



生細胞のラベルフリー非線形分光 イメージング

筑波大学 数理物質科学研究所

加納英明, 米山弘亮

理化学研究所バイオリソース研究センター

須藤和寛

愛知県がんセンター研究所

猪子誠人

1. はじめに

近年, "spectroscopic imaging" という手法が, イメージングの分野で確立しつつある^{1,2)}。類似の表現である"spectral imaging"と比べ, 分光学的な掘り下げを一層意図した手法であると解釈できよう。この傾向は, 特定の振動モードを狙い撃ちして高速イメージングを行うことを従来得意としている非線形ラマン顕微鏡で, 特に顕著である。これらを敢えて区別すると, 前者が分光学的イメージング, 後者が分光イメージングとなるが, 本稿では両者とも分光イメージングという名称で呼ぶことにする。

非線形ラマン分光イメージングは, ラベルフリー分子イメージングの手法の一つとして近年急速に発展している¹⁻⁷⁾。この中で, 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) および誘導ラマン散乱 (stimulated Raman scattering; SRS) が, 非線形ラマン分光イメージングの主な手法として用いられている。この手法をベースとして, これまでに様々なバリエーションの分光イメージング手法が報告されている。例えば広帯域のスペクトル成分をもつレーザー光源を用いて複数の振動モードを一度に励振するマルチプレックス法⁸⁻¹⁴⁾, レーザーの波長を高速に変化させてスペクトル及び空間情報を得る方法¹⁵⁻¹⁹⁾, フーリエ変換により分光器を用いずスペクトルを得る方法²⁰⁻²²⁾などがある。これらに加えて, 2台の光コムを用いたデュアルコム分光により CARS 分光イメージングを行う研究 (spectro-imaging) も報告されている²³⁾。それぞれの手法が特有の特徴を持つ中で, 特にマルチプレックス法⁸⁻¹²⁾は, 報告されている中で最も広いスペクトル帯域での測定が可能である。典型的なスペクトル帯域は $\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ と, 振動モードの基音 (fundamental) すべてを同時に励振・検出できる超広帯域 CARS (ultrabroadband CARS; U-CARS) 分光イメージングが実現可能である²⁴⁾。マルチプレックス法では, 一台のモード同期レーザー発振器^{25, 26)}を用いた方法や, スーパーコンティニューム光 (supercontinuum; SC) を用いた手法^{10, 11)}などが報告されている。後者では, SC 光発生のために, マスターレーザーからの出力をテーパ状ファイバー¹⁰⁾やフォトニック結晶ファイバー (photonic crystal fiber; PCF)¹¹⁾に導入する方法が一般的である。我々のグループでは, SC 光発生にサブナノ秒光パルスを用いることで, コストダウンと長期安定性を両立させた CARS 分光イメージング装置をこれまでに開発・報告している²⁷⁾。

非線形ラマン散乱に用いる光源は尖頭出力が高いため, CARS に加え, 第二高調波発生 (second harmonic generation; SHG) や第三高調波発生 (third harmonic generation; THG) の検出チャンネルを持つ, いわゆるマルチモーダル非線形光学イメージングも実現可能である。我々はこれまで, マルチモーダル非線形光学イメージングにより, ルートレティン (Rootletin)²⁸⁾ というタンパク質により構成されたフィラメントが, 網膜視細胞において SHG アクティブであることを報告している²⁹⁾。また, マウスの頭頂骨のマルチモーダル非線形光学イメージングにより, ピクセルデュエルタイム (pixel dwell time) 5 ms にてイメージングが可能であることを報告している³⁰⁾。本装置の更なるスペックアップのためには, 用いるレーザー光源のピーク出力や繰り返し周波数などの最適化が欠かせない。本稿では, 我々が最近開発した, 繰り返しサブ 1 MHz の新しい光源を用いた新しい CARS 分光イメージング装置について紹介し, それを用いたラベルフリー生細胞イメージングの結果を報告する。特に,