

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02689

研究課題名（和文）生きた脳の三次元イメージングを可能にする多光子励起化合物の開発

研究課題名（英文）Efficient Multiphoton Excitable Compounds for 3D Imaging of a Living Brain

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） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：生きたマウスの全脳イメージングを、マウスを殺すことなく実現できる蛍光プローブを何種類が開発した。具体的には、水に溶かすだけで生体に投与できる高い水溶性をもつとともに、生体深部への到達性の高い波長領域である650から1300 nmの範囲で、高い効率で多光子励起・発光が可能なプローブを開発した。開発したプローブを用い、生きたマウスの脳全体の非侵襲的なイメージングを世界に先駆け実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

二光子顕微鏡により、生きた脳の中での出来事を光により可視化することができるようになった。本研究がもたらした成果は、脳疾患の進行に伴う脳内物質の細胞レベルでの変化が明らかにでき、脳疾患の進行メカニズムの全容の解明に道を開いた。将来的には脳疾患の根本的治療法を導くためのツールとして活用が進み、アルツハイマーやALSのような難治性脳疾患の患者を苦しみから解放することにつながる。

研究成果の概要（英文）：Several types of fluorescent probes that can realize imaging of the whole brain of living mice without killing the mice have been developed. Specifically, developed probes exhibited both high water-solubility which is required for administering a living body simply by dissolving in water and salient multiphoton excitation efficiencies and intense luminescence in the wavelength range of 650 to 1300 nm with high efficiencies, which is highly accessible to the deepest parts of the living organ. By using the developed probes, non-invasive imaging of the whole brain of a living mouse was realized for the first time.

研究分野：非線形光学

キーワード：非線形光学 蛍光化合物 二光子顕微鏡

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多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普及が進んでいる。生きたマウスの脳全体の多光子励起蛍光顕微鏡観察を行うことができれば、アルツハイマー病や ALS などの脳疾患の発症メカニズムが解明でき、脳疾患の早期診断・治療技術に格段の進歩がもたらされる。しかし、生きた脳を低侵襲に可視化するためには、乗り越えなければならない高いハードルが未だ残されている。

生体の組織や臓器、そして生体を形成する物質や水には光吸収があり、また、生体組織は光散乱体でもある。したがって、組織や臓器の深部に光を到達させること、あるいは組織や臓器の深部で発生した光を高い分解能を伴って検出することには大きな困難が伴ってきた。そのため光技術は、スライスした組織や、培養細胞中での生体内物質の観察には広く用いられてきたが、組織や臓器の深部での生体内物質の観察に十分に活用されるには至っていない。

波長 600~1300 nm の光には、ヘモグロビンや水などの生体を構成する物質による吸収が少ない、光散乱が少ない、という特徴がある。たとえばマウスの脳の海馬の深さに相当する 1.5 mm では、波長 600 nm の光の浸透率は 2% 以下なのに対し、波長 650 nm では 15%、波長 700 nm では 20% 程度が浸透する。現在市販されている高感度でノイズが少ない光検出器が 780 nm 以下の光しか検知できないことを鑑みれば、650 nm より長い波長で発光し、1300 nm より短い波長で励起可能な多光子プローブを用いることで、低侵襲かつ高深度までのイメージングが可能となる。

### 2. 研究の目的

650 nm より長い波長で発光し、1300 nm より短い波長で励起可能な多光子プローブを開発し、生きた脳の多光子励起蛍光顕微鏡観察を実現することが本研究の目的である。光イメージングの分解能は光の波長程度であるため、生きた脳の多光子励起蛍光顕微鏡観察が実現すれば、脳内の物質の「動き」をサブミクロンレベルの高い分解能で、かつリアルタイムで特定することが可能になる。本研究では、マウスの脳全体を、マウスを生かしたまま観察できるようにすることが目的である。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウスの脳のイメージングに適した多光子励起顕微鏡の製作

市販の多光子励起顕微鏡に内蔵されているレンズやミラーなどの光学パーツは、近赤外励起・可視発光で性能が最大化するように設計されており、赤外励起・近赤外発光での高感度なイメージングは行えない。そこで我々は、赤外励起・近赤外発光型の多光子プローブを用いたイメージングが高感度で行える顕微鏡を自作した。

#### (2) 650 nm より長い波長で発光し、1300 nm より短い波長で高効率に励起可能な二光子プローブの開発

650 nm より長い波長で発光し、1300 nm より短い波長で励起可能なプローブを得るためには、通常、大きな共役系を持つ化合物を設計する。しかし、大きな共役系を持つ化合物は水溶性に乏しい。水溶性の低い化合物で生体組織を染色する際は、化合物を有機溶媒に溶解させ、生体組織に注入する。「死んだ」生体の観察であればこれで何の問題もないが、生体が「生きている」場合、有機溶媒の注入は生体の活力に影響を及ぼし、最悪の場合、生体を殺してしまう。二光子顕微鏡を「生きた」生体の観察に活用できるようにするためには、分光学的な必要条件を満たすことに加えて、必要な水溶性をもつ化合物の開発が不可欠となる。

本研究では、研究代表者がこれまで開発してきた赤外励起・近赤外発光型高効率多光子吸収化合物のライブラリーを基盤に、生体内に分散させるのに必要な水溶性、生体内の器官に特異的に親和する機能を付与した化合物を設計・合成した。合成した化合物の分光学的性質を評価し、二光子吸収効率、二光子吸収が生じる波長、発光量子収率、発光波長の観点から評価結果を化合物の分子設計にフィードバックし、必要な性質を示す化合物を何種類か新たに開発した。

#### (3) マウスの全脳イメージング

上記研究で開発したピレン誘導体を用い、マウスの全脳イメージングを行った。開発したピレン誘導体をそのまま生きたマウスに投与すると、血管壁への吸着、血中での析出、過剰投与による毒性、迅速に腎排出されてしまう、など様々な問題が生じてしまった。これらの問題を解決するために、ピレン誘導体をナノエマルジョンに包摂させた。ナノエマルジョンは内核が油、外殻が界面活性剤からなるナノサイズの粒子であり、脂溶性物質の包摂能に優れる他、生体適合性が高いといった特徴がある。ピレン誘導体をナノエマルジョン化することで、マウスの血中に多量のピレン誘導体を安全に投与できるようにした。開発した蛍光ナノエマルジョンをマウス(神経細胞に蛍光タンパク質を発現させたトランスジェニックマウス)の眼底静脈から投与し、二光子顕微鏡撮像を行い、性能を確認した。

#### 4. 研究成果

##### (1) マウスの脳のイメージングに適した多光子励起顕微鏡の製作

近赤外の波長領域で透過率に優れるレンズ、反射率に優れるミラーを設計し、メーカーに特注した。制作されたパーツを用い、二光子顕微鏡を組み上げた。制作した顕微鏡に対し、研究期間を通してパーツのチューンアップ、構成の最適化を進め、最終的には赤外励起・近赤外発光型の多光子プローブを用いたイメージングが高感度で行える顕微鏡が完成した。

従来の二光子顕微鏡では、焦点での光子数密度を高くしないと十分な強度の二光子励起発光が生じないため、開口数の大きい対物レンズを用いる必要があった。制作した顕微鏡は、極めて高感度であるため、開口数 0.4、20 倍の対物レンズを用いても、内蔵の蛍光イメージングが実現できた(図 1)。

低開口数の対物レンズを用いた二光子イメージングが実現したので、二光子イメージングと光コヒーレンス断層イメージング(OCT)の同時撮像も試みた。二光子顕微鏡法では、存在を確認したい物質を蛍光標識しておけば、その物質の有無を明確に検出できる。一方で、蛍光標識していない箇所からは全く信号が得られないため、標識された物質と標識されていない周囲組織との位置関係を可視化することには適さない。また、装置が大がかりで、撮像に多大な時間を要することも二光子顕微鏡を診断に応用する上でのボトルネックとなっていた。スペクトル領域 OCT(SD-OCT)撮像を行えば、二光子顕微鏡に比べ圧倒的に短時間で組織全体の 3 次元イメージングが行える。そのため OCT は、眼底などの断層画像診断に広く臨床応用されている。しかし、干渉強度から再構成される OCT 像は生体組織の屈折率分布であるため、二光子顕微鏡のように物質を蛍光標識して特定することはできない。

この 2 つの方法により得られる画像は相補的であり、いずれも走査型の顕微鏡技術である。しかしながら、OCT では低開口数の対物レンズの利用が不可欠であり、開口数の大きい対物レンズの利用が不可欠と考えられてきた二光子顕微鏡法との同時撮像は不可能と考えられていた。しかし、本研究の成果として制作された二光子顕微鏡では OCT の撮像に適した開口数 0.4 の対物レンズでも二光子顕微鏡像が撮像できたため、二光子顕微鏡の光学系に SD-OCT の光学系を組み込むことにチャレンジした。(図 2)

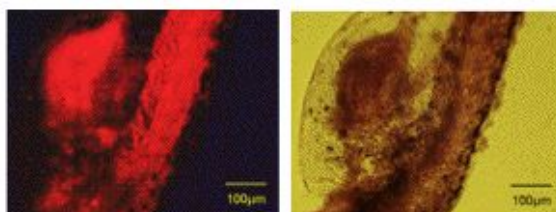


図 1、製作した二光子顕微鏡により撮像したゼブラフィッシュの内蔵(左)とその明視野像(右)。使用した対物レンズの開口数と倍率はそれぞれ 0.4 と 20 倍。

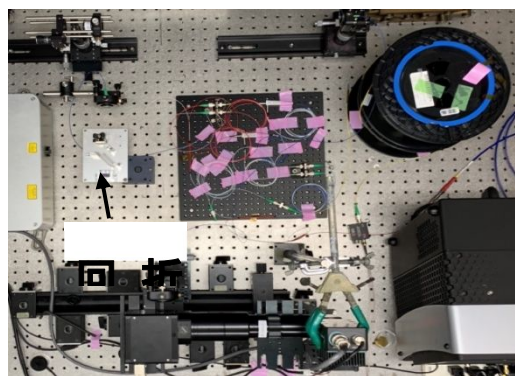
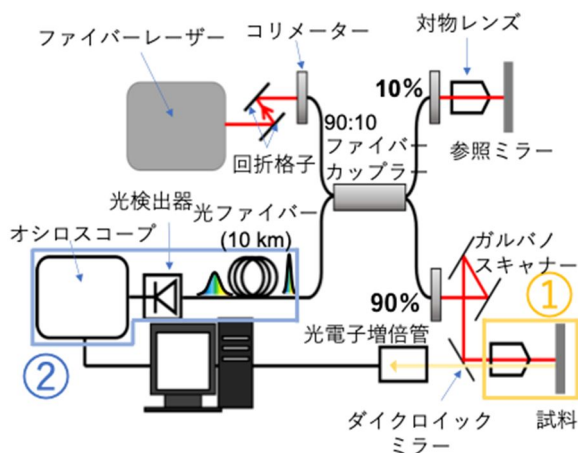


図 2 SD-OCT を組み込んだ二光子顕微鏡の光学系の概略図(左)と製作した顕微鏡の写真(右)。

図 3 には製作した顕微鏡で撮像したブタ皮膚の二光子顕微鏡像と SD-OCT 像を示す。同一の光源・光学系で二光子顕微鏡像と SD-OCT 像を世界に先駆け撮像することに成功した。この技術は皮膚がんや食道がんの低侵襲診断への応用が期待され、医師や光学機器メーカーを共同研究者とした研究へと発展している。

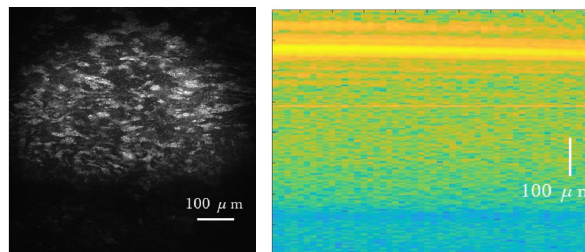


図 3、同一光源、同一光学系で撮像した二光子顕微鏡像(左)と SD-OCT 像(右)。

## (2) 650 nm より長い波長で発光し、1300 nm より短い波長で高効率に励起可能な二光子プローブの開発

まず、本研究では、650 nm より長い波長で発光し、1300 nm より短い波長で高効率に励起可能な化合物として、MPBI (図4) の誘導体を設計した。MPBI は 606 nm に蛍光ピークを持つプローブとして知られている。650 nm より長い波長で発光を示すプローブを得るために、 $\pi$  共役を伸ばした MPBBI を設計した。また、水溶性を高めるために、ポリエチレングリコール (PEG) 鎖を 2 本持つ MPBC-PEG および MPBBI-PEG を設計した。得られた誘導体の光学特性を表 1 に示す。予想通り、MPBBI および MPBBI-PEG は 650 nm より長い波長で高い蛍光量子収率で発光を示した。さらに、MPBBI-PEG は MPBI 誘導体の中で最も大きな二光子吸収 (TPA) 断面積を示すことがわかった。MPBBI-PEG 水溶液で染色した HEK293 細胞からは、1030 nm で 2 mW 以下の励起光を光源に用いた場合においても、高い蛍光量子収率と大きな TPA 断面積を反映して鮮明な 2 光子顕微鏡像が得られた。

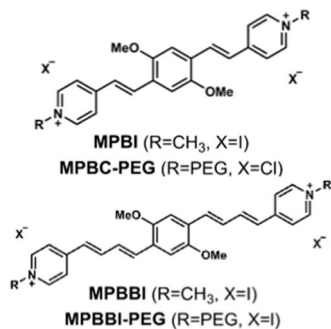


表 1、MPBI 誘導体の分光学的性質

Probe	OPA peak wavelength/nm	Fluorescence peak wavelength/nm	Fluorescence quantum yield	TPA cross section peak/GM
MPBI	462	606	0.70	340 @ 751 nm
MPBC-PEG	465	610	0.75	424 @ 751 nm
MPBBI	491	658	0.41	539 @ 960 nm
MPBBI-PEG	497	663	0.46	638 @ 960 nm

1 GM =  $10^{-50}$  cm<sup>4</sup> per photon per molecule

図 4、MPBI 誘導体の分子構造

次に、650 nm より長い波長で発光し、1300 nm より短い波長で高効率に励起可能な二光子プローブとして従来研究で既に開発してあったピレン誘導体 (PY、図 5 (左)) を包摂したナノエマルジョンを作製した。作製したナノエマルジョンの直径は 60 nm で、1 粒子あたり 2,000 個以上の PY が包摂されていると見積もられた。通常、蛍光物質をこのような高密度で集合させると、物質間相互作用によって蛍光性を消失してしまうが、カウンターアニオンを適当なものに置き換えることで、図 5 (中、右) に示すように二光子吸収断面積 ( $6.7 \times 10^5$  GM at 950 nm)、蛍光量子収率 (0.53) とともに、二光子顕微鏡を用いたイメージングに好適な性能を維持したナノエマルジョンを得ることができた。

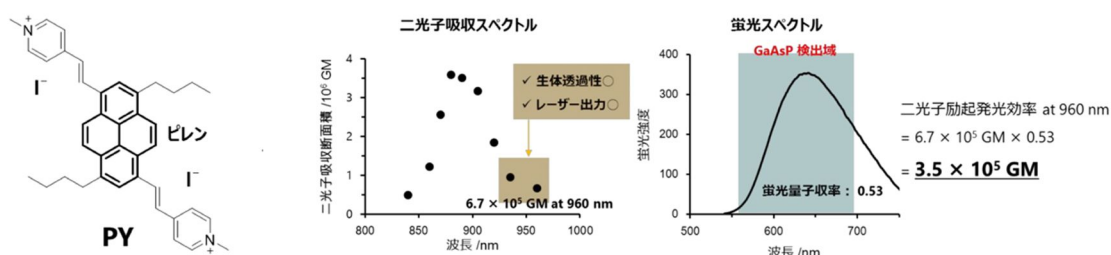


図 5、ピレン誘導体 (PY) の分子構造 (左) と、そのナノエマルジョンの二光子吸収スペクトル (中)、蛍光スペクトル (右)。

## (3) マウスの全脳イメージング

PY を含有した蛍光ナノエマルジョンをマウスの静脈から投与し、二光子顕微鏡撮像を行った。その結果、脳表面から 1.5 mm に相当する領域の血管をリアルタイムで撮像することができた。神経細胞の位置から、この深度はマウスの脳の白質層を超え、海馬領域にまで達しており、市販の血管造影剤、テトラメチルローダミン - デキストラン (TMR-dextran) を用いた場合の観察深度 (0.7~0.9 mm 程度) を大きく上回っていた (図 6、左から 2 つの画像の比較)。

1 画像の取得時間が 0.01 秒未満になるよう設定したハイフレームレート (120fps) での二光子顕微鏡撮像を行ったところ、脳表面から 0.9 mm (白質層) 最深部では 1.1 mm (海馬 CA1) の血管を撮影できた。染色されていない血球が黒い球形の影として流動している様子を捉えることができ、結果として白質層や海馬 CA1 領域血管の“血流”を観察することができた (図 6、右 2 つの画像)。以上のように、マウス脳深部領域の血流を二光子顕微鏡によって世界で初

めて直接観察し、本研究の目標であるマウスの脳全体を、マウスを生かしたまま観察することを実現した。

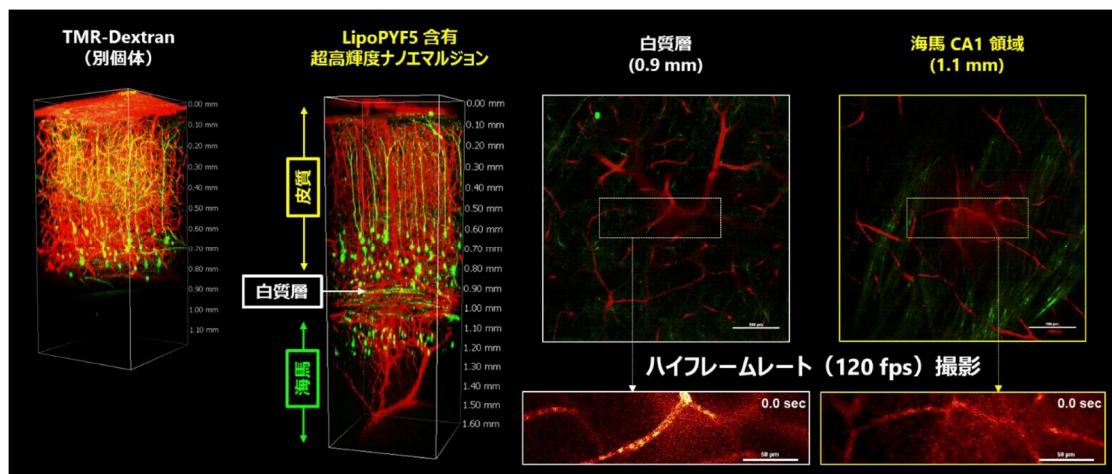


図 6 PY を含有した蛍光ナノエマルジョンを利用したマウスの二光子顕微鏡観察結果。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koide Taro, Iwamori Shohei, Koga Satoshi, Suzuki Yasutaka, Kawamata Jun, Hisaeda Yoshio	4. 巻 183
2. 論文標題 Synthesis of 2,6,9-substituted xanthen-3-one and solvent effect on structural and photophysical properties	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dyes and Pigments	6. 最初と最後の頁 108667 ~ 108667
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dyepig.2020.108667	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Onishi Shozo, Suzuki Yasutaka, Ano Hikari, Kawamata Jun	4. 巻 93
2. 論文標題 Water-Soluble Red-Fluorescent Dyes for Two-Photon Deep-Tissue Imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 1226 ~ 1233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20200090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Moritomo H., Onishi S., Makino Y., Matsumoto K., Suzuki Y., Kawamata J.	4. 巻 10
2. 論文標題 Multi-photon fluorescence microscopy imaging of mitochondria in living cells excited by Yb-doped femtosecond fiber laser utilizing two- and three-photon competitive absorption	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 AIP Advances	6. 最初と最後の頁 095219 ~ 095219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/5.0004953	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takezaki Minami, Kawakami Ryosuke, Onishi Shozo, Suzuki Yasutaka, Kawamata Jun, Imamura Takeshi, Hadano Shingo, Watanabe Shigeru, Niko Yosuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Integrated Fluorescent Nanoprobe Design for High Speed In Vivo Two Photon Microscopic Imaging of Deep Brain Vasculature in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advanced Functional Materials	6. 最初と最後の頁 2010698 ~ 2010698
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adfm.202010698	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito Hiroaki, Sakai Hayato, Suzuki Yasutaka, Kawamata Jun, Hasobe Taku	4. 巻 26
2. 論文標題 Systematic Control of Structural and Photophysical Properties of Extended Mono and Bis BODIPY Derivatives	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemistry A European Journal	6. 最初と最後の頁 316 ~ 325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.201904282	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Yasutaka, Nagashita Takashi, Ikeda Akira, Ishii Katsuhiko, Iwai Toshiaki, Nakato Teruyuki, Kawamata Jun	4. 巻 38
2. 論文標題 Formation of a Giant Anisotropically Ordered Assembled Structure of Inorganic Nanosheets through an Optically Induced Stream	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 6647 ~ 6652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.2c00528	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 鈴木康孝、塩崎文香、谷誠治、川俣純
2. 発表標題 スメクタイト層間での環境変化を利用したクロミズム材料の創出
3. 学会等名 第63回粘土科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南佑弥、石井勝弘、鈴木康孝、川俣純
2. 発表標題 悪性腫瘍の確定診断に利用できる低侵襲なイメージングシステムの開発
3. 学会等名 日本化学会低次元系光機能材料研究会 第10回サマーセミナー2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川俣純
2. 発表標題 ナノシートを観る
3. 学会等名 日本粘土学会 若手の会 第12回若手研究者研究発表会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jun Kawamata
2. 発表標題 Optical manipulation of inorganic nanosheets
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takumi Harada, Masahiro Yahara, Yasutaka Suzuki, Jun Kawamata
2. 発表標題 Selective absorption of organic molecule on the optically manipulating single layered fluorohectorite
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuya Minami, Satoshi Koga, Yasutaka Suzuki, Katuhiro Ishii, Toshiaki Iwai, Jun Kawamata
2. 発表標題 Simultaneous Measurement of Two-photon Excited Fluorescence and Optical Interference Signal through an Optical Microscopy
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年



〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 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
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-217249	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<http://web.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~kawalab/>

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ドイツ	パイロイト大学		