

非線形ラマン散乱顕微鏡による細胞内脂質の検出に関する研究

研究分担者 橋本 守 大阪大学大学院基礎工学研究科 准教授

研究要旨

中鎖脂肪酸の細胞内動態、中鎖脂肪酸添加が及ぼす影響を詳細に観測することを目的として、高速波長走査レーザーを用いた誘導ラマン散乱顕微鏡を開発した。誘導ラマン散乱を用いることで、重水素化した脂質と通常の脂質を明瞭に分別することが可能となり、重水素化によって特定の脂肪の追跡の目処がたった。

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症 (Triglyceride deposit cardiomyovasculopathy、TGCV)において、食事療法中のカプリン酸 (C10:0) が、強い細胞内 TG 含量低下活性を持つことを見出された。これは、カプリン酸等の中鎖脂肪酸は、長鎖脂肪酸とは異なる代謝過程をたどるためである。そこで、本研究では、中鎖脂肪酸の細胞内動態、中鎖脂肪酸添加が及ぼす影響を詳細に観測することを最終目的としている。この目的を達成するために、誘導ラマン散乱顕微鏡を開発し、その高性能化をはかった。

B. 研究方法

ピコ秒モードロックレーザーと、これと同期できるように改造した高速波長走査が可能な AOFT レーザーを用いて、誘導ラマン散乱顕微鏡を構築した。AOFT レーザーを 20 MHz で変調し、ピコ秒モードロックレーザーに現れる 20MHz 成分をロックイン検出する。市販のロックイン検出器では十分なイメージング速度が得られないため、ロックイン増幅器も自作した。

3T3-L1 細胞から分化させた脂肪細胞の観測を行った。また、培養液に重水素化ステアリン酸を加えて培養し、CH 伸縮振動 ( $2845\text{ cm}^{-1}$ ) と CD 伸縮振動 ( $2100\text{ cm}^{-1}$ ) のイメージングを行った。

(倫理面への配慮)

該当せず。

C. 研究結果

CH 伸縮振動で脂質を可視化した。誘導ラマン散乱を用いて、1 秒/image で十分な SN 比で観測可能であることが分かった。また、重水素化した脂質も 1 秒/image で可視化することができた。30 ms/image でも、細胞内の脂質の観測が可能であった。波長走査も 20 ms で行うことができ、細胞内の脂質、および重水素化した脂質両者を観測可能であることが分かった。

D. 考察

高速に波長走査しながら、観測可能であることから、細胞内の脂質と、重水素化によって特定の脂質を追跡して観測可能であることが分かった。また、コヒーレントアンチストークスラマン散乱では、非共鳴バックグラウンドによって、重水素化脂質か、それもと通常の脂質か判断が難しかったが、誘導ラマン散乱を用いることで、両者を明瞭に区別できることが分かった。

E. 結論

開発した誘導ラマン散乱顕微鏡で、1 秒/image で十分な SN 比で培養細胞の脂質を観測可能ながことが分かった。また、重水素化した

脂質も十分観測可能であることが分かった。

#### F. 健康危険情報

該当せず。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

橋本 守, Harsono Cahyadi, 新岡 宏彦, 荒木 勉,

“高速広帯域波長走査レーザーを光源とした多焦点 CARS 顕微鏡” 光アライアンス, Vol. 25, No. 3, pp. 16-20 (2014).

##### 2. 学会発表

M. Hashimoto, H. Cahyadi, H. Niioka, and T. Araki, “Hyper-spectral coherent Raman microscopy using acousto-optic tunable filter laser”, Japan Taiwan Bilateral Conference on Biomedical and Plasmonic Imaging, Taipei, Taiwan, Feb. 25-26 (2014).

橋本 守, “高速広帯域波長走査レーザーを用いた非線形ラマン散乱イメージング”, 医用分光学研究会, 三国観光ホテル, 福井県坂井市 Dec. 7-8 (2013).

H. Cahyadi, Iwatsuka, H. Niioka, T. Araki, and M. Hashimoto, “Spectral stimulated raman scattering microscopy with high-speed tunable laser for detection of cellular lipid uptake”, Seventh International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS7), Kobe, Japan, Aug. 25-30 (2013).

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

( 予定を含む。 )

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし