

顕微ラマン分光装置による測定の実際と医薬品／ バイオ応用の紹介

Practical Methods by Micro-Raman Spectrometer and
its Application for Pharmaceutical and Biology

沼田 朋子

Tomoko NUMATA

奥野 義人

Yoshito OKUNO

中田 靖

Yasushi NAKATA

中 庸行

Nobuyuki NAKA

顕微ラマン分光装置は、顕微鏡下で物質の分子構造や組成情報を分析する装置である。励起光(レーザー光)と試料との相互作用によって発生するラマン散乱光を分光し、スペクトルを測定する。特別な試料調製を必要とせず、大気下において、非接触で、非常に微小な領域を測定することができる。測定に際し、良い測定結果を得るためには、原理や装置の機構を理解し、試料や目的に合わせて適切な装置やアタッチメントを利用することが重要である。装置の普及に伴い、特にラマン・イメージングのための機構やデータ処理の新しい手法が開発されているので、活用が望まれる。例を挙げると、医薬品の研究開発では、化学組成の分析以外に結晶性(多形)の解析に利用されている。また、自動測定システムも開発され、生産工程管理や品質管理にも応用されている。最近では、単細胞の組成分布観察などバイオ分野での研究においても注目を集めている。

Micro Raman spectrometer (or Raman microscope) is an analytical instrument for molecular structure or chemical components under the microscope. It gives spectra of Raman scattering which involves information of interaction between sample material and excitation (laser) light. This method can be applied to non-contact measurement of micro-meter spot area of sample without special sample preparations, under the pressure of atmosphere. To get good results, it is important to understand the principle and select proper system, attachments, and data treatments. Expanding Raman application, new hardware and software especially for Raman imaging has been developed. In pharmaceutical industry, this technique has been applied to chemical components and crystallinity (polymorphism), and automation systems have been developed to be applied to control the production process and quality control. Recently, in many academic reports, it applied to biological applications, such as single cell imaging.

はじめに

顕微ラマン分光装置(Figure 1)の普及にともない、用途や測定の実際についての多くの質問が寄せられるようになって

た。しかし、これらの疑問に答えるためには、ラマン分光法の基礎的な原理、特長についてのある程度の理解が必要であり、日々開発される新技術の情報も必要になる。すでにいくつかの教科書^[1-11]やスペクトル集^[12-14]があるが、ここでは、当社の装置をもとに、できるだけ実際の測定に即して解説する。また、医薬品分野での結晶多形、粒子解析とその自動測定について、バイオ分野での細胞イメージングの事例を紹介する。



Figure 1 Micro Raman spectrometers(HORIBA Ltd.)

ラマン分光法の原理

光が物質に入射した際に、光が物質と相互作用することで散乱光の波長が変化する(非弾性散乱)。励起波長からの変化量は、測定対象となる物質が持つ分子振動のエネルギー

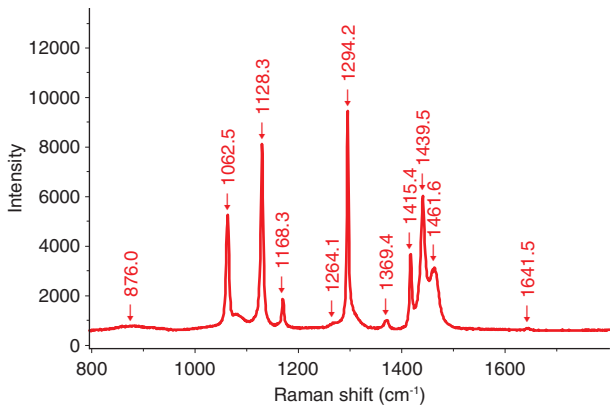


Figure 2 Raman bands of polyethylene
Their vibration modes are C-C Symmetric (1062.5), C-C Asymmetric (1128.3), CH₂ Wagging (1168.3), CH₂ Twisting (1294.2), Umbrella (residual CH₃) (1369.4), CH₂ Rocking (1415.4, 1439.5).

に対応している。この散乱光はラマン散乱光と呼ばれ、ラマン分光法は、物質の分子構造といった組成情報を知る分析法として用いられている。それに加え、負荷、熱伝導度、温度、電気伝導度などの諸物性を調べるためにも利用され、情報量に富んでいる。

ラマン分光分析装置は、入射光源(レーザー)と分光器、検出器で構成され、ラマン散乱光のスペクトル測定に用いられる。Figure 2に示すラマンスペクトルは、ある波長域に分子振動由来の輝線を持っていることを示している。ラマンスペクトルで重要になるのは、この輝線の立つ位置である。スペクトルの横軸は、波長の逆数をとった波数[cm⁻¹]で表示するのが一般的で、励起光の波長を基準とし、その波数シフト量で示される。

ラマン分光法の特長

分子振動エネルギーの違いを測定できるラマン分光法は、有機化合物の分子構造の違いを調べることができることから、同じ振動分光法である赤外分光法とよく比較される。

- ①炭素間の二重結合を有する芳香環や不飽和結合に対しては赤外分光より高い感度を持つ。
- ②赤外分光で利用されるフーリエ変換赤外分光光度計(FT-IR)が、多くの場合、光学部品に臭化カリウム(KBr)結晶を使用していることから、スペクトルの測定下限が350 cm⁻¹までに制限される。ラマン分光法では約5~200 cm⁻¹といった低波数までのスペクトルを測定することができる。そのため、有機物の骨格伸縮振動や無機物などの結晶の格子振動を測定する場合に有利となる(Figure 3)。
- ③ラマン分光法は、光の散乱を測定する手法であることから、試料の前処理なしに非接触で測定できる特長を持つ。そのため、気体、液体、溶液、固体、結晶、繊維、フィルム等物質の状態に関係せず、あるがままの状態ですべて測定することができる。

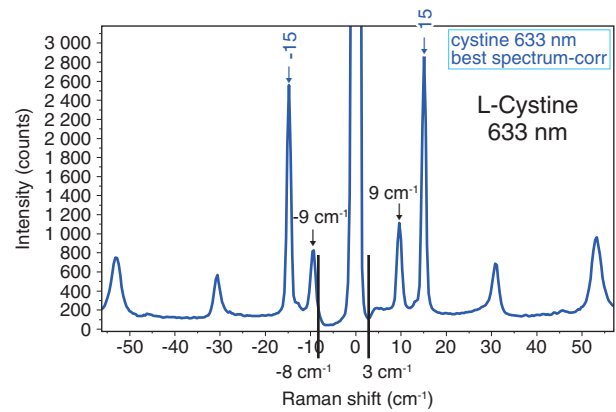


Figure 3 L-Cystine Raman spectrum in Low frequency region by LabRAM HR Evolution with ULF (Ultra Low Frequency module)

- ④可視のレーザー光で励起する場合、スペクトルは可視光領域に展開され、一般にガラスのような透明な窓材を通して対象試料を測定することができる。
- ⑤水のラマン散乱が比較的弱いことから、容易に水溶液中の溶質のスペクトルを測定することができる。水は赤外線をよく吸収するため、赤外分光は水溶液の測定が難しい。通常の分光光度計で使用されるような角セルを使った水溶液の測定はできない。一方、ラマン分光なら透明な容器に入った水溶液や有機溶剤を、容器の外から直接測定することも可能である。緑色のレーザーを使用すれば褐色ガラス瓶の中の溶液も簡単に測定することができる。
- ⑥顕微赤外分光の空間分解能が10 μm程度であるのに対して、波長の短い可視領域の分光を行う顕微ラマン分光法では、約1 μmという高い空間分解能を持っている。

X線回折は、結晶構造を解析することができ、無機物の同定にも広く使われている分析方法であるが、X線を使用するため微小領域に高輝度のX線を照射することは簡単ではない。そのため、微量物質の測定や顕微分析にあまり適していない。これに対して、顕微ラマン分光法は無機物の結晶構造に対して高い識別能力を持ち、かつ、顕微鏡下で微小領域の測定が可能である。ミクロンオーダーでの結晶相の判別にも利用されている。

ラマン分光は散乱分光であることから、表面分析手法の一つとして知られている。光学顕微鏡が、試料表面の色や形状の情報を与えるのに対して、ラマン分光は試料表面の化学情報を与える。また、表面分析手法として知られるX線光電子分光法(ESCA, XPS)、オージェ電子分光、電子顕微鏡などは、測定に高真空を必要とするのに対して、ラマン分光は大気中で測定できるというメリットがある。加えて、分子および結晶相の情報を得ることができる。

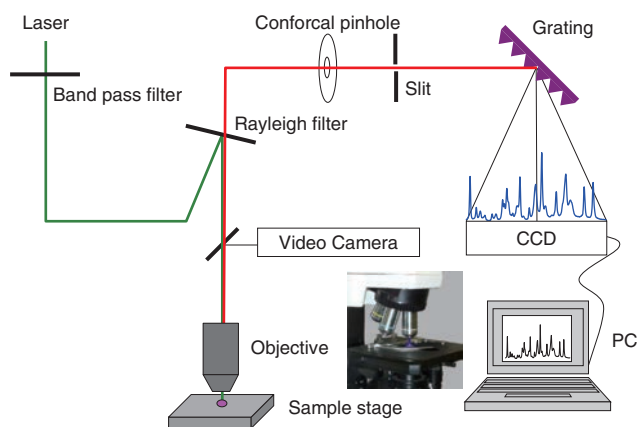


Figure 4 Optical components and light path of micro-Raman spectrometer

装置の構成

顕微ラマン分光装置の構成をFigure 4に示す。入射光源であるレーザー光は、装置前面にある顕微鏡に導かれ、光学顕微鏡で使用される対物レンズを通して試料に照射される。対物レンズの焦点位置から発生した散乱光は再び対物レンズにより集光され、レイリー光カットフィルタを通して微弱なラマン散乱光を取り出す。このラマン散乱光は、スペクトル分解能を決めるスリットを通して分光器に導入される。分光器の回折格子(グレーティング)により分散した光のスペクトルは、マルチチャンネル検出器を使って測定される。途中の光学系にある共焦点面に配置されたピンホール(共焦点ホール)は、深さ方向の分解能を決める空間フィルタとして働く。

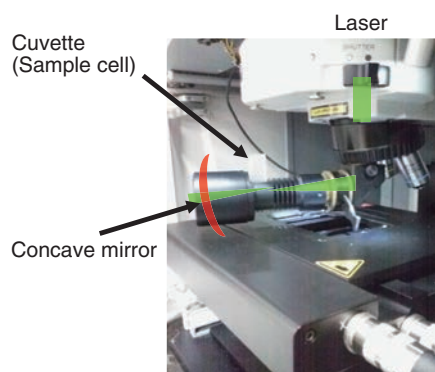
測定の実際

固体試料は、顕微鏡観察できるようにスライドガラス上などに採取する。繊維・フィルムなどは測定中に動くため試料固定が必要である。粉体は対物レンズに付着しやすいので、平らにして高低を無くす。

液体試料は、透明で、十分な量がある場合、1 cm角セルが使用できるマルチパスセル(Figure 5: 液体測定用ユニット)を使う。少量、高粘性、色が付いている液体はスライドガラスに1滴分取してそのまま測定する。カバーガラスを使いレンズへの液体の付着を避けるとよい。蒸発しやすい試料は、小さなカップに入れ、カバーガラスで蓋をして測定する。ガラス容器ごと測定したい場合、レーザ90° 曲げユニット(Figure 6)を用いて、ステージ上に載せた容器の横からレーザを照射し測定する。

厚みのある試料を測定する場合がある。当社装置に採用している光学顕微鏡BX41^{*1}では、ステージ付け位置の調整ができ、28 mm以下の厚みであれば測定可能である。ローステージホルダ(オリンパス製)を使うと、50 mmの厚みまで対応できる。それよりも大きな試料を測定するのであれば、ステージではなく対物レンズ側が上下する光学顕微鏡BXFM^{*1}搭載のラマン分光装置を選択するとよい。他には、加熱・冷却測定の場合は、光学顕微鏡用の温度コントロールステージ(Figure 7)を利用することができる。Figure 8に水が低温で凍るときのラマンスペクトル変化を示す。試料温度制御は、コントローラだけでなくラマン用ソフトウェアLabSpec6から行うこともできる。同様に、湿度コントロールステージも利用でき、医薬品の水和による結晶構造変化の測定に利用されている。反応容器中の試料を直接測定したい場合は、ファイバースコープを利用することができる。

対物レンズは、測定対象によって選択する。装置付属の対物レンズの場合の目安をTable 1に示す。凹凸のある試料には長作動対物レンズ、紫外(UV)および近赤外(NIR)レーザによる測定には、それぞれ適当なレンズが用意されている。対物レンズは同じ倍率でもNA(開口数)が大きいほど空間分解能が高くなる。焦点位置からの散乱光を集光する場合NAが大きいほど明るいので、シリコン結晶のように試料表面からの散乱光を集光する場合、100倍NA 0.9の対物レンズによって感度よく測定できる(Figure 9)。一方、



Picture of multipath cell

Figure 5 Multipath cell attachment

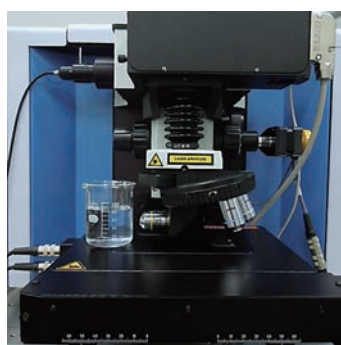


Figure 6 Liquid on sample stage measured with side illumination system



Temperature Range • -190~600°C
• RT~1500°C

Figure 7 Temperature control stage

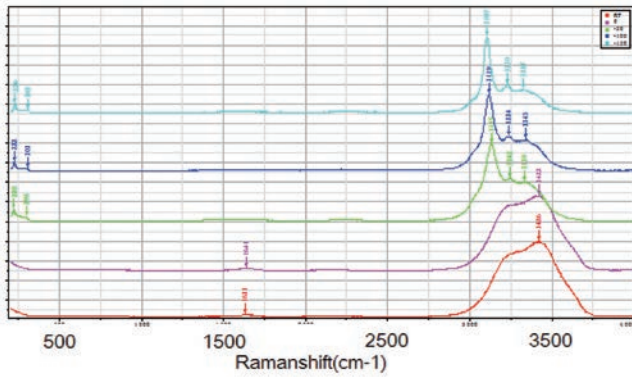


Figure 8 Water Raman spectra in various temperatures Spectra are in room temperature (Red), 0 deg (Purple), -20 degree (Green), -100 degree (Blue), -120 degree (Cyan)

Table 1 Selection of objective lens for the state of samples

Samples		Objective
Bulk samples		× 100
Powder	White or clear samples	× 50
	colored samples	× 100
Gass, liquid		× 10

Note : These are the standard objective lenses of LanRAM HR evolution

試料が透明な場合、焦点位置以外からも散乱光が発生するので、アスピリン結晶の場合では、倍率50倍NA 0.75のレンズの方が感度よく測定できる。液体セルを使った測定では、マクロレンズを用いる。この場合、共焦点ピンホールを開いて測定することでより高い感度が得られる。新製品の顕微対物鏡UVI 74x^[15]は、反射光学系の採用により色収差が発生しないため、紫外(UV)から近赤外までの波長範囲で、ほぼ一定の透過率80%が得られる。レンズからの自家蛍光の影響も無く、広い波長範囲で回折限界近い高い空間分解能が得られる。LabRAM HR Evolutionのように可視域に加えUVやNIR領域も測定する場合や、フォトルミネッセンスのように広い波長範囲にわたる測定には理想的な対物レンズと言える。Figure 10に炭化シリコン(SiC)結晶のフォトルミネッセンス(PL)測定の実例を示す。UVI 74x(反射対物鏡)の測定結果と比較して、NUV用対物レンズを使用したときは、色収差の影響により500 nm～のイエローバンド強度が低下している。

液浸対物レンズも利用できる。レンズと試料の間を水や特殊な油で満たすことで1.0以上の高いNAが得られる。NAの高い対物レンズを使用することで、深さ方向の分解能も向上する。5層ラミネートフィルムの深さ方向プロファイル測定した結果をFigure 11に示す。x100油浸対物レンズでは、各層のプロファイルの境界位置での変化が急峻で、高い空間分解能が得られている。

*1 : BX41, BXFMはOLYMPUS製光学顕微鏡の型式

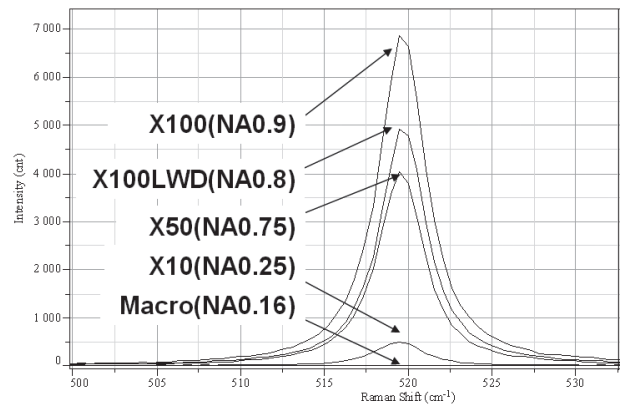


Figure 9 Variation of silicon Raman band intensity using several objectives from NA=0.16 to NA=0.90

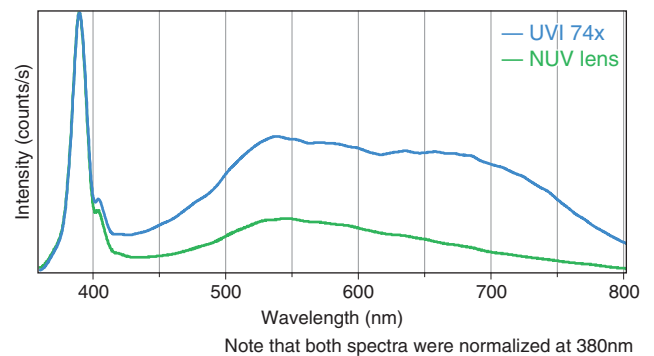


Figure 10 Photoluminescence spectra of Silicon Carbide (SiC) Blue and Green lines are by UVI 74x objective and NUV objective lens, respectively. The spectra were normalized at 380nm peaks.

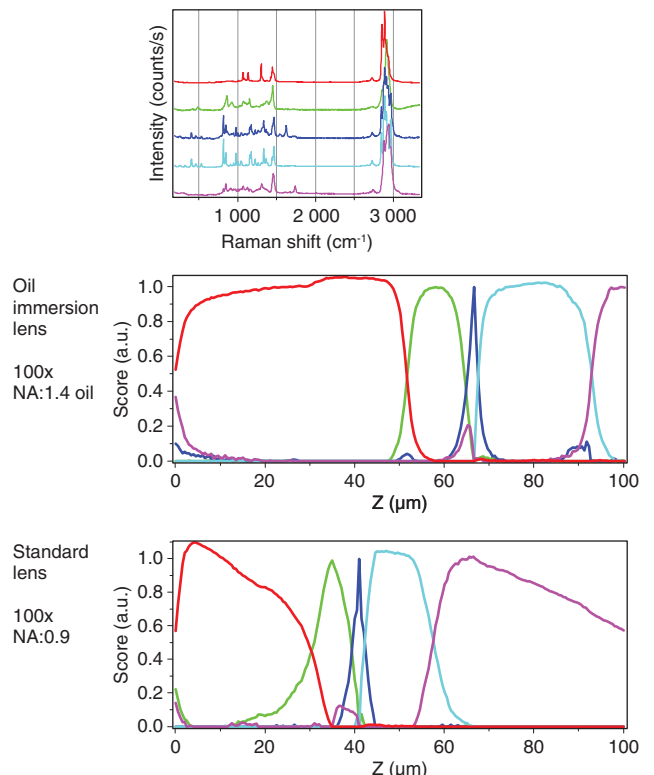


Figure 11 Depth profiles of five layers polymer film with oil immersion lens (MPLAPON100XO*) and standard lens (MPLN100X*) by LabRAM HR Evolution. The model spectra for each layer are also shown in top figure. * : Model by OLYMPUS

ラマン・イメージング

ラマン・イメージングの例として、ラマンバンドピークの強度から測定領域に含まれる化学成分の分布を示すイメージの作成方法を述べる。

試料面内に複数の化学成分が存在したとき、それぞれ異なる互いに重ならないピークを指定することによりその強度を使って各成分の分布をイメージにする。しかし、薬品結晶のようにピークが非常に多く、各成分に対して互いに独立なピークを見つけ出すことが困難な場合もある。また、後述するマッピング測定の高速度に伴い1ピクセル当たりのデータ採取時間がmsecオーダーになると、ノイズが大きくなりイメージが劣化する。このため、最近では、多変量解析によるスペクトル・イメージングの技法がよく用いられるようになってきた。データ処理には、試料走査方向に対応するX軸、Y軸に加え、スペクトル横軸の次元をZ軸にとった3次元のハイパーキューブ・データを取り扱う (Figure 12)。これらのデータセットから、互いに独立なスペクトル成分を多変量解析の手法によりモデルスペクトルとして抽出し、測定したポイントごとに各モデルスペクトルの寄与度を計算し、その寄与度の大きさを使ってイメージを作成する。目視でピークを選択する従来の方法と比較し、よりわずかな差を識別して各成分のイメージを作成することができる。スペクトルのS/N比は、イメージの質(コントラスト)に直接影響を与える。なぜなら、スペクトルの差異によってイメージが作成されるからである。Figure 13に1ピクセル当たりの測定時間を変えて測定したアセトアミノフェン結晶のイメージの変化を示す。測定時間をかけてより高いS/N比のスペクトルを測定したほうが、より明瞭なイメージを得ることができる。

一方、スペクトル分解能も重要で、いくら高いS/N比で測定してもスペクトル分解能が低すぎて本来のスペクトル波形の情報が失われてしまうとその成分のイメージを作成することができなくなる。一般にラマン分光のスペクトルは高いスペクトル分解能を必要とすることが多い。Figure 14に示すスペクトルでは、中央1600~1630 cm^{-1} のピークは、高スペクトル分解能の場合(a)では明らかに3つのピークが存在するが、低スペクトル分解能(b)ではショルダーのピークの情報が失われてしまっている。同条件で測定したラマンマッピング測定の結果からは、高スペクトル分解能の場合は4つの成分の分布をイメージ化することができるのに対して、低スペクトル分解能では3成分までしかイメージ化することができなかった。高スペクトル分解能条件下での

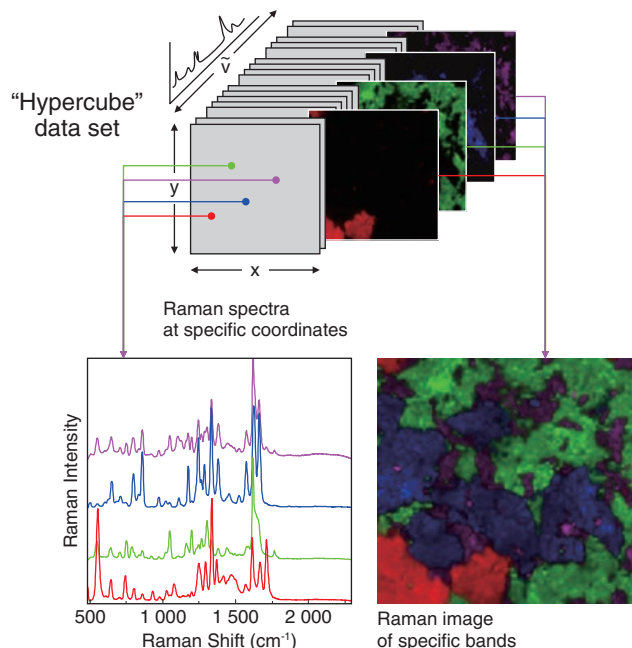


Figure 12 Hyper cube spectral data set

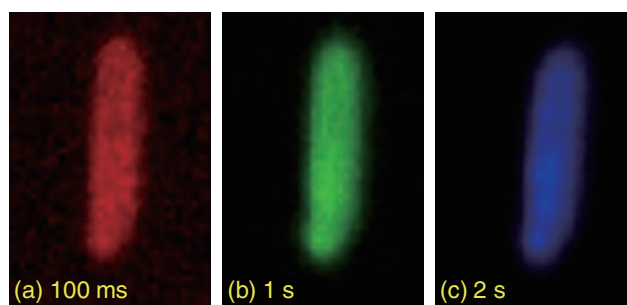


Figure 13 Raman image of acetoaminophen in various sampling time. Time of data sampling for each pixel is shown in figure

ラマンイメージ(c)は、低スペクトル分解能の場合(d)と比較してより詳細な構造がイメージ化されている様子がわかる。ラマン分光の場合には、散乱光の強度は測定対象物質が変わると1桁以上変化する。それゆえ、マッピング測定時

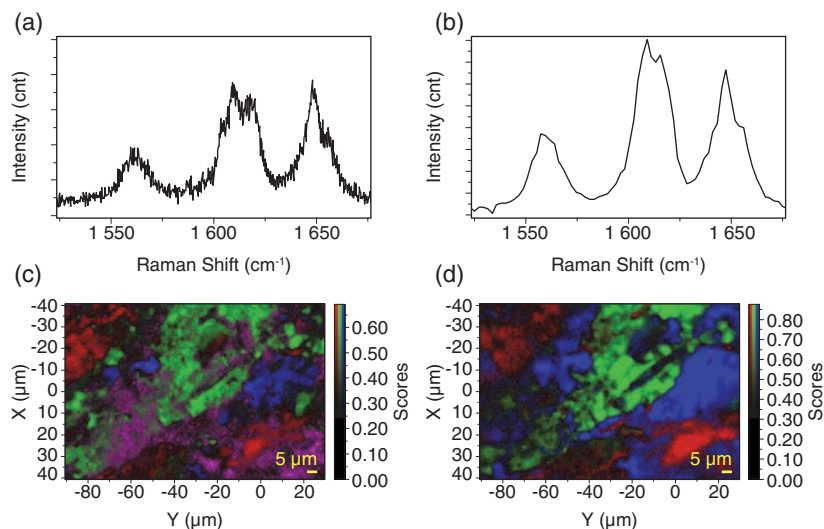


Figure 14 Effect of spectral resolution on Raman imaging Spectra (a) and (b) correspond to Raman image (c) and (d), respectively.

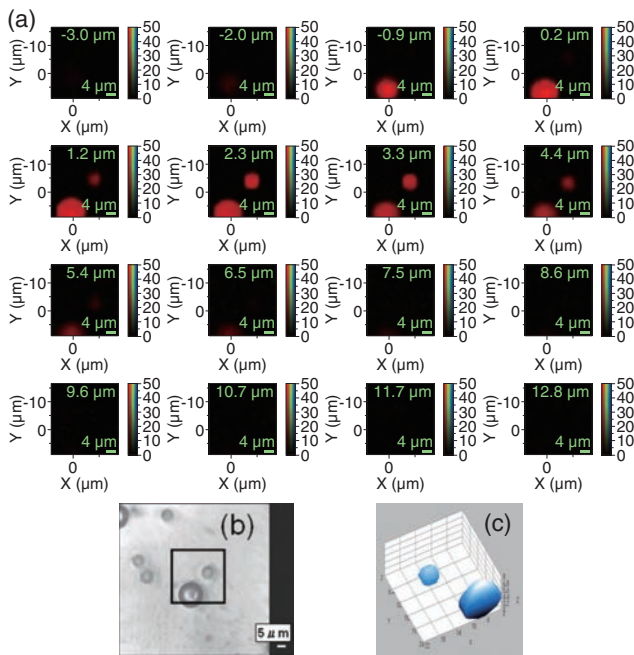


Figure 15 3D confocal Raman imaging 3D image (c) is reconstructed with 2D Raman images (a) for the region shown in optical image (b)

間は、結局は試料によって決まることになる。仮に通常のスペクトル測定に1秒の測定時間を要する試料を、測定時間100秒をかけて100点のマッピングをしていたとする。新しく高速マッピングシステムを導入し、10000点の高精細マッピングで測定するときの目安は、全測定時間が100秒になるように1ポイント当たりのデータ採取時間を10 msecにするとよい。

共焦点ラマン分光測定の場合は、深さ方向の分解能を生かし特定の深さのラマンイメージを測定することができる。それゆえ、試料前処理で薄膜化しなくても、バルク試料をそのまま測定することで表面の成分分布を観察することができる。成分が3次的に分布しているブレンドポリマーの場合でも、上下の成分が重ならず高いコントラストの表面イメージを作成できるのはこのためである。Figure 15に深さ方向の焦点位置を変えて測定した例としてフィルム中のポリスチレンビーズの3Dラマンイメージを示す。以上、ピークの強度によるスペクトラル・イメージングについて説明したが、他にも、半値幅、ピークシフト量など、スペクトルに含まれる情報を使って、様々な情報に対する空間的な分布をイメージとして作成することができる。Figure 16に、ラマンバンド強度、ピークシフト、半値幅、そして、同時に観測されたフォトルミネッセンス(PL)によるダイヤモンドのラマン・イメージングの例を示す。

1966年にDelhayeら^[16, 17]が、ラマン分光法における顕微鏡システムの効果を示してから、その感度は数桁も向上している。顕微ラマン分光装置が開発された初期の段階で、ポイントマッピング/ラインスキャンニング/グローバルイメージングの3種類の基本的コンセプトが提案されてい

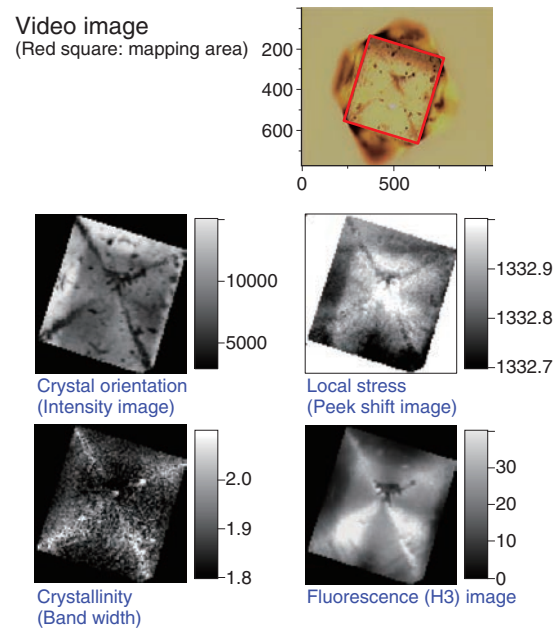


Figure 16 Raman images of diamond (Data Courtesy of M. Mermoux, LEPMI, Grenoble)

る^[18]。その後、様々な形で製品化されているが、次に各手法の一般的な特徴を解説する。

ポイントマッピング (Figure 17a)

最も基本的なイメージ作成方法である。光学系は通常のスペクトル測定のシステムとまったく同じで、試料ステージを2次的に走査することにより連続的にマッピング測定を行う。この手法の特長を次に列挙する。①各測定ポイントの単一スペクトルは通常測定と同じ高い品質のスペクトルである。②マップの測定点の間隔に関わらず各スペクトルの品質は同じである。③マッピング領域の設定の自由度が高く、試料に多少の凹凸がある場合でもそのまま測定できる。④ラマン分光の場合、共焦点性を生かしたスペクトルが得られる(深さ方向の空間分解能を有する)。

ラインスキャンニング (Figure 17b)

データ収集時間を短縮するために、線上の複数点のスペクトルを一度に測定する。2次元のイメージを得るためには、試料は測定線に対して垂直な方向に走査しなければならない。励起レーザービームは、ラスタースキャン、または、シリンドリカルレンズにより線上に照射される。検出器にCCDなどの2次元マルチチャンネル検出器(MCD)を用い、線上の各点から発生したラマンイメージを分光器のスリット方向に展開して入射することで、スペクトル軸に垂直な方向に位置情報を展開する。この手法の欠点としては、①しばしばスペクトルの質がポイントマッピングと比較して劣ること、②ラマンの場合、レーザーを線上に展開する幅に制約があることや、表面が平滑であることなどポイントマッピングと比較して測定上の制約が多くなる点が挙げられる。

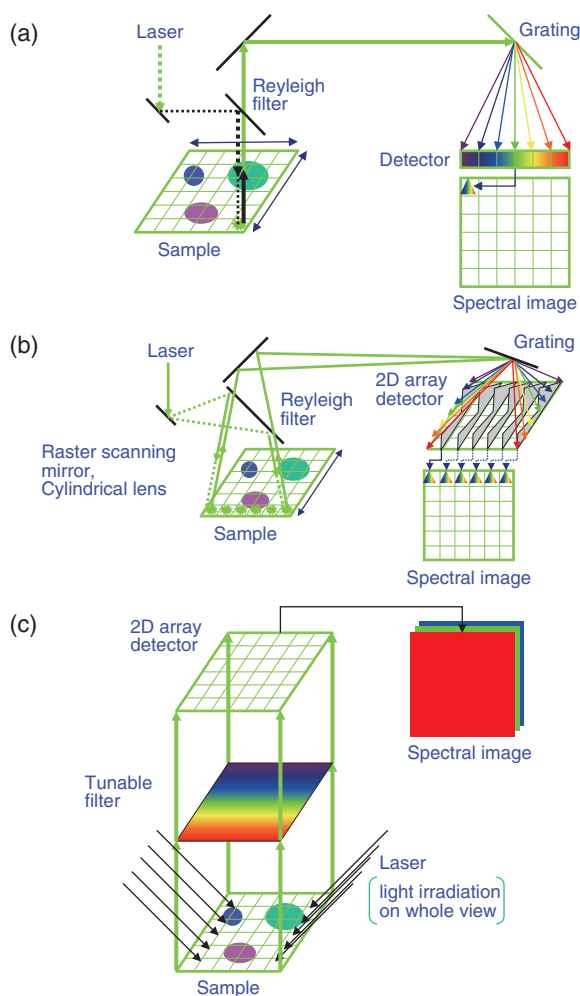


Figure 17 Schematic diagram of Raman imaging system (a) Point mapping, (b) Line scanning, (c) Global laser illumination

グローバル・レーザ・イルミネーション (Figure 17c)

もっとも早くイメージを得ることができる手法であり、その特長は、①特定波長(波数)のイメージを一度に測定することができる。②水平方向の試料走査は不要であることが挙げられる。レーザビームを広げて測定領域全域に対して照射し、バンドパスフィルタを利用して発生したラマン散乱から特定波長のみをCCDイメージとして測定する。欠点としてはスペクトル測定ができないことである。そこで、AOTF)などの波長可変フィルタを使って、フィルタ波長を走査することによりハイパーキューブ・スペクトルデータを測定する装置が開発されているが、ポイントマッピングのシステムと比較してスペクトル分解能が低い、スペクトル走査には時間がかかる、イメージ倍率によってスペクトルの質が変化するという課題が残っている。測定上の制約が多く、共焦点光学系が使えないこともあり、あまり普及していない。

次に、最新の測定手法として、超高速ラマン・イメージングモジュールSWIFTとDuoScanイメージング・テクノロジーについて説明する^[19]。

通常行われるポイントマッピングでは、通常測定で得られ

る感度をそのまま生かせるので、ラマン散乱特性が低い試料にも適用できる。加えて、高分解能測定にも、広い面積に対しても適用することができる。そのようなマップの典型的な測定時間は、1ポイントあたり1秒から10秒程度である。それゆえ、全測定時間が重要になってくる。最新の超高速モジュールSWIFTxsを使用すれば、この露光時間を最短0.72 msec/ポイントまで小さくできる。新型SynapseEMCCDと組み合わせて、より高速で高感度のラマン・イメージングが可能になる。これにより、広い領域のサーベイスキャンが高精細のラマンイメージとして数分から数秒で測定できるようになる。SWIFTは、まさにラマンマッピングの新時代の到来を告げるものである。測定時間を犠牲にすることなしに、しかも、高空間分解能を維持したままでラマン分光のメリットを生かすことができる。

DuoScanイメージング・テクノロジー^[20]は、新しいイメージングモードを実現するもので、顕微ラマン分光装置LabRAMシリーズで利用できる。ソフト上で指定したライン上の範囲や2次元マッピングのための領域に従って、二枚の走査ミラーによってレーザ照射光を試料上を移動する。走査デバイスを使ったマッピングでは、通常、光学系にレンズのような屈折を利用した光学素子を使うために使用波長範囲は可視光領域に限定される。DuoScanシステムは、この点を改良し、深紫外から赤外までマッピング測定できるようになった^{*2}。さらに、DuoScanを共焦点光学系と組み合わせるというユニークな設計により、水平・深さ方向ともに最高の空間分解能で測定できる。本システムには、次の3種類の測定モードがある。①平均化モードでは、レーザスポットが連続的に試料表面を走査した状態で測定するので、適当な対物レンズを選択することで、1 μm~300 μmまでのマクロスポットの平均スペクトルを測定することができる。また、試料ダメージを抑える効果もある。共焦点光学系により深さ方向の分解能も高い。②ステップバイステップモードでは、指定された測定対象領域を、一点一点ずつ測定しながら走査していく。その際、レーザスポットが試料上を移動し走査していくので、電動ステージによって試料を動かす必要はない。レーザビームの位置安定性と再現性もよく、ピエゾステージに匹敵する高い精度(最小50 nm間隔)でビームを移動させることができる。それゆえ、イメージは光学的分解能を生かした高い位置精度で生成される。③マクロマッピングモードでは、レーザビームをある一定の面積に対して高速に走査して、その領域の平均スペクトルを取得する。そして、平均スペクトルを取得した領域が重ならないで連続でつながる間隔でステージ移動を行い、測定対象領域全体をマッピングしていく。大きな試料の表面を観察して組成分布を調べたり、干草の中の小さな針を見つけるような異物を探索したりする場合に有効である。

*2: 適用波長範囲に合わせて顕微鏡対物レンズの選択が必要

医薬品への応用

ラマン分光法は、有機分子の指紋スペクトルが測定できることから、赤外分光と同様の高い同定能力を持っている。前処理なしで、非破壊・非接触で測定できることから、原薬分析、受け入れ検査における品質管理でもラマン分光の応用が検討されている。水溶液中の薬剤を測定できることから、抗体医薬品への応用も期待されている。特に、顕微ラマン分光法は高い空間分解能を持っているので微小試料の分析に威力を発揮する。例えば、微小粒子異物の同定による生産工程最適化や、医薬品パッケージの多層フィルムの構造解析といった事例がある。また、X線回折と同様に、結晶構造の違いを判別できる点でも注目され、特に数 μm の結晶粒子の測定では、特に結晶多形の解析手法として、後述する自動測定システムが利用されている。

薬剤そのものではなく、医薬品パッケージの材料や混入異物、薬剤の相互作用の解析にも顕微ラマン分光が用いられている。パッケージは、製品薬剤との相互作用がなく高い密閉性が求められる。加えて、扱いやすく見た目が良い、環境にやさしく規制に対応しているといった要件を満たす必要がある。そのために、多種多様な形態と素材を組み合わせた構造をしている。錠剤用包装の多層フィルムは、数種類の金属箔(アルミ)と高分子フィルム(ポリエチレン、ポリエステル、紙など)の組み合わせにより構成され、特に、柔軟性と密閉性が重視されている。その構造解析例としては、①各層の材質の同定、②層の厚み、③溶解性(糊化)の評価、④密閉性が悪い場合の原因解析(接着層の解析)、⑤層中の欠陥および内包異物の同定などがある。パッケージ内薬剤の解析としては、①成分分布の解析、②薬剤変性(結晶転移)③パッケージへの活性成分の浸透 ④薬剤表面構造の不良解析 ⑤皮膚浸透剤中の結晶化成分の同定および原因解析などの事例がある。

結晶多形(ボルモルフィ)判別の事例を紹介する。薬剤の可溶性と生体適合性は多形に依存しているため、製薬業界において、結晶多形の制御は重要な課題となっている。また、創薬の特許申請においても分子構造に加え結晶多形は重要

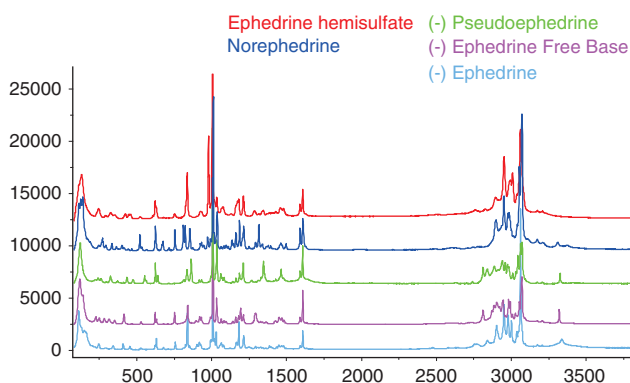


Figure 18 Raman image of ephedrine polymorph forms

な項目となっている。多形の決定は、通常X線回折法が用いられるが、ある程度の量のサンプルが必要で、化学的な情報は直接的に得ることができない。そこで、創薬時の多形のスクリーニングでは、結晶粒レベルで判別できる高い空間分解能を持つ顕微ラマン分光が利用されている。多形スクリーニングに利用されるマルチウェル自動測定システムでは、マルチウェルプレートの位置情報などの条件を読み込み、自動測定を行う。この場合も多変量解析機能により、各セルのスペクトル解析を行うことができる。ある条件下では、特定の多形体から別の多形体に非常に簡単に転移する。例えば、相対湿度が制御できなければ結晶の含水量が変化するために擬似多形の相が変化する。他に、補形薬と医薬活性成分との混合や錠剤を圧縮する製造条件が変わると含水量と結晶形が変化することが知られている。製品の製造過程における結晶形管理(結晶転移の評価)にもラマン分光が利用されている。Figure 18に様々なエフェドリン結晶のラマンスペクトルを示す。塩の形成による多形や、擬似多形によって、スペクトル波形の微細な差異が生じている。Figure 19にラマンマッピングによるエフェドリン多形体の識別の様子を示す。

医薬品の混合粉体の測定には、粒子解析ソフトウェア(ParticleFinder)^[21]が有効である。基板上に均一に分散させた粒子の位置座標を検出し、自動的にラマン測定を行う専用ソフトである。数百-数千個の粒子の位置をビデオイメージからすばやく検出し、粒子サイズ/形状とラマンスペクトルによる化学組成情報を関連づけて収集することができる。いったん粒子の位置が検出されれば、粒子形状と粒子径のパラメータが 粒子毎に計算され、統計パラメー

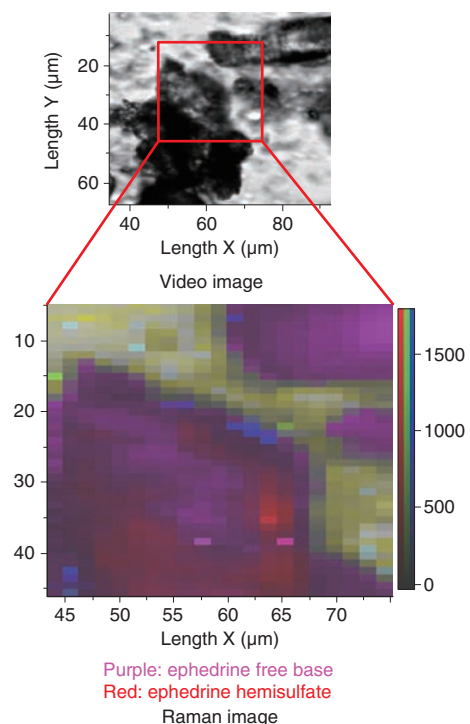


Figure 19 Raman imaging of ephedrine polymorph forms

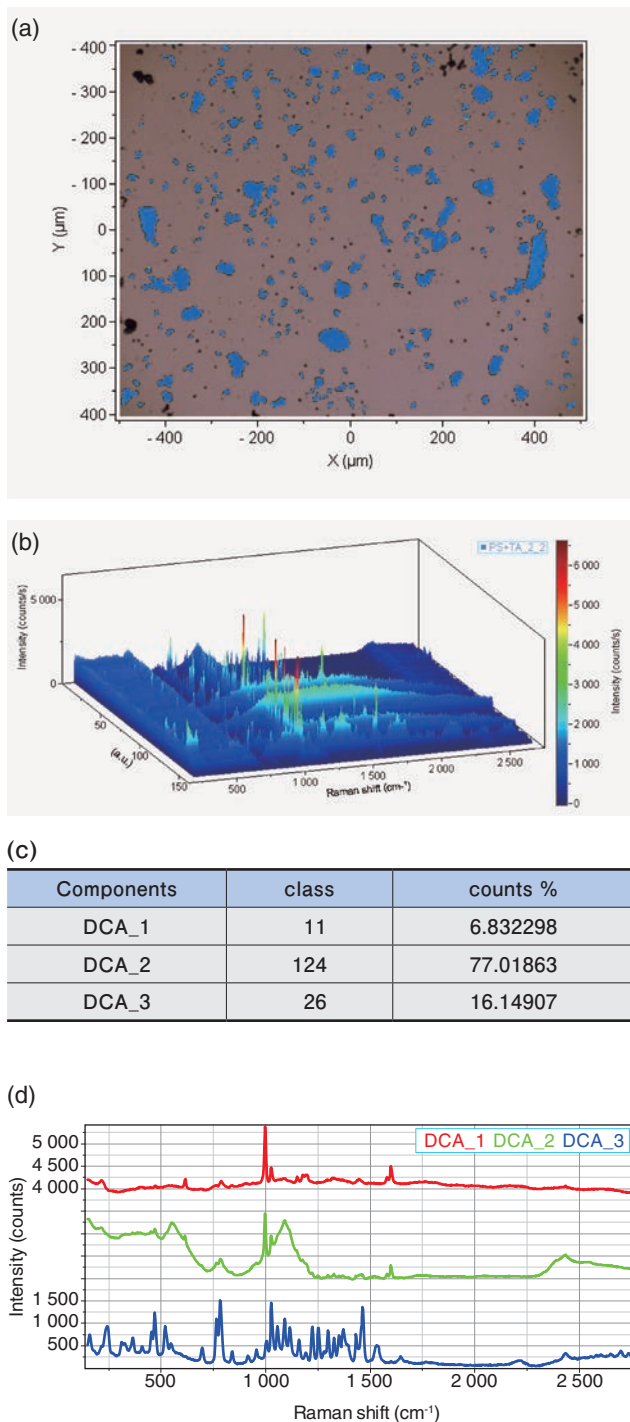


Figure 20 Output example of Particlefinder (a)Mixed particles with Polystyrene beads and tranexamic acid powder were dispersed on slide glass. (b)Raman spectra of whole particles detected by Particlefinder (c)Ingredient ratio by Multivariate Analysis (d)Extracted spectra

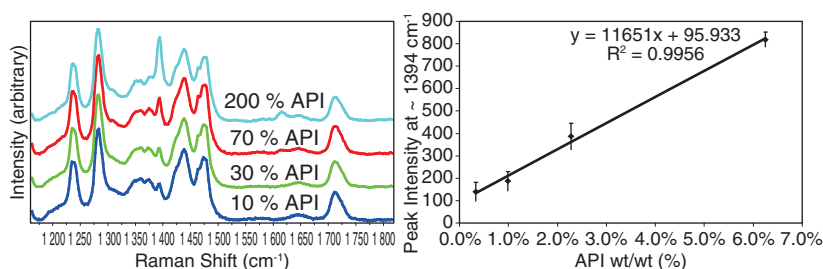


Figure 21 Transmission Raman spectra of tablets with various API content % against standard concentration (left). Correlation between API concentration and peak intensity at 1394cm⁻¹ is also shown in figure (right).

タ(度数分布:面積, パリメータ(周囲長), 軸長, 楕円軸比(アスペクト比), 真円度)が求められ, ヒストグラムとして表示される。測定されたスペクトルは, 既知物質とのスペクトル照合や, 多変量解析を使って, 自動クラスタリングやスペクトル・デコンポジションを行うことができる。Figure 20にポリスチレンビーズとトラネキサム酸粉体の混合粒子の測定結果を示す。多変量解析(クラスタリング: DCA)を用いて混合比率を算出した。

次に, 品質管理への応用として, 透過ラマン分光法^[22]を用いた有効成分の定量分析について紹介する。透過光学系でのサンプルの測定によって, 顕微タイプのような後方散乱光学系では測定できない新たな情報を得ることができる。この透過ラマン分光(Transmission Raman Spectroscopy; TRS)法は, 新しい手法ではないものの, 高出力近赤外レーザと透過ラマン専用のアクセサリの開発によって, 最近, 再び注目を集めるようになってきている。TRSは, 例えば, 錠剤のような光拡散する材料に応用することから, 最初に医薬品応用分野で発展した。この方法は, カプセルにも同様に利用でき, また, 医薬品以外にも, 光拡散により光が透過する材料について, 主構成成分のスペクトルを得たい場合に適用できる。例えば, 生体材料(組織, 食品)や高分子材料といったさまざまな分野での応用が考えられる。また, 医薬品のパッケージ越しに内部を分析する場合にも利用できる。Figure 21に錠剤中活性薬剤(API)の透過ラマンスペクトルと濃度との相関を示す。部分最小二乗法(PLS)を用いて解析すれば, 試料厚みの変動を受けずに, 複数成分の定量分析を行うこともできる。

バイオへの応用

顕微ラマン分光装置を使って, タンパク質, 多糖類, DNA/RNA, 脂質をはじめ, 生体内に蓄積された様々な化学物質を, 単一細胞のレベルでイメージ化することができる。ラマンスペクトルは各物質固有のパターンを示し, 赤外分光同様, 物質の指紋として利用することができる。複雑の物質が混ざり合った生体材料では, 特に多変量解析による成分抽出やクラスタリングによる分類が有効な手段として利用されている。細胞内の組織や薬剤の成分濃度分布をカラーイメージとして識別することができる。

一例として, DuoScanを使用した浮遊細胞ミエローマのラマン・イメージングについて述べる。ミエローマ細胞は, HeLa細胞のような足場を持たず, ステージ移動操作に伴い容易に動く。DuoScanシステムは, マッピング測定をステージ移動ではなくレーザ照射位置を走査するため, このような細胞のマッピング測定に適している。Figure 22にミエローマ細胞

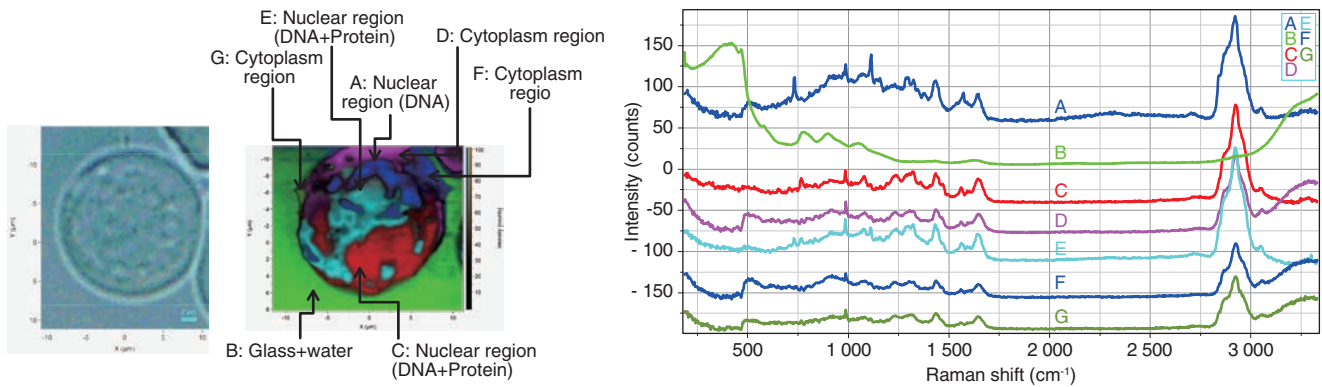


Figure 22 Raman image and spectra of contents of microrna cell.

のラマンイメージとそのモデルスペクトルを示す。細胞領域のスペクトルは、一見類似しているが、それぞれ次のような特長が読み取れる。核酸領域Aのスペクトルには、 3000 cm^{-1} 以上でベースラインが下がっていることから、OH基(H_2O)が少ない様子がわかる。また、核酸(736 cm^{-1})、 NH_3 +deformation (1126 cm^{-1})のラマンバンドが特徴的である。また、弱い δ (C-O-C) glycosidic ring (527 cm^{-1})も認められる。一方、核領域Cでは主に核酸(781 cm^{-1})とタンパク質(1251 cm^{-1} : amid III, 1657 cm^{-1} : amid I)のラマンバンドが観察される。核領域Eでは、核酸バンドが主で、特に 743 cm^{-1} 、 775 cm^{-1} のダブルレットが特徴的である。細胞質領域DおよびGのスペクトルは、主にタンパクと糖質で、ラマンバンドとして、アミノ酸 (Phenylalanine in protein: 1002 cm^{-1})、amid III (1249 cm^{-1})、amid I (1657 cm^{-1})、S-S+ δ (C-O-C) glycosidic ring (506 cm^{-1})が観察される。

次に、生細胞測定用アタッチメントについて述べる。レーザトラップシステム (CaptuR^[23]: LabRAM HR Evolution) 細胞などの微粒子を、レーザ光を使って動かないように固定する手法として開発された。レーザトラップ(別名: 光ピンセット)は、集光されたレーザビームの焦点付近で引き起こされる強い電場勾配の力を使って、焦点面に粒子や細胞を保持することができる。ラマンおよび蛍光スペクトルの共焦点顕微測定に使用できる。いったん粒子や細胞が捕捉されるとそのままの状態、従来のラマン測定の機能を使うことができる。DuoScanを使ってマッピング測定を行うこともできる。他には、ステージ上で細胞が生育できるように、湿度や炭酸ガス濃度といった環境を制御するシステムも利用されている。

おわりに

本稿は、当社の顕微ラマン分光装置を例にとり、できるだけ実際の測定の様子を理解できるように努め、原理や装置構造の説明は最小限に留めた。また、測定に必要なアクセサリやシステムおよびソフト機能をできるだけ多く紹介した。より正確で詳しい解説や、説明が不十分な点について

は、成書や参考資料を参照いただきたい。本稿が、少しでも多くの方がラマン分光法に興味を持っていただくきっかけとなり、装置を有効に活用いただく一助となれば幸いである。

参考文献

- [1] 濱口宏夫, 岩田耕一, “ラマン分光法(分光法シリーズ1)”, 日本分光学会(2015).
- [2] 尾崎幸洋編: ラマン分光法, アイビーシー出版部(1998).
- [3] 古川行夫, 高橋正夫, 長谷川健編, “赤外・ラマン分光法(分光測定入門シリーズ)”, 日本分光学会/講談社サイエンティフィック(2009).
- [4] 田中誠之, 寺前紀夫, “赤外分光法と分子振動(機器分析シリーズ, 赤外分光法, 日本分析学会編)”, 共立出版(1993).
- [5] 北川禎三, Anthony T. Tu, “ラマン分光学入門”(1988).
- [6] P. R. Carey, 伊藤紘一, 尾崎幸洋訳, “ラマン分光学—基礎と生化学への応用—”, 共立出版(1984).
- [7] 水島三一郎, 島内武彦, “赤外線吸収とラマン効果”, (共立全書129)(1958).
- [8] 坪井正道, 田隅三生, 濱口宏夫, 林秀則, 西村善文, 原田一誠, 竹内英夫他, “実験化学講座6 分光 I”, pp317, 丸善(1991).
- [9] 田中誠之, “赤外・ラマン分析, 基礎分析化学講座”, 日本分析化学会編集, 共立出版(1965).
- [10] E. Smith and G. Dent, “Modern Raman Spectroscopy”. John Wiley & sons(2005).
- [11] L. R. Lewis, H. G. M. Edwards, “Handbook of Raman Spectroscopy, Chap. 2, Evolution and Revolution of Raman Instrumentation”, Marcel Dekker, Inc., New York,(2001).
- [12] D. Lin-Vien, N. B. Colthup, W. G. Fateley and J. G. Grasselli, “The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules”, Academic Press, Inc.(1991).
- [13] George Socrates, “Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies Table and Charts”, John Wiley & Sons Ltd.,(2001)
- [14] E. Smith and G. Dent, “Modern Raman Spectroscopy”. John Wiley & Sons(2005).
- [15] “ラマン顕微鏡用アクセサリ 顕微対物鏡Microscope Objective UVI 74x”, HORIBA Note, No.RT1505081.
- [16] M. Delhaye, M. Migeon, C. R. Acad. Sc. Paris, **262**, 702(1966).
- [17] M. Delhaye, M. Migeon, C. R. Acad. Sc. Paris, **262**, 1513(1966).
- [18] M. Delhaye, P. Dhamelincourt, J. Raman, *Spectrosc.*, **3**, 33(1975).
- [19] HORIBA Technical Note RA-TN01.
- [20] HORIBA Technical Note RA-TN04.
- [21] HORIBA Technical Note SO-TN05.
- [22] “透過ラマン分光法とその応用”, HORIBA Note, RA1507051.
- [23] “ラマン顕微鏡用アクセサリ レーザトラップ ユニット CaptuR”, HORIBA Note, RT1505073.



沼田 朋子

Tomoko NUMATA

株式会社 堀場製作所
東京セールスオフィス



奥野 義人

Yoshito OKUNO

株式会社 堀場製作所
開発本部 アプリケーション開発センター
科学・半導体開発部
博士(工学)



中田 靖

Yasushi NAKATA

株式会社 堀場製作所
開発本部 アプリケーション開発センター
科学・半導体開発部 マネジャー
博士(理学)



中 庸行

Nobuyuki NAKA

株式会社 堀場製作所
開発本部 アプリケーション開発センター
科学・半導体開発部 マネジャー
博士(工学)