OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	High-sensitivity Raman scattering microscopy for imaging molecules in living cells
Author(s)	小池, 康太
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/88028
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　小池　康太　）	
論文題名	High-sensitivity Raman scattering microscopy for imaging molecules in living cells （高感度なラマン散乱顕微鏡による細胞内分子イメージング）

論文内容の要旨

Raman scattering microscopy is a powerful tool for imaging biomolecules and small molecules in living cells and tissues due to its non-invasiveness and chemical specificity. However, the spontaneous Raman scattering cross-section is 14th order of magnitude smaller than the absorption cross-section of typical fluorescent molecules. Therefore, a long exposure time is required to overcome the high background and autofluorescence signals and perform imaging with a good signal-to-noise ratio. These problems make applying Raman scattering microscopy to the real-time and high-sensitivity observation of small molecules in living cells is challenging.

To address these issues, I exploited surface-enhanced Raman scattering (SERS) and developed highly sensitive and time-resolved vibrational microscopy of small molecules in living cells. I proposed using SERS to improve the detection sensitivity of alkyne-tagged small-molecule drugs. As SERS probes, gold nanoparticles were introduced into lysosomes by endocytosis before drug administration. The SERS signal of alkynes was successfully observed when the entered small-molecule drugs came near the nanoparticles. I also performed time-lapse 3D SERS imaging to visualize the drug entry into living cells. I proposed the digital SERS counting to quantitatively analyze the relative increase of drug concentrations by time at the single-cell level.

Stimulated Raman scattering (SRS) microscopy is another way to boost Raman scattering signals, allowing for high-speed chemical imaging of samples. I applied spectral focusing of 2 ps pulses and generated 14 ps pulses with a single-grating-based chirper to improve the signal-to-background ratio (SBR). As a result, I achieved SRS imaging with a spectral resolution of 2 cm^{-1} with a reduced nonlinear background in various samples such as PS beads, Rh800 dyes, and EdU in HeLa cells, resulting in a higher SBR by two times. Due to the lower peak power excitation, I also found that the higher SNR and cellular structures can be maintained without significant nonlinear photodamages in time-lapse imaging of living cells.

I explored the saturation effect of SRS to realize super-resolution SRS imaging. At higher excitation intensities, the saturation occurs due to competition with the CARS process and a decrease in the population difference between ground and vibrational states. By extracting the saturated signals using the differential saturated excitation (dSAX) microscopy method, I realized higher spatial resolution beyond the diffraction limit using diamond crystals and PMMA beads. On the other hand, the use of visible wavelength (VW) for SRS has been proposed to improve the spatial resolution by two times compared to NIR-SRS. I applied the dSAX method to the saturation response of VW-SRS microscopy to further improve the spatial resolution. I used SHG crystals to change a laser wavelength from NIR to VW. I successfully observed the saturation of the VW-SRS signal from the Raman probe solutions, which can be applied to demonstrate super-resolution VW-SRS imaging of organelles labeled with the Raman probes in HeLa cells.

I demonstrated high-speed multiplex SRS spectroscopy of pre-resonance Raman probes using SRS microscopy with spectral focusing of femtosecond laser pulses. The laser pulses were stretched to the picosecond regime by diffraction gratings, and hyperspectral imaging was achieved by the delay line scanning. 4- and 8-color multiplex SRS spectroscopy of MARS and Rh800 dyes was demonstrated, which leads to high-speed and high-sensitivity hyperspectral SRS imaging of multiple organelles in living cells.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　小池　康太　）	
	（職）　氏　名
論文審査担当者	主査　教授　藤田　克昌 副査　教授　井上　康志 副査　教授　吉川　洋史 副査　教授　小関　泰之（東京大学　大学院工学系研究科）

論文審査の結果の要旨

本学位論文は、表面増強ラマン散乱(SERS)や誘導ラマン散乱(SRS)を用いた、細胞内分子のより高感度かつ高空間分解能での非線形分光・顕微イメージング法の開発を試みた研究をまとめたものである。その成果は以下の通りである。

・細胞内に取り込ませた金ナノ粒子の SERS を用いることによる、高感度な小分子薬剤イメージング手法を提案している。細胞の 2 次元・3 次元タイムラプス観察を行い、提案された手法を用いて小分子が細胞内に取り込まれる様子をリアルタイムに観察することを可能にしている。また、薬剤分子の取り込み速度を定量的に解析するためのデジタル SERS 計数法を提案し、その有用性を実証している。

・SRS 顕微鏡におけるスペクトル分解能や信号対背景信号比の向上が、チャープによって生成した 14-ps パルスレーザーによって実現できることを示している。実際に、チャープ光学系を導入した SRS 顕微鏡を開発し、パルス幅やスペクトル分解能の評価を行なっている。ダイアモンド粒子やポリスチレンビーズ、細胞内小分子など様々な試料の観察を行い、信号対背景信号比の向上を実験的に確認し、かつその理論的背景も明らかにしている。

・SRS 信号の飽和応答を、SRS 顕微鏡の空間分解能向上に応用することを提案している。SRS の飽和によって生じる、入射光強度に対して非線形な信号を検出することで、SRS 像の空間分解能が向上することを理論的に示している。提案手法を用いてダイアモンド粒子や PMMA ビーズを観察し、実験的にも空間分解能が向上することを確認している。さらに空間分解能を向上させるべく、提案手法の可視光励起 SRS 顕微鏡への適用を提案している。実際に装置を構築し、ラマンプローブの飽和応答を実験的に確認しており、細胞試料の高解像度多重観察への応用が可能であることを示している。

・ハイパースペクトル SRS 顕微鏡による複数種のラマンプローブの高速ラマン観察への応用を提案している。フェムト秒レーザーを用いた SRS 顕微鏡を実際に構築し、2、4、8 種類の前期共鳴型ラマンプローブの高速 SRS 分光測定を行なっている。

以上のように、本学位論文では、SERS や SRS を利用することでラマン散乱顕微鏡法を発展させ、従来法では困難であった細胞内分子の高感度・高速・高空間分解能観察に利用できることを示している。提案した手法を実現するための光学顕微鏡装置を開発し、様々な分子で構成される細胞試料などの観察への応用を示している。

これらの結果は、応用物理学、特にナノフォトニクスの発展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。