

ラマン分光顕微鏡による生細胞のダイナミクスの追跡

(東大院・理¹, CNRS・Xlim²) ○奥野 将成¹, 加納 英明¹, Leproux Philippe²,

Couderc Vincent², 濱口 宏夫¹

【序】 バイオイメージング技術は、いまや生細胞を研究する必要不可欠な手法となっている。その中でも非染色・非侵襲で生体試料の分子情報を取得することのできる、ラマン分光顕微鏡は昨今大きな注目を集めている。しかし、信号強度が微弱であるために、生細胞への応用に大きな可能性を持ちつつも、ラマンイメージングは生細胞の動的挙動の研究に活用されにくいのが現状である。本発表では、二つの手法により、ラマンイメージングの高速化を試みた結果について述べる。一つは、非線形ラマン分光法的一种である、コヒーレント・アンチ・ストークス・ラマン分光法 (Coherent anti-Stokes Raman Scattering: CARS) を顕微鏡へと応用した、マルチプレックス CARS 分光顕微鏡法である。CARS 分光顕微鏡を用い、生細胞のダイナミクスを観測し、得られた知見を示す。もう一つは、自発ラマン分光法を用いた直接ラマンイメージングである。より効率よくラマン散乱光を集光・検出することで、高速でのラマンイメージング取得を試みた。その結果についても述べる。

【実験結果】 これまでの CARS 顕微鏡では、多数のバンドが近接して存在し、かつ強度も弱い指紋領域の信号は、生細胞ではほとんど観測されていなかった。本研究では、近赤外領域の新規光源をもちいることにより、明瞭な指紋領域の信号を得ることに成功し、より豊富な分子振動情報が取得可能となった。図 1 に出芽酵母細胞を測定した結果を示す。これらのイメージは、各点において測定したマルチプレックス CARS スペクトルを理論式にフィットし、振動共鳴成分のみを抽出して再構成することによって得たものである。指紋領域においても高いコントラストを持った CARS イメージが取得できていることが分かる。時間が経過するにつれて、「生命のラマン分光指標」[1]と我々が呼んでいる 1602 cm^{-1} のバンドが減少し、また、 1160 cm^{-1} のポリリン酸のバンドが現れてくることが分かった。ポリリン酸は Dancing Body(DB)と呼ばれる、細胞死の過程で現れる顆粒に由来する[2]。さらに、DB がつぶれ、死に伴う細胞内の構造変化がラマンイメージとして得られた。これは、レーザー照射による光ダメージに

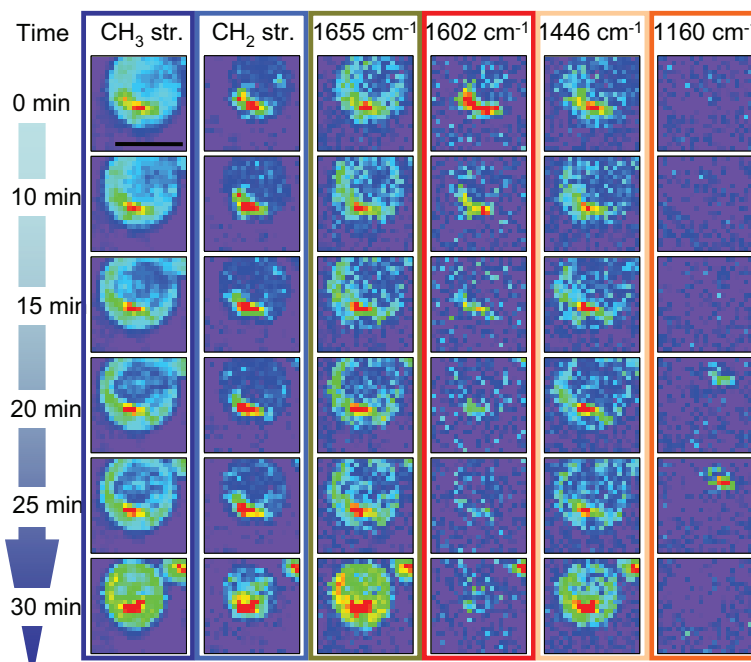


図 1 出芽酵母細胞の時間分解 CARS イメージ。

よる、細胞死の過程を加速して観測しているものと考えられる。これまでのラマン分光顕微鏡では、自発的な細胞死の過程を、5 分程度の時間分解能でしか追跡することができなかった。一方本研究では、10 秒程度の時間分解能を持って、細胞死の過程を追跡することが出来た。ラマン分光顕微鏡の持つ時間分解能では、DB の生成と「生命のラマン分光指標」の消失の時間関係は全く未知であったが、本研究で作製した装置では、生命のラマン分光指標が無くなっていき、その後 DB が現れる様子をラマンイメージとして得ることが出来た。

次に自発ラマン散乱を用いた直接ラマンイメージングについて述べる。開発した装置の概略図を図 2 に示す。正倒立顕微鏡を用い、正立側対物レンズからレーザー光を入射し、倒立側の対物レンズでラマン散乱光を集光した。入射側には低倍の対物レンズを用いることで、数 $10\ \mu\text{m}$ 四方という広い領域にレーザーを照射する。また、集光側の対物レンズに反射型対物レンズを用いることで、ガラスからの蛍光による背景光を大幅に低減している。干渉フィルターにより分光することによって、観測したいラマン散乱光のみを選択的に透過する。検出器として EMCCD(Electron Multiplied CCD)を用いることで、高速のイメージ取得を可能にしている。

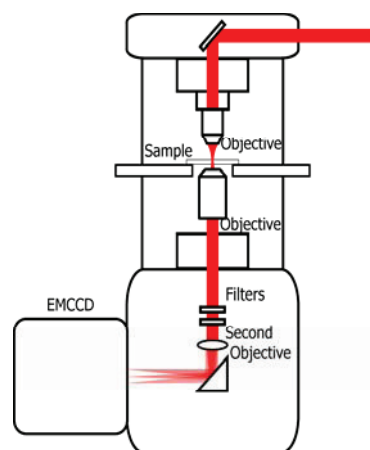


図 2 直接ラマンイメージング装置の概略図。

図 3 に CH 伸縮振動領域において、分裂酵母細胞を測定した結果を示す。(a),(b)はそれぞれ露光時間を 10 秒及び 1 秒として得た、直接ラマンイメージである。また、それぞれについて、対応する光学顕微鏡像を左側に示した。図 3 (a)では、高いコントラストを持った鮮明なラマンイメージが得られている。CH 伸縮振動の信号を強く与えるリン脂質が主にイメージされていると考えられ、図 3 (a)のイメージは、リン脂質を高濃度を含むミトコンドリアの分布を反映しているものと考えられる。さらに、隔壁と思われる信号が酵母細胞の中央付近に観測されている。図 3(b)は露光時間を 1 秒として測定を行った結果である。それぞれの酵母細胞において、細胞中央に存在する核を挟むようにミトコンドリアが分布している様子が、ラマンイメージとして観測されている。また、光学顕微鏡では全く差異が見えない 3 個の酵母細胞において、ラマンイメージを観測すると、ミトコンドリアの濃度および分布が、それぞれ大きく異なっていることもわかる。このように、短時間でコントラストの高いラマンイメージを得ることが可能となった。

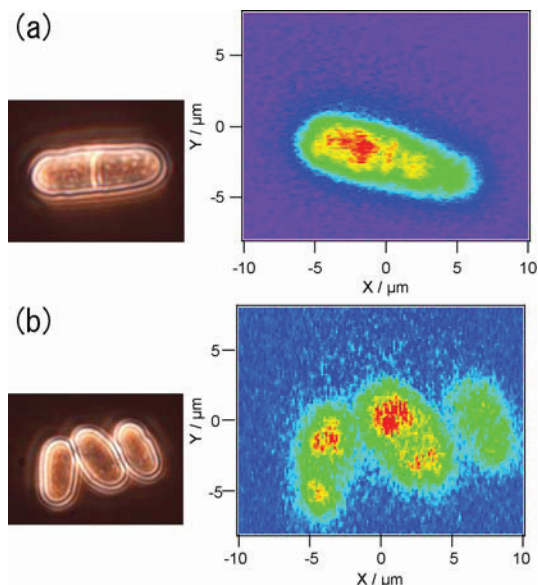


図 3 分裂酵母細胞の、直接ラマンイメージ。(a) 露光時間 10 秒、(b) 露光時間 1 秒で得たイメージ。

参考文献

- [1] Y-S. Huang, et. al., *Biochemistry*, **44**, 10009 (2005)、[2] Y. Naito, et. al., *J. Raman Spectrosc.*, **36**, 837 (2005)