

先端光源を駆使した光科学・光技術の融合展開  
平成 22 年度採択研究代表者

H26 年度  
実績報告書

小林 孝嘉

電気通信大学先端超高速レーザー研究センター  
特任教授

高性能レーザーによる細胞光イメージング・光制御と光損傷機構の解明

## § 1. 研究実施体制

### (1) 電通大グループ

- ① 研究代表者: 小林 孝嘉 (電気通信大学先端超高速レーザー研究センター, 特任教授)
- ② 研究項目
  - ・同時多色誘導放出イメージング
  - ・誘導ラマン散乱イメージング
  - ・超解像蛍光顕微イメージング
  - ・光劣化初期過程機構の研究

### (2) 東大グループ

- ① 主たる共同研究者: 河西春郎 (東京大学医学研究科, 教授)
- ② 研究項目
  - ・2色アンケイジング法によるドーパミン作用の研究
  - ・カルシウムアンケイジング法によるシナプス前終末研究法の開拓
  - ・記憶シナプス蛍光標識・操作法の開発

### (3) 広島大グループ

- ① 主たる共同研究者: 安倍 学 (広島大学大学院理学研究科, 教授)
- ② 研究項目
  - ・光解離性分子の合成
  - ・光解離性分子の物性評価
  - ・光解離性分子の光反応

## § 2. 研究実施の概要

### 【電通大グループ】

#### ・新奇レーザー顕微イメージング

前年度までに開発した同時多色誘導放出(ポンプ-プローブ)顕微鏡により、本年度は染色した生体標本やマウスメラノーマ切片など様々な生体組織を対象に3次元多色イメージングを実施した。その結果、新たに開発した顕微鏡は次の利点があることを実証した。(1)通常の光学顕微鏡より空間分解能は2倍近く向上する。(2)焦点近傍の分子のみを検出するため、厚みのある試料では通常の明視野観察と比べてコントラストが向上し、より鮮明な多色イメージが得られる。(3)蛍光分子に加え、単一の金属ナノ粒子やカーボン材料などの無蛍光性物質を検出できる。そのためヘモグロビンやミオグロビン、メラニンなどの無蛍光の生体分子の3次元分布の測定ができる。(4)複数の励起光を同時に入射することにより得られるスペクトラルイメージングから、物質の同定や分子近傍のミクロな化学分析が実施できる。そのため病理診断や材料解析などの分野で様々な応用が期待できる。

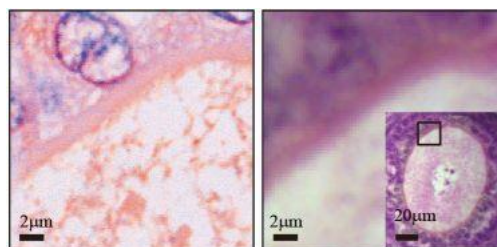


図1 HE染色生体標本の2色イメージ  
左：同時2色フォトサーマルイメージ  
右：従来の顕微鏡による明視野像

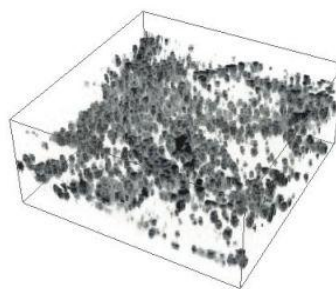


図2 メラノーマ切片の3次元イメージ

#### ・誘導ラマンイメージング

白色プローブ光と同時多波数ロックイン検出を用いることで分光誘導ラマンイメージングが可能になるが、白色プローブ光の強度雑音が信号雑音比を大きく劣化させる。そこで、これまで、全波数で同時に強度雑音を打ち消す新奇な検出法・検出器を開発してきた。前年度に開発した検出法では白色プローブ光の散弾雑音が検出限界を決定していた。散弾雑音による信号雑音比は平均光強度を大きくすることで向上させることができる。そこで今年度は白色光を生成するためのフォトニック結晶ファイバーなどの光学系を改善し、白色光の強度を向上させた。その結果、前年度は300 msの時定数が必要であったポリスチレンビーズのイメージが30 msの時定数で取得可能になった。さらに本検出器を2台用意することで2波数同時誘導ラマンイメージングを実現した。図3にポリビニルアルコール(PVA)膜中のポリスチレン(PS)ビ

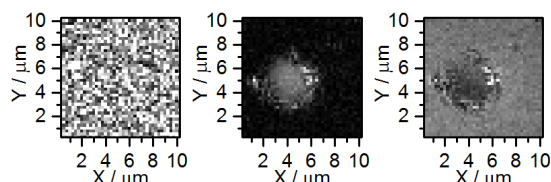


図3 PVA膜中の4 μm PSビーズの誘導ラマンイメージ 左：雑音低減法未適用 中：PSのラマンバンド( $3,054 \text{ cm}^{-1}$ )によるイメージ 右：PVAのラマンバンド( $2,914 \text{ cm}^{-1}$ )によるイメージ

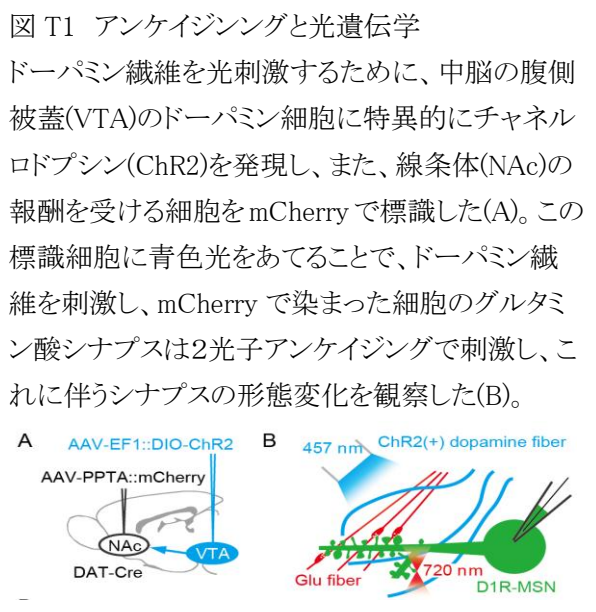
ーズのイメージを示す(文献 D-6)。左図は本方法を適用しない場合で、白色プローブ光の強度雑音が原因で誘導ラマン信号によるイメージが取得できない。中・右図は本検出法を適用したもので、それぞれ PS と PVA のラマンバンドによるイメージである。中図では PS ビーズの分布を反映し、円形状に信号が得られている(明灰色部分)。右図では PVA が分布する部分は大きな信号(明配色部分)が得られ、中央付近は PS ビーズに PVA が排除され、信号強度が下がっている。これら二つのイメージは、異なる波数の白色プローブ光の強度雑音が同時に打ち消され、それぞれの波数の誘導ラマンイメージが一度に得られていることを示すものである。本方法を発展させることで、無染色で生体試料の観測が可能になり、染色によって挙動が乱される、組織内の薬物の分布を調べる研究などへの応用が期待される。

・紫外光による光劣化機構の解明

紫外光レーザーを用いたウラシル、チミンの超高時間分解分光により超短時間の機構を明らかにした。

【東大グループ】

東京大学のグループは、光刺激法の神経科学への応用を開拓している。H26 年度は 2 光子グルタミン酸アンケイジング法によるグルタミン酸入力の刺激とチャンネルロドプシン(ChR2)によるドーパミン繊維の刺激を独立に行う系を確立した(図 T1)。これを大脳線条体に用いて、パブロプらによって明らかにされていた条件反射の際の報酬の時間枠が形成される機構について、分子細胞レベルでも機構を初めて解明した(文献 T-3)。



【広大グループ】

2 光子吸収を大きくする疎水性の分子構造と水溶性を持たせることを同時に達成することは困難であるが、平成 26 年度の研究において、比較的小さな  $\pi$  共役系で生理学実験に必要な 2 光子吸収を有する光解離性保護基の設計と合成に成功した。具体的には、スチルベン骨格を持ち、電子励起状態での異性化を阻害する分子設計を施した独自の分子デザインに基づく新規 2 光子吸収性発色団の合成とグルタミン酸(glu)のケージ化を実施し、高い効率でグルタミン酸を放出するケージドグルタミン酸 **1** の開発に成功した(文献 H-8)。

