話　題

蛍光・誘導ラマン散乱統合型超多重イメージングによる生細胞分析

三浦　篤志

1　はじめに

生物における生命現象の包括的理解のためには，生細胞中において“多種類”の観測対象分子をリアルタイムかつ“同時”に高い時間・空間分解能で“高速”に観察することが重要である．生細胞観察技術として最もポピュラーな蛍光イメージングは，近年，サブミクロン/～ミリ秒の時空間分解能での生細胞内の分子動態をリアルタイムに観測可能になりつつある[1)2)]．蛍光では現在では 6 種類もの分子を同時に観察可能であるが[3)]，より詳細な分子動態の検討にはより多くの分子を観察することが望まれる．しかし，蛍光はスペクトル幅が広く異分子間で発光が重複してしまうため，蛍光のみでより多くの分子を同時に観察することは難しい．

この解決策として，スペクトル幅が極めて狭いラマン散乱を蛍光と組み合わせて利用することが考えられる[4)～6)]．ラマン散乱を用いれば，スペクトルの重複を防ぎつつ観察分子数を増やすことが可能となると期待されるが，ラマン散乱では蛍光と比べて信号強度が桁違いに微弱なため，蛍光イメージングに比べ数千～数万倍，画像取得に時間がかかるため，蛍光との同時測定は難しい[4)～6)]．複数の発光波長の異なる蛍光プローブ分子を異なる波長のレーザーで励起し発光を高速に観察するように，異なる振動数においてラマン散乱を示す複数のラマンプローブ分子を異なる波長のレーザー光を高速にスイッチしながら十分な信号強度で観察できる技術があれば，蛍光イメージングの高速さを併せ持ったラマン散乱イメージングが同時に実行可能となる．最近，蛍光と組み合わせるラマン散乱技術として非線形ラマンイメージングの一種である誘導ラマン散乱（stimulated Raman scattering, SRS）を利用した観察法が大きく進展しており，最大で 8 種類もの蛍光・ラマン信号を“同時”かつ“高速”に観察可能な手法が報告された[6)]．本稿では，蛍光と SRS を組み合わせた蛍光･誘導ラマン散乱（SRS）統合型超多重イメージングについて紹介する．

2　誘導ラマン散乱（SRS）による超多重イメージングの原理

蛍光・SRS 統合型超多重イメージングにおける画像取得の高速化のキーポイントは，① SRS による散乱光強度の増幅と，②高速なストークス光の波長スイッチングをいかに成し遂げるかである．図 1a に SRS 過程のエネルギーダイアグラムを示す．一般に，SRS には同期した波長の異なる二つのレーザー光（ポンプ光（$\hbar\omega_p$）およびストークス光（$\hbar\omega_s$））が用いられる．これら二つの入射光の角振動数差 $\omega_p-\omega_s$ が計測対象分子の持つ振動モードの共振角振動数 ω_R と一致すると（$\omega_p-\omega_s=\omega_R$），SRS 効果により仮想状態から振動励起状態への遷移が誘導され，ストークス光と同じ角周波数 ω_s を持つ誘導放出である SRS 光を生じる．これが誘導ラマン散乱（SRS）である．SRS の信号強度は通常のラマン散乱と比較して 9 桁ほど高く，蛍光とほぼ同等の信号を得ることが可能であり，SRS を利用することで①散乱光強度の増幅が達成され，高速での画像取得が可能となる．

SRS 多重イメージング，すなわち多分子の SRS 信号の高速取得においては，ストークス光の波長を $\hbar\omega_{s1}$, $\hbar\omega_{s2}$, ... $\hbar\omega_{sn}$ と高速に変えながら特定のストークス波長（すなわち特定の SRS 振動数）$\hbar\omega_s$ における SRS 画像を取得する．一般に非線形ラマン散乱励起用の光源を高速にスイッチすることはとても困難なため高速多重 SRS イメージングは難しいのであるが，ガルバノスキャナー

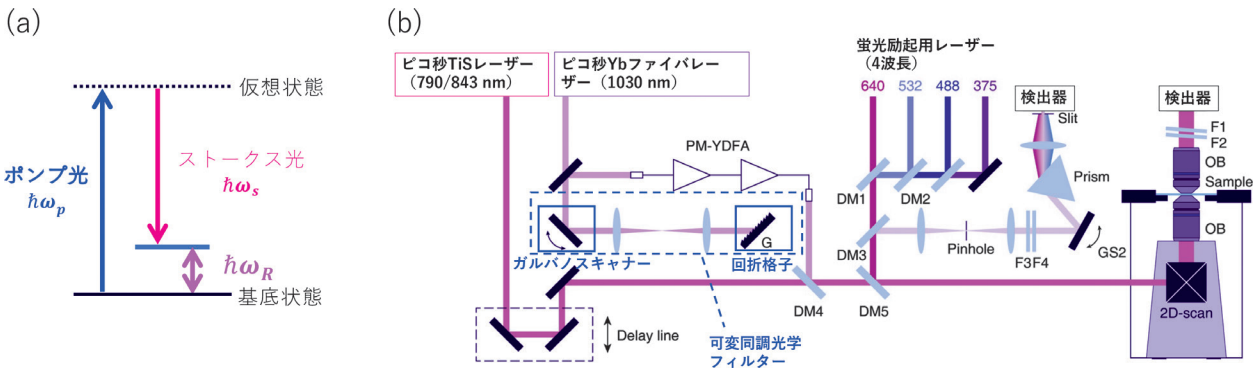

図 1　（a）SRS のエネルギーダイアグラムと（b）蛍光・SRS 統合型超多重イメージングシステムの模式図
（b）は文献 6）の図に変更を加えた．

Super-Multiplex Imaging : Integrated Fluorescence and Stimulated Raman Microscopy for Live Cell Analysis.

と回折格子からなる可変同調光学フィルター（図 1b）を用いることでストークス光波長の高速スイッチングが可能となった[6]．実験的には，ストークス光（ピコ秒 Yb ファイバレーザ，中心波長 1030 nm，波長幅±16 nm，図 1b）のスペクトルの一部を，ガルバノスキャナの角度を変えることで 1 ミリ秒ほどの極短時間で中心波長を切り替え，スペクトル幅～0.35 nm の光パルスとして切り出す．これを試料上でスキャンし $\hbar\omega_{s1}$ における SRS イメージをビデオレート（30 fps）で 1 枚取得する．次いで $\hbar\omega_{s2}$，$\hbar\omega_{s3}$, ... とストークス光の波長を高速に変えながら，順次画像をビデオレートで取得することで高速な SRS イメージ取得が可能となる．すなわち，②高速なストークス光の波長スイッチングにより，高速な SRS イメージ取得が成し遂げられる．上記に加え，SRS 信号のロックイン検出による高精度化，蛍光励起用の 4 波長の連続波レーザーの高速切り替え，イメージング用ガルバノスキャナの高速スキャニング等を組み合わせることにより，SRS・蛍光画像を毎秒 30 フレームと高速に取得可能となっている．

3　蛍光・SRS 統合型超多重イメージングによる生細胞解析

図 2 に構築された蛍光・SRS 統合型超多重イメージング装置の性能評価と実際の生細胞測定の結果の例を示す[6]．図 2-1～2-4 に，4 種類のポリマービーズの SRS と，4 種類の蛍光ビーズによる 8 多重度での性能評価結果の一部を示す．得られた SRS/蛍光像中には観測振動周波数および蛍光励起波長/蛍光検出波長に応じて異なる像が得られていることが図よりわかる．また，図 2-1～2-4 に示した 8 多重度での多重観測は僅か 0.14 秒と，従来報告よりも 20 倍以上高速に行われており，本手法による“多分子”の“同時”かつ“高速”観察が可能であることが実証された．

図 2-5～2-6 に，無標識の HeLa 細胞における SRS と蛍光による 8 多重度の観察結果を示す．図にはゴルジ体/ミトコンドリア/脂質，および，核/タンパク質/アクチンの観察結果が示してあるが，SRS による脂質の CH_2 画像からの脂肪滴や内膜の位置の確認（図 2-5）やタンパク質の CH_3 のシグナルからの核の内部核小体の観察（図 2-6），この他にも Hoechst 染色された二本鎖 DNA の分布などが明瞭に確認できている．これらの画像は 2 秒以内と非常に高速に取得されている．この他に，細胞内小器官の経時的な動態や，細胞ごとの小器官の空間分布の不均一性など，従来のイメージング手法では計測不可能だった現象が観察されており，高速観察が可能な蛍光・SRS 統合型システムによって，超多重イメージングの適用可能性が大きく広がったことが示されている．

4　おわりに

本稿では，“多分子”を“同時”かつ“高速”に測定可能な蛍光・SRS 統合型超多重イメージング法について紹介した．複雑で不均一な細胞内の現象を高速に可視化可能な本技術は，これまで困難であった時々刻々と変化する生きた単一細胞内や多数の細胞における生体分子や生理活性物質の動態や時空間的発展をリアルタイムに観測する技法として大きなポテンシャルを有しており，

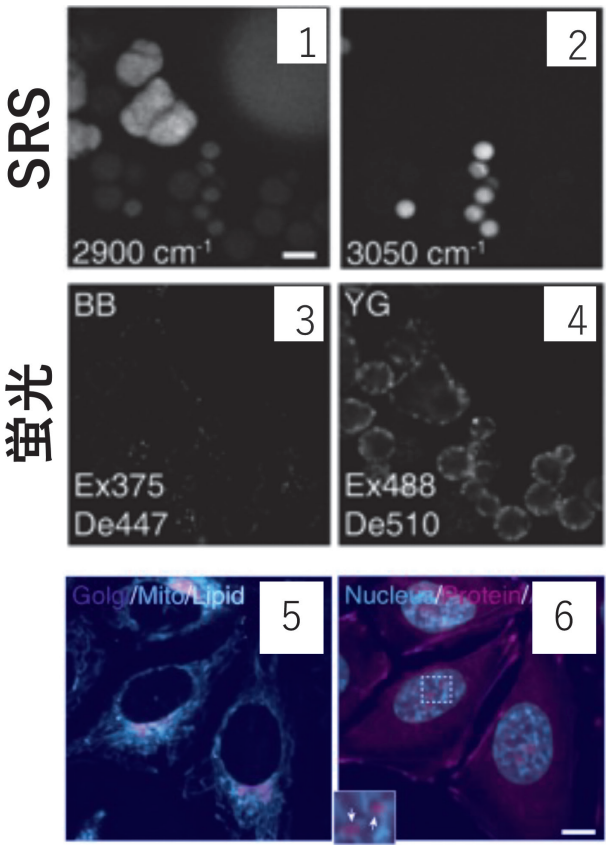

図 2　**（1）**ポリアミド（**PA**）および（**2**）ポリスチレン（**PS**）の **SRS** 画像と（**3**）**BB**（**Ex375/De447**）および（**4**）**YG**（**Ex488/De510**）をドープした **PS** 微粒子の蛍光像．**Ex** および **De** はそれぞれ励起波長/観測波長．非標識 **Hela** 細胞の（**5**）ゴルジ体/ミトコンドリア/脂質，および，（**6**）核/タンパク質/アクチンの観察画像
1～6 はともに文献 6）より抜粋した図に変更を加えた．

今後生命科学研究における強力なツールになると期待される．

文　献

1）S. G. Keller, M. Kamiya, Y. Urano : *Molecules*, **25**, 5964 (2020).
2）C. A. Combs, H. Shroff : *Curr. Protoc. Neurosci.*, **50**, 2.1.1 (2010).
3）A. Valm, S. Cohen, W. Legant, J. Melunis, U. Hershberg, E. Wait, A. Cohen, M. Davidson, E. Betzig, J. Lippincott-Schwartz : *Nature*, **546**, 162 (2017).
4）L. Wei, Z. Chen, L. Shi, R. Long, A. V. Anzalone, L. Zhang, F. Hu, R. Yuste, V. W. Cornish, W Min : *Nature*, **544**, 465 (2017).
5）F. Hu, L. Shi, W. Min : *Nat. Methods*, **16**, 839 (2019).
6）J. Shou, R. Oda, F. Hu, K. Karasawa, M. Nuriya, M. Yasui, B. Shiramizu, W. Min, Y. Ozeki : *iScience*, **24**, 102832 (2021).

三浦篤志（Atsushi Miura）
北海道大学理学研究院（〒060-0810 北海道札幌市北区北 10 条西 8 丁目）．関西学院大学理学研究科化学専攻博士課程修了．博士（理学）．《現在の研究テーマ》光を局所摂動とする微粒子生成・操作とその高感度分析．
E-mail : atsushi.miura@sci.hokudai.ac.jp