



Title	Metallic nanoparticle for bio-functional cellular analysis and molecular imaging with Raman spectroscopy
Author(s)	安藤, 潤
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57489
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	安藤 潤
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 23791 号
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科精密科学・応用物理学専攻
学位論文名	Metallic nanoparticle for bio-functional cellular analysis and molecular imaging with Raman spectroscopy (金属ナノ粒子の細胞内挙動を利用したラマン分光・イメージング)
論文審査委員	(主査) 教授 河田 聡 (副査) 教授 笠井 秀明 教授 高松 哲郎 (京都府立医科大学大学院医学研究科) 准教授 Prabhat Verma (生命機能研究科) 准教授 影島 賢巳

論文内容の要旨

本研究は、金属ナノ粒子の細胞内部における挙動を利用し、粒子近傍の生体分子を高感度に検出するラマン分光法を実験的に検証し、細胞内部のラマン分光分子振動イメージを取得する手法の開発についてまとめたものである。

第1章では、金属ナノ粒子が細胞内部に取り込まれ、細胞機能によって輸送、集積、消化、排出される粒子の細胞内挙動についてまとめた。さらに、取り込まれた金属ナノ粒子を利用して生体イメージングや細胞機能観察を行った過去の事例について説明し、本研究の位置づけを述べた。

第2章では、光と金属ナノ粒子の相互作用についてまとめた。金属中の自由電子が光電場によって共鳴的に振動し、粒子近傍に局所増強電場が発生することを説明した。

第3章では、粒子近傍の局所増強場を利用し、細胞内部に取り込まれた金属ナノ粒子からの増強ラマン散乱分光を行った実験結果を示している。

第4章では、細胞内部の金属ナノ粒子の挙動を観察しながら、同時に粒子近傍のラマン分光測定を行う装置を試作し、細胞内部のラマン分光分子振動イメージの取得に成功した実験結果を示している。リン酸、脂質、タンパク質のラマンバンドに注目することで、粒子の輸送、集積過程をラマン像から識別可能であることを示した。

さらに本研究では、近赤外超短パルスレーザー光と生体分子の非線形な相互作用による光ナノ加工技術を利用した細胞内小器官抽出と、光照射下の細胞応答の計測手法の開発についてもまとめた。

第5章では、近赤外超短パルスレーザー光と生体分子の相互作用を利用した光ナノ加工のメカニズムについてまとめた。さらに、光ナノ加工を用いて細胞刺激や遺伝子導入を行った過去の事例についてまとめた。

第6章では、近赤外超短パルスレーザー光が細胞内部に誘起する細胞応答を、膜抵抗・膜電位に置換えて測定する装置の試作を行い、光照射下の細胞応答の測定に成功した実験結果を示している。

第7章では、近赤外超短パルスレーザー光によるナノ加工技術と近赤外レーザー光による捕捉技術を組み合わせることで、酵母細胞内部の細胞小器官の抽出に成功した実験結果を示している。

総括では、本論文で得られた結果をまとめて考察し、本論文の結論および今後の展望について述べた。

論文審査の結果の要旨

ラマン分光法は、分子の振動状態から試料中の分子の同定や空間分布を取得できる。DNA、脂質、タンパク質などの生体試料を観察できるため、無標識で細胞内分子分布の観察も可能となる。さらに、光と金属ナノ構造の相互作用による局所増強場を利用することで、増強ラマン分光と呼ばれる高感度分子検出も可能となる。本論文では、細胞内部に取り込まれた金属ナノ粒子の挙動を利用し、粒子近傍の局所増強場を光源とすることで、細胞内部のラマン散乱分光イメージを取得する手法を提案し、実験的実証及び検討を行っている。以下に本論文の研究成果をまとめる。

金属ナノ粒子に光を照射すると、表面プラズモンが誘起され、金属表面近傍に局所増強場が発生する。生成した増強場による高効率なラマン散乱光を検出すれば、粒子近傍の生体分子を高感度に分析できる。本論文では、顕微ラマン分光装置に金属ナノ粒子の位置検出を行う暗視野顕微鏡を組み合わせ、リアルタイムで細胞内部の粒子の挙動を観察しながらラマン分光を行う装置を設計、試作している。高い取り込み能をもつマクロファージ細胞を試料に用い、粒径50nmの金ナノ粒子を加えて培養すると、内部に金ナノ粒子を示す輝点が複数観察できる。暗視野像から得た金ナノ粒子の空間座標を元にレーザー光を金属ナノ粒子に集光し、粒子位置とラマンスペクトルの同時測定を行っている。得られたラマンスペクトルから3つのラマンバンド(977 cm^{-1} : リン酸, 1457 cm^{-1} : 脂質, 1541 cm^{-1} : タンパク質)の強度を抽出し、粒子の軌跡に対応させたラマン像を再構成することで、細胞内での粒子の輸送、集積をラマン像から識別できることを示している。

さらに本論文では、近赤外超短パルス光と生体分子の相互作用による生体ナノ加工に着目し、超短パルス光照射による細胞の高速応答の計測と、光ナノ加工・捕捉技術を組み合わせた細胞小器官抽出手法の実験的実証及び検討を行っている。主な成果を要約すると以下の通りである。

本論文では、近赤外超短パルス光による細胞の応答を、細胞膜電位と細胞膜抵抗から測定することを提案している。超短パルス光を細胞内部に集光すると、K⁺イオンチャネルが開放され、膜電位が過分極を起こすことが見いだされた。さらに、膜抵抗測定から、超短パルス光を細胞膜に集光するとナノスケールの膜孔が形成されることも見いだされた。また、超短パルス光による細胞壁のナノ加工と、近赤外光による捕捉技術を組み合わせ、酵母細胞内部からの細胞小器官抽出にも成功している。

以上のように、本論文は金属ナノ粒子の細胞内挙動を用いることにより、細胞内部の増強ラマン分光イメージングが可能であることを実証し、さらに、細胞機能のラマン像による識別も実現している。また、近赤外超短パルスレーザーと生体の相互作用による細胞応答が、膜電位・膜抵抗から測定可能であり、さらに光捕捉技術と組み合わせて細胞小器官の抽出にも応用できる事を示している。これらの結果は応用物理学分野、さらには医学・生物学分野においても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。