

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 2 月 14 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04134

研究課題名(和文) 低侵襲・高深度三次元生体イメージングのための二光子励起蛍光プローブの開発

研究課題名(英文) Two-photon absorption fluorescent probes for non-invasive deep imaging

研究代表者

川俣 純 (Kawamata, Jun)

山口大学・大学院創成科学研究科 教授

研究者番号：40214689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：二光子励起顕微鏡は、生体の内部で生じている現象を非侵襲に、かつ、三次元的に可視化できるツールである。二光子励起顕微鏡を低コスト化すること、そして現在よりも深くまで生体にダメージを与えずに観察できるようにするためには、二光子励起のためのレーザー光を照射した際に高い効率で蛍光を発生する物質の開発が必要である。本課題では、蛍光物質の開発を通して、低コストかつ高深度までの三次元イメージングを実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

二光子励起顕微鏡は、生体の営みを動的かつ三次元的に可視化できる装置として注目を集めている。しかし、1億円以上もする高価な機器であるため、共同利用機器として総合大学が導入しているに過ぎない。この装置が高価な理由は、現在使われている蛍光プローブの励起光源に、高価なフェムト秒チタンサファイアレーザーが必要なことにある。本研究で開発された蛍光プローブにより、低コストで取扱が簡単なフェムト秒ファイバーレーザーを光源にした二光子励起イメージングが実現した。この成果は、二光子励起顕微鏡のコスト低下、汎用性の向上を通じて、医学や生物学の研究の発展に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Two-photon fluorescence microscope is a powerful biomedical tool for obtaining three-dimensional images of tissues and organs. The use of far-red/near-infrared light (above 650 nm) offers the advantages of minimal auto-fluorescence and/or absorption by endogenous molecules in tissues, as well as reduced light scattering because of the longer wavelengths. This results in large penetration depth, thus enabling deep in vivo 3D imaging. In this project, several far-red fluorescent probes with efficient two-photon excitation sensitivities have been designed. Two-photon absorption wavelengths of the probes were tuned to be 1030 nm which is a radiation wavelength of a stable and low cost light source, a femtosecond pulsed Yb-doped fiber laser. These novel probes should realize non-invasive deep imaging.

研究分野：機能物質化学

キーワード：非線形光学 二光子吸収 赤外発光 バイオイメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

二光子励起蛍光顕微鏡は、生体の営みを動的かつ三次元的に可視化できる装置として注目を集めている。しかし、1 億円以上もする高価な機器であるため、共同利用機器として総合大学が導入しているに過ぎない。この装置が高価な理由は、現在使われている蛍光プローブの励起光源に、高価なフェムト秒チタンサファイアレーザーが必要なことにある。低コストで取扱が簡単なフェムト秒ファイバーレーザーで二光子励起イメージングが行える蛍光プローブが開発できれば、広く普及している蛍光顕微鏡に 1 千万円以下で製品化できるアタッチメントシステムを取り付けるだけで三次元生体イメージングが可能となり、その魅力を医学・生物学の現場で日常的に享受できるようになる。

また、市販の二光子励起顕微鏡では、波長 800 nm 付近の光源により、500 nm 付近に発光を示すプローブを励起することで観察が行われるのが一般的である。波長 800 nm の励起光は生体深部への十分な到達性を有するが、波長 500 nm 付近での生体深部からの発光は、散乱、およびヘモグロビンの吸収に妨げられ、外部から観察することが出来ず、低侵襲に可視化できる深度は 200 μm 程度に限られる。深達性の向上に特化した特殊な装置を用い、1.2 mm までの高深度イメージングを行った例があるが、1 W 程度の高出力のレーザーが光源に用いられているため、試料の光損傷が無視できない。高深度までの生体イメージングを低侵襲で実現するためには、生体の光学窓と呼ばれる 650~1300 nm の波長範囲内で、低パワーで二光子励起が行え、かつ高効率に発光を示すプローブの開発が必要である。

2. 研究の目的

低パワーかつ低コストで取扱が容易な発振波長 1030 nm のフェムト秒ファイバーレーザーを光源に用いた二光子励起イメージングが、高効率で行える近赤外発光型蛍光プローブを開発する。このことで、二光子励起顕微鏡による三次元生体イメージングを低コストで行えるようにする。また、1030 nm 励起により、高深度までの三次元生体イメージングを低侵襲に実現することも目的とする。

3. 研究の方法

(1) 新規蛍光発色団の設計と合成

これまでの研究で、電子系の両末端にピリジニウム基を有する化合物を設計すれば、水を溶媒に生体を染色するに十分な水溶性を示すこと、二光子吸収断面積が大きくなることを独自に見いだしている。また、この骨格をもつ化合物は、極めて高い確率でミトコンドリアに局在することも確かめてある。そこで、電子系の両末端にピリジニウム基を有する化合物の骨格に、アルコキシ基やジメチルアミノ基のような電子供与性基を導入し、分子内電荷移動を大きくすることで二光子励起波長・蛍光波長のいずれもの長波長化をはかったミトコンドリア染色用蛍光プローブを得る。

(2) 新規蛍光発色団の特性評価ならびに分子設計のファインチューニング

試作したプローブの分光学的性質、すなわち蛍光スペクトル、蛍光量子収率と二光子吸収スペクトルの評価を行う。実際に合成した化合物の評価で、洗い出された問題を分子設計にフィードバックさせることで、最終的には二光子吸収効率、蛍光量子収率、水溶性のすべて要件を満たすミトコンドリア標識用蛍光プローブをまず完成させる。

(3) ファイバーレーザーを光源とした二光子励起顕微鏡の製作

市販の二光子励起顕微鏡は、800 nm 付近で発振するチタンサファイアレーザーを光源に、現在広く使われている蛍光プローブの発光波長で明るい像が撮れるように設計されている。そのため、1030 nm のレーザー光に対しては、チタンサファイアレーザーの波長に最適化された反射防止膜が逆に損失として作用し、試料に届く光は数%に過ぎなくなってしまう。そこで、本研究で開発した色素を試用するために、1030 nm の励起光を光源に明るい像が撮影できる二光子励起顕微鏡を自作し、開発したプローブの *in vivo* での評価を可能にする。

4. 研究成果

(1) 新規蛍光発色団の設計と合成

(1-1) ピレン誘導体

これまでの研究で得られた高効率二光子励起蛍光プローブの中で、蛍光の極大波長が 650 nm と最も長い化合物 1 (図 1) の、発光波長の長波長化、すなわち、より深い部分の観察に適した化合物の創製を狙い、ドナー性の大きな置換基であるメトキシ基を導入した化合物 2 を新たに設計・合成した。

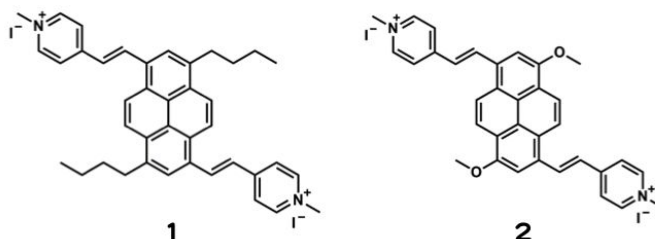


図 1 ピレン誘導体の構造式

狙ったとおり、化合物 2 は化合物 1 に比べて、吸収極大波長が 44 nm、蛍光波長が 65 nm レッドシフトした。また、1030 nm における二光子吸収断面積は、吸収極大波長の長波長シフトを反映し、化合物 1 に比べ 25%増大した。

(1-2) ヘミシアニン誘導体

ヘミシアニン誘導体には、650 nm 以上の波長で蛍光性を示すものがいくつか知られている。それらの中で、1030 nm のファイバーレーザーにより二光子励起が可能であると予想され、かつ、カチオン部位を有するためミトコンドリアに局在すると考えられる 4 種類のヘミシアニン誘導体 (図 2) に着目し、ファイバーレーザー励起により効率よく二光子イメージングが行える化合物の探索を行った。

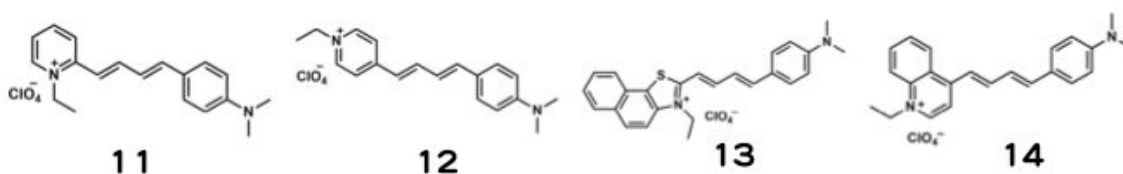


図 2 ヘミシアニン誘導体の構造式

化合物 11、12、13、14 の蛍光極大波長は、それぞれ 702、723、719、823 nm で、低侵襲な生体深部のイメージングに申し分のない波長であった。1030 nm における二光子吸収断面積 (2) は、化合物 11、12、13、14 それぞれについて、317、427、241、73 GM ($1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s photon}^{-1} \text{ molecule}^{-1}$) であった。その値に蛍光量子収率を掛け合わせた値は、それぞれ 51、115、19、3.7 GM となり、化合物 12 が最も二光子励起効率が高いことがわかった。

ヘミシアニン誘導体で HEK293 細胞を染色し、ファイバーレーザーを光源に二光子イメージングを行った際に得られた像を図 3 に示す。いずれの誘導体もミトコンドリアに局在し、明瞭な像を得ることができた。その中でも、化合物 12 は最も二光子励起効率が高いため、LDS-798 を用いたときと比べ 1/3 以下の励起光強度、3 mW で二光子イメージングを行うことができた。

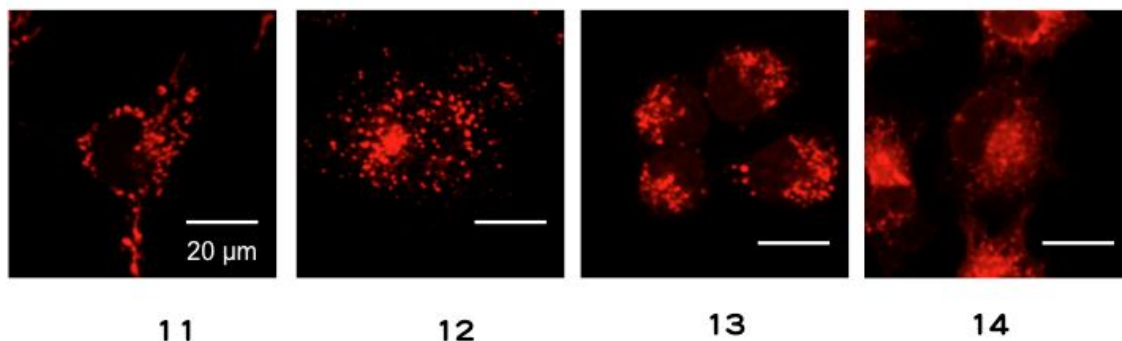


図 3 ヘミシアニン誘導体 11~14 で染色した HEK293 細胞の二光子顕微鏡画像。いずれも 1030 nm で励起。

(1-3) 三光子吸収化合物

三光子吸収の断面積は、二光子吸収に比べ格段に低い。しかし、多光子励起顕微鏡では励起光を開口数の大きいレンズで集光するため、パワーの小さいファイバーレーザーを光源に用いても、三光子励起が可能ではないかと考えた。蛍光プローブの光励起に、三光子吸収過程を用いることができれば、色素の選択の幅が広がる。そこで、三光子吸収効率が高いと予想される図 4 に構造を示すミトコンドリア染色用色素を用い、三光子吸収がファイバーレーザー励起多光子イメージングに対して、利用可能かどうかを調査した。

図 4 に示した全ての化合物をプローブに用いて、1030 nm 励起による多光子イメージングが行えた。得られた画像の一例として、monoBP によって染色された HEK293 細胞のファイバーレーザー励起三光子励起蛍光画像を図 5 に示す。他の化合物を用いても得られる画像は図 5 と本質的に同様であった。図 4 に示した化合物の一光子吸収帯は、Group A が 300~430 nm、B が 300~500 nm、C が 300~600 nm 付近である。1030 nm における各化合物の蛍光強度に対する励起光強度の依存性

を調査したところ、Group Aが三乗依存性を、Bが二乗～三乗の間の依存性を、Cが二乗依存性を示すことが確かめられた。このことから1030 nmにおいて、Group A、BおよびCがそれぞれ、三光子吸収過程、三光子吸収過程と二光子吸収過程の競合、二光子吸収過程を経て発光していることがわかった。

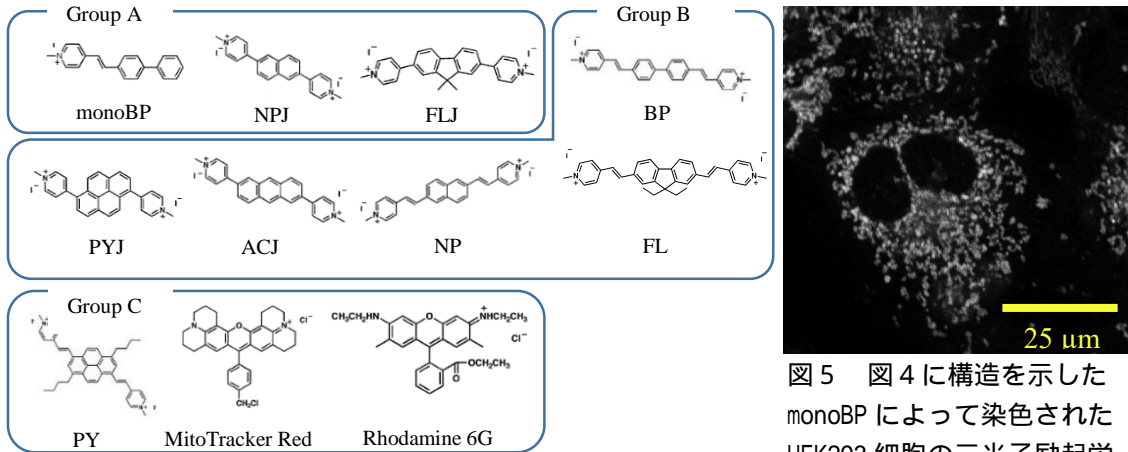


図4 蛍光プローブの構造式

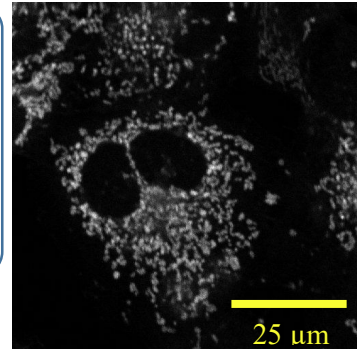


図5 図4に構造を示したmonoBPによって染色されたHEK293細胞の三光子励起蛍光画像

(2) 新規蛍光発色団の分子設計のファインチューニング

本研究では開発した蛍光プローブの用途の多様化にも取り組んだ。

(2-1) ミトコンドリア膜電位応答性蛍光プローブ

ミトコンドリアの膜電位は、細胞の活力の指標となっており、ミトコンドリアの膜電位がモニターできる蛍光プローブは、癌やミトコンドリア病などのメカニズムの解明に有用とされ、開発のニーズが高まっている。一連の研究で得られた知見を基盤に、1030 nmの励起光による二光子励起が可能で、650 nm以上で高効率に蛍光を発し、かつ、ミトコンドリアの膜電位がモニターできる蛍光プローブの開発に取り組んだ。

分極率の低い化合物は、膜電位が高いときはミトコンドリアに、膜電位が低くなると核に局在するとされている。そこで、化合物1を基盤に、分極率が低い化合物、3と4を合成した。その構造と、膜電位応答性を図6に示す。化合物1で染色した際は、薬剤により膜電位を低下させても蛍光プローブはミトコンドリアに局在し続けたが、化合物3、または4で染色した際、膜電位を低下させるとプローブの局在箇所は核へと移行した。その後薬剤を除去し、細胞を安定化させると、局在箇所はミトコンドリアへと戻った。化合物3と4の二光子吸収挙動、蛍光極大波長は化合物1と大差なく、低侵襲・高深度のイメージングに適した性質と、リバーシブルな膜電位応答性とを併せ持ったプローブを開発することができた。

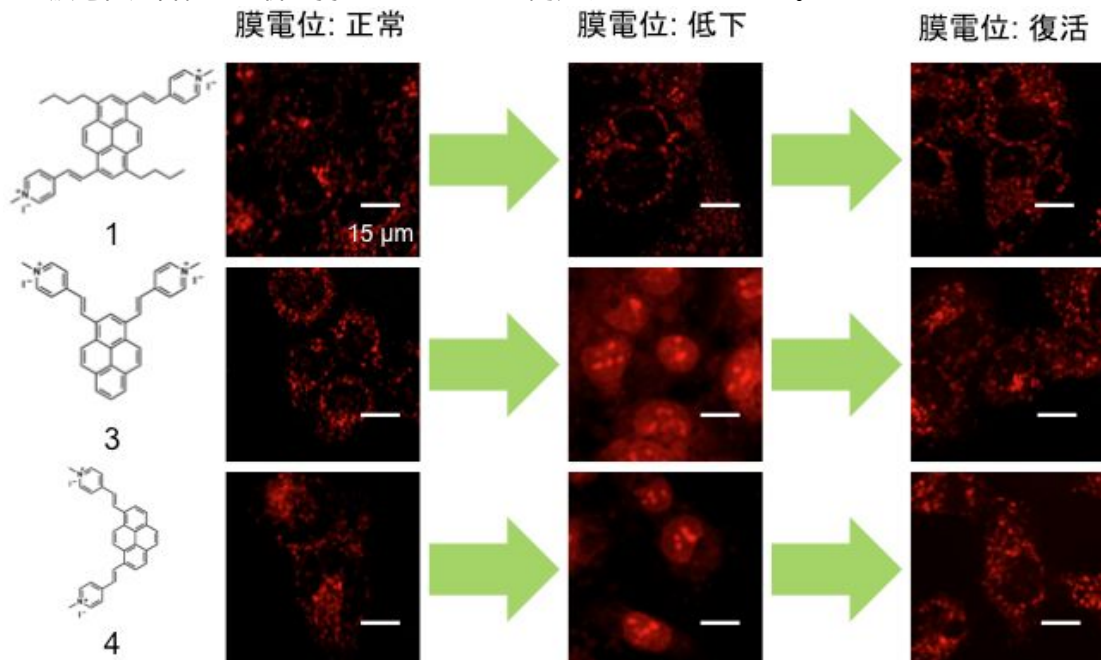


図6 蛍光プローブの構造式とその膜電位応答挙動。

(2-2) 水溶性の向上

開発した蛍光プローブにより、生きたマウスの血管の三次元撮像を試みた。いずれの蛍光プローブも、細胞中のミトコンドリアを染色するに十分な水溶性を有していたが、さまざまなイオンが共存する血液の中では溶解度が低下してしまい、微結晶が生成した。このため、発光効率が大幅に低下し、予期した明るい画像は得られなかった。そこで、開発した蛍光プローブの水溶性のさらなる向上にも取り組んだ。

ピリジン部位に導入するアルキル基をメチル基からポリエチレングリコール鎖に置換することで、水溶性を著しく向上させることに成功した。ポリエチレングリコール鎖を導入しても、高い蛍光量子収率を示し、イメージングに用いる事ができた。この成果は、民間企業と共同で特許を出願した。

(3) ファイバーレーザーを光源とした二光子励起顕微鏡の製作

本研究で製作した多光子励起顕微鏡を図7に示す。1030 nmでの励起に適したミラーや光学フィルターを装着したパーツを、本科研費により特注で製作し、高感度なイメージングが行えるようにした。3 mW程度の励起光で、十分に明るいイメージングが行えている。図3、5、6に示した二光子顕微鏡像は、すべてこの顕微鏡で撮像したものである。

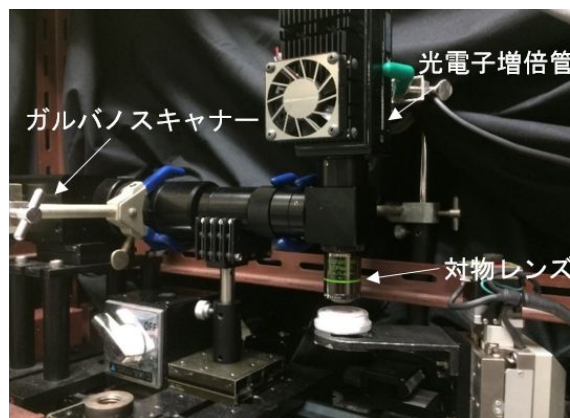


図7 製作した多光子励起顕微鏡

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6件)

Seki Hitomi, Onishi Shozo, Asamura Naoya, Suzuki Yasutaka, Kawamata Jun, Kaneno Daisuke, Hadano Shingo, Watanabe Shigeru, Niko Yosuke, "Bright and two-photon active red fluorescent dyes that selectively move back and forth between the mitochondria and nucleus upon changing the mitochondrial membrane potential", Journal of Materials Chemistry B, 査読有、Vol.6, 2018, pp. 7396-7401, DOI: 10.1039/C8TB02415D

Moritomo H., Onishi S., Asamura N., Matsumoto K., Suzuki Y., Kawamata J., "Mitochondrion-selective hemicyanine dyes suitable for fiber laser excitation two-photon microscopy", MRS Communications, 査読有、Vol. 8, 2018, pp. 1064-1069, DOI: 10.1557/mrc.2018.143

Suzuki Yasutaka, Onishi Shozo, Matsumoto Kazuya, Takiyama Takayuki, Kameyama Tatsuya, Torimoto Tsukasa, Kawamata Jun, "Two-photon absorption spectrum of solid solution nanocrystals of ZnS-AgInS₂", Chemistry Letters, 査読有、Vol. 47, 2018, pp. 1475-1477, DOI: 10.1246/cl.180718

Matejdes Marian, Himeno Daisuke, Suzuki Yasutaka, Kawamata Jun, "The effect of the negative charge density on switchable properties of pseudoisocyanine dye", Applied Clay Science, 査読有、Vol. 144, 2017, pp. 54-59, DOI: 10.1016/j.clay.2017.05.005

Takeda Takashi, Suzuki Yasutaka, Kawamata Jun, Noro Shin-ichiro, Nakamura Takayoshi, Akutagawa Tomoyuki, "The emergent intramolecular hydrogen bonding effect on the electronic structures of organic electron acceptors", Physical Chemistry Chemical Physics, 査読有、Vol. 19, 2017, 23905-23909, DOI: 10.1039/c7cp04402j

Hiroki Moritomo, Akinari Fujii, Yasutaka Suzuki, Toshitada Yoshihara, Seiji Tobita and Jun Kawamata, "Biological oxygen sensing via two-photon absorption by an Ir(III) complex using a femtosecond fiber laser", Japanese Journal of Applied Physics, 査読有、Vol. 55, 2016, 092401-1~4, DOI: 10.7567/JJAP.55.092401

[学会発表](計 13件)

Syozo Onishi, Yasutaka Suzuki, Jun Kawamata, "Red Fluorescent Compounds for Fiber Laser Excitation Multi-photon Imaging", The 3rd Taiwan-Japan Workshop on Nanospace Materials(台北), 2018

Jun Kawamata, "Optical Properties of Dyes Confined in Interlayer Spaces of Clay Minerals", The 3rd Taiwan-Japan Workshop on Nanospace Materials(台北), 2018 (招待講演)

大西省三、松本和也、守友博紀、鈴木康孝、川俣純、"ファイバーレーザー励起による多光子イメージングに適した蛍光化合物の開発"、日本化学会「低次元系光機能材料研究会」第8回サマーセミナー、2018

Shozo Onishi, Naoya Asamura, Hitomi Seki, Yosuke Niko, Seiji, Jun Kawamata, Yasutaka Suzuki, "Mitochondrial Membrane Potential Sensitive Red-Green-Blue Fluorescent Probes for Multi-Photon Microscope", MRS spring meeting (アリゾナ州), 2018
Jun Kawamata, Yasutaka Suzuki, "Fluorescent Compounds for Fiber-Laser Excitation Multi-Photon Imaging", MRS spring meeting (アリゾナ州), 2018 (招待講演)
大西省三、松本和也、浅村直哉、守友博紀、鈴木康孝、川俣純、"シアニン誘導体を用いたファイバーレーザーによる二光子励起イメージング"、日本化学会第98春季年会、2018
大西省三、富永亮、鈴木康孝、川俣純、仁子陽輔、小西玄一、"ミトコンドリア染色用赤色発光性化合物の多光子励起挙動"、2017年光化学討論会、2017
浅村直哉、大西省三、関仁望、仁子陽輔、鈴木康孝、川俣純、"ミトコンドリア膜電位応答性を示す赤色蛍光プローブ"、日本化学会中国四国支部大会、2017
大西省三、富永亮、鈴木康孝、川俣純、仁子陽輔、小西玄一、"赤色発光性ピレン誘導体の二光子励起特性"、日本化学会「低次元系光機能材料研究会」第6回サマーセミナー、2017
守友博紀、牧野洋平、大村悠理子、浅村直哉、松下寛史、大西省三、鈴木康孝、川俣純、"ピリジニウム誘導体をプローブとしたフェムト秒ファイバーレーザー励起多光子蛍光イメージング"、日本化学会第97春季年会、2017
Jun Kawamata, "Fiber laser excitable fluorescent compounds for multi-photon imaging", Second International Conference on MATERIAL SCIENCE(招待講演)(インド), 2017
川俣純、"フェムト秒ファイバーレーザーを光源としたマルチフォトンイメージング"、第13回バイオオプティクス研究会(招待講演)、2016
牧野洋平、守友博紀、鈴木康孝、川俣純、"フェムト秒ファイバーレーザーを光源とした多光子励起蛍光イメージング"、物質構造解析研究会、2016

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：赤色蛍光性高水溶性化合物及びそれを用いた蛍光色素
発明者：川俣純、鈴木康孝、大西省三、古賀訓、阿野光
権利者：国立大学法人山口大学、昭和化工株式会社
種類：特許
番号：特願 2019-217249
出願年：2019年
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等
<http://web.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~kawalab/>

6. 研究組織

(1)研究分担者：なし

(2)研究協力者：なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。