

白色レーザーを用いたラット眼組織の
マルチプレックス多光子分光イメージング

(筑波大・数理¹、東大院・理²、筑波大・医³)

○秋山敏宏¹、瀬川尋貴²、加治優一³、加納英明¹

Label-free visualization of rat eye tissue using multimodal and multiphoton spectro-microscopy with use of a white-light laser source

(Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba¹, Department of Chemistry, School of Science, The University of Tokyo²,

Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba³)

○Toshihiro Akiyama¹, Hiroki Segawa², Yuichi Kaji³, Hideaki Kano¹

【序】現在の眼医療では、診断に共焦点顕微鏡や光干渉断層像計(optical coherent tomography; OCT)などが広く普及している。これらは眼組織を *in vivo*、*in situ* で測定可能であるが、組織内の屈折率差などの光学的情報に基づいた測定手法であり、そこには分子情報は含まれない。これに対して、コヒーレント・アンチストークス・ラマン散乱(coherent anti-Stokes Raman scattering; CARS)をはじめとする非線形ラマン過程は、生体組織を染色や標識を施さずに“ありのまま”の状態での分子情報を取得することができるため、近年注目が集まっている。そこで本研究では臨床診断への応用を目指し、その前段階として、複数の非線形光学現象の観測が可能な非線形マルチモーダル顕微鏡を用いてラット眼組織の分子イメージングを行った。

【実験】実験装置は当研究室で開発した非線形マルチモーダル顕微鏡¹⁾を用いた。光源は1064 nmの単色光と広帯域の波長成分を持つスーパーコンティニューム光で、これらを同時に試料に照射し、そこで発生した複数の非線形光学現象を観測、イメージングを行った。試料はラットより摘出した眼球の凍結切片(厚さ20 μm)を用いた。図1にその光学像を示す。図のように角膜、水晶体、網膜といった眼球の各組織が含まれている。測定する直前に解凍及び4%パラホルムアルデヒドによる固定を行った。

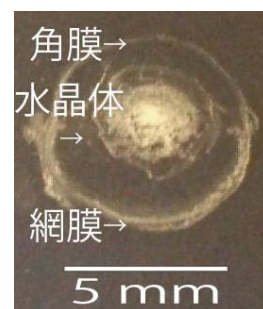


図1：凍結切片（光学像）

【結果・考察】角膜、網膜において近赤外域にCARS信号を、紫外-可視域に第二高調波発生(SHG)、第三高調波発生(THG)、三次和周波発生(Third-order sum frequency; TSFG)の信号をそれぞれ検出することができ、それらによるイメージの取得に成功した。図2,3にこれらのスペクトルおよびイメージを示す。CH₃伸縮振動(図3(c),(h))やフェニルアラニン残基(Phe; 図3(e))のイメージはタンパク質の分布に相当し、組織が主にタンパク質で構成されている

ことが分かる。一方、 CH_2 伸縮振動は脂質分子を可視化できる。この振動モードのバンド強度は細胞核で弱くなることが我々の先行知見で分かっており、CARS イメージ (図 3(d), (i)) はそれを表していると考えられる。さらに核酸塩基(A,G)のプリン環によるイメージ (図 2(j)) では核の局在とその内部構造を可視化することができた。角膜のイメージングに関しては、我々が以前報告したラット *ex vivo* 角膜の結果^[2]と類似の結果であった。図 3 で特筆すべきことは、網膜での SHG のイメージ (図 3(g)) で、視物質近傍において複数の輝点の特異的な空間分布で確認できたということである。SH の発生原理から考えると、これらの部分では局所的に反転対称性の崩れた構造が点在していると考えられる。視物質であるロドプシンは、脂質二重膜からなる円盤膜に埋め込まれた状態で視細胞内に存在している。ロドプシンを含む円盤膜は、層構造を成している網膜内部で産生されて逐次外側へと送り出され、古くなったものは網膜最下層の色素上皮細胞にて分解される。輝点が見られる領域は、この新しく産生された円盤膜が分布している部分に相当しており、視物質の合成と何らかの関連がある可能性がある。

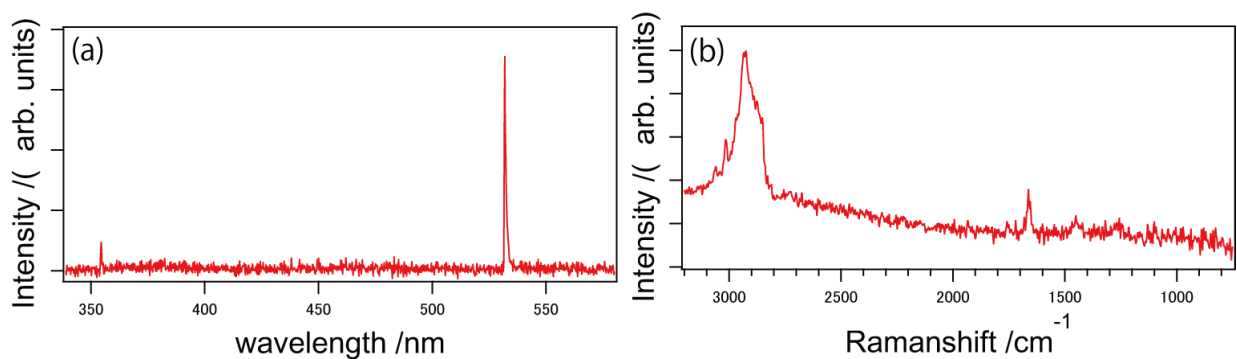


図 2 : 網膜(図 3(f)矢印部)で測定された各スペクトル

(a)THG,TSFG,SHG (b)CARS ($\text{Im}\chi^{(3)}$)

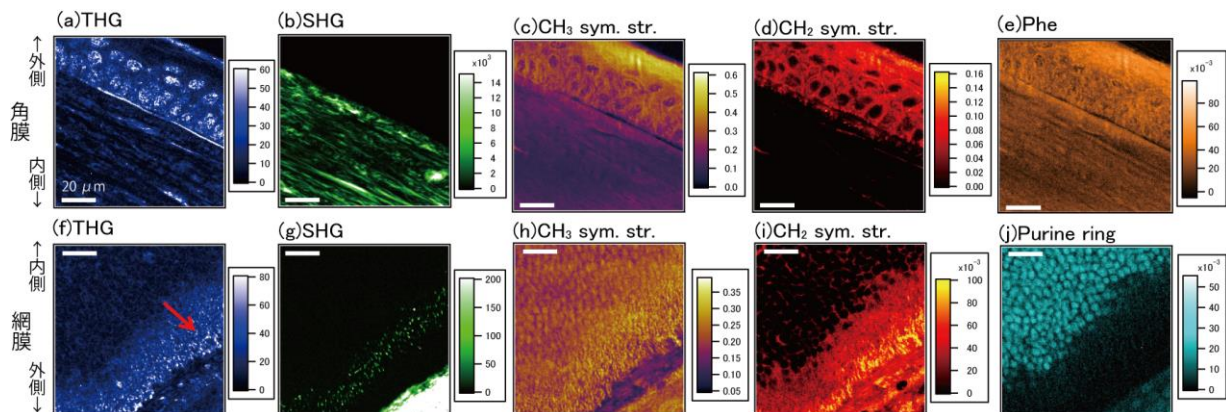


図 3 : 取得されたイメージ 上段 : 角膜 下段 : 網膜

【参考文献】

- [1] H.Segawa, M.Okuno, H.Kano, P.Leproux, V.Couderc, and H.Hamaguchi, *Opt. Express*, 20, 9551-9557 (2012)
- [2] 瀬川、加治、加納、小澤 第 7 回分子科学討論会(2013 京都) 2D12