

一般セッション(ポスター講演) | 3 光・フォトンクス：3.3 生体・医用光学 (旧3.4)

2023年9月21日(木) 16:00 ~ 18:00 | 会場 P12 (熊本城ホール)

[21p-P12-1~5] 3.3 生体・医用光学 (旧3.4)

[21p-P12-1] 光熱変換顕微鏡を用いた生細胞内タンパク質凝集過程の無標識評価

○宮崎 淳¹、我妻 亮太郎¹ (1.和歌山大シス工)

[21p-P12-2] 表面増強ラマン分光法を用いたバイオケミカルセンサの改善

○衡 彦君¹、相澤 佳乃¹、濱田 佑希乃¹、熊谷 龍馬¹、葛西 重信¹、吹留 博一²、佐藤 昭²、尾辻 泰一²、内野 俊¹
(1.東北工大工、2.東北大通研)

[21p-P12-3] 位相敏感CARS分光法を用いた振動ラマンスペクトルの指紋領域一括測定

○(M1)北村 龍星^{1,2}、中山 隆弥¹、鈴木 隆行¹ (1.明治大理工、2.横国大理工)

◆ 英語発表

[21p-P12-4] Development of Multi Focal Spots Raman Spectrophotometer for Parallel Raman Observation of Pharmaceutical Reactions in 96-well Plate

○(D)HaoXiang Liao¹, Kazuki Bando^{1,2}, Menglu Li^{1,2}, Katsumasa Fujita^{1,2,3} (1.Osaka Univ., 2.AIST PhotoBIO-OIL, 3.Osaka Univ. OTRI)

[21p-P12-5] 波長2 μm光源を用いたTD-OCTの特性評価と他波長帯との比較

○尾崎 楓太¹、張 栄捷¹、北島 将太郎¹、山中 真仁³、齋藤 毅²、周 英²、榊原 陽一²、西澤 典彦¹ (1.名大院、2.産総研、3.阪大院)

光熱変換顕微鏡を用いた生細胞内タンパク質凝集過程の無標識評価

Label Free Assessment of Aggresome Formation in Live Cells by Photothermal

Microscopy

和歌山大シスエ °宮崎 淳, 我妻 亮太郎

Wakayama Univ., °Jun Miyazaki, Ryotaro Wagatsuma

E-mail: jmiya@wakayama-u.ac.jp

細胞内で誤って折り畳まれたタンパク質や、外的なストレスを受け変性したタンパク質は、細胞内外で蓄積して凝集体を形成する。タンパク質凝集体は細胞にとって有害であり、神経変性疾患などの病気との関係が示唆されているが、その詳細は不明である。タンパク質凝集と関連する病気の仕組みの理解と治療法の確立に向けて、細胞内という微小空間でおこるタンパク質凝集体の形成や除去の仕組みを理解するための測定法が求められている。

本研究では光吸収性分子を高感度・高空間分解能でイメージングできる独自に開発した光熱変換(Photothermal: PT)顕微鏡を用いて、生きた細胞内のタンパク質凝集体の形成過程を計測・評価した。PT 顕微鏡による測定は、蛍光顕微イメージングで通常行われる分子標識が不要なため、自然な状態の細胞を対象に信頼性の高い計測ができる。図に外的ストレスにより細胞内でタンパク質凝集体を形成した人子宮頸ガン細胞(HeLa)の、2波長励起 PT 像と通常の顕微鏡による明視野像を示す。PT 像中の黄色の斑点がタンパク質凝集体であり、明視野像では凝集体と他の細胞小器官を区別することが難しいが、PT 像では容易に識別できる。講演では試験管内 (In vitro) のタンパク質凝集体を対象とした PT 顕微鏡による測定原理の検証、凝集体形成およびその分解除去 (オートファジー-リソソーム系の活性) の評価に、PT 顕微鏡が有用であることを示す結果について併せて報告する。

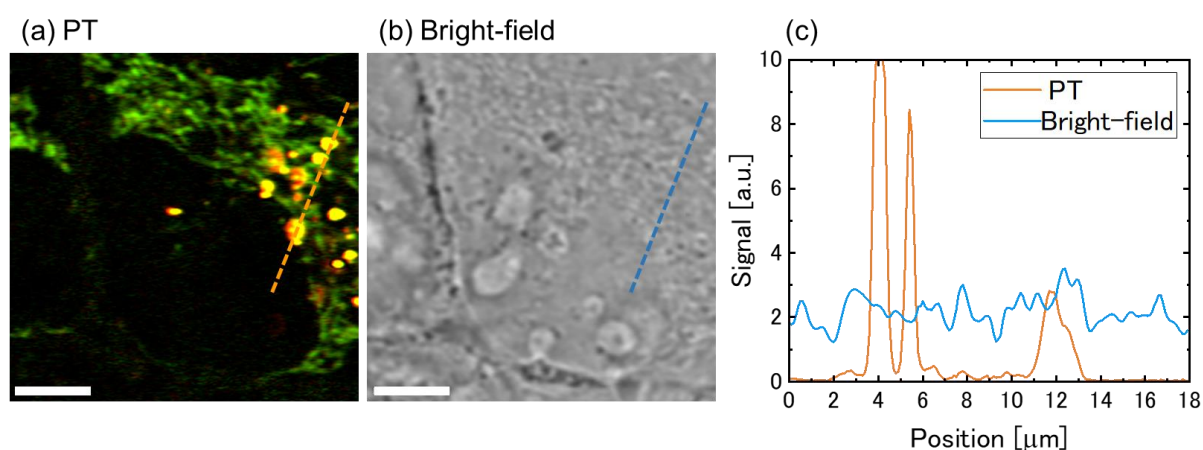


Figure 1. Label-free imaging of protein aggregates in live HeLa cells using (a) photothermal microscopy with the excitation wavelengths at 520 and 640 nm and (b) brightfield microscopy. Scale bar: 6 μm. (c) Intensity profiles along the dashed lines in the PT and brightfield images.

表面増強ラマン分光法を用いたバイオケミカルセンサの改善 Improvement of Surface Enhanced Raman Scattering Biochemical Sensors

東北工大¹, 東北大通研²

○衡彦君¹, 相澤佳乃¹, 濱田佑希乃¹, 熊谷龍馬¹, 葛西重信¹, 吹留博一², 佐藤昭², 尾辻泰一², 内野俊¹

Tohoku Inst. Tech.¹, Tohoku Univ. RIEC²

○Y. Heng¹, K. Aizawa¹, Y. Hamada¹, R. Kumagai¹, S. Kasai¹, H. Fukidome², A. Satou², T. Otsuji², T. Uchino¹

【はじめに】我々は前回、表面増強ラマン分光法 (SERS) を用いたバイオケミカルセンサを開発することを目的として、グラフェン SERS 基板上にサンドイッチ酵素結合免疫吸アッセイ (ELISA) を構築し、疾患の原因となるサイトカインの検出に成功したことを報告した。今回は、ラマン分光マーカーとして HRP (西洋ワサビペルオキシダーゼ) とその発色基質 TMB を比較検討したので、その結果について報告する。

SERS は、プラズモニック材料表面に吸着した分子を局在表面プラズモン共鳴によって、通常のラマン分光よりも 10^6 倍以上の高感度で検出することができる微量分析技術である。インフルエンザや COVID-19 などの感染症の診断や微量の有害物質のリアルタイム検出などへの展開が期待されているため、近年注目されている。しかし、従来の SERS 基板は金属を利用しているため、生体適合性や金属の酸化などの問題があった。そこで本研究では、二次元材料のグラフェンを用いて SERS 基板を作製した。

【実験方法】ナノホール構造を持つ SERS 基板を作製するために、劈開した天然マイカ上に高真空スパッタを用いて堆積温度 300°C で銀薄膜を堆積した。ELISA 構築にあたって、SERS 基板の疎水化と高感度化のために、銀薄膜のないマイカ上にグラフェンを転写し、その上にサンドイッチ法を用いてサイトカインを固定した。サイトカインにはウシ乳房炎に関係する IL-6 を用いた。ここで、グラフェンは PMMA を用いて CVD 法で Cu 箔上に成長させた市販の単層グラフェンを転写した。ラマン測定は、ELISA 作製直後および一週間後に行い、時間経過についても検討した。

【結果と考察】図 1 にグラフェン上に固定した IL-6 の検出を TMB のラマンピークを観測することにより行った結果を示す。比較のため、転写に用いたグラフェンのラマンスペクトルを示す。グラフェンの G バンドと TMB のピークが現れる波数がほぼ同じだったが、被験物質の濃度が 5 ng/ml のときは明らかに強度違うため、TMB を検出できることがわかった。図 2 は、同濃度の IL-6 の検出を HRP のラマンピークを観測することにより行った結果である。TMB のピーク強度は HRP と比較して強いことがわかった。

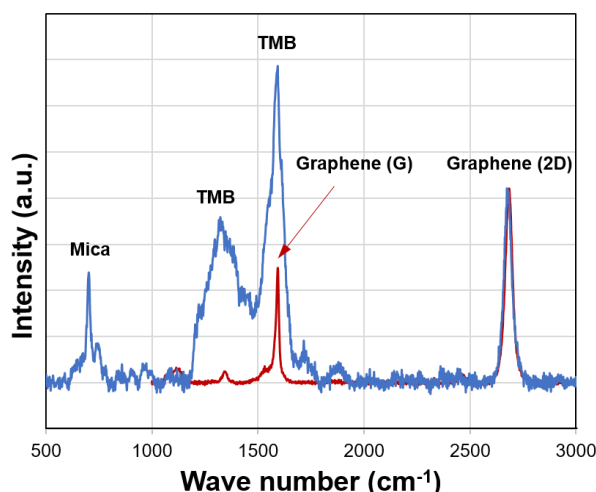


Fig. 1 Raman spectrum of the ELISA fabricated on the graphene SERS substrates. The Raman peaks from TMB combined with IL-6 of 5 ng/ml were seen. For comparison, the Raman spectrum of graphene is presented.

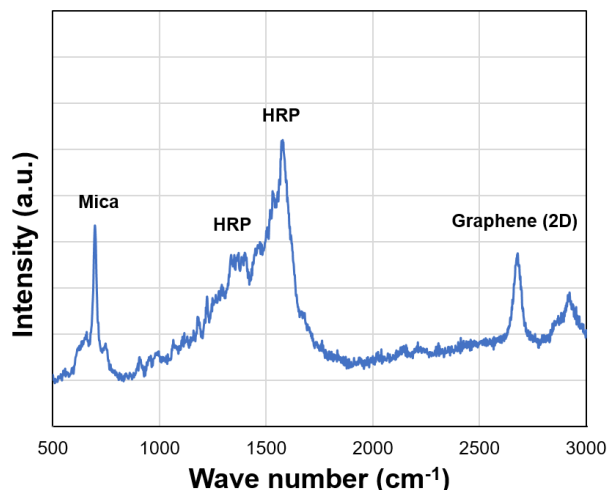


Fig. 2 Raman spectrum of the ELISA fabricated on the graphene SERS substrates. The Raman peaks from HRP combined with IL-6 of 5 ng/ml were seen. The Raman measurements were carried out a week after IL-6 coating.

位相敏感 CARS 分光法を用いた振動ラマンスペクトルの指紋領域一括測定

Overall measurement of fingerprint region of vibrational spectra

by using phase-sensitive CARS spectroscopy

明大理工 ○北村龍星、中山隆弥、鈴木隆行

Meiji Univ, ○Ryusei Kitamura, Tokiya Nakayama, Takayuki Suzuki

E-mail: suzuki@meiji.ac.jp

これまでに我々は生命科学や医療分野への応用を見据え、ラベルフリーの簡便なラマン分光手法である位相敏感 CARS 分光法を開発してきた。位相敏感 CARS 分光法では、単一の広帯域コヒーレント光源を用い、その一部を位相変調してプローブ光とみなすことにより、広帯域性と高波数分解能を同時に実現できる。観測波数帯域は、使用する光源の帯域幅で制限されるので、より広い帯域の光源を使用することで広帯域なラマン分光ができる。ところがこれまでの測定では、光源帯域で期待される波数領域の全域を観測することはできていなかった。そのため、本研究では使用している光学素子を見直し、それぞれの素子の帯域と分散測定を見直すことで、光源帯域をフルに活用した広帯域分光測定を行った。

本研究で用いた光学系を図 1 に示す。プローブのための狭帯域成分の切り分けには、ハイパスフィルターとローパスフィルターの 2 枚の光学フィルターの組み合わせを利用している。従来使用していたバンドパスフィルターは、フィルター 1 枚のみで完結するが、誘電体多層膜の設計上、光源帯域の全域をカバーできない。2 枚のフィルターを組み合わせることで、ポンプ成分の広帯域化を実現したうえに、プローブ成分の帯域も可変となった。

また、使用するミラーを全て広帯域低分散ミラーとしているが、その特性がよりよく発揮されるようにレーザー光の偏光を S 偏光に統一した。これにより、帯域の端の部分のスペクトル位相の歪みを最小に抑えることができる。さらに、光源を安定させるためのアイソレーターとその分散を補償するチャープミラーの設計を見直し、過剰な 2 次の負分散を、様々な厚さの石英ガラス基板を挿入し詳細に補償した。

試験分子としてアセトンを選び実際に分光した結果を図 2 に示す。アセトンは低波数側の 787 cm^{-1} 、指紋領域 ($\sim 1500\text{ cm}^{-1}$) を越える高波数側に 1709 cm^{-1} の鋭い振動スペクトルを有することが知られているので試験分子として都合がよい。実際、図 2 では $1710, 777\text{ cm}^{-1}$ の 2 つの鋭いラマンモードを同時に観測できている。また、間にある $1420, 1220, 1070\text{ cm}^{-1}$ に対応する 3 つのラマン信号についても観測できた。

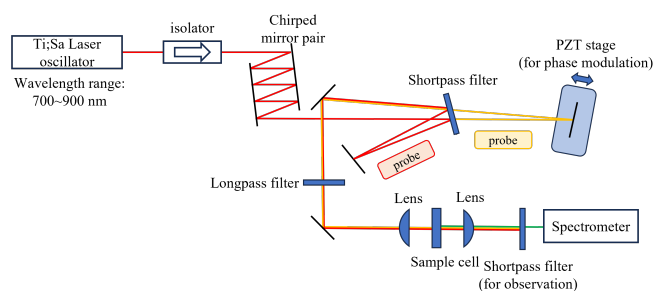


図 1: Sckematics of optical setup

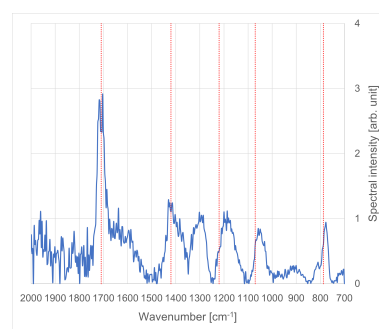


図 2: Observed Raman spectrum of acetone

Development of Multi Focal Spots Raman Spectrophotometer for Parallel Raman Observation of Pharmaceutical Reactions in 96-well Plate

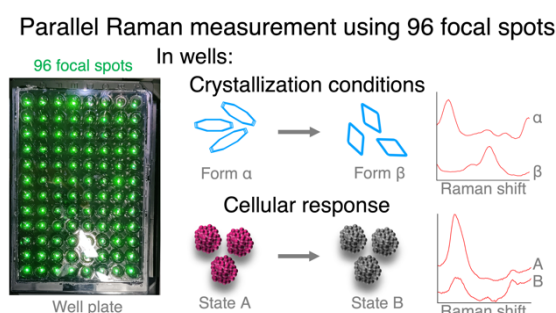
Osaka Univ.,¹, AIST Photo-BIO-OIL², Osaka Univ. OTRI³, °Hao-Xiang, Liao¹, Kazuki Bando^{1,2},

Menglu Li^{1,2}, Katsumasa Fujita^{1,2,3}

E-mail: liao@ap.eng.osaka-u.ac.jp

Raman spectroscopy has long been used as a powerful analytical method in the pharmaceutical field^{1,2} because it can non-destructively provide vibrational information of samples. For example, Raman spectroscopy can be used for the qualification of drugs in their early-stage of production, such as their crystal forms formed in different solvents, solute concentrations, and temperatures, which affect the drug efficacy; in drug development, Raman spectroscopy is used to assess drug effects and chemical changes in cells under different types and concentrations of drug treatments.

Since a large number of conditions need to be screened to find optimal conditions for producing drugs and treating cells,^{3,4} improving the throughput of Raman spectroscopy can extend its application. Here, we developed a multi focal spots Raman spectrophotometer for parallel observation of chemical change of pharmaceutical samples in a regular 96-well plate, which generated 96 focal spots and collected Raman spectroscopy of 96 different samples simultaneously. Using of fiber-based beam splitters and reflection-efficiency designed dichroic mirrors allows for uniform splitting of the laser beam. A lens array is used to simultaneously excite the samples and collect their Raman signals. Using multifocal spots Raman spectrophotometer, we observed crystal polymorphs, crystallization kinetics, drug response of cell spheroids, etc, showing the potential of the developed system to extend the Raman spectroscopy applications on pharmaceutical reactions.



Reference

- [1] Paudel, A.; Rajjada, D.; Rantanen, J., Raman spectroscopy in pharmaceutical product design. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2015**, *89*, 3-20.
- [2] Pettinato, G.; Coughlan, M. F.; Zhang, X.; Chen, L.; Khan, U.; Glyavina, M.; Sheil, C. J.; Upputuri, P. K.; Zakharov, Y. N.; Vitkin, E., Spectroscopic label-free microscopy of changes in live cell chromatin and biochemical composition in transplantable organoids. *Science Advances* **2021**, *7*.
- [3] Macarron, R.; Banks, M. N.; Bojanic, D.; Burns, D. J.; Cirovic, D. A.; Garyantes, T.; Green, D. V. S.; Hertzberg, R. P.; Janzen, W. P.; Paslay, J. W., Impact of high-throughput screening in biomedical research. *Nature reviews Drug discovery* **2011**, *10* (3), 188-195.
- [4] Magalhaes, L. M.; Nunes, C.; Lucio, M.; Segundo, M. A.; Reis, S.; Lima, J. L., High-throughput microplate assay for the determination of drug partition coefficients. *Nature Protocols* **2010**, *5* (11), 1823-30.

波長 2 μm 光源を用いた TD-OCT の特性評価と他波長帯との比較

Characteristics of 2 μm TD-OCT and comparison with other wavelength

尾崎楓太¹, 張榮捷¹, 北島将太郎¹, 山中真仁², 周英³, 齋藤毅³, 榊原陽一³, 西澤典彦¹

F.Osaki¹, R.Zhang¹, S.Kitajima¹, M.Yamanaka², Y.Zhou³, T.Saitoh³, Y.Sakakibara³ and N.Nisizawa¹

名古屋大学¹, 大阪大学², 産総研³

Nagoya Univ.¹, Osaka Univ.², AIST³

E-mail: osaki.futa.j2@s.mail.nagoya-u.ac.jp

1. 初めに

光干渉断層計測 (OCT) は計測対象に対して光を照射し、その後方散乱光を解析することで生体内部を非破壊・非接触・高分解能・即時にイメージングすることのできる技術である。OCT の性能を決定する要因の一つとして波長依存性が挙げられる。計測する際、波長帯ごとに水分含有量や散乱しやすさといった観点から被測定対象ごとに最適な波長が存在している。

我々の研究室では、コヒーレントなスーパーコンティニウム (SC) 光を複数の波長で生成し、高分解能 OCT の波長依存性の研究を進めてきた[1]。今回、単層カーボンナノチューブを用いた Tm-Ho 添加超短パルスファイバレーザをベースに波長 2 μm 帯の SC 光源、およびそれを用いた OCT を開発した。更に、開発した OCT を用いて波長 2 μm 帯、および他の波長帯の OCT イメージングの比較を行ったので報告する。

2. 実験と結果

波長 2 μm 帯 SC 光源の構成を Fig. 2 に示す。波長 1.55 μm の LD を EDFA で増幅後に励起光として用い、Tm-Ho 共添加ファイバによるファイバレーザによって波長 1.8 μm 超短パルスが発生させた[2, 3]。更に超短パルスを Tm 添加ファイバによって増幅後 2 μm に波長シフトさせ、高非線形ファイバに通し SC 光を発生させた。この 2 μm に加えて、0.9 μm , 1.7 μm の OCT を用い、比較を行った。空気中での深さ分解能は 2 μm , 1.7 μm , 0.9 μm でそれぞれ 14 μm , 13 μm , 7 μm であった。測定感度ではそれぞれ 90 dB, 100 dB, 100 dB だった。

3 つの波長帯で汗腺を計測した結果を Fig. 3 に示す。0.9 μm OCT と比べ、2 μm , 1.7 μm OCT で計測した汗腺のイメージは高コントラストであった。この結果は、波長 2 μm 帯が高散乱体である皮膚の内部を高コントラストにイメージングすることに適した波長帯であることを示唆している。

3. 参考文献

- [1] N. Nishizawa, H. Kawagoe, M. Yamanaka et al, IEEE JSTQE **25**, 7101115 (2019)
- [2] K. Watanabe, et al, OSA Continuum **4**, 137 (2021)
- [3] K. Fukazawa, et al, Applied Sciences **12**, 12369 (2022)

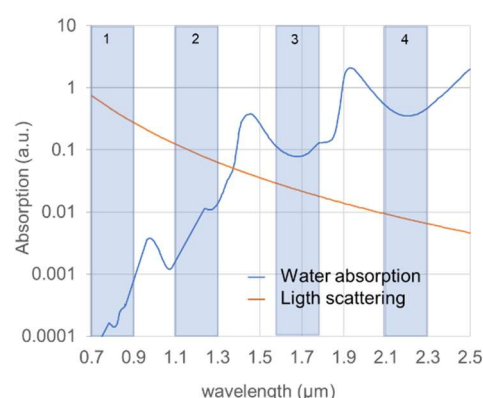


Fig. 1 the wavelength dependence of absorption

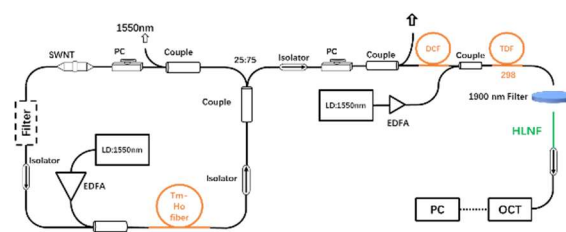


Fig. 2 the 2 μm SC supercontinuum light source

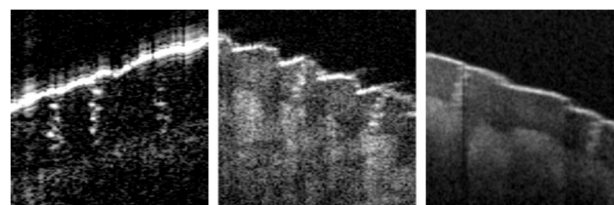


Fig. 3 Image of sweatgland (2 μm , 1.7 μm , 0.9 μm)