

3P074

## マルチプレックスCARS顕微鏡を用いたヒト皮膚の分子分光イメージング

筑波大院・数理

○木村 将大, 米山 弘亮, 加納 英明

### Molecular Spectroscopic Imaging of Human Skin

#### Using Multiplex CARS Microscopy

○Masahiro Kimura, Hiroaki Yoneyama, Hideaki Kano

*Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba*

**【Abstract】** Epidermal Langerhans cells (LCs) possess surface markers and functional attributes which identify them as being of macrophage/monocyte lineage. Recent studies reveals their contributions in immune processes such as allergic hypersensitivity reactions. In the present study, we attempted label-free visualization of LCs through the molecular fingerprint using multiplex CARS microspectroscopy. Based on the reconstructed CARS images of each Raman band, we found a unique spectroscopic signature which probably helps the assignment of LCs.

#### 【序】

近年、ランゲルハンス細胞(Langerhans Cell ; LC)が注目を集めている。LCは皮膚の有棘層近くに存在する表皮細胞の一つであり、病原性細菌や有害物質に対して防御態勢を整える指令を出す指令機能や、乾燥・紫外線などの慢性的な刺激に対して炎症が起こらないよう鎮静化する自己防衛機能を果たすことが知られている。このように皮膚の免疫機能において重要な役割を果たすLCは、蛍光標識などで細胞の局在を知る方法が知られているが、非標識にて識別する方法は確立していない。そこで本研究では、非染色・非標識で分子情報を取得できるマルチプレックス coherent anti-Stokes Raman scattering(CARS)分光顕微鏡を用いて、分子の指紋に基づくLC同定を試みた。

#### 【方法】

測定には当研究室で開発したマルチモーダル多光子顕微鏡を用いた。光源には繰り返し周波数 33kHz のマイクロチップ Nd:YAG レーザー(パルス幅: 800ps)を用いた。基本波(1064nm)と、広帯域の波長成分を持つスーパーコンティニューム光を使用し、この二つの光軸を合わせて試料に照射した。試料にて発生した複数の非線形光学過程による信号光を分光測定した。試料には①ヒト臍帯血由来の培養LC及び、②ヒト皮膚凍結切片を用いた。LCはスライドガラス上で培養し、測定直前にカバーガラスでシーリングしてプレパラートとした。一方、皮膚組織については、角層から真皮に至る深さ分布を測定できる方向にスライスして薄片とし、PBSとともに封入してプレパラートとした。

## 【結果・考察】

LCの各点においてCARSスペクトルを取得し、得られたスペクトルを最大エントロピー法により $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ スペクトルに変換した上で(Fig.1)、バンド解析を行った。Fig.2に幾つかの振動バンドにおけるCARSイメージングの結果を示す。CH伸縮領域は4つのガウス関数(ピーク波数 $2965, 2931, 2864, 2850\text{ cm}^{-1}$ )でフィッティングすることで、それぞれのラマンバンドに基づいたイメージが再構成できた。このうち $961\text{ cm}^{-1}$ のバンドは、ケラチノサイト等通常の皮膚細胞には見られないバンドであり、LCにおいてのみ特徴的に表れるバンドである可能性がある。

次に、皮膚サンプル(凍結切片)においても同様の測定を行った。Figure 2に結果を示す。LCが点在する有棘層付近(Fig.2 (a)及び(b))を測定したところ、測定視野内で $961\text{ cm}^{-1}$ のバンドは見いだせなかった。一方、角層付近(Fig.2 (c)及び(d))の測定も行ったところ、興味深いことにこれまで報告されていないSHG(第二高調波発生: Second Harmonic Generation)の信号を検出した。皮膚のSHGイメージングについては、真皮におけるコラーゲンの可視化がよく知られているが、今回検出した部位は角層であることから、SHGアクティブな未知のストラクチャを可視化している可能性がある。

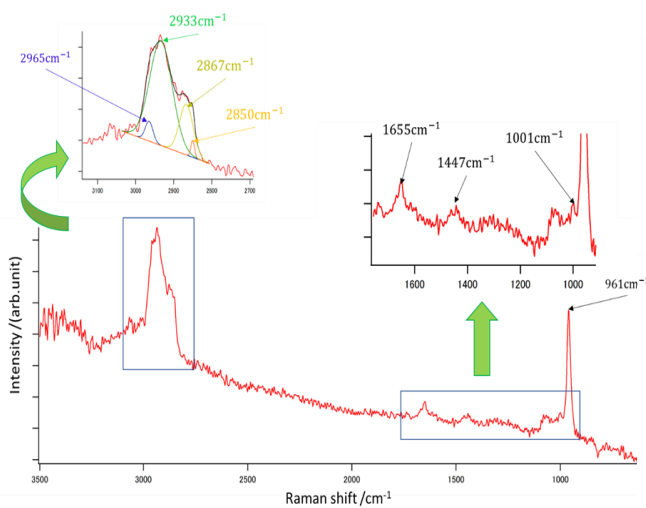


Figure 1 : Averaged  $\text{Im}[\chi^{(3)}]$  spectrum of the whole cell

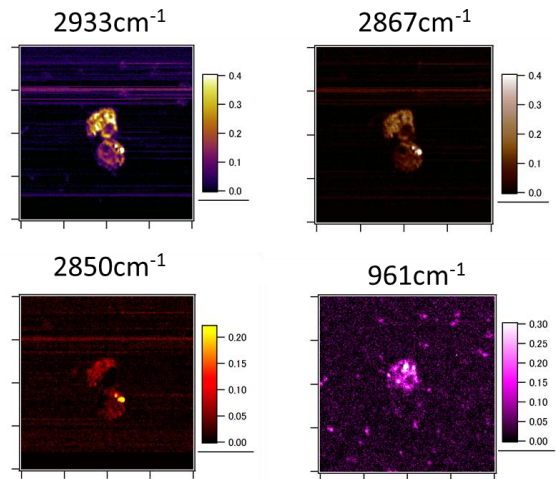


Figure 2: Reconstructed CARS images of cultured LC

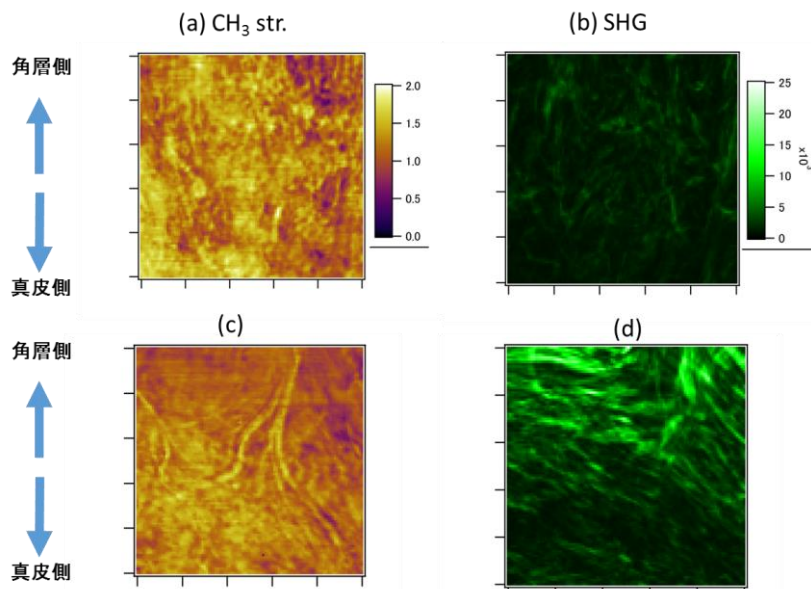


Figure 3: Reconstructed  $\text{CH}_3$  images of skin (a), (c) & SHG imaging (b), (d)