

後方散乱配置による生体組織の *ex vivo* マルチモーダル 非線形光学イメージング

¹筑波大医, ²筑波大院・遺伝子制御学研究室, ³筑波大数理

○湯口周¹, 福田綾², 久武幸司², 野口雅之¹, 加納英明³

Ex vivo multimodal non-linear optical imaging of living tissue with back-scattering configuration

○Shu Yuguchi¹, Aya Fukuda², Koji Hisatake², Masayuki Noguchi¹, Hideaki Kano³

¹ Department of Diagnostic Pathology, University of Tsukuba, Japan

² Laboratory of Gene Regulation, University of Tsukuba, Japan

³ Department of Applied Physics, University of Tsukuba, Japan

【Abstract】 Spectroscopic imaging using nonlinear Raman scattering processes such as coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) and stimulated Raman scattering (SRS) is a powerful method of performing label-free microscopic molecular imaging. In particular, multiplex CARS is capable of providing ultrabroadband spectral coverage of approximately 3000 cm^{-1} , which spans the entire region of the fundamental vibrational modes. Using this technique, a new type of pathological diagnosis can be explored. In the present study, we developed ultrabroadband CARS microspectroscopic system using a new supercontinuum light source with sub 1 MHz repetition rate, and applied it to living tissue imaging with back-scattering configuration.

【序】 術中迅速診断では、切除した組織を液体窒素にて急速凍結し、薄切した後、染色した病理標本を作製するが、脂肪組織等が含まれると薄切が困難になり、前処理が必要になることが知られている。組織に依存しない汎用的な迅速診断法が求められている。そこで本研究では、CARS (coherent anti-Stokes Raman scattering) を用いて、生体組織そのままをフレッシュな状態で測定かつ診断できる装置の開発を目標として研究を行った。従来の CARS 顕微鏡は前方散乱の測定配置が主に取られており、光が透過しない厚みがある生体組織は測定出来なかった。本研究では、後方散乱配置での新規マルチプレックス CARS 分光イメージング装置の開発を行い、凍結検体での薄切が難しい脂肪組織に本手法を適用した。

【方法 (実験)】 装置開発には、研究室で開発したマルチプレックス CARS 分光システム[1]を改良して用いた。実験装置図を Fig.1 に示す。マスター光源は cw Q スイッチマイクロチップ Nd:YVO₄ レーザーを Yb ファイバーにて増幅した master oscillator fiber amplifier(MOFA)である。光源のスペックは中心波長 1064 nm, パルス幅 85 ps, 繰り返し周波数

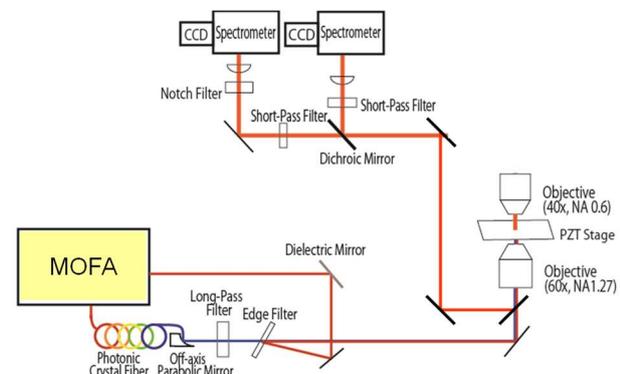


Fig. 1. CARS microspectroscopic system with back-scattering configuration

0.82 MHz, 総出力約 2 W である。この出力を二つに分け、一方はそのまま CARS のポンプ光として、もう一方はフォトニック結晶ファイバーに導入することでスーパーコンティニューム (supercontinuum; SC) 光を発生させ、ストークス光とした。二つのビームをエッジフィルタで同軸にそろえ、倒立顕微鏡に導入した。従来は正立側の対物レンズで CARS 光を集光していたが、生体組織からの後方散乱光を倒立側の対物レンズで集め、シャープダイクロイックミラーで信号光を反射させて分光器へと導いた。

サンプルにはマウス白色脂肪組織を用いた。鼠径部の脂肪組織を切り出し、そのままガラスボトムディッシュにマウントした後、顕微鏡ステージに固定して測定を行った。サンプルはピエゾステージ上に載っており、三次元的にスキャンすることが可能である。サンプルに照射した励起光出力は、ポンプ、ストークス光それぞれで約 80, 50 mW 程度であった。一点当たりの露光時間は 50 ms, 全測定時間は約 40 分であった。

【結果】マウス白色脂肪組織のラベルフリー非線形光学イメージングの結果を Fig.2 に示す。200 ミクロン四方、奥行き方向 2 ミクロン刻みで測定した。Fig.2 左は CARS の CH_2 伸縮振動による擬似カラーイメージ、Fig.2 右は第二高調波発生 (second harmonic generation; SHG) の擬似カラーイメージ (緑) である。CARS イメージから、脂肪細胞内の脂肪滴が明瞭に可視化されていることがわかる。図中左下に信号の存在しない線状の領域があるが、これは SHG イメージにて血管壁のコラーゲンによると考えられる信号が確認されたため、この部分に血管が存在していることがわかる。脂肪滴の位置における $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ スペクトルを Fig.3 に示す。分子振動基音すべてを検出できる装置の開発に成功した。

【参考文献】

[1] Yoneyama *et al.*, *APL photonics*, accepted.

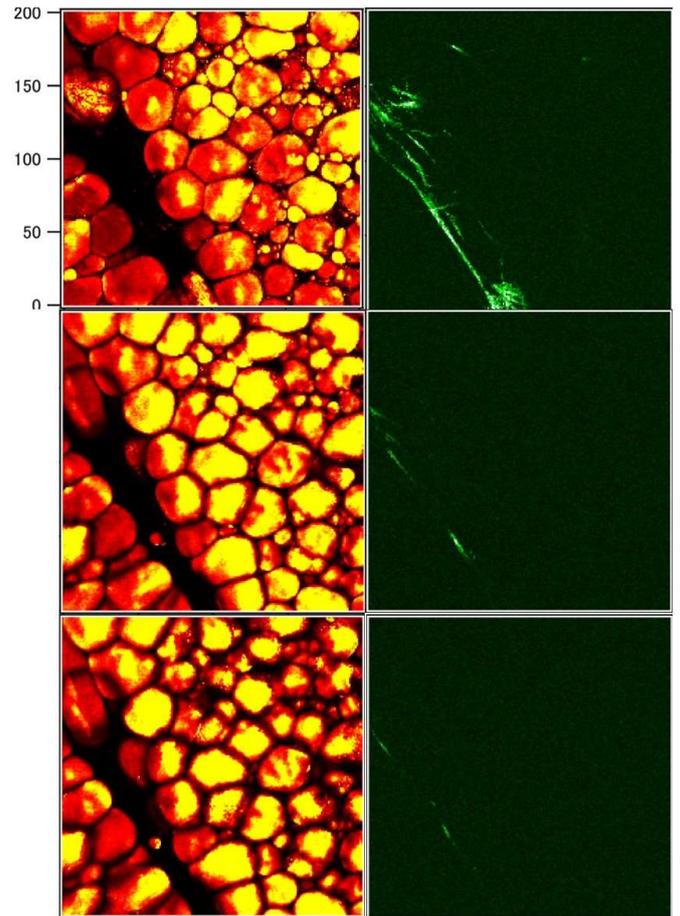


Fig.2 Label-free *Ex-vivo* nonlinear optical imaging of mouse adipose tissue with back-scattering configuration. Left: CARS (CH_2 stretching vibrational mode, yellow-red) Right: SHG (green)

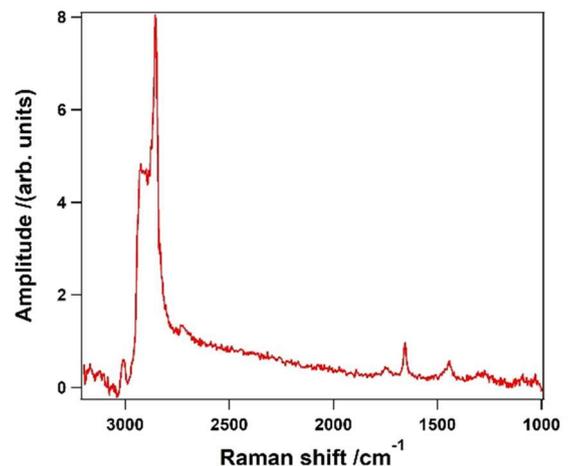


Fig.3 Spatially-averaged ($4\mu\text{m}^2$) $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ spectrum of a lipid droplet of the mouse adipose tissue.