

ミトコンドリア活性評価のための
2光子吸収蛍光励起近接場 pH 測定法の開発

Development of Near-field pH Measurement excited by Two-photon
Absorption Fluorescence for Evaluation of Mitochondrial Activity

平成 29 年度博士学位論文

東京農工大学大学院工学府

機械システム工学専攻

金指 康明

Kanazashi Yasuaki

Abstract

A proton distribution in the vicinity of mitochondria attracts interest due to its influence to a necrotic cell death. Mitochondria produce adenosine triphosphate, ATP using a proton concentration gradient generated across the inner membrane. Therefore, the pH distribution near the mitochondria changes from time to time. However, when the mitochondria is exposed to physical or chemical stress, the proton concentration gradient disappears and ATP can not be produced, resulting in necrotic cell death. This process is considered as a part of the reason for necrotic cell death. Therefore, it is expected to clarify the mechanism of necrotic cell death by measuring the pH distribution in the vicinity of mitochondria. However, since there is a limit to the spatial resolution of the conventional microscope, it is very difficult to accurately measure the pH value in the vicinity of the mitochondria.

In this study, we propose pH measurement method based on two-photon fluorescence excitation of a dual wavelength pH sensitive dye and scanning near-field optical microscopy (SNOM) to improve spatial resolution and to avoid reabsorption. In this method, two-photon absorption is generated using a femtosecond pulsed laser, and fluorescence at 580 nm and 650 nm is emitted by locally exciting the dye. The fluorescent signals are collected by a near-field probe of SNOM. Fluorescent signals of each wavelength are separately detected by a cooled photomultiplier, and the fluorescence intensity ratio ($FIR = I_{580\text{ nm}} / I_{650\text{ nm}}$) is calculated as an index of pH value. As a result of obtaining the pH calibration curve using this proposed method, the good correlation coefficients of 0.984 and 0.993 were obtained for two photon and data sheet, and two photons and one photon, respectively. Then, a time resolution of 0.1 sec in pH change was measured by the time response to the addition of acid. In addition, mitochondrial activity was observed by pH change at three different mitochondrial concentrations.

Next, a multi-probe system with two near-field probes was proposed to evaluate the difference in the activity between a single mitochondrion and mitochondrial aggregation. First, we measured the FIR at the different pH value from 5.0-8.5 and prepared a calibration curve of pH-FIR. The FIR dynamic responses were then measured by dropping hydrochloric acid (HCl) into the buffer solution. As a result, we can simultaneously measure the pH changes at two different points in the SNARF-4F solution by the measurement system. Therefore, it is possible to measure the pH change in the near-field region of mitochondria and to measure the activity difference between single mitochondrion and mitochondrial aggregation. In addition, mitochondrial samples were prepared using optical tweezers and mitochondrial activity was evaluated by the two near-field probes detection system. As a result, it was concluded that the pH change of mitochondria depends on the number of mitochondrial

individuals by clarifying the change in pH of mitochondria after addition of nutrient substrate.

目次

Abstract.....	2
第 1 章 序論.....	7
1.1 細胞死とミトコンドリア.....	7
1.2 ミトコンドリア.....	8
1.2.1 ミトコンドリアとは.....	8
1.2.2 ミトコンドリアの ATP 合成.....	9
1.3 ミトコンドリア活性.....	11
1.3.1 ミトコンドリア活性とリンゴ酸.....	11
1.3.2 ミトコンドリア集団による活性.....	11
1.3.3 ミトコンドリア活性の評価方法.....	13
1.4 目的.....	13
1.5 構成.....	14
第 2 章 近接場二光子吸収蛍光計測法の原理.....	16
2.1 近接場.....	16
2.1.1 近接場光の発生.....	16
2.1.2 近接場光の発生原理.....	17
2.1.3 近接場光の測定.....	19
2.1.4 SNOM への適用.....	20
2.2 2 光子吸収励起.....	21
2.2.1 原理.....	21
2.2.2 特徴.....	22
2.2.3 吸収断面積と励起速度.....	24
2.3 pH.....	25
2.3.1 pH の定義.....	25
2.3.2 水素イオンと酸・塩基解離平衡.....	27
2.3.3 pH 測定方法.....	29
2.3.4 pH 感受性蛍光色素.....	30
2.4 装置コンセプト.....	32
2.5 まとめ.....	32
第 3 章 近接場二光子吸収蛍光計測法の実験装置と性能評価.....	33

3.1	実験装置とその構成要素.....	33
3.2	2光子吸収励起による蛍光の確認.....	47
3.2.1	実験方法.....	47
3.2.2	実験結果と考察.....	48
3.3	2光子吸収によるpH較正曲線と単光子吸収によるpH較正曲線の比較.....	52
3.3.1	実験方法.....	53
3.3.2	実験結果と考察.....	53
3.4	プロトン滴下によるpHの時間変化の観測.....	55
3.4.1	実験方法.....	55
3.4.2	実験結果と考察.....	56
3.5	まとめ.....	57
第4章	一点励起によるミトコンドリア活性実験.....	58
4.1	ミトコンドリア試料と溶液の作成.....	58
4.1.1	トリス緩衝液.....	58
4.1.2	リンゴ酸・グルタミン酸混合溶液.....	59
4.1.3	活性観測用ミトコンドリア試料の作成(全面貼付).....	59
4.2	ミトコンドリア活性実験.....	61
4.2.1	リンゴ酸・グルタミン酸混合溶液滴下実験.....	61
4.2.2	実験方法.....	61
4.2.3	実験結果と考察.....	62
4.3	ミトコンドリア活性の観測実験.....	63
4.3.1	実験方法.....	63
4.3.2	実験結果.....	64
4.3.3	ミトコンドリア活性の観測実験の考察.....	66
4.4	まとめ.....	67
第5章	ミトコンドリア活性評価のための二点差分計測法の原理.....	68
5.1	二点差分計測の原理と光学系.....	68
5.1.1	二点差分計測の原理.....	68
5.1.2	実験装置と一点測定時からの改善点.....	68
5.2	pH測定.....	75
5.2.1	pH較正曲線.....	75
5.2.2	プロトン滴下によるプローブの分解能.....	77

5.3	まとめ.....	80
第6章	光ピンセット法を用いたミトコンドリア試料の作成.....	81
6.1	光ピンセット法とは.....	81
6.2	光ピンセット装置の光学系.....	81
6.3	光ピンセットによる試料.....	82
6.3.1	試料作製.....	82
6.3.2	従来サンプル作製方法との比較.....	85
6.4	ミトコンドリアの生死判定.....	87
6.4.1	ミトコンドリアの膜電位.....	87
6.4.2	膜電位感受性蛍光色素.....	87
6.4.3	ミトコンドリアの生死判定評価.....	88
6.5	まとめ.....	90
第7章	ミトコンドリア個体数を制御した活性観測.....	91
7.1	リンゴ酸・グルタミン酸混合溶液滴下実験.....	91
7.1.1	試料作製.....	91
7.1.2	実験方法.....	91
7.1.3	実験結果・考察.....	92
7.2	ミトコンドリア活性観測実験.....	92
7.2.1	実験方法.....	93
7.2.2	実験結果・考察.....	93
7.3	まとめ.....	98
第8章	結論.....	99
8.1	まとめ.....	99
8.1.1	一点励起によるミトコンドリア活性観測.....	99
8.1.2	二点励起によるミトコンドリア活性観測.....	99
8.2	本研究の新規性.....	100
8.3	本研究の位置づけ.....	100
8.4	将来への展望.....	102
	謝辞.....	103
	参考文献.....	104
	Appendix.....	107

第1章 序論

1.1 細胞死とミトコンドリア

我々人間は 60 兆を超える細胞からできている生きた細胞の集団であり、そのうちの約 20% の 10 兆個は、毎日生まれ変わっている。その生まれ変わりにより我々の体はバランスを保っているのである^[1]。そして、その過程で細胞が死ぬことを細胞死と呼ぶ。

細胞死研究の歴史は 1842 年に Vogt による生理的細胞死の提唱に始まり、それ以来多くの研究が行われてきた。そして、1972 年に J. F. Kerr らによってアポトーシス(apoptosis)が提唱され、それまで知られていたネクローシス(necrosis)と区別されることになった^[2]。アポトーシスとは生理的な死、つまり細胞が能動的に死ぬことであり、プログラム細胞死とも呼ばれ、その死に方は、細胞が分化し、周囲の細胞によって貪食される。これに対して、ネクローシスとは病理的な死、つまり外的要因などで受動的に死ぬことであり、非プログラム細胞死とも呼ばれる。その死に方は、細胞内小器官が膨潤し、細胞膜が破壊され、破裂することで死に至るものである。このような死に方の違いがあるため、アポトーシスが発生しても周囲の細胞は影響をほとんど受けないが、ネクローシスでは周囲の正常な細胞も巻き込む恐れがある。

アポトーシスが提唱されて以降、顕微鏡の高性能化も寄与し、細胞死関連の研究、特にアポトーシスの研究は飛躍的に進歩した。特に 1990 年代後半から、プログラム細胞死の遺伝学的解析とアポトーシスに関わる分子の発見^[3]によって、細胞死に注目が集まると、これに関する研究が爆発的に広がった。近年ではアポトーシスを制御し、疾病の予防、治療、解明に応用する研究も行われている^{[3][8]}。

以上のように、これまでの細胞死に関する研究はアポトーシスに関するものが多く、アポトーシス関連の研究は成熟してきている。一方で、心筋梗塞や、術後の臓器障害などの一因として考えられているネクローシスは、研究が行われてはいるものの発生原因はほとんど解明されていなかった。しかし、最近になってようやく Fig. 1.1 に示す細胞内小器官であるミトコンドリアが合成する ATP の枯渇がネクローシスの一因になっていることが分かってきた。そのミトコンドリアが ATP を合成しているか、すなわちミトコンドリアの活性がどの程度かということの評価することは、ネクローシスの機序の解明につながると考えられる。そこで本研究ではネクローシスの機序の解明の手掛かりとしてミトコンドリアが活性化すると変化するミトコンドリア近傍の pH 値に着目した。

ミトコンドリアを機能不全にする物質として、活性酸素や Ca^{2+} や PARP (poly-ADP-ribose polymerase) などが影響していることが分かってきている^[9]。このような、物理的ストレスや Ca^{2+} などの化学的ストレスを加えると、ミトコンドリアには分子量 1500 程度の分子が流入し

て、膜電位の低下、ミトコンドリアの膨潤が起き、結果としてミトコンドリアが破裂する。したがって、ネクロシスを解明するためには、そのようなストレスを受けた際のミトコンドリアやその周囲の pH 変化を観測し、ミトコンドリアの活性を評価することがネクロシスの予防や解明につながると考えられる。

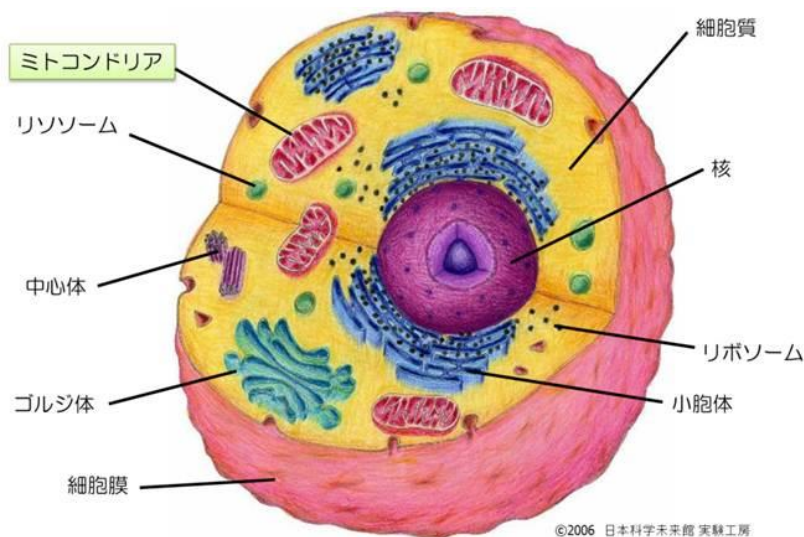
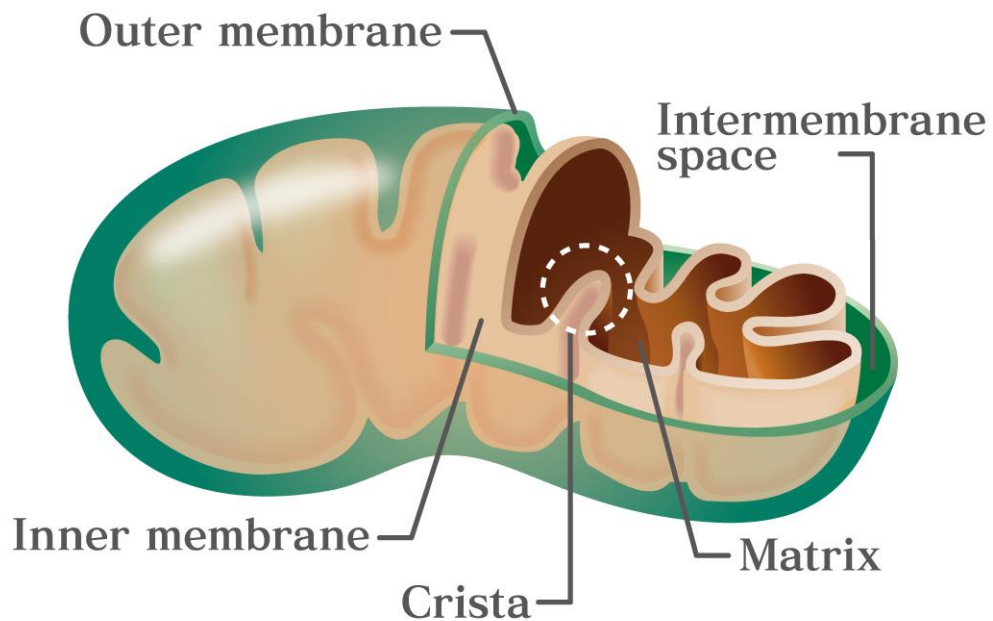


Fig. 1.1 Mitochondria in a cell^[10]

1.2 ミトコンドリア

1.2.1 ミトコンドリアとは

ミトコンドリアは直径 0.5 μm , 長さ 1 μm 程度の楕円形の細胞内小器官で、生命のエネルギー源であるアデノシン三リン酸(ATP)を合成している。ミトコンドリアには外膜と内膜の2つの膜があり、ATP を産生する複合体を持つ内膜は表面積を大きくするため、クリステというひだ状のくびれを持つ^[11]。Fig. 1.2 にミトコンドリアの構造を示す。



© University of Tokyo

Fig. 1.2 Structure of mitochondria^[12]

ミトコンドリアの外膜はたんぱく質の含有量が低く、細胞質の代謝物質やイオンなどは外膜に存在する孔を通して自由に取り込むことができる。一方で、内膜はミトコンドリア全体の75%のたんぱく質を含有し、代謝物質やイオンは内膜の電位差や対向輸送によって必要量だけが取り込まれる。自由に通過できるのは O_2 、 CO_2 、 H_2O などだけである。

1.2.2 ミトコンドリアのATP合成

本項ではミトコンドリアがATPをどのように合成していくのかについて説明する^[13]。Fig. 1.3にATP合成までの過程図を示す。

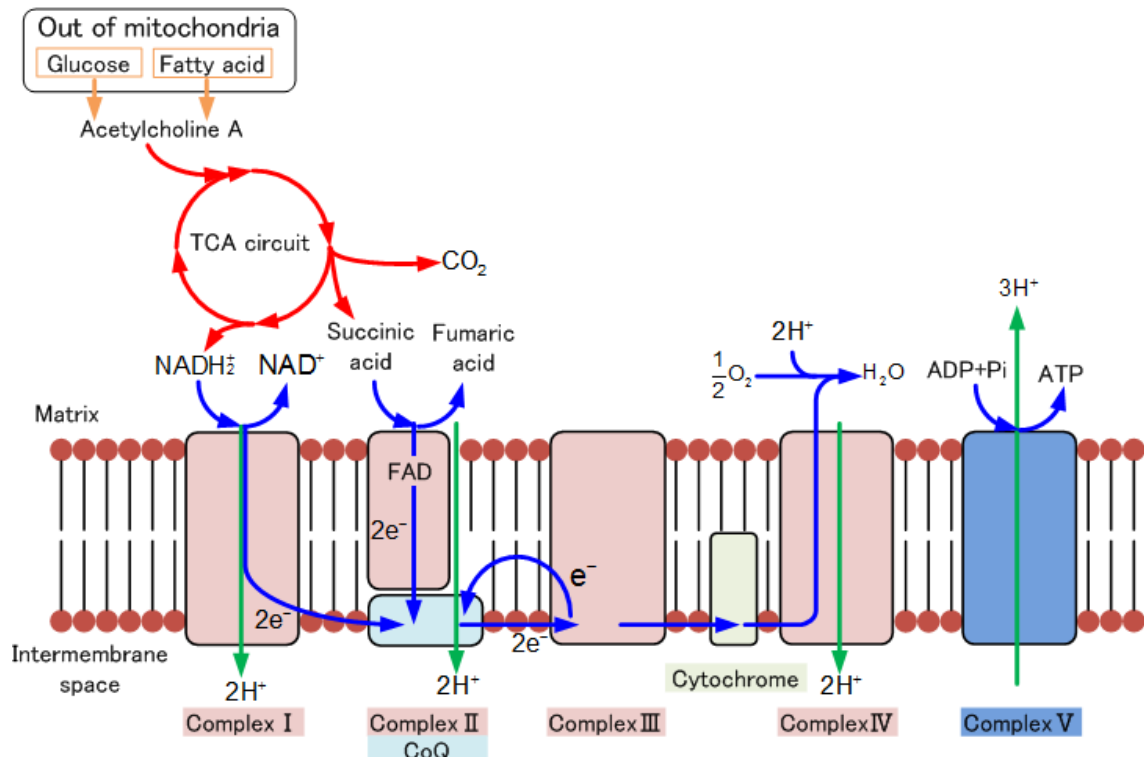


Fig. 1.3 Process of ATP synthesis

まず、細胞質でエネルギーの供給源であるグルコースが解糖反応により分解される。このときグルコース 1 分子に対して ATP2 分子と NADH_2^+ (還元型ニコチンアデニンジヌクレオチド)2 分子とピルビン酸 2 分子が生成される。

次に、解糖反応で生成された NADH_2^+ とピルビン酸がミトコンドリア内に取り込まれ、ピルビン酸はアセチル-CoA(アセチルコリン A)になる。また、脂肪酸が酸化されてもアセチル-CoA は生成される。このアセチル-CoA が TCA 回路(クエン酸回路)に導入される。TCA 回路はクエン酸、シスアコニット酸、イソクエン酸、オキサロコハク酸、2-オキソグルタル酸、スクニル-CoA、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、オキサロ酢酸によって構成される。この回路を一回りするとアセチル-CoA 1 分子から CO_2 2 分子、 NADH_2^+ 3 分子などが生成される。

そして、生成された NADH_2^+ は複合体 I で電子と水素イオンを放出し、 NAD^+ になる。放出された電子は CoQ(ユビキノン：補酵素 Q)に伝達され、水素イオンは内部から膜間スペースに運び出される。複合体 II では TCA 回路中のコハク酸が酸化され、フマル酸に酸化される。この酸化に伴い、電子が放出され、FAD(フラビンアデニンジヌクレオチド)を介して、CoQ に電子が伝達される。

次に、複合体 I, II から電子を受け取った CoQ は複合体 III に電子 2 個を伝達し、水素イオンを膜間スペースに運び出す。複合体 III に伝達された 2 個の電子のうち 1 つはそのまま伝達され、もう 1 つは CoQ に還元される。

複合体 III から電子を受け取った可溶性蛋白質のシトクロムは電子をそのまま複合体 IV に伝達する。複合体 IV では、シトクロムから伝達された電子により、酸素分子が還元され、マトリクスから取り込まれた水素イオンと結合して水が生成され、同時に水素イオンが膜間スペースに運び出される。このようにして、電子が移動し、水素イオンが膜間スペースに運び出されることにより、マトリクス内の pH が大きくなり(約 pH8)、マトリクスと膜間スペースにプロトン濃度勾配、膜電位(約-180 mV)が生じることになる。

そして、ATP 合成酵素である複合体 V が、膜間スペースから水素イオン 3 個を濃度勾配を利用して運び入れる際に、ATP 分子が合成される。合成された ATP や ADP は、ミトコンドリア内膜を通過出来ないので ATP/ADP トランスポーターによってマトリクスから運び出される。

1.3 ミトコンドリア活性

1.3.1 ミトコンドリア活性とリンゴ酸

前項で、ATP 合成に必要な NADH_2^+ を作り出すには TCA 回路が必要であることは述べたが、TCA 回路の活動には、 α -ケトグルタル酸、リンゴ酸、オキサロ酢酸が必要である。さらに、TCA 回路の基質のアセチル-CoA、オキサロ酢酸、解糖で生成された NADH_2^+ は TCA 回路の代謝を調節する重要な因子になる。

特に、リンゴ酸は TCA 回路内で NADH_2^+ を生成し、活動、代謝に必要なオキサロ酢酸に変化する重要な物質であり、オキサロ酢酸とは以下の平衡関係にある。

$$K = \frac{[\text{オキサロ酢酸}][\text{NADH}]}{[\text{リンゴ酸}][\text{NAD}]} \dots\dots\dots (1.1)$$

ここで、NADH はニコチンアデニンジヌクレオチド、NAD は酸化型ニコチンアデニンジヌクレオチドである。

ATP が生成されるとミトコンドリア内の NADH_2^+ が消費されるので減少し、リンゴ酸がオキサロ酢酸に変換され、オキサロ酢酸が増加し、TCA 回路が活性化する。つまり、ミトコンドリアを活性化させるためには、オキサロ酢酸に変換されるリンゴ酸をミトコンドリア近傍に加えることで実現できる。

1.3.2 ミトコンドリア集団による活性

ミトコンドリアの活性状態を詳しく評価することは、ネクロシスの解明の新たな知見を得ることが出来る。現在ミトコンドリアはミトコンドリア同士で相互作用を起こしていることが明らかになってきている。例として、突然変異したミトコンドリアと正常なミトコンドリアが融合することで、正常な DNA やタンパク質などを相互交換することで変異 DNA の比

率を下げる現象などがあげられる^[14]。また、エネルギーがより必要な臓器の細胞にはミトコンドリアの個数が多く、特に心臓、肝臓、卵子等には数百から数千個存在することが明らかになっている^[15]。これらはミトコンドリア独自のネットワークが存在していることを示唆している。よって、ミトコンドリアの振る舞いを正確に捉えるため単一ミトコンドリアを詳細に調べることに加えて、ミトコンドリアの集合体としての振る舞いを評価することはミトコンドリア同士の相互作用を解明するために必要不可欠である。しかし、Fig. 1.4, Fig. 1.5 に示すように、ミトコンドリアの ATP 合成器官の空間的分布状態や単一ミトコンドリアと集合体ミトコンドリアでの ATP の活性量の差異は解明されておらず、現在の研究の課題となっている。これらの知見を得ることで、単一ミトコンドリアの活性状態が詳細にわかり、またミトコンドリアの集合体システムとしての振る舞いや、ミトコンドリアの集合体でいることの有意性を明らかにすることができる。これは基礎医学や薬学の発展に寄与し、ネクロシスの機序解明につながる。そこで本研究では、単一・集合組織の活性分布や単一と集合体における活性量の差異を明らかにし、ミトコンドリアにおける ATP 生産の新たな知見を得るために、近接場マルチ光ファイバプローブによる多点同時計測システムを構築し、ミトコンドリアの活性を評価する。

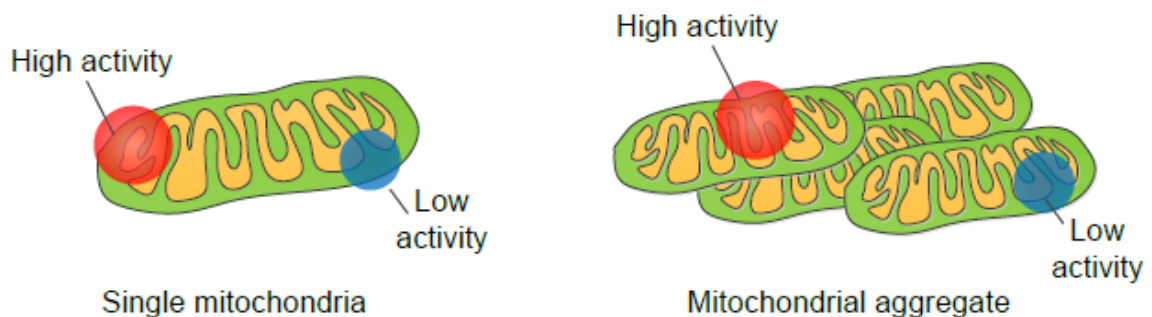


Fig. 1.4 Mitochondrial activity distribution

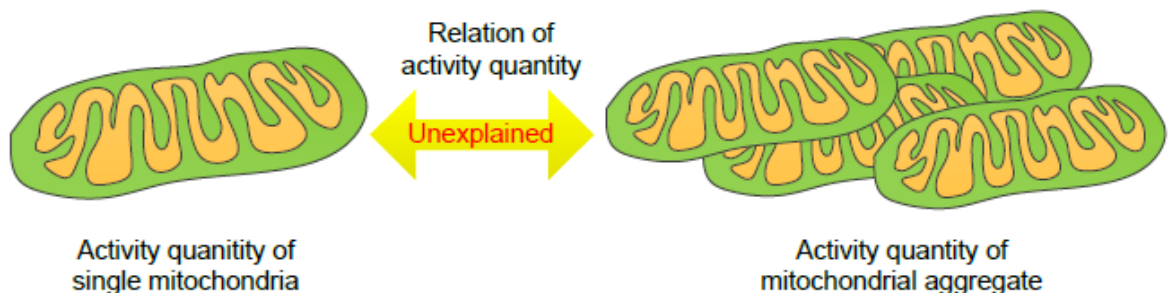


Fig. 1.5 Relation of activities between mitochondrion and mitochondria

1.3.3 ミトコンドリア活性の評価方法

従来のミトコンドリア活性評価方法は主にカルシウムイオン^{[16],[17]}によるものや SNOM を用いた pH 評価手法が提案されてきた。下記に提案されている手法のコンセプト図を示す^{[18],[19]}。

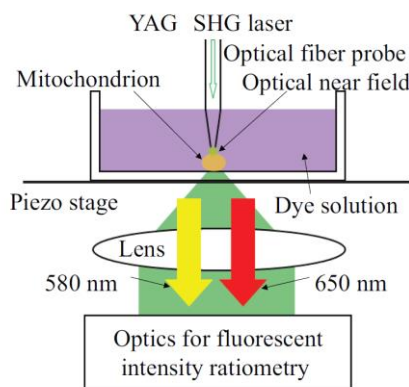


Fig. 1.6 One of the other pH measurement concept

しかしながら、カルシウムを用いる方法では ATP 合成以外のミトコンドリアの変化も評価してしまう可能性が有る。また後者の評価方法も pH を測定し評価を行ってはいいるが、単光子吸収を用いているため焦点方向の深さ分解能がない欠点がある。その上、栄養剤添加によるミトコンドリアの反応があまり明確ではないこともあげられる。そのため、ミトコンドリアの活性が見られる pH と深さ方向の分解能を持たせた 2 光子吸収を組み合わせたミトコンドリア活性評価手法が有用となる。

1.4 目的

前述したように細胞死の一種であるネクローシスは、術後の臓器障害などの一因として考えられているが、ネクローシスの発生原因はほとんど解明されておらず、最近になってミトコンドリアが合成する ATP が枯渇することがネクローシスの一因になっていることが分かってきた。そこで細胞内小器官であるミトコンドリアの活性状態を評価することで、ネクローシスの機序の解明につなげることが試みられている^{[17],[20]}。

また現在ミトコンドリアはミトコンドリア同士で相互作用を起こしていることが明らかになってきている。例として、突然変異したミトコンドリアと正常なミトコンドリアが融合することで、正常な DNA やタンパク質などを相互交換することで変異 DNA の比率をさげる現象などがあげられる^[4]。また、エネルギーがより必要な臓器の細胞にはミトコンドリアの個数が多く、特に心臓、肝臓、卵子等には数百から数千個存在することが明らかになっている。

これらはミトコンドリア独自のネットワークが存在していることを示唆している。よって、ミトコンドリアの振る舞いを正確に捉えるため単一ミトコンドリアを詳細に調べることに加えて、ミトコンドリアの集合体としての振る舞いを評価することはミトコンドリア同士の相互作用を解明するために必要不可欠である。

ミトコンドリアの活性評価の指標に、ATP が合成される程度によってミトコンドリア近傍で変化する水素イオン濃度(pH)が導入されている^[21]。しかし、従来の pH 測定法によって大きさが 1 μm 程度のミトコンドリア近傍のような局所領域を測定することは極めて難しい問題点を抱えている。さらに、ミトコンドリアの ATP 合成器官の空間的分布状態や単一ミトコンドリアと集合体ミトコンドリアでの ATP の活性量の差異は解明されておらず、現在の研究の課題となっている。

そこで、通常の顕微鏡の限界を超えて微小な試料を観測できる走査型近接場光学顕微鏡 (SNOM) と、2 つの蛍光波長を持つ pH 感受性蛍光色素を組合せた二波長蛍光レシオ測定による pH 測定が提案されている^{[22], [23]}。この手法が局所的な pH の時間変化の測定に有用であることが確認され、複数のミトコンドリアの活性化によるミトコンドリア近傍のプロトン濃度変化の観測も可能であることも確認された。しかし、今後は、大量のミトコンドリアではなく、単一ミトコンドリアの活性を評価することが要求される。そのため、以前提案された方法よりもより精度が高く、感度が高い装置を構築する必要がある。

そこで本研究では、より局所領域での蛍光励起を行うために 2 光子吸収励起という光学現象を導入し、さらに、蛍光の再吸収や分散を抑えるために、ファイバースコープをコレクションモードで使用し、蛍光点から直接蛍光収集を行う。これらを組み合わせた新たな pH 測定法を開発・評価する。

さらに、ミトコンドリアの単一・集合組織の活性分布や単一と集合体における活性量の差異を明らかにし、ATP 生産の新たな知見を得るために、近接場マルチ光ファイバースコープによる多点同時計測システムを構築し、単一および集合体のミトコンドリアの活性を評価することを目的とする。

1.5 構成

本論文は以下に示す 5 章で構成する。流れを Fig. 1.7 に示す。

第 1 章では、本研究の背景となっている細胞死とミトコンドリアの関係について述べた。またミトコンドリアによる ATP 合成やミトコンドリアの活性などについても述べた。

第 2 章では、本研究で用いる基礎的な光学現象である近接場光や 2 光子吸収について発生原理や測定法、応用方法、特徴などについて述べる。また水素イオン濃度(pH)の定義や従来の測定法、pH 感受性蛍光色素について述べる。

第3章では第2章で説明した光学現象を利用した実験装置を構築した。また構築した装置を使用して pH 校正曲線や蛍光持続時間など pH 測定の基礎実験や pH の時間変化が実際に計測可能かどうかの実験結果を述べる。

第4章では、第3章で構築した装置を使用して、一点励起によるミトコンドリア活性実験を行った。その実験で使用した試料の作製方法や活性観測実験の前実験の結果、活性観測実験の結果について述べる。

第5章では、第3章で構築した装置を改造して二点励起できるようにし、二点差分法ができるようにしたので詳細について示す。またその実験系を用いて pH 測定や分解能について実験を行ったので、その実験方法や結果を述べる。

第6章では、ミトコンドリアサンプルの作製に光ピンセットを使用し、個体数を制御した。光ピンセットの原理や光ピンセットの光学系を説明する。また試料作製方法を従来の方法と比較しながら説明する。さらにミトコンドリアの生死判定方法も導入し、実験効率を上げたので、その判定方法や評価方法についても述べる。

第7章では、第5章で構築した実験系を使用し、第6章で述べた光ピンセットを用いて、ミトコンドリアを任意の数、また活性の良いものを選択したサンプルを使用して、活性観測実験を行った。その詳細と結果について述べる。

第8章では、本研究で得られた結果をまとめるとともに、今後の課題について述べ、本論文の結論を述べる。

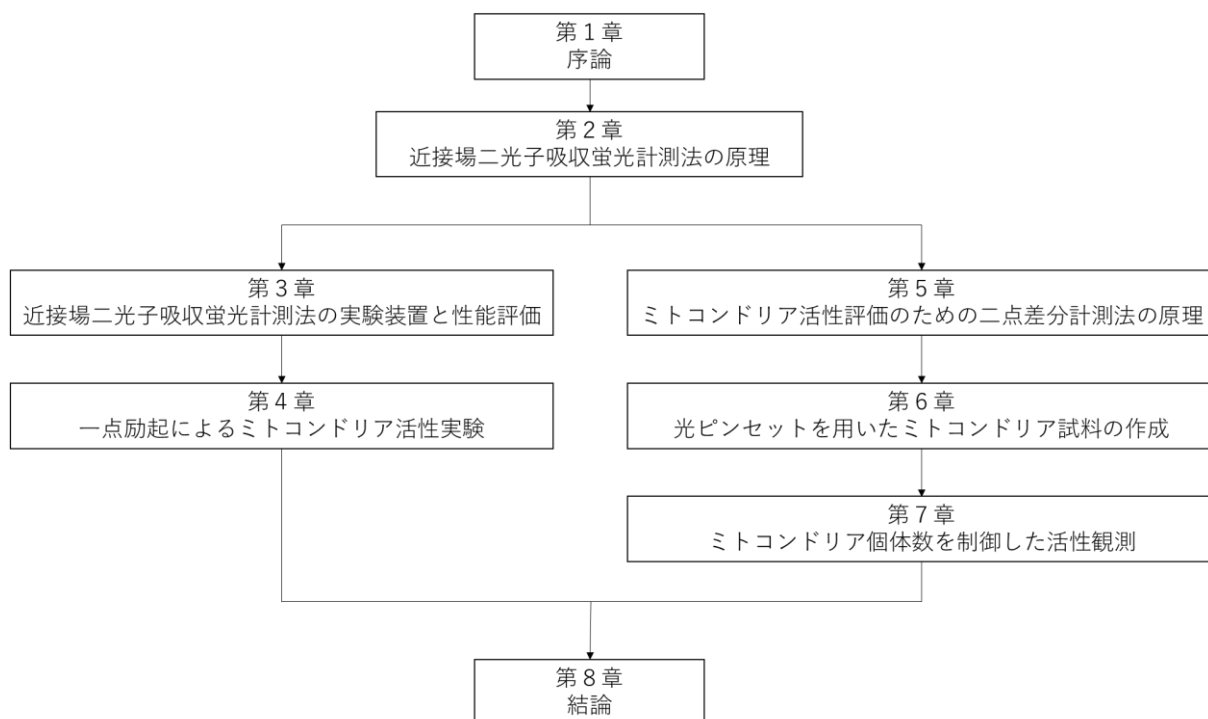


Fig. 1.7 Composition of the doctoral thesis

第2章 近接場二光子吸収蛍光計測法の原理

2.1 近接場

本研究では蛍光を収集するに当たり，近接場光を利用した走査型近接場光学顕微鏡 (SNOM : Scanning Near-field Optical Microscope)の技術を用いた．本項ではその SNOM の原理や応用例について述べる．

2.1.1 近接場光の発生

近接場光とは大きさが光の波長以下の微小物体や微小開口に光を入射・照射した際に，その構造の表面付近のみに生じ，伝搬しない光のことである．

まず，微小球体の周りに発生する近接場光について述べる．

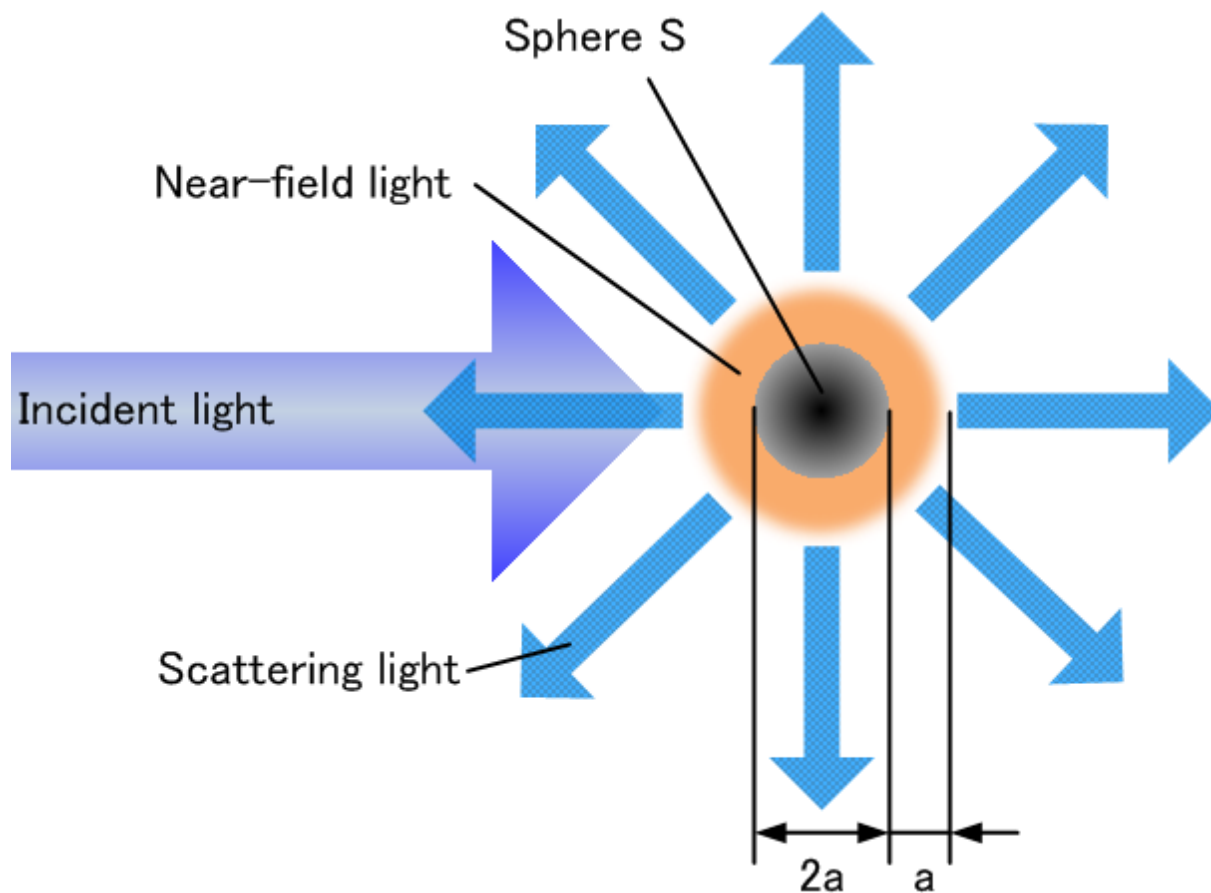


Fig. 2.1 Generation of optical near-field by sphere

Fig. 2.1 は波長 λ の光を半径 a ($\ll \lambda$) の微小球 S に光を入射したときの例である．光が入射すると，入射光が微小球によって散乱されるが，この時，微小球の表面にその半径 a と同じくらいの厚さの光の膜ができる．これが，近接場光である^[24]．また，条件にも示したよう

に微小球の半径 a は入射光の波長 λ よりも小さいため、近接場光のエネルギーは回折限界値よりも小さい数 $\text{nm} \sim 100 \text{ nm}$ に集中する。しかし、近接場光は微小球の表面から切り離せないため、検出することができない。

次に、微小開口に発生する近接場光について述べる。

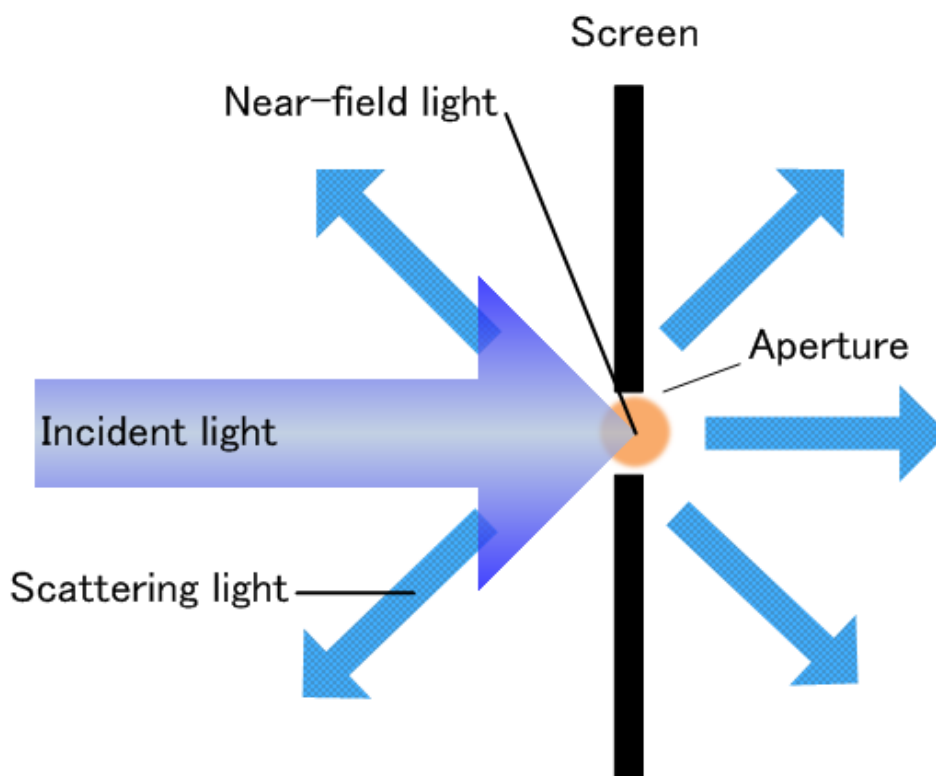


Fig. 2.2 Generation of optical near-field by aperture

Fig. 2.2 は微小開口に光が入射した場合である。波長以下の開口に光が入射した場合、光は回折限界を持つので開口を通過できない。すると、開口の近傍に直径が開口径と同じ半球状にエネルギーが集中する領域が発生し、近接場光が発生する。

このように波長以下の大きさの微小球や微小開口に光を入射したときも近接場光が発生する。

2.1.2 近接場光の発生原理

前項で近接場光の発生方法について述べた。そこで、なぜ近接場光が発生するのかを述べる。

まず、Fig. 2.3 のように、微小球 S に光が入射する状態を考える。すると、微小球の正の電荷をもつ原子核と負の電荷を持つ電子は、光の電場によりクーロン力を受け、互いに位置ず

れを起こし、対になる．このような正負の対を電気双極子といい，近接場光を発生させる根源である．また，その電荷の値と位置ずれの大きさを表すベクトルとの積は電気双極子モーメントと呼ばれる．

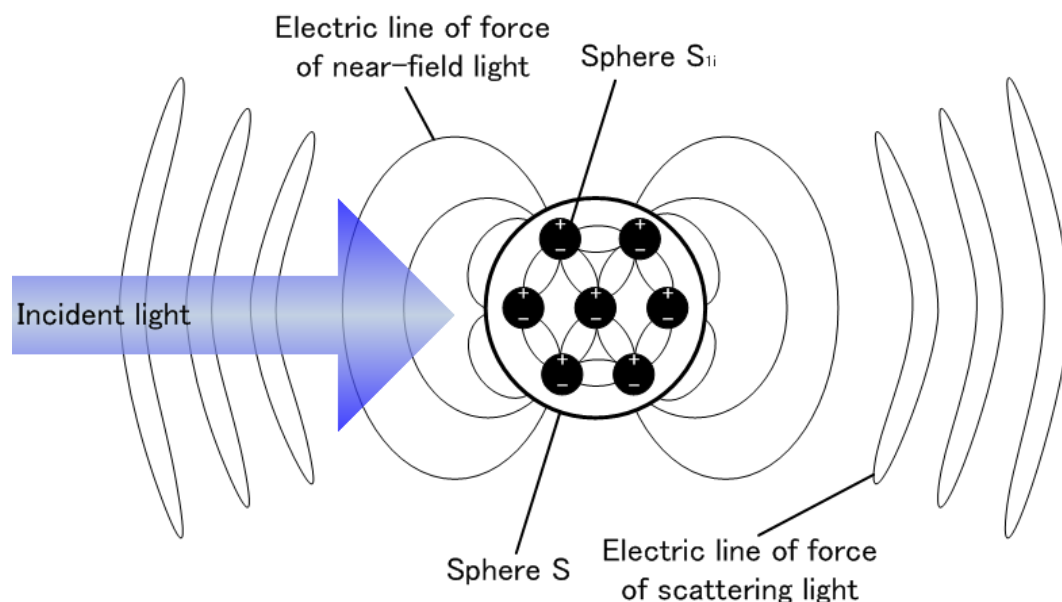


Fig. 2.3 Generation of optical near-field

次に，電気双極子モーメントを持つようになったことで発生したクーロン力の大きさと向きを表す電気力線について考える．微小球 S 中の原子レベルの微小球 S_{ii} は入射光により，電気双極子モーメントを持つようになり，互いにクーロン力による電氣的相互作用により向きをそろえる．すると，微小球 S_{ii} は大量にあるので，すべての向きがそろって全体として1つの電気双極子モーメントとみなすことができる．すなわち，電気力線は Fig. 2.3 のように描くことができる．

さらに，電場とはクーロン力の大きさと向きを表すものであるから，この電気力線は電気双極子モーメントによって発生した新たな電場と解釈できる．また，電気力線は最短距離で進む性質があるため，微小球 S から離れた所には発生せず，微小球 S の表面近傍にしか発生しない．つまり，この表面近傍にできた電気力線(電場)が表すものが近接場光である．

また，原子レベルの微小球 S_{ii} は入射光の周波数と同じ周波数で振動していることから，電気双極子の向きも常に変わる．そうすると，中にはループ状になって外へ離れていくものもある．これが散乱光である．

まとめると，微小球 S に光が照射されると電気双極子モーメントが発生し，これらの間にクーロン力が働き，電気力線で表される．この電気力線が球の表面にはみ出たものが近接場

であり、ループ状になって離れて行ったものが散乱光である。

2.1.3 近接場光の測定

前述したように近接場光は微小領域にしかない光であるため、発生した近接場光をそのまま検出することはできない。そこで、Fig. 2.4(a)のように微小球 S から半径 a 程度離れた位置に微小球 S と同じくらいの大きさの微小球 P を置くことを考える。Fig. 2.4(b)は(a)を電気力線と双極子モーメントを用いて表したものである。微小球 S に発生した近接場光の領域に微小球 P が置かれている場合、微小球 S の近接場光の電気力線が微小球 P に向かい、これにより微小球 P に新たな電気双極子モーメントが発生し、近接場光と散乱光 2 が発生する。この微小球 S の近接場光によって発生した散乱光 2 を検出することで、微小球 S の近接場光を間接的に検出することができる。

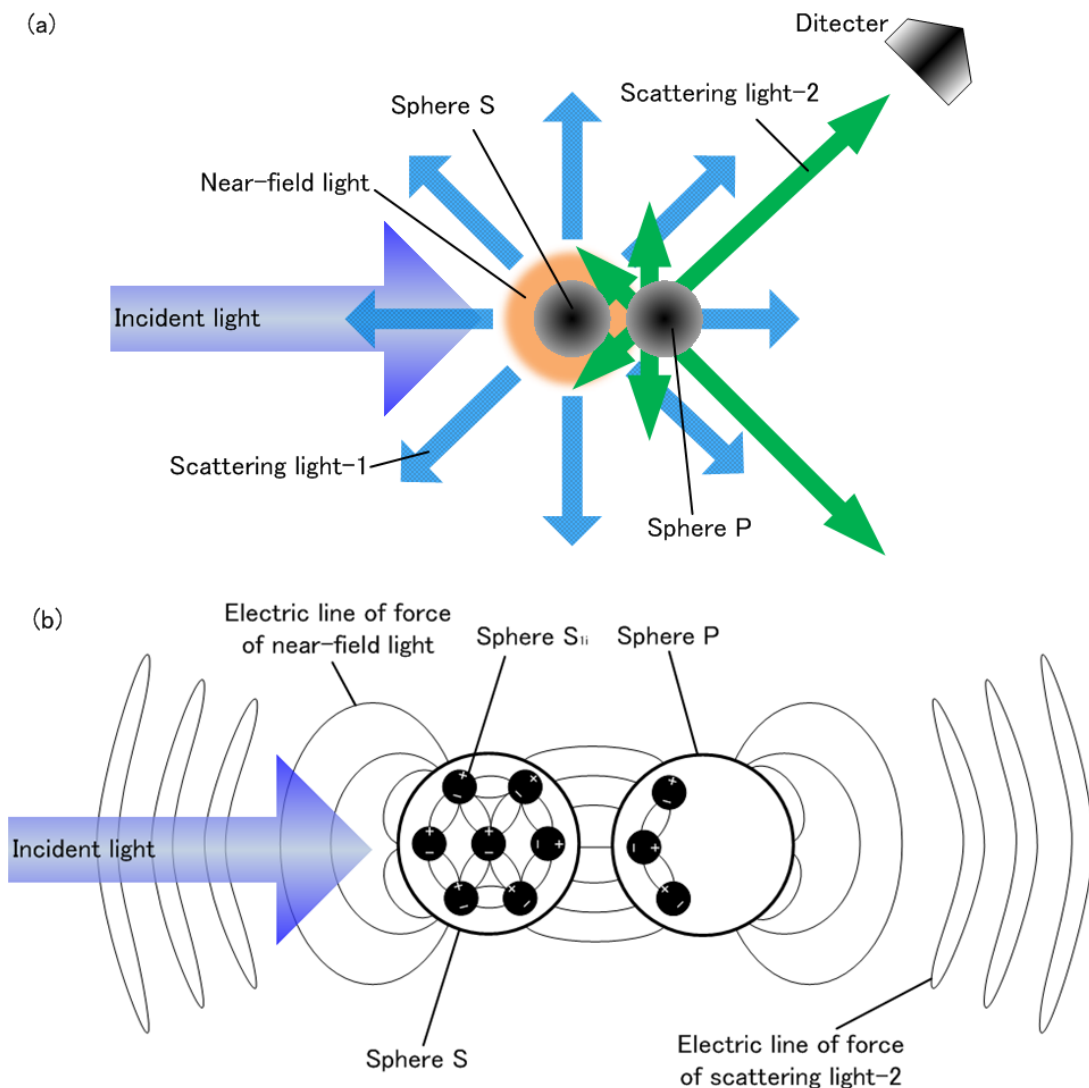


Fig. 2.4 Detection of near-field light by another sphere

このように、微小球 S の近接場領域に微小球 P を置くことにより、近接場光を散乱させ、間接的に検出ができる。しかし、この方法だと球 S による散乱光 1 も検出されてしまう可能性がある。そこで、確実に近接場光を検出するために、Fig. 2.5 に示すように衝立を立てることで、散乱光 2 のみを光検出器により検出することができる。

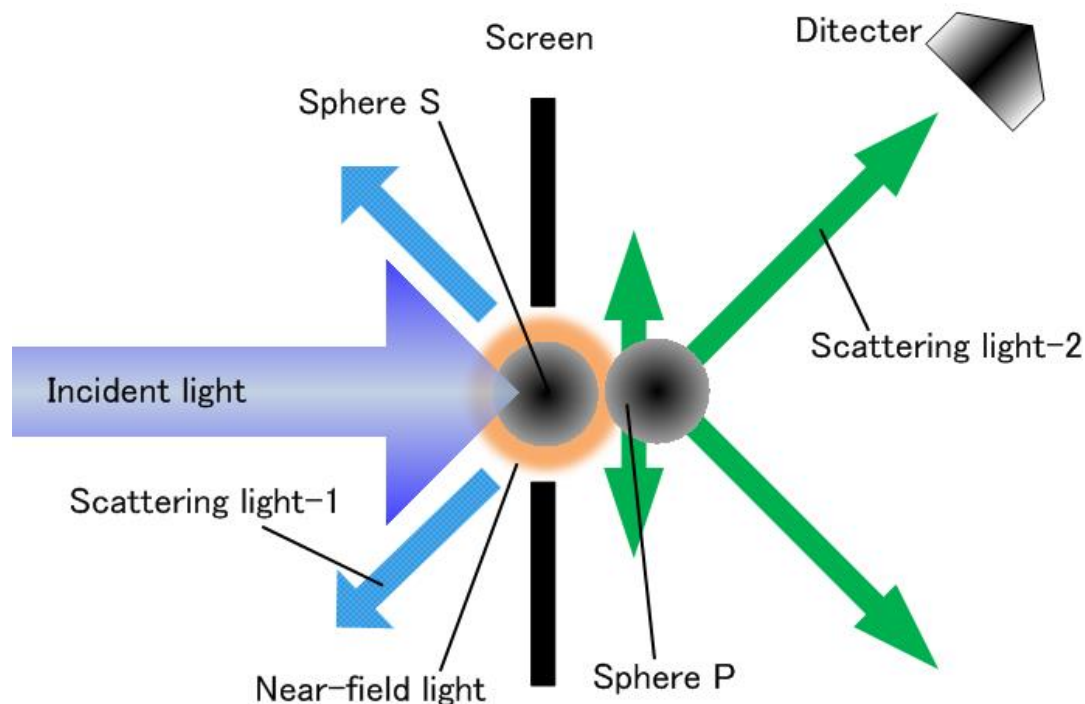


Fig. 2.5 Detection of near-field light using douser

2.1.4 SNOM への適用

SNOM では、このような衝立と微小球 P の代わりに、光ファイバーの先端を先鋭化したファイバークローブを用いている。この方法には、Fig. 2.6 に示すように集光モードと照明モードの 2 つがある。Fig. 2.6(a) は集光モード、(b) は照明モードである。

集光モードは、Fig. 2.5 の微小球 P の代わりにファイバークローブを用いて、散乱光を発生させ、それをファイバーを通して検出するものである。また、ファイバークローブの先端以外をアルミニウムなどの金属膜で覆い、金属膜の末端の半径を波長以下にすることで、散乱光 1 がファイバー内に入り込むことを防ぐことができる。

照明モードは、Fig. 2.5 の微小球 S の代わりにファイバークローブを用いて、プローブ先端に近接場光を発生させる。そして、発生した近接場光を散乱させ、その散乱光を検出する。こちらも集光モードと同様に、先端以外をアルミニウムなどの金属膜で覆い、金属膜の末端の半径を波長以下にする。これは Fig. 2.2 のように微小開口を作り、近接場光を発生させるた

めである。

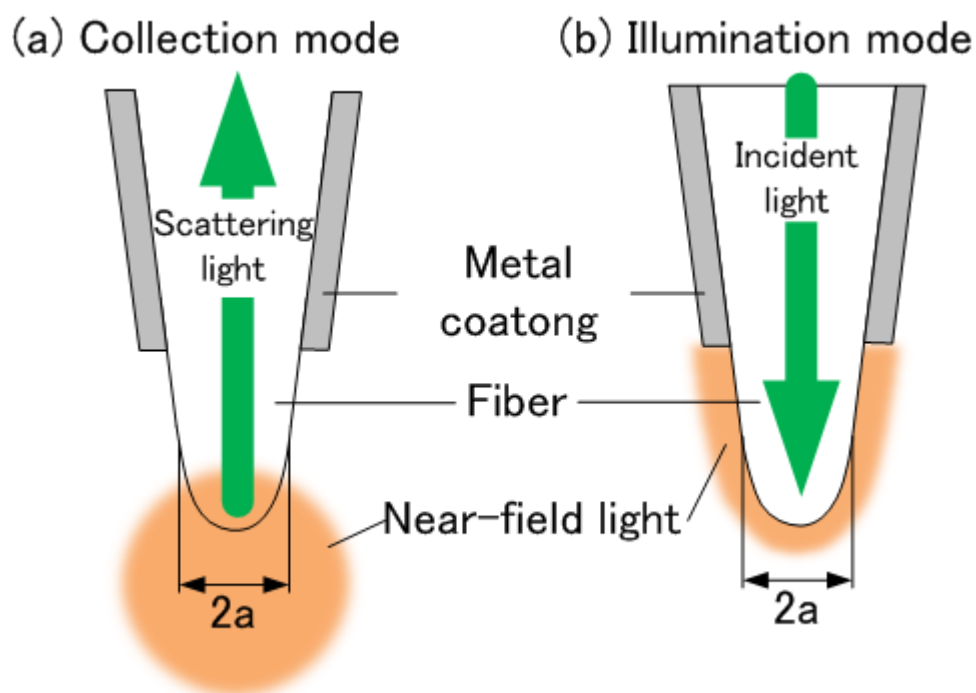


Fig. 2.6 Generation of near-field light with fiber probe

また、集光モード、照明モードともにファイバースコープ先端の曲率半径を a とすると、この大きさは SNOM の分解能に影響し、先端径が小さければ小さいほど分解能が向上して、回折限界を超える微小構造を観察できるという性質をもつ。

2.2 2光子吸収励起

2光子吸収とは非線形光学現象の1つであり、レーザー顕微鏡などに広く利用されている^[25]。本節では2光子吸収の原理や特徴、性質などを述べる。

2.2.1 原理

通常の光化学反応は、1つの分子は光子を1つしか吸収できないというアインシュタインの光化学当量則に基づいている。これに対して一度に2つの光子を吸収するのが2光子吸収である。

単光子吸収で蛍光色素を励起させる場合、光子1個と蛍光分子を相互作用させる。しかし、2光子吸収では2個の光子を蛍光分子に同時に相互作用させなければならない。ここでの相互作用とは、励起光の光子によって蛍光色素分子の電子のエネルギー準位を遷移させることをいう。Fig. 2.7にエネルギー遷移の模式図を示す。

単光子吸収の場合(Fig. 2.7 (a)), 電子は1つの光子によってエネルギー準位を基底状態から励起状態に遷移され, 約 10^{-8} 秒程度の短い時間で励起状態の電子は基底状態に戻る. エネルギーの高い励起状態から低い基底状態に戻る時に, そのエネルギー差を蛍光として発する^[26].

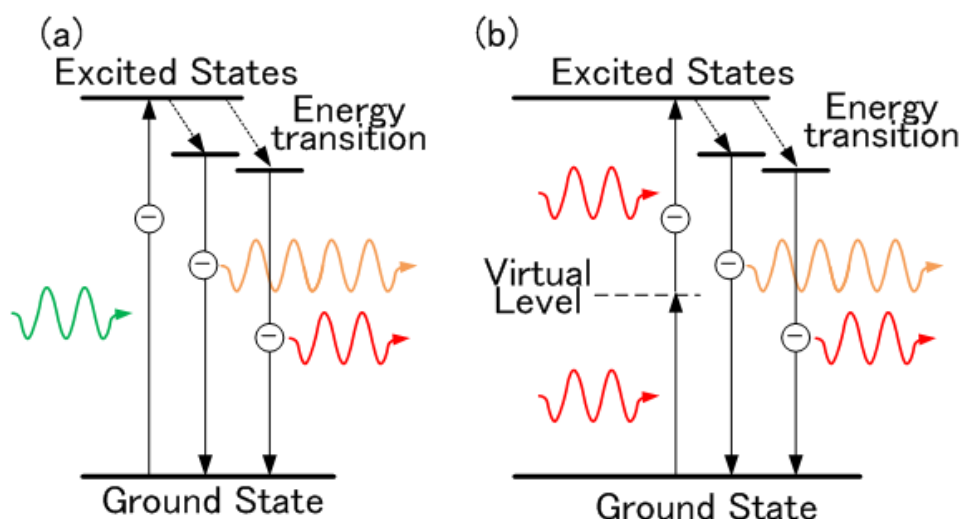


Fig. 2.7 Energy transition of (a) single-photon process and (b) two-photon process

これに対して2光子吸収の場合(Fig. 2.7 (b))は, 最初に1つの光子によって電子が仮想準位に遷移される. その直後さらにもう1つの光子を仮想準位で吸収することにより励起状態に遷移される. そして単光子励起の場合と同様に, 約 10^{-8} 秒程度経過すると励起状態の電子は基底状態に戻る. ここで単光子吸収と異なるのは励起の際の光子1個のエネルギーが単光子吸収に比べて半分で済むことである. しかし, 仮想準位に電子がとどまっている時間は 10^{-16} 秒程度と非常に短く, その間に励起状態に遷移させるためのもう1つ光子を相互作用させなければならない. このように短時間に2個の光子を相互作用させなければいけないため2光子吸収が発生する確率は極めて低くなる.

そこで, 2光子吸収の発生確率が入射光強度の2乗に比例することを利用して, 超短パルスレーザーを用いて, 瞬間的に高強度の光を照射するのが一般的である. 本研究でもフェムト秒パルスレーザーを用いた.

2.2.2 特徴

2光子吸収の特徴として, 以下の2点があげられる. 1つ目は, 前節で述べたように光強度が強いとこでないとほぼ発生しないため, 局所的に発生し, 単光子吸収に比べ局所的な領域での蛍光励起が可能であるということである. 2つ目は, 電子を1度仮想準位に遷移させたのちに励起状態に遷移するために, 1つの光子のエネルギーが単光子吸収の半分で済む.

したがって、励起光の波長は単光子吸収の場合の 2 倍の波長のレーザーを用いることができるということがあげられる。すなわち、可視光域の蛍光を得るためには赤外域のレーザーを用いることになる。その領域の波長のレーザーは吸収による生体への熱影響が少なく、組織の深部まで到達するという利点を持ち、生体の非侵襲観察によく応用されている。

Fig. 2.8 は本実験で用いた蛍光色素 SNARF-4F に波長 800 nm のフェムト秒パルスレーザーを照射したとき、Fig. 2.9 は波長 532 nm の連続波レーザーを照射した際の焦点付近の蛍光像である。

パルスレーザーを照射した Fig. 2.8 は、光強度の高い焦点付近でのみ 2 光子吸収が発生するため、発光が点状になり局所的に蛍光している。これに対して、連続波レーザー(波長 532 nm)を照射した Fig. 2.9 は、単光子吸収で蛍光しているため、蛍光が筋のように、レーザーの光路がすべて発光している。これは SNARF-4F の励起波長が 543 nm 近辺にあるので入射レーザーが通過する全航路で吸収が生じて蛍光発光するためである。

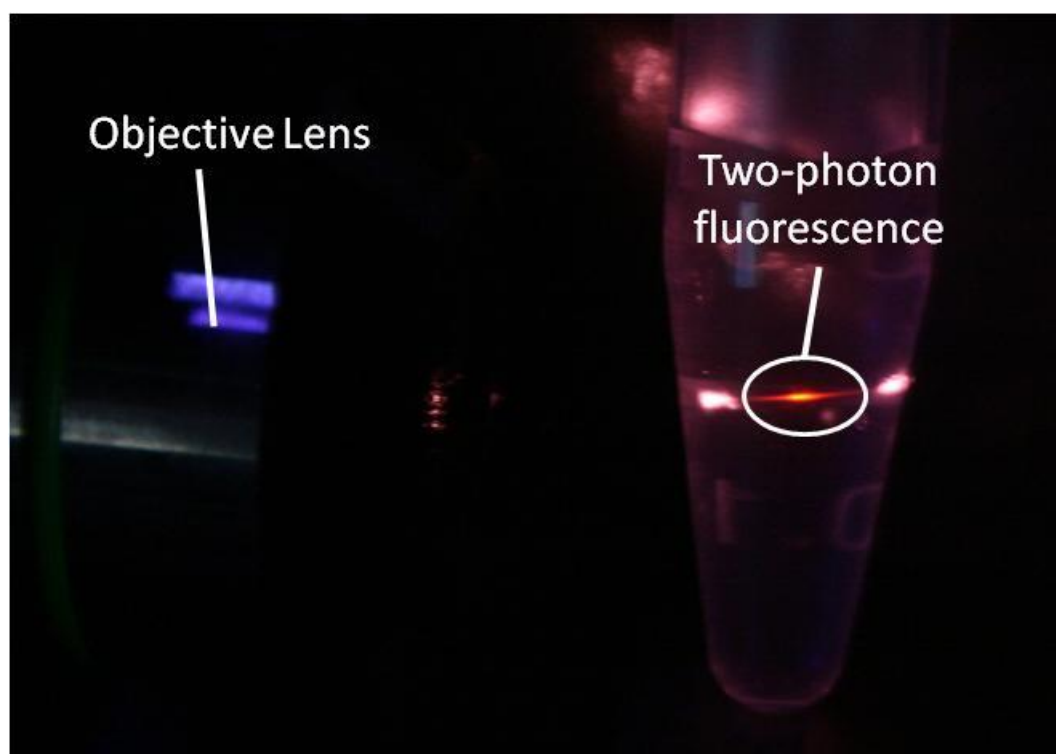


Fig. 2.8 Two-photon fluorescence ($\lambda_{ex}=800$ nm)

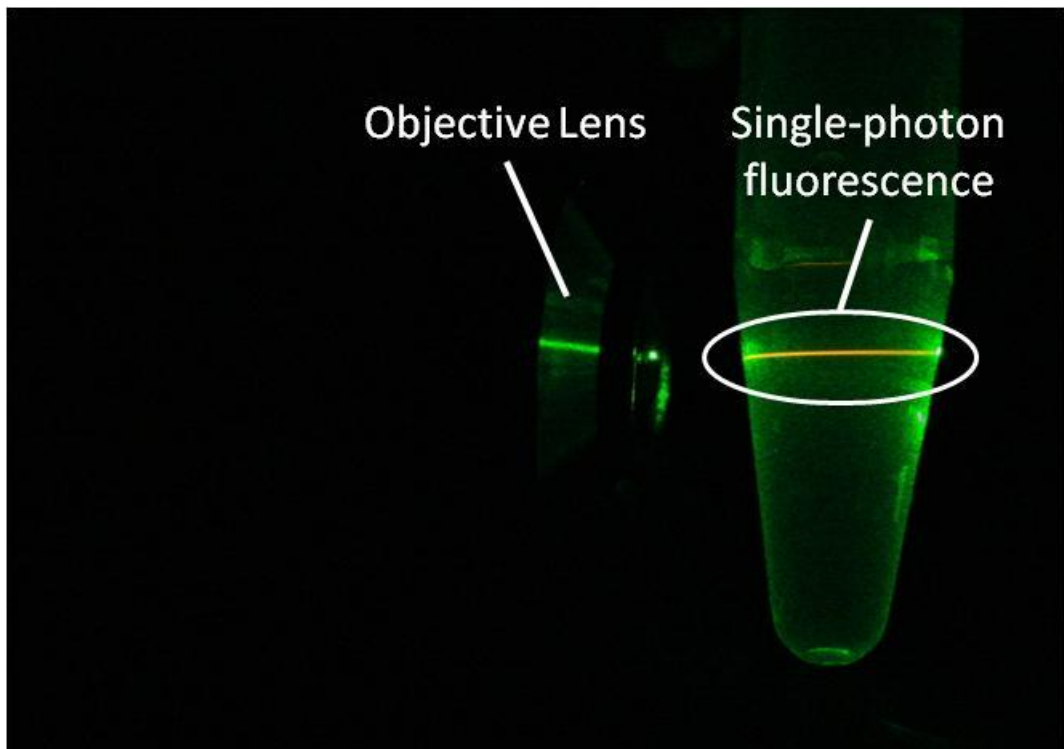


Fig. 2.9 Single-photon fluorescence ($\lambda_{ex}=532\text{ nm}$)

2.2.3 吸収断面積と励起速度

吸収断面積とは蛍光分子が光と相互作用する際の指標で、この値が大きければ相互作用しやすく、小さければしにくいことを表す^[27].

単光子吸収の場合、1秒間あたりの分子の励起回数を W_A [回/s]とおくと W_A は、単光子の吸収断面積 σ_A [cm²]、励起光のスポット面積 A [cm²]、励起光の強度 I [J/s]、プランク定数 h [J·s]、真空中の光速 c [m/s]、光の波長 λ [m]を用いて

$$W_A = \sigma_A \times \frac{I}{A} \times \frac{1}{hc/\lambda} \dots\dots\dots(2.1)$$

と定義される。これによって1秒間に蛍光分子を励起する光子数がわかる。吸収断面積 σ_A が大きければ、 W_A も大きくなり蛍光分子が励起されやすくなる。

この考えを2光子吸収に適用する。光子と蛍光分子が相互作用する確率は1個目と2個目でほぼ同じで、単光子の吸収断面積 σ_A [cm²]もほぼ同じであると考えられる。また、2光子吸収では2つの光子が相互作用する間隔 τ [s]も考慮する必要があるので、これらを考慮して2

光子吸収の吸収断面積 σ_{2A} [$\text{cm}^4 \cdot \text{s}$]を求めると

$$\sigma_{2A} = \sigma_A \times \sigma_A \times \tau \dots\dots\dots (2.2)$$

と定義できる．単光子吸収断面積 σ_A は一般に 10^{-17} cm^2 程度，間隔 τ は前述したように約 10^{-16} 秒であるから，これらを代入すると式(2.2)から2光子吸収の吸収断面積 σ_{2A} は $10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s}$ と，単光子吸収に比べると非常に小さくなる．

2光子の場合の1秒間あたりの分子の励起回数を W_{2A} [回/s]とおくと， W_{2A} と励起光の強度 I [J/s]との関係は，吸収断面積の時と同様に，単光子励起の過程が2回起きる確率にその時間幅をかけて見積もることができ，以下のように表される．

$$W_{2A} = \left(\sigma_A \times \frac{I}{A} \times \frac{1}{hc/\lambda} \right) \times \left(\sigma_A \times \frac{I}{A} \times \frac{1}{hc/\lambda} \right) \times \tau \dots\dots\dots (2.3)$$

これをまとめて式(2.2)を代入すると

$$W_{2A} = \sigma_{2A} \times \left(\frac{I}{A} \times \frac{1}{hc/\lambda} \right)^2 \dots\dots\dots (2.4)$$

と表すことができる．この式から分子の励起回数は励起光の強度の2乗に比例し，励起光の光強度が強ければ励起回数は大きくなり，2光子吸収を生じやすいことがわかる．

2.3 pH

pHは，水溶液の酸性，塩基性を示す量であり，酸性雨や温泉といった我々の生活に馴染みのある物理量である．また，化学，環境工学，食品，医療，生体工学など，さまざまな分野において非常に重要な役割を果たしている．しかし，pHの厳密な定義方法は明確に示されていない^[28]．そこで，本節ではpHがどのように定義されているかpHの持つ意味などについて述べる．

2.3.1 pHの定義

よく高校の教科書などに載っているpHの定義式は，水素イオンのモル濃度 $[\text{H}^+]$ を用いて

$$\text{pH} = -\log[\text{H}^+] \dots\dots\dots (2.5)$$

と表されている．しかし，対数の引数は無次元でなくてはならない^[29]はずだが， $[\text{H}^+]$ は(数値)

×(モル濃度)なので、pH の定義式は

$$\text{pH} = -\log\left(\frac{[\text{H}^+]}{(\text{mol} \cdot \text{dm}^3)}\right) \dots\dots\dots (2.6)$$

と書き直すことが可能で、pH を水溶液中に解離して存在している水素イオン濃度と定義する式である。

しかし、実際の水溶液中で水素イオン濃度を測定することは難しい。塩酸のような水素イオンの大部分が解離している水溶液であれば、濃度のわかっている水酸化ナトリウム水溶液で滴定すれば水素イオン濃度を知ることができる。しかし、酢酸のような水素イオンがほとんど解離していない水溶液の場合は、この手法では測定できない。水酸化ナトリウム水溶液を滴下して水素イオンを知ろうとしても、解離していない水素イオンが平衡を保つために解離し始めるからである。そのため、pH を定義するために JIS や IUPAC では測定溶液と基準溶液の2つの溶液の電位差から求めることと定めている。Fig. 2.10 に JIS で定められている pH 計測方法のガラス電極法の原理を示す。

ガラス電極法とは、水溶液の pH に比例した起電力を発生するガラス電極と電位測定のための基準電位を与える比較電極を用いて、2つの電極間に生じた電圧(電位差)を測定することにより、被測定液の pH を測定する方法である。

通常、比較電極は pH7 に調製した塩化カリウム水溶液に浸され、被測定液との pH が 1 ずれると起電力は約 60 mV 変化する。

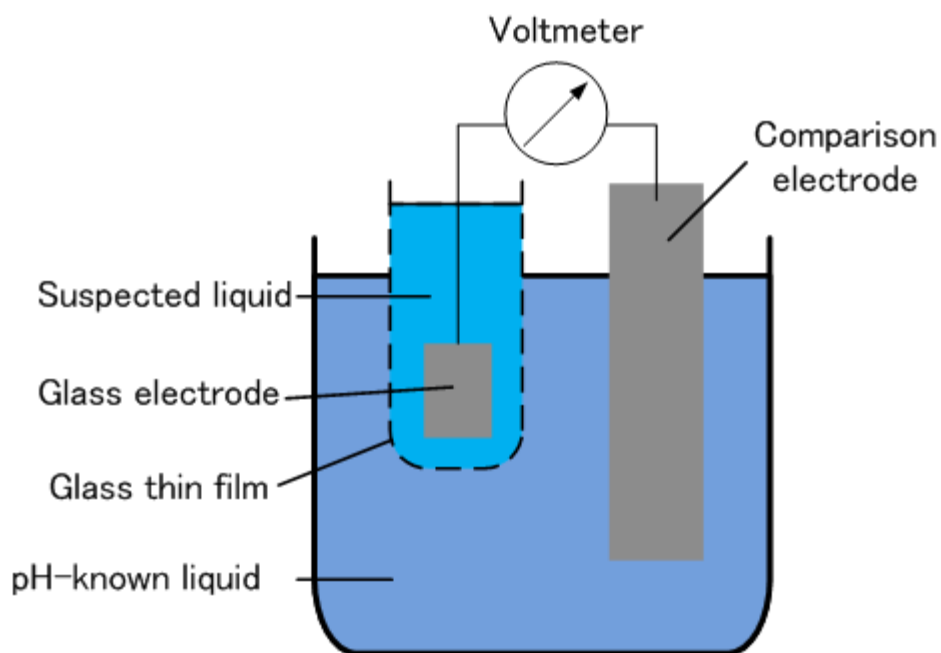


Fig. 2.10 Principle of glass electrode method

ガラス電極法を用いた pH 計測法では、まず溶液 X の起電力 E_X を計測し、次に溶液 Y の起電力 E_Y を測定する。計測時の条件として、いずれも同一の温度に保たれており、比較電極に同じものを用いるとする。このとき、溶液 X の pH(X)、溶液 Y の pH(Y) との関係は、

$$\text{pH}(X) = \text{pH}(Y) + \frac{(E_Y - E_X)F}{RT \ln 10} \dots\dots\dots (2.7)$$

となる。R は気体定数、T は熱力学温度、F はファラデー定数である。この式から、基準となる溶液 Y を pH が既知の溶液にすることによって、溶液 X の pH を式(2.6)に近い値で求めることができる。また、この方法は 2 つの溶液の起電力を測定するという操作を通して pH という量を定義している。したがって、この定義を操作的定義という。

以上のように、 $[H^+]$ を測定する一般的な手法がないため、pH の測定にはこの操作的定義が専ら用いられている。Fig. 2.11 にこのガラス電極法用いた複合電極を示す。製品には Fig. 2.10 にある要素のほかに、温度補償電極などが備え付けられている。

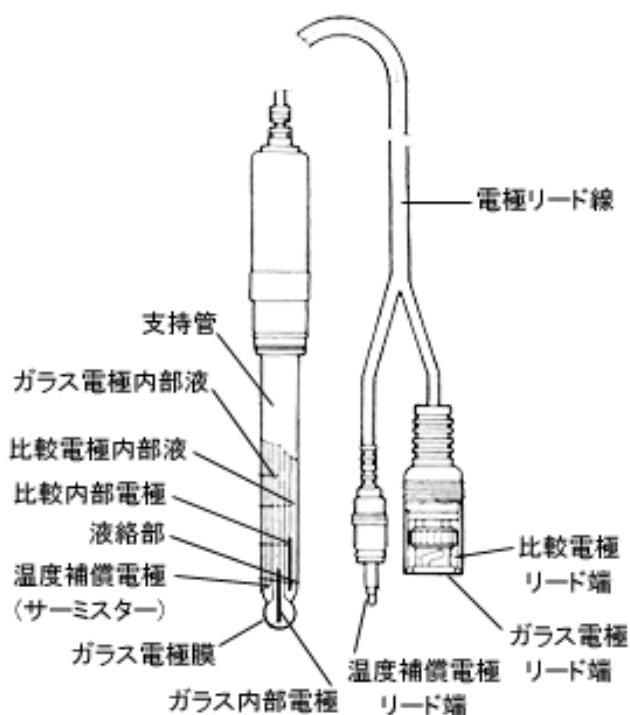


Fig. 2.11 Structure of combined electrode^[30]

2.3.2 水素イオンと酸・塩基解離平衡

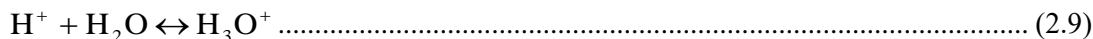
前節で、弱酸の水溶液の場合には、水溶液中に解離している水素イオンを定量的に測定できないと述べた。そこで、本節ではその理由について説明する。

水素イオンは、水素原子からただ 1 つの電子が失われたときに生じる。これを化学式で表

すと



となる。ここでの H^+ は水素原子であるが、実際には水溶液中では水分子と結合し、オキソニウムイオン(H_3O^+)を形成している。それを化学式で表すと



となる。ほとんどの場合で、この化学反応は平衡点が著しく右に偏っているため、水溶液中ではプロトンとしてほとんど存在せず、大部分はオキソニウムイオンとして存在している。しかし、オキソニウムイオンをプロトンとして議論しても、本質に影響がないので、本論文ではオキソニウムイオンをプロトンと称することにする。

水溶液中でイオン性物質はそれぞれ正と負の電荷を持つイオンに解離して存在している。特に、水素イオン(プロトン)を持つ塩 HA (A : 共役塩基)があったとき、その化学反応式は、



と表される。この反応は双方向性であり、これを解離平衡という。また水でも式(2.10)のように書くことができ



と表される。

また、物質がどの程度解離しているかを評価するために、解離定数が定義されている。式(2.11)の場合、解離定数 K は、理想溶液で、それぞれの物質の濃度を用いて

$$K = \frac{[\text{OH}^-][\text{H}^+]}{[\text{H}_2\text{O}]} \dots\dots\dots (2.12)$$

と表される。しかし、実際の溶液では濃度を用いて平衡定数を表現するよりも活量を用いて表現する方が適当である場合が多い。活量とは、理想系で議論される化学平衡を実在系に沿う形に補正するというものである。化学平衡において、理想的には分子・イオンがすべて働くとしている。しかし実際の溶液においては分子・イオンのすべてが働くことは少ない。そのため、活量という概念を定義し、濃度で記述されている分子・イオンの量を、実際に化学反応に寄与する分子・イオンの量に沿うよう補正することが必要となる。活量は活量係数と濃度を積算した形で書かれる^[31]。

今、 OH^- , H^+ , H_2O の活量をそれぞれ a_{OH^-} , a_{H^+} , $a_{\text{H}_2\text{O}}$ とすると、解離定数 K は

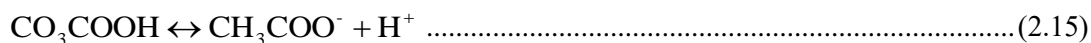
$$K = \frac{a_{\text{OH}^-} \cdot a_{\text{H}^+}}{a_{\text{H}_2\text{O}}} \dots\dots\dots (2.13)$$

と表される。解離定数 K が大きいほど、物質の解離の度合いは大きい。すなわち、式(2.11)を例とすると、解離平衡は式の右辺に傾くこととなる。解離定数 K は非常に大きい値から非常に小さい値を取りうるので、負の常用対数をとって pK とする場合も多い。すなわち、 pK は

$$pK = -\log[K] = -\log\left[\frac{a_{\text{OH}^-} \cdot a_{\text{H}^+}}{a_{\text{H}_2\text{O}}}\right] \dots\dots\dots(2.14)$$

と表される。 pK の形では、その値が小さければ小さいほど物質の解離の度合いは大きいということになる。このプロトンと塩とが解離する反応における解離定数を特に酸解離定数 K_a と呼ぶ。

ここで、酢酸の解離平衡について考える。酢酸の解離平衡は、



である。この解離平衡の酸解離定数 pK_a は 4.76 である。これに対して、強酸である塩酸の解離平衡は



と表される。この解離平衡の酸解離定数 pK_a は -7 と酢酸の酸解離平衡定数にくらべ非常に小さい、つまり反応が右に偏っている。すなわち、塩酸は水溶液中でほとんど完全に解離するといえる。そのため、塩酸の解離では塩酸の調製濃度がそのまま水素イオン濃度として議論できる。これに対して、酢酸では水素イオンが部分的にしか解離しないため、酢酸の調製濃度は水素イオン濃度とは異なる。また、解離平衡の平衡点が pH によってずれるため、滴定によって平衡が乱されてしまう。それゆえ、滴定による水素イオン濃度の定量測定ができない。これが酢酸などの弱酸の水素イオン濃度が滴定により定量測定できない理由である。

2.3.3 pH 測定方法

pH 測定の手法として、指示薬法、電極法、蛍光顕微鏡法がある。

指示薬法は酸-塩基性指示薬と呼ばれるフェノールフタレインやメチルオレンジなどの特定の pH 域において吸収スペクトルが変化する薬品を用いて、pH を判定する方法である。この手法は pH に対して溶液、もしくは薬品の色が変わるため、肉眼で溶液の pH を知ることができる。他にも、リトマス試験紙などを用いることにより、容易に溶液の大凡の pH を知ることができる。しかし、指示薬法では、吸収スペクトルの範囲が広いいため、精密な pH の測定はできない。さらに加えた指示薬に比べ多量の酸・塩基を含むものでないと用いることはできない。また 1 つの薬品で知ることのできる pH の範囲が狭いことも欠点である。

これに対して前項で述べた複合電極を用いる電極法はいかなる範囲の pH にも対応可能であり、さらに基準液の pH の正確さと精度がそのまま pH の正確さと精度になるため精密な測定が可能である。しかしながら、両者とも電極や試験紙のサイズがミトコンドリアなどの微小試料に比べ圧倒的に大きいため、それら試料近傍の局所的な pH を測定することはできない。

蛍光顕微鏡法は蛍光分子をレーザーによって励起し、その蛍光波長から pH 値を算出する方法である^[32]。この方法を用いると対象を特異的かつその局在や移動を検出・可視化できることや蛍光波長の違いを利用して、多重染色標本の観察ができるなどの利点がある。しかし、この方法でも、蛍光の褪色や回折限界による分解能の制限などの問題が存在する^[33]。

2.3.4 pH 感受性蛍光色素

周囲溶液の pH に応じて蛍光挙動が変化する色素を pH 感受性色素という。pH 感受性色素には、pH に応じて蛍光強度が変化するものと、蛍光波長が変化するものがある。本研究では蛍光強度が変化する性質をもち、かつ 2 つの蛍光波長の強度が変化する性質を持つ色素を使用して、その蛍光波長の比(レシオ)を求め、pH 値を測定する手法を用いた。これは、蛍光波長が 1 つであると励起光の強度変化による蛍光強度の変化と、pH 値の変化に対する蛍光強度の変化が区別できず、正確な pH 値測定ができない可能性があるからである。したがって、2 つの蛍光波長を持つ色素を用いれば、励起光による蛍光強度の増減はどちらも同じであると考えられ、その比から pH 値を求めれば、励起光による影響を抑制することが可能であると考えられる^{[34],[35]}。

本実験では局所的な pH を測定するために、pH 感受性蛍光色素 SNARF-4F (Invitrogen Inc., USA)を用いた。この色素は 580 nm および 650 nm の 2 つの蛍光波長ピークを持ち、pH5.0～pH8.4 に感度を示す色素で、pH 値によって各蛍光波長のピーク強度が変わる特性がある。Fig. 2.12 にメーカーカタログによる SNARF-4F の蛍光スペクトルを示す^[36]。pH 値が低い酸性側では 580 nm が強く蛍光し、逆に pH 値が高い塩基性側では 650 nm が強く蛍光することがわかる。すなわち、この蛍光波長の強度比 I_{580}/I_{650} (FIR)を求めることで pH がわかる。本実験でもこの性質を利用し、FIR から pH を求めた。

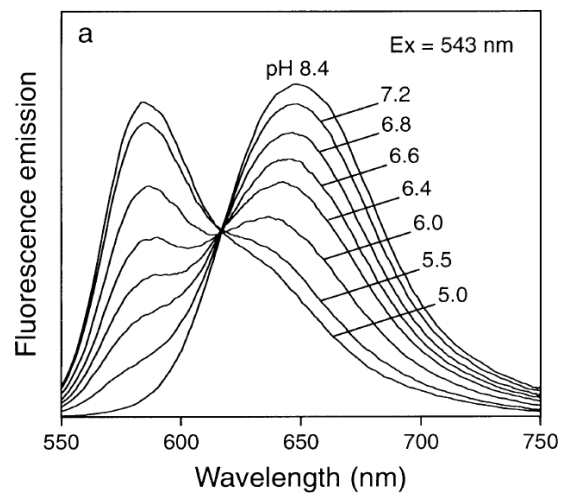


Fig. 2.12 Fluorescent emission spectrum

2.4 装置コンセプト

以上の原理を用いて近接場二光子吸収蛍光計測法の実験装置を構築する。そのコンセプトを Fig. 2.13 に示す。

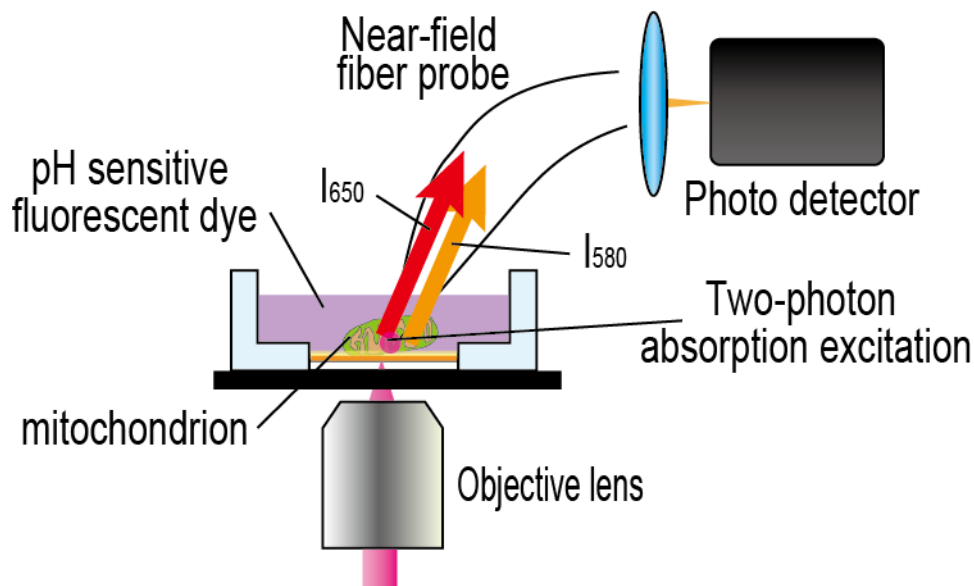


Fig. 2.13 Concept of our setup

レーザー光を対物レンズでサンプルに集光させ、ミトコンドリア近傍で2光子吸収を発生させる。その2光子吸収により発生した蛍光を近接場プローブで散乱させる。その散乱した蛍光を近接場プローブによって集光し、検出器まで導く。この集光し検出器まで導かれた蛍光の580 nmと650 nmの蛍光強度比を求めることでpHを算出する。この方法によってミトコンドリア近傍のpHを局所的に測定することができる。

また後述するが、2光子吸収点ではファイバーに蒸着した金属は泡を出して溶け出してしまう。しかしながら多くの実験で2光子吸収による細胞のin-vivo観測が行われているため、本研究で考えた装置コンセプトでのミトコンドリア活性観測は問題ないと考える。

2.5 まとめ

本章では近接場二光子吸収蛍光計測法について、まず近接場光の発生原理や測定方法、応用先であるSNOMについて述べた。次に2光子吸収についての原理やその特徴について、またその物理的などところも解説した。3番目にミトコンドリアの活性を間接的に評価するpHについて、定義やその測定方法についてpH感受性蛍光色素とともに述べた。最後にこれらを用いて構成した実験装置のコンセプトについて述べた。

第3章 近接場二光子吸収蛍光計測法の実験装置と性能評価

3.1 実験装置とその構成要素

本実験の実験装置の概略図を Fig. 3.1 に示し、蛍光強度比 I_{580}/I_{650} (FIR)算出までの過程を示す。

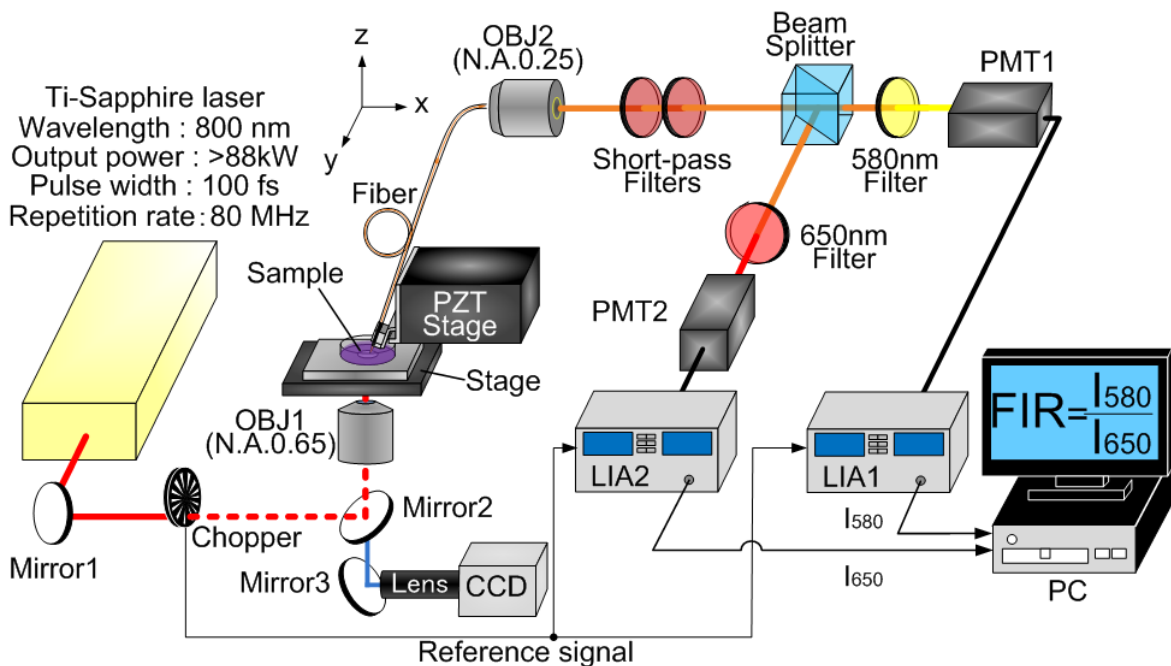


Fig. 3.1 Experimental setup

本実験では2光子吸収を発生させるために、励起光には波長 800 nm のフェムト秒パルスレーザーを使用した。励起光にチョッパーで 230 Hz の強度変調を加え、N.A.0.65 の対物レンズ1(OBJ1)で試料に集光する。焦点付近では2光子吸収によって波長 400 nm の2倍波が発生し、それによって色素を励起し、蛍光を取得する。蛍光はファイバースコープを用いて収集され、励起光成分をカットするためにショートパスフィルターを透過させる。今回は、蛍光強度が励起光よりも格段に小さく、確実に励起光をカットするため、このフィルターを2枚重ねて使用した。その後、蛍光はレシオを測定するために、ビームスプリッタ(BS)によって2分割される。分割された蛍光は580 nm 干渉フィルター、650 nm 干渉フィルターをそれぞれ透過させることで、580 nm、650 nm の波長のみになる。単一波長になった透過光は光電子増倍管 PMT1 および PMT2 で強度検出される。それぞれの PMT からの出力はフィードバック抵抗 10 M Ω で I/V 変換を行った後、2 台のロックインアンプ(LIA1, 2)でチョッパー周波数の 230 Hz で同期検波し、出力の比を求めることで FIR を算出し pH 値を求める。

また、OBJ2 から PMT1, 2 までの光路を Fig. 3.2 のように遮光した。PMT は微量な光でも

応答し、出力が大きく変わってしまう。そうすると正確なレシオが測定できなくなるため、蛍光以外の光を極力防ぐ必要があり、今回は(a)のように光路を遮光し、さらに(b)のようにカバーを付けた。

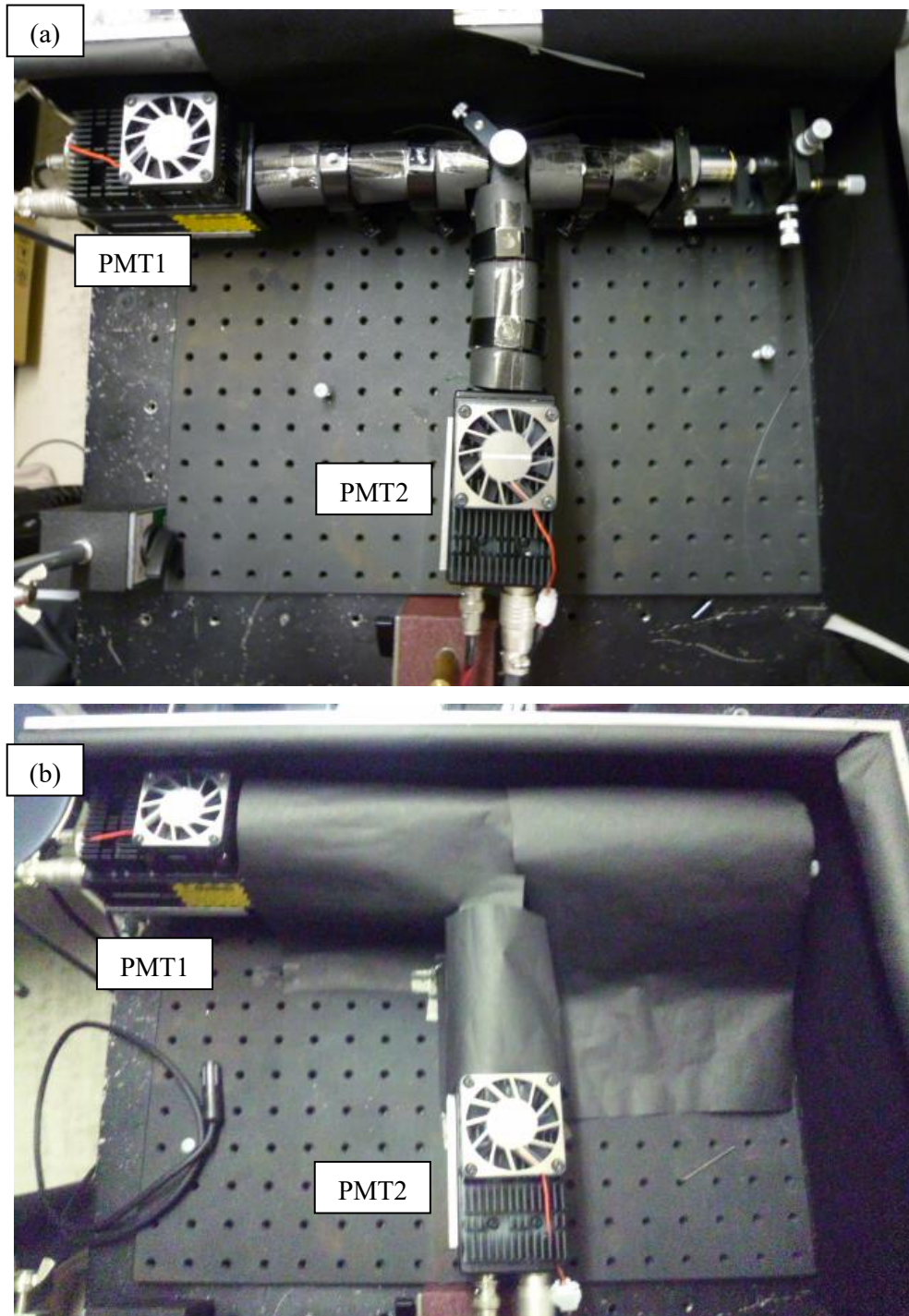


Fig. 3.2 (a) Light shielding of spectroscopic system, (b) Cover of light shielding

- ・フェムト秒パルスレーザー

励起光源には2光子吸収を発生させるためにフェムト秒パルスを出力できるTi-サファイアレーザー(Spectra-Physics : Mai Tai N1ST-E)を用いた。外観を Fig. 3.3 に示す。ピークパワーは >88 kW, 平均出力 700 mW, パルス幅は 80 fs, 繰り返しは 80 MHz である。



Fig. 3.3 Ti-Sapphire laser

- ・ファイバークラウド

局所的に発生する蛍光を局所的にかつ効率よく収集するために光ファイバーを用いた。光ファイバーは引き延ばして先鋭化しプローブ状にした。今回使用したファイバーは S630(Thorlab)で、損失特性は 650 nm で約 10dB/km, 780 nm で約 40dB/km である^[37]。

また、引き延ばしにはマイクロピペットプラー(SUTTER INSTRUMENT : P-2000)による熔融延伸法を用いた。プラー外観を Fig. 3.4 に示す。

このプラーはプログラムにパラメータを入力することでファイバークラウドを作成できるものである。ファイバークラウドを作成した際のパラメータを Tab. 3-1 に示す。まず、LINE1 のプログラムを実行し、その後 LINE 2 のプログラムを実行することでファイバークラウドを作成している。これによって、作成されたファイバークラウドの画像を Fig. 3.5 に示す。



Fig. 3.4 Puller

Tab. 3-1 Parameter of P-2000

	LINE1	LINE2
HEAT	330	330
FIL	0	0
VEL	20	20
DEL	130	100
PUL	120	50

HEAT : レーザー出力
 FIL : フィラメントの種類
 VEL : ガラス柔らかさ
 DEL : 冷却時間
 PUL : 引張力

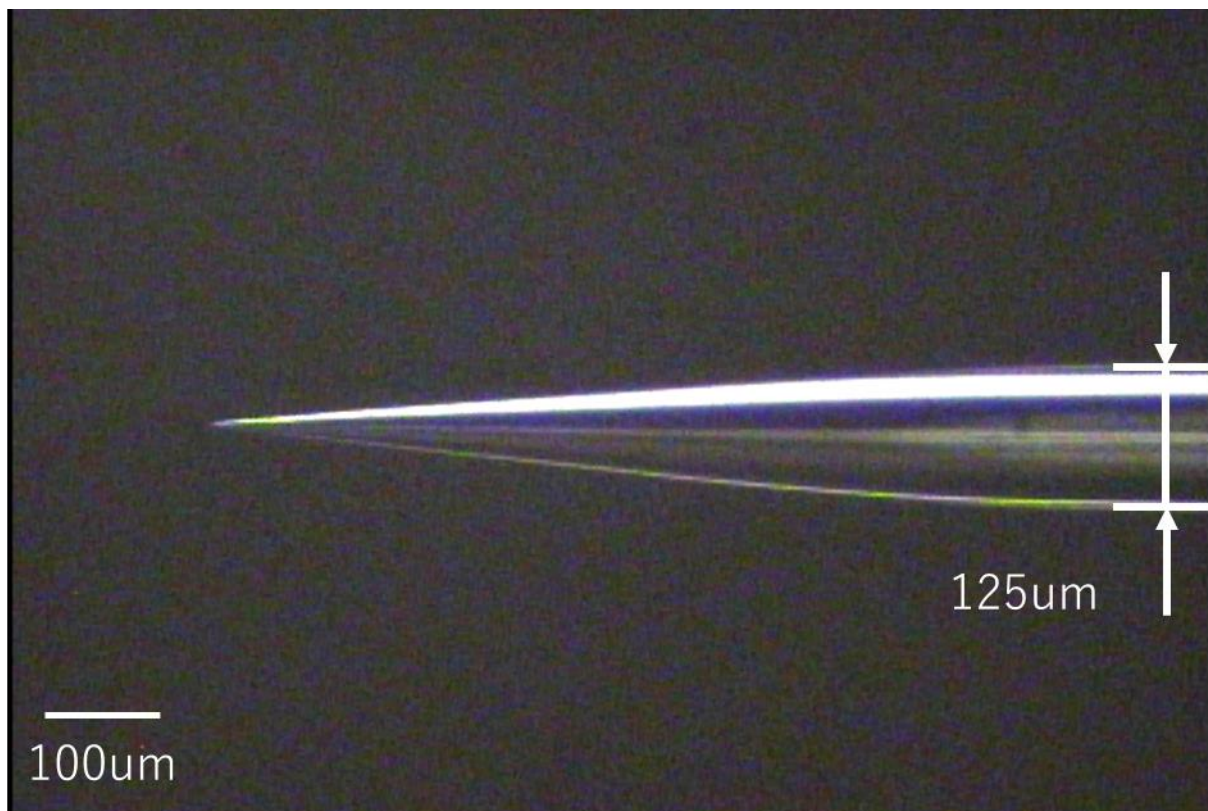


Fig. 3.5 Photograph of fiber probe

また、ファイバークローブに金属蒸着し、金属膜で開口を作製することでスループットは落ちるが、空間分解能を上げて測定することが可能である。本実験でも金属膜の作製を試みたが、2光子吸収点に蒸着したファイバーを近づけると金属膜が溶け始めた、そのため、本実験では金属膜作製をやめ、先鋭化したファイバーのみで実験を継続した。金属蒸着ファイバーよりは分解能は落ちるが、おおよそ1um程度の分解能は有していると思われ、ミトコンドリアの大きさからすると十分だと考えられる。

・ショートパスフィルター

ファイバークローブによって収集された蛍光は、光強度が強い励起光に比べて格段に小さいので、励起光の影響を最小限に抑える必要がある。そこで、本実験ではカットオフ波長 700 nm の高性能ショートパスフィルター(エドモンドオプティクス: 49822-L)を用いた。このフィルターは光学濃度(Optical Density : OD)が 4.0 以上のフィルターである。OD とは透過遮断特性を表す言葉で、OD と透過率(T)の間には以下の式が成り立つ。

$$OD = \log_{10} \frac{1}{T} \dots\dots\dots (3.1)$$

フィルター1枚と2枚の透過特性と波長 700 nm から 900 nm までの OD を実測した結果を

Fig. 3.6 と Fig. 3.7 に示す. 光源にはタングステン-ハロゲンの白色光源(Ocean Optics : LS-1), 分光器には QE65000(Ocean Optics)を用いた. 計測は光源の強さを変え 5 回ずつ計測した.

フィルターを 2 枚用いるとわずかではあるが励起光成分 800 nm の OD が高くなっている. しかし, 用いた分光器のダイナミックレンジが 25000 : 1 である¹³⁸⁾ため, OD4.4 くらいまでしか測定できない. それゆえ, OD4 を 2 枚重ねると OD8 になるはずであるが, このようにほとんど OD に差がない結果になってしまったと考えられる. しかし, 1 枚よりも 2 枚のほうがわずかではあるが OD が高くなるので, 今回は励起光成分の 800 nm の影響を最小限に抑えるため, 2 枚のフィルターを使用した.

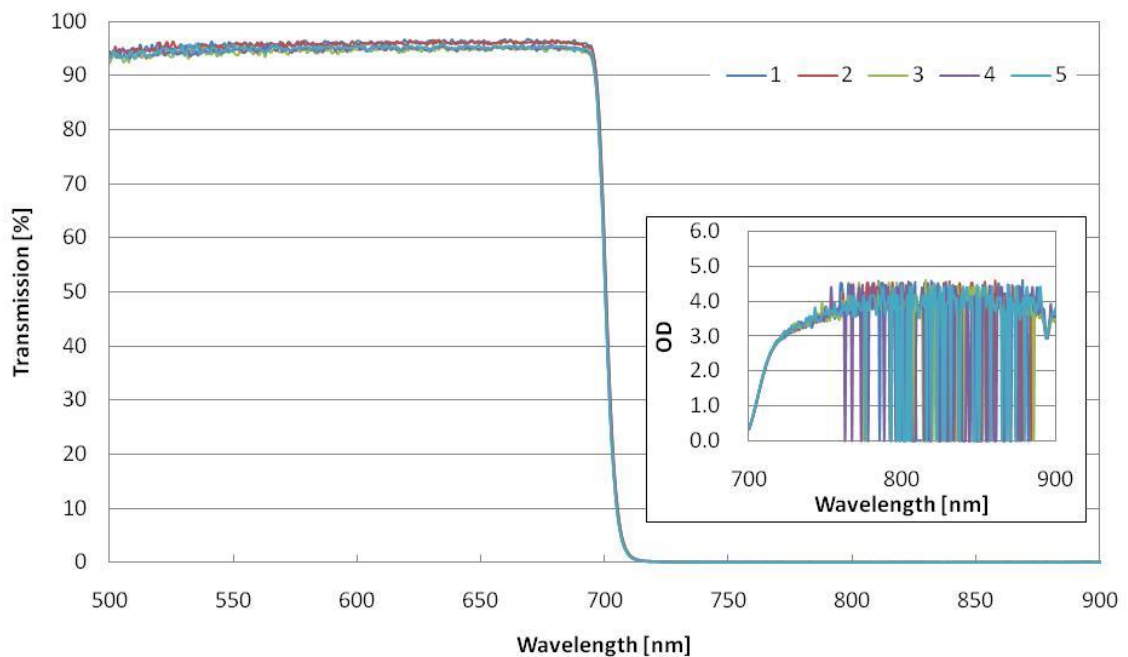


Fig. 3.6 Characteristic of a SP filter

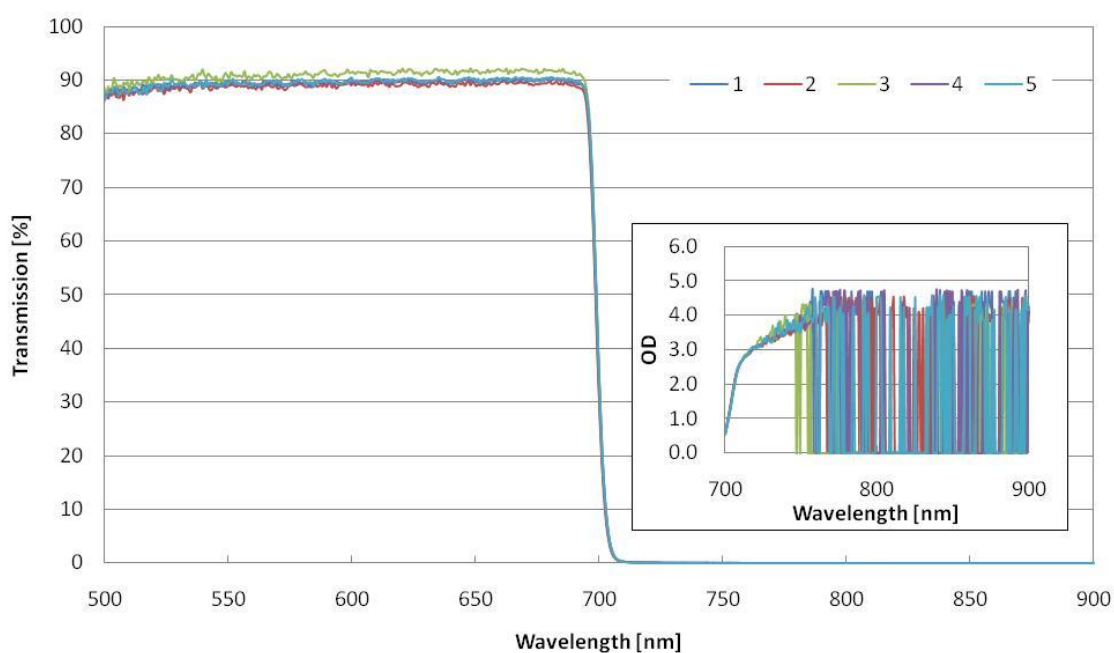


Fig. 3.7 Characteristic of two SP filters

・ビームスプリッター

蛍光比を算出するためには蛍光を 2 分割する必要がある。そのため、キューブ型無偏光ビームスプリッター(BS:エドモンドオプティクス:47008-L)を用いて蛍光を 2 分割した。今回、ダイクロミックミラーの使用も考えられたが、その性質上、特定の波長のみを反射もしくは透過するため、分割された蛍光に差が生じる可能性があるため、本研究では無偏光 BS を用いた。

そこで、BS の透過・反射特性を計測した。Fig. 3.8 に計測系を、Fig. 3.9 に得られた BS の特性を示す。Fig. 3.9 の縦軸は、蛍光が透過する側の出力を反射する側の出力で割ったものである。光源にはタングステン-ハロゲンの白色光源(Ocean Optics : LS-1)を用い、分光器には QE65000(Ocean Optics)を用いた。計測は光源の強さを変えて 4 回計測した。

Fig. 3.9 より、短波長のほうが透過しやすく、長波長は反射しやすい結果が得られた。これにより、蛍光を検出する際に BS を透過側で 580 nm の蛍光強度を、反射する側で 650 nm の蛍光強度を検出すれば最適であることがわかる。よって、本実験では今述べたように分光光学系を構築した。

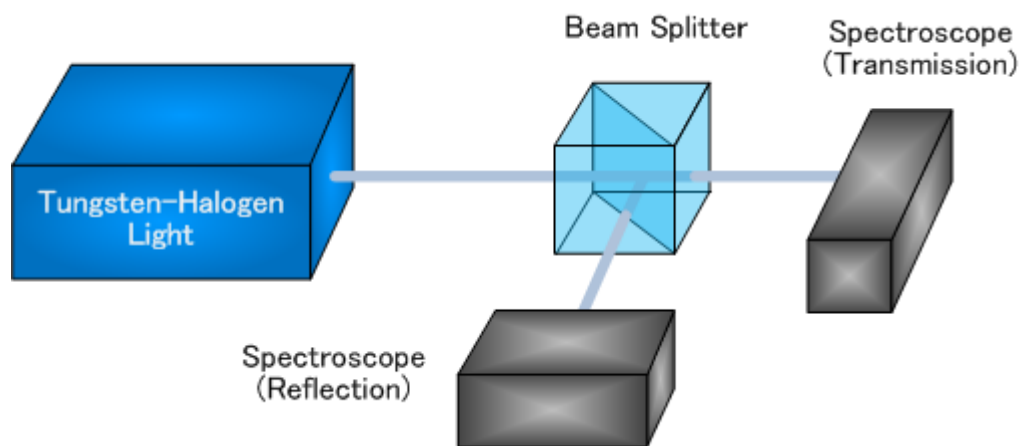


Fig. 3.8 Experimental setup for measurement of BS characteristic

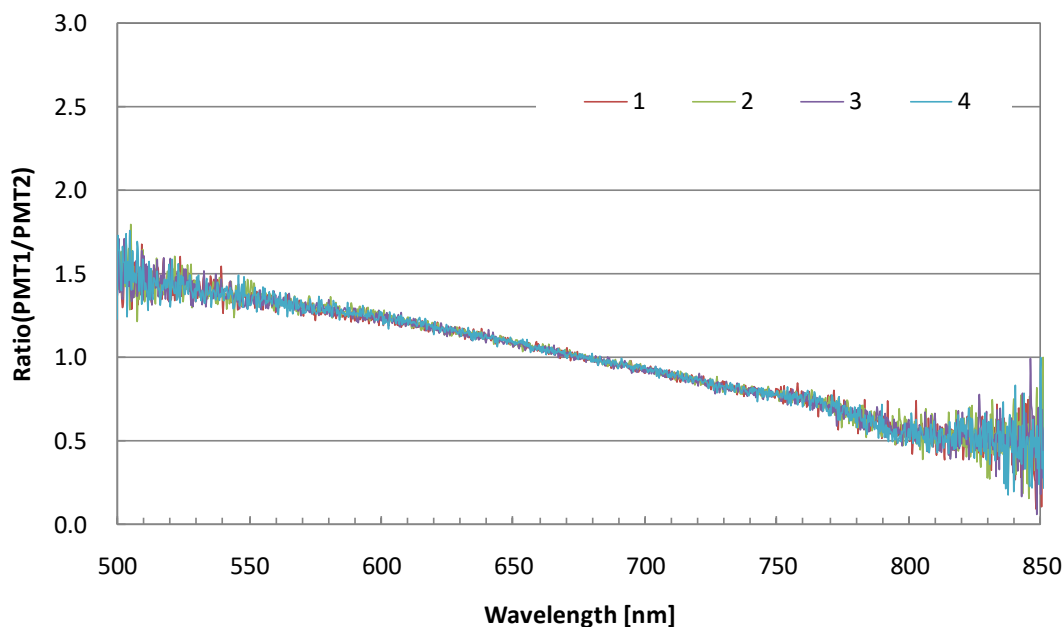


Fig. 3.9 Characteristic of BS

・干渉フィルター

580 nm, 650 nm の蛍光を分離するために, それぞれ 580 nm 干渉フィルター(エドモンドオプティクスジャパン : 65706-L), 650 nm 干渉フィルター(同 : 65715-L)を透過させた. それぞれの特性を Fig. 3.10, Fig. 3.12 に示す. また, 各フィルターの OD を Fig. 3.11, Fig. 3.13 に示す. 光源にはタングステン-ハロゲン白色光源(Ocean Optics : LS-1), 分光器には QE65000(Ocean Optics)を用いた. また計測は光源の強さを変え 12 回ずつ計測した.

Fig. 3.10 から 580 nm フィルターの半値全幅は 10 nm, 中心波長は 579 nm であり, Fig. 3.12 から 650 nm フィルターの半値全幅は 8 nm, 中心波長は 648 nm であることがわかる. また,

Fig. 3.11 から、580 nm フィルターでは半値全幅以外の波長は OD が 1.5~2.0 であり、Fig. 3.13 から、650 nm フィルターでは半値全幅以外の波長は OD が 1.0~3.0 であった。これらから、測定波長以外(半値全幅外)の波長においては、この干渉フィルターによって遮断することができ、色素から得られた蛍光から 580 nm と 650 nm の蛍光強度を計算するのは問題がないと考えられる。

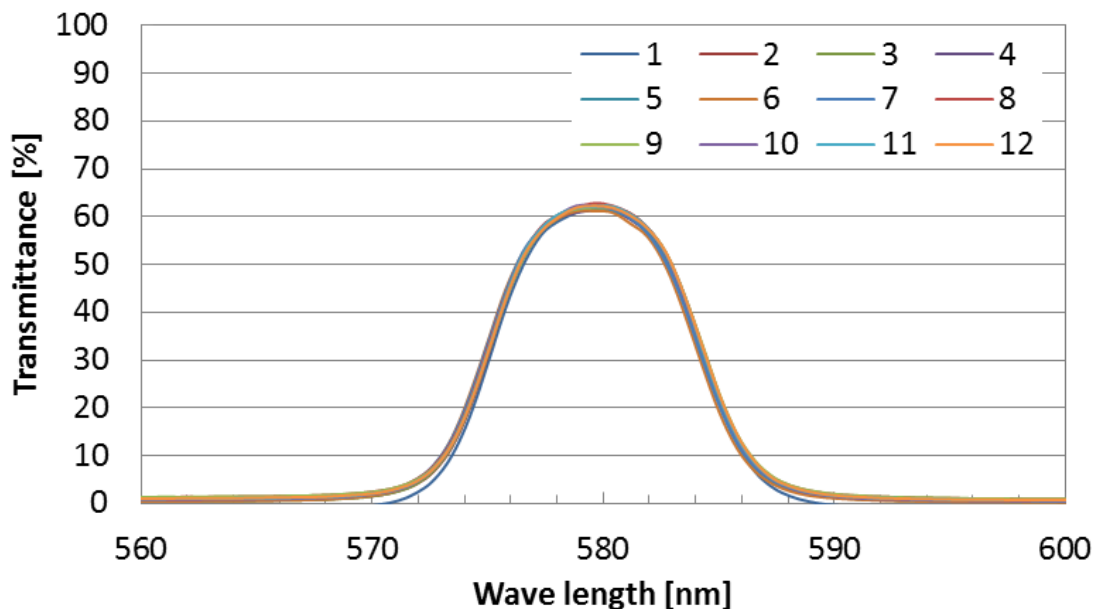


Fig. 3.10 Characteristic of 580 nm-filter

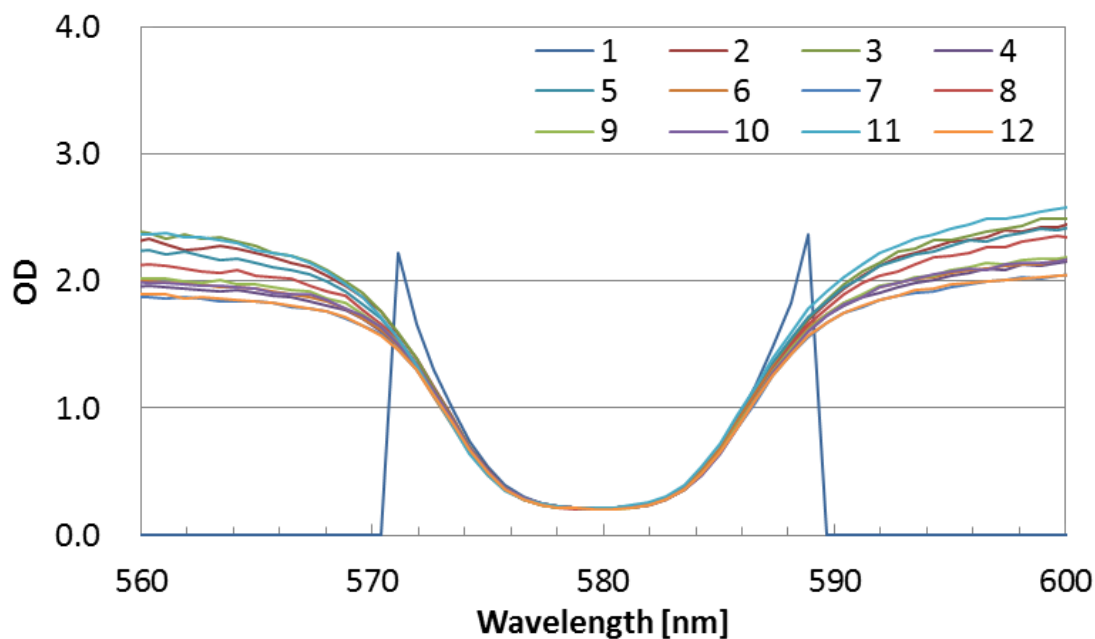


Fig. 3.11 OD of 580 nm-filter

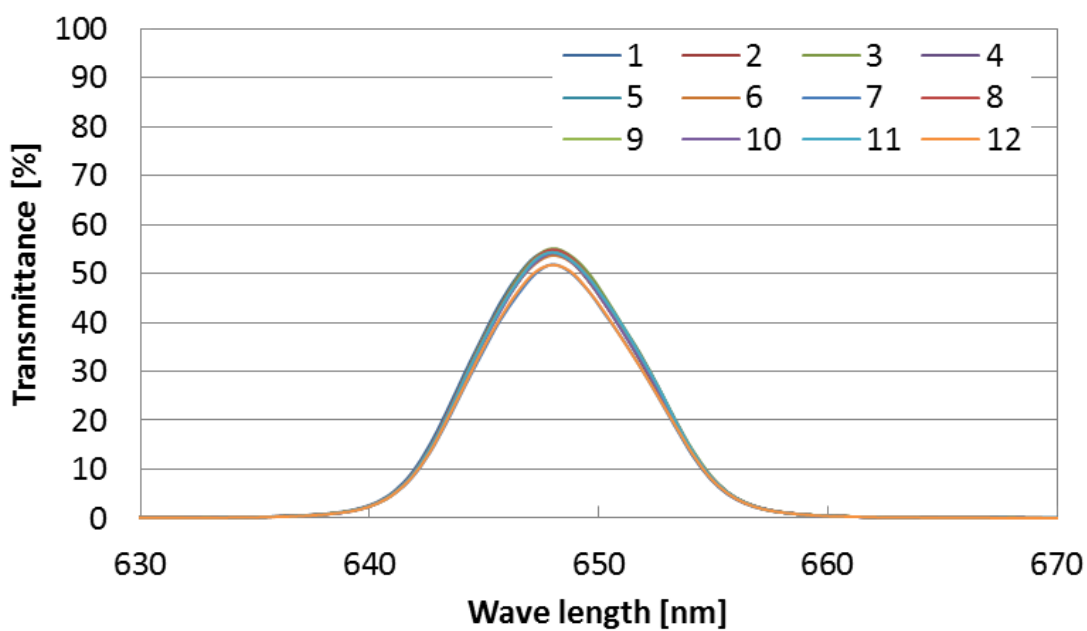


Fig. 3.12 Characteristic of 650 nm-filter

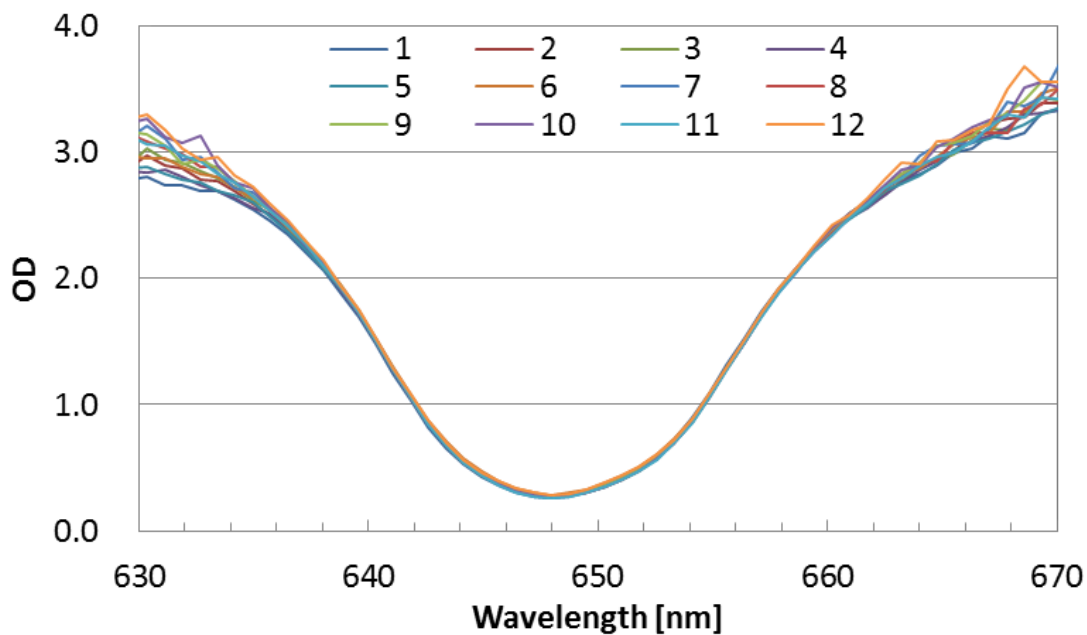


Fig. 3.13 OD of 650 nm-filter

・光電子増倍管

蛍光の強度検出には冷却光電子増倍管 H7422-40(PMT: 浜松ホトニクス)を用いた。今回、光源が光強度の強いフェムト秒レーザーであり、光電面にレーザー光が入射すると光電面の温度が上昇し、サーマルノイズが発生する。しかし、冷却 PMT ならば、光電面を効果的に冷

却でき、サーマルノイズを低減し、微弱光領域で高 S/N 比が得られるため、冷却 PMT を採用することにした。本実験で用いた冷却 PMT の感度特性を Fig. 3.14 に示す。

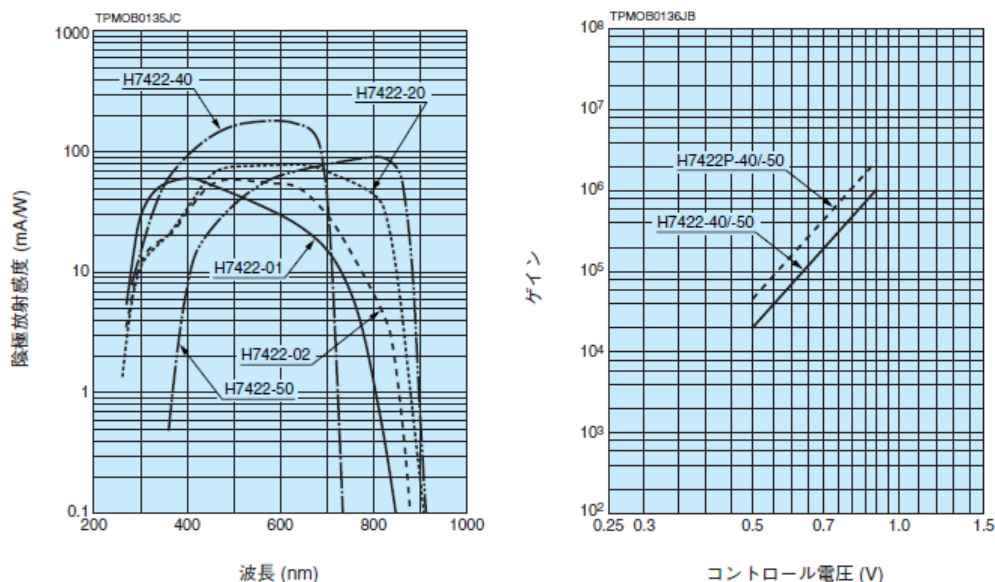


Fig. 3.14 Characteristics of photomultiplier tube^[39]

- ・ロックインアンプ

PMT からの出力をチョッパ周波数で同期検波するために 2 位相 DSP ロックインアンプ 7225(LIA)を用いた。励起光に強度変調を加えると蛍光もその周波数で蛍光するため、PMT からの出力も同じ周波数で出力される。この出力を LIA で同期検波することで、PMT 出力をノイズに埋もれることなく検出することができる。

本実験では励起光にチョッパによって強度変調を加える。これは、LIA を用いて PMT の出力を同期検波するためで、前述したように PMT 出力をノイズに埋もれることなく検出できる。そこで、今回はチョッパによる強度変調を交流電源の周波数が混信する可能性があるため 50 Hz の倍数を避け、230 Hz に設定した。また、LIA の検出波形の積分時間を決める時定数は、100 ms に設定した。

- ・光電子増倍管のコントロール電圧調整

各光学素子は前述した特性を持つ。蛍光を測定するために、PMT の感度を定めるコントロール電圧を、これらの特性を加味したうえで調整する必要がある。そこで、コントロール電圧を設定するための概略図を Fig. 3.15 に示す。

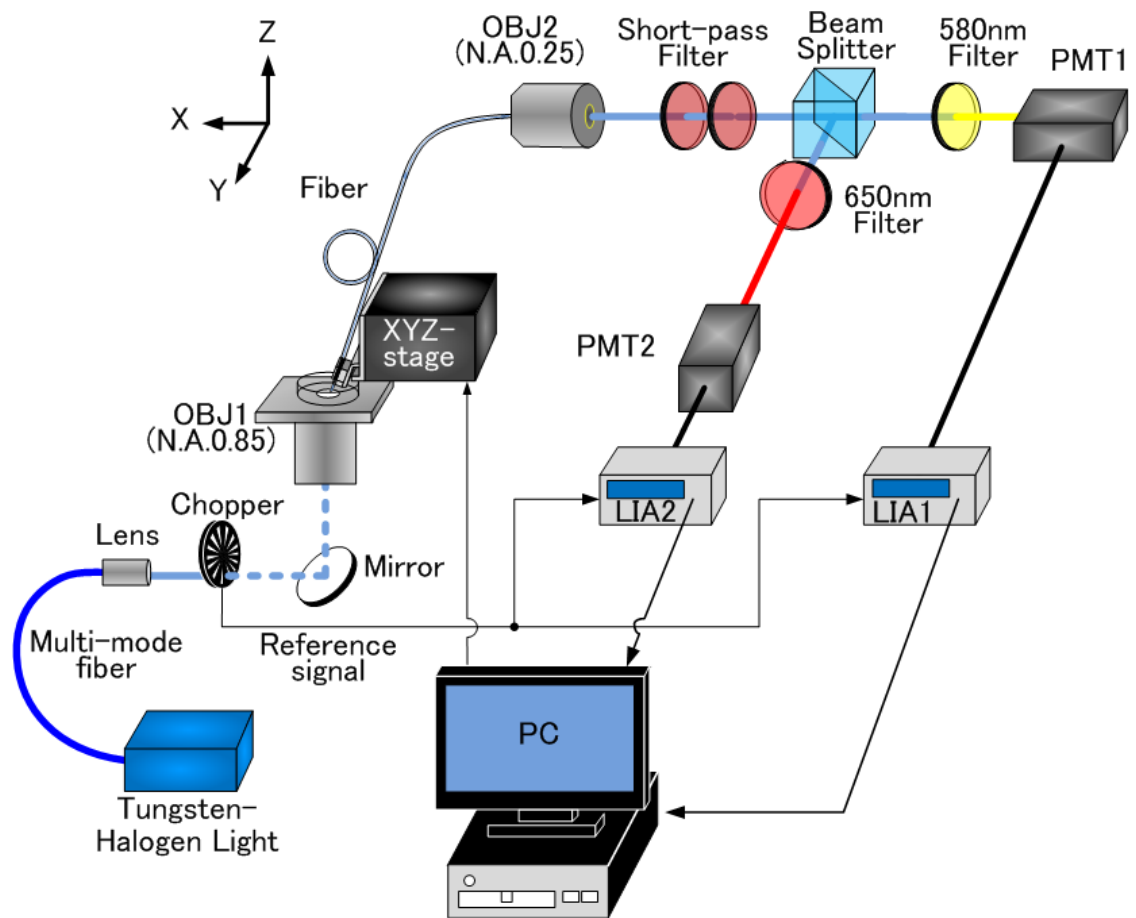


Fig. 3.15 Experiment setup for PMT calibration

光源を射出した光はレンズ付きマルチモードファイバー(Ocean Optics : P400-025-SR)を透過し、チョッパーで強度変調が加えられ、対物レンズ 1(OBJ1)でファイバープローブに集光される。その後、ショートパスフィルターを透過し、BS で分割される。分割された光はそれぞれ 580 nm フィルター、650 nm フィルターを透過した後、PMT で強度検出される。

その後、LIA の出力をあらかじめ計測しておいたタングステン-ハロゲン白色光源(Ocean Optics : LS-1)の 580 nm と 650 nm のスペクトル比になるように PMT のコントロール電圧を調整する。その光源のスペクトル強度を、650 nm の強度を 1 として標準化し、Fig. 3.16 に示す。

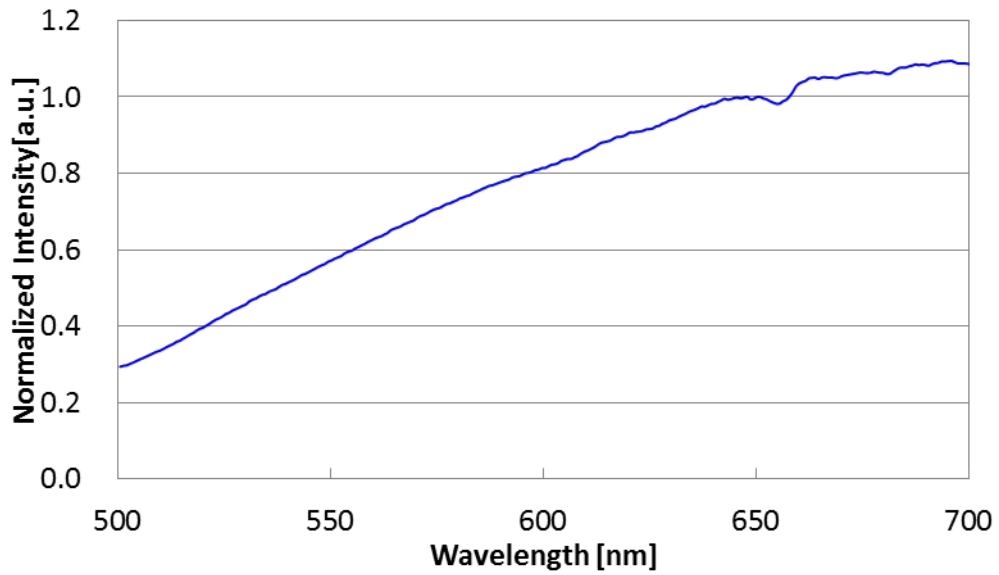


Fig. 3.16 spectral intensity of tungsten-halogen light

Fig. 3.16 から $I_{580nm}/I_{650nm} \approx 0.75$ になる. この値になるように LIA の出力を調整すると, PMT のコントロール電圧は PMT1 が 0.645 V, PMT2 が 0.553 V であった.

・対物レンズの開口数と焦点深度及び 2 光子吸収領域との関係

本実験では試料内集光用対物レンズ(OBJ1)に開口数(以下 N.A.) 0.65 の対物レンズを用いた. N.A.とは, 分解能, 焦点深度(レンズが動いたときにピントが合っている距離), 明るさなどの対物レンズの性能を判断するための指数であり, 次の式で表される.

$$\text{N.A.} = n \times \sin \theta \dots\dots\dots (3.2)$$

ここで n はレンズと試料間の媒質の屈折率, θ は光軸と一番外を通る光線のなす角である (Fig. 3.17).

レンズ-試料間の媒質を空気($n=1$)とすると, N.A.が高い場合(Fig. 3.17(a)), $\sin \theta$ が大きくなる. つまり, θ が大きくなり, 焦点深度が浅くなる. 逆に, N.A.が小さくなる(Fig. 3.17(b)) と, $\sin \theta$ が小さくなる. つまり, θ が小さくなり, 焦点深度が深くなる.

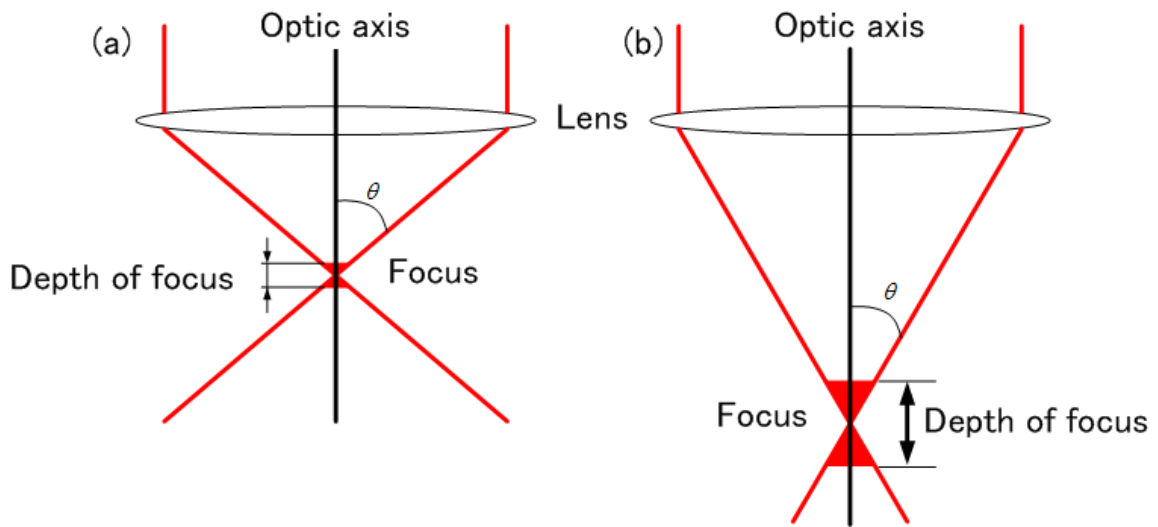


Fig. 3.17 (a) high numerical aperture and (b) low numerical aperture

多くの2光子吸収の研究において、対物レンズの開口数は高開口数のものが用いられている。これは、N.A.が大きければ焦点深度が浅くなり、2光子吸収に必要な光強度が得られる領域が小さくなって、分解能が向上するからである。Fig. 3.18 と Fig. 3.19 に異なる N.A. で測定した蛍光領域の比較を示す。グラフは最大値を1とし、標準化してある。

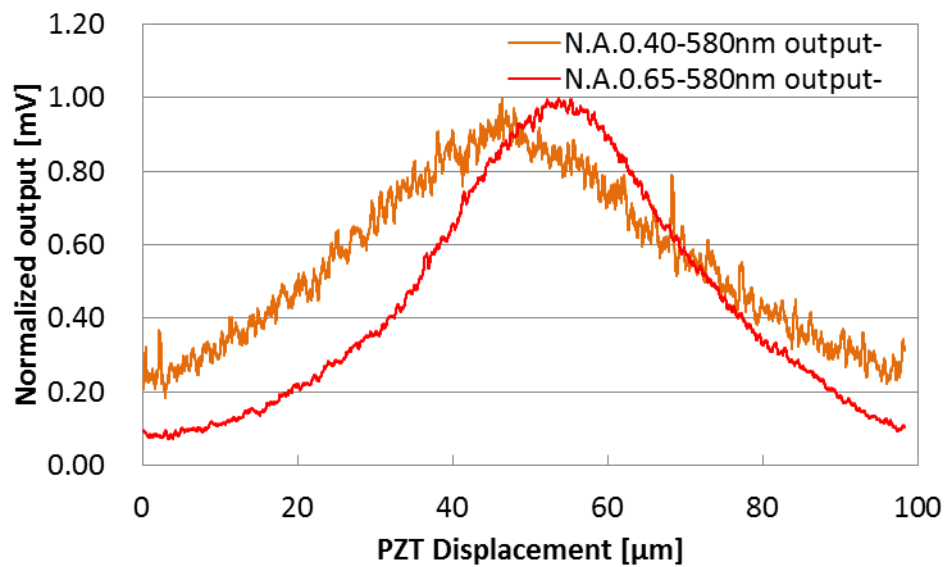


Fig. 3.18 Comparison with 580 nm fluorescent output of different N.A.

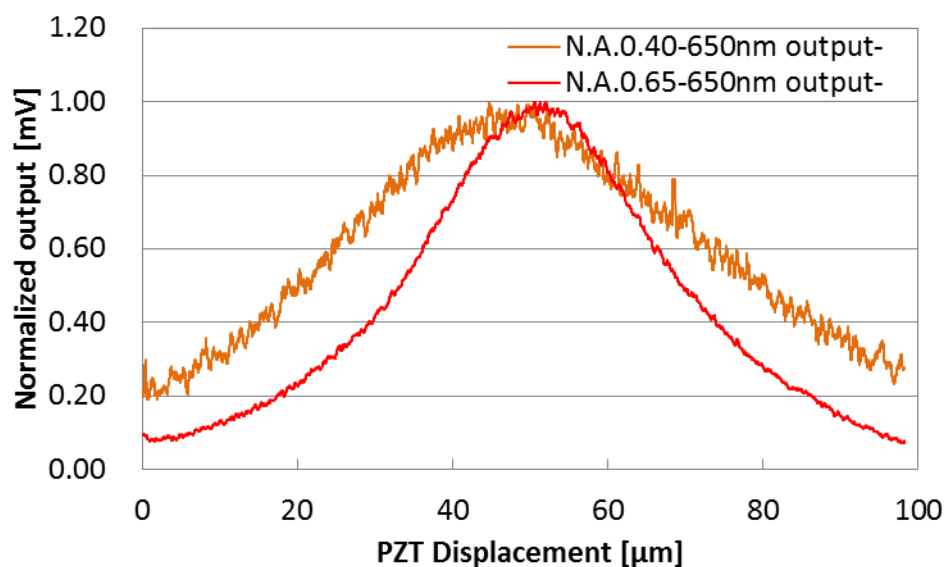


Fig. 3.19 Comparison with 650 nm fluorescent output of different N.A.

これらから、580 nm, 650 nmともにN.A.0.40のときはFWHMは約60 μm なのに対しN.A.0.60では約35 μm と約25 μm の差が発生し、高開口数のほうが波形がシャープになった。したがって、N.A.が大きなものの方が、蛍光領域が狭くなるということがわかる。

よって本実験でもN.A.0.65の高開口数の対物レンズを用いて、狭い領域で2光子吸収を発生させ、蛍光分子を励起した。

3.2 2光子吸収励起による蛍光の確認

pH測定を行うに前に、2光子励起によってSNARF-4Fの蛍光が得られるか、またその蛍光がどのくらいの時間安定して蛍光するか確認するために蛍光持続時間を測定した。

3.2.1 実験方法

ボトムディッシュにFig. 3.20のように中央部のカバーガラス上に半球状になるように色素溶液300 μl を滴下した。トリス緩衝液のpHはpH5.0, 6.0, 7.0の3種類、色素溶液のSNARF-4Fの濃度は0.02 mMである。フェムト秒パルスレーザーを試料内に集光させ、60分間蛍光させて、580 nm, 650 nmの蛍光強度を測定し、FIRを計算した。

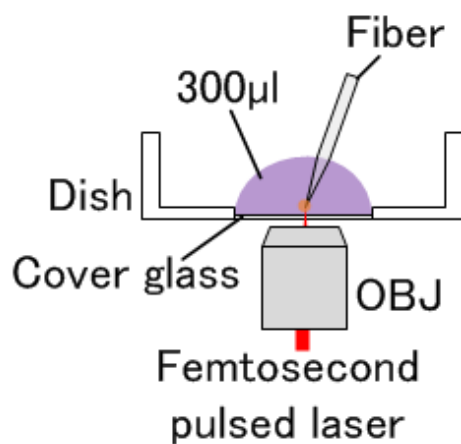


Fig. 3.20 Experimental setup for fluorescence duration

3.2.2 実験結果と考察

実験結果を Fig. 3.21～Fig. 3.23 に示す. Fig. 3.21～Fig. 3.23 において (a)は 580 nm の蛍光強度と 650 nm の蛍光強度, (b)は FIR である. また(b)の FIR のグラフには, 3.3 で求めた pH 校正曲線を用いて, FIR の値を pH 値に変換したものを第 2 軸に載せてある. さらに, Fig. 3.21～Fig. 3.23 の(b)から FIR の平均と標準偏差を計算した結果を Fig. 3.24 に示す.

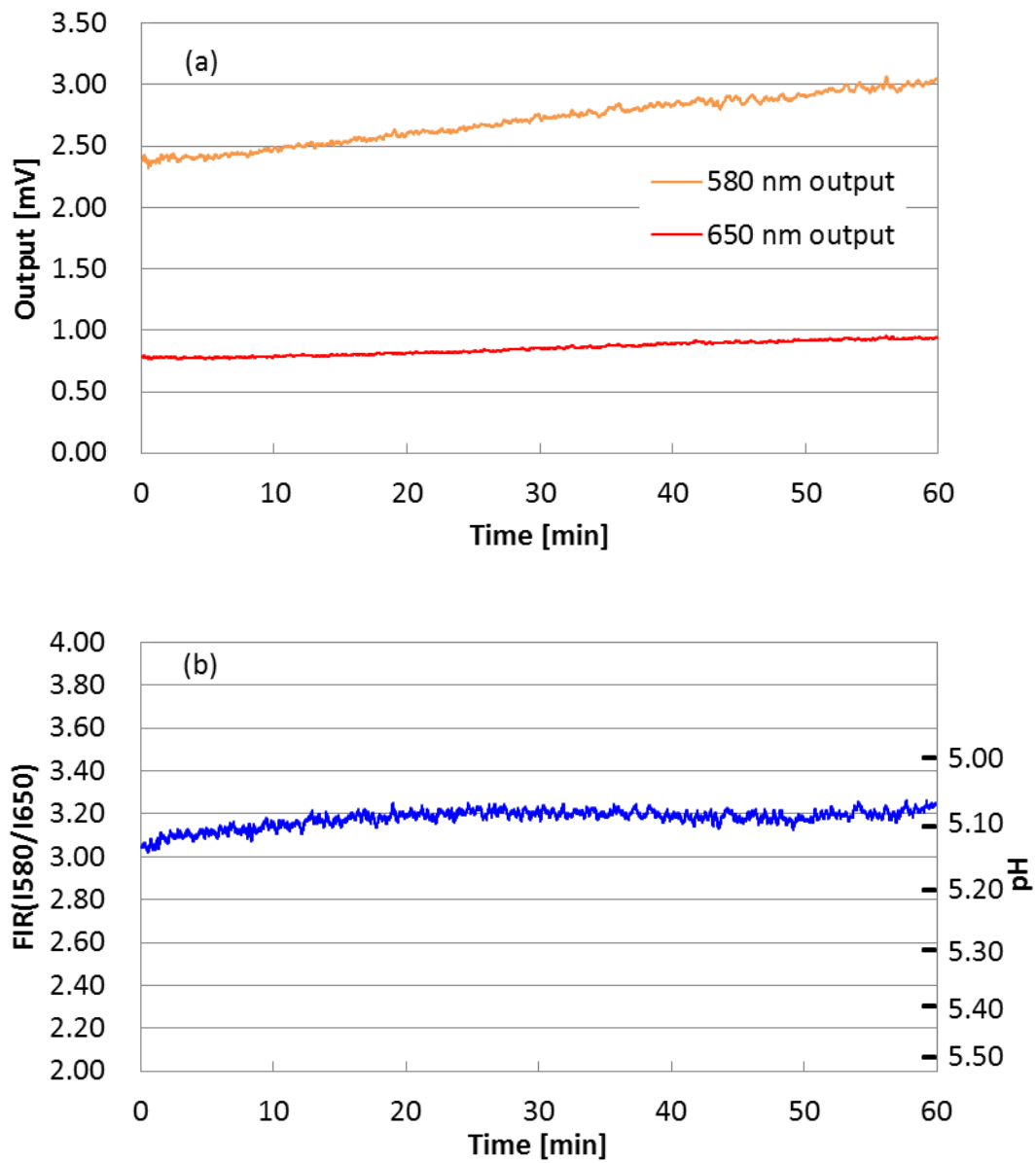


Fig. 3.21 (a) 580 nm and 650 nm fluorescence duration and (b) FIR at pH5.0

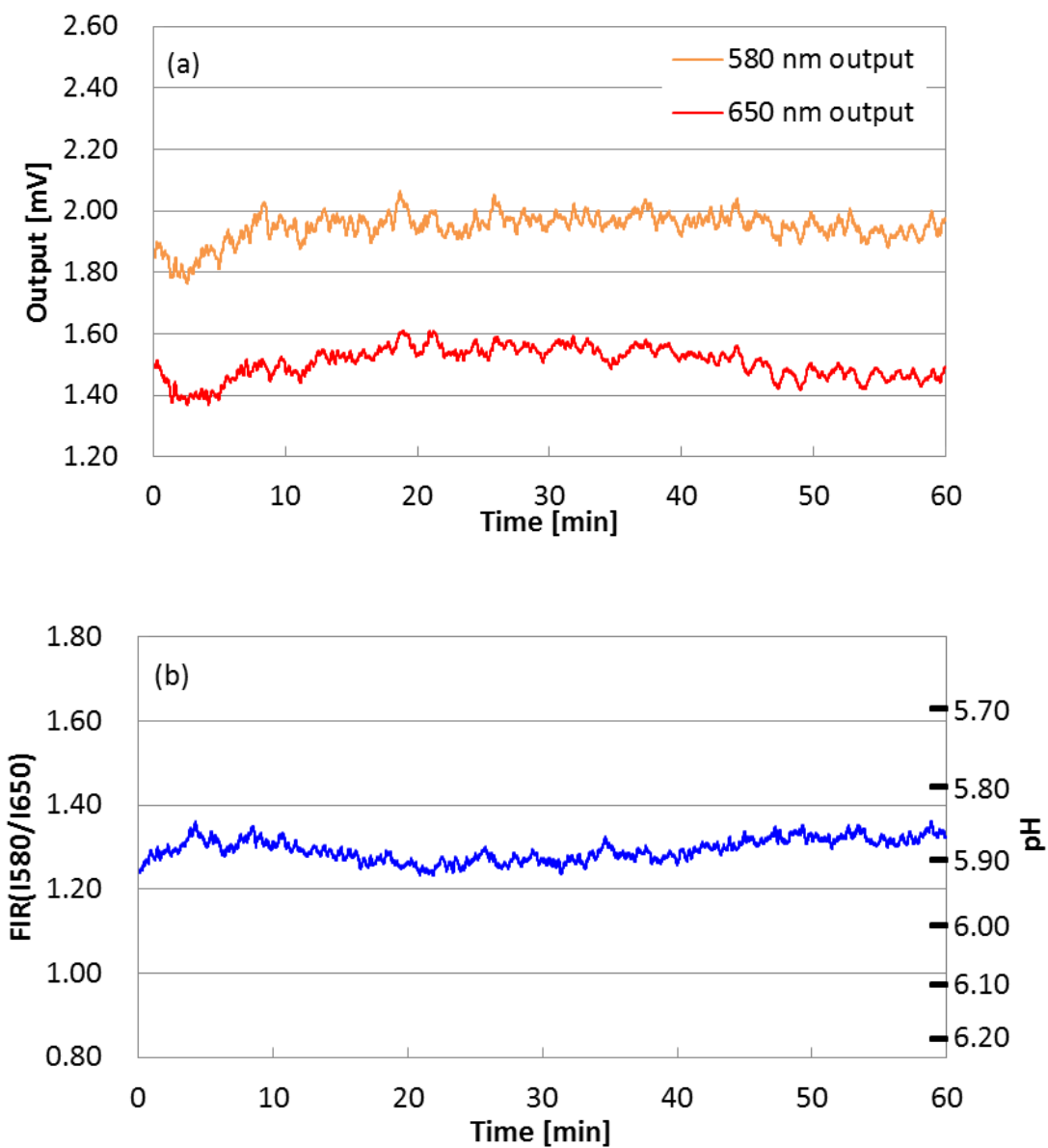


Fig. 3.22 (a) 580 nm and 650 nm fluorescence duration and (b) FIR at pH6.0

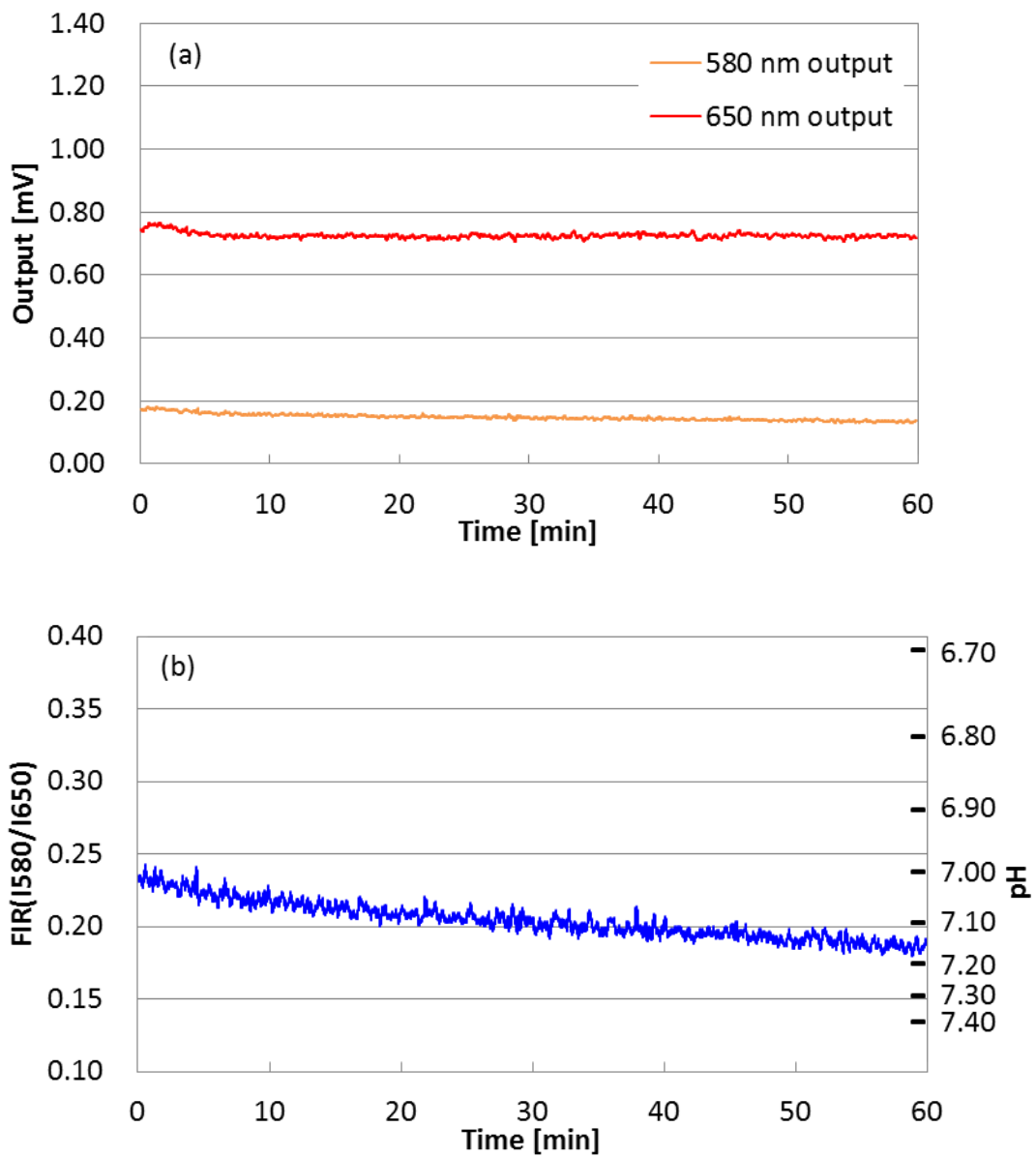


Fig. 3.23 (a) 580 nm and 650 nm fluorescence duration and (b) FIR at pH7.0

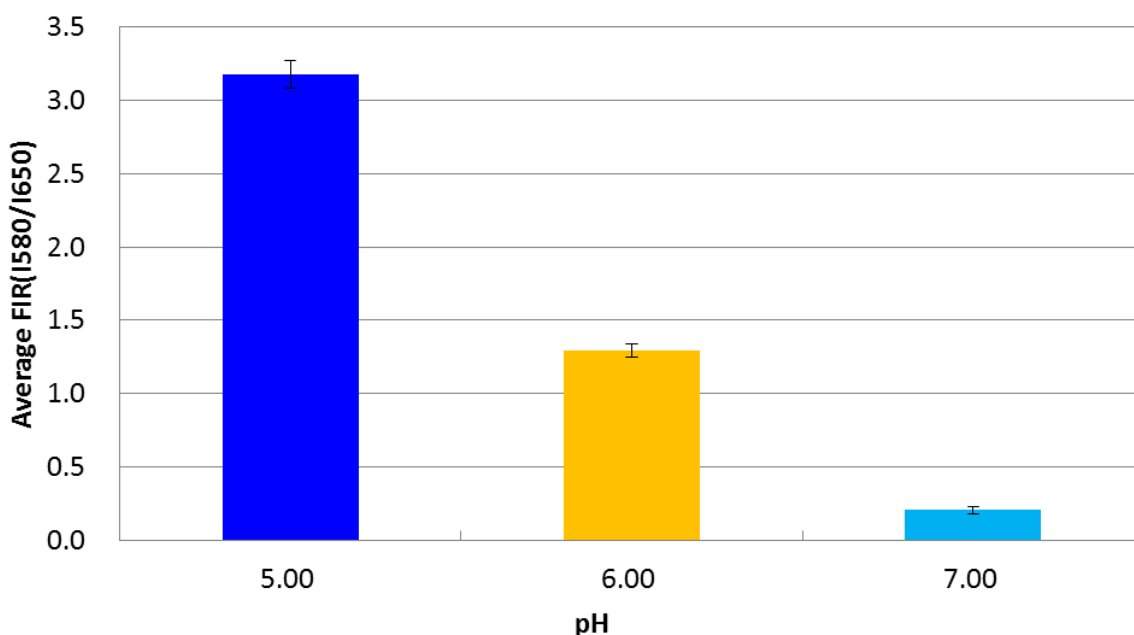


Fig. 3.24 Relation of pH-FIR

pH5.0では時間が経つにつれ、2つの蛍光波長の強度が徐々に強くなっていった。また、pH6.0の蛍光の出力では、測定開始10分間は安定性に欠けるものの、それ以降は安定した蛍光強度が得られた。pH7.0では終始安定した蛍光が得られた。これは4.1.1で示したようにトリス緩衝液の緩衝域がpH7.2~であるため、pHが低くなれば、緩衝域を外れるため、外因によるpH変化が顕著に表れるためであると考えられる。

また、FIRの標準偏差が、pHが低くなると大きくなった。これは、pHが低くなるとノイズが大きくなることを示している。この原因は、pHが低くなるにつれて580 nmの蛍光波長の出力が650 nmの蛍光波長の出力よりもノイズが大きくなるためである。これは前述した、緩衝域の問題によるものと考えられ、緩衝域を外れたため、S/N比が悪くなったと考えられる。それゆえ、pH5.00のほうがpH7.00に比べてFIRのノイズも大きくなったと考えられる。しかし、各pHともに2つの蛍光波長の出力の増減がほぼ同じであるため、FIRがそれにより大きく増減するような挙動は見られない。

以上より、2つのピーク波長の蛍光が60分間得られることが確認されるとともに、FIRを求めることで励起光、もしくは蛍光色素の揺らぎを相殺し、蛍光強度の増減に関係なく、安定したFIRが得られることが示された。したがって、本手法でミトコンドリア活性をpHを測定することにより、評価することが可能であると考えられる。

3.3 2光子吸収によるpH較正曲線と単光子吸収によるpH較正曲線の比較

本研究ではpH感受性蛍光色素SNARF-4Fを用いた。しかしこの色素は、2光子吸収用に関

発されたものではないため、蛍光を測定し、pH 値を算出するために溶液の pH 値に対する FIR 特性を知る必要がある。そこで、既知の pH 値の色素溶液の蛍光波長の FIR を算出することで pH 値較正曲線を作成した。また、その較正曲線が単光子吸収(532 nm 励起)およびデータシートとどの程度相関があるのか確認した。

3.3.1 実験方法

ボトムディッシュに Fig. 3.25 のように中央部のカバーガラス上に半球状になるように既知の pH 値の色素溶液を 300 μ l を滴下し、フェムト秒パルスレーザーで励起させ、50 分間蛍光させた。また、単光子吸収では光学系はそのまま、励起光を 532 nm YAG レーザーに変更することにより実験を行った。色素溶液の SNARF-4F の濃度は 0.02 mM である。色素の pH 感受範囲が pH5.0~pH8.4 であるため、pH5.00~8.50 まで 0.50 おきに 9 つの pH 値で、各 pH 値 5 回計測した。

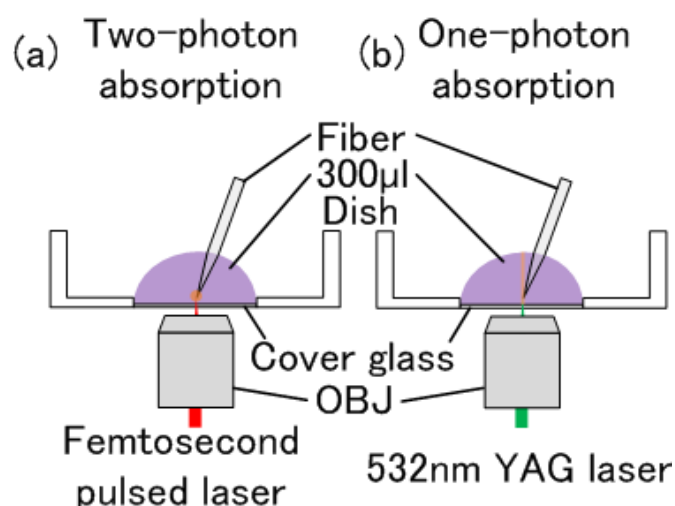


Fig. 3.25 Experimental setup for measurement of Fluorescent intensity ratio

(a) two-photon absorption (b) one-photon absorption

3.3.2 実験結果と考察

2 光子吸収、単光子吸収ともに各 pH 値で 5 回測定したうちの最大値、最小値を除く 3 回分の平均を求め、プロットした結果を Fig. 3.26 に示す。さらに、Fig. 2.12 から読み取った結果も同時に示す。グラフからわかるように 2 光子吸収でも単光子吸収やデータシートと同様、pH5.00~7.00 において FIR の大きな変化が得られた。また 2 光子吸収とデータシートとの相関係数は 0.984、単光子励起との相関係数は 0.993 と非常に高い相関が得られた

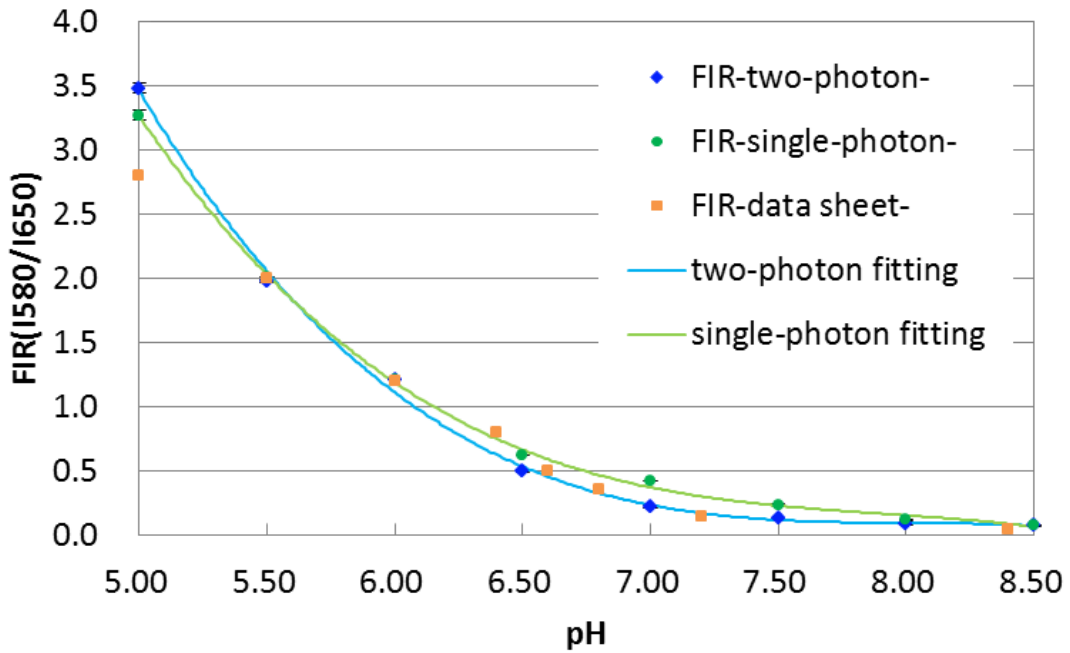


Fig. 3.26 Comparison of measured FIR with FIR of data sheet

このデータシートのデータは、単光子励起で励起光の波長が 543 nm, さらに分光器による結果であり, 本実験とは条件が違うが, pH が高いところではほぼ等しい値になった. しかし, pH が低い, 特に pH が SNARF-4F の感度ぎりぎりの pH5.0 では FIR に約 20 % の差が発生した. これはトリス緩衝液の緩衝域が pH7.2 ~ であるため, pH が低くなれば, 緩衝域を外れるためと考えられる. さらに, 単光子吸収で計測した結果においても, データシートと約 20 % の差が発生し, 2 光子吸収に近い値を取っている. したがって, 測定結果とデータシートに見られた差は, FIR の測定方法によるものと考えられる.

Fig. 3.26 の各 FIR の偏差を考慮しても各 FIR の値と pH 値が区別できること, また 2 光子吸収とデータシート及び単光子励起との非常に高い相関を持つことは, 2 光子吸収でこの色素を励起し, 得られた FIR から pH が算出可能であることを示している. さらに pH5.0 ~ 7.0 の範囲で FIR の大きな変化が得られたことは, pH が中性から弱酸性に変化するミトコンドリアにおいて, この校正曲線を基にして pH 値を求めることが可能であることを示しているものとする. これ以降はこの測定結果から得られたフィッティング曲線を算出すると

$$\text{FIR} = -0.1219(\text{pH})^3 + 2.925(\text{pH})^2 - 23.443\text{pH} + 62.772 \dots\dots\dots(3.3)$$

となる.

(2.12)の酸解離の式から考えると対数でのフィッティングにすべきであると考えたが, 対数関数でフィッティングを行うと Fig. 3.26 を精度良く再現できないため, 本研究では 3 次関数でフィッティングを行った.

この式を用いて測定された FIR から pH 値を算出する.

3.4 プロトン滴下による pH の時間変化の観測

pH の時間変化を観測できるか確認するために, 色素溶液に 1 M の塩酸(HCl) 10 μ l を流し込むか滴下し, FIR の変化を観測した.

3.4.1 実験方法

ボトムディッシュに pH7.0 のトリス緩衝液 3 ml を充填し, フェムト秒パルスレーザーを集光させ, 蛍光を取得する. 測定開始 10 分後に HCl をファイバー先端から 10 mm 及び 18 mm の位置に流し込むか(Fig. 3.27)滴下し(Fig. 3.28), その後の FIR の変化を観察する. 今回, “流し込み” は色素溶液内で HCl をピペットから注入することを意味し, “滴下” は色素溶液の液面に HCl を液滴状にした上で注入することを意味する. また, 色素溶液の SNARF-4F の濃度は 0.02 mM である.

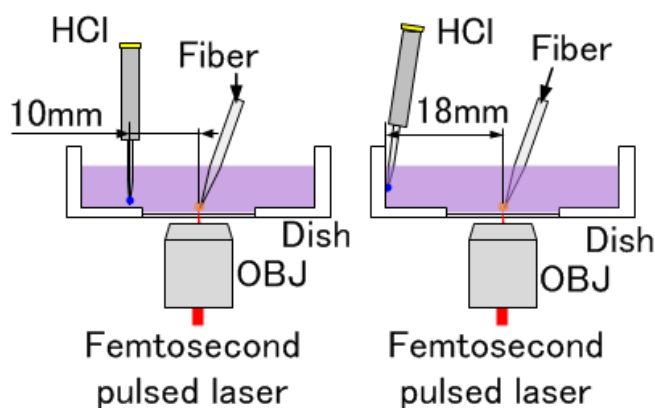


Fig. 3.27 Experimental setup for diffusion response of pouring acid solution

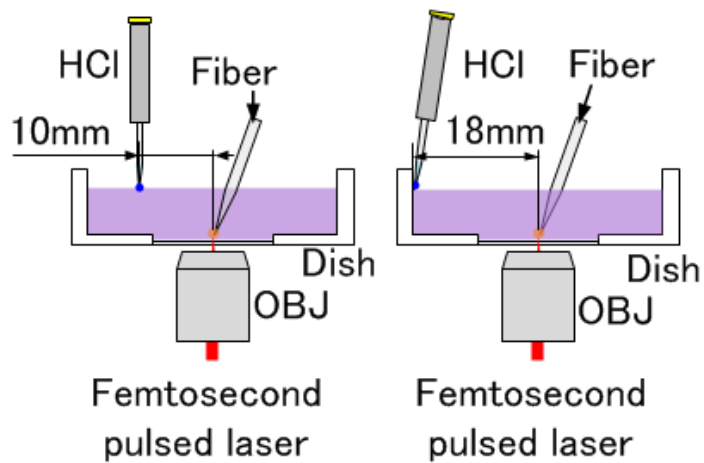


Fig. 3.28 Experimental setup for diffusion response of dropping acid solution

3.4.2 実験結果と考察

HClの注入方法、注入距離の違いによるFIR変化をpH変化に換算し直した結果をFig. 3.29に示す。ファイバー先端との距離が10mmのとき、HClを流し込むと、その後約1分程度でpHが急激に上昇し、滴下すると約6分程度で上昇し始める。18mmの場合では、HClを流し込むと、その後約10分程度でpHが急激に上昇し、滴下すると約13分程度で上昇し始めることがわかる。10mmと18mmの注入手法の違いによるpH変化開始までの時間差は、約7~9分という結果が得られた。さらに、pHの変化率も流し込みと滴下で、流し込みのほうが滴下よりもpHの変化が急であるという結果も得られ、この時の変化にかかった時間は流し込みで約0.1s、滴下で約2分である。

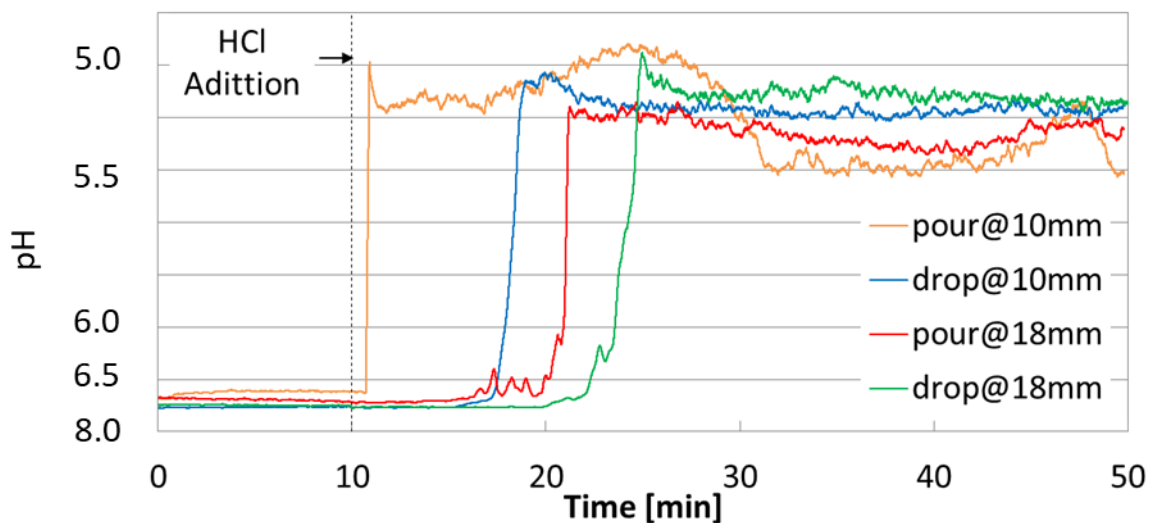


Fig. 3.29 Diffusion of proton

流し込みでは Fig. 3.27 のように液中にピペット先端を挿入し、HCl を押し出すように注入したのに対し、滴下では Fig. 3.28 のようにピペット先端に液滴を作り、液面に静かに滴下した。以上のことから、このような差の要因としては、HCl の流体内での挙動が違うことがあげられる。流し込みでは HCl 液滴の流動によりプロトンの到達が早まり、逆に滴下ではプロトンが拡散で広がったため pH の変化が遅れたと推測できる。

以上の結果から、HCl 注入点とファイバー先端の距離に応じた pH の変化開始までの時間差、HCl 注入方法による pH の上昇開始時間、変化率の違いを観測することができ、トリス緩衝液中のプロトンの広がりを観測出来たといえる。したがって、提案した手法によってプロトンの拡散により溶液内の pH が時間的に変化していく様子が観測可能であることが示された。また、時間分解能が約 0.1 s であることから、活性実験において、ミトコンドリアが活性化したことによる pH 変化をその時間分解能で観測できると考えられる。

3.5 まとめ

本章では、近接場二光子吸収蛍光計測法の実験装置を構築した。また、そこで用いられる各種光学素子、検出器について諸特性を計測し、実験系を構築するうえで十分な性能を保持していることを示した。

また pH 感受性蛍光色素を既知の 3 つの pH の緩衝液に溶かし、2 光子吸収による色素の蛍光が長時間持続して得られ、さらに 580 nm と 650 nm の蛍光強度が変化しても FIR は安定していることを示した。FIR が長時間安定して得られることが判明したことから、各 pH 値に対応する FIR を求め、本手法による pH 較正曲線を作成した。これにより、FIR と pH 値の関係性を示した。さらに、2 光子吸収で求めた FIR と単光子励起で測定した FIR、データシートから求めた FIR との相関を求め、2 光子吸収によって色素を励起しても特に問題がないことを示した。

最後に HCl をサンプル溶液中に注入し、注入位置とファイバー先端の距離の違いや注入方法の違いによって、pH の時間変化が異なることを示し、時間分解能を評価した。

第4章 一点励起によるミトコンドリア活性実験

4.1 ミトコンドリア試料と溶液の作成

4.1.1 トリス緩衝液

緩衝液とは少量の酸や塩基を加えたり,濃度が少し変化したりしても pH が変化しないように調製した溶液のことで,通常,弱酸とその塩もしくは弱塩基とその塩による混合溶液で作られている.本実験では生化学分野で広く一般に用いられている pH7.2~9.0 に緩衝域を持つトリス緩衝液(Tris buffer)を用いる.

Table 4.1 に本実験で用いたトリス緩衝液の組成を示す.

Table 4.1 Composition of Tris buffer

Components	Normal buffer	Measuring buffer
	Concentration	Concentration
Tris-HCl	1 mM	1 mM
sucrose	250 mM	250 mM
EDTA	1 mM	1 mM
KH ₂ PO ₄	—	2 mM ^{*2}
pH	Arbitrarily pH ^{*1}	7.00

*1: 通常の蛍光計測や pH の時間変化などのミトコンドリアを用いない実験, ミトコンドリアの洗浄では, その都度, 実験に最適な pH に調製した.

*2: ミトコンドリアの ATP 合成を助けるために添加する.

以下, KH₂PO₄ が添加されていない緩衝液をトリス緩衝液, 添加されている緩衝液を計測用トリス緩衝液と呼ぶことにする.

また, このトリス溶液の pH は溶液温度に依存し, 1 °C 温度が上昇すると pH が 0.02 低下するということが知られているため, 実際に計測を行い, 確認した. pH 測定は百分の一まで pH を測定できる pH メーター(METTLER TOLEDO : Seven Easy S-20)を用いて行った. その結果を Fig. 4.1 に示す.

これから, 緩衝液の温度が 1°C 上昇すると pH が 0.02 低下した. これから, ミトコンドリアの活性評価を正確に行うためには, 観測中, 溶液の温度管理が不可欠であることがわかった. 今回は, 観察前に 30 分以上, 実験環境の温度に晒しているため, 温度変化は起きにくく, 活性観測が正確に行うことができると考えられる.

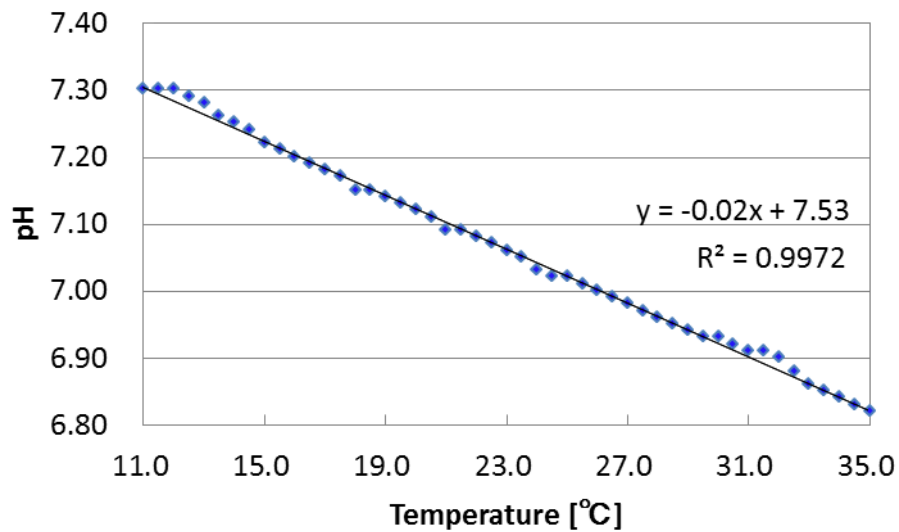


Fig. 4.1 Temperature dependency of pH of Tris buffer

4.1.2 リンゴ酸・グルタミン酸混合溶液

本実験では、ミトコンドリアを活性化させるためにリンゴ酸・グルタミン酸混合溶液(MG : malate and glutamate)を用いた。本節では滴下する MG について説明する。

1.2.2 と 1.3.1 で述べたように MG は TGA 回路を活性化させ、ミトコンドリアが ATP を作りだすのを促進させる効果がある。本実験でもその効果を利用し、ミトコンドリアを活性化させる。その MG の組成を Table 4.2 に示す。

Table 4.2 Composition of MG

Components	Concentration
malate	1 mM
glutamate	1 mM

4.1.3 活性観測用ミトコンドリア試料の作成(全面貼付)

まず、ミトコンドリアを Fig. 4.2 に示すボトムディッシュ(Matsunami)のカバーガラスに貼り付ける。そのためポリフェノールたんぱく質から生成された celltak(BD)を用いてカバーガラスをコーティングする。ミトコンドリアサンプルの準備手順を Fig. 4.3 に示す。



Fig. 4.2 Bottom dish

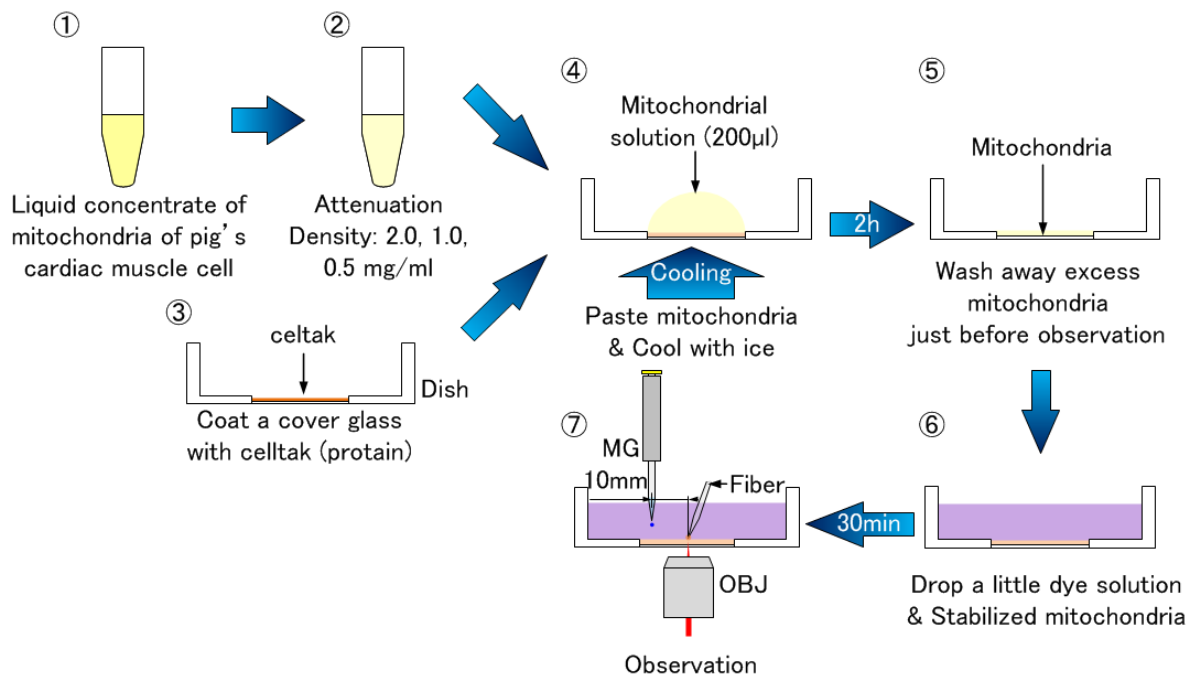


Fig. 4.3 Procedure for preparation of a mitochondrial sample

- ① ブタの心筋から単離し、凍結保存されているミトコンドリア溶液を流水で解凍
- ② ①の溶液を実験で用いる濃度に Tris 緩衝液で希釈. 今回は 2.0, 1.0, 0.5 mg/ml に調整
- ③ 1M, pH8.00 の炭酸ナトリウム水溶液と celtak を 50 : 1 で混合し、カバーガラスに 200 µl 滴下. その後、室温に 30 分間放置し、超純水で余分な celtak を洗い流し、冷蔵庫で一晩放置し、カバーガラスのコーティングが完了

- ④ ③でコーティングしたディッシュに②で希釈したミトコンドリア溶液 200 μl を滴下し、 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ で2時間冷却
- ⑤ 余分なミトコンドリア溶液をトリス緩衝液で洗浄
- ⑥ 計測用トリス緩衝液に SNARF-4F を混合させた色素溶液を 3 ml 充填し、約 30 分安定化させる
- ⑦ 実験

以上の手順でミトコンドリアサンプルを作成した。

4.2 ミトコンドリア活性実験

本章では、提案した手法でミトコンドリアの活性を観測した結果及びその予備実験の結果を示す。

4.2.1 リンゴ酸・グルタミン酸混合溶液滴下実験

本実験ではミトコンドリアを活性化させるために、4.1.2 で述べた MG を滴下する。しかし、MG は酸性であるため、滴下すると pH が減少し、FIR が上昇してしまう。そこで、本実験ではわずかの pH 変化を防ぐためにトリス緩衝液を用いているが、実際に MG を滴下し、pH 変化、つまりは FIR が変化しないことを確認する必要がある。

4.2.2 実験方法

ボトムディッシュに pH7.00 のトリス緩衝液 3 ml を Fig. 4.4 のように充填し、フェムト秒パルスレーザーを集光させ、蛍光を取得する。測定開始 10 分後に、4.1.2 で述べた MG を 10 μl 流し込み、その後の FIR の変化を観察する。同様の方法で 2 回計測した。色素溶液の SNARF-4F の濃度は 0.02 mM である。

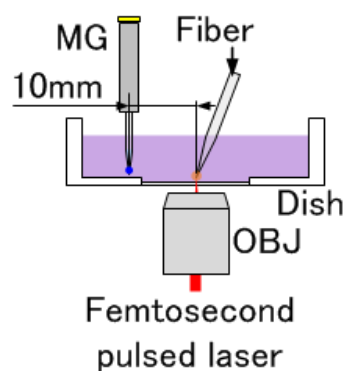


Fig. 4.4 Experimental setup for MG dripping

4.2.3 実験結果と考察

結果を Fig. 4.5 に示す. 2 回の実験のいずれにおいても, 滴下時点で蛍光強度が減少した. しかし, 滴下後約 5~10 分かけて pH の上昇がみられ, その後 pH は, MG 滴下前の pH とほぼ同値に回復し, 平衡状態に達した. またここでは pH の変化は, 滴下前 10 分の平均と滴下後 10 分以降の平均値を比較している.

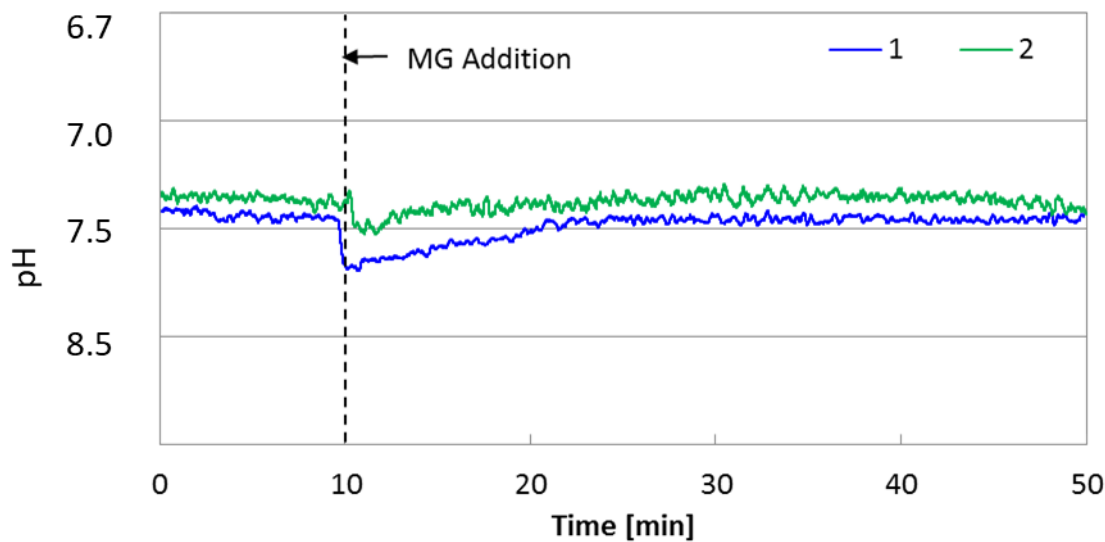


Fig. 4.5 Response of dropping malate and glutamate with SNARF-4F

今回の測定では, 弱酸性である MG を滴下させても pH の上昇は 1 回目 0.0070, 2 回目で 0.0077 とほぼ誤差の範囲と考えられるくらい小さかった.

しかし, MG 滴下直後に pH が急激に減少する. この現象は滴下点とファイバー先端が 10 mm と近いと, 滴下によってファイバー先端が振動することによって, FIR が変動したこと起因するものと考えられる. これは 2 光子吸収のような局所蛍光の場合, このような微小振動であっても, ファイバー先端が蛍光点から外れることが考えられる.

しかし, 約 10 分経過すると安定するため, 活性観測実験の際のミトコンドリアへの外環境の影響を最小限に抑えるために, ファイバー-注入間距離を 10 mm にして実験を進めた.

また, 今回は滴下する MG に色素溶液と同濃度の SNARF-4F を混合させた. それゆえ, MG の滴下によっても色素溶液の色素濃度は一定に保たれている. しかし, 滴下する MG に色素を混合しないと滴下後のサンプル内の蛍光色素濃度が下がってしまい, これによって励起される蛍光色素分子の数が減ってしまう. その結果を Fig. 4.6 に示す. 色素の初期濃度は 0.02 mM に調製したが, MG を滴下することで, 滴下後には色素の濃度が 0.0194 mM となり, 滴下前後で色素濃度に約 4% の差が発生する. このため, pH 変化で約 0.15 という大きな値になり,

ミトコンドリア活性による pH 変化の観測に支障をきたす恐れがある。したがって、ミトコンドリアを活性させるために MG を滴下する際には、MG に色素溶液と同濃度の色素を混合しなければならない。それを行うことで、ミトコンドリア活性による pH 変化を観測することができると思う。

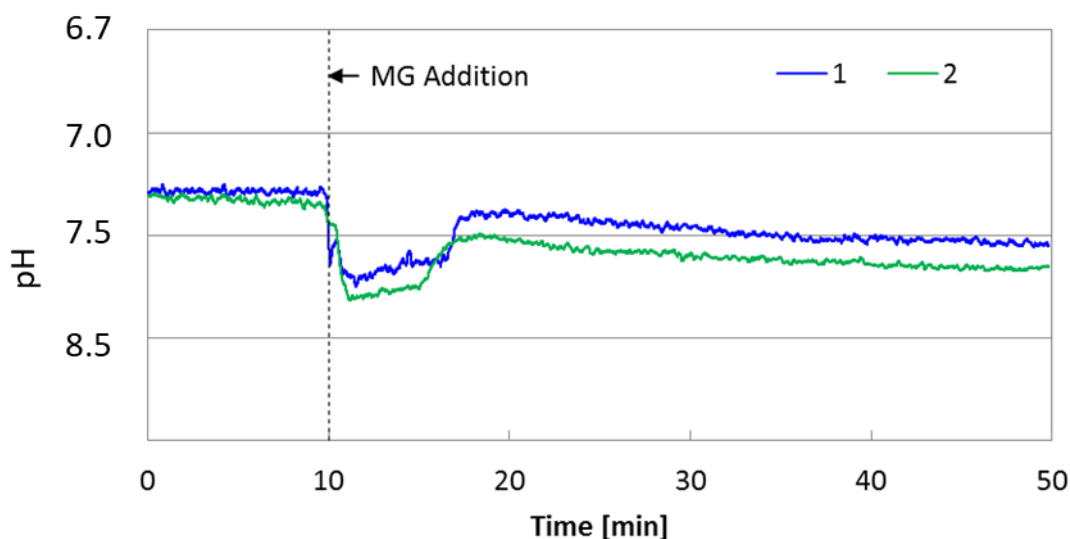


Fig. 4.6 Response of dropping malate and glutamate without SNARF-4F

4.3 ミトコンドリア活性の観測実験

本実験では生体試料として豚の心筋から分離したミトコンドリアを用いた。ミトコンドリアサンプルの準備は 4.1.3 で述べたとおりである。

4.3.1 実験方法

Fig. 4.3 で準備したミトコンドリアサンプルにフェムト秒パルスレーザーを集光させ、測定開始 10 分後に MG をファイバーから 10 mm の位置に流し込み、FIR の変化を観察する。また、ミトコンドリア密度は 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml の 3 種類、トリス緩衝液の pH は変化が得られやすい pH7.00 に設定し、色素溶液の SNARF-4F の濃度は 0.02 mM である。測定回数は 0.5 mg/ml と 2.0 mg/ml が 6 回、1.0 mg/ml が 12 回である。

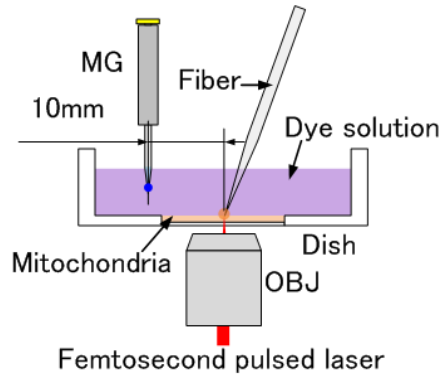


Fig. 4.7 Experimental setup for measuring mitochondrial activity

4.3.2 実験結果

0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml のミトコンドリア密度の MG 滴下による pH 変化の測定結果をそれぞれ Fig. 4.8~Fig. 4.10 に示す. また, それぞれの密度での pH 変化量を Fig. 4.11 に示す. またここでは pH の変化は, 滴下前 10 分の平均と滴下後 10 分以降の平均値を比較している.

Fig. 4.8~Fig. 4.10 から, 3 種類の濃度すべてで MG 滴下によって pH が上昇していることが確認できる. これは, 前節の MG 滴下実験では見られなかった挙動である. そしてその後は一定の pH 値を示している. Fig. 4.11 では, 3 種類の濃度で異なる pH 変化量を観測できていることがわかる. また, どの濃度においても標準偏差が小さく, 重なり合うことはなかった.

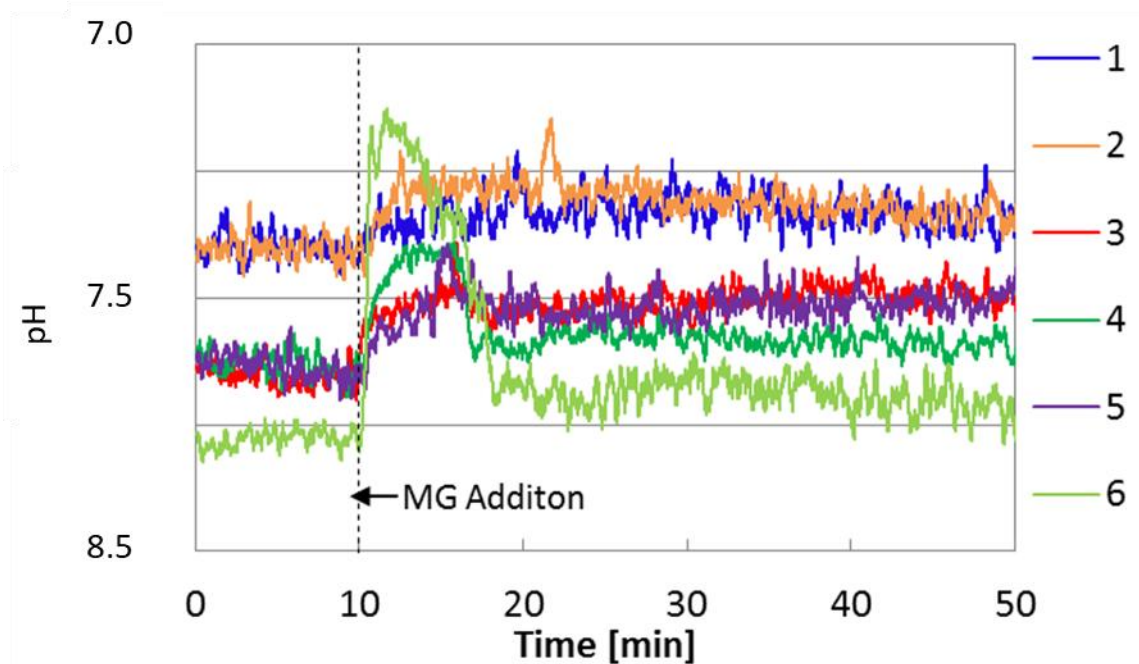


Fig. 4.8 pH responses of mitochondria with MG addition at 0.5 mg/ml

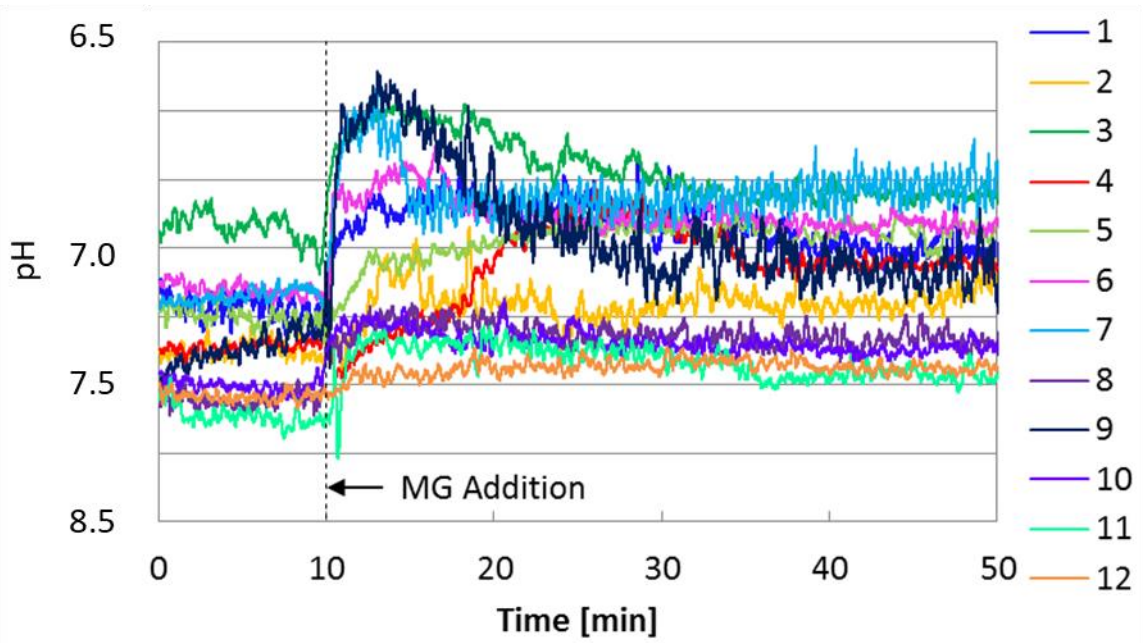


Fig. 4.9 pH responses of mitochondria with MG addition at 1.0 mg/ml

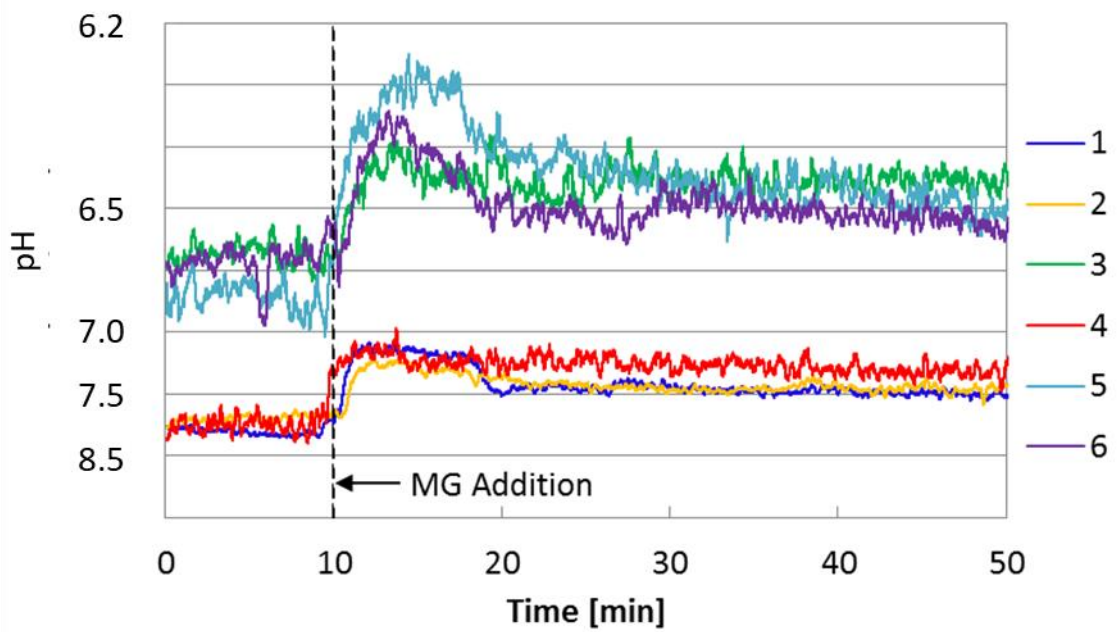


Fig. 4.10 pH responses of mitochondria with MG addition at 2.0 mg/ml

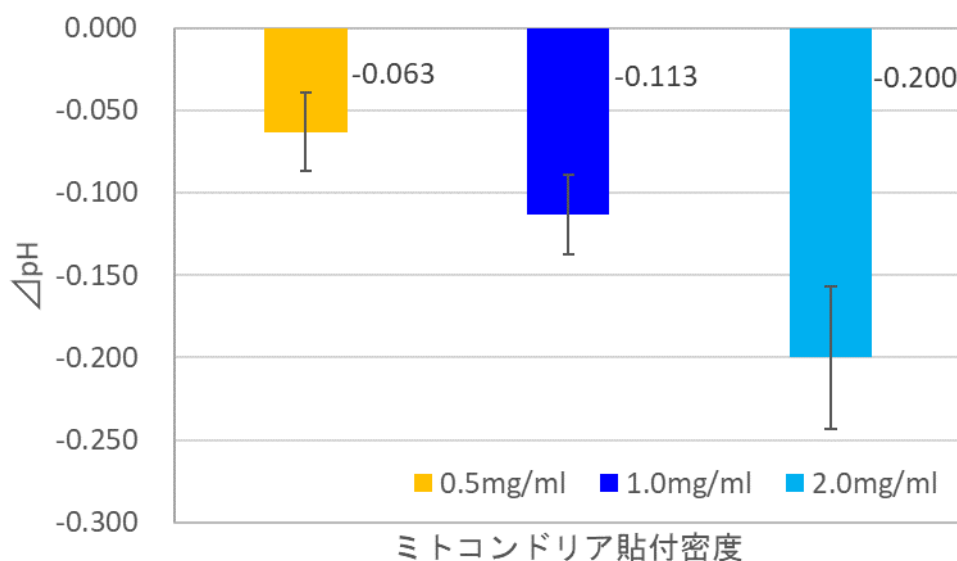


Fig. 4.11 pH change for different concentration of mitochondrial cell

4.3.3 ミトコンドリア活性の観測実験の考察

まず Fig. 4.8～Fig. 4.10 は、MG 滴下によるミトコンドリア活性によって FIR の変化がどのように表れるかを示している。MG 滴下前 10 分間の pH の差は、ミトコンドリア濃度の差によるものとミトコンドリアの個体差によるものと考えられる。また、同じ濃度内またはそれぞれの濃度によって pH 変化量に差がみられる。これも前述した個体差に起因することが考えられる。

各濃度における pH 変化量をまとめた結果を Fig. 4.11 に示す。これから、各ミトコンドリア濃度における pH 変化量の違いが明瞭に見て取れる。内訳は 0.5 mg/ml では平均 pH 変化量 0.063、標準偏差 0.024、1.0 mg/ml では平均 pH 変化量 0.113、標準偏差 0.024、2.0 mg/ml では平均 pH 変化量 0.200、標準偏差 0.043 である。また、濃度が 2 倍もしくは 1/2 になると pH 変化量もそれに応じて約 2 倍、約 1/2 になることもわかる。これは、観測対象領域のミトコンドリアの数によるものと考えられる。すなわち、ミトコンドリア数が多ければプロトン排出量も多くなり、逆に数が少なければ排出量も少なることによるものだと考えられる。

この結果から、ミトコンドリアは密集しているほど、各々のプロトン濃度勾配を利用して密集が疎のときよりもプロトン濃度勾配が大きくなり、pH の変化量も大きくなるものと推測される。

また、一度ミトコンドリアが活性化すると pH 値が維持されている。これは滴下した MG によりミトコンドリアが活性化し、プロトン濃度勾配がミトコンドリア近傍で維持されているものと考えている。

以上のことから、ミトコンドリア濃度差による pH の差を観測することができた。また今後装置の分解能を測定し、かつ分解能をミトコンドリアレベル以下(1 μm 以下)まで高めることができれば、単体のミトコンドリアの活性評価が可能であると考えられ、分解能の向上とともにファイバーと光学系を増設することで、活性化したミトコンドリア同士がどのような影響を及ぼしあっているかを議論することも可能であると考えられる。

4.4 まとめ

4.1 では本実験に用いたトリス緩衝液の組成や温度依存性、ミトコンドリア試料の作成方法を示した。4.2.1 では、ミトコンドリアを活性させるために用いる MG の注入による pH 変化は、MG に色素をサンプルと同濃度混合することにより発生しないことを示した。4.3 では、本手法でミトコンドリア活性が観測できるかどうかを 3 種類のミトコンドリア濃度で実験した。ミトコンドリアの個体差などにより pH 変化量にばらつきが生じたが、3 種類のミトコンドリア濃度に応じた pH 変化量を測定することに成功した。

本章では上記のように一点でのミトコンドリア活性観測を行い、活性観測が行えることを示した。しかしながら、ミトコンドリア間の相互作用の観測は一点励起では行うことができず、励起ポイント周辺に存在するミトコンドリアによる pH 変化を測定するにとどまり、個数による活性差を測定することはできなかった。そこで、ミトコンドリア間の相互作用を観測するために二点差分計測を利用した実験装置に改良を行った。またミトコンドリアの個数による活性差を測定するために光ピンセットを用いて測定領域内のミトコンドリア個数を制御した。その結果を以降の第 5 章、第 6 章で述べていく。

第5章 ミトコンドリア活性評価のための二点差分計測法の原理

5.1 二点差分計測の原理と光学系

5.1.1 二点差分計測の原理

本実験ではマルチプローブを用いて二点を同時に測定する、二点差分計測装置を考案した。二点差分計測とは、異なる二点間を同時に観察することで二点間に起きている状態差などを観察する方法である。次節以降にこの原理を用いて構成した実験装置を紹介する。

5.1.2 実験装置と一点測定時からの改善点

5.1.2.1 実験装置

実験装置の概略図を Fig. 5.1 に示し、蛍光強度比 FIR(I580/I650)算出までの過程を記す。

本実験では、2光子吸収を発生させるために、波長 800 nm のフェムト秒パルスレーザーを励起光に使用した。励起光は、チョッパーで 215 Hz の強度変調を加え、1 Hz の切換周波数をもつガルバノミラーを用いて、NA1.4 の対物レンズ 1 で試料に集光した。ガルバノミラーを介しているため、集光スポットは 2ヶ所に形成された。各々焦点付近では、2光子吸収が生じ、それによって色素が励起され、蛍光放出する。励起された蛍光は、光ファイバープローブで収集し、ファイバ他端からの出射光を、対物レンズ 2 および 3 で平行光にした後、700 nm のショートパスフィルターを通して励起光をカットした。その後、蛍光強度比を測定するために、ダイクロイックミラー(エッジ波長 624 nm)で、波長 624 nm 以上と波長 624 nm 以下に 2分割した。そして、580 nm と 650 nm の蛍光波長の蛍光だけを収集するため、ノッチフィルターを通し、光電子増倍管 PMT1 および PMT2 で検出する。それぞれの PMT から出力は、2台のロックインアンプでチョッパーの周波数 215 Hz で同期検波した。その出力から PC 上の Labview を用いてファイバー 1 と 2 の FIR(I580/I650)を算出し、pH を求めた。

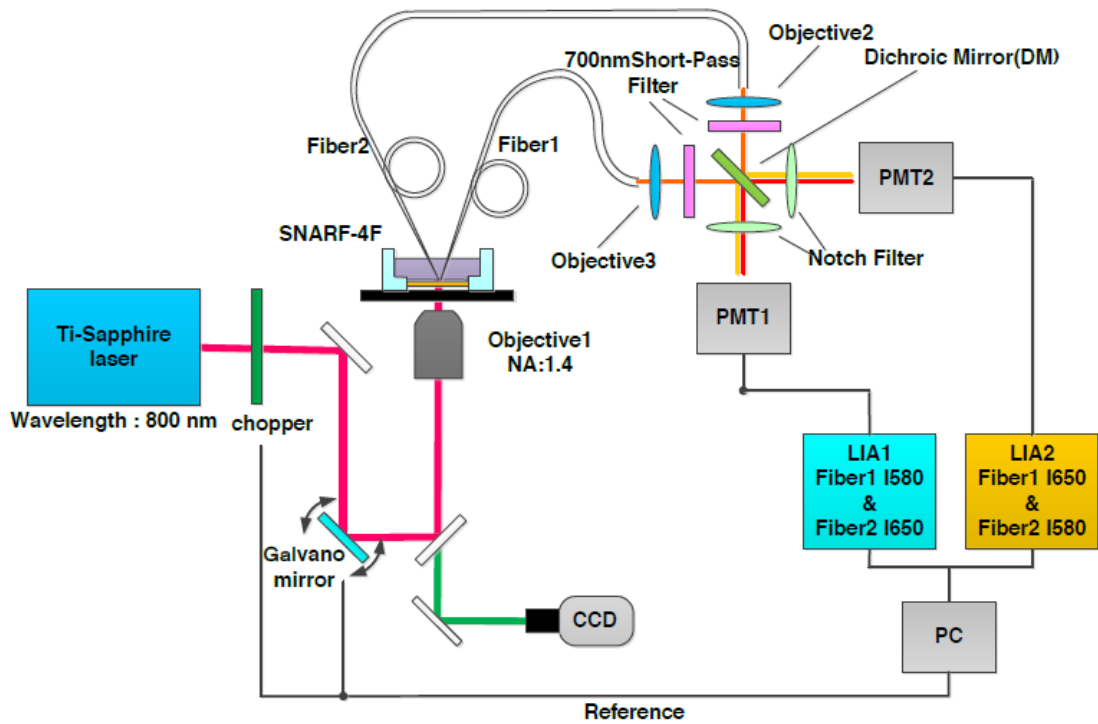


Fig. 5.1 Experimental setup for Multi-probe

5.1.2.2 一点測定時からの改善点

本研究ではまず、従来の近接場モノ光ファイバースプローブ装置からマルチプローブ化にする際、モノプローブ装置の検出光学系を2つ構築することで可能であると考えた。モノプローブ装置の概略図を Fig. 5.2(I)に、マルチプローブ装置を Fig. 5.2(II)に示す。

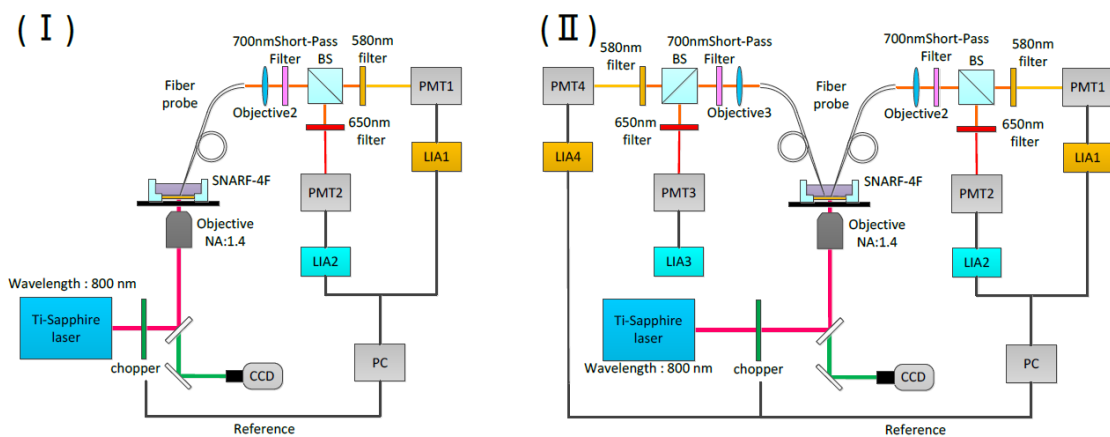


Fig. 5.2 Experimental setup for (I) single-probe setup (II) multi-probe setup

まず、モノプローブ装置の蛍光強度比 FIR(I580/I650)算出までの過程を記す。励起光に波長 800 nm のチタンサファイアレーザーを使用した。励起光をメカニカル光チョッパーを使って

215 Hz で変調し，対物レンズ(NA1.4)を通して試料に照射した．励起された蛍光は光ファイバプローブで収集し，ファイバ他端からの出射光をレンズで平行光にした後，700 nm ショートパスフィルターを通して励起光をカットした．その後，ビームスプリッター(BS)によって2分割し，それぞれ580 nm フィルターと650 nm フィルターを通す．その後PMT1 及びPMT2 を用いて蛍光強度をLIA1 及びLIA2 でロックイン検出した．その出力値からFIR を算出し，pH を求めた．

以上の検出系を2セット準備した装置がFig. 5.2(II)のマルチプローブ装置である．

このマルチプローブ装置は，モノプローブ装置と比較するとPMTが2台から4台へ，フィルターが3個から6個，LIAが2台から4台，BSが1個から2個へと光学機器が2倍となる．これはコストがかかり，また装置に不具合が生じた際の原因解明に時間がかかる．しかし，Fig. 5.1 に示す考案した実験装置は，ダイクロイックミラーを使って，検出光学系を工夫したことで，ファイバー数を2倍に増やしても，PMT，LIA,フィルターを増設する必要がなくなり，光学機器の数の簡素化が達成できた．

5.1.2.3 ダイクロイックミラー

波長580nmと650nmの蛍光強度比を検出するために，エッジ波長が624nmのダイクロイックビームスプリッター(DM, オプトライン, FF624-Di01-25×36×2.0)を使用した．次にDMの透過・反射特性を計測した．Fig. 5.3 (I)に計測装置系を示す．光源にはタングステンハロゲンランプを用いた白色光源(Ocean Optics, LS-1)を用い，分光器にはQE65000(Ocean Optics)を用いた．マルチ光ファイバプローブ装置では，DM1つを用いて，Probe1とProbe2から収集した各々の光を分光する．Fig. 5.3(II)に示すように，図3.8(I)の計測系でProbe1側から白色光源を照射し測定する．Fig. 5.4, Fig. 5.5に測定したDMの特性を示す．同様にProbe2側から照射する場合も測定した．

Fig. 5.4, Fig. 5.5に示すように，エッジ波長624nmを境に，580nm領域と650nm領域に分離することが確認できた．また，DMの正面(Probe1側)と裏面(Probe2側)によって，光の透過率が違い，表面からの光の透過の方が透過率が高い結果が得られた．

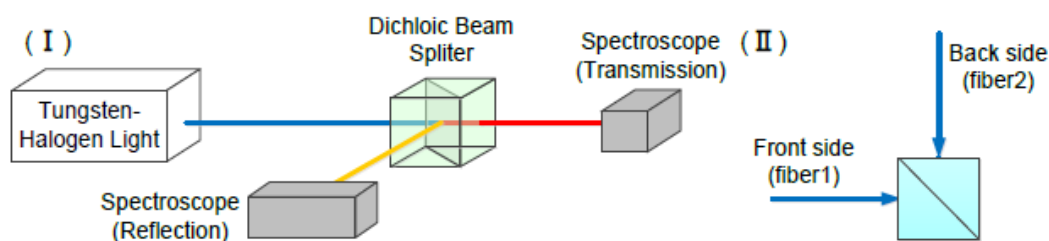


Fig. 5.3 Characteristic measurement of DM

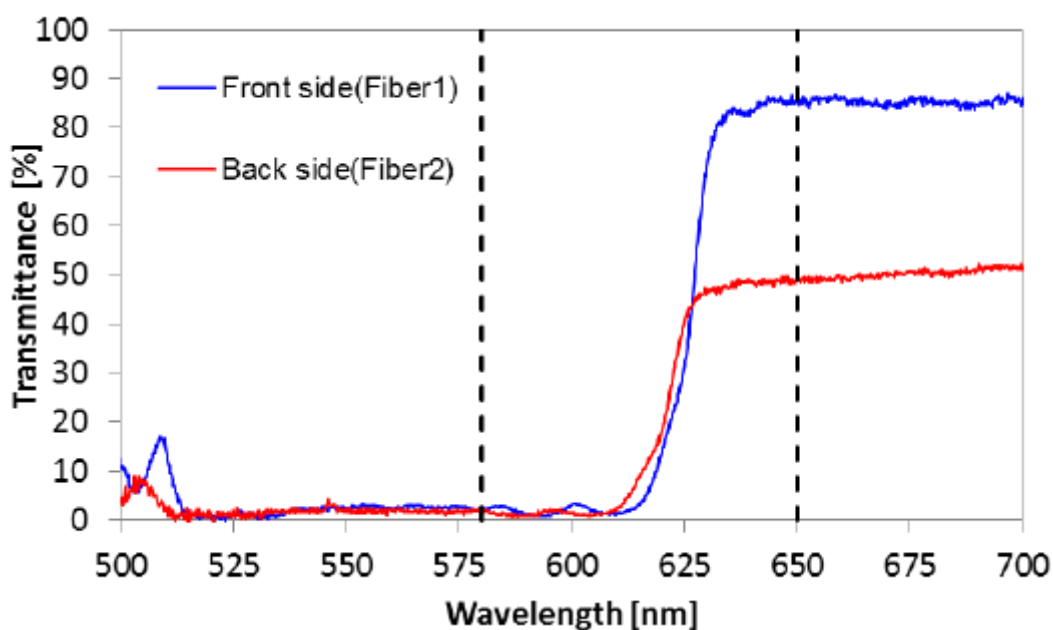


Fig. 5.4 Transmittance of DM

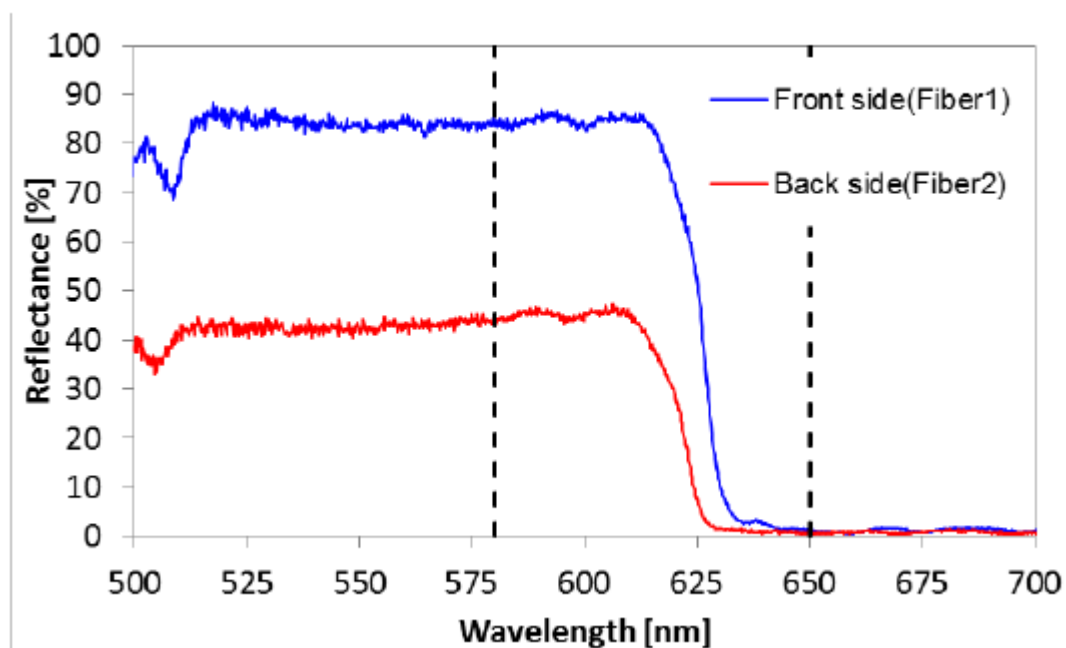


Fig. 5.5 Reflectance of DM

5.1.2.4 ガルバノミラー

レーザースポットを2ヶ所形成するために、ガルバノメータスキャナ(ジーエスアイ・グループ・ジャパン, VM1000)を使用し、ガルバノメータスキャナの制御はサーボドライブ(MiniSAX)を使用した。ガルバノミラーは電流・電圧を調整することでミラーの角度を制御できる。本研究で用いたサーボドライブは入力電圧範囲が $\pm 3V$ 、最大走査角度は $\pm 45^\circ$ である。

この範囲内で電圧を変えることでミラーの振れ角を制御できる。レーザースポットの最大間隔は $20 \mu\text{m}$ となり、電圧は 1.5V とした。このスポット間隔は対物レンズの瞳径内に制限されるため、この値以上には広げることができなかった。また、周波数を変えることでミラーの角度変化速度を変えることができ、本研究では 1Hz で設定した。

ガルバノミラーによって、レーザースポットが 2 ヶ所形成されたか確認するため、位置検出素子 PSD(SD-201, KODENSHI CORP.)を使用した。

SD-201 は、スポット光の一次元の位置を検出する非分割形の受光素子である。SD-201 素子回路を Fig. 5.6 に示す。差動増幅回路であるため、Fig. 5.7 (I)のようにレーザー方向に対して SD-201 の受光面の中心から右側にレーザーが照射されると正の電圧が生じ、左側に照射されると負の電圧が生じる。実際にガルバノミラーで制御したレーザーを SD201 に照射すると、Fig. 5.7 (II)のオシロスコープの結果のように正の電圧と負の電圧がガルバノミラーの周波数通り交互に測定された。これより、レーザーがガルバノミラーによって 2 ヶ所に振り分けられていることが確認できた。また、Fig. 5.8(I) はガルバノミラーを停止したモノスポットの CCD 画像で、(II) は実際に電圧をかけ制御したマルチレーザースポットである。

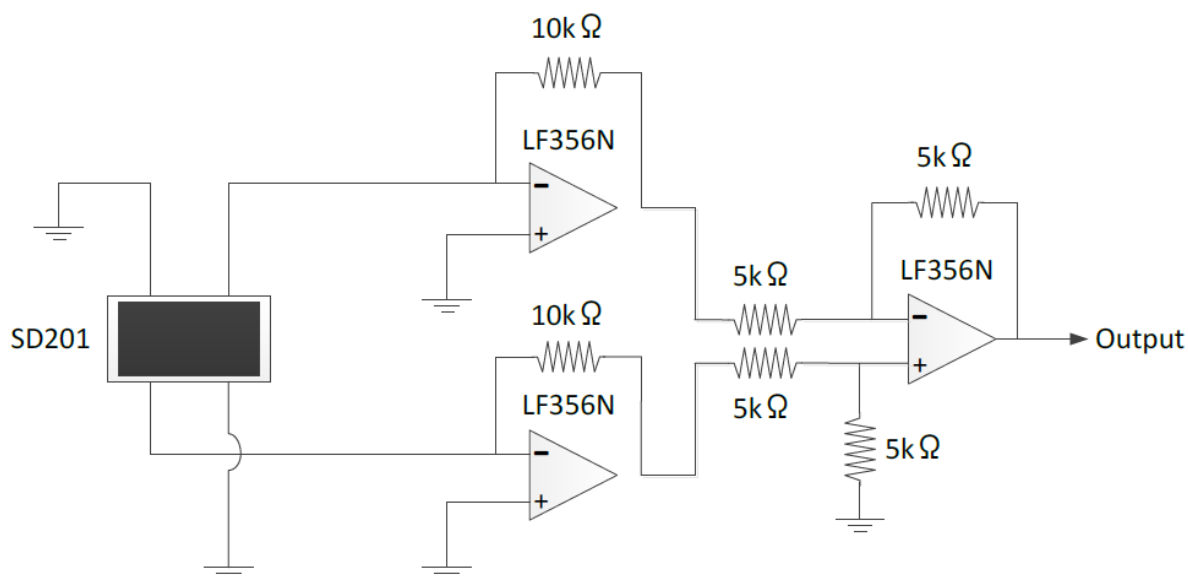


Fig. 5.6 SD201 circuit

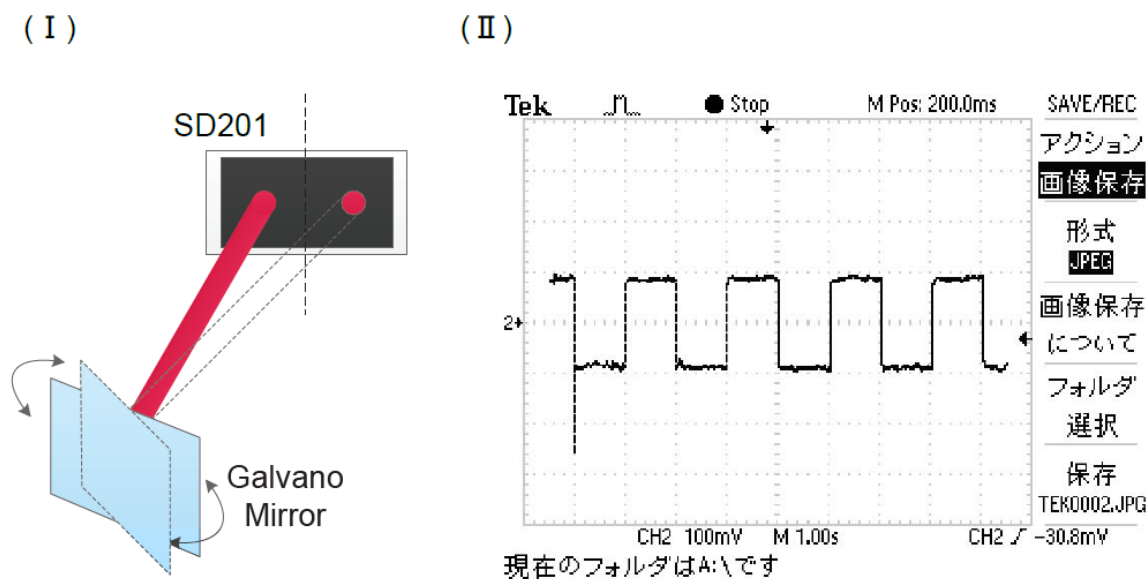


Fig. 5.7 Verification of multi spots by SD201

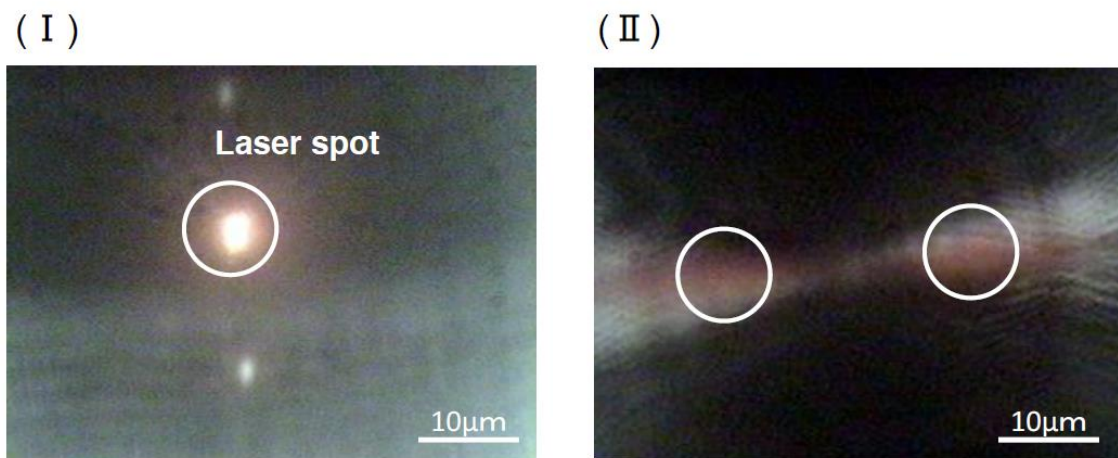


Fig. 5.8 CCD image of (I) single spot and (II) multi spots

5.1.2.5 Labview

本研究では Probe1, 2 によってそれぞれ収集された蛍光は PMT1, 2 を用いてロックイン検出している. この検出値はプローブ 1 とプローブ 2 に振り分けられてない. よってファイバー1 とファイバー2 の検出値にそれぞれ振り分け, FIR を算出する作業を Labview で制御している. そのプログラムのフローチャートを Fig. 5.9 に示す. ガルバノミラーを制御する電圧矩形波(U)を高, 低に応じて検出信号を Probe1, Probe2 により分けて取り込むプログラムである.

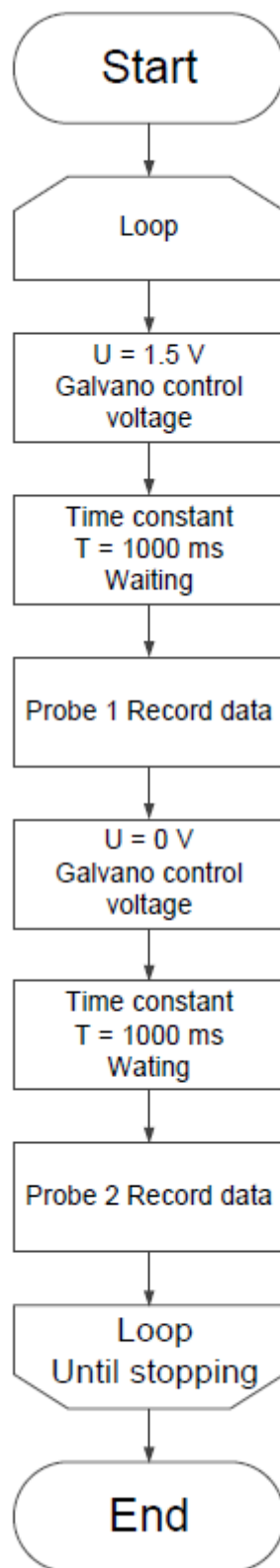


Fig. 5.9 Labview flowchart

5.2 pH 測定

5.2.1 pH 較正曲線

既知の pH 値の SNARF-4F 溶液の蛍光を測定し、蛍光波長の FIR を算出して pH 校正曲線を作成した。SNARF-4F 溶液は前章で述べたものを使用した。

5.2.1.1 実験方法

ボトムディッシュに Fig. 5.10 のように中央部のガラス基板上に既知の pH 値のトリス緩衝液 1 ml を滴下し、フェムト秒パルスレーザーを集光させ、5 分間蛍光させた。SNARF-4F の濃度は 0.02 mM を用いた。色素の pH 感受範囲が pH5.0~pH8.4 であるため、pH5.0~pH8.5 まで 0.5 間隔で 9 つの pH 値を計測した。

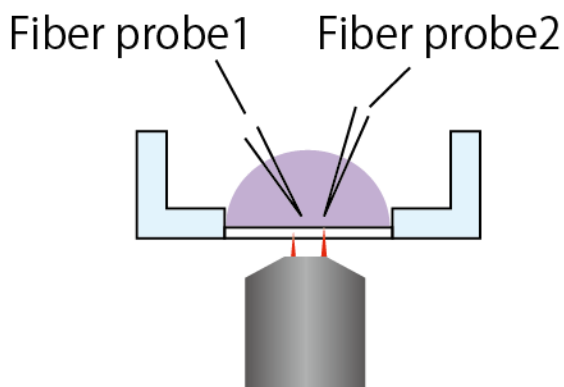


Fig. 5.10 Experimental setup for pH measurement by multi-probe

5.2.1.2 実験結果と考察

pH5.0~pH8.5 に対する Probe1 の FIR を Fig. 5.11 (I)に、Probe2 の FIR を Fig. 5.11(II), SNARF-4F のカタログデータシートの FIR を Fig. 5.12 に示す。

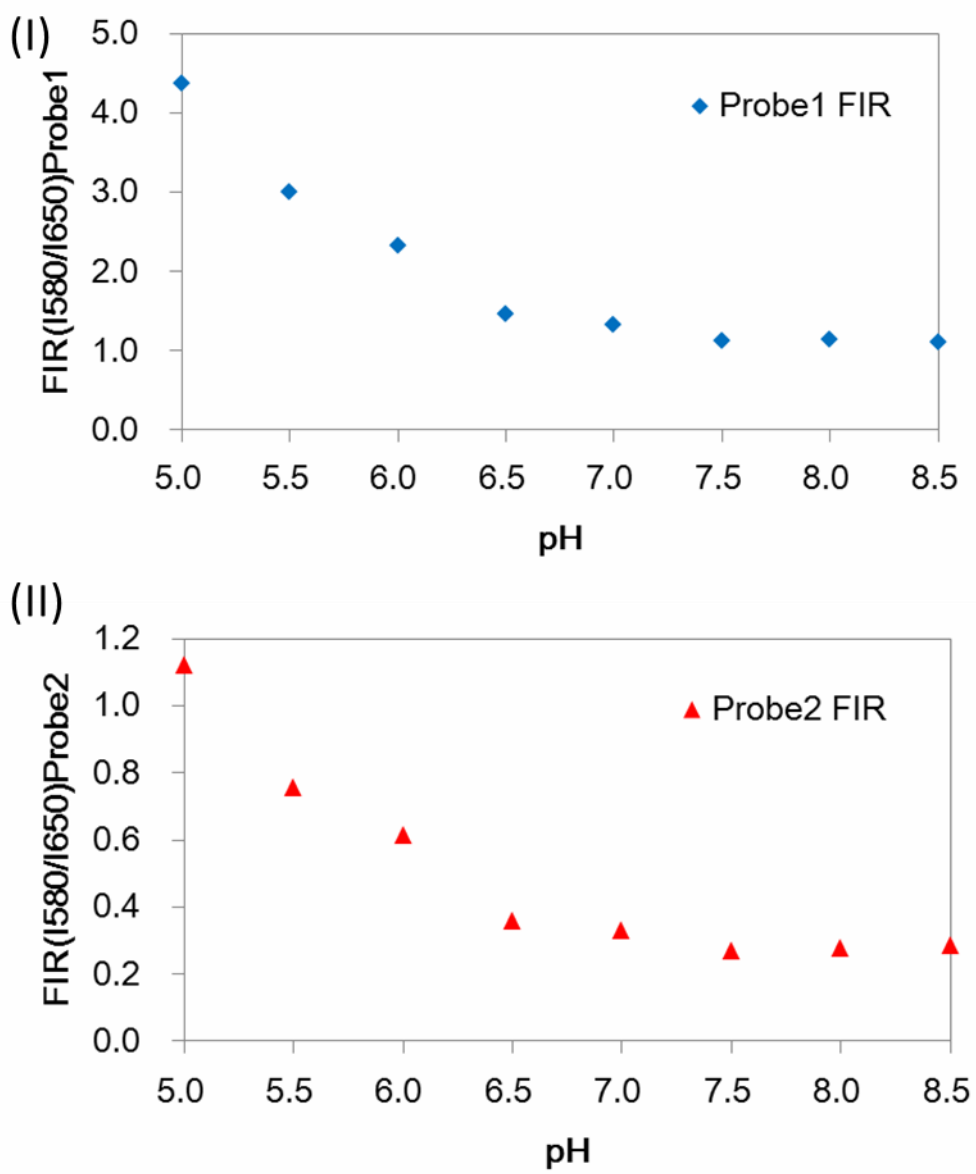


Fig. 5.11 pH calibration curves of (I)Probe1 and (II) Probe2

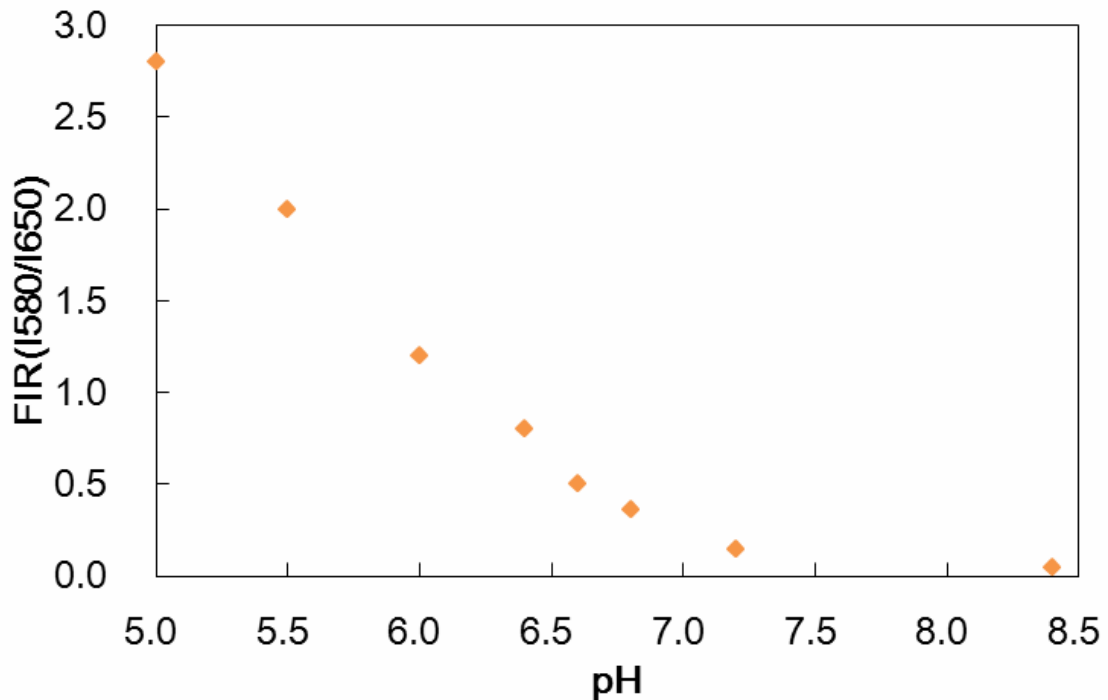


Fig. 5.12 pH calibration curve of datasheet

Fig. 5.11 (I)の Probe1, Fig. 5.11 (II)の Probe2 も pH が大きくなるにつれて, FIR が減少する結果がえられた. この結果は Fig. 5.12 のカタログデータシートの傾向と一致している. Fig. 5.12 のデータ値と Probe1 と Probe2 の FIR 値が異なるのは, FIR の測定方法と励起光のレーザー波長の違いによるものだと考えられる. カタログデータシートの測定方法は単光子励起の波長 532 nm の連続波レーザーを用い, 検出器は分光器を用いている. それに対して, 本実験では, 2 光子励起のパルス波で検出器は PMT を用いている.

また Fig. 5.11 より, Probe1 と Probe2 の FIR 値が違う. その理由はダイクロイックミラーの正面と裏面の反射率と透過率の違いと考えた.

本研究では各 Probe で pH - FIR 校正曲線を予め求めておくことで, Probe1 と Probe2 間の FIR 値の差は問題とはならない. また, pH が中性から弱酸性に変化するミトコンドリアにおいては, 最も重要となる pH5.0~pH7.0 の範囲で FIR の変化が得られたことは, この校正曲線をもとにして, ミトコンドリアの活性を評価できることを示している.

5.2.2 プロトン滴下によるプローブの分解能

構築した実験装置で, pH の時間変化を観測できるか確認するために, 濃度 10 mM の塩酸 (HCl)50 μ l を滴下し, FIR の変化を観測した.

5.2.2.1 実験方法

ボトムディッシュに pH7.0 のトリス緩衝液 3 ml をディッシュを満たすように入れ、フェムト秒パルスレーザーを集光させた。Fig. 5.13 に示すように、3 分後に HCl を 50 μ l 滴下した。ディッシュの中心から 16mm の地点に静かに滴下し、その後の変化を観測した。SNARF-4F の濃度は 0.02 mM を用いた。

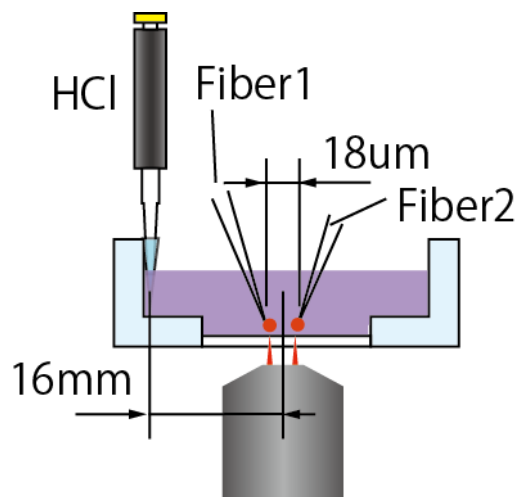


Fig. 5.13 Experimental setup for diffusion response of pouring acid solution

5.2.2.2 実験結果と考察

実験開始 3 分後に HCl を滴下したときの Probe1 と Probe2 の時間経過に対する pH の変化を Fig. 5.14 に示す。滴下後 22 分後に pH が上昇し始めた。この結果から、Probe1 と Probe2 が HCl の滴下によるプロトン拡散による変化をとらえていると結論できる。

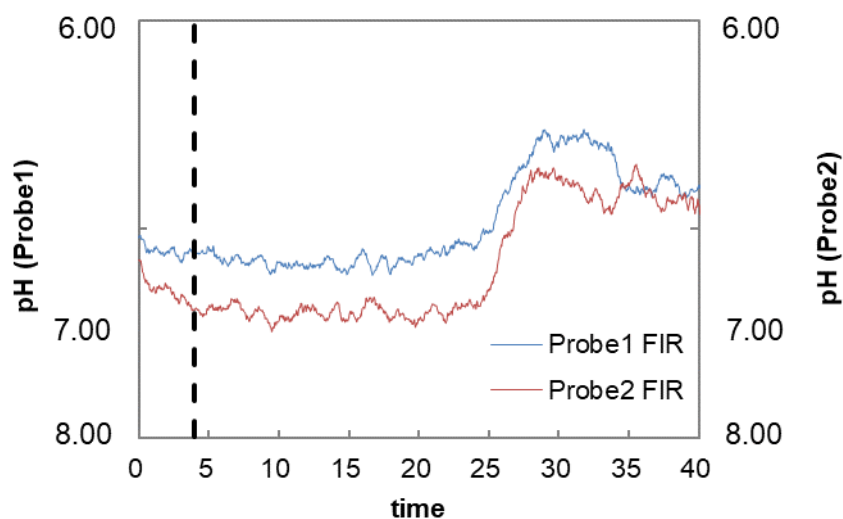


Fig. 5.14 Diffusion of proton

測定結果の 20~35 分の間を拡大して Fig. 5.15 に示す.

Probe1, Probe2 間の距離は 18 μm あるので, HCl 滴下によるプロトン拡散による pH の変化にも時間差が生じると考えていた. しかし, 結果から pH 変化の時間差は得られず, pH が同時刻で増加している. Probe1 と Probe2 の測定間隔が 18 μm であるのに対し, pH データ取得サンプリング時間が 1 秒であったため, 拡散速度が大きくそれぞれの地点での pH 変化を区別することが出来なかったためだと考えられる.

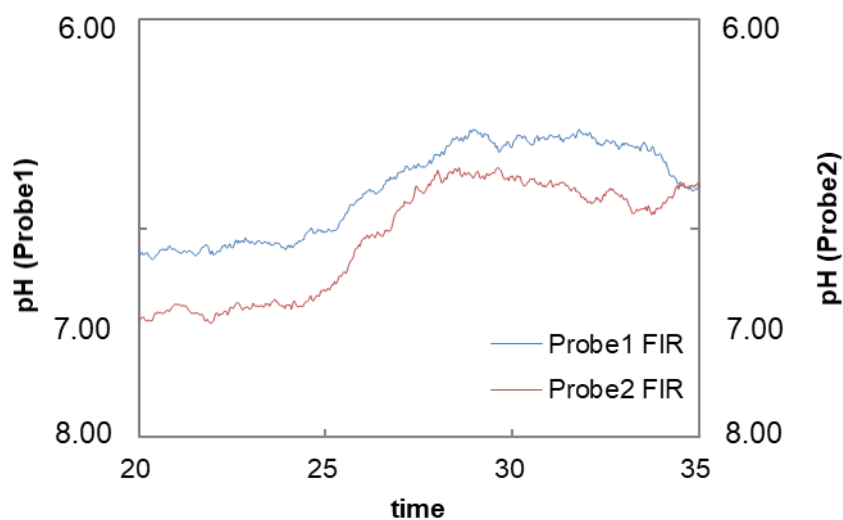


Fig. 5.15 Diffusion of proton of magnified 20-35s of Fig. 5.14

5.3 まとめ

本章では一点計測からさらに発展させ二点差分計測法を使用した実験系を構築し，その評価を行った．

まず，二点差分計測法について説明した．そしてそれを用いた実験装置について述べ，一点計測法からの改善点を解説し，ここで構築した二点計測実験装置が有用であることを示した．また，実験装置の光学系の構成要素を見直し，構成を簡素化することに成功した．

次にその簡素化した装置を使用し，各種前実験を行った．まずは2本のプローブ(マルチプローブ)を用いて pH 測定を行って pH 較正曲線を作成し，FIR と pH の関係性を示した．さらに，プロトンを滴下することで2本のプローブで pH 変化を測定することができることを証明した．

第6章 光ピンセット法を用いたミトコンドリア試料の作成

6.1 光ピンセット法とは

本研究では単一・集合体ミトコンドリアの活性分布やミトコンドリア同士の活性量を比較することを目的としているため、その条件を満たすミトコンドリアのサンプルを作製する必要がある。そこで、本研究では光ピンセットの特性を用いて、意図的にサンプルの条件を作製する方法を考案した。

本章では、光ピンセットを用いたサンプルの作成方法などについて述べる。また、原理などについては Appendix として巻末に添付した。

6.2 光ピンセット装置の光学系

本研究では、実験装置のコスト及びサンプル作製から観測までの流れをよりスムーズにするため、サンプル作製装置とサンプル観測装置を同じ光学系を用いて行った。サンプル作製の際、サンプル観測装置の励起光学系の部分を用いた。

光ピンセット装置の光学系を Fig. 6.1 に、諸元表を Table 6.1 に示す。

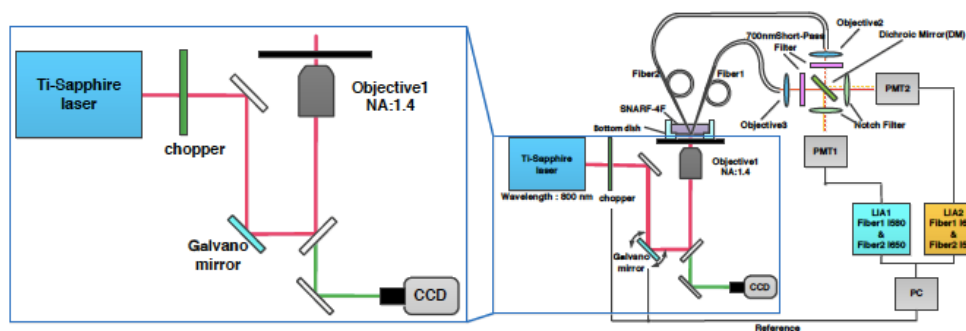


Fig. 6.1 Experimental setup for optical trapping

Table 6.1 Parameter of our setup

最大トラップ力	1.2 pN
スポットサイズ	0.38 μm^2
焦点深度	400 nm
レーザー波長	800 nm
レーザーパワー	2 mW
空間モード	TEM00
対物レンズ	Olympus UPLSAPO 100 \times Oil
開口数 NA	1.4
作動距離 W.D.	0.13 mm
カバーガラス厚	0.17 mm

6.3 光ピンセットによる試料

6.3.1 試料作製

本研究では、光ピンセット装置を用いて、ミトコンドリアが単一もしくは集合したサンプル作製を行った。Fig. 6.2 に示すようにサンプル溶液をカバーガラスで挟み、セルを作ること
で、ミトコンドリアは対物レンズの動作距離内で安定して浮遊している。その状態のミト
コンドリアを光ピンセットでトラッピングし、移動してカバーガラスに貼り付けることで、サ
ンプルの個数やサンプル間の距離等を制御した。

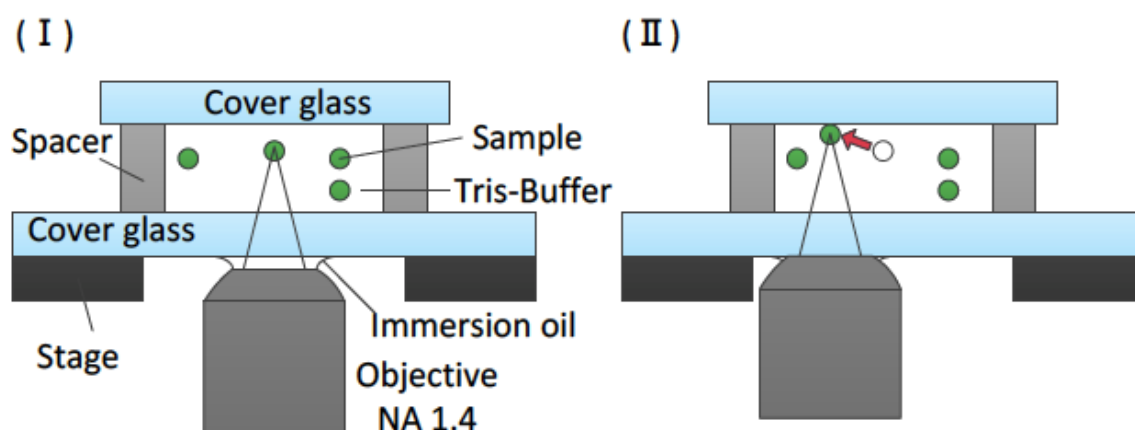


Fig. 6.2 (I) Principle of mitochondrial trapping and (II) moving & pasting

本研究での光ピンセット装置によるミトコンドリア試料の作製手順を Fig. 6.3 に示し、
各々の手順の説明を以下に示す。また、この作製手順でカバーガラスに貼り付けた CCD 画像を
Fig. 6.4 に、サンプルの貼り付け個数とサンプル間の距離制御が可能であることを示した CCD
画像を Fig. 6.5 に示す。

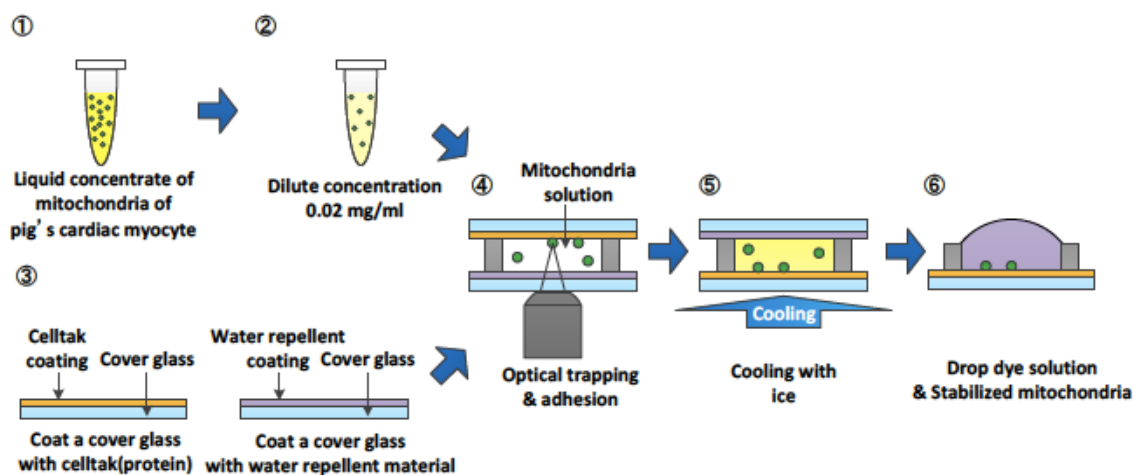


Fig. 6.3 Procedure for preparation of a mitochondrial sample by trapping

① 冷凍保存されているミトコンドリア溶液の流水解凍

本研究で用いるミトコンドリアは本学工学府生命工学専攻の太田研究室から提供して頂いた、ブタ心筋細胞から遠心分離法によって単離したミトコンドリアを使用した。

② ①の溶液を実験で使用する濃度に Tris 緩衝液で希釈

希釈後の濃度が濃すぎると光トラッピングの際に複数トラップするなど、個数制御が困難になるため、本実験では 0.02 mg/ml と低濃度に調整した。

③ Celltak コーティングと撥水コーティングしたカバーガラスを各々1枚用意

ミトコンドリアをカバーガラスに吸着させるため、ポリフェノールたんぱく質から生成された CellTak をカバーガラスにコーティングする。CellTak は細胞等をガラスや金属、プラスチックなどへ吸着させる吸着剤であり、優れた吸着性と細胞毒性もないことから生物実験に応用されている。本研究では、1 M, pH8.00 の炭酸ナトリウム水溶液と Celltak を 50 : 1 で混合し、カバーガラスに 200 μ l 滴下する。その後、室温で 30 分間放置し、超純水で余分な Celltak を洗い流し、冷蔵庫で一晩放置することでカバーガラスへコーティングする。また、ミトコンドリアを吸着させないカバーガラスには撥水コート（glaco）をコーティングした。これは、カバーガラスを取り外す際に、サンプル溶液との表面張力を軽減させることで、吸着されたミトコンドリアへの影響を抑えるためである。今回用いた撥水コート（glaco）は、一般的にガラスコートに用いられるもので、水のはじきやすさを評価する接触角は最大 106° のものを使用した。本研究では、撥水コートをカバーガラスに塗布し、室温で 30 分間放置後、ティッシュでふき、室温で一晩放置することでコーティングされる。

④ 光ピンセットによるカバーガラスへのミトコンドリア貼付

ミトコンドリア溶液 70 μ l でカバーガラス 2 枚とスペーサーで囲まれた空間（セル）を満たす。その後、ミトコンドリアを光トラップし、Celltak コーティングされたカバーガラスに貼り付ける。

⑤ サンプルの安定化

カバーガラスにミトコンドリアを貼り付けたセルを、0~4°C で 30 分間冷却し、貼り付けたミトコンドリアを安定化させる。

⑥ カバーガラスを取り外し，色素溶液を充填しミトコンドリアが張り付けられていないカバーガラスを取り外し，余分なミトコンドリア溶液を取り除き，計測用トリス緩衝液に SNARF-4F を混合させた色素溶液を 600 μl 充填し，約 30 分間安定化させる。

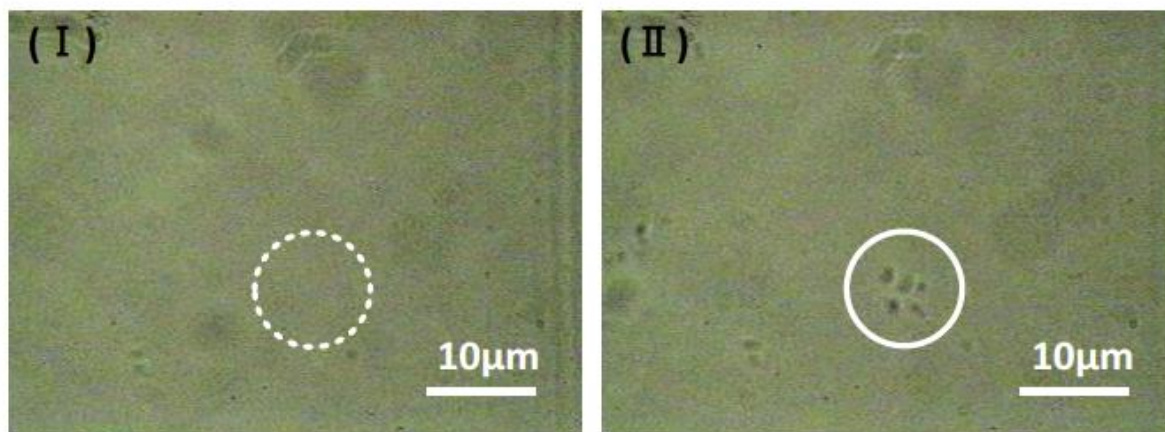


Fig. 6.4 Pasted mitochondria (I) before and (II) after pasting

構築した光ピンセットの性能を確認するため，ミトコンドリアをトラップする実験を行った結果を Fig. 6.4 に示す．光ピンセットでミトコンドリアを集める前の(I)では CCD 画像内にミトコンドリアは存在していなかったが，光ピンセットを用いることでミトコンドリアを集めることに成功した．

構築した光ピンセットの性能を確認するため，ミトコンドリアをトラップし，個数と貼付位置を変化させて，4 パターンのサンプルを作製した．Fig. 6.5 に示すように個数を 3 個，4 個，5 個，6 個と 1 個ずつ増加させた．貼付パターンは三角形型，直線型，V 型，凝集型を作製することに成功した．ここでは並べ方は特に意図はなく，光ピンセットで任意に配置できるのみを示している．これによりミトコンドリアの個数を Fig. 6.5 に示すように制御することが可能である．また，観察領域内の個数制御のみならずマイクロオーダーの距離制御が可能であり，Fig. 6.5(c) に示すようにミトコンドリア同士の距離を 1 μm 程度離して配置することも可能である．

以上の結果から，構築した光ピンセットで観察領域内の個数を制御することが可能になった．また今回は行っていないが，本研究で提案した光ピンセット法を用いることでミトコンドリア同士の距離制御も可能である．

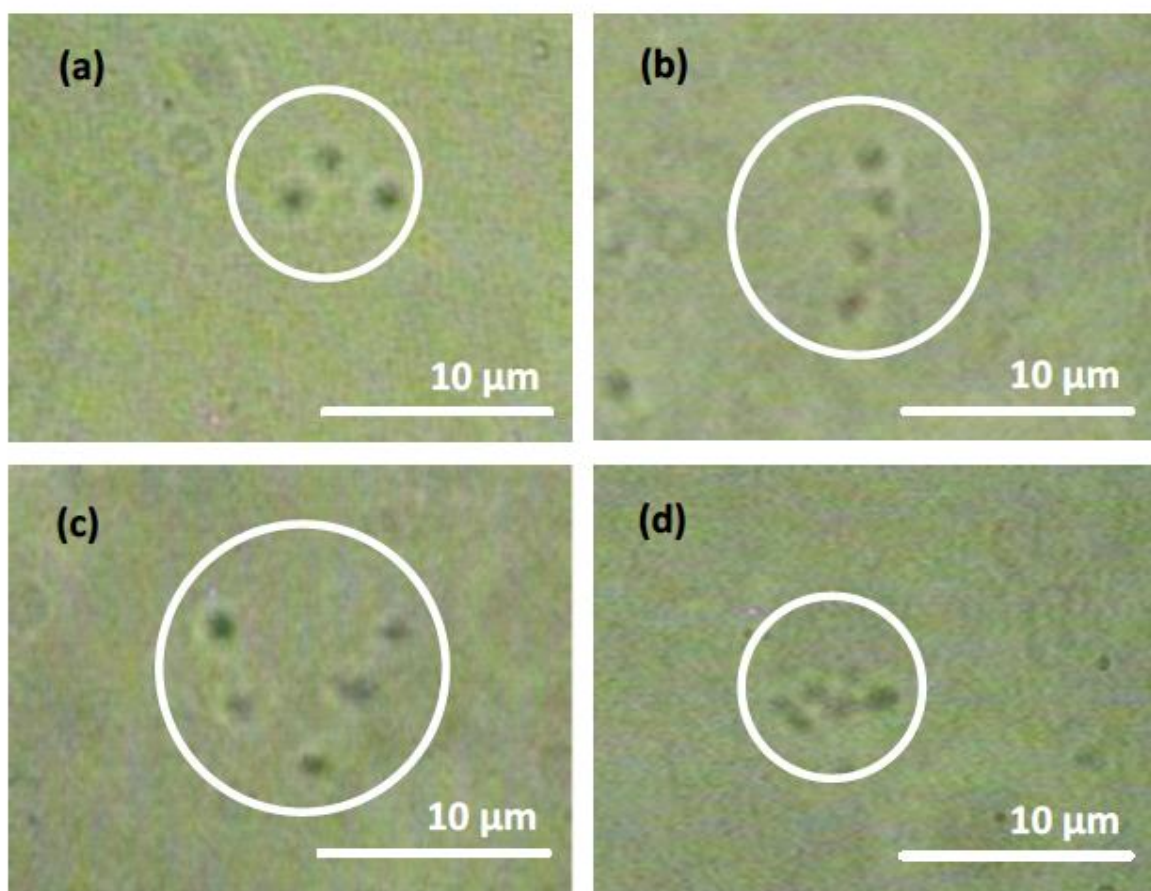


Fig. 6.5 Control of a number of mitochondria and distance
(a) triangle shape, (b) straight shape, (c) V shape and (d) aggregation

6.3.2 従来サンプル作製方法との比較

本研究室での従来サンプル作製方法は沈殿法を用いていた。沈殿法のサンプル作製手順を Fig. 6.6 に示す。

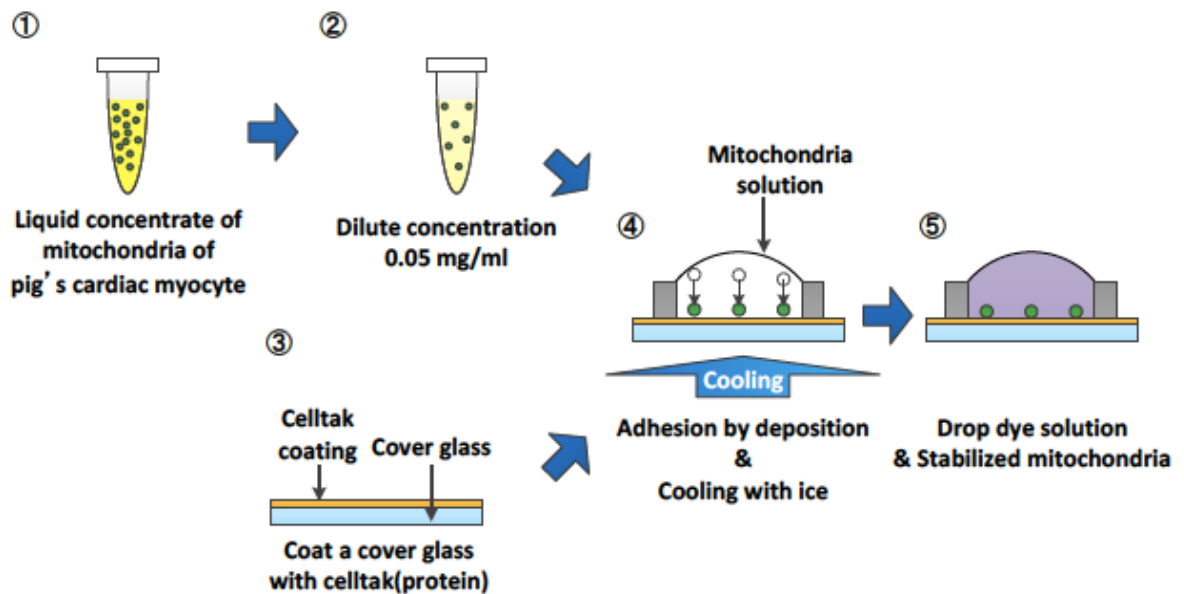


Fig. 6.6 Procedure for preparation of a mitochondrial sample by precipitation method

- ① 冷凍保存されているミトコンドリア溶液の流水解凍
 - ② ①の溶液を実験で使用する濃度に Tris 緩衝液で希釈
 - ③ Celltak コーティングしたカバーガラスを 1 枚用意
 - ④ 沈殿によるカバーガラスへのミトコンドリアの貼付とサンプルの安定化
ミトコンドリア溶液 200 μ l で Celltak コーティングされたカバーガラスに滴下する。
その後、ミトコンドリアが沈殿し、カバーガラスに貼り付き安定化するまで 2 時間、
0~4 $^{\circ}$ Cで冷却する。
 - ⑤ 色素溶液を充填
- ※①, ②, ③, ⑤は前述した光ピンセット装置によるサンプル作製方法と同じである

従来のサンプル作製方法は、サンプルであるミトコンドリアが沈殿し、Celltak に吸着することで作製される。この従来の作製方法では、沈殿する時間と、吸着して安定するまでの時間は 2 時間を必要とし、また沈殿による吸着のため、意図的に個数やミトコンドリア同士の距離等を制御することができない。

一方、光ピンセット装置によるサンプル作製方法では、光トラップによって吸着させる時間は 30 分程度であるため、サンプル作製時間が従来方法より 1 時間ほど短くなる。ミトコンドリアは、解凍から時間が経過するほど弱まるため、サンプル作製時間が短くなることは本研究では有効である。また、光トラップによってサンプルの個数や距離制御が可能となるため、あらゆるサンプル条件で実験を行うことが可能となる。

6.4 ミトコンドリアの生死判定

本研究ではサンプル作製後、ミトコンドリアの観測実験を行う。観測実験では生きているミトコンドリア（生ミトコンドリア）を観測するため、サンプル作製後にミトコンドリアの生死を確認する必要がある。これによって本研究のサンプル作製方法で、ミトコンドリアに損傷を与えているかを確認することが可能である。その生死判定評価方法として本研究では膜電位感受性蛍光色素を用いて評価した。

6.4.1 ミトコンドリアの膜電位

膜電位とは膜で仕切られた溶液間の電位差のことであり、一般的に、生体膜に囲まれた細胞やミトコンドリアなどの細胞小器官の内外に生じる電位差のことをさす。この電位差は細胞やミトコンドリアが生存や増殖に適した環境を保持するため細胞・ミトコンドリアの外とは異なるイオン環境を維持しているためであり、必然的に存在する物理化学的な現象である。

膜電位に関連するイオンは主に K^+ 、 Na^+ であり、その他に成分として少ないが Ca^{2+} 、 H^+ も関連する。これらのイオンは絶えず細胞内外を移動しており、イオンの流出入は細胞が生きている限り生じているが、ある条件においてこのイオンの移動が見かけ上なくなり定常状態になる。これは静止膜電位と呼ばれ、見かけ上のイオンの移動はなく膜電位が安定している。例として細胞等の静止膜電位を Table 6.2 に示す。

しかし、細胞やミトコンドリアが損傷あるいは死んでいる場合、膜電位が消失する。このことから、膜電位は細胞やミトコンドリアの活性が正常かを判断する指標とされている。

Table 6.2 Resting membrane potential

細胞	静止膜電位[mV]
ゾウリムシ	-40~-30
イカ神経軸索	-60~-70
カエル骨格心筋細胞	-90~-80
イヌ心筋細胞	-90~-80

6.4.2 膜電位感受性蛍光色素

本研究では、カチオン性（陽イオン）の膜電位感受性蛍光色素 TMRE(tetramethylrhodamine, ethyl ester, perchlorate, Thermo Fisher)を用いた。一方、膜電位が存在する正常なミトコンドリアの内膜内はアニオン性（陰イオン）であるため、TMRE はミトコンドリア内膜内に蓄積される。正常なミトコンドリアは内膜内の TMRE 濃度が高いため蛍光し、膜電位が消失したミトコンドリアは、TMRE がミトコンドリアの内膜外へと拡散するため蛍光が消光する。この性質から、TMRE はミトコンドリアの活性評価や生死判定評価に用いられる。蛍光色素

TMRE の諸元表を Table 6.3 に、分子構造式および蛍光スペクトルを図 5.13 に示す^[43].

Table 6.3 TMRE spec

吸収波長	550 nm
蛍光波長	575 nm
分子式	C ₂₆ H ₂₇ ClN ₂
分子量	514.9615

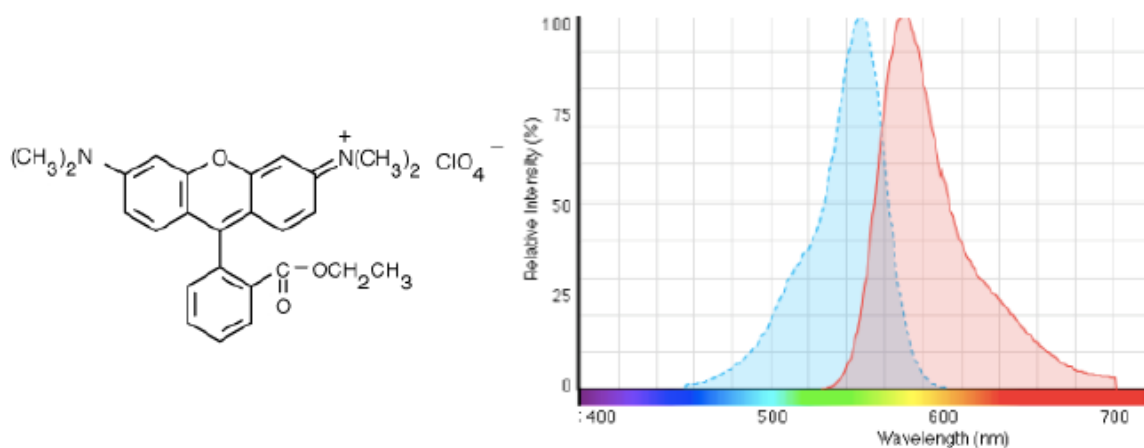


Fig. 6.7 TMRE molecular structure and fluorescent spectrum^[43]

6.4.3 ミトコンドリアの生死判定評価

本研究では、膜電位感受性蛍光色素 TMRE を用いるため、吸収波長 550 nm 付近である 532 nm の半導体レーザーと蛍光画像取得用の冷却 CCD を Fig. 6.8 のように実験装置に組み込む。今回、光ピンセット装置で貼り付けたミトコンドリアサンプルに TMRE 溶液(20 mM)を充填し、レーザーパワー18 uW で励起する。冷却 CCD の露光時間は 180 s である。励起前のミトコンドリアサンプル冷却 CCD 画像と励起した際の冷却 CCD 画像を Fig. 6.9 に示す。

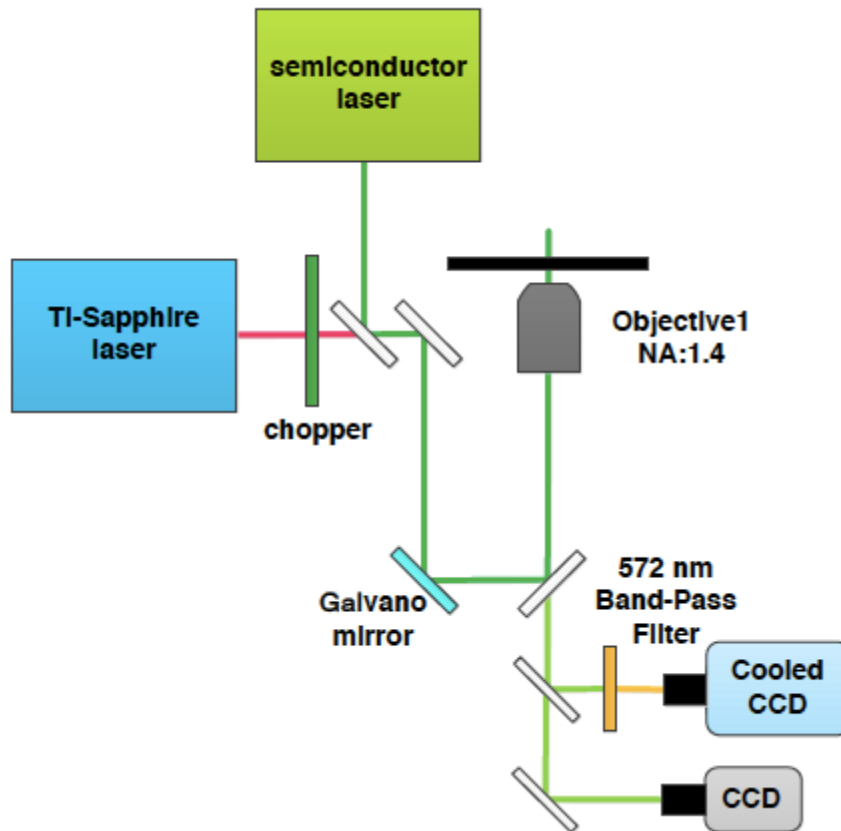


Fig. 6.8 Experimental setup for TMRE

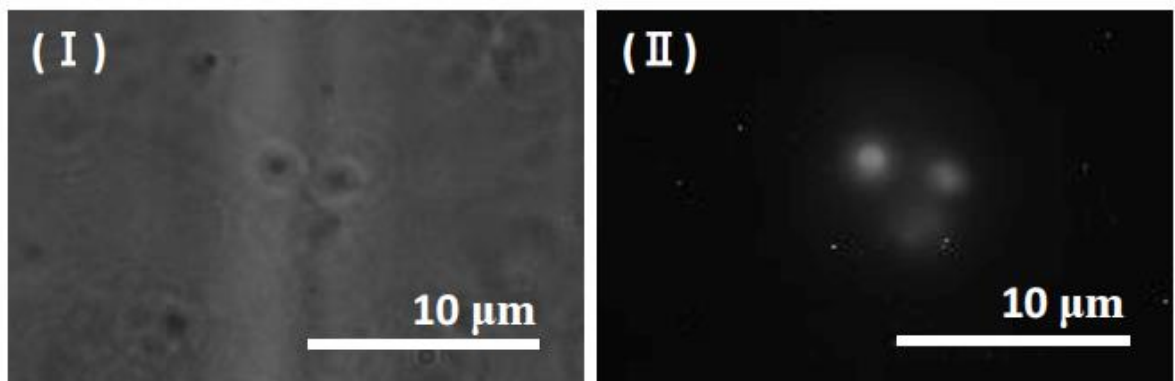


Fig. 6.9 CCD image of mitochondrial TMRE fluorescence (I) before and (II) after excitation

Fig. 6.9 に示すように、ミトコンドリアからの TMRE の蛍光が得られ、ミトコンドリアの生死が判別できることを確認できた。これから、構築した装置でミトコンドリアサンプルを作製し、ミトコンドリアの活性を観測することが可能である。

6.5 まとめ

本研究では観察対象のミトコンドリア数を制御するために光ピンセット法を用いた。本章では光ピンセットの実験装置を構築し、ミトコンドリアの個数や配置を任意に決めることに成功した。これにより、従来の沈殿法に比べて実験の意図に合わせたサンプルを作成することができるようになり、実験効率が向上した。

またミトコンドリア実験を円滑にすすめるために、膜電位感受性蛍光色素を導入し、生死判定機能を実験装置に持たせた。本章ではその蛍光色素の諸特性や基礎実験なども行って本実験で使用可能であることを示した。この生死判定機能の導入により、導入前よりも実験効率をあげることに成功し、前述したミトコンドリアサンプル作成法と合わせて格段に実験効率が上がったことは特筆すべきである。

第7章 ミトコンドリア個体数を制御した活性観測

7.1 リンゴ酸・グルタミン酸混合溶液滴下実験

本研究では、前節で述べたようにミトコンドリアを活性化させるために、活性剤であるリンゴ酸・グルタミン酸混合溶液(MG: Malate and Glutamate)を滴下する。しかし、MGは弱酸性であるため滴下することで溶液内のpHが変化することが考えられる。そこで本研究では、わずかなpH変化を防ぐためトリス緩衝液を使用しているが、実際に、MGを滴下した際に、測定溶液内のpHが変化しないことを確認する必要がある。

7.1.1 試料作製

本実験では前節で述べた計測用トリス緩衝液を用いる。この計測用トリス緩衝液にpH感受性蛍光色素SNARF-4Fを混合させ色素溶液にする。SNARF-4Fの濃度は0.02 mMである。

本実験で滴下するリンゴ酸・グルタミン酸混合溶液(MG)の組成をTable 7.1に示す。MGには色素溶液と同濃度のSNARF-4Fを混合させている。これはMGを滴下した際に測定溶液の色素濃度を変化させないためである。また色素溶液とMGのpHは測定溶液のpHに合わせた。

Table 7.1 Composition of MG

構成成分	濃度
リンゴ酸	250 mM
グルタミン酸	250 mM

7.1.2 実験方法

カバーガラスにpH7.0の色素溶液2940 μ lをFig. 7.1のように充填し、フェムト秒パルスレーザーを集光させ、蛍光をファイバースコープ2本で収集する。測定開始4分後に、活性剤であるMGをファイバースコープから12 mm離れた位置に60 μ l注入し、その後のFIRの変化を観察する。

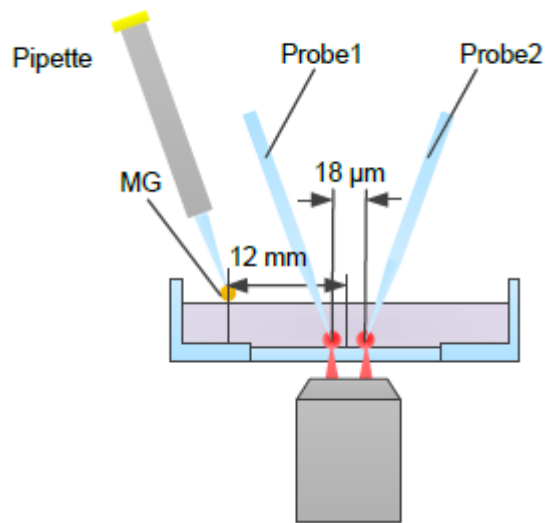


Fig. 7.1 Experimental setup for MG dripping by multi fiber

7.1.3 実験結果・考察

実験結果を Fig. 7.2 に示す. 4 分後に MG を滴下した. MG 滴下後の pH の変化は, Probe1, Probe2 共に有意な差は得られなかった. したがって, MG 滴下による pH 変化は十分小さく, ミトコンドリアの活性観測に与える影響は十分小さい事が確認された.

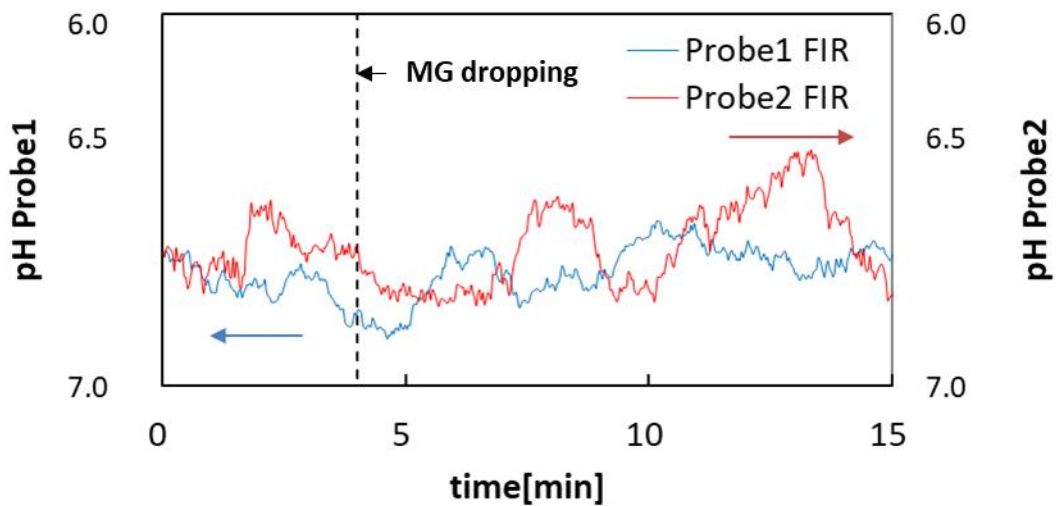


Fig. 7.2 Result of MG dripping

7.2 ミトコンドリア活性観測実験

本実験では生体試料として豚の心筋から分離したミトコンドリアを用いた. ミトコンドリアサンプルの準備は 6.3.1 節で述べたとおりである.

7.2.1 実験方法

第 6 章で述べた光ピンセットで作製したミトコンドリアサンプルにフェムト秒パルスレーザーを集光させた。Fig. 7.3 に示すように色素溶液は 588 μl で、実験開始 4 分後付近で活性剤である MG をファイバースコープから 10 mm 離れた位置に 12 μl 注入し、FIR の変化を観察する。ミトコンドリアサンプルの条件を Table 7.2 に示す。

各条件で、MG 滴下前の 4 分間と MG 滴下後の FIR の最大値から 5 分間の平均を求め、その差をミトコンドリア活性化による FIR 変化と定義する。またその FIR 変化の差を校正曲線を用いて、pH 変化に変換することで、ミトコンドリア活性化による pH 変化を求める。

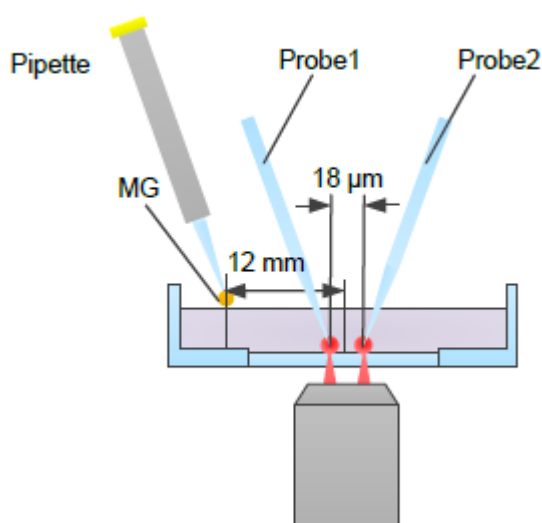


Fig. 7.3 Experimental setup for mitochondrial activity measurement by multi fiber

Table 7.2 Comparison of mitochondrial sample

Sample No.	Probe 1	Probe 2
	Mitochondrial	Mitochondrial
No.1	3	3
No.2	7	4
No.3	2	7

7.2.2 実験結果・考察

条件 No.1, No.2, No.3 で MG 滴下による FIR 応答と、サンプル CCD 画像の結果をそれぞれ Fig. 7.4, Fig. 7.6, Fig. 7.8 に示す。また FIR の変化を pH 変換したグラフを Fig. 7.5, Fig. 7.7, Fig. 7.9 に示し、Table 7.3 に pH 変化量をまとめた。

またミトコンドリアの個数差と pH 変化量をまとめたものを Fig. 7.10 に示す。

Fig. 7.4~Fig. 7.9 から、3 つの条件すべてで Probe1, Probe2 で MG 滴下によって FIR が上

昇していることが確認できる. これは, 7.1 節の MG 滴下実験では見られなかった挙動であり, ミトコンドリア活性による FIR 変化を表している.

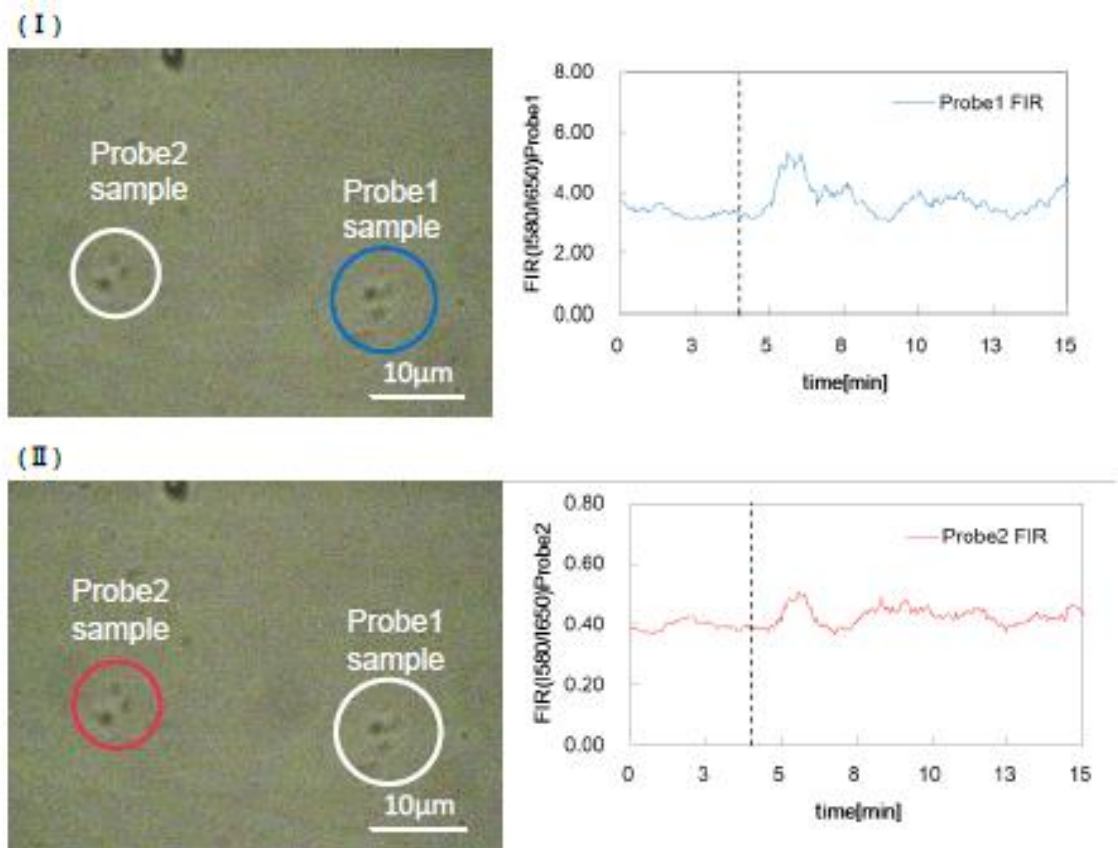


Fig. 7.4 FIR response for MG dropping of No.1 (I) FIR response of Probe1 and CCD image
(II) FIR response of Probe2 and CCD image

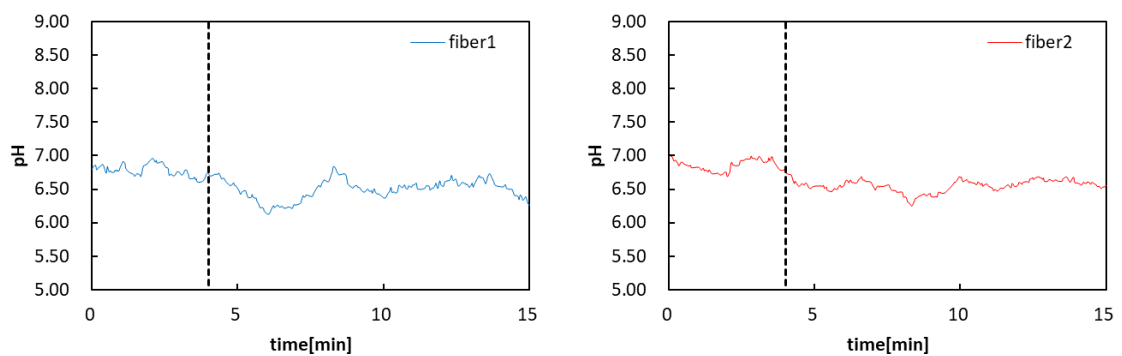
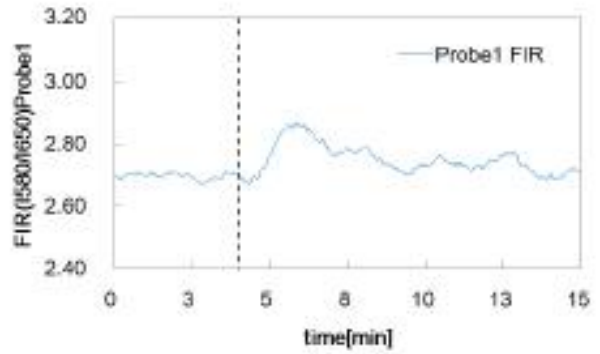
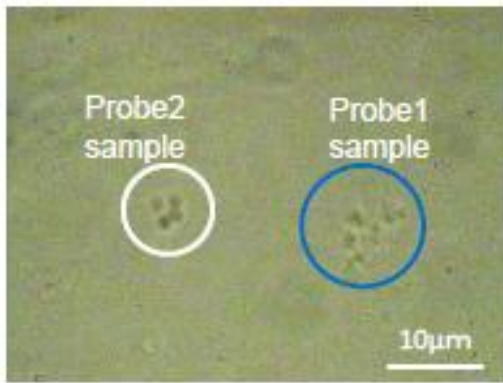


Fig. 7.5 pH changes of probe1 and probe2 of No.1

(I)



(II)

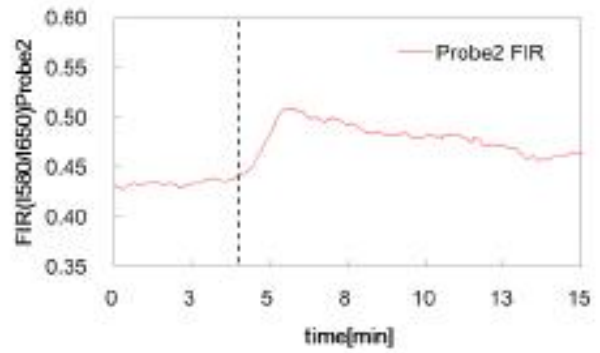
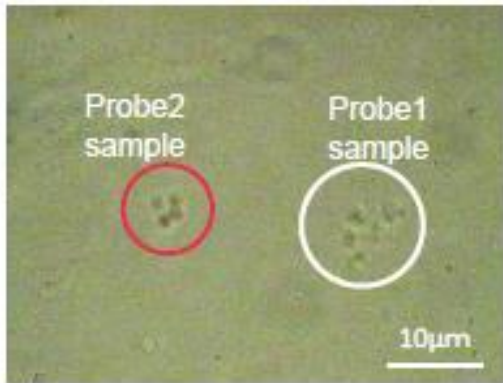


Fig. 7.6 FIR response for MG dropping of No.2 (I) FIR response of Probe1 and CCD image (II) FIR response of Probe2 and CCD image

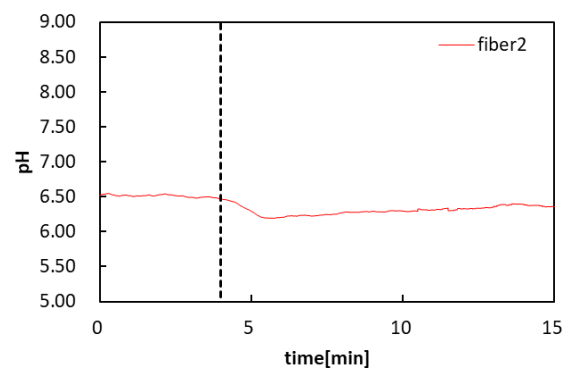
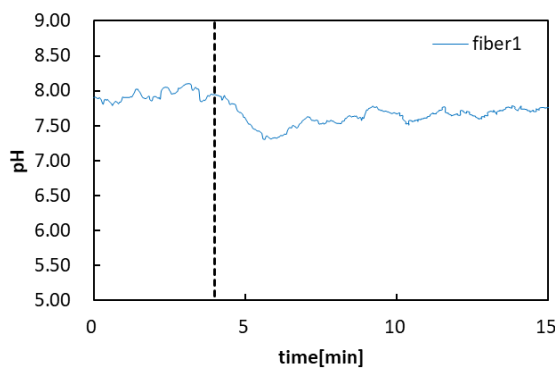


Fig. 7.7 pH changes of probe1 and probe2 of No.2

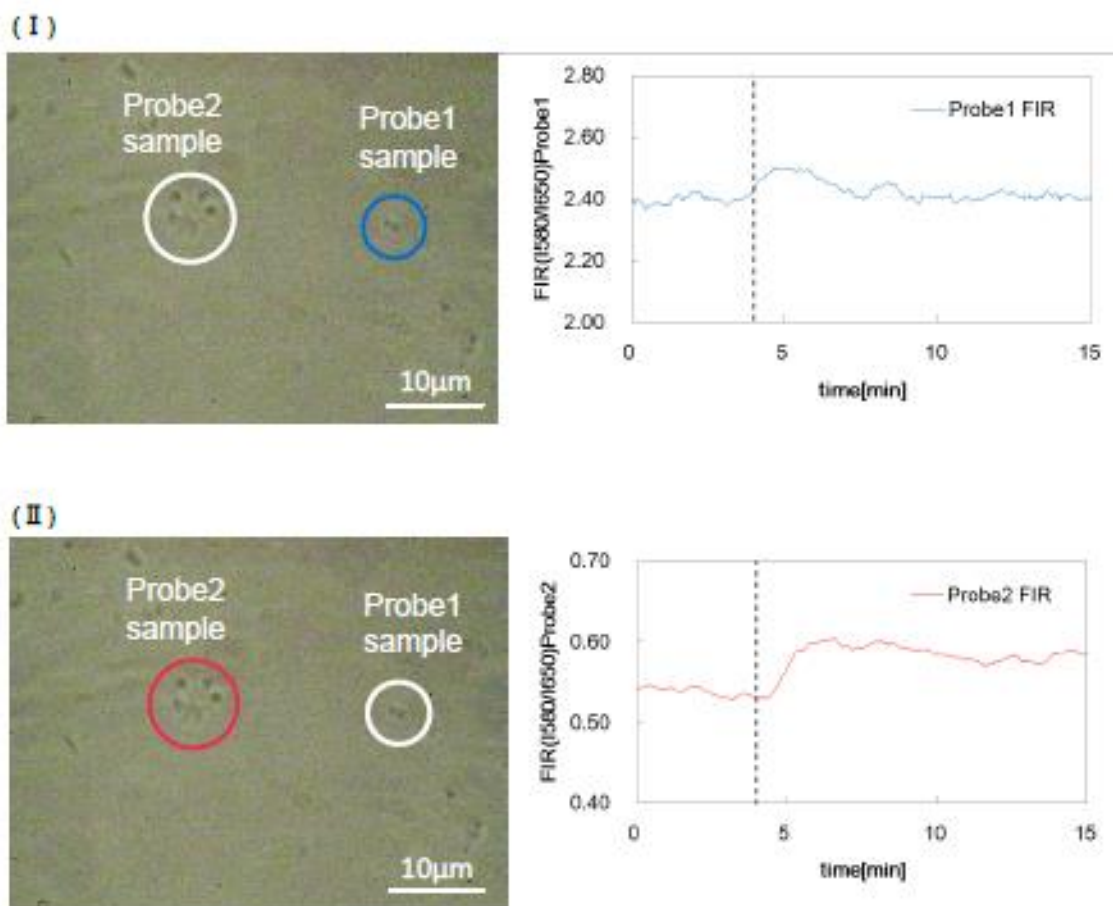


Fig. 7.8 FIR response for MG dropping of No.3 (I) FIR response of Probe1 and CCD image
(II) FIR response of Probe2 and CCD image

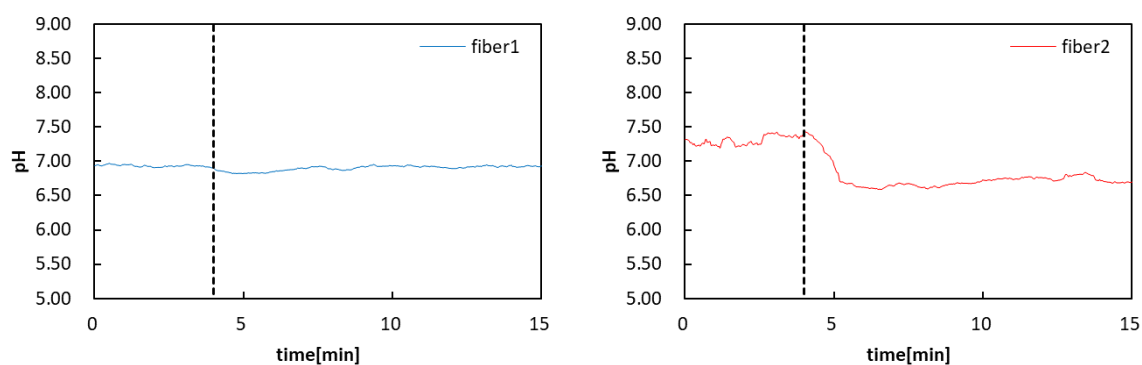


Fig. 7.9 pH changes of probe1 and probe2 of No.3

Table 7.3 pH change Δ pH of Probes 1 and 2 obtained from Figs. 7.5, 7.7, and 7.9.

Sample #	Probe	Number of mitochondria	Δ pH	単離から実験までの経過日数
1	1	3	0.46	5 日
	2	3	0.49	
2	1	7	0.34	28 日
	2	4	0.24	
3	1	2	0.05	32 日
	2	7	0.57	

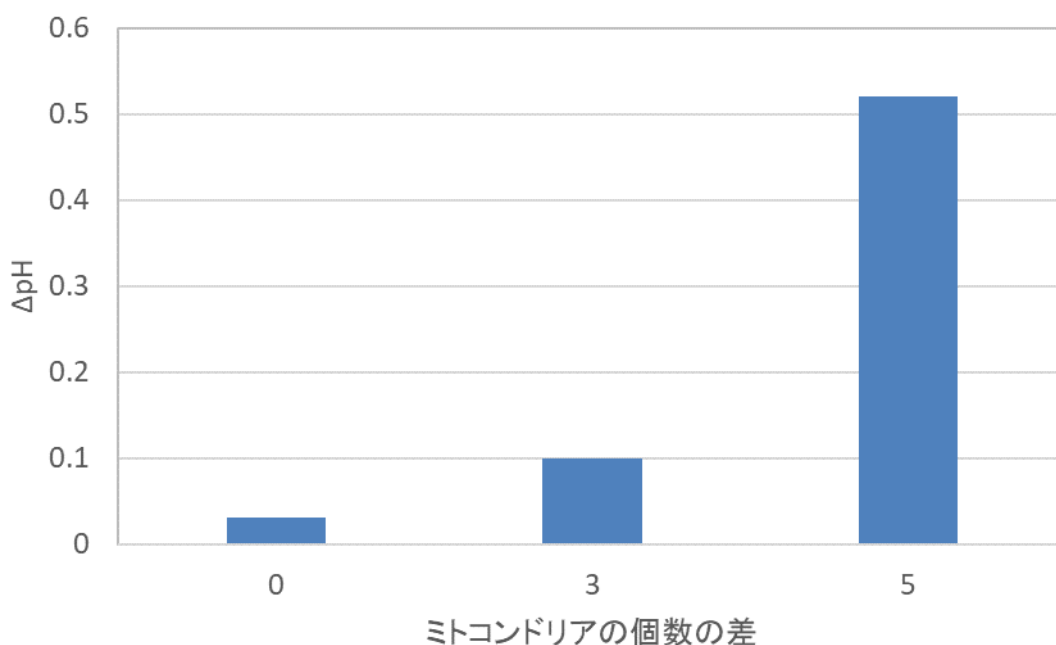


Fig. 7.10 Relation between the difference of the mitochondria number and pH change

No.1 の実験では, Probe1, Probe2 のミトコンドリアの個数が同数になるようにサンプルを作製した. その結果, pH 変化の差は 0.03 となった.

No.2, No.3 の実験では, Probe1, Probe2 のミトコンドリアの個数に差があるようにサンプルを作製した. その結果, 実験回数は少ないが, ミトコンドリアの個数が多い方が pH 変化量が大きいことを確認できた. 以上の結果より, ミトコンドリア周囲の pH 変化量はミトコンドリア個数に依存する事が明らかになった. これは, 集団の大きい方がプロトンポンプの協調産生がより大きくなる可能性を示している. それゆえ, 大きなエネルギーを必要とする臓器では, ミトコンドリアの集団の必要性が高くなり単体で ATP を作るよりも集団で ATP を作

ったほうが効率的だとも言える。

また、Table 7.3 より個数が多い方がミトコンドリアの pH 変化量が大きく得られているが、No.1 の Probe1, Probe2 の各々のサンプル個数に比べて No.2 の Probe1, Probe2 の個数は多いにも関わらず、pH 変化量は No.1 の方が大きいことが確認できる。これは、ミトコンドリアの個体差に加えて、実験日の差によるものと考えられる。ミトコンドリアは前章で述べたように豚の心筋細胞から遠心分離法で単離され冷凍保存されるが、単離された日から時間が経つにつれて活性の低下が明らかになっている。そのため、ミトコンドリアのサンプルは約 1 か月周期で作り直される。また、実験の際、冷凍保存のミトコンドリアの解凍後の経過時間につれて活性が落ちてくることも明らかになっている。今回、2015/12/23 に単離されたミトコンドリアを使用したものの、実験日は No.1 は 2015/12/28, No.2 は 2016/01/21, No.3 は 2016/01/25 と No.1 の実験日から No.2, No.3 の実験日まで時間があいている。その分ミトコンドリアの活性に影響が現れた可能性がある。これにより、ミトコンドリアの個数が同じでも活性量に差が出たと考えられる。

また今回の実験の結果からでは、プローブ先端のミトコンドリアの影響が大きく入っているかミトコンドリアの共鳴現象のほうが大きいかどうかは判断が付きづらい。しかし、プローブの分解能からすると共鳴現象による pH 変化を捉えていると考えられる。

7.3 まとめ

本章では、構築した二点差分計測法の装置を使用し、さらに光ピンセットにより個体数を制御した場合のミトコンドリア活性評価を行った。まず、ミトコンドリア活性観測実験前の予備実験として、MG 滴下による pH 変化ないことを確認した。その後、光ピンセットでミトコンドリアの個数を制御し、MG 滴下によるミトコンドリアの活性観測実験を行った。その結果、ミトコンドリア周囲の pH 変化量として観測することに成功した。その pH 差と個体数は比例はしなかったが、それらの間には高い相関を得ることができた。これは実験日の差が影響しているかもしれないが、ミトコンドリアの密集度が高ければ pH 変化が大きく、逆に低ければそれは小さくなることを意味していることを示唆することができた。

第8章 結論

8.1 まとめ

本研究では二波長型の pH 感受性蛍光色素を 2 光子吸収で励起し、その蛍光をコレクションモードファイバースコープで集光することで微小領域の pH 測定が可能な装置を開発することに成功した。また、ミトコンドリア間の活性差を観測するために光ピンセットによるサンプル作製法を提案するとともに実験光学系も二点励起光学系に変更し、個数差による活性度の差を観測することに成功した。

8.1.1 一点励起によるミトコンドリア活性観測

一点励起によるミトコンドリア活性観測では、近接場プローブや 2 光子吸収、pH 感受性蛍光色素を応用した深さ方向の分解能を持たせた pH 測定装置を開発した。本装置を使用することで局所的な蛍光励起や蛍光収集が可能になった。構築した装置において pH 感受性蛍光色素のキャリブレーションを行い、SNARF-4F の 2 光子吸収励起による蛍光の確認と取得した pH 較正曲線から FIR を算出し、pH を求めることが可能であることを実証した。さらに 2 波長のレシオ(FIR)を算出し、pH を求めることで外的要因による FIR の揺らぎの低減及び長時間安定した蛍光の持続を確認した。またプロトン注入による pH 変化の観測に成功し、本装置の時間分解能を計測・評価を行った。

一点励起によるミトコンドリア活性観測では、貼り付けたミトコンドリアの密度による pH 変化の差を観測することに成功した。これにより、本研究で提案し、構築した装置がミトコンドリアの活性観測が可能であることを実証することができた。

8.1.2 二点励起によるミトコンドリア活性観測

一点励起ではミトコンドリアの貼り付け密度の差による活性観測は可能であった。しかしながらミトコンドリア間の活性依存や個体数を制御し、同一環境下での活性観測は行うことができなかった。そこで、同一ディッシュ内で異なる 2 点を同時に測定評価するための装置の開発を行い、その装置における 2 本のプローブの pH 較正曲線を求めた。またプロトン注入による pH 変化の観測を行い、二点励起による実験系のプローブ間の時間分解能を計測・評価を行った。

ミトコンドリアサンプルの個体数を制御するために光ピンセット装置を構築し、同法を用いてミトコンドリアの数や間隔を制御したサンプルを作製した。従来の沈殿型と比べて、サンプルの個数や距離を制御することに成功し、サンプル作製時間も従来と比べて 30~1 時間ほど短くすることができ、ミトコンドリアへの負担を減らすことが出来た。基礎実験では、

MG 滴下によるミトコンドリアの活性をミトコンドリア周囲の pH 変化量として観測することが出来、pH 変化量は一点計測時とほぼ同等の値であることを示した。また活性観測では、ミトコンドリアの個数によって pH 変化量は異なり、ミトコンドリアの個数が多いほど pH 変化量が大きいことを示し、pH 変化量はミトコンドリアの個数に依存することを明らかにした。

8.2 本研究の新規性

本研究はミトコンドリア活性を pH を評価指標として計測できる装置開発をするとともに、ミトコンドリアの個数による活性度の差を開発装置によって明らかにし、新たなミトコンドリア活性評価手法であることを実証した。

ミトコンドリア近傍の局所領域の pH を測定するために、2 光子吸収という極めて限られた範囲内ではしか発生しない光学現象を利用することで蛍光発光領域の体積を縮小することに成功した。これにより蛍光強度の SN 比を上げることに成功している。また蛍光収集に近接場プローブを用いることで、対物レンズで蛍光収集するよりも収集効率を上げている。これら既知の光学現象や要素を組み合わせることで新規性の高い計測装置を提案した。

また光ピンセットを用いた個数制御されたサンプル作成や同一環境下における個数差による活性度の差の観測など、従来行われていなかった観測を今回提案した装置で実現し、新規性の高い結果を得ることができた。

8.3 本研究の位置づけ

本研究では一点励起、二点励起によるミトコンドリア活性観測手法を提案し、今までになく多くの結果を得ることができ、その結果の新規性を 8.2 で述べた。ここでは本研究で提案した手法と従来の手法との比較を行い本研究の位置づけを明確にしたい。

本研究の『2 光子励起とファイバースコープ』を組み合わせる方法以外に、多くの細胞観測に用いられている比較できる観測方法としては『単光子吸収と光学顕微鏡』、『2 光子励起と光学顕微鏡』がある。

『単光子吸収と光学顕微鏡』の特徴としては、下記のような点があげられる。

1. 従来法であるため多くの研究事例がある。
2. 特殊な光源を用いないので、低コストである。
3. 蛍光励起体積が大きい (=蛍光発光領域が大きい)
 - 蛍光発光領域が光軸方向に分布せず、軸方向分解能が無いと、空間分解能の低下や色素の退色が発生
 - 可視光のため試料による励起光の吸収

4. 蛍光の再吸収

また、『2光子励起と光学顕微鏡』に関しては、

1. 光源が高価
2. 蛍光励起体積が小さく、光軸方向の励起部が限定されるため軸方向分解能が高い
3. 色素退色が少ない
4. 励起光が赤外光のため、生体試料の吸収が低い
5. 蛍光の再吸収がある

が挙げられる。これらを本研究で提案した『2光子吸収とファイバースコープ』を組み合わせた方法と性能比較すると Table 8.1 となる。

Table 8.1 Comparison table

	単光子 + 光学顕微鏡	2光子 + 光学顕微鏡	2光子 + 光ファイバースコープ
励起レーザーのコスト	○	×	×
励起体積の大きさ	×	○	○
蛍光発光の局在化 (光軸方向)	×	○	○
空間分解能	×	○	○
色素の退色	×	○	○
試料による励起光の吸収	×	○	○
蛍光の再吸収	×	×	○
蛍光検出サイズが 回折限界を超える	×	×	○

この表から本研究で提案した手法は従来の方法に比べて、蛍光を局在化させることができ、さらに蛍光検出が回折限界を超えるため空間分解能が格段によくなる。また蛍光の再吸収がないため感度良く測定できることも従来の手法にはないものである。

8.4 将来への展望

本研究の将来性としてはクロストークの除去，マルチプローブ装置の分解能の向上，実験回数を重ねるなどが挙げられる．

現在，Probe1 と Probe2 の間隔を 18 μm 以下にすると，クロストークにより互いの蛍光を検出するため正確な測定ができない．また，単一ミトコンドリアの活性観測やミトコンドリアの活性分布観測を行うためには，より装置の分解能を向上させる必要がある．この2点の課題を解決するため，今後，ファイバースコープに金属コーティングをすることで，開口部分のみから蛍光を収集しクロストークをなくし，かつ分解能の改善が期待される．また，今回ミトコンドリアの活性が個数に依存する結論が得られたが，観測対象が生体試料であるため，本論文をより強く支持するために実験回数を重ねデータ数を増やすことが必要である．

これらをクリアすることにより，ミトコンドリアの ATP 産生のメカニズムとミトコンドリア同士の相互作用を解明するために，単一・集合体ミトコンドリアの活性分布，単一ミトコンドリアと集合体ミトコンドリアの活性量の差異を明らかにすることが期待される．また，本手法では，Probe の 1 本をリファレンスに用いることで，pH のみならず，カルシウムイオンなどの細胞に影響を及ぼす他イオンの蛍光検出にも応用が可能である．

謝辞

本研究を進めるにあたり、的確なご指導・ご鞭撻を賜りました本学工学府機械システム工学専攻の梅田倫弘教授に心より感謝いたします。

サンプルや実験器具のご提供、また、数々のご助言を下さいました本学工学府生命工学専攻の太田善浩准教授に深く御礼申し上げます。

また、本論文の審査をしていただいた、本学生物システム応用科学府生物機能システム科学専攻の岩井俊昭教授、工学府機械システム工学専攻の安藤泰久教授に深く御礼申し上げます。

研究を進めていく上で、実験装置の構築、実験方法、結果の考察など、多くの助言をいただき、かつ丁寧に面倒を見てくださった岩見健太郎准教授に心より感謝いたします。

同じミトコンドリアの実験を行い、機器の使用方法やサンプルの作成方法など1から丁寧に教えていただき、実験手法や結果の考察など多くの助言を頂いた李永波氏に心から感謝の意を表明いたします。

実験を行うにあたり、サンプルや実験器具のご提供をして頂いた太田研究室の小野島匠氏に御礼申し上げます。

ともに研究生生活を送った梅田研究室の皆様に心から感謝いたします。

また、業務と関わり合いが無いにも関わらず、気にかけていただいていた㈱ニコン、㈱栃木ニコンの上司、先輩、同僚に御礼申し上げます。

最後に、本学にて学生生活を送るにあたり、金銭面・精神面において惜しみない援助をしていただいた両親に心より感謝致します。

参考文献

- [1] アポトーシス細胞死の機能と機構 山田武ほか (1995) 日経サイエンス
- [2] 細胞死・アポトーシス集中マスター 辻本賀英 (2006) 羊土社
- [3] Metzstein, M. M. et al., “Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future Trends Genet”, *American Association for Cancer Research.*, **10** 410 - 416, (1998)
- [4] 成熟・展開するアポトーシス研究 辻本賀英ほか (2004) 羊土社
- [5] Christoph Richter, Matthias Schweizer, Andrea Cossarizza and Claudio Franceschi, “Control of apoptosis by the cellular ATP level”, *FEBS Letters*, **378** 107-110, (1996)
- [6] Guido Kroemer, Naoufal Zamzami and Santos A. Susin, “Mitochondrial control of apoptosis”, *IMMUNOLOGY TODAY*, **18** 44-51, (1997)
- [7] Carsten Scaffidi, Sabine Kirchhoff, Peter H Krammer, Marcus E Peter, “Apoptosis signaling in lymphocytes”, *Current Opinion in Immunology*, **11** 277-285, (1999)
- [8] Jae-Sung Kim, Lihua He and John J. Lemasters, “Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **304** 463–470, (2003)
- [9] Pierre Golstein and Guido Kroemer, “Cell death by necrosis: towards a molecular definition”. *TRENDS in Biochemical Sciences*, **32** (1), 37-43,(2006)
- [10] 日本科学未来館 HP <http://www.miraikan.jst.go.jp/>
- [11] ミトコンドリア・ミステリー 林純一 (2002) 講談社
- [12] 東京大学 生命科学構造化センター／生命科学ネットワーク 生命科学教育用画像集 <http://csls-db.c.u-tokyo.ac.jp/index.html>
- [13] ミトコンドリア 中澤透, 浅見行一 (1995) 東京大学出版会
- [14] 新ミトコンドリア学 内海耕慥 井上正康
- [15] S. Schmitt, S. Schulz, E. M. Schropp, C. Eberhagen, A. Simmons, W. Beisker, M. Aichler and H. Zischka “Why to compare absolute numbers of mitochondria”, *Mitochondrion* **19** (2014) 113–123
- [16] Y. Uechi, H. Yoshioka, D. Morikawa, Y. Ohta, “Stability of membrane potential in heart mitochondria: Single mitochondrion imaging”, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **344** (2006) 1094–1101
- [17] T. Hattori, K. Watanabe, Y. Uechi, H. Yoshioka and Y. Ohta, “Repetitive Transient Depolarizations of the Inner Mitochondrial Membrane Induced by Proton Pumping”,

- Biophysical Journal*, **88** 2340-2349, (2005)
- [18] Y. Li, R. Shinohara, K. Iwami, Y. Ohta, and N. Umeda, “Dual Wavelength Fluorescent Ratiometric pH Measurement by Scanning Near-Field Optical Microscopy”, Proc. of SPIE Vol. 7544 754419-1
- [19] Y. Li, S. Honda, K. Iwami, Y. Ohta and N. Umeda, “Analysis of mitochondrial mechanical dynamics using a confocal fluorescence microscope with a bent optical fibre”, *Journal of Microscopy*, **260**, Issue 2 2015, pp. 140–151
- [20] J. F. Buckman and I. J. Reynolds, “Spontaneous changes in mitochondrial membrane potential in cultured neurons”, *J. Neurosci.*, **21** 5054-5065, (2001)
- [21] B. Masola and N. P. Ngubane, “The activity of phosphate-dependent glutaminase from the rat small intestine is modulated by ADP and is dependent on integrity of mitochondria”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **504** 197–203, (2010).
- [22] 近接場光学顕微鏡を用いた二波長蛍光レシオ測定による pH 値分布の測定 篠原亮輔
平成 21 年度梅田研究室修士論文
- [23] Yongbo Li, Ryosuke Shinohara, Kentaro Iwami, Yoshihiro Ohta and Norihiro Umeda, “Observation of Mitochondrial Activity Based on Temporal and Spatial pH Variation Measured by Near-Field Fluorescent Ratiometry”, *Science China Physics, Mechanics and Astronomy*, **54** 2225–2229, (2011)
- [24] 近接場光学の基礎 大津元一, 小林潔 (2003) オーム社
- [25] ナノオプティクス・ナノフォトリクスのすべて 河田聡ほか (2006) フロンティア出版
- [26] ナノイメージング 吉田隆 (2008) エヌ・ティー・エス
- [27] 講義と実習 生細胞蛍光イメージング 原口徳子ほか (2007) 共立出版
- [28] pH を測る 佐藤弦, 本橋亮一 (1987) 丸善
- [29] 統計力学 I 田崎清明 (2008) 培風館
- [30] 株式会社堀場製作所 <http://www.horiba.com/jp/>
- [31] 活量とは何か 玉虫怜太 (1983) 共立出版株式会社
- [32] オリンパス <http://www.olympus.co.jp/jp/>
- [33] Mike Heilemann, “Fluorescence microscopy beyond the diffraction limit”, *Journal of Biotechnology*, **149**, 243–251, (2010)
- [34] P. D. JÖBSIS, C. A. COMBS and R. S. BALABAN, “Two-photon excitation fluorescence pH detection using 2,3-dicyanohydroquinone: a spectral ratiometric approach”, *Journal of Microscopy*, **217** (3), 260–264, (2005)

- [35] I. Kasik, J. Mrazek, T. Martan, M. Pospisilova, O. Podrazky, V. Matejec, K. Hoyerova and M. Kaminek, “Fiber-optic pH detection in small volumes of biosamples”, *Anal Bioanal Chem*, **398** 1883–1889, (2010)
- [36] J. Liu, Z. Diwu and W. Y. Leung, “Synthesis and Photophysical Properties of New Fluorinate Benzo[c]xanthene Dyes as Intracellular pH Indicators”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **11** 2903–2905, (2001)
- [37] Thorlab より聞きとり
- [38] オーシャン옵ティクス <http://www.optosirius.co.jp/OceanOptics/products/qe65000.html>
- [39] 浜松ホトニクス <http://jp.hamamatsu.com/resources/products/etd/pdf/m-h7422j.pdf>
- [40] 日本レーザー <http://www.japanlaser.co.jp/tabid/65/pdid/L00000431/Default.aspx>
- [41] レーザー応用光学 小原 實 他 1998 共立出版株式会社
- [42] 光マイクロマシン 澤田廉士 2002 オーム社
- [43] Thermo Fisher SCIENTIFIC 社 HP
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/T669?ICID=search-product>

Appendix

A.1 光ピンセット（光トラップ）の原理

光トラッピング法は、光の力学的な作用を利用してマイクロメータ以下の微小物体をレーザービームの焦点付近に捕捉し、非接触で移動させる事ができる技術である。この時、光の力学的作用を「放射圧」と呼び、単一光線が屈折率の異なる界面で生じる光放射圧は Fig. 0.1 のように示せる。光は光子（フォトン）であるため運動量を持ち、単一光線が物質の境界面での反射と屈折を考えると、放射圧は光線ベクトルの変化量（運動量の変化分）であるため、界面の垂直方向に力が働く^[41]。

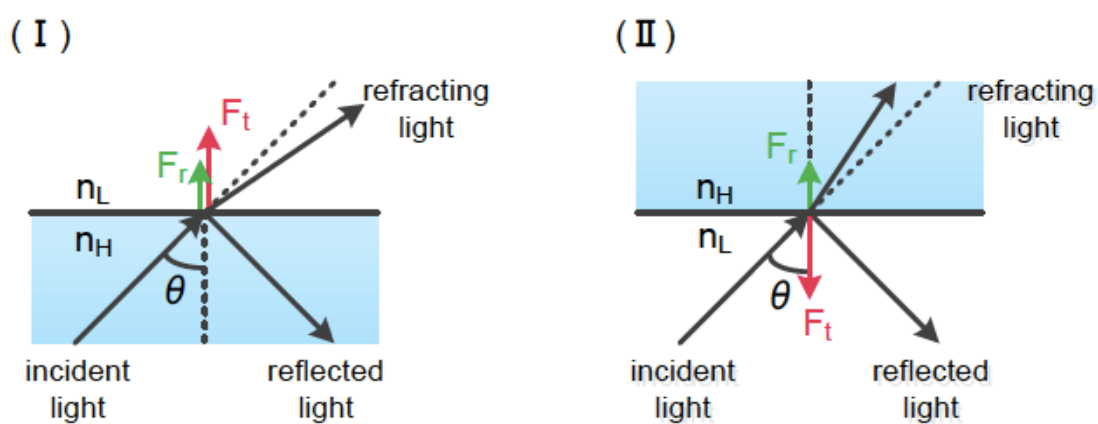


Fig. 0.1 Radiation force of different refractive index interface

(I) Incident of high refractive index to low refractive index

(II) Incident of low refractive index to high refractive index

(F_t : force of refracting light, F_r : force of refracted light, n_H, n_L : refractive index)

また、光トラッピングの原理は幾何光学理論や電磁界理論から説明される。前者はレーザー波長に比べてトラップ対象物体が大きい場合（Mi 散乱領域）、後者はレーザー波長に比べてトラップ対象物体が小さい場合に用いられる^[42]。

本研究では、トラップ対象物体が $1\sim 2\ \mu\text{m}$ サイズのミトコンドリアであり、レーザー波長 $800\ \text{nm}$ より十分大きいため、前者の幾何学光学論に基づいて光トラッピングの原理・特性を説明する。

Fig. 0.2 はレーザー波長に比べてトラップ対象物体が大きい光トラッピングの原理図である。レーザー光を NA の大きな対物レンズで集光し、対象物体に照射したと仮定する。ここでは対象物体と周囲の媒質の屈折率差が小さいため反射は無視し、屈折による力のみを考える。光線 a に着目すると、対象物体への入射面と出射面で光線は屈折し、運動量に変化する。運動量保存則により、入射面では F_{a1} 、出射面では F_{a0} が対象物体表面に対して垂直方向に作用す

る. この F_{at} , F_{a0} 両方の合力として F_a が生じる. 光線 b についても同様に生じる. これらの F_a と F_b の合力 F が対象物体に作用する. すなわち, 対象物体を焦点 f 付近に引き寄せるような力が作用する. この放射圧力 F をトラップ力と呼ぶ. 放射圧力 F が上向きに働く場合, 重力と浮力の差と, この放射圧力 F が釣り合う位置で対象物は光トラップされる.

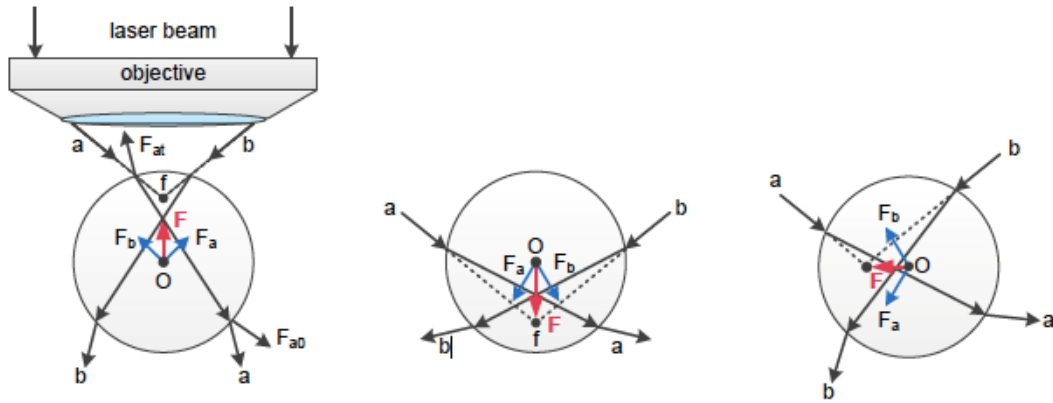


Fig. 0.2 Radiation force of different focus position

一般的な光トラッピングを実現する条件は, 以下のようにまとめられる.

光学条件として, 操作対象物に対して透過率の高い波長のレーザーを選択し, またトラップ力を増強させるためにレーザー光は開口数(NA)の大きいレンズで集光する. このことから, 本研究では, 透過率の高い近赤外域である波長 800 nm のレーザーを使用し, 開口数の大きい対物レンズ(NA 1.4, Olympus, UPLSAPO 100×O)を用いた.

A.2 光トラッピング効率

レーザービームは幾つかの独立した光線で記述され, その中の 1 本の光線が対象物体に与える放射圧力について図示したのが Fig. 0.3 である. ここで, 対象物体の周囲媒質の屈折率を n_1 , 対象物体の屈折率を n_2 , フレネル反射率を R , 透過率を T , レーザーパワーを P , 入射角 θ_1 , 屈折角 θ_2 とする.

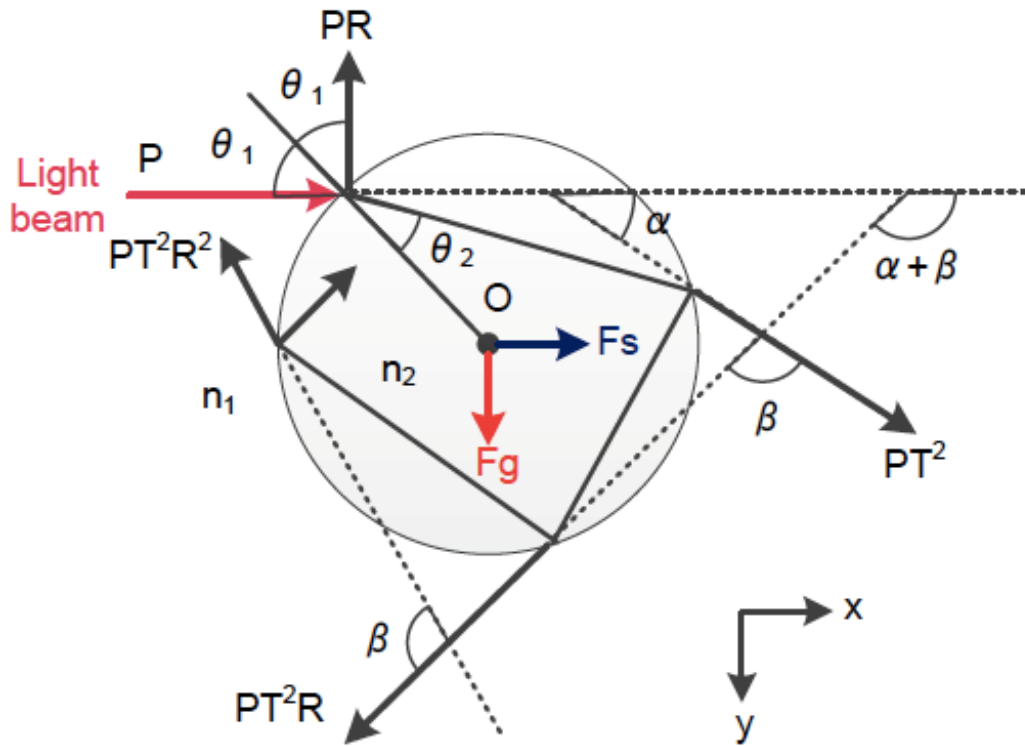


Fig. 0.3 Radiation force of experimental sample

Fig. 0.3 のようにレーザーパワーPの光線が入射角 θ_1 で対象物体に入射した際の、物体の境界面での多重屈折を追跡すると、物体に作用する力は、散乱力 F_s 勾配力 F_g である。この2つの力は、この光線によって生じる光放射圧 F_r を入射光線に平行な成分(x成分) F_s と、入射光線に垂直な成分(y成分) F_g に分解したものである。フレネル反射率R、透過率T、散乱力 F_s 、勾配力 F_g は各々以下の式で表される。

$$R = \left[\frac{1}{2} \left\{ \frac{\tan^2(q_2 - q_1)}{\tan^2(q_2 + q_1)} + \frac{\sin^2(q_2 - q_1)}{\sin^2(q_2 + q_1)} \right\} \right] \dots \dots \dots (0.1)$$

$$T = 1 - R \dots \dots \dots (0.2)$$

$$F_s = \left[1 + R \cos 2q_1 - \frac{T^2 \{ \cos 2(q_1 - q_2) + R \cos 2q_1 \}}{1 + R^2 + 2R \cos 2q_2} \right] \frac{n_1 P}{c} = Q_s \frac{n_1 P}{c} \dots \dots \dots (0.3)$$

$$F_g = \left[R \sin 2q_1 - \frac{T^2 \{ \sin 2(q_1 - q_2) + R \sin 2q_1 \}}{1 + R^2 + 2R \sin 2q_2} \right] \frac{n_1 P}{c} = Q_g \frac{n_1 P}{c} \dots \dots \dots (0.4)$$

ここで、 Q_s は散乱力 F_s の光トラップ効率、 Q_g は勾配力 F_g の光トラップ効率となり、一

本の光線によって発生する放射圧力 F_t 、光トラップ効率 Q_t は次式となる。

$$F_t = (F_s^2 + F_g^2)^{\frac{1}{2}} = Q_t \frac{n_1 P}{c} \dots\dots\dots (0.5)$$

$$Q_t = (Q_s^2 + Q_g^2)^{\frac{1}{2}} \dots\dots\dots (0.6)$$

対象物体全体に作用する放射圧力 F_t を求めるためには、全入射光線について積分することで得られる。このトラップ力 F_t (=放射圧力) 及び光トラップ効率 Q_t はレーザービームの焦点位置に依存し、対象物体の中心と焦点の距離を S_z とすると、それらの関係性は Fig. 0.4 のように表すことができる。ただし、 S_z はレーザービームの照射方向とは逆の向きを正とする。

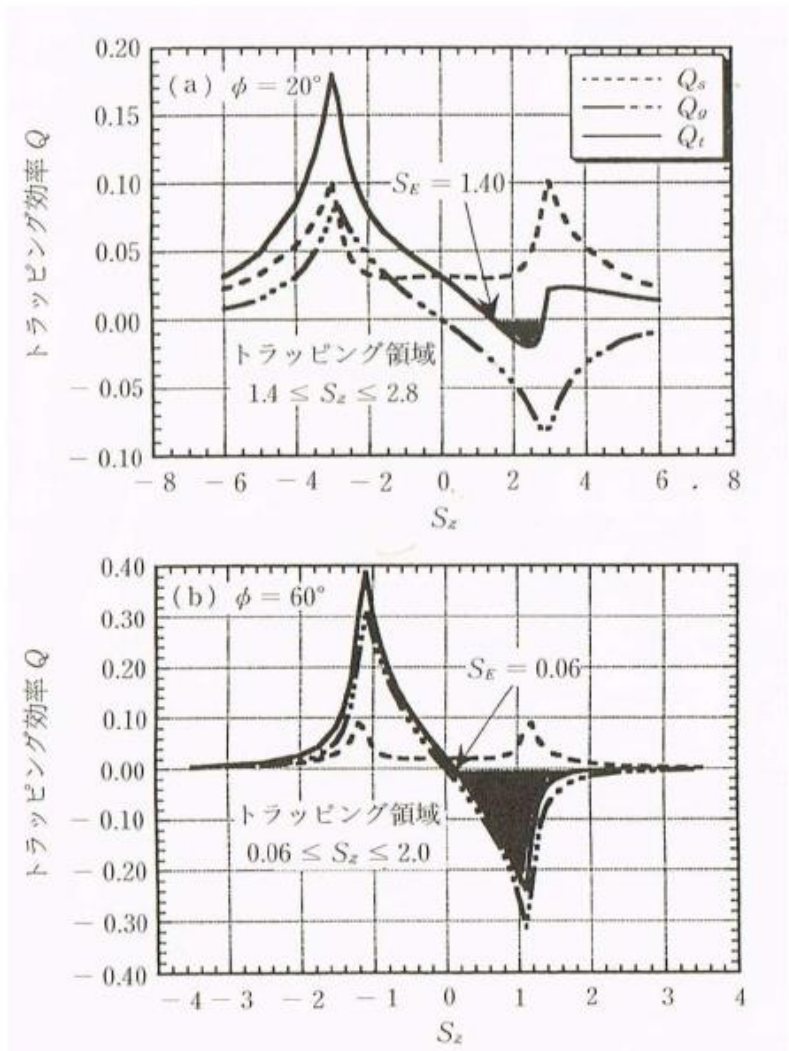
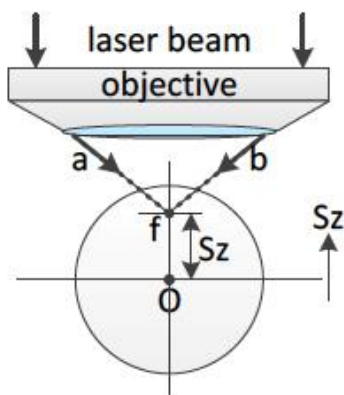


Fig. 0.4 Relation of S_z and trapping efficiency^[42]

Fig. 0.4 中において、 Q が正の場合には対象物体は光の進行方向に押され、負の場合には逆に焦点方向にひきつけられることを意味する。このことから散乱力は常に散乱力光トラップ

効率が正であるため、常に光の進行方向に物体を押し出す力として作用し、一方、勾配力は物体を焦点近傍にとどめるスプリング力のように作用する。

Fig. 0.4 の $S_z < 0$ の場合、 Q_s 及び Q_g ともに正であるため物体は光の進行方向に押される力が作用する。一方、 $S_z > 0$ の場合、勾配力の方向が散乱力とは反対であるため、勾配力が散乱力を超える力が生じた場合、焦点近傍に物体を安定してトラッピングすることが可能となる。よって、Fig. 0.4 の場合黒く塗られた範囲がトラッピング範囲となる。

A.3 光ピンセットの理論解析

前述した式を用いて、本実験で用いる光ピンセット装置のトラッピング効率の理論解析を行った。解析方法の説明として Fig. 0.5 と計算式を以下に示す。

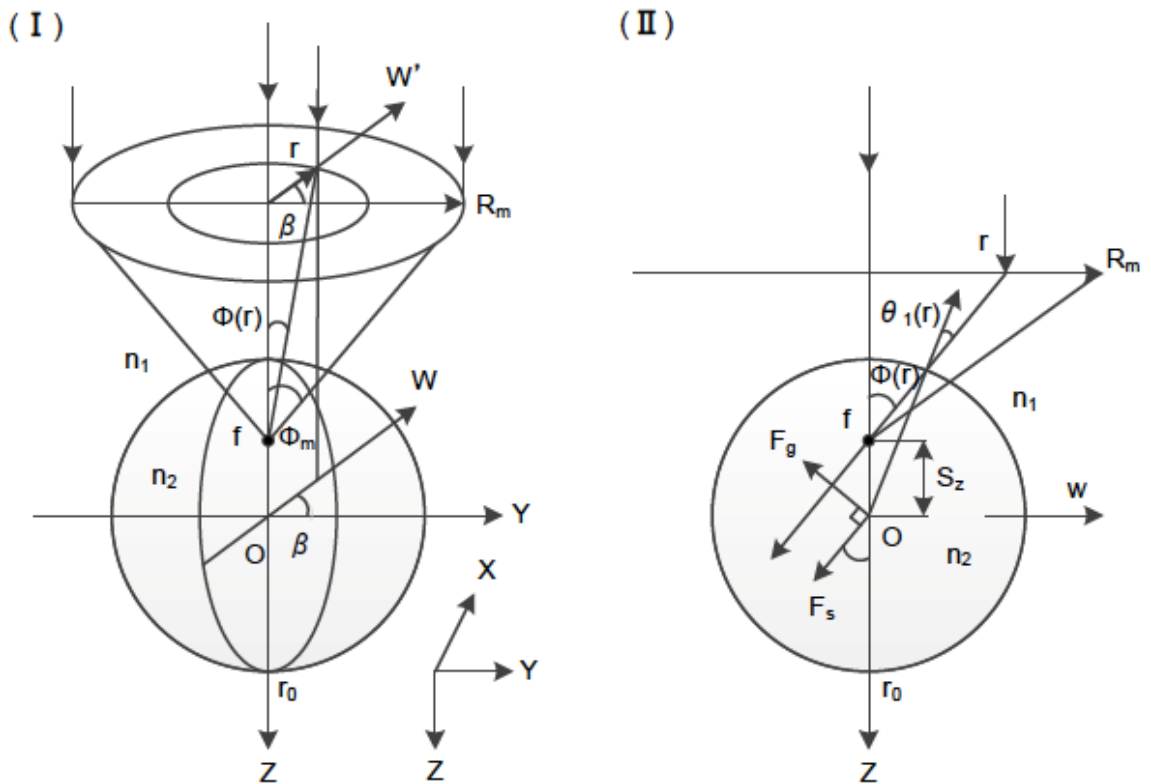


Fig. 0.5 Light trapping efficiency of optical axis (I) and space diagram (II) W-W' profile

まず、Fig. 0.5 (I)のレンズの点 (r, β) を通過し、対象物体に入射する光線の入射角 $\theta_1(r, \beta)$ を求める。入射光線と Z 軸のなす角を $\Phi(r)$ とすると

$$r_0 \sin \theta_1(r) = S_z \sin \phi(r) \dots\dots\dots (0.7)$$

となる。

r_0 は対象物体の半径、 S_z は対象物体の中心 O とレーザー焦点 f の間隔である。レーザー

ポットの最大半径を R_m ，レーザーの最大集光角を Φ_m とすると， Fig. 0.5(II) より，

$$\phi(r) = \tan^{-1} \left(\frac{r}{R_m} \tan \phi_m \right) \dots\dots\dots (0.8)$$

と求められる． よって， 入射角 $\theta_1(r)$ は

$$\theta_1(r) = \sin^{-1} \left(\frac{\frac{S_z r \tan \phi_m}{r_0 R_m}}{\sqrt{1 + \left(\frac{r \tan \phi_m}{R_m} \right)^2}} \right) \dots\dots\dots (0.9)$$

となる． 屈折角 $\theta_2(r)$ はスネルの法則から

$$\theta_2(r) = \sin^{-1} \left(\frac{n_1}{n_2} \sin \theta_1(r) \right) \dots\dots\dots (0.10)$$

となる．

$$\theta_1(r) = \sin^{-1} \left(\frac{\frac{S_z r \tan \phi_m}{r_0 R_m}}{\sqrt{1 + \left(\frac{r \tan \phi_m}{R_m} \right)^2}} \right) \quad \theta_2(r) = \sin^{-1} \left(\frac{n_1}{n_2} \sin \theta_1(r) \right) \quad (0.9) \text{ と } (0.10)$$

ここで， 式

$$\text{を式(0.3)} F_s = \left[1 + R \cos 2q_1 - \frac{T^2 \{ \cos 2(q_1 - q_2) + R \cos 2q_1 \}}{1 + R^2 + 2R \cos 2q_2} \right] \frac{n_1 P}{c} = Q_s \frac{n_1 P}{c} \quad (0.3) \text{ と式(0.4) に}$$

代入することで単一光線の $Q_s(r)$ ， $Q_g(r)$ が求められる． これを全入射光線で積分する． ただし， 光軸方向のトラップは， 対称性より $Q_s(r)$ ， $Q_g(r)$ の Y 成分は相殺されるため， Z 成分の $Q_{sz}(r)$ ， $Q_{gz}(r)$ を求める．

単一光線の $Q_{sz}(r)$ ， $Q_{gz}(r)$ は

$$Q_{sz}(r) = Q_s(r) \cos \phi(r) \dots\dots\dots (0.11)$$

$$Q_{gz}(r) = Q_g(r) \sin \phi(r) \dots\dots\dots (0.12)$$

となり， 全入射光線として積分すると各々

$$Q_s = \frac{1}{\pi R_m^2} \int_0^{2\pi} \int_0^{R_m} Q_{sz}(r) r dr d\beta = \frac{2}{R_m^2} \int_0^{R_m} Q_{sz}(r) r dr \dots\dots\dots (0.13)$$

$$Q_g = \frac{1}{\pi R_m^2} \int_0^{2\pi} \int_0^{R_m} Q_{gz}(r) r dr d\beta = \frac{2}{R_m^2} \int_0^{R_m} Q_{gz}(r) r dr \dots\dots\dots (0.14)$$

となる． 上記の式から理論解析を行う．

本実験の理論解析に必要なパラメータを Table 0.1 に、解析結果を Fig. 0.6 に示す。対象物体はミトコンドリアを想定する。結果から本研究の光ピンセットのトラッピング領域は $0 < S_z < 0.8$ であることが分かり、最大トラップ力は 1.2 pN ($Q_t = -0.13$) であることが分かった。また、 $S_z < 0$ の場合、物体を押す力が支配的であり、 $S_z > 0$ の場合、トラップ力が支配的であるという性質から、本研究では、サンプル作りの際対象を対物側のカバーガラスに貼り付けるのではなく、光照射側のカバーガラスに貼り付けることにした。

Table 0.1 Theoretical analysis parameter

緩衝液の屈折率： n_1	1.33
ミトコンドリアの屈折率： n_2	1.41
レーザーパワー： P	2 mW
最大集光角： Φ_m	67.3°
ミトコンドリアの半径： r_0	$0.5 \mu\text{m}$
ビーム半径： R_m	1 mm

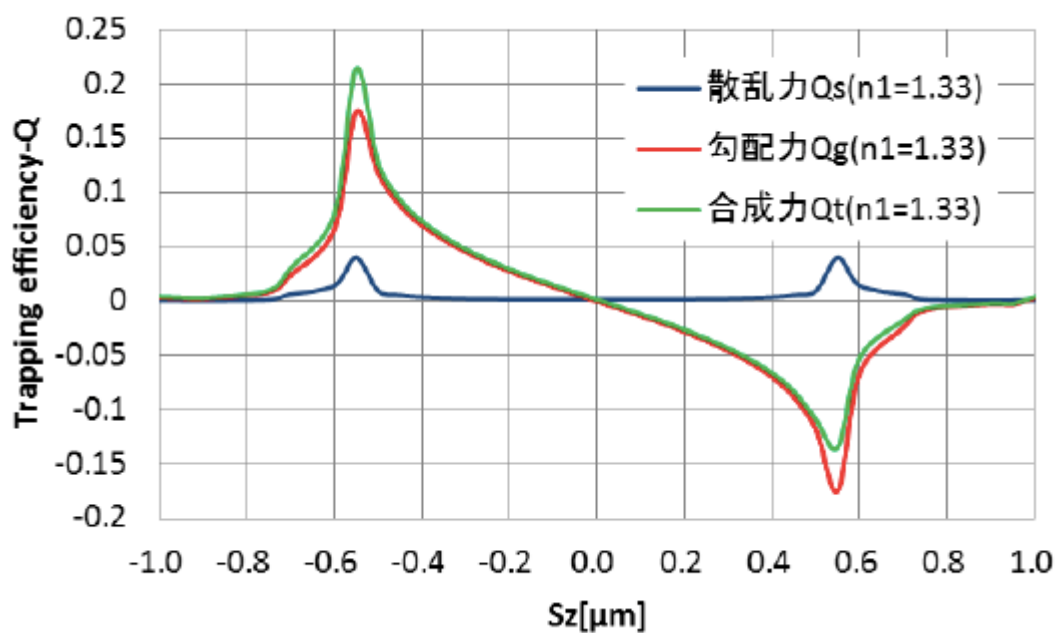


Fig. 0.6 Theoretical analysis of trapping efficiency for S_z