

白色レーザーを用いた生細胞の
非縮退マルチプレックス三次和周波分光イメージング

(東大院・理*、NCTU 分子科学研究所**)○瀬川尋貴*、奥野将成*、加納英明*、濱口宏夫**

【序】単一生細胞のイメージング技術は、*in vivo* 条件下での観察を可能にすること、リアルタイムでの生細胞のダイナミクスの追跡を可能にすることなどを始めとした様々な利点を持っており、その研究は現在大きな注目を集めている。本発表では、そのようなイメージングを可能にする光学過程の 1 つである三次和周波発生(Third order Sum Frequency Generation; TSFG)を拡張した新しいイメージング手法について報告する。

TSF は第三高調波(Third Harmonics ; TH)と類似の三次の非線形光学過程を経て発生するコヒーレント光であり、2 種類以上の異なる波長の光を 3 つ用いて生じる。本研究では、TSF 発生光源に 1064 nm のナノ秒パルスレーザー及び 1100 nm から 1600 nm までのスペクトル幅を持つナノ秒白色レーザーを用いた。これにより、白色レーザーの中の任意のスペクトル成分を用いて TSF が生じるため、非縮退かつマルチプレックスに発生させた信号をスペクトルとして取得することができると考えられる。更に、コヒーレント・アンチ・ストークス・ラマン散乱(Coherent anti-Stokes Raman Scattering ; CARS)や第二高調波(Second Harmonics ; SH)、二光子励起蛍光(Two-photon Excitation Fluorescence ; TPEF)による同時イメージングも試みた。

【実験】本研究で用いた装置を右に示す。光源には、Q スイッチ発振 Nd:YAG レーザーを用いた。基本波 1064 nm の光は最初に二分割され、一方はそのまま、もう一方はフォトニック結晶ファイバー(Photonic crystal fiber ; PCF)へ導入し、白色光に変換する。2 つのパルスを同軸に重ねた後、顕微鏡へ入射し対物レンズによってピエゾステージに乗せられた試料に集光する。発生した信号光はまず入射とは反対側に位置する別の対物レンズにより集光・コリメートされた後に、ダイクロイックミラーによって近赤外成分と可視成分に分割され、各々別々の分光器・CCD カメラによって検出される。近赤外成分には CARS の信号が、可視成分には TSF、SH、TPEF の信号が含まれており、2 台の CCD カメラとピエゾステージを電氣的に同期することで、様々な信号を同時取得し、同時イメージングすることができる。白色光を導入することで、TSF のスペクトル(マルチプレックス TSF スペクトル)を観測し、分光イメージを作成することができる。

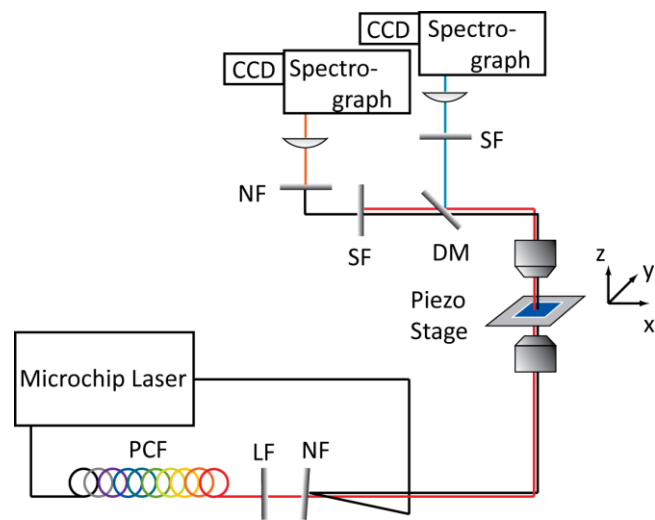


図 1. 本研究で作成した装置

【結果と考察】

出芽酵母 4 倍体 (*Saccharomyces cerevisiae* および *Saccharomyces bayanus* の接合体) を試料として用いた測定結果を図 2 に示す。(a)(b) は可視領域のスペクトルと近赤外領域のスペクトルの典型的なものであり、(a) に見られる 390 nm 付近にピークをもつブロードな信号がマルチプレックス TSF、355 nm にピークを持つ信号が TH、

532 nm にピークを持つ信号が SH である。また、(b) には得られた CARS スペクトルに最大エントロピー法を用いて、自発ラマン散乱と同じ振動情報を与える $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ に変換したものを示している^[1]。マルチプレックス TSF と同時に他の非線形光学過程から生じる信号光が同時に取得できていることが分かる。

次に、マルチプレックス TSF から作成したイメージと、CARS により作成したイメージを併せて示す。TSFG は THG と同様に、対物レンズを用いて強く集光する条件の下では屈折率の界面が焦点内に存在する時のみ強い信号を発生する。図 3(b) に示された TSF イメージは、細胞の輪郭と細胞内が局所的に可視化されており、輪郭は試料を満たす培地と細胞の間の、内部は細胞質基質と脂質豊富なオルガネラの間での屈折率の差を可視化しているものと考えられる。

また、TSF イメージは(d) に示された CH_2 変角振動のイメージとよく一致しており、CARS CH_2 イメージにおいて観察される強い輝点は脂質豊富なオルガネラ由来であることが分かった。これらのイメージは当研究室で発見し、酵母細胞の代謝活性を表すと考え「生命のラマン分光指標」^[2]と呼んでいる 1602 cm^{-1} バンドのイメージ(f)ともよく一致しており、その起源も脂質豊富なオルガネラにあることが推測される。

参考文献

[1] M. Okuno et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 6773 (2010)

[2] Y. S. Huang et al., *J. Raman Spectrosc.*, **35**, 525 (2004)

[3] 本討論会 1B13 加納、瀬川、奥野、橋本、大隅、濱口

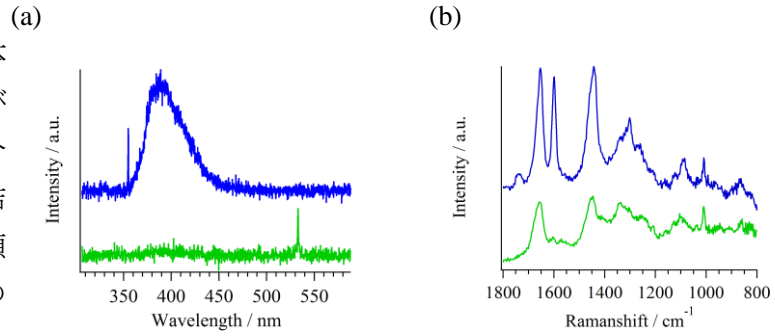


図 2. 出芽酵母の測定より得られた典型的なスペクトル

- (a) 可視領域
- (b) 近赤外領域

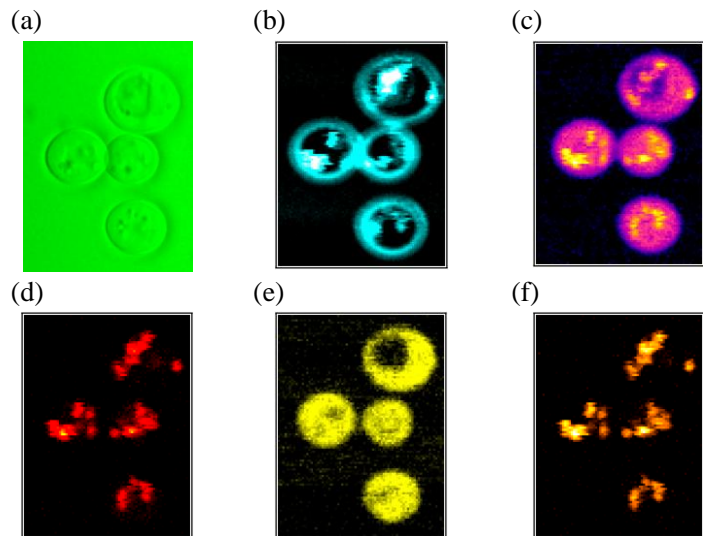


図 3. 出芽酵母の測定より得られたイメージ

- (a) 光学像 (b) マルチプレックス TSF (c) CARS CH_3 縮重変角
- (d) CARS CH_2 変角 (e) CARS アミド III (f) CARS 1602 cm^{-1}