

スーパーディープデプレッションCCDがバイオラマン分光を最適化

セバスチャン・レミ

新しいCCDは、バイオラマン計測に適した波長で2～7倍高感度になり、検出限界を拡大し実験時間を短縮する。

過去100年で、ラマン分光法は、材料や分子の構造研究の重要ツールであることが証明された。過去20年にわたり、ラマン分光法は、生物学、医療及びライフサイエンスの分野で働く人々から大いに注目されるようになった。さまざまなクラスの生体材料や分子を検出し、病気を特定し、診断ツールとして役立つ可能性があるためだ。これらの分野の他の技術と比較してラマン方法は、高い分子特異性を実現し、ラベルフリーで非破壊であり、またサンプルの準備もほとんど必要ないか、または全く必要ない。

ラマン分光法は、一般にはレーザービーム、励起光源の波長シフトを計測する。これは、非弾力性散乱光を検出することによるものである。その光は、調べているサンプルの分子で振動を起こすために利用されているエネルギーの結果としてシフトした散乱光である。アプリケーションでのラマン分光法の有用性は、2つの事実依存する。(a) 多様な分子のラマンスペクトルが、物

質を特定するために使用できる固有のフィンガープリントを作る。(b) ラマンラインの強さと位置が、サンプルの化学物質(例えばpH値)または物理的(例えば、歪、温度)特性のいずれかによって敏感に影響される。

アプリケーション

ラマン分光法のアプリケーションについて、広範囲の研究が行われている。現在、学界や産業界の研究者が、その技術をさらに広く利用できるようにするための測定器を開発している。ラマン分光法は、バイオセンシング、医療診断と処置に関わる幅広いアプリケーションに適用可能である。感染の検出、細胞の分類、細胞環境や代謝のモニタリング、また薬剤送達のモニタリングに利用できる⁽¹⁾。

多くのアプリケーションは、内科病理学、体外と体内の両方で特にガン組織の特定、手術の成功をモニターし評価する有望なツールとしてのその技術の利用に参与している。ラマン分光法

は、肺、乳房、消化器官、前立腺、皮膚及び脳の組織の健全性と腫瘍の識別することが示された。

その技術の有用性の一例は、さまざまなタイプの組織の特定である(図1)。異なるタイプの組織は、さまざまな強度と多様な波長でラマン散乱光を発生する。個別のスペクトル線を組織の細胞内の特定の分子構造、脂質やアミノ酸など、C-H結合など特定の分子群まで追跡できる。これらのラマンスペクトルは、広範囲に分析され、一覧にされている。

SERSによる増強

ラマン効果は、プラズモン、金属ナノ構造付近の電場増強により数ケタ増強可能である。表面増強ラマン散乱(SERS)は、ラマン技術の感度を大いに強め、ラマン法が利用されている多くの生物学的、医療アプリケーションで有用性が証明されている(図2)。

前述のナノ構造は、溶液ベースのナノ粒子または、マイクロ流体デバイスと結合できる人工ナノ構造面のいずれかである。さらに、SERS粒子は、機能的にすることができる。これは、極めて特殊な生化学物質や分子をモニターする技術の標的を改善することが目的である⁽²⁾。

ラマン計測器

ラマン分光計測の主要設定は、すべてのアプリケーションで同じである。レーザー光源を使いラマン放出を励起する。光学系が励起光をサンプルに転送し、

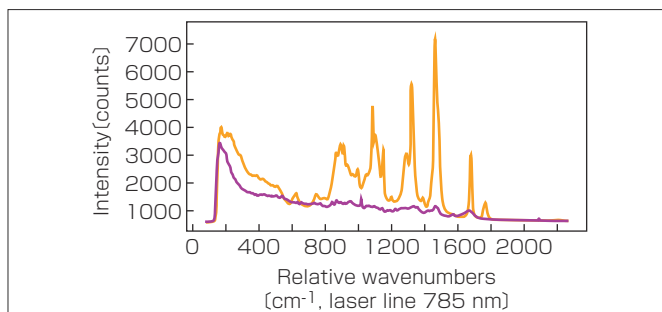


図1 脂質の多い脂肪組織(オレンジ)とタンパク質を多く含む筋組織(紫)のラマンスペクトル。ブロードバンド自家蛍光バックグラウンドが両方のスペクトルにはっきりと見える、それぞれ同じ取得時間で収集されたものである。

ラマン発光を収集する。これをスペクトログラフに搭載したカメラで検出する。

セットアップでは、光フィルタを利用してレーザラインを不要な人工物から区別し、弾性散乱光を吸収する。これは、弱いラマン放出だけを分光器でとらえるためである。ラマン放出のエネルギーは励起レーザに対してシフトするので、励起波長はラマン実験では極めて重要なパラメータである。それが信号の波長範囲を決めるからである。

組織及び体内観察のラマン分光法では、強力な自家蛍光がサンプルから放出され、ラマン信号に重なる。この現象が、観察時間を制限し、信号ノイズを増やす。自家蛍光信号は、励起波長を高くすることで大幅に低減されるので、近赤外(NIR)の比較的高い励起波長を利用するのが望ましい、通常は785nmまたは830nm発光のレーザを利用する。

一般に、光学系はアプリケーションに適合させている。細胞や組織の内部構造を研究する実験は、顕微分光法セットアップを利用する。これにより、高い空間分解能のために共焦点取得を必要とし、スキヤニングシステムと組み合わせて、サンプルのハイパースペクトルモップを提供できる。

体内では、実験は柔軟性の高さが求められるので、ファイバオプティクプローブを使う。ファイバオプティク

プローブは、ラマン分光法を臨床応用に移行させるための決定的な要素である。最近の文献で、さまざまなプローブの適切な概観が紹介されている。これらは、与えられたアプリケーションに強く依存するものである⁽³⁾。

分光パフォーマンスの最適化

すべてのラマン実験に共通することは、信号の放出が非常に弱いということである。ラマンクロスセクションは、励起光エネルギーの4乗に比例して小さくなる。特にライフサイエンス用のラマンアプリケーションは、最高レベルの計測器性能とシステムスループットを必要とする。このセクションでは、感度とパフォーマンスを最適化する分光器とディテクタの実験パラメータを検討する。

まず、分光器システムの光結合とスループットの最適化が重要である。顕微分光法実験は、一般に、低出力開口であるので、ミラーベースのグレーティング分光器が、これらの研究には最適である。

理想的には、高分解能(スペクトルのと空間的の両方)を維持し、SNR改善(低収差、高フルエンスデザイン)、最小クロストークで多くのスペクトルチャネルを同時検出できるようにするには、収差低減分光器の利用が望ましい。フレキシブルスキヤニングやマル

チグレーティングタレットのような先進の機能は、同様に非常に有用であることが明らかである。

光学ファイバは、非常に大きな出力開口(一般にf/2)であるので、分光器の開口部をファイバに一致させることが重要である。レンズベースの分光器は、従って、ファイバやファイバオプティクプローブを利用するアプリケーションには最適である。どんなタイプの分光器でも、最適化されたシステムは、各素子に光学コーティングを用いている。システム損失を最小化し、スループットを最大にするためである。

バイオラマンシステムのもう1つの重要コンポーネントはディテクタである。最高感度を保証するために、科学的CCDカメラがよく利用される。ライフサイエンスには比較的高い励起波長がラマン実験で使われるので、適切なディテクタの選択が極めて重要である。

例えば、830nm励起を利用するとき、重要なフィンガープリントや3000cm⁻¹までの高い波数域(この励起波長で1100nmにある)は、低雑音シリコンCCDでまだ検出可能であるが、このしきい値を超えた波長では光の検出はできない。

InGaAsディテクタ vs. CCD

さらに高い励起波長を選ぶと、不要な自家蛍光信号は一層低減されるが、これにはCCDではなくInGaAsディテクタが必要になる。最新のInGaAs焦点面アレイは、第2近赤外ウィンドウ(~1700nmまで)で優れた量子効率を提供するが、ノイズ性能はそれほどでもなく、CCDと比べるとアレイフォーマットの選択が少なくなることは留意すべきである。

シングルチャネルアプリケーションでは、CCDセンサアレイの高さを利用

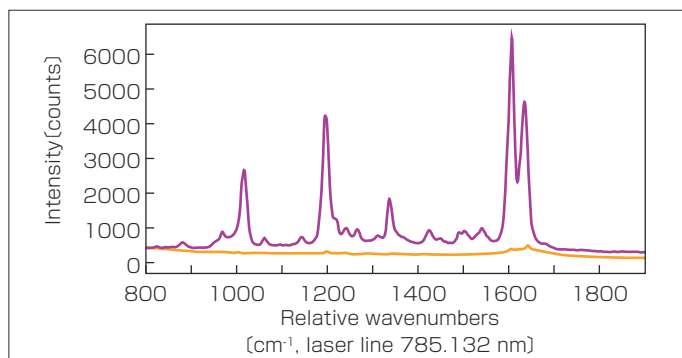


図2 ゴールドナノ粒子を使用するSERSスペクトル。標準スペクトル(オレンジ)と比較したSERSスペクトル(紫)の信号増強ははっきり見える。両方のスペクトルとも同じ実験設定で取得された。

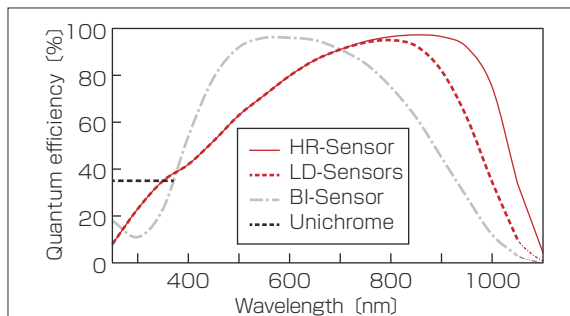


図3 +25°Cで計測した典型的なQEデータ。独自の新しいHR(高NIR量子効率)とLD(低暗電流)ディープデプレッションセンサは、多くの分光アプリケーションに、比類のない性能を提供する。留意点は以下の点。BIは、ディープデプレッションなし標準裏面入射型センサであり、Unichromeは独自のUV増強コーティング。

して利用できる信号を増やし、従ってSNRを改善することができる。体内実験では、プローブの励起側で円形パターンに配列されたマルチコアファイバのファイバオプティクプローブを利用することがよくある。

1本のファイバを使って励起光を送る一方で、残りのファイバが大面積をカバーしてより多くのラマン放出を収集する。プローブの分光器側で、ファイバを再配分して入射スリットに沿って位置決めし、高いスペクトル分解能を維持できるようにする。スペクトル信号は、より大きな合算信号が読み取れるように、垂直方向にビニングされている。

微光イメージングや分光アプリケーションで実績のある製品は従来の裏面入射型CCDであるが、これらのデバイスの量子効率(QE)は、800nm以上の波長では急速に低下する(図3)。

通常、バイオラマンアプリケーションはディープデプレッションCCDを使う。これらは、感度を近赤外域に増強するように設計されている。しかし、これらのセンサは、従来の裏面入射型CCDより暗電流が非常に大きい。

従って、結果としてのダークノイズをうまく処理するには、深くまで届く信頼性のある冷却が求められる。今日の最先端のCCDカメラは、全く冷却液を用いることなく、-95°Cの低温に達し、観察時間は数分、数時間さえ可能

になっている。特別な増強プロセスはセンサにも適用可能である。量子効率を最大化し、不要な副作用、特に近赤外光で照射されたCCDに現れるフリッジング効果を減らすことが目的である。

スーパーディープデプレッション CCD

先頃、バイオラマン分野で使える、より最適な検出ソリューションが現れた。高抵抗性結晶シリコンから作られた独自の新しいクラスの「スーパーディープデプレッション」CCDが、利用できるようになっている。これは、近赤外域(1000nmで最大75%、図3参照)で優れた量子効率を実現している。

実際、これらの新しいセンサは、バイオラマン計測関連の波長域で、2~7倍高感度であり、アプリケーション要件に従い、検出限界を拡大し、実験時間を短縮する⁽⁴⁾。

最後に、分光システムは設定やバイオラマン実験への組込みが容易でなければならない。システムは、NISTトレーサブル放射測定参照光源を使い、波長のスペクトル校正や相対的強度の迅速かつ正確なルーティーンをユーザーに提供すべきである。校正ルーティーンは、分光器メーカーの測定器制御ソフトウェアにより簡単に実行できることが望ましい。

推奨システムソフトウェアにより、ユーザーは実験のすべての要素を組織



図4 完全集積バイオラマンシステムには、分光器、ディテクタ、レーザ、サンプルチャンバー、及びソフトウェアが含まれる。光ファイバ接続用のポートも提供されている。

化することができる。ハードウェアの設定と操作だけでなく(例えば、分光器とディテクタ)、データの取得、分析、エクスポートでもある。サードパーティのソフトウェアパッケージ、スクリプトインタフェース及びファイルフォーマットとの簡単な適合が提供されるべきである。

バイオラマン分光ソリューションを探している科学者、研究者、専門家は、システムコンポーネントを個別に選択するか、完全な専用システム(図4)を選べる。完全集積バイオラマンシステムには、分光器、ディテクタ、レーザ、サンプルチャンバー、及びソフトウェアが含まれる。光ファイバ接続用のポートも提供されている。

参考文献

- (1) Krafft et al., Phys. Sci. Rev., 4, 20170047 (2019).
- (2) D. Cialla-May et al., Chem. Soc. Rev., 46, 3945 (2017).
- (3) E. Cordero et al., J. Biomed. Opt., 23, 071210 (2018).
- (4) "A new dawn for NIR spectroscopy," Teledyne Princeton Instruments white paper (2019).

著者紹介

セバスチャン・レミ Ph.Dは、テレダイネプリンストンインスツルメンツ社(Teledyne Princeton Instruments)のアプリケーションサイエンティスト。

e-mail: sebastian.remi@teledyne.com

www.princetoninstruments.com

LFWJ