

(東大院・理¹, JSTさきがけ², 兵庫県立大院・生命理³)
 ○加納英明^{1,2}, 奥野将成¹, 橋本健志³, 大隅隆³, 濱口宏夫¹

【序】 マルチプレックス coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) 顕微分光法は、分子固有の複数の振動モードを用いて分光イメージングを行うことができるため、生体試料の非標識・多色イメージングを実現する、非常に強力な手法である。特に最近、サブナノ秒マイクロチップレーザーを光源として系を構築することにより¹、非常に先鋭かつ良好な CARS スペクトルを得ることができるようになったため、生細胞² や生体組織³ の指紋領域における CARS 分光イメージングも可能となり、生命科学研究においても強力なツールとなりつつある。今回は、本手法を脂肪生細胞の動態追跡に適用した結果について報告する。脂肪細胞は、過剰なエネルギーを中性脂肪として巨大な脂肪滴に貯蔵し（脂肪合成）、必要時にはそれを分解（脂肪分解）することにより、エネルギー基質としての脂肪酸を放出する（脂肪動員）。これらの一連の過程により、生体内の脂質ホメオスタシス（恒常性）が保たれているが、その詳細については未解明な点が多い。特にこれまでの研究で、脂肪分解刺激を与えたとき、細胞内の広い領域にわたって微小脂肪滴が出現することがわかっているが、その役割は不明である。作業仮説として、微小脂肪滴が(1)大きな脂肪滴の分解により生じる、または(2)小胞体等から新たに産生される、という二つの仮説が考えられる。そこで本研究では、細胞内の大きな脂肪滴を重水素ラベルすることで、この点に焦点を絞った研究を行った

【実験】 本研究では、我々が開発したサブナノ秒マイクロチップレーザーをベースとしたマルチプレックス CARS 顕微分光装置を用い¹、前方方向に出射する CARS 光を分光器及び CCD カメラにより分光測定した。

試料にはマウス脂肪生細胞を用いた。通常の条件で培養した脂肪生細胞（コントロール）の他に、重水素化物で脂肪滴をラベルした生細胞も用意した。

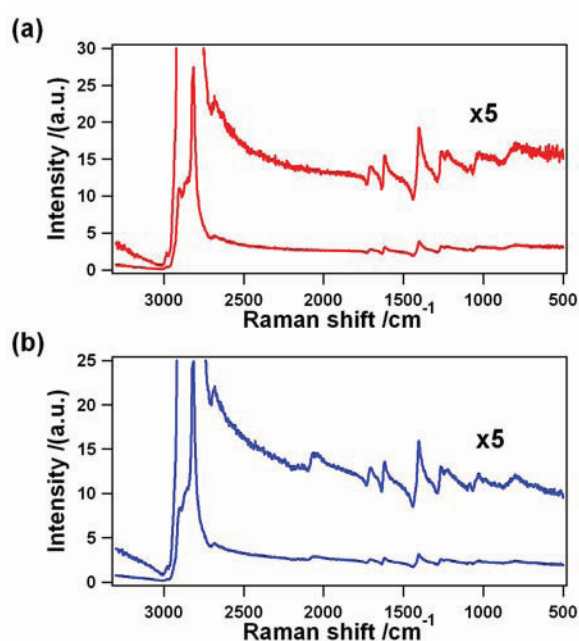


図1. 脂肪生細胞における脂肪滴のマルチプレックス CARS スペクトル;(a) コントロール;(b) 脂肪滴を重水素ラベルした脂肪生細胞

脂肪滴の重水素ラベルは以下のプロトコルで行った。重水素化されたパルミチン酸 (200 μM) を培地に導入した上で 24 時間細胞を培養した後、培地中の重水素化物を洗浄により除去した。これにより、パルミチン酸が細胞内に取り込まれ、脂肪滴に蓄積される。どちらの細胞も、顕微鏡にセットした後、アドレナリン作動薬により脂肪分解刺激を与え、動態観察を行った。細胞はすべてガラスボトムディッシュで培養したのを用い、培養液に満たされた状態で測定を行った。

【結果】 図 1 に、マウス脂肪生細胞の脂肪滴におけるマルチプレックス CARS スペクトルを示す。図 1(a)及び(b)共に、指紋領域及び C-H 伸縮領域にて振動共鳴に由来する複数の鋭い分散型の信号が得られた。これに加えて図 1(b)では、 CD_2 伸縮振動に帰属される信号が 2100 cm^{-1} 付近に見られた。次に、薬剤導入前後の CARS 分光イメージングの結果を図 2 に示す。図 2(a)及び(b)はそれぞれ、重水素ラベルした脂肪生細胞における薬剤導入前及び導入後 60 分後の CARS 分光イメージングの結果である。図 1 で見られた脂質由来の複数の振動共鳴の信号を用いてイメージを再構成した。イメージ取得時間は 4 分であった。これらから、 CD_2 伸縮振動を含むすべてのバンドにおいて、微小脂肪滴の出現がみとめられた。このことから、薬剤導入後 60 分後に存在する微小脂肪滴には、大きな脂肪滴の崩壊により生じた脂肪が含まれていることがわかった。

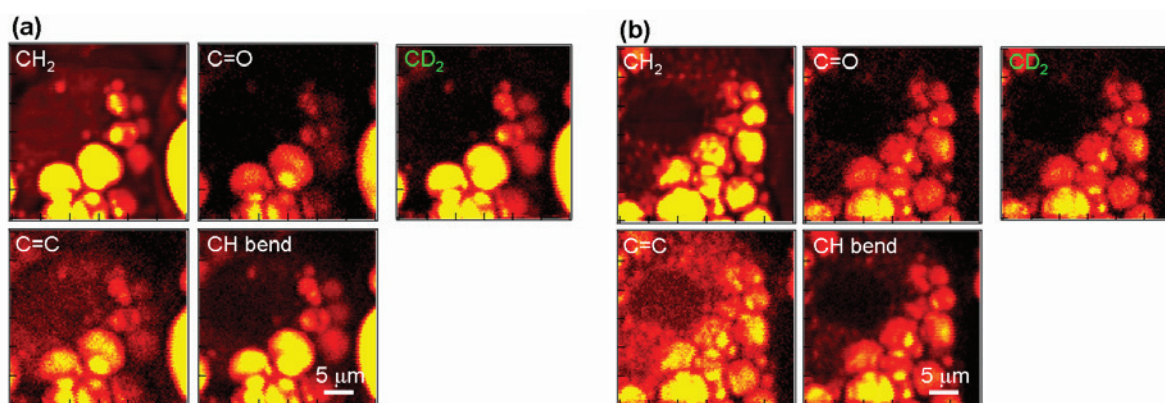


図 2 薬剤導入前(a)及び導入 60 分後(b)の脂肪生細胞の CARS 分光イメージングの結果。イメージ取得時間は 4 分。

[1] M. Okuno, H. Kano, P. Leproux, V. Couderc, and H. Hamaguchi, *Opt. Lett.* 33, 923 (2008); 特願 2008-66832

[2] 本討論会 4B04 奥野, 加納, Leproux, Couderc, 濱口, “ラマン分光顕微鏡による生細胞のダイナミクスの追跡”

[3] 本討論会 1P098 尾藤, 徳原, 内藤, 奥野, 加納, 濱口, “CARS 顕微分光法を用いたヒト毛髪の分子イメージング”