

## 2D12

マルチモード非線形分光イメージングによるラット角膜の *ex vivo* 三次元測定

(東大院・理<sup>1</sup>、筑波大・医<sup>2</sup>、筑波大・数理<sup>3</sup>)

○瀬川尋貴<sup>1</sup>、加治優一<sup>2</sup>、加納英明<sup>3</sup>、小澤岳昌<sup>1</sup>

*Ex vivo* Three-dimensional Analysis of Rat Cornea by Multimodal Nonlinear Optical Imaging

(The Univ. of Tokyo<sup>1</sup>, Univ. of Tsukuba<sup>2</sup>) ○Hiroki Segawa<sup>1</sup>, Yuichi Kaji<sup>2</sup>, Hideaki Kano<sup>2</sup>, Takeaki Ozawa<sup>1</sup>

【序】単一生細胞内の生体分子の挙動や組織・個体の内部構造を知る手段として、近年バイオイメージング技術が広範に用いられている。特に組織や個体の観察を考えた場合には、長波長励起のため浸襲長が深く、非染色条件下での観察が可能である、非線形光学イメージングが非常に有用である。我々は、マルチプレックス・コヒーレント・反ストークス・ラマン散乱(coherent anti-Stokes Raman scattering; CARS)をベースとしたマルチモード非線形分光顕微鏡を開発し、単一生細胞の観察へと応用してきた[1]。本研究では、臨床診断など医学応用を目指した研究への展開としてラット眼球より摘出した角膜の観察を行い、組織観察の可能性と得られる情報について検証した。

【実験】図1(a)に、製作したマルチモード非線形分光イメージング装置の概略を示した。光源には Q スイッチ発振マイクロチップ Nd:YAG レーザーを用いた。基本波 1064 nm の光はまず二分割され、一方はそのまま励起光として、もう一方はフォトニック結晶ファイバへ導入し、白色光に変換した後に近赤外成分(1100 – 1600 nm)のみを取り出し、2 つ目の励起光とした。これらを正倒立顕微鏡に導入し、ピエゾステージ上に載せられた試料に集光する。発生する信号光はもう一つの対物レンズにより集光された後、ダイクロイックミラーにより近赤外・可視域の信号に分割し、別々に分光検出した。

試料には、ラットより摘出した角膜を用いた。麻酔をかけたラットから眼球を摘出した後、顕微鏡下で角膜部分のみを分離し、生理食塩水で満たしたガラスボトムディッシュに浸した。全ての観察は摘出後 24 時間以内に完了している。図1(b)に、角膜の構造の模式図を示した。今回は、角膜上皮層から角膜実質層にかけての領域について、三次元イメージングを行った。

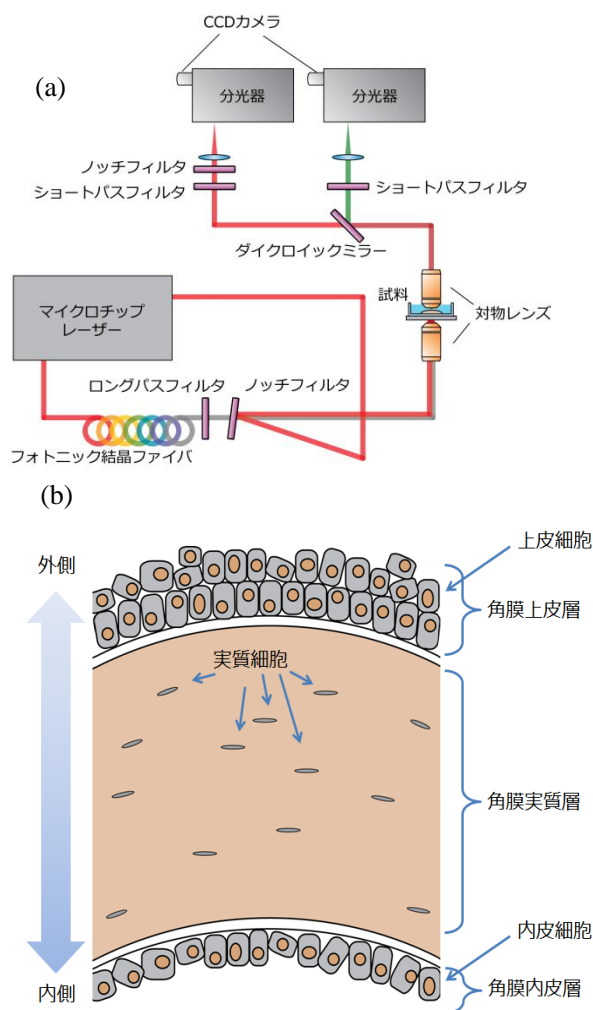


図1(a)開発した顕微鏡の概略図,

(b)角膜の内部構造の模式図

【結果と考察】 深さ方向へのスキャンにより得られたスペクトルの例を図 2(a)に示した。近赤外域にはマルチプレックス CARS 信号が検出され、可視域には第二高調波発生(second harmonic generation; SHG)および三次和周波発生(third-order sum frequency generation; TSFG)の信号が検出された。なお、ここで示した CARS スペクトルは、得られたデータに対し最大エントロピー法を適用することで自発ラマン散乱と同じ情報を持つ  $\text{Im}[\chi^{(3)}]$  スペクトルへ変換したものである[1]。スペクトルにみられる各バンドの強度情報を利用することで、奥行き方向に約 200  $\mu\text{m}$  に及ぶイメージの構成に成功した。結果を図 2(b)に示す。TSFG は屈折率・非線形感受率など媒質の光学的性質の不均一な環境下で有意な信号を生じ、SHG は反転対称性のない構造下で強い信号を与える。これと、マルチプレックス CARS イメージが与える分子振動の情報を加味すると、可視化されている構造物の同定が可能である。具体的に、角膜上皮層においては上皮細胞及びその細胞核、上皮細胞の裏打ち構造となる基底膜、角膜実質層においては実質細胞やコラーゲン線維が可視化されていることが分かった。このイメージングでは分子の指紋とも言われるラマンスペクトルを取得できているため、疾病や手術による角膜への影響を分子構造のレベルで議論するといった応用も将来可能になると考えられる。本研究により、非線形分光イメージングを用いて生体組織の内部構造を分子レベルで観察・可視化できることが示された。

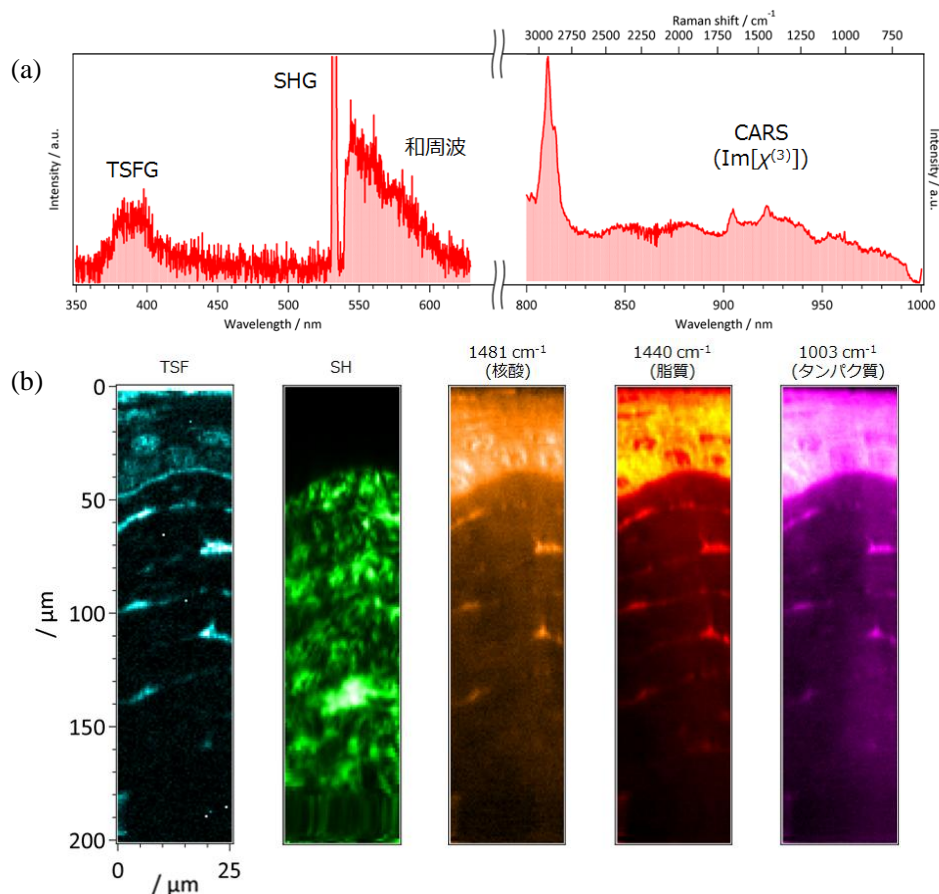


図 2 開発した装置によるラット角膜のマルチモードイメージングの結果。(a)取得されたスペクトルの例。(b)得られたスペクトル中の各バンドの強度により構成した奥行き方向のイメージ。

[1] H. Segawa, M. Okuno, P. Leproux, V. Couderc, H. Kano and H. Hamaguchi, *Opt. Express*, **20**, 9551-9557 (2012)