

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12762

研究課題名（和文）単一細胞の超解像酸素分圧イメージング

研究課題名（英文）Super-resolution oxygen partial pressure imaging of single cells

研究代表者

塚田 孝祐（Tsukada, Kosuke）

慶應義塾大学・理工学部（矢上）・教授

研究者番号：00351883

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：回折限界を超える空間分解能で生細胞内の酸素濃度情報を可視化する手法の確立を目的とした。ガウシアンビームを分岐して一方で中空ビームを生成し、それぞれで対象を2次元走査し、得られた画像の差分を取ることで超解像を得た。まず、差分過程における輝度情報損失が少なく、高い空間分解能を得るための光学条件を決定し、実測実験からおよそ100 nmの分解能を達成した。さらに酸素分圧の定量に必要なリン光寿命を高速決定するアルゴリズムを適用した。以上より、提案法は簡便かつ高速に生細胞の超解像蛍光画像を得る手法として有効であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺で取り込まれた分子状酸素は血管から抹消組織に拡散によって移動し、細胞内のミトコンドリアで消費されてエネルギー産生に利用される。その細胞内の局所空間における酸素濃度情報がどのように生理機能や病態に関わるのか大変興味深い。測定技術の欠落から未解明のままである。この研究では細胞内の酸素濃度情報を光学的に取得するための方法を提案し、数値シミュレーションと実測実験から有効性を実証した。

研究成果の概要（英文）：The establishment of a method to visualize oxygen concentration information in living cells with spatial resolution beyond the diffraction limit will contribute to the elucidation of local life phenomena. A laser beam was split to generate a Gaussian beam and a doughnut-shaped beam. The object was scanned two-dimensionally with each beam, and super-resolution images were obtained by subtracting the obtained images. Optical conditions were determined to minimize the loss of intensity information during the differencing process and to obtain high spatial resolution. As a result, a resolution of approximately 100 nm was achieved based on experimental measurements. Furthermore, an algorithm to rapidly determine the phosphorescence lifetime for quantifying the oxygen partial pressure enables fast imaging. Taken together, the proposed method is expected to be used for fast super-resolution oxygen partial pressure imaging of living cells.

研究分野：生体医工学

キーワード：超解像 酸素分圧 イメージング 代謝

1. 研究開始当初の背景

分子状酸素は細胞内ミトコンドリアにおけるエネルギー産生の基質として利用されるだけでなく、その濃度が生体の構造と機能を決定する重要なメディエータでもある。しかし、拡散によって細胞膜を通過した分子状酸素がミトコンドリアで消費されるに至る局所空間において、分子状酸素の超微視的な濃度情報や挙動に関する知見は乏しい。例えば、ミトコンドリア近傍の酸素勾配と HIF-1 活性の空間分布、血管内皮細胞の血管側および組織側の細胞膜近傍の酸素濃度勾配と血管新生因子の関係など、極めて興味深い生理情報が未解明である。一般の光学顕微鏡では光の回折限界のため、可視励起波長程度が空間分化能の限界とされており、ナノレベルの酸素濃度測定技術は達成されていない。

2. 研究の目的

本申請課題では回折限界を超える超解像度で局所の酸素濃度を定量し、二次元的に可視化するための顕微光学系を構築する。この研究によってこれまで明らかにされていなかった生細胞内の局所酸素濃度分布、特にミトコンドリア近傍の酸素濃度勾配を可視化可能な空間分解能を有する新たなプラットフォームに発展させることを目的とする。具体的には、SLAM (Switch Laser Mode) 法を応用し、空間分解能 100 nm 以下で酸素感受性色素を励起する顕微光学系の構築、数値シミュレーションによる超解像空間分解能の推定と光学条件の決定、酸素濃度の実イメージングおよび高速化を検討する。

3. 研究の方法

(1) 原理

超解像はレーザのガウシアンビーム (TEM₀₀ モード) および中空ビーム (TE₀₁ モード) で二次元スキャンして得られた画像の差分を取ることで、超解像点像関数でスキャンしたものと同等の画像を計算によって得る (図 1)。実質的にガウシアンビームの点像分布関数 (PSF) から中空ビームの PSF を差し引いた光で対象を照射するのに等しい (式 1, g : 補正係数, r : 半径, ω : ビーム幅)。

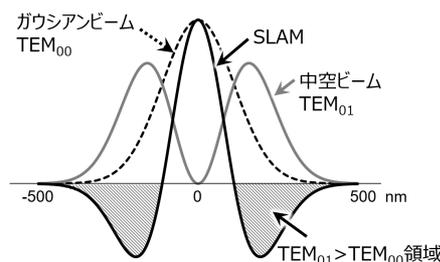


図 1 各ビームプロファイル

$$f_{\text{SLAM}}(r) = \text{TEM}_{00}(r, \omega_1) - g \cdot \text{TEM}_{01}(r, \omega_2) \quad (1)$$

(2) 酸素分圧の定量法と高速寿命決定法による高速化

酸素分圧の計測には燐光寿命法を用いた。酸素感受性色素の燐光発光寿命が周囲の酸素分圧に依存することを利用した計測法であり、生体に対して比較的低侵襲な手法である。燐光寿命の計測には式(2)に従った高速寿命決定法 (Rapid Lifetime Determination method: RLD 法) を用い、計測の高速化を図った。酸素分圧 $p[\text{O}_2]$ は式(3)の Stern-Volmer 式を用いて燐光寿命から変換した。 k_q は消光定数である。

$$\tau = \frac{\Delta t}{\ln(D_0/D_1)}, D_i = \int_{t_i}^{t_i+\Delta t} I(t) dt \quad (2)$$

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + \tau_0 k_q p[\text{O}_2] \quad (3)$$

4. 研究成果

(1) ビームプロファイルの決定

式(1)において補正係数を大きく設定すると空間分解能は向上するものの、画像情報を喪失するトレードオフが生じる問題が残されていた(図1の $TEM_{01} > TEM_{00}$ 領域). そこで、輝度情報損失が少なくさらに有効に超解像を得るためのそれぞれのビームプロファイルおよび差分補正係数を数値シミュレーションから決定した. その結果、ビーム径が等しく補正係数 $g=0.55$

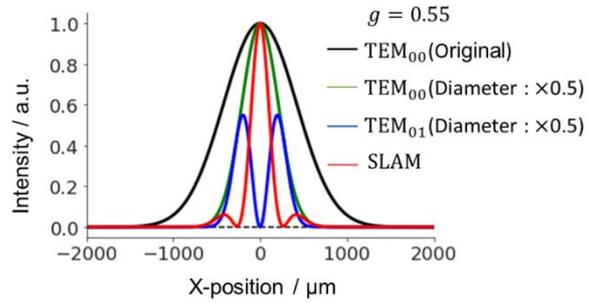


図2 情報損失の少ないビーム条件の決定

の際にガウシアンビームと比較して点像分布関数の半値全幅が22%に縮小され、また情報の損失が最小となる条件であることが明らかになった(図2). 以下の実験ではこの条件を用いた.

(2) 微小粒子を用いた基礎実験

新たに構築した光学系によるガウシアンおよび中空ビームのビームプロファイルを図3に示した. それぞれで蛍光色素含有マイクロスフェア ($\phi 50$ nm) を水平スキャンし、シミュレーションを基にした条件で超解像を得た(図4). 一般のガウシアンビームでは隣接するビーズが結合した状態で画像化されているが、SLAM法を用いることで個々の粒子として認識できる. 強度分布解析より、空間分解能は約100 nmであることが明らかになった.

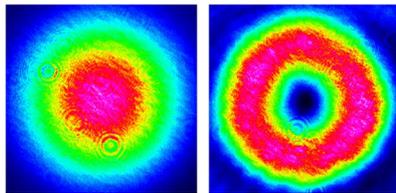


図3 ビームプロファイル
(左: ガウシアン, 右: 中空)

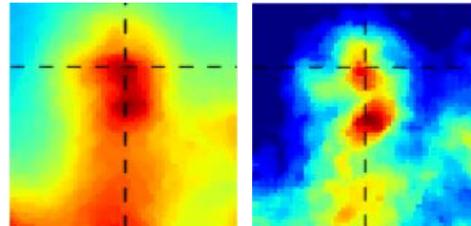


図4 校正用蛍光微小粒子イメージング
(左: ガウシアン, 右: SLAM法)

(3) 生体計測への応用

酸素感受性色素 Pd(II)meso-Tetra(4-carboxyphenyl)porphine をマウス尾静脈より投与し、皮膚微小血管の酸素分圧イメージングを行った. 図5に示すように一般的なガウシアンビームによる画像よりもSLAM法では血管の分岐部が明瞭に画像化されていることが分かる. 血管内の酸素分圧も生理的状态を示しており計測の妥当性が示された. また、血管中心部は比較的高酸素状態を示しており、局所空間における酸素勾配を画像化することに成功した. また、短寿命の燐光色素を用いることで15秒/フレームの高速イメージングが可能となり、急峻な生理現象にも対応できる可能性が示唆された. 本法は生体計測への応用が可能であり、細胞内の酸素分圧イメージングへの応用も期待された.

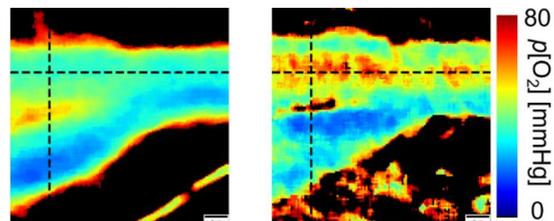


図5 微小血管の酸素分圧イメージング

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Katayama Y., Fujioka Y., Tsukada K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Development of a patch-type flexible oxygen partial pressure sensor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IEEE Journal of Translational Engineering in Health & Medicine	6. 最初と最後の頁 1400607
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1109/JTEHM.2020.3005477	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 Shirai H., Tsukada K.	4. 巻 321
2. 論文標題 Drug delivery in tumors is enhanced by bacterial proteolytic activity in a size, pharmacokinetic, and binding affinity dependent manner -A mechanistic understanding	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 348-362
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jconrel.2020.02.024	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 太郎田 樹, 國吉 一真, 塚田 孝祐
2. 発表標題 Switching laser modes法を用いた高解像度蛍光イメージング
3. 学会等名 第61回日本生体医工学会大会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Roth J., Iwamoto Y., Tsukada K.
2. 発表標題 Single and multi-photon excitation using a supercontinuum laser for oxygen metabolism imaging
3. 学会等名 2019 Annual Meeting of BMES (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shirai H., Tsukada K.
2. 発表標題 Mathematical modeling of simultaneous penetration of liposomal doxorubicin and Clostridium in tumors; Implications for combination therapy
3. 学会等名 2019 Annual Meeting of BMES (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	毛利 聡 (Satoshi Mori) (00294413)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	

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
---------	---------