

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22360027

研究課題名（和文）

レーザーアブレーションに対する細胞応答のリアルタイムCARSイメージング

研究課題名（英文）

Realtime CARS imaging of cellular response by stimulation of laser ablation

研究代表者

橋本 守 (HASHIMOTO MAMORU)

大阪大学 大学院基礎工学研究科・准教授

研究者番号：70237949

研究成果の概要（和文）：

多焦点コヒーレントアンチストークスラマン散乱顕微鏡とレーザーアブレーション法を組み合わせ、レーザー光による遠隔的な刺激に対する試料の応答をリアルタイム・無染色に観測可能なシステムを構築した。アブレーション用レーザー光は、観測システムとは独立にその照射位置をコンピュータ制御可能である。開発した装置を、生細胞の細胞膜破壊に対する応答観測、ならびにレーザー放射圧による結晶化プロセスの観測へ応用した。

研究成果の概要（英文）：

We have developed a multifocus coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy system combined with a laser-beam ablation system. The developed system visualizes sample response by laser stimulation without staining at vide-rate. The laser beam for ablation is controlled independently of observation. The developed system was applied to cellular response by membrane disruption and crystallization monitoring by photon pressure.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2010年度 | 8,000,000 | 2,400,000 | 10,400,000 |
| 2011年度 | 3,900,000 | 1,170,000 | 5,070,000 |
| 2012年度 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |
| 年度 | 0 | 0 | 0 |
| 年度 | 0 | 0 | 0 |
| 総計 | 15,200,000 | 4,560,000 | 19,760,000 |

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎

キーワード：応用光学・量子光工学

1. 研究開始当初の背景

2008年度のノーベル化学賞は「GFP(Green Fluorescence Protein)の発見とその応用」に対し贈られた。現在、GFPは生きた細胞に用いることができることから生物・医学研究に広く利用され、細胞機能解明に非常に効果を発揮している。しかしながら、遺伝子導入過程が含まれるため、実際の人間へと適応すること

や再生医療への適用に対して安全面に問題があり、またGFPの発現による細胞やたんぱく質の機能への影響を常に検証する必要がある。したがって、なんら前処理なく生細胞を、分子レベルで識別し観測することが可能な手法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

研究代表者らがこれまで開発してきた、リアルタイム CARS(coherent anti-Stokes Raman scattering)顕微鏡に、高精度に狙った位置に刺激を加えることができる、レーザーアブレーション・マニピレーションシステムを付加し、細胞に対して遠隔的に刺激を与えた際の応答を、リアルタイムに無染色にイメージング可能なシステムを開発する。刺激を与えた箇所のみならず、その周囲まで可視化することにより、刺激箇所周辺での信号伝達がどのように起きるか可視化し、細胞膜修復過程の解明や力学的刺激に対する応答の解明へ応用する。また、細胞応答のみならず、集光レーザービームの光放射圧によって生じる結晶の成長等を、偏光分布制御を用いることでその配向まで観察し、また集光スポットだけでなくその周囲に対してどのような影響を及ぼしているのか観測することで、結晶成長のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

Fig. 1 に開発したレーザーアブレーション/マニピレーション多焦点 CARS 顕微鏡システムの概略図を示す。光源には、高精度に同期したピコ秒モードロックチタンサファイアレーザーを用いている。これらのレーザーからの光を時間的・空間的に重ね合わせ、マイクロレンズアレイスキャナーに通し、複数のスポットを形成し、これを対物レンズによって試料内に投影して、各焦点から発生する CARS 光を EM-CCD にて検出している。マイクロレンズアレイを回転させることによって、複数のスポットが試料内を移動し、一度にイメージを取得することができる。あまた、CARS 光の検出には透過配置と反射(落射)配置の同時に観測可能である。

励起レーザー光に対向してアブレーション/マニピレーション用レーザー光を入射し、狙った位置でアブレーション/マニピレーションが可能としている。アブレーション/マニピレーション用のレーザー光の照射位置は、ガルバノミラーによって面内方向を、電動ステージ上に置いたレンズ位置の移動によって光軸方向をコンピュータ制御している。

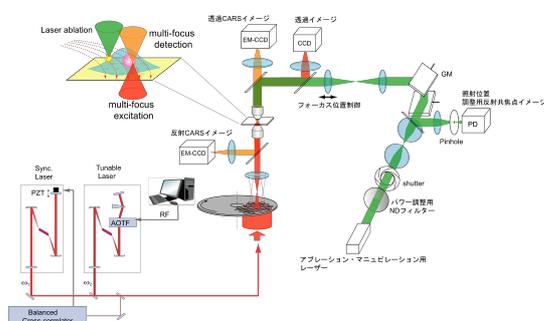


Fig. 1 Multifocus CARS microscopy system with laser ablation/manipulation system

4. 研究成果

Fig. 2 にレーザーアブレーションによる細胞膜

破壊前後の CARS 像を示す。観測は脂質を可視化する 2840 cm^{-1} で行った。試料には HeLa 細胞を用い、アブレーションレーザー光(チタンサファイアレーザー、パルス幅 5 ps)を細胞膜に集光した。細胞膜が破壊された後に、アブレーション光集光スポット付近で CARS 光強度が上昇することが観測された。一方、培養液中の Ca イオンを取り除いた場合、このような信号の上昇は見られず、逆に信号が低下した領域が観測された(Fig. 3)。Ca イオンは細胞毒性が高いため、細胞質中の小胞が Ca イオンの流入に伴い傷口を塞ぐように集まり、各々融合することで細胞内への Ca イオンの流入を防ぐことが知られている。

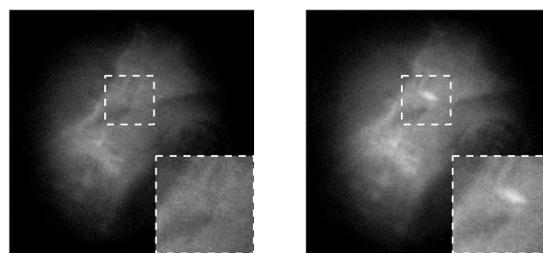


Fig. 2 Cellular response by laser induced membrane disruption. (left) before membrane disruption, (right) after membrane disruption.

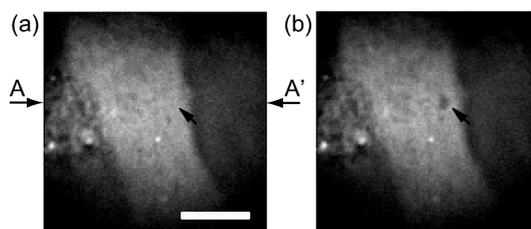


Fig. 3 Cellular response in Ca ion free medium by laser induced membrane disruption. (left) before membrane disruption, (right) after membrane disruption. Arrow indicates the ablated point.

2840 cm^{-1} 信号上昇は細胞質中の小胞が集まることによるものと考えられる。また、数十秒かけてこの信号上昇は減衰することも観測された(Fig. 4)。集まった小胞は、お互いに融合する。小胞の体積はその直径の 3 乗に比例するのに対して、小胞の表面積はその直径の 2 乗に比例する。したがって、小胞が融合してその直径が大きくなると、体積と表面積の比は小さくなる。脂質は、主に小胞の膜を構成していると考えられると、その濃度は小胞の表面積/体積に比例する。このため、融合に従って脂質の信号が小さくなっていったと推測される。

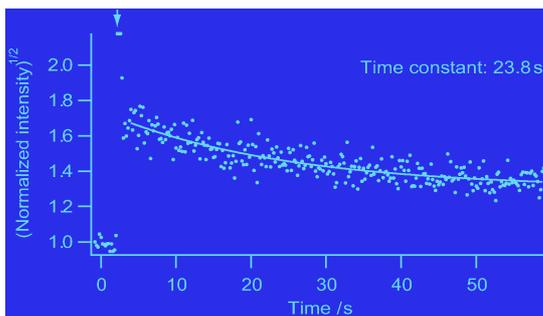


Fig. 3 Temporal response of CARS signal at 2840 cm^{-1} around disruption point by laser ablation.

また、光放射圧によって形成される結晶の形成過程観測を行った。試料には、尿素飽和溶液を用い、CN伸縮振動 1000 cm^{-1} の観測を行った。結晶化用レーザー光には、CWチタンサファイアレーザー (800 nm , 900 mW , CW)を用い、透過光およびCARSイメージのリアルタイム観測を行った。溶媒にはレーザー光の吸収による影響を避けるため重水を用い、結晶化用レーザー光を溶液-ガラス界面(ガラスは試料セル)に集光した。

Fig. 4に、レーザー照射スポットでのCARS光強度と、CARS励起光の透過強度変化を示す。集光約50秒後、CARS光強度の急激な上昇と、約100秒間に渡る緩やかな上昇が観測された。この変化は透過光強度には現れず、光放射圧による分子濃度上昇が観測された結果であると推察することができる。

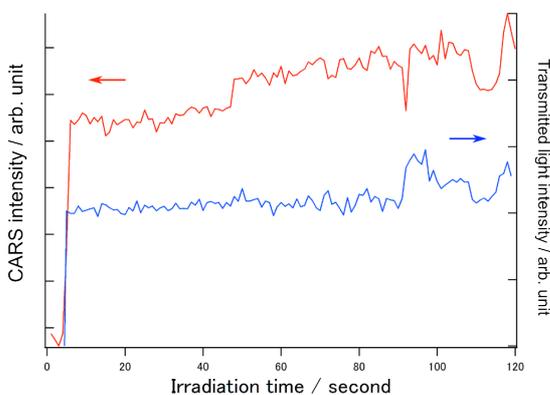


Fig. 4 Temporal change of CARS intensity (red) and transmitted light intensity (blue) at the laser focused region.

また、より長時間に渡ってレーザーを照射したところ、レーザー照射7分に、約3分間に渡る大きなCARS光の上昇と、透過光強度の減少が見られた(Fig. 5)。CARS光強度変化は矩形的であり、急激なCARS光変化が観測された。動画には焦点付近に移動してくる様子は見られなかったため、集光点以外で形成された微結晶がトラップされた可能性は低く、放射圧による結晶核

形成とその成長の様子が観測されたものと考えられる。

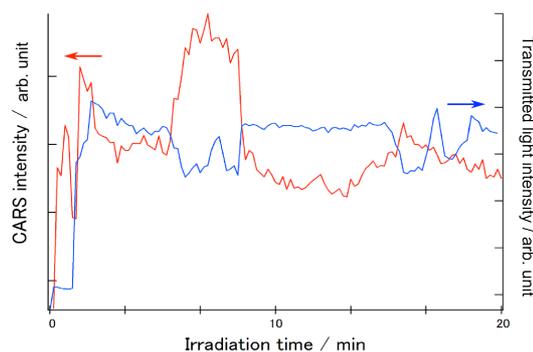


Fig. 5 Temporal change of CARS intensity (red) and transmitted light intensity (blue) at the laser focused region observed.

リアルタイムCARS顕微鏡と、レーザーアブレーション/レーザートラッピングを組み合わせ、リアルタイムに分子振動イメージと遠隔的な刺激を試料に与えることができるシステムを構築した。これを細胞膜破壊-修復、光放射圧による結晶化プロセスモニタリングへと応用した。開発したシステムは、遠隔的に試料に刺激を与えることができるため、今後様々な分野への展開を検討したい。

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6件)

① M. Hashimoto, T. Minamikawa, and T. Araki, "Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy for high speed non-staining biomolecular imaging", *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 査読有, Vol. 14, No. 2, (2013), 150-158, DOI: 10.2174/1389201011314020004

② T. Minamikawa, H. Niioka, T. Araki, and M. Hashimoto, "Real-time imaging of laser-induced membrane disruption of a living cell observed with multi-focus CARS microscopy", *J. Biomed. Opt.*, 査読有, Vol. 16, No. 2, (2011), 021111, DOI:10.1117/1.3533314

③ T. Minamikawa, Y. Murakami, N. Matsumura, H. Niioka, S. Fukushima, T. Araki, and M. Hashimoto, "Photo-induced cell damage analysis for multifocus CARS microscopy", *Proc. SPIE*, 査読有, Vol. 7903, (2011), 79032H, DOI: 10.1117/12.874677

④ 橋本 守, 南川 丈夫, 新岡 宏彦, 荒木 勉, "リアルタイムCARS顕微鏡の開発と生細胞観測への応用", *日本レーザー医学会誌*, 査読

有, Vol. 30, No. 4, (2010), pp. 421-426,
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsism/30/4/30_4_421/_pdf

[学会発表] (計 42 件)

① M. Hashimoto, H. Kanoh, H. Niioka, and T. Araki, "Imaging of recrystallized organic molecule by multiplex fourth order coherent Raman microscopy", Focus on Microscopy 2013 (FOM2013), Maastricht, The Netherlands, Mar. 24-27 (2013).

② H. Cahyadi, J. Iwatsuka, T. Minamikawa, H. Niioka, T. Araki, and M. Hashimoto, "Fast spectral CARS microscopy with high-speed tunable picosecond laser detection of lipid metabolism", 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (IHC 2012), Kyoto, Aug. 26-29 (2012).

③ H. Cahyadi, H. Niioka, K. ichi Hirano, C. Ikegami-Nomura, T. Araki, and M. Hashimoto, "Detection of lipid uptake by triglyceride deposit cardiomyovascularopathy-indicated fibroblast using CARS microscopy", OSA-JSAP joint symposia, 73th Autumn Meeting, 2012, The Japan Society of Applied Physics, Ehime University, Ehime, Sep. 11-14 (2012).

④ H. Cahyadi, J. Iwatsuka, T. Minamikawa, H. Niioka, T. Araki, and M. Hashimoto, "Fast spectral imaging CARS microscopy with picosecond high speed wavelength scanning laser", Focus on Microscopy 2012 (FOM2012), Singapore, Apr. 1-4 (2012).

⑤ 橋本守, 南川丈夫, H. Cahyadi, 新岡宏彦, 荒木勉, "高速波長走査多焦点 CARS 顕微鏡による分子振動イメージング" (招待講演), 第 35 回日本分子生物学会年会 ワークショップ 2W4III 「生体分子イメージングへの新たな挑戦～ラマン分光、プローブレスイメージングによる分子機能解析とがん診断への応用～」, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡, 福岡県, Dec. 11-14 (2012).

⑥ 橋本守, "多焦点リアルタイム CARS 顕微鏡による細胞応答の観測" (招待講演), 第 72 回応用物理学会学術講演会, 山形大学, 山形県山形市, Aug. 29 - Sept. 2 (2011).

⑦ 橋本守, "多焦点 CARS 顕微鏡による細胞応答の無染色高速観測" (招待講演), 日本分光学会 平成 22 年度 ナノ分光部会・生細胞分光部会合同シンポジウム 「分光が拓く新しいイメージング・イメージングが拓く新しい分光学」, 東京大学, 東京都, Dec. 10 (2010).

[図書] (計 1 件)

① M. Hashimoto, T. Ichimura, and K. Fujita, "CARS microscopy: Implementation of nonlinear vibrational spectroscopy for far-field and near-field imaging", Raman Imaging (A. Zoubir, ed.), Optical Science 168, Chapter. 11, pp. 317-346, Springer, (2012).

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 波長走査パルス光同期システム

発明者: 橋本守, 丸山真幸

権利者: 同上

種類: 特許出願

番号: 特願 2012-001578

出願年月日: 2012 年 1 月 6 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称: パルスレーザ光のタイミング調整装置, 調整法及び光学顕微鏡

発明者: 橋本守, 南川丈夫, 谷本尚生, 小林実, 藤田克昌, 河田聡, 荒木勉

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許第 4862164 号

取得年月日: 平成 23 年 11 月 18 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

http://sml.me.es.osaka-u.ac.jp/araki_lab

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 守 (HASHIMOTO MAMORU)

大阪大学 大学院基礎工学研究科・准教授
研究者番号: 70237949

(2) 研究分担者

福島 修一郎 (FUKUSHIMA SHUICHIRO)

大阪大学 大学院基礎工学研究科・助教
研究者番号: 40362644

新岡 宏彦 (NIIOKA HIROHIKO)

大阪大学 大学院基礎工学研究科・助教
研究者番号: 70552074