

マルチコントラストな非線形イメージングが可能にする腫瘍の微小環境の発見

腫瘍の微小環境（隣接する細胞や分子、成長をサポートする血管系）を理解することは、がん研究において大きなインパクトをもたらすが、適切なイメージング法がないために進捗が阻まれている。米イリノイ大（University of Illinois）の科学者らは、マルチコントラストな非線形イメージングを発表している。このアプローチは、腫瘍がどのように始まり、そして広がっていくかについて、新たな知見をさらに得るために用いられている⁽¹⁾。

この手法は、組織に固有の非線形光学特性を観察することに加えて、血管新生、細胞外マトリックスの再編成、非ネイティブな細胞動員といった初期の成長サインを同時に可視化しやすくする。これらのイベントが同時に変化

することが必要であると、この技術は示している。すなわち、特定の細胞外小胞が豊富になることと、生合成に向けての代謝スイッチである。この同時発生によって、がんの成長についての詳細が明らかになり、診断や治療に向けて新しい戦略が可能になるかもしれない。

パルス整形多光子顕微鏡

この技術を適用させるため、研究者らはパルス整形多光子顕微鏡を開発した。ダイクロイックミラー（米ソーラボ社（Thorlabs）のDMLP900）に反射して生じたスーパーコンティニウム（780～880nm）の短波長のエッジは、コヒーレント反ストークスラマン散乱（CARS）のポンプビームとして機能する。工業

用のパルス整形回路に向かうメインのスーパーコンティニウム（900～1300nm）はCARSのストークスまたは励起ビームであり、AF⁽²⁾、AF⁽³⁾、 $\chi^{(2)}$ SHG、 $\chi^{(3)}$ THGとのコントラストを生じさせる（図1）。コンピュータ制御された回路はストークスビームに光学遅延をもたらし、スペクトル集束したCARSが可能になる。そして、 $\chi^{(3)}$ CARSの振動コントラストを集める。

ポンプビーム・ストークスビーム内に置かれるSF57のガラスブロックのペアは、パルスをプリチャージさせる。もう一つのダイクロイックミラーが2つのビームを組み合わせ、商業用の顕微鏡（オリンパス社のBX61WI）に進ませて集束させ、アクロマート対物レンズ（同社のUPLSAPO 60×W/IR、開

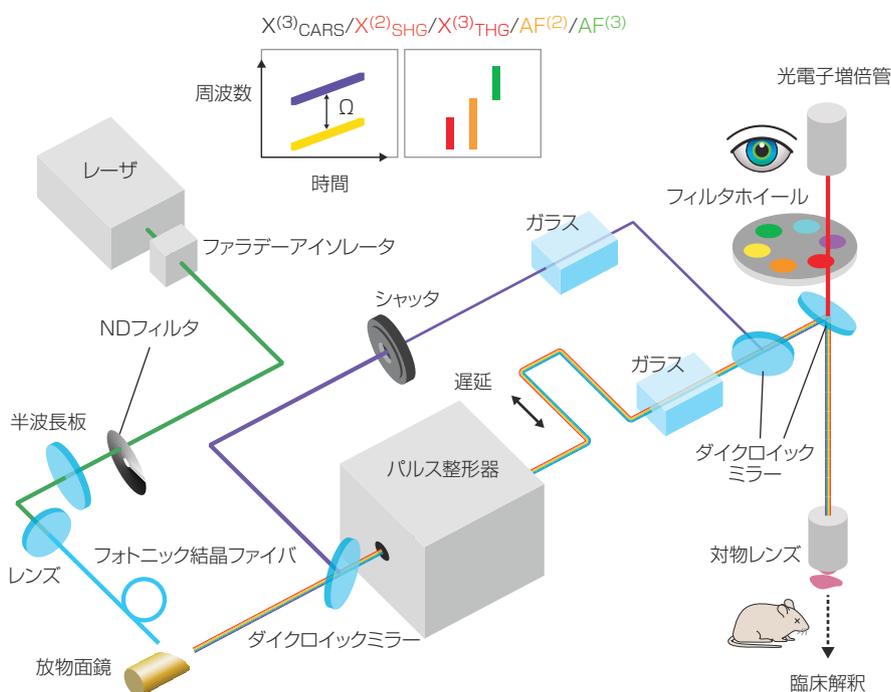


図1 パルス整形多光子顕微鏡は、ラベルフリーでマルチコントラストな非線形イメージングを可能にする。これには、スペクトル集束した $\chi^{(3)}$ CARSイメージングと、局在パルスを圧縮した $\chi^{(2)}$ SHG、 $\chi^{(3)}$ THG、AF⁽²⁾、AF⁽³⁾イメージングのためにカスタマイズされた励起光が含まれる（色は、励起パルスのスペクトルと時間特性を示す）。異なるイメージングコントラストを生み出すための励起光と検出光を変化させることでPMTとなり、組織の違いを見るためのヒトの眼として機能する。

口数1.20)を用いる。AF⁽²⁾、AF⁽³⁾、 $\chi^{(2)}$ SHG、 $\chi^{(3)}$ THGのイメージングでは、CARSのポンプビームはコンピュータ制御されたシャッタにブロックされた。スーパーコンティニウムのパルスを反復、圧縮させるために、ピクセル構成された4fパルスシャッタ(米バイオフォトニック・ソリューションズ社(Biophotonic Solutions)のMIIPS Box640)が用いられ、多光子パルス内干渉位相走査(MIIPS)に基づくパルス計測は反復ループ内で用いられた。研究者らは、変換制限されたパルス圧縮へ集束する反復を用いて、スーパーコンティニウムのコヒーレンスを評価した。彼らは、スーパーコンティニウムのバンド幅にわたって30fs未満の調整可能なパルスを発生させるために、局在圧縮を用い、それに続く変換制限されたパルス圧縮を用いて、カスタマイズした多光子モダリティに向けてパルスをプログラムした。

チームはこれらのカスタマイズした励起パルス(振幅と位相を使用)を整形して、対象の異なる内在分子や構造を標的とするために、さまざまな検出フィルタに適應した。安全なレベルに振幅を整形することで、パルス整形したスーパーコンティニウムパルスの入射電力は弱められた。異なるモダリティを用いる個々の試料を繰り返しイメージングでき、試料のダメージは観察されなかった。

非染色のラット組織(がん性と正常)で出力依存試験を実施して、個々の多光子イメージングモダリティを評価した。異なる平均出力を用いてイメージ(380×380ピクセル、1ピクセルあたり0.5×0.5 μm^2)を取得し、両対数スケールで励起平均出力と平均強度(光子計測数)を算出してプロットした。線形にフィットした勾配は、AF⁽²⁾と

$\chi^{(2)}$ SHGに対する出力依存性の2乗と一致し、AF⁽³⁾と $\chi^{(3)}$ THGに対する出力依存性の3乗と一致し、 $\chi^{(3)}$ CARSに対するポンプ/ストロークの出力依存性の2乗/線形と一致した。研究者らは、理論値から10%未満逸脱したことはいくつかの要因で説明できるかもしれないとする。例えば、試料の多様な生体分子の構造、励起・放出のクロストーク、視野のシグナルの低さまたは飽和だ。

このシステムは、全モダリティ向けのピエゾステージをラスタ走査することでイメージを取得した。ピクセルの滞留時間は200 μs だった。強度のある、高スペクトル分解能の $\chi^{(3)}$ CARSシグナルを生じさせるために、スーパーコンティニウムのスペクトル分解力を1つの振動数に集めるスペクトル集束を用いた。1つの分子振動をコヒーレントにドライブするために、ポンパルスとストロークパルスの両方をチャープさせ、相互作用時間の間で瞬間的な周波数差を不変にした。

スペクトル分解能を14 cm^{-1} にして周波数差を調節するために、2つのパルス間の遅延を走査することで、スペクトル信号を獲得できた。スペクトル集束したCARSを用いることで、イメージによって異なる1つのラマン振動数で、システムはハイパースペクトルイメージを収集する。そして、これらのイメージから、対象の領域に対応するピクセルを超えて $\chi^{(3)}$ CARSスペクトルを算出する。

この手法は、発がん転移に関わる複雑な相関関係、そして、もしかしたら因果関係における知見をもたらさだろう。(Barbara Gefvert)

参考文献

- (1) H. Tu et al, *Sci. Adv.*, 3, 1, e1600675 (2017); doi:10.1126/sciadv.1600675.

LFWJ

pco.

small
but
powerful

the blue pco.panda with
latest sCMOS technology

ultra
compact
design

resolution
2048 x 2048
pixels

pco.panda

pioneers
since 1987
30

pco.de
pco-imaging.com