# 全反射ラマン顕微鏡を用いた生体膜近傍の水の選択的観測

## 東北大学大学院薬学研究科

# 中林 孝和

Recently, Raman microscopy has attracted much attention as a label-free technique for observing living cells. We have focused on intracellular water, an intracellular molecule that cannot be labeled, as a label-free detection by Raman microscopy. This study investigated water molecules around biomembrane interfaces using Raman microscopy. The states of water molecules around biomembranes are proposed to be important for membrane functions; however, the detailed nature of water around membranes is still unknown because of insufficient measurement techniques. In this study, we constructed a total internal reflection (TIR) Raman microscope that can selectively observe molecules around membrane interfaces. Only molecules near the interface can be monitored using evanescent light generated under a TIR condition. The microscope was constructed with an objective lens-type configuration using an inverted confocal microscope and a high NA objective lens, which enables the measurement of a living cell incubated in a glass-bottomed dish. The absence of spectral distortion associated with the TIR condition was confirmed by the fluorescence of the nanoparticle. The constructed microscope was applied to the observation of water on a self-assembled monolayer fabricated on a cover glass, and the C-H stretching bands of the monolayer were observed to be enhanced under the TIR condition. We then measured TIR Raman spectra of a cultured HeLa cell and the obtained results were discussed based on the previous report on the TIR spectra of water using a prism-type configuration.

# 1. 緒 言

近年、ラマンイメージングを用いた細胞計測が広く行われている。分子の振動をラマンバンドとして直接観測する ラマンイメージングは、細胞内にある分子やタンパク質を 蛍光色素や蛍光タンパク質で染色することなく観測できる 特徴を持つ。細胞内にある脂質やタンパク質、または細胞 内に導入した分子の細胞内分布や細胞内での反応・代謝に 関する情報をラベルフリーで得ることができる<sup>1-3</sup>。

我々は、ラマンイメージングによる細胞内ラベルフリー 検出として、ラベル化できない細胞内分子、「細胞内の水 分子」に着目した研究を進めている<sup>4-6)</sup>。水は最も重要な細 胞内成分であるが、細胞内での水の理解は未だ十分ではな く、オルガネラ間での水の密度の差も不明であった。我々 は、3400 cm<sup>-1</sup>付近にある水分子のブロードなO-H伸縮振 動バンドのラマンイメージングから、細胞内の水の密度の 定量が行えることを提案し、核の方が細胞質よりも水の濃 度が高く、またO-H伸縮振動バンドの形状も核、細胞質、 細胞周囲の水で異なることも示した。水分子のO-H伸縮 振動バンドの形状は、水分子間の水素結合様式を反映して おり、我々の結果は、細胞内外で水素結合様式が異なる可 能性を示唆している。また、細胞周期に伴う細胞内の水の



Selective Observation of Water near Biological Membranes using Attenuated Total Reflection Raman Microscopy

Takakazu Nakabayashi

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University 密度変化、水分子のO-H伸縮振動ラマンバンドの形状解 析から細胞内温度の測定ができることも提案した。これら の研究を通して、「細胞内の水」が細胞を理解する新たなパ ラメータとなり得ることを示すことができた。

本研究は、ラマン顕微鏡を用いたO-H伸縮振動バンド の測定を界面水<sup>7)</sup>に応用し、細胞膜や皮膚界面にある水分 子の選択的計測および水素結合様式の解明を目的とする。 ラマン分光法の皮膚計測の応用は古くから行われており、 水のラマンバンドから皮膚の水分量なども求められてい る。しかし、深さ分解能は2µm程度が限界であり、界面 水と呼ばれる皮膚表面や細胞膜の近傍の水の選択的測定は 行うことができなかった。脂質膜近傍の水分子のO-H伸 縮振動バンドについては、和周波発生法(Sum frequency generation, SFG)によって測定されているが<sup>8)</sup>、SFGでは 高強度のパルスレーザーを用いるために、細胞膜などの生 体膜に適用することが難しい。生体膜界面の水の振動バン ドを観測する適切な分光法がないのが現状である。

そこで本研究では、生細胞や皮膚組織を対象とした全反 射ラマン顕微鏡を製作し、膜界面の水測定を行うことを目 指す。全反射ラマン顕微鏡は、エバネッセント波と呼ばれ る微弱光によって、表面近傍のみのラマン散乱光を測定す ることができる。そのために、試料の損傷を最小限に抑え、 膜近傍の約100nmの範囲の水分子や生体分子の挙動を選 択的に議論できる<sup>9,10)</sup>。全反射ラマン顕微鏡は、染色を行 わずに分子情報を得ることができ、主成分分析などの統計 解析手法と組み合わせることで生体膜界面の分子構造を知 る有用な手法になることができる。本研究を通して、全反 射ラマン顕微鏡が皮膚や細胞膜近傍の構造を観測する適切 な手法であり、コスメトロジーを発展させる汎用な手法と なり得ることを提案したい。

# 2. 方法

#### 2.1. 全反射

全反射とは、屈折率が高い媒質から低い媒質へと光を入 射する際に、入射角が臨界角を超えると光が屈折すること なくすべて反射される現象を指す。この全反射過程におい て、界面からはエバネッセント波と呼ばれる光が染み出し、 界面近傍の物質と相互作用する。界面からの深さzにおけ るエバネッセント波の強度*I*(z)は以下の式で与えられる。

$$I(z) = I_o \exp\left(-\frac{z}{d}\right)$$

dはエバネッセント波の強度が入射光(I<sub>0</sub>)に対して1/e となる深さであり、しみ出し深さといわれる。dの値は入 射光の波長をλ、屈折率が高い媒質の屈折率をn<sub>1</sub>,屈折率 が低い媒質の屈折率をn2,入射角をθとして,次式で求め られる。

$$d = \frac{\lambda}{2\pi} \cdot \frac{1}{\sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2}}$$

図1に全反射としみ出し深さの模式図を示す。このエバ ネッセント波を励起光としてラマンスペクトルを得る手法 を全反射ラマン分光法と呼ぶ。励起光を可視光の領域とす ると、エバネッセント波の染み出し深さは約100 nmとな り、100nmの深さの範囲のみのラマン散乱光が得られる。



共焦点光学系を用いて励起光源を回折限界まで絞ったとき の照射領域は軸長1-2µm程度の円筒となるため、全反射 照明では回折限界を超えた深さで分子を励起できる。

全反射照明とするには、基板と試料の間に相応の屈折率 の差が必要である。顕微鏡においては、屈折率の高いプリ ズムを利用して光学系を組むプリズム型と、開口数の大き な対物レンズの辺縁部から励起光を導入し、基板と試料の 境界面で全反射を起こす対物レンズ型がある。プリズム型 全反射顕微鏡は屈折率の高いプリズムを用い、比較的安価 に構築できる。しかし、細胞の測定においては細胞をプリ ズム上で培養する必要があり、汎用性は低い。そこで本研 究では対物レンズ型を用いた。対物レンズ型は、開口数の 高い対物レンズが必要であるが、試料操作が容易でありガ ラスベースディッシュ上で培養した生細胞の測定を行うこ とができる。対物レンズ型の試料部分を図2Aに示す。

#### 2.2. 全反射ラマン顕微鏡

製作した装置の概略図を図 2Bに示す。測定配置は通常 の倒立顕微鏡と同一であり、ディッシュ上の皮膚組織、培 養細胞など、様々な生体試料のラマンイメージングを行う ことができる。励起光には現有の532nmのcw Nd:YAG レーザーを用い、倒立顕微鏡 (OLYMPUS) 上で試料が励 起される構成とする。試料からのラマン散乱光は、ポリク ロメーター (ACTON) によってエネルギー分散され、電子 冷却CCD (ANDOR) によって検出される。顕微鏡にXY 自 動ステージ(Physik Instrumente)を組み込み、サンプル側 を二次元走査することでイメージング測定も行えるように した。ガラスベースディッシュ上に水溶液や高分子を入れ、 またはディッシュ上に細胞を培養させ、倒立型の配置でラ マン測定を行った。対物レンズには、100倍. NA 1.49の 油浸対物レンズ (UAPON 100 XOTIRF, OLYMPUS) を用 い、入射光に角度をつけて全反射条件での測定を行った。

図2Bにおいて、Mirror 1の角度をマイクロメーターに よって微調整できるようにし、試料に照射される励起光の 角度を変化させられるようにした。この角度を変化させ、



図2 全反射ラマン顕微鏡の(A) 試料部分、(B) 光学系の概略図

対物レンズに励起光が垂直に入射すると広視野顕微鏡にな り、大きく角度をつけることで全反射条件になる。また広 視野顕微鏡の条件でMirror 2 直後のレンズを外すと共焦 点顕微鏡となる。全反射ラマン顕微鏡では、励起レーザー 光の対物レンズ内の光路を精密に制御しなければならず、 また広視野や共焦点での測定も行える必要がある。製作し たシステムはそれらの要請をすべて満たし、全反射と広視 野のスペクトルの比較などを容易に行える。

#### 3. 結果

#### 3.1. 励起光の入射角の決定

蛍光色素である Rhodamine 6G水溶液をガラスベースデ ィッシュに加え、Mirror 1のマイクロメーターの移動メ モリと励起光の入射角との関係を蛍光から検討した(図3)。 マイクロメーターのメモリと入射角はほぼ直線関係となる ことがわかる。細胞の屈折率を1.38とすると、ガラスと 細胞の間の臨界角は65.2°となる。そのため、細胞を観察 するとき、マイクロメーターを105以上動かすと全反射条 件になる。

#### 3.2. 入射角の変化によるスペクトル歪みの確認

全反射ラマンスペクトルの測定において、比較対象と する広視野や共焦点の測定とは励起光の入射角が大きく 異なるため、光軸の違いがスペクトル形の変化として現 れる可能性がある。本研究では水のO-H伸縮振動バンド を検討することから、O-H伸縮振動バンドと同一の波長 域に蛍光を示す蛍光性ナノ粒子(Qdot 655)を用いて、光 の照射方法の違いによるスペクトル形の変化を検討した。 Qdot 655 は 655 nm付近に蛍光の極大波長を持ち、蛍光ス ペクトルの波長範囲(620-680 nm)は 532 nmの光を励起光 とした場合のO-H伸縮振動バンドの範囲に相当する。

Qdot 655 を Milli-Qに溶解させ、ディッシュ上に導入し、 蛍光スペクトルの入射角依存性を測定した。ガラス界面に ある粒子からの蛍光がバルク水溶液中の蛍光と異なる可能 性を考慮し、共焦点系と広視野照明、複数条件の全反射照 明に加え、全反射直前の条件での測定も行った。図4に共 焦点系と広視野照明、広視野照明でミラーを動かしたとき のQdot 655の蛍光スペクトルを示す。共焦点、広視野照明、 広視野照明でミラーを動かした場合のいずれの蛍光スペク トルもその形状が一致した。光学系を変えてもスペクトル 形状が変化しないことがわかった。全反射と共焦点におい てスペクトル形状が異なった場合、入射角の違いによるス ペクトル形の変化ではなく、全反射による界面付近の選択 測定による効果であると言える。

#### 3.3. 高分子膜の測定

実験では初めに高分子薄膜を用いて全反射条件の最適化



図3 マイクロメーターの目盛りと入射角度との関係(赤)と回帰直 線(青)



図 4 共焦点系と広視野照明、広視野照明からミラーをマイクロ メーターのメモリで 85、95、105、115 動かしたときの Qdot 655 の蛍光スペクトル。横軸は上が波長、下がラマンスペクト ルとした時の波数表示としている。



などを行った。PMMA (Polymethyl methacrylate)の高分 子薄膜をカバーガラス上に作成・その上に水滴を載せ、広 視野条件と全反射条件でのラマンスペクトルの比較を行っ た(図5)。3400 cm<sup>-1</sup>を中心とするブロードな水のO-H伸 縮振動とPMMA 膜に由来する 2900 cm<sup>-1</sup>のC-H伸縮振動 バンドが観測されている。これらの2つのバンドの強度比 が角度によって異なり、全反射条件では水のラマンバン ドが大きく減少し、薄膜のC-H伸縮振動バンドが選択的 に観測された。O-H伸縮振動バンドに対するC-H伸縮振 動バンドの強度は、全反射条件では広視野条件の約1/40 となり、全反射条件ではPMMA膜を選択的に観測できる ことがわかった。PMMA膜と水との界面で全反射が生じ、 屈折率の値から界面から約80nmまでを観測していると考 えられる。

#### 3.4. 自己組織化単分子膜の測定

次に水の全反射ラマンスペクトルの評価として、自己組 織化単分子膜をカバーガラス上に作成し、角度依存性の測 定を行った。自己組織化単分子膜は、カバーガラス上にオ クタデシルトリメトキシシランを用いて単分子膜を作成し た。

観測しているラマンスペクトルには、油浸対物レンズに 用いるオイル (immersion oil) や基板となるガラスからの 微弱発光成分を含み、これらの寄与が入射角度によって 異なり、スペクトルの角度依存性の解析を妨害する。特 にimmersion oilと単分子膜のC-H伸縮振動バンドが重な っている。そこでこれらの寄与を適切に取り除くために、 内部標準としてベンゾニトリルを immersion oil に加えた。 ベンゾニトリルのニトリル基の伸縮振動バンドは、細胞の ラマンスペクトルではバンドが現れない約 2300 cm<sup>-1</sup> にピ ークを示す。そのために容易にニトリル基の伸縮振動バン ドを検出することができ、ニトリル基のバンドが消えるよ うにベンゾニトリルを含んだ immersion oil のラマンスペ クトルをバックグラウンドとして引くことで単分子膜のラ マンスペクトルを得た。

自己組織化単分子膜/水(ハンクス平衡塩溶液(HBSS))

のラマンスペクトルの励起光角度依存性を図6に示す。プ リズム型を用いた自己組織化単分子膜上の水の全反射ラマ ンスペクトルは報告されており、本システムで得られた結 果との比較を行った。励起光の角度が増加するにつれて、 O-H伸縮振動バンドに対するC-H伸縮振動バンドの強度 が増加し、バルクに存在する水由来の情報が減少し、界 面由来の情報が相対的に増加している。Mirror 1のマイ クロメーターが80のときのラマンスペクトルを基準とし、 差スペクトルとして全反射ラマンスペクトルを評価する と、O-H伸縮振動バンドの一部にあたる 3500 cm<sup>-1</sup> 付近が 僅かに減少した形で差スペクトルが得られた。プリズム型 で報告されている結果<sup>10)</sup>では、統計解析の手法の一つで ある主成分分析を行うことで第2主成分にC-H伸縮振動 バンドの変化と同じ方向に 3600 cm<sup>-1</sup> 付近に比較的鋭いピ ークが現れていた。今回の結果では、C-H伸縮振動バン ドと逆の方向に3500 cm<sup>-1</sup>付近の変化が現れており、報告 されたスペクトルとは同一の変化ではなかった。この理由 は、考察項で検討する。

#### 3.5. HeLa細胞の測定

人のがん細胞由来の細胞株であるHeLa細胞を用いて細胞-水界面の全反射ラマンスペクトルを測定した。ガラス ベースディッシュ上にHeLa細胞を培養し、蛍光を示さな いHBSSに培地を置換して全反射ラマンスペクトルを測定 した。得られた代表的なラマンスペクトルを図7に示す。 O-H伸縮振動バンドにあたる 3050-3800 cm<sup>-1</sup>の積分強度 で規格化し、全反射照明と共焦点系の差をとるとC-H伸 縮振動バンドに負のピークが現れた。しかしこの傾向の再





現性は低く、測定した全ての細胞で現れてはいない。一方、 O-H伸縮振動バンド領域の差スペクトルの形状に着目す ると、高波数側で強度低下、低波数側で強度上昇が観測さ れ、自己組織化単分子膜と似た差スペクトルが得られた。

#### 4. 考察

自己組織化単分子膜の界面測定において、励起光の角度 増加に伴いO-H伸縮振動バンドに対するC-H伸縮振動バ ンド強度の上昇が明瞭に観測された。C-H伸縮振動バン ド強度の上昇は、Mirror 1のマイクロメーターを100か ら105に動かしたときに大きく増加している。これは100 から105の間に入射角が臨界角を超えたために、エバネッ セント波で励起されたラマン散乱光だけが観測されたため であると考えている。O-H伸縮振動バンド領域では、マ イクロメーターを80まで動かしたときのスペクトルを基 準とし、それぞれのスペクトルとの差をとると 3500 cm<sup>-1</sup> 付近に負のピークが見られた。得られた結果は、上述のよ うにOtaによって報告されたプリズム型の全反射ラマンス ペクトルと形状が異なっていた<sup>10)</sup>。Otaは主成分分析を用 いて全反射ラマンスペクトルを解析し、主成分の第2成分 では、C-H伸縮バンドと同じ変化方向に 3600 cm<sup>-1</sup> 付近の 鋭いピークが現れている。今回得られた図7では、C-H伸 縮バンドとO-H伸縮振動バンドの変化の正負は逆であっ た。再現しない理由として主成分分析と差スペクトルによ る解析の違いを上げることができる。Otaは主成分分析で 得られた結果について、どの程度の厚さの分子を観測して いるのか見積もっており、オクタデシルトリメトキシシラ ンの鎖長に対応する数ナノメートルの範囲の分子種を第2 成分で観測していると考察している。C-H伸縮バンドと 同じ変化方向に現れた3600 cm<sup>-1</sup>付近の鋭いピークにシラ ノール基の寄与があるとし、自己組織化単分子膜に生じた ナノサイズの間隙に入った水分子の寄与も大きいとしてい る。今回のような差スペクトルの場合、数十ナノメートル の範囲の水分子を観測しており、異なる状態の水分子を観 測しているために、Otaの結果を再現できなかったと考え られる。また、自己組織化単分子膜の状態もOtaとは一致 していない可能性もある。

プリズム型は変化させる角度範囲が広く、様々な角度で の測定が容易に行えるのに対し、対物レンズ型は角度の変 化範囲が狭く、主成分分析が行えるほどの角度依存性を測 定することが難しい。しかし、界面のみの情報を得るため には主成分分析をはじめとする統計解析手法が必要である と考えられ、今後の検討課題である。

構築した全反射ラマン顕微鏡でHeLa細胞を測定した結 果、共焦点系で測定した場合に比べて低波数側の強度上昇 が観測された。水のO-H伸縮振動バンドは他の振動バン ドに比べて非常にブロードであり、水の多様な水素結合様 式を反映している。今後、細胞培養を行うディッシュの基 板依存性などの詳細を検討し、得られたスペクトルが何に 基づいているのかを明らかにする。

#### 5. 総 括

全反射ラマン顕微鏡の製作に成功し、装置の特性評価、 自己組織化単分子膜、HeLa細胞の全反射ラマンスペクト ルの測定を行った。界面近傍の分子観測には成功している が、十分には膜界面の水の状態を観測しきれていないと考 えている。考察項で記したように、統計解析の手法を組み 合わせ、生体膜界面の水を捉える研究を続けていきたい。

## (引用文献)

- C. Krafft, M. Schmitt, I. W. Schie, D. Cialla-May, C. Matthäus, T. Bocklitz, J. Popp, Label-Free Molecular Imaging of Biological Cells and Tissues by Linear and Nonlinear Raman Spectroscopic Approaches. *Angew. Chem. Int. Ed.* 56, 4392-4430 (2017).
- K. Aljakouch, T. Lechtonen, H. K. Yosef, M. K. Hammoud, W. Alsaidi, C. Kötting, C. Mügge, R. Kourist, S. F. El-Mashtoly, K. Gerwert, Raman Microspectroscopic Evidence for the Metabolism of a Tyrosine Kinase Inhibitor, Neratinib, in Cancer Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* 57, 7250–7254 (2018).
- H. Takahashi, A. Yanamisawa, S. Kajimoto, T. Nakabayashi, Observation of the changes in the chemical composition of lipid droplets using Raman microscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 22, 21646-21650 (2020).
- M. Takeuchi, S. Kajimoto, T. Nakabayashi, Experimental Evaluation of Density of Water in a Cell by Raman Microscopy. J. Phys. Chem. Lett. 8, 5241-5245 (2017).

- T. Sugimura, S. Kajimoto, T. Nakabayashi, Label-free imaging of intracellular temperature by using the O-H stretching Raman band of water. *Angew. Chem. Int. Ed.* 59, 7755–7760 (2020).
- D. Shibata, S. Kajimoto, T. Nakabayashi, Label-free tracking of intracellular molecular crowding with cellcycle progression using Raman microscopy. *Chem. Phys. Lett.* **779**, 138843 (2021).
- E. Yamamoto, T. Akimoto, M. Yasui, K. Yasuoka, Origin of subdiffusion of water molecules on cell membrane surfaces. *Sci. Rep.* 4, 4720 (2014).
- J. D. Cyran, E. H. G. Backus, Y. Nagata, M. Bonn, Structure from Dynamics: Vibrational Dynamics of Interfacial Water as a Probe of Aqueous Heterogeneity. *J. Phys. Chem. B* 122, 3667–3679 (2018).
- F. Ishizaki, M. Kim, Near-Infrared Attenuated Total Reflection Raman Spectroscopy for Polymer Surface Observation. *Jpn. J. Appl. Phys.* 47, 1621–1627 (2008).
- C. Ota, Investigation of the Structure of Water at Hydrophobic and Hydrophilic Interfaces by Angle-Resolved TIR Raman Spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17, 26435-26442 (2015).