

平成21年5月20日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19700379

研究課題名（和文）ラマン散乱による細胞の分子イメージング

研究課題名（英文）Molecular imaging of biomolecules in living cells

研究代表者

藤田 克昌 (FUJITA KATSUMASA)

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：80362664

研究成果の概要：

本研究では、生体分子を直接可視化でき、蛍光プローブ無しでも生体分子の機能分析が可能なナノ顕微観察技術の開発を目指す。生体の顕微観察においては、蛍光顕微鏡は必須のツールとして用いられてきたが、そこで実際に観察されているのは蛍光分子であり、生体分子ではない。染色せずに細胞や生体組織を顕微観察できれば、有害な色素を用いることなくより望ましい状態での生体機能を可視化できる。本研究ではエバネッセント照明と表面増強ラマン散乱を利用して、生体分子からのラマン散乱を高感度、かつ高空間分解にイメージングする技術を開発する。ラマン散乱は分子振動や配向の情報を光の波長、偏光、強度として持つため、蛍光色素に頼らずとも試料の分子そのものが観察像を与える。さらに金属表面から10nm程度の局所空間における局在プラズモンと生体分子と光との相互作用を利用して、ナノ空間における生体分子の機能を染色無しで把握することを目指す。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	240,000	3,440,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学 医用生体工学・生体材料学

キーワード：生体情報・計測、分子イメージング、ナノイメージング

## 1. 研究開始当初の背景

光を用いた生体の顕微イメージング技術は、特定のタンパク質の局在や各種イオン濃度を可視化する技術として、最新のバイオテクノロジーを支えている。この背景には、

様々な色素分子の開発やイオン指示薬、蛍光性タンパク質の開発等、蛍光を主体としたプローブ開発の発展があることに間違いはない。しかしながら、蛍光を用いる最大の弱点は観察対象が蛍光分子である点である。これらの観察技術では蛍光分子と生体分子との相互

作用を可視化しているにすぎず、生体分子そのものを観ている訳ではない。また、蛍光色素には有害なものも多く、生きた生体の機能観察の上で障害となる場合もある。ナノスケールでの計測技術を用いて分子レベルでの計測を行う際には、観察対象以外の分子の存在は邪魔になるであろう。

ラマン散乱分光技術は強力な材料・物質分析技術としての様々な分野に利用されているが、生体の顕微イメージング技術として有効活用された例はあまりない。その理由は、ラマン散乱の散乱断面積(約 10-30cm<sup>2</sup>)が蛍光発光(約 10-16cm<sup>2</sup>)に比べて 10 数桁低く、十分な解像度をもつ画像を十分な速度で得ることができなかつたためである。また細胞の複雑なラマンスペクトル解析技術も十分でなく、そこから有用な情報を抽出できなかったことも理由である。本研究では、ラマン顕微鏡にエバネッセント照明と表面増強ラマン散乱を組み合わせ、生体のラマン分析における弱点を克服し、タンパク質や生体分子を無染色で直接観察できるイメージング技術を開発する。

国内外においても無染色顕微イメージングは注目されており、SPIE BIOS2006 (2006年1月開催の世界最大規模のフォトニクス会議)では、第2高調波、ラマン散乱、CARSを利用した無染色顕微イメージング技術について個別にセッションが設けられた。顕微領域でのラマン散乱の応用研究としては、細胞内での薬剤・化学物質の分布の観察(Lin, Appl Opt 2002)、細胞内の酵素活性(Manen, PNAS 2005)、細胞分裂時の分子動態観察(Huang, J Raman Spectrosc 2005)等が報告されており、ラマン散乱のもつ分子レベルでの分析力は広い領域で期待されている。

## 2. 研究の目的

ラマン散乱を用いた生体分子の分析、およびイメージングがこれまで妨げられていた理由は、光学顕微鏡の空間分解能の低さにあると考える。光学顕微鏡の空間分解能は数 100nm であり、細胞内ではこの中にいくつもの種類の糖、タンパク質、生体分子が存在する。非常に多くの生体分子が同時に観察されてしまうため、その中から分子の情報を取り出すことは難しい。本研究ではエバネッセント照明と表面増強ラマン散乱を用いて観察領域を細胞表面とし、細胞膜付近の分子のみを制限することで、分子のラマン散乱スペクトルの重なりを軽減することを目的とした。これにより観察対象となる分子種が限定されるため、得られるラマン散乱スペクトルからの分子情報の抽出も容易になり、ラマン散乱スペクトルからより有用な分子情報が得られると期待できる。

## 3. 研究の方法

試料内の観察領域を回折限界以下にするため、1) エバネッセント照明の利用、2) 表面増強ラマン散乱の利用を検討する。エバネッセント照明では、細胞等の試料を設置した基板側から光を全反射条件で集光し、基板上表面への浸み出し光であるエバネッセント場を利用する。エバネッセント場は伝搬しない光であるため、基板表面のみに局在し、その領域は基板から数百 nm 程度である。このため、試料と基板との境界部位の分子のみを選択的に観察することができる。

さらに、表面増強ラマン散乱を利用すると、金属表面の数十 nm 程度の領域のみの分子のみを効率よくラマン光により観察できる。表面増強ラマン散乱は、金属表面の自由電子の集団振動と入射および散乱電場との共鳴の効果により得られ、金属表面の分子のラマン散乱の効率が、通常のラマン散乱に比べ、数十桁向上する。本研究では、直径数十 nm の金粒子による表面増強ラマン散乱を利用し、試料内の数十 nm 領域のみの分子を高感度に検出する手法の開発を試みた。

## 4. 研究成果

図 1 に全反射照明を利用したラマン散乱顕微鏡の光学系を示す。2 枚のレンズでレーザー光をコリメートし、2 枚のアキシコンレンズを通過させ、輪帯状の平行光を形成した。輪帯状の平行光は、さらに、レンズ系によって対物レンズの瞳面に導かれ、対物レンズにより試料に集光された。全反射を起こす条件を満たした状態で瞳面を通過したレーザー光は、試料面で集光されて全反射する。基板表面近傍の試料がエバネッセント光で照明され、試料から発生した散乱光はエッジフィルターでレイリー散乱光とラマン散乱光に分けられる。また、一組のガルバノミラーを用いて 2 次元のマッピングを行なうことができる。

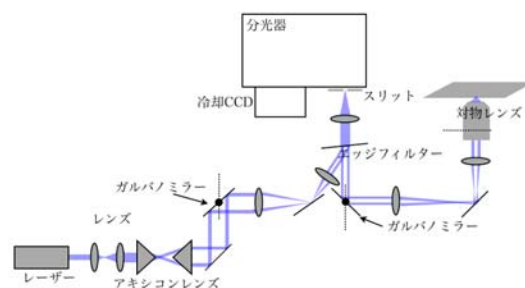


図 1 試作した顕微光学系

細胞からの SERS スペクトルの測定のため、金ナノ粒子を吸着させた基板を作製した。基

板への金ナノ粒子の吸着は、ガラス基板に高密度で被覆されているアミノ基と金ナノ粒子との静電相互作用によって行った。アミノ基が高密度に被覆されたカバーガラス (MAS コートカバーガラス, 松浪ガラス) の表面を、 $4.5 \times 10^{11}$  個/ml 含有した直径 50nm 金コロイド水溶液 (Gold Colloid 50nm, BBInternational) で浸し、金ナノ粒子をカバーガラスに接着させた。金ナノ粒子が基板に接着した後、カバーガラスに接着していない余分な金ナノ粒子を超純水で洗い流し、乾燥させた。図 2 に金ナノ粒子水溶液の水浸時間が (a) 20, (b) 40, (c) 60, (d) 80 分の場合の作製した基板の走型電子顕微鏡像を示す。次に作製した基板の中で最も密度の高い (d) の基板による SERS 効果を、代表的な生体分子である DNA 塩基のアデニン分子の純物質で確認した (図 3)。金ナノ粒子を分散させた基板を用いたときに得られたスペクトルの  $733\text{cm}^{-1}$  のラマンピークは、アデニン分子の振動モードに帰属できた。金ナノ粒子を分散していない基板上的アデニン分子からは、このような増強されたピークが得られず、作製した基板によるラマン散乱の増強効果が確認できた。

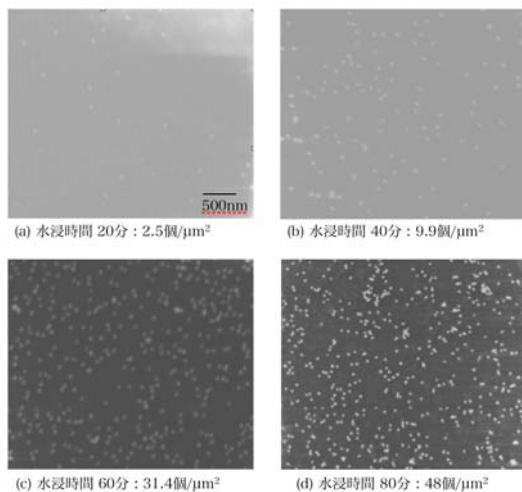


図 2 ガラス基板に分散させた金粒子

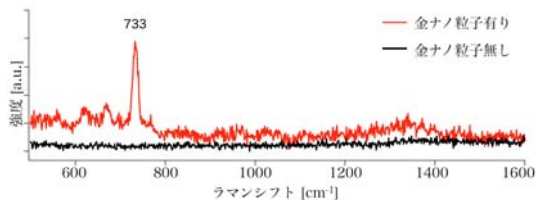


図 3 アデニンのラマン散乱スペクトル

作製した基板にヒト癌細胞 (HeLa 細胞) を培養し、ラマン観察を行うことで、細胞表

面付近の分子が検出可能かどうか検討した。試料上の複数の点においてラマン散乱スペクトルを測定し、図 4 の結果が得られた。それぞれ異なる部位でのラマン散乱スペクトルを示しており、各部位で異なる振動モードが確認できることが分かる。各スペクトルには、 $810, 1131, 1570\text{cm}^{-1}$  に強いラマンピーク (それぞれ、蛋白質骨格由来の  $\text{PO}_2^-$  伸縮振動、プロリン由来の C-N 伸縮振動、トリプトファン由来の COO 伸縮振動に帰属できる) が得られており、金粒子付近のタンパク室のラマン散乱が計測されているのではないかと考えられる。同様の実験を金粒子を分散していない基板上で培養した細胞を試料として行ったが、図 4 のようなスペクトルを得ることは出来なかった。このことから図 4 に示されたスペクトルは、基板上の金粒子による増強効果により得られたと考えられる。また、図 4 の各スペクトルのラマンピーク数は、通常の共焦点顕微ラマン分光装置で得られるスペクトルに比べ、非常に少ない。このことは、同時に観察されている分子数が少なく、スペクトルのオーバーラップの少ないラマン測定が行えていることを示している。これらの結果から、本手法により、基板と細胞の境界部にある分子のみを選択的に観察できることが示唆された。

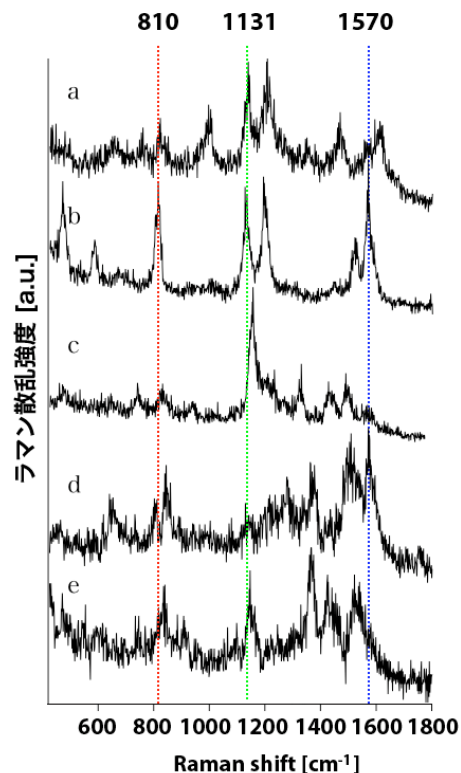


図 4 生きた HeLa 細胞の表面増強ラマン散乱スペクトル。a)~e)はそれぞれ細胞表面の異なる部位のスペクトルを示す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. K. Fujita, S. Ishitobi, K. Hamada, N. I. Smith, A. Taguchi, Y. Inouye, and S. Kawata, "Time-resolved observation of surface-enhanced Raman scattering from gold nanoparticles during transport through a living cell," *J. Biomed. Opt.* Vol. 14, 024038 (2009).
2. M. Ogawa, Y. Harada, Y. Yamaoka, K. Fujita, H. Yaku, T. Takamatsu, "Label-free biochemical imaging of heart tissue with high-speed spontaneous Raman microscopy," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 382, pp. 370-374 (2009).
3. K. Fujita, K. Hamada, N. I. Smith, Y. Inouye, and S. Kawata, "Dynamic molecular imaging of living cells by using Raman scattering," *Proc. SPIE* Vol. 7182, 71820I (Feb. 23, 2009).
4. K. Fujita, J. Ando, S. Ishitobi, K. Hamada, N. I. Smith, Y. Inouye, and S. Kawata, "Observation of living cells with gold nanoparticles by using surface-enhanced Raman scattering," *Proc. SPIE* Vol. 7192, 71920Q (Feb. 17, 2009).
5. 藤田克昌, "細胞の無標識分子イメージング," *顕微鏡*, Vol. 43, No. 4, pp. 268-272 (2008).
6. K. Fujita and N. I. Smith, "Label-free molecular imaging of living cells," *Mol. Cells*, Vol. 26, pp. 530-535 (2008).
7. K. Hamada, K. Fujita, N. I. Smith, M. Kobayashi, Y. Inouye, and S. Kawata, "Raman microscopy for dynamic molecular imaging of living cells," *J. Biomed. Opt.*, 13, 044027 (2008).
8. Y. Harada, T. Ota, D. Ping, Y. Yamaoka, K. Hamada, K. Fujita, and T. Takamatsu, "Imaging of anticancer agent distribution by a slit-scanning Raman microscope," *Proc. SPIE*, Vol. 6853, 685308 (2008).
9. Y. Saito, M. Kobayashi, D. Hiraga, K. Fujita, S. Kawano, N. I. Smith, Y. Inouye, S. Kawata, "Z-polarization sensitive detection in micro Raman spectroscopy by radially polarized incident light," *J. Raman. Spectrosc.*,

Vol. 39, pp. 1643-1648 (2008).

[学会発表] (計 12 件)

1. 藤田克昌, 安藤潤, 石飛佐和子, 浜田啓作, スミス ニコラス, 井上康志, 河田聡, "金ナノ粒子を用いた細胞内分子の表面増強ラマン散乱分光," 第 56 回応用物理学関係連合講演会 (筑波 2009 年 3 月 31 日).
2. K. Fujita, J. Ando, S. Ishitobi, K. Hamada, N. I. Smith, Y. Inouye, and S. Kawata, "Observation of living cells with gold nanoparticles by using surface-enhanced Raman scattering," *SPIE Photonics West* (San Jose, USA, 2009 年 1 月 27 日).
3. K. Fujita, K. Hamada, N. I. Smith, Y. Inouye, and S. Kawata, "Dynamic molecular imaging of living cells by using Raman scattering," *SPIE Photonics West* (San Jose, USA, 2009 年 1 月 26 日).
4. K. Fujita, S. Ishitobi, T. Ichimura, K. Hamada, Y. Inouye, S. Kawata, "Surface-enhanced Raman imaging of living cells with gold nanoparticles," *SPIE Optics and Photonics* (San Diego, USA, 2008 年 8 月 11 日).
5. K. Fujita, K. Hamada, N. I. Smith, Y. Inouye, S. Kawata, "Raman microscopy for observation of cellular dynamics," *Focus on Microscopy 2008* (Awaji, 2008 年 4 月 15 日).
6. K. Hamada, K. Fujita, N. I. Smith, Y. Inouye, S. Kawata, "Resonant Raman imaging of cytochrome c in living cells," *Focus on Microscopy 2008* (Awaji, 2008 年 4 月 15 日).
7. K. Hamada, K. Fujita, M. Kobayashi, and S. Kawata, "Observation of cell dynamics by laser scanning Raman microscopy," *SPIE Photonics West BIOS2007* (San Jose, January 25, 2007).
8. 浜田啓作, 藤田克昌, 太田泰輔, 井上康志, 河田聡, "細胞内 cytochrome c の共鳴ラマンイメージング," 第 55 回応用物理学関係連合講演会 (船橋, 2008 年 3 月 27 日).
9. 石飛佐和子, 藤田克昌, 浜田啓作, 河田聡, 井上康志, "金属微粒子の生細胞内導入における表面増強ラマンスペクトル測定," 第 46 回日本生物物理学会年会 (横浜, 2007 年 12 月 23 日).
10. 藤田克昌, 浜田啓作, 井上康志, 河田

- 聡, "レーザー走査ラマン顕微鏡による細胞動態の観察," 第 46 回日本生物物理学会年会 (横浜, 2007 年 12 月 23 日).
11. 平賀大吾, 齊藤結花, 小林実, 藤田克昌, 河田聡, "ラジアル偏光ビームを用いた偏光分解顕微ラマン分光," 日本光学会年次学術講演会 (大阪, 2007 年 11 月 26 日).
  12. Y. Saito, D. Hiraga, M. Kobayashi, K. Fujita, Y. Inouye, S. Kawata, "Polarization-resolved micro Raman spectroscopy using a radially polarized incidence," 平成 19 年度日本分光学会年次講演会 (東京, 2007 年 11 月 13 日).

[図書] (計 5 件)

1. 藤田克昌 (分担執筆), "生体の無染色イメージング," ナノメディシン (宇理須恒雄 編, オーム社, 2008 年 3 月).
2. 藤田克昌 (分担執筆), "無染色細胞イメージング," 分子イメージング技術, pp. 160-167 (佐治英郎, 田畑泰彦 編, メディカルドゥ, 2008 年 2 月).
3. 藤田克昌 (分担執筆), "非線形光学顕微鏡による細胞・生体組織のイメージング," 民谷栄一, 酒井康行 監修 "動物実験代替のためのバイオマテリアル・デバイス," pp. 315-324 (シーエムシー出版, 2007 年 8 月).
4. N. I. Smith, S. Iwanaga, H. Niioka, K. Fujita, and S. Kawata (分担執筆), "Subcellular effects of femtosecond laser irradiation," in "Nano Biophotonics - Science and Technology," pp. 255-272, (H. Masuhara, S. Kawata, and F. Tokunaga Ed. Elsevier B.V., Amsterdam, 2007).
5. P. Verma, K. Fujita, T. Ichimura, and S. Kawata (分担執筆), "Raman, CARS and near-field Raman-CARS microscopy for cellular and molecular imaging," in "Nano Biophotonics - Science and Technology," pp. 57-71, (H. Masuhara, S. Kawata, and F. Tokunaga Ed. Elsevier B.V., Amsterdam, 2007).

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

名称: ナノ粒子プローブを用いた画像化方法  
発明者: 河田聡、藤田克昌、井上康志、市村垂生  
権利者: 科学技術振興機構  
種類: 特許

番号: 特願 2008-205387  
出願年月日: 平成 20 年 8 月 8 日  
国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://lasie.ap.eng.osaka-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤田 克昌 (FUJITA KATSUMASA)  
大阪大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号: 80362664

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者