

非線形ラマン分光による生細胞の分子イメージング

加納 英明^{1,2}

1. はじめに

生細胞・生体組織を計測・診断する上で、非染色（無染色）・非標識（無標識）・非破壊・非侵襲（または低侵襲）な手法は理想的な手段の一つであろう。ラマン散乱、特にコヒーレント・ラマン散乱（非線形ラマン散乱の一種）を用いたイメージング法は、そのような特徴に加えて分子（正確には化学結合）識別能を持ち合わせた高速イメージング法であり、ラベルフリー・分子イメージングの新手法として、近年ますます注目を集めている¹⁻⁹⁾。

非線形ラマン・イメージング法では、コヒーレント・アンチストークス・ラマン散乱（coherent anti-Stokes Raman scattering: CARS）および誘導ラマン散乱（stimulated Raman scattering: SRS）の二つが、主な手法としてよく用いられている。さらに、これらの手法をベースとして、非線形ラマン分光（または非線形ラマン分光学的）イメージング（nonlinear Raman spectral/spectroscopic imaging）手法もいくつか報告されている。たとえば広帯域のスペクトル成分を持つ“白色”レーザー光源〔正確にはスーパーコンティニューム光（supercontinuum: SC）〕を用いて複数の振動モードを同時に励振させるマルチプレックス法¹⁰⁻¹⁶⁾、レーザーの波長を高速に変化させてスペクトルおよび空間情報を得る方法¹⁷⁻²¹⁾、チャープしたフェムト秒レーザーを用いる方法²²⁾、フーリエ変換を用いた干渉分光法²³⁻²⁶⁾等がこ

れまで報告されている。これらに加えて、2台の光コムを用いたデュアルコム分光によりCARS分光イメージングを行う研究（spectro-imaging）も報告されている²⁷⁾。これらのうちでマルチプレックス法¹⁰⁻¹⁴⁾は、CCDカメラ等のマルチチャンネル検出器を用いて幅広いスペクトル帯域を持つ信号光を一括して簡便に測定することのできる手法であり、典型的なスペクトル帯域は $\sim 3000\text{cm}^{-1}$ と、振動モードの基音（fundamental）すべてをカバーしており、既報の中で最もスペクトル帯域が広い^{16, 28)}。マルチプレックス法では、1台のモード同期レーザー発振器^{29, 30)}を用いた方法や、白色レーザー光（SC光）を用いた手法^{12, 13)}などがこれまで報告されている。後者では、SC光発生のために、マスターレーザーからの出力をテーパー状ファイバー¹²⁾やフォトリソニック結晶ファイバー（photonic crystal fiber: PCF）¹³⁾に導入する方法が一般的である。我々のグループではこれまで、白色レーザー光発生にサブナノ秒光パルス³¹⁾や ~ 100 ピコ秒パルス³²⁾を用いることで、コストダウンと長期安定性を両立させたCARS分光学的イメージング装置を開発している。

非線形ラマン散乱に用いるレーザー光源は一般にパルスレーザーであるため尖頭出力が高く、CARSに加えて第二高調波発生（second harmonic generation: SHG）、第三高調波発生（third harmonic generation: THG）、二光子励起蛍光（two-photon excitation fluorescence）等の信号も同時に発生する。したがって、CARSをはじめとする複数の検出チャンネルを持った、いわゆるマルチモーダル非線形光学イメージングを行うことができる。我々はこれまで、ラベルフリー・マルチモーダル非線形光学イメージングにより、ルートレチン（Rootletin）³³⁾というタンパク質により構成されたフィラメント（線毛根: rootlet）が、網膜視細胞においてSHGアクティブであることを報告している³⁴⁾。また、マウス頭頂骨のマルチモーダル非線形光学イメージングにより、pixel dwell time 5msにて生体組織の*ex vivo*マルチモーダル非線形光学イメージング（後方散乱配置）が可能であることも報告している³⁵⁾。

本稿では、CARSの原理と、我々が現在開発を進めているCARS分光学的イメージング装置の実際、そしてその生細胞への応用について解説する。

¹筑波大学大学院数理工学物質科学研究科電子・物理工学専攻（筑波大学数理工学物質系物理工学域）（〒305-8573 つくば市天王台1-1-1）

²筑波大学エネルギー物質科学研究センター（TREMS）（〒305-8571 茨城県つくば市天王台1-1-1）

Molecular imaging of living cells using nonlinear Raman spectroscopy

Hideaki Kano^{1,2} (¹Department of Applied Physics, Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8573, Japan, ²Tsukuba Research Center for Energy Materials Science (TREMS), University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8571)

本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910820

© 2019 公益社団法人日本生化学会

2. 原理

図1aにCARS過程のダイアグラムを示す。CARS過程では一般に二色のレーザー光 (ω_1 , ω_2 光, またはポンプ光, ストークス光) を用いる。これら二つの入射光の角振動数差 $\omega_1 - \omega_2$ が試料分子の持つ振動モードの角振動数 Ω と一致すると (共鳴条件: $\omega_1 - \omega_2 = \Omega$), レーザー照射された多数の試料分子の振動モードが共鳴励振される。このようにして生じた振動コヒーレンスは, 試料分子が三つ目のレーザー光 (ω_3 光, またはプローブ光) と相互作用することにより, 角振動数 $\omega_3 \pm \Omega$ の三次の非線形分極に変換され, その分極からの光電場発生により, ω_{CARS} [$= \omega_3 + \Omega$ 光 (CARS光)] として取り出される [ω_{SRS} ($= \omega_3 - \Omega$ 光) も同時に発生する; $\omega_3 = \omega_1$ の場合, 誘導ラマン利得 (stimulated Raman gain: SRG) に相当する]。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 ω_x 光の波数ベクトルである。 ω_3 光として, 通常はすでに入力済みの ω_1 光が使われる。その場合 ($\omega_3 = \omega_1$), ω_{CARS} 光の信号強度は ω_1 光および ω_2 光の強度の二乗および一乗にそれぞれ比例する。すなわち, CARS光の信号強度は ω_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, 入射レーザーの進行方向に指向性のよいCARS光 (前方散乱) を得ることができる。このように, 信号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, 高速イメージングも可能になる。信号の増倍ファクターについては, 顕微イメージングでは100倍³⁶⁾, バルク試料では $\sim 10^5$ 倍³⁷⁾ 程度強くなった, という報告がある。これらは, 発生した信号光がどの程度の距離までコヒーレントに足し合わせられるか (コヒーレンス長) と関係している。

通常のCARS顕微鏡では, ω_1 , ω_2 光として各々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励振することができない。このことは, 脂質分子の CH_2 伸縮振動 ($\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$) のように, 他のバンドから比較的離れ, 鋭くかつラマン散乱断面積の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, 以下述べるように注意が必要である。一般に, 測定により得られる信号光 ($\omega_1 - \omega_2 + \omega_3$) の成分には, 振動モードに共鳴するCARS光の他に, 図1bに示す非共鳴バックグラウンド (nonresonant background: NRB) と呼ばれる成分も含まれる (NRBの角振動数 ω_{NRB} も $\omega_{\text{NRB}} = \omega_1 + \omega_3 - \omega_2$ 等で表され, ω_{CARS} と同じ値になる)。我々の経験では, 特に生細胞の指紋領域のバンドを測定する際, 振動共鳴CARS光はNRBと同じかそれ以下の強度となるため, 単一波長のCARS測定では両者を分離することが難しい。複数の振動モードについての情報を同時に取得し, かつ, NRBのコンタミネーションのない, 純粋に振動共鳴したCARS信号のみを得るために, 我々は図1cに示したマルチプレックスCARS過程を用いてCARSスペクトルを取得している。この過程では広帯域ストークス光 (ω_2 光) が必要になるが, 高い空間コヒーレンスを持ちスポット状に集光することのできる白色レーザー光 (SC光) により, それを実現している。

CARSスペクトル $I(\omega)$ は一般に以下の式で表される。

$$I(\omega) = \left| \chi_{\text{NRB}} + \sum_n \frac{A_n}{\Omega_n - \omega - i\Gamma_n} \right|^2 \quad (1)$$

ここで, ω は信号光の角振動数, χ_{NRB} はNRB (ω によらない複素数の定数; 完全非共鳴の場合は実数), A_n は振動共鳴CARS光の振幅, Ω_n は振動共鳴角振動数, Γ_n は振動バンド幅に比例する係数である。第1項のNRBと第2項の振動共鳴信号とは電場どうしがコヒーレントで干渉するため, NRBが実数の場合, 実測スペクトルは各々の振動共鳴位置において複素ローレンツ関数の実部 (分散型) の形状になる。これを通常の振動スペクトルに復元するため, 我々は最大エントロピー法 (maximum entropy method: MEM) を用いている²⁸⁾。MEMの特徴として, スペクトル形状を式(1)のようなローレンツ型と仮定せず, 実験で得られたスペクトルからダイレクトに正しいスペクトル (自発ラマンで得られるスペクトルに相当する $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ スペクトル) を復元できる, という利点があげられる³⁸⁾。そのおかげで, 生体組織や生細胞においてよくみられる幅広い非対称な振動スペクトル形状も正しく復元することができる。

3. 実験

1) 実験装置

図2に典型的な実験装置図を示す。光源には, マスター発振器およびファイバー増幅器 (master oscillator fiber amplifier: MOFA) (Leukos: SM-1000) を用いた。光源の詳細は以下のとおりである。マスター発振器にはcw Qスイッチ・マイクロチップNd:YVO₄レーザーを, ファイバー増幅器はYb添加ダブルクラッドファイバーを採用している。最

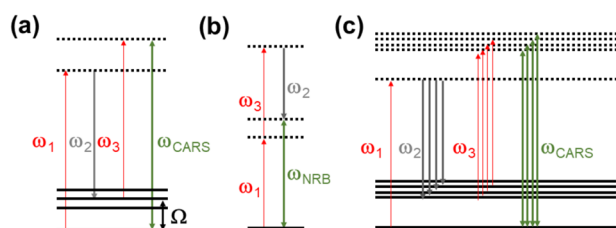


図1 CARS過程等のエネルギーダイアグラム
(a) CARS, (b) 非共鳴バックグラウンド (NRB) の一例, (c) マルチプレックスCARS.

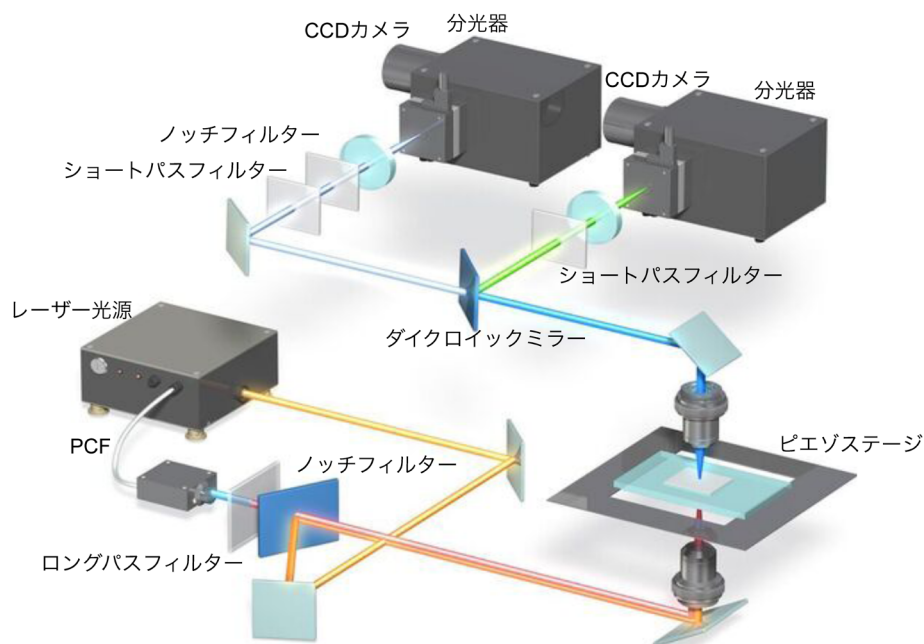


図2 本研究で開発した超広帯域 ($600\sim 3600\text{ cm}^{-1}$) ウルトラ・マルチプレックスCARS分光イメージングシステム。CARSに加え、紫外-可視用の分光システムで第二高調波発生 (second harmonic generation : SHG), 第三高調波発生 (third harmonic generation : THG), 和周波発生 (sum frequency generation : SFG), 三次和周波発生 (third-order sum frequency generation : TSFG), 二光子励起蛍光 (two-photon excitation fluorescence : TPEF) を検出することもできる。

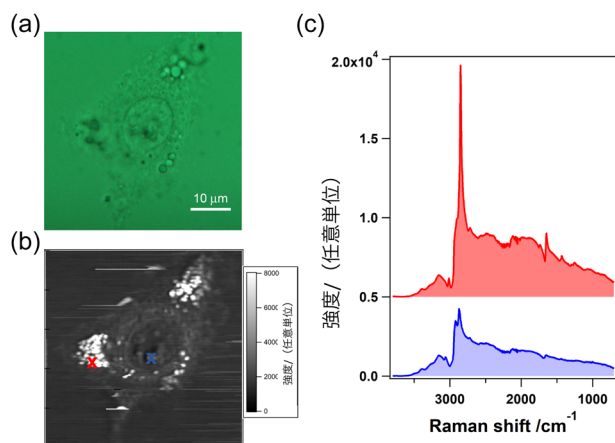


図3 A549細胞のウルトラマルチプレックスCARS分光イメージング

(a) A549細胞の光学像 (明視野像), (b) 波数 2850 cm^{-1} におけるCARS光強度を用いて構成したCARSイメージ, (c) (b)の中央および中央のX印における実測CARSスペクトル (上および下)。[Reprinted from H. Kano, T. Maruyama, J. Kano, Y. Oka, D. Kaneta, T. Guerenne, P. Leproux, V. Couderc, and M. Noguchi, "Ultra-multiplex CARS spectroscopic imaging with 1-millisecond pixel dwell time," OSA Continuum 2(5), 1693–1705 (2019); DOI: 10.1364/OSAC.2.001693, OSA Publishing]

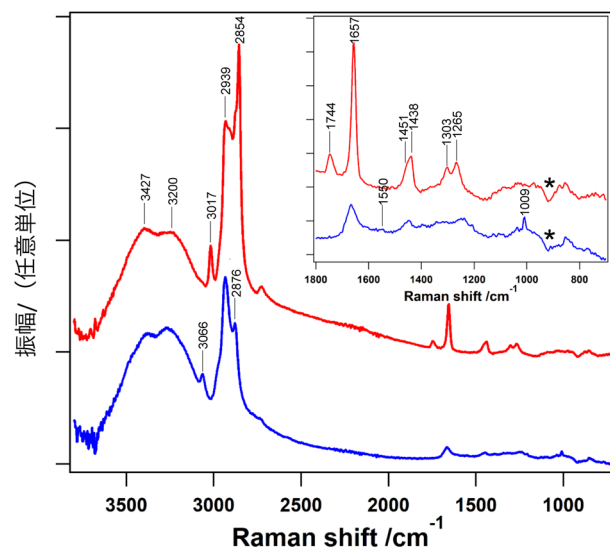


図4 図3cで示したCARSスペクトルを最大エントロピー法により自発ラマンスペクトルに相当する $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ スペクトルに変換したスペクトル

挿入図は指紋領域を拡大したスペクトル。"＊"印にみられる凹みは、解析の際発生したアーティファクト (カバーガラスのCARS信号に由来)。[Reprinted from H. Kano, T. Maruyama, J. Kano, Y. Oka, D. Kaneta, T. Guerenne, P. Leproux, V. Couderc, and M. Noguchi, "Ultra-multiplex CARS spectroscopic imaging with 1-millisecond pixel dwell time," OSA Continuum 2(5), 1693–1705 (2019); DOI: 10.1364/OSAC.2.001693, OSA Publishing]

終的な光源仕様は、中心波長、パルス幅、繰り返し周波数、平均出力がそれぞれ1064 nm、~85 ps、~0.82 MHz、~2 Wであった。光源からの出力の一部をPCFに導入することで広帯域SC光を発生させ、ストークス光 (ω_2 光) とした。SC光は可視から近赤外まで広帯域なスペクトル成分を持つが、そのうち1064 nm以上の波長成分のみを用いるため、吸収型および干渉型のフィルターを組み合わせで1100 nm以上の波長成分のみを切り出した。一方、残りの基本波 (1064 nm) はそのままポンプ光 (ω_1 光) として用いた。ポンプ光、ストークス光のパルスエネルギーはそれぞれ約2および1 μ Jであり、これは約24および12 kWの尖頭出力に対応する。

ポンプ光 (ω_1 光) およびストークス光 (ω_2 光) を、ノッチフィルターを用いて合波し、倒立顕微鏡と正立顕微鏡を合体させたカスタムメイドの正倒立顕微鏡へと導入した。二つのレーザーパルスは倒立側の水浸対物レンズ (CFI Plan Apo 60 \times NA 1.27, Nikon) を用いてサンプルへと集光した。サンプルは3軸ピエゾステージ上にマウントされており、面内・面外 (光軸) 方向の3次元スキャンが可能である。種々の非線形光学過程により発生したCARSを含む信号光は、正立側の対物レンズ (Plan S Fluor 40 \times NA 0.6, Nikon) を用いてコリメートされ、ダイクロイックミラーでCARSとSHG, THGを分割した後、それぞれ別の分光器に導入し、CCDカメラで検出した。今回、新規に導入したCCDカメラ (Blaze 400-HR, Princeton Instruments) をCARS光検出用に用いることで、測定速度の格段の向上

に成功した。そこで本稿では、CARSの高速測定にフォーカスした研究結果を紹介する。

2) 試料

生細胞サンプルとしてA549株を用いた。A549はヒト肺胞基底上皮腺がん細胞株である。この細胞の特徴として、細胞のリン脂質膜の維持に必要な不飽和脂肪酸を多く含んでいることがあげられる³⁹⁾。チェンバースライドにタイプIコラーゲンをコートした上で細胞をまき、ウシ血清 (fetal bovine serum : FBS) 10% 入りのDulbecco's Modified Eagle's Medium中で37°C, CO₂濃度5%のインキュベーター環境で2日間培養した。測定直前にインキュベーターから取り出し、チャンバーを取り除いてカバーガラスを置き、マニキュアで封じた上で即座に測定した。サンプル位置での入射レーザー出力は、ポンプ光、ストークス光でそれぞれ~80 mW, ~50 mWであった。

4. 結果

本装置を用いて生細胞 (A549) を測定した結果について述べる。図3aおよびbに生細胞 (A549) の光学像およびCARSイメージの結果を示す。図3bのCARSイメージは、測定スペクトルの2850 cm⁻¹の波数位置に現れる見かけ上のピーク (図3cの上段のスペクトルにおいて特に顕著にみられている) 信号強度値を用いて再構成した。1ピクセルあた

表1 細胞内で典型的にみられる振動バンドの波数位置、帰属、主な分子種⁴⁴⁻⁵²⁾

典型的なラマンシフト (cm ⁻¹)	帰属	主な分子種	図5, 6の対応
3427	OH 逆対称伸縮振動 (O-H a-stretch.)	水	a
3200	OH 対称伸縮振動 (O-H s-stretch.)	水	b
3066	芳香環由来のCH 伸縮振動 (C-H stretch. (aromatic))	タンパク質	c
3017	=C-H 伸縮振動 (=C-H stretch.)	脂質	d
2953	CH ₃ 逆対称伸縮振動 (CH ₃ a-stretch.)	DNA および RNA	e
~2930	CH ₃ 対称伸縮振動 (CH ₃ s-stretch.)	タンパク質/脂質	f, g
2902	CH ₂ 逆対称伸縮振動 (CH ₂ a-stretch.)	脂質/タンパク質	h
2872	CH ₃ 縮重変角振動の倍音と CH ₃ 対称伸縮振動とのフェルミ共鳴 (Overtone of CH ₃ deform. in Fermi resonance with CH ₃ s-stretch.)	タンパク質/脂質	i
2854	CH ₂ 対称伸縮振動 (CH ₂ s-stretch.)	脂質	j
1744	エステル結合由来のC=O 伸縮振動 (C=O stretch. (ester))	脂質	k
1657	<i>cis</i> C=C 伸縮振動/アミド I (<i>cis</i> C=C stretch./Amide I)	脂質/タンパク質	l
~1550	プリン環 (アデニンおよびグアニン)	DNA および RNA	
1451	CH ₃ 縮重変角振動 (CH ₃ deg. deform.)	タンパク質	m
1438	CH ₂ はさみ変角振動 (CH ₂ scis.)	脂質	n
1303	CH ₂ ひねり変角振動 (CH ₂ twist.)	脂質	o
~1284	アミド III/CH 変角振動 (Amide III/C-H bend.)	タンパク質	p
1265	CH 変角振動 (=C-H bend.)	脂質	q
1009	フェニル環の環呼吸振動 (Phenyl ring breath.)	タンパク質	r

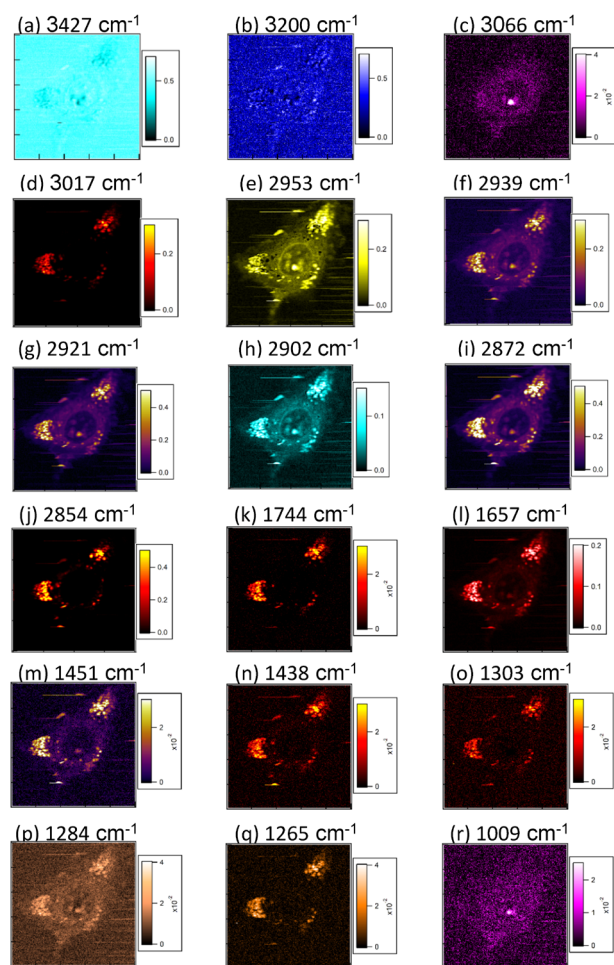


図5 A549生細胞のウルトラマルチプレックスCARS ($\text{Im}[\chi^{(3)}]$) 分光イメージング
1ピクセルあたりの露光時間は約10ms. それぞれ(a) 3427, (b) 3200, (c) 3066, (d) 3017, (e) 2953, (f) 2939, (g) 2921, (h) 2902, (i) 2872, (j) 2854, (k) 1744, (l) 1657, (m) 1451, (n) 1438, (o) 1303, (p) 1284, (q) 1265, そして(r) 1009cm^{-1} に対応. [Reprinted from H. Kano, T. Maruyama, J. Kano, Y. Oka, D. Kaneta, T. Guerenne, P. Leproux, V. Couderc, and M. Noguchi, "Ultra-multiplex CARS spectroscopic imaging with 1-millisecond pixel dwell time," OSA Continuum 2(5), 1693–1705 (2019); DOI: 10.1364/OSAC.2.001693, OSA Publishing]

りの露光時間は約10msである. 図3c上段および下段に示されたCARSスペクトル(実測スペクトル)は, 図3bで細胞内にみられる明るい輝点の位置(中央左のX印)および中央付近の核内構造(中央のX印)でのものである. この波数 2850cm^{-1} のバンドは CH_2 伸縮振動モードに帰属でき, 細胞内脂質において強い信号が観測される. したがって, 細胞内の明るい輝点は細胞内脂肪滴であると考えられる.

実測のCARASスペクトルは式(1)のように表されるため, 振動共鳴成分とNRBとがスペクトル上で干渉している. そこで2節で述べたように, 実測スペクトルをMEM⁴⁰⁾により $\chi^{(3)}$ の虚部($\text{Im}[\chi^{(3)}]$)に復元したスペクト

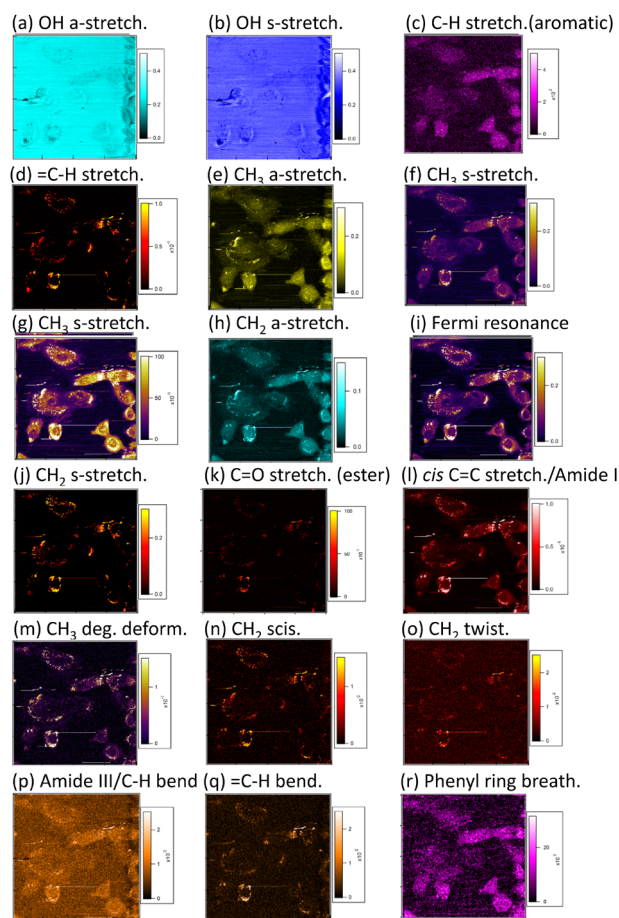


図6 $200\text{-}\mu\text{m}^2$ 四方視野で測定したA549生細胞のウルトラマルチプレックス

CARS ($\text{Im}[\chi^{(3)}]$) 分光イメージング, 露光時間は約1.8ms. それぞれ(a) 3427, (b) 3200, (c) 3066, (d) 3017, (e) 2953, (f) 2939, (g) 2921, (h) 2902, (i) 2872, (j) 2854, (k) 1744, (l) 1657, (m) 1451, (n) 1438, (o) 1303, (p) 1284, (q) 1265, そして(r) 1009cm^{-1} に対応. [Reprinted from H. Kano, T. Maruyama, J. Kano, Y. Oka, D. Kaneta, T. Guerenne, P. Leproux, V. Couderc, and M. Noguchi, "Ultra-multiplex CARS spectroscopic imaging with 1-millisecond pixel dwell time," OSA Continuum 2(5), 1693–1705 (2019); DOI: 10.1364/OSAC.2.001693, OSA Publishing]

ル(自発ラマン相当のスペクトル)を図4に示す. 図3cの上段, 下段のそれぞれのスペクトルが, 図4の上段, 下段のそれぞれへと変換されている. 挿入図は上段, 下段それぞれのスペクトルの指紋領域の拡大図である. これらのスペクトルはそれぞれ, 細胞内脂質(上段)およびタンパク質(下段)の典型的なスペクトルとよく一致している. すなわち, $3427, 3200, 3066, 3017, 2930, 2939, 2854, 1744, 1657, 1451, 1438, 1303, 1265$, そして 1009cm^{-1} の波数位置のバンドはそれぞれ, OH逆対称伸縮振動, OH対称伸縮振動, 芳香環由来のCH伸縮振動, $=\text{C-H}$ 伸縮振動, CH_3 対称伸縮振動, CH_2 対称伸縮振動, C=O 伸縮振動, アミドI(かつ/またはcis C=C伸縮振動), CH_3 縮重変角

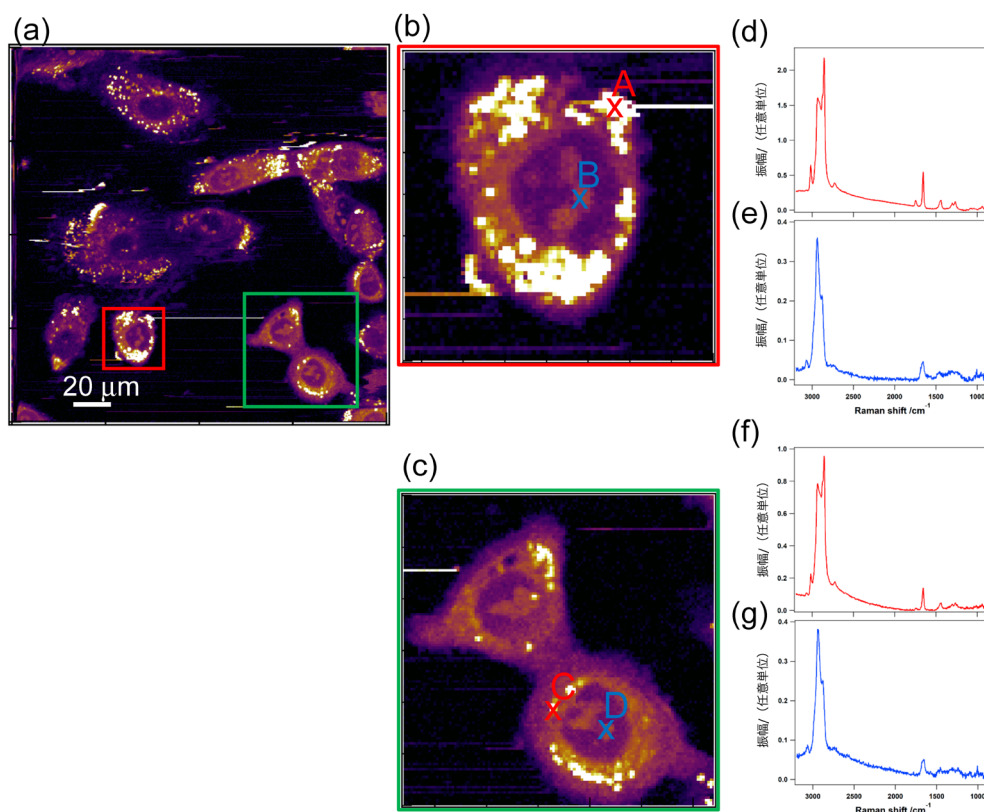


図7 A549生細胞のウルトラマルチプレックスCARS ($\text{Im}[\chi^{(3)}]$) スペクトル (a) 波数 2939 cm^{-1} のCARSイメージ (図8fと同一), (a)の左下四角枠(b)および右下四角枠(c)を拡大したCARSイメージ, (b)のA点(d), B点(e)における $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ スペクトル, (c)のC点(f), D点(g)における $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ スペクトル. [Reprinted from H. Kano, T. Maruyama, J. Kano, Y. Oka, D. Kaneta, T. Guenne, P. Leproux, V. Couderc, and M. Noguchi, "Ultra-multiplex CARS spectroscopic imaging with 1-millisecond pixel dwell time," OSA Continuum 2(5), 1693–1705 (2019); DOI: 10.1364/OSAC.2.001693, OSA Publishing]

振動, CH_2 はさみ変角振動, CH_2 ひねり変角振動, そしてフェニル環の環呼吸振動に同定できる. 表1に, 振動バンドの波数位置と帰属等を示す^{32, 41)}.

図5の各波数でのCARSイメージでは, マイクロスコピックな種々の細胞内構造が可視化されている. たとえば直径数マイクロメートルの粒子状の構造物が図5d, j, k, n, o, およびqにて多数みられている. これらの振動モードはそれぞれ, 不飽和結合由来のCH伸縮振動 ($=\text{C-H}$) (d), CH_2 対称伸縮振動(j), そしてエステル結合由来の C=O 伸縮振動(k), CH_2 はさみ(n), CH_2 ひねり(o), そして不飽和結合由来のCH変角振動 ($=\text{C-H}$) (q)であり, すべて脂質において典型的にみられるバンド群である. したがって, これら粒子状の構造物は細胞内脂肪滴であると同定できる. また, 図5dおよびqで示されているように, 脂肪滴には不飽和脂質が豊富に含まれている. これらの結果はA549細胞の特徴 (不飽和脂質を生合成する) と矛盾しない. 一方, 図5fおよびgのCARSイメージでは, 細胞内に暗くて丸い構造物がある. これは細胞核に対応する. 核内には, 芳香環由来のCH伸縮振動 (図5c) はじめ, 複

数のイメージ (図5e, f, g, i, m, およびr) において複数の輝点が観測されているが, これらは核小体と同定できる. HeLa細胞を測定した我々の以前の報告³²⁾では, DNAおよびRNAに由来する複数のバンドも観測されたが, 今回測定したA549株では, 1550 cm^{-1} 付近に小さいバンドが観測された程度であった. これはおそらく今回の実験の信号対雑音比が悪かった, または細胞株依存性があるためであると考えられる. また, 興味深いことに 2902 cm^{-1} のCARSイメージでは核膜が顕著なコントラストを示している. これはおそらくリン脂質に由来する CH_2 逆対称伸縮振動に帰属できると考えられる. 一方, OH逆対称および対称伸縮振動に帰属できる 3427 および 3200 cm^{-1} のCARSイメージでは, 培地, 細胞内ともに含まれる水のためコントラストが視野全体にわたって低下している. このOH領域のスペクトルを詳細に解析することで, 細胞内水の水素結合の度合いを評価できることを, 最近我々は報告した⁴²⁾.

次に, 生細胞の超広帯域ウルトラ・マルチプレックスCARS分光イメージングを行った結果を図6に示す. 視野は $200\text{ }\mu\text{m}^2$, 全画素は 401×401 ピクセルであった. CCDカ

メラの読み出し時間を考慮に入れたところ、1ピクセルあたりの露光時間は1.8msであった。これまでの我々の測定時間(50ms³²⁾)と比べて、25倍以上速度が向上した。図5と同様に、各振動モードにて複数の生細胞が明瞭に可視化されている。図7には図6の一部を拡大した結果を示す。図7a(図6fと同一)の中の左および右四角枠を拡大した結果を図7bおよびcに、その中に示したA~D点のスペクトルを図7d~gに示す。スペクトルは2- μm^2 四方を空間平均した結果である。図7dおよびfは不飽和脂質に、図7eおよびgはタンパク質に同定できる。以上のように、露光時間1.8msでも、十分なクオリティのIm [$\chi^{(3)}$] スペクトル(自発ラマン相当のスペクトル)を取得できることが示された。

5. まとめ

本稿では、SC光を用いた超広帯域(600~3600 cm^{-1})ウルトラ・マルチプレックスCARS分光イメージング装置の紹介と、それを用いた生細胞可視化の結果を紹介した。1.8ms/ピクセルで生細胞のIm [$\chi^{(3)}$] スペクトル(自発ラマン相当のスペクトル)を良好な信号対雑音比で得ることができた。本手法をmultivariate curve resolution-alternating least-square (MCR-ALS)⁴³⁾等の多成分解析と組み合わせることで、細胞内のさまざまな生命現象にユニークな切り口でアプローチできることが期待される。

謝辞

本成果の一部は、文部科学省科学研究費補助金基盤研究B (No. 18H02000)の研究助成のもと行われました。本稿で紹介したレーザー光源開発はPhilippe Leproux博士、Vincent Couderc博士(仏Limoges大学)、右近寿一郎氏(右近工舎)との共同研究によるものです。ここに記して感謝の意を表します。また、A549細胞は加野准子博士、野口雅之博士(筑波大附属病院診断病理研究室)から提供いただき、猪子誠人博士(愛知医科大学)とは細胞生物学的側面で有益な議論をさせていただきました。ここに記して感謝の意を表します。テレダイン・ジャパン(株)プリンストンインスツルメンツ様には、最新のCCDカメラ(Blaze 400-HR)をお貸し出しいただきました。ここに記して感謝の意を表します。

文 献

- Cheng, J.X. & Xie, X.S. (2015) Vibrational spectroscopic imaging of living systems: An emerging platform for biology and medicine. *Science*, **350**, aaa8870.
- Kano, H. (2010) Molecular Spectroscopic Imaging Using a White-Light Laser Source. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **83**, 735-743.
- Zhang, C. & Cheng, J.-X. (2018) Perspective: Coherent Raman scattering microscopy, the future is bright. *APL Photonics*, **3**, 090901.
- Day, J.P.R., Domke, K.F., Rago, G., Kano, H., Hamaguchi, H., Vartiainen, E.M., & Bonn, M. (2011) Quantitative coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy. *J. Phys. Chem. B*, **115**, 7713-7725.
- Min, W., Freudiger, C.W., Lu, S.J., & Xie, X.S. (2011) Coherent nonlinear optical imaging: beyond fluorescence microscopy. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **62**, 507-530.
- Chung, C.Y., Boik, J., & Potma, E.O. (2013) Biomolecular imaging with coherent nonlinear vibrational microscopy. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **64**, 77-99.
- Liao, C.S. & Cheng, J.X. (2016) In Situ and In Vivo Molecular Analysis by Coherent Raman Scattering Microscopy. *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto, Calif.)*, **9**, 69-93.
- Kano, H., Segawa, H., Okuno, M., Leproux, P., & Couderc, V. (2016) Hyperspectral coherent Raman imaging - principle, theory, instrumentation, and applications to life sciences. *J. Raman Spectrosc.*, **47**, 116-123.
- Camp, C.H. Jr. & Cicerone, M.T. (2015) Chemically sensitive bioimaging with coherent Raman scattering. *Nat. Photonics*, **9**, 295-305.
- Cheng, J.X., Volkmer, A., Book, L.D., & Xie, X.S. (2002) Multiplex Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microspectroscopy and Study of Lipid Vesicles. *J. Phys. Chem. B*, **106**, 8493-8498.
- Muller, M. & Schins, J.M. (2002) Imaging the Thermodynamic State of Lipid Membranes with Multiplex CARS Microscopy. *J. Phys. Chem. B*, **106**, 3715-3723.
- Kee, T.W. & Cicerone, M.T. (2004) Simple approach to one-laser, broadband coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Opt. Lett.*, **29**, 2701-2703.
- Kano, H. & Hamaguchi, H. (2005). *Appl. Phys. Lett.*, **86**.
- Petrov, G.I. & Yakovlev, V.V. (2005) Enhancing red-shifted white-light continuum generation in optical fibers for applications in nonlinear Raman microscopy. *Opt. Express*, **13**, 1299-1306.
- Andresen, E.R., Paulsen, H.N., Birkedal, V., Thogersen, J., & Keiding, S.R. (2005) Broadband multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy employing photonic-crystal fibers. *J. Opt. Soc. Am. B*, **22**, 1934.
- Camp, C.H. Jr., Lee, Y.J., Heddleston, J.M., Hartshorn, C.M., Walker, A.R.H., Rich, J.N., Lathia, J.D., & Cicerone, M.T. (2014) High-Speed Coherent Raman Fingerprint Imaging of Biological Tissues. *Nat. Photonics*, **8**, 627-634.
- Freudiger, C.W., Min, W., Holtom, G.R., Xu, B., Dantus, M., & Xie, X.S. (2011) Highly specific label-free molecular imaging with spectrally tailored excitation stimulated Raman scattering (STE-SRS) microscopy. *Nat. Photonics*, **5**, 103-109.
- Ozeki, Y., Umemura, W., Sumimura, K., Nishizawa, N., Fukui, K., & Itoh, K. (2012) Stimulated Raman hyperspectral imaging based on spectral filtering of broadband fiber laser pulses. *Opt. Lett.*, **37**, 431-433.
- Fu, D., Lu, F.K., Zhang, X., Freudiger, C., Pernik, D.R., Holtom, G., & Xie, X.S. (2012) Quantitative chemical imaging with multiplex stimulated Raman scattering microscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 3623-3626.
- Ozeki, Y., Umemura, W., Otsuka, Y., Satoh, S., Hashimoto, H., Sumimura, K., Nishizawa, N., Fukui, K., & Itoh, K. (2012) High-speed molecular spectral imaging of tissue with stimulated Raman scattering. *Nat. Photonics*, **6**, 845-851.
- Liao, C.-S., Huang, K.-C., Hong, W., Chen, A.J., Karanja, C.,

- Wang, P., Eakins, G., & Cheng, J.-X. (2016) Stimulated Raman spectroscopic imaging by microsecond delay-line tuning. *Optica*, **3**, 1377.
- 22) Hellerer, T., Enejder, A.M.K., & Zumbusch, A. (2004) Spectral focusing: High spectral resolution spectroscopy with broad-bandwidth laser pulses. *Appl. Phys. Lett.*, **85**, 25–27.
- 23) Ogilvie, J.P., Beaufort, E., Alexandrou, A., & Joffe, M. (2006) Fourier-transform coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Opt. Lett.*, **31**, 480–482.
- 24) Hashimoto, K., Takahashi, M., Ideguchi, T., & Goda, K. (2016) Broadband coherent Raman spectroscopy running at 24,000 spectra per second. *Sci. Rep.*, **6**, 21036.
- 25) Duarte, A.S., Schnedermann, C., & Kukura, P. (2016) Wide-Field Detected Fourier Transform CARS Microscopy. *Sci. Rep.*, **6**, 37516.
- 26) Hashimoto, K., Omachi, J., & Ideguchi, T. (2018) Ultra-broadband rapid-scan Fourier-transform CARS spectroscopy with sub-10-fs optical pulses. *Opt. Express*, **26**, 14307–14314.
- 27) Ideguchi, T., Holzner, S., Bernhardt, B., Guelachvili, G., Picque, N., & Hansch, T.W. (2013) Coherent Raman spectro-imaging with laser frequency combs. *Nature*, **502**, 355–358.
- 28) Okuno, M., Kano, H., Leproux, P., Couderc, V., Day, J.P.R., Bonn, M., & Hamaguchi, H. (2010) Quantitative CARS Molecular Fingerprinting of Single Living Cells with the Use of the Maximum Entropy Method. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 6773–6777.
- 29) Isobe, K., Suda, A., Tanaka, M., Hashimoto, H., Kannari, F., Kawano, H., Mizuno, H., Miyawaki, A., & Midorikawa, K. (2009) Single-pulse coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy employing an octave spanning pulse. *Opt. Express*, **17**, 11259–11266.
- 30) Langbein, W., Rocha-Mendoza, I., & Borri, P. (2009) Single source coherent anti-Stokes Raman microspectroscopy using spectral focusing. *Appl. Phys. Lett.*, **95**, 081109.
- 31) Okuno, M., Kano, H., Leproux, P., Couderc, V., & Hamaguchi, H. (2007) Ultrabroadband ($>2000\text{ cm}^{-1}$) multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering spectroscopy using a subnanosecond supercontinuum light source. *Opt. Lett.*, **32**, 3050–3052.
- 32) Yoneyama, H., Sudo, K., Leproux, P., Couderc, V., Inoko, A., & Kano, H. (2018) Invited Article: CARS molecular fingerprinting using sub-100-ps microchip laser source with fiber amplifier. *APL Photonics*, **3**, 092408.
- 33) Vlijm, R., Li, X., Panic, M., Ruthnick, D., Hata, S., Herrmannsdorfer, F., Kuner, T., Heilemann, M., Engelhardt, J., Hell, S.W., et al. (2018) STED nanoscopy of the centrosome linker reveals a CEP68-organized, periodic rootletin network anchored to a C-Nap1 ring at centrioles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, E2246–E2253.
- 34) Akiyama, T., Inoko, A., Kaji, Y., Yonemura, S., Kakiguchi, K., Segawa, H., Ishitsuka, K., Yoshida, M., Numata, O., Leproux, P., et al. (2017) SHG-specificity of cellular Rootletin filaments enables naïve imaging with universal conservation. *Sci. Rep.*, **7**, 39967.
- 35) Capitaine, E., Moussa, N.O., Louot, C., Bardet, S.M., Kano, H., Duponchel, L., Leveque, P., Couderc, V., & Leproux, P. (2018) Fast epi-detected broadband multiplex CARS and SHG imaging of mouse skull cells. *Biomed. Opt. Express*, **9**, 245–253.
- 36) Petrov, G.I., Arora, R., Yakovlev, V.V., Wang, X., Sokolov, A.V., & Scully, M.O. (2007) Comparison of coherent and spontaneous Raman microspectroscopies for noninvasive detection of single bacterial endospores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 7776–7779.
- 37) Pestov, D., Ariunbold, G.O., Wang, X., Murawski, R.K., Sautenkov, V.A., Sokolov, A.V., & Scully, M.O. (2007) Coherent versus incoherent Raman scattering: molecular coherence excitation and measurement. *Opt. Lett.*, **32**, 1725–1727.
- 38) Vartiainen, E.M., Rinia, H.A., Muller, M., & Bonn, M. (2006) Direct extraction of Raman line-shapes from congested CARS spectra. *Opt. Express*, **14**, 3622–3630.
- 39) Lieber, M., Todaro, G., Smith, B., Szakal, A., & Nelson-Rees, W. (1976) A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer*, **17**, 62–70.
- 40) Vartiainen, E.M., Rinia, H.A., Müller, M., & Bonn, M. (2006) Direct extraction of Raman line-shapes from congested CARS spectra. *Opt. Express*, **14**, 3622–3630.
- 41) Kano, H., Maruyama, T., Kano, J., Oka, Y., Kaneta, D., Guerenne, T., Leproux, P., Couderc, V., & Noguchi, M. (2019) Ultra-multiplex CARS spectroscopic imaging with 1-millisecond pixel dwell time. *OSA Continuum*, **2**, 1693.
- 42) Nuriya, M., Yoneyama, H., Takahashi, K., Leproux, P., Couderc, V., Yasui, M., & Kano, H. (2019) Characterization of Intra/Extracellular Water States Probed by Ultrabroadband Multiplex Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) Spectroscopic Imaging. *J. Phys. Chem. A*, **123**, 3928–3934.
- 43) Ando, M. & Hamaguchi, H. (2013) Molecular component distribution imaging of living cells by multivariate curve resolution analysis of space-resolved Raman spectra. *J. Biomed. Opt.*, **19**, 011016.
- 44) Shimanouchi, T. (1977) Tables of molecular vibrational frequencies. Consolidated volume II. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **6**, 993–1102.
- 45) Matthews, Q., Brolo, A., Lum, J., Duan, X., & Jirasek, A. (2011) Raman spectroscopy of single human tumour cells exposed to ionizing radiation in vitro. *Phys. Med. Biol.*, **56**, 19–38.
- 46) Cicerone, M.T. & Camp, C.H. (2017) Histological coherent Raman imaging: a prognostic review. *Analyst (Lond.)*, **143**, 33–59.
- 47) Krafft, C., Neudert, L., Simat, T., & Salzer, R. (2005) Near infrared Raman spectra of human brain lipids. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **61**, 1529–1535.
- 48) Barry, B.W., Edwards, H.G.M., & Williams, A.C. (1992) Fourier transform Raman and infrared vibrational study of human skin: Assignment of spectral bands. *J. Raman Spectrosc.*, **23**, 641–645.
- 49) Deng, H., Bloomfield, V.A., Benevides, J.M., & Thomas, G.J. Jr. (1999) Dependence of the Raman signature of genomic B-DNA on nucleotide base sequence. *Biopolymers*, **50**, 656–666.
- 50) Snyder, R.G., Strauss, H.L., & Elliger, C.A. (1982) Carbon-hydrogen stretching modes and the structure of n-alkyl chains. 1. Long, disordered chains. *J. Phys. Chem.*, **86**, 5145–5150.
- 51) Snyder, R.G. & Scherer, J.R. (1979) Band structure in the C-H stretching region of the Raman spectrum of the extended polymethylene chain: Influence of Fermi resonance. *J. Chem. Phys.*, **71**, 3221–3228.
- 52) Brown, K.G., Bicknell-Brown, E., & Ladjadj, M. (1987) Raman-active bands sensitive to motion and conformation at the chain termini and backbones of alkanes and lipids. *J. Phys. Chem.*, **91**, 3436–3442.

テクニカルノート

著者寸描

●加納 英明（かのう ひであき）



国立大学法人筑波大学数理物質系物理工学域准教授。博士（理学）。

■略歴 2001年東京大学大学院理学系研究科物理学専攻博士課程修了（博士（理学））。同年同大学院理学系研究科化学専攻構造化学研究室助手。07年同准教授。07～11年JST さきがけ研究員（併任）。12年国立大学法人筑波大学数理物質系物理工学域准教授。

■研究テーマと抱負 光と分子との非線形な相互作用，特に非線形ラマン散乱を用いることで，“分子の指紋”を用いた新しい細胞・生体組織イメージング手法の開発を行っています。最近，附属病院の先生との共同研究を通して，病理診断，疾患診断などの医療応用を主な研究ターゲットとしています。

■ウェブサイト <http://www.bk.tsukuba.ac.jp/~CARS/index.html>