすればそのままの形で蓄積されるのかについて調べた。

図10(A)は *Colpidium* の細胞内に取り込まれた不溶性物質(直径1～2 μ m)のラマンスペクトルである²⁰⁾。一方図10(B)は4', 4'-dichlorodiphenylの参考スペクトルである。(A)のスペクトルではバックグラウンドがやや高くなっているが、ラマンバンドの振動数と相対強度に関しては(A)(B)のスペクトルはよく一致した²⁰⁾。この結果は殺虫剤4', 4'-dichlorodiphenyl が確かに *Colpidium* の細胞内に取り込まれ、しかも化学変化を受けずにそのままの形で蓄積されることを示している²⁰⁾。同様の結果は β -endosulfan についても得られた。

5. おわりに

最後にレーザーラマンマイクロプローブ法が現在直面している問題点を指摘しておく必要がある。レーザーラマンマイクロプローブ法で一番問題となるのはやはりレーザー光による試料の損傷である⁸⁾。たとえレーザー出力がわずか10mWでも1 μ m程度までレーザービームを絞るとすると照射部分でのエネルギー密度は 10^{10} W/m²にも達する。このため試料の損傷という問題にしばしば遭遇する。本来非破壊分析法であるものが単なる“破壊”の道具と化してしまうことがあるのである。De Mulら^{15, 16)}は肺組織についてレーザーパワー密度と試料の損傷との関係はかなり詳しく調べている。彼らによれば^{15, 16)}、肺組織そのものはレーザーパワー密度 0.5×10^9 W/m²で目で見て明らかな程度に損傷したが、CaCO₃やMgCO₃などの蓄積物はこの程度のレーザーパワー密度では損傷しなかった。ただし“blue bodies”は 1×10^9 W/m²のレーザーパワー密度で損傷した。

レーザー光による損傷という問題の他に蛍光によるラマン光の妨害という問題がある。ラマン光と蛍光とは常に競争的關係にあるので、蛍光があまり強くなるとラマン光が隠されてしまう。生体物質、特に病態物質は強い蛍光を発することが多いので、この問題を克服できるか否かがレーザーラマンマイクロプローブ法がどこまで一般的な分析方法になりうるかの鍵をにぎっていると言っても過言ではない。“損傷”と“蛍光”という問題はラマン分光法一般に見られる問題点で、これらの問題点を解決するために多くの分光学者が非常な努力をはらっている。“損傷”と“蛍光”の問題を同時に解決するこれらのラマン分光法として注目されるものに近赤外ラマン分光法がある^{27, 28)}。ほとんどの生体物質は近赤外領域には強い蛍光を示さないで、この領域でラマンスペ

クトルを励起すれば蛍光の妨害を受けることはまず考えられない。近赤外光はもちろん“損傷”の問題に関して、もたいへん有利である。いずれにしてもこの2つの大きな問題点が解決されればレーザーラマンマイクロプローブ法は日常的なマイクロアナリシスの方法の1つとして広く医学分野で使われることになる。

文献

- 1) 升島努：顕微フーリエ変換赤外分光法，ぶんせき，886-888，1985.
- 2) 佐藤俊一，稲場文男：レーザー励起蛍光顕微鏡，分光研究，32：341-344，1983.
- 3) 沢田嗣郎，笠井正信：光/電子音響顕微鏡，分光研究，33：307-319，1984.
- 4) Rosasco, G. J., Etz, E. S., and Cassatt, W. A.: The analysis of discrete fine particles by Raman spectroscopy, Appl. Spectrosc., 29, 396-404, 1975.
- 5) Rosasco, G. J.: Raman microprobe spectroscopy, Clark, R. J. H. and Hester, R. E. (Eds.), Advances in Infrared and Raman Spectroscopy, Vol. 7, 223-282, Wiley-Heyden, 1980.
- 6) Delhaye, M. and Dhamelincourt, P.: Raman microprobe and microscope with laser excitation, J. Raman Spectrosc., 3: 33, 1975.
- 7) Dhamelincourt, P., Wallart, F., Leclercq, M., N'Guyen, A. T., and Landon, D. O.: Laser Raman molecular microprobe (MOLE), Anal. Chem., 51: 414A-421A, 1979.
- 8) 石谷炯：ラマンマイクロプローブ，坪井正道，田中誠之，田隅三生編，赤外・ラマン・振動〔Ⅱ〕，133-145，南江堂，1983.
- 9) 尾崎幸洋，吉浦昌彦，岩本武夫，入山啓治：レーザーラマン分光法の臨床医学への応用，レーザー研究 14: 234-245, 1986.
- 10) 尾崎幸洋，入山啓治：レーザーラマン分光法による臨床診断の可能性，昭和61年電気・情報関連学会連合大会講演論文集 Vol.3, 129-132, 1986.
- 11) Ozaki, Y. and Iriyama, K.: Potential of Raman spectroscopy in medical science, Prosser, V. (Ed.), Laser Scattering Spectroscopy of Biological Objects, in press,
- Elsevier, 1987.
- 12) Ishida, H., Kamoto, R., Uchida, S., Ishitani, A., Ozaki, Y., Iriyama, K., Tsukie, E., Shibata, K., Ishihara, F., and Kameda, H.: Raman microprobe and fourier transform infrared microsampling studies of the microstructure of gallstones, Appl. Spectrosc., in press.
- 13) Abraham, J. L., and Etz, E. S.: Molecular microanalysis of pathological specimens in situ with a laser-Raman microprobe, Science, 206: 716-718, 1979.
- 14) Daudon, M., Protat, M. F., Reveillaud, R. J., and Boyer, H. J.: Infrared spectrometry and Raman microprobe in the analysis of urinary calculi, Kidney Int., 23: 842-850, 1983.
- 15) Buiteveld, H., De Mul, F. F. M., Mud, J., and Greve, J.: Identification of inclusions in lung tissue with a Raman microprobe, Appl. Spectrosc., 38, 304-306, 1984.
- 16) De Mul, F. F. M., Buiteveld, H., Lankester, J., Mud, J., and Greve, J.: Raman microspectroscopy in human pathology, Human Pathol., 15: 1062-1068, 1984.
- 17) Huong, P. V. and Plouvier, S. R.: Blue particles in cancerous organs studied by laser micro-Raman spectroscopy, J. Mol. Struct., 115: 489-492, 1984.
- 18) Gijsbers, G., Vrensen, G., Willekens, B., Maatman, D., De Mul, F., and Greve, J.: Raman microspectroscopic investigations of human eye lens, Prosser, V. (Ed.), Laser Scattering Spectroscopy of Biological Objects, in press, Elsevier, 1987.
- 19) 鈴木正子，加藤裕正，和久本貞雄，片桐元，石谷炯：マイクロプローブラマン分光法による歯科用接着性レジーン-象牙質界面層の組成分析，日本化学会第52春季年会講演予稿集，154，1986.
- 20) Dive, D., Devynck, J. M., Leroy, G., Fourmaux, M. N., and Moschetto, Y.: Identification of intracellular particles of pesticides in ciliate protozoa by Raman microprobe, Experientia, 36: 832-834, 1980.
- 21) Carey, P. R.: Biochemical Application of

- Raman and Resonance Raman Spectroscopies, Academic Press, 1982. (邦訳)伊藤紘一, 尾崎幸洋: ラマン分光学—基礎と生化学への応用, 共立出版, 1984.
- 22) 坪井正道, 田中誠之, 田隅三生編: 赤外・ラマン・振動 [I] [II] [III], 南江堂, 1983, 1986.
 - 23) Barry, B. and Mathies, R.: Resonance Raman microscopy of rod and cone photoreceptors, *J. Cell. Biol.*, 94: 479-482, 1982.
 - 24) Blaha, J. J., Rosasco, G. J., and Etz, E. S.: Raman microprobe associated with urban airborne particles, *Appl. Spectrosc.*, 32: 292-297, 1978.
 - 25) 立石和男, 古谷圭一, 菊地正, 石田英之, 石谷炯: ラマンマイクロプローブによる環境中のアスベストの分析, *分析化学*, 30: 774-779, 1981.
 - 26) Yu, N.-T.: Ocular lenses, Spiro, T. G. (Ed.), *Biological Application of Raman Spectroscopy*, John Wiley & Sons, in press.
 - 27) Hirschfeld, T. and Chase, B.: FT-Raman spectroscopy; development and justification, *Appl. Spectrosc.*, 40: 133-137, 1986.
 - 28) Fujiwara, M., Hamaguchi, H., and Tasumi, M.: Measurements of spontaneous Raman scattering with Nd:YAG 1064-nm laser light, *Appl. Spectrosc.*, 40: 137-139, 1986.