

論文審査の結果の要旨

氏名 奥野将成

本論文は、生細胞について、分子レベルで定量的情報を高速に取得するための新規顕微ラマン分光法の開発と、その応用について記述されており、全5章から構成される。

第1章では導入として、本研究の目的が、生細胞内分子の挙動を分子レベルで理解することであり、そのためにバイオイメーキングがいかに重要であるかが述べられている。そして、バイオイメーキング手法として、既存の自発ラマン顕微分光装置およびコヒーレント・アンチ・ストークス・ラマン散乱(CARS)顕微分光装置が、細胞内分子の動的挙動を測定するための十分な高速性、定量性をもっていないことが説明されている。既存手法に代わる新規な手法として、定量的 CARS 顕微分光法、および自発ラマン散乱に基づいた、多焦点共焦点顕微ラマン分光法が提案されている。さらに、ラマン散乱の絶対定量性に着目し、生細胞中の生体分子数・濃度を見積もる、絶対定量的分子イメーキングが提案されている。

第2章では、定量的 CARS 顕微分光法の詳細およびその生細胞への応用について述べられている。(サブ)ナノ秒パルス光を用いることで、生細胞の指紋領域の信号取得を可能とした。また、得られた CARS スペクトルに対して最大エントロピー法を適用することで、濃度に線形な非線形感受率の虚部スペクトルへと変換し、定量的な議論を可能にした。定量的 CARS 顕微分光法を生細胞に応用した結果が二つ述べられている。一つ目は、レーザー照射による出芽酵母細胞の死過程の研究である。本論文では、12 sec/イメージという高い時間分解能を達成することで、その動的挙動を追跡した。その結果、「生命のラマン分光指標」と呼ばれる 1602 cm^{-1} のラマンバンドが消失した後、「ダンシングボディ」と呼ばれる液胞由来の物質が出現することが示唆された。二つ目は、界面活性剤の生細胞の可溶化過程への応用である。細胞内分子と重水素化したドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を同時に追跡した。本論文の結果から、SDS が数 10 mM の濃度で細胞内の脂肪滴に選択的に蓄積していることが示唆された。さらに、時間分解 CARS イメージとして、SDS が細胞内に徐々に取り込まれ、最終的に細胞が可溶化され、タンパク質が細胞外へと急激に流出する様子が可視化された。このように、細胞内分子の動的挙動を測定するためには、定量的 CARS 顕微分光法が非常に強力であることが示された。

第3章では、多焦点共焦点顕微ラマン分光法の詳細および性能評価、生細胞への応用が述べられている。マイクロレンズ・アレイ、ピンホール・アレイ、ファイバー・バンドルを用いることで、多焦点励起、共焦点配置、位置情報とスペクトル情報の同時取得を実現した。これにより、試料における48個の異なる焦点からの48本のラマンスペクトルの同時測定に成功した。面内 $0.3\text{ }\mu\text{m}$ 、奥行き $1\text{ }\mu\text{m}$ 程度の空間分解能を有している。本装置により、 $16 \times 12\text{ }\mu\text{m}^2$ の領域における出芽酵母細胞のラマン分光イメージを20秒以下で取得

可能とした。また、6分以下で3次元ラマン分光イメージを得ることが出来るようになり、出芽酵母細胞の細胞内構造を立体的に可視化した。このように、既存の単焦点共焦点顕微ラマン分光装置と比較して、数10倍の高速化に成功した。

第4章では、絶対定量的分子イメージングの試みが述べられている。生体分子の絶対ラマン散乱断面積を正確に決定し、分光計を厳密に較正することで、生細胞内の分子濃度を見積もった。L929(NCTC)細胞について、フェニルアラニン残基、還元型シトクロム c、リン酸の濃度イメージが、出芽酵母細胞について、フェニルアラニン残基、還元型シトクロム c、b、エルゴステロールの濃度イメージが得られている。これら複数の化学種の濃度イメージに基づいて、細胞小器官ごとの化学組成の定量的見積もりを可能とした。これは、他の手法では得られない、生細胞中分子の新たな定量的情報であり、顕微ラマン分光法による絶対定量的分子イメージングが、いかにユニークで強力な分析手法であるかを示している。

第5章は以上の研究成果のまとめおよび今後の展望である。

本研究により、高速定量的顕微ラマン分光法が開発され、これまで不可能であった、生細胞中の速い分子の動的挙動の測定、分子濃度に関する情報の取得が可能となった。本研究においてもさまざまな応用がなされているように、開発された手法が生細胞を研究する新しい方法論となることは明白である。このような新規の測定手法の開発とその有用性を提示した本論文の内容は高く評価できる。

本論文第2章の主要部分は、*Angewandte Chemie International Edition* 誌に公表済み（加納英明、Philippe Leproux、Vincent Couderc、James Day、Mischa Bonn、濱口宏夫との共著）、第3章の主要部は *Optics Letters* 誌および応用物理学会誌に公表済み（ともに濱口宏夫との共著）であるが、論文提出者が主体となって実験および解析を行っており、その寄与が十分であるので、学位論文の一部とすることに何ら問題はないと判断する。

以上の理由から、論文提出者奥野将成に博士（理学）の学位を授与することが適当であると認める。