

機関番号：14401
研究種目：基盤研究（A）
研究期間：2008～2010
課題番号：20240044
研究課題名（和文） 非線形フォトンクスによるリアルタイム生体分子イメージング顕微鏡群の開発と応用
研究課題名（英文） Development and application of real-time molecular microscope based on non-linear optical effect for biological specimen
研究代表者 荒木 勉（ARAKI TSUTOMU） 大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授 研究者番号：50136214

研究成果の概要（和文）：極短パルスレーザーによって誘起される非線形光学現象を利用して、無染色で生体分子を可視化することができる生体分子イメージング顕微鏡を開発し、これらによって実際の細胞や生体組織を観察し生理活性に関する情報の取得することを目的としている。具体的には SHG 顕微鏡と CARS 顕微鏡を対象とし、初年度は装置基盤技術の確立を進め、次年度以降はその改良を通じて実用機器の開発を目指すとともに、ヒト真皮コラーゲンの in situ 測定や生細胞のリアルタイム計測ならびに応用や目指した。

研究成果の概要（英文）：

Aims of this research project are to develop new microscopes utilizing non-linear optical effect induced by an ultra-short pulse laser and to observe molecular imaging of the biological specimen without unwanted staining treatment. We have developed a high-quality SHG microscope and CARS microscope, and following results have been obtained using these microscopes: (1) Age-dependency of collagen distribution in human skin was observed with the SHG microscope. This microscope was also applied to evaluate quality of cartilage cultured in collagen gel. (2) CARS image of Hela cell was demonstrated. Also repair of cell membrane was traced in time based on the CARS images.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	19,900,000	5,970,000	25,870,000
2009年度	10,400,000	3,120,000	13,520,000
2010年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
年度			
年度			
総計	39,100,000	11,730,000	50,830,000

研究分野：生体光計測

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体計測

キーワード：分子イメージング SHG 顕微鏡 CARS 顕微鏡 ラマン分光 コラーゲン  
皮膚 非線形光学効果

#### 1. 研究開始当初の背景

複雑系の中から所定の生体分子を非侵襲・非染色（すなわち、対象物に影響を与えるこ

となく)、生きたまま、リアルタイムで認識し、その形態・高次構造および変化をイメージングする「分子イメージング顕微鏡技術」

が分子医療や再生医学を初めとする次世代の医療のみならず、ポストゲノムの生命現象を研究するうえで必要不可欠な技術として強く求められている。

しかし、この要求を充たす実用機の開発は遅れている。そこで本研究では、光学顕微鏡の優れた物体情報検出能と物質情報検出能に着目し、無染色で生体試料の形態と分子識別が可能な新しい光学顕微鏡を開発し生体計測へ応用する

## 2. 研究の目的

上述の要求を充たす実用機の開発は遅れている。そこで本研究では、光学顕微鏡の優れた物体情報検出能と物質情報検出能に着目し、無染色で生体試料の形態と分子識別が可能な新しい光学顕微鏡を開発し生体計測へ応用する。具体的には(1)極短パルス光に誘起されるフォトニクス現象の多様性を積極的に利用して、独自の分子イメージング顕微鏡を開発する。今回開発・改良する顕微鏡は第2高調波(SHG)顕微鏡とコヒーレンス反ストークスラマン散乱(CARS)顕微鏡が中心となる。(2)また、時間分解蛍光顕微鏡の性能向上に関する研究も行う。(3)さらにこれらの顕微鏡群の実用性を評価するため、細胞組織学診断や制御に応用し、新しい形態学の知見や再生治療への貢献を目指したい。

## 3. 研究の方法

本研究では非線形光学現象を利用する。非線形光学現象とは、ある物質に光を入射した場合、入射光の周波数が2倍、あるいは3倍、・・・と言う具合にn次の高調波に変換される現象である。図1のように、ピアノ鍵盤を強く叩くと歪みによってその鍵盤の1オクターブ上(2倍周波数)の音が発生することがある。光学においても非中心対称物質(界面、コラーゲン、結晶)に極短時間の強パルスが入射すると、入射波長の半分の波長の光が発生する。このアナロジーのように、

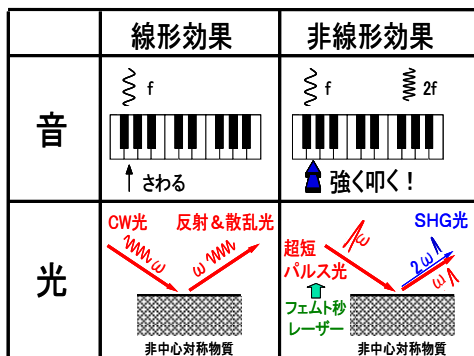


図1 非中心対称物質に超短パルス光を照射すると、非線形相互作用により、SHG光(Second-Harmonic Generation Light)が誘起される

入射波長(あるいは振動数)と異なる波長の出力を得るものが非線形フォトニクスであり、SHG光、CARS分光、2光子蛍光などが相当する。

ただし、その効率は悪く通常の強度の入射光では観測されないが、パルスレーザーのような瞬間的ではあるが極高強度光を入射した場合には観測可能な光量が得られる。パルスレーザーとして一般にはフェムト秒あるいはピコ秒レーザーを用いるが、これらの平均パワーは1ワット程度である。にもかかわらずそのピークパワーは100キロワットにも達する(ただし、パルス周期10ns、パルス幅100fsの場合)。したがって生細胞のような試料においても温度上昇による試料の破壊を引き起こすことなく、顕微鏡下で非線形光学現象が実現できる。

## 4. 研究成果

(1) あたらしくSHG顕微鏡を開発した。光源にはフェムト秒モードロックチタン・サファイアレーザー(Ti:Sレーザー、中心波長800nm、パルス幅100fs、繰り返し周波数80MHz)あるいはフォルステライトレーザー(Cr:Fレーザー、中心波長1250nm)を用いる。SHG信号は光電子増倍管で検出し、フォトンカウンティングを行う。なお、基本は反射光学配置であるが、透過型の光学配置へも随時転換できるようにしている。さらに自動ステージによるサンプル走査あるいはガルバノミラーによるビーム走査を用いて、SHGイメージング計測を行っている。なお、本システムの面内分解能と深さ分解能はそれぞれ1.5 $\mu$ mと14 $\mu$ mである。

はじめにブタ真皮コラーゲンの詳細な構造分布測定を行い、その結果をもとにヒト皮膚測定への応用の可能性について考察した。

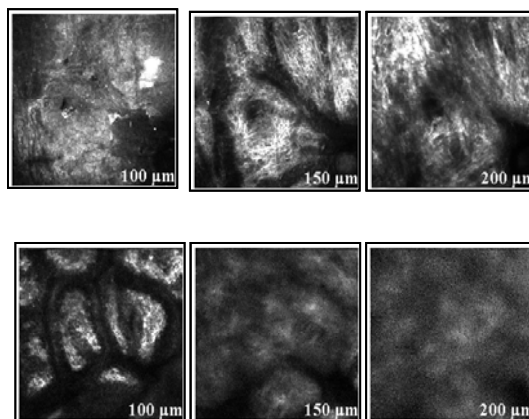


図2 上段Cr:Fレーザー使用、下段Ti:Sレーザーによる豚のSHG像

次にTi:SレーザーとCr:Fレーザーを使用し、両者の測定能を比較した。ここでは豚皮を測定試料として、表面から50 $\mu$ mごとに

深さ 350  $\mu\text{m}$  までの SHG 画像を取得した。レーザーパワーは試料面上でいずれも 40mW である。1 画面あたりの試料の大きさは 300 x 300  $\mu\text{m}$  であり、1 画面あたりの取得時間を 10 秒にした。図 2 にその測定結果を示す。

この図からも明らかのように Ti:S レーザーでは組織の光散乱の影響で 100  $\mu\text{m}$  程度の深さまでしか像が得られなかったのに対して、Cr:F レーザーを使用することで深さ 300  $\mu\text{m}$  まで鮮明な画像が得られており、レーザーの長波長化の有効性が確認できた。さらに高速計測へのアプローチを続けた結果、安全に数秒で 3D 画像取得が可能となった。

この装置でヒト皮膚を計測するためには安全性の確保が必須である。そこで用 Cr:F レーザー光が皮膚へ及ぼすダメージについて検討した。Cr:F レーザー光の生体への影響に関して、120mW の光をタマネギ切片の細胞壁に 10 分間照射しても細胞壁の破壊は認められなかったとする報告、100mW の光をゼブラフィッシュの胚へ 12 時間照射しても正常な幼魚に成長したとする報告、150mW の光をハムスターの口腔部へ 3 時間照射しても細胞の壊死は観測されないとした報告などがある。我々が提唱する装置では Cr:F レーザー照射光エネルギーが 40mW と低く設定され、照射時間も 1 秒程度であるため、測定時における被験者への光照射エネルギーは上記例に比べて格段に小さい。したがって皮膚へのダメージは無視できると思われる。

そこで学内倫理委員会の承認のもとで各年代の被験者を募り、頬の真皮を測定してコラーゲン分布像を得た。その結果、図 3 のように加齢によるコラーゲンの減少が観測された。さらに光老化に関する研究を開始し、ヌードマウスを用いて紫外線照射の有無によるコラーゲン分子配向の変化を観測した。またマウス皮膚火傷のグレードを指標化できた。

これらの詳細は論文⑥、⑧および学会発表③で報告した。

(2) CARS(coherent anti-Stokes Raman scattering)では分子の指紋と呼ばれるほど分子構造に敏感な分子振動情報が得られる

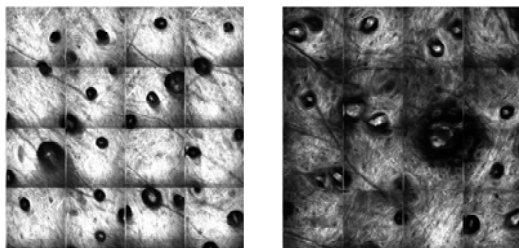


図3 20歳代女性(左)と50歳代男性(右)の頬のSHG像。領域:2.2mm×2.2mm 深さ0.2mm

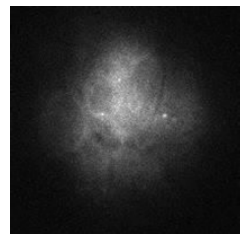


図4 HeLa細胞のCARS画像

ため、分子の同定に威力を発する。CARSを実現するには、正確に同期された2台のパルスレーザーが必要である。そこで我々は2台のピコ秒レーザーを用いて、これらをフェムト秒オーダーで同期し、

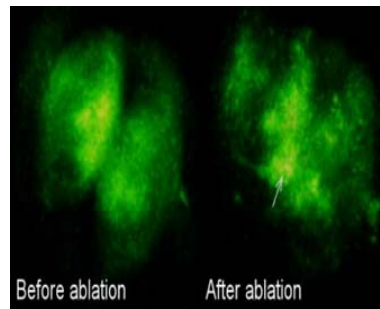


図5 CARS信号による細胞の膜修復情報

さらにその1つに高速波長走査可能な機能を持たせた。さらに高速なイメージングを実現するため光学系にも工夫をし、微小なレンズが多数集まったマイクロレンズアレイを搭載した。その結果、多スポットでのCARS信号が順次取得でき、細胞のリアルタイム観測が可能となった。

性能の評価のため、DOPC/DPPC 混合脂質リボソームの脂質分布計測を行った。次に生きた HeLa 細胞を観察した例を図 4 に示す。観測波数は  $\text{CH}_2$  伸縮運動に相当する 2840  $\text{cm}^{-1}$  に設定した。露光時間を 0.1 秒に設定したので毎秒 10 フレームの画像の取得が可能であり、細胞の動きを捉えることができた。この詳細は論文②に記載されている。

つぎにパルスレーザーで細胞膜を局所破壊し、膜修復の時に現われる脂質の出現を指標として生細胞の細胞膜修復過程のリアルタイム観測を行った。その結果、図 5 に示すように細胞膜破壊された数秒後には破壊箇所(矢印の箇所)で、脂質に対応する CARS 光強度が上昇することが観測され、細胞膜修復の様子が示されるなど、細胞生物学研究における有用なツールとなることが示された。この詳細は論文①に記載されている。

(3) 時間分解蛍光顕微鏡のアルゴリズムとして自己回帰法を利用した新しい手法を提案し、時間分解能を向上させることに成功した。この項については省略するが、別記論文③と④に詳述されているので参照されたい。

(4) 応用に関する研究として、軟骨細胞を

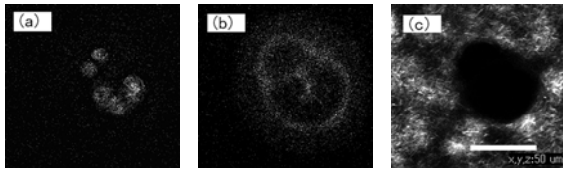


図6 左から、細胞質染色、タイプIIコラーゲン染色、SHG像

タイプIコラーゲンゲル培地に播種し、軟骨細胞の産生能をSHG顕微鏡で評価した。結果の一部を図6に示す。ここでは細胞が高活性であればタイプIIコラーゲンを多く産生し、かつ細胞集団を形成する。タイプIIコラーゲンはタイプIに比べてSHG発生効率が悪いので、細胞集団の周囲は暗部となって観測される。そこで播種2週間後にパラホルムアルデヒドで固定し、細胞質とタイプIIコラーゲンを蛍光染色したのち、20倍の対物レンズ下でSHG光と蛍光を同時観察した。図のように細胞が集団となって存在し、その周りに蛍光染色でもわかるようにタイプIIコラーゲンを産生しているため、SHG像は円形の暗部となって現れる。

このような暗部を指標とすることで軟骨細胞の産生能が評価できることを示した。この詳細は学会発表②、⑤に記載されている。

再生医療に供する細胞がコラーゲンゲル培地で培養されている。培地としてのコラーゲンは単に物理的な細胞支持構造をとるだけでなく、細胞と力学的なインターアクションを持ち、その刺激が細胞の増殖能や分化などにまで影響を及ぼすことが明らかになってきた。したがって高品質な培養細胞を安定に得るには細胞とコラーゲンゲルとの力学的な関係を調べ、その結果をもとに最適な培養環境を整える必要がある。そのため細胞とコラーゲンゲルの選択的な可視化を行い、ゲルを評価することが重要な課題となる。そこで力学的刺激による腱組織のコラーゲン配向変化を定量化するため、偏光制御型SHG顕微鏡を基礎として配向ベクトルを求めるシステムを構築した。また配向計測の高速化についての指針を得た。これについては研究を継続している。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

①T. Minamikawa, H. Niioka, T. Araki, and M. Hashimoto, Real-time imaging of laser-induced membrane disruption of a living cell observed with multifocus coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy, *J. Biomedical Optics*, 査読有,

Vol. 16, 021111(2011).

②橋本守, 南川丈夫, 新岡宏彦, 荒木勉, リアルタイムCARS顕微鏡の開発と生細胞観測への応用, *日本レーザー医学会誌*日本レーザー医学会誌, 査読有, 30 巻, 421-426 (2010).

③T. Iwata, R. Ito, Y. Mizutani and T. Araki, Autoregressive-model-based fluorescence-lifetime measurements by phase-modulation fluorometry using a pulsed-excitation light source and a high-gain photomultiplier tube, *Applied Spectroscopy*, 査読有, Vol.63, 256-1261 (2009).

④T. Iwata, H. Ochi and T. Araki, A proposal of a pseudo-lock-in light-detection scheme by sinusoidal modulation of bias voltages applied to two dynodes in a photomultiplier tube, *Meas. Sci. Technol.*, 査読有, Vol.20, 065901(7pp) (2009).

⑤T. Minamikawa, M. Hashimoto, K. Fujita, S. Kawata, and T. Araki, Multi-focus excitation coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy and its applications for real-time imaging, *Opt. Express*, 査読有, Vol. 17, 9526-9536 (2009).

⑥T. Yasui, Y. Takahashi, M. Ito, S. Fukushima, and T. Araki, "Ex vivo and in vivo second-harmonic-generation imaging of dermal collagen fiber in skin: comparison of imaging characteristics between mode-locked Cr:Forsterite and Ti:Sapphire lasers, *Appl. Opt.*, 査読有, Vol. 48, D88-D95 (2009).

⑦M. Hashimoto, K. Ashida, K. Yoshiki, and T. Araki, Enhancement of second harmonic generation from self-assembled monolayers on gold by excitation with radially polarized beam, *Opt. Lett.*, 査読有, Vol. 34, 1423-1425 (2009).

⑧T. Yasui, Y. Takahashi, S. Fukushima, Y. Ogura, T. Yamashita, T. Kuwahara, T. Hirao, and T. Araki, Observation of dermal collagen fiber in wrinkled skin using polarization-resolved secondharmonic-generation microscopy, *Optics Express*, 査読有, Vol. 17, 912-923 (2009).

[学会発表] (計 46 件)

①T. Araki, In vivo observation of dermal collagen fiber in human skin using a second harmonic generation microscope, WINPTech2010 (招待講演) 2010年12月2日 神戸大学(神戸市)

②S. Fukushima, R. Maehara, M. Kino-oka, T. Araki, Second-harmonic-generation microscopy for quality evaluation of extracellular matrix, 23rd Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (招待講演)2010年9月4日 北海道大学(札幌市)

③T. Yasui, K. Sasaki, R. Tanaka, S. Fukushima, T. Araki, Determination of burn depth based on depth-resolved second-harmonic-generation imaging of dermal collagen, Biomedical Optics (OSA Topical Meeting and Tabletop Exhibit) 2010年4月11日Miami (USA)

④橋本 守, 南川丈夫, 新岡宏彦, 荒木 勉, リアルタイムCARS顕微鏡による細胞の膜修復過程の観測, レーザー学会学術講演会第30回年次大会(招待講演)2010年2月2日千里ライフサイエンスセンター(吹田市)

⑤前原鈴子, 福島修一郎, 紀ノ岡正博, 荒木 勉, 第2高調波発生顕微鏡による培養軟骨の品質評価, 日本機械学会 第20回バイオロンティア講演会, A208, 2009年11月8日和歌山県民文化会館(和歌山市)

⑥M. Hashimoto, High-speed non-staining biomolecular imaging by nonlinear Raman microspectroscopy, 10th Polish-Japanese Seminar on Biomedical Engineering (招待講演)2009年9月15日Warsaw (Poland)

[図書] (計2件)

①荒木 勉(共著) シーメムシー出版、近接場光のセンシング・イメージング技術への応用(2010)204-209.

②橋本 守(共著) 講談社サイエンティフィック、顕微分光法 ナノ・マイクロの世界を見る分光法(2009)55-76.

[その他]

ホームページ等

<http://sml.me.es.osaka-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

荒木 勉 (ARAKI TSUTOMU)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授  
研究者番号：50136214

### (2) 研究分担者

橋本 守 (HASHIMOTO MAMORU)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・准教授  
研究者番号：70237949

福島 修一郎 (FUKUSHIMA SHUICHIROU)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教  
研究者番号：40362644

紀ノ岡 正博 (KINO-OKA MASAHIRO)  
大阪大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：40234314

岩田 哲郎 (IWATA TETSUO)  
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス  
研究部・教授  
研究者番号：50304548

安井 武史 (YASUI TAKESHI)  
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス  
研究部・教授  
研究者番号：70314408

