

CARS顕微分光法を用いたヒト毛髪分子イメージング

(花王(株)¹、東大院・理²) ○尾藤 宏達^{1, 2}、徳原 志穂美¹、内藤 智¹、

奥野 将成²、加納 英明²、濱口 宏夫²

【序】 コヒーレント・アンチストークス・ラマン(CARS)顕微分光法は、非染色でありのままの生体試料の分子情報を高速に取得可能な強力な分光手法である。我々は、従来困難であった生体試料の指紋領域におけるCARSスペクトルの取得を目的として、ナノ秒白色レーザーを用いたCARS顕微分光装置を開発し、生細胞等に応用してきた⁽¹⁾。本装置の大きな特徴として、通常のCARS顕微鏡で問題となる非共鳴バックグラウンドに伴う画像のコントラストの低下をスペクトル形状解析によって回避でき、また一度の測定で複数の振動モードの情報を得ることができることが挙げられる。この特長を生体組織に活用すると、形態と分子組成/状態とを対応させ、さらにその動的な変化をも追跡できる生体機能の強力な解析手法になると期待される。そこで今回、生体組織のモデルとしてヒト毛髪を用いて、CARS顕微分光装置を用いた分子イメージングを行った。

【実験】 新たに開発したCARS顕微分光装置の概略を図1に示す。サブナノ秒マイクロチップレーザーの基本波(1064 nm)をポンプ光 ω_1 とし、一部をフォトニック結晶ファイバーに導入することで発生させたスーパーコンテニューム光(1.1~1.7 μm 、ラマンシフトとして $>3500\text{ cm}^{-1}$ の領域を満たす)をストークス光 ω_2 として用いた。各レーザー光の強度は、試料の位置でそれぞれ25 mW、15 mWであった。試料から、前方方向に出射するCARS光を分光器およびCCDカメラによって分光測定した。

試料には、図2に示す毛髪輪切り切片(20代男性の白髪、厚さ5 μm)を用いた。図2に示す様に一般に毛髪は、3種の内部構造(メデュラ：中心部の多孔質構造部、コルテックス：繊維を主体とした主要構造部、キューティクル：最外部の保護層)より構成されている。図2に示すコル

テックス部、キューティクル部と考えられる位置のCARSスペクトルの取得および図2の波線の領域でイメージング測定を行った。露光時間は、各部位のCARSスペクトルの取得時では1 s、イメージング測定時では50 msとした。イメージング測定の測定領域は、 $50\times 50\text{ }\mu\text{m}^2$ (101 \times 101点)であり、測定時間は約10分であった。

【結果と考察】 得られた各部位のCARSスペクトルの内で指紋領域付近を拡大したものを図3に示す。キューティクル部、コルテックス部、共にCARSに特徴的な分散型のピークが指紋領域においても明瞭に得られた。コルテックス部、キューティクル部共通で、 2900 cm^{-1} 近傍にCH伸縮振

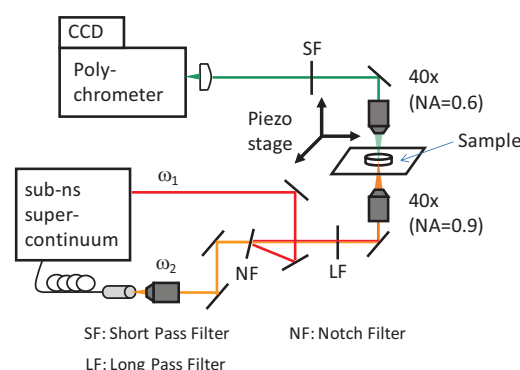


図 1. CARS 顕微分光装置の概略

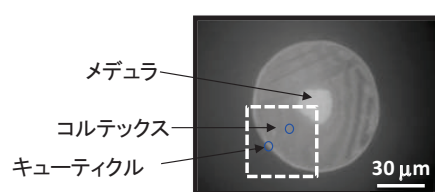


図 2. 20 代男性白髪切片の光学顕微鏡像

動(CH str.)、1660 cm^{-1} 近傍にアミドI(Amide I)、1450 cm^{-1} 近傍にCH変角振動(CH bend.)および1000 cm^{-1} 近傍にフェニルアラニンに特徴的な環呼吸振動(Phe)と考えられるピークが得られた。またコルテックス部では、1320 cm^{-1} 近傍に α -helixの骨格炭素原子のC-H変角振動(C(α)-H)と考えられるピークが観察された。キューティクル部では、1250 cm^{-1} 近傍にアミドIII(Amide III)、1050 cm^{-1} 近傍にシステイン酸のスルホン基のS-O伸縮振動(S-O)と考えられるピークが得られた。

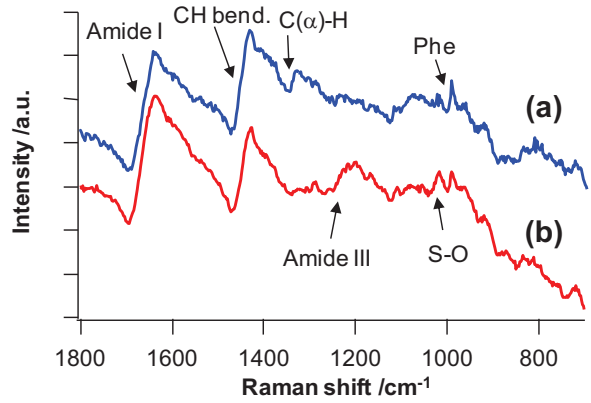


図3. 各部位のCARSスペクトル

(a) コルテックス部、(b) キューティクル部

Pheがコルテックス部で、S-Oがキューティクル部でそれぞれ相対的に強く観察され、フェニルアラニンがコルテックス部で、システイン酸がキューティクル部でそれぞれ多いという毛髪の蛋白質のアミノ酸解析による従来知見²⁾と一致した。また、 α -helix構造をとる蛋白質に特徴的なC(α)-Hが、コルテックス部で強く観察された。これは、コルテックス部中のケラチン繊維が α -helix構造をとり、キューティクル部で α -helix構造が少ないという従来知見²⁾を支持する結果であった。よって、指紋領域のCARSスペクトルから、部位毎の蛋白質の組成および二次構造を反映した情報が引き出せることが確認できた。

各バンドから得たCARS分光像の一部を図4に示す。バンド毎でコントラストは大きく異なっていた。Amide IおよびCH bend.の強度は、メデュラ部を除く毛髪全体に分布していた。一方、Amide IIIの強度は、キューティクル部と考えられる領域で強く、Pheの強度は、コルテックス部と考えられる領域で強く観察された。このように、蛋白質の組成および二次構造の分布に基づいた像を取得できた。

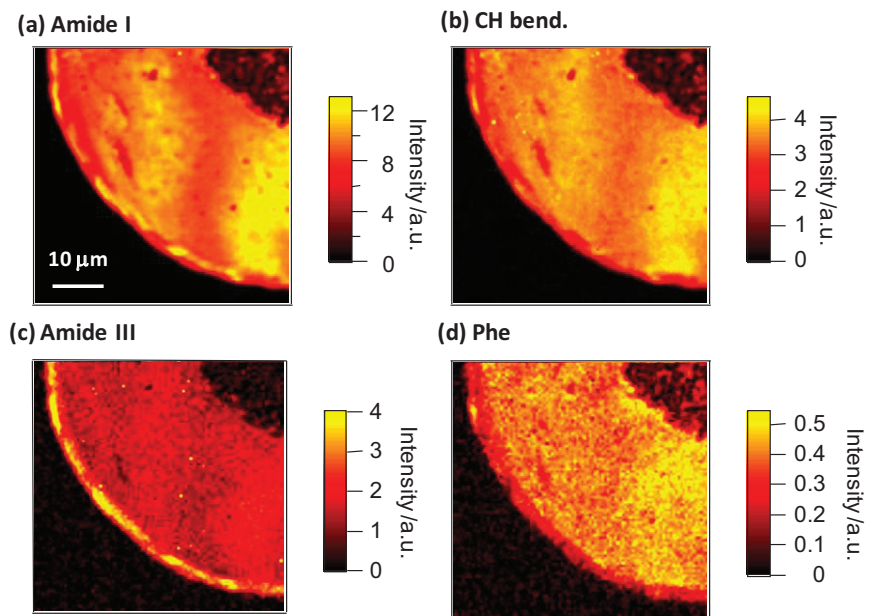


図4. 各バンドの強度によるCARS分光像

(a) Amide I、(b) CH bend.、(c) Amide III、(d) Phe

以上より、ナノ秒白色レーザーを用いたCARS顕微分光法によって、ヒト毛髪中の分子組成/状態の分布を明瞭に可視化できた。

(1) M. Okuno *et al.*, *Opt. Lett.*, **33**, 923-925 (2008).

(2) C. R. Robbins (Ed.), *Chemical and Physical Behaviors of Human Hair 4th ed.*, Springer, New York (2002).