

3P082

マルチモーダル多光子分光顕微鏡を用いた  
ラット網膜・視細胞の分子イメージング

(筑波大・数理<sup>1</sup>、東大院・理<sup>2</sup>、愛知がんセ研、腫瘍医化学部<sup>3</sup>、筑波大・医<sup>4</sup>)

○秋山敏宏<sup>1</sup>、瀬川尋貴<sup>2</sup>、猪子誠人<sup>3</sup>、加治優一<sup>4</sup>、大鹿哲郎<sup>4</sup>、加納英明<sup>1</sup>

**Label-free imaging of rat retina using multimodal and multiphoton  
spectroscopic microscopy**

(Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba<sup>1</sup>,

Department of Chemistry, School of Science, The University of Tokyo<sup>2</sup>,

Division of Biochemistry, Aichi Cancer Center Research Institute<sup>3</sup>,

Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba<sup>4</sup>)

○Toshihiro Akiyama<sup>1</sup>, Hiroki Segawa<sup>2</sup>, Akihito Inoko<sup>3</sup>, Yuichi Kaji<sup>4</sup>, Tetsuro Oshika<sup>4</sup>,  
Hideaki Kano<sup>1</sup>

【序】現在の眼医療では、治療・診断に様々な最先端の光技術が使われており、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。我々は、このような非線形光学効果を用いることで、既存の手法では見えないものを可視化する新しい治療・診断手法の開発を目指している。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網膜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マルチモーダル多光子顕微鏡を用いた[1,2]。光源は波長 1064 nm のレーザー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の2つで、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、coherent anti-Stokes Raman scattering(CARS)、第二高調波発生(second harmonics generation: SHG)、和周波発生(sum frequency generation: SFG)、第三高調波発生(third harmonics generation: THG)、三次和周波発生(third-order sum frequency generation: TSFG)を同時に分光測定した。さらに試料各点からの信号を用いてマルチモーダル・イメージングも行った。試料にはラットより摘出した眼球の凍結切片(厚さ 20  $\mu\text{m}$ )を用いた。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。

【結果・考察】近赤外域に CARS を、紫外-可視域に SHG、SFG、THG、TSFG の信号をそれぞれ検出することができた。また、それらによるマルチモードイメージの取得にも成功し

た。図 1 にこれらのスペクトルおよびイメージを示す。CH<sub>3</sub> 伸縮振動 (図 1(c))やフェニルアラニン残基 (Phe; (g)) 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<sub>2</sub>伸縮振動は主に脂質分子を可視化している。この振動モードのバンド強度は細胞核で弱くなるのが我々の先行知見で分かっており、CARS イメージ(d)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(e)や DNA, RNA の骨格に由来する PO<sub>2</sub><sup>-</sup>の振動モードによるイメージ(f)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。図 1 で特筆すべきことは、SHG のイメージ (b)で視細胞付近において複数の輝点が特異的な空間分布で確認できたということである。これらの輝点は視細胞内の結合繊毛に対応していると現在のところ考えている。発表ではその詳細について報告する。

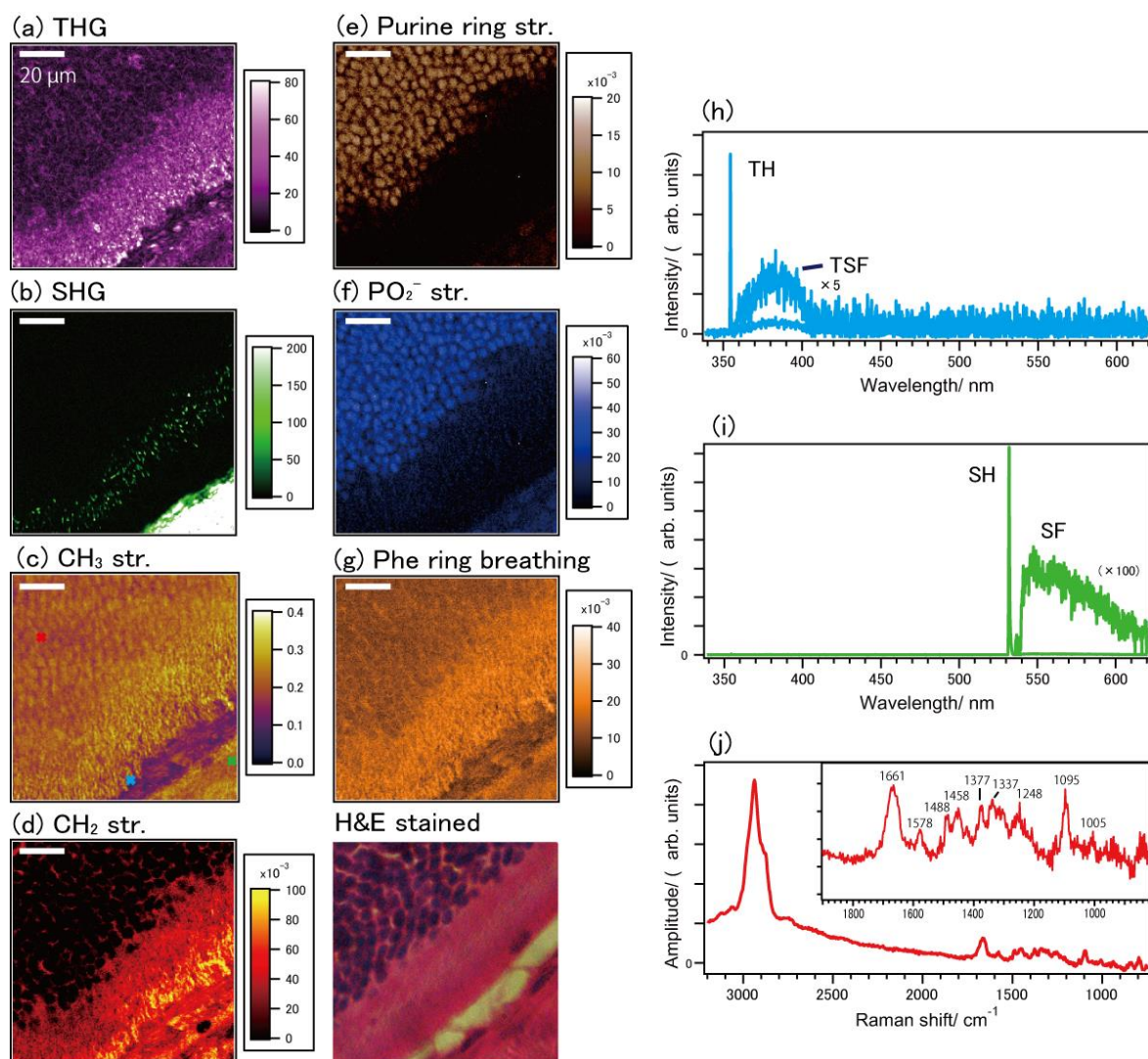


図 1 取得された網膜のマルチモードイメージ(a-g)、参照用 HE 染色像、イメージ(C)の 3 点 (青、緑、赤) における TH, TSF (h)、SH, SF (i)、および  $\text{Im}[\chi^{(3)}]$  スペクトル(h)

#### 【参考文献】

- [1] M. Okuno, H. Kano, P. Leproux, V. Couderc, J. P. R. Day, M. Bonn and H. Hamaguchi, *Angew. Chem. Int. Edit.*, 49, 6773-6777 (2010)  
 [2] H. Segawa, M. Okuno, H. Kano, P. Leproux, V. Couderc, and H. Hamaguchi, *Opt. Express*, 20, 9551-9557 (2012)