

顕微ラマン分光法による生細胞の定量イメージング

(東大院・理*、NCTU **) ○奥野将成*、濱口宏夫**

【序】現在実用されているバイオイメージング手法の中で、顕微ラマン分光法によるラマン分光イメージングは近年特に大きな注目を集めている。顕微ラマン分光法によって得られるラマンスペクトルは、“分子の指紋”と呼ばれるように、分子構造を鋭敏に反映し、分子レベルの豊富な情報を与える。染色を必要とせず、高い分子選択性を持つことから、顕微ラマン分光法は生細胞や組織などの生体試料の測定に応用され、どのような分子がどのような状態で、その中に含まれているのかを明らかにしてきた。

我々は本研究で、ラマン散乱が持つ定量性、すなわち「ラマン散乱光強度が、ラマン散乱光を出す物質の量に厳密に比例する」という性質を用いることにより、これまで他手法では容易に知り得なかった、細胞内物質の濃度を生きたままの状態で決定することを試みた。単位時間当たりに観測されるラマン散乱光の光子数は次のように表される。

$$\text{(単位時間に観測されるラマン散乱光 [光子数/s])} = \text{(分子の絶対ラマン散乱断面積 [cm}^2 \text{/ sr])} \\ \times \text{入射光の光束密度 [光子数/s cm}^2\text{]} \times \text{(焦点中の分子数)} \times \text{(集光立体角 [sr])} \times \text{(検出効率)}$$

この積の中の、「絶対ラマン散乱断面積」は、ラマン散乱の基礎概念の一つであり、分子のラマンバンドに固有のものである。「絶対ラマン散乱断面積」および「分子数」以外の項は、実験条件によって決定されるものであるから、分子のラマンバンドの「絶対ラマン散乱断面積」を求めることが出来れば、焦点内の「分子数」を推定することが出来る。

これまで、いくつかの有機分子のバンドに対しては、絶対ラマン散乱断面積を求める試みが行われてきた。本研究ではそれを拡張し、生体分子に対して絶対ラマン散乱断面積を見積もり、それらの値を用いて生細胞中の分子濃度を推定した。

【実験】絶対ラマン散乱断面積の測定ならびに生細胞の顕微ラマン分光測定は、532 nm 励起の共焦点ラマン分光顕微鏡を用いて行った。絶対ラマン散乱断面積の測定においては、もっともよく絶対ラマン散乱断面積の研究が行われているベンゼンの環伸縮振動(992 cm⁻¹)のラマンバンドを参照とし¹、生体分子の偏光ラマン測定を行い、ラマンバンドの面積強度から絶対ラマン散乱断面積を求めた。測定した生体分子は、フェニルアラニン、シトクロム b および c の酸化および還元型などであり、これらを溶媒に溶解して測定を行った。また、測定系の波長依存性や偏光依存性を厳密に較正することによって、より確度の高いデータを得た。本実験で得られた絶対ラマン散乱断面積の実験誤差は 20 %以内である。

測定した生体試料は、マウス結合組織由来の L929(NCTC)細胞である。露光時間は一点あたり 2 秒、試料下でのレーザー出力は約 1 mW である。

【実験結果・考察】図 1(A)および(B)に、フェニルアラニン水溶液(73 mM)および還元型シトクロム c 水溶液(51 μM)から得た、平行成分および垂直成分の偏光ラマンスペクトルを示す。これらの偏光ラマンスペクトルの平行成分から、ラマンバンドの絶対ラマン散乱断面積の平行成分

($d\sigma_{\parallel}/d\Omega$)を、垂直成分から絶対ラマン散乱断面積の垂直成分($d\sigma_{\perp}/d\Omega$)をそれぞれ求めた。この二つの分子には、特徴的なラマンバンドが存在し、生体試料中の指標として用いられる。フェニルアラニンについては、ベンゼン環の呼吸振動に由来する 1004 cm^{-1} 、還元型シトクロム c については、 603 cm^{-1} のラマンバンドである。フェニルアラニンの 1004 cm^{-1} のラマンバンドについて、 $d\sigma_{\parallel}/d\Omega = 0.96 \times 10^{-29}$ 、 $d\sigma_{\perp}/d\Omega = 0.05 \times 10^{-29}$ [$\text{cm}^2/\text{molecule sr}$]、還元型シトクロム c の 603 cm^{-1} のラマンバンドについて、 $d\sigma_{\parallel}/d\Omega = 2.5 \times 10^{-26}$ 、 $d\sigma_{\perp}/d\Omega = 4.6 \times 10^{-26}$ [$\text{cm}^2/\text{molecule sr}$]と絶対ラマン散乱断面積を決定した。還元型シトクロム c のラマンバンドの絶対ラマン散乱断面積は、フェニルアラニンのものと比較して 10^3 倍程度大きな数値が得られた。これは、還元型シトクロム c のラマンバンドが、 532 nm で励起することによって、共鳴ラマン効果により増強され、高感度に検出できることを示している。

次に、これらの生体分子のラマンバンドの絶対ラマン散乱断面積を用いて、生細胞中の生体分子濃度を決定した結果を示す。図 2 は顕微ラマン分光測定によって得られたラマン散乱光強度を、絶対ラマン散乱断面積を用いて分子濃度イメージに変換したものである。得られた分子濃度はラマン分光顕微鏡の共焦点体積内での平均値であるが、L929(NCTC)細胞の厚みが焦点深度よりも十分大きいため、およそ細胞内の分子濃度を表していると考えられる。図 2(A)および(B)は、フェニルアラニンの 1004 cm^{-1} 、還元型シトクロム c の 603 cm^{-1} のラマンバンドから、それぞれの分子濃度分布を見積もったものである。フェニルアラニンは $20 \sim 40\text{ mM}$ の濃度

で、細胞内に比較的一様に分布していることが分かる。これは、 10 nm 立方中に 20 個程度フェニルアラニン分子が存在することに対応し、1つあたり数 10 nm の大きさをもつタンパク質の中に、数 10 個のフェニルアラニン残基が含まれることに対応すると考えられる。一方、還元型シトクロム c の分布は、細胞内で局在しており、核と思われる細胞中心部にはほとんど観測されていない。このことから、還元型シトクロム c の分布は、細胞内のミトコンドリアの分布に対応していると考えられ、その中の還元型シトクロム c の分子濃度はおよそ $10 \sim 20\text{ }\mu\text{M}$ であることがわかった。

このように、ラマンバンドの絶対ラマン散乱断面積を求め、顕微ラマン分光法を用いることで、非染色で生きた細胞内の物質濃度・分子数を決定することができた。

1. K. T. Schomacker, J. K. Delaney and P. M. Champion, J Chem Phys **85** (8), 4240-4247 (1986).

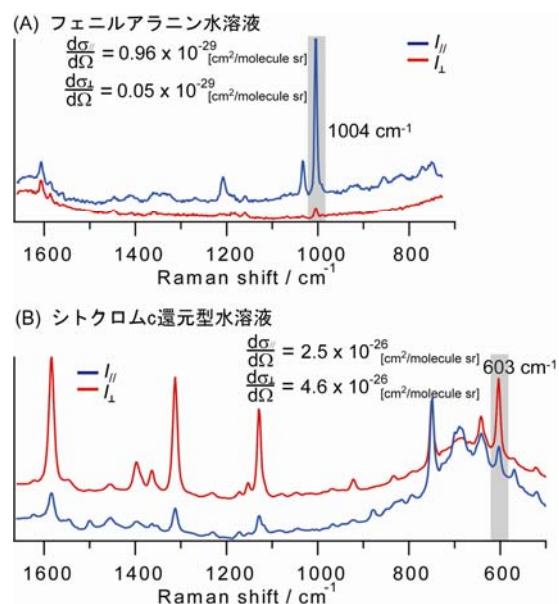


図 1 フェニルアラニン水溶液および還元型シトクロム c 水溶液のラマンスペクトルの平行成分(I_{\parallel})および垂直成分(I_{\perp})。

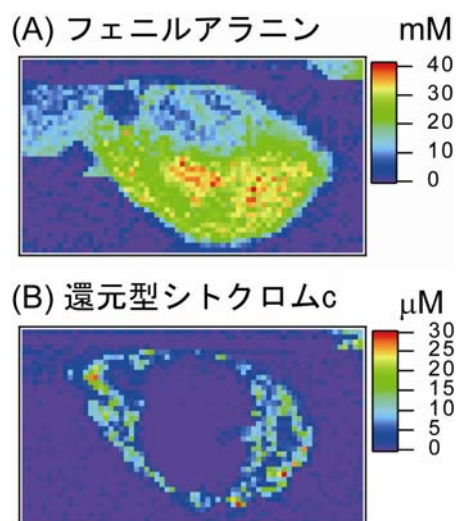


図 2 L929 (NCTC)細胞の、フェニルアラニンおよび還元型シトクロム c の濃度イメージ。