

# 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

加納 英明・奥野 将成・濱口 宏夫

## Coherent Raman Spectroscopic Imaging by a Nanosecond White-Light Laser Source

Hideaki KANO, Masanari OKUNO and Hiro-o HAMAGUCHI

Coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy has become a powerful technique for label-free and noninvasive imaging of chemical and biological systems at the molecular level. We have extended the CARS technique from monochromatic imaging (microscopy) to multi-color imaging (microspectroscopy) with use of a multiplex CARS process and spectroscopic imaging. For the broadband Stokes laser, a nanosecond white-light laser source is used. Owing to an ultrabroadband spectral profile of the white-light laser, a wide range of the vibrational resonances can be investigated.

**Key words:** coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS), white-light laser, supercontinuum, microscopy, microspectroscopy, living cell

近年, coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) 顕微鏡による *ex vivo* または *in vivo* イメージングが, 細胞や組織などさまざまな対象に幅広く応用されている<sup>1)</sup>. CARS 過程による非線形な信号強度の増強により, 特に脂質分子のイメージングについては, ビデオレートでのイメージングが実現する<sup>2)</sup> など発展が著しい. CARS 過程では, 図 1 (a) に示すように, 一般に波長の異なる 2 つのレーザー光 ( $\omega_1$ ,  $\omega_2$  光, またはポンプ光, ストークス光ともいう) を用いる. これら 2 つの入射光の角振動数差  $\omega_1 - \omega_2$  が試料分子のもつ振動モードの角振動数  $\Omega$  と一致すると, 多数の試料分子の振動モードが共鳴的に励振される. このようにして生じた振動コヒーレンスは, 試料分子が 3 つ目のレーザー光 ( $\omega_3$  光, またはプローブ光ともいう) と相互作用することにより, 三次の非線形分極に由来する  $\omega_{\text{CARS}}$  光として取り出される. エネルギー保存則から,  $\omega_{\text{CARS}} = \omega_1 - \omega_2 + \omega_3$  であることが要請される. また, 位相整合条件から, CARS 光は  $\mathbf{k}_{\text{CARS}} = \mathbf{k}_1 - \mathbf{k}_2 + \mathbf{k}_3$  の方向に発生する. ここで,  $\mathbf{k}_x$  は  $\omega_x$  光の波数ベクトルである.  $\omega_3$  光として, しばしば  $\omega_1$  光が用いられる. その場合 ( $\omega_3 = \omega_1$ ),  $\omega_{\text{CARS}}$  光の信号強度は  $\omega_1$  光および  $\omega_2$  光の強度の 2 乗および 1 乗に

それぞれ比例する. すなわち,  $\omega_{\text{CARS}}$  光の信号強度は  $\omega_1$  光の強度に対して非線形に増大する. また, 位相整合条件から, CARS 過程により指向性のよいラマン散乱光を得ることができる. このように, ラマン散乱光をコヒーレントかつ非線形に増幅することができるため, 高速イメージ測定も可能になる. しかしながら, 通常の“CARS 顕微鏡”では,  $\omega_1$ ,  $\omega_2$  光としておのおの単色のレーザー光を用いるため, 特定かつ単一の振動モードしか可視化することができない (モノクロ・イメージング). このことは, 脂質分子の  $\text{CH}_2$  伸縮振動のように, 他のバンドから比較的離れ, かつラマン散乱断面積の比較的大きい振動モードについては大きな問題とならないが, 指紋領域のように多数のバンドが密集しているスペクトル領域では致命的な欠点となる. 一般に, 測定により得られる  $\omega_{\text{CARS}}$  光の波長成分には, 振動モードに共鳴する CARS 光のほか, 図 1 (b) に示す非共鳴バックグラウンド (nonresonant background; NRB) とよばれる光学過程による成分も含まれる. われわれの経験では, 特に生細胞の指紋領域のバンドを測定する際, これらの強度は同じオーダーとなるため, 通常の CARS 顕微鏡では両者を分離することができない. これまでに,

東京大学大学院理学系研究科化学専攻 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1) E-mail: hkano@chem.s.u-tokyo.ac.jp

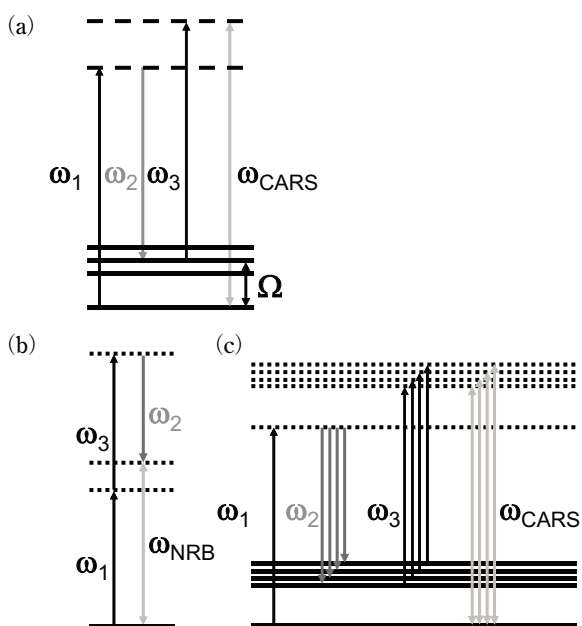


図1 (a) coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) 過程, (b) 非共鳴バックグラウンドが発生する光学過程の一例, (c) マルチプレックス CARS 過程.

NRB を抑制するさまざまな手法が提案されているが<sup>3,4)</sup>, 抑制と同時に, 振動共鳴した CARS 成分の光強度も減じてしまうため, 根本的な解決には至っていない.

通常の CARS 顕微鏡では, これに加え, より本質的な問題がある. 振動スペクトルは, 測定中常に同じ形状を示すとは限らない. このことは, 単一波長のイメージングでは, 測定領域における分子数の変化 ( $\Delta N$ ) と, 分子の構造変化に伴うスペクトル変化またはピーク位置変化 ( $\Delta\Omega$ ) を見分けることができない, ということを意味する. 振動分光法は, 本来そのような構造変化を鋭敏にとらえることができる方法であり, スペクトル測定により  $\Delta N$  および  $\Delta\Omega$  を独立に評価することができる. したがって, 分光イメージングは, 振動イメージングにおいて必須である. 近年, CARS と同じ三次の非線形ラマン散乱である, ラマン利得またはラマン損失分光法を用いた stimulated Raman scattering (SRS) 顕微鏡という方法も報告されている<sup>5,6)</sup>. SRS 顕微鏡では NRB の影響はないが, やはり単一波長のイメージングであるため,  $\Delta N$  および  $\Delta\Omega$  の問題は依然存在する.

複数の振動モードについての情報を同時に取得し, NRB の影響のない, 純粹に振動共鳴した CARS 信号を得るためには, CARS スペクトルの取得が欠かせない. 図 1 (c) に示したマルチプレックス CARS 過程は, 広帯域ストークス光 ( $\omega_2$  光) を用いることで複数の振動モードを共鳴的に励振させ, CARS スペクトルを得る方法であるが,

レーザーの発振帯域などの制約があったため, これまで部分的なスペクトル領域での測定しか行うことができなかった. 近年, フォトニック結晶ファイバーを用いることで得られるスーパーコンティニューム光 (以降白色レーザーとよぶことにする), または広帯域発振 Ti:sapphire レーザーの直接出力を用いる<sup>7,8)</sup> ことで, 超広帯域マルチプレックス CARS 分光イメージングが可能になった. これにより, 分子振動基本音のすべての領域にわたる CARS 光発生が可能となり, CARS を用いた振動分光イメージングの基盤が確立した<sup>9,10)</sup>.

通常の CARS 顕微鏡についてはこれまで多くの解説が発表されているので<sup>1,3,4)</sup>, 本稿では, マルチプレックス CARS 顕微鏡分光法を用いた生細胞のイメージングに焦点を絞ることとする. はじめに CARS 分光イメージングによる細胞のイメージングについて概観し, 次に, われわれが最近取り組んでいる, ナノ秒白色レーザーを用いたマルチプレックス CARS 分光イメージング<sup>11)</sup> について詳述する.

## 1. マルチプレックス CARS 分光による生細胞イメージング

CARS 顕微鏡は, 1982 年に Duncan らにより初めて報告された<sup>12)</sup>. 彼らは重水に浸したタマネギの表皮細胞を用い, O-D 伸縮振動により細胞を可視化した. その後, 1999 年に Zumbusch らが HeLa 細胞やバクテリアの C-H 伸縮振動<sup>13)</sup>, そして 2000 年に Hashimoto らが出芽酵母のアミド III (指紋領域に位置する, タンパク質由来のバンド) による CARS イメージング<sup>14)</sup> を報告した. 両者とも, Ti:sapphire レーザー発振器および再生増幅器による, 高尖頭出力・低繰り返し ( $\sim$  kHz) の光パルスを用いたものであった. それ以降, レーザー技術の発展により, 複雑で大がかりなレーザーシステムを用いることなく, レーザー発振器のみで CARS イメージング<sup>15)</sup> およびマルチプレックス CARS 分光イメージング<sup>9,10,16)</sup> が可能になった. Cheng らは, 同期させたピコ秒およびフェムト秒 Ti:sapphire レーザー発振器 2 台を用いたマルチプレックス CARS 分光顕微鏡を構築し, C-H 伸縮振動を用いた NIH 3T3 生細胞の可視化を行った<sup>17)</sup>. われわれも, 分裂酵母生細胞 (*Schizosaccharomyces pombe*) のマルチプレックス CARS 分光イメージング<sup>18)</sup>, および二光子励起蛍光 (two-photon excitation fluorescence; TPEF) との組み合わせによる非線形マルチモーダルイメージング<sup>19)</sup> の報告を行った. Rinia らは, 生細胞中の脂肪滴について, C-H 伸縮振動に加え, *cis* 型の C=C 伸縮振動によるイメージングを報告している<sup>20)</sup>. 一方, Isobe らは, 超広帯域 Ti:sapphire レーザー発

振器からの直接出力を用いることで、C-H および O-H 伸縮振動のイメージングを報告している<sup>7)</sup>。

X-H 伸縮振動 (X=C, N, および O), 特に C-H 伸縮振動における CARS 分光イメージングの研究は、このほかにも多数の報告例がある。これに対して、指紋領域における CARS 分光イメージングは、現在でもチャレンジングな研究領域であり、これまでのところ生細胞については数例の報告しかない<sup>8, 16, 21-24)</sup>。Pestov らはモード同期ピコ秒レーザーを用いて、細菌胞子のマルチプレックス CARS スペクトルの測定を行った<sup>16)</sup>。複数の細菌胞子から得た平均化された CARS スペクトルから、最大エントロピー法 (maximum entropy method; MEM) などの利用により、自発ラマンスペクトルに対応する  $\text{Im}[\chi^{(3)}]$  スペクトルを得た。 $\text{Im}[\chi^{(3)}]$  スペクトルには、細菌胞子の主成分であるジピコリン酸に由来するバンドがみられた。細菌胞子は小さいため、胞子内の分子分布をみることは難しい。細胞内の分子分布については、最近になっていくつかの報告例がある<sup>8, 23, 24)</sup>。Parekh らは、固定化した L929 細胞を用いた指紋領域の CARS 分光イメージングを行った。時間領域 Kramers-Kronig 変換を用いることで、歪んだ CARS スペクトルの復元が可能であることを示した。Chen らは、チャープした広帯域光パルスを用いた周波数変調 CARS 法という方法を用い、細胞壁のセルロースやリグニンを可視化した<sup>8)</sup>。これらの方法では、フェムト秒またはピコ秒レーザーが必須であった。これに対してわれわれは、サブナノ秒マイクロチップレーザーを用いたマルチプレックス CARS 分光イメージングシステムを立ち上げ、先述の報告に先んじて生細胞の指紋領域 CARS 分光イメージングを実現した (CARS molecular fingerprinting)<sup>11, 23)</sup>。サブナノ秒光パルスを PCF に導入することで、紫外から近赤外にわたるスペクトル帯域をもつナノ秒白色レーザー光を発生させることが可能である。また、パルス幅がナノ秒程度と幅広いため、フェムト秒・ピコ秒の光源では必須であった光学遅延路などが不要となり、システムが革新的に簡略化された。本システムを用いることで、後述のように、生細胞の動態追跡を指紋領域の振動モードで行うことにも成功した。

## 2. 実験装置

図 2 (a) に、われわれが開発した超広帯域マルチプレックス CARS 分光顕微鏡の実験装置を示す<sup>11)</sup>。光源にはサブナノ秒マイクロチップレーザー (繰り返し 33 kHz, パルス幅 800 ps, スペクトル幅  $< 1 \text{ cm}^{-1}$ , 中心波長 1064 nm) を用い、出力の一部を PCF (特注品, Leukos 社) に導入し

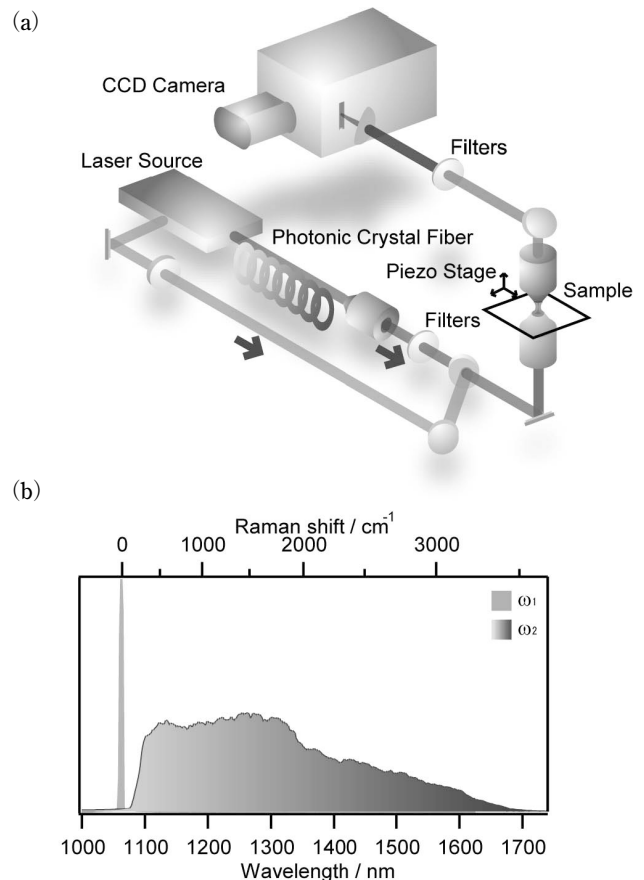


図 2 (a) 白色レーザー光を用いたマルチプレックス CARS 顕微分光システムの実験装置図, (b) ポンプ光・ストークス光のスペクトル。

て白色レーザー光を発生させた。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を有するが、そのうち 1064 nm 以上の近赤外成分のみを広帯域ストークス光 ( $\omega_2$  光) として用いた。一方、発振器からの残りの基本波をポンプ光 ( $\omega_1$ ) とし、ノッチフィルターによりストークス光と同軸に顕微鏡へと導入した。この顕微鏡は、倒立顕微鏡 (Nikon, ECLIPSE Ti) の上部に正立顕微鏡を組み合わせ、CARS 用に改造を施した正立顕微鏡システムである。2つの光パルスは倒立側の対物レンズにより試料に集光される。通常、CARS 発生には位相整合条件が満たされる必要があるが、対物レンズの高い NA 値のため、この条件は緩和され、幅広い波数領域で CARS 光の発生が可能となっている。試料から発生した CARS 光を正立側の対物レンズで集め、各種フィルターを経由させた後、分光器 (Acton 社, SpectraPro2300i または LS785) および CCD カメラ (Roper Scientific 社, PIXIS 100BR) で分光測定した。試料は三軸ピエゾステージ (MadCity, Nano-LP200) 上に載っており、三次元的なスキャンが可能である。

図 2 (b) に、 $\omega_1$ ,  $\omega_2$  光のスペクトルを示す。白色レー

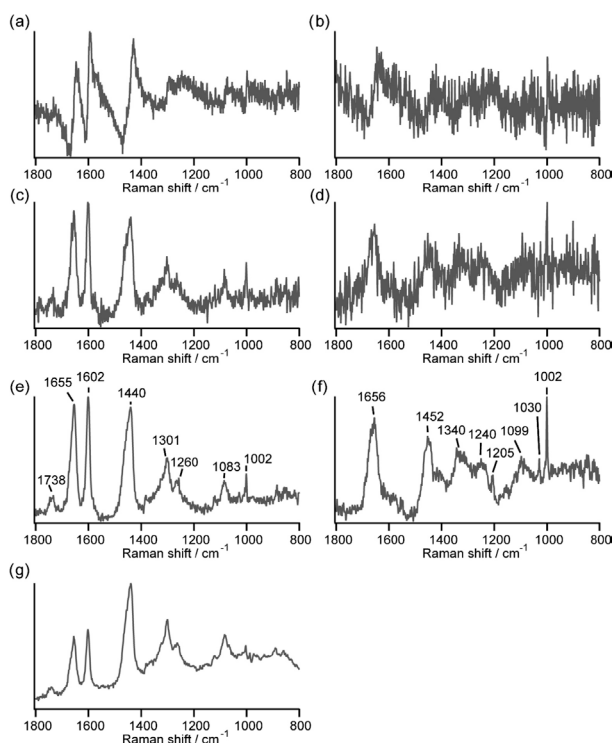


図3 (a) (b) 出芽酵母生細胞内の異なる空間点におけるマルチプレックス CARS スペクトル, (c) (d) MEM により復元した  $\text{Im}[\chi^{(3)}]$  スペクトル, (e) (f) SVD 解析後の  $\text{Im}[\chi^{(3)}]$  スペクトル, (g) 自発ラマンスペクトル. CARS および自発ラマンスペクトルの測定時間はそれぞれ 50 ms および 300 s である.

レーザー光のスペクトルは指紋領域から X-H 伸縮振動 (X=C, N, および O) にまで及んでおり, 分子振動基音すべてを励振できることがわかる. 実測のマルチプレックス CARS スペクトルは, 図2 (b) に示す白色レーザー光のスペクトル形状, 分光器および CCD カメラの分光特性を反映して歪みをもつため, 強度補正が必要である. 本研究では, 試料下部にあるカバーガラスからの NRB を測定し, 試料のスペクトルを NRB で割ることで, 強度補正を行った.

$\omega_1$  光は十分細い線幅をもつため, CARS スペクトルの分解能はおもに分光器によって決まる. 本装置のスペクトル分解能およびスペクトル帯域は, 焦点距離 30 cm の分光器 (Acton 社, SpectraPro2300i) および 600 grooves/mm の回折格子を用いたとき, それぞれ  $5 \text{ cm}^{-1}$  および  $1200 \text{ cm}^{-1}$  であった. 空間分解能は,  $100\times / \text{NA } 1.3$  の対物レンズを用いたとき, 面内および光軸方向について, それぞれ 470 nm および  $4.5 \mu\text{m}$  であった.

### 3. 実験結果

#### 3.1 出芽酵母生細胞

図3 (a), (b) に, 指紋領域のマルチプレックス CARS スペクトルを示す<sup>23)</sup>. 試料は出芽酵母生細胞 (*Saccharo-*

*myces cerevisiae* および *Saccharomyces bayanus* の接合体 (四倍体)) であり, 細胞内の異なる空間点 2 点におけるスペクトルが示されている. 露光時間は 50 ms である. 酵母は YPD 培地にて培養し, 測定前にガラスボトムディッシュ上に分散させた. ガラスボトムディッシュのカバーガラスには ConA をコートしてあるため, 酵母はカバーガラス近傍に貼りついている.

われわれのこれまでの顕微自発ラマン分光の研究との比較から, 図3 (a), (b) はそれぞれミトコンドリアおよび細胞質 (および核) のスペクトルであることがわかった<sup>25)</sup>. 図3 (a), (b) にみられる鋭い分散型の構造は, すべて振動共鳴に由来するものである. 分散型になるのは, 振動共鳴した CARS 光と NRB とが干渉するためである. この干渉現象は, 振動共鳴した CARS 光が, NRB をローカル・オシレーターとしてヘテロダイン検波されている, といいかえることもできる. この特徴を利用することで, 最大エントロピー法 (MEM) により, 振動共鳴成分の振幅・位相を復元することができる<sup>26)</sup>. MEM では振動バンドについてのア・プリオリな情報を必要とせず, 三次の非線形複素感受率  $\chi^{(3)}$  を復元することができる. 生細胞のラマンスペクトルは, ローレンツ関数などで近似することのできないさまざまな形状の振動バンドが指紋領域に密集しているため, この特徴は非常に重要である. 三次の非線形複素感受率  $\chi^{(3)}$  の虚部は通常の自発ラマンスペクトルに対応するため,  $\text{Im}[\chi^{(3)}]$  の値は分子濃度に比例する. いいかえると, MEM により, 複雑なマルチプレックス CARS スペクトルから振動共鳴成分のみを抽出することができ, かつ得られた振動バンドについて, それぞれを定量的に評価することができる. 図3 (c), (d) に, MEM により図3 (a), (b) から復元した  $\text{Im}[\chi^{(3)}]$  スペクトルを示す. 分散型の歪みが良好に補正されていることがわかる. MEM による CARS スペクトルの復元については, すでに文献<sup>21, 27)</sup> に報告例がある. 本研究では, MEM による復元後, さらに特異値 (singular value decomposition; SVD) 解析を行い<sup>28)</sup>,  $\text{Im}[\chi^{(3)}]$  スペクトルにおけるノイズフィルタリングを行った. 結果を図3 (e), (f) に示す. 図3 (c), (d) と比べ, 信号対雑音比が格段に向上していることが明らかである. SVD 解析は, MEM による復元を行う前の CARS スペクトル (濃度に対して線形および非線形の因子が同時に含まれている) に対して行うことができない. この点で, MEM と SVD の併用は, 大変有効である. 比較のため, 図3 (g) に自発ラマンスペクトルの結果を示す. 複雑な CARS スペクトルが, MEM により正確に  $\text{Im}[\chi^{(3)}]$  スペクトルへと変換されていることがわかる.

次に、おのおののスペクトルを“読む”ことにする。図3 (e) には、1655, 1602, および  $1440\text{ cm}^{-1}$  において顕著なバンドがみられる。これらのバンドは、顕微自発ラマン分光の研究によりすでに同定している<sup>25, 29</sup>。  $1655\text{ cm}^{-1}$  のバンドは、不飽和脂質に含まれる *cis* 型の C=C 結合の伸縮振動と、タンパク質に含まれるアミド I (おもにペプチド結合由来の C=O 伸縮振動) との2つの振動モードの重なったバンドである。  $1440\text{ cm}^{-1}$  のバンドは、C-H 変角振動に帰属することができる。このバンドはやや非対称な形をしているが、それは  $\text{CH}_2$  変角振動と  $\text{CH}_3$  変角振動が重畳しているためである。後ほど示すように、これら2つのバンドを分割して、  $\text{CH}_2$  変角振動と  $\text{CH}_3$  変角振動のそれぞれのイメージを構築することができる。  $1602\text{ cm}^{-1}$  のバンドは、われわれのこれまでの研究から、非常にユニークな特性をもつことがわかっている<sup>25, 29</sup>。このバンドはミトコンドリアに局在しており、酵母の代謝活性を鋭敏に反映する。われわれは、このバンドを“生命のラマン分光指標”と名付け<sup>29</sup>、そのバンドを与える分子について研究を進めている<sup>30</sup>。図3 (e) には、そのほかにもさまざまなバンドがみられる。1738, 1301, 1260,  $1083\text{ cm}^{-1}$  のバンドはそれぞれ、エステル結合由来の C=O 伸縮振動、  $\text{CH}_2$  面内ひねり振動、 *cis* 型の  $-\text{CH}=\text{CH}-$  結合由来の面内 C=C-H 変角振動、 *gauche* 型のコンフォメーションに由来する C-C 骨格振動である。これらのバンドはリン脂質などの脂質分子によるものであり、二層の脂質二重膜により構成されるミトコンドリアでは、特にその信号強度が大きいと予想される。一方、  $1002\text{ cm}^{-1}$  における鋭いバンドはタンパク質のフェニルアラニン残基に帰属できる。フェニルアラニン残基に帰属できるバンドは、このほか小さいながら  $1205$  および  $1030\text{ cm}^{-1}$  にもみられる。図3 (e) にみられるすべての特徴は、図3 (g) に示した自発ラマンスペクトルとほぼ完全に一致している。

次に、細胞質 (および核) のスペクトル (図3 (f)) を“読む”ことにする。このスペクトルは、ミトコンドリアのスペクトルである図3 (e) とまったく異なる。すでに議論したように、  $1002\text{ cm}^{-1}$  のバンドはタンパク質のフェニルアラニン残基に帰属できる<sup>25</sup>。このバンド強度が大きいことは、細胞質 (および核) では脂質に比べタンパク質濃度が高いことを意味している。したがって、  $1656$ ,  $1452$ , および  $1240\text{ cm}^{-1}$  におけるバンドはタンパク質由来のアミド I, C-H 変角, そしてアミド III (C-N 伸縮と面内 N-H 変角の混ざった振動モード) であると帰属できる。これらのバンドの中で、特に C-H 変角振動のピーク位置 ( $1452\text{ cm}^{-1}$ ) が図3 (e) のピーク位置 ( $1440\text{ cm}^{-1}$ ) と異なるこ

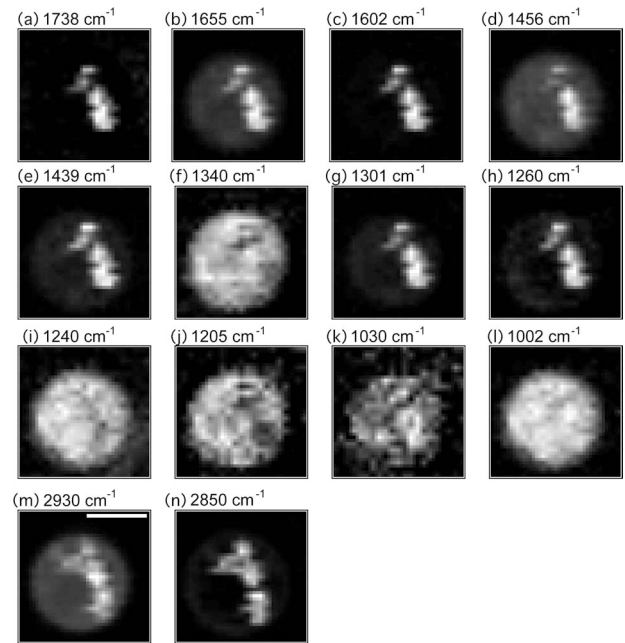


図4 出芽酵母生細胞の CARS イメージ。1738, 1655, 1602, 1456, 1439, 1340, 1301, 1260, 1240, 1205, 1030, および  $1002\text{ cm}^{-1}$  のバンドにてイメージを構成した (a)~(l)。スケールバーは  $4\text{ }\mu\text{m}$  である。これらはすべて同時に得られた。比較のため、  $2930\text{ cm}^{-1}$  (m) および  $2850\text{ cm}^{-1}$  (n) における CARS イメージも示す。

とは興味深い。このピーク位置の違いは、  $\text{CH}_2$  よりも  $\text{CH}_3$  のほうが、より C-H 変角振動のバンドに寄与していることを意味する。このことは、脂質と比べ、末端のメチル基を多数有するタンパク質のほうが  $\text{CH}_3/\text{CH}_2$  のバンド強度比が大きいことと、よい一致を示している。タンパク質のバンドのほかに、  $1099\text{ cm}^{-1}$  には核酸に帰属できるバンド ( $\text{PO}_2^-$  対称伸縮振動) もみられる。

以上の振動スペクトル情報に基づき、生細胞の CARS molecular fingerprinting を行った結果を図4 (a)~(l) に示す。ラマンシフトの値として 1738, 1655, 1602, 1456, 1439, 1340, 1301, 1260, 1240, 1205, 1030, そして  $1002\text{ cm}^{-1}$  の計 14 個のバンドについて、  $\text{Im}[\chi^{(3)}]$  のピーク強度を用いたイメージが示されている<sup>23</sup>。これらのイメージすべてを 22 秒にて取得することができた。一点あたりの露光時間は  $50\text{ ms}$ 、おのおののイメージは  $21 \times 21$  ピクセルである。すでに述べたように、C-H 変角振動は  $\text{CH}_3$  ((d)  $1456\text{ cm}^{-1}$ ) および  $\text{CH}_2$  ((e)  $1439\text{ cm}^{-1}$ ) 変角振動に分離することができた。比較のため、C-H 伸縮振動における対応するイメージも図4 (m), (n) に示す。それぞれ、  $\text{CH}_3$  ((m)  $2930\text{ cm}^{-1}$ ) および  $\text{CH}_2$  ((n)  $2850\text{ cm}^{-1}$ ) 伸縮振動である。

図4に示した  $\text{Im}[\chi^{(3)}]$  イメージは、大きく分けて3つのグループに分類することができる。第1のグループは図4

(a), (c), (e), (g), (h) および (n), すなわちラマンシフトとして 1738, 1602, 1439, 1301, 1260, および 2850  $\text{cm}^{-1}$  のものである。これらのイメージでは、信号強度の大きい箇所が細胞内に局在している。第2のグループは図4 (f), (i), (j), (k) および (l), すなわちラマンシフトとして 1340, 1240, 1205, 1030, および 1002  $\text{cm}^{-1}$  のものである。これらのイメージでは、細胞内に局在した分子分布はみられず、一様な空間パターンを与えている。第3のグループは図4 (b), (d), および (m), すなわちラマンシフトとして 1655, 1456 および 2930  $\text{cm}^{-1}$  のものである。これらのグループのイメージは、第1と第2のグループの和を取ったものに類似している。第1のグループで、“生命のラマン分光指標”である 1602  $\text{cm}^{-1}$  以外のバンドは、脂質分子によるものであり、ミトコンドリアなど膜系オルガネラを可視化したものと考えられる。図4 (c) に示した 1602  $\text{cm}^{-1}$  のイメージは脂質の分子分布とほぼ一致しており、“生命のラマン分光指標”がミトコンドリアに局在しているという、これまでのわれわれの研究と一致する。これに対して、第2のグループはタンパク質の分子分布に相当する。そして、第3のグループのイメージは、脂質とタンパク質の分子分布の和として解釈できる。このことは、1656  $\text{cm}^{-1}$  のバンドが脂質由来の C=C 伸縮振動およびタンパク質由来のアミド I の重なったものであることや、1456  $\text{cm}^{-1}$  および 2930  $\text{cm}^{-1}$  のバンドが  $\text{CH}_3$  由来の C-H 変角および伸縮振動であり、 $\text{CH}_3$  基は脂質およびタンパク質両者に含まれることも矛盾しない。興味深いことに、C-H 変角振動のイメージである図4 (d) と (e) は、C-H 伸縮振動のイメージである図4 (m) と (n) と大変よく一致している。このことから、指紋領域の CARS 分光イメージさえ得られれば、C-H 伸縮領域の情報はその中に含まれている、ということもわかる。

マルチプレックス CARS 分光イメージングにより、生細胞から多数の振動モードの情報を高速かつ一度に得ることができる。本手法を用いて生細胞の動態追跡を行った結果を図5に示す。1枚あたり12秒で測定し、35分にわたって追跡した結果が示されている。図5には、特徴的なラマンバンドとして 1655, 1602, 1445, および 1160  $\text{cm}^{-1}$  を用いて再構成した4つの CARS イメージが示されている。1445  $\text{cm}^{-1}$  のイメージは、 $\text{CH}_2$  および  $\text{CH}_3$  変角振動のバンド強度の和を用いて再構成した。図5には、1160  $\text{cm}^{-1}$  のバンド強度によるイメージも示している。これは、液胞中に観測される“dancing body” (DB) とよばれるオルガネラを可視化したものである<sup>31)</sup>。DBは、出芽酵母が飢餓状態になると、液胞中に発生し、活発に動き回ることがわかって

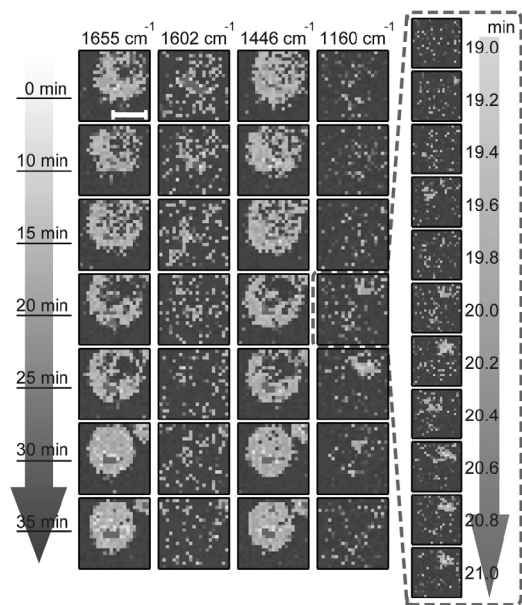


図5 1655  $\text{cm}^{-1}$ , 1602  $\text{cm}^{-1}$ , 1446  $\text{cm}^{-1}$ , および 1160  $\text{cm}^{-1}$  における時間分解 CARS イメージングの結果。スケールバーは 5  $\mu\text{m}$ 。破線枠で囲んだ領域は、1160  $\text{cm}^{-1}$  における 19~21 分の間のイメージである。おのおののイメージは 12 秒で得られた。

いる。これまでのわれわれの顕微自発ラマン分光の研究から<sup>31)</sup>、DBはポリリン酸 ( $\text{PO}_2^-$  対称伸縮振動によるラマンバンドが 1160  $\text{cm}^{-1}$  に存在する) が主成分であることがわかっている。図5からは、次のような動態変化がみてとれる。0分では細胞は正常であり、1602  $\text{cm}^{-1}$  のバンドのイメージもはっきりしている。時間の経過とともに 1602  $\text{cm}^{-1}$  の強度が小さくなり、20分でほとんど消失する。この時点で、細胞の代謝活性が消失していることが予想される。また、この間、他のバンドのイメージには目立った変化はない。これに付随して、DBによる 1160  $\text{cm}^{-1}$  のバンドが突如出現し、液胞と思われる領域を動き回る。DBの動きを詳細に追跡するため、図5では19~21分の間の動態を右側破線枠にハイライトして表示してある。1160  $\text{cm}^{-1}$  のバンド強度は時間とともに増加していることから、DBの出現をリアルタイムでとらえていることがわかる(ただし、図5のDBの動態には、CARS測定に用いたレーザーによるトラッピングの影響が含まれている)。21分では、DBは動きを止め、液胞上側に局在する。30分後には、細胞全体が収縮し、死に至る。マルチプレックス CARS 分光イメージングにより、細胞が死に至る過程を、非染色かつマルチモードにて可視化することができた。

今回みられた細胞死の過程は、レーザー照射によるものである。ポンプ光・ストークス光がそれぞれ約 10 mW のときにみられた上記の現象は、レーザーパワーを減じ、ポンプ光・ストークス光をそれぞれ約 5 mW および 10 mW

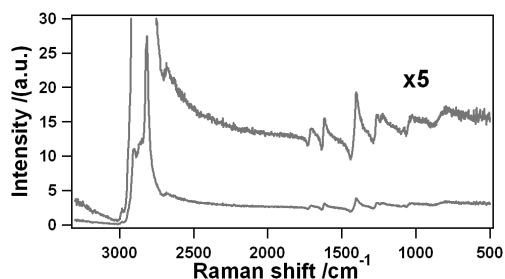


図6 マウス生細胞中の脂肪滴のマルチプレックス CARS スペクトル。

にしたときにはみられず、動態追跡を行った35分間にわたって通常のCARSイメージを与えた<sup>23)</sup>。以上のように、マルチプレックスCARS分光イメージングを用い、生細胞の動態をさまざまなモードにより多角的に追跡することが可能である。

### 3.2 脂肪細胞

脂肪細胞は、過剰なエネルギーを中性脂肪の形で巨大な脂肪滴に蓄積している。図6にマウス脂肪生細胞の脂肪滴のマルチプレックスCARSスペクトルを示す。C-H伸縮振動領域にはCH<sub>2</sub>伸縮振動に由来する大きいバンド(2840 cm<sup>-1</sup>付近)が、そして指紋領域にはC=O二重結合(1740 cm<sup>-1</sup>付近)、*cis* C=C二重結合(1650 cm<sup>-1</sup>付近)およびC-H変角振動(1440 cm<sup>-1</sup>付近)のバンドが検出された。図6で得られた複数の振動共鳴成分を用いてCARSイメージを構成した結果を図7に示す。イメージ範囲は101×101ピクセル(30 μm四方)、露光時間は1ピクセルあたり10 msであった。各バンドにおいて、大小さまざまな脂肪滴が明瞭

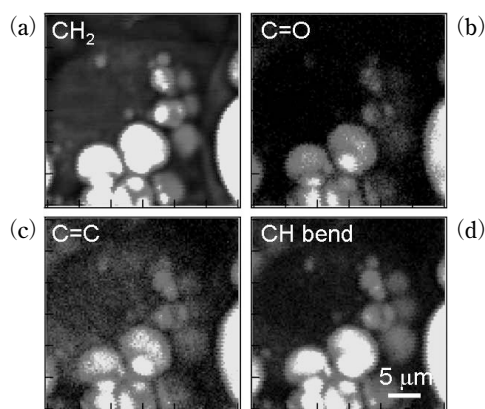


図7 マウス生細胞の (a) CH<sub>2</sub>伸縮振動, (b) C=O伸縮振動, (c) C=C変角振動, (d) C-H変角におけるCARSイメージングの結果。

に可視化されていることがわかる。

### 3.3 線虫

線虫は、多細胞動物のモデルとして広く研究に用いられている。本研究では、線虫(*Caenorhabditis elegans*; *C. elegans*)のうち、*unc-119*とよばれる、動きが遅い変異体を用いた。線虫の動きを最小限に抑えるため、麻酔薬(レバミゾール)を添加することで線虫の動きを抑え、カバーガラスおよびスライドガラスに挟んで試料とした。図8(a)に線虫(*C. elegans*)のマルチプレックスCARSスペクトルを示す。図6と同様に、C-H伸縮振動領域には強度の大きいCH<sub>2</sub>伸縮振動のバンドが検出された。加えて、指紋領域にはC=C二重結合およびC-H変角振動のバンドが検出された。先述の出芽酵母および脂肪細胞の結果と比べ、

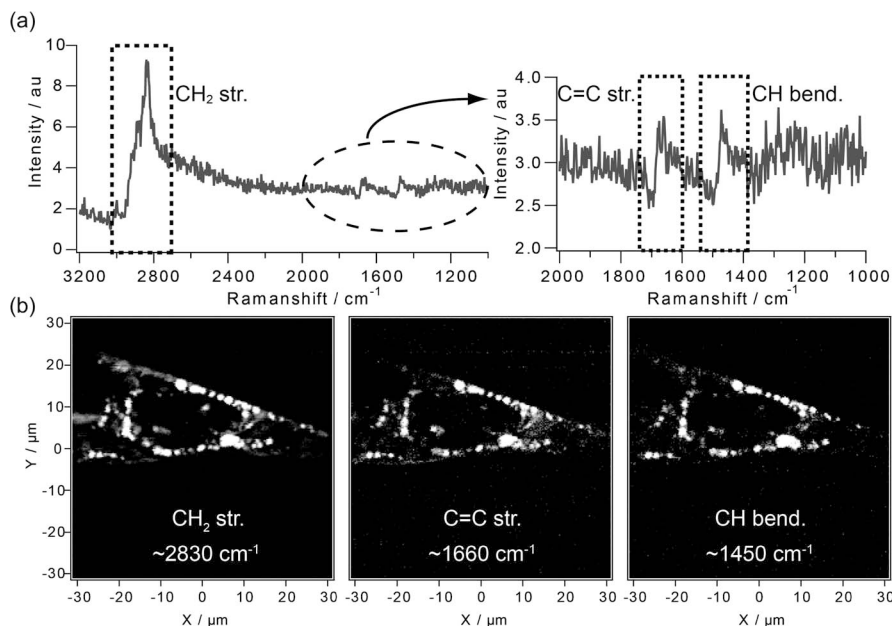


図8 (a) 線虫のマルチプレックスCARSスペクトル。露光時間は100 ms。(b) CH<sub>2</sub>伸縮, *cis*型のC=C伸縮, およびC-H変角振動によるCARSイメージ。



スペクトルの質が悪いのは、CARS 光を分光計測する際、マルチモードファイバーを用いて CARS 光を伝送したためである。伝送中にモード間で干渉して、それがスペクトルの質を劣化させたと考えている。図 8 (b) はこれら 3 つのバンド、CH<sub>2</sub> 伸縮振動、C=C 二重結合、CH 変角振動について振動共鳴成分を抽出・再構成したマルチカラー CARS イメージである。イメージ範囲は 201 ピクセル四方 (60 μm 四方)、露光時間は 1 ピクセルあたり 100 ms であった。得られたイメージはどれも非常に類似しており、どのバンドも線虫体内の同一箇所強い信号を与えている。このことから、これらのバンドを与えるのは同一の化学種に由来するものと考えられる。強度の大きい CH<sub>2</sub> 伸縮振動、および C-H 変角振動をもつことから、これは脂質であることが予想される。また、C=C 結合でも同様のイメージが得られたことから、その分子は不飽和結合を含んでいることもわかる。以上のように CARS スペクトルを読むことで、不飽和脂肪酸を可視化していることがわかる。線虫の CARS イメージングについては、C-H 伸縮信号を可視化したモノクロ・イメージングの既報があるが<sup>32)</sup>、マルチプレックス CARS “分光” イメージングを用いた本研究は、分子の情報を十二分に引き出すことのできる、ユニークな方法であるといえるであろう。

マルチプレックス CARS 分光イメージングにより、生体試料を構成するさまざまな分子種を、分子の指紋であるラマンスペクトルに基づいて多彩に“色分け”することが可能である。本方法は、既知の分子を可視化することが得意な蛍光イメージングと比べ、スペクトルを通して、未知の分子をも分析・検出することが可能であるため、生細胞内や生体組織でこれまで知られていなかった分子や分子構造についても研究対象とすることが可能である。以上のように、マルチプレックス CARS 分光イメージングに代表される非線形ラマン分光イメージング法が、医学、生命科学、物質・材料科学をはじめ、幅広い分野で必須の手法として活躍する日が来るのは、そう遠くはないであろう。

本項で紹介した研究は、文部科学省研究費学術創成研究 (No. 15GS0204)、文部科学省研究費若手研究 B (No. 15750005, 18750007)、JST さきがけ、JST 先端計測の研究助成のもと行われた。また、酵母を用いた研究は黄郁珊、中塚岳 (東京大学大学院理学系研究科化学専攻)、辛島健、山本正幸 (同研究科生物化学専攻) の諸氏との、脂肪細胞を用いた研究は橋本健志 (立命館大学大学院スポーツ健康科学研究科)、大隅隆 (兵庫県立大学大学院生命理学研究科) の諸氏との、線虫を用いた研究は村松勇佑 (東京

大学大学院理学系研究科化学専攻)、辛島健、山本正幸 (同研究科生物化学専攻) の諸氏との共同研究によるものである。ここに記して感謝する。

## 文 献

- 1) C. L. Evans and X. S. Xie: “Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: chemical imaging for biology and medicine,” *Annu. Rev. Anal. Chem.*, **1** (2008) 883-909.
- 2) C. L. Evans, E. O. Potma, M. Puoris’haag, D. Cote, C. P. Lin and X. S. Xie: “Chemical imaging of tissue *in vivo* with video-rate coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102** (2005) 16807-16812.
- 3) J.-X. Cheng and X. S. Xie: “Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: Instrumentation, theory, and applications,” *J. Phys. Chem. B*, **108** (2004) 827-840.
- 4) A. Volkmer: “Vibrational imaging and microspectroscopies based on coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy,” *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **38** (2005) R59-R81.
- 5) C. W. Freudiger, W. Min, B. G. Saar, S. Lu, G. R. Holtom, C. He, J. C. Tsai, J. X. Kang and X. S. Xie: “Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy,” *Science*, **322** (2008) 1857-1861.
- 6) B. G. Saar, C. W. Freudiger, J. Reichman, C. M. Stanley, G. R. Holtom and X. S. Xie: “Video-rate molecular imaging *in vivo* with stimulated Raman scattering,” *Science*, **330** (2010) 1368-1370.
- 7) K. Isobe, A. Suda, M. Tanaka, H. Hashimoto, F. Kannari, H. Kawano, H. Mizuno, A. Miyawaki and K. Midorikawa: “Single-pulse coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy employing an octave spanning pulse,” *Opt. Express*, **17** (2009) 11259-11266.
- 8) B.-C. Chen, J. Sung and S.-H. Lim: “Chemical imaging with frequency modulation coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy at the vibrational fingerprint region,” *J. Phys. Chem. B*, **114** (2010) 16871-16880.
- 9) T. W. Kee and M. T. Cicerone: “Simple approach to one-laser, broadband coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy,” *Opt. Lett.*, **29** (2004) 2701-2703.
- 10) H. Kano and H. Hamaguchi: “Ultrabroadband (>2500 cm<sup>-1</sup>) multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy using a supercontinuum generated from a photonic crystal fiber,” *Appl. Phys. Lett.*, **86** (2005) 121113.
- 11) M. Okuno, H. Kano, P. Leproux, V. Couderc and H. Hamaguchi: “Ultrabroadband multiplex CARS microspectroscopy and imaging using a subnanosecond supercontinuum light source in the deep near infrared,” *Opt. Lett.*, **33** (2008) 923-925.
- 12) M. D. Duncan, J. Reintjes and T. J. Manuccia: “Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope,” *Opt. Lett.*, **7** (1982) 350-352.
- 13) A. Zumbusch, G. R. Holtom and X. S. Xie: “Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-Stokes Raman scattering,” *Phys. Rev. Lett.*, **82** (1999) 4142-4145.
- 14) M. Hashimoto, T. Araki and S. Kawata: “Molecular vibration imaging in the fingerprint region by use of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy with a collinear configuration,” *Opt. Lett.*, **25** (2000) 1768-1770.
- 15) J.-X. Cheng, Y. K. Jia, G. Zheng and X. S. Xie: “Laser-scanning coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy and applications to cell biology,” *Biophys. J.*, **83** (2002) 502-509.
- 16) G. Petrov, V. Yakovlev, A. Sokolov and M. Scully: “Detection of *Bacillus subtilis* spores in water by means of broadband coherent anti-Stokes Raman spectroscopy,” *Opt. Express*, **13**



- (2005) 9537–9542.
- 17) J.-X. Cheng, A. Volkmer, L. D. Book and X. S. Xie: “Multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy and study of lipid vesicles,” *J. Phys. Chem. B*, **106** (2002) 8493–8498.
  - 18) H. Kano and H. Hamaguchi: “Vibrationally resonant imaging of a single living cell by supercontinuum-based multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy,” *Opt. Express*, **13** (2005) 1322–1327.
  - 19) H. Kano and H. Hamaguchi: “*In-vivo* multi-nonlinear optical imaging of a living cell using a supercontinuum light source generated from a photonic crystal fiber,” *Opt. Express*, **14** (2006) 2798–2804.
  - 20) H. A. Rinia, K. N. J. Burger, M. Bonn and M. Mueller: “Quantitative label-free imaging of lipid composition and packing of individual cellular lipid droplets using multiplex CARS microscopy,” *Biophys. J.*, **95** (2008) 4908–4914.
  - 21) G. I. Petrov, R. Arora, V. V. Yakovlev, X. Wang, A. V. Sokolov and M. O. Scully: “Comparison of coherent and spontaneous Raman microspectroscopies for noninvasive detection of single bacteria endospores,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104** (2007) 7776–7779.
  - 22) D. Pestov, R. K. Murawski, G. O. Ariunbold, X. Wang, M. Zhi, A. V. Sokolov, V. A. Sautenkov, Y. V. Rostovtsev, A. Dogariu, Y. Huang and M. O. Scully: “Optimizing the laser-pulse configuration for coherent Raman spectroscopy,” *Science*, **316** (2007) 265–268.
  - 23) M. Okuno, H. Kano, P. Leproux, V. Couderc, J. P. R. Day, M. Bonn and H. Hamaguchi: “Quantitative CARS molecular fingerprinting of single living cells with the use of the maximum entropy method,” *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49** (2010) 6773–6777, S6773/6771–S6773/6776.
  - 24) S. H. Parekh, Y. J. Lee, K. A. Amer and M. T. Cicerone: “Label-free cellular imaging by broadband coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy,” *Biophys. J.*, **99** (2010) 2695–2704.
  - 25) Y.-S. Huang, T. Karashima, M. Yamamoto and H. Hamaguchi: “Molecular-level investigation of the structure, transformation, and bioactivity of single living fission yeast cells by time- and space-resolved Raman spectroscopy,” *Biochemistry*, **44** (2005) 10009–10019.
  - 26) E. M. Vartiainen, K. E. Peiponen and T. Tsuboi: “Analysis of coherent Raman spectra,” *J. Opt. Soc. Am. B*, **7** (1990) 722–725.
  - 27) E. M. Vartiainen, H. A. Rinia, M. Muller and M. Bonn: “Direct extraction of Raman line-shapes from congested CARS spectra,” *Opt. Express*, **14** (2006) 3622–3630.
  - 28) H.-J. Van Manen, Y. M. Kraan, D. Roos and C. Otto: “Intracellular chemical imaging of heme-containing enzymes involved in innate immunity using resonance Raman microscopy,” *J. Phys. Chem. B*, **108** (2004) 18762–18771.
  - 29) Y.-S. Huang, T. Karashima, M. Yamamoto, T. Ogura and H. Hamaguchi: “Raman spectroscopic signature of life in a living yeast cell,” *J. Raman Spectrosc.*, **35** (2004) 525–526.
  - 30) C. Onogi, H. Torii and H. Hamaguchi: “Raman spectra of isotope-substituted mitochondria of living budding yeast cells: Possible origin of the ‘Raman spectroscopic signature of life’,” *Chem. Lett.*, **38** (2009) 898–899.
  - 31) Y. Naito, A. Toh-e and H. Hamaguchi: “*In vivo* time-resolved Raman imaging of a spontaneous death process of a single budding yeast cell,” *J. Raman Spectrosc.*, **36** (2005) 837–839.
  - 32) T. Hellerer, C. Axaeng, C. Brackmann, P. Hillertz, M. Pilon and A. Enejder: “Monitoring of lipid storage in *Caenorhabditis elegans* using coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104** (2007) 14658–14663.

(2011年4月13日受理)