

振動和周波赤外超解像顕微鏡を用いた生細胞の赤外分光イメージング

(東工大資源研) ○小暮 聡、井上 圭一、菊地 克也、藤井 正明、酒井 誠

【序】振動分光法を光学顕微鏡技術に適用したラマン顕微鏡及び赤外顕微鏡は、細胞内部を分子レベルで観察する手法の一つとして注目されている。分子振動は「分子の指紋」に例えられるように分子の構造と環境を鋭敏に反応する。その中、最近では単一細胞など微小な生体試料の構造や環境の情報を得ようとする需要が高まってきている。しかしながら、赤外顕微鏡では光の波長に比例する回折限界の制約により、空間分解能を数 μm よりも小さくすることができない。従って例えば生体試料の場合、組織レベルでしか観察が行えず、従来の可視光を用いたラマン顕微鏡と比べて応用が遅れている。

我々はこの問題を打破するために、2波長レーザー分光法のひとつである過渡蛍光検出赤外分光法 (TFD-IR 法) を顕微鏡技術に応用した赤外超解像顕微鏡の開発を行い、蛍光色素染色を施した植物細胞の赤外超解像イメージングに成功した (1, 2)。しかし、TFD-IR 法は蛍光性の試料にしか適用できず、大部分が蛍光を發さない生細胞の振動情報を得ることはできない。そこで今回蛍光性を示さない生細胞にも適用が可能な振動和周波 (VSFG) 赤外超解像顕微鏡の開発を行った。VSFG 法は赤外光によって振動励起された分子に、さらに可視光を照射することで非線形光学効果により發生する、赤外光と可視光のエネルギーの和に相当する光子、すなわち和周波發生光を得る方法である (図 1)。この VSFG 過程は細胞の細胞膜や核膜などの界面に存在する分子やキラル分子において許容となり、可視領域に発色団を持たない分子も含め、大部分の生体分子についてその赤外情報を得ることができる。さらに可視領域の發光であることから、顕微鏡を用いて VSFG 光を観察することで、赤外光に対して超解像を達成した赤外像を得ることが可能となる。

本研究では、培養したヒト肺がん由来の A549 細胞や酵母生細胞などの生細胞を対象として、振動和周波赤外超解像顕微鏡により、赤外イメージングを行い、生きた細胞の構造中における分子の赤外情報や細胞の活動との関係についてより深い見識を得ることを目指した。

【実験】励起光源としての赤外光と可視光は再生増幅器によって増幅された Ti:Sapphire レーザーのピコ秒パルスを波長変換することで得られ、それぞれの波長を 2500-4000 nm ($2500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) および 610 nm の波長の光を用いた。強度を $7\ \mu\text{J/pulse}$ および $100\ \text{nJ/pulse}$ 程度とした。これらの光をビームコンバイナーによって同軸化し、 CaF_2 レンズ ($f=100$) を

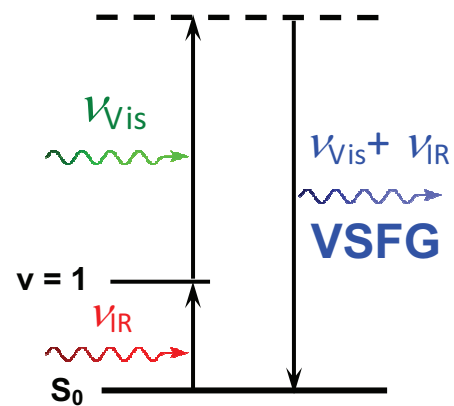


図 1 赤外励起による和周波發生のエネルギーダイアグラム

用いて、サンプル上に照射した。発光は背面から対物レンズ (N. A. = 0.5) を用いて集め、ノッチフィルターおよびバンドパスフィルター、赤外カットフィルターを通した後、結像レンズにより ICCD カメラ上に結像した。試料は細胞をカバーガラスまたはスライドガラス上で培養し、培地を充填してカバーガラスで閉じ、プレパラート化したものを使用した。A549 は防衛医科大学校の菊地眞教授、石原美弥准教授、大森努助教に提供して頂いた。

【結果と考察】 図 2 (a) に A549 の透過像、(b), (c) に可視光 (610 nm) および赤外波長を 3055 cm^{-1} 、 2803 cm^{-1} にそれぞれ固定し、入射したときの A549 からの VSFG 像を示した。赤外波長を 3055 cm^{-1} に固定した場合 (図 2 (b)) では主として芳香環の-C-H 伸縮振動が励起されるが、ところどころ強いスポット状の発光が観察された。それに対し 2803 cm^{-1} に固定した場合 (図 2 (c)) では主に脂肪族性の-C-H 伸縮振動が励起されるが、この場合細胞全体から弱い発光がみられ、それぞれの赤外波長において分布に違いが見られた。次に図 2 (d) に酵母の透過像、(e), (f) に赤外波長を 3294 cm^{-1} 、 3002 cm^{-1} にそれぞれ固定した場合の酵母からの VSFG 像を示した。両者を比較すると発光強度に差が見られた。これらから各赤外波長により振動励起される分子の量が異なることが伺える。つまり今回開発した顕微鏡により、生きたままの細胞内部の分子の赤外吸収による情報を反映した赤外イメージングに成功した。今回の結果は VSFG 顕微鏡を使うことで生細胞中の分子の赤外情報を赤外超解像で得ることが可能であると示した非常に意義深いものであり、将来的には医学革新に繋がるものであるとして強く期待される。発表では A549 と酵母生細胞の赤外スペクトルを測定した結果と合わせて、細胞内部の化学種の違いなど、より詳細な議論を行う予定である。

(1) M. Sakai *et al.*, *Chem. Phys. Lett.* (2007) **439**, 171-176

(2) M. Sakai *et al.*, *Chem. Lett.* (2007) **36**, 1380-1381

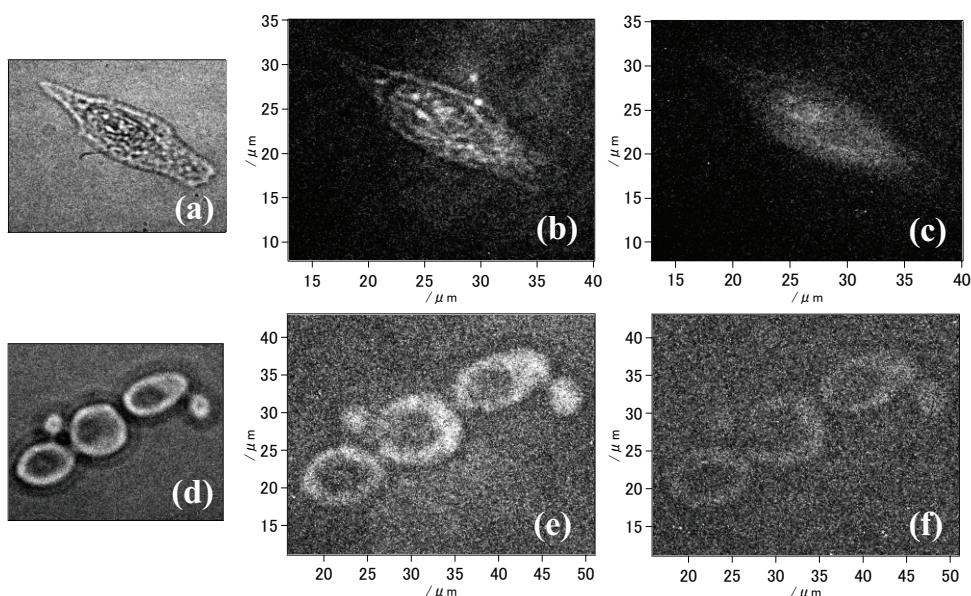


図 2 (a) A549 の透過像。同一の細胞に (b) $\nu = 3055\text{ cm}^{-1}$ および (c) 2803 cm^{-1} の赤外光と可視光 (610 nm) を入射した場合の VSFG 像。(d) 酵母の透過像。同様に測定した酵母の VSFG 像。(e) $\nu = 3294\text{ cm}^{-1}$ および (f) 3002 cm^{-1} 。