

マルチライン照明ラマン顕微鏡を用いた生体試料の高速ラマンイメージング

Multi-line illumination Raman microscopy for high speed Raman imaging of biological samples

○ 前田俊輔¹、望月健太郎¹、田沼将人²、熊本康昭³、橋本剛佑³、笠井淳司²、原田義規³、橋本均²、田中秀央³、Nicholas Isaac Smith⁴、藤田克昌¹

(1. 阪大院工、2. 阪大院薬、3. 京府立医大、4. 阪大 iFRec)

○ Shunsuke Maeda¹, Kentaro Mochizuki¹, Masato Tanuma², Yasuaki Kumamoto³, Kosuke Hashimoto³, Atsushi Kasai², Yoshinori Harada³, Hitoshi Hashimoto², Hideo Tanaka³, Nicholas Isaac Smith⁴, and Katsumasa Fujita¹

(1. Eng., Osaka University, 2. Phar., Osaka University, 3. Kyoto Prefectural University of Medicine
4. iFReC, Osaka University)

E-mail: fujita@ap.eng.osaka-u.ac.jp

ラマン顕微鏡は撮像の際に前処理を必要としないため、生細胞などの生体試料を生きのまま無標識でイメージングすることができる。しかし、ラマン散乱効率が低いいため測定時間が長くなることが課題である。従来のポイント走査型ラマン顕微鏡では、一枚のラマン散乱像を取得するにあたり、各画素ごとにラマン散乱スペクトルを1点ずつ測定する必要があるため、256×256画素の像を得るのにも6万回以上の露光が必要になる。この課題を解決するための手法の一つとしてラマン散乱スペクトルの並列検出がある。一回の露光時間で検出する試料面上の点数を増やすことで、露光回数を減らし撮像速度を向上させることができる。我々の研究グループでは、ライン状照明によるラマン顕微鏡を開発し、従来のラマン顕微鏡と比較して2桁以上撮像速度を向上した[1, 2]。

本研究では、さらに高速な撮像を可能にするマルチライン照明ラマン顕微鏡を開発した。本顕微鏡では、複数のライン状照明(以下、マルチライン照明)を試料に露光し、各ライン状照明により誘起されるラマン散乱スペクトルを並列検出する。マルチライン照明はシリンドリカルレンズアレイにより形成され、対物レンズにより試料に集光される。誘起されたラマン散乱光は、分光器の入り口に設置されたスリットアレイを通過後、分光器により分散され、2次元光検知器にラマンスペクトルとして検出される。撮像する際は、マルチライン照明を同時に走査しラマンスペクトルの並列検出を行うため、照射するライン状照明の本数に比例して露光回数を減らすことができ、撮像速度が向上する。しかしながら、本顕微鏡では2次元光検知器の波数軸方向においてスペクトルの重複が起きてしまうため、検出波数域を限定する必要がある、使用する照明のライン数と検出波数域の大きさはトレードオフの関係となる。

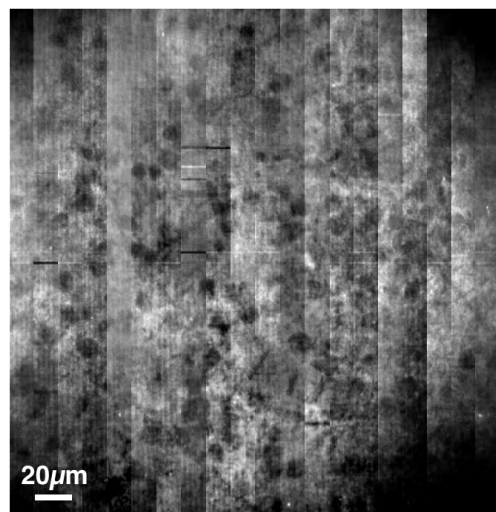


Fig 1: Raman image of sliced mouse brain tissue, constructed with 2840 cm^{-1} . Excitation wavelength was 532 nm and image acquisition time was 460 s. Objective lens was 40×, NA 1.25, water immersion lens. Number of pixels were 460×470 .

Fig 1 に、開発した顕微鏡で測定したマウス脳組織切片のラマン散乱像を示す。この時、照射ライン数は20本であった。この他に、ポリスチレンビーズと生きた細胞のラマンイメージングを行い、それぞれの測定で10～21本のライン状照明を用いて、従来のライン走査型ラマン顕微鏡と比較して10倍以上の速度での撮像を実現した。

参考文献

- [1] K. Hamada, K. Fujita, N. I. Smith, M. Kobayashi, Y. Inoue, and S. Kawata. Raman microscopy for dynamic molecular imaging of living cells. *Journal of biomedical optics*, 13(4):044027, (2008).
- [2] A. F. Palonpon, J. Ando, H. Yamakoshi, K. Dodo, M. Sodeoka, S. Kawata, and K. Fujita. Raman and SERS microscopy for molecular imaging of live cells. *Nature protocols*, 8(4):677–692, 2013.