



2015年6月11日

報道関係各位

無走査型単一細胞吸収分光イメージング法の開発について
~単一細胞の3次元情報 $A(x, y, \lambda)$ (空間分解吸収スペクトル) を一瞬で取得~

東京理科大学 理学部第一部 物理学科 教授 徳永英司 等の研究グループは細胞を生きたままで、細胞内の組織や器官を区別して瞬時にイメージングする技術の開発に成功しました。人類共通の課題である食の生産性を高める微細藻類の大量培養や細胞の癌化メカニズムの解明に貢献すると期待されます。

*本論文はオープンアクセスの査読付き Web 版科学雑誌「PLOS ONE」に6月10日に掲載されました。

<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0128002>

【背景】

昨年度のノーベル化学賞の対象となった超解像蛍光顕微鏡は、生物学、医学に革命をもたらした細胞イメージング技術が評価されたものです。しかし、これらは光の波長で決まる空間分解能の限界(回折限界)を破る高分解能を実現した画期的な技術ですが、細胞内の特定の組織や器官を観測したい場合、観測したいものだけを光らせる特別な蛍光標識を導入しなければならない侵襲性が生理機能に影響を与えかねないこと、観測領域全体のレーザー走査や多数の画像の取得が必要なために測定時間がかかること、といった欠点があります。蛍光標識なしのありのままの細胞を生きたままで、細胞内の組織や器官を区別して瞬時にイメージングする技術があれば画期的です。

【要旨】

細胞イメージング技術は昨年度のノーベル化学賞に代表されるように、蛍光イメージング法が主流ですが、蛍光ラベル[1]導入が細胞機能に影響を及ぼさない(非侵襲)とはいえ、特に強固な細胞壁がラベル導入を阻む植物細胞では大きな制約が生じます。そこで、吸収スペクトルによる細胞イメージングが実現すれば、ラベル不要の非侵襲イメージングとなり、吸収スペクトルは発光スペクトルよりも電子励起状態の詳しい情報を持っているため、吸収スペクトルの違いから細胞内の器官や組織を区別することができるので画期的です。しかし、マイクロスケールの領域を透過する微弱光の吸収による減光をS/Nよく測定するのは、微弱な発光を測定するよりもはるかに困難であるために、過去にほとんど例がない未開拓領域でした。

また、蛍光ラベルを必要としない細胞イメージング法として(非線形)ラマンイメージング

法がありますが、フェムト秒レーザーなど高価な光源と観測領域のレーザー走査、そして高感度計測技術が必要です。また得られる情報は分子振動で、細胞の癌化メカニズム解明につながる電子状態の情報を得るものではありません。

研究グループは、光源にレーザーでなく白色光ランプを用いて、生きたままの細胞内の吸収スペクトル分布 $A(x,y,\lambda)$ を瞬時にイメージングする技術を開発しました[2]。具体的には

(1) 2次元-1次元変換バンドルファイバアレイ(ファイバー60 μm ピッチ、イメージ結像側16 \times 16、分光器スリット側1 \times 256)を導入し、細胞吸収分光イメージを一度に2次元CCD検出器にmappingする手法を開発、

(2) 収差なしに長い縦幅(18mm以上)で結像できる分光器と大面積(2048 \times 2048pixels, pixel size 13.5 \times 13.5 μm^2)のCCDを導入

して、取得時間0.05秒の無走査吸収分光イメージング法を実現しました(図1)。

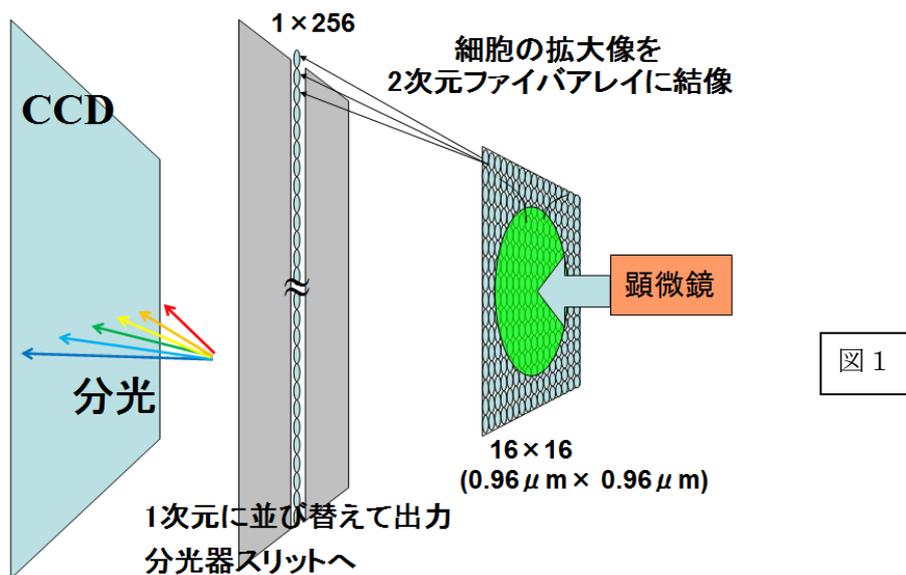


図1

すなわち、10 μm ×10 μm の領域の各点(1 μm ×1 μm の空間分解能)の吸光度スペクトル $A(x,y,\lambda)$ を0.05秒(シャッターの性能で制限)で測定することが可能となりました。これにより、大きさ約8 μm の単細胞緑藻クラミドモナスの細胞内吸収スペクトル分布の測定(図2)、クロロフィル吸収の背景の中にある約1 μm の細胞内小器官である眼点の吸収スペクトルの直接測定(図3)、培養槽内で鞭毛運動により100 $\mu\text{m}/\text{s}$ で遊泳中の緑藻細胞1匹の吸光度測定(図4)などを実現しています。

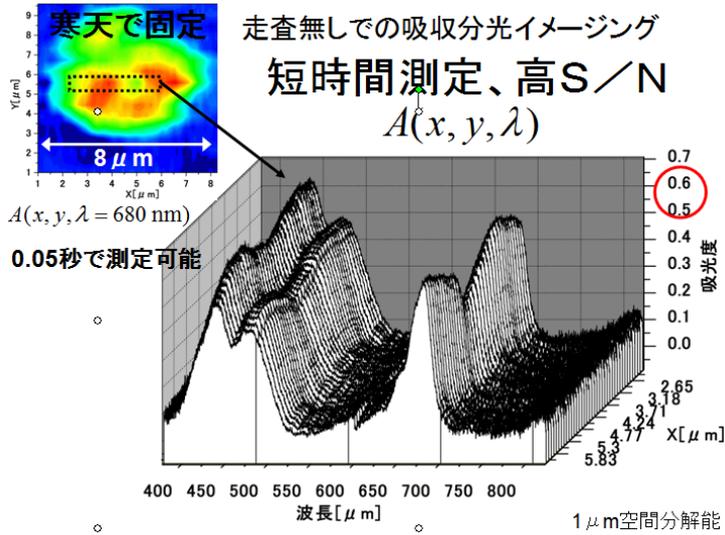


図 2

眼点の吸収分光イメージング

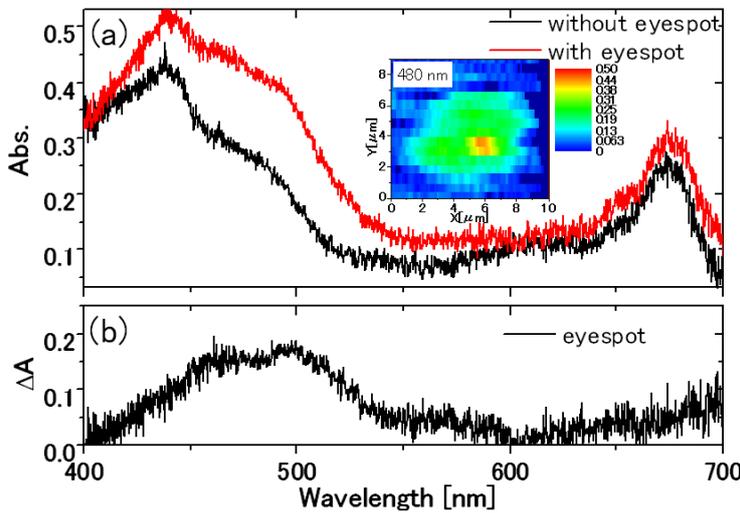


図 3

100 $\mu\text{m/s}$ で遊泳する細胞の吸光度イメージ

$A(\lambda = 680\text{nm}, x, y)$ 取得時間0.05秒

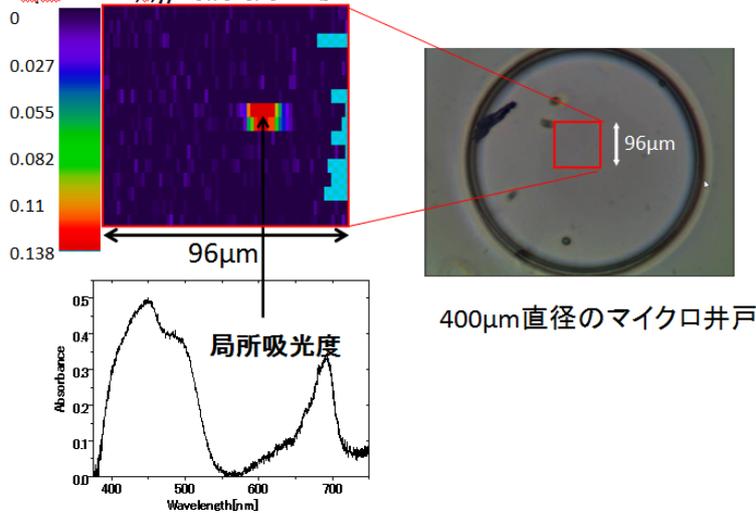


図 4

また、この細胞の高速吸収分光イメージング法により、以下の未解決だった課題を解決しました。

クラミドモナスやユーグレナなどの微細藻類は光合成による高いクリーンエネルギーの生産性を持っています。従って、人類が永続的に地球環境を持続しながら、食の生産性、エネルギーの依存形態を変革することが求められている現在、その有望な解決策の一つとして、〈微細藻類〉の利用が注目されています。そのためには微細藻類の大量培養が必要で、微細藻類の細胞懸濁液（細胞が分散している溶液）の光吸収特性を知ることは生産性を高める基礎研究に最重要要素の一つです。しかし、細胞懸濁液の『吸光度』について定量的な評価方法はなく、経験的に知るしか方法がないのが現状でした。なぜなら、単一細胞の吸光度の情報がないことと、色素が細胞内に集中している細胞懸濁液が、色素が一様分布した溶液に比べ、吸光度が下がり平坦化するパッケージ効果が細胞数密度と懸濁液吸光度の間に非線形性をもたらすためです。

研究グループは開発した単一細胞吸収分光法によりこの問題に取り組み、細胞懸濁液の吸光度 A_s 、細胞内吸収係数 α 、細胞直径 d 、細胞数密度 n_c の間の関係式 $A_s(\lambda) = A_s(\alpha(\lambda), d, n_c)$ を導出して、100 匹の単一細胞吸光度、21 万匹の細胞計数、850 匹の細胞直径計測をして fitting parameter なしで式が成立することを実験的に証明し、初めて細胞懸濁液と細胞の吸光度を関係づける式を確立しました（図5）。これにより、単一細胞吸収から細胞懸濁液の吸光度を定量的に予測して再現することが可能となりました。

単一細胞吸光度(実験)と(計算)

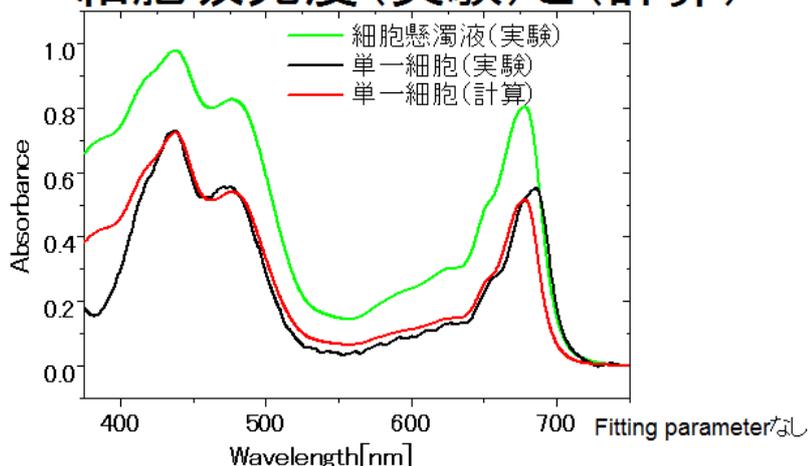


図5

単一細胞(計算、細胞懸濁液吸収から)と単一細胞(実験、単一細胞吸収の平均値)が一致



初めて、細胞懸濁液⇔細胞の吸光度を
関係づける式 $A_s(\lambda) = F(\alpha(\lambda), d, n_c)$ を確立した

【まとめ/展望】

現状では、観測スペクトル領域は 380nm から 750nm の主に可視光領域に限定されるので（顕微鏡の透過スペクトル領域で制限されている）、葉緑体を持つ植物細胞に適していますが、透明な動物細胞[3]にも適用できるように紫外領域への拡張を検討しています。紫外領域に拡張できれば、例えば誰も見たことがない癌細胞の紫外吸収イメージングによる識別や吸収スペクトルから電子状態の変化を知ることによって癌化のメカニズム解明につなげたりする応用分野が期待できます。

この研究は、東京理科大学 総合研究機構グリーン&セーフティ研究センター(2010-2014)の協力のもと行われた。

[1] 蛋白質などの生体分子に結合させることができる蛍光性の分子。励起(レーザー)光を照射すれば観測したい特定の生体分子の分布を発光でイメージングできる。

[2] $A(x,y,\lambda)$ を撮影するハイパースペクトルカメラが実用化されているが、スリット上でのイメージの1次元掃引を必要とする。

[3]動物細胞について今の波長領域のままですぐに取り組める課題は、ミトコンドリアは最大 $2-3\mu\text{m}$ の長さを持ちチトクロームによる可視吸収があるので、この吸収スペクトルによってミトコンドリアを可視化することです。

～本件に関するお問い合わせ～

東京理科大学 研究戦略・産学連携センター 担当：宮田、山内

TEL：03-5876-1530 FAX：03-5876-1676