

# 3Dラマンイメージングと 油浸対物レンズによる表面下構造からの 化学的情報

## はじめに

コンフォーカルラマンイメージングにより、ミクロンレベルの空間分解能でサンプルについての詳細な情報を得ることができます。得られるイメージング画像は分子構造に基づいており、化学的特性、物理的特性のわずかな変化に極めて敏感です。さらに、サンプルを断面で切断したり、サンプル内部を露出させることなく、半透明で非混濁性のサンプルの表面下の特性を、光学的特性に応じて数百 $\mu\text{m}$ の深さまで、非破壊分析することが可能です。サンプル内のさまざまな深さで測定したラマン画像を順に重ねれば、三次元的な化学的画像を作成することができます。

標準的な顕微鏡対物レンズを使用してサンプル内部のイメージング画像を収集すると、表面の分析では遭遇しない悪化因子が発生する可能性があります。収差や分析結果の質の低下を招きます。屈折率が空気よりも大きい ( $n > 1$ ) 材料を光が通過すると、近軸光は、軸外光とは異なる焦点に集まります。この収差は焦点がぼやける原因となり (図1参照)、この影響は、サンプル内の深度が増すほど大きくなります。これは、実際のサンプリング点の深度を歪め、3D画像がz (焦点) 軸に沿って圧縮されたように見える原因になるだけでなく、焦点の分散により空間分解能やラマン強度の損失の原因にもなります。コンフォーカル像を得るためにアパーチャーを使用すると、収集するシグナルを焦点の周りの領域に限定することにより損失した空間分解能の一部を回復させることができますが、ラマン強度は減少します。したがって従来の顕微鏡対物レンズでは、ラマン顕微鏡の3Dイメージングの可能性を十分に引き出すことができません。

数学的な補正を用いてこの正確さの損失を補正することは可能ですが、収差に対応するには複雑さや完全性の点でばらつきがあり、ラマン強度や空間分解能の損失を回復させることはできません。こういった数学的補正や半経験的な補正の詳細は他文

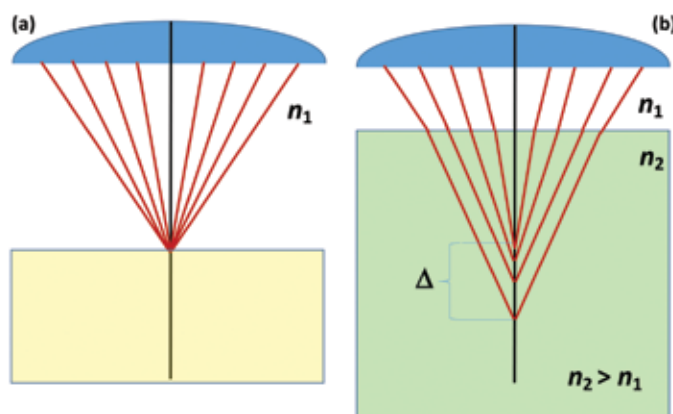


図1. (a) 対物レンズと焦点間の中間媒体が空気の場合の、サンプル表面上への焦点の様子 (b) 焦点のぼやけを引き起こす高い屈折率を持つ透明サンプル内での焦点の様子。

献などに詳しく記載されているため、ここではこれ以上扱いません<sup>1,2</sup>。

収差は、液浸対物レンズを使用することにより光学的に対処できます。対物レンズとサンプルの間のギャップを、空気ではなく水、オイルなどの液体で満たすことにより、収差を低減または限りなく除去できます。本質的には、これによりサンプル表面の光の屈折が無くなり、空間分解能とラマン強度が損なわれることはありません。油浸対物レンズは通常、多くのポリマー材料に類似する値であるおよそ $n \approx 1.5$ の屈折率を持つオイルを使用します。オイルを使用すると開口数を上げることもできるため (効果的な焦点と分解能の向上)、収集するラマン強度を高めることができます。さらに、油浸はサンプルの形状の影響を抑えるため、最終的に優れた3Dラマンイメージング結果が得られます。

本アプリケーションノートでは、油浸対物レンズとThermo Scientific™ DXR™3xiイメージング顕微ラマンを使用して、埋没した構造物や表面下の構造物の3Dラマンイメージングを改善した例を示します。

### 実験

本アプリケーションノートで示す3Dラマンイメージング画像は、DXR3xiイメージング顕微ラマンとThermo Scientific™ OMNIC™xiソフトウェアを使用して作成しました。OMNICxiソフトウェアには、3Dラマンデータセットの収集を簡単に行うためのツールと、インタラクティブな3D可視化機能を搭載した3Dラマンイメージ作成用のツールが含まれています。画像データは、通常の対物レンズとしてOLYMPUS™ MPlanN 100X BD対物レンズ、またはOLYMPUS™ PlanApo 100X油浸対物レンズを使用して収集しました。使用したオイルは、屈折率が1.516の非蛍光性のもので、全てのラマン画像について、サンプルに10 mWパワーの532 nmレーザーを使用しました。

### 結果と考察

コンフォーカル顕微レーザーラマンによる深さ方向分析は、一般的には多層構造のポリマー複合材料の調査に使用されます。この例のために選択した多層構造のポリマー複合材料は、厚さはおよそ124 μmで、5つの異なる層で構成されています。30 μm × 30 μm × 135 μmの体積を、通常の対物レンズと油浸対物レン

ズの両方を使用して、xとy方向に1 μm、z方向に1 μmステップの画像ピクセルサイズで分析しました。油浸対物レンズは、最終的に次の三つの重要な面においてパフォーマンスの向上を示しました。層厚さの正確な測定、S/N (信号対ノイズ) の向上、スペクトル品質の向上です。

図2に、通常の対物レンズ (a) と油浸対物レンズ (b) の両方を使用して得られた3Dラマン画像を示します。図は、MCR (multivariate curve resolution) に基づくラマン画像です。MCR分析は大変有効な分析アプローチであり、OMNICxiソフトウェアは、コンポーネントのラマンスペクトル特性の直接的な情報なしで、層を自動的に分類できます。図3に、同じポリマー複合材料の物理的な断面の2D画像を示します。通常の対物レンズの場合、油浸対物レンズを使用した3D画像と断面から得られた2D画像のどちらと比べても、明らかに層が大幅に圧縮されています。油浸対物レンズで収集した3D画像から得られた層の厚さと断面の2D画像から得られた層の厚さはほぼ一致しています。また、通常の対物レンズを使用したコンフォーカル3D画像での層はあまり明瞭ではなく、焦点のぼやけや空間分解能の損失の影響を受けていることが明らかで、結果的に隣接層のスペクトル特性の混合が増大します。これにより厚さの測定に関しても不確実性がいくらか増すこととなります。これに対して、油浸対物レンズを使用すると、ほぼ実際のサイズの層厚さの情報が得られます。

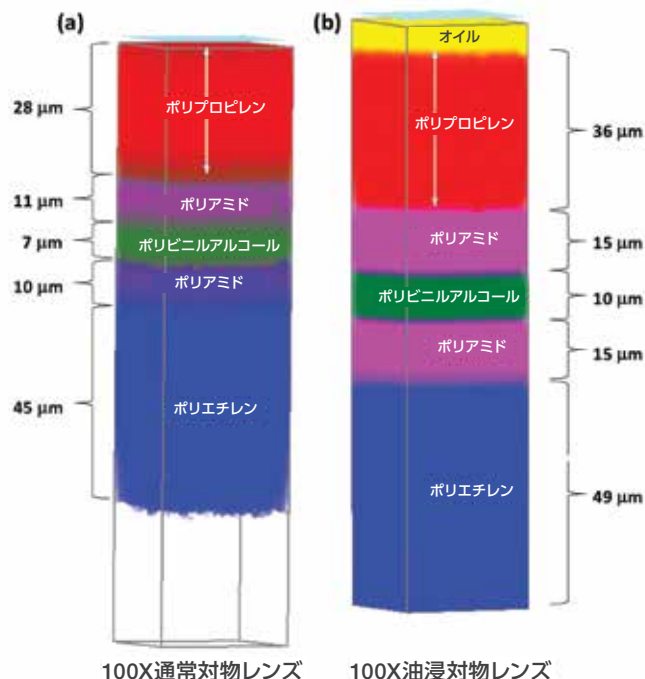


図2. (a) 通常対物レンズを使用した層状のポリマー複合フィルムのMCR分析に基づく3Dラマンイメージング画像。(b) 油浸対物レンズを使用した同じ層状のポリマー複合フィルムのMCR分析に基づく3Dラマンイメージング画像。通常の対物レンズよりも油浸対物レンズでの分析の方が、明確でくっきりとした層を示す。

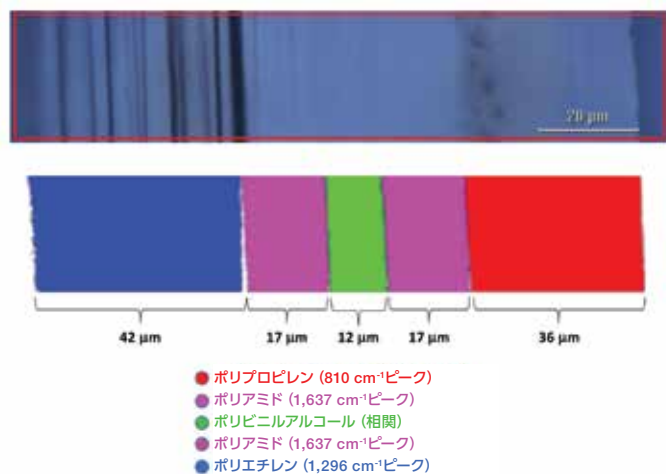


図3. 層状ポリマー複合材料の2Dラマン画像と断面の観察画像。この比較測定は、油浸対物レンズを使用した3Dラマンイメージング画像が実際の層の厚みとほぼ合致する結果を示しており、良好な空間分解能を実現することが分かる。

油浸対物レンズを使用するもう一つの利点は、ラマン強度の大幅な増加です。図4に、二つの3Dコンフォーカル画像データセットからの、ポリビニルアルコール層の中央の位置からのラマンスペクトルの比較を示します。油浸対物レンズ（緑色のスペクトル）で、およそ3倍のラマン強度とS/Nのスペクトルが得られます。

最後に、油浸対物レンズで得られた3Dケミカルイメージでは、さまざまなポリマー層間のスペクトル分離がより優れています。このサンプルでは、ポリビニルアルコール層が、 $1,635\text{ cm}^{-1}$ で強いラマンバンドを持つ二つのポリアミド層の間に挟まれています。このスペクトル特性の相対強度とポリビニルアルコールの相対強度 ( $1,441\text{ cm}^{-1}$ ) の比較は、スペクトル分離の手段として使用できます。断面画像から得られたかなり純粋なポリビニルアルコールのスペクトル (図5、青い線) は、本質的に $1,635\text{ cm}^{-1}$ で

はラマンの特性がないことを示しています。通常の対物レンズを使用して3D体積から抽出したポリビニルアルコールのスペクトル (図5、赤色の線) は、層間のスペクトルの混合の結果である、小さいもののはっきりしたポリアミドの影響を示していますが、油浸対物レンズ (図5、緑色の線) では、隣接するポリアミドからの相対的な影響は大幅に低減されています。以上の結果は、油浸対物レンズによりこのタイプの3Dコンフォーカルラマン深さイメージングにおいて優れた結果が得られ、その結果、層の厚さの測定の正確さが増し、各層からのスペクトルの品質が向上し、測定のS/Nが全体的に向上することを示しています。サンプル断面の切断という複雑な作業を追加する必要がなく、結果は断面の分析に匹敵するものとなります。



図4. 層状ポリマー複合フィルムのポリビニルアルコール層からのスペクトル。ラマン強度とS/Nのいずれも少なくとも3倍向上している。S/Nは $1,441\text{ cm}^{-1}$ でのピークの強度から計算し、二乗平均平方根のノイズは $2,300\sim 2,200\text{ cm}^{-1}$ からの領域で計算した。

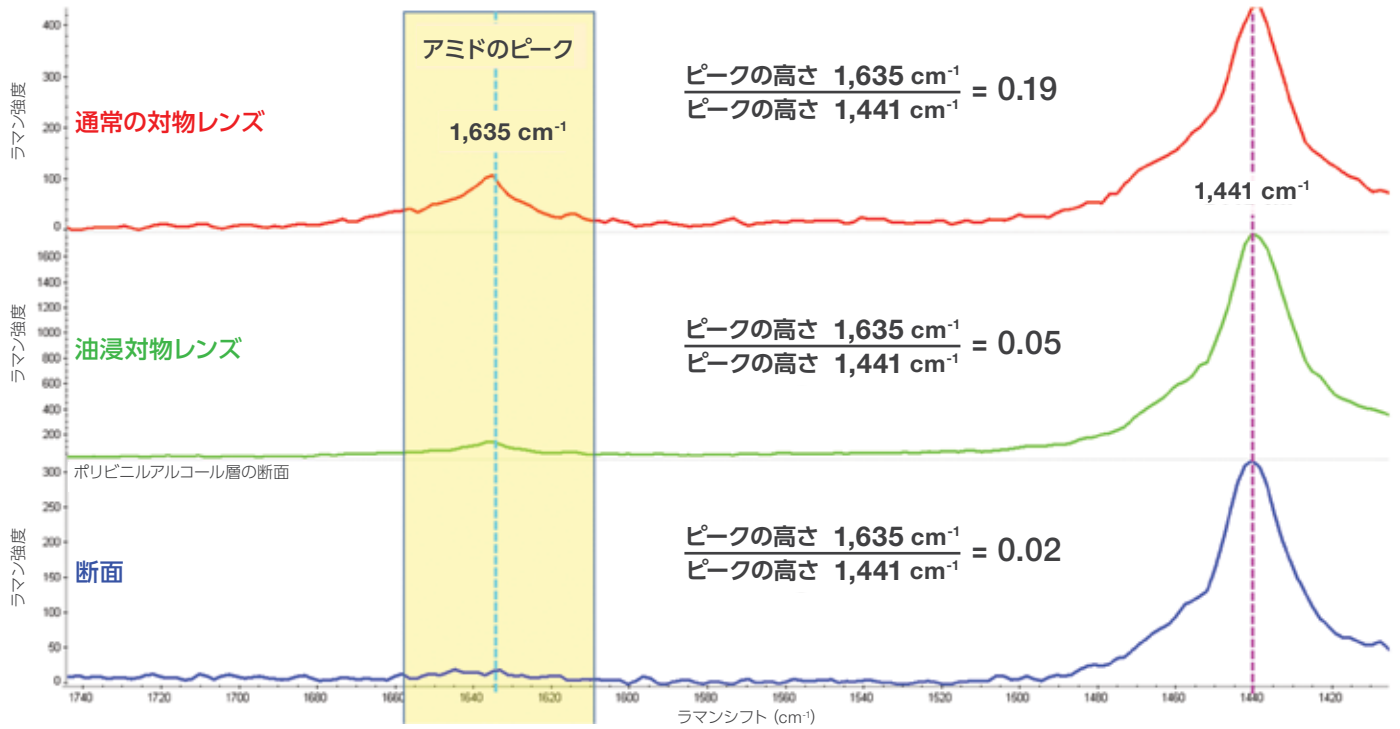


図5. 通常の対物レンズ (赤) と油浸対物レンズ (緑) の両方を使用した3Dコンフォーカルデータセット、ならびに断面の2D画像 (青) から得られた層状ポリマー複合フィルムのポリビニルアルコール層からのスペクトル。ピーク高さの比 (1,635 cm<sup>-1</sup>/1,441 cm<sup>-1</sup>) は、隣接するポリアミド層からのスペクトルの影響を測定し、3Dコンフォーカルラマンイメージングに油浸対物レンズを使用した際に隣接層のスペクトルの影響が抑制されたことを示す。

非平面的形状や表面により屈折率の差の影響が悪化する可能性があります。油浸対物レンズはこの状況でも適用できます。これを示す例としては、直径およそ25 μmのポリスチレン球 (Polysciences, Inc.) のラマンイメージングがあります。ガラス製の顕微鏡スライド上のポリスチレン球の画像は、通常の対物レンズと油浸対物レンズの両方を使用して取得しました。結果を図6に示します。通常の対物レンズでは、ラマン強度の大幅な損失に加えて、球の下側半分のz軸 (画像cとd) 方向に拡張と歪みが見られます。これは屈折の結果であり、また、比較的程度の低いですが、球の曲面や周囲の空気と比べて異なる屈折率に起因する反射効果の結果です。油浸対物レンズで撮像した同じ球 (画像aとb) では、境界がよりはっきりしており、歪みがない明確な球体を示しています。3Dラマンイメージングを実施する際、サンプルの形状が屈折率の差異と相まって、さらなる悪化因子を発生させる可能性があります。この画像は、油浸対物レンズを使用すれば、こういった影響を最小限に抑えられることを示しています。

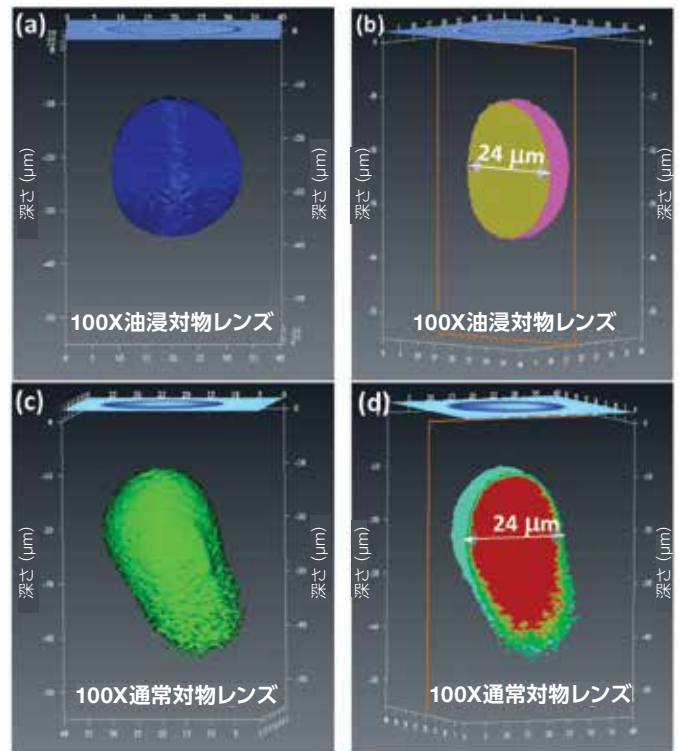


図6. (a) と (b) 油浸対物レンズを使用して収集した25 μmのポリスチレン球体のラマンイメージング画像、(c) と (d) 通常の対物レンズを使用して収集した同じ25 μmのポリスチレン球体のラマンイメージング画像。油浸対物レンズの画像では球体が正確に再現されている一方で、通常の対物レンズの画像では大幅な歪みが見られる。

これらの原理は、例えば二成分繊維など、異なる層と非平面的な特性を併せ持つサンプルにも当てはまります。二成分繊維には、互いに混じり合わない二つの構成成分がありますが、繊維内に不連続の配置（並び、分割、芯鞘など）を取り、その構成成分の異なる特性を利用するために人工的に作製されています。ここに示した二成分繊維は、芯鞘構造を持ちます。繊維は直径およそ20  $\mu\text{m}$ で、外側の鞘はナイロン6、内側の鞘はナイロン6,6です。図7に、通常対物レンズ (d, e, f) と油浸対物レンズ (a, b, c) の両方を使用した、繊維の3Dコンフォーカルイメージングの結果を示します。これらの画像もMCR分析に基づいています。ポリスチレン球のサンプルと同様に、通常対物レンズを使用するとラマン強度は繊維の底に向かって大幅に低下し、繊維の底の部分では全く化学情報を決定できないところまで低下し

ます。また、芯と鞘の間の境界線の位置は明らかに不明瞭です。油浸対物レンズを使用して収集した同じ繊維の3D画像では、断面がはっきりと、かなり対称であることが分かります。

この20  $\mu\text{m}$ の繊維を、層状ポリマー複合材料で行った際と同様に物理的に断面で切断しようとする、問題のあることが判明しました。繊維を封入し断面で切断する単純な方法では、繊維が物理的に変形する結果となりました。樹脂包埋などのさらに厳格な固定技術では、時間と複雑さがさらに大幅に増すこととなります。油浸対物レンズを使用した3Dコンフォーカルラマンイメージングにより、複雑なサンプル調製が不要な非破壊のソリューションが実現しました。

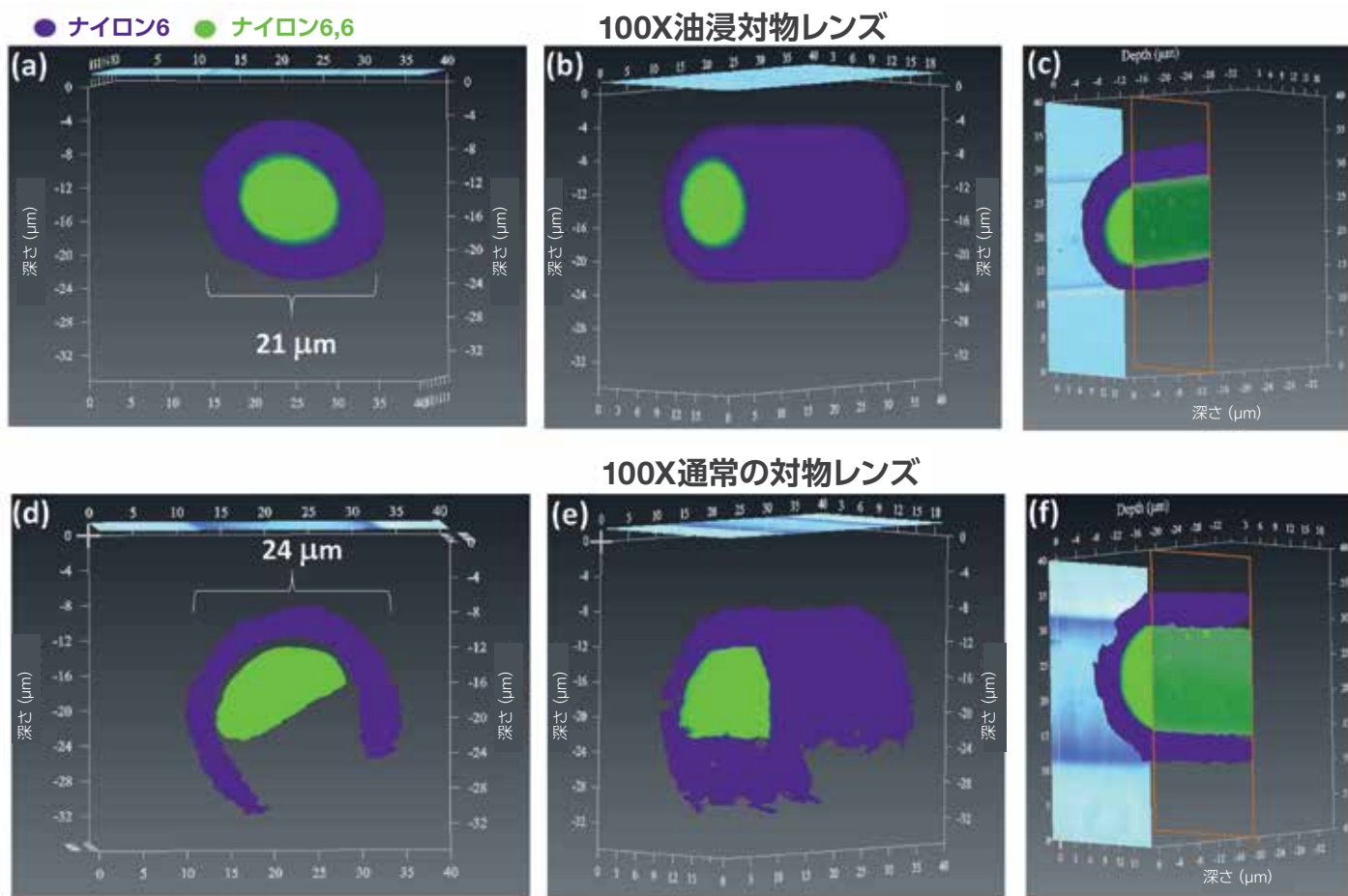


図7. (a), (b), (c) 油浸対物レンズを使用して収集した二成分繊維 (ナイロン6,6 (緑色) とナイロン6 (紫色)、芯鞘配置) のコンフォーカル3DラマンMCR画像。(d), (e), (f) 通常の対物レンズを使用して収集した、同じ二成分繊維のコンフォーカル3DラマンMCR画像。(c)と(f)のビューは、油浸対物レンズと通常の対物レンズのそれぞれの3DラマンMCR画像をz軸に沿って見ている薄片を示す。

## 結論

コンフォーカル3Dラマンイメージングは、内部を物理的に露出させることなく、半透明なサンプルの表面下の画像を取得することができます。通常の対物レンズは表面分析に優れている一方で、サンプル内部を測定するために使用すると収差の影響を受けます。収差の影響は、数学的補正を適用することにより部分的に説明できますが、空間分解能やラマン強度の損失を完全に補正することは不可能です。油浸対物レンズの使用は、この問題に光学的に対処するための有効な手段であり、大部分のポリマーを含め、多くの材料の表面下の構造のイメージング能力を向上させることができます。油浸対物レンズは、DXR3ラマン顕微鏡のオプションアクセサリです。簡単に使用でき、3Dラマンイメージングの能力を最大限に発揮させることができます。

## 参考文献

- 1 N.Everall, *J. Raman Spectrosc.* 2014, 45, 133-138
- 2 M.P. Miguel, J.P. Tomba, *J. Raman Spectrosc.* 2013, 44, 447-452

研究用のみ使用できます。診断用には使用いただけません。  
© 2020, 2022 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.  
All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.  
OLYMPUS is a trademark of OLYMPUS CORPORATION  
実際の価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。  
価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。  
標準販売条件はこちらをご覧ください。thermofisher.com/jp-tc **FTIR102-B2209CE**

## サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

分析機器に関するお問い合わせはこちら

TEL: 0120-753-670 FAX: 0120-753-671

Analyze.jp@thermofisher.com

facebook.com/ThermoFisherJapan

@ThermoFisherJP

thermofisher.com