

## ラマン散乱顕微鏡が拓く新しいバイオイメージング



技術解説

望月 健太郎\*, 藤田 克昌\*\*

Raman microscopy as a new modality of biomedical imaging

Key Words : Raman microscopy, label-free imaging, Raman-tag imaging

### はじめに

光は生体に優しいと言われ、光を用いた顕微観察技術は主に生きた細胞や生体組織の観察に力を発揮している。特に最近では、生体を生きたまま3次元的に観察する技術が多く登場しており、細胞や生体組織が織りなす生命活動をありのまま観察することが可能になった。生体分子が互いに相互作用し、時間的、空間的に複雑な動態を示し、その結果として生体機能が生じる様子が観察され、文字通り生体のパーツとして分子の働きを詳細に理解することが可能となった。

この光の優しさは光と物質との相互作用の弱さ故であるため、物質や材料を分析する上では弱点にもなり得る。一般的に使用される光学顕微鏡、たとえば明視野顕微鏡や蛍光顕微鏡では、試料は光を吸収する色素や蛍光を発する色素で標識された後に観察される。生体分子と光との相互作用が微弱であるた

め、画像を構成するコントラスト（明暗）を十分に与えることができないためである。色素標識は観察したい対象（分子）を特異的に観察する上では極めて強力な手法である。しかしながら、それだけで全ての生体分子を観察できる訳ではない。観察できる分子は色素で標識できることが分かっているものに限られ、理解したい生命活動を担う分子をあらかじめ知っておくか、予想しておく必要がある。また、そもそも標識が不可能な生体分子もある。実際のところ、生きた細胞中で比較的容易に標識できるのはタンパク質に限られ、小さな核酸、脂質、その他の生体分子や薬剤を観察することは難しい。

一方で分光光学に代表されるように、光は物質分析にも使用されている。実は光は分析に不向きという訳ではなく、その作用が小さいため、顕微観察で対象とする微小な物質の分析には感度が十分ではなかっただけである。なかでも赤外/近赤外吸収やラマン散乱は分子の振動の情報を検出し、試料中の分子や結晶格子の構造を知ること利用されている。昨今の光源技術や光検出技術の進展は、この微弱な相互作用を検出することを可能にし、顕微観察と分光分析とが融合した新しい顕微分光イメージング技術を登場させた。

本稿では、近年進展が著しい顕微分光イメージング技術でも、とくにラマン散乱分光と光学顕微鏡とを融合させたラマン散乱顕微鏡とそのバイオイメージングへの応用について紹介する。ラマン散乱分光法は、特に分析化学、物理化学、材料工学分野での分析に用いられ、すでに確立された技術という印象が強いが、顕微鏡技術との融合は、物理、化学、生物、医学分野まで広い科学分野において新しい知見を与えている。



\* Kentaro MOCHIZUKI

1987年5月生  
大阪大学 大学院工学研究科 博士後期課程 (2015年)  
現在、大阪大学大学院 工学研究科 特任研究員 博士(工学)  
TEL : 06-6879-7847  
FAX : 06-6879-7330  
E-mail : mochizuki@ap.eng.osaka-u.ac.jp



\*\* Katsumasa FUJITA

1972年12月生  
大阪大学 大学院工学研究科 博士後期課程 (2000年)  
現在、大阪大学大学院 工学研究科 精密科学・応用物理学専攻 教授 博士(工学) 光学  
TEL : 06-6879-7847  
FAX : 06-6879-7330  
E-mail : fujita@ap.eng.osaka-u.ac.jp

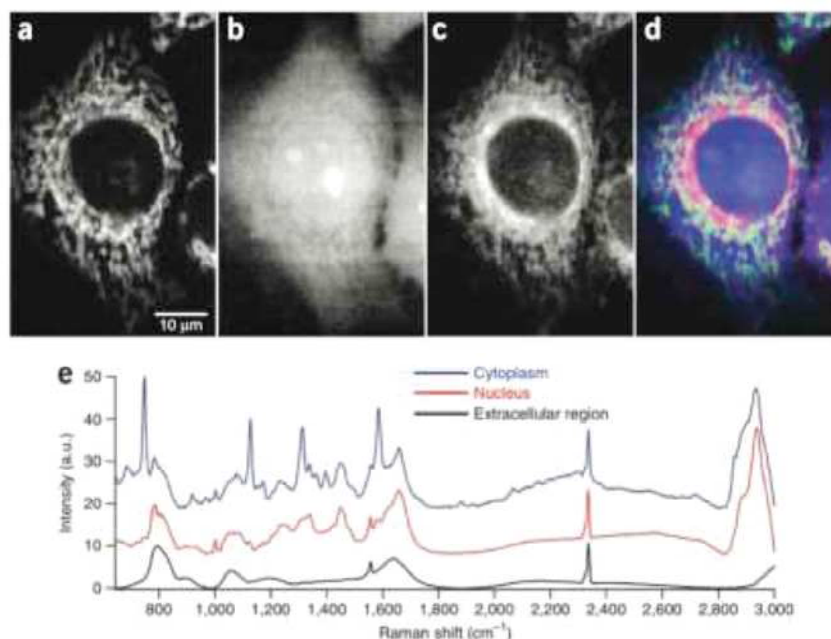


図1. 生きた子宮頸癌 (HeLa) 細胞のラマン散乱像 (a-d)、およびラマンスペクトル (e)。ラマン散乱像は、波数 (a)753cm<sup>-1</sup>, (b)1,686cm<sup>-1</sup>, (c)2,852cm<sup>-1</sup>におけるラマン散乱光強度で構築され、それぞれ細胞内のシトクロムc、タンパク質、脂質の分布に相当する。また、各分布をそれぞれ緑、青、赤の色チャンネルで表示した画像が (d) である。ラマンスペクトルは、細胞質領域 (青)、細胞核領域 (赤)、細胞外領域 (黒) それぞれから検出された平均スペクトルを表す。

## ラマン散乱顕微鏡

ラマン分光法は、試料中分子から得られるラマン散乱光を分子振動情報として読み解くことで、試料の組成や形状の測定を可能にする。入射光に対する物質の散乱現象のうち、入射光よりもエネルギーの低い (長波長側へシフトした) 散乱光を伴うものを、ストークスラマン散乱 (以下、ラマン散乱) と呼ぶ [1]。ラマン散乱過程に寄与する分子の振動状態は複数あるが、ラマン分光法では多くの場合において、分子の振動運動 (異なる振動準位間の遷移) と入射光の間のエネルギー享受に基づく振動ラマン散乱光を検出する [2]。分子種毎に固有振動数は異なるため、ラマン散乱過程において生じるエネルギー差、つまりラマン散乱光そのものの振動数も分子種毎に特有である。ラマン散乱光強度を励起光からのエネルギー差 (波数、ラマンシフト) 毎に表記したものが、いわゆるラマン散乱スペクトルである。試料から得られるラマン散乱スペクトルにより、試料内の物質構成や空間分布を取得できる。

ラマン散乱顕微鏡は、一般的にレーザー光源、顕微鏡体、対物レンズ、分光用光学フィルタ、分光器、2次元光検出器 (CCD カメラ) から構成される [3,4]。

ラマンスペクトル測定時は、レーザー光源が対物レンズにより試料に照射され、誘起されたラマン散乱光は同じ対物レンズにより集められ、分光器へと送られる。分光器内で分散されたラマン散乱光は、ラマンスペクトルとして検出される。イメージングを行う場合は、ガルバノメーターミラーもしくはピエゾステージにより照射レーザー光 (もしくは試料) を走査し、試料の各部位のラマンスペクトルを計測する。参考までに、図1は、ラマン散乱顕微鏡を用いて取得した、生きたヒト子宮頸癌 (HeLa) 細胞のラマン散乱像およびラマンスペクトルである。

これまでラマン散乱顕微鏡は、有機材料・半導体・化成品・生体物質など様々な試料の無標識観察・構造解析のために利用されてきたが、近年も改良が進んでいる。具体的には、撮像速度の向上 [5,6,7]、空間分解能の向上 [8]、撮像領域の広視野化 [9]、装置の小型化 [10] などがあげられる。主にイメージング速度を向上することを目的として、コヒーレントアンチストークスラマン散乱顕微鏡 [11] や誘導ラマン散乱顕微鏡 [12] 等のコヒーレントラマン分光法も確立されてきたが、本稿において詳細は割愛する。

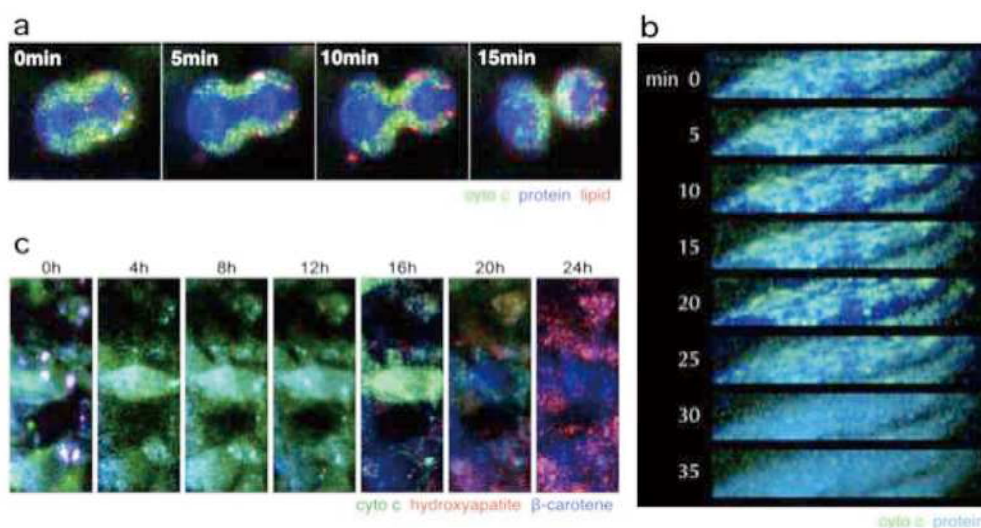


図2. ラマン顕微鏡を用いて観察された生体試料ダイナミクスの例。(a)は細胞分裂中のHeLa細胞の経時ラマンイメージング。(b)はアポトーシス過程におけるHeLa細胞内のシトクロムcの分布変化を、また(c)は骨芽細胞の石灰化過程においてハイドロキシアパタイトが生成される様子を捉えた例。

### 無標識観察バイオイメーjing

生体試料の分布やダイナミクスをありのままに観察する場合、非侵襲・無標識で行えることは極めて重要である。ラマン散乱顕微鏡により、生体試料の形状や機能を無標識で観察した例がこれまで数多く報告されている。

2008年に我々は、ライン照明型ラマン散乱顕微鏡を用いて、細胞分裂中のHeLa細胞の経時ラマンイメージングの結果を報告した(図2-a) [5]。分裂に伴う細胞内のシトクロムc、タンパク質、脂質の分布変化が観察できる。またKongらは、多焦点型ラマン散乱顕微鏡を用いて単一細菌包子の発芽過程の経時ラマンイメージングを報告した [13]。図2-bには、細胞のアポトーシス(細胞の自死機能)におけるシトクロムcの空間分布を経時観察した例を示す [14]。アポトーシスを誘導する薬剤(Actinomycin D)をHeLa細胞に投与後、数時間経過してからラマン散乱顕微鏡により観察された。観察開始後30分において、ミトコンドリア内に局在していたシトクロムcが細胞全体に広がった。これは、アポトーシスにおいてシトクロムcがミトコンドリアから細胞質へと放出される過程を捉えたものである。また、図2-cには、マウス骨芽細胞の石灰化過程を経時観察した例を示す [15]。これまで観察が困難であった、ハイドロキシアパタイト(骨の主成分として知られる)が生成される様子が捉えられた。

### ラマンタグイメージングによる小分子検出

これまで分子量の小さな、いわゆる小分子を生き細胞中で観察することはこれまでほぼ不可能であった。通常、細胞内分子を特異的に観察するには、蛍光分子などの標識を観察対象に付加し、標識の蛍光発光を頼りに観察するのが一般的である。しかし、小分子は蛍光標識よりも小さいか同じ程度の大きさをもつため、標識された小分子の細胞内での振る舞いは、小分子そのものの振る舞いと大きく異なってしまう。そのため小分子の観察を可能とする技術が求められてきた。

小分子が生じるラマン散乱を観察することは原理的には可能であるが、細胞内の他の分子のラマン散乱との見分けが難しい。細胞内に高濃度で存在する脂質やタンパク質、共鳴ラマン効果を期待できるシトクロムcは、強いラマン散乱を生じる。それらの散乱光の中から、低濃度で、かつ共鳴ラマン効果も与えない分子を検出するのは困難である。

細胞内の特定の分子をラマン散乱顕微鏡により検出するために我々は、アルキンを標的分子にタグとして付加し、小分子の検出を可能にするラマンタグイメージング法を提案した [16]。アルキンのもつ炭素間三重結合は、生体分子由来のラマンピークがほとんど存在しない波数領域(サイレント領域)にラマンピークをもつため、アルキンタグからのラマン散乱光は、生体分子由来のラマンピークと重なることなく検出される。このためアルキンを付加した小

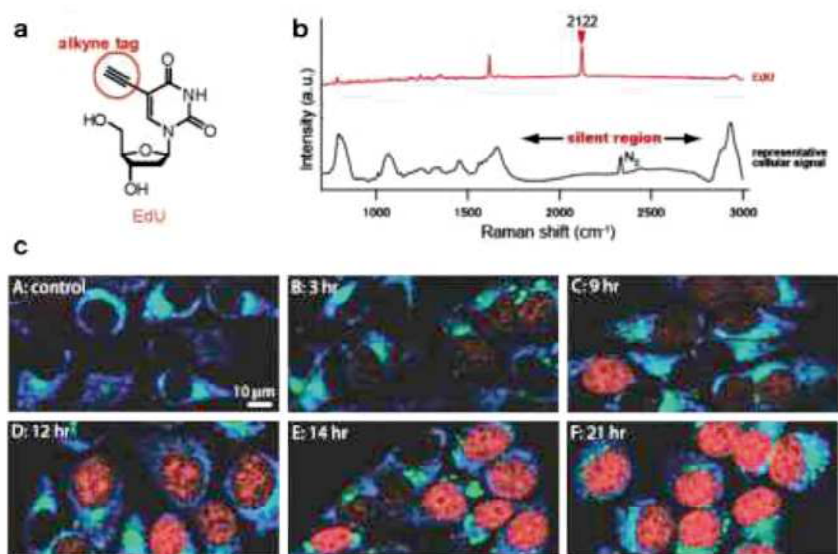


図3. (a)EdUの構造式。赤線で囲まれた箇所が、付加されたアルキンタグに該当する。(b)EdU、および細胞の代表的なラマンスペクトル。EdUは、細胞由来のラマンピークがほとんど存在しない波数領域(サイレント領域)に、アルキン由来のラマンピークを持つ。(c)EdUと共に培養されたHeLa細胞のラマン散乱像。培養時間毎にEdUが細胞核に集積する過程を示す。

分子は、アルキンのラマン散乱を頼りに、他の分子と区別して観察できる。アルキン自体の分子量は25であり、一般的な蛍光分子のそれと比べてもおよそ10倍以上小さい。そのため、これまで蛍光分子を標識できなかった小分子もラマンタグにより標識が可能となる。

我々は、dU(2'-deoxyuridine)にアルキンタグを付加したEdU(5-ethynyl-2'-deoxyuridine)を細胞内に導入してラマン散乱顕微鏡で観察した。図3-a,bに、EdUの構造式およびラマン散乱スペクトルを示す。dUはDNAの構成成分であるdT(2'-deoxythymidine)と構造が似ているため、細胞内におけるDNA合成時にdTと誤認されてDNAに取り込まれ、細胞核に集積することが知られている。図3-cは、EdUと共に培養したHeLa細胞のラマン散乱像である。培養時間毎に、細胞核にEdUが集積する過程が見られる。21時間後には視野内の全ての細胞の核にEdUが集積しており、HeLa細胞の倍加時間である20時間と一致していることから、アルキンタグがdTの取り込みに大きな影響を与えなかったことが推察できる。アルキン以外にも、ニトリルやアジドなどをラマンタグとして利用した生体試料イメージングも複数報告されている[17,18]。また近年では、Minらによりラマンタグ技術がSRS顕微鏡にも応用され、生体

試料の多色イメージングなどに成功した[19]。

### おわりに

本稿では近年我々が開発した高速観察可能なラマン散乱顕微鏡を用いて可能となった新しいバイオイメージングの手法について紹介した。2014年にノーベル化学賞が送られた超解像顕微鏡をはじめとして、バイオイメージングのための技術開発は急速に進んではいるが、実際に観察可能な生体分子、構造はまだまだ限られている。10 $\mu$ mの微細な空間で、その分布や状態をダイナミックに変化させる生体分子や微細構造を十分な空間分解能、時間分解能で、分析および観察できる技術の実現に向け今後も研究開発が進むと期待される。

ラマン分光法は、物理化学、分析化学、様々な材料分析に日常的に利用されており、すでに確立された分析手法として、技術的な新しさを感じさせないかもしれない。しかし、顕微鏡技術との融合は、従来のラマン分光法では分析できなかった微小な領域の観察において新しい知見を多く与えている。それは、従来の材料分析だけでなく、生物学、医学、創薬分野にまで広く渡っており、今後さらに普及が進むのは確かであろう。

参考文献

- 1) A. T. Tu, "Raman Spectroscopy in Biology: Principles and Applications", Wiley (1982).
- 2) 浜口宏夫, 平川暁子 / 編 "ラマン分光法", 学会出版センター (1988).
- 3) H.J. Butler et al., Nat. Protoc., Vol.11, pp.664-687 (2016).
- 4) A.F Palonpon et al., Nat. Protoc., Vol.8, pp.677-692 (2013).
- 5) K. Hamada et al., J. Biomed. Opt., Vol.13, No.4, p.044027 (2008).
- 6) M. Okuno and H. Hamaguchi, Opt. Lett., Vol.35, No.24, pp.4096-4098 (2010)
- 7) J. Ling et al., Appl. Opt., Vol.41, No.28, pp.6006-6017 (2002)
- 8) K. Watanabe et al., Nat. Commun., Vol.6, p.10095 (2015)
- 9) W. Muller et al., Optica, Vol.3, No.4, pp.452-457 (2016)
- 10) M. Jermyn et al., Sci. Tranl. Med., Vol.7, No.274, pp.274ra19 (2015)
- 11) C. W. Freudiger et al., Science, Vol.322, No.5909, pp.1857-1861 (2008)
- 12) M. D. Duncan et al., Opt. Lett., Vol.7, No.8, pp.350-352 (1982)
- 13) L. Kong et al., J. Biomed. Opt., Vol.19, No.7, p.011003 (2014)
- 14) M. Okada et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.109, No.1, pp.28-32 (2012)
- 15) A. Hashimoto et al., Sci. Rep., Vol.5, p.12529 (2015)
- 16) H. Yamakoshi et al., J. Am. Chem. Soc., Vol.133, No.16, pp.6102-6105 (2011)
- 17) H. Yamakoshi et al., J. Am. Chem. Soc., Vol.134, No.51, pp.20681-20689 (2012)
- 18) J. Ando et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.112, No.15, pp.4558-4563 (2015)
- 19) L. Wei et al., Nature, Vol.544, No.7651, pp.465-470 (2017)

