

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患実用化研究事業）
分担研究報告書

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 機能創成専攻 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。重水素化した脂質を用い、標的とした脂質を誘導ラマン散乱により可視化した。中性脂肪蓄積心筋血管症(Triglyceride deposit cardiomyovasculopathy、TGCV)患者の線維芽細胞に、重水素化した長鎖脂肪酸、中鎖脂肪酸を加えて培養し、重水素信号の取得を行った。培養1日後、長鎖脂肪酸を加えた細胞では明瞭に重水素の信号が得られたが、中鎖脂肪酸を加え培養した細胞では殆ど重水素の信号は得られず、脂肪酸鎖長による代謝経路の違いが確認された。

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症（TGCV）において、食事療法中の中鎖脂肪酸が、強い細胞内 TG 含量低下活性を持つことを見出しされた。これは、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。これらの脂質の動態を細胞レベルで観測するためには、一般的に脂肪酸に蛍光色素を標識しその蛍光を観測することが行われてきた。しかしながら、観測しているのは蛍光色素であり必ずしも脂質そのものを観測している訳ではない。そこで、脂質を最低の修飾により観測することを目的として、重水素化脂質の観測を行った。

B. 研究方法

TGCV 患者から採取した線維芽細胞を、250 μM の重水素化した中鎖脂肪酸(重水

素化オクタン酸)、あるいは長鎖脂肪酸(重水素化ステアリン酸)で培養し試料として用いた。重水素信号の取得には、誘導ラマン散乱を用いた。誘導ラマン散乱は分子振動を用いて可視化する手法である。脂質の CH_2 伸縮振動は 2845 cm^{-1} であるが、水素を重水素で置換した CD_2 伸縮振動は 2100 cm^{-1} に低下する。

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 の誘導ラマン成分をロックイン検出するため、検出器、ロックイン増幅器も自作し観測に用いた。

(倫理面の配慮)

本研究では、遺伝子解析は施行してい

ない。試料については研究実施前に実施計画に関して大阪大学の倫理委員会から文書による承認を得ている。

C. 研究結果

重水素化長鎖脂肪酸を与え 1 日培養した TGCV 細胞では、 2100 cm^{-1} の CD_2 伸縮振動と、 2945 cm^{-1} の CH_2 伸縮振動で同等な強度の信号が得られた。一方、重水素化中鎖脂肪酸を与え 1 日培養した TGCV 細胞では、 2945 cm^{-1} の CH_2 伸縮振動は、長鎖脂肪酸を与えた試料と同等な信号強度が得られたが、 2100 cm^{-1} の CD_2 伸縮振動は観測することができなかった。

D. 考察

長鎖脂肪酸と中鎖脂肪酸において、 CD_2 信号強度が異なる理由としては、代謝経路が異なるためであると考えられる。これまで、他の非線形ラマンである coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS)顕微鏡では、4 日培養した試料でないと、両者の明白な違いを観測することができなかった。これは誘導ラマン散乱の方が、CARS で問題となる非共鳴バックグラウンドの影響がないためであると考えられる。

今回の観測には、固定した試料を用いていたが、比較的短時間培養した試料でも観測することが可能であったので、今後培養下の生きたままの細胞の観測が可能であると考えられる。

E. 結論

重水素化長鎖脂肪酸と重水素化中鎖脂

肪酸で、1 日培養後において代謝経路の違いによる脂肪酸の蓄積の違いが観測された。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

M. Hashimoto, “Nonlinear Coherent Raman Imaging using Fast and Wide Spectral Tuning Mode-locked Laser”, Optics & Photonics International Congress 2014, The 3rd Advanced Lasers and Photon Sources (Yokohama, JAPAN: 2014/4/22-25).

M. Hashimoto and T. Araki, “Nonlinear Raman imaging using fast tunable picosecond laser”, 32nd Physics Congress of the Physics Society of the Philippines (Quezon, PHILIPPINE: 2014/10/17-20).

M. Hashimoto, S. Fukushima, and T. Araki, “Nonlinear Raman imaging to trace the lipid in cells using deuterated lipid”, The 3rd International Symposium on Triglyceride Deposit Cardiomyovascularopathy Neutral Lipid Storage Disease (Tokyo, JAPAN: 2015/3/14).

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