

■緒言

以下の性能を有する新たなレーザー走査型顕微鏡を実用化した。

1. 生体組織観察のための振幅変調機能と薬剤計測に特化した位相変調機能を両方搭載
2. 共焦点反射光学系を備えることで組織形態観察や蛍光観察等にも対応
3. レーザー装置1台で多様な分子に対応

これにより、細胞や生体組織構造とそこにある小分子の局在や輸送、代謝の動態解析を容易とした。実用化したレーザー走査型顕微鏡は、生命科学などの学術研究分野だけでなく、医薬品や化粧品などの産業分野への応用ができる。

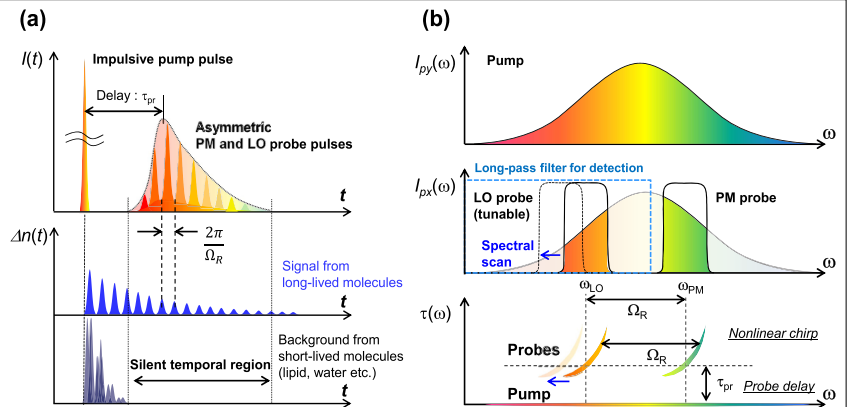
■研究の背景と経緯

近年、標識を使わずにレーザーの照射だけで分子の濃度分布を高速撮影できる「コヒーレントラマン散乱顕微鏡」と呼ばれる非染色イメージング技術が注目されている。従来のコヒーレントラマン散乱顕微鏡は、観察に用いる入射レーザー光の振幅を変調して試料に照射し、入射光に対する散乱光を光検出器で検出し、それを復調することでラマン信号を検出する振幅変調型コヒーレントラマン散乱顕微鏡が一般的である。振幅変調型顕微鏡では、水や脂質などの生体自身に含まれる分子振動持続時間の短いラマン信号を検出することで、細胞や組織等の形態情報を高速に画像化できるという特徴がある。

本研究グループでは、生体中で局所的に分布する低濃度の薬剤を画像化することを目的に、位相変調型コヒーレントラマン散乱顕微鏡(PM-SRS)を開発した。位相変調型顕微鏡では、励起光とプローブ光の相対的な時間差を利用することにより、分子振動の持続時間が比較的長い低分子量の物質を高いコントラストで選択的に検出できるという特徴がある。

非対称パルスを用いたスペクトルフォーカスによるポンプ・プローブPM-SRS

- (a) 非対称形状のプローブパルスによるコヒーレントラマン信号の高コントラスト検出。  
 $I(t)$ : パルスの強度、 $\Delta n(t)$ : インパルスラマン励起で誘起される瞬時屈折率変化。  
長寿命分子振動からのラマン信号を選択的に検出することで、コントラスト増強を達成できる。
- (b) ポンプ、PMプローブ、LOプローブパルスの周波数割り当てと周波数領域での非線形パルス整形。  
Y偏光ポンプ $I_{py}(\omega)$ とX偏光プローブ $I_{px}(\omega)$ の強度(上と中)と群遅延 $\tau_{pr}(\omega)$ (下)  
検出周波数は、LOプローブの帯域を $\pm\omega$ 方向に平行移動させることで調整する。



無標識による局所適用薬剤の皮膚浸透測定

塩酸リドカイン (LID)、ロキソプロフェンナトリウム塩 (LOX)、

および未処置皮膚組織モデル (STM) のラマンスペクトル

- (a) 自発的ラマン分光法
- (b) PM-SRS

薬剤塗布30分後と240分後のPM-SRS皮膚浸透画像  
スケールバーは50 μm

- (c) 4% LID溶液
- (d) 4% LOX溶液

LIDでは、薬物の浸透は角質層表面でブロックされて、深さ方向の濃度分布に変化は見られなかった。一方、LOXでは、数時間以内に濃度分布が深さ方向にシフトし、角質層およびその下の表皮細胞層における局所的な薬物濃度の上昇を示した。LOXの皮膚内濃度は240分後に  $47.3 \pm 4.8 \text{ mM}$  と測定された。

なお、この無標識定量測定における検出限界は LID 9.0 mM、LOX 4.9 mM と推定された。

今回開発した光波形整形技術によって、細胞や組織中に低い濃度で存在する小分子薬剤であっても、空間分布やその時間変化を捉えることが可能になった。

■発表論文および特許

- APL Photonics 3, 092405 (2018)  
Biomed. Opt. Express 12, 6545 (2021)  
JP Patent 7169684, Patent pending 2021-570009  
US Patent granted, Patent pending 17/791043  
DE Patent 602019022314.5, EP Patent pending 20912604.4

