

【序】 顕微ラマン分光法は生細胞に対する物理化学的研究手法として有用である。その特徴として、単一生細胞の *in vivo* 測定が可能であること、細胞内の物質分布や構造に関する情報が分子レベルで得られること、染色などの前処理が不必要なことなどが挙げられる。中でも、物質分布やそのダイナミクスに関する情報を得ようとするときに、ラマンイメージングは非常に有用である。ある振動モードでラマンイメージングを行うことで、その振動モードを持つ分子の分布を可視化することができる。これまで、ラマンイメージングはそのほとんどが共焦点ラマン顕微鏡を用いたスキャン方式によって行われてきた。しかしながら、この方法ではサンプル全体をスキャンしてひとつのラマンイメージを得るのに数分から数十分程度の測定時間を必要とする。細胞内の変化を追跡するには測定時間の短縮が求められる。また、スキャンすることでサンプル中の場所によって測定時刻にずれが生じる。そこで、我々は高速かつ全領域を同時にラマンイメージングできる装置を開発し、生細胞に応用することを目指した。

【実験】 図1に本装置の原理を示した。ビーム径を広げたレーザー光を対物レンズ後で平行光となるように顕微鏡に導入し、サンプル位置で広い領域に照射する。サンプル各点からのラマン散乱光は、バンドパスフィルターで特定の波長だけが透過し、直接 CCD 検出器に結像する。つまり、分光器を用いずにバンドパスフィルターによって波長を選別し、直接ラマンイメージを得る。

図2には装置の概略図を示す。励起光源として波長可変な色素レーザーを用い、レーザー光をピンホールによって空間フィルタリングした後に、ビーム径を広げて顕微鏡に導入する。サンプルから出るラマン散乱光は、バンドパスフィルター(800 nm 中心) およびレーザ散乱光除去用のロングパスフィルター(750 nm 以上透過) を通って選別され、CCD 検出器に結像する。

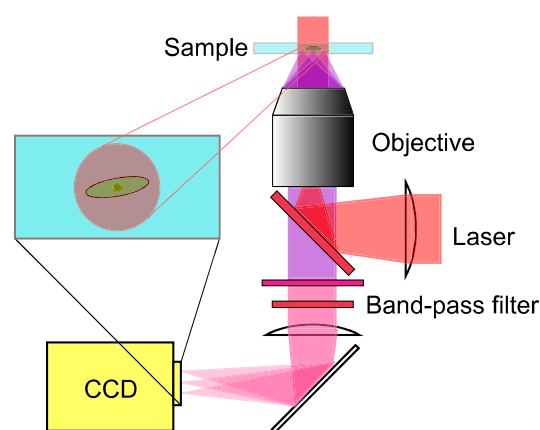


図1 直接ラマン分光イメージングの原理

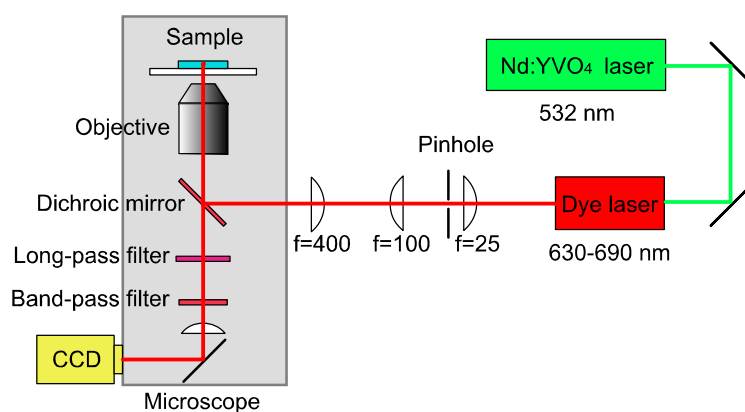


図2 直接ラマン分光イメージング装置

バンドパスフィルターを固定し、色素レーザーの波長を変化させることで、様々なラマンシフトにおけるイメージを得ることができる。本実験では、色素レーザーの発振波長を 649 nm に合わせ、バンドパスフィルターを透過してくるラマン散乱光が約  $2900\text{ cm}^{-1}$  に対応するようにした。これはサンプルとして用いた分裂酵母の C-H 伸縮モードのピークが現れる領域である。分裂酵母は自家蛍光の少ない石英ガラスボトムディッシュ上に固定して測定した。サンプル位置でのレーザーパワーは約 25 mW で、測定時間はひとつのイメージあたり 30 秒間であった。

【結果】 得られた分裂酵母のイメージを図 3 に示す。(a) は分裂酵母の光学像であり、(b) は励起波長 649 nm でのイメージである。同様に、(c) は励起波長 639 nm、(d) は励起波長 659 nm である。前述のように、(b) は  $2900\text{ cm}^{-1}$  の C-H 伸縮モードにラマン共鳴させたものであり、(c)、(d) はそれぞれ  $3150\text{ cm}^{-1}$ 、 $2670\text{ cm}^{-1}$  に相当し、ともにラマン非共鳴のものである。それぞれのイメージの強度はレーザーパワーで規格化してある。(b) では光学像と一致した形のイメージが得られた。一方、(c) および (d) では、特に強い信号が得られなかった。これは、(b) のイメージが蛍光ではなくラマン散乱光によって構成されているものであるということを示している。つまり、C-H 伸縮モードでの分裂酵母のラマンイメージを、高速に、かつ明瞭なコントラストで得ることに成功した。このラマンイメージは分裂酵母の輪郭だけでなく、細胞内にある C-H 結合を持った分子の分布をも可視化している。細胞内で特に強く信号が出ている部分は、リン脂質二重膜からなり C-H 結合が豊富にあるミトコンドリアに対応していると考えられ、ミトコンドリアの分布も可視化されていると言える。

今後は、分裂酵母の細胞周期に伴う細胞内の物質分布の変化を追跡するなど、時間分解ラマンイメージングを行っていく予定である。

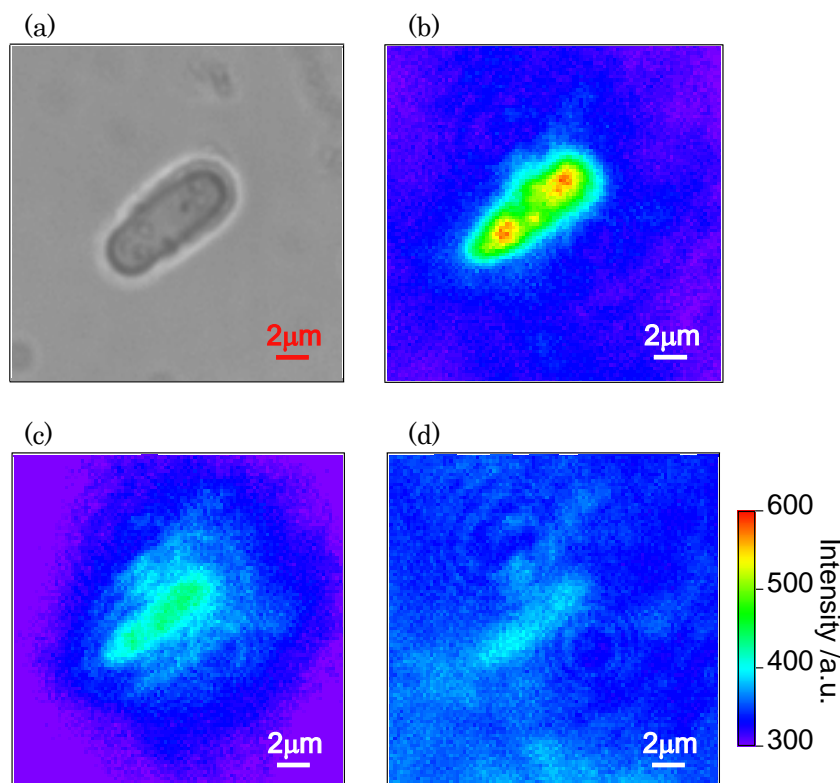


図 3

- (a) 分裂酵母の光学像
- (b) 励起波長 649 nm でのイメージ
- (c) 励起波長 639 nm でのイメージ
- (d) 励起波長 659 nm でのイメージ