

研 究 報 告 書

「コヒーレント・ラマン内視分光鏡による生体組織の *in vivo* 計測」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：加納 英明

1. 研究のねらい

ラマン分光法は、非染色・非侵襲で生体の“その場観察”を可能とするため、分子レベルでの生細胞分析や病理診断など、生命科学・医学双方に大きなブレイクスルーを創出することが期待される。本研究では、ラマン散乱光を増幅するコヒーレント・ラマン分光法を利用することで、薬剤や病変等による生体組織の構造変化を *in vivo*、*in situ* で高速に可視化できる、まったく新しいコヒーレント・ラマン内視分光鏡を開発することを目標として、研究を行った。

2. 研究成果

本研究では、コヒーレント・ラマン過程として coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) を採用した(図1)。CARS光は入射レーザー光の波長より短波長側(アンチストークス側)に発生するため、生体組織の計測でしばしば発生する自家蛍光が問題とならない。本研究では、近年注目を集めている白色レーザー光を光源として用いることで、“分子の指紋”であるラマン(CARS)スペクトルを取得できる、マルチプレックスCARS過程を生細胞・生体計測に応用した。本研究成果は主に、(1)マルチプレックスCARS分光による非染色・非標識・マルチカラー(マルチモード)イメージングのための基盤技術の確立、そして(2)CARSファイバースコープの開発と *in vivo* 計測の試み、の二つに分けられる。

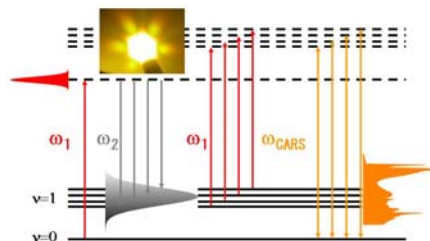


図1. マルチプレックスCARS過程; 狭帯域 ω_1 光、広帯域 ω_2 光(白色レーザー光; 挿入写真)により、幅広い振動スペクトル領域においてCARS光発生を実現した。

2. 1. CARS 分光イメージングのための基盤技術の確立

複雑なCARSスペクトルから分子の情報を抽出し、分子の指紋を“読み解く”ためには、CARSスペクトルを解析する新しい方法論の開発が必要である。そこで本研究では、最大エントロピー法(Maximum Entropy Method; MEM)及び特異値解析(Singular Value Decomposition; SVD)を用いたスペクトル解析を、CARS分光イメージングに導入した。図2に、出芽酵母(zygote of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus*)生細胞内の異なる空間点におけるCARSスペクトル((a)及び(b))、MEM及びSVDを用いたスペクトル解析の結果((c)及び(d))を示す。露光時間は50 msである。指紋領域の信号強度は、C-H伸縮振動など 3000 cm^{-1} 付近に現れる信号強度より一般に小さく、生細胞でのCARS測定はこれまで困難であったが、ナノ秒白色レーザーという新しい光源及びCARS測定に最適化した顕微イメージングシステムの構築により、今回明瞭に検出することに成功した。一般に、CARSスペクトルには非共鳴バックグラウンドと呼ばれる背景光が重畳するため、分散型の複雑なスペクトル形状になる

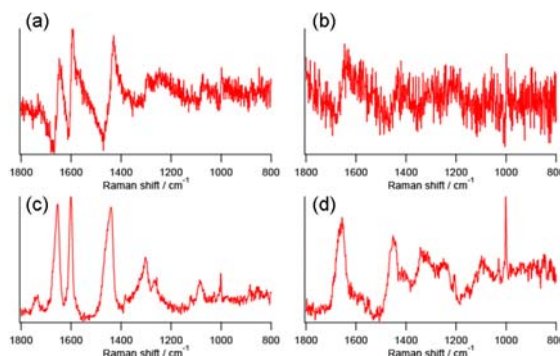


図2. 出芽酵母生細胞の CARS スペクトル(a,b)。(a)及び(b)は異なる空間位置でのもの;(c,d) MEM 及び SVD により(a)及び(b)から再構成した $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ スペクトル(通常のラマンスペクトルに相当する)

((a)及び(b))。MEMでは、この非共鳴バックグラウンドを逆に活用することで、自発ラマンスペクトルに対応する $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ スペクトル(三次の非線形感受率の虚部)を得ることが出来る。図2(c)及び(d)は、各々主に脂質及びタンパク質のスペクトルに対応している。これに加え、ミトコンドリアの代謝活性を反映する 1602 cm^{-1} のラマンバンドも見られる¹。各々のバンドを用いて、生細胞を可視化した結果を図3に示す。生細胞のラベルフリー・マルチカラー(マルチモード)イメージングに、はじめて成功した。

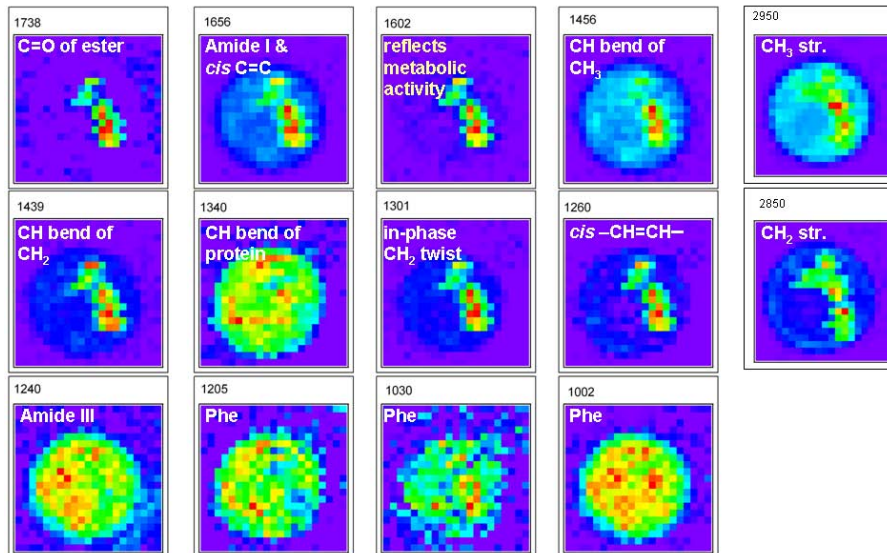


図3. 出芽酵母生細胞のラベルフリー・マルチカラー(マルチモード)CARS 分光イメージ。左上に、ラマンシフトの値と対応する振動モードの帰属を示す。

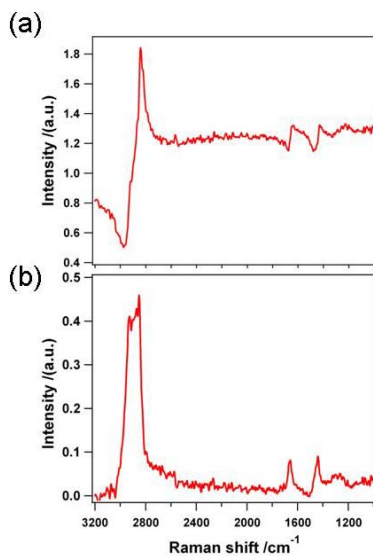


図4. 動物細胞(CHL細胞)のCARSスペクトル(a)及びMEMにより(a)から再構成した $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ スペクトル(b)

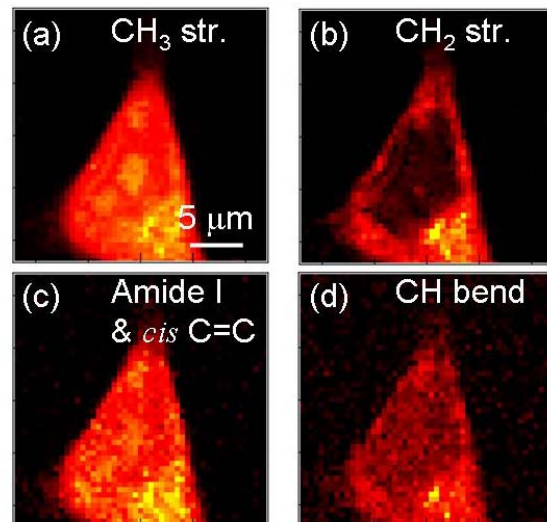


図5. 動物細胞(CHL細胞)のCARS分光イメージ。右上に振動モードの帰属を示す。

次に、本方法を動物細胞に適用した。図4(a)にChinese hamster lung (CHL)生細胞のCARSスペクトル(a)及びMEMにより復元した $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ スペクトル(b)を示す。自発ラマンスペクトルに対応する、歪みのないスペクトルが得られた。 $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ スペクトルにおいて特徴的な4つのバンド(CH_3 伸縮、 CH_2 伸縮、アミドI及び cis C=C の重畳したバンド、CH変角振動)を用いてイメージを構成した結果を図5に示す。 CH_3 伸縮(a)、 CH_2 伸縮(b)は、タンパク質及び脂質の分

布にそれぞれほぼ対応する。CH₂伸縮(b)のイメージで黒くなったエリアは、細胞核に相当する。このエリアにおけるCH₃伸縮イメージ(a)には、核内に構造物が見られるが、これらは核小体であると考えられる。この他、CH₂伸縮(b)のイメージには、信号の強い領域が細胞内に局在しているが、これらは脂質リッチなオルガネラ(膜系オルガネラや脂肪滴等)であると考えられる。このように、生細胞内のオルガネラを非染色・非標識にて可視化することが出来た。この他、生体組織(毛髪、皮膚等)についても、非染色・マルチカラーイメージを得ることに成功した。以上のように、白色レーザーを用いた実験手法とMEMIによるスペクトル解析により、生細胞から生体組織まで、様々な対象のCARS分光イメージングに成功し、CARS分光を用いた本手法の基盤技術を確立することができた。

2. 2. CARS ファイバースプローブの開発

CARS内視分光鏡実現のため、プロトタイプとしてCARSファイバースプローブを設計、開発した。

ファイバースプローブの写真及び実験装置を図6(a)に示す。光源にはピコ秒モード同期Nd:YVO₄レーザー(パルス幅 8 ps, 中心波長 1064 nm, 繰り返し 76 MHz)を用いた。発振器からの出力を二分岐し、一方を第二高調波(532 nm, 4W)に変換後、光パラメトリック発振器(optical parametric oscillator; OPO)のポンプ光として用いた。OPOからはシグナル光(690 - 990 nm)及びアイドラー光(1150 - 2300 nm)の二つの波長可変パルスが同時に出力される。本研究では、アイドラー光(~1147 nm)を用いた。光源から分岐したもう一方の光パルスは、基本波のままフォトニック結晶ファイバー(photonic crystal fiber; PCF)に導入して白色レーザー光を発生させた。白色レーザー光のスペクトルと写真を図6(b)に示す。白色レーザー光は可視から近赤外まで幅広いスペクトル広がりを持つが、そのうち近赤外光のみを用いた。近赤外光を用いることで、侵入長が深く、かつ生体試料に対する光損傷を抑えることができる。OPOからの

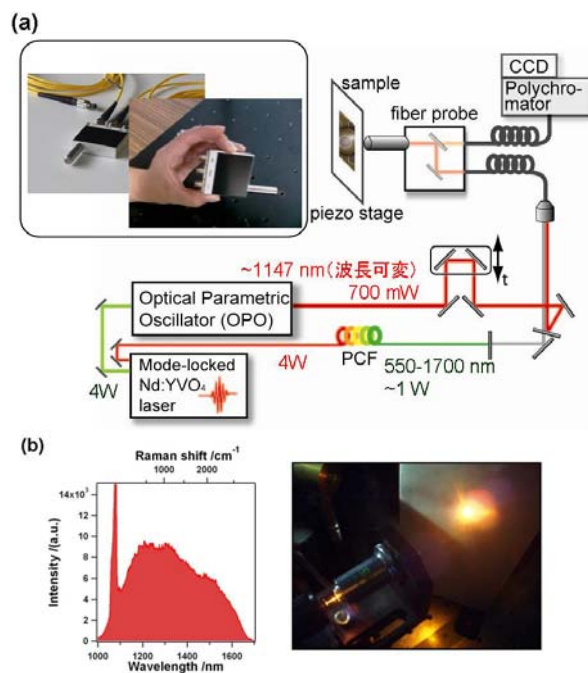


図6(a) CARS ファイバースプローブの写真(挿入図)及び実験装置図; PCF(photonic crystal fiber), (b)発生させた白色レーザー光のスペクトル(InGaAs 検出器の感度特性のため近赤外光のみ検出)及び写真

アイドラー光及びPCFからの白色レーザー光を、各々CARS過程の ω_1 光、 ω_2 光として用いた。 ω_1 光、 ω_2 光を、時間的遅延(τ)を合わせた後、同軸にしてシングルモードファイバーに導入した。ファイバースプローブ(特注品)にはダイクロイックミラーが内蔵されており、レーザー入射用とCARS受光用の二つの経路が一つの筐体コンパクトにおさめられている(図6(a)写真)。 ω_1 光、 ω_2 光を、プローブ先端に搭載したレンズ(焦点距離 10 mm)により試料に集光し、試料から発生したCARS光の後方散乱成分を、同じレンズで集めた。ダイクロイックミラーを透過したCARS光をマルチモードファイバーにより分光器へと導き、CCDカメラによりスペクトル測定を行った。試料は三軸ピエゾステージに載せることもできるため、スキャンすることでCARS分光イメージを得ることも可能である。

図7に、テスト試料として用いた p -ニトロアニリン微結晶(a)及びポリ(3-ヘキシルチオフェン)のキャスト膜(b)のCARSスペクトルを示す。露光時間はどちらも 100 msである。指紋領域において、各々NO₂対称伸縮(a)、CH変角振動(b)に由来する強い信号が観測された他、 p -ニトロアニリン微結晶では様々な振動モードに由来するバンドを多数検出した。 p -ニトロアニリン微

結晶について、NO₂対称伸縮のバンドを用いたCARS分光イメージングを行った結果を図8に示す。数マイクロメートルのサイズの微結晶が明瞭に可視化できていることがわかる。以上のように、CARSファイバースコープを用いることで、マイクロメートルスケールの分解能にてCARSスペクトル及びイメージの取得が可能であることが示された。

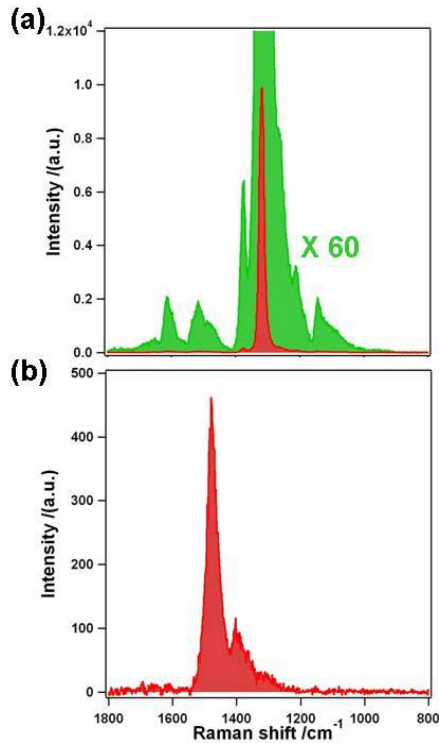


図7. *p*-ニトロアニリン微結晶(a)及びポリ(3-ヘキシルチオフェン)(b)のCARSスペクトル

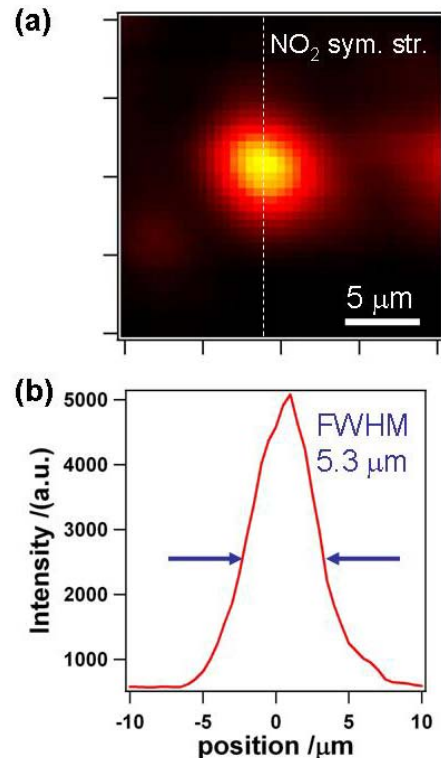


図8. *p*-ニトロアニリン微結晶のCARSイメージ(a)及び強度プロファイル((a)の白点線)(b)

最後に、*in-vivo* CARS分光を試みた。ヒト(H.K.)の上腕皮膚にマッサージオイルを塗布し、測定した結果を図9に示す。露光時間は10秒である。オイルに由来すると思われる信号が、微弱ながらCH変角振動領域(1450 cm⁻¹付近)に観測された。

以上のように、CARS内視分光鏡に向けて、白色レーザーを利用した、新しいCARSファイバースコープの開発を行った。顕微鏡では測定が困難である試料について、CARSの強みを活かした高速振動分光イメージングを行える可能性が示された。

参考文献

- [1] Y. -S. Huang, T. Karashima, M. Yamamoto, and H. Hamaguchi, *Biochemistry* 44, 10009 (2005).

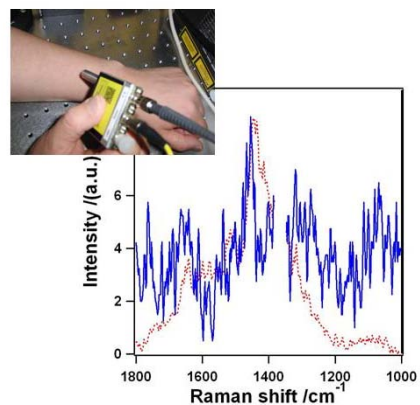


図9. ヒト上腕部(写真)にマッサージオイル塗布後、ファイバースコープにて測定したCARSスペクトル(青実線)。露光時間は10秒。CH変角振動領域に微弱な信号が観測された。図中赤点線は、マッサージオイルのCARSスペクトル。

3. 今後の展開

本研究により、白色レーザー光を用いた生細胞、生体組織のCARS分光イメージングの有用性を示すことが出来た。すなわち、生体試料を染色／標識することなく、“分子の指紋”であるラマン(CARS)スペクトルのみを用いて、分子レベルで“色づけ”できることが示された。本研究の今後の発展としては、この“分子の指紋”をより広く、そして深く活用することが挙げられる。例えば幹細胞科学と再生医療の分野では、細胞を選択して再利用する必要があるが、その際の選別は非侵襲的に行うことが必須である。細胞の分化プロセスのモニタリング、細胞スクリーニングなどに、本手法は大変有効であると考えられる。また、分子の指紋であるラマンスペクトルを丹念に“読む”ことは、分子の構造・機能・相互作用を“観る”ことにつながる。スペクトル情報を十二分に活用することで、生細胞、生体組織、そして生体個体まで、幅広い生命システムを対象として、分子の“機能”を観ることができるイメージングシステムを実現できる可能性がある。蛍光イメージングなど、従来法ではアプローチできない対象に本手法を適用し、更なる研究を展開していきたい。

4. 自己評価

本研究では、目標として掲げた CARS 内視分光鏡を、研究期間中に開発することができなかった。しかしながら、(1)新しい白色レーザー光源を用いることにより、生細胞や生体組織から分子の情報を直接抽出することのできる、新しい実験及び解析手法の立ち上げに成功した。そして、(2)新しいCARSファイバースコープを開発し、テスト試料について、CARS光の検出に成功した。以上により、CARS 内視分光鏡を開発するための基盤となる結果を得ることができた。

(1)については、顕微鏡、内視鏡、腹腔鏡などハードウェアによらない、CARS 分光イメージング全般に適用できる成果である。特に顕微イメージングについては、その方法論を確立したと考えている。

(2)で開発した CARS ファイバースコープは、内視分光鏡の実現を目指したプロトタイプのものであり、最終目標に向けて依然多くの課題が残っている。しかしながら、ハンディなプローブタイプの装置により、CARS スペクトルが取得可能であることが今回示された。生体組織からの信号は未だ得られていないが、研究期間中に見つけた問題点を解決し、蓄積したアイデアを試すことで、近い将来是非“使えるモノ”を立ち上げたい。

上記に加え、研究期間中、フランスの研究者との国際共同研究を並行して進めた。これにより、新しい白色レーザー光源を用いた、低コストかつコンパクトな CARS 分光イメージングシステムの製作が可能であることがわかった。製品化する上で基盤となる要素技術を、特許(加納英明・濱口 宏夫、「非線形分光計測システム用の光源装置、非線形分光計測システム及び方法」, 特願 2008-66832)として申請することが出来たことも、本研究の重要な成果の一つである。

5. 研究総括の見解

白色レーザーを光源とする CARS による分子イメージング技術の開発に成功し細胞への応用(基礎データ)には一応成果が挙げている点は高く評価したい。ファイバースコープの開発に成功したことも CARS 内視鏡の製作に寄与した。生体組織を見るレベルには至っていないが今後期待したい。ここで得られた分子構造情報を生体情報とどのように関連づけるのか、すなわちどのような生命現象を分子レベルで語れるようにするのが課題となろう。膜中の C-C 結合の trans-gauche に対応するピークを見た点は興味深い。細胞生物学、分子生理学、病理学、臨床への応用など今後の発展を大いに期待したい。いずれにしても良く頑張ったと高く評価したい。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

・ Masanari Okuno, Hideaki Kano, Philippe Leproux, Vincent Couderc, James Day, Mischa

	Bonn, and Hiro-o Hamaguchi, "Quantitative CARS molecular fingerprinting of single living cells with the use of the maximum entropy method", <i>Angewandte Chemie International Edition</i> , 49, 6773-6777 (2010).
	• Hideaki Kano, "Molecular Spectroscopic Imaging Using a White-Light Laser Source", <i>Bulletin of The Chemical Society of Japan</i> 83, 735-743 (2010).
	• Hideaki Kano, "Molecular Vibrational Imaging of a Human Cell by Multiplex Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microspectroscopy Using a Supercontinuum Light Source", <i>Journal of Raman Spectroscopy</i> 39, 1649-1652 (2008)
	• Masanari Okuno, Hideaki Kano, Philippe Leproux, Vincent Couderc, and Hiro-o Hamaguchi, "Ultrabroadband multiplex CARS microspectroscopy and imaging using a subnanosecond supercontinuum light source in the deep near infrared", <i>Optics Letters</i> , 33 (9), 923-925 (2008).

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件

発 明 者: 加納 英明, 濱口 宏夫
 発明の名称: 非線形分光計測システム用の光源装置、非線形分光計測システム及び方法
 出 願 人: 東京大学
 出 願 日: 2008/3/14

(3) 受賞

- 加納英明、光科学技術研究振興財団 研究表彰 (2008年3月)
- 加納英明、日本化学会 第57回進歩賞 (2008年3月)
- 加納英明、日本分光学会 若手奨励賞 (2009年11月)

(4) 著書

- 加納 英明, 奥野 将成, 濱口 宏夫, "脂質分子を"ありのまま"にとらえるー白色レーザーを用いた脂質分子の CARS 分光イメージングー", *実験医学* 5月号 28(8), 1234-1240 (2010).
- 加納 英明, 奥野 将成, 濱口 宏夫, "ナノ秒白色レーザーを用いたコヒーレント・ラマン分光イメージング", *レーザー研究* 37(10), 739-745 (2009).
- 加納 英明, 濱口 宏夫, "コヒーレントラマン分光イメージング", *オプトロニクス* 8月号 (332), 108-114 (2009).
- 奥野 将成, 加納 英明, 濱口 宏夫, "生細胞のラマン分光イメージング ~生命の分子レベル時空間解析に向けて~", *遺伝* 63(3), 80-84 (2009).
- 加納英明, "白色レーザーを用いた非線形ラマン分光イメージング", *分光研究* 57, 238-248 (2008).

(5)招待講演

招待講演(国際会議)

・Hideaki Kano, Masanari Okuno, and Hiro-o Hamaguchi, "CARS molecular fingerprinting using a white-light laser source", The 22nd International Conference on Raman Spectroscopy, Boston (2010).

・Hideaki Kano, Masanari Okuno, and Hiro-o Hamaguchi, " Label-free, multi-colour, high-speed imaging of a living cell by CARS spectral imaging", Laser Application in Life Sciences Conference (LALS-2010), Oulu (2010).

・Hideaki Kano, "CARS spectroscopic imaging using a white-light laser source", 5th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS-5), Melbourne (2009).

・Hideaki Kano, Hiro-o Hamaguchi, "CARS Spectroscopic Imaging Using a Supercontinuum Light Source", The 21st International Conference on Raman Spectroscopy, London (2008).

招待講演(国内会議)

・加納英明・濱口宏夫, "白色レーザー光を用いたコヒーレントラマン分光イメージング", レーザー学会学術講演会第30回年次大会, Feb 2 (2010).

・加納英明・濱口宏夫, "生細胞を染めずに見る ~振動分光を用いたアプローチ~", 2009年度 薬物動態談話会 特別例会, 浜松, Nov 19 (2009).

・加納英明・濱口宏夫, "コヒーレントラマン分光によるラベルフリー・マルチカラーイメージング", 生体医工学会, 東京, Apr 25 (2009).

・加納英明・濱口宏夫, "非線形ラマン分光法による非染色・マルチカラー生体計測 ~分子から生体組織まで~, (財)バイオインダストリー協会"未来へのバイオ技術"勉強会, 東京, Jan 14 (2009).

・加納英明・濱口宏夫, "生細胞の非線形ラマン分光イメージング", 光・量子デバイス研究会(電気学会研究会), 横浜, Feb 8 (2008).