

Title	ラマン散乱による細胞内分子分析イメージング
Author(s)	浜田, 啓作
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49327
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【43】

氏名	はま だ けい さく 浜 田 啓 作
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学位記番号	第 2 2 5 2 1 号
学位授与年月日	平成 20 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学位論文名	ラマン散乱による細胞内分子分析イメージング
論文審査委員	(主査) 教 授 井上 康志 (副査) 教 授 平岡 泰 教 授 近藤 寿人 准教授 橋本 守 准教授 藤田 克昌

論 文 内 容 の 要 旨

光を用いた生体観察は、非侵襲で試料を観察できること、試料を染色して観察することで特定の分子の分布が得られることから、生物学・医学の分野で大きく貢献してきた。生命活動中の分子の代謝や化学変化・環境を知ることは原因不明の疾患の解明や新たな治療法の確立、新薬の実用化につながる。光を用いて試料分子の分子振動を測定する振動分光法は、非染色で試料の分子の構造や環境を知ることができ、生体試料の観察・解析法への応用が求められている。

本研究では、ラマン散乱を用いた生きた生体試料の観察・解析法の開発を目的とし、生命活動を観察に必要な空間分解能・時間分解能を持つラマン顕微鏡を開発した。ラマン分光法は、非侵襲・非染色下で、試料分子の分子振動の測定を行い、分子の構造・環境の情報が得られる。励起に紫外域～近赤外域を用いるため、水中の試料の測定が可能であり、また、サブマイクロの空間分解能が得られることから、生体観察に適している。開発したラマン顕微鏡では、励起光をライン状にして試料を照明し、試料中の照射した広範囲からの

ラマンスペクトルを、二次元検出器を用いて同時に測定する光学系を導入した。開発したラマン顕微鏡は、ラマン散乱の低散乱効率のために数時間を必要とした観察を数分で行うことに成功した。

開発したラマン顕微鏡を用いて、生きたヒト子宮頸ガン細胞 (HeLa 細胞) を観察した。励起波長・レーザー強度・露光時間を生きた細胞の観察に最適化し、生きた細胞中のチトクロム C、脂質、タンパク質各分子の空間分布を非染色で得ることに成功した。HeLa 細胞を開発したラマン顕微鏡を用いて経時観察し、有糸分裂・細胞質分裂中のチトクロム C、脂質、タンパク質の細胞内の空間分布の変化をとらえた。また、チトクロム C のもつ異常偏光解消帯を利用して、HeLa 細胞中のチトクロム C を無標識で観察することに成功した。

拘束条件と最小二乗法を交互に適用し、収束解を求めることで観察データに含まれる成分の空間分布・スペクトルを分離する交互最小二乗法の拘束条件を新たに提案した。開発したラマン顕微鏡の観察データが持つ空間分布の情報から得られる、近接する場所のスペクトル波形の類似性を空間拘束条件とした。従来の非負拘束条件とともに細胞の観察データに適用し、非負拘束条件のみでは、チトクロム C、脂質、タンパク質それぞれが混在し、困難であった空間分布・スペクトルの分離を、高正確度で行うことに成功した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、生きている細胞における生体分子イメージングを確立するために、生体のダイナミクスを高速で観察することを実現するラマン散乱顕微法に関する研究成果をまとめたものである。具体的には、1) スリット走査ラマン顕微鏡の開発、2) 開発したラマン顕微鏡を用いたヒト子宮頸ガン細胞の観察、3) 共鳴ラマン効果を用いた細胞内チトクロム C の観察、4) 多変量解析を用いたラマンスペクトル解析法の開発が述べられている。1) では、ライン照明を導入し、スリット効果を有する 2 次元カメラによるパラレル検出を行うことで、従来よりも数十倍から数百倍の高速化を実現している。2) では、開発したラマン顕微鏡を用いて、細胞分裂時のヒト子宮頸ガンを観察し、分裂時における細胞中の分子の変化をとらえることに成功している。3) では、532nm の励起波長を用いることで、細胞内のチトクロム C の共鳴ラマン散乱光が得られることを新たに見出し、励起波長依存性、偏光特性を用いてチトクロム C の選択観察を行っている。4) では、ラマン顕微鏡がもつ結像特性を空間拘束条件として加えた多変量解析法を提案し、これまで困難であった生体の複雑なラマンスペクトルの分離に成功している。

以上のように、本論文では、ラマン顕微法において、新たな顕微光学手法と数値解析的手法を用いることで、生体分子イメージング手法の確立を行っている。この研究成果は、生命機能学、とくにバイオフォニクス学に寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。