総説

REVIEW ARTICLE

マルチモーダル多光子分光顕微鏡を用いたラット眼組織の分子イメージング

秋山 敏宏¹, 瀬川 尋貴², 加治 優一³, 大鹿 哲郎³, 加納 英明¹¹ 筑波大学 数理物質科学研究科² 東京大学大学院 理学系研究科³ 筑波大学 医学医療系眼科

(平成 27 年 3 月 31 日受理, 平成 27 年 5 月 25 日掲載決定)

**Label-Free Spectroscopic Imaging of Rat Eye Tissue
Using Multimodal and Multiphoton Microscopy**Toshihiro Akiyama¹, Hiroki Segawa², Yuichi Kaji³, Tetsuro Oshika³, Hideaki Kano¹¹ *Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba*² *School of Science, The University of Tokyo*³ *Faculty of Medicine, University of Tsukuba*

(Received March 31, 2015, Accepted May 25, 2015)

要 旨

多光子顕微鏡によるイメージングは、非染色・非標識で細胞や生体組織の分子情報の取得が可能な手法であり、近年注目を集めている。本稿では、我々が開発した複数のマルチモーダル・イメージング装置の紹介を通して、そのユニークな特徴を解説する。ラット眼組織の非染色イメージングでは、角膜や網膜の層状構造が第二高調波発生 (second harmonics generation; SHG), 第三高調波発生 (third harmonics generation; THG), 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) 信号などにより明瞭に可視化することができた。特に網膜の SHG イメージでは、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された。これらの輝点は視細胞の結合繊毛と呼ばれる部分に対応していると考えられる。

キーワード : 非線形光学, ラマン, CARS, SHG, 分子イメージング, 眼組織**Abstract**

Nonlinear spectroscopic imaging enable us to obtain molecular information of cells and tissues without staining and molecular tagging. In the present study, we developed multimodal and multiphoton microscopic systems and performed label-free imaging of a rat eye tissue with molecular specificity through linear and nonlinear optical processes. We observed second harmonics generation (SHG), third harmonics generation (THG), coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) at cornea and retina of a rat eye tissue. In particular, at the area of retina, several SHG spots were detected around visual pigments. These SHG spots possibly correspond to connecting cilium of photoreceptor cells.

Key words : nonlinear optics, Raman, CARS, SHG, molecular imaging, eye tissue

1. 序

生体組織を染めることなく *in vivo*, *in situ* にて可視化・分析・診断することは、生命科学・医学における究極の目標の一つであろう。現在、生体組織の非染色イメージング手法として、optical coherence tomography (OCT)¹⁾ や共焦点顕微鏡²⁾ 等が広く用いられている。両者ともマイクロメートルスケールで三次元的に生体組織のイメージを得ることが出来るが、イメージ・コントラストには組織構成分子の情報が限定的にしか含まれない。例えば OCT では組織の屈折率の違いに基づく散乱強度の違いがコントラストを決定し、共焦点顕微鏡では分子の電子吸収に基づく可視化が主であり、血管中の血球などターゲットが限られている。

これらに対して近年、多光子顕微鏡と呼ばれる方法が新しい非染色イメージング手法として注目を集めている。一般に、多光子過程では近赤外域のパルスレーザーを試料に集光する。空間的及び時間的に高い光子数密度が試料に生じることで、通常とは異なる光学過程が生じる。例えば、二または三個の光子を入力して、その合算の光子エネルギーと等価な一個の光子が発生する現象が知られている。出力された光子は、入力された光子と位相関係が保たれたコヒーレンスを有しており、第二高調波発生または第三高調波発生 (second harmonics generation or third harmonics generation; SHG or THG) と呼ばれる。このような多光子過程は光をタイトに集光した場所からしか発生しないため、マイクロメートルスケールの高い三次元空間分解能を持つ。非染色の生体試料に対して、これまで様々な多光子過程が応用されている。多光子過程を実効的に応用した SHG, THG 顕微鏡³⁻⁹⁾、和周波発生 (sum-frequency generation; SFG) 顕微鏡¹⁰⁾、三次和周波発生 (third-order sum frequency generation; TSFG) 顕微鏡¹¹⁾、以降の節で詳述するコヒーレント・アンチストークス・ラマン散乱 (coherent anti-Stokes Raman scattering; CARS) 顕微鏡¹²⁻¹⁴⁾、そして誘導ラマン散乱 (stimulated Raman scattering; SRS) 顕微鏡¹⁵⁻¹⁷⁾ などが代表例として挙げられる。

これらの多光子過程は異なる複数の過程が同時に起こりうるため、複数の検出器を用意することでマルチモーダル・イメージングの実現が可能である^{11,18)}。特に、入力レーザーを“白色化”することで、試料の様々な共鳴効果 (電子共鳴、振動共鳴など) を同時に満たすことが可能である。従来の光源ではこのような白色レーザーを顕微鏡に組み込むことは困難であったが、フォトニック結晶ファイバー (photonic crystal fiber) を用いた新しい白色光発生、すなわちスーパーコンティニューム (supercontinuum; SC) 発生¹⁹⁾ により容易に実現可能となり、ユニークなマルチモーダル分光顕微鏡が実現している^{11,20)}。本稿では、多光子イメージングのユニークな特徴の数々を紹介するため、我々が開発した複数のマルチモーダル・イメージング装置を用いた、ラット眼組織の非染色イメージングの結果を中心に解説する。

2. 原理

本装置では、白色レーザーを用いた CARS 過程、マルチプレックス CARS 過程を採用している。CARS は顕微イメージングに最も活用されているコヒーレント・ラマ

ン過程の一つである。CARS 過程では入射光強度に対して信号強度が非線形に増大するため、例えば脂質分子について、ビデオレートでのイメージングが既に 2005 年に実現する²¹⁾ など発展が著しい。CARS 過程では、Fig.1 (a) に示すように、一般に波長の異なる二つのレーザー光 (ω_1, ω_2 光、またはポンプ光、ストークス光とも言う) を用いる。これら二つの入射光の角振動数差 $\omega_1 - \omega_2$ が試料分子の持つ振動モードの角振動数 Ω と一致すると、多数の試料分子の振動モードが共鳴的に励振される。このようにして生じた振動コヒーレンスは、試料分子が三つ目のレーザー光 (ω_3 光、またはプローブ光とも言う) と相互作用することにより、三次の非線形分極に由来する ω_{CARS} 光として取り出される。エネルギー保存則から、 $\omega_{\text{CARS}} = \omega_1 - \omega_2 + \omega_3$ であることが要請される。また、位相整合条件から CARS 光は $\mathbf{k}_{\text{CARS}} = \mathbf{k}_1 - \mathbf{k}_2 + \mathbf{k}_3$ の方向に発生する。ここで、 $\mathbf{k}_x$ は ω_x 光の波数ベクトルである。 ω_3 光として、しばしば ω_1 光が用いられる。その場合 ($\omega_3 = \omega_1$)、 ω_{CARS} 光の信号強度は ω_1 光及び ω_2 光の強度の二乗及び一乗にそれぞれ比例する。すなわち、 ω_{CARS} 光の信号強度は ω_1 光の強度に対して非線形に増大する。また、位相整合条件から、CARS 過程により指向性のよい ω_{CARS} 光を得ることができる。このように、信号光をコヒーレントかつ非線形に増幅することができるため、高速イメージ測定も可能になる。しかしながら、通常の CARS 顕微鏡では、 ω_1, ω_2 光として各々単色のレーザー光を用いるため、特定かつ単一の振動モードしか可視化することができない (モノクロ・イメージング)。このことは、脂質分子の CH_2 伸縮振動のように、他のバンドから比較的離れ、かつラマン散乱断面積の比較的大きい振動モードについては大きな問題とならないが、指紋領域のように多数のバンドが密集しているスペクトル領域では致命的な欠点となる。一般に、測定により得られる ω_{CARS} 光の波長成分には、振動モードに共鳴する CARS 光の他に、Fig.1 (b) に示す非共鳴バックグラウンド (nonresonant background; NRB) と呼ばれる光学過程による成分も含まれる。この NRB の角周波数 ω_{NRB} は $\omega_{\text{NRB}} = \omega_1 - \omega_2 + \omega_3$ で表され、 ω_{CARS} と同じ値を示すことがわかる。我々の経験では、特に生細胞の指紋領域のバンドを測定する際、これらのバンドと NRB の強度は同じオーダーとなり、NRB 由来のショットノイズと指紋領域の共鳴成分との区別が困難であるため、通常の CARS 顕微鏡では両者を分離することが難しい。複数の振動モードについての情報を同時に取得し、NRB の影響のない、純粋に振動共鳴した CARS 信号を得るためには、以降で述べるように CARS スペクトルの取得が欠かせない。Fig.1 (c) に示

Fig.1 Schematic diagrams of (a) CARS, (b) one of the NRBs and (c) multiplex CARS.

したマルチブレックス CARS 過程は、広帯域ストークス光 (ω_2 光) を用いることで複数の振動モードを共鳴的に同時に励振させ、CARS スペクトルを得る方法である。

このマルチブレックス CARS 過程により測定される CARS スペクトルの信号強度 $I(\omega)$ は、一般的に以下の式で表される。

$$I(\omega) = \sum \left| \chi_{NR} + \frac{A}{(\Omega - \omega) - i\Gamma} \right|^2 \cdots (1)$$

ここで、 ω は信号光の角周波数、 χ_{NR} は NRB、 A は振動共鳴 CARS 光の振幅、 Ω は振動共鳴角周波数、 Γ はバンド幅に比例する係数である。NRB は理論的にはフラットなスペクトルであるが、白色レーザーのスペクトル形状や分光器・光検出器の波長特性のため、我々の装置ではゆるやかな山形のスペクトル形状となっており、実際の実験では、例えば試料近くのカバーガラス等を測定することで NRB スペクトルを実測し、そのスペクトルを利用することで、試料の CARS スペクトル上に現れる実験装置に由来する様々な効果を補正している。Fig.2 (a) に、式 (1) より求めた理論上の CARS スペクトルを示す。スペクトルは振動共鳴した信号と NRB との干渉により分散型の形状をしている。これを通常の振動スペクトルに復元するため、我々は最大エントロピー法 (maximum entropy method; MEM) を用いている²²⁾。この計算により得られた $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ スペクトルが Fig.2 (b) である。Fig.2 (b) には、復元したスペクトル (下部) と、モデルスペクトルとして用いたローレンツ関数との差スペクトル (上部) も示してい

Fig.2 (a) Calculated CARS spectrum and (b) Retrieved $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ spectrum by MEM algorithm (lower). The upper spectrum is the residual obtained by subtracting the retrieved spectrum from the substituted Lorentzian function in (a).

る。残差より、0.5% 以内の正しきで復元できていることが示されている。MEM では三次の非線形感受率 $\chi^{(3)}$ の位相情報の計算も行い、振幅スペクトルの復元を行っており、求められた $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ スペクトルは自発ラマンスペクトルと同等の情報を有している。CARS スペクトルの復元には、振動スペクトルをローレンツ型と仮定して式 (1) を用いる方法もあるが、MEM による解析では振動バンドの形状を予め仮定する必要がないため、生体組織や生細胞においてよく見られる幅広い非対称な振動バンドが存在していても復元可能である²³⁾。

3. 実験装置

本研究では Fig.3 (a), 3 (b) に示す 2 つの多光子顕微鏡を用いた。Fig.3 (a) は複数の非線形光学効果の検出が可能な非線形ラマン分光顕微鏡^{11,22)}である。光源はマイクロチップ Nd:YAG レーザーで発振波長は 1064 nm (ω_1 光) である。この出力を二つに分け、一方をフォトニック結晶ファイバーに導入して白色レーザー光を発生させる。

Fig.3 (a) Nonlinear multimodal microscope, (b) multimodal microscope, (c) Raman spectrum of β -carotene.

このうちの近赤外の波長成分(ω_2 光)と、分けたもう一方の ω_1 光を同時に試料へと照射する。 ω_2 光は広帯域の波長成分を持つため、複数の振動モードを同時に励振するマルチブレックス CARS 過程の実現が可能となる。さらに、紫外～可視域には THG, TSFG, SHG, SFG に由来する信号も得られるため、ダイクロイックミラーを用いて近赤外域の CARS 光とそれ以外とを分割し、二台の分光器及び CCD カメラを用いて分光測定を行う。

Fig.3 (b)は自発ラマン散乱と SHG の検出が可能なラマン分光顕微鏡である。自発ラマン散乱の測定には、Nd:YVO₄ の発振波長の第二高調波 532 nm を励起光(昭和オプトロニクス株式会社: J200GS-11)とした共焦点系を構築した。励起光を顕微鏡(Nikon: ECLIPSE TE2000-S)へ導入した後、ターレットに設置したダイクロイックミラー (Semrock: LPD01-532RU-25) で反射し油浸対物レンズ (Nikon: Plan Apo, $\times 100$, NA 1.45) を通してピエゾステージ (Mad City Lab: Nano-LPQ) 上に置かれたサンプルに照射した。試料で発生したラマン散乱光のうち後方散乱光を同じ対物レンズで集め、ダイクロイックミラーを透過した成分をピンホール(直径 100 μm)に通し、分光器 (LUCIR: Z3208) と CCD カメラ (Princeton Instruments: PIXIS 100BR) を用いた分光測定を行った。一方、SHG の観察には中心波長 1060 nm のモード同期ファイバーレーザー (Fianium: SC-4-dual) 用いた。レーザー光を顕微鏡へと導入する際に 532 nm のレーザー光と同軸にし、前述の対物レンズを通してサンプルへと照射した。レーザー用の打ち上げミラーは対物レンズ下に置かれたターレットに複数セットされており、各々の実験に合わせて最適なミラーを選択できる。前方方向に進む信号光を別の対物レンズ (Nikon: S Plan Fluor ELWD, $\times 40$, NA 0.6) で集め、光ファイバーへと導入し分光測定を行った。このように2つのレーザー光を同軸にしてサンプルに照射することにより、同一視野での自発ラマン散乱と SHG の測定が可能となった。この装置で β -カロテン微結晶の測定を行い、共鳴ラマンスペクトルが取得できることを確認した (Fig.3 (c))。

4. 試料

本研究では、ラット眼球の凍結切片(厚さ: 20 μm)を試料として用いた。ラットより摘出した眼球を凍結した後、多数スライスし、多光子イメージング用と H&E 染色用のサンプルを用意した。どちらも測定前に組織固定の処理を行った。Fig.4 (I)に角膜(上が眼球外側)、4 (II)に網膜(上が眼球内側)の H&E 染色した凍結切片の光学像を示す。H&E 染色像から明らかなように、角膜、網膜は層構造をなしている。角膜表面には上皮細胞が層状に並んだ角膜上皮層 (Fig.4 (a)) があり、その内側にはコラーゲンが密に配列した角膜実質層 (Fig.4 (b)) がある。また網膜には光受容細胞である視細胞があり、その核が密集して外顆粒層 (Fig.4 (c)) を形成している。その外側には錐状体・桿状体層 (Fig.4 (d)) があり、ここには視細胞に含まれる細胞質や光受容タンパク質(視物質)が存在している。さらにその外側には強膜 (Fig.4 (e)) があり、角膜実質層と同じようにコラーゲンが主な構成要素となっている。

Fig.4 H&E stained image of the frozen section at cornea (I) and retina (II); The layer in each image is assigned as (a) epithelium, (b) stroma (c) outer nuclear layer, (d) layer of rods and cones, (e) sclera, respectively.

5. 結果・考察

眼球凍結切片の角膜を非線形ラマン分光顕微鏡 (Fig.3 (a)) で測定した結果を Fig.5 に示す。測定範囲は角膜上皮層から角膜実質層にわたる 100 $\mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ (201 pix $\times$ 201 pix) で、露光時間は一点あたり 50 ms、全測定時間は 40 min である。Fig.5 の H&E 染色像は参照用であり、実際に測定を行った凍結切片は非染色、非標識のものである。紫外～可視域には 1064 nm の ω_1 光による THG や SHG の信号が検出された (Fig.5 (g-1,h-1))。これらのスペクトルを見ると、THG や SHG よりも強度は弱い ω_1 光と広帯域である ω_2 光との相互作用によって発生した SFG、および TSFG 信号も観測された。THG と TSFG, SHG と SFG からは同じ情報が得られ、お互いのイメージ・コントラストは全く異なっており、それぞれ別の組織情報を与えることがわかる (Fig.5 (a, b))。また、Fig.5 (c-f)には複数の振動モードに基づく CARS イメージを示した。THG は角膜上皮層で強く発生しており、いくつもの円形の構造が可視化された。角膜上皮層における円形構造は THG とはコントラストが逆ではあるが、CH₂伸縮振動 (2850 cm^{-1}) の CARS イメージ (Fig.5 (d)) でも見られた。角膜上皮層には上皮細胞が層状に並んでいることから (H&E stained image in Fig.5), これら円形の構造は細胞核を可視化していると考えられる。それに対し SHG は、角膜上皮層では見られなかったが、角膜実質層にて強く発生していた。先に述べたように、角膜実質層は主にコラーゲンで形成されている。生体組織内ではコラーゲン線維が SHG アクティブな物質として広く知られている²⁴⁾。このことから SHG イメージ (Fig.5 (b)) では角膜実質層のコラーゲンを可視化していると考えられる。このイメージでは、コラーゲン線維同士が規則正しく配向していることがわかる。また、CH 変角振動 (1451 cm^{-1}) やフェニルアラニン残基の環振動 (1005 cm^{-1}) の CARS イメージ (Fig.5 (e, f)) では、組織全体の様子を可視化する

Fig.5 H&E stained image, multimodal images and spectral profiles of the frozen rat cornea section; (a) THG, (b) SHG, (c) CARS at CH_3 str. (2930 cm^{-1}), (d) CARS at CH_2 str. (2850 cm^{-1}), (e) CARS at CH bend (1451 cm^{-1}), (f) CARS at Phenylalanine ring breathing (1005 cm^{-1}), (g) spectral profiles at the green spot in image (c); (g-1) UV-visible region, (g-2) $\text{Im}[\chi^{(3)}]$, (h) spectral profiles at the blue spot in image (c); (h-1) UV-visible region, (h-2) $\text{Im}[\chi^{(3)}]$.

ことができた。フェニルアラニン残基由来のバンドはタンパク質で特徴的に見られることから、これらのイメージはタンパク質分布を表していることが考えられる。つまり、角膜上皮層、実質層には全体的にタンパク質が含まれていることがわかる。これらのバンド強度は、 2900 cm^{-1} 付近に見られるCH伸縮の強度に比べ弱い(Fig.5(g-2, h-2))が、鮮明なCARSイメージを得ることができた。これまでにマウスの角膜に関して、THG, SHG, CARSや二光子励起蛍光(two-photon excitation fluorescence; TPEF)を用いたタンパク質や脂質のイメージングが報告されているが²⁵⁾、これらはCH伸縮振動領域のみにフォーカスしており、ラマンスペクトルの持つ豊富な分子情報を有効に活用していない。それに対して我々の白色レーザー光を用いた手法は、様々な分子振動のバンドが現れる“指紋領域”($800\sim 1800\text{ cm}^{-1}$)を観測することができ、様々な分子振動に基づく複眼的な組織構造解析が可能となった。

次に網膜を非線形ラマン分光顕微鏡(Fig.3(a))で測定

した結果をFig.6に示す。測定範囲は外顆粒層、錐状体・桿状体層を中心とした $100\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m}$ ($201\text{ pix} \times 201\text{ pix}$)で、露光時間は前述の角膜と同じである。Fig.6(c, f)はいずれも CH_3 基の振動モードによるものであり、それぞれ伸縮振動(2930 cm^{-1})(c)、変角振動(1458 cm^{-1})(f)である。これらは主にタンパク質の分布を表している。またFig.6(d)は 2850 cm^{-1} の CH_2 伸縮振動のバンドでのCARSイメージで、主に脂質の分布を表している。脂質のイメージでは、視細胞の細胞核が密集している外顆粒層では信号が弱く、錐状体・桿状体層においては逆に強くなるという傾向が見られた。錐状体・桿状体層は視物質がリン脂質二重膜に囲まれるように存在しており、脂質リッチな部位である²⁶⁾。Fig.6(d)のCARSイメージはこの脂質の分布を可視化していると考えられる。またFig.6(j)の $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ スペクトルは、視細胞の細胞核におけるもので、核酸塩基(アデニン、グアニン)に含まれる 1578 cm^{-1} のプリン環や 1095 cm^{-1} のDNA主鎖における PO_2^- の振動モ

Fig.6 H&E stained image and multimodal and multiplex images and spectral profiles of rat retina of the frozen section; (a) THG, (b) SHG, (c) CARS at CH₃ str. (2930 cm⁻¹), (d) CARS at CH₂ str. (2850 cm⁻¹), (e) CARS at Purine ring str. (1578 cm⁻¹), (f) CARS at CH₃ def. (1458 cm⁻¹), (g) CARS at PO₂⁻ str. (1095 cm⁻¹), (h) spectral profile of UV-visible region at blue spot of image (c), (i) spectral profile of UV-visible region at green spot of image (c), (j) spectral profile of Im[$\chi^{(3)}$] at red spot of image (c).

ードによるバンドが確認できた。Fig.6 (e, g) にそれぞれのイメージを示す。いずれの振動モードも細胞核で高いコントラストを与えており、これらのイメージ (Fig.6 (e, g)) は外顆粒層の様子を可視化していることがわかる。以上のイメージは Im[$\chi^{(3)}$] スペクトルより得られた分子情報を基にしたものである。

Fig.6 (b) は SHG によるイメージである。右下の非常に強く信号が発生している部分はコラーゲン線維からなる強膜であると考えられる。このイメージには強膜部分以外においても網膜の層構造に沿うようにして多数の輝点が見られた。他のイメージと比較することにより、これらの SHG 信号は錐状体・桿状体層において発生していることがわかった。この SHG 輝点から得られた平均の Im[$\chi^{(3)}$] スペクトルを Fig.7 に

Fig.7 Spectral profile of Im[$\chi^{(3)}$] at the SHG-spots (average of 101 spots).

示す。このスペクトルにはフェニルアラニン残基の環振動 (1006 cm^{-1}), アミド III (1260 cm^{-1}), CH 変角 (1450 cm^{-1}), アミド I (1661 cm^{-1}) などのバンドが見られることから, SHG 輝点の起源はタンパク質リッチな組成であることがわかった。

我々はこの SHG 輝点の起源について詳細に検討を行った。前述の通り, これらの輝点は錐状体・桿状体層においてのみ観察されるため, この層に特異的に存在している分子や組織構造が SHG に寄与していると考えられる。その候補のひとつとして挙げられるのが視物質であるロドプシンである。ロドプシンは 500 nm 付近に吸収極大を持つ吸収スペクトルを示す。また, この実験条件において発生している SHG の波長は 532 nm である。これらのことから, ロドプシンによる電子的な共鳴増強 SHG が発生した, という可能性が考えられる。

視物質において共鳴増強がある場合, 532 nm 励起による共鳴ラマン効果も生じると考えられる。そこで Fig.3 (b) のラマン分光顕微鏡を用いてラット眼球凍結切片の測定を行った。結果を Fig.8 (a~c) に示す。ラマン分光顕微鏡による測定においても SHG 輝点は確認された (Fig.8 (a))。Fig.8 (b) は, DNA 主鎖における PO_2^- の振動モードによるラマンイメージであり, 細胞核の様子を可視化している。つまり測定範囲の左上部は細胞核が密集している外顆粒層に対応する。このことから Fig.8 (a) の SHG 輝点も, 先程の結果 (Fig.6) と同様, 外顆粒層の下にある錐状体・桿状体層において分布していることがわかる。これらの輝点におけるラマンスペクトルを平均, fluorescence background subtraction (FBgS)^{27,28)} により補正したものを Fig.8 (c) に示す。ロドプシンのラマンスペクトルは 1550 cm^{-1} に C=C 伸縮振動の鋭いピークが見られるが²⁹⁾, それを筆頭とするロドプシン由来のバンドは, 輝点におけるラマンスペクトルでは確認できなかった。

Fig.8 Multimodal spectral images (measurement range: $60\text{ }\mu\text{m}\times 60\text{ }\mu\text{m}$ ($121\text{ pix}\times 121\text{ pix}$), exposure time: 1.5 s/pix ; (a) SHG, (b) PO_2^- str. (1094 cm^{-1}), (c) Raman spectrum at the SHG-active spots (average of 143 spots) with background subtraction.

Fig.8 (a) を詳しく見ると, 錐状体・桿状体層において見られる輝点の形状は, 点ではなくフィラメント状であり, それらが部分的にはあるが規則的に配向している。これらのことから, SHG の起源は線維状の構造であると考えられた。スペクトル情報と組み合わせると, これらは SHG アクティブなタンパク質生体内線維であると考えられる。代表例として, コラーゲン線維やミオシンフィラメント, 神経細胞 (axon) 内の微小管²⁴⁾ などが SHG アクティブな生体内線維として知られている。これらの候補を念頭に錐状体・桿状体層の組織構造と照らし合わせることで, 現在我々は, SHG により結合繊毛というオルガネラを可視化していると考えている。結合繊毛とは, 微小管がバンドル状に 9 本束ねられた構造をしており³⁰⁾, 視物質などの視覚を司る重要な分子の輸送を担っている視細胞中のキー・パーツの一つである。微小管から構成されていることから, SHG の発生源として有力な候補の一つであると考えられる。現在, この同定を確かなものとすべく, 免疫染色など多方面から検討を進めているところである。

6. まとめ

マルチモーダル多光子分光顕微鏡を用いて, ラット眼組織の非染色イメージングを行った。角膜や網膜の層構造や細胞の様子を分子構造に基づいて可視化することができた。特に網膜の視細胞のイメージングでは, 結合繊毛を SHG にて可視化できることを示唆する結果が得られた。結合繊毛は視細胞の形成や代謝に関わる重要な部位である。そのため結合繊毛の異常は様々な疾患の要因とされている。結合繊毛の異常は, 例えばその長さに現れることがある。通常よりも結合繊毛の長さが長いと, 錐状体・桿状体層にあるべき視物質が, 視細胞の核周辺 (外顆粒層) に蓄積されてしまい, 最悪の場合, 細胞死を招くと言われている³¹⁾。結合繊毛の“長さ”を非染色可視化できるこのような多光子イメージング手法は, その異常を発見するという意味でも大変有用な手法であるといえる。

利益相反の開示

利益相反なし。

参考文献

- 1) W. Drexler, J.G. Fujimoto: State-of-the-art retinal optical coherence tomography. *Prog. Retin. Eye Res.*, 27: 45-88, 2008.
- 2) R. F. Guthoff, A. Zhivov, O. Stachs: *In vivo* confocal microscopy, an inner vision of the cornea - a major review. *Clin. Experiment. Ophthalmol.*, 37: 100-117, 2009.
- 3) V. Nuzzo, K. Plamann, M. Savoldelli, M. Merano, D. Donate, O. Albert, P. F. Gardeazabal Rodríguez, G. Mourou, J.-M. Legeais: *In situ* monitoring of second-harmonic generation in human corneas to compensate for femtosecond laser pulse attenuation in keratoplasty. *J. Biomed. Opt.*, 12: 064032-064032, 2007.
- 4) J. M. Bueno, E. J. Gualda, A. Giakoumaki, P. Pérez-Merino, S. Marcos, P. Artal: Multiphoton microscopy of *ex vivo* corneas after collagen cross-linking. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, 52: 5325-5331, 2011.

- 5) P. Steven, M. Hovakimyan, R.F. Guthoff, O. Stachs: Imaging corneal crosslinking by autofluorescence 2-photon microscopy, second harmonic generation, and fluorescence lifetime measurements. *J. Cataract Refract. Surg.*, 36: 2150-2159, 2010.
- 6) S.Y. Chen, H.C. Yu, I. J. Wang, C.K. Sun: Infrared-based third and second harmonic generation imaging of cornea. *J. Biomed. Opt.*, 14: 044012-044012-044017, 2009.
- 7) S.W. Teng, H.Y. Tan, J.L. Peng, H.H. Lin, K.H. Kim, W. Lo, Y. Sun, W.C. Lin, S.J. Lin, S.H. Jee, P. T. C. So, C.Y. Dong: Multiphoton autofluorescence and second-harmonic generation imaging of the *ex vivo* porcine eye. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, 47: 1216-1224, 2006.
- 8) M. Han, G. Giese, J.F. Bille: Second harmonic generation imaging of collagen fibrils in cornea and sclera. *Opt. Express*, 13: 5791-5797, 2005.
- 9) A.T. Yeh, N. Nassif, A. Zoumi, B.J. Tromberg: Selective corneal imaging using combined second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. *Opt. Lett.*, 27: 2082-2084, 2002.
- 10) V. Raghunathan, Y. Han, O. Korth, N.-H. Ge, E.O. Potma: Rapid vibrational imaging with sum frequency generation microscopy. *Opt. Lett.*, 36: 3891-3893, 2011.
- 11) H. Segawa, M. Okuno, H. Kano, P. Leproux, V. Couderc, H. Hamaguchi: Label-free tetra-modal molecular imaging of living cells with CARS, SHG, THG and TSFG (coherent anti-Stokes Raman scattering, second harmonic generation, third harmonic generation and third-order sum frequency generation). *Opt. Express*, 20: 9551-9557, 2012.
- 12) J.P. Pezacki, J.A. Blake, D.C. Danielson, D.C. Kennedy, R. K. Lyn, R. Singaravelu: Chemical contrast for imaging living systems: molecular vibrations drive CARS microscopy. *Nat. Chem. Biol.*, 7: 137-145, 2011.
- 13) C.Y. Chung, J. Boik, E.O. Potma: Biomolecular imaging with coherent nonlinear vibrational microscopy. *Annual Review of Physical Chemistry*, Vol 64, 64: 77-99, 2013.
- 14) C.L. Evans, X.S. Xie: Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: chemical imaging for biology and medicine. *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 1: 883-909, 2008.
- 15) C.W. Freudiger, W. Min, B.G. Saar, S. Lu, G.R. Holtom, C.W. He, J.C. Tsai, J.X. Kang, X.S. Xie: Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy. *Science*, 322: 1857-1861, 2008.
- 16) Y. Ozeki, W. Umemura, Y. Otsuka, S. Satoh, H. Hashimoto, K. Sumimura, N. Nishizawa, K. Fukui, K. Itoh: High-speed molecular spectral imaging of tissue with stimulated Raman scattering. *Nat. Photonics*, 6: 845-851, 2012.
- 17) M.C. Wang, W. Min, C.W. Freudiger, G. Ruvkun, X.S. Xie: RNAi screening for fat regulatory genes with SRS microscopy. *Nat. Methods*, 8: 135-138, 2011.
- 18) S.H. Parekh, Y.J. Lee, K.A. Aamer, M.T. Cicerone: Label-free cellular imaging by broadband coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Biophys. J.*, 99: 2695-2704, 2010.
- 19) J.K. Ranka, R.S. Windeler, A.J. Stentz: Visible continuum generation in air-silica microstructure optical fibers with anomalous dispersion at 800 nm. *Opt. Lett.*, 25: 25-27, 2000.
- 20) L.B. Mostaço-Guidolin, M.G. Sowa, A. Ridsdale, A.F. Pegoraro, M.S. D. Smith, M.D. Hewko, E.K. Kohlenberg, B. Schattka, M. Shiomi, A. Stelow, A.C.T. Ko: Differentiating atherosclerotic plaque burden in arterial tissues using femtosecond CARS-based multimodal nonlinear optical imaging. *Biomed. Opt. Express*, 1: 59-73, 2010.
- 21) C.L. Evans, E.O. Potma, M. Puoris'haag, D. Cote, C.P. Lin, X.S. Xie: Chemical imaging of tissue *in vivo* with video-rate coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102: 16807-16812, 2005.
- 22) M. Okuno, H. Kano, P. Leproux, V. Couderc, J.P.R. Day, M. Bonn, H. Hamaguchi: Quantitative CARS molecular fingerprinting of single living cells with the use of the maximum entropy method. *Angew. Chem. Int. Edit.*, 49: 6773-6777, 2010.
- 23) E.M. Vartiainen, H.A. Rinia, M. Muller, M. Bonn: Direct extraction of Raman line-shapes from congested CARS spectra. *Opt. Express*, 14: 3622-3630, 2006.
- 24) P.J. Campagnola, A.C. Millard, M. Terasaki, P.E. Hoppe, C.J. Malone, W.A. Mohler: Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues. *Biophys. J.*, 82: 493-508, 2002.
- 25) N. Olivier, F. Aptel, K. Plamann, M.C. Schanne-Klein, E. Beaurepaire: Harmonic microscopy of isotropic and anisotropic microstructure of the human cornea. *Opt. Express*, 18: 5028-5040, 2010.
- 26) K. Boesze-Battaglia, R.J. Schimmel: Cell membrane lipid composition and distribution: Implications for cell function and lessons learned from photoreceptors and platelets. *J. Exp. Biol.*, 200: 2927-2936, 1997.
- 27) K. Hamada, K. Fujita, N.I. Smith, M. Kobayashi, Y. Inouye, S. Kawata: Raman microscopy for dynamic molecular imaging of living cells. *J. Biomed. Opt.*, 13: 044027, 2008.
- 28) C.A. Lieber, A. Mahadevan-Jansen: Automated method for subtraction of fluorescence from biological Raman spectra. *Appl. Spectrosc.*, 57: 1363-1367, 2003.
- 29) A.R. Oseroff, R.H. Callende: Resonance Raman-spectroscopy of rhodopsin in retinal disk membranes. *Biochemistry-U.S.*, 13: 4243-4248, 1974.
- 30) A.F. Wright, C.F. Chakarova, M.M. Abd El-Aziz, S.S. Bhattacharya: Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nat. Rev. Genet.*, 11: 273-284, 2010.
- 31) Y. Omori, T. Chaya, K. Katoh, N. Kajimura, S. Sato, K. Muraoka, S. Ueno, T. Koyasu, M. Kondo, T. Furukawa: Negative regulation of ciliary length by ciliary male germ cell-associated kinase (Mak) is required for retinal photoreceptor survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107: 22671-22676, 2010.

著者紹介

秋山 敏宏 (Toshihiro Akiyama)
筑波大学数理物質科学研究科電子・物理工学専攻 博士前期課程在籍中。専門分野：分子分光学，非線形光学。所属学会：分子科学会、日本応用物理学会。

瀬川 尋貴 (Hiroki Segawa)
東京大学大学院理学系研究科化学専攻 博士課程在籍中。日本学術振興会特別研究員。専門分野：分析化学，分子分光学，顕微分光。所属学会：分子科学会

加治 優一 (Yuichi Kaji)
1994 年 東京大学医学部医学科卒業，東大眼科学教室研修医。1999 年 東京大学大学院医学系研究科博士課程修了。2000 年 新潟大学歯学部口腔解剖学教室研究員。2001 年 ハーバード大学研究員。2002 年 筑波大学眼科講師。2010 年 筑波大学眼科 准教授。専門分野：眼科一般，加齢のメカニズム。所属学会：日本眼科学会，日本角膜学会，日本眼感染症学会，日本コンタクトレンズ学会，抗加齢学会，メイラード学会。日本眼科学会(評議員)，抗加齢学会(評議員)，メイラード学会(世話人)。受賞歴：2004 年 アメリカ白内障屈折矯正学会のフィルムフェスティバルで優勝，2005 年 日本眼科学会学術奨励賞，2005 年 ジャムコン賞，2006 年 日本角膜学会学術奨励賞，2007 年 ロート賞，2009 年 日本眼科学会評議員賞，2010 年 アメリカ白内障屈折矯正手術学会におけるフィルムフェスティバルで Honorable Mention 受賞，2010 年 ヨーロッパ白内障屈折矯正手術学会 フィルムコンテスト 準優勝，2011 年第 6 回 Ophthalmic Surgery Film Award：最優秀賞 Grand Prix，2011 年 財団法人桐仁会設立 20 周年記念臨床医学研究賞，2012 年 アメリカ白内障屈折矯正手術学会のポスター部門で準優勝。

大鹿 哲郎 (Tetsuro Oshika)
1985 年 東京大学医学部卒業，1991 年 博士(医学) 東京大学。1995 年 東京大学医学部講師。1997 年 Louisiana State University, Visiting Assistant Professor。1998 年 東京大学医学部助教授。2002 年 筑波大学教授(眼科学)。専門分野：眼科学，眼光学，マイクロサージェリー。所属学会，役職：日本眼科学会(常務理事)，日本眼光学学会(常任理事)，日本眼炎症学会(理事)など。受賞歴：1989 年 日本眼科学会学術奨励賞，2000 年 第 5 回ロートアワード，2004 年 日本医師会医学研究助成受賞，2006 年 American Academy of Ophthalmology, Achievement Award，2007 年 日本眼科学会評議員会賞，2015 年 APAO Achievement Awards，など。

加納 英明 (Hideaki Kano)
1996 年 東京大学理学部物理学科卒業，1996 年 東京大学大学院理学系研究科物理学専攻入学，2001 年 同博士課程修了博士(理学)。2001 年 東京大学大学院理学系研究科化学専攻物理化学講座助手。2007 年 東京大学大学院理学系研究科化学専攻物理化学講座准教授。2012 年 筑波大学 数理物質科学研究科 電子・物理工学専攻 准教授。専門分野：分子分光学，非線形光学。所属学会：分子科学会，日本応用物理学会。受賞歴：2008 年 光科学技術研究振興財団研究表彰，2008 年 日本化学会第 57 回進歩賞，2014 年 コニカミノルタ画像科学奨励賞。