

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04503

研究課題名（和文）第2近赤外窓領域を用いた生体深部超解像イメージング技術の開発と再生医療への応用

研究課題名（英文）Development of deep-tissue super-resolution imaging using the second near-infrared window and its application to regenerative medicine

研究代表者

新岡 宏彦（Niioaka, Hirohiko）

大阪大学・大学院情報科学研究科・特任准教授（常勤）

研究者番号：70552074

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,000,000円

研究成果の概要（和文）：再生医療技術への応用を目指し、細胞組織深部超解像イメージング技術の開発を行った。細胞組織深部を観察するために、生体透過性の高い第二近赤外窓領域の光（波長950 nmから1600 nm）で観察可能な蛍光プローブの合成を行った。蛍光プローブとして980 nm励起1030 nm蛍光を示すNaYF<sub>4</sub>:Ybナノ粒子の合成に成功した。新たに開発した超解像顕微鏡光学系により、生体模倣材料を用いた実験において深部超解像イメージングに成功した。細胞組織深部イメージングではコントラストの高い画像を取得することが難しくノイズが多い画像になるため、深層学習によるノイズ除去技術の開発も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

第二近赤外窓領域（波長950 nmから1600 nm）の光と希土類蛍光ナノ粒子を用いて、細胞組織深部超解像顕微イメージング技術の研究を行った。細胞組織深部の細胞を生きのまま超解像イメージングする技術が確立されることで、オルガノイドやスフェロイドなどの再生医療を目的とした細胞組織の詳細な観察が可能となる。細胞の状態や治療効果をモニタリングできるようになれば、今後の再生医療用製品の効果や安全性を担保する技術となりえる。

研究成果の概要（英文）：We have developed a deep tissue super-resolution imaging microscopy for application to regenerative medicine technology. We synthesized fluorescent probes that can be observed with light in NIR-II window region (wavelengths from 950 nm to 1600 nm), which is highly transparent to cellular tissues, and constructed a laser scanning microscopy to observe them. NaYF<sub>4</sub>:Yb nanoparticles exhibiting 980 nm excitation 1030 nm fluorescence were successfully synthesized as fluorescent probes. Using the newly developed super-resolution microscope optics, we succeeded in deep super-resolution imaging through biomimetic materials. Since it is difficult to obtain high-contrast images in deep imaging of cellular tissue, which results in noisy images, we also developed an deep learning-based noise reduction model.

研究分野：バイオイメージング

キーワード：超解像顕微鏡 生体深部イメージング 近赤外第二領域 蛍光プローブ 再生医療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

再生医療技術は患者の治療や QOL 改善の観点から大変注目されている。再生医療の実現において、体外から生体内へ移植した細胞あるいは組織(臓器)の安全性や機能評価が課題となり、生体内を直接モニタリングする技術が必要である。

これまでに、X線 CT や MRI、PET、OCT、二光子蛍光顕微鏡(TPFM)、超解像顕微鏡(SRM)など様々なイメージング手法が開発されてきたが、細胞組織深部において超解像イメージングを実現するものは無かった(図1)。そのため、オルガノイドやスフェロイドなどの再生医療を目的とした培養細胞組織やそれらをマウス体内深部へ移植した状態において、細胞組織深部を高い空間分解能で観察/解析はできなかった。

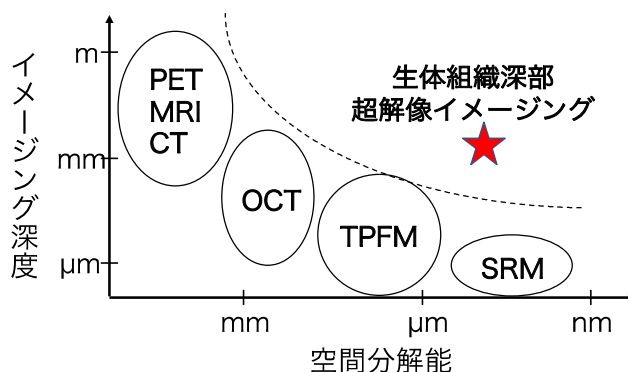


図1 様々なイメージング技術についてその空間分解能とイメージング深度

TPFM は 2 光子蛍光顕微鏡、SRM は超解像蛍光顕微鏡を表す。赤い星の印で示した生体組織深部超解像イメージング技術の開発を行う。

### 2. 研究の目的

100 μm 以上の細胞組織深部において超解像光学顕微鏡イメージングが可能な技術を開発することである。

### 3. 研究の方法

2014 年にノーベル賞を受賞した超解像顕微鏡技術(STED, PALM [1 - 3])は平面培養された細胞など生体試料の表層でしか観察ができなかった。理由は、細胞内の屈折率分布により光の位相が歪められてしまうことや 1 分子の微弱な発光を用いていたためである。また、基本的に可視光を用いた手法なので、光散乱の影響により深部まで光が届かず、深部イメージングには向いていない。可視光に比べて近赤外光は水や生体分子による光吸収が起こりにくく、波長が長いために光散乱の影響も小さく、生体深部まで届きやすい。生体イメージングにおいて、近赤外光を使用する場合は、波長 700 nm から 1000 nm の光を指すが、さらに波長が長くより生体深部に届く光として近赤外第 2 生体窓領域の光(波長 1000 - 1350 nm)がある(図 2)。本研究では、この近赤外第 2 生体窓領域の光と新規光学系を用いて、細胞組織深部超解像顕微鏡を実現する。

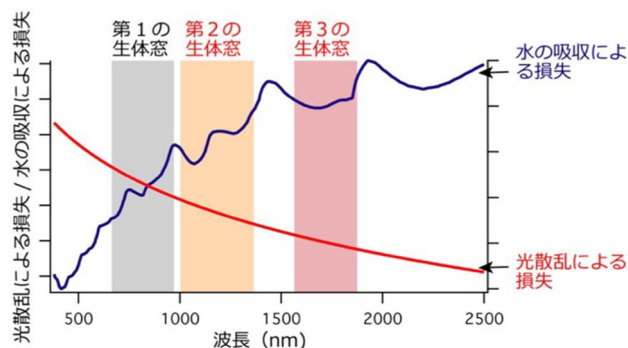


図2 水の吸収スペクトルと光散乱による損失と波長の関係

光を用いて生体深部観察する際は、水の吸収による影響が少ない波長域を選択する。上図に示すように、それぞれ第 1 の生体窓領域、第 2 の生体窓領域、第 3 の生体窓領域と呼ばれる。

### 4. 研究成果

### (1) 細胞組織深部超解像顕微鏡の開発

光学系の詳細については特許準備中のため省略する。生体模倣材料(1% intralipid)を用い、深部 500  $\mu\text{m}$  において蛍光ナノ粒子の超解像イメージングを行なった。用いた蛍光プローブは  $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Yb}$  のナノ粒子である。波長 915 nm で励起すると、980 nm と 1030 nm 付近の蛍光発光を示す。本蛍光プローブを用いて、単一粒子のイメージングに成功した。新規光学系を用いることで、従来手法と比べて空間分解能がおよそ 1.5 倍向上した。

### (2) 希土類ナノ粒子蛍光プローブの高輝度化

蛍光プローブの高輝度化を目指し、 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}$  の合成を行った。高輝度なプローブを用いることでこれまでよりもより深部の観察が可能となる。 $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Yb}$  と比べて  $\text{NaYF}_4:\text{Yb}$  を使用することで母材に依存した多フォノン緩和が起こりにくくなり、励起エネルギーのロスを低減することができる。したがって高輝度なプローブを作成できる。図 3 は合成した  $\text{NaYF}_4:\text{Yb}$  の TEM 像である。また、蛍光発光の明るさは Yb イオンの濃度にも依存する。Yb イオンが発光中心であるため、Yb イオンの濃度を上昇させれば蛍光発光が明るくなると考えられる。しかし、濃度が上昇しすぎると濃度消光によりエネルギーロスが起こる。 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}$  の発光が強くなる Yb イオン濃度を探索するため、Yb イオンの濃度を変化させながらその明るさを測定した。結果として Yb イオンの濃度が 2% の時に蛍光発光が強くなることが明らかとなった。

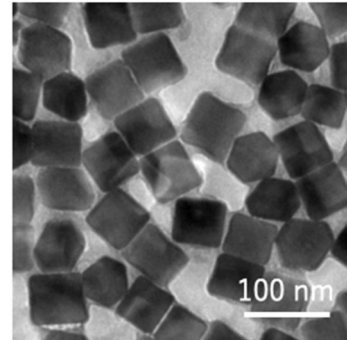


図 3  $\text{NaYF}_4:\text{Yb}$  の TEM 像

### (3) 深層学習 AI を用いたイメージングの高速化

深部イメージングでは光散乱や光吸収の影響により、励起レーザー光が深部まで届きにくく、さらに、蛍光も深部から検出器まで到達するまでに減衰する。したがって、得られる画像は信号強度が低くノイズの多い画像になってしまう。通常、ノイズの除去を行う際は長時間露光あるいは複数回観察して平均値を取得するが、時間がかかってしまい生きている試料のイメージングには適さない。深層学習を用いてノイズを除去できれば短時間のイメージングで低ノイズを得ることが可能になる。図 4 は赤外第 2 生体窓領域の蛍光を発するナノ粒子プローブを用い、生体模倣材料を通して深部 1 mm にて観察した結果である。深層学習を用いたノイズ除去技術により、およそ 7~10 倍程度のイメージング時間の短縮に成功した。

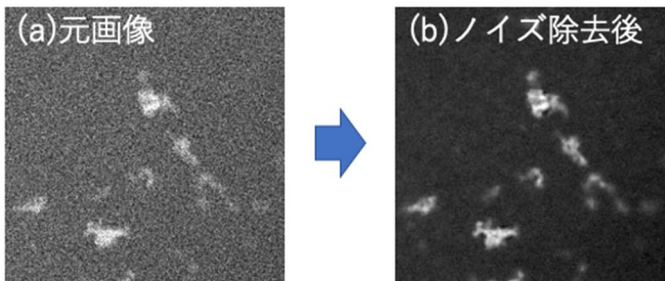


図 4 人工知能(深層学習)モデルを用いてノイズ除去を行った。(a)ノイズ除去前 (b)ノイズ除去後。

### <引用文献>

- [1] S. Hell & J. Wichmann, *Optic Letters*, 19, 780 (1994).
- [2] G. Vicidomini et al., *Nature Methods*, 15, 173 (2018).
- [3] E. Betzig et al., *Science*, 313, 1642 (2006).

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 新岡 宏彦	4. 巻 37
2. 論文標題 STED顕微鏡による細胞組織深部超解像イメージングについて	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 39-43
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山中真仁、河内彰宏、秋野善紀、古川太一、新岡宏彦、西澤典彦
2. 発表標題 希土類添加ナノ粒子と生体窓を用いた深部・高空間分解能蛍光イメージング
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第41回年次大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河内 彰宏, 秋野 善紀, 山中 真仁, 古川 太一, 新岡 宏彦, 西澤 典彦
2. 発表標題 希土類イッテルビウム添加ナノ粒子の第2の生体窓(NIR- )発光を用いた近赤外共焦点蛍光イメージング
3. 学会等名 optics & Photonics Japan 2020
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 超解像顕微鏡およびその制御法	発明者 新岡宏彦、山中真仁、古川太一	権利者 大阪大学、東海国立大学機構、横浜国立大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-009162	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	長原 一  (Nagahara Hajime)  (80362648)	大阪大学・データプライバシー機構・教授    (14401)	
研究分担者	山中 真仁  (Yamanaka Masahito)  (90648221)	大阪大学・工学研究科・特任准教授(常勤)    (14401)	
研究分担者	古川 太一  (Furukawa Taichi)  (70749043)	横浜国立大学・大学院工学研究院・助教    (12701)	

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